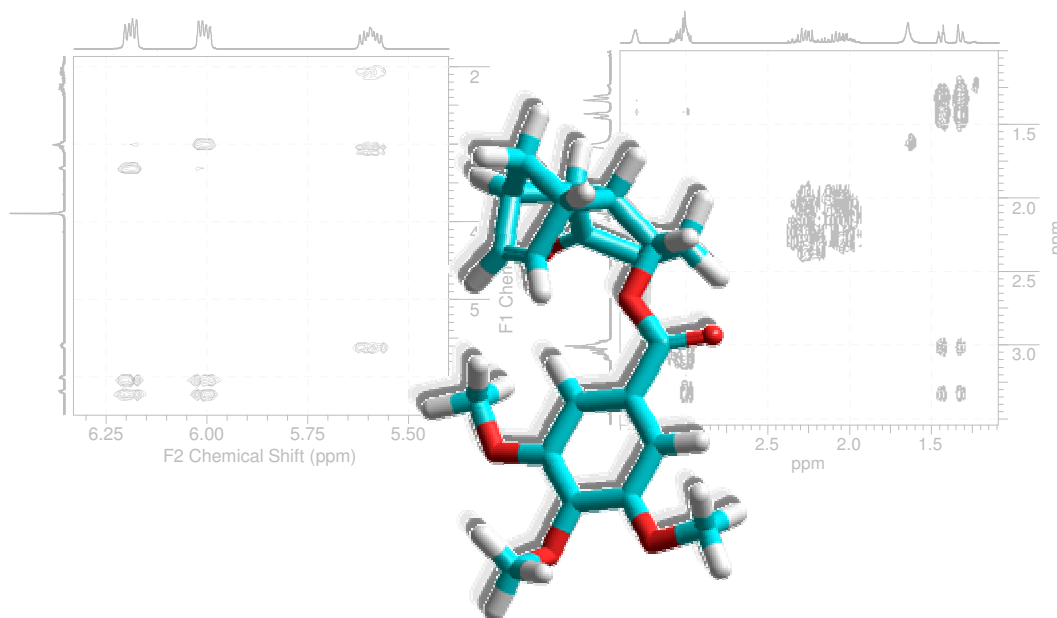




UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Felicia Megumi Ito

Síntese, Biotransformação e Avaliação Biológica de
Substâncias Policíclicas *Cage-Like* Derivadas do Aduto de
Diels-Alder Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona



Campo Grande, MS
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Felicia Megumi Ito

Síntese, Biotransformação e Avaliação Biológica de
Substâncias Policíclicas *Cage-Like* Derivadas do Aduto de
Diels-Alder Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Dissertação apresentada como um
dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Química, área de concentração
em Química Orgânica, junto ao programa
de Pós-Graduação em Química do Centro
de Ciências Exatas e Tecnologia da
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz
Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Maria Rita Marques

Campo Grande, MS
2007

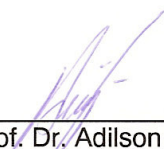


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

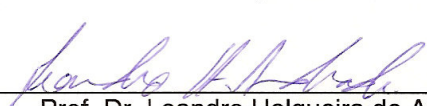
**TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE
FELÍCIA MEGUMI ITO
“SÍNTESE, BIOTRANSFORMAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
SUBSTÂNCIAS POLICÍCLICAS *CAGE-LIKE* DERIVADAS DO ADUTO DE
DIELS-ALDER TRICÍCLO [6.2.1.0^{2,7}] UNDECA-4,9-DIEN-3,6-DIONA”**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (Resolução nº 011/2007) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Orgânica.

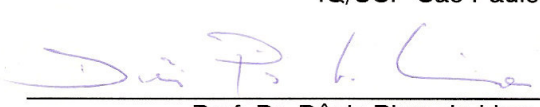
Aprovada Por:



Prof. Dr. Adilson Beatriz
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora
DQI/UFMS



Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
IQ/USP-São Paulo



Prof. Dr. Dênis Pires de Lima
DQI/UFMS

Campo Grande, 11 de maio de 2007.

Dedico este trabalho a pessoas especiais

Hitoshi Ito
Mieko Nagata Ito
Marcelino Hirofumi Ito



Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Adilson Beatriz pela orientação, confiança, principalmente paciência, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e por mostrar que ciência é feito com dedicação, muito trabalho e que também é uma arte.

À Profa. Dra. Maria Rita Marques pela co-orientação, pela amizade, pelo incentivo à pesquisa e me confortando nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Dênis Pires de Lima pelos valiosos ensinamentos, pela colaboração, pela amizade e por abrir as portas de seu laboratório para eu estagiar e por aceitar o convite de fazer parte da banca deste trabalho.

À Profa. Dra. Neusa Maria Mazzaro Somera pelos ensinamentos, sempre otimista e um exemplo de dedicação e organização.

À Profa. Dra. Neli Kika Honda pelos ensinamentos, sempre disposta para emprestar o seu laboratório, equipamentos e materiais.

Aos Professores do Departamento de Química por ter contribuído para a minha formação.

Aos integrantes do Laboratório de RMN do DQI/UFMS, em especial a Ms. Edilene Delfino e Dra. Lucinéia Vizzoto pela eficiência na obtenção dos espectros de RMN. Ao químico Luiz Leonardo pelos espectros de IV obtidos e pela leitura dos desvios ópticos.

Ao Prof. Dr. Mauricio Gomes Constantino (USP-RP) por disponibilizar o aparelho de cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade (USP-SP) pelos experimentos no cromatógrafo gasoso e líquido com adsorvente quirais e por aceitar o convite de fazer parte da banca deste trabalho.

Aos Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa, Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, Hemerson Iuri Ferreira Magalhães (UFC) pelas atividades citotóxicas e hemolíticas.

Ao Prof. Dr. Antônio Pacrácio de Souza (DMF-UFMS) pelos testes de atividade inseticida.

Ao Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena (IQ-UNICAMP) pela obtenção dos espectros de massas.

Às alunas de iniciação científica Jacqueline Marques Petroni, Ana Elisa Maciel Mena e Vânia Gomes Mariano por auxiliarem-me na parte experimental.

Ao Euzébio Guimarães Barbosa pela realização de cálculo de RMN teórico, pela amizade, sinceridade e companheirismo e “haja paciência, heim!”.

Ao Edson dos Anjos dos Santos pela amizade, paciência e por estar sempre auxiliando e ajudando tanto no início do estágio no LP4 como na conclusão deste trabalho.

Ao Gustavo H. Trossini e Rodrigo Rotta pela obtenção de algumas referências, pela amizade e companheirismo.

Ao Dr. Kleber Thiago de Oliveira por ter me hospedado em sua casa durante a estada em Ribeirão Preto.

À família LP4. Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery por algumas sugestões. Aos colegas de bancada Charles E. M. Zamberlam, Gíllian M. Angreves, Vanessa M. Kayahara, Ricardo V. de Lima, Yara J. Kerber, Luiz Augusto S. Bega, Fábio A. de S. Ferreira, Lucas P. da Mota, Adriana G. de F. Andrade, Déborah Z. Jeffery, Rosângela, Andressa, Tatiane, acho que não esqueci de ninguém...

Às meninas do LP2, Aline S. Gianini, Ana Camila Micheletti e Luciana M. Ravaglia, pela amizade e momentos de descontração e que também faz parte do

nosso LP4.

À Nídia Cristiane Yoshida e Cristiane Yuriko Kawasoko por terem dividido todos os momentos, seja nos laboratórios e salas de aula como em nossa “Casa de Estudante JAMIC”.

A todos os colegas do mestrado (Deize, Vande, Carlão, Ana Carolina...).

Aos secretários do mestrado em Química: Maria Otávia P. Vasco Toledo e Celestino Gonçalves de Oliveira.

Ao Hiro e Adriana, Tootian e Kaatian pela amizade, pelo apoio psicológico e financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.

À FUNDECT pela bolsa concedida e apoio financeiro.

À Kardol pelos reagentes e solventes.

À PROPP-UFMS pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. COMPOSTOS ORGÂNICOS POLICÍCLICOS <i>CAGE-LIKE</i> E REAÇÃO DE DIELS-ALDER.....	1
1.2. BIOTRANSFORMAÇÃO NA SÍNTESE ORGÂNICA: UMA VISÃO GERAL.....	7
1.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	13
1.3.1. Atividade Citotóxica e Hemolítica.....	13
1.3.2. Atividade Inseticida.....	15
2. A IDÉIA CENTRAL.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. SÍNTESE.....	21
4.2. BIOTRANSFORMAÇÕES.....	26
4.2.1. Determinação da Concentração Ótima de Esporos de <i>M.</i> <i>ramosissimus</i> para Biotransformação.....	32
4.2.2. Determinação do pH Ótimo de Crescimento de <i>M. ramosissimus</i> para Biotransformação.....	35
4.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	39
4.3.1. Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	39
4.3.2. Avaliação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss.....	42
4.3.3. Atividade Inseticida.....	43
4.4. DISCUSSÃO DOS ESPECTROS.....	46
<i>endo</i> -tríciclo[6.2.1.0 ^{2,7}] undeca-4,9-dieno-3,6-diona (7).....	47

<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno-3,6-diona (28).....	51
<i>rel</i> -(1S,2S,6S,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona (12).....	55
<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] dodecan-1-ona (29).....	60
<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol (30).....	68
<i>rel</i> -(7S,8S,9S,11S,12S,1R,5R)-6-oxapentaciclo[6.4.0.0 ^{1,9} .0 ^{5,12} .0 ^{7,11}]dodecan-2-ona (32).....	78
(1S,3S,7S,2R,8R)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno (34).....	87
<i>rel</i> -(8S,12S,1R,2R,4R,6R)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona (15).....	99
Composto 35	109
Triciclo[2.1.0 ^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol (36).....	112
<i>rel</i> -(1S,2S,6R,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona (37).....	115
<i>rel</i> -(2S,7S,8S,1R,3R,5R)-tetraciclo[6.2.1.0 ^{2,7} .0 ^{3,5}]undec-9-en-6-ona(16).....	118
acetato de β-6-oxotriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-il (38).....	120
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
6. PARTE EXPERIMENTAL	126
6.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	126
6.2. SÍNTESE.....	128
<i>p</i> -benzoquinona (6).....	128
<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}] undeca-4,9-dien-3,6-diona (7).....	128
<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno-3,6-diona (28).....	129
<i>rel</i> -(1S,2S,6S,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona (12).....	130
<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] dodecan-11-ona (29).....	131
<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol (30).....	132
6,9-epoxitetraciclo[6.2.1.0 ^{2,7} .0 ^{2,10}]undecan-3-ona (32).....	133
3,4,5-trimetóxi-benzoato de metila (39).....	133
Ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (40).....	134
(1S,3S,7S,2R,8R)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno-(34) e <i>rel</i> -(8S,12S,1R,2R,4R,6R)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona(15).....	135

Composto 35	136
<i>rel</i> -(2S,7S,8S,1R,3R,5R)-tetraciclo[6.2.1.0 ^{2,7} .0 ^{3,5}]undec-9-en-6-ona(16).....	137
(-)- β -6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona (37), <i>rel</i> -(8S,12S,1R,2R,4R,6R)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona (15) e acetato de (3R)-6-oxotriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-il (38).....	138
6.3. BIOTRANSFORMAÇÕES.....	140
6.3.1. Condições Microbiológicas.....	140
6.3.2. Ensaio Padrão.....	140
6.3.3. Determinação da Concentração Ótima de Esporos de <i>M. ramosissimus</i> para Biotransformação.....	143
6.3.4. Ensaio com Diferentes Concentrações de Esporos do Fungo <i>M. ramosissimus</i>	145
6.3.5. Determinação do pH ótimo de Crescimento de <i>M. ramosissimus</i> em Meio Líquido para Biotransformação.....	146
6.4. ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	147
6.4.1. Atividade Citotóxica.....	147
6.4.1.1. Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	147
6.4.1.2. Atividade Hemolítica sobre Eritrócitos de Camundongo (<i>Mus musculus</i> Swiss).....	149
6.4.2. Atividade Inseticida.....	151
6.5. CÁLCULO DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE ¹³ C.....	153
7. REFERÊNCIAS	154

ABREVIATURAS

B3LYP: Terceira Revisão do método de Beeck incluindo os parâmetros de correlação de Lee, Yang e Parr

BDA: batata dextrose ágar

CCD: cromatografia em camada delgada

cc-pVDZ: correlation – consistent polarized Valence Double Zeta

δ : deslocamento químico em partes por milhão

d: dubleto

dd: duplo dubleto

dt: duplo tripleto

DEPT: “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer” ou intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização

EM: espectrometria de massas

gCOSY: “gradiente Correlation Spectroscopy” ou espectroscopia de correlação em gradiente

gHMBC: “gradiente Heteronuclear Multiple-Bond Coherence” ou correlação heteronuclear de ligação múltipla em gradiente

gHSQC: “gradiente Heteronuclear Single Quantum Coherence” ou correlação heteronuclear quântica simples em gradiente.

NOE: “Nuclear Overhauser Effect” ou efeito nuclear de Overhauser

HCT-8: célula de carcinoma ileocecal humano

HL-60: célula leucêmica promielocítica humana

IV: infravermelho

m: multiplete

MDA-MB 435: célula de câncer de mama humano

NBS: *N*-bromosuccinimida

-OMe: metoxila

-OAc: acetato

Py: piridina

Rac: racêmico ou racemato

RMN ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C : ressonância magnética nuclear de carbono

SF-295: célula tumoral de Sistema Nervoso Central (glioblastoma)

s. l.: sinal largo

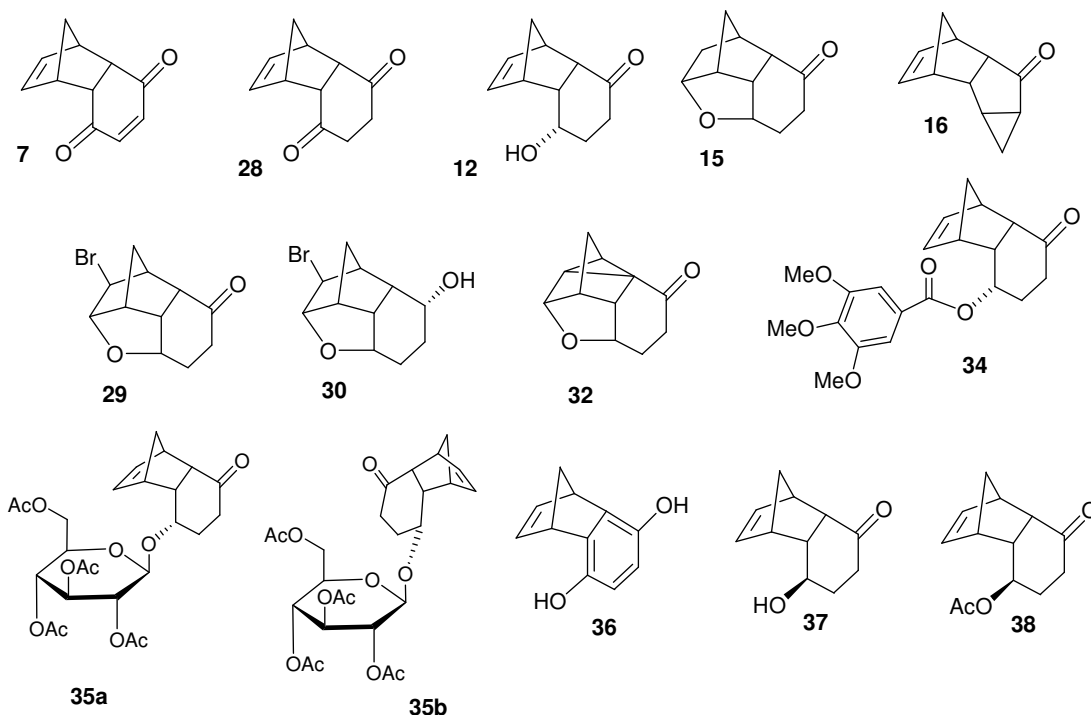
TBABr: brometo de tetrabutilamônio

TMS: trimetilsilano

UV: Ultravioleta

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a síntese de moléculas policíclicas do tipo gaiola (do inglês *cage-like*) por reações orgânicas clássicas e por biotransformação, visando obter substâncias potencialmente bioativas a partir do aduto de Diels-Alder triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona. Foram preparados os compostos **7**, **12**, **15**, **16**, **28**, **29**, **30**, **32**, **34**, **35a**, **35b**, **36**, **37**, **38** e **39**, os quais foram submetidos à avaliação de atividades: citotóxica, hemolítica e inseticida. Os compostos **15**, **32**, **34**, **35** e **35b** são inéditos na literatura.



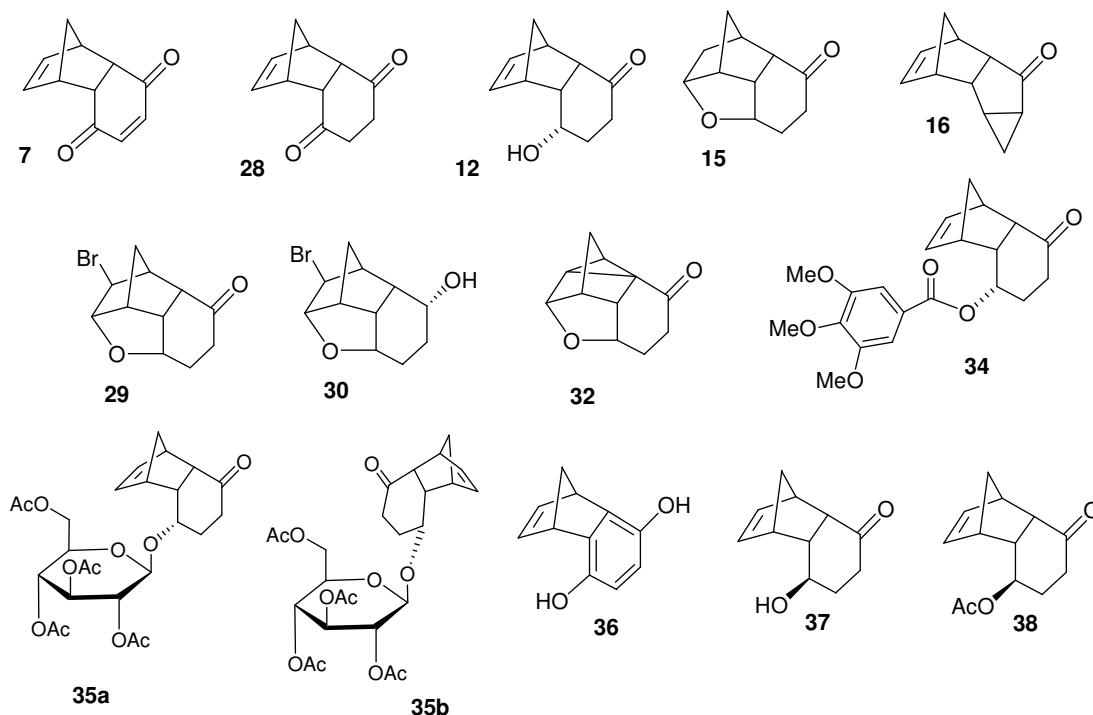
Foram testados os compostos **7**, **12**, **15**, **16**, **28**, **29**, **30**, **32**, **34** e **39** quanto à atividade citotóxica. Destes, o composto **34** mostrou ação citotóxica significativa para as linhagens HCT-8 (carcinoma ileocecal - cólon), SF-295 (glioblastoma - tumor de SNC) e MDA-MB 435 (câncer de mama), com valores de IC₅₀ de 6,68 (17,9), 7,58 (20,4) e 13,51 (36,3) µg/ mL (µM), respectivamente. O composto **7**

apresentou citotoxicidade moderada embora inespecífica, para as linhagens HL-60 (leucemia), HCT-8 e MDA-MB 435, com valores de IC₅₀ de 11,34 (65,2), 13,62 (78,2) e 13,52 (77,7) µg/ mL (µM), respectivamente. A substância **28** demonstrou citotoxicidade apenas sobre a linhagem MDA-MB 435 com IC₅₀ correspondente a 10,4 (59,5) µg/mL (µM). Os compostos **7**, **28**, **30**, **34** e **39** não apresentaram atividade hemolítica sobre hemácias de *Mus musculus* Swiss. Os outros compostos não foram testados. Foram realizados teste de atividade inseticida sobre indivíduos adultos não sexados de *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho). Foram testados os compostos **7**, **12**, **28**, **29**, **30** e **34** e todos causaram mortalidade significativa, sendo estes resultados bastante promissores, estimulando o desenvolvimento de compostos inseticidas mais potentes e menos tóxicos. Os compostos **7**, **12** e **28** foram submetidos à biotransformação com fragmentos de cultura ou solução de esporos de *M. ramosissimus*. Obtiveram-se os compostos **28** e **36** a partir da biotransformação do composto **7**. O composto **28** foi obtido pela biotransformação do composto **12**. Uma mistura diastereoisomérica dos álcoois **12** e **37** foi produzida a partir da substância **28**. O composto **28** foi submetido a ensaios com variação na concentração de esporos (10⁶, 10⁴ e 10² esporos/ mL) e pH (4 a 9). Nestes ensaios obtivemos também misturas de diastereoisômeros, **12** e **37**, em diversas proporções e também o composto **15**.

PALAVRAS-CHAVE: triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona, Diels-Alder, biotransformação, inseticida, atividade citotóxica, hemólise, química orgânica medicinal

ABSTRACT

In this work it was performed the synthesis of polycyclic cage-like molecules by classical organic reactions and by biotransformation process in order to obtain potentially bioactive compounds from the Diels-Alder adduct tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione. We obtained the compounds **7**, **12**, **15**, **16**, **28**, **29**, **30**, **32**, **34**, **35a**, **35b**, **36**, **37**, **38** e **39**. The compounds **15**, **32**, **34**, **35** and **35b** are being reported for the first time.



Among the tested compounds **7**, **12**, **15**, **16**, **28**, **29**, **30**, **32**, **34**, **39** for cytotoxic activity, compound **34** showed cytotoxic towards HCT-8, SF-295 and MDA-MB 435 cell lines, with IC₅₀ values of 6.68 (17.9), 7.58 (20.4) and 13.51 (36.3) µg/ mL (µM), respectively. Compound **28** showed moderate albeit unspecific cytotoxic towards HL-60, HCT-8 and MDA-MB 435 cell lines, with IC₅₀ values of 11,34 (65.2), 13,62 (78.2) and 13,52 (77.7) µg/ mL (µM), respectively. The results revealed the

absence of hemolytic activity for compound **7**, **28**, **30**, **34** e **39** in mouse erythrocytes. The others compounds were not tested.

Compounds **7**, **12**, **28**, **29**, **30** and **34** were tested for insecticidal activity and the results were quite promising as they caused significant mortality on insects of the species *S. zeamais*. Compounds **7**, **12** and **28** were submitted to a biotransformation assays employing the saprobe fungus *Mucor ramosissimus*. As a result it was formed compounds **28** and **36** from **7**. Compound **28** was obtained from biotransformation of **12**. A mixture of isomers **12** and **37** was produced from compound **28**. This compound was submitted to assays at different concentrations of spores (10^6 , 10^4 e 10^2 spores/ mL) and pH (4-9), leading to diastereomeric mixture of **12** and **37** with varied proportions.

KEY-WORDS: tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione, Diels-Alder, biotransformation, insecticide, cytotoxic activity, hemolysis, medicinal organic chemistry

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A química orgânica sempre influenciou nos hábitos culturais das diversas sociedades, desde a antiguidade. Muitas reações orgânicas foram realizadas por nossos ancestrais na preparação de alimentos, bebidas, corantes e muito antes de tais preparações serem reconhecidos como uma área da ciência. Atualmente encontramos em nosso cotidiano, muitos produtos disponíveis comercialmente que são o resultado de esforços incansáveis de pesquisadores em química orgânica e áreas afins, abrangendo desde detergentes, combustíveis, tintas, medicamentos, alimentos, bebidas, defensivos agrícolas, entre outros.

A síntese orgânica merece um destaque na preparação de inúmeros compostos. A descoberta e avaliação das propriedades de novas substâncias bioativas, têm impulsionado a pesquisa em síntese orgânica no sentido de desenvolver e descobrir novos compostos, tais como fármacos e/ou agroquímicos mais eficazes e eficientes.

1.1 COMPOSTOS ORGÂNICOS POLICÍCLICOS *CAGE-LIKE* E REAÇÃO DE DIELS-ALDER

Durante muitos anos, os compostos policíclicos *cage-like* saturados tem despertado o interesse de muitos químicos orgânicos (^aMARCHAND, **1989**; GRIFFIN & ^bMARCHAND, **1989**). Os compostos *cage-like* ou do tipo gaiola contêm um ângulo de ligação incomum entre as ligações C-C-C tetraédricas que se encontram num valor significativamente diferente de 109,5 °. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de explicar como esses compostos, com geometria incomum, afetam na reatividade

química e seu comportamento (^aMARCHAND, 1989). Na Figura 1 estão listados os melhores exemplos de moléculas *cage-like*.

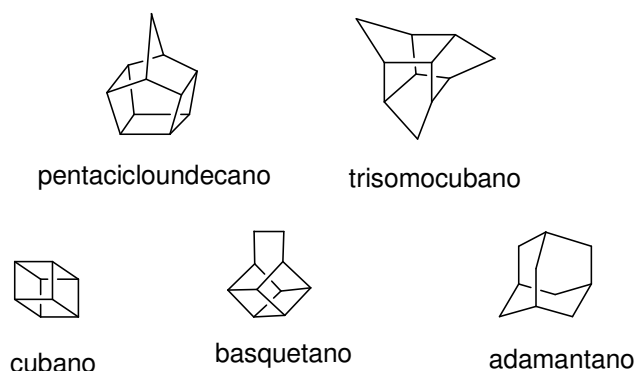


Figura 1: Exemplos de compostos policíclicos *cage-like*.

O interesse na farmacologia dos compostos policíclicos engaiolados foi estimulado pela descoberta inicial da atividade antiviral da amantadina (**1**) e posteriormente com a rimantadina (**2**), com efeitos colaterais reduzidos. Estudos adicionais relacionados a compostos policíclicos engaiolados levaram a descoberta de outros compostos com propriedades similares, como os pentacycloundecanos **3** e **4** (GOVENDER *et al.*, 2005; GELDENHUYS *et al.*, 2005, KITAGAWA *et al.*, 1997) (Figura 2).

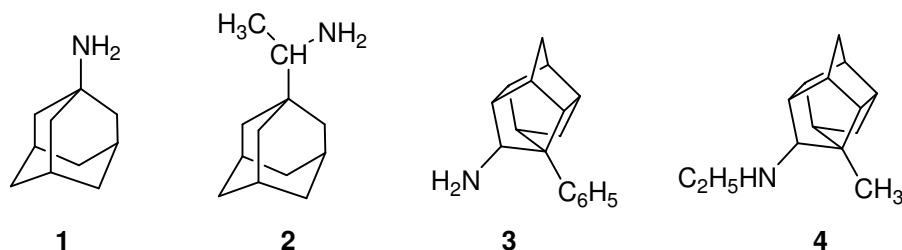
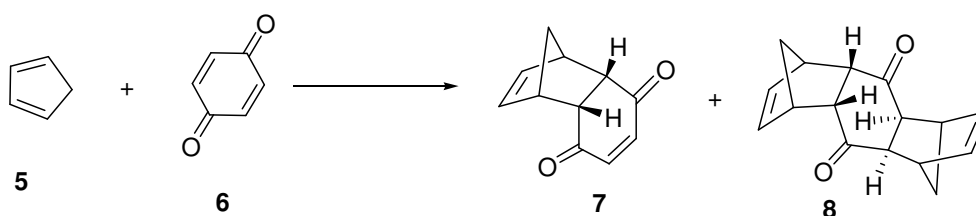


Figura 2. Exemplos de compostos policíclicos *cage-like* bioativos.

Oliver *et al.* (1991) avaliou a atividade antiviral dos compostos **3** e **4** sobre herpes simplex I e II, influenza A2/Taiwan e vírus Rhino 1A. Ambos os compostos testados apresentaram uma atividade *in vitro* sobre herpes simplex II e influenza A2/Taiwan, comparáveis com o aciclovir e amantadina. Foi verificado também atividade anti-parkinsoniana da amantadina através da observação de um paciente com doença de Parkinson, infectado com o vírus da influenza (GELDENHUYS *et al.*, 2005).

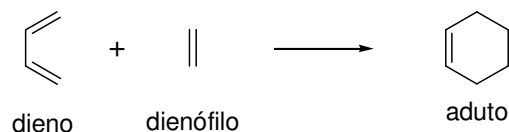
A reação de Diels-Alder, desde a descoberta por Diels & Alder em 1928, se destaca como uma das mais versáteis estratégias empregadas na síntese orgânica (OLIVEIRA, 2006). A descoberta teve início na reação de cicloadição envolvendo o ciclopentadieno (**5**) e *p*-benzoquinona (**6**), formando principalmente o aduto *endo*-tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-diona (**7**) como mostrado no esquema 1. (DIELS & ALDER, 1928)

Esquema 1



Consiste de uma reação entre um dieno conjugado e um dienófilo para formar um aduto com anel de seis membros, na literatura mais antiga era conhecido como síntese de dienos. O esquema 2 apresenta um exemplo geral da reação de Diels-Alder, em que duas moléculas insaturadas combinam para formar um composto cíclico onde elétrons π são usados para formar duas novas ligações σ .

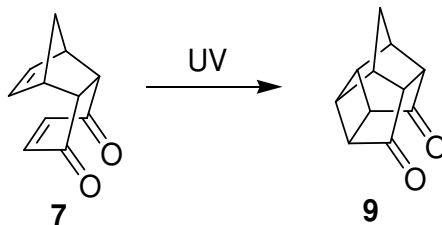
Esquema 2



Esta é uma reação de cicloadição [4+2], envolvendo um sistema de quatro elétrons π e um outro sistema de dois elétrons π . Em geral a reação ocorre facilmente, simplesmente pela mistura dos componentes à temperatura ambiente ou por um leve aquecimento em um solvente apropriado, apesar de que em casos de dienos e dienófilos pouco reativos, condições mais rigorosas (altas temperaturas e/ou altas pressões, catalisadores etc.) podem ser necessárias. A reação de Diels-Alder é reversível e muitos adutos se dissociam nos seus componentes mesmo a baixa temperatura (CARRUTHERS, 1986).

O aduto **7** possui uma característica estrutural peculiar que é a sua alta simetria. Contudo, transformações químicas seletivas em um ou nos dois grupos carbonílicos podem ser executadas sem muitos problemas por reagentes “clássicos” ou “não-clássicos”, incluindo biotransformações com células íntegras de microrganismos e/ ou enzimas (MARCHAND *et al*, 1995). Uma outra característica a ser considerada é o seu esqueleto semi-engaiolado (*cage-like*), que força os grupos funcionais a ficarem próximos espacialmente, como pode ser mais bem observado no esquema **3** na transformação de **7** em **9**, exemplificado pela síntese da dicetona de Cookson (COOKSON *et al*. 1958).

Esquema 3



Apesar do composto **7** ter sido intensivamente estudado, o seu potencial na área da química medicinal ainda não é bem explorado. Por outro lado, existe um grande interesse no estudo da avaliação biológica destas moléculas policíclicas rígidas devido à sua peculiaridade estrutural. Estes esqueletos moleculares são úteis na interação específica com receptores biológicos e/ou na inibição competitiva ou não-competitiva com espécies químicas menores em seu interior (RANGANATHAN *et al.*, 1999). Além disso, a incorporação destas estruturas carbogênicas rígidas em compostos biologicamente ativos geralmente aumentam sua atividade fisiológica. Estruturas policíclicas rígidas aumentam a lipofilicidade através das membranas celulares, bem como aumentam sua afinidade pelas regiões lipofílicas nos receptores. Estas estruturas também proporcionam estabilidade metabólica, podendo prolongar o efeito farmacológico o que permitiria, por exemplo, a redução da dose (BROOKES *et al.*, 1992; GOVENDER *et al.*, 2005).

Em trabalhos anteriores, foram relatadas preparações das substâncias **10** (CONSTANTINO *et al.*, 2000; BEATRIZ, 2001) e **11** (CONSTANTINO *et al.*, 2003), que possuem muitos dos aspectos estruturais do esqueleto básico de produtos naturais denominados furanoeliangolídeos (MINNAARD, 1999). Os compostos **10** e **11** foram preparados a partir de reações de cicloadição [4 + 2] e [6 + 4], respectivamente, seguido de clivagem de uma ligação interna de uma estrutura policíclica (Figura 3).

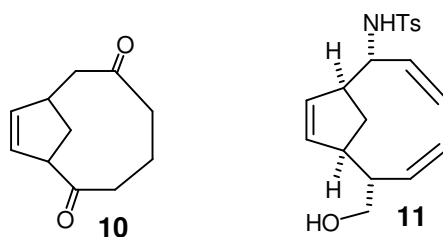
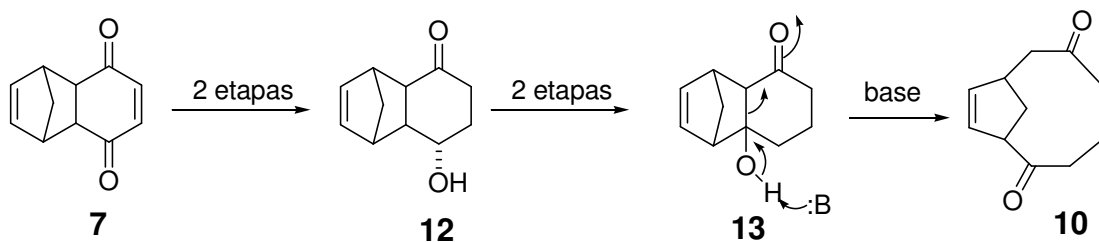


Figura 3: Compostos preparados a partir de reações de cicloadição.

Em uma das rotas de síntese para a preparação da substância **10** foi utilizado o aduto de Diels-Alder **7** (CONSTANTINO *et al.*, 2000; BEATRIZ, 2001) (Esquema 4):

Esquema 4



Durante esses estudos foram preparadas algumas substâncias com estruturas rígidas do tipo *gaiola* (CONSTANTINO *et al.*, 2000; BEATRIZ, 2001), como mostrado na Figura 4:

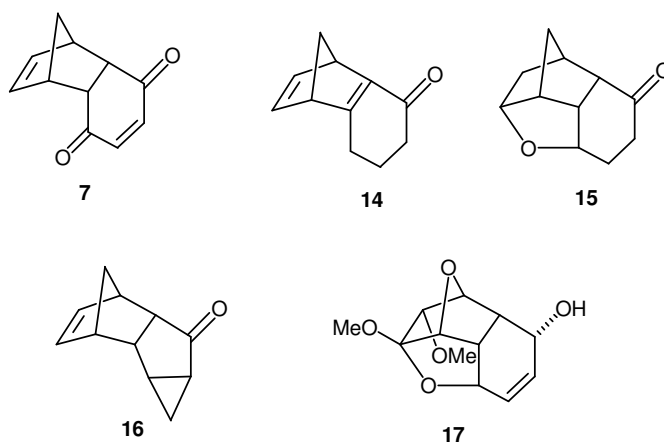


Figura 4. Alguns exemplos de estruturas rígidas do tipo *gaiola*, preparadas pelo grupo de pesquisa.

1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO NA SÍNTESE ORGÂNICA: UMA VISÃO GERAL

A incorporação da biotransformação em rotas sintéticas usando microrganismos e/ ou enzimas isoladas está sendo bastante explorada por indústrias e pela comunidade acadêmica. A primeira consideração para o uso da biotransformação numa rota sintética é o controle régio e estereosseletivo, que podem ser alcançados através de reações catalisadas por enzimas ou microrganismos. A biotransformação está sendo um dos métodos eficazes na produção de compostos opticamente puros e no desenvolvimento de rotas eficientes para compostos alvos. Ainda, a biotransformação proporciona alternativas para metodologia sintética clássica, assim representando uma ferramenta viável para a síntese orgânica (LOUGHLIN, 2000).

Enzimas isoladas e/ ou microrganismos têm sido freqüentemente utilizados na indústria como catalisadores. Na Tabela 1 estão sumariadas algumas aplicações de sucesso no processo catalisado por células integrais de microrganismos para síntese em larga escala. Comparando com enzimas isoladas, culturas de microrganismos podem ser preparadas mais rapidamente e com menor custo. Em particular, os microrganismos têm sido mais comumente utilizados em processos industriais graças à sua diversidade e facilidade de manuseio. Crescentes avanços na área acadêmica têm aumentado as vantagens do uso de microrganismos com catalisadores (ISHIGE *et al.* 2005).

Tabela 1: Aplicações recentes de catalisadores microbianos em processos sintéticos industriais.

itens	Produtos	Substrato(s)	Microrganismo	Enzima(s)	Companhia
Produtos Farmacêuticos e seus intermediários	Ácido (S)-2-cloropropiônico	Ácido (R,S)-2-cloropropiônico	<i>Pseudomonas</i> sp.	Desalogenase	Avencia
	L-DOPA	Pilocatecol, piruvato, NH ₄ ⁺ , L-lisina	<i>Erwinia herbicola</i>	Tirosina fenol liase	Ajinomoto
	Ácido L-pipecólico	L-lisina	<i>E. coli</i> recombinante	Lisina amino-transferase (de <i>Flavobacterium lutescens</i>)	Mercian
	CDP colina	Ácido orótico, cloreto de colina	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	múltiplos passos sob geração de ATP	Kyowa Hakko
	Glutathiona	Ácido glutâmico, cisteína, glicina	<i>E. coli</i> recombinante	g-glutamylcisteína sintetase, glutathiona sintetase (de <i>E. coli</i>) sob geração de ATP	Kyowa Hakko
	Hidroxiprolina	Prolina	<i>E. coli</i> recombinante	Prolina hidroxilase (de <i>Streptomyces</i> sp.)	Kyowa Hakko
	Álcoois quirais	Cetonas correspondentes	<i>E. coli</i> recombinante	Oxidoredutase (de vários microrganismos)	Kaneda
	Ácido 5-hidroxi pirazina carboxílico	2-cianopirazina	<i>Agrobacterium</i> sp.	Nitrilase, hidroxilase	Lonza
	Ácido (s)-2-piperazina carboxílico	Ácido (R,S)-2-piperazina carboxílico	<i>Klebsiella terrigena</i>	amidase	Lonza
	4-[6-hidroxipiridin-3-il]-4-oxobutirato	(S)-nicotina	<i>Pseudomonas</i> sp.	múltiplos passos	Lonza
Vitaminas	Pravastatina sódica	compactina	<i>Streptomyces carbophilus</i>	Citocromo P450	Sankyo
	(2R, 5R)-hexanodiol	2,5-hexanodiona	<i>Lactobacillus kefir</i>	Álcool desidrogenase	JFC
	intermediário do pantotenato	DL-pantoil lactona	<i>Fusarium osysporum</i>	lactonase	Daiichi Fine Chemical
Aminoácidos	Ascorbato 2-fosfato	Ácido ascórbico	<i>Sphingomonas trueperi</i>	Fosfoquinase	Kyowa Hakko
	Nicotinamida	3-cianopiridina	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Nitrila hidratase	Lonza
Realçador de flavor	L-Aminoácidos	DL-hidantoínas	<i>E. coli</i> recombinante	L-hidantoinase, L-carbamoilase	Degussa
	5'-GMP	XMP	<i>E. coli</i> recombinante	XMP aminase (GMP sintase de <i>E. coli</i>)	Kyowa Hakko
		Guanosina, pirofosfato	<i>E. coli</i> recombinante	AP/PTase (de <i>Escherichia blattae</i>)	Ajinomoto
	5'-IMP	Inosina	<i>E. coli</i> recombinante	Guanosina/inosina cinase (de <i>E. coli</i>)	Kyowa Hakko
		Inosina, pirofosfato	<i>E. coli</i> recombinante	AP/PTase (de <i>Escherichia blattae</i>)	Ajinomoto
Resinas	Acilamida	Acilnitrila	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Nitrila hidratase	Mitsubishi Rayon
Inseticidas	Ácido 6-hidroxi nicotínico	Niacina	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Niacina hidroxilase	Lonza

Fonte: copiada de ISHIGUE *et al.* 2005.

As reações catalisadas por enzimas podem ser divididas em seis principais grupos, de acordo com a União Internacional de Bioquímica. Estes grupos são: (1) Oxidorredutases: realizam reações de oxidação e redução; Oxigenação das ligações C-H, C-C e C=C, remoção de átomos de hidrogênio equivalentes. (2) Transferases: Transferência de grupos tais como o grupo acila, fosforila, aldeídico, cetônico e açúcar. (3) Hidrolases: Hidrólise de glicosídeos, anidridos, ésteres, amidas, peptídeos e outras funções contendo C-N. (4) Liases: Reações tais como adição de HX em ligações duplas como em C=C, C=N e C=O e processo reverso. (5) Isomerases: Isomerização tais como migração de ligação C=C, isomerização e racemização cis-trans. (6) Ligases: Formação de ligação C-O, C-S, C-N, C-C e formação de ligação éster de fosfato (LOUGHLIN, 2000). A maior parte das biotransformações é realizada por enzimas da classe das hidrolases, seguida das oxidorredutases e das demais classes (LOUGHLIN, 2000).

As principais vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica são: (i) catálises eficientes, sendo o processo da reação mais rápido comparado com a catálise química (MENGER, 1993) e as enzimas podem ser efetivas mesmo em baixas concentrações molares; (ii) reações sob condições suaves, numa faixa de temperatura moderada (20-40°C) e pH (em torno de 7,0), minimizando reações indesejadas, tais como rearranjos e reações laterais; (iii) ação catalítica sobre um grande número de substratos em locais na molécula de difícil acesso por meio sintético; (iv) seletividade, tais como: quimiosseletividade (as enzimas podem agir sobre vários grupos funcionais na presença de outros grupos funcionais sensíveis), regiosseletividade, diastereosseletividade (SWEERS & WONG, 1986; SIH & WU, 1989) e enantiosseletividade (as enzimas são catalisadores quirais e suas especificidades

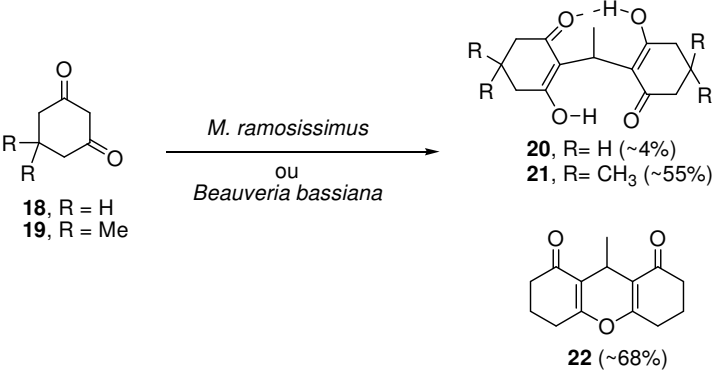
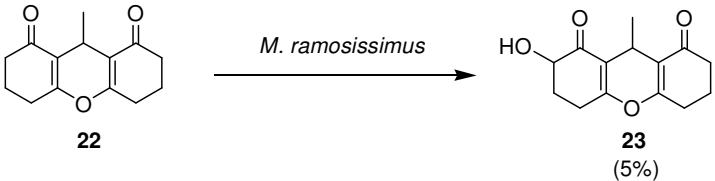
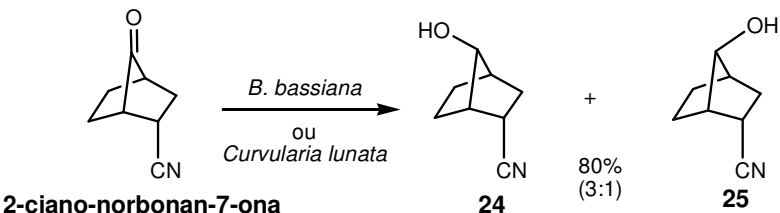
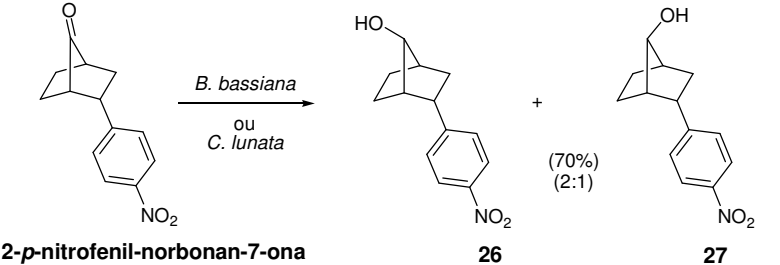
podem ser exploradas para conversões seletivas e assimétricas) (SWEERS & WONG, 1986; SIH & WU, 1989); (v) catálise em meio não-aquoso, usualmente são enzimas que podem também operar em solventes orgânicos (KLIBANOV, 1990; LAANE et al., 1987).

A principal desvantagem das enzimas na síntese é o fato delas usualmente serem formadas por *L*-aminoácidos e então estarem impossibilitadas de inverter sua indução quiral na reação. Entretanto, com o isolamento de novas enzimas e com o avanço da técnica em biologia molecular para criar enzimas modificadas, este problema pode eventualmente ser superado. As enzimas são propensas à inibição pelo substrato ou pelo produto. Este problema pode ser contornado pela manutenção da baixa concentração do substrato e/ ou pelo desencadeamento da reação *in situ* onde o produto de uma reação torna-se o substrato da próxima reação. Outra desvantagem é que a enzima mostra alta atividade catalítica em solventes aquosos. Entretanto, em muitas reações com compostos orgânicos o solvente de escolha geralmente é um solvente orgânico para solubilizar o substrato. Assim, as enzimas requerem um manuseio cuidadoso, para evitar desnaturação e conseqüente perda de atividade catalítica (LOGHLIN, 2000).

As pesquisas em biotransformação no Estado de Mato Grosso do Sul ainda se restringem a um grupo de pesquisadores do Departamento de Química e do Laboratório de Bioquímica Vegetal da UFMS. Os projetos envolvem a utilização de microrganismos brasileiros isolados de plantas nativas ou do solo da Mata Atlântica e do Pantanal nas bioconversões de substâncias naturais e/ou sintéticas, a fim de promover transformações químicas que dificilmente seriam realizadas por reações clássicas (BEATRIZ *et al.*, 2005).

Na **Tabela 2** estão relacionadas biotransformações recentes realizadas pelo grupo, utilizando-se os fungos *M. ramosissimus* e *Beauveria bassiana*.

Tabela 2: Recentes biotransformações de substâncias orgânicas realizadas no Estado de Mato Grosso do Sul.

Biotransformação		Referência
 18, R = H 19, R = Me <i>M. ramosissimus</i> ou <i>Beauveria bassiana</i> 20, R = H (~4%) 21, R = CH₃ (~55%) 22 (~68%)	(MARTINS, 2004)	
 22 <i>M. ramosissimus</i> 23 (5%)	(MARTINS, 2004)	
 2-ciano-norbonan-7-ona <i>B. bassiana</i> ou <i>Curvularia lunata</i> 24 80% (3:1) 25	(ARRUDA <i>et al.</i> , 2006)	
 2-p-nitrofenil-norbonan-7-ona <i>B. bassiana</i> ou <i>C. lunata</i> 26 (70%) (2:1) 27	(ARRUDA <i>et al.</i> , 2006)	

Neste trabalho, utilizamos o fungo *Mucor ramosissimus* (Samusevich), uma espécie sapróbia isolada de folhas de *Rudgea jasminoides* (*Rubiaceae*) nativa de Mata

Atlântica. Este fungo foi selecionado por ser componente da microbiota fúngica de um ecossistema brasileiro e por não existirem registros na literatura de sua utilização em biotransformações.

1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A seguir apresentamos três ensaios biológicos de nosso interesse para experimentação de bioatividade dos compostos orgânicos.

1.3.1 Atividades citotóxica e hemolítica

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para avaliação da biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Depois de comprovada a toxicidade do produto este é utilizado em ensaios pré-clínicos com animais de laboratório. Vários métodos *in vitro*, para avaliar a citotoxicidade de biomateriais foram padronizados, utilizando-se culturas celulares. Estes testes consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ *et al.* 1987, GUESS *et al.* 1965, ROGERO *et al.* 2000).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como: limitam o número de variáveis experimentais, permitem obter dados estatisticamente significativos, são realizados em períodos de tempo mais curtos e sinalizam a presença de extrema citotoxicidade, evitando o sacrifício desnecessário de animais experimentais. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados. Como a variedade de produtos a serem avaliados tem crescido muito,

estudos como estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução de estudos de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO *et al.* 2003).

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

Após a avaliação citotóxica dos produtos geralmente são realizadas avaliações do potencial hemolítico das substâncias-teste. Mesmo que as substâncias testadas apresentem baixa citotoxicidade, podem causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos, seja por formação de poros ou pela ruptura total impossibilitando o transporte das substâncias até o seu alvo ou receptor além de causar lesões que comprometem a saúde geral do paciente.

1.3.2 Atividade inseticida

O armazenamento impróprio de grãos de milho e outros cereais é a principal causa de infestação por diversas espécies de insetos, destacando-se como uma das principais pragas primárias internas o *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: *Curculionidae*), conhecido como gorgulho-do-milho (Figura 5). O controle químico desta praga é geralmente efetuado como inseticidas fumigantes que, apesar de eficazes, podem causar intoxicações aos aplicadores, presença de resíduos tóxicos nos grãos e seleção de populações resistentes (LORINI, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003; BENHALIMA *et al.*, 2004).



Figura 5: *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho): principal praga associada aos grãos de armazenamento.

No Brasil, as perdas de grãos são ocasionadas pelo ataque de pragas antes, durante e depois da colheita. As maiores perdas dos grãos são durante o armazenamento e são estimadas em cerca de 10% da produção. Considerando-se que a estimativa da produção brasileira em 2002/2003 foi de aproximadamente 114 milhões de toneladas (BRASIL, 2005), fica evidente a relevância destes prejuízos.

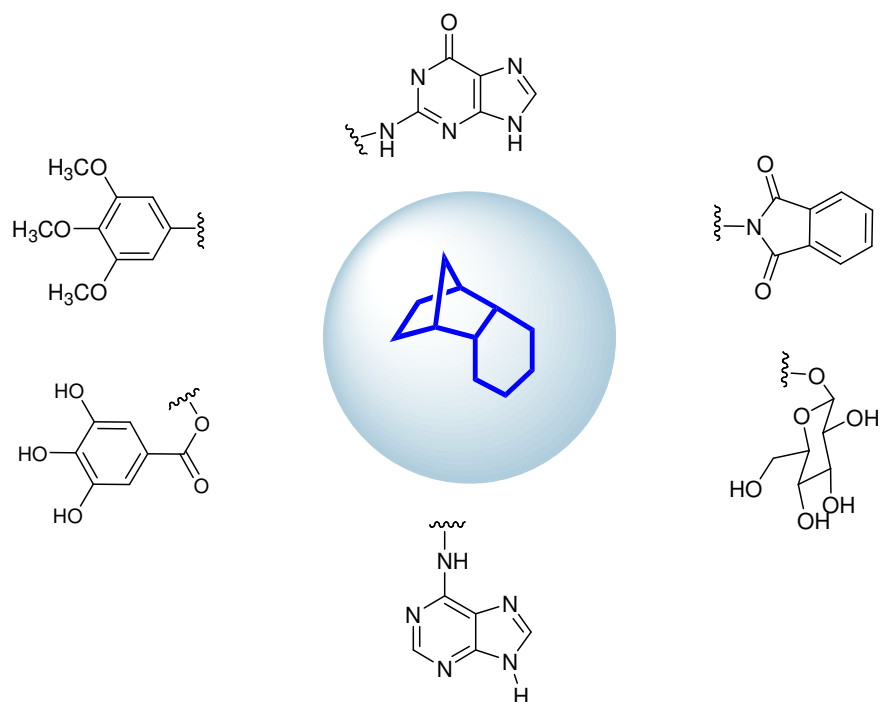
Dentre as pragas associadas aos grãos armazenados no Brasil, o gorgulho-do-milho é considerado como o mais importante, devido ao grande número de hospedeiros, elevado potencial biótico, infestação cruzada, praga de profundidade e pelo fato de tanto as larvas como adultos danificarem os grãos (GALLO *et al.*, 2002).

A descoberta de novas substâncias sintéticas é uma demanda freqüente tanto para uso de novos inseticidas, com reduzido impacto ambiental e para a saúde pública, quanto para se desacelerar o desenvolvimento de resistência aos inseticidas, utilizando-se diferentes classes de compostos químicos num plano de manejo de pragas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou a descoberta e o desenvolvimento de novas substâncias com potencial atividade citotóxica e inseticida, a partir do aduto de Diels-Alder obtido pela reação do ciclopentadieno com benzoquinona.

A Idéia Central

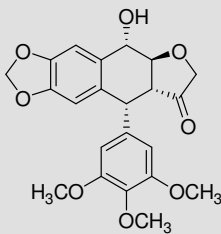
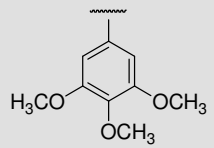
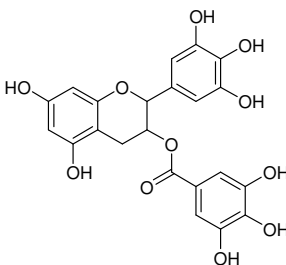
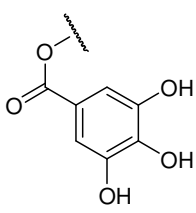
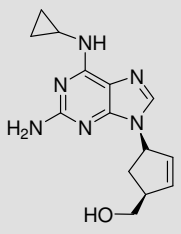
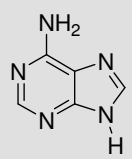
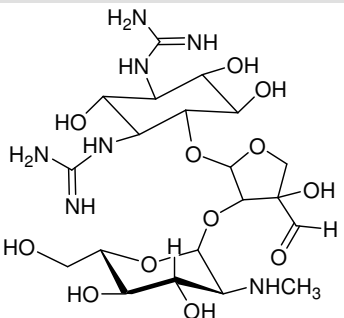
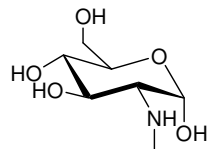
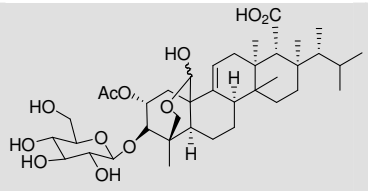
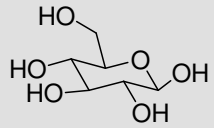
2 A IDÉIA CENTRAL



Planejou-se incorporar no esqueleto carbônico do aduto de Diels-Alder alguns grupos responsáveis por atividades biológicas conhecidas e que estão presentes em fármacos ou em estruturas de produtos naturais bioativos. Por exemplo, adenina, galato trimetoxilado e açúcares, presentes em muitas substâncias bioativas.

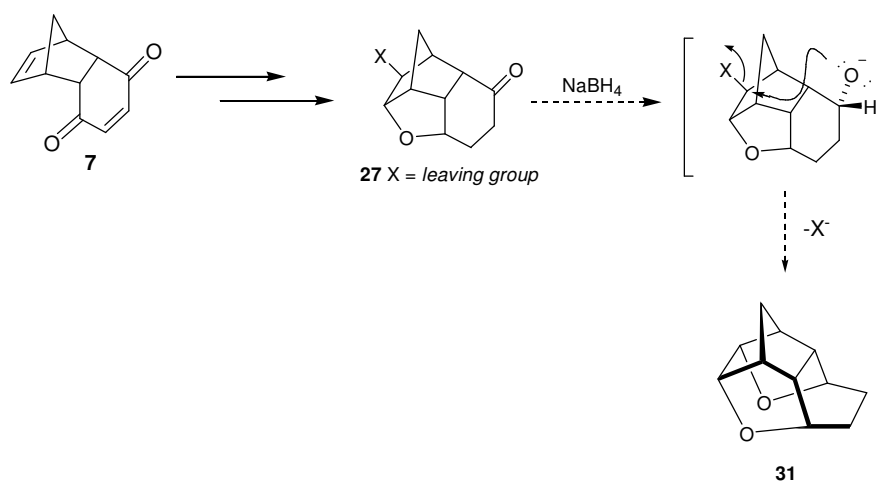
A Tabela 3 exibe alguns exemplos de fármacos e produtos naturais bioativos, destacando-se grupos importantes para a(s) atividade(s) biológica(s).

Tabela 3: Substâncias bioativas com grupos farmacofóricos com atividade conhecida.

Composto	Grupo Farmacofórico	Atividade	Referência
 podofilotoxina	 galoil	antitumoral	(GAUKROGE R <i>et al.</i> 2003)
 (-)-epigallocatequina-3-galato	 galato	antitumoral	(PALERMO <i>et al.</i> 2003)
 abacavir	 adenina	antiviral	(BALZARINI <i>et al.</i> 2004; DE CLERCQ <i>et al.</i> 1997)
 streptomicina	 glicosilamina	antibacteriano	(HEIFETS & LINDHOLM-LE VY, 1989)
 enfumafugin	 glucose	antifúngico	(ONISHI <i>et al.</i> 2000)

		Bloqueador de canal de Ca^{2+}, (HARA <i>et al.</i> 1998) tratamento de enxaqueca
lomerizine	piperazina	
		Antiinflamatória e propriedade imunomoduladora (TADASSE & SANNON, 2005; LIMA <i>et al.</i> 2001)
talidomida	ftalimida	

O desafio em sintetizar um composto policíclico rígido inédito, também norteou o desenvolvimento desta pesquisa. O policiclo **31**, por exemplo, poderia ser preparado através da seqüência de reações simplificadas a seguir, gerando, no final, um composto *cage-like* possuindo uma face hidrofóbica (face β) e outra hidrofílica (face α), o qual poderia, muito provavelmente, possuir propriedades físico-químicas inusitadas, em meio biológico ou não.



Objetivos

3 OBJETIVOS

- a) Síntese de substâncias com estruturas policíclicas rígidas (*cage-like*), a partir do aduto de Diels-Alder formado pela cicloadição entre ciclopentadieno e benzoquinona.
- b) Testar a capacidade de *Mucor ramosissimus* na biotransformação dos produtos sintetizados.
- c) Delineamento de algumas condições ótimas de ensaios de biotransformação, tais como a concentração de esporos do inóculo e pH do meio.
- d) Avaliar:
 - i) a atividade citotóxica com as linhagens: HL-60 (leucemia), MDA-MB 435 (mama-humano), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (SNC-glioblastoma) e também testar a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss.
 - ii) a atividade inseticida e repelente sobre adultos não sexados de *S. zeamais* (gorgulho-do-milho).

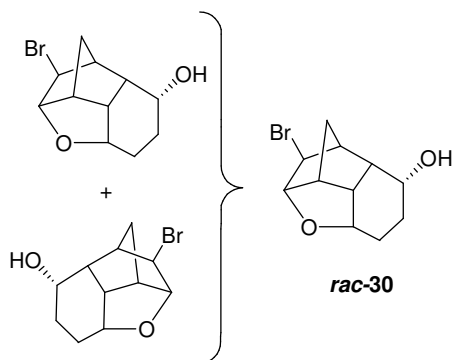
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de facilitar a leitura, esta seção foi dividida em 4 partes: 4.1. Síntese; 4.2. Biotransformação; 4.3. Atividade Biológica e por último apresentamos uma discussão dos dados espectrais das substâncias no item 4.4.

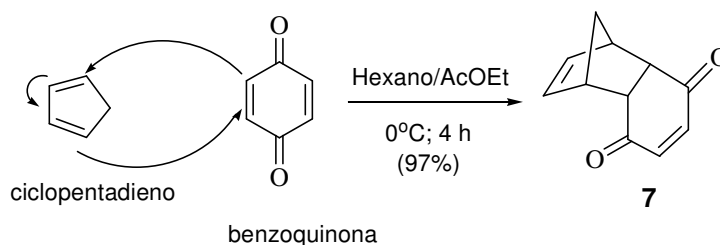
4.1 SÍNTESE

Nesta subseção não será dada atenção à configuração absoluta, mas à configuração relativa dos vários centros assimétricos. Todas as fórmulas de substâncias dotadas de assimetria simbolizam misturas racêmicas; é representada apenas um dos enantiômeros por simplicidade, como exemplificado a seguir:



Algumas das substâncias inicialmente propostas para serem submetidas aos testes de atividade biológica e ensaios de biotransformações, foram preparadas a partir da reação clássica de Diels-Alder entre ciclopentadieno e a benzoquinona.

Esquema 5



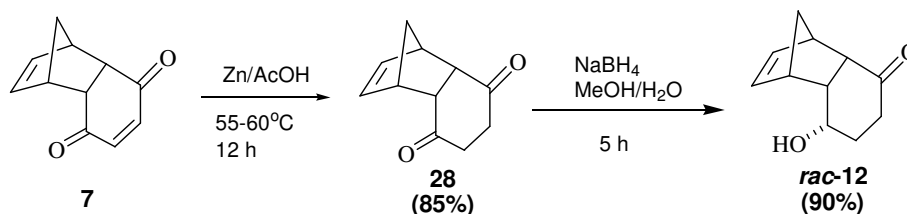
A reação mostrada no esquema acima é bastante conhecida na literatura (OLIVEIRA, 2006; MARCHAND & ALLEN, 1974; WASSERMAN, 1935; ODA *et al.* 1998; STROERMER *et al.* 2003). Entretanto, do ponto de vista experimental, algumas desvantagens são notadas, tais como o uso de solventes tóxicos e a necessidade de temperaturas muito baixas. Estas características conduziram-nos a procurar um método mais eficiente para obtenção do composto **7**.

Propôs-se experimentar a reação de cicloadição da mistura de benzoquinona em hexano:acetato de etila (5:1) com excesso de ciclopentadieno recém-destilado (Esquema 5). Neste método, foi trocado o metanol, que é reconhecidamente tóxico, por um sistema menos tóxico (AcOEt:hexano) e a temperatura usada foi de 0° C em vez de -78° C. Este sistema de solvente foi usado para forçar o controle cinético da reação e também para solubilizar os reagentes. O procedimento levou a um rendimento de 97% do isômero *endo*, após recristalização de hexano.

Em seguida, foi realizada a redução seletiva das ligações duplas conjugadas, utilizando Zn (zinco) e ácido acético entre 50-60° C, método adaptado de Marchand *et al.* (1991), produzindo-se a dicetona **28**, que, por sua vez, teve uma das suas carbonilas reduzida por NaBH₄, obtendo-se o ceto-álcool **12**, como

exibido no esquema 6.

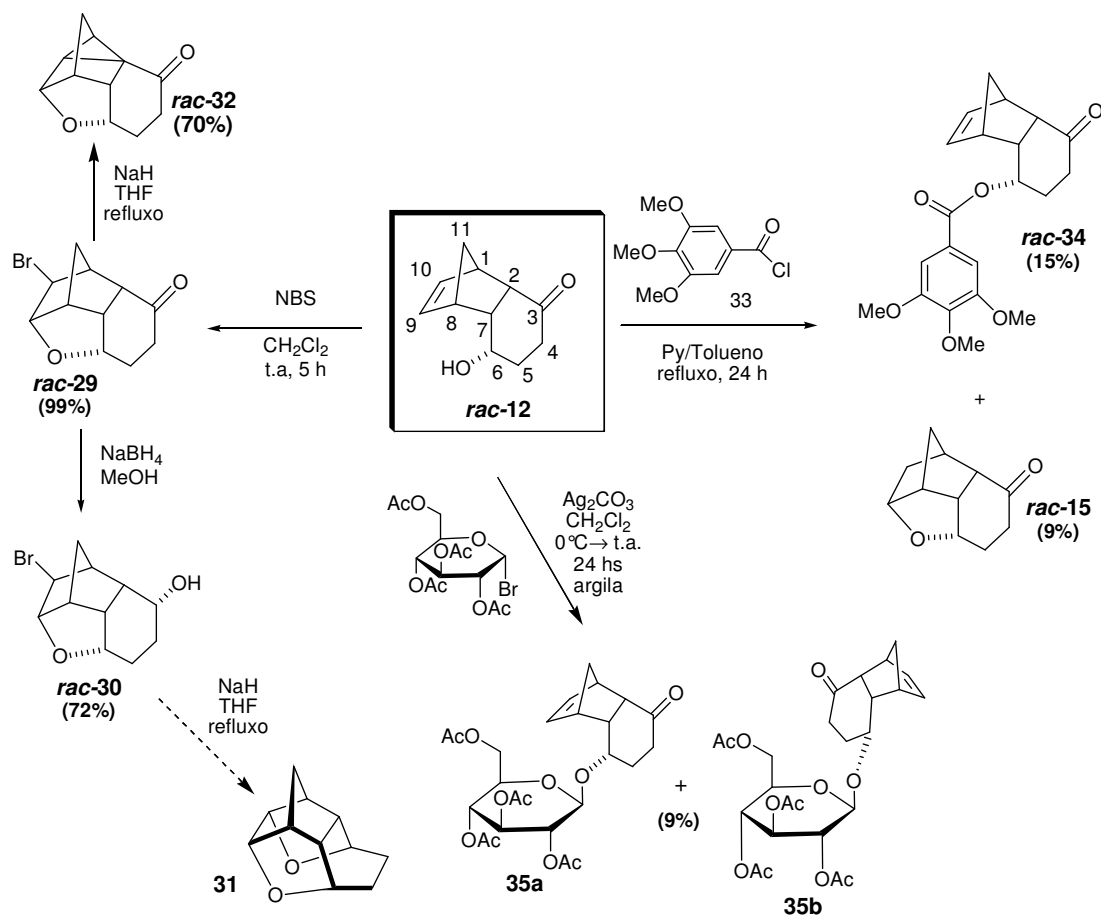
Esquema 6



Na seqüência e partindo-se do composto **12**, foram obtidos vários compostos policíclicos, com funcionalidades químicas diversificadas, como mostrado no esquema 7.

O tetraciclo **29** foi obtido em rendimento quantitativo a partir do tratamento do álcool **12** com NBS em diclorometano (YOSHIDA *et al*, 1998). Ao se tentar preparar o composto altamente tencionado **31**, por redução da carbonila do composto **29** (pela face convexa), com subsequente ciclização após deslocamento do brometo, obtivemos apenas a conhecida bromoidrina **30** (KONNO & OGASAWARA, 1998). Mesmo após o tratamento da bromoidrina **30** com NaH em THF sob refluxo, não foi possível obter o composto **31** desejado, recuperando-se o material de partida.

Esquema 7

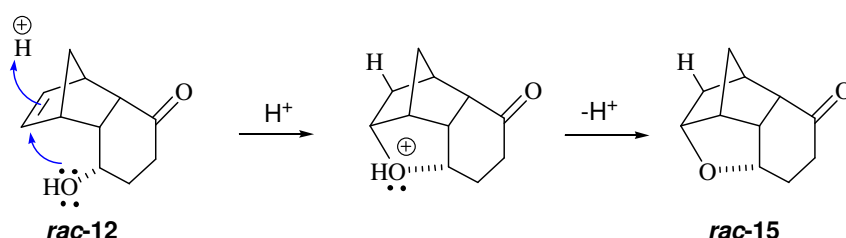


Por outro lado, o tratamento do tetraciclo **29** com NaH e THF sob refluxo levou à remoção do hidrogênio ácido em C-2 e subsequente reação intramolecular para formar o anel ciclopropano, tendo como produto o composto **32** (esquema 7).

O galato **34** foi obtido através de uma esterificação com o tratamento do ceto-álcool **12** com o cloreto de ácido **33**, em tolueno sob refluxo, na presença de piridina. Juntamente com **34** foi obtido o tetraciclo **15**, provavelmente formado pela condição reacional levemente ácida (após formação inicial de **34**, produz-se cloreto de piridínio) favorecendo a protonação da ligação dupla levando à

ciclização via grupo hidroxila (CONSTANTINO *et al.* 2001) (esquema 8). Com o objetivo de verificar esta proposição, checkou-se a estabilidade do composto **12**. Observou-se que **12** permanece inalterado em acetato de etila puro, no entanto, ele é rapidamente convertido em **15** quando se adiciona ao solvente uma pequena quantidade de ácido *p*-toluenossulfônico.

Esquema 8



A mistura diastereoisomérica dos compostos glicosilados **35a** e **35b** foi obtida através do tratamento do ceto-álcool **12** sob condição Koenig-Knorr (HANNA *et al.* 1987). Com o intuito de promover catálise ou manter o meio reagente anidro, foi adicionada argila seca (esmectita 200 mesh) (esquema 7). Com este procedimento, obtive-se rendimento de 9% após 24 horas sob agitação. O material de partida que não reagiu foi recuperado.

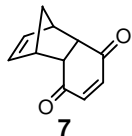
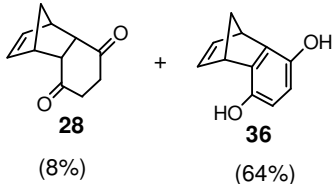
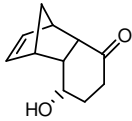
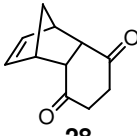
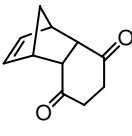
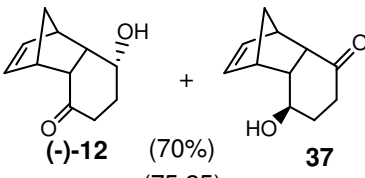
Todos os compostos foram identificados e elucidados por dados espectroscópicos de RMN de hidrogênio (1H), carbono (^{13}C), infravermelho (IV), espectrometria de massas, entre outros métodos, bem como por comparação dos dados de compostos conhecidos com a descrição na literatura. No Item 4.4. encontra-se uma discussão dos dados espectroscópicos e espectrométricos das substâncias preparadas neste trabalho.

4.2 BIOTRANSFORMAÇÕES

Nesta subseção, com exceção do composto **12**, não foi determinada a configuração absoluta dos produtos que apresentaram atividade óptica; novamente por simplicidade representamos apenas um dos enantiômeros com a configuração relativa dos carbonos estereogênicos.

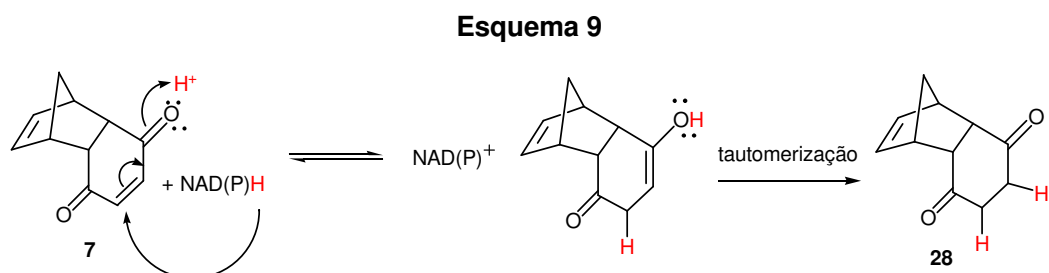
Os compostos **7**, *rac*-**12** e **28** foram submetidos aos ensaios de biotransformação empregando o fungo sapróbio *Mucor ramosissimus*. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4. Os principais espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **28** e **36** estão na discussão dos espectros (Item 4.4. Figuras 13 e 55, respectivamente).

Tabela 4: Resultados das Biotransformações de Adutos *cage-like* de Diels-Alder por *Mucor ramosissimus*.

Exp.	Substrato	Produto	t (d)	% M. P. rec.
1		 28 (8%) + 36 (64%)	14	11
2	 <i>rac</i> - 12	 28 (7%)	12	$[\alpha]_D^{20} = + 2,5^\circ$
3		 <i>(-)</i> - 12 (70%) + 37 (75:25) $[\alpha]_D^{20} = - 31,04^\circ$	10	10

Exp. = experimento; t (d) = tempo (dias); % M. P. rec. = porcentagem de material de partida recuperado.

A formação do produto **36** pode ser racionalizada como sendo uma isomerização da enediona **7**, provavelmente pela ação de uma base presente no meio de cultura. A redução que levou ao produto **28** sugere a participação de uma coenzima (NADH ou NADPH) efetuando uma adição-1,4 de hidreto com subsequente captura de próton (H^+) do meio (esquema 9).

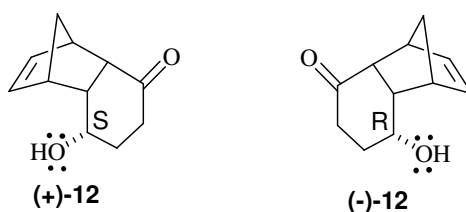


No experimento com o ceto-álcool **12** (racêmico) foi obtida a dicetona **28**, um produto de oxidação do carbono carbinólico de **12**, muito provavelmente devido à ação de oxidoredutases. O material de partida, que foi recuperado e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, apresentou atividade óptica ($[\alpha]_D^{20} = +2,5$, c 0,04 $CHCl_3$), indicando uma biotransformação enantiosseletiva.

Quando a dicetona **28** foi submetida à biotransformação, produziu-se uma mistura diastereoisomérica dos álcoois **12** e **37**, com excesso da substância **12** (75:25). Os estereoisômeros **12** e **37** não puderam ser separados por procedimento usual de cromatografia em coluna de sílica gel. No entanto, foi possível identificar os sinais de RMN de 1H e de ^{13}C de cada composto e compará-los aos reportados na literatura (MARCHAND *et al.* 1995). A proporção entre os isômeros foi determinada através das integrações relativas dos sinais de H no espectro da mistura (Figura 6).

A mistura dos álcoois diastereoisoméricos **12** e **37** apresentou atividade óptica ($[\alpha]_D^{20} = -31,04$, c 0,06, MeOH), indicando uma biotransformação estereosseletiva.

Marchand *et al.* (1995) usaram uma cultura de *Saccaromices cerevisae* para biotransformar a mesma substância **28** e foram produzidos os mesmos álcoois **12** e **37** na proporção de 80:20, no entanto, apresentando atividade óptica contrária ($[\alpha]_D^{25} + 52,4$; c 1,4, CH₂Cl₂). A configuração absoluta do composto (+)-**12**, obtido no experimento de Marchand, foi determinada por difração de raios-X de um derivado. O álcool (+)-**12** apresenta uma configuração absoluta *S* em C-6, ou seja, o microrganismo usado promoveu biorredução com especificidade Prelog (fornece *S*-álcoois).



Por correlação, o produto obtido na biotransformação por *Mucor ramosissimus*, neste experimento, tem a configuração absoluta contrária ao descrito por Marchand. Sendo, portanto, uma biorredução com especificidade anti-Prelog (fornece *R*-álcoois) (ARRUDA *et al.* 2006).

Em estudos futuros pretende-se avaliar se a biorredução apresentada *M. ramosissimus* (anti-Prelog) é uma generalização ou específica apenas para o composto **28**.

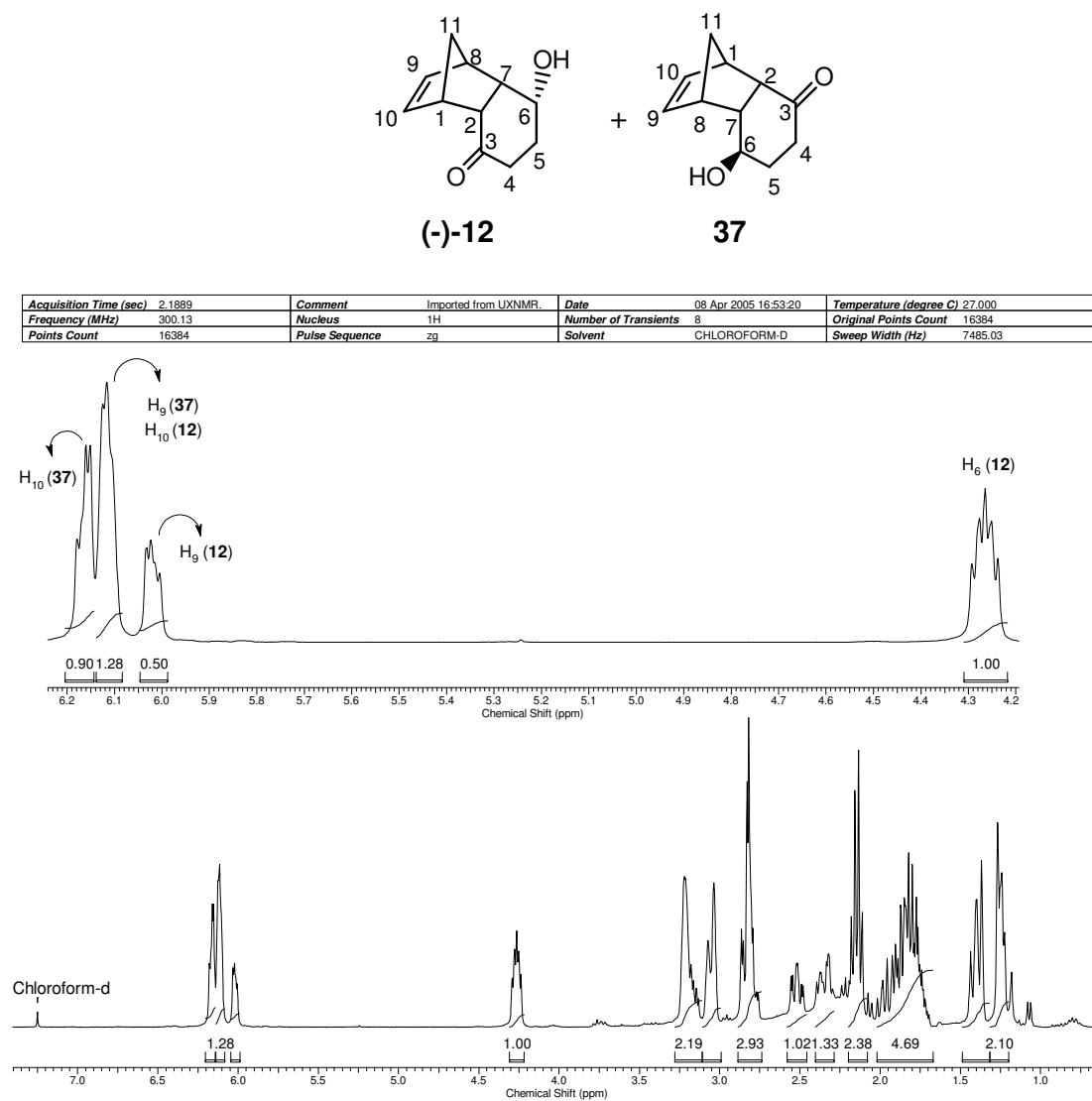
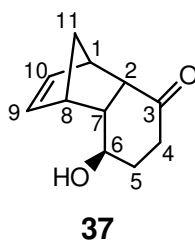


Figura 6: Espectro de RMN de ¹H da mistura dos compostos **12** e **37**.



Acquisition Time (sec)	2.1889	Comment	Imported from UXNMR.	Date	02 Feb 2006 16:55:28	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	7485.03

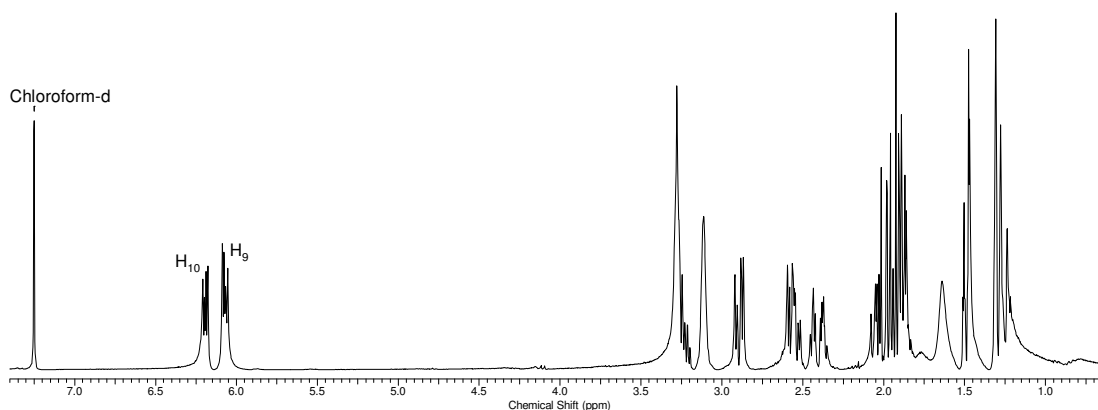
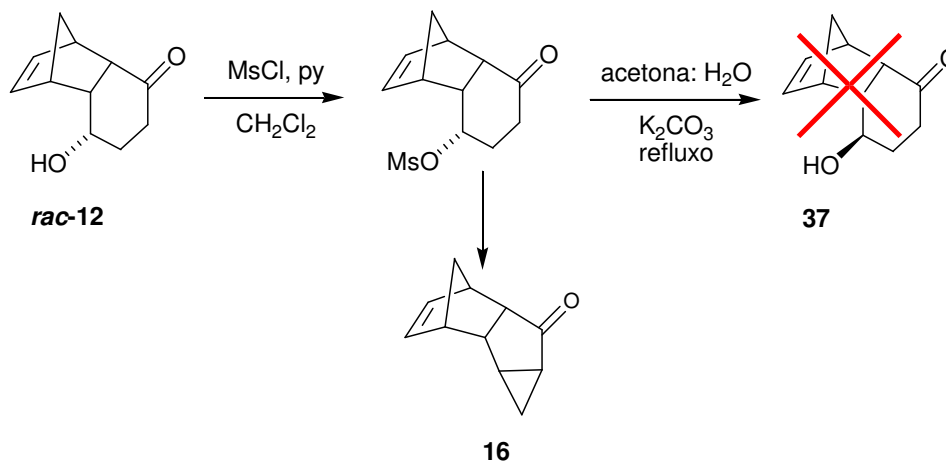


Figura 7: Espectro de RMN de ¹H do composto **37**.

Objetivando obter o composto **37**, para ser usado como padrão nos experimentos em cromatografia gasosa, submeteu-se o ceto-álcool **rac-12** em tratamento com cloreto de mesila e piridina a fim de produzir o mesilato correspondente e, na seqüência, obter o álcool **rac-37**, via uma reação do tipo S_N2. Porém, quando se tratou o mesilato do ceto-álcool **rac-12**, com uma mistura de acetona:água, sob refluxo, na presença de K₂CO₃, se obteve apenas o ciclopropano **rac-16** (esquema **10** e Figura **42** - espectro).

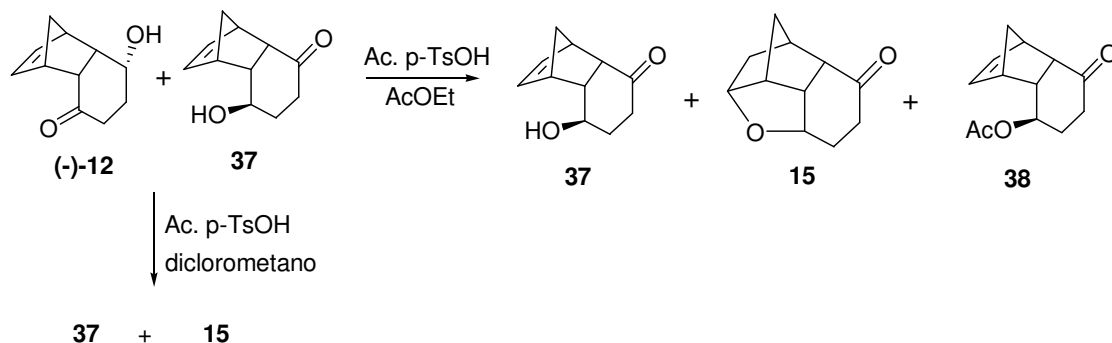
Esquema 10



Sabendo-se de antemão que o composto **rac-12** em meio ácido sofre ciclização para formar o composto **15**, devido à sua estereoquímica, alternativamente, para obter **37**, dissolveu-se os produtos de biotransformação (mistura de **(-)-12** e **37**) em acetato de etila, na presença de ácido *p*-toluenossulfônico em quantidade catalítica. Com este tratamento, foi obtido o esperado éter **15** e também o acetato **38**, ambos derivados de **12** e **37**, respectivamente (esquema 11). Os produtos desta reação foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel.

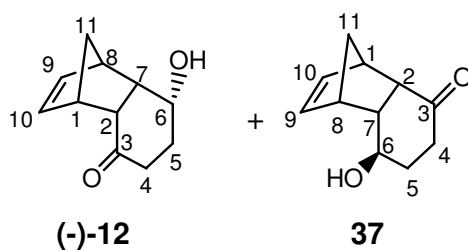
A fim de evitar a formação do acetato **38**, diclorometano foi utilizado como solvente em vez de acetato de etila, obtendo-se apenas **37** e **15**.

Esquema 11



4.2.1 Determinação da concentração ótima de esporos de *M. ramosissimus* para biotransformação

O composto **28** foi submetido aos ensaios de biotransformação empregando os esporos do fungo sapróbio *Mucor ramosissimus* em concentrações de 10^6 , 10^4 e 10^2 esporos/mL. Aparentemente, em CCD, foram observadas transformações da substância **28** produzindo uma mancha com Rf compatível com a mistura dos ceto-álcoois (-)-**12** e **37**, já observados nos experimentos anteriores, onde se utilizou fragmentos de meio de cultura sólido. Pode-se observar a similaridade dos espectros apresentados na Figura 8, com os espectros da Figura 6, tratando-se, portanto, da mesma mistura. Os resultados deste experimento estão sumariados na Tabela 5.



Acquisition Time (sec)	2.1889	Comment	Imported from UXNMR.	Date	25 Oct 2005 15:00:16	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	7485.03

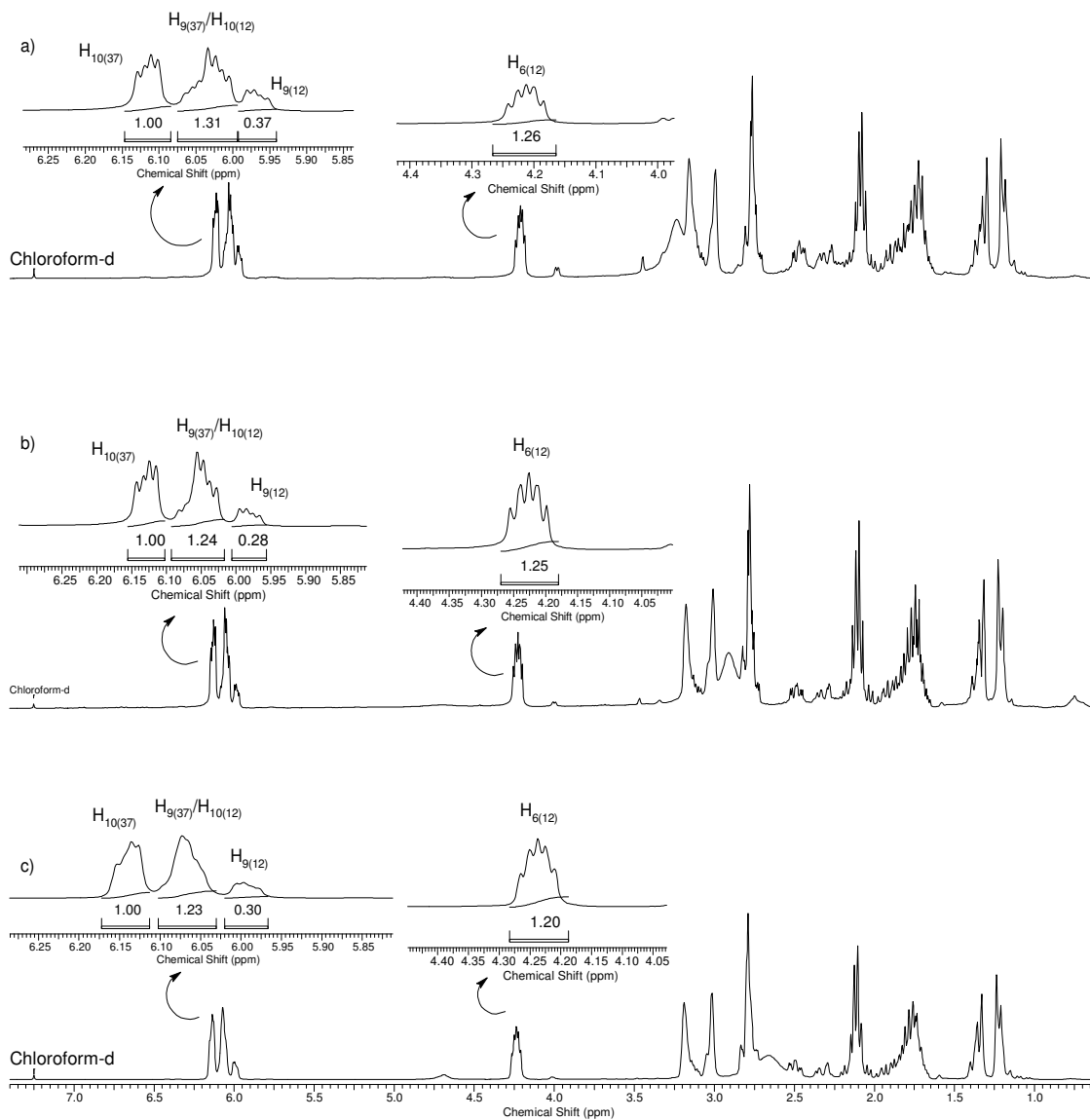
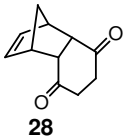
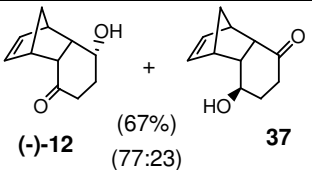
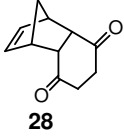
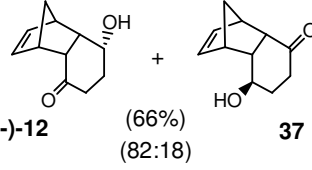
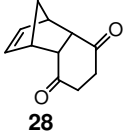
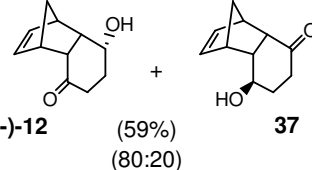


Figura 8: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos produtos das biotransformações **12** e **37** a partir do composto **28** variando-se a concentração de esporos. a) 10^6 esporos/ mL. b) 10^4 esporos/ mL. c) 10^2 esporos/ mL.

Tabela 5. Produtos de biotransformação obtidos com diferentes concentrações de esporos.

Exp.	Substrato	[esporos]	Produto	t (d)	% M.P. rec.
1		10^6	 (-)-12 (67%) (77:23) $[\alpha]_D^{20} = -40,3^0$	20	7 %
2		10^4	 (-)-12 (66%) (82:18) $[\alpha]_D^{20} = -44,2^0$	20	21,5 %
3		10^2	 (-)-12 (59%) (80:20) $[\alpha]_D^{20} = -37,3^0$	20	5,5 %

Exp. = experimento; t (d) = tempo (dias); % M. P. rec. = porcentagem de material de partida recuperado.

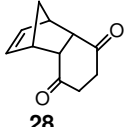
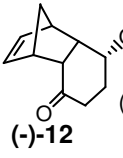
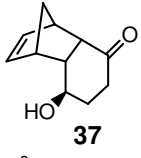
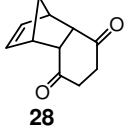
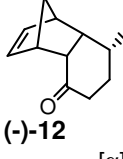
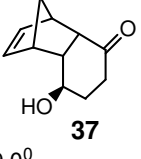
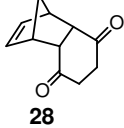
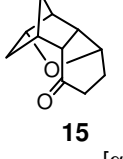
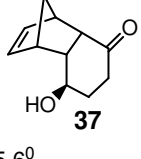
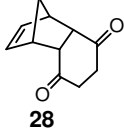
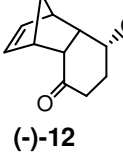
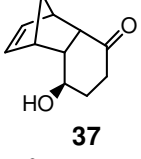
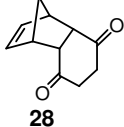
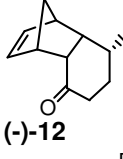
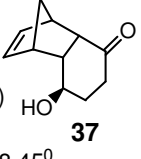
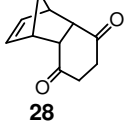
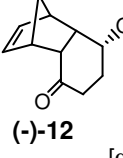
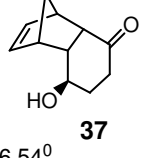
Nestes ensaios, pode-se destacar o experimento 2, o qual apresentou rendimento de 66%, semelhante ao experimento 1, no entanto, recuperou-se 21,5% do material de partida, o qual pode ser submetido novamente à biotransformação.

4.2.2 Determinação do pH ótimo de crescimento de *M. ramosissimus* para biotransformação

O composto **28** foi submetido aos ensaios de biotransformação empregando os esporos do fungo sapróbio *Mucor ramosissimus* em uma concentração de 10^4 esporos/ mL variando-se o pH na faixa entre 4 a 9.

A mistura resultante das biotransformações nos diferentes valores de pH foram cromatografadas em coluna de sílica gel e os espectros de RMN de ^1H de cada experimento estão apresentados na Figura 9. Os valores de rotação óptica, bem como rendimentos e proporção entre os produtos estão exibidos na Tabela 6. O álcool (-)-**12**, obtido no experimento 9 (pH 6), isomerizou-se para formar a substância **15** devido ao fato do produto ficar mantido em solução por longo período em clorofórmio deuterado. Para evitar esta transformação indesejada, os espectros dos produtos dos demais experimentos foram obtidos tão rápido quanto possível.

Tabela 6: Biotransformação determinando as condições ótimas de ensaio com diferentes variações de pH utilizando 10^4 esporos/ mL de *M. ramosissimus*.

Exp.	Substrato	pH	Produto	t (d)	M.P. rec. (%)
7		4	 +  (46,68%) 60:40 $[\alpha]_D^{20} = -21,6^0$	20	7, 1%
8		5	 +  (43,4%) (70:30) $[\alpha]_D^{20} = -39,0^0$	20	6,2 %
9		6	 +  (41,5%) (83:17) $[\alpha]_D^{20} = -55,6^0$	20	7,5 %
10		7	 +  (49,4%) (61:39) $[\alpha]_D^{20} = -20,7^0$	20	7,2 %
11		8	 +  (43,2%) (67:33) $[\alpha]_D^{20} = -8,45^0$	20	8,3 %
12		9	 +  (42,8%) (75:25) $[\alpha]_D^{20} = -16,54^0$	20	13,6 %

Exp. = experimento; t (d) = tempo (dias); M. P. rec. (%) = porcentagem de material de partida recuperado.

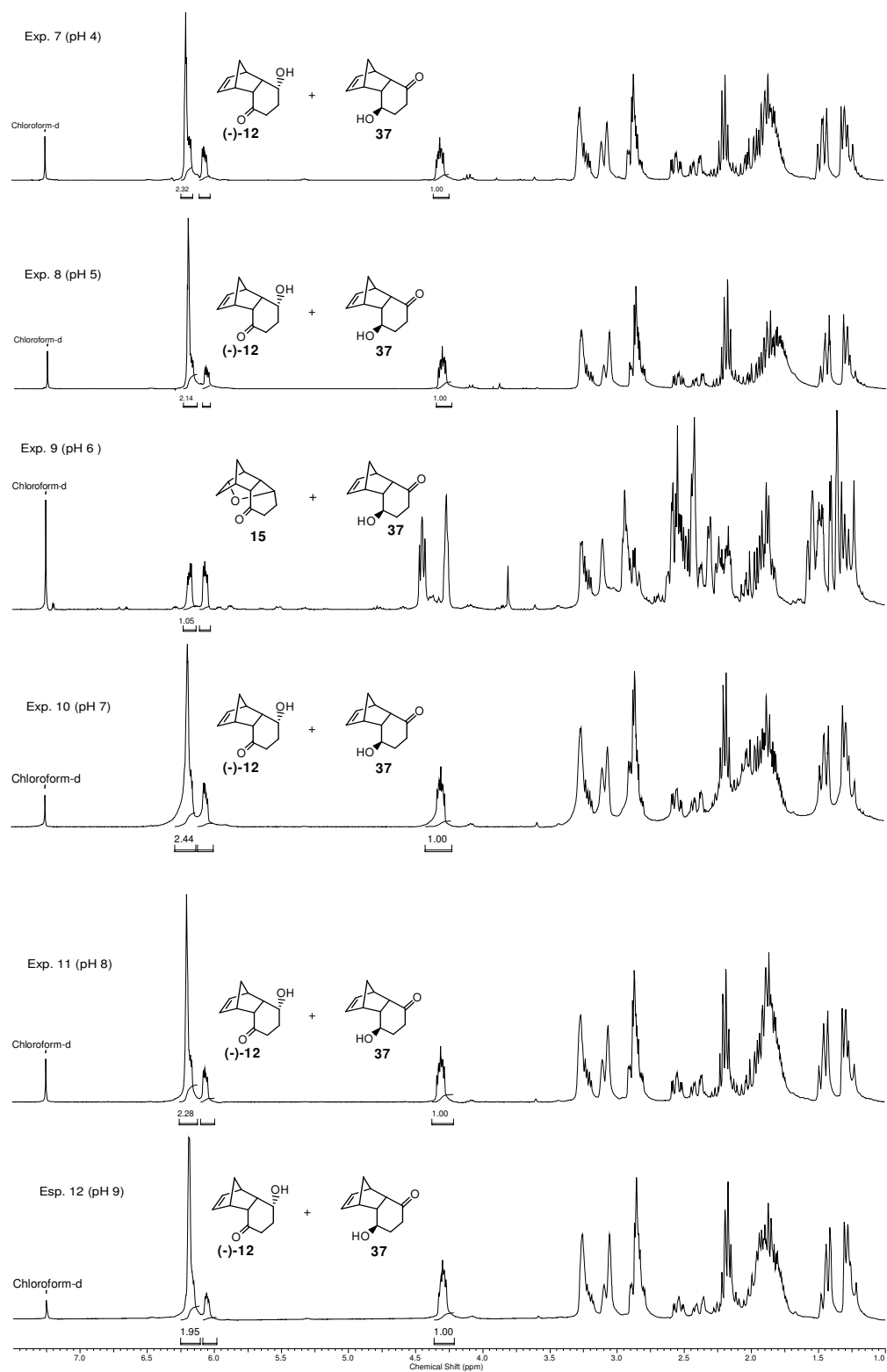


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos produtos da biotransformação do composto **28** em diferentes valores de pH.

Os ensaios de determinação das condições ótimas de pH para biotransformação dessas substâncias deverão ser repetidos com modificações metodológicas que permitam um melhor monitoramento e uma melhor separação dos produtos obtidos. Para tanto são necessários equipamentos que não estão disponíveis no momento, tais como cromatógrafo gasoso para controle detalhado dos produtos formados ao longo do tempo de ensaio, bem como as proporções entre eles. Além disso, para a determinação do excesso enantiomérico de cada composto, é necessária a utilização de cromatografia líquida ou gasosa com adsorvente quiral ou, como alternativa, a realização de uma derivatização com reagente de Mösher e posterior análise por RMN de ^1H . Portanto, esta parte do trabalho de dissertação carece de um estudo mais detalhado. De qualquer maneira, temos informações valiosas sobre os tipos de transformações que o fungo *M. ramosissimus* pode realizar.

4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os testes de atividades citotóxica e hemolítica foram efetuados no Laboratório de Oncologia Experimental da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, supervisionados pela Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa.

Os ensaios de atividade inseticida sobre indivíduos adultos *Sitophilus zeamais* foram realizados no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. Antônio Pancrácio de Souza.

4.3.1 Atividade citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica de cada amostra está apresentada na Tabela 7. Foram consideradas substâncias puras com potencialidade citotóxica, aquelas que apresentaram IC₅₀ menor que 4 µg/mL, em mais de duas linhagens estudadas (FÁVARO, 1990). Dentre as seis amostras estudadas, a substância **7** apresentou citotoxicidade moderada, inespecífica, com IC₅₀ de 11,34 (65,2), 13,62 (78,2) e 13,52 (77,7) µg/mL (µM) sobre as linhagens celulares HL-60, HCT-8 e MDA-MB 435 respectivamente. De forma semelhante, a substância **34** mostrou ação citotóxica moderada sobre as linhagens (HCT-8, SF-295 e MDA-MB 435) com IC₅₀ correspondendo respectivamente a 6,68 (17,9), 7,58 (20,4) e 13,51 (36,3) µg/mL (µM). A amostra **28** apresentou citotoxicidade apenas para a linhagem MDA-MB 435 com IC₅₀ correspondente a 10,47 (59,5) µg/mL (µM).

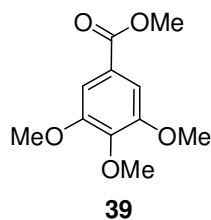
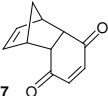
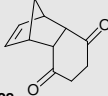
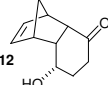
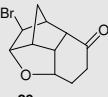
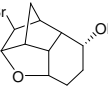
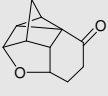
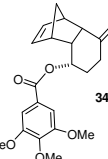
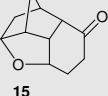
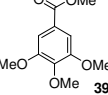


Figura 9: metil galato (**39**)

Por outro lado, metil galato (**39**) não apresentou efeito citotóxico sobre as quatro linhagens testadas (HL-60, HCT-8, SF-295 e MDA-MB 435) com IC_{50} maior que > 25 (110,6) $\mu\text{g/mL}$ (μM). Isto sugere que a estrutura engaiolada presente em **34** pode apresentar um importante papel no aumento de sua atividade.

Tabela 7. Atividade citotóxica dos compostos sintéticos.

Amostras	Células ^a			
	IC ₅₀ ^b (μg/mL) {μM}			
	HL-60	HCT-8	SF-295	MDA-MB 435
 7	(11,34){65,2} (8,68- 14,80){49,9- 85,1}	(13,62){78,2} (5,52- 33,63){31,7- 193,3}	(> 25){> 143,6}	(13,52){77,7} (11,57- 15,80){66,5- 90,8}
 28	.(> 25){> 142,0}	(> 25){> 142,0}	(> 25){> 142,0}	(10,47){59,5} (4,80- 22,05){27,3- 125,3}
 12	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}
 29	(> 25){> 97,3}	(> 25){> 97,3}	(> 25){> 97,3}	(> 25){> 97,3}
 30	(> 25){>96,9}	(> 25){> 96,9}	(> 25){> 96,9}	(> 25){> 96,9}
 32	(> 25){> 142,0}	(> 25){> 142,0}	(> 25){> 142,0}	(> 25){> 142,0}
 34	(> 25){> 67,2}	(6,68){17,9} (4,22- 10,56){11,3- 28,4}	(7,58){20,4} (6,12- 9,39){16,5- 25,2}	(13,51){36,3} (11,16- 16,37){0,03- 44,0}
 15	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}	(> 25){> 140,4}
 39	(> 25){>110,6}	(> 25){> 110,6}	(> 25){> 110,6}	(> 25){> 110,6}

^aAs células foram cultivadas em placas de 96 poços em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, por 72h, na presença das concentrações das substâncias puras (0,39-25 μg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações.

^bIC₅₀ corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (Intervalo de confiança).

4.3.2 Avaliação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos *Mus musculus* Swiss

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002) e Dresch *et al.* (2005), permitiu avaliar o potencial das substâncias testadas em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. A membrana dos eritrócitos é uma estrutura dinâmica que pode revelar mudanças significativas em sua interação com o medicamento (AKI & YAMAMOTO, 1991; MALHEIROS *et al.*, 2000).

Dos compostos testados (**7**, **28**, **30**, **34** e **39**) nenhum apresentou atividade hemolítica em todas as concentrações testadas, sugerindo que a atividade citotóxica não está relacionada com propriedade lítica ou indução da instabilidade da membrana por estes compostos. Provavelmente as alterações causadas pelas substâncias teste devem ser resultados de modificação em processos metabólicos intracelulares.

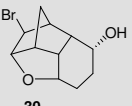
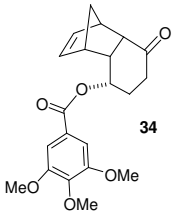
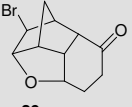
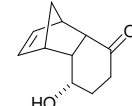
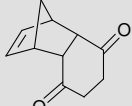
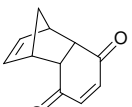
4.3.3 Atividade inseticida

Os grãos de trigo (100 g) foram pulverizados com soluções contendo 10 mg da amostra solubilizadas em solventes apropriados numa quantidade de 10 mL. avaliações foram feitas no primeiro, segundo, quinto e décimo dia, contando-se o número de insetos mortos e descartando-os. Seguiu-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento (TAVARES, 2003).

Através da Tabela 8 e gráfico da Figura 10, pode-se observar que até o segundo dia não houve diferença de mortalidade entre os tratamentos e os controles, a partir do quinto dia todas as substâncias testadas provocaram mortalidade maior do que os controles, com destaque para o composto **12** que causou 26,50% de mortalidade. No décimo dia, a mortalidade foi muito significativa em todas as substâncias testadas. O composto **29** com 80,50% de mortalidade, o composto **34** com 78%, **28** com 78,00%, **12** com 76,50%, **30** com 66,00% e a substância **7** com 65,50%. Os resultados obtidos foram bastante promissores justificando a complementação de experimentos para avaliação da atividade de repelência.

O potencial inseticida observado sobre *S. zeamais* (gorgulho-do-milho) dos compostos testados torna-se mais importante com o fato de que essas mesmas substâncias não apresentam atividade citotóxica significativa e, mais importante ainda, atividade hemolítica não foi observada nos testes realizados. Portanto, sob esta ótica, se pode preconizar que tais compostos, muito provavelmente, apresentam pouca toxicidade sobre animais e serão úteis como protótipos de novos pesticidas mais potentes e menos tóxicos para os animais.

Tabela 8: Mortalidade de indivíduos de *S. zeamais* tratados com as substâncias teste.

amostras	Dias			
	1	2	5	10
 30	0 (±0,00)	0 (±0,00)	10,5 (±2,84)	66,0 (±8,76)
 34	0 (±0,00)	0 (±0,00)	14,0 (±7,38)	78,0 (±9,49)
 29	0 (±0,00)	0,5 (±1,58)	15,0 (±3,33)	80,5 (±5,99)
 12	0 (±0,00)	1,5 (±2,42)	26,5 (±4,12)	76,5 (±10,81)
 28	1 (±2,11)	1 (±2,11)	19,0 (±6,58)	78,0 (±7,89)
 7	0 (±0,00)	0 (±0,00)	12,0 (±5,87)	65,5 (±6,43)
controle	1 (±2,11)	0 (±0,00)	2,5 (±4,86)	9,0 (±6,15)

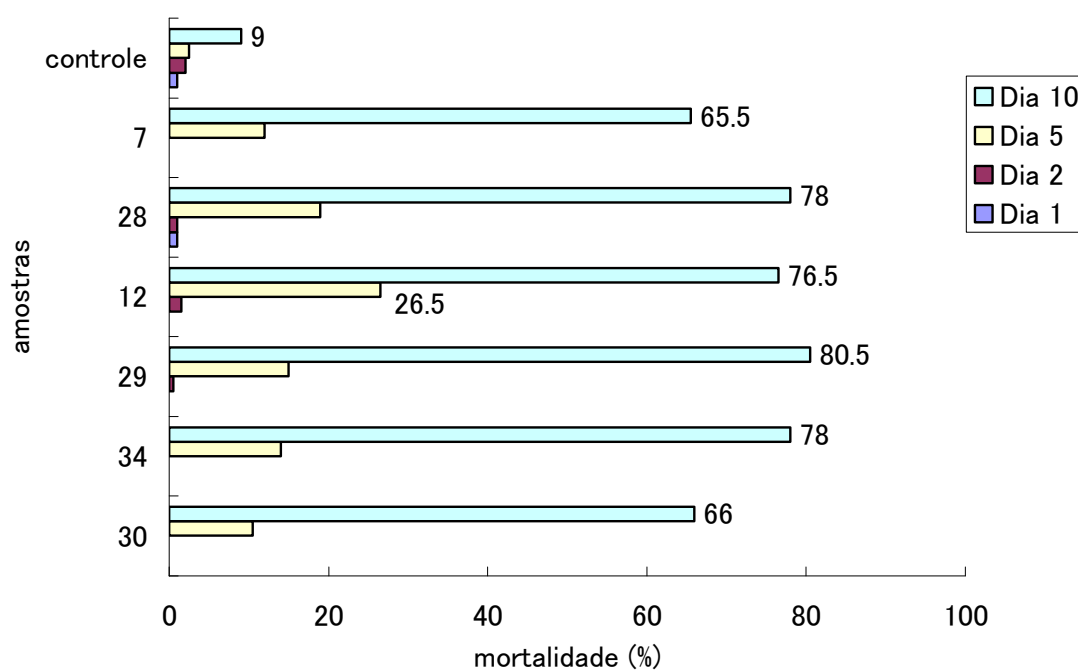


Figura 10: Porcentagem de mortalidade de adultos de *S. zeamais* tratados com compostos *cage-like*.

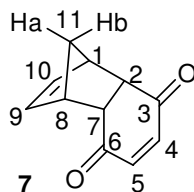
4.4. Discussão dos espectros

Nesta seção a numeração dos átomos de carbono e hidrogênio dos compostos, não segue nenhuma norma ou recomendação oficial. O objetivo é facilitar a identificação dos átomos de carbono e hidrogênio nas discussões dos espectros das substâncias sintetizadas e biotransformadas.

A nomenclatura dos compostos foi gerada a partir de programas computacionais ChemDraw e/ou ACD/NAME e possui uma numeração diferente da utilizada nesta seção de discussão.

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

Para a atribuição dos sinais espectrais foram consultados artigos, revisões, tabelas e livros textos (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2001 e BREITMEYER, 2001).

***endo*-triciclo[6.2.1.0^{2,7}] undeca-4,9-dieno-3,6-diona (7)**

Nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (figuras **11** e **12**, respectivamente) pode se notar a simetria deste composto pelo número de sinais. O espectro de RMN de ^1H do composto **7** observa-se cindo sinais com integrais relativas na proporção de 2: 2: 2: 2: 2 onde os singletos, um em δ 6,03 ppm e outro em δ 6,53 ppm, indicam a presença de olefinas. Os hidrogênios da ponte apresentaram dubleto em δ 1,40 ppm e outro em δ 1,50 ppm atribuídos à H11b e H11a respectivamente. Estes hidrogênios têm acoplamento geminal com $J = 8,8$ Hz e o deslocamento do H11a mais desblindado deve-se ao seu posicionamento dentro do cone de desblindagem da olefina em C9-C10.

No espectro de RMN de ^{13}C observam-se seis sinais confirmando a presença de carbonila em δ 199,4 ppm e ausência deste no DEPT 135. Além disso, pode-se confirmar a presença de CH_2 da ponte, em δ 48,6 ppm. Os sinais em δ 142,0 e 136,2 ppm são indicativos de carbonos de olefinas e em δ 48,7 ppm o carbono da ponte e em δ 48,3 ppm os carbonos da conexão entre os anéis. Os sinais de RMN do composto **7**, bastante conhecido, foram comparados com os da literatura (MARCHAND, et al., 1974).

No espectro de IV (Figura **13**), observam-se bandas de deformação axial de C=O de carbonila (1659 e 1670 cm^{-1}), CH de olefinas (3032 e 3053 cm^{-1}) e CH de alifático (2941 ; 2991 e 2991 cm^{-1}). Ainda observam-se bandas de deformação

angular de C(C=O)C.

Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	2.2675	Comment	Imported from UXMNR.	Date	04 Mar 2005 19:46:08	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	7225.43

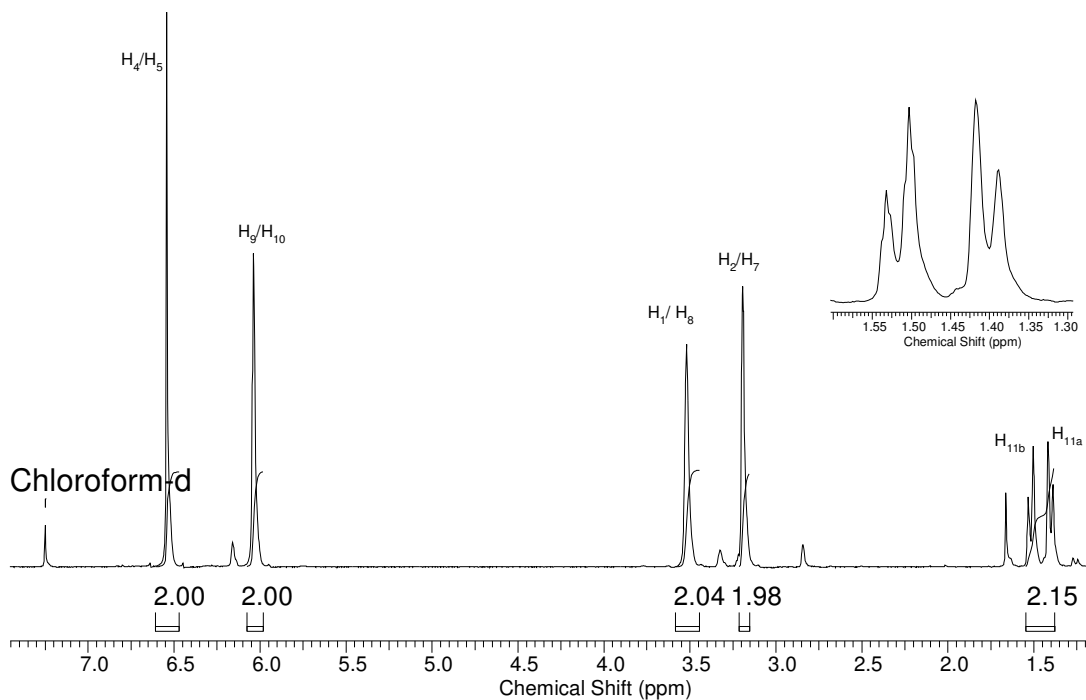
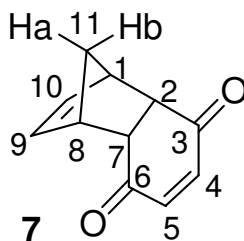


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **7**, com expansões de alguns sinais.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UxNMR.	Date	20 Apr 2005 15:51:28	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	2854	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39

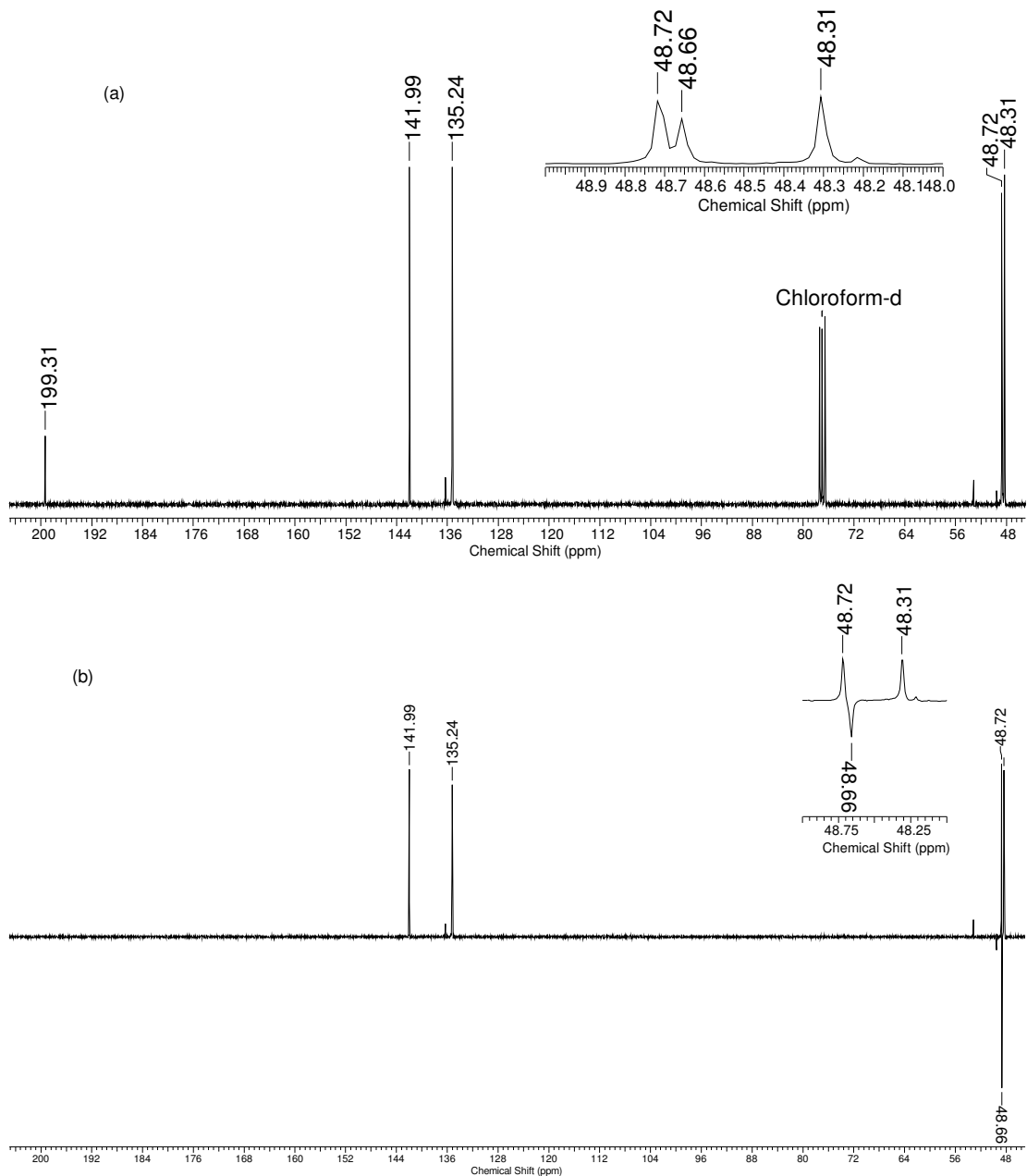


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **7**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 9: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **7**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1 e 8	3,51 (m, 2H)	48,3	CH
2 e 7	3,18 (d, 2H, J= 2,1)	48,7	CH
3 e 6	-----	199,4	C
4 e 5	6,53 (s, 2H)	135,3	CH
9 e 10	6,03 (dd, 2H, J=1,7)	142,0	CH
11a	1,40 (d, 1H, J= 8,8)	48,6	CH ₂
11b	1,50 (d, 1H, J= 8,8)		

Espectro de Infravermelho

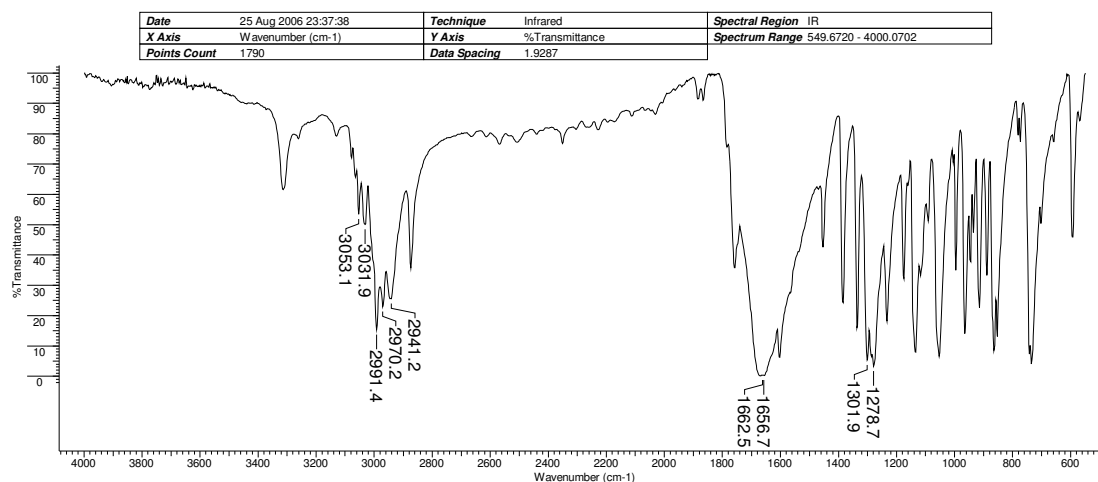
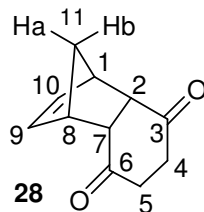


Figura 13: Espectro de IV do composto **7**.

Tabela 10: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **7**.

ν_{MAX} (cm ⁻¹)	Atribuição
3053 e 3032	Deformação axial de CH olefínico
2991, 2970 e 2941	Deformação axial de CH alifático
1663	Deformação axial de C=O de cetona conjugada
1658	Deformação axial de C=C de alceno
1278 e 1302	Deformação angular de C(C=O)C.

endo-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-eno-3,6-diona (28)

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras **14** e **15**, respectivamente) pode-se notar, pelo número de sinais, que a molécula apresenta plano de simetria. O espectro de RMN de ^1H mostra sinal em δ 6,13 ppm indicativo de olefina. Em δ 1,32 ppm atribui-se um dubleto referente ao H11a ($J=8,8$) e δ 1,44 ppm referente a um duplo tripleto do H11b ($J=8,8; 1,9$) dos hidrogênios da ponte. Sinais na região de δ 3,0 – 3,5 ppm, o mais desblindado em δ 3,41 ppm refere-se aos hidrogênios da cabeça de ponte e em δ 3,18 ppm o da junção entre os anéis (referentes ao H2 e H7). Além disso, pode se observar o desdobramento dos sinais em δ 2,27 e 2,60, multipletos referentes aos H4 e H5.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se sinal de carbonila em δ 209,6 e ausência deste no DEPT 135°. Ainda no DEPT pode se observar a presença de três sinais de CH_2 podendo confirmar a redução seletiva do composto **7** para o **28**. Os valores de RMN deste composto foram comparados com os descritos na literatura (MARCHAND *et al.*, 1991).

No espectro de infravermelho (Figura **16**), atribui-se bandas referentes às deformações axiais de olefina (3065 cm^{-1}), de alifático ($2943; 2970$ e 2989 cm^{-1}) e de carbonila da cetona (1709 cm^{-1}). Além disso, observam-se bandas de deformação angular de $\text{C}(\text{C}=\text{O})\text{C}$ (1302 cm^{-1}).

Espectro de RMN de ^1H

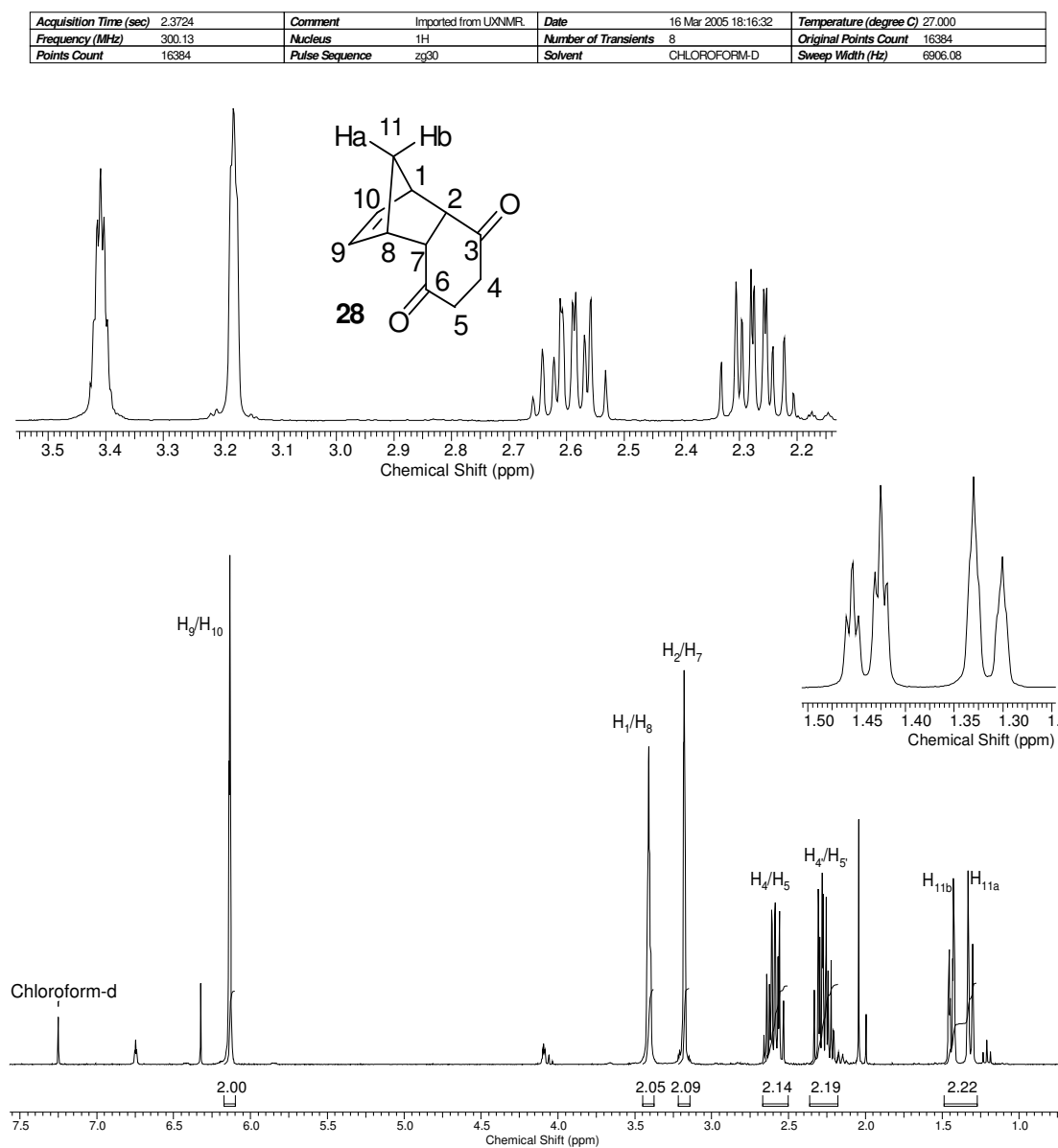


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **28**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	18 Mar 2005 10:03:44	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	6202	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	Py	Sweep Width (Hz)	18832.39

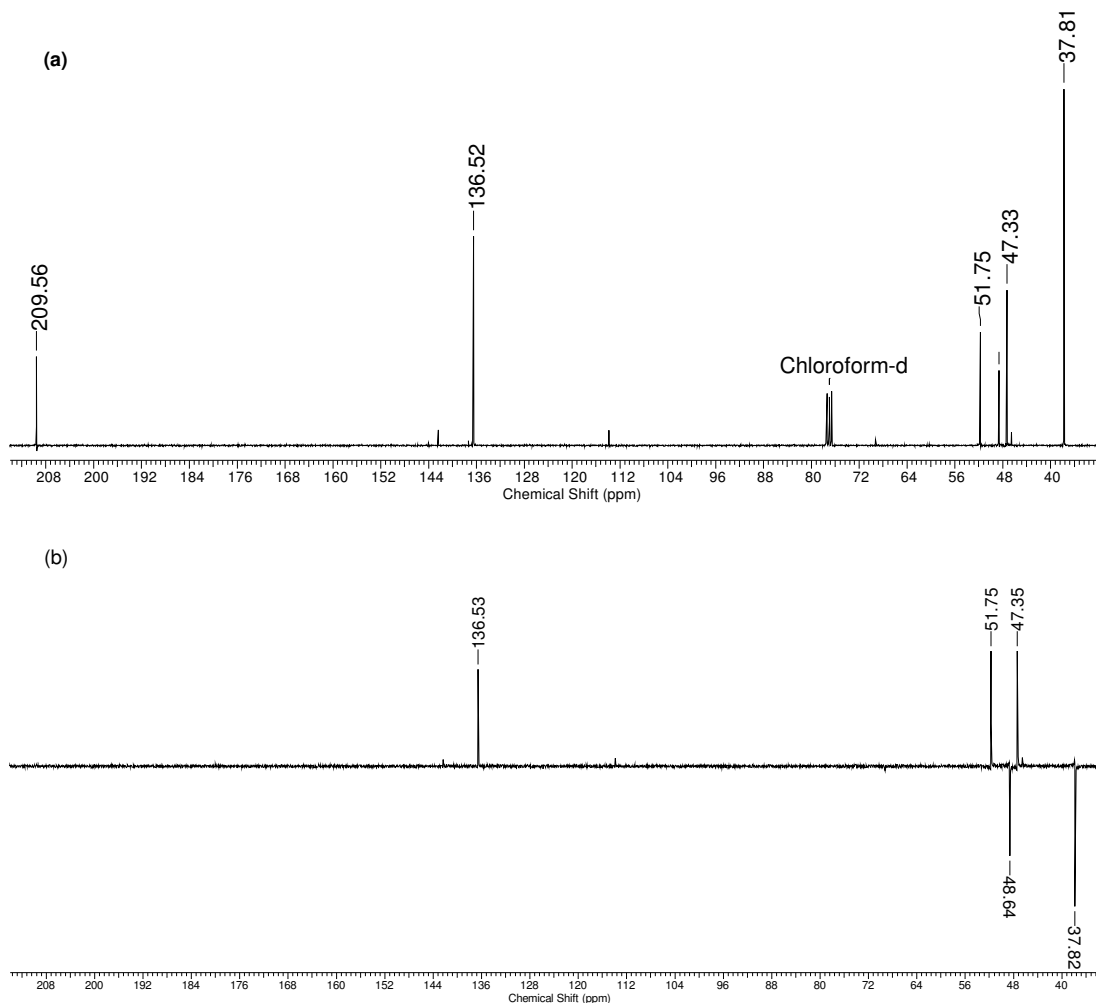


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **28**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 11: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **28**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1 e 8	3,41 (m, 2H)	51,8	CH
2 e 7	3,18 (m, 1H)	47,3	CH
3 e 6	-----	209,6	C
4	2,60 (m, 1H)	37,8	CH ₂
4'	2,27 (m, 1H)		
5	2,60 (m, 1H)	37,8	CH ₂
5'	2,27 (m, 1H)		
9 e 10	6,13 (t, 2H, J=1,7)	136,5	CH
11a	1,32 (d, 1H, J= 8,8)	48,6	CH ₂
11b	1,44 (td, 1H, J= 8,8; J= 1,9)		

Espectro de Infravermelho

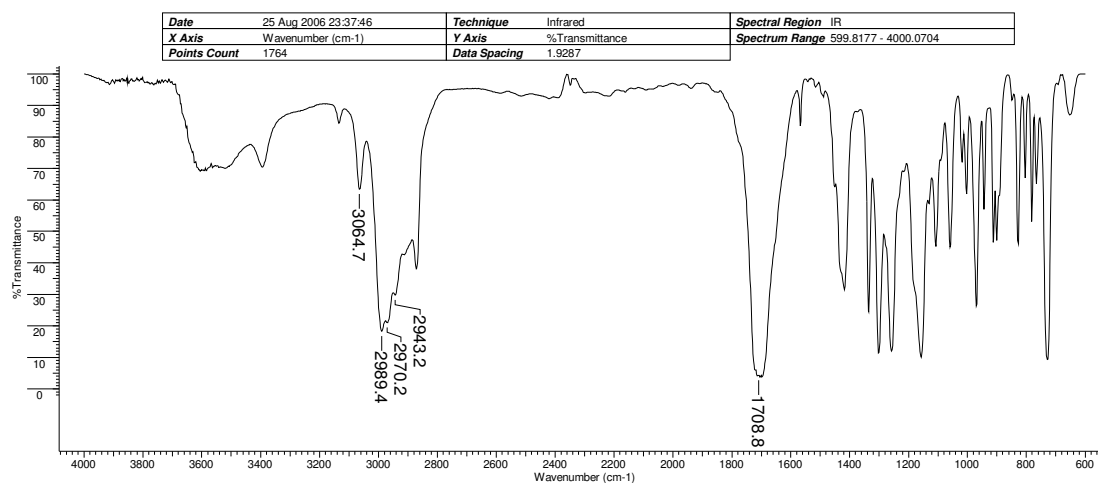
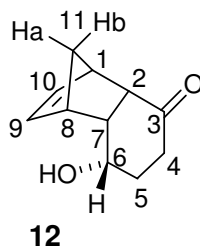


Figura 16: Espectro de IV do composto **28**.

Tabela 12: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **28**.

ν_{MAX} (cm ⁻¹)	Atribuição
3065	Deformação axial de C-H olefínico
2989, 2970 e 2943	Deformação axial de C-H alifático
1709	Deformação axial de C=O de cetona
1302	Deformação angular de C(C=O)C

***rel*-(1S,2S,6S,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0²⁷]undec-9-en-3-ona (12)**

No espectro de RMN de ^1H (Figura 17) do composto **12** observa-se um duplo-dublete ($J = 5,6; 2,9 \text{ Hz}$) em δ 6,04 e 6,12 ppm correspondente a hidrogênio de olefinas. A presença do multiplete em δ 4,23 ppm referente ao hidrogênio carbinólico (H6), confirma a transformação do composto **28** para **12**. Os hidrogênios da cabeça-de-ponte apresentam na forma de um multiplete, mas aparentemente aparecem como um singlete largo que absorvem em δ 3,18 (H_1) sofrendo efeito de desblindagem da carbonila em relação ao H8 absorvendo em δ 3,01. O dublete ($J = 8,4 \text{ Hz}$) em δ 1,21 ppm e duplo tripleto em δ 1,33 ppm referem-se aos H11b e H11a da ponte, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 18) observam-se onze sinais diferentes conferindo a assimetria do composto, podendo observar a presença de carbonila em δ 213,4 e ausência deste no DEPT 135. Além disso, no espectro de DEPT 135, confirma a presença de CH_2 referentes ao carbono da ponte (δ 49,8) e C-4 (27,6) e C-5 (35,9).

Os dados espectrais de RMN deste composto foram comparados com os dados descritos na literatura (BEATRIZ, 2001; MARCHAND, 1995), se confirmando a estrutura.

No espectro de infravermelho (Figura 19) se confirma a presença de banda larga de O-H em 3439 cm^{-1} característico de álcool. Observa-se ainda deformação axial de alcenos (3062 cm^{-1}), de alifático ($2872 - 2961 \text{ cm}^{-1}$) e carbonila de cetona

(1688 cm^{-1}). Além disso, deformação angular de C(C=O)C (1331 cm^{-1}) e C-O-H (1074 cm^{-1}).

Espectro de RMN de ^1H

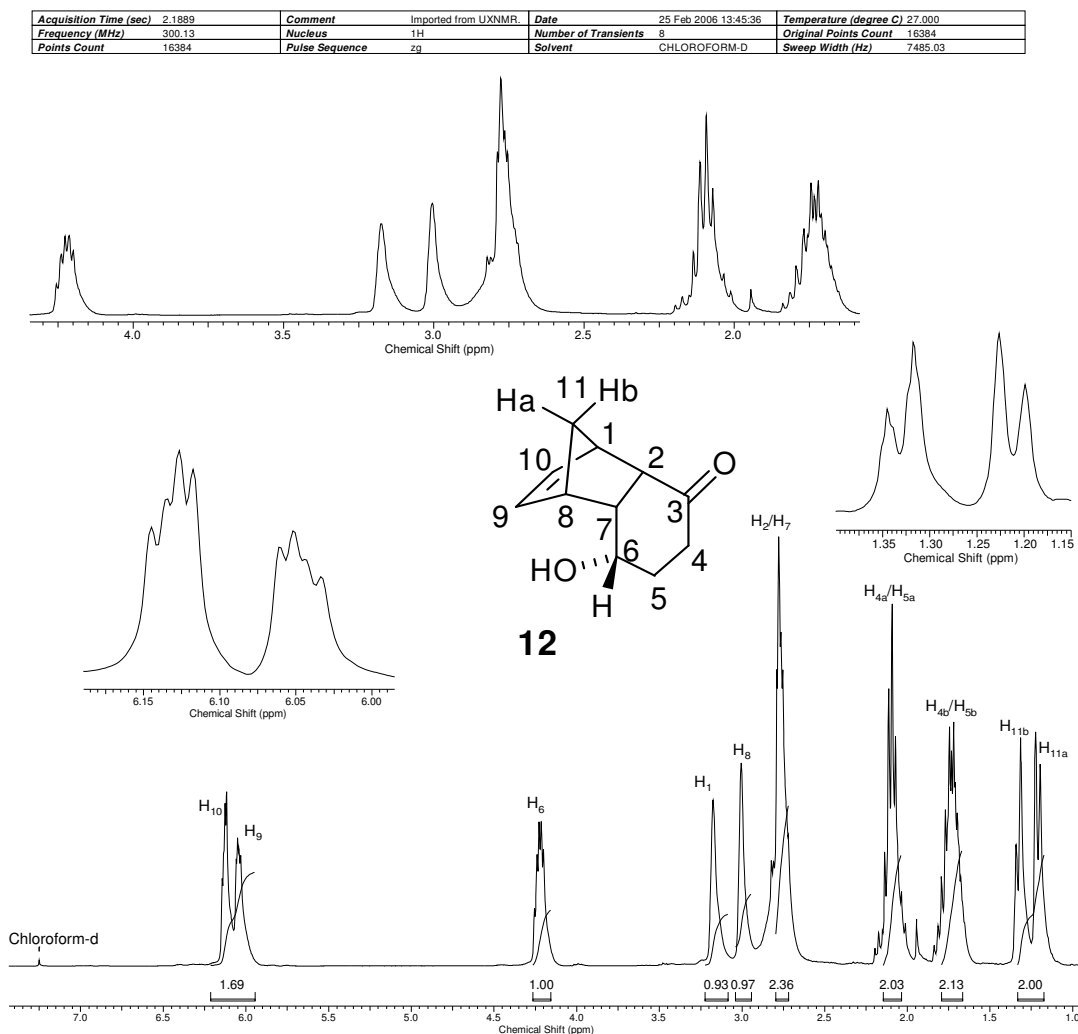


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **12**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Composto

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXMNR.	Date	25 Feb 2006 13:52:00	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	147	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39

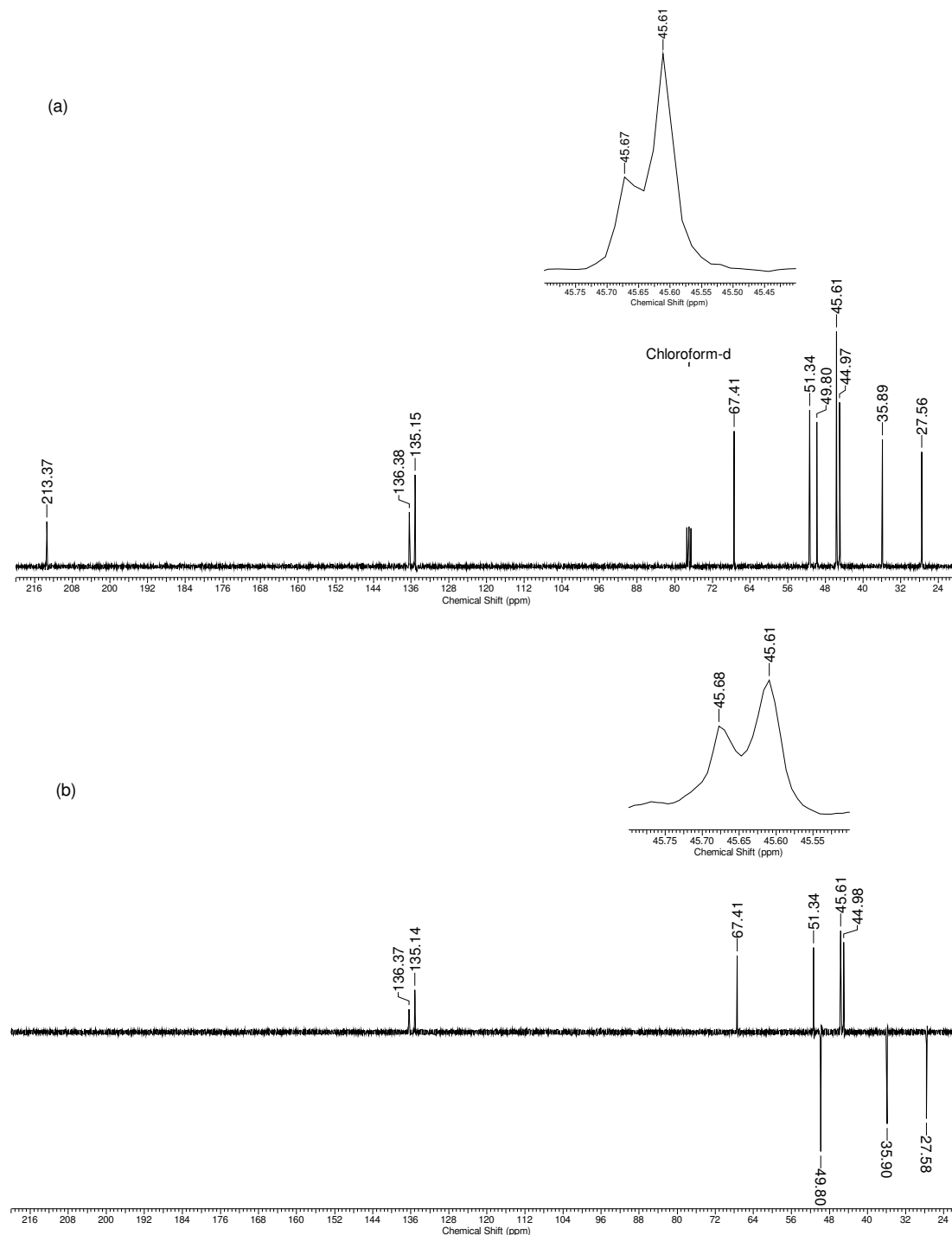


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **12**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 13: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **12**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1	3,18 (m, 1H)	45,6	CH
2	2,71 – 2,82 (m, 1H)	51,3	CH
3	-----	213,4	C
4b	1,65 – 1,84 (m, 1H)	27,6	CH ₂
4a	2,01 – 2,20 (m, 1H)		
5a	2,01 – 2,20 (m, 1H)	35,9	CH ₂
5b	1,65 – 1,84 (m, 1H)		
6	4,23 (m, 1H)	67,4	CH
7	2,71 – 2,82 (m, 1H)	45,7	CH
8	3,01 (m, 1H)	44,9	CH
9	6,05 (dd, 1H, J= 5,6; 2,9)	135,2	CH
10	6,13 (dd, 1H, J= 5,6; 2,9)	136,4	CH
11a	1,21 (d, 1H, J= 8,4)	49,8	CH ₂
11b	1,33 (dt, 1H, J= 8,4; J= 1,8)		

Espectro de Infravermelho

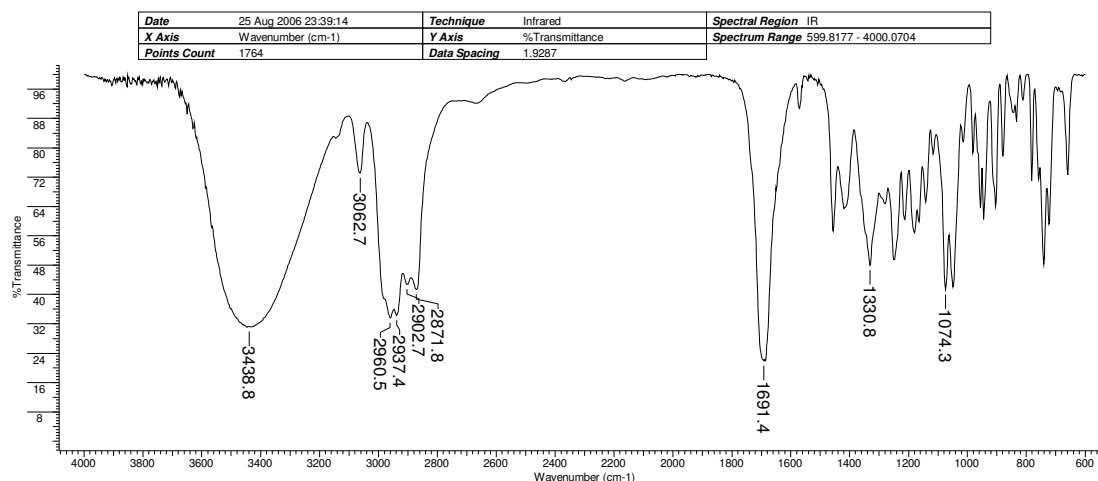
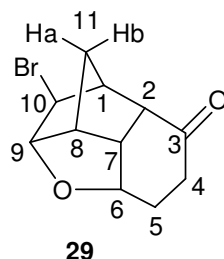


Figura 19: Espectro de IV do composto **12**.

Tabela 14: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **12**.

$\nu_{\text{MAX}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3439	Deformação axial de O-H
3062	Deformação axial de C-H olefínico
2961 - 2872	Deformação axial de C-H alifático
1688	Deformação axial de C=O de cetona
1331	Deformação angular de C(C=O)C
1074	Deformação angular de C-O

***rel*-(4S,5S,6S,8S,1R,2R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (29)**

Pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras **20** e **21**, respectivamente) observa-se assimetria na molécula. O espectro de RMN de ^1H revela 10 sinais com integrais relativas de 1: 1: 1: 1: 2: 1: 2: 2: 1: 1. O H11a em δ 1,66 (dd, $J = 11,2$ e $2,2$) torna-se mais blindado devido à presença do átomo de bromo. O dubleto mais desblindado em δ 4,59 refere-se ao H9 e o ddd ($J = 4,2; 4,0; 1,8$) em δ 4,28 ao H6.

O dubleto observado em δ 3,72 atribui-se ao H10. Este se encontra em uma região mais blindada devido à presença do cone de proteção da carbonila causando um efeito anisotrópico sobre o H10.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta onze sinais, e em δ 211,7 ppm observa-se sinal de grupo carbonila e ausência deste no espectro de DEPT 135°. No DEPT ainda observa-se três sinais de CH_2 referentes aos carbonos da ponte e C4 e C5. No espectro de gHSQC foi identificada a correlação direta de H-C e nos espectro de gHMBC foram observadas as correlações (Tabela **16** e figuras **22** e **23**, respectivamente).

No espectro de IV (Figura **24**) podem-se observar bandas de absorção de deformações axiais de carbonila (1697 cm^{-1}), C-H de alifático (2982 , 2951 e 2883 cm^{-1}) e deformação axial de C-Br (1184 cm^{-1}).

Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	2.6935	Comment	Imported from UXXNMR.	Date	17 Nov 2005 18:10:08	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8	Original Points Count	16394
Points Count	16394	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6082.73

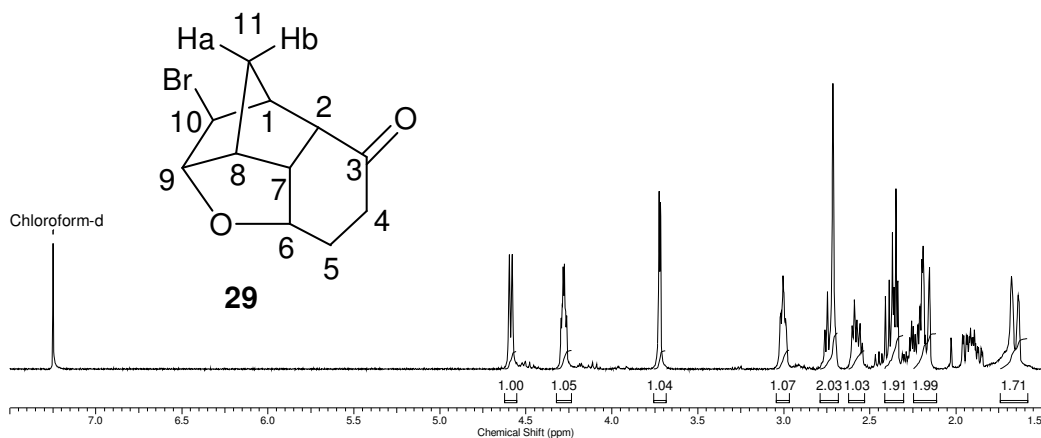
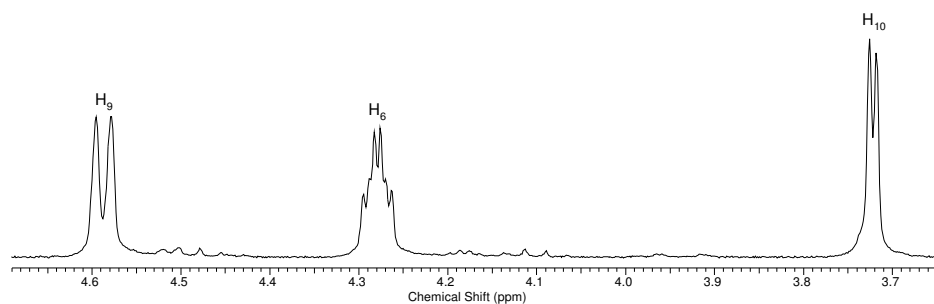
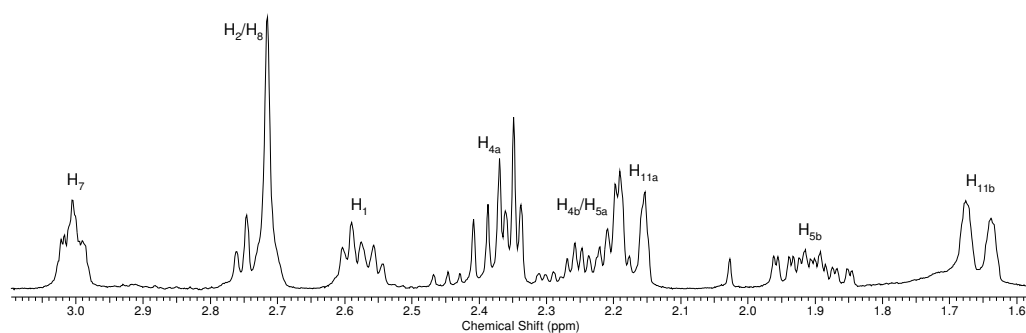


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **29**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	20 Dec 2005 23:32:16
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000		

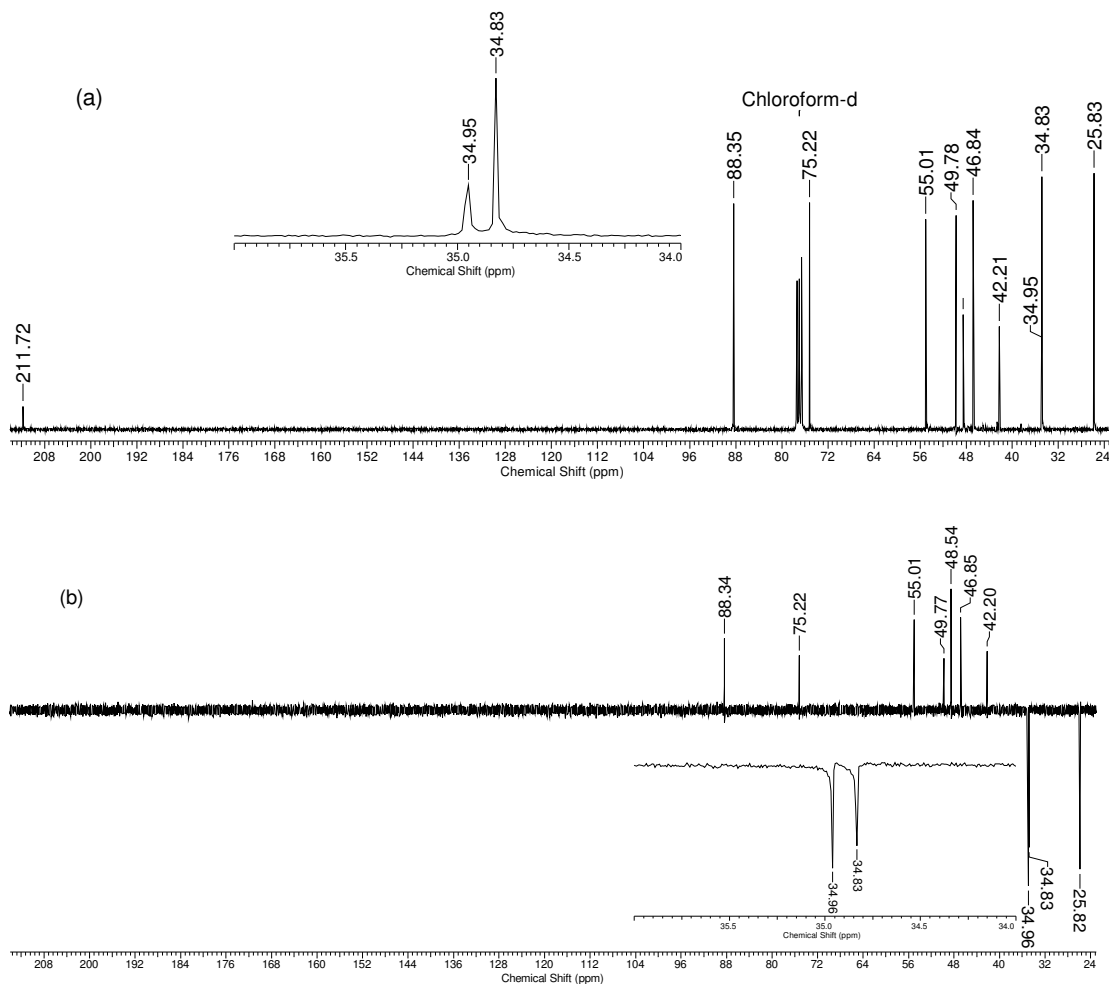


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **29**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 15: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **29**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,54 – 2,60 (m, 1H)	42,2	CH
2	2,69 - 2,77 (m, 1H)	49,8	CH
3	-----	211,7	C
4a	2,34 - 2,41 (m, 1H)	35,0	CH ₂
4b	2,18 – 2,31 (m, 1H)		
5a	2,18 – 2,31 (m, 1H)	25,8	CH ₂
5b	1,85 – 1,96 (m, 1H)		
6	4,28 (ddd, J = 4,2; 4,0; 1,8, 1H)	75,2	CH
7	3,00 (m, 1H)	46,8	CH
8	2,69 - 2,77 (m, 1H)	48,5	CH
9	4,59 (d, J= 5,1, 1H)	88,4	CH
10	3,72 (d, J = 2,3, 1H)	55,0	CH
11a	2,17 (dd, J = 11,2; 1H)	34,8	CH ₂
11b	1,66 (d, J = 11,2; 2,2, 1H)		

Acquisition Time (sec)	(0.0136, 0.2028)	Date	15 Jan 2007 11:15:00	Frequency (MHz)	(75.48, 300.13)	Points Count	(256, 512)
Nucleus	(¹³ C, ¹ H)	Number of Transients	8	Original Points Count	(256, 512)		
Pulse Sequence	hsqcdegtp	Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(18867.92, 2525.25)	Temperature (degree C)	27.000

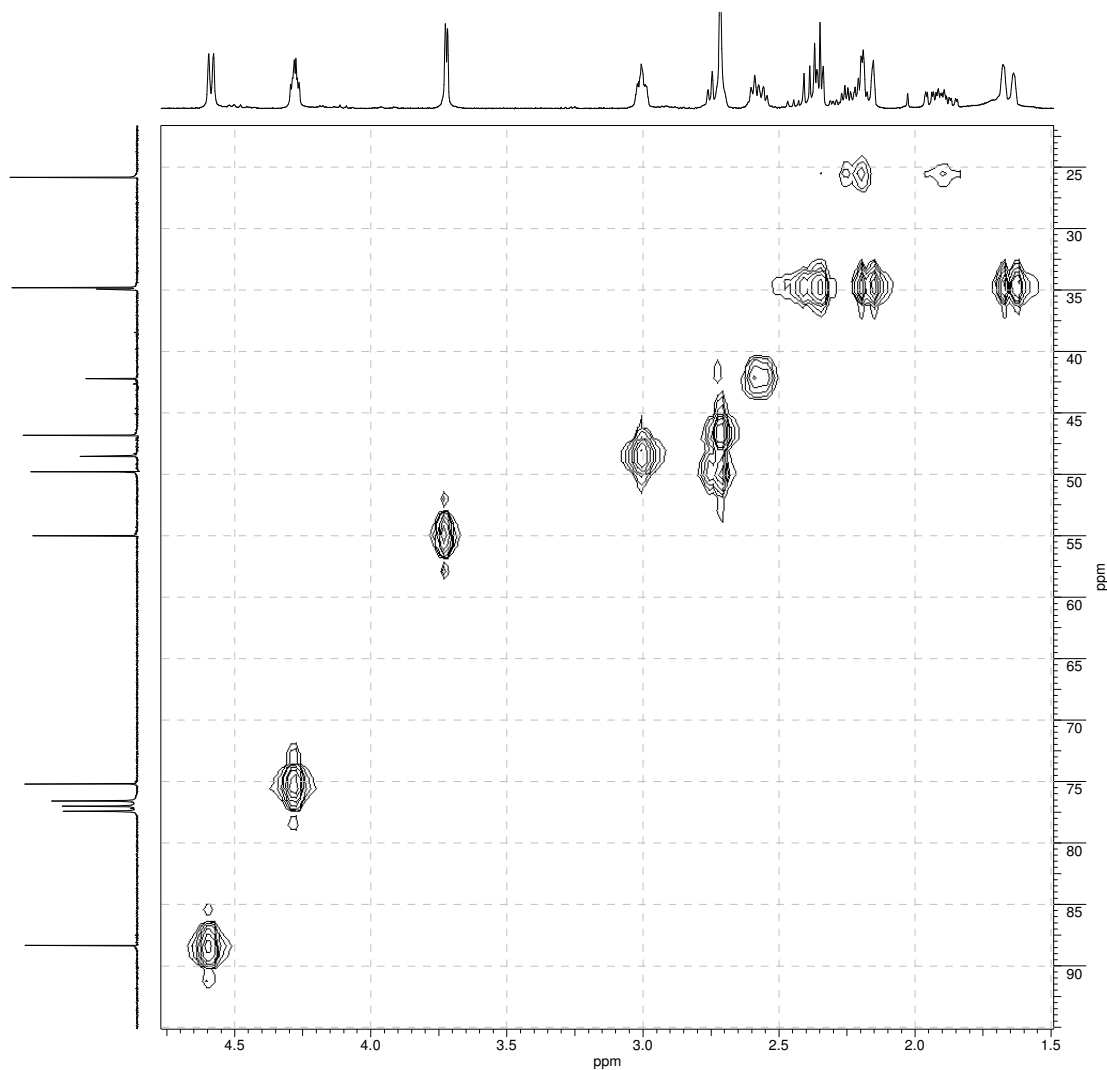


Figura 22: Espectro 2D em CDCl₃ (gHSQC; C/ H) do composto **29**.

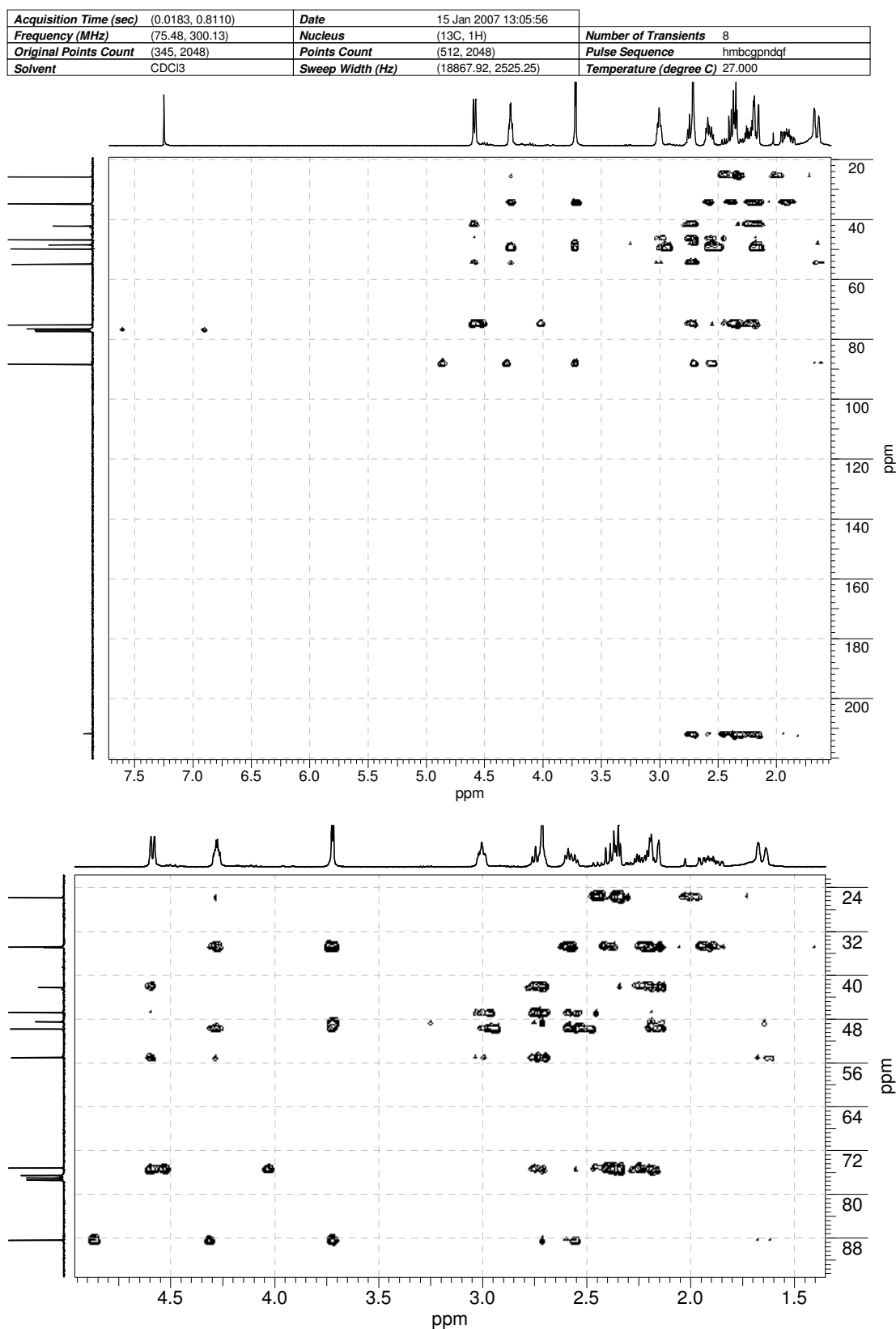


Figura 23: Espectro 2D em CDCl₃ (gHMBC; C/ H) do composto **29**.

Tabela 16: Dados espectrais (δ) do composto **29** obtidos por gHSQC [1J (C, H)] e gHMBC [nJ (C, H), n= 2 e 3].

	gHSQC		gHMBC	
	δ_C	δ_H	2J (C,H)	3J (C,H)
C-1	42,2	2,54 – 2,60	H2	H9; H8
C-2	49,8	2,69 – 2,77	H7; H1	H6
C-3	211,7	-----	H2; H4a; H4b	H5a
C-4a	35,0	2,34 – 2,41	H5a; H5b	H2
C-4b		2,18 – 2,31		
C-5a	25,8	2,18 – 2,31	H4a; H4b	H6; H2
C-5b		1,85 – 1,96		
C-6	75,2	4,28	H5a; H7	H5a; H8; H9; H2; H4a
C-7	46,8	3,00	H2; H8	H11b;
C-8	48,5	2,69 – 2,77	H11a; H11b; H9	H2; H10
C-9	88,4	4,59	H10; H8	H11b
C-10	55,0	3,72	H9; H8	H11b
C-11a	34,8	2,17	H1; H8	H7; H10; H2
C-11b	34,8	1,66		

Espectro de Infravermelho

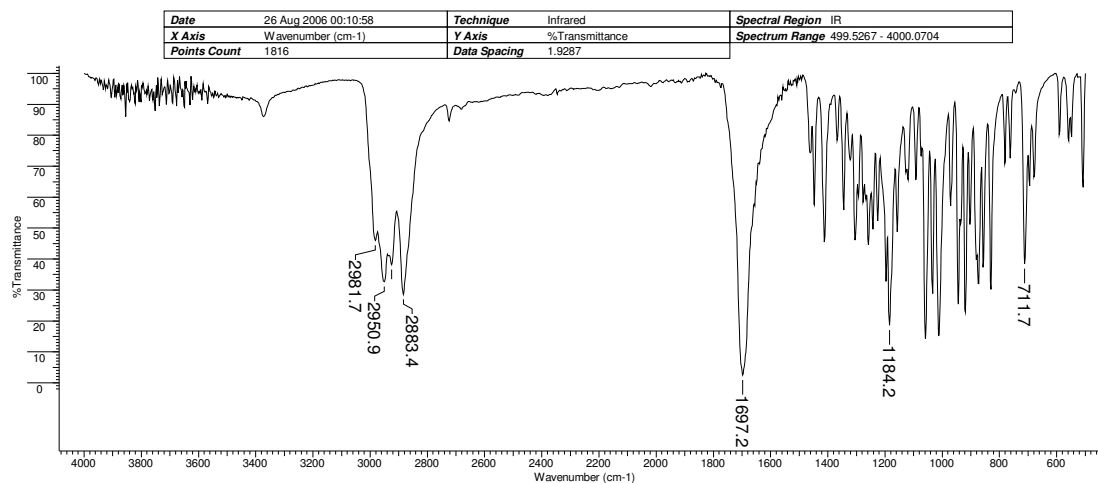
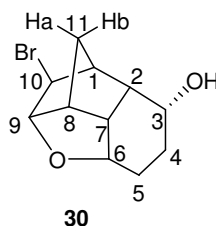


Figura 24: Espectro de IV do composto **29**.

Tabela 17: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **29**.

V_{MAX}	Atribuição
2982, 2951e 2883	Deformação axial de C-H alifático
1697	Deformação axial de C=O de cetona
1184	Deformação angular de C-Br

rel-(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ol (30)

No espectro de massas (Figura 32) observa-se o pico do íon molecular em $m/z = 260$ e 258. No espectro de RMN de ^1H (Figura 25) observa-se um dubleto em δ 4,55 referente ao H9, o dubleto em δ 4,25 referente ao H10, deslocado para região mais desblindada em relação ao material de partida 29, corroborando a transformação. Pode-se destacar o multiplete em δ 3,96 referente ao H3, que não foi notado no espectro do composto 29. Os acoplamentos dos hidrogênios da ponte seguem os mesmos padrões que o material de partida (composto 29), duplo-dubletos observados em δ 1,52 e 2,14.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) observam-se onze sinais e no DEPT 135. Pode-se notar a presença de três carbonos metilênicos. Ainda no DEPT 135 observa-se que nesta estrutura não existe carbono quaternário, confirmando a redução da carbonila. O CH_2 em δ 35,4 refere-se ao carbono da ponte. Com o espectro gHSQC foi possível correlacionar os carbonos e seus respectivos hidrogênios (Tabela 19 e Figura 27). O espectro de gCOSY foi essencial para atribuição dos sinais de H1, H2, H4, H5, H7 e H8 (Tabela 20 e Figura 29) que ainda não estavam definidos.

No espectro de IV (Figura 31) observa-se banda larga na região de 3269 cm^{-1} indicativa de grupo hidroxila. As bandas entre 2976 – 2922 cm^{-1} indicam deformação axial de C-H de alifático.

Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	2.3724	Comment	Imported from UXMNR.	Date	05 May 2005 12:11:44	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6906.08

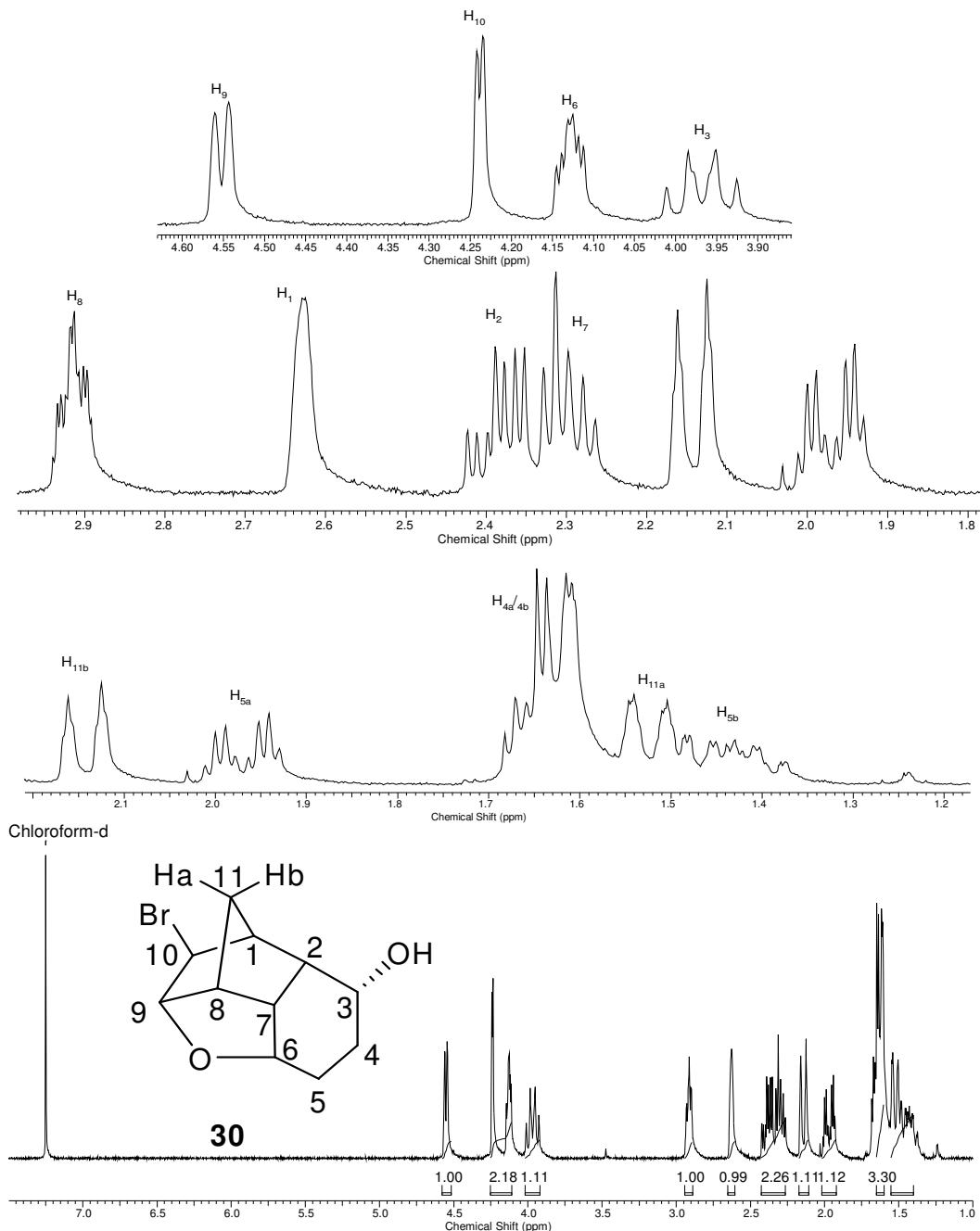


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	06 May 2005 11:39:44	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	2339	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39

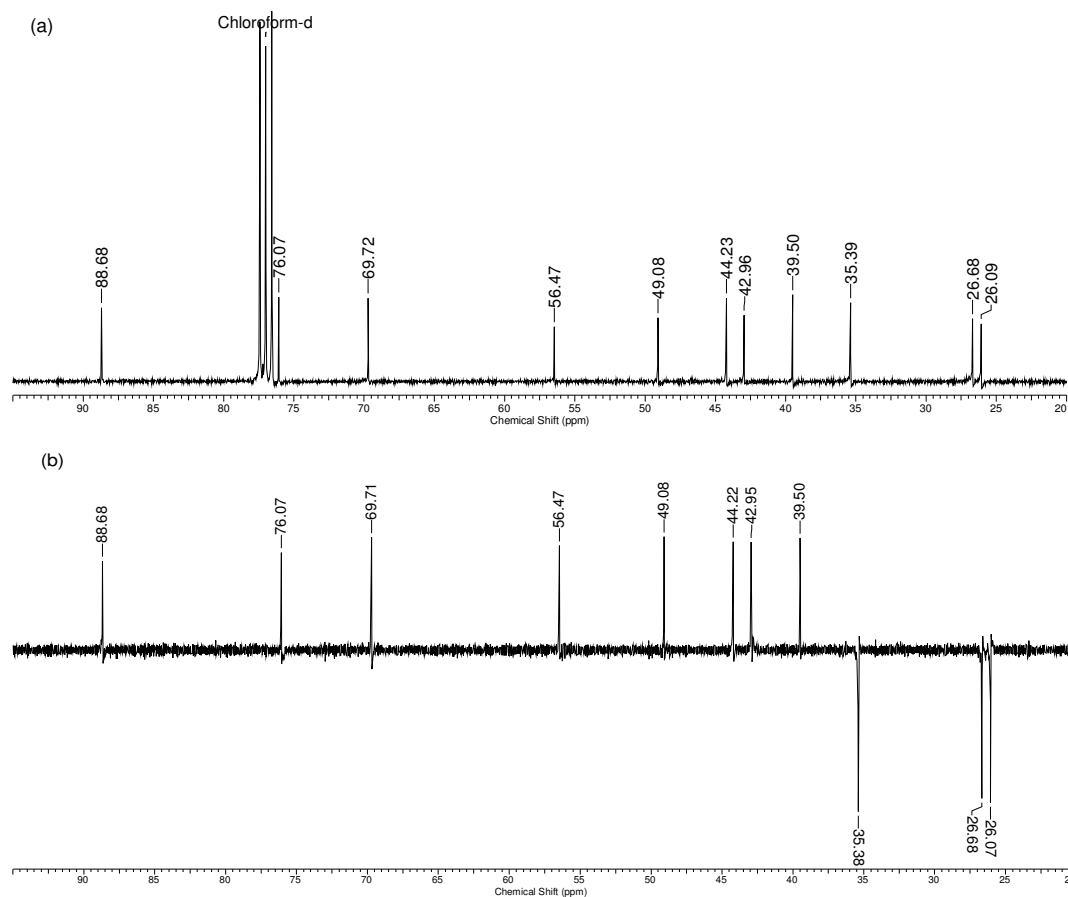


Figura 26: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **30**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, ↑(CH, CH₃); ↓(CH₂).

Tabela 18: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **30**.

Posição	$\delta (^1\text{H})$ [<i>m</i> , <i>J</i> (Hz), integral relativa]	$\delta (^{13}\text{C})$	DEPT
1	2,63 (m, 1H)	44,2	CH
2	2,41 (m, 1H)	42,9	CH
3	3,96 (dd, <i>J</i> = 7,9; 18,0, 1H)	69,7	CH
4 ^a	1,61 - 1,68 (m, 1H)	26,7	CH ₂
4b			
5 ^a	1,97 (ddd, <i>J</i> = 14,4; 6,8; 3,4, 1H)	26,1	CH ₂
5b	1,40-1,47 (m, 1H)		
6	4,13 (m, 1H)	76,1	CH
7	2,31 (m, 1H)	39,5	CH
8	2,92 (m, 1H)	49,1	CH
9	4,55 (d, <i>J</i> = 5,1, 1H)	88,7	CH
10	4,25 (dd, <i>J</i> = 17,9; 7,7, 1H)	56,5	CH
11 ^a	1,52 (dd, <i>J</i> = 11,1; 1,7, 1H)	35,4	CH ₂
11b	2,14 (d, <i>J</i> = 11,1; 1,7, 1H)		
-OH	Não observado	-----	-----

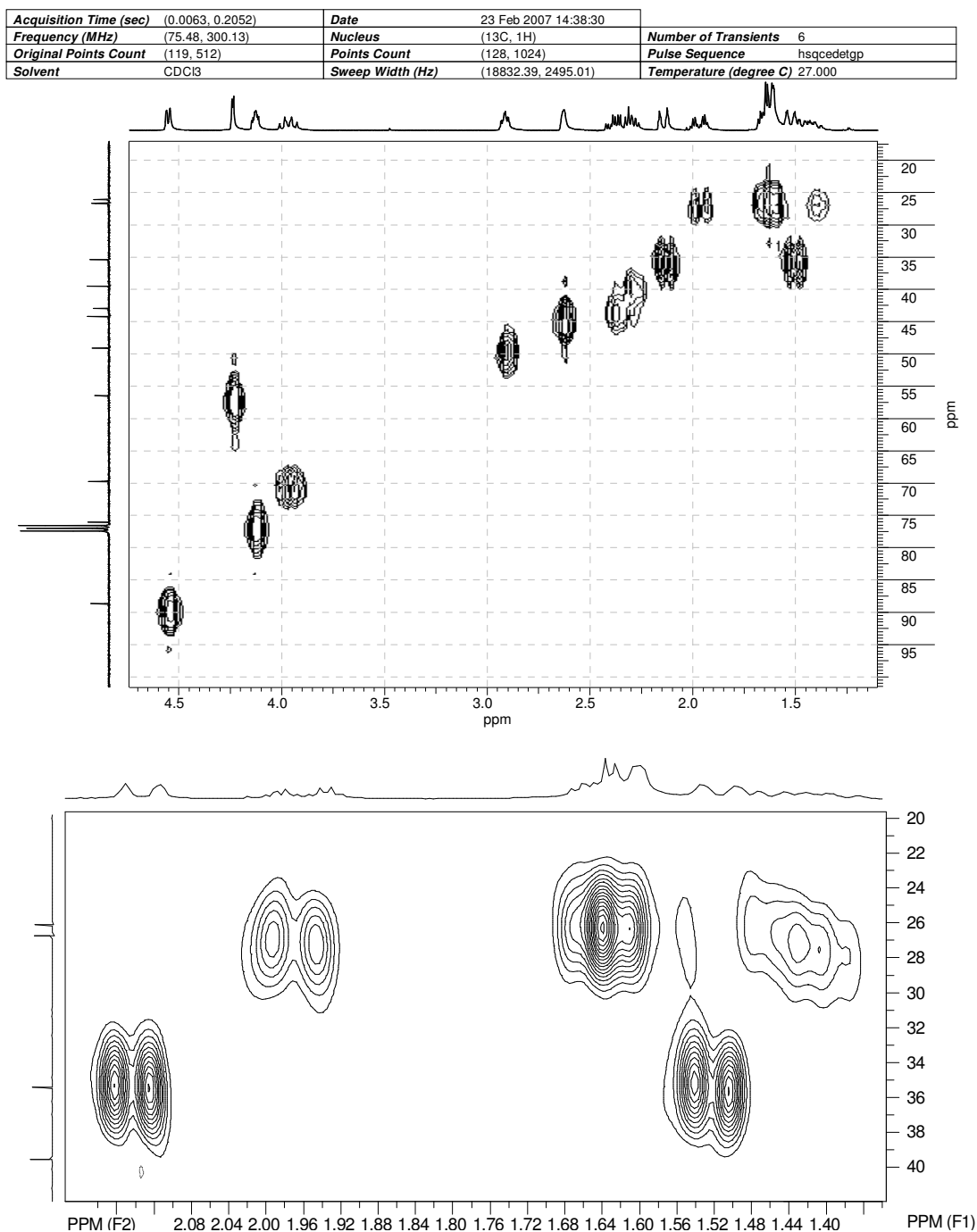


Figura 27: Espectro 2D em CDCl₃ (gHSQC; C/ H) do composto **30**.

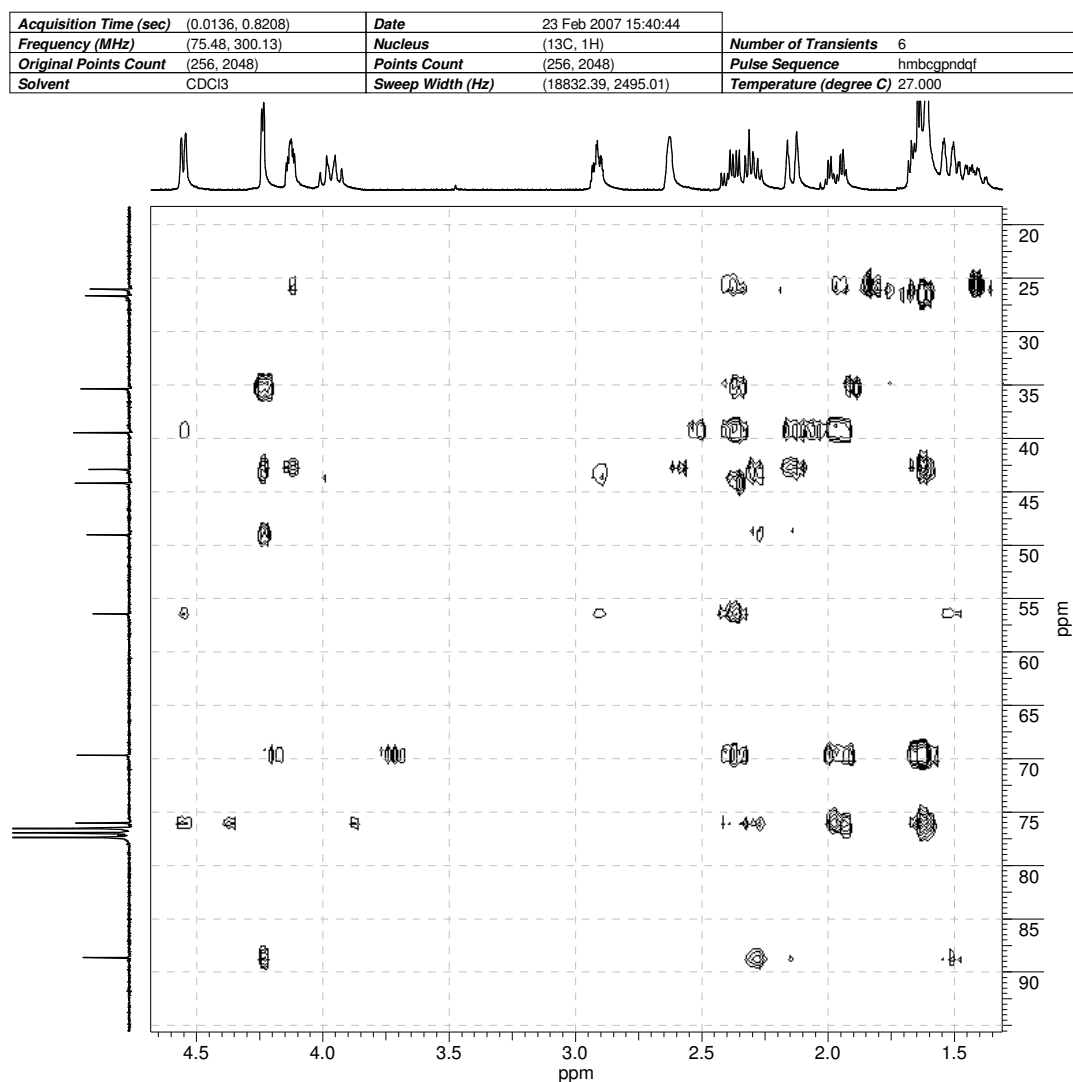


Figura 28: Espectro 2D em CDCl₃ (gHMBC; C/ H) do composto **30**.

Tabela 19: Dados espectrais (δ) do composto **30** obtidos por gHSQC [1J (C, H)] e gHMBC [nJ (C, H), n= 2 e 3].

Posição	gHSQC		gHMBC	
	δ_C	δ_H	2J (C,H)	3J (C,H)
C-1	44,2	2,63	H2; H11a	H10
C-2	42,9	2,41	H1	H4a
C-3	69,7	3,96	H4a	H5; H1
C-4a	26,7	1,60-1,68	H5	
C-4b				
C-5a	26,1	1,93-2,01	H6	
C-5b		1,40-1,47		
C-6	76,1	4,13	H5	H4a
C-7	39,5	2,31		H1
C-8	49,1	2,92		H10
C-9	88,7	4,55	H10	H11b
C-10	56,5	4,25	H1; H9;	
C-11a	35,4	2,14	H1	H10
C-11b		1,52		

*sinais que podem estar trocados

Acquisition Time (sec)	(0.1200, 0.4178)	Date	19 Mar 2007 16:01:52	Number of Transients	8
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)	Pulse Sequence	cosygpgf
Original Points Count	(294, 1024)	Points Count	(512, 1024)	Temperature (degree C)	27.000
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(2450.98, 2450.98)		

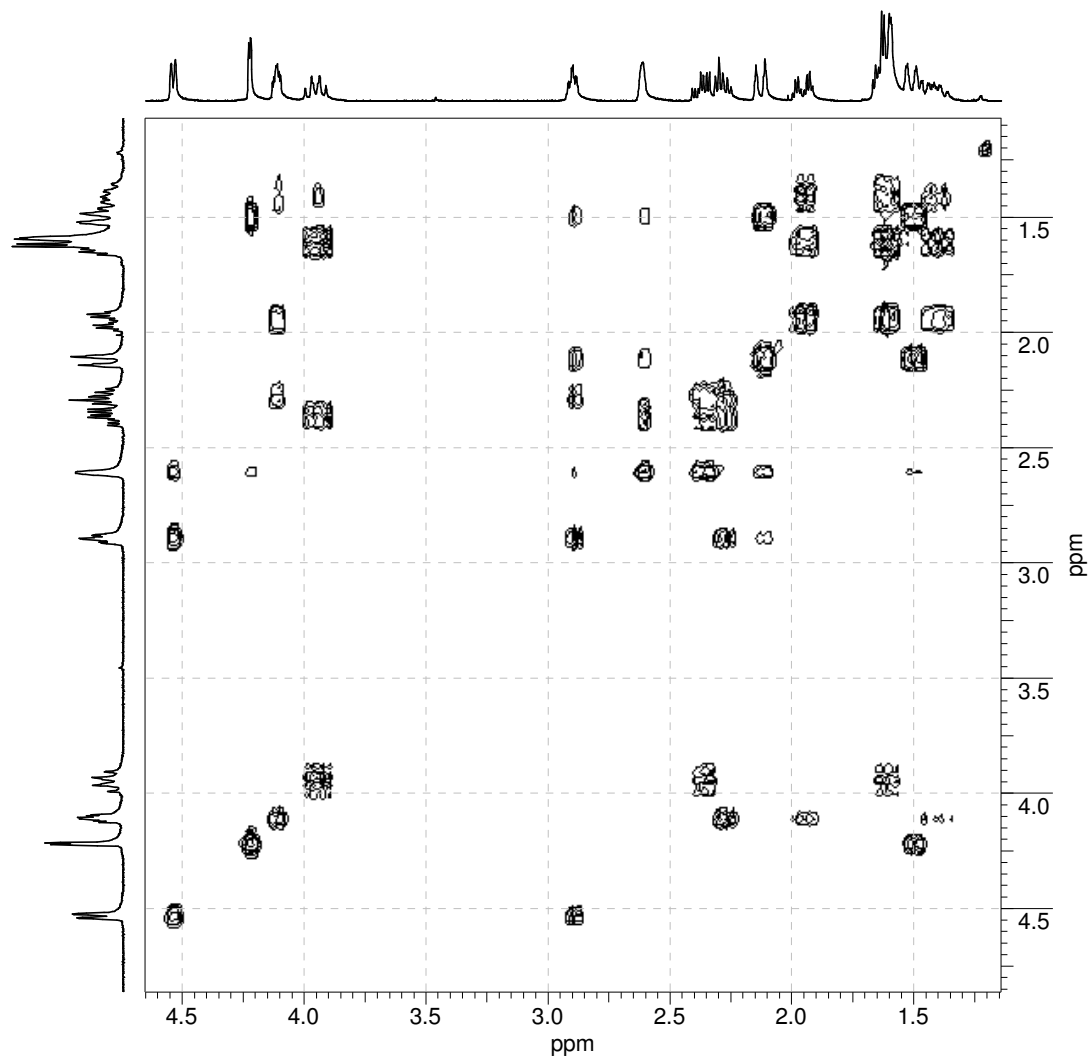


Figura 29: Espectro 2D (gCOSY 1H/ 1H) do composto **30**.

Tabela 20: Dados espectrais (δ) do composto **30** obtidos por gCOSY [nJ (H, H), $n= 2, 3$ e 4].

posição	(δ_H)	COSY: 1H / 1H
1	2,63	H2; H8(w); H10; H11a; H11b;
2	2,41	H1; H3; H7
3	3,96	H2; H4a; H4b
4a	1,60 – 1,68	H3; H4b; H5a; H5b
4b		H3; H4a; H5a; H5b
5a	1,93 – 2,01	H4a; H4b; H5b; H6
5b	1,40 – 1,47	H4a; H4b; H5a; H6
6	4,13	H5a; H5b; H7
7	2,31	H2; H6; H8
8	2,92	H1(w); H7; H9; H11a; H11b
9	4,55	H8
10	4,25	H1; H11b(w)
11a	2,14	H1; H8; H11b
11b	1,52	H1; H8; H10(w); H11a

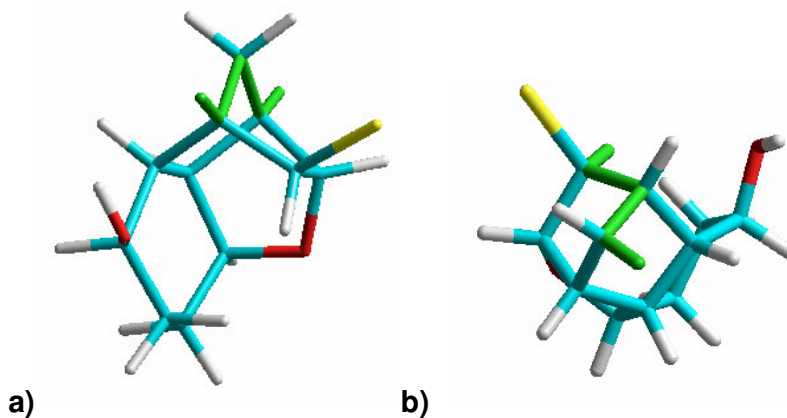


Figura 30: Acoplamento a longa distância observado no espectro de gCOSY do composto **30**. a) acoplamento em W entre H1 e H8. b) acoplamento em W entre H10 e H11b.

Espectro de Infravermelho

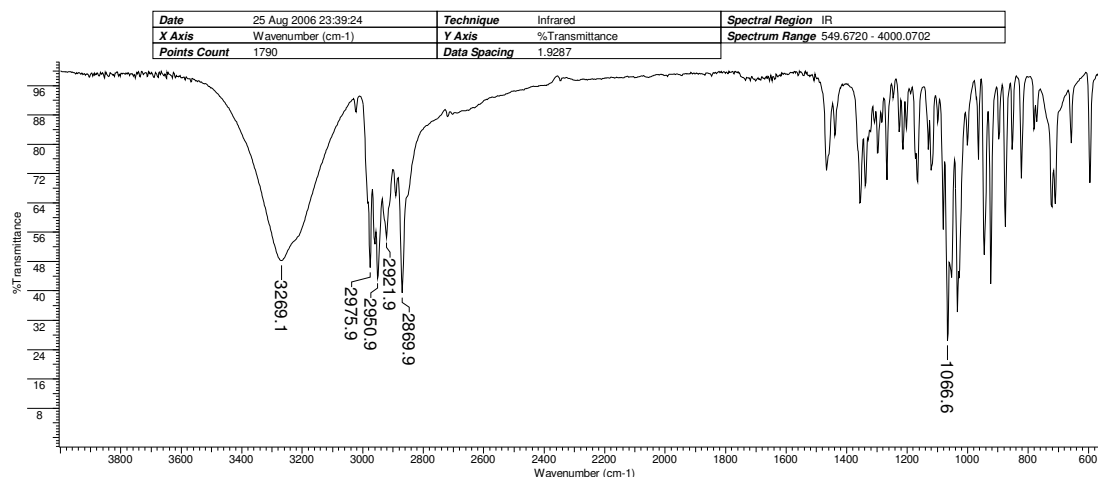


Figura 31: Espectro de IV do composto 30.

Tabela 21: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto 30.

ν_{MAX} (cm ⁻¹)	Atribuição
3269	Deformação axial de O-H
2922, 2951 e 2976	Deformação axial de C-H alifático
1067	Deformação angular de C-Br

Espectro de Massas

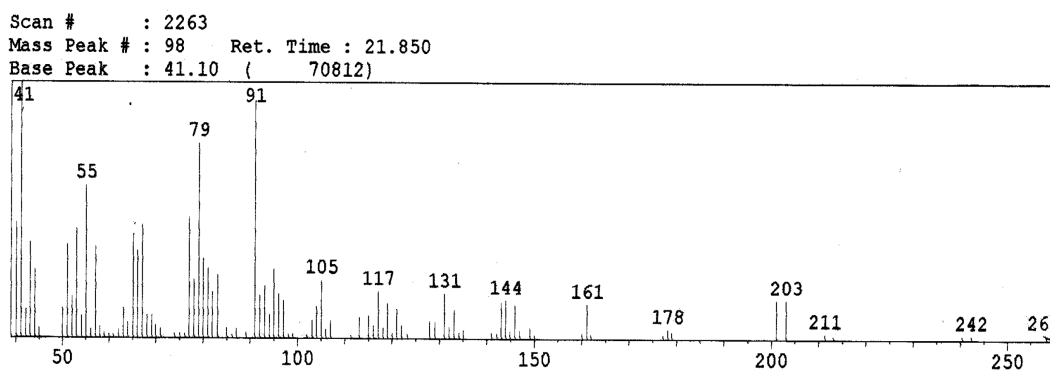
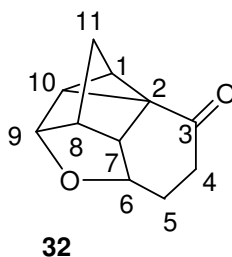


Figura 32: Espectro de massas do composto 30.

***rel*-(7S,8S,9S,11S,12S,1R,5R)-6-oxapentaciclo[6.4.0.0^{1,9}.0^{5,12}.0^{7,11}]dodecan-2-ona (32)**

O espectro de RMN de ¹H (Figura 33) mostra multipletos que aparecem em δ 4,56 e 4,36 e referem-se aos H6 e H9 respectivamente. Os dubletos ($J = 11,3$ Hz) em δ 1,73 e 1,79 referem-se aos hidrogênios da ponte seguindo os mesmos padrões de acoplamento do material de partida (composto 29).

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 34) observam-se onze sinais sendo δ 209,4 ppm indicativo de grupo carbonila de cetona. O DEPT 135° confirma com o desaparecimento desse sinal. Ainda no DEPT 135°, um sinal referente a um carbono quaternário em δ 33,1 não está presente, enquanto que sinais referentes C-2 e três CH₂ referentes a C-4, C-5 e C-11, em δ 38,3, 30,39 e 30,37 respectivamente, estão presentes.

Através da regressão linear entre os valores δ experimentais e teóricos obtidos com o programa GAUSSIAN '03, usando o método GIAO com teoria da funcional da densidade, B3LYP e conjunto de bases cc-PVDZ, ficou constatado que os valores de RMN de ¹³C possuem ótima correlação $r = 0,99975$ (Figura 37).

Pelo espectro de gHSQC foi possível identificar a conectividade de cada carbono ligado diretamente ao seu hidrogênio correspondente e no espectro de gHMBC foram observadas as correlações previstas (Tabela 23; figuras 35 e 36).

O espectro de IV (Figura 38) confirma a presença de grupo carbonila em 1695 cm⁻¹ e deformação axial de C-H de grupos alifáticos em 2872, 2941, 2955 e

2997 cm⁻¹.

Espectro de RMN de ¹H

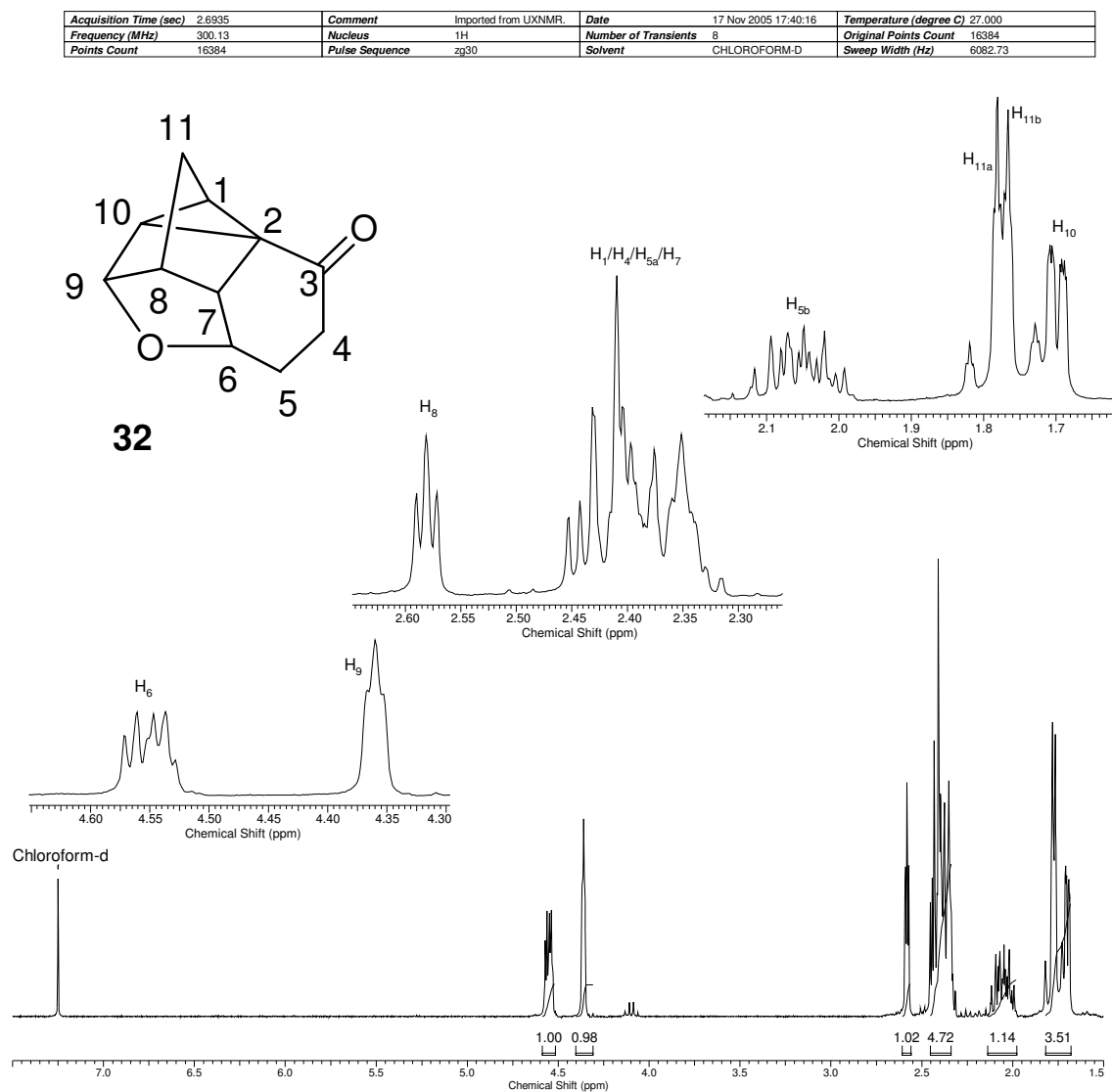


Figura 33: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **32**.

Espectro de RMN de ^{13}C

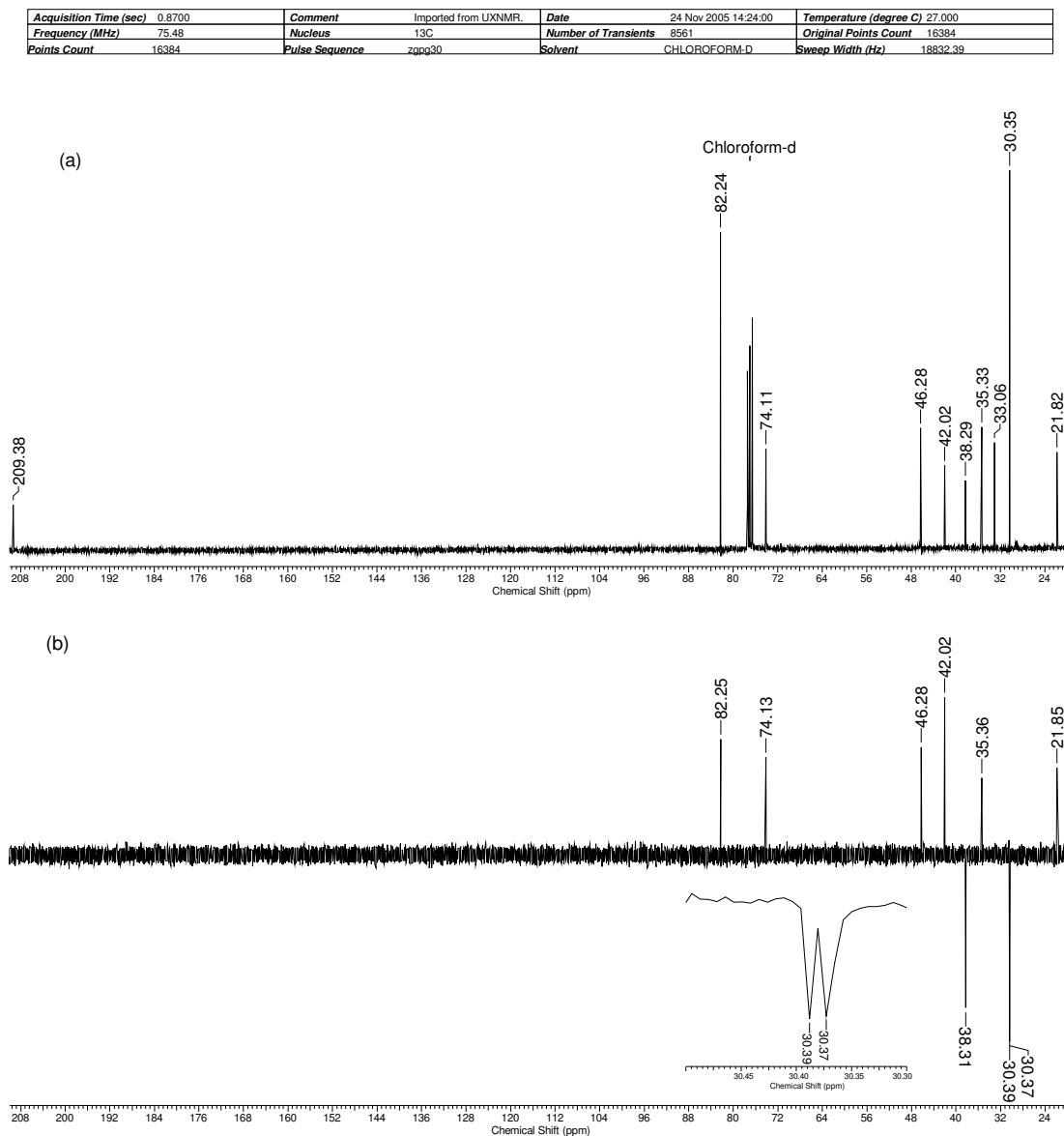


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **32**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 22: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **32**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,33 - 2,45 (m, 1H)	21,8	CH
2	-----	33,1	C
3	-----	209,4	C
4	2,33 - 2,45 (m, 1H)	38,3	CH ₂
5a	2,33 - 2,45 (m, 1H)	30,39	CH ₂
5b	1,98 - 2,15 (m, 1H)		
6	4,56 (dt, <i>J</i> = 7,0; 2,8; 2,8, 1H)	74,2	CH ₂
7	2,31 - 2,41 (m, 1H)	42,0	CH ₂
8	2,58 (t, 1H; <i>J</i> =2,8; 3,2)	46,3	CH ₂
9	4,36 (t, <i>J</i> =2,2; 2,9, 1H)	82,3	CH
10	1,69 (dd, 1H; <i>J</i> = 5,0; 0,8)	35,3	CH ₂
11a	1,79 (d, 1H, <i>J</i> = 11,3 Hz)	30,37	CH ₂
11b	1,73 (d, 1H, <i>J</i> = 11,3 Hz)		

Acquisition Time (sec)	(0.0177, 0.1708)	Date	16 Jan 2007 10:53:26	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	(75.48, 300.13)	Nucleus	(¹³ C, ¹ H)	Number of Transients	8
Original Points Count	(334, 512)	Points Count	(512, 512)	Pulse Sequence	hsqcetgpg
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(18867.92, 2997.60)		

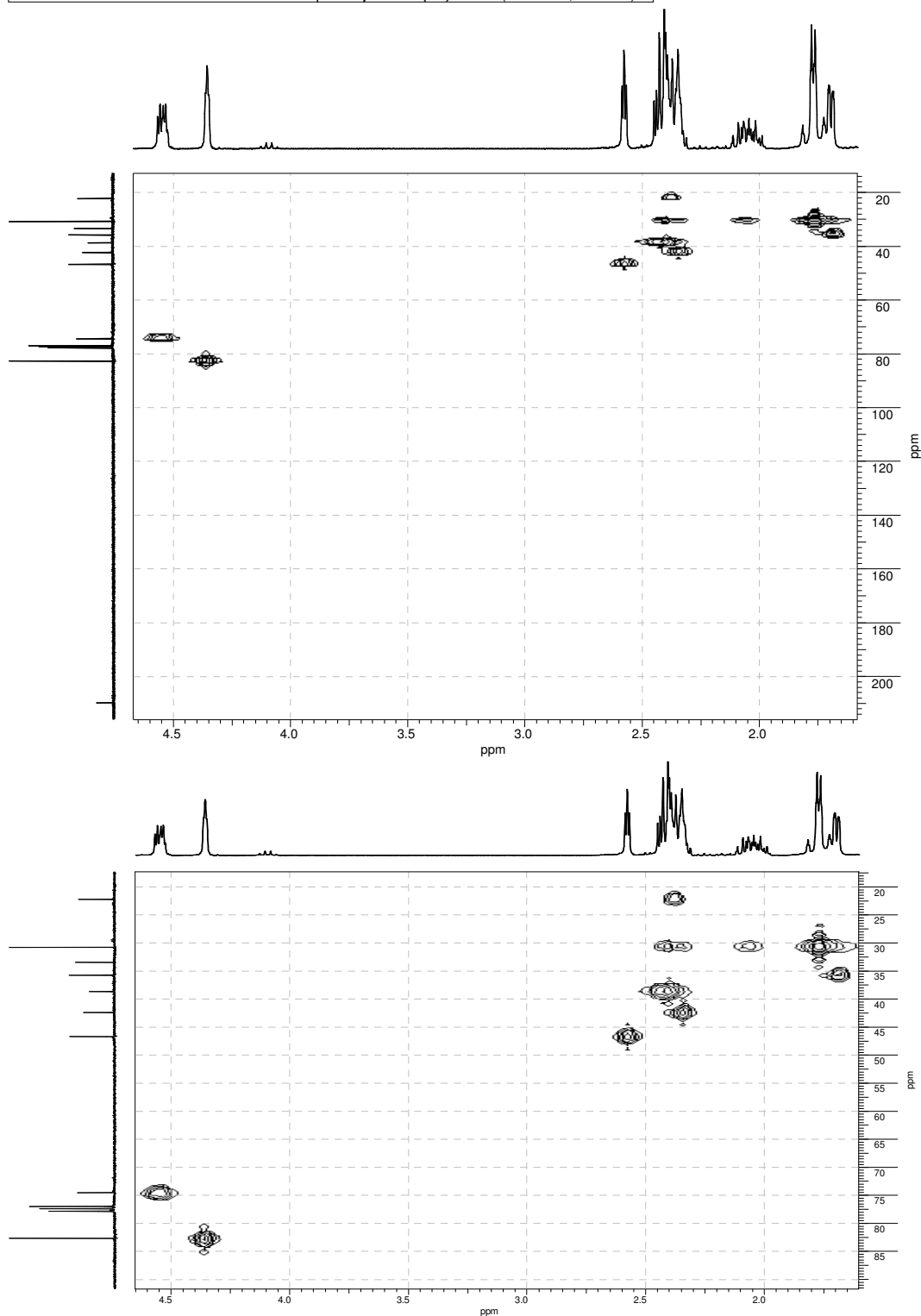


Figura 35: Espectro 2D em CDCl₃ (gHSQC; C/ H) do composto **32**.

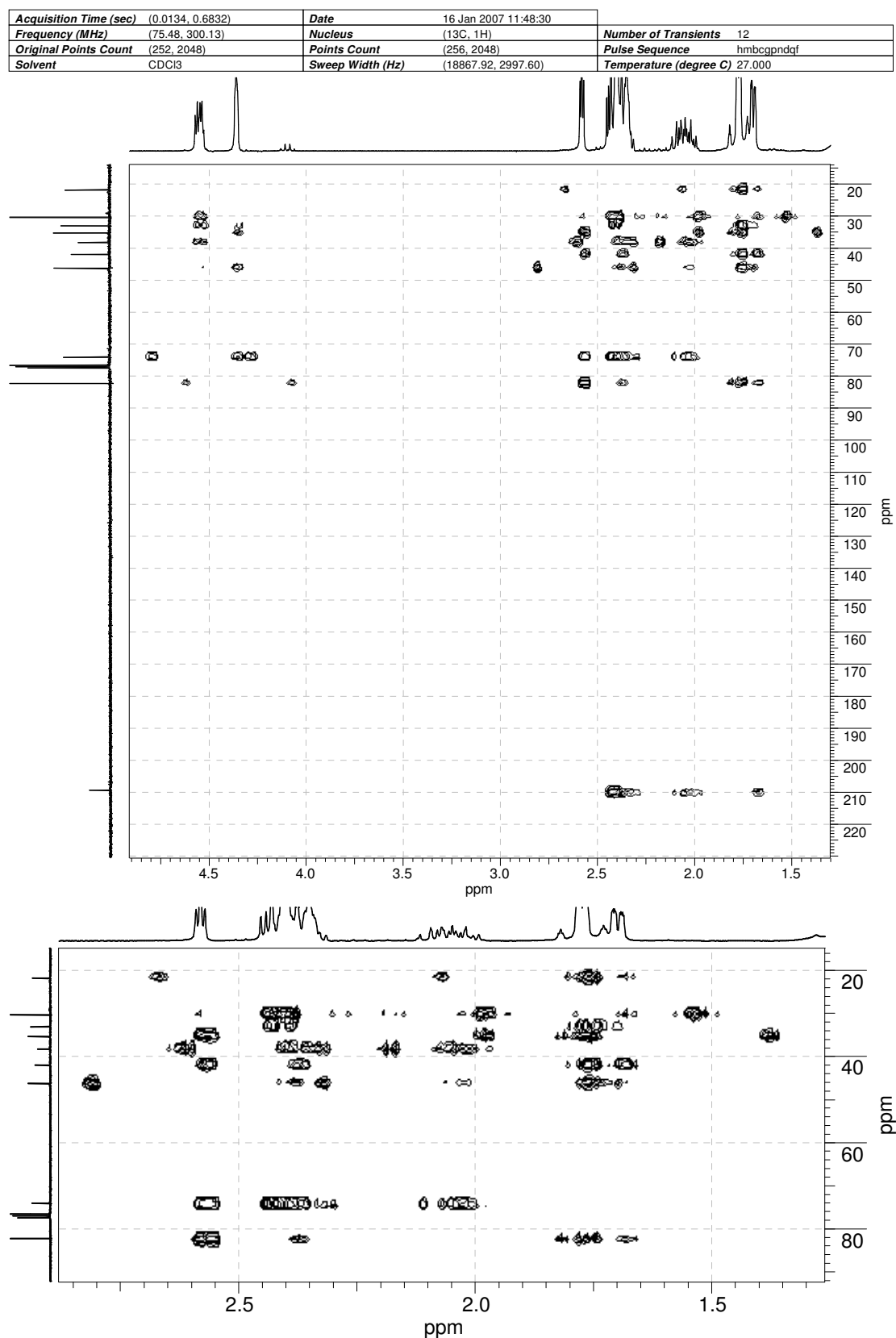


Figura 36: Espectro 2D em CDCl₃ (gHMBC; C/ H) do composto **32**.

Tabela 23: Dados espectrais (δ) do composto **32** obtidos por gHSQC [1J (C, H)] e gHMBC [nJ (C, H), $n=2$ e 3] em CDCl_3 .

	gHSQC		gHMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J(\text{C,H})$	$^3J(\text{C,H})$
C-1	21,8	2,31-2,45	H10; H11	
C-2	33,1	-----	H7; H1	H6; H9; H11a; H11b
C-3	209,4	-----	H4	H1; H5a; H5b; H7; H10
C-4	38,3	2,31-2,45	H5a; H5b	H6
C-5a	30,4	2,31-2,45	H6	
C-5b		1,98-2,12		
C-6	74,2	4,56	H5a; H5b; H7	H4; H8; H9
C-7	42,0	2,31-2,45	H8	H5a; H10; H11a; H11b
C-8	46,3	2,58	H9; H11a; H11b; H7	H6
C-9	82,3	4,36	H8; H10	H1; H7; H11a; H11b
C-10	35,3	1,69	H9	H8; H11a; H11b
C-11a	30,3	1,79	H1; H8	H7
C-11b		1,73		

Tabela **24**: Valores dos deslocamentos químicos teóricos e experimentais de RMN de ^{13}C e valores corrigidos do composto **32**.

	$\delta_{\text{C}} \text{ Exp.}^*$	$\delta_{\text{C}} \text{ Teor.}^*$	$\delta_{\text{C}} \text{ Teor. Corrig.}^*$	erro
C-1	21,8	28,76	21,07	0,728924
C-2	33,1	40,18	33,37	-0,2682458
C-3	209,4	203,02	208,72	0,6840138
C-4	38,3	44,07	37,56	0,7429633
C-5	30,4	37,38	30,35	0,0468222
C-6	74,2	78,36	74,48	-0,38088516
C-7	42,0	50,11	44,06	-2,0609691
C-8	46,3	52,91	47,08	-0,7760371
C-9	82,3	86,56	83,31	-1,0106936
C-10	35,3	42,34	35,69	0,6840138
C-11	30,3	35,01	27,80	2,5888619

* $\delta_{\text{C}} \text{ Exp.}$ = Deslocamento químico experimental de RMN de ^{13}C .

* $\delta_{\text{C}} \text{ Teor.}$ = Deslocamento químico teórico de RMN de ^{13}C .

* $\delta_{\text{C}} \text{ Teor. Corrig.}$ = Deslocamento químico teórico corrigido de RMN de ^{13}C .

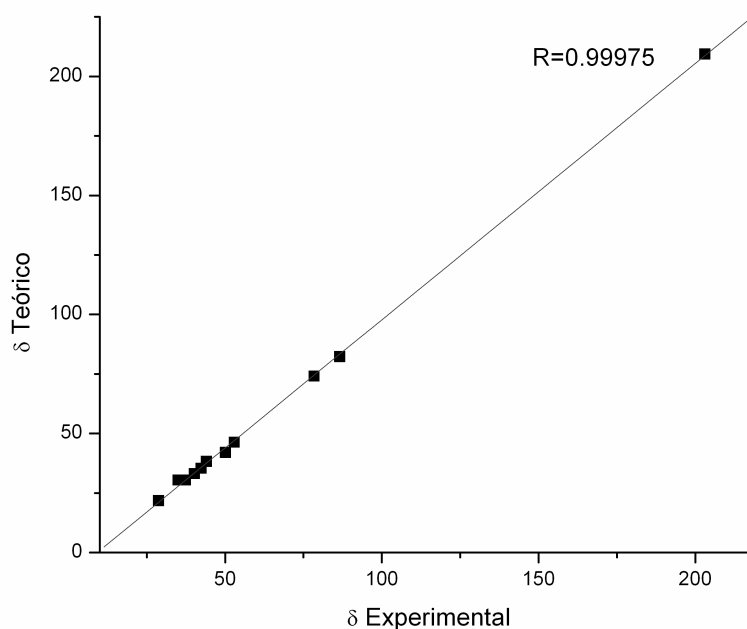


Figura 37: Regressão linear dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C do composto **32**.

Espectro de Infravermelho

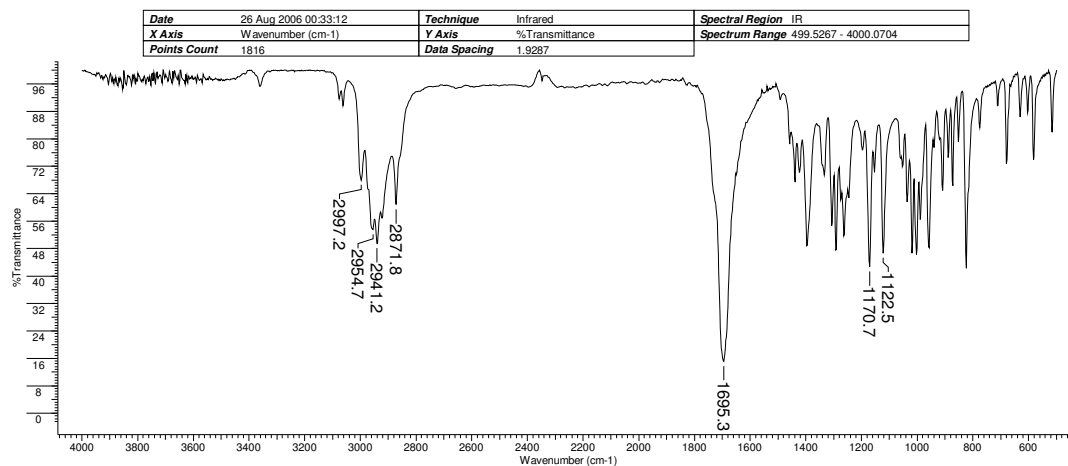


Figura 38: Espectro de IV em filme de CHCl_3 do composto **29**.

Tabela 25: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **32**.

VMAX	Atribuição
2872 - 2997	Deformação axial de C-H de alifático
1695	Deformação axial de C=O de cetona
1123 e 1171	Deformação axial de C-O de éter

Espectro de Massas

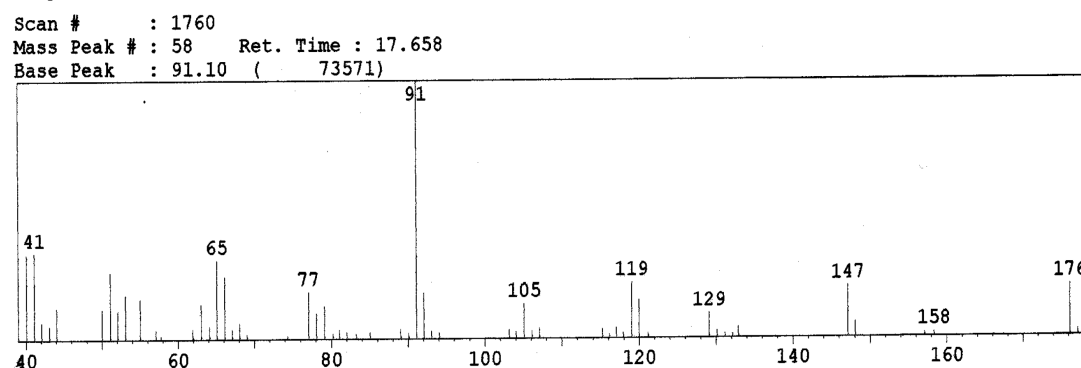
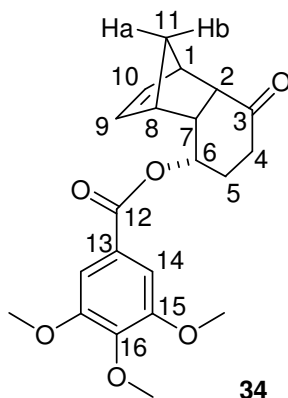


Figura 39: Espectro de Massas do composto **32**.

***rel*-(1S,3S,7S,2R,8R)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-eno (34)**



No espectro de RMN de ^1H (Figura 41) observam-se dois hidrogênios em δ 7,17, indicativo de aromático. O sinal intenso em δ 3,83 indica grupos metoxilas com integração para 9 prótons, revelando 3 grupos metoxilas na estrutura. Os duplo-dubletos ($J = 5,3; 2,9$ Hz) em δ 5,93 e 6,13 ppm indicam a presença de olefinas de H9 e H10, respectivamente e o sinal desprotegido observado como multiplete em δ 5,52 refere-se ao H6 ligado ao um grupo éster. Em δ 1,92-2,29 foram atribuídos para os dois grupos metilênicos referentes à H4 e H5. Os hidrogênios da ponte em δ 1,26 e 1,34 seguem os mesmos padrões de acoplamento do material de partida (composto 12).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 42) mostra sinais em δ 211,5 e δ 165,1 indicativo de grupos carbonilas de cetona e éster respectivamente, não sendo observado no DEPT 135°. Três sinais de carbonos quaternários referentes aos carbonos aromáticos substituídos foram confirmados, bem como os carbonos de olefinas que aparecem em δ 135,4 e 135,8. Foi possível identificar os 3 sinais relativos a CH_2 em 25,6 (C-4), 35,6 (C-5) e 49,7 (C-11).

Pelo espectro de gHSQC (Figura 43) foi possível de observar a correlação

dos carbonos ligados diretamente ao seu hidrogênio correspondente. Este espectro não foi elucidativo em relação aos hidrogênios metínicos H1, H2, H7 e H8. No espectro de gHMBC (Figura 44) foram observadas as correlações previstas mas também não foram decisivos para elucidação dos hidrogênios em questão.

Experimento de NOESY foi decisivo para definir a estereoquímica deste composto, sendo observado, neste experimento, correlação entre o H9 e H10 com as metoxilas, demonstrado na Figura 46. No espectro de COSY foi possível identificar as correlações dos hidrogênios H10 com H1, H9 com H8 e H6 com H7 e H5 (Figura 45).

No espectro de IV (Figura 47) observam-se a presença de bandas indicativas de deformação axial de aromático e olefinas em 3069 e 3107, deformação axial de alifático em 2839 e 2962, deformação axial de C=O de éster em 1711, deformação axial de C=O de cetona em 1589 e deformação axial de C-O em 1225 e 1126.

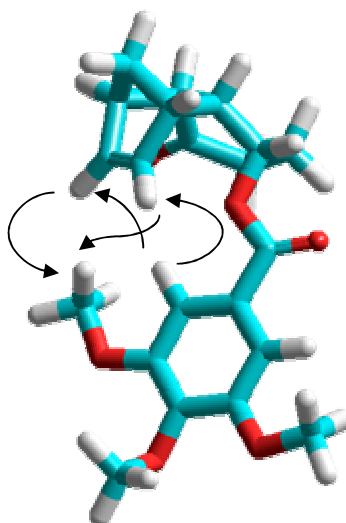


Figura 40: Estereoquímica do composto 34.

Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	5.1905	Date	22 Jan 2007 18:29:20	Frequency (MHz)	300.13	Sweep Width (Hz)	6313.13
Nucleus	^1H	Number of Transients	1	Pulse Sequence	zg	Solvent	CHLOROFORM-D
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Temperature (degree C)	27.000		

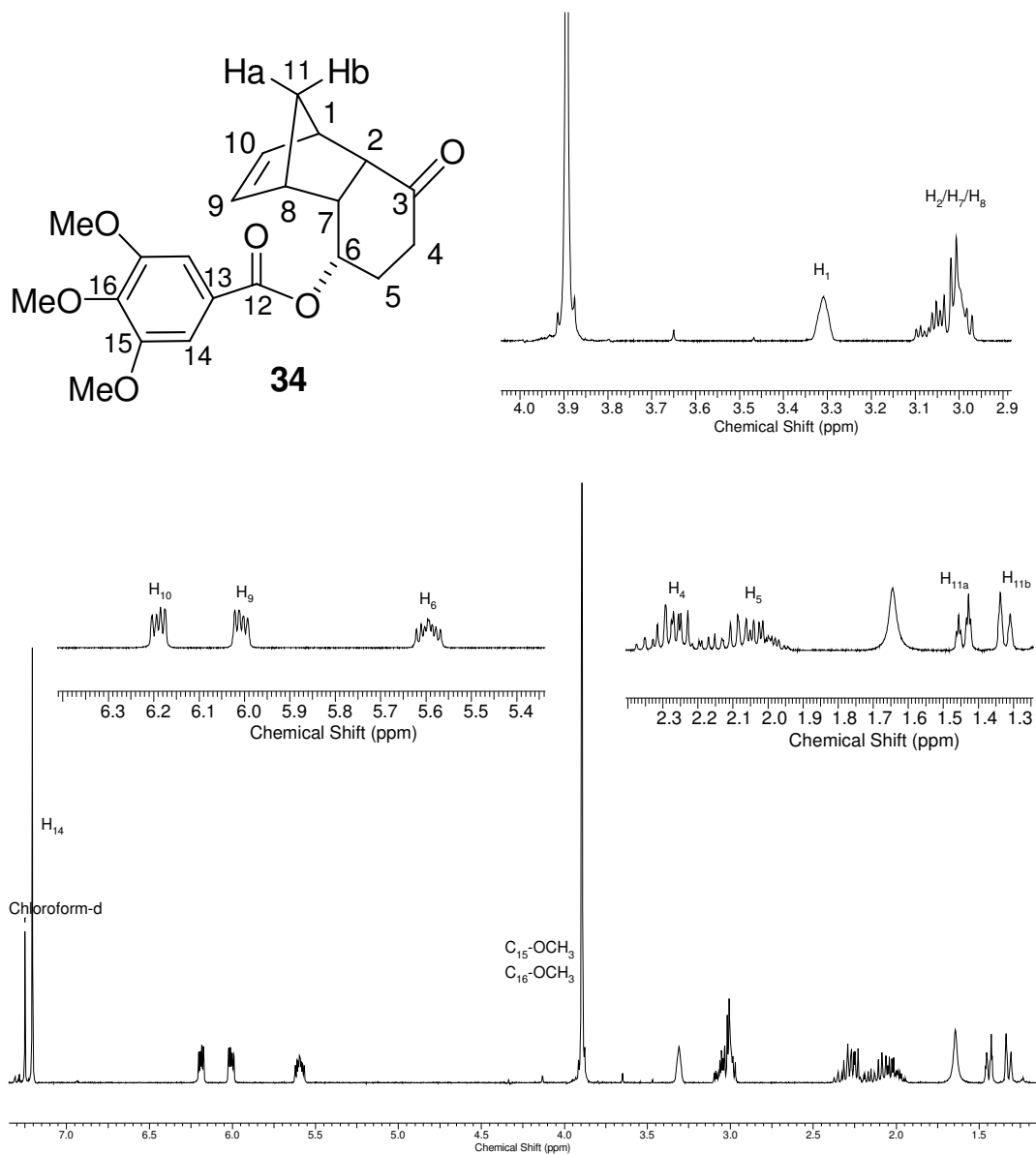


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 34.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	20 Jul 2005 11:12:00
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000		

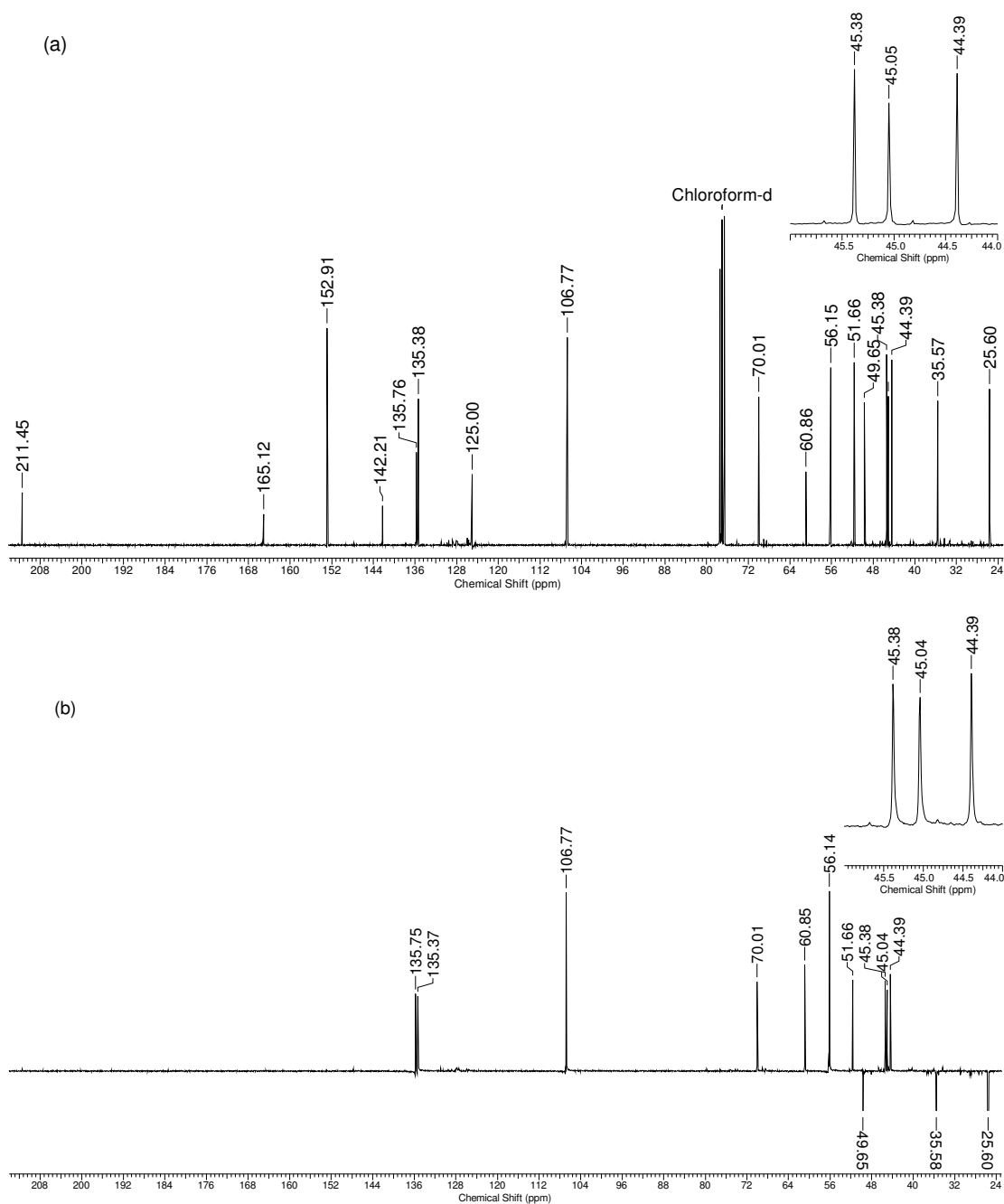


Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 34. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 26: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **34**.

H e C	δ_H [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	$\delta (^{13}\text{C})$	DEPT
1	3,24 (s. l., 1H)	45,0	CH
2	2,91-3,03 (m, 1H)	45,4	CH
3	-----	211,5	C
4	2,16-2,29 (m, 2H)	35,6	CH ₂
5	1,92-2,05 (m, 2H)	25,6	CH ₂
6	5,52 (m, 1H)	70,0	CH
7	2,91-3,03 (m, 1H)	44,4	CH
8	2,91-3,03 (m, 1H)	51,7	CH
9	5,93 (dd, 1H, J= 5,3; 2,9)	135,4	CH
10	6,12 (dd, 1H, J=5,3; 2,9)	135,8	CH
11a	1,34 (d, 1H, J=8,4)	49,7	CH ₂
11b	1,26 (d, 1H, J=8,4)		
12	-----	165,1	C
13	-----	142,2	C
14	7,14 (s, 2H)	106,8	CH
15	-----	152,9	C
16	-----	125,0	C
C ₁₅ -OCH ₃	3,83 (s, 6H)	56,1	CH ₃
C ₁₆ -OCH ₃	3,83 (s, 3H)	60,8	CH ₃

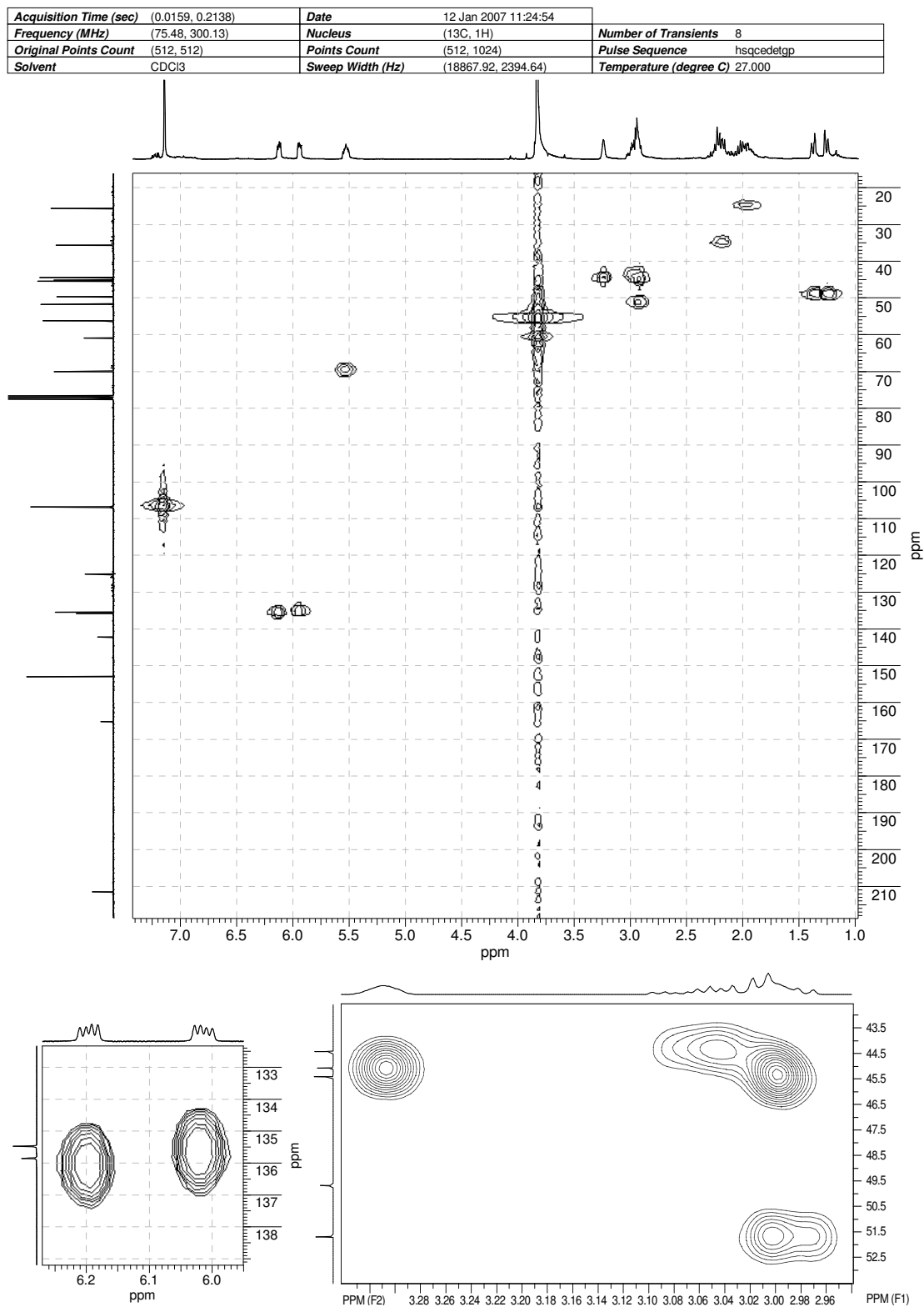


Figura 43: Espectro 2D (gHSQC; C/ H) do composto **34** e ampliação.

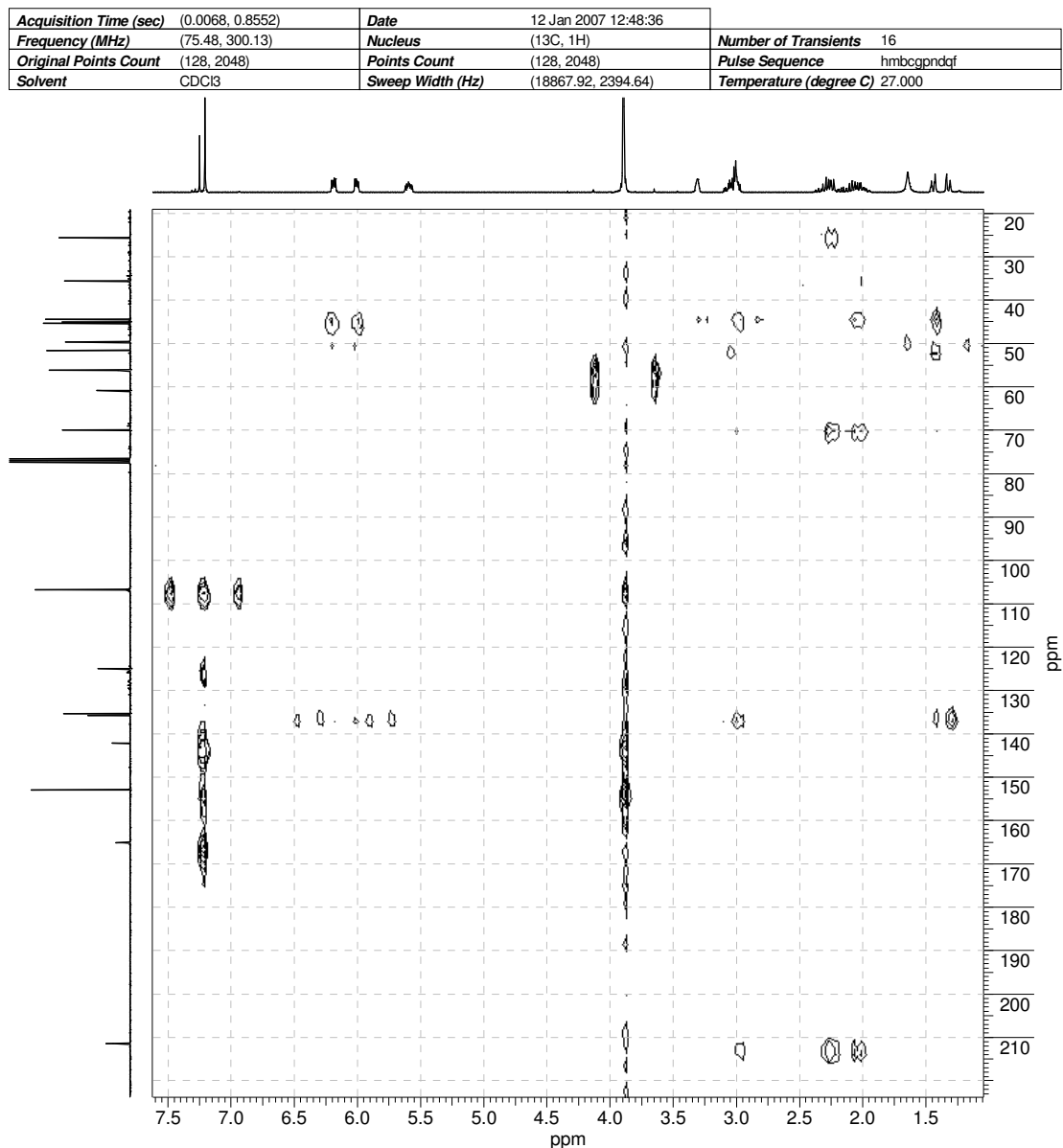


Figura 44: Espectro 2D (gHMBC; C/ H) do composto **34**.

Tabela 27: Dados espectrais (δ) do composto **34** obtidos por gHSQC [1J (C, H)] e gHMBC [nJ (C, H), n= 2 e 3] em CDCl_3 .

	gHSQC		gHMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J(\text{C,H})$	$^3J(\text{C,H})$
C-1	45,0	3,24	H2; H9; H11	H7; H9
C-2	45,4	2,91 – 3,03	H1; H7	H8
C-3	211,5	-----	H2; H4	H7; H5
C-4	35,6	2,16 – 2,29	H5	
C-5	25,6	1,92 – 2,05	H4	H7
C-6	70,0	5,52	H5; H7	H4; H2
C-7	44,4	2,91 – 3,03	H2; H8	H1
C-8	51,7	2,91 – 3,03	H7; H9; H11	H2
C-9	135,4	5,93	H8; H10	H11
C-10	135,8	6,12	H1; H9	H11
C-11a	49,7	1,34		H9; H10
C-11b		1,26		H9; H10
C-12	165,1	-----		H14
C-13	142,2	-----	H14	
C-14	106,8	7,14		H14
C-15	152,9	-----	H14	C15-OCH ₃
C-16	125,0	-----		H14
C15-OCH ₃	56,1	3,83		
C16-OCH ₃	60,8	3,83		

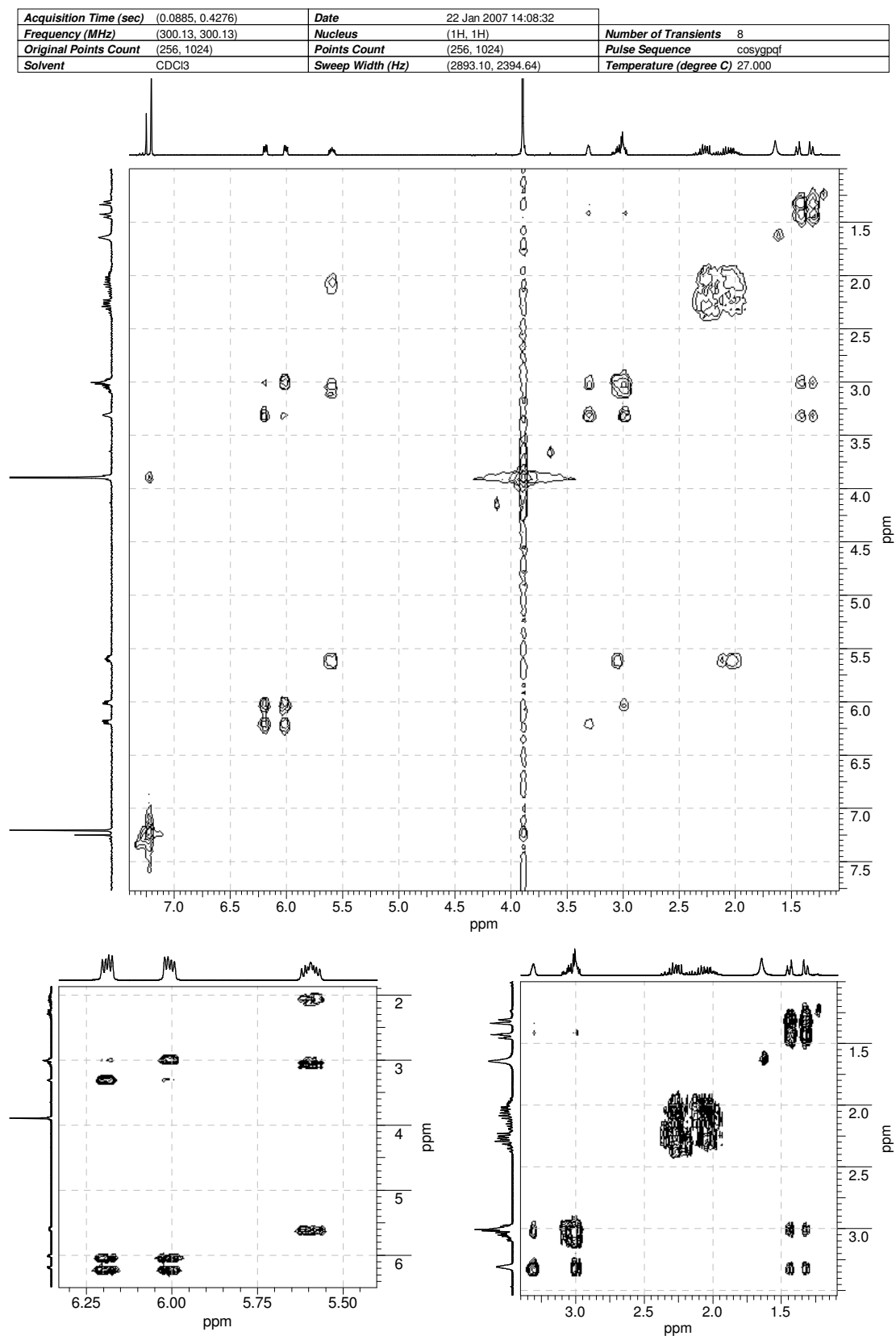


Figura 45: Espectro 2D (gCOSY $^1\text{H}/^1\text{H}$) do composto **34**.

Acquisition Time (sec)	(0.0725, 0.2900)	Date	18 Nov 2006 15:23:24	Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)
Nucleus	(1H, 1H)	Number of Transients	32	Original Points Count	(256, 1024)
Pulse Sequence	noesytp	Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(3531.07, 3531.07)
				Points Count	(256, 1024)
				Temperature (degree C)	27.000

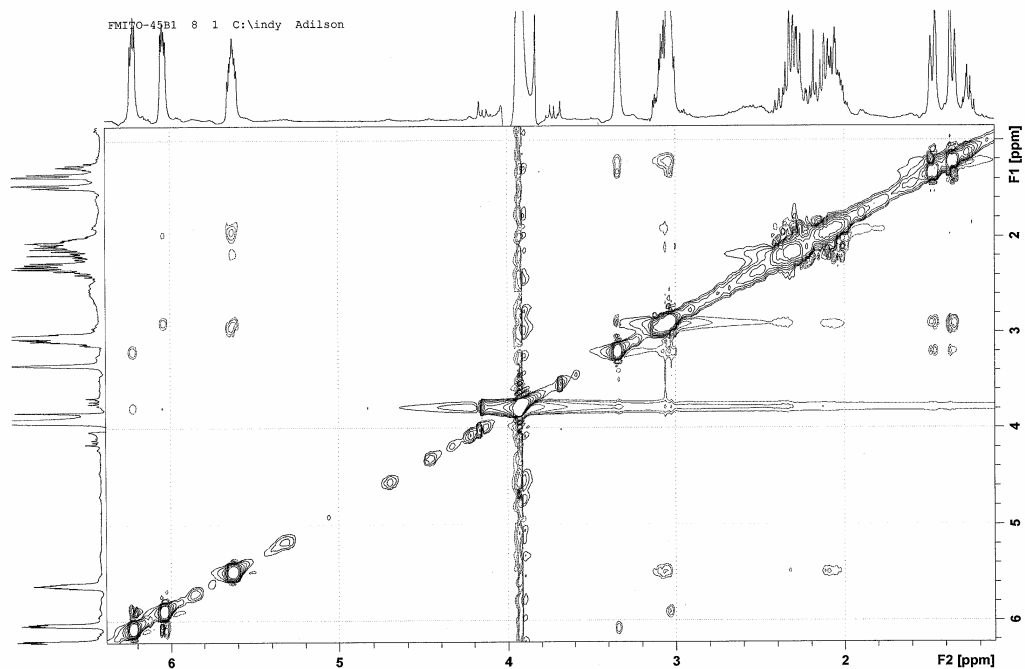
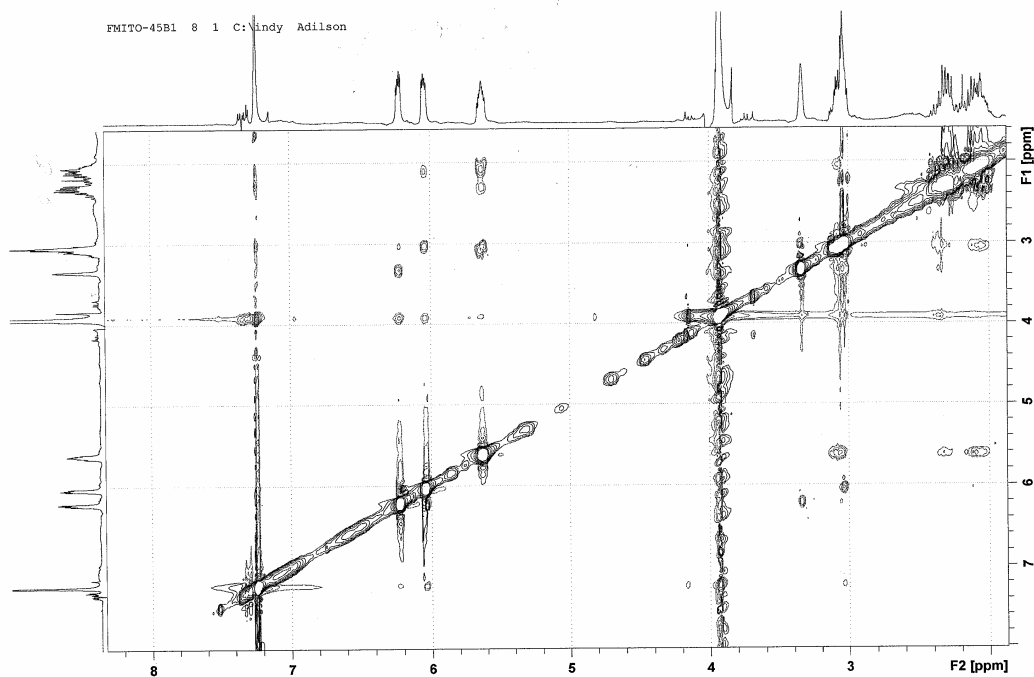


Figura 46: Espectro 2D (NOESY) do composto **34**.

Tabela 28: Dados espectrais (δ) do composto **34** obtidos por gCOSY [nJ (H, H), $n=2$ e 3] e NOESY em $CDCl_3$.

posição	(δ_H)	gCOSY: $^1H / ^1H$	NOESY: $^1H / ^1H$
1	3,24	H2; H7; H8	H10
2	2,91 – 3,03	H11a; H7; H8	H6; H9
3	-----	-----	-----
4	2,16 – 2,29	H6	H5; H2; H7; H8
5	1,92 – 2,05	H6	H4; H2; H7; H8
6	5,52	H5; H2; H7; H8	H5
7	2,91 – 3,03	H2; H7; H8	H6; H9
8	2,91 – 3,03	H2; H7; H8	H6; H9
9	5,93	H2; H7; H8; H10	H10; H8; H7; 15-OCH ₃ ; 16- OCH ₃
10	6,12	H1; H9	H9; H1; 15-OCH ₃ ; 16- OCH ₃
11a	1,34	H11b; H2; H7; H8; H1	H11b; H8; H1
11b	1,26	H11a; H2; H7; H8; H1	H11a; H8; H1
12	-----	-----	-----
13	-----	-----	-----
14	7,14		H9; H10
15	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----
15-OCH ₃	3,83		
16- OCH ₃	3,83		

Espectro de Infravermelho

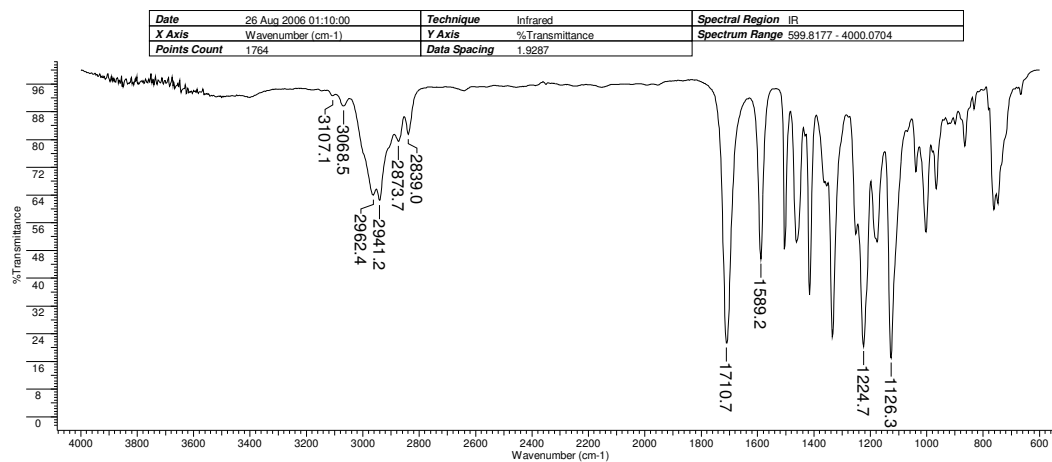
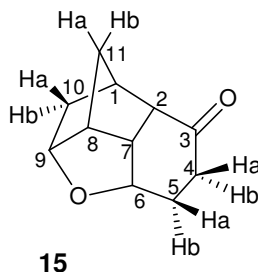


Figura 47: Espectro de infravermelho do composto 34.

Tabela 29: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto 34.

V _{MAX}	Atribuição
3069 e 3107	Deformação axial de C-H de aromático e olefina
2839 - 2962	Deformação axial de C-H de alifático
1711	Deformação axial de C=O de éster
1589	Deformação axial de C=O de cetona
1225 e 1126	Deformação axial de C-O

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

O espectro de massas (Figura 54) registrou o pico do íon molecular (M^+) em $m/z = 178$ como esperado. No espectro de RMN de 1H (Figura 48) o multipeto atribuído a δ 4,22 ppm refere-se ao H6 e o tripleto em δ 4,40 ppm refere-se ao H9 como principais sinais.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49) podem ser identificados onze sinais e no experimento de DEPT 135° pode-se notar que o composto contém um carbono quaternário em δ 214,0 ppm indicando carbonila, bem como a presença de quatro sinais de CH_2 e seis sinais de CH .

No espectro bidimensional de gHSQC (Figura 50) foi possível identificar a conectividade de cada carbono ligado diretamente ao hidrogênio. Assim, as correlações observadas no espectro de COSY $^1H/^1H$ foram essenciais para atribuir os sinais de H10 correlacionados com H9, de H6 correlacionando com H5 e H4 (Figura 52) que no espectro de gHSQC ainda não estavam totalmente definidos. O acoplamento a longa distância foi decisivo para atribuição do H10a correlacionando com H2 e de H4a correlacionando com H6. Foram observados ainda correlação a longa distância entre H1 e H8.

Espectro de RMN de ^1H

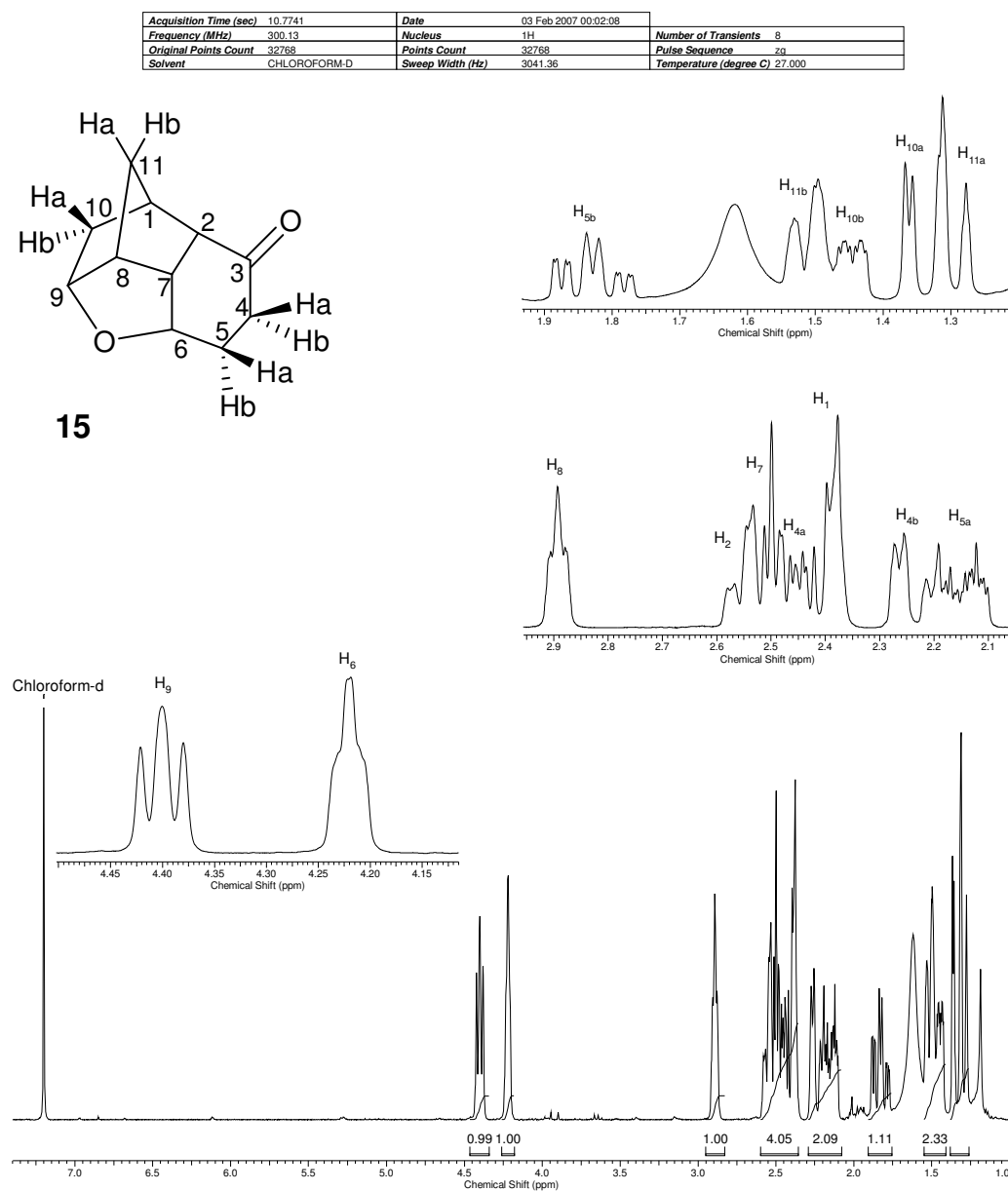


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **15**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	03 Mar 2006 16:02:08
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	9869
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000

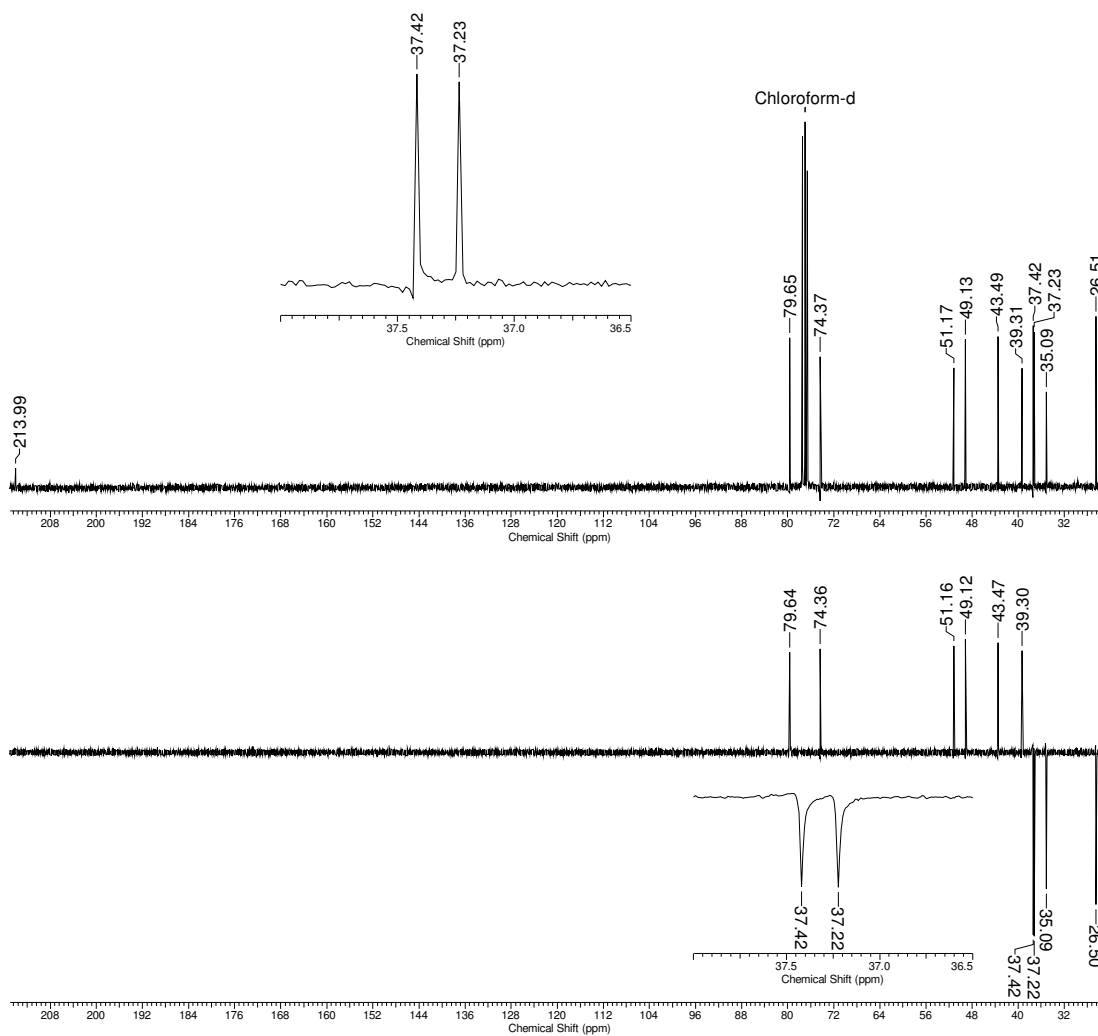


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **15**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 30: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **15**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , J (Hz), integral relativa]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,39 (d, J = 5,8, 1H)	39,3	CH
2	2,51 – 2,61 (dd, J = 3,6; 10,3, 1H)	51,2	CH
3	-----	214,0	C
4a	2,42 – 2,47 (m, 1H)	35,1	CH ₂
4b	2,23 (d, J = 5,5, 1H)		
5a	2,10 – 2,21 (m, 1H)	26,5	CH ₂
5b	1,83 (dt, J = 5,5, 13,8; 14,9, 1H)		
6	4,21 (m, 1H)	74,4	CH
7	2,47 – 2,51 (m, 1H)	43,5	CH
8	2,89 (t, J = 4,0; 6,3, 1H)	49,1	CH
9	4,39 (t, J= 6,3, 7,4 1H)	79,7	CH
10a	1,36 (d, J=7,4, 1H)	37,4	CH ₂
10b	1,44 (dt, J = 7,4; 2,7 1H)		
11a	1,30 (d, J= 10,3, 1H)	37,2	CH ₂
11b	1,52 (d, J= 10,3, 1H)		

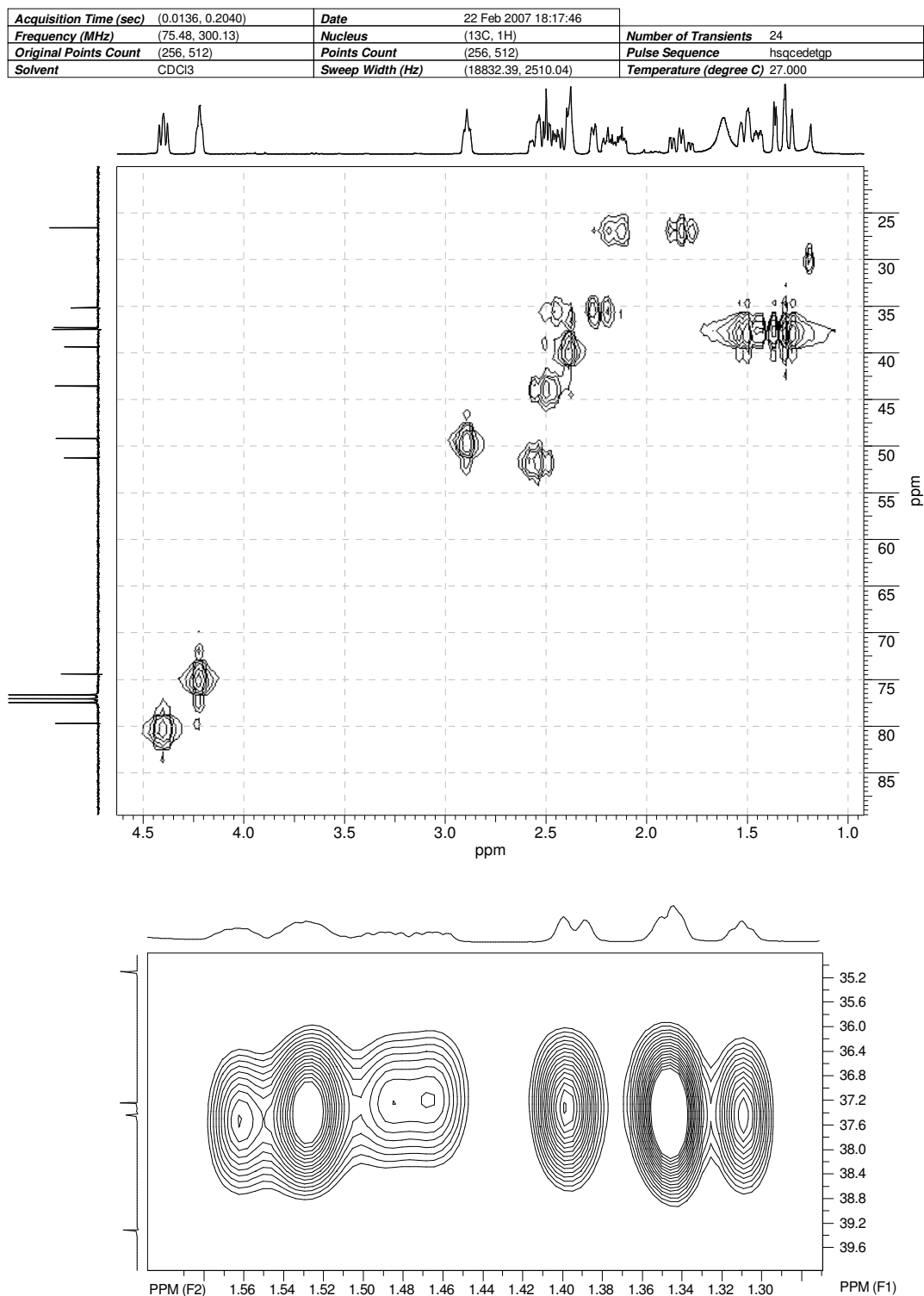


Figura 50: Espectro 2D (gHSQC; C/ H) do composto **15**.

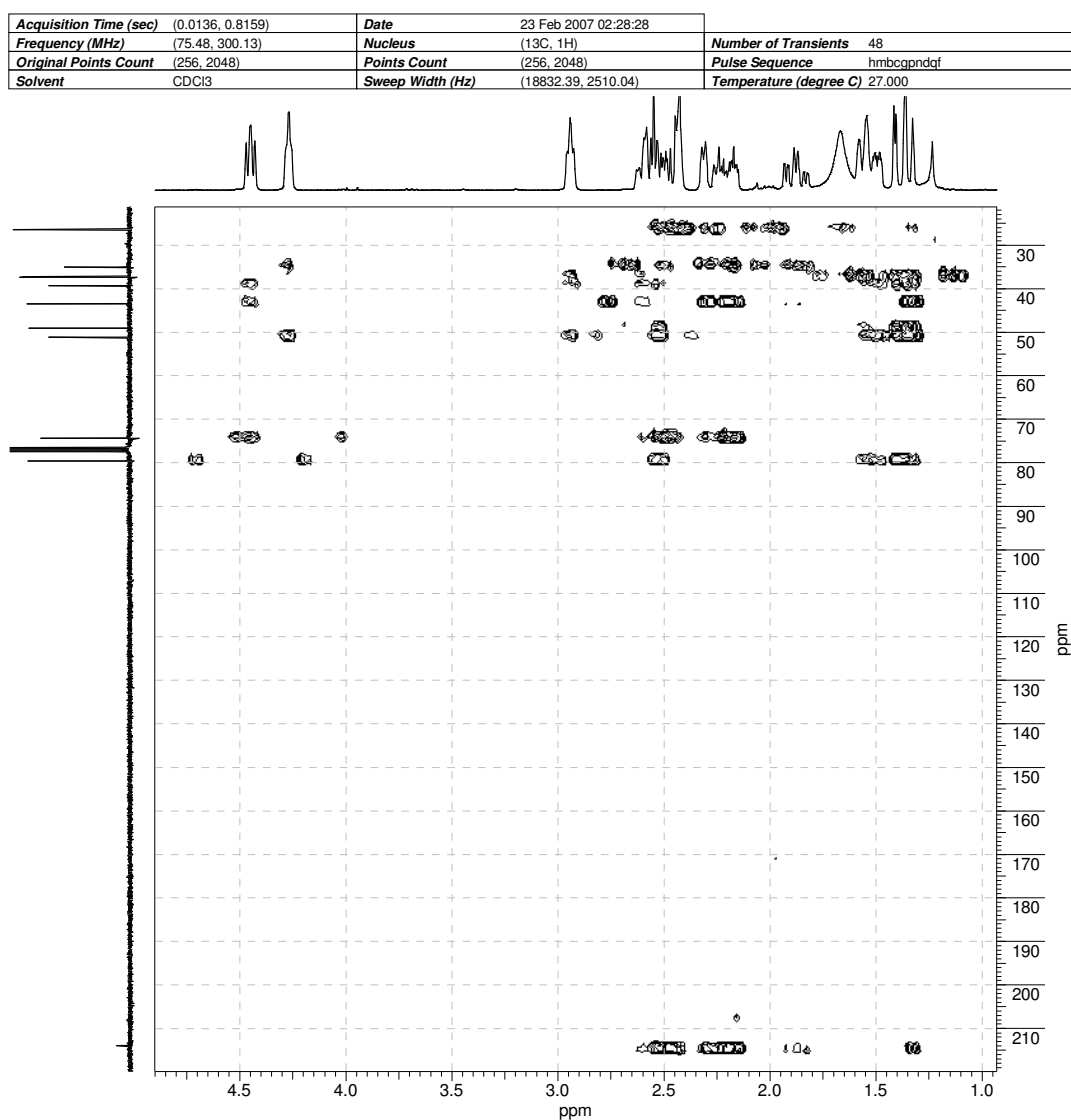


Figura 51: Espectro 2D (gHMBC; C/ H) do composto **15**.

Tabela 31: Dados espectrais (δ) do composto **15** obtidos por gHSQC [1J (C, H)] e gHMBC [nJ (C, H), $n=2$ e 3] em CDCl_3 .

posição	gHSQC		gHMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J(\text{C,H})$	$^3J(\text{C,H})$
1	39,3	2,36-2,40	H2; H10a; H10b; H11a; H11b	H7; H8
2	51,2	2,51-2,61	H7	H4a; H6; H8; H10a; H10b; H11a; H11b
3	214,0	-----	H2; H4	H1; H5a; H7
4a	35,1	2,42-2,47	H5a; H5b	H6
4b		2,23		
5a	26,5	2,10-2,21	H4a; H4b	H7
5b		1,83		
6	74,4	4,21	H5a; H7	H9; H4a; H4b
7	43,5	2,47-2,51		H11a; H5
8	49,1	2,95-3,01	H9; H7	H6; H10b; H11a
9	79,7	4,39	H10a; H10b	H7; H11a; H11b
10a	37,4	1,36	H8	H10
10b		1,44		
11a	37,2	1,30	H8	H10
11b		1,52		

Acquisition Time (sec)	(0.1020, 0.4080)	Date	23 Feb 2007 04:42:26	
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)	Number of Transients 16
Original Points Count	(256, 1024)	Points Count	(256, 1024)	Pulse Sequence cosygpoqf
Solvent	CDCI3	Sweep Width (Hz)	(2510.04, 2510.04)	Temperature (degree C) 27.000

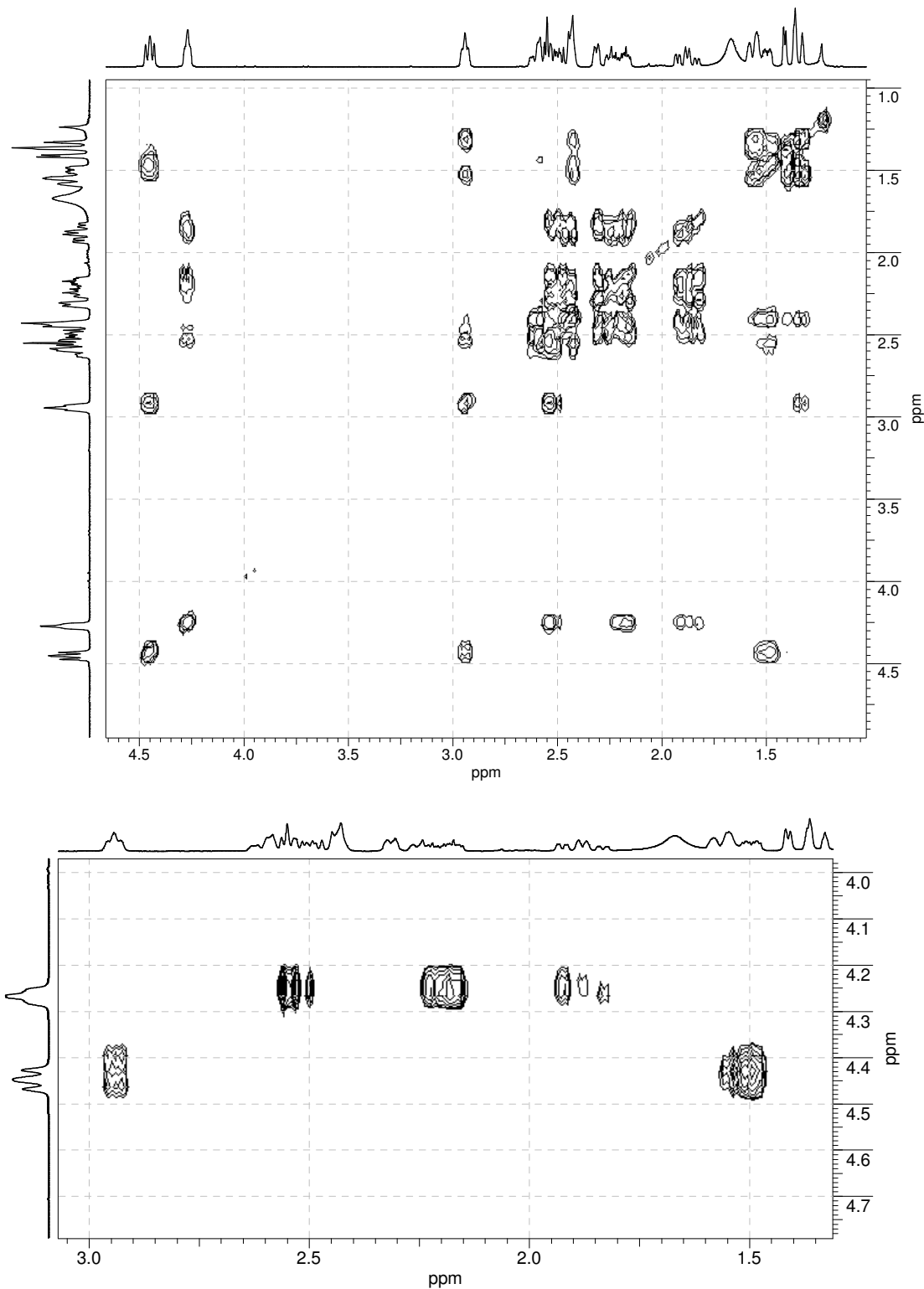
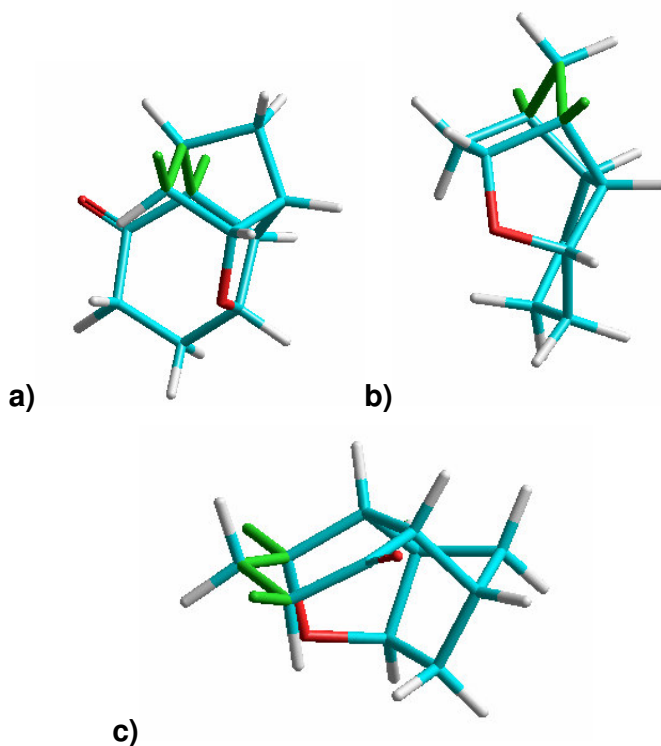


Figura 52: Espectro 2D (gCOSY $^1\text{H}/^1\text{H}$) do composto **15**.

Tabela 32: Dados espectrais (δ) do composto **15** obtidos por gCOSY [nJ (H, H), $n= 2, 3$ e 4].

posição	(δ_H)	COSY: $^1H / ^1H$
1	2,36 – 2,40	H2; H8(w); H10a
2	2,51 – 2,61	H1; H7; H10a(w)
3	-----	-----
4a	2,42 – 2,47	H4b; H5a; H5b; H6(w)
4b	2,23	H4a; H5a; H5b
5a	2,10 – 2,21	H4a; H4b; H5b; H6
5b	1,83	H4a; H4b; H5a; H6
6	4,21	H5a; H5b; H7
7	2,47 – 2,51	H2; H6; H8
8	2,95 – 3,01	H1(w); H7; H9; H811a; H11b
9	4,39	H8; H10a
10a	1,36	H1; H2(w); H9; H10b
10b	1,44	H1; H9; H10a
11a	1,30	H1; H2(w); H8; H11b
11b	1,52	H1; H8; H11a

**Figura 53:** Acoplamento em W observados no espectro de gCOSY do composto **15**. a) entre H10a e H2. b) entre H1 e H8. c) entre H6 e H4a.

Espectro de Massas

Scan # : 1769
Mass Peak # : 64 Ret. Time : 17.733
Base Peak : 41.10 (47775)

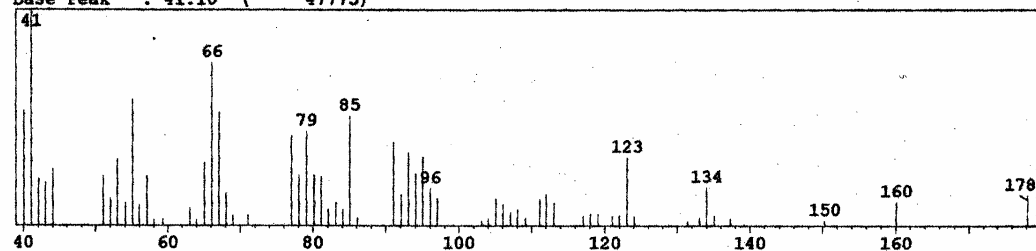
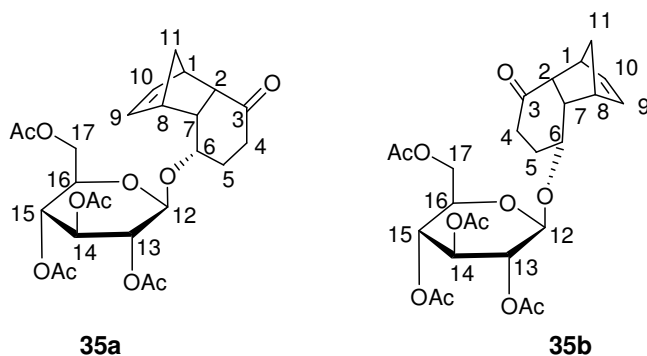


Figura 54: Espectro de Massas do composto 15.

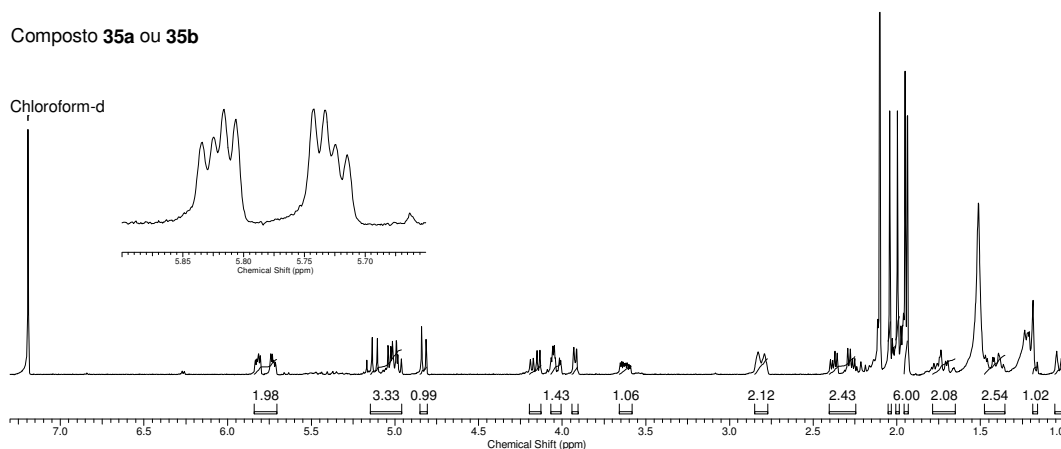
Compostos 35a e 35b



Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	5.1905	Date	20 Dec 2006 17:31:44	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Solvent	CHLOROFORM-D
				Original Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	6313.13

Composto **35a** ou **35b**



mistura do composto **35a** e **35b**

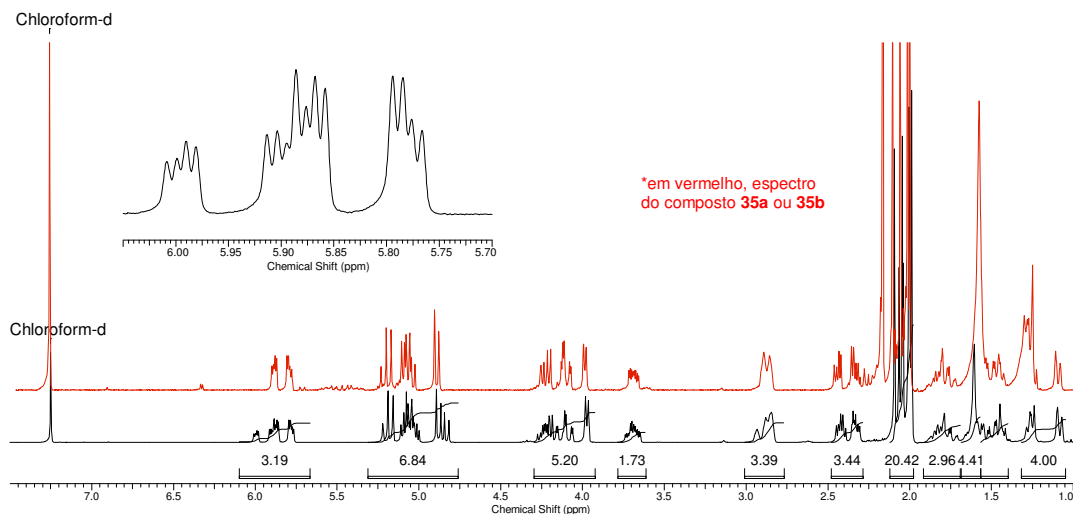


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **35a** e/ou **35b**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	28 Feb 2007 15:32:16	Original Points Count	16384
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Solvent	CHLOROFORM-D
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Temperature (degree C)	27.000
Sweep Width (Hz)	18832.39				

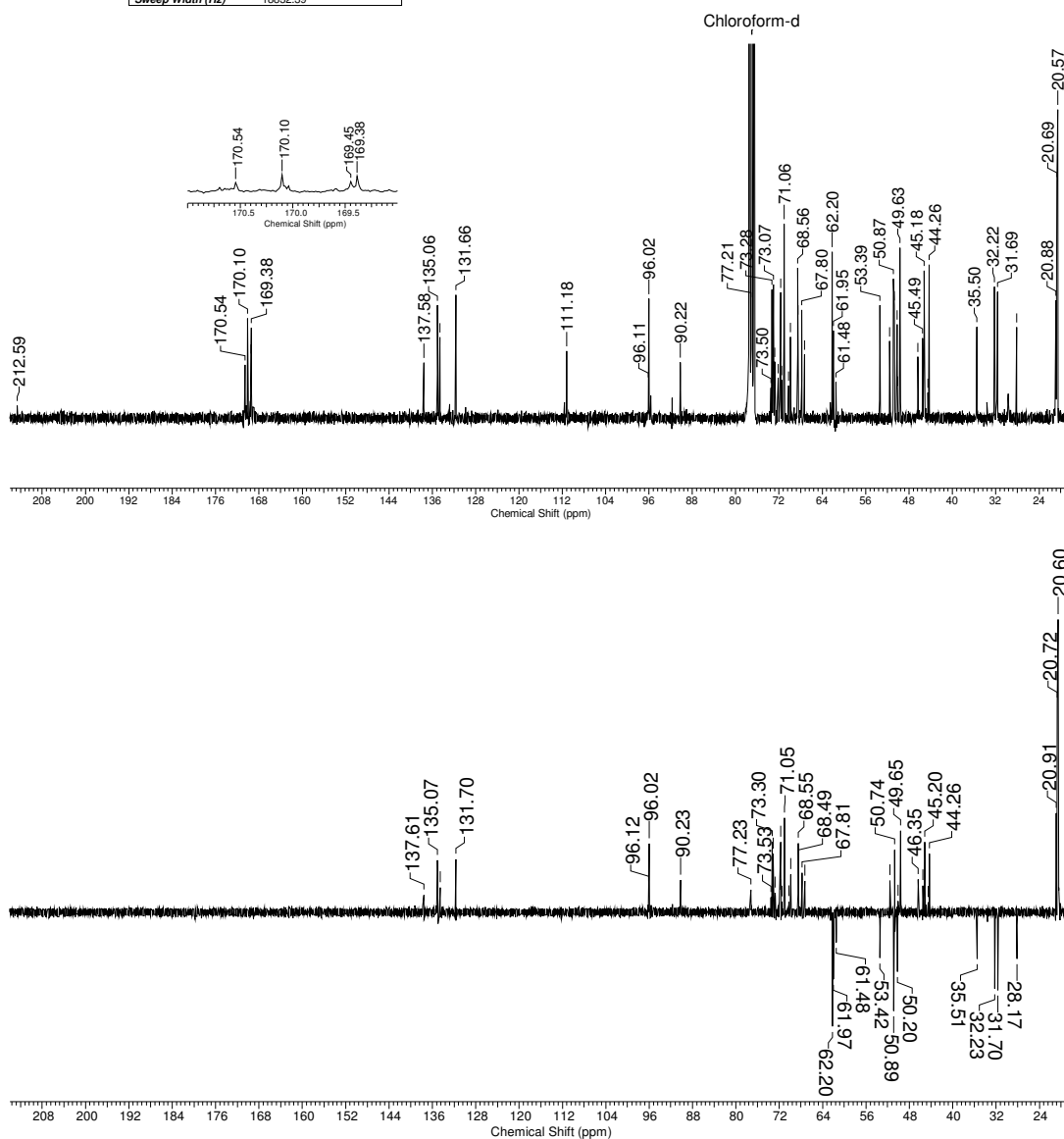


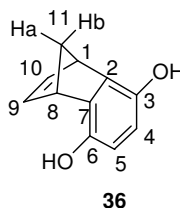
Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura dos compostos **35a** e **35b**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 33: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) da mistura do composto **35a** e/ou **35b**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)] [#]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,79 (m, 1H)	49,7/ 50,1	CH
2	1,66-1,78 (m, 1H)	50,7/ 51,6	CH
3	-----	212,6	C
4a	*2,38 (dd, J= 8,1; 3,9, 1H)	31,7/ 31,8	CH ₂
4b	*2,27 (dd, J= 8,1; 3,9, 1H)		
5a	1,36 – 1,47 (m, 1H)	32,2 / 35,5	CH ₂
5b	1,36 – 1,47 (m, 1H)		
6	3,62 (m, 1H)	67,3/ 67,8	CH
7	1,66-1,78 (m, 1H)	45,3/ 45,5	CH
8	2,83 (m, 1H)	44,3/ 45,2	CH
9	5,73 (dd, J= 5,45, 3,0)	131,7/ 134,6	CH
10	5,82 (dd, J= 5,45, 3,0)	135,1/ 137,6	CH
11a	1,20 (d, J= 7,6, 1H)	50,2/ 50,9	CH ₂
11b	1,03 (d, J= 7,6, 1H)		
12	4,83 (d, J= 8,1, 1H)	96,0/ 96,1	CH
13	4,96 – 5,17 (m, 1H)	73,1/ 73,3	CH
14	4,96 – 5,17 (m, 1H)	71,1/ 71,7	CH
15	4,96 – 5,17 (m, 1H)	67,8/ 68,5	CH
16	4,03 (m, 1H)	68,6/ 69,8	CH
17a	*3,92 (m, 1H)	61,2/ 62,2	CH ₂
17b	*4,16 (m, 1H)		
13-OAc(CH ₃)	1,94 (sl, 3H)	20,5	CH ₃
13-OAc(C=O)	-----	169,4	C
14-OAc(CH ₃)	1,95 (sl, 3H)	20,6	CH ₃
14-OAc(C=O)	-----	169,5	C
15-OAc(CH ₃)	2,00 (sl, 3H)	20,7	CH ₃
15-OAc(C=O)	-----	170,1	C
17-OAc(CH ₃)	2,04 (sl, 3H)	20,9	CH ₃
17-OAc(C=O)	-----	170,5	C

*Os sinais podem estar trocados

[#]Os valores de hidrogênios referem-se ao espectro do composto **35a** ou **35b**.

Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol (36)

No espectro de RMN de ^1H (Figura 57) é possível identificar 4 sinais com integral relativa proporcional a 2: 2: 2: 2. O tripleto ($J = 1,9$ Hz) em δ 6,79 ppm é indicativo de olefina e o singlete em δ 6,34 ppm de aromático. Os duplos-tripletos ($J = 6,9; 1,8$ Hz) em δ 2,20 e 2,25 ppm referem-se aos H11a e H11b, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57) apresenta seis carbonos, dois destes podem ser identificados como quaternários pelo DEPT 135° e um CH_2 refere-se ao carbono da ponte. Tanto no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C pode-se notar pelos sinais apresentados que se trata de uma estrutura com plano de simetria. Estes valores de deslocamentos químicos de RMN foram comparados com os valores reportados por Souza (1999).

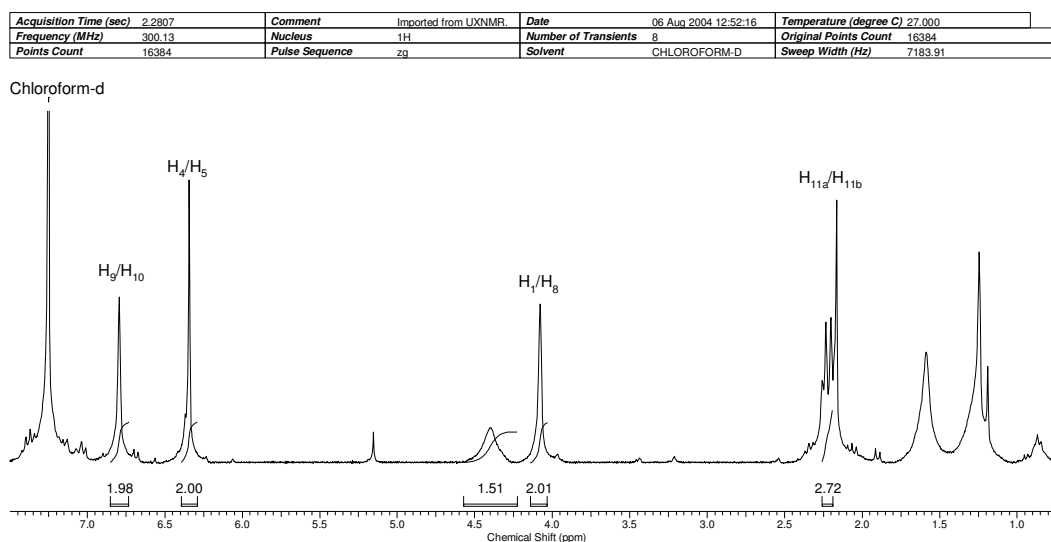
Espectro de RMN de ^1H 

Figura 57: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 36.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXXMR.	Date	18 Aug 2004 10:37:52	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	21102	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39

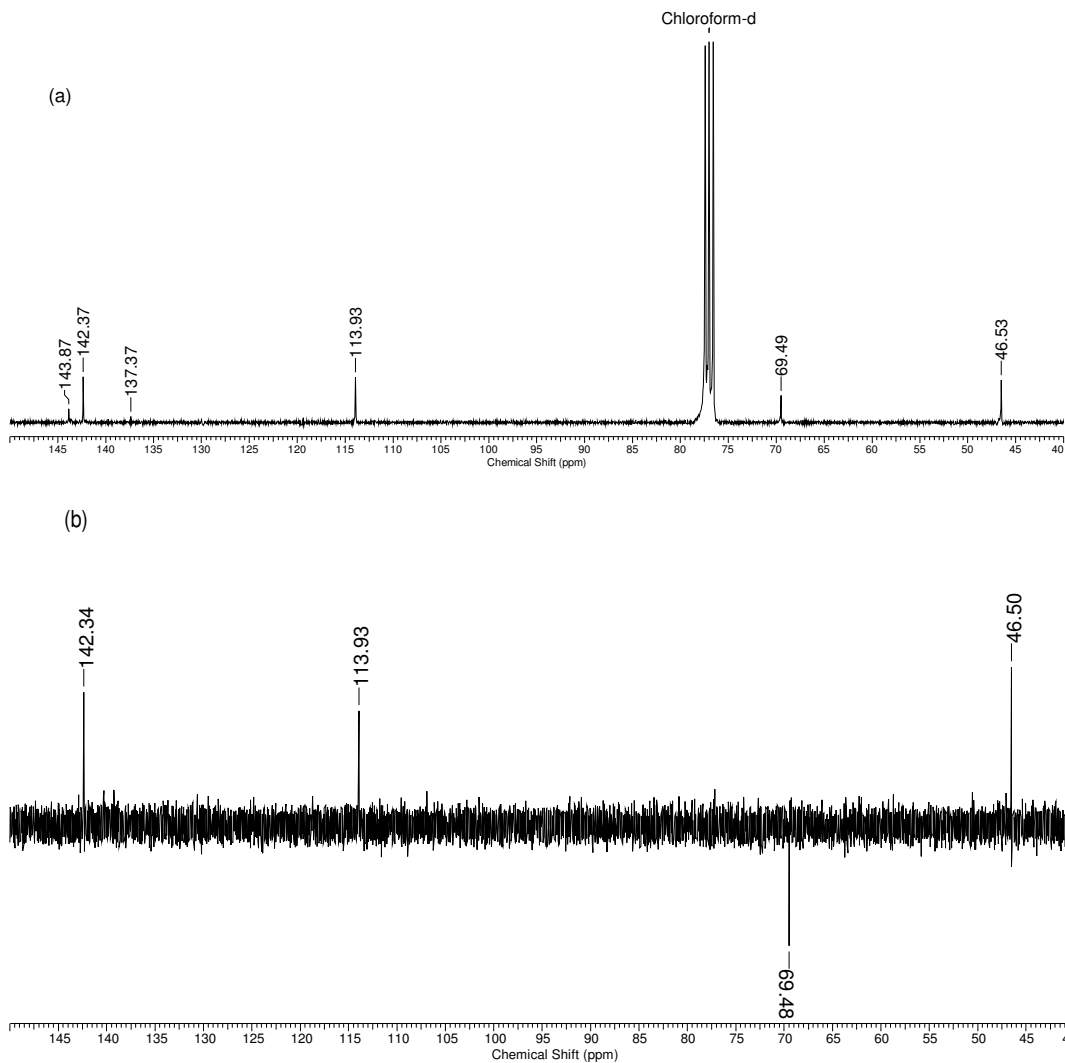
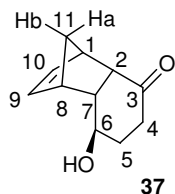


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **36**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 34: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **36**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1 e 8	4,08 (m, 2H)	46,5	CH
2 e 7	-----	143,9	C
3 e 6	-----	137,4	C
4 e 5	6,34 (s, 2H)	142,3	CH
9 e 10	6,79 (t, J= 1,9; , 2H)	113,9	CH
11a	2,20 (dt, J= 6,9; 1,8, 1H)	69,5	CH ₂
11b	2,25 (dt, J= 6,9; 1,8, 1H)		
-OH	(2,17 sl, 2H)	-----	-----

***rel*-(1S,2S,6R,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-ona (37)**

No espectro de RMN de ^1H (Figura 59) observam-se sinais em δ 6,09 e 6,17ppm atribuídos ao H9 e H10 respectivamente. Os sinais em δ 1,28 e 1,47 ppm seguem os mesmos padrões de acoplamento observados nos compostos 7, 12 e 28, sendo assim atribuído aos hidrogênios da ponte. Na região de δ 3,5-5,5 não se observa sinais de hidrogênio carbinólico (H6). Devido ao fato de que H6 está no lado côncavo, seu sinal aparece em 3,23 ppm (mais blindado que o H6 do composto 12), confirmando a estereoquímica em C-6.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 60) observa-se a presença de 11 carbonos e no DEPT 135° a ausência de um carbono em δ 213,3 sendo indicativo de carbonila de grupo cetona. Ainda no DEPT pode-se identificar 2 sinais de carbonos metilênicos e em δ 48,3 pode ser atribuído ao carbono da ponte.

Espectro de RMN de ^1H

Acquisition Time (sec)	2.1889	Comment	Imported from UXNMR.	Date	02 Feb 2006 16:55:28	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	7485.03

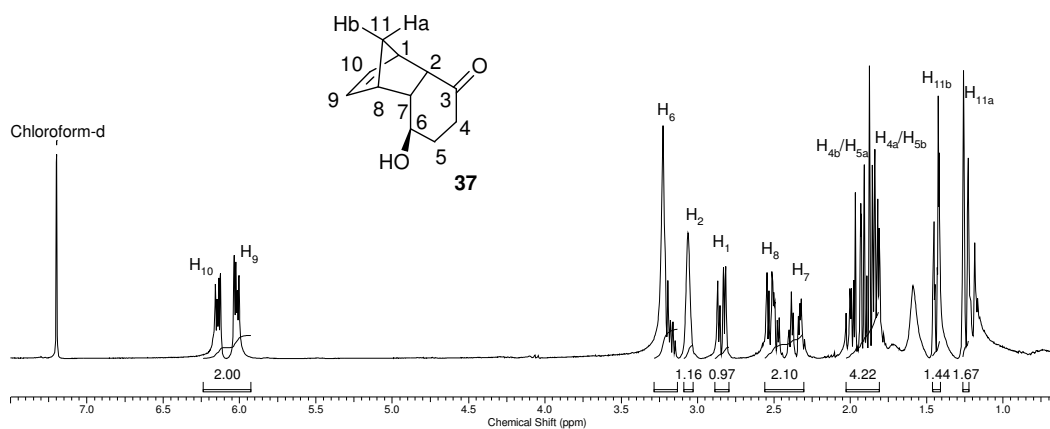


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **37**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	03 Feb 2006 10:22:56	Temperature (degree C)	27.000
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	2272	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39

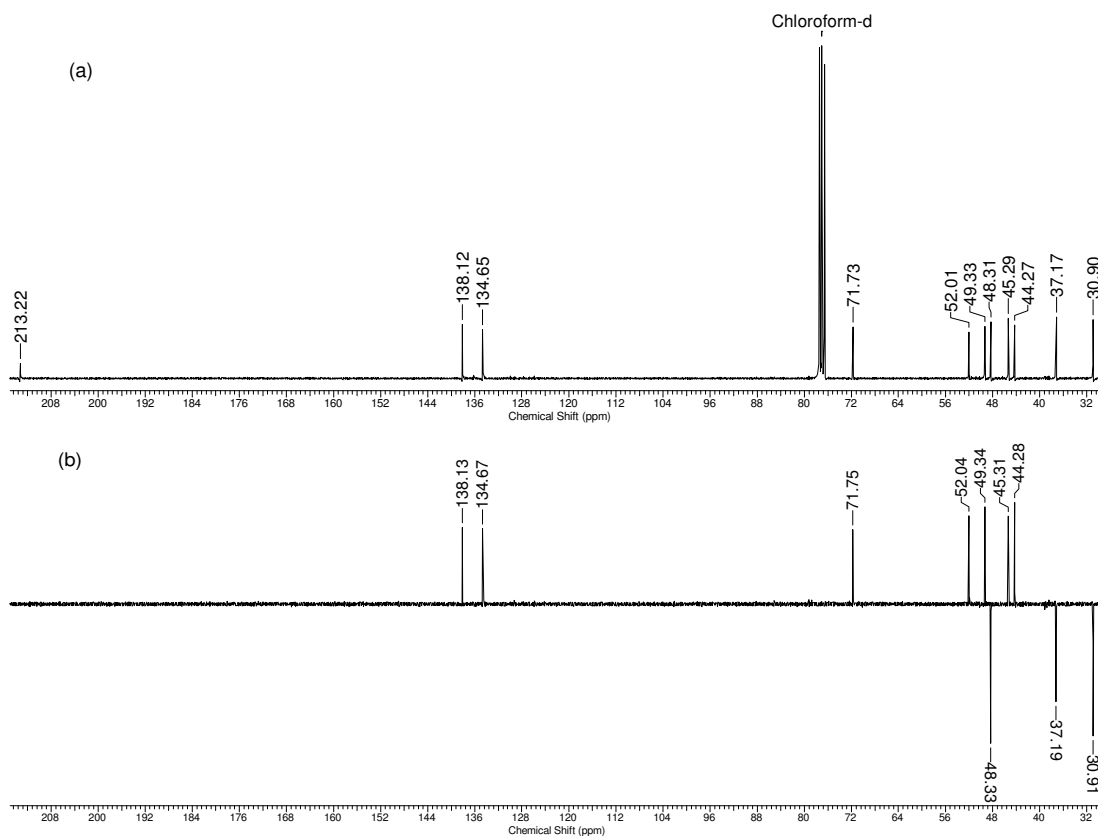
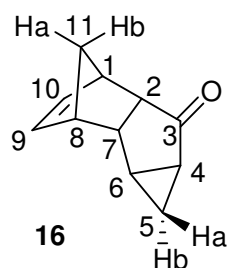


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **37**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 35: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **37**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,84 (m, 1H)	45,3	CH
2	3,17 (m, 1H)	52,0	CH
3	-----	213,2	C
4a	1,85 – 1,93 (m, 1H)	37,2	CH ₂
4b	1,95 - 2,03 (m, 1H)		
5a	1,95 - 2,03 (m, 1H)	30,9	CH ₂
5b	1,85 – 1,93 (m, 1H)		
6	3,23 (m, 1H)	71,7	CH
7	2,35 (m, 1H)	49,3	CH
8	2,50 – 2,58 (m, 1H)	44,3	CH
9	6,06 (dd, J= 6,2; 3,3, 1H)	138,1	CH
10	6,17 (dd, J= 6,2; 3,3, 1H)	134,6	CH
11a	1,28 (d, J= 8,7, 1H)	48,3	CH ₂
11b	1,47 (dd, J= 8,7; 2,0, 1H)		
-OH	3,06 (sl, 1H)	-----	-----

***rel*-(2S,7S,8S,1R,3R,5R)-tetraciclo[6.2.1.0^{2,7}.0^{3,5}]undec-9-en-6-ona (16)**

No espectro de RMN de ^1H (Figura 61) observa-se duplo-dubletos em δ 6,09 e 6,18 ppm, atribuídos aos H9 e H10 respectivamente. Os hidrogênios da ponte podem ser observados como duplo-triplete em δ 1,44 e 1,53 ppm referentes ao H11a e H11b, respectivamente. O sinal mais blindado em δ 0,61 atribui-se ao H5b devido a este próton estar na face endo desta molécula, podendo contribuir para identificar o ciclopropano na estrutura. Os hidrogênios da cabeça de ponte (H1 e H8) apresentam-se como um singleto largo. Têm sido observados em outras estruturas como nos compostos **7**, **12** e **28** que freqüentemente seguem o mesmo padrão de acoplamento. Este composto foi identificado a partir da comparação com o espectro descrito por Beatriz (2001).

Espectro de RMN de ^1H

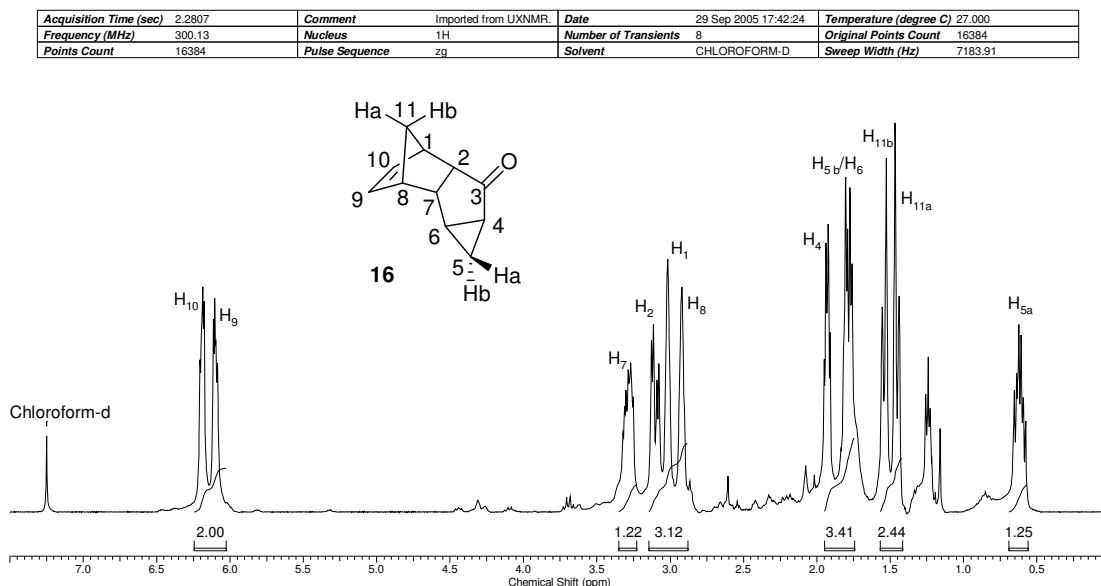
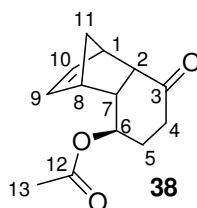


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **16**.

Tabela 36: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) do composto **16**.

H e C	$\delta (^1\text{H})$ [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]
1	3,01 (m, 1H)
2	3,09 (dd, 1H, J= 10,9; J= 4,2)
3	-----
4	1,92 (d, J = 3,9; 9,7, 1H)
5	0,61 (dt, J = 5,2; 9,3; 10,0, 1H)
5'	1,75-1,83 (m, 1H)
6	1,75-1,83 (m, 1H)
7	3,28 (m, 1H)
8	2,91 (m, 1H)
9	6,09 (dd, 1H, J= 5,5; J= 3,0)
10	6,18 (dd, 1H, J= 5,5; J= 3,0)
11a	1,44 (d, 1H, J= 8,3)
11b	1,53 (d, 1H, J= 8,3; J= 1,7)

Acetato de β -6-oxotriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-il (38)

No espectro de RMN de ^1H (Figura **62**) observa-se duplo-dublete em δ 6,10 e 6,14 ppm (dd = 5,4; 2,7 Hz) de próton de olefina. O multiplete em δ 4,36 ppm pode ser designado como o H6. O sinal intenso em δ 2,06 ppm indica três hidrogênios da metila de grupo acetil também de acordo com a integral relativa.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura **63**) revela treze sinais, apresentando grupamento carbonila de cetona em δ 212,2 ppm e carbonila de éster em δ 170,4 ppm que pode conferir sua ausência no DEPT 135°. Ainda o DEPT 135° mostra três sinais de CH_2 referentes aos hidrogênios da ponte (δ 48,1) e ao H4 (δ 37,0) e H5 (δ 27,2). O carbono mais blindado em δ 21,2 ppm refere-se ao carbono metílico do grupo acetila. Os sinais observados em δ 135,3 ppm e δ 137,8 ppm são indicativos de olefinas e em δ 73,4 refere-se a sinal de carbono ligado a oxigênio (C6).

Espectro de RMN de ^1H

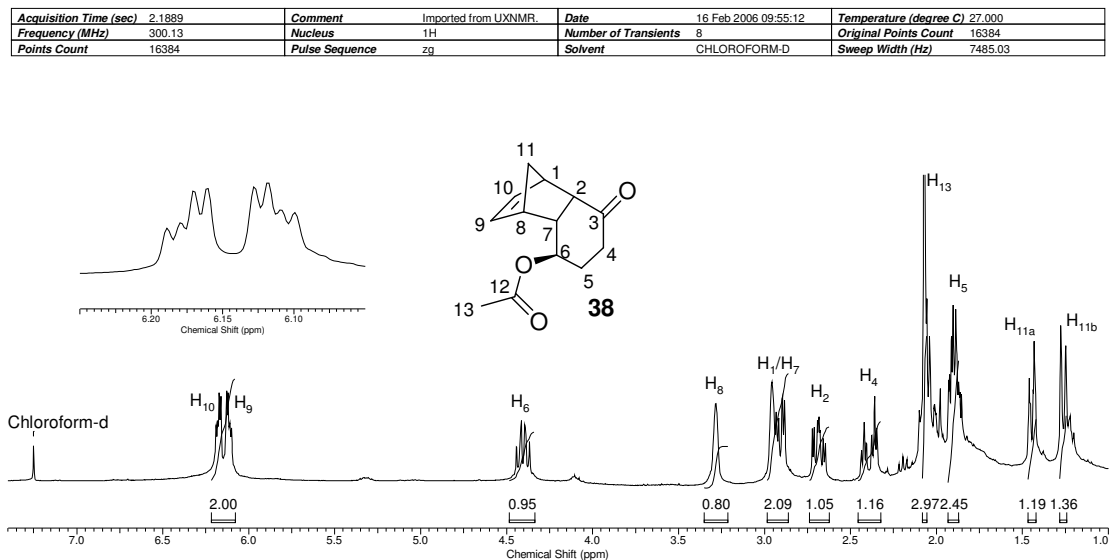


Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **38**.

Espectro de RMN de ^{13}C

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	Imported from UXNMR.	Date	02 Mar 2006 17:38:08
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	4201
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18632.39	Temperature (degree C)	27.000

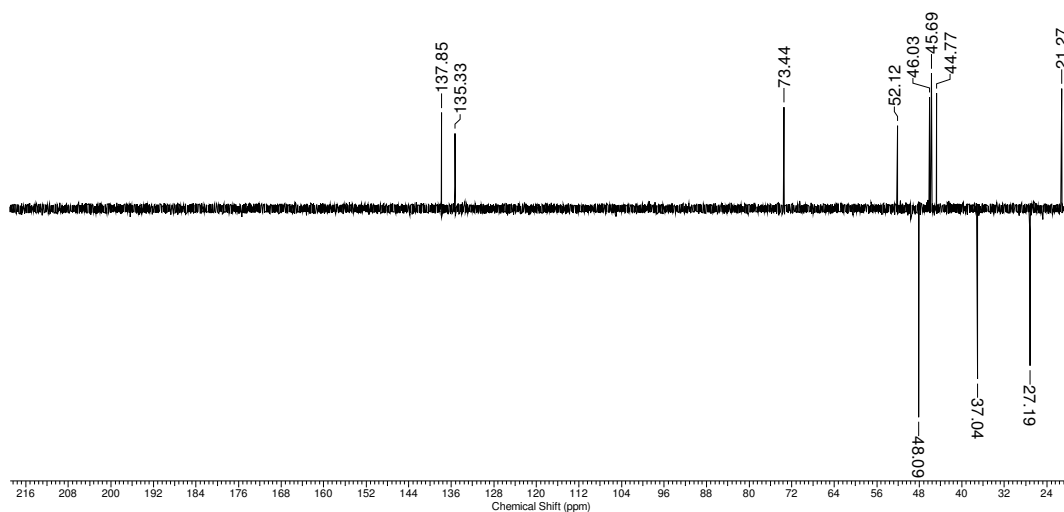
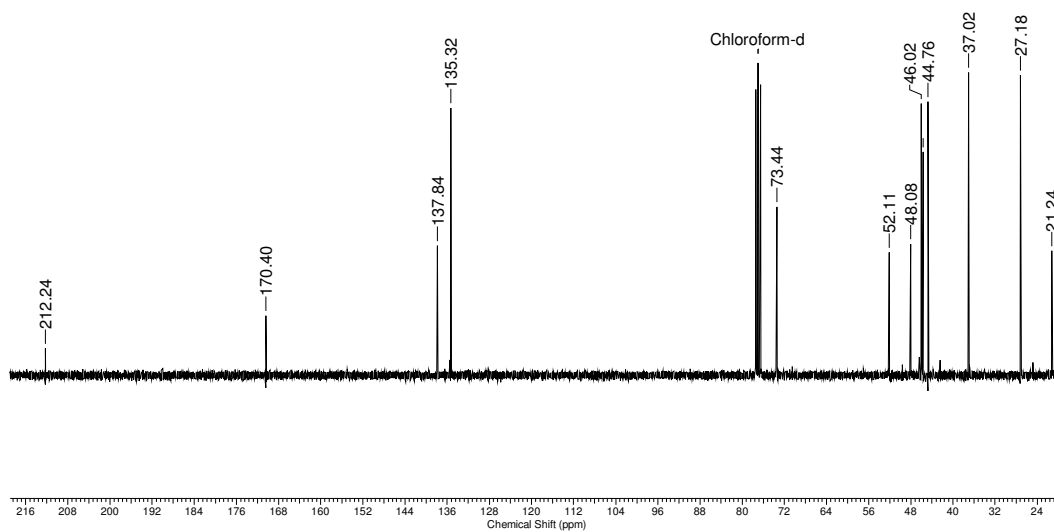


Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **38**. (a) Totalmente desacoplado; (b) DEPT 135, $\uparrow(\text{CH}, \text{CH}_3)$; $\downarrow(\text{CH}_2)$.

Tabela 37: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (H) e carbonos (C) do composto **38**.

H e C	δ (^1H) [<i>m</i> , integral relativa, J (Hz)]	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,96 (m, 1H)	45,7	CH
2	2,65 - 2,72 (m, 1H)	46,0	CH
3	-----	212,2	C
4	2,39 (dt, J = 4,3; 5,0; 18,3, 2H)	37,0	CH ₂
5	1,84 - 1,89 (m, 2H)	27,2	CH ₂
6	4,36 (m, 1H)	73,4	CH
7	2,91 (m, 1H)	44,8	CH
8	3,24 (m, 1H)	52,1	C
9	6,10 (dd, J= 5,4; 2,7, 1H)	135,3	CH
10	6,14 (dd, J= 5,4; 2,7, 1H)	137,8	CH
11a	1,44 (dt, J= 8,4; 1,8, 1H)	48,1	CH ₂
11b	1,22 (d, J= 8,4; 1H)		
12	-----	170,4	C
13	2,06 (s, 3H)	21,3	CH ₃

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizada síntese de treze substâncias com estruturas rígidas policíclicas do tipo gaiola (*cage-like*), com o intuito de obter novos compostos orgânicos potencialmente bioativos, a partir da clássica reação de Diels-Alder entre benzoquinona e ciclopentadieno.

Dos compostos sintetizados, três foram submetidos a transformações com o fungo *Mucor ramosissimus*. Foram testados nove compostos em ensaios de atividade citotóxica, cinco compostos em ensaios de atividade hemolítica e seis compostos em ensaios de atividade inseticida.

Os compostos **7**, **12**, **15**, **28**, **29**, **30**, **32**, **34**, **39** foram testados quanto à atividade citotóxica. O composto **34** mostrou ação citotóxica moderada sobre as linhagens HCT-8, SF-295 e MDA-MB 435 com IC₅₀ correspondendo respectivamente a 6,68 (17,9), 7,58 (20,4) e 13,51 (36,3) µg/mL (µM). A substância **28** demonstrou citotoxicidade apenas sobre a linhagem MDA-MB 435 com IC₅₀ correspondente a 10,4 (59,5) µg/mL (µM). O composto **7** apresentou citotoxicidade moderada embora inespecífica, para as linhagens HL-60 (leucemia), HCT-8 e MDA-MB 435, com valores de IC₅₀ de 11,34 (65,2), 13,62 (78,2) e 13,52 (77,7) µg/mL (µM), respectivamente. Os compostos **7**, **28**, **30**, **34** e **39** não causaram hemólise sobre hemácias de *Mus musculus* Swiss.

Os compostos **7**, **12**, **28**, **29**, **30** e **34** foram testados quanto à atividade inseticida sobre os indivíduos adultos da espécie *Sitophilus zeamais*. Todos os compostos testados apresentaram uma alta atividade inseticida. Estudos dessa natureza deverão ser conduzidos com mais detalhes.

Os compostos **7**, **12** e **28** foram submetidos à biotransformação com

fragmentos de meio de cultura ou solução de esporos de *M. ramosissimus*. Os compostos **28** e **37** foram obtidos a partir da biotransformação do composto **7**. O **28** foi obtido da biotransformação de **12**. A mistura de diastereoisômeros foi produzida a partir da substância **28**. Este último também foi biotransformado em diferentes concentrações de esporos de *M. ramosissimus* e em diferentes valores de pH.

Em todos os ensaios de biotransformação obtivemos diferentes produtos, de oxidação e/ou redução, com enantioseletividade, indicando que *Mucor ramosissimus* é uma espécie promissora para uso em biotransformações.

Os métodos de biotransformação bem como o monitoramento e isolamento dos produtos formados deverão ser melhorados, para obtenção de resultados mais precisos e com maior rendimento.

O potencial inseticida sobre o *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho) das substâncias testadas, torna-se mais importante com o fato de que essas mesmas substâncias não apresentaram atividade citotóxica significativa e, mais importante ainda, atividade hemolítica não foi observada nos testes realizados. Portanto, sob esta ótica, podemos preconizar que tais compostos, muito provavelmente, apresentarão pouca toxicidade sobre animais e serão úteis como protótipos de novos pesticidas mais potentes e menos tóxicos.

Parte Experimental

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os solventes utilizados foram da marca Merck, Acros e tratados conforme descrito na Literatura (PERRIN & ARMAREGO 1988).

As reações envolvendo reagentes sensíveis à umidade foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio em vidraria previamente secada e resfriada em dessecador.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio – Sílica Gel 60 F₂₅₄ da Merck.

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

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

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

Os espectros de RMN de ¹H a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz foram registrados no Espectrômetro Bruker Avance DPX-300.

Todos os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em CDCl₃ e como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente e/ou do TMS.

Os espectros de massas foram registrados no espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso modelo QP500 da Shimatzu.

Os espectros de absorção de infravermelho foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer modelo 783, com transformada de Fourier, em filme de CHCl_3 para líquidos ou em pastilhas de KBr para sólidos.

As rotações ópticas foram observadas no polarímetro Perkin Elmer, modelo 341.

Os pontos de fusão foram obtidos no equipamento Uniscience do Brasil, modelo 498.

Cultivo, inoculação e coleta das amostras biotransformadas foram feitas em câmara de fluxo laminar da Labconco, previamente esterilizada com álcool 70% e incidência de luz UV.

A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer $1/400 \text{ mm}^2$ com auxílio de microscópio óptico da Nikon.

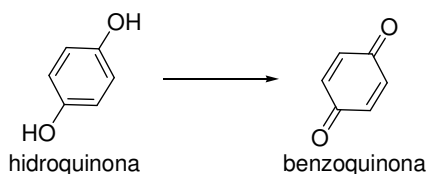
As biotransformações foram realizadas em incubadora refrigerada com agitação, marca Marconi, modelo MA 830/A.

Os ensaios de atividade citotóxica e atividade hemolítica foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Os testes de atividade inseticida foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Pancrácio de Souza.

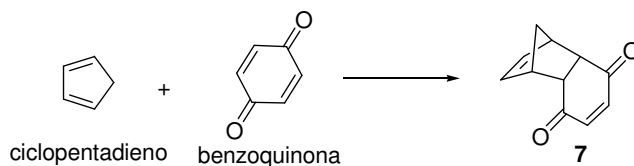
6.2 SÍNTESE

6.2.1 *p*-Benzoquinona (6)



Procedimento: Uma solução de 33 g (0,33 mol) de hidroquinona em 150 mL de ácido acético a 60% foi resfriada em banho de gelo. 42 g de trióxido de cromo (0,42 mol) foram dissolvidos em 70 mL de água destilada e 30 mL de ácido acético glacial. Esta solução de trióxido de cromo foi adicionada gota-a-gota durante 2 horas sobre a solução de hidroquinona em banho de gelo e agitação. Em seguida a mistura foi filtrada a vácuo e lavado várias vezes com porções de 10 mL de água gelada até que o precipitado adquirisse uma coloração amarelada. O precipitado foi secado em dessecador e purificado por sublimação. Rendimento: 60%. Cristal amarelo brilhante, estocado em local escuro. (FURNISS, 1998).

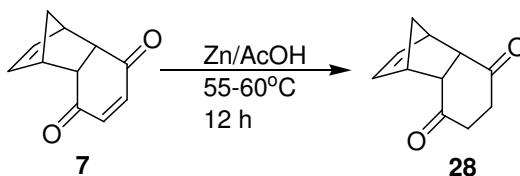
6.2.2 *endo*-Triciclo[6.2.1.0^{2,7}] undeca-4,9-dien-3,6-diona (7)



Procedimento: A uma solução de benzoquinona (3,3 g, 30,4 mmol) em hexano e acetato de etila (40:30), resfriada a 0° C, foi adicionado ciclopentadieno (2,2 g, 33,5 mmol) recém destilado. A mistura resultante foi agitada durante 1 hora e meia em banho de gelo e água. Evaporou-se o solvente e o produto foi recristalizado em

hexano, obtendo-se um cristal amarelo. Rendimento: 97%. Ponto de Fusão: 61-65°C. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,40 (dt, 1H, *J* = 8,8 Hz; *J* = 1,7 Hz); 1,50 (dt, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,7 Hz); 3,18 (m, 2H); 3,51 (m, 2H); 6,03 (t, 2H, *J* = 1,7 Hz); 6,53 (s, 2H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 48,3 (CH); 48,6 (CH₂); 48,7 (CH); 135,3 (CH); 142,0 (CH); 199,4 (C). **I.V.** (cm⁻¹): 3032; 3035; 2991; 2941; 2970; 1670; 1659; 1278; 1302.

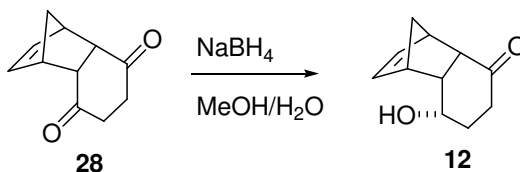
6.2.3 *endo*-Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-eno-3,6-diona (28)



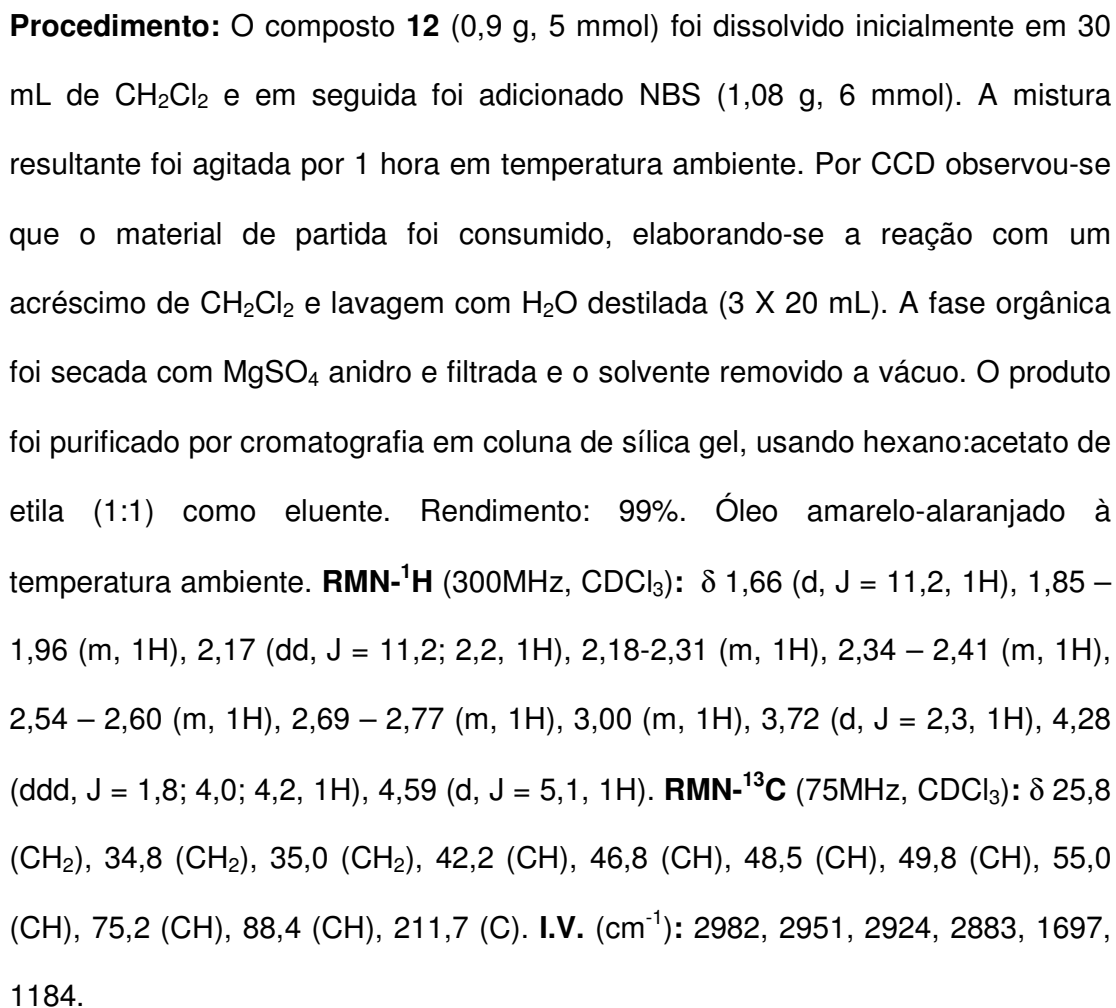
Procedimento: A uma solução do composto **7**, (0,64 g, 3,7 mmol) em ácido acético glacial (4,6 mL) foi adicionado Zn em pó (0,46 g) sendo a mistura resultante foi agitada a 55-60°C num período de 2 horas. Ainda sendo observada a presença de material de partida por CCD, foi adicionada mais 0,46 g de Zn em pó e 4,6 mL de ácido acético glacial com posterior por mais 10 horas. A mistura foi então filtrada e o resíduo sólido foi lavado com CH₂Cl₂ (4 X 20 mL). O filtrado foi colocado em funil de separação juntamente com solução saturada de NaCl. A mistura foi vigorosamente agitada e as fases foram separadas. A fase aquosa foi novamente lavada com CH₂Cl₂ (2 X 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com água destilada (100 mL), solução aquosa de NaHCO₃ (100 mL) e água destilada (100 mL) novamente. Após secagem da fase orgânica com MgSO₄ anidro e filtração, o solvente foi removido a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se acetato de etila/ hexano (2:1)

como eluente. Rendimento: 85%. Óleo amarelo. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,32 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 1,44 (dt, 1H, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = *J*₃ = 1,9 Hz); 2,27 (m, 2H); 2,59 (m, 2H); 3,18 (s, 2H); 3,40 (m, 2H); 6,12 (t, 2H, *J* = 1,7 Hz). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): 37,8 (CH₂); 47,3 (CH); 48,6 (CH₂); 51,8 (CH); 136,5 (CH); 209,6 (C=O). **I.V.** (cm⁻¹): 3065; 2989; 2970; 2943; 1709; 1302.

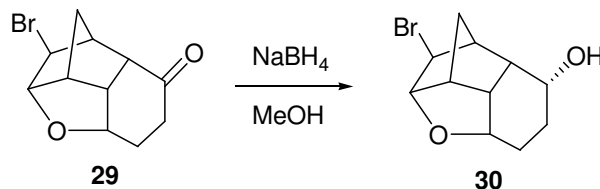
6.2.4 *rel*-(1S,2S,6S,7R,8R)-6-Hidroxitriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-ona (12)



Procedimento: Uma solução do composto **28** (250 mg, 1,41 mmols) em uma mistura de metanol (4,0 mL) e água (0,7 mL) foi resfriada a 0° C. A esta mistura fria foi adicionado NaBH₄ (15 mg, 1,56 mmol). Após a adição do agente redutor à temperatura ambiente, a mistura reagente foi agitada por 2,5 horas. Ácido acético glacial (0,05 mL) foi adicionado, seguido da adição de água gelada (3 mL). O produto foi extraído com CH₂Cl₂ (3 X 10,0 mL). Após a secagem da fase orgânica com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido com vácuo. Rendimento: 90%. Óleo alaranjado. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,21 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 1,33 (dt, 1H, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = *J*₃ = 1,8 Hz); 1,65-1,84 (m, 2H); 2,01-2,20 (m, 2H); 2,71-2,82 (m, 2H); 3,01 (s, 1H); 3,18 (s, 1H); 4,23 (m, 1H); 6,05 (dd, 1H, *J*₁ = 5,6 Hz, *J*₂ = 2,9 Hz); 6,13 (dd, 1H, *J*₁ = 5,6 Hz, *J*₂ = 2,9 Hz). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 27,6 (CH₂); 35,9 (CH₂); 44,9 (CH); 45,6 (CH); 45,7 (CH); 49,8 (CH₂); 51,3 (CH); 67,4 (CH); 135,2 (CH); 136,34 (CH); 213,4 (C=O). **I.V.** (cm⁻¹): 3439; 3062; 2961; 2937; 2903; 2871; 1687, 1331; 1074.

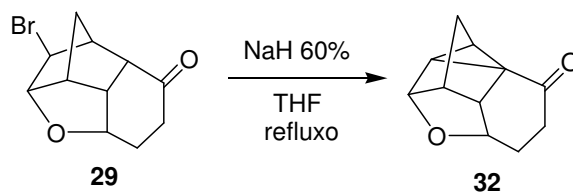


6.2.6 *rel*-(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-Bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ol (30):



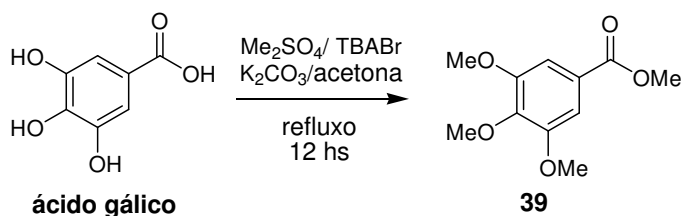
Procedimento: Uma solução do composto **29** (0,53 g, 0,6 mmol) em MeOH (1,6 mL) foi resfriada em banho de gelo. Em seguida foi acrescentou-se NaBH₄ (0,034 g, 0,89 mmol). Depois de acrescentados os reagentes a solução foi retirada do banho de gelo e agitada por 1 hora em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 1 gota de ácido acético, extraída com CH₂Cl₂ (3 X 2 mL) e lavada com H₂O destilada. A fase orgânica foi secada em MgSO₄ anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (2:1) como eluente. Rendimento: 72%. Ponto de Fusão: 156~158°C. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): 1,40 - 1,47 (m, 1H), 1.52 (dd, *J* = 11,1; 1,7 Hz, 1H); 1.61 - 1.68 (m, 2H); 1.97 (ddd, *J* = 14,4; 6,8; 3,4 Hz, 1H); 2.13 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H); 2,31 (m, 1H); 2,41 (m, 1H); 2,63 (m, 1H); 2.92 (m, 1H), 4.13 (m, 1H); 4,25 (d, *J* = 17,9; 7,7 Hz, 1H); 4,55 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): 26,1 (CH₂); 26,7 (CH₂); 35,4 (CH₂); 39,5 (CH); 42,9 (CH); 44,2 (CH); 49,1 (CH); 56,5 (CH); 69,7 (CH); 76,1 (CH); 88,7 (C-O). **I.V.** (cm⁻¹): 3269; 2975, 2950, 2922, 2870, 1067. **EM m/z**: 260 [(M + 2)⁺, ⁸¹Br], 258 (M⁺, ⁷⁹Br), 242 [(M - H₂O + 2)⁺, ⁸¹Br], 240 [(M - H₂O)⁺, ⁷⁹Br].

6.2.7 6,9-Epoxitetraciclo[6.2.1.0^{2,7}.0^{2,10}]undecan-3-ona (32)



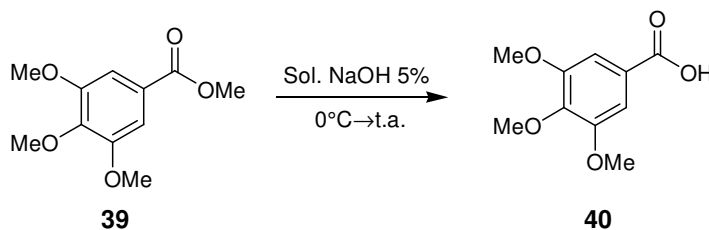
Procedimento: A uma solução do composto **29** (0,60 g, 2,3 mmol) em THF (1,6 mL) foi adicionada uma mistura de NaH 60% (0,11 g, 2,8 mmol) resfriada em banho de gelo. Depois de acrescentados os reagentes a mistura foi retirado do banho de gelo e agitada por 1 hora em temperatura ambiente e depois sob refluxo por 6 horas. A extração foi feita com CH₂Cl₂ (3 X 2 mL). A fase orgânica foi secada em MgSO₄ anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (2:1) como eluente. **RMN-¹H (300MHz, CDCl₃):** δ 1,69 (dd, *J* = 5,0; 0,8 Hz, 1H), 1,73 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 1,79 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 1,98 – 2,15 (m, 1H), 2,31 – 2,41 (m, 1H), 2,33-2,45 (m, 3H), 2,58 (t, *J* = 2,8; 3,2 Hz, 1H), 4,36 (t, *J* = 2,2; 2,9 1H), 4,56 (dd, *J* = 7,0; 2,8, Hz, 1H). **RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ 21,8 (CH); 30,3 (CH₂), 30,4 (CH₂), 33,1 (C), 35,3 (CH₂), 38,3 (CH₂), 42,0 (CH), 46,3 (CH₂), 74,2 (CH), 82,3 (CH), 209,4 (C). **EM *m/z*:** 176 [M⁺].

6.2.8 3,4,5-Trimetóxi-benzoato de metila (39)



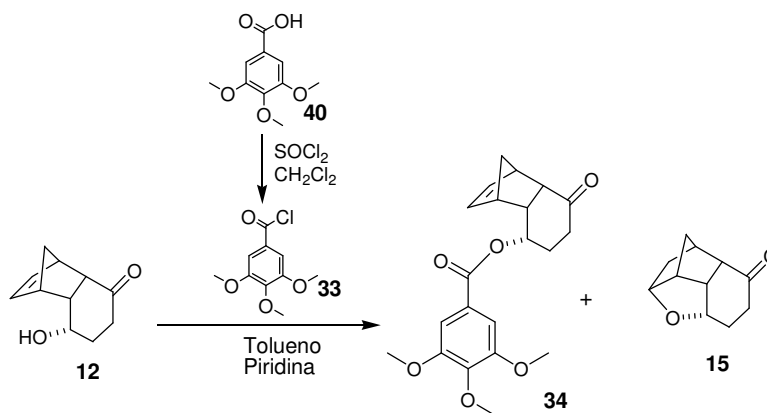
Procedimento: Uma mistura de ácido gálico (50 g; 0,294 mols), Me_2SO_4 (178,1 mg; 1,413 mols), K_2CO_3 anidro (175,5 g; 1,293 mols) e TBABr (1,0 g) em acetona (375 mL) foi refluxada por 12 horas. Em seguida foi filtrada em funil de Büchner e lavada com acetona (3 X 150 mL). Os filtrados foram reunidos para remoção do solvente obtendo-se um produto sólido branco com rendimento de 90%. Ponto de fusão: 78-80° C.

6.2.9 Ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (40)



Procedimento: Foi adicionada uma solução aquosa de NaOH 5% (5,6 mL) ao composto **39** (0,567 g, 2,76 mmol). A mistura foi resfriada a 0°C e agitada por 4 horas à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se 9 mL de água destilada. Lavou-se a solução aquosa com hexano (5 X 3 mL). Acidificou-se a solução com HCl concentrado até o pH 2,0 obtendo-se um precipitado branco. Este foi filtrado e lavado com água destilada gelada e em seguida mantido em dessecador.

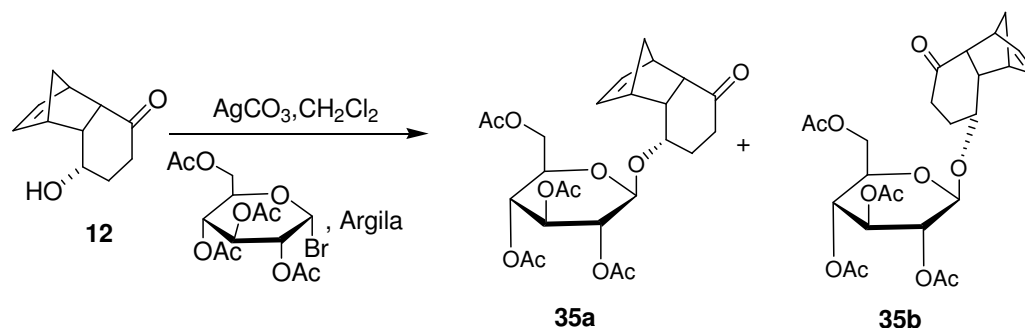
6.2.10 (1S,3S,7S,2R,8R)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-eno (34) e rel-(8S,12S,1R,2R,4R,6R)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (15)



Procedimento: Sob atmosfera inerte (N₂), foi adicionado o cloreto de tionila (0,270 mL; 3,6 mmol) a foi adicionado numa solução do composto **40** (0,385 g; 1,8 mmol) em CH₂Cl₂ (5,5 mL). A mistura foi refluxada por 4 horas. Após a remoção do solvente a vácuo, o cloreto do ácido foi dissolvido em tolueno (5,5 mL). A esta solução foram adicionados o composto **12** (0,318 g, 1,8 mmol) e piridina (5,0 mL) sendo a mistura refluxada por 24 horas e a reação monitorada por CCD. A solução foi diluída em CH₂Cl₂ e extraída com solução saturada de CuSO₄. A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro e concentrada à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel, usando-se hexano/ acetato de etila (1:1) como eluente. **Composto 34:** Rendimento: 15%. Ponto de Fusão: 42-46°C. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); 1,34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1,92-2,05 (m, 2H); 2,16-2,29 (m, 2H); 2,91-3,03 (m, 3H); 3,24 (s. l., 1H); 3,83 (s, 9H), 5,52 (m, 1H); 5,93 (dd, 1H, *J* = 5,3; 2,9 Hz, 1H); 6,12 (dd, *J* = 5,3; 2,9 Hz, 1H); 7,14 (s, 2H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 25,6 (CH₂), 35,6 (CH₂), 45,0 (CH),

44,4 (CH), 45,4 (CH), 49,7 (CH₂), 51,7 (CH), 56,1 (CH₃), 60,8 (CH₃), 70,0 (CH), 106,8 (C), 125,0 (CH), 135,4 (CH), 135,8 (CH), 142,2 (C), 152,9 (C), 165,1 (C), 211,5 (C). Composto **15**: Rendimento: 9%. Óleo transparente incolor. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1.30 (d, *J* = 10.3, 1H); 1.36 (d, *J* = 7,4, 1H); 1.44 (dt, *J* = 7,4; 2,7, 1H) 1.52 (d, *J* = 10.3, 1H); 1.83 (dt, *J* = 5,5; 13.8; 14,9 Hz, 1H); 2.10 - 2.21 (m, 1H); 2.23 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H); 2.39 (d, *J* = 5,8, 1H); 2.42 - 2.47 (m, 1H); 2.47 - 2.51 (m, 1H); 2.56 (dd, *J* = 3,6; 10,3, 1H); 2.89 (t, *J* = 4,0; 6,3 Hz, 1H); 4.31 (m, 1H); 4.49 (t, *J* = 6,3; 7,4 Hz, 1H); **RMN-¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 26.5 (CH₂), 35.1 (CH₂), 37.2 (CH₂), 37.4 (CH₂), 39.3 (CH), 43.5 (CH), 49.1 (CH), 51.2 (CH), 74.4 (CH), 79.7 (CH), 214.0 (C=O). **EM *m/z***: 178 [M⁺].

6.2.11 Compostos 35a e 35b

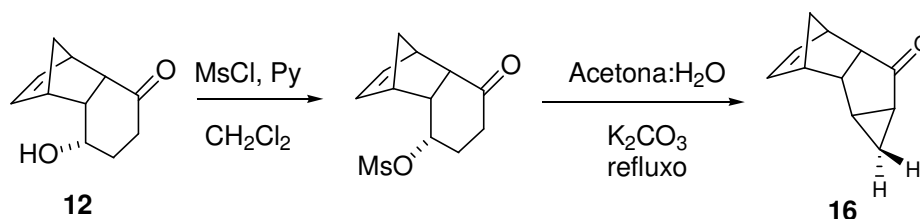


Procedimento: Uma mistura do composto **12** (45 mg; 0,25 mmol), Ag_2CO_3 (138mg; 0,50 mmol) e diclorometano (4,0 mL) seco foi agitado por 1 hora a temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida foi resfriado a 0° C e acrescentou-se argila (0,05 g), o brometo de tetra-*O*-acetil- α -D-Glucopiranosil (105 mg; 0,26 mmol) sob agitação. Após 24 horas adicionou-se diclorometano (4 mL) e a mistura foi filtrada em celite. O filtrado foi lavado com água destilada (3 X 2 mL) e a fase orgânica foi secada com MgSO_4 anidro sendo o solvente removido

sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica flash usando-se hexano/ acetato de etila como eluente. Óleo amarelo (mistura).

Composto **35a** ou **35b**: **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,03 (d, J = 7,6, 1H); 1,20 (d, J = 7,6, 1H); 1,36-1,47 (m, 2H); 1,66-1,78 (m, 2H); 1,94 (s. l., 3H); 1,95 (s. l., 3H); 2,00 (s. l., 3H); 2,04 (s. l., 3H); 2,27 (dd, J = 8,1; 3,9, 1H); 2,38 (dd, J = 8,1; 3,9, 1H); 2,79 (m, 1H); 2,83 (m, 1H); 3,62 (m, 1H); 3,92 (m, 1H); 4,03 (m, 1H); 4,16 (m, 1H); 4,83 (d, J = 8,1, 1H); 4,96-5,17 (m, 3H); 5,73 (dd, J = 5,5; 3,0, 1H); 5,82 (dd, J = 5,5; 3,0, 1H). **RMN-¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 20,5 (CH₃); 20,6 (CH₃); 20,7 (CH₃); 20,9 (CH₃); 31,7/ 31,8 (CH₂); 32,2 / 35,5 (CH₂); 44,3/ 45,2 (CH); 45,3/ 45,5 (CH); 49,7/ 50,1 (CH); 50,2/ 50,9 (CH₂); 50,7/ 51,6 (CH); 61,2/ 62,2 (CH₂); 67,3/ 67,8 (CH); 67,8/ 68,5 (CH); 68,6/ 69,8 (CH); 71,1/ 71,7 (CH); 73,1/ 73,3 (CH); 96,0/ 96,1 (CH); 131,7/ 134,6 (CH); 135,1/ 137,6 (CH); 169,4 (C); 169,5 (C); 170,1 (C); 170,5 (C); 212,6 (C).

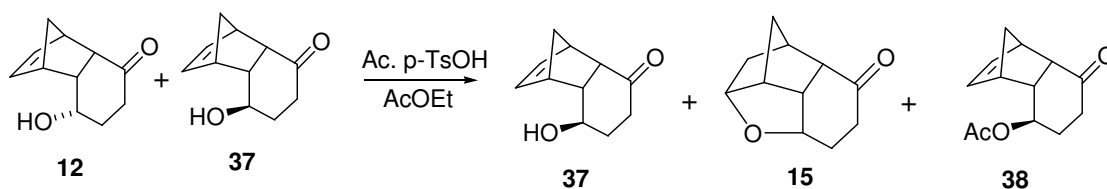
6.2.12 *rel*-(2S,7S,8S,1R,3R,5R)-Tetraciclo[6.2.1.0^{2,7}.0^{3,5}]undec-9-en-6-ona (16)



Procedimento: Em atmosfera de N₂, o composto **12** (240 mg, 1,35 mmol) foi dissolvido em diclorometano (6,5 mL) e piridina (1,3 mL) sob agitação a 0°C por 1 hora. Após atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se cloreto de mesila (0,21 mL, 2,7 mmol) sob agitação por 6 horas. A reação foi interrompida com 4,3 mL de

água destilada e em seguida extraída com acetato de etila (3X2mL) sendo a fase orgânica seca com MgSO_4 anidro e o solvente removido sob pressão reduzida, obtendo-se o produto mesilado. Este produto mesilado foi tratado sob refluxo em uma solução de 8 mL de acetona: água (75:25) e K_2CO_3 (0,065g, 0,325 mol) por 10 horas. A extração foi feita com acetato de etila (3 X 2 mL). A fase orgânica foi secada em MgSO_4 anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (1:1) como eluente. Composto **16**: **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 0,61 (dt, $J = 5,2; 9,3; 10,0$, 1H), 1,44 (dt, $J = 8,3$ Hz, 1H), 1,53 (dd, $J = 8,3; 1,7$ Hz, 1H), 1,75~1,83 (m, 2H), 1,92 (d, $J = 3,9; 9,7$, 1H), 2,91 (m, 1H), 3,01 (m, 1H), 3,09 (dd, $J = 10,9; 4,2$ Hz, 1H), 3,28 (m, 1H), 6,09 (dd, $J = 5,5; 3,0$, 1H), 6,18 (dd, $J = 5,5; 3,0$, 1H).

6.2.13 (-)- β -6-Hidroxitriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-ona-(37), rel-(8S,12S,1R,2R,4R,6R)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (15) e acetato de (3R)-6-oxotriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-il (38)



Procedimento: Os produtos da biotransformação (compostos **12** e **37**) foram dissolvidos em 1 mL de acetato de etila. Em seguida acrescentou-se 10 mg de ácido p-toluenossulfônico e a mistura foi agitada por 6 horas em temperatura ambiente. A extração foi feita com acetato de etila (3 X 2 mL). A fase orgânica foi

secada em MgSO_4 anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (1:1) como eluente. **Composto 37:** **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1,28 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 1,47 (dd, $J = 8,7$; 2,0, 1H), 1,85~1,93 (m, 2H), 1,95~2,03 (m, 2H), 2,35 (m, 1H), 2,50~2,58 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 3,06 (-OH), 3,17 (m, 1H) 3,23 (m, 1H), 6,06 (dd, $J = 6,2$; 3,3, 1H), 6,17 (dd, $J = 6,2$; 3,3, 1H). **RMN- ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): δ 30,9 (CH_2), 37,2 (CH_2), 44,3 (CH), 45,3 (CH), 48,3 (CH_2), 49,3 (CH), 52,0 (CH), 71,7 (CH), 134,6 (CH), 138,1 (CH), 213,2 (C). **Composto 15:** **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1.30 (d, $J = 10.3$, 1H); 1,36 (d, $J = 7,4$, 1H); 1,44 (dt, $J = 7,4$; 2,7, 1H) 1,52 (d, $J = 10.3$, 1H); 1,83 (dt, $J = 5,5$; 13.8; 14,9 Hz, 1H); 2,10 - 2,21 (m, 1H); 2,23 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H); 2.39 (d, $J = 5,8$, 1H); 2,42 - 2,47 (m, 1H); 2,47 - 2,51 (m, 1H); 2,56 (dd, $J = 3,6$; 10,3, 1H); 2,89 (t, $J = 4,0$; 6,3 Hz, 1H); 4,31 (m, 1H); 4,49 (t, $J = 6,3$; 7,4 Hz, 1H). **RMN- ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ 26.5 (CH_2), 35.1 (CH_2), 37.2 (CH_2), 37.4 (CH_2), 39.3 (CH), 43.5 (CH), 49.1 (CH), 51.2 (CH), 74.4 (CH), 79.7 (CH), 214.0 (C=O). **Composto 38:** **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1,22 (d, $J = 8,4$, 1H), 1,44 (dt, $J = 8,4$; 1,8, 1H), 1,84 – 1,89 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 2,31 – 2,40 (m, 2H), 2,65 – 2,72 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 6,10 (dd, $J = 5,4$; 2,7, 1H), 6,14 (dd, $J = 5,4$; 2,7, 1H). **RMN- ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): δ 21,3 (CH_3), 27,2 (CH_2), 37,0 (CH_2), 44,8 (CH), 45,7 (CH), 46,0 (CH), 48,1 (CH_2), 52,1 (CH), 73,4 (CH), 135,3 (CH), 137,8 (CH), 170,4 (C), 212,2 (C).

6.3 BIOTRANSFORMAÇÕES

6.3.1 Condições microbiológicas

Manutenção dos Microrganismos

A manutenção dos microrganismos foi feita por subcultura sucessivas em meio sólido BDA da Merck, em tubos inclinados e placas de Petri.

Microrganismo utilizado

Culturas do fungo *Mucor ramosissimus* Samutsevitch (URM 3087), foram obtidos do Laboratório de Bioquímica Vegetal do Departamento de Morfofisiologia.

Meio de Cultura Líquido

O fungo *Mucor ramosissimus* foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL previamente autoclavados em meio de cultura contendo D-glucose (4,0 g), asparagina (0,2 g), fosfato de potássio monobásico (0,05 g), sulfato de magnésio (0,025 g), tiamina (0,05 g) dissolvidos em 100mL de água destilada (MARQUES, 1998). O pH do meio foi ajustado para 6,0 com uma solução aquosa de NaOH 0,1M.

6.3.2 Ensaio padrão

Inoculação do Microrganismo ao Meio Líquido

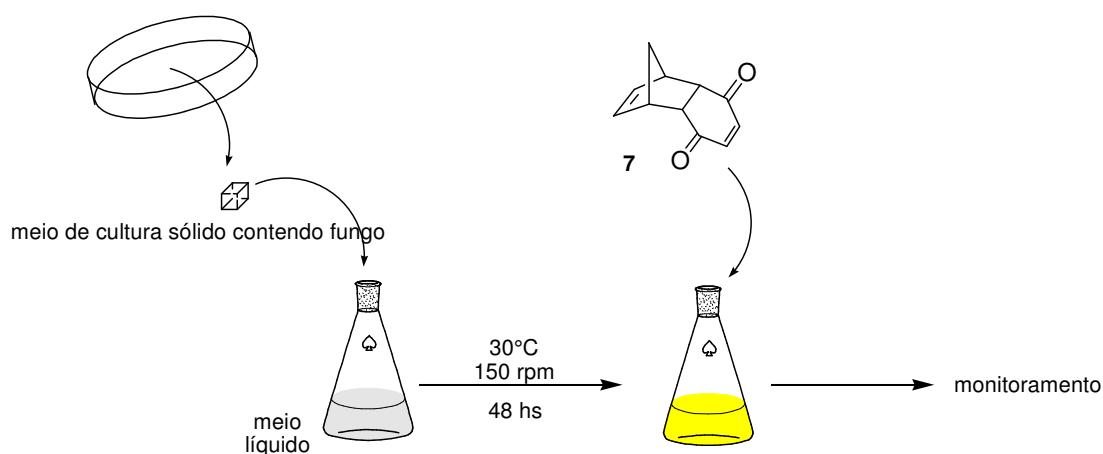
A inoculação do meio de cultura líquido foi realizada pela retirada de um pequeno fragmento do meio de cultura sólido contendo o fungo com a ajuda de uma alça do tipo agulha em forma de “L”, o qual foi adicionado ao meio de cultura

líquido. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e com incidência de luz ultravioleta por 15 minutos.

Reação de Biotransformação

Experimento 1:

Esquema 12



Biotransformação do composto 7: Após a inoculação com *M. ramosissimus* o meio líquido (200 mL) foi mantido em incubadora a 30°C com agitação a 150 rpm na ausência de luz. Após um período de 48 horas o substrato orgânico **7** (200 mg) foi adicionado. Foram utilizados três tipos de controles para as reações: apenas meio de cultura, meio de cultura e substrato, meio de cultura e fungo. A reação foi monitorada a cada 24 horas por 2 dias e depois a cada 28 horas, por remoção contínua de alíquotas que foram analisadas por CCD durante 14 dias. O meio foi filtrado em celite para retirada dos micélios e os produtos extraídos com acetato de etila (3 X 50 mL), sendo a fase orgânica secada sobre MgSO₄ anidro e

concentrado em evaporador rotativo. O resíduo da fase orgânica foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel, usando hexano/ acetato de etila (2:1) como eluente, obtendo-se rendimentos de 8% da substância **28**, 64% da substância **36** e 11% de material de partida recuperado. *Composto 28: RMN-¹H* (300 MHz, CDCl₃): δ 1,32 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 1,44 (dt, 1H, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = *J*₃ = 1,9 Hz); 2,27 (m, 2H); 2,59 (m, 2H); 3,18 (s, 2H); 3,40 (m, 2H); 6,12 (t, 2H, *J* = 1,7 Hz). *RMN-¹³C* (75MHz, CDCl₃): 37,8 (CH₂); 47,3 (CH); 48,6 (CH₂); 51,8 (CH); 136,5 (CH); 209,6 (C=O). *Composto 36: RMN-¹H* (300 MHz, CDCl₃): δ 2,20 (dt, *J* = 6,9; 1,6 Hz, 1H), 2,25 (dt, *J*₁ = 6,9; 1,6 Hz, 1H), 4,10 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 6,34 (s, 2H), 6,79 (t, *J* = 1,9 Hz, 2H). *RMN-¹³C* (75 MHz, CDCl₃): δ 46,5 (CH), 69,5 (CH₂), 113,9 (CH), 137,4 (C), 142,3 (CH), 143,9 (C).

Experimento 2:

Biotransformação do composto rac-12: O procedimento foi idêntico ao descrito no Experimento 1. O tempo total da reação foi de 12 dias. O produto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (1:1) como eluente. Obteve-se 7% de rendimento do composto **28** e 77% do material de partida, que apresentou atividade óptica ($\alpha_{20}^D = +2.5$, *c* 0,04 CHCl₃). *Composto 28:* Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C apresentaram-se idênticos aos espectros de uma amostra autêntica da dicetona **28**.

Experimento 3:

Biotransformação do composto 28: Procedimento idêntico ao descrito no Experimento 1. O tempo total da reação foi de 10 dias. O produto bruto foi

purificado por cromatografia de coluna em sílica gel usando-se hexano/ acetato de etila (1:1) como eluente. Foram recuperados 10% de material de partida e 70% da mistura dos álcoois **12** e **37** na proporção de 75:25 (determinada através do espectro de RMN de ^1H). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da mistura estão de acordo com os reportados na literatura (MARCHAND, 1995). Os valores da atividade óptica obtidos foram $\alpha_{20}^D = -31,04$, c. 0,057, MeOH.

6.3.3 Determinação da concentração ótima de esporos de *M. ramosissimus* para biotransformação

Coleta e Contagem de Esporos *M. ramosissimus*

Culturas de *M. ramosissimus* cultivadas por 8 dias em meio BDA foram lavadas com água destilada estéril com auxílio de um pincel. A suspensão de esporos foi filtrada com gaze e nylon (Figura 64). Uma alíquota da suspensão de esporos foi diluída em água (1:10) e utilizada para contagem de esporos em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A contagem foi realizada em 5 campos uniformemente distribuídos nos reticuladores da câmara (Figura 65).

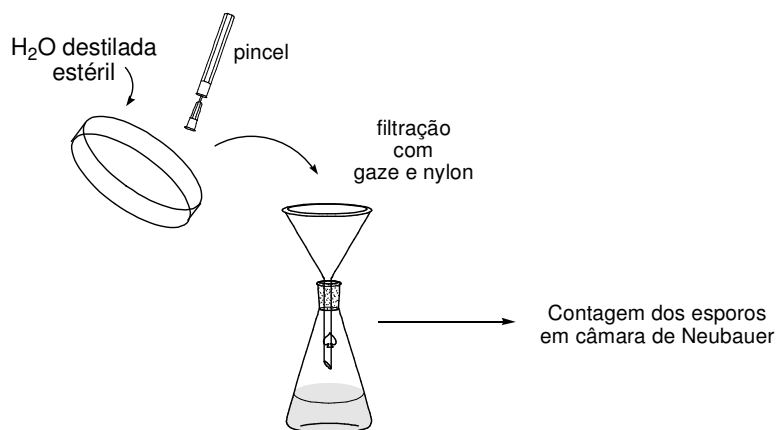


Figura 64: Esquema de preparo da suspensão de esporos

Cada campo numerado na Figura 65 possui uma área de $1/25 \text{ mm}^2$ e é composto por 16 campos menores de $1/400 \text{ mm}^2$. O cálculo da concentração de esporos na suspensão foi realizado da seguinte forma:

$$C_{\text{susp}} = \frac{D_a \times \bar{N}}{V_{\text{campo}}}; \text{ onde:}$$

C_{susp} : Concentração de esporos na suspensão (esporos/ mL)

D_a : Fator de Diluição

$\bar{N}$: Número médio de esporos no campo de $1/25 \text{ mm}^2$

V_{campo} : Volume de um campo de área $1/25 \text{ mm}^2$ e espessura de 0,1 mm de

filme líquido ($V_{\text{campo}} = 4 \times 10^{-6} \text{ mL}$)

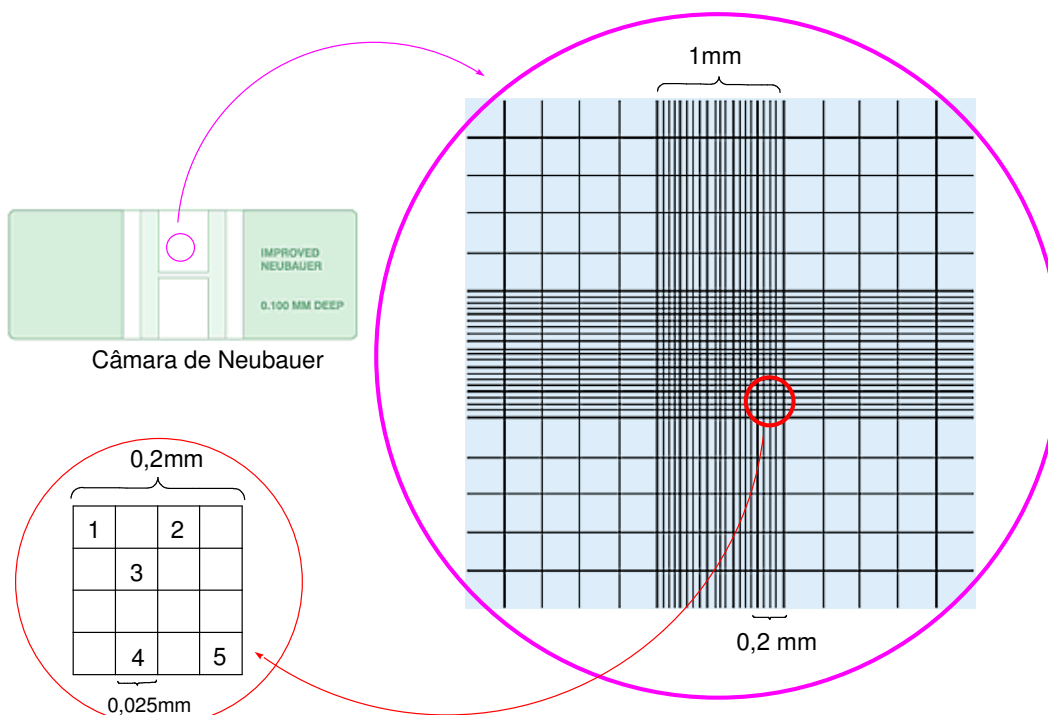


Figura 65: Esquema Câmara de Neubauer $1/400 \text{ mm}^2$ com destaque para o retículo central.

6.3.4 Ensaio com diferentes concentrações de esporos do fungo *M. ramosissimus*

Após determinar a concentração inicial de esporos, foram feitas diluições finais de 10^6 , 10^4 e 10^2 esporos/mL que foram utilizados nos ensaios de biotransformação.

Reação de Biotransformação

Experimento 4:

Biotransformação do composto 28: Após a inoculação dos esporos na concentração 10^6 esporos/ mL do fungo *M. ramosissimus* no meio líquido (100 mL) foi colocado em uma incubadora a 32°C com agitação a 150 rpm na ausência de luz. Após um período de 48 horas o substrato orgânico **28** (100 mg) foi adicionado. Foram utilizados três tipos de controles para as reações: apenas meio de cultura, meio de cultura e substrato, meio de cultura e esporos do fungo (1 mL) com concentração definida. A reação foi monitorada a cada 24 horas por remoção contínua de alíquotas de 0,5 mL e analisadas por CCD e CG durante 20 dias. O meio foi filtrado em celite para retirada dos micélios e os produtos foram extraídos com acetato de etila. O resíduo da fase orgânica foi purificado por cromatografia de coluna de sílica gel, usando hexano/ acetato de etila (2:1) como eluente.

Experimento 5:

Biotransformação do composto 23: O procedimento foi idêntico ao Experimento 4 mas inoculando no meio líquido com uma solução de 10^4 esporos/

mL de *M. ramosissimus*.

Experimento 6:

Biotransformação do composto 23: O procedimento foi idêntico ao Experimento 5 mas inoculando no meio líquido com uma solução de 10^2 esporos/mL de *M. ramosissimus*.

6.3.5 Determinação do pH ótimo de crescimento de *M. ramosissimus* em meio líquido para biotransformação

Nos ensaios com diferentes concentrações de esporos, optou-se pela concentração de 10^4 esporos/mL. Foram preparados meios de cultura com pH variando de 4 a 9, com intervalos de 1,0. Os ensaios foram feitos em triplicata e como controle foi utilizado o meio de cultura e substrato apenas. 48 horas após a inoculação dos esporos, o composto **28** (25 mg) dissolvido em etanol (1 mL) foi adicionado aos meios. A reação foi monitorada a cada 48 horas por remoção contínua de alíquotas e analisadas por CCD durante 20 dias. O meio foi filtrado em celite para separação dos micélios e os produtos foram extraídos com acetato de etila (3 X 50 mL). A fase orgânica foi secada em MgSO_4 anidro e concentrado em evaporador rotativo.

Os experimentos foram numerados de **7** a **12**, conforme o pH: Experimento **7**: pH 4; Experimento **8**: pH 5; Experimento **9**: pH 6; Experimento **10**: pH 7; Experimento **11**: pH 8; Experimento **12**: pH 9.

6.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLOGICA

6.4.1 Atividade citotóxica

6.4.1.1 Ensaio de Citotoxicidade in vitro

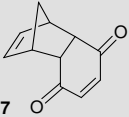
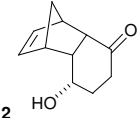
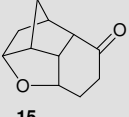
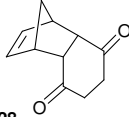
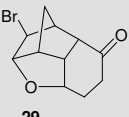
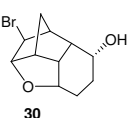
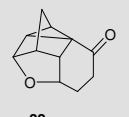
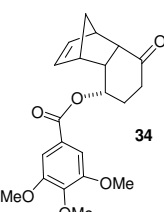
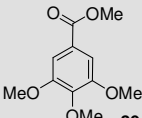
As culturas de células e os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal de Ceará, sob supervisão da Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Material Biológico

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células: HL-60 (célula leucêmica promielocítica humana), MDA-MB 435 (célula de câncer de mama humano), HCT-8 (célula de carcinoma ileocecal humano) e SF-295 (célula tumoral de SNC) todas cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: foram testados nove compostos sintetizados (Tabela 37) descritos neste trabalho. Estas amostras foram diluídas em DMSO e preparadas nas concentrações estoques de 5mg/ mL.

Tabela 38: Amostras testadas para ensaio *in vitro*.

amostras	Nomenclatura
	<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undeca-4,9-dieno-3,6-diona
	<i>rel</i> -(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona
	<i>rel</i> -(8 <i>S</i> ,12 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona
	<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec9-eno-3,6-diona
	<i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona
	<i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol
	<i>rel</i> -(7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,11 <i>S</i> ,12 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-6-oxapentaciclo[6.4.0.0 ^{1,9} .0 ^{5,12} .0 ^{7,11}]dodecan-2-ona
	<i>rel</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno
	3,4,5-trimetóxi-benzoato de metila

Método

As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 céls./ 100μL, para células em suspensão de 2×10^3 céls./ 100μL, para células aderidas. Os

diversos compostos foram acrescentados em diferentes concentrações, que variaram entre 3,9 a 100ug/ mL para as misturas e 0,39 – 25µg/ mL para substâncias puras. As células foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Foram então adicionados 200µL de uma solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas incubadas por 3h. As absorbâncias em 550 nm foram registradas após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa leitor de ELISA.

6.4.1.2 Atividade Hemolítica sobre Eritrócitos de Camundongo (*Mus musculus* Swiss)

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da UFC. A metodologia utilizada foi descrita por Costa-Lotufo *et al.* 2002; Dresh *et al.* 2005 (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002; DRESCH *et al.*, 2005), permite avaliar o potencial de substância em causar lesões na membrana plasmática de eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da mesma.

Foram testadas amostras puras (Composto **7, 12, 15, 28, 29, 30, 32, 34 e 39**) diluídas em DMSO na concentração de 5 mg/ mL.

Foi realizada a coleta de sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) via plexo orbital após anestesia, posteriormente sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/ 3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados

em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 200 a 3,9µg/ mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância em leituras de ELISA, a 540 nm. A atividade hemolítica das substâncias foi determinada a partir dos valores de referência.

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

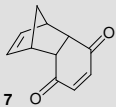
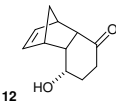
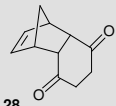
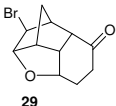
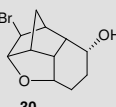
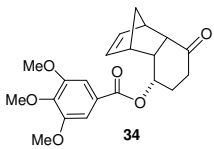
6.4.2. Atividade Inseticida

Material Biológico

Insetos: Indivíduos não sexados de *Sitophilus zeamais* utilizados nos ensaios foram provenientes de criação mantida em laboratório à temperatura de $25 \pm 22^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo natural, em grãos de trigo, utilizando-se frascos de vidro de 300 mL, com o gargalo vedado com filó.

Amostras: Foram testados seis compostos (Tabela 38) descritos neste trabalho. Estas amostras puras foram diluídas em metanol, etanol, clorofórmio e hexano.

Tabela 39: Amostras testadas para ensaios de atividade inseticida.

amostras	Nomenclatura
	<i>endo</i> -triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undeca-4,9-dieno-3,6-diona
	<i>rel</i> -(1S,2S,6S,7R,8R)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ²⁷]undec-9-en-3-ona
	<i>endo</i> -triciclo [6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-eno-3,6-diona
	<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,1} ²]dodecan-11-ona
	<i>rel</i> -(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol
	<i>rel</i> -(1S,3S,7S,2R,8R)-6-Oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenilcarbonilóxi)tríciclo o[6.2.1.0 ^{2,7}] undec-9-eno

Procedimento: Os grãos de trigo foram pulverizados em capela de fluxo laminar com pulverizador acoplado a uma bomba de vácuo, com soluções contendo 10 mg de cada amostra. Estas foram diluídas em solventes apropriados numa quantidade máxima de 10 mL por amostra em 100 g de trigo. Após evaporação do solvente por 72 horas a 38°C, o trigo foi acondicionado em caixas plásticas circulares (6 cm de diâmetro e 2,1 cm de altura), totalizando 10 g de trigo por recipiente. O controle foi feito com trigo não tratado e tratado somente com solvente. Em cada recipiente foram liberados 20 adultos não sexados de *S. zeamais*, com idade entre dez e vinte dias. As avaliações foram feitas no primeiro, segundo, quinto e décimo dia, contando-se o número de insetos mortos e descartando-os. As parcelas foram organizadas segundo delineamento experimental inteiramente casualizado com dez repetições para cada tratamento.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

6.5 CÁLCULO DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C

Os experimentos de cálculo teórico de deslocamento químico foram realizados no Laboratório de Modelagem Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo Mestrando Euzébio Guimarães Barbosa.

Método

O composto **32** foi totalmente otimizado com o programa Gaussian no nível de teoria B3LYP/cc-pVDZ (FRISCH *et al.* 2004). Em seguida, foram realizados cálculos de *single point* em solvente clorofórmio por meio do Modelo de Contínuo Polarizável (PCM) no mesmo nível de teoria. Os confôrmeros de menor energia foram utilizados para realização de cálculo de deslocamento químico de ^{13}C pelo método GIAO, utilizando como referência a blindagem correspondente do TMS calculados no mesmo nível de teoria. As análises de correlação linear foram feitas usando o programa XMGrace. A qualidade da correlação foi julgada examinando R , e o coeficiente de correlação de Pearson.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ARRUDA, A. L.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. **Seletividade π -facial em Biorreduções de Norbonan-7-onas 2-endo-substituídas por *Beauveria densa* (CMC 3240) e *Curvularia lunata* (NRRL 2380).** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, p. 1-6, 2006.

BALZARINI, J.; AQUAROB, S.; HASSAN-ABDALLAH, A.; DALUGED, S. M.; PERNOB, C. F.-McGUIGANC, C. FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters. v. 537, p. 38-.

BENHALIMA, H.; CHAUDHRY, M.Q.; MILLS, K.A.; PRICE, N.R. **Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco.** Journal of Stored Products Research, v. 40, p. 241-249, 2004.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S.; McCOY, K.D.; WANG, R. **The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.** Biochemica, v. 4, p. 15-20, 1996.

BREITMAYER, E. **Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide.** 3rd ed. Germany. John Wiley & Sons, Ltd. 2002.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Série histórica de produção - safras 1990/ 91 a 2004/ 05. Disponível em: <
<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>>.
Acesso em: 1 set. 2006.

BEATRIZ, A. **Estudos Sobre a Síntese de Heliangolídeos através da Reação de Diels-Alder.** 2001. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo).

BEATRIZ, A., LIMA, D. P., MARQUES, M. R. **Biotransformações com Microorganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas.** Revista Ágora; v. 1, n. 4, p. 1-12, 2005.

BROOKES, K. B.; HICKMOTT, P. W. JUTLE, K. K.; SCHREYER, C. A.; **Introduction of pharmacophoric groups into polycyclic systems. Part 4. Aziridine, oxiran and tertiary β -hydroxyethylamine derivatives of adamantane.** South African Journal of Chemistry. v. 45, p. 8-11, 1992.

CARRUTHERS, W. **Some Modern Methods of Organic Synthesis.** 3rd ed. Cambridge texts in Chemistry and Biochemistry. Cambridge. New York, 1986.

CONSTANTINO, M. G., OLIVEIRA, K. T.; BEATRIZ, A., da SILVA, G. V. J. **A synthetic approach to bicyclo[6.2.1]undecane ring systems.** Tetrahedron Letters. V. 44, p. 2641- 2643, 2003.

CONSTANTINO, M. G., da SILVA, G. V. J., BEATRIZ, A. **A model synthesis of the bicyclic core structure of the furanoheliangolide sesquiterpenes.** Tetrahedron Letters. v. 41, p. 7001-7004, 2000.

CONSTANTINO, M. G.; BEATRIZ, A.; SILVA, G.V.J.da.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Synthetic studies on the diels–alder adduct from 3,4-dimethoxyfuran and benzoquinone.** Synthetic Communications, v. 31, p. 3329-3336, 2001.

COOKSON, R.C.; GRUNDWELL, E.; HUDEC, J. **Synthesis of cage-like molecules by irradiation of Diels-Alder adducts.** Chemical & Industry, p. 1003–1004, 1958.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FONTENELE, J.B.; JUNIOR, H.V.N.F.; SOUSA, C.M.; SILVEIRA, E.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; MORAES, M.O .; VIANA, G.S.B. **Cytotoxic activity of chalcones isolated from Lonchocarpus sericeus.** Phytotherapy. Research, v. 17, p. 155-159, 2003.

CRUZ, A. S., CUPPOLONI, K. M., MARTINEZ, C. H. O., GOMES, L. F. S., **Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.

DE CLERCQ, E. Clinical Microbiology Review, v. 10, p. 674-693.

DENIS, J. N.; GREENE, A. E.; GUÉNARD, D.; GUERITE-VOEGELEIN, F.;

MANGATAL, L.; POTIER, P. **A highly efficient, practical approach to natural taxol**. Journal American Chemical Society. v. 110, p. 5917 - , 1988.

DIELS, O; ALDER, K. **Synthesen in der hydroaromatischen reihe**. Liebigs Annalen der Chemie, v. 460, p. 98-122, 1928.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A., JR; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J. B., V.; MENNUCCI, B. C.; M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M. E., M.; TOYOTA, K. F., R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X. K., J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚŁOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPL, J. A.; Gaussian, I., Ed. Wallingford CT, 2004.

FURNESS, B.S.; HANNAFORD, A.J.; SMITH, P.W.G.; TACHELL, A.R. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5th ed; Longman Scientific & Technical: New York, p. 1025-1026, 1989.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3^a ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GAUKROGER, K.; HADFIELD, J. A.; LAWRENCE, N. J.; NOLAN, S.; MCGOWN, A. **Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit?** Organic Biomolecular Chemistry, v. 1, 3033-3037.

GELDENHUYS, W.J.; MALAN, S. F.; BLOOMQUIST, J.R.; MARCHAND, A.P.; Van der Schyf, C.J. **Pharmacology and structure – activity relationships of bioactive polycyclic cage compounds: a focus on pentacycloundecane derivatives.** Medicinal Research Review, v. 25, p. 22-48, 2005.

GOVENDER, T.; HARIPRAKASHA, H. K.; KRUGER, H. G.; RAASCH, T.; **Synthesis of Trishomocubane Amino Acid Derivatives.** South African Journal of Chemistry, v. 58, p. 37-40, 2005.

GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHIMIDT, B.; AUTIAN, J. **Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers.** Journal of Pharmaceutical Science, v. 54, p. 1545-1547, 1965.

HANNA, N. B.; ROBINS, R. K.; REVANKAR, G. R. **Syhtnesis of 5'-O- β -D-glucopyranosyl and 5'- O- β -D-galactopyranosyl derivatives of ribavirin.** Carbohydrate Research, v. 165, p. 267-274. 1987.

HARA, H.; SHIMASAWA, M.; HASHIMOTO, M.; SUKAMOTO, T. Anti-migraine effects of Lomerazine. Folia Pharmacology Japonica, v. 112, p. 138-142. 1998.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. **Comparison of Bactericidal Activity of Streptomycin, Amikacin, Kanamycin, and Capreomycin against *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 33, n. 8, p. 1298-1301.1989.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. **Whole organism biocatalysis.** Current Opinion in Chemical Biology. V. 9, p. 174-180. 2005.

KITAGAWA, K.; MIZOBUCHI, N.; HAMA, T.; HIBI, T.; KONISHI, R.; FUTAKI, S. **Synthesis and antinociceptive activity of [D-Ala2]Leu-enkephalin derivatives conjugated with the adamantane moiety.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 45, p. 1782-1787, 1997.

KLIBANOV, A.M., **Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents.** Accounts of Chemical Research v. 23, p. 114-120, 1990.

KONNO, H.; OGASAWARA, K. **Enantiosseletive construction and utilization of**

2-(cyclohex-2-enyl)phenols. Synlett. v. p. 1004-1006, 1998.

LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEEGER, C., **Rules for optimization of Biocatalysis in Organic Solvents.** Biotechnology & Bioeng v. 30, p. 81- , 1987.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **O renascimento de um fármaco: Talidomida.** Química Nova, v. 24, p. 683-688, 2001.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados.** 2003. 80p. Passo Fundo: Embrapa Trigo,

LOUGHLIN, W. A. **Biotransformation in Organic Synthesis.** *Bioresource Technology*, 74, 49-62, 2000.

MARCHAND, A. P., ALLEN, R. W. **An improved synthesis of pentacyclo [5.4.0.0^{2,6}.0^{3,1}.0.0^{5,9}] undecane.** Journal of Organic Chemistry, v. 39, p. 1596 - 1597, 1974.

^aMARCHAND, A. P. **Synthesis and Chemistry of Homocubanes, Bishomocubanes, and Trishomocubanes.** Chemical Review, v. 89, p. 1011-1033, 1989.

^bMARCHAND, A. P. In **Advances in Theoretically Interesting Molecules**, R. P. Thummel, ed, JAI Press, Greenwich CT, v. 1, p. 357 - , 1989.

MARCHAND, A.P.; REDDY, G.M. **Mild and highly selective ultrasound-promoted zinc/acetic acid reduction of C:C bonds in α,β -unsaturated γ -dicarbonyl compounds.** Synthesis, v. p. 198-200, 1991.

MARCHAND, P.; XING, D.; WANG, Y.; BOTT, S. G. **Improved synthesis of racemic and optically active 4-hydroxycyclohex-2-en-1-one.** Tetrahedron Asymmetry, v. 6, p. 2709-2711, 1995.

MARTINS, L. R. **Isolamento de constituintes de *Maytenus ilicifolia* Matius e Biocatálise de Substratos e Intermediários de Reações em Meio Aquoso.** 2004. Dissertação (Mestrado em Química). Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MENGER, F.M., **Enzyme reactivity from an organic perspective**. Accounts of Chemical Research, v. 26, p. 206-212, 1993.

MINNAARD, A.; WIJINBERG, J. B. P. A.; de GROOT, A. **The Synthesis of Germacrane Sesquiterpenes and Related Compounds**. Tetrahedron, v. 55, p. 2115-2146, 1999.

ODA, M.; KAWASE, T.; OKADA, T.; ENOMOTO, T. *Org. Synth. Coll. Vol. IX*, 1998; p.186.

OLIVEIRA, K. T. **Estudos sintéticos e teóricos sobre anulenos e baquenolidas**. Tese (Doutorado em ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2006. (acesso on-line ver: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-18082006-181618/>)

OLIVER, D. W.; DEKKER, T. G.; SNYCKERS, F. O. **Antiviral properties of 4-amino-(D₃)-trishomocubanes**. Drug Research. v. 41, p. 549-552.

ONISHI, J.; MEINZ, M.; THOMPSON, J.; CUROTTO, J.; DREIKORN, S.; OSENBACH, M.; DOUGLAS, C.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; KONG, L.; CABELLO, A.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; DIEZ, M. T.; MARTIN, I.; BILLS, G.; GIACOBBE, R.; DOMBROWSKI, A.; SCHWARTZ, R.; MORRIS, S.; HARRIS, G.; TSIPOURAS, A.; WILSON, K.; KURTZ M. B. **Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -D-Glucan Synthase Inhibitors**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. V. 44, p. 368-377, 2000.

PALERMO, C. M.; MARTIN HERNANDO, J. I.; DERTINGER, S. D.; KENDE, A. S.; GASIEWICZ, T. A. **Identification of Potential Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists in Green Tea**. Chemical Research in Toxicology. v. 16, p. 865-872.

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

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

RIBEIRO, B.M.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, E.E.; SANTOS, J.P. **Insecticide resistance and synergism in brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**. Journal of Stored Products Research, v. 39, p.21-31, 2003.

RANGANATHAN, D. THOMAS, A., HARIDAS, V., KURUR, S., MADHUSUDANAN, P., ROY, R., KUNWAR, A. C., SARMA, A. V. S., VAIRAMANI, M., SARMA, K. D. **Design, Synthesis, and Characterization of Tyrosinophanes, a Novel Family of Aromatic-Bridged Tyrosine-Based Cyclodepsipeptides**. Journal of Organic Chemistry, v. 64, p. 3620- 3629.1999.

RISINGER, G E.; GREEN. L. L.; GREEN, E. E. **Structure of *exo*-5-hydroxy-*endo*-6-hydroxybicyclo[2.2.1]heptane-*endo*-2-carboxylic acid lactone**. Chemistry and Industry. v. p. 298-299, 1969..

ROGERO, S.O.; SOUZA-BAZZI, A.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S.; FERNANDES, K.C.; HIGA, O. Z. **Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 59, n. (1/2), p. 1-5, 2000.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. **Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias**. Materials Researchs, v. 6, p. 317-320, 2003.

SHEKAN, O. C.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. **New colorimetric cytotoxycity assay for anticancer – drug screening**. Journal of. Immunological Methods, v. 65, p. 55-65, 1983.

SIH, C. J., WU, S-H., in: ELIEL, E.L., ALLINGER, N. L., DENMARK, S.E., (Eds.), **Topics in Stereochemistry**, vol. 19. Interscience, New York, pp. 63, 1989.

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

SOUZA, A. X. **Estudos sobre a síntese de anulenos pela reação de Diels-Alder**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e

Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

STROERMER, M.J.; BUTLER, D.N.; WARRENER, R.N.; WEERASURIA, K.D.V.; FAIRLIE, D.P. **Cycloadditions of isobenzofuran to a constrained template bearing neighboring dienophiles.** Chemistry - A European Journal, v. 9, p. 2068-2071, 2003.

SWEERS, H.M., WONG, C.-H., **Enzyme-catalysed regioselective deacylation of protected sugars in carbohydrate synthesis.** Journal American Chemical Society. V. 108, p. 6421-6422, 1986.

TADESSE, A.; SHANNON, E. J. **Effects of Thalidomide on Intracellular *Mycobacterium leprae* in normal and Activated Macrophages.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 12, p. 130-134.

TAVARES, M. A. G. C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae).** 2003. 59p. Dissertação (Mestrado em entomologia)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

WASSERMANN, A. **The mechanism of additions to double bonds. Part I. Thermochemistry and kinetics of a diene synthesis.** Journal of Chemical Society. v. p. 828-838, 1935.

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

Full Paper

Synthesis and Biological Evaluation of Rigid Polycyclic Derivatives of the Diels-Alder Adduct Tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione

Felicia Megumi Ito ¹, Jacqueline Marques Petroni ¹, Dênis Pires de Lima ¹, Adilson Beatriz ^{1,*}, Maria Rita Marques ², Manoel Odorico de Moraes ³, Leticia Veras Costa-Lotufo ³, Raquel Carvalho Montenegro ³, Hemerson Iury Ferreira Magalhães ³ and Cláudia do Ó Pessoa ³

¹ Department of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil. E-mails: megumi@nin.ufms.br, jacque_petroni@hotmail.com, dlima@nin.ufms.br

² Department of Morphophysiology, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil. E-mail: mrmarx@nin.ufms.br

³ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. E-mail: odorico@ufc.br, lvcosta@secrel.com.br, hemersoniury@yahoo.com.br, cpessoa@ufc.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: adilbeat@nin.ufms.br; Homepage: <http://www.dqi.ufms.br/~lp4/adilson.htm>.

Received: 30 January 2007; in revised form: 14 February 2007 / Accepted: 16 February 2007 /

Published: 27 February 2007

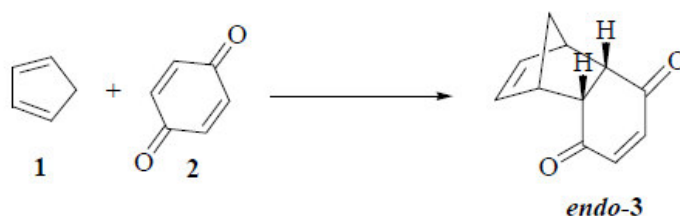
Abstract: Part of our research program concentrates on the discovery of new bioactive compounds prepared either by total synthesis or molecular transformation of compounds with bioactivity profiles. In this work we have focused our interest on chemical transformations of the Diels-Alder adduct tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione in order to obtain cage-like compounds and derivatives, followed by an evaluation of their biological activity.

Keywords: Tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecane ring system, cage-like compounds, Diels-Alder adducts, biological activity.

Introduction

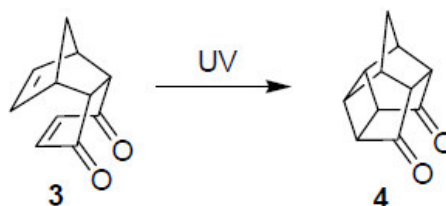
Since the discovery of the Diels-Alder reaction [1], it has become one of the most employed strategies in organic synthesis [2]. This all began in 1928, when the cycloaddition between cyclopentadiene (**1**) and *p*-benzoquinone (**2**), forming mostly the *endo* adduct tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]-undeca-4,9-dien-3,6-dione (**3**), as shown in Scheme 1, was described.

Scheme 1. Preparation of tricyclo [6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione.

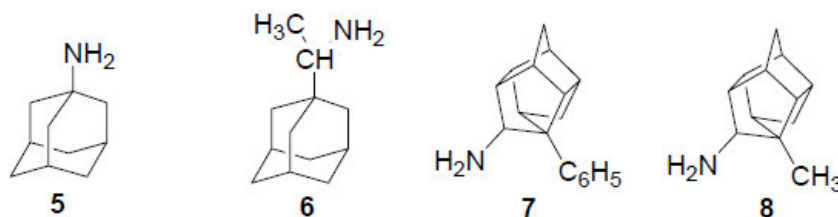


A unique aspect of adduct **3** is its high symmetry, which allows for facile selective reactions at one or both carbonyl groups by means of classical and non-classical reagents, including microbial transformations [3]. Another feature to be considered is its cage-like framework, which forces functional groups into close spatial proximity, facilitating subsequent reactions, as exemplified, for instance, by the synthesis of Cookson's diketone (**4**) [4] (Scheme 2).

Scheme 2. Preparation of Cookson's diketone (**4**).



Although compound **3** has been extensively studied, its use in the medicinal chemistry field has not been exploited very much. On the other hand, there is considerable interest nowadays in studying the biological activity of cage-like rigid polycyclic molecules, which owing to their structural peculiarities, may interact in a specific way with biological receptors and/or trap smaller chemical species in their interior. It is known, for example, that the incorporation of a rigid carbogenic structure in biologically active compounds often increases their physiological activity. One of their advantages is a slowing down of metabolic degradation and consequent prolongation of the activity [5-7].

Figure 1: Examples of bioactive cage-like polycyclic compounds.

Considering the important antiviral activity of amantadine (**5**) and rimantadine (**6**), additional studies related to cage-like polycyclic compounds led to the discovery of other compounds with similar properties, such as the pentacycloundecanes **7** and **8** [6] (Figure 1).

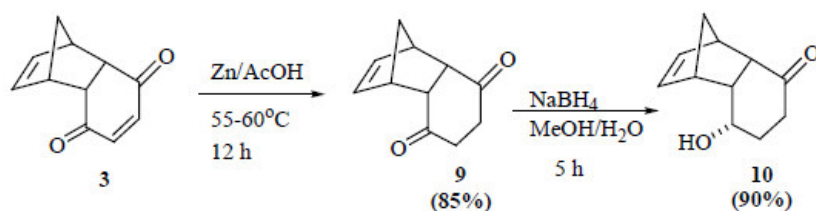
Accordingly, as a part of a research program aimed at finding new synthetic compounds with interesting bioactivity profiles, we decided to investigate the preparation of some rigid polycyclic oxygenated compounds, taking advantage of the structural versatility of the Diels-Alder adduct **3**. The central idea in this work was to make accessible new structurally complex molecules which are both easy to prepare and endowed with potential biological activity.

Results and Discussion

Chemistry

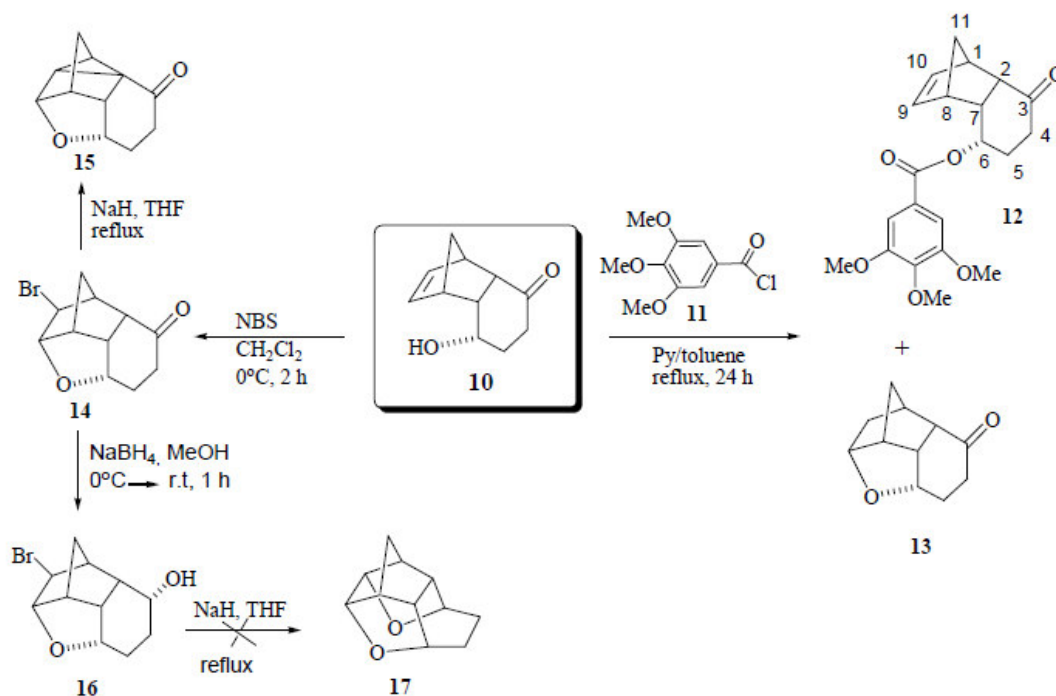
The reaction shown in Scheme 1 is widely known in literature [2, 8-11], however, from an experimental point of view, a few drawbacks can be noted, such as the use of toxic solvents and the need to perform the reaction at very low temperatures. These features prompted us to search for a more efficient and higher yielding methodology to generate **3**. As a result of these studies the cycloaddition reaction was performed in a 5:1 mixture of hexane-ethyl acetate to both force the kinetic control of the reaction and to solubilize the reagents. This procedure led to a 97% yield of the *endo* isomer after recrystallization from hexane, as proven by its ¹H-NMR spectrum.

Schemes 3 and 4 show some of the compounds chosen for chemical transformation and screening for biological activity that were prepared from adduct **3**. Compounds **9** and **10** (Scheme 3) were easily obtained using described methods [3, 12]. As one may observe, the keto-alcohol **10** possesses appropriate structural and chemical functionality for the insertion of new groups and building rigid cage-like polycyclic molecules, in conformity with our initial plan.

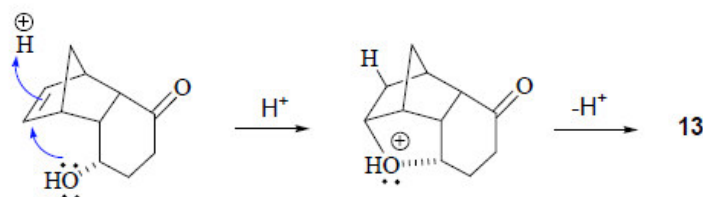
Scheme 3. Selective reductions of tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione (**3**).

The structures of compounds **3**, **9** and **10** were confirmed by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature [8, 12 and 3, respectively]. Next, and starting from compound **10**, five rigid polycyclic compounds were obtained, possessing various and diverse chemical functionalities, as shown in Scheme 4.

Scheme 4. Syntheses of derivatives of keto-alcohol **10**.



Gallate **12** was prepared by submitting **10** to simple esterification in refluxing toluene with the acid chloride **11** in the presence of pyridine. The structure and stereochemistry of the resulting ester **12** were assigned based on NMR spectral analyses, including HSQC, HMBC, COSY and NOESY experiments. The ^1H -NMR spectrum showed a multiplet at 5.52 ppm, assigned to the hydrogen attached to C6, which is probably deshielded by the ester carbonyl. It also showed a multiplet (4H) at 1.95–2.45 ppm, assigned to the two methylene groups at C4 and C5. The two doublets at 1.26 and 1.37 ppm ($J = 8.4$ Hz) correspond to the geminal methylene protons at C11. The broad signal at 3.24 ppm was ascribed to the hydrogen attached to C1 and the signals of the protons on C2, C7 and C8 were superimposed at around 2.91–3.03 ppm. The olefinic hydrogens of C9 and C10 appear as double-doublets at 5.93 and 6.2 ppm, respectively, while the aromatic ring singlets and methoxys are observed at 7.21 and 3.83 ppm. A comparison of the NMR data of substance **12** with that of a similar tricyclic ketoester described by Marchand *et al.*, which contains an *endo*-6-OC(O)Ar group where Ar = 3,5-dinitrophenyl [3], also confirmed the structure proposed for compound **12**. Compound **13** was obtained along with **12** (Scheme 4), probably due to the mild acid conditions of reaction mixture favoring protonation of double bond followed by ring closure via the hydroxyl group [13] (Scheme 5). With the purpose of verifying this proposal, we checked the stability of compound **10**. We have observed that **10** is stable in pure ethyl acetate, however, it is rapidly converted into **13** when a small amount of *p*-toluenesulfonic acid is added to the solution.

Scheme 5. Mechanistic proposal for the formation of compound **13**.

The structure of compound **13** was confirmed on the basis of its spectral data. In contrast to **10**, no olefinic proton signals were observed in the ^1H -NMR spectrum. As main signals a multiplet at 4.22 ppm, ascribed to the hydrogen attached to C9, and the triplet at 4.41 ppm assigned to the hydrogen at C6 were observed. The ^{13}C -NMR data were in agreement with the proposal structure. The appearance of C10 as an additional secondary carbon (CH_2) at 35.1 ppm was decisive for confirmation of the **10** $\rightarrow$ **13** transformation. Moreover, the mass spectrum registered the expected molecular ion (M^+) at $m/z = 178$.

The bromoether **14** was obtained in quantitative yield from alcohol **10** by bromination with NBS in dichloromethane [14]. Treatment of tetracycle **14** with NaH in THF under reflux induced abstraction of the acidic proton at C2 and subsequent intramolecular cyclopropanation leading to formation of compound **15**. Its structure was confirmed by spectroscopic studies comprising 2D experiments (COSY, HSQC, HMBC and NOESY). The ^1H -NMR spectrum showed the hydrogen at C6 as a multiplet at 4.35 ppm, whereas the C9 hydrogen was a double doublet at 4.55 ppm. The hydrogen of the cyclopropane ring (C10-H) is in a current shielding region and can be seen at 1.69 ppm, coupled with the C9-H ($J = 5.0$ Hz). The triplet at 2.51 ppm was attributed to the C8-H that is coupled with the C9-H and C7-H ($J = 2.8$ Hz). The ^{13}C -NMR spectrum showed signals in accordance with the chemical transformation performed, mainly at 21.8 (C1), 33.1 (C2) and 35.3 (C10) ppm (see Table 1). The mass spectrum showed the molecular ion peak (M^+) at $m/z = 176$.

When we attempted to prepare the highly strained compound **17** by reduction of the carbonyl in **14** from the convex face, followed by displacement of the bromide, only the known bromohydrin **16** [15] was formed (Scheme 4). Even forcing conditions, such as treatment of **16** with NaH in THF under reflux, failed to yield **17**.

Bromohydrin **16** (m.p. 136–138 $^\circ\text{C}$; Lit. [15], m.p. 133–134 $^\circ\text{C}$), was characterized by means of its spectroscopic data (^1H - and ^{13}C -NMR, IR) and mass spectrum (cf. Experimental Part). Its mass spectrum showed molecular ion peak at m/z 258/260 and a $(\text{M}-18)^+$ peak at m/z 240/242, due to loss of one water molecule from the hexane ring system.

Table 1 list the experimental ^{13}C -NMR data of compounds **13**, **14**, **15** and **16**, allowing a rapid comparison of the chemical shifts of all carbons of these molecules and supporting the main transformations carried out on the 6,9-epoxytricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecane ring system (Figure 2).

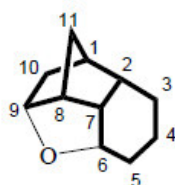
Figure 2.

Table 1. ^{13}C -NMR (CDCl_3) spectral data of the compounds **13**, **14**, **15** and **16** ^a

Position ^b	13 C_δ	14 C_δ	16 C_δ	15 C_δ
1	39.3	42.2	42.9	21.8
2	51.2	49.8	39.5	33.1
3	214.0	211.8	69.7	209.4
4	37.4	35.0	26.7	38.3
5	26.5	25.9	26.1	30.4
6	74.4	75.3	76.1	74.1
7	43.5	46.9	44.2	42.0
8	49.1	48.6	49.1	46.3
9	79.7	88.4	88.7	82.2
10	35.1	55.1	56.5	35.3
11	37.2	34.9	35.4	30.3

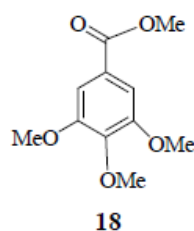
^a Data acquired at 75 MHz.^b Confirmed by bidimensional NMR techniques. Signal multiplicity of carbons in all compounds was assigned by DEPT-135 experiments.

Biological Evaluation

1. Assay for cytotoxic activity

Cytotoxic analyses by the MTT method are used in the screening program of the U.S. National Cancer Institute (NCI), which tests more than 10,000 samples per year [16]. It is a fast, sensitive and cheap methodology, described for the first time by Mosman [17] in 1983 and subsequently modified in 1996 by Alley *et al.* [18]. This evaluation allows one to easily determine the cytotoxicity of a particular compound, but it does not provide any insight into the mechanism of action [19].

The cytotoxic activity of compounds **3**, **9**, **10**, **12**, **14**, **15**, **16** and **18** are listed in Table 2, with the respective IC_{50} values. Among the eight samples analyzed, compound **3** showed moderate albeit unspecific cytotoxicity, with IC_{50} values of 11.34, 13.62 and 13.52 $\mu\text{g/mL}$ towards the HL-60, HCT-8 and MDA-MB 435 cell lines, respectively. Similarly, the novel gallate **12** was cytotoxic towards the HCT-8, SF-295 and MDA-MB 435 cell lines, with IC_{50} values of 6.68, 7.58 and 13.51 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Figure 3: Methyl gallate.

On the other hand, methyl gallate **18** (Figure 3) did not show any cytotoxic effects on the cell growth of the tested cell lines, suggesting that the cage structure present in **12** may play an important role in any observed increase of activity. Compound **9** was noticeably cytotoxic towards the MDA-MB 435 cell line with an IC_{50} of 10.4 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, the other samples did not show important cytotoxic effects.

Table 2. Cytotoxicity of compounds **3**, **9**, **10**, **12**, **14**, **15**, **16** and **18**, based on inhibition of tumor cell growth.

Compound	Cells ^a			
	IC_{50} ^b [$\mu\text{g/mL}$, confidence interval]			
	HL-60	HCT-8	SF-295	MDA-MB 435
3	11.34 (8.68 – 14.80)	13.62 (5.52 – 33.63)	> 25	13.52 (11.57 – 15.80)
9	> 25	> 25	> 25	10.47 (4.80 – 22.05)
10	> 25	> 25	> 25	> 25
12	> 25	6.68 (4.22 – 10.56)	7.58 (6.12 – 9.39)	13.51 (11.16 – 16.37)
14	> 25	> 25	> 25	> 25
15	> 25	> 25	> 25	> 25
16	> 25	> 25	> 25	> 25
18	> 25	> 25	> 25	> 25

^a Cells were plated in 96-well plates incubated with a 5% CO_2 atmosphere, at 37°C, for 72h, in presence of concentrations of pure compounds (0.39–25 $\mu\text{g/mL}$). Each concentration was tested in triplicate and the analyses were performed in duplicate.

^b The IC_{50} corresponds to inhibitory concentration for 50% of cellular growth (95% Confidence Interval).

2. Assay of hemolytic activity in Swiss mouse (*Mus musculus*) erythrocytes

In order to verify whether the observed cytotoxic and antimitotic activities are related to membrane disruption, compounds were tested for their ability to induce lysis of mouse erythrocytes. The erythrocyte membrane is a dynamic structure that can dictate significant changes in its interaction with drugs [20, 21]. The results revealed the absence of hemolytic activity for compounds **3**, **12**, **9**, **16** and **18** at the highest tested concentration (200 $\mu\text{g/mL}$), suggesting that both cytotoxic and antimitotic activities were not related to the lytic properties or membrane instability induced by these compounds, which may be probably caused by a more specific pathway. The others compounds were not tested.

Conclusions

From the results presented it may be concluded that a polycyclic framework could be a useful scaffold for generating new lead compounds with biological activity and further synthetic studies are warranted, aimed at the preparation of hybrid compounds similar, for instance, to compound **12**, which represents a kind of hybrid between a polycyclic and a trimethoxy residue found in some cytotoxic molecules such as podophyllotoxin and colchicine. Another topic of potential interest would be molecular modeling studies aimed at revealing possible structural modifications that could be made in the prepared compounds so they would be active in the receptor site(s) of proteins involved in the structure-cytotoxicity activity relationships, such as tubuline.

Experimental Section

General

^1H - and ^{13}C -NMR spectra were obtained at 300 and 75 MHz respectively on a Bruker AVANCE DPX-300 spectrometer. Chemical shifts were referenced to TMS and coupling constants are given in Hertz. Infrared (IR) spectra were obtained on a Perkin Elmer equipment model 783. Mass spectra were recorded on a GC/Mass Spectrometer model QP5000 (Shimadzu). Solvents were purified before use and chemical reagents were commercially available and used without previous treatment. *p*-Benzoquinone was prepared by oxidation of hydroquinone [22]. Column chromatography was performed using Merck 60 Å (70-230 mesh) silica gel, eluting with a hexane-ethyl acetate gradient. TLC analyses employed Merck (60F254/0.2 mm) silica gel plates. Melting points were recorded on Koffler equipment and are reported without correction.

Chemistry

Synthesis of *rel*-(1*S*,2*S*,7*R*,8*R*)-tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-dione (**3**)

Cyclopentadiene (14.6 g, 221 mmol) was added to a solution of *p*-benzoquinone (22 g, 203 mmol) in hexane-ethyl acetate (5:1), cooled at 0°C. The resulting mixture was stirred for 4 hours. Afterwards, the solvent was removed under vacuum and the product was recrystallized from hexane to give the title compound as yellow crystals: 97% yield; m.p.: 71-75°C; ^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.46 (dt, $J = 8.8/1.3$ Hz, 1H), 1.55 (dt, $J = 8.8/1.8$ Hz, 1H), 3.20 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 6.09 (t, $J = 1.8$ Hz, 2H), 6.60 (s, 2H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 43.4 (CH), 46.3 (CH), 49.8 (CH_2), 67.7 (CH), 131.3 (CH), 136.6 (CH).

Synthesis of *rel*-(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*S*,10*S*,1*R*,9*R*)-2-bromine-3,6-epoxytricyclo[6.2.1.0^{5,10}]undecan-9-ol (**16**)

NaBH_4 (0.034g, 0.89 mmol) was added to an ice-bath-cooled solution of compound **14** [14] (0.153 g, 0.6 mmol) in MeOH (1.6 mL). The ice bath was then removed and the reaction mixture was stirred for 1 hour at room temperature, before being quenched by addition of a drop of acetic acid. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 2 mL) and washed with distilled water. The organic layer was

dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and the solvent was removed under vacuum. The product was purified by flash chromatography on silica gel column using hexane-ethyl acetate (2:1) as eluent to afford a white amorphous solid: 72% yield; m.p.: 136–138°C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1.36–1.42 (m, 1H), 1.50 (d, $J = 11$ Hz, 1H), 1.59–1.67 (m, 3H), 1.97 (ddd, $J = 17.8/6.5/3.2$ Hz, 1H), 2.13 (d, $J = 11$ Hz, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.61 (broad signal, -OH), 2.90 (m, 1H), 3.95 (dd, $J = 17.8/7.8$ Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.22 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 5$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 26.1 (CH_2), 26.7 (CH_2), 35.4 (CH_2), 39.5 (CH), 42.9 (CH), 44.2 (CH), 49.1 (CH), 56.5 (CH), 69.7 (CH), 76.1 (CH), 88.7 (CH); IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3269, 2975–2869; MS m/z : 260 $[(\text{M} + 2)^+]$, ^{81}Br , 258 (M^+ , ^{79}Br), 242 $[(\text{M} - \text{H}_2\text{O} + 2)^+]$, ^{81}Br , 240 $[(\text{M} - \text{H}_2\text{O})^+]$, ^{79}Br .

Synthesis of rel-(1S,3S,7S,2R,8R)-6-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenylcarbonyloxy) tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]-undec-9-ene (12) and rel-(1S,2S,6S,8S,7R,9R)-6,9-epoxytricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecan-3-one (13)

Under a nitrogen atmosphere, thionyl chloride (0.270 mL; 3.6 mmol) was added to a solution of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid (0.385 g; 1.8 mmol) in CH_2Cl_2 (5.5 mL). The mixture was refluxed for 4 hours. After evaporation of the solvent under reduced pressure the acid chloride **11** was dissolved in anhydrous toluene (5.5 mL). To this solution it was added compound **10** (0.318 g, 1.8 mmol) and pyridine (5.0 mL) and the mixture was refluxed during 24 hours. The reaction was monitored by TLC and after completion it was diluted with dichloromethane and the resulting solution was washed with a saturated solution of CuSO_4 . The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The products were purified by silica gel column chromatography using hexane-ethyl acetate (1:1) as eluent. Compound **12**: white solid: 15% yield; m.p.: 42–46 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.92–2.05 (m, 2H), 2.16–2.29 (m, 2H), 2.91–3.03 (m, 3H), 3.24 (broad signal, 1H), 3.83 (s, 9H), 5.52 (m, 1H), 5.93 (dd, $J = 5.3/2.7$ Hz, 1H), 6.12 (dd, $J = 5.3/2.9$ Hz, 1H), 7.21 (s, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 25.6 (CH_2), 35.6 (CH_2), 44.4 (CH), 45.0 (CH), 45.4 (CH), 49.6 (CH_2), 51.7 (CH), 56.1 (CH_3), 60.8 (CH_3), 70.0 (CH), 106.8 (CH), 125.0 (C), 135.4 (CH), 135.8 (CH), 142.2 (C), 152.9 (C), 165.1 (C), 211.5 (C=O). Compound **13**: colorless oil: 9 % yield; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1.31 (d, $J = 10.4$, 1H), 1.35 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.82 (tdd, $J = 13.0/13.0/5.4/1.3$ Hz, 1H), 2.12 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.26 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 2.37–2.58 (m, 3H), 2.89 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.40 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 26.5 (CH_2), 35.1 (CH_2), 37.2 (CH_2), 37.4 (CH_2), 39.3 (CH), 43.5 (CH), 49.1 (CH), 51.2 (CH), 74.4 (CH), 79.7 (CH), 214.0 (C=O); MS m/z : 178 $[\text{M}^+]$.

Synthesis of 6,9-epoxytricyclo[6.2.1.0^{2,7}.0^{2,10}]undecan-3-one (15)

A solution of compound **14** (0.60 g, 2.3 mmol) in THF (1.6 mL) was added to a mixture of 60% NaH (0.11 g, 2.8 mmol) cooled in water-ice bath. The mixture was then stirred for 1 hour at room temperature and 6 hours under reflux before extraction with dichloromethane (3 x 2 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and the solvent was removed on a rotavapor. The product was purified by silica gel column chromatography using hexane-ethyl acetate (2:1) as eluent: 76% yield. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1.69 (ddd, $J = 5.0/1.5/0.7$ Hz, 1H), 1.73 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 1.79 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 2.03 (m, 1H), 2.30–2.44 (m, 5H), 2.51 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.55 (dd, $J =$

5.0/2.8 Hz, 1H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 21.8, (CH), 30.3 (CH_2), 30.4 (CH_2), 33.1 (C), 35.3 (CH), 38.3 (CH_2), 41.8 (CH), 46.3 (CH), 74.1 (CH), 82.2 (CH), 209.4 (C=O); MS m/z : 176 [M^+].

Biological Evaluation

1. Assay for cytotoxic activity

The cytotoxicity of the compounds was tested against HL-60 (human leukemia), HCT-8 (human colon), SF-295 (human central nervous system) and MDA-MB 435 (human breast cancer) cell lines obtained from the National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin and incubated at 37 °C with a 5% CO_2 atmosphere. Cells were plated in 96-well plates (10^5 cells/well for adherent cells or 0.5×10^5 cells/well for suspended cells in 100 μL of medium). After 24 h, the compounds (0.39 to 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolved in DMSO 1% were added to each well and incubated for 72 h. Control group received the same amount of DMSO. Doxorubicin (Doxolem[®], Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, Brazil) was used as positive control. Tumor cell growth was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a purple formazan product [17]. At the end of the incubation, the plates were centrifuged and the medium was replaced by fresh medium (200 μL) containing 0.5 mg/mL MTT. Three h later, the MTT formazan product was dissolved in DMSO (150 μL), and absorbance was measured using a multiplate reader (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). The drug effect was quantified as the percentage of the absorbance of reduced dye at 550 nm in relation to control wells.

2. Swiss mouse (*Mus musculus*) erythrocyte hemolysis assay

The test was performed in 96-well plates following the method described by Costa-Lotufo *et al.* [23]. Each well received 100 μL of 0.85% NaCl solution containing 10mM CaCl_2 . The first well was the negative control that contained only the vehicle (DMSO 10%), and, in the second well, test substance (100 μL) half was added. The compounds were tested at concentrations ranging from 3.9 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The serial dilution continued until the 11th well. The last well received 0.1% Triton X-100 in 0.85% saline (20 μL) to produce 100% hemolysis (positive control). Then, each well received a 2% suspension of mouse erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM CaCl_2 (100 μL). After incubation at room temperature for 30 min and centrifugation, the supernatant was removed and the hemoglobin liberated was measured spectroscopically as absorbance at 540 nM.

Statistical Analysis

The IC_{50} values and their 95% confidence intervals (CI 95%) were obtained by nonlinear regression using the GRAPHPAD program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, U.S.A.). For the hemolytic assay, the differences were analyzed by ANOVA followed by Student Newman Keuls test compared to negative control at a significance level of 5%.

Acknowledgements

We are thankful to the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) and the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for financial support in the form of grants and fellowship awards. We also thank to Kardol Indústria Química Ltda., for providing solvents and reagents and Professor Dr. Cláudio F. Tormena (Unicamp) for access to the GC/Mass Spectrometer.

References and Notes

1. Diels, O.; Alder, K. Synthesen in der hydroaromatischen reihe. *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
2. Oliveira, K.T. Estudos sintéticos e teóricos sobre anulenos e baquenolidas. Ph.D. Thesis, University of São Paulo. **2006**. (for online access see: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-18082006-181618/>)
3. Marchand, P.; Xing, D.; Wang, Y.; Bott, S.G. Improved synthesis of racemic and optically active 4-hydroxycyclohex-2-en-1-one. *Tetrahedron Asymmetr.* **1995**, *6*, 2709-2711.
4. Cookson, R.C.; Grundwell, E.; Hudec, J. Synthesis of cage-like molecules by irradiation of Diels-Alder adducts. *Chem. Ind. (London)* **1958**, 1003-1004.
5. Govender, T.; Hariprakash, H.K.; Kruger, H.G.; Raasch, T. Synthesis of Trishomocubane Amino Acid Derivatives. *S. Afr. J. Chem.* **2005**, *58*, 37-40.
6. Geldenhuys, W.J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J.R.; Marchand, A.P.; Van der Schyf, C.J. Pharmacology and structure – activity relationships of bioactive polycyclic cage compounds: a focus on pentacycloundecane derivatives. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 22-48.
7. Kitagawa, K.; Mizobuchi, N.; Hama, T.; Hibi, T.; Konishi, R.; Futaki, S. Synthesis and antinociceptive activity of [D-Ala²]Leu-enkephalin derivatives conjugated with the adamantane moiety.. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1782-1787.
8. Marchand, A.P.; Allen, R.W. Improved synthesis of pentacyclo[5.4.0.0^{2,6}.0^{3,10}.0^{5,9}]undecane. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1596-1596.
9. Wassermann, A. The mechanism of additions to double bonds. Part I. Thermochemistry and kinetics of a diene synthesis. *J. Chem. Soc.* **1935**, 828-838.
10. Oda, M.; Kawase, T.; Okada, T.; Enomoto, T. *Org. Synth. Coll. Vol. IX*, **1998**; p. 186.
11. Stroemer, M.J.; Butler, D.N.; Warren, R.N.; Weerasuria, K.D.V.; Fairlie, D.P. Cycloadditions of isobenzofuran to a constrained template bearing neighboring dienophiles. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2068-2071.
12. Marchand, A.P.; Reddy, G.M. Mild and highly selective ultrasound-promoted zinc/acetic acid reduction of C:C bonds in α,β -unsaturated γ -dicarbonyl compounds. *Synthesis* **1991**, 198-200.
13. Constantino, M. G.; Beatriz, A.; Silva, G.V.J.da.; Zukerman-Schpector, J. Synthetic studies on the diels-alder adduct from 3,4-dimethoxyfuran and benzoquinone. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3329-3336.
14. Takano, S.; Inomata, K.; Ogasawara, K. A new route to (+)-2,3-(isopropylidenedioxy)-4-cyclopentenone via the optically active dicyclopentadiene intermediate. *Chem. Lett.* **1989**, 359-362.

15. Konno, H.; Ogasawara, K. Enantioselective construction and utilization of 2-(cyclohexenyl)phenols. *Synlett* **1998**, 1004-1006.
16. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bodesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.
17. Mosman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **1983**, *65*, 55-63.
18. Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Hursey, M.L.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589-601.
19. Berridge, M.V.; Tan, A.S.; McCoy, K.D.; Wang, R. The biochemical and cellular basis of proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **1996**, *4*, 15-20.
20. Aki, H.; Yamamoto, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis : flow microcalorimetric approaches. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 133-138.
21. Malheiros, S.V.P.; Meirelles, N.C.; de Paula, E. Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis. *Biophys. Chem.* **2000**, *83*, 89-100.
22. Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed; Longman Scientific & Technical: New York, **1989**; pp. 1025-1026.
23. Costa-Lotufo, L.V.; Cunha, G.M.A.; Fontenele, J.B.; Junior, H.V.N.F.; Sousa, C.M.; Silveira, E.R.; Nogueira, N.A.P.; Moraes, M.O.; Viana, G.S.B. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus*. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 155-159.

Sample Availability: Samples of all compounds are available from authors.

Este projeto de pesquisa recebeu apoio financeiro da:

