



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Caleol: modificações estruturais, estereoquímica absoluta
e atividade antimicrobiana dos derivados**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCELO PEDROSO

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**CALEOL: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, ESTEROQUÍMICA
ABSOLUTA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS**

por

Marcelo Pedroso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, área de Química Orgânica da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA E
ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CALEOL**

elaborada por
Marcelo Pedroso

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel – UFSM
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Ionara Irion Dalcol – UFSM

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur – UNIVATES

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011.

Aos meus pais, Célia e Airton,
e à minha irmã Marcelli dedico essa
dissertação com muito amor.

À Andréia,
namorada, amiga e
companheira de todas as horas.

Ao professor Ademir, meus mais sinceros agradecimentos pela orientação, paciência e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Professora Ionara Dalcol pela co-orientação e por sempre se mostrar disposta a me ajudar durante todo o mestrado.

Ao Dr. Ubiratan Flores da Silva pelas contribuições sugeridas no exame de qualificação e pela ajuda com o CG.

Ao Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur pela participação na banca e sugestões para a dissertação.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do grupo de pesquisa pela contribuição e agradável convivência durante o curso: Alessandra, Alexandre, Carolina, Caroline, Daniele, Denise, Dirceu, Graciane, Graciela, Janice, Karine, Liziane, Luciana, Nalin, Patricia, Tanize, Vanessa Gressler e, em especial, ao Vinícius Ilha pela amizade, confecção dos espectros de RMN e ajuda prestada desde a época da iniciação científica.

Ao amigo Felipe Wouters pelas referências bibliográficas e análises.

Aos secretários do curso de Pós-Graduação em Química Ademir e Valéria pela cortesia em seu tratamento durante os serviços prestados.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida para a execução do trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

CALEOL: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS

Autor: Marcelo Pedroso
Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

O óleo essencial das folhas de *Calea clematidea*, um arbusto da família Asteraceae utilizado popularmente como antigripal, estomáquico e contra úlceras gástricas, foi extraído e dele foi isolado o monoterpeno caleol. Este metabólito foi submetido a reações de modificação em sua estrutura por meio da abertura de seu grupo funcional epóxido. A reação catalisada por cloreto férrico anidro proporcionou a abertura seletiva do epóxido quando utilizado como nucleófilos alcoóis primários, no sentido da formação do álcool menos substituído. A estereoquímica do caleol foi também avaliada dor RMN, da onde se verificou que a configuração do carbono C4 é *R*. O óleo essencial, o caleol e os derivados obtidos foram submetidos a análise microbiológica. O caleol apresentou melhor atividade contra bactérias e os derivados melhor contra fungos.

Palavras chave: *Calea clematidea*, caleol, atividade microbiológica, estereoquímica absoluta.

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011

ABSTRACT

Master dissertation in Chemistry
Post-Graduate Program of Chemistry
Federal University of Santa Maria

CALEOL: STRUCTURAL MODIFICATION, ABSOLUTE STEREOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF CALEOL

Author: Marcelo Pedroso
Academic Advisor: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

The essential oil of the leaves of *Calea clematidea*, a plant of Asteraceae family used in the folk medicine in treatment of flu, stomachic disease and gastric ulcer, was extracted and of it was isolated the monoterpene caleol. This metabolite was submitted to structural modification reactions by the opening of its epoxide functional group. In the reactions catalyzed by anhydrous iron (III) chloride, the epoxide opening was selective when primary alcohols was used like nucleophile, giving like product the less substituted alcohol. In addition, the absolute stereochemistry of caleol was analyzed by NMR, where was verified that the carbon C4 configuration is *R*. The essential oil, the caleol and the obtained derivatives were submitted to a microbiological activity. The caleol showed best activity against bacteria and derivatives against yeast.

Keywords: *Calea clematidea*, caleol, microbiological activity, absolute stereochemistry.

Santa Maria, February 24th, 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	4
3 – REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 – Características e reatividade dos epóxidos.....	5
3.2 – Reações de abertura dos epóxidos.....	6
3.3 – Determinação da estereoquímica absoluta.....	9
3.3.1 – Método de Horeau.....	10
3.3.2 – Determinação da estereoquímica absoluta por ressonância magnética nuclear.....	11
3.4 – Estudo do óleo essencial de <i>Calea clematidea</i>	16
4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	18
4.1 - Extração e purificação do óleo essencial de <i>Calea clematidea</i>	18
4.2 - Reações de abertura do epóxido do caleol.....	22
4.2.1 – Reações com acetato de 1-(3',3'-dimetil-2'-oxiranil)-2,2-dimetil-3-butenila...22	
4.2.2 – Hidrólise básica do caleol.....	25
4.3 – Abertura do epóxido do álcool 1-(3',3'-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol.....	28
4.3.1 – Aberturas com alcoóis primários.....	28
4.3.2 – Abertura com isopropanol.....	41
4.3.3 – Abertura com terc-butanol.....	43
4.3.4 – Mecanismos propostos para as reações de abertura do epóxido.....	44
4.3.5 – Outras aberturas de epóxido realizadas com o álcool do caleol.....	46
4.4 – Atividade antimicrobiana dos compostos obtidos.....	54
5 – PARTE EXPERIMENTAL.....	61
6 – CONCLUSÃO.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Epóxidos utilizados por Iranpoor.....	7
Tabela 2: Alcoóis e rendimentos da abertura com TCNE.	9
Tabela 3: Comparação entre os deslocamentos químicos do composto 1 com os da literatura.....	21
Tabela 4: Comparação entre os deslocamentos químicos do composto 6 com os da literatura.....	27
Tabela 5: Deslocamentos químicos do composto 7	31
Tabela 6: Deslocamentos químicos do composto 8	36
Tabela 7: Deslocamentos químicos do composto 9	41
Tabela 8: Deslocamentos químicos e $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dos ésteres obtidos 16 e 17	52
Tabela 9: Microrganismos utilizados no ensaio.....	55
Tabela 10: Atividade antimicrobiana dos compostos obtidos	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regioquímica das aberturas de epóxidos.....	5
Figura 2: Curso da reação de esterificação do álcool secundário com ácido 2-fenilbutanóico.....	10
Figura 3: Auxiliares quirais empregados nas derivatizações para determinação da estereoquímica por RMN.....	12
Figura 4: Efeito anisotrópico do auxiliar sobre os grupos L ₁ e L ₂ e consequência nos espectros de RMN de ¹ H.....	13
Figura 5: Disposição dos grupos L ₁ e L ₂ no estereocentro de acordo com a configuração do MFA.....	15
Figura 6: Disposição dos grupos L em torno do estereocentro na dupla derivatização.....	16
Figura 7: Estereoquímica absoluta do caleol determinada por Flach.....	17
Figura 8: Cromatograma de CG típico do óleo essencial de <i>C. clematidea</i>	19
Figura 9: Espectro de RMN de ¹ H do caleol, em CDCl ₃ a 400 MHz.....	20
Figura 10: Espectro de RMN de ¹³ C do caleol, em CDCl ₃ a 100 MHz.....	21
Figura 11: Cromatogramas de CG dos produtos da reação de abertura do epóxido do caleol por: a) metanol, b) isopropanol, c) t-butanol e d) álcool alílico.....	23
Figura 12: Cromatograma da hidrólise do caleol.....	25
Figura 13: Espectro de RMN de ¹ H do composto 6 , em CDCl ₃ a 400 MHz.....	26
Figura 14: Espectro de RMN de ¹³ C do composto 6 , em CDCl ₃ a 100 MHz.....	27
Figura 15: Cromatograma de CG da abertura com metanol.....	29
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H do produto 7 em CDCl ₃ a 400 MHz.....	30
Figura 17: Espectro de RMN de ¹³ C do produto 7 em CDCl ₃ a 100 MHz.....	30
Figura 18: Experimento COLOC do composto 7 em CDCl ₃ , a 100 MHz.....	32
Figura 19: Cromatograma da abertura com propanol.....	33
Figura 20: Espectro de ¹ H do produto 8 em CDCl ₃ a 400 MHz.....	33
Figura 21: Espectro de ¹³ C do produto 8 em CDCl ₃ a 100 MHz.....	34
Figura 22: Espectro de DEPT 135° do produto 8 em CDCl ₃ a 100 MHz.....	35
Figura 23: Espectro de COSY (¹ H - ¹ H) do produto 8 em CDCl ₃ a 400 MHz.....	36
Figura 24: Cromatograma da abertura com álcool alílico.....	37
Figura 25: Espectro de ¹ H do composto 9 em CDCl ₃ a 400 MHz.....	38

Figura 26: Espectro de ^{13}C do composto 9 em CDCl_3 a 100 MHz.....	39
Figura 27: Espectro de DEPT 135° do composto 9 em CDCl_3 a 100 MHz	39
Figura 28: Experimento de COSY ^1H - ^1H do composto 9 em CDCl_3 a 100 MHz.....	40
Figura 29: Cromatograma da reação de abertura do epóxido com isopropanol.....	42
Figura 30: Cromatograma da abertura do epóxido com terc-butanol.....	43
Figura 31: Espectros de ^{13}C dos compostos 16 (superior) e 17 (inferior) em CDCl_3 a 100 MHz.....	50
Figura 32: Espectros de ^1H dos compostos 17 (superior) e 16 (inferior) em CDCl_3 a 400 MHz.....	51
Figura 33: $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dos grupos L_1 e L_2	53
Figura 34: Modelo para determinação da estereoquímica.....	53
Figura 35: Resumo da relação estrutura atividade do caleol e derivados	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção do taxol por isolamento e semi-síntese.....	2
Esquema 2: Isolamento e modificação estrutural da artemisinina.....	3
Esquema 3: Possíveis transformações dos epóxidos.....	6
Esquema 4: Reação empregada por Iranpoor.....	7
Esquema 5: Reação de abertura de um epóxido tri-substituído com TCNE.....	9
Esquema 6: Esquema para determinação da estereoquímica absoluta de amins primárias por RMN pelo método da complexação com bário.....	14
Esquema 7: Hidrólise do caleol.....	25
Esquema 8: Reação de abertura do álcool do caleol com metanol.....	28
Esquema 9: Reação de abertura do epóxido com propanol.....	32
Esquema 10: Reação de abertura do epóxido com álcool alílico.....	37
Esquema 11: Reação de abertura do epóxido com isopropanol.....	41
Esquema 12: Reação de abertura do epóxido com terc-butanol.....	43
Esquema 13: Mecanismo proposto para reação de abertura do epóxido catalisada por FeCl ₃	45
Esquema 14: Mecanismo da abertura de epóxidos catalisadas por TCNE.....	45
Esquema 15: Esterificações do álcool 6 com ácidos mandélicos.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia gasosa
COSY	Correlated spectroscopy
COLOC	Correlation spectroscopy via long range coupling
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
Hz	Hertz
Min	Minutos
tr	Tempo de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
°C	Grau Celsius
CG-Em	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
PPM	Parte por milhão
d	Dubleto
dd	Dubleto de dubleto
s	Singleto
t	Tripleto
FID	Flame Ionization Detector (detector de ionização em chama)
TCNE	Tetracianoetileno

1 – INTRODUÇÃO

É incalculável a diversidade molecular proporcionada pela natureza. Entre os produtos naturais oriundos de fontes vegetais encontra-se uma ampla diversidade de estruturas moleculares. A variedade de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais como terpenos, flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, cumarinas, limoninas, alcalóides de diversas classes, entre outros, mostram sua grande variedade molecular, fonte inesgotável de compostos bioativos e de modelos para a produção de fármacos¹, que praticamente seriam impossíveis de ser obtidos por meio de uma síntese aleatória.

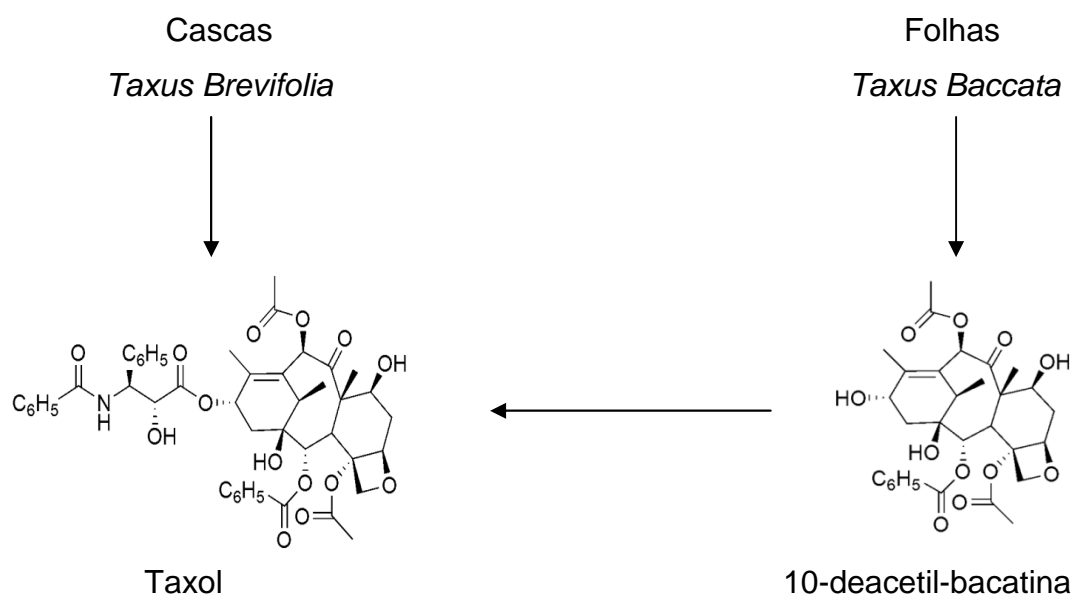
Por isso a busca por novos fármacos deve ser realizada em um trabalho conjunto entre a química de produtos naturais e a química orgânica sintética, além da farmacologia, naturalmente! Isso é necessário porque normalmente a quantidade do metabólito bioativo presente na fonte natural é tão pequena que se torna inviável sua industrialização, sendo necessária a síntese em laboratório. Além disso, também é necessária a realização de modificações na estrutura do produto natural bioativo, para determinar o seu grupo farmacofórico, por meio de estudos de relação estrutura-atividade, ou ainda para tentar incrementar suas propriedades farmacológicas. Há diversos exemplos na literatura que denotam tal trabalho em conjunto, entre eles a obtenção em larga escala do taxol, a origem da Aspirina e a adequação da estrutura da artemisinina para sua administração como medicamento, melhores detalhados nos parágrafos a seguir.

Encontram-se muitos exemplos da originalidade estrutural dos produtos naturais entre os recursos quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer. O taxol é um diterpeno de estrutura incomum e complexa, isolado da espécie *Taxus brevifolia*². Ele é empregado no tratamento do câncer, atuando como inibidor do crescimento celular pela ativação da polimerização da tubulina, que estabiliza os microtúbulos.³ Este composto, que apresenta diversos centros estereogênicos, foi obtido pela semi-síntese a partir da 10-deacetil-bacatina, isolada em grande quantidade das cascas de *Taxus baccata* (Esquema 1).

¹ Yunes, R.A., Calixto, J.B., Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna, Argos, **2001**.

² Wani, M.C., et al., Journal of the American Chemical Society, 93, 2325, **1971**.

³ Rowinsky, E.K., Donehower, R.C., New England Journal Medicinal, 332, 1004, **1995**.

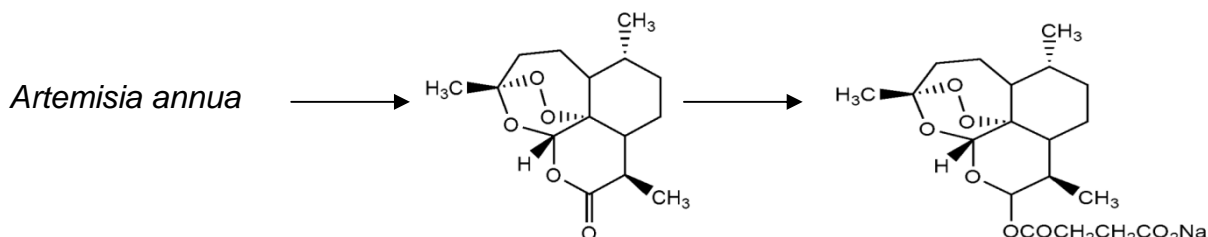


Esquema1: Obtenção do taxol por isolamento e semi-síntese.

Além do taxol há o exemplo da produção do ácido acetilsalicílico. Antigamente as cascas de *Salix alba* eram empregadas na etnofarmacologia como analgésico. O estudo fitoquímico da espécie mostrou a existência de ácido salicílico no extrato das cascas *S. alba*. A avaliação da atividade biológica desse composto mostrou que ele realmente possui propriedades analgésicas. Entretanto, ele possuía o inconveniente de ser muito ácido e por isso gerava distúrbios gástricos quando era consumido. Para diminuir tal efeito, foi realizada a acetilação do ácido salicílico, que manteve as propriedades farmacológicas do ácido salicílico e acabou com grande parte dos problemas gerados pela sua acidez. Neste momento acabava de ser produzido o medicamento mais vendido no mundo, a Aspirina.

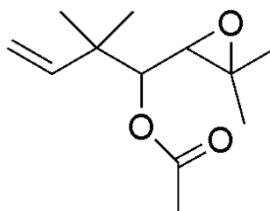
Outro exemplo que demonstra o trabalho em conjunto da química de produtos naturais com a síntese orgânica é o da artemisinina. Este metabólito secundário é uma lactona sesquiterpênica isolada das folhas da *Artemisia annua*, uma planta utilizada na china há mais de dois mil anos para o combate de febres e malária. Estudos demonstraram que a artemisinina é o princípio ativo do extrato da planta, mas ela apresenta o inconveniente de ser muito apolar, o que dificultaria a administração da artemisinina como fármaco para a cura da malária. Então, foram realizadas diversas modificações na estrutura da artemisinina, com o intuito de torná-la mais polar sem perder sua atividade. Dentre os compostos obtidos destacou-se o artesunato de sódio, o sal de um éster obtido a partir da artemisinina,

que é hidrossolúvel o bastante para ser utilizado como medicamento com as propriedades medicinais da lactona sesquiterpênica natural (Esquema 2).⁴



Esquema 2: Isolamento e modificação estrutural da artemisinina.

Os parágrafos anteriores mostraram exemplos bem sucedidos do trabalho concomitante dos produtos naturais com a síntese orgânica para a produção de fármacos. Dentro desse contexto, na busca por produtos naturais bioativos, o Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria investiga plantas da fronteira oeste do estado do Rio Grande do Sul utilizadas na medicina popular. Entre as plantas pesquisadas pelo grupo está *Calea clematidea*, um arbusto da família Asteraceae encontrado no sul do Brasil, Uruguai e Argentina e utilizado popularmente para o tratamento de úlceras gástricas, como estomáquica e antigripal. O óleo essencial desta espécie foi pesquisado em 2000 por Flach⁵, que por meio deste estudo verificou a existência de um monoterpene como componente majoritário. Tal componente apresenta o esqueleto artemisinil e é um derivado do álcool de Yomogi, que também é encontrado no óleo essencial da espécie citada. O composto isolado por Flach foi chamado de caleol **1** e apresenta em sua estrutura os grupos funcionais alceno éster e epóxido.



1

O caleol é o foco do estudo dessa dissertação.

⁴ Hostettmann, K. Queiroz, E.F., Vieira, P.C., Princípios Ativos de Plantas Superiores, EdUFSCar, **2003**

⁵ Flach, Adriana, Dissertação de Mestrado, UFSM, **2000**.

2 – Objetivos

Diante do exposto anteriormente, tem-se como principais objetivos dessa dissertação:

- ➔ Realizar a extração do óleo essencial de *Calea clematidea*, seguida do isolamento do caleol.
- ➔ Obter novos derivados desse monoterpene por meio do estudo da abertura do seu epóxido.
- ➔ Determinar a estereoquímica do caleol por ressonância magnética nuclear, para validar a metodologia de Horeau.
- ➔ Submeter os derivados obtidos a análise microbiológica, para determinar quais aspectos estruturais são importantes para a atividade.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Características e reatividade dos epóxidos

Epóxidos são éteres cíclicos de três membros. O fato de sua estrutura ser composta por um sistema cíclico torna essa classe de compostos muito mais reativa que os éteres de cadeia aberta frente a reagentes nucleofílicos.⁶ Essa diferença reacional entre os éteres acíclicos e os epóxidos ocorre devido à tensão angular no anel de três membros, que pode ser facilmente clivado, tanto em condições ácidas como básicas, sendo que nessa última condição os éteres simples são inertes. Há uma importante diferença na regioquímica das reações de abertura do anel epóxido dependendo das condições reacionais: epóxidos assimétricos tendem a reagir em condições alcalinas, preferencialmente, no carbono menos impedido do anel, ao passo que em condições de catalise ácida o ataque do nucleófilo ocorre no carbono mais impedido do anel (Figura 1).⁷

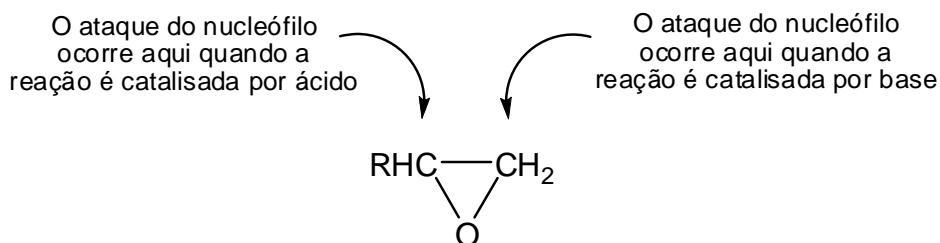


Figura 1: Regioquímica das aberturas de epóxidos.

A característica acima associada à possibilidade de introdução na estrutura de um novo grupo funcional a partir da abertura do anel epóxido com diferentes nucleófilos, torna-o um importante intermediário em síntese orgânica⁸, já que por meio da sua abertura podem ser formados compostos β-substituídos-álcoóis⁹. Os nucleófilos mais comuns empregados nas transformações dos epóxidos são os nitrogenados (como amônia, azidas e aminas) que tem um importante papel na

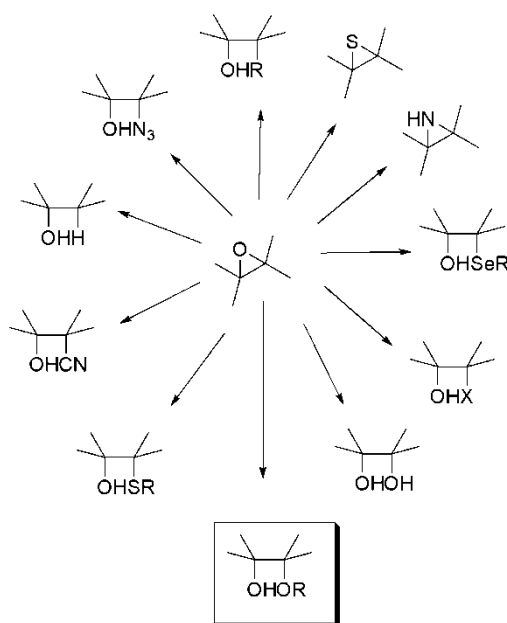
⁶ Morrison, R., Boyd, R. Química Orgânica, 14ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **2005**.

⁷ Carey, F. A. Organic Chemistry, 3th ed, McGraw-Hill, **1996**.

⁸ Carey, F. A., Sundberg, R. J. Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, 4th ed, Springer, **2001**.

⁹ Liu, Y. H., Liu, Q. S., Zhang, Z. H. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 296, 42–46, **2008**.

síntese de produtos naturais e na química medicinal¹⁰, os oxigenados (como alcoóis, fenol e ácidos)¹¹ e os calcogenetos telúrio, selênio e enxofre.¹² Além desses, há várias outras possibilidades de transformações (Esquema 3).



Esquema 3: Possíveis transformações dos epóxidos.

3.2 – Reações de abertura dos epóxidos

Os produtos gerados pela abertura de epóxidos com alcoóis, os β -alcóxi alcoóis, são importantes intermediários na síntese orgânica. A relativamente fácil oxidação desse grupo funcional é um método comum para o preparo de α -alcóxi cetonas ou α -alcóxi ácidos. Além disso, β -alcóxi alcoóis estão também presentes na estruturas de vários compostos de origem natural. Por isso, a alcólise de epóxidos sob condições brandas ou neutras com a produção de β -alcóxi alcoóis é um importante aspecto dentro da síntese orgânica. Entretanto, os métodos convencionais para a clivagem de epóxidos com alcoóis muitas vezes não são satisfatórios e apresentam desvantagens como a alta acidez necessária, baixa regioseletividade, reagentes caros e longos tempos reacionais.¹³

¹⁰ Ollevier, T., Nadeau, E., *Tetrahedron Letters*, 49, 1546–1550, **2008**.

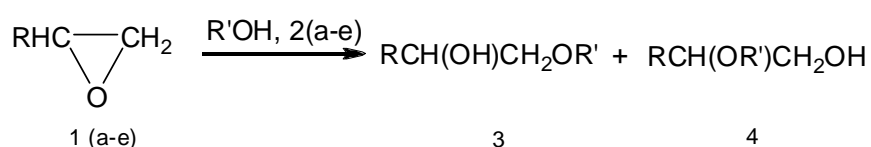
¹¹ Saikia, L., Satyarathi, J.K., Srinivas, D., Ratnasamy, P., *Journal of Catalysis*, 252, 148–160, **2007**.

¹² Rodrigues, O.E.D., et al., *Tetrahedron Letters*, 51, 2237–2240, **2010**.

¹³ Iranpoor, N., Salehi, P., *Synthesis*, 1192, **1994**.

Diante disso, Iranpoor¹³ investigou a utilização de ferro III na forma de cloreto, em quantidade catalítica, como um meio de obter β -alcóxi alcoóis a partir da reação de abertura de alguns epóxidos com alcoóis. Os resultados apresentados pelo autor mostram que o cloreto férrico se mostrou um eficaz catalisador para as reações de álcoolise, tendo bons rendimentos e com régio e estereoseletividade. Iranpoor empregou nas reações de abertura (Esquema 4) os alcoóis metanol 2a, etanol 2b, propanol 2c, isopropanol 2d e terc-butanol 2e e os epóxidos da Tabela 1.

Em todas as reações executadas houve a formação de apenas um β -alcóxi álcool, com a produção preferencial do álcool mais substituído pelo ataque do nucleófilo ao carbono menos substituído do epóxido. Apenas as reações realizadas com o epóxido 1a formaram os alcoóis mais substituídos, independente do nucleófilo empregado. Os rendimentos das reações foram de bons a excelentes (75-98%).



2a – MeOH, 2b – EtOH, 2c – n-PrOH, 2d – i-PrOH 2e - t-BuOH

Esquema 4: Reação empregada por Iranpoor.

Tabela 1: Epóxidos utilizados para abertura por Iranpoor.¹³

Epóxido	Substituinte (R-)
1a	Ph-
1b	ClCH ₂ -
1c	(CH ₃) ₂ CHOCH ₂ -
1d	PhOCH ₂ -
1e	CH ₂ =CHCH ₂ OCH ₂ -

Diante dos bons resultados obtidos com a catálise do cloreto férrico anidro nas reações com epóxidos, Iranpoor¹⁴ realizou as reações empregando como catalisador o cloreto férrico adsorvido em sílica-gel, de maneira a formar um suporte sólido. Diversos suportes sólidos que envolvem a adsorção de ferro III, como nitrato de ferro III sobre betonita A e K10 (Clay), tem sido descritos e aplicados em diversas reações orgânicas, como desidratação e rearranjo de alcoóis, oxidação de compostos aromáticos substituídos e tioacetilação de aldeídos e cetonas.

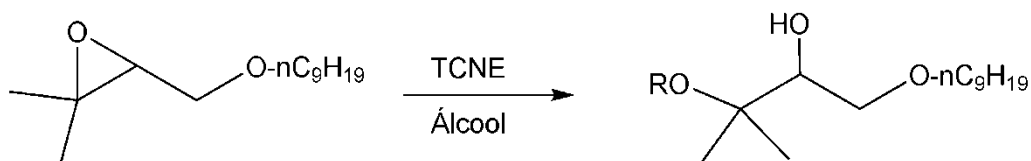
Para a realização do trabalho, Iranpoor empregou os mesmos epóxidos e alcoóis utilizados nas aberturas catalisadas por cloreto férrico anidro. Os resultados das reações com suporte sólido também se mostraram seletivas e com elevados rendimentos. Assim como na metodologia anterior, nessas reações houve a abertura preferencial no sentido da formação do álcool mais substituído, formando exclusivamente o álcool secundário nas aberturas realizadas com o epóxido 1a (Tabela 1), com todos os alcoóis utilizados. Os rendimentos dessas reações também foram semelhantes aqueles das reações de abertura anteriores, apresentando rendimentos superiores a 90% para a maioria das reações.

Além dos alcoóis, foram empregados também como nucleófilos íons cloreto, brometo e nitrato. Os produtos dessas reações seguiram a mesma regioquímica das aberturas com alcoóis, havendo o ataque dos íons ao carbono menos impedido do epóxido, levando a formação do álcool mais substituído. Essas reações também apresentaram bons rendimentos (51-96%), mas ficaram abaixo daqueles gerados pelas aberturas com alcoóis.

Masaki¹⁵ aplicou o tetracianoetileno, TCNE, um acceptor π -ácido, como catalisador nas reações de abertura do epóxido com alcoóis enquanto investigava seu papel no rearranjo e acetonidação de epóxidos. Para as reações de abertura foram empregados epóxidos di e tri-substituídos e terminais, bem como alcoóis como nucleófilos (Tabela 2). As reações com os epóxidos tri-substituídos (Esquema 5) apresentaram alta regioseletividade, levando a introdução dos grupos alcóxido na estrutura com a formação do álcool menos substituído. As reações nas quais foram utilizados alcoóis mais volumosos como nucleófilos foram as que apresentaram os rendimentos mais baixos. As reações nas quais foram empregados epóxidos terminais ou di-substituídos apresentaram pouca ou nenhuma regioseletividade.

¹⁴ Iranpoor, N., Tarrian, T., Movahedi, Z., *Synthesis*, 1473, **1996**.

¹⁵ Masaki, Y., Miura, T., Ochiai, M., *Synlet*, 847-849, **1993**.



Esquema 5: Reação de abertura de um epóxido tri-substituído com TCNE.

Tabela 2: Alcoóis e rendimentos das reações de abertura com TCNE.

Álcool	Rendimento
CH ₃ OH	97%
H ₂ C=CHCH ₂ OH	95%
HC≡CCH ₂ OH	91%
i-PrOH	69%
BnOH	71%

3.3 – Determinação da estereoquímica absoluta

O interesse em determinar a estereoquímica absoluta de um composto orgânico quiral se deve ao fato amplamente conhecido de que a estereoquímica freqüentemente determina importantes propriedades nos aspectos químicos, físicos, biológicos e medicinais destes compostos. A necessidade de se obter fármacos e reagentes químicos enantiomericamente puros tem produzido um grande crescimento nos campos de síntese assimétrica, catálise assimétrica e outros onde se faz necessária a determinação da pureza enantiomérica e configuração absoluta de compostos puros.¹⁶

Existem diversos métodos instrumentais para a determinação da estereoquímica absoluta de um composto, sendo que o mais conhecido deles é a difração de raios-x. Entretanto, esse apresenta o inconveniente de ser necessário o emprego de monocristais de boa qualidade, o que muitas vezes não é possível de se obter.

¹⁶ Seco, J.M., Quinóá, E., Riguera, R. *Chemical Reviews.*, 104, 17-117, 2004

3.3.1 – Método de Horeau

Diante da necessidade de novos métodos para a determinação da estereoquímica, Horeau¹⁷ desenvolveu um método que permitia a determinação da configuração de alcoóis secundários de maneira indireta. Ele propôs que a esterificação do álcool secundário assimétrico com anidrido ou cloreto do ácido 2-fenilbutanóico racêmico gera diferentes proporções dos enantiômeros do ácido 2-fenilbutanóico como produto. Segundo ele, isso está relacionado ao estado de transição das reações, que apresentarão diferentes energias de ativação devido às diferentes estereoquímicas dos complexos ativados desenvolvidos durante o curso da reação (Figura 2).

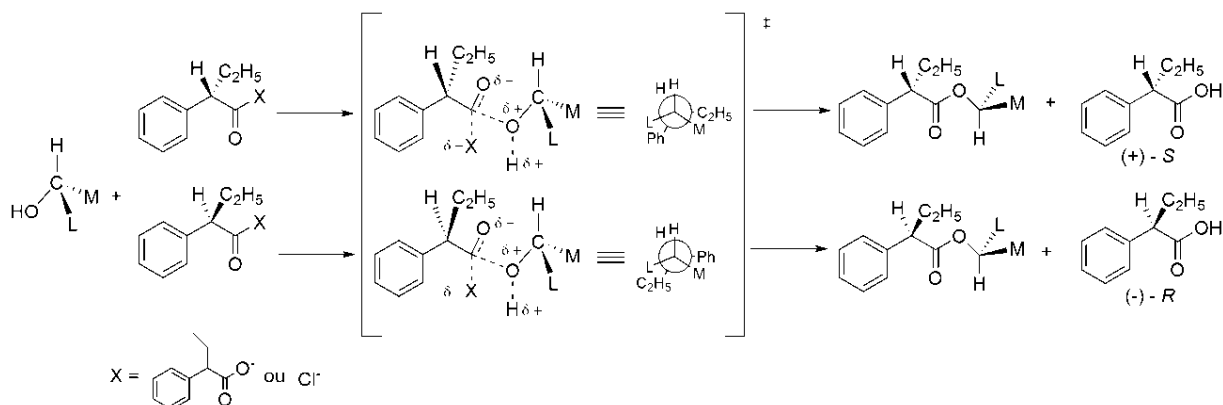


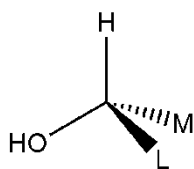
Figura 2: Curso da reação de esterificação do álcool secundário com ácido 2-fenilbutanóico.

Na Figura 2 um álcool secundário genérico é submetido a esterificação com um derivado racêmico do ácido 2-fenilbutanóico. O álcool apresenta em sua estrutura os substituintes L, de maior volume, e M, de volume médio. Os estados de transição das duas reações apresentam estereoquímica diferente, onde em um deles o grupo L do substituinte está eclipsado com a fenila do ácido 2-fenilbutanóico, e no outro estado de transição o substituinte L está eclipsado com a etila do ácido, como pode ser percebido pela projeção de Newman de ambos estados de transição. O estado de transição onde o grupo L, de maior volume, está eclipsado com a etila será favorecido em relação aquele que apresenta esse grupo eclipsado a fenila,

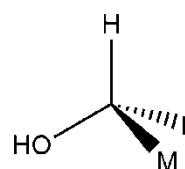
¹⁷ Horeau, A., *Tetrahedron Letters*, 15, 505-512, 1961.

devido à menor energia provocada pela interação entre os grupos, a segunda reação na Figura 2.

Após a esterificação, deve-se medir o excesso enantiomérico dos ácidos formados. Isso pode ser feito por rotação ótica, cromatografia líquida¹⁸ ou cromatografia gasosa enantioseletiva.¹⁹ Se houver excesso do ácido (+)-(S)-2-fenilbutanóico, o álcool apresentará a configuração representada pela estrutura 2, mas se houver excesso enantiomérico do (-)-(R)-2-fenilbutanóico sua configuração será representada pela estrutura 3. Então, conhecendo-se a disposição dos grupos no carbono quiral do álcool secundário, aplica-se a regra de prioridade de Cahn, Ingold e Prelog para determinar a estereoquímica do carbono assimétrico.



2



3

Apesar de ser um método bastante difundido para a determinação da estereoquímica absoluta de alcoóis secundários, o emprego do método de Horeau apresenta alguma reserva por parte do meio acadêmico como método eficaz para determinação da estereoquímica absoluta. Isso se deve ao fato de que a determinação da estereoquímica é feita de maneira indireta, pela análise do produto da esterificação do álcool com o anidrido 2-fenilbutanóico. Além disso, por vezes fica difícil diferenciar qual o grupo de maior volume e o de volume médio do álcool, sendo necessário o uso de ferramentas computacionais para determinar o tamanho relativo dos substituintes.

3.3.2 – Determinação da estereoquímica absoluta por ressonância magnética nuclear

Nos últimos anos tem sido publicados diversos trabalhos descrevendo o uso da ressonância magnética nuclear para a determinação da estereoquímica absoluta

¹⁸ Christensen, S.B., *Journal of Organic Chemistry*, 48, 396-399, **1993**.

¹⁹ König, W.A., Ghercke, B.E., Weseloh, G., *Chirality*, 6, 141-146, **1994**.

de compostos orgânicos. Dentre esses trabalhos, destacam-se os desenvolvidos pelo Professor Ricardo Riguera, da Universidade de Santiago de Compostela. Riguera aperfeiçoou a metodologia desenvolvida por Mosher²⁰ e utilizou novos auxiliares quirais para o emprego do RMN como ferramenta para determinação da estereoquímica, bem como criou novas metodologias para a utilização do RMN para o estudo da estereoquímica de vários grupos funcionais.²¹

Há diversos procedimentos que podem ser executados na determinação da estereoquímica por RMN, como a complexação do composto de configuração desconhecida com sal de bário; a simples derivatização do composto com um reagente quiral seguida da análise de RMN de ¹H a baixa temperatura; e as duplas derivatizações. Entretanto, todos esses métodos têm em comum o fato de necessitarem a derivatização do composto em análise com algum auxiliar quiral enantiomericamente puro. Os auxiliares mais comuns empregados são MFA (ácido metoxifenilacético), MTFA (ácido metoxitrifluormetilacético), BFG (Boc fenilglicina), 9-AMA (ácido antrilhidroxiacético) e 9-AHA (ácido antrilhidroxiacético etil éster) (Figura 3). Sendo que os dois últimos são os que proporcionam os melhores resultados.

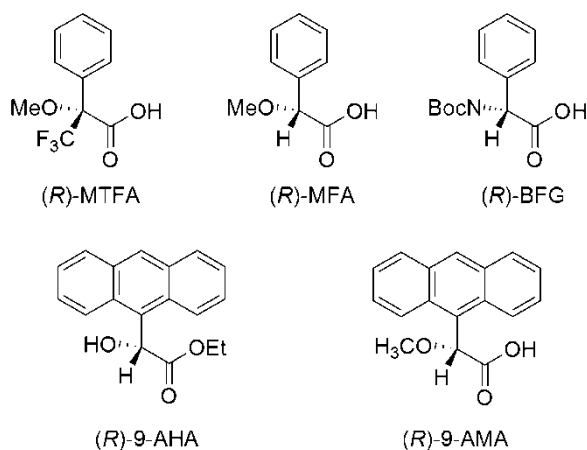


Figura 3: Auxiliares quirais empregados nas derivatizações para determinação da estereoquímica por RMN.

A comparação dos espectros de RMN dos dois derivados com a avaliação das diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais referentes aos substituintes

²⁰ Dale, J.A., Mosher, H.S., *Journal of the American Chemical Society*, 95, 512, **1973**.

²¹ Seco, J.M., Quinôá, E., Riguera, R. *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 2915-2925, **2001**

genéricos L_1 e L_2 deve ser feita. Isso é necessário porque este parâmetro contém informações a respeito da posição relativa dos substituintes L_1 e L_2 , devido ao efeito anisotrópico proporcionado pelo anel aromático presente nos auxiliares quirais sobre esses substituintes. Por isso, é necessário que haja uma conformação preferencial para cada um dos dois diastereoisômeros, pois assim o anel aromático poderá projetar sua anisotropia sobre o grupo L_1 em um derivado e sobre L_2 no outro.

Isso pode ser visualizado no exemplo da determinação da determinação da estereoquímica do *R*-2-pentanol (Figura 4), onde a metoxila, a carbonila e a metila 1' estão situadas no mesmo plano. Desta maneira, no derivado (*R*)-MFA, a fenila blinda o grupo L_1 (-CH₂CH₂CH₃), enquanto no derivado (*S*)-MFA o grupo blindado é o L_2 (-CH₃). A comparação de ambos os espectros mostra que $\Delta\delta^{RS}L_1 < 0$ e $\Delta\delta^{RS}L_2$ (-0,14, -0,23, -0,09 e +0,013 ppm, respectivamente).

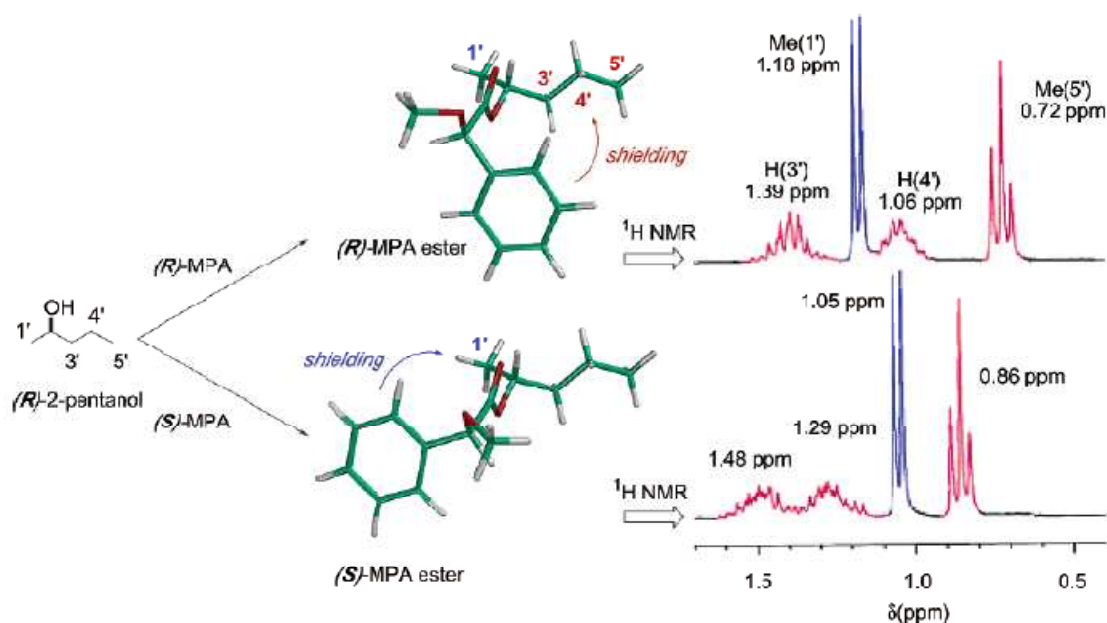


Figura 4: Efeito anisotrópico do auxiliar sobre os grupos L_1 e L_2 e consequência nos espectros de RMN de ^1H .

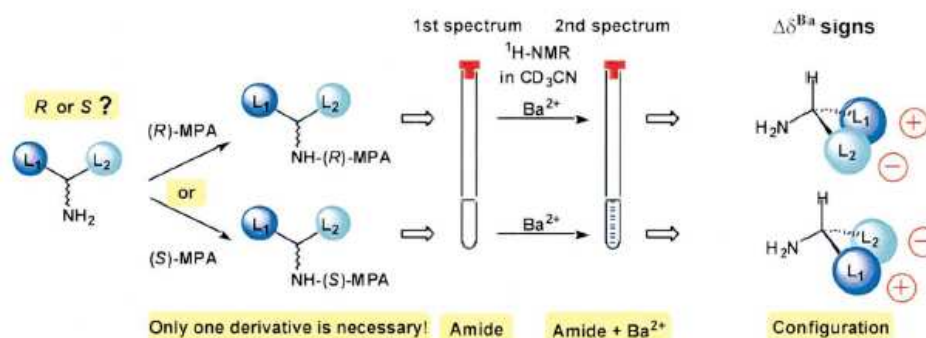
Simples derivatização com complexação de Ba^{2+}

O procedimento que utiliza sal de bário como complexante pode ser utilizado na determinação da estereoquímica de aminas primárias e alcoóis secundários (o Esquema 6 representa o procedimento para aminas primárias). Ele se baseia na quelação seletiva do Ba^{2+} , que se dá entre a porção do agente derivatizante, normalmente MFA, e a carbonila do éster ou da amida produzida. A execução do

experimento consiste, primeiramente, na derivatização do substrato de configuração desconhecida com um dos enantiômeros do auxiliar quiral. Após a obtenção do espectro de RMN de ^1H do derivado, adiciona-se $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ao tubo de RMN e obtém-se o espectro de RMN de ^1H do composto complexado. A comparação dos espectros é feita através do parâmetro $\Delta\delta^{\text{Ba}}$, que é definido como o deslocamento químico de um determinado substituinte, L_1 , no espectro do composto complexado menos o deslocamento químico do mesmo substituinte, L_1 , antes da adição de bário ao tubo, ou seja:

$$[\Delta\delta^{\text{Ba}} \text{L}_1 = (\delta_{\text{L}_1} \text{ do derivado} + \text{Ba}^{2+}) - (\delta_{\text{L}_1} \text{ do derivado})]$$

O mesmo cálculo deve ser feito para outro grupo L_2 . Como L_1 e L_2 estão em lados opostos da estrutura, eles devem apresentar sinais opostos também.



Esquema 6: Esquema para determinação da estereoquímica absoluta de aminas primárias por RMN pelo método da complexação com bário.

Se for empregado para derivatizar a amina (*R*)-MFA, o grupo $\text{L}_{<0}$ deve ficar para frente do plano no tetraedro representando o centro quiral, mas se for utilizado (*S*)-MFA o grupo $\text{L}_{>0}$ é quem deve ficar para frente, conforme representado no Esquema 6.

Simples derivatização com RMN a baixa temperatura

O método da simples derivatização a baixa temperatura pode ser empregado na determinação da estereoquímica de alcoóis secundários. Utiliza-se nesse método a derivatização do álcool com apenas um enantiômero do auxiliar quiral,

normalmente MFA. Este método é baseado na modificação da conformação do éster obtido pela reação do MFA com o álcool de configuração desconhecida, devido ao abaixamento da temperatura no *probe* do aparelho de RMN, que varia da temperatura ambiente a -70°C durante a análise da amostra. A configuração é determinada pelo parâmetro $\Delta\delta^{T^1T^2}$, que é dado pela comparação dos espectros de RMN de ^1H do derivado em temperatura ambiente e na mais baixa temperatura. Para um dado substituinte, $\Delta\delta^{T^1T^2}L_1$, por exemplo, é a diferença entre o deslocamento químico do substituinte L_1 do éster na temperatura ambiente ($\delta^{T^1}L_1$) e o deslocamento químico do mesmo substituinte L_1 na mais baixa temperatura ($\delta^{T^2}L_1$). O mesmo cálculo deve ser feito com um substituinte L_2 do éster e, assim como no método da complexação com bário, L_1 e L_2 devem ter sinais contrários.

Se for empregado na derivatização do álcool (*R*)-MFA, o grupo $L>0$ deve ficar para frente do plano no tetraedro representando o centro quiral, mas se for utilizado (*S*)-MFA o grupo $L<0$ é quem deve ficar para frente, conforme representado na Figura 5.

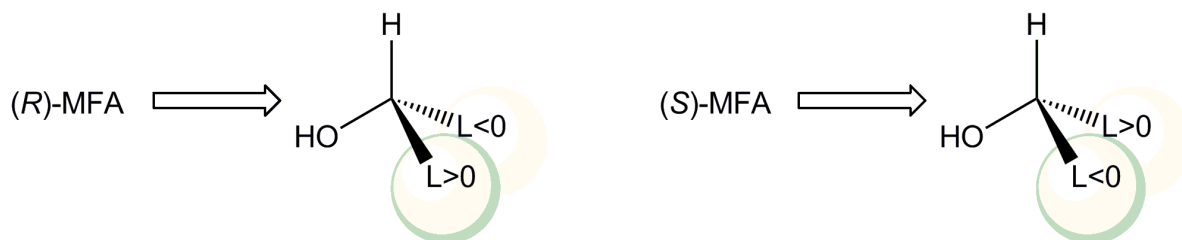


Figura 5: Disposição dos grupos L_1 e L_2 no estereocentro de acordo com a configuração do MFA.

Método da dupla derivatização

Este método pode ser empregado na determinação da estereoquímica de alcoóis e aminas primárias, ácidos carboxílicos e alcoóis secundários. Os auxiliares quirais mais comuns utilizados para este procedimento são *R* e *S*-MFA, *R* e *S*-MTFA e *R* e *S*-9-AMA. O procedimento geral deste método consiste na derivatização do substrato de configuração desconhecida com os dois enantiômeros, individualmente, de um reagente quiral auxiliar. Os espectros de RMN de ^1H dos derivados diastereoisoméricos são comparados e calcula-se o $\Delta\delta^{\text{RS}}$ para um substituinte L_1 pela diferença entre o deslocamento químico dele no éster obtido com o auxiliar

quiral *R* e o deslocamento químico dele no éster obtido com o auxiliar quiral *S*. O mesmo procedimento deve ser efetuado com um substituinte L_2 , que deve ter sinal contrário ao L_1 .

O substituinte *L* que apresentar valor menor que zero deve ficar para frente do plano e o que apresentar valor positivo para trás, conforme a Figura 6.

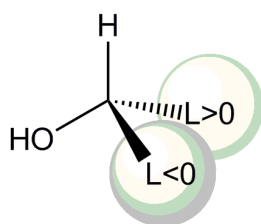
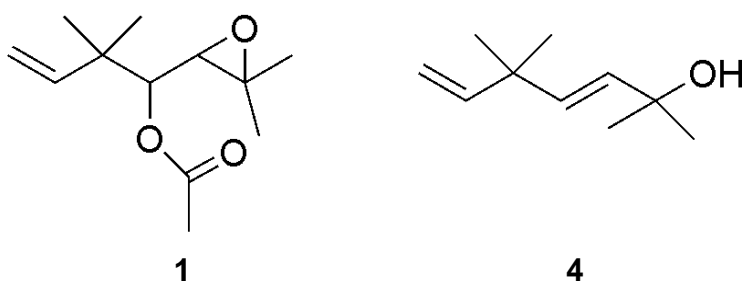


Figura 6: Disposição dos grupos *L* em torno do estereocentro na dupla derivatização.

3.4 – Estudo do óleo essencial de *Calea clematidea*

O óleo essencial das folhas e flores de *Calea clematidea* foi estudado em 2000 por Flach.²² Nesse trabalho, verificou-se a presença de um monoterpreno no óleo das folhas como composto majoritário. Tal monoterpreno foi isolado e teve sua estrutura determinada por RMN uni e bidimensionais, da onde se verificou que este composto tratava-se de um monoterpreno inédito. Ele foi chamado de caleol (**1**) e apresenta em sua estrutura os grupos funcionais alceno, epóxido e éster. O caleol é um derivado do álcool de yomogi (**4**), que também é encontrado no óleo das folhas de *C. clematidea*. Os compostos minoritários do óleo essencial foram identificados por índice de retenção de Kovats e CG-EM.

A estereoquímica absoluta do caleol²² foi determinada pelo método de Horeau, que mostrou que o carbono C4 apresenta configuração *R* e o carbono C3 *S* (Figura 7).



²² Flach, A., Dissertação de Mestrado, UFSM, 2000.

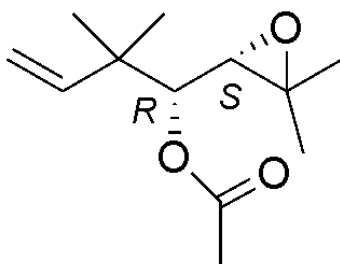
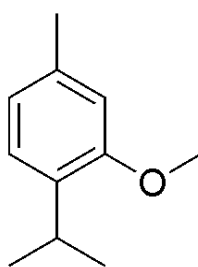


Figura 7: Estereoquímica absoluta do caleol determinada por Flach.

O óleo essencial das folhas teve sua atividade microbiológica testada pelo método da difusão em meio sólido frente a bactérias e fungos dermatófitos.²² Nesse ensaio, o óleo não se mostrou muito ativo contra as bactérias testadas, mas apresentou bons resultados contra os fungos *Microsporium nanum*, *Trichophyton rubrum* 78 e *Trichophyton rubrum* 1370.

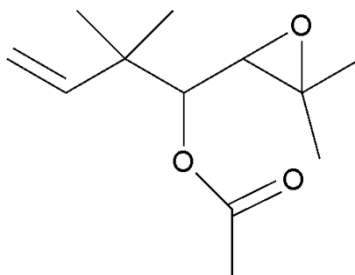
O óleo essencial das flores de teve sua composição determinada por índice de retenção de Kovats e CG-EM. Além disso, foi isolado um monoterpene que teve sua estrutura determinada por RMN uni e bidimensionais, da onde se descobriu tratar do timol metil éter **5**, um componente comum nos óleos essenciais das plantas do gênero *Calea*.



5

4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Para a realização deste estudo, foi utilizado o monoterpene caleol **1**, presente no óleo essencial de *Calea clematidea*, com a finalidade de realizar modificações em sua estrutura. Mais especificamente, fazer um estudo da abertura do seu epóxido e, posteriormente, investigar suas atividades biológicas.



1

Este capítulo apresenta a descrição de procedimentos para extração e isolamento do caleol de *C. clematidea*, seguidos das reações de abertura do epóxido desse composto. Após, será descrito o procedimento para determinação da configuração do carbono C4 do caleol com a aplicação do método da ressonância magnética nuclear. E ao final do capítulo serão mencionadas as atividades biológicas dos produtos obtidos

4.1 - Extração e purificação do óleo essencial de *Calea clematidea*

Para a extração do óleo essencial de *C. clematidea* foram realizadas várias coletas utilizando folhas frescas, coletadas na cidade de Santana do Livramento/RS/BR, nos anos de 2009 e 2010. O óleo, de cor verde, foi obtido por hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger modificado. O rendimento do óleo volátil, bem como sua composição, variou de acordo com a época de coleta da planta, sendo que o início do verão (de dezembro a janeiro) foi o período no qual ocorreu maior produção de óleo, com rendimentos de até 1,2%. A concentração do caleol no óleo foi verificada por cromatografia gasosa (CG) a cada extração de óleo realizada, mantendo quase sempre bons rendimentos, sendo que os maiores foram

observados nas coletas de verão, no mês de janeiro, com uma proporção de até 75% de caleol no óleo (Figura 8).

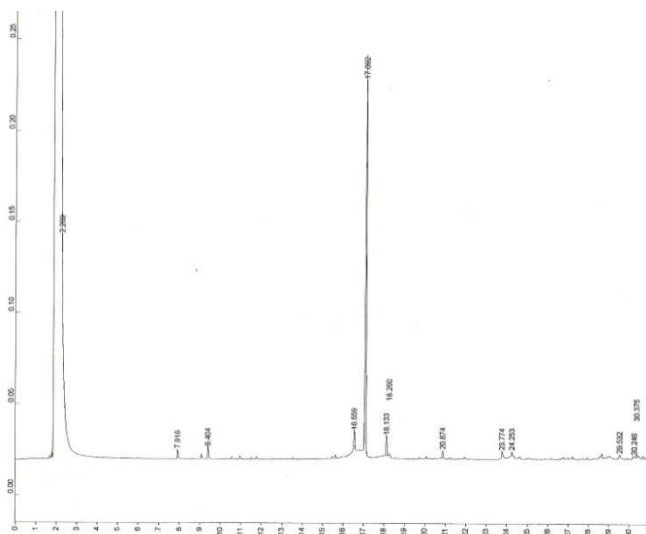


Figura 8: Cromatograma de CG típico do óleo essencial de *C. clematidea* com as seguintes condições cromatográficas: coluna DB-5; 50-250°C 4/ min; injetor 220°C; detector 280°C; pressão 8psi.

As purificações do óleo essencial foram feitas por cromatografia em coluna, com sílica gel como fase estacionária e hexano e acetato de etila como fase móvel. Tal técnica possibilitou o isolamento do monoterpreno, que aparece no cromatograma com tempo de retenção de 17,092 min e com grau de pureza acima de 90%.

A estrutura do composto isolado foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN), e a numeração empregada foi a mesma utilizada por Flach para melhor comparação dos espectros. O espectro de RMN de ^1H do composto isolado (Figura 9) apresentou quatro singletos referentes a hidrogênios metílicos, sendo que um destes representa aqueles da metila ligada à carbonila (H9) em δ 2,06 ppm e os demais hidrogênios metílicos ligados a carbonos desidrogenados (H5', H5'', H1 e H1') em δ 1,04 (6 H), 1,33 e 1,25 ppm, respectivamente; dois hidrogênios de grupos metínicos, como dubletos, ligados a oxigênio (H3, H4) em δ 2,77 e 4,68 ppm; e mais um metileno como um duplo dubleto de dubletos (H7) em δ 5,04 ppm e outro grupo metino como dubleto de dubletos (H6) em δ 5,85 ppm, de ligação dupla.

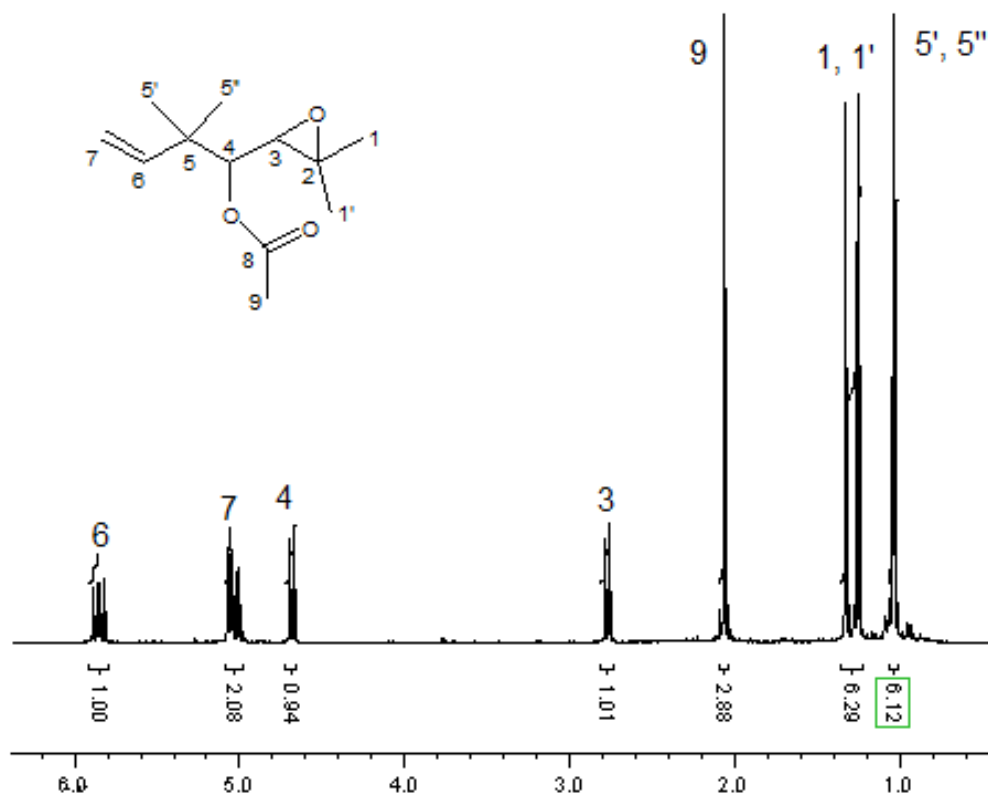


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do caleol, em CDCl_3 a 400 MHz.

Já o espectro de RMN de ^{13}C do composto (Figura 10), mostra doze sinais, sendo que cinco destes referentes aos carbonos das metilas (C1 , $\text{C1}'$, C9 , $\text{C5}'$, $\text{C5}''$), em δ 19, 8, 20,8, 22,5, 23,3 e 24,3 ppm, respectivamente; um carbono quartenário ($\text{C} - 5$) em δ 39,7 ppm; três carbonos carbinólicos (C2 , C3 , C4) em δ 60,2, 62,3 e 76,5 ppm, respectivamente; dois carbonos oleofínicos (C6 , C7) em δ 143,0 e 113,2 ppm e, por fim, um carbono carbonílico de éster (C8) em 170,3 ppm.

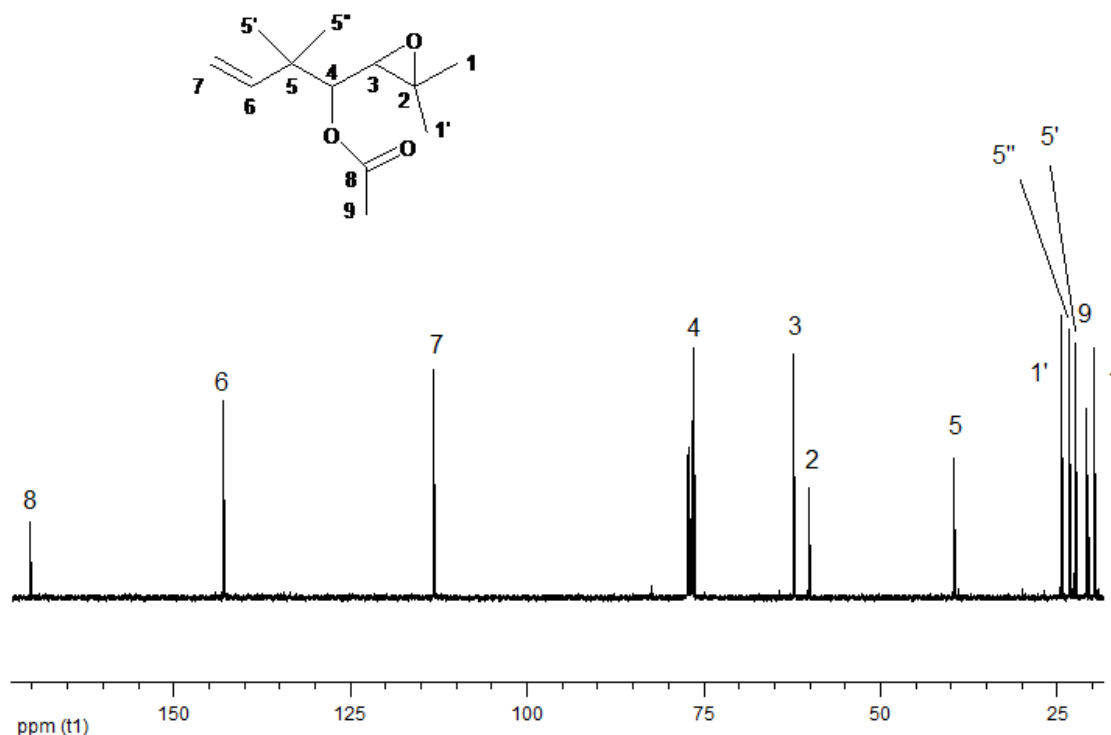


Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C do caleol, em CDCl_3 a 100 MHz.

A Tabela 3 apresenta os deslocamentos químicos dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do composto isolado neste trabalho e o do caleol descrito por Flach, comprovando que se trata do mesmo composto.

Tabela 3: Comparação entre os deslocamentos químicos em, CDCl_3 , do caleol isolado com os da literatura.

Posição	Isolado		Literatura ²²	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,33 (s)	19,8	1,30 (s)	19,7
1'	1,25 (s)	20,8	1,24 (s)	20,7
2	-	60,2	-	60,1
3	2,77 (d)	62,3	2,75 (d)	62,2
4	4,68 (d)	76,3	4,65 (s)	76,5
5	-	39,7	-	39,6
5'	1,04 (s)	23,3	1,01 (s)	22,7
5''	1,04 (s)	24,3	1,01 (s)	23,3
6	5,85 (dd)	143,0	5,83 (dd)	142,9
7	5,04 (ddd)	113,2	5,03 (dd)	113,2
8	-	170,3	-	170,2
9	2,03 (s)	22,5	2,04 (s)	24,3

4.2 - Reações de abertura do epóxido do caleol

4.2.1 – Reações com acetato de 1-(3',3'-dimetil-2'-oxiranyl)-2,2-dimetil-3-butenila

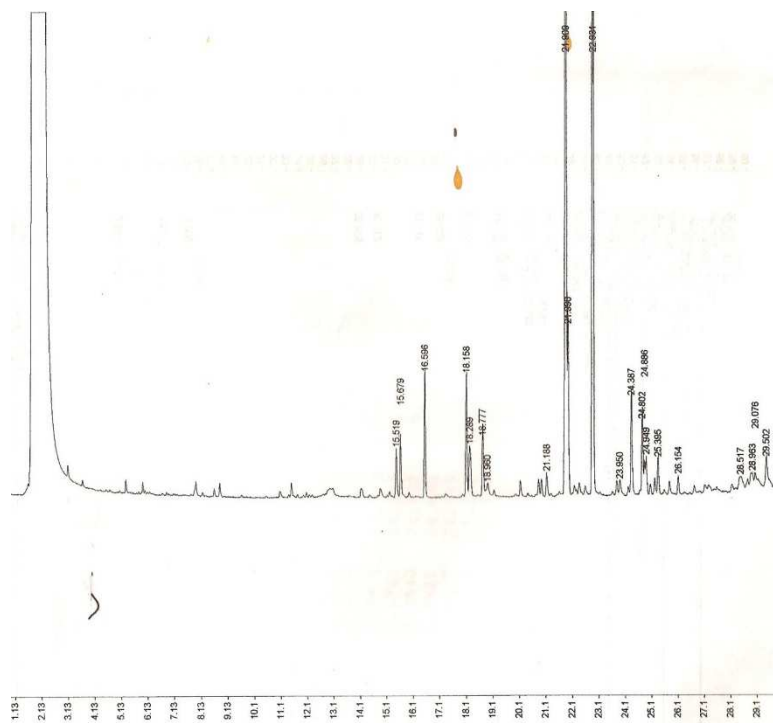
O caleol isolado foi submetido à reações de abertura de seu epóxido com a metodologia descrita por Iranpoor (1994)²³, utilizando FeCl₃ anidro como catalisador. O nucleófilo é o próprio álcool que serve como solvente para essa reação. Segundo Iranpoor, assim como todas as aberturas de epóxido catalisadas por ácido, ocorre a formação preferencial do álcool menos substituído.²⁴

No trabalho foram empregados como solvente e nucleófilo os seguintes alcoóis: metanol, álcool alílico, t-butanol e isopropanol. As reações foram acompanhadas por CCD e CG e após seu término, determinado pelo consumo do material de partida, todos os produtos foram submetidos à análise por CG (Figura 11). Em todas as reações ocorreu a formação de inúmeros produtos, sem apresentar qualquer seletividade, não sendo possível o isolamento de nenhum dos compostos produzidos e, conseqüentemente, a determinação de suas estruturas. A hipótese para tal fato é a possível ocorrência de reações secundárias, tanto no epóxido quanto na carbonila do éster do caleol, devido ao fato de o ácido de Lewis empregado ser também utilizado como catalisador em reações de adição nucleofílica à carbonila. Nos cromatogramas apresentados não é possível a visualização do sinal referente ao material de partida por este ter sido completamente consumido na reação.

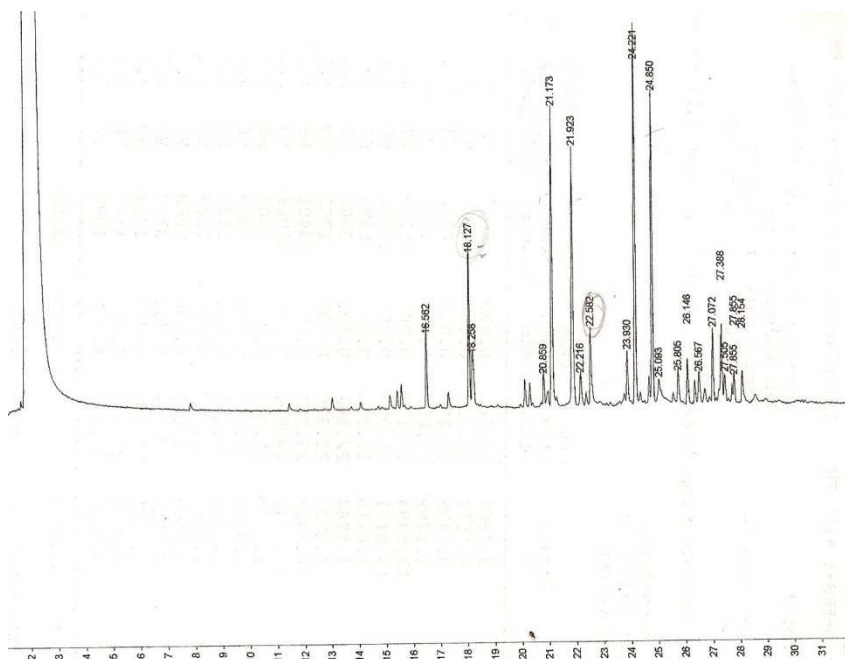
²³ Iranpoor, N., Salehi, P., *Synthesis* **1994**, 1152

²⁴ Clayden, Greeves, Warren e Wothers, *Organic chemistry*, Oxford

A



B



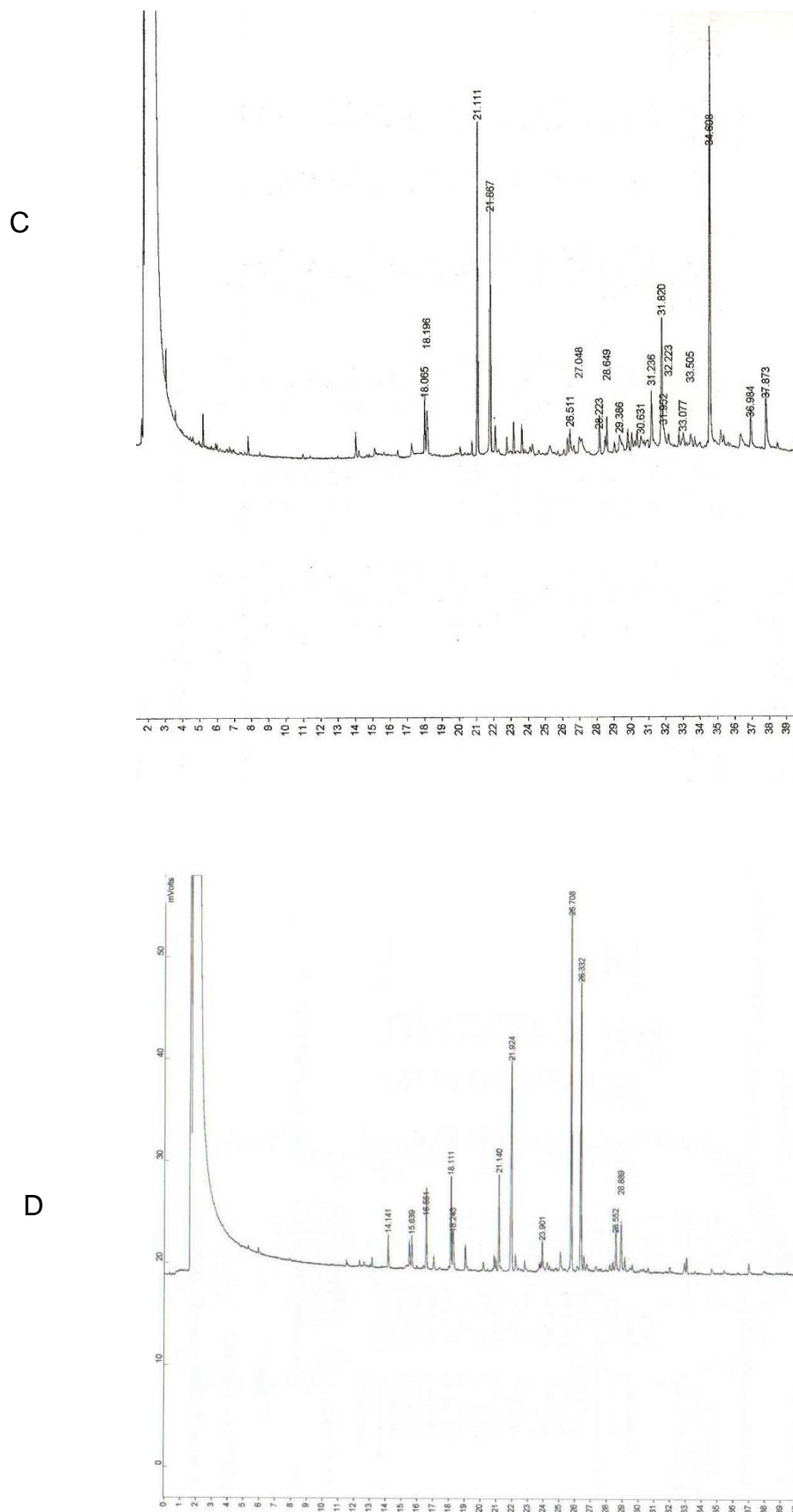
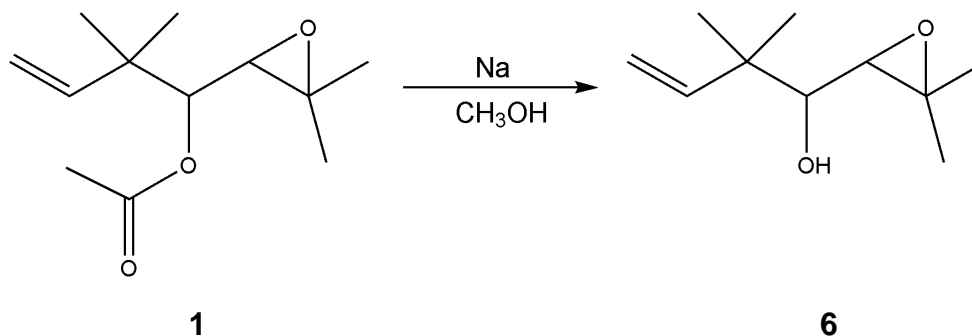


Figura 11: Cromatogramas de CG dos produtos da reação de abertura do epóxido do caleol por: a) metanol, b) isopropanol, c) t-butanol e d) álcool alílico.

4.2.2 – Hidrólise básica do caleol

Com o intuito de verificar se os inúmeros produtos, formados na reação de abertura do epóxido do caleol, são devidos realmente à função éster, realizou-se sua hidrólise básica com sódio metálico (Esquema 7). Essa reação é bastante limpa, no sentido de que não houve a geração de subprodutos, e com rendimentos em torno de 90%.



Esquema 7: Hidrólise do caleol

O produto da reação foi analisado por CG (Figura 12). Por este meio, verificou-se o consumo completo do éster devido ao desaparecimento do sinal deste no cromatograma, com a formação de um único produto, com tempo de retenção inferior ao material de partida, em $t_r = 11,439$ min, com pureza acima de 90%.

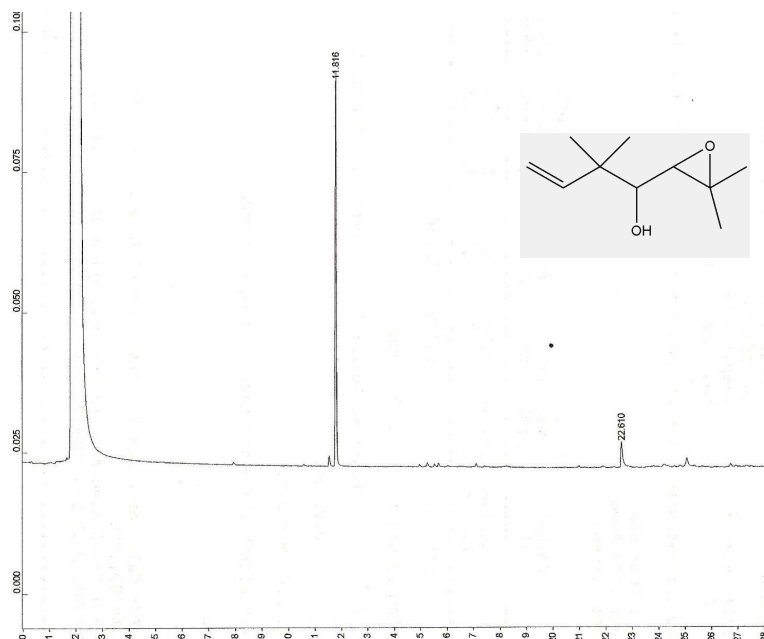


Figura 12: Cromatograma da hidrólise do caleol com as seguintes condições cromatográficas: coluna DB-5; 50-250°C 4/min; injetor 220°C; detector 280°C ; pressão 8psi.

Após a purificação do composto por cromatografia em coluna, o produto foi submetido a análise de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de hidrogênio (Figura 13) pode-se observar que ocorreu o desaparecimento do sinal dos hidrogênios H9 da metila do grupo acetil em relação ao espectro do caleol. Além disso, houve o deslocamento do dubleto referente ao hidrogênio H4 para δ 3,17ppm.

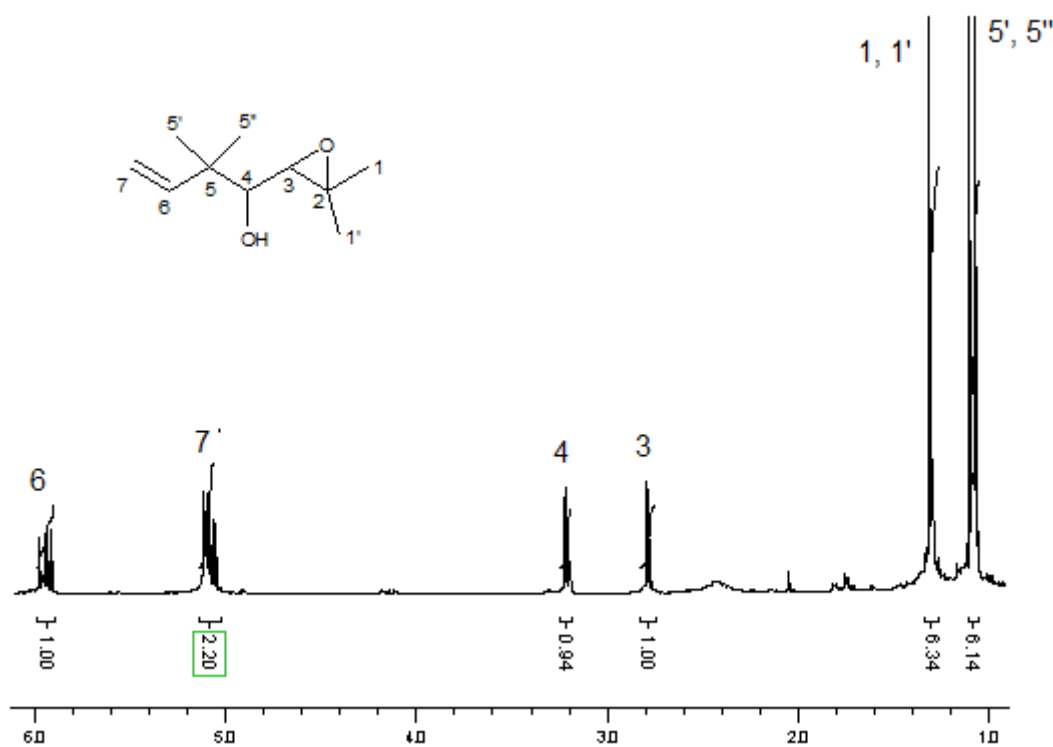


Figura 13: Espectro de RMN de ^1H do composto 6, em CDCl_3 a 400 MHz

Pelo espectro de RMN ^{13}C da Figura 14, fica caracterizada a ocorrência da hidrólise do composto 1, levando à formação do álcool 1-(3',3'-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol, devido ao desaparecimento dos sinais referentes à carbonila (C8) e da metila C9 do éster, que antes aparecia em δ 20,7ppm.

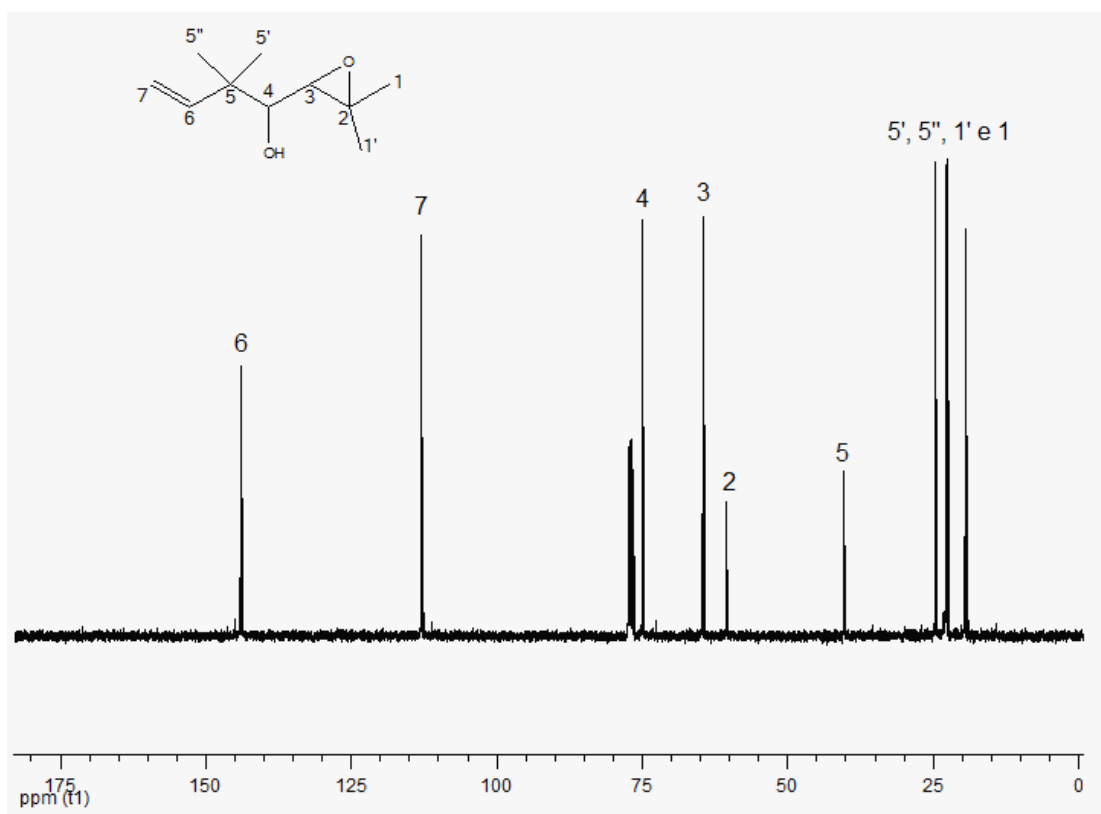


Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6**, em CDCl_3 a 100 MHz

Os demais sinais não sofreram mudanças significativas em seus deslocamentos químicos. A estrutura do composto foi confirmada pela comparação dos deslocamentos obtidos com os descritos por Flach (Tabela 4).¹

Tabela 4: Comparação entre os deslocamentos químicos do composto **6**, em CDCl_3 , com os da literatura.

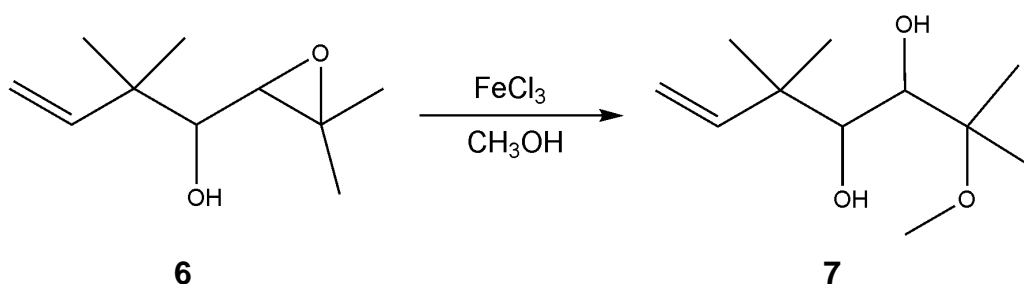
Posição	Isolado		Literatura ²²	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,28 (s)	22,6	1,31 (s)	22,5
1'	1,27 (s)	19,5	1,30 (s)	19,7
2	-	60,5	-	60,4
3	2,75 (d)	64,6	2,78 (d)	64,6
4	3,17 (d)	74,9	3,22 (d)	74,9
5	-	40,3	-	40,2
5'	1,04 (s)	24,6	1,07 (s)	24,5
5''	1,07 (s)	22,9	1,10 (s)	22,8
6	5,90 (dd)	144,0	5,94 (dd)	144,0
7	5,04 (ddd)	112,9	5,05 (dd)	112,7

4.3 – Abertura do epóxido do álcool 1-(3',3'-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol

4.3.1 – Aberturas com alcoóis primários

Após a hidrólise do éster, o produto obtido foi submetido à reação de abertura de seu epóxido com cloreto férrico anidro como catalisador. Foram utilizados como nucleófilos: metanol, propanol e álcool alílico. Diferentemente da reação com a função éster no substrato, em todas as aberturas realizadas com o composto **6** empregando os alcoóis citados houve a formação de um produto principal oriundo da abertura do epóxido, mostrando que há seletividade no método quando foram utilizados alcoóis primários como nucleófilos.

Abertura com metanol



Esquema 8: Reação de abertura do álcool do caleol com metanol

A primeira reação de abertura com o composto **6** foi realizada com metanol. A reação foi acompanhada por CCD e CG e deixada sob agitação por 5h. O produto apresentou o cromatograma da Figura 15 antes de sua purificação. Apesar da existência de compostos minoritários, é possível a visualização de um composto majoritário. Este sinal aparece em $t_r = 16,840$ min, tempo superior ao álcool de partida **6**. O rendimento dessa reação foi 62%.

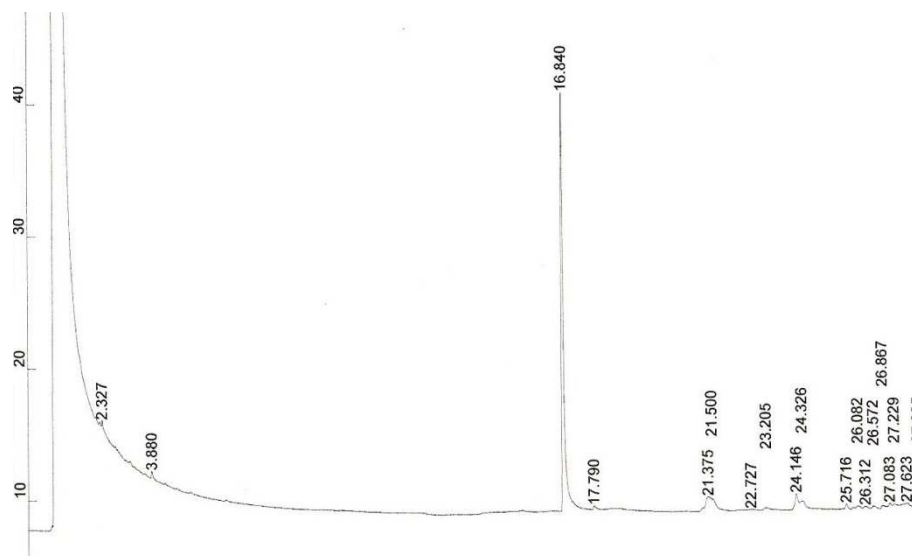


Figura 15: Cromatograma de CG da abertura com metanol

O produto foi purificado por cromatografia em coluna e, posteriormente, analisado por ressonância magnética nuclear. No espectro de RMN ^1H (Figura 16) do composto obtido foi possível observar os singletos dos hidrogênios H1, H1', H5', H5'' das metilas em δ 1,13, 1,17, 1,05 ppm (6H), respectivamente; além de dois sinais dos hidrogênios oleofínicos H6 e H7 em δ 5,88 e 5,03 ppm. Entretanto, o sinal mais importante é o singlete bastante intenso com integração para três hidrogênios em δ 3,20 ppm, sinal inexistente no espectro do composto **6**. Isso sugere a inserção na estrutura da metoxila H8, o que confirma a abertura do epóxido.

A proposta para a estrutura do produto formado é corroborada pelo espectro de RMN de carbono (Figura 17), o qual apresenta um sinal adicional do composto, em relação ao material de partida **6**. Esse sinal aparece em δ 49,2 ppm, sendo típico de metila ligada a oxigênio. Além disso, em comparação ao espectro de RMN de ^{13}C do composto de partida, observa-se a migração do sinal referente ao carbono C2, que sofreu o deslocamento de δ 60,4 ppm no composto **1** para 78,6 ppm no produto formado, devido ao efeito de desblindagem exercido pela metoxila. Tal efeito também foi observado no carbono C3, com seu deslocamento químico para δ 73,4 ppm. Os demais deslocamentos encontram-se descritos na tabela 5.

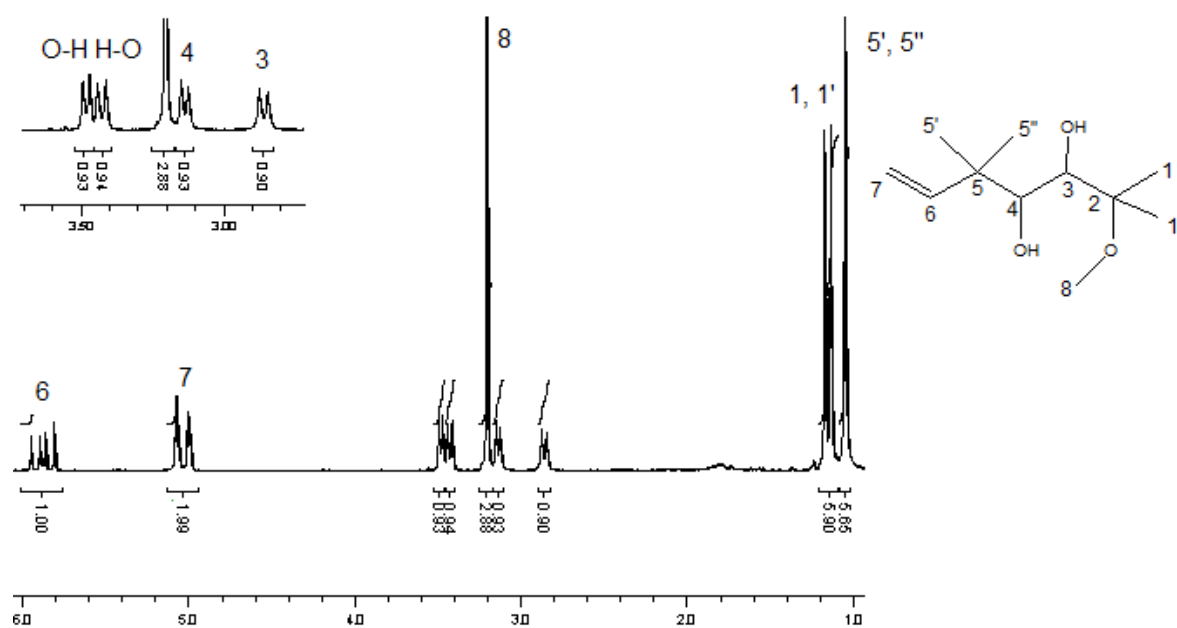


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H do produto 7, obtido em CDCl_3 , a 200 MHz.

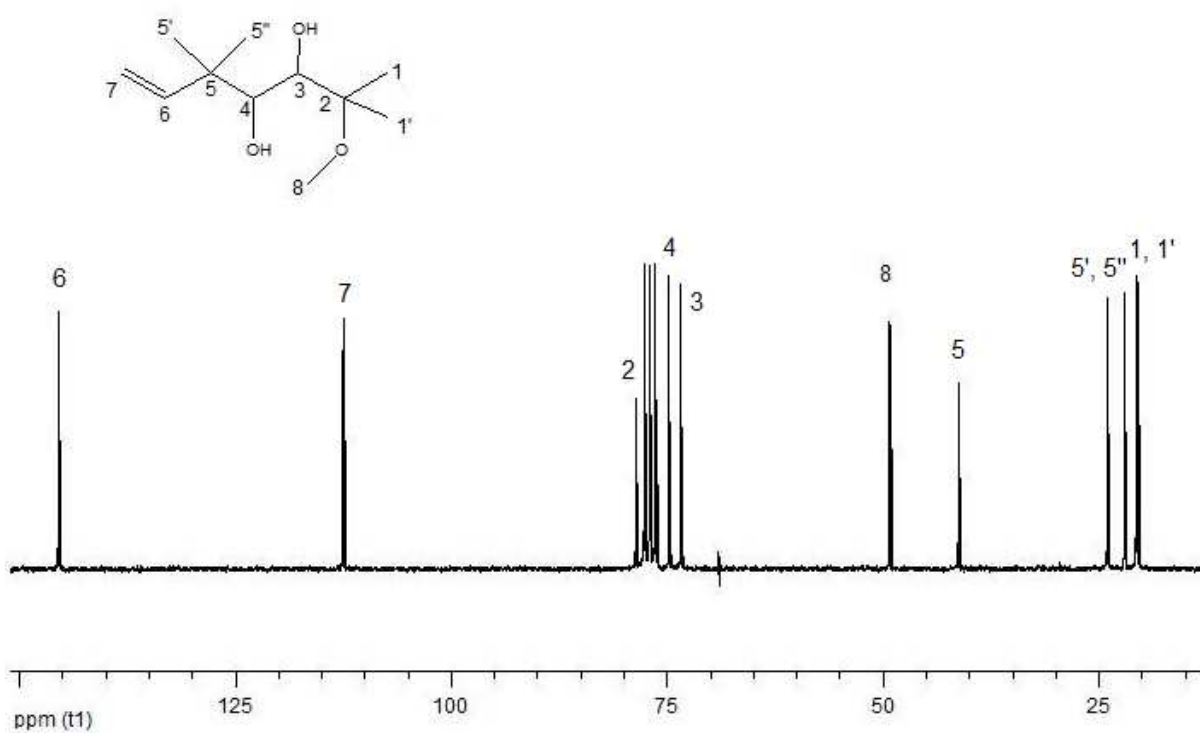


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C do produto 7 em CDCl_3 , a 100 MHz.

Tabela 5: Deslocamentos químicos do composto 7.

Posição	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
1	1,13 (s)	20,5
1'	1,17 (s)	20,7
2	-	78,6
3	2,86 (d)	73,4
4	3,13 (d)	74,8
5	-	41,3
5'	1,05 (s)	22,0
5''	1,05 (s)	24,0
6	5,88 (dd)	145,5
7	5,03 (dd)	112,5
8	3,20 (s)	49,2

Apesar de não haver dúvida com relação à abertura do epóxido, as análises de RMN unidimensionais não esclarecem em qual carbono do substrato a metoxila está ligada, ou seja, se há a abertura no sentido da formação do álcool secundário ou do terciário. Para esclarecer tal dúvida, foi realizado o experimento COLOC. A expansão da região em discussão é mostrada na figura 18. No espectro é possível visualizar a correlação entre o carbono C4 e os hidrogênios H5'; entre o carbono C3 e os hidrogênios H1 e, finalmente, entre o carbono 2 e os hidrogênios H1 e H8, da metoxila. Além disso, aparece nesse espectro bidimensional as correlações J_1 entre C4 e H4, bem como C3 e H3. Tal experimento confirma o fato de haver ocorrido a abertura no sentido da formação do álcool menos substituído, típico da abertura de epóxido catalisada por ácido.

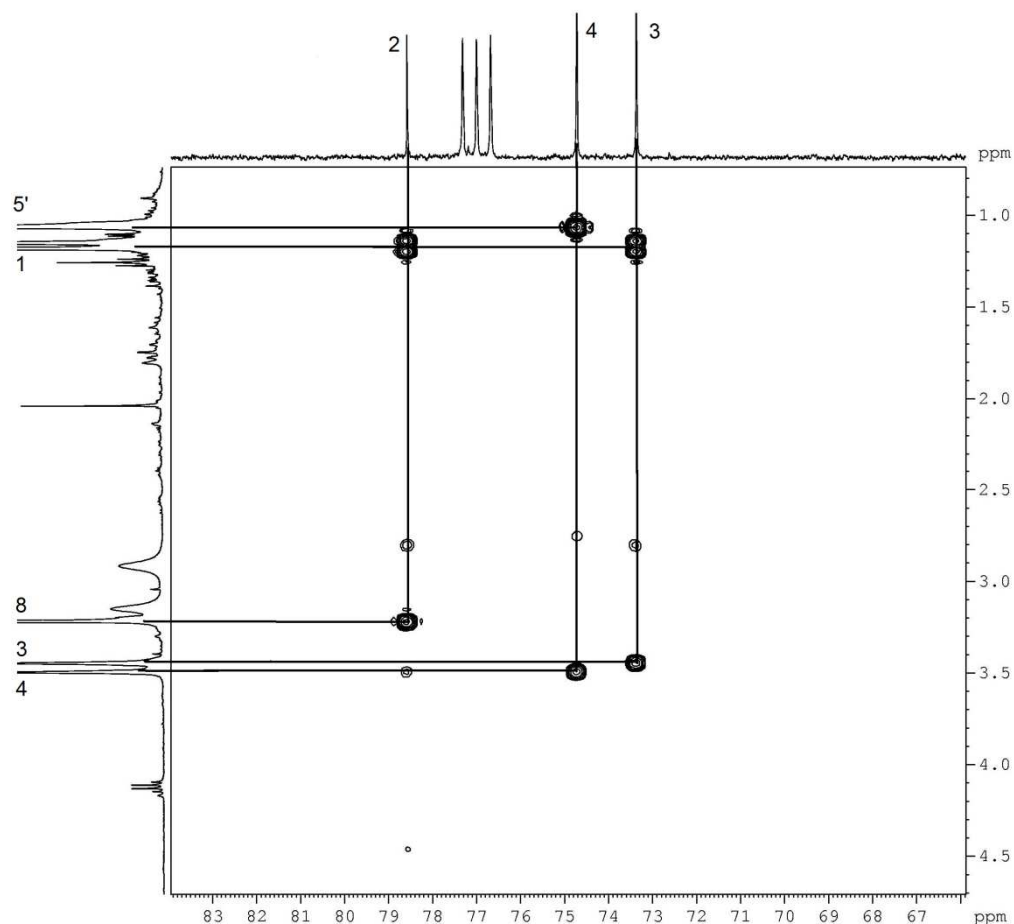
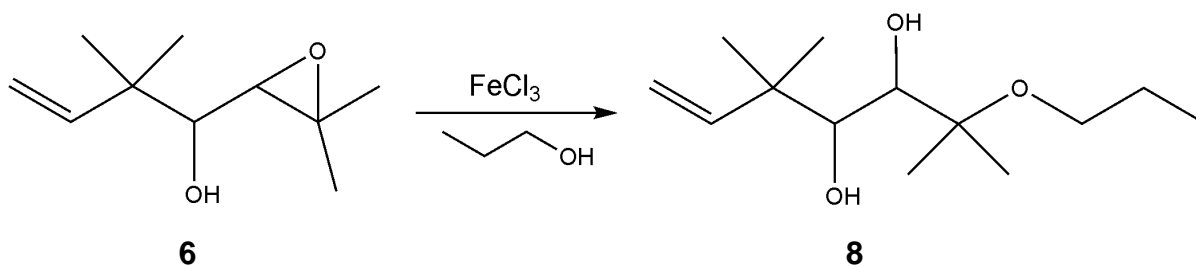


Figura 18: Experimento COLOC do composto 7 em CDCl_3 , a 100 MHz

Abertura com propanol



Esquema 9: Reação de abertura do epóxido com propanol.

Outro álcool primário utilizado na abertura do epóxido do caleol hidrolisado foi o propanol (Esquema 9). Efetivou-se essa transformação com o intuito de verificar se a reação também ocorre com a utilização de um nucleófilo primário mais volumoso que o metanol. Essa reação foi mais rápida que a abertura com metanol e durou 4h. Após seu término o produto foi analisado por cromatografia gasosa (Figura

19). Apesar de algumas poucas impurezas, o cromatograma obtido nessa reação também apresenta um produto principal, com tempo de retenção $t_r = 22,462\text{min}$, mostrando a ocorrência da reação de maneira seletiva, ou seja, com a formação de somente um produto da abertura do epóxido, assim como ocorreu com o emprego de metanol. O rendimento dessa reação também foi maior que o anterior, 71%.

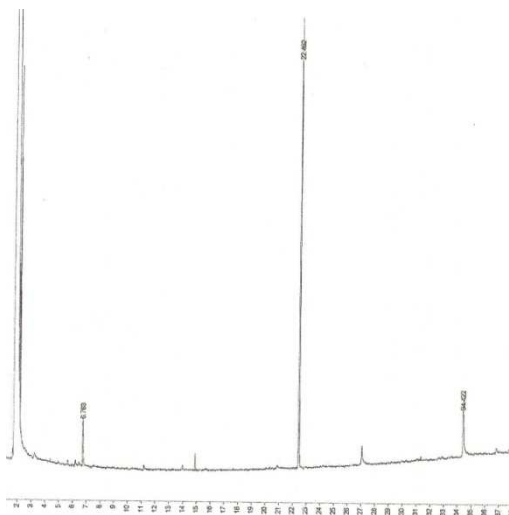


Figura 19: Cromatograma da abertura com propanol.

O produto foi submetido a purificação por cromatografia em coluna e após seu isolamento foi analisado por RMN.

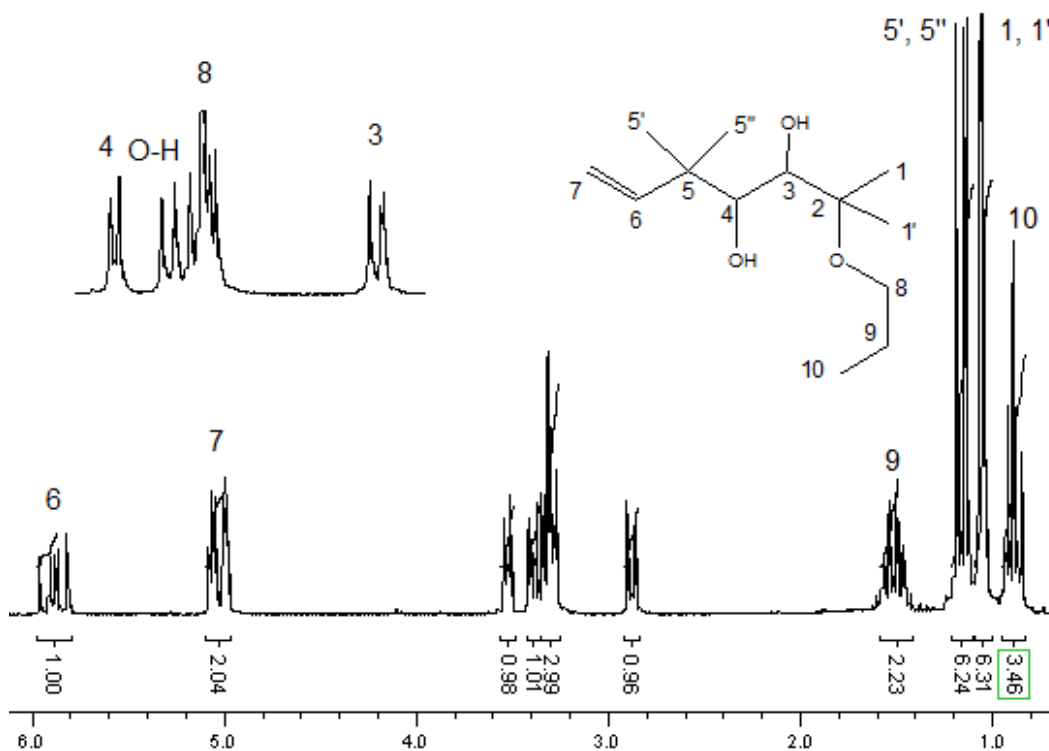


Figura 20: Espectro de ^1H do produto 8 em CDCl_3 a 400 MHz.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 20) do composto isolado apresenta sinais característicos da existência do grupo propila em sua estrutura. Além dos hidrogênios das metilas $\text{H5}'$, $\text{H5}''$, H1 e $\text{H1}'$, respectivamente em δ 1,05 (6H), 1,14 e 1,18 ppm do esqueleto natural do composto, há mais um sinal em δ 0,88 ppm desdobrada em tripleto, indicando os hidrogênio de uma metila vizinha a um grupo metileno. Estes devem ser os hidrogênios da metila H10 do grupo propil. Há também a presença de um sexteto em δ 1,51 ppm, multiplicidade típica de um grupamento metileno entre uma metila e outro metileno. Esse sinal se refere aos hidrogênios H9 . Além desses, aparece no espectro um tripleto em δ 3,30 ppm, região típica de grupos ligados a oxigênio, referente ao H8 . A visualização desse sinal ficou um tanto prejudicada, possivelmente, pela sua sobreposição com os sinais dos hidrogênios das hidroxilas.

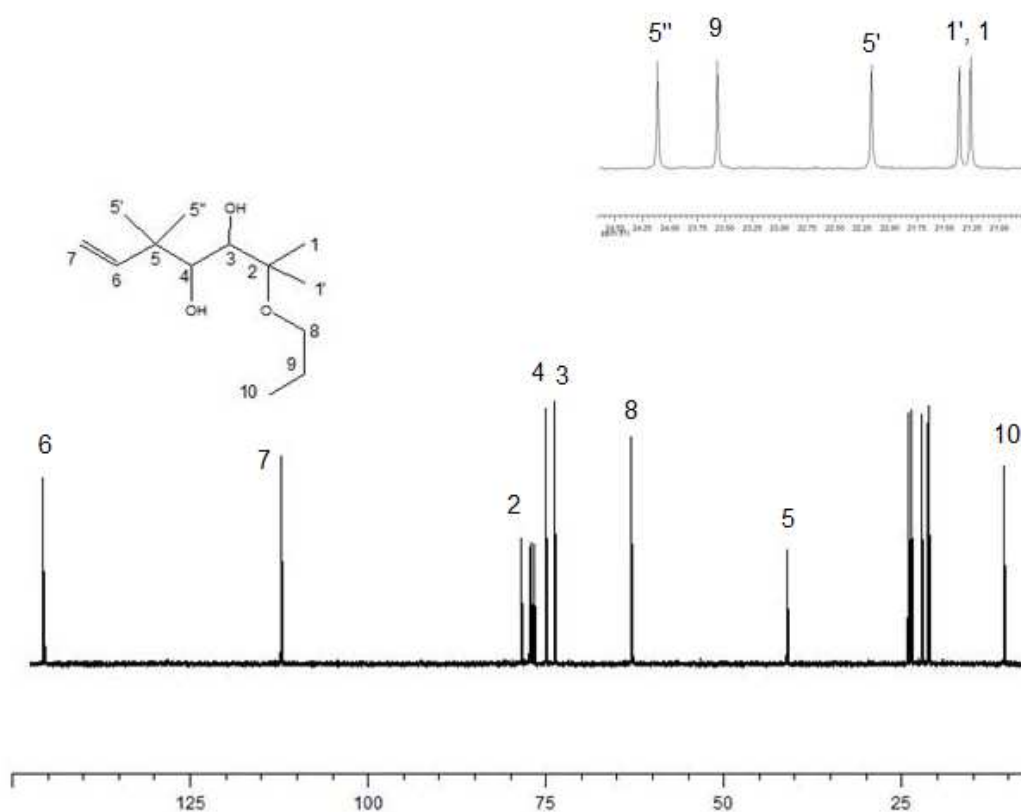


Figura 21: Espectro de ^{13}C do produto **8** em CDCl_3 , a 100 MHz.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) apresenta os treze sinais esperados para o composto. Além das metilas do esqueleto normal, em δ 21,3, 21,4, 22,1 e 24,1 ppm (dos carbonos C1, C1', C5' e C5'', respectivamente), há a incorporação na estrutura, em relação ao material de partida, de mais um sinal em δ 10,7 ppm, do C10. Em δ 23,5 e 62,9 ppm aparecem mais dois sinais, aparentemente dos C9 e C8. Os carbonos da função alceno não sofreram grande variação em seus deslocamentos químicos, apresentando δ 112,3 e 145,6 ppm, para C7 e C6, respectivamente, enquanto C3 e C4 se deslocaram para δ 74,8 e 75,0 ppm.

O espectro de DEPT 135° (Figura 22) confirma as afirmações expostas acima, pois os sinais de C8 e C9 são dos metilenos da estrutura proposta. Além disso, houve o desaparecimento dos sinais referentes aos carbonos desidrogenados C2 e C5, que absorvem em δ 41,2 e 78,5 ppm.

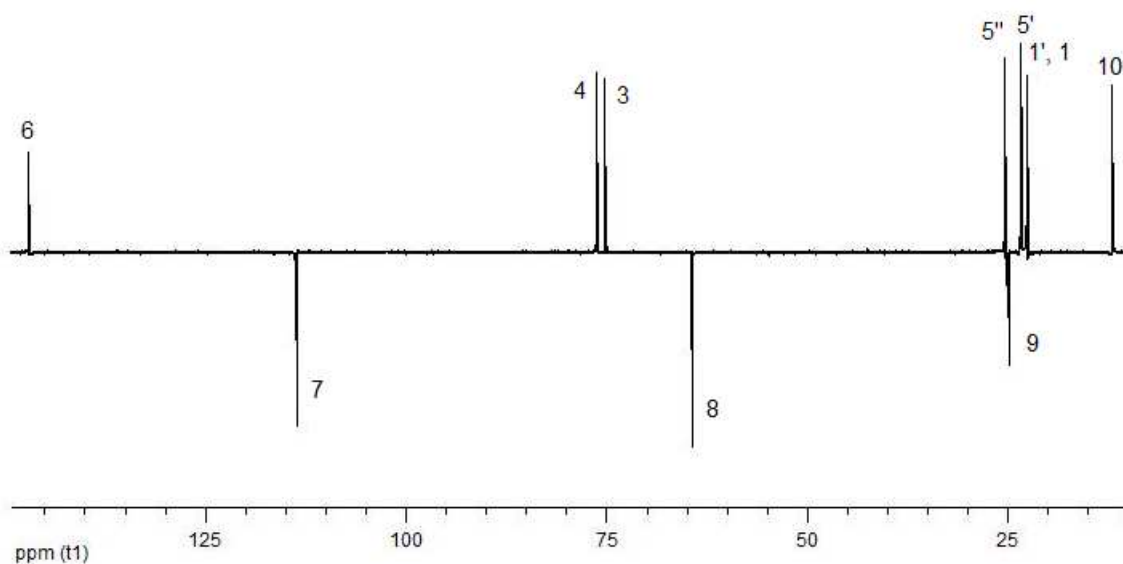


Figura 22: Espectro de DEPT 135° do produto **8** em CDCl_3 , a 100 MHz.

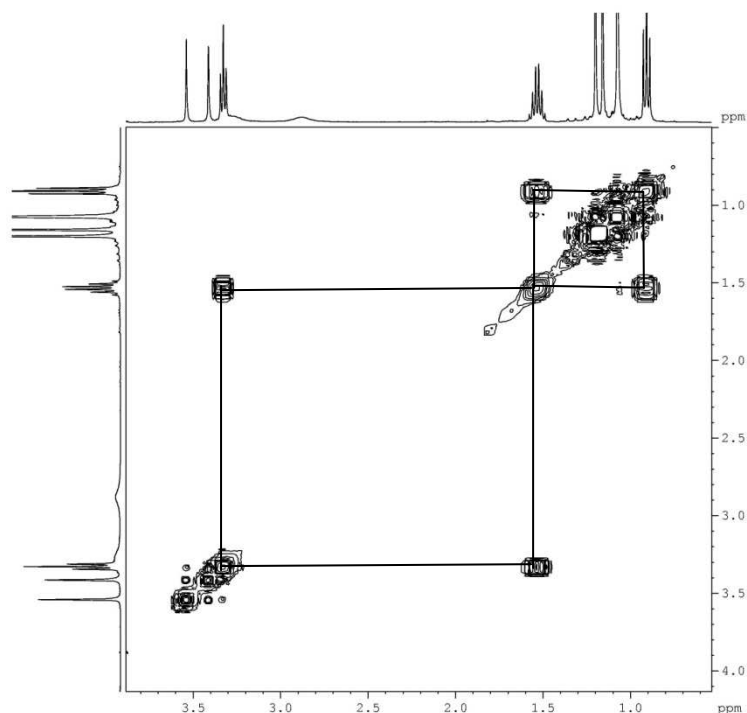


Figura 23: Espectro de COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) do produto **8** em CDCl_3 , a 400 MHz.

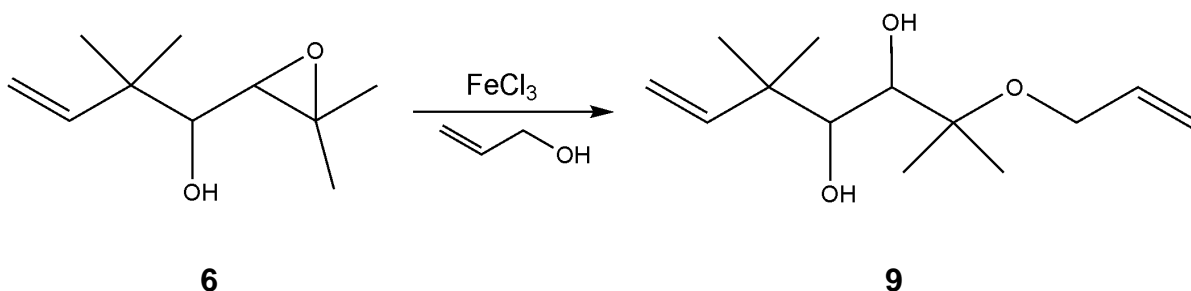
No experimento de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Figura 23) do composto é possível a visualização de um sistema de spins na região dos sinais do grupo propila, mostrando a correlação dos prótons H8, H9 e H10 entre si.

Na tabela 6 estão descritos todos os deslocamentos químicos do composto.

Tabela 6: deslocamentos químicos do composto **8**.

Posição	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	1,14 (s)	21,3
1'	1,18 (s)	21,4
2	-	78,5
3	2,88 (d)	74,8
4	3,28 (d)	75,0
5	-	41,2
5'	1,05 (s)	22,1
5''	1,05 (s)	24,1
6	5,89 (dd)	145,6
7	5,03 (dd)	112,3
8	3,30 (t)	62,9
9	1,51 (sex)	23,5
10	0,88 (t)	10,7

Abertura com álcool alílico



Esquema 10: Reação de abertura do epóxido com álcool alílico.

O último experimento realizado com álcool primário foi a abertura do epóxido com álcool alílico (Esquema 10). Este álcool, apesar de apresentar o mesmo número de carbonos que o propanol, possui uma insaturação. Portanto, a idéia de utilizar esse nucleófilo consistia em verificar se a ligação dupla do álcool tem alguma influência na abertura do epóxido, já que a insaturação proporciona a esse álcool maior densidade eletrônica se comparado ao propanol. Após a realização da reação, em 5 h, o produto foi analisado por cromatografia gasosa. Assim como as reações anteriores, cromatograma da reação (Figura 24) apresenta um produto majoritário, indicativo da formação de apenas um composto pela abertura do anel. Além do produto da reação em tr 20,858 min., é possível a visualização de material de partida remanescente em tr 17,748 min. Além desses dois, são vistos no cromatograma outros compostos de menor concentração. O rendimento dessa reação ficou abaixo dos demais, em 50 %.

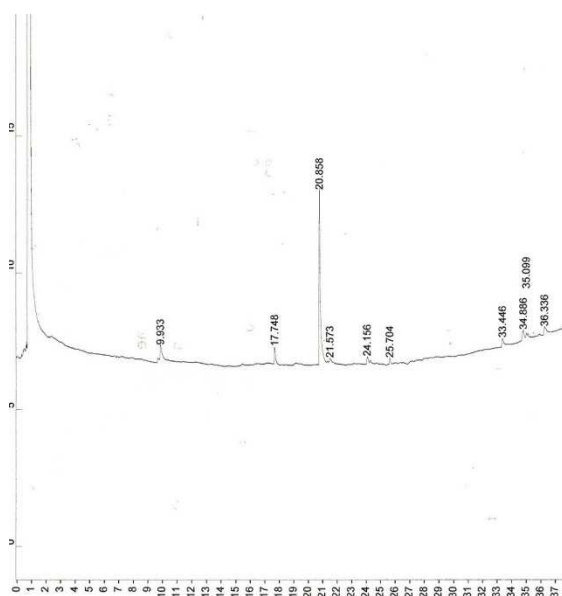


Figura 24: Cromatograma da abertura com álcool alílico.

Após a purificação cromatográfica por coluna da reação, o produto foi analisado por RMN. O espectro de RMN de ^1H (Figura 25) do composto mostra os sinais dos hidrogênios da insaturação do novo substituinte em δ 5,10 e 5,84 ppm para os hidrogênios H10 e H9, respectivamente, além daqueles da estrutura base em δ 5,04 e 5,86 ppm para H7 e H6. Além desses sinais, há o sinal na forma de dubleto em δ 3,91 ppm referente aos hidrogênios do grupo metileno H8. Esse valor é superior ao metileno equivalente no produto da abertura com propanol. Isso se deve, provavelmente, ao efeito da ligação dupla do grupo alila, que desblinda esse metileno.

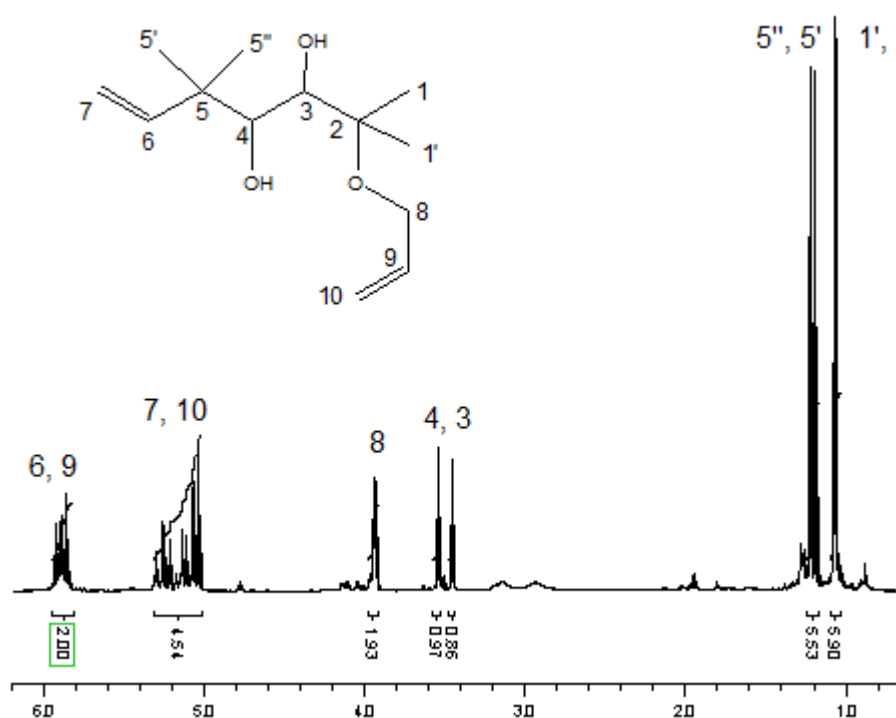


Figura 25: Espectro de ^1H do composto **9** obtido em CDCl_3 , a 400 MHz.

O espectro de RMN de ^{13}C do composto (Figura 26) mostra dois carbonos oleofínicos em δ 115,9 e 135,3 ppm, referentes aos carbonos C10 e C9. Além desses, aparece mais um sinal em δ 62,7 ppm do C8. Os demais deslocamentos químicos não apresentam mudanças significativas, com exceção ao fato de haver sobreposição dos sinais dos carbonos C1 e C1'. O espectro DEPT 135° (Figura 27) mostra três sinais invertidos referentes aos dois carbonos oleofínicos C10 e C7 em δ

115,9 e 112,5 ppm, respectivamente, e um carbono metilênico C8 em δ 62,7 ppm. Além disso, houve também o desaparecimento dos sinais equivalentes aos carbonos C2 e C5 do composto **6**.

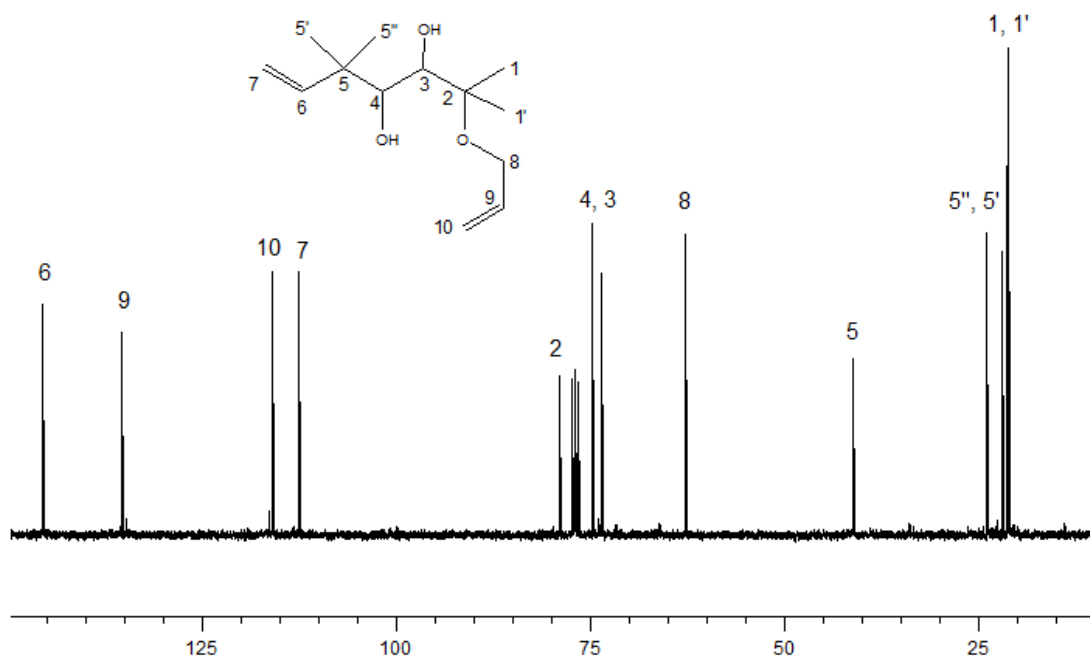


Figura 26: Espectro de ^{13}C do composto **9** obtido em CDCl_3 , a 100 MHz.

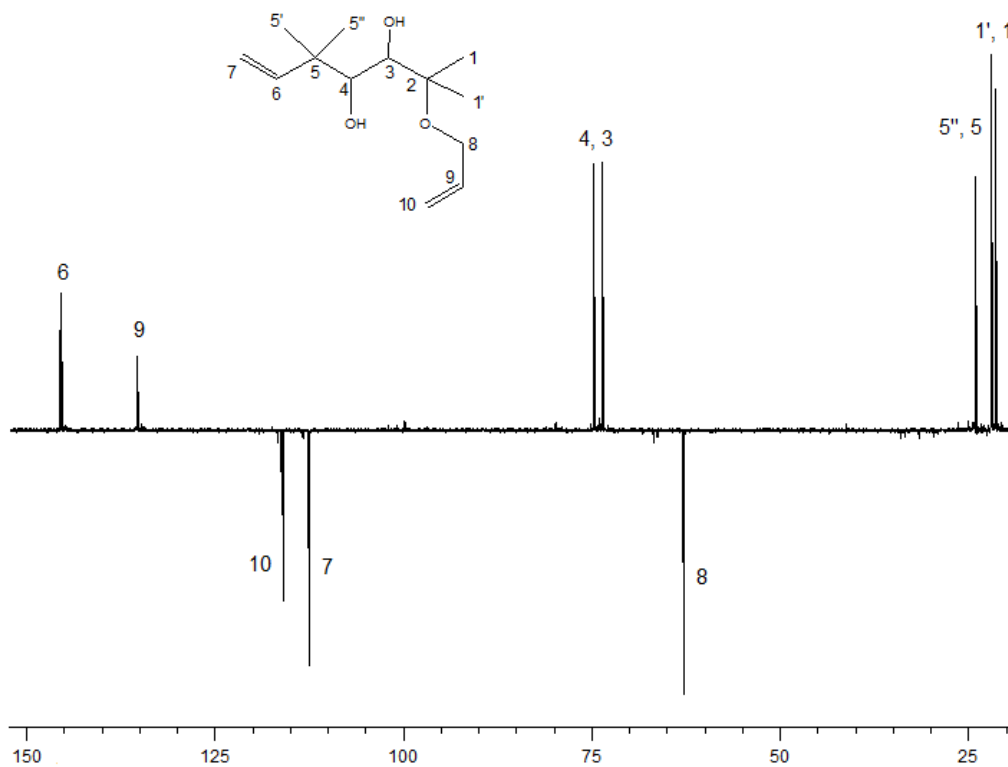


Figura 27: Espectro de DEPT 135° do composto **9** em CDCl_3 , a 100 MHz.

O experimento de COSY ^1H - ^1H (Figura 28) mostra dois sistemas de spins na região das duplas ligações. Um deles (não destacado) se refere à dupla ligação do composto natural, mostrando a interação dos hidrogênios H7 e H6 em δ 5,04 e 5,86 ppm, ao passo que o outro mostra o acoplamento entre os hidrogênios H8, H9 e H10 em δ 3,91, 5,84 e 5,10 ppm.

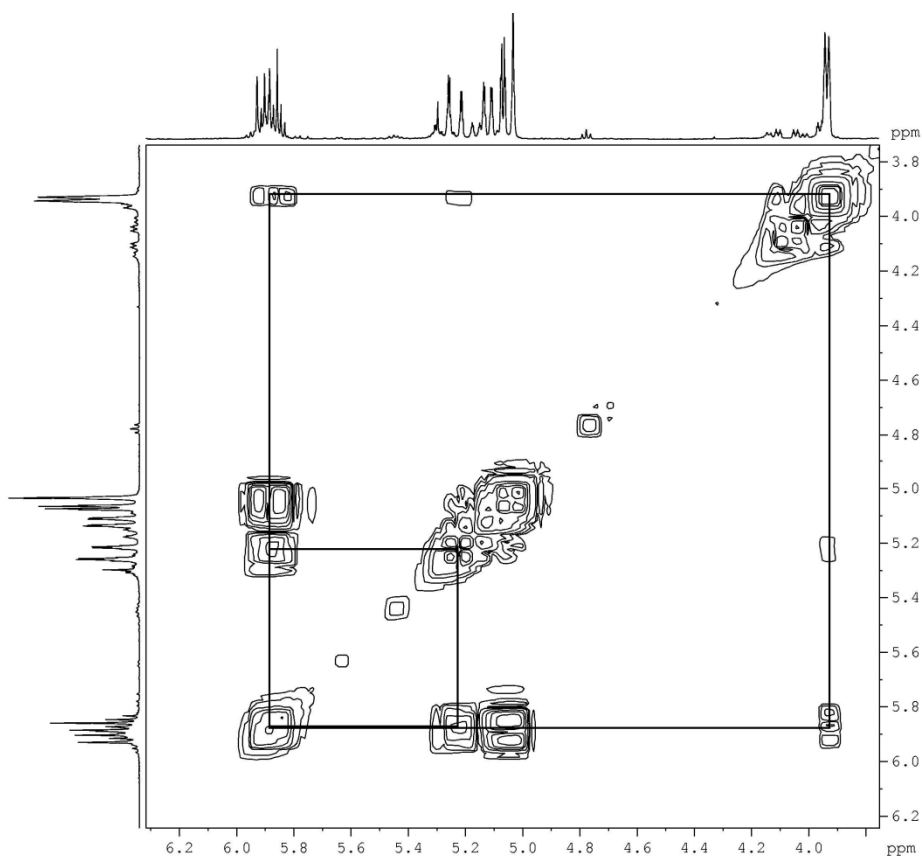


Figura 28: Experimento de COSY ^1H - ^1H do composto **9** em CDCl_3 , a 100 MHz

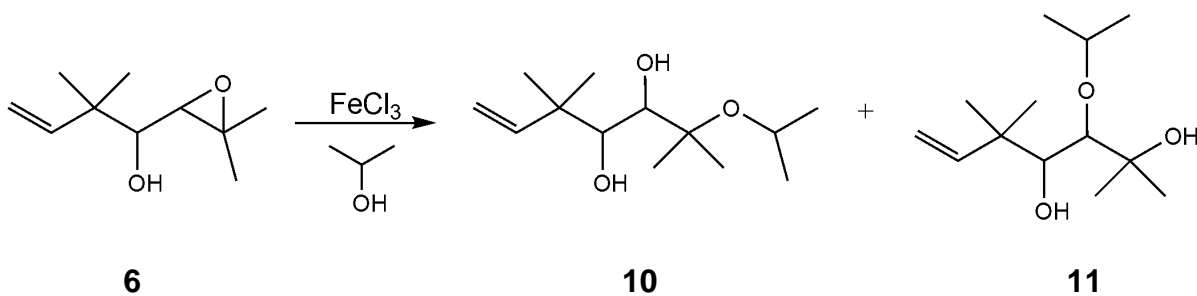
Os demais deslocamentos químicos do composto encontram-se descritos na tabela 7.

Tabela 7: Deslocamentos químicos do composto **9**.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,17 (s)	21,3
1'	1,20 (s)	21,3
2	-	79,0
3	3,43 (s)	73,6
4	3,52 (s)	74,7
5	-	41,3
5'	1,05 (s)	22,0
5''	1,05 (s)	24,0
6	5,86 (dd)	145,5
7	5,04 (dd)	112,5
8	3,91 (d)	62,7
9	5,84 (dd)	135,3
10	5,10 (dd)	115,9

4.3.2 – Abertura com isopropanol

Todas as aberturas realizadas com os alcoóis primários foram regioseletivas, formando apenas um composto oriundo da reação de abertura. Em face disso, decidiu-se estender a gama de nucleófilos para verificar se o emprego de compostos mais impedidos que os já testados têm alguma influência sobre o produto formado na reação de clivagem do epóxido utilizada neste trabalho. Para isso, foi empregado isopropanol, que apesar de também apresentar três carbonos em sua estrutura, é um álcool secundário.

**Esquema 11:** Reação de abertura do epóxido com isopropanol.

Diferentemente das demais reações, a abertura com isopropanol não foi completa, como pode ser visualizado na Figura 29, onde aparecem três sinais. O primeiro deles representa o material de partida **6** em tr 9,079 min, e os outros dois, em tr 17,525 e 18,293 min, é possível que sejam produtos de abertura. Tal perfil sugere a perda de seletividade do método, pois nenhum dos sinais aparece em excesso, ou seja, apresentam a proporção de 1:1. A reação foi agitada ao todo por um período de 48h, com adição extra de catalisador perto das 24h, com a intenção de que fosse consumido todo o material de partida. Mas isso não foi eficiente o bastante para completá-la, bem como o aquecimento no decorrer desse processo. Também não foi possível a separação dos produtos por cromatografia em coluna com o sistema de solvente utilizado.

Tal resultado vai de encontro ao fato de não ocorrer dimerização do composto devido à abertura do epóxido com o próprio substrato agindo como nucleófilo, pois este também apresenta em sua estrutura um álcool secundário.

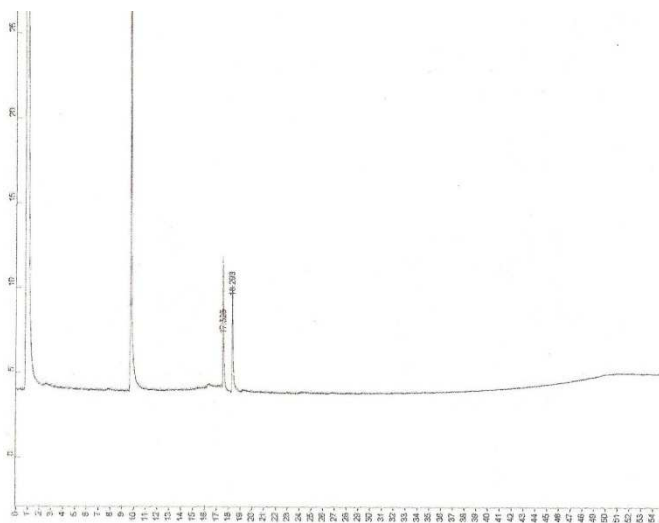
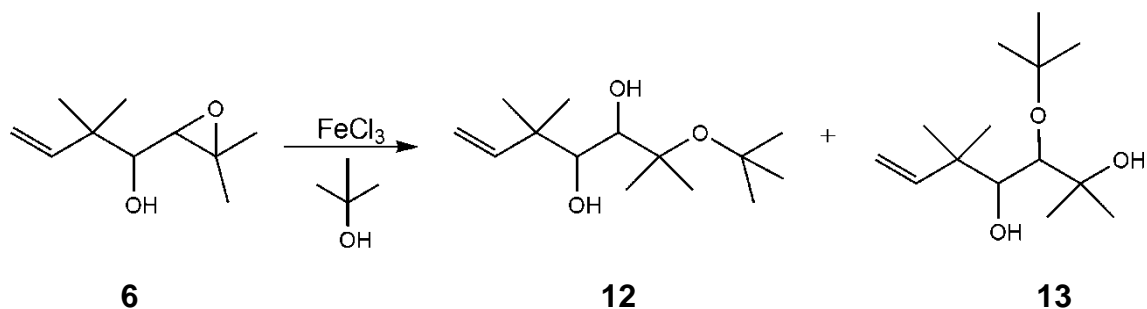


Figura 29: Cromatograma da reação de abertura do epóxido com isopropanol.

4.3.3 – Abertura com terc-butanol



Esquema 12: Reação de abertura do epóxido com terc-butanol.

A abertura com o álcool terciário também não foi completa. Além disso, não aconteceu de maneira seletiva como nas reações com alcoóis primários, com a formação de vários produtos, como pode ser verificado pelo cromatograma da reação (Figura 30).

Além do material de partida em tr 11,333min, é possível visualizar mais três sinais em tr 14,448, 16,897 e 17,516 min (com percentagens de 4,1, 10,4 e 30,6 %, respectivamente). Diferentemente da abertura com isopropanol, nessa reação há diferença na proporção dos produtos formados, com uma relação de aproximadamente de 1:3 entre os dois últimos sinais. Assim como a reação com isopropanol, não foi possível a separação destes compostos por cromatografia em coluna, e conseqüentemente determinar sua estrutura.

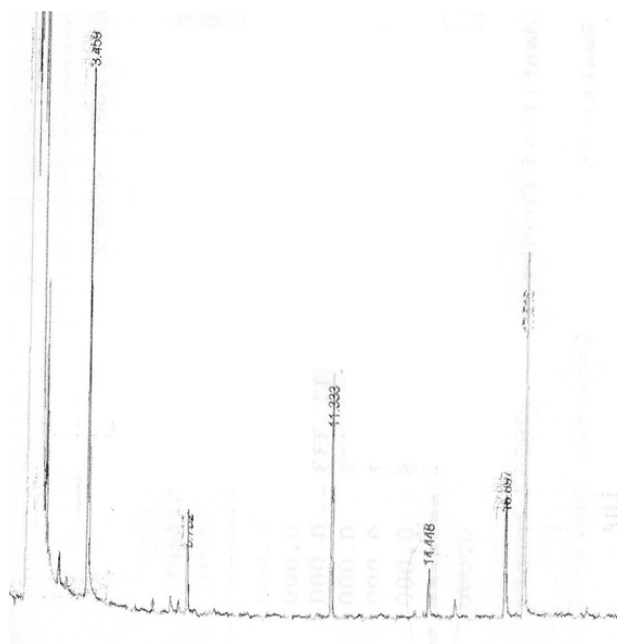
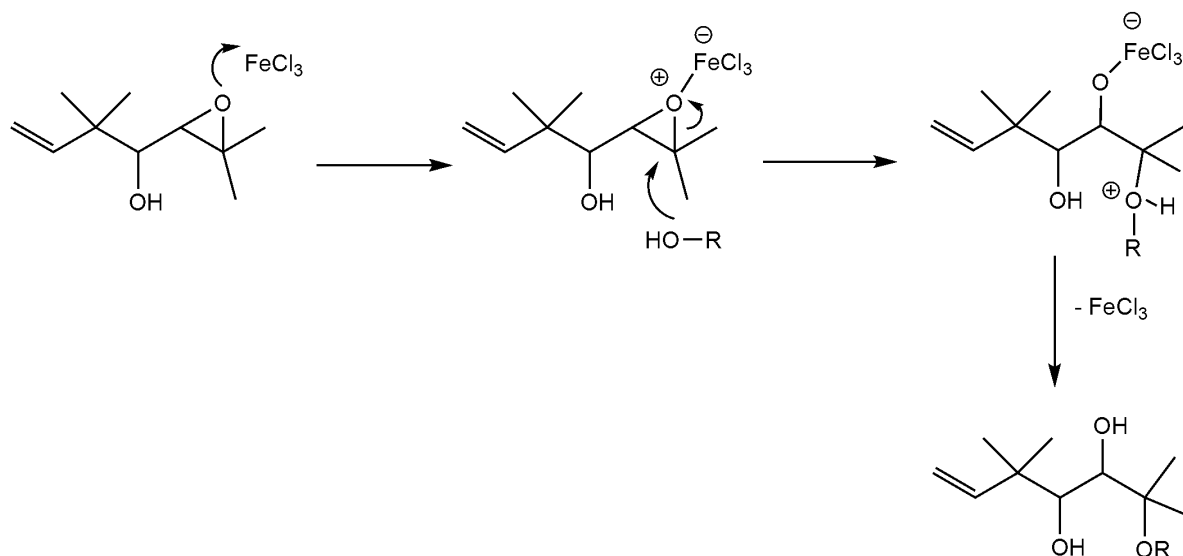


Figura 30: Cromatograma da abertura do epóxido com terc-butanol.

4.3.4 – Mecanismos propostos para as reações de abertura do epóxido

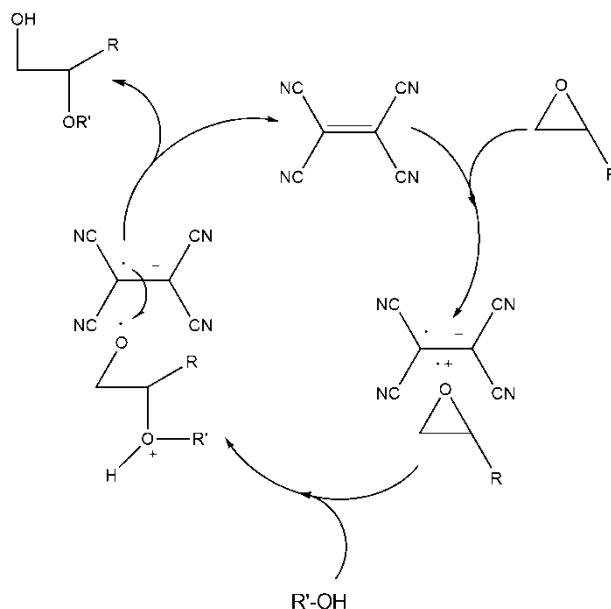
De acordo com os produtos formados nas reações de abertura do epóxido realizadas, algumas considerações podem ser feitas acerca dos efeitos estéricos dos nucleófilos na reação. Nas transformações realizadas com nucleófilos pouco volumosos, como os alcoóis primários, observou-se uma abertura do epóxido seletiva, favorecendo a formação do produto com a hidroxila no carbono secundário, logo, com o ataque do nucleófilo acontecendo no carbono mais substituído do epóxido. Entretanto, com o aumento do volume do álcool, não houve mais a seletividade observada com os alcoóis primários, observando-se produtos decorrentes dos dois tipos possíveis de abertura. Possivelmente isso tenha a ver com efeitos estéricos, que se tornam mais pronunciados com os alcoóis mais substituídos, que devido à dificuldade de atacar o carbono mais substituído do epóxido passa a atacar também o menos substituído, levando às misturas de produtos observadas. Além disso, a perda de seletividade do método devido ao aumento do volume do nucleófilo também explica o fato de o próprio substrato não agir também como nucleófilo, levando à formação de um dímero nas reações de abertura, já que ele poderia agir dessa forma por também apresentar em sua estrutura um álcool secundário bastante volumoso.

Com relação ao mecanismo da reação (Esquema 13), propõe-se que primeiramente haja a complexação do cloreto férrico com oxigênio do epóxido, tornando os carbonos ligados a ele mais eletrofílicos, propiciando, assim, o ataque nucleofílico do oxigênio do álcool. Posteriormente, há o ataque propriamente dito, no carbono mais substituído se o nucleófilo for suficientemente pequeno, ou nos dois carbonos se ele for mais volumoso. Concomitantemente ao ataque, há a quebra da ligação carbono–oxigênio. O mecanismo se encerra com a migração do próton do alcóxido ao oxigênio, levando à regeneração do catalisador.



Esquema 13: Mecanismo proposto para reação de abertura do epóxido catalisada por FeCl₃.

Com relação ao mecanismo de abertura de epóxidos com TCNE (Esquema 14), Masaki²⁵ propôs que a reação fosse catalisada pela ativação da ligação carbono-oxigênio do epóxido para o ataque do álcool devido à simples transferência de um elétron do epóxido ao sistema π do TCNE.



Esquema 14: Mecanismo da abertura de epóxidos catalisadas por TCNE.

²⁵ Masaki, Y., et al., Bulletin Chemical Society Japanese, 69,1, 198-201, 1996.

4.3.5 – Outras aberturas de epóxido realizadas com o álcool do caleol

Além das reações já descritas, outros métodos de abertura também foram empregados, utilizando outros nucleófilos, catalisadores e condições reacionais.

Reações com diferentes nucleófilos e cloreto férrico anidro

Com cloreto férrico anidro como catalisador, também se efetuou as reações com os nucleófilos álcool benzílico, etilamina e fenol. Foram duas tentativas para a reação com o álcool benzílico, variando o solvente utilizado. Na primeira delas foi utilizado o próprio álcool como solvente. Como a reação não ocorria, decidiu-se executar a reação com aquecimento, o que também foi ineficiente. Diante da inércia da condição reacional anterior, tentou-se utilizar THF como solvente, e executou-se a reação tanto a temperatura ambiente como sob refluxo. Nenhuma das condições testadas propiciou a abertura do epóxido. A tentativa de reação com a amina também foi mal sucedida, não havendo a formação de nenhum composto. Nesta tentativa, utilizou-se etilamina em THF e foi procedida tanto em temperatura ambiente quanto em refluxo. O último nucleófilo testado com cloreto férrico foi o fenol. Para sua realização foi utilizado também THF e, assim como as anteriores, não houve formação de nenhum produto.

Reações com cloreto férrico em suporte sólido

Também foi testado como catalisador cloreto férrico hexahidratado suportado em sílica gel. Essa metodologia, que também foi desenvolvida por Iranpoor²⁶, foi empregada com o intuito de verificar se havia incremento no rendimento das reações comparado ao método que utiliza somente cloreto férrico anidro. Para isso, foi testada a abertura com metanol, que produziu o mesmo produto com rendimento semelhante ao outro método. Como não houve melhora na reação com suporte de

²⁶ Iranpoor, N., Tarran, T., Movahedi, Z., *Synthesis*, **1996**, 1473

sílica, decidiu-se então não utilizar mais esse método. Outro catalisador utilizado na abertura do epóxido consistia em cloreto férrico hexahidratado suportado em K10. Com esse catalisador procedeu-se a abertura do epóxido **6** com metanol. Diferentemente das outras reações, onde havia a formação de só um produto ou de nenhum, nessa reação houve a produção de inúmeros produtos, sem nenhuma seletividade. Por isso, não seguiu-se adiante com esse método.

Reações com tetracianoetileno

O outro catalisador empregado nesse trabalho foi o tetracianoetileno, TCNE, da maneira descrita por Masaki.²⁷ Com esse catalisador realizou-se as aberturas com metanol e álcool alílico a temperatura ambiente. Essa reação apresentou as mesmas características que as aberturas realizadas com cloreto férrico anidro, não havendo aumento em seu rendimento, variação no tempo reacional e nem mudança no produto formado, que foram identificados pela co-injeção com os produtos obtidos anteriormente.

Além das condições normais de reação, foi utilizado também banho de ultrassom com o intuito de incrementar o rendimento das reações e torná-las mais rápidas. O acompanhamento das reações foi feito por CG, que foi utilizado nos intervalos de tempo de 10, 15, 20, 30 e 40 minutos e depois a cada hora de reação.

As reações com o auxílio do banho de ultrassom não se mostraram mais eficientes que aquelas do método tradicional, pois também houve a formação dos mesmos produtos com rendimentos semelhantes nos mesmos tempos reacionais. Com banho de ultrassom também foi testada a abertura com cloreto férrico anidro, que apresentou as mesmas características que quando realizada com a simples agitação magnética. Por isso, não se seguiu adiante as reações com ultrassom.

²⁷ Masaki, Y., Miura, T., Ochiai, M, Synlett, 847, **1993**.

4.4 – Determinação da estereoquímica absoluta do caleol pelo método da ressonância magnética nuclear

Neste trabalho a configuração do carbono quiral C4 do caleol foi determinada pelo método do RMN²⁸ por meio de uma dupla derivatização do álcool **6**. A finalidade deste estudo é validar a metodologia de Horeau²⁹, que foi empregada por Flach em seus estudos com o caleol, como um método eficiente para determinação de estereoquímica absoluta. A metodologia desenvolvida por Horeau consiste na esterificação do álcool que se deseja determinar a configuração com anidrido 2-fenilbutanóico racêmico, seguida da análise do excesso enantiomérico, por rotação ótica ou cromatografia gasosa enantioseletiva, dos ácidos 2-fenilbutanóicos formados nessa reação. As dificuldades impostas por essa metodologia decorrem do fato de ela determinar a estereoquímica absoluta de maneira indireta, já que são analisados os subprodutos da reação do álcool que se deseja determinar a estereoquímica com o anidrido 2-fenilbutanóico racêmico, e em nenhum momento ocorre uma avaliação do álcool propriamente dito. Além disso, é necessário conhecer o volume dos substituintes do álcool, que quando apresentam tamanhos aproximados fica difícil determinar qual é o grupo maior e o menor, sendo necessário, nesses casos, o emprego de técnicas computacionais para a determinação de seus tamanhos relativos para, finalmente, predizer a estereoquímica do álcool em estudo. Em seus estudos, Flach determinou que o carbono C4 do caleol apresenta configuração *R* e o carbono C3 configuração *S*.

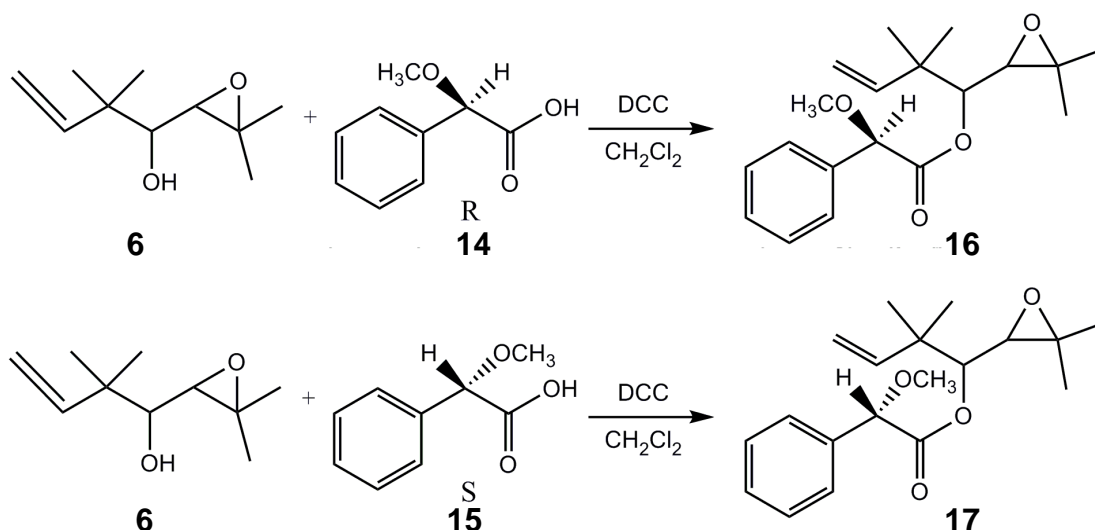
Método da ressonância magnética nuclear

A determinação da estereoquímica absoluta do carbono C4 do caleol foi realizada com o álcool **6**, já que na hidrólise básica não ocorre a clivagem da ligação carbono C4 – oxigênio, mantendo, assim, a configuração deste carbono assimétrico. Para isso, foram empregados como auxiliares quirais as substâncias *R* e *S* ácido 2-metoxifenilacético (MFA), também conhecido como ácido mandélico (**15**, **16**), que foram utilizadas, individualmente, na esterificação do álcool **6** (Esquema 15). As reações foram acompanhadas por CCD e ocorreu por 14 h. Para evitar a

²⁸ Riguera, R., Quiñoá, E., Seco, J. M., *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 2915-2925, **2001**

²⁹ Horeau, A., *Tetrahedron Letters*, 15, 505-512, **1961**.

derivatização do MFA ao seu cloreto de ácido e houve o emprego de diciclohexilcarbodiimida, DCC, como ativador da carbonila do ácido; e mais N,N-dimetilaminopiridina, DMAP, como catalisador. A reação foi bastante limpa, não havendo formação de subprodutos. Após a formação dos diastereoisômeros 17 e 18, o produto bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa, apresentando rendimento de 81% após seu isolamento.



Esquema 15: Esterificações do álcool **6** com ácidos mandélicos.

Os ésteres produzidos foram analisados por RMN. Primeiramente, procurou-se determinar se o produto formado em ambas as reações era realmente o esperado para a reação acima pela análise de seus espectros de RMN ¹³C (Figura 31) e, em um segundo momento, utilizar o espectro de RMN de ¹H para, além de confirmar a estrutura do composto obtido, estudar a configuração do carbono C4 do caleol. Os espectros dos dois produtos apresentaram os mesmos sinais, diferenciados apenas por pequenas variações entre os deslocamentos químicos. É possível observar os seguintes sinais do esqueleto do composto natural: as quatro metilas ligadas a carbonos deshidrogenados, entre δ 19,87 e 24,44 ppm; dos carbonos C2 e C3 entre δ 60,12 e 62,03 ppm; em δ 77,39 e 77,60 ppm os deslocamentos do carbono C4, nos produtos *S* e *R*, respectivamente; e os oleofínicos nas regiões δ 113 e 142 ppm, para C7 e C6. Nenhum desses deslocamentos sofreu uma mudança significativa quando comparados com os do composto **6**.

Com relação aos sinais do grupo adicionado à estrutura, pode-se identificar: o carbono carbonílico C8 em δ 170,39 e 169,86 ppm, no éster *R* e *S*, respectivamente;

o carbono C9 em δ 83,27 e 82,39 no composto *R* e *S*, respectivamente; e mais a metoxila na região δ 57 ppm nos dois compostos. Além desses, também é possível a visualização dos carbonos do anel aromático, C11, C12, C13 e C14, na região que vai de δ 126,93 a 136,71 ppm.

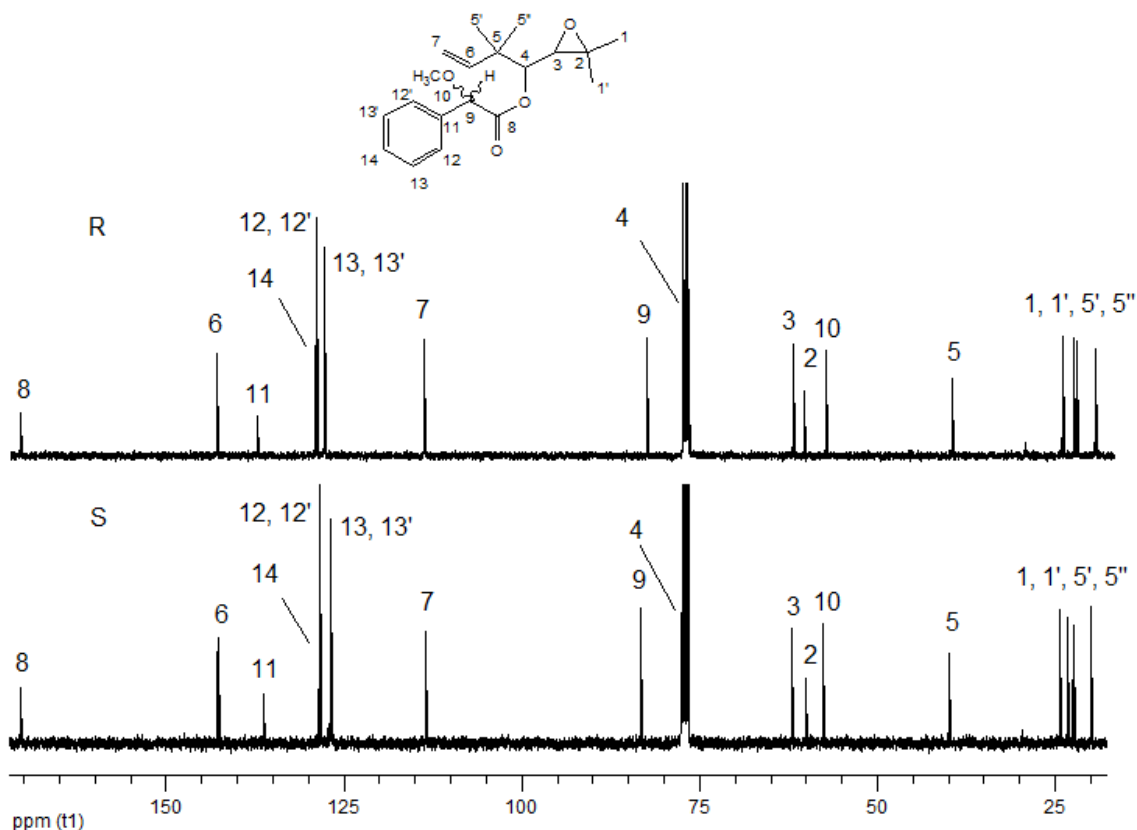


Figura 31: Espectros de ¹³C dos compostos **16** (superior) e **17** (inferior), em CDCl₃ a 100 MHz.

Assim como os espectros de carbono dos dois ésteres, os espectros de hidrogênio (Figura 32) também apresentam uma similaridade bastante grande, mudando apenas os deslocamentos químicos em poucos ppm de um para outro. Os sinais dos hidrogênios pertencentes ao esqueleto do álcool **6** que aparecem também nos ésteres obtidos são: as duas metilas H1 e H1', que aparecem nas faixas entre δ 1,26 e 1,34 ppm no composto *R* e δ 1,29 e 1,36 ppm no *S*; o hidrogênio H3, que no espectro do composto *S* está em δ 2,80 e no *R* em 2,79 ppm; os hidrogênios das metilas H5' e H5'', que dão entre δ 0,95 e 0,97 ppm no éster *R* e δ 0,74 e 0,81 ppm no *S*; e, finalmente, os hidrogênios H7 e H6 da função alceno, que aparecem em δ 5,00 e 5,80 ppm, respectivamente, no éster de configuração *R* e em δ 4,87 e 5,61 ppm no de *S*.

Com relação aos sinais do novo grupamento, pode-se observar um singlete (1H) em δ 4,84 ppm no espectro *R* e em δ 4,80 ppm no *S*, do hidrogênio H9; um singlete (3H) de maior intensidade que anterior em δ 3,50 e 3,44 ppm nos espectros *R* e *S*, referente à metoxila H10. Além desses, há o sinal dos hidrogênios aromáticos H12 a H14 (5H) nas faixas que vão de δ 7,62 a 7,38 e δ 7,46 a 7,38 ppm nos ésteres *R* e *S*, respectivamente.

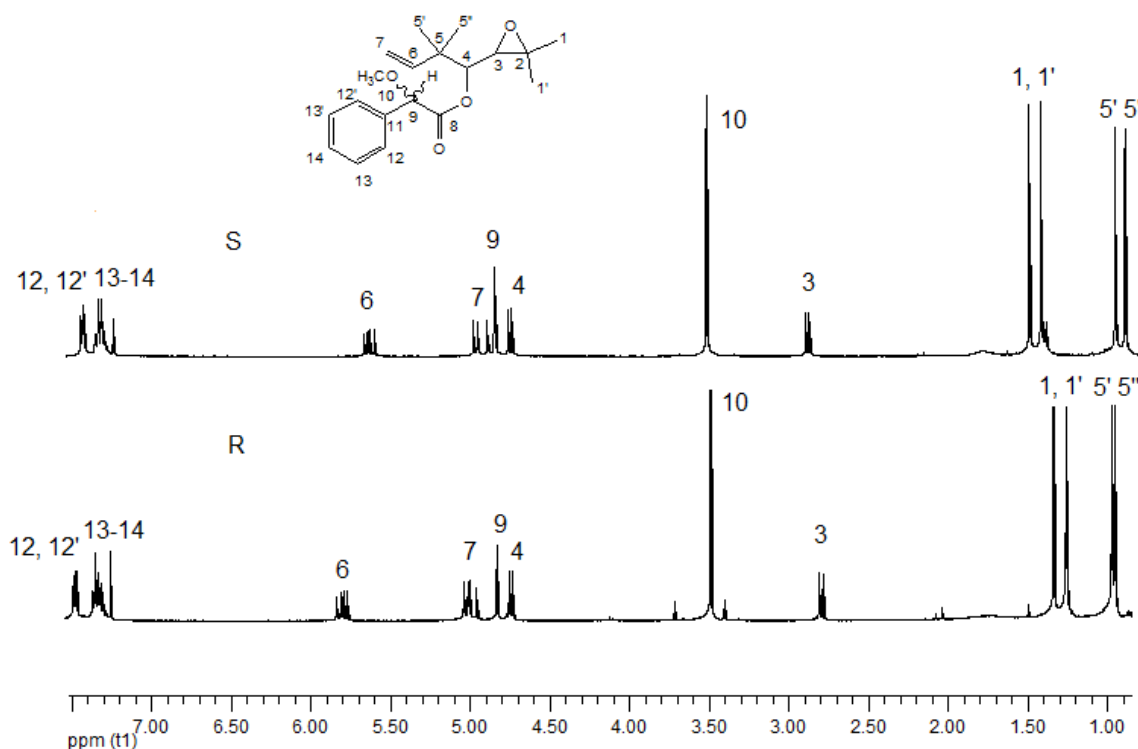


Figura 32: Espectros de ^1H dos compostos **17** (superior) e **16** (inferior), em CDCl_3 a 400 MHz.

Para a determinação da configuração, do carbono C4, após as derivatizações e obtenção dos espectros de ^1H com as devidas atribuições de sinais, chamou-se o grupo de hidrogênio H5', 5'', 6 e 7 de L_1 e o grupo de hidrogênios H1, 1' e 3 de L_2 e compararam-se os deslocamentos químicos dos prótons, tanto no derivado *R* quanto no *S*, expressando suas diferenças como $\Delta\delta^{\text{RS}}$. Este parâmetro representa as diferenças entre os espectros de RMN dos dois derivados, e é obtido pela diminuição do deslocamento químico de um determinado próton (H_R) no derivado preparado com o auxiliar quiral *R* menos o deslocamento químico do mesmo próton (H_S) no derivado preparado com o auxiliar *S*, ou seja, $\Delta\delta^{\text{RS}} = \delta H_R - \delta H_S$. Na tabela 8

encontram-se as diferenças entre os deslocamentos químicos de todos os prótons das estruturas obtidas.

Tabela 8: Deslocamentos químicos e $\Delta\delta^{RS}$ dos ésteres obtidos **16** e **17**.

Posição	$\delta^{13}\text{C}^R$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^S$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^R$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^S$ (ppm)	$\Delta\delta^{RS}$ (ppm)
1	22,48	22,33	1,262	1,286	- 0,024
1'	19,93	19,87	1,340	1,362	- 0,022
2	60,12	60,48	-	-	-
3	61,95	62,03	2,800	2,790	0,010
4	77,60	77,39	4,746	4,432	0,314
5	39,96	39,85	-	-	-
5'	24,38	24,44	0,956	0,745	0,211
5''	23,26	22,86	0,975	0,807	0,168
6	142,74	142,39	5,870	5,611	0,259
7	113,52	113,45	5,002	4,872	0,130
8	170,39	169,86	-	-	-
9	83,27	82,39	4,836	4,801	0,035
10	57,66	57,47	3,494	3,441	0,053
11	136,36	136,71	-	-	-
12, 12'	128,50	128,62	7,619	7,459	
13, 13'	128,42	128,45	7,306-7,376	7,314-7,377	
14	126,93	127,44	7,306-7,376	7,314-7,377	

Pela observação da tabela, pode-se perceber que os prótons do grupo L₁ apresentam apenas valores positivos de $\Delta\delta^{RS}$, enquanto os hidrogênios H1 e H1' do grupo L₂ apresentam valores negativos.

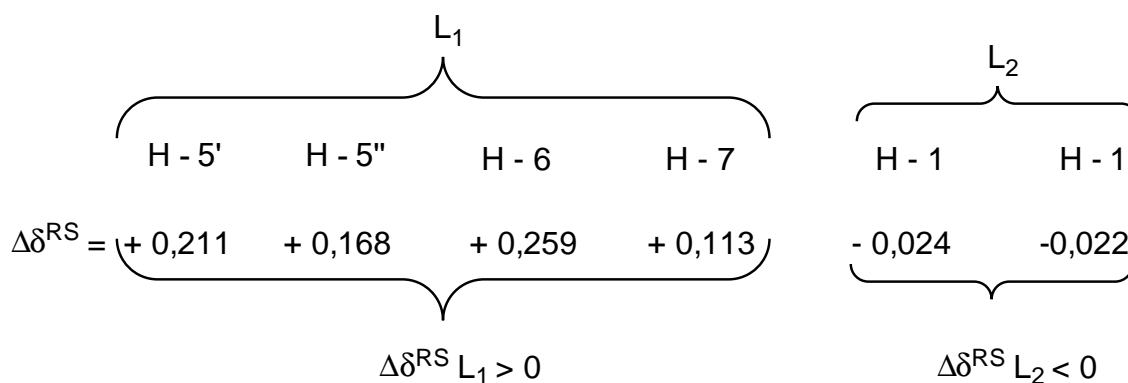


Figura 33: $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dos grupos L_1 e L_2

A configuração do centro quiral pode ser determinada segundo o modelo da Figura 34, onde é desenhado um tetraedro representando o carbono assimétrico que se deseja determinar a estereoquímica. Uma das posições do plano do papel (para cima) do tetraedro é ocupada pelo hidrogênio ligado ao carbono, e a outra pelo oxigênio do éster. E, por convenção, o grupo que possuir $\Delta\delta^{\text{RS}} < 0$ (representada por L_2 no modelo) fica para fora do plano, restando ao outro grupo $\Delta\delta^{\text{RS}} > 0$ (no modelo, L_1) a posição de dentro do plano. Então, completando-se o modelo descrito, com as informações deste texto, tem-se que L_2 representa a parte da molécula onde há a função epóxido do caleol, e L_1 o fragmento com a dupla ligação. Desta maneira, aplicando a regra de prioridade, vemos que o carbono C4 do caleol possui estereoquímica *R*.

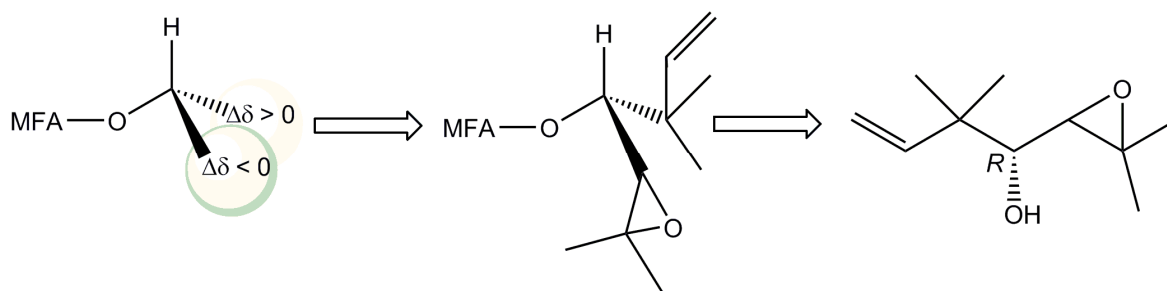


Figura 34: Modelo para determinação da estereoquímica.

4.4 – Atividade antimicrobiana dos compostos obtidos

O uso intensivo de antibióticos tem tornado os microrganismos patógenos cada vez mais resistentes ao tratamento terapêutico, fazendo com que os métodos tradicionais de combate a micoses e infecções bacterianas se tornem cada vez mais ineficientes. Diante de tal necessidade, diversos estudos têm sido realizados para a busca de compostos com atividade antimicrobiana, e entre as fontes de possíveis moléculas bioativas estão as espécies vegetais. Por isso, os ensaios antimicrobianos com extratos de plantas, óleos essenciais, frações de extratos e de óleos voláteis, compostos naturais isolados e moléculas obtidas por semi-síntese se tornam importantes para o surgimento de futuros antibióticos.

Por isso, nesse trabalho, o óleo essencial, o caleol (**1**), o álcool do caleol (**6**) e os compostos isolados das reações de abertura do epóxido do álcool caleol (**7**, **8** e **9**) obtidos tiveram suas atividades antimicrobianas testadas pelo método da microdiluição em caldo. Os resultados representam a concentração inibitória mínima, CIM, dos compostos, que é a menor concentração do composto necessária para inibir o crescimento de um determinado microrganismo após sua incubação *in vitro*. Neste ensaio foram utilizadas bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (Tabela 9) padrões ATCC.

Tabela 9: Microrganismos utilizados no ensaio.

Características	Microorganismos	ATCC
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25792
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Shiguella sonnei</i>	ATCC 25931
Fungos	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952
	<i>Sacharomyces cerivisae</i>	ATCC 2601

Muitos dos microrganismos utilizados nesse estudo são membros da microbiota natural do corpo, mas que quando crescem de maneira excessiva desenvolvem inúmeras doenças.³⁰ É o caso de *S. aureus*, que é freqüentemente encontrado no corpo humano e uma das bactérias patogênicas mais importantes, já que é o causador de uma ampla gama de infecções. As principais doenças causadas por essa bactéria são infecções cutâneas e subcutâneas, pneumonia, osteomielite, entre outras.

Assim como *S. aureus*, *S. epidermidis* também é encontrada na microbiota natural do corpo humano (predominando na pele e nas mucosas de indivíduos normais) ou como causa de infecções em seres humanos. Na última década essa

³⁰ Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Microbiologia, 5ª Ed, Atheneu, São Paulo, 2008.

bactéria tem chamado atenção pelo fato de ser o agente de infecções hospitalares, onde as principais doenças causadas por ela estão associadas ao uso de dispositivos médicos implantados, como cateteres e próteses. As doenças incluem meningites, osteomielites e infecções do trato urinário.

S. pyogenes apresenta uma alta adaptação ao hospedeiro humano, atuando como agente etiológico de uma série de manifestações clínicas, como faringites, piodermites, erisipela, entre outras.

Escherichia coli é uma espécie de bactéria causadora de diarreia humana pertencente à família Enterobacteriaceae, que é bastante heterogênea e complexa. Devido à sua relação com os seres humanos, há três grandes grupos de *E. coli*: o grupo das cepas comensais que habitam nossos intestinos ao longo de toda a vida, o grupo das cepas enteropatogênicas que causam infecções por diversos mecanismos e o grupo das cepas patogênicas extra-intestinais que causam diversos tipos de infecção.

S. sonnei é uma espécie também pertencente à família Enterobacteriaceae que afeta principalmente o homem, causando shigelose ou disenteria bacilar. Ela raramente ocorre em animais, mas em casos excepcionais é encontrada em outros primatas, como macacos e chimpanzés.

P. aeruginosa é um microrganismo encontrado na água, no solo, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e em diversos ambientes hospitalares. Raramente causa infecção em indivíduos imunocompetentes, mas é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com defesas diminuídas. É considerado um patógeno oportunista e um dos mais importantes agentes de infecção hospitalar. Sua importância se deve ao fato à difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, devido à resistência natural e adquirida a antibióticos e desinfetantes.

Três tipos de doença humana estão associados a elementos fúngicos ou à seus produtos metabólitos: alérgicas, tóxicas e infecciosas. A doença alérgica é causada pela interação entre um hospedeiro sensível e um fungo (por exemplo, a aspergilose broncopulmonar alérgica). A toxigênica pode ser provocada pela ingestão de alimentos contaminados por fungos microscópicos ou pelo consumo de fundos macroscópicos venenosos. E a doença infecciosa é aquela que tem capacidade de agir como patógeno primário ou oportunista (por exemplo, paracoccidioomicose e candidíases).

Outra doença originada por um fungo oportunista é a candidíase, causada por várias espécies do gênero *Candida*, sendo que o agente mais comum é *Candida albicans*. Essa levedura é encontrada na boca, tubo digestivo, intestino, orofaringe, vagina e pele de indivíduos saudáveis.

C. neoformans é uma levedura que pode causar micoses sistêmicas, pela inalação da levedura veiculada pelas fezes de pombos e morcegos.

As concentrações utilizadas nesse ensaio para as substâncias puras foram 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL. Além da determinação do CIM, este método permitiu determinar a concentração letal mínima, CLM, que é a concentração do composto necessária para eliminar o microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicada e os resultados da CIM estão expostos na Tabela 10.

Tabela 10: Atividade antimicrobiana dos compostos obtidos.

Microrganismo ^a	COMPOSTO													
	Óleo		1		6		7		8		9		Padrão ^b	
	CIM ^c	CLM ^c	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Se	10	20	25	200	50	>200	>100	>100	>100	>100	100	>100	3,12	3,12
Sa	10	20	50	>200	100	>200	>100	>100	100	>100	50	>100	3,12	3,12
Kp	NT	NT	NT	NT	NT	NT	>100	>100	100	>100	100	>100	3,12	3,12
Bs	10	20	50	>200	200	>200	>100	>100	100	100	100	>100	3,12	3,12
Sp	20	20	100	>200	50	>200	100	>100	100	100	100	>100	3,12	3,12
Ec	10	20	50	>200	200	>200	100	100	50	>100	100	>100	3,12	3,12
Pa	10	>20	50	>200	100	>200	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ss	10	>20	50	200	100	>200	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Sg	10	>20	25	100	200	>200	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ca	20	20	100	>200	200	>200	50	>100	25	>100	50	>100	6,25	6,25
Sc	20	20	100	>200	200	>200	50	>100	50	50	50	>100	10,3	10,3
Cn	20	20	100	>200	100	>200	25	50	25	>100	25	100	5,15	5,15

^a Se: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), Sa: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), Kp: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), Bs: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), Sp: *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), Ec: *Escherichia coli* (ATCC 25922), Pa: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), Ss: *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), Sg: *Shigella sonnei* (ATCC 25931), Ca: *Candida albicans* (ATCC 10231), Sc: *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), Cn: *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821.).

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura.

^c mg/mL.

O óleo essencial das folhas de *C. clematidea* apresenta apenas uma modesta atividade contra os microrganismos testados, apresentando para a maioria das bactérias uma CIM de 10 mg/mL e CLM de 20 mg/mL, enquanto para todos os fungos testados CIM e CLM de 20 mg/mL. Já o caleol isolado apresentou uma boa atividade contra a maior parte das bactérias, com uma CIM de 50 µg/mL para a maioria delas. Destaca-se a atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e *Shiguella sonnei*, contra as quais ele foi mais ativo, apresentando 25 µg/mL. Uma exceção às boas atividades do caleol contra bactérias foi com *Streptococcus pyogenes*, que mostrou CIM de 100 µg/mL. Essa também foi a concentração obtida contra todos os fungos testados. Apesar de se mostrar ativo na inibição das bactérias, o caleol não se mostrou eficiente na eliminação delas, tendo, por isso, propriedades bacteriostáticas.

Já o álcool do caleol não se mostrou tão ativo quanto o éster. As únicas bactérias contra as quais ele apresentou uma CIM de 50 µg/mL foram *Staphylococcus epidermidis* e *Shiguella sonnei*, tendo para as demais 100 ou 200 µg/mL. Assim como o caleol, ele não apresentou atividade bactericida e nem contra os fungos testados.

Com relação aos produtos oriundos das reações de abertura do epóxido do álcool do caleol, pode-se perceber que todos eles apresentam maior atividade contra os fungos do que contra as bactérias testadas. As únicas bactérias que foram suscetíveis aos compostos obtidos foram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os compostos responsáveis por isso foram os compostos **8** e **9** que apresentaram uma CIM de 50 µg/mL para ambos os microrganismos, mas eles não conseguiram matar as bactérias, caracterizando atividade bacteriostática.

Todos os compostos obtidos pelas reações de abertura foram ativos para todas as cepas de fungos testadas. Contra *Candida albicans*, os compostos **7** e **9** apresentaram CIM de 50 µg/mL; mas o mais ativo contra esse fungo foi o composto **8**, com uma CIM de 25 µg/mL. Entretanto, nenhum deles conseguiu matar o fungo, caracterizando, assim, atividade fungostática para todos os compostos.

Com relação ao *Sacharomyces cerevisiae*, todas as substâncias tiveram uma CIM de 50 µg/mL, sendo que apenas o composto **8** mostrou atividade fungicida, com uma CLM de 50 µg/mL. A cepa de fungo contra as quais as substâncias testadas foram mais ativas foi *Cryptococcus neoformans*, com todas elas apresentando uma

CIM de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O composto **7** foi o que conseguiu eliminar o fungo em maior grau, com uma CLM de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os resultados da atividade microbiológica dos compostos testados demonstram que o caleol foi ativo contra as bactérias e pouco ativo contra os fungos. Ao contrário dele, os compostos obtidos com as aberturas do epóxido foram ativos contra os fungos e quase inertes contra as bactérias e o álcool do caleol foi pouco ativo contra os dois tipos de microrganismos. Isso sugere que a função epóxido associada ao acetato do caleol é um relevante fator para a atividade bacteriostática do monoterpeno. O fato de o álcool do caleol praticamente não possuir atividade antibacteriana demonstra que a função epóxido sozinha é incapaz de proporcionar esse tipo de atividade, contra os microrganismos testados, para o caleol. Tal fato é corroborado pela falta de atividade bacteriostática dos produtos das aberturas do epóxido, onde não há a presença do éster e nem do epóxido.

Se para a atividade bacteriostática é fundamental a presença do grupo acetil e da função epóxido na estrutura do caleol, para a atividade antifúngica essa associação é prejudicial. Isso pode ser percebido pela alta concentração do monoterpeno necessária para proporcionar algum tipo dano aos fungos. Assim como na atividade bacteriostática, a função epóxido sozinha também não apresenta nenhuma atividade contra os fungos, como pode ser percebido pela falta de atividade do álcool do caleol contra as leveduras. Entretanto, quando o epóxido é clivado com alcoóis ocorre um aumento bastante significativo na atividade fungiosstática do monoterpeno. O tamanho da cadeia do nucleófilo que abre o epóxido não tem influência significativa sobre a atividade fungiosstática, como pode ser notado pelas atividades semelhantes dos compostos **7** e **8**, e nem a presença de uma insaturação nesta cadeia (composto **9**). O fato de esses substituintes caracterizarem a função éter também não parece ter importância, pois o grupo funcional epóxido é também um éter e, como já referido anteriormente, não colabora para a atividade fungiosstática. Portanto, a atividade fungiosstática dos derivados testados deve ocorrer em função da presença do diol na estrutura. A figura 35 resume a influência dos grupos funcionais para a atividade antimicrobiana dos compostos.

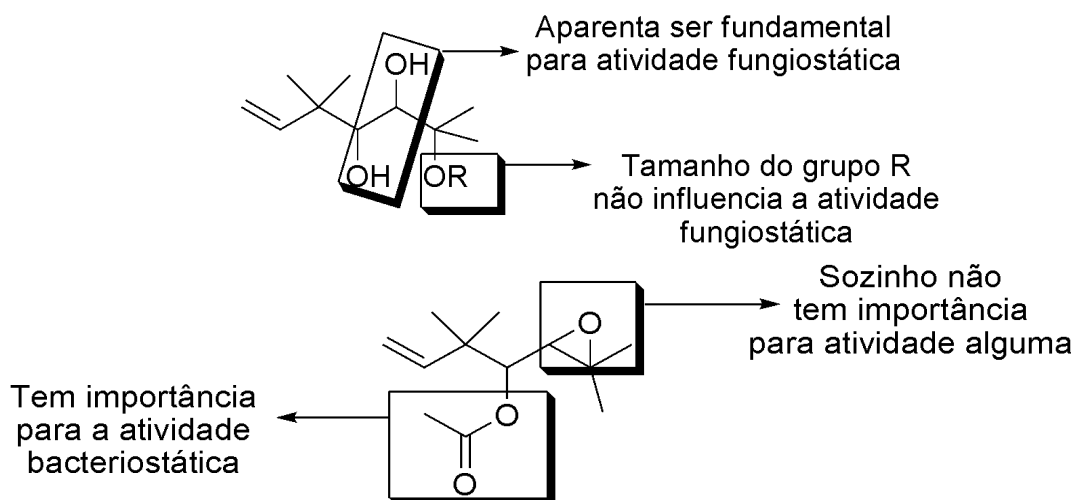


Figura 35: Resumo da relação estrutura atividade do caleol e derivados.

5 – PARTE EXPERIMENTAL

5.1 – Instrumentos utilizados

5.1.1 – Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram realizados nos Espectrômetros Bruker-200, que opera a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C e Bruker-400, que opera a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . As amostras foram preparadas em tubos de 5 mm com clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm em relação ao tetrametilsilano.

5.1.2 – Cromatografia Gasosa

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafos Varian 3400 e Varian 3800, com detector de ionização em chama, FID, alimentado por ar sintético ultra-seco e com hidrogênio ultra puro como gás de arraste. As análises foram realizadas com coluna capilar de sílica fundida DB-5, com temperatura do forno de 50-250 °C com aumento de 4 °C/min. A temperatura do injetor e do detector 220 e 280 °C, respectivamente, e a pressão na coluna de 8 psi.

As amostras para cromatografia gasosa foram preparadas pela dissolução de 1 µL do óleo a ser analisado em 1 mL de hexano. Dessa solução foi injetados no aparelho uma alíquota de 0,2 µL.

5.2 – Solventes

Os solventes utilizados nas extrações, colunas cromatográficas e cromatografia em camada delgada foram solventes de nível técnico, que receberam os seguintes tratamentos para diminuição da umidade e purificação:

Hexano → refluxado e destilado na presença de óxido de cálcio.

Diclorometano → refluxado e destilado na presença de pentóxido de sódio.

Acetato de Etila → refluxado e destilado na presença de óxido de cálcio.

Metanol → refluxado e destilado na presença de magnésio e iodo.

Já os solventes utilizados nas reações eram grau PA, mas mesmo assim receberam os seguintes tratamentos:

Tetrahidrofurano → refluxado sobre sódio metálico/benzofenona em atmosfera de argônio até o aparecimento de coloração azul intenso, e após destilado.

Alcoóis em geral → refluxados e destilados sobre magnésio e iodo.

5.3 – Técnicas cromatográficas

5.3.1 – Cromatografia em coluna

Nas purificações cromatográficas em coluna foram empregadas colunas de diversos tamanhos e sílica-gel 230-400 mesh como fase estacionária. O sistema eluente empregado era hexano acetato de etila com gradiente de polaridade.

5.3.2 – Cromatografia em camada delgada e preparativa

Foram empregadas cromatoplasmas de alumínio de sílica-gel com indicador de fluorescência F_{254} . Essas eram observadas em câmara de UV e posteriormente, borrifadas com solução 5% de H_2SO_4 em etanol e 10% de vanilina em etanol, seguidas de tratamento térmico.

A cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada em placas de vidro de 20 x 20 cm, preparadas em laboratório, cobertas com sílica-gel, numa espessura de 0,75 mm, apresentando em sua composição indicador de fluorescência F_{254} e gipsa.

5.4 – Extração do óleo essencial

Em um balão foram colocadas folhas frescas de *Calea clematidea* e o óleo foi extraído por hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger modificado. A extração foi realizada até a exaustão. Após a extração, o óleo foi separado da água com éter etílico, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. O rendimento foi de 1,2 %.

5.5 – Isolamento do caleol

O óleo essencial extraído foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica-gel 1:70 de fase estacionária para cada grama de óleo. A coluna foi eluída com os sistemas de solvente: hexano, hexano/acetato de etila 5, 10, 15 e 20%.

5.6 – Hidrólise alcalina do caleol

Em 15 mL de metanol anidro sob banho de gelo colocou-se 200 mg (800 mmol) de sódio metálico e após o completo consumo do metal adicionou-se 1 g do óleo essencial. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente e acompanhada por CCD utilizando o sistema eluente hexano/acetato de etila 20%. Após o total consumo do éster, a reação foi encerrada pela neutralização do metóxido de sódio formado com HCl 1M até pH 6. Posteriormente, o metanol foi evaporado e o resíduo extraído três vezes com 15 mL de diclorometano. As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas. O óleo resultante foi cromatografado em coluna com o sistema eluente hexano/acetato de etila, da onde se isolou o álcool do caleol com 89% de rendimento e alta pureza, determinada pela análise em cromatografia gasosa.

5.7 – Abertura do epóxido com cloreto férrico anidro

Uma mistura de 1 mmol do epóxido e 0,05 mmol de cloreto férrico anidro foram dissolvidos em 5 ml de cada um dos alcoóis empregados nas reações. As reações foram agitadas em temperatura ambiente e acompanhadas por CCD e CG. Após o consumo do epóxido, o solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em água. A fração aquosa foi extraída três vezes com 15 mL de diclorometano e o combinado orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. Após isso, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna, empregando hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade como fase móvel.

5.8 – Aberturas do epóxido com tetracianoetileno

A uma mistura de 1 mmol do epóxido dissolvido no álcool apropriado foram adicionados 0,1 mmol de tetracianoetileno. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente e acompanhada por CCD e CG. Após o término da reação, o solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em água. Foi realizada a extração três vezes com 15 mL de diclorometano. O combinado orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna.

5.9 – Preparo do cloreto férrico adsorvido em sílica-gel

Em uma solução de 1,2 g de cloreto férrico hexahidratado em 16 mL de acetona, foram adicionados 10 g de sílica-gel 70-230 mesh a temperatura ambiente a mistura foi agitada mecanicamente até a total dispersão do cloreto férrico na sílica. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o pó amarelo resultante foi seco mais uma sob vácuo.

5.10 – Aberturas do epóxido com suporte de sílica

O suporte sólido (15 mg) foi adicionado à uma solução de 150 mg do epóxido (0,88 mmol) em 10 mL de metanol. A mistura foi agitada a temperatura ambiente e acompanhada por CCD e CG. Após 6 horas o metanol foi evaporado e 15 mL de diclorometano foram adicionados à mistura e filtrados. O resíduo sólido foi novamente lavado com 15 mL de diclorometano. As frações orgânicas combinadas foram evaporadas e o produto foi cromatografado em coluna gerando como produto um óleo com rendimento de 60%.

5.11 – Reações de abertura com banho de ultrassom

5.11.1 – Abertura com cloreto férrico

Uma mistura de 1 mmol do epóxido e 0,05 mmol de cloreto férrico anidro foram dissolvidos em 5 ml de metanol e álcool alílico, individualmente. Essa solução foi mantida em banho de ultrassom e acompanhada por CG. Foram retiradas alíquotas da reação nos intervalos de tempo de 10, 15, 20, 30 e 40 minutos e depois a cada hora de reação. Após o consumo do epóxido, o solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em água. A fração aquosa foi extraída três vezes com 15 mL de diclorometano e o combinado orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. Após isso, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna, empregando hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade como fase móvel. Após a purificação os produtos foram caracterizados por co-injeção com padrão sintetizado anteriormente. Rendimentos: metanol 60% e álcool alílico 50%.

5.11.2 – Abertura com tetracianoetileno

A uma mistura de 1 mmol do epóxido dissolvido metanol e álcool alílico, individualmente, foram adicionados 0,1 mmol de tetracianoetileno. As soluções foram mantidas em banho de ultrassom e acompanhadas por CG. Foram retiradas alíquotas das reações nos intervalos de tempo de 10, 15, 20, 30 e 40 minutos e

depois a cada hora de reação. Após o término das reações, os solventes foram evaporados e os resíduos dissolvidos em água. Foi realizada a extração três vezes com 15 mL de diclorometano em cada reação. O combinado orgânico das duas reações foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna e co-injetados com padrão. Rendimentos: metanol 57% e álcool alílico 52%.

5.12 – Esterificação do ácido 2-metoxifenilacético com 1-(3',3'-dimetil-2-oxiranyl)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol

N,N'-Dimetilaminopiridina (4 mg, 0,03 mmol), DMAP, foi adicionado em uma solução do álcool do caleol (50 mg, 0,29 mmol), ácido *R*-2-metoxifenilacético (48 mg, 0,29 mmol), MFA, e dicitlohexilcarbodiimida (60 mg, 0,29 mmol), DCC, em 5 mL de diclorometano. A reação foi acompanhada por CCD. Após 24 horas a uréia formada na reação foi removida por filtração e o filtrado lavado com diclorometano. O combinado orgânico foi então lavado com solução saturada de cloreto de sódio, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. O produto cru foi submetido a purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, com sistema eluente de hexano/acetato de etila 6%. Rendimento 81%.

O procedimento descrito acima foi também executado com o ácido *S*-2-metoxifenilacético, que também apresentou rendimento de 81%.

5.13 – Atividade antimicrobiana

5.13.1 – Método da concentração inibitória mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima, CIM, pelo método da microdiluição, empregou-se a técnica descrita pela NCCLS³¹ modificada^{32,33}. Este método é determinado em placas de cultura estéreis de 96 poços onde se realizou

³¹ NCCLS, Approved Standard 5 th Ed, NCCLS document M7-A5, **2000**.

³² Hammer, K. A., Journal of Applied Microbiology, 86, 985-990, **1999**.

³³ Burt, S., International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253, **2004**.

uma série de diluições das amostras em meio líquido, nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL, contendo 2% do surfactante Tween 80. Os poços foram inoculados com os microorganismos e homogeneizados. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C para bactérias e por 48 horas a 25°C para fungos. Após o período de incubação, observou-se, pela turvação do meio, o crescimento microbiano, determinando-se a CIM. Os testes foram realizados em triplicata.

Como padrões, foram utilizados cloranfenicol nas concentrações de 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL e nistidina nas concentrações 41,15, 20,6, 10,3 e 5,15µg/mL.

5.13.2 – Método da concentração letal mínima

As culturas de teste de CIM que não apresentaram crescimento nos poços foram utilizadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar, onde foi determinada a concentração letal mínima, CLM. Segundo Hammer² trata-se da menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias.

6 - CONCLUSÃO

Após a realização dos experimentos com o caleol e seus derivados sintetizados e análise dos resultados pode-se concluir que:

- A abertura do epóxido do caleol catalisada por cloreto férrico anidro não ocorre de maneira seletiva, mas quando essa reação é executada com o álcool do caleol e são utilizados como nucleófilos alcoóis primários ela ocorre de maneira seletiva, mas esse método é falho quando são empregados nucleófilos mais volumosos.
- O tetracianoetileno também foi um catalisador eficaz para as reações de abertura do epóxido do álcool do caleol, levando à formação dos mesmos produtos que as reações catalisadas por cloreto férrico anidro.
- A utilização de banho de ultrassom não proporciona incremento nos rendimentos das reações catalisadas tanto por cloreto férrico anidro quanto por tetracianoetileno, nem leva à diminuição do tempo reacional ou produção de produtos diferentes das reações com os mesmos catalisadores sob agitação magnética.
- O emprego de suporte sólido foi eficiente apenas com cloreto férrico hexahidratado suportado em sílica-gel, que levou ao mesmo produto da abertura catalisada por cloreto férrico anidro. Entretanto, o cloreto férrico suportado em K10 forma inúmeros produtos sem seletividade aparente para a abertura do epóxido do álcool do caleol.
- A utilização da ressonância magnética nuclear foi eficaz na determinação da configuração do carbono C4 do caleol, utilizando o método da dupla derivatização com os ácidos *R* e *S* 2-metoxifenilacético, que apresentou configuração *R*, a mesma encontrada por Flach que empregou o método de Horeau. Isso é um indício importante que o método de Horeau é eficiente para a determinação da estereoquímica absoluta de alcoóis secundários.

- O óleo essencial das folhas de *C. clematidea* apresentou uma fraca atividade microbiológica contra os microrganismos testados. Entretanto, o caleol isolado mostrou boa atividade bacteriostática. Diferentemente, o álcool do caleol não apresentou significativa atividade microbiológica. Os produtos das aberturas do epóxido do caleol mostraram boas atividades fungiostática, mas fracas atividades bacteriostáticas.