



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIELY HOLANDA PINTO VASCONCELOS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENO CLERODANO E DO IBUPROFENO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS
ORGÂNICOS**

FORTALEZA

2018

DANIELY HOLANDA PINTO VASCONCELOS

BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENO CLERODANO E DO IBUPROFENO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jair Mafezoli
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V45b Vasconcelos, Daniely Holanda Pinto.
Biotransformação de diterpeno clerodano e do ibuprofeno por fungos endofíticos e modificação química de compostos orgânicos. / Daniely Holanda Pinto Vasconcelos. – 2019.
225 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Jair Mafezoli.
Coorientação: Profa. Dra. Francisco Geraldo Barbosa..
- I. biotransformação. I. Título.

CDD 540

DANIELY HOLANDA PINTO VASCONCELOS

BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENO CLERODANO E DO IBUPROFENO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química orgânica.

Aprovada em: 05/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nirla Rodrigues Romero
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Davila Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

*Aos meus pais, Vanda e Juarez. Ao meu esposo
Bonfim, meu filho João Pedro e meus irmãos
Daniel e Diego.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e acreditou em mim.

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli pela excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa pela co-orientação do trabalho.

Aos Professores Marcos Carlos de Mattos e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira por terem cedido o laboratório para realização dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química e em especial a Profa. Telma Leda que permitiu o uso do seu laboratório.

Ao CENAUREMN pela aquisição dos espectros de RMN e em especial a Carol, Onassis, Bruna e Herbert pela realização dos experimentos.

Aos companheiros de laboratório Aquino, Tatiana, Thiago, Lara, Paulo, Tell, Maria, Diana, Reinaldo, Iana, Fatinha, Onassis e Lucas, em especial as parceiras de todas as horas Bruna e Carol.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Aos funcionários Célia, Lana e Orlando pela colaboração.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A minha prima Priscila pela ajuda na formatação do trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos outros órgãos financiadores CNPq e FUNCAP.

RESUMO

Esta tese apresenta os resultados de quatro estudos independentes descritos em quatro capítulos. O primeiro capítulo descreve o estudo de biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno pelas culturas celulares dos fungos endofíticos *Lasiodiplodia gonubienses*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* da família Botryosphaeriaceae. Neste estudo foram obtidos quatro bioprodutos (P1, P2, P3 e P6), sendo os três últimos inéditos na literatura. A partir de P2 foram obtidos dois derivados semissintéticos um acilado e outro alquilado, ambos inéditos na literatura. O segundo capítulo descreve a biotransformação do ibuprofeno pelo fungo *Neofusicoccum ribis*, com obtenção do produto hidroxilado (IB-1), e também a obtenção de cinco derivados semissintéticos (IB-M, IB-Et, IB-But, IB-BrCN e IB-CIP) deste composto. O terceiro capítulo reporta a obtenção sintética de precursores do fármaco fluoxetina (Pr-FLX1 e Pr-FLX2) e três derivados (FLX-Be, FLX-PCl, R-FLXH), sendo os compostos Pr-FLX2, FLX-PCl e R-FLXH inéditos na literatura. No quarto e último capítulo, descreve-se a obtenção de quatro derivados semissintéticos (D2, D3, D4 e D9) a partir do produto natural 4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, por meio de reações de adição nucleofílica.

Palavras-chave: Biotransformação. Derivados semissintéticos. Fungos endofíticos. Diterpeno clerodano. Ibuprofeno. Fluoxetina. Benzilisotiocianato.

ABSTRACT

This thesis presents the results of four independent studies described in four chapters. The first chapter describes the biotransformation of the diterpene 3,12-dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxyclerodane-13 (16), 14-diene by the cell cultures of the endophytic fungi *Lasiodiplodia gonubienses*, *Neofusicoccum ribis* and *Pseudofusicoccum stromaticum* of the *Botryosphaeriaceae* family. P1, P2, P3 and P6 are the bioproducts obtained in these study, the last three are unpublished in the literature. In addition, two semi-synthetic derivatives were obtained from P2, one acylated and the other alkylated, both inedited in the literature. The second chapter describes the biotransformation of ibuprofen by the fungus *Neofusicoccum ribis*, obtaining the hydroxylated product (IB-1), as well as five semi-synthetic derivatives (IB-M, IB-Et, IB-But, IB- BrCN and IB -CIP). The third chapter relates to synthetic preparation of medicine precursors fluoxetine (Pr-FLX1 and Pr-FLX2) and three derivatives (FLX-Be, FLX-PCl, R-FLXH), the compounds Pr-FLX2, FLX-PCl and R-FLXH are inedited in the literature. The fourth and last chapter describes the achievement of four semisynthetic derivatives (D2, D3, D4 and D9) are obtained from the natural product 4-(4'-O-acetyl- α -L-raminosyloxy)benzylisothiocyanate through Nucleophilic addition reactions.

Keywords: Biotransformation. Semisynthetic derivatives. Endophytic fungi. Diterpene clerodane. Ibuprofen. Fluoxetine. Benzylisothiocyanate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	— Culturas fúngicas usadas nos estudos de biotransformação.....	35
Figura 2	— Espectro de absorção na região de infravermelho do P1.....	39
Figura 3	— Espectro de massa de alta resolução do P1.....	40
Figura 4	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P1.....	41
Figura 5	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P1.....	42
Figura 6	— Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do P1.....	42
Figura 7	— Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do P1.....	43
Figura 8	— Estrutura química do P1, denominado de (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i>) -3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno.....	45
Figura 9	— Espectro de absorção na região de infravermelho do P2.....	46
Figura 10	— Espectro de massas de alta resolução do P2.....	47
Figura 11	— Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do P2.....	47
Figura 12	— Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do P2.....	48
Figura 13	— Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) do P2.....	49
Figura 14	— Espectro de RMN 2D HSQC (500 MHz, CD_3OD) do P2.....	49
Figura 15	— Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN ^1H x ^1H COSY do P2.....	50
Figura 16	— Espectro de RMN 2D COSY (500 MHz, CDCl_3) do P2.....	50
Figura 17	— Espectro de RMN 2D HMBC (500 MHz, CDCl_3) do P2.....	51
Figura 18	— Estruturas mostrando as correlações observadas no RMN HMBC para o P2.....	51
Figura 19	— Espectro de RMN ^1H x ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do P2.....	52
Figura 20	— Subestrutura do P2, mostrando as correlações de acordo com o espectro de RMN ^1H x ^1H -NOESY.....	52
Figura 21	— Estrutura química do P2, denominado de (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>) -4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16), 14-dieno.....	53
Figura 22	— Espectro de absorção na região de infravermelho do P3.....	56
Figura 23	— Espectro de massas de alta resolução do P3.....	57
Figura 24	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P3.....	58
Figura 25	— Determinação da estereoquímica da hidroxila do C-3.....	58
Figura 26	— Determinação da estereoquímica da hidroxila do C-7.....	59
Figura 27	— Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do P3.....	60

Figura 28	— Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do P3.....	60
Figura 29	— Espectro de RMN 2-D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do P3.....	61
Figura 30	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do P3.....	61
Figura 31	— Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY do P3.....	62
Figura 32	— Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times$ ^{13}C -HMBC para o P3.....	62
Figura 33	— Espectro de RMN 2-D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do P3.....	63
Figura 34	— Estrutura química do P3, denominada (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 3,4,7-trihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16), 14-dieno.....	63
Figura 35	— Espectro de massas de alta resolução do P6.....	66
Figura 36	— Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do P6.....	67
Figura 37	— Determinação da estereoquímica da hidroxila do C-6.....	67
Figura 38	— Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do P6.....	68
Figura 39	— Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do P6.....	69
Figura 40	— Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) do P6.....	69
Figura 41	— Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN COSY do P6.....	70
Figura 42	— Espectro de RMN 2D HMBC (500 MHz, CDCl_3) do P6.....	70
Figura 43	— Subestruturas mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times$ ^{13}C - HMBC para o P6.....	71
Figura 44	— Estrutura química do P6, denominado (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-4,6- dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16), 14-dieno.....	73
Figura 45	— Espectro de massas de alta resolução do P2(a).....	74
Figura 46	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P2(a).....	75
Figura 47	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P2(a).....	76
Figura 48	— Estrutura química do P2(a), denominada (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-7- propioniloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16), 14- dieno.....	76
Figura 49	— Espectro de massas de alta resolução do P2(o).....	78
Figura 50	— Fragmentação do composto P2(o).....	78
Figura 51	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P2(o).....	79
Figura 52	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P2(o).....	80

Figura 53	— Estrutura química do P2(o), denominada (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-7-benziloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno.	80
Figura 54	— Derivados do ibuprofeno com ação anti-inflamatória e analgésica.....	95
Figura 55	— Derivados do ibuprofeno com ação anti-inflamatória e antidepressiva.....	96
Figura 56	— Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do IB-1.....	100
Figura 57	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) do IB-1.....	101
Figura 58	— Espectro de RMN ¹³ C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) do IB-1.....	101
Figura 59	— Espectro de RMN 2D HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do IB-1.....	102
Figura 60	— Estrutura química do IB-1.....	102
Figura 61	— Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) do IB-M.....	104
Figura 62	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) do IB-M.....	105
Figura 63	— Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) do IB-M.....	105
Figura 64	— Espectro de RMN ¹ H x ¹³ C - HSQC (500MHz, CDCl ₃) do IB-M.....	106
Figura 65	— Estrutura química do IB-M.....	106
Figura 66	— Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do IB-Et.....	108
Figura 67	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) do IB-Et.....	109
Figura 68	— Espectro de RMN 1H x 13C - HSQC (500MHz, CDCl ₃) do IB-Et.....	109
Figura 69	— Estrutura químico do IB-E.....	110
Figura 70	— Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do IB-But.....	111
Figura 71	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CDCl ₃) do IB-But.....	112
Figura 72	— Espectro de RMN ¹³ C - JMOD (75 MHz, CDCl ₃) do IB-But.....	112
Figura 73	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) do IB-But.....	113
Figura 74	— Estrutura química do IB-But.....	113
Figura 75	— Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) do IB-CIP.....	115
Figura 76	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) do IB-CIP.....	116
Figura 77	— Espectro de RMN ¹³ C-JMOD (125 MHz, CDCl ₃) do IB-CIP.....	116
Figura 78	— Espectro de RMN 1H x 13C-HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do IB-CIP....	117
Figura 79	— Estrutura química do IB-CIP.....	117
Figura 80	— Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	119
Figura 81	— Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	120
Figura 82	— Espectro de RMN ¹³ C-APT (75 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	120
Figura 83	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	121

Figura 84	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	121
Figura 85	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl ₃) do IB-BrCN.....	122
Figura 86	— Estrutura química do IB-BrCN.....	122
Figura 87	— Fármacos antidepressivos.....	132
Figura 88	— Estrutura química de analgésicos e antidepressivos.....	133
Figura 89	— Derivados da fluoxetina.....	134
Figura 90	— Compostos com atividade antimicrobiana.....	135
Figura 91	— Medicamentos Psicotrópicos com ação antimicrobiana.....	136
Figura 92	— Estrutura química de um composto fungicida.....	137
Figura 93	— Espectro de RMN ¹ H do 3-cloro-1fenilpropan-1-ol(300 MHz, CDCl ₃).....	138
Figura 94	— Espectro de RMN ¹³ C-BB do 3-cloro-1fenilpropan-1-ol (75 MHz, CDCl ₃)	138
Figura 95	— Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX1.....	140
Figura 96	— Espectro de RMN de ¹³ C-BB (75 MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX1.....	141
Figura 97	— Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX1.....	141
Figura 98	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) de Pr-FLX1.....	142
Figura 99	— Espectro RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl ₃) do PR-FLX1.....	142
Figura 100	— Correlações heteronuclear ¹ H x ¹³ C - HMBC.....	143
Figura 101	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX1.....	143
Figura 102	— Estrutura química do Pr-FLX1.....	144
Figura 103	— Espectro de RMN ¹ H do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (300 MHz, CDCl ₃).....	145
Figura 104	— Espectro de RMN ¹³ C-BB do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (75 MHz, CDCl ₃)	146
Figura 105	— Espectro de RMN ¹ H do Pr-FLX2 (300 MHz, CDCl ₃).....	148
Figura 106	— Espectro de RMN ¹³ C -BB do Pr-FLX2 (75 MHz, CDCl ₃).....	148
Figura 107	— Espectro de RMN ¹³ C - JMOD do Pr-FLX2 (75 MHz, CDCl ₃).....	149
Figura 108	— Espectro de RMN 2D HSQC (300MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX2.....	149
Figura 109	— Espectro de RMN 2D HMBC (300MHz, CDCl ₃) do Pr-FLX2.....	150
Figura 110	— Estrutura química do Pr-FLX2.....	150
Figura 111	— Espectro de RMN ¹ H do Pr-FLX2 (300 MHz, CDCl ₃).....	153
Figura 112	— Espectro de RMN ¹³ C-BB (75MHz, CDCl ₃) do FLX-PCI.....	153

Figura 113	— Espectro de RMN ¹³ C - DEPT 135° (75MHz, CDCl ₃) do FLX-PCl....	154
Figura 114	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) do FLX-PCl.....	154
Figura 115	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl ₃) do FLX-PCl.....	155
Figura 116	— Correlações heteronuclear do espectro de RMN 1H x 13C-HMBC.....	155
Figura 117	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl ₃) do FLX-PCl.....	156
Figura 118	— Estrutura química do FLX-PCl.....	156
Figura 119	— Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do FLX-Be.....	159
Figura 120	— Espectro de RMN ¹³ C -BB (75 MHz, CDCl ₃) do FLX-Be.....	159
Figura 121	— Espectro de RMN ¹³ C - JMOD (75 MHz, CDCl ₃) do FLX-Be.....	160
Figura 122	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) do FLX-Be.....	160
Figura 123	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl ₃) do FLX-Be.....	161
Figura 124	— Correlações heteronuclear presentes no espectro de RMN ¹ H x ¹³ C- HMBC.....	161
Figura 125	— Estrutura química do FLX-Be.....	161
Figura 126	— Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	164
Figura 127	— Espectro de RMN ¹³ C -BB (75MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	164
Figura 128	— Espectro de RMN ¹³ C - DEPT 135° (75MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	165
Figura 129	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	165
Figura 130	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	166
Figura 131	— Correlações heteronuclear do espectro de RMN 1H x 13C-HMBC.....	166
Figura 132	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl ₃) do R-FLXH.....	167
Figura 133	— Estrutura química do R-FLXH.....	167
Figura 134	— Estrutura química do antibiótico amoxicilina.....	176
Figura 135	— Fotos da <i>Moringa oleifera</i> Lam. e a estrutura química do benzil- isotiocianato.....	177
Figura 136	— Estrutura química dos metabólitos secundários da <i>Moringa oleifera</i> ...	177
Figura 137	— Compostos naturais de nitrilas e isotiocianatos com atividades antitumorais e anti-inflamatórios.....	178
Figura 138	— Derivados do benzil-isotiocianato.....	179
Figura 139	— Compostos bioativos.....	182
Figura 140	— Espectro de massas de alta resolução do D2.....	184
Figura 141	— Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do D2.....	185
Figura 142	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl ₃) do D2.....	185

Figura 143	— Fragmento do D2 com as correlações homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY..	186
Figura 144	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D2.....	186
Figura 145	— Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do D2.....	187
Figura 146	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do D2.....	188
Figura 147	— Correlações determinadas a partir do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC.....	188
Figura 148	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D2.....	189
Figura 149	— Estrutura química do D2.....	189
Figura 150	— Espectro de massa de alta resolução do D3.....	191
Figura 151	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D3.....	192
Figura 152	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D3.....	192
Figura 153	— Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do D3.....	193
Figura 154	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do D3.....	194
Figura 155	— Correlações determinadas a partir do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC.....	195
Figura 156	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D3.....	195
Figura 157	— Estrutura química do D3.....	195
Figura 158	— Espectro de massas de alta resolução do D4.....	197
Figura 159	— Subestrutura do D4 com as correlações homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY.	197
Figura 160	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D4.....	198
Figura 161	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do D4.....	198
Figura 162	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D4.....	199
Figura 163	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D4.....	200
Figura 164	— Correlações heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC.....	200
Figura 165	— Estrutura química do D4.....	201
Figura 166	— Espectros de massas de alta resolução do D9.....	203
Figura 167	— Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D9.....	204
Figura 168	— As correlações homonuclear do espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY.....	204
Figura 169	— Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do D9.....	205
Figura 170	— Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D9.....	206
Figura 171	— Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do D9.....	206
Figura 172	— Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do D9.....	207
Figura 173	— Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D9.....	207

Figura 174	— Correlação heteronuclear do espectro RMN ^1H x ^{13}C -HMBC.....	208
Figura 175	— Estrutura química do D9.....	208

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	— Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e padrão de hidrogenação dos carbonos do P1.....	41
Tabela 2	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do substrato (500/125 MHz, CDCl_3), do composto P1 (300/75 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4 α -hidroxicleroda-13(16),14-dieno registrado na literatura (Mafezoli, 2014)	44
Tabela 3	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do P2, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.....	54
Tabela 4	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P3, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.....	64
Tabela 5	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P6, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.....	72
Tabela 6	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P2(a), comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato (P2) usado no estudo de síntese química.....	77
Tabela 7	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P2(o), comparado com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato (P2).	81
Tabela 8	— Avaliação do efeito antifúngico das substâncias P1, P2, P3 e do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16), 14-dieno (substrato), frente as cepas de <i>Candida spp</i>	82
Tabela 9	— Fungos endofíticos utilizados no estudo de biotransformação.....	85
Tabela 10	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do IB-1 (500/125 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H (390 MHz, CDCl_3) registrado na literatura.....	103
Tabela 11	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do IB-M (500/125 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H registrado na literatura.....	107
Tabela 12	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-Et em comparação com dados do etil 2-[4-(2-metilpropil).....	110
Tabela 13	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-But em comparação com dados do	

	butil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato descrito na literatura.....	114
Tabela 14	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do prop-2-inil 2-(4-isobutilfenil)propanoato (IB-CIP).....	117
Tabela 15	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-CIP em comparação com dados do cianometil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato descrito na literatura.	123
Tabela 16	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (300/75 MHz, CDCl_3).....	139
Tabela 17	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno em comparação com dados do mesmo composto descrito na literatura.....	144
Tabela 18	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (300/75 MHz, CDCl_3).....	146
Tabela 19	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno (300/75 MHz, CDCl_3).....	151
Tabela 20	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do FLX-PCl (300/75 MHz, CDCl_3).....	157
Tabela 21	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do FLX-Be (300/75 MHz, CDCl_3).....	162
Tabela 22	— Dados de RMN ^1H e ^{13}C do R-FLXH (300/75 MHz, CDCl_3).....	168
Tabela 23	— Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (300 MHz/ CDCl_3) do D2.....	190
Tabela 24	— Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D3 (300 MHz/ CDCl_3).....	196
Tabela 25	— Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D4 (300 MHz/ CDCl_3).....	202
Tabela 26	— Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D9 (300 MHz, CDCl_3).....	209

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	— Biotransformação do heptanoato de testosterona por <i>Absidia griseolla</i> e <i>Acremonium chrysogenu</i>	30
Esquema 2	— Biotransformação do curcumenol.....	32
Esquema 3	— Degradação do diuron pelos fungos: <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Cunninghamella elegans</i>	33
Esquema 4	— Biotransformação da azadiradiona por <i>Mucor sp.</i>	33
Esquema 5	— Biotransformação do Isoxanto-humol por <i>Eupenicillium javanicum</i> .	34
Esquema 6	— Biotransformação do α -santonina.....	34
Esquema 7	— Biotransformação do diterpeno clerodano.....	37
Esquema 8	— Reação de acilação do P2.....	38
Esquema 9	— Reação de <i>O</i> -alquilação do P2.....	38
Esquema 10	— Reação de biotransformação do ibuprofeno.....	97
Esquema 11	— Reação de esterificação do ibuprofeno com metanol.....	98
Esquema 12	— Reação de esterificação do ibuprofeno com etanol.....	98
Esquema 13	— Reação de esterificação do ibuprofeno com butanol.....	98
Esquema 14	— Reação com cloreto de propargilacom o ibuprofeno.....	99
Esquema 15	— Reação do ibuprofeno com bromoacetnitrila.....	99
Esquema 16	— Redução da 3-cloropropilfenona.....	137
Esquema 17	— Reação de Mitsunobi do precursor da fluoxetina (Pr-FLX1).....	139
Esquema 18	— Redução da 3,4'- dicloropropiofenona.....	145
Esquema 19	— Reação de Mitsunobi do derivado do precursor da fluoxetina (Pr-FLX2).....	147
Esquema 20	— Reação de N-alquilação da fluoxetina.....	151
Esquema 21	— Reação de <i>N</i> -alquilação da fluoxetina com cloreto de benzila.....	157
Esquema 22	— Reação de <i>N</i> -acilação da fluoxetina com cloreto de hexanoíla.....	162
Esquema 23	— Síntese do derivado D2.....	182
Esquema 24	— Síntese do derivado D3.....	183
Esquema 25	— Síntese do derivado D4.....	183
Esquema 26	— Síntese do derivado D9.....	184

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometria de massa
FM	Fórmula molecular
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
IV	Infravermelho
RMN ¹³ C-BB	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 – <i>Broand Band</i>
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
TEBA	Cloreto de benziltriethylamônio
BD	Meio de Cultura Batata-Dextrose
BDA	Meio de Cultura Batata-Dextrose-Àgar
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
JMOD	Ecos de spin modulados em J
APT	<i>Attached proton test</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
m/z	Razão massa/carga
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>S</i>	Singleto
<i>D</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Dubleto de dubleto
<i>t</i>	Tripleto
<i>q</i>	Quarteto
<i>sep</i>	Septeto
<i>m</i>	Multiplete
<i>Sl</i>	Singleto largo
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UFC	Unidade Formadora de Colonia
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
P(Ph) ₃	Trifenilfosfina
DIAD	Diisopropil azodicarboxilato
MeCN	Acetonitrila
Δ	Deslocamento químico
Et ₃ N	Trietilamina
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
HSTBA	Hidrogenosulfato de terabutylamônio
DMAP	Dimetilaminopiridina

LISTA DE SÍMBOLOS

Lg + d	Extrato da biotransformação do <i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> com o substrato
Nr + d(1)	Extrato da biotransformação do <i>Neofusicoccum ribis</i> com o substrato (1º grande escala)
Nr + d(2)	Extrato da biotransformação do <i>Neofusicoccum ribis</i> com o substrato (2º grande escala)
Ps + d(1)	Extrato da biotransformação do <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> com o substrato (1º grande escala)
Ps + d(2)	Extrato da biotransformação do <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> com o substrato (2º grande escala)
P1	(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i>)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno
P2	(4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i>)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno
P3	(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i>)-3,4,7-triidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno
P6	(4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i>)-4,6-diidroxi-15,16-epoxi-3, 12-dioxocleroda-13(16),14-dieno
P2(a)	(4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>S</i>)-7-propioniloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3, 12-dioxocleroda-13(16),14-dieno
P2(o)	(4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>S</i>)-7-benziloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3, 12-dioxocleroda-13(16),14-dieno
DC	Diterpeno Clerodano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	28
2	BIOTRANSFORMAÇÃO DO DITERPENO CLERODANO.....	29
2.1	Introdução.....	30
2.2	Considerações da família botryosphaeriaceae.....	31
2.3	Levantamento bibliográfico.....	32
2.3.1	<i>Biotransformações por fungos.....</i>	32
2.4	Resultados e discussão.....	34
2.4.1	<i>Triagem dos fungos endofíticos para uso no estudo de biotransformação do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno.....</i>	34
2.4.2	<i>Isolamento de P1, P2, P3 e P6.....</i>	35
2.4.3	<i>Modificação estrutural do P2.....</i>	38
2.4.4	<i>Reação de acilação do P2.....</i>	38
2.4.5	<i>Reação de O-alkilação do P2.....</i>	38
2.4.6	<i>Determinações estruturais dos produtos de biotransformação.....</i>	39
2.4.6.1	<i>Determinação estrutural do P1.....</i>	39
2.4.6.2	<i>Determinação estrutural do P2.....</i>	46
2.4.6.3	<i>Determinação estrutural do P3.....</i>	56
2.4.6.4	<i>Determinação estrutural do P6.....</i>	66
2.4.7	<i>Determinações estruturais dos produtos de modificação química, usando P2 como substrato.....</i>	74
2.4.7.1	<i>Determinação estrutural do P2(a).....</i>	74
2.4.7.2	<i>Determinação estrutural do P2(o).....</i>	77
2.4.8	<i>Atividade antifúngica das substâncias isoladas.....</i>	81
2.5	Procedimentos experimentais.....	82
2.5.1	<i>Métodos Cromatográficos.....</i>	82
2.5.1.1	<i>Cromatografia de adsorção.....</i>	82
2.5.1.2	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	83
2.5.2	<i>Métodos espectrométricos e espectroscópicos.....</i>	83
2.5.2.1	<i>Espectrometria de Ressonância magnética nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas.....</i>	83

2.5.2.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	84
2.5.3	<i>Outras determinações</i>	84
2.5.3.1	<i>Ponto de fusão</i>	84
2.5.3.2	<i>Rotação óptica</i>	84
2.5.4	<i>Substrato</i>	85
2.5.5	<i>Reagentes comerciais</i>	85
2.5.6	<i>Amostras fúngicas</i>	85
2.5.7	<i>Preservação dos microrganismos</i>	86
2.5.8	<i>Meios de cultura usados nos estudos</i>	86
2.5.8.1	<i>Meio Batata-Dextrose sintético</i>	86
2.5.8.2	<i>Meio Batata-Dextrose-Ágar sintético</i>	87
2.5.9	<i>Esterilização de vidraria e meios de cultura</i>	87
2.5.10	<i>Biotransformação do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por fungos endofíticos</i>	87
2.5.10.1	<i>Cultivo fúngico para o estudo de biotransformação</i>	87
2.5.10.2	<i>Processamento das culturas líquidas</i>	87
2.5.10.3	<i>Retirada de gordura</i>	88
2.5.11	<i>Isolamento dos produtos de biotransformação</i>	88
2.5.11.1	<i>Fracionamento do extrato Nr + d (1) por cromatografia gravitacional</i>	88
2.5.11.2	<i>Fracionamento dos extratos Lg + d e Ps + d (1) por cromatografia em camada delgada preparativa</i>	88
2.5.11.3	<i>Fracionamento dos extratos Nr + d (2) e Ps + d (2) por CLAE</i>	89
2.5.12	<i>Atividade antifúngica</i>	90
2.5.13	<i>Obtenção dos derivados reacionais de P2</i>	90
2.5.13.1	<i>Reação de acilação do P2</i>	90
2.5.13.2	<i>Reação de O-alquilação do P2</i>	91
2.6	<i>Conclusão</i>	91
3	BIOCONVERSÃO E OBTENÇÃO DE DERIVADO SEMISSINTÉTICOS DO IBUPROFENO	93
3.1	<i>Introdução</i>	94
3.2	<i>Levantamento bibliográfico</i>	94
3.3	<i>Resultados e discussão</i>	97
3.3.1	<i>Triagem dos fungos endofíticos para uso no estudo de</i>	

	<i>biotransformação do ibuprofeno</i>	97
3.3.3.1	<i>Biotransformação do Ibuprofeno e obtenção de IB-1</i>	97
3.3.2	Modificação química do ibuprofeno	97
3.3.2.1	<i>Reação de esterificação do ibuprofeno com metanol</i>	97
3.3.2.2	<i>Reação de esterificação do ibuprofeno com etanol</i>	98
3.3.2.3	<i>Reação de esterificação do ibuprofeno com butanol</i>	98
3.3.2.4	<i>Reação do ibuprofeno com cloreto de propargila</i>	98
3.3.2.5	<i>Reação do ibuprofeno com bromoacetoneitrila</i>	99
3.4	Determinação estrutural dos derivados do ibuprofeno	99
3.4.1	<i>Determinação estrutural do IB-1</i>	99
3.4.2	<i>Determinação estrutural do IB-M</i>	103
3.4.3	<i>Determinação estrutural do IB-Et</i>	107
3.4.4	<i>Determinação estrutural do IB-But</i>	110
3.4.5	<i>Determinação estrutural do IB-ClP</i>	114
3.4.6	<i>Determinação estrutural do IB-BrCN</i>	118
3.4.7	<i>Atividade antifúngica</i>	123
3.5	Procedimentos experimentais	123
3.5.1	<i>Cromatografia de adsorção</i>	123
3.5.2	<i>Métodos espectrométricos e espectroscópicos</i>	124
3.5.3	<i>Outras determinações</i>	124
3.5.3.1	<i>Ponto de fusão</i>	124
3.5.3.2	<i>Substrato</i>	124
3.5.4	<i>Reagentes</i>	125
3.5.5	<i>Amostra fúgica</i>	125
3.5.6	<i>Preservação do micro-organismo</i>	125
3.5.7	<i>Meios de cultura usado no estudo e esterilização de vidrarias e meios de cultura</i>	125
3.5.8	<i>Cultivo do Neofusicoccum ribis para o estudo de biotransformação em meio BD</i>	125
3.5.8.1	<i>Processamento das culturas líquidas e retirada de gordura</i>	126
3.5.9	<i>Isolamento do produto de biotransformação</i>	126
3.6	Modificação estrutural do ibuprofeno	126
3.6.1	<i>Síntese do derivado IB-M</i>	126

3.6.2	<i>Síntese do derivado IB-Et</i>	127
3.6.3	<i>Síntese do derivado IB-But</i>	127
3.6.4	<i>Síntese do derivado IB-BrCN</i>	127
3.6.5	<i>Síntese do derivado IB-CIP</i>	128
3.7	Atividade antifúngica	128
3.8	Conclusão	129
4	OBTENÇÃO DE PRECURSORES DO FÁRMACO FLUOXETINA E DERIVADOS	130
4.1	Introdução	131
4.2	Levantamento bibliográfico	132
4.2.1	<i>Atividades diversas da fluoxetina</i>	132
4.2.2	<i>Atividade antimicrobiana da fluoxetina</i>	134
4.3	Resultados e discussão	137
4.3.1	<i>Síntese do precursor da fluoxetina</i>	137
4.3.1.1	<i>Redução do 3-cloropropilfenona</i>	137
4.3.1.2	<i>Identificação da 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol</i>	137
4.3.1.3	<i>Reação de Mitsunobi do precursor da fluoxetina (Pr-FLX1)</i>	139
4.3.1.4	<i>Identificação do 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno (Pr-FLX1)</i>	139
4.3.2	<i>Síntese do derivado do precursor da fluoxetina Pr-FLX2</i>	144
4.3.2.1	<i>Redução do 3,4'-dicloropropiofenona</i>	144
4.3.2.2	<i>Identificação do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol</i>	145
4.3.2.3	<i>Reação de Mitsunobi do derivado do precursor da fluoxetina (Pr-FLX2)</i>	146
4.3.2.4	<i>Identificação do 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4- (trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno (Pr-FLX2)</i>	147
4.3.3	Obtenção de derivados da fluoxetina	151
4.3.3.1	<i>Obtenção do FLX-PCl</i>	151
4.3.3.2	<i>Identificação do derivado FLX-PCl</i>	151
4.3.3.3	<i>Obtenção do FLX-Be</i>	157
4.3.3.4	<i>Identificação do derivado FLX-Be</i>	157
4.3.3.5	<i>Obtenção do R-FLXH</i>	162
4.3.3.6	<i>Identificação do derivado R-FLXH</i>	162
4.3.4	<i>Atividade antimicrobiana das amostras</i>	168

4.4	Procedimentos experimentais.....	168
4.4.1	<i>Cromatografia de adsorção.....</i>	168
4.4.2	<i>Métodos espectrométricos e espectroscópicos.....</i>	169
4.4.3	<i>Substrato.....</i>	169
4.4.4	<i>Reagentes.....</i>	169
4.5	Síntese dos precursores da fluoxetina.....	170
4.5.1	<i>Síntese do Pr-FLX1.....</i>	170
4.5.1.1	<i>Redução da 3-cloropropiofenona.....</i>	170
4.5.1.2	<i>Reação de Mitsunobu 1.....</i>	170
4.5.2	<i>Síntese do Pr-FLX2.....</i>	171
4.5.2.1	<i>Redução da 3,4'-dicloropropiofenona.....</i>	171
4.5.2.2	<i>Reação de Mitsunobu 2.....</i>	171
4.6	Modificação química da fluoxetina.....	171
4.6.1	<i>Reação de alquilação da fluoxetina com cloreto de propargila (FLX-CIP)</i>	171
4.6.2	<i>Reação de alquilação da fluoxetina com brometo de benzila (FLX-Be)</i>	172
4.6.3	<i>Reação de alquilação da fluoxetina com cloreto de hexanoíla (R-FLXH)</i>	172
4.7	Atividade antifúngica.....	173
4.8	Conclusão.....	173
5	OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO BENZIL-ISOTIOCIANATO.....	175
5.1	Introdução.....	176
5.2	Levantamento bibliográfico.....	177
5.2.1	<i>Isotiocianatos.....</i>	177
5.2.2	<i>Derivados do isotiocianato.....</i>	179
5.3	Resultados e discussão.....	182
5.3.1	<i>Preparação do derivado D2.....</i>	182
5.3.2	<i>Preparação do derivado D3.....</i>	183
5.3.3	<i>Preparação do derivado D4.....</i>	183
5.3.4	<i>Preparação do derivado D9.....</i>	183
5.4	Determinação estrutural dos derivados do benzil-isotiocianato.....	184
5.4.1	<i>Identificação estrutural do D2.....</i>	184

5.4.2	<i>Identificação estrutural do D3</i>	190
5.4.3	<i>Identificação estrutural do D4</i>	196
5.4.4	<i>Identificação estrutural do D9</i>	202
5.5	Procedimentos experimentais	209
5.5.1	<i>Cromatografia de adsorção</i>	209
5.5.2	<i>Métodos espectrométricos</i>	210
5.5.2.1	<i>Espectrometria de massa (EM)</i>	210
5.5.3	<i>Substrato</i>	210
5.5.4	<i>Reagentes</i>	210
5.6	Síntese dos derivados do benzil-isotiocianato	211
5.6.1	<i>Síntese do derivado D2</i>	211
5.6.2	<i>Síntese do derivado D3</i>	211
5.6.3	<i>Síntese do derivado D4</i>	211
5.6.4	<i>Síntese do derivado D9</i>	212
5.7	Conclusão	212
6	CONCLUSÃO GERAL	213
	REFERÊNCIAS	214
	ANEXO A - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO FUNGO <i>N. RIBIS</i> COM O DITERPENÓ CLERODANO (DC) EM COLUNA ANALÍTICA	222
	ANEXO B - CROMATOGRAMA EM CLAE DO BRANCO DO FUNGO <i>N. RIBIS</i> EM COLUNA ANALÍTICA	223
	ANEXO C - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO <i>N. RIBIS</i> EM COLUNA SEMI-PREPARATIVA	224
	ANEXO D - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO <i>P. STROMATICUM</i>	225
	ANEXO E - CROMATOGRAMA EM CLAE DO BRANCO DO FUNGO <i>P. STROMATICUM</i>	226
	ANEXO F - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO <i>P. STROMATICUM</i> EM COLUNA SEMI-PREPARATI	227

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta tese apresenta os resultados de quatro estudos independentes descritos em quatro capítulos. No primeiro capítulo foi descrito o estudo de biotransformação do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno pelos fungos endofíticos *Lasiodiplodia gonubienses*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* da família Botryosphaeriaceae. Foram obtidos quatro produtos de biotransformação denominados P1, P2, P3 e P6, os quais tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas. No estudo de biotransformação o bioproduto P2 foi obtido em quantidade apreciável. Para este substrato foram realizadas as reações de acilação e *O*-alquilação, obtendo-se dois produtos reacionais.

No segundo capítulo realizou-se modificações químicas na molécula do ibuprofeno, por meio de reações de esterificação, sendo obtido cinco produtos distintos. Foram feitas também reações de biotransformação com a obtenção de um bioproduto. Todos os produtos obtidos foram testados frente a sua capacidade antifúngica e anti-inflamatória.

No terceiro capítulo foram realizadas a síntese do precursor da fluoxetina e de um derivado por meio de reações de redução e de Mitsunobu. Também foram realizadas modificações na estrutura química da molécula, por meio de reações de *N*-alquilação e *N*-acilação, com obtenção de três novos derivados. Todas as moléculas tiveram sua atividade antimicrobiana avaliadas.

No quarto capítulo foram realizadas reações de adição nucleofílica com reagentes contendo o grupo amina no substrato natural benzilisotiocianato 4-[(4'-*O*-acetil- α -L-rhamnosiloxi)benzil]isotiocianato, com a obtenção de quatro produtos.

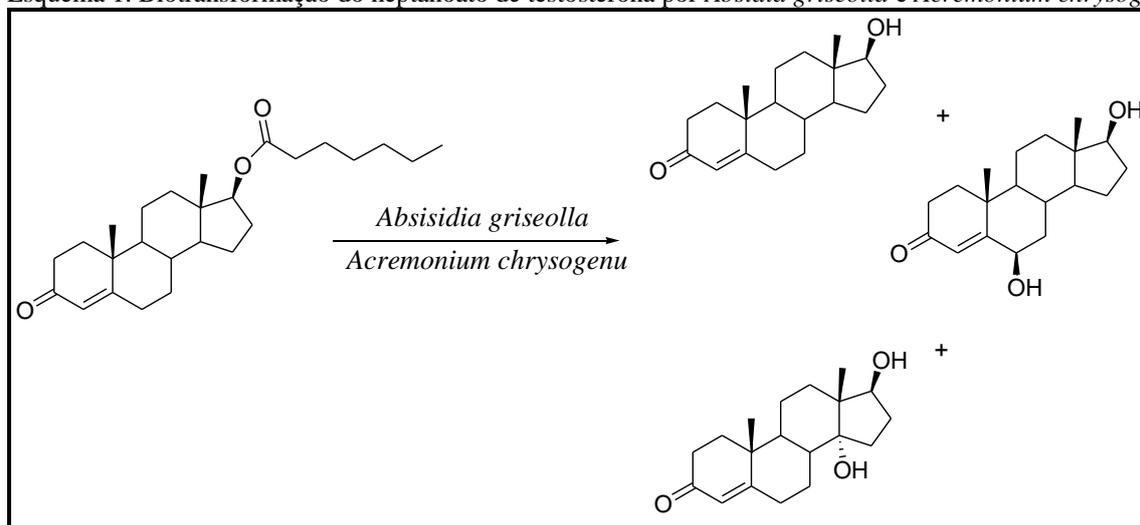
2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO DITERPENO CLERODANO

2.1 Introdução

A biocatálise é um campo amplo e crescente da biotecnologia. Dentre os organismos que realizam a transformação metabólica estão os biocatalisadores, os quais, em sua grande maioria, se apresentam na forma de enzimas isoladas e células íntegras de vegetais ou microrganismos, visando a transformação de compostos naturais ou sintéticos. A produção de compostos químicos por biotransformação microbiana pode oferecer várias vantagens, das quais podemos citar: baixa formação de subprodutos, alto grau de seletividade (regio- quimio- e estereosseletividade), além de condições reacionais brandas de pH e temperatura (GHASEMI; MOHAJERY; HABIBI, 2014).

As transformações microbianas representam uma alternativa para a síntese química de insumos farmacêuticos. Os microrganismos, especialmente os fungos, têm notável capacidade para realizar várias reações enzimáticas, tais como hidroxilação, oxidação, redução, hidrólise, dentre outras. A introdução da hidroxila como grupo funcional em uma molécula de esteroide por biotransformação é ainda o método mais eficiente para a produção de derivados com uso terapêutico e alto valor agregado (Esquema 1) (GHASEMI; MOHAJERY; HABIBI, 2014).

Esquema 1. Biotransformação do heptanoato de testosterona por *Absidia griseolla* e *Acremonium chrysogenu*.



Fonte: GHASEMI; MOHAJERY; HABIBI, 2014.

As hidroxilações regio- e estereosseletiva de carbonos sp^3 não reativos são úteis em síntese orgânica, uma vez que, estas são de difícil obtenção por processos sintéticos convencionais. Com isso, os complexos enzimáticos presentes nos fungos são frequentemente

empregados em tais hidroxilações. O principal desafio de uma biohidroxilação de um substrato é encontrar o micro-organismo adequado para esse fim, sendo que a triagem de várias cepas fúngicas é uma das estratégias mais utilizadas para solucionar tal problema (GHOUMARI *et al.*, 2006).

O uso de microrganismos em processos de biotransformação pode permitir a produção de intermediários reacionais de fármacos e compostos químicos mais complexos. No entanto, a utilização de microrganismos na indústria para obtenção de compostos de interesse ainda é modesta, levando-se em consideração a grande biodiversidade de microrganismos e o grande número de reações que podem ser realizadas pelos complexos enzimáticos dos mesmos (BORGES *et al.*, 2008).

As biotransformações podem ser divididas em duas fases: as reações de fase 1, nas quais as enzimas presentes nos microrganismos promovem as modificações químicas no substrato, deixando-os mais polares; e as reações de fase 2, que consistem em uma espécie de reações de conjugação. Nessa fase, uma substância que esteja em excesso no meio reacional, como por exemplo a glicose, pode reagir com o substrato gerando produtos mais hidrossolúveis (BIROLI *et al.*, 2015).

Neste trabalho descreve-se o estudo de biotransformação do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno pelos fungos endofíticos *Lasiodiplodia gonubienses*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* da família Botryosphaeriaceae. Segundo Monte, Dantas e Braz (1987), o diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno, utilizado como substrato, foi isolado pela primeira vez de *Croton argyrophyloides* (Euphorbiaceae), comumente encontrada nas regiões semiáridas do Brasil.

2.2 Considerações da família botryosphaeriaceae

Os fungos endofíticos utilizados neste trabalho pertencem a família Botryosphaeriaceae e podem ser encontrados como hospedeiros de várias plantas. A família Botryosphaeriaceae abrange diversos fungos que são fitopatogênicos, endofíticos ou saprófitos. Contudo, fungos desta família são geralmente considerados como patógenos fracos e oportunistas, que causam infecção apenas em plantas normalmente expostas a condições de estresse como seca, tempo frio ou quente, deficiência nutricional e danos causados por outros patógenos ou pragas (CHEN *et al.*, 2011). Taxonomicamente, a família Botryosphaeriaceae

pertence ao Domínio Eukaryota, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH *et al.*, 2006).

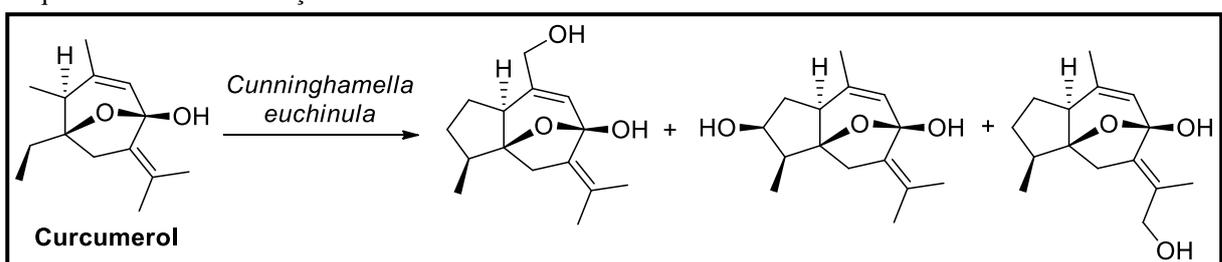
A família Botryosphaeriaceae distribui-se em todas as áreas geográficas e climáticas do planeta, com exceção das regiões polares. A frequente associação dessa família a doenças em plantas tem estimulado o interesse por seus fungos, principalmente, na sistemática dos gêneros e espécies (PHILLIPS *et al.*, 2013). Segundo Srivastava *et al.* (2013), os fungos da família Botryosphaeriaceae são ascomicetos ligninolítico que podem causar podridão de frutos, manchas foliares, podridão de colo em mudas, cancrios, secas em brotos e mudas, vassoura-de-bruxa e morte das árvores.

2.3 Levantamento bibliográfico

2.3.1 Biotransformações por fungos

A biotransformação pode ser utilizada como estratégia de modificação estrutural de produtos naturais, produzindo novos derivados com atividades biológicas e características físico-químicas superiores. De acordo com os autores, o estudo de biotransformação do curcumenol como substrato, pelo fungo *Cunninghamella*, resultou na obtenção de três produtos (Esquema 2). Nos três produtos de biotransformação foram adicionadas hidroxilas com alta regio- e estereosseletividade, o que fez aumentar a solubilidade dos mesmos em água (ZHANG *et al.*, 2015).

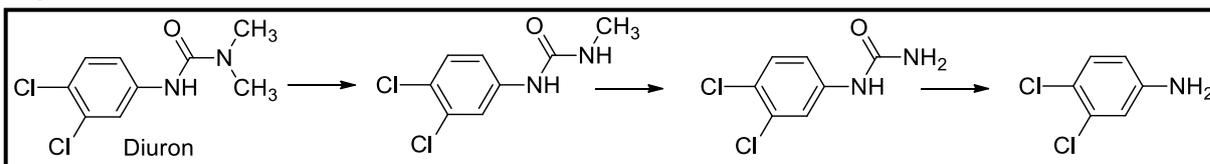
Esquema 2. Biotransformação do curcumenol.



Fonte: ZHANG *et al.*, 2015.

Perissini-Lopes *et al.* (2016) relataram o potencial de bioremediação dos fungos *Aspergillus brasilienses*, *Aspergillus sp.* e *Cunninghamella elegans* sobre o diuron, um herbicida sistêmico presente no solo areno-argiloso (Esquema 3, p. 33).

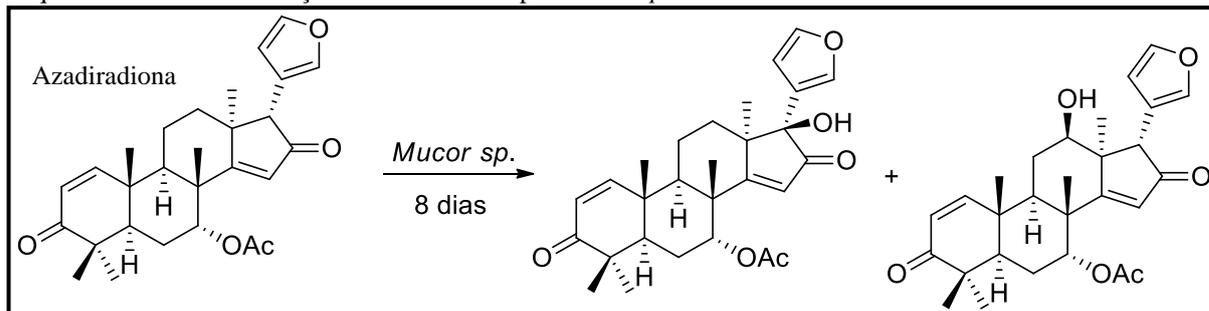
Esquema 3. Degradação do diuron pelos fungos: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus sp.* e *Cunninghamella elegans*.



Fonte: Perissini-Lopes *et al.*, 2016.

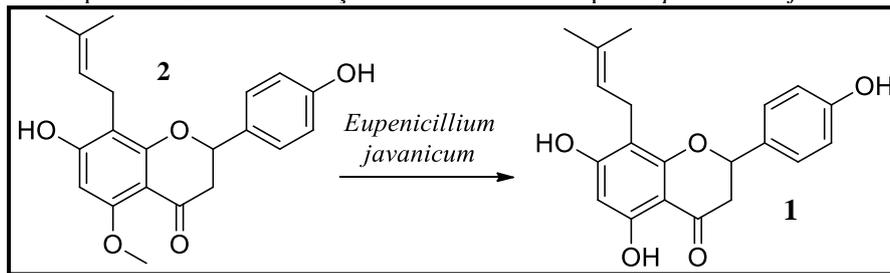
Haldar *et al.* (2013) apresentaram o processo de hidroxilação mediada pelo fungo *Mucor sp* com alta estereo- e regioselectividade. A biohidroxilação foi altamente eficiente e branda o suficiente para manter grupos funcionais quimicamente sensíveis ao redor do esqueleto básico do limonóide. A azadiradiona foi utilizado como substrato no processo de biotransformação com o fungo *Mucor sp*, dando origem a dois produtos hidroxilados (Esquema 4).

Esquema 4. Biotransformação da azadiradiona por *Mucor sp*.

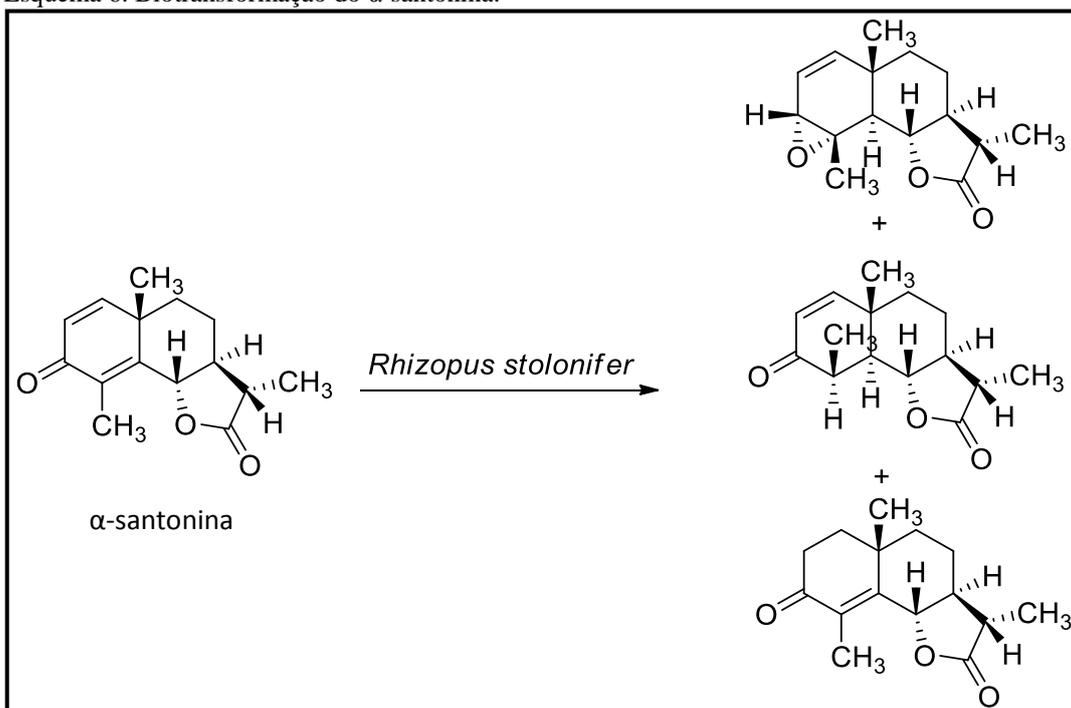


Fonte: Halder *et al.*, 2013.

Fu *et al.* (2011) relataram que o composto 8-prenilnaringenina (**1**) pode ser sintetizado a partir de isoxanto-humol (**2**) por via química, porém algumas dificuldades persistem por se tratar de uma síntese complexa, de elevado custo e por gerar muitos resíduos. Em contrapartida aos métodos químicos, a biotransformação é uma ferramenta útil para produzir compostos biologicamente ativos com vantagens como: alta estereo- e regioselectividade, condições reacionais mais brandas e segurança ambiental. Neste trabalho Fu *et al.* selecionaram o fungo *Eupenicillium javanicum*, o qual foi capaz de produzir o composto **1** a partir do composto **2** (Esquema 5, p. 34).

Esquema 5. Biotransformação do Isoxanto-humol por *Eupenicillium javanicum*.Fonte: Fu *et al.*, 2011.

Os metabolitos obtidos através de biotransformações por microrganismos são semelhantes aos obtidos a partir das biotransformações que ocorrem no organismo dos seres humanos. No estudo de biotransformação do α -santonina (anti-helmíntico) foram produzidos três derivados de redução, os quais estão representados no Esquema 6 (ATA *et al.*, 2004).

Esquema 6. Biotransformação do α -santonina.Fonte: Ata *et al.*, 2004.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Triagem dos fungos endofíticos para uso no estudo de biotransformação do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno

Inicialmente para o estudo de biotransformação do diterpeno clerodano 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxiclerodano-13(16),14-dieno foi realizada uma triagem onde o potencial biocatalítico dos fungos *Albonectria rigidiuscula*, *Botryosphaeria mamane*, *Lasiodiplodia citrícola*, *Lasiodiplodia gonubiensis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum cordaticola*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* foram avaliados. Os extratos obtidos no item 5.10, p.82 foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dos fungos usados na triagem o *Botryosphaeria mamane* e o *Albonectria rigidiuscula* não possuíam enzimas capazes de reagir com o substrato no período de sete dias. Dos demais fungos, selecionou-se o *Lasiodiplodia gonubiensis*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* (Figura 1). Os produtos de biotransformação obtidos foram codificados como P1, P2, P3 e P6, dos quais três deles são inéditos na literatura (P2, P3 e P6).

Figura 1. Culturas fúngicas usadas nos estudos de biotransformação.



Fonte: elaborada pelo autor.

2.4.2 Isolamento de P1, P2, P3 e P6

O potencial enzimático dos fungos *Lasiodiplodia gonubiensis*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* foi testado em estudos de biotransformação fazendo uso do diterpeno clerodano 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxiclerodano-13(16),14-dieno como substrato, resultando na produção dos derivados P1, P2, P3 e P6 (Esquema 7, p. 37). Na biotransformação empregando-se o fungo *Neofusicoccum ribis* houve a formação de P1 (12 mg; 5,9%) e P2 (5,7 mg; 2,7%), isolado por cromatografia em coluna aberta. Em um segundo momento, realizou-se novamente a biotransformação do substrato, obtendo-se os produtos P1 (13,9 mg; 12,9%) e P2 (5,1 mg; 4,9%), sendo o isolamento realizado por cromatografia

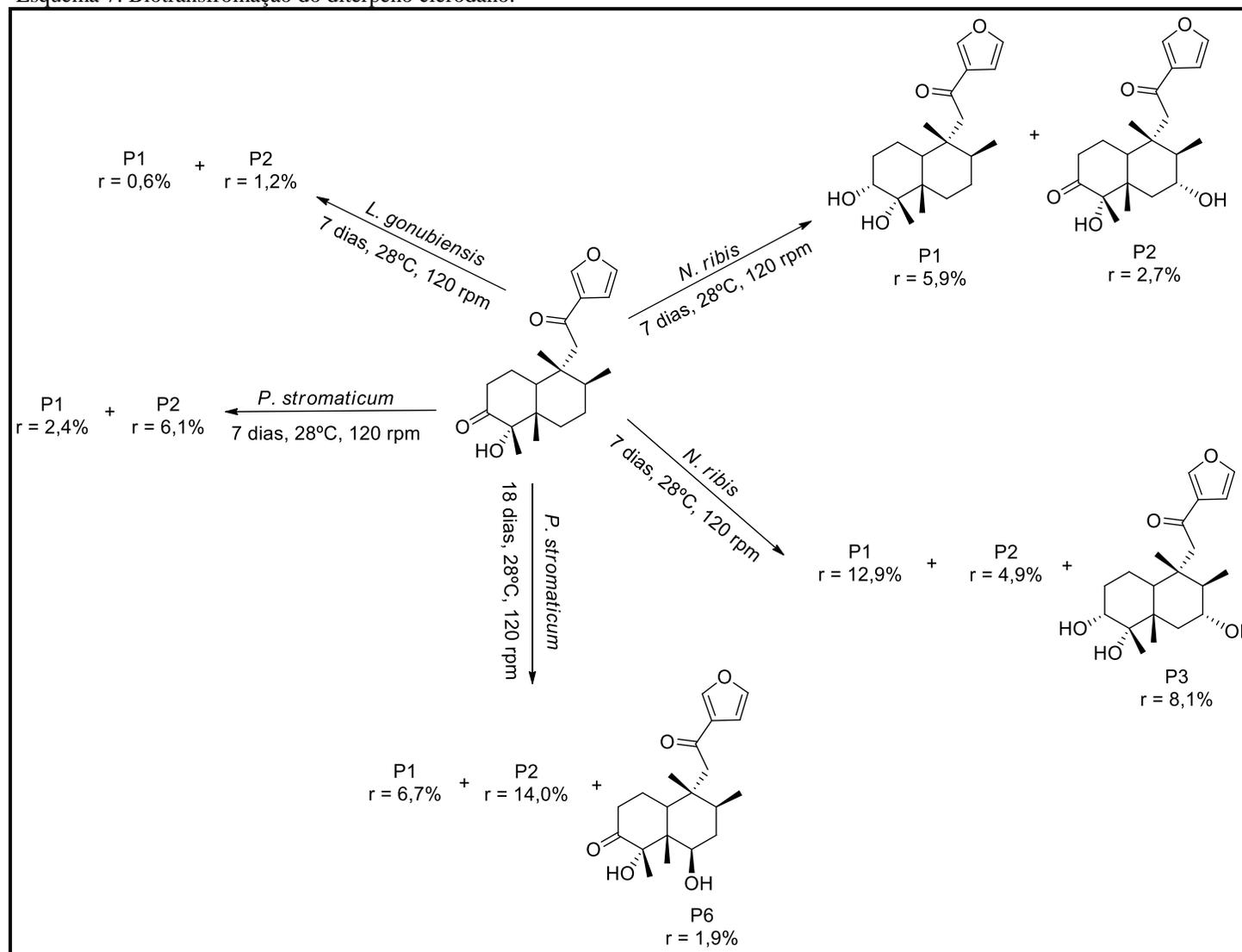
líquida de alta eficiência (CLAE). Neste caso, os rendimentos foram superiores ao primeiro procedimento, além da obtenção do derivado P3 (9,2 mg; 8,1%).

Na biotransformação do substrato com o fungo *Lasiodiplodia gonubiensis*, pode-se observar a formação dos produtos majoritários P1 (1,6 mg; 0,6%) e P2 (4,5 mg; 1,2%). Neste processo os produtos foram isolados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com rendimentos baixos.

Na biotransformação utilizando o fungo *Pseudofusicoccum stromaticum*, obteve-se os produtos P1 (7,2 mg; 2,4%) e P2 (16,9 mg; 6,1%) isolados por CCDP. Com a repetição do procedimento, alterando-se o tempo de biotransformação de 7 dias para 18 dias, foi possível obter os produtos P1 (12,6 mg; 6,7%), P2 (30,4 mg; 14,0%) e um novo produto codificado como P6 (3,7 mg; 1,9%).

Dos produtos obtidos no estudo de biotransformação do diterpeno cleradano 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno, P2, P3 e P6 são inéditos. Com os resultados obtidos pode-se confirmar o potencial biocatalítico dos fungos estudados em funcionalizar carbonos sp^3 , através da inserção de grupos hidroxilas, modificações estas difíceis de se obter por via química.

Esquema 7. Biotransformação do diterpeno clerodano.



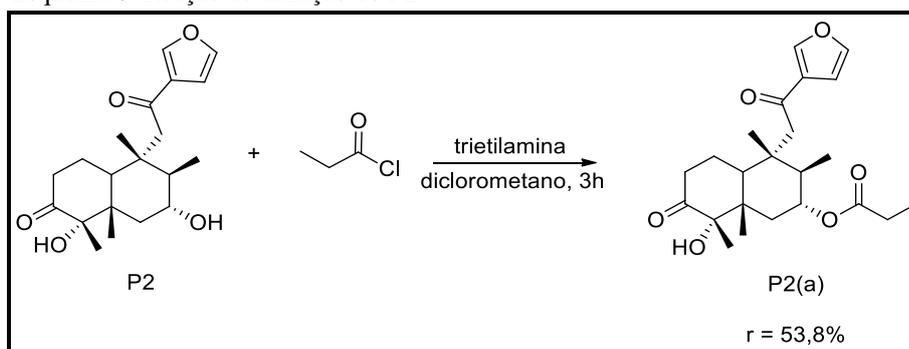
2.4.3 Modificação estrutural do P2

Foi possível obter uma quantidade apreciável (40,6 mg) de massa do referido produto de biotransformação, sendo possível a realização de modificações estruturais no mesmo.

2.4.4 Reação de acilação do P2

A modificação química realizada em P2 (Esquema 8) ocorreu através de uma reação de acilação, utilizando-se como reagente o cloreto de propanoíla. Após 3 horas de reação obteve-se P2(a) com rendimento de 53,8% (item 5.13.1, p. 89).

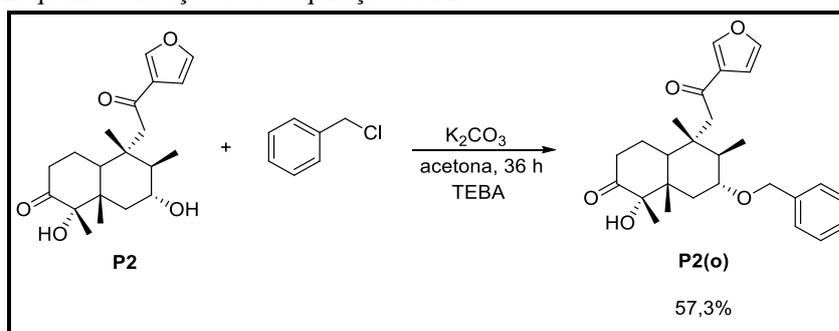
Esquema 8. Reação de acilação do P2.



2.4.5 Reação de O-alkilação do P2

A modificação química realizada em P2 (Esquema 9) ocorreu através de uma reação de O-alkilação, utilizando-se como reagente o cloreto de benzíla. Após 36 horas de reação obteve-se P2(o) com rendimento de 57,3% (item 5.13.2, p. 89).

Esquema 9. Reação de O-alkilação do P2.



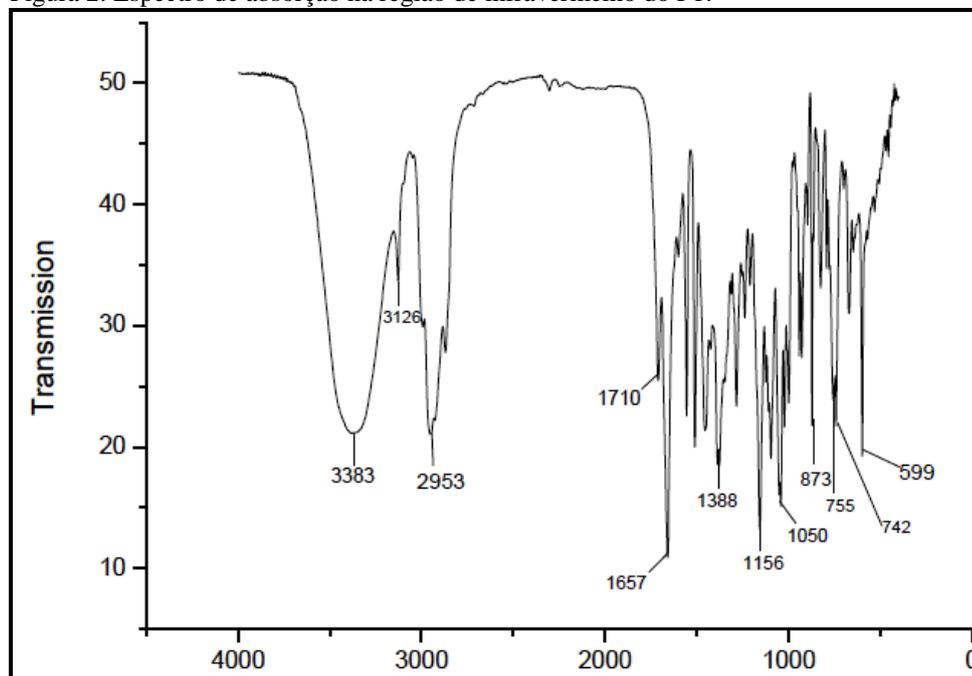
2.4.6 Determinações estruturais dos produtos de biotransformação

2.4.6.1 Determinação estrutural do P1

O derivado P1 apresentou-se como um sólido branco amorfo com rotação específica $[\alpha]_D^{27} = +17,03$ ($c = 0,1$ g/mL, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1) e ponto de fusão de 115,0–119,0 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho de P1 (Figura 2) exibiu uma banda larga de absorção em 3383 cm^{-1} característica de estiramento O-H. Observou-se também bandas fracas de estiramento C-H sp^2 em 3126 cm^{-1} e C-H sp^3 em 2953 cm^{-1} . Este espectro também apresentou uma banda mais intensa referente à carbonila conjugada em 1657 cm^{-1} e uma absorção menos intensa em 1710 cm^{-1} , característica de estiramento C=C, além de um estiramento C-O em 1156 cm^{-1} característico de álcool secundário. Comparação dos espectros de infravermelho de P1 e do substrato revelou o desaparecimento da absorção em 1701 cm^{-1} em P1, referente à carbonila não conjugada do carbono 3 do substrato.

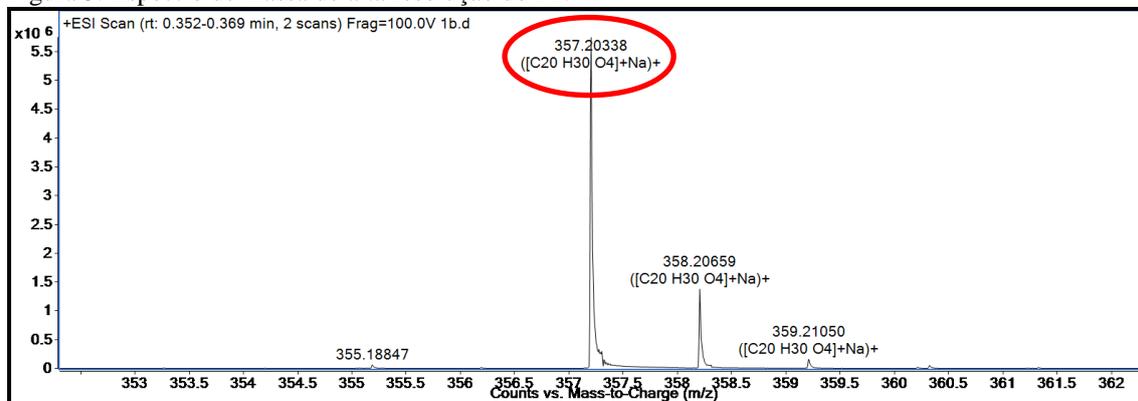
Figura 2. Espectro de absorção na região de infravermelho do P1.



O espectro de massas de alta resolução do P1 (Figura 3, p. 40) exibiu o íon correspondente a molécula como aduto de sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em

357,2034 (calculado: 357,2042, erro: 0,79 ppm), compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}NaO_4$.

Figura 3. Espectro de massa de alta resolução do P1.



O espectro de RMN 1H do P1 (300 MHz, $CDCl_3$; Figura 4, p. 41), quando comparado ao do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno mostrou a presença de um sinal referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado em δ_H 3,79 (dd; 1H; $J=18,0$ e $6,0$ Hz; H-3), o qual não estava presente no espectro do substrato, indicando a ocorrência da biorredução da carbonila em C-3. Os dados de RMN 1H do substrato e P1 estão listados na Tabela 2, p. 44.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, $CDCl_3$) do P1 (Figura 5, p. 42) foram observados 20 linhas espectrais. Neste espectro foram verificados sinais em δ_C 195,3 (C-12) pertencente a uma carbonila conjugada, dois sinais em δ_C 72,6 (C-3) e 79,4 (C-4) relacionados a carbonos oxigenados, além dos sinais em δ_C 146,8 (C-16), 144,4 (C-15), 129,8 (C-13) e 108,9 (C-14) relativos aos carbonos sp^2 do anel furânico. Comparação dos espectros de ^{13}C do substrato e do produto P1 mostrou o sinal em δ_C 72,6 de carbono metínico oxigenado em P1 e a ausência do sinal em δ_C 215,3 da carbonila presente no substrato. Os dados de RMN ^{13}C do substrato e de P1 estão listados na Tabela 2, p. 44.

Análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Figura 6, p. 42) do P1 permitiu confirmar o padrão de hidrogenação dos carbonos de P1. P1 apresentou cinco carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH), cinco metilênicos (CH_2) e quatro sinais para carbonos metílicos (CH_3), conforme Tabela 1, p. 41.

Tabela 1. Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e padrão de hidrogenação dos carbonos do P1.

C	CH	CH ₂	CH ₃
79,4	72,6		
41,9	37,3	21,3	14,8
42,5	42,5	30,3	16,1
	108,9	31,5	16,8
195,3	144,4	26,9	17,6
129,8	146,8	47,4	
5C	6CH	5CH ₂	4CH ₃
Fórmula molecular - C ₂₀ H ₃₀ O ₄			

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC; Figura 7, p. 43) possibilitou a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono como observado na Tabela 2, p. 44.

Através das informações mencionadas acima e comparando-se com os dados de RMN ^1H e ^{13}C descritos na literatura (Tabela 2, p. 44) foi possível identificar o derivado P1 como sendo o diterpeno clerodano (3*R*,4*S*,5*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 8, p. 48), já descrito na literatura (MAFEZOLI *et al.*, 2014).

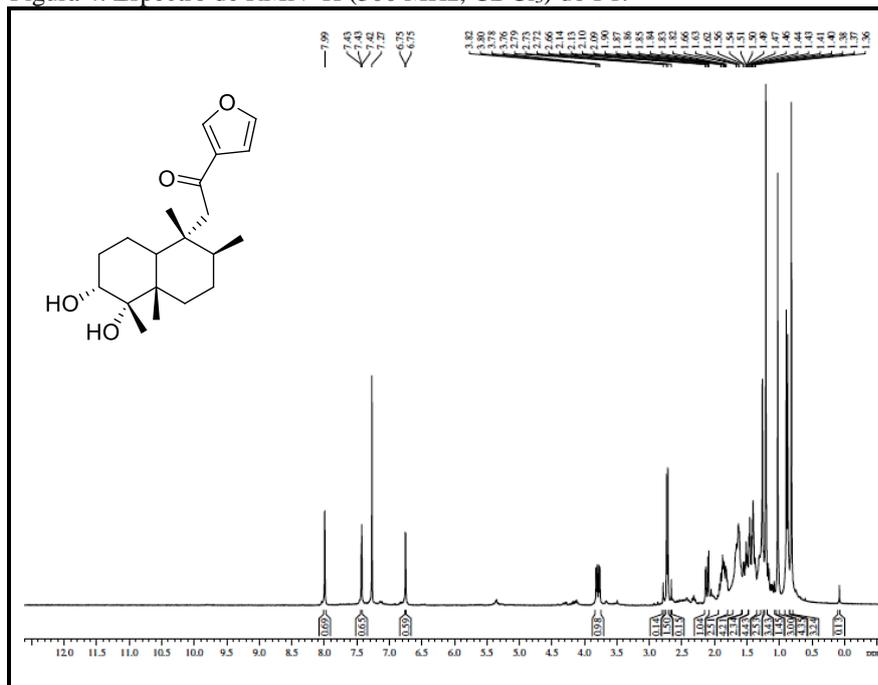
Figura 4. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl₃) do P1.

Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P1.

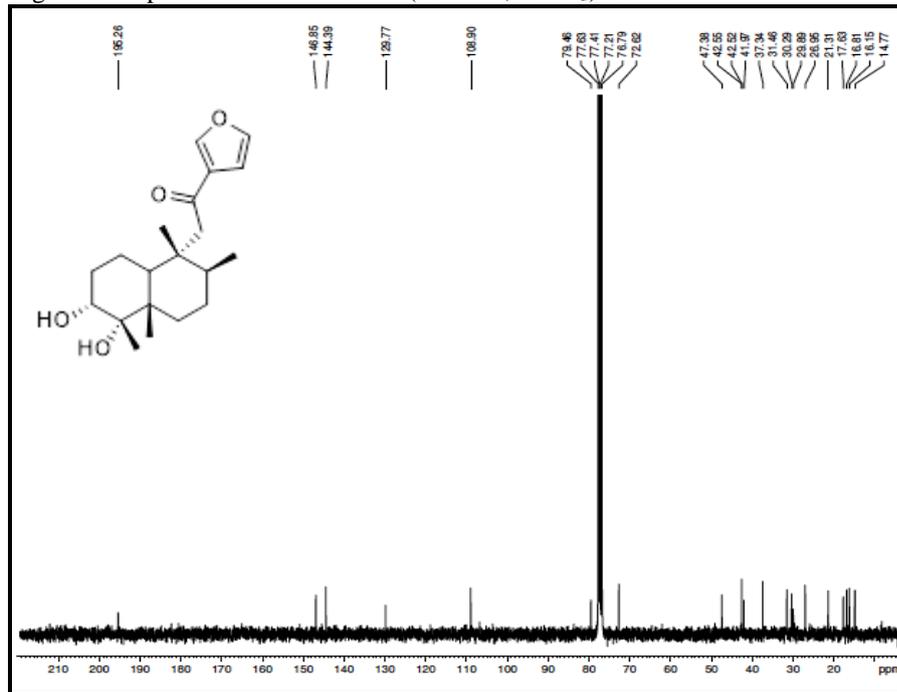


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do P1.

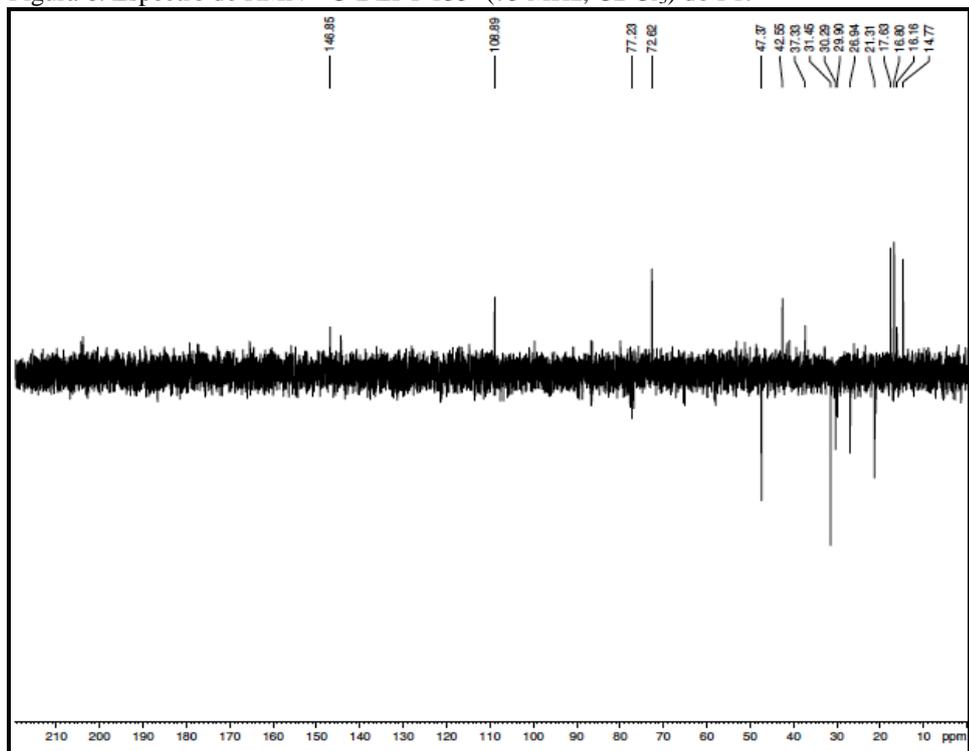


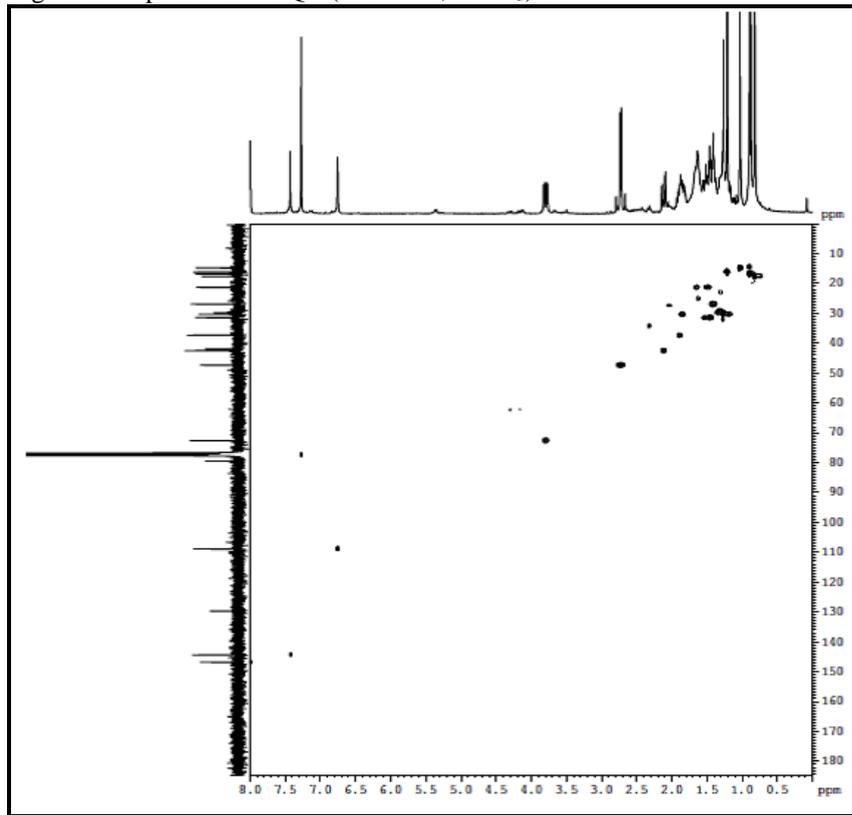
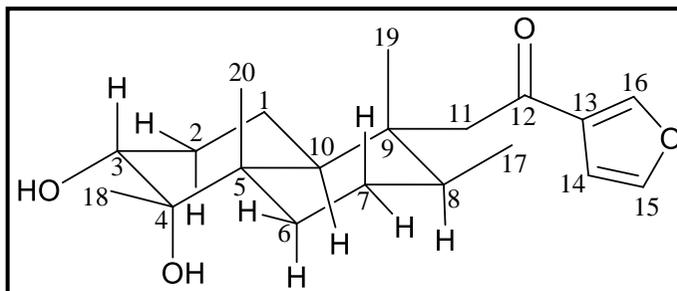
Figura 7. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) do P1.

Tabela 2. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do substrato (500/125 MHz, CDCl_3), do composto P1 (300/75 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4 α -hidroxicleroda-13(16),14-dieno registrado na literatura (Mafezoli, 2014).

3,12-dioxo-15,16-epoxi-4 α -hidroxicleroda-13(16),14-dieno			P1			Literatura		
HSQC			HSQC			Mafezoli, 2014 (CDCl_3)		
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}		
1	23,8	2,00 (m; 1H) 1,72 (qd; $J = 13,1$ e $5,2$ Hz; 1H)	21,3	a. 1,64 (m; 1H) b. 1,45 (m; 1H)	21,1	a. 1,64 (m; 1H) b. 1,46 (m; 1H)		
2	36,1	2,51 (td; $J = 14,0$ e $7,3$ Hz; 1H) 2,38 (ddd; $J = 14,2$; $5,0$ e $1,7$ Hz; 1H)	30,3	1,85 (m; 2H)	30,0	a. 1,83 (m; 1H) b. 1,12 (ddd; $J = 17,4$; $12,1$ e $4,7$ Hz; 1H)		
3	215,3	-	72,6	3,79 (dd; $J = 18,0$ e $6,0$ Hz; 1H)	72,4	3,79 (dd; $J = 12,1$ e $5,0$ Hz; 1H)		
4	81,6	-	79,4	-	79,3	-		
5	45,3	-	41,9	-	41,7	-		
6	31,1	1,63 (td; $J = 13,0$ e $4,1$ Hz; 1H) 1,46 (dt; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz; 1H)	31,5	a. 1,54 (m; 1H) b. 1,43 (m; 1H)	31,2	a. 1,52 (m; 1H) b. 1,40 (m; 1H)		
7	26,8	1,38 (m; 1H) 1,35 (m; 1H)	26,9	1,40 (m; 2H)	26,7	1,40 (m; 2H)		
8	37,4	1,85 (m; 1H)	37,3	1,85 (m; 1H)	37,1	1,88 (m; 1H)		
9	42,0	-	42,5	-	42,3	-		
10	41,6	2,69 (m; 1H)	42,5	2,11 (dd; $J = 15,0$ e $3,0$ Hz; 1H)	42,3	2,12 (dd; $J = 12,6$ e $3,0$ Hz; 1H)		
11	47,2	2,81 (d; $J = 15,9$ Hz; 1H) 2,70 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H)	47,4	a. 2,76 (d; $J = 18,0$ Hz; 1H) b. 2,69 (d; $J = 18,0$ Hz; 1H)	47,1	a. 2,76 (d; $J = 15,8$ Hz; 1H) b. 2,69 (d; $J = 15,8$ Hz; 1H)		
12	195,2	-	195,3	-	195,0	-		

13	129,7	-	129,8	-	129,5	-
14	108,8	6,75 (sl; 1H)	108,9	6,75 (s; 1H)	108,6	6,75 (dd; $J = 1,8$ e $0,8$ Hz; 1H)
15	144,5	7,42 (d; $J = 1,2$ Hz; 1H)	144,4	7,42 (d; $J = 3,0$ Hz; 1H)	144,2	7,43 (dd; $J = 1,8$ e $1,4$ Hz; 1H)
16	147,0	8,02 (sl; 1H)	146,8	7,99 (s; 1H)	146,7	7,99 (dd; $J = 1,4$ e $0,8$ Hz; 1H)
17	16,6	0,88 (d; $J = 6,7$ Hz; 3H)	14,8	1,03 (s; 3H)	14,5	0,88 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H)
18	21,9	1,35 (s; 3H)	16,1	1,21 (s; 3H)	15,9	1,21 (s; 3H)
19	15,0	0,80 (s; 3H)	16,8	0,88 (d; $J = 6,0$ Hz; 3H)	16,6	1,03 (s; 3H)
20	17,7	0,82 (s; 3H)	17,6	0,81 (s; 3H)	17,4	0,81 (s; 3H)

Figura 8. Estrutura química do P1, denominado de (3*R*,4*S*,5*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno.

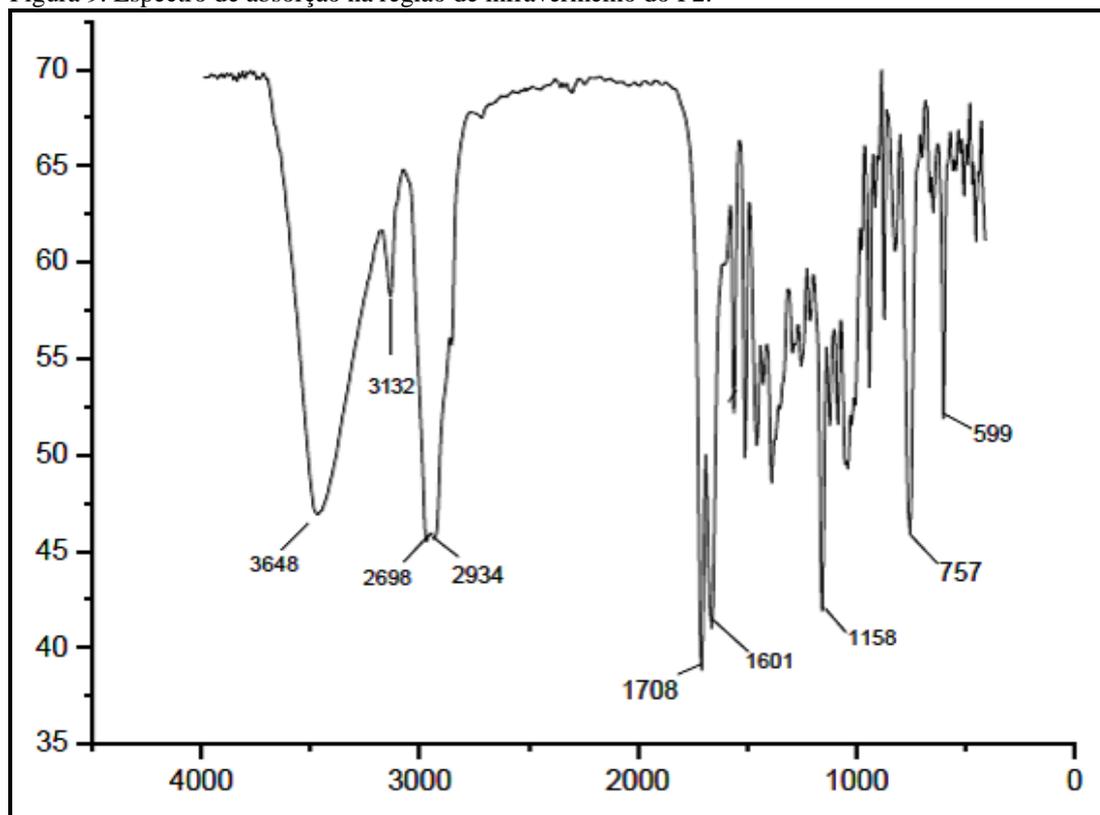


2.4.6.2 Determinação estrutural do P2

O derivado P2 apresentou-se como um sólido amorfo com rotação específica $[\alpha]_D^{27} = -7,86$ ($c = 0,1$ g/mL, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1) e ponto de fusão de 64,5-65,0 °C.

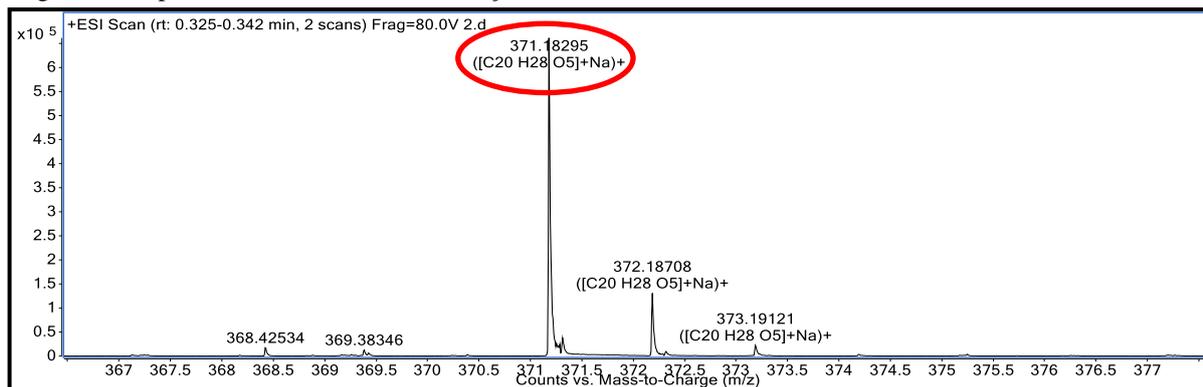
O espectro de absorção na região do infravermelho de P2 (Figura 9) exibiu uma banda larga de absorção em 3648 cm^{-1} relativa a estiramento O-H. Observou-se também uma banda fraca de estiramento C-H sp^2 em 3132 cm^{-1} e bandas mais fortes em 2698 cm^{-1} e 2934 cm^{-1} referentes a estiramento C-H para carbono sp^3 . Este espectro também apresentou bandas de estiramento de ligações C=O em 1708 cm^{-1} e 1601 cm^{-1} , sendo esta última referente à carboníla conjugada, bem como uma absorção intensa de estiramento de ligação C-O em 1158 cm^{-1} característico de álcool secundário.

Figura 9. Espectro de absorção na região de infravermelho do P2.

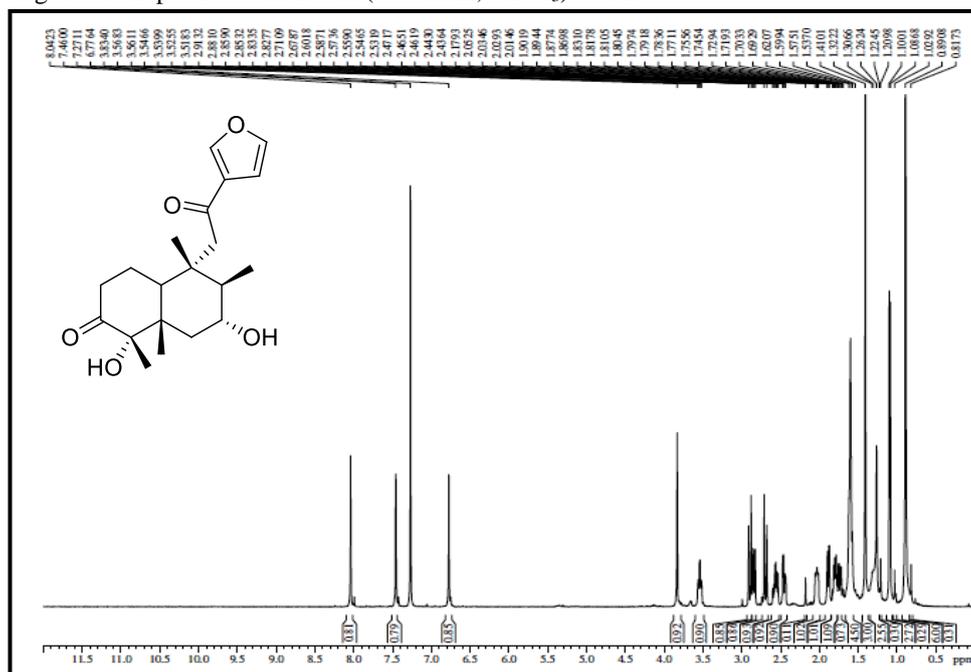


O espectro de massas de alta resolução do P2 (Figura 10, p. 47), exibiu o íon correspondente a molécula como aduto de sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 371,1830 (calculado: 371,1834, erro: 0,65 ppm), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NaO}_5$.

Figura 10. Espectro de massas de alta resolução do P2.

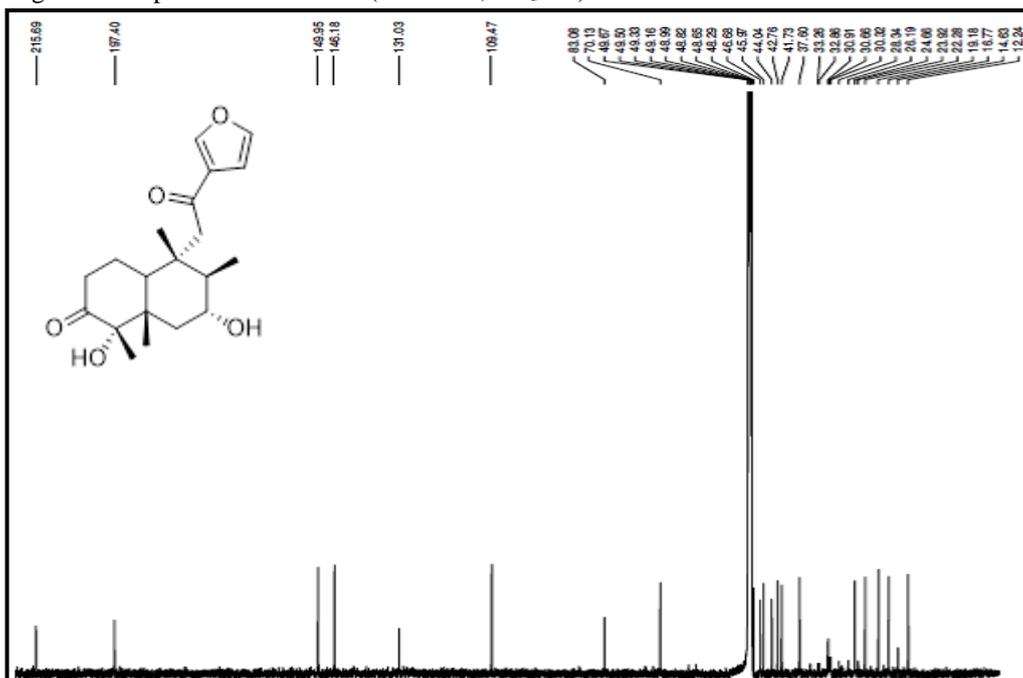


O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do P2 (Figura 11), quando comparado ao do substrato 3,12- dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno apresentou o surgimento do sinal em δ_{H} 3,54 referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado, bem como a ausência dos sinais em δ_{H} 1,30 e 1,35 referentes aos hidrogênios de carbono metilênico.

Figura 11. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do P2.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de P2 (Figura 12, p. 48) apresentou 20 linhas espectrais, destacando-se os sinais em δ_{C} 215,7 e 197,4 referentes a dois grupos carbonílicos de cetonas, sendo o último referente à carbonila conjugada. Esse espectro ainda revelou sinais em δ_{C} 83,0 e 70,1 atribuídos a dois carbonos oxigenados e os sinais em δ_{C} 149,9, 146,1, 131,0 e 109,4 relativos a carbonos sp^2 do anel furânico.

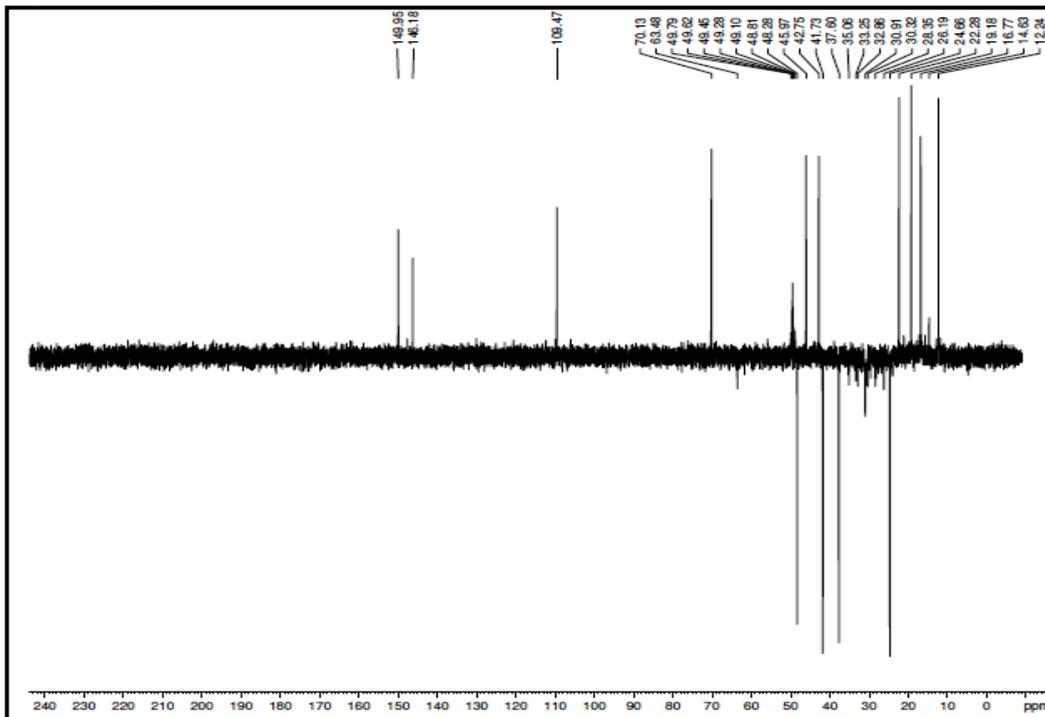
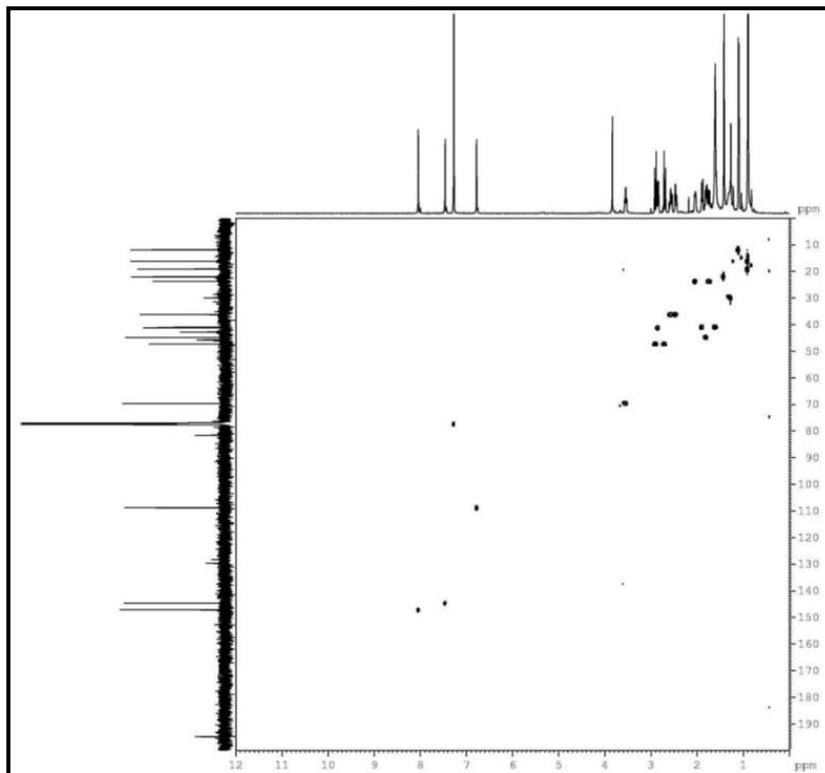
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do P2.



A comparação do espectro de ^{13}C do substrato e do P2 revelou o desaparecimento do sinal em δ_{C} 26,8, característico de carbono metilênico e o surgimento do sinal em δ_{C} 70,1 característico de carbono metínico oxigenado.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Figura 13, p. 49) mostrou a presença de dois carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, três carbonos metínicos e cinco carbonos não-hidrogenados (Tabela 3, p. 54).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Figura 14, p. 49) possibilitou a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, de acordo com a Tabela 3, p. 54.

Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) do P2.Figura 14. Espectro de RMN 2D HSQC (500 MHz, CD_3OD) do P2.

A análise do espectro RMN bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) do P2 (Figura 15, p. 50) mostrou o acoplamento entre os hidrogênios em δ_{H} 3,54(H-7) e 1,59 (H-6b); δ_{H} 1,79 (H-8) e 1,09 (H-17); δ_{H} 1,41 (H-18) e 0,89 (H-19) (Figura 16, p. 50).

Figura 15. Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do P2.

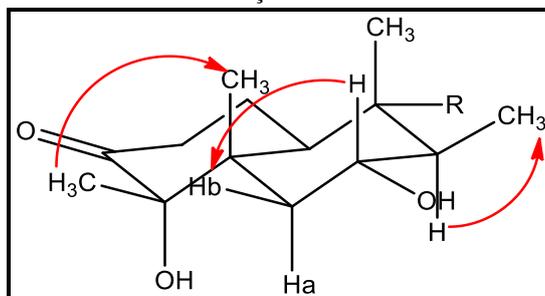
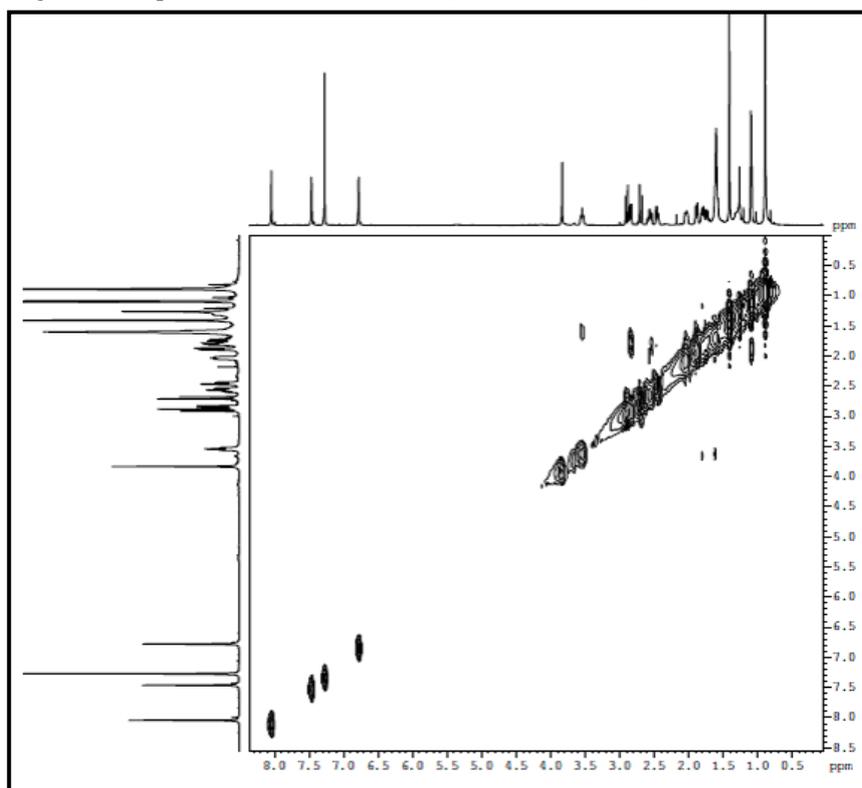


Figura 16. Espectro de RMN 2D COSY (500 MHz, CDCl_3) do P2.



O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$, com detecção no canal do hidrogênio (HMBC; Figura 17, p. 51) evidenciou a correlação à longa distância ($^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$) entre hidrogênios e carbonos (Tabela 3, p. 54) de P2. Pode-se observar as correlações do sinal em δ_{H} 1,59 (H-6b) com o sinal em δ_{C} 70,1 (C-7), do sinal em δ_{H} 0,89 (H-20) com o sinal em δ_{C} 45,9 (C-8); do sinal em δ_{H} 0,89 (H-20)

com o sinal em δ_C 44,0 (C-9); do sinal em δ_H 2,69 (H-11b) com o sinal em δ_C 42,7 (C-10); e do sinal em δ_H 2,69 (H-11b) com o sinal em δ_C 19,2 (C-20), conforme Tabela 3, p. 54 e representadas na Figura 18, p. 51.

Figura 17. Espectro de RMN 2D HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do P2.

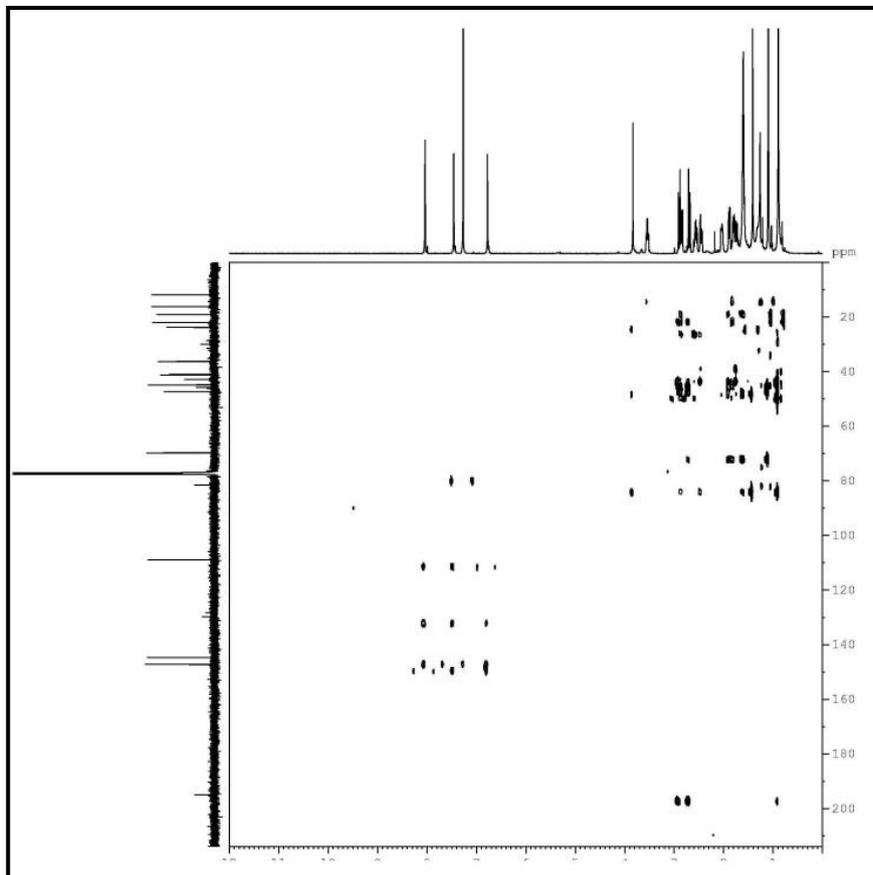
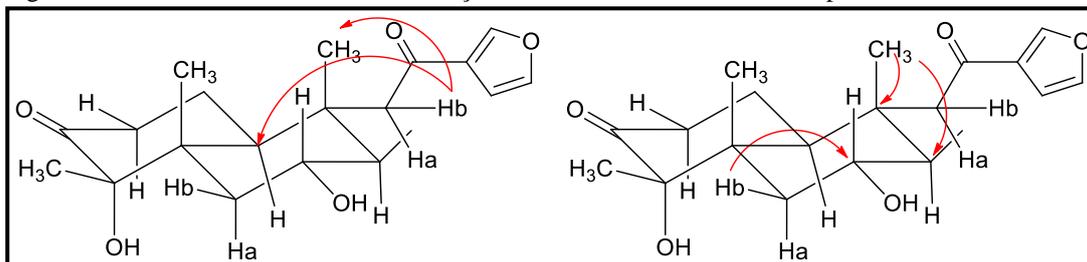


Figura 18. Estruturas mostrando as correlações observadas no RMN HMBC para o P2.



No espectro de RMN bidimensional de 1H , 1H -NOESY (Figura 19, p. 52) corroborou-se a estereoquímica da hidroxila na posição α , devido às correlações dos sinais de hidrogênios em δ_H 3,54 (H-7) com o sinal de hidrogênio em δ_H 0,89 (H-19 e 20) (Figura 20, p. 52).

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para o P2 a estrutura química do (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 21, p. 53), a qual é inédita na literatura.

Figura 19. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do P2.

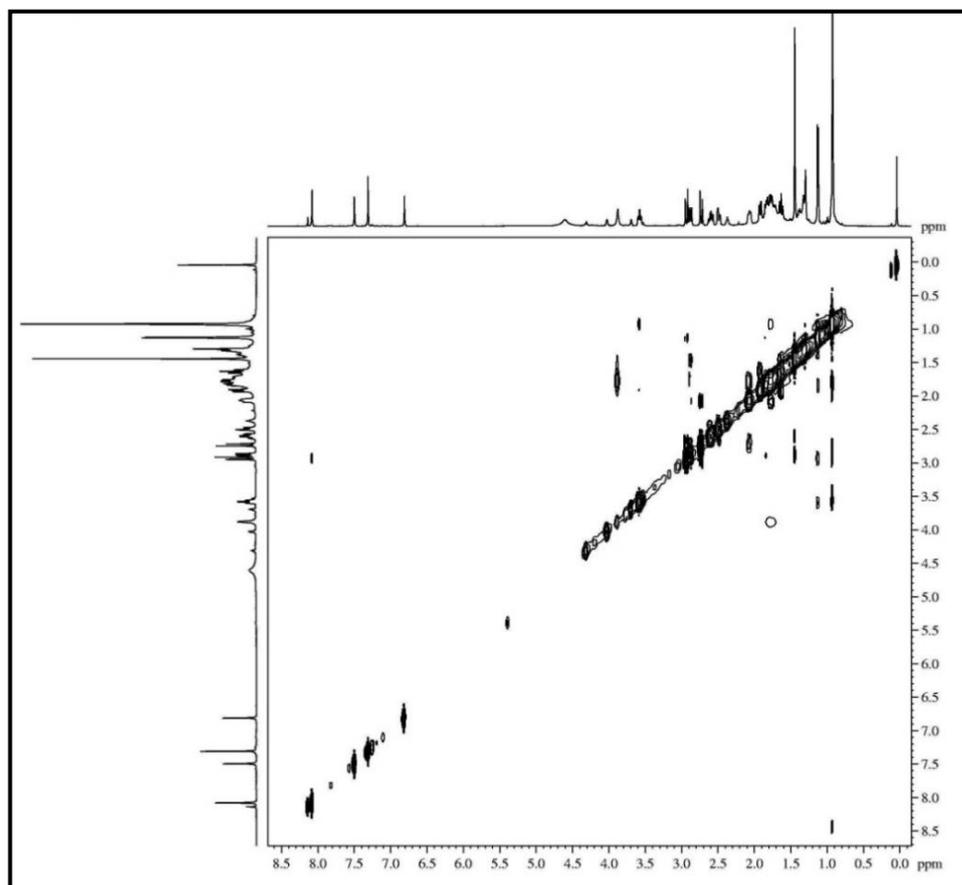


Figura 20. Subestrutura do P2, mostrando as correlações de acordo com o espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY.

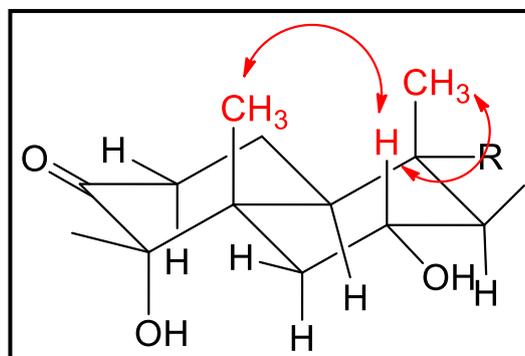


Figura 21. Estrutura química do P2, denominado de (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno.

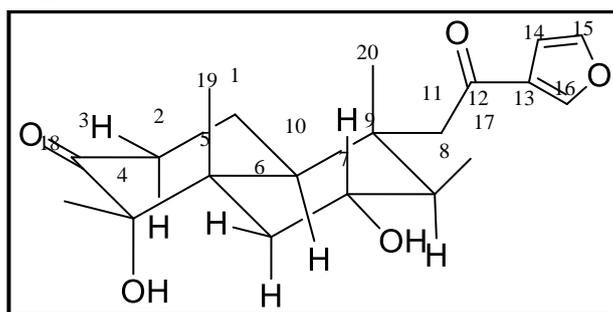


Tabela 3. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do P2, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.

3,12-dioxo-15,16-epoxi-4α-hidroxicleroda-13(16),14-dieno			P2			
HSQC			HSQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	23,8	2,00 (m; 1H) 1,72 (qd; $J = 13,1$ e $5,2$ Hz; 1H)	24,6	a. 2,03 (m; 1H) b. 1,73 (dd; $J = 18,1$ e $5,1$ Hz; 1H)		
2	36,1	2,38 (ddd; $J = 14,2$ e $1,7$ Hz; 1H)	37,6	a. 2,56 (m; 1H) b. 2,45 (dd; $J = 17,6$ e $3,3$ Hz; 1H)		
3	215,3	-	215,7	-		
4	81,6		83,0	-		
5	45,3		46,7	-		
6	31,1	1,63 (td; $J = 13,0$ e $4,1$ Hz; 1H) 1,46 (dt; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz; 1H)	41,7	a. 1,88 (dd; $J = 16,0$ e $3,7$ Hz; 1H) b. 1,59 (m; 1H)		
7	26,8	1,38 (m; 1H) 1,35 (m; 1H)	70,1	3,54 (ddd; $J = 10,0$; $10,9$ e $3,6$ Hz; 1H)	1,59	
8	37,4	1,85 (m; 1H)	45,9	1,79 (m; 1H)		0,89
9	42,0	-	44,0	-	0,89	
10	41,6	2,69 (m; 1H)	42,7	2,84 (dd; $J = 15,6$ e $3,0$ Hz; 1H)		2,69
11	47,2	2,81 (d; $J = 15,9$ Hz; 1H) 2,70 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H)	48,3	a. 2,89 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H) b. 2,69 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H)		
12	195,2	-	197,4	-		
13	129,7	-	131,0	-		
14	108,8	6,75 (sl; 1H)	109,4	6,77 (s; 1H)		
15	144,5	7,42 (d; $J = 1,2$; 1H)	146,1	7,46 (s; 1H)		
16	147,0	8,02 (sl; 1H)	149,9	8,04 (s; 1H)		

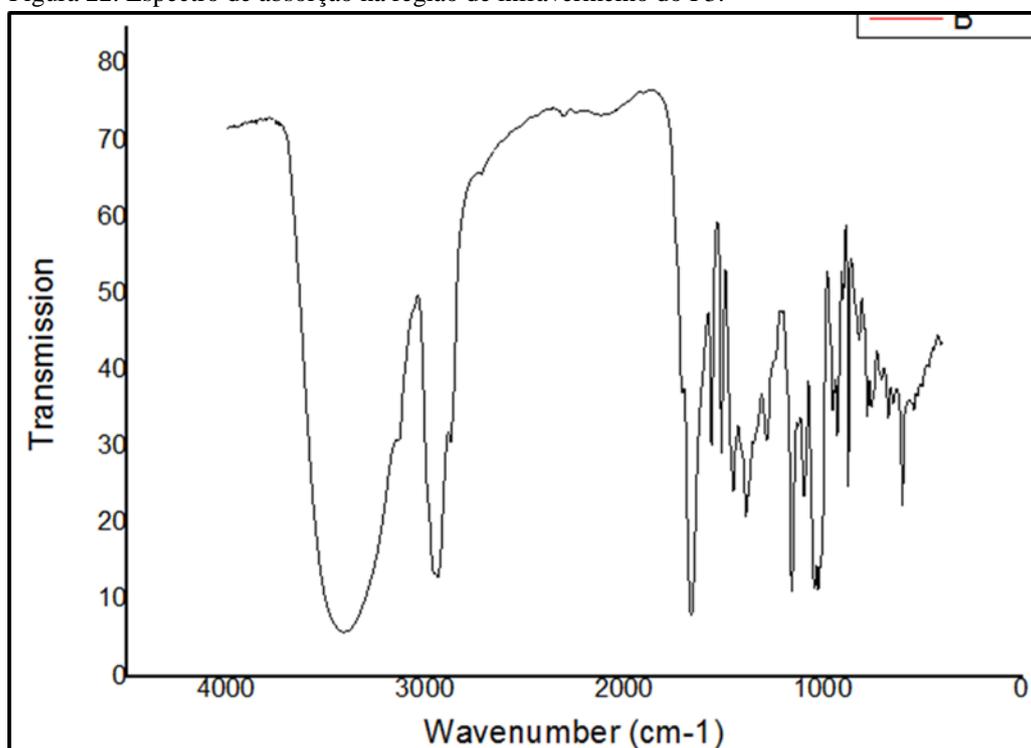
17	16,6	0,88 (d; $J = 6,7$; 3H)	12,2	1,09 (d; $J = 6,6$ Hz; 3H)		
18	21,9	1,35 (s; 3H)	22,2	1,41 (s; 3H)		
19	15,0	0,80 (s; 3H)	16,7	0,89 (s; 3H)		
20	17,7	0,82 (s; 3H)	19,2	0,89 (s; 3H)		2,69

2.4.6.3 Determinação estrutural do P3

O derivado P3 apresentou-se como um sólido amorfo e com rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = +12,80$ ($c = 0,1$ g/mL, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1).

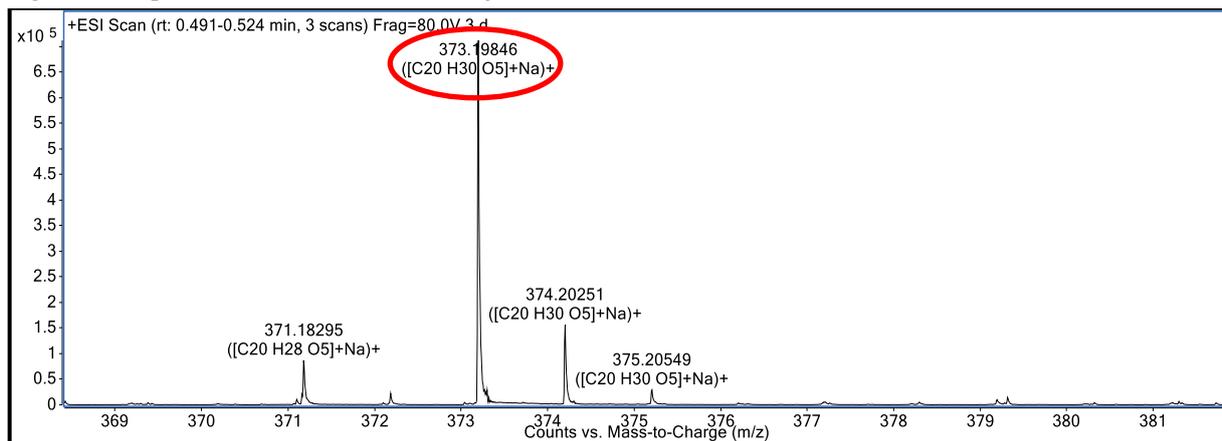
O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de P3 (Figura 22) exibiu bandas de absorções em 3430 cm^{-1} indicativo de estiramento O-H, em 2980 cm^{-1} referente a estiramento C-H sp^3 e em 1570 cm^{-1} típico de estiramento C=C em anél aromático.

Figura 22. Espectro de absorção na região de infravermelho do P3.



O espectro de massas de alta resolução de P3 (Figura 23, p. 57) exibiu o íon correspondente a molécula como aduto de sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 373,1985 (calculado: 373,1985 erro: 0,15 ppm), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_5$.

Figura 23. Espectro de massas de alta resolução do P3.



O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H) [300 MHz, CDCl_3] (Figura 24, p. 58), mostrou sinais em δ_{H} 3,77 (dd; 1H; $J = 12,0$ e 4,9 Hz; H-3) e δ_{H} 3,54 (ddd; 1H; $J = 10,9$; 10,6 e 3,8 Hz; H-7) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos oxigenados, os sinais em δ_{H} 1,79 (m; 1H; H-8); δ_{H} 2,18 (dd; 1H; $J = 12,1$ e 2,8 Hz; H-10); δ_{H} 6,73 (s; 1H; H-14); δ_{H} 7,40 (s; 1H; H-15) e δ_{H} 8,00 (s; 1H; H-16) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos (CH), sendo os três últimos sinais referentes a hidrogênios do anel furano. Observou-se também sinais em δ_{H} 1,45 (m, 2H; H-1); δ_{H} 1,88 (dd; $J = 12,0$ e 3,7 Hz; 1H; H-2); δ_{H} 1,44 (m; 1H; H-2); δ_{H} 1,85 (dd; $J = 12,0$ e 3,7 Hz; 1H; H-6a); δ_{H} 1,38 (dl; $J = 13,0$ Hz; 1H; H-6b); δ_{H} 2,98 (s; 1H; H-11a) e 2,73 (s; 1H; H-11b) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos (CH_2). O espectro exibiu ainda sinais em δ_{H} 1,06 (d; 3H; $J = 6,8$; H-17); δ_{H} 1,14 (s; 3H; H-18); δ_{H} 1,03 (s; 3H; H-19) e δ_{H} 0,85 (s; 3H; H-20) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metílicos (CH_3). A comparação dos espectros de RMN ^1H do substrato e P3 revelou o desaparecimento dos sinais em δ_{H} 1,35 e 1,38 e o surgimento dos sinais em δ_{H} 3,77 e δ_{H} 3,54 para P3 (Tabela 4, p. 64).

Com base nos dados obtidos para o espectro de RMN ^1H foi possível determinar a estereoquímica do C-3 baseada nas constantes de acoplamento do sinal em δ_{H} 3,77 (dd, $J = 12,0$ e 4,8 Hz), confirmando a orientação α do hidrogênio em C-3 de acordo com os acoplamentos axial-axial entre H3 e H2'' e axial-equatorial entre H3 e H2' (Figura 25, p. 58).

Também foi possível determinar a estereoquímica do C-7 baseado nas constantes de acoplamento do sinal em δ_{H} 3,54 (ddd, $J = 10,9$; 10,6 e 3,8 Hz). Confirmou-se a orientação α do hidrogênio em C-7 de acordo com os acoplamentos

axial-axial para H7–H8, axial-axial para H7–H6'' e axial-equatorial para H7–H6' (Figura 26, p. 59).

Figura 24. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P3.

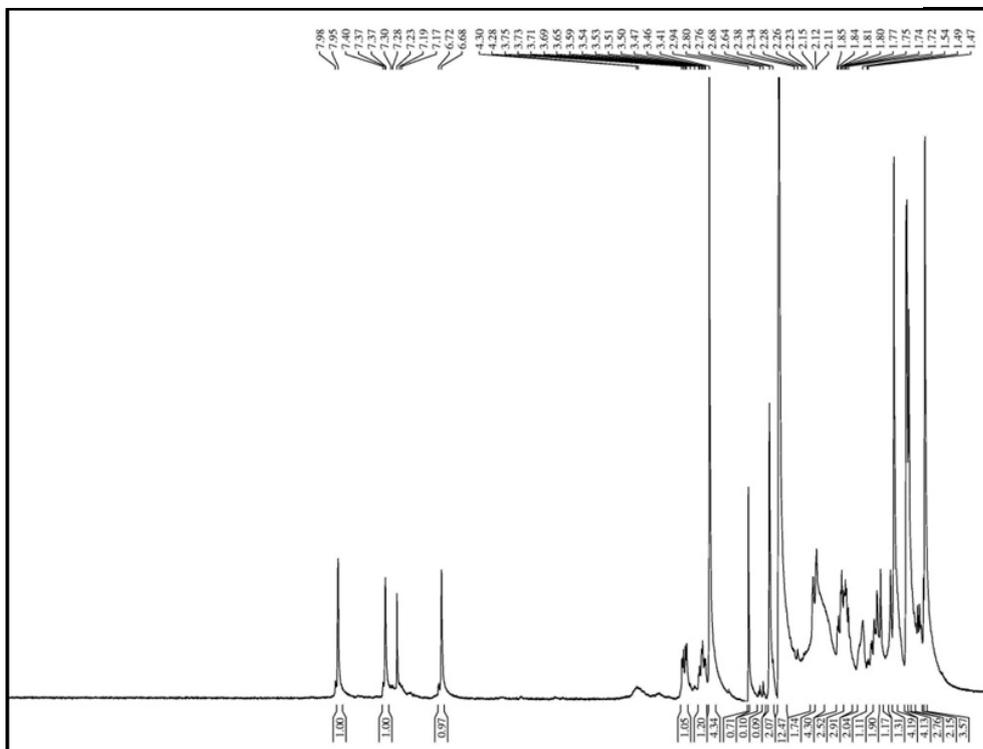


Figura 25. Determinação da estereoquímica da hidroxila do C-3.

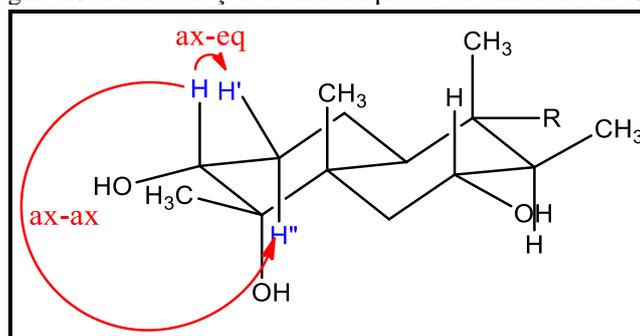
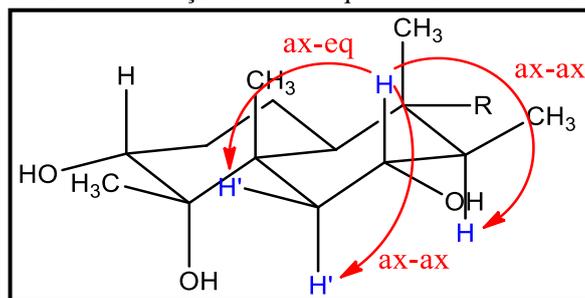


Figura 26. Determinação da estereoquímica da hidroxila do C-7.



O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 27, p. 60) revelou sinais correspondentes a 20 átomos de carbono. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 28, p. 60) com o espectro de RMN ^{13}C -BB possibilitou determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, confirmando a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), sendo um carbono de carbonila em δ_{C} 194,8 e outro carbono do anel furano em δ_{C} 129,6; sete carbonos metínicos (CH), sendo dois carbonos oxigenados em δ_{C} 72,2 e 70,0 e três carbonos do anel furano em δ_{C} 108,8; 144,5 e 146,9; quatro carbonos metilênicos (CH_2) e cinco sinais para carbonos metílicos (CH_3). A comparação dos espectros de RMN ^{13}C do substrato e P3 revelou o desaparecimento dos sinais em δ_{C} 215,3 e 26,8 característicos de carbono carbonílico e carbono metilênico, respectivamente; e o surgimento dos sinais em δ_{C} 72,2 e 70,0 característicos de carbonos oxigenados. Os dados de RMN ^{13}C de P3 estão sumariados na Tabela 4, p. 64.

O espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C - HSQC (Figura 29, p. 61) permitiu relacionar todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos sinais de carbonos inequivocamente, como observado na Tabela 4, p. 64.

A análise do espectro RMN bidimensional de ligação homonuclear (^1H , ^1H -COSY) de P3 (Figura 30, p. 61) evidenciou o acoplamento entre os hidrogênios em δ_{H} 3,77 (H-3) e 1,14 (H-18); δ_{H} 2,18 (H-10) e 1,45 (H-1); δ_{H} 2,18 (H-10) e 1,44 (H-2b); δ_{H} 3,77 (H-3) e 1,85 (H-6a); δ_{H} 3,54 (H-7) e 1,79 (H-8); δ_{H} 1,14 (H-18) e 1,79 (H-8), e do δ_{H} 1,85 (H-6a) e 1,44 (H-2b). Algumas correlações estão representadas na Figura 31, p. 62.

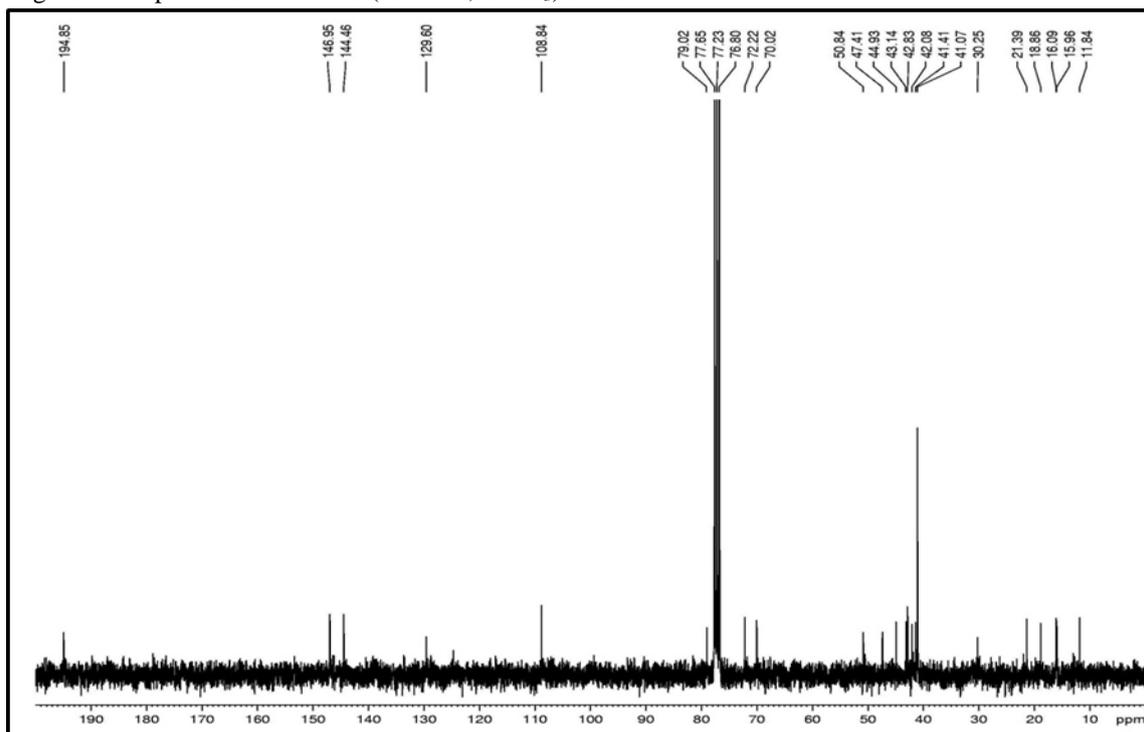
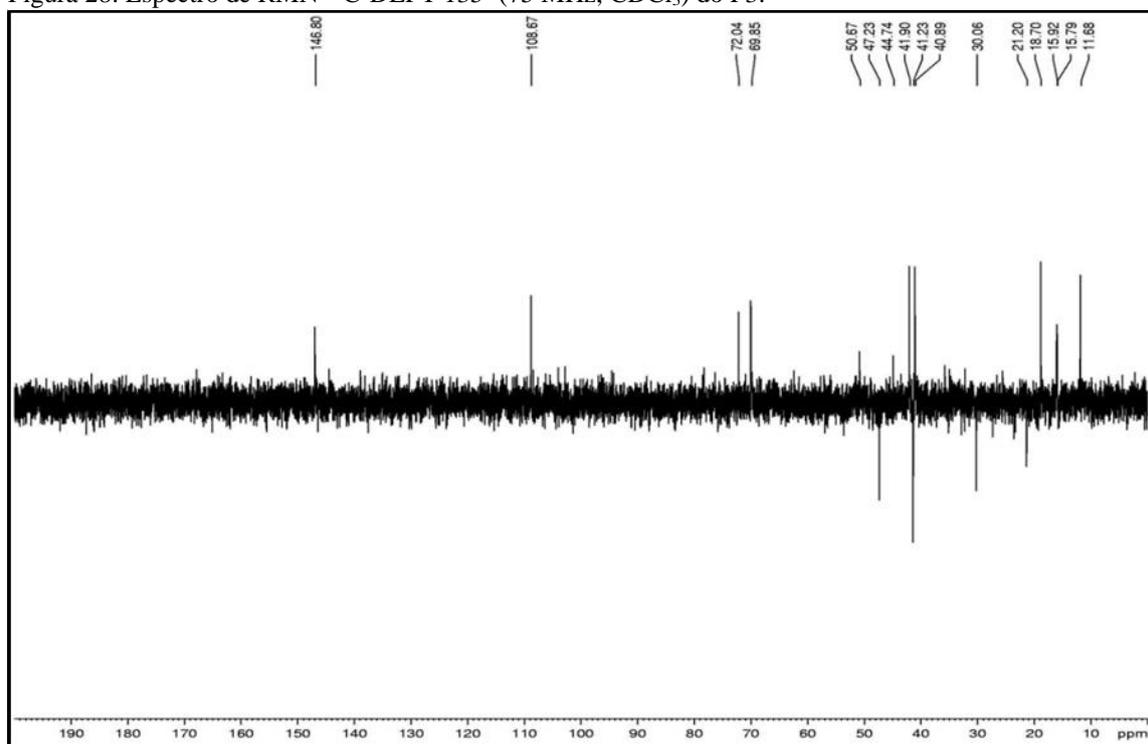
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do P3.Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do P3.

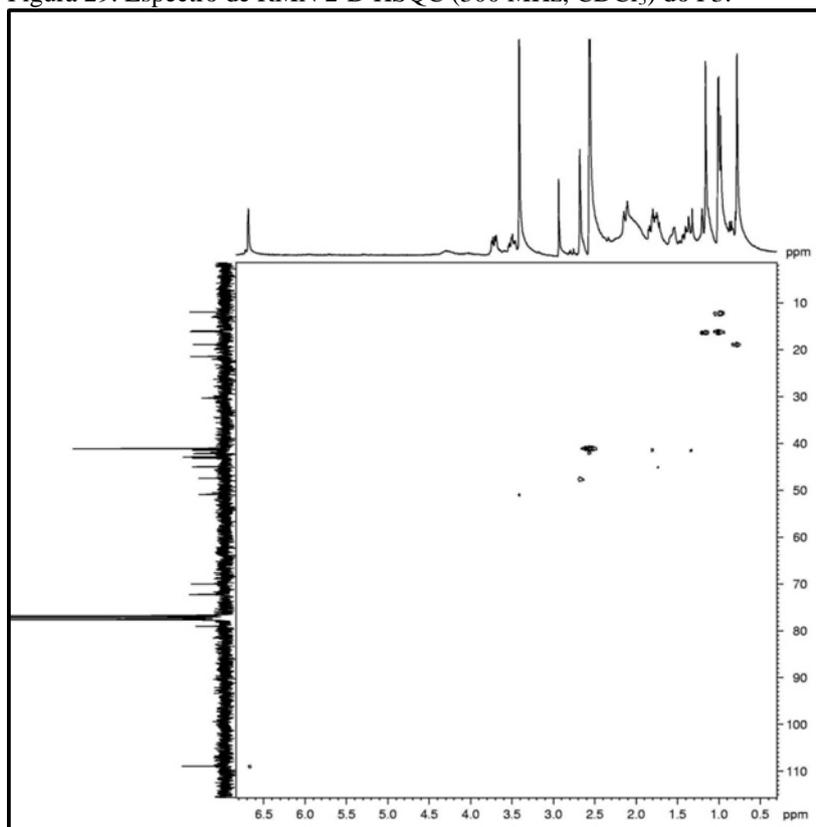
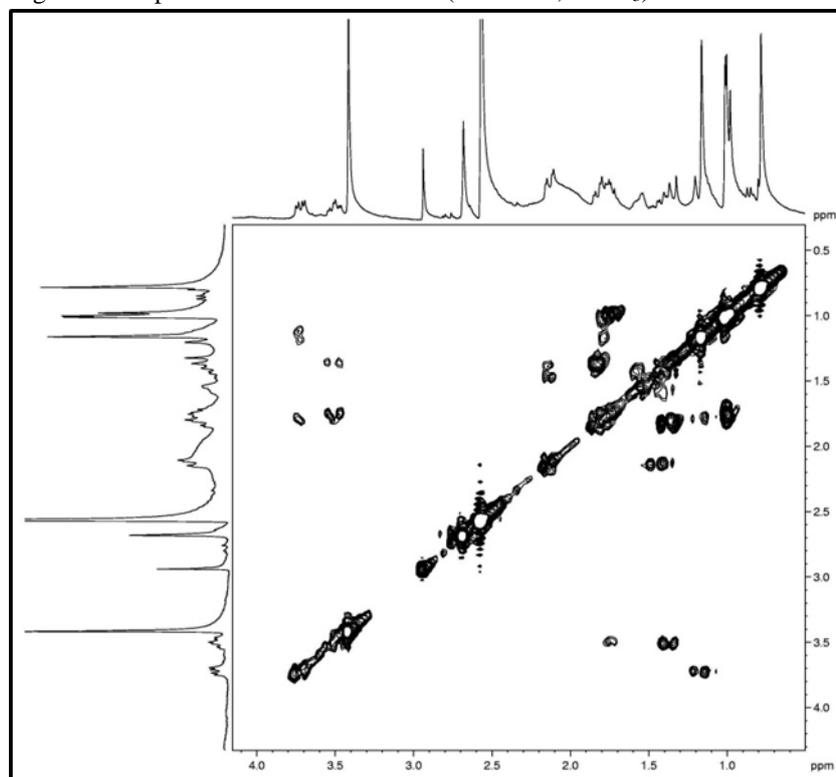
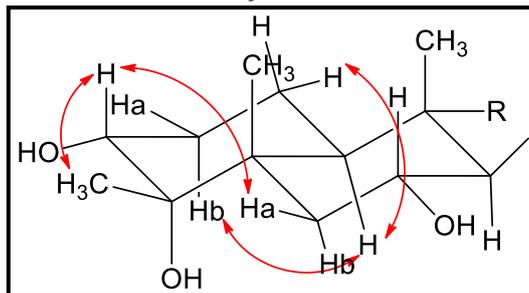
Figura 29. Espectro de RMN 2-D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do P3.Figura 30. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do P3.

Figura 31. Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY do P3.



O espectro de HMBC de P3 (Figura 33, p. 63) evidenciou as correlações à longa distância ($^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$) entre hidrogênios e carbonos (Tabela 4, p. 64). Pode-se observar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 0,85 (H-20) com o carbono em δ_{C} 47,4 (C-11); do hidrogênio em δ_{H} 1,14 (H-18) com o carbono em δ_{C} 72,2 (C-3); do hidrogênio em δ_{H} 1,14 (H-18) com o carbono em δ_{C} 79,0 (C-4); do hidrogênio em δ_{H} 1,14 (H-18) com o carbono em δ_{C} 43,1 (C-5); do hidrogênio em δ_{H} 1,06 (H-17) com o carbono em δ_{C} 44,9 (C-8); do hidrogênio em δ_{H} 2,73 (H-11b) com o carbono em δ_{C} 45,0 (C-8); do hidrogênio em δ_{H} 0,85 (H-20) com o carbono em δ_{C} 42,8 (C-9) e por último do hidrogênio em δ_{H} 1,03 (H-19) com o carbono em δ_{C} 42,0 (C-10) (Figura 32).

A análise dos dados espectrométricos permitiu confirmar para P3 a estrutura química do (3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-3,4,7-trihidroxí-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 34, p. 63), a qual é inédita na literatura.

Figura 32. Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC para o P3.

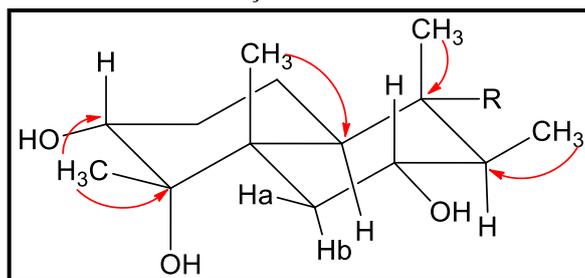


Figura 33. Espectro de RMN 2-D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do P3.

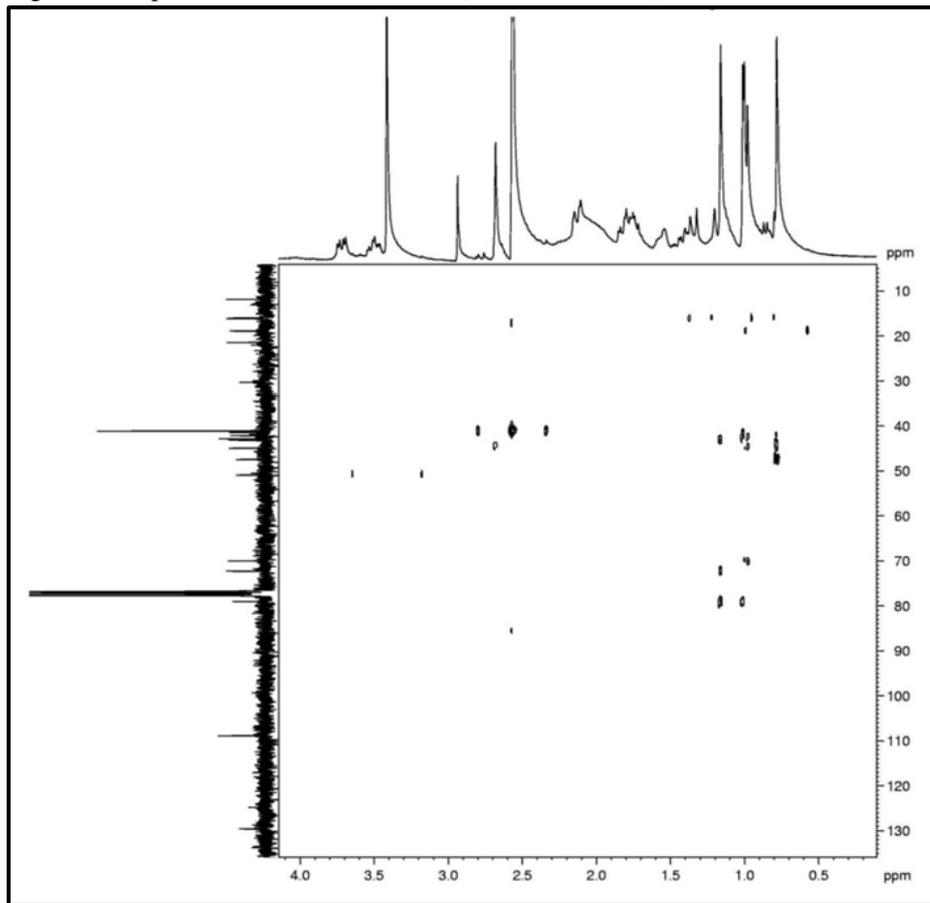


Figura 34. Estrutura química do P3, denominada (3*R*,4*S*,5*S*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-3,4,7-trihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno.

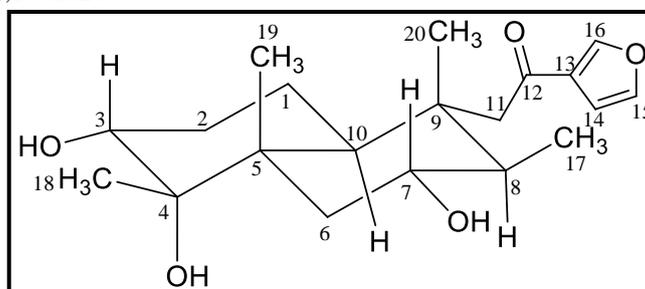


Tabela 4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P3, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.

3,12-dioxo-15,16-epoxi-4 α -hidroxicleroda-13(16),14-dieno			P3			
HSQC			HSQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	23,8	2,00 (m; 1H) 1,72 (qd; $J = 13,1$ e $5,2$ Hz; 1H)	21,4	1,45 (m; 2H)		
2	36,1	2,38 (ddd; $J = 14,2$ e $1,7$ Hz; 1H)	30,2	a. 1,88 (m; 1H) b. 1,44 (m; 1H)		
3	215,3	-	72,2	3,77 (dd; $J = 12,0$ e $4,8$ Hz; 1H)		1,14
4	81,6		79,0	-	1,14	
5	45,3		43,1	-		1,14
6	31,1	1,63 (td; $J = 13,0$ e $4,1$ Hz; 1H) 1,46 (dt; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz; 1H)	41,4	a. 1,85 (dd; $J = 12,0$ e $3,7$ Hz; 1H) b. 1,38 (dl; $J = 13,0$ Hz; 1H)		
7	26,8	1,38 (m; 1H) 1,35 (m; 1H)	70,0	3,54 (ddd; $J = 10,9$; $10,6$ e $3,8$ Hz; 1H)		
8	37,4	1,85 (m; 1H)	44,9	1,79 (m; 1H)	1,06	2,73
9	42,0	-	42,8	-	0,85	
10	41,6	2,69 (m; 1H)	42,0	2,18 (dd; $J = 12,3$ e $3,0$ Hz; 1H)		1,03
11	47,2	2,81 (d; $J = 15,9$ Hz; 1H) 2,70 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H)	47,4	a. 2,98 (s; 1H) b. 2,73 (s; 1H)		
12	195,2	-	194,8	-		0,85
13	129,7	-	129,6	-		
14	108,8	6,75 (sl; 1H)	108,8	6,73 (s; 1H)		
15	144,5	7,42 (d; $J = 1,2$; 1H)	144,5	7,40 (s; 1H)		
16	147,0	8,02 (sl; 1H)	147,0	8,00 (s; 1H)		
17	16,6	0,88 (d; $J = 6,7$; 3H)	11,8	1,06 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H)		
18	21,9	1,35 (s; 3H)	16,0	1,14 (s; 3H)		

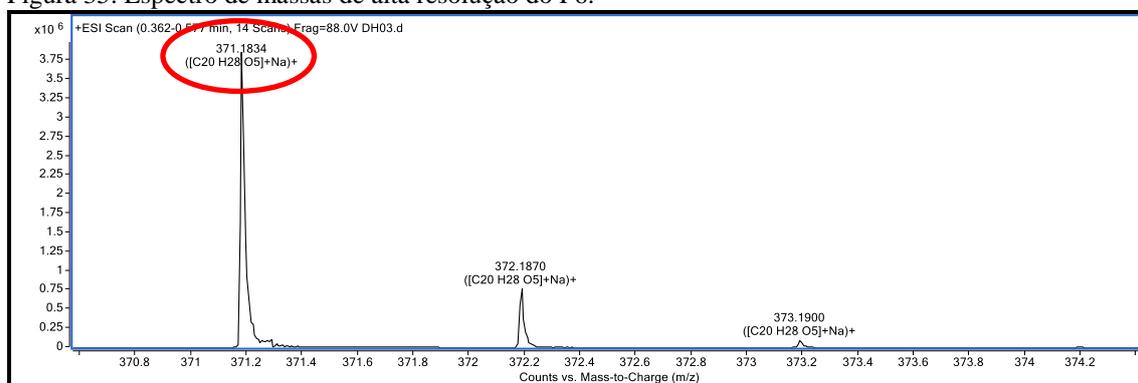
19	15,0	0,80 (s; 3H)	16,1	1,03 (s; 3H)		
20	17,7	0,82 (s; 3H)	18,8	0,85 (s; 3H)		

2.4.6.4 Determinação estrutural do P6

O derivado P6 apresentou-se como um sólido amorfo com rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = -57,13$ ($c = 0,1$ g/mL, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1).

O espectro de massas de alta resolução de P6 (Figura 35) exibiu o íon correspondente a molécula como aduto de sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 371,1834 (calculado: 371,1834, erro: 1,6 ppm), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NaO}_5$.

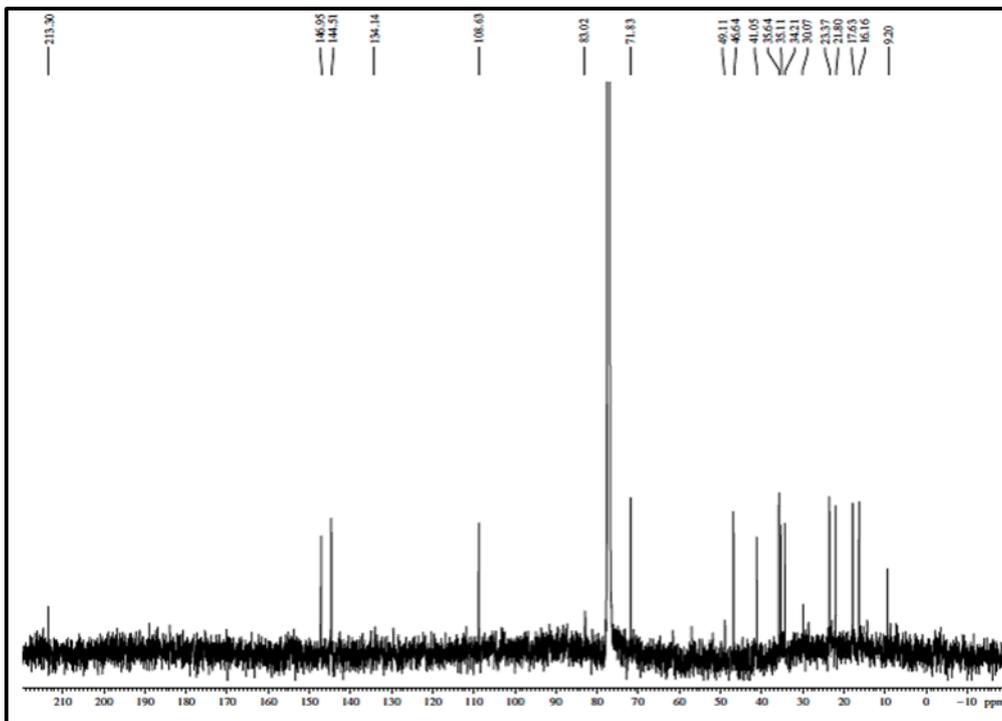
Figura 35. Espectro de massas de alta resolução do P6.



O espectro de RMN ^1H de P6 (500 MHz, CDCl_3 ; Figura 36, p. 67) mostrou um sinal em δ_{H} 4,08 (dd; 1H; $J = 11,3$ e $4,1$ Hz; H-6) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado, os sinais em δ_{H} 2,03 (m; 1H; H-8); δ_{H} 2,80 (dd; 1H; $J = 13,2$ e $3,0$ Hz; H-10); δ_{H} 6,77 (s; 1H; H-14); δ_{H} 7,46 (s; 1H; H-15) e δ_{H} 8,03 (s; 1H; H-16) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos (CH), sendo os três últimos sinais referentes a hidrogênios do anel furano. Observou-se também sinais em δ_{H} 1,85 (dd, 1H; $J = 12,9$ e $4,4$ Hz; H-1a); δ_{H} 2,03 (m; 1H; H-1b); δ_{H} 2,55 (ddl; 1H; $J = 13,8$ e $7,4$ Hz; H-2a); δ_{H} 2,46 (ddl; 1H; $J = 14,3$ e $3,6$ Hz; H-2b); δ_{H} 1,60 (dl; 1H; $J = 13,4$ Hz; H-7a); 1,48 (m; 1H; H-7b); 2,85 (d; 1H; $J = 16,3$ Hz; H-11a) e 2,68 (d; 1H; $J = 16,3$ Hz; H-11b) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos (CH_2). O espectro exibiu ainda sinais em δ_{H} 0,93 (d; 3H; $J = 6,8$; H-17); δ_{H} 1,52 (s; 3H; H-18), δ_{H} 0,86 (s; 3H; H-19) e 0,85 (s; 3H; H-20) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metílicos (CH_3). A comparação dos espectros de RMN ^1H do substrato e de P6 revelou o desaparecimento dos sinais em δ_{H} 1,63 e 1,46 e o surgimento do sinal em δ_{H} 4,08 (Tabela 5, p. 72).

quatro carbonos metilênicos (CH_2) e quatro sinais para carbonos metílicos (CH_3). A comparação dos espectros de RMN ^{13}C do substrato e P6 mostrou o desaparecimento do sinal em δ_{C} 31,1 característicos de carbono metilênico e o surgimento do sinal em δ_{C} 71,9 característico de carbono oxigenado.

Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do P6.



O espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C - HSQC de P6 (Figura 39, p. 69) permitiu relacionar todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos sinais de carbonos inequivocamente, como observado na Tabela 5, p. 72.

A análise do espectro ^1H , ^1H -COSY de P6 (Figura 40, p. 69) evidenciou os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 4,08 (H-6) e 1,48 (H-7b); δ_{H} 4,08 (H-6) e 1,60 (H-7a) e por fim δ_{H} 2,80 (H-10) e 1,85 (H-1a). As correlações estão representadas na Figura 41, p. 70.

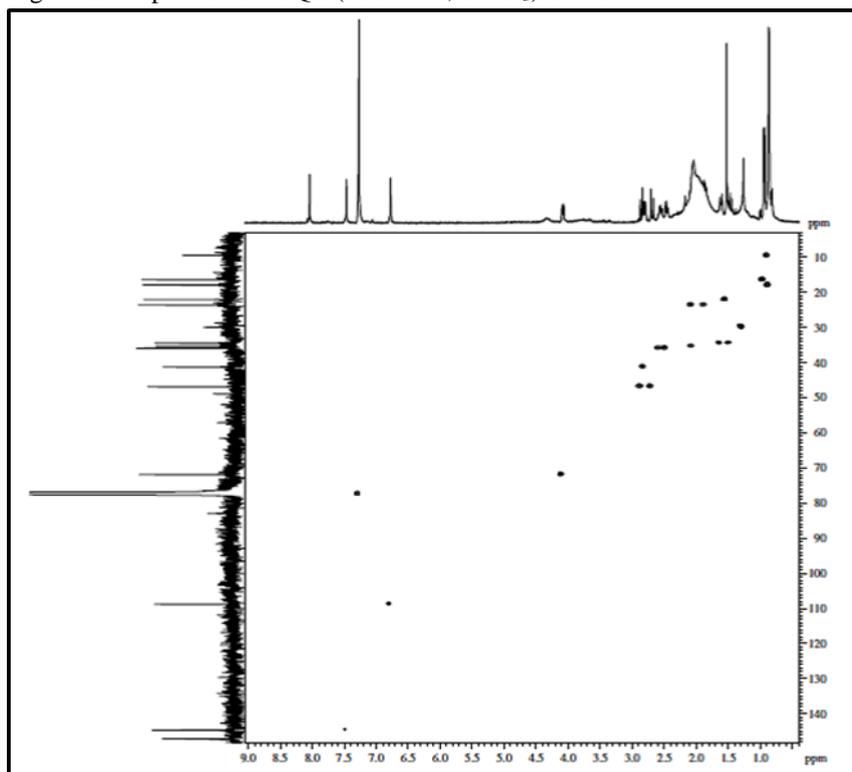
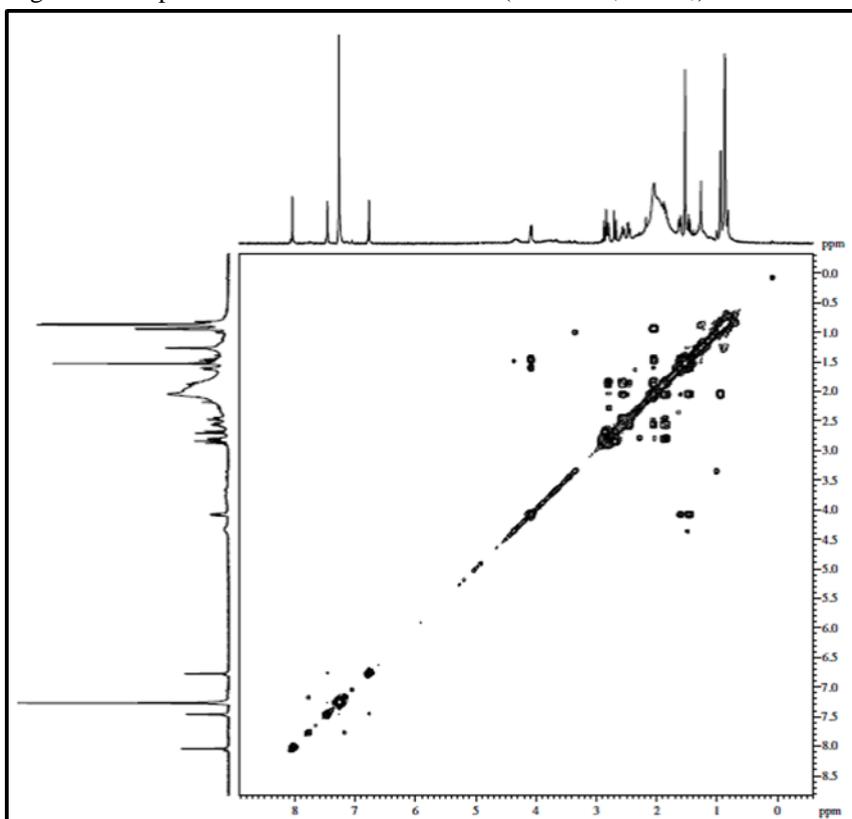
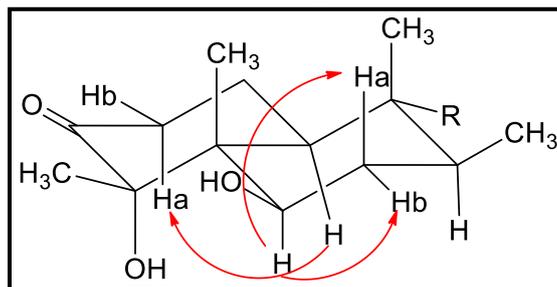
Figura 39. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do P6.Figura 40. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) do P6.

Figura 41. Subestrutura mostrando as correlações observadas no RMN COSY do P6.



Através da análise do espectro de RMN 2D heteronuclear HMBC do P6 (Figura 42) pode-se correlacionar os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,48 (H-7b) com o carbono em δ_C 71,9 (C6) [Figura 43, p. 71], o que possibilitou o correto posicionamento da hidroxila, que foi inserida no carbono C-6, por meio de uma reação de biotransformação. A Tabela 5, p. 72 exibe os sinais de todas as correlações observadas no espectro, os quais corroboram com a estrutura química do produto de biotransformação obtido.

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para o P6 a estrutura química do (4*S*,5*R*,6*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-4,6-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 44, p. 73), a qual é inédita na literatura.

Figura 42. Espectro de RMN 2D HMBC (500 MHz, CDCl₃) do P6.

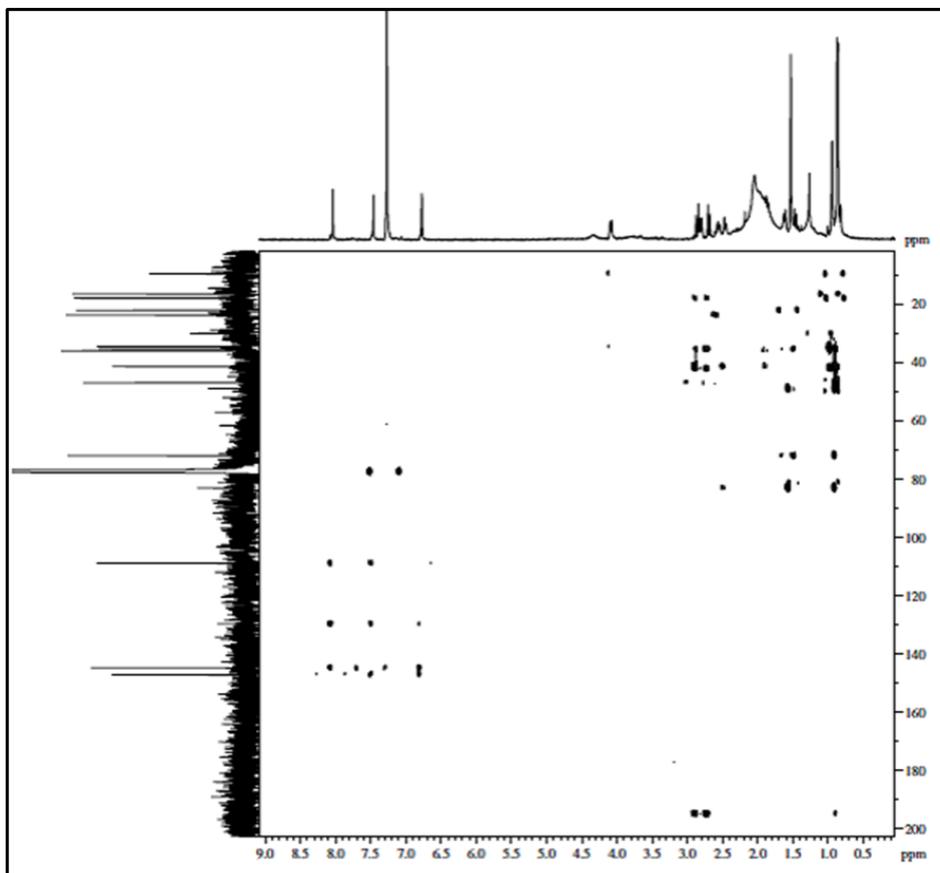


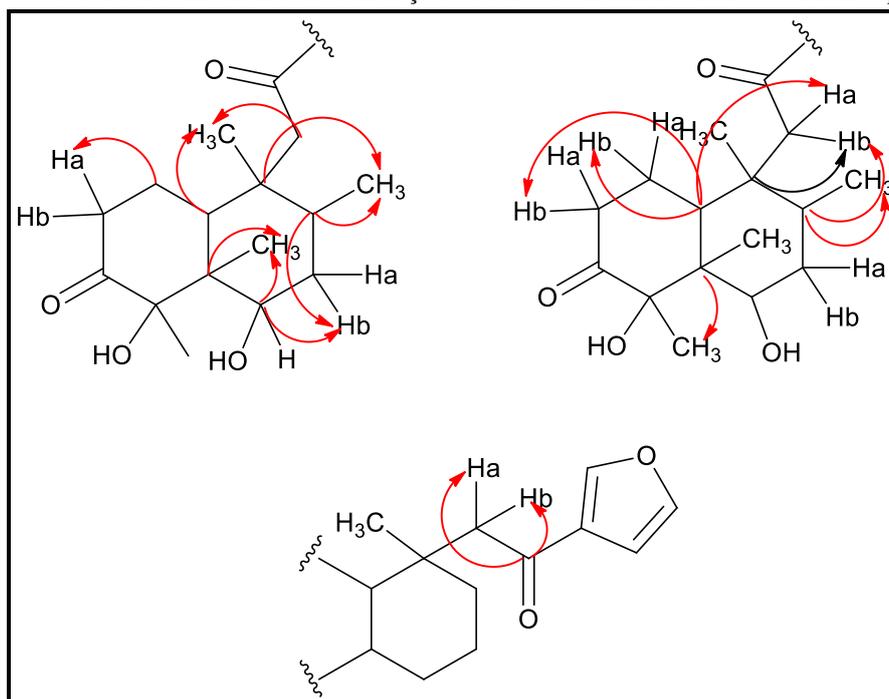
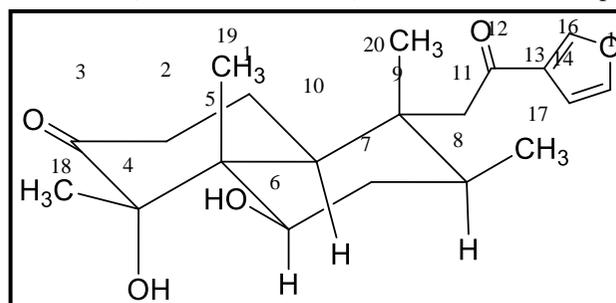
Figura 43. Subestruturas mostrando as correlações observadas no RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC para o P6.

Tabela 5. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P6, comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato usado no estudo de biotransformação.

3,12-dioxo-15,16-epoxi-4 α -hidroxicleroda-13(16),14-dieno			P6			
HSQC			HSQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	23,8	2,00 (m; 1H) 1,72 (qd; $J = 13,1$ e $5,2$ Hz; 1H)	23,5	a. 1,85 (dd; $J = 12,9$ e $4,4$ Hz; 1H) b. 2,03 (m; 1H)	2,55	
2	36,1	2,38 (ddd; $J = 14,2$ e $1,7$ Hz; 1H)	35,8	a. 2,55 (ddl; $J = 13,8$ e $7,4$ Hz; 1H) b. 2,46 (ddl; $J = 14,3$ e $3,6$ Hz; 1H)		
3	215,3	-	213,5	-		
4	81,6		83,0	-		
5	45,3		48,9	-	0,86	1,52
6	31,1	1,63 (td; $J = 13,0$ e $4,1$ Hz; 1H) 1,46 (dt; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz; 1H)	71,9	4,08 (dd; $J = 11,3$ e $4,1$ Hz; 1H)	1,50	0,86
7	26,8	1,38 (m; 1H) 1,35 (m; 1H)	34,4	a. 1,60 (dl; $J = 13,4$; 1H) b. 1,48 (m; 1H)		
8	37,4	1,85 (m; 1H)	35,3	2,03 (m; 1H)	0,93; 1,50	2,70
9	42,0	-	42,0	-	2,68	0,94
10	41,6	2,69 (m; 1H)	41,2	2,80 (dd; $J = 13,2$ e $3,0$ Hz; 1H)	1,85	0,86; 2,46; 2,85
11	47,2	2,81 (d; $J = 15,9$ Hz; 1H) 2,70 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H)	46,8	a. 2,85 (d; $J = 16,3$ Hz; 1H) b. 2,68 (d; $J = 16,3$ Hz; 1H)		0,86
12	195,2	-	196,8	-	2,85; 2,68	
13	129,7	-	129,6	-		

14	108,8	6,75 (sl; 1H)	108,8	6,77 (s; 1H)		
15	144,5	7,42 (d; $J = 1,2$; 1H)	144,7	7,46 (s; 1H)		
16	147,0	8,02 (sl; 1H)	147,1	8,03 (s; 1H)		
17	16,6	0,88 (d; $J = 6,7$; 3H)	16,3	0,93 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H)		
18	21,9	1,35 (s; 3H)	22,0	1,52 (s; 3H)		
19	15,0	0,80 (s; 3H)	9,4	0,86 (s; 3H)		
20	17,7	0,82 (s; 3H)	17,8	0,85 (s; 3H)		

Figura 44. Estrutura química do P6, denominado (4*S*,5*R*,6*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-4,6-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno.



2.4.7 Determinações estruturais dos produtos de modificação química, usando P2 como substrato

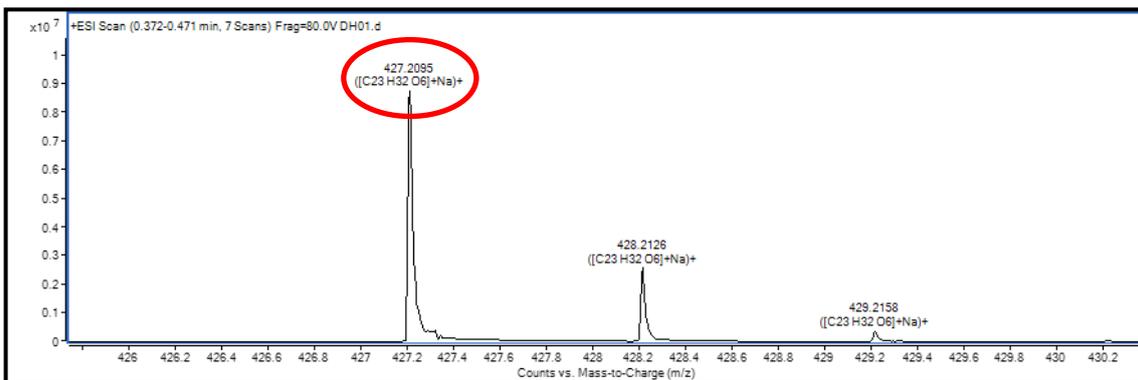
2.4.7.1 Determinação estrutural do P2(a)

Após o tratamento da reação obteve-se um sólido amorfo (Item 5.13.1, p. 86), com ponto de fusão de 98,5–99,2 °C e rotação específica $[\alpha]_D^{20} = + 96,2$ (c = 0,1 g/mL, CHCl₃/CH₃OH 1:1).

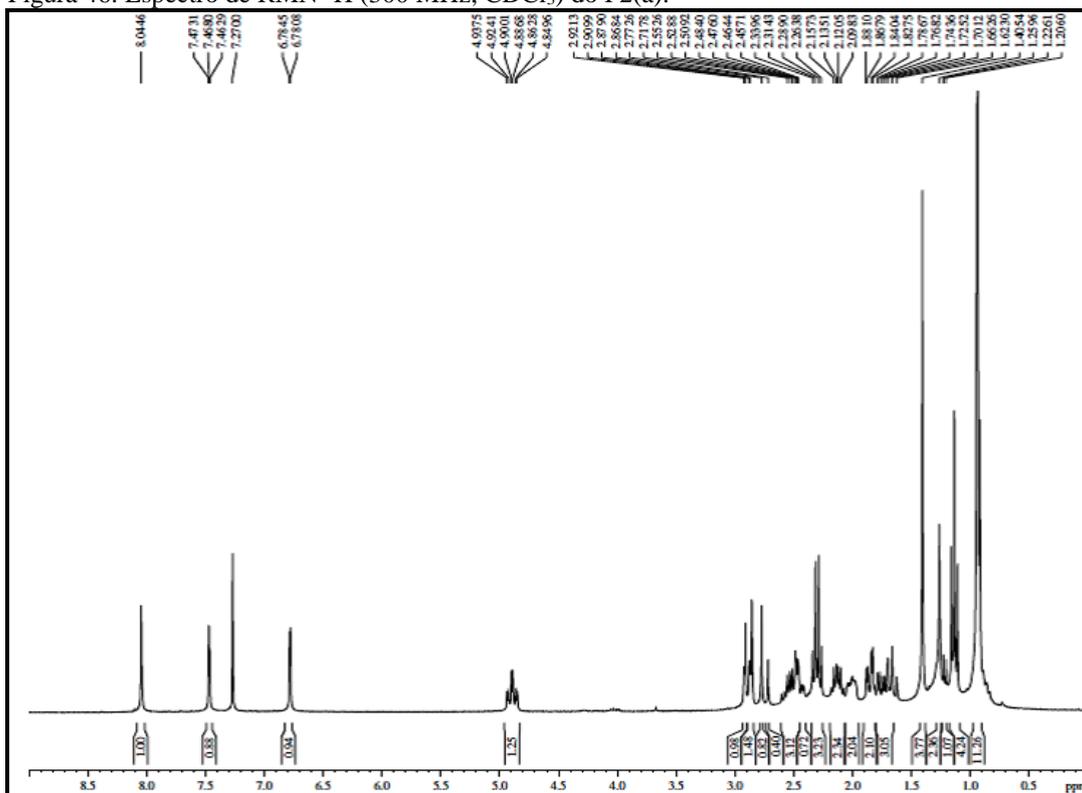
A caracterização do produto P2(a) foi realizada em comparação com o substrato P2, descrito no item 4.4.2, p. 41.

O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 45) exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de sódio $[M + Na]^+$ com razão massa/carga (m/z) em 427,2095 (calculado: 427,2097, erro: 0,9 ppm), o qual foi compatível com a fórmula molecular C₂₃H₃₂NaO₆.

Figura 45. Espectro de massas de alta resolução do P2(a).



O espectro de RMN ¹H de P2(a) (300 MHz, CDCl₃; Figura 46, p.75) mostrou sinais equivalentes para a maioria dos hidrogênios quando comparado ao do substrato P2. Porém, observou-se o aumento no deslocamento químico do sinal de H-7 (δ_H 4,89 em P2(a) e δ_H 3,54 em P2), ambos referentes a carbono metínico oxigenado. Esse aumento no deslocamento químico de H-7 ocorre devido ao efeito anisotrópico do grupo acila inserido em P2(a). O surgimento dos sinais em δ_H 2,30 (q; 2H; $J = 7,6$ Hz; H-2'), referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico vizinho a carbonila, e δ_H 1,13 (t; 3H; $J = 7,6$; Hz; H-3') referente a hidrogênios ligado a carbono metílico, estão de acordo com a presença do grupamento propanoato. Os demais sinais não sofreram modificações, conforme apresentado na Tabela 6, p. 77.

Figura 46. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P2(a).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3 ; Figura 47, p. 76) revelou sinais correspondentes a 23 átomos de carbono. Os dados observados nos espectros de RMN ^{13}C -BB do produto P2(a), mostraram-se bastante similares aos observados para o substrato P2. As diferenças observadas foram: o aumento no deslocamento químico do C-7 que passou de δ_{C} 70,1 no substrato P2 para δ_{C} 72,2 no produto de reação P2(a) e o surgimento dos sinais em δ_{C} 174,1 referente à carbonila (C-1'), em δ_{C} 28,1 (C-2') referente a carbono metilênico vizinho a carbonila e em δ_{C} 9,41 (C-3') referente a carbono metílico, os quais são característicos do grupo propanoato. Os demais sinais não sofreram modificações (Tabela 6, p. 77).

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para o P2(a) a estrutura química do (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-7-propioniloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 48, p. 76), a qual é inédita na literatura.

Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P2(a).

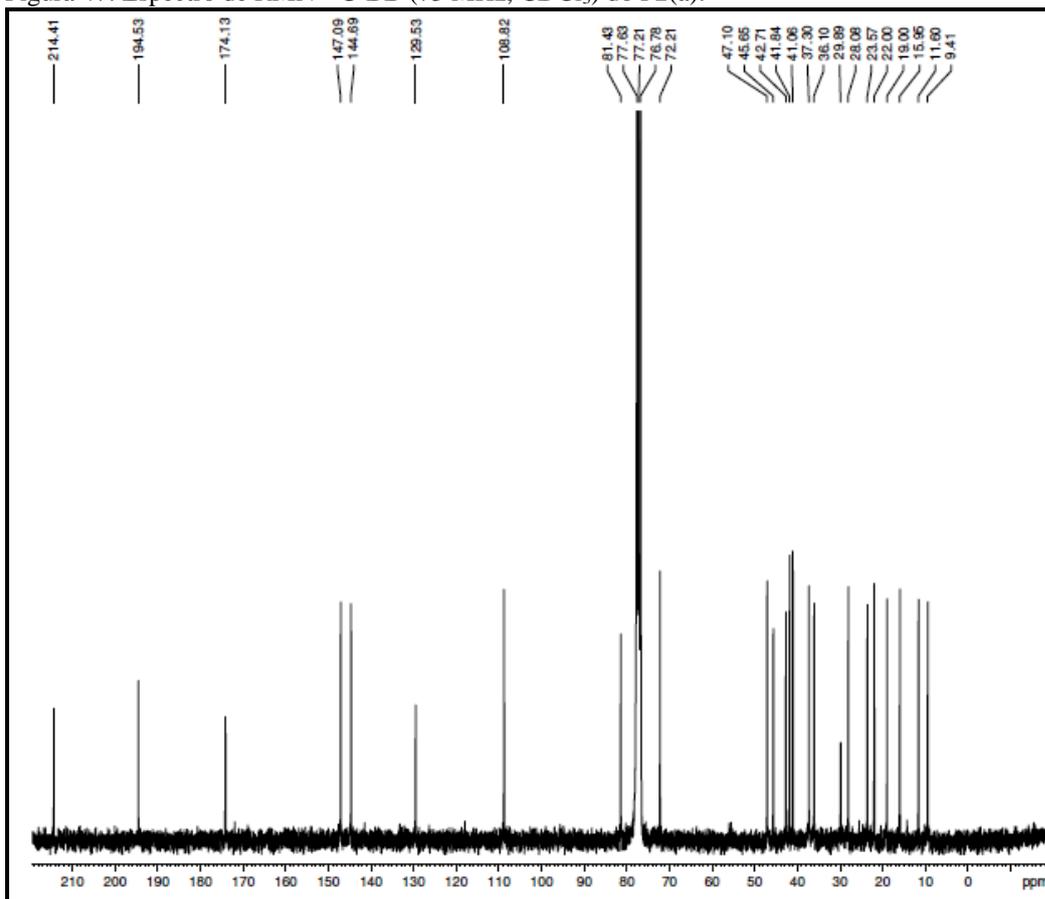


Figura 48. Estrutura química do P2(a), denominada (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-7-propioniloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno.

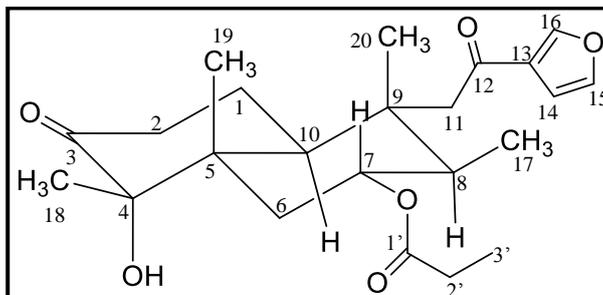


Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P2(a), comparados com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato (P2) usado no estudo de síntese química.

P2			P2(a)		
HSQC			HSQC		
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	24,6	a. 2,03 (m; 1H) b. 1,73 (dd; $J = 18,1$ e $5,1$ Hz; 1H)	23,5	a. 2,00 (m; 1H) b. 1,75 (dd; $J = 12,6$ e $5,3$ Hz; 1H)	
2	37,6	a. 2,56 (m; 1H) b. 2,45 (dd; $J = 17,6$ e $3,3$ Hz; 1H)	36,1	a. 2,46 (dd; $J = 5,8$ e $2,4$ Hz; 1H) b. 2,52 (m; 1H)	
3	215,7	-	214,4	-	
4	83,0	-	81,4	-	
5	46,7	-	45,6	-	
6	41,7	a. 1,88 (dd; $J = 16,0$ e $3,7$ Hz; 1H) b. 1,59 (m; 1H)	37,3	a. 1,85 (dd; $J = 12,1$ e $4,0$ Hz; 1H) b. 1,66 (m; 1H)	
7	70,1	3,54 (ddd; $J = 10,9$; $10,9$ e $3,6$ Hz; 1H)	72,2	4,89 (ddd; $J = 11,2$; $11,2$ e $4,0$ Hz; 1H)	
8	45,9	1,79 (m; 1H)	41,8	2,14 (dq; $J = 11,0$ e $6,6$ Hz; 1H)	
9	44,0	-	42,7	-	
10	42,7	2,84 (dd; $J = 15,6$ e $3,0$ Hz; 1H)	41,0	2,89 (dd; $J = 12,6$ e $3,0$ Hz; 1H)	
11	48,3	a. 2,89 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H) b. 2,69 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H)	47,1	a. 2,88 (d; $J = 16,4$ Hz; 1H) b. 2,74 (d; $J = 16,4$ Hz; 1H)	
12	197,4	-	194,5	-	
13	131,0	-	129,5	-	
14	109,4	6,77 (s; 1H)	108,8	6,78 (s; 1H)	
15	146,1	7,46 (s; 1H)	144,6	7,46 (s; 1H)	
16	149,9	8,04 (s; 1H)	147,0	8,04 (s; 1H)	
17	12,2	1,09 (d; $J = 6,6$ Hz; 3H)	11,6	0,91 (d; $J = 5,5$ Hz; 3H)	
18	22,2	1,41 (s; 3H)	22,0	1,40 (s; 3H)	
19	16,7	0,89 (s; 3H)	15,9	0,93 (s; 3H)	
20	19,2	0,89 (s; 3H)	19,0	0,93 (s; 3H)	
1'	-	-	174,1	-	
2'	-	-	28,1	2,30 (q; $J = 7,6$ Hz; 2H)	
3'	-	-	9,41	1,13 (t; $J = 7,6$ Hz; 3H)	

2.4.7.2 Determinação estrutural do P2(o)

Após o tratamento da reação obteve-se um sólido amorfo (Item 5.13.2, p. 86) com rotação específica $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,7$ ($c = 0,1$ g/ml, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1).

A caracterização do produto P2(o) foi realizada em comparação com o substrato P2, descrito no item 4.4.2, p. 41.

O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 49, p. 78), exibiu o íon correspondente a uma parte da molécula $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Figura 50, p. 78) com razão

massa/carga (m/z) em 331,1908 (calculado: 331,1908, erro: 1,3 ppm), compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{27}O_4$ [Figura 50, p. 78].

Figura 49. Espectro de massas de alta resolução do P2(o).

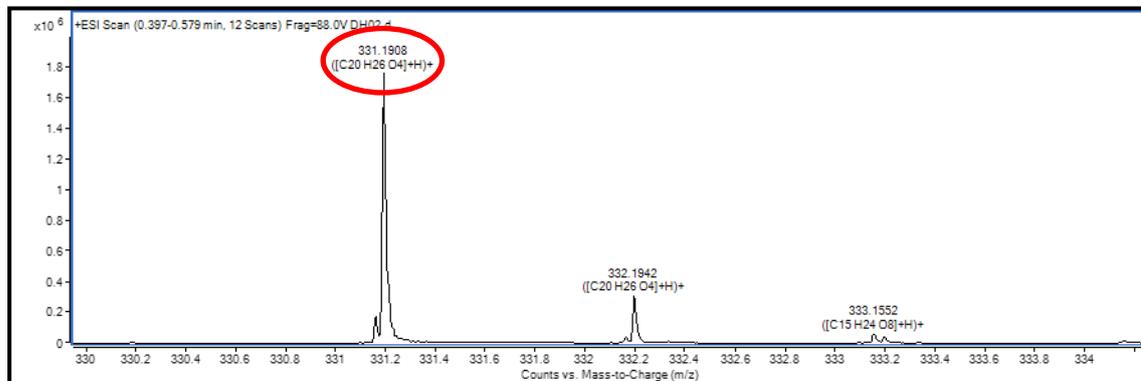
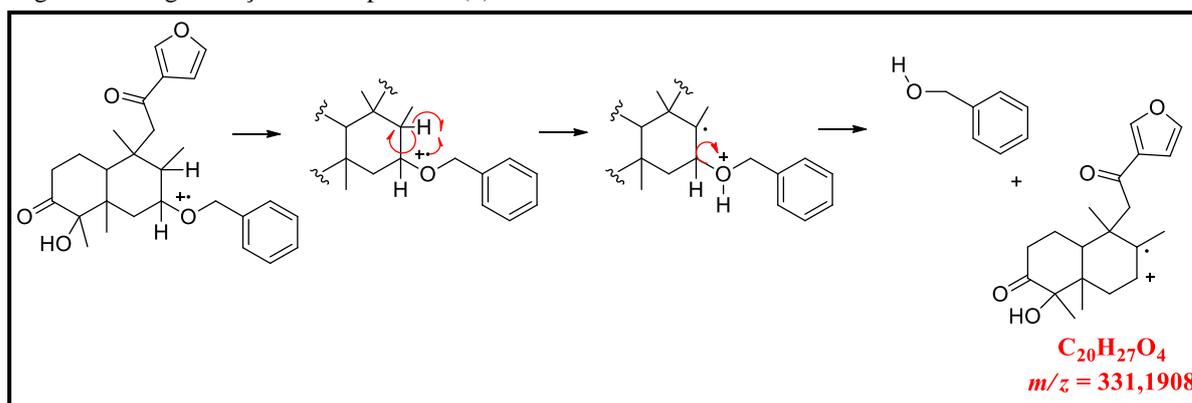
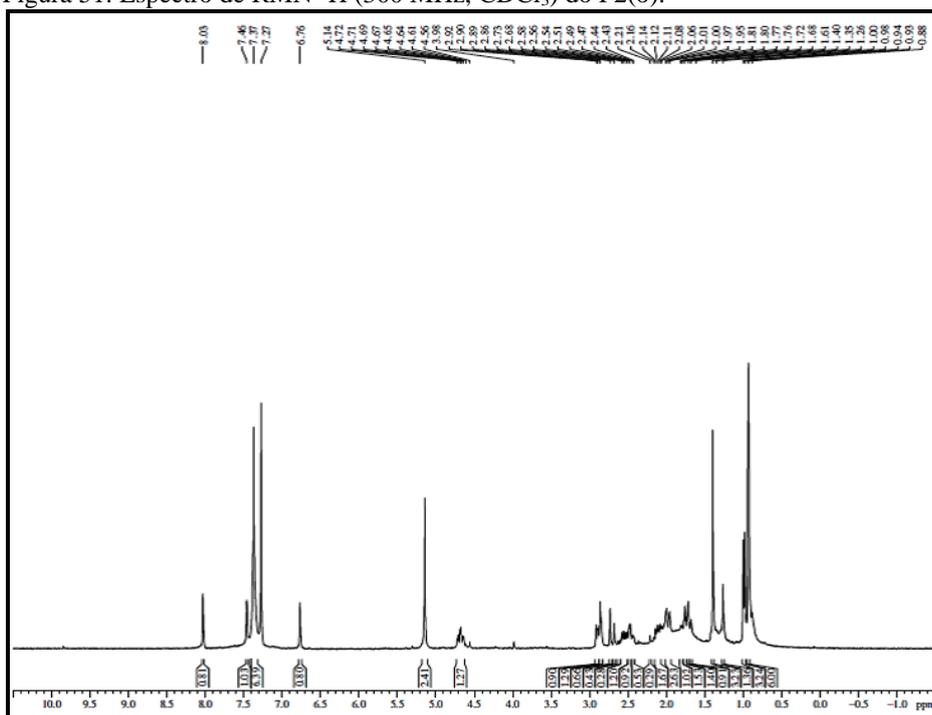


Figura 50. Fragmentação do composto P2(o).



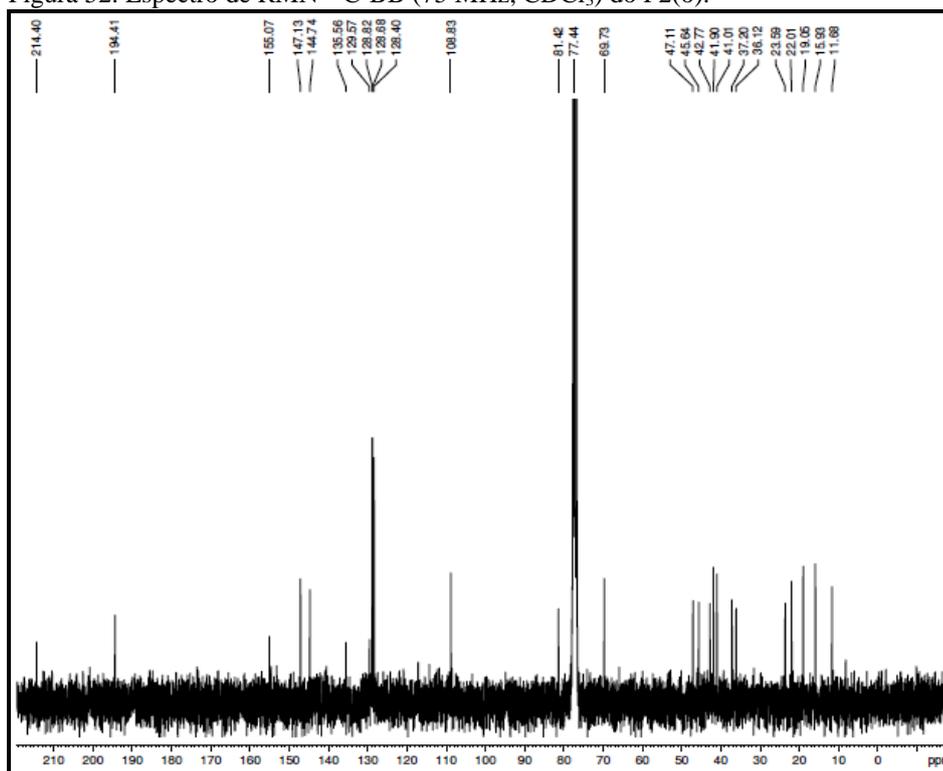
O espectro de RMN 1H de P2(o) (300 MHz, $CDCl_3$; Figura 51, p. 79) mostrou sinais equivalentes de hidrogênios em relação a P2. Porém, foi observado um aumento no deslocamento químico do H-7, o qual passou de δ_H 3,54 (ddd; 1H; $J = 10,9; 10,9$ e $3,6$ Hz; H-7) em P2 para δ_H 4,68 (ddd; 1H; $J = 11,3; 11,3$ e $3,9$ Hz; H-7) no produto de reação P2(o). Estes sinais são referentes ao hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado. Esta desproteção de H-7 deve-se ao efeito anisotrópico do grupo benzila inserido na posição C-7 de P2(o). Os sinais δ_H 5,14 (s; 2H; H-1') referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico oxigenado e δ_H 7,37 (s; 5H; H-3', H-4', H-5', H-6' e 7') referente aos hidrogênios aromáticos confirmam a inserção do grupo benzila. Os demais sinais não sofreram modificações (Tabela 7, p. 81).

Figura 51. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do P2(o).



O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 52, p. 80) revelou sinais correspondentes a 27 átomos de carbono. Neste espectro foi observado um aumento no deslocamento químico de C-7 (δ_{C} 70,1 em P2 e δ_{C} 77,4 em P2(o)) e o aparecimento dos sinais característicos do grupo benzila em δ_{C} 69,7 referente a carbono metilênico oxigenado (C-1') e em δ_{C} 135,6 (C-2'); δ_{C} 128,3 (C-3'); δ_{C} 128,7 (C-4' e 6'); δ_{C} 128,6 (C-5') característicos do anel benzênico. Os dados de RMN ^{13}C estão sumariados na Tabela 7, p. 81.

Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do P2(o).



A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para o P2(o) a estrutura química do (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-7-benziloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (Figura 53), a qual é inédita na literatura.

Figura 53. Estrutura química do P2(o), denominada (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-7-benziloxi-4-hidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno.

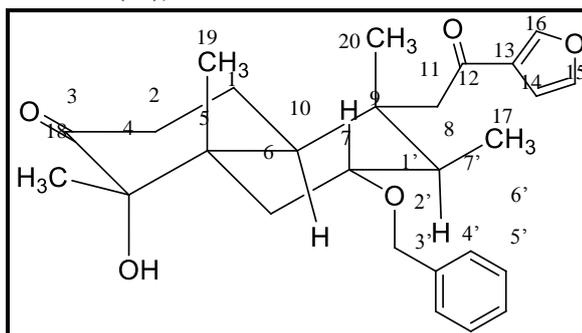


Tabela 7. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do P2(o), comparado com os valores de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CDCl_3) do substrato (P2).

P2			P2(o)		
HSQC			HSQC		
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	24,6	a. 2,03 (m; 1H) b. 1,73 (dd; $J = 18,1$ e $5,1$ Hz; 1H)	23,5	a. 2,09 (m; 1H) b. 1,77 (m; 1H)	
2	37,6	a. 2,56 (m; 1H) b. 2,45 (dd; $J = 17,6$ e $3,3$ Hz; 1H)	36,1	a. 2,55 (m; 1H) b. 2,45 (m; 1H)	
3	215,7	-	214,3	-	
4	83,0	-	81,3	-	
5	46,7	-	45,6	-	
6	41,7	a. 1,88 (dd; $J = 16,0$ e $3,7$ Hz; 1H) b. 1,59 (m; 1H)	37,1	a. 1,98 (dd; $J = 12,3$ e $3,9$ Hz; 1H) b. 1,71 (m; 1H)	
7	70,1	3,54 (ddd; $J = 10,9$; $10,9$ e $3,6$ Hz; 1H)	77,4	4,68 (ddd; $J = 11,3$; $11,3$ e $3,9$ Hz; 1H)	
8	45,9	1,79 (m; 1H)	41,8	2,09 (m; 1H)	
9	44,0	-	42,7	-	
10	42,7	2,84 (dd; $J = 15,6$ e $3,0$ Hz; 1H)	40,9	2,86 (dd; $J = 12,1$ e $3,6$ Hz; 1H)	
11	48,3	a - 2,89 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H) b - 2,69 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H)	47,0	a - 2,88 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H) b - 2,70 (d; $J = 16,1$ Hz; 1H)	
12	197,4	-	194,3	-	
13	131,0	-	129,5	-	
14	109,4	6,77 (s; 1H)	108,8	6,76 (s; 1H)	
15	146,1	7,46 (s; 1H)	144,7	7,46 (s; 1H)	
16	149,9	8,04 (s; 1H)	147,1	8,03 (s; 1H)	
17	12,2	1,09 (d; $J = 6,6$ Hz; 3H)	11,6	0,98 (d; $J = 6,6$ Hz; 3H)	
18	22,2	1,41 (s; 3H)	21,9	1,40 (s; 3H)	
19	16,7	0,89 (s; 3H)	19,0	0,92 (s; 3H)	
20	19,2	0,89 (s; 3H)	15,8	0,93 (s; 3H)	
1'	-	-	69,7	5,14 (s; 2H)	
2'	-	-	135,6	-	
3'	-	-	128,3	7,37 (s; 1H)	
4'	-	-	128,7	7,37 (s; 1H)	
5'	-	-	128,6	7,37 (s; 1H)	
6'	-	-	128,7	7,37 (s; 1H)	
7'	-	-	128,3	7,37 (s; 1H)	

2.4.8 Atividade antifúngica das substâncias isoladas

As substâncias **P1**, **P2**, **P3** e 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (substrato) tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas frente a *Candida parapsilosis* (ATCC[®] 22019[™]), *Candida albicans* (ATCC[®] 10522[™]) e *Candida krusei* (ATCC[®] 6258[™])

pertencentes ao LABEL sensíveis e resistentes ao fluconazol. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação do efeito antifúngico das substâncias P1, P2, P3 e do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (substrato), frente as cepas de *Candida spp.*

Cepas	Concentração inibitória mínima (CIM)			
	Valores de CIM			
	Substrato ($\mu\text{g/mL}$) CIM ₉₀ 24h	P1 ($\mu\text{g/mL}$) CIM ₉₀ 24h	P2 ($\mu\text{g/mL}$) CIM ₉₀ 24 h	P3 ($\mu\text{g/mL}$) CIM ₉₀ 24h
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC® 22019™)	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Candida krusei</i> (ATCC® 6258™)	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10522™)	> 128	> 128	> 128	> 128

Na concentração testada esses compostos não apresentaram atividade antifúngica frente as cepas de *Candida spp.*

2.5 Procedimentos experimentais

2.5.1 Métodos Cromatográficos

2.5.1.1 Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção em coluna foram empregadas como fase estacionária gel de sílica 0,035-0,70 mm da marca Vetec®. Os comprimentos e o diâmetro das colunas variam de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da marca Merck® com espessura de 0,2 mm.

O fracionamento das misturas reacionais e frações, obtidos no estudo de biotransformação, bem como a separação e purificação de substâncias, foram realizados em placas de vidro 20 x 20 cm com gel de sílica Si250F da marca J.T.Baker®.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Todos os solventes eram de qualidade P.A. da marca Synth® e Vetec®.

A revelação das substâncias nas placas analíticas e preparativas foram realizadas através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL - 25 da Mineral Light®, em dois comprimentos de onda (254 e 365) e imersa em solução de vanilina em HClO₄/EtOH.

2.5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema Shimadzu UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos, modelo SPD-M20A. Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex® (4,6 x 250 mm, 5 µm) para as análises dos extratos, obtidos no estudo de biotransformação, e para as separações dos picos usou-se uma coluna semi-preparativa Phenomenex® (10,0 x 250 mm, 5µm).

Os solventes utilizados nas separações, assim como nas análises cromatográficas são de grau CLAE da marca Tedia®, os mesmos foram filtrados através de membrana de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex®). As amostras foram dissolvidas nos solventes utilizados como fase móvel e filtradas num sistema manual através de membranas de teflon com poros de 0,45µm (Waters®).

2.5.2 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

2.5.2.1 Espectrometria de Ressonância magnética nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetros Brucker® DPX 300 e DRX 500, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da UFC.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado (CDCl₃) e metanol deuterado (CD₃COD). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dublete),

dd (duplo dubleto), dt (dubleto de tripleto), t (tripleto), ddd (duplo dubleto dubleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY e NOESY) e heteronuclear (HSQC e HMBC), foram realizados em aparelho Bruker[®] DPX 300 e DRX 500.

As análises GC-HRMS (cromatografia gasosa de alta resolução de espectrometria de massa) foram realizadas em um GC-MS/TOF GCT Premier (Waters) (tempo-de-vôo) usando um HP5-MS coluna (30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm espessura do filme).

2.5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro PERKIN-ELMER[®], modelo FT - IR SPECTRUM (utilizando clorofórmio para solubilizar as amostras), pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica na Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

2.5.3 Outras determinações

2.5.3.1 Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em Aparelho digital, modelo MQAPF - 302, da marca Microquímica Equipamentos Ltda, número de série 231/07 e não foram corrigidos.

2.5.3.2 Rotação óptica

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Jasco, modelo P-2000 no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará, sendo as medidas realizadas a 589 nm e temperatura em torno de 20°C.

2.5.4 Substrato

O diterpeno clerodano 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno foi cedido pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais III (LAFIPLAM III).

2.5.5 Reagentes comerciais

Os reagentes comerciais utilizados no desenvolvimento das modificações químicas com o P2 (produto de biotransformação) estão listados a seguir com suas respectivas procedências:

- ✓ Cloreto de propanoíla (SIGMA – ALDRICH)
- ✓ Trietilamina (SIGMA – ALDRICH)
- ✓ Carbonato de potássio (DINÂMICA)
- ✓ Cloreto de benzila (SIGMA – ALDRICH)
- ✓ TEBA- Brometo de benziltriethylamônia (SIGMA – ALDRICH)

2.5.6 Amostras fúngicas

Os fungos endofíticos estudados foram isolados a partir de plantas dispersas, no bioma Caatinga, no estado do Ceará e encontram-se depositados no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT sob a supervisão do Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire. Todos os fungos foram identificados por estudos filogenéticos de biologia molecular, com sequenciamento da região ITS e foram identificados como *Lasiodiplodia theobromae* (71); *L. citricola* (258); *L. gonubiensis* (474); *Neofusicoccum cordaticola* (434); *N. parvum* (600); *N. ribis* (683); *Botryosphaeria mamane* (20) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (477). Já o *Albonectria rigidiuscula* (533) foi identificado com sequenciamento das regiões LSU, ITS, BT, ACT e TEF (Tabela 9).

Tabela 9. Fungos endofíticos utilizados no estudo de biotransformação.

Código	Hospedeiro		Fungo
	Nome científico	Nome comum	
533	<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
20	<i>Licania rígida</i>	Oiticica	<i>Botryosphaeria mamane</i>

258	<i>Croton campestris</i>	Velame-do-campo	<i>Lasiodiplodia citrícola</i>
474	<i>Croton</i> sp.2	-	<i>Lasiodiplodia gonubiensis</i>
71	<i>Croton sonderianus</i>	Marmeleiro	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
434	<i>Centrolobium microchaete</i>	Putumuju	<i>Neofusicocum cordaticola</i>
600	<i>Psidium guyanensis</i>	Araçá azedo	<i>Neofusicocum parvum</i>
683	<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	<i>Neofusicocum ribis</i>
477	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Pau-preto	<i>Pseudofusicocum stromaticum</i>

2.5.7 Preservação dos microrganismos

Os microrganismos foram inicialmente incubados em meio de cultura semissólidos batata dextrose ágar (BDA) por sete dias, em seguida preservado de acordo com o Método Castellani (MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W.; 1997):

- ✓ Esterilizou-se, aproximadamente, 5 mL de água destilada contidas em frascos de 10 mL;
- ✓ Retirou-se discos de ágar (3 cm de diâmetro) das culturas fúngicas;
- ✓ Três discos de cada cultura fúngica foram introduzidos em cada frasco, e estes fechados hermeticamente e estocados a temperatura ambiente.

2.5.8 Meios de cultura usados nos estudos

No estudo químico dos fungos foram utilizados dois meios de cultura: 1. BD (batata-dextrose), sintético da marca Himedia®; 2. BDA (batata-dextrose ágar), sintético da marca Kasvi®, preparados conforme procedimentos descritos a seguir.

2.5.8.1 Meio Batata-Dextrose sintético

O meio de cultura batata dextrose (BD) líquido foi preparado pela dissolução de 24 g de meio em 1 L de água destilada, preparados de acordo com instruções do fabricante. O meio de cultura foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL e autoclavados a 120 °C por 15 min.

2.5.8.2 Meio Batata-Dextrose-Ágar sintético

O meio semissólido BDA foi preparado pela dissolução de 42 g de meio em 1L de água destilada, preparado de acordo com instruções do fabricante. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C por 15 min e distribuídos em placa de Petri.

2.5.9 Esterilização de vidraria e meios de cultura

A esterilização de vidrarias e meios de cultura foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) - UFC. Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclave vertical Phoenix[®] AV 75 e a repicagem nos meios de cultura em capela de fluxo laminar Labconco[®] MOD # 8089000.

2.5.10 Biotransformação do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por fungos endofíticos

2.5.10.1 Cultivo fúngico para o estudo de biotransformação

Cepas de *Lasiodiplodia gonubienses*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum* foram inoculadas em erlemmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura líquido BD. Depois de 7 dias de crescimento sob agitação a 120 rpm e temperatura ambiente, o substrato previamente solubilizado em 200 µl de DMSO foi adicionado as culturas fúngicas e mantidos sob agitação por mais 7 dias. Em um dos erlenmeyers não foi adicionado o substrato, o qual serviu como branco.

O procedimento experimental para a biotransformação do substrato com as cepas de *Pseudofusicoccum stromaticum* na 2^o grande escala foi o mesmo citado anteriormente, porém o tempo de incubação do fungo foi menor (3 dias) e o tempo de reação foi maior (18 dias).

2.5.10.2 Processamento das culturas líquidas

A cultura fúngica foi filtrada à vácuo, separando-se o meio de cultura do micélio. O meio de cultura foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. A fase orgânica foi submetida a partição líquido-líquido com água destilada para retirada dos

açúcares. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), a solução límpida foi filtrada em papel de filtro. Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, à temperatura abaixo de 40 °C. Transferiu-se os extratos obtidos para vidro previamente tarado, deixando-o uma noite sob vácuo a temperatura ambiente.

2.5.10.3 Retirada de gordura

Os extratos obtidos foram solubilizados em metanol/acetoneitrila (1:1), os mesmos foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano. Posteriormente, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C. Transferiu-se o extrato obtido para vidro previamente tarado, deixando-o uma noite sob vácuo a temperatura ambiente.

2.5.11 Isolamento dos produtos de biotransformação

2.5.11.1 Fracionamento do extrato Nr + d (1) por cromatografia gravitacional

O extrato da biotransformação (947,1mg), codificado como **Nr + d (1)**, foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna com gel de sílica, utilizando como eluente a mistura binária hexano/acetato de etila (9:1), hexano/acetato de etila (8:2), hexano/acetato de etila (1:1), diclorometano/acetato de etila (4:6) seguido pela adição de metanol. As frações que tinham perfil cromatográfico semelhante foram reunidas após análise por CCDA, foram obtidas desse tratamento cromatográfico duas substâncias puras, codificadas como P1 com massa de 12,0 mg (5,9%) e P2 com massa de 5,7 mg (2,7%). As quais foram analisadas por EM, IV, RMN ^1H e ^{13}C , identificadas como (3*R*,4*S*,5*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno e (4*S*,5*S*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno, respectivamente.

2.5.11.2 Fracionamento dos extratos Lg + d e Ps + d (1) por cromatografia em camada delgada preparativa

Os extratos das biotransformações, codificados como **Lg + d** (161,2 mg) e **Ps + d (1)** (390,8 mg), foram submetidos a fracionamento cromatográfico em placas de vidro 20 x 20 cm com gel de sílica Si250F, usou-se aproximadamente de 25 - 30 mg de extrato. As eluições

foram realizadas com os solventes hexano/acetato de etila (3:7) para o extrato **Lg + d** e hexano/acetona (7:3) para o extrato **Ps + d (1)**.

A revelação das substâncias nas placas preparativas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL - 25 da Mineral Light®, em dois comprimentos de onda (254 e 365) e imersa em solução de vanilina em HClO₄/EtOH. As frações obtidas desse tratamento cromatográfico foram P1 e P2. Do extrato Lg + d foi isolado P1 com massa de 1,6 mg (0,6%) e P2 com massa de 4,5 mg (1,2%) e do extrato Ps + d (1) foi isolado P1 com massa de 7,2 mg (2,4%) e P2 com massa de 16,9 mg (6,1%), as quais foram analisadas por EM, IV, RMN ¹H e ¹³C, identificadas como (3*R*, 4*S*, 5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno e (4*S*, 5*S*, 7*R*, 8*R*, 9*S*,10*S*)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno, respectivamente.

2.5.11.3 Fracionamento dos extratos *Nr + d (2)* e *Ps + d (2)* por CLAE

Os extratos das biotransformações, codificados como **Nr + d (2)** (139,7 mg) e **Ps + d (2)** (291,8 mg), foram submetidos a tratamento cromatográfico por CLAE, no qual o melhor método de separação para o extrato **Nr + d (2)** foi verificado com a utilização de uma coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex® (4,6 x 250 mm, 5µm) e sistema de eluição acetonitrila:água Milli-Q (4:6) com fluxo de 4,72 mL/min, usando loop de 200 µL para injeção da amostra, comprimento de onda de 190-400 nm e concentração da amostra de 19,95 mg/mL (Anexo 1, p. 218). Foram coletadas cinco frações, das quais foram analisadas em CCDA, as frações 2, 3 e 5 foram consideradas substâncias puras. As mesmas foram codificadas como P3, P2 e P1, respectivamente.

O extrato **Ps + d (2)** foi submetido as mesmas condições citadas anteriormente as únicas modificações foram no fluxo (3,5 mL/min) e na concentração da amostra (29,2 mg/mL) [Anexo 2, p. 219]. Obteve-se 12 frações, das quais foram analisadas em CCDA, concluiu-se que a fração 9 tratava-se de uma substância pura, codificada como P6 e a fração 6 era uma mistura e foi recromatografada em camada delgada preparativa (CCDP); onde foi obtido P1 e P2. Essas amostras foram submetidas à análise por EM, IV, RMN ¹H e ¹³C, identificadas como (3*R*, 4*S*, 5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-3,4-dihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno (P1), (4*S*, 5*S*, 7*R*, 8*R*, 9*S*, 10*S*)-4,7-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (P2), (3*R*, 4*S*, 5*S*, 7*R*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-3,4,7-trihidroxi-15,16-epoxi-12-oxocleroda-13(16),14-dieno (P3) e (4*S*, 5*R*, 6*R*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-4,6-dihidroxi-15,16-epoxi-3,12-dioxocleroda-13(16),14-dieno (P6).

2.5.12 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica das substâncias isoladas (P1, P2 e P3) e do substrato empregado no estudo de biotransformação foram avaliadas no Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da UFC, sob a coordenação do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

O ensaio para os produtos de biotransformação e o substrato foi realizado frente à *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™), *Candida albicans* (ATCC® 10522™) e *Candida krusei* (ATCC® 6258™) pertencentes ao LABEL. Estas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 24h.

Os compostos mencionados acima foram solubilizados em dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) numa proporção até 2% para não ocorrer interferência sobre a biologia do micro-organismo.

Foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). As substâncias P1, P2 e P3 e o 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (substrato) foram testadas no intervalo de concentração de 128 a 0,25 µg/mL. As placas foram preparadas no dia da realização do teste, para evitar que as mesmas fossem congeladas.

A partir de um cultivo de 24h das leveduras a serem testadas, realizado em ágar Sabouraud dextrose foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por um período de 24 horas a uma temperatura de 35°C (± 2°C). As leituras visuais foram realizadas após esse período.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2012).

2.5.13 Obtenção dos derivados reacionais de P2

2.5.13.1 Reação de acilação do P2

Em um balão de fundo redondo de 20 mL foram adicionados 5 mg (0,0143 mmol) do P2 em 143 μ L de diclorometano, com posterior adição de 6 μ l (0,0715 mmol) de trietilamina e 11 μ l (0,143 mmol) de cloreto de propanoíla. A mistura reacional foi agitada durante 3 horas. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado em coluna sob média pressão e eluída com hexano. Um sólido branco, denominado P2(a), foi obtido com rendimento de 53,8%.

2.5.13.2 Reação de O-alkilação do P2

Em um balão de fundo redondo de 20 mL foram adicionados 5 mg (0,0143 mmol) do P2 juntamente com 1,97 mg (0,0143 mmol) de K_2CO_3 em 44,7 μ l de acetona, com posterior adição de 1,6 μ l (0,0143 mmol) de cloreto de benzila e 0,15 mg (0,00143 mmol) de Cloreto de benziltriethylamônio (TEBA). A reação ocorreu em refluxo e foi agitada durante 36 horas. Em seguida adicionou-se 5 ml de solução saturada de $NaHCO_3$ ao meio reacional, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (3 x 5 ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (20 ml) (BOUYSSOU *et al.*, 2010). O produto bruto foi purificado em coluna sob média pressão, utilizando como eluente a mistura binária dos solventes acetato de etila/hexano 10% e 20%. Um sólido amorfo, denominado P2(o), foi obtido com rendimento de 57,3%.

2.6 CONCLUSÃO

A pesquisa descrita neste capítulo foi realizada em duas vertentes: potencial biocatalítico de fungos endofíticos e a modificação estrutural de P2 por biotransformação.

Para a realização da biotransformação foi utilizado o potencial biocatalítico dos fungos endofíticos da família Botryosphaeriaceae. Após os experimentos, foi confirmado a capacidade de biohidroxilação e biorredução das enzimas presentes nos fungos *N. ribis*, *L. gonubiensis* e *P. stromaticum*. Como resultado, obteve-se quatro produtos de biotransformação denominados de P1, P2, P3 e P6. Todos tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas frente as cepas de *Candida spp.* No entanto, não apresentaram atividade na concentração testada. Após a obtenção dos produtos resultantes da biotransformação, foram feitas duas modificações químicas em P2. Essas modificações deram origem a dois derivados denominados de P2(a) e P2(o).

As descobertas descritas nesse trabalho contribuíram de forma relevante à literatura científica, pois houve a obtenção de cinco novos compostos orgânicos (P2, P3, P6, P1(a) e P2(o)). Os resultados deste estudo foram publicados no periódico *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, v.1, n.6, 2017.

3 BIOCONVERSÃO E OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO IBUPROFENO

3.1 Introdução

O ibuprofeno é um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) derivado do ácido fenilpropiónico, o qual é amplamente consumido pela população mundial devido às suas propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. O mesmo também possui menor incidência de efeitos adversos, se comparado aos outros AINEs disponíveis no mercado (RANG *et al*, 2004; KATZUNG, 2005; MONTES *et al*, 2016).

O ibuprofeno é a terceira droga mais consumida no mundo (ROBERT; MURDOCH; HAY, 2015). Segundo Abbas *et al*. (2017), a presença do grupo carboxílico na molécula do ibuprofeno é considerado o responsável por seus efeitos colaterais, incluindo erosão superficial do estômago, vômitos, dispepsia, desconforto abdominal, sangramento grave ou ativação da úlcera péptica e diarreia, especialmente após administração prolongada. O ibuprofeno possui também baixa biodisponibilidade e tempo de meia vida curto, devido à sua insolubilidade em água (Bowe *et al*, 2017). Por essas razões, há a necessidade de modificações na estrutura química do fármaco para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais.

Baseado nisso, realizou-se modificações químicas nesta região da molécula. Foram feitas também reações de biotransformação, pois estes tipos de reações, são capazes de modificar a estrutura química do substrato de uma forma que não seria possível ou ocorreria com muita dificuldade por via química (Al-Aboudi *et al*, 2017). Os produtos obtidos foram testados frente a sua capacidade antifúngica e anti-inflamatória.

3.2 Levantamento bibliográfico

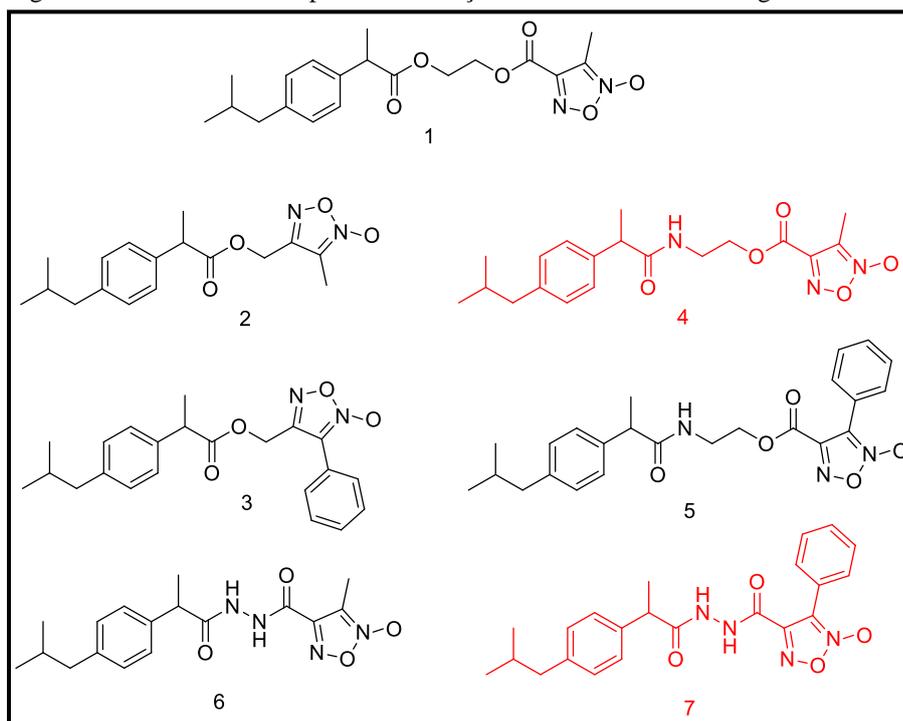
A indústria farmacêutica atualmente encontra frequentemente a atividade antimicrobiana em fármacos que, teoricamente, não apresentariam essa ação farmacológica. Isso ocorre durante os testes de adequação realizado antes da análise rotineira de pureza microbiológica descritos na Farmacopeia, um dos requisitos de qualidade após a liberação do medicamento para o mercado, o que garante a segurança microbiológica do paciente. A atividade antibacteriana e antifúngica do ibuprofeno foi mencionada pela primeira vez por Hersh *et al*. em 1991 e por Sanyal *et al*. em 1993, respectivamente. Portanto, a atividade antimicrobiana do ibuprofeno é conhecida há mais de 20 anos (OBAD, ŠUŠKOVIĆ e KOS, 2015).

Em Singh *et al.* (2016) foi relatado do uso do ibuprofeno no tratamento do Parkinson, induzido por cipermetrina em ratos. O ibuprofeno demonstrou ter um mecanismo plausível para inibir os efeitos do Parkinson em ratos, por ser capaz de evitar a neurodegeneração dopaminérgica nigrostriatal induzida por cipermetrina.

Em Amir, Akhter e Alam (2016) foi realizado uma série de modificações químicas na estrutura do ibuprofeno, obtendo treze derivados, nos quais foram introduzindo derivados do anel furoxano no ácido carboxílico da molécula. Os derivados foram testados quanto à sua ação anti-inflamatória, analgésica, ulcerogênica, e propriedades hepatotóxicas. Dos compostos estudados, os que apresentaram melhor ação anti-inflamatória e analgésica foram os compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, e **7** (Figura 54, p. 95), sendo que os compostos **4** e **7** (em vermelho) apresentaram ação superior. Estes compostos exibiram ulcerogenicidade gástrica reduzida quando comparados ao ibuprofeno. É possível que a modificação do grupo carboxílico livre do ibuprofeno tenha reduzido sua ação tóxica irritante.

No estudo realizado por Endo, Yano, Okumura e Kido (2014) foi constatado que o ibuprofeno potencializou as propriedades antitumorais do cisplatino nas células do adenocarcinoma pulmonar, através de um mecanismo de ação mediado pela supressão de Hsp70. Em outro estudo realizado por Ahmetaj-Shala *et al.* (2017) o mesmo foi capaz de produzir efeitos antiplaquetários.

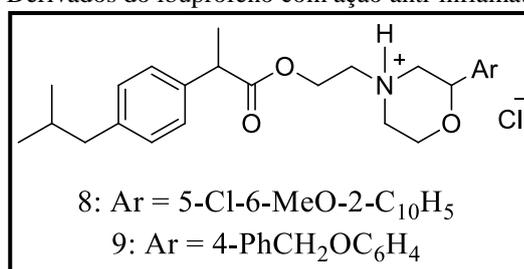
Figura 54. Derivados do ibuprofeno com ação anti-inflamatória e analgésica.



Fonte: Amir, Akhter e Alam, 2016.

Algumas evidências demonstraram que a depressão está associada ao aumento da inflamação, uma vez que ao provocar uma resposta inflamatória aguda em seres humanos saudáveis, gera um comportamento semelhante a depressão. Em estudo objetivando desenvolver novos compostos que possuem atividade inibitória da enzima COX-2 e da recaptação da serotonina, Dou *et al.* (2014) sintetizaram diversos derivados do ibuprofeno, dos quais os compostos **8** e **9** (Figura 55) apresentaram atividade inibitória da enzima COX-2 e da recaptação de serotonina. O composto **9** mostrou uma atividade anti-inflamatória maior que a do ibuprofeno e possui atividade antidepressiva boa se comparada a fluoxetina.

Figura 55. Derivados do ibuprofeno com ação anti-inflamatória e antidepressiva.



Fonte: Dou *et al.*, 2014.

Nos últimos anos, foram realizados alguns estudos, que mostraram claramente que o ibuprofeno é um fármaco eclético, pois o mesmo consegue se ligar a diferentes tipos de receptores farmacológicos, até o momento, mais de 20 proteínas foram identificadas para interagir diretamente com o mesmo. Conseqüentemente, possuem várias possíveis aplicações terapêuticas. Sendo inicialmente orientado principalmente contra a tríade de artrite reumatóide (combinando propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas). Existem estudos nos quais o ibuprofeno é usado como um meio para a prevenção da trombose, no tratamento do ducto arterial persistente em lactentes prematuros e/ou de baixo peso ao nascer, na prevenção da doença de Parkinson, enxaqueca, câncer de cólon, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (CARTER; BROWN, 2013).

O ibuprofeno, assim como outros AINEs, possuem como efeito colateral uma ação tóxica nas células do epitélio gastrointestinal, a redução dessa toxicidade continua sendo o objetivo fundamental de cada modificação química realizada na estrutura de tais compostos. A esterificação ou amidação do grupo carboxílico da molécula é uma das modificações na estrutura química da mesma que quase sempre se mostra eficiente na redução desses efeitos colaterais. Além disso, a modificação, especialmente com moléculas poliméricas, permite prolongar a ação do fármaco. O ibuprofeno é a segunda molécula mais modificada após a aspirina. Várias centenas, senão milhares (se tomar em consideração patentes), de ibuprofeno

e outros derivados de ácido fenilpropiónico, tais como fenoprofeno, flubiprofeno, etc. são conhecidos (CARTER; BROWN, 2013).

Baseado nisso, foram realizadas modificações químicas no grupo carboxila da molécula do ibuprofeno, tentando minimizar os efeitos colaterais, potencializar a ação farmacológica e aumentar a solubilidade do mesmo em água.

3.3 Resultados e discussão

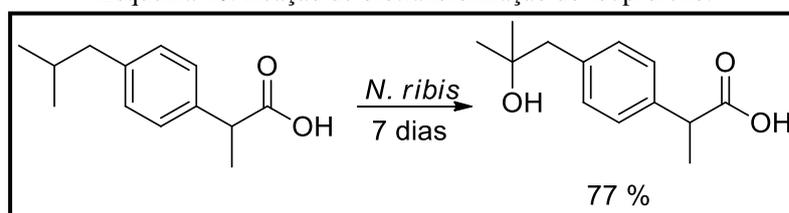
3.3.1 Triagem dos fungos endofíticos para uso no estudo de biotransformação do ibuprofeno

Inicialmente para o estudo de biotransformação do ibuprofeno foi realizada uma triagem onde foi testado o potencial biocatalítico dos fungos *Lasiodiplodia gonubiensis*, *Neofusicoccum ribis* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Os extratos obtidos dos estudos de biotransformação foram analisados por CCDA. Dos fungos usados na triagem apenas o *Neofusicoccum ribis* foi capaz de reagir com o substrato. O produto de biotransformação obtido foi e codificado como IB-1.

3.3.1.1 Biotransformação do Ibuprofeno e obtenção de IB-1

Conforme a metodologia descrita nos itens 5.8 e 5.9 (p. 115 e 116) o fungo *Neofusicoccum ribis* transformou o ibuprofeno, gerando o derivado IB-1 (Esquema 10). O derivado IB-1 apresentou-se como um sólido marrom com ponto de fusão de 117,9-119,0 °C e rendimento de 77% (massa de 125,4 mg).

Esquema 10. Reação de biotransformação do ibuprofeno.

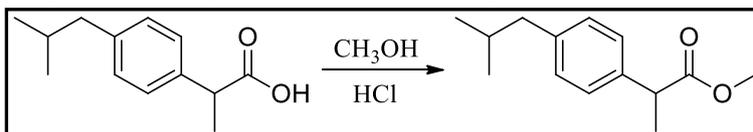


3.3.2 Modificação química do ibuprofeno

3.3.2.1 Reação de esterificação do ibuprofeno com metanol

De acordo com o método descrito no item 6.1 (p. 122) realizou-se uma reação de esterificação de Fischer do ibuprofeno (Esquema 11). O produto derivado obtido apresentou-se como um óleo amarelo após 1 hora de reação e com rendimento de 75%. Este derivado foi codificado como IB-M.

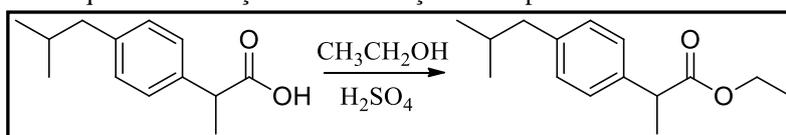
Esquema 11. Reação de esterificação do ibuprofeno com metanol.



3.3.2.2 Reação de esterificação do ibuprofeno com etanol

Outro derivado obtido, usando o ibuprofeno como substrato de partida (item 6.2, p. 122; Esquema 12), envolveu a realização de uma esterificação de Fischer, utilizando como reagente o etanol. Após 3 horas de reação com rendimento de 42%, o éster obtido na forma de um óleo amarelo foi codificado como IB-Et.

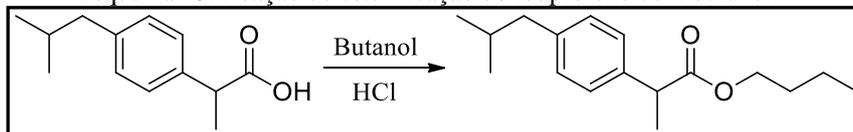
Esquema 12. Reação de esterificação do ibuprofeno com etanol.



3.3.2.3 Reação de esterificação do ibuprofeno com butanol

Outro derivado do ibuprofeno obtido por esterificação de Fischer (item 6.3, p. 122; Esquema 13), utilizando como reagente o n-butanol foi codificado como IB-But. O tempo de reação foi de 1 hora com rendimento de 48%.

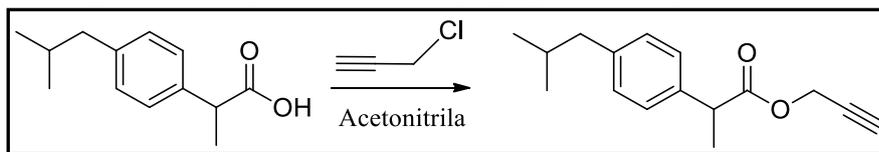
Esquema 13. Reação de esterificação do ibuprofeno com butanol.



3.3.2.4 Reação do ibuprofeno com cloreto de propargila

O derivado denominado IB-CIP foi obtido por esterificação do ibuprofeno utilizando como reagente o cloreto de propargila (item 6.5, p. 123; Esquema 14, p. 99). O tempo reacional foi 4 horas com rendimento de 36%.

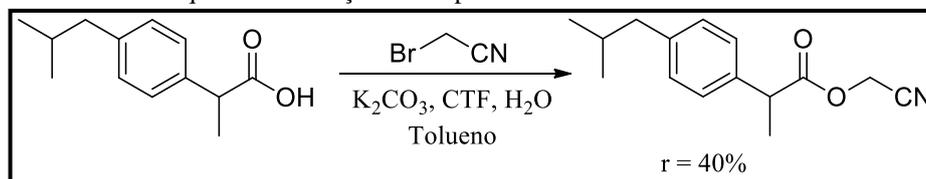
Esquema 14. Reação com cloreto de propargilacom o ibuprofeno.



3.3.2.5 Reação do ibuprofeno com bromoacetnitrila

O derivado denominando IB-BrCN foi obtido por esterificação do ibuprofeno utilizando como reagente bromoacetnitrila (item 6.4, p. 123; Esquema 15). O tempo reacional foi de 2 horas de reação com rendimento de 40%.

Esquema 15. Reação do ibuprofeno com bromoacetnitrila.



3.4 Determinação estrutural dos derivados do ibuprofeno

3.4.1 Determinação estrutural do IB-1

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do IB-1 (Figura 56, p. 100) apresentou os sinais em δ_{H} 3,73 (d; 1H; $J = 6,8$ Hz; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, em δ_{H} 7,27 (d; 2H; $J = 5,7$ Hz; H-4) e δ_{H} 7,18 (d; 2H; $J = 6,4$ Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático, em δ_{H} 2,75 (s; 2H; H-7) referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico, em δ_{H} 1,23 (s; 6H; H-9 e 10) e em δ_{H} 1,51 (d; 3H; $J = 5,1$ Hz; H-11) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metílicos.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-1 (Figura 57, p. 101), foram observados 10 linhas espectrais. Foram verificados sinais em δ_{C} 179,9 (C-1) pertencente a carboníla de ácido carboxílico, um sinal em δ_{C} 71,2 (C-8) referente a carbono oxigenado, além dos sinais em δ_{C} 137,0 (C-3), 127,6 (C-4), 130,9 (C-5) e 138,3 (C-6) relativos aos carbonos do anel aromático. O sinal em δ_{C} 45,1 (C-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, o outro sinal em δ_{C} 49,5 (C-7) referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico, já os sinais em δ_{C} 18,3 (C-11) e em δ_{C} 29,3 (C-9 e 10) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metílicos. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 58, p. 101) com o espectro de ^{13}C -BB mostrou a presença de quatro carbonos não

hidrogenados (C), três carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH₂) e dois sinais para carbonos metílicos (CH₃).

O espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C - HSQC (Figura 59, p. 102) de IB-1 permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos, os quais estão descritos na Tabela 10, p. 103.

Os dados espectrométricos de IB-1 (Figura 60, p. 102) de hidrogênio foram comparados com os dados de hidrogênio da literatura (KURTZ *et al*, 1981) para o ácido 2-[4-(2-hidroxil-2-metilpropil)fenil]propanóico (Tabela 10, p. 103), confirmando a estrutura química proposta.

Figura 56. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do IB-1.



Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-1

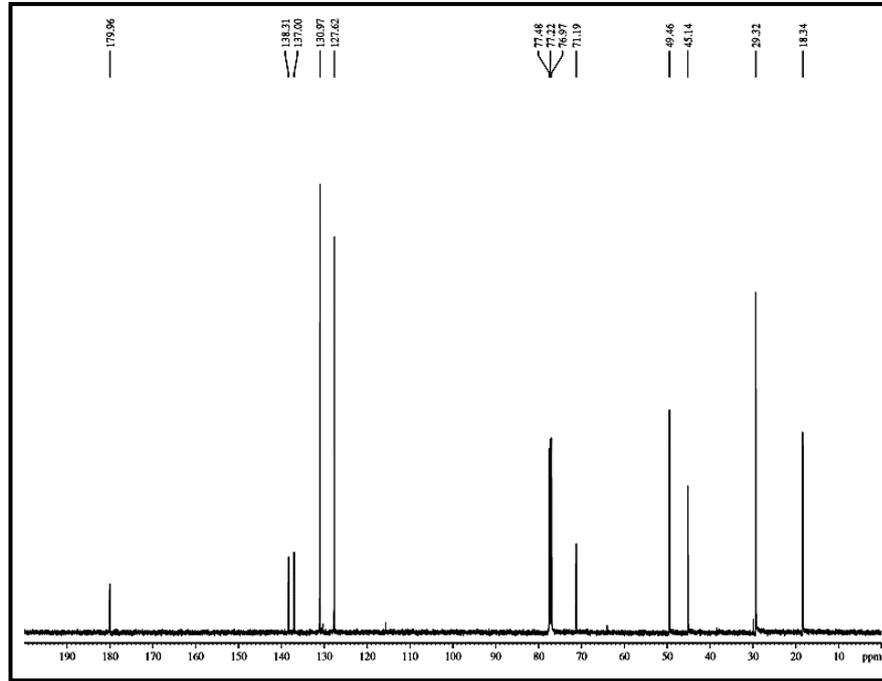


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do IB-1.

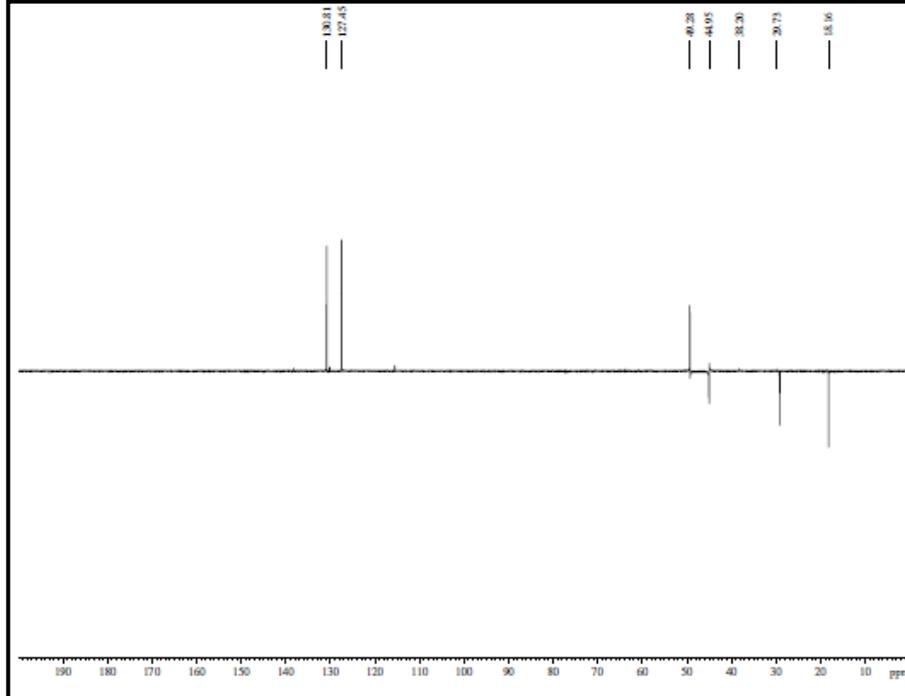


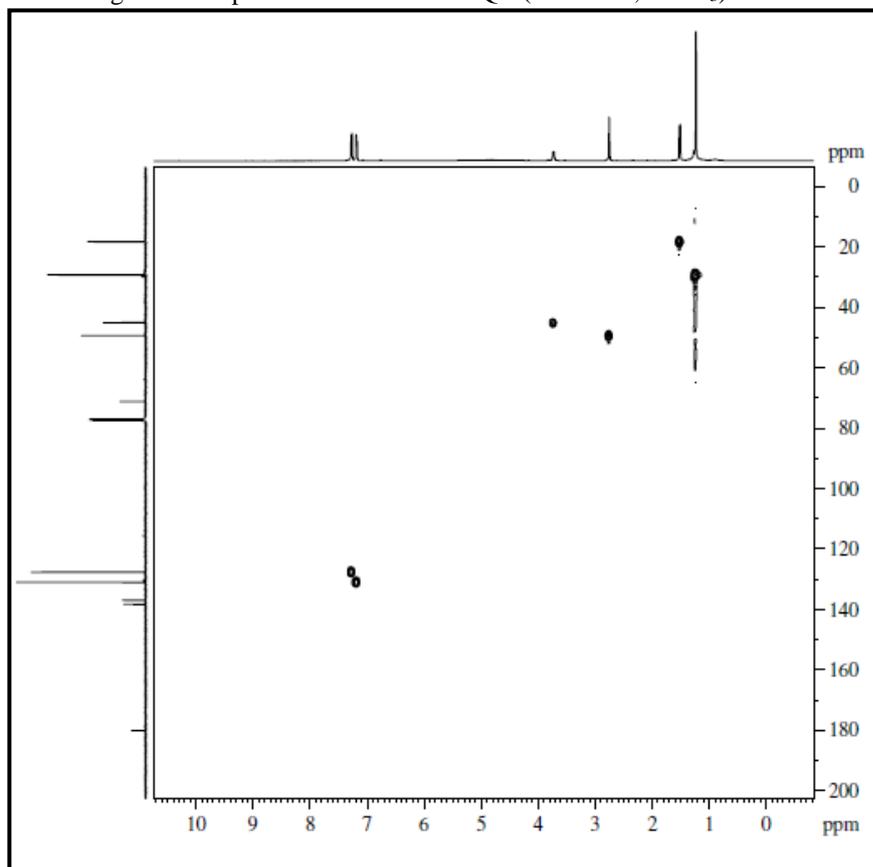
Figura 59. Espectro de RMN 2D HSQC (500 MHz, CDCl₃) do IB-1.

Figura 60. Estrutura química do IB-1.

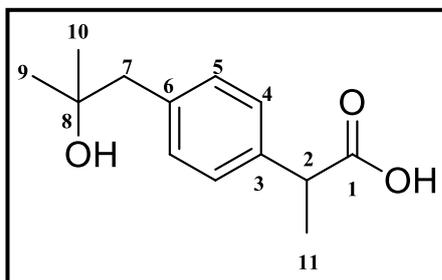


Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do IB-1 (500/125 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H (390 MHz, CDCl_3) registrado na literatura.

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C
	IB-1	Kurtz <i>et al.</i> , 1981 ^a	IB-1
1	-	-	179,9
2	3,73 (<i>d</i> ; 1H; $J = 6,8$ Hz)	3,7 (<i>q</i> , 1H)	45,1
3	-	-	137,0
4	7,27 (<i>d</i> ; 2H; $J = 5,7$ Hz)	7,3 (<i>m</i> , 2H)	127,6
5	7,18 (<i>d</i> ; 2H; $J = 6,4$ Hz)	7,1 (<i>m</i> , 2H)	130,9
6	-	-	138,3
7	2,75 (<i>s</i> ; 2H)	2,7 (<i>s</i> , 2H)	49,5
8	-	-	71,2
9	1,23 (<i>s</i> ; 3H)	1,2 (<i>s</i> , 3H)	29,3
10	1,23 (<i>s</i> ; 3H)	1,2 (<i>s</i> , 3H)	29,3
11	1,51 (<i>d</i> ; 3H; $J = 5,1$ Hz)	1,5 (<i>s</i> , 3H)	18,3

3.4.2 Determinação estrutural do IB-M

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do IB-M (Figura 61, p. 104) apresentou sinal em δ_{H} 3,71 (*q*; 1H; $J = 7,2$ Hz; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, sinais em δ_{H} 7,21 (*d*; 2H; $J = 8,0$ Hz; H-4) e δ_{H} 7,10 (*d*; 2H; $J = 8,0$ Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático. Ressaltou-se também os sinais em δ_{H} 2,46 (*d*; 2H; $J = 7,1$ Hz; H-7) referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico, em δ_{H} 1,86 (*sept.*; 1H; $J = 7,2$ Hz; H-8) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, em δ_{H} 0,91 (*d*; 6H; $J = 6,6$ Hz; H-9 e 10) referentes a hidrogênios ligados a carbono metílico, um outro sinal em δ_{H} 1,5 (*d*; 3H; $J = 7,1$ Hz; H-11) referente a hidrogênio ligado a carbono metílico e um sinal em δ_{H} 3,67 (*s*; 3H; H-12) referente a hidrogênio ligado a metoxila.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-M (Figura 62, p. 105) foram observados 10 linhas espectrais. Foram verificados sinais em δ_{C} 175,4 (C-1) indicativo a um carboníla de éster, um sinal em δ_{C} 52,2 (C-12) referente a carbono da metoxila, além dos sinais em δ_{C} 137,9 (C-3), 127,3 (C-4), 129,5 (C-5) e 140,7 (C-6) relativos aos carbonos do anel aromático. Os sinais em δ_{C} 45,3 (C-2) e δ_{C} 30,4 (C-8) referentes a hidrogênios ligados a carbono metínico, o outro sinal em δ_{C} 45,3 (C-2 e 7) referente a hidrogênio ligado a carbono

metilênico. Os sinais em δ_C 22,6 (C-9 e 10) e δ_C 18,8 (C-11) foram associados a hidrogênios ligados a carbonos metílicos. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 63, p. 105) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de três carbonos não hidrogenados (C), quatro carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH₂) e quatro carbonos metílicos (CH₃).

O espectro de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 64, p. 106) de IB-M permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 11, p. 107).

Os dados espectrométricos de IB-M (Figura 65, p. 106) de RMN 1H foram comparados com os dados de RMN 1H da literatura (Fujisawa *et al.*, 2005) para o metil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato (Tabela 11, p. 107), confirmando a estrutura química proposta.

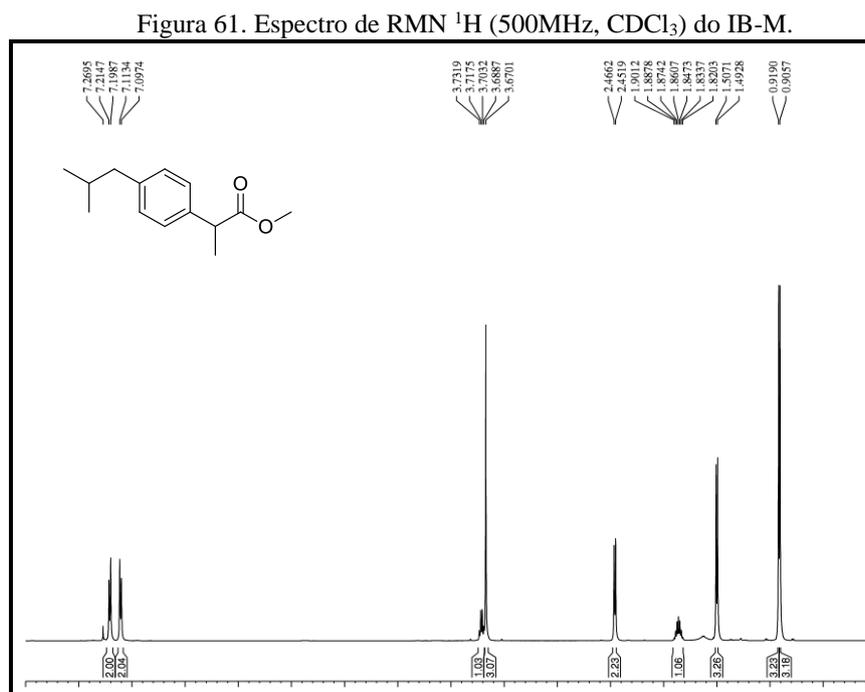


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-M.

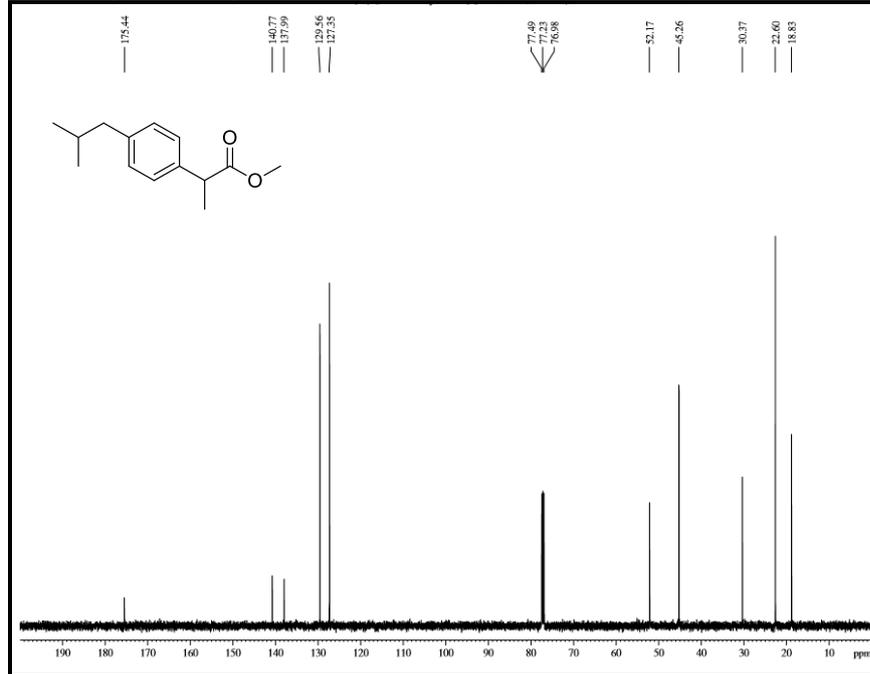


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do IB-M.

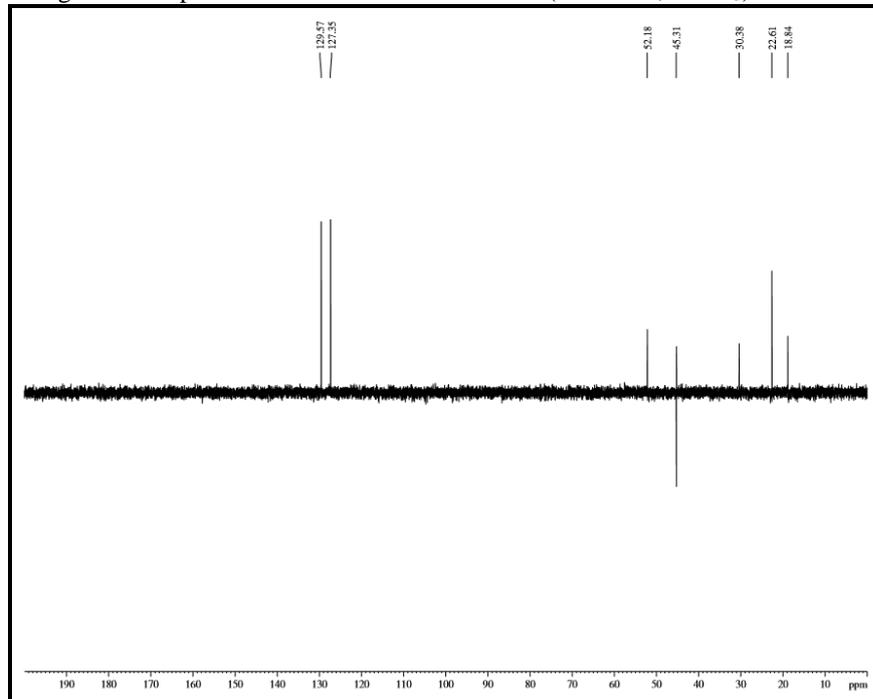


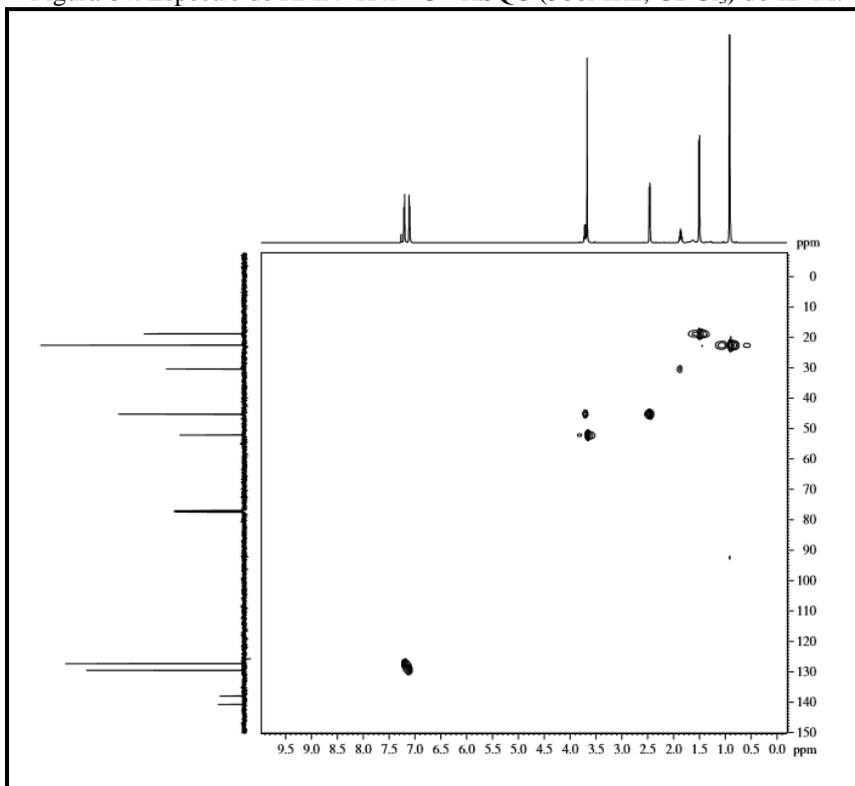
Figura 64. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500MHz, CDCl_3) do IB-M.

Figura 65. Estrutura química do IB-M.

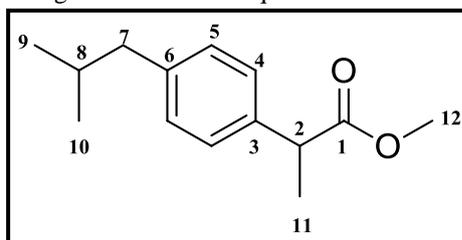


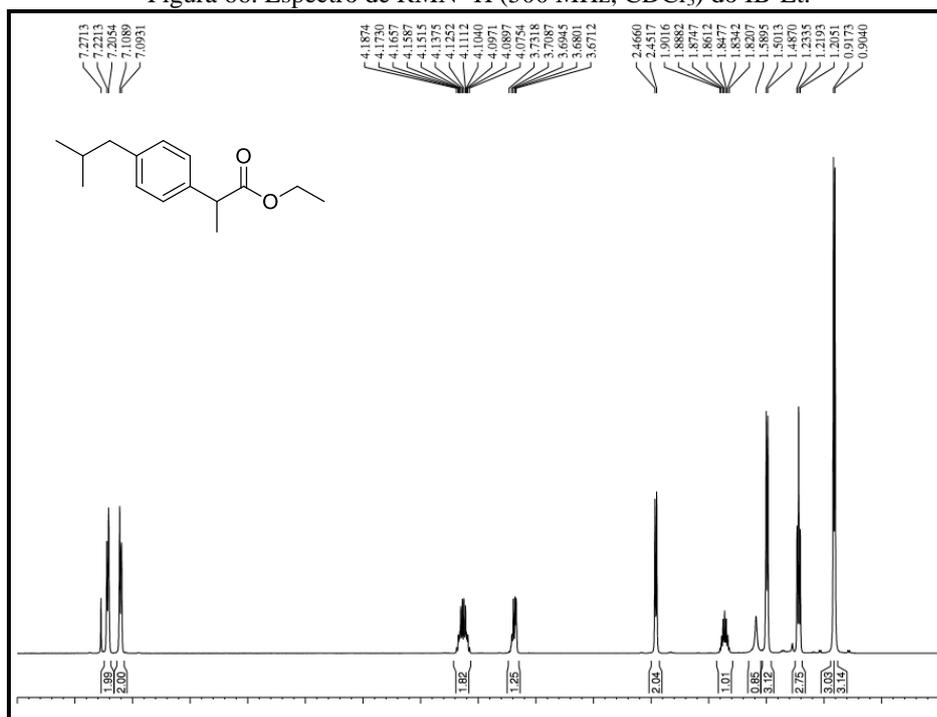
Tabela 11. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do IB-M (500/125 MHz, CDCl_3) e os dados espectrais de RMN ^1H registrado na literatura.

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C
	IB-M	Fujisawa <i>et al</i> , 2005 ^a	IB-M
1	-	-	175,4
2	3,71 (q; 1H; $J = 7,2$ Hz)	3,70 (q; 1H; $J = 7,0$ Hz)	45,3
3	-	-	137,9
4	7,21 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz)	7,20 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz)	127,3
5	7,10 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz)	7,09 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz)	129,5
6	-	-	140,7
7	2,46 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz)	2,44 (d; 2H; $J = 7,0$ Hz)	45,3
8	1,86 (sept.; 1H; $J = 7,2$ Hz)	1,82 (sept.; 1H; $J = 7,0$ Hz)	30,4
9	0,91 (d; 3H; $J = 6,6$ Hz)	0,90 (d; 3H; $J = 7,0$ Hz)	22,6
10	0,91 (d; 3H; $J = 6,6$ Hz)	0,90 (d; 3H; $J = 7,0$ Hz)	22,6
11	1,50 (d; 3H; $J = 7,1$ Hz)	1,49 (d; 3H; $J = 7,0$ Hz)	18,8
12	3,7 (s, 3H)	3,67 (s, 3H)	52,2

(a) 270 MHz, CDCl_3

3.4.3 Determinação estrutural do IB-Et

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do IB-Et (Figura 66, p. 108) apresentou sinal em δ_{H} 3,69 (q; 1H; $J = 4,4$ Hz; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, sinais em δ_{H} 7,21 (d; 2H; $J = 7,9$ Hz; H-4) e δ_{H} 7,10 (d; 2H; $J = 7,9$ Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático. Destacou-se também sinais em δ_{H} 1,87 (sept.; 1H; $J = 6,7$ Hz; H-8) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, em δ_{H} 2,46 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz; H-7) e δ_{H} 4,13 (q; 2H; $J = 7,0$ Hz; H-12) referentes a hidrogênios ligados a carbono metilênico. Os sinais em δ_{H} 0,91 (d; 6H; $J = 6,6$ Hz; H-9 e 10), δ_{H} 1,49 (d; 3H; $J = 7,1$ Hz; H-11) e em δ_{H} 1,22 (t; 3H; $J = 7,1$ Hz; H-9/13), referentes a hidrogênios ligados a carbono metílico.

Figura 66. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do IB-Et.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-Et (Figura 67, p. 109), foram observados 12 linhas espectrais. Neste espectro foram verificados sinais em δ_c 175,0 (C-1) alusivo a um carboníla de éster e um sinal em δ_c 60,8 (C-12) referente a carbono oxigenado, além dos sinais em δ_c 138,1 (C-3), 127,3 (C-4), 129,5 (C-5) e 140,6 (C-6) associados aos carbonos do anel aromático. Os sinais em δ_c 45,4 (C-2) e δ_c 30,4 (C-8) referentes a hidrogênios ligados a carbono metínico, o sinal em δ_c 45,3 (C-7) referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico, já os sinais em δ_c 22,6 (C-9 e 10), δ_c 18,8 (C-11) e δ_c 14,3 (C-13) foram associados a hidrogênios ligados a carbonos metílicos.

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 68, p. 109) de IB-Et permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 12, p. 110).

Os dados espectrométricos de IB-Et (Figura 69, p. 110) foram comparados com os dados da literatura (Koul *et al*, 2005) para o etil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato (Tabela 12, p. 110), confirmando a estrutura química proposta.

Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-Et.

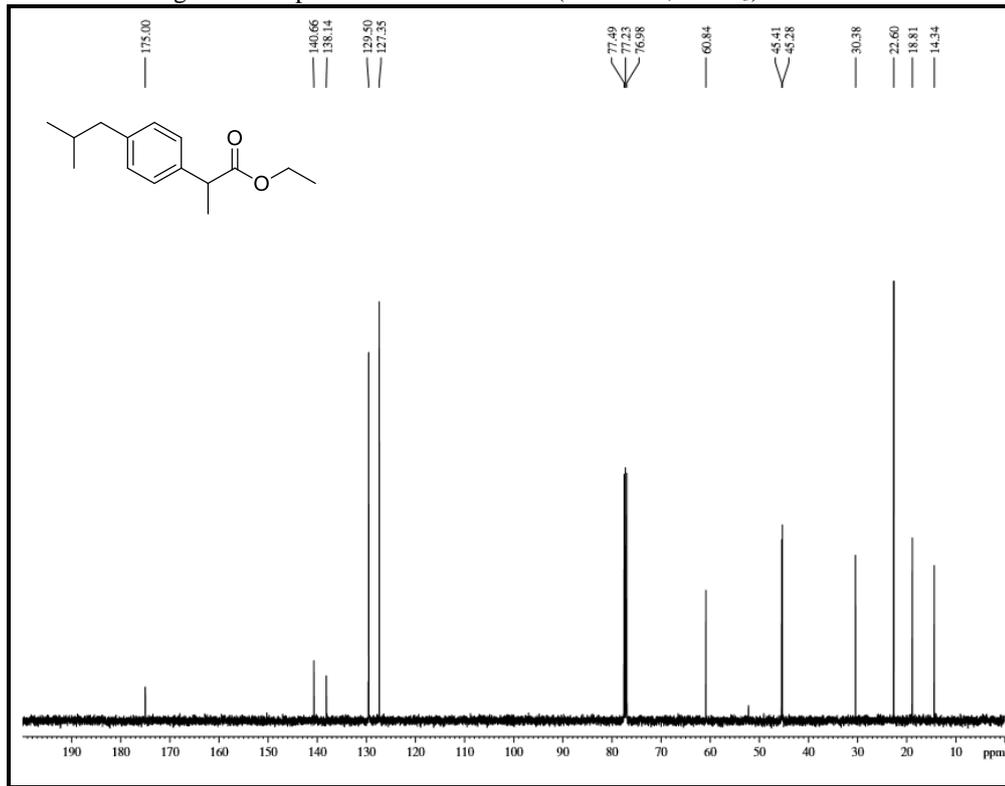


Figura 68. Espectro de RMN ^1H x ^{13}C - HSQC (500MHz, CDCl_3) do IB-Et.

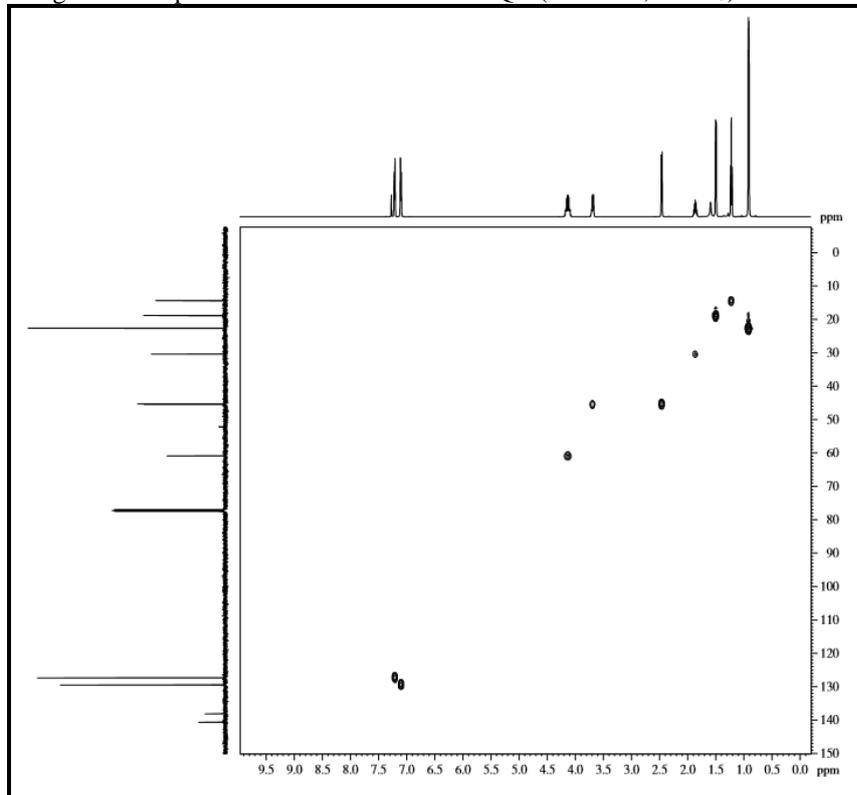
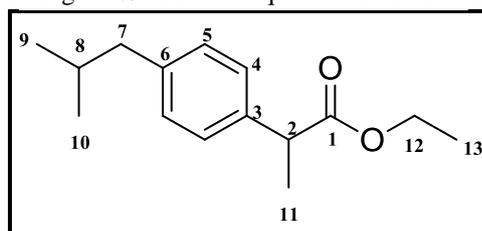


Figura 69. Estrutura química do IB-Et.

Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-Et em comparação com dados do etil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato descrito na literatura.

IB-Et ^a			Koul <i>et al</i> , 2005 ^b	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	175,0	-	174,7
2	3,69 (<i>q</i> ; 1H; $J = 4,4$ Hz)	45,4	3,70 (<i>q</i> ; 1H; $J = 7,0$ Hz)	45,2
3	-	138,1	-	137,9
4	7,21 (<i>d</i> ; 2H; $J = 7,9$ Hz)	127,3	7,23 (<i>d</i> ; 2H; $J = 8,1$ Hz)	127,1
5	7,10 (<i>d</i> ; 2H; $J = 7,9$ Hz)	129,5	7,11 (<i>d</i> ; 2H; $J = 8,1$ Hz)	129,3
6	-	140,6	-	140,4
7	2,46 (<i>d</i> ; 2H; $J = 7,1$ Hz)	45,3	2,49 (<i>d</i> ; 2H; $J = 7,1$ Hz)	45,1
8	1,87 (<i>sept.</i> ; 1H; $J = 6,7$ Hz)	30,4	1,30-1,44 (<i>m.</i> ; 1H)	30,2
9	0,91 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	22,6	0,92 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	
10	0,91 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	22,6	0,92 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	22,4
11	1,49 (<i>d</i> ; 3H; $J = 7,1$ Hz)	18,8	1,49 (<i>d</i> ; 3H; $J = 7,1$ Hz)	18,6
12	4,13 (<i>q</i> ; 2H; $J = 7,0$ Hz)	60,8	4,13 (<i>q</i> ; 2H; $J = 7,1$ Hz)	60,6
13	1,22 (<i>t</i> ; 3H; $J = 7,1$ Hz)	14,3	1,22 (<i>t</i> ; 3H; $J = 7,1$ Hz)	14,1

(a) 500 MHz/125 MHz, CDCl_3 (b) 200 MHz/ 50 MHz, CDCl_3

3.4.4 Determinação estrutural do IB-But

O espectro de RMN ^1H (Figura 70, p. 111) do IB-But (300 MHz, CDCl_3) apresentou sinal em δ_{H} 3,70 (m; 1H; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, sinais em δ_{H} 7,21 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz; H-4) e δ_{H} 7,10 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático. Destacou-se também os sinais em δ_{H} 1,60 (m; 1H; H-8) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, em δ_{H} 2,45 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz; H-7), δ_{H} 4,07 (t; 2H; $J = 6,6$ Hz; H-12), δ_{H} 1,58 (m; 2H; H-13) e δ_{H} 1,29 (sext; 2H; $J = 7,4$ Hz; H-14) referentes a hidrogênios ligados a carbono metilênico. Os sinais em δ_{H} 0,89

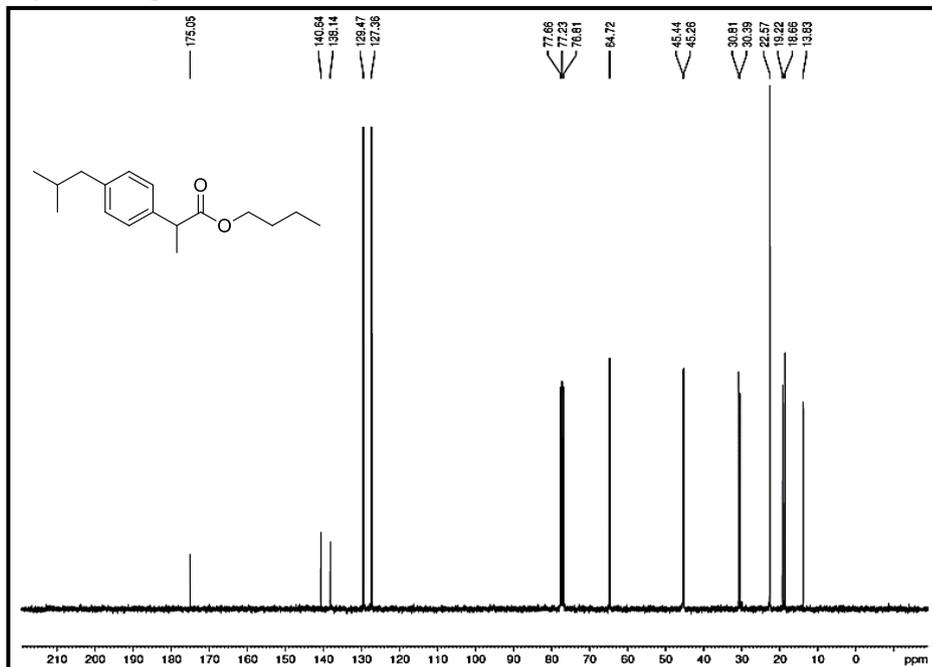
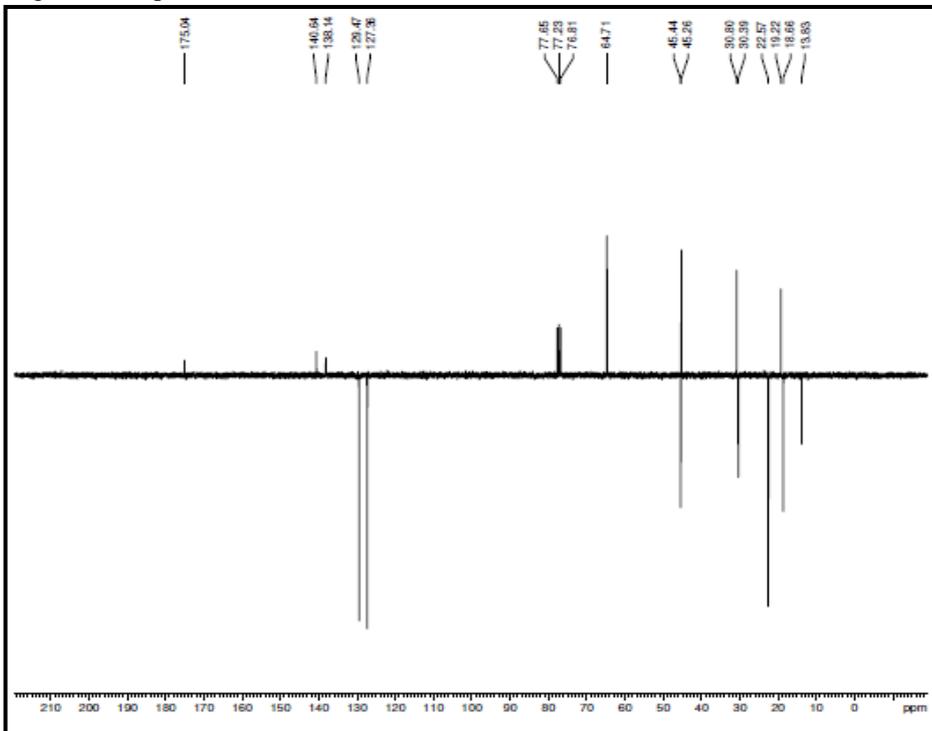
Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do IB-But.Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C - JMOD (75 MHz, CDCl_3) do IB-But.

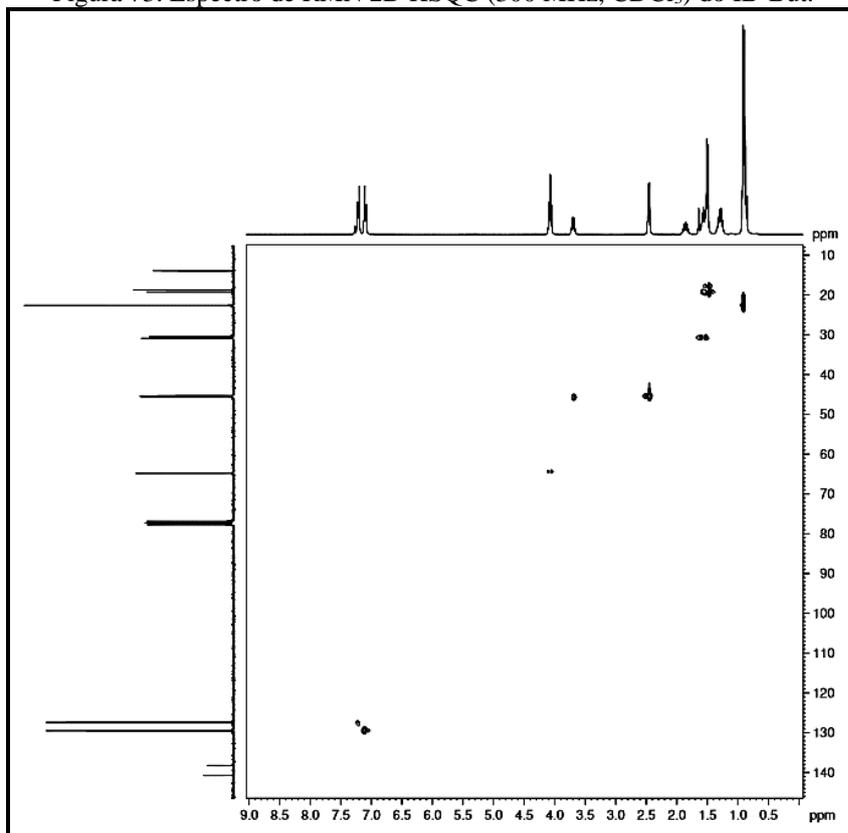
Figura 73. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl₃) do IB-But.

Figura 74. Estrutura química do IB-But.

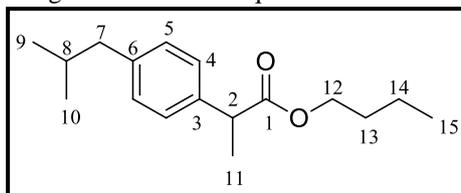


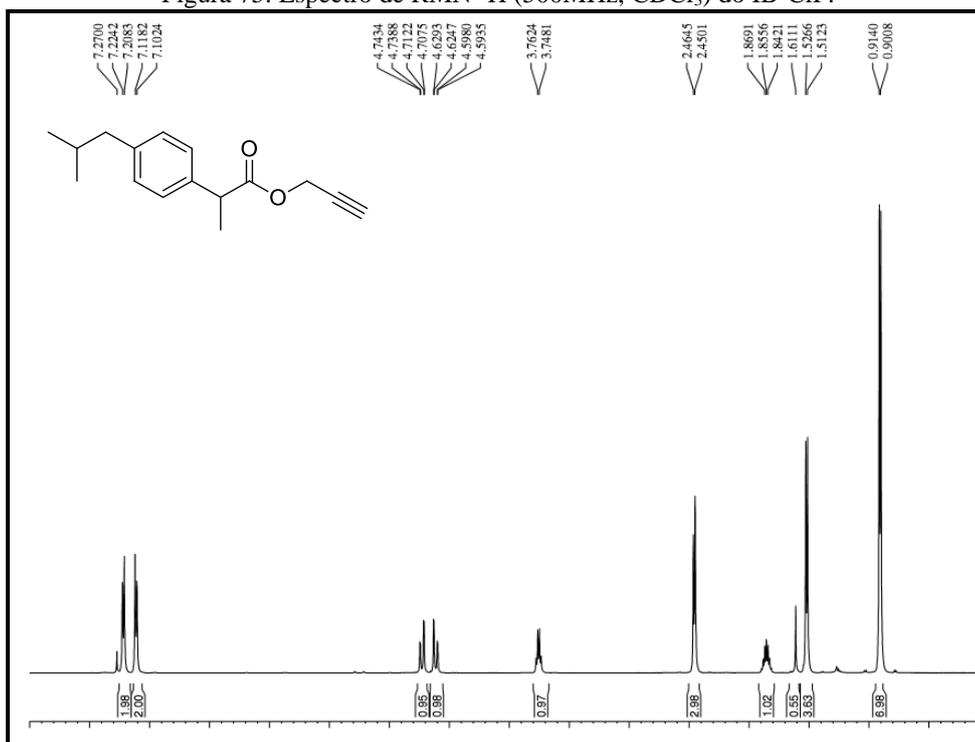
Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-But em comparação com dados do butil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato descrito na literatura.

IB-But ^a			Koul <i>et al</i> , 2005 ^b	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	175,0	-	174,7
2	3,70 (<i>m</i> ; 1H)	45,3	3,71 (<i>q</i> ; 1H; <i>J</i> = 7,2 Hz)	45,1
3	-	138,1	-	137,9
4	7,21 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 8,0 Hz)	127,4	7,24 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 8,1 Hz)	127,1
5	7,10 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 8,0 Hz)	129,5	7,21 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 8,1 Hz)	129,2
6	-	140,6	-	140,4
7	2,45 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,1 Hz)	45,4	2,42 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,2 Hz)	45,2
8	1,60 (<i>m.</i> ; 1H)	30,4	1,42-1,62 (<i>m</i> ; 3H)	30,6
9	0,89 (<i>m</i> ; 3H)	22,6	0,92 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 6,6 Hz)	20,3
10	0,89 (<i>m</i> ; 3H)	22,6	0,92 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 6,6 Hz)	20,3
11	1,58 (<i>m</i> ; 3H)	18,7	1,50 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 7,2 Hz)	18,4
12	4,07 (<i>t</i> ; 2H; <i>J</i> = 6,6 Hz)	64,7	4,09 (<i>t</i> ; 2H; <i>J</i> = 6,5 Hz)	64,4
13	1,58 (<i>m</i> ; 2H)	30,8	1,42-1,62 (<i>m</i> ; 2H)	30,6
14	1,29 (<i>sext.</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,4 Hz)	19,2	1,24-1,35 (<i>m.</i> ; 2H)	19,3
15	0,89 (<i>m</i> ; 3H)	13,8	0,88 (<i>t</i> ; 3H; <i>J</i> = 7,0 Hz)	13,6

(a) 500 MHz/125 MHz, CDCl_3 (b) 200 MHz/ 50 MHz, CDCl_3

3.4.5 Determinação estrutural do IB-CIP

O espectro de RMN ^1H (Figura 75, p. 115) do IB-CIP (500 MHz, CDCl_3) apresentou sinal em δ_{H} 3,75 (*q*; 1H; *J* = 7,1 Hz; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, sinais em δ_{H} 7,22 (*d*; 2H; *J* = 7,9 Hz; H-4) e δ_{H} 7,11 (*d*; 2H; *J* = 7,9 Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático. Destacou-se também os sinais em δ_{H} 1,85 (*m*; 1H; H-8) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, em δ_{H} 2,45 (*d*; 2H; *J* = 7,2 Hz; H-7) referentes a hidrogênios ligados a carbono metilênico. Os sinais em δ_{H} 0,91 (*d*; 6H; *J* = 6,6 Hz; H-9 e 10) e em δ_{H} 1,52 (*d*; 3H; *J* = 7,1 Hz; H-11), referentes a hidrogênios ligados a carbono metílico.

Figura 75. Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) do IB-CIP.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-CIP (Figura 76, p. 116) foram observados 13 linhas espectrais. Nesse espectro foram verificados sinais em δ_c 174,1 (C-1) alusivo a uma carboníla de éster e um sinal em δ_c 52,4 (C-12) referente a carbono oxigenado, além dos sinais em δ_c 137,4 (C-3), 140,9 (C-4), 137,4 (C-5) e 140,9 (C-6) referentes aos carbonos do anel aromático. Os sinais em δ_c 45,1 (C-2) e δ_c 30,4 (C-8) referentes a hidrogênios ligados a carbono metínico, o sinal em δ_c 45,2 (C-7) alusivos à carbono metilênico. Já os sinais em δ_c 22,6 (C-9 e 10) e δ_c 18,8 (C-11) foram associados a carbonos metílicos. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -JMOD (Figura 77, p. 116) com o espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) mostrou a presença de cinco carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH_2) e três sinais para carbono metílico (CH_3).

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 78, p. 117) de IB-CIP permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 14, p. 117).

Os dados espectrométricos discutidos são compatíveis com a estrutura química do prop-2-inil 2-(4-isobutilfenil)propanoato (Figura 79, p. 117).

Figura 76. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) do IB-CIP.

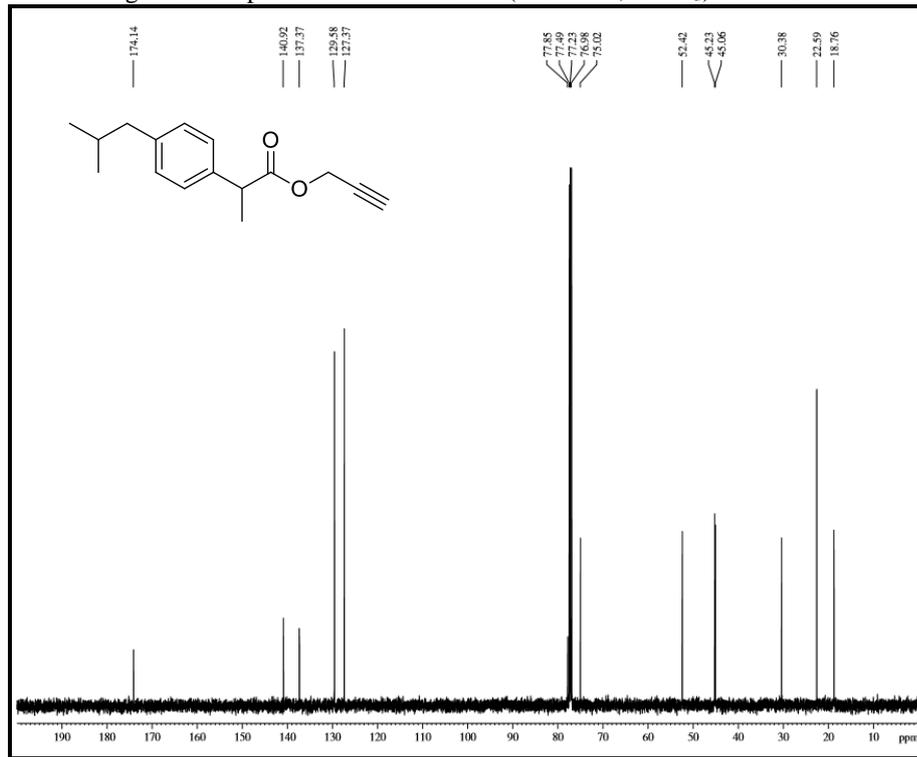


Figura 77. Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (125 MHz, CDCl_3) do IB-CIP.

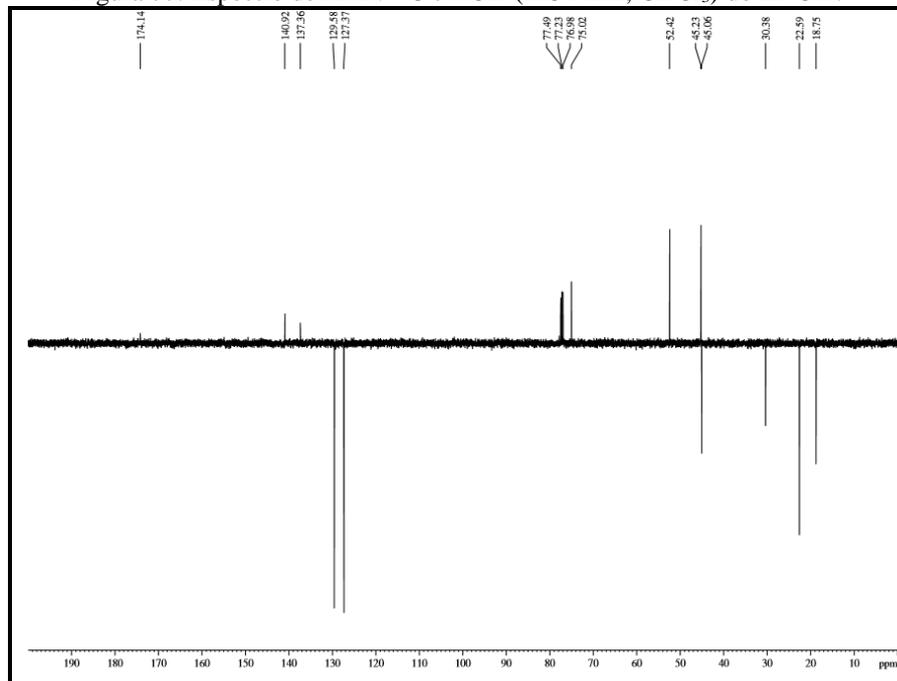


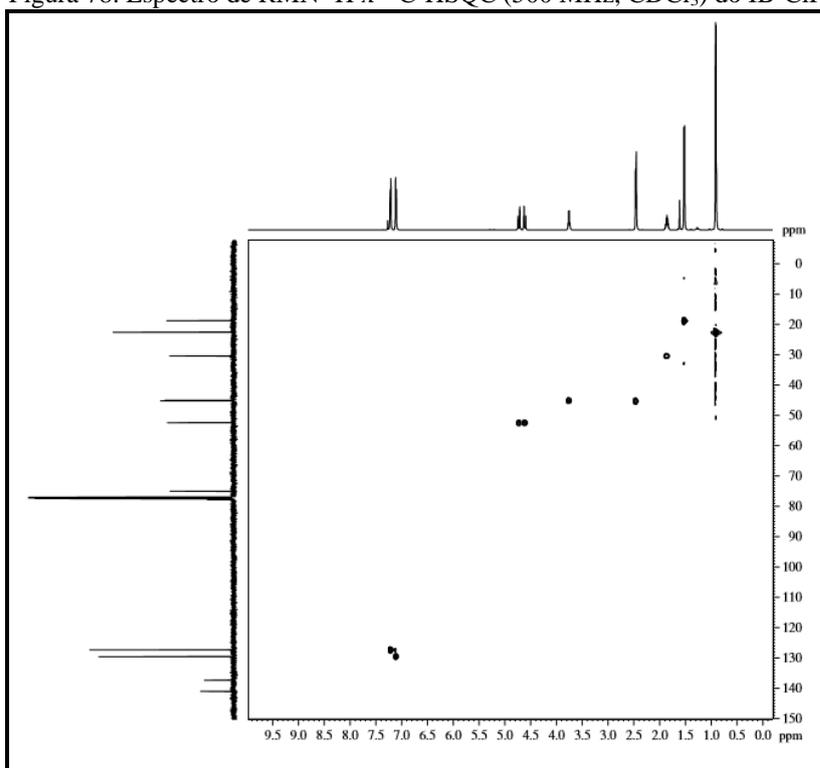
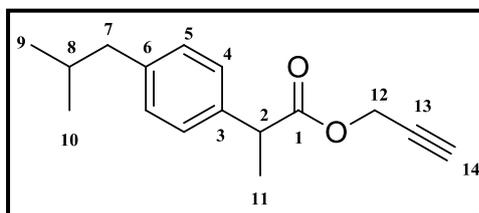
Figura 78. Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HSQC (500 MHz, CDCl_3) do IB-CIP.

Figura 79. Estrutura química do IB-CIP.

Tabela 14. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do prop-2-ynil 2-(4-isobutilfenil)propanoato (IB-CIP).

HSQC		
IB-CIP ^a		
C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
1	-	174,1
2	3,75 (<i>q</i> ; 1H; <i>J</i> = 7,1 Hz)	45,1
3	-	137,4
4	7,22 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,9 Hz)	120,9
5	7,11 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,9 Hz)	137,4
6	-	140,9
7	2,45 (<i>d</i> ; 2H; <i>J</i> = 7,2 Hz)	45,2

8	1,85 (<i>m.</i> ; 1H)	30,4
9	0,91 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 6,6 Hz)	22,6
10	0,91 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 6,6 Hz)	22,6
11	1,52 (<i>d</i> ; 3H; <i>J</i> = 7,1 Hz)	18,8
12	a. 4,72 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 15,6 Hz) b. 4,61 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 15,6 Hz)	54,2
13	-	77,8
14	-	75,0

(a) 500 MHz/125 MHz, CDCl₃

3.4.6 Determinação estrutural do IB-BrCN

O espectro de RMN ¹H (Figura 80, p. 119) do IB-BrCN (300 MHz, CDCl₃) apresentou sinal em δ_H 3,78 (*q*; 1H; *J* = 7,2 Hz; H-2) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, sinais em δ_H 7,19 (*d*; 2H; *J* = 8,1 Hz; H-4) e δ_H 7,12 (*d*; 2H; *J* = 8,1 Hz; H-5) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel aromático. Destacou-se também os sinais em δ_H 1,86 (*m*; 1H; H-8) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico, já os sinais em δ_H 2,46 (*d*; 2H; *J* = 7,1 Hz; H-7), δ_H 4,74 (*d*; 1H; *J* = 15,6 Hz; H-12a) e em δ_H 4,64 (*d*; 1H; *J* = 15,6 Hz; H-12b) foram associados a hidrogênios ligados a carbono metilênico. Os sinais em δ_H 0,91 (*d*; 6H; *J* = 6,6 Hz; H-9 e 10) e em δ_H 1,54 (*d*; 3H; *J* = 7,2 Hz; H-11) foram compatíveis com hidrogênios ligados a carbono metílico.

No espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, CDCl₃) do IB-BrCN (Figura 81, p. 120) foram observados 12 linhas espectrais. Neste espectro foram verificados sinais em δ_C 173,3 (C-1) alusivo a uma carboníla de éster e um sinal em δ_C 48,7 (C-12) referente a carbono oxigenado, além dos sinais em δ_C 136,5 (C-3), 127,3 (C-4), 129,8 (C-5) e 141,4 (C-6) referentes aos carbonos do anel aromático. Os sinais em δ_C 44,8 (C-2) e δ_C 30,3 (C-8) foram associados a hidrogênios ligados a carbono metínico, o sinal em δ_C 45,2 (C-7) alusivo a carbono metilênico; os sinais em δ_C 22,6 (C-9 e 10) e δ_C 18,5 (C-11) referentes a carbonos metílicos e o sinal em δ_C 114,5 referente a carbono não hidrogenado. A comparação do espectro de RMN ¹³C-APT (Figura 82, p. 120) com o espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, CDCl₃) mostrou a presença de quatro carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH₂) e três sinais para carbono metílico (CH₃).

A análise do espectro bidimensional de RMN de ¹H x ¹³C-HSQC (Figura 83, p. 121) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio a seu respectivo

carbono (Tabela 15, p. 123). O espectro bidimensional de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figura 84, p. 121) permitiu atribuir todas as correlações a duas (2J) e três (3J) ligações, conforme mostra a Tabela 15, p. 123.

No espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (Figura 85, p. 122) foram visualizados alguns acoplamentos como o acoplamento do hidrogênio em δ 3,78 com o hidrogênio em δ 1,54, do hidrogênio em δ 2,46 com o hidrogênio em δ 1,86 e por último o acoplamento do hidrogênio em δ 1,86 com o hidrogênio em δ 0,91.

Após a análise dos dados espectrométricos de IB-BrCN (Figura 86, p. 122) confirmou-se a esterificação do ibuprofeno, tendo como produto o cianometil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato.

Figura 80. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do IB-BrCN.

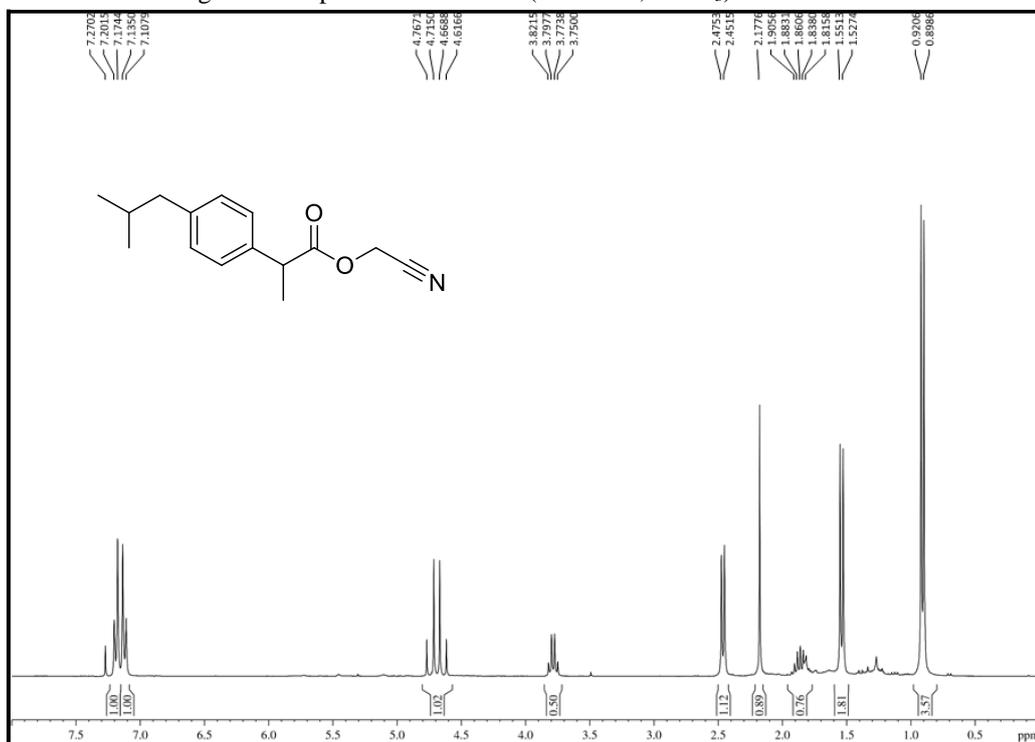


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do IB-BrCN.

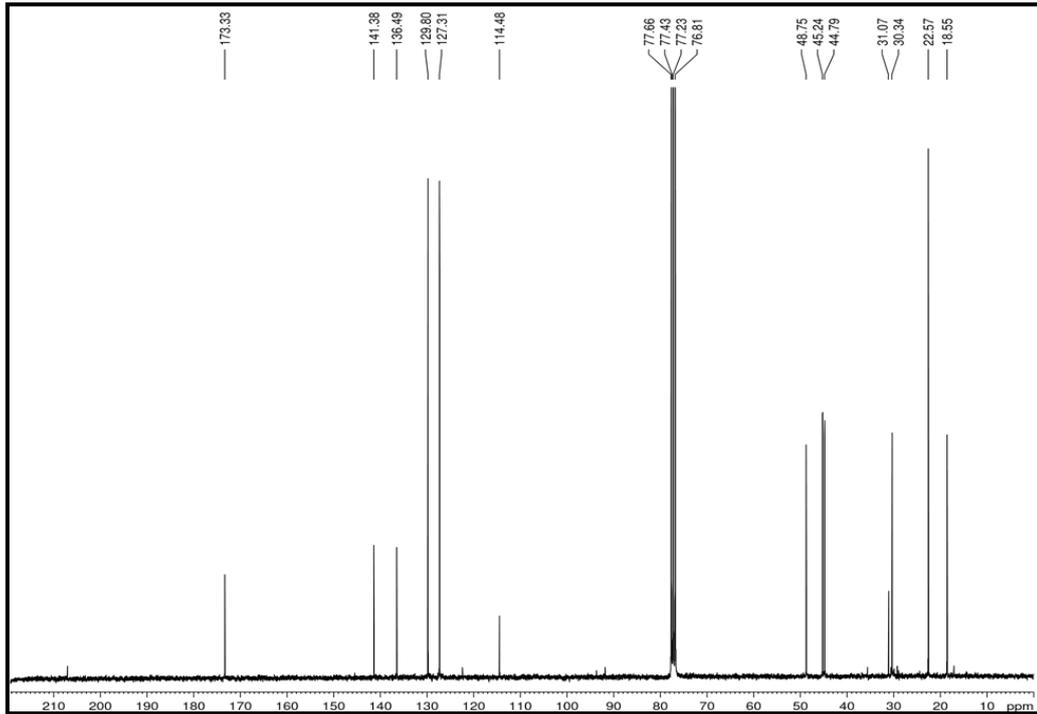


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) do IB-BrCN.

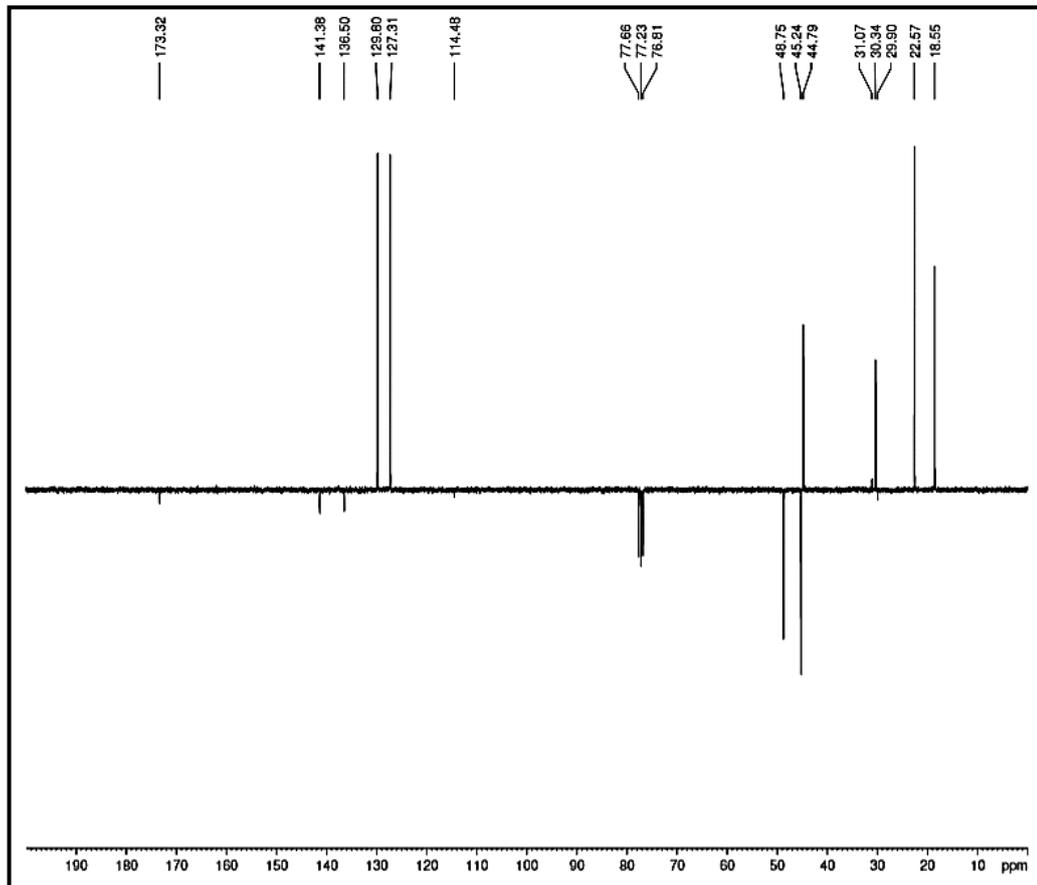


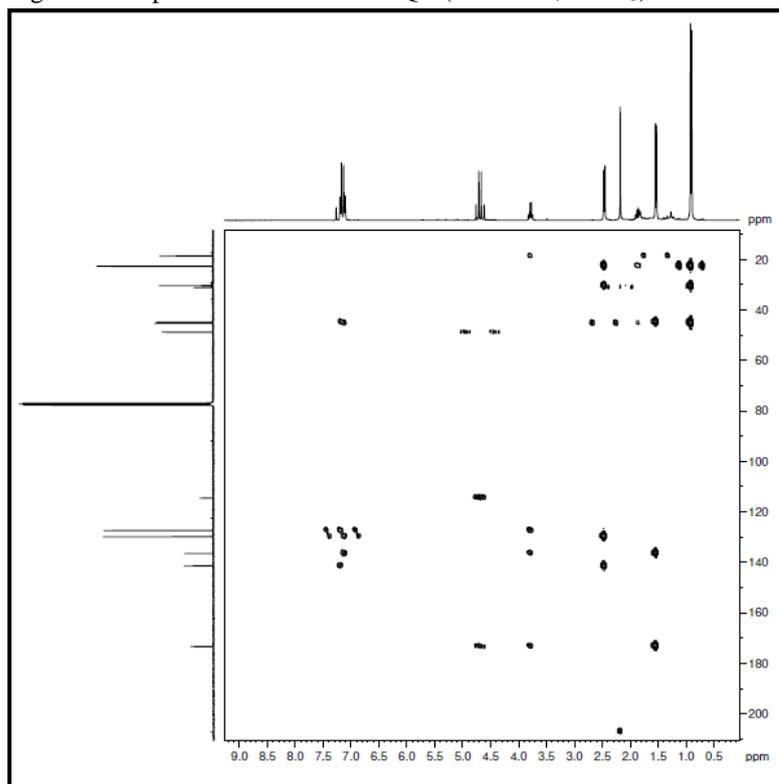
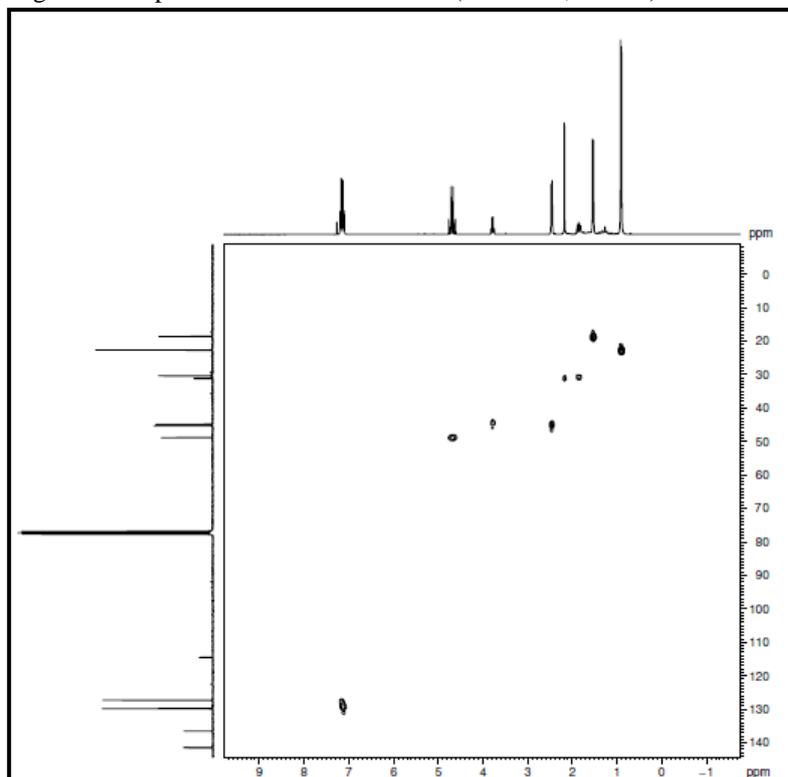
Figura 83. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do IB-BrCN.Figura 84. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do IB-BrCN.

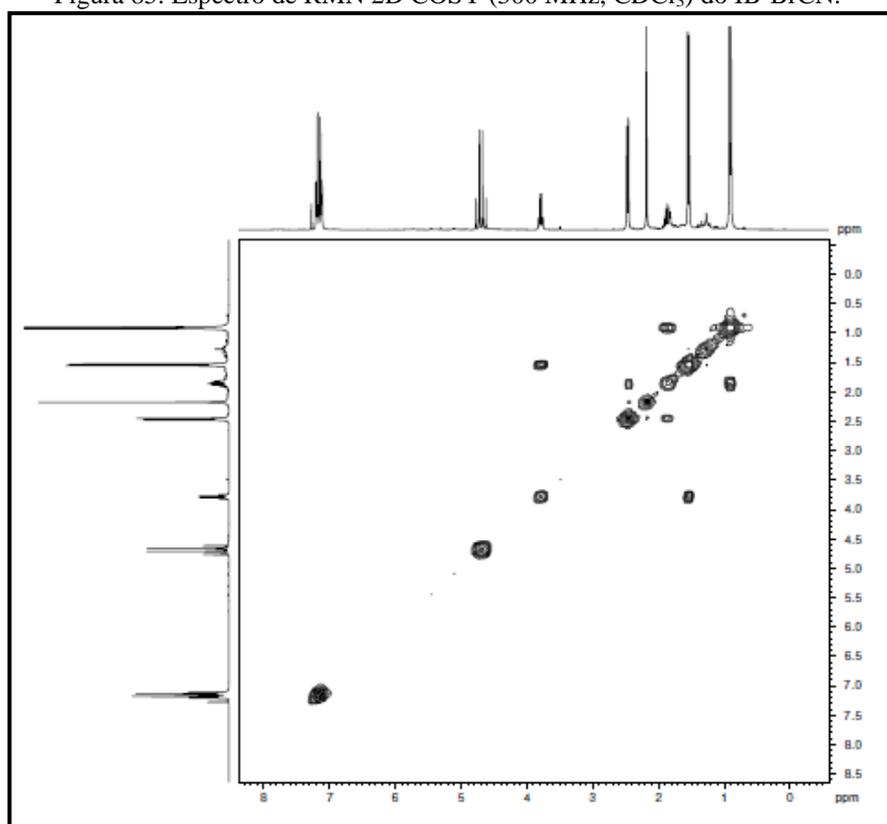
Figura 85. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl₃) do IB-BrCN.

Figura 86. Estrutura química do IB-BrCN.

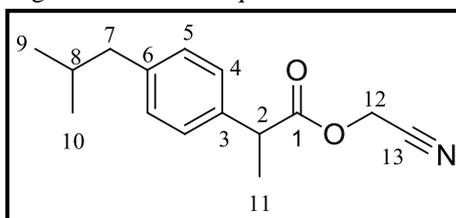


Tabela 15. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IB-CIP em comparação com dados do cianometil 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato descrito na literatura.

IB-BrCN ^a				
HSQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	-	173,3	H-2	H-11
2	3,78 (<i>q</i> ; 1H; $J = 7,2$ Hz)	44,8	H-11	H-4
3	-	136,5	H-2	H-5 H-11
4	7,19 (<i>d</i> ; 2H; $J = 8,1$ Hz)	127,3	H-5	H-2
5	7,12 (<i>d</i> ; 2H; $J = 8,1$ Hz)	129,8	H-4	H-7
6	-	141,4	H-7	H-4
7	2,46 (<i>d</i> ; 2H; $J = 7,1$ Hz)	45,2	H-8	H-9 e 10
8	1,86 (<i>m.</i> ; 1H)	30,3	H-7 H-9 e 10	
9	0,91 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	22,6	H-8	H-7
10	0,91 (<i>d</i> ; 3H; $J = 6,6$ Hz)	22,6	H-8	H-7
11	1,54 (<i>d</i> ; 3H; $J = 7,1$ Hz)	18,5	H-2	
12	a. 4,74 (<i>d</i> ; 1H; $J = 15,6$ Hz) b. 4,64 (<i>d</i> ; 1H; $J = 15,6$ Hz)	48,7		
13	-	114,5		

(a) 300 MHz/75 MHz, CDCl_3

3.4.7 Atividade antifúngica

As substâncias testadas (IB-1, IB-M, IB-But, IB-CIP e IB-Et) não apresentaram atividade antifúngica dentro da faixa de concentração testada (1000-1,95 $\mu\text{g/mL}$) frente as cepas de *Candida spp.*

3.5 Procedimentos experimentais

3.5.1 Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção em coluna foi empregado, como fase estacionária gel de sílica 0,035-0,70 mm, 60 A, da marca Vetec[®]. Os comprimentos e os diâmetros da

coluna variam de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizados.

O fracionamento dos meios reacionais, bem como a separação e purificação de frações, foram realizadas em placas de vidro 20 x 20 cm com gel de sílica Si250F da marca J.T.Baker®.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da marca Merck® com espessura de 0,2 mm.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, diclorometano e acetato de etila P.A, da marca Sintth® e Vetec®.

A revelação nas placas analíticas e preparativas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light®, em dois comprimentos de onda (254 e 265 nm) e imersas em solução de vanilina em HClO₄/EtOH.

3.5.2 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

Ver capítulo I, item 5.2.1, p. 79.

3.5.3 Outras determinações

3.5.3.1 Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em Aparelho digital, modelo MQAPF - 302, da marca Microquímica Equipamentos Ltda, número de série 231/07 e não foram corrigidos.

3.5.3.2 Substrato

O ibuprofeno utilizado no estudo de biotransformação e nas modificações estruturais, foi cedido pelo Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN).

3.5.4 Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento da modificação química do ibuprofeno, estão listados a seguir com suas respectivas procedências:

- ✓ Ácido clorídrico P.A (DINÂMICA)
- ✓ Ácido sulfúrico P.A (SYNTH)
- ✓ Bromoacetona (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Butanol P.A (VETEC)
- ✓ Carbonato de potássio (DINÂMICA)
- ✓ Cloreto de benzil trietilamonio - TEBA (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Cloreto de propanoíla (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Etanol P.A (SYNTH)
- ✓ Metanol P.A(VETEC)
- ✓ Trietilamina (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Tolueno P.A (SYNTH)
- ✓ Cloreto de Benziltriethylamonio TEBA (SIGMA - ALDRICH)

3.5.5 Amostra fúngica

Ver capítulo I, item 5.6, p. 80.

3.5.6 Preservação do micro-organismo

Ver capítulo I, item 5.7, p. 81.

3.5.7 Meios de cultura usado no estudo e esterilização de vidrarias e meios de cultura

Ver capítulo I, itens 5.8 e 5.9, p. 82

3.5.8 Cultivo do *Neofusicoccum ribis* para o estudo de biotransformação em meio BD

Foram utilizados 16 erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD, previamente autoclavado a 120 °C, por 15 minutos. Em cada erlenmeyers foi colocado um disco da cultura fúngica, previamente crescida em BDA, juntamente com o fungo foi

adicionado 10mg de ibuprofeno. Em um dos erlenmeyers não foi adicionado o substrato, o qual foi utilizado como branco. Os mesmos foram colocados sob agitação (120 rpm, temperatura ambiente) por um período de sete dias.

3.5.8.1 Processamento das culturas líquidas e retirada de gordura

O material foi filtrado a vácuo para remoção do micélio. Extraiu-se o filtrado com acetato de etila (3 x 50 mL), posteriormente, extraiu-se a fase orgânica com água (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com uma pequena quantidade de Na₂SO₄ e a solução límpida foi filtrada em papel de filtro, sendo posteriormente concentrado por destilação do solvente a pressão reduzida. Transferiu-se o extrato obtido para vidro previamente tarado, deixando-o uma noite sob vácuo a temperatura ambiente.

3.5.9 Isolamento do produto de biotransformação

O extrato (348,4 mg) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna com gel de sílica, utilizando gradiente de eluição, com os solventes hexano, CH₂Cl₂ e acetato de etila [acetato de etila/hexano (1:1) e acetato de etila/ CH₂Cl₂ (8:2)]. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e, depois de comparadas as que tinham perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. Uma das frações obtida desse tratamento cromatográfico, apresentou-se pura, tornando possível a identificação de uma substância denominada IB-1, a qual foi analisada por RMN ¹H e ¹³C e identificada como ácido 2-[4-(2-hidroxil-2-metilpropil)fenil]propanóico.

3.6 Modificação estrutural do ibuprofeno

3.6.1 Síntese do derivado IB-M

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 300 mg (1,45 mmol) de ibuprofeno, em seguida 25 mL de metanol e 2 gotas de HCl. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética em refluxo a 70°C (SILVA *et al.*, 2014) e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 1 hora, então o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando

como eluente: hexano/acetato de etila (1:4). Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, com rendimento de 75,0%.

3.6.2 Síntese do derivado IB-Et

A reação de esterificação de Fischer ocorreu em um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo 150 mg (0,72 mmol) de ibuprofeno, dissolvido em 20 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A mistura foi mantida sob agitação magnética em refluxo a 80°C (SILVA *et al.*, 2014) e monitorada por CCDA. O término da reação foi observado após 3 horas, então evaporou-se o solvente da mistura reacional em evaporador rotativo e o submeteu a cromatografia de adsorção com gel de sílica, usando como fase móvel 20% de hexano em acetato de etila. Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, com rendimento de 45,0%.

3.6.3 Síntese do derivado IB-But

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, adicionou-se 5 mL de butanol em 150 mg (0,72 mmol) de ibuprofeno e 3 gotas de HCl. A mistura reacional foi mantida sob agitação em refluxo a 100 °C (SILVA *et al.*, 2014) até a formação do produto da reação (1 hora), monitorado por CCDA. O tratamento da reação ocorreu da seguinte forma, adicionou-se 10 mL de acetato de etila ao meio reacional, ao qual foi particionado com água (3 x 30 mL). O produto reacional foi purificado em coluna gravimétrica com gel de sílica, usando como fase móvel: hexano/acetato de etila (2:3). Um óleo viscoso de coloração amarelada foi obtido, com rendimento de 50,0%.

3.6.4 Síntese do derivado IB-BrCN

A reação ocorreu em um balão de fundo redondo de 15 mL, contendo 50mg (0,17 mmol) de ibuprofeno em 1 mL de água e 2,5 mL de tolueno. Em seguida, adicionou-se 71,2 mg (0,52 mmol) de carbonato de potássio (K₂CO₃), 10% em mol de CTF e 36 µL (0,52 mmol) de bromoacetnitrila (SILVA *et al.*, 2014). A formação do produto foi monitorada por CCDA. Para o tratamento da reação adicionou-se 10 mL de acetato de etila ao meio reacional, ao qual foi particionado com água (3 x 30 mL). O produto reacional foi purificado em coluna

gravimétrica com gel de sílica, usando como fase móvel: hexano/acetato de etila (7:3). Um óleo viscoso de coloração amarelada foi obtido, com rendimento de 40,0%.

3.6.5 Síntese do derivado IB-CIP

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionou-se 150 mg (0,78 mmol) de ibuprofeno e 105 μ L (0,75 mmol) de trietilamina. Em seguida, adicionou-se 3 mL de acetonitrila e 60 μ L (0,84 mmol) de cloreto de propargila. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética em refluxo a 90 °C por 4 horas, e a formação do produto foi monitorado por CCDA (BOUYSSOU *et al.*, 2010). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto purificado em cromatografia em coluna gravimétrica de gel de sílica, usando como fase móvel 80% de hexano em acetato de etila. Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, com rendimento de 35,7%.

3.7 Atividade antifúngica

Foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 \pm 0,1) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

As substâncias IB-1, IB-But, IB-CIP, IB-M e IB-Et foram testadas no intervalo de concentração de 1000-1,95 μ g/mL.

A partir de um cultivo de 24 h das leveduras a serem testadas, realizado em àgar Sabouraud-dextrose foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala de 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 $\times 10^3$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de 35 °C (\pm 2 °C). As leituras foram realizadas visualmente.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% e 100% do crescimento do micro-organismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

3.8 Conclusão

A biotransformação do ibuprofeno pelo fungo endofítico *N. ribis* levou a obtenção de um derivado hidroxilado (IB-1), onde houve a oxidação de um carbono sp^3 não funcionalizado, pouco comum de se obter por via química. Além disso, foram obtidos por processo de semissíntese cinco derivados esterificados. Todos os compostos tiveram a atividade antifúngica testada, sendo que não houve inibição nas concentrações avaliadas. Apesar destes derivados serem conhecidos, estes não possuíam todos os dados de ressonância magnética nuclear descritos.

**4 OBTENÇÃO DE PRECURSORES E
DERIVADOS DO FÁRMACO
FLUOXETINA**

4.1 Introdução

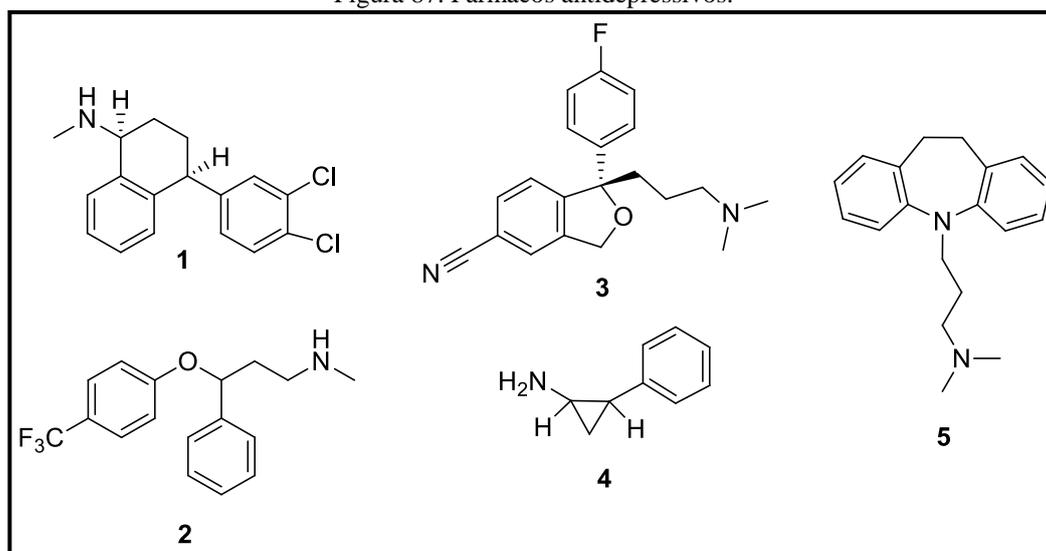
A fluoxetina [*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenoxi] propan-1-amina] é um antidepressivo amplamente utilizado e pertencente à classe dos inibidores seletivo da recaptação da serotonina. É usado no tratamento do transtorno depressivo maior, no transtorno obsessivo-compulsivo, em distúrbios pré-menstruais, síndrome do pânico e estresse pós-traumático. A fluoxetina foi inicialmente aprovada, em 29 de dezembro de 1987, pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos para uso terapêutico no tratamento da depressão. No início de 1988, a fluoxetina foi produzida pela empresa farmacêutica EliLilly, sob o nome comercial de Prozac, a partir de então tornou-se a droga antidepressiva mais prescrita em todo o mundo, por apresentar menor toxicidade e efeitos secundários reduzidos, sendo o primeiro inibidor seletivo da recaptação de serotonina com um perfil de segurança clínica reconhecido (HANCU *et al.*, 2017 e PHAM *et al.*, 2018).

Atualmente a fluoxetina é comercializada como uma mistura racêmica (SCHULZE, M., 2010). Em 1994, a FDA aprovou o um novo uso clínico da fluoxetina no tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo e os membros do Comitê Consultivo da FDA recomendaram por unanimidade a aprovação da mesma para o tratamento da bulimia em abril desse mesmo ano (CAIAFFO *et al.*, 2016).

Apesar de ser um importante antidepressivo, a fluoxetina pode induzir vários efeitos secundários, incluindo ansiedade, disfunção sexual, distúrbios do sono e distúrbios gastrointestinais (OLIVEIRA, M. R.; 2016). O que pode ser feito para minimizar esses efeitos secundários são modificações químicas na estrutura da fluoxetina e a realização de um estudo da influência desta alteração através da relação estrutura química-atividade farmacológica.

A fluoxetina possui outras ações farmacológicas como: ação anti-inflamatória, antiapoptótica, antioxidante (HANCU *et al.*, 2017), entre outros. Vários antidepressivos, como a sertralina (1), fluoxetina (2), escitalopram (3) e fármacos mais antigos, como tranilcipromina (4) e imipramina (5) (Figura 87, p. 132) apresentam efeitos antimicrobianos (MACEDO *et al.*, 2017). Baseado nessas informações, foram realizadas modificações químicas na estrutura e nos precursores da fluoxetina com a finalidade de testar a atividade antimicrobiana.

Figura 87. Fármacos antidepressivos.



Fonte: MACEDO *et al.*, 2017.

4.2 Levantamento bibliográfico

4.2.1 Atividades diversas da fluoxetina

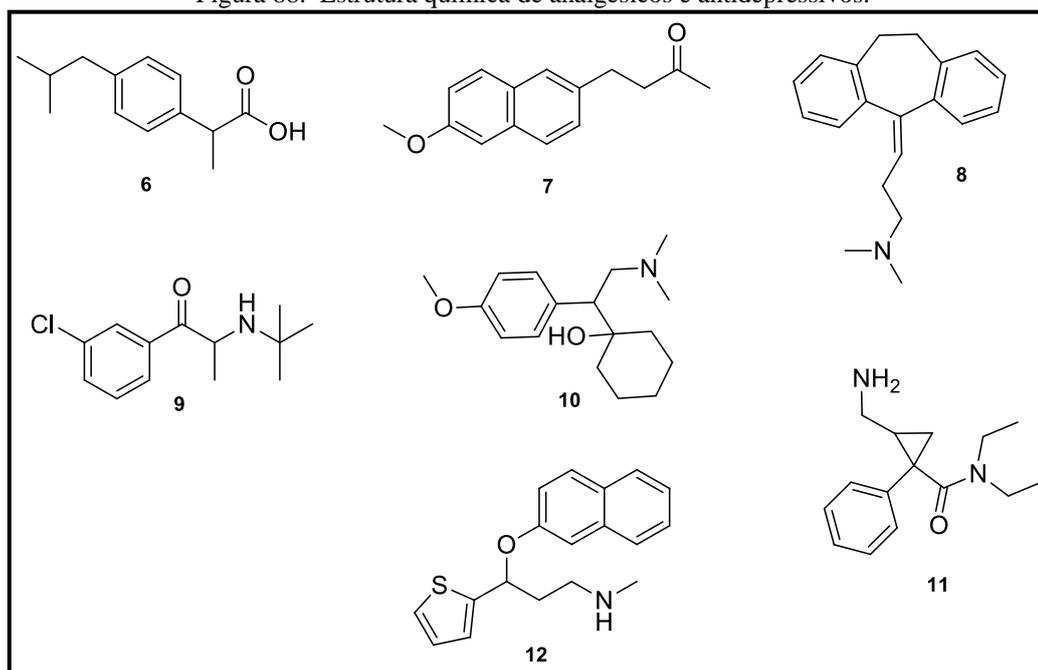
O objetivo da terapia antidepressiva é o alívio rápido e completo dos sintomas depressivos em todos os pacientes. No entanto, o perfil clínico dos antidepressivos estabelecidos está longe de ser o ideal, um atraso no início da resposta terapêutica e uma resposta parcial em muitos pacientes são dois problemas importantes a serem considerados (JOHNSON *et al.*, 2007). Esses problemas podem ser resolvidos com a modificação química na estrutura da molécula, gerando assim, benefícios na eficácia terapêutica do fármaco, por isso a modificação química de fármacos é tão importante.

Segundo Kouwenhoven (2017) os antidepressivos orais, como a fluoxetina, possuem efeito antiprurítico em função de sua influência sobre os níveis de serotonina e histamina. Segundo as diretrizes europeia, os mesmos foram recomendados para formas de prurido crônico que não responderam a outras terapias. A fluoxetina também foi associada a perda de peso (DOMECQ *et al.*, 2015).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como ibuprofeno (6) e nabumetona (7), são amplamente utilizados para o alívio da dor. Além dos analgésicos clássicos, os antidepressivos também podem ser utilizados no tratamento da dor. A amitriptilina (8), bupropiona (9) e fluoxetina (2) produzem efeitos antialodínicos em ratos com feridas crônicas. Dos antidepressivos, os classificados como tricíclicos são os mais indicados no

tratamento da dor crônica, mas os inibidores seletivos da recaptação da serotonina ou os inibidores seletivos da recaptação da norepinefrina também são efetivos contra a dor (PARK *et al.*, 2016). Estudos controlados mostraram que antidepressivos tricíclicos [(amitriptilina (8)], inibidores seletivos da recaptação de serotonina [fluoxetina (2)] e inibidores duplos de serotonina e norepinefrina [venlafaxina (10), milnacipram (11) e duloxetina (12)] (Figura 88) podem aliviar a dor e melhorar a qualidade de vida de pacientes com fibromialgia (ATZENI *et al.*, 2014).

Figura 88. Estrutura química de analgésicos e antidepressivos.



Fonte: Atzeni *et al.*, 2014.

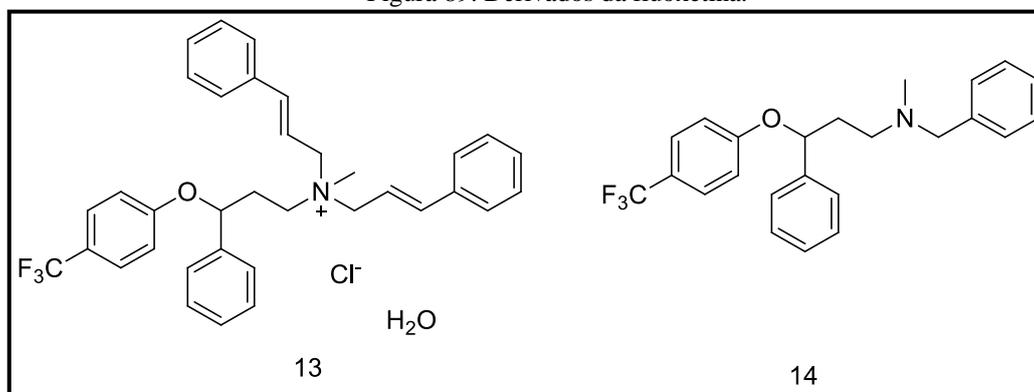
A fluoxetina tem sido utilizada no tratamento de pacientes obesos, pois seu efeito na inibição do apetite já foi largamente descrito na literatura. Porém, o presente estudo forneceu evidências de que a fluoxetina diminui a proliferação de células do tecido adiposo através da autofagia. Além da supressão do apetite, os resultados sugerem que a inibição da proliferação de células do tecido adiposo pode contribuir parcialmente para a perda de peso associada ao tratamento com fluoxetina (SUN *et al.*, 2015).

Em 2017, Sun e colaboradores evidenciaram que a fluoxetina quando administrada durante o período da adolescência proporcionam efeitos protetores no sistema neurológico, os quais estão associados ao aumento do número de neurônios, aumento dos níveis de proteínas sinápticas entre outras alterações, concluímos que a fluoxetina pode apresentar um efeito protetor e terapêutico para doença de Alzheimer em camundongos adultos. Em outro estudo realizado *in vitro* e *in vivo* por Zeng e colaboradores (2016) essa

ação neuroprotetora também foi relatada, juntamente com o melhoramento do aprendizado e da memória.

A fluoxetina está sendo utilizada mundialmente no tratamento da depressão maior, entretanto, a mesma vem sendo utilizada no tratamento de outros transtornos psiquiátricos como síndrome do pânico, bulimia nervosa e transtorno obsessivo compulsivo, como já citada anteriormente. Existem estudos que relatam o uso da fluoxetina para prevenir a recorrência da hipertensão arterial pulmonar em ratos. No entanto, estudos recentes indicaram que a fluoxetina tem um grande potencial no bloqueio dos canais de Na^+ e K^+ , o potencial antioxidante deste fármaco também tem sido um assunto de interesse, já que é conhecido por integrar propriedades antioxidantes e antidepressivas. No estudo desenvolvido por Kanwal *et al.* (2013), foram realizadas modificação química na estrutura da fluoxetina, dando origem a dois novos compostos: a *N*-benzil fluoxetina e a cinamil fluoxetina. Os dois compostos e a fluoxetina foram testados quanto a ação antioxidante e os resultados revelaram que a cinamil fluoxetina (**13**) possui potencial antioxidante muito superior ao da *N*-benzil fluoxetina (**14**) (Figura 89) e essa possui uma atividade antioxidante superior à da fluoxetina (**2**).

Figura 89. Derivados da fluoxetina.

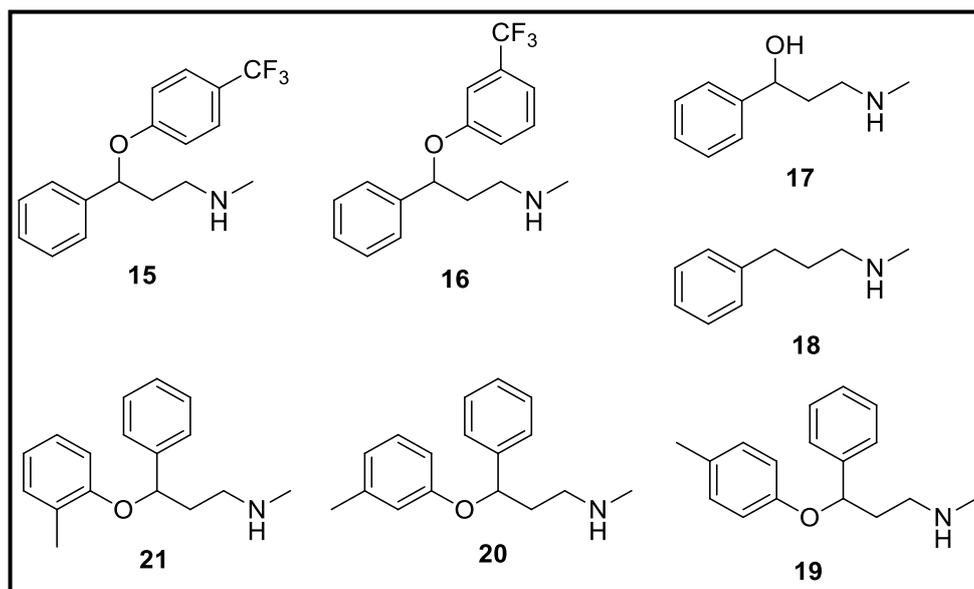


Fonte: Kanwal *et al.*, 2013.

4.2.2 Atividade antimicrobiana da fluoxetina

O principal objetivo do estudo relatado por Mohanty *et al.* (2015) foi modificar a estrutura química de compostos bioativos, como a fluoxetina, e testar se a mesma e seus derivados possuem atividade antimicrobiana e citotóxica (Figura 90, p. 135). Todos os compostos apresentaram atividade antibacteriana de boa a excelente, nenhum dos compostos sintetizados apresentaram elevada atividade citotóxica.

Figura 90. Compostos com atividade antimicrobiana.

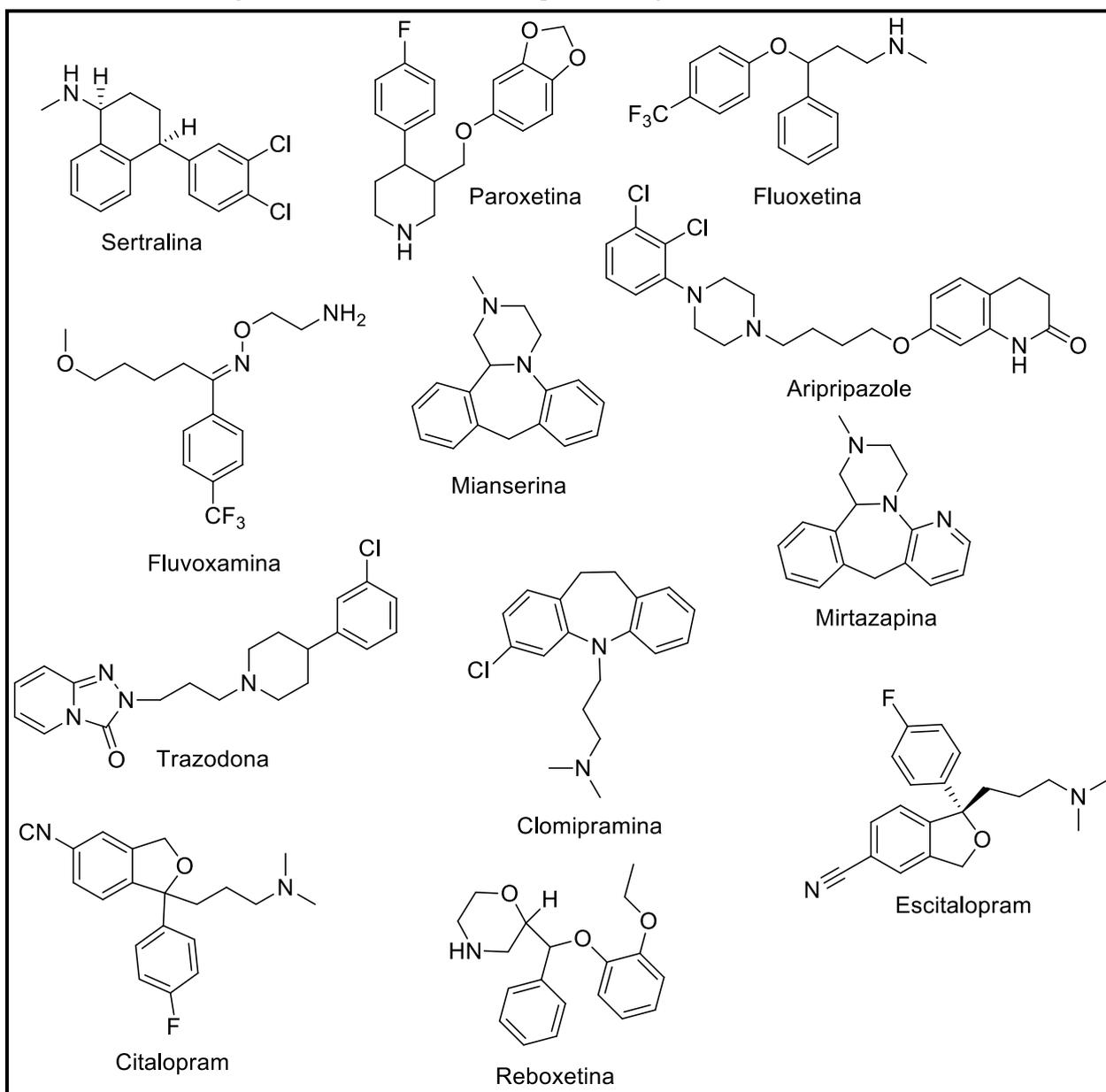


Fonte: Mohanty *et al.*, 2015.

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos existentes é um importante problema de saúde, na prática clínica atual. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de amplo espectro e o aumento da eficiência dos antibióticos já existentes são de grande interesse. Alguns medicamentos psicotrópicos apresentam atividade antimicrobiana contra vários agentes patogênicos. Em estudos anteriores, foram analisados 16 fármacos psicotrópicos diferentes: sertralina, paroxetina, aripiprazole, fluvoxamina, moclobemida, venlafaxina, mianserina, trazodona, mirtazapina, clomipramina, alprazolam, escitalopram, citalopram, fluoxetina, gabapentina e reboxetina. Suas propriedades antimicrobiana foram testadas em uma grande variedade de bactérias e fungos. Os resultados revelaram que, com exceção da gabapentina, venlafaxina, moclobemida e alprazolam, os demais medicamentos testados neste estudo apresentaram atividades antimicrobianas (Figura 91, p. 136). Os medicamentos seletivos do grupo inibidor da recaptação de serotonina incluindo a sertralina, paroxetina, fluvoxamina e fluoxetina mostraram atividade antibacteriana de ampla espectro em comparação com outros medicamentos psicotrópicos. Explorar as atividades antimicrobianas, desses medicamentos, aumentará o uso e a aplicação dos mesmos na prática clínica. No entanto, estudos *in vitro* e ensaios clínicos são estritamente necessários para avaliar a eficiência desses produtos químicos para o tratamento de infecções microbianas sistêmicas (KALAYCI *et al.*, 2014).

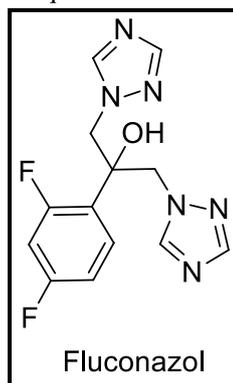
Oliveira *et al.* (2014) determinaram a atividade antimicrobiana da fluoxetina, isolada e combinada com fluconazol, contra 29 cepas de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal. A combinação de fluconazol (Figura 92, p. 137) com fluoxetina (2) resultou em atividade sinérgica contra seis cepas de *Candida*. Os resultados deste estudo leva em consideração um futuro uso da fluoxetina em formulações tópicas para o tratamento da candidíase vulvovaginal, principalmente se combinado com fluconazol (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Figura 91. Medicamentos Psicotrópicos com ação antimicrobiana.



Fonte: Kalayci *et al.*, 2014.

Figura 92. Estrutura química de um composto fungicida.

Fonte: Oliveira *et al.*, 2014.

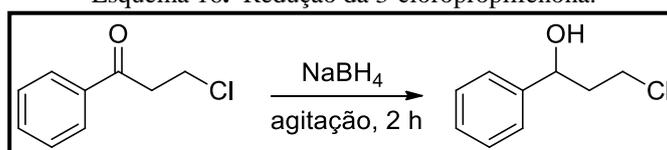
4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Síntese do precursor da fluoxetina

4.3.1.1 Redução do 3-cloropropilfenona

Conforme a metodologia descrita no item 5.1.1 (p. 165) a primeira etapa na obtenção do precursor da fluoxetina foi a reação de redução da carbonila do 3-cloropropilfenona com NaBH_4 (Esquema 16) para obtenção do 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol. O álcool foi obtido com 96% de rendimento na forma de um óleo amarelado.

Esquema 16. Redução da 3-cloropropilfenona.



4.3.1.2 Identificação da 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (Figura 93, p. 138) apresentou um sinal adicional em δ_{H} 4,95 (dd; 1H; $J = 9,0$ e $6,0$ Hz; H-1) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado em relação ao espectro de RMN ^1H substrato de partida.

O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (Figura 94, p. 138) apresentou um sinal em δ_{C} 71,6 (C-1) referente a carbono sp^3 oxigenado e a ausência do sinal de carbonila, confirmando a redução da carbonila do material de partida. O

3-cloro-1-fenilpropan-1-ol foi usado na etapa seguinte da síntese do precursor da fluoxetina. Todos os sinais de ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 16, p. 139.

Figura 93. Espectro de RMN ^1H do 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (300 MHz, CDCl_3).

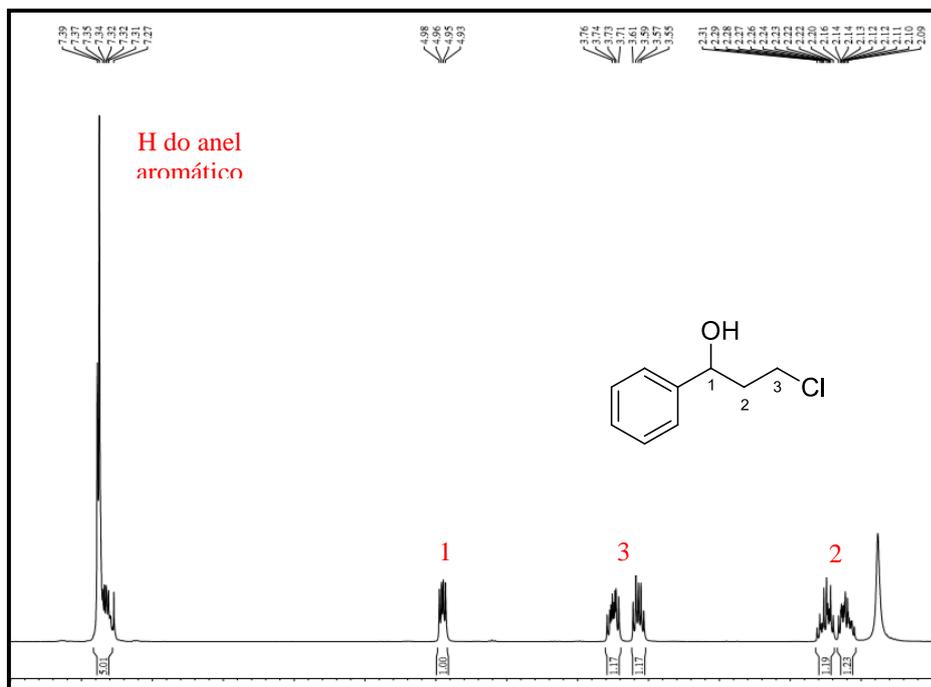


Figura 94. Espectro de RMN ^{13}C -BB do 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (75 MHz, CDCl_3).

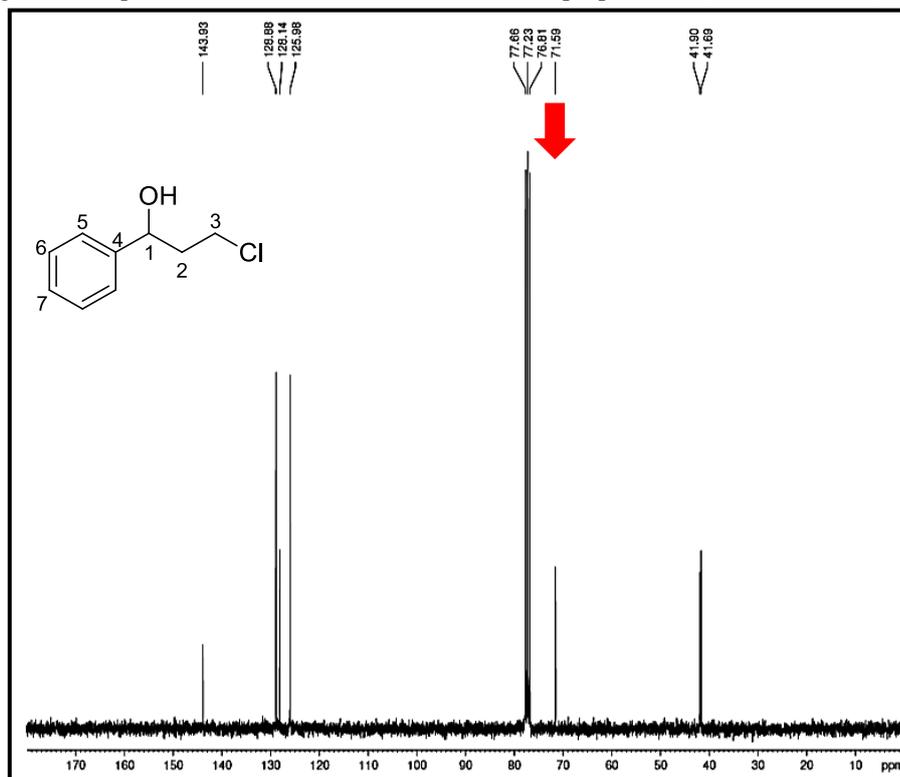


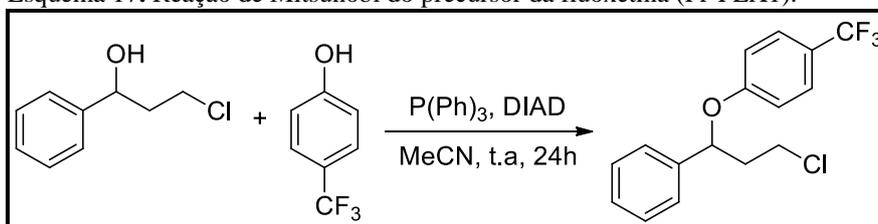
Tabela 16. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (300/75 MHz, CDCl_3).

3-cloro-1-fenilpropan-1-ol		
C	δ_{H}	δ_{C}
1	4,95 (dd; 1H; $J = 9,0$ e $6,0$ Hz)	71,6
2	a. 2,09 (m; 1H) b. 2,25 (m; 1H)	41,9
3	a. 3,58 (m; 1H) b. 3,73 (m; 1H)	41,7
4	-	143,9
5	7,33 (m; 2H)	128,1
6	7,33 (m; 2H)	128,9
7	7,33 (m; 1H)	126,0

4.3.1.3 Reação de Mitsunobi do precursor da fluoxetina (Pr-FLX1)

Conforme metodologia descrita no item 5.1.2 (p. 165) o álcool obtido na etapa anterior sofreu uma reação de Mitsunobu (Ou *et al.*, 2008), levando a obtenção do éter 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno (**Pr-FLX1**), com rendimento de 50%, conforme descrito no Esquema 17.

Esquema 17. Reação de Mitsunobi do precursor da fluoxetina (Pr-FLX1).

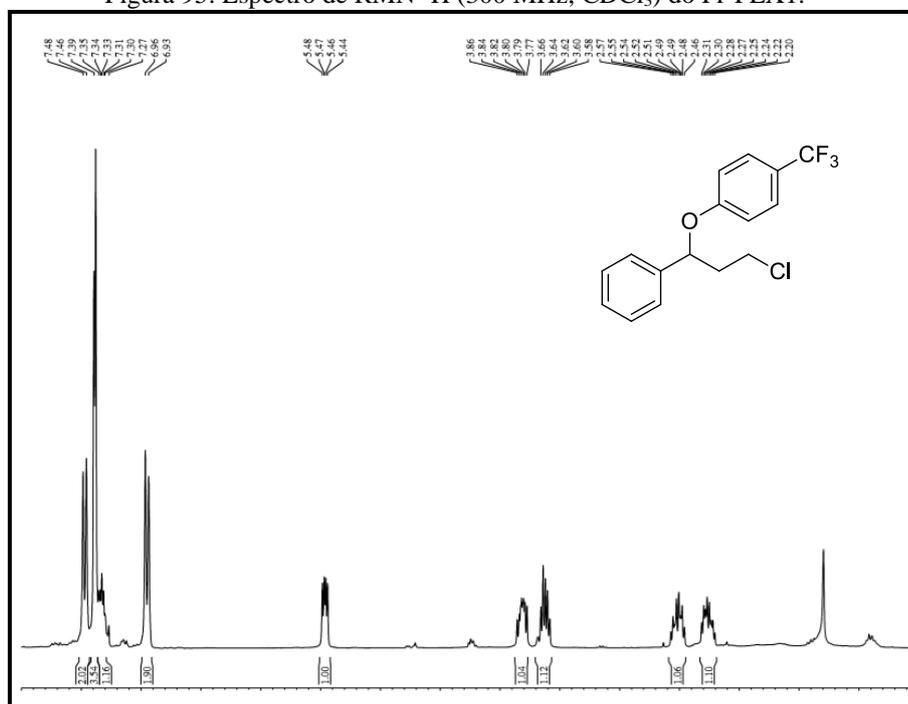


4.3.1.4 Identificação do 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno (Pr-FLX1)

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do **Pr-FLX1** (Figura 95, p. 140) apresentou o sinal em δ_{H} 5,45 (dd; 1H; $J = 8,5$ e $4,5$ Hz; H-1) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado. Os sinais em δ_{H} 6,94 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz; H-5), δ_{H} 7,46 (d; 2H; $J = 8,7$ Hz; H-6) e em δ_{H} 7,29-7,38 (m; 5H; H-10, 11 e 12) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos de anel aromático, sendo os dois primeiros sinais referentes a hidrogênios de anel aromático di-substituído e o terceiro sinal referente a hidrogênios de anel aromático monossubstituído. Já os sinais em δ_{H} 2,19-2,30 (m; 1H; H-2a), δ_{H} 2,45-2,56 (m; 1H; H-2b), δ_{H}

3,58-3,66 (m; 1H; H-3a) e δ_H 3,77-3,85 (m; 1H; H-3b) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos.

Figura 95. Espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) do Pr-FLX1.



No espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, $CDCl_3$) do precursor da fluoxetina (Figura 96, p. 141) foram observadas 9 linhas espectrais, das quais, três puderam ser relacionadas a carbono sp^3 e oito foram atribuídas a carbonos sp^2 . O padrão de hidrogenação dos carbonos fornecidos pelo espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° revelou a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH) e dois carbonos metilênicos (CH_2). A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 97, p. 141) com o espectro RMN ^{13}C -BB, mostrou a presença de um carbono oxigenado em δ_C 77,3, o qual estava encoberto pelos sinais do solvente.

No espectro de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ - HSQC (Figura 98, p. 142) do **Pr-FLX1** permitiu o assinalamento dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 17, p. 144). Pode-se observar a correlação do hidrogênio metínico em δ_H 5,45 com o carbono em δ_C 77,3, o qual estava encoberto pelos sinais do solvente $CDCl_3$. A partir do espectro de correlação heteronuclear a longa distância $^1H \times ^{13}C$ - HMBC (Figura 99, p. 142) do **Pr-FLX1** foi possível atribuir as correlações à duas (2J) e três (3J) ligações, conforme mostra a Figura 100, p. 143.

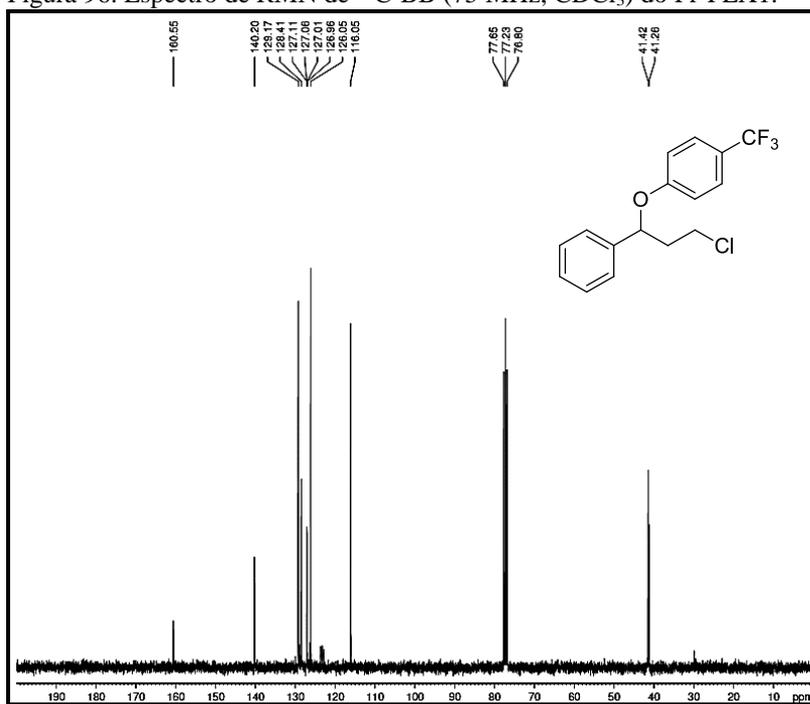
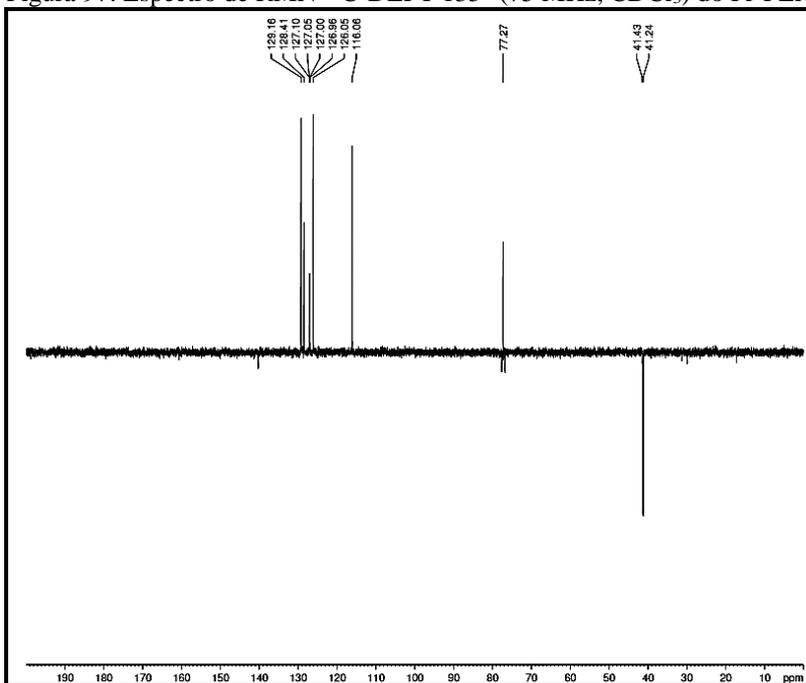
Figura 96. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do Pr-FLX1.Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do Pr-FLX1.

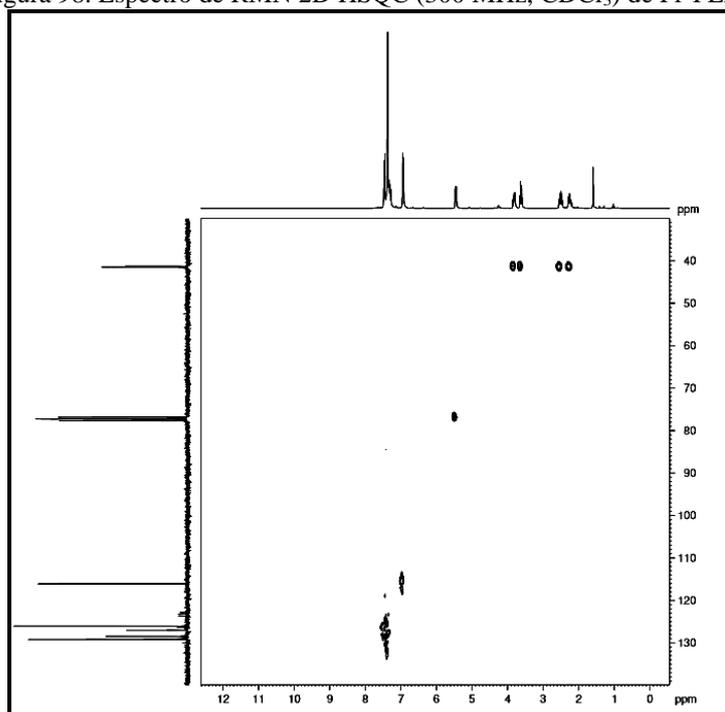
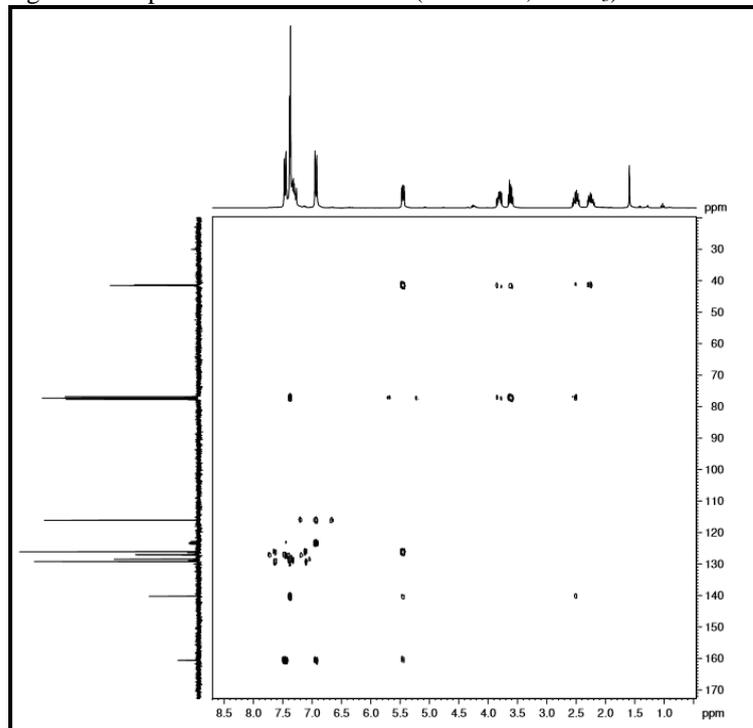
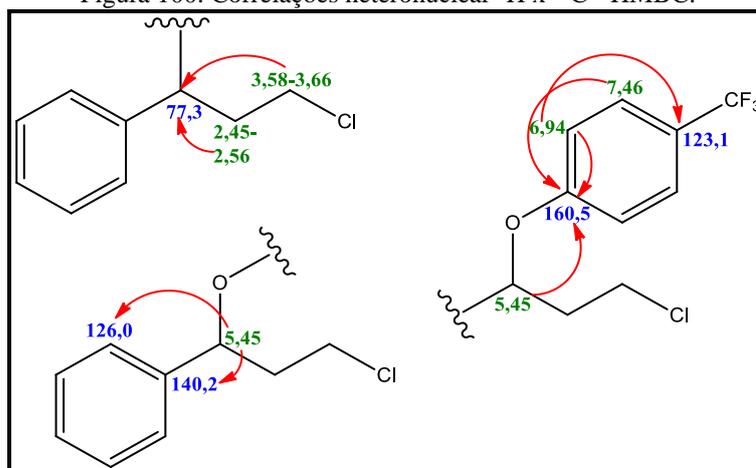
Figura 98. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) de Pr-FLX1.Figura 99. Espectro RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do PR-FLX1.

Figura 100. Correlações heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC.

No espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (Figura 101) foram visualizados os acoplamentos do hidrogênio em $\delta 2,19-2,30$ com os hidrogênios $\delta 5,45$ e $\delta 3,58-3,66$ e do hidrogênio em $\delta 3,77-3,85$ com o hidrogênio em $2,45-2,56$. Os dados espectrométricos discutidos são compatíveis com a estrutura química do 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno (Figura 102, p. 144).

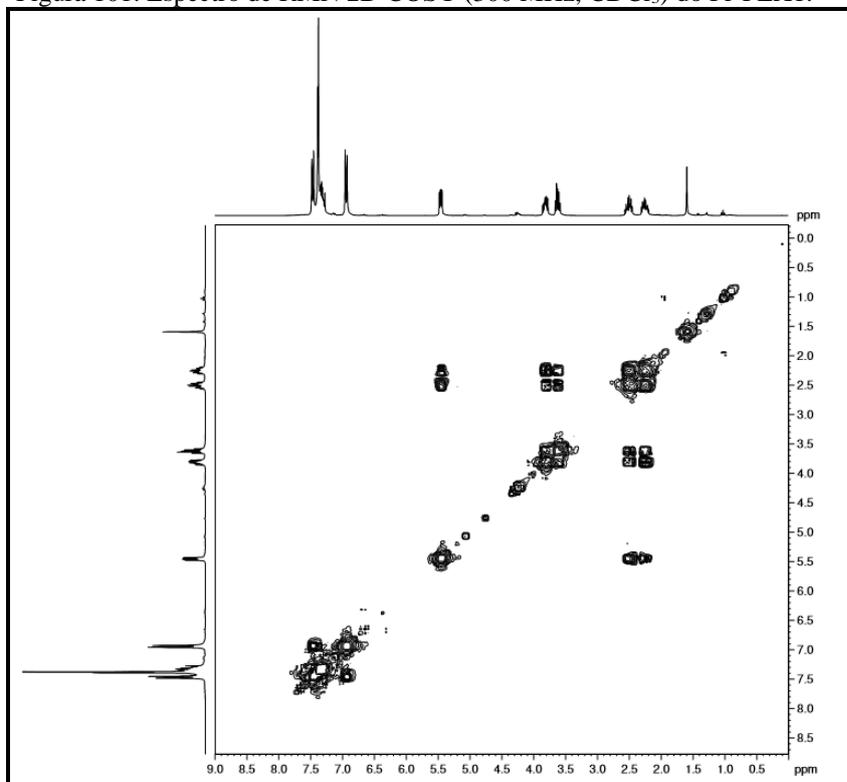
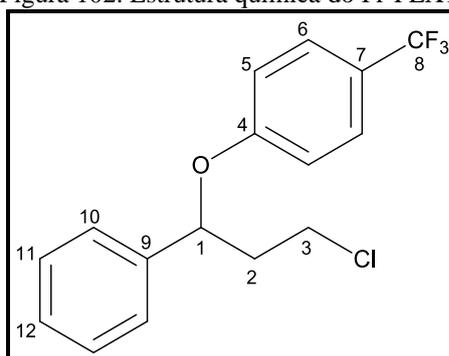
Figura 101. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do Pr-FLX1.

Figura 102. Estrutura química do Pr-FLX1.

Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno em comparação com dados do mesmo composto descrito na literatura.

1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluorometil)benzeno					Jeon <i>et al.</i>, 2007^a
C	HSQC		HMBC		
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J	δ_{H}
1	5,45 (dd; 1H; $J = 8,5$ e 4,5 Hz)	77,3	140,2	126,0 160,5	5,45 (dd; 1H; $J = 11,3$ e 6,2 Hz)
2	a. 2,19-2,30 (m; 1H) b. 2,45-2,56 (m; 1H)	41,4	77,3		a. 2,28 - 2,24 (m; 1H) b. 2,51 - 2,47 (m; 1H)
3	a. 3,58-3,66 (m; 1H) b. 3,77-3,85 (m; 1H)	41,3		77,3	a. 3,65 - 3,58 (m; 1H) b. 3,83 - 3,77 (m; 1H)
4	-	160,5			-
m o5	6,94 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz)	116,0	160,5	123,1	6,93 (d; 2H; $J = 8,7$ Hz)
6	7,46 (d; 2H; $J = 8,7$ Hz)	129,2		160,5	7,46 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz)
7	-	123,1			-
8	-	127,0			-
9	-	140,2			-
10	7,29-7,38 (m; 2H)	126,0			7,41 - 7,32 (m; 2H)
11	7,29-7,38 (m; 2H)	129,2			7,41 - 7,32 (m; 2H)
12	7,29-7,38 (m; 1H)	128,4			7,41 - 7,32 (m; 1H)

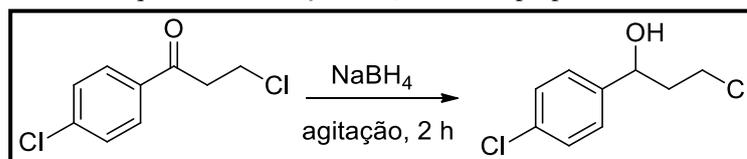
(a) 400 MHz, CDCl_3

4.3.2 Síntese do derivado do precursor da fluoxetina Pr-FLX2

4.3.2.1 Redução do 3,4'-dicloropropiofenona

Conforme a metodologia descrita, no item 5.2.1 (p. 166) a 3,4'-dicloropropiofenona sofreu uma reação de redução da carbonila com NaBH_4 (Esquema 18, p. 145), gerando o álcool 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol com rendimento de 85,4%. O derivado apresentou-se como um óleo amarelado.

Esquema 18. Redução da 3,4'- dicloropropiofenona.



4.3.2.2 Identificação do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (Figura 103), mostrou os sinais adicionais em δ_{H} 4,93 (dd; 1H; $J = 8,4$ e $4,6$ Hz; H-1), referente a hidrogênio ligado a carbono oxigenado e em δ_{H} 3,46 referente a um singlete do hidrogênio da hidroxila, os quais não existiam no material de partida.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (Figura 104, p. 146) apresentou 7 sinais. Dos sinais presentes o que confirmou a redução da carbonila foi o surgimento do sinal em δ_{C} 70,8 referente a carbono sp^3 oxigenado. Todos os sinais estão descritos na Tabela 18, p. 146.

Figura 103. Espectro de RMN ^1H do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (300 MHz, CDCl_3).

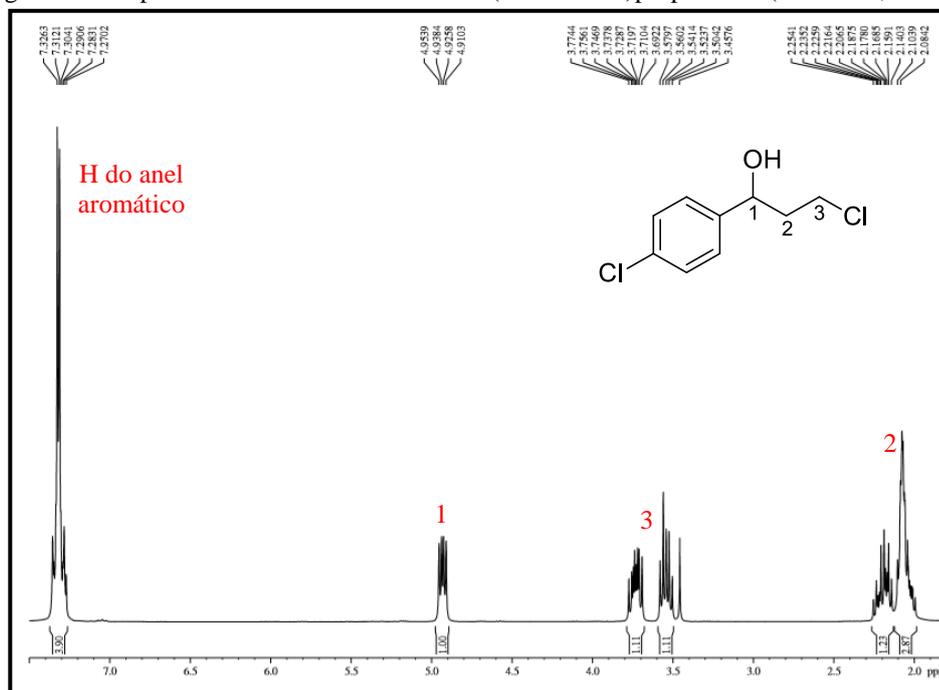
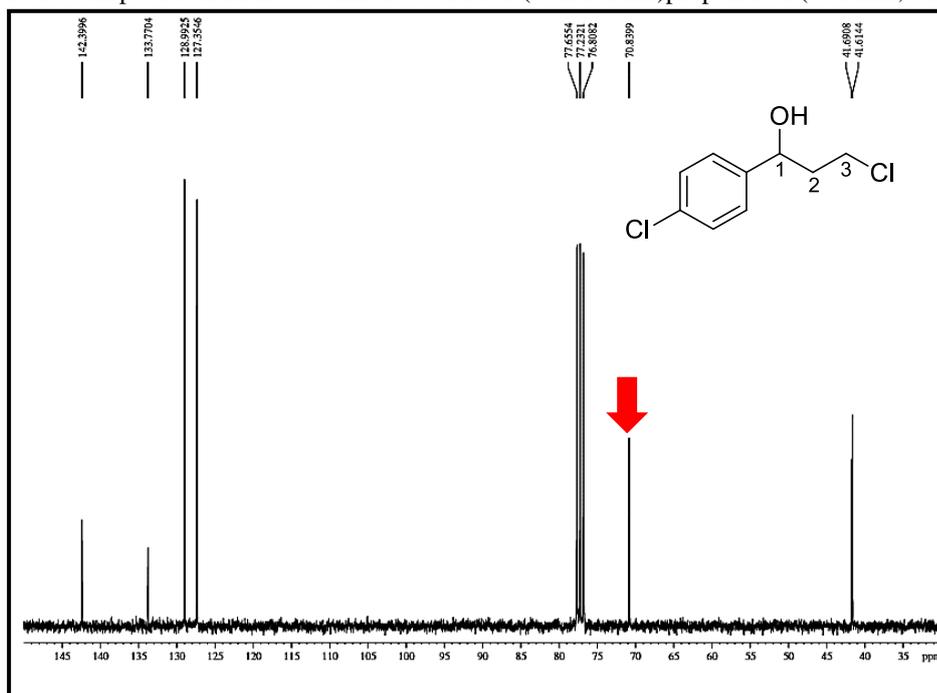


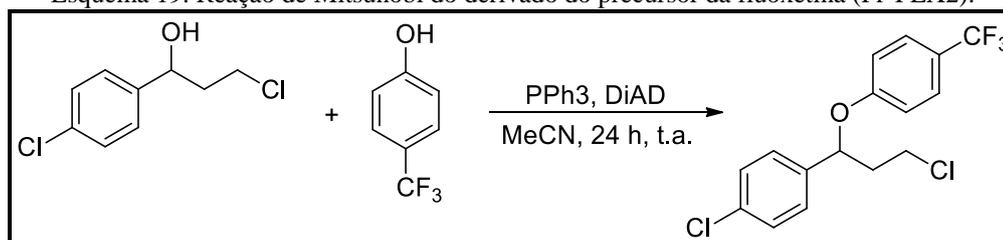
Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C -BB do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (75 MHz, CDCl_3).Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol (300/75 MHz, CDCl_3).

3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol		
C	δ_{H}	δ_{C}
1	4,95 (<i>dd</i> ; 1H; $J = 8,4$ e $4,6$ Hz)	70,8
2	a. 2,11 (<i>m</i> ; 1H) b. 2,20 (<i>m</i> ; 1H)	41,7
3	a. 3,54 (<i>m</i> ; 1H) b. 3,73 (<i>m</i> ; 1H)	41,6
4	-	142,4
5	7,30 (<i>m</i> ; 2H)	127,3
6	7,30 (<i>m</i> ; 2H)	129,0
7	-	133,8
HO-	3,46 (<i>s</i> , 1H)	-

4.3.2.3 Reação de Mitsunobi do derivado do precursor da fluoxetina (Pr-FLX2)

Conforme metodologia descrita no item 5.2.2 (p. 166), a obtenção do éter 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno (Pr-FLX2) foi alcançada através de uma reação de Mitsunobu (Ou *et al.*, 2008) com rendimento de 35%, conforme exemplificado no Esquema 19, p. 147.

Esquema 19. Reação de Mitsunobu do derivado do precursor da fluoxetina (Pr-FLX2).



4.3.2.4 Identificação do 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno (Pr-FLX2)

O espectro de RMN ^1H (Figura 105, p. 148) do derivado do precursor da fluoxetina [1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil]benzeno] (Pr-FLX2) (300 MHz, CDCl_3) mostrou sinais em δ_{H} 5,44 (dd; 1H; $J = 8,5$ e $4,5$ Hz; H-1) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado, em δ_{H} 7,27-7,37 (m; 4H; H-10 e 11), δ_{H} 7,47 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz; H-6) e δ_{H} 6,91 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz; H-5) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico. Os sinais em δ_{H} 2,17-2,26 (m; 1H; H-2a), δ_{H} 2,42-2,53 (m; 1H; H-2b), δ_{H} 3,56-3,63 (m; 1H; H-3a) e δ_{H} 3,76-3,84 (m; 1H; H-3b) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos.

O espectro de RMN ^{13}C -BB ($\text{CDCl}_3/75$ MHz) Pr-FLX2 (Figura 106, p. 148) apresentou 11 sinais. Os sinais em δ_{C} 134,2, δ_{C} 138,7, δ_{C} 160,2, δ_{C} 123,3 e δ_{C} 127,1 alusivos aos carbonos não hidrogenados. Já os sinais em δ_{C} 129,4, δ_{C} 127,4, δ_{C} 76,6 e δ_{C} 116,0 foram associados a carbonos metínicos e os sinais em δ_{C} 41,3 e δ_{C} 41,0 associados a carbonos metilênicos. Os carbonos tiveram seus padrões de hidrogenação confirmados pelo espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3 ; Figura 107, p. 149). Todos os sinais de carbono e hidrogênio estão descritos na Tabela 19, p. 151

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (Figura 108, p. 149) do 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil]benzeno apresentou as devidas correlações entre os átomos de hidrogênio aos seus respectivos átomos de carbono. Estas correlações podem ser vistas na Tabela 19, p. 151.

No espectro HMBC de Pr-FLX2 (Figura 109, p. 150) observaram-se as correlações a duas (2J) e três (3J) ligações, as quais corroboram com a estrutura química do éter para produto reacional obtido. De acordo com o levantamento realizado, o derivado 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil]benzeno (Figura 110, p. 150) é inédito na literatura. As correlações do espectro HMBC podem ser vistas na Tabela 19, p. 151.

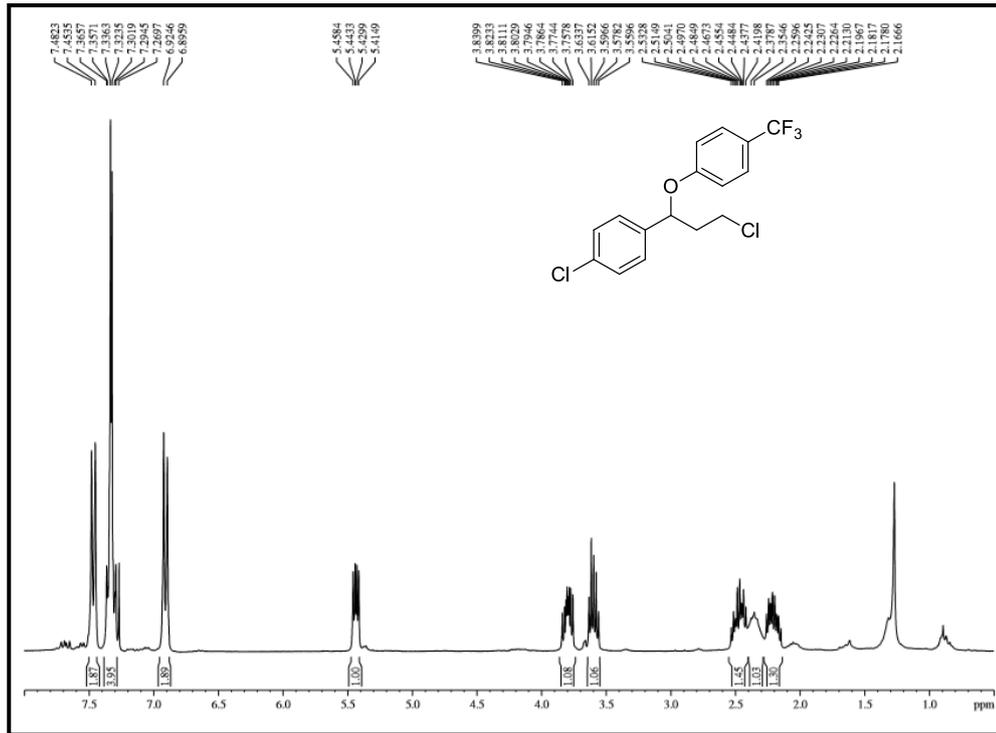
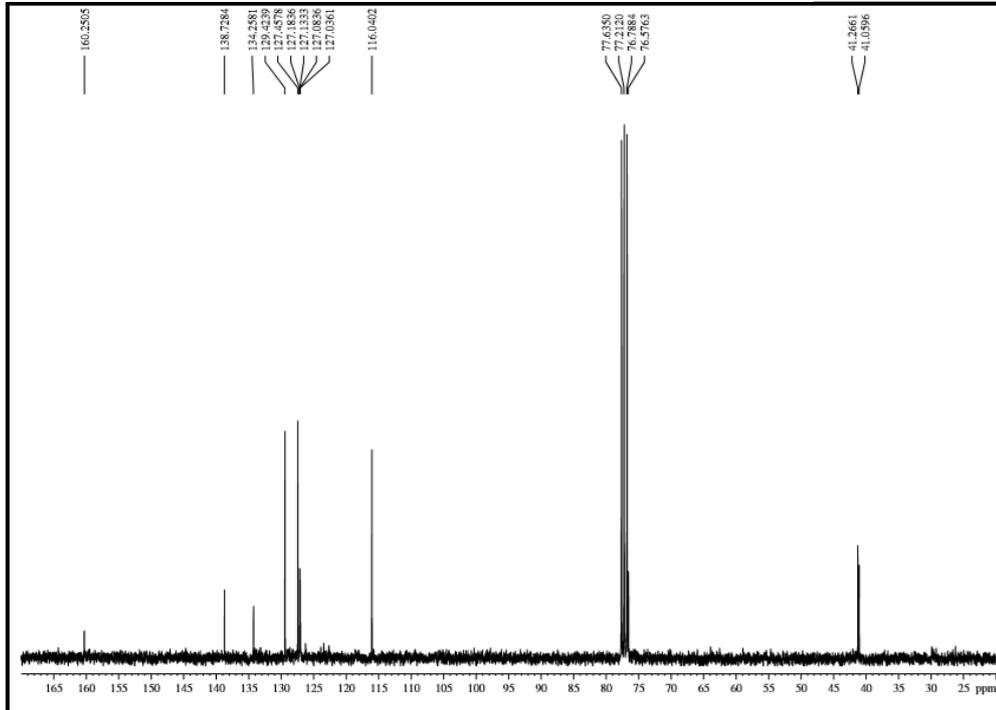
Figura 105. Espectro de RMN ^1H do Pr-FLX2 (300 MHz, CDCl_3).Figura 106. Espectro de RMN ^{13}C -BB do Pr-FLX2 (75 MHz, CDCl_3).

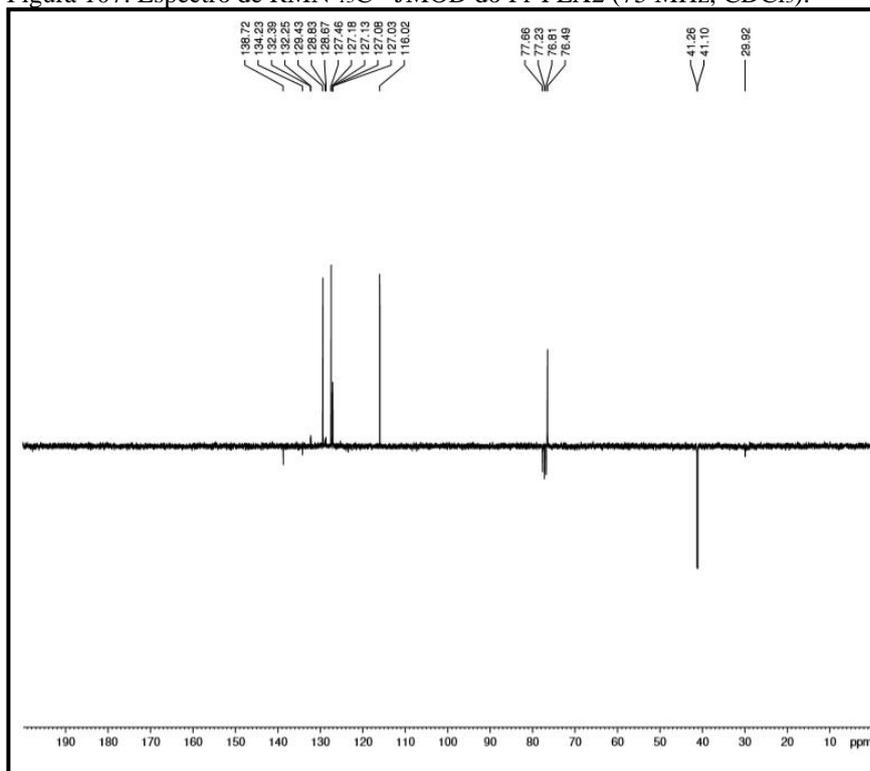
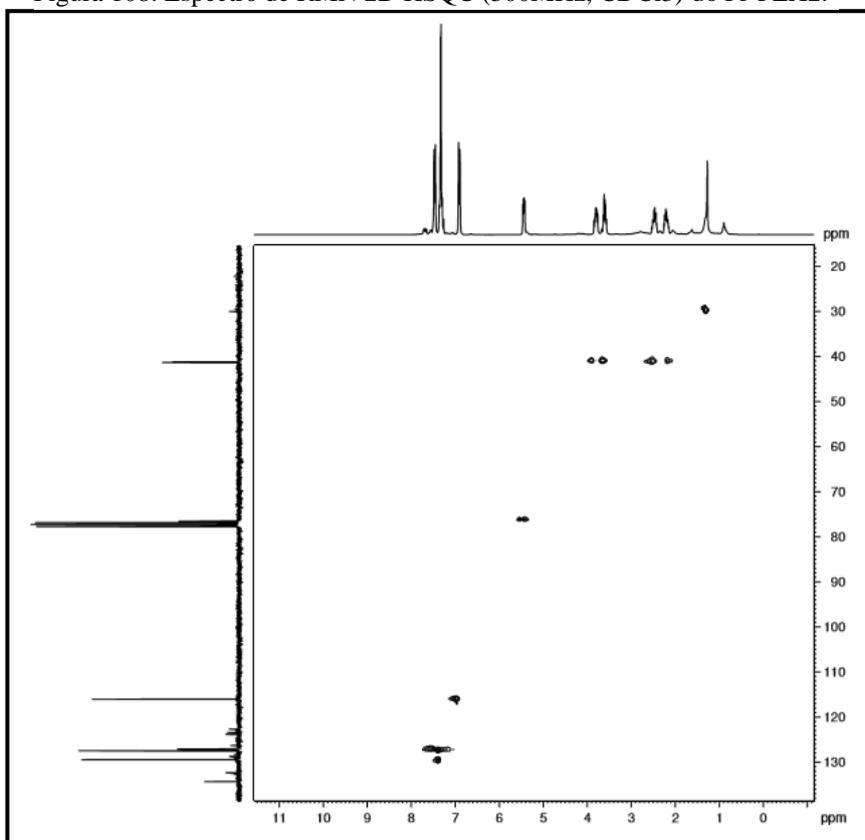
Figura 107. Espectro de RMN ^{13}C - JMOD do Pr-FLX2 (75 MHz, CDCl_3).Figura 108. Espectro de RMN 2D HSQC (300MHz, CDCl_3) do Pr-FLX2.

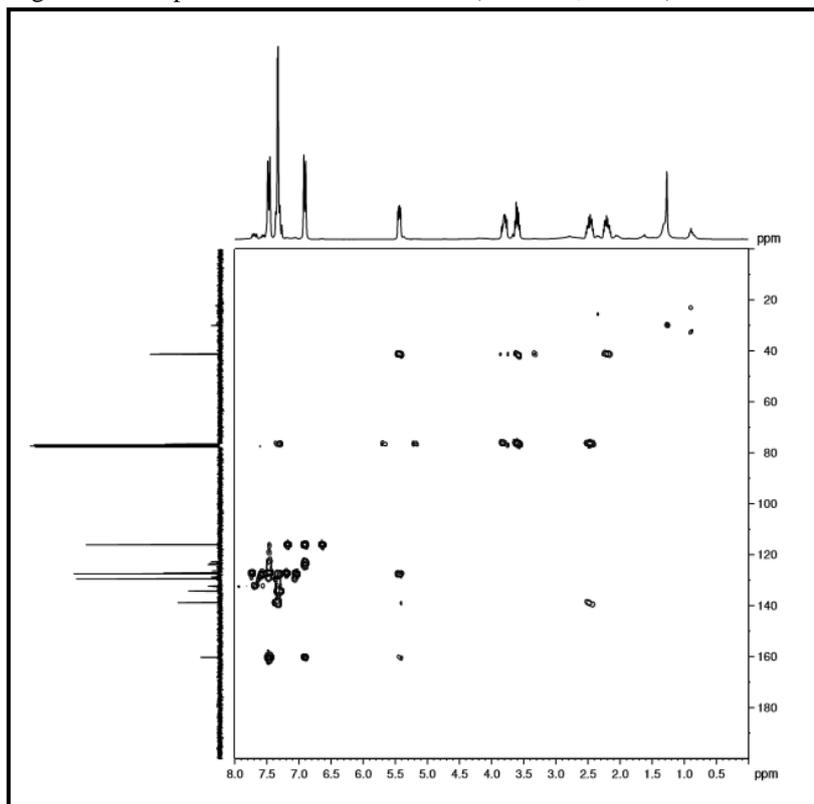
Figura 109. Espectro de RMN 2D HMBC (300MHz, CDCl₃) do Pr-FLX2.

Figura 110. Estrutura química do Pr-FLX2.

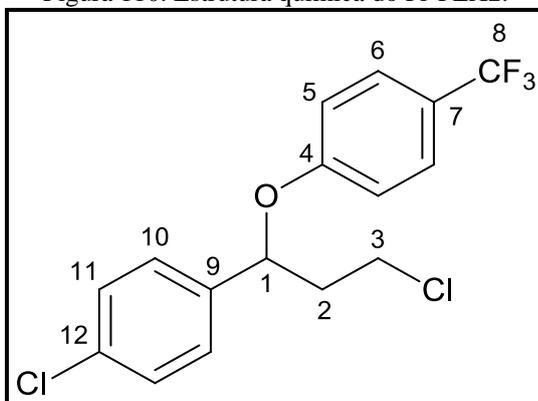


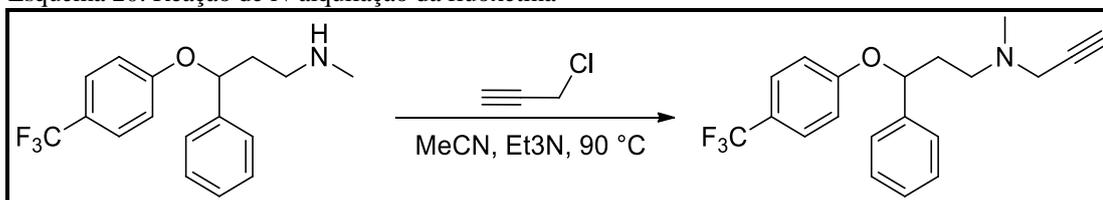
Tabela 19. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno (300/75 MHz, CDCl_3).

1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-trifluorometil)fenoxi)propil)benzeno				
HSQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	5,44 (dd; 1H; $J = 8,5$ e $4,5$ Hz)	76,6	41,3 138,7	41,0 127,4
2	a. 2,17-2,26 (m; 1H) b. 2,42-2,53 (m; 1H)	41,3	41,0 76,6	138,7
3	a. 3,56-3,63 (m; 1H) b. 3,76-3,84 (m; 1H)	41,0		76,6
4	-	160,2		
5	6,91 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz)	116,0	160,2	123,3
6	7,47 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz)	129,4	123,3	160,2
7	-	123,3		
8	-	127,1		
9	-	138,7		
10	7,27-7,37 (m; 2H)	127,4	138,7	76,6
11	7,27-7,37 (m; 2H)	127,2		138,7
12	-	134,2		

4.3.3 Obtenção de derivados da fluoxetina

4.3.3.1 Obtenção do FLX-PCI

Conforme metodologia descrita no item 6.1 (p. 167) para obtenção do derivado **FLX-PCI**, realizou-se uma reação de *N*-alquilação no substrato fluoxetina. Como produto obteve-se uma amina trissubstituída (Esquema 20) com rendimento de 26,3%.

Esquema 20. Reação de *N*-alquilação da fluoxetina

4.3.3.2 Identificação do derivado FLX-PCI

O espectro de RMN ^1H (Figura 111, p. 153) do derivado da fluoxetina **FLX-PCI** (300MHz, CDCl_3) expôs sinais em δ_{H} 5,31 (dd; 1H; $J = 8,2$ e $4,9$ Hz; H-6) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico oxigenado, em δ_{H} 1,94-2,05 (m; 1H; H-7a), δ_{H} 2,10-2,21 (m; 1H; H-7b), em δ_{H} 2,59-2,66 (m; 2H; H-8) e em δ_{H} 3,38 (s; 2H; H-9) referentes a

hidrogênios ligados a carbonos metilênicos. O sinal em δ_{H} 2,35 (s, 3H) é referente a hidrogênio ligado a carbono metílico. A estrutura do anel aromático di-substituído foi comprovada devido a presença dos sinais em δ_{H} 7,43 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz; H-3) e em δ_{H} 6,92 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz; H-4). Por fim, os sinais em δ_{H} 7,35-7,36 (m; 5H; H-14, 15 e 16) referente a hidrogênio ligado a carbono metínico de anel aromático mono-substituído.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do **FLX-PCI** (Figura 112, p. 153) apresentou 15 sinais. O sinal em δ_{C} 126,9 foi atribuído à carbono não hydrogenado ligado a três átomos de flúor. Já os sinais em δ_{C} 78,2 e δ_{C} 73,7 sugestivos de carbonos não hydrogenados. O sinal em δ_{C} 78,5 referente a carbono metínico oxigenado. Já os sinais em δ_{C} 36,7, δ_{C} 51,9 e δ_{C} 45,9 sugestivos de carbono metilênico e o sinal em δ_{C} 41,8 referente a carbono metílico. E por fim, os sinais em δ_{C} 123,0, δ_{C} 126,9, δ_{C} 116,0 e δ_{C} 160,8 alusivos à carbonos do anel aromático di-substituído, e os sinais em δ_{C} 141,2, δ_{C} 126,1, δ_{C} 129,0 e δ_{C} 128,1 indicativos de carbono de anel aromático mono-substituído. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 113, p. 154) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de seis carbonos não hydrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH), três carbonos metilênicos (CH_2) e um sinal para carbono metílico (CH_3).

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC de **FLX-PCI** (Figura 114, p. 154) apresentou as devidas correlações entre os átomos de hidrogênio aos seus respectivos átomos de carbono, as quais estão descritas na Tabela 20, p. 157.

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (Figura 115, p. 155) de **FLX-PCI** mostrou as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 2,10-2,21 com o carbono δ_{C} 78,5 (2J), do hidrogênio em δ_{H} 1,94-2,05 com o carbono δ_{C} 51,9 (2J), do hidrogênio em δ_{H} 2,35 com os carbonos δ_{C} 45,9 (3J) e δ_{C} 51,9 (3J). Já o hidrogênio em δ_{H} 2,59-2,66 faz correlações com os carbonos em δ_{C} 45,9 (3J), δ_{C} 41,8 (3J) e δ_{C} 36,7 (2J). Mostrou ainda as correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 3,38 com os carbonos δ_{C} 51,9 (3J) e δ_{H} 73,7 (3J), o hidrogênio em δ_{H} 5,31 com os carbonos δ_{C} 36,7 (2J), δ_{C} 51,9 (3J) e δ_{C} 126,1 (3J). A determinação do carbono em δ_{C} 123,0 (3J) só foi possível devido a sua correlação com o hidrogênio em δ_{H} 6,92. E por fim, a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 7,43 com o carbono δ_{C} 160,8 (3J), conforme a Figura 116, p. 155.

No espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 117, p. 156) foram visualizados o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 5,31 com o sinal em δ_{H} 2,10-2,21, acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 3,38 com um sinal em δ_{H} 2,10-2,21 e o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 7,43 com o sinal em δ_{H} 6,92.

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **FLX-PCI** a estrutura química do *N*-metil-*N*-(3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)prop-2-ino-1-amina (Figura 118, p. 156), sendo a mesma inédito na literatura.

Figura 111. Espectro de RMN ^1H do Pr-FLX2 (300 MHz, CDCl_3).

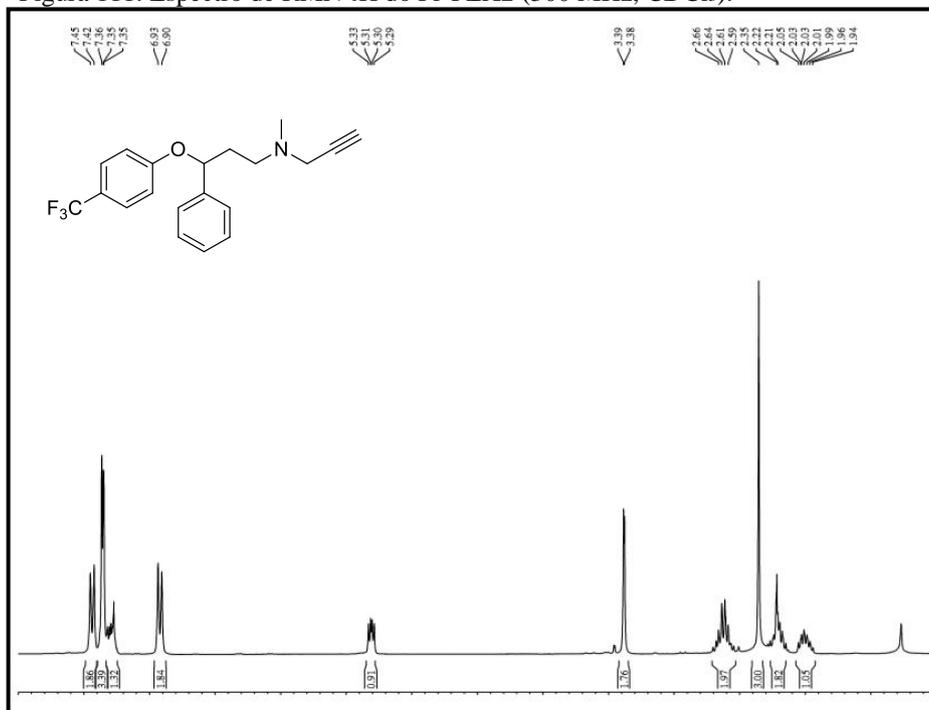


Figura 112. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) do FLX-PCI.

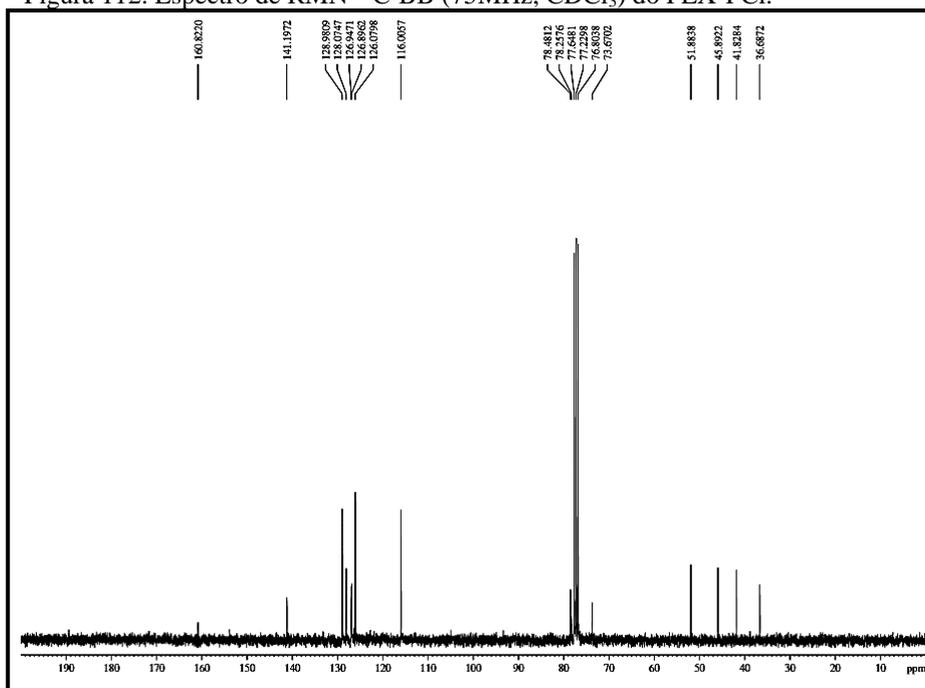


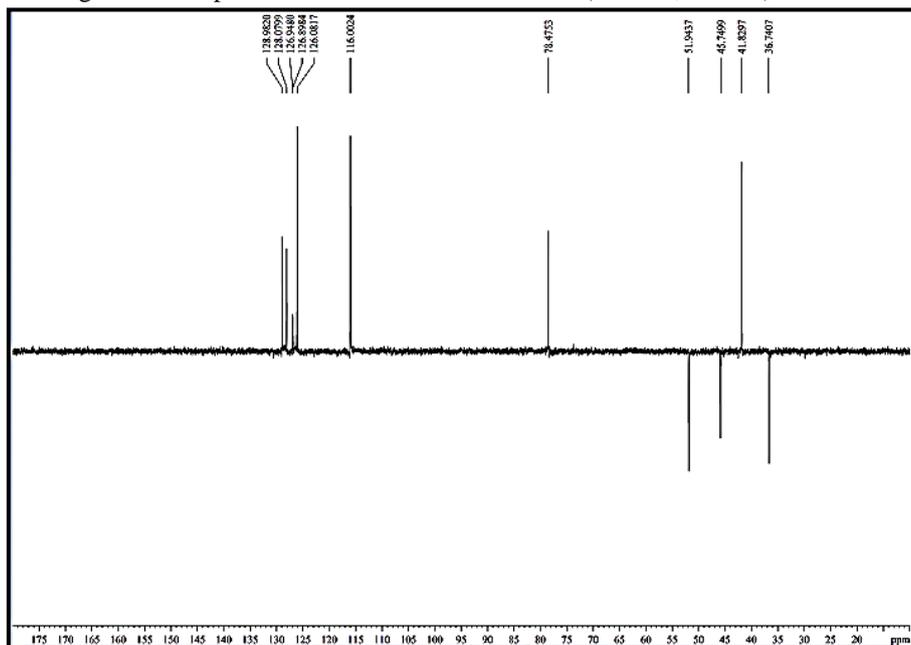
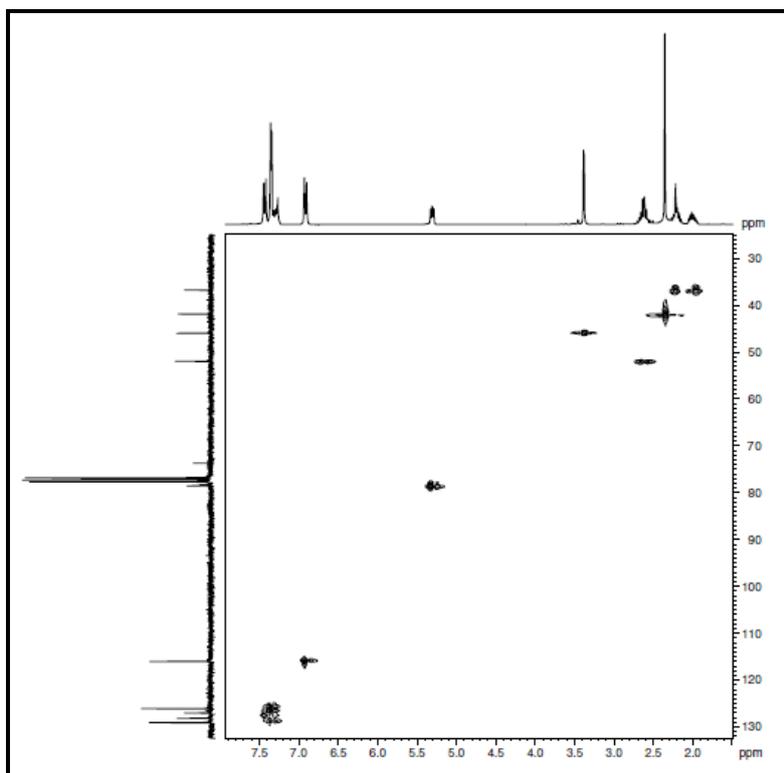
Figura 113. Espectro de RMN 13C - DEPT 135° (75MHz, CDCl₃) do FLX-Figura 114. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl₃) do FLX-PCI.

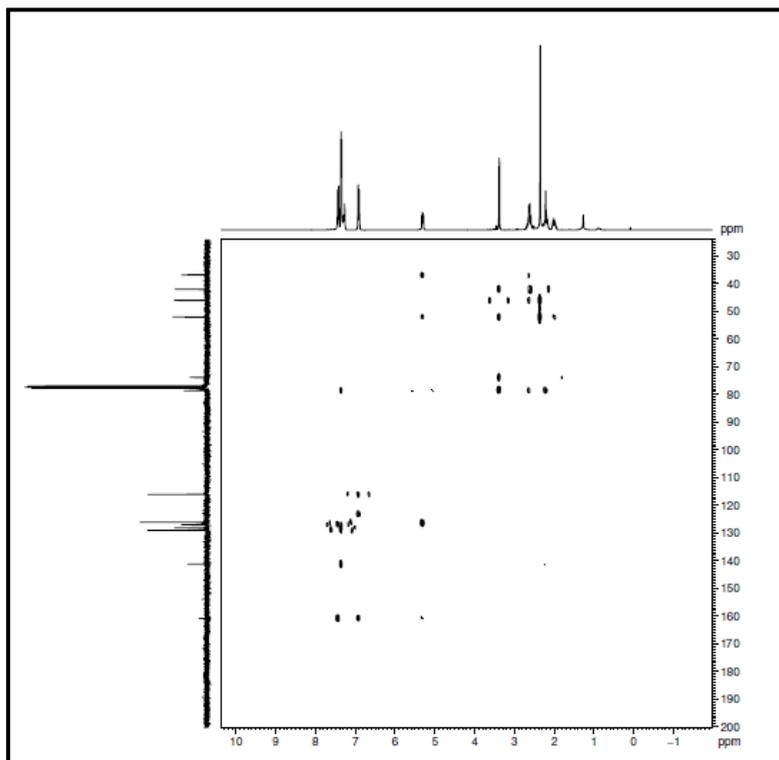
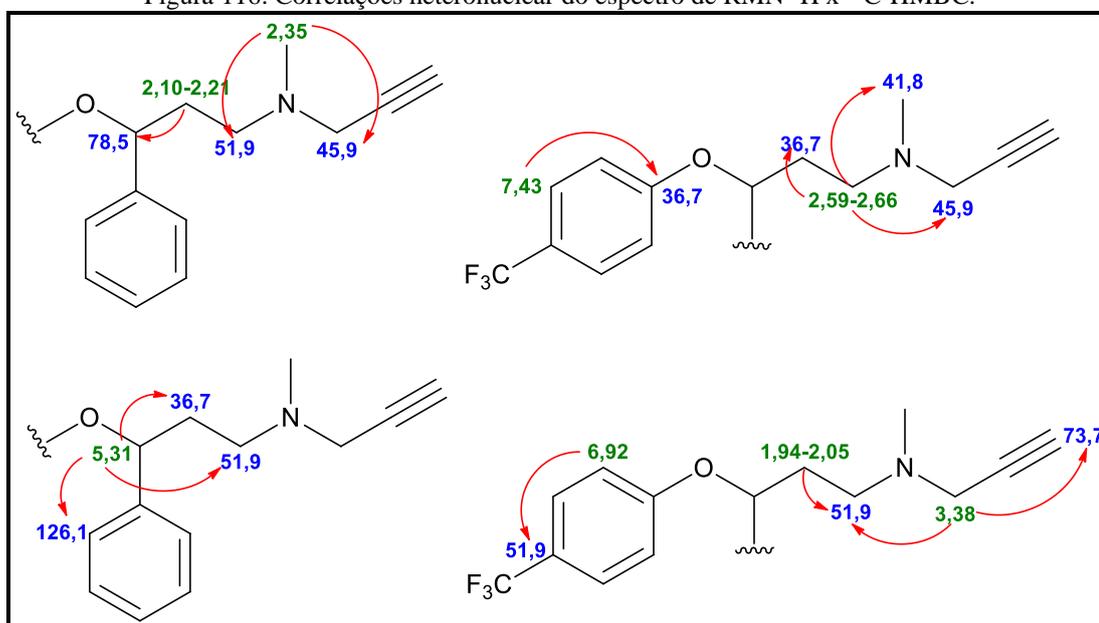
Figura 115. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do FLX-PCI.Figura 116. Correlações heteronuclear do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC.

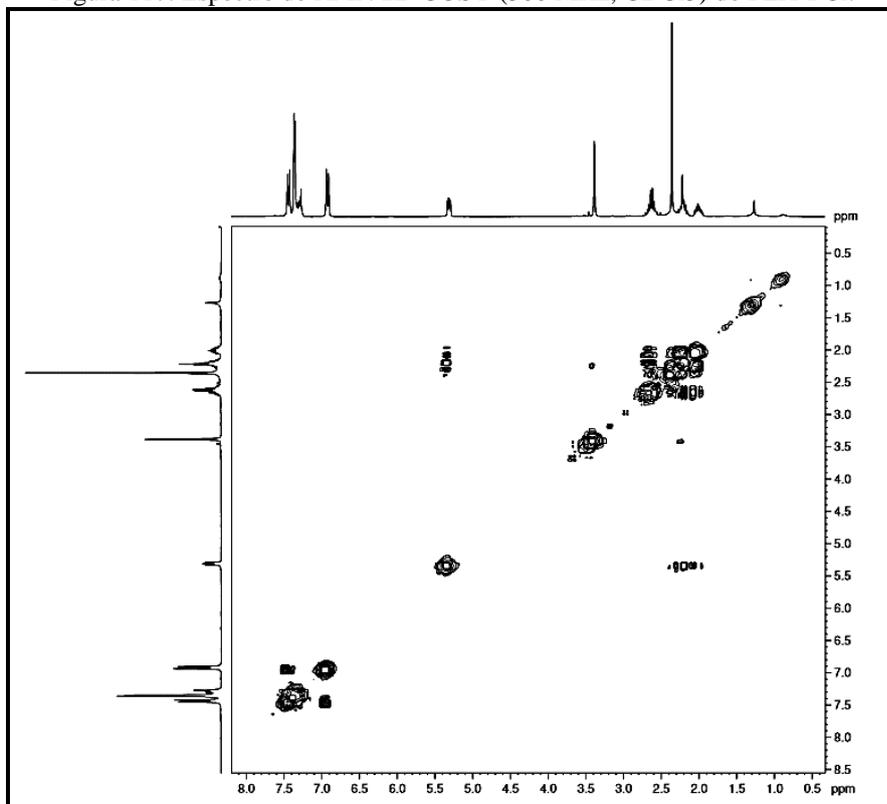
Figura 117. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl₃) do FLX-PCI.

Figura 118. Estrutura química do FLX-PCI.

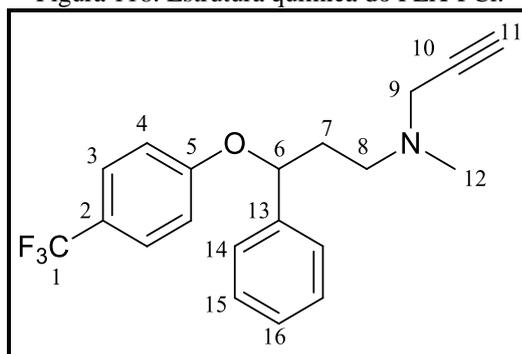
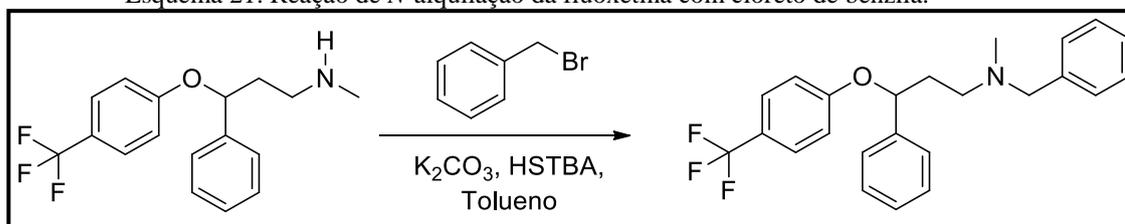


Tabela 20. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do FLX-PCI (300/75 MHz, CDCl_3).

FLX-PCI				
HSQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	-	126,9		
2	-	123,0		
3	7,43 (d; 2H; $J = 8,6$ Hz)	126,9		160,8
4	6,92 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz)	116,0		123,0
5	-	160,8		
6	5,31 (dd; 1H; $J = 8,2$ e $4,9$ Hz)	78,5		51,9 126,1
7	a. 1,94-2,05 (m; 1H) b. 2,10-2,21 (m; 1H)	36,7	51,9 78,5	
8	2,59-2,66 (m; 2H)	51,9	36,7	45,9 41,8
9	3,38 (s; 2H)	45,9		51,9 73,7
10	-	78,2		
11	-	73,7		
12	2,35 (s; 3H)	41,8		45,9 51,9
13	-	141,2		
14	7,35-7,36 (m; 2H)	126,1		
15	7,35-7,36 (m; 2H)	129,0		
16	7,35-7,36 (m; 1H)	128,1		

4.3.3.3. Obtenção do FLX-Be

Conforme metodologia descrita no item 6.2 (p. 167) para obtenção do **FLX-Be**, onde realizou-se uma reação de *N*-alquilação, utilizando como reagente brometo de benzila (Esquema 21). O produto *N*-benzil-*N*-metil-3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propan-1-amina foi obtido com rendimento de 31,2%.

Esquema 21. Reação de *N*-alquilação da fluoxetina com cloreto de benzila.

4.3.3.4 Identificação do derivado FLX-Be

O espectro de RMN ^1H de **FLX-Be** (Figura 119, p. 159) mostrou quatro sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos em δ_{H} 7,43 (d; 1H; $J = 9,0$ Hz; H-3),

δ_{H} 6,87 (d; 1H; $J = 9,0$ Hz; H-4), δ_{H} 7,24-7,27 (m; 5H; H-11, 12 e 13) e δ_{H} 7,32-7,33 (m; 5H; H-16, 17 e 18). Um hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ_{H} 5,35 (m; 2H; H-6), além de outro sinal em δ_{H} 2,28 (s; 3H; H-14) característico de hidrogênio de carbono metílico. Por fim, cinco sinais de hidrogênios de carbonos metilênicos em δ_{H} 2,05-2,10 (m; 1H; H-7a), δ_{H} 2,18-2,25 (m; 1H; H-7b), δ_{H} 2,50-2,54 (m; 1H; H-8a), δ_{H} 2,64-2,71 (m; 1H; H-8b) e δ_{H} 3,55 (q; 2H; $J = 9,0$ Hz; H-9).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 120, p. 159) apresentou 17 sinais, sendo um referente a grupamento metila em δ_{C} 36,8 e um carbono sp^3 oxigenado em δ_{C} 78,4. Vários sinais de carbonos aromáticos foram observados na região de δ_{C} 116,0 - δ_{C} 161,0. Também foram observados sinais em δ_{C} 126,9 referente a carbono sp^3 trifluorado e os sinais em δ_{C} 29,9, 53,4 e 62,7 atribuídos a carbonos metilênicos, sendo os dois últimos carbonos nitrogenados. A comparação do espectro de RMN-JMOD (Figura 121, p. 160) com o espectro RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), nove carbonos metínicos (CH), três carbonos metilênicos (CH_2) e um carbono metílico (CH_3).

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 122, p. 160) do **FLX-Be** permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 21, p. 162). O espectro RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figura 123, p. 161) de **FLX-Be** permitiu atribuir todas as correlações a duas (2J) e três (3J) ligações, conforme mostra a Figura 124 (p. 161) e a Tabela 21, p. 162.

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **FLX-Be** a estrutura química do *N*-benzil-*N*-metil-3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propan-1-amina (Figura 125, p. 161), sendo o mesma inédita na literatura.

Figura 119. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do FLX-Be.

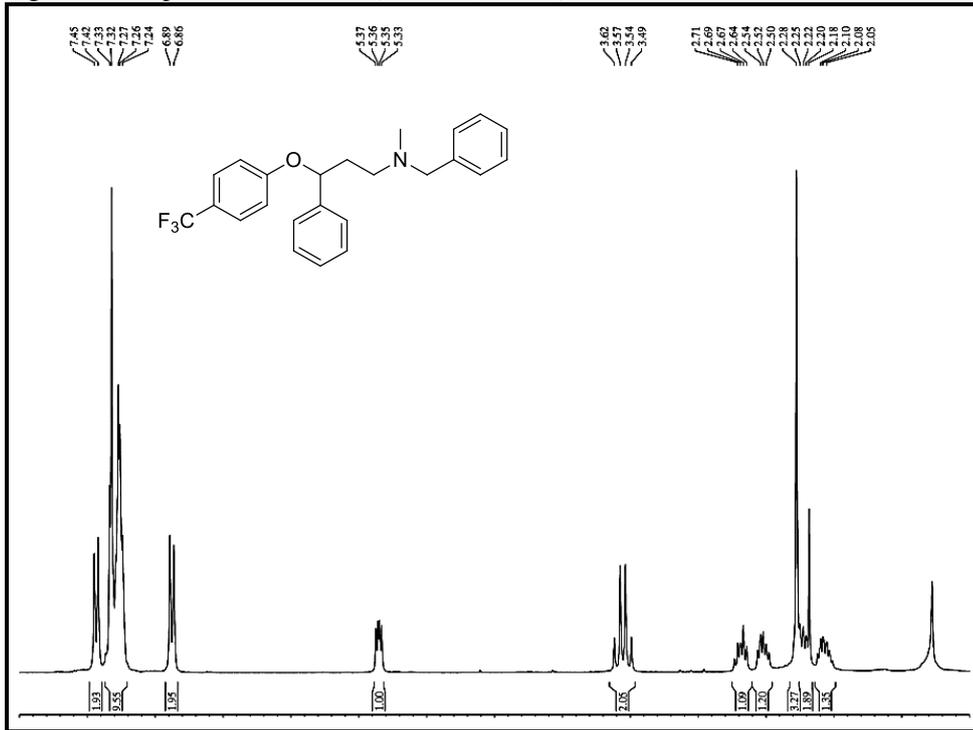


Figura 120. Espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, CDCl₃) do FLX-Be.

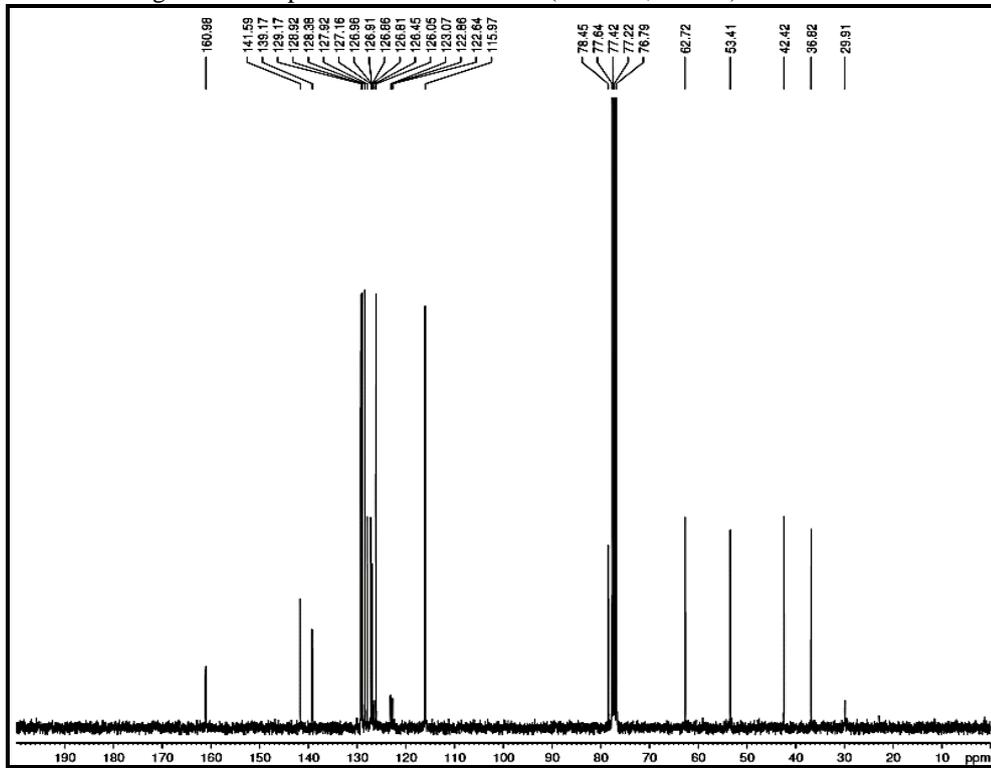


Figura 121. Espectro de RMN ^{13}C - JMOD (75 MHz, CDCl_3) do FLX-Be.

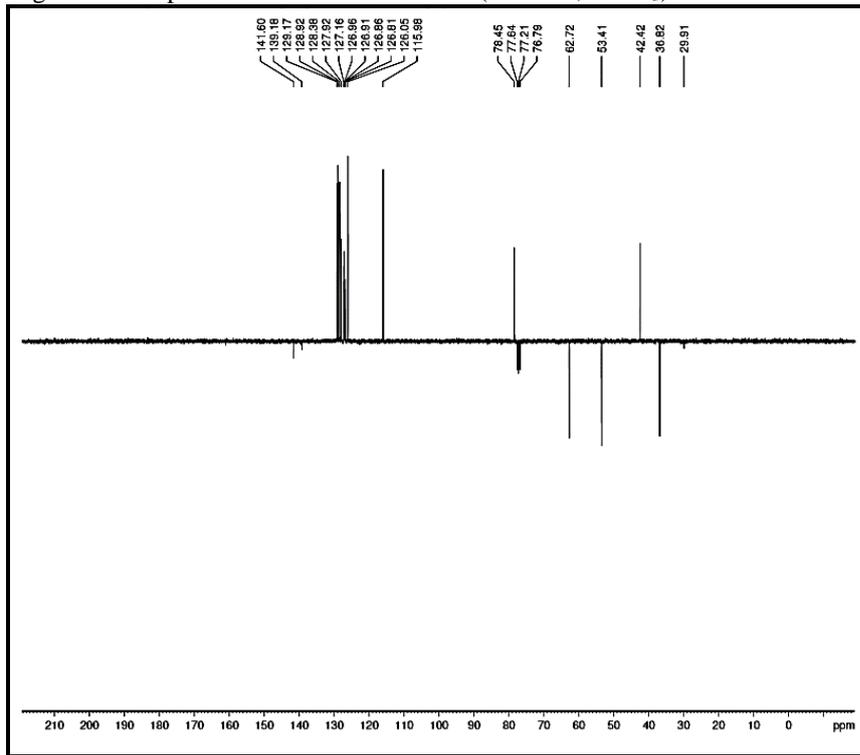


Figura 122. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do FLX-Be.

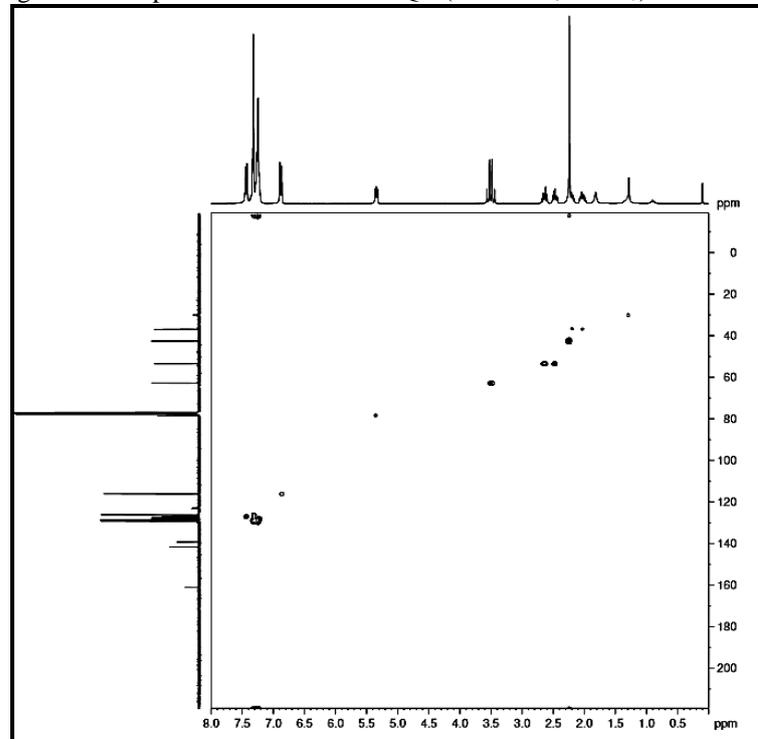


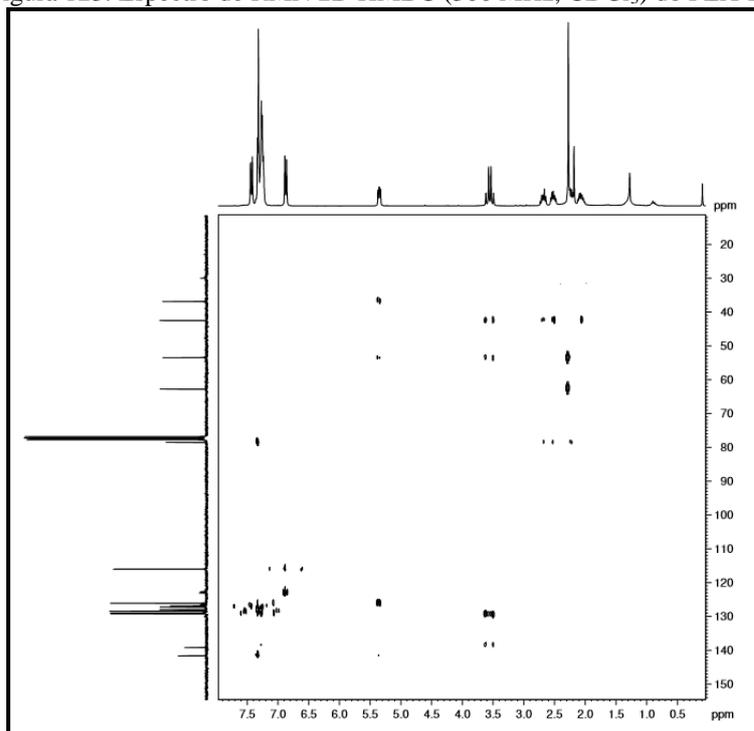
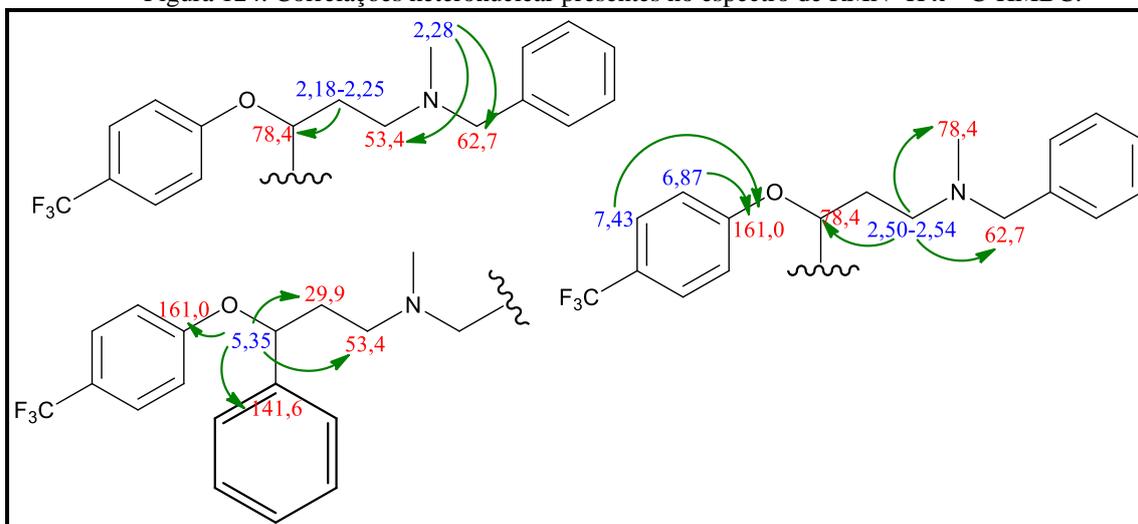
Figura 123. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl₃) do FLX-Be.Figura 124. Correlações heteronuclear presentes no espectro de RMN ¹H x ¹³C-HMBC.

Figura 125. Estrutura química do FLX-Be.

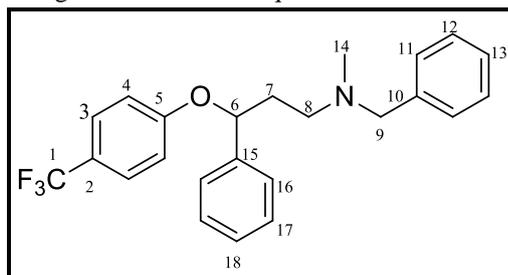
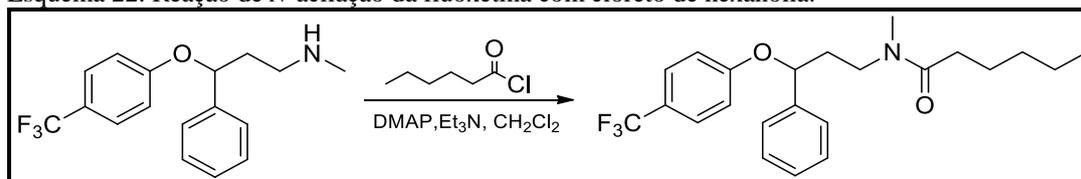


Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do FLX-Be (300/75 MHz, CDCl_3).

FLX-Be				
HSQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	-	126,9		
2	-	122,8		
3	7,43 (d; 2H; $J = 9,0$ Hz)	127,2-129,2		161,0
4	6,90 (d; 2H; $J = 9,0$ Hz)	116,0	161,0	
5	-	161,0		
6	5,35 (m; 1H)	78,4	29,9 141,6	53,4 161,0
7	a. 2,05-2,10 (m; 1H) b. 2,18-2,25 (m; 1H)	29,9	78,4	
8	a. 2,50-2,54 (m; 1H) b. 2,64-2,71 (m; 1H)	53,4		36,8 62,7 78,4
9	3,55 (q; 2H; $J = 9,0$ Hz)	62,7		
10	-	139,2		
11	7,24-7,27 (m; 2H)	127,2-129,2		
12	7,24-7,27 (m; 2H)	127,2-129,2		
13	7,24-7,27 (m; 1H)	127,2-129,2		
14	2,28 (s; 3H)	36,8		53,4 62,7
15	-	141,6		
16	7,32-7,33 (m; 2H)	126,0		
17	7,32-7,33 (m; 2H)	127,2-129,2		
18	7,32-7,33 (m; 1H)	127,2-129,2		

4.3.3.5 Obtenção do R-FLXH

Conforme metodologia descrita no item 6.3 (p. 167) para obtenção do **R-FLXH**, realizou-se uma reação de *N*-acilação, utilizando com reagente o cloreto de hexanoíla. Obteve-se a *N*-metil-*N*-(3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)hexanamida como produto com rendimento de 74,0% (Esquema 22).

Esquema 22. Reação de *N*-acilação da fluoxetina com cloreto de hexanoíla.

4.3.3.6 Identificação do derivado R-FLXH

O espectro de RMN ^1H (Figura 126, p. 164) do derivado da fluoxetina **R-FLXH** (300 MHz, CDCl_3) expôs sinais em δ_{H} 5,19-5,24 (m; 1H; H-6) referente a hidrogênio ligado a

carbono metínico oxigenado, em δ_H 2,17-2,29 (m; 2H; H-7), δ_H 3,54-3,66 (m; 2H; H-8), em δ_H 2,35 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; H-10), δ_H 1,56-1,69 (m; 2H; H-11) e em δ_H 1,30-1,35 (m; 4H; H-12 e 13) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos. Os sinais em δ_H 2,96 (d; 3H; $J = 10,9$ Hz; H-15) e δ_H 0,90-0,93 (m; 3H; H-14) são referentes a hidrogênio ligado a carbono metílico. A estrutura do anel aromático di-substituído foi comprovada devido a presença dos sinais em δ_H 7,39-7,46 (m; 2H; H-3) e em δ_H 6,90 (d; 2H; $J = 8,2$ Hz; H-4). Por fim, os sinais em δ_H 7,27-7,34 (m; 5H; H-17, 18 e 19) referentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos de anel aromático mono-substituído.

O espectro de RMN ^{13}C -BB ($\text{CDCl}_3/75$ MHz) do **R-FLXH** (Figura 127, p. 164) apresentou 17 linhas espectrais. O sinal em δ_C 127,0 referente a carbono tri-fluorado, o sinal em δ_C 179,6 referente a carbono sp^2 de carbonila e o sinal em δ_C 78,6 referente a carbono metínico oxigenado. Já os sinais em δ_C 36,5, δ_C 45,5, δ_C 31,8, δ_C 25,0, δ_C 22,6 e δ_C 31,4 sugestivos de carbono metilênico e os sinais δ_C 14,0 e δ_C 33,8 referentes a carbono metílico, sendo o último sinal de uma metila ligada a um átomo de nitrogênio. E por fim, os sinais em δ_C 122,0, δ_C 129,0, δ_C 115,8 e δ_C 160,7 indicativos de carbonos de anel aromático di-substituído, e os sinais em δ_C 140,2, δ_C 125,7, δ_C 129,0 e δ_C 128,1 indicativos de carbono de anel aromático mono-substituído. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 128, p. 165) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH), seis carbonos metilênicos (CH_2) e dois carbonos metílicos (CH_3).

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC de **R-FLXH** (Figura 129, p. 165) apresentou as devidas correlações entre os átomos de hidrogênio aos seus respectivos átomos de carbono, as quais foram evidenciadas na Tabela 22, p. 168.

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **R-FLXH** (Figura 130, p. 166) mostrou as correlações dos hidrogênios em δ_H 7,42 com o carbono δ_C 160,7 (3J), do hidrogênio em δ_H 6,90 com os carbonos em δ_C 160,7 (2J) e δ_C 122,0 (3J), do hidrogênio em δ_H 1,63 com os carbonos δ_C 179,6 (3J) e δ_C 22,6 (2J). Já o hidrogênio em δ_H 2,35 faz correlações com o carbono em δ_C 179,6 (2J). Mostrou ainda as correlações entre o hidrogênio em δ_H 2,96 com o carbono δ_C 45,5 (3J) e o hidrogênio em δ_H 0,92 com os carbonos δ_C 22,6 (3J) e δ_C 31,4 (2J). Essas correlações estão representadas na Figura 131, p. 166.

No espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 132, p. 167) foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ_H 5,22 com o sinal em δ_H 2,23, em δ_H 3,60 com o sinal em δ_H 2,23, em δ_H 2,35 com o sinal em δ_H 1,63, em δ_H 1,63 com o sinal em δ_H

1,33, em δ_H 7,39-7,46 com o sinal em δ_H 6,90 e o acoplamento do hidrogênio em δ_H 1,33 com o sinal em δ_H 0,92.

A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **R-FLXH** a estrutura química do *N*-metil-*N*-(3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)hexanamida (Figura 133, p. 167), sendo o mesmo inédito na literatura.

Figura 126. Espectro de RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) do R-FLXH.

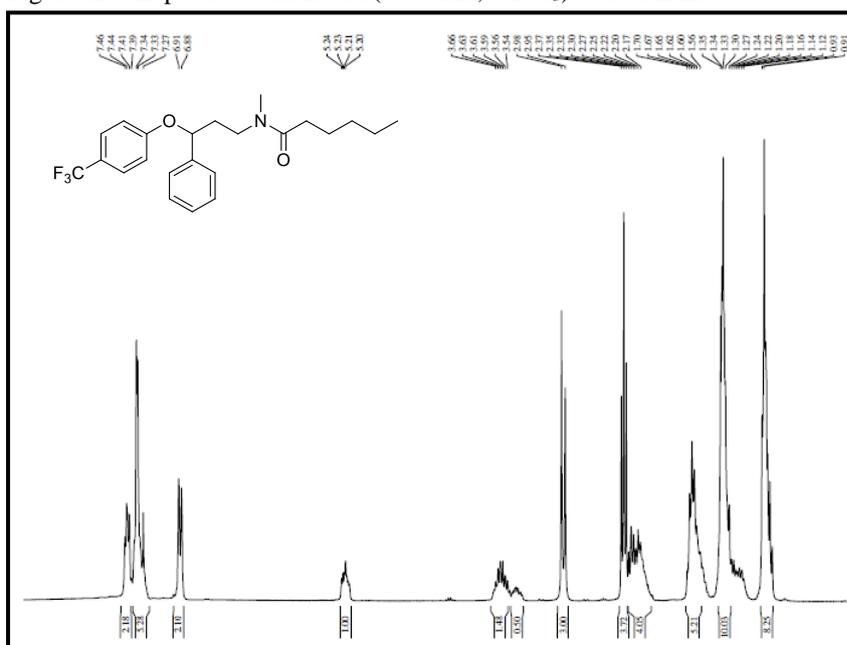


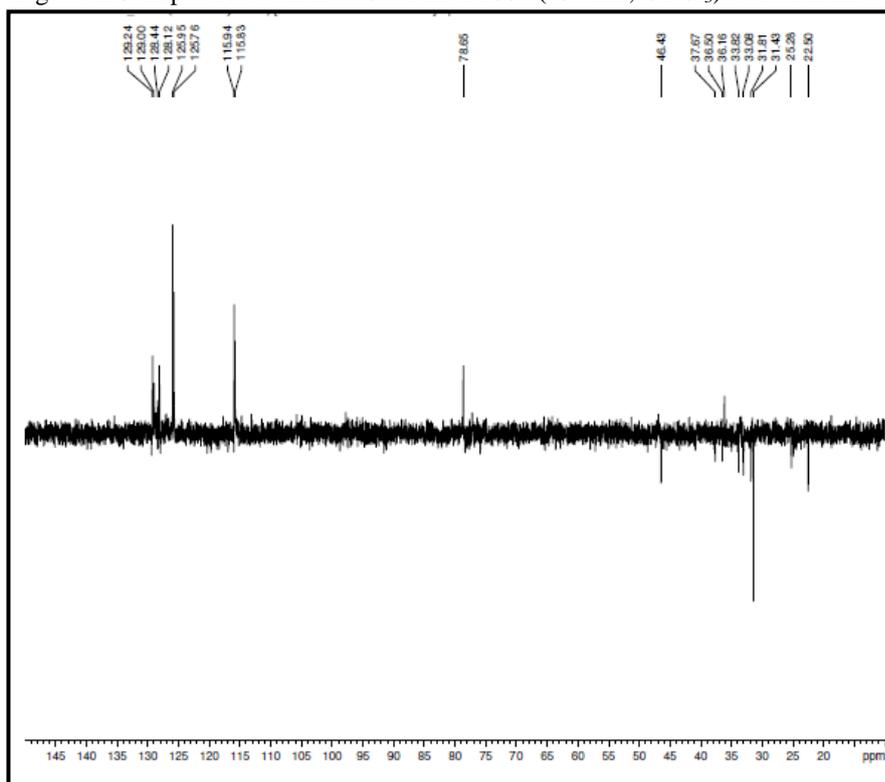
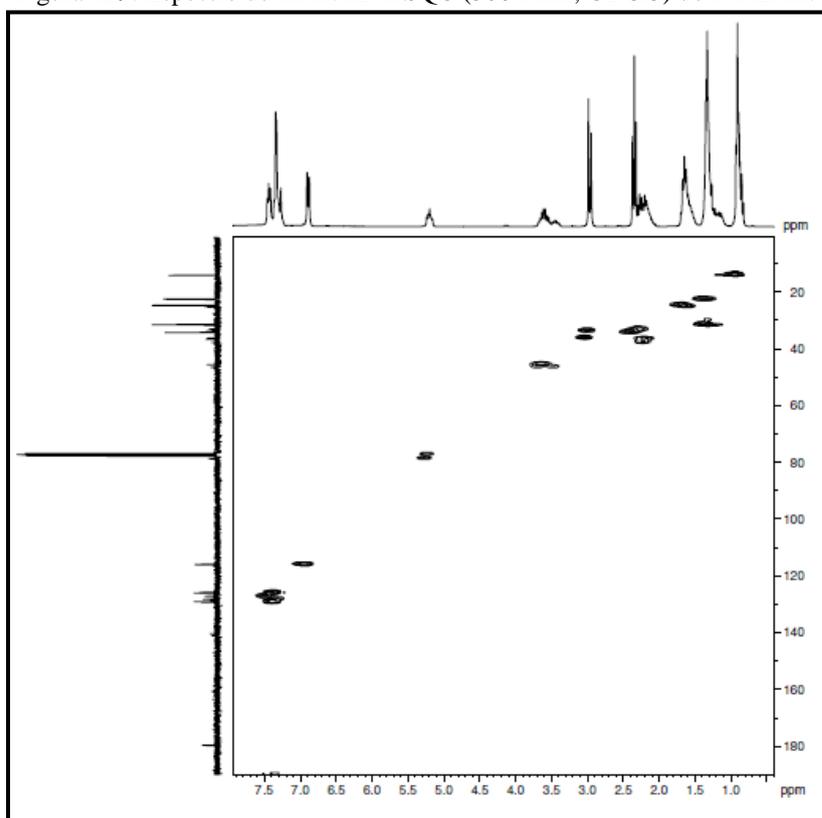
Figura 128. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) do R-FLXH.Figura 129. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do R-FLXH.

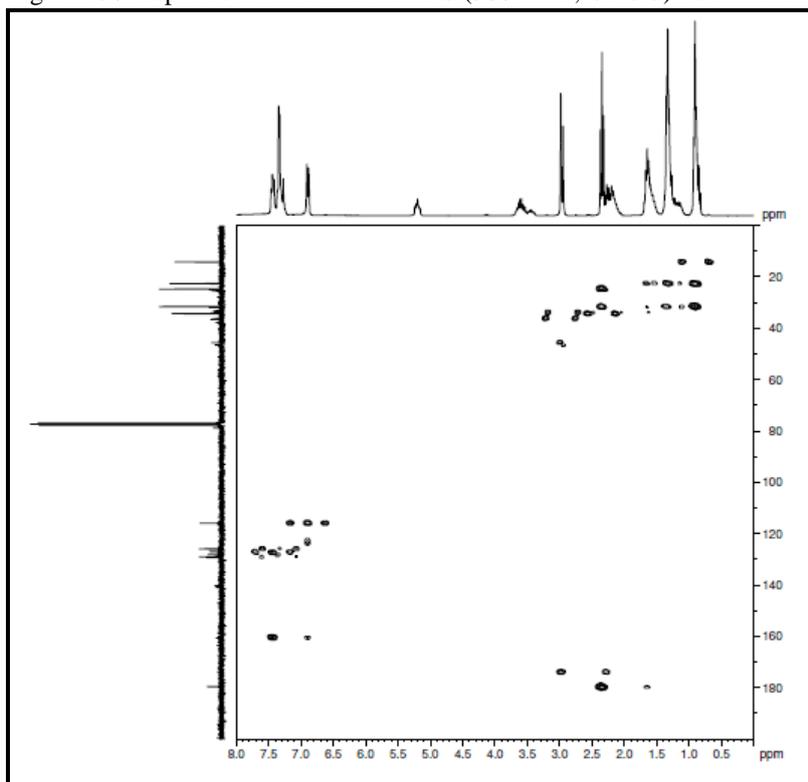
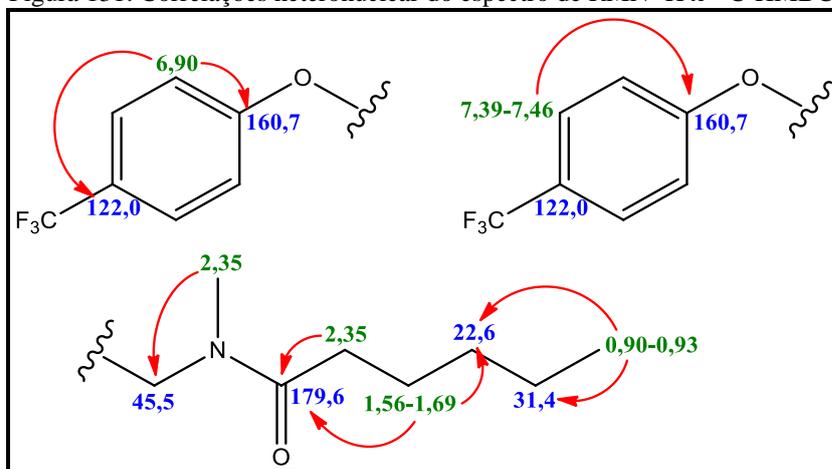
Figura 130. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl₃) do R-FLXHFigura 131. Correlações heteronuclear do espectro de RMN ¹H x ¹³C-HMBC.

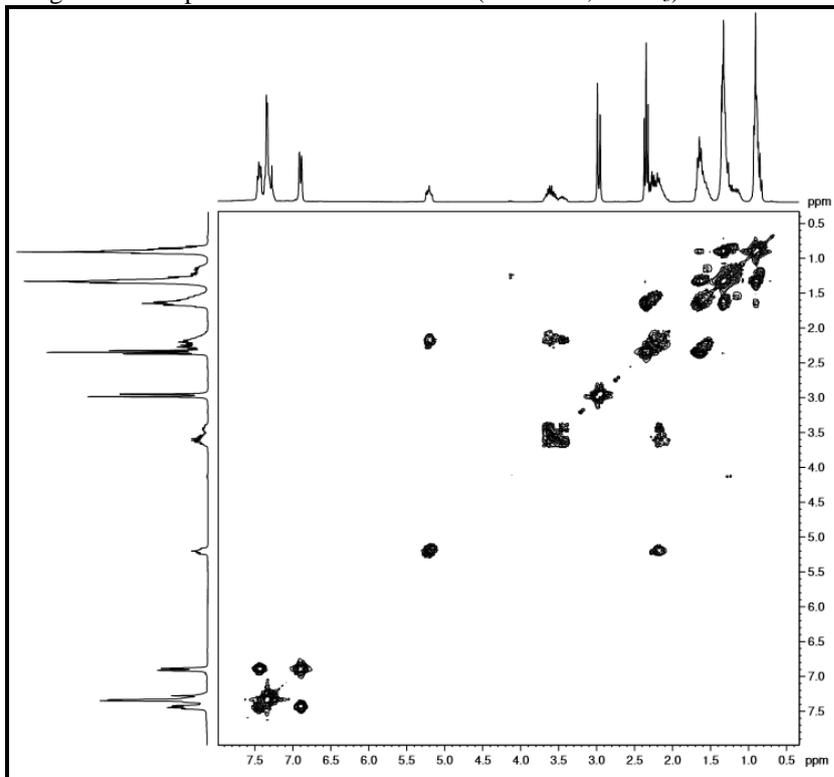
Figura 132. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl₃) do R-FLXH.

Figura 133. Estrutura química do R-FLXH.

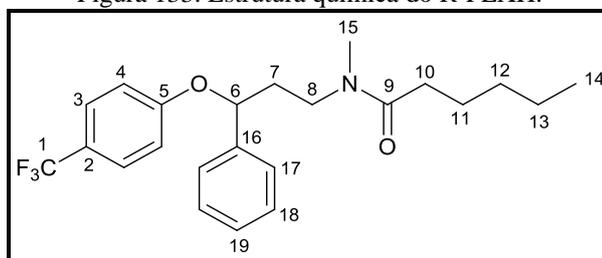


Tabela 22. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do R-FLXH (300/75 MHz, CDCl_3).

<i>N</i>-metil-<i>N</i>-(3-fenil-3-(4-(trifluorometil)fenoxi)propil)hexanamida				
C	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	-	127,0		
2	-	122,0		
3	7,39-7,46 (m; 2H)	129,0		160,7
4	6,90 (d; 2H; $J = 8,2$ Hz)	115,8	160,7	122,0
5	-	160,7		
6	5,19-5,24 (m; 1H)	78,6		
7	2,17-2,29 (m; 2H)	36,5		
8	3,54-3,66 (m; 2H)	45,5		
9	-	179,6		
10	2,35 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz)	31,8	179,6	
11	1,56-1,69 (m; 2H)	25,0	22,6	179,6
12	1,30-1,35 (m; 2H)	22,6		
13	1,30-1,35 (m; 2H)	31,4		
14	0,90-0,92 (m; 3H)	14,0	31,4	22,6
15	2,96 (d; 3H; $J = 10,9$ Hz)	33,8		45,5
16	-	140,2		
17	7,27-7,34 (m; 2H)	125,7		
18	7,27-7,34 (m; 2H)	129,0		
19	7,27-7,34 (m; 1H)	128,1		

4.3.4 Atividade antimicrobiana das amostras

As amostras **P-FLX-1**, **P-FLX-2**, **FLX-PCI**, **FLX-Be** e **R-FLXH** tiveram suas atividades antimicrobiana avaliadas frente a uma cepa de cada bactéria da coleção: *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 6538PTM), MRSA (ATCC[®] 65398TM), uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027TM) e uma cepa de *Candida albicans* (ATCC[®] 14053TM), todas pertencente à bacterioteca e micoteca do LABIMAN. Estas foram semeadas em ágar Mueller Hilton e Sabouraud e incubadas a 35°C por 24h. As amostras na concentração de 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ não mostraram atividade contra as cepas testadas.

4.4 Procedimentos experimentais

4.4.1 Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção em coluna foi empregado, como fase estacionária gel de sílica 0,035-0,70 mm, 60 A, da marca Vetec[®]. Os comprimentos e os diâmetros da coluna

variam de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizados.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da marca Merck® com espessura de 0,2 mm e as cromatografias em camada delgada preparativa foram realizadas em placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com gel de sílica 250 F₂₅₄ da marca J.T.Baker.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, acetato de etila, metanol e clorofórmio da marca Synth® e Vetec®.

A revelação nas placas analíticas e preparativas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light®, em dois comprimentos de onda (254 e 265 nm) e imersas em solução de vanilina em HClO₄/EtOH.

4.4.2 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

Ver capítulo I, item 5.2.1, p. 79.

4.4.3 Substrato

A fluoxetina foi cedida pelo Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN).

4.4.4 Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento dos precursores da fluoxetina e nas modificações químicas da mesma, estão listados a seguir com suas respectivas procedências:

- ✓ Trietilamina (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Carbonato de potássio (DINÂMICA)
- ✓ Boroidreto de sódio - NaBH₄ (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ 4-dimetilaminopiridina - DMAP (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ 4-trifluormetilfenol (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ 3,4'- dicloropropiofenona (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Anidrido acético (VETEC)
- ✓ 3-cloropropiofenona (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Trifenilfosfina (SIGMA - ALDRICH)

- ✓ Diisopropil azodicarboxilato - DIAD (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Hidrogenosulfato de terabutylamônio - HSTBA
- ✓ Trietilamina (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Cloreto de propargila (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ Brometo de benzila (SIGMA - ALDRICH)
- ✓ 4-(dimetiamino)piridina - DMAP (SIGMA – ALDRICH)
- ✓ Cloreto de haxanoíla (SIGMA - ALDRICH)

4.5 Síntese dos precursores da fluoxetina

4.5.1 Síntese do Pr-FLX1

4.5.1.1 Redução da 3-cloropropiofenona

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, foi adicionou 45 mL de metanol juntamente com 834,1 mg (5 mmol) de 3-cloropropiofenona. Em seguida, o balão foi colocado em banho de gelo e ao mesmo foi adicionado 283,7 mg (7,5 mmol) de NaBH₄ ao meio reacional. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 2 horas (Li *et al.*, 2007). O solvente foi removido sob pressão reduzida, ao bruto reacional foi adicionado água e foram realizadas partições com acetato de etila. O produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: hexano/acetato de etila (9:1). Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, denominado 3-cloro-1fenilpropan-1-ol, com rendimento de 96,0%.

4.5.1.2 Reação de Mitsunobu 1

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, adicionou-se 2,1 g (8 mmol) de trifetilfosfina (PPh₃) em 25 mL de acetonitrila seco sobre atmosfera de N₂. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL (8 mmol) de DIAD, gota a gota, a temperatura de 0 °C por 30 min. Depois, adicionou-se 1 mL (8 mmol) de 4-trifluormetilfenol e 500 mg (3 mmol) de 3-cloro-1-fenilpropan-1-ol, sendo que a mistura foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. Ao término da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto bruto foi purificado através de uma coluna cromatográfica com gel de sílica e eluente: 10% de acetato

de etila em hexano. Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, denominado de 1-(3-cloro-1-fenilpropoxi)-4-(trifluormetil)benzeno, com rendimento de 50,0%.

4.5.2 Síntese do Pr-FLX2

4.5.2.1 Redução da 3,4'-dicloropropiofenona

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionou 10 mL de metanol juntamente com 250 mg (1,23 mmol) de 3,4'-dicloropropiofenona. Em seguida, o balão foi colocado em banho de gelo e foi adicionado 71,0 mg (1,85 mmol) de NaBH₄ ao meio reacional. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 2 horas (Li *et al.*, 2007). O solvente foi removido sob pressão reduzida, a mistura reacional foi adicionada água e foram realizadas partições com acetato de etila. O produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: hexano/acetato de etila (9:1). Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, denominado 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol, com rendimento de 85,4%.

4.5.2.2 Reação de Mitsunobu 2

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, adicionou-se 2,1 g (8 mmol) de trifetilfosfina (PPh₃) em 5 mL de acetonitrila seco sobre atmosfera de N₂. Em seguida, adicionou-se 219 µL (1,38 mmol) de DIAD, gota a gota, a temperatura de 0 °C por 30 min. Depois, adicionou-se 168 µL (1,38 mmol) de 4-trifluormetilfenol e 150 mg (0,53 mmol) de 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-ol, sendo que a mistura foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. Ao término da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e a mistura reacional foi purificado através de uma coluna cromatográfica com gel de sílica e eluente: 10% de acetato de etila em hexano. Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, denominado de 1-cloro-4-(3-cloro-1-(4-(trifluormetil)fenoxi)propil)benzeno, com rendimento de 35,0%, o qual é de caráter inédito na literatura.

4.6 Modificação química da fluoxetina

4.6.1 Reação de alquilação da fluoxetina com cloreto de propargila (FLX-CIP)

A reação ocorreu em um balão de fundo redondo de 10 mL, no qual inicialmente foi adicionado 60 mg (0,23 mmol) de fluoxetina e 32 μ L (0,23 mmol) de trietilamina, os quais foram mantidos sob agitação por 10 minutos. Após esse período foi adicionado ao meio reacional 22,6 μ L (0,25 mmol) de cloreto de propargila, a reação ocorreu a 90 °C, por um período de 20 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida, o bruto reacional foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: 10% de metanol em CH_2Cl_2 . Obtendo-se um óleo viscoso de coloração amarelada, denominado N-metil-N-(3-fenil-3-(4-(trifluórmetil)fenoxi)propil)prop-2-in-1-amina, com rendimento de 26,3%, o qual é inédito na literatura.

4.6.2 Reação de alquilação da fluoxetina com brometo de benzila (FLX-Be)

A reação de alquilação ocorreu em balão de fundo redondo de 5 mL contendo 50 mg (1,16 mmol) de fluoxetina, 22,1 mg (0,16 mmol) de K_2CO_3 em em 1,6 ml de tolueno, foi adicionado ao meio reacional HSTBA em quantidades catalíticas, o mesmo ficou em agitação por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 37 μ L de brometo de benzila. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética a 70 °C por 24 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto purificado em cromatografia em coluna, usando como fase móvel 100% de clorofórmio e depois 10% de metanol em clorofórmio. O produto **FLX-Be** foi obtido com 31,2% de rendimento.

4.6.3 Reação de alquilação da fluoxetina com cloreto de hexanoíla (R-FLXH)

Em um balão de 10 ml, adicionou-se 13,4 mg (0,11 mmol) DMAP em 2,5 mL de CH_2Cl_2 e 200 μ L (1,38 mmol) de cloreto de hexanoíla. Em seguida, adicionou-se 70 mg (0,23 mmol) de fluoxetina e por último 32 μ L (0,23 mmol) de trietilamina. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 3 horas. Após o término da reação, adicionou-se 10 mL de CH_2Cl_2 , ao mesmo foi realizado uma partição líquido-líquido com solução saturada de NaHCO_3 (3 x 10 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna com gel de sílica eluída com 100% de CH_2Cl_2 . O rendimento do produto **R-FLXH** foi de 74%.

4.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das substâncias P-FLX-1, P-FLX-2, FLX-PCI, FLX-Be e R-FLXH foram avaliadas no Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da UFC, sob a coordenação do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

O ensaio dos precursores da fluoxetina e de seus derivados foi realizado frente a uma cepa de cada bactéria da coleção: *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 6538PTM), MRSA (ATCC[®] 65398TM), uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027TM) e uma cepa de *Candida albicans* (ATCC[®] 14053TM), todas pertencente à bacterioteca e micoteca do LABIMAN. Estas foram semeadas em ágar Mueller Hilton e Sabouraud e incubadas a 35°C por 24h. Os compostos mencionados foram solubilizados em Tween 80% na concentração de 1000 µg/mL.

Foi utilizada a técnica por disco de difusão de acordo com os documentos M2-A8 (CLSI, 2003) e Famacopeia Brasileira 2010 com modificações. Utilizando o meio de cultura ágar Mueller Hilton (pH 7,0 +/- 0,1) e ágar Sabouraud (pH 7,0 +/- 0,1). As substâncias foram testadas na concentração 1000 µg/mL. Para a comparação do padrão do halo de inibição foram utilizados discos antimicrobianos da amicacina 30µg, vancomicina 30µg, meropenem 10µg e solução de fluconazol 1000 µg/mL.

A partir de um cultivo de 24h das bactérias e leveduras a serem testadas, realizado em ágar Mueller Hilton e Sabouraud, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland e verificada sua transmitância em 625 nm. Em seguida, foi realizado o ensaio por difusão, em que foi colocado uma camada base de cada meio e, após a solidificação, foi colocada a suspensão preparada com o meio e microrganismos. Depois foram colocados cilindros de inox e, dentro de cada um deles, 150 µL de cada solução contendo cada amostra sendo o ensaio realizado em triplicata. No centro de cada placa foi colocado o disco antimicrobiano ou solução de fluconazol para produzirem os halos de inibição padrão.

4.8 Conclusão

Neste capítulo foi descrito a síntese do precursor da fluoxetina e seu derivado clorado, denominados Pr-FLX1 e Pr-FLX2, sendo esse último inédito na literatura.

Descreveu-se também a modificação estrutural da fluoxetina, obtendo-se três derivados denominados FLX-Be, R-FLXH e FLX-PCI, sendo os dois últimos inéditos na literatura.

Todos os compostos tiveram suas atividades antibacterianas e antifúngicas avaliadas. No entanto, na concentração testada, os compostos não apresentaram atividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

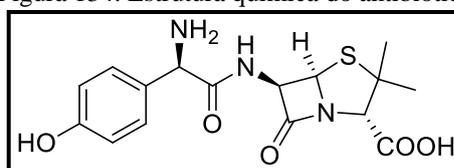
Esta pesquisa contribuiu de forma relevante à literatura científica com a obtenção de três novos compostos orgânicos totalmente caracterizados.

**5 OBTENÇÃO DE DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS DO
BENZILISOTIOCIANATO**

5.1 Introdução

Cada vez mais, os produtos naturais se destacam em importantes setores econômicos tais como farmacêutico e agrícola. Somente na indústria farmacêutica, moléculas únicas, como o antibiótico amoxicilina (Figura 134) movimentam em torno de US\$ 1 bilhão de dólares em vendas anuais em todo o mundo. Além disso, nos últimos 30 anos, mais de 50% dos novos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico são oriundos de produtos naturais e seus derivados (HILLMAN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; GUO, Z., 2017).

Figura 134. Estrutura química do antibiótico



Do ponto de vista da inovação de medicamentos é melhor para a indústria farmacêutica a modificação estrutural de produtos naturais com atividades biológicas comprovadas, do que o estudo em moléculas novas. Com isso são criados novos compostos com eficácia melhorada, através do aumento da potência e da seletividade, melhoramento das propriedades físico-químicas, bioquímicas e farmacocinéticas, e eliminando ou reduzindo os efeitos adversos. A modificação na estrutura química de produtos naturais pode também ser utilizada para simplificar a complexidade na estrutura química das mesmas, incluindo remoção de átomos redundantes e quiralidade, mantendo a atividade e gerando compostos patenteáveis. A cooperação mútua e a interação entre químicos orgânicos e medicinais desempenham um papel essencial na modificação de produtos naturais para uso comercial através da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (GUO, Z., 2017).

O benzilisotiocianato 4-[(4'-*O*-acetil- α -L-rhamnosiloxi)benzil]isotiocianato (**1**) (Figura 136, p. 177) é um composto que apresentou diversas atividades biológicas (ALMEIDA *et al.*, 2017), sendo escolhido como substrato de partida para gerar novos compostos. O benzilisotiocianato (**1**) foi isolado das flores da *Moringa oleifera* Lam. (Figura 135, p. 177), uma planta tropical cujos componentes são amplamente utilizados para fins medicinais (SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 135. Fotos da *Moringa oleifera* Lam. e a estrutura química do benzil-isotiocianato.

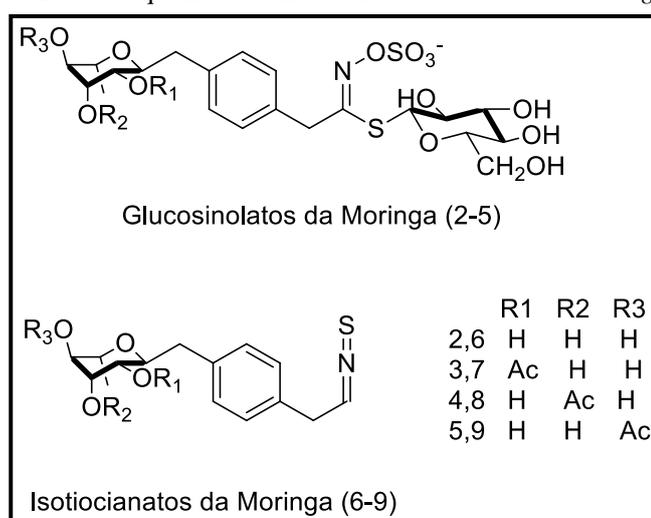


5.2 Levantamento bibliográfico

5.2.1 Isotiocianatos

Os isotiocianatos são formados a partir dos seus precursores glicosilados (glicosinolatos) (Figura 136/2-5), através de uma reação realizada por ação da mirosinase (ou tioglicosidase), uma enzima ativada durante a ferida ou a digestão do tecido vegetal. A mirosinase cliva a glicose ligada ao grupo tio no glicosinolato, liberando o aglicona que se rearranja rapidamente para formar o isotiocianato ativo (Figura 136/6-9) (WATERMAN *et al.*, 2014). Todos os isotiocianatos são caracterizados pela presença do grupo $-N=C=S$ e são ótimos agentes quimiopreventivos para o câncer. Um estudo anterior relatou que uma reação entre o carbono central eletrofílico do grupo $-N=C=S$ com alvos nucleofílicos celulares, seriam os responsáveis pela atividade anticancerígena dos mesmos (YEH *et al.*, 2016).

Figura 136. Estrutura química dos metabólitos secundários da *Moringa oleifera*.

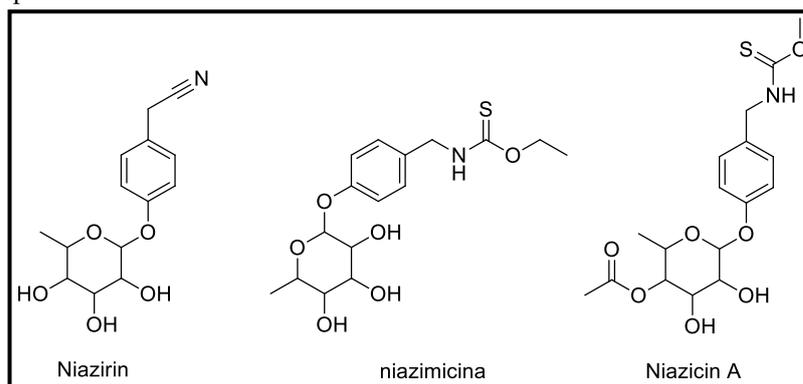


Fonte: YEH *et al.*, 2016.

A *Moringa oleifera* Lam. (Figura 135, p. 177) comumente conhecida como "árvore baqueta" ou "árvore rábano", é uma planta bastante comum em países tropicais e subtropicais, usadas há séculos na medicina popular para o tratamento de numerosas doenças por causa de seus efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, anticâncer e antidiabéticos. Numerosos artigos publicados nos últimos anos demonstraram amplamente seus benefícios. Os efeitos farmacológicos conferidos a *M. oleifera* são devido ao seu alto teor de fitoquímicos específicos, conhecidos como glicosinolatos (GIACOPPO *et al.*, 2017).

O valor medicinal das sementes e das diferentes partes da *Moringa oleifera* tem sido reconhecido na medicina popular para tratar várias doenças relacionadas à dor e à inflamação. Vários tipos de compostos bioativos foram isolados dos frutos da *Moringa oleifera*. Os frutos, em particular, foram relatados por conter compostos antitumorais e anti-inflamatórios do tipo glicosídeo (isto é, niazirin, niazimicina, niazicina A) (Figura 137) (CHEENPRACHA *et al.*, 2010).

Figura 137. Compostos naturais de nitrilas e isotiocianatos com atividades antitumorais e anti-inflamatórias.



Fonte: CHEENPRACHA *et al.*, 2010

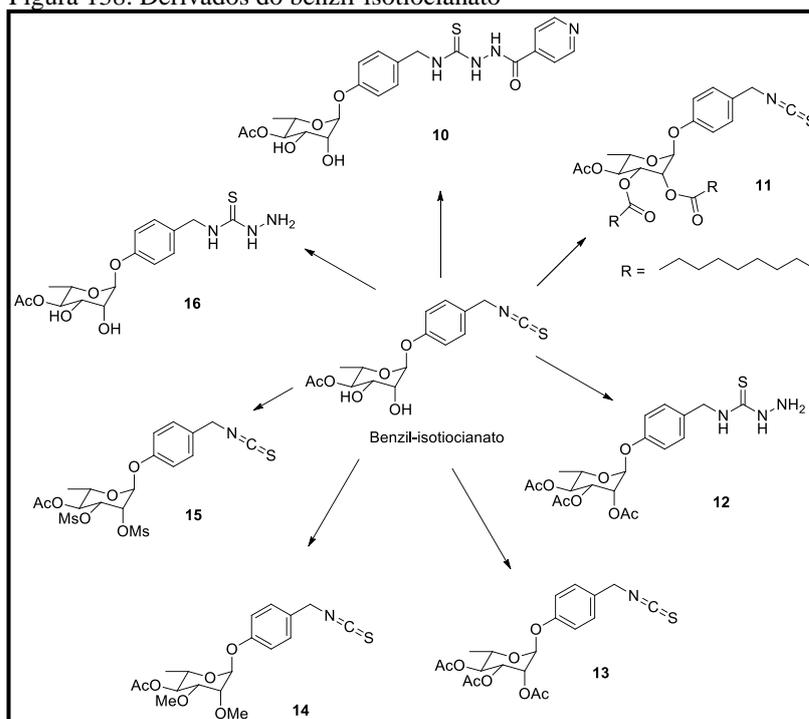
Os anti-inflamatórios atualmente utilizados são divididos em dois grupos: os agentes esteróidais e os não esteróidais. No entanto, a sua utilização prolongada provoca muitos efeitos colaterais, especialmente danos gástricos. A busca por novos compostos bioativos mais seguros e com propriedades anti-inflamatórias mais potentes e menos tóxicas, levou ao estudo dos metabólitos secundários de plantas medicinais comumente usada na medicina popular para a inflamação. Várias evidências demonstraram que drogas derivadas de produtos naturais são capazes de influenciar vários mediadores da inflamação como: óxido nítrico sintase, ciclooxigenase 2, IL-1 β , TNF- α e IL-10 (GIACOPPO *et al.*, 2017).

5.2.2 Derivados do isotiocianato

O benzil-isotiocianato (**1**) é um composto bioativo que contém um átomo de enxofre na sua estrutura química, existente predominantemente em plantas como: *Tropaeolum mnajus* L., *Lepidium sativum* L., *Carica papaya* L., *Moringa oleifera* Lam. e *Capparis flexuosa* L. Esse composto apresentou excelente atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos *in vitro* (UPPAL *et al.*, 2017).

Moringa oleifera Lam. (Figura 135, p. 177) é uma espécie tropical cujos componentes são amplamente utilizados para fins medicinais. Suas folhas, sementes, flores e frutos produzem isotiocianatos capazes de reduzir os danos neuronais, a produção de óxido nítrico e a produção de citoquinas *in vitro*. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos em camundongos do benzil-isotiocianato (**1**) de ocorrência natural e seus derivados (Figura 138). Os derivados **10**, **11** e **12** (Figura 138) foram os mais seguros entre os setes derivados testados. Eles reduziram a nocicepção e a inflamação induzida por formalina na articulação temporomandibular de ratos e somente o composto **12** reduziu a hipernocicepção induzida por serotonina. Estes resultados sugerem que as alterações químicas no benzil-isotiocianato (**1**) produziram derivados menos tóxicos e mais eficientes na redução da dor e da inflamação (SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 138. Derivados do benzil-isotiocianato



Fonte: SANTOS *et al.*, 2018

Inúmeros estudos elucidaram os benefícios para a saúde dos compostos de organossulfurado, conhecidos como isotiocianatos, derivados de vegetais crucíferos. Uma vez que os isotiocianatos são eletrofílicos, eles podem formar prontamente conjugados com tióis, bem como se ligar covalentemente a glutatona e a proteínas celulares, incluindo a tubulina. Numerosos estudos relataram os benefícios dos isotiocianatos na promoção da saúde humana, como sua eficácia quimiopreventiva e possível prevenção de doenças neurodegenerativas. Dois dos isotiocianatos mais estudados são o benzil-isotiocianato (**1**) e o feniletil-isotiocianato (**17**). Os isotiocianatos apresentam um grande potencial no tratamento do câncer, das doenças neurodegenerativas e nas infecções bacterianas e virais (KHAMIS; HEIKKILA, 2018).

Segundo Liu *et al.* (2017) o benzil-isotiocianato (**1**) apresentou propriedades antiproliferativas contra uma variedade de linhas celulares, incluindo hepatócitos, linfócitos T, fibroblastos de cólon, células epiteliais cervicais, células do tubo tubular proximal renal e células cancerígenas no colo e no reto. Além das atividades biológicas já descritas em estudos de diversos pesquisadores, Lee *et al.* (2015), relataram o estudo, no qual os isotiocianatos foram usados em doenças crônicas degenerativas, como: doenças cardiovasculares e diabetes. Além disso, os isotiocianatos, incluindo benzil-isotiocianato (**1**), feniletil-isotiocianato (**17**) e sulforafano (**18**) têm efeitos preventivos sobre vários tipos de câncer. Além dos efeitos preventivos, o isotiocianato pode ser usado no tratamento do mieloma, câncer de mama e câncer de pâncreas. Observou-se também que o benzil-isotiocianato (**1**) inibia a proliferação do câncer de colon humano. O feniletil-isotiocianato (**17**) inibe proliferação de células do adenocarcinoma gástrico humano. Além disso, descobriu-se que o sulforafano (**18**) (Figura 139, p. 182) apresentou um mecanismo que ataca as células do adenocarcinoma pulmonar.

Entre os derivados do isotiocianatos, o benzil-isotiocianato (**1**) apresentou muitas atividades biológicas como: atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, sendo que esta última já foi citada varias vezes em diversos estudos. Assim, o tratamento com benzil-isotiocianato (**1**) pode ser uma estratégia terapêutica eficaz e inovadora no tratamento da neuroinflamação induzida por lipopolisacarídeos de *E. coli* (LEE *et al.*, 2016). Foi relatado, neste estudo, o uso de isotiocianatos nas infecções por *Escherichia coli* enterohemorrágica, um agente patogénico humano, que pode causar intoxicações alimentares graves (NOWICKI *et al.*, 2016).

Em outro estudo, foi relatado um novo e promissor uso do benzil-isotiocianato (**1**), isolado da *Moringa oleifera*, no tratamento da esclerose lateral amiotrófica em ratos, o qual poderia ser um candidato a novos estudos destinados a avaliar seu possível uso na prática clínica para a prevenção ou inibição da progressão da doença (GALUPPO *et al.*, 2015). Entre

as doenças crônicas, o acidente vascular cerebral (AVC) representa a terceira maior causa de mortalidade e a primeira causa de incapacitação na fase adulta a longo prazo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 15 milhões de pessoas sofrem AVC em todo o mundo a cada ano e destes, 5 milhões morrem e outros 5 milhões ficam com sequelas. O benzil-isotiocianato (**1**) testado no estudo foi capaz de proteger o tecido cerebral de danos graves induzidos por isquemia/reperfusão (GALUPPO *et al.*, 2015).

Em Giacoppo e colaboradores (2015) foi realizado um estudo onde fez-se uso do benzil-isotiocianato (**1**) para inibir a morte das células neuronais, preservando os tecidos da medula espinhal após lesão em camundongos. Em conclusão, os resultados mostraram um efeito positivo ao uso do benzil-isotiocianato (**1**) no tratamento de danos na medula espinhal de ratos, através de um mecanismo antioxidante de neuroproteção. Portanto, o benzil-isotiocianato (**1**), pode revelar-se útil no tratamento do trauma da medula espinhal.

O objetivo do estudo realizado por Galuppo e colaboradores (2014) foi avaliar o efeito do benzil-isotiocianato (**1**) no tratamento da esclerose múltipla, uma doença desmielinizante inflamatória com neurodegeneração caracterizada por placas desmielinizantes, perda neuronal e axonal, em um modelo experimental. O experimento foi realizado em ratos, nos quais foram injetados glicoproteína oligodendrocitária de mielina que é capaz de evocar uma resposta autoimune contra as fibras de mielina que imitam a fisiopatogênese da esclerose múltipla humana. Os resultados mostraram claramente que o tratamento foi capaz de inibir a cascata inflamatória que leva a uma esclerose múltipla severa. O benzil-isotiocianato (**1**) pode ser sugerido como um fármaco útil no tratamento ou na prevenção da esclerose múltipla, pelo menos em associação com a terapia convencional atual.

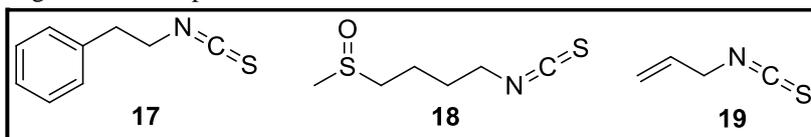
Em outro estudo o benzil-isotiocianato (**1**) foi testado frente aos cistos de um nematóide, denominado *Heterodera glycine* presente na soja, o qual afetou o desenvolvimento, a incubação e a reprodução desse nematóide. O uso de isotiocianatos em processos biológicos deve agregar um valor considerável a esses compostos como agentes de controle de nematóides (WU *et al.*, 2014).

As propriedades antimicrobianas dos isotiocianatos naturais encontrados em plantas como o capuchinho (*Tropaeolum majus*) e o rábano (*Armoracia rusticana*) e a necessidade de novas opções quimioterapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos fármacos, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, nos levou a avaliar os efeitos de três isotiocianatos o: alil-isotiocianato (**19**), benzil-isotiocianato (**1**) e o feniletil-isotiocianato (**17**) e uma mistura de isotiocianatos (Figura 139, p. 182). Todos os isotiocianatos testado apresentaram atividade contra a cepa

Pseudomonas aeruginosa. O tratamento de bactérias com feniletil-isotiocianato (**17**) e com a mistura de isotiocianatos em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (MIC) inibiu significativamente a formação de biofilmes. Particularmente, a mistura de isotiocianatos reduziu a massa do biofilme e a proliferação bacteriana. Os isotiocianatos inibiram significativamente a atividade metabólica em biofilmes maduros. Combinando isotiocianatos com meropenem aumentou sinergicamente a eficácia antimicrobiana contra os biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Os isotiocianatos representam um grupo promissor de compostos anti-infecciosos naturais com atividade contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (KAISER *et al.*, 2017).

No presente estudo, foi investigado o potencial do benzil-isotiocianato (**1**) em inibir o desenvolvimento de câncer de próstata em ratos com adenocarcinoma de próstata. Esses resultados indicaram que a inibição da progressão do ciclo celular contribuiu para a inibição do desenvolvimento do câncer de próstata em ratos tratados com benzil-isotiocianato (**1**) (CHO *et al.*, 2016).

Figura 139. Compostos bioativos.

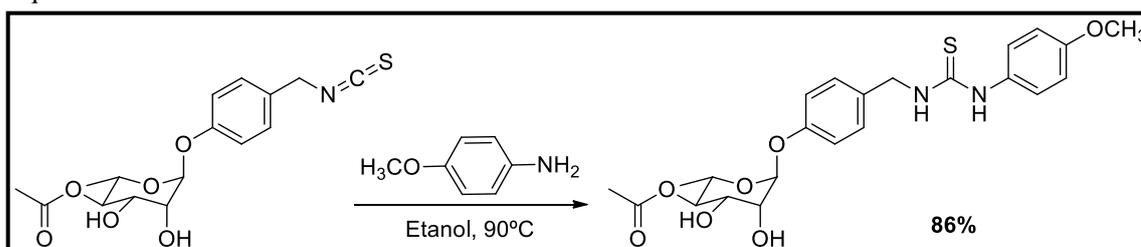


5.3. Resultados e discussão

5.3.1 Preparação do derivado D2

A rota sintética a que nos propusermos estudar, envolve a realização de uma reação de adição nucleofílica, utilizando como reagentes os compostos benzil-isotiocianato e *p*-metoxianilina (Item 6.1, p. 206). Com obtenção do produto sólido denominado D2, em 6 horas de reação, com rendimento de 86,0% (Esquema 23).

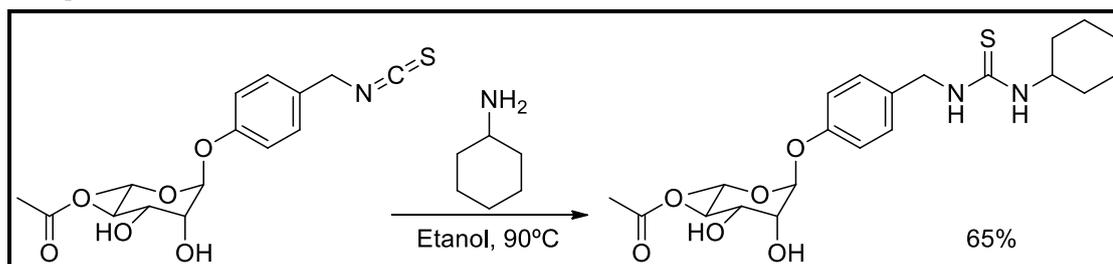
Esquema 23. Síntese do derivado D2.



5.3.2 Preparação do derivado D3

O esquema reacional a que nos propusermos estudar, envolve a realização de uma reação de adição nucleofílica, utilizando como reagentes os compostos benzil-isotiocianato e ciclohexilamina (Item 6.2, p. 206). Com obtenção de um produto sólido denominado **D3**, em 48 horas de reação, com rendimento de 65,0% (Esquema 24).

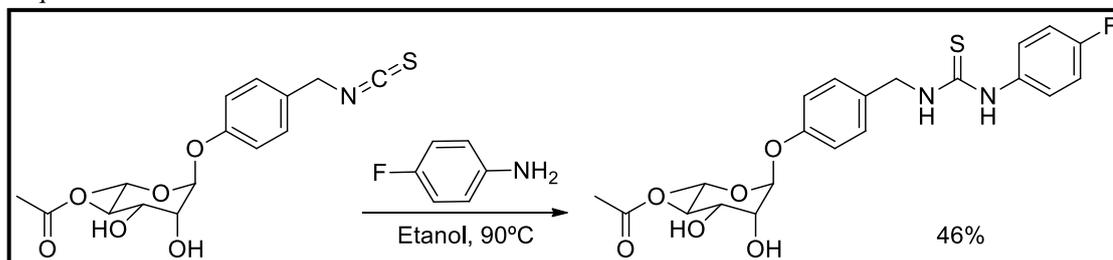
Esquema 24. Síntese do derivado D3.



5.3.3 Preparação do derivado D4

O esquema reacional a que nos propusermos estudar, envolve a realização de uma reação de adição nucleofílica, utilizando como reagentes os compostos benzil-isotiocianato e *p*-fluoranilina (Item 6.3, p. 207). Com obtenção do produto sólido denominado **D4**, em 12 horas de reação, com rendimento de 46,0% (Esquema 25).

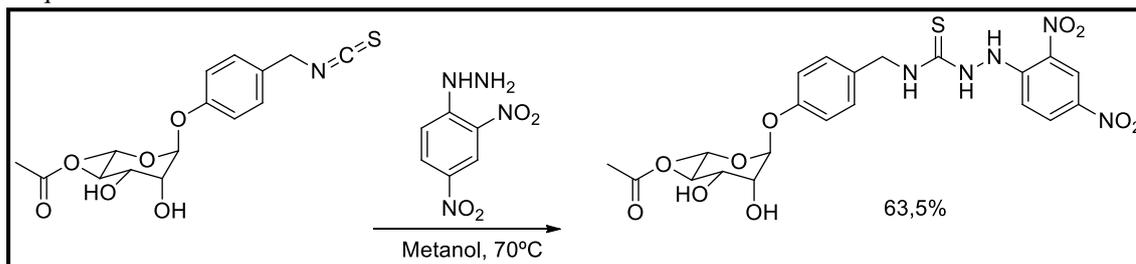
Esquema 25. Síntese do derivado D4.



5.3.4 Preparação do derivado D9

A rota sintética a que nos propusermos estudar, envolve a realização de uma reação de adição nucleofílica, utilizando como reagentes os compostos benzil-isotiocianato e 2,4-dinitrofenilhidrazina (Item 6.4, p. 207). Com obtenção do produto sólido denominado **D9**, em 24 horas de reação, com rendimento de 63,5% (Esquema 26, p. 179).

Esquema 26. Síntese do derivado D9.

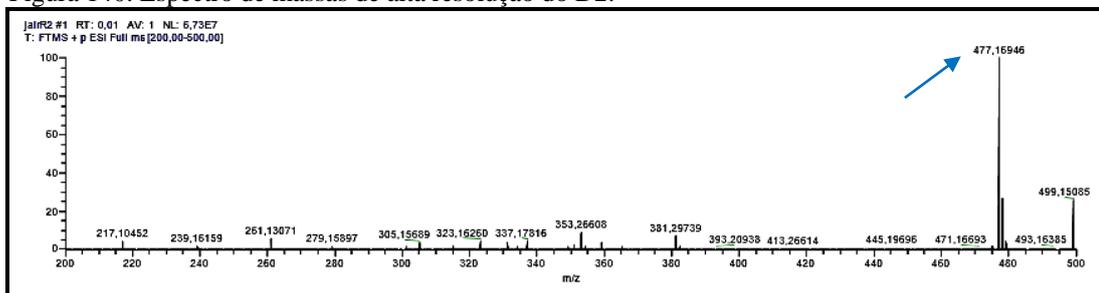


5.4 Determinação estrutural dos derivados do benzil-isotiocianato

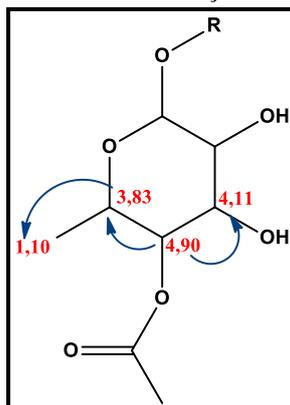
5.4.1 Identificação estrutural do D2

O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 140), exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de hidrogênio $[M + H]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 477,16946, o qual apontou a fórmula molecular $C_{23}H_{29}N_2O_7S$ (calculado: 476,1617/ erro: -0,182 ppm).

Figura 140. Espectro de massas de alta resolução do D2.



O espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) de **D2** (Figura 141, p. 185) mostra os sinais em δ 5,44 (sl; 1H; H-1'), δ 4,11-3,97 (m; 2H; H-2' e 3'), δ 4,90 (t; 1H; $J = 9,7$ Hz; H-4') e δ 3,83-3,75 (m; 1H; H-5') referentes aos hidrogênios do anel tetraidropirano. Os outros sinais em δ 1,10 (d; 3H; $J = 6,2$ Hz; H-6') referente a hidrogênios de metila ligada a esse anel e um outro sinal em 2,08 (s; 3H; H-8') compatível com os hidrogênios ligados a carbono α à carbonila de éster ligada ao anel tetraidropirano. Os sinais em δ 6,96 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz; H-2), δ 7,17 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz; H-3 e 5) e δ 6,96 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz; H-6) referentes a hidrogênio do anel aromático que já estava presente na molécula, já o sinal em δ 4,73 (s; 2H) é compatível com hidrogênio de carbono sp^3 ligado a esse anel. Os sinais em δ 6,86 (d; 1H; $J = 8,8$ Hz; H-2'' e 6''), 7,11 (d; 3H; $J = 8,8$ Hz; H-3'' e 5'') e em δ 3,75 (s; 3H, H-7'') são referentes a *p*-metoxianilina introduzida na reação de adição nucleofílica.

Figura 143. Fragmento do D2 com as correlações homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do **D2** (Figura 144, p. 186) apresentou 19 sinais. Destes, 9 encontram-se na região de carbono sp^3 , sendo 6 carbonos sp^3 oxigenado e um carbono sp^3 nitrogenado. Outros 4 sinais na região de carbono sp^2 de anel aromático, 2 carbonos sp^2 oxigenado, 1 carbono sp^2 de carbonila de éster, 2 carbonos sp^2 nitrogenado e por último 1 carbono sp^2 de tioureia. A comparação do espectro RMN ^{13}C -JMOD (Figura 145, p. 187) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de seis carbonos não hidrogenados (C), nove carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH_2) e três carbonos metílicos (CH_3).

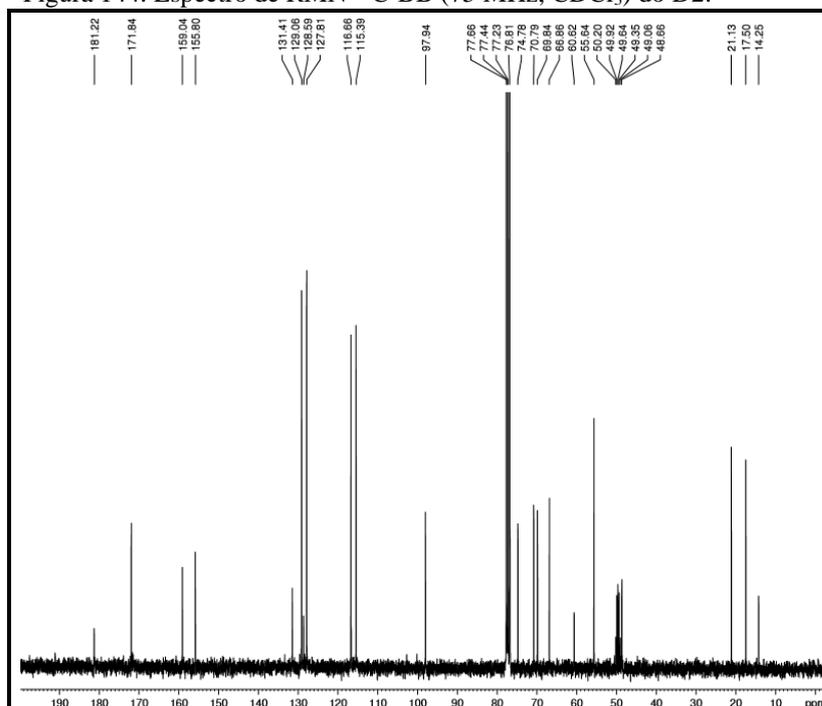
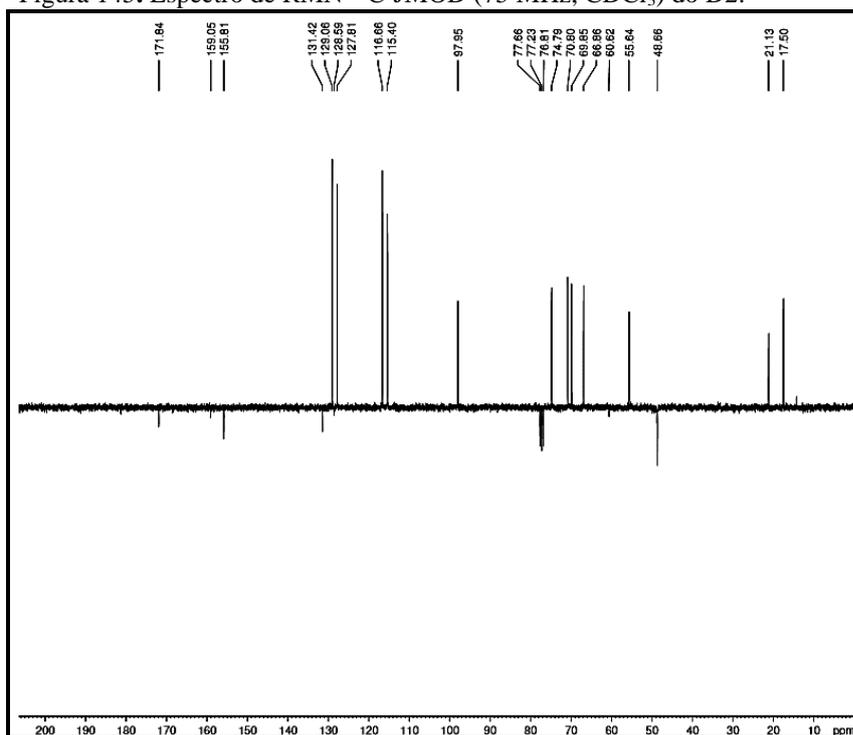
Figura 144. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D2.

Figura 145. Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do **D2**.

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 146, p. 188) do **D2** permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 23, p. 190). A partir do espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figura 148, p. 189) do **D2** podemos mostrar as correlações do hidrogênio em δ 5,44 com o carbono oxigenado δ 66,8 (3J) e dos hidrogênios em δ 1,10 com os carbonos δ 74,7 (3J) e 66,8 (2J). Mostrou ainda a correlação do hidrogênio em δ 1,10 com os carbonos δ 74,7 (3J) e 66,8 (2J), do hidrogênio em δ 4,73 com o carbono δ 181,1 (3J), do hidrogênio em δ 3,75 com o carbono δ 159,0 (3J) e por fim do hidrogênio em δ 2,08 com o carbono δ 171,8 (2J), essas correlações estão representadas na Figura 147, p. 188 [Tabela 23, p. 190].

Os dados espectrométricos discutidos são compatíveis com a estrutura química do acetato de (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-4,5-dihidroxi-6-(4-((3-(4-metoxifenil)tioureia)metil)fenoxi)-2-metiltetrahydro-2*H*-piran-3-ilo (Figura 149, p. 189), a qual é inédito na literatura.

Figura 146. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do D2.

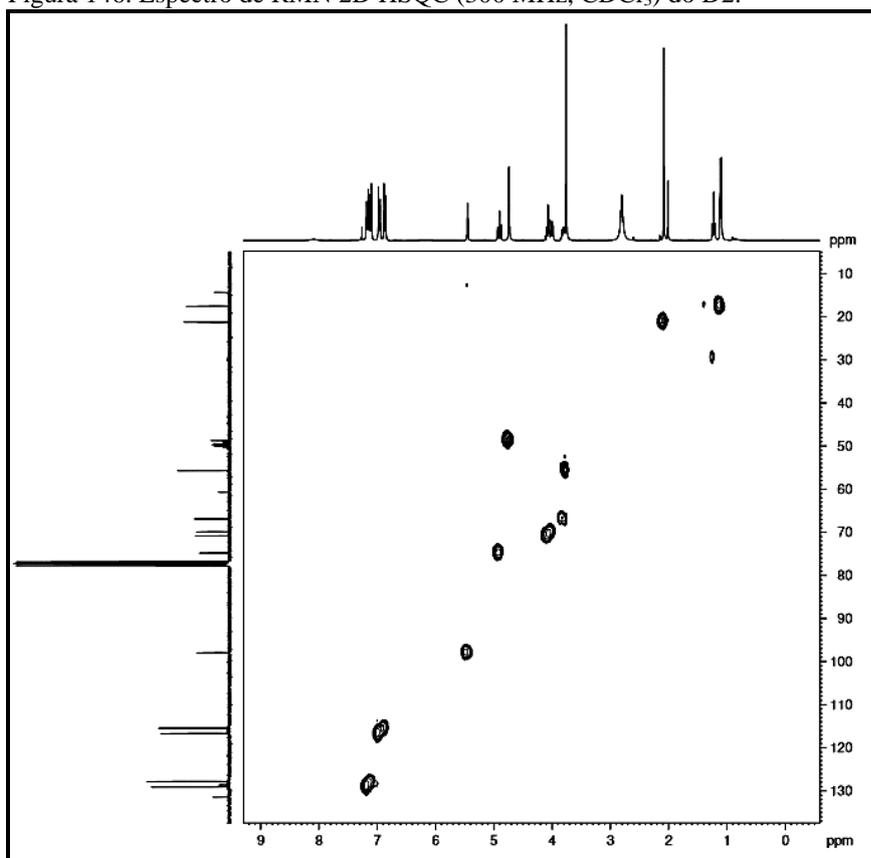


Figura 147. Correlações determinadas a partir do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC.

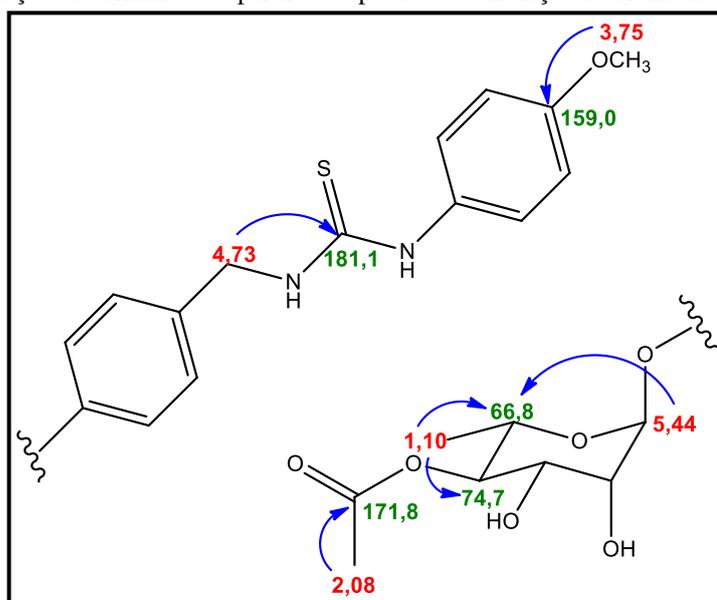


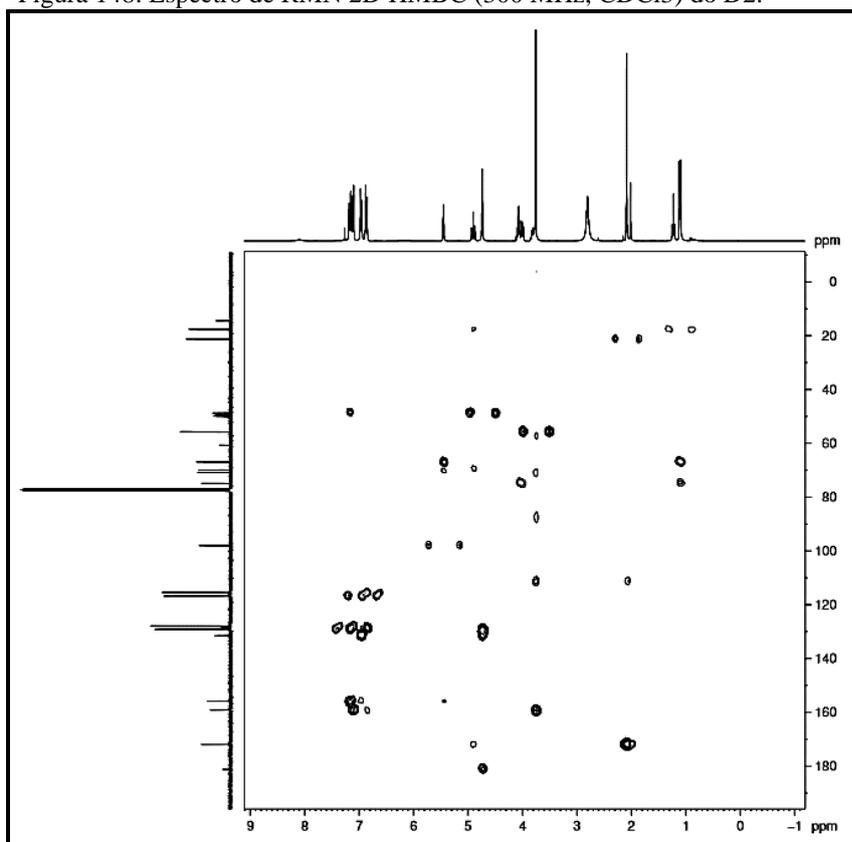
Figura 148. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl₃) do D2.

Figura 149. Estrutura química do D2.

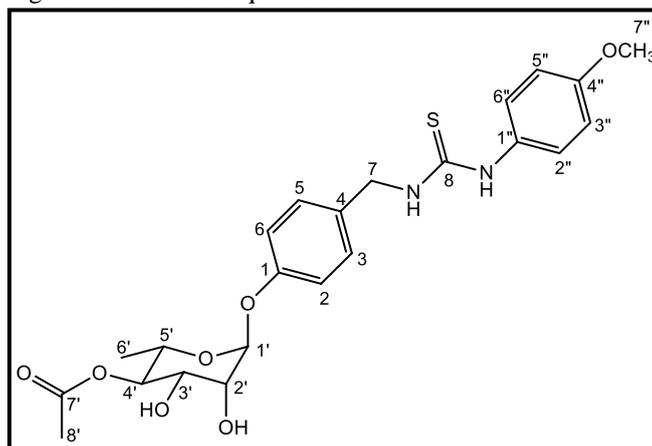


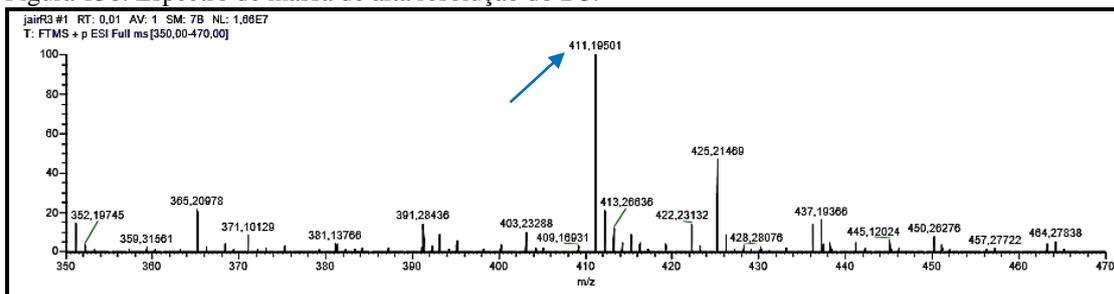
Tabela 23. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (300 MHz/ CDCl_3) do D2.

C	HSQC		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1'	5,44 (sl; 1H)	97,9		66,8
2'	4,11-3,97 (m; 2H)	69,8		
3'	4,11-3,97 (m; 2H)	70,8		
4'	4,90 (t; 1H; $J = 9,7$ Hz)	74,7		
5'	3,83-3,75 (m; 1H)	66,8		
6'	1,10 (d; 3H; $J = 6,2$ Hz)	17,4	66,8	74,7
7'	-	171,8		
8'	2,08 (s; 3H)	21,1	171,8	
1	-	155,7		
2/6	6,96 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz)	116,6		
3/5	7,17 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz)	128,6		
4	-	128,5		
7	4,73 (s; 2H)	48,6		181,1
8	-	181,1		
1''	-	131,3		
2''/6''	6,86 (d; 1H; $J = 8,8$ Hz)	127,7		
3''/5''	7,11 (d; 1H; $J = 8,8$ Hz)	115,3		
4''	-	159,0		
7''	3,75 (s; 3H)	55,6		159,0

5.4.2 Identificação estrutural do D3

O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 150, p. 191), exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de hidrogênio $[\text{M-COCH}_3 + \text{H}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 411,19501, o qual apontou a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (calculado: 411,1948/ erro: - 0,870 ppm).

Figura 150. Espectro de massa de alta resolução do D3.



O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do **D3** (Figura 151, p. 192) apresentou cinco sinais referentes a hidrogênios ligados a carbono oxigenado em δ 5,37 (sl; 1H), δ 3,84 (dq; 2H; $J = 9,4$ e $3,4$ Hz), δ 4,00 (m; 1H), δ 3,42 (t; 1H; $J = 9,5$ Hz) e δ 3,62 (m; 1H). Um hidrogênio de metila em δ 1,18 (d; 3H; $J = 6,1$ Hz) e um hidrogênio de metila de éster em δ 2,03 (s; 3H). Outros sinais em δ 6,93 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz) e δ 7,16 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz) alusivos a hidrogênios de anel aromático dissubstituído. Os sinais em δ 4,53 (s; 2H) e δ 3,91-3,80 (m; 1H) referentes a hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados. E por último, os sinais em δ 1,89 (m; 2H), δ 1,61 (m; 2H), δ 1,51 (m; 1H), δ 1,06 (m; 3H) e δ 1,29 (m; 2H) referentes a hidrogênio de carbono metilênico sp^3 .

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do **D3** (Figura 152, p. 192) apresentou 15 sinais. Destes, 11 encontram-se na região de carbono sp^3 , sendo 5 carbonos sp^3 oxigenado e dois carbonos sp^3 nitrogenado. Outros 5 carbonos na região de carbono sp^2 , sendo 2 sinais na região de carbono sp^2 de anel aromático, 1 carbono sp^2 oxigenado e por último 1 carbono sp^2 de tioureia. Por meio, do espectro de RMN-JMOD (Figura 154, p. 194), pode-se confirmar o padrão de hidrogenação dos carbonos. A comparação do espectro RMN ^{13}C -JMOD (Figura 153, p. 193) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de três carbonos não hidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH), seis carbonos metilênico (CH_2) e um carbono metílico (CH_3).

Figura 151. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D3.

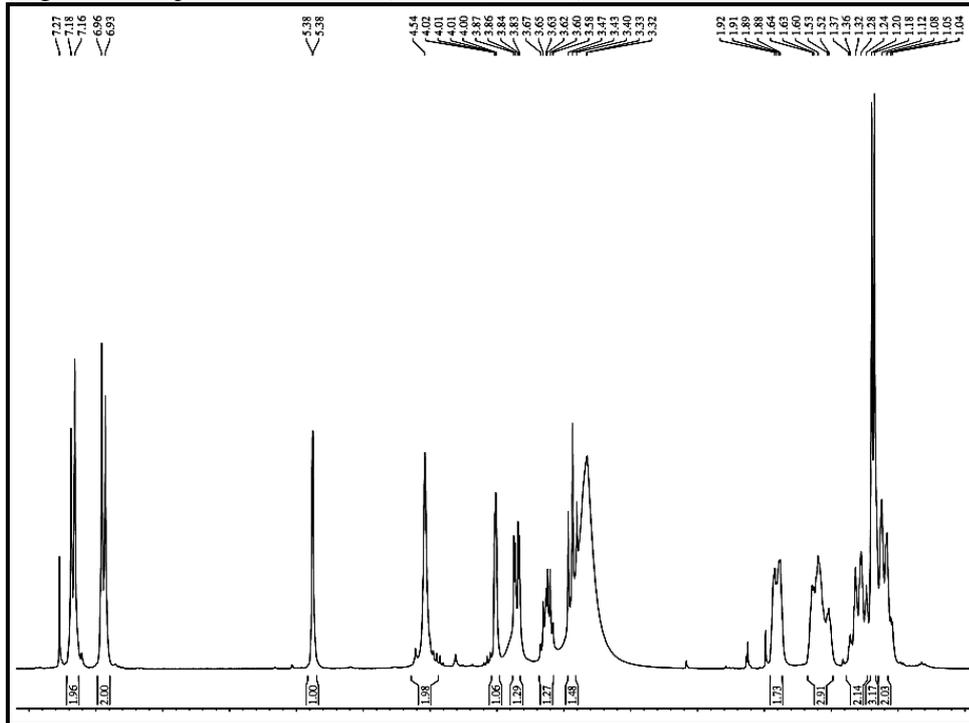


Figura 152. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D3.

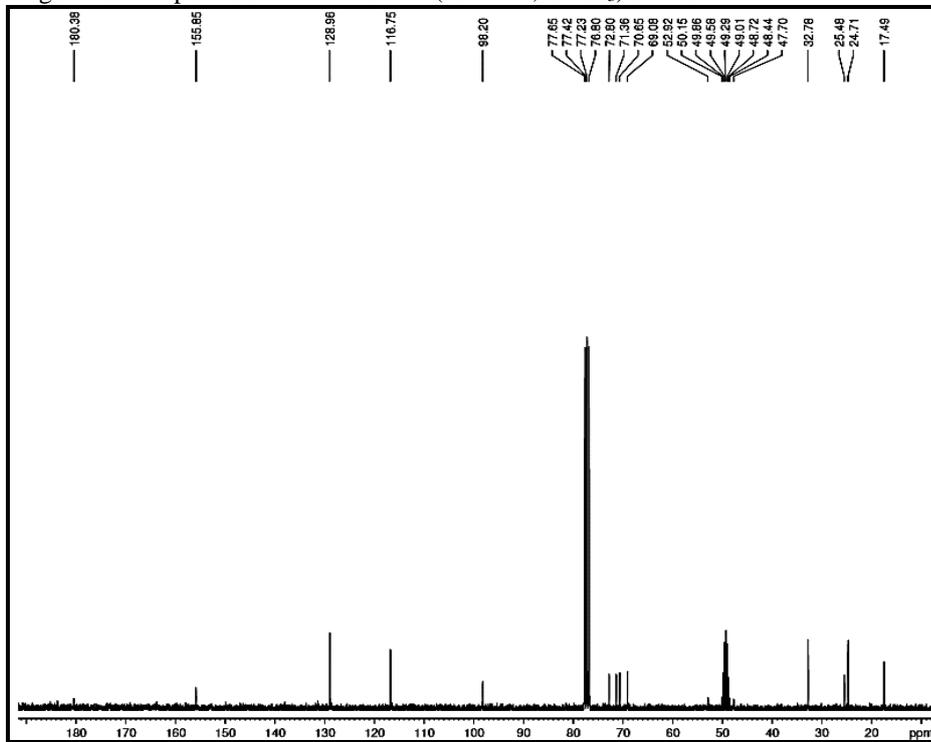
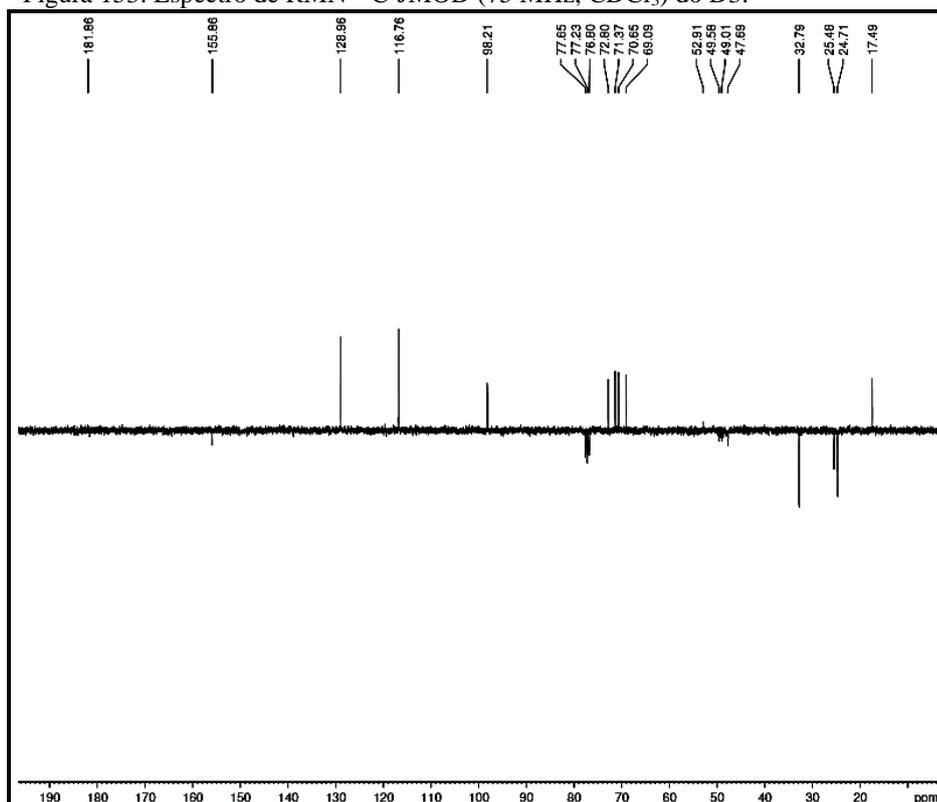


Figura 153. Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do **D3**.

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 154, p. 194) do **D3** permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 24, p. 196). A partir do espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (Figura 156, p. 195) do **D3** podemos mostrar as correlações do hidrogênio em δ 7,16 com os carbonos δ 155,8 (3J) e δ 48,6 (3J). Do hidrogênio em δ 6,93 com os carbonos δ 115,8 (2J) e δ 181,2. Mostrou ainda as correlações do hidrogênio em δ 5,37 com o carbono δ 155,8 (3J), do hidrogênio em δ 4,53 com o carbono δ 128,9 (3J), do hidrogênio em δ 3,42 com o carbono δ 17,42 (3J). E por fim, do hidrogênio em δ 1,18 com os carbonos δ 72,3 (3J) e δ 69,0 (2J), do hidrogênio em δ 3,42 com o carbono δ 69,0 (2J) e do hidrogênio em δ 5,37 como carbono δ 69,0 (3J) (Figura 155, p. 195) [Tabela 24, p. 196].

Os dados espectrométricos discutidos são compatíveis com a estrutura química do acetato de (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-4,5-dihidroxi-6-(4-((3-(4-metoxifenil)tioureia)metil) fenoxi) -2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo (Figura 157, p. 195), a qual é inédito na literatura.

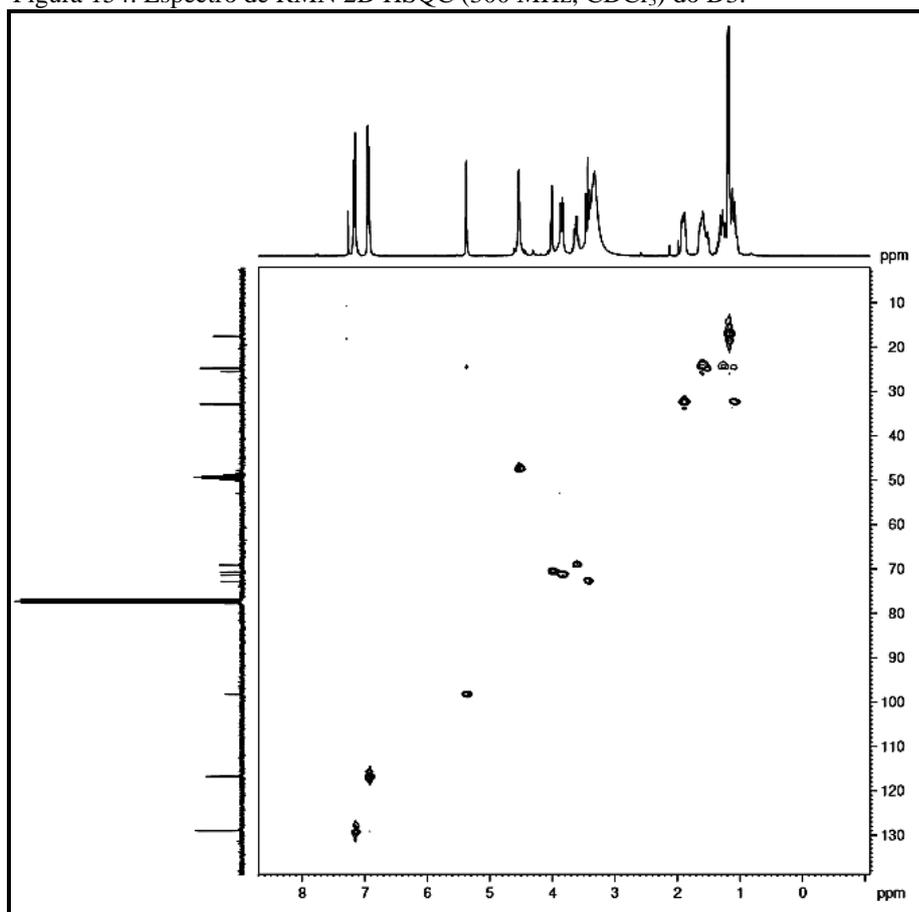
Figura 154. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl₃) do D3.

Figura 155. Correlações determinadas a partir do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC.

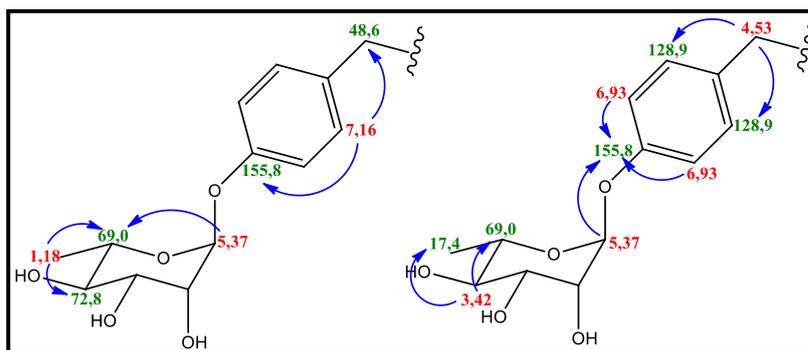


Figura 156. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D3.

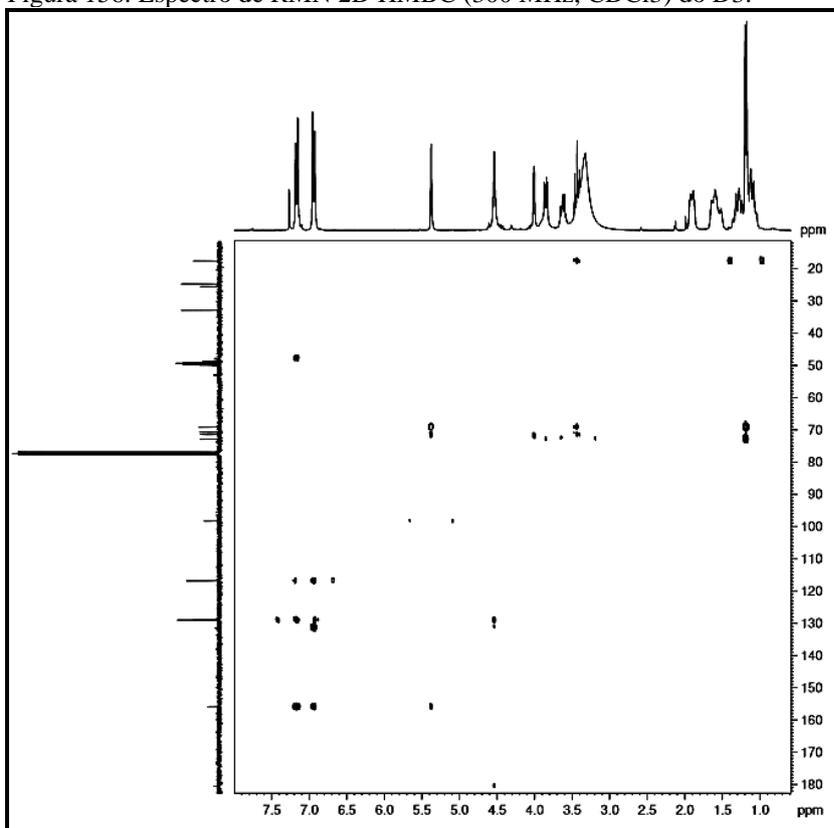


Figura 157. Estrutura química do D3.

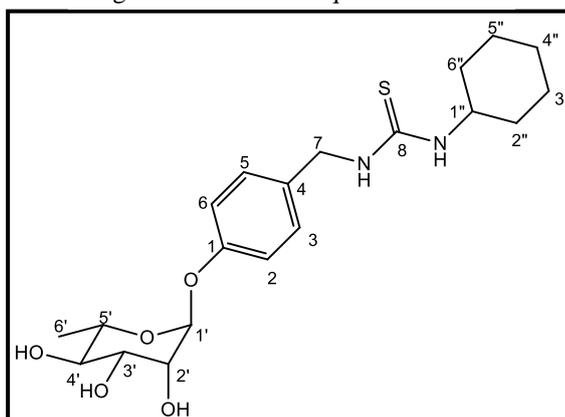


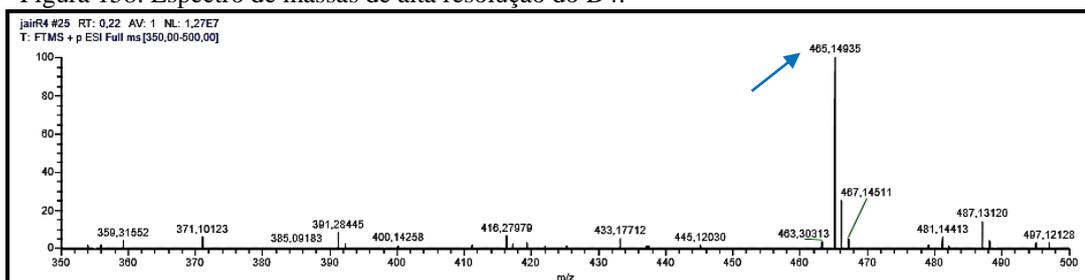
Tabela 24. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D3 (300 MHz/ CDCl_3).

C	HSQC		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1'	5,37 (sl; 1H)	98,2		155,8 69,0
2'	3,84 (dq; 1H; $J = 9,4$ e $3,4$ Hz)	71,3		
3'	4,00 (m; 1H)	70,6		
4'	3,42 (t; 1H; $J = 9,5$ Hz)	72,8	69,0	17,4
5'	3,62 (m; 1H)	69,0		
6'	1,18 (d; 3H; $J = 6,1$ Hz)	17,4	69,0	72,8
1	-	155,8		
2/6	6,93 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	116,7	155,8	
3/5	7,16 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	128,9		155,8 48,6
4	-	128,5		
7	4,53 (s; 2H)	48,6		128,9
8	-	180,3		
1''	3,91-3,80 (m; 1H)	52,8		
2''	1,89 (m; 2H)	32,7		
3''	1,61 (m; 2H)	24,6		
4''	a. 1,06 (m; 1H) b. 1,51 (m; 1H)	25,4		
5''	1,29 (m; 2H)	24,6		
6''	1,06 (m; 2H)	32,7		

5.4.3 Identificação estrutural do D4

O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 158, p. 197), exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de hidrogênio $[\text{M} + \text{H}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 465,14935, o qual apontou a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{FN}_2\text{O}_6\text{S}$ (calculado: 464,1417/ erro: -0,710 ppm).

Figura 158. Espectro de massas de alta resolução do D4.



O espectro de RMN ^1H (300 MHz/ CDCl_3) do **D4** (Figura 160, p. 198) apresentou quatro sinais referentes a hidrogênios ligados a carbono oxigenado em δ 5,38 (sl; 1H), δ 3,96 (m; 2H), δ 4,86 (t; 1H; $J = 9,7$ Hz) e δ 3,75 (dq; 1H; $J = 12,3$ e $6,1$ Hz). Um hidrogênio de metila em δ 1,05 (d; 3H; $J = 6,1$ Hz) e um hidrogênio de metila de éster em δ 2,03 (s; 3H). Outros sinais em δ 7,00 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz), δ 6,93 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz) e δ 7,27-7,12 (m; 4H) indicativo a hidrogênios de anel aromático dissubstituído. E por último, o sinal em δ 4,68 (s; 2H) referente a hidrogênio ligado a carbono nitrogenado.

No espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figura 161, p. 198) foram visualizados alguns acoplamentos como o do hidrogênio em δ 4,86 com os sinais em δ 3,96 e 3,75 e do hidrogênio em δ 3,75 com o hidrogênio em δ 4,11-3,97 e 3,83-3,75 (Figura 159).

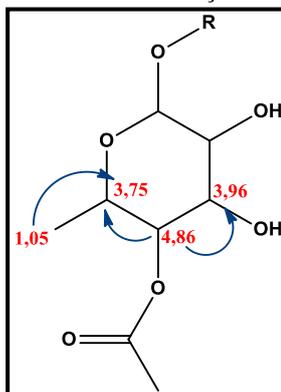
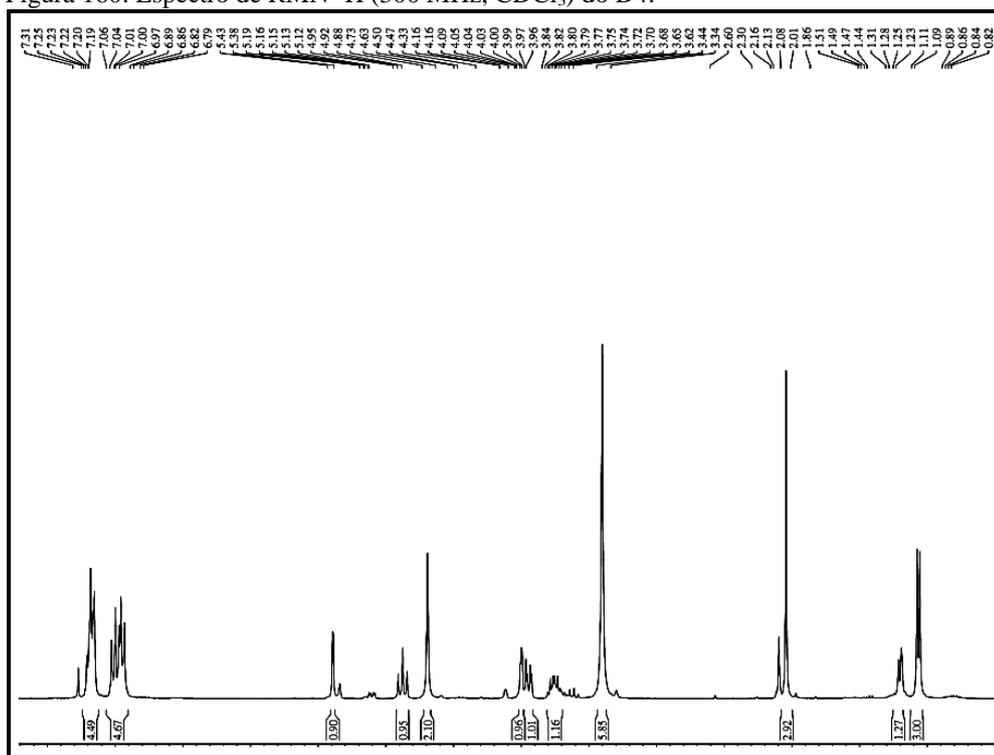
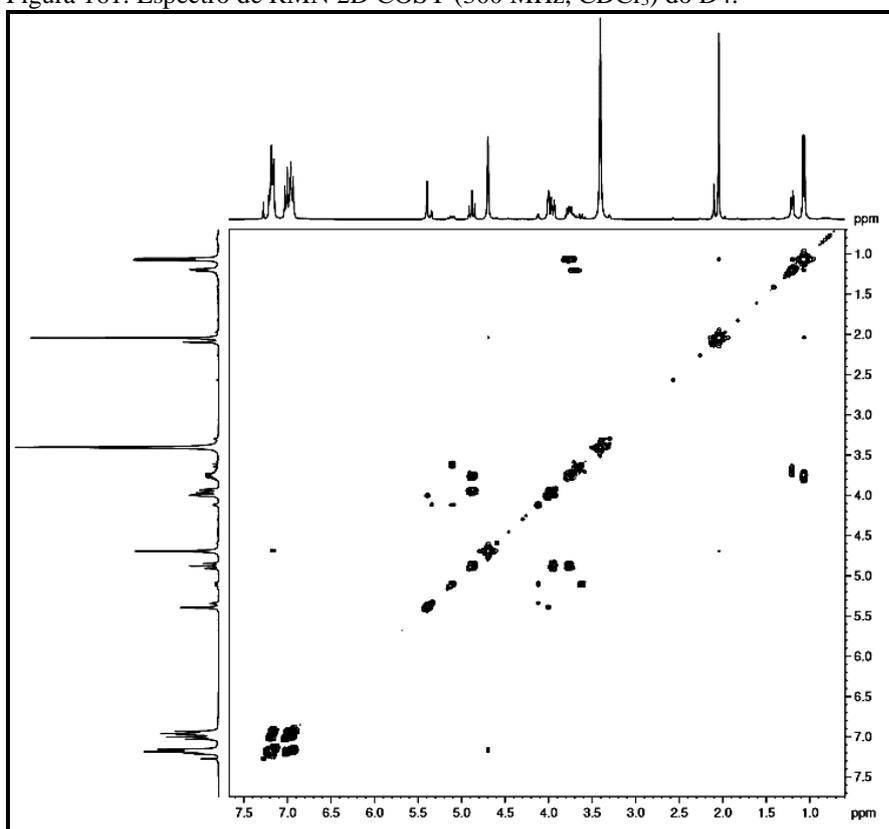
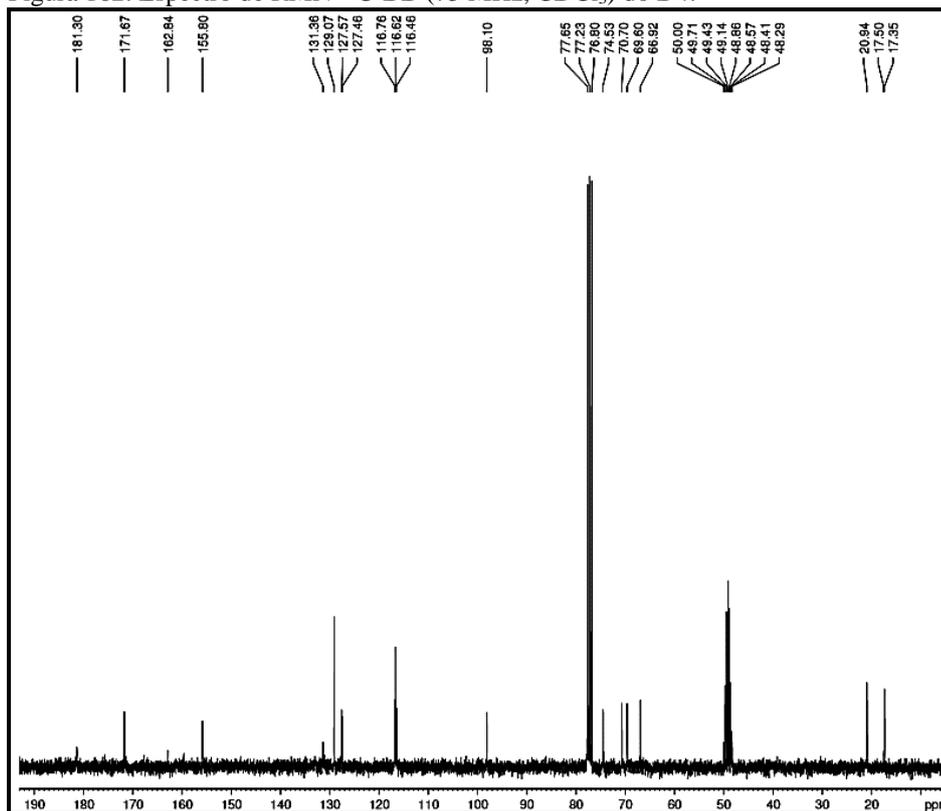
Figura 159. Subestrutura do D4 com as correlações homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY.

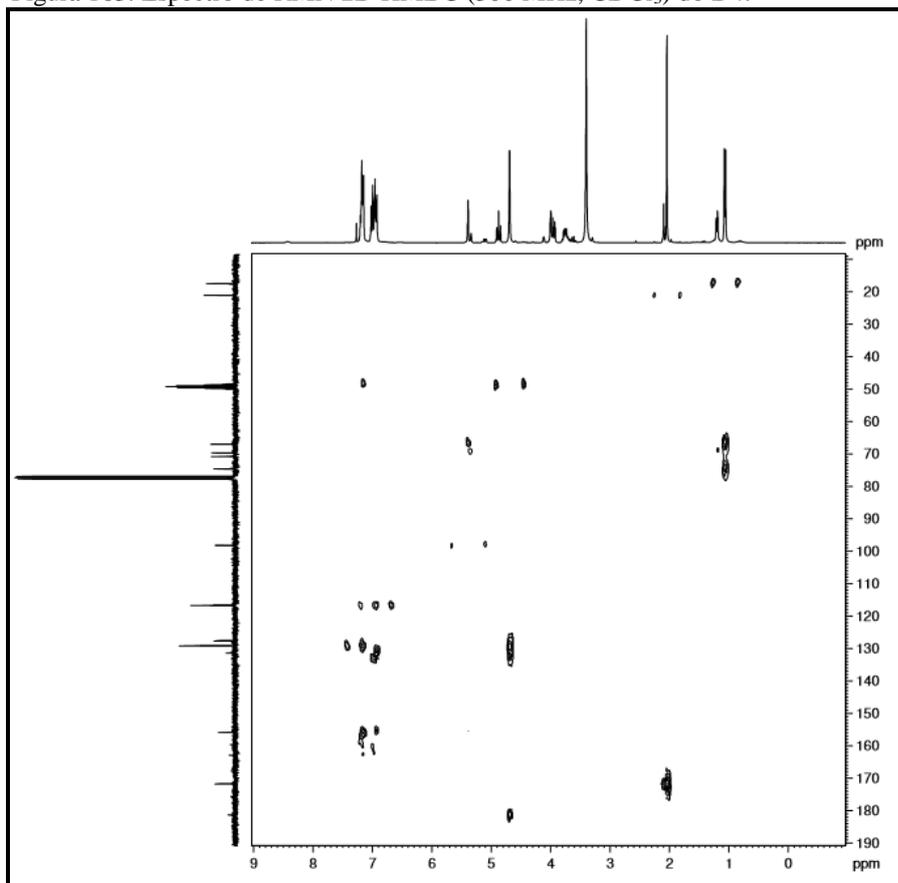
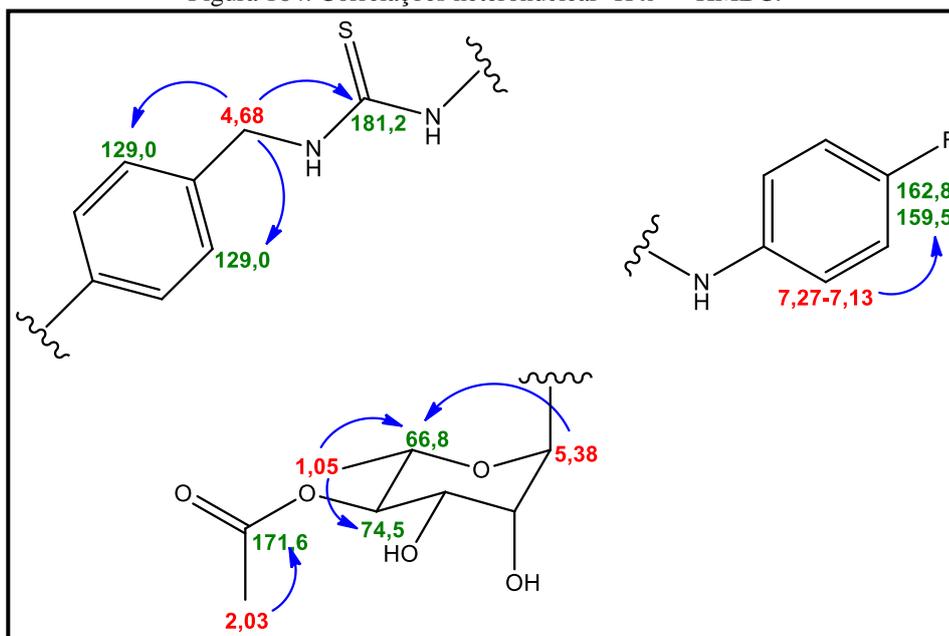
Figura 160. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D4.Figura 161. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl_3) do D4.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do **D4** (Figura 162) apresentou 18 sinais. Destes, 8 encontram-se na região de carbono sp^3 , sendo 5 carbonos sp^3 oxigenado e um carbono sp^3 nitrogenado. Outros 10 sinais na região de carbono sp^2 , sendo 4 carbonos sp^2 de anel aromático, 1 carbono sp^2 de carbonila de éster, 1 carbono sp^2 oxigenado, 1 carbono sp^2 nitrogenado, 1 carbono sp^2 fluorado e por último 1 carbono sp^2 de tioureia.

Figura 162. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D4.



A partir do espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (Figura 163, p. 200) do **D4** podemos mostrar as correlações do hidrogênio em δ 5,38 com o carbono oxigenado δ 66,8 (3J), do hidrogênio em δ 4,68 com os carbonos δ 129,0 (3J) e δ 181,2 (3J). Mostrou ainda a correlação do hidrogênio em δ 2,03 com o carbono δ 171,6 (2J), do hidrogênio em δ 1,05 com os carbonos em δ 66,8 (2J) e δ 74,5 (3J) e do hidrogênio em δ 7,27-7,12 com o carbono em δ 162,8-159,5 (3J) (Figura 164, p. 200) [Tabela 25, p. 202].

Figura 163. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl₃) do D4.Figura 164. Correlações heteronuclear ¹H x ¹³C-HMBC.

Os dados espectrométricos discutidos são compatíveis com a estrutura química do acetato de (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(4-((3-(4-fluorofenil)tioureia)metil)fenoxi)-4,5-dihidroxi-2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo (Figura 165), o qual é inédito na literatura.

Figura 165. Estrutura química do D4.

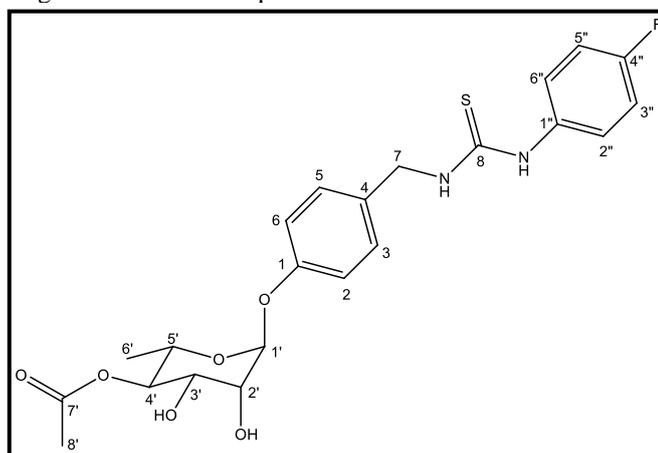


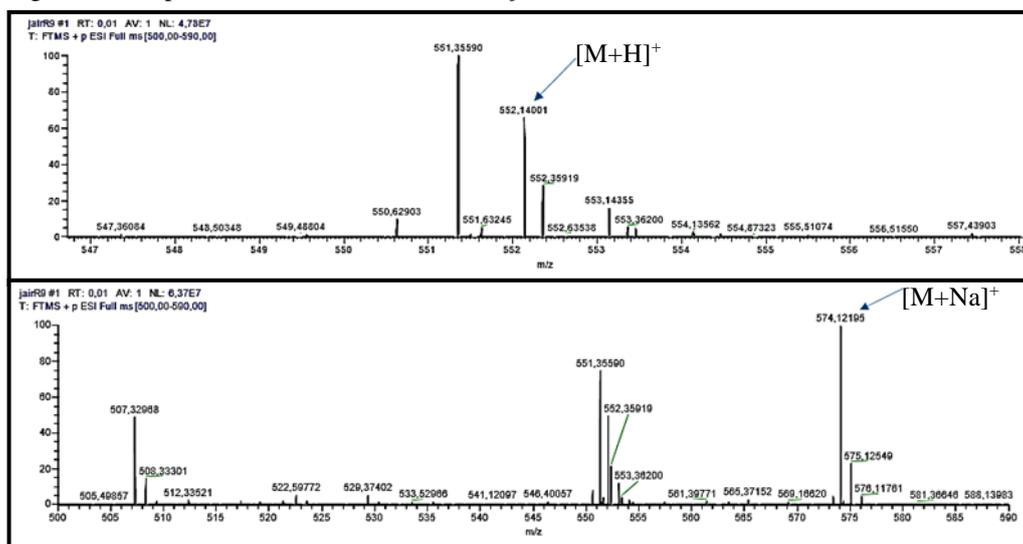
Tabela 25. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D4 (300 MHz/ CDCl_3).

C	HSQC		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1'	5,38 (sl; 1H)	98,0		66,8
2'	3,96 (m; 1H)	69,5		
3'	3,96 (m; 1H)	70,6		
4'	4,86 (t; 1H; $J = 9,7$ Hz)	74,5		
5'	3,75 (dq; 1H; $J = 12,3$ e $6,1$ Hz)	66,8		
6'	1,05 (d; 3H; $J = 6,1$ Hz)	17,3	66,8	74,5
7'	-	171,6		
8'	2,03 (s; 3H)	20,8	171,6	
1	-	155,7		
2/6	7,00 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	116,6		
3/5	6,93 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	129,0		
4	-	128,5		
7	4,68 (s; 2H)	48,3		129,0 181,2
8	-	181,2		
1''	-	131,3		
2''/6''	7,27-7,12 (m; 2H)	127,5 127,4		162,8 159,5
3''/5''	7,27-7,12 (m; 2H)	116,7 116,4		
4''	-	162,8 159,5		

5.4.4 Identificação estrutural do D9

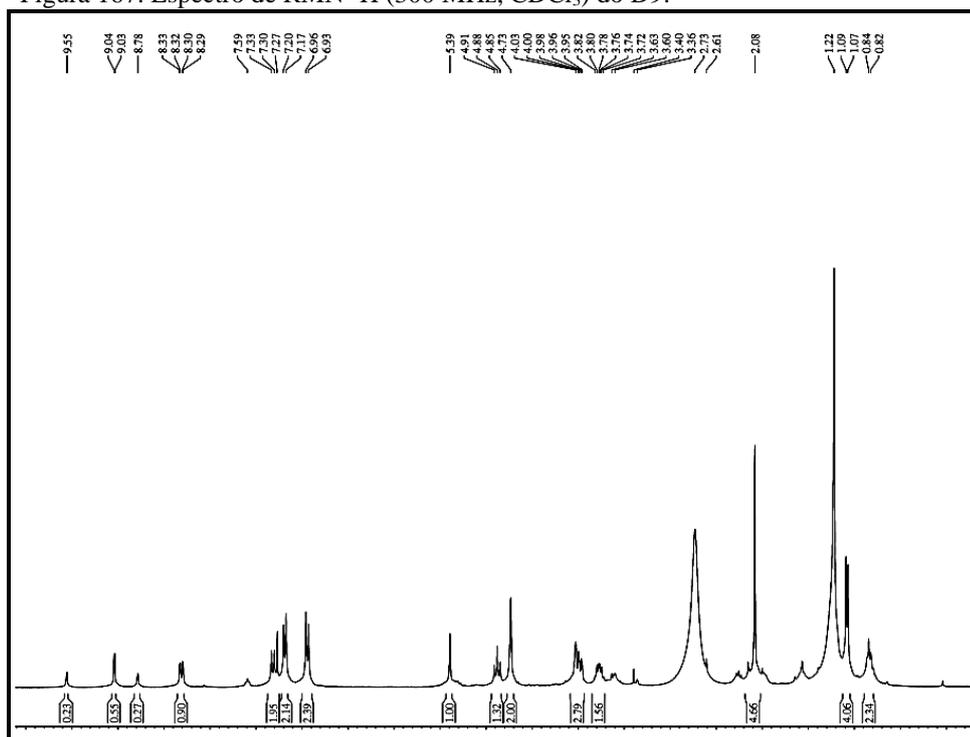
O espectro de massas de alta resolução desta molécula (Figura 166, p. 203), exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de hidrogênio $[\text{M} + \text{H}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 552,14001, o qual apontou a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ e o íon correspondente a molécula com aduto de sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com razão massa/carga (m/z) em 574,12195 Daltons, o qual apontou a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{SNa}$ (calculado: 551,1322/ erro: 0 ppm).

Figura 166. Espectros de massas de alta resolução do D9.



O espectro de RMN ¹H (300 MHz/CDCl₃) do **D9** (Figura 167, p. 204) apresentou cinco sinais referentes a hidrogênios ligados a carbono oxigenado em δ 5,38 (sl; 1H), δ 4,01 (sl; 1H), δ 3,96 (dd; 1H; *J* = 9,7 e 3,3 Hz), δ 4,87 (t; 1H; *J* = 9,7 Hz) e δ 3,76 (dq; 1H; *J* = 12,3 e 6,1 Hz). Um hidrogênio de metila em δ 1,07 (d; 3H; *J* = 6,1 Hz) e um hidrogênio de metila de éster em δ 2,07 (s; 3H). Outros sinais em δ 6,93 (d; 2H; *J* = 8,5 Hz) e δ 7,18 (d; 2H; *J* = 8,5 Hz) alusivos a hidrogênios de carbonos metínicos de anel aromático di-substituído e os sinais em δ 7,31 (d; 1H; *J* = 9,4 Hz), δ 8,30 (dd; 1H; *J* = 9,4 e 2,5 Hz) e δ 9,03 (d; 1H; *J* = 2,5 Hz) sugestivo a hidrogênios de carbonos metínicos de anel aromático tri-substituído. E por último, o sinal em δ 4,72 (s; 2H) referente a hidrogênio ligado a carbono metilênico nitrogenado.

Figura 167. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do D9.



No espectro de correlação homonuclear ^1H x ^1H -COSY (Figura 169, p. 205) foram visualizados alguns acoplamentos como o do hidrogênio em δ 4,87 com o sinal em δ 3,76, do hidrogênio em 3,76 com o sinal em 1,07, com o hidrogênio em δ 5,38 com o sinal em δ 4,01 e do hidrogênio em δ 8,30 com o sinal em δ 7,31 (Figura 168).

Figura 168. As correlações homonuclear do espectro ^1H x ^1H - COSY.

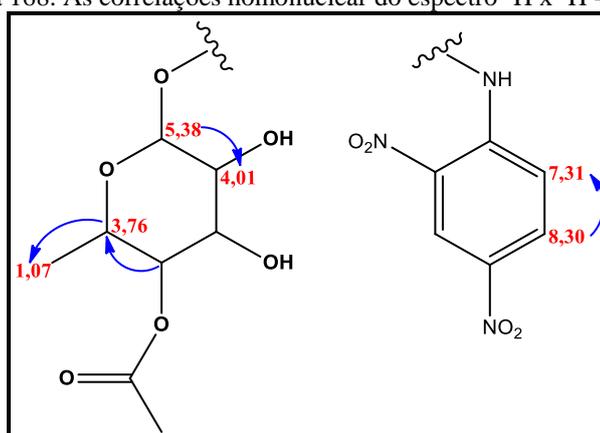
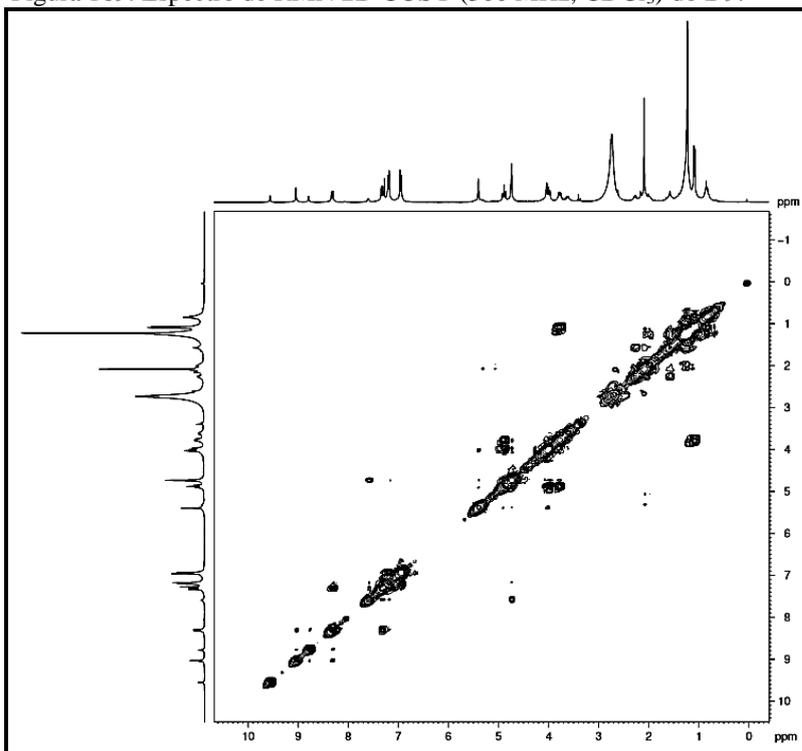


Figura 169. Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz, CDCl₃) do D9.



O espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, CDCl₃) do **D9** (Figura 170, p. 206) apresentou 20 sinais. Destes, 8 encontram-se na região de carbono *sp*³, sendo 5 carbonos *sp*³ oxigenado, um carbono *sp*³ nitrogenado e dois carbonos de metila. Outros 12 sinais na região de carbono *sp*², sendo 10 carbonos *sp*² de anel aromático, 1 carbono *sp*² de carbonila de éster e 1 carbono *sp*² de tioureia. A comparação do espectro RMN ¹³C-JMOD (Figura 171, p. 206) com o espectro de RMN ¹³C-BB mostrou a presença de sete carbonos não hidrogenados (C), dez carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH₂) e dois carbonos metílicos (CH₃).

O espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-HSQC (Figura 172, p. 207) do **D9** permitiu o assinalamento de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 26, p. 209). A partir do espectro de correlação heteronuclear à longa distância ¹H x ¹³C-HMBC (Figura 173, p. 207) do **D9** podemos mostrar as correlações do hidrogênio em δ 4,72 com o carbono δ 182,6 (³J) do grupamento tioureia, do hidrogênio em δ 7,18 com o carbono δ 48,3 (³J) e do hidrogênio em δ 8,30 com o carbono δ 145,2 (²J). Mostrou ainda as correlações do hidrogênio em δ 5,38 com o carbono δ 66,8 (³J), do hidrogênio em δ 2,07 com o carbono em δ 171,8 (²J) e do hidrogênio em δ 4,87 com o carbono em δ 69,5 (³J) [Figura 174, p. 208] (Tabela 26, p. 209).

Figura 170. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) do D9.

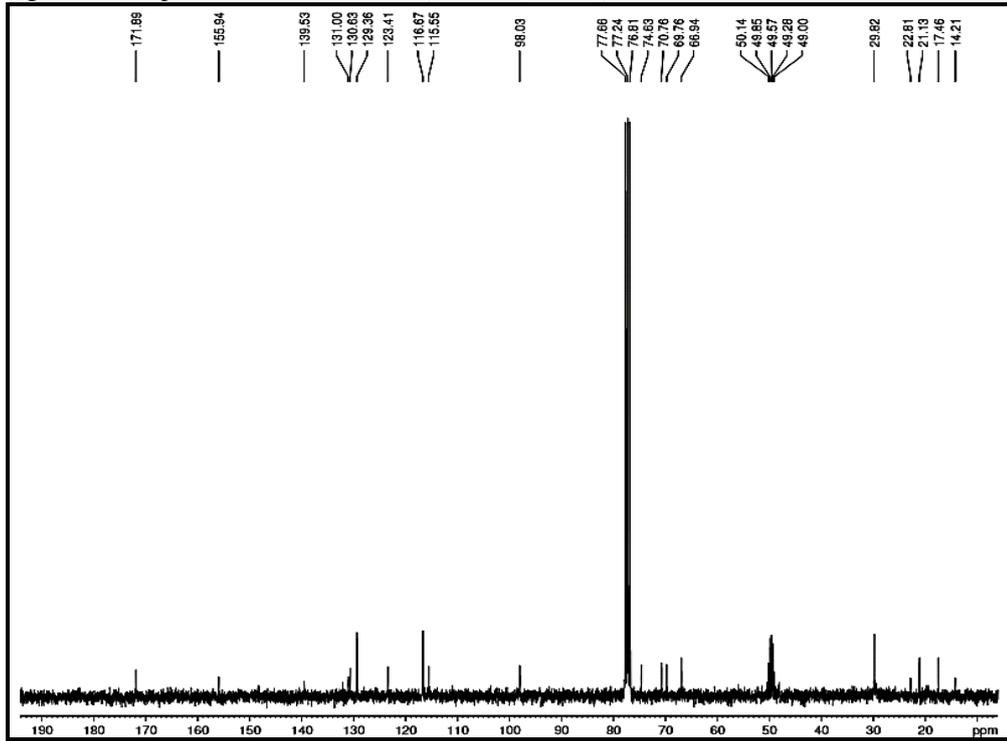


Figura 171. Espectro de RMN ^{13}C -JMOD (75 MHz, CDCl_3) do D9.

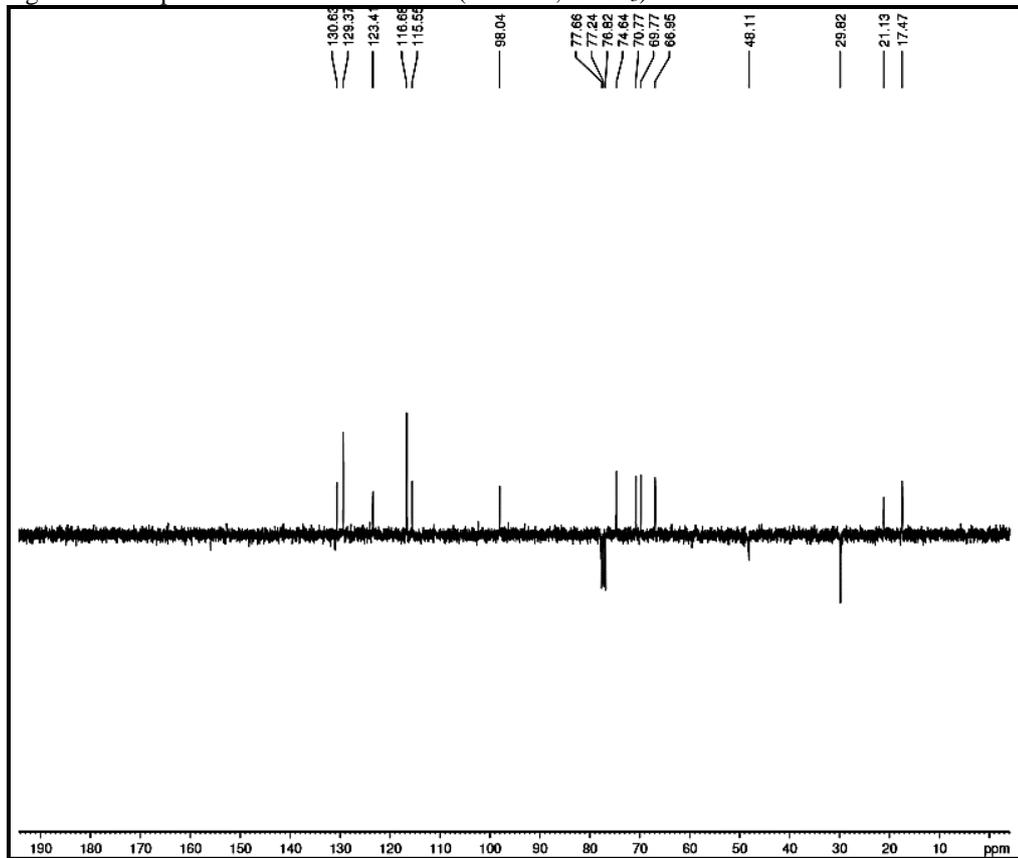


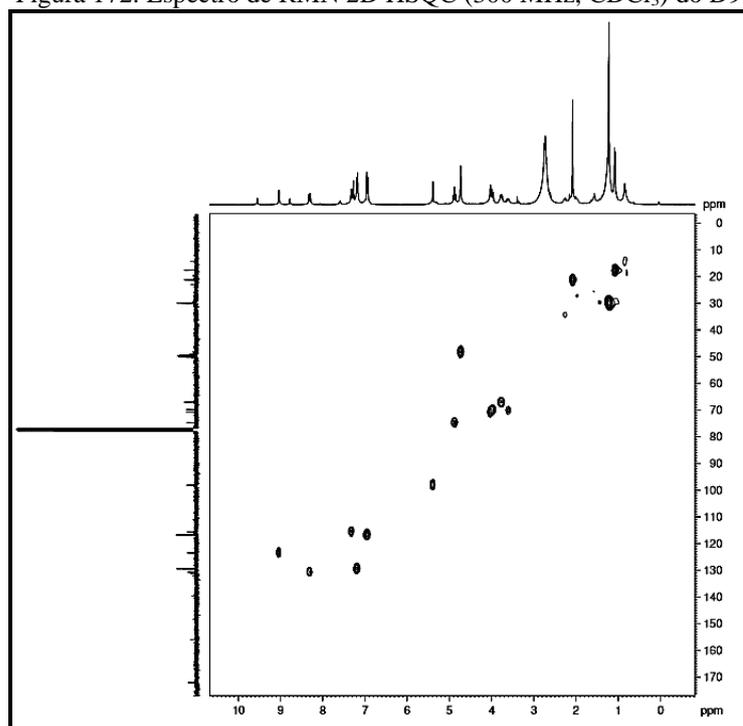
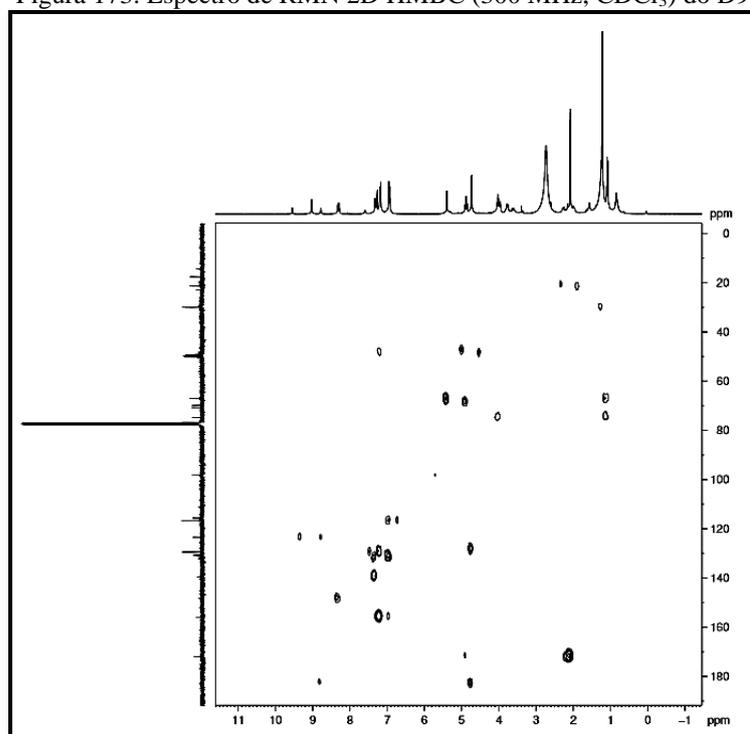
Figura 172. Espectro de RMN 2D HSQC (300 MHz, CDCl_3) do D9.Figura 173. Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz, CDCl_3) do D9.

Tabela 26. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do D9 (300 MHz, CDCl_3).

C	HSQC		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J
1	-	155,8		
2/6	6,93 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	166,6		
3/5	7,18 (d; 2H; $J = 8,5$ Hz)	128,5		48,3
4	-	130,6		
7	4,72 (s; 2H)	48,3		182,6
8	-	182,6		
1'	5,38 (sl; 1H)	98,0		66,8
2'	4,01 (sl; 1H)	69,53		
3'	3,96 (dd; 1H; $J = 9,7$ e $3,3$ Hz)	70,6		
4'	4,87 (t; 1H; $J = 9,7$ Hz)	74,5		69,5
5'	3,76 (dq; 1H; $J = 12,3$ e $6,1$ Hz)	66,9		
6'	1,07 (d; 3H; $J = 6,1$ Hz)	17,4		
7'	-	171,8		
8'	2,07 (s; 3H)	21,0	171,8	
1''	-	139,4		
2''	-	148,2		
3''	9,03 (d; 1H; $J = 2,5$ Hz)	123,3		
4''	-	145,2		
5''	8,30 (dd; 1H; $J = 9,4$ e $2,5$ Hz)	130,5	145,2	
6''	7,31 (d; 1H; $J = 9,4$ Hz)	115,5		

5.5 Procedimentos experimentais

5.5.1 Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção em coluna foi empregado, como fase estacionária gel de sílica 0,035-0,70 mm, 60 A, da marca Vetec[®]. Os comprimentos e os diâmetros das colunas variam de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizados.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da marca Merck[®] com

espessura de 0,2 mm e as cromatografias em camada delgada preparativa foram realizadas em placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com gel de sílica 250 F₂₅₄ da marca J.T.Baker.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, diclorometano e acetato de etila.

A revelação nas placas analíticas e preparativas foram realizadas através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light[®], em dois comprimentos de onda (254 e 265 nm) e imersas em solução de vanilina em HClO₄/EtOH.

5.5.2 Métodos espectrométricos

Capítulo I, item 5.2.1, p. 79.

5.5.2.1 Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos em um espectrômetro de massas Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, resolução 70.000, utilizando-se voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 12, gás auxiliar 0, temperatura do capilar 300°C, temperatura de gás auxiliar 350°C, tube lens 55. Os erros calculados estão em ppm. As amostras foram diluídas em MeOH com 0,1% de ácido fórmico para concentrações de aproximadamente 100 ppm.

5.5.3 Substrato

O benzil-isotiocianato (**1**) foi cedido pelo Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LabFito).

5.5.4 Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento dos derivados do benzil-isotiocianato estão listados a seguir com suas respectivas procedências:

- ✓ *p*-metoxianilina
- ✓ *p*-flúoranilina
- ✓ Ciclohexilamina
- ✓ 2,4-dinitrofenilhidrazina (SIGMA - ALDRICH)

✓ Etanol (Synth)

5.6 Síntese dos derivados do benzil-isotiocianato

5.6.1 Síntese do derivado D2

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, foi dissolvido 30 mg (0,085 mmol) do benzil-isotiocianato (**1**) em 2 mL de etanol juntamente com 11,2 mg (0,09 mmol) de *p*-metoxianilina. Em seguida, o balão foi colocado sob refluxo a 90 °C, o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 6 horas (SARKIS *et al.*, 2014). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: diclorometano/acetato de etila (9:1) e (6:4). Obtendo-se um sólido, denominado acetato de 4,5-dihidroxi-6-(4-((3-(4-metoxifenil)tiouréia)metil)fenoxi)-2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo, com rendimento de 86,0% e ponto de fusão de 85,5 - 86,0°C.

5.6.2 Síntese do derivado D3

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, foi dissolvido 30 mg (0,085 mmol) do benzil-isotiocianato (**1**) em 2 mL de etanol juntamente com 8,4 mg (0,09 mmol) de ciclohexilamina. Em seguida, o balão foi colocado sob refluxo a 90 °C, o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 48 horas (SARKIS *et al.*, 2014). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: 100% acetato de etila. Obtendo-se um sólido, denominado acetato de 6-(4-((3-ciclohexiltiouréia)metil)fenoxi)-4,5-dihidroxi-2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo, com rendimento de 65,0%.

5.6.3 Síntese do derivado D4

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, foi dissolvido 30 mg (0,085 mmol) do benzil-isotiocianato (**1**) em 2 mL de etanol juntamente com 10 mg (0,09 mmol) de *p*-flúoranilina. Em seguida, o balão foi colocado sob refluxo a 90 °C, o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado

após 12 horas (SARKIS *et al.*, 2014). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: diclorometano/acetato de etila (1:1). Obtendo-se um sólido incolor, denominado acetato de 6-(4-((3-(4-fluorofenil)tiouréia)metil)fenoxi)-4,5-dihidroxi-2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo, com rendimento de 73,0% e ponto de fusão de 92,0 – 92,5°C.

5.6.4 Síntese do derivado D9

Em um balão de fundo redondo de 15 mL, foi dissolvido 30 mg (0,085 mmol) do benzil-isotiocianato (**1**) em 1 mL de metanol juntamente com 34 mg (0,17 mmol) 2,4-dinitrofenilhidrazina. Em seguida, o balão foi colocado sob refluxo a 75 °C, o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e monitorado por CCDA. O término da reação foi observado após 24 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado em cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando como eluente: diclorometano/acetato de etila (1:1) (Almeida *et al.*, 2017). Obtendo-se um sólido, denominado acetato de (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(4-((2-(2,4-dinitrofenil)hidrazinacarbotoamido)metil)fenoxi)-4,5-dihidroxi-2-metiltetrahidro-2*H*-piran-3-ilo, com rendimento de 63,5%.

5.7 Conclusão

Neste capítulo, destacou-se a preparação de derivados a partir do benzil-isotiocianato, isolado das flores da *Moringa oleífera*. Houve uma contribuição relevante à literatura científica com a obtenção de quatro novos compostos totalmente caracterizados.

Em vários estudos foram elucidados os benefícios para a saúde dos compostos de organossulfurado, por esse motivo, a preparação de derivados a partir de isotiocianatos permanece como uma área atraente, por causa da possível melhoria das atividades biológicas apresentadas por eles em comparação com o substrato de origem.

6 CONCLUSÃO GERAL

Para a realização da biotransformação foi utilizado o potencial biocatalítico dos fungos endofíticos da família Botryosphaeriaceae frente ao substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno. Após os experimentos, foi confirmado a capacidade de biohidroxilação e biorredução das enzimas presentes nos fungos *N. ribis*, *L. gonubiensis* e *P. stromaticum*. Como resultado, obteve-se quatro produtos de biotransformação denominados de P1, P2, P3 e P6. Após a obtenção dos produtos resultantes da biotransformação, foram feitas duas modificações químicas em P2. Essas modificações deram origem a dois derivados denominados de P2(a) e P2(o). As descobertas descritas nesse estudo contribuíram de forma relevante à literatura científica, pois houve a obtenção de cinco novos compostos orgânicos (P2, P3, P6, P1(a) e P2(o)). Os resultados deste estudo foram publicados no periódico MOJ Bioorganic & Organic Chemistry, v.1, n.6, 2017.

A biotransformação do ibuprofeno pelo fungo endofítico *N. ribis* levou a obtenção de um derivado hidroxilado (IB-1). Além disso, foram obtidos por processo de semissíntese cinco derivados esterificados. Apesar destes derivados serem conhecidos, estes não possuíam todos os dados de ressonância magnética nuclear descritos.

Neste estudo foi descrito a síntese do precursor da fluoxetina e seu derivado clorado, denominados Pr-FLX1 e Pr-FLX2, sendo esse último inédito na literatura. Descreveu-se também a modificação estrutural da fluoxetina, obtendo-se três derivados denominados FLX-Be, R-FLXH e FLX-PCl, sendo os dois últimos inéditos na literatura. Esta pesquisa contribuiu de forma relevante à literatura científica com a obtenção de três novos compostos orgânicos totalmente caracterizados.

No último capítulo, destacou-se a preparação de derivados a partir do benzil-isotiocianato, isolado das flores da *Moringa oleífera*. Houve uma contribuição relevante à literatura científica com a obtenção de quatro novos compostos totalmente caracterizados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K.; AMIN, M.; HUSSAIN, M. A.; SHER, M.; BUKHARI, S. N. A.; EDGAR, K. J. Design, characterization and pharmaceutical/pharmacological applications of ibuprofen conjugates based on hydroxyethylcellulose. **RSC Adv.**, [s.l.], v. 7, p. 50672–50679, October 2017.
- AHMETAJ-SHALA, B.; TESFAI, A.; CONSTANTINOU, C.; LESZCZYNSKI, R.; CHAN, M. V.; GASHAW, H.; GALARIS, G.; MAZI, S.; WARNER, T. D.; KIRKBY, N. S.; MITCHELLA, J. A. Pharmacological assessment of ibuprofen arginate on platelet aggregation and colon cancer cell killing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, London, v. 484, n° 4, p. 762-766, January 2017.
- AL-ABOUDIA, A.; KANA'ANA, B. M.; ZARGAA, M. A.; BANOB, S.; ATIA-TUL-WAHABC; JAVEDB, K.; CHOUDHARY, M. I. Fungal biotransformation of diuretic and antihypertensive drug spironolactone with *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata*, *Fusarium lini* and *Aspergillus alliaceus*. **Steroids**, [s.l.], v. 128, p. 15-22, December 2017.
- ALMEIDA, D. K.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. C. F.; MAFEZOLI, J.; MATTOS, M. C.; MOURA, A. F.; FILHO, M. O. M.; BARBOSA, F. G. New semisynthetic derivatives of a benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* and evaluation of their cytotoxic activity. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 40, n° 10, p. 1-5, October 2017.
- AMIR, M.; AKHTER, M. W.; ALAM, O. Synthesis, characterization, and biological evaluation of furoxan coupled ibuprofen derivatives as anti-inflammatory agentes. **Monatsh Chem**, [s.l.], v. 147, p. 493-508, 2016.
- ATA, A.; NACHTIGALL, J. A. Microbial Transformations of α -Santonin. **The University of Winnipeg**, Canada, v. 59, p. 209-214, July 2004.
- ATZENI, F.; BOCCASSINI, L.; FRANCO, M. D.; ALCIATI, A. MARSICO, A.; CAZZOLA, M.; CASSISI, G.; SARZI-PUTTINI, P. Chronic widespread pain in spondyloarthritis. **Reumatismo**, Italy, v. 66, n. 1, p. 28-32 2014.
- BIROLI, W. G.; YAMAMOTO, K. Y.; OLIVEIRA, J. R.; NITSCHKE, M.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, São Paulo, v. 4, p. 39-43, January 2015.
- BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, São Paulo, v. 46, p. 945-952, April 2008.
- BOUYSSOU, T.; HOENKE, C.; RUDOLF, K.; LUSTENBERGER, P.; PESTEL, S.; SIEGER, P.; LOTZ, R.; HEINE, C.; BÜTTNER, F. H.; SCHNAPP, A.; KONETZKI, I. Discovery of olodaterol, a novel inhaled b2-adrenoceptor agonist with a 24 h Bronchodilatory efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Germany, v. 20, p. 1410-1414, February 2010.

BOWEI, W.; WANSHI, H.; YINGNAN, W.; SHAOHENG, L.; ZHIHUI, L.; ZHIGUANG, S. Synthesis and Pharmacodynamics of Ibuprofen-1-acetoxyethyl Ester. **Chem. Res. Chin. Univ.**, China, v. 33, n. 4, p. 569-573, August 2017.

BRUICE, Paula Yurkanis. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v. 1 e 2.

CAIAFFO, V.; BELISA D. R. OLIVEIRA, B. D. R.; SÁ, F. B.; NETO, J. E. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. **Pharma Res Per**, v. 4, n° 3, 2016.

CARTER, W. C.; BROWN, B. R. Ibuprofen: clinical pharmacology, medical uses and adverse effects. New York: **Nova Biomedical**, 2013. p. 404.

CHEENPRACH, S.; EUN-JUNGPARK, EUN-JUNG; YOSHIDA, W. Y.; BARIT, C.; WALL, M.; PEZZUTO, J. M.; CHANG, L. C. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, USA, v. 18, p. 6598-6602, September 2010.

CHEN, S. F.; PAVLIC, D.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; XIE, Y. J.; WINGFIELD, M. J.; ZHOU, X. D. Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China. **Plant Pathology**, China, v. 60, p. 739-751, August 2011.

CHO, H. J.; LIM, D. Y.; KWON, G. T.; KIM, J. H.; HUANG, Z.; SONG, H.; OH, Y. S.; KANG, YOUNG-HEE; LEE, K. W.; DONG, Z.; PARK, J. H. Y. Benzyl Isothiocyanate Inhibits Prostate Cancer Development in the Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate (TRAMP) Model, Which Is Associated with the Induction of Cell Cycle G1 Arrest. **Int. J. Mol. Sci.**, Korea, v. 17, p. 264, Febuary 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Fourth Informational Supplement M27-S4 Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA. 2012.

DOMECQ, J. P.; PRUTSKY, G.; LEPPIN, A.; SONBOL, M. B.; ALTAYAR, O.; UNDAVALLI, C.; WANG, Z.; ELRAIYAH, T.; BRITO, J. P.; MAUCK, K. F.; LABABIDI, M. H.; PROKOP, L. J.; ASI, N.; WEI, J.; FIDAHUSSEIN, S.; MONTORI, V. M.; MURAD, M. H. Drugs Commonly Associated With Weight Change: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 100, n° 2, p. 363–370, January 2015.

DOU, J.; SHI, L.; HU, A.; DONG, M.; XU, J.; LIU, A.; JIANG, Y. Synthesis and Evaluation of 2-(2-Arylmorpholino)ethyl Esters of Ibuprofen Hydrochlorides as COX-2 and Serotonin Reuptake Inhibitors. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, China, v. 347, p. 89-95, Febuary 2014.

ENDO, H.; YANO, M.; OKUMURA, Y.; KIDO, H. Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. **Cell Death and Disease**, Japan, v. 5, p. e1027, January 2014.

FU, MING-LIANG.; WANG, W.; CHEN, F.; DONG, YA-CHEN.; LIU, XIAO-JIE.; NI, H.; QI-HE CHEN, QI-HE. Production of 8-Prenylnaringenin from Isoxanthohumol through Biotransformation by Fungi Cells. **J. Agric. Food Chem.**, China, v. 59, p. 7419-7426, July 2011.

FUJISAWA, H.; FUJIWARA, T.; TAKEUCHI, Y.; OMATA, K. Synthesis and Optical Resolution of 2-Aryl-2-fluoropropionic Acids, Fluorinated Analogues of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs). **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 53, n. 5, p. 524-528, December 2005.

GALUPPO, M.; GIACOPPO, S.; IORI, R.; NICOLA, G. R.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Administration of 4-(α -L-Rhamnosyloxy)-benzyl Isothiocyanate Delays Disease Phenotype in SOD1^{G93A} Rats: A Transgenic Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **BioMed Research International**, Italy, v. 2015, p. 1-12, April 2015.

GALUPPO, M.; GIACOPPO, S.; IORI, R.; NICOLA, G. R.; MILARDI, D.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. 4(α -L-rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive phytochemical that defends cerebral tissue and prevents severe damage induced by focal ischemia/reperfusion. **Journal of biological regulators & homeostatic agentes**, Italy, v. 29, n. 2, p. 343-356, April 2015.

GALUPPO, M.; GIACOPPO, S.; NICOLA, G. R.; IORI, R.; NAVARRA, M.; LOMBARDO, G. E.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Fitoterapia**, Italy, v. 95, p. 160-174, June 2014.

GHASEMI, S.; MOHAJERY, M.; HABIBI, Z. Biotransformation of testosterone and testosterone heptanoate by four filamentous fungi. **Steroids**, Iran, v. 92, p. 7-12, December 2014.

GHOUMARI, H.; MOHAMED-HASSAN BENAJIBA, GARCÍA-GRANADOS, A.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M. Biotransformations of ent-18-acetoxy-6 ketomanoyl oxides epimers at C-13 with filamentous fungi. **Phytochemistry**, Morocco, v. 67, p. 2294-2302, September 2006.

GIACOPPO, S.; GALUPPO, M.; NICOLA, G. R.; IORI, R.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. 4(α -L-Rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive phytochemical that attenuates secondary damage in an experimental model of spinal cord injury. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Italy, v. 23, p. 80-88, January 2015.

GIACOPPO, S.; RAJAN, T. S.; IORI, R.; ROLLIN, P.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. The α -cyclodextrin complex of the Moringa isothiocyanate suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells through Akt and p38 inhibition. **Inflamm. Res.**, Italy, v. 66, p. 487-503, March 2017.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica**, China, v. 7, p. 119-136, March 2017.

HALDAR, S.; KOLET, S. P.; THULASIRAM, H. V. Biocatalysis: fungi mediated novel and selective 12 β - or 17 β -hydroxylation on the basic limonoid skeleton. **Green Chemistry**, India, v. 15, p. 1311–1317, 2013.

HANCU, G.; CÂRCU-DOBRIN, M.; BUDAU, M.; RUSU, A. Analytical methodologies for the stereoselective determination of fluoxetine: Na overview. **Biomedical Chromatography**. Romania, v. 32, January 2017.

HILLMAN, E.T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, United States, v. 5, p. 50-56, October 2017.

JEON, S. A.; CHOO, H.; PARK, WOO-KYU; RHIM, H.; KO, S. Y.; CHO, Y. S.; KOH, H. Y.; PAE, A. N. Synthesis and Biological Evaluation of Arylsulfonylpiperazine Derivatives as 5-HT₆ Receptor Ligands. **Bull. Korean Chem. Soc.**, Korea, v. 28, 2007.

JOHNSON, D. A.; GRANT, E. J.; INGRAM, C. D.; GARTSIDE, S. E. Glucocorticoid Receptor Antagonists Hasten and Augment Neurochemical Responses to a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressant. **BIOL PSYCHIATRY**, United Kingdom, v. 62, p. 1228-1235, July 2007.

KAISER, S. J.; MUTTERS, N. T.; BLESSING, B.; GUNTHER, F. Natural isothiocyanates express antimicrobial activity against developing and mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Fitoterapia**, Germany, v. 119, p. 57-63, June 2017.

KALAYCI, S.; DEMIRCI, S.; SAHIN, F. Antimicrobial Properties of Various Psychotropic Drugs Against Broad Range Microorganisms. **Current Psychopharmacology**, [s. l.], v. 3, ed. 3, 2014.

KANWAL, N.; SAHIN, O.; HUSAIN, E. A.; KHAN, I. U.; ORHAN BUYUKGUNGOR, O. Synthesis, crystal structure and antioxidant potential of di-(n-cinnamyl) fluoxetine chloride. **J. Chil. Chem. Soc.**, Pakistan, v. 58, n° 1, p. 58, 2013.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1216p.

KHAMIS, I.; HEIKKILA, J. J. Effect of isothiocyanates, BITC and PEITC, on stress protein accumulation, protein aggregation and aggresome-like structure formation in *Xenopus* A6 kidney epithelial cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Canada, v. 204, p. 1-13, January 2018.

KOUL, S.; KOUL, J. L.; SINGH, B.; KAPOOR, M.; PARSHAD, R.; MANHAS, K. S.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Trichosporon beigelli esterase (TBE): a versatile esterase for the resolution of economically important racemates. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s. l.], v. 16, p. 2575-2591, 2005.

KOUWENHOVEN, T. A.; KERKHOF, P. C. M. V.; KAMSTEEG, M. K. Use of oral antidepressants in patients with chronic pruritus: A systematic review. **J. Am. Acad. Dermatol**, Netherlands, v. 77, n° 6, p. 1068-1073, December 2017.

KURTZ, R. R.; HOUSER, D. J. A 1,6-Eliminative Epoxide Cleavage in the Synthesis of an Ibuprofen Metabolite. **J. Org. Chem.**, [s. l.], v. 46, p. 202-203, January 1981.

LEE, CHANG-MIN; LEE, DAE-SUNG; JUNG, WON-KYO; JONG SU YOO, J. S.; YIM, MI-JIN; YUNG HYUN CHOI, Y. H.; PARK, S.; SEO, SU-KIL; CHOI, J. S.; LEE, YOUNG-MIN; PARK, W. S.; CHOI, IL-WHAN. Benzyl isothiocyanate inhibits inflammasome activation in E. coli LPS-stimulated BV2 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, Korea, v. 38, p. 912-918, September 2016.

LEE, CHANG-SU; CHO, HYUN-JI; JEONG, YUN-JEONG; SHIN, JAE -MOON; PARK, KWAN -KYU; PARK, YOON-YUB; BAE, YOUNG-SEUK; CHUNG, IL-KYUNG; KIM, M.; KIM, CHEORL-HO; JIN, F.; CHAN, HYEUN-WOOK; CHAN, YOUNG-CHAE. Isothiocyanates inhibit the invasion and migration of C6 glioma cells by blocking FAK/JNK-mediated MMP-9 expression. **Oncology Reports**, Korea, v. 34, p. 2901-2908, September 2015.

LI, J. J.; LIMBERAKIS, C.; PFLUM, D. A. **Modern Organic Synthesis in the Laboratory: a collection of standard experimental procedures**. 3. ed.; New York: Oxford University Press, Inc, 2007. 198 p.

LI, J., ZHANG, L., LIU, W. Cell-free synthetic biology for in vitro biosynthesis of pharmaceutical natural products. **Synthetic and Systems Biotechnology**, China, v. 3, p. 83-89, June 2018.

LIU, X.; TAKANO, C.; SHIMIZU, T.; YOKOBE, S.; ABE-KANO, N.; ZHU, B.; NAKAMURA, T.; MUNEMASA, S.; MURATA, Y.; NAKAMURA, Y. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase ameliorates antiproliferation by benzyl isothiocyanate in human colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Japan, v.491, p. 209-216, September 2017.

MACEDO, D.; CHAVES FILHO, A. J. M.; SOUSA, C. N. S.; JOÃO QUEVEDO, J.; TATIANA BARICHELLO, T.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; LUCENA, D. F. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal of Affective Disorders**. Brasil, v. 208, p. 22-32, January 2017.

MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M. C. F.; PAIVA, J. R.; SOUSA, A. H.; LIMA, M. A. S.; SILVA JÚNIOR, J. N.; BARBOSA, F. G.; WIIERATNE, E. M. K.; GUNATILA, A. A. L. Stereo and Regioselective Microbial Reduction of the Clerodane Diterpene 3,12 dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxycleroda-13(16),14-diene. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 759-762, 2014.

MENEZES, M., SILVA-HANLIN, D.M.W. 1997. Microculturas. Pp. 79-80. In: M. Menezes & D.M.W. Silva-Hanlin (eds.). **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE.

MOHANTY, S.; REDDY, S. G.; RAMADEVI, B.; KARMAKAR, A. C. An assembly of structurally diverse small and simple 5-aminomethylene derivatives of 2,4-thiazolidinedione and studies of their biological activity. **Med Chem. Res.**, India, v. 24, p. 4037-4049, December 2015.

MONTE, F. J. Q., DANTAS, E. M. G., BRAZ, R. New diterpenoids from *Croton Argyrophylloides*. **Phytochemistry**, Brazil, v. 27, p. 3209-3212, December 1987.

MONTES, R. H. O.; LIMA, A. P.; CUNHA, R. R.; GUEDES, T. J.; SANTOS, W. T. P.; NOSSOL, E.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Size effects of multi-walled carbon nanotubes on the electrochemical oxidation of propionic acid derivative drugs: Ibuprofen and naproxen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Brazil, v. 775, p. 342-349, August 2016.

NOWICKI, D.; OLGA RODZIK, O.; HERMAN-ANTOSIEWICZ, A.; SZALEWSKA-PALASZ, A. Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: insight to the mode of action. **Scientific Reports**, [s. l.], February 2016.

OBAD, J.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antimicrobial activity of ibuprofen: New perspectives on an "Old" non-antibiotic drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Croatia, v. 71, p. 93-98, April 2015.

OLIVEIRA, A. S.; GASPAR, C. A.; OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, A. P. Anti-Candida Activity of Fluoxetine Alone and Combined with Fluconazole: a Synergistic Action against Fluconazole-Resistant Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Portugal, v. 58, n. 7, p. 4224-4226, July 2014.

OLIVEIRA, M. R. Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects. **Toxicology Letters**, Brazil, v. 258, p. 185-191, September 2016.

OU, L.; XU, Y.; LUDWIG, D.; PAN, J.; XU, J. H. Chemoenzymatic Deracemization of Chiral Secondary Alcohols: Process Optimization for Production of (R)-1-Indanol and (R)-1-Phenylethanol. **Organic Process Research & Development**, Germany, v. 12, p. 192-195, 2008.

PARK, H.; KIM, EUN-JIN; HAN, J.; HAN, J.; KANG, D. Effects of analgesics and antidepressants on TREK-2 and TRESK currents. **Korean J. Physiol. Pharmacol.**, Korea, v. 20, p. 379-385, June 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 773p.

PERISSINI-LOPES, B.; EGEEA, T. C.; MONTEIRO, D. A.; VICI, A. C.; SILVA, D. G. H.; LISBOA, D. C. O.; ALMEIDA, E. A.; PARSONS, J. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Evaluation of Diuron Tolerance and Biotransformation by Fungi from a Sugar Cane Plantation Sandy-Loam Soil. **J. Agric. Food Chem.**, Brazil, v. 64, p. 9268-9275, 2016.

PHAM, V. T.; NGUYEN, T. Q.; DAO, U. P. N.; NGUYEN, T.T. On the interaction between fluoxetine and lipid membranes: Effect of the lipid composition. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Viet Nam, v. 191, p. 50-61, February 2018.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Portugal, v. 76, p. 51-167, September 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 784p.

ROBERT, W.; MURDOCH, R. W.; HAY, A. G. The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1. **Biodegradation**, USA, v. 26, p. 105-113, April 2015.

SANTOS, A. O.; VAL, D. R.; SILVEIRA, F. D.; GOMES, F. I. F.; FREITAS, H. C.; ASSIS, E. L.; ALMEIDA, D. K. C.; SILVA, I. I. C.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLIE, J.; SILVA, M. R.; BRITTO, G. A. C.; CLEMENTE-NAPIMOGAG, J. T.; PINTO, V. P. T. P. T.; FILHO, G. C.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V. Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of semisynthetic molecules obtained from a benzyl-isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* Lam. in a temporomandibular joint inflammatory hypernociception model in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 609-618, 2018.

SARKIS, M.; TRAN, DIEM-NGAN; LANG, M. C. D.; GARBAY, C.; BRAUD, E. Convenient Synthesis of 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinone Derivatives Using Microwave Irradiation. **SYNLETT**, Brazil, v. 25, p. 1257-1262, January 2014.

SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, USA, v.98, p.1041-1052, December 2006.

SCHULZE, M. Novel synthetic route to fluoxetine. **Synthetic Communications**, [s. l.], v. 40, p. 3415-3422, October 2010.

SILVA, M. R.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; RICARDO, N. M. P. S.; GONZALO, G.; LAVANDERA, J.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of N-acetyl- α -amino esters based on lipase-catalyzed kinetic resolutions through interesterification reactions. **Tetrahedron**, Brazil, v. 70, p. 2264-2271, April 2014.

SINGH, A.; TRIPATHI, P.; PRAKASH, O.; SINGH, M. P. Ibuprofen abates cypermethrin-induced expression of pro-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinases and averts the nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. **Mol Neurobiol**, India, v. 53, p. 6849-6858, December 2016.

SRIVASTAVA, P.; ANDERSEN, P. C.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; SRIVASTAVA, M.; HARMON, P. F. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria* isolates. **Crop Protection**, USA v. 43, p. 146-156, January 2013.

SUN, B. K.; KIM, J. H.; CHOI, JOON-SEOK; HWANG, SUNG-JOO; SUNG, JONG-HYUK. Fluoxetine Decreases the Proliferation and Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, Korea, v. 16, p. 16655-16668, July 2015.

SUN, DONG-SHENG; GAO, LI-FENG; JIN, L.; WU, H.; WANG, Q.; ZHOU, Y.; FAN, S.; JIANG, X.; KE, D.; LEI, H.; WANG, JIAN-ZHI; LIU, GONG-PING. Fluoxetine administration during adolescence attenuates cognitive and synaptic deficits in adult 3 \times TgAD mice. **Neuropharmacology**, China, v. 126, p. 200-212, September 2017.

UPPAL, S.; KAUR, K.; KUMAR, R.; KAHLON, N. K.; SINGH, R.; MEHTA, S. K. Encompassment of Benzyl Isothiocyanate in cyclodextrin using ultrasonication methodology to enhance its stability for biological applications. **Ultrasonics – Sonochemistry**, India, v. 39, p. 25-33, November 2017.

WATERMAN, C.; CHENG, D. M.; ROJA-SILVA, P.; POULEV, A.; DREIFUS, J.; LILA, M. A.; RASKIN, I. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*. **Phytochemistry**, USA, v. 103, p. 114-122, April 2014.

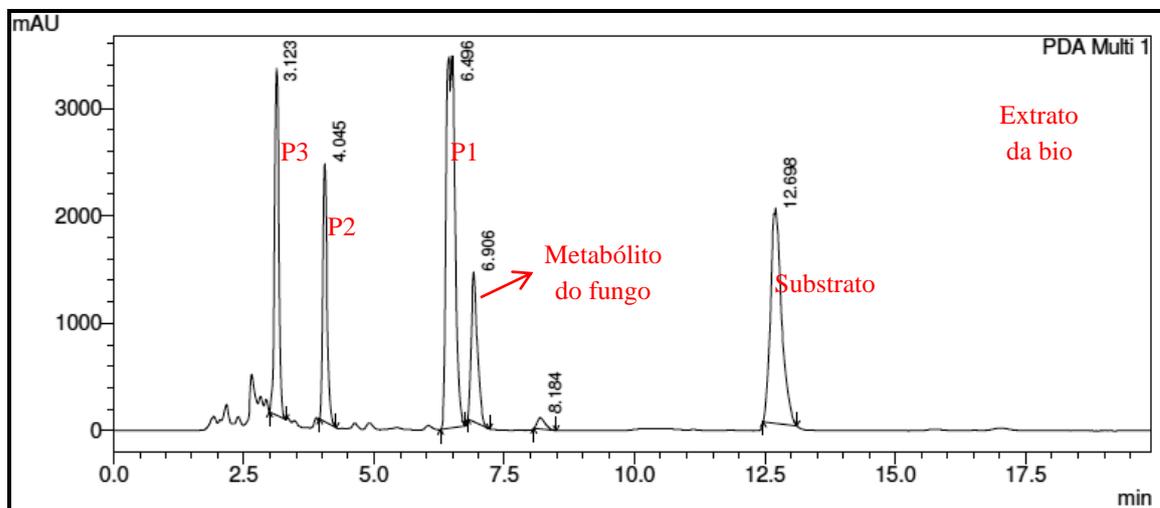
WU, H. Y.; MASLER, E. P.; ROGERS, S. T.; CHEN, C.; DAVID, J.; CHITWOOD, D. J. Benzyl isothiocyanate affects development, hatching and reproduction of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Nematology**, China, v. 16, n. 4p. 495-504, 2014.

YEH, YAO-TSUNG; HSU, YEN-NIEN; HUANG, SHENG-YUN; LIN, JIAN-SHENG; CHEN, ZI-FENG; CHOW, NAN-HAW; SU, SHU-HUI; SHYU, HUEY-WEN; LIN, CHING-CHIANG; HUANG, WU-TEIN; HUA YEH, H.; CHIH, YU-CHIA; HUANG, YU-HSUAN; SU, SHU-JEM. Benzyl isothiocyanate promotes apoptosis of oral cancer cells via acute redox stress-mediated DNA damage response. **Food and Chemical Toxicology**, Taiwan, v. 97, p. 336-345, September 2016.

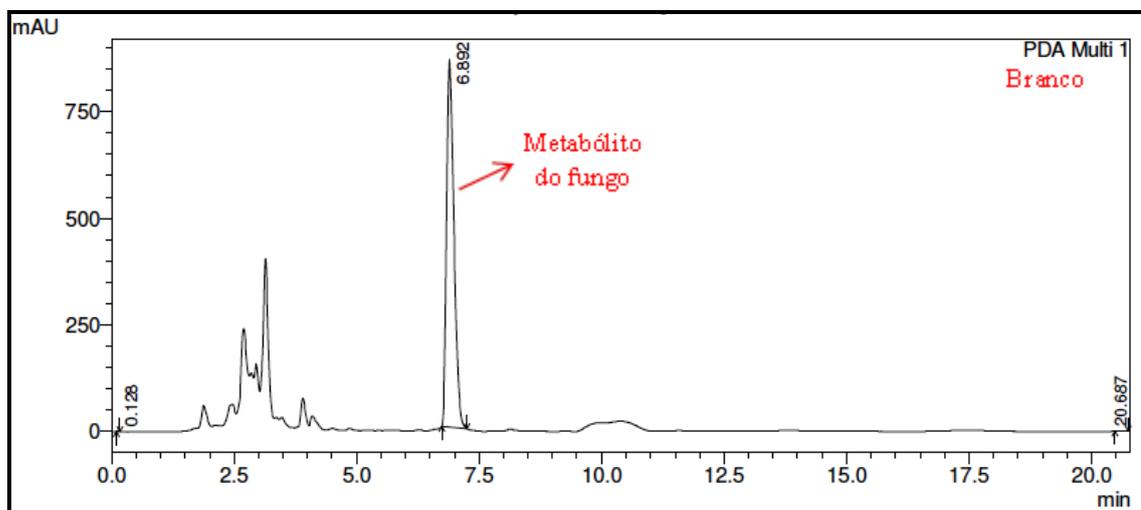
ZENG, B.; YIWEN LI1, Y.; NIU1, B.; WANG1, X.; CHENG1, Y.; ZHOU1, Z.; YOU1, T.; LIU, Y.; WANG1, H.; XU1, J. Involvement of PI3K/Akt/FoxO3a and PKA/CREB Signaling Pathways in the Protective Effect of Fluoxetine Against Corticosterone-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. **J. Mol. Neurosci.**, China, v. 59, p. 567-578, August 2016.

ZHANG, M.; ZHAO, Q.; LIANG, Y.; MA, J.; CHEN, L.; ZHANG, X.; DING, L.; ZHAO, F.; QIU, F. Stereo- and regiospecific biotransformation of curcumenol by four fungal strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, China, v. 115, p. 13-19, May 2015.

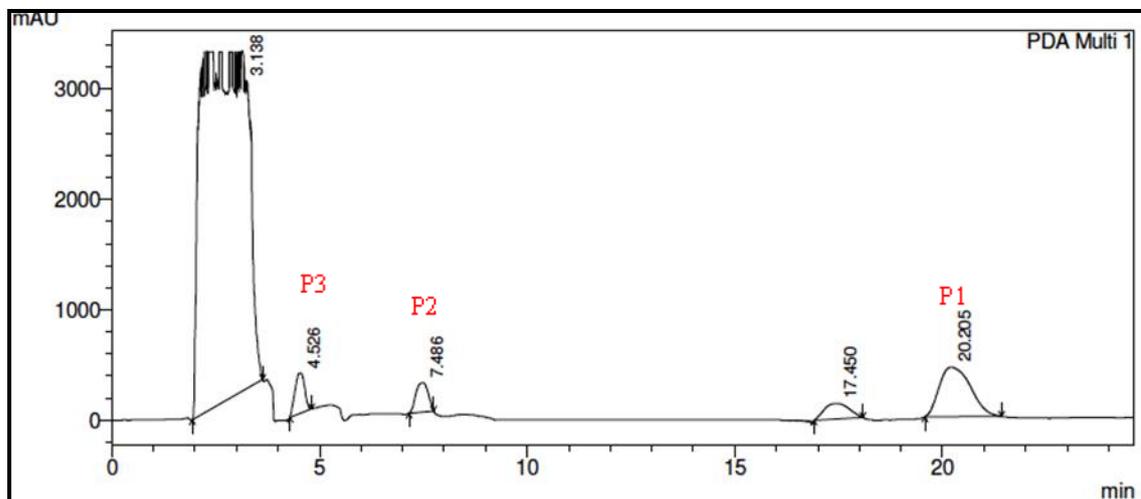
**ANEXO A - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO FUNGO *N. RIBIS* COM O DITERPENO CLERODANO
(DC) EM COLUNA ANALÍTICA.**



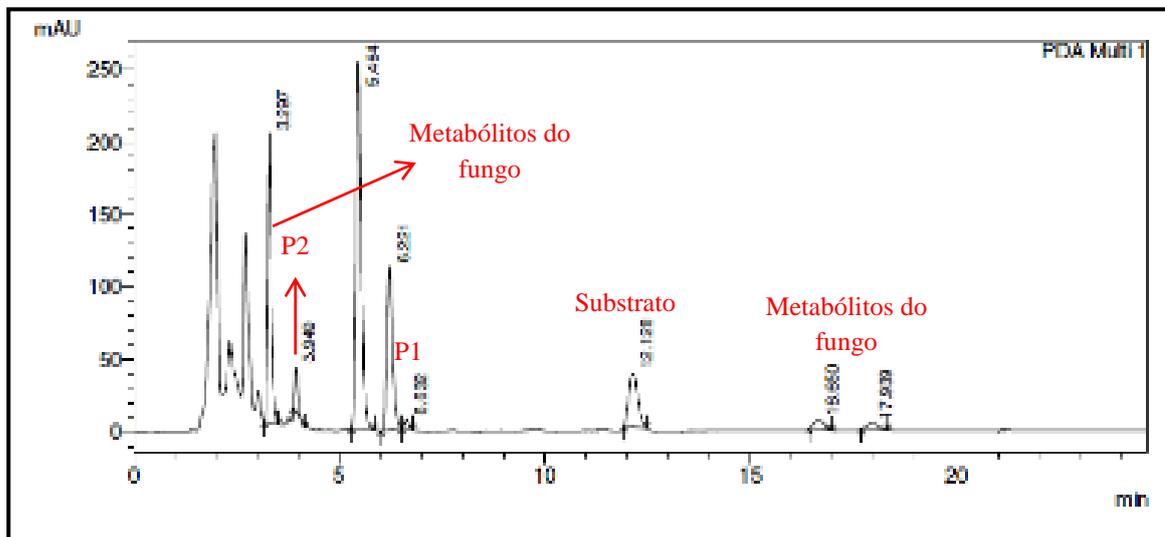
ANEXO B - CROMATOGRAMA EM CLAE DO BRANCO DO FUNGO *N. RIBIS* EM COLUNA ANALÍTICA.



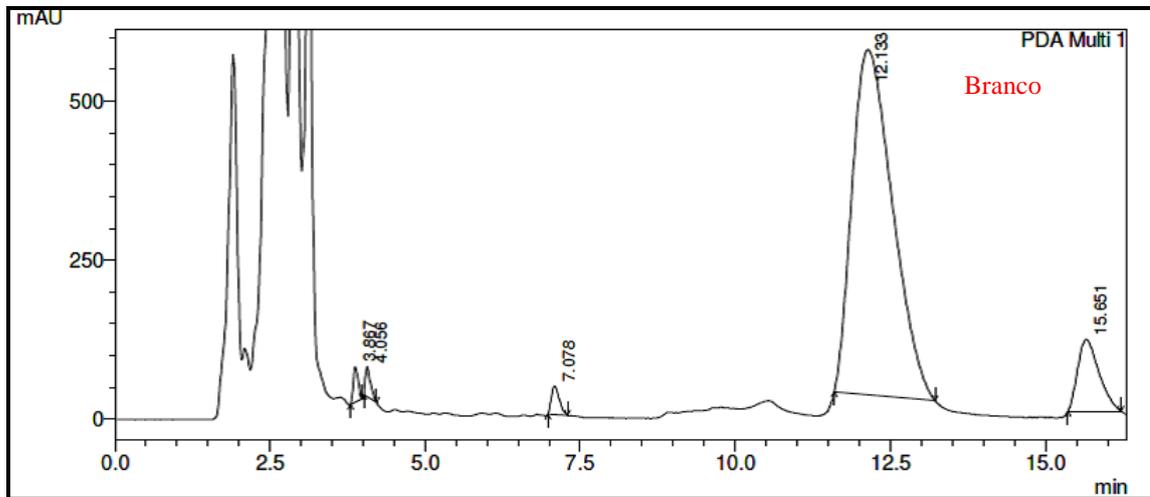
**ANEXO C - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO *N. RIBIS* EM COLUNA SEMI-
PREPARATIVA.**



**ANEXO D - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO *P. STROMATICUM*.**



ANEXO E - CROMATOGRAMA EM CLAE DO BRANCO DO FUNGO *P. STROMATICUM*.



**ANEXO F - CROMATOGRAMA EM CLAE DO EXTRATO DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO DC PELO FUNGO *P. STROMATICUM* EM COLUNA
SEMI-PREPARATIVA.**

