

FERNANDA DA CONCEIÇÃO MORAES

**SÍNTESE, CÁLCULO TEÓRICO E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA
TIROSINASE DE DERIVADOS DE ISOBENZOFURANONAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M827s
2018

Moraes, Fernanda da Conceição, 1987-
Síntese, cálculo teórico e avaliação da inibição da tirosinase
de derivados de isobenzofuranonas / Fernanda da Conceição
Moraes. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 233f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Elson Santiago de Alvarenga.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Lactonas - Síntese. 2. Isobenzofuranonas - Síntese.
3. Diels-Alder, Reação de. 4. Cálculo. 5. Tirosinase.
6. Pesticidas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 547.5

FERNANDA DA CONCEIÇÃO MORAES

**SÍNTESE, CÁLCULO TEÓRICO E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA
TIROSINASE DE DERIVADOS DE ISOBENZOFURANONAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

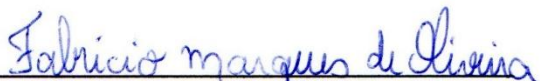
APROVADA: 25 de julho de 2018.



Antônio Jacinto Demuner
(Coorientador)



Vânia Maria Teixeira Carneiro



Fabrício Marques de Oliveira



Lidervan de Paula Melo



Elson Santiago de Alvarenga
(Orientador)

**Dedico a Deus, a meus pais João e Dôra, à
minha irmã Flávia, à eterna Nina e ao meu
marido Marlon, essenciais em minha vida**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me amparado em todos os momentos dessa jornada, me proporcionando saúde, sabedoria, paciência, fé e muita força, nunca permitindo que eu desistisse desse sonho.

Aos meus amados pais João e Dôra, e à minha amada irmã Flávia, por todos os ensinamentos de vida, pelas orações, pelo amor sem limites, por sempre acreditarem nos meus sonhos, pelo apoio, incentivo e pela dedicação incansável. Ao Leonardo, agradeço a torcida e incentivo.

Ao meu amado marido Marlon, pelo companheirismo, pelo amor e pela paciência. Ao Monteiro, Elza, Clóvis, Higor, Carla, Wesley e ao pequeno Miguel, obrigada pela força e pelo carinho.

Ao professor Elson por acreditar na minha capacidade e pelos ensinamentos. Aos professores da banca examinadora, Vânia, Demuner, Lidervan e Fabrício, agradeço a disponibilidade e as sugestões enriquecedoras. Ao professor Róbson pelo incentivo e exemplo.

Às minhas queridas amigas Simone, Milene e Milena e ao querido amigo Júnio, agradeço a dedicação, paciência, amizade, ajuda e por tudo que me ensinaram. Às minhas amigas/madrinhas Aline, Gabi, Hainy, Ana Cláudia, Patrícia, Lucinha e Rosinha, que mesmo distantes nunca deixaram de fazer parte da minha vida, me apoiando, me ouvindo e aconselhando. Aos meus queridos Vinícius e Fernanda, obrigada pela convivência e pelos conhecimentos trocados. Agradeço à Gabriela pela dedicação, boa vontade e execução dos testes biológicos.

Aos companheiros do LASA e dos outros laboratórios, obrigada pelo incentivo e companhia. Aos técnicos do Departamento de Química, Cristiane, José Luiz e Márcio pela aquisição dos espectros e pela disponibilidade. Agradeço aos amigos Ricardo e Vivi pelo bom humor, incentivo e por sempre me ouvirem no momento de desespero. À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química e ao Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA), pela oportunidade de realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS DE ISOBENZOFURANONAS QUIRAIS A PARTIR DO D-MANITOL	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.1.1. A necessidade da utilização de defensivos agrícolas no Brasil	1
1.1.2. Lactonas Bioativas	2
1.1.3. Ftalidas e derivados	3
1.1.4. Reações de Diels Alder na síntese de compostos bioativos	4
1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA PROPOSTA APRESENTADA	5
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
1.3.1. Técnicas experimentais	6
1.3.2. Técnicas espectroscópicas	6
1.3.3. Purificação e preparo de reagentes e solventes	7
1.3.3.1. Secagem do tolueno	7
1.3.3.2. Secagem da acetona	7
1.3.3.3. Secagem de diclorometano	7
1.3.3.4. Secagem do metanol	8
1.3.3.5. Tratamento de cloreto de zinco	8
1.3.4. Procedimentos sintéticos	8
1.3.4.1. Síntese do (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1,2-bis((<i>S</i>)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (1)	8
1.3.4.2. Síntese do (<i>S</i>)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldeído (2)	9
1.3.4.3. Síntese do ílideo de fósforo (3)	10
1.3.4.4. Síntese dos isômeros (<i>S</i>)-(Z)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (4) e (<i>S</i>)-(E)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (5)	11
1.3.4.5. Síntese da (<i>S</i>)-5-(hidroximetil)furan-2(5 <i>H</i>)-ona (6)	12
1.3.4.6. Síntese do Acetato de (<i>S</i>)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (7)	13

1.3.4.7. Síntese da Benzoato de (<i>S</i>)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (8)	14
1.3.4.8. Procedimento geral para a síntese dos cicloadutos com o ciclopentadieno.....	15
1.3.4.8.1. Dados referentes ao composto (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(hidroximetil)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (9a).....	17
1.3.4.8.2. Dados referentes ao composto (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(hidroximetil)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (9b) ...	17
1.3.4.8.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (10a)	18
1.3.4.8.4. Dados referentes ao composto Acetato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (10b).....	19
1.3.4.8.5. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (11a)	19
1.3.4.8.6. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (11b).....	20
1.3.4.9. Procedimento geral para a hidrogenação catalítica.....	21
1.3.4.9.1. Dados referentes ao composto (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(hidroximetil)hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (12).....	22
1.3.4.9.2. Dados referentes ao composto (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(hidroximetil)hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (13).....	23
1.3.4.9.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxooctahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (14)	24
1.3.4.9.4. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxooctahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (15)...	24
1.3.4.10. Procedimento geral para epoxidação	25
1.3.4.10.1. Dados referentes ao composto (1 <i>aR</i> ,2 <i>R</i> ,2 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>aS</i>)-5-(hidroximetil)hexahidro-2,6-metanooxireno[2,3- <i>f</i>]isobenzofuran-3(1 <i>aH</i>)-ona (16)	26
1.3.4.10.2. Dados referentes ao composto (1 <i>aS</i> ,2 <i>S</i> ,2 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,6 <i>aR</i>)-5-(hidroximetil)hexahidro-2,6-metanooxireno[2,3- <i>f</i>]isobenzofuran-3(1 <i>aH</i>)-ona (17)	27

1.3.4.10.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1 <i>aS</i> ,2 <i>S</i> ,2 <i>aS</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,6 <i>aR</i>)-5-oxooctahidro-2,6-metanooxireno[2,3- <i>f</i>]iso-benzofuran-3-il)metila (18).....	28
1.3.4.10.4. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1 <i>aS</i> ,2 <i>S</i> ,2 <i>aS</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,6 <i>aR</i>)-5-oxooctahidro-2,6-metanooxireno[2,3- <i>f</i>]iso-benzofuran-3-il)metila (19).....	29
1.3.4.11. Síntese de ((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-3-oxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexaidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metilmetanosulfonato (20)	29
1.3.4.12. Síntese de (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(azidometil)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (21)	30
1.3.4.13. Síntese de (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)-3-(bromometil)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (22)	31
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.4.1. Reações de Diels Alder entre o ciclopentadieno e as γ -lactonas α,β -insaturadas	33
1.4.1.1. Síntese dos dienófilos 6 , 7 e 8	33
1.4.1.2 Reação de Diels Alder entre o ciclopentadieno e os dienófilos 6-8	41
1.4.1.2.1. Elucidação estrutural dos adutos 10a e 10b da reação de Diels-Alder... 43	
1.4.1.3. Modificações Estruturais dos cicloadutos 9a , 9b , 10a e 11a	62
1.4.1.3.1. Reações de Hidrogenação	63
1.4.1.3.2. Reações de epoxidação	73
1.5. CONCLUSÃO	83
1.6. REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO, DE MASSAS E DE RMN DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	89
CAPÍTULO 2 - ATRIBUIÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA RELATIVA E ABSOLUTA DE DOIS NOVOS EPÓXIDOS UTILIZANDO CÁLCULOS DE RMN E DFT-GIAO.....	180
2.1. INTRODUÇÃO	180
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	181
2.2.1. Cálculo Teórico	181
2.2.1.1. Análise de DP4	182
2.2.1.2. Análise MEA	182
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	183

2.3.1. Identificação do Epóxido 16	185
2.3.2. Identificação do Epóxido 17	194
2.4. CONCLUSÃO	201
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202
2.6. ANEXO - Artigo original	206
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE DOS DERIVADOS DE IZOBENZOFURANONAS A PARTIR DO D-MANITOL	213
3.1. INTRODUÇÃO	213
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	216
3.2.1. Ensaios inibição da tirosinase de cogumelo	216
3.2.3 Cultivo da linhagem tumoral B16F10	218
3.2.4 Ensaios de viabilidade celular	218
3.2.5 Determinação do teor de melanina	219
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	219
3.3.1. Ensaios inibição da tirosinase de cogumelo	219
3.4. CONCLUSÃO	228
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	229

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AK	Ácido kójico
AMCPB	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
ddt	Duplo duplo tripleto
δ	Deslocamento químico
DA	Diels-Alder
DCM	Diclorometano
DFT	<i>Density functional theory</i>
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
eV	Elétron-volt
GIAO	<i>Gauge including atomic orbitals</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% da atividade enzimática
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
λ	Comprimento de onda
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
L-tirosina	L-4-hidroxifenilalanina
m	Multiplete
MEA	Média do erro absoluto

MM	Massa molar
MMFF	<i>Merk Molecular Force Field</i>
MMMC	Mínimo Múltiplo de Monte Carlo
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m/v	Massa/volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga dos fragmentos na EM
<i>NOESY</i>	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
s	Simpleto
SFB	Soro Fetal Bovino
t	Tripleto
T _f	Temperatura de fusão
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volume/volume

RESUMO

MORAES, Fernanda da Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Síntese, cálculo teórico e avaliação da inibição da tirosinase de derivados de isobenzofuranonas.** Orientador: Elson Santiago de Alvarenga. Coorientador: Antônio Jacinto Demuner.

Ftalidas e seus derivados são um grupo de metabólitos secundários que apresentam bioatividades variadas, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, inseticida, anticâncer, fitotóxica e fungicida. Uma subclasse de ftalidas que possui bioatividade inclui as tetraidroisobenzofuranonas. Considerando a potencial aplicação biológica dessa classe de compostos, novos derivados de isobenzofuranonas foram sintetizadas. A rota sintética escolhida para a síntese teve como material de partida a (S)-5-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (**6**) obtida em seis etapas a partir do D-manitol. A essa lactona (**6**) foram feitas reações com anidrido acético e cloreto de benzoíla, produzindo o acetato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (**7**) e o benzoato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (**8**), respectivamente. A reação de Diels Alder entre o ciclopentadieno e as γ -lactonas α,β -insaturadas (**6**, **7** e **8**) foi escolhida como a etapa chave para a obtenção dos derivados de isobenzofuranonas. Foram obtidos os adutos (3S,3aS,4R,7S,7aR)-3-(hidroximetil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-(3H)-ona (**9a**), (3S,3aS,4S,7R,7aR)-3-(hidroximetil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3H)-ona (**9b**), acetato de ((1S,3aR,4S,7R,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (**10a**), acetato de((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (**10b**), benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (**11a**) e benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (**11b**) com rendimentos acima de 82%. Nos adutos **9a**, **9b**, **10a** e **11a** foram realizadas reações de hidrogenação catalítica e epoxidação, sendo obtidos 8 adutos modificados com rendimentos que variaram de 65 a 98%. Além disso, modificações na hidroxila do composto **9a** também foram realizadas, obtendo-se os compostos ((1S,3aR,4S,7R,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexaidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metil-metanosulfonato (**20**), (3S,3aS,4R,7S,7aR)-3-(azidometil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3H)-ona (**21**) e

(3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(bromometil)-3*a*,4,7,7*a*-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**22**). Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectrometria de massas, espectroscopia no IV e de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C, além das técnicas de RMN bidimensionais: *COSY*, *NOESY*, *HSQC* e *HMBC*. Adicionalmente, cálculos computacionais (DFT) foram utilizados para a elucidação estrutural de dois dos novos epóxidos sintetizados, (1*aR*,2*R*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*S*,6*aS*)-5-(hidroximetil)hexa-hidro-2,6-metano-oxireno [2,3-*f*]isobenzofurano-3(1*aH*)-ona (**16**) e (1*aS*,2*S*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*R*,6*aR*)]-5-(hidroximetilo)hexa-hidro-2,6-metanooxireno[2,3-*f*]isobenzofurano-3(1*aH*)-ona (**17**). Além das análises dos espectros de RMN 2D, as atribuições das configurações relativas das estruturas dos epóxidos também foram inferidas a partir de informações obtidas por cálculos teóricos. Como consequência da síntese enantiosseletiva a partir de um poliol natural, as configurações absolutas dos epóxidos **16** e **17** também foram definidas. Por fim, para avaliar a atividade biológica, testes de inibição da enzima tirosinase utilizando os substratos *L*-tirosina e *L*-DOPA foram realizados com os 20 compostos sintetizados. Os compostos **8** e **11b** apresentaram porcentagens de inibição superior a 50% tanto para a *L*-tirosina quanto para a *L*-DOPA e para esses compostos foram determinados os valores de IC₅₀. O valor obtido para o composto **8** foi IC₅₀ = 4,23 µM e para o cicloaduto **11b** o valor obtido foi IC₅₀ = 4,03 µM, enquanto que ácido kójico (controle positivo) apresentou IC₅₀ = 6,45 µM. Testes de viabilidade celular realizados com células de melanoma B16F10 demonstraram que os compostos **8** e **11b** não possuem efeito citotóxico significativo nas concentrações avaliadas. Em seguida, foi avaliado o efeito inibitório dos compostos quanto ao teor de melanina nas células de melanoma B16F10. O composto **8** numa concentração de 50 µM diminuiu o teor de melanina em 23% enquanto que na concentração de 100 µM houve uma diminuição de 39%. Já a substância **11b** apresentou inibição no teor de melanina nas concentrações de 50 µM e 100 µM, com porcentagens inibitórias de 25% e 45%, respectivamente. Com isso, os compostos avaliados **8** e **11b** demonstraram ser promissores como agentes despigmentantes da pele, uma vez que apresentaram valores de IC₅₀ inferiores ao obtido para o ácido kójico, equilibraram baixa toxicidade e potente atividade inibitória do teor de melanina em células de melanoma B16F10.

ABSTRACT

MORAES, Fernanda da Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Synthesis, theoretical calculation and evaluation of the tyrosinase activity of isobenzofuranones.** Advisor: Elson Santiago de Alvarenga. Co-adviser: Antônio Jacinto Demuner.

Phthalides and their derivatives are a group of secondary metabolites that exhibit varied bioactivities, such as anti-inflammatory, antibacterial, insecticidal, anticancer, phytotoxic and fungicidal. A subclass of phthalides having bioactivity includes tetrahydroisobenzofuranones. Considering the potential biological application of this class of compounds, new isobenzofuranone derivatives have been synthesized. The synthetic route chosen for the synthesis was as a starting material (*S*)-5-(hydroxymethyl)furan-2(5*H*)-one (**6**) obtained in six steps from D-mannitol. Acetic anhydride and benzoyl chloride were reacted with lactone (**6**) to give (*S*)-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)methyl acetate (**7**) and (*S*)-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**8**), respectively. The Diels Alder reaction between the cyclopentadiene and α,β -unsaturated γ -lactones (**6**, **7** and **8**) was chosen as the key step for the preparation of the isobenzofuranone derivatives. The adducts were obtained (3*S*3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(hydroxymethyl)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-one (**9a**), (3*S*,3*aS*,4*S*,7*R*,7*aR*)-3-(hydroxymethyl)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-one (**9b**), ((1*S*,3*aR*,4*S*,7*R*,7*aS*)-3-oxo-1,3,3*a*,4,7,7*a*-hexahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1-yl)methyl acetate (**10a**), ((1*S*,3*aR*,4*R*,7*S*,7*aS*)-3-oxo-1,3,3*a*,4,7,7*a*-hexahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1-yl)methyl acetate (**10b**), ((1*S*,3*aR*,4*S*,7*R*,7*aS*)-3-oxo-1,3,3*a*,4,7,7*a*-hexahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1-yl)methyl benzoate (**11a**) and ((1*S*,3*aR*,4*R*,7*S*,7*aS*)-3-oxo-1,3,3*a*,4,7,7*a*-hexahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1-yl)methyl benzoate (**11b**) with yields above 82%. In the adducts **9a**, **9b**, **10a** and **11a** reactions of catalytic hydrogenation and epoxidation were carried out, and eight modified adducts were obtained in yields ranging from 65 to 98%. In addition, modifications to the hydroxyl of compound **9a** were also performed to give the (1*S*, 3*aR*, 4*S*, 7*R*, 7*aS*) -3-oxo-1,3,3*a*, 4,7,7*a*-hexahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1-yl)methylmethanesulfonate (**20**), (3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(azidomethyl)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-one (**21**)

and the (3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(Bromomethyl)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-one (**22**). The synthesized compounds were characterized by mass spectrometry, IR spectroscopy and ¹H NMR and ¹³C NMR, as well as two-dimensional NMR techniques: COSY, NOESY, HSQC and HMBC. In addition, computational calculations (DFT) were used for the structural elucidation of two of the new synthesized epoxides (1*aR*,2*R*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*S*,6*aS*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methano-oxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (**16**) and (1*aS*,2*S*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*R*,6*aR*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methano-oxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (**17**). In addition to the analyzes of the 2D NMR spectra, the attributions of the relative configurations of the structures of the epoxides were also inferred from information obtained by theoretical calculations. As a consequence of the enantioselective synthesis from a natural polyol, the absolute configurations of epoxides **16** and **17** were also defined. Finally, to evaluate the biological activity, test of inhibition of the enzyme tyrosinase using the substrates L-tyrosine and L-DOPA were performed with the 20 compounds synthesized. Compounds **8** and **11b** showed percentages of inhibition greater than 50% for both L-tyrosine and L-DOPA and for these compounds the IC₅₀ values. The value obtained for compound **8** was IC₅₀ = 4.23 μM and for cycloadduct **11b** the value obtained was IC₅₀ = 4.23 μM, whereas kojic acid (positive control) showed IC₅₀ = 6.45 μM. Cell viability tests performed with B16F10 melanoma cells demonstrated that compounds **8** and **11b** have no significant cytotoxic effect at the concentrations evaluated. Next, the inhibitory effect of the compounds on melanin content in B16F10 melanoma cells was evaluated. Compound **8** at a concentration of 50 μM decreased the melanin content by 23% while at the concentration of 100 μM there was a decrease of 39%. Substance **11b** showed inhibition of melanin content at concentrations of 50 μM and 100 μM, with inhibitory percentages of 25% and 45%, respectively. Thus, the evaluated compounds **8** and **11b** were shown to be promising as depigmenting agents of the skin, since they had lower IC₅₀ values than that obtained for kojic acid, low toxicity and potent inhibitory activity of melanin content in B16F10 melanoma cells.

CAPÍTULO 1

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS DE ISOBENZOFURANONAS QUIRAIS A PARTIR DO D-MANITOL

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. A necessidade da utilização de defensivos agrícolas no Brasil

Ao longo dos anos, a humanidade vem encontrando dificuldades na produção e no armazenamento de alimentos para a sua subsistência. A redução da produtividade de plantas cultivadas ocorre normalmente pela ação de pragas, doenças e competição com plantas daninhas. Com o passar do tempo, estes problemas adquiriram dimensões devastadoras, comprometendo as lavouras e tornando necessária a utilização de tecnologias para evitar os prejuízos à agricultura (BARBOSA *et al.*, 2004). A população mundial atingiu 7 bilhões de pessoas em 2010 com projeção para crescer 34%, ou seja, serão 9 bilhões de habitantes em 2050 (WIEBE, 2012). Um dos desafios a ser enfrentado no século 21 é o de produzir mais alimentos e fibras para suprir essa população crescente (TOMLIN, 2006).

No Brasil há uma grande oferta de terra arável e água, além de um clima favorável para o setor agrícola em praticamente todo o seu território. Com isso, o país tem mostrado um ótimo desempenho no agronegócio. Porém, esse bom desempenho não está ligado somente à disponibilidade de recursos naturais, mas também ao uso de tecnologias e manejo recomendados pela pesquisa e ao desenvolvimento de defensivos agrícolas que auxiliam no controle de pragas e doenças que acometem a agricultura. Diante disso, os defensivos agrícolas são essenciais para a melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos, fibras e vegetais (ANDEF, 2018).

Defensivos agrícolas são substâncias usadas com a finalidade de proteger as plantações, uma vez que elas são naturalmente atacadas por doenças, insetos nocivos, ácaros e plantas invasoras. Os defensivos são desenvolvidos de acordo com o seu objetivo no controle das variedades de pragas, podendo ser inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas,

nematicidas, formicidas e moluscicidas (ANDEF, 2018). O controle químico é uma forma usada para que haja produção de alimentos de forma eficiente e satisfatória. Porém, o uso indiscriminado e inadequado dos defensivos agrícolas pode acarretar sérios problemas como a contaminação do ecossistema, evolução e desenvolvimento de mecanismos de resistência aos pesticidas e pragas, além da morte de organismos não alvos (PIMENTEL e BURGESS, 2014). Com o intuito de reduzir os efeitos negativos do uso de pesticidas, a busca por princípios ativos mais eficientes, menos persistentes e menos tóxicos tem sido uma alternativa utilizada (SPARKS, 2013).

1.1.2. Lactonas Bioativas

De acordo com a IUPAC, lactonas são ésteres cíclicos de hidroxiácidos classificadas em α , β , γ , δ e ϵ -lactonas de acordo com a posição do grupo OH em relação ao grupo carboxila. As γ -lactonas saturadas geralmente são denominadas de butenolídeos ou butirolactonas. Os butenolídeos ou γ -crotonolactonas correspondem às γ -lactonas α,β ou β,γ - insaturadas como mostrado na Figura 1.

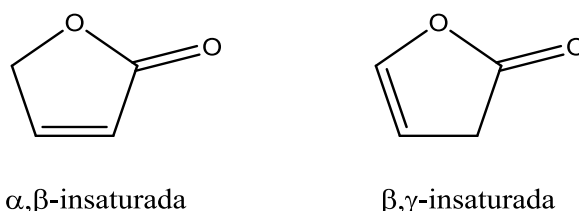


Figura 1: Estrutura química geral de lactonas α,β e β,γ -insaturadas.

As δ -lactonas α,β -insaturadas estão presentes em um vasto número de compostos isolados a partir de organismos marinhos e plantas e sua potencial atividade biológica pode estar diretamente relacionada à sua excelente propriedade aceptora de Michael (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As lactonas são parte de compostos mais populares da natureza e apresentam atividades biológicas de grande interesse como antitumoral (CHEN, *et al.*, 2013), fitotóxico (KUMAR *et al.*, 2013), inseticida (GUO *et al.*, 2013) e no tratamento da doença de Alzheimer (KUANG *et al.*, 2014) (Figura 2, p.3).

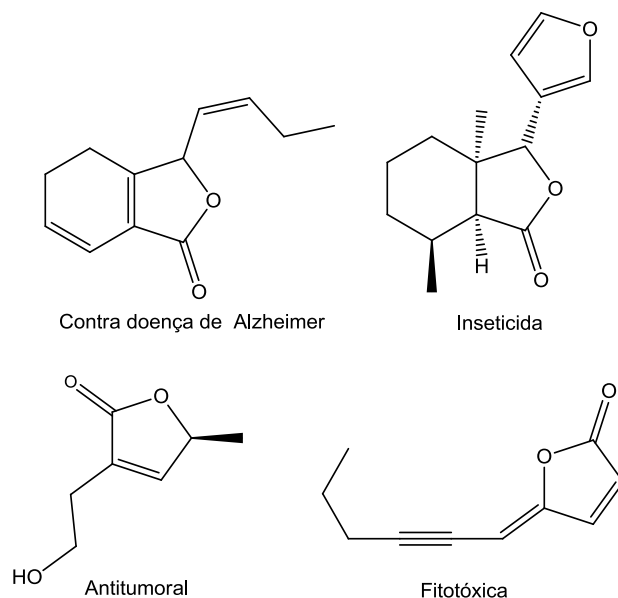


Figura 2: Exemplos de algumas lactonas bioativas.

As lactonas com anéis de cinco ou de seis membros são as mais estáveis e com isso as mais abundantes na natureza (SARDAN *et al.*, 2012).

1.1.3. Ftalidas e derivados

Compostos cíclicos contendo elementos diferentes de carbono, conhecidos como heterocíclicos, desempenham papel importante em diversas áreas do conhecimento científico. Dentre as diferentes classes de heterocíclicos, as ftalidas, também conhecidas como isobenzofuran-1(3*H*)-onas (I), são caracterizadas por um núcleo bicíclico derivado da fusão de um anel benzeno com um anel γ -lactônico (KARMAKAR *et al.*, 2014). Uma subclasse de ftalidas inclui as tetraidroisobenzofuran-1(3*H*)-ona (II) e hexaidroisobenzofuran-1(3*H*)-onas (III) (Figura 3).

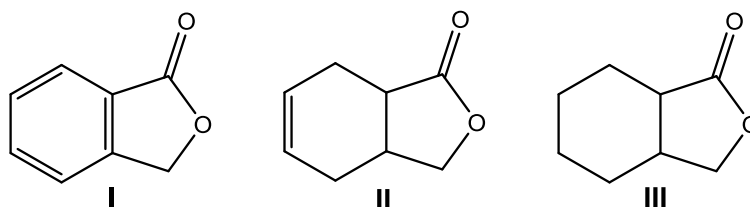


Figura 3: Estruturas da Isobenzofuran-1(3*H*)-ona (I), 3a,4,7,7a-tetraidroisobenzofuran-1(3*H*)-ona (II) e 3a,4,5,6,7,7a-hexaidroisobenzofuran-1(3*H*)-ona (III).

Vinte e uma lactonas derivadas da tetraidroisobenzofuran-1(3*H*)-onas e hexaidroisobenzofuran-1(3*H*)-onas foram sintetizadas por Olejniczak e colaboradores (2011) com posterior teste da sua atividade fungicida sobre o crescimento de *Aspergillus ochraceus* AM 456, de *Fusarium culmorum* AM 282, de *F. oxysporum* AM 13, de *F. tricinctum* AM 16 e de *Penicillium citrinum* AM 354. Os compostos **IV** e **V** (Figura 4) foram os mais ativos sobre o fungo *F. oxysporum* AM 13 apresentando valores de IC₅₀ de 30,1 e 72,2 µg/mL. De forma geral, os autores relataram que a introdução do grupo gem-dimetil (**VI** e **VII**) (Figura 4) no esqueleto da molécula proporcionou uma ligeira queda na atividade.

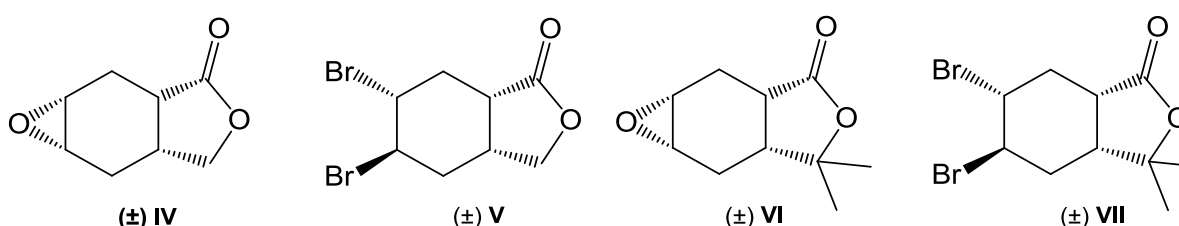


Figura 4: Ftalidas sintetizadas por Olejniczak e colaboradores.

Durante as últimas décadas, vários produtos naturais contendo ftalidas foram isolados e constatou-se que apresentam atividades biológicas importantes, sendo utilizadas em medicamentos anti-convulsivos, modulação da função cardíaca, proteção contra isquemia cerebral, etc (LIN *et al.*, 2005). Ftalidas funcionalizadas exibem propriedades medicinais importantes para a produção de fármacos, já que apresentam atividade antiparasitária (MISHRA *et al.*, 2014) e citotoxicidade contra linhagens celulares cancerígenas (LOGRADO *et al.*, 2010; MAIA *et al.*, 2016).

1.1.4. Reações de Diels Alder na síntese de compostos bioativos

Ftalidas e seus derivados são um grupo de metabólitos secundários que apresentam bioatividades variadas, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, inseticida, anticâncer, fitotóxica e fungicida (RESENDE *et al.*, 2015). Além de serem consideradas importantes intermediários sintéticos por apresentarem grande variedade de atividades biológicas, muitos métodos têm sido desenvolvidos para a síntese de ftalidas (YASMIN e RAY, 2013).

A reação de Diels Alder (DA) é uma ferramenta muito utilizada na síntese orgânica devido à possibilidade de formar duas ligações carbono-carbono, além de permitir construir em apenas uma etapa anéis de seis membros contendo até quatro estereocentros. Essa cicloadição é classificada como [4+2], onde 4 e 2 representam o número de elétrons π envolvidos no rearranjo eletrônico (FRINGUELLI e TATICCHI, 2002).

A cicloadição de DA é amplamente aplicada a reações em sínteses orgânicas por serem altamente regioseletivas e estereoespecíficas quando dienos e dienófilos assimétricos estão envolvidos. Uma grande vantagem da cicloadição de DA é a sua estereoquímica previsível. A configuração dos substituintes no dieno e no dienófilo é preservada no produto da cicloadição. Se dienos ou dienófilos cíclicos estão envolvidos na reação, um produto em ponte é formado que pode ser orientado *endo* ou *exo*. Na maioria dos casos, o produto *endo* é favorecido devido a interações secundárias dos orbitais. Por fim, a cicloadição pode ser enantiosseletiva com a utilização de catalisadores quirais (KURTI e CAZAKÓ, 2005).

Dentre as singularidades da reação de DA pode-se destacar a possibilidade de produzir moléculas orgânicas complexas com eventual interesse farmacológico e industrial. Dentro desse contexto, as γ -lactonas α,β -insaturadas podem atuar como excelentes dienófilos em reações de cicloadição com um dieno (BENMEDDAH *et al.*, 2007).

1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA PROPOSTA APRESENTADA

A busca por produtos naturais que possam ser usados como pesticidas naturais ou como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas têm sido consideradas estratégias promissoras (CANTRELL *et al.*, 2012; FAROOQ *et al.*, 2011).

Considerando as diversas atividades biológicas observadas em compostos contendo o anel γ -lactônico, além de atuarem como bons dienófilos e a versatilidade das reações de cicloadição [4+2], o presente trabalho teve como objetivo a síntese e μ modificação estrutural de derivados de isobenzofuranonas obtidos a partir da reação de Diels Alder das lactonas com o ciclopentadieno.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Técnicas experimentais

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas empregando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio (Polygram-UV₂₅₄ 0,20 mm Macherey – Nagel).

As placas de CCD, após serem observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), foram reveladas com solução aquosa de permanganato de potássio.

As separações cromatográficas em coluna foram feitas utilizando-se sílica-gel 60 como fase estacionária. As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

1.3.2. Técnicas espectroscópicas

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos por reflectância, com varredura espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , no espectrômetro VARIAN 660-IR equipado com acessório PIKE Gladi ATR (Departamento de Química - UFV).

As rotações óticas foram medidas a 22 °C no polarímetro digital Bellingham Stanley modelo ADP 220 usando faixa angular de -85° a 85° (Departamento de Química – UFMG).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos no aparelho Varian Mercury 300 MHz (Departamento de Química - UFV). Utilizou-se o clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e os espectros foram referenciados pelo sinal do padrão de referência interna tetrametilsilano (TMS) ($\delta = 0,00$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

A técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) foi conduzida em um espectrômetro de massa com cromatógrafo a gás Shimadzu QP5050A (Shimadzu, Japão) (Departamento de Química – UFV), usando uma coluna capilar de vidro (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm) DBI. Impacto de elétrons a 70 eV foi empregado para ionizar as moléculas

antes da fragmentação na câmara do espectrômetro de massa e os espectros de massas foram obtidos na faixa de m/z 40 - 340.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos através da utilização do espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo™ TQ-S acoplado ao sistema UPLC ACQUITY H-Class com fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP).

1.3.3. Purificação e preparo de reagentes e solventes

1.3.3.1. Secagem do tolueno

Em um béquer de 500 mL foram adicionados 300 mL de tolueno com 5 g de sulfato de magnésio. Em seguida, a mistura foi filtrada e o tolueno recolhido em um balão de 500 mL, onde posteriormente foram adicionados 3 g de hidreto de cálcio. O sistema foi refluxado por cinco horas. Em seguida, o tolueno foi destilado e armazenado sobre peneira molecular 4 Å em um frasco de vidro âmbar, sob atmosfera de nitrogênio (PERRIN e ARMAREGO, 1994).

1.3.3.2. Secagem da acetona

A acetona (600 mL) foi mantida sob refluxo na presença de carbonato de potássio anidro (40 g, 7% m/v) por 3 h. Posteriormente, o solvente foi destilado e armazenado em frascos contendo peneira molecular 3 Å tampados com septo de borracha. O carbonato de potássio anidro foi obtido através de secagem em mufla a 200 °C durante 6 horas.

1.3.3.3. Secagem de diclorometano

O diclorometano (DCM) (600 mL) foi mantido sob refluxo na presença de hidreto de cálcio (3 g, 0,5% m/v) por 3 h. Em seguida, o DCM foi destilado e armazenado em frascos contendo peneira molecular 3 Å tampados com septo de borracha.

1.3.3.4. Secagem do metanol

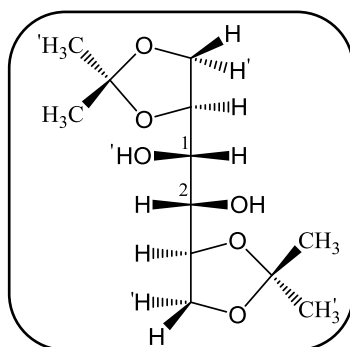
A um balão de 500 mL foram adicionados 2,5 g de magnésio, 0,25 g de iodo molecular e 50 mL de metanol anidro. O sistema foi refluxado durante uma hora. Após esse tempo, 250 mL de metanol foi adicionado ao balão, onde foi mantido sob refluxo por mais 2 horas. Posteriormente, o metanol anidro foi destilado e devidamente armazenado sobre peneira molecular 3 Å em um frasco de vidro âmbar devidamente vedado, sob atmosfera de nitrogênio (PERRIN e ARMAREGO, 1994).

1.3.3.5. Tratamento de cloreto de zinco

O cloreto de zinco comercial, muitas vezes contaminado com óxido de zinco, foi dissolvido em ácido clorídrico concentrado (1 mL por g de $ZnCl_2$) e a solução aquecida até total eliminação de vapor de água e de $HCl_{(g)}$. Em seguida, o $ZnCl_2$ foi transferido para um frasco apropriado e mantido em dessecador.

1.3.4. Procedimentos sintéticos

1.3.4.1. Síntese do (1S,2S)-1,2-bis((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (1)



A um balão de fundo redondo (500 mL) foram adicionados acetona anidra (250 mL) e cloreto de zinco (40 g; 294 mmol). Com o balão tampado, a mistura foi mantida sob agitação magnética por aproximadamente 30 minutos até total dissolução do sólido. Em seguida, foi acrescentado o D-manitol (20 g; 110

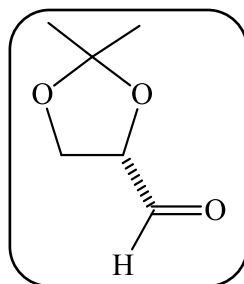
mmol) à mistura reacional, formando uma suspensão. Após 5 horas de agitação magnética, foi observado a formação de uma solução incolor que foi neutralizada com solução de carbonato de potássio (45 g; 326 mmol) em água (45 mL). O sólido formado (KCl e ZnCO₃) foi separado por filtração simples e lavado com 50 mL de acetona. O filtrado foi concentrado sob ar comprimido até início da cristalização. O éter dietílico (100 mL) foi acrescentado ao resíduo aquoso, sendo separado a fase orgânica da aquosa, e essa, extraída com éter dietílico (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secadas com MgSO₄ anidro e concentradas sob pressão reduzida, produzindo um sólido branco. Posteriormente, adicionou-se hexano (100 mL) a este resíduo, a mistura foi mantida em geladeira por 2 horas e filtrada sob vácuo sendo o sólido lavado com hexano (100 mL) previamente resfriado. O sólido foi seco sob ar comprimido, sendo obtido o (1*S*,2*S*)-1,2-bis((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (**1**) (23,3 g; 89 mmol) em 81% de rendimento, e pureza suficiente para ser utilizado na próxima etapa da síntese.

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,20 (hexano:éter dietílico 1:1 v/v).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,35 (s, 6H, CH₃'), 1,41 (s, 6H, CH₃), 2,68 (d, J_{3,OH} = 6,7 Hz, 2H, OH e OH'), 3,74 (m, 1H, H₃), 3,97 (dd, J_{1,2} = 5,4 Hz e J_{1,1'} = 8,3 Hz, 2H, H₁), 4,07 – 4,21 (m, 4H, H₁' e H₂).

1.3.4.2. Síntese do (*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldeído (**2**)



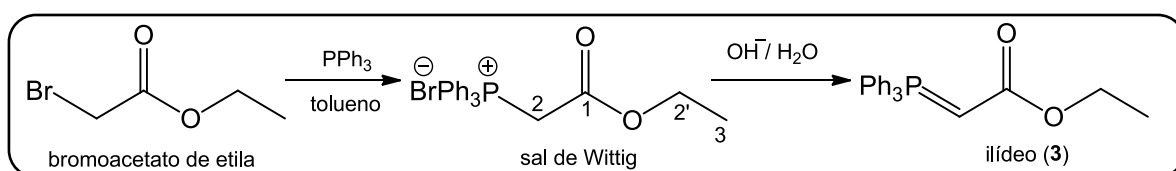
A um balão de 250 mL foi adicionado (1*S*,2*S*)-1,2-bis((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (**1**) (20 g; 76,3 mmol), DCM (110 mL) e 8,0 mL de solução saturada de NaHCO₃ (0,4 mL por g de diacetal). A mistura foi agitada por 5 min e colocada em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado o periodato de sódio (32,5 g; 152 mmol) e a mistura reacional foi mantida sob agitação em

banho de gelo por 3 h. Após esse período, foi adicionado 10 g de MgSO_4 (0,5 g por g de diacetil) mantendo a agitação por mais 20 min. A mistura foi filtrada e o sólido lavado com DCM (3 x 50 mL). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida sendo obtido o (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldeído (**2**) na forma de um óleo castanho impuro (12 g), utilizado diretamente na próxima etapa da rota sintética sem qualquer purificação.

Característica: óleo castanho.

CCD: $R_f = 0,25$ (hexano: acetato de etila 1:1).

1.3.4.3. Síntese do ilídeo de fósforo (**3**)



Esquema 1: Síntese do ilídeo **3** a partir do bromoacetato de etila.

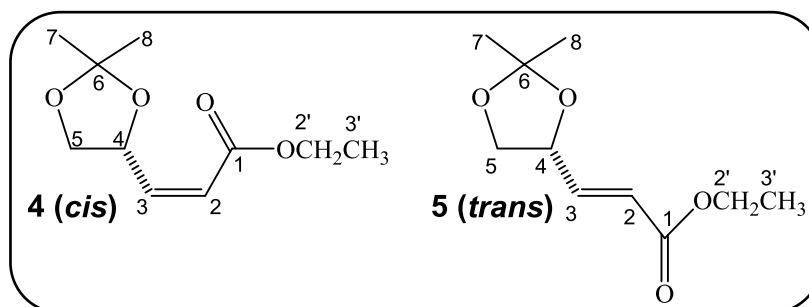
A um balão de 500 mL equipado com a montagem para refluxo, foi adicionada trifenilfosfina (31 g; 118 mmol) a uma solução de bromoacetato de etila (18 g; 108 mmol) em tolueno anidro (250 mL). Ao sistema contendo a mistura foi colocado um tubo de cloreto de cálcio e mantido sob agitação magnética por 16 h. O sólido branco formado foi filtrado sob vácuo, lavado com éter dietílico (100 mL) e mantido sob ar comprimido até sua secagem. Obteve-se o brometo de metoxicarbonil-etileno(trifenil)fosforano (70 g; 169 mmol) com rendimento de 91%. O sal de Wittig formado foi solubilizado em 400 mL de água destilada e foi adicionado lentamente uma solução de NaOH 2 mol/L (400 mL), sendo observado a formação de um precipitado amarelo que foi separado por filtração à vácuo em funil de vidro sinterizado. O sólido obtido foi dissolvido em DCM (150 mL), a solução foi seca com MgSO_4 e filtrada. O DCM foi evaporado sob pressão reduzida obtendo-se o metoxicarbonil-etileno(trifenil)fosforano (**3**) (52 g; 148 mmol) em 88% de rendimento global na forma de um sólido amarelado.

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,10$ (hexano: acetato de etila 1:1).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,98 (t, $J_{2',3'} = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 3,96 (q, $J_{3,2'} = 7,1$ Hz, 2H, CH_2'), 5,33 (d, $J_{\text{H-P}} = 13,8$ Hz, 2H, CH_2), 7,57 – 7,87 (m, 15H, PPh_3)

1.3.4.4. Síntese dos isômeros (S)-(Z)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**4**) e (S)-(E)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**5**)



A um balão de 250 mL foram adicionados 12 g de (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldeído (**2**) solubilizado em 60 mL de metanol. A mistura foi mantida sob banho de gelo e constante agitação, sendo adicionado lentamente o metoxicarboniletileno(trifenil)fosforano (**3**) (23 g; 65,7 mmol). Para o cálculo da quantidade de ilídeo, considerou-se 50% de rendimento para a reação de clivagem do diacetal. A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho de gelo por 6 horas e o término da reação foi acompanhado por CCD (solução reveladora de KMnO_4). O metanol foi evaporado e o resíduo extraído a quente com hexano: éter dietílico 7:3 (5 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida e em seguida, purificadas por cromatografia em coluna (hexano: acetato 15:1). Foram obtidos, na forma de óleo castanho claro, os isômeros (S)-(Z)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**4**) e (S)-(E)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**5**) (6,80 g e 0,85 g, respectivamente).

Dados referentes ao composto **4** (*cis*):

Característica: óleo castanho claro.

CCD: $R_f = 0,70$ (hexano:éter dietílico 4:1 v/v).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,28 (t, $J_{3',2'} = 7,1$ Hz, 3H, $\text{H}_{3'}$), 1,38 (s, 3H, H_7), 1,44 (s, 3H, H_8), 3,61 (t, $J_{5,4} = 8,1$ Hz, e $J_{5,5'} = 6,8$ Hz, 1H, H_5), 4,16 (q, $J_{2',3'} = 7,1$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$), 4,37 (dd, $J_{5',5} = 6,8$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 5,44 – 5,54 (m, 1H, H_4),

5,83 (dd, $J_{2,3} = 11,6$ Hz e $J_{2,4} = 1,7$ Hz, 1H, H2), 6,34 (dd, $J_{3,2} = 11,6$ Hz e $J_{3,4} = 6,7$ Hz, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (C3'), 25,4 (C7), 26,5 (C8), 60,4 (C2'), 69,4 (C4), 73,5 (C5), 109,7 (C6), 120,8 (C2), 149,1 (C3), 165,6 (C1).

Dados referentes ao composto **5** (*trans*):

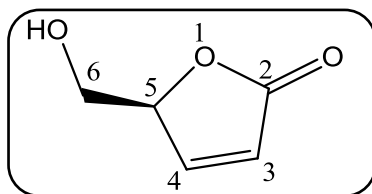
Característica: óleo castanho claro.

CCD: $R_f = 0,50$ (hexano:éter dietílico 4:1 v/v).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,27 (t, $J_{3',2'} = 7,1$ Hz, 3H, H3'), 1,39 (s, 3H, H7), 1,43 (s, 3H, H8), 3,66 (dd, $J_{5,4} = 8,3$ Hz, e $J_{5,5'} = 7,0$ Hz, 1H, H5), 4,13 – 4,23 (m, 3H, H2', H5'), 4,65 (dd, $J_{4,3} = 5,6$ Hz e $J_{4,2} = 1,4$ Hz, 1H, H4), 6,08 (dd, $J_{2,3} = 15,6$ Hz e $J_{2,4} = 1,4$ Hz, 1H, H2), 6,86 (dd, $J_{3,2} = 15,6$ Hz e $J_{3,4} = 5,6$ Hz, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (C3'), 25,7 (C7), 26,4 (C8), 60,5 (C2'), 68,8 (C4), 74,9 (C5), 110,1 (C6), 122,4 (C2), 144,6 (C3), 166,0 (C1).

1.3.4.5. Síntese da (*S*)-5-(hidroximetil)furan-2(5*H*)-ona (**6**)



A um balão de 100 mL foi adicionado 25 gotas de uma solução metanólica de H_2SO_4 20% (v/v) à uma solução de 6,0 g do (*S*)-(*Z*)-4,5-*oisopropilidenopent-2-enoato* de etila (**4**) (30,0 mmol) em 40 mL de metanol, sob agitação magnética e banho de gelo. O término da reação foi determinado por CCD. Em seguida, foi adicionado 25 gotas de solução metanólica de KOH 2 mol/L e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. Éter dietílico (60 mL) foi adicionado à mistura reacional, a fase orgânica foi secada com MgSO_4 e o éter foi evaporado. O resíduo foi submetido à cromatografia em coluna (acetato de etila) sendo obtido a da (*S*)-5-(hidroximetil)furan-2(5*H*)-ona (**6**) (2,6 g; 22,8 mmol) como um sólido branco em 75% de rendimento.

Característica: sólido branco.

$T_f = 39,5\text{-}41\text{ }^\circ\text{C}$ (literatura: $43\text{ }^\circ\text{C}$) (ORTUNO *et al.*, 1986).

CCD: $R_f = 0,52$ (acetato de etila).

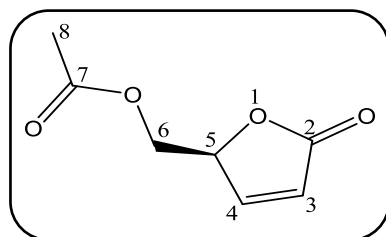
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 3389, 3103, 2941, 1715, 1422, 1333, 1108, 1047, 948, 828, 717, 620, 514.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,73 (s, 1H, OH), 3,79 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 12,3$ Hz e $J_{6,5} = 5,1$ Hz, H6), 4,00 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 12,3$ Hz e $J_{6',5} = 3,8$ Hz, H6'), 5,15 (dddd, 1H, $J_{5,6} = 5,1$ Hz, $J_{5,6'} = 3,8$ Hz, $J_{5,4} = 1,6$ Hz e $J_{5,3} = 2,1$ Hz, H5), 6,21 (dd, $J_{3,4} = 5,8$ Hz e $J_{3,5} = 2,1$, H3), 7,48 (dd, 1H, $J_{4,3} = 5,8$ Hz e $J_{4,5} = 1,6$ Hz, H4).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 62,5 (C6), 83,9 (C5), 123,1 (C3), 153,3 (C4), 172,9 (C2).

EM, m/z (%): 84 (100), 55 (56).

1.3.4.6. Síntese do Acetato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (7)



A um balão de 100 mL foi adicionado (S)-5-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (**6**) (0,50 g; 4,40 mmol) em 30 mL de diclorometano. A mistura reacional foi deixada sob agitação e em banho de gelo até completa dissolução do material de partida. Posteriormente, anidrido acético (0,66 mL; 7,00 mmol) e DMAP (0,185 g, 1,50 mmol) previamente dissolvido em 5,00 mL de DCM foram adicionados ao meio reacional. Após 1 hora de reação, 30,0 mL de água destilada foi adicionado à solução resultante e foi extraído com diclorometano (2 x 30,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secadas e concentradas, obtendo-se um óleo marrom. O óleo foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano/acetato de etila 2:1 v/v), resultando na obtenção do acetato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (**7**) em 95% de rendimento (0,65 g; 4,10 mmol).

Característica: óleo amarelado.

CCD: $R_f = 0,28$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

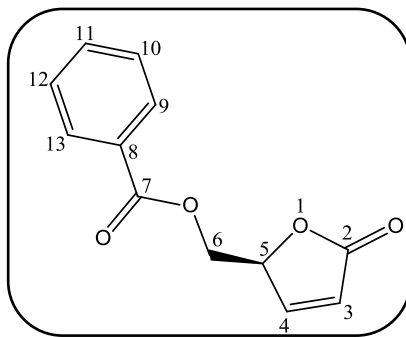
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3094, 2922, 1748, 1710, 1582, 1453, 1262, 1093, 930, 817, 713, 675, 488.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,05 (s, 3H, CH_3), 4,39 – 4,25 (m, 2H, H6, H6'), 5,19 – 5,25 (m, 1H, H5), 6,20 (dd, $J_{3,4} = 5,8$ Hz e $J_{3,5} = 2,2$ Hz, 1H, H3), 7,43 (dd, $J_{4,3} = 5,8$ Hz e $J_{4,5} = 1,4$ Hz, 1H, H4).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,5 (C8), 62,5 (C6), 80,7 (C5), 123,3 (C3), 152,3 (C4), 170,5 (C7), 172,2 (C2).

EM, m/z (%): 126 (13), 96 (12), 83 (21), 68 (19), 55 (84), 54 (100), 53 (59), 51 (55), 50 (77).

1.3.4.7. Síntese da Benzoato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (8)



A um balão de 100 mL foi adicionado (S)-5-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (6) (0,50g, 4,40 mmol) em 30 mL de diclorometano. A mistura reacional foi deixada sob agitação e em banho de gelo até completa dissolução do material de partida. Posteriormente, cloreto de benzoíla (0,82 mL, 7,00 mmol) e DMAP (0,185 g; 1,50 mmol) previamente dissolvido em 5,00 mL de DCM foram adicionados no meio reacional. Após o período de 45 minutos, 30,0 mL de água destilada foi adicionada à solução resultante e foi feita a extração com diclorometano (2 x 30,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secadas e concentradas, obtendo-se um óleo marrom. O óleo foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano/acetato de etila 2:1 v/v), resultando na obtenção do benzoato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (8) em 92% de rendimento (0,88 g; 4,00 mmol).

Característica: sólido branco.

T_f: 92,5 – 94,0 °C (literatura: 94,5 °C) (GOSH *et al.*, 2004).

CCD: R_f = 0,48 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3509, 3098, 2924, 1793, 1367, 1160, 1114, 1044, 956, 816, 675, 510.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,62 (d, $J_{6,5} = J_{6',5} = 4,3$ Hz, 2H, H6 e H6'), 5,37 (ddt, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 4,3$ Hz, $J_{5,4} = 1,6$ Hz e $J_{5,3} = 2,1$ Hz, 1H, H5), 6,24 (dd, $J_{3,4} = 5,8$ Hz e $J_{3,5} = 2,1$ Hz, 1H, H3), 7,41 – 7,48 (m, 1H, H10 e H12), 7,52 (dd, $J_{4,3} = 5,8$ Hz e $J_{4,5} = 1,6$ Hz, 1H, H4), 7,56 – 7,62 (m, 1H, H11), 8,00 (dd, $J_{9,10} = J_{13,12} = 8,5$ Hz e $J_{9,11} = J_{13,11} = 1,6$ Hz, 2H, H9 e H13).

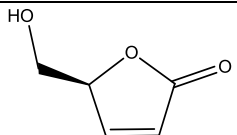
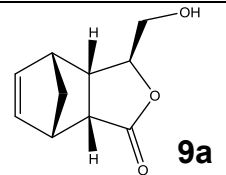
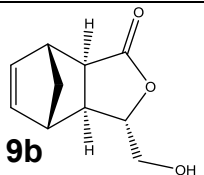
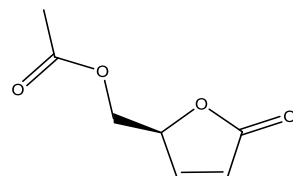
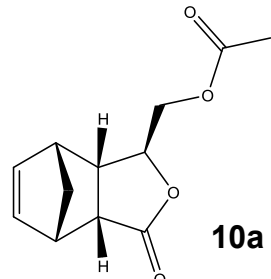
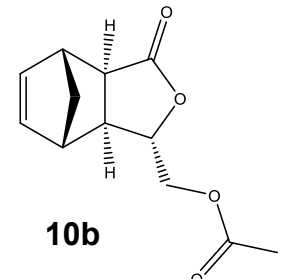
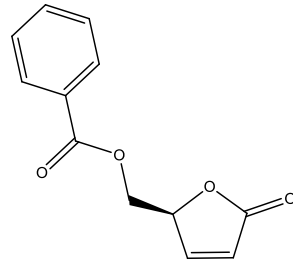
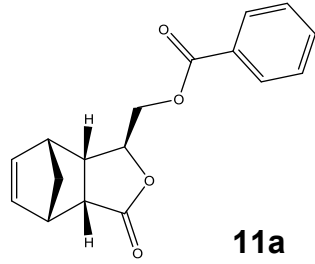
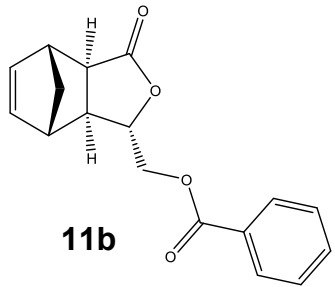
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 62,8 (C6), 80,9 (C5), 123,4 (C3), 128,5 (C10 e C12), 129,0 (C8), 129,7 (C9 e C13), 133,5 (C11), 152,3 (C4), 166,0 (C7), 172,2 (C2).

EM, m/z (%): 105 (57), 83 (26), 77 (69), 55 (70), 51 (100), 49 (83).

1.3.4.8. Procedimento geral para a síntese dos cicloadutos com o ciclopentadieno

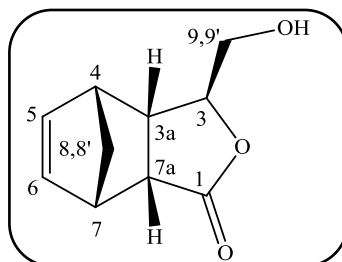
A um tubo selado foi adicionado (S)-5-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (**6**), acetato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (**7**) ou benzoato de (S)-(5-oxo-2,5-diidrofuran-2-il)metila (**8**) e o ciclopentadieno previamente destilado, nas condições conforme apresentadas na Tabela 1. A mistura reacional foi mantida a uma temperatura de 100 °C e sob agitação magnética. Após esse período, o excesso de ciclopentadieno foi removido sob pressão reduzida e o material bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila, obtendo-se os cicloadutos *endo* e *exo* (Tabela 1).

Tabela 1: Dados referentes ao preparo dos cicloadutos **9a-b**, **10a-b** e **11a-b**.

Dienófilo (mg; mmol)	Ciclopentadieno (mL; mmol)	Tempo reacional (h)	Hex: AcOEt ^a (v/v)	Massa e Rendimento ^b (mg; %)	Cicloadutos (%) ^c	
					Anti-endo	Anti-exo
 6 (500,0; 4,40)	3,70; 43,00	20	1:1	648,0; 82	 9a 80	 9b 20
 7 (500,0; 3,20)	2,70; 31,70	16	3:1	640,3; 90	 10a 85	 10b 15
 8 (750,0; 3,40)	2,90; 34,40	14	4:1	889,0; 91	 11a 75	 11b 25

^a Eluente utilizado durante as purificações em coluna. ^b Somatório dos rendimentos dos produtos após purificação por cromatografia em coluna. ^c Determinado por CG/EM.

1.3.4.8.1. Dados referentes ao composto (3S,3aS,4R,7S,7aR)-3-(hidroximetil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzo-furan-1(3H)-ona (9a)



Característica: sólido branco.

T_f: 94,5 – 96,0 °C (literatura: 96,0 – 97,0 °C) (BATLLORI *et al.*, 1989).

CCD: R_f = 0,29 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

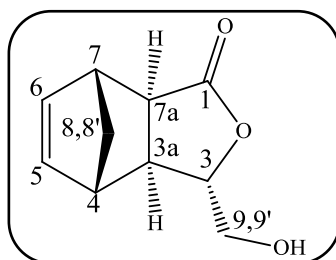
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3440, 2972, 2939, 2882, 1725, 1402, 1351, 1191, 1011, 986, 745, 622, 538.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,43 (d, $J_{8',8} = 8,4$ Hz, 1H, H8'), 1,62 (d, $J_{8,8'} = 8,4$ Hz, 1H, H8), 2,87 – 2,82 (m, 1H, H3a), 3,01 (s, 1H, OH), 3,03 – 3,12 (m, 1H, H4), 3,23 – 3,30 (m, 2H, H7a e H7), 3,59 (dd, $J_{9',9} = 11,9$ Hz e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9'), 3,76 (dd, $J_{9,9'} = 11,9$ Hz e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9), 3,96 – 4,02 (m, 1H, H3), 6,18 – 6,31 (m, 1H, H5 e H6).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 42,6 (C3a), 45,5 (C4), 45,7 (C7), 48,7 (C7a), 51,7 (C8), 64,6 (C9), 83,0 (C3), 134,7 (C5), 136,6 (C6), 178,3 (C1).

EM, m/z (%): 115 (7), 91 (23), 66(100), 65 (54), 51 (33).

1.3.4.8.2. Dados referentes ao composto (3S,3aS,4S,7R,7aR)-3-(hidroximetil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzo-furan-1(3H)-ona (9b)



Característica: sólido branco.

T_f: 106,5 – 108,0 °C. (literatura: 108 °C) (BATLLORI *et al.*, 1989).

CCD: R_f = 0,44 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

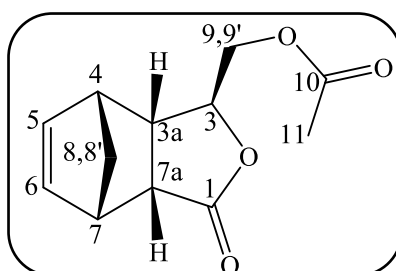
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 3440, 2972, 2939, 2882, 1725, 1402, 1350, 1212, 1045, 1011, 741, 618.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,44 – 1,56 (m, 2H, H8 e H8'), 2,32 – 2,38 (m, 1H, H3a), 2,68 (d, $J_{7a,3a} = 8,3$ Hz, 1H, H7a), 2,77 (s, 1H, OH), 2,91 (s, 1H, H4), 3,24 (s, 1H, H7), 3,66 (dd, $J_{9',9} = 12,3$ Hz e $J_{9',3} = 4,5$ Hz, 1H, H9'), 3,83 (dd, $J_{9,9'} = 12,3$ e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9), 4,22 (dd, $J_{3,9'} = 4,5$ e $J_{3,9} = 3,0$ Hz, 1H, H3), 6,13 – 6,24 (m, 2H, H5 e H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 43,6 (C8), 44,2 (C3a), 46,5 (C7), 47,5 (C4), 48,9 (C7a), 64,8 (C9), 84,2 (C3), 137,4 (C6), 137,6 (C5), 177,8 (C1).

EM, m/z (%): 149 (5), 115 (12), 91 (17), 83 (12), 66 (100), 65 (42), 51 (26).

1.3.4.8.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1S,3aR,4S,7R,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzo-furan-1-il)metila (10a)



Característica: óleo amarelado.

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

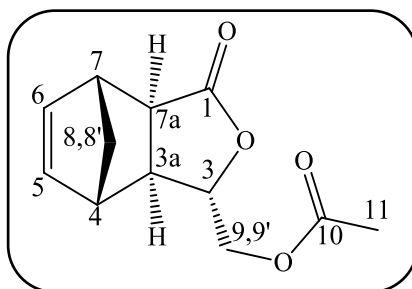
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 2946, 1737, 1454, 1371, 1214, 1174, 1029, 972, 738.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,43 – 1,44 (m, 1H, H8'), 1,63 – 1,64 (m, 1H, H8), 2,06 (s, 3H, CH_3), 2,82 – 2,84 (m, 1H, H3a), 3,10 – 3,16 (m, 1H, H4), 3,27 – 3,29 (m, 1H, H7a), 3,32 – 3,34 (m, 1H, H7), 4,07 – 4,24 (m, 3H, H3, H9, H9'), 6,24 (dd, $J_{5,6} = 5,8$ Hz e $J_{5,4} = 2,9$ Hz, 1H, H5), 6,30 (dd, $J_{6,5} = 5,8$ Hz e $J_{6,7} = 2,8$ Hz, 1H, H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,7 (C11), 43,1 (C3a), 45,6 (C7), 45,8 (C4), 48,2 (C7a), 51,6 (C8), 65,9 (C9), 79,2 (C3), 134,4 (C5), 137,0 (C6), 170,5 (C10), 177,2 (C1).

EM, m/z (%): 97 (16), 91 (13), 66 (100), 65 (28), 51 (13).

1.3.4.8.4. Dados referentes ao composto Acetato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzo-furan-1-il)metila (10b)



Característica: óleo amarelado.

CCD: $R_f = 0,52$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

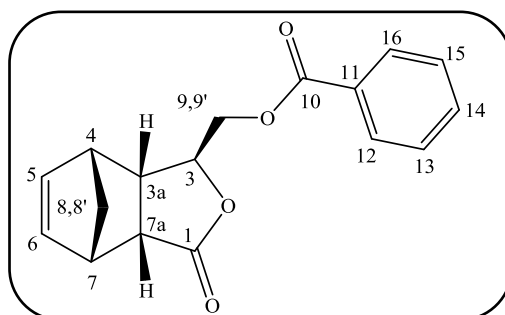
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 2961, 2890, 1751, 1733, 1437, 1373, 1281, 1031, 956, 725, 610, 491.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,46 – 1,52 (m, 1H, H8'), 1,55 – 1,56 (m, 1H, H8), 2,07 (s, 3H, CH_3), 2,24 – 2,30 (m, 1H, H3a), 2,69 – 2,70 (m, 1H, H7a), 2,93 – 2,94 (m, 1H, H4), 3,27 – 3,29 (m, 1H, H7), 4,15 (dd, $J_{9,9'} = 12,0$ Hz e $J_{9',3} = 4,9$ Hz, 1H, H9'), 4,26 (dd, $J_{9,9'} = 12,0$ Hz e $J_{9,3} = 3,2$ Hz, 1H, H9), 4,35 – 4,37 (m, 1H, H3), 6,18 (dd, $J_{6,5} = 5,7$ Hz e $J_{6,7} = 3,0$ Hz, 1H, H5), 6,24 (dd, $J_{5,6} = 5,7$ Hz e $J_{5,4} = 3,0$ Hz, 1H, H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,6 (C11), 43,4 (C8), 44,7 (C3a), 46,4 (C7), 47,5 (C4), 48,5 (C7a), 65,8 (C9), 80,5 (C3), 137,5 (C5 e C6), 170,5 (C10), 176,7 (C1).

EM m/z (%): 97 (19), 91 (18), 66 (100), 65 (28), 51 (13).

1.3.4.8.5. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (11a)



Característica: sólido branco.

T_f : 110 -111,5 °C.

CCD: $R_f = 0,31$ (hexano:acetato de etila 4:1 v/v).

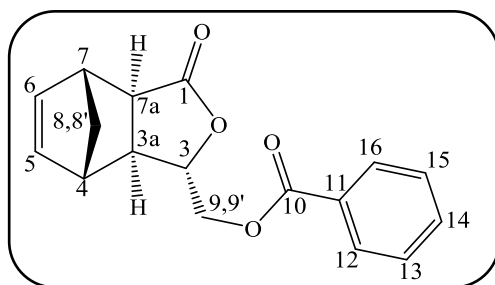
IV ($\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 2986, 2876, 1746, 1713, 1445, 1369, 1270, 1174, 1115, 1023, 960, 713, 499.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,45 – 1,48 (m, 1H, H8'), 1,65 – 1,68 (m, 1H, H8), 2,91 – 2,99 (m, 1H, H3a), 3,17 – 3,19 (m, 1H, H4), 3,32 – 3,38 (m, 2H, H7 e H7a), 4,27 – 4,29 (m, 1H, H3), 4,38 – 4,51 (m, 2H, H9 e H9'), 6,28 – 6,30 (m, 1H, H5), 6,32 – 6,37 (m, 1H, H6), 7,44 – 7,47 (m, 2H, H13 e H15), 7,55 – 7,62 (m, 1H, H14), 8,00 – 8,20 (m, 2H, H12 e H16).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 43,2 (C3a), 45,8 (C7), 45,9 (C4), 48,4 (C7a), 51,7 (C8), 66,3 (C9), 79,5 (C3), 128,6 (C13 e C15), 129,7 (C11, C12 e C16), 133,4 (C14), 134,4 (C5), 137,0 (C6), 166,1 (C10), 177,3 (C1).

EM m/z (%): 122 (55), 105 (69), 96 (41), 77 (65), 66 (100), 65 (64), 50 (41).

1.3.4.8.6. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (11b)



Característica: sólido branco.

T_f: 115- 116,8 °C.

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano:acetato de etila 4:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3070, 2977, 2831, 2551, 1752, 1711, 1681, 1584, 1452, 1274, 1176, 1119, 930, 705, 670, 550.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,50 – 1,62 (m, 2H, H8 e H8'), 2,37 – 2,39 (m, 1H, H3a), 2,73 – 2,78 (m, 1H, H7a), 2,97 – 3,04 (m, 1H, H7), 3,27 – 3,35 (m, 1H, H4), 4,48 – 4,50 (m, 3H, H3, H9 e H9'), 6,18 (dd, $J_{6,5} = 5,7$ Hz e $J_{6,7} = 3,0$ Hz, 1H, H6), 6,24 (dd, $J_{5,6} = 5,7$ Hz e $J_{5,4} = 3,0$ Hz, 1H, H5), 7,40 – 7,52 (m, 2H, H13 e H14), 7,53 – 7,65 (m, 1H, H15), 7,99 – 8,11 (m, 1H, H16), 8,12 – 8,19 (m, 1H, H12).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 43,5 (C8), 44,9 (C7a), 46,6 (C4), 47,7 (C7), 48,7 (C3a), 66,3 (C9), 80,8 (C3), 128,5 (C13), 128,6 (C15), 129,3 (C11),

129,7(C12), 130,2 (C16), 133,4 (C14), 133,7 (C5), 137,7 (C6), 166,1 (C10), 177,0 (C1).

EM *m/z* (%): 122 (65), 105 (100), 77 (84), 66 (23).

1.3.4.9. Procedimento geral para a hidrogenação catalítica

A um balão de fundo redondo (100 mL) contendo solução do cicloaduto **9a** em 10 mL de etanol foi adicionado 0,006 g do catalisador Pd/C sob atmosfera de H₂ e a reação foi mantida sob agitação magnética. Posteriormente, a solução foi filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato de etila 1:1 obtendo-se o cicloaduto hidrogenado. O mesmo procedimento foi usado para a hidrogenação dos cicloadutos **9b**, **10a** e **11a**. Na Tabela 2 são apresentadas as quantidades necessárias de cada cicloaduto e os rendimentos obtidos de cada reação.

Tabela 2: Dados referentes ao preparo dos cicloadutos hidrogenados.

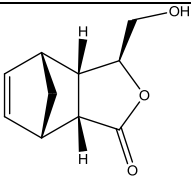
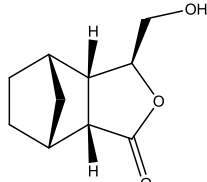
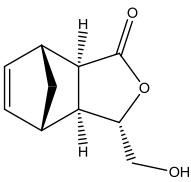
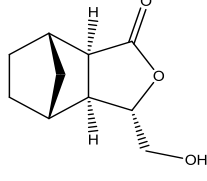
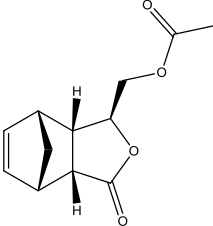
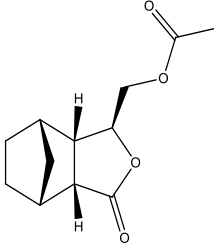
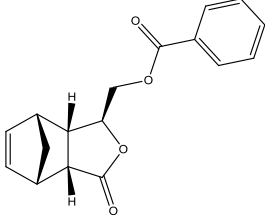
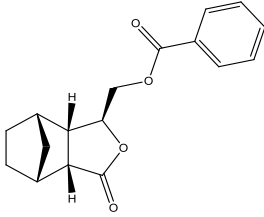
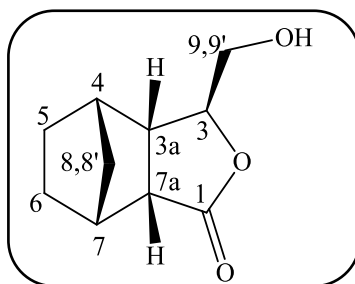
Aduto (mg; mmol)	Tempo (h)	Hex:AcOEt ^a (v/v)	Rendimento (mg; %)	Produto
 9a (100,0; 0,55)	6	1:2	96,0; 96	 12
 9b (50; 0,28)	4	1:2	49,5; 98	 13

Tabela 2: Continuação...

Aduto (mg; mmol)	Tempo (h)	Hex:AcOEt ^a (v/v)	Rendimento (mg; %)	Produto
 10a (100; 0,45)	5	1:1	95,8; 95	 14
 11a (100; 0,35)	5	2:1	95,6; 95	 15

^a Eluente utilizado durante as purificações em coluna.

1.3.4.9.1. Dados referentes ao composto (3*S*,3*aS*,4*S*,7*R*,7*aR*)-3-(hidroximetil)hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3*H*)-ona (12)



Característica: sólido branco.

T_f: 92,0 – 93,7 °C.

CCD: R_f = 0,29 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 2960, 2885, 1762, 1738, 1456, 1374, 1220, 1165, 1028, 908, 805, 595.

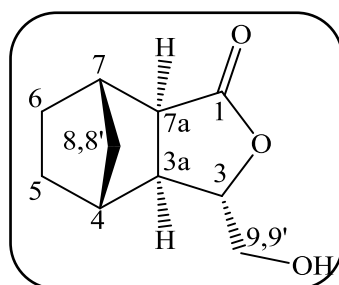
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,38 – 1,58 (m, 7H, OH, H5, H5', H6, H6', H8 e H8'), 2,33 – 2,39 (m, 1H; H4), 2,56 – 2,69 (m, 2H, H3a e H7), 3,00 (dd, $J_{7a,3a}$

= 11,2 e $J_{7a,7} = 5,7$ Hz, 1H; H7a), 3,57 (dd, $J_{9',9} = 12,2$ Hz e $J_{9',3} = 4,1$ Hz, 1H, H9'), 3,82 (dd, $J_{9,9'} = 12,1$ Hz e $J_{9,3} = 2,9$ Hz, 1H, H9), 4,42 – 4,47 (m, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,2 (C6), 25,2 (C5), 39,6 (C7), 40,0 (C4), 41,6 (C8), 44,6 (C7a), 47,9 (C3a), 65,1 (C9), 80,7 (C3), 179,1 (C1).

EM m/z (%): 151(81), 123 (7), 91 (24), 79 (45), 67 (100), 53 (61).

1.3.4.9.2. Dados referentes ao composto (3S,3aS,4R,7S,7aR)-3-(hidroximetil)hexahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3H)-ona (13)



Característica: sólido branco.

T_f: 96,4 – 98,3 °C.

CCD: R_f = 0,44 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

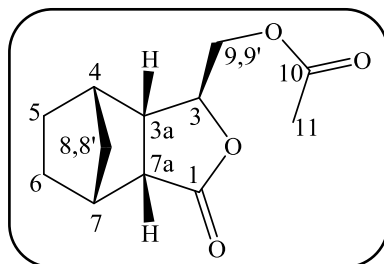
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3426, 2953, 2875, 1737, 1458, 1357, 1182, 1025, 856, 606.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,16 – 1,38 (m, 4H, OH, H5, H6 e H6'), 1,48 – 1,64 (m, 2H, H5 e H8), 2,22 – 2,30 (m, 2H, H4 e H8), 2,58 – 2,62 (m, 3H, H3a, H7 e H7a), 3,60 (dd, $J_{9',9} = 12,3$ Hz e $J_{9',3} = 4,6$ Hz, 1H, H9'), 3,80 (dd, $J_{9,9'} = 12,3$ Hz e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9), 4,14 (m, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 27,3 (C6), 27,8 (C5), 33,9 (C8), 40,6 (C7), 42,0 (C4), 44,2 (C3a), 49,4 (C7a), 64,6 (C9), 85,3 (C3), 179,4 (C1).

EM m/z (%): 151(77), 123 (22), 91 (22), 81 (53), 67 (100), 53 (42).

1.3.4.9.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxooctahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (14)



Característica: óleo amarelado.

CCD: Rf = 0,41 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

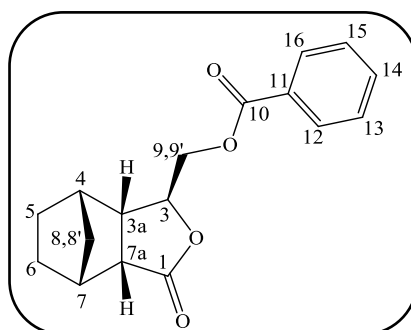
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 2965, 2925, 1721, 1459, 1352, 1192, 1057, 916, 801, 610, 470.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,47 – 1,57 (m, 6H, H6, H6', H5, H5', H8 e H8'), 2,06 (s, 3H, H11), 2,00 – 2,41 (m, 1H, H4), 2,57 – 2,63 (m, 1H, H3a), 2,65 – 2,67 (m, 1H, H7), 3,00 – 3,25 (m, 1H, 7a), 4,09 (dd, $J_{9',9} = 12,0$ Hz e $J_{9',3} = 4,4$ Hz, 1H, H9'), 4,24 (dd, $J_{9,9'} = 12,0$ Hz e $J_{9,3} = 3,1$ Hz, 1H, H9), 4,54 – 4,59 (m, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,7 (C11); 22,0 (C6); 25,2 (C5); 39,6 (C3a); 40,0 (C4); 41,6 (C8); 45,0 (C7a); 47,4 (C7); 66,4 (C9); 77,0 (C3); 170,5 (C10); 177,8 (C1).

EM m/z (%): 151 (95), 91 (32), 81 (43), 67 (100), 66 (62), 65 (42), 53 (43).

1.3.4.9.4. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxooctahidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metila (15)



Característica: sólido branco.

T_f: 95,2 97,0 °C.

CCD: Rf = 0,31 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3061, 2959, 2882, 1749, 1715, 1465, 1278, 1167, 1091, 800, 717, 515.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,49 – 1,63 (m, 6H, H8, H6, H6', H5, H5' e H8'), 2,38 – 2,49 (m, 1H, H4), 2,63 – 2,74 (m, 2H, H3a e H7), 3,00 – 3,18 (m, 1H, H7a), 4,48 – 4,50 (m, 2H, H9 e H9'), 4,74 – 4,75 (m, 1H, H3), 7,40 – 7,50 (m, 2H, H13 e H15) 7,5 – 7,6 (m, 1H, H14) 7,94 – 8,00 (m, 2H, H12 e H16).

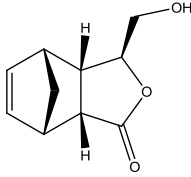
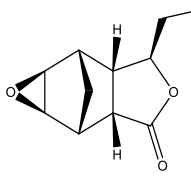
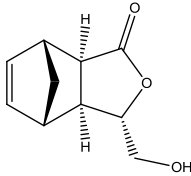
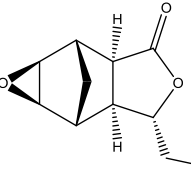
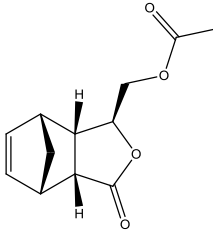
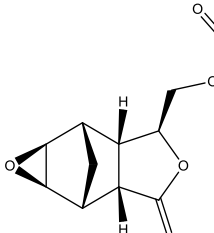
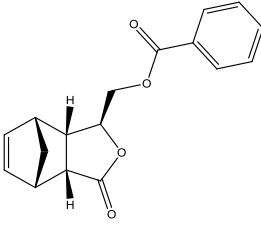
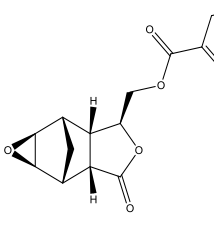
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1 (C6), 25,3 (C5), 39,7 (C7), 40,1 (C4), 41,5 (C8), 45,1 (C7a), 47,6 (C3a), 66,8 (C9), 77,3 (C3), 128,5 (C13 e C15), 12,3 (C11), 129,6 (C12 e C16), 134,1 (C14), 166,1 (C10), 177,9 (C1).

EM m/z (%): 151 (44), 105 (74), 77 (100), 67 (62), 51 (60).

1.3.4.10. Procedimento geral para epoxidação

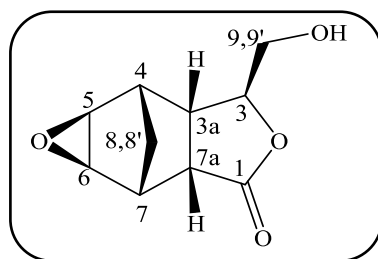
A um tubo selado foram adicionados o cicloaduto **9a** e o ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB) (1,5 eq) dissolvido em diclorometano (10 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação a 50 °C até que todo material fosse consumido. Subsequentemente, 10 mL de solução aquosa de Na_2SO_3 a 20% (v/v) foi adicionado à reação e extraído com diclorometano (3 x 10 mL). Os extratos orgânicos foram combinados. A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de Na_2CO_3 a 10% (v/v) (2 x 10 mL) e secada com MgSO_4 anidro. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. O mesmo procedimento foi usado para a epoxidação dos cicloadutos **9b**, **10a** e **11a**. Na Tabela 3 são apresentadas as quantidades necessárias de cada cicloaduto, do ácido *m*-cloroperbenzóico e os rendimentos obtidos de cada reação.

Tabela 3: Dados referentes ao preparo dos cicloadutos epoxidados.

Aduto (mg; mmol)	AMCPB (mg; mmol)	Tempo (h)	Hex:AcOEt ^a (v/v)	Rendimento (mg; %)	Produto
 9a (100,0; 0,55)	144,0; 0,83	4	1:1	70,8; 65%	 16
 9b (50,0; 0,28)	72,0; 0,42	4	1:1	47,9; 88%	 17
 10a (100,0; 0,45)	116,5; 0,67	5	1:2	87,9 ;82%	 18
 11a (100,0; 0,35)	91,0; 0,53	6	1:2	83,4; 79%	 19

^a Eluente utilizado durante as purificações em coluna.

1.3.4.10.1. Dados referentes ao composto (1aR,2R,2aR,5S,5aS,6S,6aS)-5-(hidroximetil)hexahidro-2,6-metanooxireno[2,3-f]isobenzofuran-3(1aH)-ona (16)



Característica: sólido branco.

$[\alpha]_D = -18,87$.

T_f : 87,2 – 87,7 °C.

CCD: $R_f = 0,29$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

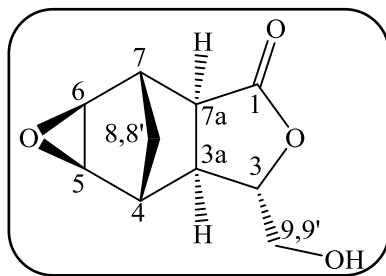
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 3466, 3319, 2981, 2163, 1737, 1455, 1353, 1180, 1012, 968, 842, 642, 510.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,91 (m, $J_{8',4} = 0,6$ Hz, $J_{8',7} = 0,9$ Hz e $J_{8',8} = 10,2$ Hz, 1H, H8'), 1,51 (dt, $J_{8,7} = 1,8$ Hz e $J_{8,8'} = 10,2$, 1H, H8), 2,70 (m, 1H, H4), 2,79 (ddd, $J_{3a,4} = 3,0$ Hz, $J_{3a,3} = 4,5$ Hz e $J_{3a,7a} = 10,2$ Hz, 1H, H3a), 2,89 (m, 1H, H7), 3,11 (dd, $J_{7a,7} = 5,4$ Hz e $J_{7a,7} = 10,1$ Hz, 1H, H7a), 3,26 (m, 1H, H5), 3,29 (m, 1H, H6), 3,56 (dd, $J_{9,9'} = 12,3$ Hz e $J_{9,3} = 3,9$ Hz, 1H, H9'), 3,81 (1H, dd, $J_{9,9'} = 12,2$ Hz e $J_{9,3} = 2,7$ Hz, H 9), 4,50 (1H, ddd, $J_{3,9} = 2,7$ Hz, $J_{3,9'} = 3,9$ Hz e $J_{3,3a} = 6,3$ Hz, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 28,9 (C8), 39,0 (C7); 39,5 (C4), 43,8 (C3a), 46,6 (C7a), 47,6 (C5), 48,5 (C6), 64,7 (C9), 79,7 (C3), 177,1 (C1).

EM, m/z (%): 165 (32), 105 (11), 91 (24), 83 (26), 82 (61), 81 (100), 80 (10), 79 (64), 77 (36), 66 (12), 55 (23), 54 (19), 53 (31), 51 (18), 41 (31), 40 (10).

1.3.4.10.2. Dados referentes ao composto (1aS,2S,2aR,5S,5aS,6R,6aR)-5-(hidroximetil)hexahidro-2,6-metanooxireno[2,3-f]isobenzofuran-3(1aH)-ona (17)



Característica: sólido branco.

$[\alpha]_D = -1,94$.

T_f : 98,8 – 100,2 °C.

CCD: $R_f = 0,52$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

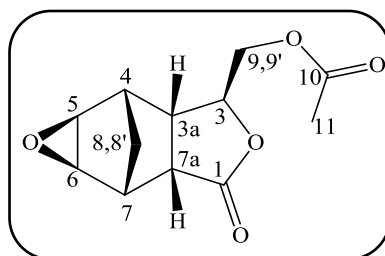
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 3412, 3038, 2956, 2885, 2161, 1730, 1458, 1366, 1295, 1196, 1002, 909, 844, 789, 552, 478.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,87 (d, $J_{8,8'} = 11,4$ Hz, 1H, H8'), 1,40 (d, $J_{8,8} = 11,1$ Hz, 1H, H8), 2,44 (dd, $J_{7a,3a} = 8,1$ Hz, 1H, H3a), 2,56 (m, 1H, H4), 2,71 (d, $J_{7a,7} = 8,2$ Hz, 2H, H7a e OH), 2,88 (m, 1H, H7), 3,16 (m, 1H, H5), 3,23 (m, 1H, H6), 3,63 (dd, $J_{9,9'} = 12,3$ Hz e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9'), 3,85 (dd, $J_{9,9'} = 12,3$ Hz e $J_{9,3} = 3,0$ Hz, 1H, H9), 4,21 (q, $J_{3,7a} = 2,2$ Hz e $J_{3,9} = J_{3,9'} = 3,0$ Hz, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,8 (C8), 41,5 (C3a), 41,6 (C7), 42,5 (C4), 47,0 (C7a), 50,5 (C5), 50,8 (C6), 64,1 (C9), 84,0 (C3), 177,5 (C8).

EM m/z (%): 165 (32), 105 (11), 91 (24), 83 (26), 82 (61), 81 (100), 80 (10), 79 (64), 77 (36), 67(10), 66 (12), 65 (12), 55 (23), 54 (19), 53 (31), 51 (18), 41 (31), 40 (10).

1.3.4.10.3. Dados referentes ao composto Acetato de ((1aS,2S,2aS,3S,5aR,6R,6aR)-5-oxooctahidro-2,6-metanooxireno[2,3-f]isobenzofuran-3-il)metila (18)



Característica: sólido branco.

T_f: 102,0 – 103,9 °C.

CCD: R_f = 0,34 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

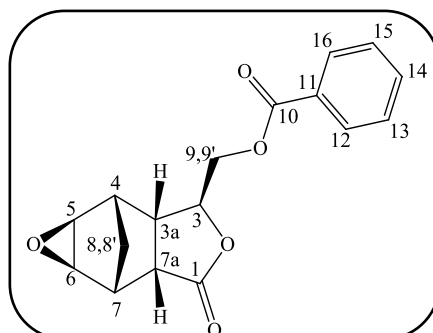
IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 2961, 1763, 1736, 1373, 1222, 1171, 1030, 964, 846, 538.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,92 - 0,97 (m, 1H, H8'); 1,56 – 1,62 (m, 1H, H8); 2,08 (s, 3H, H11); 2,68 – 2,77 (m, 2H, H3a e H4); 2,95 – 2,98 (m, 1H, H7); 3,13 (dd, $J_{7a,3a} = 9,7$ Hz, $J_{7a,7} = 5,2$ Hz, 1H, H7a); 3,30 – 3,34 (m, 2H, H5 e H6); 4,11 (dd, $J_{9,9'} = 12,0$ Hz e $J_{9,3} = 4,4$ Hz, 1H, H9'); 4,25 (dd, $J_{9,9'} = 12,0$ Hz e $J_{9,3} = 3,3$ Hz, 1H, H9); 4,63 – 4,67 (m, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,7 (C11); 29,1 (C8); 39,2 (C7); 39,8 (C4); 44,3 (C3a); 46,2 (C7a); 47,3 (C5); 48,4 (C6); 66,1 (C9); 76,2 (C3); 170,4 (C10); 175,7 (C1).

EM m/z (%): 165 (10), 91 (20), 81 (100), 79 (42), 77 (43), 53 (41), 51 (32).

1.3.4.10.4. Dados referentes ao composto Benzoato de ((1a*S*,2*S*,2a*S*,3*S*,5a*R*,6*R*,6a*R*)-5-oxooctahidro-2,6-metanooxireno[2,3-*f*]iso-benzofuran-3-il)metila (19)



Característica: sólido branco.

Tf: 105,1 – 107,5 °C.

CCD: Rf = 0,40 (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

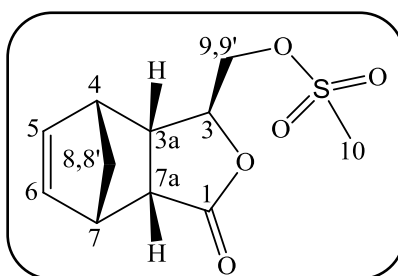
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 2963, 1763, 1737, 1710, 1454, 1372, 1222, 1172, 1030, 946, 909, 846, 613, 534.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,91 – 0,97 (m, 1H, H8'), 1,57- 1,58 (m, 1H, H8), 2,76 – 2,84 (m, 2H, H4 e H7), 2,95 – 2,99 (m, 1H, H3a), 3,16 - 3,17 (m, 1H, H7a), 3,35 (s, 2H, H5 e H6), 4,44 – 4,45 (m, 1H, H9 e H9'), 4,76 – 4,78 (m, 1H, H3), 7,42 – 7,49 (m, 2H, H13 e H15), 7,55 – 7,62 (m, 1H, H14), 7,95 – 8,01 (m, 2H, H12 e H16).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,6(C11), 29,1 (C8), 39,2 (C5), 39,7 (C6), 44,3(C4), 46,13 (C7), 47,3 (C3a), 48,3 (C7a), 66,1 (C9), 76,2 (C3), 170,4 (C10), 175,71 (C1)

EM, m/z (%): 105 (100), 81 (43), 77 (66), 51 (43).

1.3.4.11. Síntese de ((1*S*,3a*R*,4*S*,7*R*,7a*S*)-3-oxo-1,3,3a,4,7,7a-hexaidro-4,7-metanoisobenzofuran-1-il)metilmetanosulfonato (20)



A um balão de fundo redondo bitubulado (25 mL) sob agitação magnética, atmosfera de nitrogênio e temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado o aduto **9a** (150 mg; 0,83 mmol) solubilizado em diclorometano anidro (5 mL), cloreto de mesila (115 μL ; 1,30 mmol) e trietilamina (110 μL ; 0,83 mmol). Após 30 minutos, o meio reacional foi aquecido até temperatura ambiente permanecendo sob agitação magnética por 12 horas. Após o consumo do material de partida, que foi acompanhado por CCD, a reação foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, sendo obtido o composto **20** como um sólido branco em 96% de rendimento (205 mg; 0,80 mmol).

Característica: sólido branco.

Tf: 90,8 – 91,3 $^{\circ}\text{C}$.

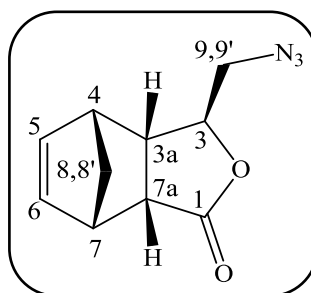
CCD: $R_f = 0,50$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3010, 2878, 1740, 1349, 1218, 1164, 964, 816, 730, 530.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,48 (d, $J_{8',8} = 8,7$ Hz, 1H, H8'), 1,67 (d, $J_{8,8'} = 8,7$ Hz, 1H, H8), 2,92 – 3,00 (m, 1H, H3a), 3,04 (s, 3H, H10), 3,14 – 3,19 (m, 1H, H4), 3,31 – 3,36 (m, 1H, H7), 4,12 – 4,18 (m, 1H, H7a), 4,24 – 4,34 (m, 2H, H9 e H9'), 5,28 – 5,31 (m, 2H, H3), 6,24 – 6,35 (m, 2H, H5 e H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 37,7 (C10), 42,9 (C3a), 45,7 (C4), 45,8 (C7), 48,2 (C7a), 51,7 (C8), 70,4 (C9), 78,6 (C3), 134,3 (C5), 137,2 (C6), 176,8 (C1).

1.3.4.12. Síntese de (3S,3aS,4R,7S,7aR)-3-(azidometil)-3a,4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3H)-ona (**21**)



A um balão de fundo redondo (25 mL) foi adicionado o aduto **20** (60 mg; 0,23 mmol) solubilizado em dimetilformamida (2 mL) e azida de sódio (100 mg; 1,54 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 5 dias. Terminado a reação, esta foi dissolvida em diclorometano e transferida para um funil de separação. A reação foi lavada com água (3 x 15 mL) e a fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um óleo amarelo como material bruto da reação. O óleo foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano/acetato de etila 1:1 v/v), resultando na obtenção do (3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(azidometil)-3*a*,4,7,7*a*-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**21**) em 87% de rendimento (41,5 mg; 0,20 mmol).

Característica: sólido amarelo claro.

Tf: 89,7 – 90,5 °C.

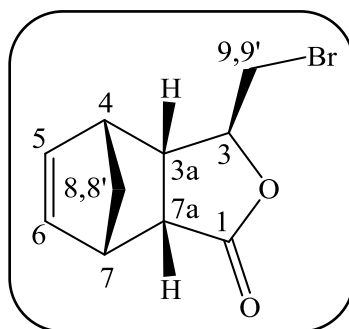
CCD: $R_f = 0,53$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{m\acute{a}x}/\text{cm}^{-1}$): 2963, 2104, 1754, 1470, 1172, 969, 819, 541.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,46 (d, $J_{8',8} = 8,7$ Hz, 1H, H8'), 1,66 (d, $J_{8,8'} = 8,7$ Hz, 1H, H8), 2,83 – 2,91 (m, 1H, H3a), 3,09 – 2,14 (m, 1H, H4), 3,29 – 3,35 (m, 2H, H7 e H7a), 3,44 (dd, $J_{9',9} = 12,9$ Hz e $J_{9',3} = 4,3$ Hz, 1H, H9'), 3,54 (dd, $J_{9,9'} = 12,9$ Hz e $J_{9,3} = 4,1$ Hz, 1H, H9), 4,05 (dd, $J_{3,9'} = 4,3$ Hz e $J_{3,9} = 4,2$ Hz, 1H, H3), 6,21 – 6,35 (m, 2H, H5 e H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 44,1 (C3a), 45,6 (C4), 45,9 (C7), 48,4 (C7a), 51,8 (C8), 55,0 (C9), 79,9 (C3), 134,4 (C5), 137,1 (C6), 177,0 (C1).

1.3.4.13. Síntese de (3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(bromometil)-3*a*,4,7,7*a*-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**22**)



A um balão de fundo redondo (25 mL) foi adicionado o aduto **20** (60 mg, 0,23 mmol) solubilizado em dimetilformamida (2 mL) e brometo de sódio (100 mg, 0,97 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 5 dias. Terminado a reação, esta foi dissolvida em diclorometano e transferida para um funil de separação. A reação foi lavada com água (3 x 15 mL) e a fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um óleo castanho escuro como material bruto da reação. O óleo foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano/acetato de etila 1:1 v/v), resultando na obtenção do (3*S*,3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-3-(bromometil)-3*a*,4,7,7*a*-tetraidro-4,7-metanoisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**22**) em 79% de rendimento (44,6 g, 0,18 mmol).

Característica: sólido branco.

Tf: 88,4 – 89,1 °C.

CCD: $R_f = 0,60$ (hexano:acetato de etila 1:1 v/v).

IV ($\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3477, 2941, 1740, 1440, 1350, 1243, 1190, 1003, 908, 805, 760, 622.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,48 (d, $J_{8',8} = 8,7$ Hz, 1H, H8'), 1,67 (d, $J_{8,8'} = 8,7$ Hz, 1H, H8), 2,94 – 3,01 (m, 1H, H3a), 3,13 – 3,18 (m, 1H, H4), 3,31 – 3,36 (m, 2H, H7a e H7), 3,44 – 3,55 (m, 2H, H9 e H9'), 4,11 – 4,16 (m, 1H, H3), 6,23 – 6,35 (m, 2H, H5 e H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 35,8 (C3a), 45,6 (C4), 46,0 (C7), 46,1 (C7a), 48,7 (C8), 51,8 (C9), 79,8 (C3), 134,7 (C5), 137,2 (C6), 177,0 (C1).

EM, m/z (%): 95 (18), 93 (20), 91 (21), 66 (100), 65 (34), 51 (28).

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

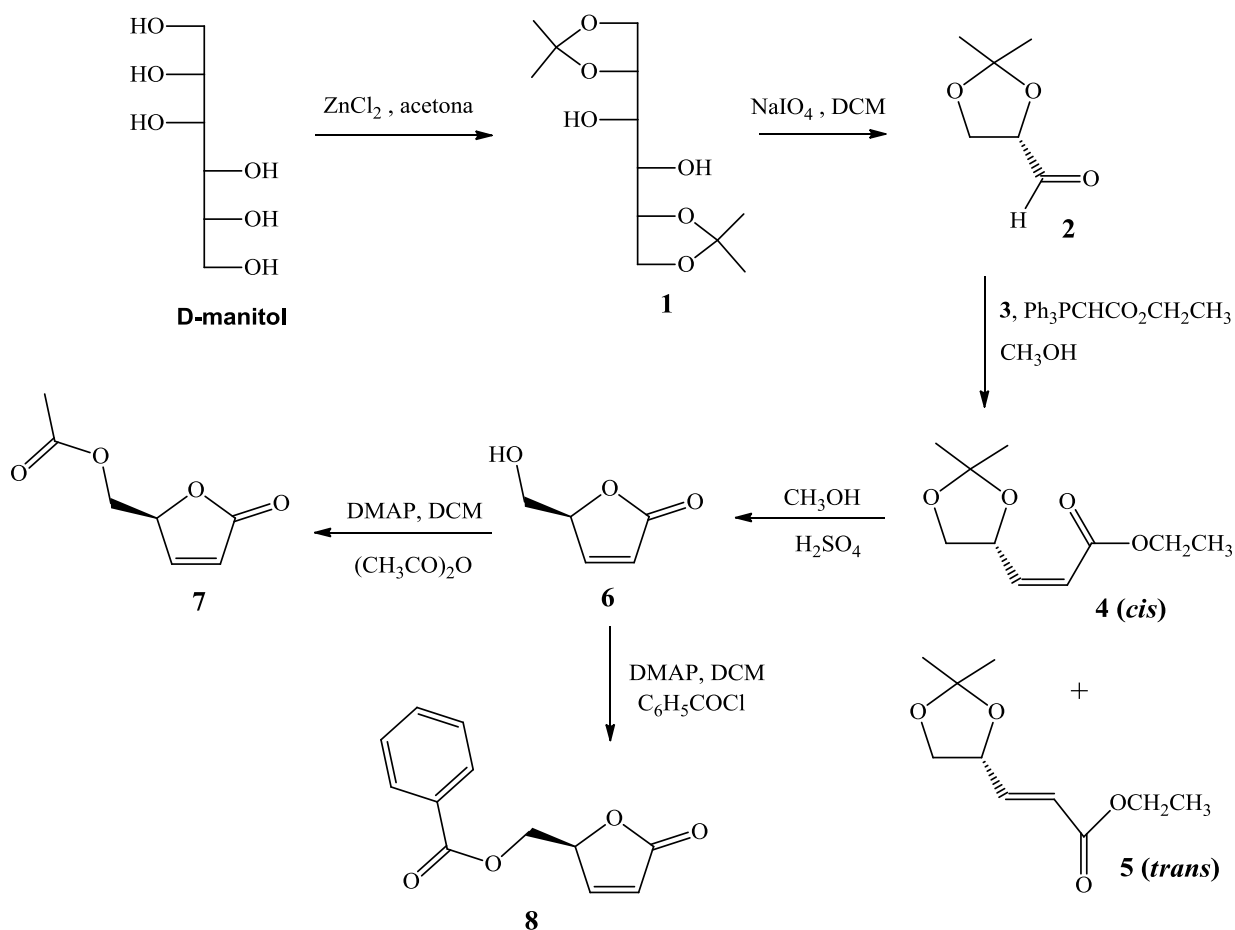
1.4.1. Reações de Diels Alder entre o ciclopentadieno e as γ -lactonas α,β -insaturadas

1.4.1.1. Síntese dos dienófilos **6**, **7** e **8**

Como estratégia inicial para a síntese dos dienófilos **6**, **7** e **8**, utilizou-se o D-manitol como material de partida, como mostrado no Esquema 2 (p. 34).

Para a síntese do 1,2:5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol (**1**) com 81% de rendimento, empregou-se procedimento modificado de Baer (Baer, 1945; Alvarenga et al., 2006). Para isto, utilizou-se acetona anidra como solvente e cloreto de zinco como catalisador da reação.

Inicialmente, o $ZnCl_2$ foi dissolvido em acetona anidra formando uma solução incolor. A esta mistura adicionou-se o D-manitol, o que resultou na formação de uma suspensão. Ao decorrer da reação, o sólido em suspensão dissolveu-se, indicando, assim, a formação do (1S,2S)-1,2-bis((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (**1**), que é solúvel em acetona. Terminada a reação, neutralizou-se o meio reacional com solução aquosa de carbonato de potássio. Devido à instabilidade observada experimentalmente do diacetal no meio reacional frente à temperatura, utilizou-se fluxo de ar comprimido para remoção do solvente. O resíduo obtido foi extraído com éter dietílico de maneira que tanto o D-manitol que não reagiu quanto o carbonato de zinco formado na etapa de neutralização não foram extraídos do sistema reacional. Após evaporação do éter, obteve-se um sólido branco formado pela mistura do diacetal (**1**) e resíduos de triacetais. Este último foi removido pela lavagem do sólido com hexano, já que os triacetais são solúveis nesse solvente, enquanto que o diacetal (**1**) é pouco solúvel. Desta forma, foi possível obter o (1S,2S)-1,2-bis((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etano-1,2-diol (**1**) com pureza suficiente para ser utilizado na próxima etapa da rota.



Esquema 2: Síntese dos dienófilos **6**, **7** e **8** a partir do D-manitol.

A partir da clivagem oxidativa de **1**, foi obtido o (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldeído (**2**) em reação com o metaperiodato de sódio (2 equivalentes molares) em diclorometano, na presença de solução saturada de bicarbonato de sódio (SCHMID e BRYANT, 1993). Devido a sua baixa estabilidade, o aldeído **2** não foi purificado, sendo usado na próxima etapa da síntese imediatamente após sua preparação.

A produção dos ésteres (S)-(Z)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**4**) e (S)-(E)-4,5-O-isopropilidenopent-2-enoato de etila (**5**) foi realizada em banho de gelo por meio de reação de Wittig, entre o aldeído **2** e o etoxicarbonilmetileno- (trifenil)fosforano (**3**) usando o metanol como solvente (MANN *et al.*, 1987). Os isômeros (**4**) e (**5**) foram obtidos na proporção de 8:1.

O éster **4** foi reagido com quantidade catalítica de ácido sulfúrico em metanol fornecendo a (S)-5-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (**6**) com 73% de rendimento (MANN *et al.*, 1987).

Em seguida, o composto **6** foi utilizado em reação com o anidrido acético catalisado pela 4-dimetilaminopiridina (DMAP) em diclorometano para obtenção do dienófilo **7** em 95% de rendimento. Para a obtenção do composto **8**, a lactona **6** foi reagida com cloreto de benzoíla catalisada pelo DMAP em diclorometano fornecendo o produto em 92% de rendimento. Ambas as reações foram mantidas a temperatura ambiente sob agitação magnética por 2 horas e em seguida purificadas por cromatografia em coluna.

Por meio dos dados espectroscópicos foi possível corroborar as estruturas dos compostos sintetizados. Para o composto **6**, observa-se no espectro no infravermelho IV (Figura 5, p. 36) uma banda intensa em 3389 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H. Para os compostos **7** e **8**, como esperado, no espectro de IV (Figura 6, p. 36 e Figura 7, p. 37) não há bandas na região referente ao estiramento da ligação O-H. Já as bandas intensas referentes ao estiramento da ligação C=O são observadas para os compostos **6** e **8**, em 1715 cm^{-1} , 1793 cm^{-1} , respectivamente. Enquanto que para o composto **7** são observadas duas bandas correspondentes ao estiramento da ligação C=O, uma em 1748 cm^{-1} referente ao éster alifático e outra em 1710 cm^{-1} referente à lactona α,β -insaturada.

Não foi possível observar os picos do íon molecular através do espectro de massas para os compostos **6**, **7** e **8** (Figura 8, p. 37, Figura 9, p. 38 e Figura 10, p. 38). Entretanto, no Esquema 3 (p. 39) são mostradas fragmentações dos principais picos, sendo possível confirmar a obtenção das lactonas **6**, **7** e **8**.

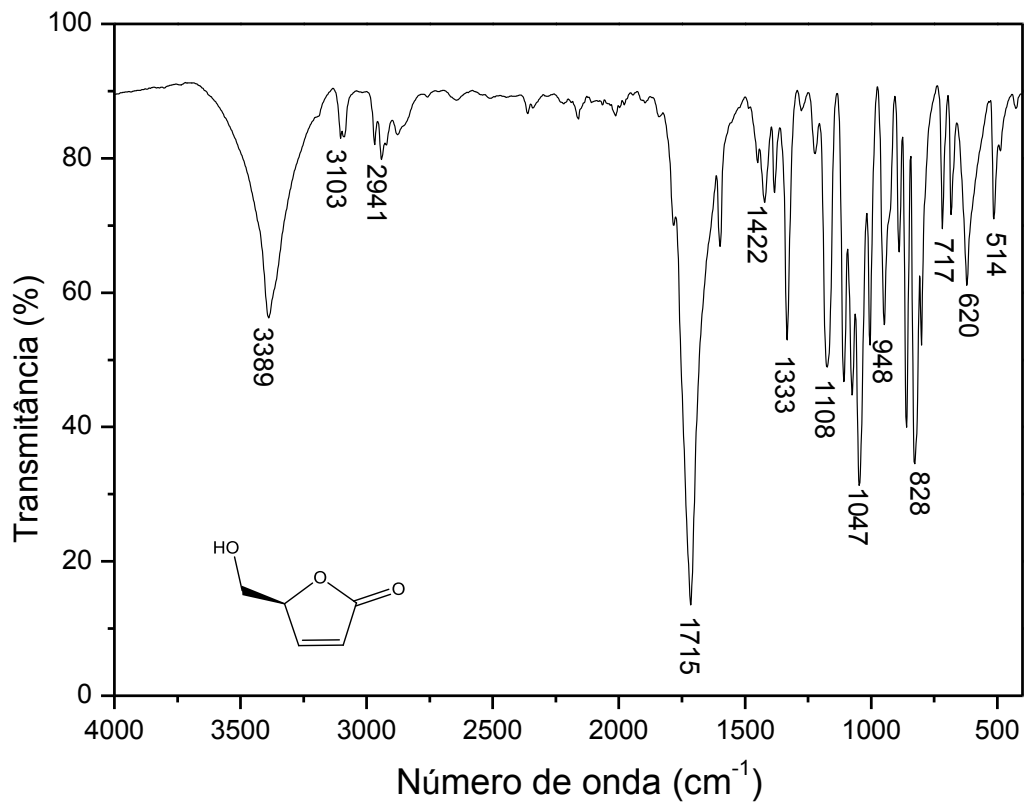


Figura 5: Espectro no Infravermelho do composto 6.

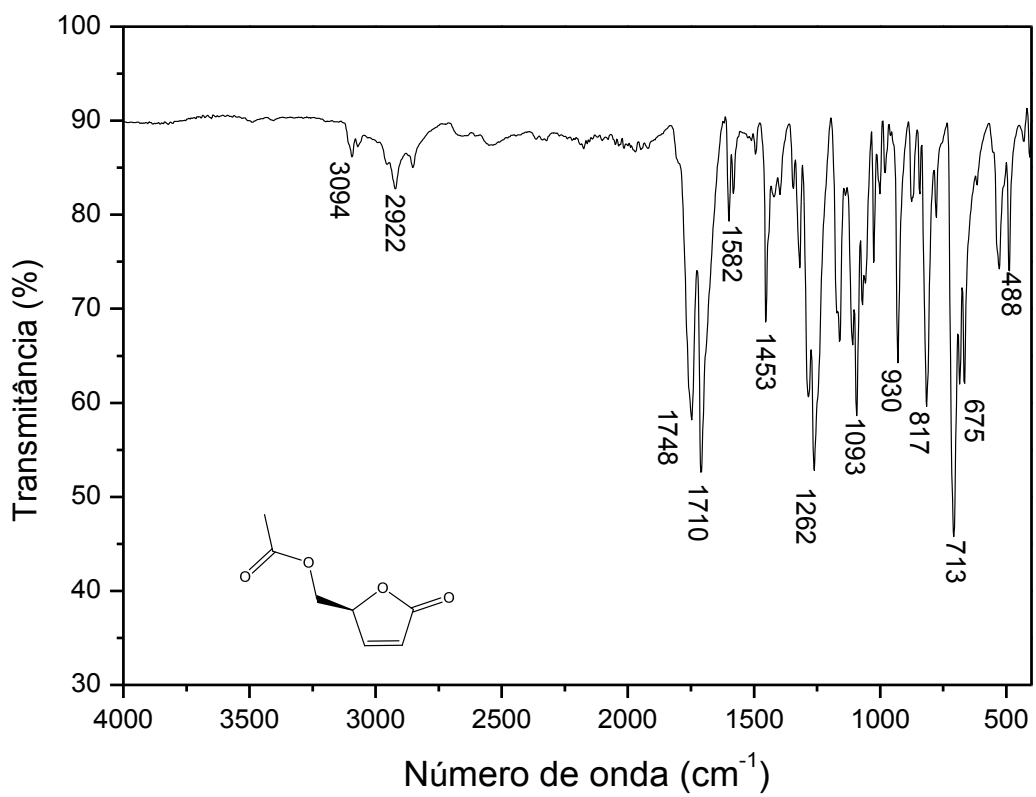


Figura 6: Espectro no Infravermelho do composto 7.

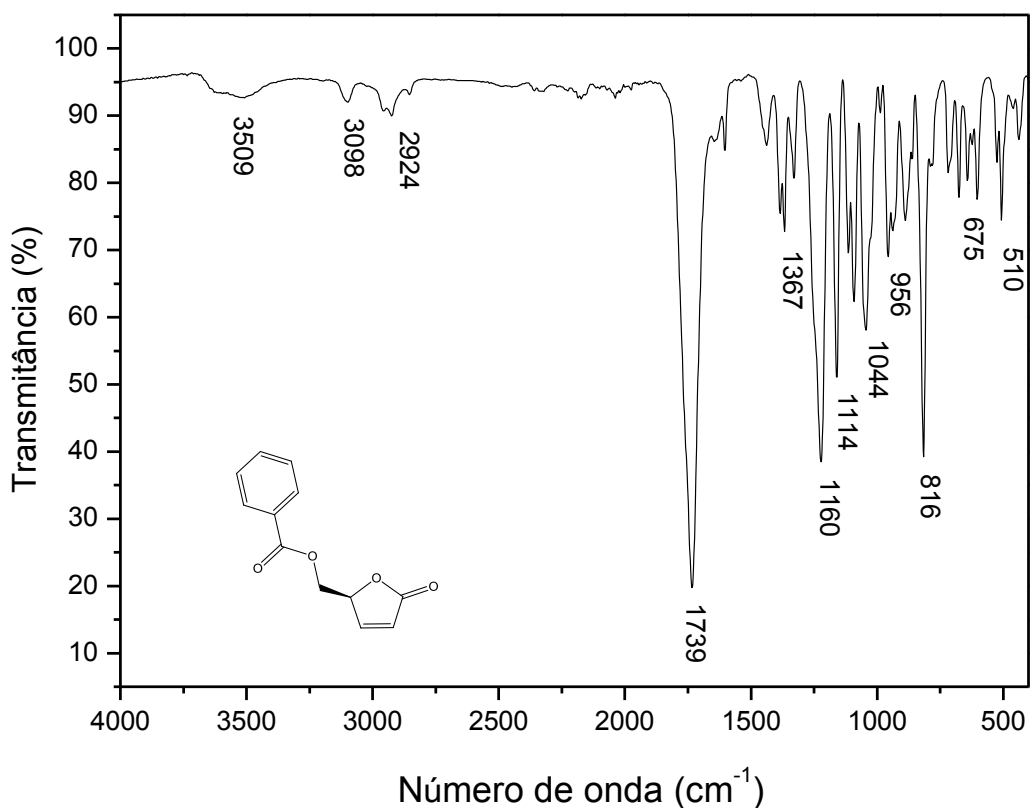


Figura 7: Espectro no Infravermelho do composto **8**.

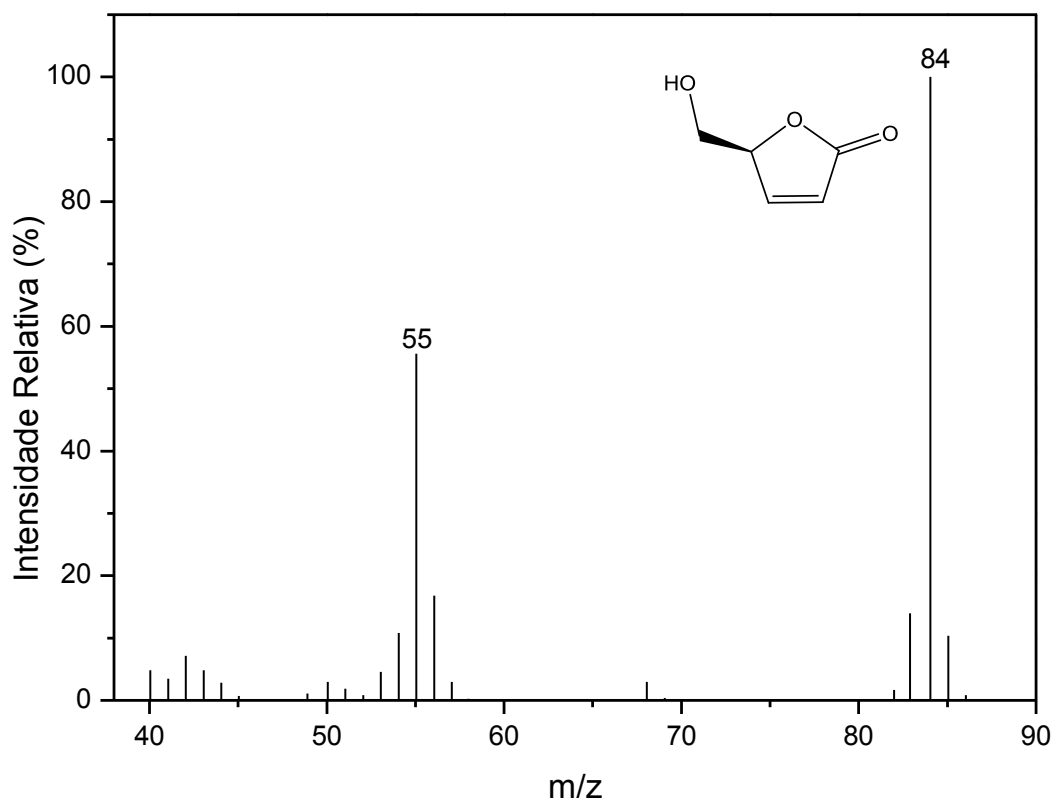


Figura 8: Espectro de Massas do composto **6**.

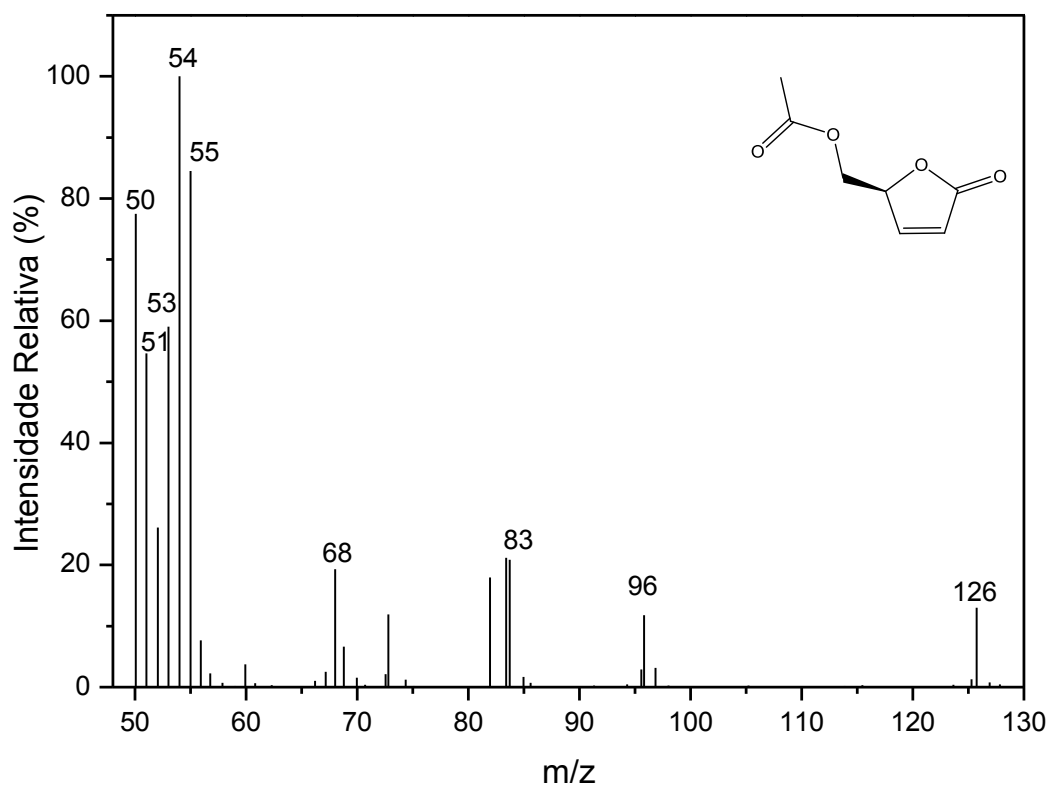


Figura 9: Espectro de Massas do composto 7.

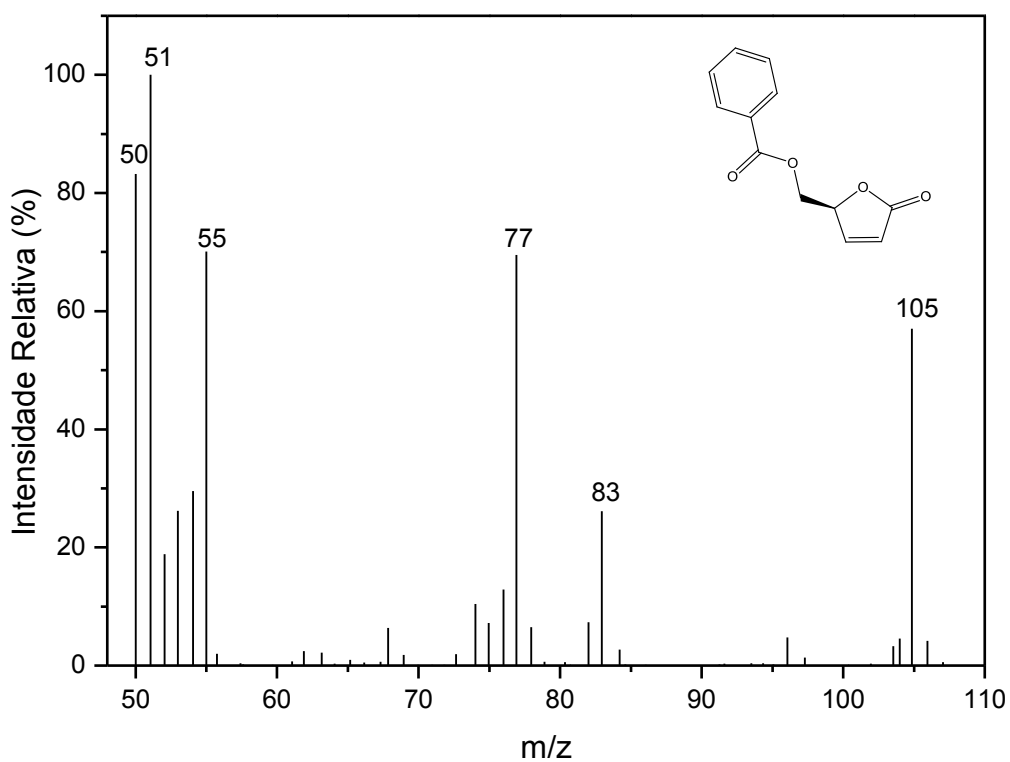
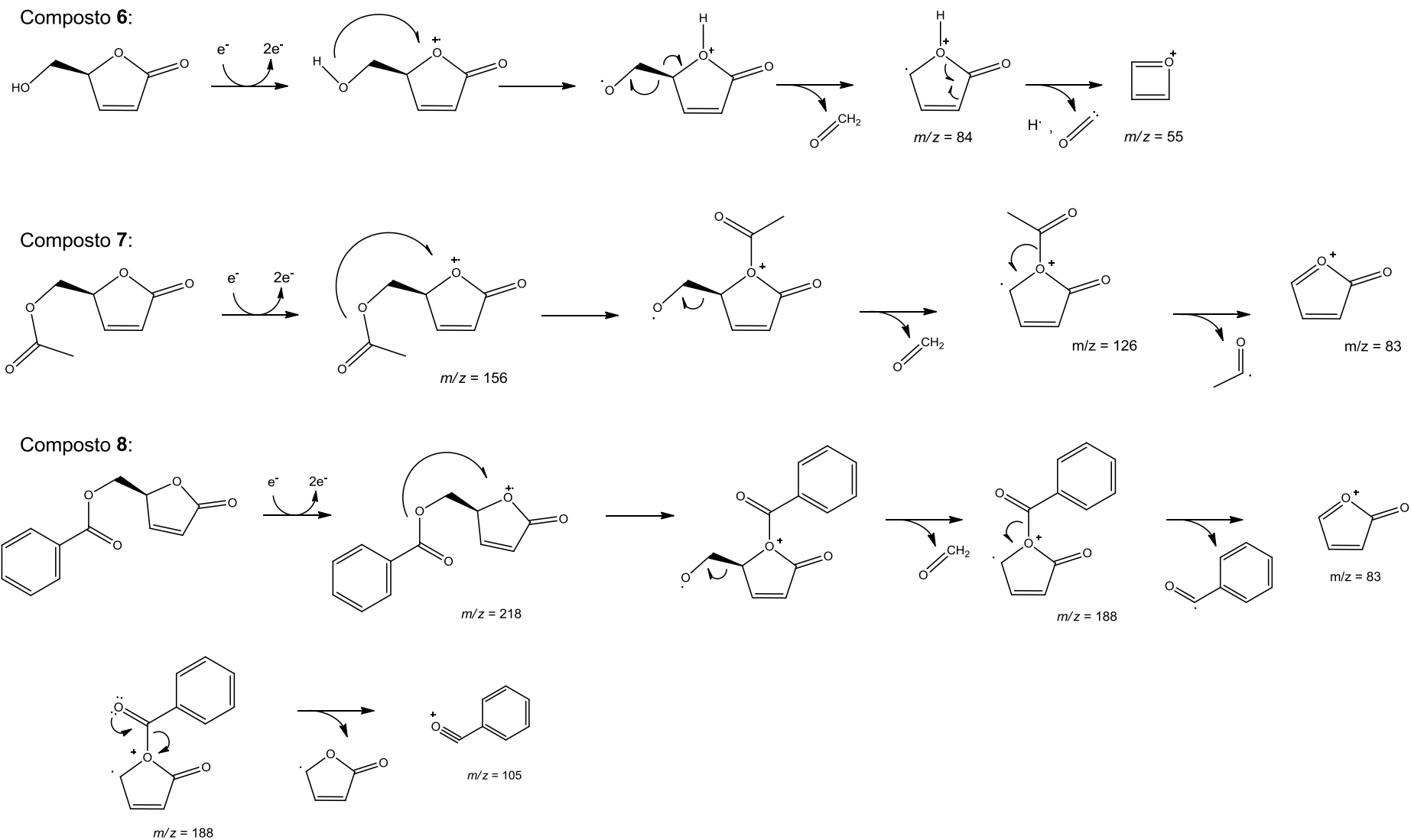


Figura 10: Espectro de Massas do composto 8.



Esquema 3: Proposta mecânica de fragmentação para os compostos 6, 7 e 8.

Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figura 11) dos dienófilos sintetizados, pode-se observar no espectro do composto **6**, um simpleto em δ 1,73 correspondente ao grupo hidroxila, enquanto que no espectro do composto **7** pode ser observado um simpleto em δ 2,05 integrado para 3 hidrogênios referente aos hidrogênios do grupo metila. No espectro de RMN de ^1H do composto **8** não foi visto nenhum sinal na região entre 1,00 e 4,50 ppm, porém observa-se sinais na região de hidrogênios de anel aromático (4,40 a 8,00 ppm).

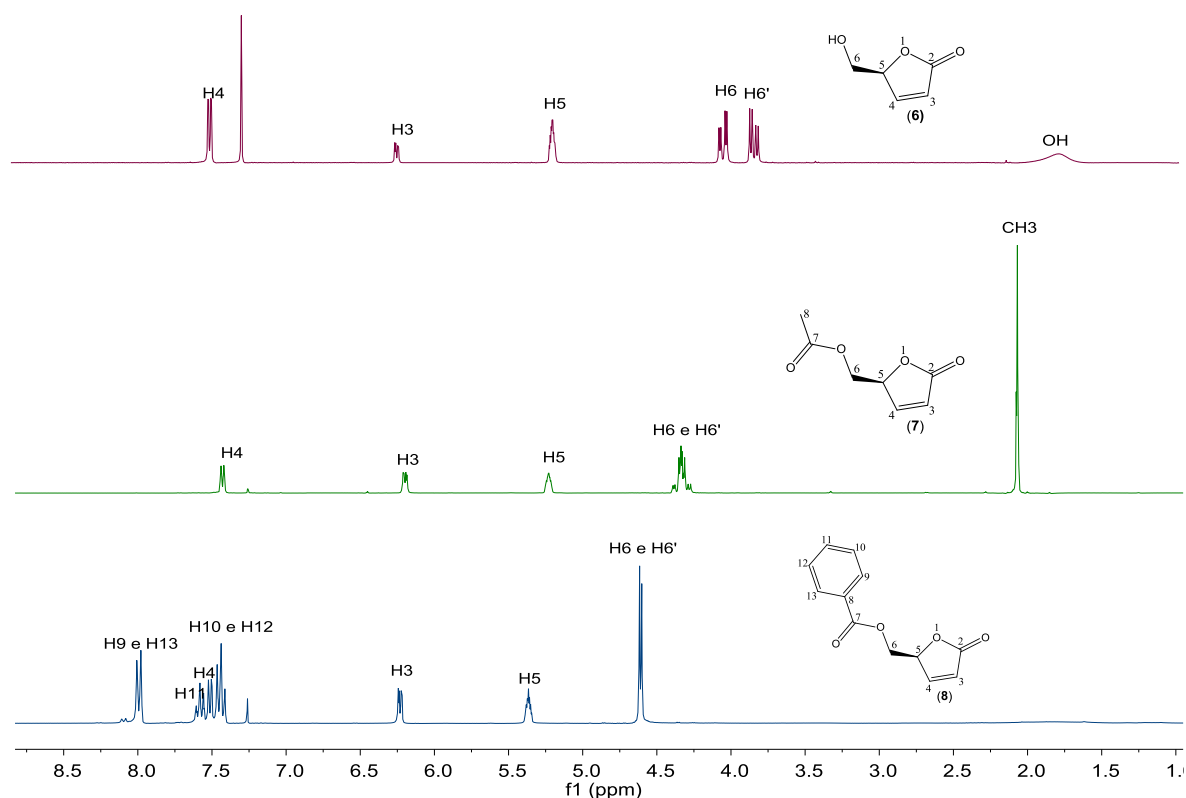


Figura 11: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos **6**, **7** e **8**.

Pelos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 12, p 41) dos compostos **6**, **7** e **8** pode-se observar a presença de sinais nos compostos **7** e **8** ausentes no composto **6**. No espectro do dienófilo **7** são vistos sinais em 20,5 ppm referente ao carbono metílico e em 170,5 ppm referente ao carbono carbonílico do éster alifático. Já no espectro do dienófilo **8** são observados sinais referentes ao carbono carbonílico do grupo benzóila em δ 166,0 ppm e carbonos aromáticos na faixa de 128,5 - 129,7 ppm.

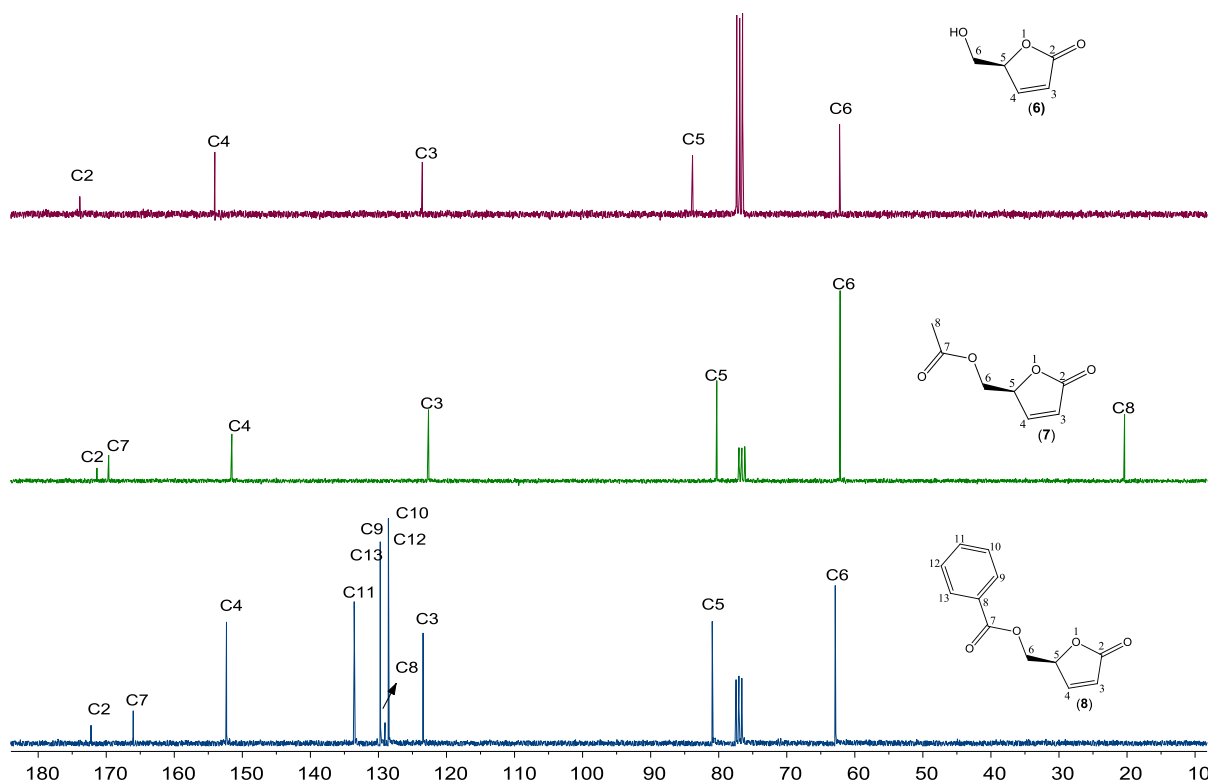
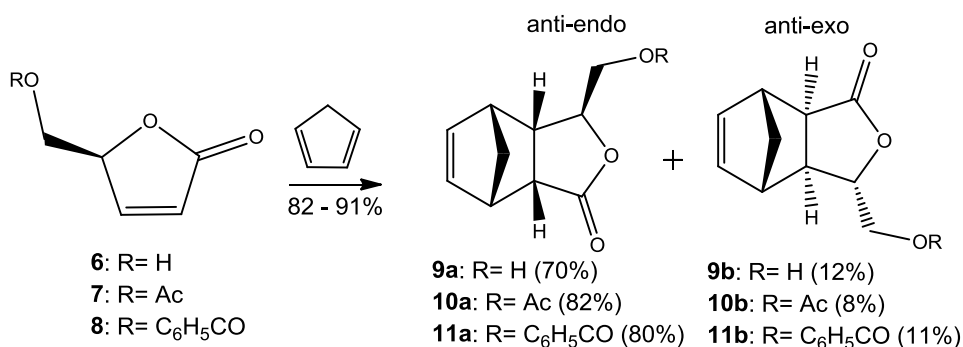


Figura 12: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) dos compostos **6**, **7** e **8**.

1.4.1.2 Reação de Diels Alder entre o ciclopentadieno e os dienófilos **6-8**

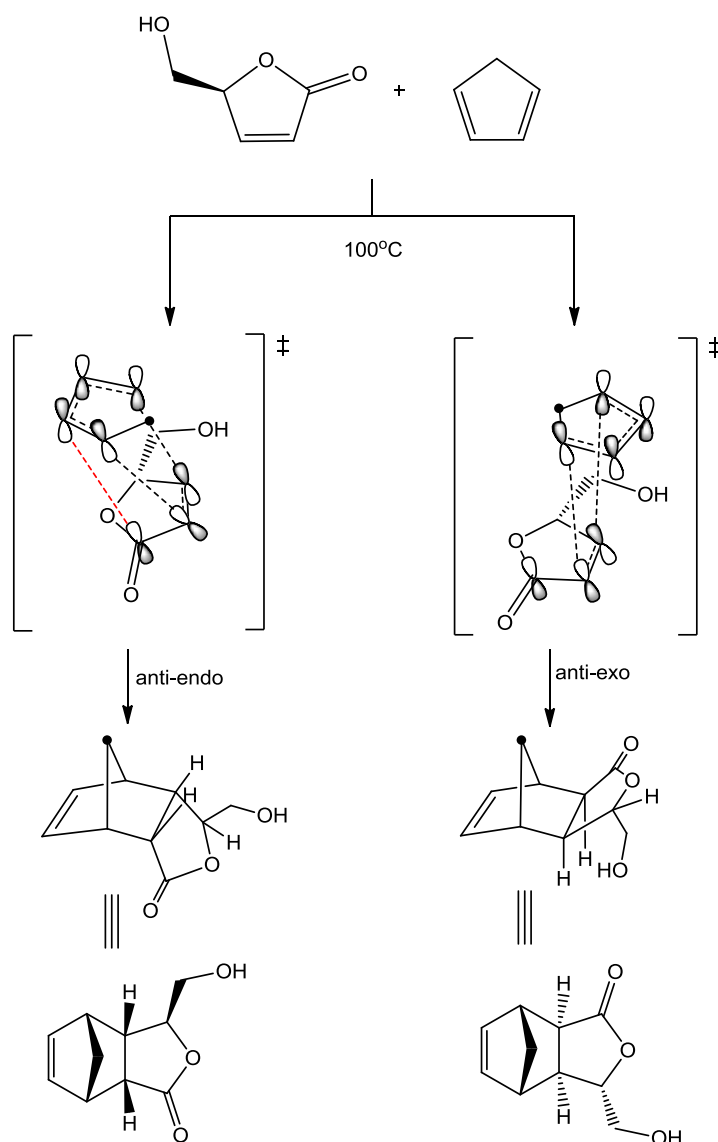
As lactonas α,β -insaturadas são dienófilos de grande interesse, visto que suas reações de cicloadição são boas ferramentas para a síntese de lactonas olefínicas policíclicas (YANAI *et al.*, 2007).

Todas as reações de Diels Alder foram realizadas em tubo selado numa temperatura de 100 °C, excesso de ciclopentadieno (10 equivalentes molares) e agitação magnética constante, conforme mostrado no Esquema 4.



Esquema 4: Síntese dos cicloadutos **9a-11b**.

Na reação de Diels-Alder, o dieno e o dienófilo podem interagir em duas orientações diferentes, levando a formação dos adutos *endo* e *exo*, conforme mostrado no Esquema 5. A primeira possibilidade é a aproximação do dieno com as ligações duplas direcionadas para a carbonila do dienófilo, o que resulta no aduto *endo*. Já quando as ligações duplas do ciclopentadieno se orientam do lado oposto à carbonila do dienófilo, são formados os adutos *exo*. Devido a redução da energia do estado de transição por causa das interações secundárias dos orbitais π geralmente, o aduto *endo* é favorecido (YANAI *et al.*, 2007).



Esquema 5: Proposta mecanística para a formação dos adutos **9a** e **9b**.

Todos os adutos sintetizados (**9a-11b**) foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , *COSY*, *NOESY*, *HSQC* e *HMBC*). No entanto, devido às similaridades conformacionais e estruturais, somente a caracterização dos isômeros **10a** e **10b** serão discutidas.

1.4.1.2.1. Elucidação estrutural dos adutos 10a e 10b da reação de Diels-Alder

A confirmação estrutural dos compostos **10a** e **10b** iniciou-se pela análise de seus espectros no infravermelho. Foi possível observar a presença de uma banda em 1755 cm^{-1} no espectro de **10a** (Figura 13, p. 44) e uma banda em 1751 cm^{-1} no espectro de **10b** (Figura 14, p. 44), ambas bandas referentes ao estiramento da ligação C=O dos ésteres alifáticos. O estiramento C=O correspondente às carbonilas das lactonas saturadas com anel de cinco membros também foi visto para os compostos **10a** e **10b**, em 1737 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} , respectivamente.

Nos espectros de massas dos compostos **10a** (Figura 15, p. 45) e **10b** (Figura 16, p. 45) não foram observados os picos correspondentes aos íons moleculares. Foi possível perceber que nos espectros dos isômeros **10a** e **10b** são detectados os mesmos picos de fragmentação, mostrando que os processos de clivagem independem da conformação do isômero, como pode ser visto no Esquema 6 (p. 46).

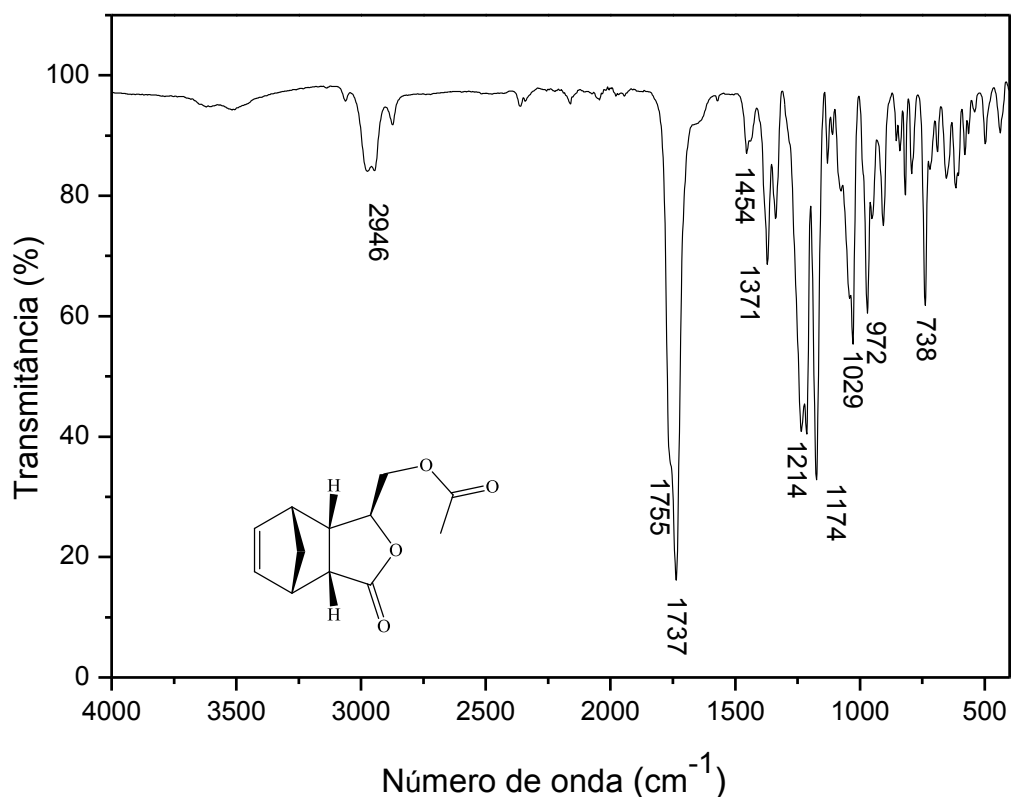


Figura 13: Espectro no Infravermelho do composto **10a**.

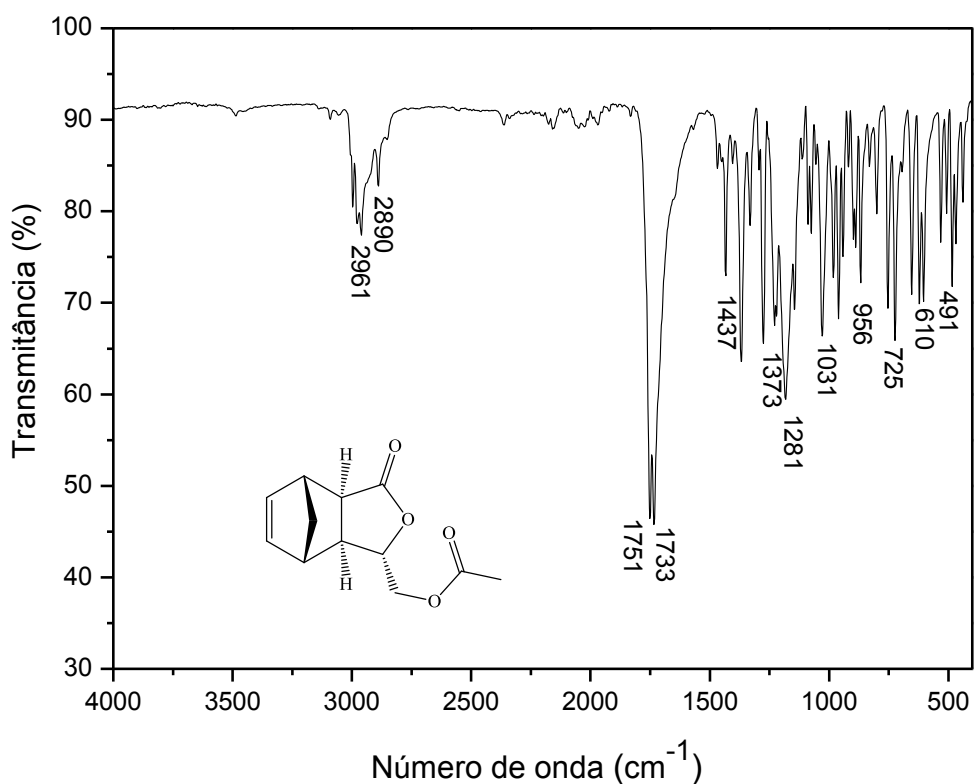


Figura 14: Espectro no Infravermelho do composto **10b**.

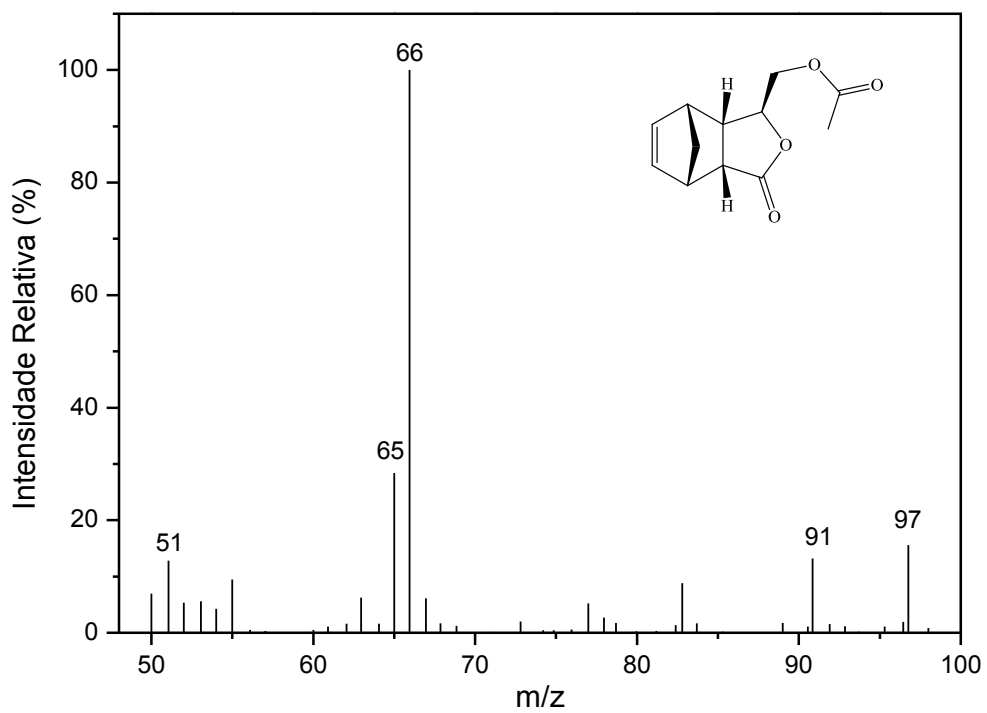


Figura 15: Espectro de massas do composto **10a**.

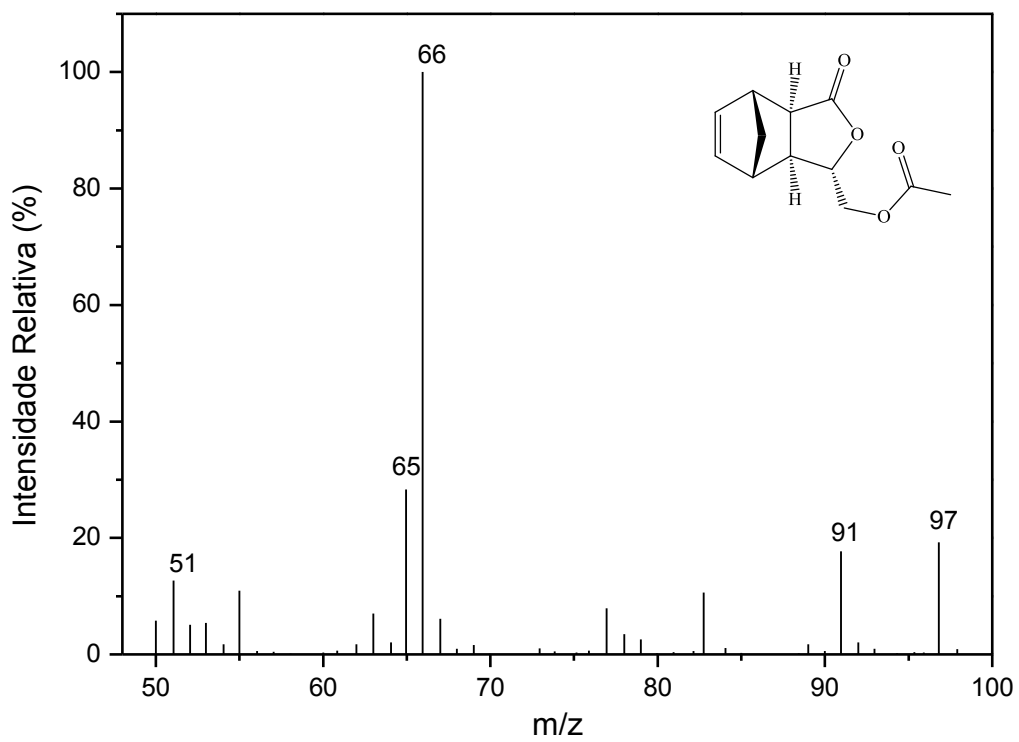
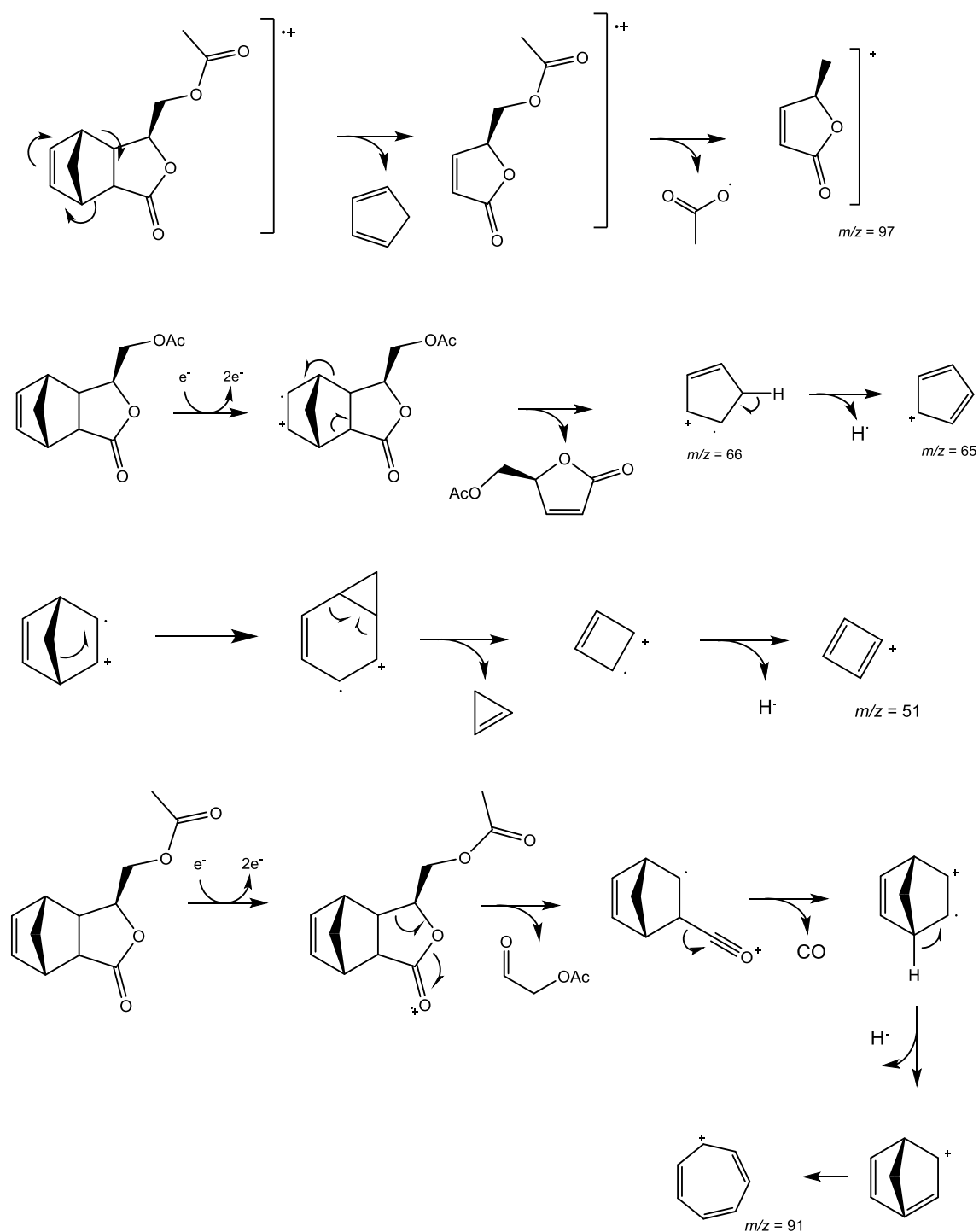


Figura 16: Espectro de massas do composto **10b**.



Esquema 6: Proposta mecanística para principais fragmentos dos compostos **10a** e **10b**.

A interpretação do espectro de RMN de ^1H de **10a** (Figura 17, p. 48) foi iniciada pela atribuição do sinal referente aos hidrogênios H3, H9 e H9' presentes como um multipletto em δ 4,07 – 4,20. Os hidrogênios metílicos (H11) foram atribuídos ao simpleto integrado para três hidrogênios em 2,06 ppm. Os

sinais mais blindados da molécula foram atribuídos aos hidrogênios geminais H8 e H8', em δ 1,63 – 1,64 e δ 1,43 – 1,44, respectivamente.

No mapa de contornos COSY de **10a** (Figura 18, p. 49), a partir do acoplamento entre os sinais dos hidrogênios H3 e H3a foi possível atribuir o sinal em δ 2,83, correspondente ao hidrogênio H3a. A correlação entre os hidrogênios que acoplam entre si, H3a e H7a também foi visualizada no mapa de contornos COSY. Portanto, o sinal em δ 3,27 – 3,29 foi atribuído ao hidrogênio H7a e o sinal em δ 3,32 – 3,34 foi atribuído ao sinal H7. Dessa forma, H4 foi atribuído como sendo um multiplete em δ 3,10 – 3,16.

Por fim, os hidrogênios olefínicos H5 e H6 foram atribuídos aos sinais em δ 6,24 (duplo duplete, $J = 5,8$ Hz e $J = 2,9$ Hz) e δ 6,30 (duplo duplete, $J = 5,8$ Hz e $J = 2,9$ Hz). A diferenciação desses hidrogênios foi possível através das correlações observadas no mapa de contornos COSY (Figura 18, p 49), onde foi visto correlação entre o sinal referente à H4 e o sinal em 6,24 ppm e correlação entre o sinal de H7 e o sinal em 6,30 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **10a** (Figura 20, p. 51), o sinal em δ 177,2 foi atribuído ao carbono carbonílico C1. A carbonila (C7) e a metila (C11) do grupo acetila foram atribuídos aos sinais em δ 170,5 e 20,7, respectivamente. Na região de carbonos olefínicos foram observados dois sinais em δ 137,0 e δ 134,4, correspondentes aos carbonos C5 e C6, respectivamente. Dentre os carbonos sp^3 , o sinal mais desblindado corresponde ao carbono C3 (δ 79,2). O carbono sp^3 C9 foi atribuído ao sinal em 65,9 ppm. O carbono da ponte C8 (δ 51,6) pode ser atribuído com o auxílio do mapa de contorno HSQC do cicloaduto **10a** (Figura 21, p. 52), que apresentou mancha de correlação com os sinais dos hidrogênios H8 e H8'. Os demais carbonos também foram associados através das manchas de correlação observadas no mapa de contorno HSQC (Figura 21, p. 52), sendo os sinais em δ 43,1, δ 45,8, δ 45,6 e δ 48,2 e δ 51,6 que correspondem aos carbonos C3a, C4, C7 C7a e C8, respectivamente. A correlação entre H3/H5 observada no mapa de contorno NOESY (Figura 19, p. 50) confirma a conformação *endo* do composto **10a**. A correlação entre C6/H7a vista no mapa de contorno HMBC (Figura 22, p. 53) corrobora a atribuição feita a C6 como sendo o carbono visto em 137,0 ppm.

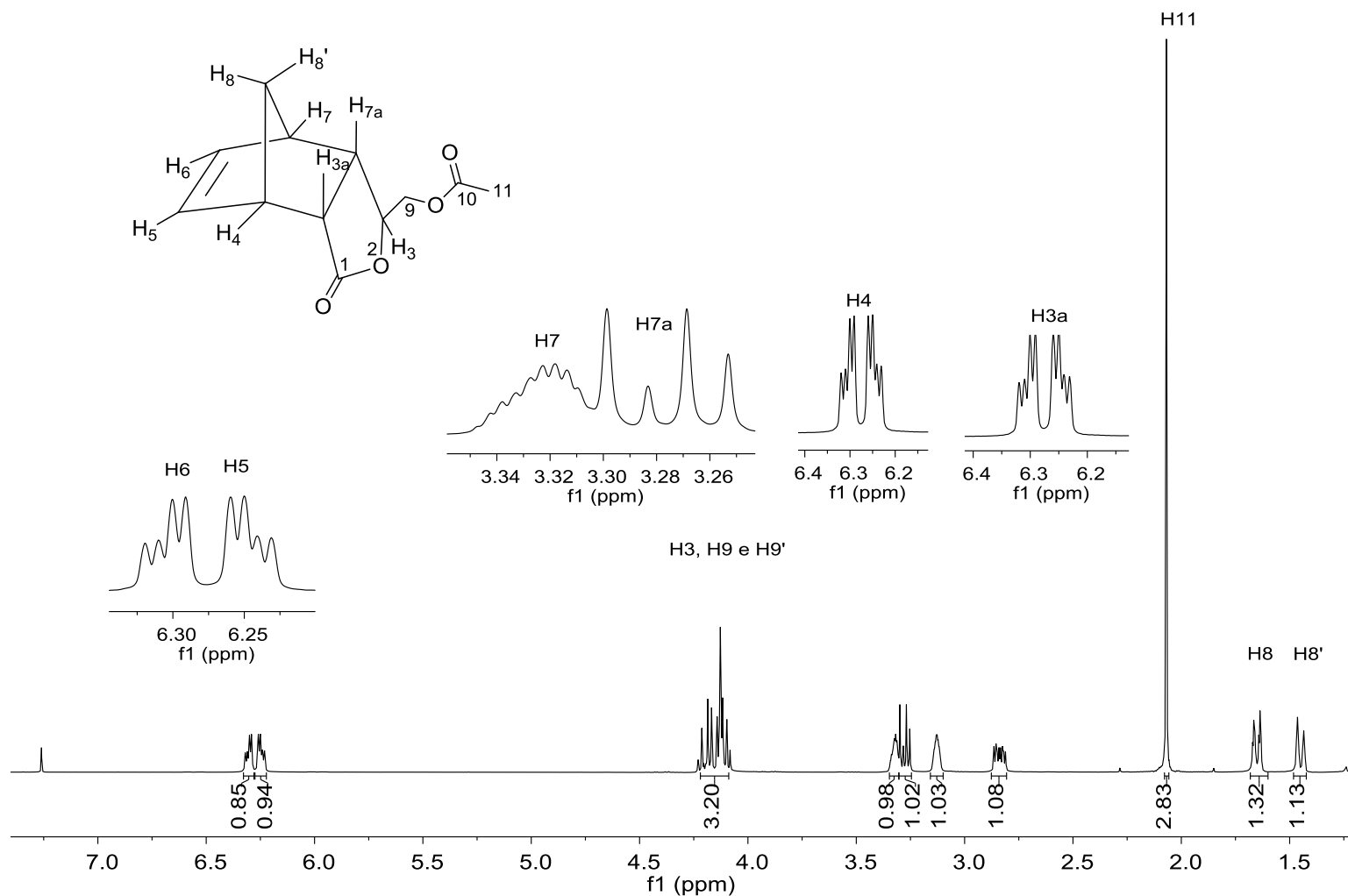


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **10a**.

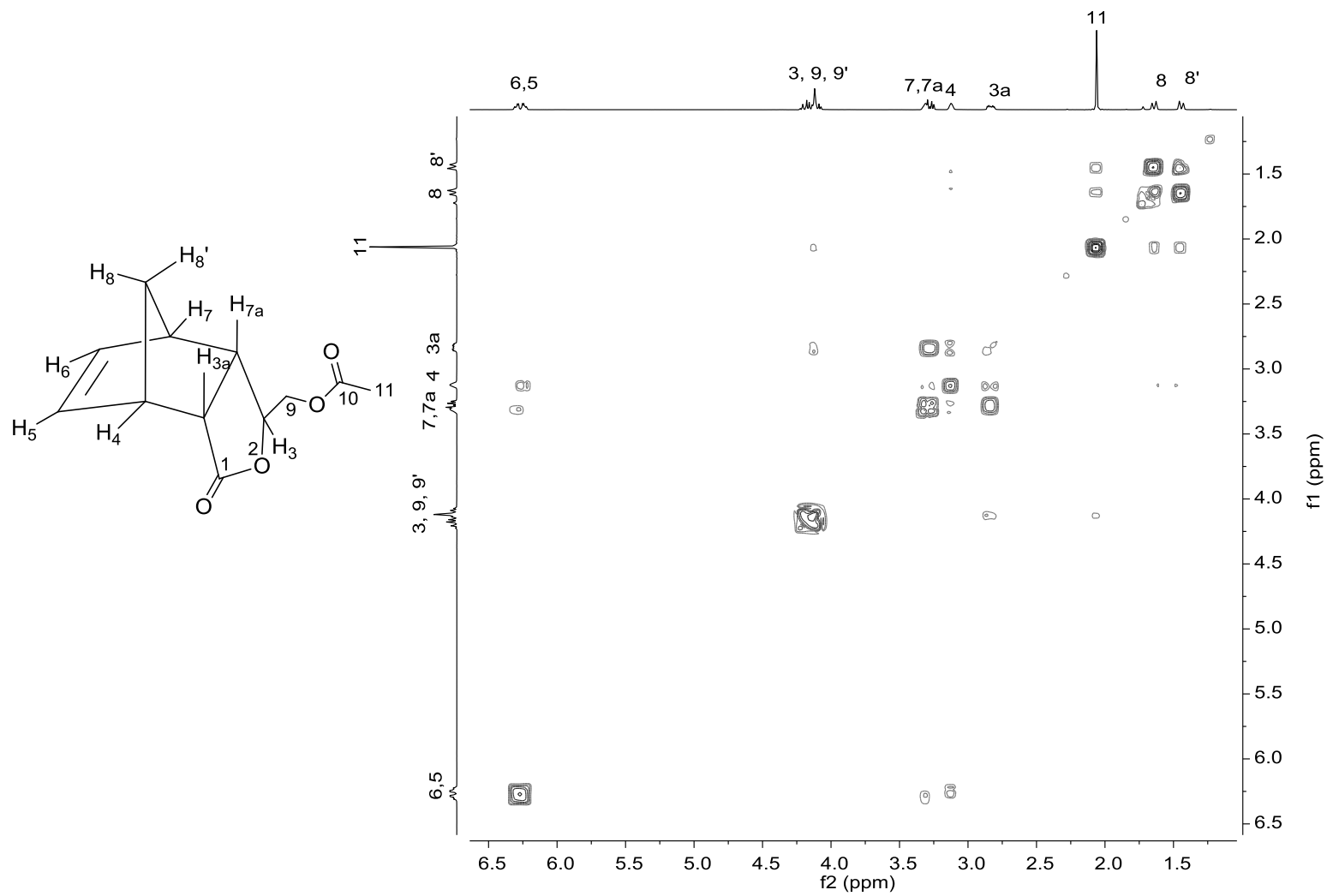


Figura 18: Mapa de contorno COSY do composto **10a**.

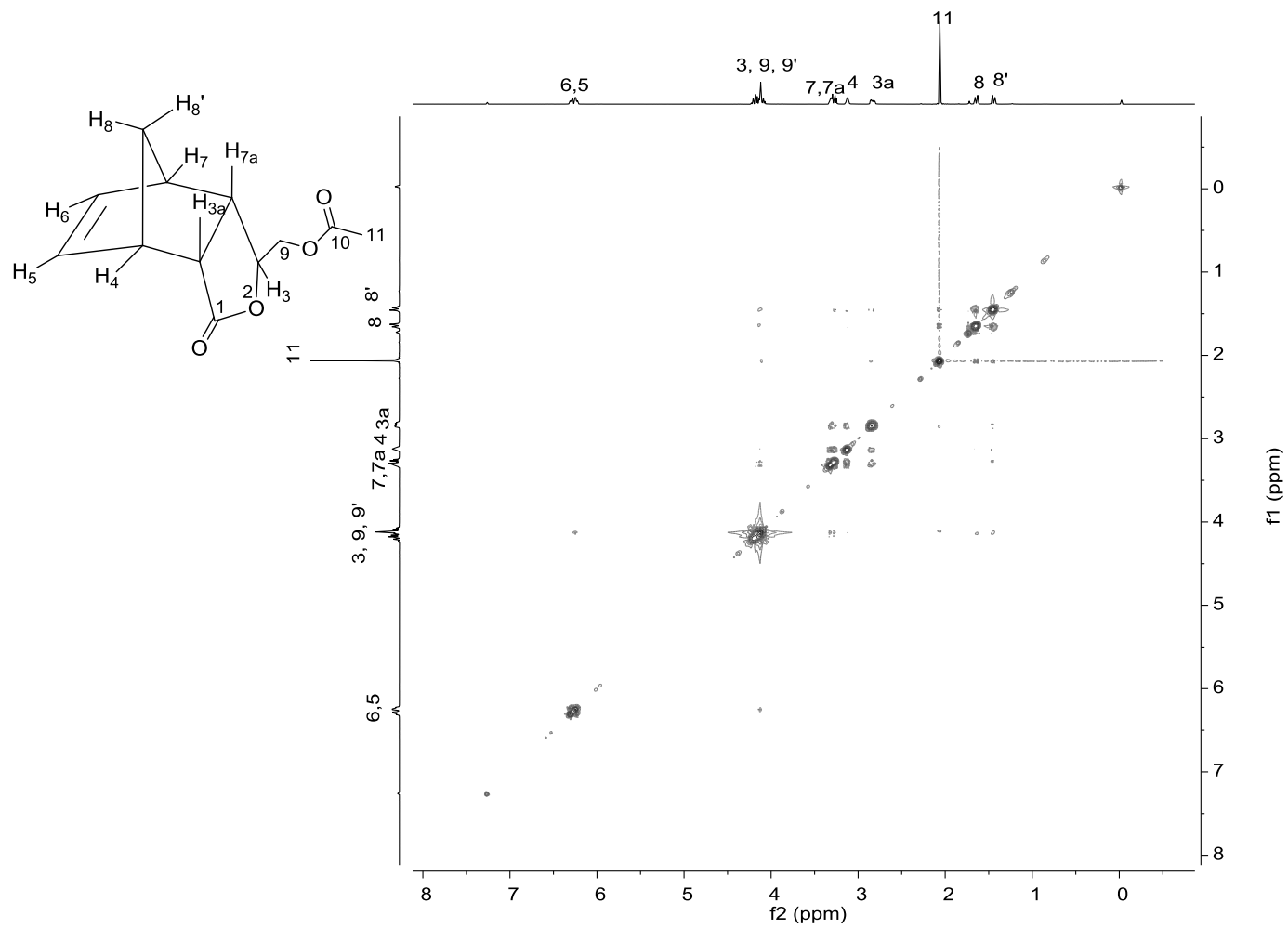


Figura 19: Mapa de contorno NOESY do composto **10a**.

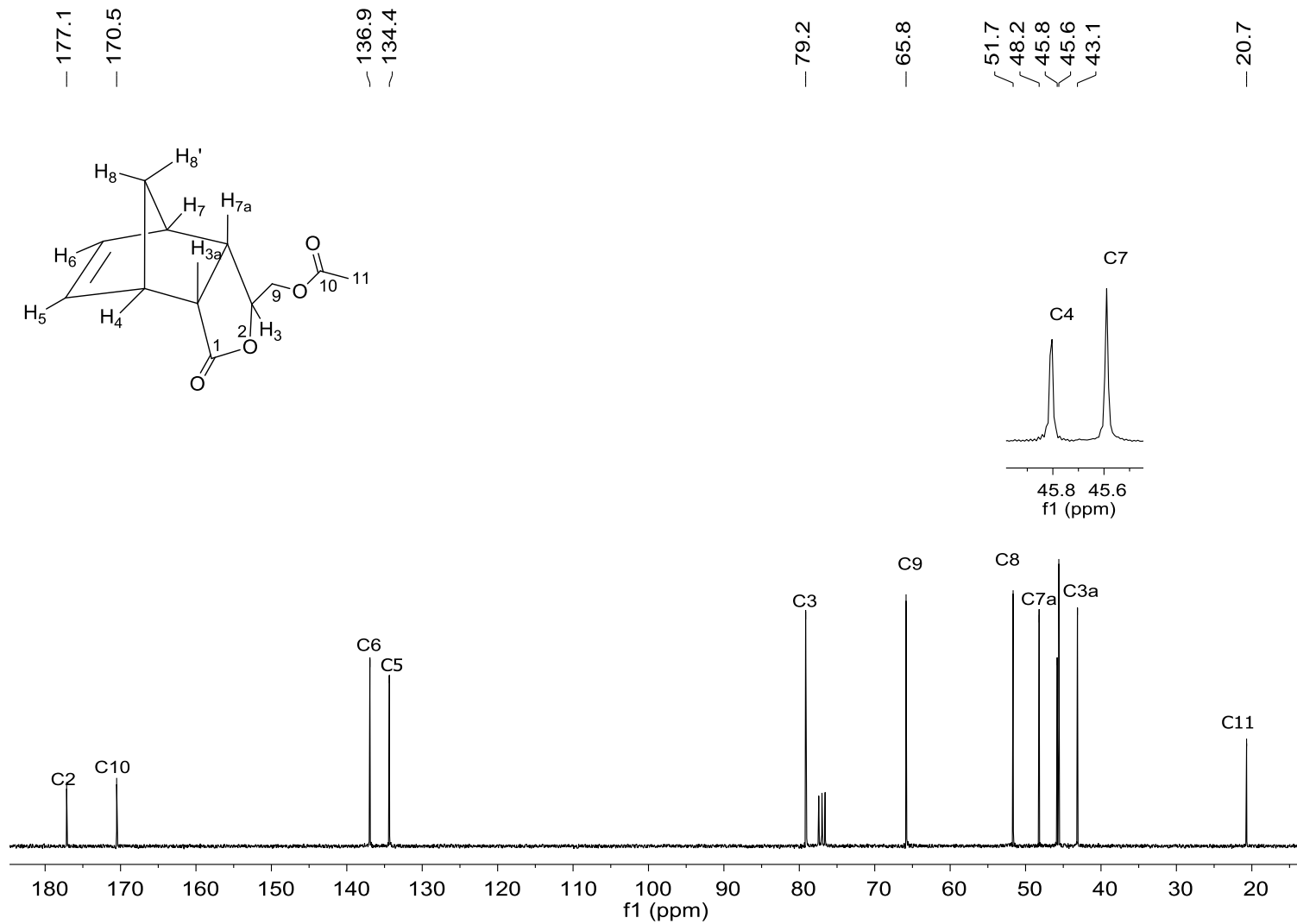


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **10a**.

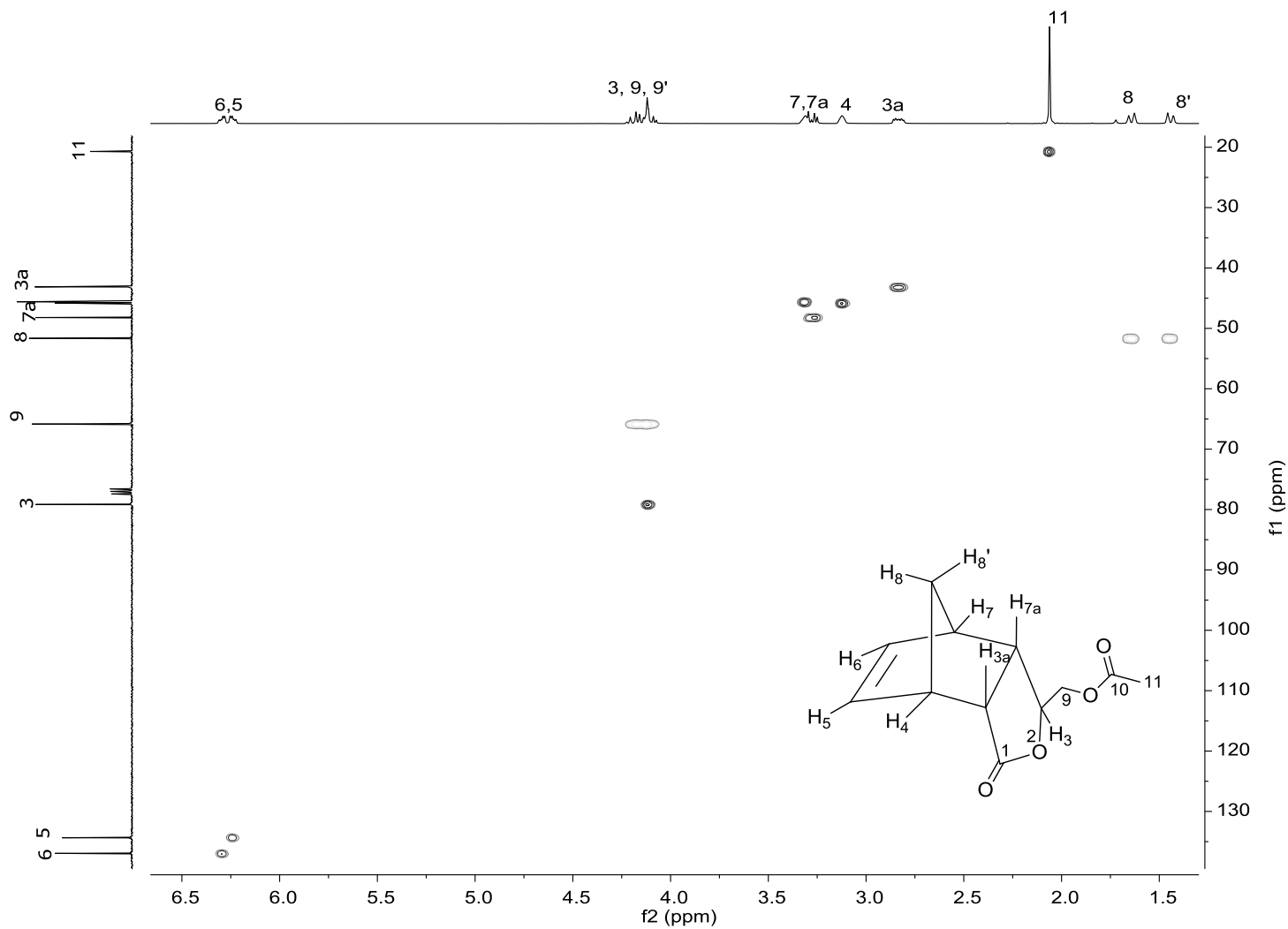


Figura 21: Mapa de contorno *HSQC* do composto **10a**.

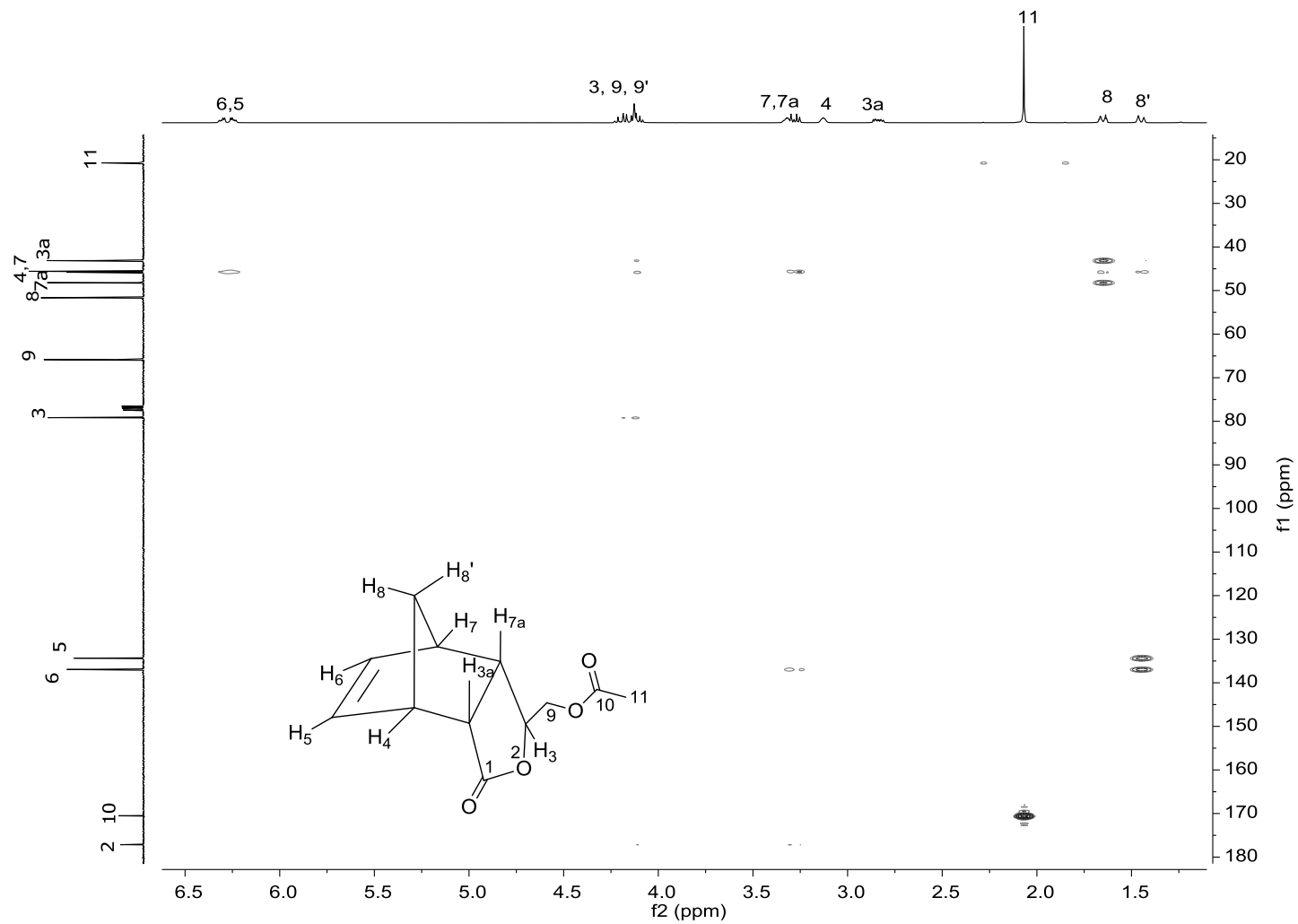


Figura 22: Mapa de contorno *HMBC* do composto **10a**.

A interpretação do espectro de RMN de ^1H de **10b** (Figura 24, p. 56) foi iniciada pela atribuição do sinal referente ao hidrogênio H3 ($\delta 4,35 - 4,37$), multipletto devido aos acoplamentos do H3 com os hidrogênios H9 e H9' e com o H3a. Sendo assim, atribui-se o sinal em 4,15 ppm a H9' como um duplo dupletto ($J = 4,9 \text{ Hz}$ e $J = 12,0 \text{ Hz}$) o sinal em 4,26 ppm a H9 também um duplo dupletto ($J = 3,2 \text{ Hz}$ e $J = 12,0 \text{ Hz}$) e ao hidrogênio 3a foi atribuído o multipletto em $\delta 2,24 - 2,30$. O sinal de hidrogênio correspondente aos hidrogênios metílicos (H11) foi facilmente definido como sendo o simpletto integrado para três hidrogênios em $\delta 2,07$.

Os hidrogênios mais blindados do composto **10b** referentes ao H8' e H8 foram observados como multipletos em $\delta 1,46 - 1,52$ e $\delta 1,55 - 1,56$. Para a correta atribuição de H8 e H8' foram utilizadas as manchas de correlação do mapa de correlação COSY (Figura 25, p. 57). O sinal referente a H8' foi determinado como sendo o multipletto em $\delta 1,46 - 1,52$. O sinal do H8 foi atribuído ao multipletto em $\delta 1,55 - 1,56$ devido aos acoplamentos com H8', H4 e H7. O sinal do hidrogênio H8 apresenta acoplamentos a longa distância do tipo W com H3a e H7a, possíveis apenas na conformação *exo*, conforme destacado na Figura 23. De acordo com Constatino e colaboradores (2001), o acoplamento em W tem sido uma ferramenta muito utilizada na elucidação estrutural de compostos na espectroscopia de RMN e muitas configurações e conformações podem ser decididas com base nesse acoplamento.

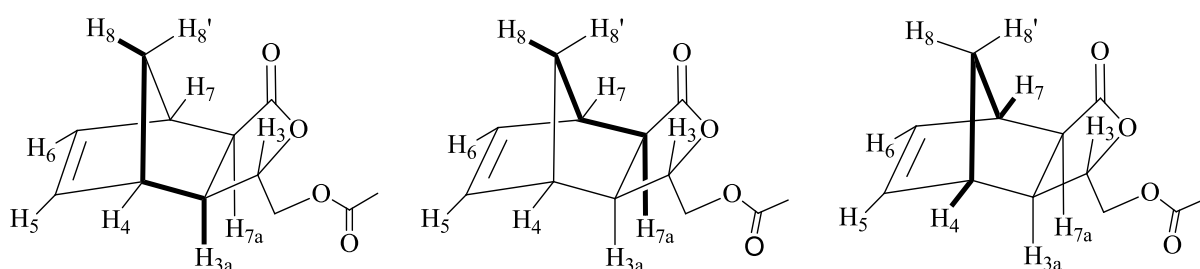


Figura 23: Acoplamentos em W (realçados em negrito) observados no mapa de contornos COSY do cicloaduto **10b**.

No mapa de contornos COSY para **10b** (Figura 25, p. 57), foi possível observar a correlação dos sinais do hidrogênio H3a com o hidrogênio H7a atribuído ao sinal $\delta 2,69 - 2,70$, atribuições confirmadas pelas correlações

H3a/H7a observadas no mapa de correlação *NOESY* (Figura 26, p. 58). Mais ainda, manchas de correlação no mapa de contornos *COSY* (Figura 25, p. 57) auxiliaram na atribuição dos sinais referentes aos dos hidrogênios H4 e H7 em $\delta 2,93 - 2,94$ e $\delta 3,27 - 3,29$. Foi observado o acoplamento do sinal atribuído ao hidrogênio H4 com H5 e de H6 com H7, além do acoplamento em W entre os sinais dos hidrogênios H4 e H7.

Como pode ser observado no espectro de RMN de ^{13}C do composto **10b** (Figura 27, p. 59), os sinais referentes aos carbonos C1 (C=O: 176,7 ppm), C10 (C=O: 170,5 ppm), C3 (O-C-O: 80,5 ppm), C9 (C-O: 65,8 ppm) e C11 (CH₃: 20,6 ppm) foram vistos em deslocamento químicos muito próximos aos valores atribuídos para os mesmos carbonos do composto **10a**, sendo assim, tais carbonos para o composto **10b** foram facilmente atribuídos. Foram observados sinais de carbonos sobrepostos em 137,5 ppm, sendo atribuídos aos sinais dos carbonos olefínicos C5 e C6. Os sinais dos carbonos C3a, C4, C7, C7a e o carbono da ponte C8 foram associados através das manchas de correlação observadas no mapa de contorno *HSQC* (Figura 28, p. 60), sendo os sinais em $\delta 44,7$, $\delta 47,5$, $\delta 46,4$, $\delta 48,5$ e $\delta 43,4$, respectivamente. O sinal de carbono referente ao C7 (46,4 ppm) pode ser confirmado pela mancha de correlação com o sinal de hidrogênio do H4 ($\delta 2,93 - 2,94$) observada no mapa de correlação *HMBC* (Figura 29, p. 61).

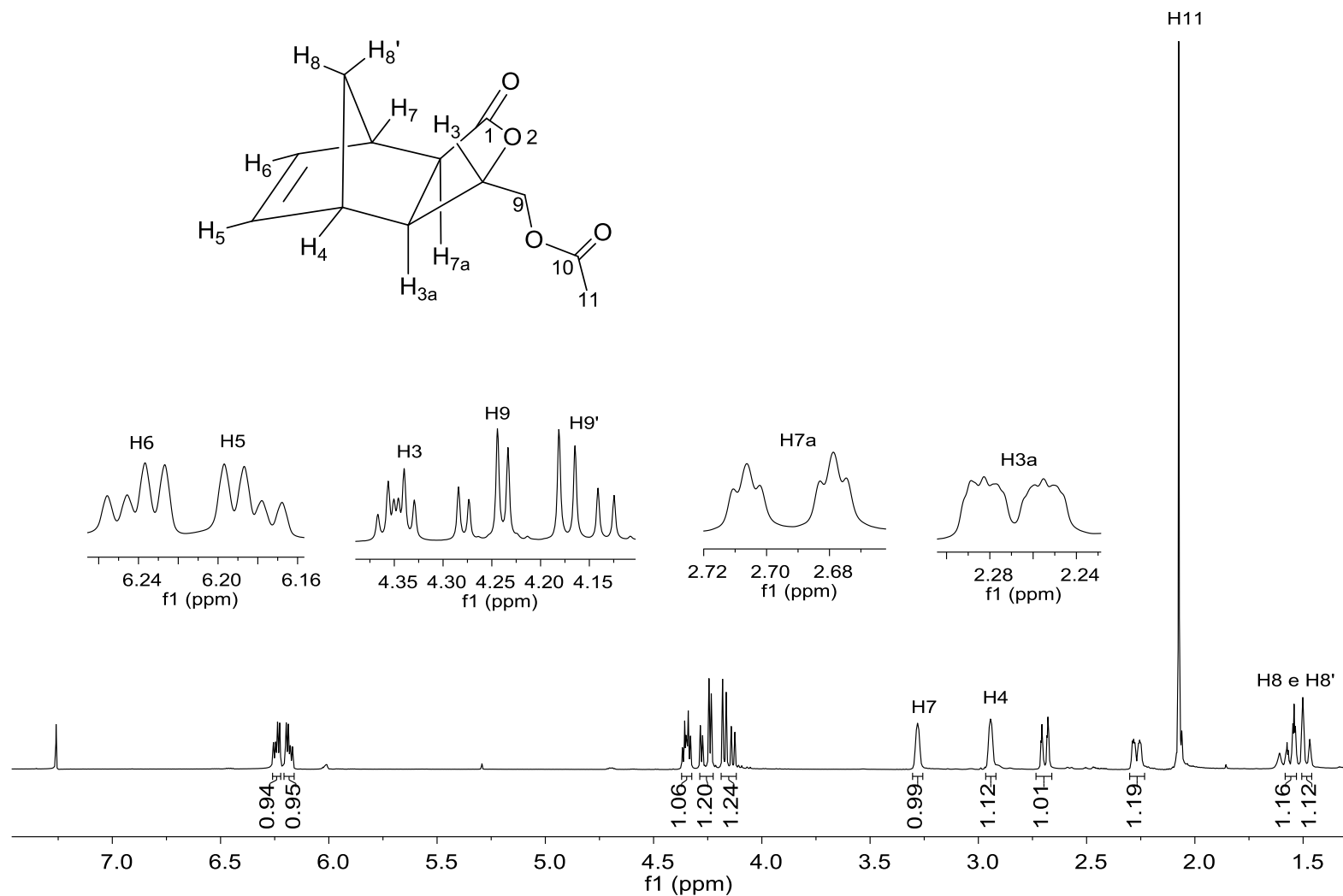


Figura 24: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **10b**.

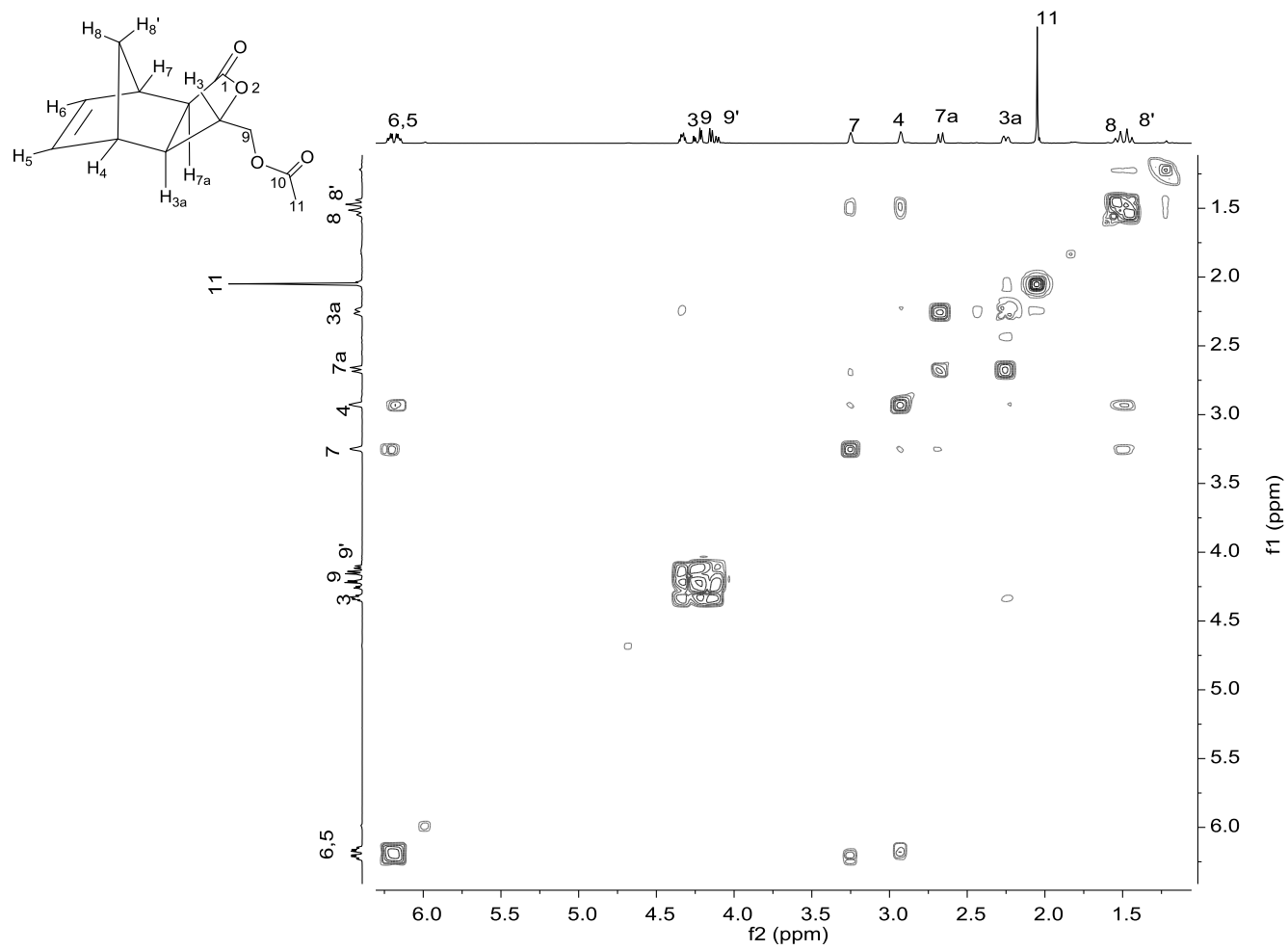


Figura 25: Mapa de contorno COSY do composto **10b**.

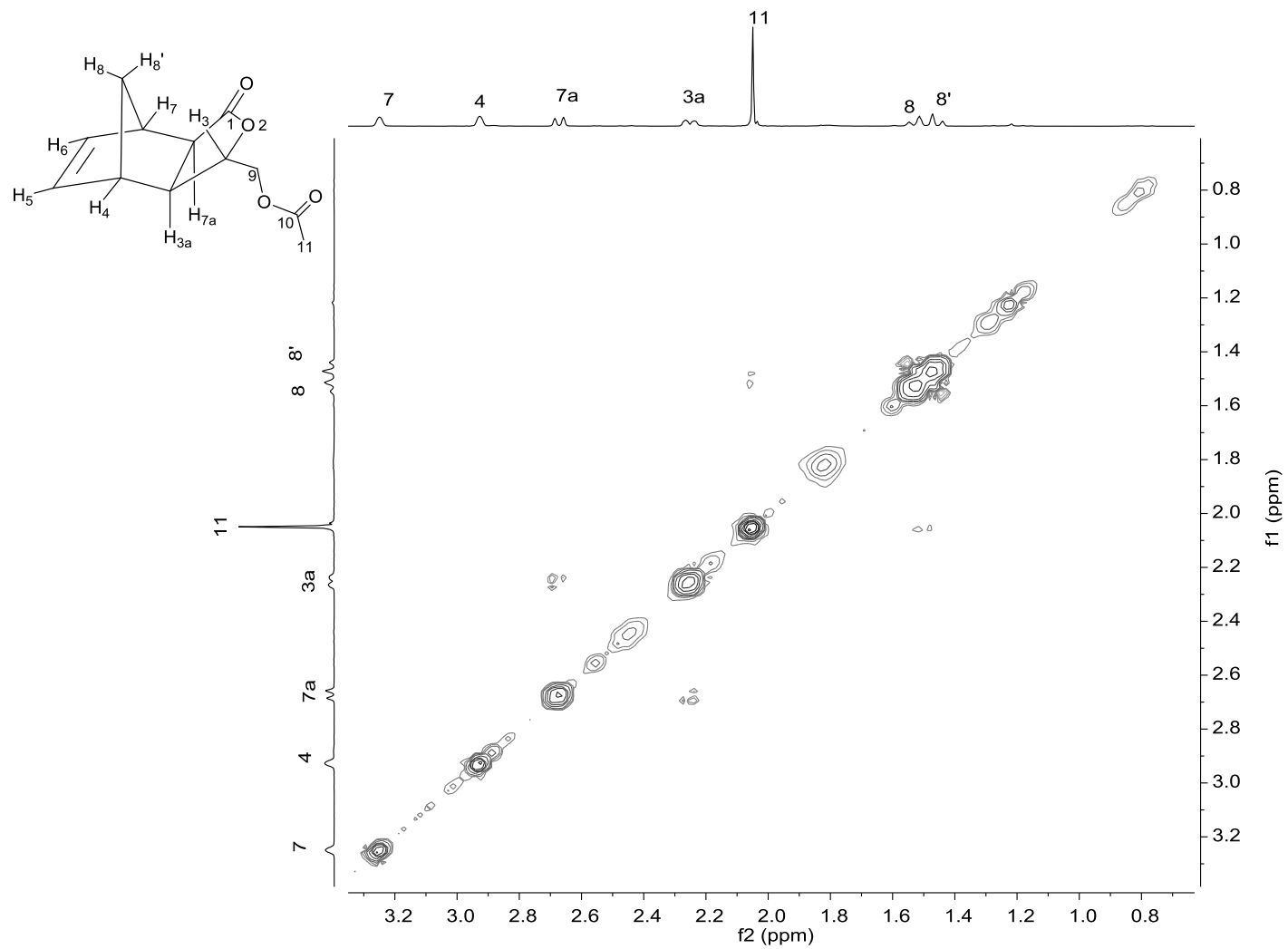


Figura 26: Mapa de contorno NOESY do composto 10b.

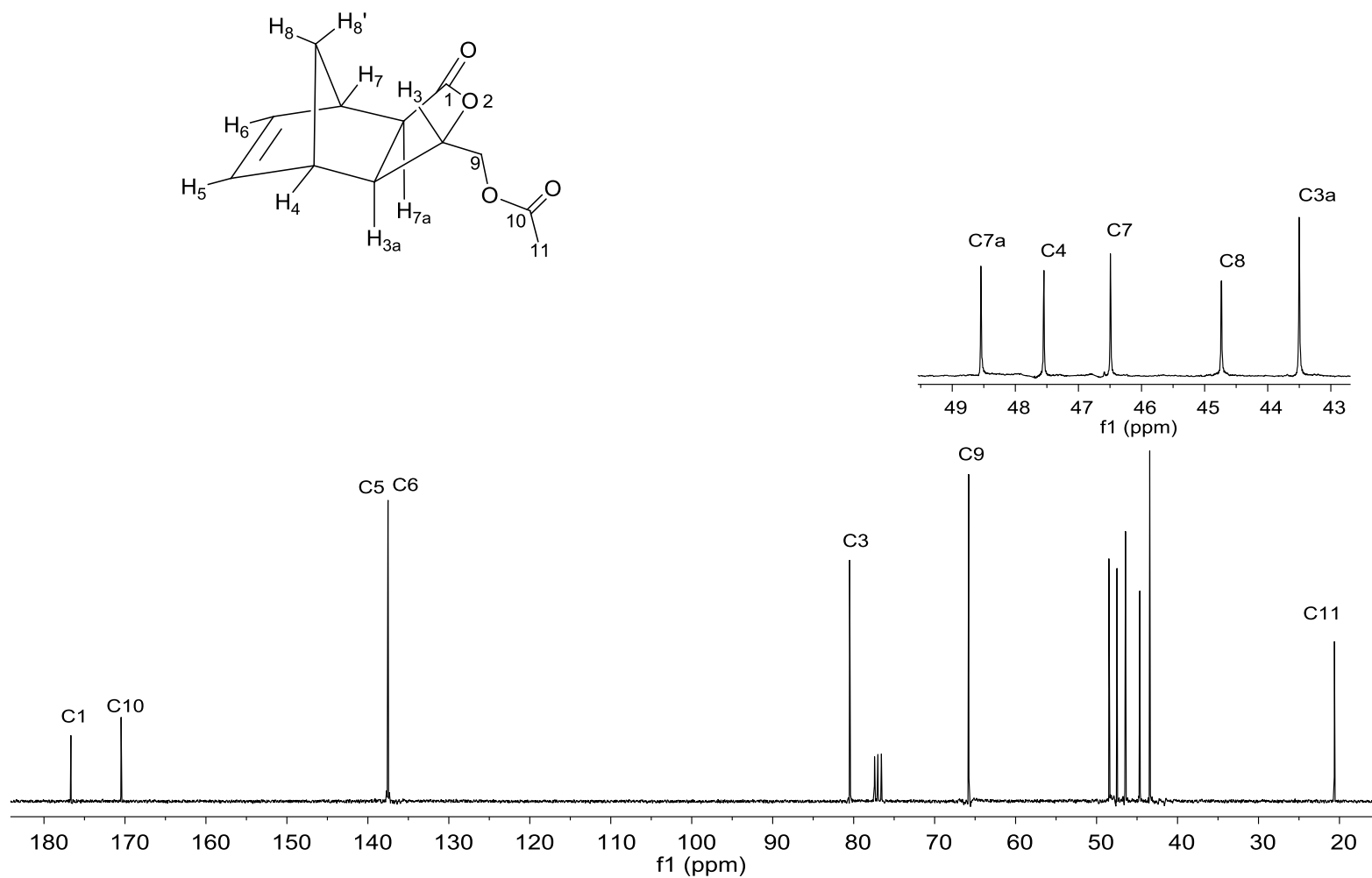


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **10b**.

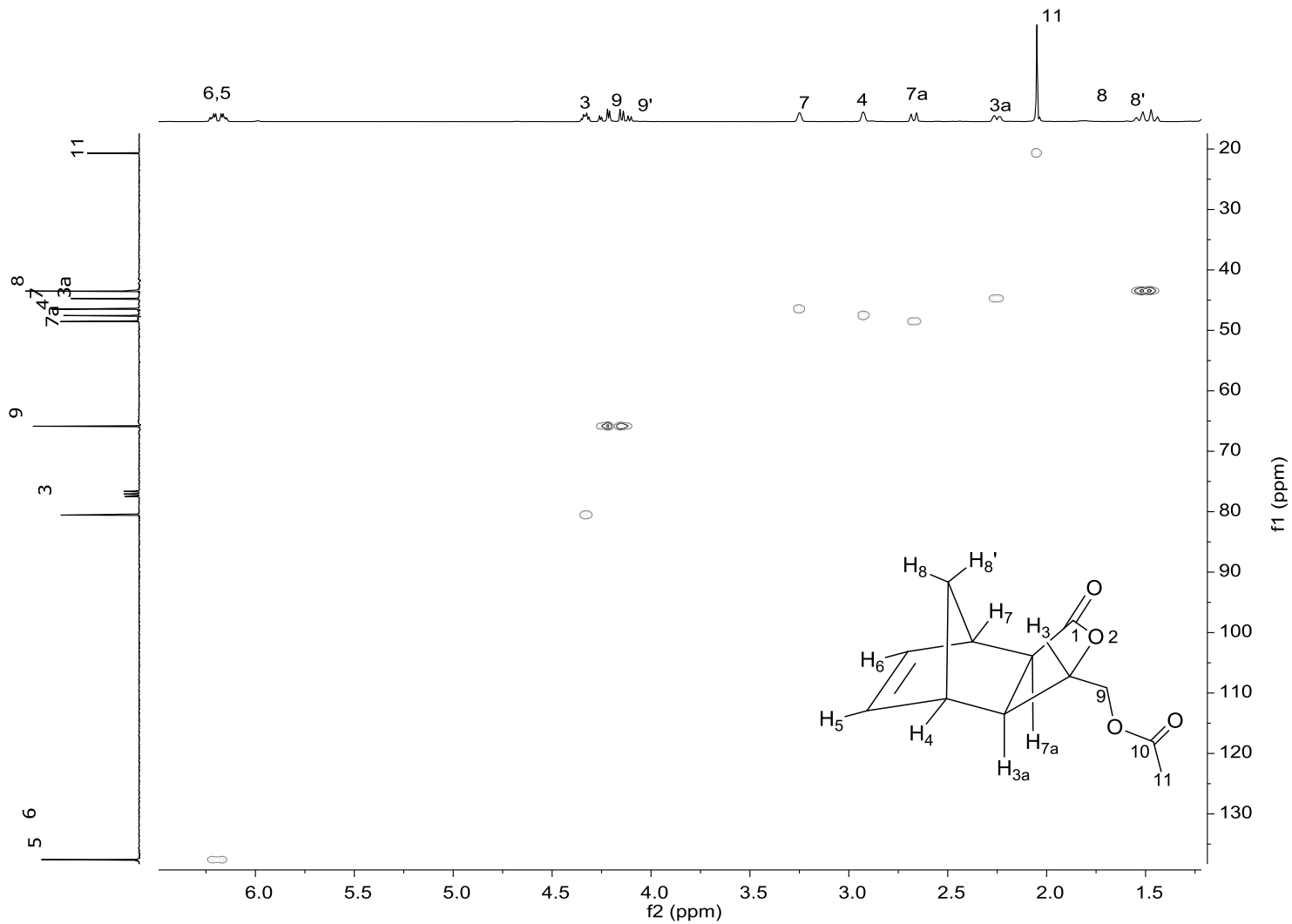


Figura 28: Mapa de contorno *HSQC* do composto **10b**.

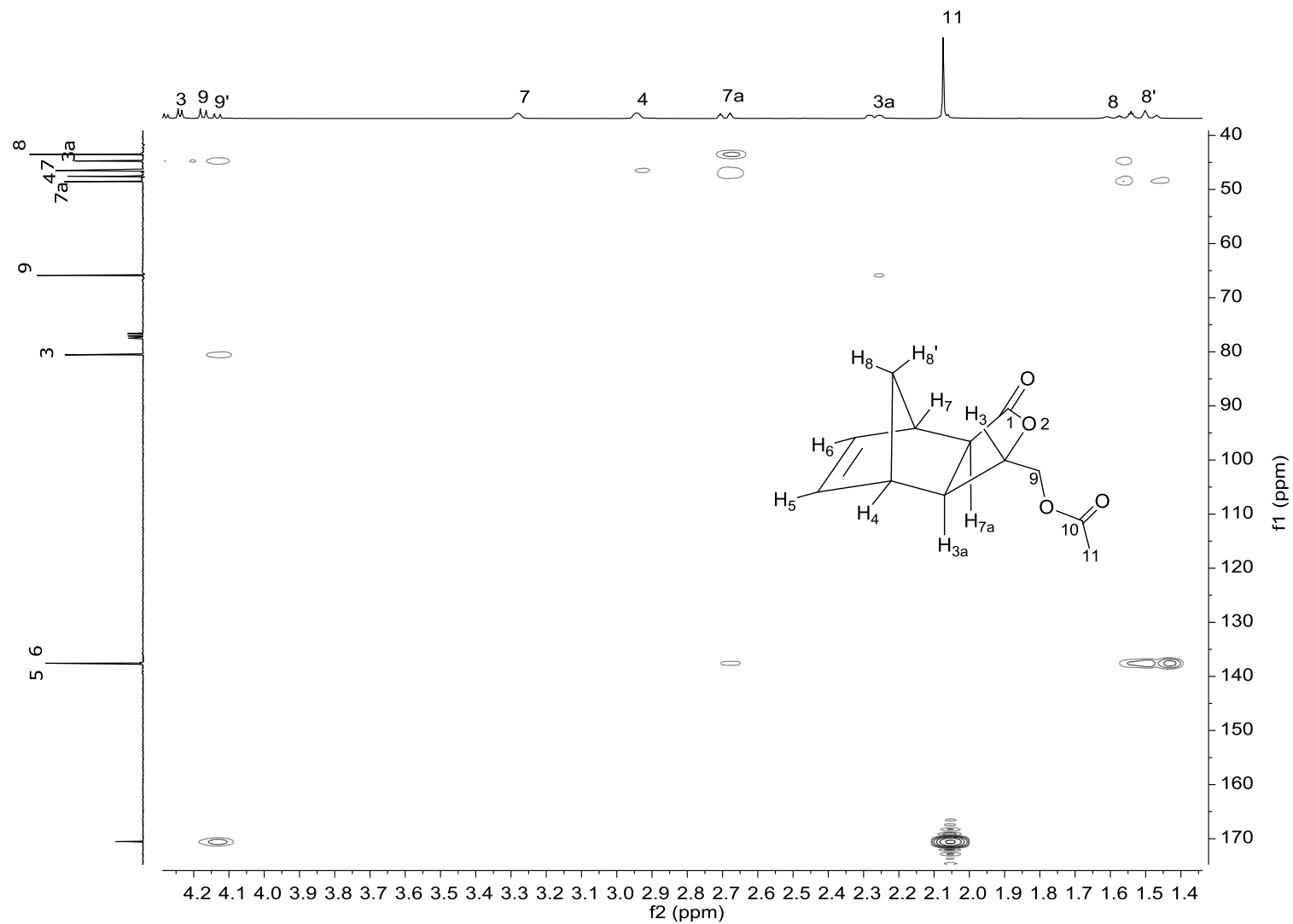


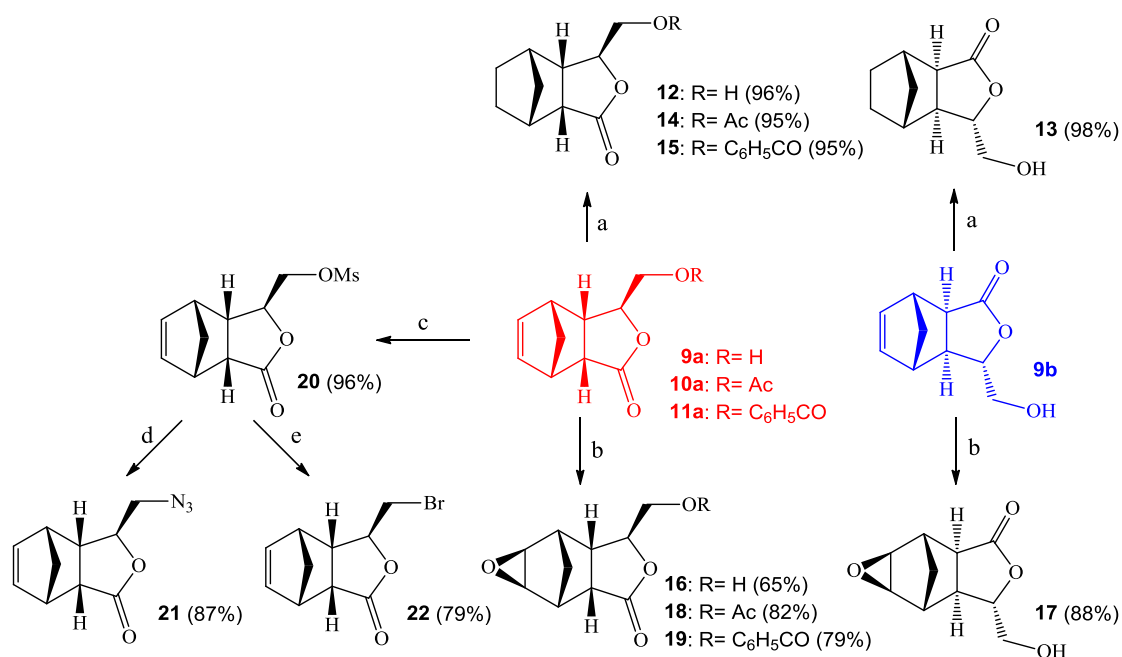
Figura 29: Mapa de contorno *HBMC* do composto **10b**.

1.4.1.3. Modificações Estruturais dos cicloadutos 9a, 9b, 10a e 11a.

Tendo assegurada a síntese dos cicloadutos, concentrou-se esforços na funcionalização dos mesmos. Com isso, foram realizadas modificações na ligação dupla presente nos adutos **9a**, **9b**, **10a** e **11b** realizando reações de epoxidação e hidrogenação (Esquema 7).

Além disso, modificações na hidroxila do composto **9a** também foram realizadas (Esquema 7). Inicialmente a hidroxila foi convertida em um melhor grupo abandonador em reação com o cloreto de mesila. Posteriormente, o composto mesilado **20** foi usado para a obtenção de dois novos compostos (**21** e **22**). O primeiro composto foi obtido através da reação de **20** com azida de sódio fornecendo o composto **21** e o outro foi obtido através da reação de **20** com NaBr obtendo o composto **22**.

A seguir, será apresentada apenas a discussão dos produtos obtidos a partir do aduto **10a** devido à alta similaridade das moléculas obtidas.



Esquema 7: Modificações sintéticas dos cicloadutos obtidos na reação de Diels Alder. Reagentes e condições: (a) H₂, cat. Pd/C, etanol, 4-6h, 25 °C; (b) AMCPB, DCM, 4-6 h, 50 °C; (c) MsCl, Et₃N, DCM, -78 °C por 30 min; 25 °C por 12 h; (d) NaN₃, DMA, 25 °C; 5 dias; (e) NaBr, DMA, 25 °C; 5 dias.

1.4.1.3.1. Reações de Hidrogenação

A síntese do composto **14** foi realizada por reação de hidrogenação da dupla ligação C=C do composto **10a**. A obtenção da substância **14** foi inicialmente investigada pela análise do seu espectro no infravermelho (Figura 30) onde é possível observar a presença de duas bandas intensas em 1762 e 1738 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O das carbonilas do grupo acetila e da lactona, respectivamente.

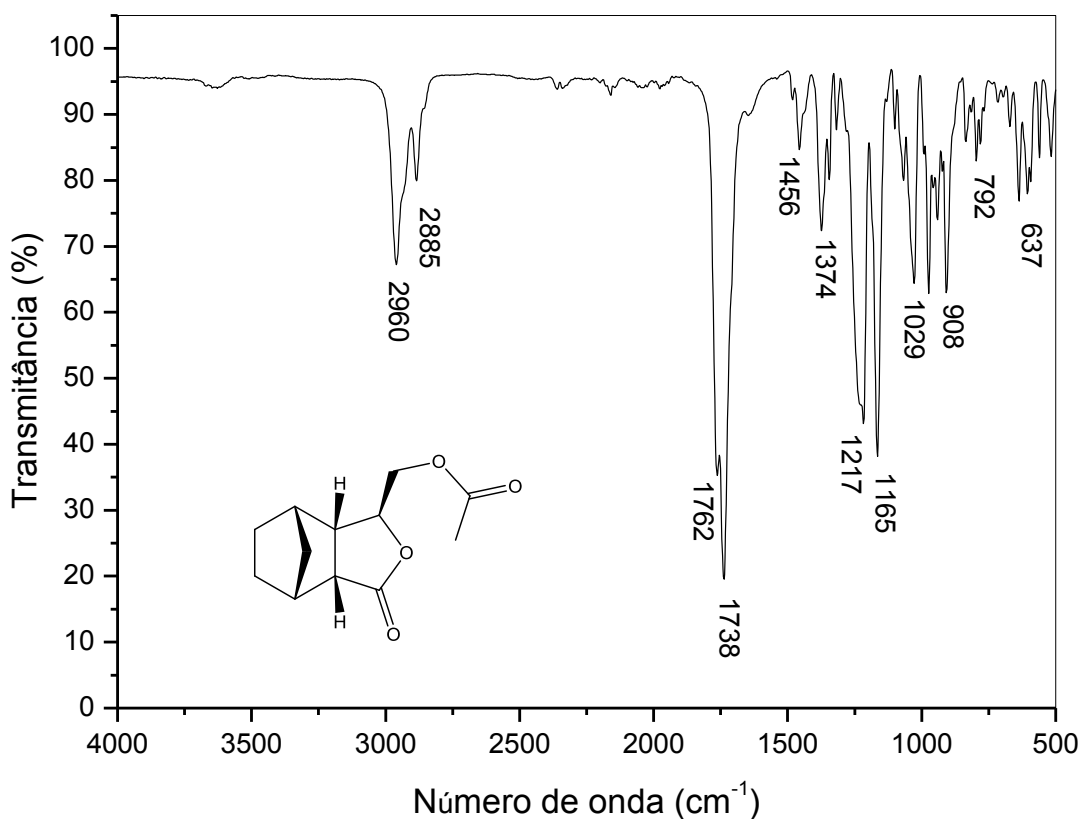
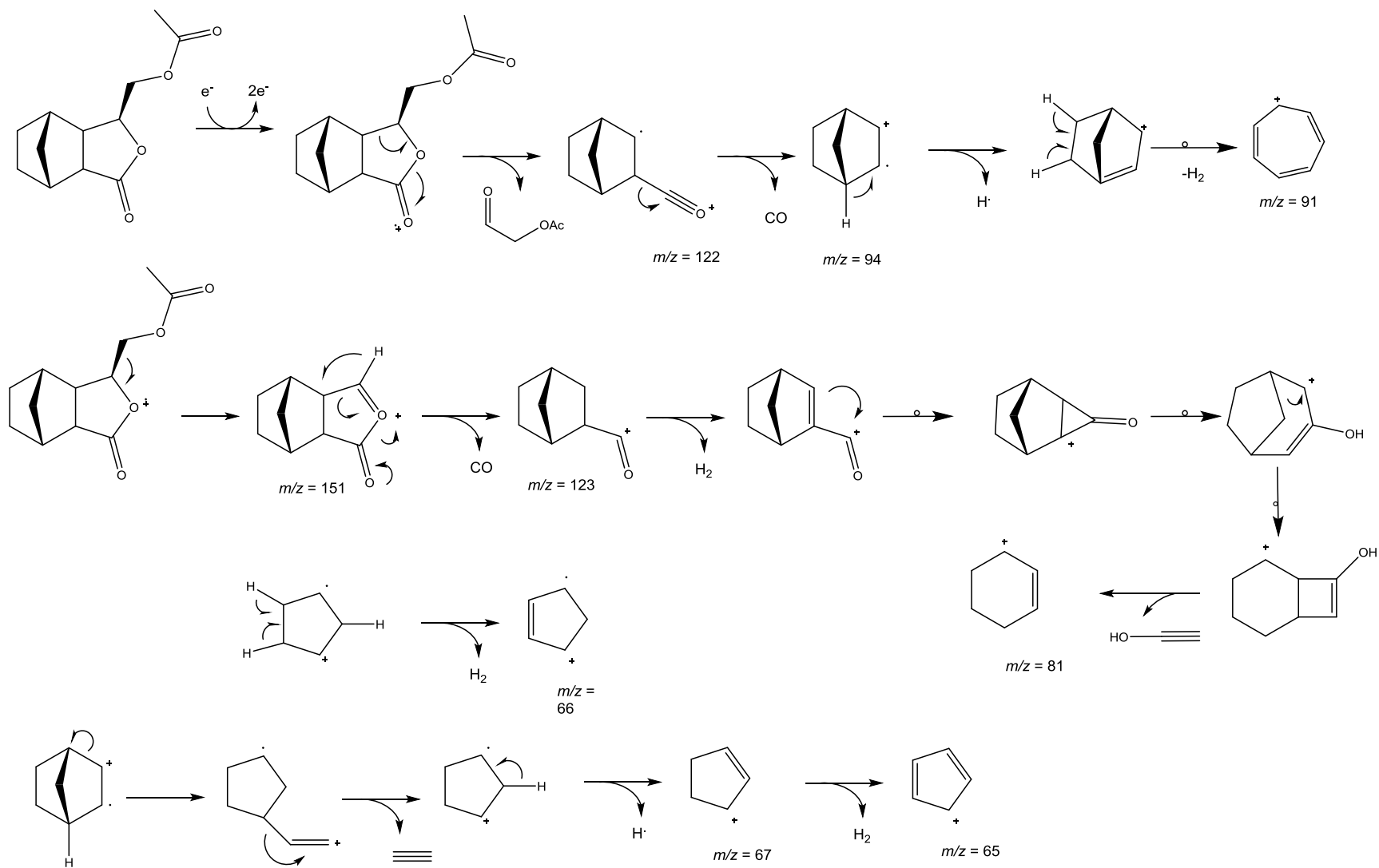


Figura 30: Espectro no Infravermelho do composto **14**.

No espectro de massas do composto **14** (Figura 31, p. 65) foi observado o pico base em m/z 67. As propostas mecanísticas para a fragmentação dos íons obtidos são apresentadas no Esquema 8 (p. 64).



Esquema 8: Proposta mecanística para principais fragmentos dos compostos **14**.

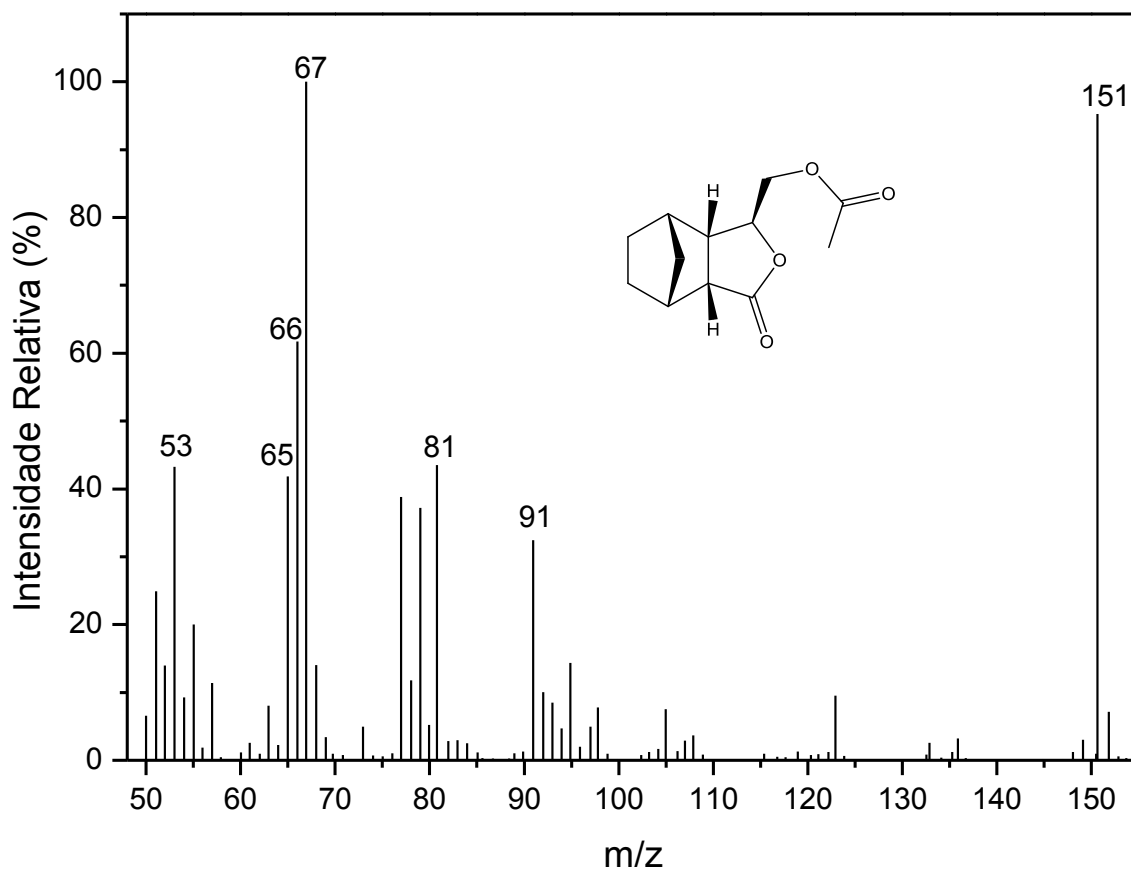


Figura 31: Espectro de massas do composto **14**.

A ausência de sinais em δ 6,30 e 6,24 no espectro de RMN de ^1H é forte evidência da formação do produto hidrogenado visto que, no espectro de RMN de ^1H do composto **10a** (Figura 17, p. 48) esses sinais estão presentes como dois duplos dupletos correspondentes aos hidrogênios olefínicos da molécula.

Os sinais de hidrogênios mais desblindados observados no espectro de RMN de ^1H do composto **14** (Figura 32, p. 67) foram facilmente atribuídos como H3 (δ 4,54 – 4,59), H9 (δ 4,24) e H9' (δ 4,09), enquanto que os sinais mais blindados foram vistos como um multipletto em δ 1,47 – 1,57 integrado para 6 hidrogênios, sendo assim referente os hidrogênios H5, H5', H6, H6', H8 e H8'. O simpleto em 2,06 ppm foi atribuído aos hidrogênios metílicos H11.

Pelo mapa de contorno COSY (Figura 33, p. 68) foi possível atribuir o sinal de H7a ao multipletto em δ 3,00 – 3,25 devido a mancha de correlação com o multipletto relativo ao hidrogênio H3a (δ 2,57 – 2,63). Essa atribuição pode ser confirmada pelo mapa de contorno NOESY (Figura 34, p. 69).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35, p. 70) observou-se sinais em δ 170,5 e δ 177,8 que foram atribuídos às carbonilas do grupo acetila (C10) e da lactona (C1), respectivamente. O sinal do carbono metílico foi atribuído ao sinal em 20,7 ppm.

A obtenção do composto **14** pode ser evidenciada devido à ausência de sinais na região típica de carbonos olefínicos, cujos deslocamentos químicos podem variar de 110 a 140 ppm (BARBOSA, 2008). Os carbonos C5 (δ 22,0) e C6 (δ 25,2) foram atribuídos a partir das correlações C5/H3a e C6/H7a observadas no mapa de contorno *HMBC* (Figura 37, p.72). Ainda com o auxílio do mapa de contorno *HMBC* atribuiu-se o sinal do hidrogênio H7 (δ 2,65 – 2,67) devido a correlação observada com C3a (δ 45,0). Os demais sinais de carbono foram atribuídos com o auxílio das correlações vistas no mapa de contorno *HSQC* (Figura 36, p.71).

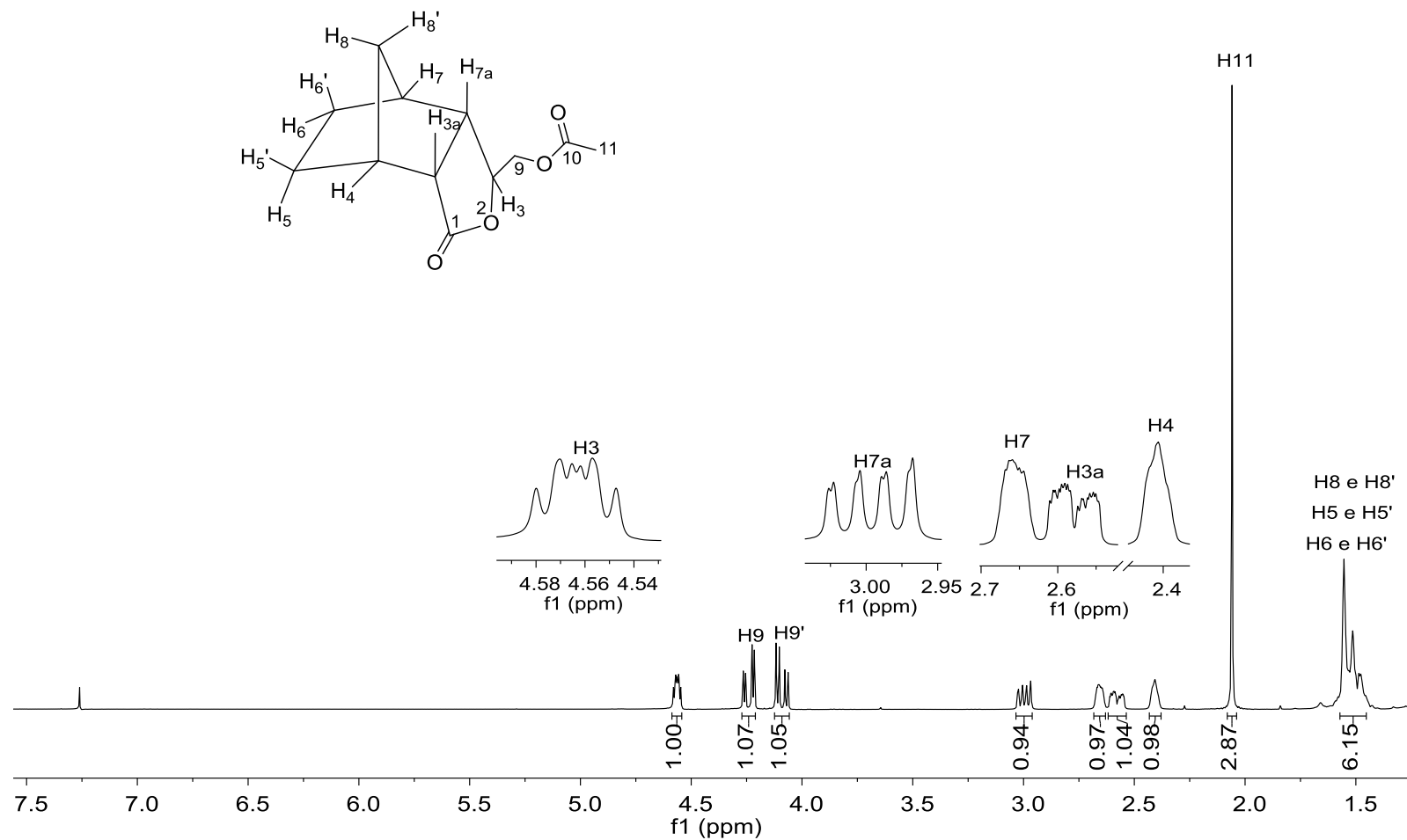


Figura 32: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **14**.

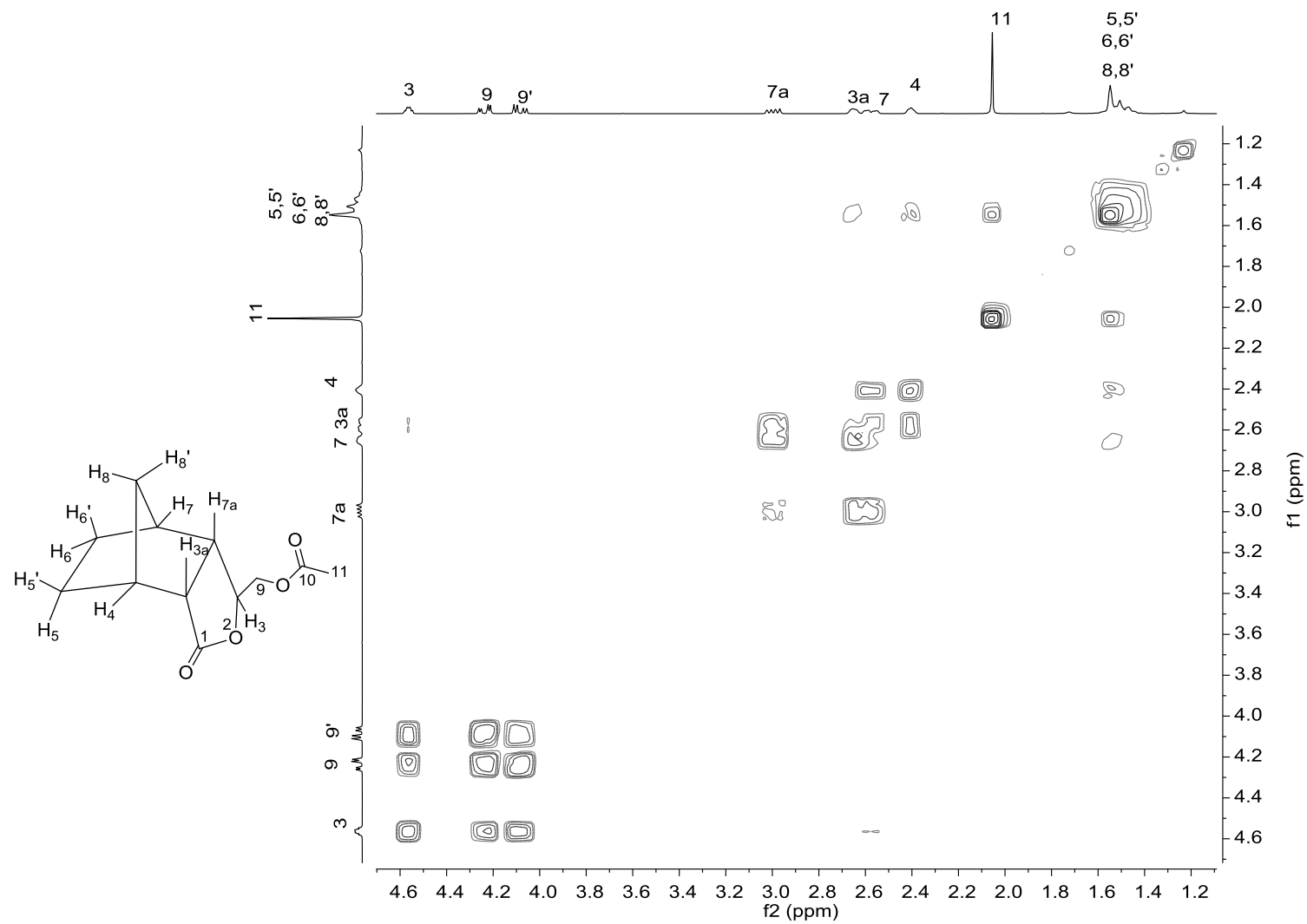


Figura 33: Mapa de contorno COSY do composto 14.

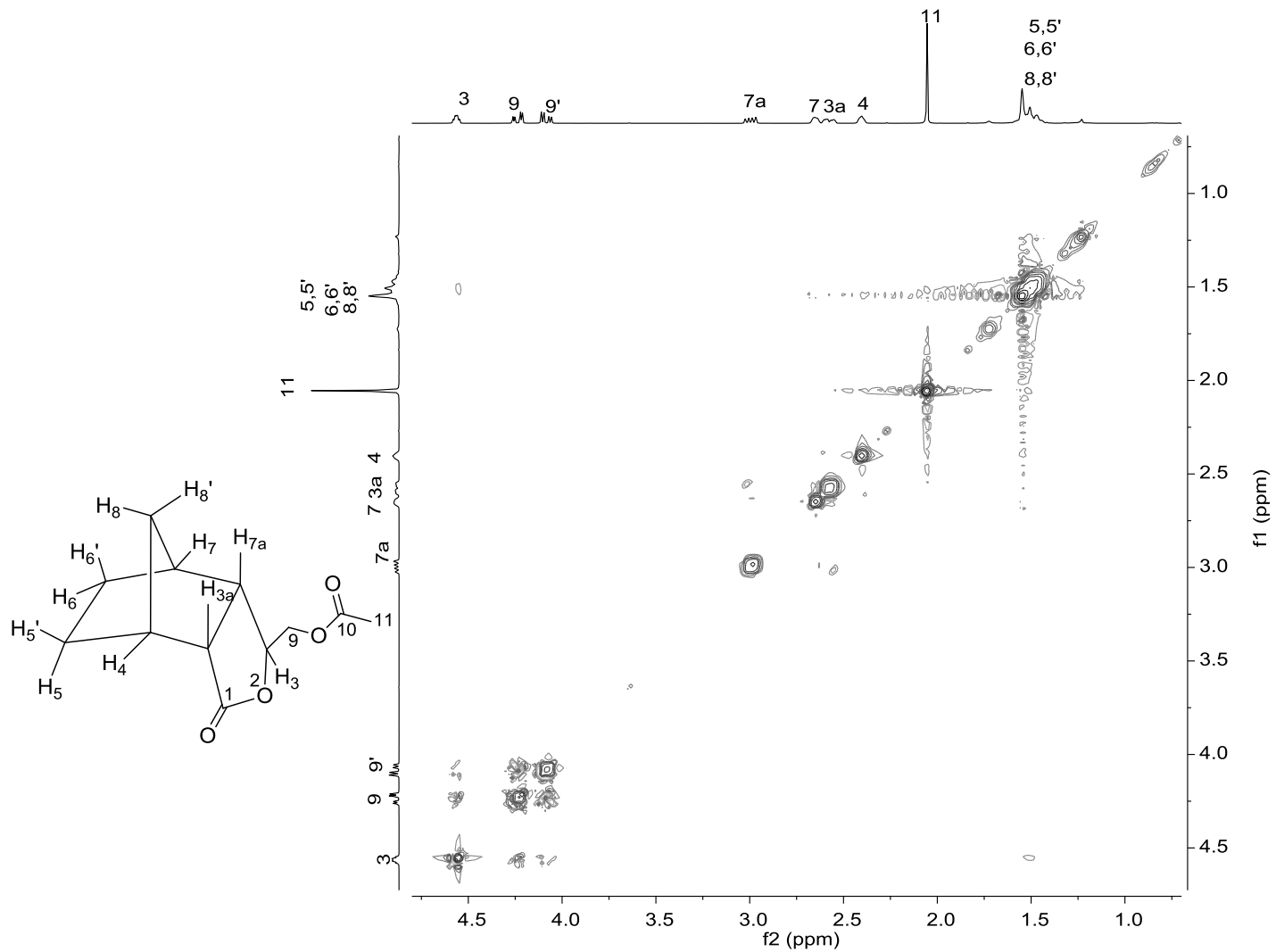


Figura 34: Mapa de contorno *NOESY* do composto **14**.

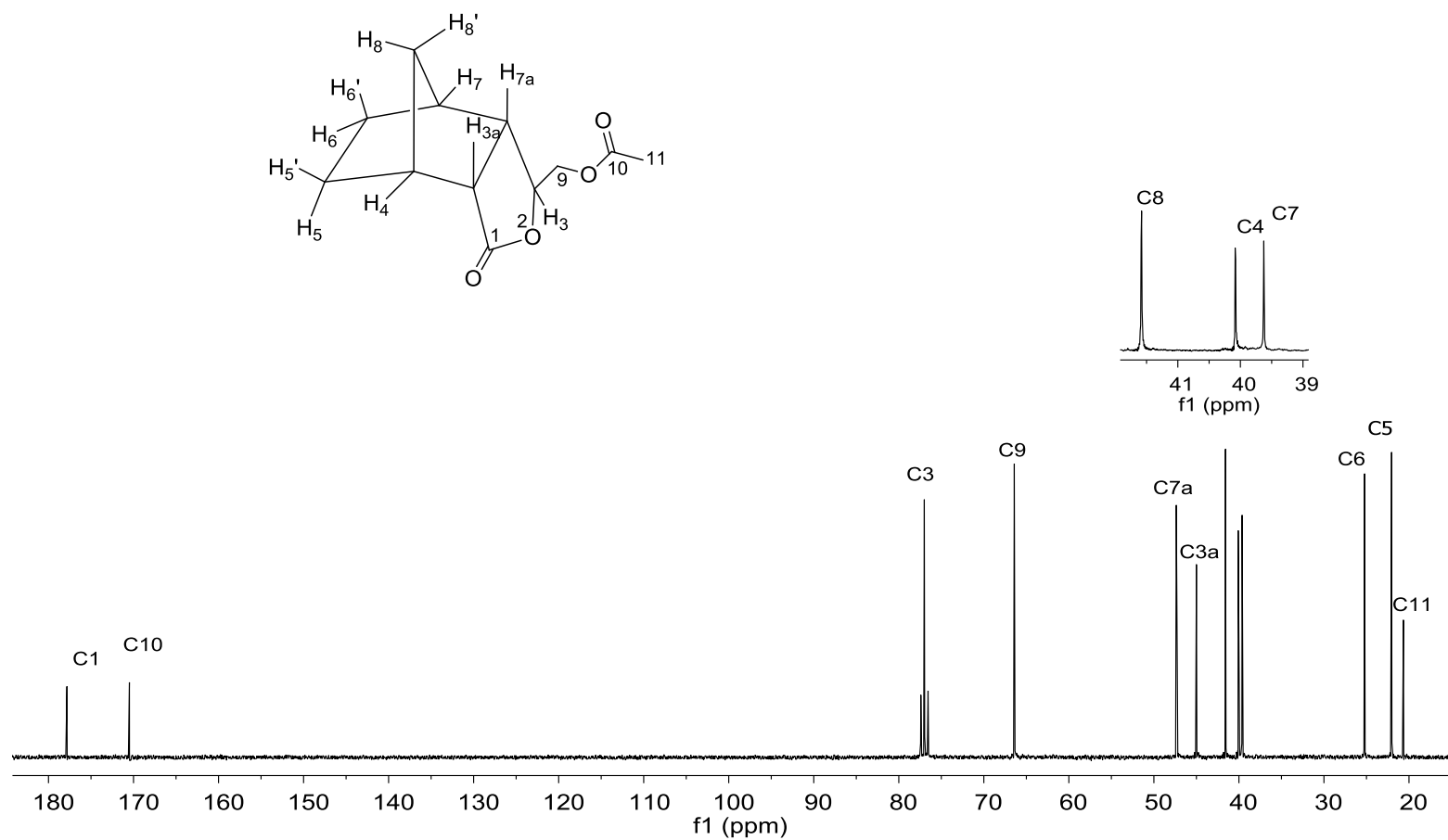


Figura 35: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **14**.

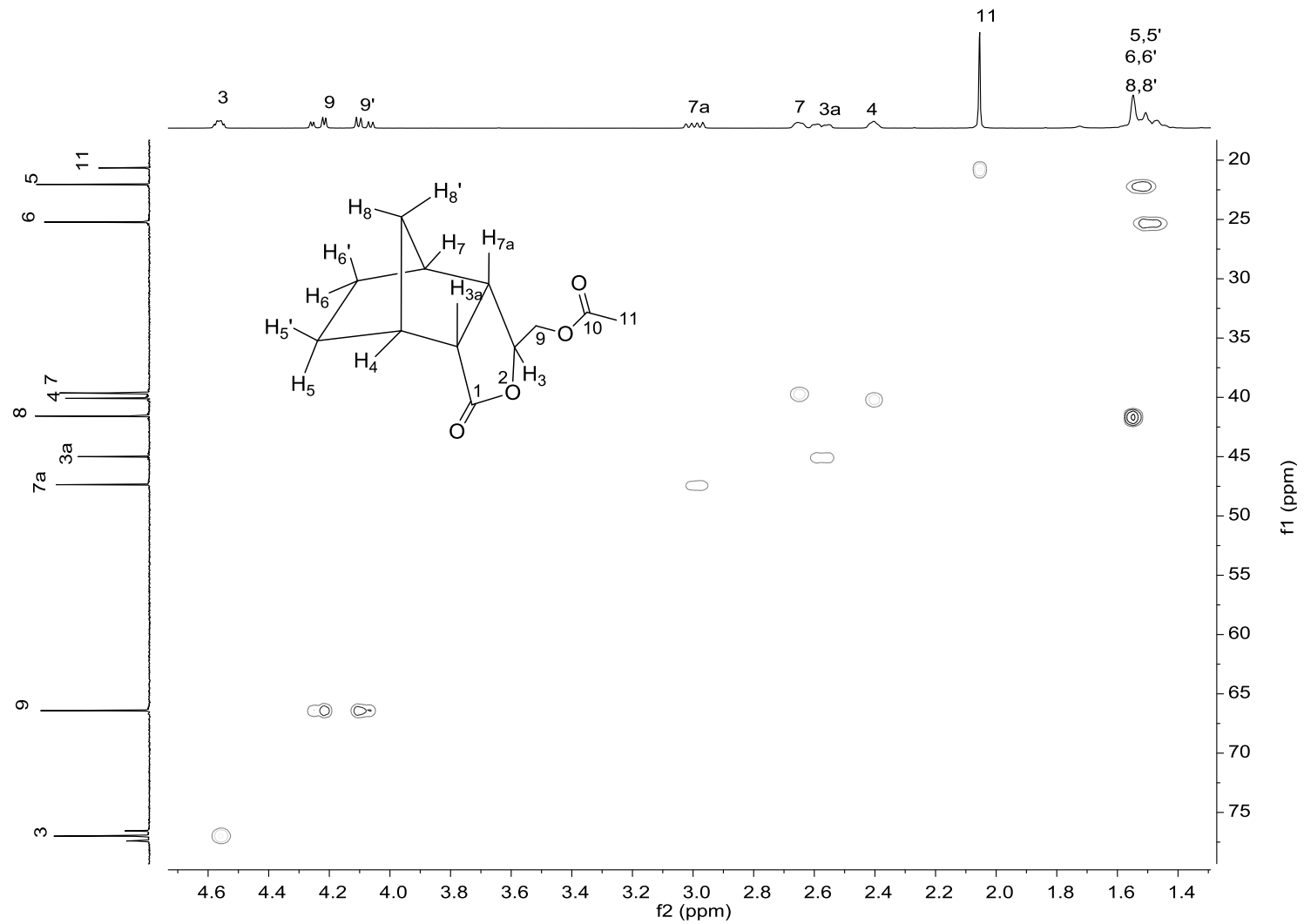


Figura 36: Mapa de contorno *HSQC* do composto 14.

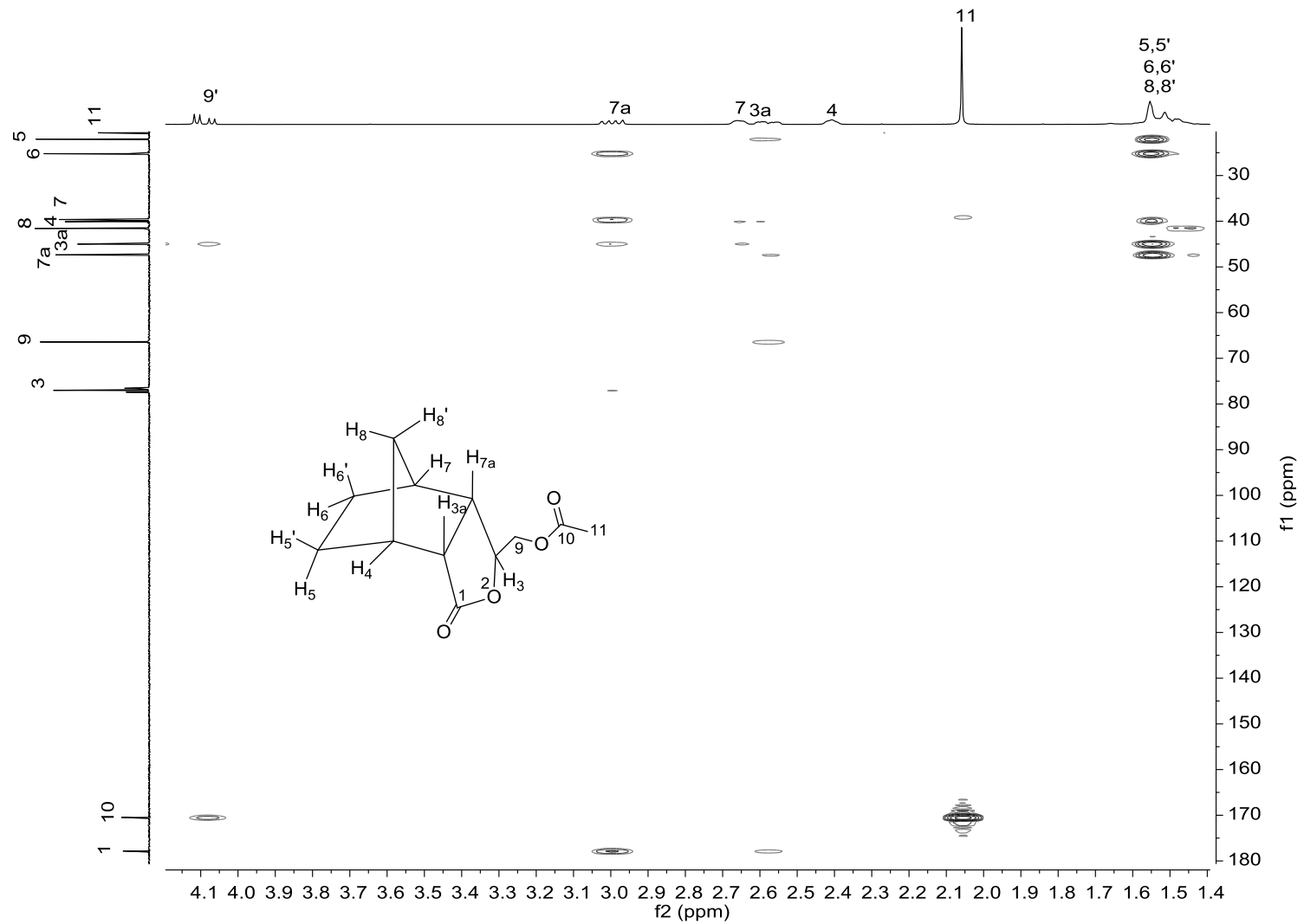


Figura 37: Mapa de contorno *HBMC* do composto 14.

1.4.1.3.2. Reações de epoxidação

A fim de avaliar a influência dos oxiranos na atividade dos compostos sintetizados, propôs-se a oxidação dos adutos **9a**, **9b**, **10a** e **11a** com ácido *m*-cloroperbenzóico para a obtenção dos respectivos epóxidos. A reação de epoxidação do composto **10a** foi realizada em tubo selado a 50 °C sob agitação por 5 horas até que todo material de partida fosse consumido. Após a elaboração o composto **18** foi obtido como um óleo amarelo cujo rendimento de síntese foi de 82%.

No espectro no infravermelho do composto **10a** (Figura 38) as bandas referentes aos estiramentos das ligações C=O da lactona e C=O do grupo acetila foram observadas em 1736 cm⁻¹ e 1763 cm⁻¹, respectivamente. A modificação estrutural obtida pela reação de epoxidação não pode ser observada pela comparação dos espectros no infravermelho entre o composto **10a** (Figura 13, p. 44) e o composto **18** (Figura 38). Dessa forma, outras técnicas espectrométricas e espectroscópicas foram realizadas para a elucidação da estrutura do composto **18**.

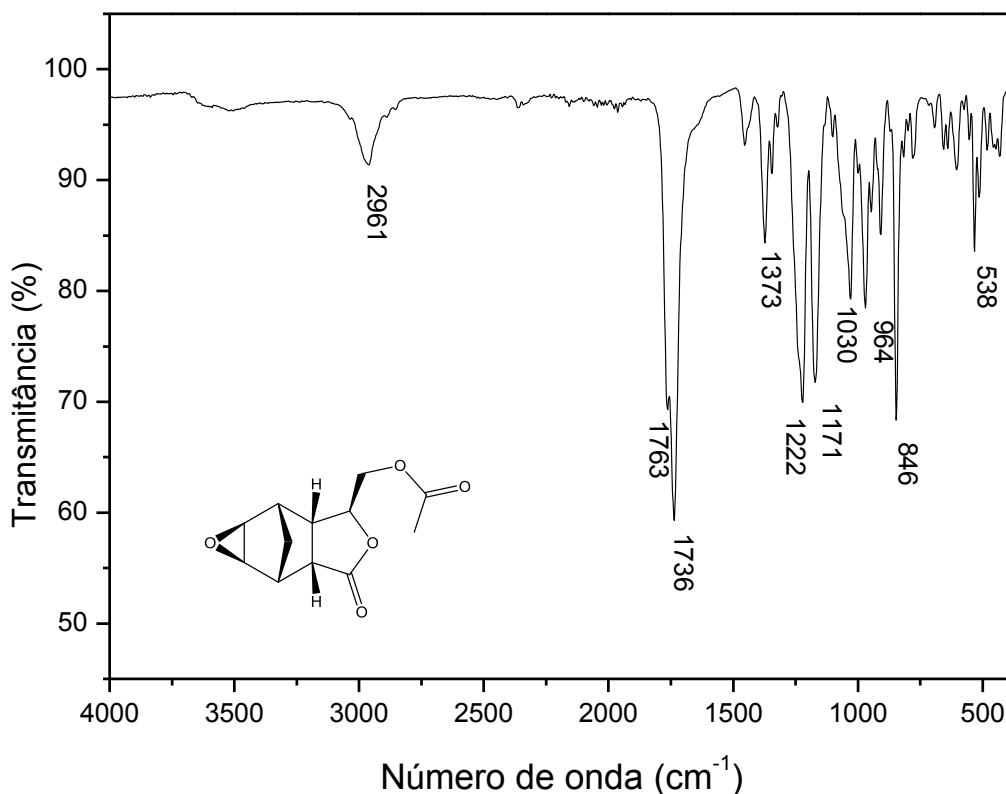


Figura 38: Espectro no Infravermelho do composto **18**.

O pico do íon molecular referente ao composto **18** não foi observado em seu espectro de massas (Figura 39). Conforme o mecanismo proposto no Esquema 9, o pico base ($m/z = 81$) é formado após a perda da lactona de partida e hidrogênio.

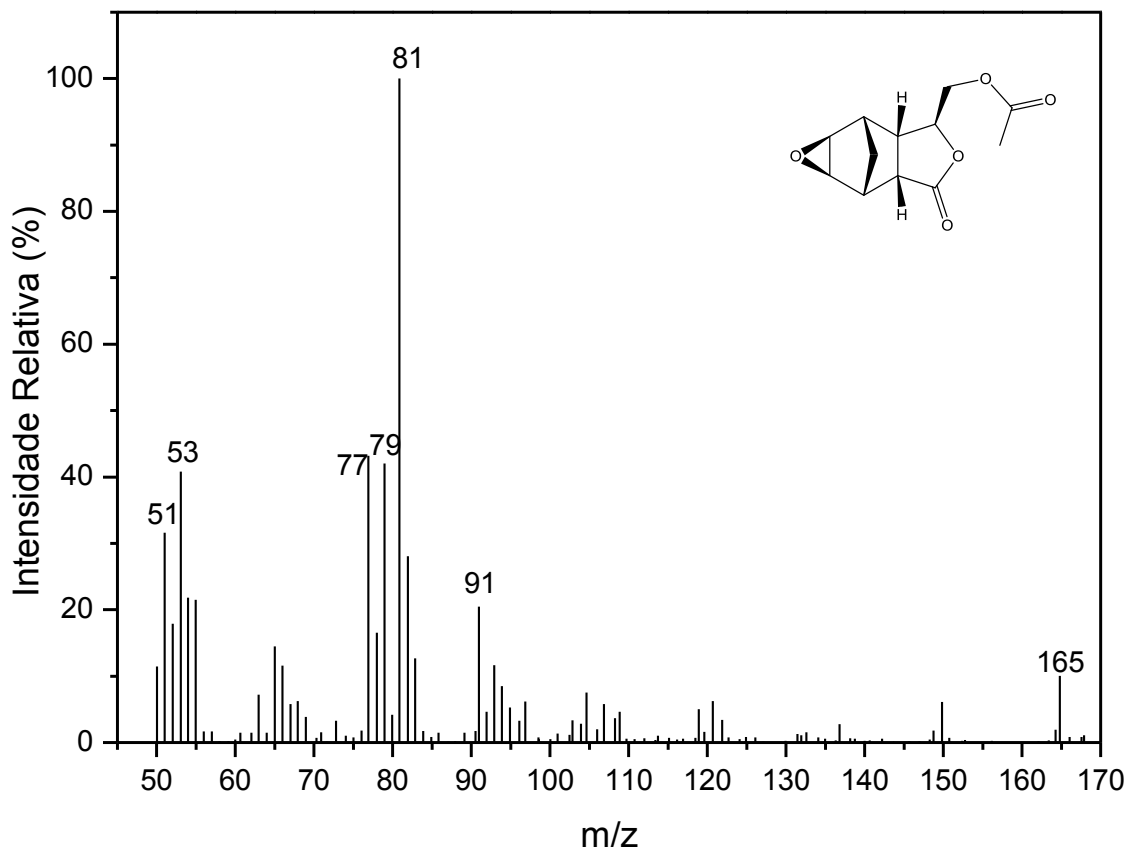
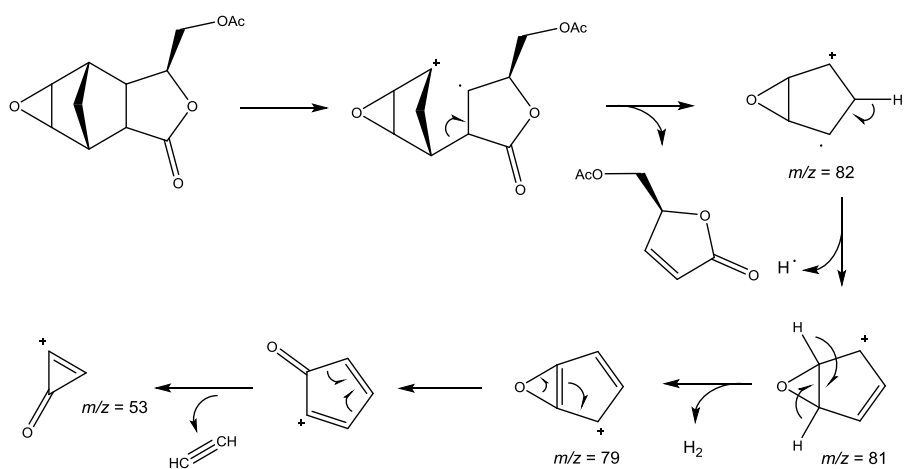


Figura 39: Espectro de massas do composto **18**.



Esquema 9: Proposta mecanística de fragmentação para o composto **18**.

Para a determinação da estrutura **18**, os espectros de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H foram analisados. A ausência de sinais olefínicos tanto no RMN de ^1H quanto no RMN de ^{13}C do composto **18** confirma a ocorrência da reação.

O espectro de RMN de ^1H do composto **18** (Figura 40, p. 77) apresentou um simpleto em δ 2,08, referente aos hidrogênios metílicos H11. Os hidrogênios H3, H9 e H9' são os mais desblindados da molécula **18** e foram visualizados em δ 4,63 – 4,67 (m), δ 4,11(dd), e δ 4,25 (dd), respectivamente. Os hidrogênios mais blindados H8 e H8' foram também facilmente atribuídos aos sinais em δ 1,56 – 1,62 (m) e δ 0,92 - 0,97 (m), respectivamente. O sinal do hidrogênio H8 acopla-se com os sinais dos hidrogênios H8', H4 e H7 formando um multiplete. Já o sinal referente ao H8' além de apresentar acoplamento com H8, H4 e H7, também apresentou acoplamento a longa distância do tipo W com os sinais dos hidrogênios H5 e H6, o que explica multiplete para o hidrogênio H8'.

A partir das correlações observadas no mapa de contornos COSY (Figura 41, p. 78) foi possível atribuir o sinal em δ 2,68 – 2,77 aos sinais dos hidrogênios H3a e H4. Subsequentemente a partir da correlação do multiplete referente aos sinais H3a e H4 com o duplo duplete δ 3,13 ($J = 9,7$ Hz e $J = 5,2$ Hz) pode-se atribuir o hidrogênio H7a. A atribuição do multiplete em δ 3,30 - 3,34 relacionado aos hidrogênios H5 e H6 foi estabelecida pelas correlações cruzadas com H4 e H7 também observadas no COSY (Figura 41, p. 78). A posição relativa do hidrogênio H3a foi estabelecida pelas correlações cruzadas com os hidrogênios H7a e H8' observadas no mapa de contorno NOESY (Figura 42, p. 79).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43, p. 80) os sinais de carbonos facilmente atribuídos são os carbonos mais desblindados C1 (δ 175,7) C10 (δ 170,4), C3 (δ 76,2) e C9 (δ 66,1) e o carbono mais blindado C11 (δ 20,7). Os sinais dos carbonos C7 (δ 39,2) e C7a (δ 46,2) foram determinados com o auxílio dos mapas de contorno HSQC (Figura 44, p. 81).

O mapa de correlação HMBC (Figura 45, p. 82) foi usado para confirmar a atribuição do sinal em δ 3,13 como sendo H7a de acordo com a correlação com o grupo carbonila em 175,7 ppm. Também com o auxílio do mapa de contorno HMBC (Figura 45) foi possível definir os sinais dos carbonos C5

(δ 47,3) e C6 (δ 48,4) devido a correlação vista entre C6/H7a e C5/H3a. O sinal do carbono C4 foi estabelecido em 39,8 ppm devido a correlação observada com o H7a. Por fim, atribuiu-se C3a como sendo o sinal em 44,5 ppm devido a correlação com o multiplete em δ 2,95 – 2,98, referente ao sinal do hidrogênio H7.

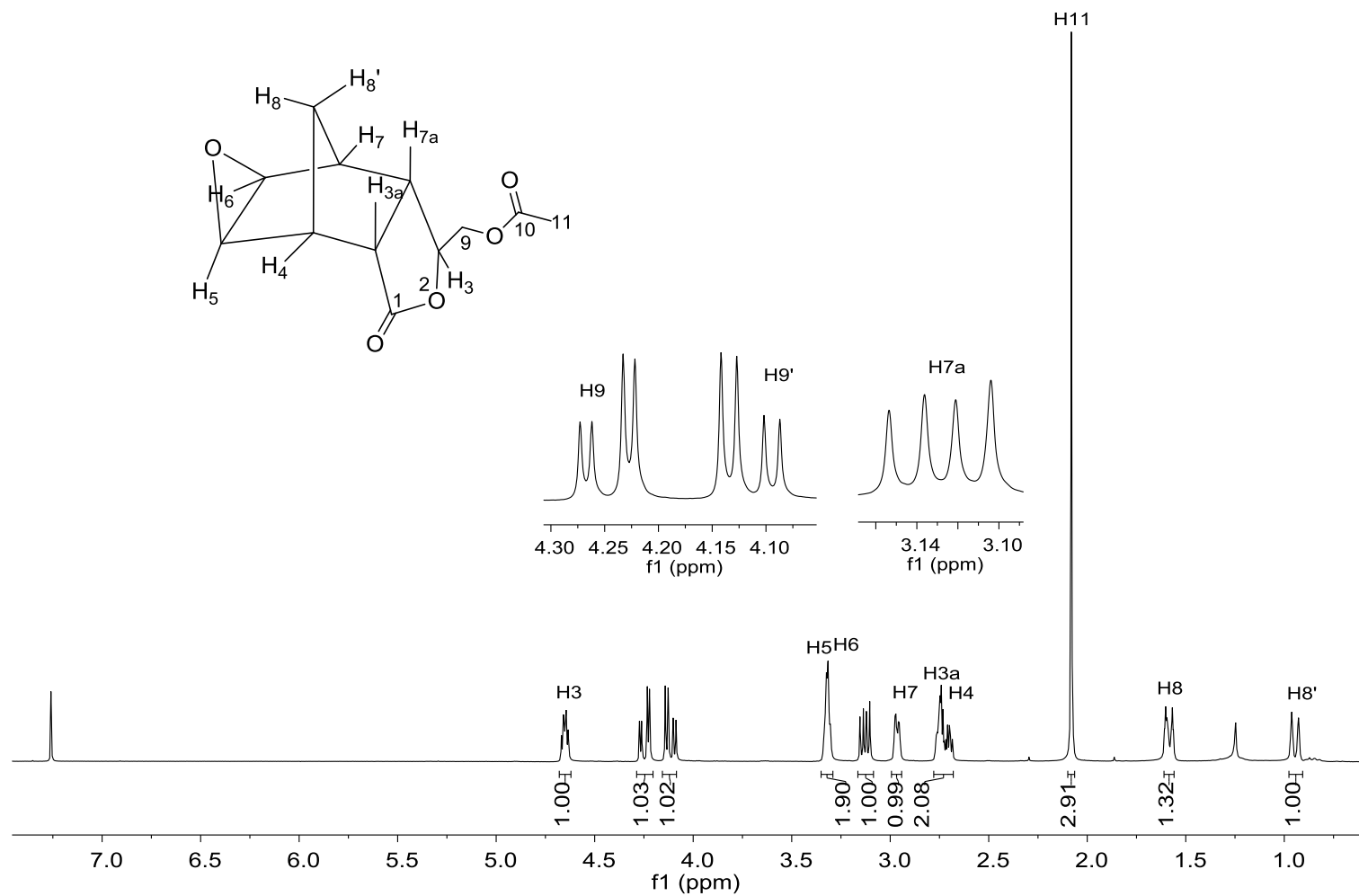


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **18**.

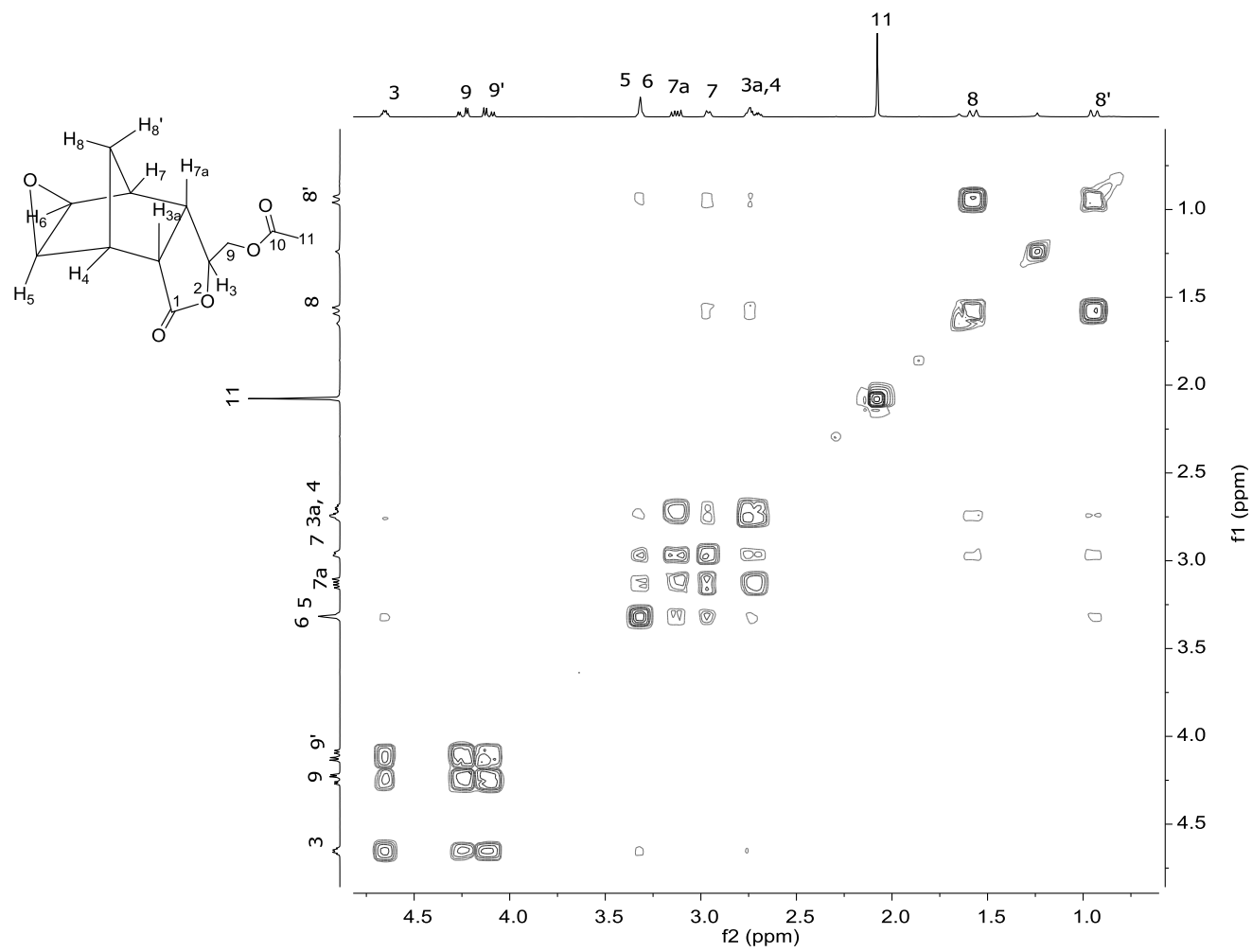


Figura 41: Mapa de contorno COSY do composto **18**.

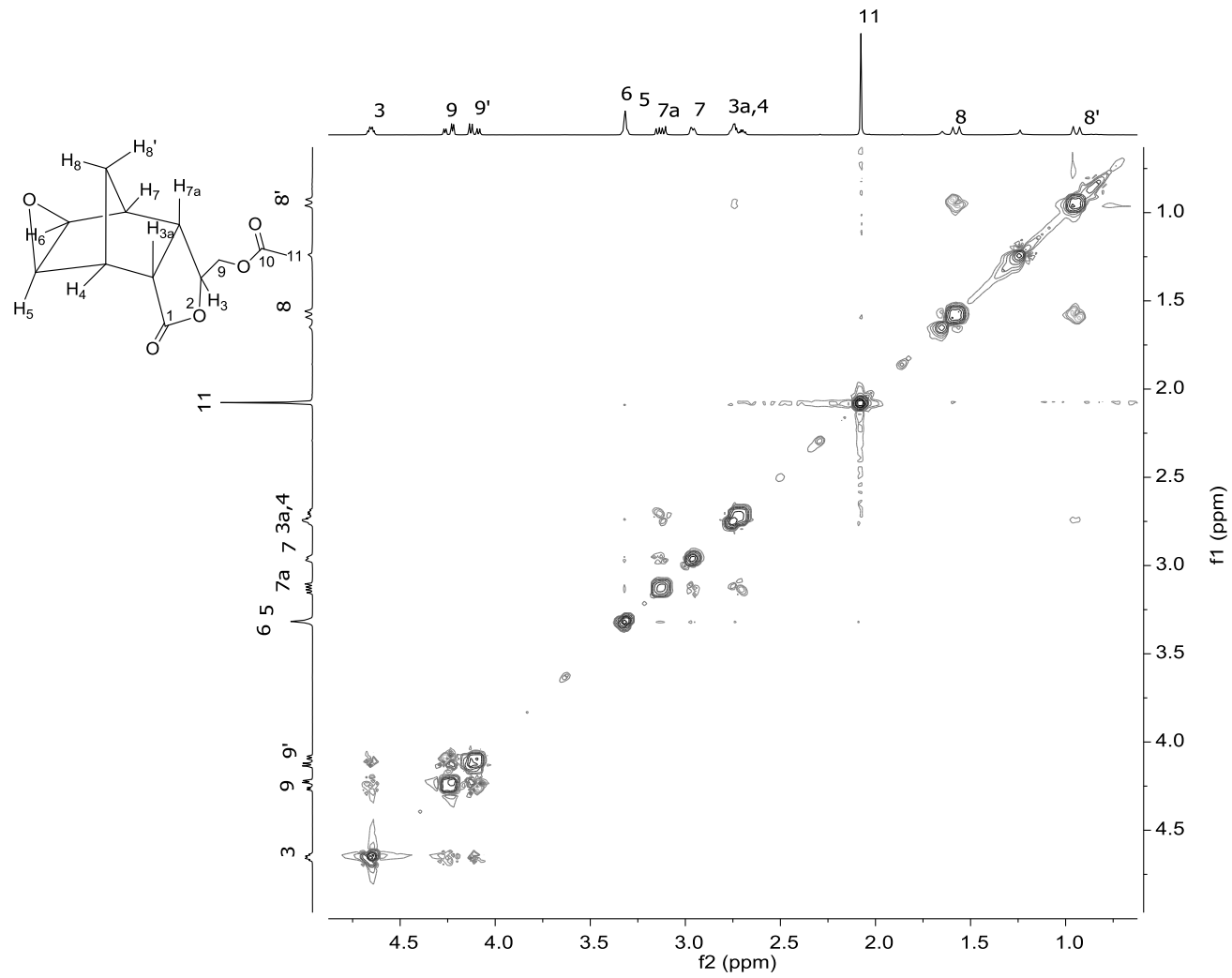


Figura 42: Mapa de contorno NOESY do composto 18.

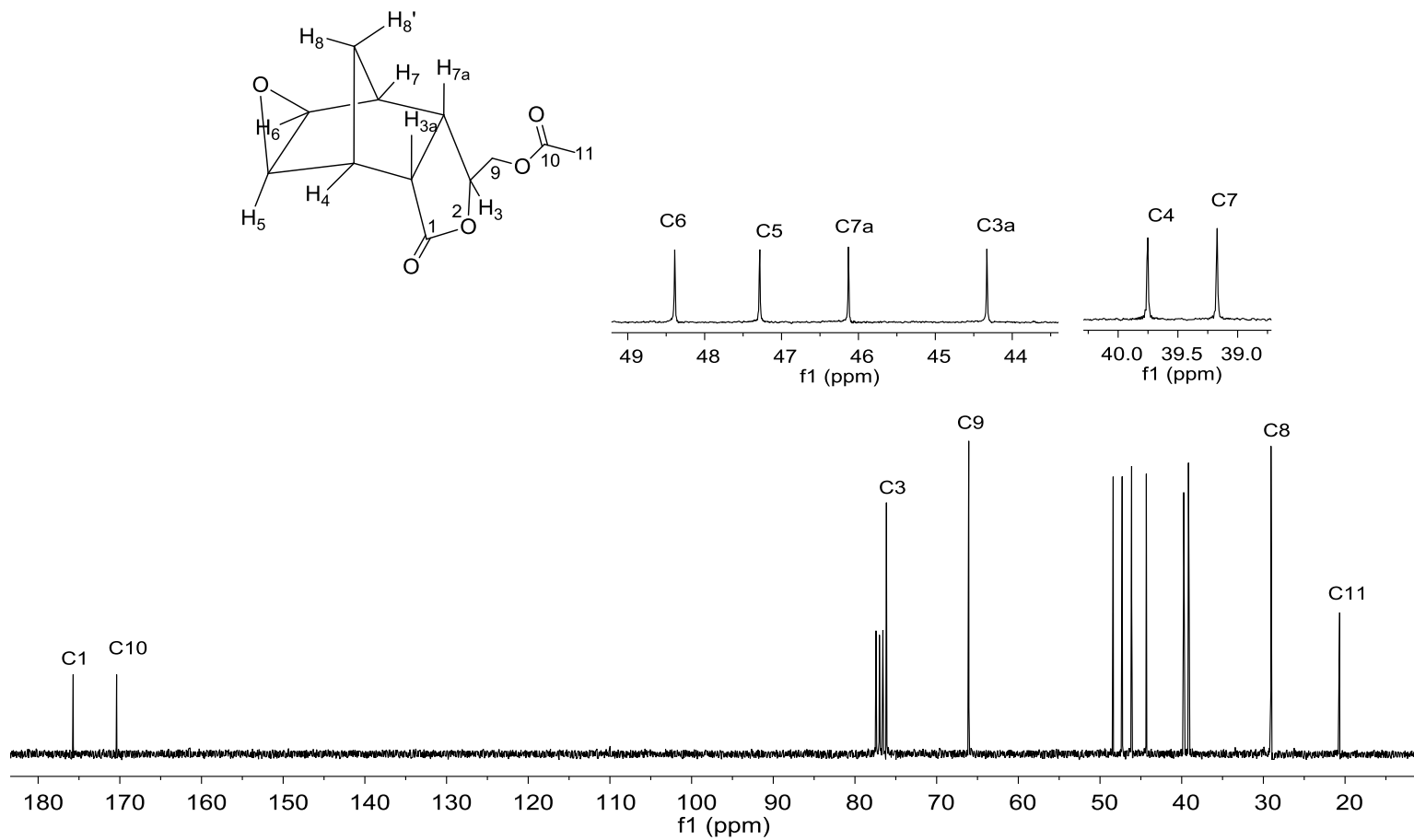


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **18**.

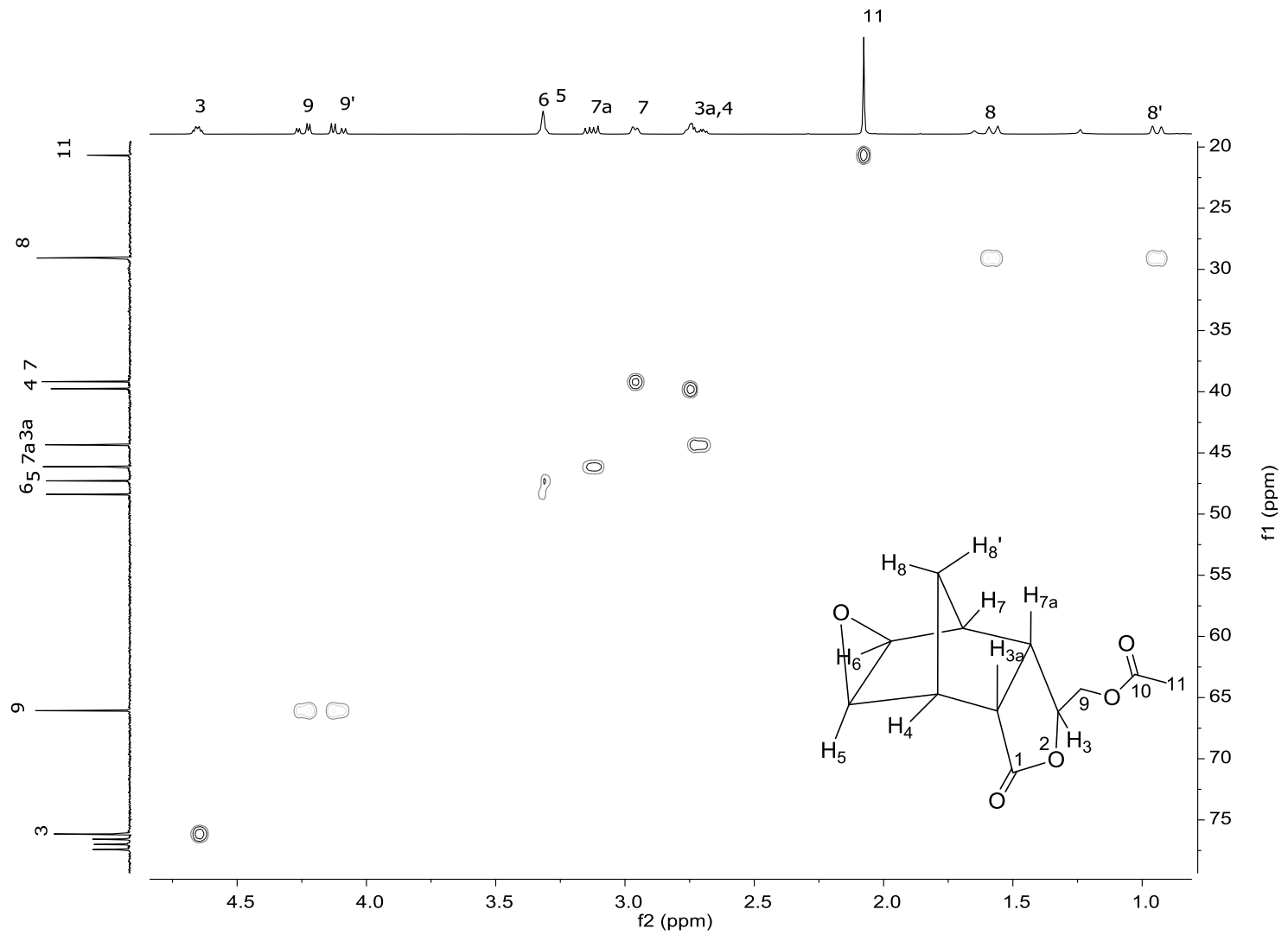


Figura 44: Mapa de contorno HSQC do composto 18.

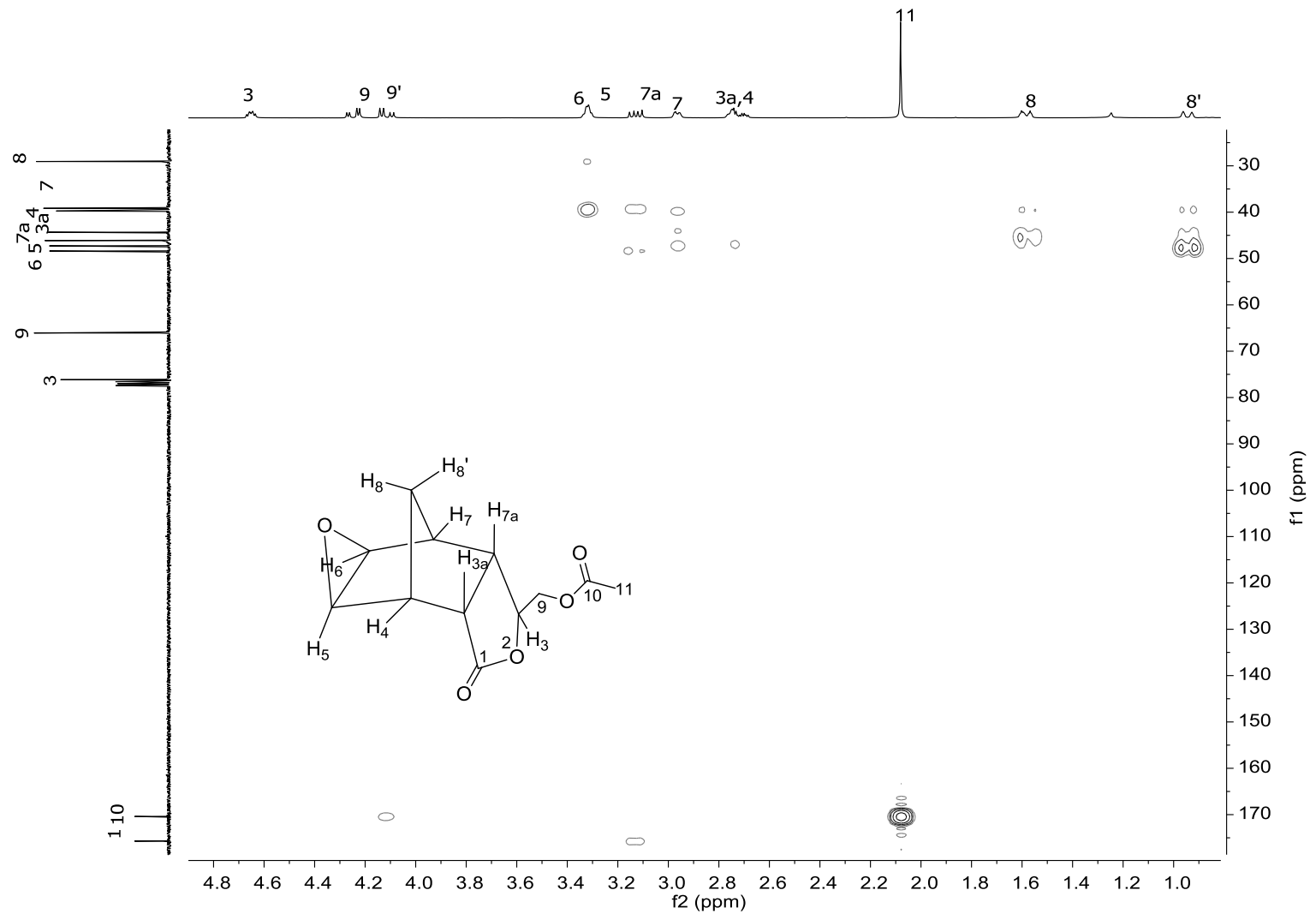


Figura 45: Mapa de contorno *HMBC* do composto **18**.

1.5. CONCLUSÃO

Três γ -lactonas α,β -insaturadas (**6**, **7** e **8**) foram sintetizadas e utilizadas como dienófilos em reações de Diels Alder com o ciclopentadieno para a síntese de dezessete derivados de isobenzofuranonas, sendo 14 inéditas, com rendimentos que variaram entre 65 e 98%.

Os derivados de isobenzofuranonas sintetizados foram caracterizados via espectroscopia no IV e de RMN, bem como espectrometria de massas. Técnicas bidimensionais (*COSY*, *NOESY*, *HMBC* e *HSQC*) auxiliaram na atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e nas atribuições das configurações relativas das estruturas. As configurações absolutas das estruturas também foram definidas, devido a síntese enantiosseletiva a partir do poliol natural.

1.6. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, E. S.; CARNEIRO, V. M. T.; SILVÉRIO, F. O.; SALIBA, W. A. A High Yield Synthesis of 1,2:5,6-Di-O-Isopropylidene-D-Mannitol. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 51 (3), p. 986-988, 2006.

ANDEF. **Associação Nacional de Defesa Vegetal**. Acessado em: 17 maio, 2018. Disponível: www.undef.com.br.

BAER, E. 1,2,5,6-diacetone *D*-mannitol and 1,2,5,6-diactonide *d*-mannitol. **Journal the American Chemical Society**. v. 67, p. 338-339, 1945.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 189 p.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; FILOMENO, C. A.; SILVA, A. A. Síntese de novos herbicidas derivados do 1,2 α ,4 α ,5-tetrametil-8oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-ona. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 241-246, 2004.

BATLLORI, R; FONT, J; NONSALVATJE, M; ORT α O, R. M; SANCHEZ-FERRANDG, F. Diels Alder Cycloadditiows of chiral butenolides with cyclopentadiene: exo/endo selectivity. **Tetrahedron** v. 45, n. 6, p. 1833-1838, 1989.

BENMEDDAH, A.; MEKELLECHE, S. M.; BENCHOUK, W.; MOSTERA-KARA Kara, B.; VILLEMIN, D. Prediction of the reactivity of 2(5H)-furanones as potential dienophiles in Diels–Alder reactions using philicity indexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 821,p. 42-46, 2007.

CANTRELL, C. L., DAYAN, F. E., DUKE S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1231-1242, 2012.

CHEN, X. W.; Li, C. W.; CUI, C. B.; HUA, W.; Zhu, T. J.; GU, Q. Q. Nine New and Five Known Polyketides Derived from a Deep Sea-Sourced *Aspergillus* sp. **Marine Drugs**, v. 12, p. 3116-3137, 2014.

CONSTANTINO, M. G.; Jr. LACERDA, V.; SILVA, G. V. J.; TASIC, L.; RITTNER, R. Principal component analysis of long-range '*W*' coupling constants of some cyclic compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 597, p. 129-136, 2001.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z. A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493-506, 2011.

FRINGUELLI, F.; TATICCHI, A. **The Diels Alder Reaction: Selected Practical Methods**, Wiley: Chichester, 2002. 358 p.

GOSH, A. K; LESHCHENKO, S; NOETZEL, M. Stereoselective Photochemical 1,3-Dioxolane Addition to 5-Alkoxyethyl-2(5*H*)-furanone: Synthesis of Bis-tetrahydrofuranyl Ligand for HIV Protease Inhibitor UIC-94017 (TMC-114). **Journal Organic Chemistry**, v. 69, p. 7822-7829, 2004.

GUO, Y.; QU, H.; ZHI, X.; Yu, X.; YANG, C.; XU, H. Semisynthesis and Insecticidal Activity of Some Fraxinellone Derivatives Modified in the B Ring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 11937-11944, 2013.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Compendium of Chemical Terminology. Acessado em: 19 maio, 2018. Disponível: <http://goldbook.iupac.org>.

KARMAKAR, R.; PAHARI, P.; MAL D. Phthalides and Phthalans: Synthetic Methodologies and Their Applications in the Total Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 6213-6284, 2014.

KUANG, X.; CHEN, Y.; WANG, L. F.; LI, Y.; LIU, K.; ZHANG, M.; Li, L.; CHEN, C.; He, Q.; WANG, Y.; Du, J. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging** v. 35, p. 169-178, 2014.

KUMAR, A; NEPAK, D; SRINIVAS, D. Direct synthesis of amides from amines using mesoporous Mn-SBA-12 and Mn-SBA-16 catalysts. **Catalysis Communications**, v. 37, p. 36-40, 2013.

KURTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**. London: Elsevier, 2005. 864 p.

LIN, G.; CHAN, S. SK.; CHUNG, HS.; LI, SL. Chemistry and biological activities of Naturally occurring phthalides. **Bioactive Natural Products**, v. 32, p. 611-669, 2005.

LOGRADO, L. P. L.; SANTOS, C. O.; ROMEIRO, L. A. S.; COSTA, A. M.; FERREIRA, J.R. O.; CAVALCANTI, B. C.; DE MORAES, O. M.; COSTA-LOTUFO L. V.; PESSOA. C.; SANTOS, M. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3480-3489, 2010.

MAIA, A. F.; SIQUEIRA, R. P.; DE OLIVEIRA, F. M.; FERREIRA, J. G.; DA SILVA, S.F.; CAIUBY, C. A. D.; DE OLIVEIRA, L. L.; DE PAULA, S. O.; SOUZA, R. A. V.; GUILARDI, S.; BRESSAN, G. C.; TEIXEIRA, R. R. Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 2810-2816, 2016.

MANN, J.; PARTLETT, N. K.; THOMAS, A. A practical synthesis of (S)-5-hydroxymethylfuran-2(5H)-one from 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene-D-mannose. **Journal of Chemical Research**, v. 8, p. 369-371, 1987.

MANN, J.; WEYMOUTH-WILSON, A. C. Photoinduced-addition of Methanol to (5S)-(5-*o*-*ter*-butyldimethylsiloxymethyl)furan-2(5*H*)-one:(4R,5S)-4-hydroxymethyl-(5-*o*-*tert*-butyldimethylsiloxymethyl)furan-2(5*H*)-one. **Organic Syntheses**, v. 10, p. 152-155, 2004.

MISHRA, A.; VINAYAGAM, J.; SAHA, S.; CHOWDHURY, S.; ROYCHOWDHURY, S.; JAISANKAR, P.; MAJUMDER, H. K. Isobenzofuranone derivatives exhibit antileishmanial effect by inhibiting type II DNA topoisomerase and inducing host response. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 2, p. 1-14, 2014.

OLEJNICZAK, T.; BORATYNSKI, F.; BIALONSKA, A. Fungistatic Activity of Bicyclo[4.3.0]- γ -lactones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6071-6081, 2011.

OLIVEIRA, J. M; FREITAS, J. C. J; COMASSETO, J. V; MENEZES, H.P. Synthesis of substituted α,β unsaturated δ -lactones from vinyl tellurides; **Tetrahedron**, v. 67, p. 3003-3009, 2011.

ORTUNO, R. M., CORBERA, J; FONT J. Chiral butenolides as dienophiles in Diels Alder cycloadditions. **Tetrahedron**, v. 27, p. 1081-1084, 1986.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3rd ed., Londres: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994. 340p.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. Environmental and economics costs of the application of pesticides primarily in the United States. **Integrated Pest Management**, v. 3, p. 47-71, 2014.

RESENDE, G.C; ALVARENGA, E. S; WILLOUGHBY, P. H. Isolation and stereochemical assignment of phthalides resulting from the Diels-Alder reaction between 5-isopropoxyfuran-2(5*H*)-one and cyclopentadiene. **Journal of Molecular Structure**, v. 1101, p. 212-218, 2015.

SARDAN, M.; SEZER, S.; GUNEL, A.; AKKAYA, M.; TANYELI, C. Synthesis and biological evaluation of optically active conjugated γ - and δ -lactone derivatives. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 5814-5818, 2012.

SCHMID, C. R.; BRYANT, J. D. D-(R)-Glyceraldehyde Acetonide [1,3-Dioxolane-4-carboxaldehyde, 2,2-dimethyl-, (R)-]. **Organic Syntheses**. v. 72, p. 6-10, 1993.

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107 (1), p. 8-17, 2013.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual**, 14th ed.; BCPC: Alton, UK, 2006. 1349 p.

WIEBE, K. How to feed the world in 2050. **Global Forum on Agriculture**, 2012. Acessado em: 05 maio, 2018. Disponível: <http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/43256458.pdf>

YANAI, H.; TAKAHASHI, A.; TAGUCHI, T. Development of effective Lewis acids for the catalytic Diels-Alder reaction of α,β -unsaturated lactones with cyclopentadiene, **Tetrahedron**, v. 48, p. 2993-2997, 2007.

YASMIN, N.; RAY, J. K. Synthesis of phthalides utilizing a one-pot intramolecular domino protocol. **RSC Advances**, v. 3, p. 25631-25635, 2013.

ANEXOS

ESPECTROS NO INFRAVERMELHO, DE MASSAS E DE RMN DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

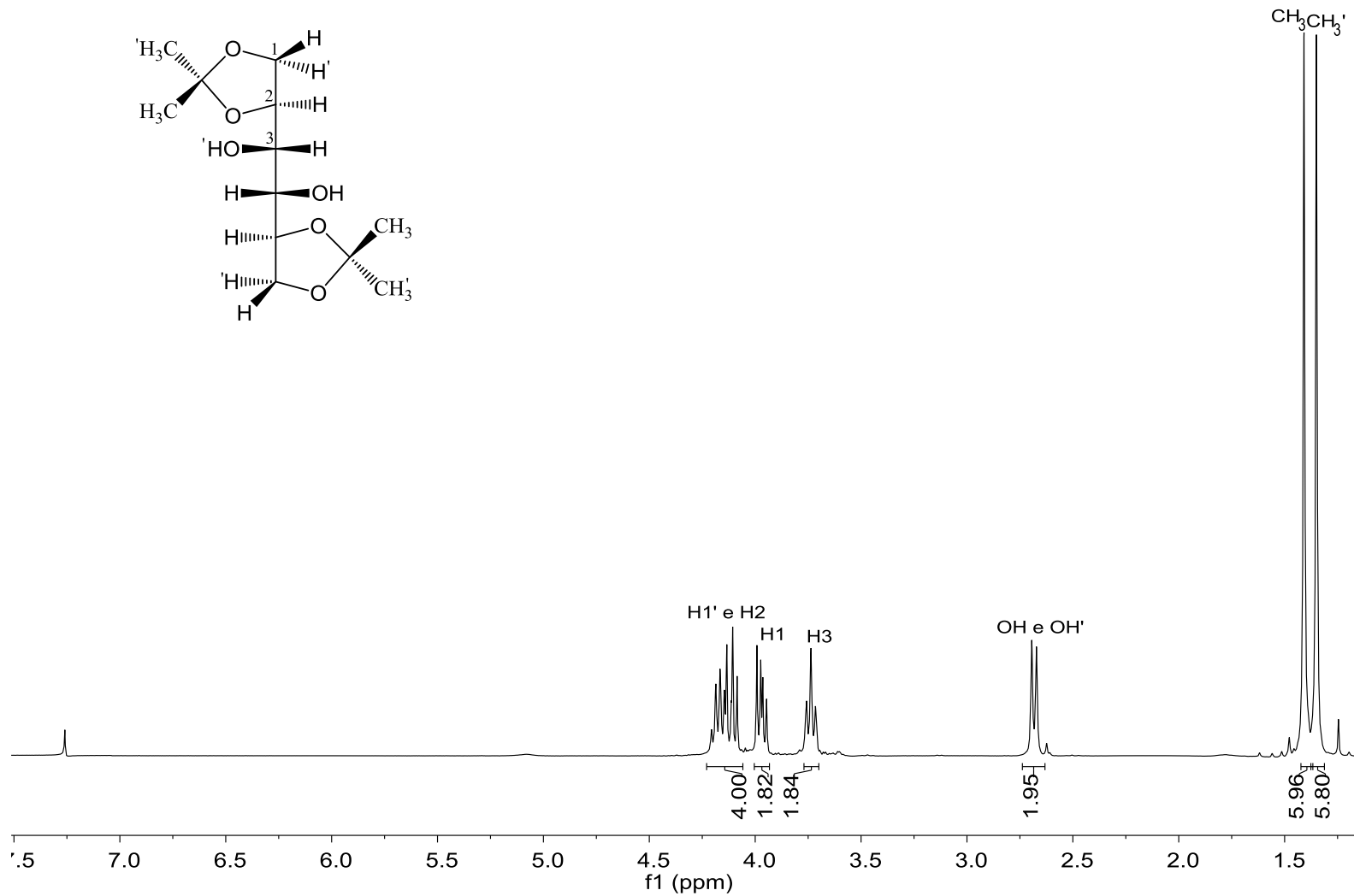


Figura A1: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **1**.

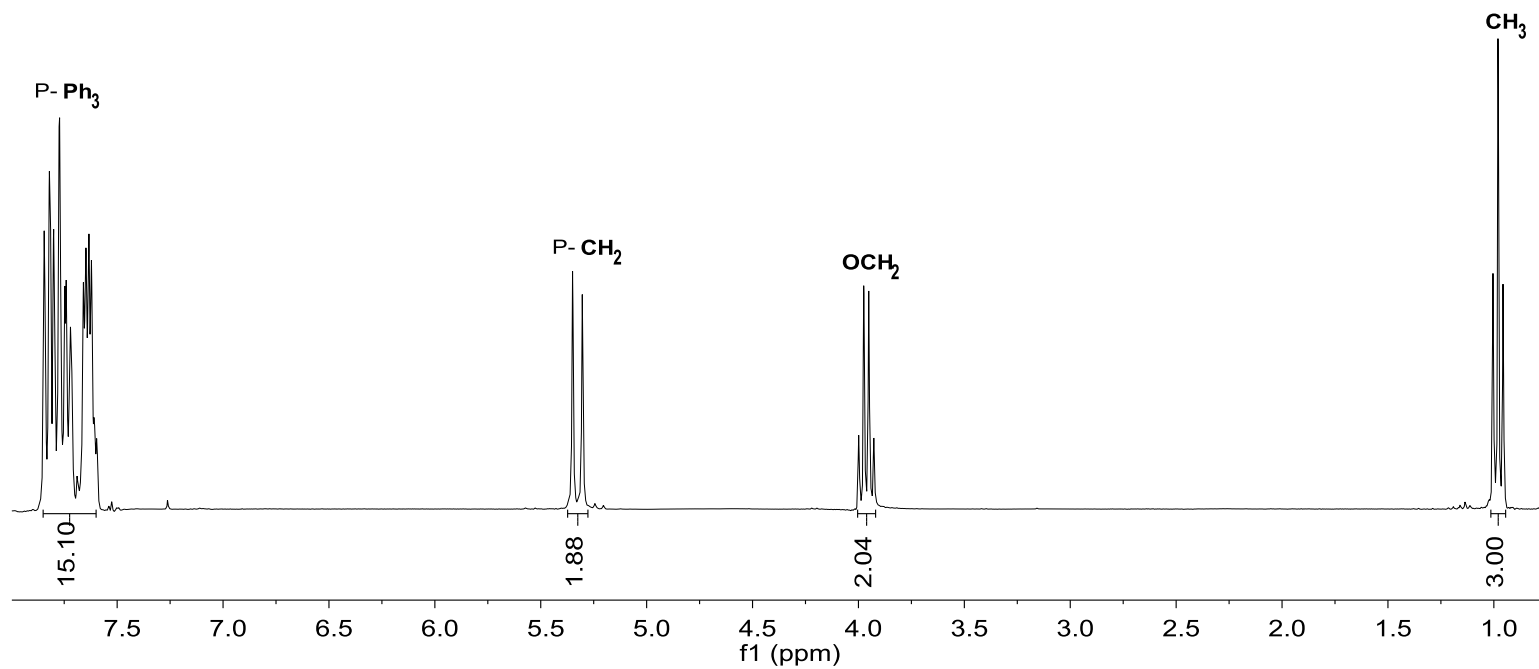
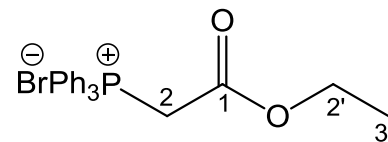


Figura A2: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

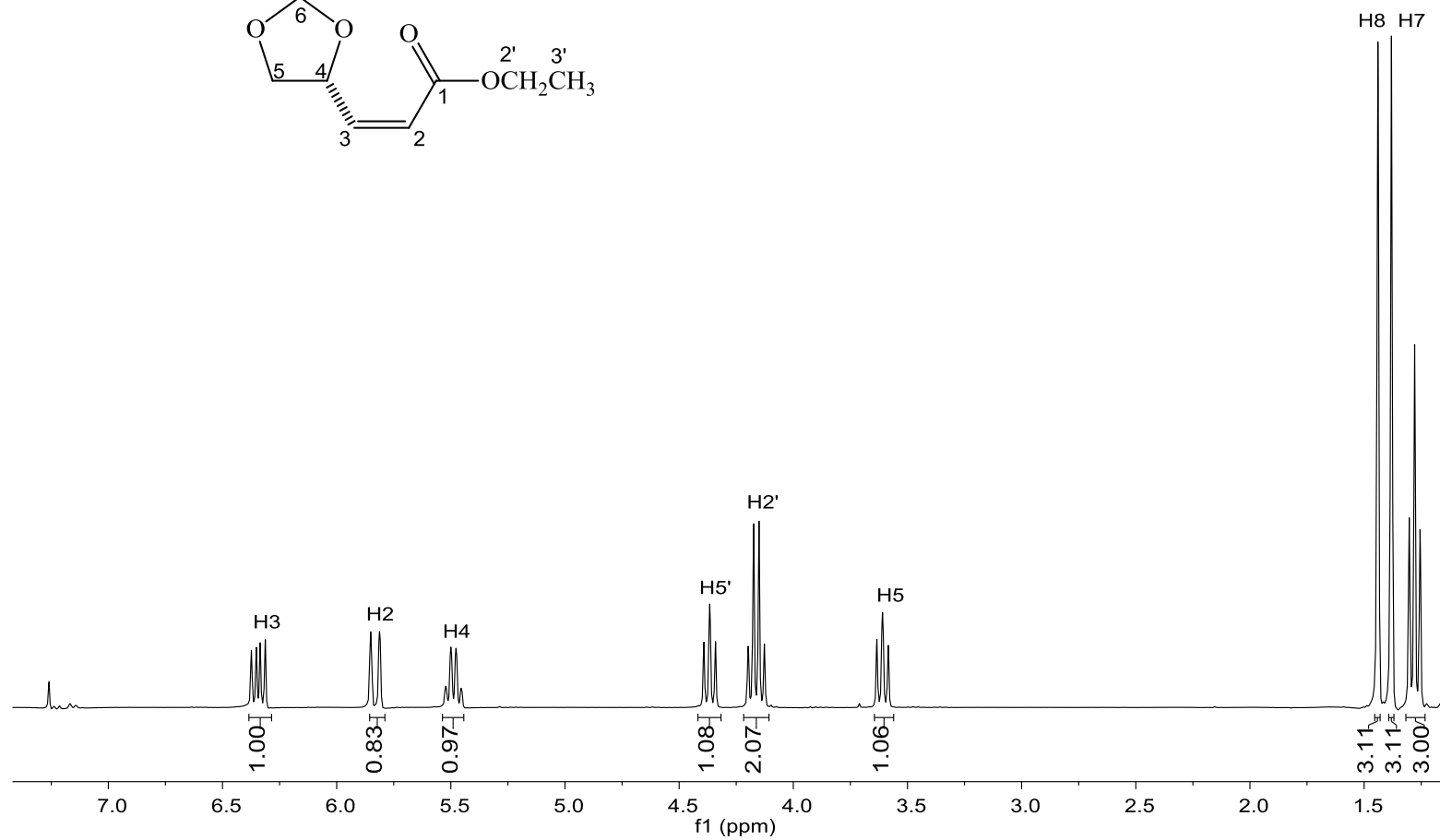
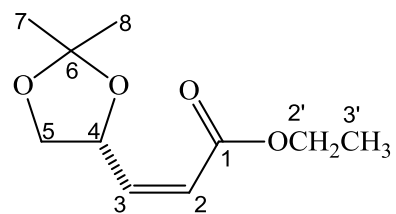


Figura A3: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4**.

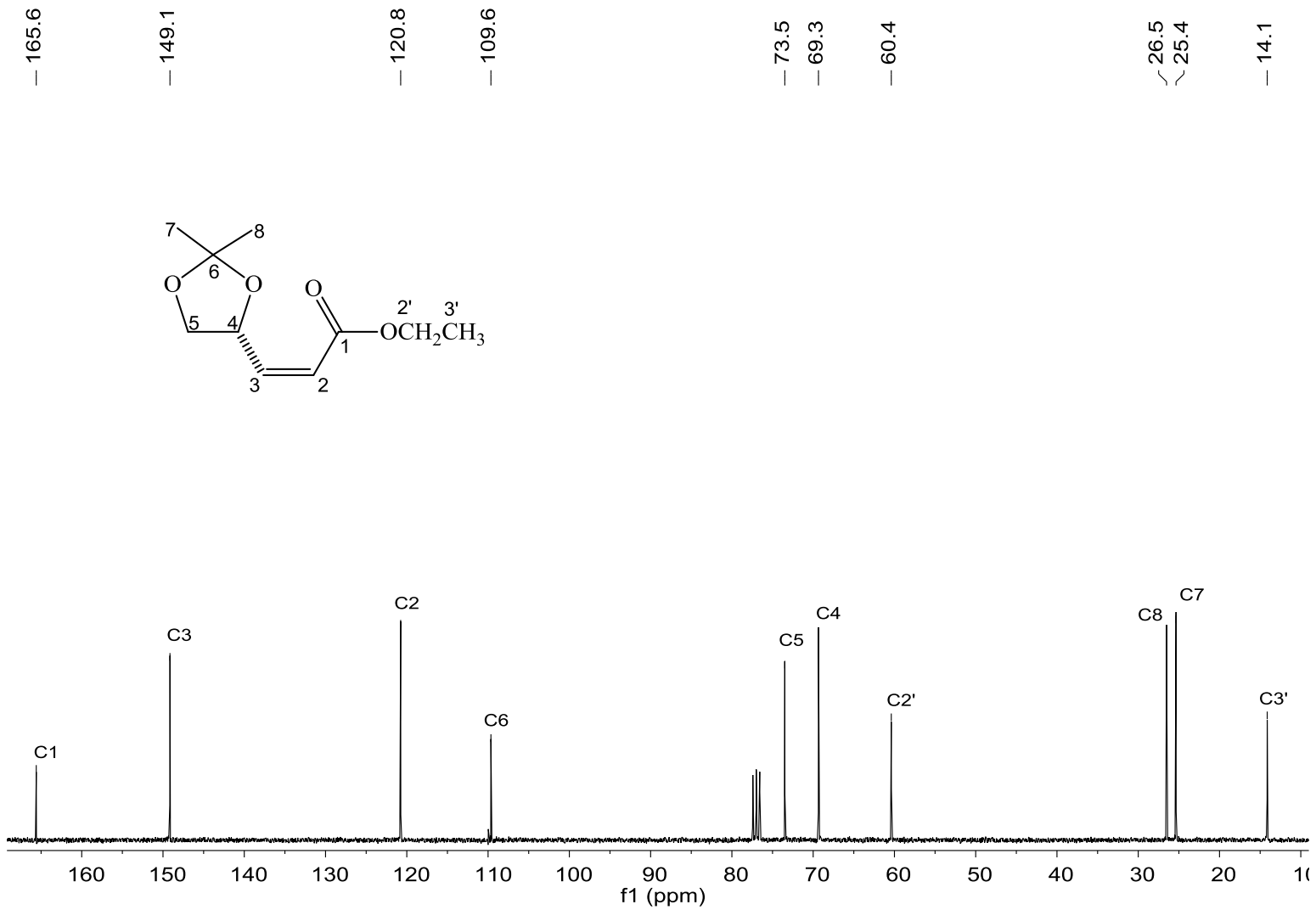


Figura A4: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 4.

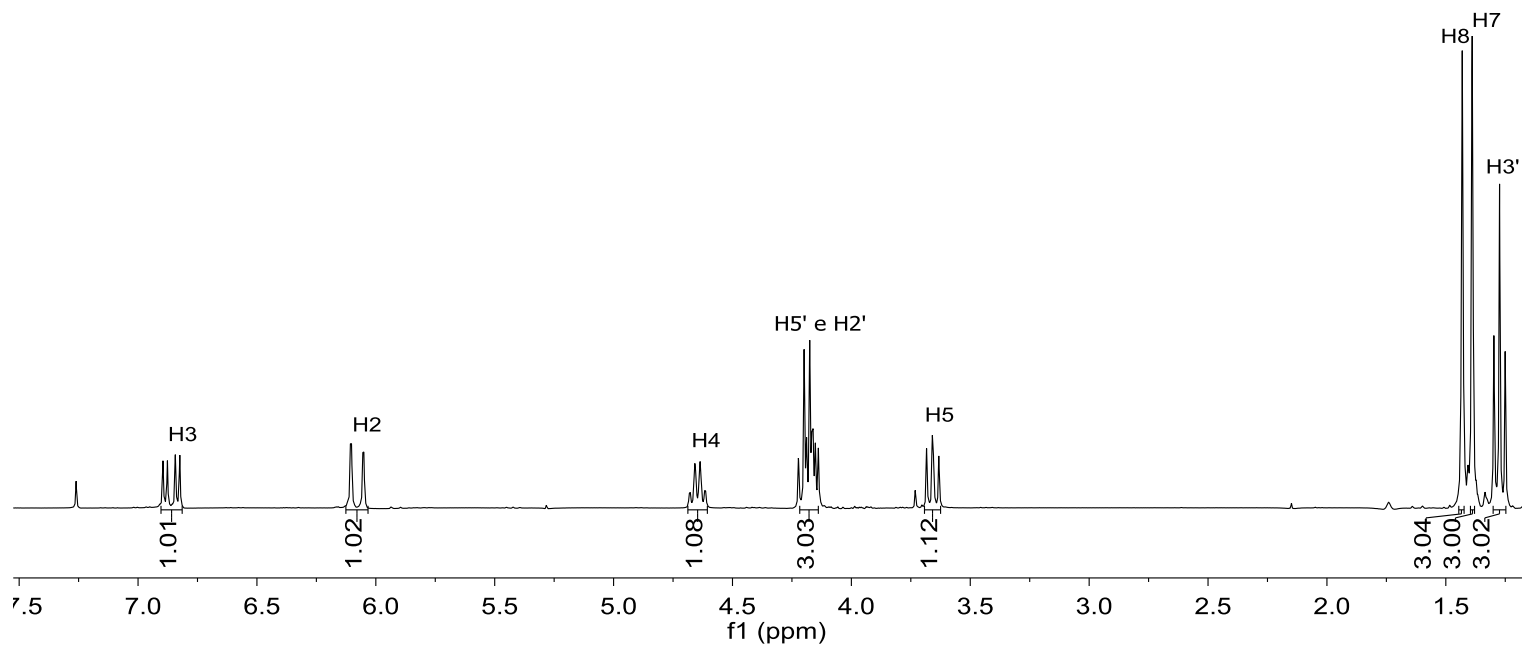
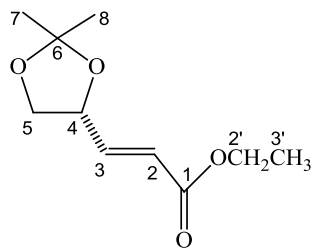


Figura A5: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5**.

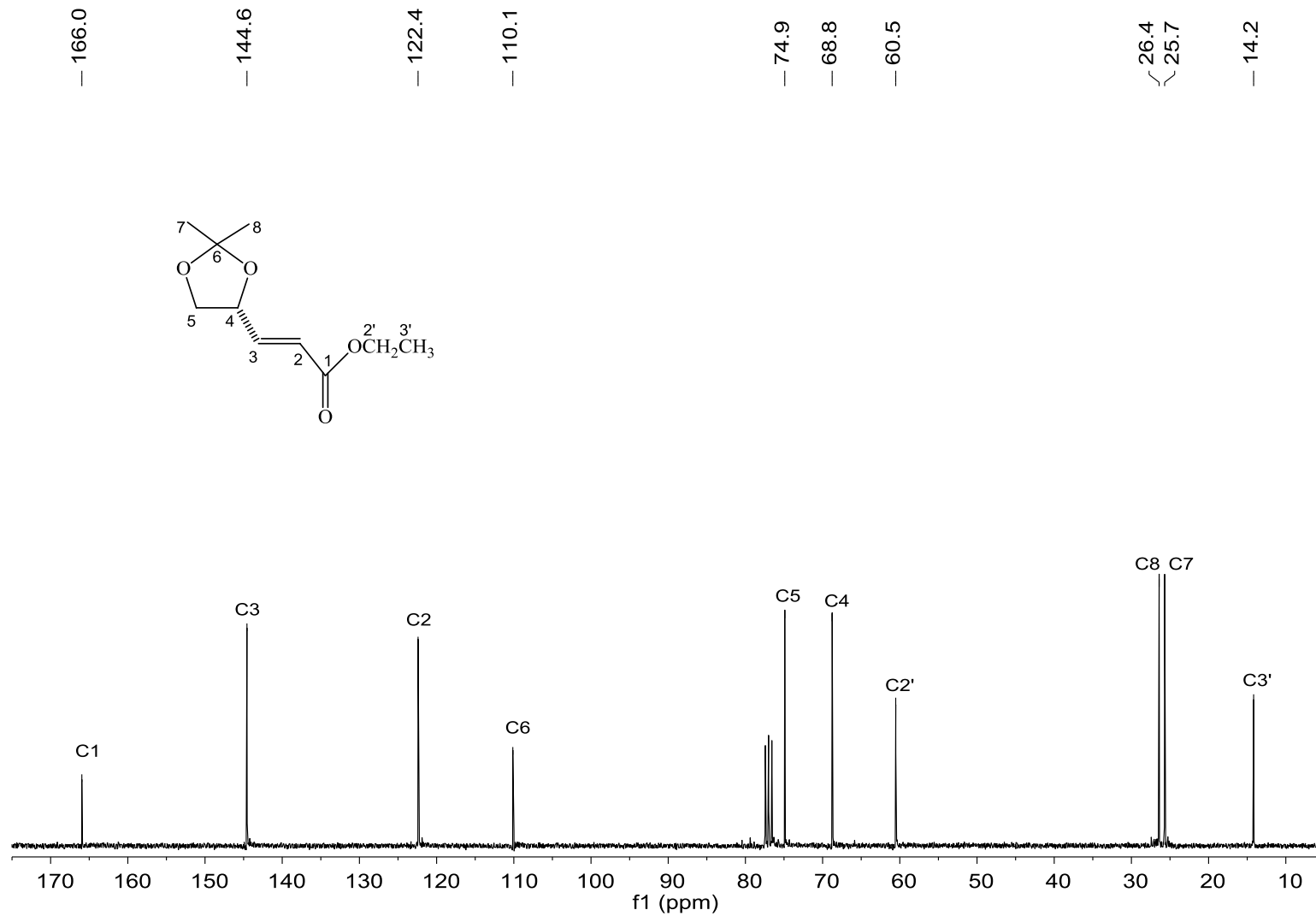


Figura A6: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 5.

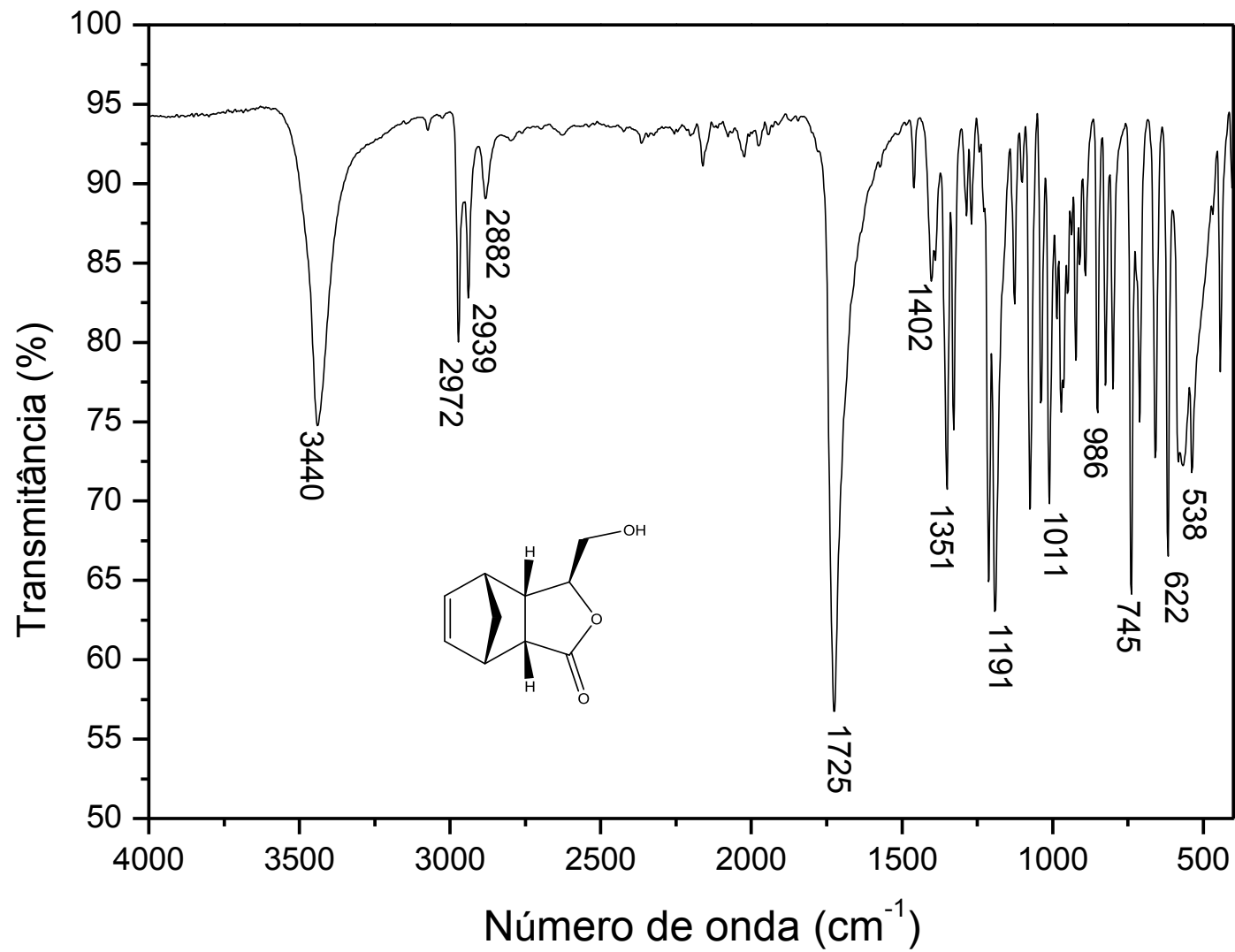


Figura A7: Espectro no Infravermelho do composto 9a.

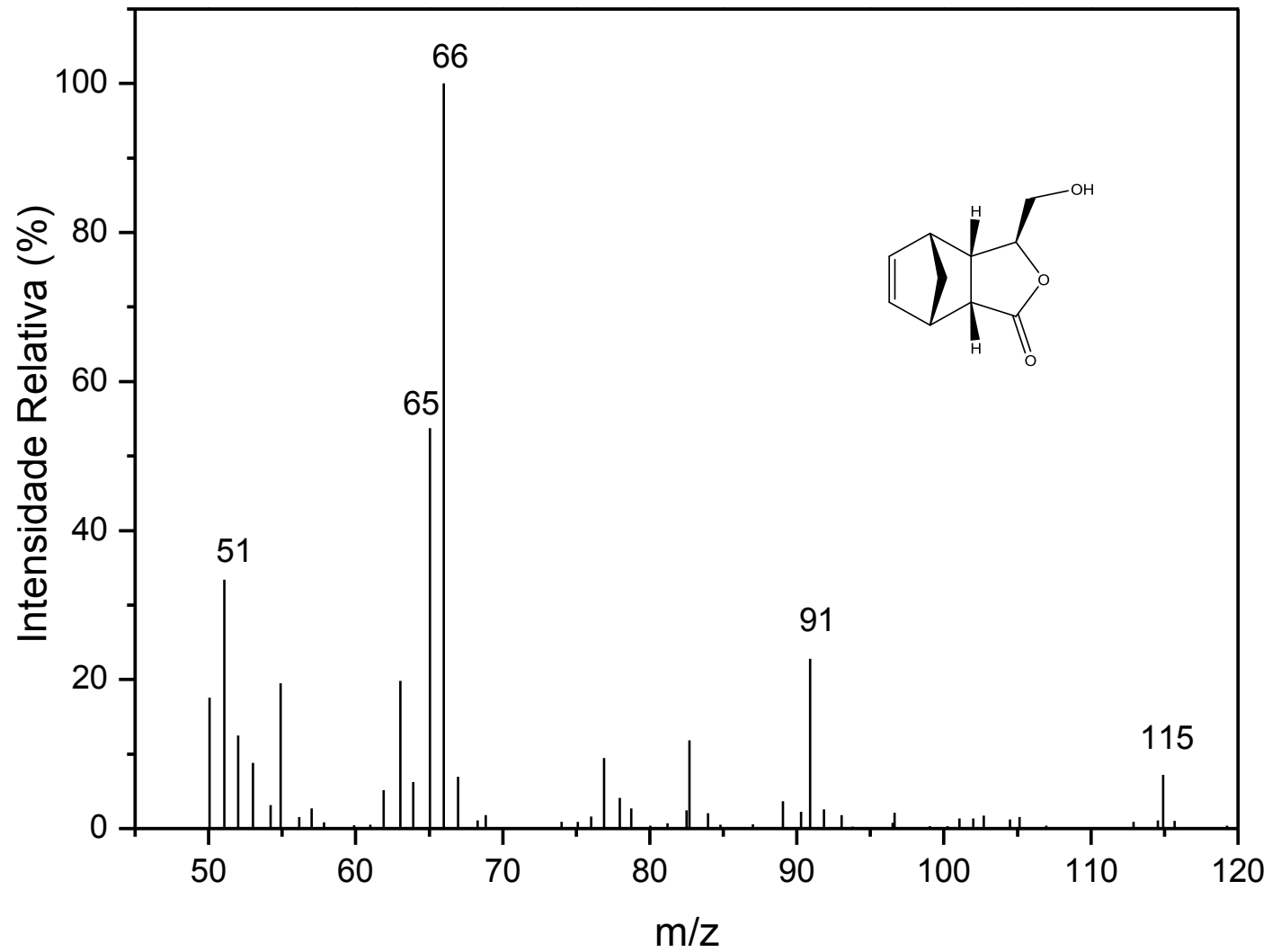


Figura A8: Espectro de massas do composto **9a**.

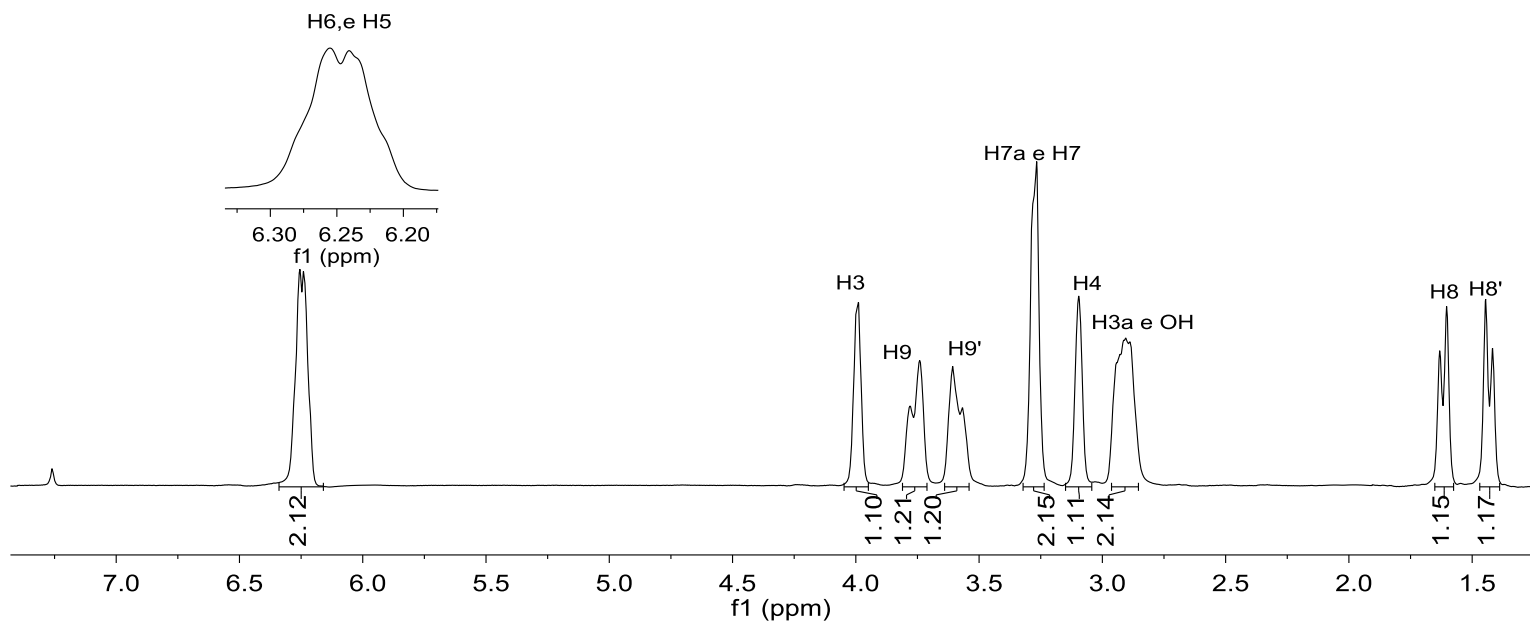
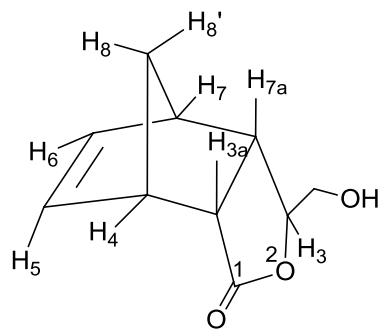


Figura A9: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **9a**.

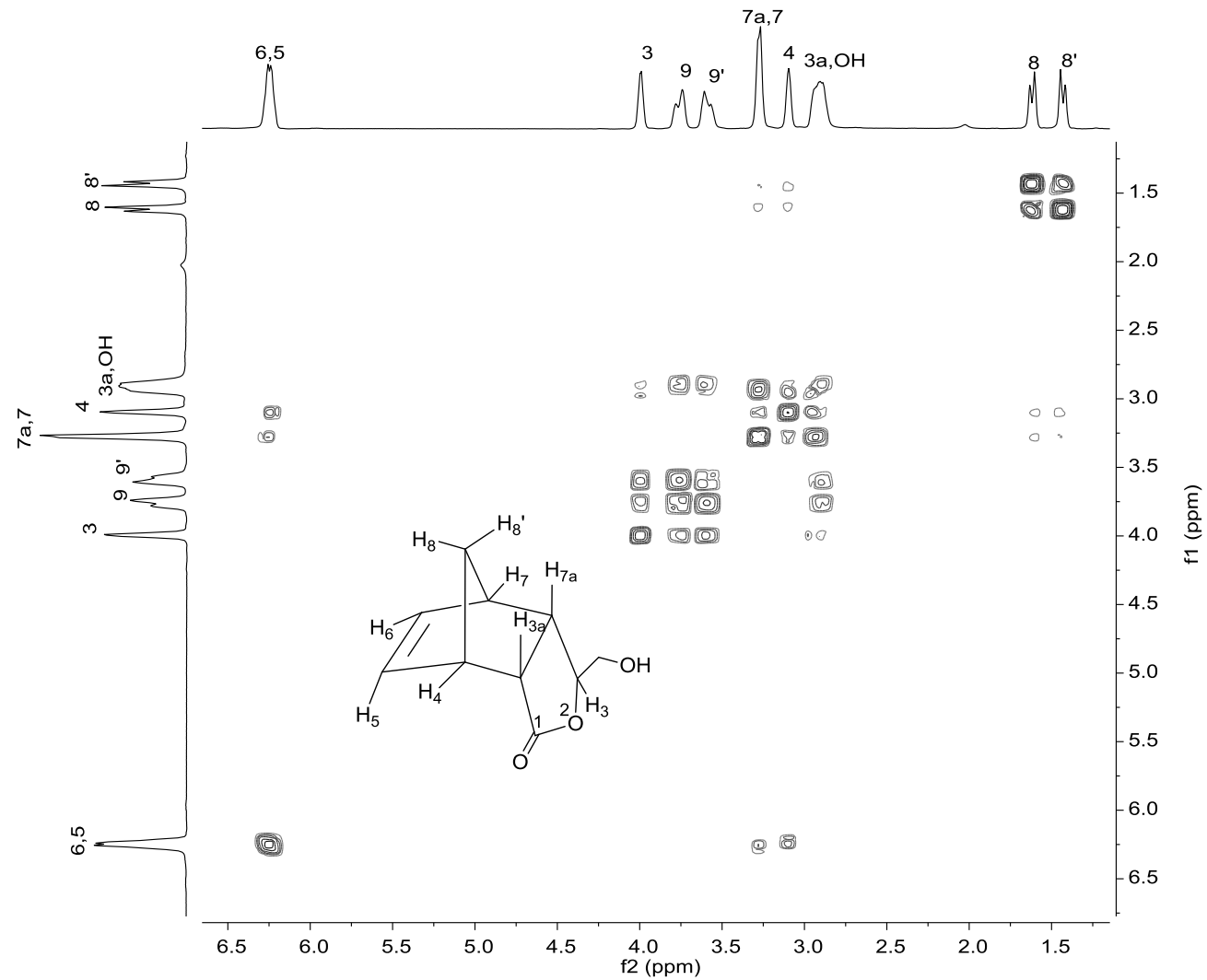


Figura A10: Mapa de contorno COSY do composto **9a**.

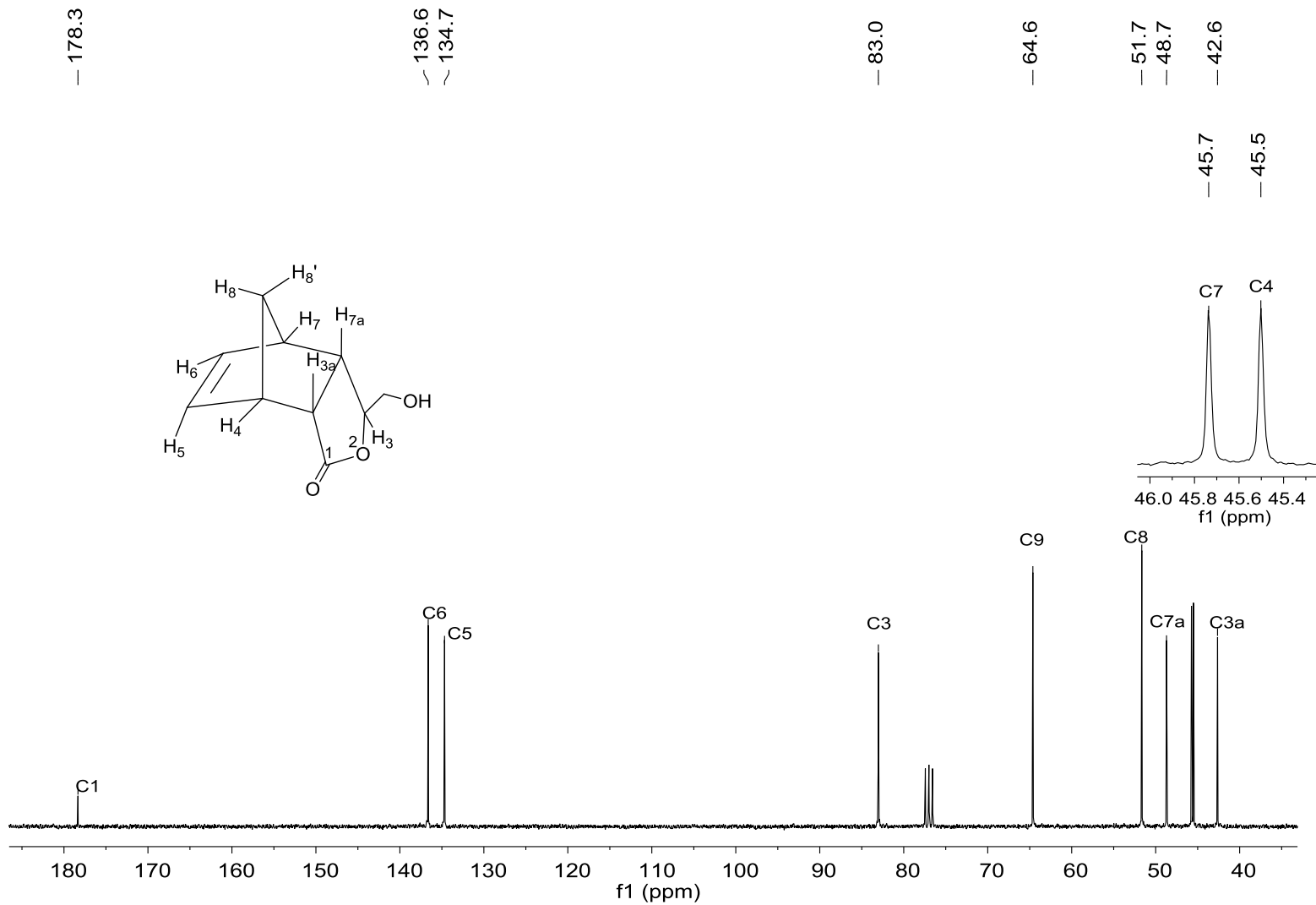


Figura A11: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **9a**.

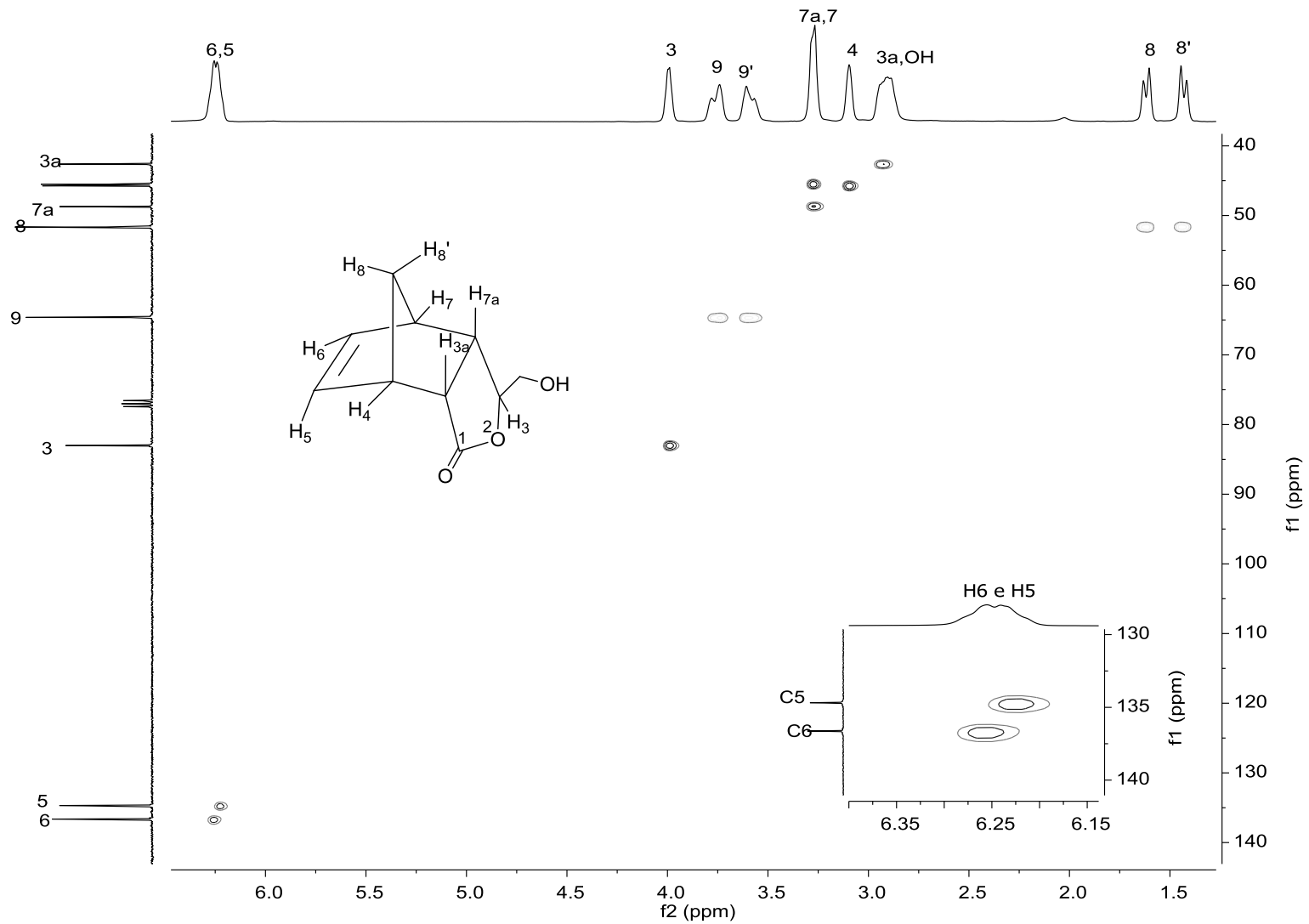


Figura A12: Mapa de contorno *HSQC* do composto **9a**.

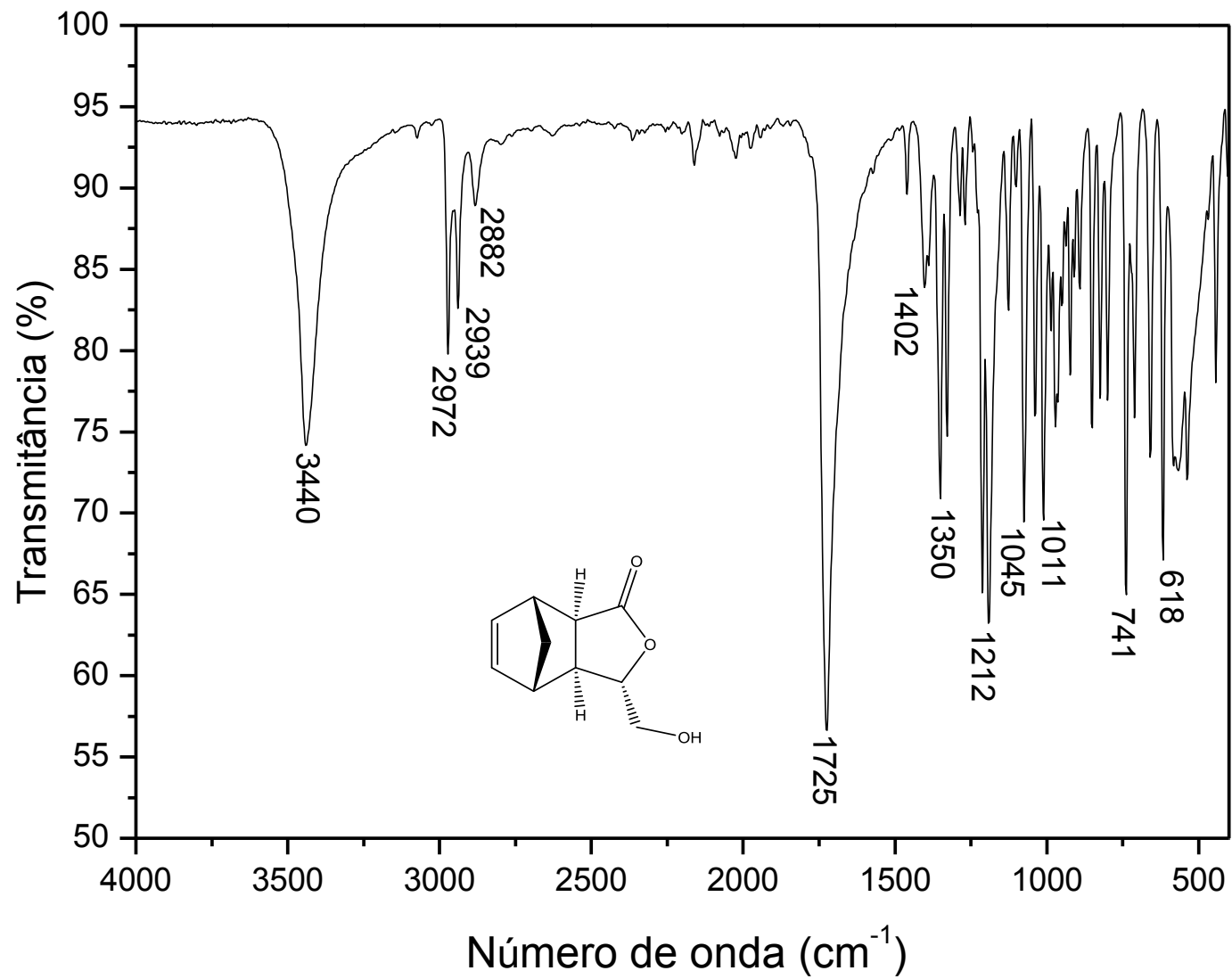


Figura A13: Espectro no Infravermelho do composto **9b**.

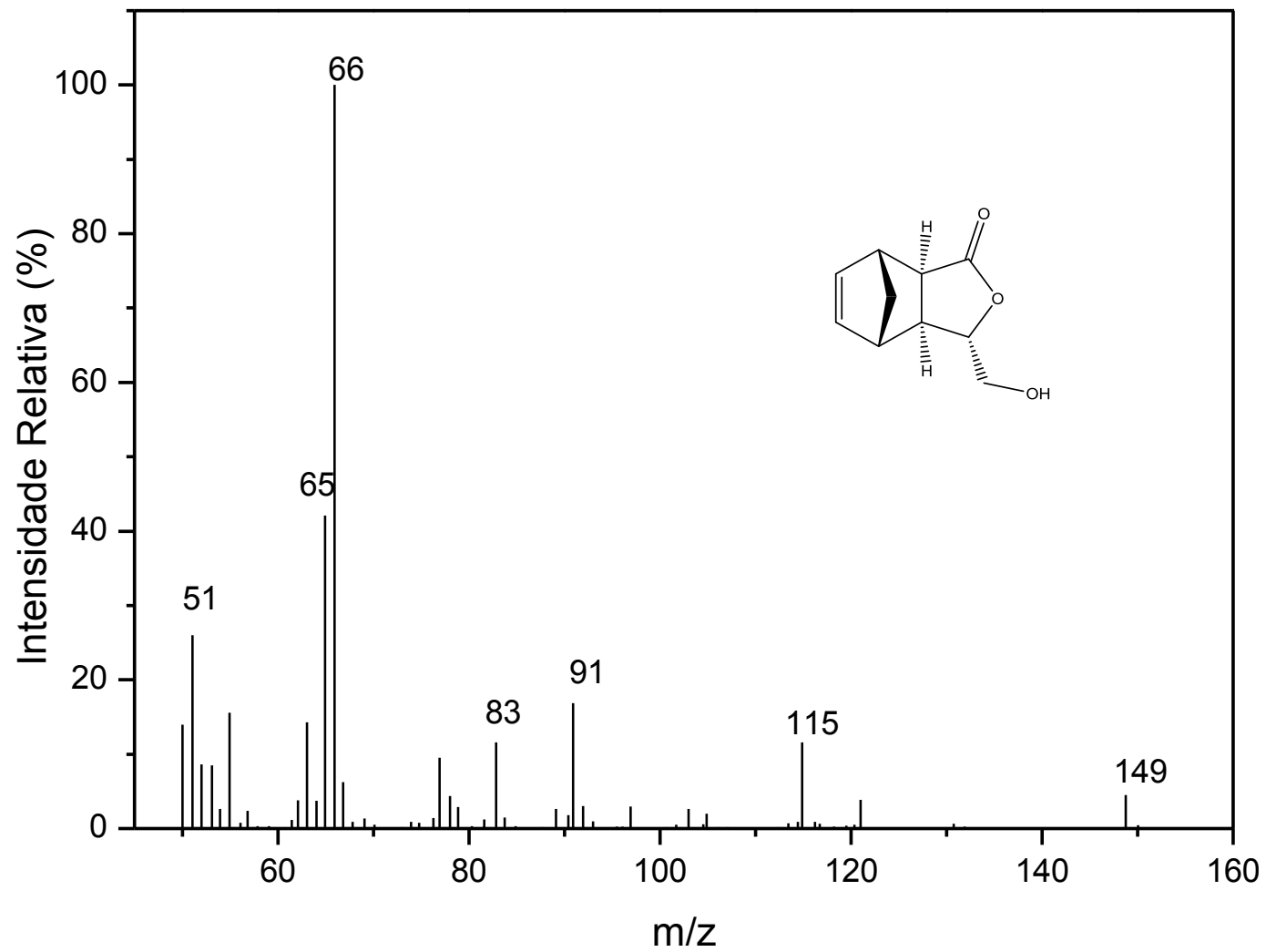


Figura A14: Espectro de massas do composto **9b**.

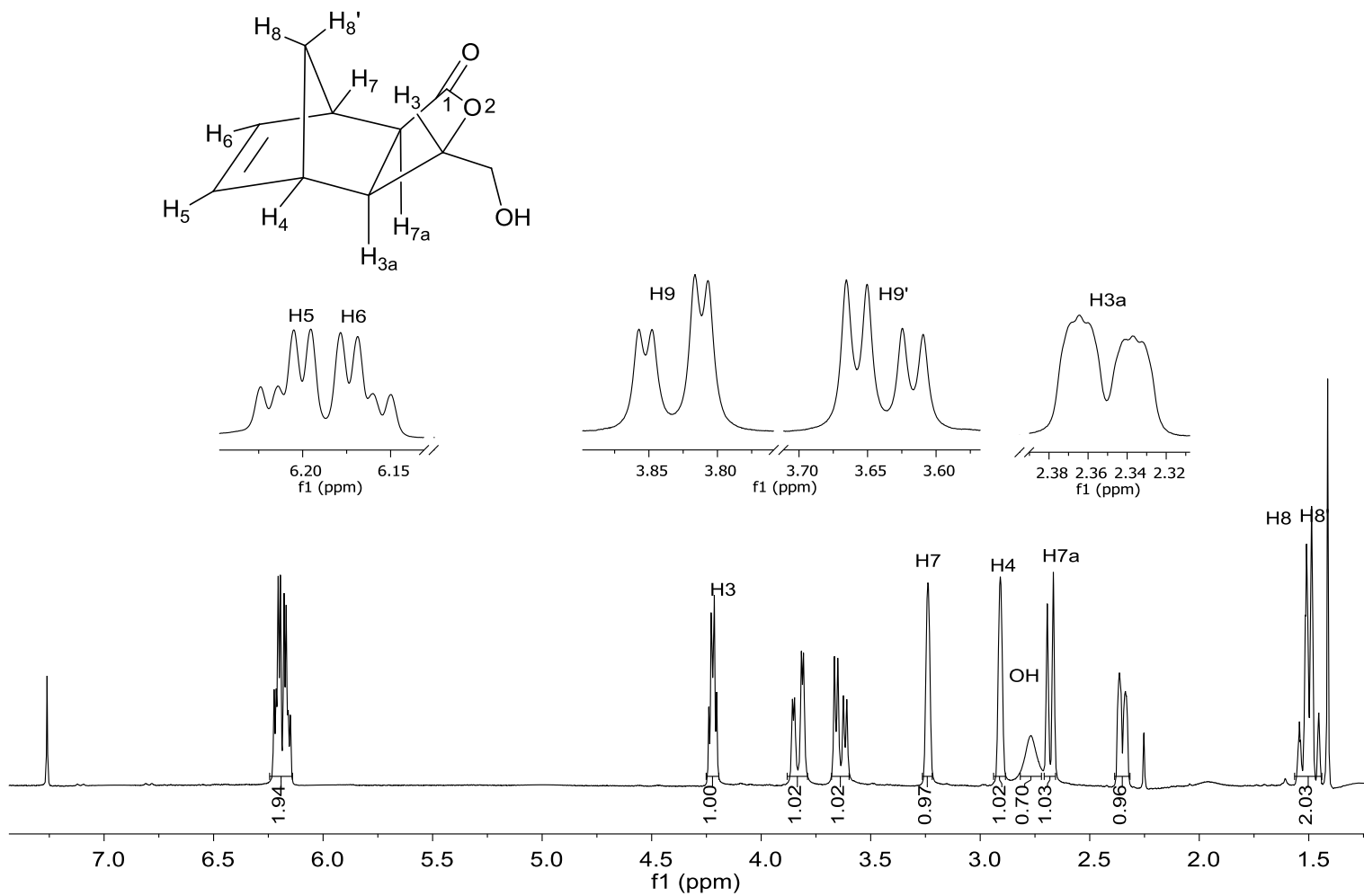


Figura A15: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **9b**.

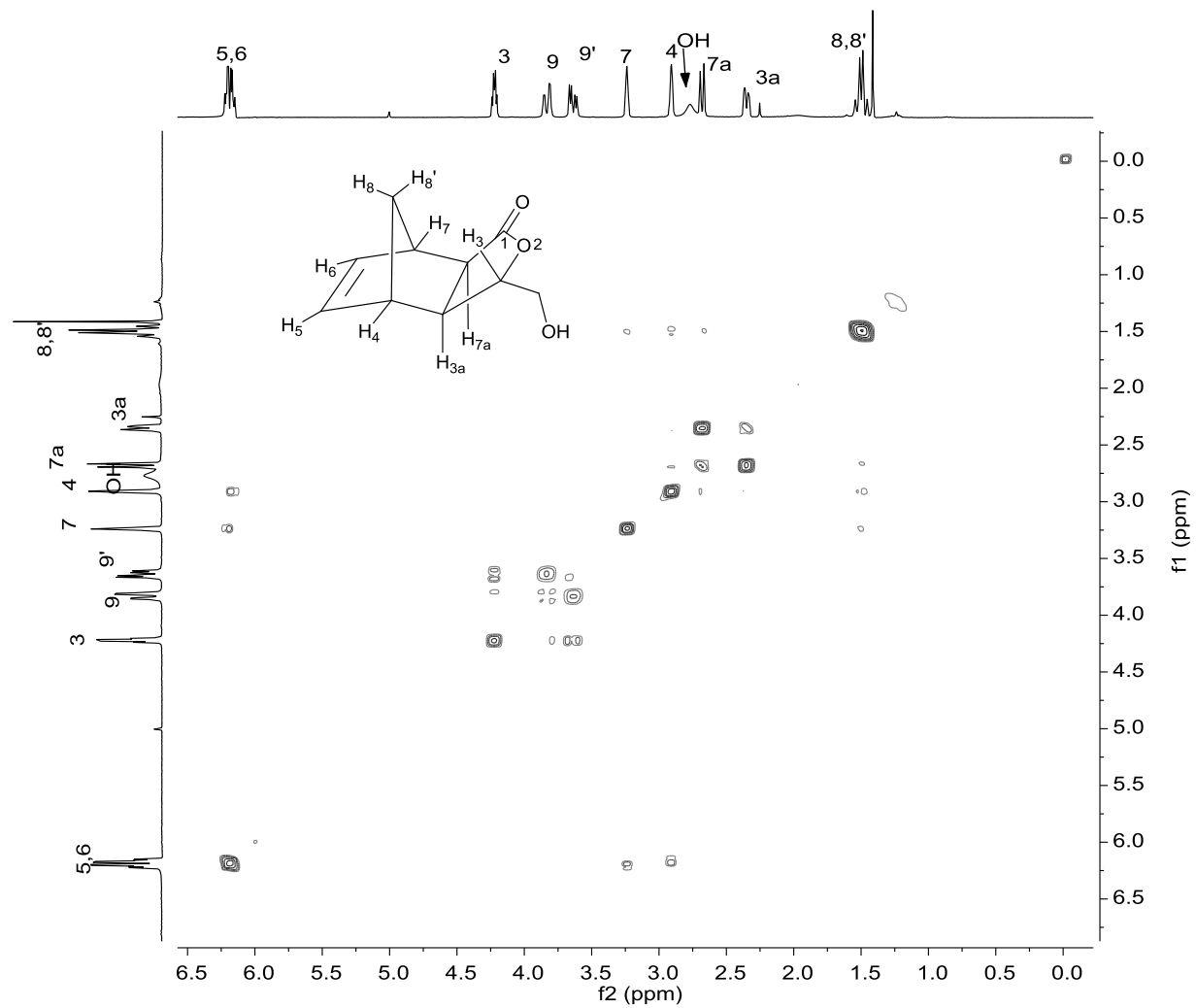


Figura A16: Mapa de contorno COSY do composto **9b**.

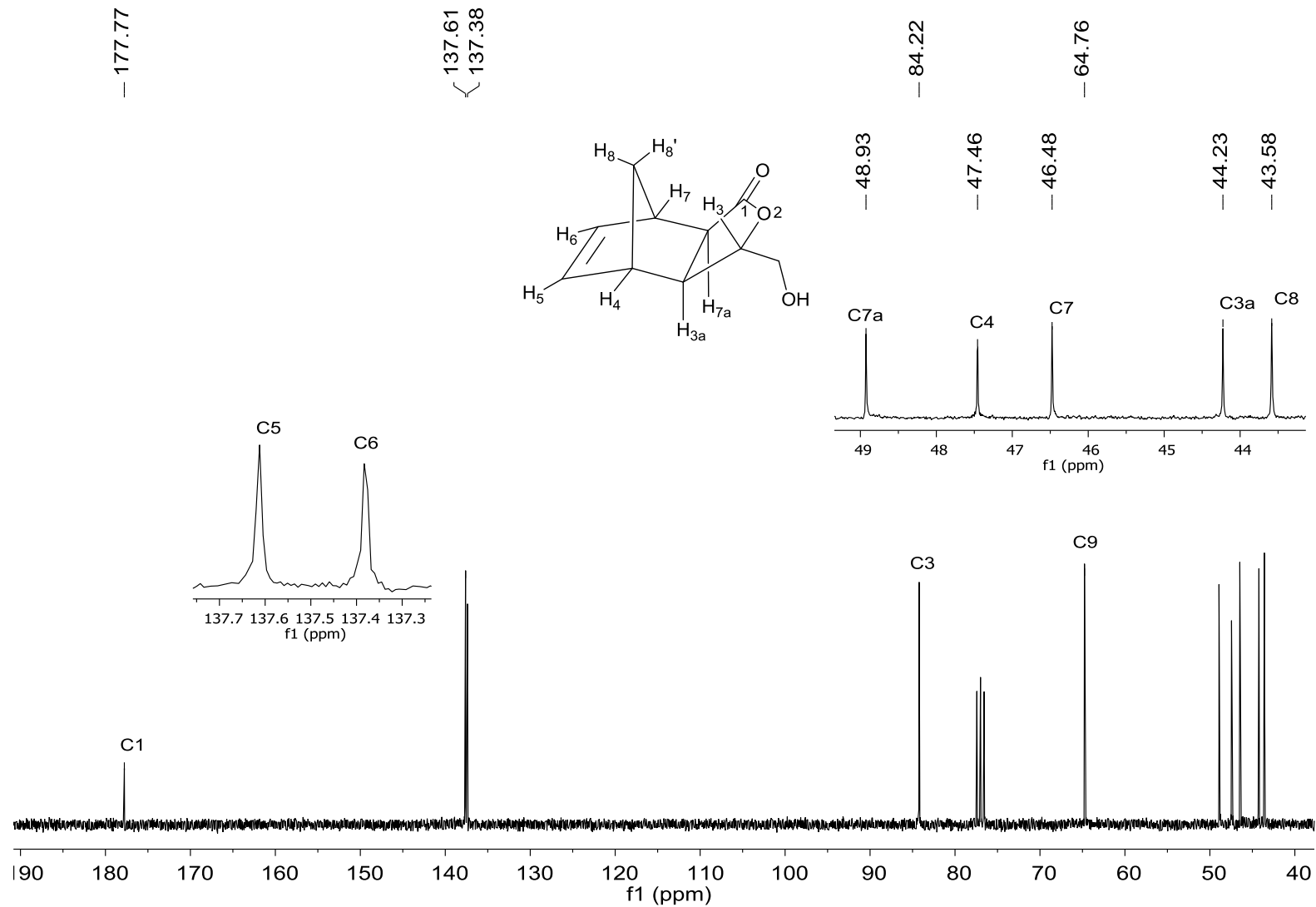


Figura A17: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **9b**.

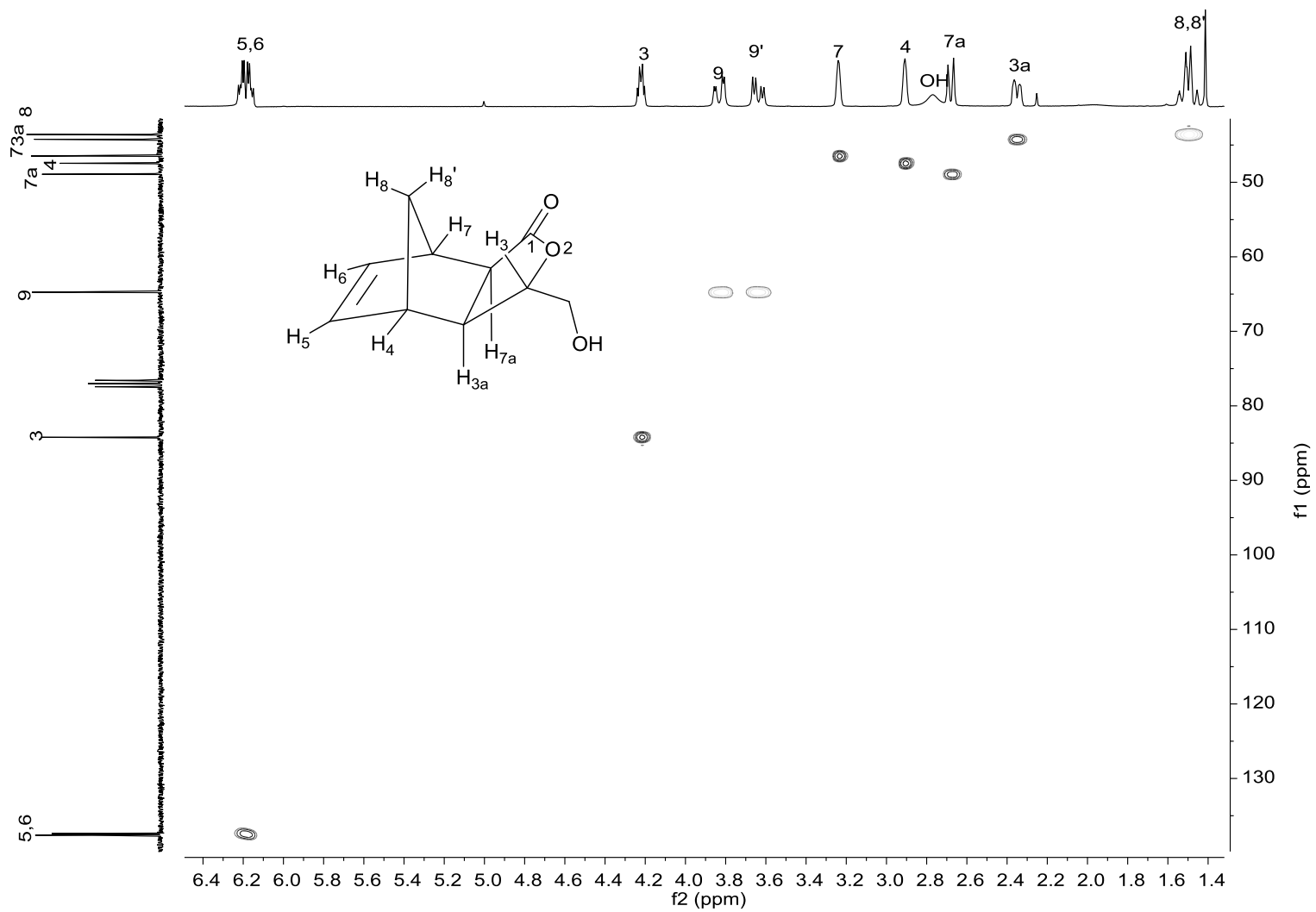


Figura A18: Mapa de contorno *HSQC* do composto **9b**.

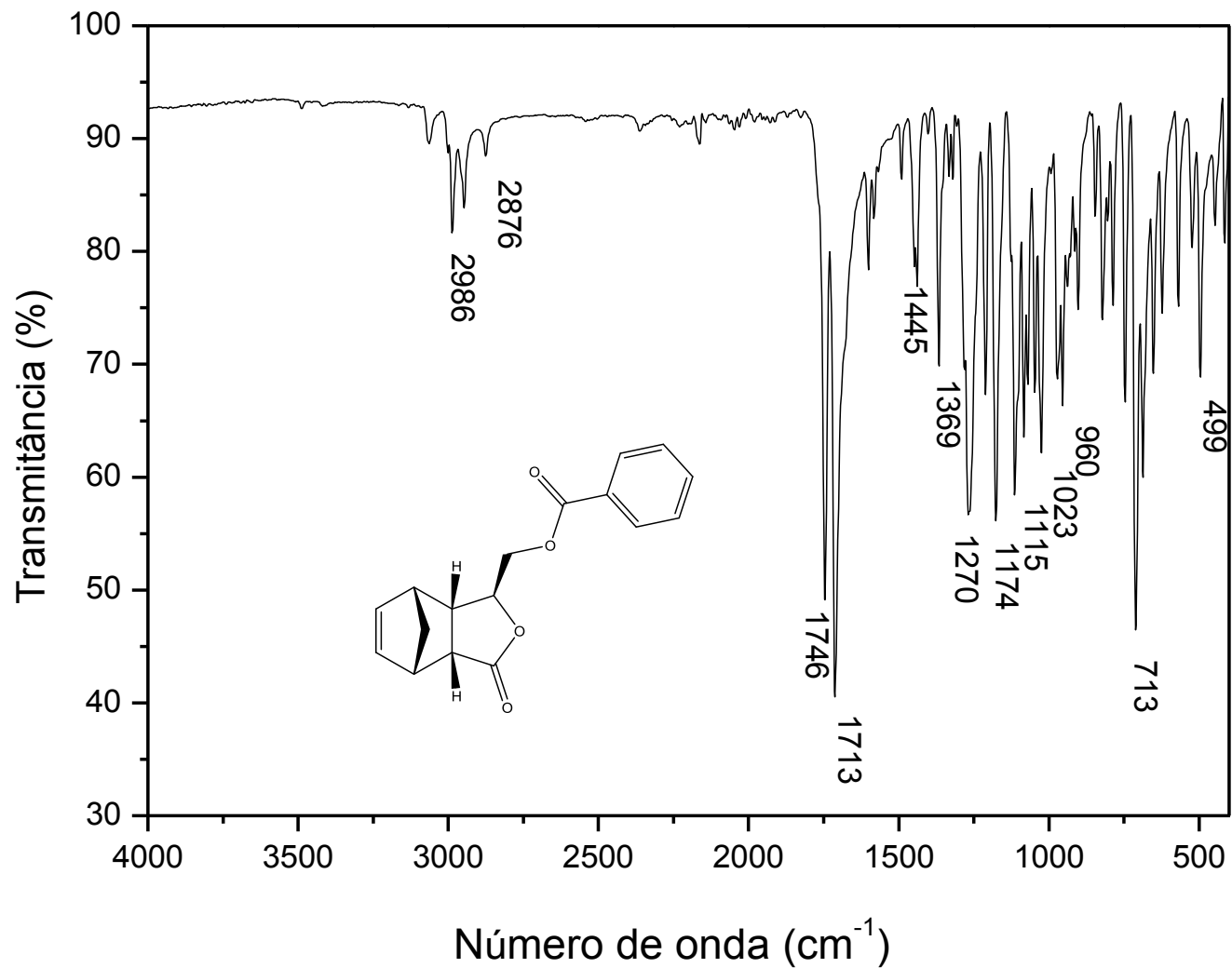


Figura A19: Espectro no Infravermelho do composto **11a**.

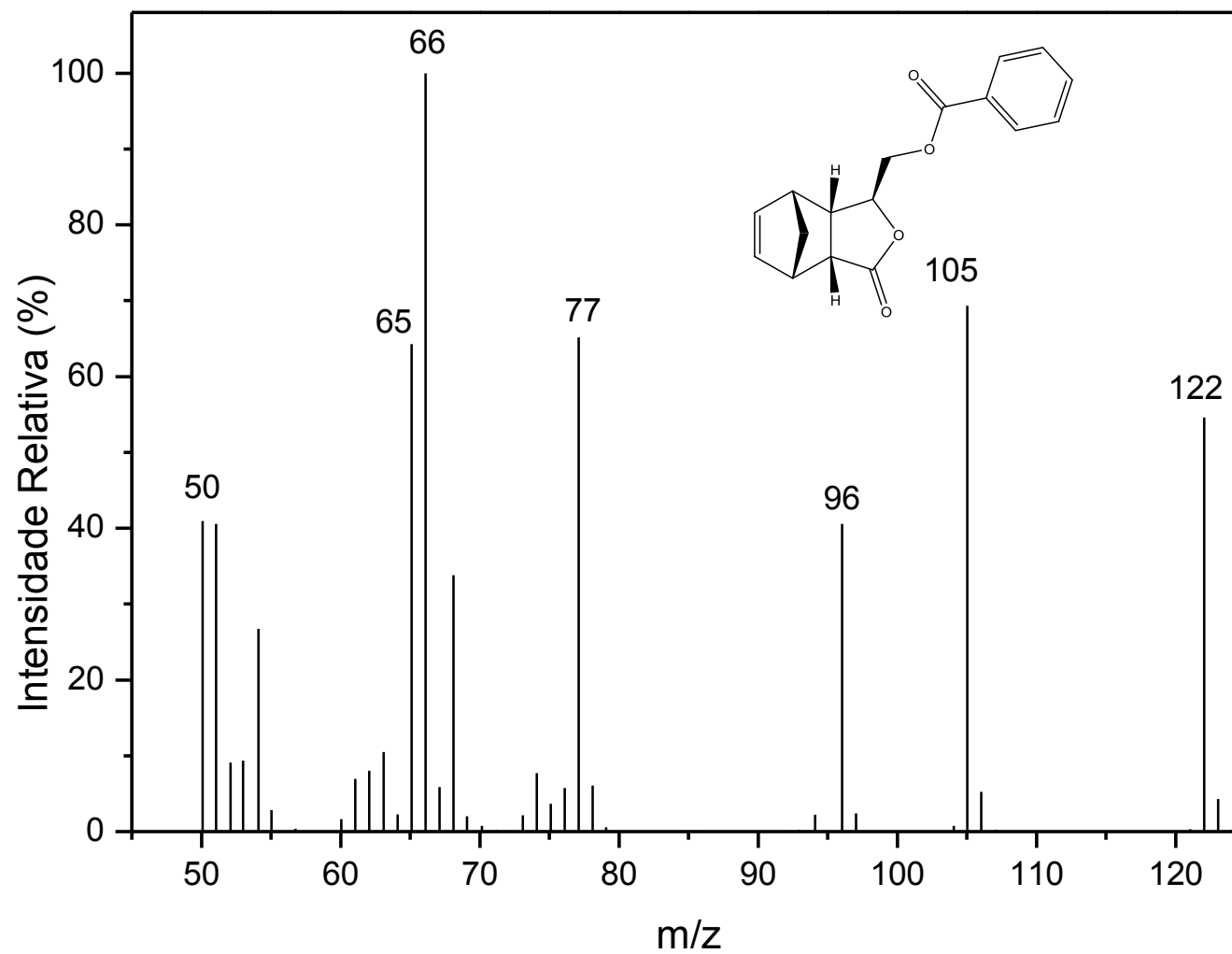


Figura A20: Espectro de massas do composto 11a.

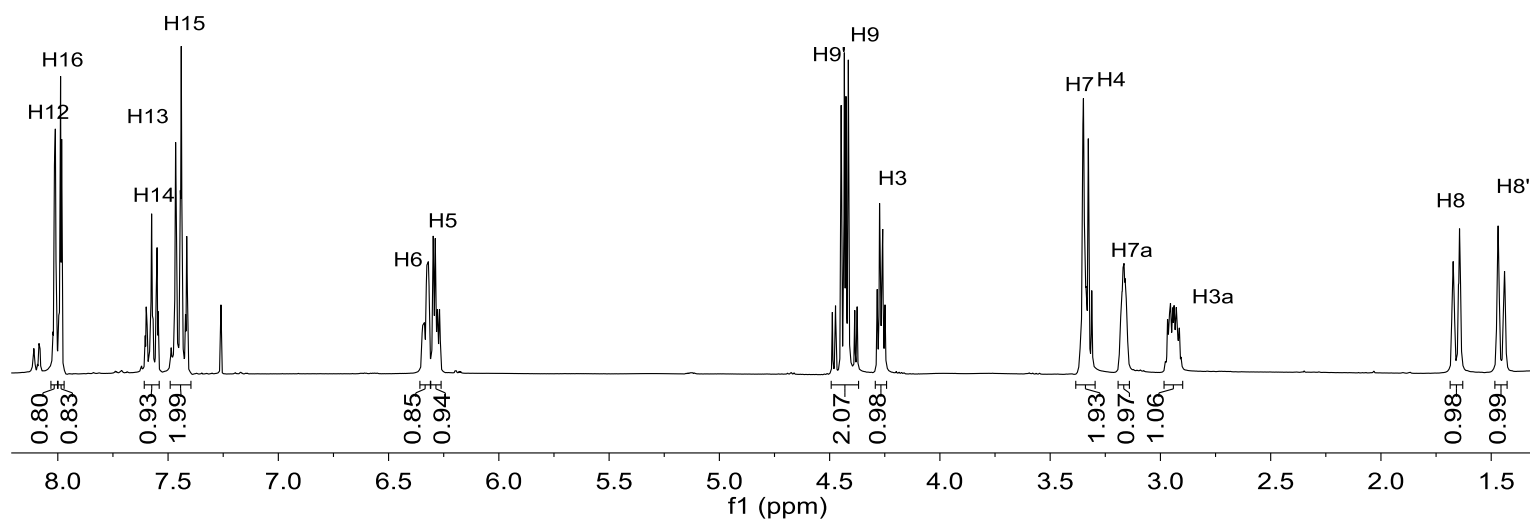
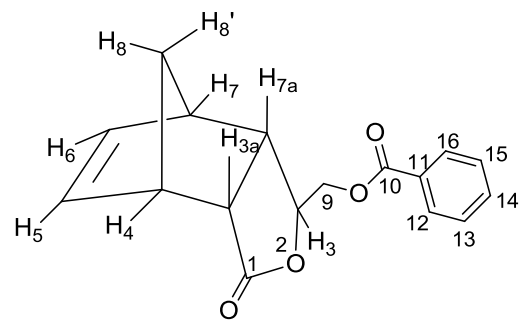


Figura A21: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **11a**.

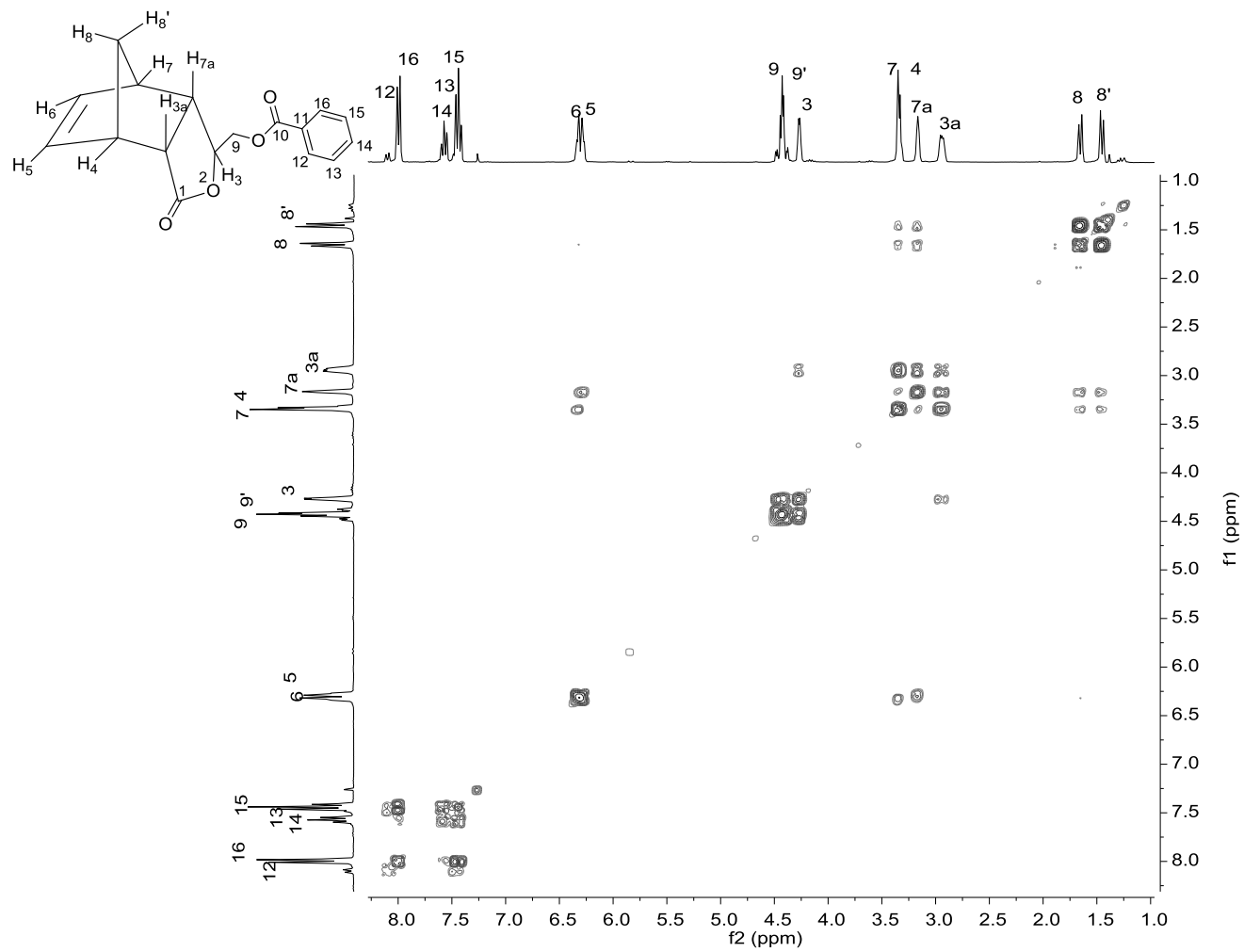


Figura A22: Mapa de contorno COSY do composto **11a**.

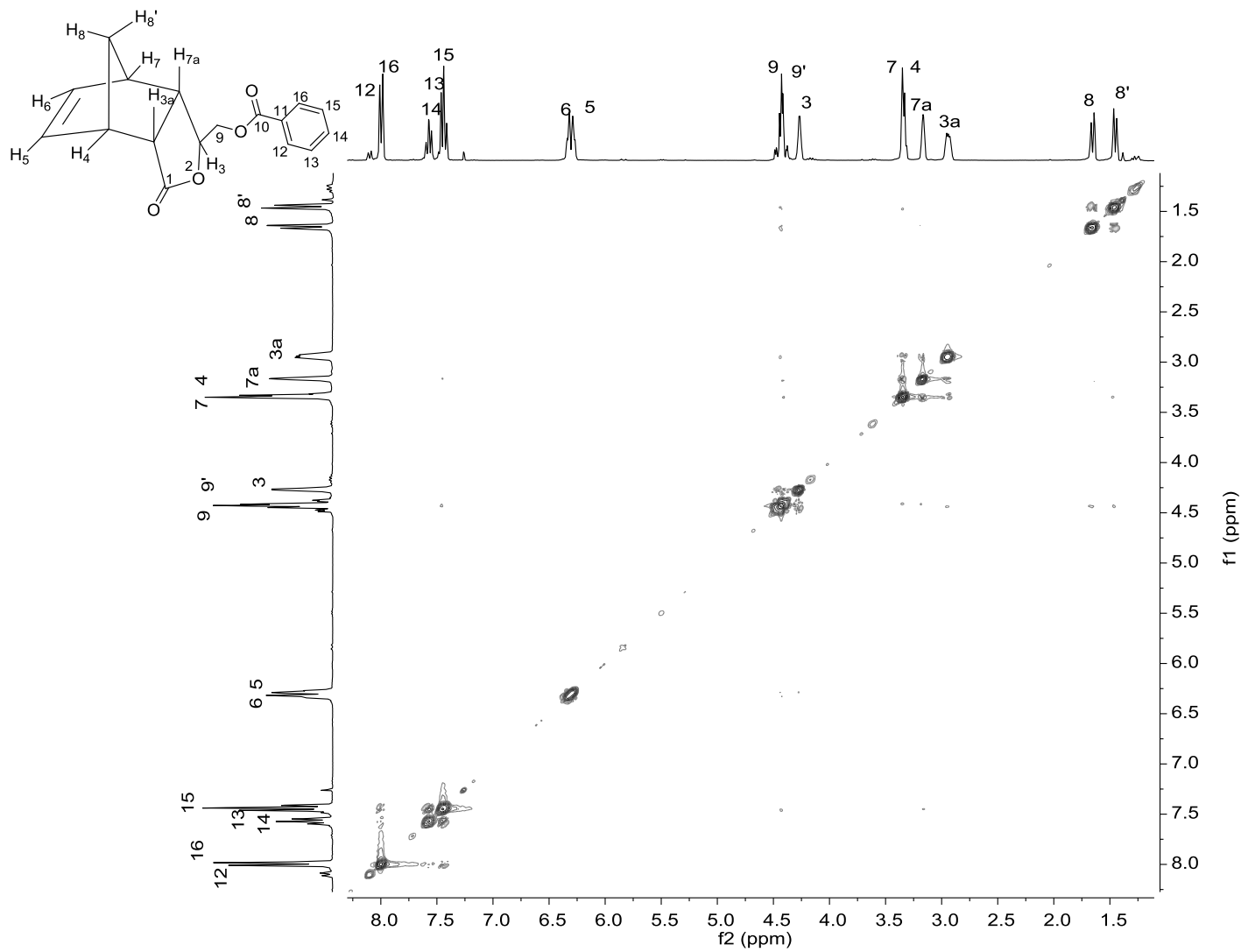


Figura A23: Mapa de contorno NOESY do composto 11a.

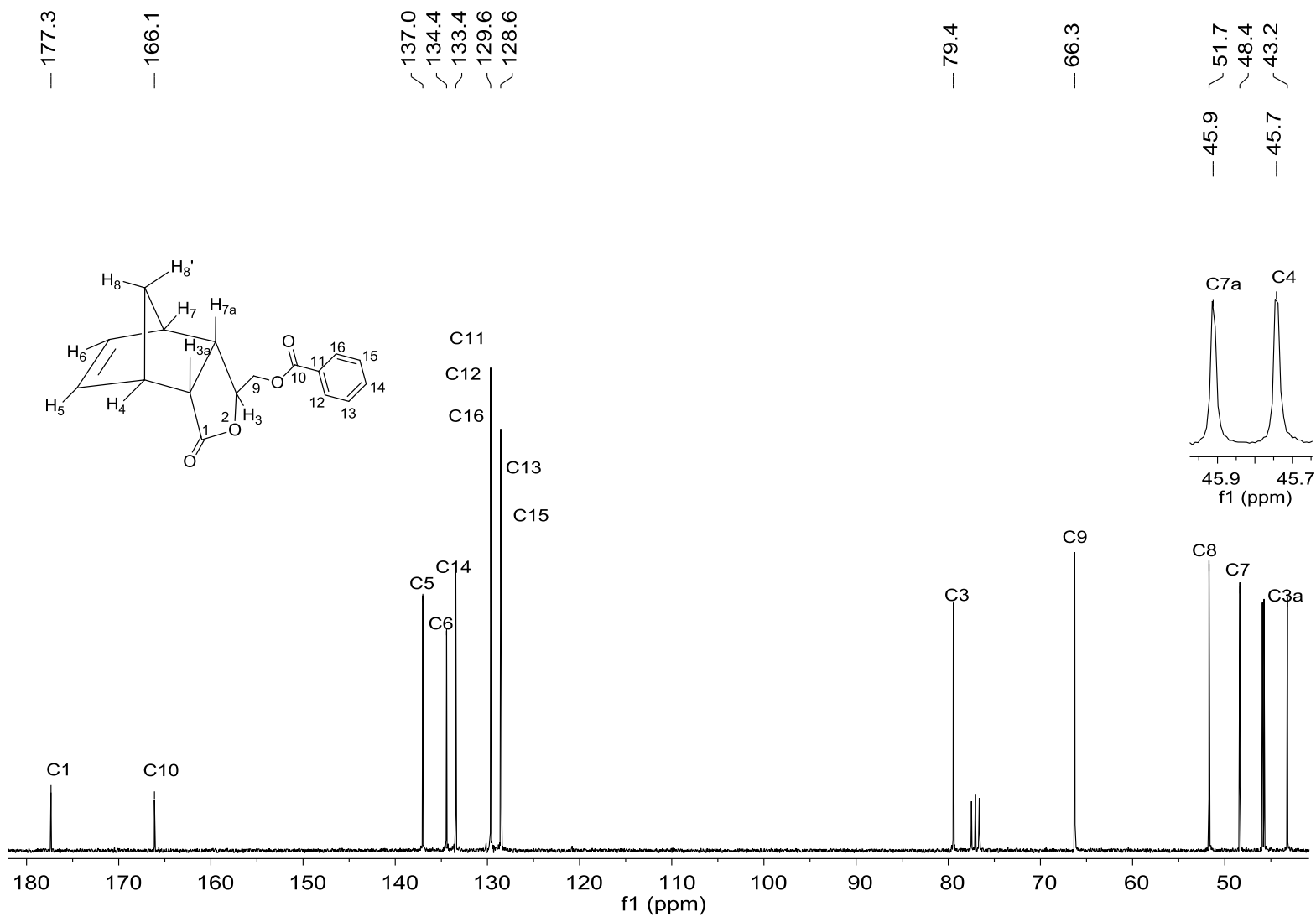


Figura A24: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **11a**.

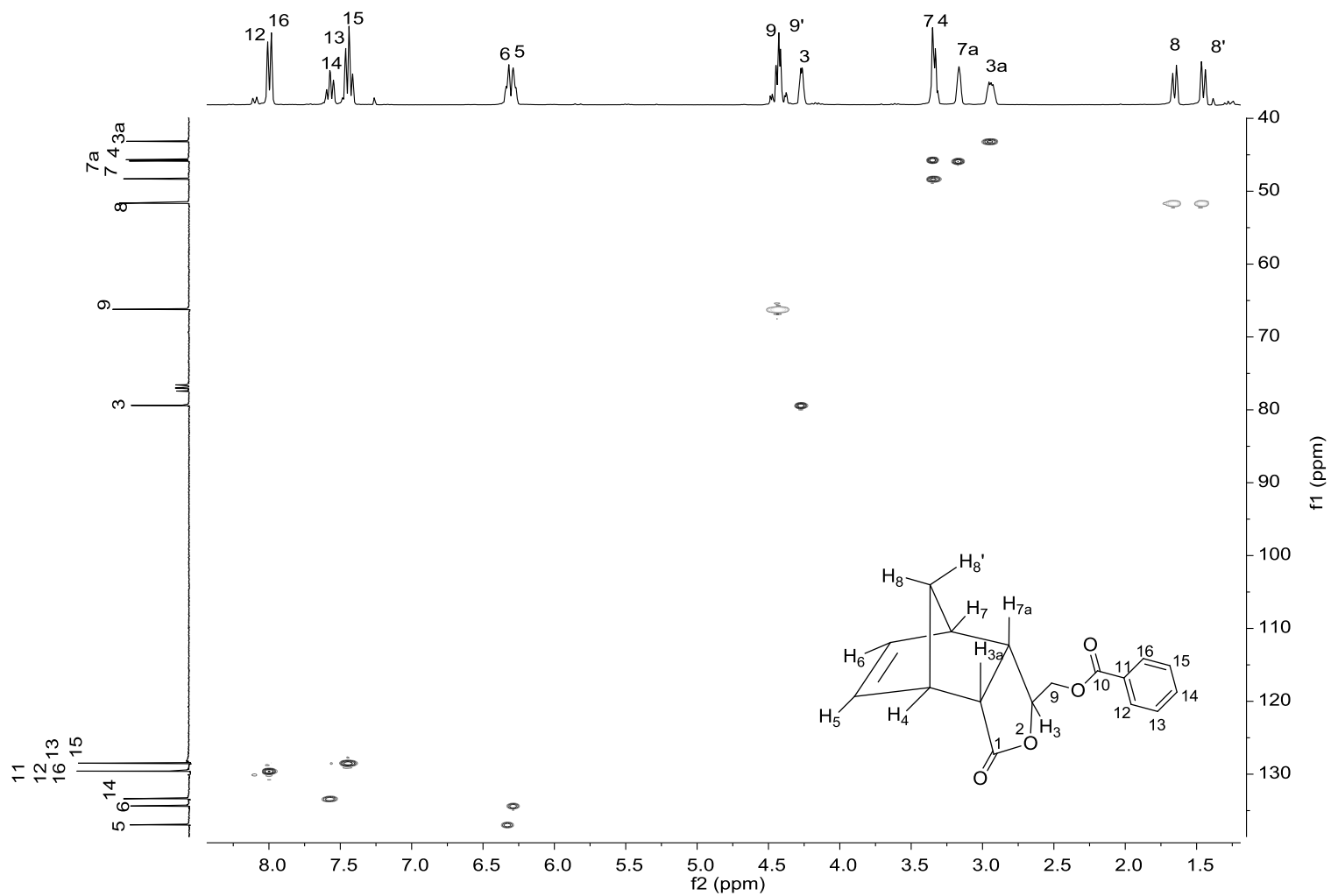


Figura A25: Mapa de contorno *HSQC* do composto **11a**.

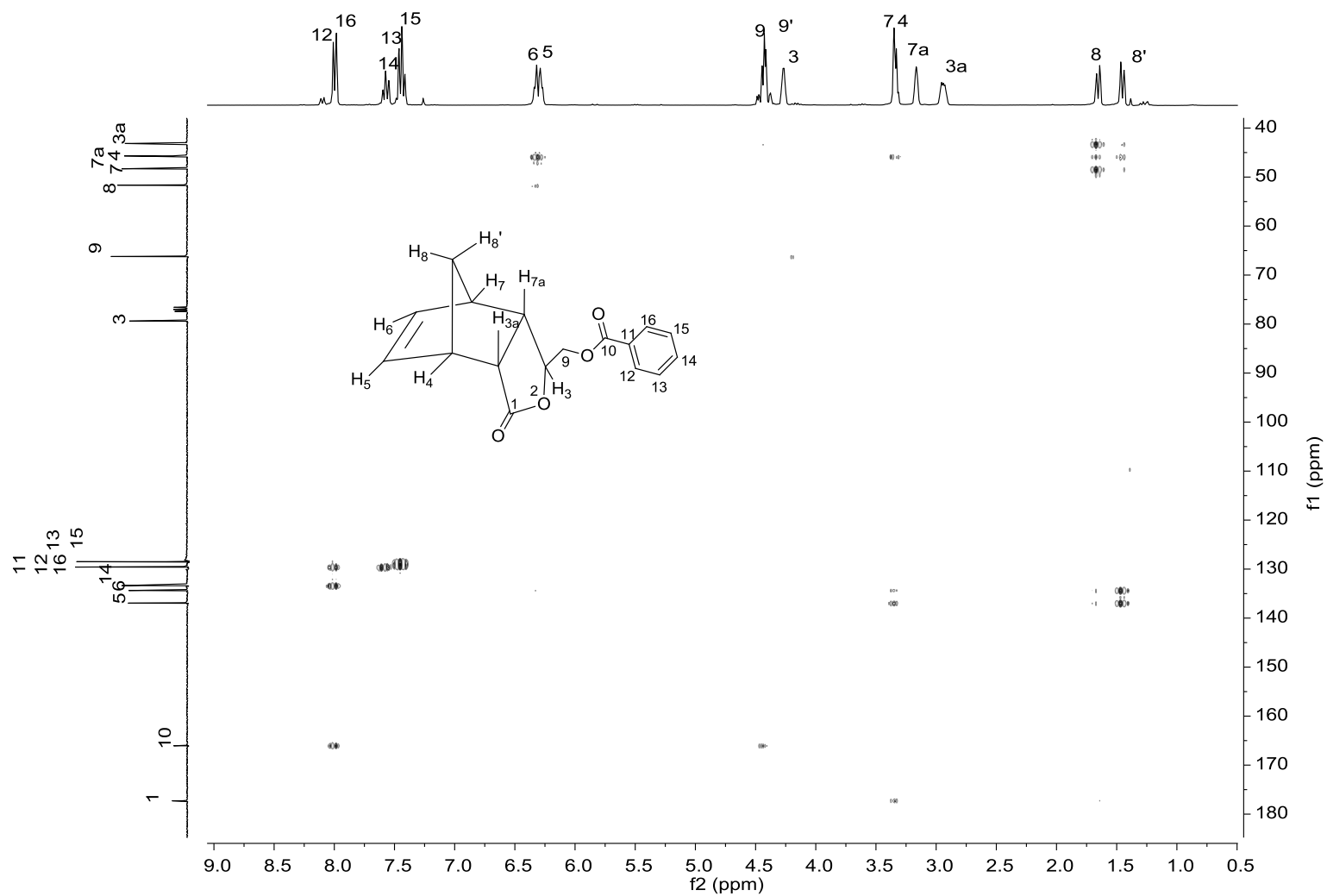


Figura A26: Mapa de contorno *HMBC* do composto 11a.

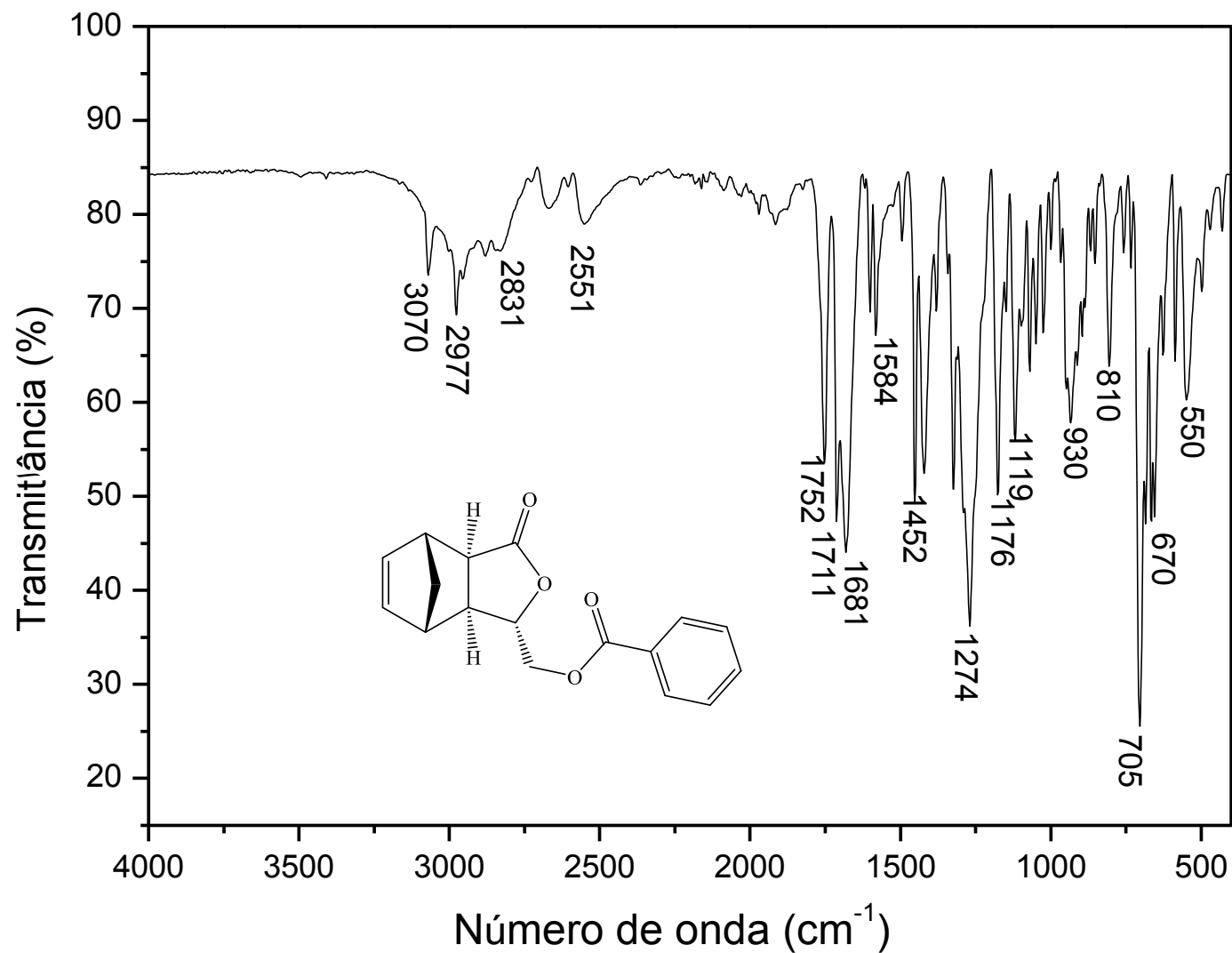


Figura A27: Espectro no Infravermelho do composto **11b**.

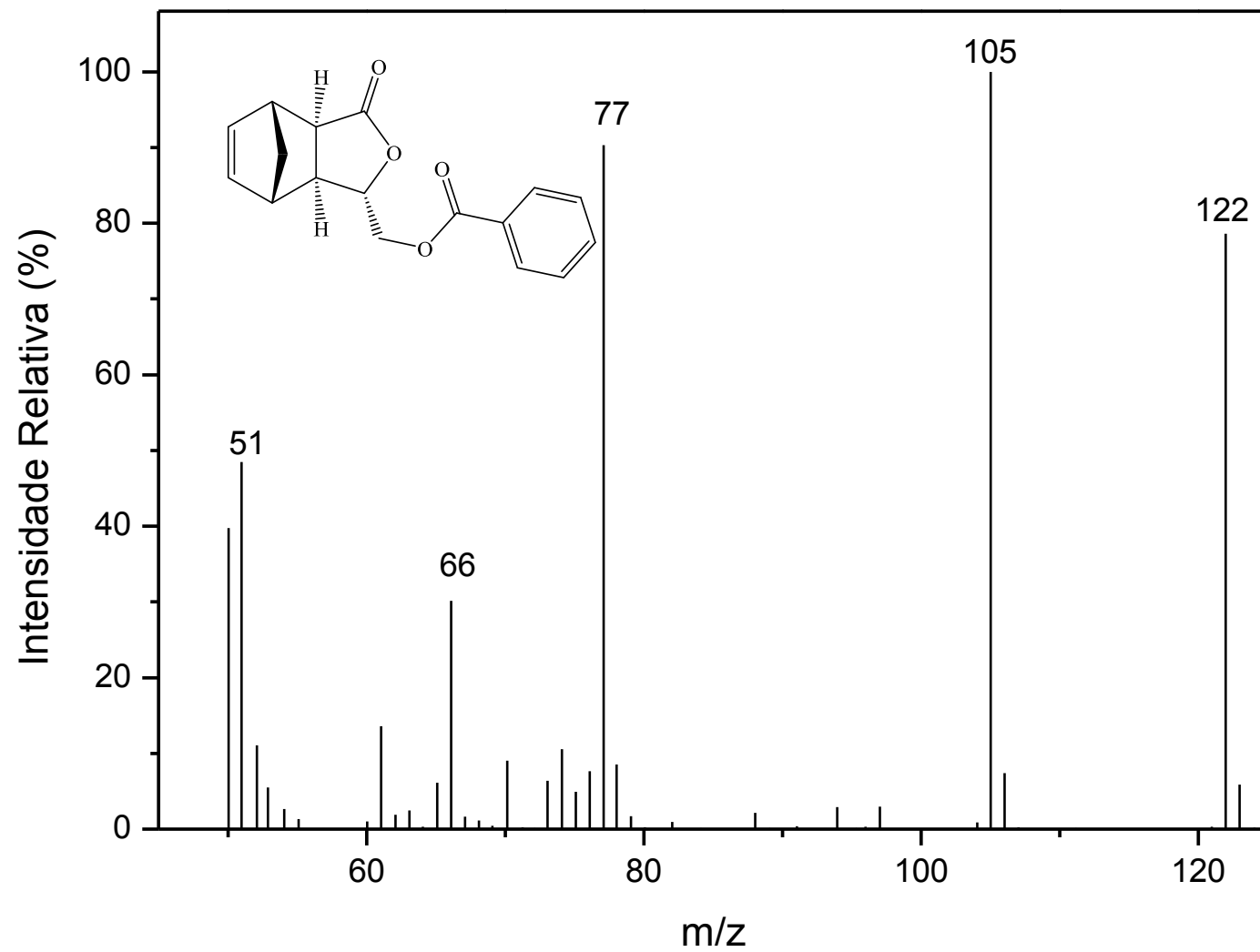


Figura A28: Espectro de massas do composto **11b**.

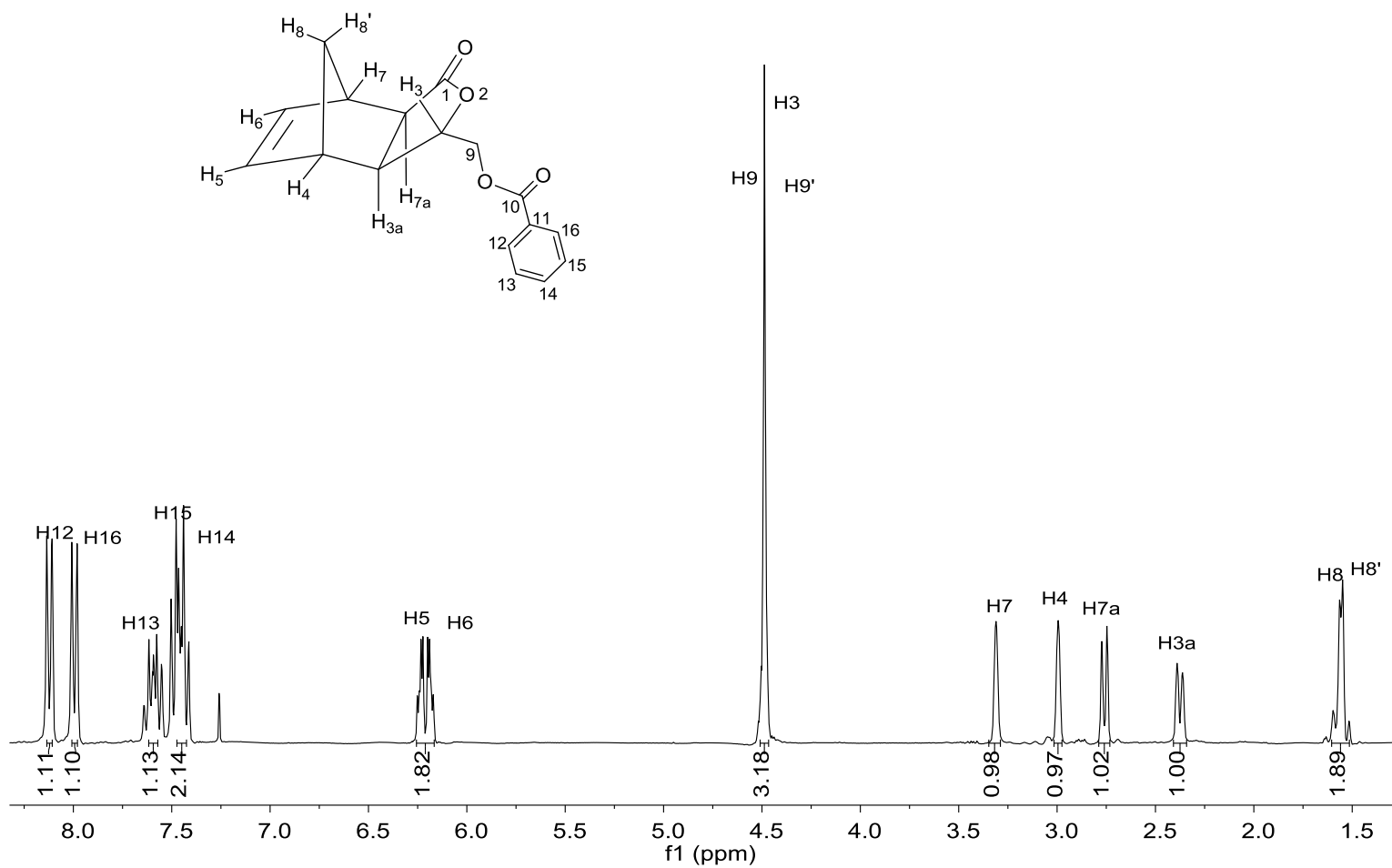


Figura A29: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **11b**.

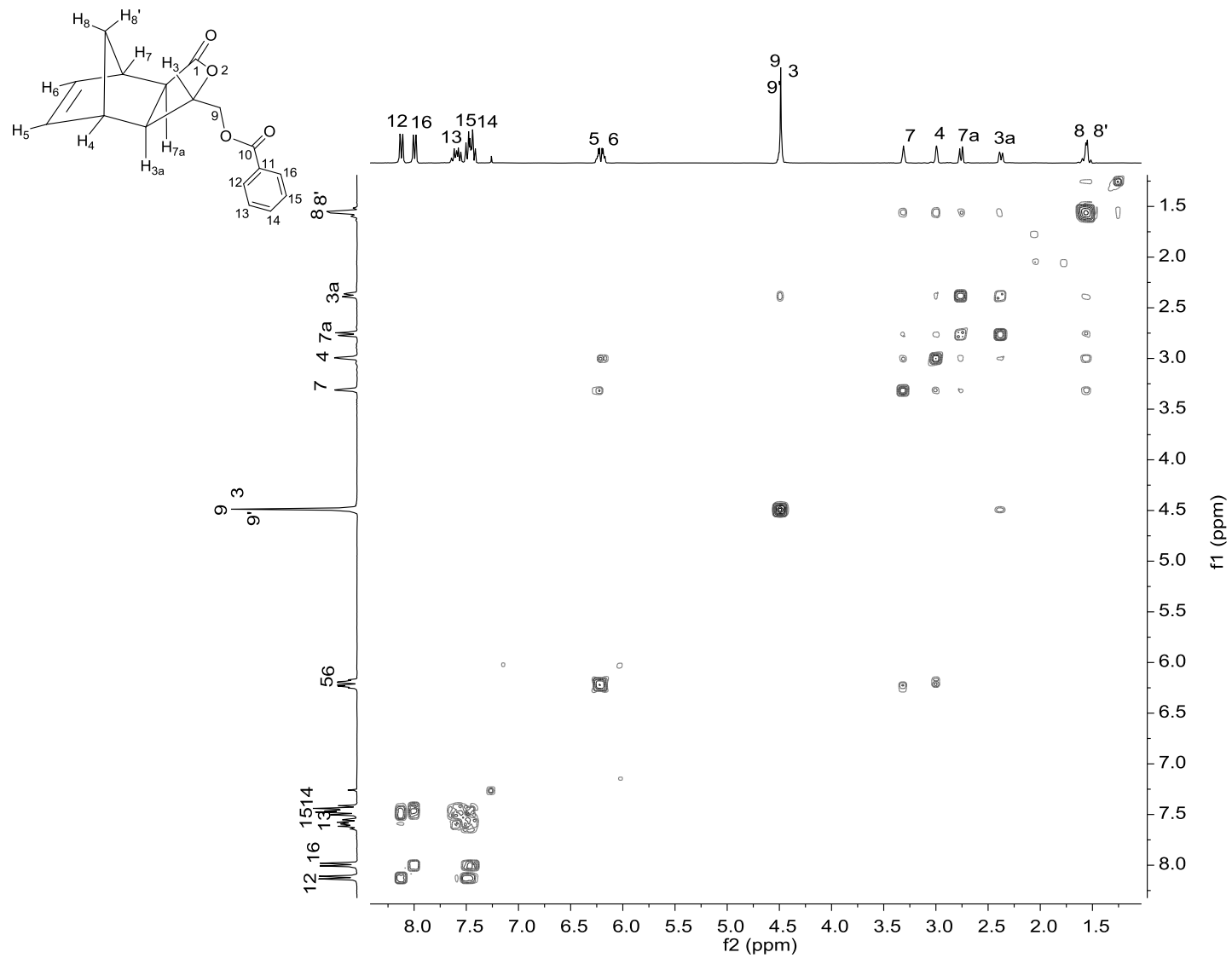


Figura A30: Mapa de contorno COSY do composto **11b**.

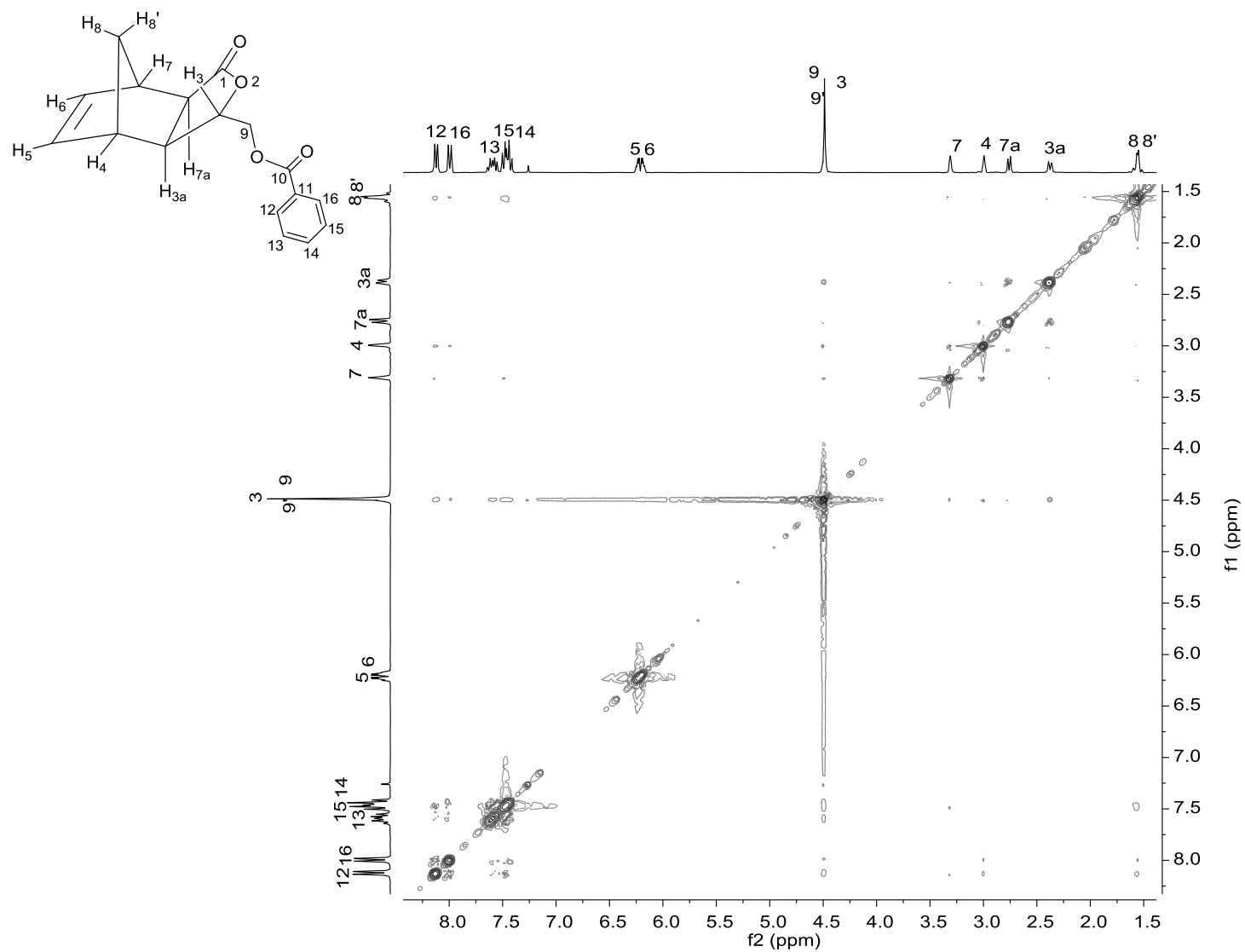


Figura A31: Mapa de contorno NOESY do composto 11b.

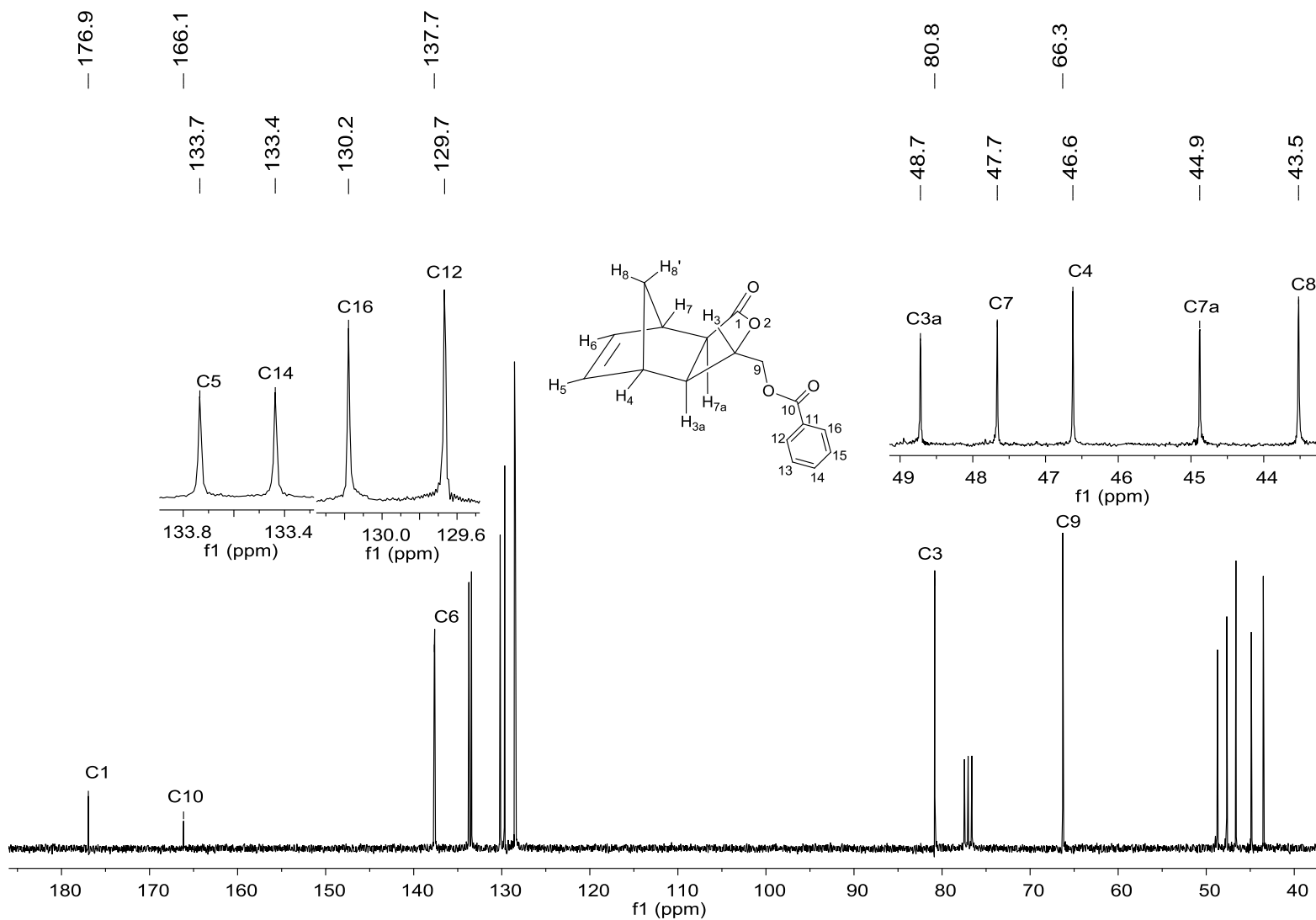


Figura A32: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **11b**.

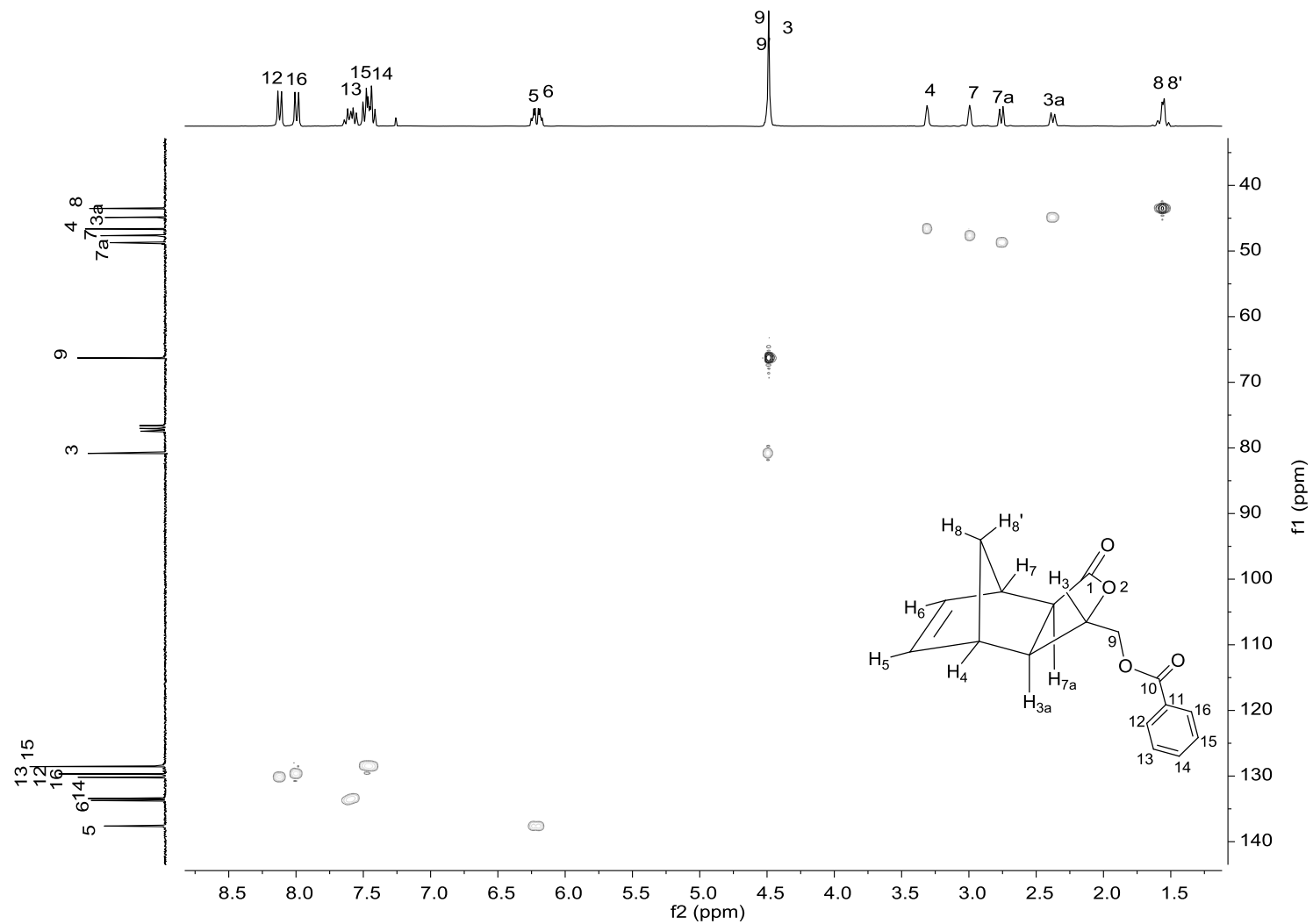


Figura A33: Mapa de contorno *HSQC* do composto **11b**.

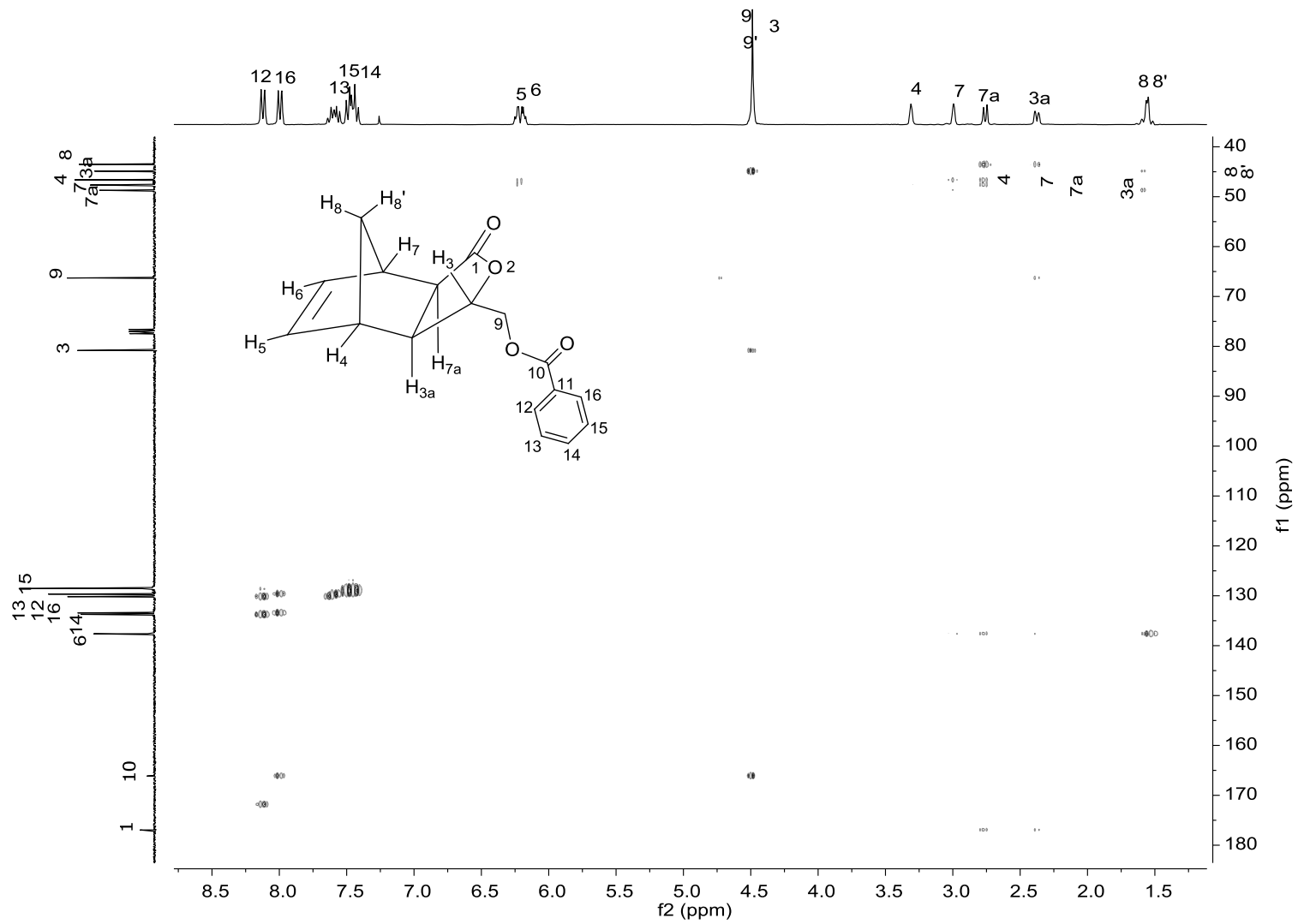


Figura A34: Mapa de contorno *HMBC* do composto 11b.

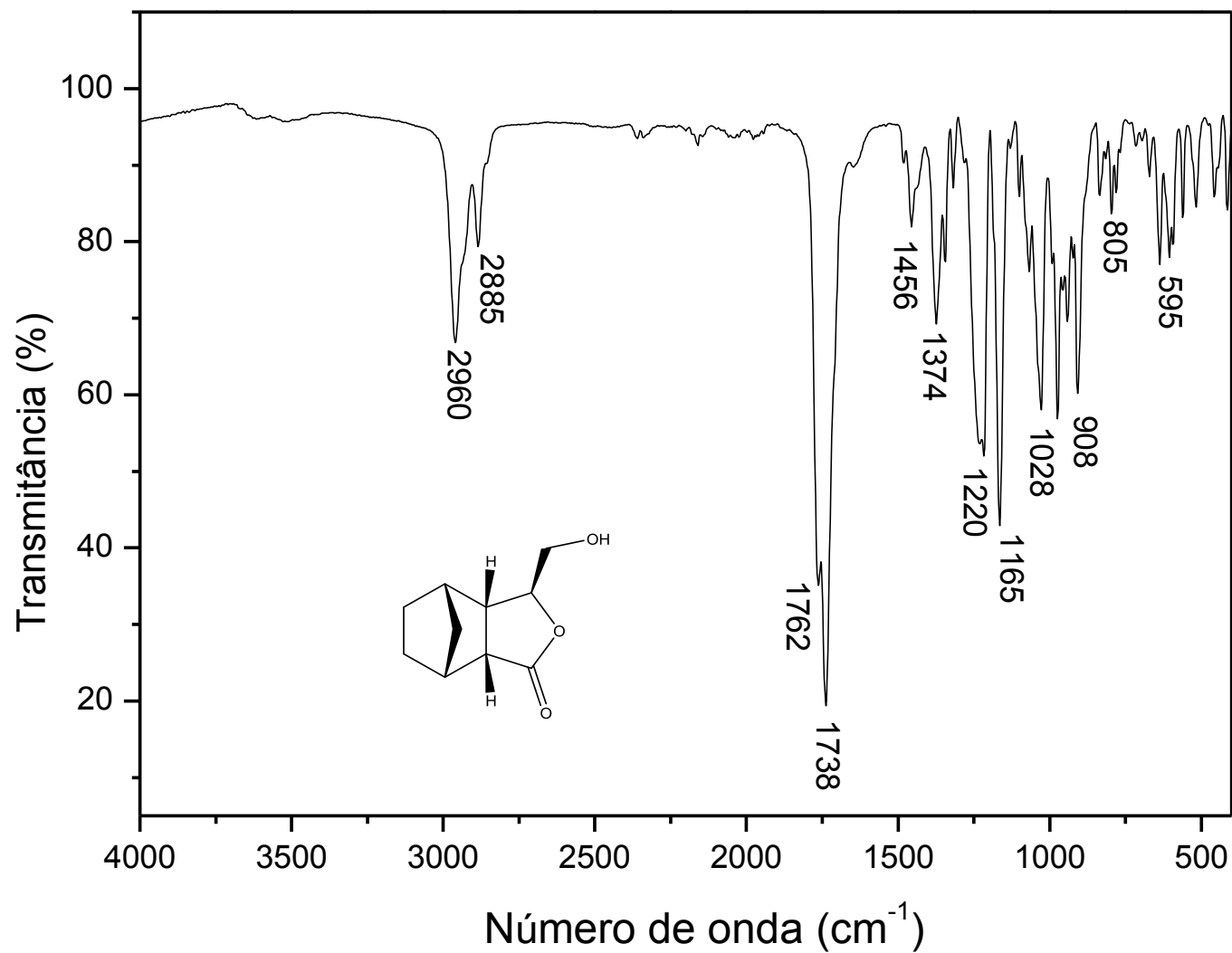


Figura A35: Espectro no Infravermelho do composto 12.

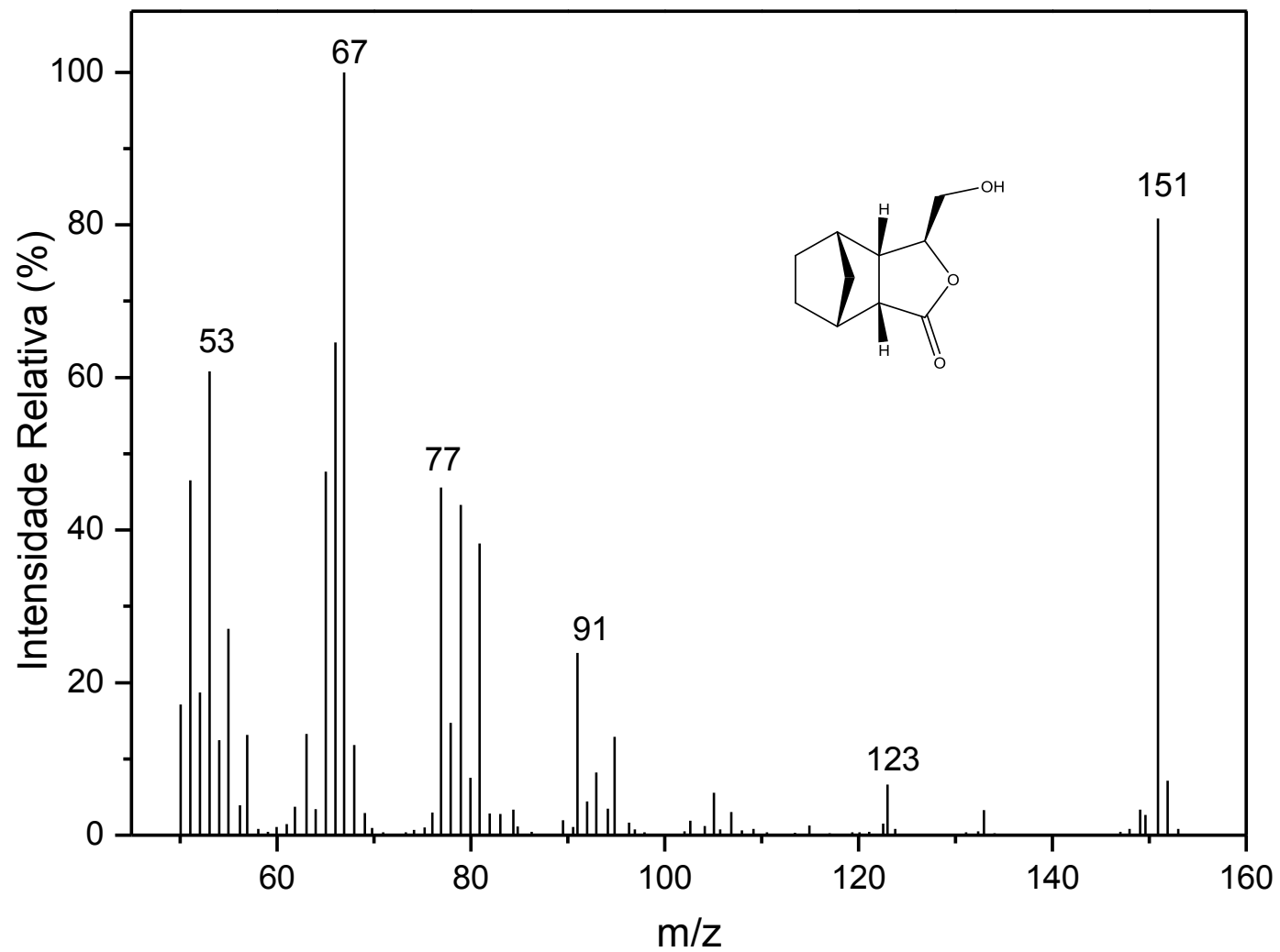


Figura A36: Espectro de massas do composto **12**.

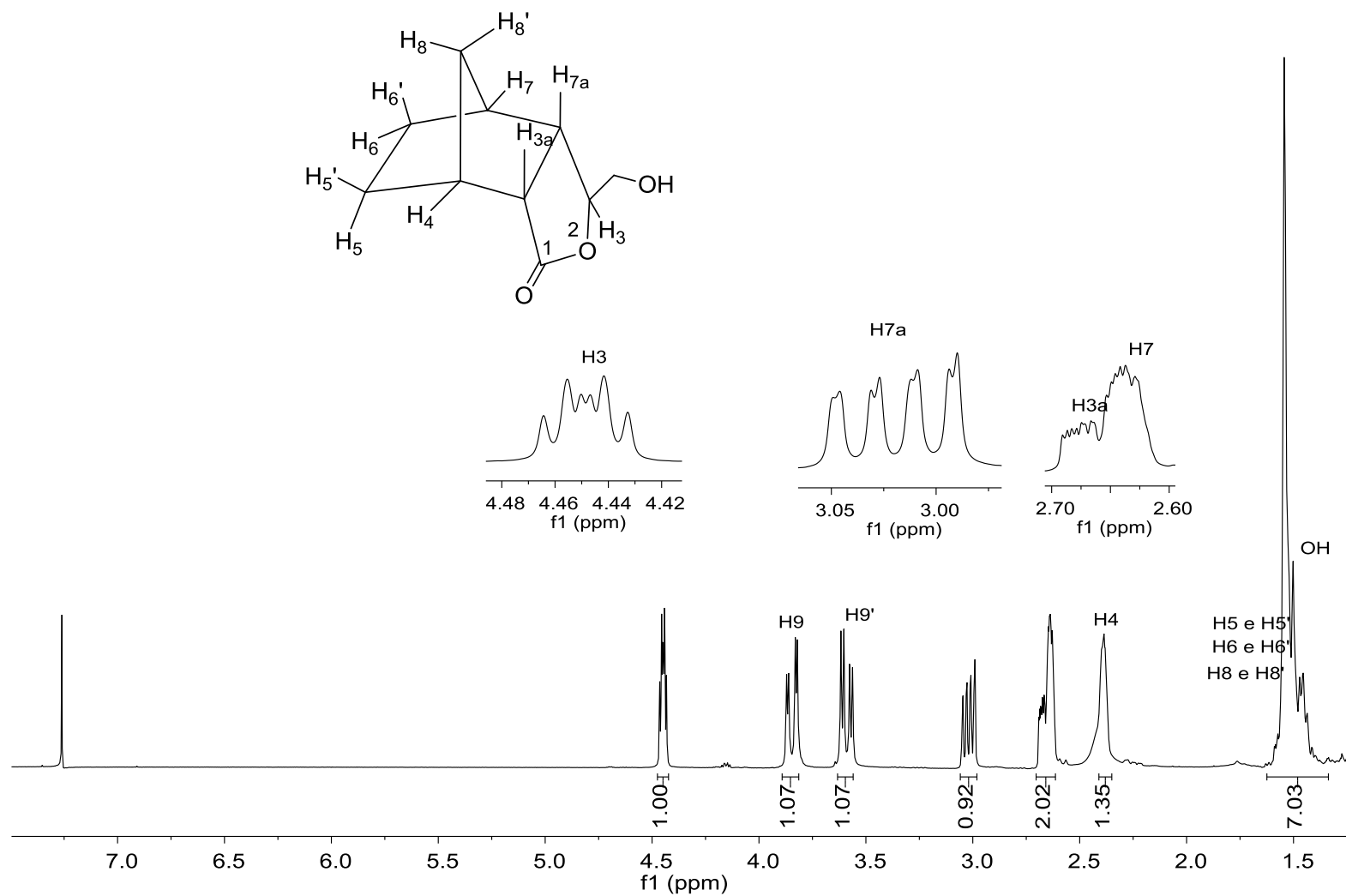


Figura A37: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **12**.

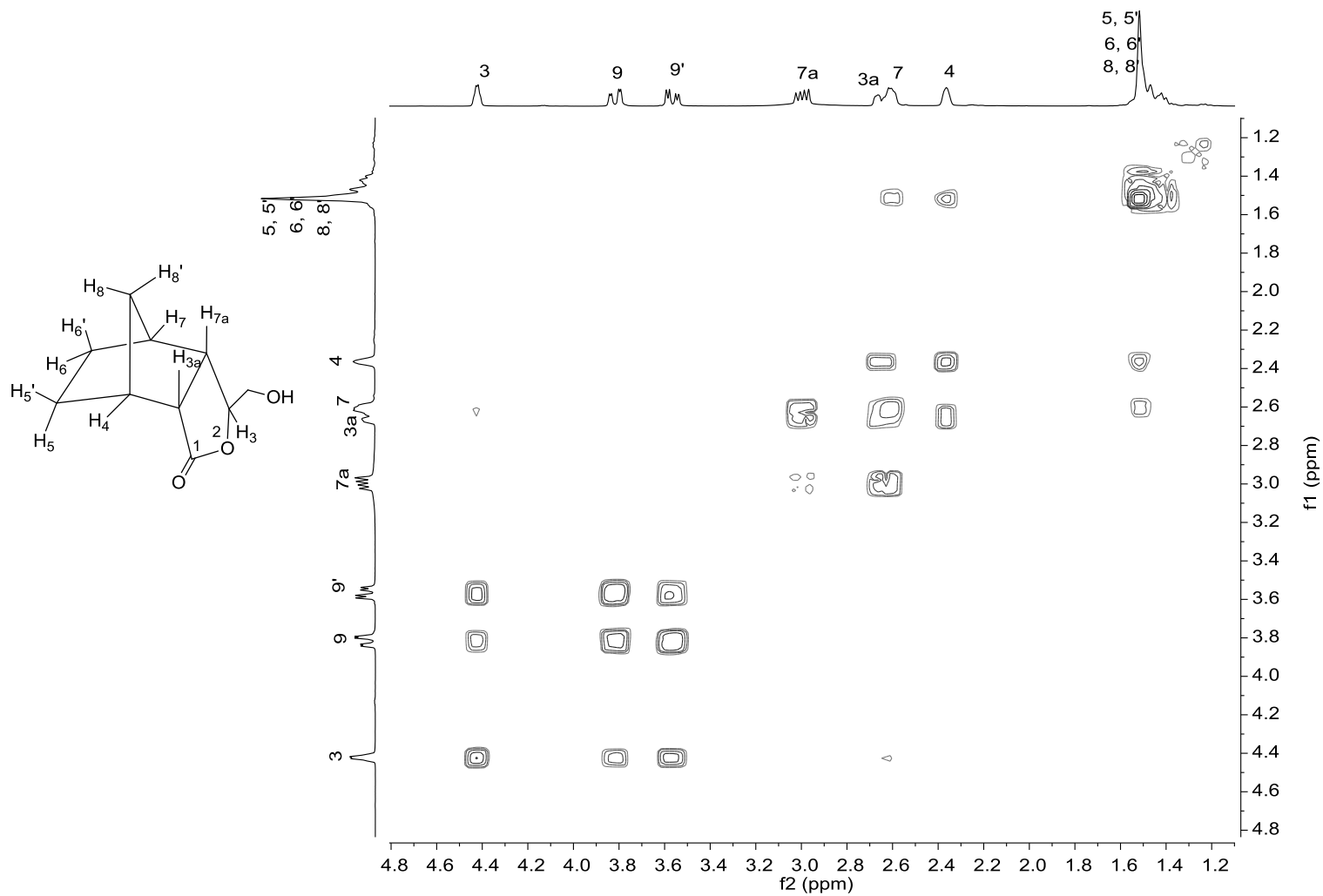


Figura A38: Mapa de contorno COSY do composto 12.

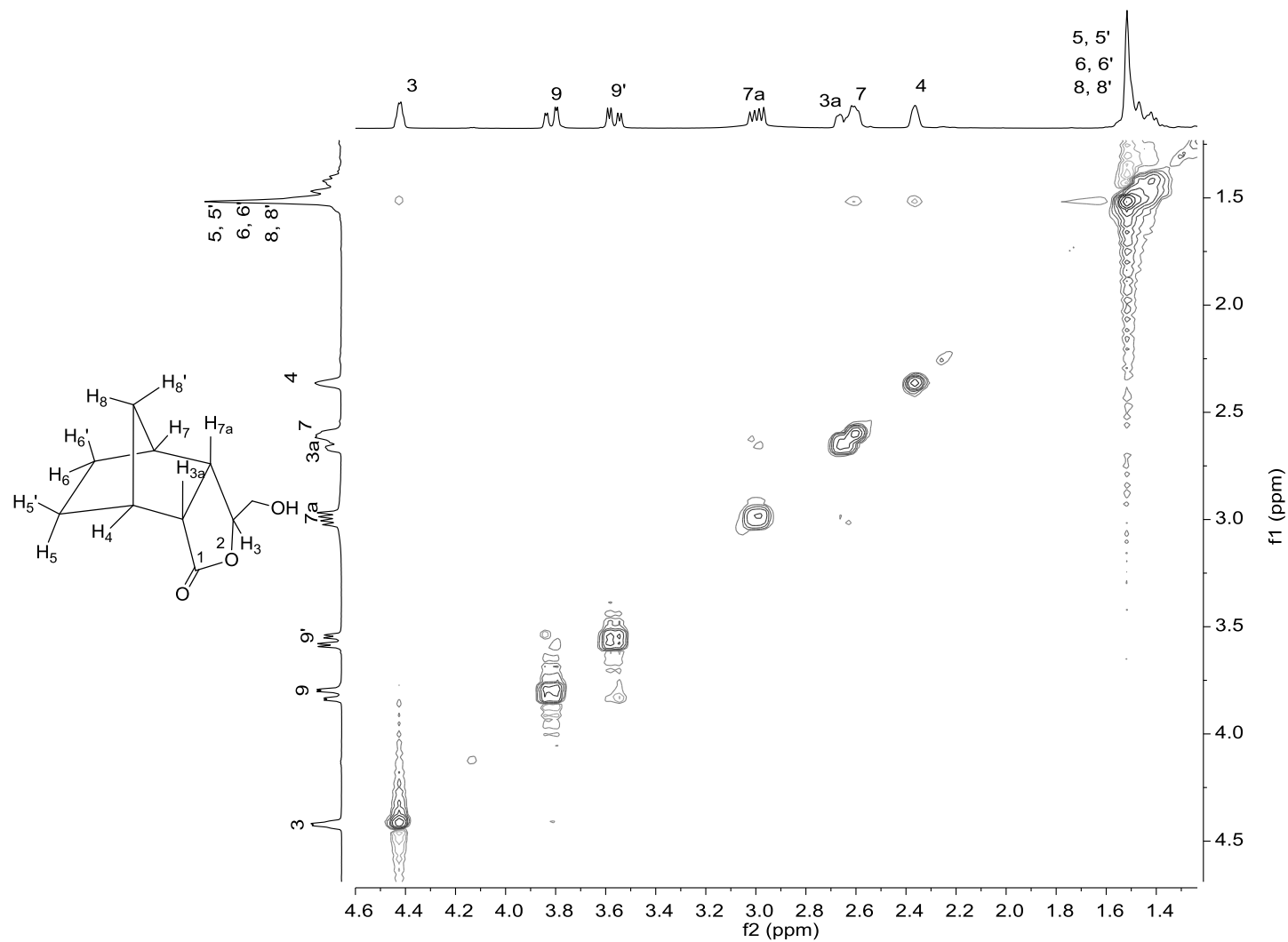


Figura A39: Mapa de contorno NOESY do composto 12.

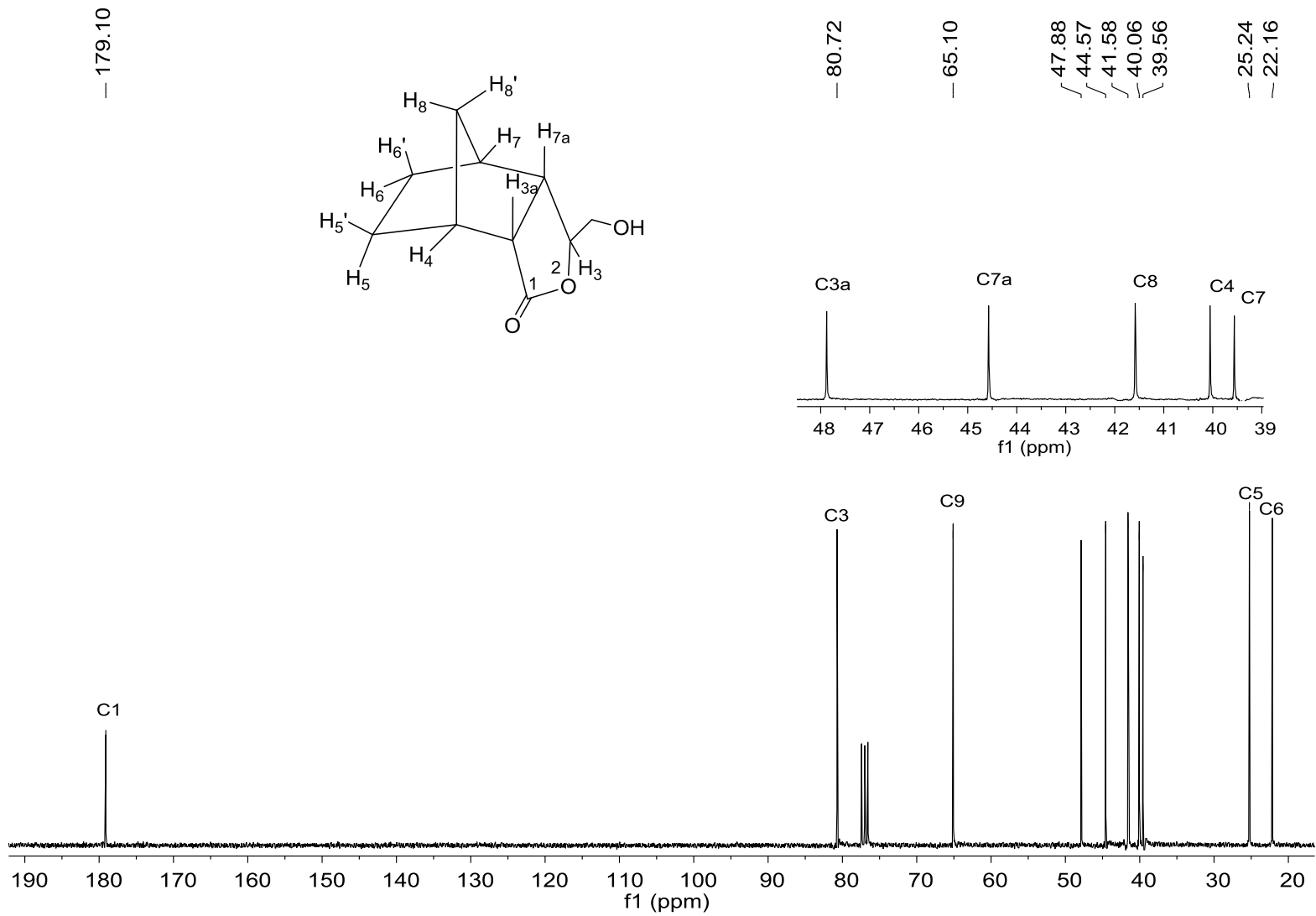


Figura A40: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 12.

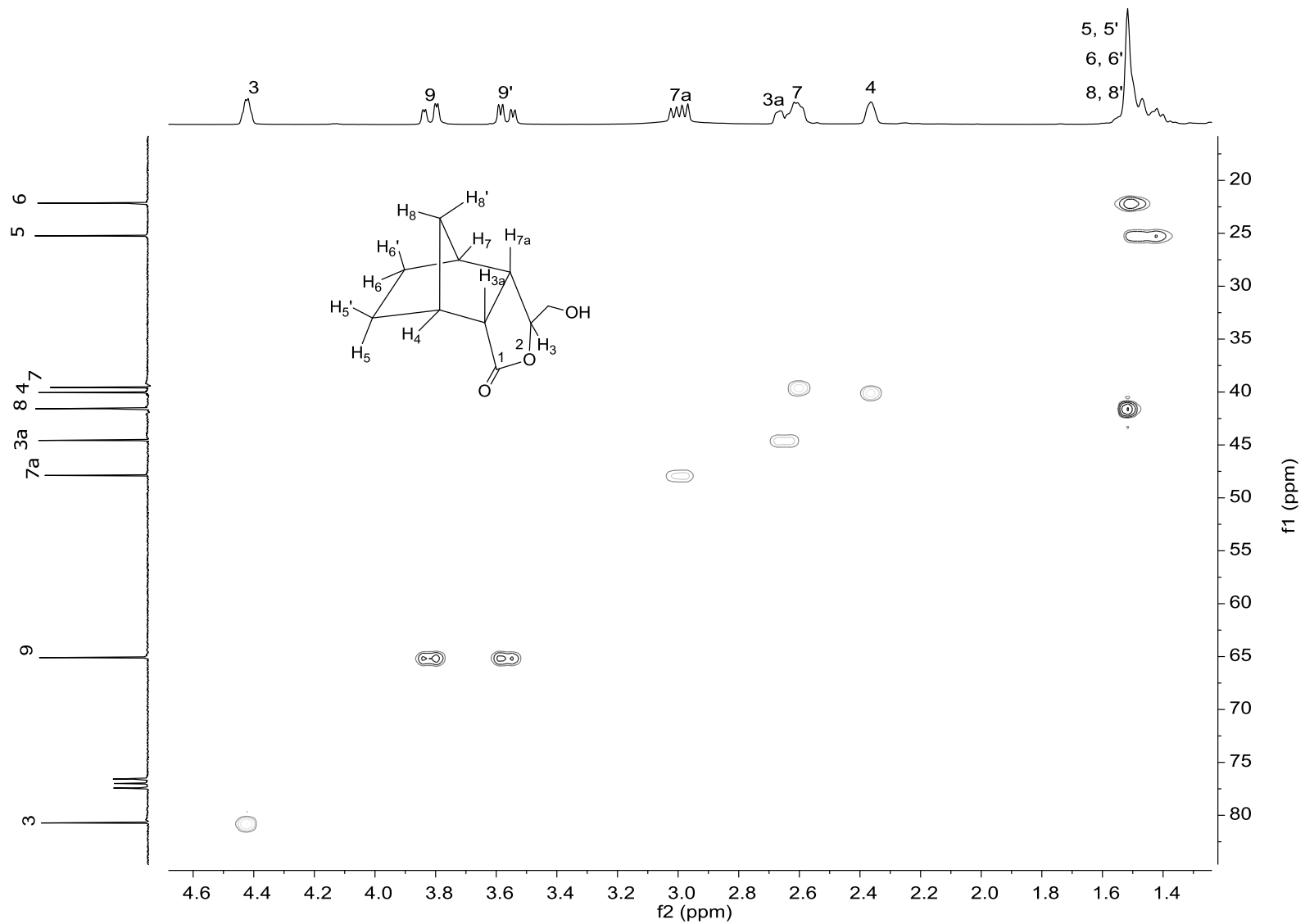


Figura A41: Mapa de contorno HSQC do composto **12**.

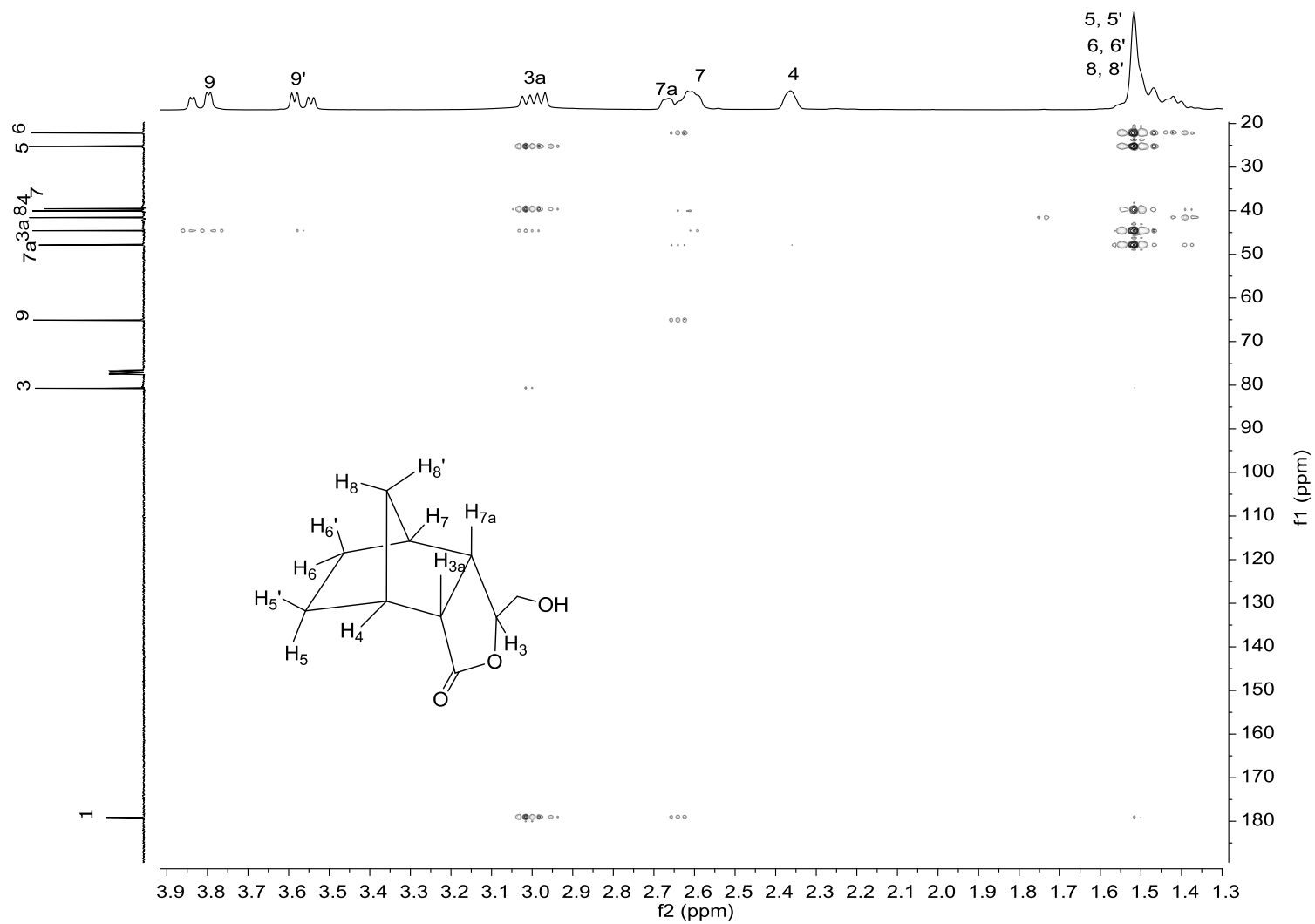


Figura A42: Mapa de contorno *HMBC* do composto **12**.

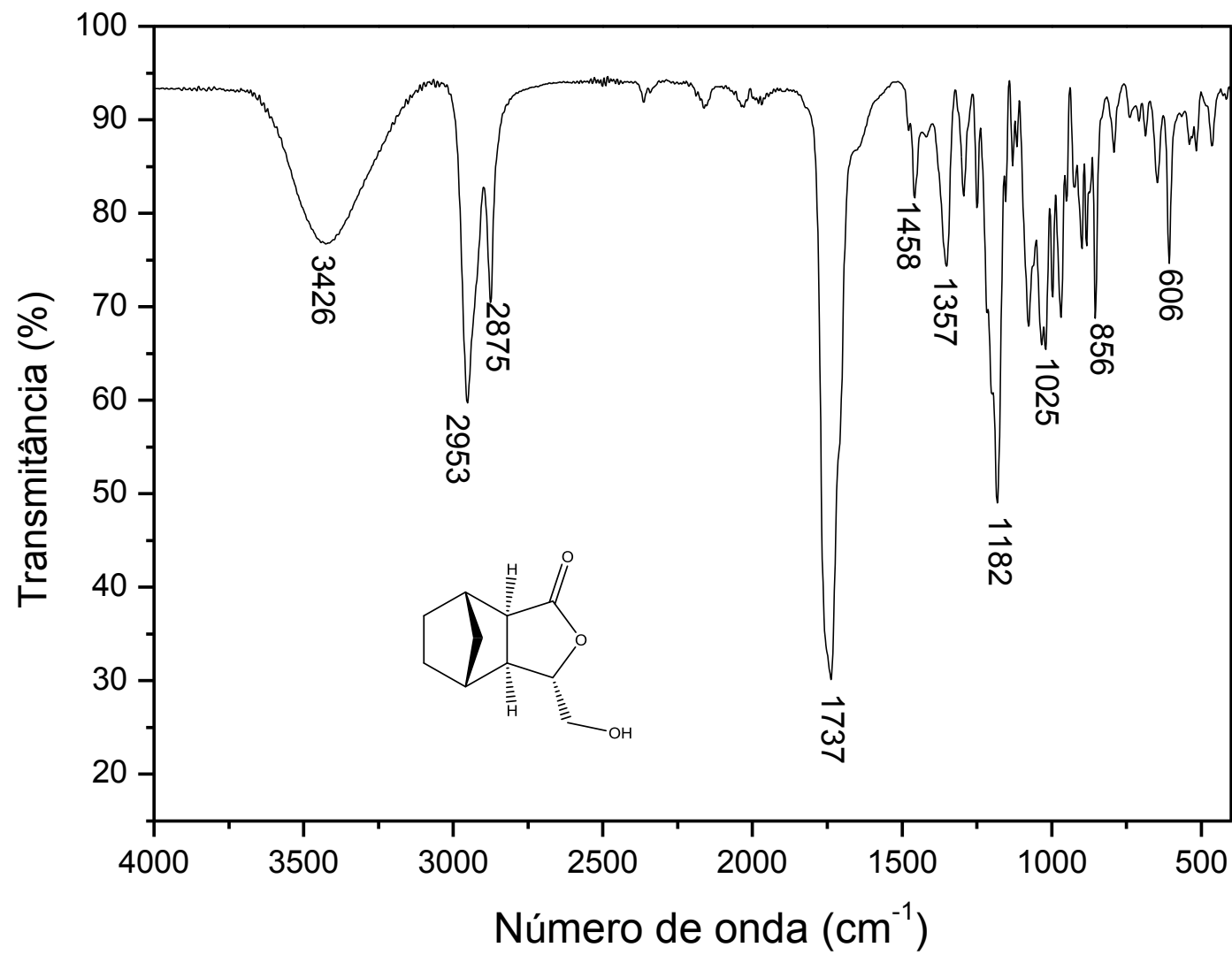


Figura A43: Espectro no Infravermelho do composto 13.

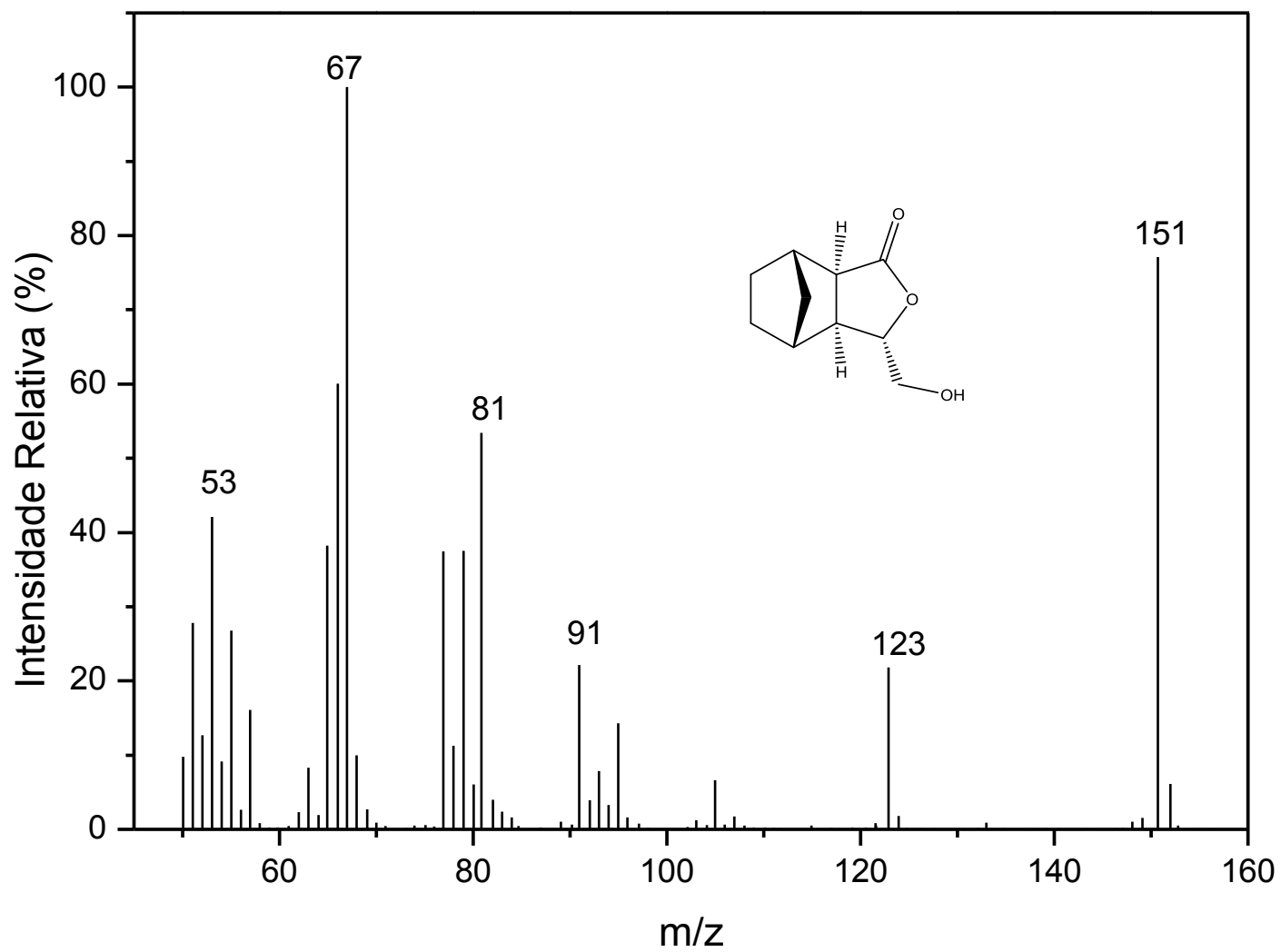


Figura A44: Espectro de massas do composto **13**.

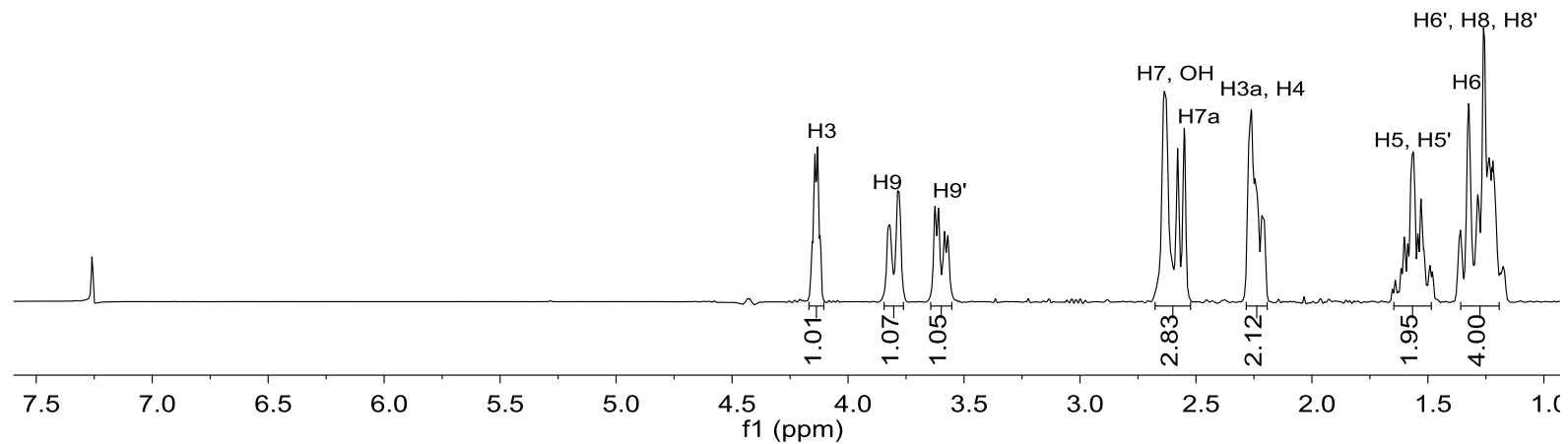
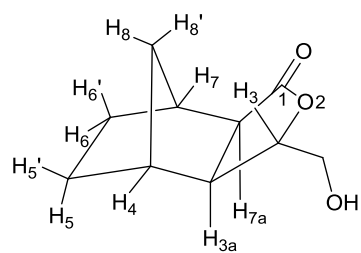


Figura A45: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13**.

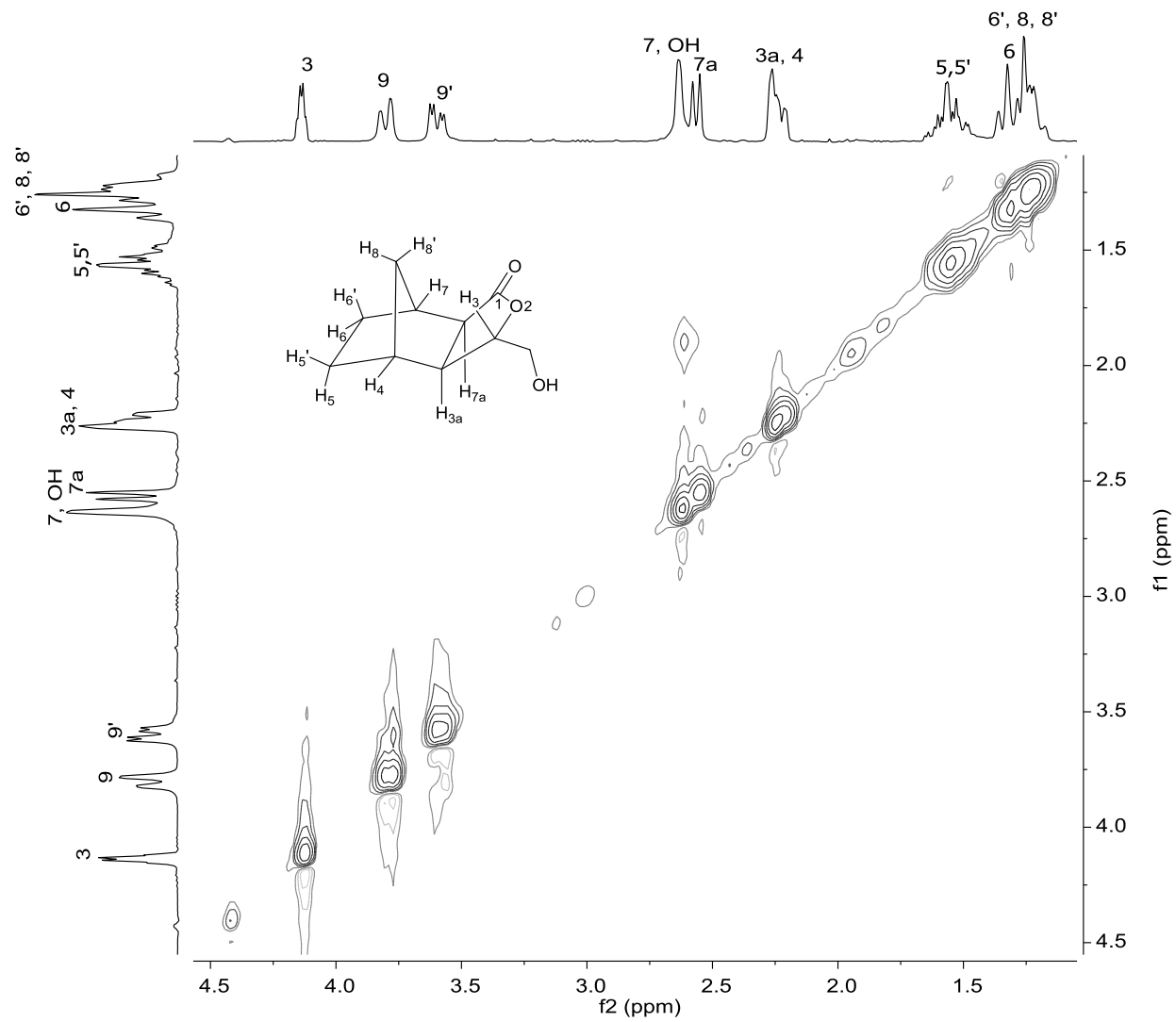


Figura A47: Mapa de contorno *NOESY* do composto **13**.

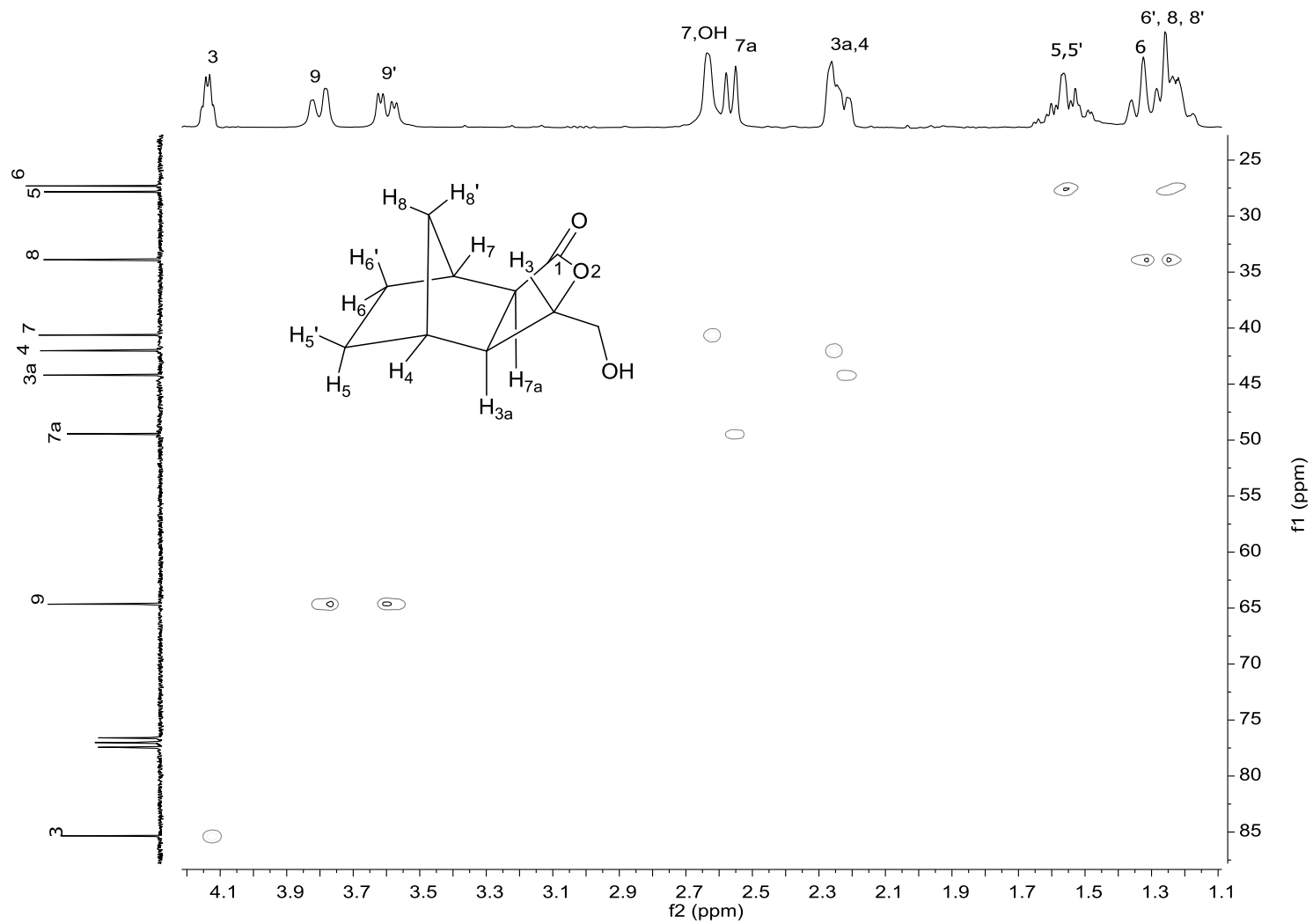


Figura A49: Mapa de contorno *HSQC* do composto **13**.

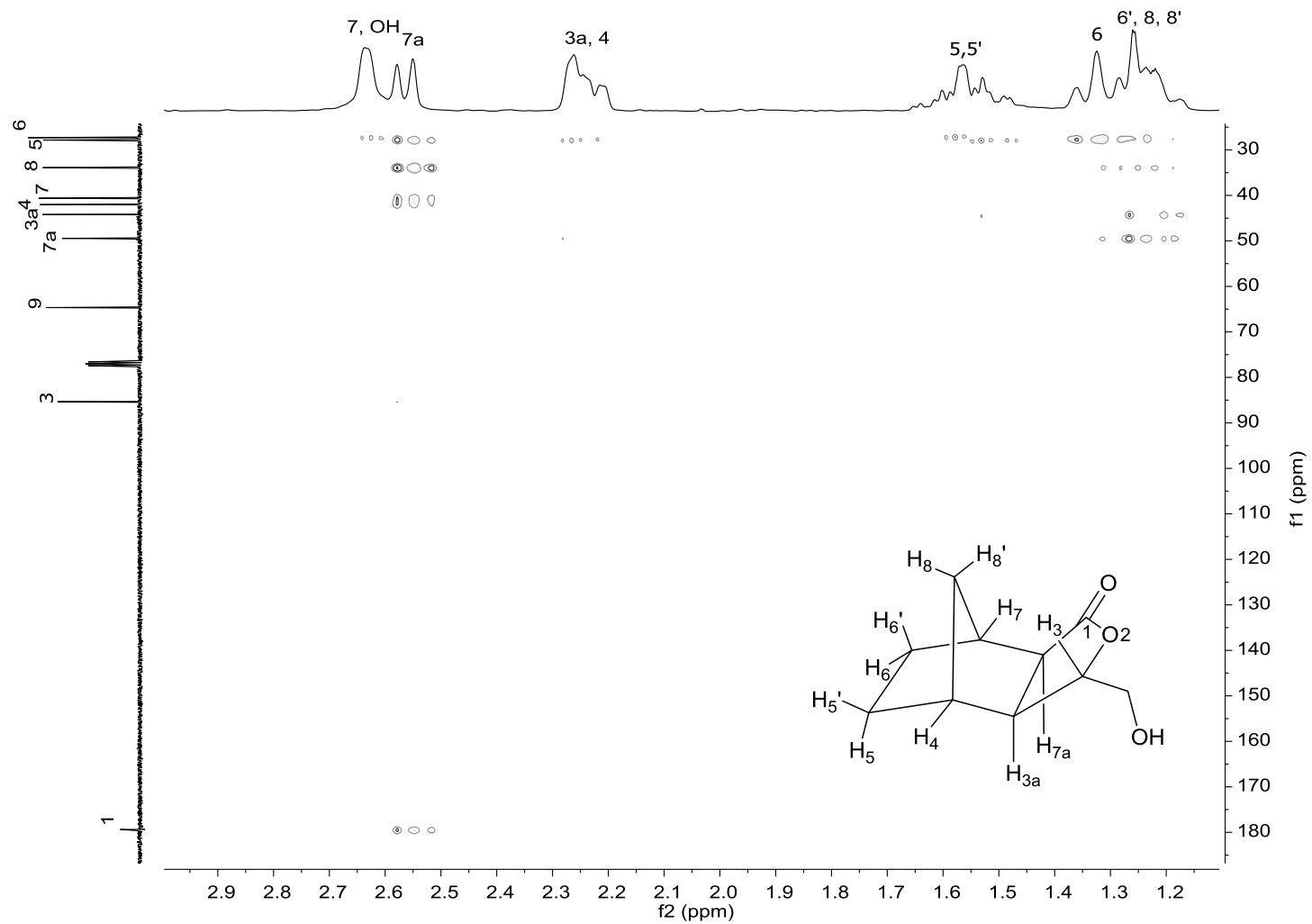


Figura A50: Mapa de contorno *HMBC* do composto **13**.

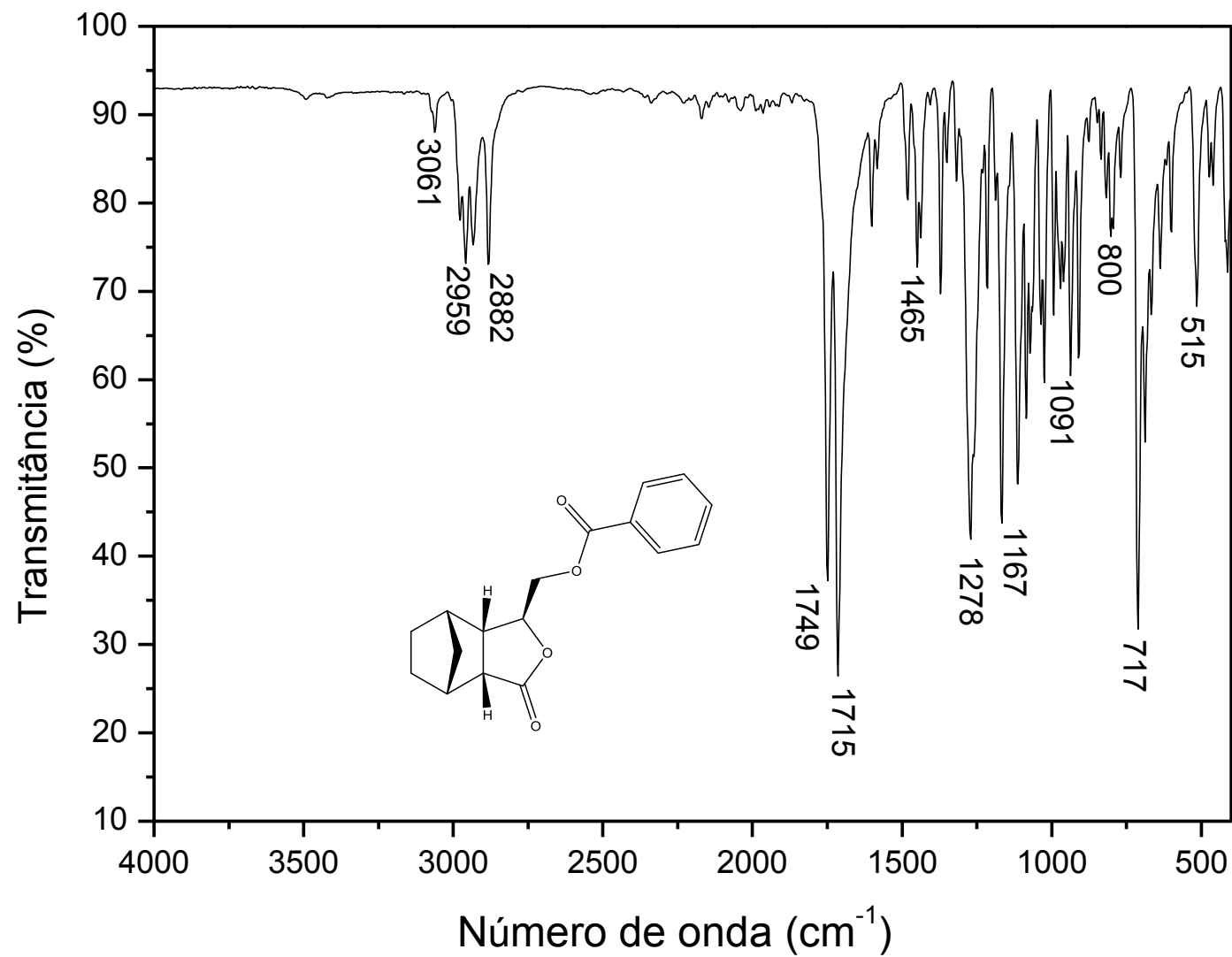


Figura A51: Espectro no Infravermelho do composto 15.

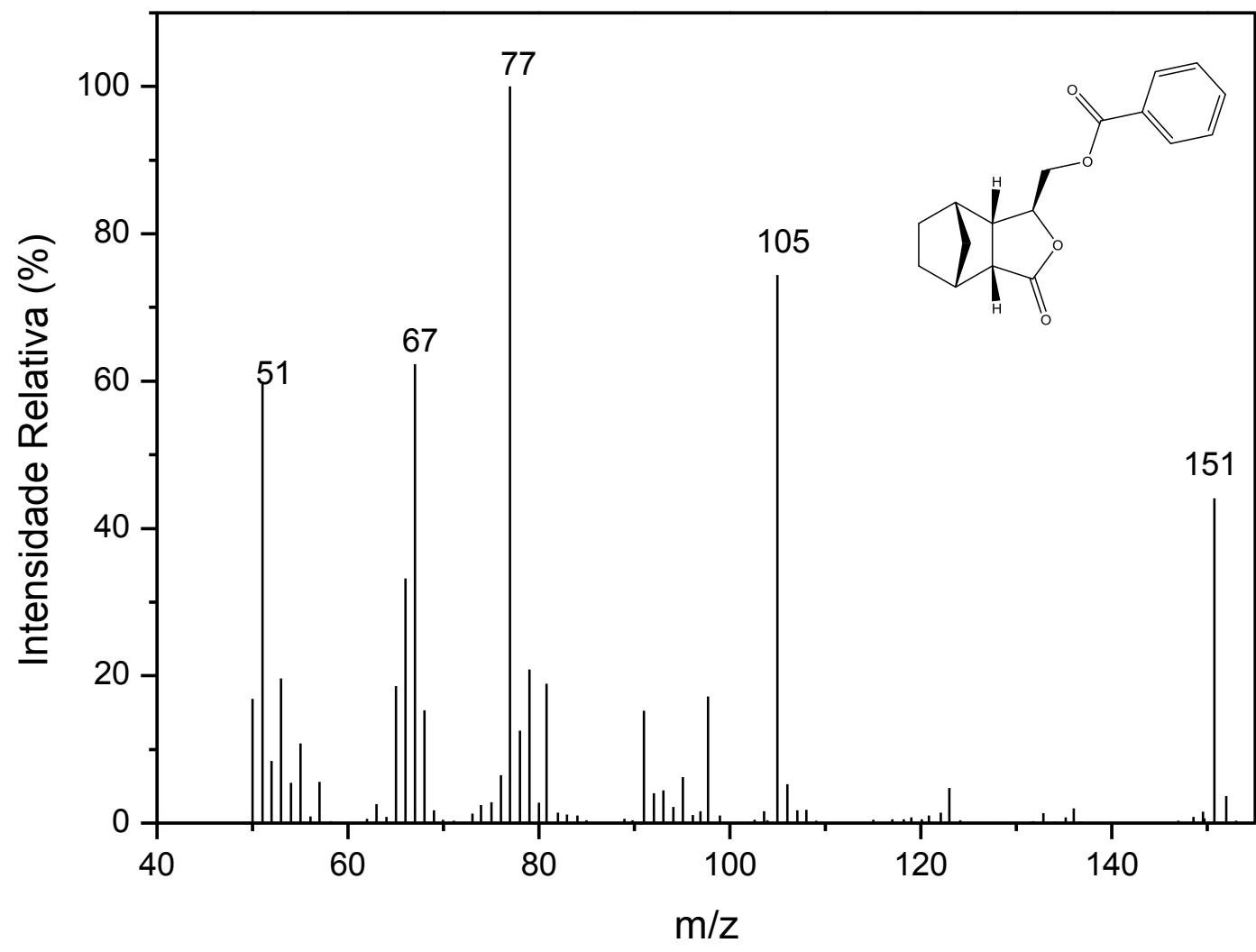


Figura A52: Espectro de massas do composto **15**.

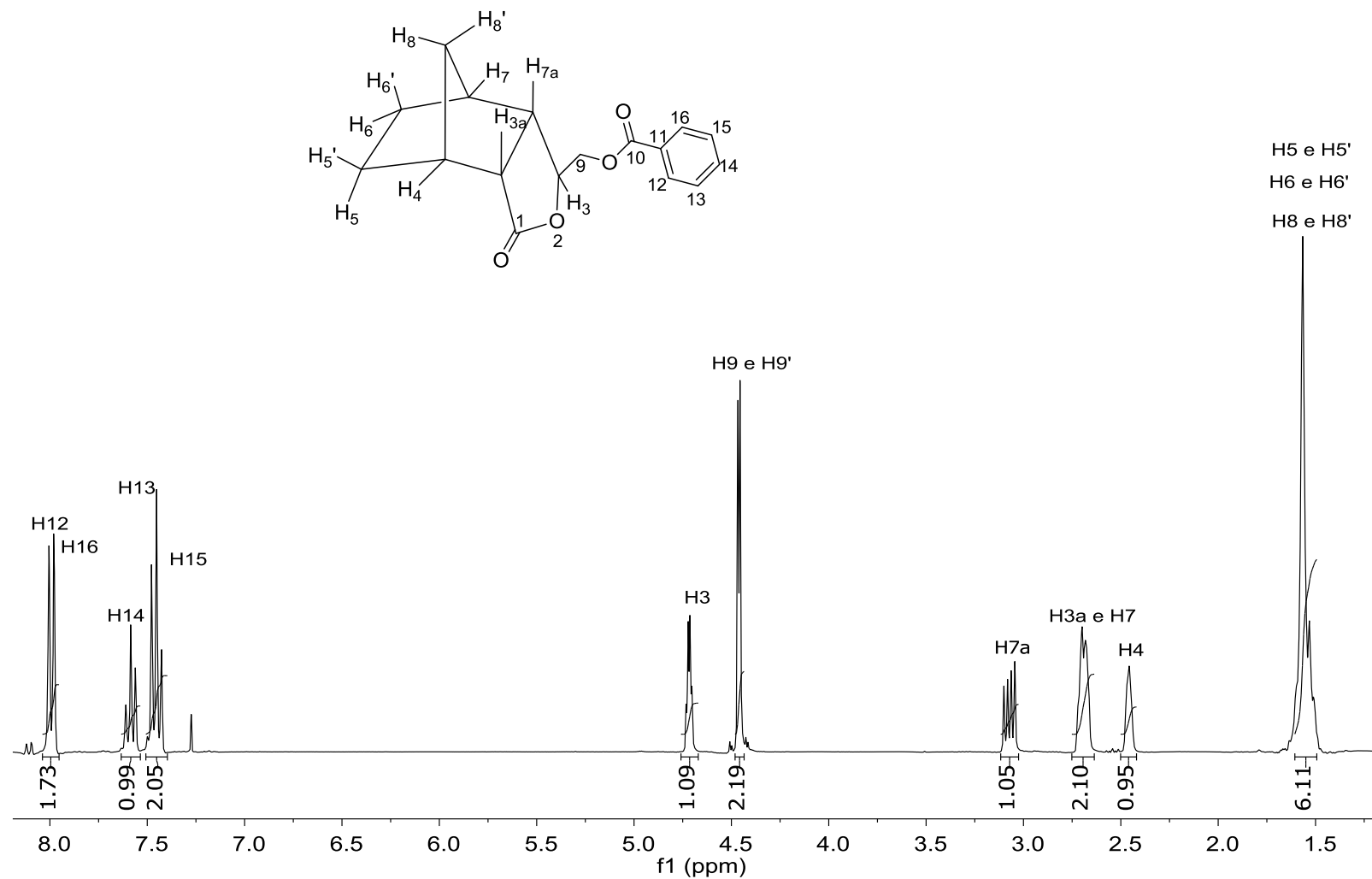


Figura A53: Espectro de RMN de ¹H (75 MHz, CDCl₃) do composto 15.

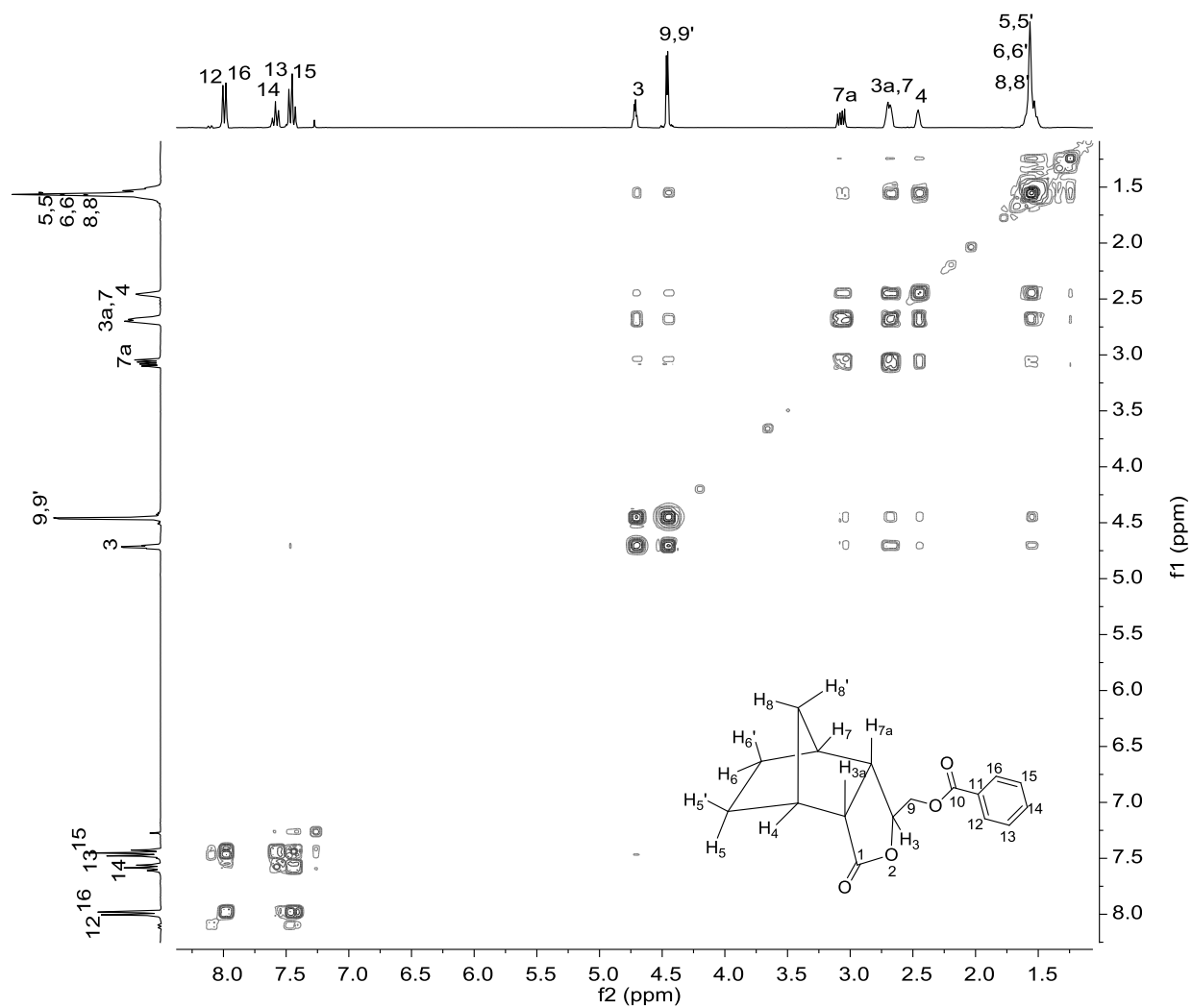


Figura A54: Mapa de contorno COSY do composto **15**.

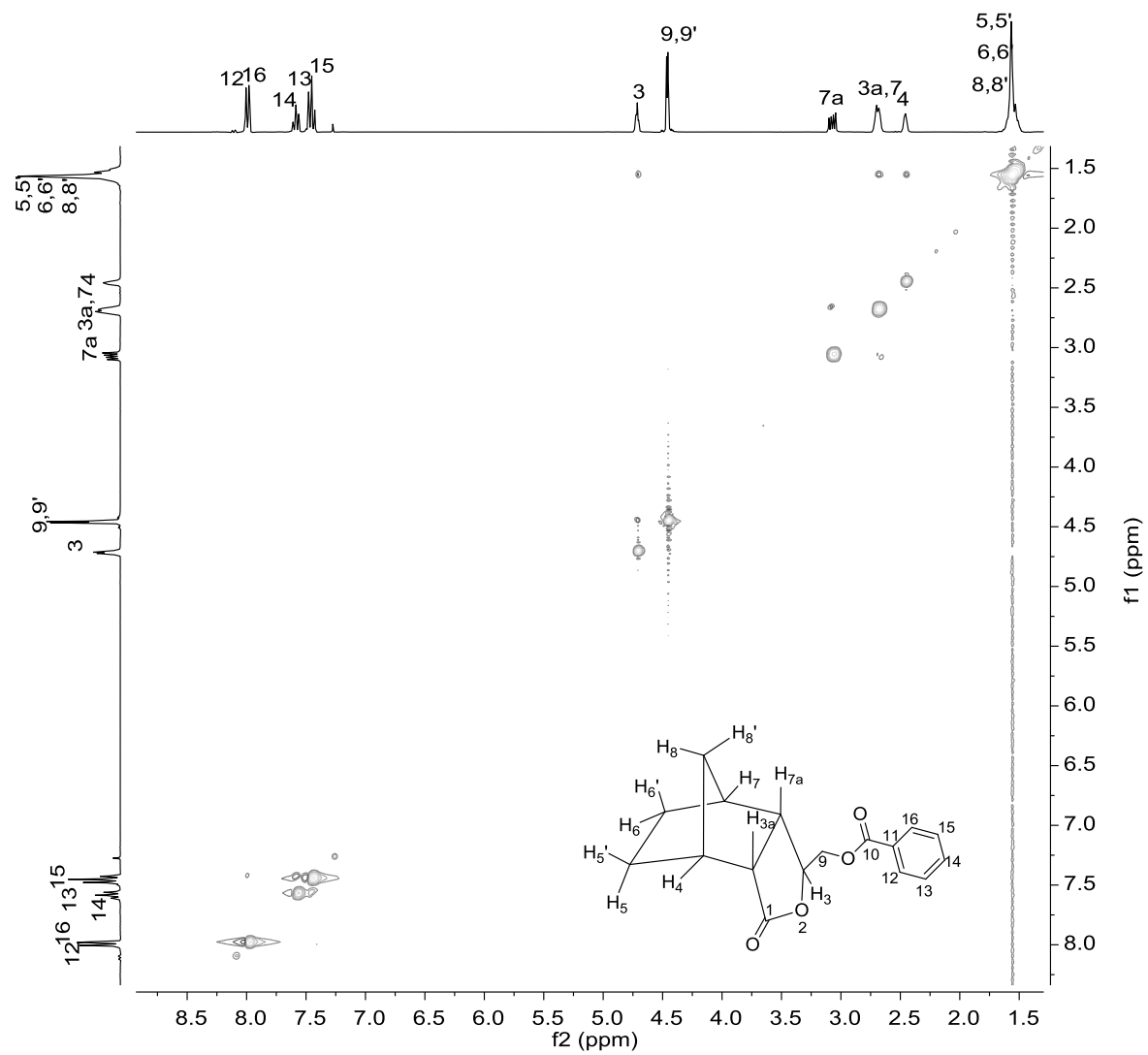


Figura A55: Mapa de contorno NOESY do composto 15.

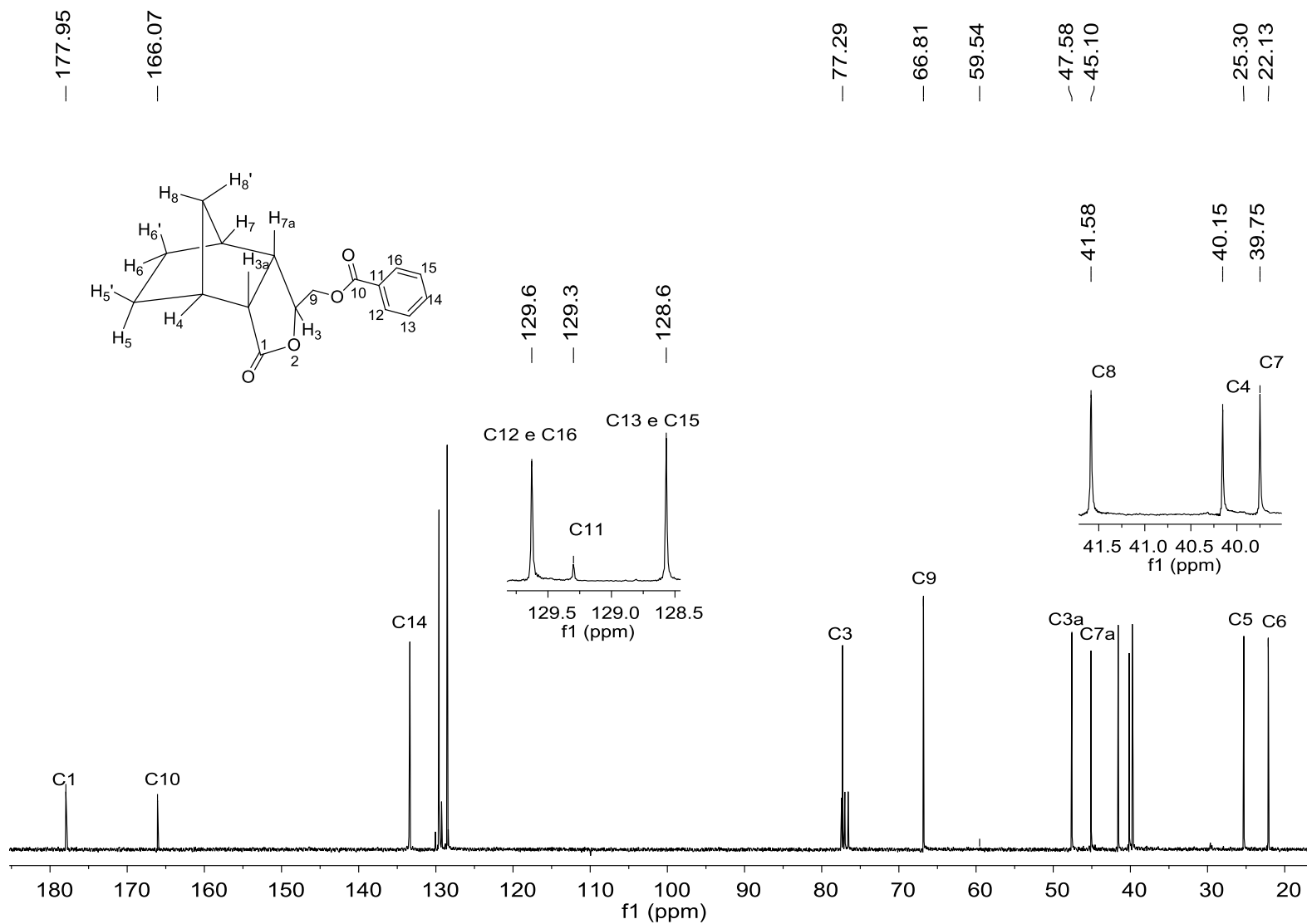


Figura A56: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 15.

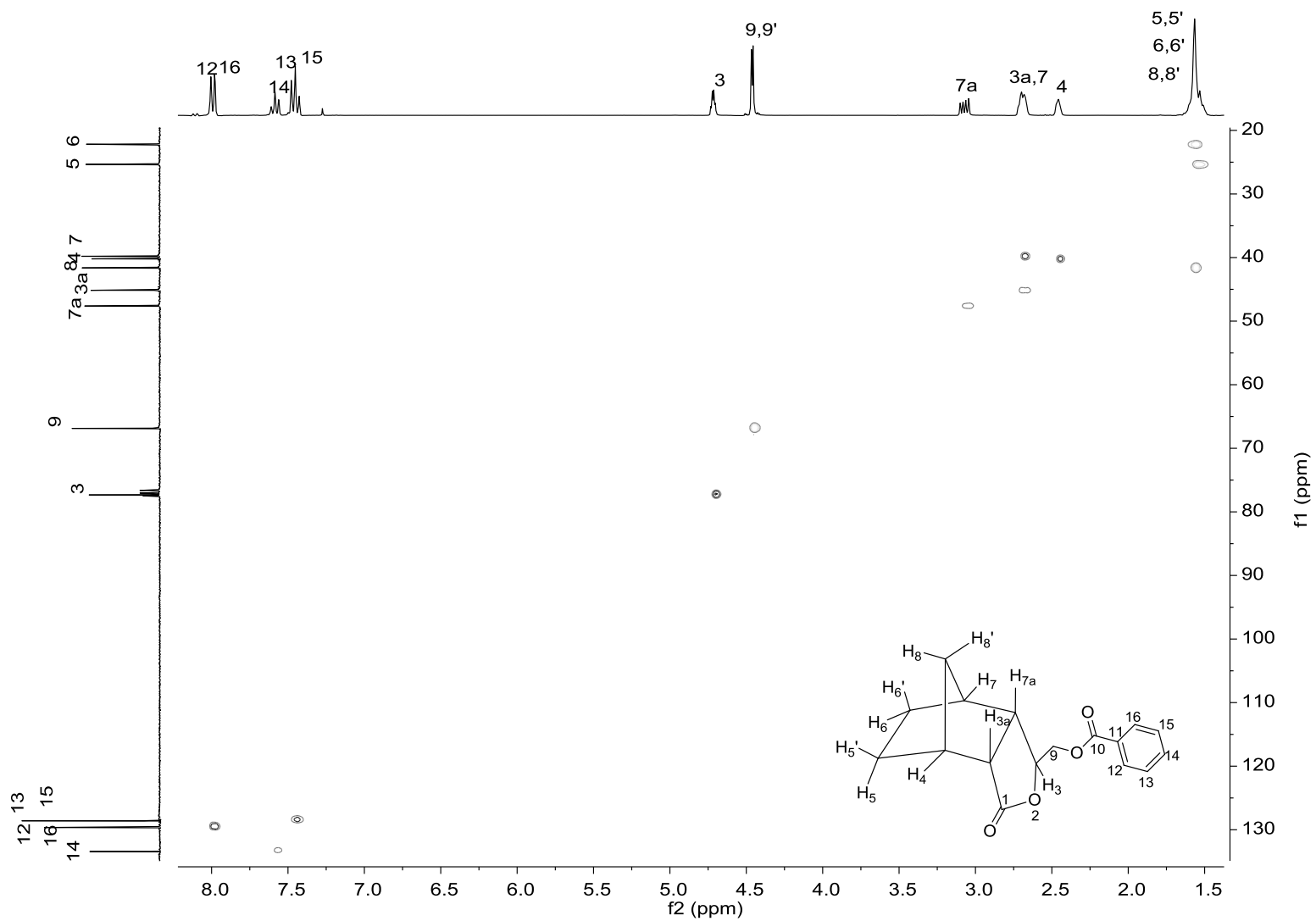


Figura A57: Mapa de contorno *HSQC* do composto **15**.

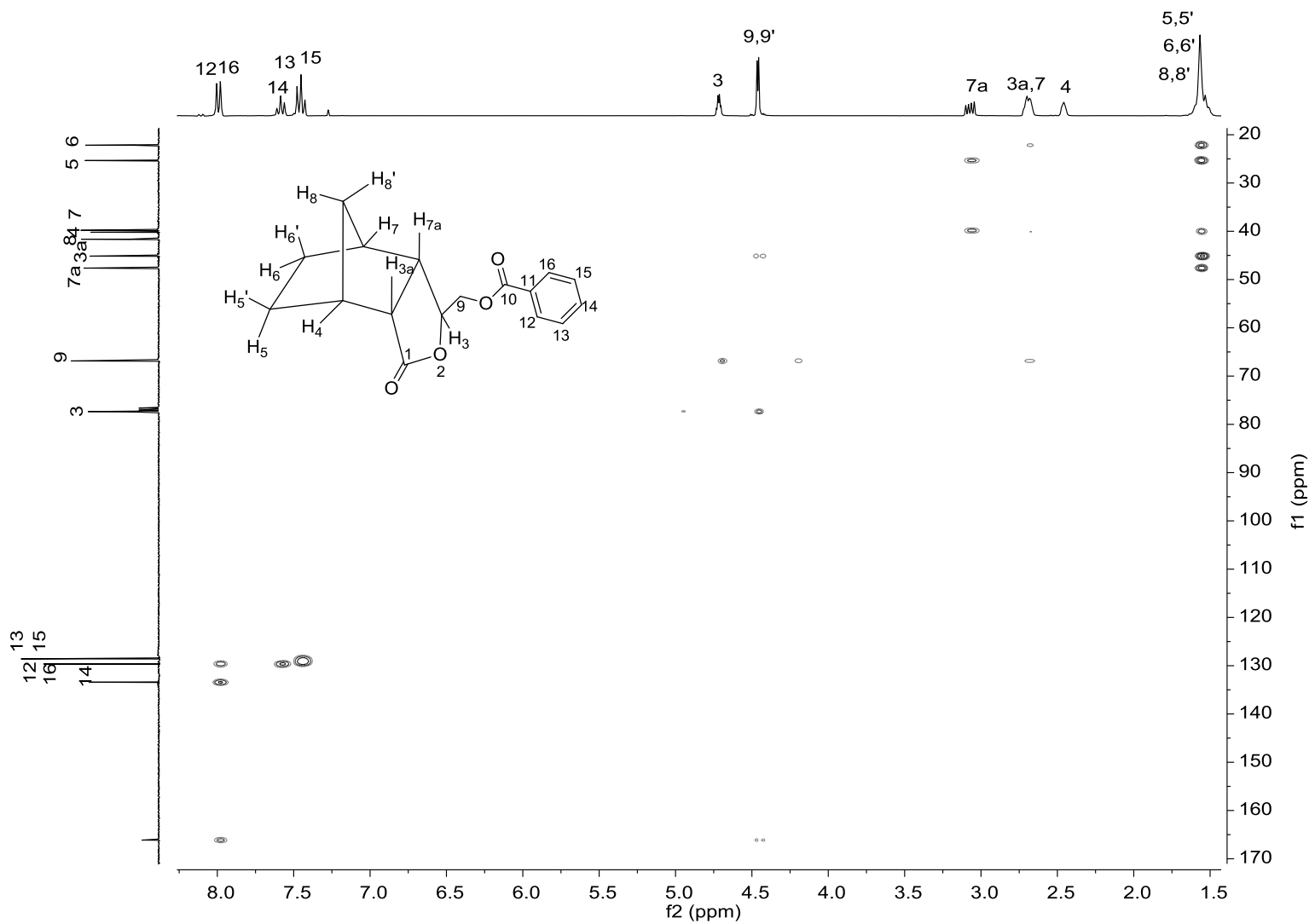


Figura A58: Mapa de contorno *HMBC* do composto 15.

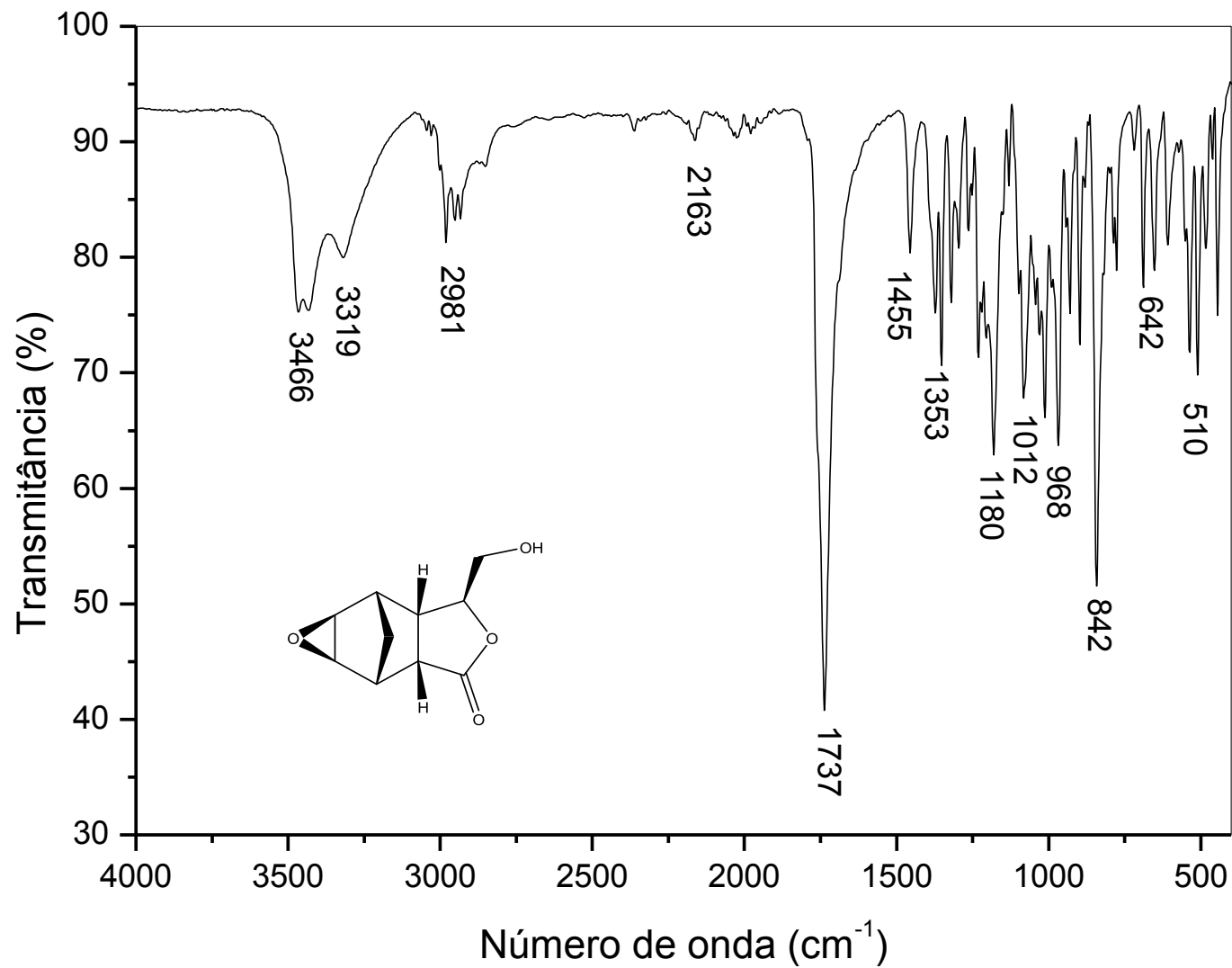


Figura A59: Espectro no Infravermelho do composto 16.

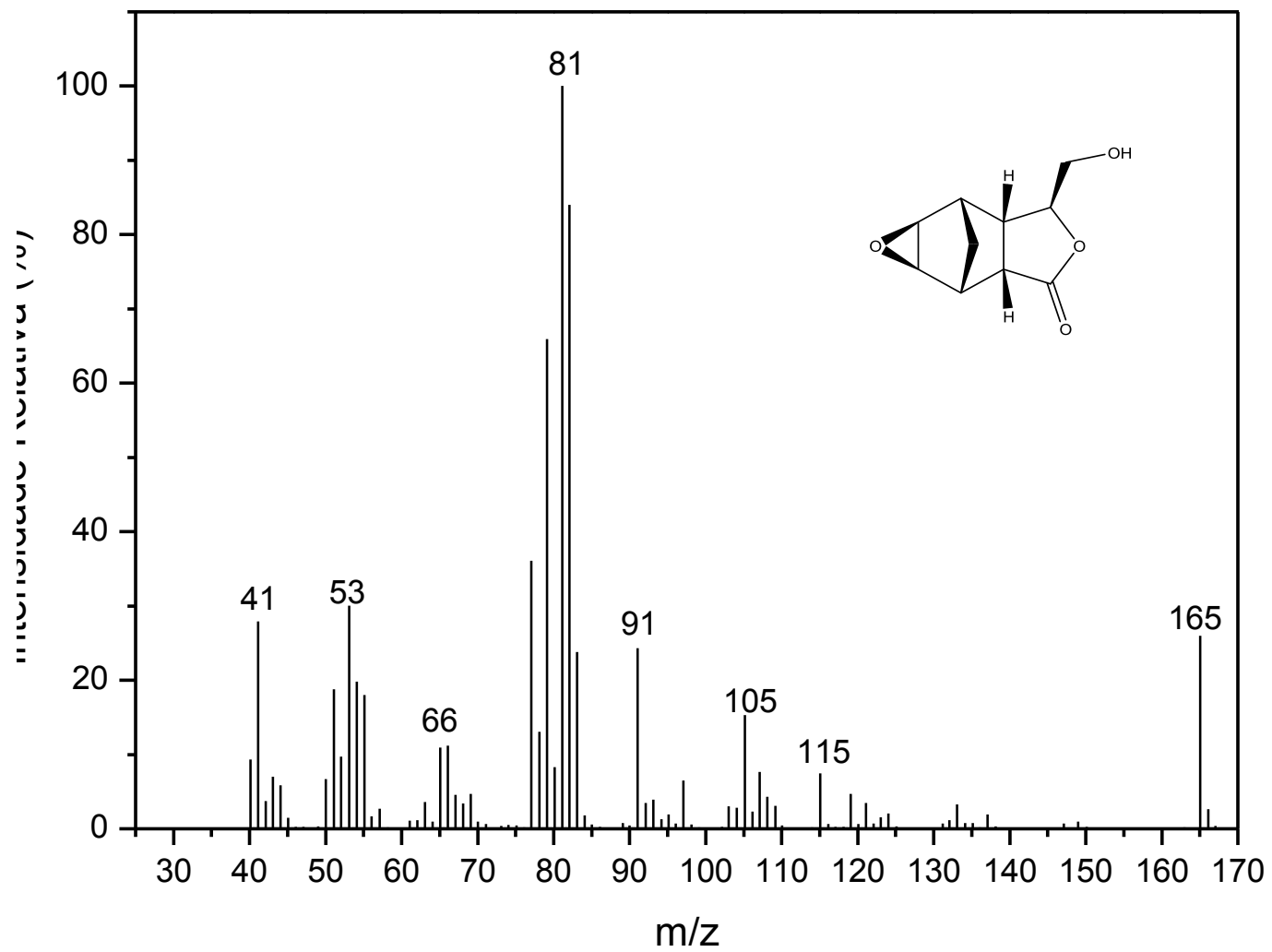


Figura A60: Espectro de massas do composto **16**.

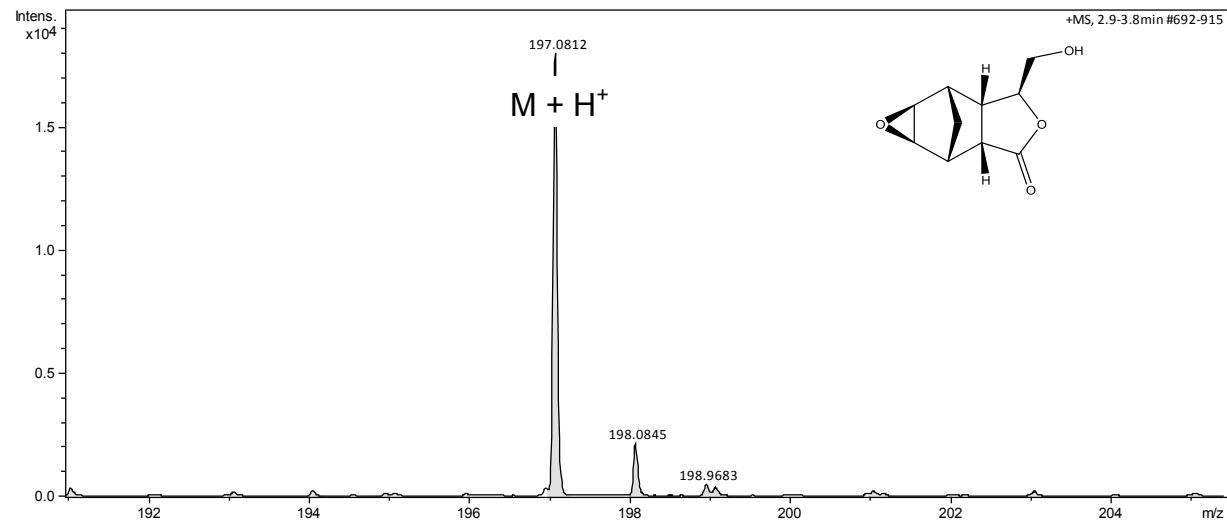
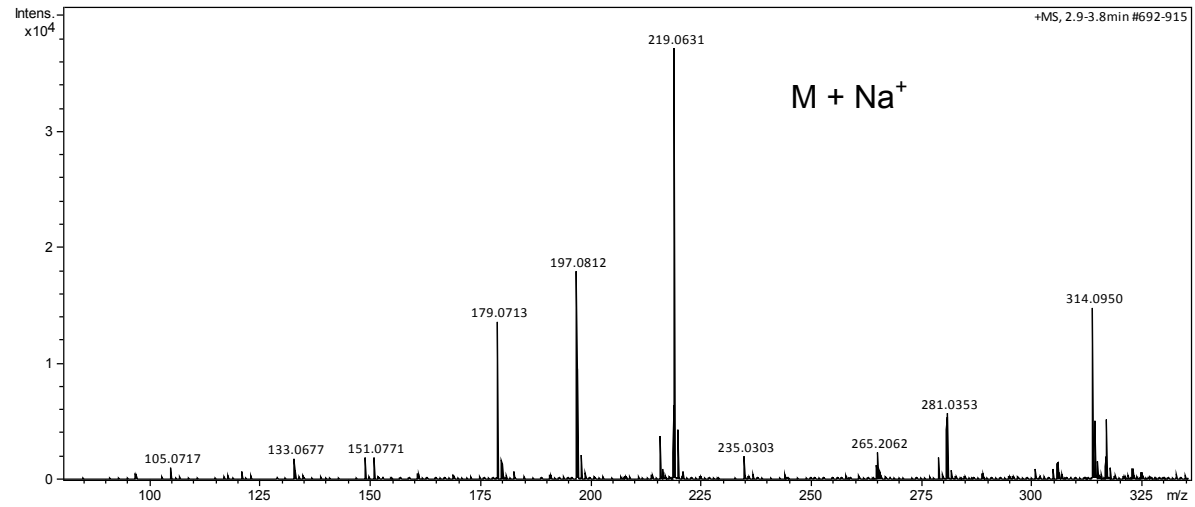


Figura A61: Espectro de massas de alta resolução do composto **16**

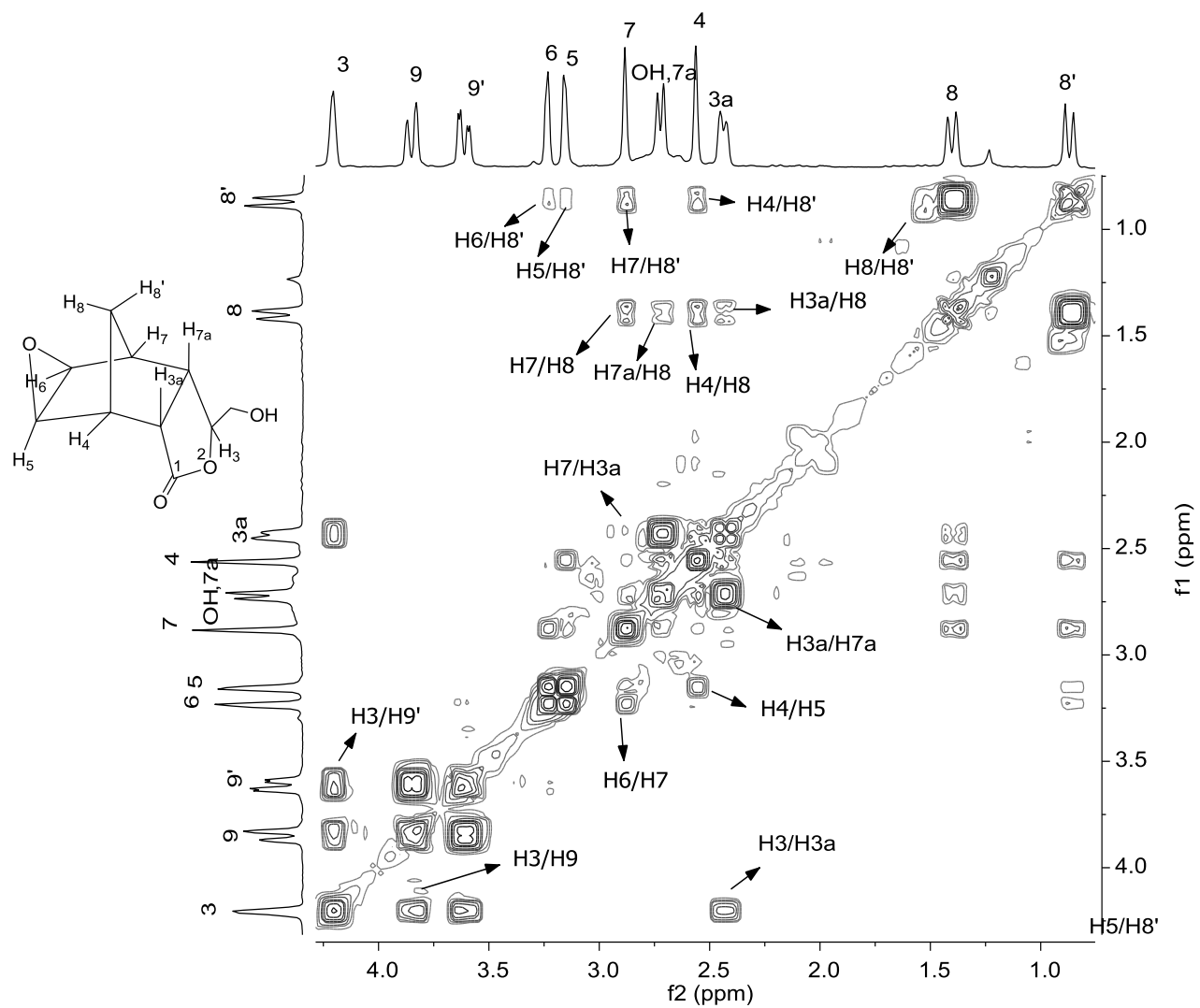


Figura A62: Mapa de contorno COSY do composto 16.

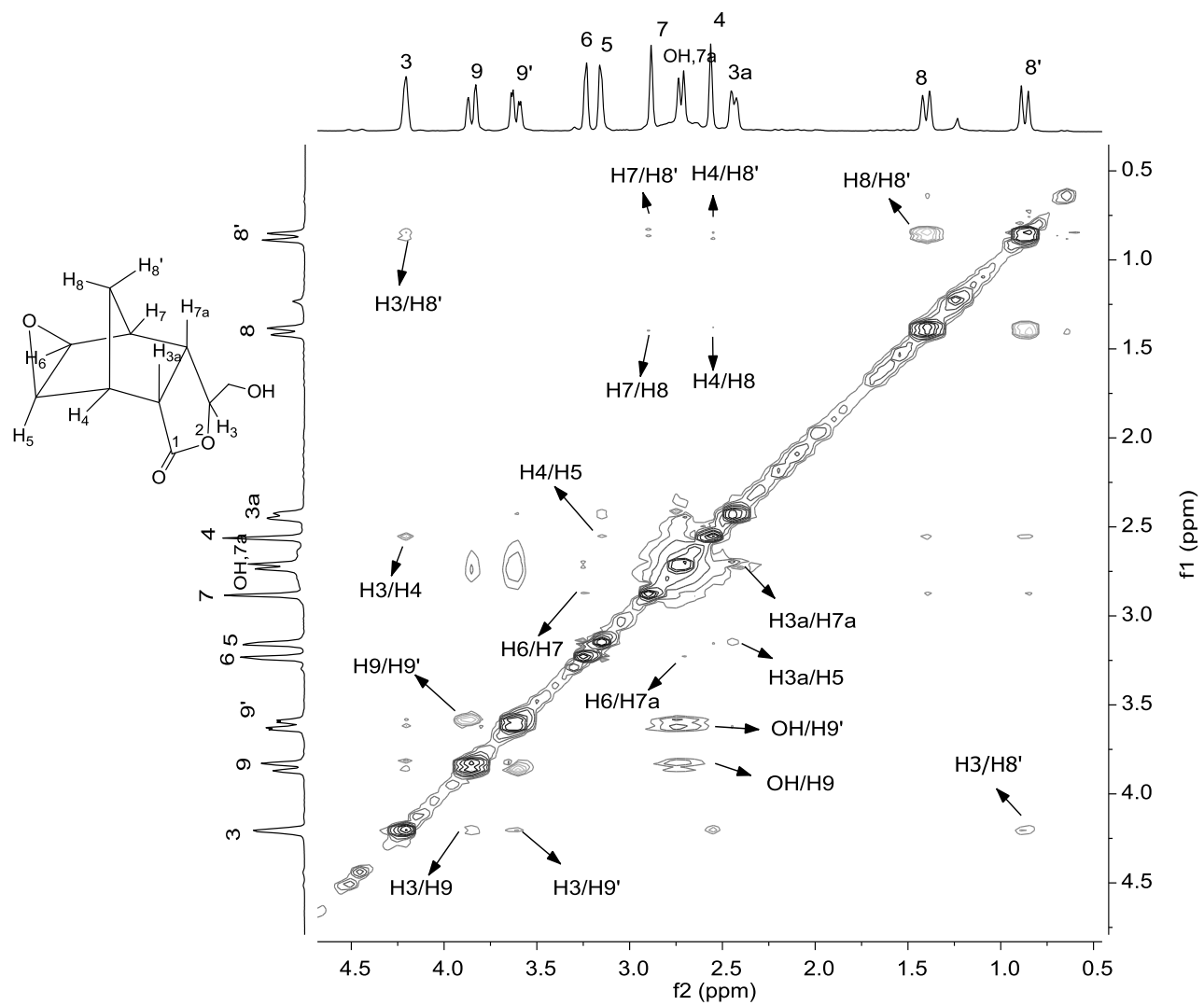


Figura A63: Mapa de contorno NOESY do composto 16.

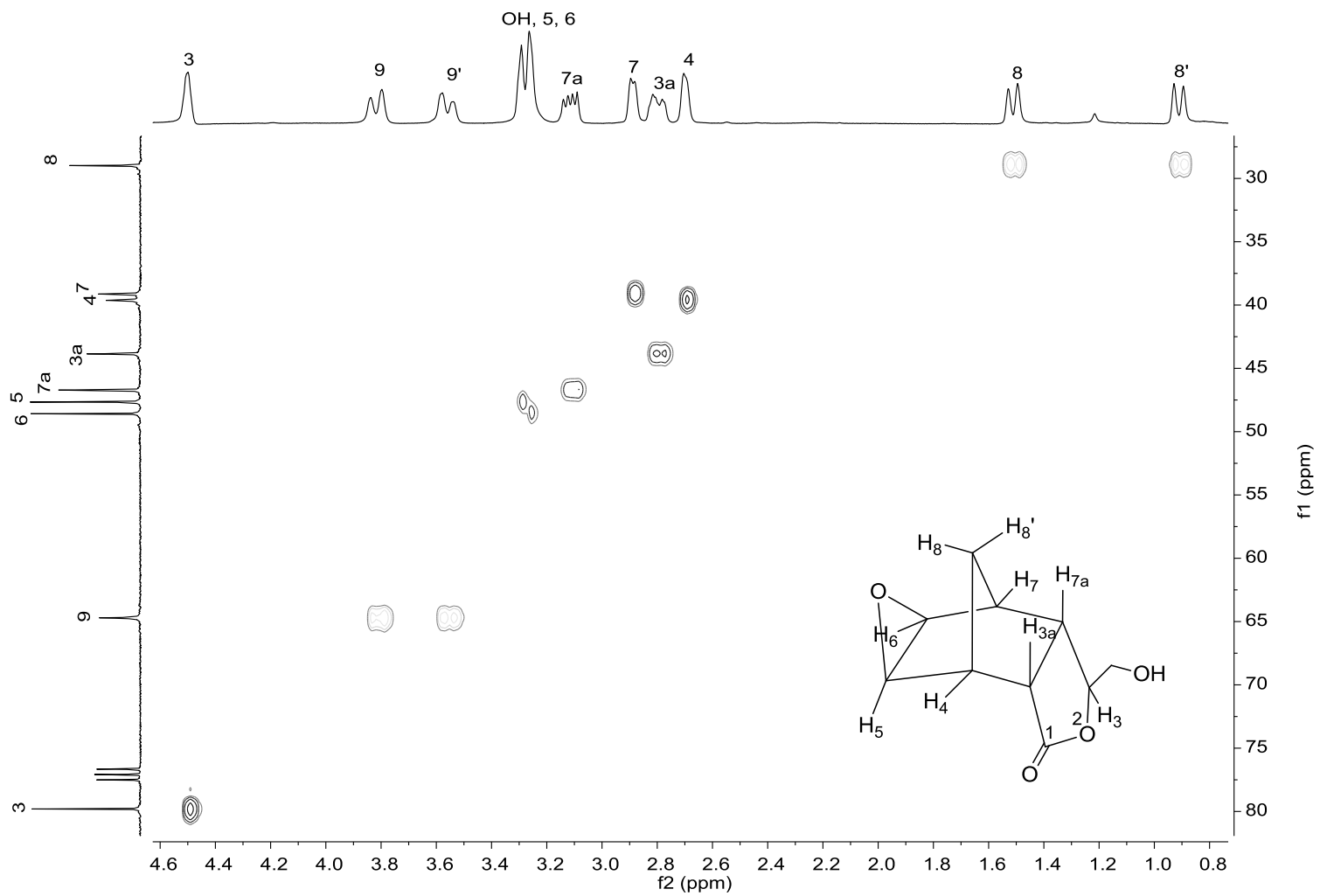


Figura A64: Mapa de contorno *HSQC* do composto **16**.

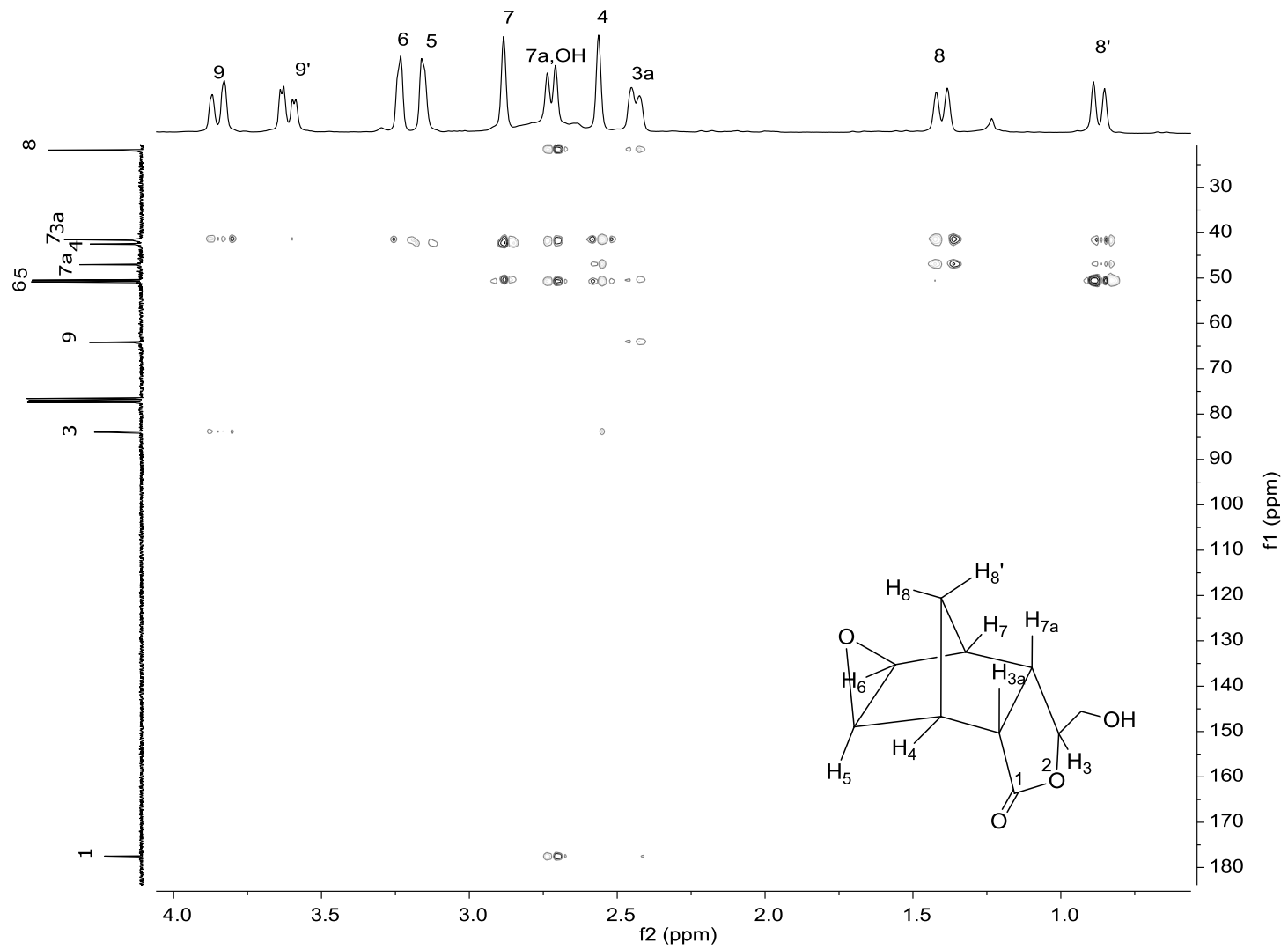


Figura A65: Mapa de contorno *HMBC* do composto **16**.

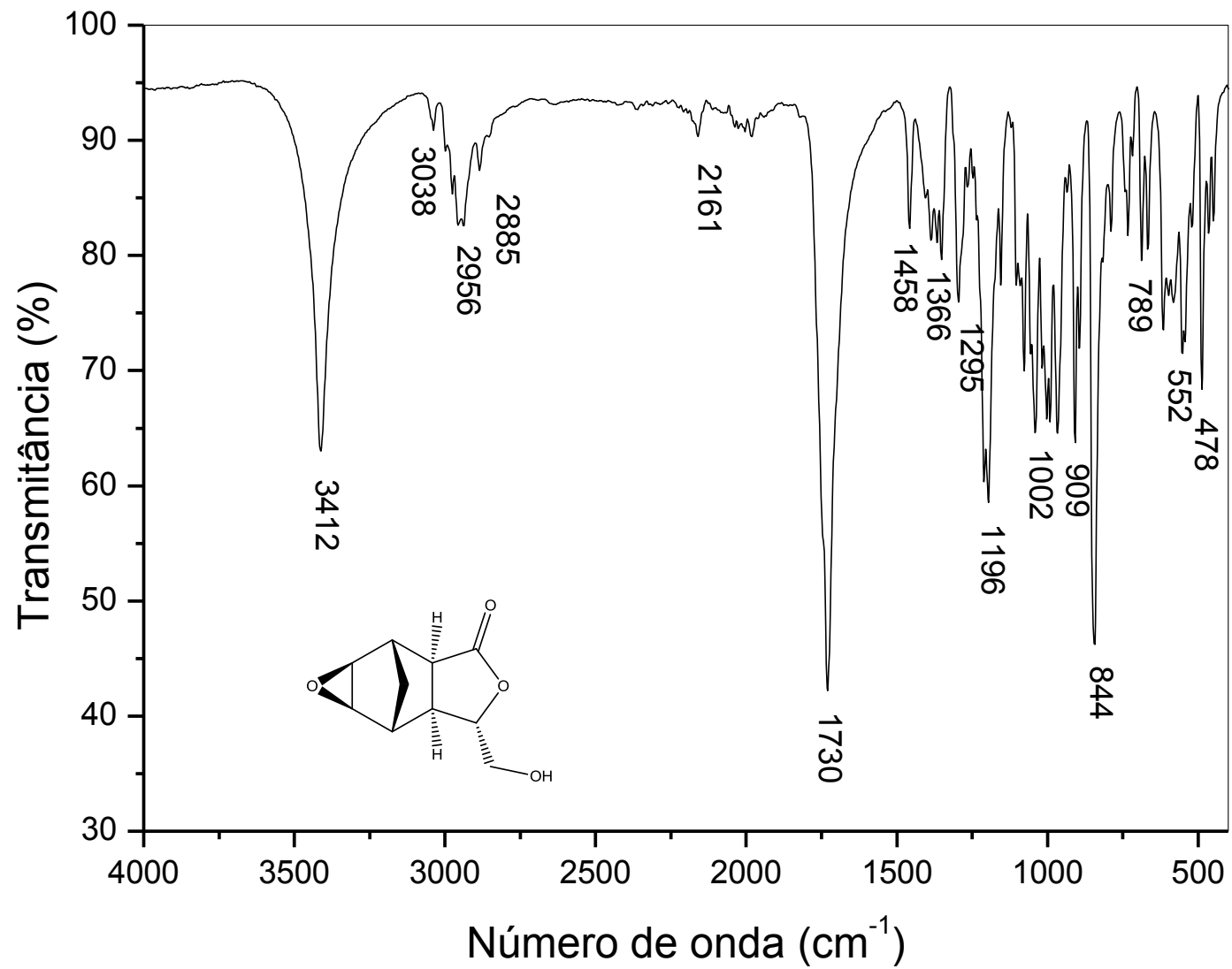


Figura A66: Espectro no Infravermelho do composto 17.

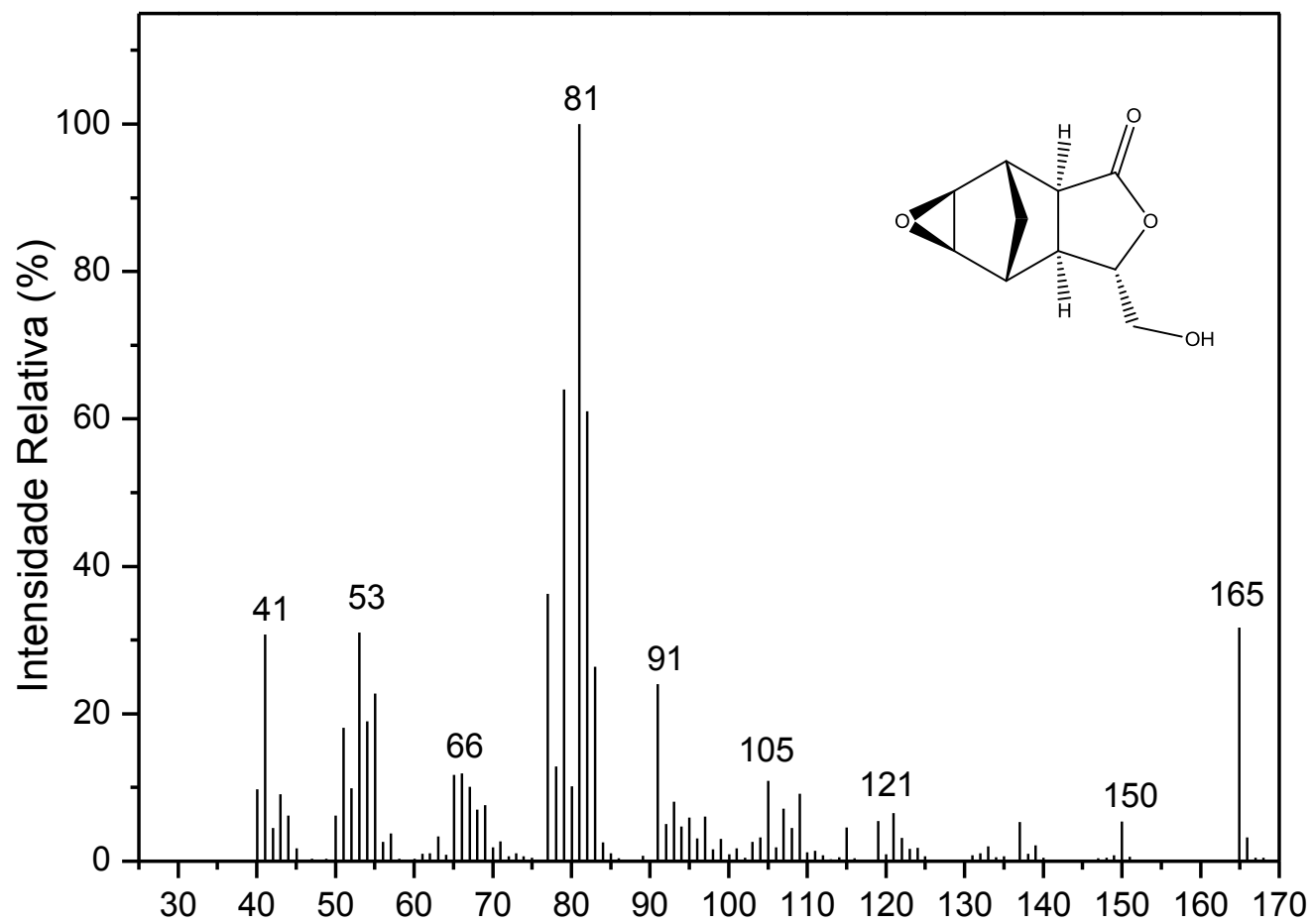


Figura A67: Espectro de massas do composto **17**.

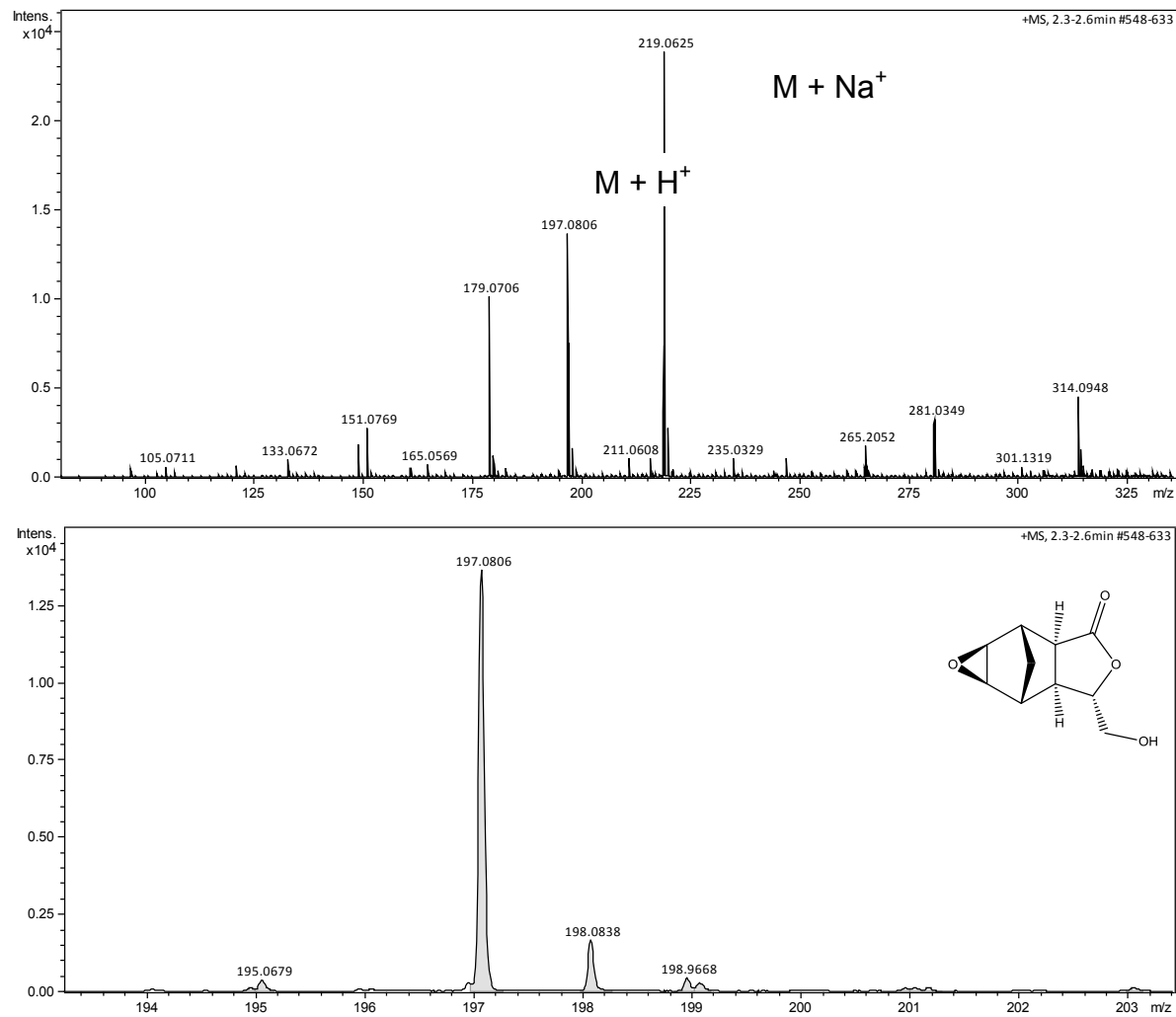


Figura A68: Espectro de massas de alta resolução do composto **17**.

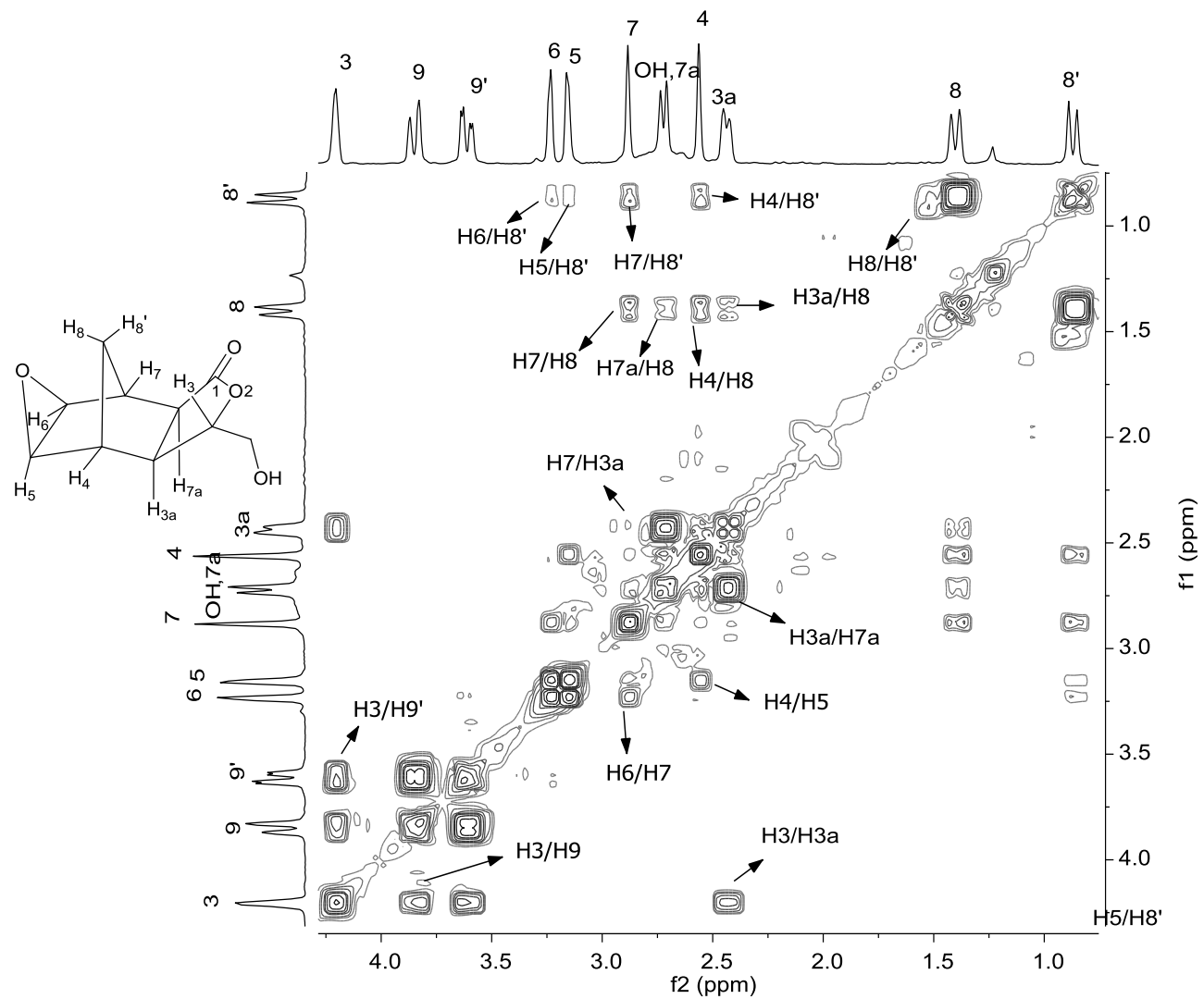


Figura A69: Mapa de contorno COSY do composto 17.

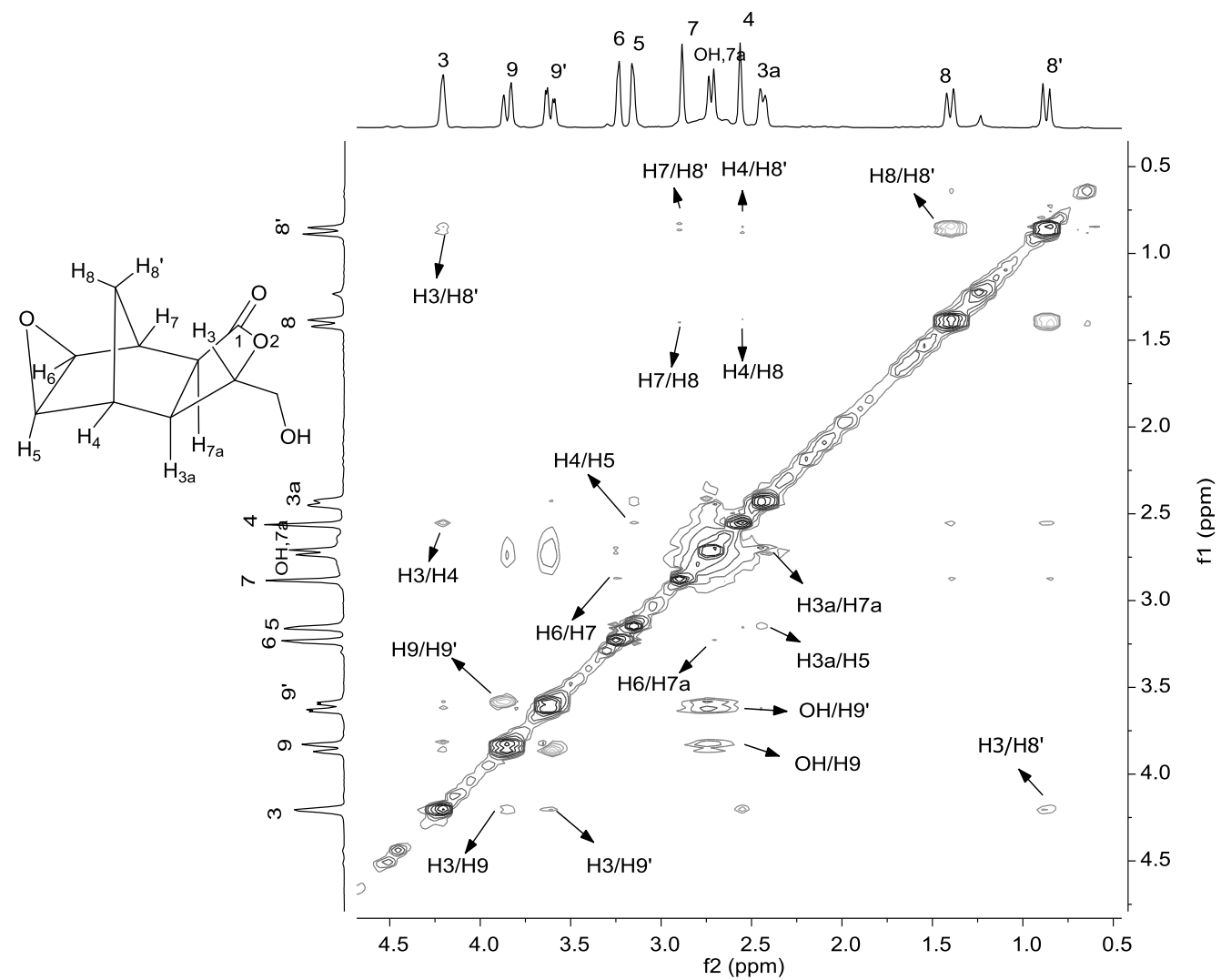


Figura A70: Mapa de contorno NOESY do composto 17.

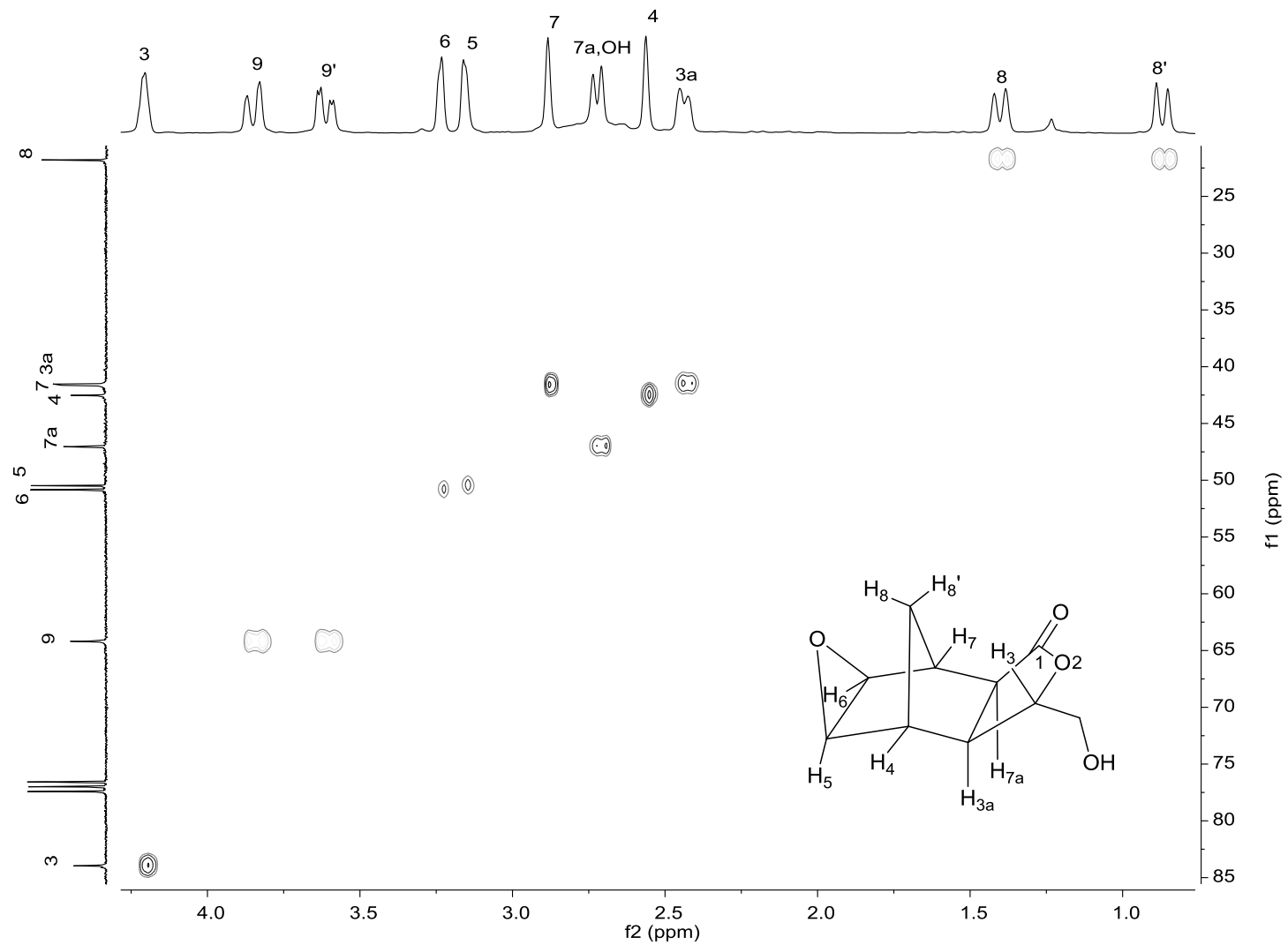


Figura A71: Mapa de contorno *HSQC* do composto 17.

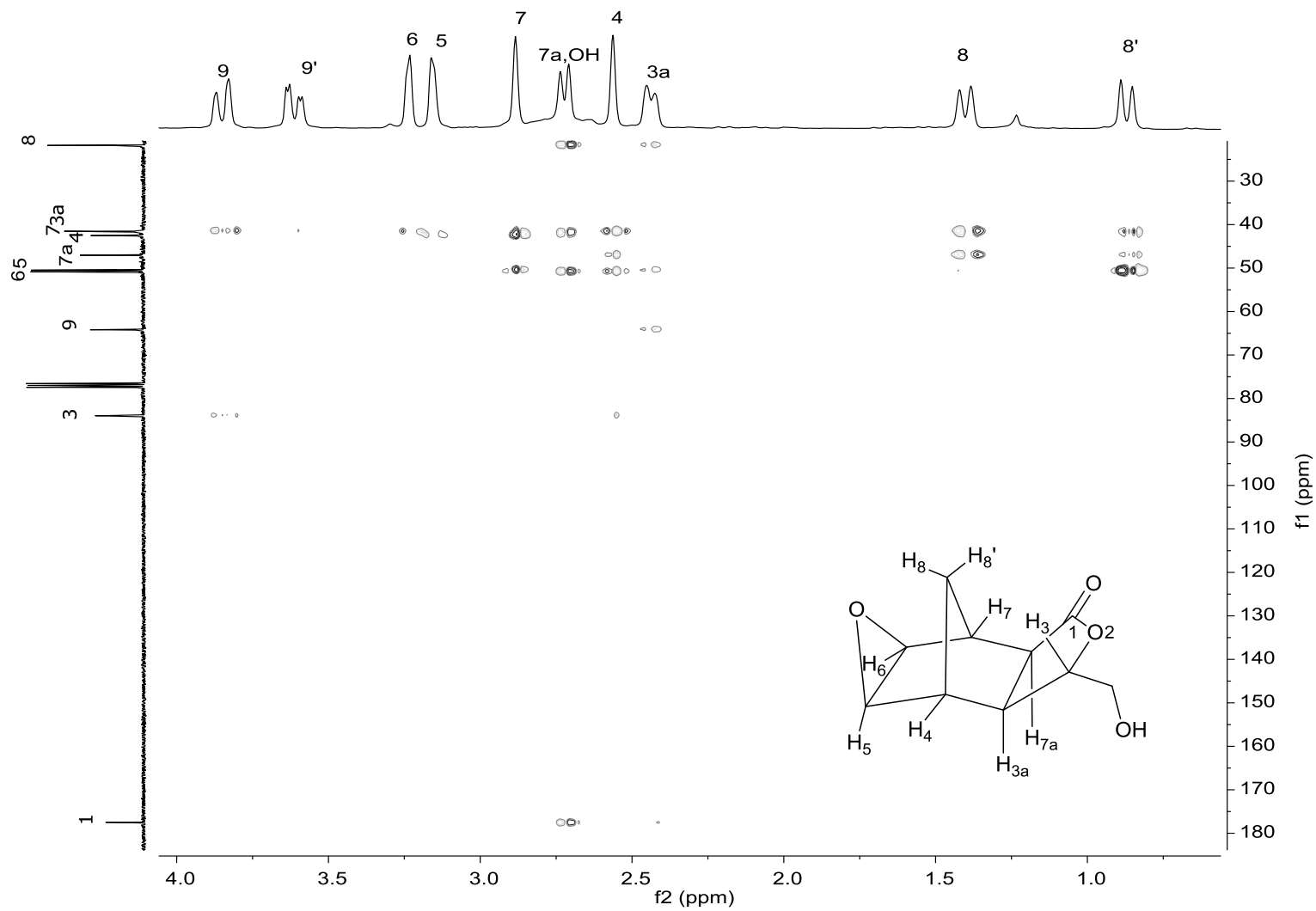


Figura A72: Mapa de contorno *HMBC* do composto 17.

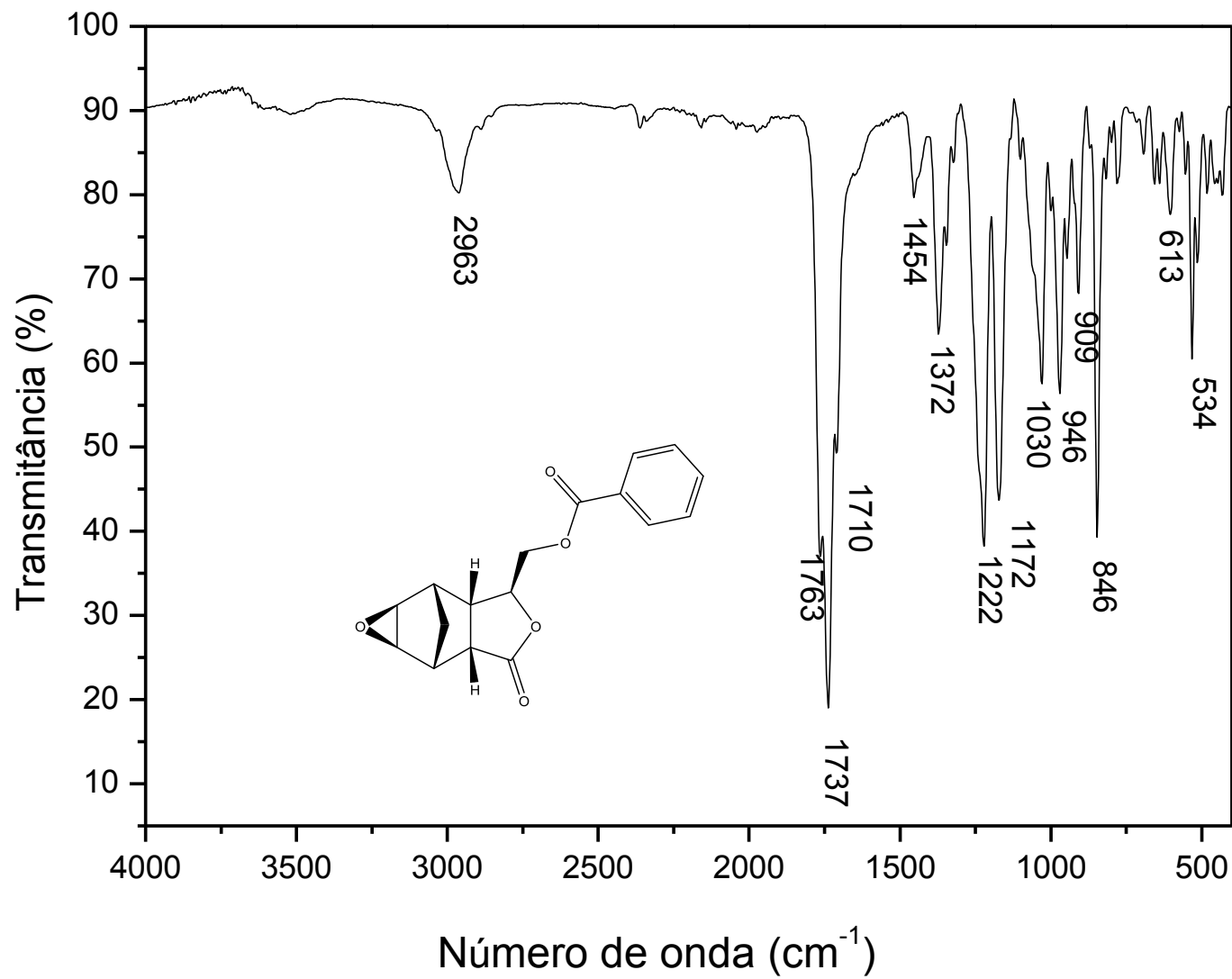


Figura A73: Espectro no Infravermelho do composto 19.

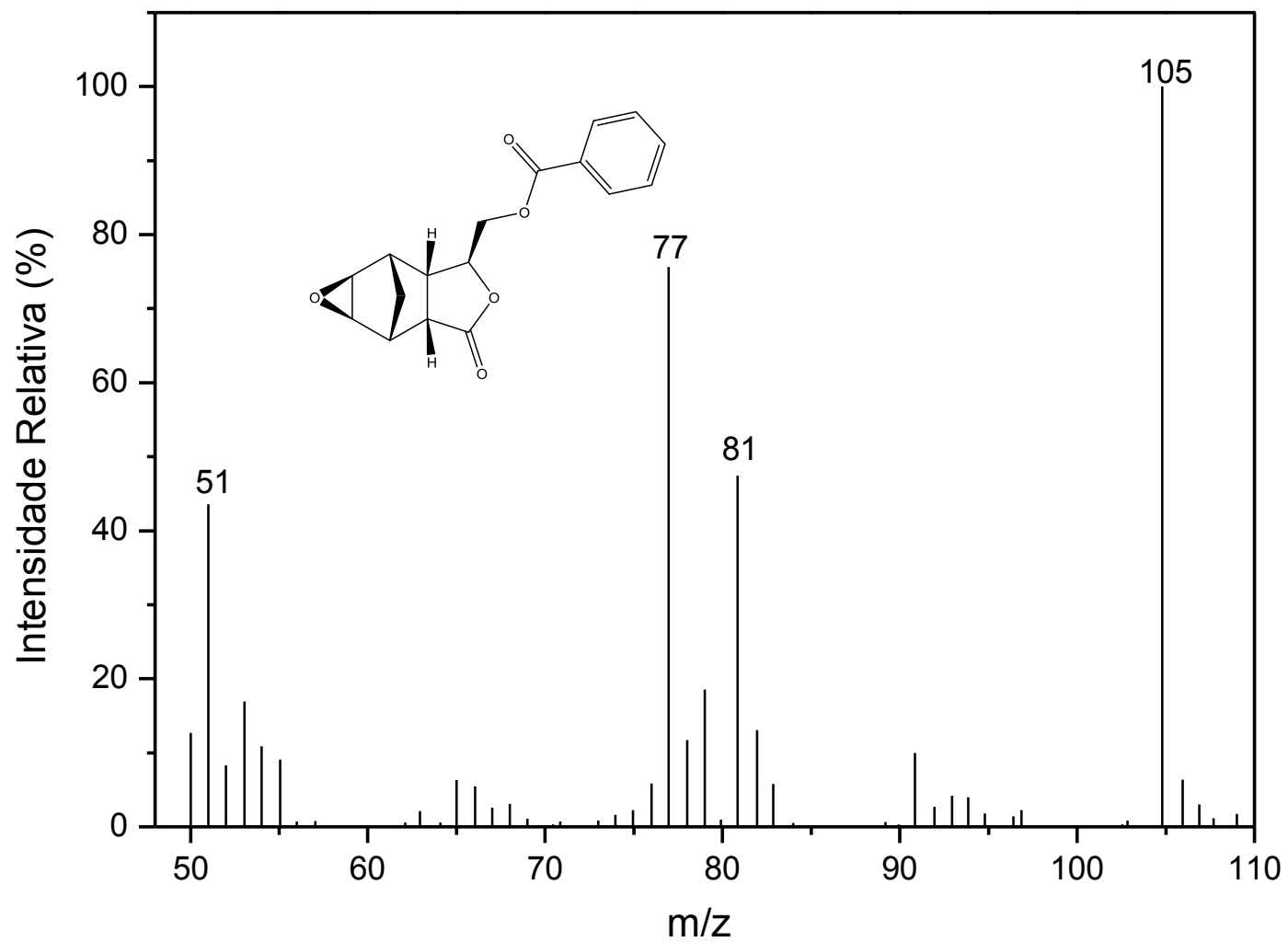


Figura A74: Espectro de massas do composto **19**.

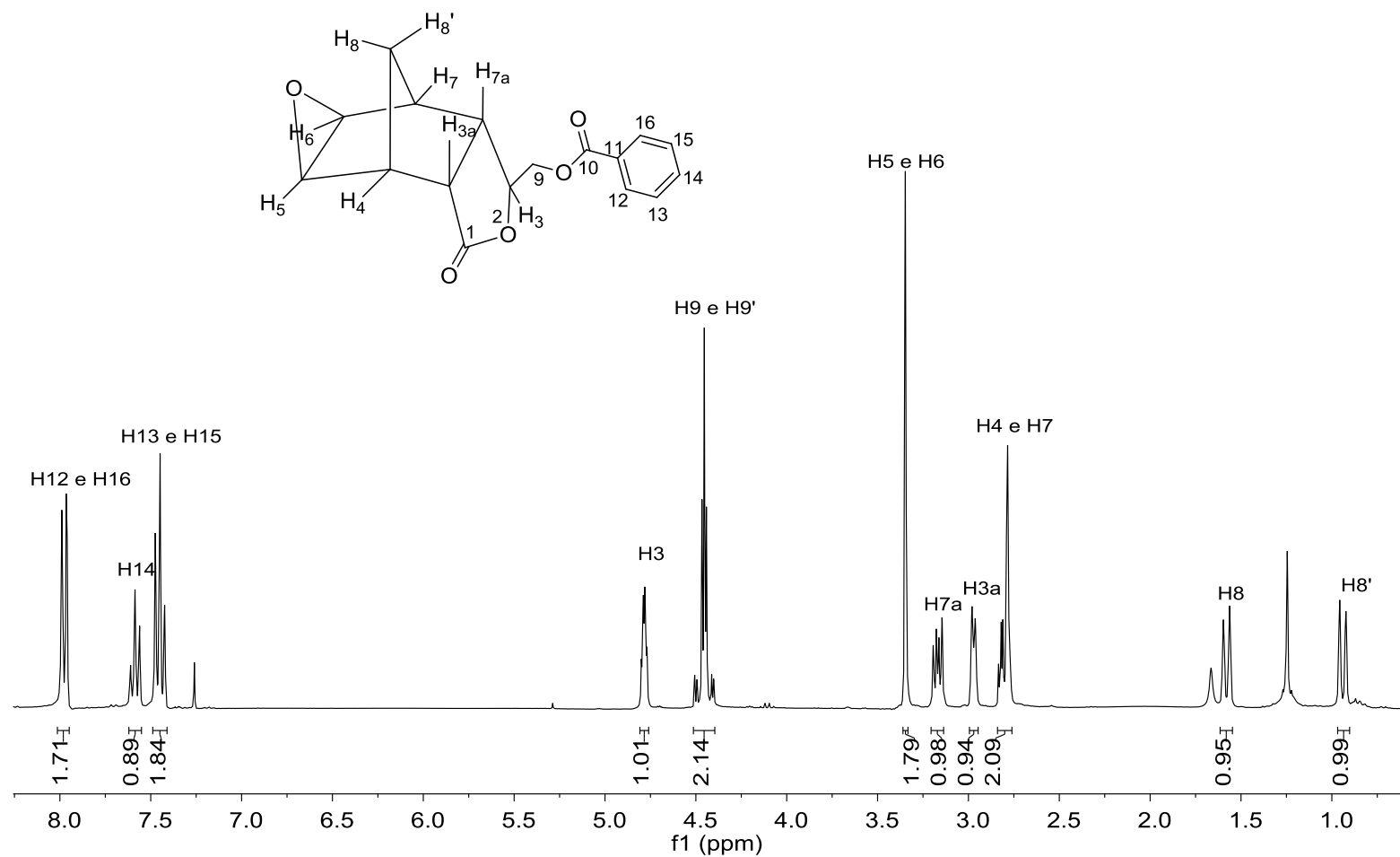


Figura A75: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **19**.

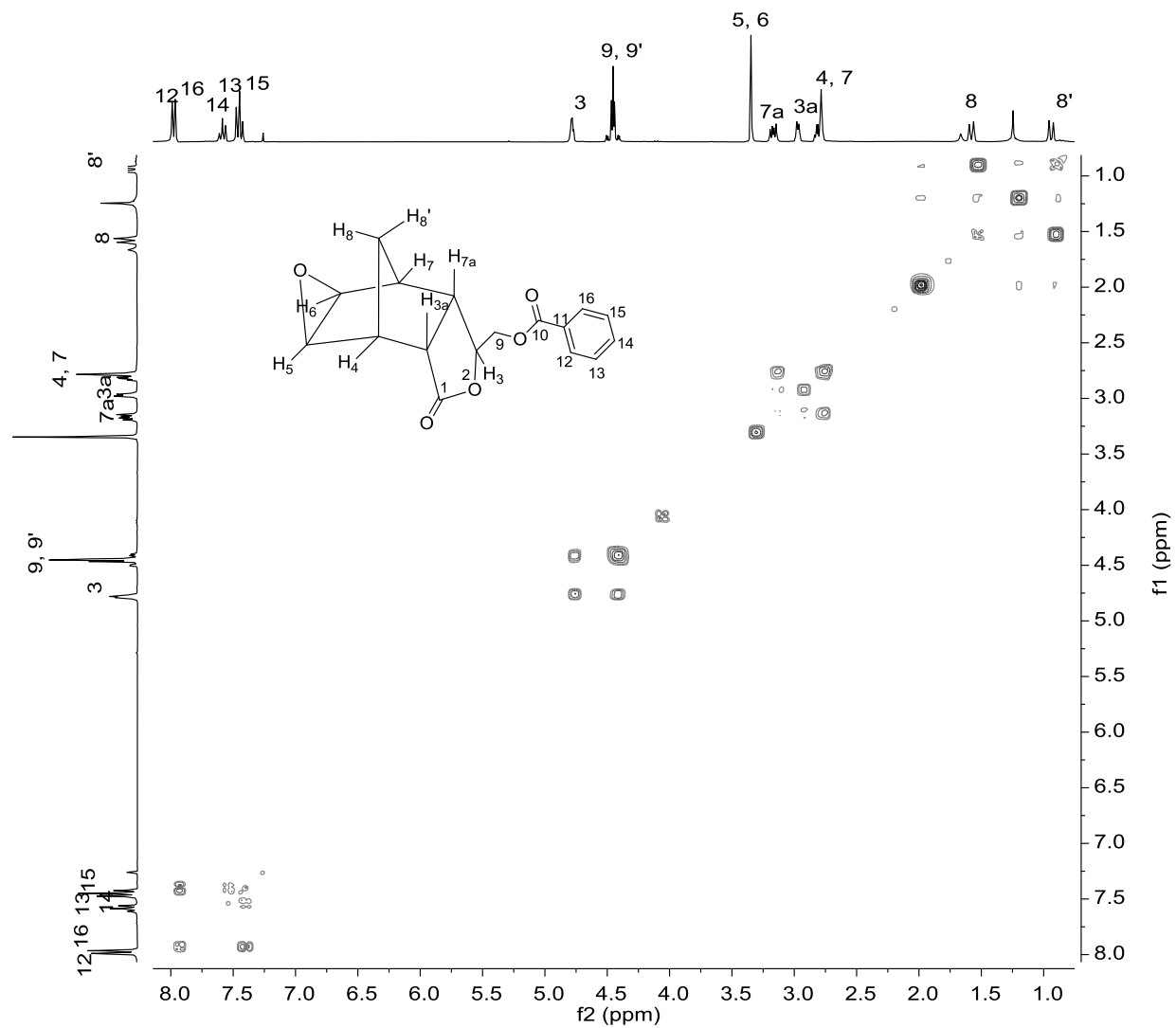


Figura A76: Mapa de contorno COSY do composto 19.

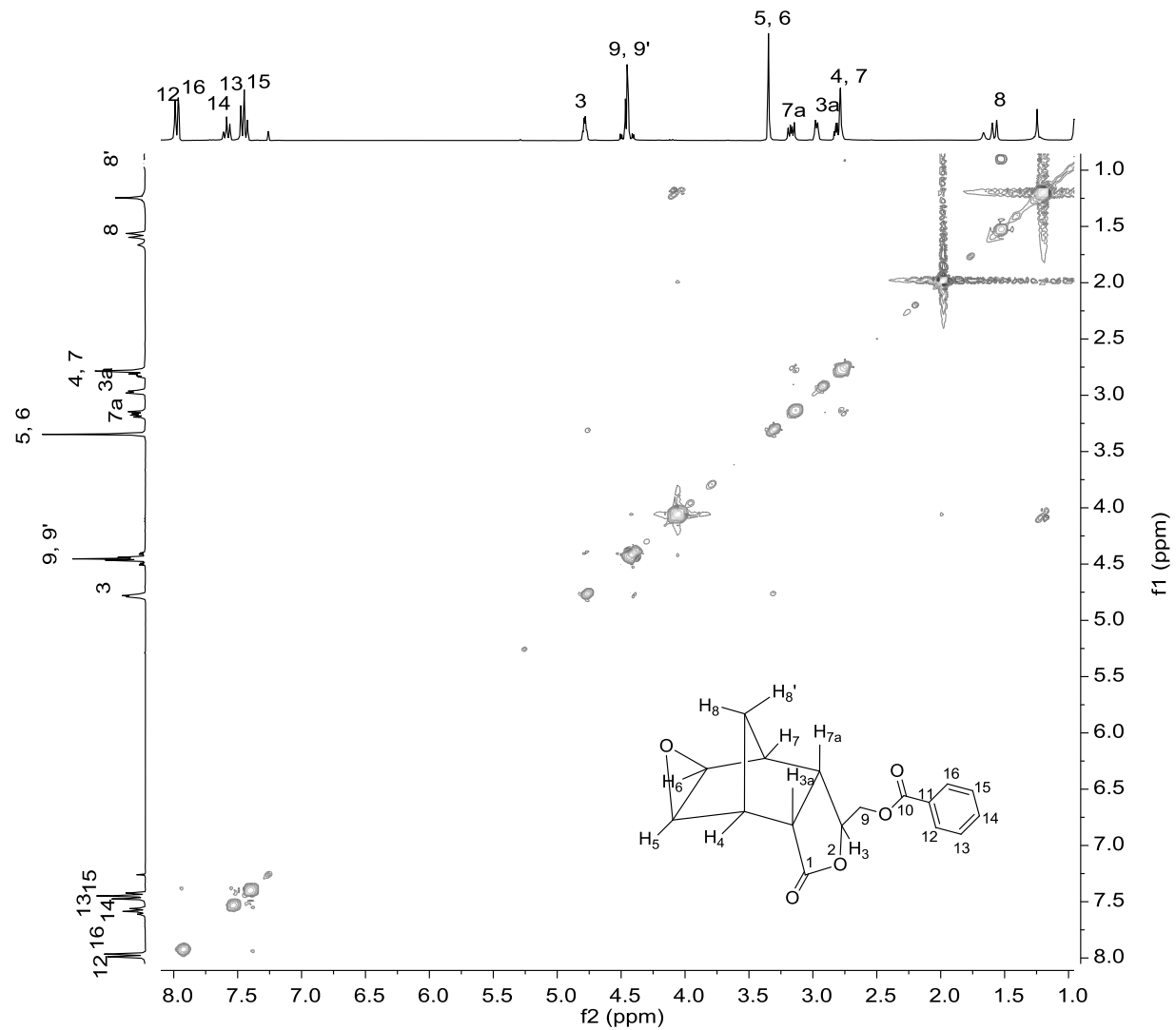


Figura A77: Mapa de contorno NOESY do composto 19.

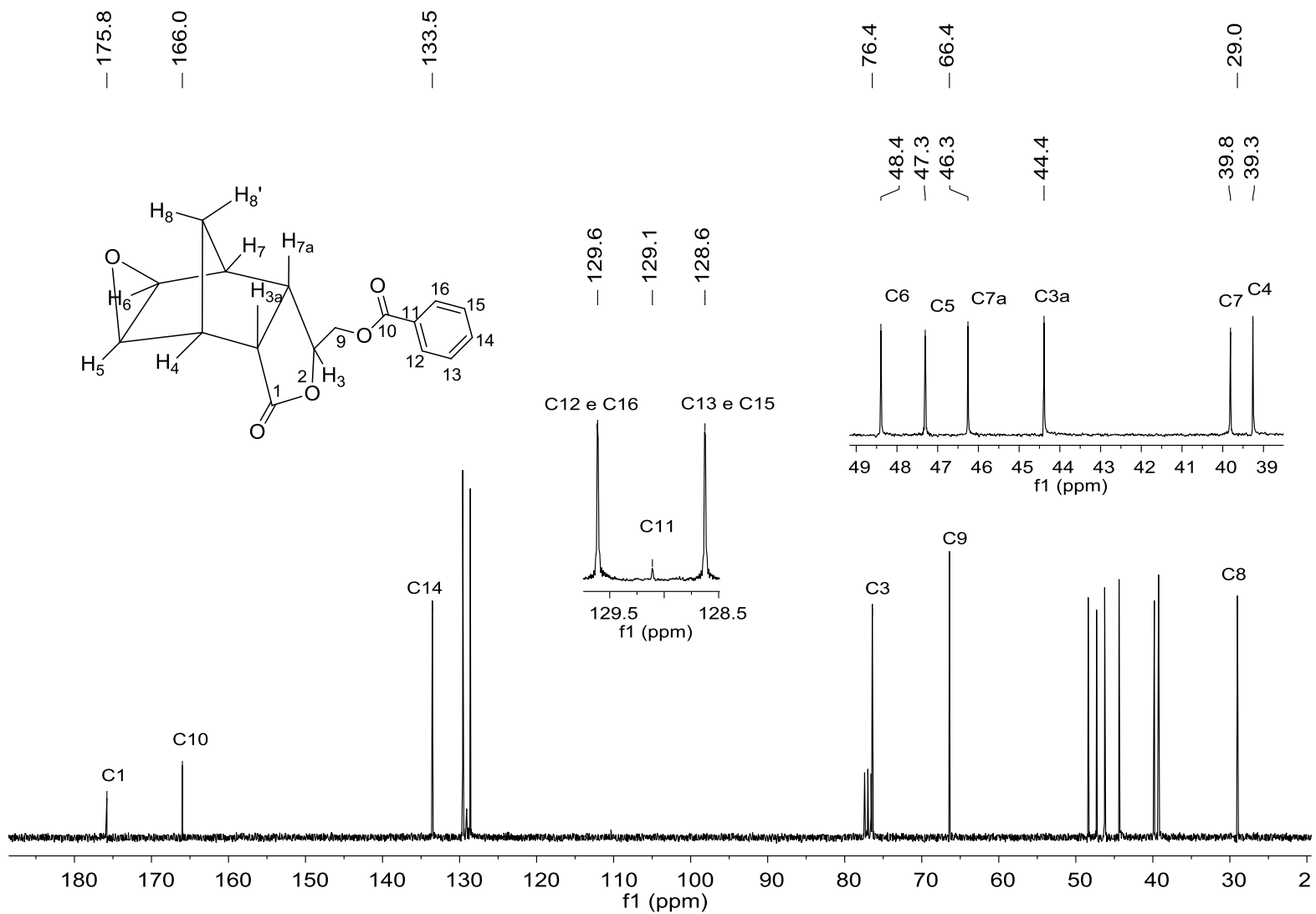


Figura A78: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 19.

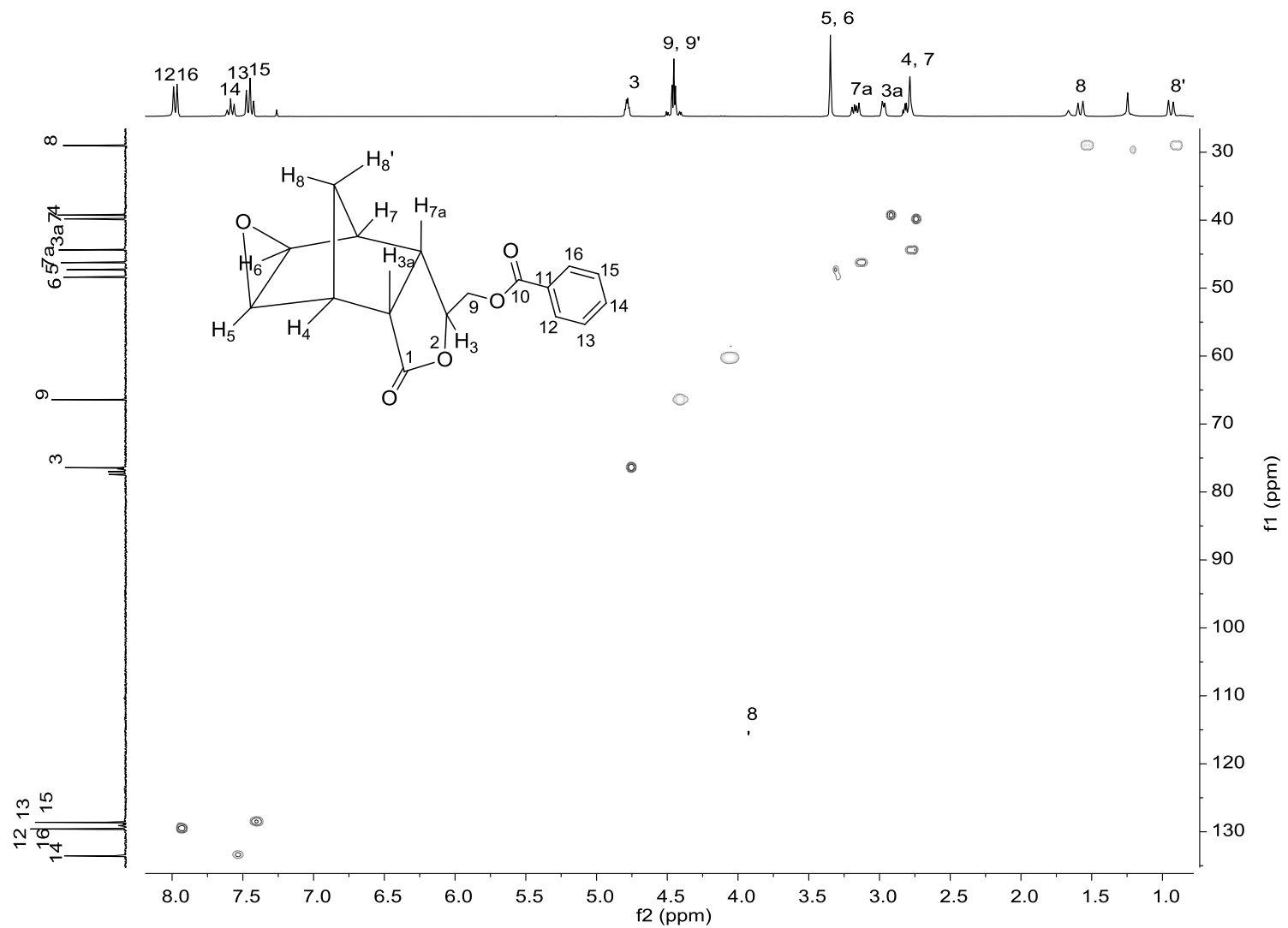


Figura A79: Mapa de contorno *HSQC* do composto **19**.

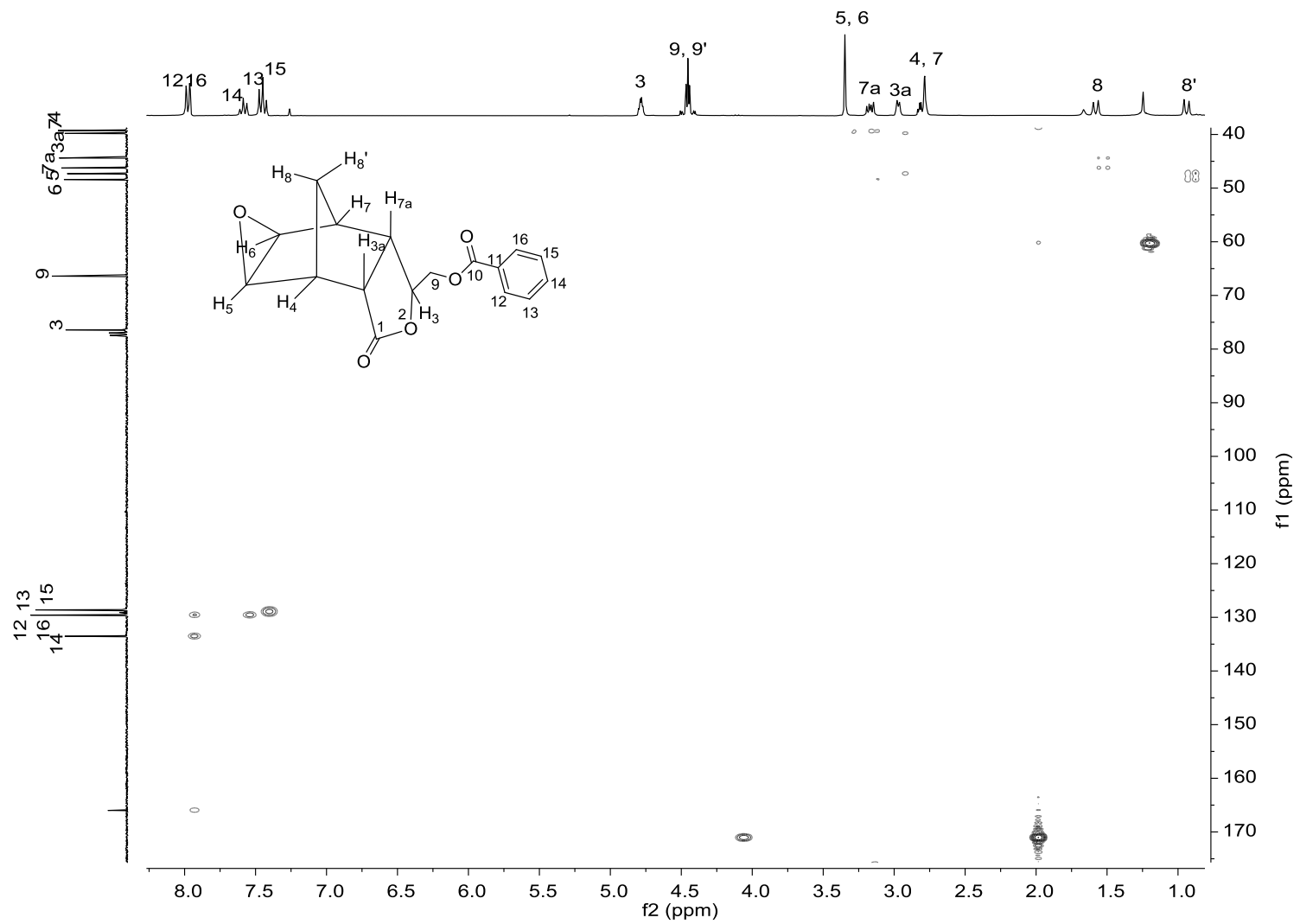


Figura A80: Mapa de contorno *HMBC* do composto 19.

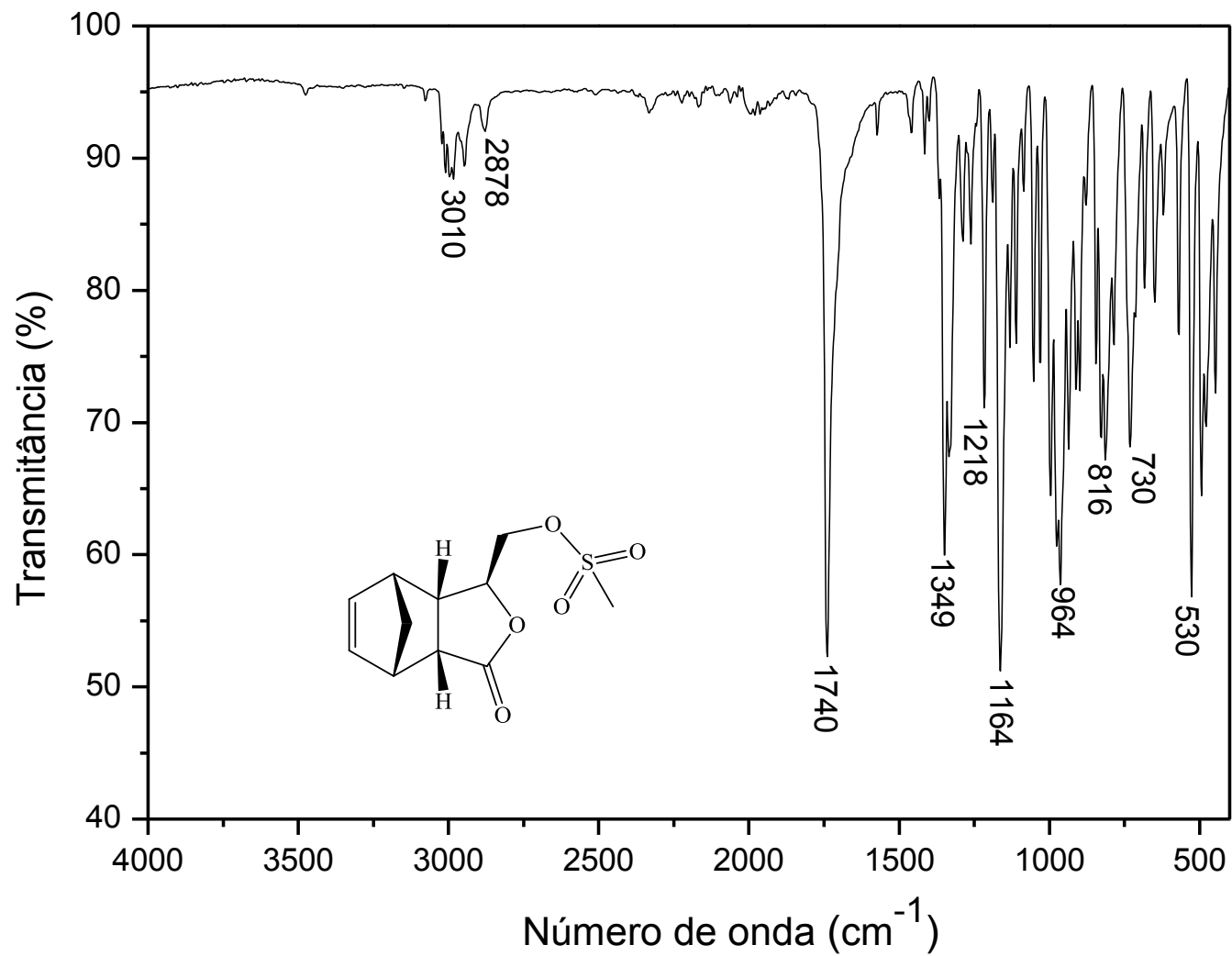


Figura A81: Espectro no Infravermelho do composto 20.

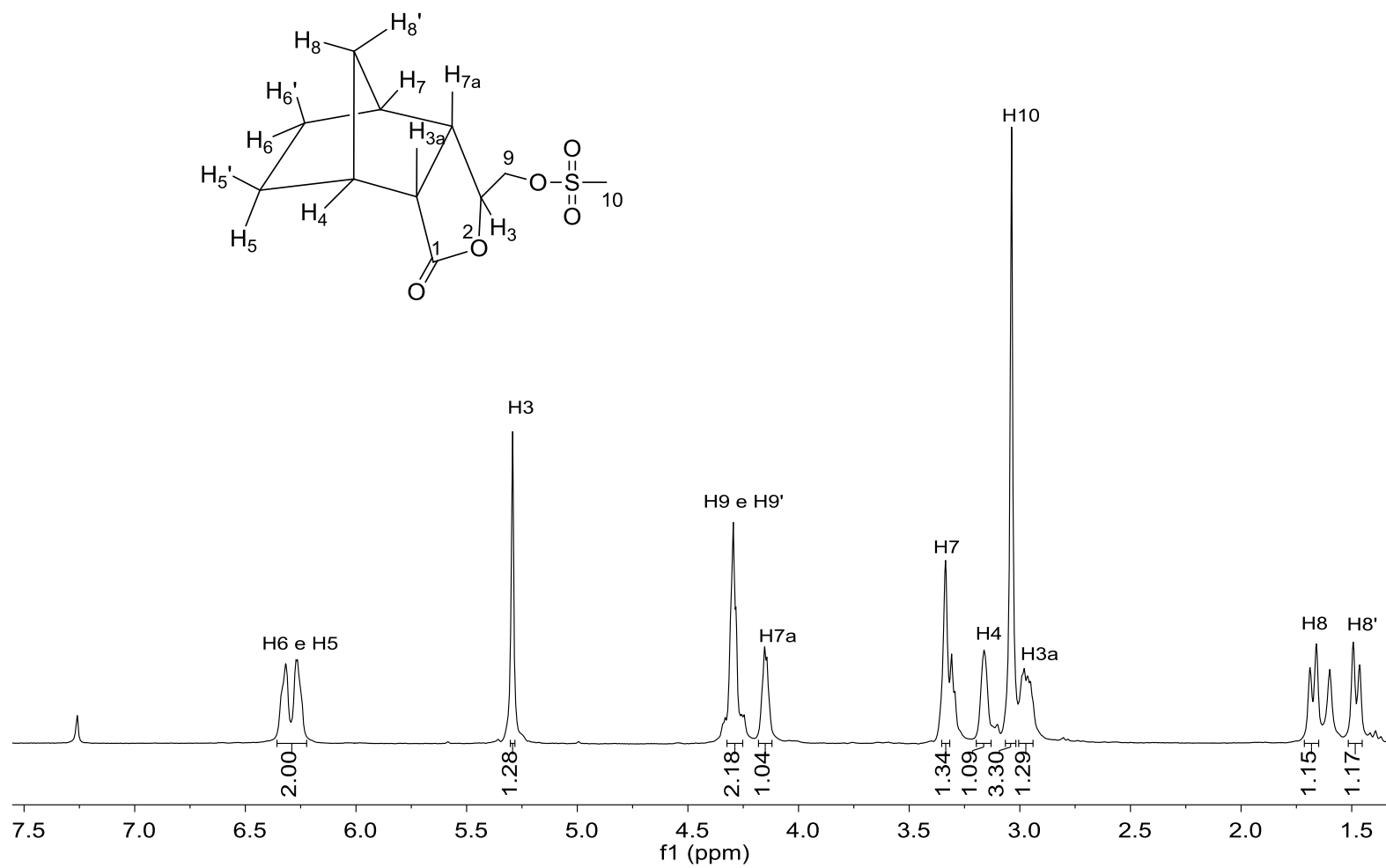


Figura A82: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 20.

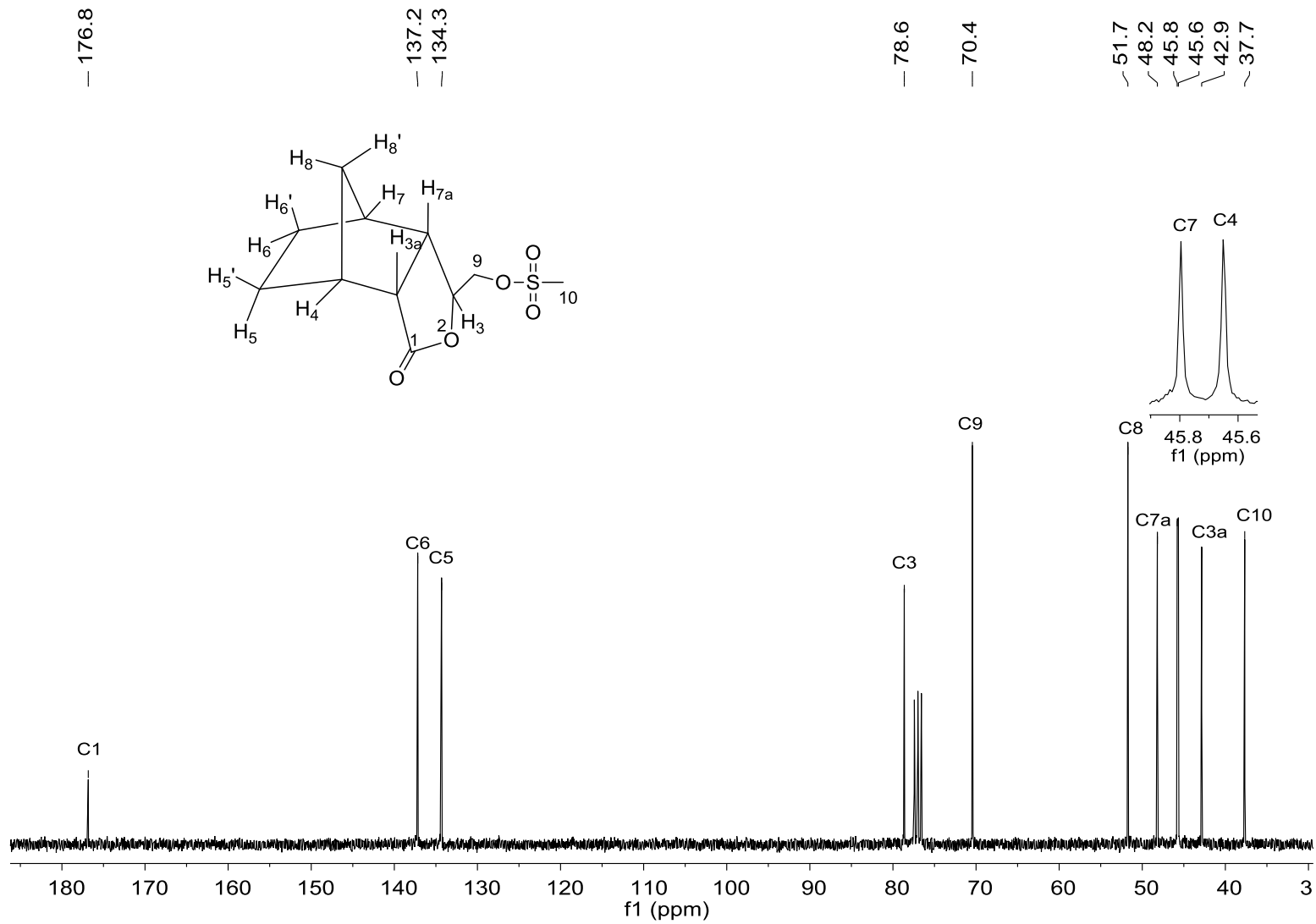


Figura A83: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 20.

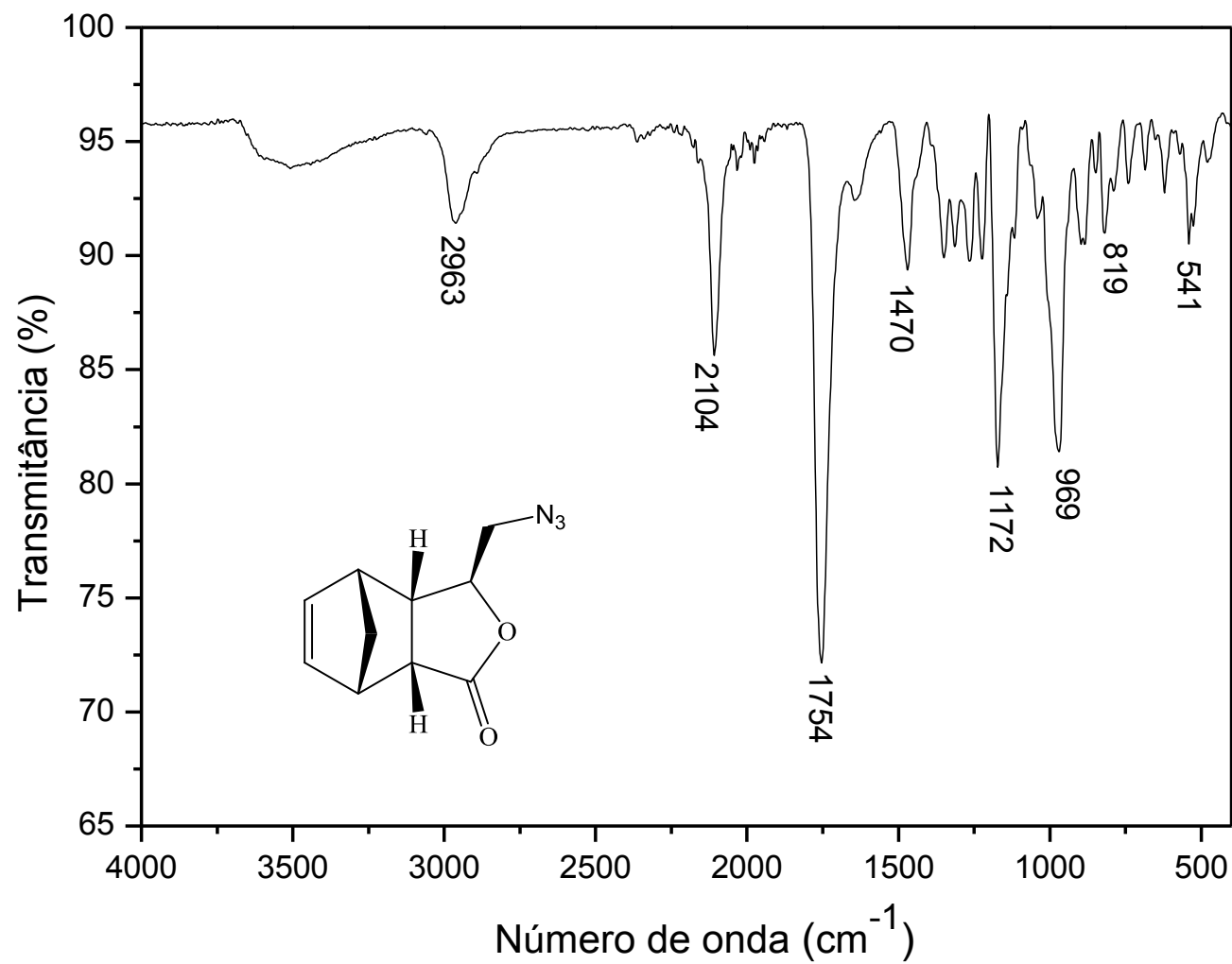


Figura A84: Espectro no Infravermelho do composto **21**.

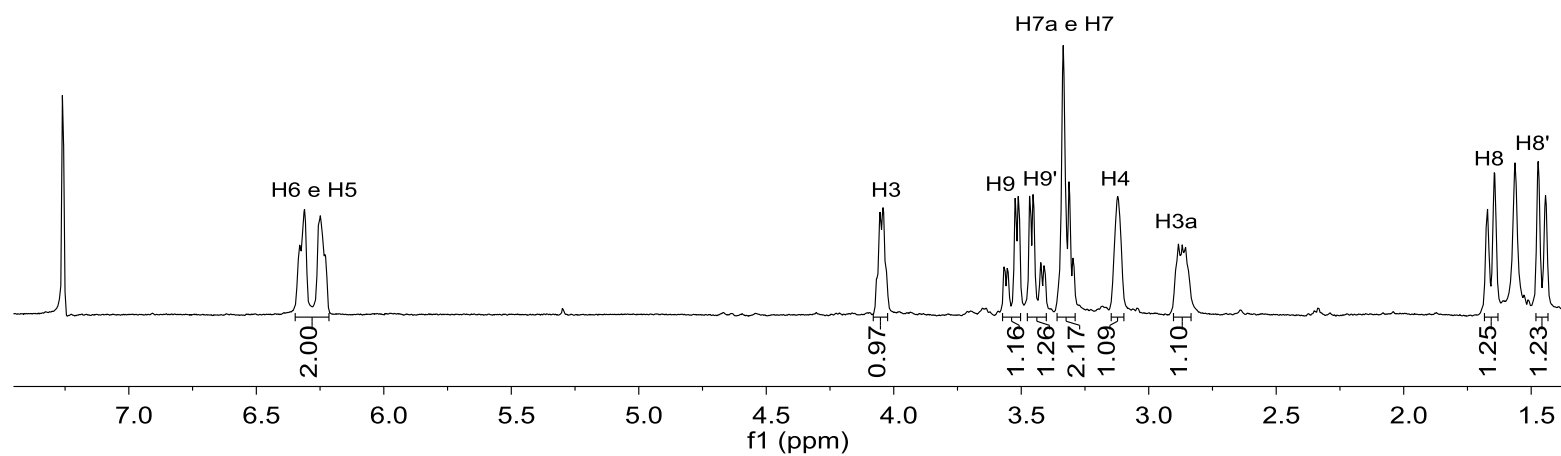
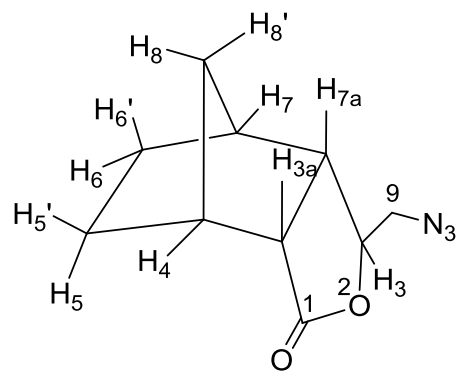


Figura A85: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **21**.

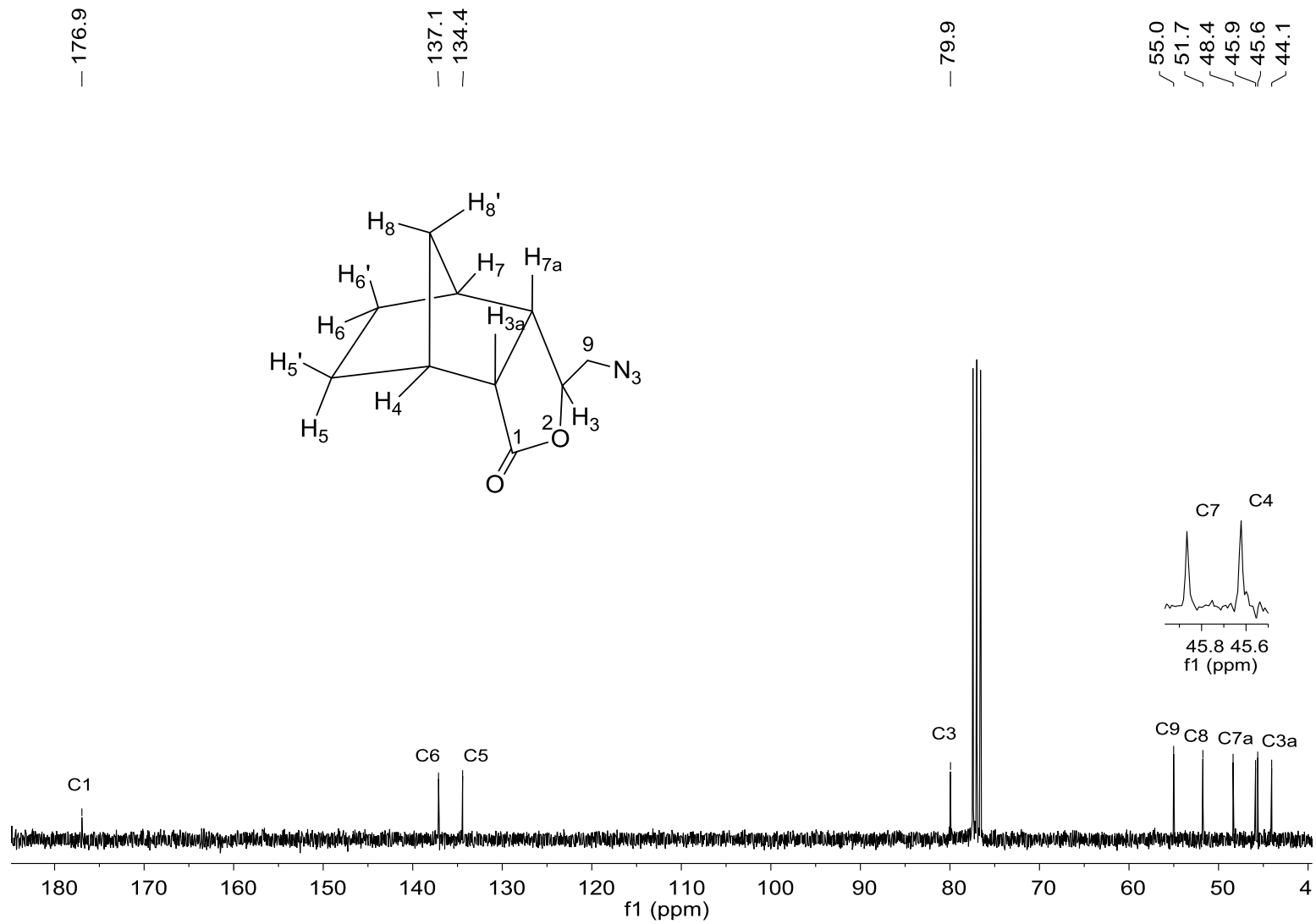


Figura A86: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **21**.

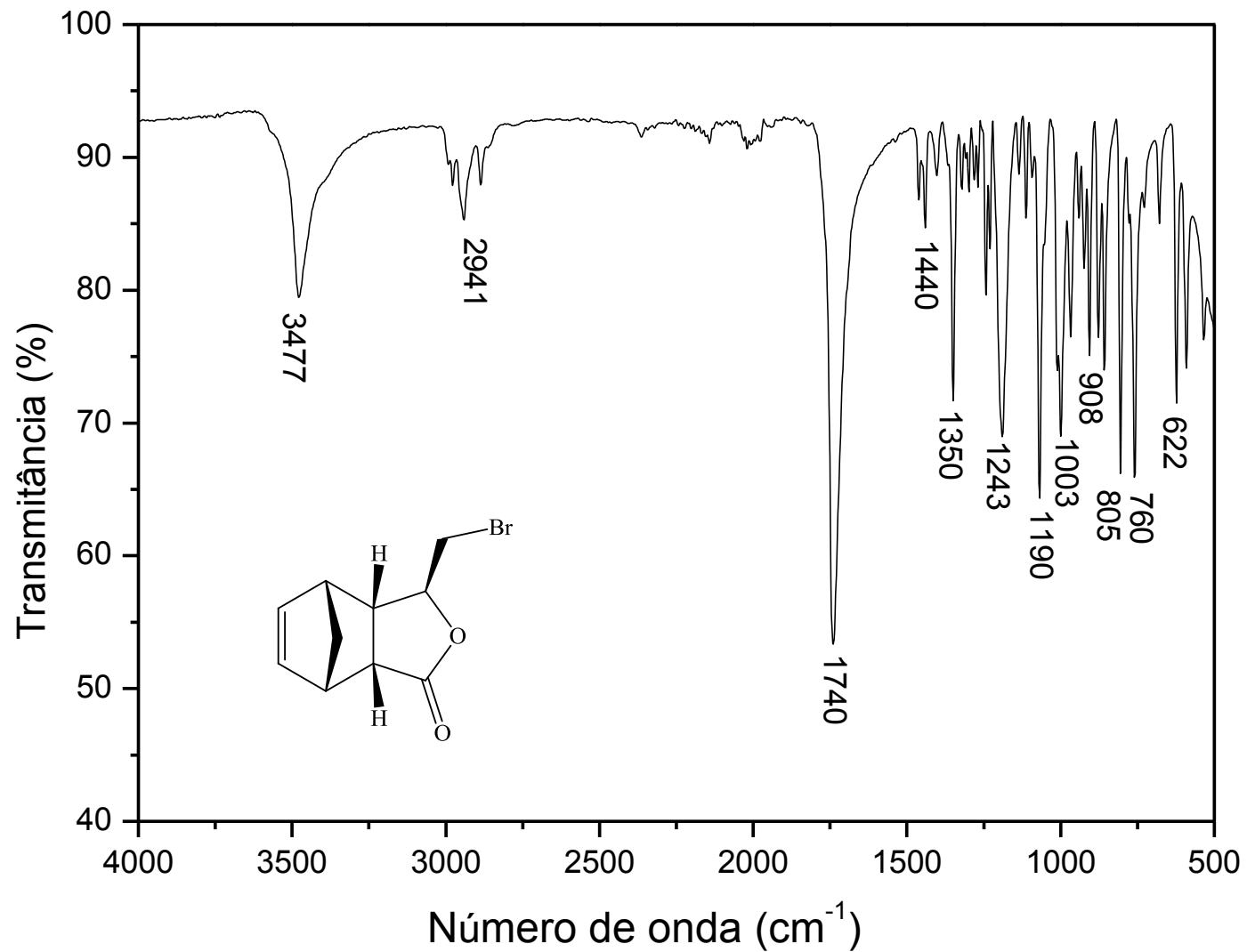


Figura A87: Espectro no Infravermelho do composto 22.

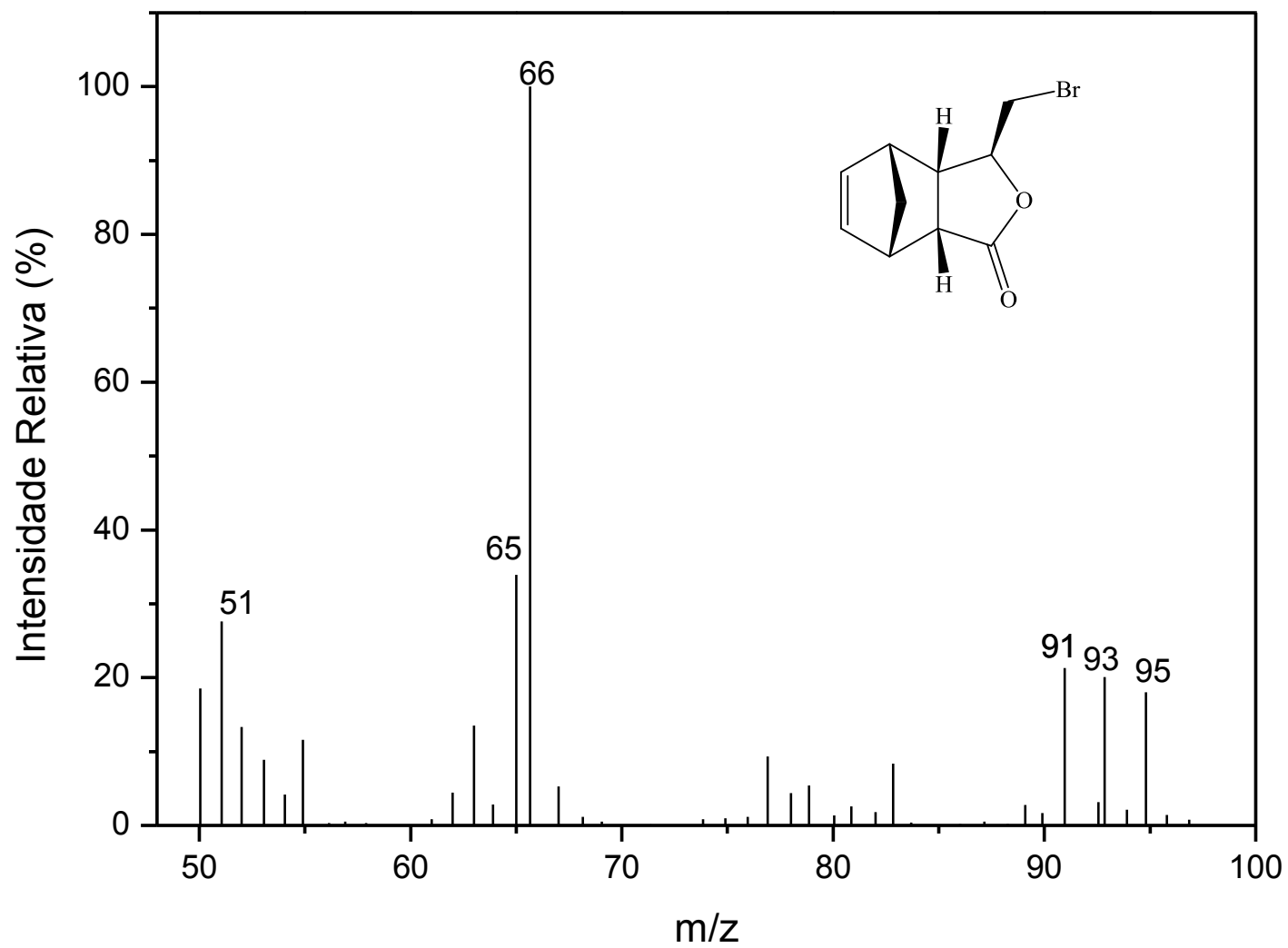


Figura A88: Espectro de massas do composto **22**.

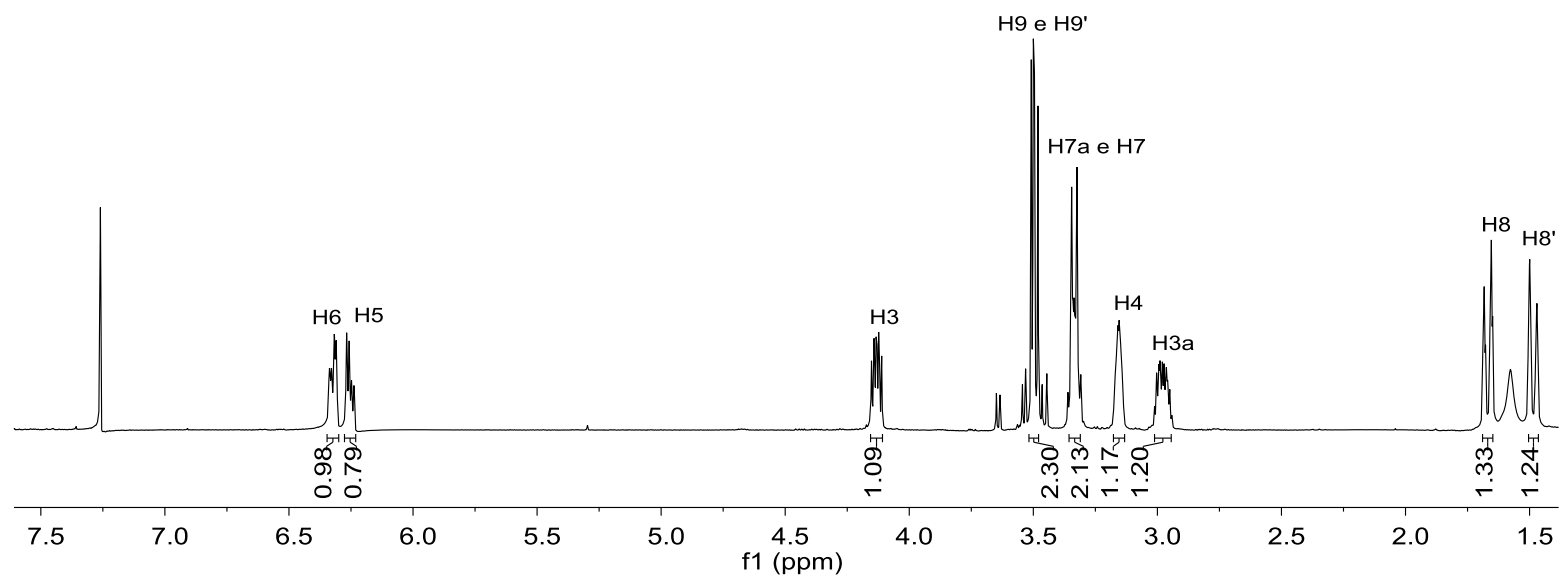
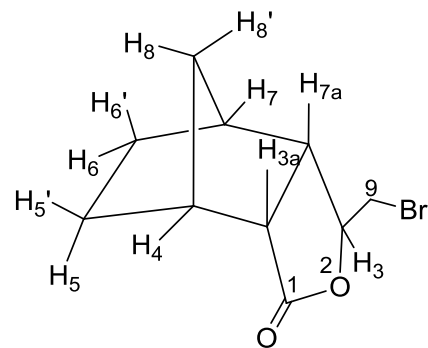


Figura A89: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **22**.

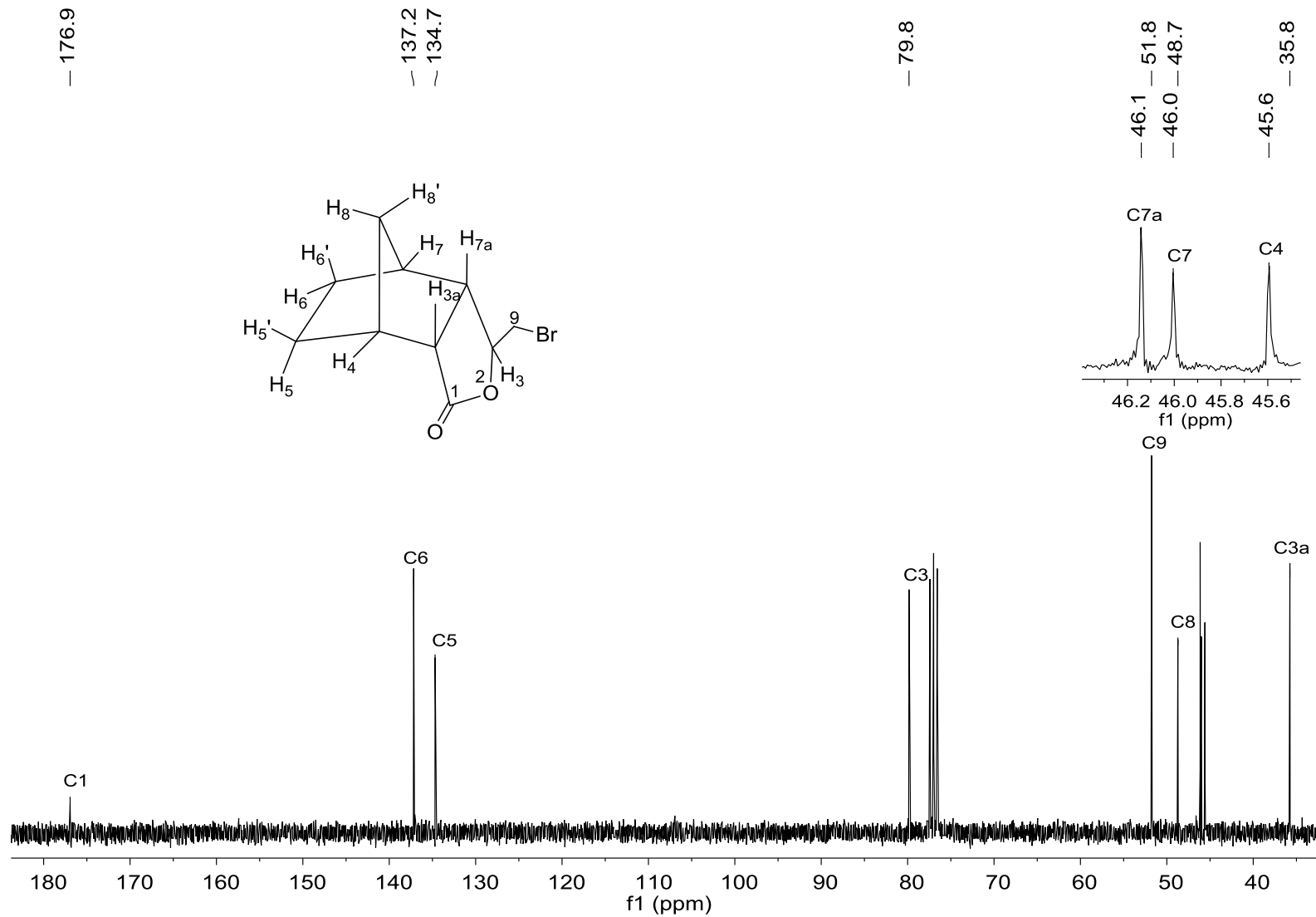


Figura A90: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 22.

CAPÍTULO 2

ATRIBUIÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA RELATIVA E ABSOLUTA DE DOIS NOVOS EPÓXIDOS UTILIZANDO CÁLCULOS DE RMN E DFT-GIAO

Publicado como artigo original

(Journal of Molecular Structure, v. 1164, p. 109-115, 2018)

DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.03.050

2.1. INTRODUÇÃO

As lactonas são um dos compostos mais populares da natureza e apresentam variadas atividades biológicas (CHEN *et al.*, 2014; RESENDE *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2013). Lactonas funcionalizadas são intermediários úteis e diversos métodos sintéticos são desenvolvidos para a síntese dessas moléculas (PEHLIVAN *et al.*, 2011).

Uma das ferramentas mais utilizadas para elucidação estrutural de novos compostos é a espectroscopia de RMN (TAGGI *et al.*, 2004). No entanto, mesmo com a utilização dessa técnica pode-se encontrar na literatura a determinação molecular errada ou incompleta de variados compostos (NICOLAOU e SNYDER, 2005). Em função disso, muitos pesquisadores usam cálculos de química quântica para simular deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H das substâncias (TÄHTINEN *et al.*, 2003; BIFULCO *et al.*, 2007). Esta técnica de caracterização iniciada pela Bifulco em 1987 (BARONE *et al.*, 2002) foi usada satisfatoriamente em muitos trabalhos (TAI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2012; TEIXEIRA e ALVARENGA, 2016; RESENDE e ALVARENGA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SMITH *et al.*, 2008; SMITH e GOODMAN, 2009; BROWN, 2012).

Em princípio, existem duas estratégias principais relativas ao uso de cálculos teóricos de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para elucidação estrutural. Em primeiro lugar, a exatidão de uma determinada estrutura candidata pode ser avaliada comparando os dados experimentais de RMN para um determinado composto e os deslocamentos químicos calculados

para as possíveis estruturas. Além disso, Smith e Goodman (2010) introduziu a probabilidade de DP4 que é atribuir um conjunto de dados experimentais a duas (ou mais) estruturas candidatas, comparando as diferenças de deslocamentos químicos entre eles, o qual é frequentemente usado para o caso de produtos naturais, mas também para reações orgânicas estereosseletivas. O poder desta abordagem foi demonstrado na atribuição da estereoquímica de anéis flexíveis de cinco membros, como o elatenino, um produto que teve a estrutura revisada (SMITH *et al.*, 2008).

Publicações recentes de nosso grupo de pesquisa descrevem o isolamento e caracterização de produtos naturais e cálculos teóricos para a determinação estrutural de vários produtos e compostos improváveis formados por reações de Diels-Alder (TEIXEIRA e ALVARENGA, 2016; RESENDE e ALVARENGA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Neste trabalho determinamos as estruturas de dois novos epóxidos obtidos por uma síntese enantiosseletiva a partir de produto natural quiral por cálculos de RMN e DFT (*density functional theory*).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese dos compostos **16** e **17** está descrita na seção 1.3.4.10. do Capítulo 1 (p. 25), assim como seus dados experimentais (seção 1.3.4.10.1., p. 26 e seção 1.3.4.10.2., p. 27).

2.2.1. Cálculo Teórico

Na primeira etapa do cálculo teórico, uma busca conformacional usando o programa *Spartan 16* (Wavefunction Inc) foi realizada para todas as estruturas candidatas **en1-en4** e **ex1-ex4** na fase gasosa, usando campo de forças MMFF e o método de Mínimo Múltiplo de Monte Carlo (MMMC) especificando o número máximo de confôrmeros examinados igual a 1000. Para as estruturas candidatas **en1**, **en2**, **en3** e **en4**, o número de confôrmeros encontrados foram 6, 6, 6 e 5, respectivamente. Enquanto que para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4**, o número de confôrmeros encontrados foram 6, 7, 6 e 6, respectivamente. Todos os confôrmeros foram

submetidos às análises de DP4 e MEA (TEIXEIRA e ALVARENGA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018; LODEWYK *et al.*, 2012; WILLOUGHBY *et al.*, 2014).

2.2.1.1. Análise de DP4

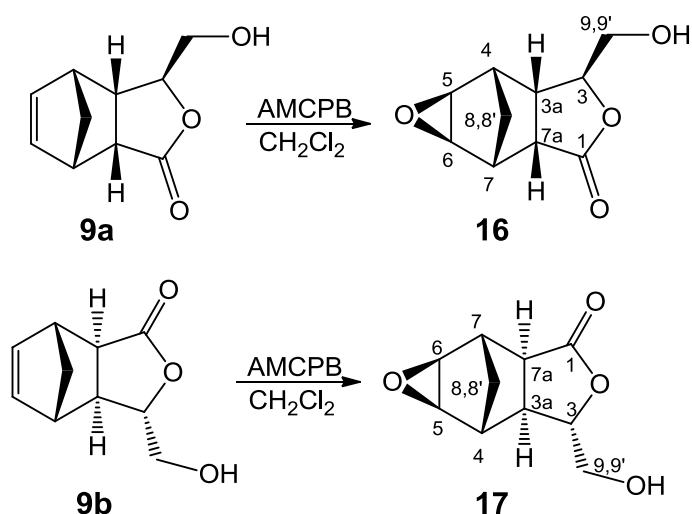
Cada um desses confôrmeros **en1**, **en2**, **en3**, **en4**, **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** foram submetidos a cálculos de tensor de blindagem de RMN no nível B3LYP/6-31G(d,p) usando Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2009). O conjunto resultante de valores de tensores ponderados por Boltzmann foram convertidos em deslocamentos químicos, subtraindo os tensores de blindagem computadorizada do tetrametilsilano (TMS). A análise de DP4 foi realizada inserindo-se os deslocamentos químicos experimentais na ferramenta de análise de DP4, disponibilizada em: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>.

2.2.1.2. Análise MEA

Cada um dos confôrmeros de **en1**, **en2**, **en3**, **en4**, **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** foram submetidos a otimização da geometria no Spartan 16 (Wavefunction Inc) e cálculo da frequência no nível M06-2x/6-31+G(d,p) no Gaussian 09. Os valores do tensor de blindagem de RMN foram calculados para cada confôrmero e otimizado com as funções B3LYP e 6-311+G(d,p), bases definidas no Gaussian 09. Os tensores de blindagem calculados para cada núcleo foram submetidos a ponderação de Boltzmann e depois convertidos em valores dos desvios químicos empiricamente dimensionados para cada núcleo das estruturas **en1**, **en2**, **en3**, **en4**, **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4**. Parâmetros de análise de regressão foram utilizados para obter a escala de referência dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (LODEWYK *et al.*, 2012). Os conjuntos de dados experimentais dos epóxidos **16** e **17** foram comparados com seus respectivos conjuntos de dados calculados: (**en1**, **en2**, **en3** e **en4**) e (**ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4**). Então os valores médios de erro absoluto foram determinados.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os epóxidos são intermediários importantes e reativos sintetizados a partir de reagentes prontamente disponíveis. Um método típico para a preparação dos epóxidos é a oxidação da ligação dupla C=C (OCHIAI e HIRANO, 2014). As reações de epoxidação com ácido *m*-cloroperbenzóico dos adutos de Diels-Alder **9a** e **9b** foram realizados utilizando condições descritas anteriormente no Capítulo 1 (p.24), conforme mostrado no Esquema 1.



Esquema 1: Reação de epoxidação dos adutos **9a** e **9b**.

As reações de epoxidação são estereoespecíficas, e nesse trabalho as reações também foram estereosseletivas. Tanto o aduto *endo* **9a** quanto o *exo* **9b** tiveram o ataque de oxigênio na face menos impedida. O grupo hidroximetil na posição 3 não tem nenhum papel sobre estas reações, uma vez que é distante do local onde a epoxidação ocorreu. Considerando que os adutos **9a** e **9b** foram formados a partir do butenolídeo quiral **6** de um modo enantiosseletivo, e as reações de epoxidação foram estereoespecíficas e estereosseletivas, os epóxidos são enantiomericamente puros.

Epoxidação e halogenação de adutos de Diels-Alder com AMCPB foram descritos formando compostos tipo gaiola como uma mistura racêmica. No presente trabalho, os compostos tipo gaiola enantiomericamente puros não foram formados mesmo quando os epóxidos **16** e **17** foram aquecidos em tolueno em um tubo selado. Os éteres de cinco membros tipo gaiola são

frequentemente descritos na literatura, no entanto, éteres de seis membros tipo gaiola foram descritos em ocasiões especiais seguindo uma rota sintética distinta da apresentada neste trabalho (RESENDE e ALVARENGA, 2016). Aqui caracterizamos completamente os epóxidos enantiomericamente puros **16** e **17** por métodos espectrométricos e cálculos teóricos.

O estiramento da carbonila no infravermelho ($1730\text{-}1737\text{ cm}^{-1}$) é consistente com os anéis de γ -lactonas, indicando a presença deste grupo funcional nos produtos (Figura 1 e Figura 2). O estiramento vibracional do O-H para o epóxido **16** foi observado em 3466 cm^{-1} como uma banda acentuada em vez do sinal de ligação de hidrogênio intermolecular amplo, como mostrado na Figura 1.

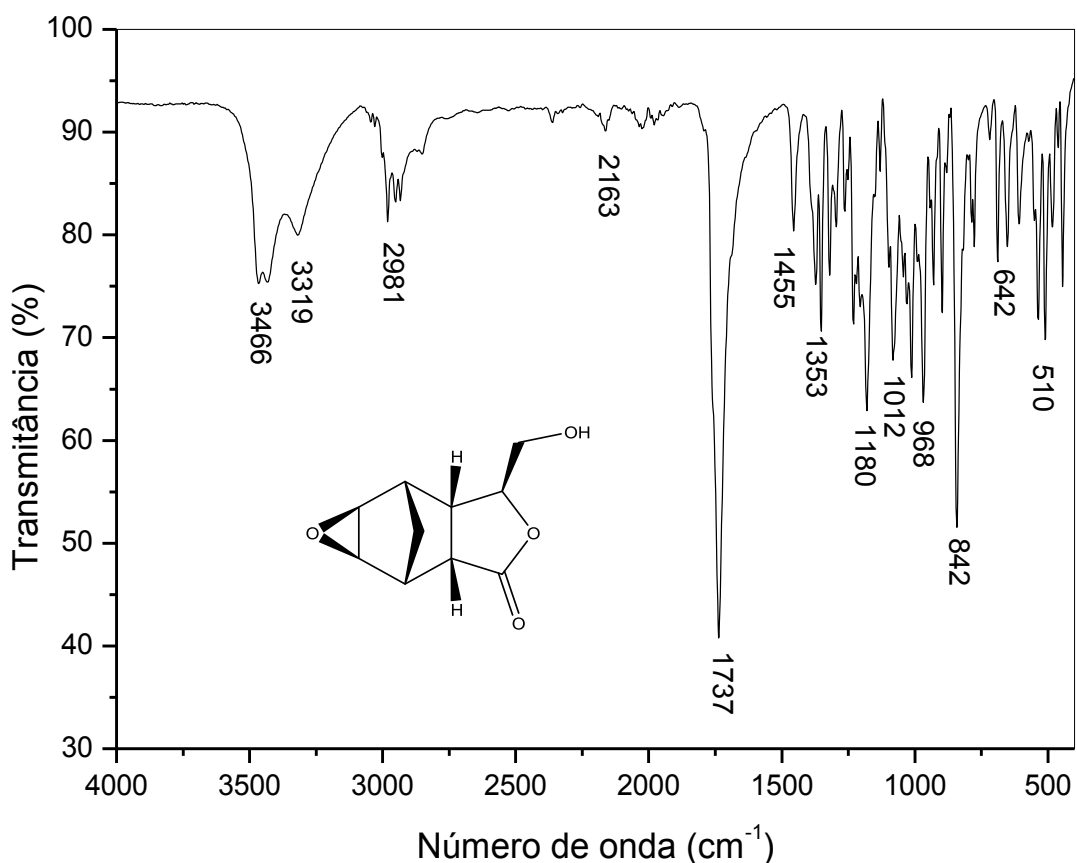


Figura 1: Espectro no Infravermelho do epóxido **16**.

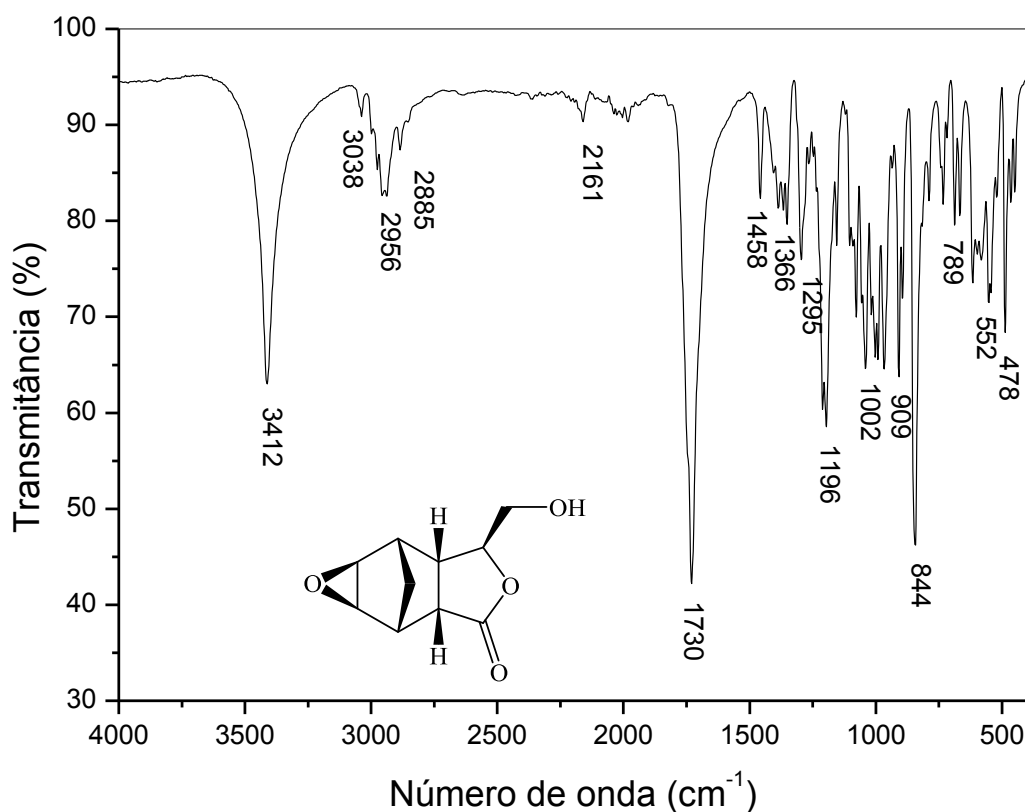


Figura 2: Espectro no Infravermelho do epóxido **17**.

Após a análise inicial dos espectros no infravermelho, realizamos a interpretação dos dados de RMN para a determinação estrutural completa. Uma característica observada no RMN que é comum a ambos os epóxidos é a ausência de sinais olefínicos presentes nos espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C dos adutos *endo* e *exo* (**9a** e **9b**) e ausentes nos epóxidos **16** e **17**.

2.3.1. Identificação do Epóxido **16**

Os sinais mais característicos para o epóxido **16** no RMN de ^1H (Figura 3) são os H3, H9 e H9' mais desprotegidos, a δ 4,50 (ddd), δ 3,81 (dd), e δ 3,56 (dd), respectivamente. Os mais protegidos H8 e H8' foram também facilmente atribuídos aos sinais em δ 1,51 (dt) e δ 0,91 (m), respectivamente. O hidrogênio H8 acopla com H8', H4 e H7 formando um duplo tripleto. Além do acoplamento com H8, H4 e H7, o hidrogênio H8' também acopla em W com H5 e H6, conforme destacado na Figura 4, o que explica o multiplete para H8'.

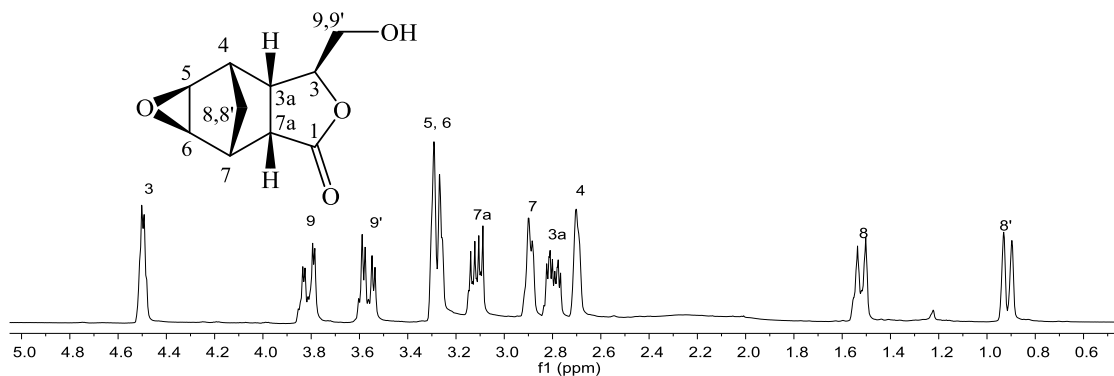


Figura 3: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o epóxido **16**.

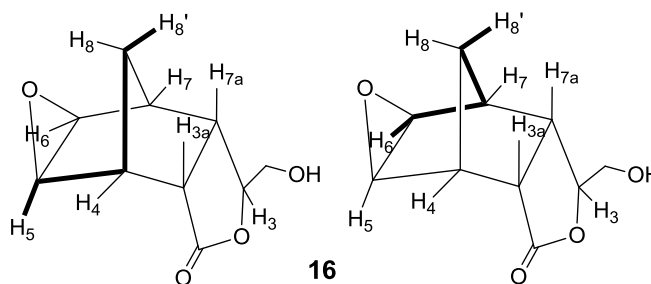


Figura 4: Estrutura do epóxido **16** com o acoplamento em W destacado de $\text{H}_{8'}$.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5) os carbonos mais desblindados são C1, C5, C6, C3 e C9 e o carbono mais blindado, facilmente atribuído, refere-se ao C8 em 28,9 ppm. Além da carbonila em δ 177,1, o C3 em δ 79,7 é o carbono mais desblindado devido ao efeito retirador de elétrons do oxigênio do anel de lactônico. O carbono C9 ($\text{H}_2\text{C-O}$) em δ 64,7 é mais desblindado que C5 e C6 (HC-O) em 47,6 e 48,5 ppm, respectivamente.

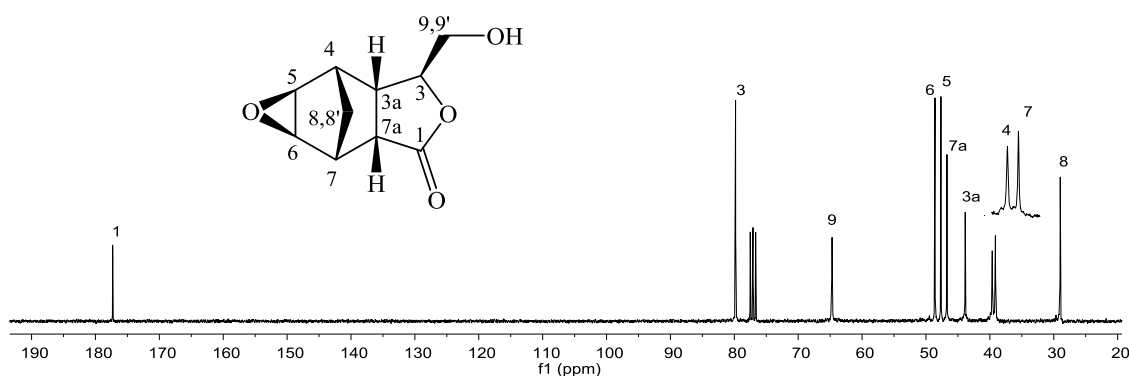


Figura 5: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para o epóxido **16**.

O comprimento da ligação C9-Oxigênio (1,41 Å) é mais curto que as ligações C5-Oxigênio e C6-Oxigênio (~ 1,42 Å), assim, a densidade de elétrons em C5 e C6 é maior que em C9, o que explica a blindagem de C5 e C6. O C6 é

mais desblindado do que C5 porque o comprimento da ligação C6-Oxigênio (1,42 Å) é menor que a ligação C5-Oxigênio (1,43 Å). Assim, a densidade eletrônica em C6 é menor que em C5, o que explica a desblindagem de C6. O comprimento das ligações foram obtidas a partir do confôrmero mais estável após otimização com a base teórica M06-2x/6-31+G(d,p).

A configuração relativa e, conseqüentemente, a absoluta foram estabelecidas pelas correlações cruzadas de *NOESY* (Figura 6). A partir da correlação cruzada observada no *HMBC* (Figura 8) com C9 pode-se fazer a atribuição de H3a. A posição relativa de H3a foi estabelecida pela correlação cruzada com H7a e H8' observado no *NOESY*. A atribuição de H5 e H6 foi estabelecida pela correlação cruzada com H4 e H7 observada no *COSY* (Figura 7), respectivamente. Portanto, a atribuição provisória acima de C5 e C6 foi confirmada pela correlação com H7 e H4, respectivamente, pela análise do espectro de *HMBC*.

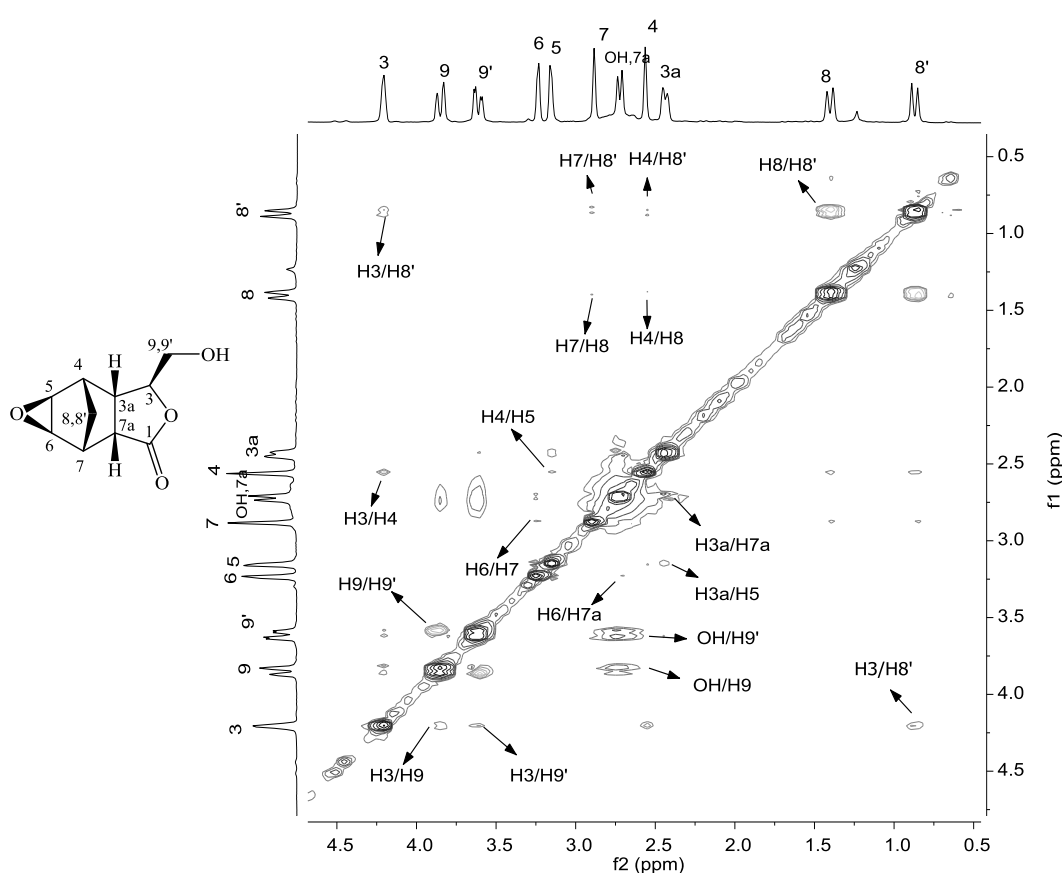


Figura 6: Mapa de contorno *NOESY* do epóxido **16** obtido a 25 °C.

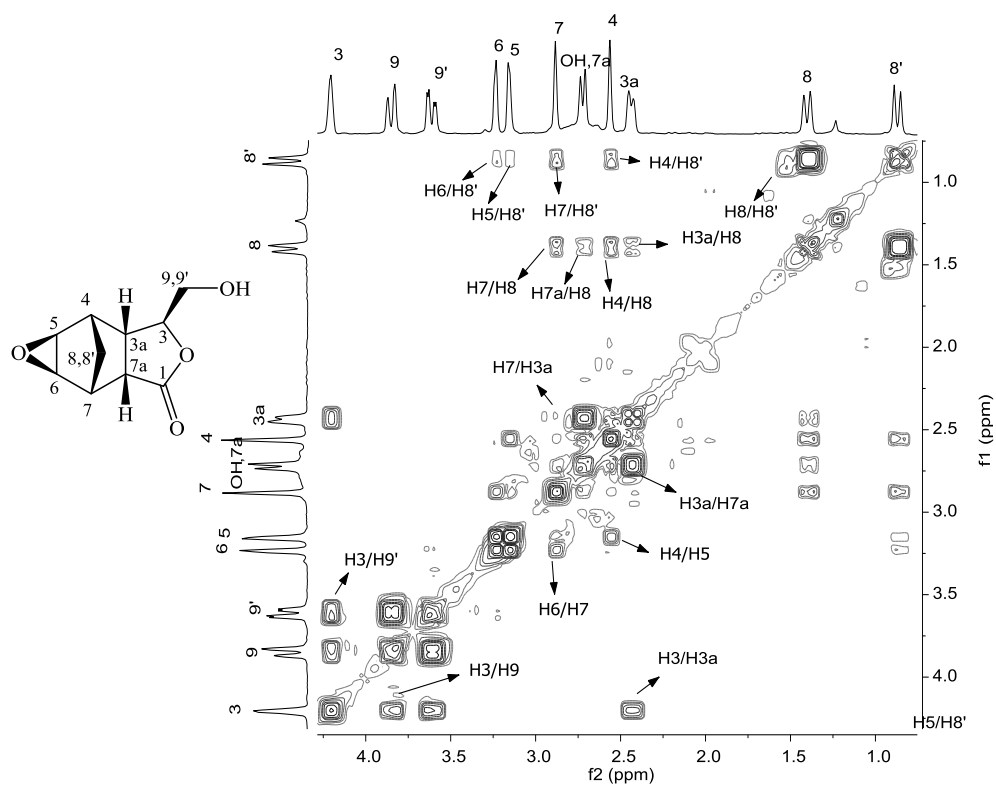


Figura 7: Mapa de contorno COSY do epóxido **16** obtido a 25 °C.

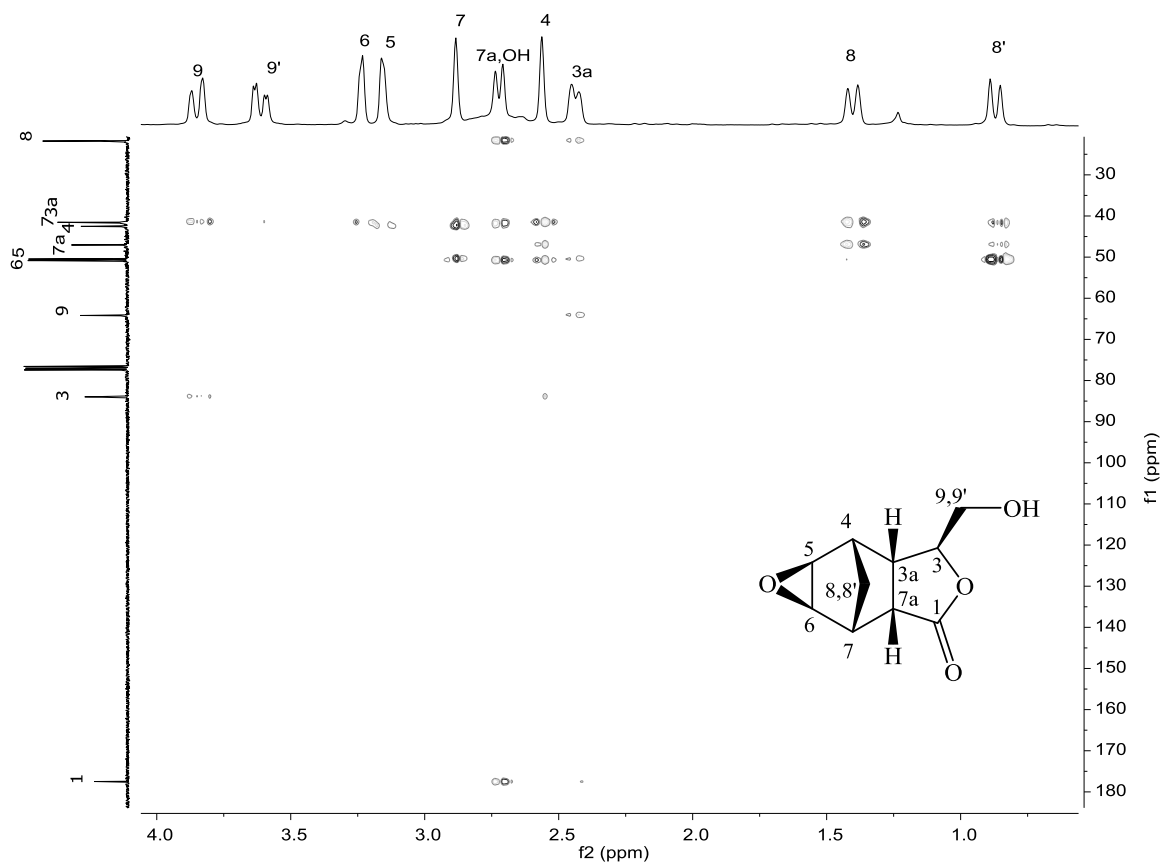


Figura 8: Mapa de contorno HMBC do epóxido **16** obtido a 25 °C.

Os espectros experimentais e calculados de RMN ^1H e ^{13}C para todas as estruturas candidatas são apresentados nas Figura 8 e Figura 9, respectivamente, e é possível observar algumas similaridades, principalmente entre os espectros experimentais com os espectros calculados para a estrutura candidata **en1**.

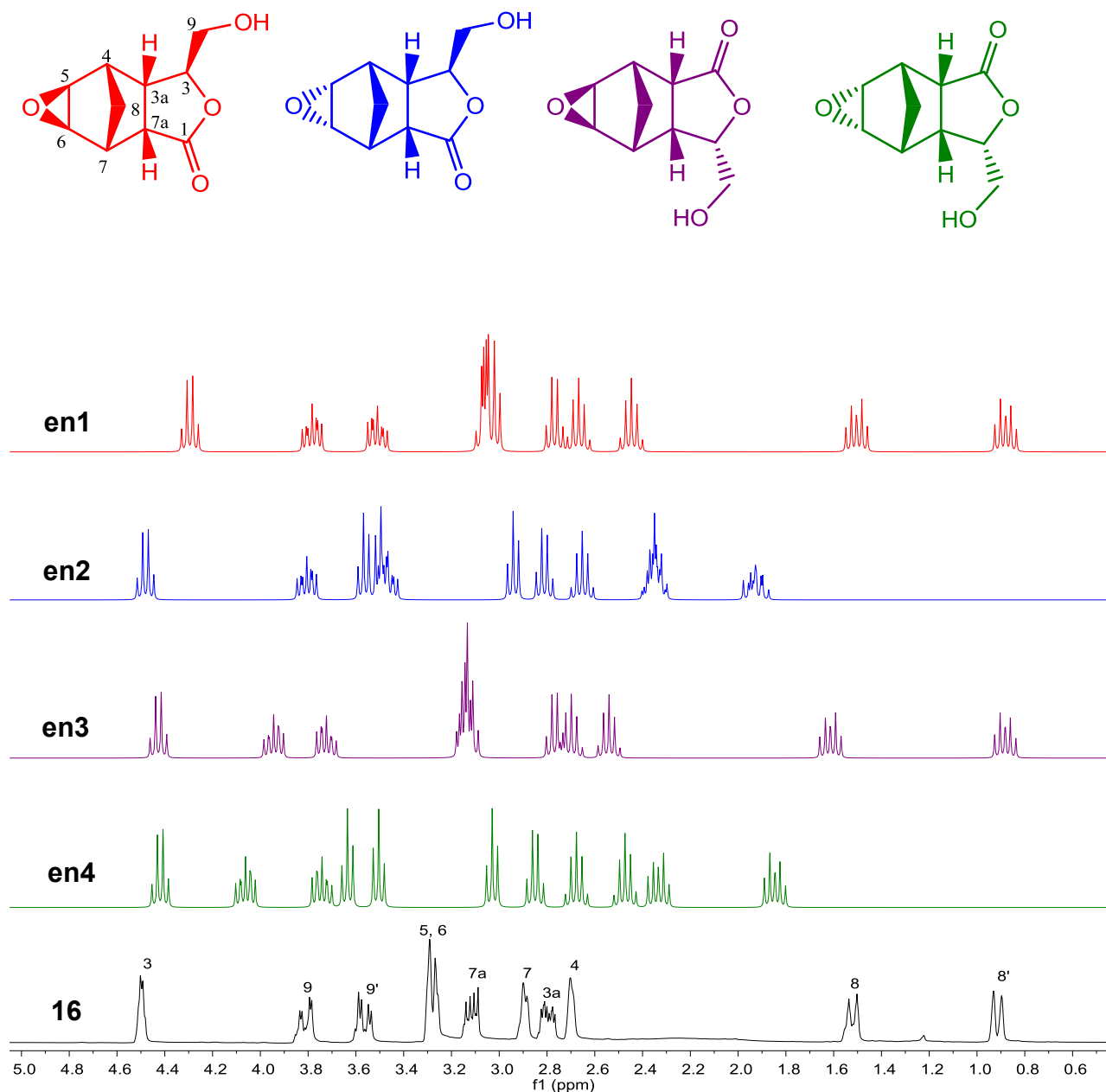


Figura 8: Espectros de RMN de ^1H experimental para o epóxido **16** e os calculados para as estruturas candidatas **en1**, **en2**, **en3** e **en4** obtido a 25 °C.

Contudo, inspecionando os espectros experimentais e calculados de RMN de ^1H e de ^{13}C não somos capazes de apontar um melhor ajuste, uma vez que **en1** e **en3** são muito parecidos. Os espectros **en1**, **en2**, **en3** e **en4** foram montados no MestreNova usando os desvios químicos calculados com a base teórica B3LYP/6-311+G (2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

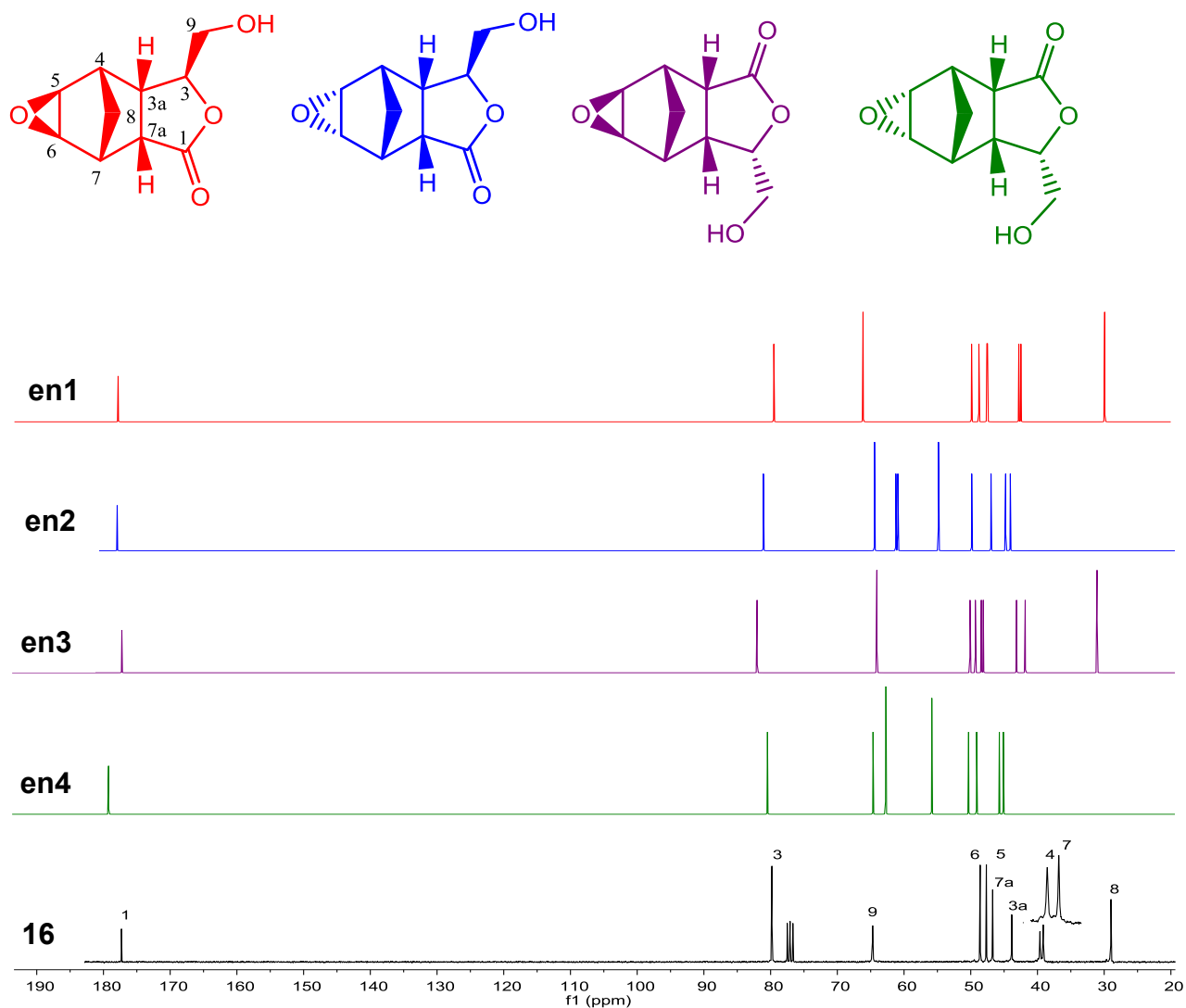


Figura 9: Espectros de RMN de ^{13}C experimental para o epóxido **16** e os calculados para as estruturas candidatas **en1**, **en2**, **en3** e **en4** obtido a 25 °C.

Para confirmar a estereoquímica do produto esperado **16**, previmos os desvios químicos de RMN de ^{13}C e ^1H para quatro estruturas candidatas e verificamos a melhor combinação entre os dados teóricos e experimentais. Os

desvios químicos de ^1H e ^{13}C foram calculados usando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) e são apresentados na Tabela 1.

Os dados experimentais atribuídos são comparados lado a lado com os valores teóricos e o MEA é calculado com o auxílio de uma planilha. O MEA para a estrutura candidata **en1** foi de 0,10 para o hidrogênio e de 1,32 para o carbono, enquanto para **en2**, **en3** e **en4** os valores do MEA foram maiores, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Cálculos dos desvios químicos ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas **en1**, **en2**, **en3** e **en4** para análises de MEA^a

H	C	Calc. δ_{H}				Calc. δ_{C}				$\Delta\delta_{\text{H}}$				$\Delta\delta_{\text{C}}$			
		en1 ^b	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4
H3	C1	4,31	4,49	4,44	4,43	176,58	177,42	175,75	177,41	0,19	0,01	0,06	0,07	0,63	0,21	1,46	0,19
H3a	C3	2,79	2,81	2,76	2,85	78,11	80,27	80,33	78,75	0,00	0,02	0,04	0,05	1,61	0,55	0,60	0,98
H4	C3a	2,47	2,35	2,53	2,47	46,02	46,14	46,33	47,45	0,23	0,35	0,17	0,23	2,25	2,37	2,55	3,68
H5	C4	3,09	3,50	3,11	3,51	41,34	43,15	41,30	43,52	0,17	0,24	0,15	0,24	1,79	3,60	1,75	3,97
H6	C5	3,07	3,57	3,15	3,64	46,14	60,14	46,57	61,07	0,19	0,31	0,11	0,38	1,44	12,56	1,01	13,49
H7	C6	2,69	2,65	2,69	2,67	47,29	60,36	47,50	62,95	0,20	0,23	0,20	0,22	1,22	11,85	1,01	14,44
H7a	C7	3,04	2,94	3,14	3,03	40,94	43,95	40,04	44,10	0,07	0,17	0,03	0,09	1,89	4,90	1,00	5,05
H8	C7a	1,53	1,93	1,59	2,33	48,42	48,97	48,30	48,67	0,03	0,42	0,08	0,82	1,79	2,36	1,66	2,04
H8'	C8	0,91	2,34	0,85	1,84	28,43	53,97	29,18	54,15	0,00	1,43	0,06	0,94	0,47	25,07	0,28	25,24
H9	C9	3,80	3,81	3,95	4,08	64,69	63,57	62,31	43,42	0,02	0,00	0,14	0,26	0,07	1,05	2,31	3,54
H9'		3,53	2,48	3,73	3,75					0,03	0,08	0,17	0,19				
MEA										0,10	0,30	0,11	0,32	1,32	6,45	1,36	7,26

^a Os cálculos foram realizados usando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

^a MEA: Média de erro absoluto. ^b en: epóxido derivado de **9a**

O segundo método utilizado foi o de probabilidade DP4, em que os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para **en1**, **en2**, **en3** e **en4** das estruturas candidatas foram calculadas no nível B3LYP/6-31G(d, p).

Em seguida, os deslocamentos químicos calculados, bem como os deslocamentos experimentais, foram organizados e transferidos para o site www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/, que calculou a probabilidade para cada estrutura candidata de forma prática e rápida. Esses cálculos foram realizados combinando os deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H e de ^{13}C com os respectivos dados calculados para **en1**, **en2**, **en3** e **en4**, simultaneamente. A análise estatística foi realizada após a atribuição dos sinais, feita a partir da interpretação dos espectros de RMN. De acordo com a metodologia do DP4, os dados experimentais são mais próximos dos valores calculados para a estrutura candidata **en1** com 100% de probabilidade. Os resultados das probabilidades do método de DP4 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Dados da análise de DP4 para o RMN de ^1H e ^{13}C para epóxidos **16**

Produto Candidato	Probabilidade de DP4 (%) ^a	
	(após atribuição)	
	^{13}C	^1H
en1	100	
en2	0.0	
en3	0.0	
en4	0.0	

^a Os cálculos foram realizados usando o nível de teoria mecânica molecular B3LYP/6-31G(d,p).

Portanto, tanto as análises de DP4, como o MEA, estabeleceram **en1** como a estrutura para o epóxido **16**. Os valores do MEA para o hidrogênio são geralmente os melhores para a distinção de estruturas candidatas, e no nosso caso, satisfatoriamente os valores de MEA para o hidrogênio foram inferiores aos valores de MEA para o carbono. Embora a metodologia DP4 tenha sido desenvolvida para distinguir diastereoisômeros, empregamos essa análise estatística com sucesso em nosso trabalho, onde escolhemos uma molécula entre quatro estruturas candidatas (SMITH e GOODMAN, 2010).

2.3.2. Identificação do Epóxido 17

Os hidrogênios mais blindados, H8 e H8', foram facilmente atribuídos aos sinais em δ 1,40 (d) e δ 0,87 (d), respectivamente (Figura 10). As multiplicidades destes sinais foram observadas como dupletos largos por causa dos acoplamentos em W de H8 (com H3a e H7a) e H8'(com H5 e H6), como mostrado na Figura 11.

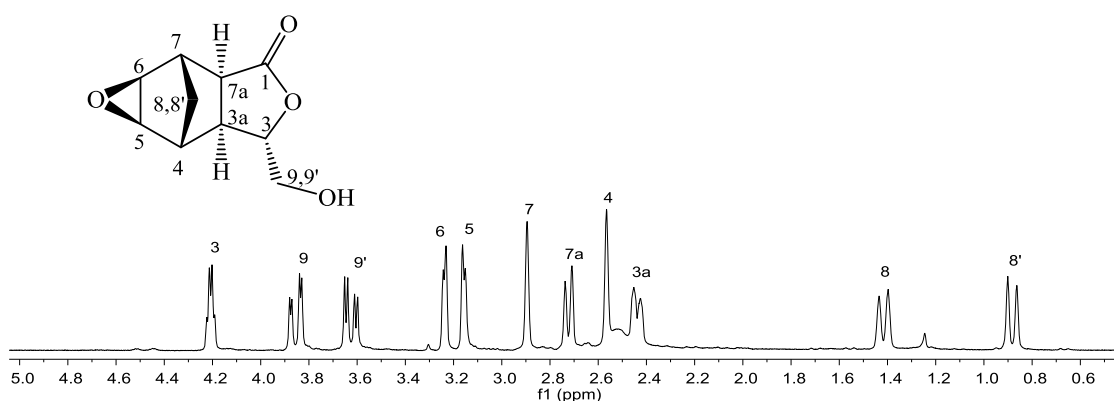


Figura 10: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o epóxido **17**.

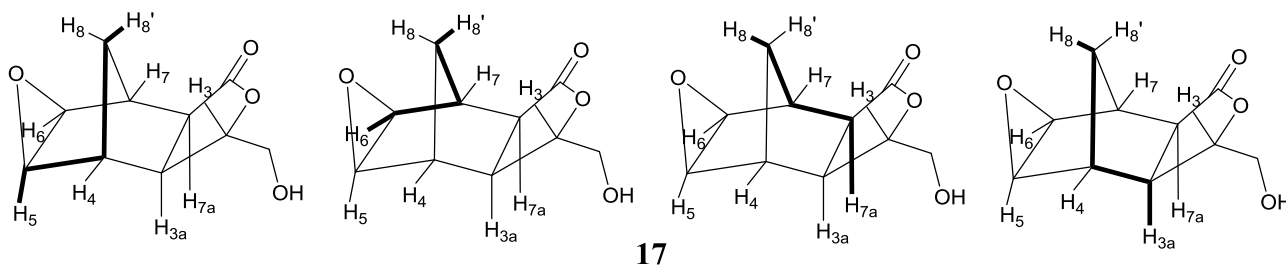


Figura 11: Estruturas do epóxido **17** com o acoplamento em W destacado de H8 e H8'.

Além dos acoplamentos em W e do acoplamento geminal, H8 e H8' mostraram também acoplamentos com H4 e H7. No entanto, a única constante de acoplamento medida para estes dois hidrogênios foi o acoplamento geminal de $J = 11,1$ Hz.

O sinal em δ 2,44 ppm foi atribuído a H3a com o auxílio das correlações cruzadas no COSY (Figura 12) com H3, H7, H7a e H8. Porém, esse sinal foi observado apenas como um simpleto largo ($J = 8,1$ Hz) devido ao acoplamento *cis* vicinal com H7a, observado em δ 2,71 ppm.

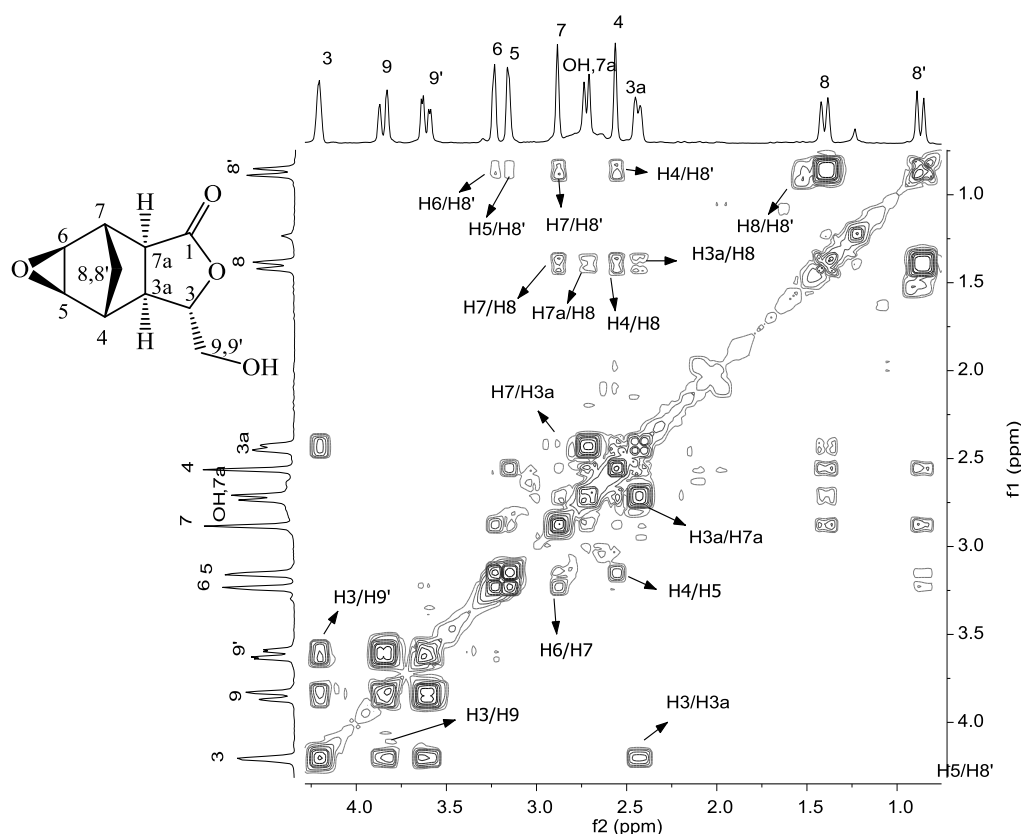


Figura 12: Mapa de contorno COSY do epóxido **17** obtido a 25 °C.

Além disso, o mapa de contorno COSY apresentou as correlações cruzadas W acima mencionadas de H8 e H8'. O acoplamento W é uma das principais diferenças entre os epóxidos **16** e **17**. O epóxido **16** apresentou o acoplamento em W (H8') apenas com os hidrogênios do anel do epóxido, enquanto o epóxido **17** mostrou acoplamento em W (H8/H8') com os hidrogênios do anel do epóxido e com os hidrogênios da lactona. O *HMBC* (Figura 14) foi usado para confirmar a atribuição dos sinais em δ 2,44 (H3a) e 2,88 ppm (H7) de acordo com a correlação com o grupo carbonila (δ 177,5 ppm). O segundo sinal mais desblindado (84,0 ppm, C3) apresentou correlações no *HMBC* com os sinais em δ 2,56 e 2,71 ppm que foram atribuídos aos hidrogênios H4 e H7a, respectivamente. Posteriormente, a correlação de H4 e H7a foi fundamentada para atribuir o sinal em 50,9 ppm a C6. Além disso, a correlação no *HMBC* com H7 e H3a forneceu a atribuição do sinal em 50,5 ppm a C5.

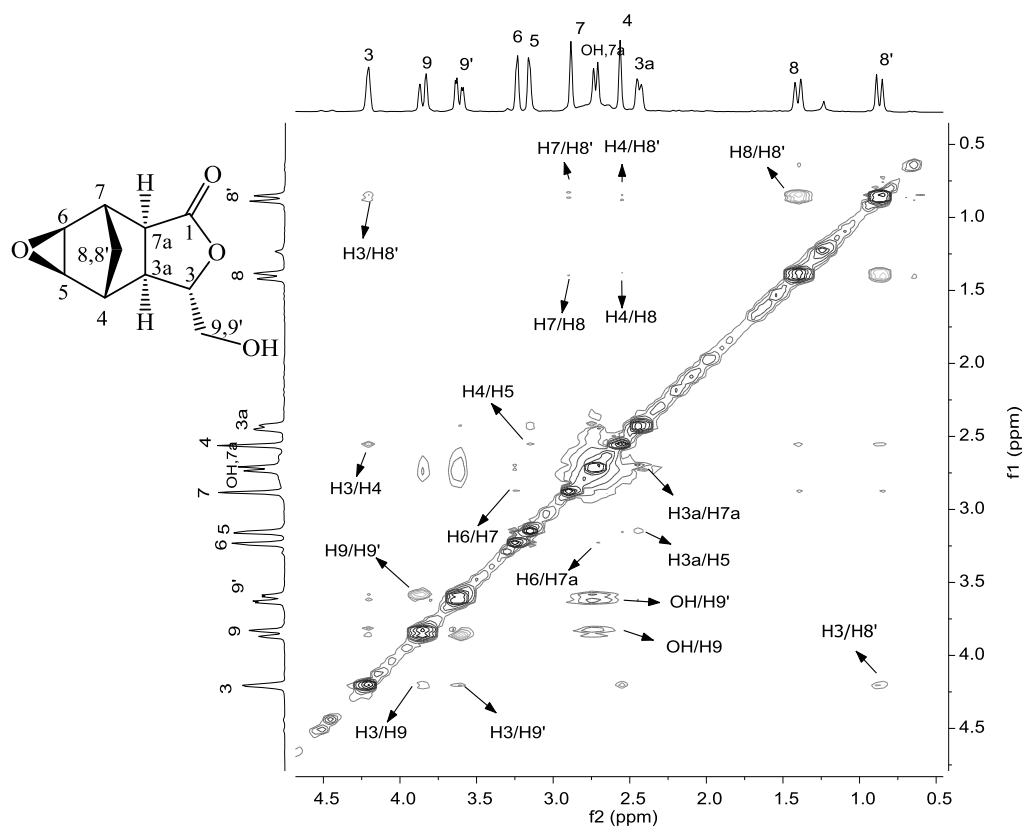


Figura 13: Mapa de contorno NOESY do epóxido 17 obtido a 25 °C.

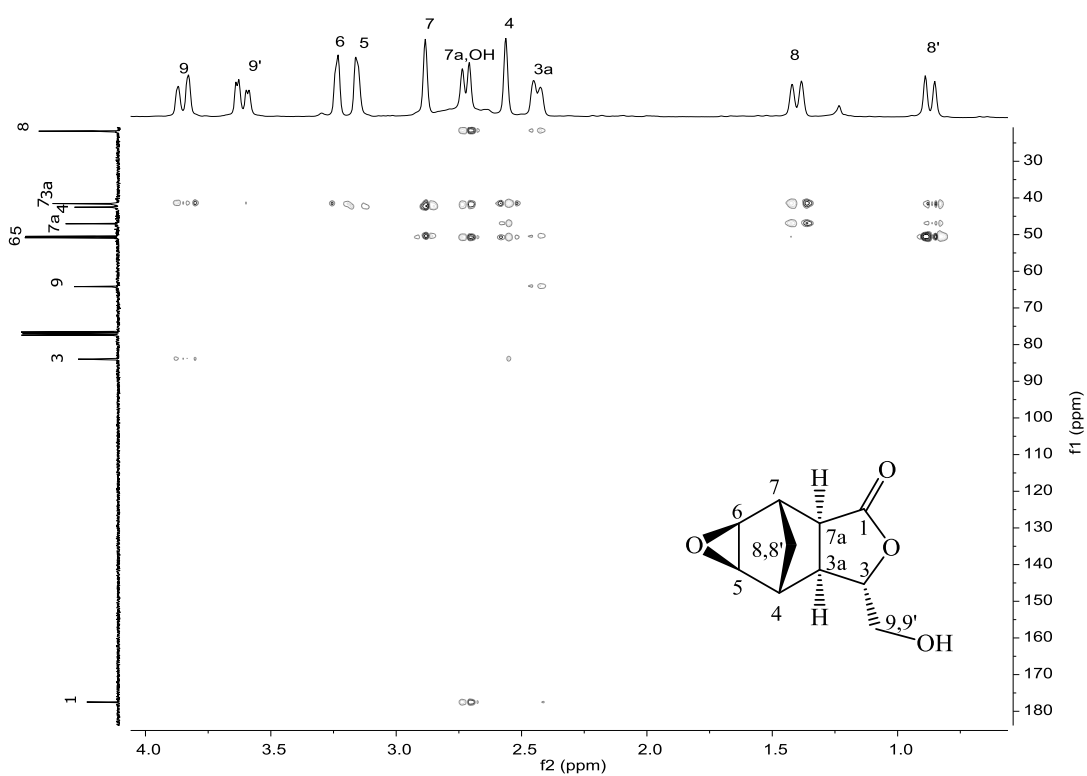


Figura 14: Mapa de contorno HMBC do epóxido 17 obtido a 25 °C.

Os espectros **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** também foram montados no MestreNova usando os deslocamentos químicos calculados com a base teórica B3LYP/6-311+G (2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p). Os espectros experimentais e calculados de RMN ^1H e ^{13}C para todas as estruturas candidatas são apresentados na Figura 15 e Figura 16, respectivamente, apresentando similaridades principalmente entre os espectros experimentais com os espectros calculados para a estrutura candidata **ex3**.

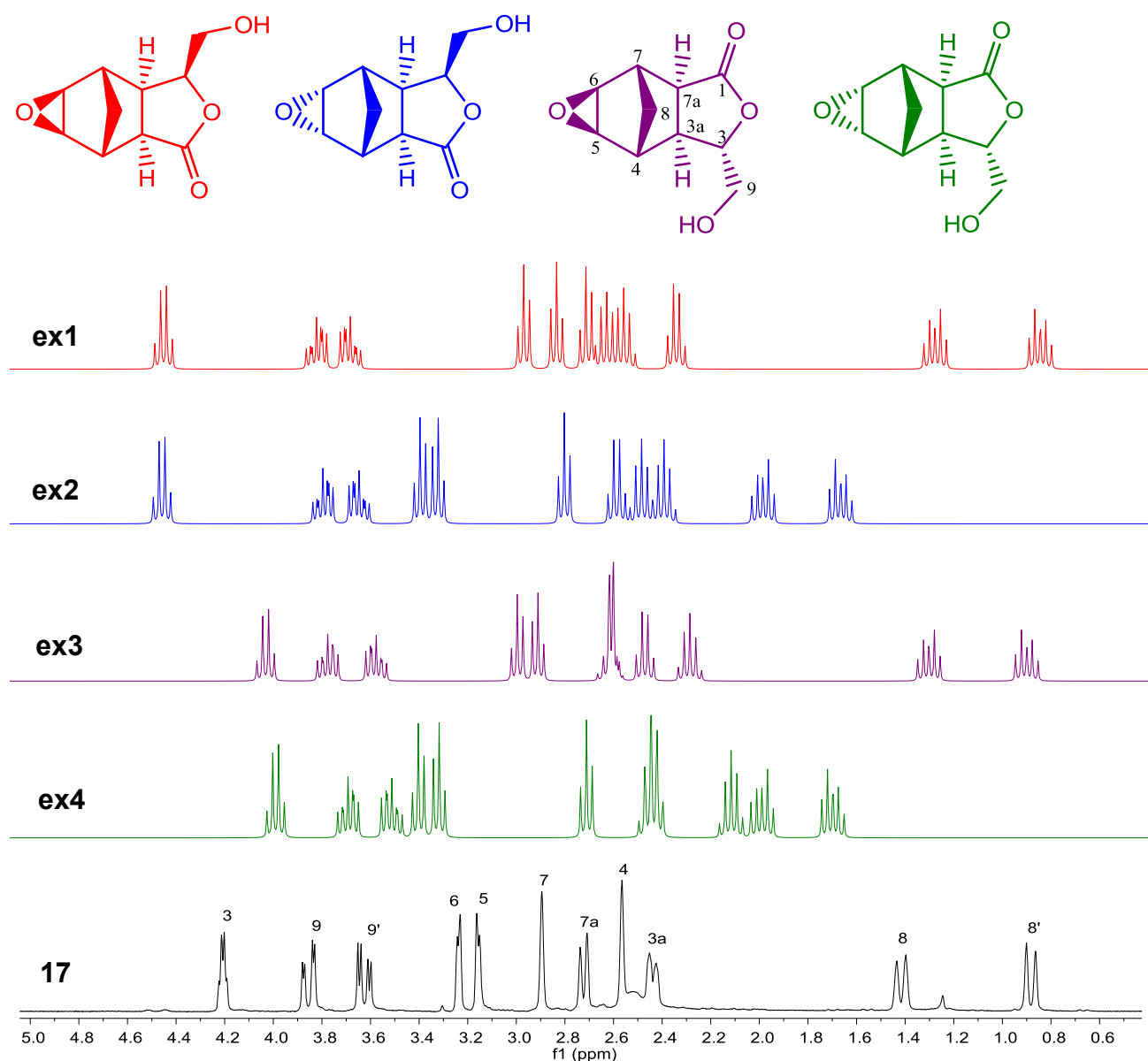


Figura 15: Espectros de RMN de ^1H experimental para o epóxido **17** e os calculados para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** obtido a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

No entanto, assim como para o epóxido **16**, é difícil concluir sobre qual é a estrutura do epóxido **17** apenas por comparação visual entre os espectros de RMN ^{13}C e ^1H experimentais e calculados. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H RMN foram calculados no nível B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** (Tabela 3).

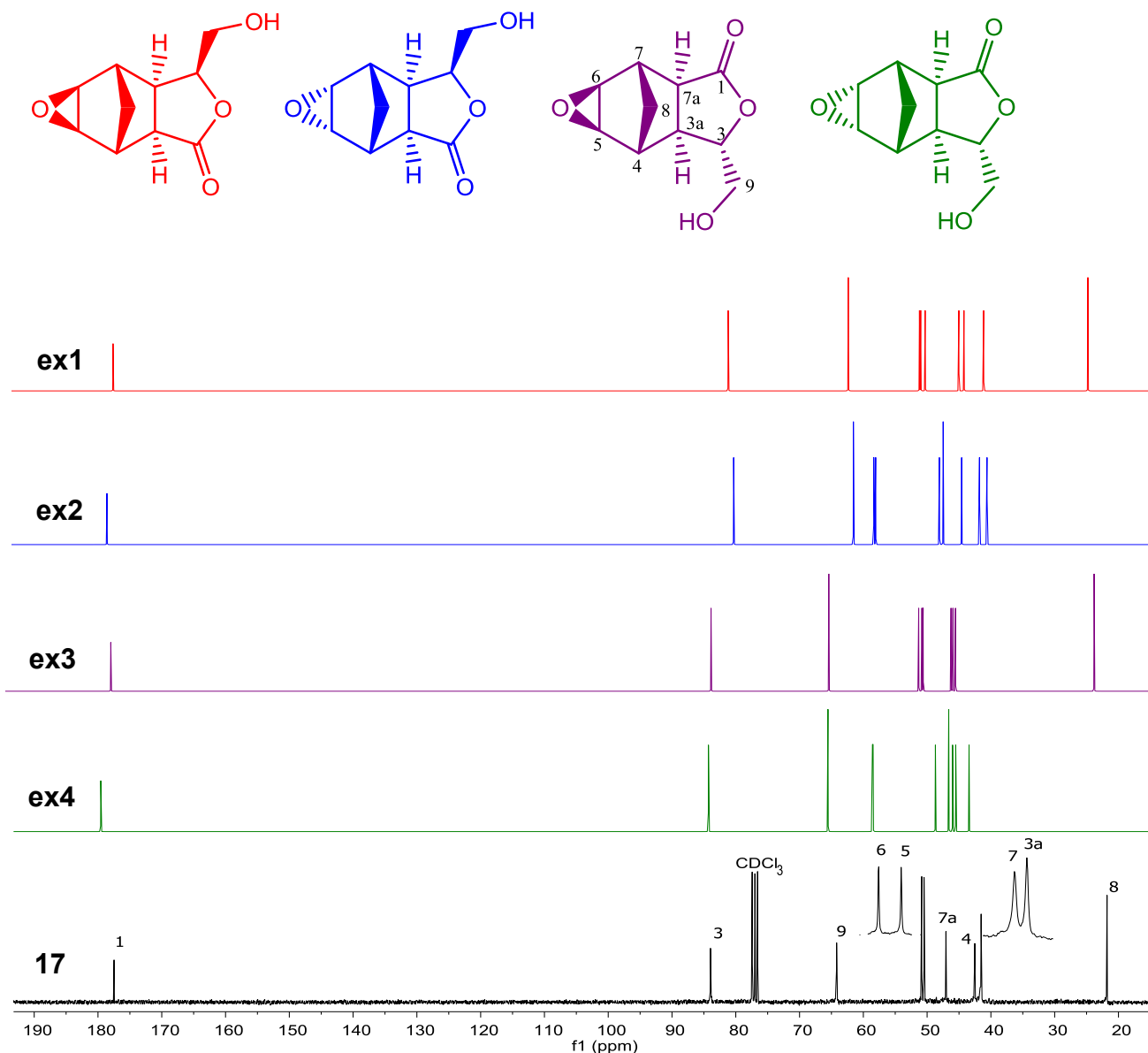


Figura 16: Espectros de RMN de ^{13}C experimental para o epóxido **17** e os calculados para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** obtido a 25 °C.

A média das diferenças entre os deslocamentos químicos calculados e experimentais fornecem o valor do MEA. O MEA para a estrutura candidata **ex3** foi de 0,14 para o hidrogênio e 1,34 para o carbono, enquanto que para

198

ex1, **ex2** e **ex4** os valores de MEA foram maiores, conforme apresentado Tabela 3. Portanto, a estrutura e estereoquímica do epóxido **17** foi confirmada pela análise do MEA como sendo **ex3**.

Tabela 3: Cálculos dos desvios químicos ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** para análises de MEA^a

H	C	Calc. δ_{H}				Calc. δ_{C}				$ \Delta\delta_{\text{H}} $				$ \Delta\delta_{\text{C}} $			
		ex1 ^b	ex 2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4
H3	C1	4,44	4,45	4,02	3,99	176,62	178,16	177,12	178,74	0,24	0,24	0,19	0,22	0,85	0,70	0,36	1,26
H3a	C3	2,39	2,62	2,50	2,48	79,83	79,80	82,34	83,09	0,05	0,19	0,06	0,04	4,14	4,16	1,62	0,87
H4	C3a	2,60	2,43	2,32	2,17	42,74	41,17	44,06	42,11	0,03	0,13	0,24	0,39	1,21	0,36	2,53	0,58
H5	C4	2,87	3,34	2,93	3,34	39,57	40,07	44,36	44,67	0,29	0,18	0,23	0,18	2,96	2,46	1,83	2,14
H6	C5	3,00	3,41	3,01	3,42	49,53	57,83	49,02	57,02	0,23	0,18	0,22	0,19	0,95	7,35	1,46	6,77
H7	C6	2,67	2,52	2,64	2,50	49,65	57,47	49,52	57,33	0,22	0,37	0,24	0,38	1,20	6,62	1,33	6,48
H7a	C7	2,75	2,83	2,65	2,75	43,54	43,96	43,71	44,18	0,05	0,12	0,06	0,05	1,90	2,32	2,07	2,54
H8	C7a	1,35	2,03	1,36	2,05	48,75	47,51	48,77	47,41	0,05	0,63	0,04	0,65	1,71	0,47	1,73	0,36
H8'	C8	0,93	1,72	0,97	1,77	23,24	46,94	21,80	45,34	0,06	0,85	0,10	0,90	1,45	25,15	0,01	23,55
H9	C9	3,70	3,66	3,77	3,70	60,93	61,01	63,70	64,32	0,15	0,18	0,08	0,15	3,25	3,17	0,48	0,13
H9'		3,83	3,80	3,58	3,53					0,20	0,17	0,05	0,10				
									MEA	0,14	0,29	0,14	0,29	1,96	5,28	1,34	4,47

^aOs cálculos foram realizados usando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).^aMEA: Média de erro absoluto. ^b ex: epóxido derivado de **9b**

Os desvios químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C calculados no nível B3LYP/6-31G(d,p) para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2**, **ex3** e **ex4** foram organizados e transferidos para o site www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/, que calculou uma melhor correspondência entre os dados calculados e experimentais. As atribuições dos sinais por interpretação dos espectros de RMN foram feitos antes da análise estatística.

Os valores calculados para a estrutura candidata **ex3**, com probabilidade de 98,8%, são muito mais próximos dos dados experimentais do que para as estruturas candidatas **ex1**, **ex2** e **ex4**. Os resultados da probabilidade de DP4 são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Dados da análise de DP4 para o RMN de ^1H e ^{13}C para epóxidos **17**

Probabilidade de DP4 (%) ^a	
(após atribuição)	
Produto Candidato	^{13}C and ^1H
ex1	1.2
ex2	0.0
ex3	98.8
ex4	0.0

^a Os cálculos foram realizados usando o nível de teoria mecânica molecular B3LYP/6-31G(d,p).

2.4. CONCLUSÃO

As estruturas dos dois novos epóxidos foram determinadas como sendo (1*aR*,2*R*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*S*,6*aS*)- 5-(hidroximetil)hexaidro-2,6-metanoxireno[2,3-*f*]iso- benzofurano-3(1*aH*)-ona (**16**) e (1*aS*,2*S*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*R*,6*aR*)-5-(hidroximetil)hexa-idro-2,6-metanoxireno[2,3-*f*]isobenzofurano-3(1*aH*)-ona (**17**). As configurações absolutas e relativas dos epóxidos **16** e **17** foram definidas através da síntese enantiosseletiva a partir do material de partida quiral associada às análises de RMN e cálculos de DFT.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARONE, G.; GOMEZ-PALOMA, L.; DUCA, D.; SILVESTRI, A.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Structure validation of natural products by quantum-mechanical GIAO calculations of ^{13}C NMR chemical shifts GIAO=gauge including atomic orbitals. **Chemistry – A European Journal**, v. 8 p. 3233, 2002.

BIFULCO, G.; DAMBRUOSO, P.; GOMEZ-PALOMA, L.; RICCIO, R. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. **Chemical Reviews**, v.107, p. 3744-3779, 2007.

BROWN, S. G.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. Case study of empirical and computational chemical shift analyses: reassignment of the relative configuration of phomopsichalasin to that of diaporthichalasin. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1326-1331, 2012.

CHEN, X.-P.; LI, W.; XIAO, X.-F.; ZHANG, L. L.; LIU, C.-X. Phytochemical and pharmacological studies on Radix Angelica sinensis. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11 p. 577-587, 2014.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.;

MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian '09, Revision D.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GUO, Y.; QU, H.; ZHI, X.; YU, X.; YANG, C.; XU, H. Semisynthesis and insecticidal activity of some fraxinellone derivatives modified in the B Ring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11937-11944, 2013.

LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational prediction of ^1H and ^{13}C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1839-1862, 2012.

MORAES, F. C.; ALVARENGA, E. S.; AMORIM, K. B.; DEMUNER, A. J.; PEREIRA-FLORES, M. E. Novel platensimycin derivatives with herbicidal activity. **Pest Management Science**, v. 72, p. 580-584, 2016.

NICOLAOU, K. C.; SNYDER, S. A. Chasing molecules that were never there: misassigned natural products and the role of chemical synthesis in modern structure elucidation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 1012-1044, 2005.

OCHIAI, B.; HIRANO, T. Facile synthesis of glycidates via oxidation of acrylates with aqueous solution of NaOCl in the presence of ammonium salts. **Heterocycles** v. 89, p. 487-493, 2014.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; GUIMARAES, L. M.; AGUIAR, A. R. Experimental and theoretical studies on the characterization of monocrotaline by infrared and Raman spectroscopies, **Journal of Molecular Structure**, v. 1135, p. 228-233, 2017.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, T. M. A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by

NMR and DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 337-343, 2018.

PEHLIVAN, L.; JACOLOT, M.; COIA, N.; MONTEIRO, N.; BOUYSSI, D.; BALME, G. Synthesis of stereodefined fused d-hydroxy-g-lactones from dealkylative cyclization of epoxy-diester. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 4716-4719, 2011.

RESENDE, G. C.; ALVARENGA, E. S. Structural elucidation of dioxo-cage compounds from tetrahydroisobenzofuran-1(3H)-one: analysis of NMR data and GIAO chemical shifts calculations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, p. 968-974, 2016.

RESENDE, G. C.; ALVARENGA, E. S.; GALINDO, J. C. G.; MACIAS, F. A. Synthesis and phytotoxicity of 4,5 functionalized tetrahydrofuran-2-ones, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 2266-2270, 2012.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning the stereochemistry of pairs of diastereoisomers using GIAO NMR shift calculation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 4597-4607, 2009.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 12946-12959, 2010.

SMITH, S. G.; PATON, R. S.; BURTON, J. W.; GOODMAN, J. M. Stereostructure assignment of flexible five-membered rings by GIAO ¹³C NMR calculations: prediction of the stereochemistry of elatenyne. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 4053-4062, 2008.

TAGGI, A. E.; MEINWALD, J.; SCHROEDER, F. C. A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, p. 10364-10369, 2004.

TÄHTINEN, P.; BAGNO, A.; KLIKA, K. D.; PIHLAJA, K. Modeling NMR parameters by DFT methods as an aid to the conformational analysis of cis-fused 7a(8a)-methylocta(hexa)hydrocyclopenta[d][1,3]oxazines and [3,1]benzoxazines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 4609-4618, 2003.

TAI, C.; YEH, P.; WU, Y.; SHIH, T.; WANG, B. Theoretical investigation of conformational stabilities and ¹³C NMR chemical shifts of a seven-membered ring thiosugar, (3R,4R,5R,7S)-7-(hydroxymethyl)thiepane-3,4,5-triol. **Journal of Molecular Structure**, v. 1068 p. 84-93, 2014.

TEIXEIRA, M. G.; ALVARENGA, E. S. Characterization of novel isobenzofuranones by DFT calculations and 2D NMR analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, p. 623-631, 2016.

TEIXEIRA, M. G.; ALVARENGA, E. S.; PIMENTEL, M. F., PICANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of lactones derived from furan-2(5H)-one. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2279-2289, 2015.

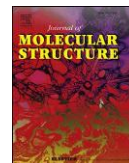
WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, p. 643-660, 2014.

ZHANG, L.; WANG, S.-Q.; LI, X.-J.; ZHANG, A.-L.; ZHANG, Q.; GAO, J.-M. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a Phoma endophyte. **Journal of Molecular Structure**, v. 1016, p. 72-75, 2012.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>

Assignment of the relative and absolute stereochemistry of two novel epoxides using NMR and DFT-GIAO calculations

F.C. Moraes, E.S. Alvarenga*, A.J. Demuner, V.M. Viana

Chemistry Department, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

article info

Article history:

Received 7 November 2017

Received in revised form

13 March 2018

Accepted 13 March 2018

Available online 15 March 2018

Keywords:

D-mannitol

Enantioselective synthesis

DFT

Diels-Alder

Epoxide

abstract

Considering the potential biological application of isobenzofuranones, especially as agrochemical defensives, two novel epoxides, (1*aR*,2*R*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*S*,6*aS*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (9), and (1*aS*,2*S*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*R*,6*aR*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (10), were synthesized from the readily available D-mannitol in six steps. The multiplicities of the hydrogens located at the bridge of the bicycle are distinct for epoxides 9 and 10 due to W coupling, and this feature was employed to confirm the assignment of these nuclei. Besides analyses of the 2D NMR spectra, the assignments of the nuclei at the epoxide ring were also inferred from information obtained by theoretical calculations. The calculated ¹H and ¹³C NMR chemical shifts for eight candidate structures were compared with the experimental chemical shifts of 9 and 10 by measuring the mean absolute errors (MAE) and by the DP4 statistical analysis. The structures and relative configurations of 9, and 10 were determined via NMR spectroscopy assisted with theoretical calculations. As consequence of the enantioselective syntheses starting from a natural polyol, the absolute configurations of the epoxides 9 and 10 were also defined.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lactones are one of nature's most popular compounds and present biological activities of great interest as antitumor [1], phytotoxic [2,3], insecticide [4,5], and in the treatment of Alzheimer's disease [6]. The *a,b*-unsaturated-*d*-lactones are present in a large number of compounds isolated from marine organisms and plants. Their wide range of biological activities may be related to the *a,b*-unsaturated-*d*-lactone, which is a potential Michael acceptor [7,8]. The lactones with rings of five or six members are the most stable and the most abundant in nature [8]. Functionalized lactones are useful intermediates for the synthesis of complex molecules, whereby a variety of synthetic methods have been developed [9].

One of the most commonly used tools for structural elucidation of novel compounds is NMR spectroscopy [10]. However, even with the use of this technique it is found in the literature the wrong or incomplete molecular determination of various compounds [11]. In this context, many researchers use quantum chemistry calculations

to simulate ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of the substances [12,13]. This characterization technique initiated by Bifulco in 1987 [14] has been used satisfactorily in many works [15–22].

In principle, there are two main strategies concerning the use of theoretical calculations of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts in structural elucidation. Firstly, the correctness of a given candidate structure can be assessed by comparing the experimental NMR data for a given compound and the chemical shifts calculated for the putative structures. Moreover Goodman et al. have introduced the DP4 probability to assign one set of experimental data to two (or more) candidate structures by comparing the differences of chemical shifts between them. This is often the case of natural products, but also of stereoselective organic reactions. The power of this approach was demonstrated in assigning the stereochemistry of flexible five-membered rings, such as elatenyne, a natural product which had the structure revised [20].

Recent publications from our research group describe the isolation and characterization of natural products and theoretical calculations for the structural determination of several isolated products and unforeseen compounds formed by the Diels-Alder reactions [17,18,23]. In this work we describe the enantioselective syntheses of two novel epoxides from a chiral natural product and determine their structures by NMR and DFT calculations.

* Corresponding author.

E-mail address: elson@ufv.br (E.S. Alvarenga).

1. Experimental section

1.1. General

Reagents and solvents were obtained from commercial sources and were purified according to standard procedures when necessary. (S)-5-Hydroxymethylfuran-2(5*H*)-one (6) [24], endo (7) and exo (8) [25] were prepared as previously described in the literature. The progress of the reactions was monitored by silica gel thin layer chromatography (TLC). The TLC plates were visualized in a UV chamber [26] prior to staining the spots by chemical means. Column chromatography was carried out on silica gel (60 μ m mesh). Melting points were determined on a MQAPF-301 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were acquired in a Varian 660-IR spectrometer (equipped with GladiATR) using thin film solid method. NMR experiments were performed on a Varian Mercury 300 spectrometer with CDCl₃ as solvent. The chemical shifts were referenced to CDCl₃ (δ 77.0 for ¹³C NMR) and residual CHCl₃ (7.26 for ¹H NMR). Optical rotations were measured using Bellingham Stanley digital polarimeter ADP 220 at 22 °C and angular range from –255° to 255°. High Resolution Mass Spectra (HRMS) were obtained on a MicrOTOF II (Bruker Daltonics) instrument with Electron Spray Ionization (ESI) in the positive ion mode.

Synthesis of (1*a*R,2*R*,2*a*R,5*S*,5*a*S,6*S*,6*a*S)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno [2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*a*H)-one (9)

To a sealed tube were added the endo adduct 7 of the Diels-Alder (0.200 g, 1.1 mmol) reaction and *m*-chloroperbenzoic acid (1.5 eq) dissolved in dichloromethane (10 mL). The reaction mixture was kept under stirring at 50 °C for 4 h until all the starting material was consumed. Subsequently, 10 mL of 20% Na₂SO₃ solution was added to the reaction mixture, and extracted with dichloromethane (3 \times 10 mL). The organic extracts were combined and the organic phase was washed with 10% Na₂CO₃ solution (2 \times 10 mL) and dried with anhydrous MgSO₄. After evaporation of the solvent under reduced pressure the residue was purified by silica gel column chromatography using hexane/ethyl acetate 2:1 (v/v) to afford the title compound in 65% yield (0.142 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 0.91 (1H, m, $J_{8,4}$ 1/4 0.6, $J_{8,7}$ 1/4 0.9 and $J_{8,8}$ 1/4 10.2 Hz, H8^b); 1.51 (1H, dt, $J_{8,7}$ 1/4 1.8 and $J_{8,8}$ 1/4 10.2 Hz, H8); 2.70 (1H, m, H4); 2.79 (1H, ddd, $J_{4,3a}$ 1/4 3.0, $J_{3,3a}$ 1/4 4.5 and $J_{3a,7a}$ 1/4 10.2 Hz, H3a); 2.89 (1H, m, H7); 3.11 (1H, dd, $J_{7a,7}$ 1/4 5.4 and $J_{3a,7a}$ 1/4 10.2 Hz, H7a); 3.26 (1H, m, H5); 3.29 (1H, m, H6); 3.56 (1H, dd, $J_{9,9}$ 1/4 12.3 and $J_{9,3}$ 1/4 3.6 Hz, H9^b); 3.81 (1H, dd, $J_{9,9}$ 1/4 12.3 and $J_{9,3}$ 2.8 Hz, H9); 4.50 (1H, ddd, $J_{3,9}$ 2.8, $J_{9,3}$ 3.6, $J_{3,3a}$ 4.5 Hz, H3).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 28.9 (C8); 39.0 (C7); 39.5 (C4); 43.9 (C3a); 46.7 (C7a); 47.6 (C5); 48.5 (C6); 64.7 (C9); 79.7 (C3); 177.1 (C1). IR (thin film solid, cm⁻¹): 3466, 3319, 2981, 2163, 1737, 1455, 1353, 1180, 1012, 968, 842, 642, 510.

EM m/z (%): 165 (32); 105 (11); 91 (24); 83 (26); 82 (61); 81 (100); 80 (10); 79 (64); 77 (36); 66 (12); 55 (23); 54 (19); 53 (31); 51 (18); 41 (31); 40 (10). $[\alpha]_D^{25}$ 1/4 –18.87.

$m.p.$: 87.2–87.7 °C

HRMS m/z C₁₀H₁₃O₄ (M⁺)^b calcd 197.0808, found 197.0812.

Synthesis of (1*a*S,2*S*,2*a*R,5*S*,5*a*S,6*R*,6*a*R)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno [2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*a*H)-one (10)

The epoxide 10 was obtained in 88% yield (0.070 g) from the exo adduct 8 (0.100 g, 0.55 mmol) using the same procedures employed to prepare epoxide 9.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 0.87 (1H, d, $J_{8,8}$ 1/4 11.4 Hz, H8^b); 1.40

(1H, d, $J_{8,8}$ 1/4 11.1 Hz, H8); 2.44 (1H, dd, $J_{7a,3a}$ 1/4 8.1 Hz, H3a); 2.56 (1H, m, H4); 2.71 (2H, d, $J_{7a,7}$ 1/4 8.1 Hz, H7a and OH); 2.88 (1H, m, H7); 3.16 (1H, m, H5); 3.23 (1H, m, H6); 3.63 (1H, dd, $J_{9,9}$ 1/4 12.3 and $J_{9,3}$ 1/4 3.3 Hz, H9^b); 3.85 (1H, dd, $J_{9,9}$ 1/4 12.3, and $J_{9,3}$ 1/4 3.0 Hz, H9); 4.21 (1H, q, $J_{3,7a}$ 2.2 and $J_{9,3}$ 3.0 Hz, H3).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 21.8 (C8); 41.5 (C3a); 41.6 (C7); 42.5 (C4); 47.0 (C7a); 50.5 (C5); 50.9 (C6); 64.2 (C9); 84.0 (C3); 177.5 (C8).

IR (thin film solid, cm⁻¹): 3412, 3038, 2956, 2885, 2161, 1730, 1458, 1366, 1295, 1196, 1002, 909, 844, 789, 552, 478.

EM m/z (%): 165 (32); 105 (11); 91 (24); 83 (26); 82 (61); 81 (100); 80 (10); 79 (64); 77 (36); 67 (10); 66 (12); 65 (12); 55 (23); 54 (19); 53 (31); 51 (18); 41 (31); 40 (10).

$[\alpha]_D^{25}$ 1/4 –1.94.

$m.p.$: 98.8–100.2 °C

HRMS m/z C₁₀H₁₃O₄ (M⁺)^b calcd 197.0808, found 197.0806.

1.2. Computational

Step 1: The conformational search was performed for all candidate structures en1-en4 and ex1-ex4 in the gas phase using MMFF force field and Monte-Carlo procedure which was set by specifying the maximum number of conformers examined equal to 1000. For the candidate structures en1, en2, en3, and en4, the number of conformers found was 6, 6, 6, and 5, respectively. For the candidate structures ex1, ex2, ex3, and ex4, the number of conformers found was 6, 7, 6, and 6 conformers, respectively. All conformers were subjected to the DP4 and MAE analyses [17,19,27,28].

1.3. DP4 analysis

Step 2: Each of these conformers of en1, en2, en3, en4, ex1, ex2, ex3, and ex4 (Step 1) were subjected to NMR shielding tensor calculations at B3LYP/6-31G(d,p) level of theory using Gaussian [29].

Step 3: The resulting set of Boltzmann-weighted tensor values were converted to chemical shifts by subtracting the shielding tensor value of tetramethylsilane (TMS) at this level of theory.

Step 4: DP4 analysis was accomplished by inputting computed and experimental chemical shifts into the DP4 analysis tool (located at: <http://www.jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>).

1.4. MAE analysis

Step 5: Each of these conformers of en1, en2, en3, en4, ex1, ex2, ex3, and ex4 (Step 1) were subjected to geometry optimization and frequency calculation at M06-2x/6-31G(d,p) level of theory in Gaussian 09.

Step 6: NMR shielding tensor values were computed for each optimized conformer with B3LYP functional and 6-311G(2p,p) basis set in Gaussian 09.

Step 7: The computed shielding tensors for each nucleus were Boltzmann-weighted and then converted to empirically scaled chemical shift values for each nucleus for en1, en2, en3, en4, ex1, ex2, ex3, and ex4. Regression analysis parameters were used to scale and reference ¹H and ¹³C NMR chemical shifts [30]. The experimental data sets of epoxide 9 and 10 were compared with their respective calculated data sets: (en1, en2, en3, and en4) and (ex1, ex2, ex3, and ex4). Then the mean absolute error values were calculated.

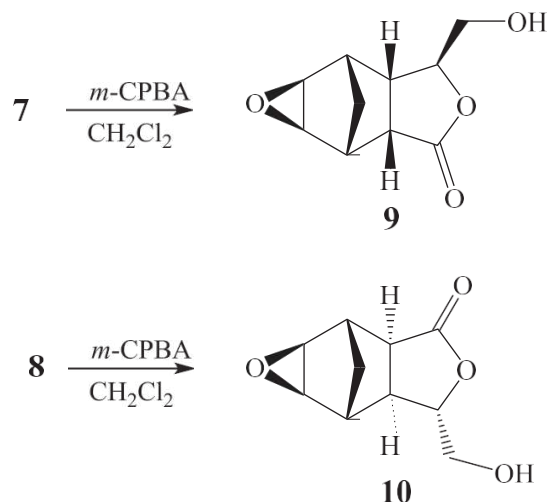
2. Results and discussions

D-mannitol was acetalated following a methodology described

by our group [31]. The diacetal was cleaved by sodium metaperiodate and the aldehyde was converted into the *cis* 4 and *trans* 5 esters by Wittig reaction. Ethyl (*R,Z*)-3-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)acrylate 4 was reacted with catalytic amount of sulfuric acid in methanol to afford the (*S*)-5-(hydroxymethyl)furan-2(5*H*)-one 6 [24,32]. Diels-Alder reaction of the butenolide 6 with cyclopentadiene provided the cycloadducts 7 and 8 in 82% overall yield [25]. The crude mixture was injected in the GC-MS and the relative proportion was determined as 80% of 7 and 20% of 8 (Scheme 1). The endo adduct 7, formed in greater quantity, is the kinetic product. While the exo adduct 8, formed in smaller quantity, is the thermodynamic product. The adducts 7 and 8 were formed with anti-facial selectivity as observed by Casas [25].

Epoxides are important and reactive intermediates synthesized from readily available reagents. A typical method for the preparation of epoxides is the oxidation of the C=C double bond [33]. Epoxidation reactions with *meta*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA) of Diels-Alder adducts 7 and 8 were performed using the conditions previously described [18] (Scheme 2). The epoxidation reactions are stereospecific, but in our case the reactions were also stereoselective. Both endo 7 and exo 8 adducts had the oxygen attack on the less hindered face. The hydroxymethyl group at position 3 has no role on these reactions, because it is distant from the place where the epoxidation took place. Considering the adducts 7 and 8 were formed from the chiral butenolide 6 in an enantioselective way, and the epoxidation reactions were stereospecific and stereoselective, the epoxides are enantiomerically pure.

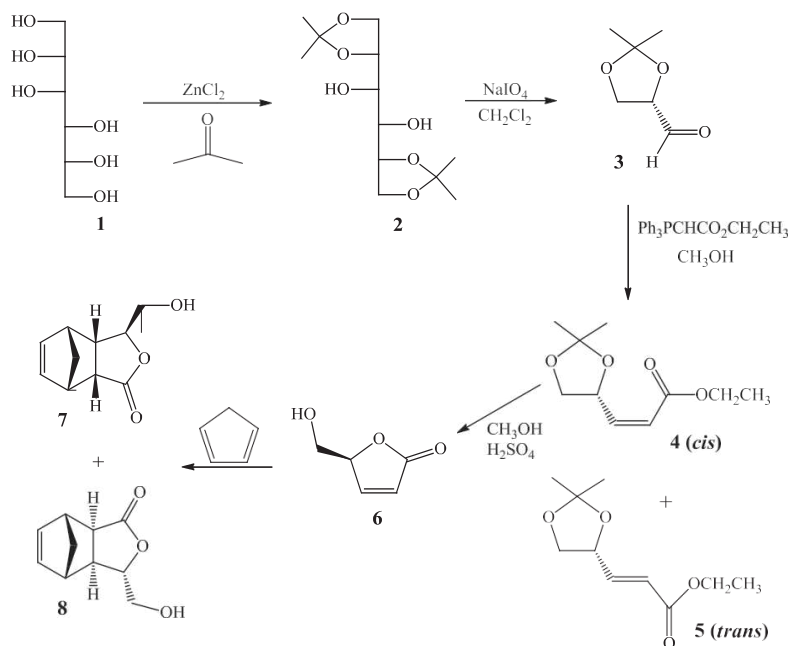
Epoxidation and halogenation of Diels-Alder adducts with *m*-CPBA were described to form cage compounds as a racemic mixture. In the present work the enantiomeric pure cage compounds were not formed even when the epoxides 9 and 10 were heated in toluene in a sealed tube. The five membered ethers in cage compounds are often described in the literature; however the



Scheme 2. Epoxidation of the endo adducts 7 and 8 and the virtual cage compounds.

six membered ethers in cage compounds have been described on special occasions following a synthetic route distinct from ours [18]. Herein we fully characterize the enantiomeric pure epoxides 9 and 10 by spectrometric methods and theoretical calculations.

Carbonyl stretching vibration in the infrared ($1730\text{--}1737\text{ cm}^{-1}$) is consistent with β -lactone rings, indicating the presence of this functional group in the products. The OeH stretching vibration for epoxide 9 was observed at 3466 cm^{-1} as a sharp peak instead of the broad intermolecular hydrogen bonded signal.



Scheme 1. Synthesis of the endo 7 and exo 8 adducts from D-mannitol.

Following the initial infrared analysis we performed full NMR interpretation for complete structural determination. A feature observed in the NMR that is common to both epoxides is the absence of olefinic signals present in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the endo and exo adducts (7 and 8) and absent in the epoxides 9 and 10.

11. Identification of epoxide 9

The most characteristic signals for epoxide 9 in the ^1H NMR are the most deshielded H3, H9, and H9 0 , at δ 4.50 (ddd), δ 3.81 (dd), and δ 3.56 (dd) respectively. The most shielded H8 and H8 0 were also easily assigned to the signals at δ 1.51 (dt) and δ 0.91 (m) respectively. The hydrogen H8 couples with H8 0 , H4 and H7 to afford a doublet of triplets. Besides coupling with H8, H4 and H7, the hydrogen H8 0 has a W coupling with H5 and H6, which explains the multiplet for H8 0 (Fig. 1).

The most characteristic signals in the ^{13}C NMR are the most deshielded carbons C1, C5, C6, C3, and C9. The carbon C8 is easily assigned to the shielded signal at δ 28.9. Apart from the carbonyl at δ 177.1, C3 at δ 79.7 is the most deshielded carbon because of the withdrawing effect of the oxygen from the lactone ring. The carbon C9 (H $_2$ CeO) at δ 64.7 is more deshielded than C5 and C6 (HCeO) at δ 47.6, and 48.5 ppm, respectively. The C9-Oxygen bond length (1.41 Å) is shorter than the C5-Oxygen and C6-Oxygen (~1.42 Å) bonds, thus the electron density on C5 and C6 is greater than on C9 which explains the shielding of C5 and C6. The C6 is more deshielded than C5 because C6-Oxygen bond length (1.42 Å) is shorter than C5-Oxygen bond (1.43 Å). Thus the electron density on C6 is less than on C5 which explains the deshielding of C6. The bonds lengths were taken from the most stable conformer after optimization at M06-2x/6-31 G(d,p) level of theory.

The relative and consequently absolute configuration was established by NOESY cross correlations. Cross correlation observed in the HMBC with C9 provided the assignment of H3a. The relative position of H3a was established by the cross correlation with H7a and H8 0 observed in the NOESY. The assignment of H5 and H6 was set up by the cross correlation with H4 and H7 observed in the COSY, respectively. Therefore the above tentative assignment of C5 and C6 was confirmed by correlation with H7 and H4 in HMBC respectively (Table 1).

A visual note of similarity comparing the experimental and calculated ^1H and ^{13}C NMR spectra for all candidate structures are presented in Figs. S15 and S16 respectively (Supplementary Material). From the ^1H NMR we are able to visually match the calculated spectrum for candidate structure en1 to the experimental spectrum. However inspecting the experimental and calculated ^{13}C NMR spectra we are not able to point a best fit, as en1 and en3 are very similar. The spectra en1, en2, en3, and en4 were assembled in MestreNova using the chemical shifts calculated at B3LYP/6-311 G(2d,p)/M06-2X/6-31 G(d,p) level of theory.

To confirm the stereochemistry of the expected product 9 we predicted the ^{13}C and ^1H chemical shifts for four candidate

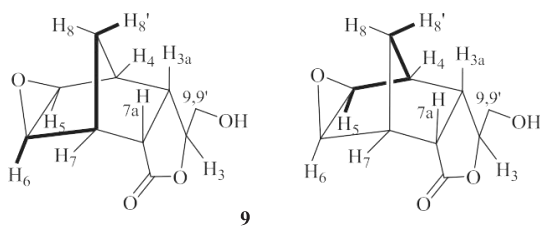


Fig. 1. Structure of epoxide 9 with the W coupling highlighted in bold of H8 0 .

structures and checked the best match between theoretical and experiment data. The calculated ^1H and ^{13}C chemical shifts using B3LYP/6-311 G(2d,p)/M06-2X/6-31 G(d,p) level of theory are presented in Table 2. The assigned experimental data are compared with the theoretical values side by side and MAE is calculated using a spreadsheet.

The MAE for the candidate structure en1 was 0.10 and 1.32 for both hydrogen and carbon respectively, while for en2, en3, and en4 the MAE values were larger, as presented in Table 2.

The second method used was the DP4 probability where the NMR chemical shifts of carbon and hydrogen for en1, en2, en3, and en4 candidate structures were calculated at B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. Then the calculated chemical shifts as well as the experimental shifts were aligned and transferred to the web applet at <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>, which calculated the 'goodness-of-fit' in a practical and fast way. These calculations were carried out by matching the experimental ^1H and ^{13}C chemical shifts with the respective calculated data of en1, en2, en3, and en4 simultaneously. The statistical analysis was performed after assignment of the signals, which was done by NMR spectra interpretation.

According to the DP4 methodology, the experimental data are much closer to the calculated values of the candidate structure en1 than the other potential structures with 100% probability. The DP4 probability results are summarized in Table 3.

Therefore DP4 analyses, like MAE, established en1 as the correct structure. The MAE values for hydrogen were lower than those for carbon and are generally considered to present better distinction. Although the DP4 methodology was developed to distinguish between diastereoisomers, we have employed this statistical analysis with success in our advantage, where we have chosen one molecule between four candidate structures [34].

12. Identification of epoxide 10

The most shielded H-8 and H-8 0 were easily assigned to the signals at δ 1.40 (d) and δ 0.87 (d) respectively. The multiplicities of these signals were observed as broad doublets because of the W couplings of H8 (with H3a, and H7a), and H8 0 (with H5, and H6), besides the geminal coupling (H8 and H8 0), which is shown in Fig. 2. Besides the W couplings, H8 has shown coupling with H8 0 , H4, and H7. To sum up, H8 0 has presented the same couplings of H8 besides the W couplings. However the only coupling constant measured for these two hydrogens was the geminal coupling of $J \approx 11.1$ Hz (Table 4).

The signal at δ 2.44 ppm was assigned to H3a with the aid of the COSY cross correlations with H3, H7, H7a, and H8. However this signal was observed only as a broad doublet (J 84 Hz) due to the *cis* vicinal coupling with H7a. Following that, the signal at δ 2.71 ppm was assigned to H7a. Furthermore the COSY contour map presented the above mentioned W cross correlations of H8 and H8 0 . The W coupling is one of the key differences between epoxide 9 and 10. Epoxide 9 presented W coupling (H8 0) only with the hydrogens of the epoxide ring, while epoxide 10 showed W coupling (H8/H8 0) with the hydrogens of the epoxide ring and with the hydrogens of the lactone.

The HMBC was used to confirm the assignment of the signals at δ 2.44 (H3a), and 2.88 ppm (H7) via correlation with the carbonyl (δ 177.5 ppm). The second most deshielded signal (δ 84.0 ppm, C3) presented correlations in the HMBC with the signals at δ 2.56, and 2.71 ppm which were assigned to H4, and H7a, respectively. Thereafter, correlation of H4, and H7a was reasoned to assign the signal at δ 50.9 ppm to C6. Furthermore, the correlation in the HMBC with H7, and H3a provided the assignment of the signal at δ 50.5 ppm to C5.

Table 1
The experimental ¹H and ¹³C data for epoxide 9, COSY, NOESY, and HMBC correlations.

Label	d _c	Label	d _H (m, J, n)	COSY	NOESY	HMBC
C1	177.1	e	e	e	e	H7a, H8
C3	79.7	H3	4.50 (ddd, J ¼ 4.5, 3.6, 2.8 Hz, 1H)	H3a, H9, H9 ^δ	OH, H9, H9 ^δ	H7a, H9
C3a	43.9	H3a	2.79 (ddd, J ¼ 10.2, 4.5, 3.0 Hz, 1H)	H4, H3, H7a	H8 ^δ , H7a	H7, H8, H8 ^δ , H9, H9 ^δ
C4	39.5	H4	2.70 (m, 1H)	H3a, H5, H8, H8 ^δ	H5, H8, H8 ^δ	H6, H7, H8, H8 ^δ
C5	47.6	H5	3.26 (m, 1H)	H4, H8, H8 ^δ	H4	H7, H8 ^δ
C6	48.5	H6	3.29 (m, 1H)	H7, H8, H8 ^δ	H7	H4, H7a, H8 ^δ
C7	39.0	H7	2.89 (m, 1H)	H6, H8, H8 ^δ	H6, H7a, H8, H8 ^δ	H4, H7a, H8, H8 ^δ
C7a	46.7	H7a	3.11 (dd, J ¼ 10.2, 5.4 Hz, 1H)	H3a	H3a, H7, H8 ^δ	H4, H8, H8 ^δ
C8	28.9	H8	1.51 (dt, J ¼ 10.2, 1.8 Hz, 1H)	H4, H5, H6, H7, H8 ^δ	H4, H7, H8 ^δ	H5, H6
		H8 ^δ	0.91 (m, J ¼ 10.2, 0.9, 0.6 Hz, 1H)	H4, H5, H6, H7, H8	H3a, H4, H7, H8	e
C9	64.7	H9	3.81 (dd, J ¼ 12.3, 2.8 Hz, 1H)	H3, OH	H3, OH	e
		H9 ^δ	3.56 (dd, J ¼ 12.3, 3.6 Hz, 1H)	H3, OH	H3, OH	e

d: experimental chemical shifts (ppm); m: multiplicities; J: coupling constants; n: number of hydrogens.

Table 2
The calculated ¹H and ¹³C chemical shifts for candidate structures en1, en2, en3, and en4 for MAE^a analyses.

		Calc. d _H				Calc. d _c			jDd _{ij}				jDd _{cj}				
H	C	en1 ^b	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4	en1	en2	en3	en4
H3	C1	4.31	4.49	4.44	4.43	176.58	177.42	175.75	177.41	0.19	0.01	0.06	0.07	0.63	0.21	1.46	0.19
H3a	C3	2.79	2.81	2.76	2.85	78.11	80.27	80.33	78.75	0.00	0.02	0.04	0.05	1.61	0.55	0.60	0.98
H4	C3a	2.47	2.35	2.53	2.47	46.02	46.14	46.33	47.45	0.23	0.35	0.17	0.23	2.25	2.37	2.55	3.68
H5	C4	3.09	3.50	3.11	3.51	41.34	43.15	41.30	43.52	0.17	0.24	0.15	0.24	1.79	3.60	1.75	3.97
H6	C5	3.07	3.57	3.15	3.64	46.14	60.14	46.57	61.07	0.19	0.31	0.11	0.38	1.44	12.56	1.01	13.49
H7	C6	2.69	2.65	2.69	2.67	47.29	60.36	47.50	62.95	0.20	0.23	0.20	0.22	1.22	11.85	1.01	14.44
H7a	C7	3.04	2.94	3.14	3.03	40.94	43.95	40.04	44.10	0.07	0.17	0.03	0.09	1.89	4.90	1.00	5.05
H8	C7a	1.53	1.93	1.59	2.33	48.42	48.97	48.30	48.67	0.03	0.42	0.08	0.82	1.79	2.36	1.66	2.04
H8 ^δ	C8	0.91	2.34	0.85	1.84	28.43	53.97	29.18	54.15	0.00	1.43	0.06	0.94	0.47	25.07	0.28	25.24
H9	C9	3.80	3.81	3.95	4.08	64.69	63.57	62.31	43.42	0.02	0.00	0.14	0.26	0.07	1.05	2.31	3.54
H9 ^δ		3.53	2.48	3.73	3.75					0.03	0.08	0.17	0.19				
									MAE	0.10	0.30	0.11	0.32	1.32	6.45	1.36	7.26

^a Calculations were carried out using the B3LYP/6-311 þ G(2d,p)//M06-2X/6-31 þ G(d,p) level of theory.

^b MAE: mean absolute error.
^c en: epoxide derived from 7.

Table 3
DP4 analysis of ¹H and ¹³C NMR data for epoxide 9.

Candidate product structure	DP4 probability (%) ^a after assignment	
	¹³ C	¹ H
en1	100	100
en2	0.0	0.0
en3	0.0	0.0
en4	0.0	0.0

^a Calculations were carried out using the B3LYP/6-31G(d,p)//Molecular mechanic level of theory.

The spectra ex1, ex2, ex3, and ex4 were also assembled in MestreNova using the chemical shifts calculated at B3LYP/6-311 þ G(2d,p)//M06-2X/6-31 þ G(d,p) level of theory. The closest visual match of the experimental spectrum can be made to the calculated ¹H NMR spectrum of candidate structure ex3 (Supplementary Material, Fig. S17). However, similar to the epoxide 9, it is difficult to visually match the experimental and calculated ¹³C NMR spectra (Supplementary Material, Fig. S18).

The ¹³C and ¹H NMR chemical shifts were calculated at B3LYP/6-311 þ G(2d,p)//M06-2X/6-31 þ G(d,p) level of theory for ex1, ex2, ex3, and ex4 candidate structures (Table 5). The average of the differences between the calculated and the experimental chemical shifts afforded the MAE. The MAE for the candidate structure ex3 was 0.14 and 1.34 for both hydrogen and carbon respectively, while for ex1, ex2, and ex4 the MAE values were larger, as presented in Table 5. Therefore the structure and stereochemistry of epoxide 10 was confirmed by MAE analysis as being ex3.

The calculated ¹H and ¹³C NMR chemical shifts at B3LYP/6-31G(d,p) level of theory for ex1, ex2, ex3, and ex4 candidate structures were aligned and transferred to the web applet at <http://www.jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>, which calculated the best match between the calculated and experimental data. The assignment of the signals by interpretation of the NMR spectra was done prior to the statistical analysis.

The calculated values of the candidate structure ex3 are much closer to the experimental data than candidate structure ex1, ex2, and ex4 with 98.8% probability. The DP4 probability results are presented in Table 6.

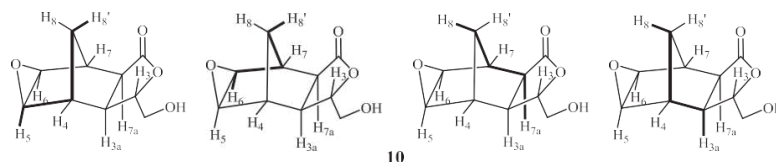


Fig. 2. Representation of the W coupling highlighted in bold for the epoxide 10.

Table 4
The experimental ¹H and ¹³C data, and COSY, NOESY, and HMBC correlations for epoxide 10.

Label	d	Label	d (m, J, n)	COSY	NOESY	HMBC
C1	177.5	e	e	e	e	H3a, H7, H7a
C3	84.0	H3	4.21 (q, J 2.2, 3.0 Hz, 1H)	H3a, H9, H9 ^δ	H3a, H4, H8 ^δ , H9, H9 ^δ	H4, H7a, H9
C3a	41.5	H3a	2.44 (d, J 8.1 Hz, 1H)	H3, H7, H7a, H8	H3, H5, H7a	H4, H5, H9
C4	42.5	H4	2.56 (m, 1H)	H5, H8, H8 ^δ	H3, H6, H8, H8 ^δ	H5, H7
C5	50.5	H5	3.16 (m, 1H)	H4, H8 ^δ	H3a, H4	H3a, H7, H8, H8 ^δ
C6	50.9	H6	3.23 (m, 1H)	H7, H8 ^δ	H7, H7a	H4, H7a
C7	41.6	H7	2.88 (m, 1H)	H3a, H6, H8, H8 ^δ	H6, H8, H8 ^δ	H5, H7a
C7a	47.0	H7a	2.71 (d, J 8.1 Hz, 1H)	H3a, H7, H8	H3a, H6	H4, H8, H8 ^δ
C8	21.8	H8	1.40 (d, J 11.1 Hz, 1H)	H3a, H4, H7, H7a, H8 ^δ	H4, H7, H8 ^δ	H3a, H7a
		H8 ^δ	0.87 (d, J 11.1 Hz, 1H)	H4, H5, H6, H7, H8	H3, H4, H7, H8	e
C9	64.2	H9	3.85 (d, J 12.3, 3.0 Hz, 1H)	H3, H9 ^δ	H3, OH, H9 ^δ	H3a
		H9 ^δ	3.63 (dd, J 12.3, 3.3 Hz, 1H)	H3, H9	H3, OH, H9	e

d: experimental chemical shifts (ppm); m: multiplicities; J: coupling constants; n: number of hydrogens.

Table 5
The calculated ¹H and ¹³C chemical shifts for candidate structures ex1, ex2, ex3, and ex4 for MAE^a analyses.

		Calc. d _H				Calc. d _C				jDd _H				jDdc _j			
H	C	ex1 ^b	ex2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4	ex1	ex2	ex3	ex4
H3	C1	4.44	4.45	4.02	3.99	176.62	178.16	177.12	178.74	0.24	0.24	0.19	0.22	0.85	0.70	0.36	1.26
H3a	C3	2.39	2.62	2.50	2.48	79.83	79.80	82.34	83.09	0.05	0.19	0.06	0.04	4.14	4.16	1.62	0.87
H4	C3a	2.60	2.43	2.32	2.17	42.74	41.17	44.06	42.11	0.03	0.13	0.24	0.39	1.21	0.36	2.53	0.58
H5	C4	2.87	3.34	2.93	3.34	39.57	40.07	44.36	44.67	0.29	0.18	0.23	0.18	2.96	2.46	1.83	2.14
H6	C5	3.00	3.41	3.01	3.42	49.53	57.83	49.02	57.02	0.23	0.18	0.22	0.19	0.95	7.35	1.46	6.77
H7	C6	2.67	2.52	2.64	2.50	49.65	57.47	49.52	57.33	0.22	0.37	0.24	0.38	1.20	6.62	1.33	6.48
H7a	C7a	2.75	2.83	2.65	2.75	43.54	43.96	43.71	44.18	0.05	0.12	0.06	0.05	1.90	2.32	2.07	2.54
H8	C7a	1.35	2.03	1.36	2.05	48.75	47.51	48.77	47.41	0.05	0.63	0.04	0.65	1.71	0.47	1.73	0.36
H8 ^δ	C8	0.93	1.72	0.97	1.77	23.24	46.94	21.80	45.34	0.06	0.85	0.10	0.90	1.45	25.15	0.01	23.55
H9	C9	3.70	3.66	3.77	3.70	60.93	61.01	63.70	64.32	0.15	0.18	0.08	0.15	3.25	3.17	0.48	0.13
H9 ^δ		3.83	3.80	3.58	3.53					0.20	0.17	0.05	0.10				
									MAE	0.14	0.29	0.14	0.29	1.96	5.28	1.34	4.47

^a Calculations were carried out using the B3LYP/6-311 p G(2d,p)//M06-2X/6-31 p G(d,p) level of theory.

^a MAE: mean absolute error.

^b ex: epoxide derived from 8.

Table 6

DP4 analysis of H and C NMR data for epoxide 10.

Candidate product structure	DP4 probability (%) ^a after assignment	
	¹³ C	¹ H
ex1	1.2	
ex2	0.0	
ex3	98.8	
ex4	0.0	

^a Calculations were carried out using the B3LYP/6-31G(d,p)//Molecular mechanic level of theory.

1. Conclusion

The structures of two novel epoxides were determined as being (1*aR*,2*R*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*S*,6*aS*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (9) and (1*aS*,2*S*,2*aR*,5*S*,5*aS*,6*R*,6*aR*)-5-(hydroxymethyl)hexahydro-2,6-methanooxireno[2,3-*f*]isobenzofuran-3(1*aH*)-one (10). The relative and absolute configurations of the epoxides (9) and (10) were defined via the enantioselective syntheses from the chiral starting material associated with NMR analyses and DFT calculations.

Acknowledgements

We are grateful to FAPEMIG, CNPq, CAPES, and RQ-MG for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.050>.

References

- [1] X.-P. Chen, W. Li, X.-F. Xiao, L.-L. Zhang, C.-X. Liu, Phytochemical and pharmacological studies on *Radix Angelica sinensis*, *Chin. J. Nat. Med.* 11 (2014) 577-587, <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2013.00577>.
- [2] G.C. Resende, E.S. Alvarenga, J.C.G. Galindo, F.A. Macias, Synthesis and phytotoxicity of 4,5 functionalized tetrahydrofuran-2-ones, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 2266-2270, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012001200016>.
- [3] F.C. Moraes, E.S. Alvarenga, K.B. Amorim, A.J. Demuner, M.E. Pereira-Flores, Novel platensimycin derivatives with herbicidal activity, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 580-584, <https://doi.org/10.1002/ps.4028>.
- [4] M.G. Teixeira, E.S. Alvarenga, M.F. Pimentel, M.C. Picanço, Synthesis and insecticidal activity of lactones derived from furan-2(5H)-one, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 2279-2289, <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150217>.
- [5] Y. Guo, H. Qu, X. Zhi, X. Yu, C. Yang, H. Xu, Semisynthesis and insecticidal activity of some fraxinellone derivatives modified in the B Ring, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 11937-11944, <https://doi.org/10.1021/jf404195m>.
- [6] X. Kuang, Y.-S. Chen, L.-F. Wang, Y.-J. Li, K. Liu, M.-X. Zhang, L.-J. Li, C. Chen, Q. He, Y. Wang, J.-R. Du, Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model, *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 169-178, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.019>.
- [7] J.M. Oliveira, J.C.R. Freitas, J.V. Comasseto, P.H. Menezes, Synthesis of substituted α,β -unsaturated δ -lactones from vinyl tellurides, *Tetrahedron* 67 (2011) 3003-3009, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.02.029>.
- [8] M. Sardan, S. Sezer, A. Günel, M. Akkaya, C. Tanyeli, Synthesis and biological evaluation of optically active conjugated γ - and δ -lactone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5814-5818, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.090>.
- [9] L. Pehlivan, M. Jacolot, N. Coia, N. Monteiro, D. Bouyssi, G. Balme, Synthesis of stereodefined fused δ -hydroxy- γ -lactones from dealkylative cyclization of

- epoxy-diester, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 4716-4719, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.06.106>.
- [1] A.E. Taggi, J. Meinwald, F.C. Schroeder, A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 10364-10369, <https://doi.org/10.1021/ja047416n>.
- [2] K.C. Nicolaou, S.A. Snyder, Chasing molecules that were never there: misassigned natural products and the role of chemical synthesis in modern structure elucidation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 1012-1044, <https://doi.org/10.1002/anie.200460864>.
- [3] P. Tihinen, A. Bagno, K.D. Klika, K. Pihlaja, Modeling NMR parameters by DFT methods as an aid to the conformational analysis of cis-fused 7a(8a)-methyl octa(hexa)hydrocyclopenta[d][1,3]oxazines and [3,1]benzoxazines, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 4609-4618, <https://doi.org/10.1021/ja021237t>.
- [4] G. Bifulco, P. Dambrosio, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods, *Chem. Rev.* **107** (2007) 3744-3779, <https://doi.org/10.1021/cr030733c>.
- [5] G. Barone, L. Gomez-Paloma, D. Duca, A. Silvestri, R. Riccio, G. Bifulco, Structure validation of natural products by quantum-mechanical GIAO calculations of ¹³C NMR chemical shifts GIAO gauge including atomic orbitals, *Chem. Eur. J.* **8** (2002) 3233, [https://doi.org/10.1002/1522-3765\(20020715\)8:14<3233::AID-CHEM3233>3.0.CO;2#0](https://doi.org/10.1002/1522-3765(20020715)8:14<3233::AID-CHEM3233>3.0.CO;2#0).
- [6] C. Tai, P. Yeh, Y. Wu, T. Shih, B. Wang, Theoretical investigation of conformational stabilities and ¹³C NMR chemical shifts of a seven-membered ring thiosugar, (3R,4R,5R,7S)-7-(hydroxymethyl)thiopyran-3,4,5-triol, *J. Mol. Struct.* **1068** (2014) 84-93, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.070>.
- [7] L. Zhang, S.-Q. Wang, X.-J. Li, A.-L. Zhang, Q. Zhang, J.-M. Gao, New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a Phoma endophyte, *J. Mol. Struct.* **1016** (2012) 72-75, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.02.041>.
- [8] M.G. Teixeira, E.S. Alvarenga, Characterization of novel isobenzofuranones by DFT calculations and 2D NMR analysis, *Magn. Reson. Chem.* **54** (2016) 623-631, <https://doi.org/10.1002/mrc.4411>.
- [9] G. da Costa Resende, E.S. Alvarenga, Structural elucidation of dioxo-cage compounds from tetrahydroisobenzofuran-1(3H)-one: analysis of NMR data and GIAO chemical shifts calculations, *Magn. Reson. Chem.* **54** (2016) 968-974, <https://doi.org/10.1002/mrc.4483>.
- [10] R.P. Oliveira, A.J. Demuner, E.S. Alvarenga, L.C.A. Barbosa, T. de Melo Silva, A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT calculations, *J. Mol. Struct.* **1152** (2018) 337-343, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.065>.
- [11] S.G. Smith, R.S. Paton, J.W. Burton, J.M. Goodman, Stereostructure assignment of flexible five-membered rings by GIAO ¹³C NMR calculations: prediction of the stereochemistry of elatényne, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 4053-4062, <https://doi.org/10.1021/jo8003138>.
- [12] S.G. Smith, J.M. Goodman, Assigning the stereochemistry of pairs of diastereoisomers using GIAO NMR shift calculation, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 4597-4607, <https://doi.org/10.1021/jo900408d>.
- [13] S.G. Brown, M.J. Jansma, T.R. Hoye, Case study of empirical and computational chemical shift analyses: reassignment of the relative configuration of phomopsichalasin to that of diaphorhichalasin, *J. Nat. Prod.* **75** (2012) 1326-1331, <https://doi.org/10.1021/np300248w>.
- [14] R.P. Oliveira, A.J. Demuner, E.S. Alvarenga, M.C. Parma, L.C. de Almeida Barbosa, L. de Moura Guimaraes, A.R. Aguiar, Experimental and theoretical studies on the characterization of monocrotaline by infrared and Raman spectroscopies, *J. Mol. Struct.* **1135** (2017) 228-233, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.01.050>.
- [15] John A. Mann, Neil K. Partlett, Thomas, A practical synthesis of (S)-5-hydroxymethylfuran-2(5H)-one from 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-D-mannose, *J. Chem. Res.* (1987) 369.
- [16] R. Casas, T. Parella, V. Branchadell, A. Oliva, R.M. Ortuno, A. Guingant, Diastereofacial selectivity in uncatalyzed Diels-Alder cycloadditions involving α,β-unsaturated esters and lactones with stereogenic centers containing oxygen functionalities, *Tetrahedron* **48** (1992) 2659-2680, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88527-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88527-6).
- [17] E.S. De Alvarenga, W.A. Saliba, B.G. Milagres, Montagem de câmara com lâmpada de ultravioleta de baixo custo, *Quim. Nova* **28** (2005) 927-928, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500034>.
- [18] M.W. Lodewyk, M.R. Siebert, D.J. Tantillo, Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry, *Chem. Rev.* **112** (2012) 1839-1862, <https://doi.org/10.1021/cr200106v>.
- [19] P.H. Willoughby, M.J. Jansma, T.R. Hoye, A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts, *Nat. Protoc.* **9** (2014) 643-660, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.042>.
- [20] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, J. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian '09, Revision D.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [21] M.W. Lodewyk, M.R. Siebert, D.J. Tantillo, Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry, *Chem. Rev.* **112** (2012) 1839-1862, <https://doi.org/10.1021/cr200106v>.
- [22] W.A. Alvarenga, E.S. Carneiro, V.M.T. Silvério, F.O. Saliba, A high yield synthesis of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-D-mannitol, *J. Chil. Chem. Soc.* **51** (2006) 986-988, <https://doi.org/10.4067/S0717-9702006000300013>.
- [23] E.S. de Alvarenga, J. Mann, Photocatalysed addition of pyrrolidines to butenolides: a concise synthesis of the pyrrolizidine alkaloid ring system, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1993) 2141, <https://doi.org/10.1039/p19930002141>.
- [24] B. Ochiai, T. Hirano, Facile synthesis of glycidates via oxidation of acrylates with aqueous solution of NaOCl in the presence of ammonium salts, *Heterocycles* **89** (2014) 487, <https://doi.org/10.3987/COM-13-12895>.
- [25] S.G. Smith, J.M. Goodman, Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 12946-12959, <https://doi.org/10.1021/ja105035r>.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE DOS DERIVADOS DE IZOBENZOFURANONAS A PARTIR DO D-MANITOL

3.1. INTRODUÇÃO

A tirosinase é uma metaloenzima contendo cobre e é amplamente distribuída na natureza entre plantas, animais e micro-organismos. É a enzima chave na produção do pigmento polimérico melanina (MATSUURA *et al.*, 2006; SCHALLREUTER *et al.*, 2009). Na rota biossintética da melanina, as duas primeiras etapas são catalisadas pela tirosinase, ocorrendo a hidroxilação da L-tirosina para L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que é posteriormente oxidada a *orto*-quinona (dopaquinona) (PARVEEN *et al.*, 2010; HEARING, 2011). A dopaquinona será transformada posteriormente através de várias reações para produzir a melanina (ASHRAF *et al.*, 2015). Os primeiros relatos sobre a ação catalítica da tirosinase foram obtidos a partir de extratos de cogumelos, os quais são utilizados até hoje como fonte dessa enzima (HEARING, 2011).

A tirosinase é a principal enzima responsável pela produção da melanina, um importante pigmento biológico que confere proteção contra a irradiação ultravioleta (RAMSDEN e RILEY, 2014). A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, sendo assim, a cor da pele humana é determinada pela quantidade de melanina presente nas células da pele (YI *et al.*, 2010; SAED *et al.*, 2017).

Ainda que a melanina tenha principalmente função de fotoproteção na pele humana, a superprodução ou acumulação anormal de melanina pode levar à distúrbios de hiperpigmentação da pele, incluindo o melanoma (SMIT *et al.*, 2009; RESZKO *et al.*, 2009). Melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele originado nos melanócitos, que são células epiteliais onde é produzido o pigmento melanina. Apesar de representar apenas 3% das neoplasias malignas da pele, o melanoma possui alta probabilidade de sofrer metástase (INCA, 2018), que é a propagação do tumor de seu local de origem para outras partes do corpo, constituindo o maior problema no campo do câncer (KHANNA e HUNTER, 2005).

A atividade da tirosinase também é responsável pelo escurecimento dos alimentos o que não é desejável à indústria agrícola (SEO *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2003)

Diversos inibidores da enzima tirosinase são encontrados na literatura, os quais podem ser obtidos de maneira sintética ou de ocorrência natural, incluindo o ácido kójico, a arbutina, o ácido ascórbico e a hidroquinona (Figura 1). Dentre estes, o ácido kójico é o mais utilizado como controle positivo na avaliação de novos compostos inibidores (SAED *et al.*, 2017).

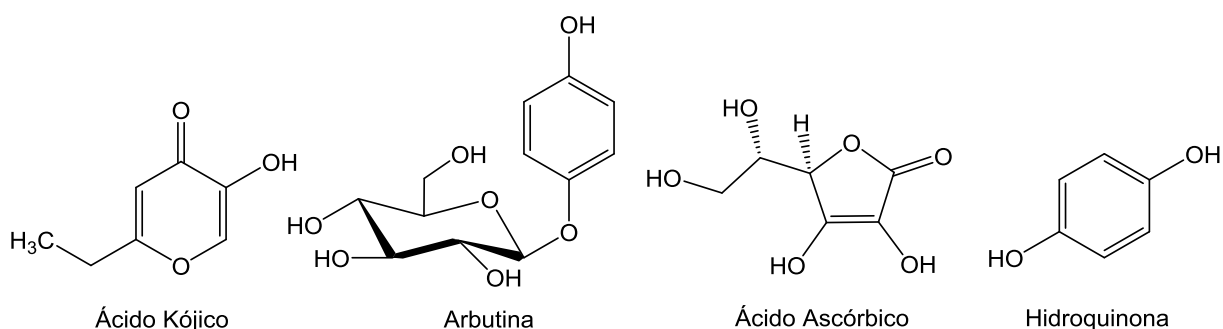


Figura 1: Estruturas de alguns inibidores da enzima tirosinase.

Entretanto, a maioria destes inibidores não apresenta atividade inibitória suficiente para uso ou ainda não cumprem os regulamentos de biossegurança, como citotoxicidade, estabilidade e seletividade para serem utilizados em medicamentos e cosméticos (SEO *et al.*, 2003; BAE *et al.*, 2003). Por isso, continua sendo necessário o desenvolvimento de compostos que demonstrem atividades seguras e potentes e que causam menos efeitos colaterais (BAE *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2006).

Variadas fontes de obtenção de inibidores da tirosinase são estudadas, dentre elas, o ambiente marinho, que possui uma grande diversidade biológica e química que fornecem compostos químicos com alto potencial de aplicação industrial, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos (AGRAWAL *et al.*, 2018). O composto 6-[(*E*)-Hept-1-enil]- α -pirona (I) (Figura 2) foi isolado a partir do fungo *Botrytis* sp. e exibiu maior inibição da atividade da tirosinase comparado ao o valor obtido com a utilização do ácido kójico (ZHANG *et al.*, 2007). Mais ainda, dois novos sesquiterpenos 1 β ,5 α ,6 α ,14-tetraacetoxi-9 α -benzoiloxi-7 β H-eudesman-2 β ,11-diol (II) e o 4 α ,5 α -diacetoxi-

9 α -benzoiloxi-7 β H-eudesman-1 β ,2 β ,11,14-tetraol (III) foram isolados a partir do *Pestalotiopsis* sp. Z233 obtido da alga *Sargassum horneri* (Figura 2). Estes compostos apresentaram atividade inibitória da tirosinase com IC₅₀ 14,8 μ M e 22,3 μ M, respectivamente (WU *et al.*, 2013).

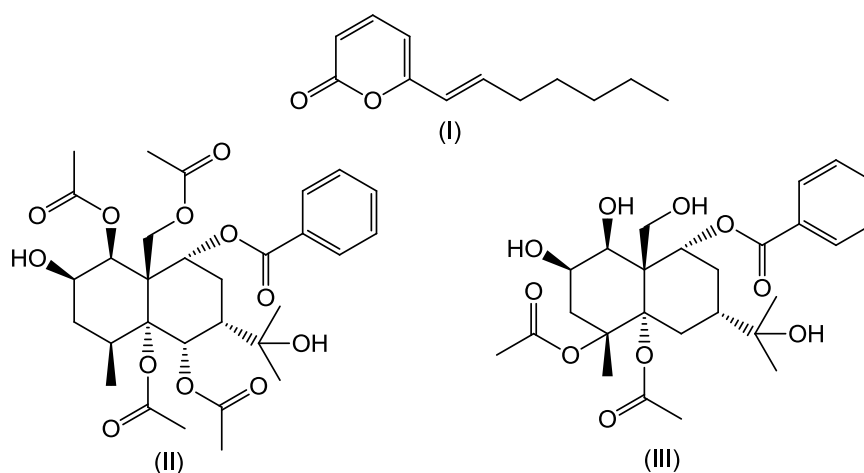


Figura 2: Inibidores de tirosinase isolados a partir de espécies de fungos marinhos.

Ohguchi e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de lactonas sesquiterpênicas isoladas da planta *Calea urticifolia* (Asteraceae) na melanogênese em células de melanoma B16. O tratamento das células com a 2,3-epoxijuanislamina (IV) (Figura 3) provocou reduções significativas na biossíntese de melanina. Um outro estudo desenvolvido por Lee e colaboradores (2007) estudou a capacidade de despigmentação causada pela 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (V) e mostrou que essa furanona inibiu a melanogênese de células de melanoma B16.

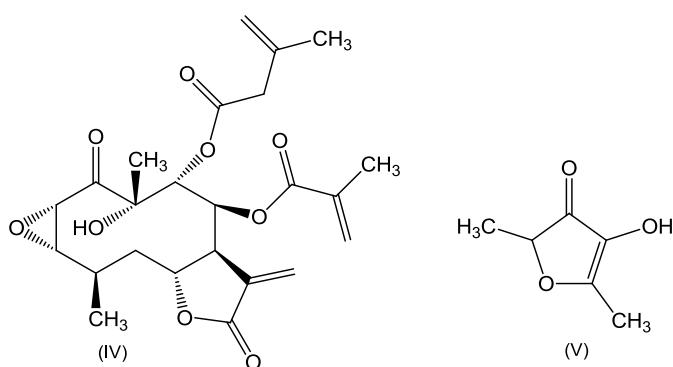


Figura 3: Lactonas que demonstraram atividade na inibição da tirosinase.

Assim, a inibição constitui uma importante ação para o desenvolvimento de despigmentantes dirigido por enzimas (RAMSDEN e RILEY, 2014). Por essa razão, o presente trabalho visou avaliar o efeito dos compostos sintetizados demonstrados no Capítulo 1 como inibidores da enzima tirosinase. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Ensaios inibição da tirosinase de cogumelo

A atividade da tirosinase foi determinada adicionando-se a uma microplaca de 96 poços: 80 μL de solução aquosa do tampão fosfato (66,67 mM) no pH = 6,8, 40 μL de solução do composto a ser testado (512 μM), 40 μL de solução de substrato (*L*-DOPA ou *L*-tirosina/ Sigma Aldrich) (0,1 mM), 40 μL solução aquosa de tirosinase de cogumelo (50 unidades de atividade por mL; Sigma Aldrich) totalizando 200 μL de volume final da solução (KHATIB *et al.*, 2005; KUBO *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 1998). Os 20 compostos avaliados estão mostrados na Figura 4 (p. 211).

A reação de conversão do substrato (*L*-tirosina ou *L*-DOPA) em dopaquinona, logo após a adição da tirosinase de cogumelo, foi monitorada a cada 16 segundos durante 30 minutos através da medida de absorbância no comprimento de onda de 495 nm (KHATIB *et al.*, 2005; KUBO *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 1998). Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro UV/VIS de microcroplacas MultiskanTM GO (Thermo Scientific).

Os experimentos foram realizados em triplicatas e empregou-se um inibidor conhecido na literatura, o ácido kójico, como controle positivo nos ensaios. Os compostos testados foram previamente solubilizados em DMSO e ao serem adicionados aos poços, a concentração de DMSO na solução final foi igual a 10% (v/v). O controle negativo (branco) continha apenas o substrato (*L*-DOPA ou *L*-tirosina), a solução do tampão fosfato, a solução da enzima tirosinase e 10% (v/v) de DMSO. Para o cálculo da porcentagem de atividade, utilizou-se o $t(1/2)$ (metade do tempo para alcançar a atividade máxima da enzima).

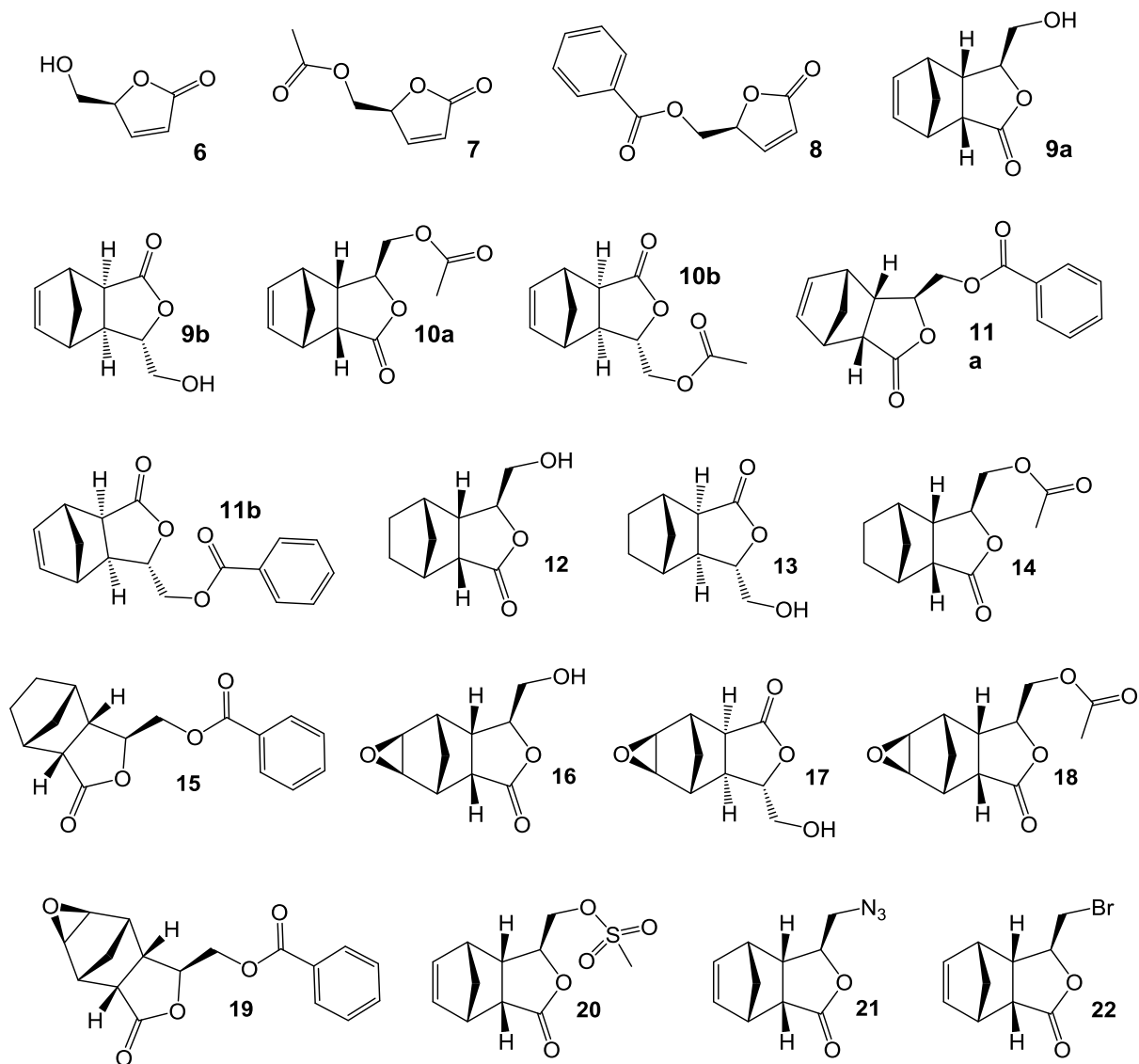


Figura 4: Estrutura química dos compostos avaliados no ensaio de inibição da enzima tirosinase.

Para os compostos que apresentaram atividade de inibição para os dois substratos (*L*-DOPA e *L*-tirosina) superior a 50%, repetiu-se o ensaio com a *L*-tirosina como substrato variando as concentrações testadas com o objetivo de determinar o valor de IC_{50} (FIGUEROA *et al.*, 2015). Sendo assim, foram avaliadas as seguintes concentrações: 512 μ M, 256 μ M, 128 μ M, 64 μ M, 32 μ M, 16 μ M e 8 μ M, tanto para o benzoato de (*S*)-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)metila (**8**) quanto para o benzoato de ((1*S*,3*a*R,4*R*,7*S*,7*a*S)-3-oxo-1,3,3*a*,4,7,7*a*-hexahidro-4,7-metanoiso- benzofuran-1-il)metila (**11b**). Para

estes compostos também foram feitos ensaios de viabilidade celular e a determinação do teor de melanina em células de melanoma B16F10.

3.2.3 Cultivo da linhagem tumoral B16F10

As células de melanoma B16F10 foram cultivadas em garrafas de cultivo celular, com meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), 11ml/L de tampão HEPES, 10mL/L de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (GIBCO, CAT 15140148, USA). Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram desprendidas das garrafas de cultivo por meio da exposição à tripsina (3mL) por 10 minutos, coletadas em tubos de 15 mL, centrifugadas a 1500 rpm por 6 minutos, ressuspensas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (AKABERIA *et al.*, 2018, ZAIDI *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2017).

3.2.4 Ensaios de viabilidade celular

As células de melanoma B16F10 foram plaqueadas em 96 poços a uma concentração de $1,0 \times 10^4$ células por poço. As células foram deixadas crescendo durante 24 h e depois tratadas com 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M dos compostos (**8**) e (**11b**). Após 48 h de tratamento, a viabilidade celular foi determinada por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A solução de MTT foi adicionada a cada poço (concentração final, 5 mg/mL) e a placa foi incubada durante 3 h. Finalmente, 100 μ l de DMSO foram adicionados a cada poço e a absorbância foi medida num leitor de placas (Sinergy HT, Biotek) a 540 nm. Os testes foram realizados em triplicatas e os dados expressos como a média \pm desvio padrão dos experimentos (AKABERIA *et al.*, 2018, ZAIDI *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2017).

3.2.5 Determinação do teor de melanina

As células de melanoma B16F10 foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células por poço em placas de cultura de 6 poços. As células foram deixadas crescendo durante 24 h e depois tratadas com 50 μM e 100 μM dos compostos (**8**) e (**11b**) e com solução do controle negativo, DMSO (0,4% v/v). Após 24 h de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) e colhidas por tripsinização. Em seguida, a melanina foi dissolvida em NaOH 1M durante 1 h a 80 °C. A absorbância foi medida a 405 nm e o conteúdo de melanina foi comparado com o controle (DMSO), sendo considerado o teor de melanina de 100% das células no controle. Os testes foram realizados em triplicatas e os dados expressos como a média \pm desvio padrão dos experimentos (AKABERIA *et al.*, 2018, ZAIDI *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2017).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Ensaios inibição da tirosinase de cogumelo

Todos os compostos sintetizados no Capítulo 1 foram testados quanto a sua porcentagem de inibição da atividade da enzima tirosinase. A tirosinase comercial de cogumelo, modelo *in vitro* da tirosinase humana, é frequentemente utilizada para a busca de novos agentes anti-escurecimento da pele isolados de fontes naturais e sintetizados (NEELEY *et al.*, 2009).

O ácido kójico, agente natural obtido a partir do fungo *Aspergillus oryzae*, é utilizado como despigmentante já que age inibindo a atividade da enzima tirosinase, e conseqüentemente, inibindo a formação da melanina (CABANES *et al.*, 1994). Esse inibidor foi utilizado como controle positivo para avaliar o potencial de inibição dos compostos sintetizados sobre a enzima tirosinase.

Diante disso, todos os 20 compostos foram testados e comparados frente ao controle positivo na concentração final de 512 μM , entretanto, o benzoato de ((1S,3aR,4R,7S,7aS)-3-oxooctahidro-4,7metanoisobenzofuran-1-

il)metila (**15**) precipitou nas condições reacionais do teste, não sendo possível ter sua atividade de inibição confirmada.

Os substratos utilizados no teste foram a *L*-tirosina e o *L*-DOPA, uma vez que na biossíntese da melanina, a tirosinase catalisa a reação de conversão da tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e posteriormente catalisa a oxidação da DOPA em dopaquinona (TAN *et al.*, 2016).

Porcentagens de inibição da enzima tirosinase acima de 50% utilizando o substrato *L*-tirosina foram observadas para os compostos **6**, **7**, **8**, **10a**, **10b**, **11b**, **12**, **13**, **17**, **20**, **21** e **22** com porcentagem de inibição igual a 55,8±4,8, 54,6±1,3, 88,3±1,6, 55,1±0,6, 56,0±1,8, 88,1±2,5, 57,0±1,4, 54,6±0,9, 61,6±1,8, 55,9±3,0, 51,0±1,8, 55,1±1,8, respectivamente. O ácido kójico apresentou atividade inibidora da tirosinase de 97,7±0,6 (Tabela 1, p. 215).

Ao ser avaliada a atividade de inibição da tirosinase usando o *L*-DOPA como substrato apenas dois compostos apresentaram porcentagens de inibição superior a 50%, sendo obtidos os valores de inibição de 61,2±1,9 para a substância **8** e 64,0±3,8 para a substância **11b**. Nessas condições o ácido kójico apresentou porcentagem de inibição igual a 97,6±1,1 (Tabela 1, p. 215).

Tabela 1: Porcentagens de inibição da tirosinase e desvios padrão obtidos para os compostos testados na concentração de 512 μ M usando os substratos *L*-tirosina e *L*-DOPA

Compostos	%Inibição <i>L</i>-tirosina	%Inibição <i>L</i>-DOPA
6	55,8 \pm 4,8	27,8 \pm 4,3
7	54,6 \pm 1,3	38,6 \pm 1,5
8	88,3 \pm 1,6	61,2 \pm 1,9
9a	48,8 \pm 1,8	30,5 \pm 3,3
9b	49,9 \pm 2,6	31,2 \pm 2,5
10a	55,1 \pm 0,6	31,9 \pm 2,0
10b	56,0 \pm 1,8	33,2 \pm 2,8
11a	39,3 \pm 3,9	41,6 \pm 4,3
11b	88,1 \pm 2,5	64,0 \pm 3,8
12	57,0 \pm 1,4	32,4 \pm 2,4
13	54,6 \pm 0,9	36,6 \pm 3,5
14	48,1 \pm 1,5	36,1 \pm 2,2
16	43,9 \pm 3,9	33,3 \pm 2,1
17	61,6 \pm 1,8	30,4 \pm 2,7
18	42,0 \pm 2,3	37,4 \pm 2,2
19	47,3 \pm 0,6	35,1 \pm 4,2
20	55,9 \pm 3,0	36,8 \pm 4,6
21	51,0 \pm 1,8	28,8 \pm 1,6
22	55,1 \pm 1,8	32,7 \pm 0,8
ácido kójico	97,7 \pm 0,6	97,6 \pm 1,1

Comparando-se os valores de inibição entre os dienófilos e os cicloadutos quando utilizado o substrato *L*-tirosina (Figura 5), pode-se perceber que a reação de Diels Alder, para obtenção dos produtos *endo* e *exo*, não foi favorável ao aumento de porcentagem de inibição da enzima tirosinase se tratando dos cicloadutos **9a** e **9b**, os quais são derivados da lactona **6**. Nos cicloadutos **10a** e **10b** a porcentagem de inibição foi mantida, comparando-se com o butenólídeo **7**. Já o dienófilo **8** apresentou alta porcentagem de inibição que foi mantida pelo cicloaduto **11b**, aduto *exo* derivado da reação entre o dienófilo **8** e o ciclopentadieno, no entanto, a substância **11a** (cicloaduto *endo*) dessa mesma reação apresentou uma queda de 2,25 vezes na porcentagem de inibição.

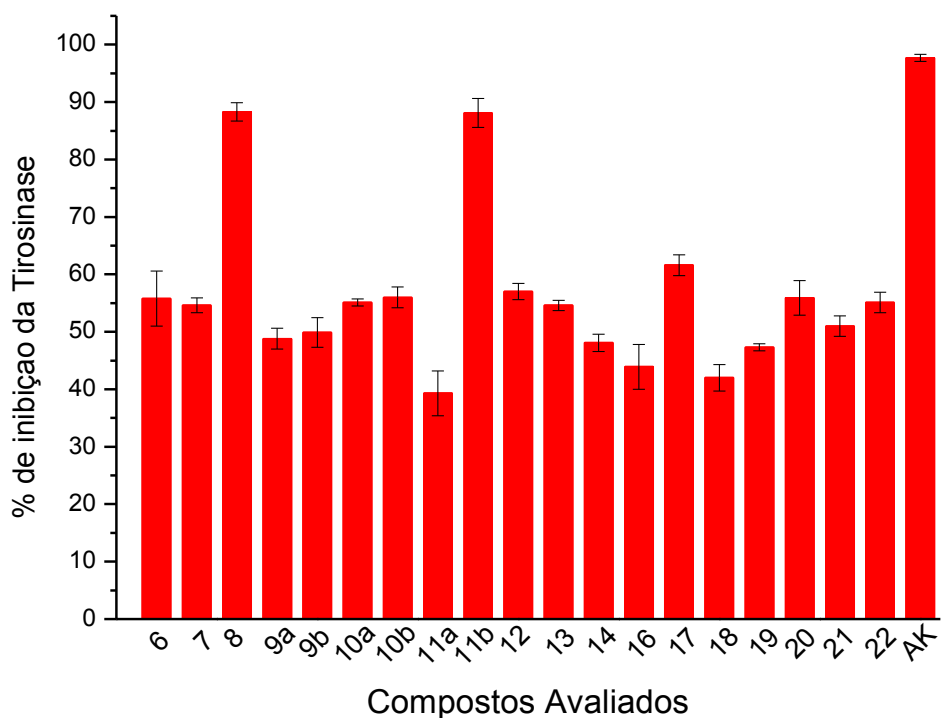


Figura 5: Porcentagens de inibição dos compostos testados na concentração de 512 μ M usando a *L*-tirosina como substrato e o ácido kójico (AK) como padrão positivo testado na concentração de 512 μ M.

Tratando-se da utilização do substrato *L*-tirosina (Figura 5, p. 216) e das modificações estruturais realizadas nos compostos, a conversão do grupo hidroxila presente na lactona **6** ao grupo benzoíla para obtenção da lactona **8**

foi bastante satisfatória para o aumento da atividade de inibição, visto que **8** é 1,6 vezes mais ativa que **6**.

Kubo e colaboradores (2003) estudaram a atividade de diferentes benzoatos hidroxilados e observaram que o ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico) apresentou-se como um inibidor da enzima tirosinase. Posteriormente, Kang *et al.* (2003) concluíram que a inibição do ácido gálico é comparável à atividade exibida pela hidroquinona.

A partir do cicloaduto **9a** foram obtidos os compostos **12**, **16**, **20**, **21** e **22**, enquanto que a partir do cicloaduto **9b** foram obtidos os compostos **13** e **17**. Pode-se perceber que o aumento da porcentagem de inibição foi inferior a 20% para os compostos **12**, **13**, **20**, **21** e **22** comparadas à porcentagem de seu precursor.

Uma mesma modificação estrutural causou variação na porcentagem de inibição diferente para os compostos derivados da reação de epoxidação de **9a** e **9b**. Para o epóxido **16** houve uma queda de 10% no valor de inibição comparado à inibição causada pelo material de partida **9a**, contudo, para o epóxido **17** foi observado um aumento de 23,4% na porcentagem de inibição comparado ao valor de inibição exibido pelo material de partida **9b**.

Os produtos **14** e **18** isolados a partir das reações de hidrogenação catalítica e epoxidação do cicloaduto **10a**, respectivamente, tiveram a porcentagem de inibição diminuída comparada ao material de partida. Nesse caso, há um indicativo de que a presença da dupla ligação nesses compostos é importante para o aumento da porcentagem de inibição da enzima tirosinase. Esse efeito da presença da ligação dupla não foi observado para o cicloaduto **11a**, visto que seu derivado epoxidado **19** apresentou um aumento de 20% na sua capacidade inibitória da enzima testada.

Quando utilizado o substrato *L*-DOPA, pode-se notar que os compostos foram pouco inibitórios visto que apresentaram porcentagem de inibição inferior a 50%, exceto os compostos **8** e **11b**, que apresentaram percentuais de inibição igual a 61,2% e 64,0%, respectivamente (Figura 6, p. 218).

A porcentagem de inibição foi praticamente mantida comparando-se o efeito inibitório causado pela lactona **8** e o composto **11b**, produto *exo* da reação de Diels Alder. Já o cicloaduto **11a**, produto *endo* da reação de Diels

Alder, foi 1,47 vezes menos inibidor da atividade da enzima tirosinase que o dienófilo **8**.

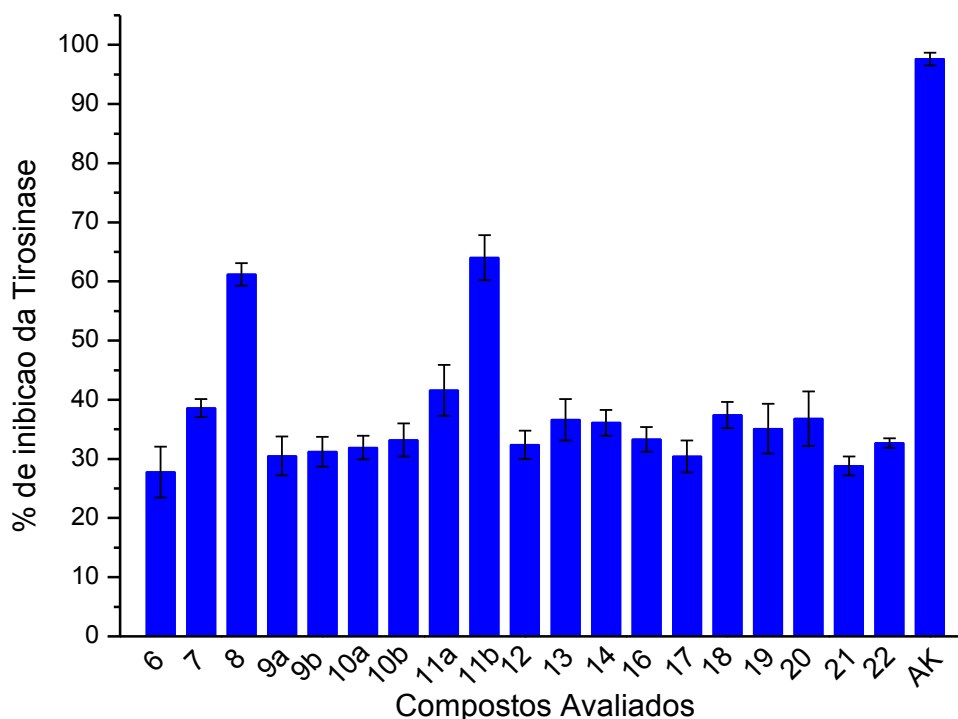


Figura 6: Porcentagens de inibição dos compostos testados na concentração de 512 µM usando o *L*-DOPA como substrato e o ácido kójico (AK) como padrão positivo testado na concentração de 512 µM.

Os compostos **8** e **11b** apresentaram porcentagens de inibição superior a 50% tanto para a *L*-tirosina quanto para a *L*-DOPA como pode ser observado na Tabela 1, p. 215. Com a finalidade de estudar o perfil de inibição desses compostos, foram determinados os valores de IC_{50} que é a concentração necessária para inibir 50 % da atividade enzimática. Para isso, foram feitas diluições seriadas dos compostos com concentrações de 512 µM, 256 µM, 128 µM, 64 µM, 32 µM, 16 µM e 8 µM as quais foram avaliadas utilizando o substrato *L*-tirosina.

A concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática ocasionado pelo composto **8** foi $IC_{50} = 4,23 \mu\text{M}$ e para o cicloaduto **11b** o valor obtido foi $IC_{50} = 4,23 \mu\text{M}$, enquanto que ácido kójico apresentou $IC_{50} = 6,45 \mu\text{M}$ (Tabela 2, p. 219). Diante desses valores, pode-se observar que a substância **8**

é 1,52 vezes mais inibitória que o ácido kójico enquanto que a substância **11b** é 1,60 vezes mais inibitória se comparada com o mesmo ácido. Sendo assim, percebe-se que a reação de Diels Alder foi favorável, uma vez que o valor de IC₅₀ obtido para o cicloaduto *exo* (composto **11b**) foi inferior ao valor exibido pelo dienófilo **8**.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ calculados para os compostos **8** e **11b** e para o padrão positivo (ácido kójico).

Composto	IC ₅₀
8	4,23 ± 0,31
11b	4,03 ± 0,18
ácido kójico	6,45 ± 0,44

Visto que os compostos **8** e **11b** foram promissores quanto a inibição da enzima tirosinase, novos testes foram realizados com o intuito de investigar o efeito citotóxico dos compostos **8** e **11b** a nível celular.

A viabilidade celular, ou seja, a citotoxicidade dos compostos testados foi realizada utilizando-se células de melanoma B16F10. Para determinar a viabilidade celular, foi realizado um ensaio colorimétrico de proliferação celular utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para medição da atividade mitocondrial nas células viáveis. Este método baseia-se na conversão de cristais de MTT para MTT-formazan por uma enzima mitocondrial. A quantidade de MTT-formazan gerado pela atividade das desidrogenases nas células é diretamente proporcional ao número de células vivas presente em cada poço da placa de 96 poços (TADA *et al.*, 1986).

Os resultados mostrados na Figura 9 (p. 220) indicam que estes compostos não demonstraram efeito citotóxico significativo nas células de melanoma B16F10, nem mesmo nas concentrações mais elevadas testadas.

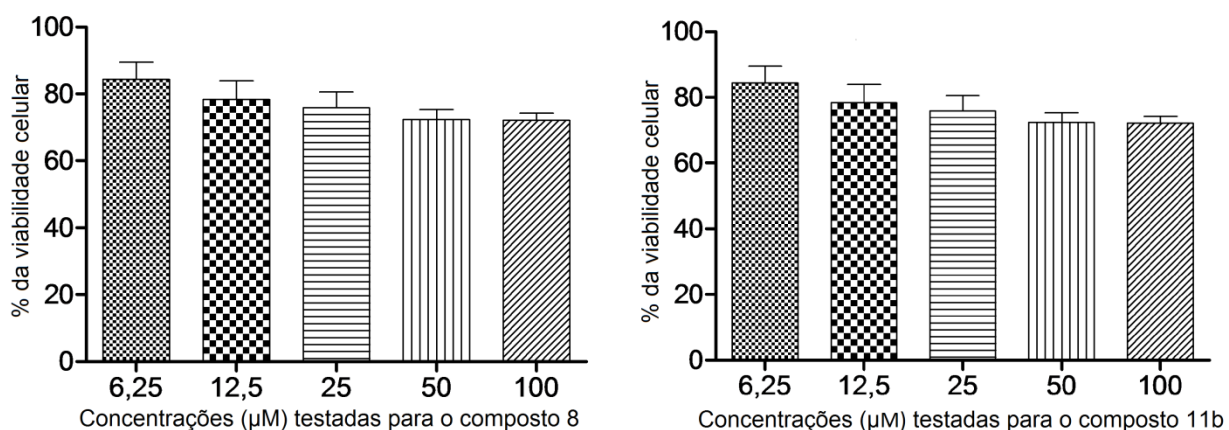


Figura 9: Efeito dos compostos na viabilidade de células de melanoma.

Posteriormente, foi feita a análise do teor de melanina nas células de melanoma B16F10. Para a triagem de efeitos antimelanogênicos, células B16F10 de melanoma murino são amplamente utilizadas, devido à relativa facilidade de cultura *in vitro* (CHANG, 2012).

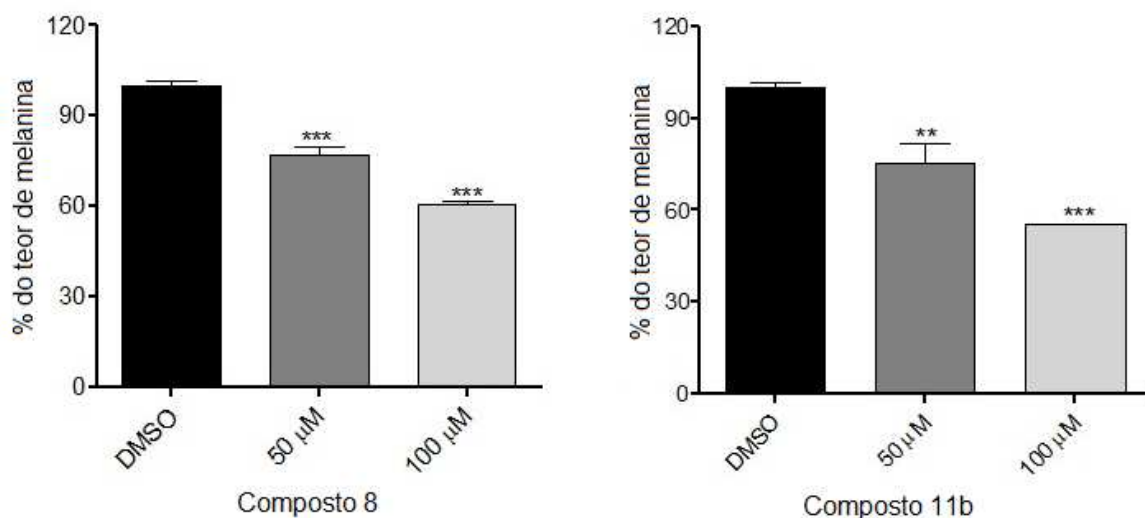


Figura 10: Efeito de compostos **8** e **11b** no teor de melanina de células de melanoma. ** P < 0,01 ou *** P < 0,001 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar uma diminuição no teor de melanina quando as células de melanoma B16F10 foram tratadas com solução dos compostos **8** e **11b**. O composto **8** numa concentração de 50 µM diminuiu o teor de melanina em 23% enquanto que na concentração de 100 µM

houve uma diminuição de 39%. Já a substância **11b** apresentou inibição no teor de melanina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, com porcentagens inibitórias de 25% e 45%, respectivamente. Com isso, pode-se observar que o aumento nas concentrações dos compostos ocasionou um aumento no efeito inibitório, diminuindo o teor de melanina no meio celular, demonstrando uma linearidade na dose-resposta do ensaio.

Portanto, os compostos avaliados **8** e **11b** demonstraram ser promissores como agentes despigmentantes da pele, uma vez que equilibraram baixa toxicidade e potente atividade inibitória do teor de melanina em células de melanoma B16F10.

3.4. CONCLUSÃO

Todos os 20 compostos sintetizados no Capítulo 1 foram testados quanto a sua porcentagem de inibição da atividade da enzima tirosinase utilizando como substratos *L*-tirosina e *L*-DOPA. Dentre os compostos avaliados, dois deles (**8** e **11b**) demonstraram ser promissores como agentes despigmentantes da pele, uma vez que apresentaram valores de IC₅₀ inferiores ao obtido para o ácido kójico, equilibraram baixa toxicidade e potente atividade inibitória do teor de melanina em células de melanoma B16F10.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWALA, S.; ADHOLEYAA, A.; BARROWB, C.; DESHMUKHA, S. Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals. **Phytochemistry Letters**, v. 23, p. 15-20, 2018.

AKABERIA, M.; EMAMIA S.A.; VATANIA, M.; TAYARANI-NAJARANC, Z. Evaluation of Antioxidant and Anti-Melanogenic Activity of Different Extracts of Aerial Parts of *N. Sintonisii* in Murine Melanoma B16F10 Cells. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 225-235, 2018.

ASHRAF, Z.; RAFIQ, M.; SEO, S.; BABAR, M.; ZAIDI, N. Design, synthesis and bioevaluation of novel umbelliferone analogues as potential mushroom tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 874-883, 2015.

BAE, S.; HA, Y.; KIM, J.; PARK, J.; HA, T.; PARK, D.; CHUN, P.; PARK, N.; MOON, H.; CHUNG, H. A Novel Synthesized Tyrosinase Inhibitor: (E)-2-((2,4-Dihydroxyphenyl)diazanyl)phenyl-4-Methylbenzenesulfonate as an Azo-Resveratrol Analog, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 65-72, 2013.

CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 982-985, 1994.

CHANG, T. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. **Materials**, v. 5, p. 1661-1685, 2012.

FIGUEROA, J.D.F.; FERREIRA, M.S.; PIRES, D.A.T. Evaluation of tetraketones and xanthenediones as tyrosinase inhibitors or activators. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1705-1718, 2015.

HEARING, V. Determination of melanin synthetic pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 8-11, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 15 de maio de 2018.

KANG, H.H.; RHO, H.S.; HWANG, J.S.; OH, S.G. Depigmenting activity and low cytotoxicity of alkoxy benzoates or alkoxy cinnamate in cultured melanocytes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 1085-1088, 2003.

KHAN, K.; MAHARVI, G.; KHAN, M.; SHAIKH, A.; PERVEEN, S.; BEGUMB, S., CHOUDHARYA, M. Tetraketones: A new class of tyrosinase inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 344-351, 2006.

KHANNA, C.; HUNTER, K. Modeling metastasis *in vivo*. **Carcinogenesis**, v. 26 (3), p. 513-523, 2005.

KHATIB, S.; NERYA, O.; MUSA, R.; SHMUEL, M.; TAMIRA, S.; VAYA, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 433-441, 2005.

KUBO, I.; CHEN, Q.; NIHEI, K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 241-247, 2003.

MATSUURA, R.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Tyrosinase Inhibitory Activity of Citrus Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2309-2313, 2006.

NEELEY, E.; FRITCH, G.; FULLER, A.; WOLFE, J.; WRIGHT, J.; FLURKEY, W. Variations in IC50 Values with Purity of Mushroom Tyrosinase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3811-3823, 2009.

OH, T.; YUN, J.; PARK, E.; KIM, Y.; LEE, Y.; LIM, J. Plumbagin Suppresses α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells by Inhibiting Tyrosinase Activity. **International Journal Molecular Sciences**, v. 18, p. 320-330, 2017.

OHGUCHI, K.; ITO, M.; YOKOYAMA, K.; IINUMA, M.; ITOH, T.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y. Effects of Sesquiterpene Lactones on Melanogenesis in Mouse B16 Melanoma Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 308-310, 2009.

PARVEEN, I.; THREADGILL, M.; MOORBY, J.; WINTERS, A. Oxidative phenols in forage crops containing polyphenol oxidase enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1371-1382, 2010.

RAMSDEN, C.; RILEY, P. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388-2395, 2014.

RESZKO, A.; BERSON, D.; LUPO, M. Cosmeceuticals: practical applications. **Dermatologic Clinics**, v. 27, p. 401-416, 2009.

SAEED, A.; MAHESAR, P.; CHANNAR, P.; ABBAS, Q.; LARIK, F.; HASSAN, M.; RAZA, H.; SEO, S. Synthesis, molecular docking studies of coumarinyl-pyrazolinyl substituted thiazoles as non-competitive inhibitors of mushroom tyrosinase. **Bioorganic Chemistry**, v.74, p. 187-196, 2017.

SCHALLREUTER, K.; HASSE, S.; ROKOS, H.; CHAVAN, B.; SHALBAF, M.; SPENCER, J.; WOOD, J. Cholesterol regulates melanogenesis in human epidermal melanocytes and melanoma cells. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 680-688, 2009.

SEO, S.; SHARMA, V.; SHARMA, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2837–2853, 2003.

SHIN, N.; RYU, S.; CHOI, E.; KANG, S.; CHANG, I.; MIN, K.; KIM, Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochemical and Biophy Research Communications**, v. 243, n. 3, p. 801-803, 1998.

SMIT, N.; VICANOVA, J.; PAVEL, S. The hunt for natural skin whitening agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 5326-5349, 2009.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TAN, X.; SONG, Y.; CAHNIN, P.; LEE, K.; KIM, J.; KIM, D.; KIM, K.; LEE, K.; CURTIS-LONG, M.; PARK, K. Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular Docking. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p.153-159, 2016.

WU, B.; WU, X.; SUN, M.; LI, M. Two novel tyrosinase inhibitory sesquiterpenes induced by CuCl_2 from a marine-derived fungus *Pestalotiopsis* sp Z233. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2713–2721, 2013.

YI, W.; CAO, R.; PENG, W.; WEN, H.; YAN, Q.; ZHOU, B.; MA, L.; SONG, H. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 639-646, 2010.

ZAIDI, K.U.; ALI, S.A.; ALI, A. A. Purified Mushroom Tyrosinase Induced Melanogenic Protein Expression in B16F10 Melanocytes: A Quantitative Densitometric Analysis. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 12, p. 36-47, 2018.

ZHANG, D.; LI, X.; KANG, J.; CHOI, H.; SON, B. A new α -Pyrone derivative, 6-[(E)-Hept-1-enyl]- α -pyrone, with tyrosinase inhibitor activity from a marine isolate of the Fungus *Botrytis*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 887-888, 2007.