

NATÁLIA APARECIDA LIBERTO

**SÍNTESE DO AVENACIOLÍDEO E NOVOS ANÁLOGOS AROMÁTICOS E
SUA ATIVIDADE FRENTE A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

NATÁLIA APARECIDA LIBERTO

**SÍNTESE DO AVENACIOLÍDEO E NOVOS ANÁLOGOS AROMÁTICOS E
SUA ATIVIDADE FRENTE A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

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

Aprovada: 25 de fevereiro de 2010.

Prof^a. Daniele Cristiane Menezes

Prof^a. Alessandra Regina Pepe Ambrozini

**Prof Sergio Antonio Fernandes
(Co-orientador)**

**Prof. Laércio Zambolim
(Co-orientador)**

**Prof^a Mayura Marques Magalhães Rubinger
(Orientadora)**

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria e Raimundo, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e amparo durante toda a minha vida.

Aos meus pais Maria e Raimundo pelo amor, incentivo e por ter deixado de realizar algum sonho para que eu realizasse o meu.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao Departamento de Fitopatologia, por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPEMIG e à CAPES pela concessão das bolsas de estudo.

Ao CNPQ e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À minha orientadora Mayura M. M. Rubinger, pela eficiente orientação, pelas incansáveis leituras e revisões do material e pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao professor Laércio Zambolim e alunos do laboratório de proteção de planta pela grande ajuda durante a realização dos ensaios biológicos.

Ao professor Sergio Antonio Fernandes pelas sugestões e obtenção de espectros de RMN.

Às professoras Daniele Cristiane Menezes e Alessandra Regina Pepe Ambrozini pelas valiosas sugestões durante a defesa da dissertação.

Aos técnicos Márcio e José Luís, pela boa vontade demonstrada para a obtenção dos espectros no infravermelho e de massas, respectivamente.

Às funcionárias do DEQ, especialmente a Dona Onesina e Marisa, por serem tão prestativas e atenciosas.

Aos meus irmãos, Renata e Régis, pelo carinho e apoio.

Ao Leonardo, pelo amor, carinho e paciência durante este período. Sua presença me anima e me faz mais feliz.

A minha amiga Elba pelos momentos alegres e outros não tão alegres assim vividos. Pelas caminhadas, pelas festas, pelos sonhos compartilhados.

Ao “irmão” Tiago Lage. Obrigada por ser meu braço direito neste mestrado, sempre uma mão lavando a outra e compartilhando não apenas conhecimento como também vida.

Aos amigos do laboratório 305 e da UFV, em especial Thayane, Tiago P., Vânia, Éder, Letícia, Ju, Paula, Gabi, Montanha, Simone, Mari, Junior, Dayana, Thaís, Leandro, Ana e Nayane pela ajuda e pela boa convivência e por tornar a vida mais alegre, mesmo quando os resultados não eram animadores.

Aos amigos de Timóteo, em especial Aline, Gi, Dany, Lú, Dé, Douguinha, Kênia, Renato, Pri, e Neylor pela ajuda nas horas difíceis e por serem meu alicerce ao longo desses anos e provar que verdadeiras amizades crescem mesmo a longa distância.

A minha “primiga” Liana por dar força quando esta me faltava.

A Geovana, simplesmente por existir.

As amigas de república: Mizinha, Sâm, Kátia e Dê, por dividirem não apenas despesas de casa, mas também experiências que perdurarão por toda vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada!

BIOGRAFIA

NATÁLIA APARECIDA LIBERTO, filha de Raimundo Geraldo Liberto e Maria das Graças de Carvalho Liberto, nasceu em Timóteo, Minas Gerais, em 19 de outubro de 1982.

Em 2000, ingressou no CET/CEFET-Timóteo, onde concluiu o curso técnico em Química Industrial em 2001.

Em 2003, ingressou na Universidade Federal Viçosa, onde concluiu o curso de Licenciatura e Bacharelado em Química em 2007.

Em fevereiro de 2008, começou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica sendo a área de concentração Química Orgânica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1: SÍNTESE DO AVENACIOLÍDEO E DE ANÁLOGOS AROMÁTICOS.....	3
1.1 INTRODUÇÃO.....	3
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
1.2.1. Tratamento de solventes e reagentes.....	6
1.2.1.1 Tratamento da Acetona.....	6
1.2.1.2 Tratamento de Ácido acético.....	7
1.2.1.3 Tratamento de Diclorometano.....	7
1.2.1.4 Tratamento de Éter dietílico.....	7
1.2.1.5 Tratamento de Tetraidrofurano e Tolueno.....	8
1.2.1.6 Ativação da Peneira Molecular.....	8
1.2.1.7 Purificação do Cloreto de zinco.....	8
1.2.2 Técnicas cromatográficas.....	8
1.2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	8
1.2.2.2 Cromatografia em coluna.....	9
1.2.3 Caracterização de substâncias.....	9
1.2.3.1 Temperatura de fusão.....	9
1.2.3.2 Rotação específica.....	9
1.2.3.3 Análise elementar.....	10
1.2.3.4 Espectroscopia no infravermelho.....	10
1.2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	10
1.2.3.6 Espectrometria de Massas.....	10
1.2.4 Desenvolvimento da rota sintética	11
1.2.4.1 Síntese de 1,2:5,6-di-O-Isopropilideno- α -D-glicofuranose [2]..	11

1.2.4.2 Síntese de 1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -ribohexofuran-3- ulose [3].....	12
1.2.4.2.1 Preparo do Oxidante Dicromato de Piridínio.....	12
1.2.4.2.2 Reação de Oxidação.....	13
1.2.4.3 Síntese de 3-(<i>E,Z</i>)- <i>C</i> -(carbometoximetilideno)-3-desoxi- 1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -alofuranose [4].....	14
1.2.4.4 Síntese de 3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-3-desoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> - isopropilideno- α - <i>D</i> -alofuranose [5].....	15
1.2.4.5 Síntese de 3-desoxi-3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-1,2- <i>O</i> -isopropili- deno- α - <i>D</i> -alofuranose [6].....	16
1.2.4.6 Síntese de 3-desoxi-3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-1,2- <i>O</i> -isopropili- deno- α - <i>D</i> -ribofuranose [7].....	17
1.2.4.7 Síntese de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-{2-[2-alquenil]-4,5-isopropilide- nodioxi-tetraidrofuran-3-il}acetatos de metila [8].....	18
1.2.4.7.1 Preparo dos Sais de Wittig.....	18
1.2.4.7.2 Reações de Wittig.....	19
1.2.4.8 Síntese de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-[2-alquil]-4,5-isopropilide- nodioxi-tetraidrofuran-3-il]acetatos de metila [9].....	24
1.2.4.9 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxa-bici- clo[3.3.0]octan-3-onas [10 β] e (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7- dioxabici-clo[3.3.0]octan-3-onas [10 α].....	27
1.2.4.10 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(alquil)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0] octa- no-3,8-dionas [11].....	32
1.2.4.10.1 Preparo do Reagente de Jones.....	32
1.2.4.10.2 Reações de Oxidação de Jones.....	32
1.2.4.11 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(alquil)-4-metilideno-2,7-dioxabici- clo[3.3.0]octano-3,8-dionas [13].....	36
1.3 Resultados e Discussão.....	41
1.3.1 Síntese de 1,2:5,6-di- <i>O</i> -Isopropilideno- α - <i>D</i> -glicofuranose [2].....	41
1.3.2 Síntese de 1,2:5,6-di- <i>O</i> -Isopropilideno- α - <i>D</i> -ribo-hexofura-3- ulose [3].....	43

1.3.3 Síntese de 3-(<i>E, Z</i>)- <i>C</i> -(carbometoximetilideno)-3-desoxi-1,2;5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -alofuranose [4].....	46
1.3.4 Síntese de 3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-3-desoxi-1,2;5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -alofuranose [5].....	47
1.3.5 Síntese de -desoxi-3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -alofuranose [6].....	49
1.3.6 Síntese de 3-desoxi-3- <i>C</i> -(carbometoximetil)-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α - <i>D</i> -ribofuranose [7].....	51
1.3.7 Síntese de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-{2-[2-alquenil]-4,5-isopropilideno-dioxitetraidrofuran-3-il}acetatos de metila [8].....	56
1.3.8 Síntese de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(alquil)-4,5-isopropilidenodioxitetraidrofuran-3-ilacetatos de metila [9].....	64
1.3.9 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3-onas [10 β] e (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3-onas [10 α].....	70
1.3.10 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(alquil)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0] octano-3,8-dionas [11].....	80
1.3.11 Síntese de (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(alquil)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-dionas [13].....	86
1.4 CONCLUSÕES.....	96
CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO AVENACIOLÍDEO E DE BIS-LACTONAS ANÁLOGAS AROMÁTICAS.....	97
2.1 INTRODUÇÃO.....	97
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.2.1 Equipamentos.....	104
2.2.2 Preparo das amostras para os testes biológicos de difusão em placa.....	104
2.2.3 Preparo do meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	105
2.2.4 Identificação dos fungos.....	105
2.2.5 Repicagem dos fungos.....	105
2.2.5.1 Injúria da cultura de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	106
2.2.6 Ensaio biológico pelo método de difusão em placa.....	106

2.2.7 Ensaio biológico pelo método <i>Poisoned food</i>	108
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
2.3.1 Resultados dos testes de difusão em placa.....	111
2.3.2 Resultado do teste <i>Poisoned food</i> para o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	116
2.4 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AcONa	Acetato de sódio
BDA	Batata-dextrose-ágar
Bu	Grupo butil(a)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMM	Carbonato de metilmetoximagnésio
COSY	Correlated Spectroscopy
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto duplo
dt	Duplo tripleto
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
Et	Grupo etil(a)
EM	Espectrometria de massas
Hz	Hertz
FM	Fórmula molecular
Isoprop	Grupo isopropil(a)
IV	Infravermelho

<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
Me	Grupo metil(a)
M	Massa molar
m/z	Relação massa/carga dos fragmentos no EM
PDC	Dicromato de piridínio
Ph	Grupo fenil(a)
R	Grupo alquila
Rdt	Rendimento
R_f	Fator de retenção em cromatografia em camada delgada
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
sl	Sinal largo
t	Triplete
T	Transmitância
t-BuOK	<i>tert</i> -butóxido de potássio
T_f	Temperatura de fusão
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
ν	Número de onda

RESUMO

LIBERTO, Natália Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Síntese do avenaciolídeo e novos análogos aromáticos e sua atividade frente a fungos fitopatogênicos.** Orientadora: Mayura Marques Magalhães Rubinger. Co-orientadores: Sergio Antonio Fernandes e Laércio Zambolim.

O avenaciolídeo, (1*R*,5*R*,6*R*)-4-metilideno-6-octil-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]-octano-3,8-diona, é uma bis- γ -lactona natural isolada de culturas de *A. avenaceus* e apresenta atividade antifúngica. Este trabalho, descreve a síntese do avenaciolídeo e de análogos sintéticos inéditos (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(2-*ariletil*)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-dionas, sendo os grupos arila: 2-metilfenila e 3-metilfenila. Utilizou-se como material de partida a *D*-glicose, numa rota sintética envolvendo 12 etapas. Foram preparados 27 compostos, sendo 14 inéditos, que foram caracterizados por espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear, análises elementares e espectrometria de massas. As bis- γ -lactonas sintetizadas e o análogo com o grupo 4-metilfenila tiveram sua atividade antifúngica testada contra *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani*. Ensaios biológicos de difusão em disco e testes pelo método *Poisoned food* foram realizados. Todos os compostos foram ativos contra os três fungos, sendo o avenaciolídeo o mais ativo. O análogo aromático com substituinte metila na posição *orto* apresentou inibição maior do que aquele com substituinte na posição *meta*, e este por sua vez foi mais ativo que o composto com substituinte em *para*, sendo este resultado semelhante para os três fungos testados indicando que a cadeia lateral ligada ao C6 da bis- γ -lactona apresenta um papel importante na atividade antifúngica, modulando a intensidade da atividade. Os compostos sintetizados foram mais ativos contra *C. gloeosporioides* e menos ativos contra *F. solani*, apresentando atividade intermediária contra *A. flavus*. Concluiu-se que a cadeia lateral interfere na atividade das bis- γ -lactonas e que o avenaciolídeo tem potencial como agroquímico.

ABSTRACT

LIBERTO, Natália Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Synthesis of avenaciolide and new aromatic analogues and their activity against phytopathogenic fungi.** Adviser: Mayura Marques Magalhães Rubinger. Co-Advisers: Sergio Antonio Fernandes and Laércio Zambolim.

Avenaciolide, (1*R*,5*R*,6*R*)-4-methylidene-6-octil-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3,8-dione, is a natural bis- γ -lactone isolated from cultures of *A. avenaceus* and possess antifungal activity. This dissertation describes the synthesis of avenaciolide and new synthetic analogues (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(2-arylethyl)-4-methylidene-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3,8-diones, with the aryl groups: 2-methylphenyl and 3-methylphenyl. *D*-glucose was used as starting material. Twenty-seven compounds were prepared and 14 of them are unpublished. The new compounds were characterized by infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopies, elemental analysis and mass spectrometry. The compounds synthesized and the analogue with group 4-methylphenyl had their antifungal activity tested against *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium solani*. Biological assays were performed using the disk diffusion and Poisoned food methods. All compounds were active against these fungi, and the avenaciolide was the most active. The aromatic analogue with methyl substituent in the *orto* position showed greater inhibition than that with the substituent in *meta*, which was more active than the compound with the substituent in *para* position. These results were observed for the three fungi tested indicating that the side chain attached to C6 of bis- γ -lactone has an important role in the antifungal activity, modulating the intensity of the activity. The compounds were more active against *C. gloeosporioides* and less against *F. solani*, showing intermediate activity against *A. flavus*. It was concluded, therefore, that the side chain interferes in the activity of these bis- γ -lactones and that the avenaciolide has potential as agrochemical.

INTRODUÇÃO GERAL

As doenças de plantas são ocasionadas geralmente por tipos diferentes de organismos. Aquelas que afetam folhas, frutos e hastes geralmente são causadas por bactérias, vírus ou fungos.

As principais doenças das plantas são causadas por fungos que produzem enormes quantidades de esporos, que são rapidamente propagados pelo vento, água, insetos ou outros animais. Os fungos são difíceis de serem eliminados porque podem manter-se dormentes no solo, em restos de plantas que se encontram em decomposição ou em uma planta saudável, à espera das condições climáticas adequadas para voltarem a se multiplicar.

Os prejuízos financeiros causados pelas doenças fúngicas podem ser diretos, pela queda na produção, alterando tanto a qualidade quanto a quantidade do produto. Os prejuízos indiretos ocorrem pela implantação de medidas de controle, muitas vezes dispendiosas. Muitos dos agentes patogênicos, particularmente fungos e bactérias causadores de podridões moles, bolores e mofos, continuam causando prejuízos pela disseminação por plantas matrizes e após a colheita no período de armazenamento (SOLOGUREN e JULIATTI, 2007).

Um dos modos mais eficazes de controlar doenças de plantas é o uso dos agroquímicos. atualmente há no mercado dezenas de princípios ativos com ação fungicida, mas por desenvolverem resistência fúngica há necessidade de constantes estudos para a produção de novos compostos ativos (zambolim *et al.*, 2007).

Vários fungicidas comerciais são tóxicos a outros seres vivos ou contêm substâncias que podem resultar em problemas ambientais. portanto, o desenvolvimento de novos defensores químicos mais potentes e menos danosos ao ambiente é desejável.

Assim como outros seres vivos, os fungos produzem metabólitos secundários, com a finalidade de se defenderem de outros organismos competidores ou predadores. A primeira referência sobre metabólitos fúngicos foi publicada em 1911, mas em menos de 100 anos, até o segundo trimestre de 2007, haviam sido cadastradas nos bancos de dados Caplus e Medline 11376

publicações sobre este tema, inclusive patentes, evidenciando o crescente interesse por esta área. (TAKAHASH e LUCAS, 2008)

O avenaciolídeo (figura 1.1) é um metabólito fúngico, isolado de *Aspergillus avenaceus* por BROOKES e colaboradores em 1963 e mostrou-se ativo contra diversos fungos e bactérias.

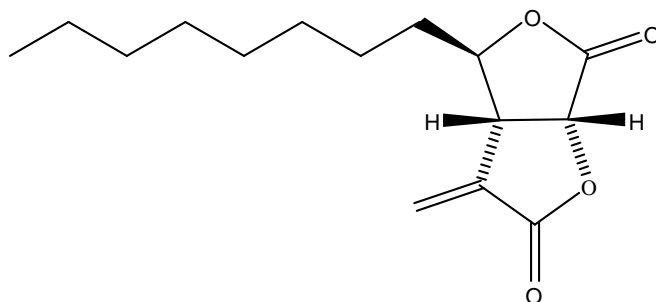


Figura 1.1 Fórmula estrutural do avenaciolídeo.

Em trabalhos realizados anteriormente foram preparados análogos ao avenaciolídeo contendo diferentes grupos alquila em substituição ao grupo octila e alguns análogos aromáticos (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2007; MAGATON *et al.*, 2007; BARROS, 2008; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2009). Este projeto pretendeu dar continuidade a esses estudos buscando o desenvolvimento de novos análogos ao avenaciolídeo com grupos aromáticos na cadeia lateral ligada ao carbono-6 do esqueleto bis-lactônico, e estudar sua atividade para verificar a influência da posição de substituintes no anel benzênico (*orto*, *meta* e *para*) para a atividade.

Portanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Síntese do avenaciolídeo e de bis- γ -lactonas análogas com os grupos 2-(*o*-metilfenil)-etila e 2-(*m*-metilfenil)-etila;
- Caracterização dos produtos de síntese por análise elementar, espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, temperatura de fusão e rotação específica.
- Estudo da atividade fungicida dos compostos sintetizados contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium solani*, em diferentes doses, comparando com a atividade apresentada por fungicidas comerciais e pelo análogo contendo o grupo 2-(*p*-metilfenil)-etila, previamente sintetizado por CASTELO-BRANCO *et al.* (2009).

CAPÍTULO 1

SÍNTESE DO AVENACIOLÍDEO E DE ANÁLOGOS AROMÁTICOS

1.1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos fungicidas pode ser feita a partir do estudo de produtos naturais (GULLINO, 2000). Metabólitos secundários ativos geralmente estão presentes em quantidades pequenas nos seres vivos. Assim, para estudar a relação estrutura-atividade é necessário obter maiores quantidades dessas substâncias, ou mesmo preparar compostos de estruturas semelhantes. Portanto, a preparação de análogos pela via sintética é muito utilizada.

Dentre as estruturas presentes em produtos naturais com atividade biológica, as γ -lactonas são uma das mais abundantes (KHAN et al., 2006).

O avenaciolídeo (1) é uma bis- γ -lactona (Figura 1.2), e é um fungicida natural que foi isolado por Brookes *et al.* de culturas de *Aspergillus avenaceus* (BROOKES *et al.*, 1963) que contém três centros quirais.

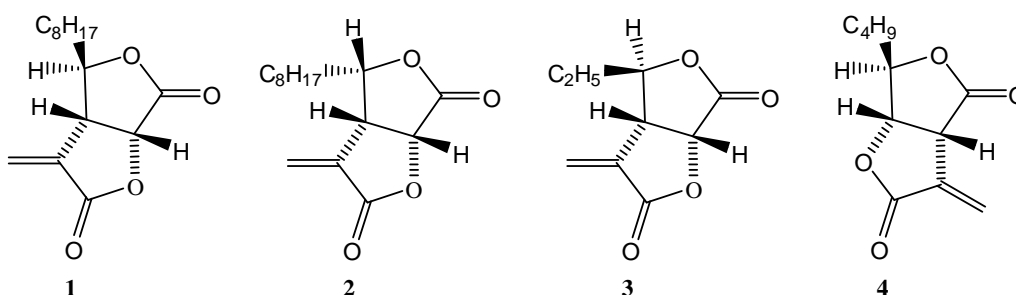
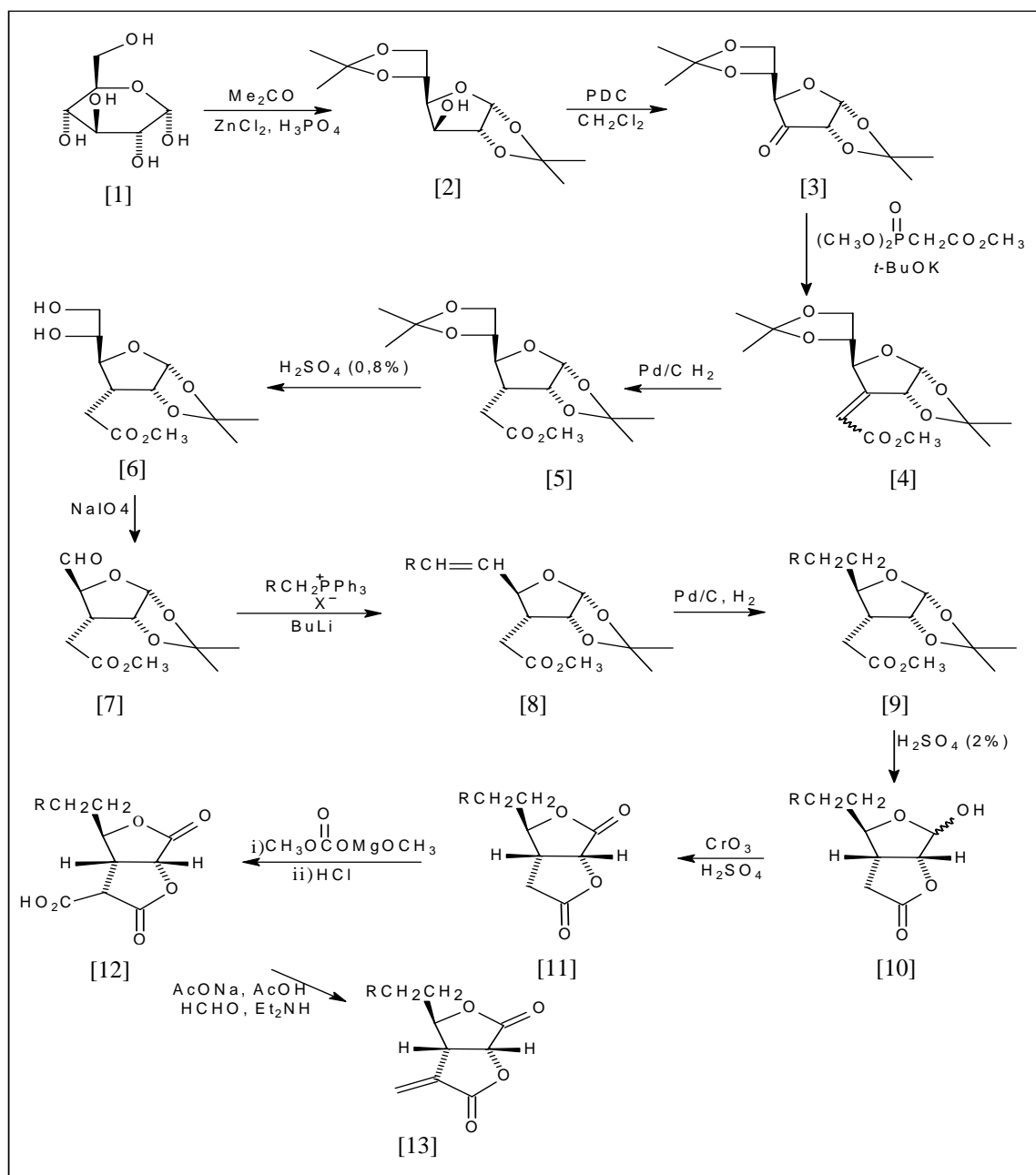


Figura 1.2. Metabólitos secundários de estrutura bis- γ -lactônica isolados de culturas de fungos.

Avenaciolídeo (1), isoavenaciolídeo (2) e etisolídeo (3) (Figura 1.2) constituem um trio de metabólitos isolados de culturas de *Aspergillus* e *Penicillium*. O canadensolídeo (4) foi isolado de culturas de *Penicillium canadense* (McCORKINDALE *et al.*, 1968). O avenaciolídeo é o que exibe a maior e mais diversa atividade biológica, como a inibição da germinação de esporos de fungos e ação antibacteriana (MEYER, 1973; ALDRIDGE e TURNER, 1971).

A descoberta da atividade antifúngica do avenaciólídeo *in vitro* motivou o desenvolvimento de várias rotas sintéticas para a sua preparação (MARTIN et al, 1998). Este trabalho seguiu a estratégia desenvolvida por Anderson e Fraser-Reid (1985). Esta escolha permitiu a preparação do (-)-avenaciólídeo (mesma configuração do produto natural) e de análogos com diferentes grupos substituintes em C6, obtidos com a devida pureza enantiomérica a partir de *D*-glicose, material de partida de baixo custo (Esquema 1).



Esquema 1. Rota sintética usada neste trabalho para a obtenção do avenaciólídeo e análogos opticamente ativos.

A rota sintética proposta por ANDERSON e FRASER-REID (1975 e 1985) já foi utilizada com êxito na preparação de diversos análogos ao avenaciólídeo opticamente ativos com variação da cadeia lateral e também de grupos funcionais (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2007; MAGATON *et al.*, 2007, BARROS, 2008, CASTELO-BRANCO *et al.*, 2009). A rota (esquema 1) inicia-se com a proteção de quatro hidroxilas da D-glicose [1] (SCHMIDT, 1962), levando à obtenção do produto [2], que é oxidado com PDC (dicromato de piridínio), formando a cetona [3] (CZERNECKY, 1985), que é posteriormente submetida a uma reação de Wittig-Horner, formando o éster [4] contendo o grupo precursor de um dos anéis lactônicos (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969). A hidrogenação do éster formado leva ao composto [5] que, após ser submetido a hidrólise ácida seletiva na presença de H₂SO₄, gera o diol [6]. Uma clivagem oxidativa de [6] com NaIO₄ forma o aldeído [7]. Esse aldeído, já descrito na literatura (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969), é o precursor-chave do avenaciólídeo (ANDERSON e FRASER-REID, 1985) e das bis-lactonas análogas inéditas descritas nesta dissertação.

O aldeído [7] pode ser submetido a reações com diferentes lídeos, preparados *in situ* a partir de sais de Wittig e butilítio, formando os compostos [8]. Após hidrogenação e posterior hidrólise ácida, são produzidas as estruturas bicíclicas [10] que, por oxidação de Jones, fornecem as bis-lactonas [11]. Na última etapa o grupo metilênico exocíclico pode ser adicionado via intermediários ácidos, seguindo a metodologia descrita por PARKER e JOHNSON (1973), obtendo-se assim o avenaciólídeo e os análogos aromáticos [13].

Os análogos [13] preparados neste trabalho apresentam diferentes cadeias laterais em C6: 2-CH₃C₆H₄CH₂CH₂ [13b] e 3-CH₃C₆H₄CH₂CH₂ [13c], que os diferem do produto natural avenaciólídeo (CH₃(CH₂)₇ [13a]). A discussão da síntese e caracterização dessas substâncias, assim como a metodologia experimental utilizada, encontram-se nos itens 1.2 e 1.3 deste Capítulo. O Capítulo 2 desta dissertação descreverá os estudos de atividade antifúngica realizados.

1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

A montagem da figura 1.3 foi utilizada para todas as reações sob refluxo para tratamento de solventes.

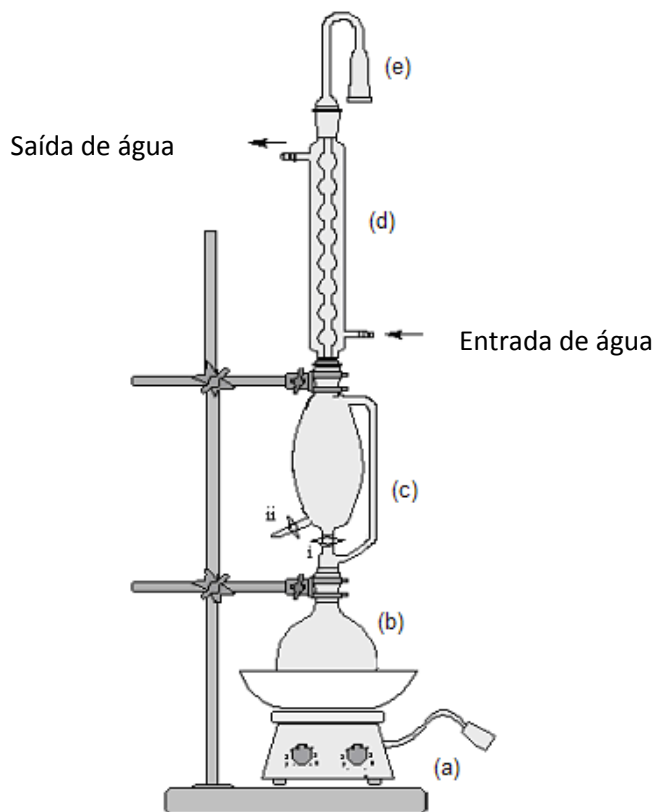


FIGURA 1.3. Montagem utilizada para tratamento de solventes: (a) manta ou chapa aquecedora; (b) balão contendo o solvente e o agente de tratamento; (c) frasco coletor; (d) condensador; (e) tubo com cloreto de cálcio anidro. Para manter a mistura em refluxo deve-se manter a torneira (i) aberta e para coletar o solvente deve-se fechar a torneira (i). O solvente é retirado do frasco coletor através da torneira (ii).

1.2.1 Tratamento de Solventes e Reagentes

1.2.1.1. Tratamento de Acetona

Para a secagem da acetona utilizada na reação de proteção da *D*-glicose, 40 g de carbonato de potássio seco previamente na estufa a 120⁰ C

por 2 horas, foram adicionados a 600 mL de acetona. Deixou-se em refluxo por 2 horas. A acetona seca foi destilada e armazenada em frasco vedado contendo peneira molecular 4Å (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

Para o tratamento da acetona utilizada na reação de oxidação de Jones (etapa 8), 250 mL de acetona PA foram submetidos a 3 horas de refluxo com permanganato de potássio. Este foi adicionado com o solvente já em refluxo até que a coloração roxa permanecesse constante. A acetona tratada foi destilada e armazenada em frasco limpo (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

1.2.1.2. Tratamento de Ácido Acético

Para a secagem do ácido acético foram adicionados 3,0 mL de anidrido acético em 100 mL de ácido acético glacial. A mistura foi deixada sob refluxo por 2 horas. Em seguida destilou-se e armazenou-se em frasco vedado contendo peneira molecular 4Å (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

1.2.1.3. Tratamento de Diclorometano

O diclorometano foi tratado com hidreto de cálcio na proporção de 1,5 a 2% m/v, sob refluxo por 2 horas, destilado e armazenado em frasco vedado contendo peneira molecular 4Å (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

1.2.1.4. Tratamento de Éter Dietílico

O éter dietílico foi tratado diferentemente para etapas distintas da rota sintética. Para a preparação dos sais de Wittig (brometo de heptiltrifenilfosfônio, brometo de (2-metilbenzil)trifenilfosfônio e brometo de (3-metilbenzil)trifenilfosfônio) o solvente foi tratado com sulfato de magnésio anidro, filtrado e armazenado em recipiente vedado contendo peneira molecular 4Å por 24 horas.

Para a etapa 3 da rota sintética, na qual era importante a ausência de água, após o tratamento com sulfato de magnésio anidro, o éter foi submetido a 3 horas de refluxo com raspas de sódio metálico. Adicionou-se, então,

benzofenona, deixando-se sob refluxo até que a solução obtivesse coloração azul, caracterizando a secagem do solvente. Então, o éter foi destilado e armazenado em recipiente vedado, contendo peneira molecular 4Å (PERRIN e ARMAREGO, 1996)

1.2.1.5. Tratamento de Tetraidrofurano e Tolueno

O tolueno e o tetraidrofurano (THF) VETEC foram tratados com raspas de sódio metálico e deixados sob refluxo por 3 horas. Após esse tempo adicionou-se, então, benzofenona, deixando-se sob refluxo até que a solução obtivesse coloração azul. Então, o solvente seco foi destilado e armazenado em recipiente vedado, contendo peneira molecular 4Å (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

1.2.1.6. Ativação da Peneira Molecular

A peneira molecular 3Å, pulverizada e previamente pesada, foi ativada por aquecimento a uma temperatura de aproximadamente 300 °C em mufla, durante 5 horas. Após esse período retirou-se a peneira molecular e deixou-se resfriar em dessecador, utilizando-se em seguida.

1.2.1.7. Purificação do Cloreto de Zinco

A um béquer contendo 50,0 g de $ZnCl_2$ adicionou-se 50,0 mL de HCl concentrado e aqueceu em chapa (aproximadamente 120 °C) sob agitação magnética até a solidificação completa do sal (PERRIN e ARMAREGO, 1996).

1.2.2. Técnicas Cromatográficas

1.2.2.1. Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas placas (ALDRICH) de sílica gel 60 (espessura de 250 μm) sobre vidro e sobre alumínio. Câmara de luz UV de $\lambda = 254 \text{ nm}$

(ESPECTRLINE modelo CM10) e solução alcoólica de ácido fosfomolibdico (4,0 g de ácido / 100 mL de etanol) foram utilizadas como reveladores.

1.2.2.2. Cromatografia em coluna

A purificação das substâncias foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária. O eluente usado varia de acordo com a substância a ser purificada.

Na maioria dos casos foi utilizada sílica-gel recuperada da seguinte forma:

A sílica gel usada foi lavada com etanol e água. Para cada 100 g de sílica-gel adicionaram-se duas alíquotas de 65,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30% com intervalo de 1 hora entre cada adição. Deixou-se a sílica exposta ao sol por um período de 5 horas. Filtrou-se a vácuo e lavou-se com 2 L de água destilada. A sílica foi ativada na estufa a 125 °C durante 48 horas. (TEIXEIRA *et al.*, 2003)

1.2.3. Caracterização de substâncias

1.2.3.1. Temperatura de Fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-301 MICROQUÍMICA, sem correção.

1.2.3.2. Rotação Específica

As medidas de rotação específica foram realizadas em um polarímetro Bellingham+Stanley Model D. A concentração dos compostos é dada em g100 mL⁻¹.

1.2.3.3. Análise Elementar

As análises elementares de C e H dos compostos sintetizados foram realizadas em aparelho *Perkin Elmer* 2400, do Departamento de Solos da UFV.

1.2.3.4. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho foram registrados a partir de pastilhas de KBr para os compostos sólidos. Para os compostos oleosos a análise foi feita espalhando-se a amostra sobre um cristal de NaCl. Em alguns casos as amostras sólidas foram dissolvidas em diclorometano e a solução espalhada sobre um cristal de NaCl. O espectro foi obtido após evaporação do solvente. As análises foram realizadas com um espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM FT-IR 1000.

1.2.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram obtidos em espectrômetros VARIAN MERCURY 300. Clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi o solvente utilizado e o tetrametilsilano (TMS) foi o padrão de referência interna ($\delta = 0$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

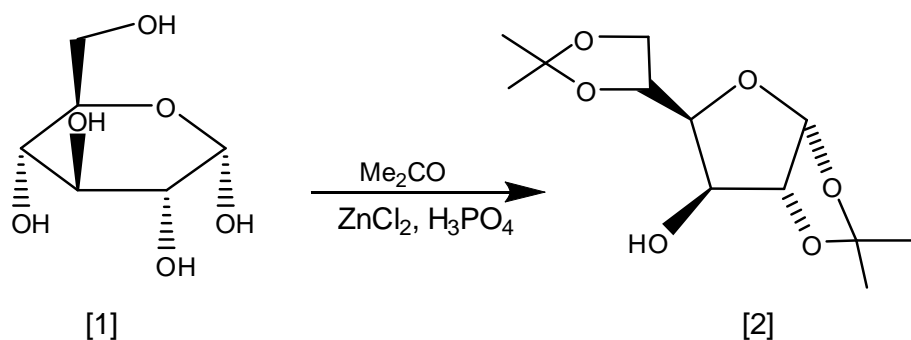
1.2.3.6. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV. As separações ocorreram em uma coluna DB-5 ms de 30m x 0,25 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura com a seguinte programação de temperatura: 80 °C inicial, 6 °C/

min até 220 °C. A energia da ionização foi de 70 eV e o detector usado foi o de massas.

1.2.4. Desenvolvimento da rota sintética

1.2.4.1. Síntese de 1,2:5,6-di-O-Isopropilideno- α -D-glicofuranose [2].



A um balão de fundo redondo de 500 mL, adicionaram-se 37,74 g (0,21 mol) de α -D-glicose anidra (VETEC) e, sob agitação magnética, 250 mL de acetona seca, 30,16 g (0,22 mol) de ZnCl_2 anidro pulverizado e 1,10 mL (1,88 g; 0,019 mol) de ácido fosfórico 85% (MERCK). Deixou-se a mistura sob agitação durante 30 horas a temperatura ambiente. O final da reação foi determinado através de CCD, usando-se como eluente hexano/AcOEt 2:1 v/v. A D-glicose [1] (11,48 g, 0,06 mol) que não reagiu foi coletada por filtração a vácuo e lavada com 500 mL de acetona. Os filtrados reunidos foram resfriados e alcalinizados com solução de hidróxido de sódio [42,6 g de NaOH em 42 mL de água destilada]. O material inorgânico insolúvel de cor branca formado ($\text{Zn}(\text{OH})_2$), foi removido por filtração simples e lavado com acetona. Os filtrados reunidos, de coloração amarela-palha, foram concentrados sob pressão reduzida. O resíduo foi diluído com 100 mL de água destilada e extraído com clorofórmio (5 x 60 mL). A porção orgânica foi secada com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Os cristais foram purificados em coluna de sílica-gel usando como eluente AcOEt/hexano 2:1 v/v e em seguida recristalizados em clorofórmio-hexano (1:2 v/v), obtendo-se cristais brancos de [2]. (34,16 g, 0,13 mol, 90 %)

Produto [2]

Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (**M:** 260,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

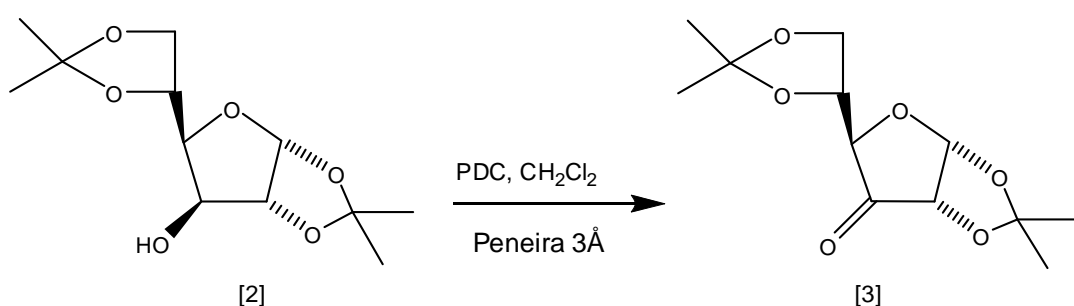
Aspecto: Sólidos brancos.

T_f: 105,3-106,4 °C (Produto comercial Aldrich: **T_f:** 109-113 °C)

CCD: R_f: 0,38 (AcOEt/ hexano 1:2 v/v).

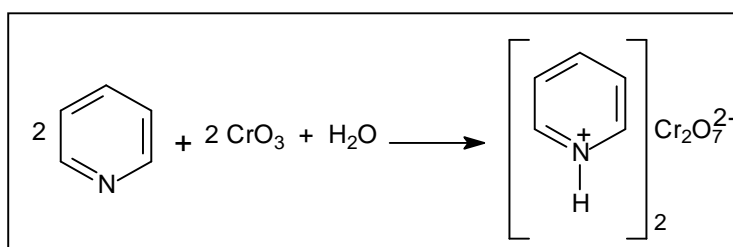
Infravermelho de [2] (KBr, $\nu_{\text{MAX}}/\text{cm}^{-1}$): 3430, 2984, 2935, 2901, 2871, 1457, 1426, 1317, 1287, 1248, 1221, 1162, 1119, 1089, 1065, 1031, 1009, 943, 885, 847, 785, 637.

1.2.4.2. Síntese de 1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-ribo-hexofuran-3-ulose [3]



1.2.4.2.1. Preparo do Oxidante Dicromato de Piridínio (PDC)

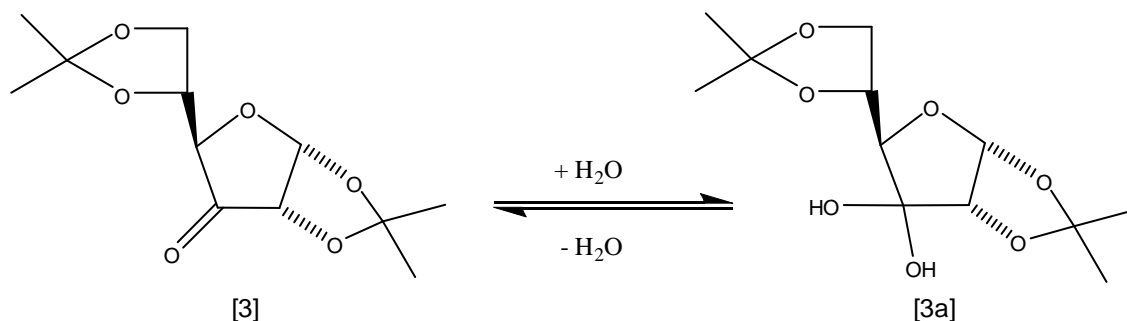
A um béquer de 500 mL contendo uma solução de óxido de cromo(VI) (34,0 g de CrO_3 em 34,0 mL de água destilada), em banho de gelo e sal, adicionaram-se gradualmente 28 mL de piridina. A esta solução adicionaram-se 300 mL de acetona gelada. A mistura foi agitada com um bastão de vidro. Formaram-se cristais alaranjados (57,5 g, 90,2% de rendimento), que foram filtrados a vácuo e lavados com acetona gelada. (CZERNECKI *et al.*, 1985). O esquema 2 mostra a síntese do PDC.



Esquema 2 – Síntese do PDC

1.2.4.2.2. Reação de oxidação

A um balão de fundo chato de 250 mL, adicionaram-se 7,5 g de diacetona-*D*-glicose [2] (0,029 mol) e 175 mL de diclorometano seco. Acrescentaram-se, sob agitação magnética, o oxidante PDC finamente pulverizado (16,25 g, 0,044 mol), 22,5 g de peneira molecular 3Å previamente triturada e ativada (conforme descrito em 1.2.1.6) e 5,8 mL de ácido acético glacial seco. Adaptou-se um tubo de cloreto de cálcio anidro ao balão e o sistema foi deixado sob agitação durante 18 horas. A mistura foi filtrada em funil de placa porosa, acrescentando-se uma pequena quantidade de celite ao fundo do funil antes da filtração. Lavou-se o resíduo com acetato de etila. Concentrou-se o filtrado em evaporador rotatório. Ao concentrado foram adicionados éter dietílico seco (500 mL) e MgSO₄ anidro (aproximadamente 2 g). A mistura foi filtrada novamente em funil de placa porosa e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. Purificou-se o produto em coluna cromatográfica de sílica-gel, utilizando AcOEt como eluente. Obteve-se uma mistura de cetona [3] com seu hidrato [3a] (6,77g, 0,03mol, 91%).



Produto [3]

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₈O₆ (**M:** 258,26 g mol⁻¹).

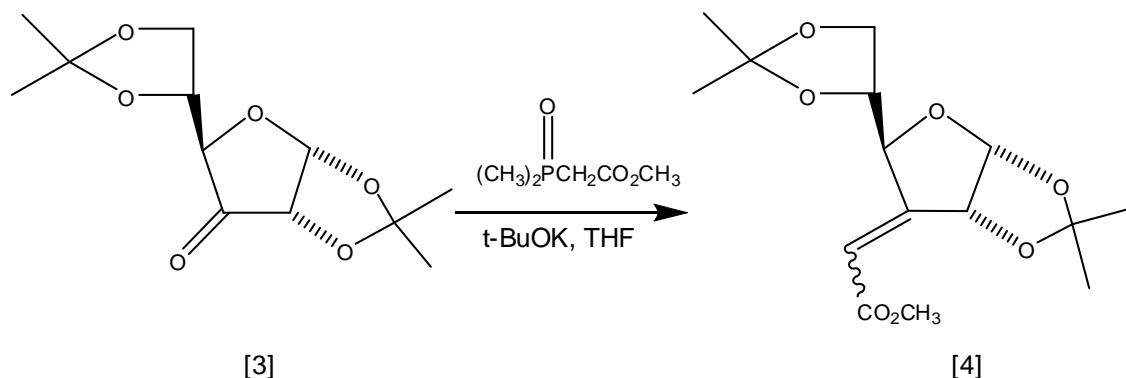
Aspecto: sólido branco [3].

T_f[3]: 74,1-75,0 °C (WHISTLER, 1963: 77-78 °C).

CCD: R_f: 0,25 [3a] e 0,56 [3] (AcOEt/hexano 1:2 v/v).

Infravermelho de [3] + [3a] (KBr, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3004, 2986, 2935, 2907, 1773, 1457, 1333, 1311, 1373, 1216, 1107, 1082, 1024, 875, 825.

1.2.4.3. Síntese de 3-(*E,Z*)-*C*-(carbomoximetilideno)-3-desoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -*D*-alofuranose [4].



A um balão bitubulado de 250 mL, adicionaram-se 3,81 g de *tert*-butóxido de potássio 95% (0,032 mol), fez-se atmosfera de nitrogênio e adicionaram-se 50 mL de THF seco sob agitação magnética. Resfriou-se o sistema em banho de gelo e adicionou-se, gota a gota, fosfonoacetato de trimetila (ALDRICH, 4,6 mL). Deixou-se a mistura sob agitação por 20 minutos e a cetona [3] (6,700 g, 0,03 mol) solubilizada em 24 mL de THF seco foi adicionada ao sistema. A mistura ficou sob agitação por 48 horas a temperatura ambiente e então foi transferida para um balão de 250 mL e o THF foi eliminado em evaporador rotatório.

Adicionaram-se 50 mL de água destilada ao concentrado e o produto foi extraído com éter dietílico (4 x 50 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano/AcOEt 3:1. Obteve-se um par de isômeros *E*, *Z* (6,060 g; 0,018mol; 74,4 %).

Produtos [4]

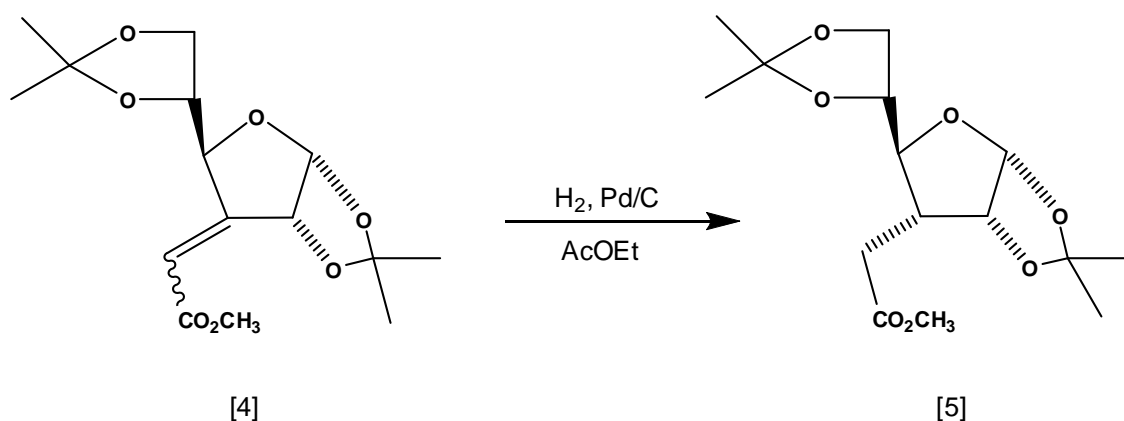
Fórmula Molecular: C₁₅H₂₂O₇ (**M:** 314,32 g·mol⁻¹).

Aspecto: Óleo incolor.

CCD: R_f: 0,62 e 0,67 (AcOEt/ hexano 1:3 v/v).

Infravermelho de 4 (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 2987, 2938, 2886, 1727, 1680, 1456, 1436, 1373, 1350, 1305, 1262, 1218, 1159, 108, 1019, 918, 886,845, 793,699, 512.

1.2.4.4. Síntese de 3-C-(carbometoximetil)-3-desoxi-1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-alofuranose [5].



Os ésteres [4] (6,000 g, 0,019 mol) foram dissolvidos em 100 mL de acetato de etila, e transferidos para um balão de fundo redondo, e 0,16 g de Pd/C a 10% foram adicionados ao balão. A mistura foi deixada sob agitação em atmosfera de H₂ por 18h, sendo o hidrogênio repostado 2 vezes. Acompanhou-se o final da reação através de CCD. Após o término da reação, a mistura foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório, obtendo assim o composto [5] (5,557g, 92,0%).

Produto [5]

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₄O₇ (**M:** 316,34 g mol⁻¹).

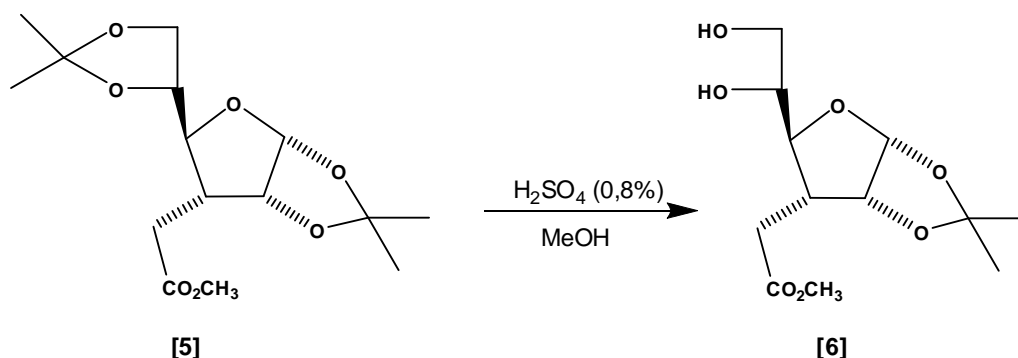
Aspecto: Sólido branco.

T_f: 56,5-57,3 °C. (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969: 57-58 °C).

CCD: R_f: 0,68 (hexano/AcOEt 3:1 v/v).

Infravermelho de 5 (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 2986, 2937, 2882, 1737, 1456, 1438, 1419, 1381, 1335, 1305, 1241, 1214, 1167, 1128, 1095, 1065, 1043, 1018, 947, 915, 874, 846, 794, 700, 660, 541, 512.

1.2.4.5. Síntese de 3-desoxi-3-C-(carbometoximetil)-1,2-O-isopropilideno- α -D-alofuranose [6]



O composto [5] (5,000 g, 0,0158 mol) foi transferido para um balão de fundo redondo de 100 mL, solubilizado em 30 mL de metanol, e 5 mL de solução aquosa de H_2SO_4 0,8% foram adicionados ao sistema que foi deixado sob agitação por 48h. A reação foi interrompida quando uma análise por CCD mostrou a formação de um produto secundário.

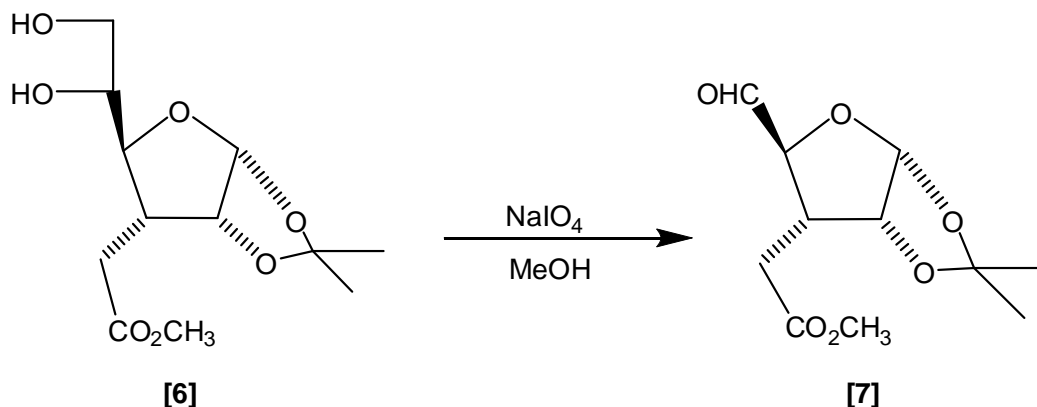
Neutralizou-se a mistura com solução de Na_2CO_3 10% (0,8 mL; 1,11 mol.L⁻¹) e o MeOH foi eliminado em evaporador rotatório. Obteve-se uma solução aquosa do produto [6] que foi utilizada na etapa posterior sem purificação.

Produto [6]

Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7$ (**M:** 276,12 gmol⁻¹)

CCD: R_f : 0,40 (AcOEt/hexano 2:1 v/v).

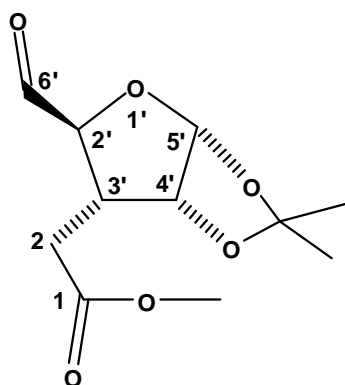
1.2.4.6. Síntese de 3-desoxi-3-C-(carbometoximetil)-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranose [7]



Acrescentou-se uma solução de NaIO_4 (3,93 g em 50 mL de água destilada) à solução contendo o diol [VI] obtido na etapa anterior (Item 1.2.5.5).

O pH da mistura foi monitorado e mantido em 7 durante toda a reação através da adição de gotas de solução de NaOH $0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Deixou-se sob agitação por 3 horas e então o produto foi extraído com AcOEt (5 x 50 mL). Os extratos orgânicos reunidos foram secados com MgSO_4 anidro, filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotatório.

Purificou-se o produto em coluna de sílica-gel, usando hexano/ AcOEt 1:1 v/v como eluente, obtendo-se o composto [7] (2,53 g, 65,6 % a partir de [6]).



Produto [7]

Fórmula Molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (**M:** $244,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Aspecto: Óleo viscoso incolor.

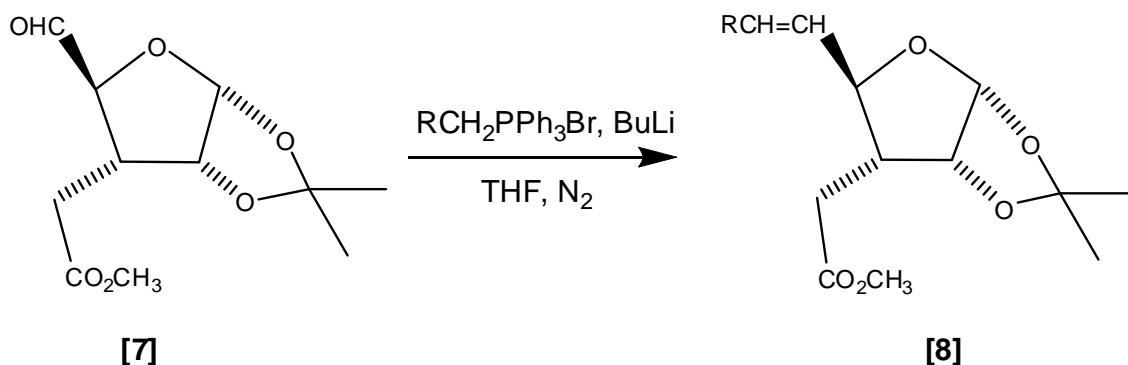
CCD: R_f: 0,41(AcOEt/hexano 1:1 v/v).

Infravermelho (Filme sobre NaCl, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 3453, 2987, 2953, 1736, 1438, 1416, 1382, 1375, 1331, 1217, 1167, 1129, 1080, 1020, 917, 874, 795, 736.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,33 (s, 3H, CH_3), 1,49 (s, 3H, CH_3), 2,42-2,52 (m, 1H, $\text{H3}'$), 2,58 (dd, 1H, $J_{2a,2b} = 17,4$ Hz, $J_{2a,3'} = 4,5$ Hz, H2a), 2,75 (dd, 1H, $J_{2b,2a} = 17,4$ Hz, $J_{2b,3'} = 10,2$ Hz, H2b), 3,69 (s, 3H, OCH_3), 4,05 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10,8$ Hz, $J_{2',6'} = 2,4$ Hz, $\text{H2}'$), 4,83 (pseudo t, 1H, $J = 3,8$ Hz, $\text{H4}'$), 5,95 (d, 1H, $J_{5',4'} = 3,6$ Hz, $\text{H5}'$), 9,65 (d, 1H, $J_{6,2} = 2,4$ Hz, H6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 26,9 (CH_3), 27,3 (CH_3), 29,3 (C2), 42,4 ($\text{C3}'$), 52,1 (OCH_3), 80,9 ($\text{C2}'$), 83,7 ($\text{C4}'$), 106,3 ($\text{C5}'$), 112,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 171,9 (C1), 200,5 ($\text{C6}'$).

1.2.4.7. Síntese de (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-{2-[2-alquenil]-4,5-Isopropilidenodioxitetraidrofurano-3-il}acetatos de metila [8]



1.2.4.7.1. Preparo dos sais de Wittig

A um balão bitubulado de 100 mL contendo trifenilfosfina (VETEC) sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se tolueno seco sob agitação magnética. Após a dissolução da trifenilfosfina (5 minutos) foi adicionado o haleto orgânico apropriado. O sistema foi deixado sob refluxo a 80°C e sob agitação magnética. Após formação de precipitado, a mistura foi resfriada, filtrada em funil de vidro sinterizado e o produto foi lavado com éter dietílico seco, obtendo-se os sais de Wittig **a-c**. As quantidades dos reagentes, solvente, tempos de reação e os rendimentos estão resumidos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Condições para preparação dos sais de Wittig **a-c** e rendimentos obtidos

Sal de Wittig	Haleto / g	Tolueno / mL	Ph ₃ P / g	Tempo / h	Rdt (%)
a	CH ₃ (CH ₂) ₆ Br / 10,23	20	15,00	24	90,4
b	2-CH ₃ PhCH ₂ Br / 5,00	12	6,94	4	96,3
c	3-CH ₃ PhCH ₂ Br / 3,00	7	4,08	4	96,0

a= Brometo de heptiltrifenilfosfônio, **b**= Brometo de (2-metilbenzil)trifenilfosfônio e **c**= Brometo de (3-metilbenzil)trifenilfosfônio

1.2.4.7.2. Reações de Wittig

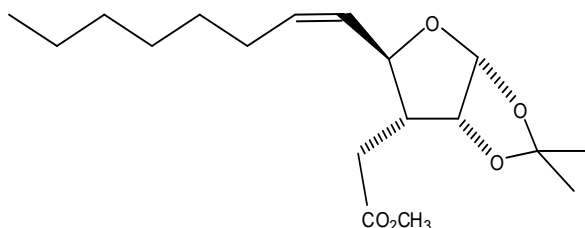
A um balão bitubulado de 100 mL, adicionou-se o sal de Wittig apropriado (Tabela 1.1), fez vácuo, deixou sob atmosfera de N₂. Em seguida, adicionou pela via lateral do balão THF seco, butilítio (2,0 molL⁻¹ em ciclohexano, SIGMA-ALDRICH) e após 30 minutos o aldeído [7] solubilizado em THF seco. Manteve-se o sistema sob agitação por 20 horas. O final da reação foi determinado por CCD. Após este período, eliminou-se o THF em evaporador rotatório, acrescentou-se água à mistura e transferiu-se para um funil de separação. Os produtos foram extraídos com éter dietílico. O balão de reação foi lavado com clorofórmio e o restante de aldeído que não reagiu foi assim recuperado. Foi adicionado MgSO₄ anidro para remoção da água residual na fase etérea e a fase etérea foi concentrada em evaporador rotatório. Os produtos foram purificados em coluna de sílica-gel, usando hexano/AcOEt 4:1 v/v como eluente obtendo-se os compostos [8a], [8b], [8c] (0,878 g (49,7%), 0,417g (59,6%) e 0,415 (59,2%), respectivamente). O composto alifático [8a] tem a configuração *Z* e os produtos aromáticos [8b] e [8c] foram obtidos como misturas de isômeros *Z* e *E*, aproximadamente 3,5:1 (*Z*:*E*).

Tabela 1.2. Reagentes e solventes utilizados nas reações de Wittig

Composto 7 (g)	Sal de Wittig (g)	Butilítio (mL)	THF (mL)	Et₂O (mL)
1,321	(a) 4,146	4,6	17 + 7	3 x 20
0,515	(b) 1,092	1,2	8 + 3	3 x 12
0,515	(c) 1,092	1,2	8 + 3	3 x 12

a= Brometo de heptiltrifenilfosfônio, **b=** Brometo de (2-metilbenzil)trifenilfosfônio e **c=** Brometo de (3-metilbenzil)trifenilfosfônio

Produto [8a]



Fórmula Molecular: C₁₈H₃₀O₅ (**M:** 326,42 gmol).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 54,6-55,2 °C. (ANDERSON e FRASER-REID, 1975: 60,0-65,0 °C).

CCD: R_f: 0,63 (hexano/AcOEt 5:1 v/v).

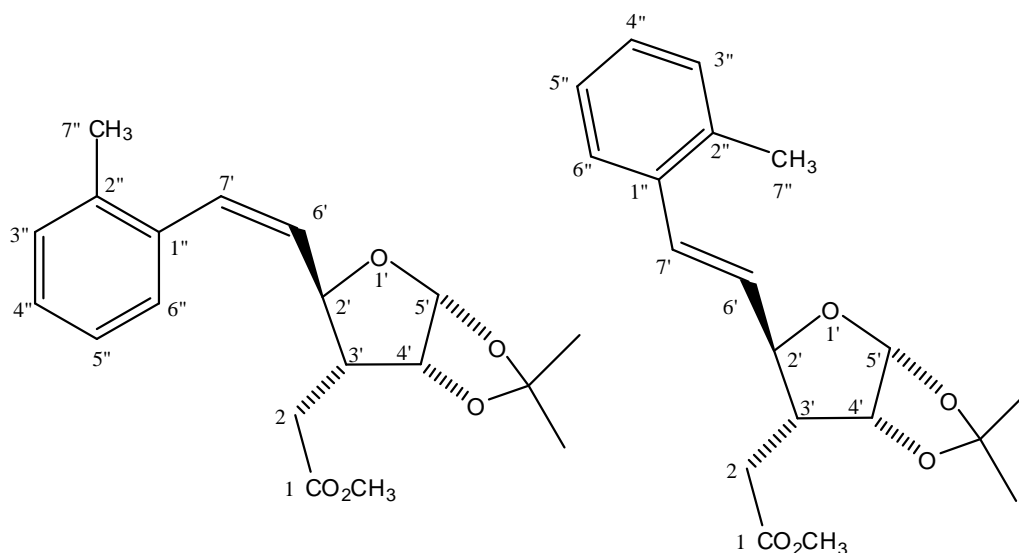
Análise elementar: Calculado: C: 66,26%; H: 9,20 %

Experimental: C: 66,44%; H: 8,96 %

Erro relativo: C: 0,3%; H: 2,7 %

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 2984, 2955, 2929, 2856, 1739, 1664, 1456, 1437, 1415, 1380, 1373, 1328, 1250, 1214, 1167, 1133, 1091, 1073, 1023, 967, 912, 873, 745, 723, 698, 670.

Produtos [8b]



Fórmula Molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$ (**M:** 332,39 g mol^{-1}).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 86,7-87,6 °C.

CCD: R_f: 0,63 e 0,53 (AcOEt/hexano 1:3 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 68,61%; H: 7,22 %

Experimental: C: 68,40%; H: 7,28 %

Erro relativo: C: 0,3%; H: 0,8 %

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 3060, 3017, 2987, 2952, 1738, 1601, 1487, 1455, 1437, 1415, 1381, 1373, 1331, 1251, 1215, 1166, 1131, 1089, 1077, 1044, 1017, 967, 913, 873, 790, 762, 744.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,28 (s, 3H, CH_3), 1,33 (s, 3H, CH_3^*), 1,35 (s, 3H, CH_3), 1,61 (s, 3H, CH_3^*), 2,15-2,25 (m, 2H, **H2a**, **H2a***), 2,27 (s, **CH37''**), 2,42-2,48 (m, 1H, **H2b***), 2,44 (dd, 1H, $J_{2b,2a}=17,1\text{Hz}$, $J_{2b,3'}=11,0\text{Hz}$, **H2b**), 2,50-2,52 (m, 2H, **H3'**, **H3'***), 3,65 (s, 3H, OCH_3^*), 3,68 (s, 3H, OCH_3), 4,33-4,38 (m, 1H, **H2''**), 4,44 (pseudo t, 1H, $J \cong 9,7\text{ Hz}$, **H2'**), 4,74-4,77 (m, 1H, **H4'***), 4,83 (t, 1H, $J_{4',5'}=3,9\text{ Hz}$, **H4'**), 5,85 (d, 1H, $J_{5',4'}=3,9\text{ Hz}$, **H5'**), 5,89-5,91 (m, 2H, **H6'**,

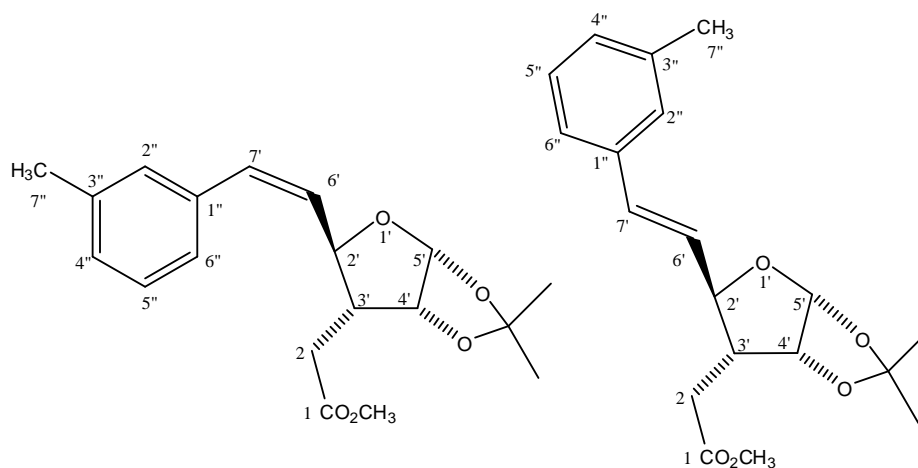
H6⁺*), 6,84 (d, 1H, $J_{7,6} = 11,4\text{Hz}$, **H7'**), 7,17-7,20 (m, 4H, **H3''**, **H3''***, **H4''**, **H4''***), 7,25-7,38 (m, 4H, **H5''**, **H5''***, **H6''**, **H6''***).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 20,15 (**CH₃7''**), 26,9 (**CH₃**), 29,19 (**C2**), 29,79 (**CH₃**), 46,45 (**C3'**), 51,90 (**OCH₃**), 76,49 (**C-2'**), 81,04 (**C4'**), 105,10 (**C5'**), 111,90 (**C(CH₃)₂**), 125,78 (**C5''**), 127,60 (**C6''**), 128,08 (**C3''**), 128,24 (**C4''**), 129,23 (**C6'**), 130,15 (**C7'**), 135,90 (**C2''**), 136,99 (**C1''**), 172,70 (**C1**).

Obs: os sinais contendo o símbolo "*" se referem ao isômero minoritário *E*. Os demais sinais se referem ao isômero principal *Z*, sendo a proporção *Z*:*E* de 3,5:1.

EM, m/z (%): 332 (0,34, M^+), 317 (3, $(M^+ - 15)^+$), 242 (22), 215 (5), 169 (15), 157 (17), 155 (14), 145 (41), 142 (17), 141 (12), 131 (27), 129 (20), 128 (16), 118 (24), 117 (18), 115 (22), 105 (9), 91 (11), 88 (10), 86 (56), 85 (12), 84 (100), 69 (7), 59 (33), 55 (17), 51 (74), 50 (12), 43 (11), 41(9).

Produtos [8c]



Fórmula Molecular: C₁₉H₂₄O₅ (**M:** 332,39 g.mol⁻¹).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 75,3-76,2 °C

CCD: R_f: 0,62 e 0,52 (AcOEt/hexano 1:3 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 68,61%; H: 7,22 %

Experimental: C: 68,46%; H: 7,28 %

Erro relativo: C: 0,2%; H: 0,8 %

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}/\text{cm}^{-1}$): 3058, 3016, 2987, 2953, 2936, 1738, 1603, 1583, 1488, 1455, 1437, 1381, 1331, 1215, 1167, 1017, 966, 914, 873, 802, 790, 780, 753, 701.

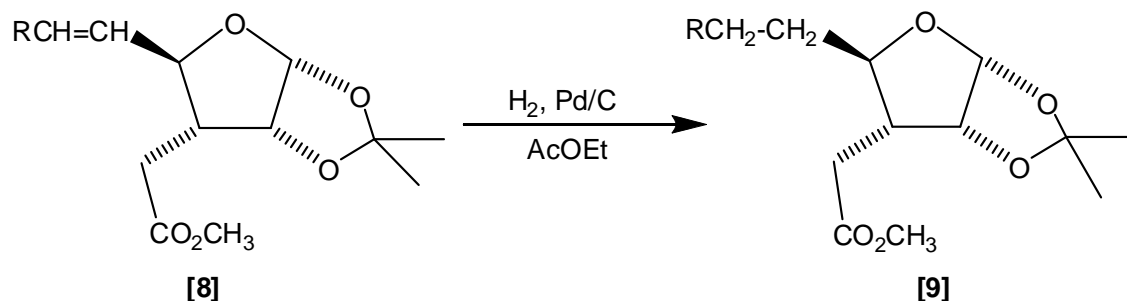
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,28 (s, 3H, CH_3^*), 1,29 (s, 3H, CH_3), 1,34 (s, 3H, CH_3), 1,56 (s, 3H, CH_3^*), 2,14-2,30 (m, 2H, H_3' , $\text{H}_3'^*$), 2,16-2,24 (m, 2H, H_2a , H_2a^*), 2,27 (CH_37''), 2,31-2,40 (m, 1H, H_2b^*), 2,33 dd, $J_{2\text{b},2\text{b}}=17,2\text{Hz}$, $J_{2\text{b},3}=11,2\text{Hz}$), 3,64 (s, 3H, OCH_3^*), 3,68 (s, 3H, OCH_3), 4,02-4,19 (m, 1H, $\text{H}_2'^*$), 4,34 (pseudo t, 1H, $J \cong 9,6$ Hz, $\text{H}-2'$), 4,47 (t, 1H, $J_{4,5}=3,8$ Hz, H_4') 4,68-4,84 (m, 1H, $\text{H}_4'^*$), 5,61(dtd, $J_{6',6''}=2,7$ Hz, $J_{6',2}=9,6$ Hz, $J_{6',7}=11,5\text{Hz}$, H_6'), 5,64-5,72 (m, 1H, $\text{H}_6'^*$), 5,87 (d, 1H, $J_{5',4'}=3,8$ Hz, H_5'), 5,91 (d, 1H, $J_{5'^*,4'^*}=4,0$ Hz, $\text{H}_5'^*$), 6,85 (dd, 1H, $J_{7',6'}=11,5\text{Hz}$, $J_{7'}=2,7$, H_7'), 6,88 (d, 1H, $J_{7'^*,6'^*}=15,3\text{Hz}$, $\text{H}_7'^*$), 7,10-7,22 (m, 2H, H_4'' , $\text{H}_4''^*$), 7,29-7,32 (m, 4H, H_2'' , $\text{H}_2''^*$, H_6'' , $\text{H}_6''^*$), 7,38-7,46 (m, 2H, H_5'' , $\text{H}_5''^*$).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 20,15 (CH_37''), 26,48 (CH_3), 26,79 (CH_3), 29,35 (C_2), 46,45 (C_3'), 51,95 (OCH_3), 77,49 ($\text{C}-2'$), 81,04 (C_4'), 105,16 (C_5'), 111,94 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 125,78 (C_6''), 126,35 (C_2''), 128,25 (C_6'), 129,23 (C_7'), 130,54 (C_4''), 132,59 (C_5''), 136,39(C_1''), 172,72 (C_1).

Obs: os sinais contendo o símbolo “*” se referem ao isômero minoritário *E*. Os demais sinais se referem ao isômero principal *Z*, sendo a proporção *Z*:*E* de 3,5:1.

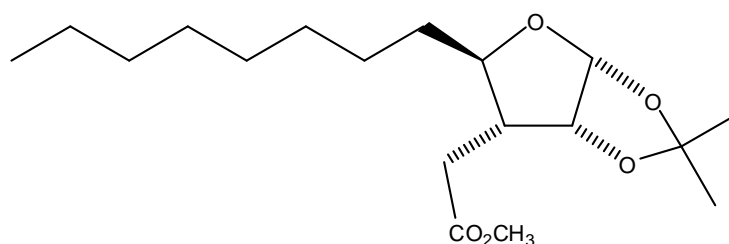
EM, m/z (%): 332 (0,26, M^{\dagger}), 317 (2, ($\text{M}^{\dagger}-15$)⁺), 242 (12), 169 (10), 157 (11), 145 (19), 142 (11), 131 (15), 129 (12), 118 (17), 115 (10), 84 (100), 69 (8), 59 (20), 55 (13), 51 (70), 50 (11), 43 (9), 41(6).

1.2.4.8. Síntese de (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-[2-(alquil)-4,5-isopropilideno-dioxi-tetraidrofuran-3-il]acetatos de metila [9]



Os compostos [8] (0,847 g de [8a], 0,416 g de [8b] ou 0,411g de [8c]) foram dissolvidos em 20 mL de AcOEt e adicionaram-se 0,03 g de Pd/C a 10%. O sistema foi mantido sob agitação magnética e atmosfera de H₂ durante 36 horas, sendo o H₂ repostado 3 vezes ao dia. O final da reação foi determinado através de CCD. A mistura foi filtrada através de filtração simples para retirar o catalisador e então concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se os compostos [9a] (0,8181 g, 96,0 %), [9b] (0,3905 g, 93,4%), [9c] (0,3850 g, 93%).

Produto [9a]



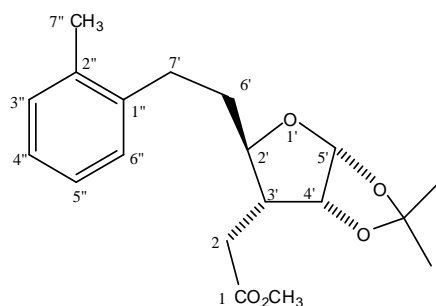
Fórmula Molecular: C₁₈H₃₂O₅ (**M:** 328,43 gmol⁻¹).

Aspecto: óleo incolor.

CCD: *R_f*: 0,65 (hexano/AcOEt 5:1 v/v).

Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 2984, 2954, 2928, 2856, 1739, 1458, 1437, 1380, 1373, 1333, 1250, 1214, 1167, 1132, 1098, 1076, 1021, 968, 912, 874, 850, 803, 726, 670. (ANDERSON e FRASER-REID, 1985: 1730, 1458, 1375, 1160, 1010, 868 cm⁻¹).

Produtos [9b]



Fórmula Molecular: C₁₉H₂₆O₅ (**M:** 334,40 g mol⁻¹).

Aspecto: sólido branco

T_f: 75,8-76,9 °C

CCD: *R_f*: 0,65 (AcOEt/hexano 1:3 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 68,24%; H: 7,84 %

Experimental: C: 68,33%; H: 7,92 %

Erro relativo: C: 0,13% H: 1,02%

Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3017, 2960, 2925, 2870, 1734, 1601, 1487, 1459, 1434, 1415, 1380, 1373, 1327, 1259, 1215, 1163, 1090, 1018, 967, 912, 873, 799, 745.

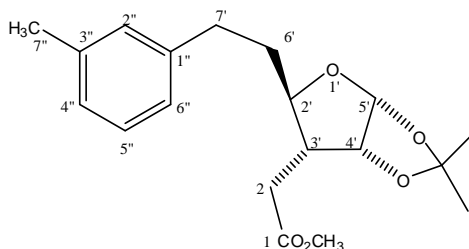
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,32 (s, 3H, CH₃), 1,48 (s, 3H, CH₃), 1,58-1,62 (m, 2H, H6'a e H6'b), 2,04-2,17 (m, H3'), 2,26 (dd, 1H, J_{2a,2b} = 16,8 Hz, J_{2a,3'} = 4,3 Hz, H2a), 2,31 (s, 3H, CH₃7''), 2,58-2,72 (m, 1H, H7'a), 2,60-2,71 (m, 1H, H2b), 2,83-2,94 (m, 1H, H7'b), 3,69 (s, 3H, OCH₃), 3,75-3,85 (m, 1H, H2'), 4,77 (pseudo t, 1H, J ≈ 4 Hz, H4'), 5,85 (d, 1H, J_{5',4'} = 3,9 Hz, H5'), 7,06-7,15 (m, 3H, H3'', H5'', H6''), 7,26-7,31 (m, 1H, H4'').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 19,49 (CH₃7''), 26,46 (CH₃), 26,50 (CH₃), 29,73 (C7'), 29,76 (C2), 33,34 (C6'), 44,99 (C3'), 52,01 (OCH₃), 76,49 (C2'), 81,04 (C4'), 104,92 (C5'), 111,58 (C(CH₃)₂), 126,17 (C3''), 126,24 (C5''), 128,24 (C4''), 130,40 (C2''), 136,30 (C1''), 140,21 (C6''), 172,80 (C1).

EM, m/z (%): 334 (0,09, M⁺), 319 (8), 276 (22), 186 (11), 157 (32), 156 (15), 153 (19), 143 (13), 142 (15), 134 (12), 131 (16), 130 (14), 129 (11), 127 (14),

119 (11) 118 (12), 117 (10), 106 (17), 105 (100), 104 (13), 100 (11), 97 (15), 91 (14), 84 (13), 79 (17), 77 (15), 59 (26), 51 (10).

Produto [9c]



Fórmula Molecular: C₁₉H₂₆O₅ (**M:** 334,40 g mol⁻¹).

Aspecto: sólido amarelo claro.

T_f: 48,2-48,7 °C

CCD: *R_f*: 0,65 (AcOEt/hexano 1:3 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 68,24%; H: 7,84 %

Experimental: C: 68,69%; H: 7,96 %

Erro relativo: C: 0,66% H: 1,53%

Infravermelho (KBr, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3019, 2987, 2952, 2935, 1738, 1603, 1582, 1487, 1437, 1373, 1331, 1251, 1215, 1138, 1018, 979, 897, 876, 787, 741.

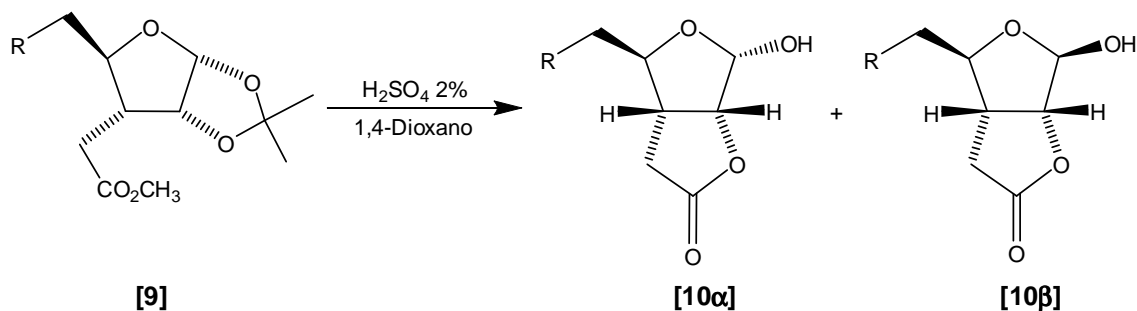
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,32 (s, 3H, CH₃), 1,47 (s, 3H, CH₃), 1,60-1,68 (m, 2H, H6'a e H6'b), 2,03-2,14 (m, 1H, H3'), 2,17 (s, 3H, CH₃7''), 2,24-2,26 (m, 1H, H7'a), 2,68 (dd, 1H, J_{2a,2b}=16,8Hz, J_{2a,3}= 4,3Hz, H2a), 2,78-2,90 (m, 1H, H7'b), 3,69 (s, 3H, OCH₃), 3,75-3,85 (m, 2H, H2', H2b), 4,76 (pseudo t, 1H, J □ 4 Hz, H4'), 5,85 (d, 1H, J_{5',4'}= 4,0Hz, H5'), 7,07-7,11 (m, 2H, H4'', H6''), 7,16-7,23 (m, 2H, H2'', H5'').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 21,57 (CH₃7''), 26,48 (CH₃), 26,79 (CH₃), 29,67 (C2), 32,41 (C7'), 34,73 (C6'), 45,01 (C3'), 51,95 (OCH₃), 77,49 (C2'), 81,09 (C4''), 104,99 (C5'), 111,94 (C(CH₃)₂), 126,82 (C6''), 128,49 (C6''), 129,50 (C5''), 133,23 (C2''), 138,13 (C3''), 142,06 (C1''), 172,57 (C1).

EM, m/z (%): 334 (0,09, M⁺), 276 (22), 186 (11), 157 (31), 156 (15), 153 (19), 142 (13), 134 (12), 131 (16), 130 (14), 129 (11), 127 (14), 119 (11) 118 (11),

117 (10), 106 (16), 105 (100), 104 (13), 100 (11), 97 (15), 91 (14), 84 (13), 79 (17), 77 (15), 59 (26), 51 (10).

1.2.4.9. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*,8*R*)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octan-3-onas [10_β] e (1*R*,5*R*,6*R*,8*S*)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octan-3-onas [10_α].

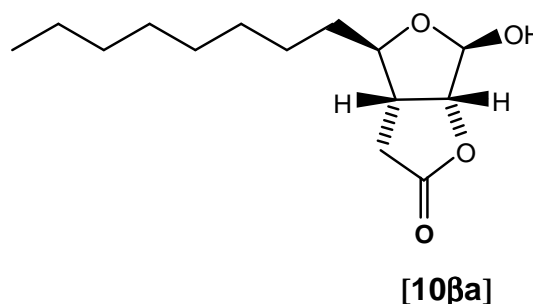
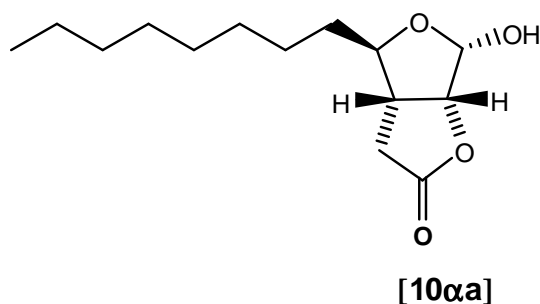


Os ésteres [9] (0,759 g de [9a], 0,385 de [9b] ou 0,381 g de [9c]), foram solubilizados em 1,4-dioxano em um balão de fundo redondo de 50 mL e acrescentou-se solução aquosa de H₂SO₄ a 2% (tabela 1.3). Manteve-se o sistema em refluxo e sob agitação por 3 horas. Verificou-se o final da reação por CCD e, após o resfriamento, extraíram-se os produtos com éter dietílico (130 mL para cada mmol de [9] em três porções). Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaHCO₃ (30 mL para cada mmol de [9]). Foi adicionado a fase orgânica MgSO₄ anidro para remoção da água residual e em seguida foi filtrado sendo o solvente removido em evaporador rotatório.. Purificaram-se os produtos em coluna de sílica gel utilizando como eluente uma mistura hexano/ AcOEt 2:1 v/v obtendo 0,538 g de [10_αa] + [10_βa], 0,280 g de [10_αb] e [10_βb] e 0,270 de [10_αc] e [10_βc] com 90,8%; 92,6% e 90,4 de rendimento respectivamente.

Tabela 1.3 - Condições utilizadas nas reações de hidrólise

Produto	1.4-Dioxano (mL)	H ₂ SO ₄ 2% (mL)
[9a]	35	16
[9b]	18	8,2
[9c]	18	8,1

Produtos [10_αa] e [10_βa]



Fórmula Molecular: C₁₄H₂₄O₄ (**M:** 256,33 g mol⁻¹)

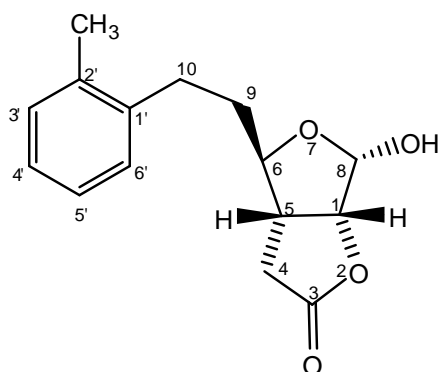
Aspecto: sólido branco.

T_f: 72,5-74,7 °C. (ANDERSON e FRASER-REID, 1975: 73,5-74,5 °C).

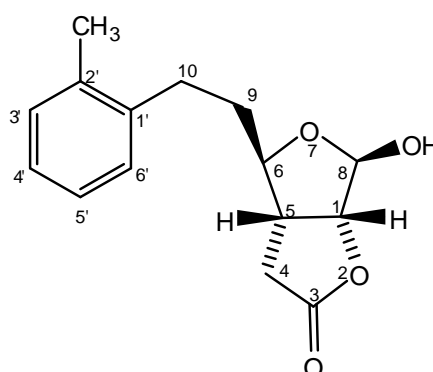
CCD: *R_f*: 0,45 (AcOEt/hexano 1:2 v/v).

Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3403, 2954, 2925, 2854, 1781, 1465, 1419, 1377, 1357, 1347, 1293, 1239, 1160, 1079, 1047, 1005, 973, 905, 776, 723, 695. (ANDERSON e FRASER-REID, 1985: 3400, 1781, 1465, 1345, 1165, 1035 cm⁻¹).

Produtos [10_αb] e [10_βb]



[10_αb]



[10_βb]

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₈O₄ (**M:** 262,30 g mol⁻¹)

Aspecto: sólido branco.

T_f: 67,8,5-69,7°C.

CCD: *R_f*: 0,64 e 0,71 (AcOEt/hexano 1:3 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 69,22%; H: 6,20%

Experimental: C: 68,57 %; H: 6,28 %

Erro relativo: C: 0,94% H: 1,27%

Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3018, 2948, 2872, 1789, 1493, 1461, 1363, 1309, 1292, 1145, 1075, 1004, 979, 931, 904, 761, 744.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,25 (sl, 2H, OH, OH*) 1,84-1,96 (m, 3H, H_{9a}, H_{9a}*, H_{9b}*), 2,02-2,18 (m, 1H, H_{9b}), 2,31 (s, 6H, CH₃ e CH₃*), 2,44 (dd, 2H, J_{4a,4b}=18Hz, J_{4a,5}=1,5Hz H_{4a}), 2,50-2,54 (m, 1H, H_{4a}*), 2,59-2,68 (m, 3H, H_{4b}, H_{4b}*, H₅*), 2,91-2,95 (m, 1H, H₅), 3,45-3,52 (m, 4H, H_{10a}, H_{10a}*, H_{10b}, H_{10b}*), 3,95-4,08 (m, 2H, H₆, H₆*), 4,89 (d, 1H, J_{1,5}=6,0 Hz, H₁), 4,90-4,93 (m, 1H, H₁*), 5,55 (d, 1H, J_{8,1}=3,9Hz, H₈*), 5,59 (s, 1H, H₈), 7,11-7,15 (m, 8H, H₃', H₃'*, H₄', H₄'*, H₅', H₅'*, H₆', H₆'*).

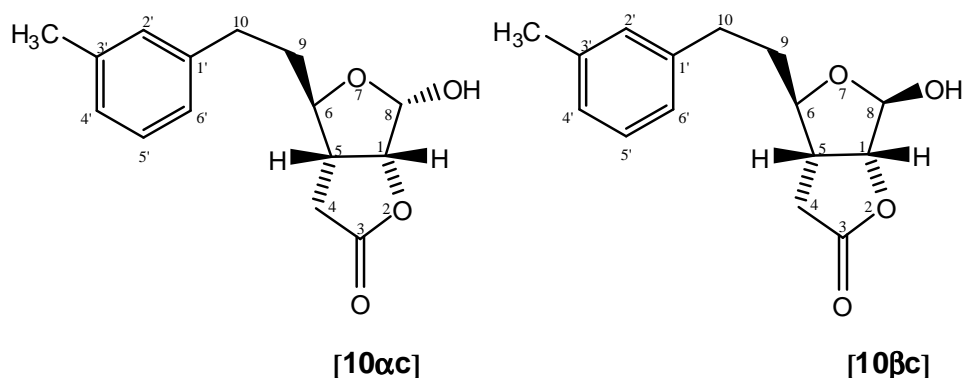
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 19,27 (CH₃ e CH₃*), 29,30 (C₁₀*), 29,68 (C₁₀), 33,30 (C₄*), 33,96 (C₄), 35,21 (C₉*), 38,03 (C₉), 42,09 (C₅*), 42,67 (C₅), 82,17 (C₁*), 82,81 (C₆*), 87,65 (C₆), 88,29 (C₁), 95,54 (C₈*), 101,02 (C₈), 126,06 (C₅' e C₅'*), 126,09 (C₄'*), 126,24 (C₄'), 128,73 (C₆'*), 130,31 (C₆'), 135,80

(C2' e C2'*), 136,06 (C3' e C3'*), 139,47 (C1' e C1'*), 175,66 (C3), 176,49 (C3*).

Obs: Os sinais marcados com "*" referem-se aos átomos do epímero minoritário, no qual a hidroxila encontra-se ligada em posição alfa. Os demais sinais se referem ao epímero principal, com a hidroxila em posição beta.

EM, m/z (%): 262 (1,94, M⁺), 244 (24), 157 (15), 131 (13), 118 (14), 117 (10), 106 (42), 105 (100), 104 (20), 91 (26), 87 (11), 86 (46), 85 (12), 84 (91), 79 (17), 77 (21), 65 (11), 57 (16), 55 (22), 51 (65).

Produtos [10_αc] e [10_βc]



Fórmula Molecular: C₁₅H₁₈O₄ (**M:** 262,30 g mol⁻¹).

Aspecto: Sólido branco.

T_f: 64,2- 65,0 °C.

CCD: R_f: 0,59 e 0,65 (AcOEt/hexano 1:1 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 69,22%; H: 6,20%

Experimental: C: 67,69%; H: 6,19 %

Erro relativo: C: 2,21% H: 0,16%

Infravermelho (KBr, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3407, 3015, 2930, 2862, 1781, 1607, 1487, 1453, 1418, 1292, 1237, 1165, 1079, 1046, 972, 1145, 1075, 1004, 979, 905, 787, 701.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,62-1,98 (m, 3H, **H9a**, **H9a***, **H9b***), 1,65 (sl, 2H, OH, OH*), 2,05-2,18 (m, 1H, **H9b**), 2,33 (s, 6H, **CH₃** e **CH₃***), 2,35-2,46 (m, 2H, **H4a***) 2,42 (dd, 1H, $J_{4a,4b} = 16,8$ Hz, $J_{4a,5} = 1,8$ Hz, **H4a**), 2,60-2,81 (m, 4H, **H4b**, **H4b***, **H5**, **H5***), 2,87-2,95 (m, 4H, **H10a**, **H10a***, **H10b**, **H10b***), 3,92-4,04 (m, 2H, **H6**, **H6***), 4,88 (d, 1H, $J_{1,5} = 6,0$ Hz, **H1**), 4,90-4,92 (m, 1H, **H1***), 5,54 (d, 1H, d, $J_{8,1} = 3,6$ Hz, **H8***), 5,58 (s, 1H, **H8**), 6,97-7,03 (m, 8H, **H2'**, **H2''***, **H4'**, **H4''***, **H5'**, **H5''***, **H6'**, **H6''***).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 21,27 (**CH₃**), 21,38 (**CH₃***), 31,87 (**C10***), 32,2 (**C10**), 33,27 (**C4***), 33,93 (**C4**), 36,45 (**C9***), 39,8 (**C9**), 42,09 (**C5***), 42,67 (**C5**), 82,13 (**C1***), 82,66 (**C6***), 87,44 (**C6**), 88,23 (**C1**), 95,64 (**C8***), 101,04 (**C8**), 119,86 (**C4'** e **C4''***), 125,30 (**C6'** e **C6''***), 125,35 (**C5''***), 126,88 (**C5'**), 126,93 (**C3''***), 128,43 (**C2''***), 129,18 (**C2'**) 138,13 (**C3'**), 140,87 (**C1''*** e **C1'**), 169,90 (**C3***), 175,66 (**C3**).

Obs: Os sinais marcados com "*" referem-se aos átomos do epímero minoritário, no qual a hidroxila encontra-se ligada em posição alfa. Os demais sinais se referem ao epímero principal, com a hidroxila em posição beta.

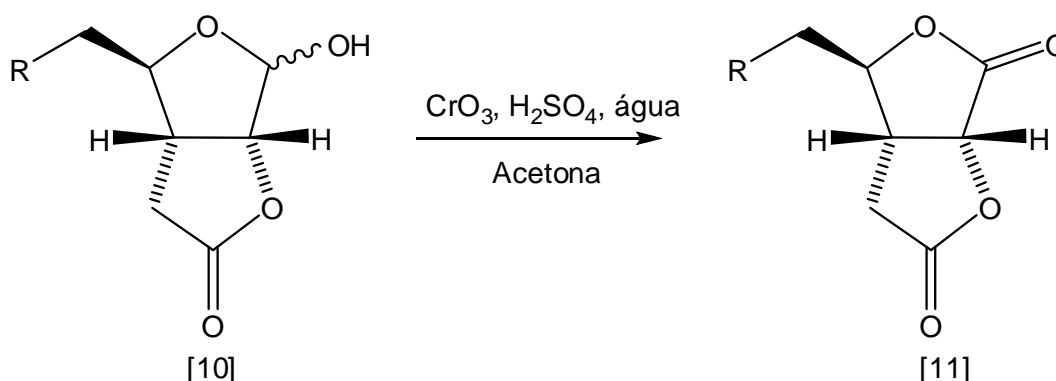
EM, m/z (%): 262 (1,9, M^+), 244 (22), 157 (19), 131 (16), 119 (14), 118 (17), 106 (91), 105 (100), 91 (33), 86 (49), 85 (11), 84 (99), 79 (16), 77 (21), 57 (14), 55 (20), 51 (78).

1.2.4.10. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(alquil)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-diona [11]

1.2.4.10.1. Preparo do Reagente de Jones

O reagente de Jones foi preparado dissolvendo-se 2,67 g de CrO₃ em 2,3 mL de H₂SO₄ concentrado e 4 mL de água destilada. O volume da solução foi completado para 10 mL com água destilada.

1.2.5.10.2. Reações de oxidação de Jones

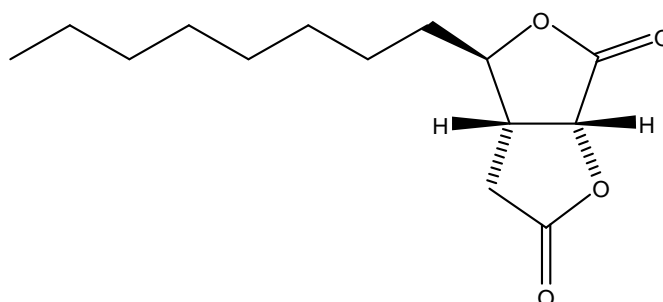


As misturas de bicilos [10] (0,536 g de [10a], 0,277 g de [10b] ou 0,260 g de [10c]) foram dissolvidas em acetona previamente tratada com KMnO₄ e uma porção do Reagente de Jones foi adicionada lentamente e sob agitação ao meio reacional. Após 10 minutos de agitação, adicionou-se outra porção de igual volume do Reagente de Jones, e a mistura com coloração marrom foi deixada sob agitação por mais 30 min. Adicionou-se metanol, e após 10 minutos, água destilada. Transferiu-se a mistura para um funil de separação e extraiu-se com éter dietílico. Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaHCO₃, e em seguida com água destilada. A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se as bis- γ -lactonas que foram purificadas em coluna de sílica gel, usando AcOEt/hexano 1:2 como eluente, obtendo [11a], [11b] e [11c] (0,427 g, 0,202 g, 0,181 g, respectivamente com rendimentos de 80,3%, 73,7% e 70,3%). As condições utilizadas nas reações encontram-se detalhadas na tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Condições utilizadas nas reações de oxidação de Jones

Composto [10] / g (mmol)	Acetona/ mL	Reagente de Jones / mL	Metanol/ mL	Água/ mL	NaHCO ₃ (aq)/ mL
[10a] 0,81 (3,159)	44	2,2 + 2,2	90	45	2 x 35
[10b] 0,32 (1,219)	17	0,9 + 0,9	35	20	2 x 15
[10c] 0,26 (0,991)	14	0,7 + 0,7	30	15	2 x 12

Produto [11a]



Fórmula Molecular: C₁₄H₂₂O₄ (**M:** 254,31 g mol⁻¹)

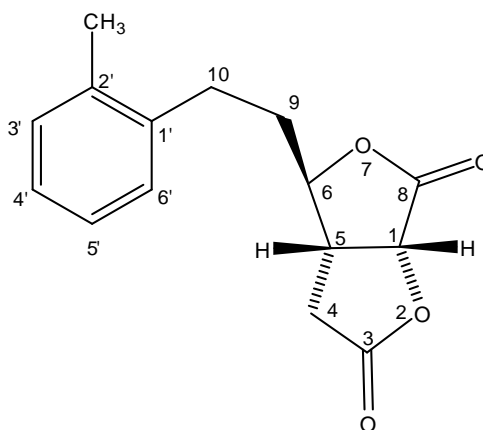
Aspecto: sólido branco.

T_f: 108,0-109,5 °C. (ANDERSON e FRASER-REID, 1985: 105,0-111,5 °C).

CCD: R_f: 0,48 (hexano/AcOEt 1:1 v/v).

Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 2954, 2925, 2855, 1783, 1465, 1417, 1360, 1296, 1246, 1217, 1149, 1129, 1075, 1054, 1007, 973, 928, 903, 857, 790, 723, 692, 633. (ANDERSON e FRASER-REID, 1985: 1600, 1460, 1282, 1148, 1070 cm⁻¹).

Produto [11b]



Fórmula Molecular: C₁₅H₁₆O₅ (**M:** 260,29 gmol⁻¹).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 109,2-110,1 °C

CCD: R_f: 0,58 (AcOEt/hexano 1:1 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 68,66%; H: 7,28 %

Experimental: C: 68,64%; H: 7,38 %

Erro relativo: C: 0,029% H: 1,37%

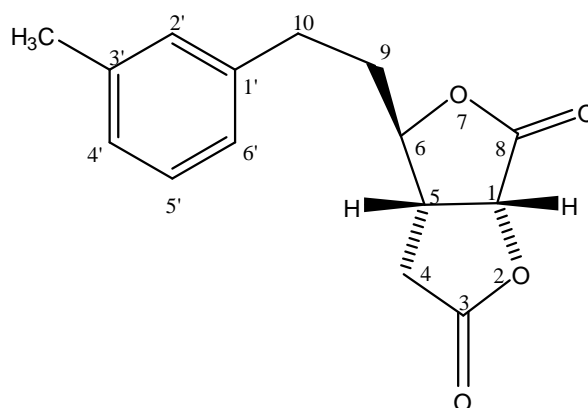
Infravermelho (KBr, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3007, 2981, 2940, 1735, 1637, 1486, 1456, 1435, 1417, 1384, 1373, 1327, 1299, 1210, 1199, 1168, 1076, 1089, 1023, 985, 963, 909, 885, 845, 755.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,96-2,05 (m, 2H, **H9a**, **H9b**), 2,52 (dd, 1H, J_{4a,4b} = 18,2Hz, J_{4a,5} = 3,9Hz, **H4a**), 2,67 (dd, 1H, J_{4b,4a} = 18,2 Hz, J_{4b,5} = 8,0 Hz, **H4b**), 2,73 (s, 3H, **CH₃**), 2,82-2,96 (m, 2H, **H10a**, **H10b**), 3,01-3,09 (m, 1H, **H5**), 4,36(dt, 1H, J_{6,9a} = J_{6,9b} = 4,8 Hz, J_{6,5} = 6,9 Hz, **H6**), 5,03 (d, 1H, J_{1,5} = 7,8 Hz, **H1**), 7,09-7,19 (m, 4H, **H3'**, **H4'**, **H5'**, **H6'**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 19,24 (**CH₃**), 28,64 (**C5**), 32,56 (**C10**), 35,98 (**C9**), 40,18 (**C4**), 82,81 (**C6**), 83,95 (**C1**), 126,28 (**C5'**), 126,72 (**C4'**), 128,78 (**C6'**), 130,59 (**C3'**), 135,82 (**C2'**), 137,80 (**C1'**), 169,74 (**C8**), 173,47 (**C3**).

EM, m/z (%): 260 (14, M⁺), 185 (14), 131 (13), 130 (19), 106 (29), 105 (100), 104 (37), 91 (24), 86 (57), 84 (91), 83 (12), 79 (14), 77 (20), 57 (13), 55 (21), 51 (67), 50 (10).

Produto [11c]



Fórmula Molecular: C₁₅H₁₆O₅ (**M:** 260,29 g mol⁻¹).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 115,6 -116,8 °C

CCD: R_f: 0,70 (AcOEt/hexano 1:2).

Análise elementar: Calculado: C: 68,66%; H: 7,28 %

Experimental: C: 68,25%; H: 7,30%

Erro relativo: C: 0,55% H: 0,27%

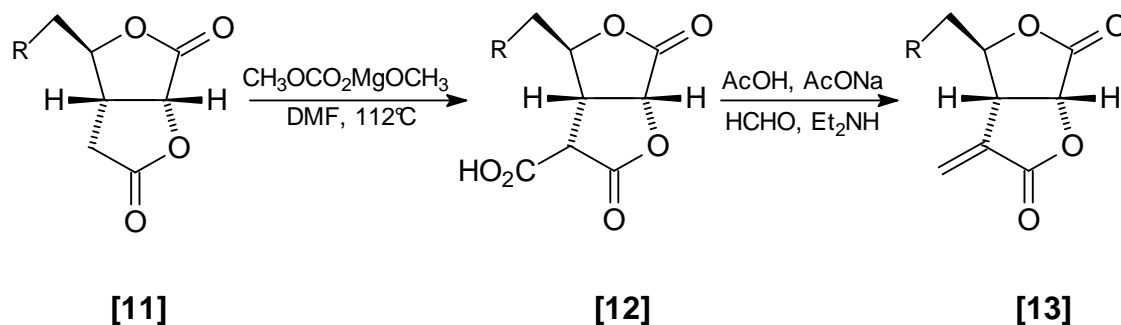
Infravermelho (Filme sobre NaCl, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3010, 2924, 2859, 1789, 1608, 1488, 1455, 1417, 1363, 1310, 1294, 1245, 1217, 1145, 1076, 1059, 1031, 981, 934, 901, 868, 785, 725, 702.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,98-2,08 (m, 2H, **H9a**, **H9b**), 2,34 (s, 3H, **CH₃**), 2,42 (dd, 1H, *J*_{4a,4b} = 18,0Hz, *J*_{4a,5} = 4,5Hz, **H4a**), 2,65-2,96 (m, 2H, **H10a**, **H10b**), 2,88 (dd, 1H, *J*_{4b,4a} = 18,0 Hz, *J*_{4b,5} = 9,6 Hz **H4b**), 2,97-3,07 (m, 1H, **H5**), 4,31 (dt, 1H, *J*_{6,9a} = *J*_{6,9b} = 5,1 Hz, *J*_{6,5} = 8,1Hz, **H6**), 5,01 (d, 1H, *J*_{1,5} = 8,1 Hz, **H1**), 6,96-7,06 (m, 4H, **H2'**, **H4'**, **H5'** **H6'**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 21,37 (**CH₃**), 31,16 (**C5**), 32,66 (**C10**), 37,22 (**C9**), 40,15 (**C4**), 77,42 (**C1**), 83,70 (**C6**), 125,30 (**C2'**), 127,35 (**C4'**), 128,66 (**C3'**), 129,18 (**C6'**), 138,44 (**C5'**), 139,47 (**C1'**), 169,71 (**C8**), 173,45 (**C3**).

EM, m/z (%): 260 (5,4; M⁺), 106 (41), 105 (43), 91 (16), 86 (11), 85 (60), 84 (100), 77 (11), 57 (15), 55 (16), 51 (80), 50 (11).

1.2.4.11. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(alquil)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octano-3,8-dionas [13]



Transferiram-se os compostos [11a], [11b] ou [11c] para um balão de 2 vias de 50 mL, deixou-se sob atmosfera de nitrogênio e com ajuda de uma seringa de 10 mL acrescentou-se solução de carbonato de metilmagnésio (CMM), 2,0 mol L⁻¹). O sistema foi deixado em refluxo e agitação mantendo-se a temperatura do banho em 112 °C durante 5 horas. Decorrido este tempo, interrompeu-se o aquecimento. Após resfriamento, adicionou-se uma mistura de HCl 6 mol L⁻¹ / éter dietílico (5:1) ao balão. Deixou-se o sistema sob agitação até dissolução de todo o precipitado. Posteriormente extraiu-se com éter dietílico. Os extratos foram lavados com solução saturada de NaCl e concentrados em evaporador rotatório, obtendo-se os produtos [12a], [12b] e [12c], que foram utilizados na reação seguinte sem purificação.

As condições utilizadas nas reações encontram-se detalhadas na tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Condições utilizadas na síntese dos ácidos dilactônicos [12]

Substrato / g (mmol)	CMM (mL)	HCl/Et ₂ O (mL)	Et ₂ O (mL)	Solução de NaCl (mL)
[11a] 0,303 (1,191)	6,6	12,0	2 x 17,0	17,0
[11b] 0,150 (0,576)	3,2	12,0	2 x 9,0	9,0
[11c] 0,150 (0,576)	3,2	12,0	2 x 9,0	9,0

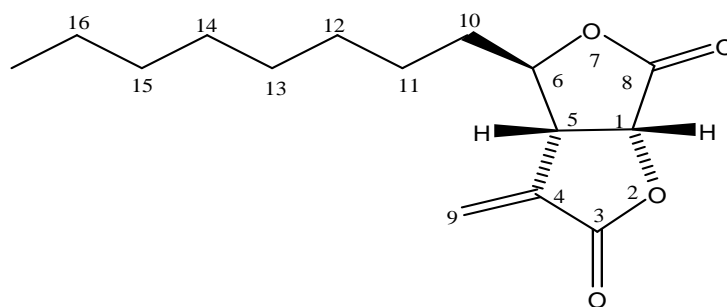
Os ácidos dilactônicos obtidos [12a], [12b], [12c], sofreram metilenação descarboxilativa. Inicialmente 0,30 g de acetato de sódio foram dissolvidos em 12,0 mL de ácido acético e misturados com uma solução contendo 9,0 mL de formol (40%) e 3,0 mL de dietilamina previamente destilada. Uma parte desta mistura foi adicionada ao ácido dilactônico contido em um balão. Agitou-se a mistura vigorosamente por 5 minutos, deixou-se em banho-Maria até liberação de todo CO₂ (aproximadamente 5 min). Agitou-se manualmente por mais 5 minutos. Resfriou-se até temperatura ambiente e então verteu a mistura reacional para um funil de separação. Ao funil adicionou-se uma mistura de água destilada e éter dietílico, agitou-se e separou-se a fase orgânica. Efetuou-se novamente a extração da fase aquosa com éter dietílico.

Os extratos orgânicos reunidos foram lavados com 20 mL de água, 20 mL de solução saturada de NaHCO₃, 20 mL de água e, então, secados com MgSO₄ anidro, e concentrados em evaporador rotatório. Os produtos foram purificados por coluna cromatográfica, utilizando-se como eluente a mistura de AcOEt/hexano 1:2 v/v, obtendo-se [13a] (0,150g, 47,9%), [13b] (0,076g, 46,2%) e [13c] (0,050, 47,3% de rendimento).

Tabela 1.6 - Condições utilizadas nas reações de metilenação descarboxilativa dos ácidos dilactônicos [12]

Composto	Solução (AcONa, AcOH, Et ₂ NH, HCHO) / mL	Et ₂ O + H ₂ O / mL
[12a]	2,2	46 + 23
[12b]	1,1	26 +11
[12c]	1,1	26 +11

Produto [13a]



Fórmula Molecular: C₁₅H₂₂O₄ (**M:** 266,15g mol⁻¹)

$[\alpha]_D^{25} = -41,4$ (1,3g/100mL; EtOH). (BROOKES *et al*, 1965; -41,6, c=1,27; EtOH).

Aspecto: sólido branco.

T_f: 53,5-54,3 °C. (ANDERSON e FRASER-REID, 1985: 50,0-51,0 °C).

CCD: R_f: 0,62 (hexano/AcOEt 2:1 v/v)

Análise elementar: Calculado: C: 67,65%; H: 8,33 %

Experimental: C: 67,25 %; H: 8,42 %

Erro relativo: C: 0,59% H: 1,08%

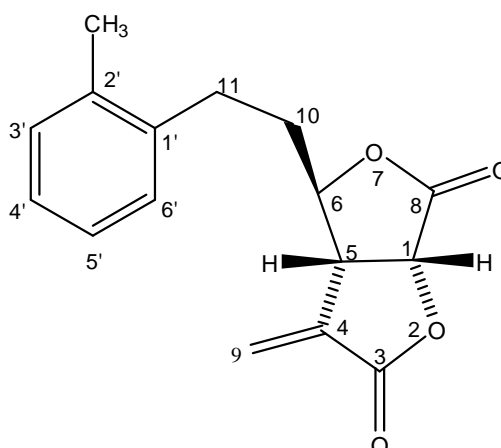
Infravermelho (KBr, ν_{MAX}/cm^{-1}): 3100, 2955, 2925, 2854, 1789, 1773, 1664, 1465, 1358, 1294, 1260, 1217, 1104, 1062, 1011, 965, 809.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H, $J_{Me,16}=7,2$ Hz, CH₃), 1,50 (sl, 12H, H11-H16), 1,72-1,88 (m, 2H, H10), 3,52-3,60 (m, 1H, H5), 4,43 (td, 1H, $J_{6,10a}=J_{6,10b}=3,9$ Hz, $J_{6,5}=9,0$ Hz, H6), 5,07 (d, 1H, $J_{1,5}=8,4$ Hz, H1), 5,88 (d, 1H, $J_{9a,9b}=2,4$ Hz, H9a), 6,47 (d, 1H, $J_{9b,9a}=2,4$ Hz, H9b).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,03 (CH₃), 22,57 (C16), 24,78 (C15), 29,07 (C14), 29,27 (C13), 29,65 (C12), 31,72 (C11), 36,02 (C10), 44,12 (C5), 74,26 (C1), 85,15 (C6), 126,23 (C9), 134,57 (C4), 167,47 (C3), 169,75 (C8).

EM, m/z (%): 266 (0,22, M⁺), 109 (13), 96 (30), 95 (13), 86 (46), 85 (14), 84 (100), 82 (11), 81 (17), 71 (22), 69 (25), 68 (13), 67 (17), 57 (43), 56 (12), 55 (37), 51 (54), 50 (10).

Produto [13b]



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₆O₄ (**M:** 272,30 g mol⁻¹)

$[\alpha]_D^{25} = + 28,9$ (1,0g/100mL, CH₂Cl₂)

Aspecto: sólido amarelo claro.

T_f: 74,6 -76,8 °C

CCD: R_f: 0,55 (AcOEt/hexano 1:1 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 70,57%; H: 5,92 %

Experimental: C: 70,01%; H: 6,08 %

Erro relativo: C: 0,80% H: 2,19%

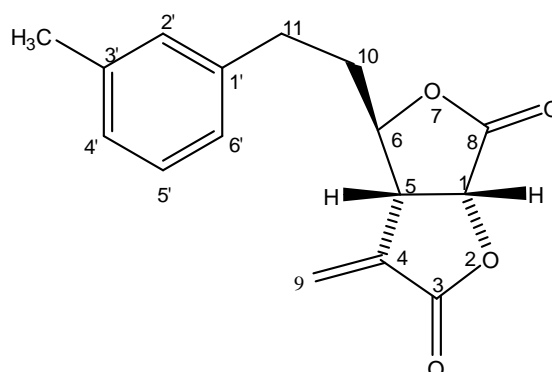
Infravermelho (KBr, ν_{MÁX}/cm⁻¹): 3100, 3059, 3015, 2954, 2924, 2870, 1782, 1664, 1603, 1493, 1459, 1293, 1106, 1066, 1016, 967, 811, 759, 747, 665.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,06-2,09 (m, 2H, **H10A**, **H10b**), 2,33 (s, 3H, **CH₃**) 2,71-2,94 (m, 1H, **H11**), 3,43-3,85 (m, 1H, **H5**), 4,42-4,48 (m, 1H, **H6**), 5,07 (d, 1H, J_{1,5} = 8,4 Hz, **H1**), 5,84 (d, 1H, J_{9a,9b} = 2,2 Hz, **H9a**) 6,46 (d, 1H, J_{9b,9a} = 2,2 Hz, **H9b**), 7,11-7,27 (m, 4H, **H3'**, **H4'**, **H5'**, **H6'**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 19,57 (**CH₃**), 28,90 (**C11**), 36,79 (**C10**), 44,57 (**C5**), 74,40 (**C1**), 84,52 (**C6**), 126,58 (**C9**), 126,73 (**C5'**), 127,03 (**C4'**), 128,93 (**C6'**), 130,86 (**C3'**), 134,43 (**C4**), 136,06 (**C2'**), 137,97 (**C1'**), 167,61 (**C3**), 169,86 (**C8**).

EM, m/z (%): 272 (7,2, M⁺), 149 (18), 131 (13), 106 (39), 97 (10), 91 (18), 86 (63), 84 (100), 77 (11), 69 (13), 67 (10), 57 (26), 55 (24), 51 (64), 50 (11).

Produto [13c]



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₆O₄ (**M:** 272,30 g mol⁻¹)

$[\alpha]_D^{25} = + 25,2$ (1,0g/100mL, CH₂Cl₂).

Aspecto: sólido amarelo claro

T_f: 80,0-81,4 °C

CCD: R_f: 071 (AcOEt/hexano 1:1 v/v).

Análise elementar: Calculado: C: 70,57%; H: 5,92 %

Experimental: C: 70,53%; H: 6,01 %

Erro relativo: C: 0,057% H: 2,70%

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{MÁX}}$ /cm⁻¹): 3100, 2958, 2923, 2853, 1783, 1665, 1608, 1487, 1454, 1295, 1261, 1103, 1068, 1049, 935, 874, 799, 746, 725, 701, 619.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,03-2,15 (m, 2H, **H10**), 2,34 (s, 3H, **CH₃**), 2,71-2,86 (m, 1H, **H11**), 3,50-3,59 (m, 1H, **H5**), 4,25-4,44 (m, 1H, **H6**), 5,03 (d, 1H, $J_{1,5}=8,4$ Hz, **H1**), 5,74 (d, 1H, $J_{9a,9b} = 2,1$ Hz, **H9a**) 6,42 (d, 1H, $J_{9b,9a} = 2,1$ Hz, **H9b**), 7,00-7,26 (m, 4H, **H2'**, **H4'**, **H5'**, **H6'**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 21,48 (**CH₃**), 29,85 (**C11**), 37,87 (**C10**), 44,50 (**C5**), 74,31 (**C1**), 84,21 (**C6**), 126,18 (**C6'**), 126,19 (**C9**), 127,60 (**C4'**), 128,89 (**C5'**), 129,31 (**C2'**), 134,70 (**C4'**), 138,67 (**C3'**), 160,66 (**C3**), 161,22 (**C8**).

EM, m/z (%): 272 (1,7; M⁺), 167 (14), 105 (34), 104 (15), 91 (13), 86 (55), 85 (12), 84 (100), 83 (17), 77(11), 71 (26), 70 (21), 69 (14), 67 (11), 57 (47), 55 (31), 51 (88), 50 (16).

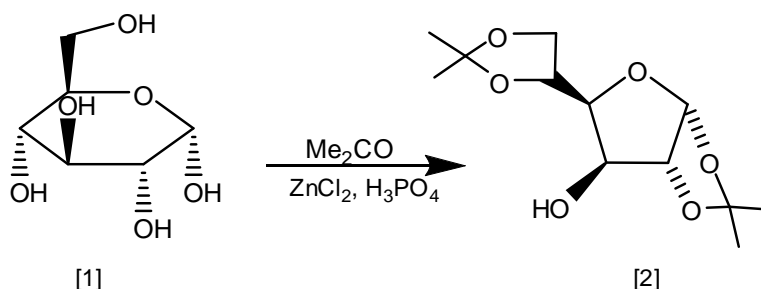
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão discutidos os resultados obtidos através da rota sintética mostrada na Figura 1.2. A obtenção dos intermediários sintéticos [2] a [7], já descritos na literatura foi confirmada a partir da determinação de temperaturas de fusão e da obtenção de espectros no infravermelho, por comparação com dados publicados. As estruturas dos intermediários [8] a [11] e dos produtos finais [13] foram confirmadas a partir de análises elementares, espectroscopias no infravermelho, de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Para os compostos [13] foram determinadas, ainda, as rotações específicas ($[\alpha]_D$).

1.3.1. Síntese da 1,2:5,6-di-O-Isopropilideno- α -D-glicofuranose [2]

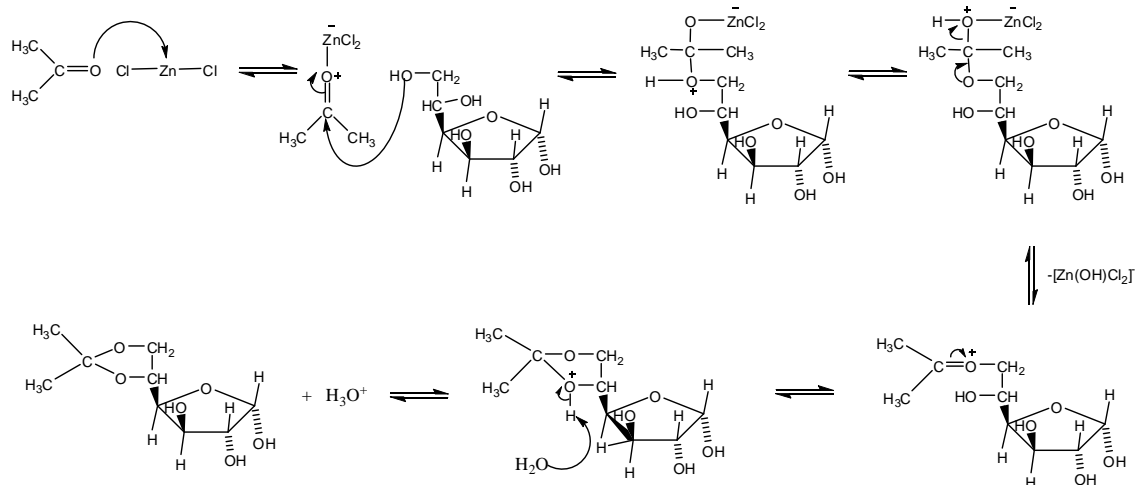
Uma técnica muito utilizada para proteger grupos funcionais de cetona e alcoóis que não devem participar da reação é a formação de acetais. A vantagem das reações com acetais é que podem ocorrer tanto em meio básico quanto em meio neutro sem alteração deste grupo formado. Na primeira etapa da rota sintética utilizou a formação de grupos isopropilideno de modo a evitar oxidações indesejáveis na etapa posterior da rota.

A proteção das hidroxilas 1,2,5 e 6 da α -D-glicose utilizando acetona em meio ácido e o catalisador cloreto de zinco, $ZnCl_2$, levou a formação da 1,2:5,6-di-O-Isopropilideno- α -D-glicofuranose (Esquema 3).



Esquema 3. Reação de proteção das hidroxilas nos carbonos 1, 2, 5 e 6 da α -D-glicose.

O mecanismo de proteção das hidroxilas 5 e 6 está representado no esquema 4. O mecanismo é análogo para a proteção das hidroxilas 1 e 2.



Esquema 4. Mecanismo de proteção das hidroxilas 5 e 6 do material de partida [1].

O di-acetal formado [2] é solúvel em acetona ao contrário da glicose que é pouco solúvel. Como a reação atinge o equilíbrio e nem toda a *D*-glicose [1] é consumida, esta diferença de solubilidade permitiu separar o material de partida remanescente através de filtração.

O produto [2] é encontrado comercialmente (nome comum: Diacetona-*D*-glicose), porém optou-se por realizar sua síntese já que a mesma é simples e economicamente viável. O espectro no infravermelho do produto sintetizado (figura 1.4) foi idêntico ao do composto comercial (Aldrich). Nota-se uma banda intensa em 3430 cm⁻¹, característica do estiramento O-H da hidroxila livre e várias bandas na região de 1100 a 1000 cm⁻¹, características de estiramentos C-O-C, devidas aos grupos isopropilideno.

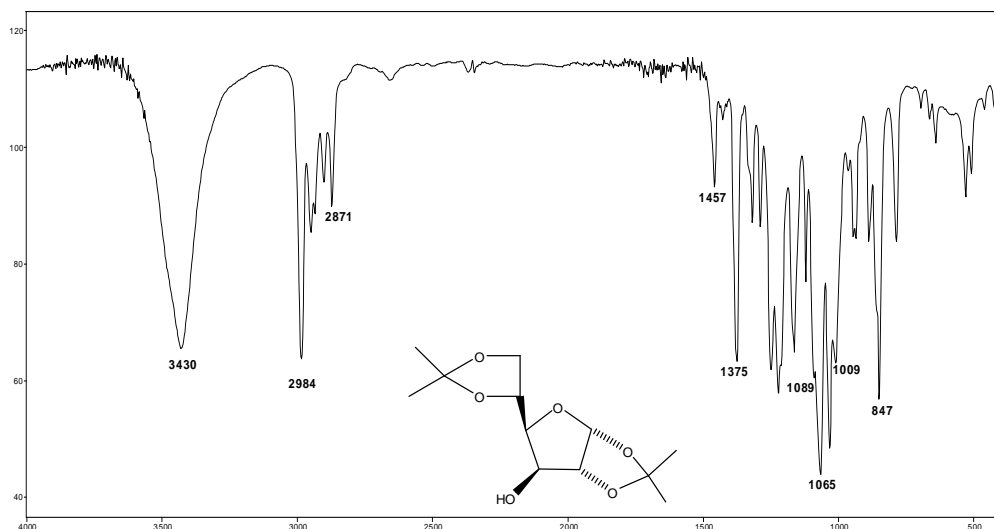


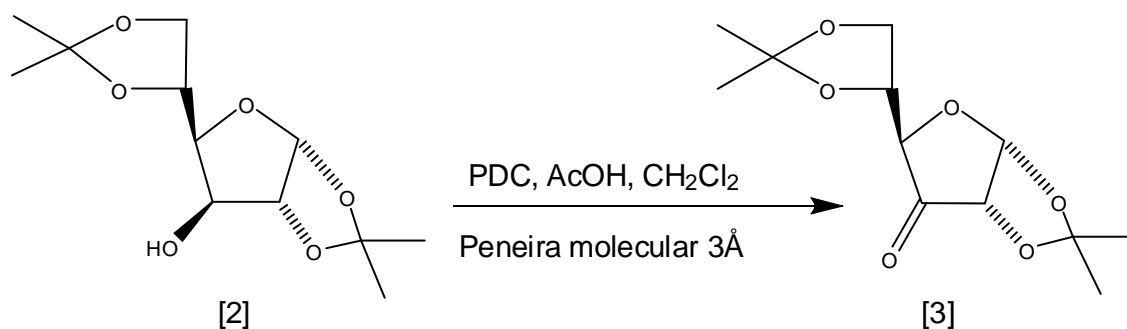
Figura 1.4. Espectro no Infravermelho (KBr) do acetal [2].

A faixa de fusão medida para o composto [2] foi 107,5 °C (sem correção) enquanto o produto comercial apresenta uma faixa de fusão de 110-112°C (ALDRICH). Estes resultados caracterizam a produção eficiente da diacetona-*D*-glicose, sendo o rendimento da reação igual a 90% (considerando-se o material de partida recuperado).

1.3.2. Síntese da 1,2:5,6-di-*O*-Isopropilideno- α -*D*-ribo-hexofuran-3-ulose [3]

Na etapa 2 da rota sintética (Figura 1.2), foi realizada uma oxidação do grupo hidroxila da *D*-glicose protegida [2], seguindo o método adotado por CZERNECKI *et al* (1985). Nesta metodologia o dicromato de piridínio (PDC) é o agente oxidante. Este reagente foi preparado a partir de anidrido crômico e piridina, conforme descrito na literatura (COREY e SCHMIDT, 1979).

A oxidação de [2] foi catalisada por ácido acético e peneira molecular 3Å ativada, que também mantém o meio reacional seco, o que favorece a formação da cetona, minimizando a formação do hidrato correspondente. Esta reação levou à formação de cristais brancos de cetona [3] com rendimento de 91% (Esquema 5).



Esquema 5. Reação de oxidação do acetal [2].

Para otimização do processo utiliza-se o PDC e a peneira molecular pulverizados, sendo a peneira utilizada logo após ser ativada em mufla a 300 °C por 5 horas e resfriada em dessecador. O ácido acético e o diclorometano também foram previamente secados. Após purificação do composto [3] este foi mantido sob vácuo para evitar formação do hidrato. Mesmo assim, a formação do hidrato pode ser evidenciada por análise dos espectros no infravermelho. A figura 1.5 mostra o espectro da cetona [3] logo após ser purificada. Observa-se uma banda em 1773 cm⁻¹ característica do estiramento da ligação C=O da cetona. Observou-se também uma absorção em 3402 cm⁻¹ atribuída a hidroxilas.

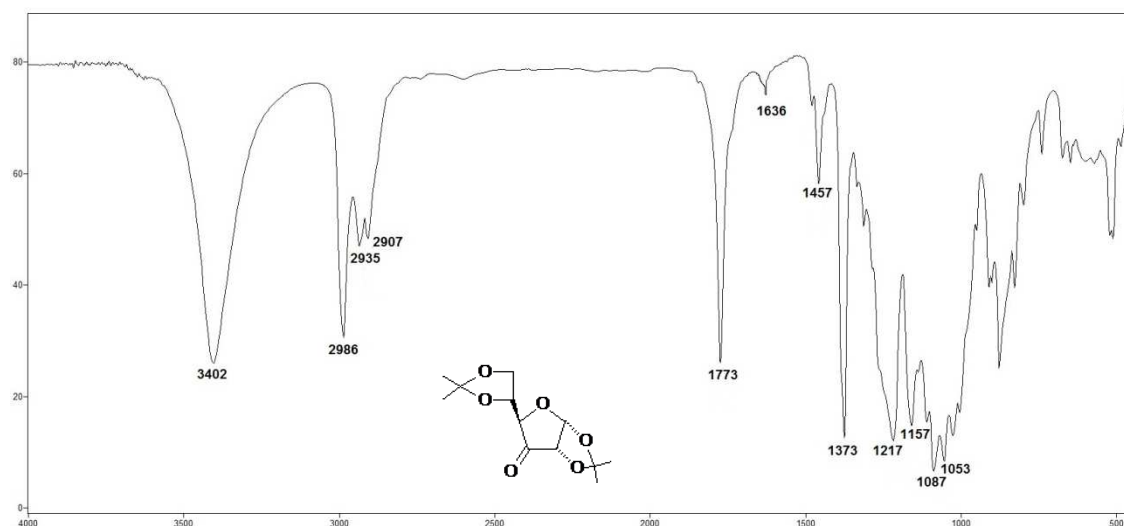


Figura 1.5. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do produto [3] imediatamente após sua síntese.

Já a figura 1.6 representa o espectro no infravermelho do composto [3] após armazenamento em dessecador por 48 horas. Neste espectro a banda característica do estiramento C=O da cetona encontra-se com uma intensidade reduzida enquanto a banda característica de hidroxilas em 3411 cm⁻¹ encontra-se alargada, indicando maior formação do hidrato [3a].

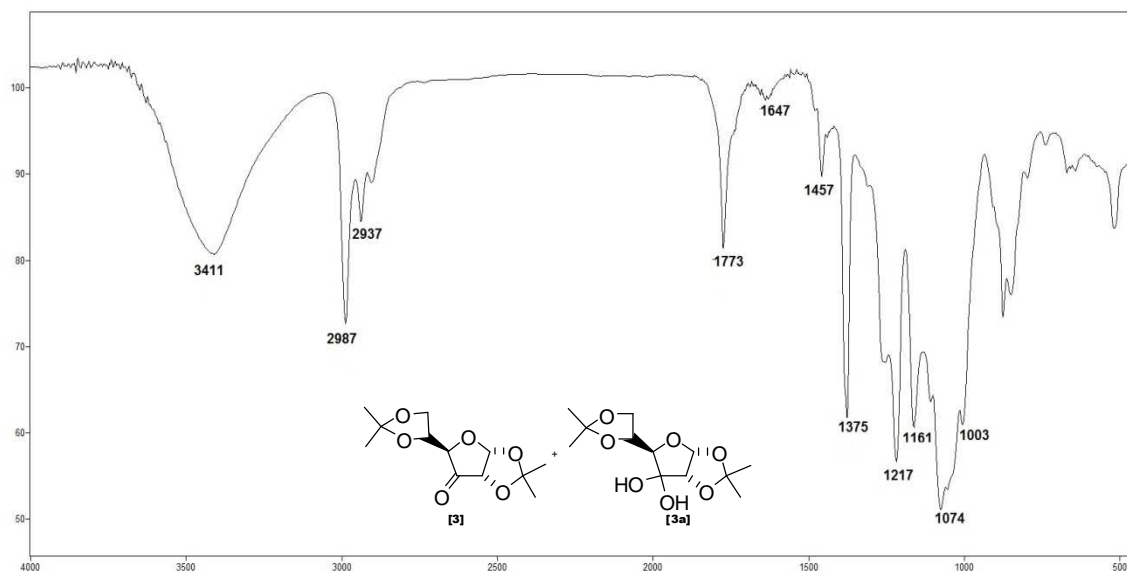
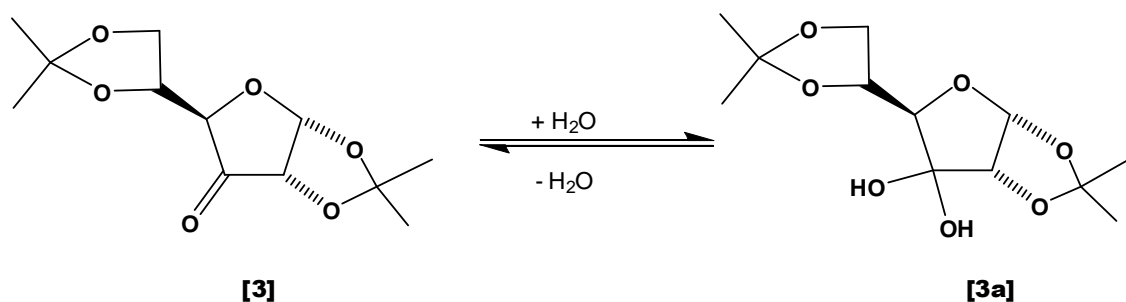


Figura 1.6. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do produto [3] após 48 horas da sua síntese.

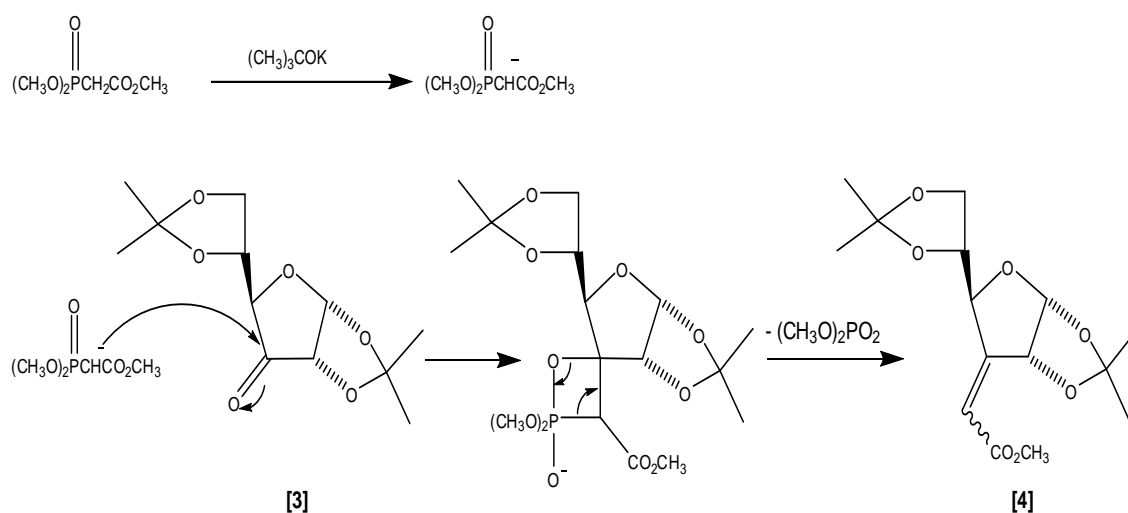
O esquema 6 mostra a hidratação, formando o hidrato correspondente [3a].



Esquema 6. Hidratação da cetona.

1.3.3. Síntese de 3-(*E,Z*)-C-(carbometoximetilideno)-3-desoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -*D*-alofuranose [4]

Para introduzir a cadeia lateral, precursora do anel lactônico, utilizou-se uma reação de Wittig modificada, conhecida como Wittig-Horner. Reações de Wittig-Horner são constantemente utilizadas para introduzir duplas ligações C-C em *D*-lactonas. Neste trabalho o ílideo foi formado a partir da reação entre *tert*-butóxido de potássio e o éster fosfonoacetato de trimetila em THF seco. O ílideo então foi reagido com o composto [III] que levou a formação dos ésteres α,β -insaturados, uma mistura de isômeros *E* e *Z* [4]. O esquema 7 mostra o mecanismo para a reação de Wittig-Horner.



Esquema 7. Mecanismo para a reação de Wittig-Honer.

A formação dos compostos [4] foi monitorada por CCD. A revelação das cromatoplasmas foi realizada em câmara de luz UV ($\lambda = 254$ nm) e também com solução alcoólica de ácido fosfomolibdico. O cromatograma apresentou duas manchas próximas com valores de R_f de 0,62 e 0,67 (eluente AcOEt/hexano 1:3, v/v), devidas aos isômeros *Z* e *E*, respectivamente. Uma vez que a etapa subsequente da rota sintética era a hidrogenação dos carbonos da ligação dupla que levaria a obtenção de um mesmo produto, não foi necessária a separação dos isômeros *E* e *Z*.

A análise do espectro no infravermelho da mistura de isômeros [4] (Figura 1.7) apresentou bandas importantes para confirmar a sua obtenção. A primeira em 1680 cm^{-1} característica de estiramento da ligação C=C, confirmando a presença da dupla ligação. A segunda, em 1726 cm^{-1} , foi atribuída ao estiramento da ligação C=O da carbonila dos ésteres α,β -insaturados, confirmando a formação dos produtos [4].

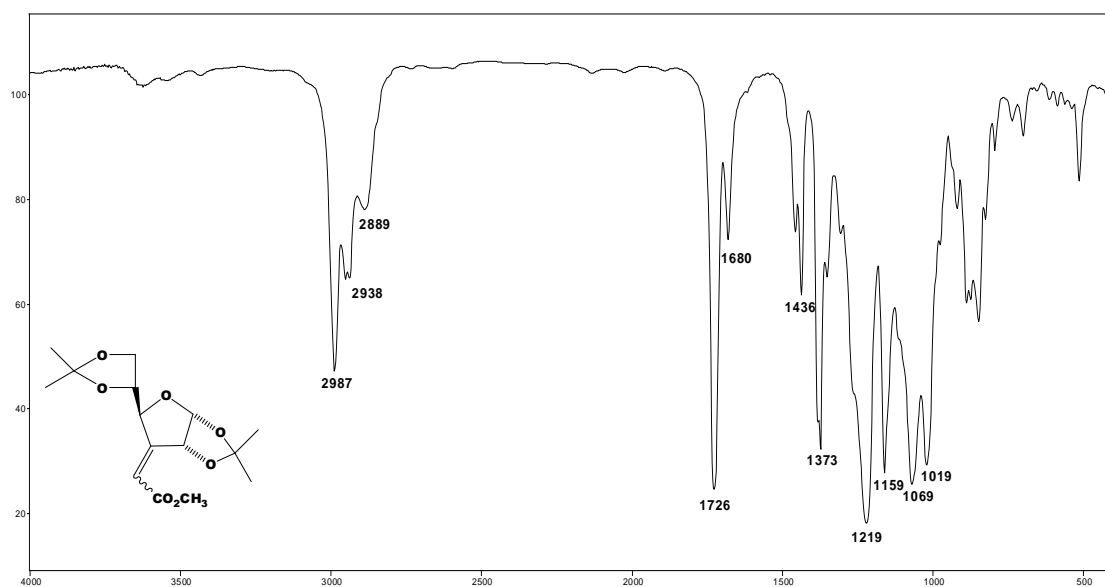


Figura 1.7. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do produto [4].

1.3.4. Síntese de 3-C-(carbometoximetil)-3-desoxi-1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-alofuranose [5]

Reações de adição de H_2 a duplas ligações de compostos orgânicos estão entre as mais importantes na química orgânica preparativa. Podem ser feitas através de diferentes métodos: hidrogenação catalítica homogênea ou heterogênea, redução eletroquímica e hidrogenação eletrocatalítica. Neste trabalho os ésteres insaturados *E* e *Z* [4] foram solubilizados em AcOEt e hidrogenados sob atmosfera de H_2 na presença do catalisador heterogêneo de paládio finamente dividido depositado em superfície de carbono. Esta reação é uma adição *sin*, na qual ambos os átomos de hidrogênio se adicionam do

mesmo lado da molécula. (HOLLEBEN, 1998; SOLOMONS, 2005). Na figura 1.8 podemos ver o mecanismo para hidrogenação de um alqueno catalisado por paládio em carbono. Na etapa (a) elétrons não-emparelhados na superfície do par metálico com elétrons de hidrogênio ligam o hidrogênio à superfície, ou seja, ocorre a adsorção do hidrogênio. Em seguida (b) ocorre a colisão do alqueno com a superfície carregada com hidrogênio adsorvido causando a adsorção do alqueno. Uma transferência em etapas de átomos de hidrogênio ocorre (c) produzindo um alceno antes de a molécula orgânica deixar a superfície do catalisador, causando a adição dos átomos de hidrogênio na mesma face do alqueno (d).

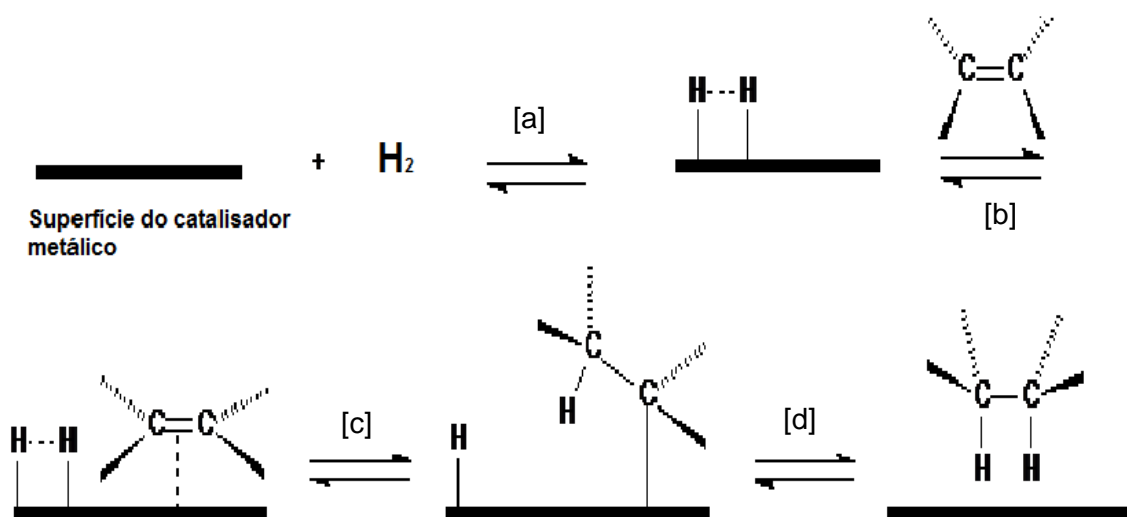


Figura 1.8. Mecanismo para hidrogenação catalítica.

O grupo isopropilideno ligado diretamente ao anel provoca um impedimento estérico, promovendo a adição de hidrogênio pela face oposta da molécula, formando um único produto, com a cadeia do éster em alfa.

A formação do produto foi acompanhada por CCD com revelação da cromatoplaça em solução alcoólica de ácido fosfomolibdico. Não foi observada mancha do produto quando revelada sobre câmara de luz UV.

Analisando o espectro no infravermelho do composto [5] (Figura 1.9), nota-se a ausência de banda em torno de 1680 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $C=C$ presente no espectro dos ésteres insaturados precursores (Figura 1.7), além do deslocamento da banda referente à carbonila de 1726

cm^{-1} no espectro de [4] para 1737 cm^{-1} no espectro de [5] confirmando a hidrogenação (BARBOSA, 2007). A faixa de temperatura de fusão observada para [5] ($56,5\text{-}57,3 \text{ }^\circ\text{C}$) está de acordo com a literatura ($57,0\text{-}58,0 \text{ }^\circ\text{C}$, ROSENTHAL e NGUYEN, 1969) e indicou bom grau de pureza do produto.

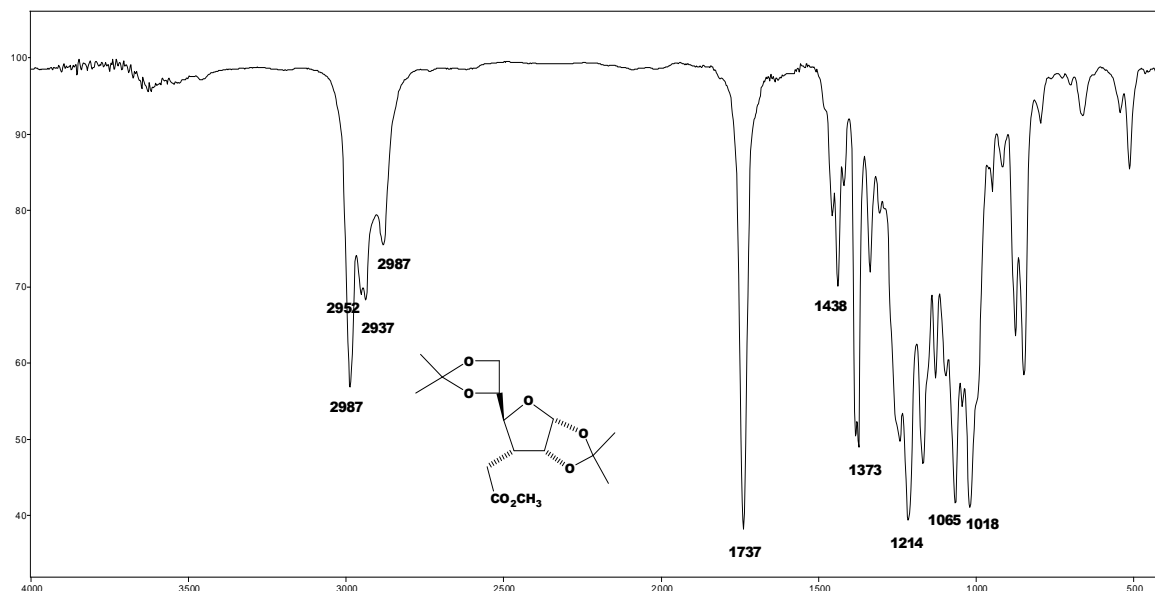
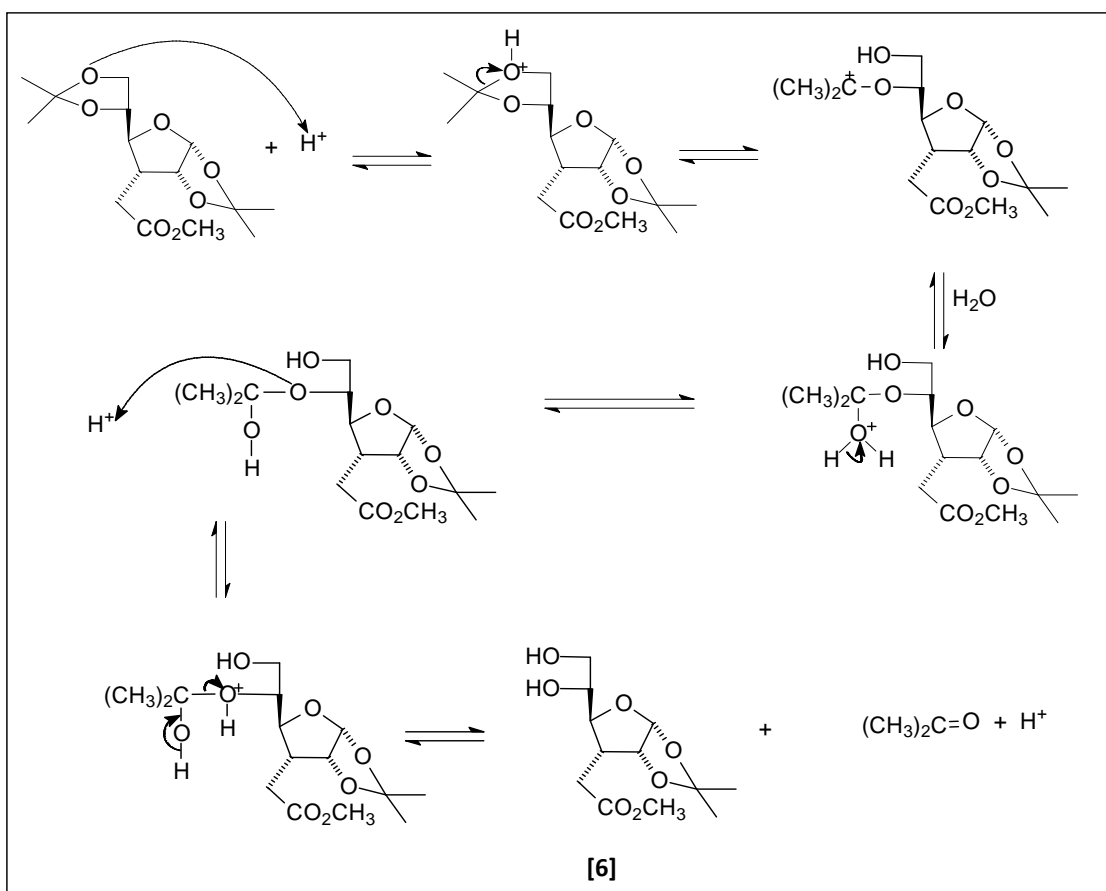


Figura 1.9. Espectro no infravermelho (KBr) do produto [5].

1.3.5. Síntese de 3-desoxi-3-C-(carbometoximetil)-1,2-O-isopropilideno- α -D-alofuranose [6]

Dando prosseguimento à rota sintética (Figura 1.4), realizou-se a eliminação seletiva do grupo protetor isopropilideno ligado a C5 e C6, dando origem ao diol [6] (Esquema 8). Para evitar a clivagem do segundo grupo protetor, realizou-se esta etapa em condições brandas, utilizando quantidades pequenas de solução de ácido sulfúrico 0,8% a temperatura ambiente (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969). A hidrólise do grupo isopropilideno ligado diretamente ao anel heterocíclico é dificultada devido à maior estabilidade do sistema bicíclico de dois anéis de cinco membros fundidos.

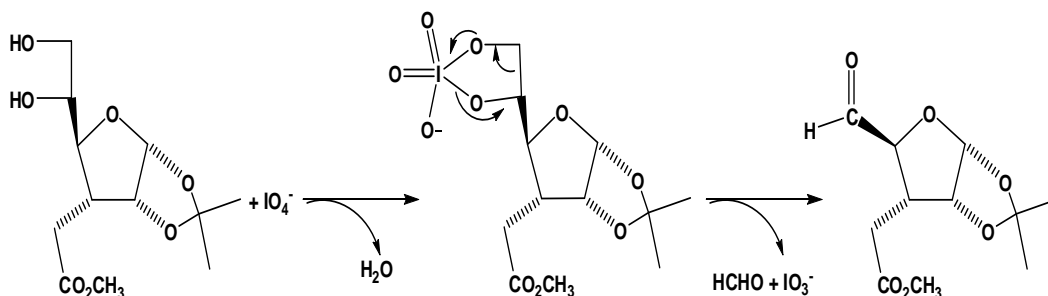


Esquema 8. Mecanismo da desproteção do grupo isopropilideno.

A reação foi acompanhada por CCD. A mancha relativa ao diol [6] apresentou um R_f igual a 0,40 (hexano/AcOEt 1:2 v/v). Logo que apareceu uma segunda mancha, com R_f inferior a 0,40 a reação foi interrompida através de neutralização com solução de Na_2CO_3 a 10%. Esta mancha de menor R_f é devida à hidrólise do segundo grupo protetor. Em seguida, eliminou-se o metanol em evaporador rotatório e a fase aquosa foi utilizada na etapa posterior sem isolamento do composto [6]. Em trabalho anterior (PEREIRA, 2000) constatou-se um aumento no rendimento global da transformação de [5] em [7] (Figura 1.2) por essa metodologia, em comparação com a descrita na literatura (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969). Esses autores neutralizam o meio com carbonato de bário sólido e separam a solução neutra do produto por filtração. O produto é extraído da fase aquosa com clorofórmio, com rendimento de 88%.

1.3.6. Síntese de 3-desoxi-3-C-(carbometoximetil)-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranose [7]

Após formação do produto [6] realizou-se uma clivagem oxidativa do diol, seguindo procedimento semelhante ao descrito por ROSENTHAL e NGUYEN (1969), utilizando um equivalente de NaIO_4 em solução aquosa com rendimento de 65,6 % a partir de [5] (Esquema 9). O rendimento descrito na literatura para essa etapa é de 60%. Considerando-se as duas etapas ([5] para [7]), o rendimento da literatura é de 53% (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969).



Esquema 9. Formação do aldeído através da clivagem oxidativa do diol.

O pH da mistura reacional foi monitorado e mantido igual a 7 pela adição de gotas de solução de NaOH $0,1\text{molL}^{-1}$, sempre que necessário, de forma a neutralizar o ácido fórmico resultante da oxidação do formaldeído. Este controle foi necessário para evitar a hidrólise do grupo isopropilideno restante.

A estrutura do aldeído [7] obtido foi confirmada através de espectroscopias no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro no infravermelho (Figura 1.10) pode-se observar uma banda em 1736 cm^{-1} correspondente à deformação axial das ligações $\text{C}=\text{O}$ do aldeído e do éster, superpostas.

O alargamento da banda de estiramentos $\text{C}-\text{H}$ para menores números de onda (Figura 1.10), quando comparada, por exemplo, com a banda equivalente no espectro de [5] (Figura 1.9), indicou a presença da ligação $\text{C}-\text{H}$ aldeídica, que normalmente é observada na região entre 2830 e 2650 cm^{-1} (BARBOSA, 2007). Notou-se, entretanto, uma banda larga em 3453 cm^{-1}

característica de estiramento de ligação O-H. Uma vez que o pH da mistura reacional ia tornando-se mais ácido conforme o processamento da reação, indicando o consumo do oxidante pelo metanol, acredita-se que o rendimento da reação poderia ter sido melhor utilizando-se 2 equivalentes de periodato de sódio nesta reação ao invés de 1 equivalente, como descrevia a literatura. Assim, supõe-se que a origem desta banda seja devida a contaminação pelo diol de partida [6].

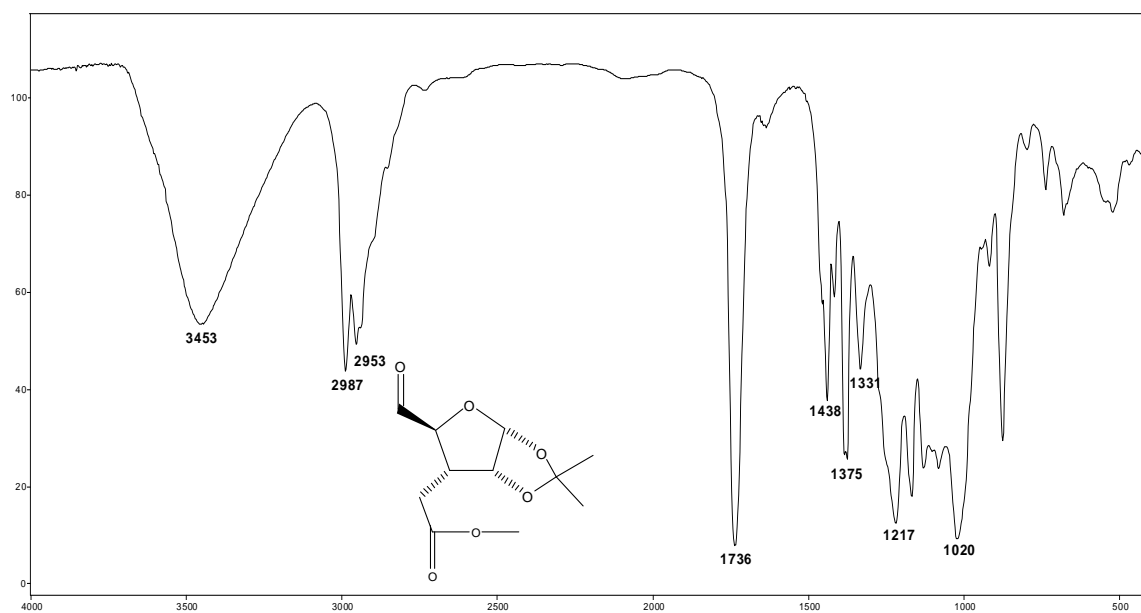


Figura 1.10. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do aldeído [7].

No espectro de RMN de ^1H (Figura 1.11) pode-se observar um duplete em δ 9,65 referente ao hidrogênio do aldeído com $J = 2,4$ Hz, referente ao seu acoplamento com $\text{H}2'$. Sinais de menor intensidade não identificados comprovaram a hipótese da presença de impureza, provavelmente o diol [6]. Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H do composto [7] estão apresentados na Tabela 1.7 e confirmam a formação do aldeído.

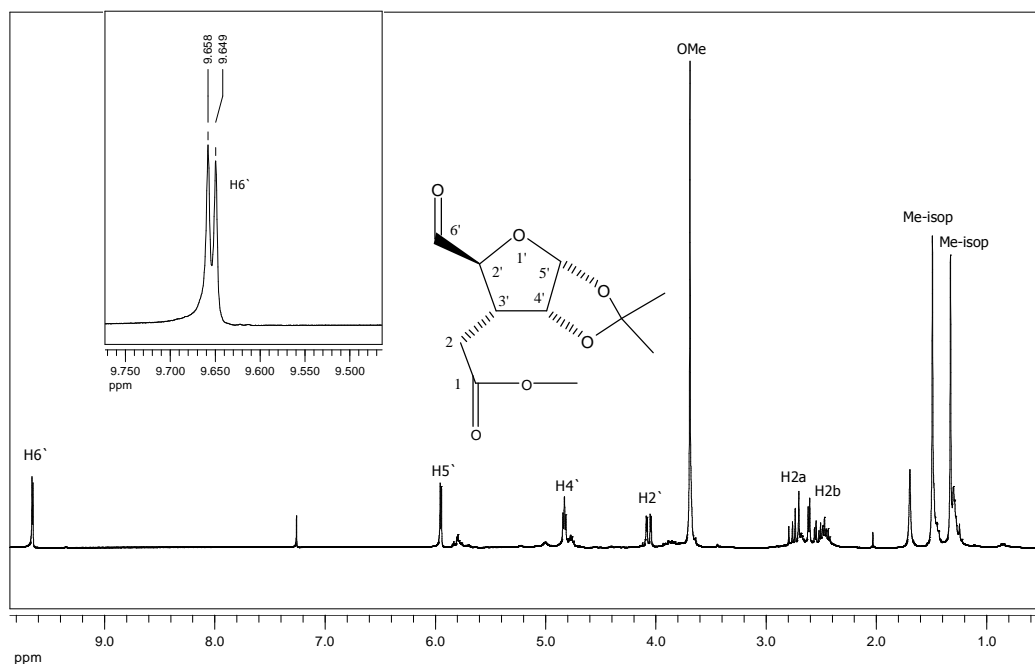


Figura 1.11. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto [7] com ampliação do sinal de $\text{H}6'$.

Tabela 1.7 - Atribuições dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H do aldeído [7] a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	^1H [Aldeído] δ (m, J^*)
H2a	2,58 (dd, $J_{2a,3'} = 4,5$ Hz, $J_{2a,2b} = 17,4$ Hz)
H2b	2,75 (dd, $J_{2b,3'} = 10,2$ Hz, $J_{2b,2a} = 17,4$ Hz)
H2'	4,05 (dd, $J_{2',6'} = 2,4$ Hz, $J_{2',3'} = 10,8$ Hz)
H3'	2,42-2,52 (m)
H4'	4,83 (pseudo t, $J \sim 3,8$ Hz)*
H5'	5,95 (d, $J_{5',4'} = 3,6$ Hz)
H6'	9,65 (d, $J_{6,2'} = 2,4$ Hz)
OCH_3	3,69 (s)
Me	1,49 (s)
Me	1,33 (s)

* $J_{4'5'} = 3,6$ Hz e $J_{4'3'} \approx 4$ Hz

A Figura 1.12 representa o espectro de RMN de ^{13}C do composto [7], onde nota-se o sinal em 200,5 ppm atribuído ao carbono C6' da carbonila de aldeído. Os demais dados estão de acordo com a literatura (ROSENTHAL e NGUYEN, 1969; PEREIRA, 2000).

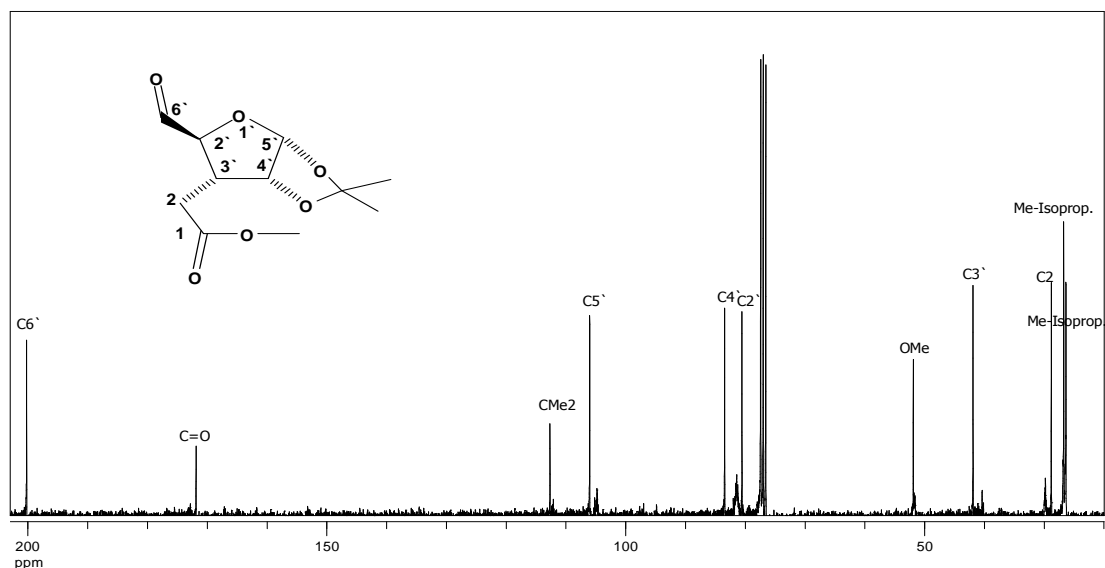


Figura 1.12 - Espectro de RMN de ^1H (75 MHz, CDCl_3) do composto [7].

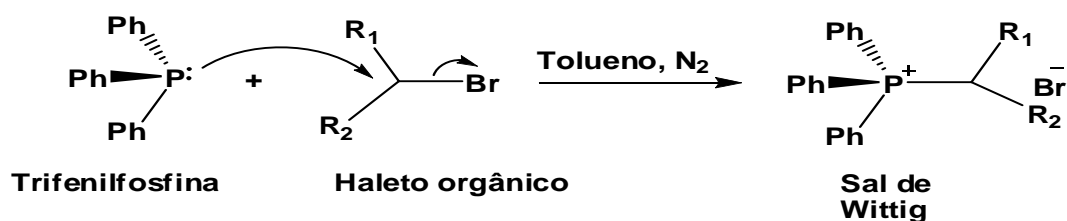
A Tabela 1.8 lista as demais atribuições para os sinais do espectro de RMN de ^{13}C de [7].

Tabela 1.8 - Atribuições dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C do aldeído [7] a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição	^{13}C [7]
Me	26,9
Me	27,3
OCH_3	52,1
$\text{C}(\text{Me})_2$	112,9
C1	171,9
C2	29,3
C2'	80,9
C3'	42,4
C4'	83,7
C5'	106,3
C6'	200,5

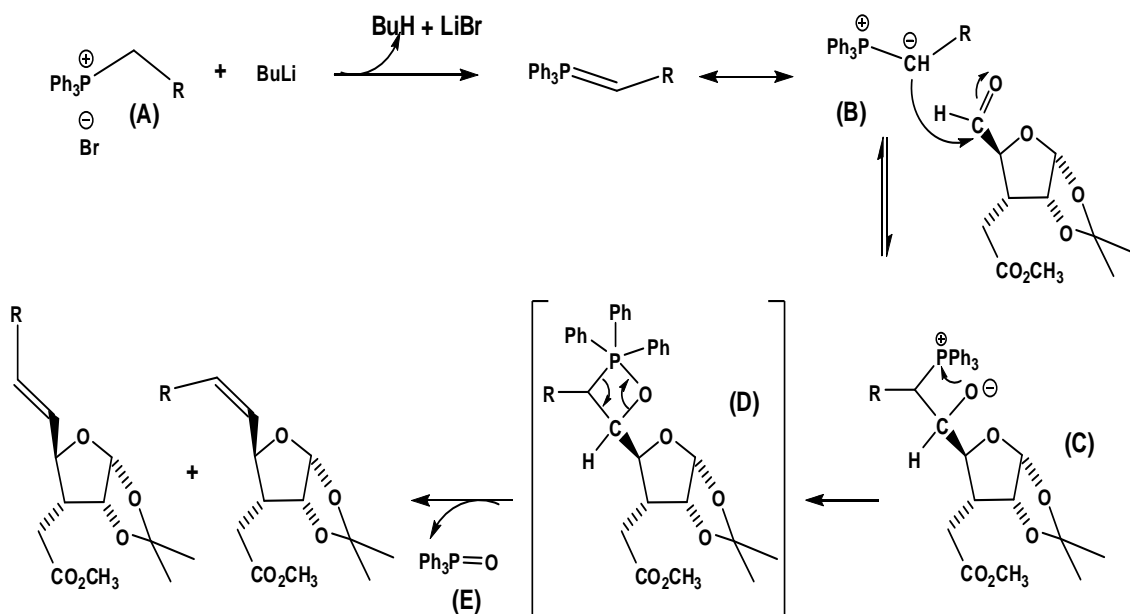
1.3.7. Síntese de (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-{2-[2-alquenil]-4,5-isopropilidenodioxitetraidrofurano-3-il}acetatos de metila [8]

Reações de Wittig são utilizadas para a preparação de olefinas, a partir de aldeídos ou cetonas e íldeos apropriados obtidos de sais de Wittig em meio básico. Os sais de Wittig utilizados neste trabalho (**a**= Brometo de heptiltrifenilfosfônio, **b**= Brometo de (2-metilbenzil)trifenilfosfônio e **c**= Brometo de (3-metilbenzil)trifenilfosfônio) foram sintetizados a partir de trifenilfosfina e dos brometos orgânicos correspondentes, com rendimentos de 90, 96 e 96%, respectivamente (Esquema 10).



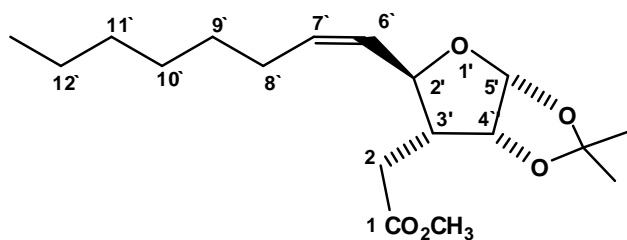
Esquema 10. Síntese do sal Wittig.

Os íldeos foram preparados *in situ* obtidos pela reação entre os sais de Wittig e butilítio, em THF seco e atmosfera de N₂. A reação entre os íldeos de fósforo e o aldeído [7] produziu os compostos [8], como mostra o Esquema 11. O carbono do íldeo de fósforo (A) carregado negativamente atua como nucleófilo e se liga ao carbono da carbonila, ocorrendo a formação da betaína (B) intermediária. Esta se converte em um heterociclo com formação da oxifosfetana (C). A estabilidade do óxido de trifenilfosfina dirige a reação para formação do alqueno (CAREY, 2007).

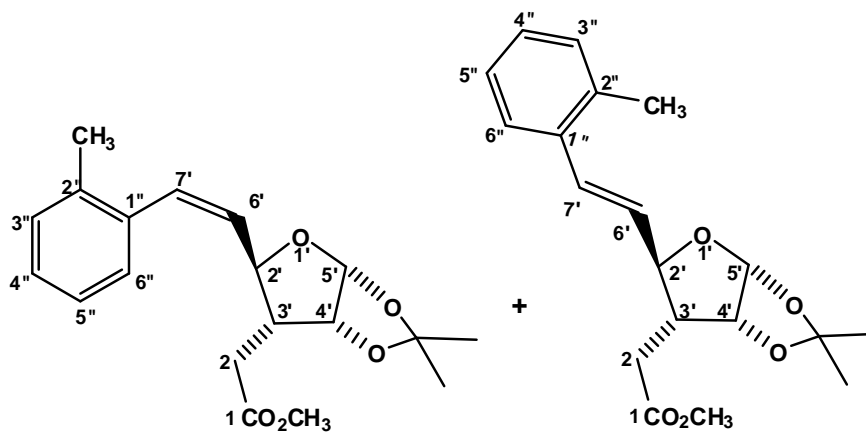


Esquema 11. Mecanismo geral para a reação de Wittig.

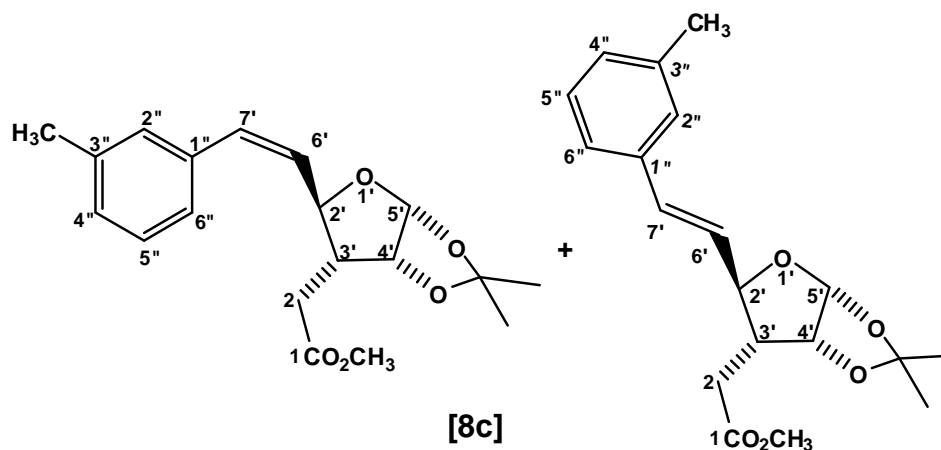
A estereoquímica da reação depende dentre outros fatores da estabilidade do ílideo. Representando o sal de Wittig por $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{R}]\text{Br}$, se o grupo R for igual a H ou alquila, que não estabilizam a carga negativa sobre o carbono no ílideo, este será pouco estável, portanto muito reativo. A estereoquímica do produto será preferencialmente Z. Se o grupo R é fenila (Ph) ou vinila ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), que estabilizam levemente a carga negativa por ressonância, os ílideos serão mais estáveis. Neste caso a reação é menos estereosseletiva. O resultado é uma mistura de isômeros Z e E. (CAREY, 1993). Assim, na reação com o ílideo (2a), observou-se a formação de um produto [8a] com configuração Z. Os produtos aromáticos [8b] e [8c] foram obtidos como misturas de isômeros Z e E, aproximadamente 3,5:1 (Z:E). A Figura 1.13 apresenta os produtos obtidos a partir das reações de Wittig realizadas.



[8a]



[8b]



[8c]

Figura 1.13. Compostos obtidos através de reações de Wittig.

A confirmação das estruturas dos alquenos foi feita pela análise do espectro de infravermelho, dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , além da análise elementar.

O composto [8a] já está descrito na literatura e é um intermediário na rota de síntese do avenaciólídeo (ANDERSON e FRASER-REID, 1985). O resultado das análises elementares do produto [8a] obtido permitiu a

confirmação da sua fórmula mínima, apresentando erros relativos de apenas 0,3% para a análise de carbono e 2,7% para a análise de hidrogênio. O espectro no infravermelho do composto [8a], representado na Figura 1.14, apresenta uma banda em 3017 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H de alqueno, confirmando a presença de hidrogênio ligado a carbono sp^2 ($=\text{C-H}$). Pode ser observada ainda banda em 1664 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C=C. As demais bandas estão de acordo com aquelas apresentadas na literatura, confirmando a obtenção do composto [8a] (ANDERSON E FRASER-REID, 1985).

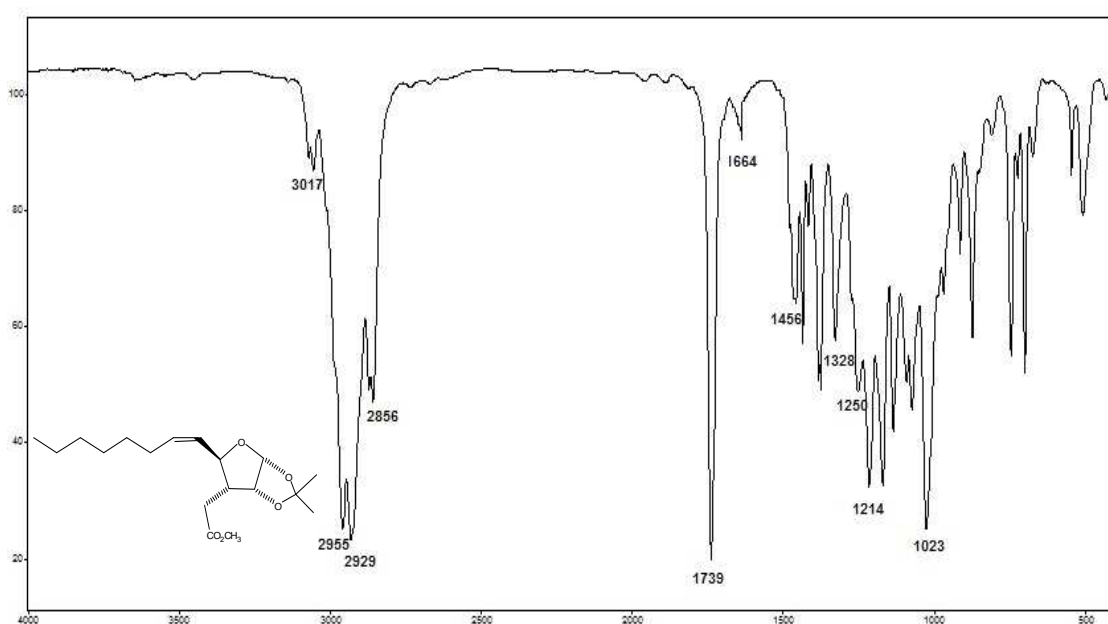


Figura 1.14 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto [8a].

A fórmula mínima ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$) dos produtos [8b] e [8c] foi confirmada por análises elementares, obtendo-se erros relativos menores que 0,9%.

Os espectros no infravermelho dos compostos [8b] e [8c] representados nas Figuras 1.15 e 1.16, apresentaram bandas em torno de 3017 e 3060 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C-H de alqueno e de compostos aromáticos respectivamente. Observam-se ainda a presença de bandas harmônicas entre 1646 e 1541 cm^{-1} , características de anéis aromáticos, além da banda intensa em 1738 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de éster.

Estes compostos são semelhantes, diferenciando-se apenas na posição do grupo metila no anel aromático, sendo a metila na posição *orto* para o composto [8b] e *meta* para o composto [8c]. Portanto seus espectros de RMN de ^1H também apresentam o mesmo aspecto geral, como mostra a Tabela 1.9.

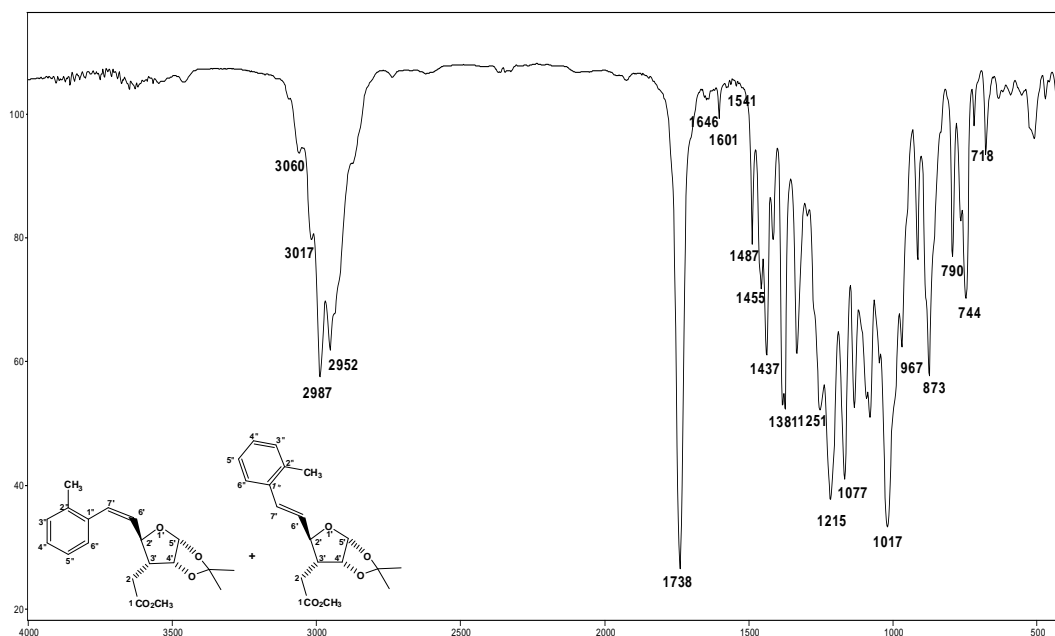


Figura 1.15 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto [8b].

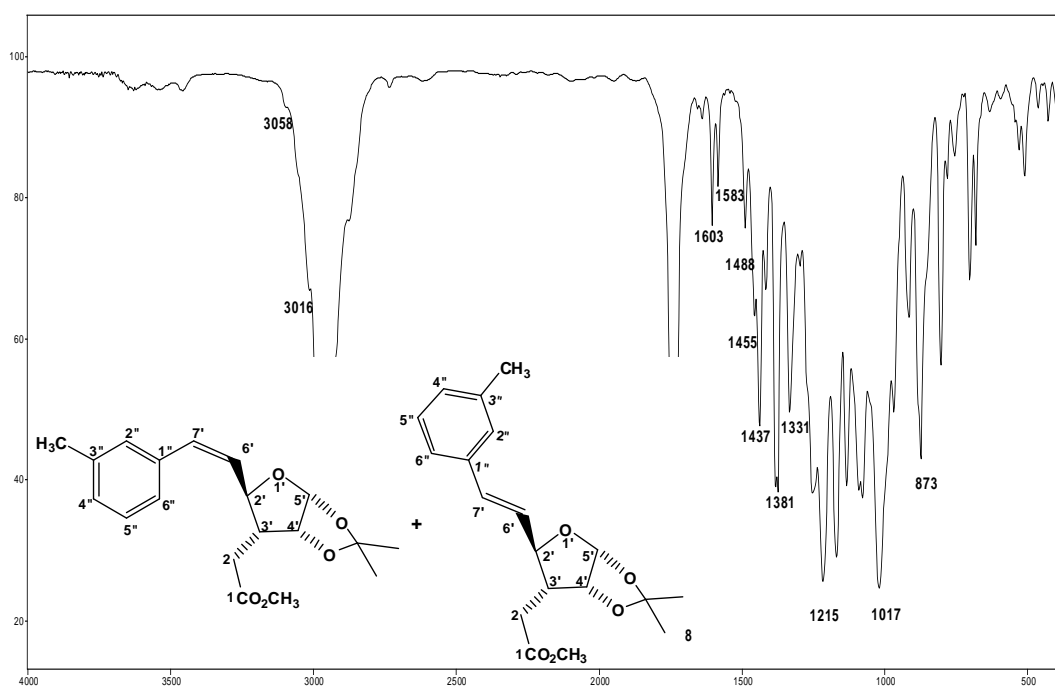


Figura 1.16 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto [8c].

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios da dupla ligação H6' e H7' apareceram em valores esperados para hidrogênios olefínicos. O aparecimento de sinais entre δ 7,14-7,34 relativos aos hidrogênios aromáticos confirma a incorporação dos grupos arila à estrutura do precursor. Nesses espectros foi possível identificar sinais dos isômeros *Z* e *E*, que foram obtidos na proporção aproximada de 3,5:1, de acordo com a comparação entre suas curvas de integração.

Tabela 1.9 – Deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento *J* (Hz) dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H dos compostos [8b] e [8c], a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	[8b] δ (m, J^*)	[8c] δ (m, J^*)
CH_3	1,28 (s)	1,29 (s)
CH_3	1,35 (s)	1,34 (s)
CH_3^*	1,33 (s)	1,28 (s)
CH_3^*	1,61 (s)	1,56 (s)
OCH_3	3,68 (s)	3,68 (s)
OCH_3^*	3,65 (s)	3,64 (s)
H2a H2a*	2,15-2,25 (m)	2,16-2,24 (m)
H2b	2,44 (dd, $J_{2b,2a}=17,1$, $J_{2b,3'}=11,0$)	2,33 (dd, $J_{2b,2a}=17,2$, $J_{2b,3'}=11,2$)
H2b*	2,42-2,48 (m)	2,31-2,40 (m)
H2'	4,44 (pseudo t, $J \approx 9,7$)	4,47 (pseudo t, $J \approx 9,6$)
H2'*	4,33-4,38 (m)	4,02-4,19 (m)
H3' H3'*	2,50-2,52 (m)	2,14-2,30(m)
H4'	4,83 (t, $J_{4',5'}=3,9$)	4,47 (t, $J_{4',5'}=3,8$)
H4'*	4,74-4,77 (m)	4,68-4,84 (m)

H5'	5,85 (d, $J_{5',4'}=3,9$)	5,87(d, $J_{5',4'}=3,8$)
H5''*	5,96 (d, $J_{5'',4''}=4,0$)	5,91 (d, $J_{5'',4''}=4,0$)
H6'	5,89-5,91 (m)	5,61 (dtd, $J_{6',6''}=2,7$, $J_{6',2}=9,6$, $J_{6',7'}=11,5$)
H6''*	5,89-5,91 (m)	5,64-5,72 (m)
H7'	6,84 (d, $J_{7',6'} = 11,4$)	6,85(dd, $J_{7',6'}=11,5$, $J_{7',2'} =2,7$)
H7''*	6,87 (d, $J_{7'',6''} = 15,9$)	6,88(d, $J_{7'',6''} = 15,3$)
H2'', H2''*	-	7,29-7,32(m)
H3'', H3''*	7,17-7,20 (m)	-
H4'', H4''*	7,17-7,20 (m)	7,10-7,22 (m)
H5'', H5''*	7,25-7,38(m)	7,38-7,46 (m)
H6'', H6''*	7,25-7,38(m)	7,29-7,32(m)
H7'' H7''*	2,27 (s)	2,27 (s)

*Sinais referentes ao isômero minoritário *E*. Os demais sinais são referentes aos componentes principais *Z*.

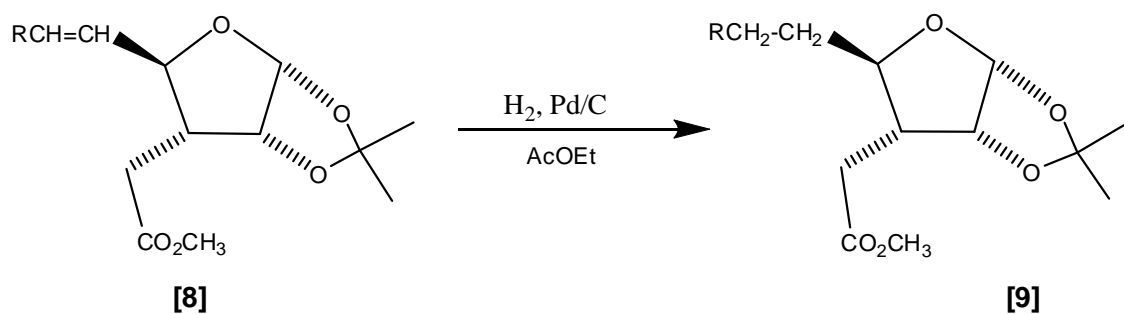
Tabela 1.10. Dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C dos compostos [8b] e [8c], a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição (C)	[8b] δ	[8c] δ
CH_3	26,9	26,5
CH_3	29,8	26,8
OCH_3	51,9	51,9
$\text{C}(\text{Me})_2$	111,9	111,9
C1	172,7	172,7
C2	29,2	29,3
C2'	76,5	77,5
C3'	46,4	46,4
C4'	81,0	81,0
C5'	105,1	105,2
C6'	129,2	128,2
C7'	130,1	129,2
C1''	137,0	136,4
C2''	135,9	126,3
C3''	128,1	135,9
C4''	128,2	130,5
C5''	125,8	132,6
C6''	127,6	125,8
C7''	20,1	20,1

O pico do íon molecular m/z 332 está presente nos espectros de massas de [8b] e [8c]. Além disto, o pico resultante da perda de um radical metila a partir do íon molecular em m/z 317 (2% de intensidade) também foi observado em ambos os espectros.

1.3.8. Síntese de (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(alquil)-4,5-isopropilidenodioxitetrahydrofuran-3-ilacetatos de metila [9]

A etapa seguinte na rota sintética consistiu da hidrogenação dos compostos [8] (Esquema 12), utilizando a mesma metodologia descrita no item 1.2.5.4, obtendo os compostos [9] mostrados na figura 1.17.



Esquema 12. Formação dos compostos hidrogenados.

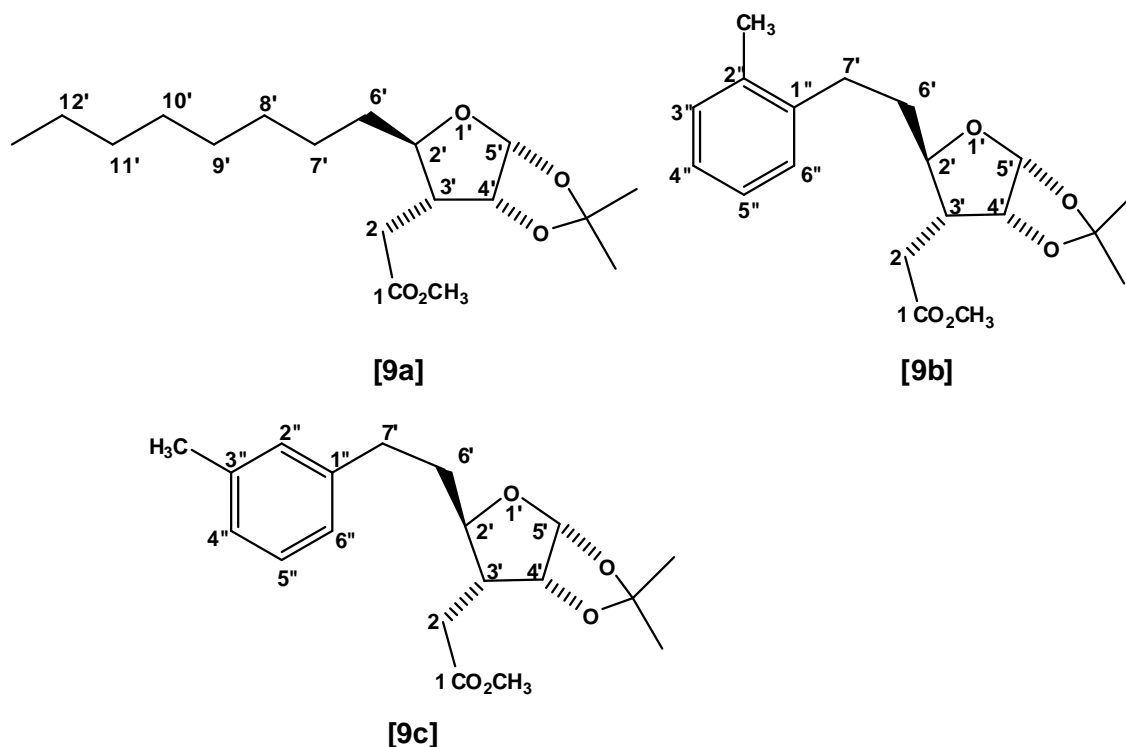


Figura 1.17. Compostos hidrogenados sintetizados.

Apenas a reação de hidrogenação do composto [8a] teve seu final confirmado por CCD, pois os demais compostos possuem um anel aromático ligado à cadeia lateral e tanto os materiais de partida quanto os produtos são revelados no UV e os R_f s destes compostos são muito semelhantes. Para garantir total hidrogenação de [8b] e [8c] utilizou-se uma quantidade maior do catalisador Pd/C a 10%, além de deixar a mistura em agitação em atmosfera de hidrogênio por um tempo maior. Assim, foram obtidos os compostos [9a], [9b] e [9c] (Figura 1.17) com rendimentos acima de 87%.

Dados obtidos através da análise elementar confirmaram as fórmulas mínimas e a pureza dos compostos [9b] e [9c] ($C_{19}H_{26}O_5$) apresentando erro relativo menor que 1,6% tanto para o C quanto para o H para ambos compostos. Não foi feita esta análise para [9a] por se tratar de substância já descrita na literatura. Sua caracterização foi feita com base na comparação de dados de espectroscopia no infravermelho com os dados publicados (ANDERSON E FRASER-REID, 1985).

Os espectros no infravermelho dos compostos [9] (Figuras 1.18, 1.19 e 1.20) mostraram as bandas esperadas de acordo com as estruturas propostas.

Destacam-se as bandas entre 1734-1739 cm^{-1} referentes ao estiramento da carbonila do éster. Para o composto [9a] (Figura 1.18) é nítida ausência de bandas presentes no espectro do precursor [8a] na região de 1664 cm^{-1} e 3017 cm^{-1} (Figura 1.14) referentes, respectivamente, aos estiramentos de $\text{C}=\text{C}$ e $=\text{C}-\text{H}$. Porém, nos espectros dos demais compostos (Figuras 1.19 e 1.20), bandas referentes ao anel aromático impediram esta diferenciação em relação aos espectros no infravermelho dos precursores (Figuras 1.15 e 1.16). Sua caracterização principal se deu através da análise de seus espectros de RMN.

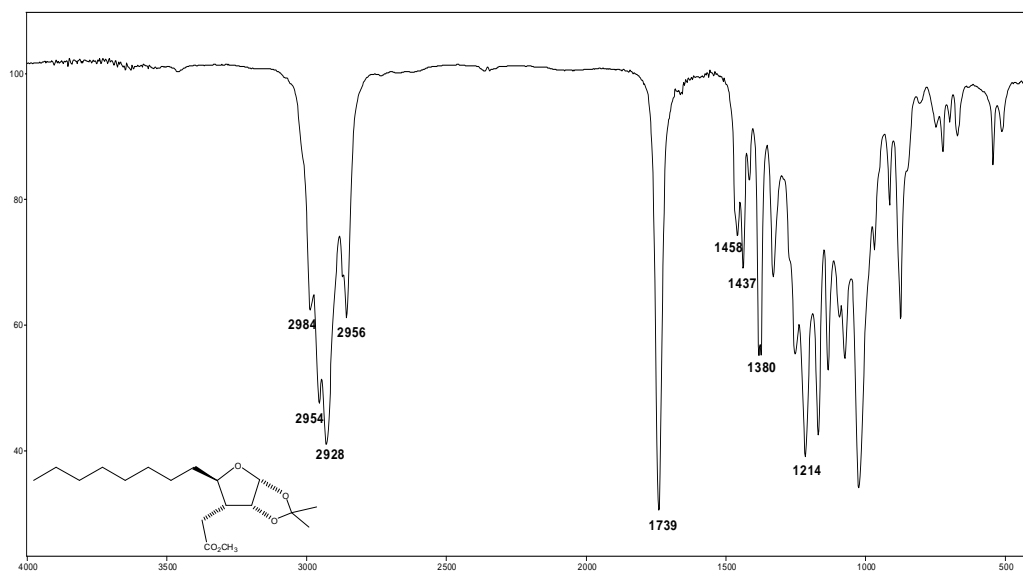


Figura 1.18. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [9a].

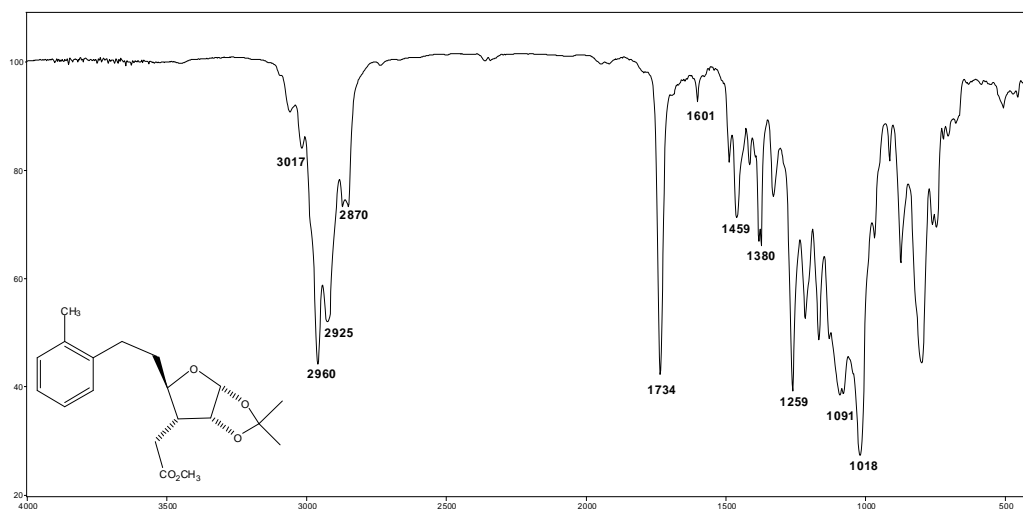


Figura 1.19. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [9b].

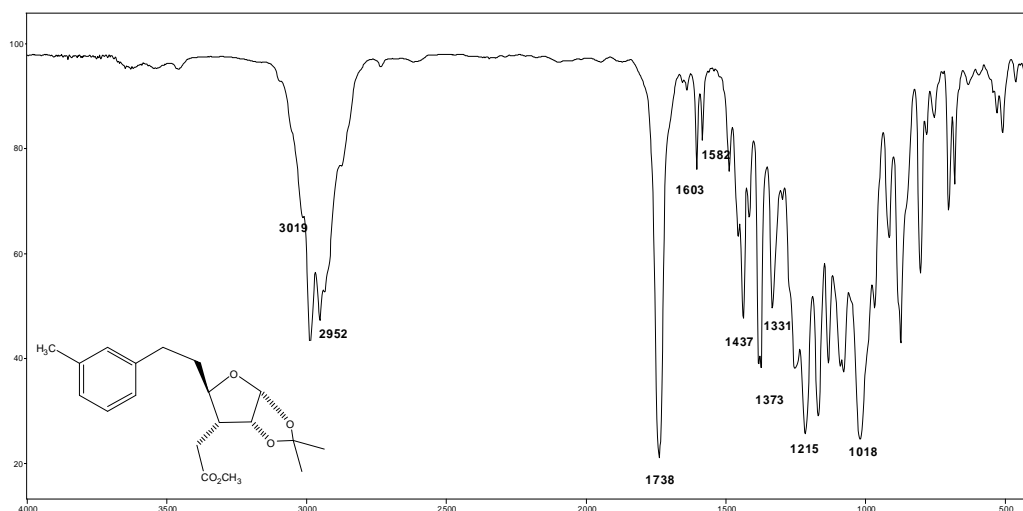


Figura 1.20. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [9c].

Os dados obtidos através de RMN de ^1H dos compostos [IXb] e [IXc] estão listados na Tabela 1.11. Uma evidência da efetiva hidrogenação dos ésteres é o surgimento de dois multipletos em δ 1,58 a 1,90 e δ 2,24 e 2,93 referentes aos hidrogênios ligados a C6' e C7', somada à inexistência de sinais na região de hidrogênios olefínicos.

Os sinais obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C estão apresentados na Tabela 1.12 e estão de acordo com o que se esperava, apresentando deslocamentos similares aos dos ésteres precursores, exceto pelos carbonos que foram hidrogenados.

Tabela 1.11 – Deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento J (Hz) dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H dos compostos [9b] e [9c], a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	[9b] δ (m, J^*)	[9c] δ (m, J^*)
CH_3	1,32 (s)	1,32 (s)
CH_3	1,48 (s)	1,47 (s)
OCH_3	3,69 (s)	3,69 (s)
H2a	2,26 (dd, $J_{2a,2b}=16,8$, $J_{2a,3'}=4,3$)	2,68 (dd, $J_{2a,2b}=16,8$, $J_{2a,3'}=4,3$)
H2b	2,60-2,71 (m)	3,75-3,85 (m)
H2'	3,75-3,85 (m)	3,75-3,85 (m)
H3'	2,04-2,17 (m)	2,03-2,14 (m)
H4'	4,77 (pseudo t, $J \approx 4$)*	4,76 (pseudo t, $J \approx 4$)*
H5'	5,85 (d, $J_{5',4'}=3,9$)	5,85 (d, $J_{5',4'}=4,0$)
H6'a e H6'b	1,58-1,62 (m)	1,60-1,68 (m)
H7'a	2,58-2,72 (m)	2,24-2,26 (m)
H7'b	2,83-2,94 (m)	2,78-2,90 (m)
H2''	-	7,16-7,23 (m)
H3''	7,06-7,15 (m)	-
H4''	7,26-7,31 (m)	7,07-7,11 (m)
H5''	7,06-7,15(m)	7,16-7,23 (m)
H6''	7,06-7,15(m)	7,07-7,11 (m)
H7''	2,31 (s)	2,17 (s)

* $J_{4',5'} = 3,9$ para [9b] e $4,0$ para [9c], e $J_{4',3'} \approx 4$ para ambos os compostos

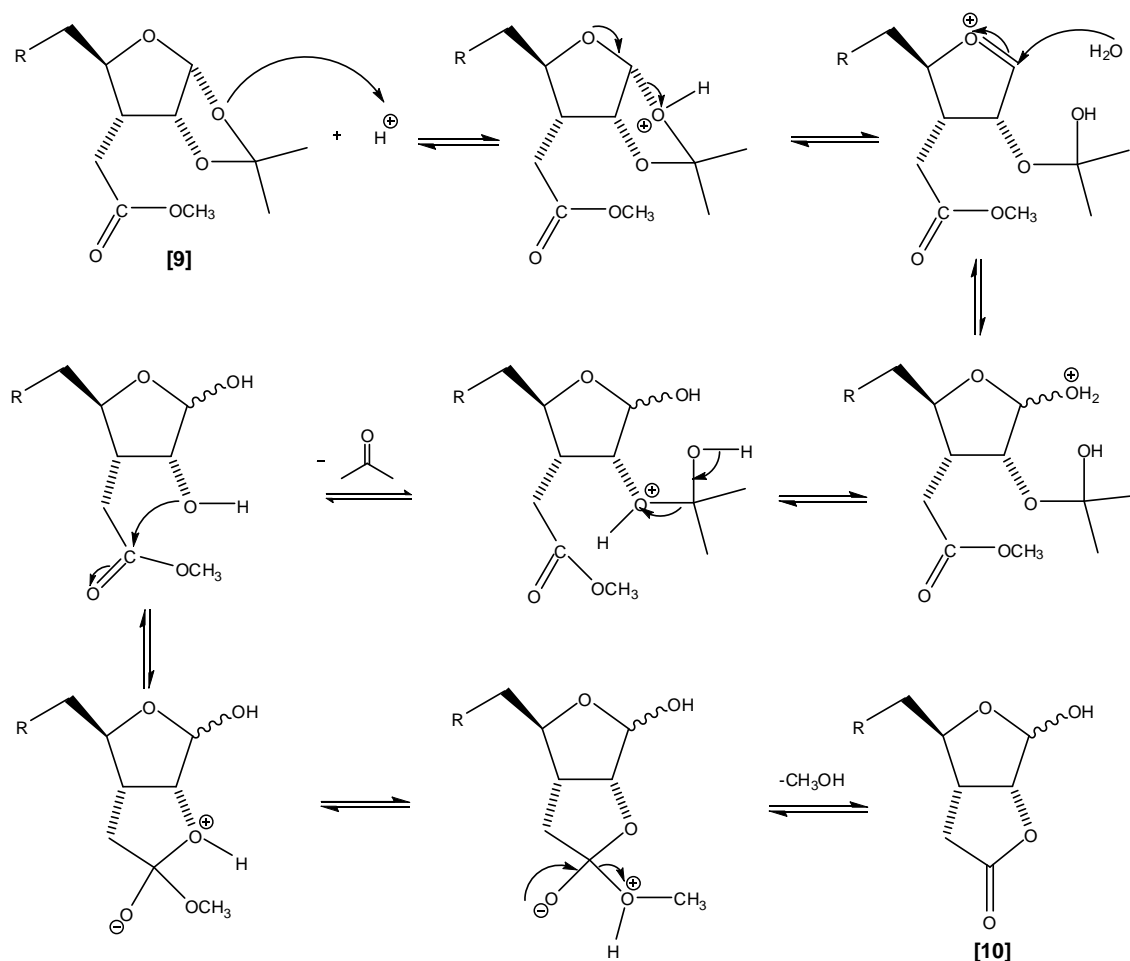
Tabela 1.12. Dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C dos compostos [9b] e [9c], a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição (C)	[IXb] δ	[IXc] δ
CH_3	26,5	26,5
CH_3	26,5	26,8
OCH_3	52,0	51,9
$\text{C}(\text{Me})_2$	111,6	111,9
C1	172,8	172,6
C2	29,8	29,7
C2'	76,5	77,5
C3'	45,00	45,0
C4'	81,0	81,0
C5'	104,9	105,0
C6'	33,3	34,7
C7'	29,7	32,4
C1''	136,3	142,1
C2''	130,4	133,2
C3''	126,2	138,1
C4''	128,2	128,5
C5''	126,2	129,5
C6''	140,2	126,8
C7''	19,5	21,6

Os espectros de massas dos compostos [9b] e [9c] são muito semelhantes e em ambos é possível observar o pico referente ao íon molecular.

1.3.9. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*,8*R*)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octan-3-onas [10β] e (1*R*,5*R*,6*R*,8*S*)-6-(alquil)-8-hidroxi-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3-onas [10α].

Durante a hidrólise do segundo grupo protetor isopropilideno, seguindo-se metodologia semelhante à descrita por ANDERSON e FRASER-REID (1985), ocorreu o processo de lactonização formando misturas de epímeros [10] com hidroxilas em α ou β com rendimentos acima de 85%. Uma proposta de mecanismo para estas reações está representada no Esquema 13.



Esquema 13. Proposta de mecanismo para formação das lactonas [10].

Como a geometria em torno da ligação $C=O^+$ mostrada no segundo intermediário do Esquema 13 é plana, o nucleófilo (a molécula de água) pode se ligar ao carbono C8 por qualquer uma das faces da molécula, gerando os epímeros representados nas Figuras 1.21 a 1.23. Nos desenhos tridimensionais dos epímeros podem-se observar as hidroxilas em α ou em β .

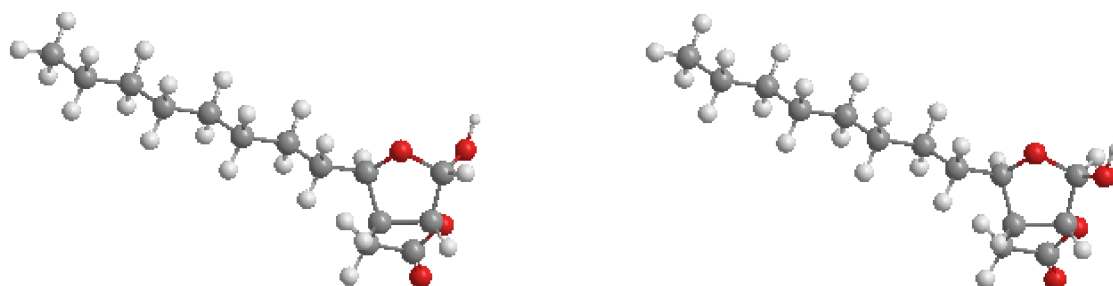


Figura 1.21 Modelos moleculares dos compostos [10a α] e [10a β], respectivamente.

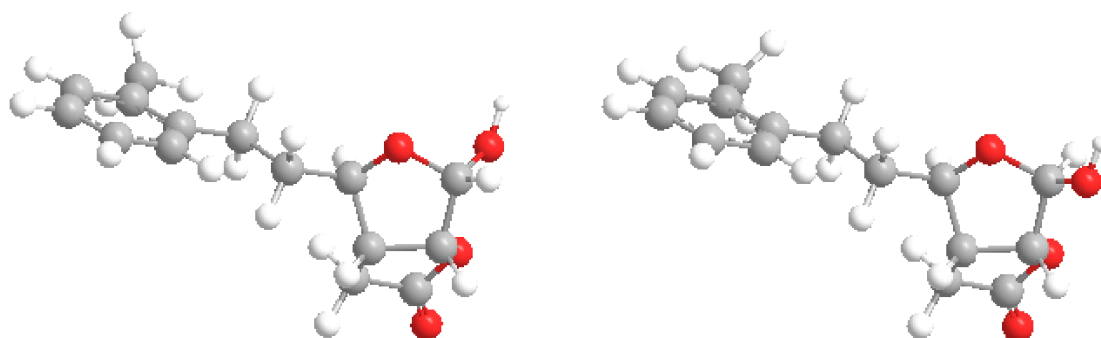


Figura 1.22 Modelos moleculares dos compostos [10b α] e [10b β], respectivamente.

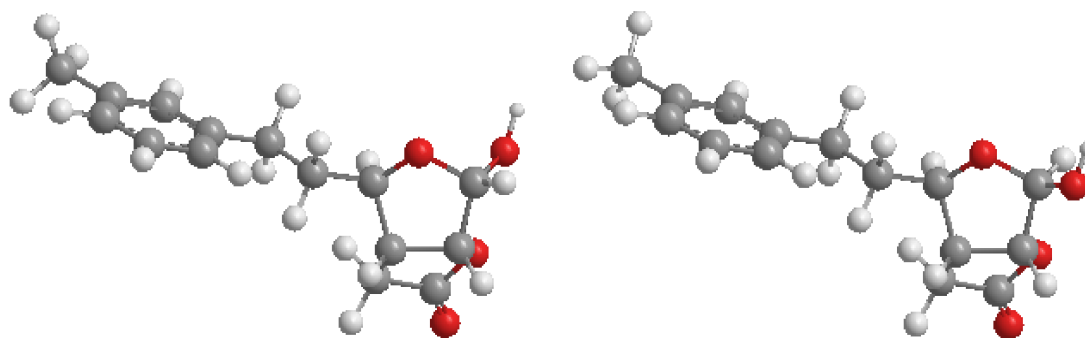


Figura 1.23 Modelos moleculares dos compostos [10c α] e [10c β], respectivamente.

As figuras 1.24 a 1.26 apresentam os espectros no infravermelho das misturas de epímeros [10a], [10b] e [10c], respectivamente, onde podem ser observadas bandas largas centradas entre 3411 e 3407 cm^{-1} referentes ao estiramento O-H das hidroxilas, inexistentes nos espectros dos compostos precursores [9] (Figuras 1.17 a 1.19). O deslocamento da banda relativa ao estiramento C=O de 1734 (nos espectros dos precursores) para 1781 cm^{-1} evidencia a formação de γ -lactonas (CASTELO-BRANCO, 2009, MAGATON, 2007).

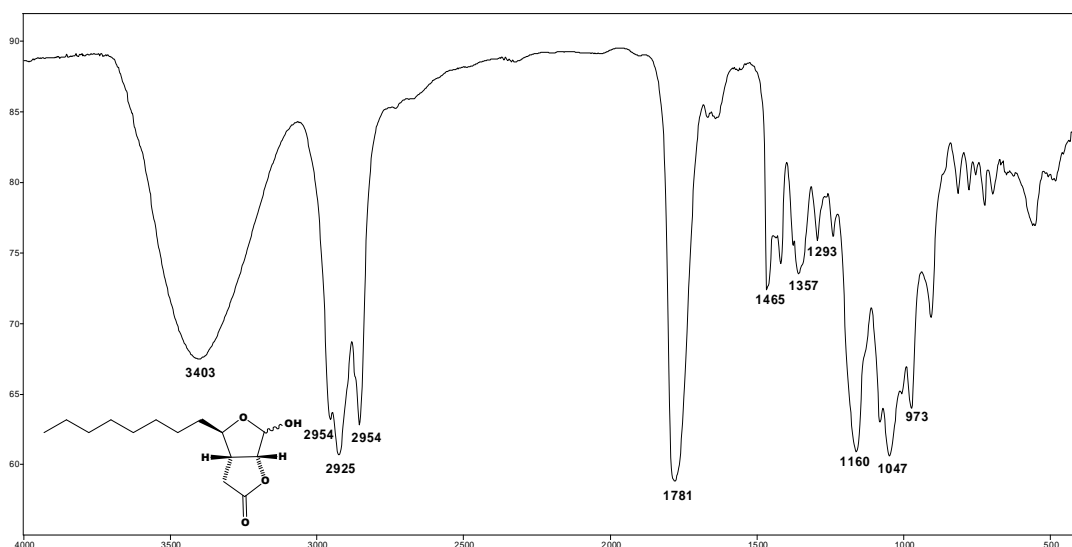


Figura 1.24. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [10a].

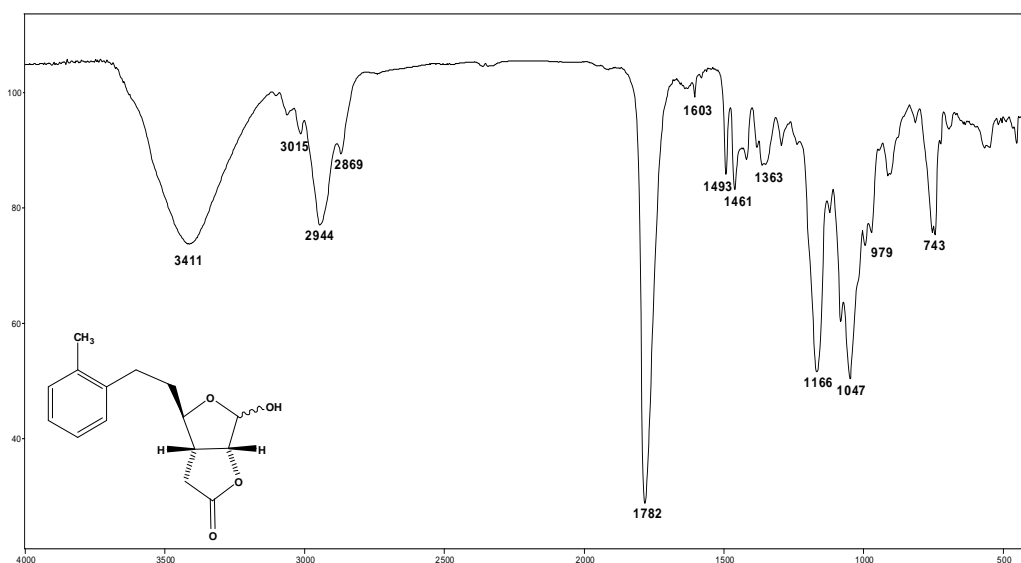


Figura 1.25. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [10b].

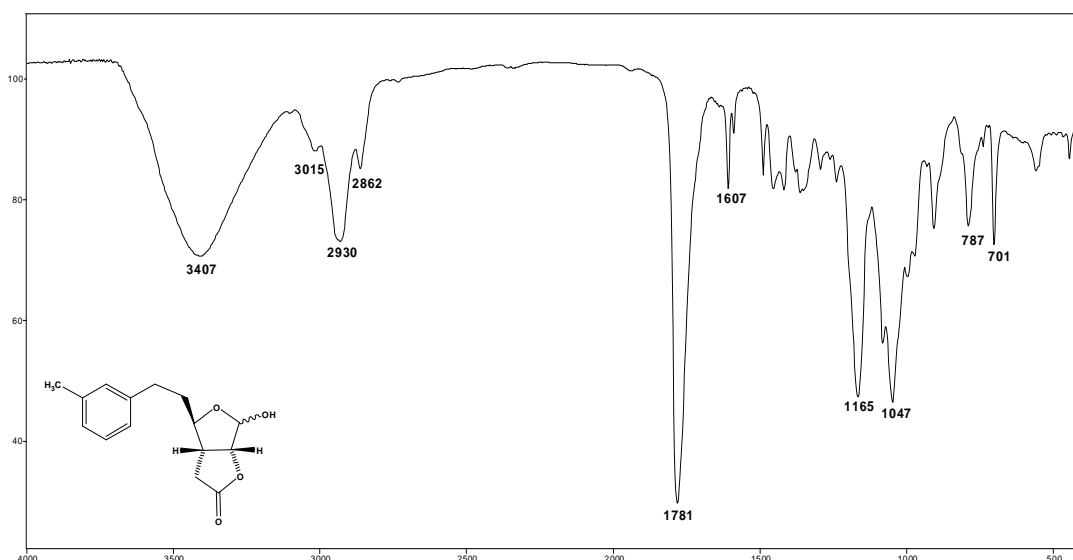


Figura 1.26. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [10c].

Através dos resultados das análises elementares de carbono e hidrogênio foi possível confirmar a fórmula mínima e a pureza dos compostos [10b] e [10c], com um erro relativo abaixo de 1,3%. A caracterização [10a] foi feita com base na comparação de temperatura de fusão e dados de espectroscopia no infravermelho com os dados publicados (ANDERSON E FRASER-REID, 1985).

Os espectros de RMN de ^{13}C dos compostos [10b] e [10c] encontram-se nas Figuras 1.28 e 1.30. Em ambos os espectros observa-se a duplicação da maioria dos sinais, indicando a formação de isômeros. Por exemplo, na Figura 1.28 encontram-se os sinais em δ 176,7 (C3 α) e 175,9 (C3 β) referentes aos carbonos das carbonilas dos epímeros com a hidroxila em α e em β , respectivamente. Outros sinais importantes para a confirmação da formação dos epímeros foram observados em δ 101,2 e 95,9 (Figura 1.28) relativos aos carbonos ligados às hidroxilas, C8 α e C8 β , respectivamente. Entretanto, a confirmação da configuração de C8 dos isômeros majoritários foi feita com base na análise dos espectros de RMN de ^1H (Figuras 1.27e 1.29).

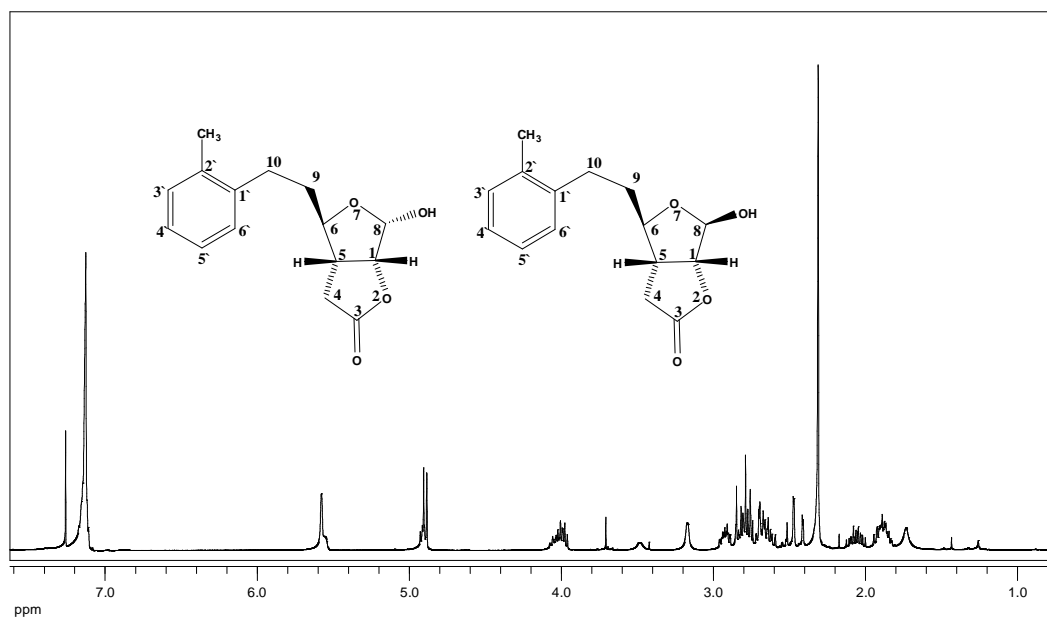


Figura 1.27. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de isômeros [10b].

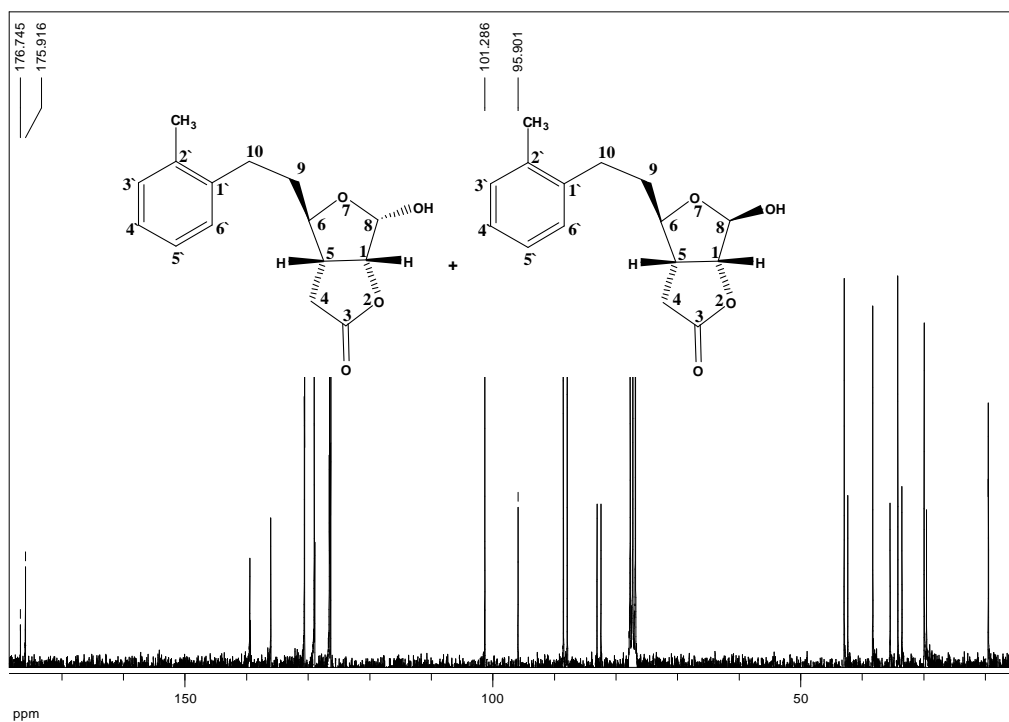


Figura 1.28. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura de isômeros [10b].

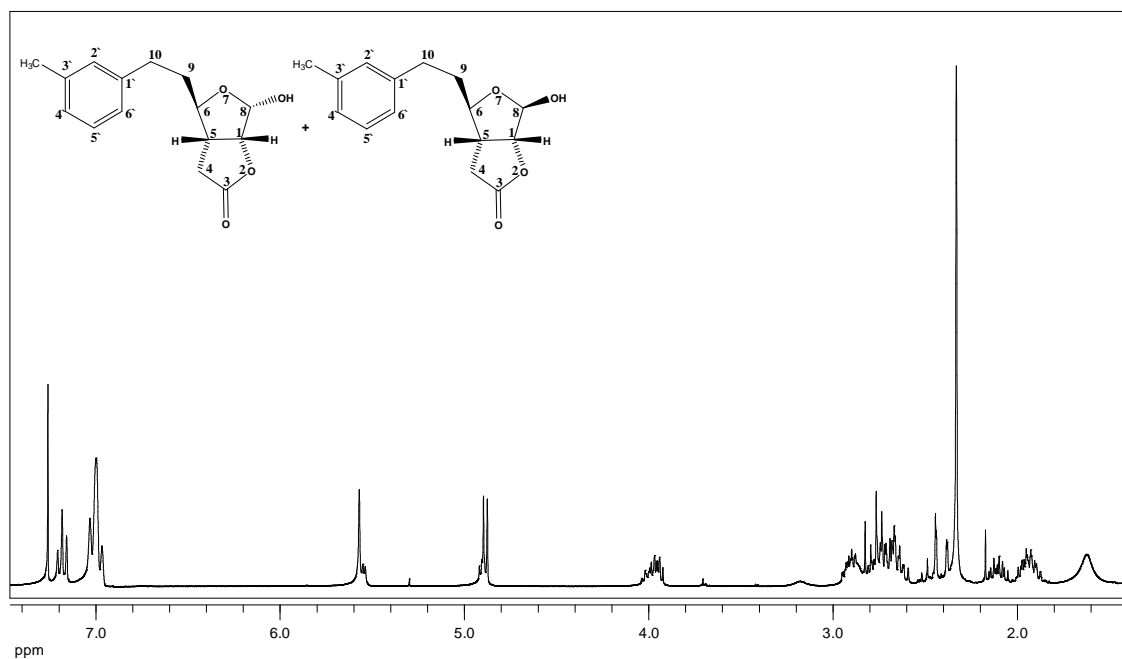


Figura 1.29. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de isômeros [10c].

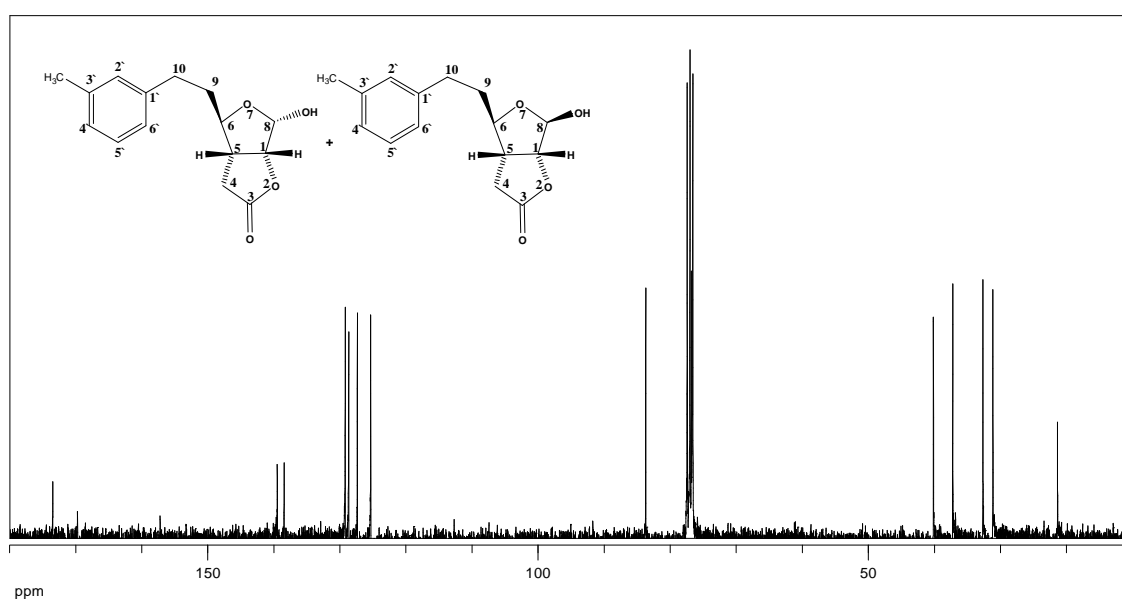


Figura 1.30. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura de isômeros [10c].

As atribuições feitas a partir dos espectros de RMN de ^1H encontram-se listadas na Tabela 1.13. Para a determinação da configuração relativa em C8

nos isômeros sintetizados, os sinais relativos aos H8 foram essenciais. O sinal do componente majoritário (segundo as curvas de integração) é um simpleto. Isto indicou que o sinal de H8 do componente principal da mistura não estava acoplado ao de H1, portanto esses hidrogênios devem estar fazendo um ângulo próximo de 90° na estrutura molecular. Isto ocorre nas estruturas dos isômeros [10] com a hidroxila em β (Figuras 1.21 a 1.23). O sinal de H8 dos isômeros minoritários aparece como um duplete, indicando acoplamento do sinal de H8 com o de H1. A constante $J_{8,1}$ é de aproximadamente 4 Hz.

Assim, foram caracterizados os isômeros com hidroxila em α como sendo os componentes em menor proporção nas misturas de epímeros [10]. Destacam-se ainda os sinais característicos dos hidrogênios das hidroxilas, aparecendo entre δ 1,25 e 1,65. Os demais sinais observados confirmam as estruturas propostas e a análise completa dos espectros de RMN está descrita nas Tabelas 1.13 e 1.14.

Tabela 1.13. Deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento J (Hz) dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H dos compostos [10b] e [10c], a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	[10b] δ	[10c] δ
H1	4,89 (d, $J_{1,5}=6,0$)	4,88 (d, $J_{1,5}=6,0$)
H1*	4,90-4,93 (m)	4,90-4,92 (m)
H4a	2,44 (dd, $J_{4a,4b} = 18$, $J_{4a,5}=1,5$)	2,42 (dd, $J_{4a,4b} = 16,8$, $J_{4a,5}=1,8$)
H4a*	2,50-2,54 (m)	2,35-2,46 (m)
H4b e H4b*	2,59-2,68(m)	2,60-2,81(m)
H5	2,91-2,95 (m)	2,60-2,81(m)
H5*	2,59-2,68(m)	2,60-2,81(m)
H6 e H6*	3,95-4,08 (m)	3,92-4,04 (m)

H8	5,59 (s)	5,58 (s)
H8*	5,55 (d, $J_{8,1}=3,9$)	5,54 (d, $J_{8,1}=3,6$)
H9a e H9a*	1,84-1,96 (m)	1,62-1,98 (m)
H9b	2,02-2,18 (m)	2,05-2,18 (m)
H9b*	1,84-1,96 (m)	1,62-1,98 (m)
H10a e H10a*	3,45-3,52 (m)	2,87-2,95 (m)
H10b e H10b*	3,45-3,52 (m)	2,87-2,95 (m)
OH e OH*	1,25 (sl)	1,65 (sl)
H2' e H2'*	—	6,97-7,03 (m)
H3' e H3'*	7,11-7,15 (m)	—
H4' e H4'*	7,11-7,15 (m)	6,97-7,03 (m)
H5' e H5'*	7,11-7,15 (m)	6,97-7,03 (m)
H6' e H6'*	7,11-7,15 (m)	6,97-7,03 (m)
Me e Me*	2,31 (s)	2,33 (s)

Obs: Os sinais marcados com “*” referem-se aos átomos do epímero minoritário, no qual a hidroxila encontra-se ligada em posição alfa. Os demais sinais se referem ao epímero principal, com a hidroxila em beta.

Tabela 1.14. Dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C dos compostos [10b] e [10c], a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição (C)	[Xb] δ	[Xc] δ
C1	88,3	88,2
C1*	82,2	82,1
C3	175,6	175,6
C3*	176,5	169,9
C4	34,0	33,9
C4*	33,3	33,3
C5	42,7	45,6
C5*	42,1	42,1
C6	87,6	87,4
C6*	82,8	82,7
C8	101,0	101,0
C8*	95,5	95,6
C9	38,0	39,3
C9*	35,2	36,4
C10	29,7	32,2
C10*	29,3	31,9
C1'	139,5	140,9
C1'*	139,5	140,9
C2'	135,8	129,2

C2'*	135,8	128,4
C3'	136,1	138,1
C3'*	136,1	126,9
C4'	126,2	119,9
C4'*	126,1	119,9
C5'	126,0	126,9
C5'*	126,0	125,3
C6'	130,3	125,3
C6'*	128,7	125,3
CH ₃	19,3	21,4
CH ₃ *	19,3	21,3

* Os sinais marcados com “*” referem-se aos átomos do epímero minoritário, no qual a hidroxila encontra-se ligada em posição alfa. Os demais sinais se referem ao epímero principal, com a hidroxila em beta.

Analisando os espectros de massas dos compostos [10b] e [10c], nota-se que ambos apresentaram picos relativos ao íon molecular em m/z 262. Os picos referentes à perda de uma molécula de água [M^{\ddagger} -H₂O] também aparecem nesses espectros.

Visto que a etapa posterior consistiria na oxidação dos compostos [10α] e [10β] formando produtos únicos [11], não foi necessária a separação dos epímeros.

1.3.10. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(alquil)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-dionas [11].

Para a oxidação dos lactóis [10] e conseqüente formação do sistema bis- γ lactônico, foi utilizada a metodologia de Jones, seguindo procedimento semelhante àquele reportado para a síntese do avenaciólídeo (ANDERSON e FRASER-REID, 1985). Aos compostos solubilizados em acetona foi adicionado gota a gota o reagente de Jones até que não houve mais alteração da coloração (alaranjada), indicando que o crômio(VI) não estava mais sendo reduzido, confirmando portanto, o final da reação. Na seqüência adicionou-se metanol para consumir o excesso do oxidante. Após elaboração da reação e purificação dos produtos, foram obtidas as bis- γ lactonas [11] com rendimentos entre 63 e 80%. As temperaturas de fusão dos compostos [11] apresentaram uma faixa pequena de variação. A análise elementar de carbono e hidrogênio confirmou as fórmulas propostas e a pureza dos compostos [11b] e [11c].

As Figuras 1.31 a 1.33 mostram os espectros no infravermelho dos compostos sintetizados: [11a], [11b] e [11c], respectivamente. A ausência da banda próxima em 3400 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação O-H, presente nos espectros dos lactóis precursores [10] (Figuras 1.24 a 1.26) não se observa nos espectros dos produtos [11], confirmando a ocorrência da oxidação em C8. Nota-se ainda uma banda intensa e larga entre $1783\text{-}1789\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de C=O de γ lactonas nos espectros de [11a], [11b] e [11c], devida à superposição das bandas das duas carbonilas.

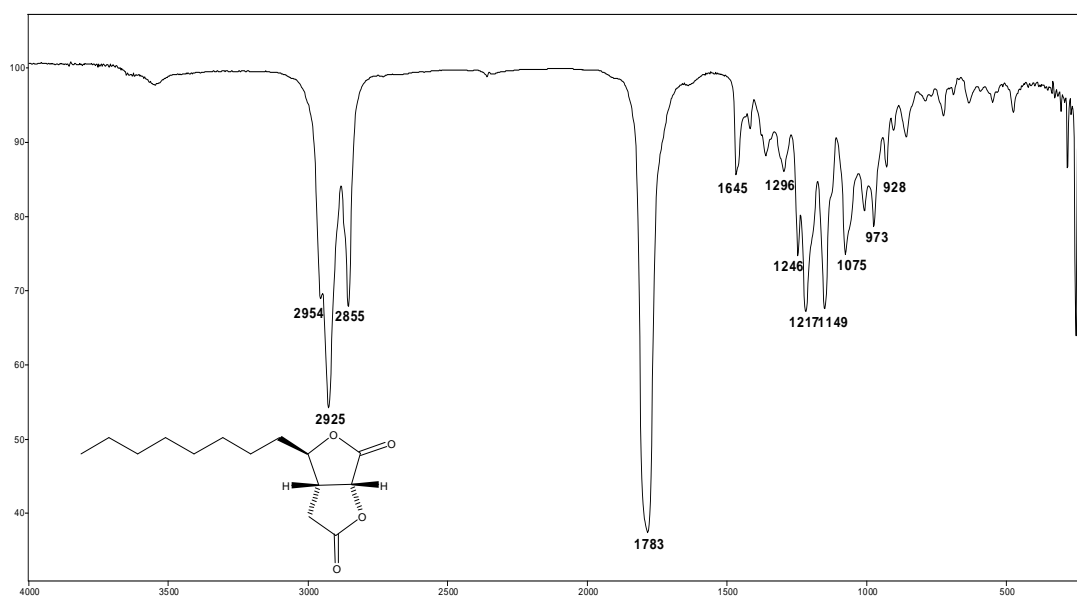


Figura 1.31. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [11a].

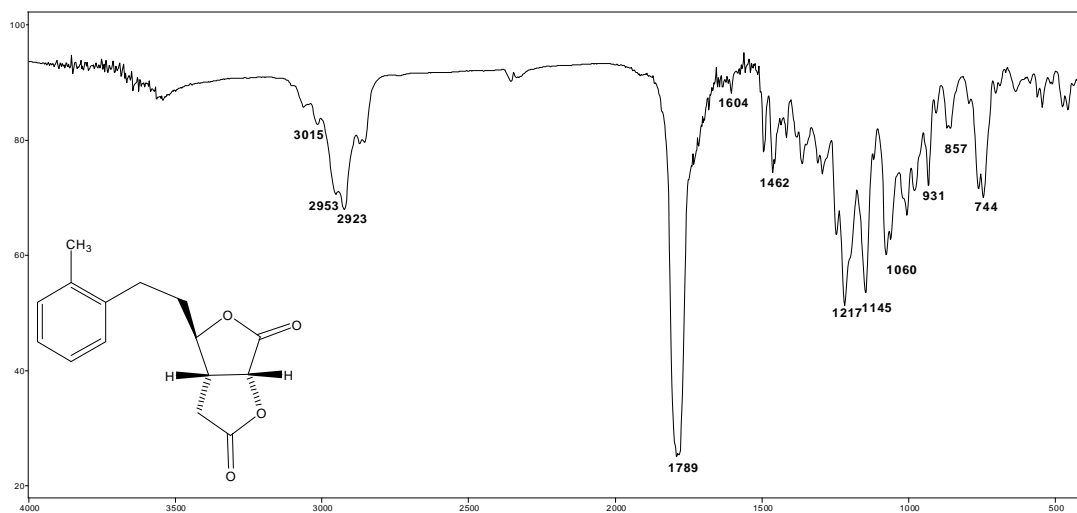


Figura 1.32. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [11b].

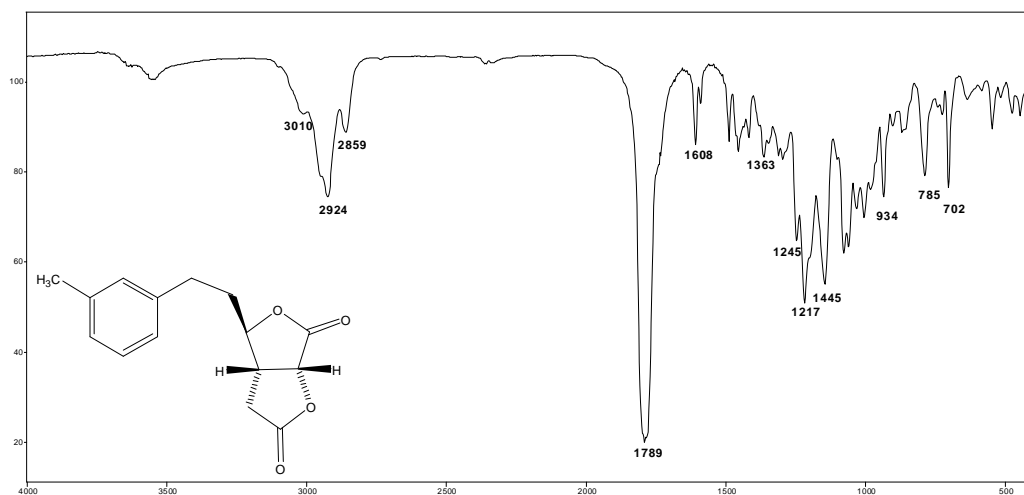


Figura 1.33. Espectro no infravermelho (filme sobre NaCl) do composto [11c].

A caracterização do composto [11a] foi feita com base na comparação de temperatura de fusão e dados de espectroscopia no infravermelho com os dados publicados (ANDERSON E FRASER-REID, 1985). Para os compostos [11b] e [11c] foram obtidos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 1.34 a 1.37).

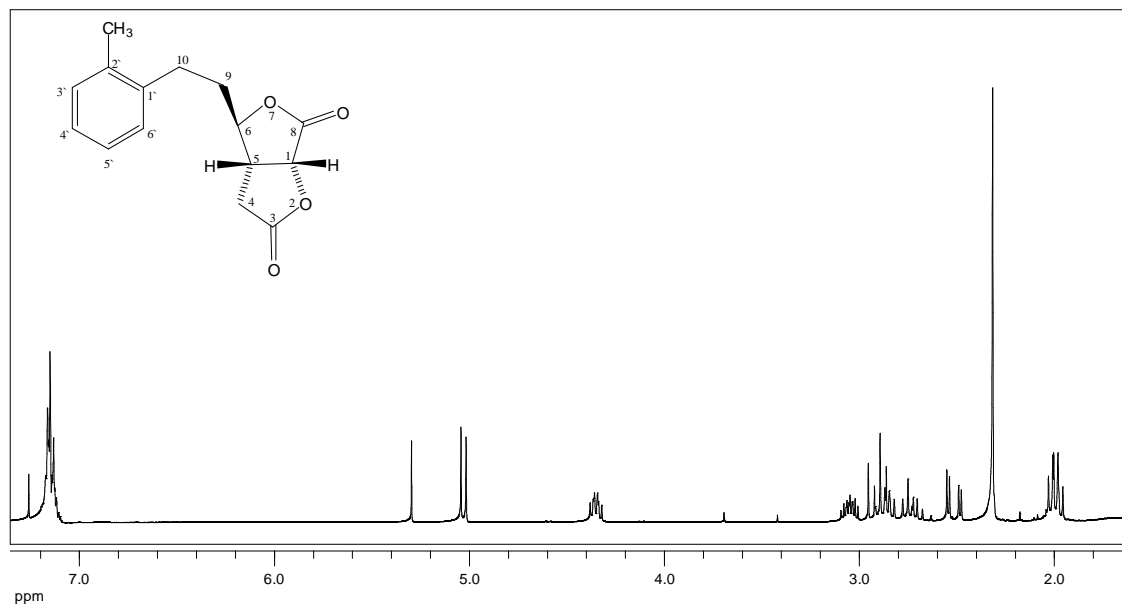


Figura 1.34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto [11b].

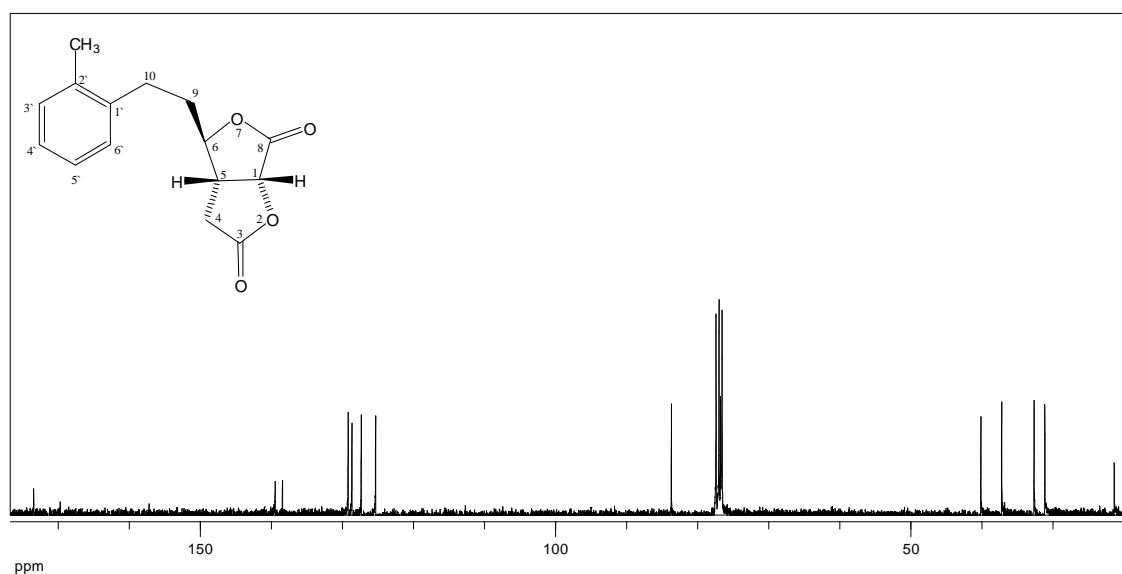


Figura 1.35. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto [11b].

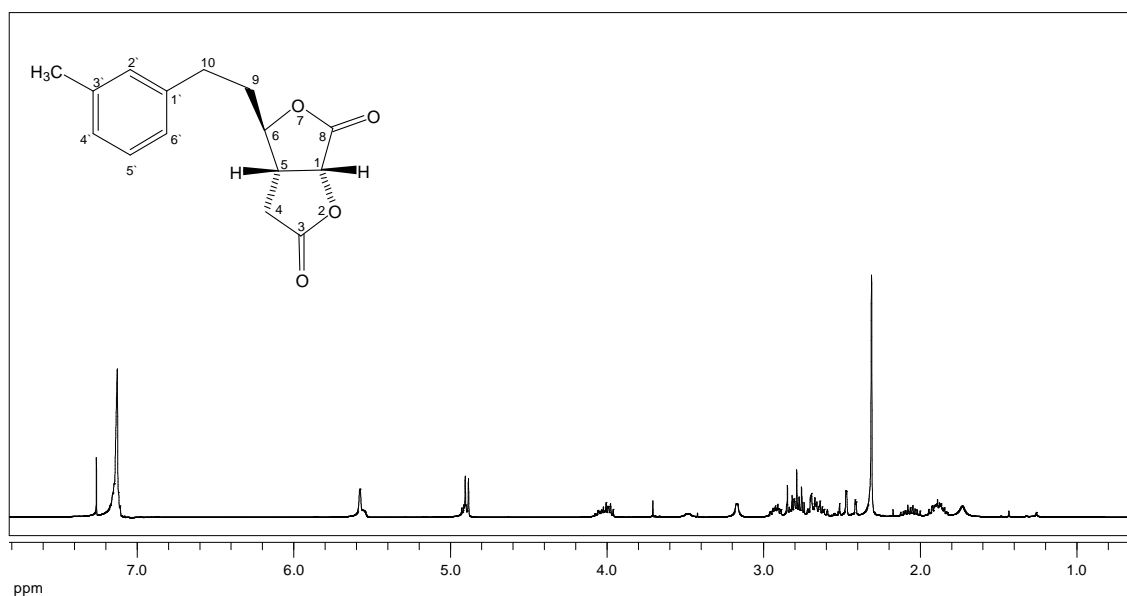


Figura 1.36. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto [11c].

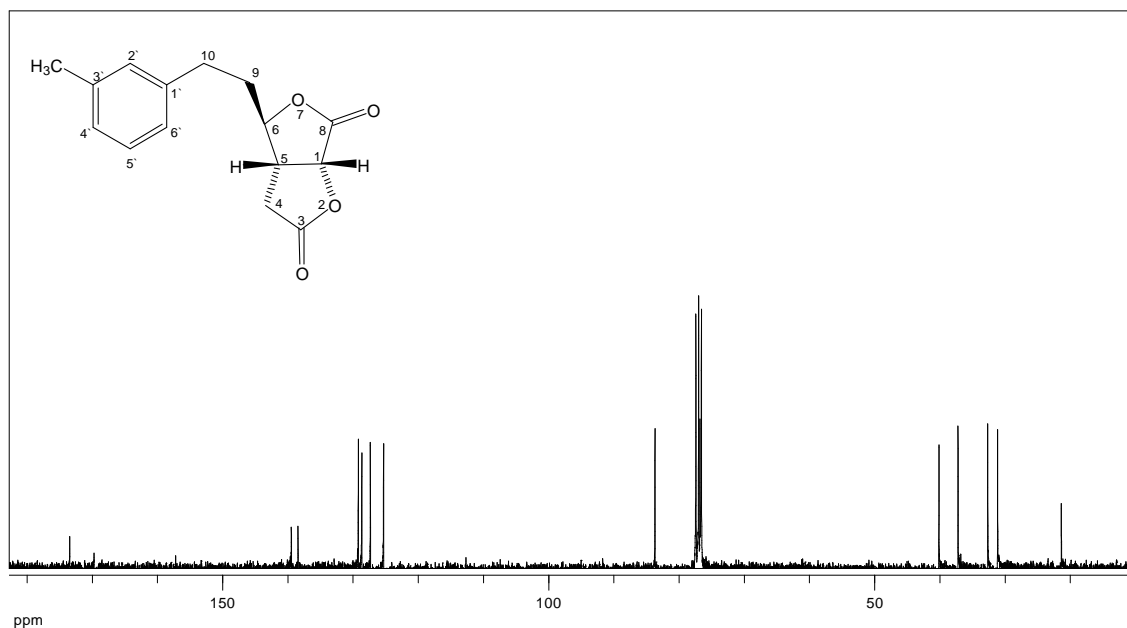


Figura 1.37. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto [11c].

A análise dos espectros de RMN de ¹H dos compostos [11b] e [11c] está resumida na Tabela 1.15. A ausência do sinal referente ao hidrogênio H8 observado nos espectros dos precursores [10] indicou a ocorrência da

oxidação de C8, levando aos produtos [11b] e [11c]. São notáveis ainda os aumentos nos valores dos deslocamentos químicos relativos ao H1, que agora aparecem como dupletos por se acoplarem apenas com H5, devidos ao efeito da desproteção causada pela carbonila vizinha. Os demais sinais estão de acordo com as estruturas esperadas para as bis- γ -lactonas.

Tabela 1.15. Deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento J (Hz) dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H dos compostos [11b] e [11c], a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	[11b] δ	[11c] δ
H1	5,03 (d, $J_{1,5}=7,8$)	5,01(d, $J_{1,5}=8,1$)
H4a	2,52 (dd, $J_{4a,4b}=18,2$, $J_{4a,5}=3,9$)	2,42 (dd, $J_{4a,4b}=18,0$ $J_{4a,5}=4,5$)
H4b	2,67 (dd, $J_{4b,4a}=18,2$, $J_{4b,5}=8,0$)	2,88(dd, $J_{4b,4a}=18,0$, $J_{4b,5}$ $=9,6$)
H5	3,01-3,09 (m)	2,97-3,07(m)
H6	4,36 (dt, $J_{6,9a}=J_{6,9b}=4,8$; $J_{6,5}=6,9$)	4,31 (dt, $J_{6,9a}=J_{6,9b}=5,1$; $J_{6,5}=8,1$)
H9a e H9b	1,96-2,05 (m)	1,98-2,08 (m)
H10a e H10b	2,82-2,96 (m)	2,65-2,95 (m)
H2'	—	6,96-7,06 (m)
H3'	7,09-7,19 (m)	—
H4', H5' e H6'	7,09-7,19 (m)	6,96-7,06 (m)
Me	2,73 (s)	2,34 (s)

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C estão apresentados na Tabela 1.16. Notam-se os sinais relativos aos carbonos das duas carbonilas

que apareceram em torno de δ 173 para o carbono C3 e δ 170 para C8. Os demais sinais estão de acordo com as estruturas propostas.

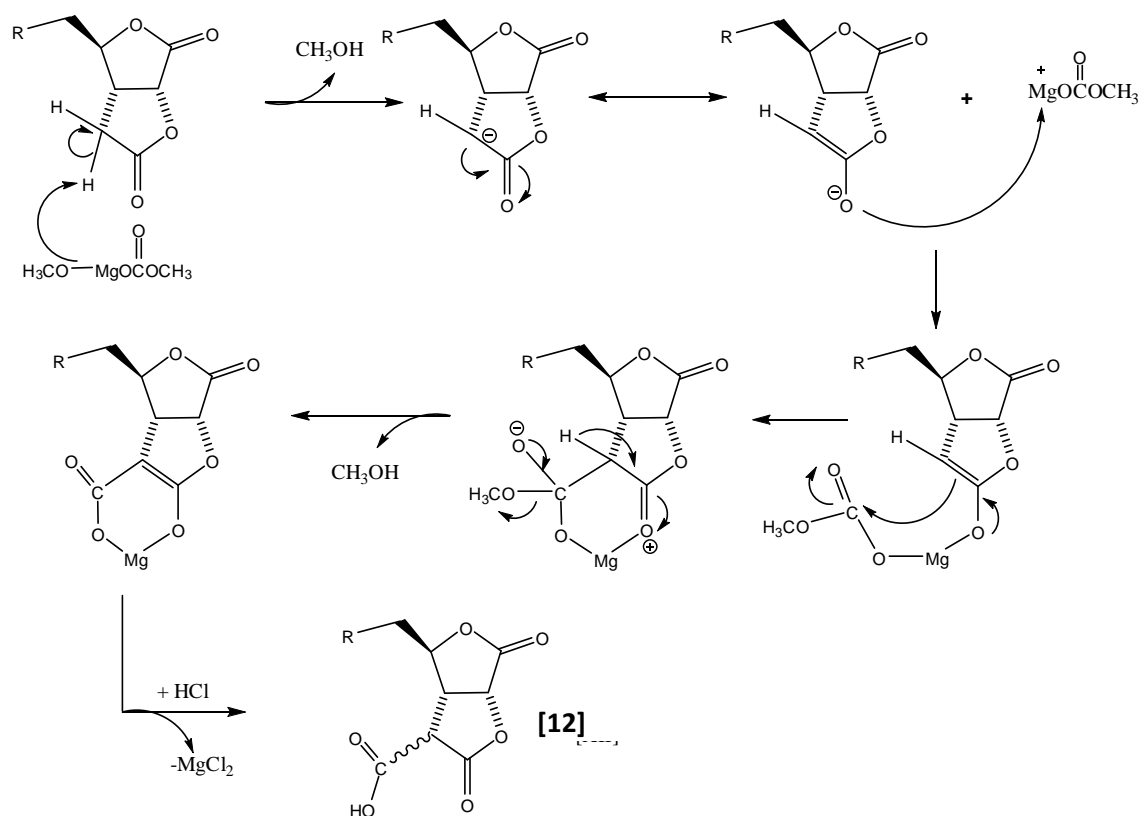
Tabela 1.16. Dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C dos compostos [11b] e [11c], a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição (C)	[11b] δ	[11c] δ
C1	83,9	77,4
C3	173,5	173,4
C4	40,2	40,1
C5	28,6	31,2
C6	82,8	83,7
C8	169,7	169,7
C9	36,00	37,2
C10	32, 6	32,7
C1'	137,8	139,5
C2'	135,8	125,3
C3'	130,6	128,7
C4'	126,7	127,3
C5'	126,3	138,4
C6'	128, 8	129,2
Me	19,2	21,4

Os espectros de massas dos compostos [11b] e [11c] são semelhantes, apresentando o pico referente ao íon molecular em m/z 260.

1.3.11. Síntese de (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(alquil)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octano-3,8-dionas [13]

A introdução da dupla ligação exocíclica vizinha à carbonila em C3 foi realizada seguindo a metodologia de PARKER e JOHNSON (1973), na qual ao composto [11] foi colocado para reagir sob refluxo com solução de carbonato de metilmetoximagnésio (CMM), em atmosfera de N₂. Após o resfriamento da mistura reagente a adição de solução de HCl completa a formação dos ácidos carboxílicos, que são extraídos com éter dietílico. Uma proposta de mecanismo para esta reação está mostrada no esquema 14.

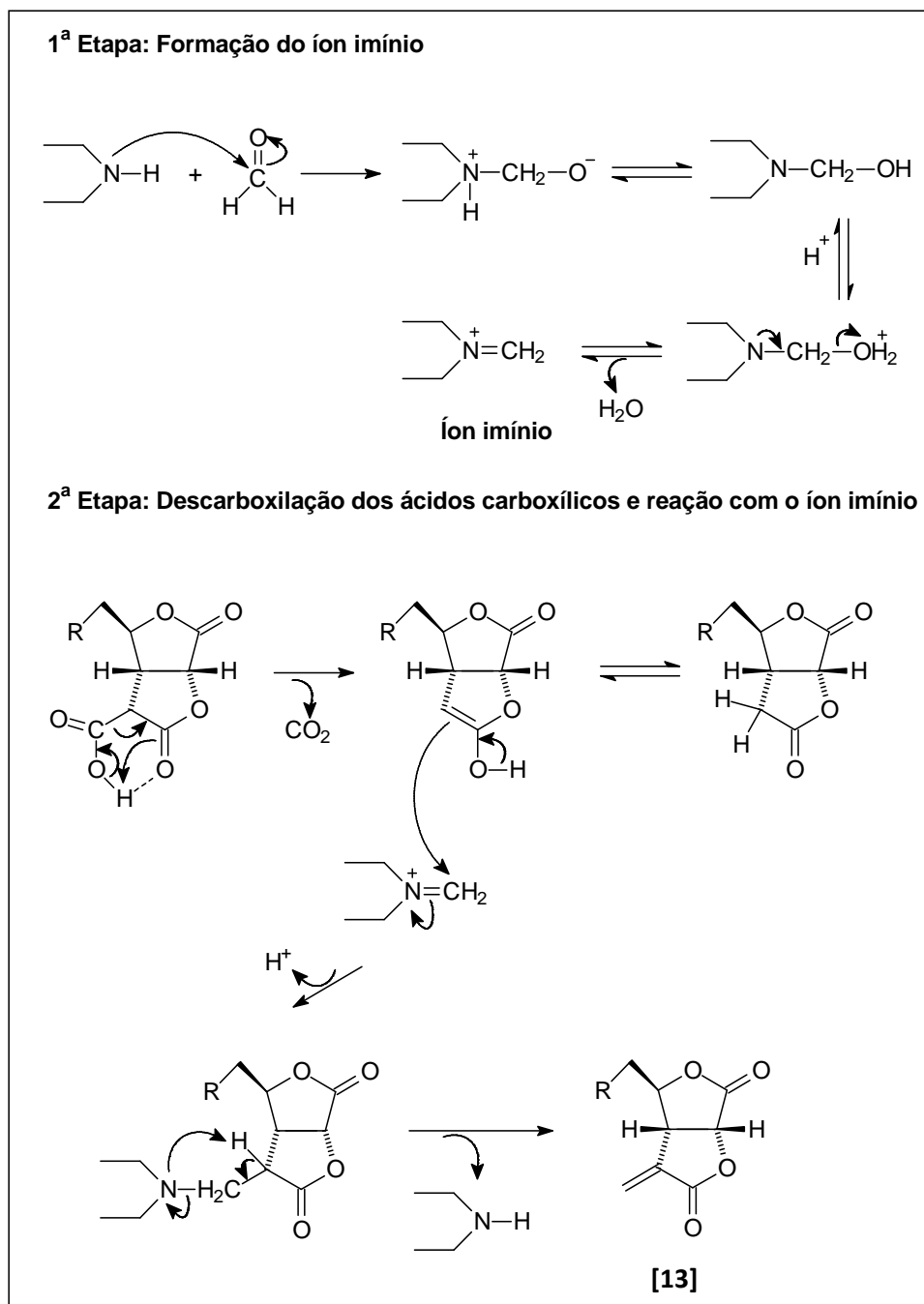


Esquema 14. Proposta de mecanismo para a formação dos ácidos carboxílicos [12].

Os ácidos dilactônicos [12] não foram identificados, sendo utilizados na etapa adjacente sem purificação. Adicionou-se aos ácidos [12] uma solução preparada a partir de ácido acético, acetato de sódio, dietilamina e formol,

promovendo a descarboxilação seguida da metilenação do intermediário, obtendo-se assim, os produtos finais [13], com rendimentos entre 46 e 48 % a partir de [11].

O mecanismo proposto para a formação da dupla ligação exocíclica está representado no esquema 15.



Esquema 15. Proposta de mecanismo para a descarboxilação do ácido carboxílico e adição da dupla ligação exocíclica ao sistema bicíclico.

Os produtos finais [13] obtidos (Figura 1.38) foram caracterizados através de análise elementar de carbono e hidrogênio, espectroscopia de RMN e no infravermelho, espectrometria de massas e rotação específica.

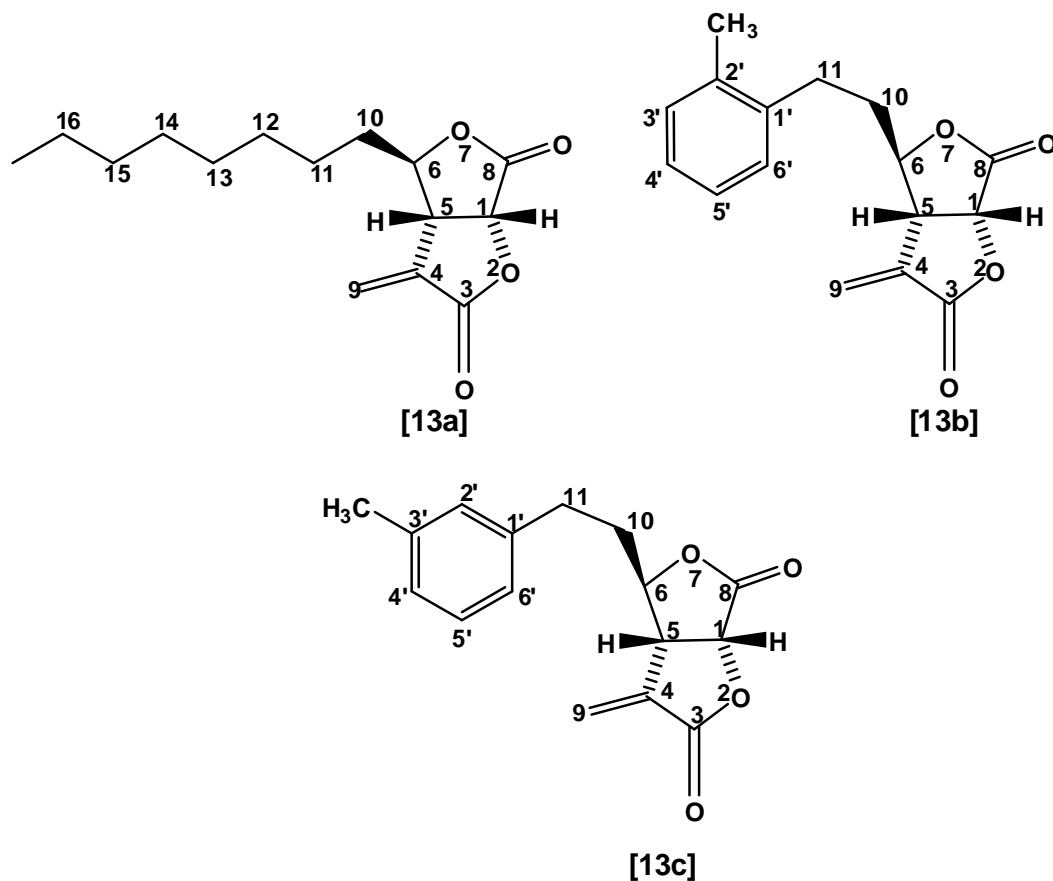


Figura 1.38. Produtos finais obtidos.

Os dados das análises elementares apresentaram-se condizentes, confirmando a fórmula mínima dos produtos ($C_{15}H_{22}O_4$ para [13a] e $C_{16}H_{16}O_4$ para [13b] e [13c]) e sua pureza, obtendo-se percentagens de carbono e hidrogênio com erros relativos inferiores a 2,7%.

Os espectros no infravermelho do avenaciólídeo e análogos, mostrados nas figuras 1.39 a 1.41 apresentaram bandas em torno de 1665 cm^{-1} , características do estiramento C=C do grupo metilideno, e em torno de 3100 cm^{-1} características de estiramento da ligação C-H de carbono sp^2 . Foram observadas as bandas largas e intensas características das carbonilas de lactonas, superpostas, como ocorreu nos espectros dos compostos [11]

precursores. No espectro do avenaciólídeo (Figuras 1.39) pode-se notar a subdivisão dessa banda com máximos em 1773 e 1789 cm^{-1} : As demais bandas observadas no espectro de [13a] também estão de acordo com a literatura.

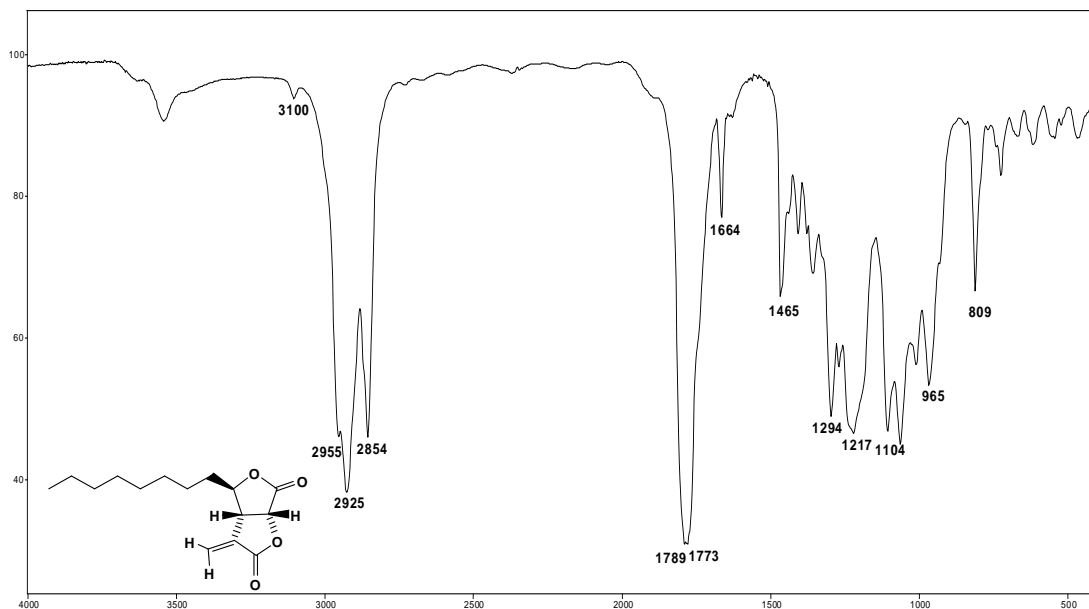


Figura 1.39. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [13a].

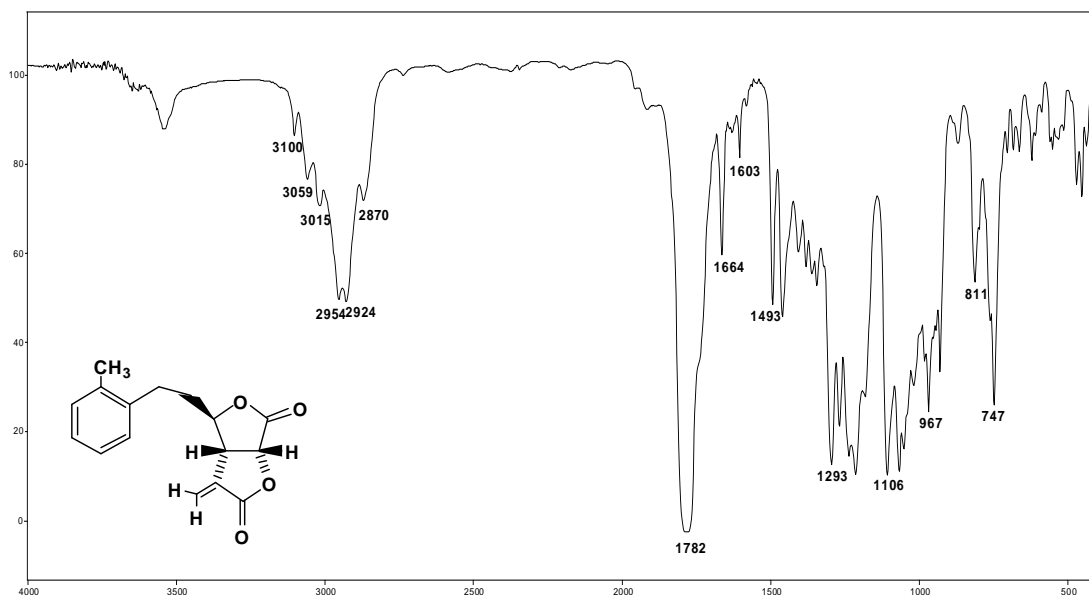


Figura 1.40. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [13b].

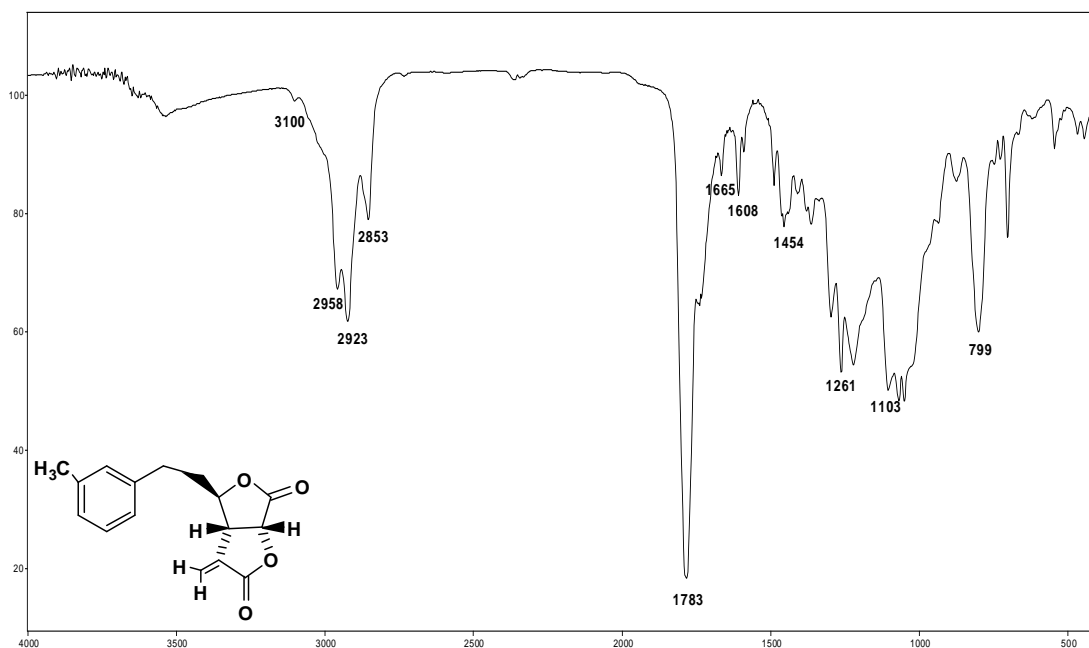


Figura 1.41. Espectro no infravermelho (KBr) do composto [13c].

Os espectros de RMN de ^1H dos produtos [13a], [13b] e [13c] estão apresentados nas Figuras 1.42 a 1.44, respectivamente. Esses espectros indicam a formação dos produtos esperados, pela presença dos sinais em torno de δ 5 e 6 ppm, característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^2 e que corresponde a H9a e b, respectivamente. Os demais dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H estão listados na Tabela 1.17.

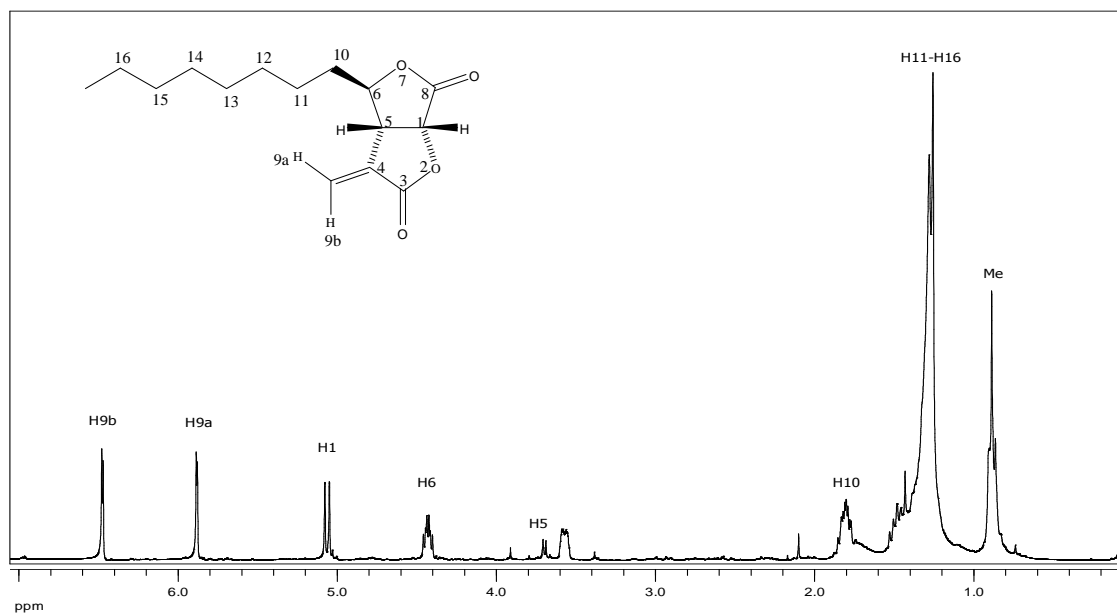


Figura 1.42. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do produto final [13a].

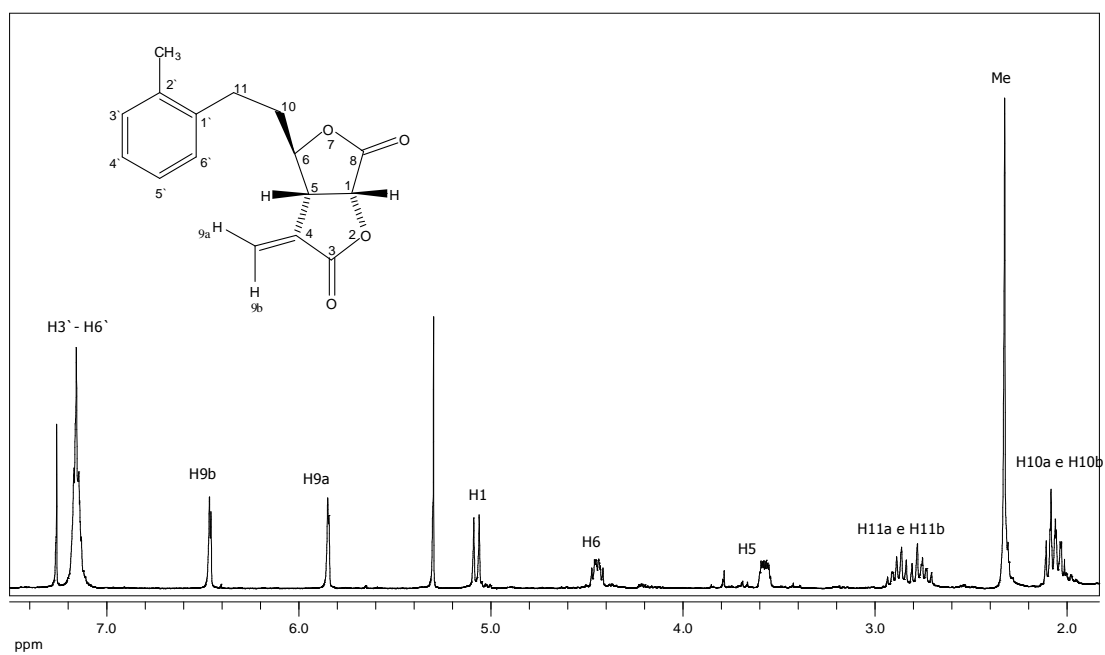


Figura 1.43. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do produto final [13b].

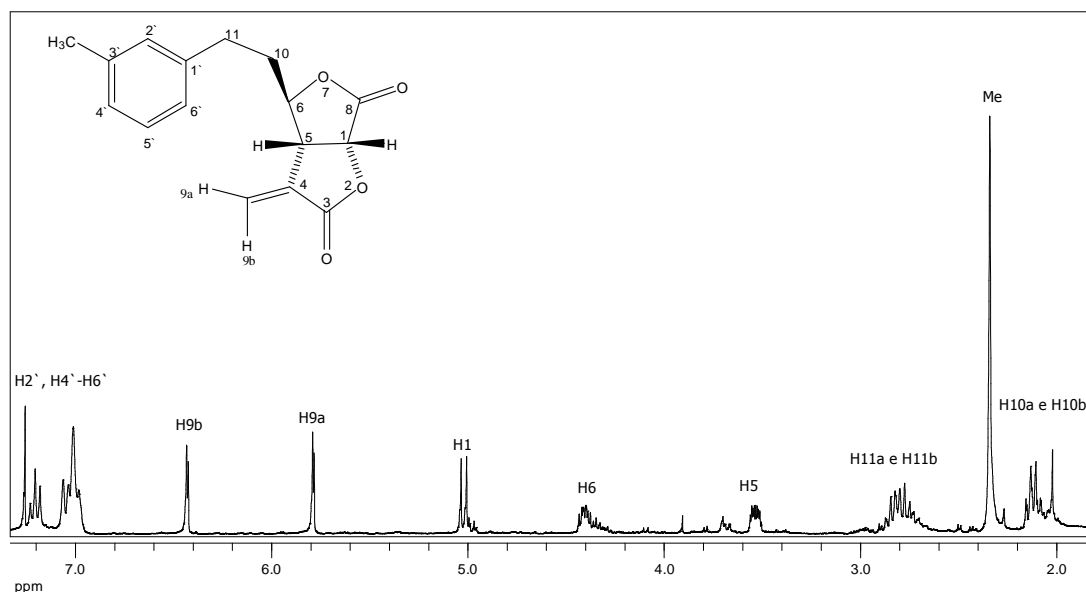


Figura 1.44. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto final [13c].

Tabela 1.17. Deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento J (Hz) dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H dos compostos [13a], [13b] e [13c], a 300 MHz, em CDCl_3

Atribuição	[13a] δ	[13b] δ	[13c] δ
H1	5,07 (d, $J_{1,5}=8,4$)	5,07 (d, $J_{1,5}=8,4$)	5,03 (d, $J_{1,5}=8,4$)
H5	3,52-3,60 (m)	3,43-3,85 (m)	3,50-3,59 (m)
H6	4,43 (td, $J_{6,10a}=J_{6,10b}=3,9, J_{6,5}=9,0$)	4,42-4,48 (m)	4,25-4,44 (m)
H9a	5,88 (d, $J_{9a,9b}=2,4$)	5,84 (d, $J_{9a,9b}=2,2$)	5,74 (d, $J_{9a,9b}=2,1$)
H9b	6,47 (d, $J_{9b,9a}=2,4$)	6,46 (d, $J_{9b,9a}=2,2$)	6,42 (d, $J_{9b,9a}=2,1$)
H10	1,72-1,88 (m)	2,06-2,09 (m)	2,03-2,15 (m)
H11	1,50 (s)	2,71-2,94 (m)	2,71-2,86 (m)
H12	1,50 (s)	-	-
H13-H16	1,50 (sl)	-	-

H2'	-	-	7,0-7,26 (m)
H3'	-	7,11-7,27 (m)	-
H4' H5'			7,0-7,26 (m)
H6'	-	7,11-7,27 (m)	
Me	0,88 (t, $J_{17,16}=7,2$)	2,33 (s)	2,34 (s)

Comparando os dados obtidos para [13a] (300 MHz) com os dados obtidos para o produto natural (-)-avenaciólídeo (BROOKES *et al.*, 1963) e com os dados publicados para o (-)-avenaciólídeo sintetizado por ANDERSON e FRASER-REID (1985), ambos obtidos a 60 MHz, confirma-se a obtenção da mesma substância. O espectro de RMN de ^1H do produto natural isolado por BROOKES *et al.*, (1963) mostrou que o produto natural possuía um grupo metilideno terminal, pela observação da presença de dois dupletos referentes aos hidrogênios H9a e H9b, o que foi observado para o composto [13a] sintetizado neste trabalho. Os sinais para H1, H5 e H6 (BROOKES *et al.*, 1963, ANDERSON e FRASER-REID, 1985) apareceram como duplete, multiplete e multiplete respectivamente. Para o multiplete atribuído a H6 por estes autores supracitados, na Figura 1.42 pode-se observar sua multiplicidade, como um tripleto duplo, demonstrando um acoplamento de H6 com H5 $J= 9,0$ Hz e com H10a e H10b $J_{6,10a}= J_{6,10b}= 3,9$ Hz. Os demais sinais também estão de acordo com a literatura.

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C dos produtos [13], estão analisados na Tabela 1.18. Os sinais mais característicos foram aqueles referentes aos carbonos da dupla ligação exocíclica, C4 e C9, que apareceram em todos os compostos em torno de δ 134 e 126 respectivamente.

Tabela 1.18. Dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C dos compostos [13a], [13b] e [13c], a 75 MHz, em CDCl_3

Atribuição (C)	δ [13a] DEPT*	δ [13b]	δ [13c]
C1	74,3 (+)	74,4	74,3
C3	167,5	167,6	160,7
C4	134,6	134,4	134,7
C5	44,1 (+)	44,6	44,5
C6	85,1 (+)	84,5	84,2
C8	169,7	169,9	161,2
C9	126,2 (-)	126,9	126,2
C10	36,0 (-)	36,8	37,9
C11	31,7 (-)	28,9	29,8
C12	29,6	-	-
C13	29,3	-	-
C14	29,1	-	-
C15	24,8	-	-
C16	22,6	-	-
C1'	-	138,0	139,5
C2'	-	136,1	129,3
C3'	-	130,9	138,7
C4'	-	127,0	127,6
C5'	-	126,7	128,9
C6'	-	128,9	126,2
CH ₃	14,0 (+)	19,6	21,5

*(+ e -): Sinais observados nas fases positiva e negativa do sub-espectro DEPT 135, respectivamente.

Os sub-espectros de DEPT e os dados apresentados na literatura (BROOKES *et al.*, 1963, ANDERSON e FRASER-REID, 1985) auxiliaram nas atribuições dos sinais de ^{13}C para o [13a]. A análise dos sinais observados nos espectros dos compostos aromáticos teve, ainda, o suporte de dados publicados para compostos semelhantes, em especial, aqueles referentes ao isômero de [13b] e [13c], com a metila em *para* no anel aromático (CASTELO-BRANCO, 2007). Todos os sinais listados na Tabela 1.18 estão de acordo com as estruturas propostas para os compostos [13].

Os espectros de massas dos compostos sintetizados apresentaram o pico do íon molecular em m/z 266 para [13a] com 0,2% de intensidade relativa e em m/z 272 para [13b] e [13c] com intensidades de 7 e 2% respectivamente.

A medida da rotação específica do composto [13a] encontrada foi $[\alpha]_D^{25} = -41,4^\circ$ (1,30g/100mL, EtOH). A literatura reporta medidas de rotação para o avenaciólídeo em $[\alpha]_D^{26,5} = -41,6^\circ$ (1,20 g /100 mL, EtOH) e $[\alpha]_D^{29,5} = -41,0^\circ$ (0,274 g /100 mL, EtOH) (BROOKES *et al.* (1963); ANDERSON e FRASER-REID, 1985). Portanto a medida da rotação específica do produto [13a] indicou que o produto obtido é idêntico ao produto natural isolado por BROOKES *et al.* (1963).

A medida da rotação específica do análogo aromático [13b] foi $[\alpha]_D^{25} = +28,9^\circ$ (1,0g/100mL, CH_2Cl_2) e para o análogo [13c] foi encontrada a medida de $[\alpha]_D^{25} = +25,2^\circ$ (1,0g/100mL, CH_2Cl_2). Supõe-se, então, que a rota sintética também foi enantiosseletiva para a preparação dos análogos do avenaciólídeo, que devem apresentar a mesma estereoquímica relativa do composto [13], obtido segundo a mesma metodologia de síntese.

Os compostos finais sintetizados neste trabalho tiveram sua ação antifúngica testada frente aos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os resultados destes testes estão apresentados e discutidos no capítulo 2 desta dissertação.

1.4 CONCLUSÕES

Uma sequência de reações seguindo procedimentos semelhantes aos descritos por SCHMIDT (1962), CZERNECKI (1985) e ROSENTHAL e NGUYEN (1969) partindo do carboidrato *D*-glicose permitiu a síntese do intermediário chave, o aldeído 3-desoxi-3-*C*-(carbometoximetil)-1,2-*O*-isopropilideno- α -*D*-ibofuranose [7] que foi usado para a preparação do avenaciolídeo e bis-lactonas análogas.

A partir do aldeído [7], seguindo-se a estratégia descrita por ANDERSON e FRASER-REID (1985), foram preparadas e caracterizadas 27 substâncias, sendo 14 inéditas.

Os produtos finais da rota sintética foram caracterizados como (1*R*,5*R*,6*R*)-4-metilideno-6-octila-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-diona, [13a], (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(2-metilfeniletil)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-3,8-diona, [13b], (1*R*,5*R*,6*R*)-6-(3-metilfeniletil)-4-metilideno-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-3,8-diona), [13c]. Confirmou-se que [13a] tem estrutura idêntica à do produto natural avenaciolídeo, apresentando os mesmos valores de rotação específica, temperatura de fusão e dados espectroscópicos relatados na literatura.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO AVENACIOLÍDEO E DE BIS-LACTONAS ANÁLOGAS AROMÁTICAS

2.1. INTRODUÇÃO

O potencial de produção de uma cultura é determinado por diversos fatores como o clima, o tipo e a qualidade do solo, emprego de sementes sadias livres de patógenos, irrigação, uso correto de fertilizantes e controle adequado de doenças, pragas e plantas daninhas. A proteção de plantas por meio do controle de doenças e pragas tem o objetivo de permitir que a planta possa expressar seu máximo potencial produtivo. Doenças de plantas de natureza fúngica podem reduzir drasticamente o rendimento de uma cultura no campo, diminuir a germinação de sementes no campo e ou ocasionar perdas totais ou parciais durante o armazenamento. Em regiões subtropicais e tropicais os fungos fitopatogênicos são os agentes bióticos mais importantes na redução da produção das culturas (PRAPAGDEE, 2008). Portanto, se torna importante na agricultura o emprego do controle químico com produtos químicos. (ZAMBOLIM *et al.*, 1997).

Neste trabalho foi estudada a atividade antifúngica do avenaciolídeo e de análogos aromáticos contra fungos que causam doenças em culturas tropicais causadas por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* e *Aspergillus flavus*.

Doenças denominadas como antracnose, causadas por espécies de *Colletotrichum*, principalmente *C. gloeosporioides*, encontram-se disseminadas em todo o mundo causando danos tanto em campo quanto em pós-colheita. *C. gloeosporioides* causa danos em frutas como banana, mamão, melancia, goiaba, maracujá, manga e uva. Além disso, também afeta seres humanos causando infecções como a ceratite ocular (Inflamação da córnea), principalmente em pacientes debilitados. (LUCCA, 2007).

Fusarium solani é considerado o principal patógeno de plantas herbáceas e de algumas lenhosas. Este fungo é responsável pela fusariose na pimenta-do-reino, pela Podridão Vermelha e a Síndrome da Morte Súbita na soja, Podridão do Colo do feijoeiro, entre outras doenças (VALE e ZAMBOLIM, 1997). Os principais sintomas causados por *F. solani* incluem o apodrecimento da raiz e do coleto, e a murcha em um grande número de culturas, incluindo ervilhas, algodão, plantas ornamentais e cucurbitáceas.

Além de causar doenças em plantas, *F. solani* pode também causar doenças em animais e seres humanos do tipo invasivas. Por exemplo, a aleuquia tóxica alimentar é uma micotoxicose que causou a morte de cerca de cem mil pessoas na Rússia no fim da II Guerra Mundial. Esta doença afeta o sistema hematopoiético e se desenvolve após a ingestão de cereais contaminados com o fungo (LUCCA, 2007). A fusariose invasiva em humanos requer a exposição ao patógeno e grau de comprometimento local ou sistêmica das defesas do hospedeiro (NELSON *et al.*, 1994). *F. solani* também causa ceratite fúngica. Os pacientes que sofrem este tipo de quadro apresentam lacrimejamento, dor, fotofobia, olho vermelho, sensação de corpo estranho durante cinco a dez dias. As ceratites podem ter conseqüências devastadoras se não diagnosticadas e tratadas efetivamente. Ceratite causada por *Fusarium solani* é clinicamente similar àquelas causadas por outros gêneros de fungos, porém de pior prognóstico, resultando em rápidas alterações da córnea, marcadas pela perda da visão, chegando até a necessidade de transplante (VEMUGANTI, 2002). Entre as infecções superficiais, a ceratomicose ou infecção da córnea por fungos é provavelmente o tipo de infecção mais freqüente.

As espécies do gênero *Aspergillus* são saprófitas encontrados no solo, em produtos de forragem, alimentos, poeira e restos orgânicos em decomposição. São considerados patógenos fracos de plantas (LUCCA, 2007), entretanto, causam grandes prejuízos em sementes e grãos armazenados. Espécies oleaginosas como amendoim, milho e nozes são sensíveis a estes fungos. Sob condições de armazenamento inadequado, grãos e sementes podem ser invadidos por espécies desse gênero. As espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas de primeira importância neste contexto. O fungo

pode infectar as sementes ainda nos campos de cultivo, sob condições de alta umidade relativa, se ocorrerem injúrias mecânicas nas partes reprodutivas da planta. O processo infeccioso pode também se iniciar no armazenamento em ambientes de elevado teor de umidade. Os fungos que atacam as sementes armazenadas são xerofíticos, podendo crescer em umidade relativa de até 70% e causam a deterioração de sementes e grãos durante o armazenamento (DHINGRA, 1985).

Embora mais de 180 espécies de *Aspergillus* sejam conhecidas, poucas são comumente associados à infecção invasiva em seres humanos. Estas espécies incluem *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*. Embora saprófitos, eles podem causar infecções em indivíduos saudáveis e, cada vez mais, são os agentes causadores de infecções oportunistas fatais em pacientes imunocomprometidos. (LUCCA, 2007). Estes fungos são onipresentes em todo o mundo e produzem quantidades abundantes de conídios que são prontamente dispersos no ar, facilitando a exposição do indivíduo ao patógeno (CHRISTENSEN e TUTHILL,1985). Os conídios do fungo são microscópicos podendo ser inalados e infectar o pulmão incluindo os alvéolos. São facilmente disseminados pelo ar e podem também penetrar na pele, olhos e ouvidos do ser humano (LUCCA, 2007).

A imunidade natural das pessoas saudáveis as protege de infecções, exceto em determinadas situações, tais como traumas, onde conídios podem contaminar a ferida. Nos casos em que o sistema imunológico já se apresenta enfraquecido, os conídios inalados podem germinar e produzir hifas que invadem os arredores do tecido pulmonar, levando ao desenvolvimento de aspergilose pulmonar invasiva. Esta doença é causada de três maneiras: como uma reação alérgica, nas pessoas que sofrem de asma (aspergilose pulmonar, tipo broncopulmonar alérgico); como uma colonização em uma cavidade pulmonar com uma cicatriz causada por uma doença anterior, como uma tuberculose ou um abscesso pulmonar, onde ele produz uma bola de fungo denominada aspergiloma e como uma infecção invasiva, como a pneumonia, que se alastra às outras partes do organismo através da corrente sangüínea (aspergilose pulmonar, tipo invasivo). A infecção invasiva pode afetar os olhos e causar cegueira, podendo também afetar outras partes do corpo, em especial

o coração, pulmões, cérebro e rins. A terceira manifestação é quase que exclusiva das pessoas cujo sistema imunológico está deprimido por efeito de altas doses de cortisona, de quimioterapia ou por uma doença que reduza o número de glóbulos brancos. As pessoas que correm mais riscos são as imunodeprimidas, como os receptores de transplantes de órgãos e as pessoas que sofrem de câncer, AIDS ou leucemia (LUCCA, 2007).

Aspergillus flavus pode ainda produzir micotoxinas, como as aflatoxinas (Figura 2.1) (REDDY e SHETTY, 1992), contaminando alimentos, principalmente milho e amendoim. Estas micotoxinas apresentam efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos representando um risco à saúde humana e animal (HEDAYATI et al, 2007; PRADO et al, 1999).

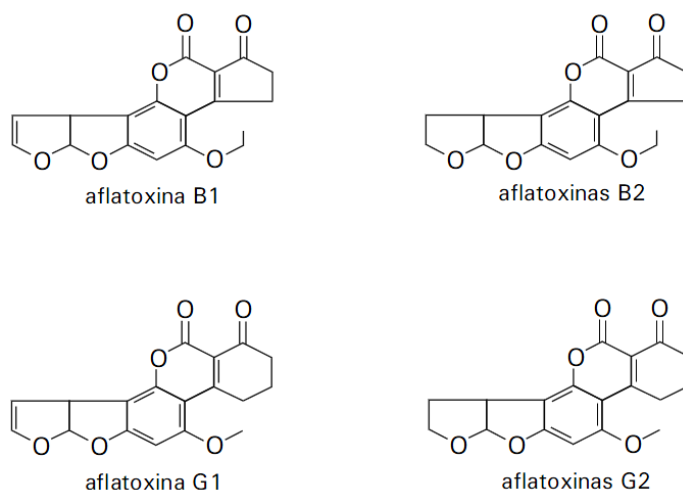


Figura 2.1. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Apesar da existência de vários produtos de ação fungicida no mercado para o controle das doenças causadas por *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *A. flavus*, o desenvolvimento de resistência (BERGAMIN-FILHO, 1995; ZAMBOLIM *et al.*, 2008), a ineficiência, a toxidez e a busca por moléculas “ecologicamente” corretas e também seguras ao ser humano justificam a constante busca por novos fungicidas.

A Figura 2.2 mostra um esquema que exemplifica o processo de desenvolvimento de resistência a fungicidas, um processo de seleção no qual o fungicida é o agente seletivo. Indivíduos menos sensíveis aos fungicidas apresentam chances maiores de sobrevivência aos tratamentos. A população de fungos é então deslocada no sentido de aumentar a resistência, e um

número crescente de indivíduos com graus mais elevados de resistência são encontrados. Assim, se os tratamentos com um mesmo fungicida forem repetidos, a população resultante pode vir a ser constituída quase completamente de indivíduos resistentes (DEISING *et al.*, 2008; ZAMBOLIM *et al.*, 2008). Para evitar essa situação, em muitos casos é necessário intercalar fungicidas com modos de ação diferentes no controle de determinada doença de planta (ZAMBOLIM *et al.*, 2008).

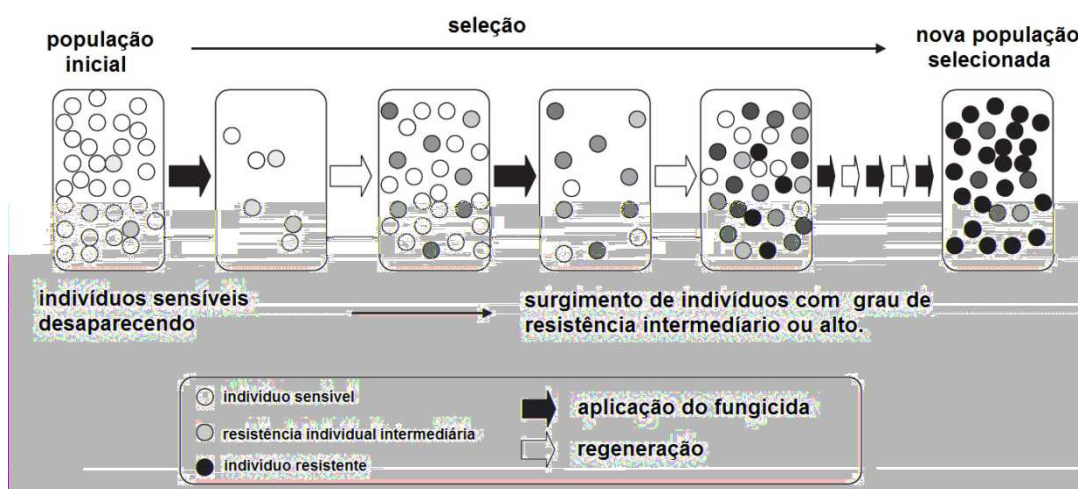


Figura 2.2. Processo de desenvolvimento de resistência a fungicidas. (Adaptado de ZAMBOLIM *et al.*, 2008).

Além da atividade antifúngica apresentada pelo avenaciolídeo, há relatos de que ele inibe o transporte de glutamato em mitocôndria de ratos, sendo o metabólito análogo 4-isoavenaciolídeo (Figura 2.3) inativo (PATERSON, 1986). Isto indica que a estereoquímica da molécula é importante para a atividade biológica desse bis- γ -lactonas, pois o 4-isoavenaciolídeo tem a mesma estrutura geral do avenaciolídeo (Figura 2.3) diferindo apenas na configuração absoluta do carbono 6, que é *R* para o primeiro e *S* para o segundo.

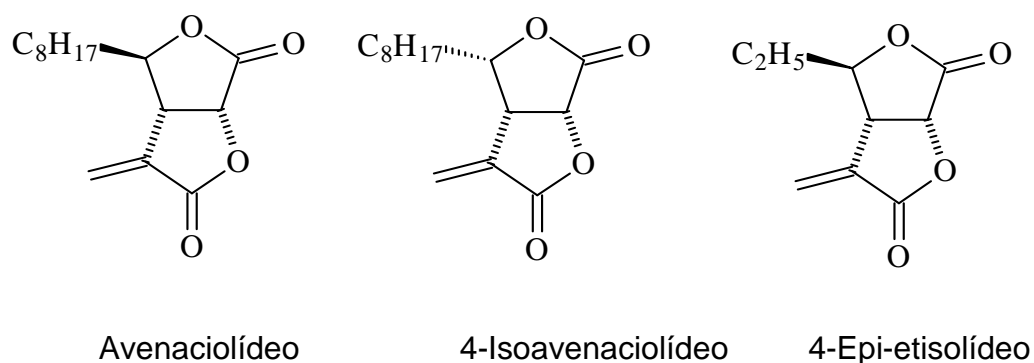


Figura 2.3. Metabólitos secundários de estrutura bis- γ -lactônica isolados de fungos

Há indícios que a extensão cadeia lateral também afeta a atividade biológica das bis- γ -lactonas. O 4-Epi-etisolídeo (Figura 2.3), possui a mesma configuração relativa do avenaciolídeo, mas é pouco ativo em relação ao transporte de glutamato em mitocôndria de ratos (PATERSON, 1986).

Em trabalhos anteriores (CASTELO BRANCO *et al.*, 2009; CASTELO BRANCO *et al.*, 2007; MAGATON *et al.*, 2007) foram preparados análogos com variação da cadeia lateral e de grupos funcionais, conforme mostra a Figura 2.4. Ensaios *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* mostraram que, no caso de compostos com grupos R alifáticos, a atividade parece aumentar com a extensão da cadeia lateral. Também ficou evidenciada a necessidade da dupla ligação exocíclica vizinha à carbonila para a atividade observada, pois independentemente dos grupos R utilizados (aromáticos ou alifáticos) as bis- γ -lactonas **B** (Figura 2.4) foram inativas enquanto as **C** foram ativas. Compostos bicíclicos semelhantes contendo grupo hidroxila em C8 (Estrutura **A**, Figura 2.4) também foram inativos (PEREIRA, 2000).

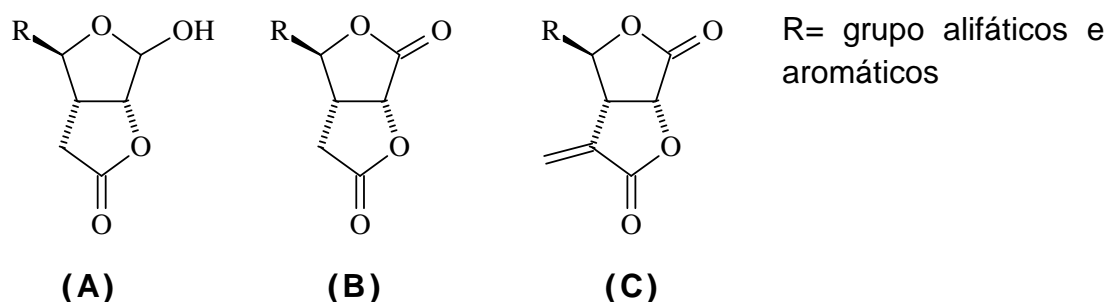


Figura 2.4. Estruturas genéricas de compostos bicíclicos preparados anteriormente

Bis- γ -lactonas contendo grupos aromáticos na cadeia lateral (grupos fenila, 4-metilfenila, 4-trifluorometilfenila e 4-clorofenila) avaliados contra *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram atividades 12 a 25% menores que a do avenaciolídeo pelo método de difusão em placa a exceção do análogo com o grupo 4-trifluorometilfenila (CASTELO BRANCO *et al.*, 2009; CASTELO BRANCO *et al.*, 2007).

Com a finalidade de ampliar os conhecimentos sobre a atividade antifúngica do avenaciolídeo e de verificar a influência da posição (*orto*, *meta* ou *para*) de substituintes no anel aromático de bis-lactonas análogas, os compostos finais sintetizados contendo grupos aromáticos 2-metilfenila [13b] e 3-metilfenila [13c] ligados ao segundo carbono da cadeia lateral (Figura 2.5) juntamente com o análogo contendo o grupo 4-metilfenila [13d] sintetizado por CASTELO BRANCO (2009), foram utilizados em ensaios biológicos para a avaliação de seu potencial antifúngico contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani*.

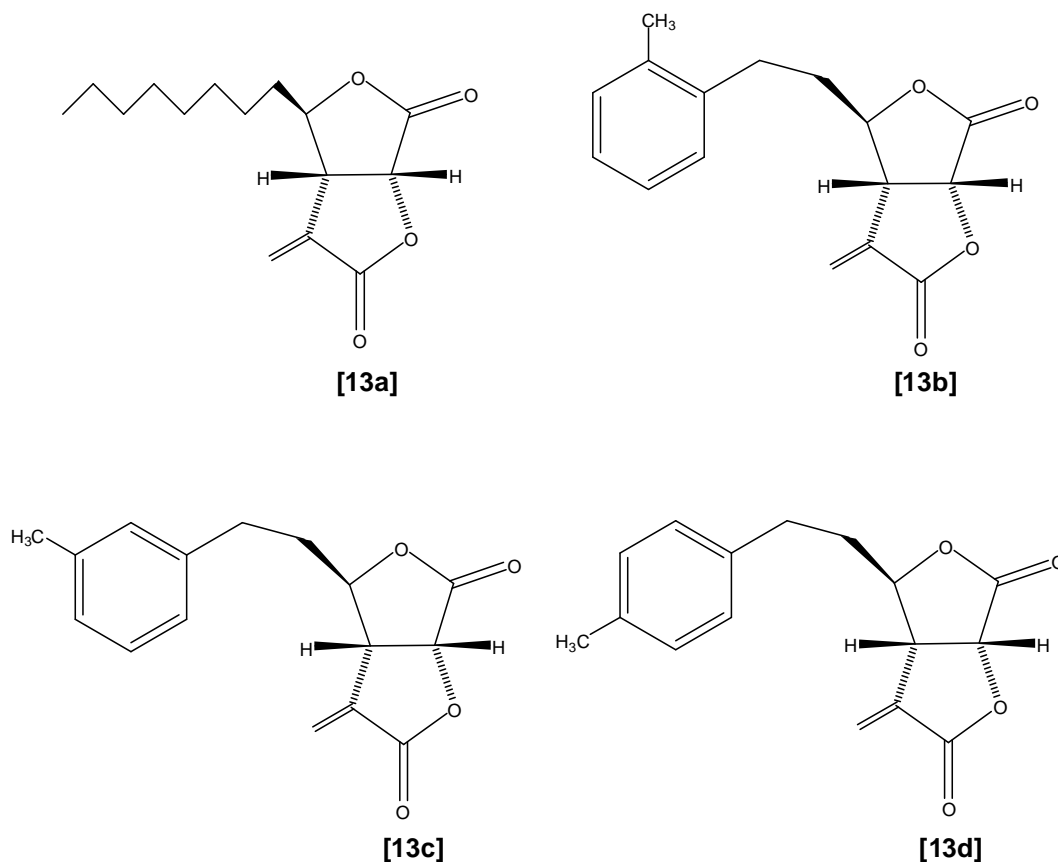


Figura 2.5. Compostos submetidos aos ensaios biológicos

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório de Proteção de Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFV.

2.2.1. Equipamentos

Para a esterilização das vidrarias foi utilizado vapor úmido em autoclave vertical (FANEM mod. 415). O material biológico foi manuseado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool etílico 70%, equipada com luz ultravioleta (VECO). Para fundir o meio de cultura foi utilizado forno de microondas (SANYO). O desenvolvimento da maioria dos fungos ocorreu em câmara incubadora B.O.D (Nova Ética mod. 109). Os fungos foram visualizados com o auxílio de uma lupa estereoscópica (ZEISS) e um microscópio óptico (OLYMPUS CX41).

2.2.2. Preparo das amostras para os testes biológicos de difusão em placa

Soluções dos compostos [13a], [13b], [13c] e [13d] foram preparadas a 1000 e 3000 ppm em diclorometano.

Discos de papéis *blank* estéreis de 6 mm de diâmetro foram imersos nas soluções e, após 5 minutos, estes foram retirados com o auxílio de uma pinça e secados em dessecador, sob vácuo.

O controle negativo (branco) foi preparado mergulhando discos de papel em diclorometano. Foi incluído nos testes como controle positivo, o tebuconazol. Este está presente no fungicida comercial Folicur (20% (m/v)). As amostras para o branco e para o tebuconazol foram preparadas do mesmo modo que as das substâncias em teste levando em conta a porcentagem do tebuconazol no Folicur de forma a obter soluções a 1000 e 3000 ppm.

Três repetições foram realizadas para cada tratamento e um disco de papel foi utilizado para cada repetição.

2.2.3. Preparo do meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

A um erlenmeyer de 250 mL contendo 2,93 g de BDA (SIGMA) foram adicionados 75 mL de água destilada. A mistura foi agitada até completa homogeneização e então o erlenmeyer foi vedado com chumaço de algodão e papel alumínio. Um erlenmeyer contendo apenas 75 mL de água destilada também foi vedado com algodão e papel alumínio. Estes sistemas foram autoclavados a 120°C durante 15 minutos, a uma pressão de 1,2 kgf cm⁻². Os meios de cultura e a água após serem autoclavados foram armazenados em local limpo.

2.2.4 Identificação dos fungos

Neste trabalho utilizaram-se isolados dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* disponíveis no laboratório de Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia – UFV. Para cada fungo, fez-se uma lâmina contendo conídios a serem utilizados e esta foi analisada em microscópio óptico para confirmação da espécie do isolado.

2.2.5 Repicagem dos fungos

O meio de cultura BDA preparado como descrito no item 2.2.3 foi fundido em forno microondas. Após a fusão, o meio foi agitado para a homogeneização e deixado resfriar até uma temperatura próxima a 45°C. Em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool etílico 70% e luz ultravioleta por 30 minutos, retiraram-se os chumaços de algodão do

erlenmeyer e adicionou-se uma pequena quantidade (8 mg) de sulfato de estreptomicina ao meio, sob agitação.

Verteram-se 15 mL do meio de cultura para cada placa de Petri estéril de 90 mm de diâmetro, totalizando 5 placas por erlenmeyer de meio BDA.

Aguardou-se a completa solidificação do BDA nas placas e, em seguida, os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* ou *Colletotrichum gloeosporioides* foram repicados sobre as placas e estas foram vedadas com papel filme de PVC e transferidas para a estufa incubadora, com temperatura controlada em 25°C, sob um regime diário de oito horas de luz.

2.2.5.1. Injúria da cultura de *Colletotrichum gloeosporioides*

Os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides* apresentam esporulação *in vitro* espontânea, porém para *C. gloeosporioides* foi realizada injúria da colônia, durante o seu cultivo, para possibilitar a obtenção de uma maior concentração de conídios.

Decorridos sete dias de incubação e crescimento da cultura de *Colletotrichum gloeosporioides*, esta foi submetida à injúria, por meio de cortes com bisturi estéril em toda a extensão da colônia, nos sentidos longitudinal e transversal para se obter maior quantidade de conídios. Após a injúria, as culturas retornaram à condição de incubação, por mais três dias.

2.2.6. Ensaio biológico pelo método de difusão em placa

Ensaio biológicos com os fungos, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram realizados, respectivamente, 5, 7 e 10 dias após a repicagem dos fungos (conforme descrito em 2.2.5). Verteram-se cerca de 10 mL de água esterilizada sobre cada placa de Petri contendo as colônias dos fungos. Com um bastão de vidro esterilizado, foi feita uma varredura sobre o meio de cultura, e filtrou-se em gase estéril, adaptada a um béquer. Da suspensão filtrada foi feito o cálculo da concentração de

conídios/mL com o auxílio de um hematocitômetro (câmara de Neubauer) (Figura 2.6) e de um microscópio (OLYMPUS CX41).

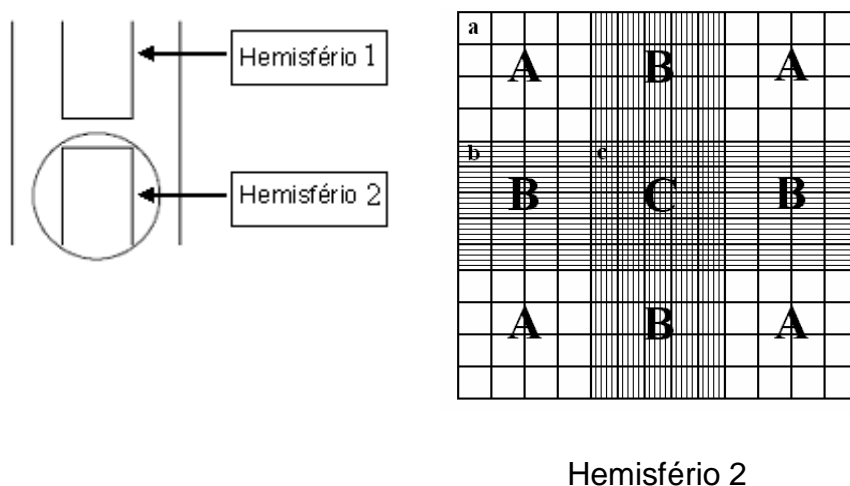


Figura 2.6. Esquema de um hematocitômetro tipo Neubauer

O hematocitômetro empregado neste trabalho consiste de uma lâmina retangular, tendo no centro dois compartimentos delimitados, um ao lado do outro, cada um com uma superfície de 9 mm^2 e profundidade de $0,1 \text{ mm}$, circundados por uma pequena canaleta. Cada um dos compartimentos é, por sua vez, dividido em nove compartimentos de 1 mm^2 de área. Esses nove compartimentos são de três tipos: “A”, “B” e “C” (Figura 2.1). Os compartimentos “A” estão localizados nos quatro cantos e subdivididos em 16 quadrados (“a”). Com auxílio de um microscópio óptico, efetuou-se a contagem em quatro quadrados “a” opostos diagonalmente de cada quadrante totalizando 16 leituras em cada um dos hemisférios (ALFENAS et al., 2007). A concentração de conídios por mL de suspensão foi calculada multiplicando-se o número médio de conídios em “a” por $1,60 \times 10^5$, encontrando-se o valor de $1,20 \times 10^7$ conídios/mL para o *Colletotrichum gloesporioides*, $2,25 \times 10^7$ conídios/mL para o fungo *Fusarium solani* e $4,48 \times 10^7$ conídios/mL para o *Aspergillus flavus*. Todos os compostos foram testados na mesma concentração de conídios.

O meio de cultura (75 mL) foi fundido como descrito em 2.2.4 e resfriado até temperatura de aproximadamente 45 °C. Adicionaram-se ao meio fundido 7,5 mg de sulfato de estreptomicina e um certo volume da suspensão de conídios (1,9 mL para *Colletotrichum gloeosporioides* ou 1,0 mL para o *Fusarium solani* ou 0,8 mL para o *Aspergillus flavus*). Antes da solidificação do meio, 15 mL da mistura foram vertidos em cada placa de Petri estéril (totalizando 5 placas), obtendo-se uma concentração final de $3,0 \times 10^5$ conídios/mL em cada placa para os fungos *C. gloeosporioides* e *F. solani* e $5,0 \times 10^5$ conídios/mL em cada placa para o fungo *A. flavus*.

Após a solidificação do meio de cultura, discos de papel com as substâncias em teste, o tebuconazol ou o branco foram adicionados ao centro de cada placa. As placas foram transferidas para a incubadora à temperatura de 25°C e os halos de inibição medidos após 48 horas.

2.2.7. Ensaio biológico pelo método *Poisoned food*

O teste *Poisoned Food*, foi organizado de forma semelhante àquela descrita por CHUTIA et al (2009), preparando-se quatro repetições para cada amostra.

Prepararam-se cinco erlenmeyers BDA conforme o item 2.2.3, porém para este foram preparados 50 mL de meio. Prepararam-se soluções estoque em concentrações conhecidas em diclorometano de todos os compostos a serem avaliados. Retiraram-se três alíquotas de cada solução mãe e transferiu-se uma alíquota para cada balão de fundo redondo de 100 mL. O solvente foi então evaporado em evaporador rotatório e o balão foi mantido em vácuo por mais 30 minutos. Os balões foram fechados com uma tampa de vidro e lacrados com parafilme.

A Tabela 2.1 mostra o volume das alíquotas retiradas da solução estoque e transferidas para cada balão de 100 mL, com a finalidade de se prepararem posteriormente as suspensões de meios de cultura contendo as amostras teste nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,40 mmol L⁻¹

Tabela 2.1. Quantidades de cada substância utilizada para a preparação de 10 mL de solução estoque em CH₂Cl₂, e alíquotas desta solução transferidas aos balões de fundo redondo de 100 mL para posterior preparo de meios de cultura contendo as amostras teste nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,40 mmol L⁻¹

Composto	Solução estoque	Alíquota (mL) para 0,10mmol/L	Alíquota (mL) para 0,25 mmol/L	Alíquota (mL) para 0,40 mmol/L
[13a]	4mg/mL	0,33	0,83	1,33
[13b]	4mg/mL	0,34	0,85	1,36
[13c]	4mg/mL	0,34	0,85	1,36
Tebuconazol*	200 mg/mL	0,02	0,05	0,08

*O tebuconazol foi pipetado diretamente do folicur.

Adicionou-se uma alíquota de 0,5 mL de DMSO a cada um dos balões para facilitar a dispersão dos compostos orgânicos no meio de cultura. O meio de cultura (50 mL de meio para cada balão) foi fundido e resfriado a uma temperatura próxima de 60°C e, em seguida, vertido ao balão contendo o composto-teste, e agitado vigorosamente. A cada balão foram acrescentados 8 mg de sulfato de estreptomicina para evitar a contaminação por bactérias.

A cada placa foram adicionados 6,0 mL de meio de cultura contendo o composto a ser testado (0,10 ou 0,25 ou 0,40 mmol L⁻¹), sulfato de estreptomicina (8 mg/50 mL) e DMSO (0,5 mL/ x 50 mL). Este procedimento foi realizado para todos os compostos testados, com exceção do branco e do tebuconazol, onde foram adicionados diretamente ao erlenmeyer 0,5 mL de DMSO para o branco e 0,5 mL de DMSO e quantidade de Folicur[®] de acordo com a tabela 2.1 para o teste com tebuconazol.

Discos de micélio de 5,0 mm de *Aspergillus flavus* foram retirados das placas de repicagem (item 2.2.5), todos a igual distância da borda da placa, e

adicionados ao centro das placas de Petri contendo o meio de cultura (BDA), dimetilsulfóxido (DMSO), e as substâncias teste tebuconazol, [13a], [13b] ou [13c] nas concentrações de 0,10, 0,25 ou 0,40 mmol·L⁻¹. O Branco foi preparado da mesma forma.

As placas foram lacradas e deixadas à temperatura de 25,0 ± 2,5 °C. Foram medidos os halos de crescimento da colônia de fungos a cada 24 horas por um período de 7 dias.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos [13a], [13b], [13c] e [13d] (Figura 2.5) foram submetidos aos testes biológicos pelo método de difusão em placa contra os fungos, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani*. Esta metodologia foi escolhida por requisitar pequenas quantidades das amostras e por apresentar resultados em curto espaço de tempo (48 horas), permitindo uma rápida avaliação do potencial antifúngico contra várias espécies de fungos. Os precursores sintéticos dos compostos não foram testados, pois em trabalhos anteriores (PEREIRA, 2000; CASTELO BRANCO et al., 2007; MAGATON et al., 2007) foi constatado que somente as bis-lactonas com a dupla ligação exocíclica possuem atividade fungicida.

Como controle positivo foi avaliado o fungicida tebuconazol, utilizado neste trabalho como um controle positivo visual e também para comparação semi-quantitativa do potencial fúngico dos compostos em estudo.

O teste de difusão em placas foi realizado como uma triagem para verificar se os compostos eram ativos contra os fungos supracitados e para avaliar preliminarmente a intensidade relativa das atividades. Neste teste, os conídios dos fungos estão uniformemente distribuídos no meio de cultura e um disco de papel contendo a substância em teste em baixa dose é adicionado ao centro da placa. Observa-se, então, em 48 horas um halo de inibição em torno do disco, e mede-se o diâmetro do halo.

Realizou-se também o teste denominado *Poisoned food*, frente ao fungo *A. flavus*. Esses ensaios são organizados de maneira oposta aos por difusão em placa. O meio de cultura é que contém a substância teste uniformemente distribuída, e acrescenta-se ao centro um disco de micélio do fungo. Observa-se, então um halo de crescimento da colônia do fungo no decorrer de vários dias. Esses dados são comparados com o crescimento na ausência das amostras (o branco) e o ensaio é interrompido quando a colônia atinge os limites das placas do controle (do branco).

Os resultados de cada teste estão discutidos a seguir.

2.3.1. Resultados dos testes de difusão em placa

Discos de papel esterilizados (6 mm de diâmetro) foram mergulhados em soluções de [13a], [13b], [13c] e [13d] a 1000 ppm e 3000 ppm em diclorometano. Após 5 min, os discos foram removidos da solução e mantidos em um dessecador sob pressão reduzida. Cada disco foi colocado no centro de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio de cultura e conídios do fungo. As distâncias do centro dos discos para o limite da zona de inibição foram medidas após 48 h a temperatura de $25,0 \pm 2,5$ °C. O mesmo procedimento foi empregado na preparação do controle negativo (somente diclorometano) e do controle positivo, tebuconazol.

Os diâmetros médios dos halos de inibição das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* pelas bis-lactonas [13a], [13b], [13c] e [13d] estão listados nas Tabelas 2.2 a 2.4. Os resultados foram comparados com o tebuconazol, arbitrariamente definido como 100% de inibição.

Tabela 2.2. Diâmetro médio do halo de inibição do crescimento fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 48 horas, sob tratamentos a 1000 e 3000 ppm com as bis-lactonas [13a], [13b], [13c] e [13d] em comparação com o tebuconazol

Tratamento	Médias* (mm) (1000 ppm)	Inibição (%) (1000 ppm)	Médias* (mm) (3000 ppm)	Inibição (%) (3000 ppm)
Tebuconazol	63,3 ± 0,5 (Ba)	100	70,2 ± 0,4 (Aa)	100
[13a]	23,2 ± 0,4 (Bb)	37	25,9 ± 0,6 (Ab)	37
[13b]	15,3 ± 0,4 (Bc)	24	21,9 ± 0,9 (Ac)	31
[13c]	14,0 ± 0,3 (Bc)	22	16,3 ± 0,6 (Ad)	23
[13d]	13,2 ± 0,2 (Ad)	21	14,8 ± 0,3 (Ae)	21
Branco	0,0 (Ae)	0	0,0 (Af)	0

*Médias de três repetições. Medidas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas são comparações na mesma linha, letras minúsculas são comparações na mesma coluna.

Tabela 2.3. Diâmetro médio do halo de inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*, após 48 horas, sob tratamentos a 1000 e 3000 ppm com as bis-lactonas [13a], [13b], [13c] e [13d] em comparação com o tebuconazol

Tratamento	Médias* (mm) (1000ppm)	Inibição (%) (1000ppm)	Médias* (mm) (3000ppm)	Inibição (%) (3000ppm)
Tebuconazol	21,3 ± 0,7 (Ba)	100	38,1 ± 0,3 (Aa)	100
[13a]	14,6 ± 0,4 (Bb)	68	16,9 ± 0,2 (Ab)	44
[13b]	9,6 ± 0,2 (Bc)	45	11,8 ± 0,1(Ac)	31
[13c]	9,4 ± 0,3 (Bc)	44	11,6 ± 0,2 (Ac)	30
[13d]	9,0 ± 0,2 (Ac)	42	9,8 ± 0,4(Ad)	26
Branco	0,0 (Ad)	0	0,0 (Ae)	0

*Médias de três repetições. Medidas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas são comparações na mesma linha, letras minúsculas são comparações na mesma coluna.

Tabela 2.4. Diâmetro médio do halo de inibição do crescimento fúngico de *Fusarium solani*, após 48 horas, sob tratamentos a 1000 e 3000 ppm com as bis-lactonas [13a], [13b], [13c] e [13d] em comparação com o tebuconazol

Tratamento	Médias* (mm) (1000ppm)	Inibição (%) (1000ppm)	Médias* (mm) (3000ppm)	Inibição (%) (3000ppm)
Tebuconazol	34,2 ± 0,4 (Aa)	100	38,0 ± 0,5 (Aa)	100
[13a]	10,0 ± 0,4 (Ab)	29	11,3 ± 0,3 (Ab)	30
[13b]	8,8 ± 0,2 (Ac)	26	10,3 ± 0,4 (Ac)	27
[13c]	8,0 ± 0,4 (Ac)	24	9,6 ± 0,2 (Ad)	25
[13d]	7,5 ± 0,1 (Bd)	22	8,6 ± 0,1 (Ae)	23
Branco	0,0 (Ae)	0	0,0 (Af)	0

*Médias de três repetições. Medidas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas são comparações na mesma linha, letras minúsculas são comparações na mesma coluna.

Pode-se observar que os compostos em estudo foram ativos contra os três fungos, sendo mais ativos contra *Colletotrichum gloeosporioides*, e menos ativos contra *Fusarium solani*. Observa-se que também a atividade do tebuconazol variou para cada espécie de fungo estudada.

Para exemplificar o teste realizado, a Figura 2.7 mostra fotografias de placas representativas dos testes contra *C. gloeosporioides*. Foi observado que as bis-lactonas foram menos ativas que o tebuconazol. Entretanto, a Figura 2.7 mostra um halo de inibição totalmente transparente nos tratamentos com as bis-lactonas e um halo parcialmente opaco no tratamento com o tebuconazol. É preciso ressaltar que neste teste não foi utilizado o tebuconazol puro, mas o fungicida comercial Folicur, que contém além do princípio ativo, outros compostos denominados de surfactantes facilitam sua difusão no meio aquoso, potencializando sua ação. Assim, as percentagens calculadas (Tabelas 2.2 a 2.4) não refletem exatamente a diferença de atividade entre as bis-lactonas e o

tebuconazol. A principal razão da inclusão do tebuconazol neste ensaio foi possibilitar uma comparação qualitativa visual da situação positiva de atividade. Por outro lado, o branco permitiu um controle negativo do teste (situação sem atividade).



Figura 2.7. Ilustração do ensaio por difusão em placa realizado com as substâncias [13a], [13b], [13c], [13d] e tebuconazol (controle (+)) na concentração de 1000 mg/L contra *C. gloesporioides* em comparação com o branco (controle(-)).

O avenaciólídeo [13a] foi a bis-lactona mais ativa contra os três fungos, sendo que os análogos aromáticos apresentaram halos de inibição semelhantes, indicando que não só a dupla ligação conjugada à carbonila e o esqueleto bis- γ -lactônico são importantes para a atividade apresentada. Também a cadeia tem um papel relevante, modulando a intensidade da atividade.

Com as amostras preparadas a partir de soluções dos análogos aromáticos a 1000 ppm não foi possível diferenciar suas atividades em todos os casos (Tabelas 2.2 a 2.4). A Tabela 2.5 mostra uma comparação da percentagem de inibição dos análogos aromáticos quando comparadas ao

avenaciolídeo (100%) a 3000 ppm. Nessa concentração foi possível verificar que o composto com substituinte metila na posição *orto* no anel aromático apresentou uma inibição maior que aquele com substituinte na posição *meta*, e este por sua vez foi mais ativo que o composto com substituinte na posição *para*.

Tabela 2.5. Comparação das atividades do avenaciolídeo com a de seus análogos aromáticos, em testes realizados com amostras preparadas a partir de soluções a 3000 ppm das bis-lactonas, contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg), *Aspergillus flavus* (Af) e *Fusarium solani* (Fs), em percentagens de inibição, pelo método da difusão em placa.

Substâncias / Fungos	Cg	Af	Fs
[13a]	100	100	100
[13b]	85	69	91
[13c]	63	68	85
[13d]	55	58	76

2.3.2. Resultado do teste *Poisoned food* para o fungo *Aspergillus flavus*

Este teste tem um papel importante para descobrir a bioeficácia de um composto sintetizado. Ele envolve a preparação de placas de Petri contendo o meio de cultura BDA homogeneamente misturado ao composto cujo potencial fungicida se deseja avaliar. Ao centro de cada placa é adicionado um disco de micélio do fungo e as placas são incubadas por um período de tempo em que se possa observar o crescimento da colônia do fungo em comparação com um branco (preparado da mesma forma e na ausência de substâncias teste). (SINGH *et al.*, 2006.) Variando-se a concentração da amostra nas placas, pode-se determinar a dose mínima necessária para a inibição de 50% do crescimento fúngico (IC₅₀), em relação ao branco. Com isto é possível

comparar a eficiência *in vitro* de diferentes moléculas químicas. Por requisitar maiores quantidades de cada amostra, este estudo foi realizado apenas com as substâncias [13a], [13b] e [13c], uma vez que não se dispunha de quantidades suficientes de [13d].

Além disso, restringiu-se o estudo aos fungos para os quais as bis-lactonas se mostraram mais ativas, de acordo com os testes preliminares de difusão (descritos no item 2.2.1): *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus flavus*. Entretanto, os ensaios com *C. gloeosporioides* foram abandonados devido a defeito apresentado na incubadora, impossibilitando a continuidade dos experimentos.

O estudo foi realizado contra *Aspergillus flavus* nas concentrações de 0,05, 0,10, 0,25 e 0,40 mmol L⁻¹ para o composto [13^a] e nas concentrações de 0,10, 0,25, 0,40 e 0,70 mmol L⁻¹ para os compostos [13b] e [13c]. Além das três bis-lactonas, foi testado também para comparação o tebuconazol. O diâmetro do halo de crescimento da colônia foi medido a cada 24 horas, obtendo-se as médias das medidas feitas em quatro direções, como mostra a Figura 2.8, em cada uma das quatro repetições por amostra.

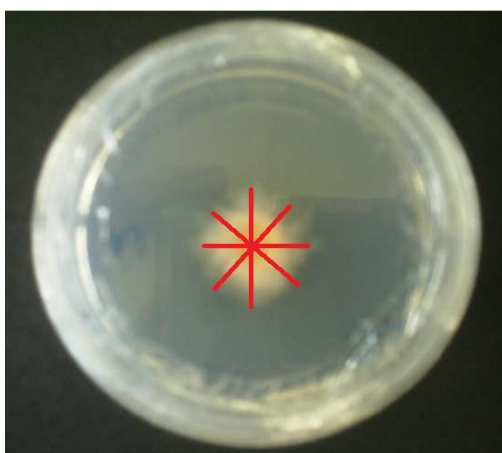


Figura 2.8. Representação da medição dos halos de crescimento fúngico em cada placa, durante o teste *Poisoned food*.

As Figuras 2.9a-c ilustram o diâmetro da colônia de *A. flavus* durante os cinco dias de incubação a temperatura de $25,0 \pm 2,5$ °C quando tratada com os compostos [13a], [13b], [13c], tebuconazol em comparação com o branco, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,40 mmolL⁻¹, respectivamente.

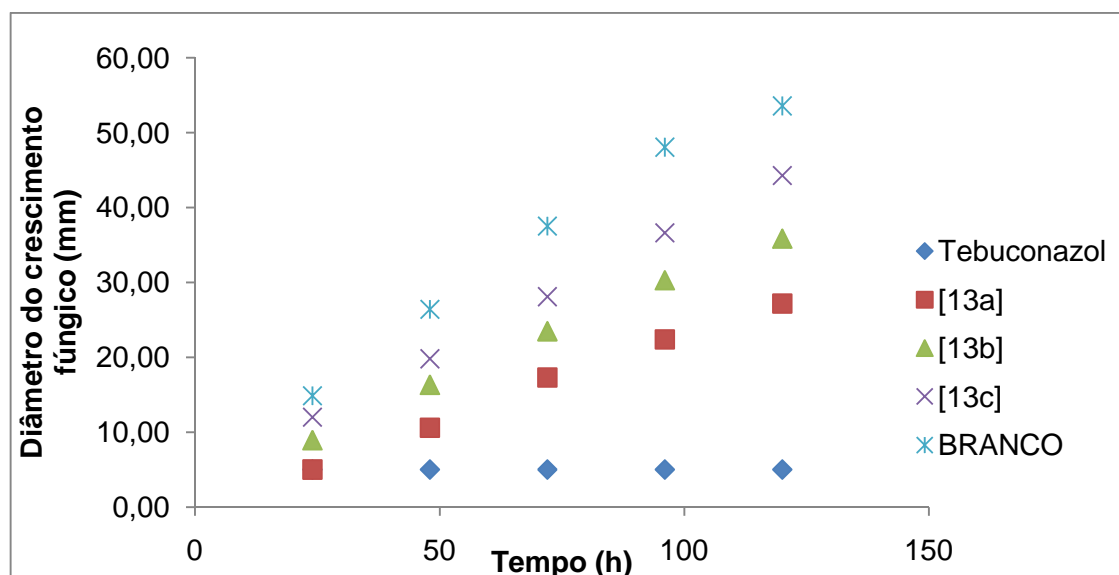


Figura 2.9a. Curva de resposta do crescimento do *A. flavus* em função do tempo para os diferentes compostos ([13a], [13b], [13c] e tebuconazol) na concentração de 0,10 mmolL⁻¹ em comparação com o branco.

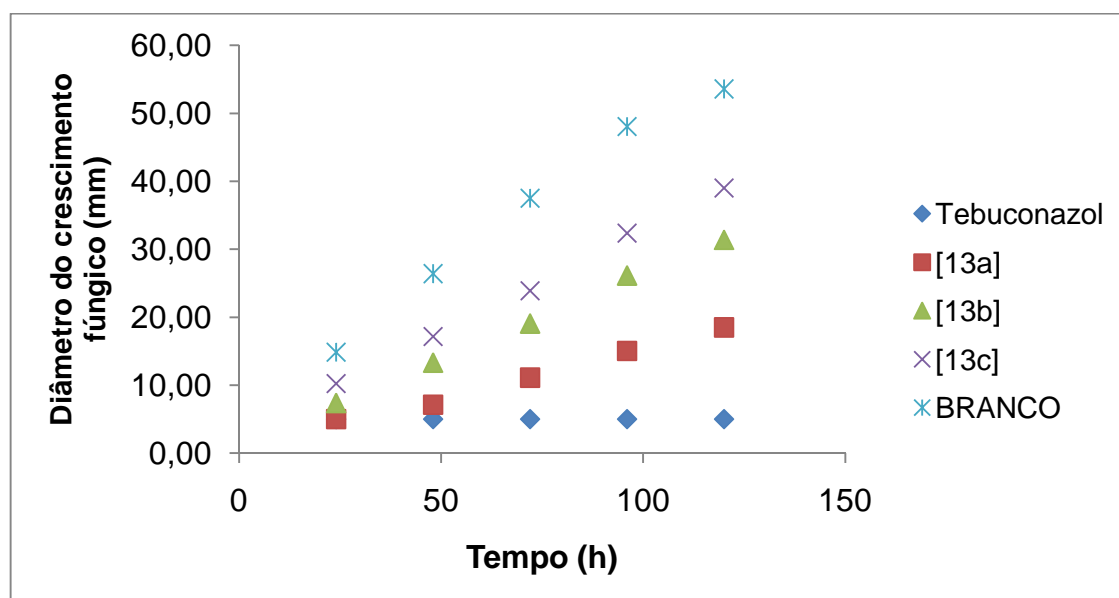


Figura 2.9b. Curvas de resposta do crescimento do *A. flavus* em função do tempo para os diferentes compostos ([13a], [13b], [13c] e tebuconazol) na concentração de 0,25 mmolL⁻¹, em comparação com o branco.

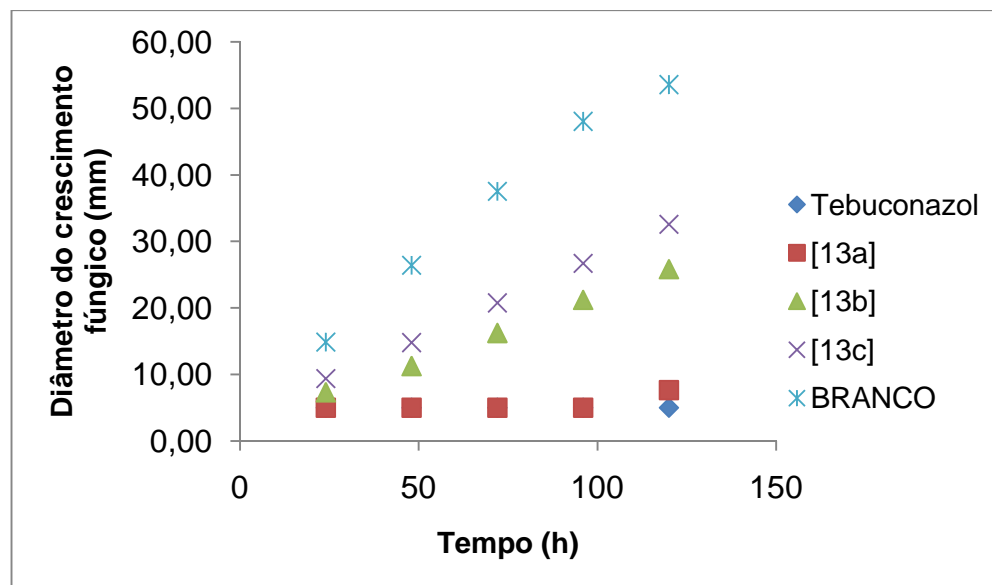


Figura 2.9c. Curva de resposta do crescimento do *A. flavus* em função do tempo para os diferentes compostos ([13a], [13b], [13c] e tebuconazol) concentração de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$, em comparação com o branco.

Pode-se observar que a atividade de todas as bis-lactonas aumenta com a concentração. Observa-se ainda que o avenaciolídeo é a bis-lactona mais ativa também por esta metodologia de teste. Nas concentrações menores, o tebuconazol (na formulação do Folicur) foi mais ativo que o avenaciolídeo, mas pode-se observar que a partir da concentração de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ suas atividades praticamente se equiparam. Com isto, pode-se supor que, utilizando-se de uma formulação adequada seja possível a utilização do avenaciolídeo como um fungicida comercial, assim como ocorre com o tebuconazol.

A atividade antifúngica do avenaciolídeo na concentração de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ foi de 100% durante os quatro primeiros dias do teste, aparecendo algum crescimento apenas no quinto dia de observação. A Figura 2.10 mostra que as porcentagens de inibição do crescimento da colônia de *A. flavus* na presença das substâncias testadas nas três concentrações em relação ao branco, no quinto dia de teste. A ordem crescente de atividade ($[13c] < [13b] < [13a]$) observada nos testes pelo método de difusão em placa se repete aqui, confirmando a importância da natureza da cadeia lateral para a atividade dessas bis-lactonas.

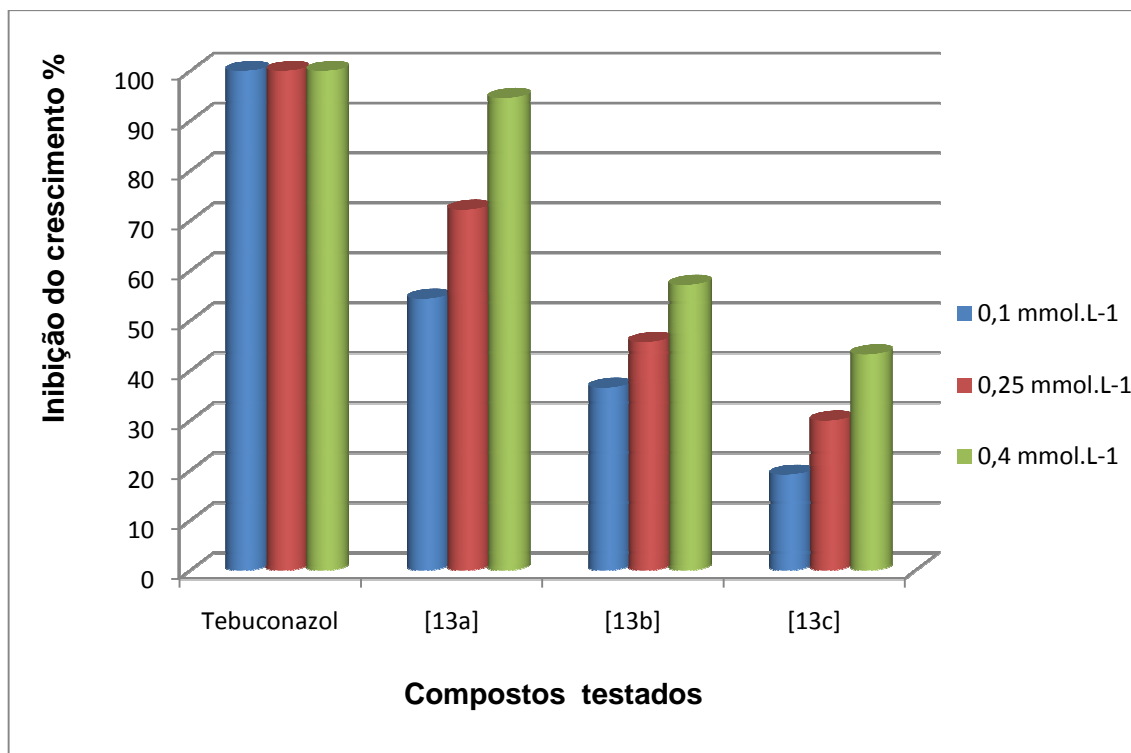


Figura 2.10. Inibição do crescimento fúngico no quinto dia (120 horas) de incubação para os compostos [13a], [13b] e [13c] em comparação com o branco (controle negativo de atividade = 100% de crescimento).

As porcentagens de inibição foram calculadas substituindo-se os valores obtidos (halos médios de crescimento fúngico no quinto dia do ensaio) na Equação 2.1, onde C_n é a média de crescimento do controle negativo (branco) e C_s é a média de crescimento do fungo em contato com a substância em teste.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(C_n - C_s)}{C_n} \cdot 100\% \quad \text{Equação 2.1}$$

Curvas de porcentagem de inibição versus concentração das amostras no meio de cultura foram construídas, e a partir destas, foram determinadas as suas equações por regressão linear (Figura 2.11 a-c). Os coeficientes de correlação obtidos das curvas indicaram boa precisão nas medidas e a linearidade da variação da atividade na faixa de concentrações escolhida.

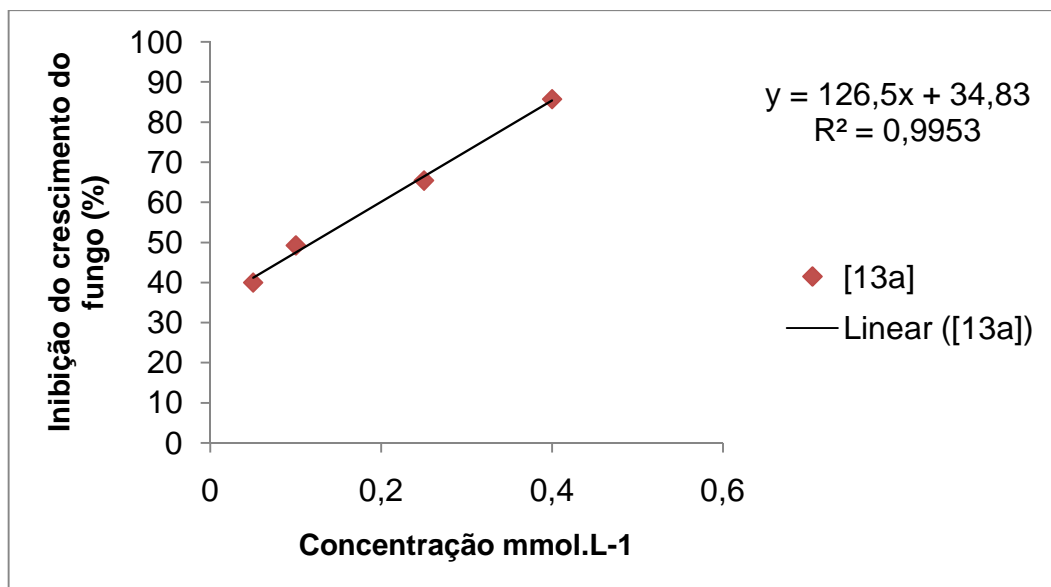


Figura 2.11a Curva de dose (concentração em mmol L⁻¹) versus percentagem de inibição do crescimento da colônia de *A. flavus* obtidas pelo método *Poisoned food* na presença da bis- γ lactona **[13a]**.

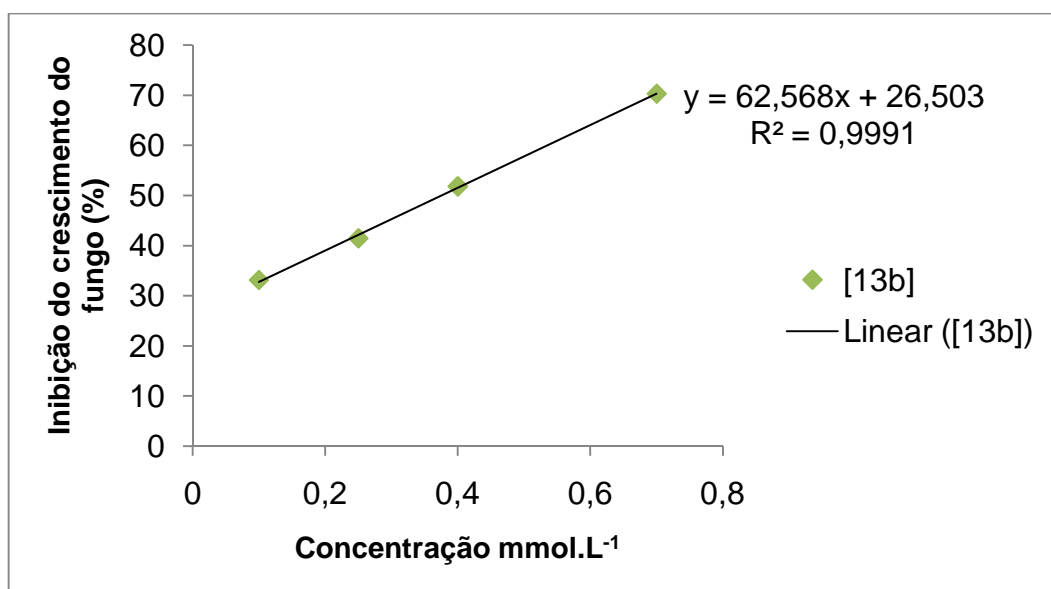


Figura 2.11b Curvas de dose (concentração em mmol L⁻¹) versus percentagem de inibição do crescimento da colônia de *A. flavus* obtidas pelo método *Poisoned food* na presença da bis- γ lactona **[13b]**.

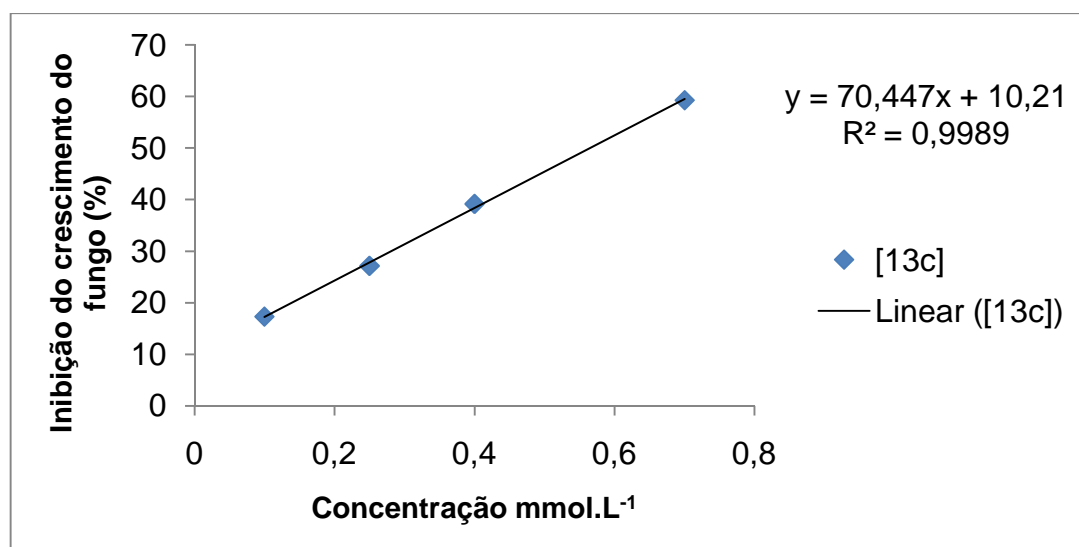


Figura 2.11c Curvas de dose (concentração em mmol L⁻¹) versus percentagem de inibição do crescimento da colônia de *A. flavus* obtidas pelo método *Poisoned food* na presença da bis- γ -lactona [13c].

A partir das equações das curvas de dose versus percentagem de inibição (Figura 2.9) foi possível calcular o IC₅₀, dose mínima necessária para inibir 50% do crescimento fúngico.

Considera-se mais ativo o produto que apresentar o menor IC₅₀. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa *Origin 6.1*®. Para encontrar o valor de IC₅₀ utilizaram-se as equações de regressão linear substituindo o termo Y por 50 e o valor X encontrado corresponde ao IC₅₀. Os resultados desses cálculos estão reunidos na tabela 2.5.

Tabela 2.5. Dose mínima para inibição de 50% do crescimento do fungo *A. flavus*

Compostos	IC ₅₀ (mmol/L)
[13a]	0,12
[13b]	0,37
[13c]	0,56

Pode-se perceber que todos os compostos sintetizados apresentam potencial para serem utilizados no controle de *A. flavus*, sendo o avenaciolídeo [13a] três vezes mais ativo do que o análogo aromático mais ativo, com o grupo metila em *orto* [13b]. Observa-se também que a mudança da posição do substituinte no anel aromático afeta drasticamente a atividade dessas bis-lactonas.

2.4- CONCLUSÕES

As bis- γ -lactonas [13a], [13b], [13c] e [13d] a 1000 ppm, foram ativas contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloesporioides* através do método de difusão em placa. Quando se aumentou a dose para 3000 ppm obteve-se aumento na inibição do crescimento fúngico. O avenaciolídeo [13a] foi o mais ativo em relação aos três fungos avaliados.

O análogo aromático com substituinte metila na posição *orto* no anel aromático apresentou inibição maior do que aquele com substituinte na posição *meta*, e este por sua vez foi mais ativo que o composto com substituinte na posição *para*, ou seja, observou-se a ordem crescente de ação fungicida [13d] < [13c] < [13b] < [13a]. Este resultado foi semelhante para os três fungos testados indicando que a cadeia lateral ligada ao C6 da bis- γ -lactona apresenta um papel importante, modulando a intensidade da atividade.

Os testes pelo método *Poisoned food*, a partir das curvas dose-inibição calculados proporcionaram valores de IC₅₀ de 0,12; 0,37 e 0,56 mmol L⁻¹ para os compostos [13a], [13b] e [13c], respectivamente contra *A. flavus*.

Observou-se que em doses menores do que 0,40 mmol L⁻¹, o tebuconazol foi mais ativo do que as bis- γ -lactonas, mas nesta concentração sua atividade foi semelhante à do avenaciolídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, V. K.; DAVIES, P. W.; SCHIMIDT, A. T. Asymmetric synthesis of avenaciolide via cascade palladium catalysed cyclisation-carbonylation of bromodienes. **Chemical Communications**, p. 1232-1233, 2004.

ALCÁZAR, E.; KASSOU, M.; MATHEU, I.; CASTILLÓN, S. The Enantioselective Formal Synthesis of (+)- Avenaciolide and (+)-Isoavenaciolide from Tri-O-acetyl-D-glucal Using a Ring Contraction Reaction as the key step. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2285-2289, 2000.

ALDRIDGE, D. C.; TURNER, W. B.; Two new mould metabolites related to avenaciolide **Journal of Chemical Society (C)**, p. 2431-2432. 1971.

ANDERSON, R. C.; FRASER-REID, B. A Synthesis of Optically Active Avenaciolide from D-glucose. The Correct stereochemistry of the Natural Product. **Journal of the American chemical Society**, v. 97, n. 13, p. 3870-3871, 1975.

ANDERSON, R. C.; FRASER-REID, B. Synthesis of Bis- γ -lactones from "Diacetone Glucose" - Optically Active Avenaciolide and Isoavenaciolide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 4781-4786, 1985.

BARBOSA. L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1 ed, Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189p.

BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGÉ, J.P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 494-503, 2005.

BARROS, P. M. **Síntese e estudo da atividade fungicida do avenaciólídeo e de novas bis-lactonas análogas**. Viçosa: UFV, 2008, 132p. (Dissertação de mestrado).

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v.1, São Paulo: Ed. Ceres, 1995, 919p.

BRAUKMUELLER, S.; BRUCKNER, R. Enantioselective Butenolide Preparation for Straightforward Asymmetric Syntheses of γ -lactones - Paraconic Acids, Avenaciolide, and Hydroxylated Eleutherol. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2110-2118, 2006.

BROOKES, D.; TIDD, B. K.; TURNER, W. B. Avenaciolide, Antifungal Lactone from *Aspergillus avenaceus*. **Biochemistry Journal**, v. 68, n. 647, p. 5385-5391, 1963.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and Synthesis**. 3. ed., New York: John Wiley & Sons, 1993. 800p.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms**. 4. ed., New York: John Wiley & Sons, 2000. 823p.

CASTELO-BRANCO, P. A.; RUBINGER, M. M. M.; ALVES, L.C.; BARROS, P. M.; PEREIRA, S. G.; MELLO, V. J.; VELOSO, D. P.; ZAMBOLIM, L. Synthesis and Antifungal Activity of Aromatic Bis-gamma-lactones Analogous to Avenaciolide. **Chemistry & Biodiversity**. v. 4, p. 2745-2754, 2007.

CASTELO-BRANCO, P. A.; RUBINGER, M. M. M.; GUILARDI, S.; LEITE, V.M.; SANTOS, A. R.; ALVES, L. C.; LARIUCCI, C.; VENCATO, I.; VELOSO, D. P.; ZAMBOLIM, L. Synthesis, characterization, absolute structural determination and antifungal activity of a new chlorinated aromatic avenaciolide analogue. **Pest Management Science**. v. 65, p. 34-40, 2009.

CHEN, M. J.; NARKUNAN, K.; LIU, R. S. Total Synthesis of Natural Bicyclic Lactones (+)-Dihydrocanadensolide, (±)- Avenaciolide , and (±)-Isoavenaciolide via Tungsten- Allyl Complexes. **Journal of Organic Chemistry**. v. 64, p. 8311-8318, 1999.

CHUTIA, M.; BHUYAN, D.; PATHAK, M. G.; SARMA, T. C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from north east India, **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 777-780, 2009

COREY, E. J.; SCHMIDT, G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. **Tetrahedron Letters**, v. 5, p. 399-402, 1979.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**. Oxford University Press, New York, 1998, 552 p.

CZERNECKI, S.; GEORGOULOUS.; STEVENS, C. L.; VIJAYAKUMARAN, K. Pyridinium Dichromate Oxidation, Modifications Enhancing its Synthetic Utility. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 1699-1702, 1985.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 286-295, 2008.

DHINGRA, ONKAR. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes- **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 139-146, 1985.

FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de plantas**. v. 12. Passo Fundo: Berthier, 2004, 403p.

GULLINO, M. L., LEROUX. P., SMITH, C. M. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. **Crop Protection**. v. 19, p. 1-11, 2000.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v.153, p.1677–1692, 2007.

KHAN, F. A.; RAO, C .N. An efficient synthesis of diquinane-based bis- α -lactones. **Tetrahedron letters**, v. 47, p. 7567-7570, 2006.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia - Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005, 663p.

LUCCA, A. J. Harmful fungi in both Agriculture and Medicine Review. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.24, p. 3-13, 2007.

MAGATON, A. S.; RUBINGER, M. M. M.; MACEDO-JÚNIOR, F. C.; ZAMBOLIM, L. Synthesis and Antifungal Activity of New Bis- γ -lactones Analogous to Avenaciolide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 18, p. 284-290, 2007.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure**, 4. ed., New york: Jonh Wiley & Sons, 1992, 1495p.

MARTÍN, V. S.; RODRÍGUES, C. M.; MARTÍN, T. Syntheses of avenaciolide and related bislactones. A review. **Organic Preparations and Procedures Int.**, v. 30, n. 3, p. 291-324, 1998.

MARTINÉZ, P. C. G. **Diversidade Genotípica de cepas de *Fusarium solani* isoladas de episódios de ceratites**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004, 101f. (Tese de Doutorado)

McCORKINDALE, N. J.; WRIGHT, J. L. C.; BRIAN, P. W.; CLARKE, S. A.; HUTCHINSON, S. A.. Canadensolide – an antifungal metabolite of penicillium canadense. **Tetrahedron Letters**. v. 9, n. 6, p. 727-730, 1968.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. - Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of Fusarium Species- **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

PARKER, W. L.; JOHNSON, F. The Total Synthesis of dl-Avenaciolide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n. 14, p. 2489-2496, 1973.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 257-265, 1988.

PEREIRA, S. G. Síntese e avaliação da atividade fungicida de compostos aromáticos análogos ao avenaciolídeo. Viçosa, 2000. 140 p. **Dissertação de mestrado** - Departamento de Química, Universidade federal de Viçosa.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 4.ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing, 1996.

POMERANS, Y. **Biochemical, functional and nutritive changes during storage**. In: CHRISTENSEN, C. M. (ed). Storage of cereal grains and their products. 4 ed., Austrália: ISBN, 1992. 615 p.

PRADO, G. *et al*, Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus* - **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1 Campinas, 1999.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 230-237, 2008.

REDDY, M. J.; SHETTY, H. S. Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, p. 177-181, 1992.

RODRÍGUES, C. M.; MARTÍN, T.; MARTÍN, V. S. A New Stereoselective Synthesis of (-)-Isoavenaciolide and (-)-Avenaciolide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 8448-8452, 1996.

ROSENTHAL, A.; NGUYEN, L. Branched-Chain Sugar Nucleosides. I. 9-[deoxy-3-C-(2'-hydroxyethyl)- β -D-allofuranosyl]adenine and 9-[deoxy-3-C-(2'-hydroxyethyl)- β -D-ribofuranosyl]adenine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 1029-1034, 1969.

SCHLOSSER, M.; SCHAUB, B. *Cis* Selectivity of "Salt-Free" Wittig Reactions: A "Leeward Approach" of the Aldehyde at the Origin? **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 5821-5823, 1982.

SCHMIDT, O. T. Isopropylidene Derivatives. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 318-325, 1962.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2000, 460 p.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; DE HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 174-181, 2006

TAKAHASH, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**. v. 31,n 7, São Paulo, 2008.

TAKEI, H.; FUKUDA, Y.; TAGUCHI, T.; KAWARA, T.; MIZUTANI, H.; MUKUTA, T. Total Synthesis of (±)- Avenaciolide and its Analogues. **Chemistry Letters**, p. 1311-1414, 1980.

TAMURA, E.; SAEGUSA, K.; KAKIHANA, M.; ODA, DAIHEI. Stereoselective *E* and *Z* olefin formation by Wittig olefination of aldehydes with allylic phosphorus ylides. Stereochemistry. **The Journal of Organic chemistry**, v. 53, p. 2723-2728, 1988.

TEIXEIRA, S. C.G.; MATHIAS, L.; CANELA, M. C. Recuperação de sílica-gel utilizando processos oxidativos avançados: uma alternativa simples e de baixo custo. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 931-933, 2003.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM. L. **Controle de doenças de plantas: Grandes Culturas**. v. 1, Viçosa: Ed. UFV, 1997, 548p.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM. L. **Controle de doenças de plantas: Grandes Culturas**. v. 2, Viçosa: Ed. UFV, 1997, 578p.

VEMUGANTI, G.K.; PRASHANT, G.; USHA G *et al.* Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis. **Ophthalmology**; v. 109 n. 8 p. 1538-1546, 2002.

YU, C. M.; YOUN, J.; JUNG, J. Asymmetric Sequential Allylic Transfer Reaction for the Synthesis of 2-(1-stannylvinyl)-1,3-diols: Concise Synthesis of (-)-Avenaciolide and (-)-Isoavenaciolide. **Angewandte Chemie**, v. 45, n. 10, p. 1553-1556, 2006.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X; MONTEIRO, A. J. A; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Ed. UFV, 2002, 674p.

ZAMBOLIM, L. **Especialização em Proteção de Plantas. Módulo 7. Controle de Doenças de Plantas. Módulo 7.4. Fungicidas Sistêmicos, Modo de Ação, Translocação e Uso**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 27p.

ZAMBOLIM, L. **Especialização em Proteção de Plantas. Módulo 7. Controle de Doenças de Plantas. Módulo 7.3. Fungicidas de Contato, Modo de Ação e Usos**, Viçosa: Ed. UFV, 2006. 133p.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas**. Viçosa: Ed. UFV, 2007, 168p.

ZAMBOLIM, L. Tipos de fungicidas empregados no controle de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L. et al. (eds). **Produtos fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas)** Viçosa, MG; UFV, DFP, 2008. p. 263-348.

WHISTLER, R. L., **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 6, p. 123-128, 1962.