



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



**BIOTRANSFORMAÇÃO E SEQUESTRO DE
MICROMOLÉCULAS DE *ARISTOLOCHIA GIBERTI* POR
*BATTUS POLYDAMAS***

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

PROF^a. DR^a. LUCIA MARIA XAVIER LOPES
ORIENTADORA

ARARAQUARA
2014

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

**BIOTRANSFORMAÇÃO E SEQUESTRO DE
MICROMOLÉCULAS DE *ARISTOLOCHIA GIBERTI* POR
*BATTUS POLYDAMAS***

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Xavier Lopes

ARARAQUARA
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

N778b Nogueira, Cláudio Rodrigo
Biotransformação e sequestro de micromoléculas de
Aristolochia giberti por *Battus polydamas* / Cláudio Rodrigo
Nogueira. – Araraquara : [s.n], 2014
283 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes

1. Biotransformação. 2. Diterpenos. 3. Lignanas.
4. Ecologia química. 5. Ressonância magnética nuclear.
I. Título.

DADOS CURRICULARES

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

1 DADOS PESSOAIS

- 1.1 **Nascimento:** 31/07/1986
1.2 **Nacionalidade:** Brasileiro
1.3 **Naturalidade:** Americana – SP
1.4 **Estado Civil:** Casado
1.5 **Filiação:** Pai: Cláudio Martins Nogueira
Mãe: Meire Teixeira
1.6 **Endereço eletrônico:** nogueiracr@rocketmail.com

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2.1 **Graduação:** Química Bacharelado em Química Tecnológica
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS
Monografia: Sesquiterpenos das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae)
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Rodrigues Garcez
Bolsista: Grupo PET-Química
Data de conclusão: 05/12/2007
- 2.2 **Mestrado:** Mestrado em Química, na área de Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química de Araraquara – UNESP
Dissertação: Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso: compostos nitrados
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Xavier Lopes
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Data de conclusão: 19/01/2010
- 2.3 **Doutorado:** Doutorado em Química, na área de Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química de Araraquara – UNESP
Tese: Biotransformação e sequestro de micromoléculas de *Aristolochia giberti* por *Battus polydamas*
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Xavier Lopes
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

3 PARTICIPAÇÃO EM CURSO

3.1 II Curso de Ecologia Química Aplicada na Agricultura, realizado, em Brasília, pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, durante 01 a 05 de julho de 2013.

4 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

4.1 Gubiani, J. R.; Zeraik, M. L.; Oliveira, C. M.; Ximenes, V. F.; Nogueira, C. R.; Fonseca, L. M.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Araujo, A. R. Biologically active eremophilane-type sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 668-672, Mar. 2014.

4.2 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 780-782, Jan. 2012.

4.3 Gutierrez, Z. R.; Silva, A. F. G.; Nogueira, C. R.; Camargo, M. J.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Spanó, M. A. Atividade genotóxica de extratos de plantas do gênero *Ocotea*. **Revista Brasileira de Biociências (Online)**, v. 10, n. 2, p. 157-163, Abr./Jun. 2012.

4.4 Santos, V. A. F. F. M.; Regasini, L. O.; Nogueira, C. R.; Passerini, G. D.; Martinez, I.; Bolzani, V. S.; Graminha, M. A. S.; Cicarelli, R. M. B.; Furlan, M. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 991-995, May. 2012.

4.5 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Antiplasmodial Natural Products. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2146-2190, Mar. 2011.

5 RESUMOS DE CONGRESSO INTERNACIONAL PUBLICADOS EM PERIÓDICO

5.1 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Determination of configuration at C-13 of (–)-ent-8β-hydroxy-labdan-15-oic acid and its biotransformation by *Battus polydamas* larvae. 2013. Em: 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). **Planta Medica**, 79-SL35, 2013; DOI: 10.1055/s-0033-1351861. Obs.: Durante o congresso na Alemanha, este trabalho foi apresentado oralmente pela Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Xavier Lopes.

5.2 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Sequestration and biotransformation of lignans from *Aristolochia giberti* by *Battus polydamas* larvae (Papilionidae: Troidini). 2013. Em: 61st

International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). **Planta Medica**, 79-PI67, 2013; DOI: 10.1055/s-0033-1352156.

6 RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

6.1 Nogueira, C. R.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Hamerski, L.; Vizzoto, L. Sesquiterpenos das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae). Em: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia – SP.

6.2 Nogueira, C. R.; Tieppo, C.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Hamerski, L. Novos terpenóides das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae). Em: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia – SP.

6.3 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso. Em: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza – CE.

6.4 Fuzzato, J.; Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Estudo fitoquímico de constituintes polares do extrato etanólico de *Aristolochia pubescens*. Em: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza – CE.

6.5 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Nitro derivatives and other constituents from *Aristolochia melastoma*. Em: 2nd Brazilian Conference on Natural Products & XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), 2009, Águas de São Pedro – SP.

6.6 Viana, C. M.; Lopes, L. M. X.; Nogueira, C. R. Diterpenos e lignanas das folhas de *Aristolochia giberti*. Em: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia – SP.

6.7 Nogueira, C. R.; Lopes, L. M. X. Biotransformation and sequestration of *Aristolochia giberti* by *Battus polydamas* larvae. Em: 3rd Brazilian Conference on Natural Products & XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), 2011, Ouro Preto – SP.

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 20 de outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. LUCIA MARIA XAVIER LOPES (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara, SP



Prof. Dr. IAN CASTRO-GAMBOA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara, SP



Prof^a. Dr^a. ANGELA REGINA ARAÚJO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara, SP



Prof. Dr. MARCO ANTONIO BARBOSA FERREIRA
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCar / São Carlos, SP



Prof^a. Dr^a. FERNANDA RODRIGUES GARCEZ
Instituto de Química / UFMS / Campo Grande, MS

Dedico este trabalho ao Deus Vivo Todo-Poderoso (Deus de Abraão, Isaque e Jacó, e Pai do meu Senhor e Salvador Jesus Cristo), Quem me ama, e amou-me antes mesmo da fundação do mundo, e com Seu preciso sangue comprou-me, remiu-me, resgatou-me dos meus pecados; e É [Ele – O Grande Eu Sou, O Alfa, O Ômega, O Princípio e O Fim], e Será de eternidade a eternidade, o meu Único Senhor, Salvador, Mestre e Rei.

Dedico-o também Àquela quem é Carne de minha carne e Ossos de meus ossos, minha linda, valorosa e mui amada esposa, Luciana Nuñez, quem entrou em minha vida para completá-la de maneira inenarrável.

Por fim, dedico-o aos meus adoráveis, preciosos e amados familiares: meus pais, Cláudio Martins Nogueira e Meire Teixeira (*in memoriam*), minha irmã, Cláudia Fernanda Teixeira Nogueira, meu sobrinho, Afonso, e meu irmão, Anderson Silva.

Em primeiro lugar, eu agradeço e louvo ao Único e Vivo Deus (YWHW), o Pai do meu Senhor, do meu Salvador e do meu Redentor Jesus Cristo, sem O Qual não haveria esperança, salvação para mim vil pecador, vida alguma, nem natureza qualquer para ser estudada e compreendida por nós Químicos de Produtos Naturais. A Ele, O Grande Designer do Universo, Aquele que Era, que É e que Há de Vir, seja dada toda a honra, glória e poder para todo o sempre, por toda a eternidade e de eternidade a eternidade. Há vários motivos para eu estar grato a Ele. Sem dúvidas, o principal motivo é pela Sua graça, manifesta na obra salvífica de Seu Filho, Cristo Jesus. Em segundo lugar eu O agradeço pela Suas infinitas misericórdias e bondade. Eu O agradeço também por abrir os meus olhos, por estar mudando, dia após dia, a minha mente e o meu coração, por me perdoar, por cuidar daqueles quem eu amo, por me ensinar a amar aqueles que me perseguem, por me mostrar a enorme diferença que há entre viver uma vida meramente religiosa e viver uma vida em comunhão com o Rei dos reis, entre outras tantas bênçãos incontáveis. Por fim, eu O agradeço por ter ficado ao meu lado durante o início, realização e, sobretudo, conclusão deste trabalho. Na verdade, Ele já estava presente muito antes, quando com Suas delicadas mãos e criatividade sem limites, criou a borboleta e a planta estudadas neste trabalho. Sem Ele, eu jamais teria conseguido terminá-lo. Sem Ele eu jamais teria forças. Em resumo, sem Ele, sem o amor dEle e sem a presença diária e constante dEle eu não seria ninguém. Tudo isso é melhor do que a vida, bem mais do que as conquistas, bem mais que as riquezas, bem mais que tudo nesta Terra. Eu amo você Meu Senhor Jesus! Maranatha! Louvado seja para todo o sempre! Aleluia! Amém!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Xavier Lopes, meus cordiais agradecimentos pelos valiosos ensinamentos, pelos enormes esforços cotidianamente empreendidos para garantir excelentes condições e infraestrutura para a execução deste trabalho, pela confiança, pelo compromisso, pela constante dedicação na orientação deste trabalho e pela paciência que teve durante todos estes anos de convívio e de muito aprendizado para mim.

À Prof^a. Dr^a. Isabelle Rodrigues Nascimento pelos valiosos ensinamentos, pelo convívio enriquecedor e pela ajuda sempre presente, sobretudo, no final da redação deste manuscrito.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo e a Dr^a. Kamila Ferreira Massuda Garcia pela colaboração, pelos valiosos ensinamentos, pela recepção calorosa, pela orientação na execução dos bioensaios para atividade antipredatória e pela ajuda na interpretação dos resultados obtidos nesses ensaios.

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector e ao Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira pela colaboração, por sempre estarem dispostos a me atender, pela execução dos cálculos teóricos, pelos diversos esclarecimentos fornecidos, pela ajuda na interpretação dos resultados e na confecção das tabelas e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Odair Fernandes, ao Dr. Alexandre Carlos Menezes Neto e ao MSc. Luan Alberto Odorizzi pela colaboração, pela realização dos bioensaios para atividade inseticida, pela hospitalidade, pela realização dos tratamentos estáticos e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Bo Wang e a equipe da Biotoools pela realização dos estudos teóricos e das análises por dicroísmo circular vibracional e pela colaboração na interpretação dos resultados e na manipulação dos dados.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, a Dr^a. Lucineia Vizotto Marconcini e a Dr^a. Silvia Helena Santagneli pela amizade, pelos diálogos enriquecedores, pela paciência e pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Dr. Alberto Alécio, a Dr^a. Bianca Ferreira da Silva, a Dr^a. Marília Valli e ao Dr. José Carlos Tomaz pela obtenção dos espectros de massas e pelas análises de CLAE-EM.

A Prof^a. Dr^a. Gisele Baraldi Messiano pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos ótimos conselhos, pela companhia e pela realização das análises por CG-EM.

A Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni e a Dr^a. Luciana Nuñez pela realização das inúmeras medições de pH.

A todos da pós-graduação do IQ-UNESP, em especial a Wennia Limonti de Souza e a Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva, para quem me faltaram palavras para expressar a minha graditão, que jamais será esquecida.

A todos os professores da pós-graduação do IQ-UNESP pelos valiosos e inesquecíveis ensinamentos.

Aos funcionários da biblioteca do IQ-UNESP, em especial a Maria Isabel Uthman Sitta, pela competência, pela dedicação na execução de suas funções, pelo atendimento exemplar, pela ajuda em todos os momentos e pelo empenho na correção das referências bibliográficas, apesar do curto período para isso.

A minha linda esposa, Luciana Nuñez, registro meus mais sinceros e profundos agradecimentos. Não há palavras para expressar o quanto você é importante para mim, nem para descrever como é bom ter você em minha vida. Seu apoio e sua ajuda foram fundamentais em minhas jornadas espiritual, pessoal, profissional, entre outras. Você, com certeza, merece “o título de Provérbios capítulo 31”. Muito obrigado por iluminar a minha vida e fazê-la feliz. Escolher passar a vida contigo, indubitavelmente, foi a segunda melhor escolha que fiz em minha vida. Te amarei para sempre. Eternizo aqui aquilo que lhe disse um dia: “quando você entrou em minha vida eu não fui apenas abençoado, mas divinamente favorecido.” Por último, eu a agradeço pela ajuda na redação desta tese. Eu jamais teria conseguido sem a sua ajuda, compreensão e paciência. Tenha certeza que esta tese e esta conquista não são minhas, mas nossa.

Ao meu querido pai, Cláudio Martins Nogueira, quem sempre esteve ao meu lado, quem eu amo muito e é um exemplo de homem de Deus para mim.

Aos meus irmãos, Cláudia Fernanda Teixeira Nogueira e Anderson Silva, e ao meu sobrinho, Afonso, pessoas em quem eu sempre encontro apoio e preenchem o meu coração de alegria.

Aos meus amigos do IQ-UNESP, em especial a Alessandra Dametto, Vania A. F. F. M. dos Santos, Patrícia Cardoso, Fernando Passarelli, Marília Valli e Lidianne Gasparetto Felipe, e aos meus colegas de laboratório, Tito da Silva, Luciano da

Silva Pinto, Marcos Donizete Peliçon Pereira, Gislaine Felipe Martins, Vitoria Marques Picolini e Alfredo Danilo Ferreira de Souza, deixo um profundo agradecimento por tudo, em especial pela colaboração, pela amizade e pela paciência.

A todos os meus Irmãos em Cristo da Igreja do Evangelho Quadrangular do bairro Santana, a todos os meus Irmãos em Cristo da Primeira Igreja Batista de Araraquara, onde atualmente estou congregando, as minhas Amadas Irmãs na fé, Selma, Eliete e Maria e aos meus Irmãos José, Claudemir e Daniel pela força, pelas orações e pelas vigílias abençoados, e a todos os meus demais Irmãos em Cristo, que ao passarem na minha vida me deixaram exemplos verdadeiramente dignos de serem imitados.

Ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara pelo acolhimento, pela excelência acadêmica e por fornecer as condições para execução deste trabalho.

Ao CNPq, a Capes e a Fapesp pelo suporte financeiro, imprescindível para execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro (bolsa de estudos) que permitiu a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

*E, como Moisés levantou a serpente no deserto, assim importa que o Filho do
homem seja levantado;
Para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.
Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que
todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.
Porque Deus enviou o seu Filho ao mundo, não para que condenasse o mundo, mas
para que o mundo fosse salvo por ele.
Quem crê nele não é condenado; mas quem não crê já está condenado, porquanto
não crê no nome do unigênito Filho de Deus.
E a condenação é esta: Que a luz veio ao mundo, e os homens amaram mais as
trevas do que a luz, porque as suas obras eram más.
Porque todo aquele que faz o mal odeia a luz, e não vem para a luz, para que as
suas obras não sejam reprovadas.
Mas quem pratica a verdade vem para a luz, a fim de que as suas obras sejam
manifestas, porque são feitas em Deus...
...Aquele que vem de cima é sobre todos; aquele que vem da terra é da terra e fala
da terra. Aquele que vem do céu é sobre todos.
E aquilo que ele viu e ouviu isso testifica; e ninguém aceita o seu testemunho.
Aquele que aceitou o seu testemunho, esse confirmou que Deus é verdadeiro.
Porque aquele que Deus enviou fala as palavras de Deus; pois não lhe dá Deus o
Espírito por medida.
O Pai ama o Filho, e todas as coisas entregou nas suas mãos.
Aquele que crê no Filho tem a vida eterna; mas aquele que não crê no Filho não
verá a vida, mas a ira de Deus sobre ele permanece.*

RESUMO

Este trabalho descreve os estudos químicos dos extratos orgânicos de fezes e de tecidos de lagartas da borboleta *Battus polydamas*, as quais foram alimentadas com folhas de *Aristolochia giberti*. As etapas de isolamento dos constituintes químicos foram precedidas por microfracionamentos e/ou estudos comparativos entre as composições químicas de folhas, fezes e lagartas, o que visou a detecção de substâncias, possivelmente, biotransformadas e uma seleção racional das frações a serem estudadas. Do extrato de fezes de lagartas foram isoladas cinco substâncias inéditas: i) ácido (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-dihidroxi-labdan-15-óico (**3**), ii) ácido (-)-(4*S*,5-*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15,18-dióico (**4**), iii) ácido 7 β ,8 β ,18 α -trihidroxi-labdan-15-óico (**19**), iv) ácido (-)-(8*S*,8'*R*')-(3,4-metilenodioxi)-(3',4'-dimetoxi)-9'-*O*- β -glucopiranyl-lignan-9-óico (**17**) e v) ácido (-)-(8*S*,8'*R*')-[3,4:3',4'-bis(metilenodioxi)]-9'-*O*- β -glucopiranyl-lignan-9-óico (**18**), as quais não foram detectadas no extrato de folhas de *A. giberti*. Foram ainda isolados do extrato fecal a lignana dibenzilbutirolactônica kusunokina (**2**) e o diterpeno labdânico ácido (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-óico (**1**), cujas ocorrências, em folhas de *A. giberti*, foram previamente relatadas na literatura. Além disto, neste trabalho, revisitou-se e corrigiu-se a configuração absoluta de **1**, e determinaram-se as configurações absolutas das substâncias **3**, **4** e **17**. Para isso, empregaram-se as seguintes abordagens: i) estudos de dicroísmo circular vibracional associado com cálculos químico-quânticos, ii) estudos teóricos conformacionais, iii) aplicação de uma metodologia de RMN baseada na derivatização com reagentes quirálicos anisotrópicos (método PGME), iv) predições de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , em solução, v) medidas polarimétricas e de dicroísmo circular eletrônico e vi) transformações químicas. No total, obtiveram-se treze derivados semi-sintéticos: i) (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-oato de sódio (**1a**), ii) (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-oato de metila (**1b**), iii) (+)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*R*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15-amida (**1c**), iv) (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15-amida (**1d**), v) ácido (5*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-labd-7-en-15-óico (**1e**), vi) ácido (5*R*,10*R*,13*R*)-labd-8-en-15-óico (**1f**), vii) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8,18-diidroxi-labdan-15-amida (**3b**), viii) (-)-(4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-dihidroxi-labdan-15-ol (**20**), ix) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*R*,1''*R*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-

-feniletil)]-[N-(2"-metoxi-2"-oxo-1"-feniletil)]-8-hidroxilabdan-15,18-diamida (**4a**), x) (4S,5S,8R,9S,10-R,13R,1'S,1"S)-[N-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-[N-(2"-metoxi-2"-oxo-1"-feniletil)]-8-hidroxilabdan-15,18-diamida (**4b**), xi) ácido (4S,5S,10R,13R)-labd-8-en-15,18-diólico (**4c**), xii) (-)-(8S,8R')-(3,4-metilenodioxi)-(3',4'-dimetoxi)-9'-O-β-glucopiranyl-lignan-9-oato de metila (**17a**) e v) (-)-(8S,8R')-[3,4:3',4'-bis(metilenodioxi)]-9'-O-β-glucopiranyl-lignan-9-oato de metila (**18a**), além de uma mistura contendo o sal de bário de **17** (**17b**) e os anômeros α e β da glucopiranoose. Do extrato de lagartas de *B. polydamas*, isolaram-se as substâncias **2** e **4**, e identificou-se, por RMN de ¹H, a lignana hinoquinina (**8**) em mistura com um ácido graxo. As estruturas dessas 23 substâncias foram caracterizadas baseando-se em análises de dados espectrométricos de RMN e EM, pela comparação dos dados obtidos com os de modelos disponibilizados na literatura ou pela comparação dos espectros obtidos com os de amostras autênticas. Neste trabalho, identificaram-se ainda, por CG-EM, RMN de ¹H e/ou CLAE, os diterpenos ácido copálico (**5**), ácido eperúico (**7**), eperuato de metila (**7a**) e *trans*-fitol (**9**), os policetídeos *n*-hexadecanoato de metila (**10**), *n*-hexadecanoato de etila (**11**), *trans*-octadec-9-enoato de metila (**12**), *n*-octadecanoato de metila (**13**), ácido (9Z,12-Z,15Z)-octadecatrienóico (**14**), (9Z,12Z,15Z)-octadecatrienoato de etila (**15**), (9E,12-E)-octadecadienoato de metila (**16**) e os epímeros da cubebina (**6+6-epi**). Os compostos **5**, **6+6-epi**, **7**, **7a** e **10** foram identificados em folhas e fezes, os compostos **9**, **12**, **13** e **16** foram detectados em fezes, os compostos **11** e **14** foram identificados em folhas e lagartas e o composto **15** foi identificado em lagartas. Além disto, foram efetuados bioensaios para atividades inseticida (E-Fol, E-Fz, **1** e **2**) e/ou antipredatória (**1**, **2** e/ou **4**) com os extratos de folhas (E-Fol) e fezes (E-Fz) e com as substâncias **1**, **2** e **4**. Nenhuma das substâncias testadas impediu a predação de larvas de *Tenebrio molitor* por pintinhos e/ou de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por formigas. O bioensaio para atividade inseticida, por outro lado, mostrou que o extrato de folhas e o diterpeno **1** foram ativos para lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, uma vez que estes provocaram mortalidades de 39,5 e 65,0 %, respectivamente. Verificou-se ainda que o extrato de fezes, como a lignana **2**, não exibiu atividade inseticida nas concentrações testadas, evidenciando, assim, que as micromoléculas presentes nas folhas de *A. giberti* foram detoxificadas durante o processo digestivo das lagartas da borboleta *B. polydamas*.

ABSTRACT

This work describes the chemical studies of the extracts of feces and *Battus polydamas* larvae, which were fed at laboratory with leaves of *Aristolochia giberti*. The isolation steps of the chemical constituents of these extracts were preceded by micro-fractionations and/or comparative studies among the chemical compositions of feces, leaves, and larvae, what aimed at the detection of biotransformed compounds. From the fecal extract were isolated five new compounds: i) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-dihydroxy-labdan-15-oic acid (**3**), ii) (–)-(4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hydroxy-labdan-15,18-dioic acid (**4**), iii) 7β,8β,18α-trihydroxy-labdan-15-oic acid (**19**), iv) (–)-(8*S*,8*R'*)-3,4-methylenedioxy)-(3',4'-dimethoxy)-9'-*O*-β-glucopyranyl-lignan-9-oic acid (**17**), and v) (–)-(8*S*,8*R'*)-[3,4:3',4'-bis(methylenedioxy)]-9'-*O*-β-glucopyranyl-lignan-9-oic acid (**18**), which were not detected in the extract of *A. giberti* leaves, in addition to two known compounds, kusunokinin (**2**) and (5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hydroxy-labdan-15-oic acid (**1**), whose occurrences in *A. giberti* leaves were previously reported. Moreover, the absolute configuration of **1** was revisited and corrected and the absolute configurations of the compounds **3**, **4**, and **17** were determined using the following approaches: i) vibrational circular dichroism measurements and quantum chemical calculations, ii) conformational analyses, iii) application of NMR methodology based on derivatizations with chiral anisotropic reagents (PGME method), iv) predictions of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts in solution, v) optical activity and electronic circular dichroism measurements, and vi) chemical transformations. A total of thirteen semisynthetic derivatives were obtained: i) sodium (–)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hydroxy-labdan-15-oate (**1a**), methyl (–)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hydroxylabdan-15-oate (**1b**), iii) (+)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*R*)-[*N*-(2'-methoxy-2'-oxo-1'-phenylethyl)]-8-hydroxylabdan-15-amide (**1c**), iv) (–)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-methoxy-2'-oxo-1'-phenylethyl)]-8-hydroxylabdan-15-amide (**1d**), v) (5*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-labd-7-en-15-oic acid (**1e**), vi) (5*R*,10*R*,13*R*)-labd-8-en-15-oic acid (**1f**), vii) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-methoxy-2'-oxo-1'-phenylethyl)]-8,18-dihydroxy-labdan-15-amide (**3b**), viii) (–)-(4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-dihydroxy-labdan-15-ol (**20**), ix) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*R*,1''*R*)-[*N*-(2'-methoxy-2'-oxo-1'-phenylethyl)]-[*N*-(2''-methoxy-2''-oxo-1''-phenylethyl)]-8-hydroxy-labdan-15,18-diamide (**4a**), (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*,1''*S*)-[*N*-(2'-methoxy-2'-oxo-1'-phenylethyl)]-[*N*-(2''-methoxy-2''-oxo-1''-phenylethyl)]-8-hydroxy-labdan-15,18-diamide (**4b**), xi) (4*S*,5-

S,10*R*,13*R*)-labd-8-en-15,18-dioic acid (**4c**), xii) methyl (–)-(8*S*,8*R'*)-3,4-methylenedioxy)-(3',4'-dimethoxy)-9'-*O*-β-glucopyranyl-lignan-9-oate (**17a**), and xiii) methyl (–)-(8*S*,8*R'*)-[3,4:3',4'-bis(methylenedioxy)]-9'-*O*-β-glucopyranyl-lignan-9-oate (**18a**), in addition to a mixture containing barium salt of **17** (**17b**) with the α and β anomers of glucopyranose. From the tegumental extracts of *B. polydamas* larvae were isolated compounds **2** and **4**, and the lignan hinokinin (**8**) was identified in mixture with a fatty acid by ¹H NMR. The structures of these twenty three compounds were characterized based on NMR and MS spectrometric data and by comparisons with data available in the literature and/or with spectra of authentic samples. In this work, copalic acid (**5**), eperuic acid (**7**), methyl eperuate (**7a**), *trans*-phytol (**9**), methyl *n*-hexadecanoate (**10**), ethyl *n*-hexadecanoate (**11**), methyl *trans*-octadec-9-enoate (**12**), methyl *n*-octadecanoate (**13**), (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienoic acid (**14**), ethyl (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienoate (**15**), methyl (9*E*,12*E*)-octadecadienoate (**16**), and cubebin (**6+6-epi**) were also identified by GC-MS, ¹H NMR, and/or HPLC. Compounds **5**, **6+6-epi**, **7**, **7a**, and **10** were identified in the leaves and feces, compounds **9**, **12**, **13**, and **16** were detected in the feces, compounds **11** and **14** were identified in the leaves and larvae, and compound **15** was identified in the larvae. In addition, the antipredatory (**1**, **2**, and/or **4**) and/or insectical (E-Fol, E-Fz, **1**, and **2**) activities of **1**, **2**, and **4** and of the extract of leaves and feces were also evaluated. None of these compounds prevented the predation of *Tenebrio molitor* larvae by chicks and/or of *Spodoptera frugiperda* larvae by ants. However, compound **1** and extract of leaves were active against 3^o instar larvae of *S. frugiperda*, causing mortalities of 39,5 and 65,0 %, respectively. Exactly as it was verified for the lignan **2**, which was inactive in the tested concentrations, it was observed that the extract of feces did not exhibit insecticidal activity, evidencing that compounds from leaves of *A. giberti* were detoxified during the digestive processes of the *Polydamas* Swallowtail caterpillars.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais filos do Reino animal, com as respectivas porcentagens em termos de números de espécies. Os valores foram calculados em relação ao número total de espécies de animais.	31
Figura 2 - Percentagens de espécies nas ordens da Classe Insecta.	32
Figura 3 - Filogenia da família Papilionidae.	34
Figura 4 – <i>B. polydamas polydamas</i> : a) lagarta de 2º instar, b e e) lagartas de 5º instar, c) lagartas de 2º e 3º instars, d e g) lagartas de 3º instar e f) inseto adulto...	35
Figura 5 - <i>A. giberti</i> (folha e flor em destaque).	36
Figura 6 - Três dos principais constituintes de folhas de <i>A. giberti</i> Hook. ⁵⁹	37
Figura 7 - Constituintes químicos de <i>A. pubescens</i> testados para <i>A. gemmatalis</i> . ⁷⁹	39
Figura 8 - Constituintes químicos de <i>A. malmeana</i> testados para <i>A. gemmatalis</i>	40
Figura 9 - Diterpenos labdânicos com atividade antialimentar ou inseticida. ⁸³⁻⁸⁶	41
Figura 10 - Biotransformação de nerol por lagartas de <i>S. litura</i>	44
Figura 11 - Biotransformação da (–)-mentona por lagartas de <i>S. litura</i>	45
Figura 12 - Biotransformação pela proteína CYP4C7.	45
Figura 13 - Biotransformação de flavonoides por <i>B. mori</i>	46
Figura 14 - Biotransformação de flavonoides por <i>R. mencia</i> . R=H ou OH.	47
Figura 15 - Biotransformação de isoflavonas por <i>S. litura</i>	47
Figura 16 - Biotransformação do 3-geranil-4-hidroxibenzoato de metila por <i>N. bipes</i>	48
Figura 17 - Biotransformação do psoraleno xantotoxina por <i>P. polyxenes</i> e <i>S. frugiperda</i>	48
Figura 18 - Biotransformação do 4-nerolidilcatecol por <i>H. brasiliensis</i>	49
Figura 19 - Biotransformação de lignanas dibenzilbutânicas por <i>S. litura</i>	50
Figura 20 - Biotransformação de lignanas furofurânicas por <i>S. litura</i>	50
Figura 21 - Biotransformação de neolignanas por <i>N. bipes</i>	51
Figura 22 - Biotransformação de lignana, de fenilpropanóides e de derivado do ácido benzóico por: a) <i>N. bipes</i> , b) <i>Q. u-lucida</i> e c) <i>H. hectorides</i>	52
Figura 23 - Estruturas dos AAs.	53
Figura 24 - Estruturas de substâncias sequestradas por insetos das tribos Troidini e Zerynthiini ou identificadas em extratos de tegumentos, de tecidos e do osmetério desses insetos.	55
Figura 25 - Biotransformação de AA-I e AA-II por <i>B. polydamas archidamas</i>	57
Figura 26 - Biotransformação de AL-I e AL-II por <i>B. polydamas archidamas</i> . ¹⁴⁴	58
Figura 27 - Estruturas das micromoléculas dos extratos de fezes e/ou lagartas e dos derivados semi-sintéticos.	64
Figura 28 - <i>Battus polydamas</i> [a) adulto e b) lagarta], c) <i>Areoscelis rufa</i> (vespa parasitóide) e d) <i>Aristolochia giberti</i> (folha e flor em destaque).	65
Figura 29 - Lagartas da borboleta <i>B. polydamas</i> alimentando-se de folhas de <i>A. giberti</i> , em cativeiro.	66
Figura 30 - Resíduos (fezes) de lagartas de <i>B. polydamas</i> , após a extração exaustiva com CH ₃ OH.	67
Figura 31 - Preparação dos extratos de lagartas de <i>B. polydamas</i>	67
Figura 32 - Microfracionamentos dos extratos de folhas de <i>A. giberti</i> (E-Fol) e fezes de <i>B. polydamas</i> (E-Ba).	69
Figura 33 - Screening por micromoléculas biotransformadas.	70
Figura 34 - Fracionamento do extrato EO-Ba.	73
Figura 35 - Fracionamento do extrato EHM-Ba.	76

Figura 36 - Fracionamento do extrato L2.	77
Figura 37 - Obtenção do carboxilato de sódio do diterpeno 1	78
Figura 38 - Metilação de 1 , de 17 e de 18 com diazometano.	79
Figura 39 - Derivatizações de 1 com os hidrocloreto dos ésteres metílicos de <i>R</i> - e <i>S</i> -fenilglicina.	80
Figura 40 - Derivatizações de 3+4 com os hidrocloreto dos ésteres metílicos de <i>R</i> - e <i>S</i> -fenilglicina.	81
Figura 41 - Cromatograma preparativo de 1-R-PGME	81
Figura 42 - Cromatograma preparativo de 1-S-PGME	82
Figura 43 - Cromatograma preparativo de 3+4-R-PGME	83
Figura 44 - Cromatograma preparativo de 3+4-S-PGME	83
Figura 45 - Redução da mistura de 3+4	84
Figura 46 - Reações de desidratação dos diterpenos 1 e 4	85
Figura 47 - Hidrólise ácida de 17	87
Figura 48 - <i>Clusters</i> de menor energia (sobrepostos) de 1c , 1d , 1c-epi e 1d-epi . ..	89
Figura 49 - Estruturas das moléculas-modelo M1 a M13 . R=CH ₂ CH ₂ CH ₃ . R ¹ =H (M5) ou Br (M6). R ² = {N-[(1 <i>R</i>)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]}. R ³ = {N-[(1 <i>S</i>)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]}.	90
Figura 50 - Bioensaio com <i>G. gallus domesticus</i> – treinamento. Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Trigo e pela Dr ^a . Kamila Ferreira Massuda Garcia.	92
Figura 51 - Bioensaio com <i>C. crassus</i> . Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Trigo e pela Dr ^a . Kamila Ferreira Massuda Garcia.	94
Figura 52 - Bioensaio com <i>S. frugiperda</i> . Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e pelo MSc. Luan Alberto Odorizzi dos Santos.	95
Figura 53 - Cromatoplaça eluída em hexanos-EtOAc 1:1 (4% de AcOH) e revelada com vanilina sulfúrica. Os pontos de aplicação 1-21 correspondem às fases F-1 e Ba-1, às frações F-1A, Ba-1A, F-1B, Ba-1B, F-1C, Ba-1-C, F-1D, Ba-1D, F-1E, Ba-1E, F-1F, Ba-1F, F-1G, Ba-1G, F-1H, Ba-1H, F-1I e Ba-1I e à subfração C3-B (mistura dos diterpenos biotransformados inéditos 3 e 4), respectivamente. Note que 3 e 4 foram detectados somente nas frações oriundas do E-Ba.	101
Figura 54 - Cromatoplaça eluída em hexanos-EtOAc 3:2 (2% de AcOH e mais 2% de álcool isopropílico) e revelada com vanilina sulfúrica. Os pontos de aplicação 1-21 correspondem às fases F-1 e Ba-1, às frações F-1A, Ba-1A, F-1B, Ba-1B, F-1C, Ba-1-C, F-1D, Ba-1D, F-1E, Ba-1E, F-1F, Ba-1F, F-1G, Ba-1G, F-1H, Ba-1H, F-1I e Ba-1I e à subfração C3-B (mistura dos diterpenos biotransformados inéditos 3 e 4), respectivamente. Note que 3 e 4 foram detectados somente nas frações oriundas do E-Ba.	102
Figura 55 - Espectro de massas (baixa resolução; IES) da subfração MDB [diterpenos 3 (<i>m/z</i> 339,39) e 4 (<i>m/z</i> 353,49); infusão direta; modo negativo; -20 V].	103
Figura 56 - Espectro de RMN de ¹ H da subfração C3-B (CDCl ₃ , 500 MHz).	104
Figura 57 - Espectro de RMN de ¹³ C da subfração C3-B (CDCl ₃ , 126 MHz).	104
Figura 58 - Espectro de RMN de ¹ H da subfração C3-B (CDCl ₃ , 500 MHz): Irradiação seletiva na frequência de absorção dos hidrogênios em δ 3,10 e 3,43.	105
Figura 59 - Dados espectrométricos de modelos disponibilizados na literatura. ¹⁷⁹⁻¹⁸⁵	106
Figura 60 - Cromatogramas das frações F-2F (1 ^o linha) e Ba-2F (2 ^o linha; picos projetados para baixo).	107
Figura 61 - Cromatograma da fração Ba-2F. Lignana 17 e lignana 18	107

Figura 62 - Espectros de absorção no UV de a) 2 , b) 8 , c) 17 e d) 18 .	109
Figura 63 - Espectro de massas do composto com $t_r = 21,00$ min.	110
Figura 64 - Espectro de massas do composto com $t_r = 22,33$ min.	110
Figura 65 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das subfrações Ba-1G e F-1G (CDCl_3 , 500 MHz).	111
Figura 66 - Espectros de RMN de ^1H das frações Ba-1H e F-1H (CDCl_3 , 500 MHz).	112
Figura 67 - Espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz].	113
Figura 68 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz].	113
Figura 69 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz].	114
Figura 70 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz].	114
Figura 71 - Espectro de massas por impacto eletrônico da lignana hinoquinina (8).	116
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração L2-D.	117
Figura 73 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração L2-D.	117
Figura 74 - Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração F-1C, a qual era majoritariamente uma mistura dos diterpenos 5 e 7 .	118
Figura 75 - Espectro de massas por impacto eletrônico do diterpeno ácido copálico (5).	119
Figura 76 - Espectro de massas por impacto eletrônico do diterpeno ácido eperúico (7).	119
Figura 77 - Espectro de massas por impacto eletrônico do éster metílico do ácido eperúico (7a).	119
Figura 78 - Provável rota de fragmentação do diterpeno ácido copálico (5). Para simplificar, as espécies radicalares ou neutras liberadas na fragmentação de 5 foram omitidas nesta figura. As propostas para as fragmentações dos diterpenos 7 e 7a foram bastante similares a destacada nesta figura para a fragmentação de 5 .	120
Figura 79 - Espectro de massas de alta resolução do diterpeno 1 .	122
Figura 80 - Espectro de RMN de ^{13}C de 1 (CDCl_3 , 151 MHz).	123
Figura 81 - Exemplos de dados espectrométricos de RMN de diterpenos <i>ent</i> -labdânico e clerodanos.	124
Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de 1 (CDCl_3 , 600 MHz).	125
Figura 83 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 1 (CDCl_3 , 600 MHz).	125
Figura 84 - Espectros de RMN de 1 adquiridos nos três solventes deuterados (600 MHz).	126
Figura 85 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl_3 , 14,1 T).	127
Figura 86 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl_3 , 14,1 T).	127
Figura 87 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl_3 , 14,1 T).	128
Figura 88 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl_3 , 14,1 T).	128
Figura 89 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl_3 , 14,1 T).	129

Figura 90 - Mapa de contornos (expansão) de <i>g</i> HSQC-TOCSY de 1 (CDCl ₃ , 14,1 T).	129
Figura 91 - Subestruturas I a III. A direita está a estrutura planar de 1 , e em destaque as correlações que conectam as subestruturas. O asterisco (*) significa que naquela posição há um carbono não hidrogenado.....	130
Figura 92 - Correlações homo- e heteronucleares observadas para a subestrutura I de 1	130
Figura 93 - Espectro (expansão) de RMN de ¹ H (HOMODEC) irradiando-se na frequência de absorção do H-7 _{eq} (δ 1,74).	131
Figura 94 - Biossíntese dos quatro diastereoisômeros do difosfato de copaloila. Conformação cadeira-cadeira: série <i>normal</i> , conformação cadeira-cadeira enantiomérica (antípoda): série <i>ent</i> , conformação cadeira-barco: série <i>syn</i> e conformação cadeira-barco enantiomérica (antípoda): série <i>ent-syn</i> . Relações estereoquímicas <i>anti</i> e <i>syn</i> refere-se as configurações relativas entre a Me-20 e os H-5 e H-9.....	134
Figura 95 - Mecanismo enzimático da ciclase de pirofostato de <i>ent</i> -copaloila.	135
Figura 96 - Prováveis configurações relativas para o sistema decalínico do diterpeno 1 . Radical R=CH ₂ CH ₂ CH ₃ equivale aos modelos M1 a M5 e M7 a M9	137
Figura 97 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M1 a M3	138
Figura 98 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M4	138
Figura 99 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M5 e M6 (–Br).	139
Figura 100 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M7	139
Figura 101 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M8	139
Figura 102 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de M9	140
Figura 103 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C de Lit-8 a Lit-11 . Ref. 216. Os deslocamentos químicos foram atribuídos neste trabalho. O asteriscos (*) significa que as atribuições são intercambiáveis. Ref. 210.	141
Figura 104 - Principais interações envolvidas nas diferenças de deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C observadas entre Lit-8 a Lit-11 . Ref. 210. *Somando-se todas as interações observadas ao longo de todas as ligações envolvendo o carbono quartenário cabeça de ponte.....	142
Figura 105 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C dos “Cy e Cε e da –Meε” de Lit-12 a Lit-16	143
Figura 106 - Deslocamentos químicos de grupos metílicos em axiais e equatoriais, em substâncias estruturalmente similares ao diterpeno 1	146
Figura 107 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C de Lit-17 e Lit-18 . Valores de δΔ(Lit-17 menos Lit-18).	148
Figura 108 - Predição dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C dos C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-17 e C-20 de 1 partindo-se dos dados dos epímeros do ácido labdanólico. ^{240,241}	149
Figura 109 - Interações espaciais (selecionadas) e acoplamentos escalares ¹ H/ ¹ H chaves para a confirmação da configuração relativa do sistema decalínico de 1	149
Figura 110 - Dados de RMN de ¹ H de 1 obtidos e publicados por Marchesini <i>et al.</i> (2009). ⁵⁹	150
Figura 111 - Espectros de RMN de ¹ H de a) 1 , b) F-1F e c) Ba-1F (CDCl ₃ , 500 MHz).	151
Figura 112 - Atividades ópticas dos epímeros C-13 do ácido labdanólico. Refs 240 e 241.	152
Figura 113 - Efeito da metilação de grupos –CO ₂ H e –OH sobre a magnitude da atividade óptica. Ref. 254.	152

Figura 114 - Efeito da oxidação de um grupo –CH ₂ OH sobre a magnitude e sobre o sinal da atividade óptica. Ref. 251.....	153
Figura 115 - Exemplo clássico dos iridóide isoplumericina, plumericina e oruvacina, respectivamente. Refs. 247 e 248.....	153
Figura 116 - Espectro de massas de 1b (IES, +10 V, infusão direta).....	156
Figura 117 - Dados de RMN de ¹³ C de 1 e 1b , respectivamente.	157
Figura 118 - Espectros de RMN de ¹ H de 1 e 1b (CDCl ₃ , 600 MHz), respectivamente.	157
Figura 119 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1b (CDCl ₃ , 151 MHz).	158
Figura 120 - Espectro (expansão) de RMN de ¹³ C de 1b (CDCl ₃ , 151 MHz).	158
Figura 121 - Quatro possíveis diastereoisômeros de 1b (D1=1b , D2 , D3 e D4). ...	159
Figura 122 - Geometrias otimizadas [B3LYP/6-31G(d)] dos confôrmeros mais estáveis do epímero C-13R de 1b=D1	160
Figura 123 - Geometrias otimizadas [B3LYP/6-31G(d)] dos confôrmeros mais estáveis do epímero C-13S de 1b=D3	160
Figura 124 - Comparação entre os espectros de IV e DCV obtidos para 1b (D1) com os calculados para D1 a D4 : a) Curvas de D1 e D2 (C-13R) e b) Curvas de D3 e D4 (C-13S). Abaixo das figuras estão os resultados dos estudos de correlação efetuados no programa CompareVoa (BioTools, Inc.).	1
Figura 125 - Comparação entre os espectros de IV e DCV obtidos para 1b (D1) com os calculados para D1 e D3 : a) Curva de D1 (C-13R) e b) Curva de D3	2
Figura 126 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1a (CD ₃ OD, 151 MHz).	164
Figura 127 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1a (CD ₃ OD, 151 MHz).	164
Figura 128 - Espectro de RMN de ¹ H de 1a (CD ₃ OD, 600 MHz).	165
Figura 129 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1a (CD ₃ OD, 600 MHz).	165
Figura 130 - Eperuato de metila (Lit-19) e labdanoato de metila (Lit-20). ²⁶⁶	166
Figura 131 - Estruturas químicas de Lit-21 a Lit-24 . Os valores de Δδ correspondem as diferenças calculada entre os deslocamentos químicos dos epímeros.	167
Figura 132 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1e+1f (CDCl ₃ , 126 MHz).	169
Figura 133 - Modelo proposto por Yabuuchi & Kusumi (2000) para a determinação da configuração absoluta de ácidos β,β-alquil-dissubstituídos. Os valores de Δδ (em ppm) são referentes a seguinte subtração: δR–δS.	171
Figura 134 - Projeções de Newman para derivados amídicos PGME de ácidos β,β-alquil-dissubstituídos.	172
Figura 135 - Estruturas do ácido (3R)-metil-pentanóico e derivados (R)- e (S)-PGME deste. Ref. 163.	172
Figura 136 - Confôrmeros de menor energia do derivado amídico R-PGME do ácido (3R)-metil-pentanóico.	174
Figura 137 - Confôrmeros de menor energia do derivado amídico S-PGME do ácido (3R)-metil-pentanóico.	174
Figura 138 - Representação esquemática para facilitar a “visualização” de “confôrmeros médios” dos derivados PGME do ácido (R)-3-metilpentanóico.	175
Figura 139 - Espectro de massas de 1c (IES, +10 V, infusão direta).....	176
Figura 140 - Espectro de massas de 1d (IES, +10 V, infusão direta).....	177
Figura 141 - Espectro de RMN de ¹ H de 1c (CDCl ₃ , 600 MHz).	178
Figura 142 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1c (CDCl ₃ , 151 MHz).	178
Figura 143 - Espectro de RMN de ¹ H de 1d (CDCl ₃ , 600 MHz).	179
Figura 144 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1d (CDCl ₃ , 151 MHz).	179
Figura 145 - Espectros (expansões) de RMN de ¹ H de 1c e 1d (CDCl ₃ , 600 MHz).	180

Figura 146 - Valores calculados de $\Delta\delta(\delta_R - \delta_S)$ entre os dados de RMN dos derivados 1c e 1d	180
Figura 147 - Confôrmeros (RHF/6-31G) de menor energia de 1c	183
Figura 148 - Confôrmeros (RHF/6-31G) de menor energia de 1d	183
Figura 149 - Confôrmeros (RHF/6-31G) de menor energia de 1c-epi	184
Figura 150 - Confôrmeros (RHF/6-31G) de menor energia de 1d-epi	184
Figura 151 - Mortalidade acumulada em sete dias. A1=E-Fol, A2=E-Fz, A3=Diterpeno 1 e A4=Lignana 2	186
Figura 152 - Espectro de massas de alta resolução de 4	188
Figura 153 - Espectro de RMN de ^1H de 4 (CDCl_3 , 600 MHz).....	189
Figura 154 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4 (CDCl_3 , 600 MHz).....	189
Figura 155 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4 (CDCl_3 , 151 MHz).....	190
Figura 156 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4 (CDCl_3 , 151 MHz).....	190
Figura 157 - Espectro de DEPT 135° de 4 (CDCl_3 , 151 MHz).....	191
Figura 158 - Mapa de contornos gCOSY de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	191
Figura 159 - Mapa de contornos gHSQC de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	192
Figura 160 - Mapa de contornos (expansão) gHSQC de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	192
Figura 161 - Mapa de contornos (expansão) gHSQC de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	193
Figura 162 - Espectro de APT com 1/(2J) de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	195
Figura 163 - Correlações à longa distância e interações espaciais selecionadas.....	195
Figura 164 - Alguns dados de RMN de ^{13}C de Lit-26 , Lit-27 , Lit-28 e Lit-29	196
Figura 165 - Expansão do mapa de contornos de JResolved de 4 (CDCl_3 , 14,1 T).....	198
Figura 166 - Espectro de massas de 4a (IES, +10 V, infusão direta).....	199
Figura 167 - Espectro de massas de 4b (IES, +10 V, infusão direta).....	199
Figura 168 - Espectro de RMN de ^1H de 4a (CDCl_3 , 600 MHz).....	200
Figura 169 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4a (CDCl_3 , 151 MHz).....	200
Figura 170 - Espectro de RMN de ^1H de 4b (CDCl_3 , 600 MHz).....	201
Figura 171 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4b (CDCl_3 , 151 MHz).....	201
Figura 172 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H de a) 4a e b) 4b (CDCl_3 , 600 MHz).....	202
Figura 173 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas.....	203
Figura 174 - Valores de $\Delta\delta(\delta_R - \delta_S)$, calculados a partir dos dados de RMN de ^1H de 4a e 4b . Confôrmeros de menor energia de 4a (<i>R</i>) e 4b (<i>S</i>).....	204
Figura 175 - Espectro de RMN de ^1H de 4c (CDCl_3 , 600 MHz).....	206
Figura 176 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4c (CDCl_3 , 151 MHz).....	207
Figura 177 - Correlações a longa distância (selecionadas) observadas no mapa de contornos gHMBC de 4c (CDCl_3 , 14,1 T).....	207
Figura 178 - Espectro de RMN de ^1H de 3 (CDCl_3 , 600 MHz).....	210
Figura 179 - Espectro de RMN de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , 151 MHz).....	211
Figura 180 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , 151 MHz).....	211
Figura 181 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , 151 MHz).....	212
Figura 182 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , 151 MHz).....	212
Figura 183 - Espectro de RMN de ^1H de 3b (CDCl_3 , 600 MHz).....	214
Figura 184 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 3b (CDCl_3 , 600 MHz).....	215
Figura 185 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 3b (CDCl_3 , 600 MHz).....	215
Figura 186 - Espectro de RMN de ^{13}C de 3b (CDCl_3 , 151 MHz).....	216
Figura 187 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de 3b (CDCl_3 , 151 MHz).....	216

Figura 188 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas (3b ; CDCl ₃ , 14,1 T).	217
Figura 189 - Espectro de RMN de ¹ H de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz].	217
Figura 190 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz]. ...	218
Figura 191 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz]. ...	218
Figura 192 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz]. ...	219
Figura 193 - Espectro de RMN de ¹³ C de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 151 MHz].	219
Figura 194 - Espectro de massas de 20 (IES, +10 V, infusão direta).	220
Figura 195 - Mapa de contornos gHSQC de 20 [(CD ₃) ₂ CO, 14,1 T].	221
Figura 196 - Interações espaciais selecionadas.	222
Figura 197 - Espectros de RMN de ¹ H de 18+19 (600 MHz).	223
Figura 198 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz].	224
Figura 199 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 600 MHz].	224
Figura 200 - Espectro de RMN de ¹³ C de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 151 MHz].	225
Figura 201 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 151 MHz].	225
Figura 202 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 151 MHz].	226
Figura 203 - Expansão do mapa de contornos gHSQC de 18+19 [(CD ₃) ₂ CO, 14,1 T].	227
Figura 204 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas [19 ; (CD ₃) ₂ CO, 14,1 T].	228
Figura 205 - Dados de RMN de ¹³ C de alguns carbonos de Lit-30 a Lit-33 e valores de Δδ calculados a partir dos dados de 19 e de cada um desses modelos.	229
Figura 206 - Espectro de RMN de ¹ H de 2 (CDCl ₃ , 600 MHz).	230
Figura 207 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 2 (CDCl ₃ , 600 MHz).	231
Figura 208 - Expansão do mapa de contornos gHSQC de 2 (CDCl ₃ , 14,1 T).	231
Figura 209 - Expansão do mapa de contornos JResolved de 2 (CDCl ₃ , 14,1 T). ...	232
Figura 210 - Espectro de RMN de ¹³ C de 2 (CDCl ₃ , 126 MHz).	233
Figura 211 - Correlações a longa distância (gHMBC) e acoplamentos escalares homonucleares ¹ H/ ¹ H selecionados.	234
Figura 212 - Conformeros de menor energia ²⁹⁸⁻³⁰⁰ de 2 , interações espaciais selecionadas e HOMO.	234
Figura 213 - Espectro de massas de 2 (IES, +10 V, infusão direta).	235
Figura 214 - Proposta de fragmentação da lignana 2	236
Figura 215 - Espectro de massas por impacto eletrônico de 2	237
Figura 216 - Espectro de RMN de ¹ H de 17 (CD ₃ OD, 600 MHz).	239
Figura 217 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de 17 (CD ₃ OD, 600 MHz).	240
Figura 218 - Expansão do mapa de gCOSY de 17 (CD ₃ OD, 14,1 T).	240
Figura 219 - Expansão do mapa de gHSQC-TOCSY de 17 (CD ₃ OD, 14,1 T).	241
Figura 220 - Expansão do mapa de gHSQC-TOCSY de 17 (CD ₃ OD, 14,1 T).	242
Figura 221 - Experimento de TOCSY 1D de 17 (CD ₃ OD, 600 MHz).	242
Figura 222 - Espectro de APT de 17 (CD ₃ OD, 151 MHz).	243
Figura 223 - Expansão do espectro de APT de 17 (CD ₃ OD, 151 MHz).	244
Figura 224 - Expansão do espectro de APT de 17 (CD ₃ OD, 151 MHz).	244
Figura 225 - Correlações a longa distâncias, acoplamentos escalares homonucleares ¹ H/ ¹ H e interações espaciais selecionadas.	245
Figura 226 - Espectro de massas de alta resolução de 17	246

Figura 227 - Proposta de fragmentação da lignana 17	246
Figura 228 - Espectro de RMN de ^1H de 17a (CD_3OD , 600 MHz).....	247
Figura 229 - Espectro de RMN de ^{13}C de 17a (CD_3OD , 151 MHz).	249
Figura 230 - Rota proposta para a síntese de 17 a partir de 2	249
Figura 231 - Espectros de RMN de ^1H de 2 (natural) e do produto de lactonização da aglicona de 17 (sintética) (CDCl_3 , 600 MHz).	251
Figura 232 - Espectro de RMN de ^1H de 17b+21+21-epi (D_2O , 600 MHz).	252
Figura 233 - Experimento de TOCSY 1D irradiando na frequência do H-1 da β -glucose (D_2O , 600 MHz).....	252
Figura 234 - Espectro de RMN de ^1H de 18 (CD_3OD , 600 MHz).....	254
Figura 235 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 18 (CD_3OD , 600 MHz).	254
Figura 236 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 18 (CD_3OD , 600 MHz).	255
Figura 237 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 18 (CD_3OD , 600 MHz).	255
Figura 238 - Espectro de APT de 18 (CD_3OD , 600 MHz).....	256
Figura 239 – Curvas de dicroísmo circular eletrônico (DCE) de 17 (curva a) e 18 (curva b) obtidas em CH_3OH	256

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequestro de ácidos aristolóquicos (AAs) de plantas por insetos.	54
Tabela 2 - Cálculos teóricos de energia para confômeros de 2 e M1 a M13	91
Tabela 3 - Análises por CG-EM das frações F-1B, F-1C, Ba-1B e Ba-1C e do extrato L1.	115
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H de 8 (CDCl_3 , 500 MHz, δ , J).	118
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1 (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	132
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1a e 1b (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	163
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1e e 1f (14,1 T, CDCl_3 , δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	170
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1c (<i>R</i> -PGME) e 1d (<i>S</i> -PGME) (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz, CDCl_3).	181
Tabela 9 - Confômeros de menor energia de 1c , 1d , 1c-epi e 1d-epi	182
Tabela 10 - Erros médios absolutos (MAE) calculados a partir dos dados computados e/ou observados para 1c , 1d , 1c-epi e 1d-epi	186
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 4 , 4a (<i>R,R</i> -PGME) e 4b (<i>S,S</i> -PGME) (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	194
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 4c (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	206
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 3 , 3b e 20 (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	213
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 19 (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	228
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 2 (CDCl_3 , 14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	238
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 17 , 17a , 18 e 18a (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).	248

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
$[\alpha]_\lambda$	Rotação óptica específica no comprimento de onda λ
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AcOH	Ácido acético
B3LYP	Funcional híbrido
6-31G(d)	Conjunto base 6-31G com função polarização de orbitais d
<u>C</u> —O	Carbono da ligação C—O
C-18	Octadecilsiloxano
CA	Configuração absoluta
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLAE-UV-DC-AFD	Cromatografia de alta eficiência acoplada a detectores de ultravioleta e visível, de dicroísmo circular e de arranjo de fotodiodos
COSMO	<i>Conductor-like Screening Model</i>
<i>d</i>	Dubleto
DCE	Dicroísmo circular eletrônico
DCV	Dicroísmo circular vibracional
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	Teoria do funcional de densidade
DMF	Dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsufóxido hexadeuterado
<i>dt</i>	Duplo tripleto
EM	Espectrometria de massas
E_R	Energia relativa
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
<i>g</i> COSY	<i>Gradient Correlated Spectroscopy</i>
<i>g</i> HMBC	<i>Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>g</i> HMQC	<i>Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<i>g</i> HSQC	<i>Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>g</i> HSQC-TOCSY	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence-Total Correlation Spectroscopy</i>

GIAO	<i>Gauge independent atomic orbital</i>
gNOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
gTOCSY	Total Correlation Spectroscopy
h	Altura do leito cromatográfico
HF	<i>Restricted Hartree-fock</i>
HOBt	Hidroxibenzotriazol
Int. rel.	Intensidade relativa
I^T	Índice de retenção linear
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
J_2	Constante de acoplamento a duas ligações
J_3	Constante de acoplamento a três ligações
m	Multipeto
m/z	Razão massa/carga
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
p.f.	Ponto de fusão
PyBoP	Hexafluorofosfato de benzotriazolil-oxitripirrolidino-fosfônio
q	Quadrupeto
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
$s/$	Singleto largo
t	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
t_r	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
V_0	Volume morto
$W_{1/2}$	Largura a meia altura
δ	Deslocamento químico
ΔI^T	Variação entre índices de retenção linear
ε	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
σ	<i>Atomic chemical shielding tensors</i>
φ	Fração molar
Φ	Diâmetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Biodiversidade e filogenias de Arthropoda e Insecta	31
1.2 Lepidópteros (com ênfase em borboletas): biologia e diversidade	33
1.3 Família Papilionidae e <i>Battus polydamas</i>	34
1.4 Aristolochiaceae	36
1.4.1 Aspectos botânicos	36
1.4.2 Aspectos metabólicos	36
1.4.3 Substâncias bioativas: Atividades inseticida e “antialimentar”	38
1.5 Ecologia química	41
1.6 Ecologia das interações entre insetos e plantas: significância dos metabólitos secundários contra a herbivoria e metabolização e sequestro de micromoléculas por insetos	42
1.7.1 Biotransformação/bioconversão	43
1.7.1 Biotransformação por insetos	44
1.8 Aristolochiaceae e Papilionidae: Sequestro e biotransformação de micromoléculas	52
2 OBJETIVOS	59
2.1 Objetivos gerais	59
2.2 Objetivos específicos	59
3 EXPERIMENTAL	60
3.1 Especificação dos materiais, reagentes e equipamentos utilizados	60
3.1.1 Solventes	60
3.1.2 Reagentes	60
3.1.3 Cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna	61
3.1.4 Análises por RMN	61
3.1.5 Análises e separações por CLAE-UV-DC-AFD	62
3.1.6 Análise por CLAE-EM e obtenção dos EM de 1, 2 e 3+4	62
3.1.7 Análises por EM	62
3.1.8 Análises quirópticas	63
3.1.9 Evaporação dos solventes e medição de pH	63
3.2 Identificação da borboleta e da planta hospedeira	65
3.3 Coleta, criação das lagartas e preparo dos extratos de fezes e de lagartas	66
3.4 Preparo do extrato representativo de folhas de <i>A. giberti</i>	68
3.5 Análises preliminares dos extratos de folhas, fezes e lagartas	68
3.6 Fracionamento em escala reduzida dos extratos E-Fol e E-Ba	68
3.6.1 Extrações líquido-líquido e extrações em fase sólida	68

3.7 Screening por micromoléculas biotransformadas	70
3.7.1 Análises por RMN	70
3.7.2 Análises por CLAE-UV-DC-AFD	71
3.7.3 Análises por CCDC	71
3.7.4 Análise por CLAE-EM	71
3.7.5 Análises por CG-EM	72
3.8 Isolamento dos diterpenos e das lignanas	72
3.8.1 Fracionamento em escala ampliada do extrato fecal (E-Ba)	72
3.8.1.1 Fracionamento da fração C1-E	74
3.8.1.2 Obtenção da lignana 2	74
3.8.1.3 Fracionamento da fração C1-H	74
3.8.1.4 Fracionamento da subfração C3-B	75
3.8.1.5 Fracionamento da fração C2-E	75
3.8.1.6 Fracionamento da fração C2-F	75
3.9 Sequestro de micromoléculas por lagartas de <i>B. polydamas</i>	76
3.9.1 Fracionamento do extrato L2	76
3.10 Reações de derivatização e transformações químicas	77
3.10.1 Preparo e purificação do ent-8 β -hidroxi-labdan-15-oato de sódio (1a)	77
3.10.2 Metilação de 1, 17 e 18 com diazometano (CH ₂ N ₂)	78
3.10.3 Derivatização de 1 e de 3+4 com reagentes quirais anisotrópicos [(R)- e (S)-PGME]	79
3.10.3.1 Purificação por CLAE das amidas diastereoisoméricas 1c e 1d	81
3.10.3.2 Purificação dos derivados amídicos 3b, 4a e 4d	82
3.10.4 Redução da mistura de 3+4 com LiAlH ₄	83
3.10.5 Desidratação dos diterpenos 1 e 4 em CDCl ₃	84
3.10.5.1 Teste da acidez do CDCl ₃	85
3.10.6 Procedimentos para a determinação da configuração absoluta da lignana di-benzilbutânica 17	86
3.10.6.1 Abertura do anel lactônico de 2	86
3.10.6.2 Hidrólise ácida de 17	86
3.11 Cálculos teóricos	87
3.11.1 Dicroísmo circular vibracional associado a cálculos mecânico-quânticos: Determinação da configuração absoluta de 1	87
3.11.2 Análises conformacionais e cálculos de deslocamentos químicos de RMN dos derivados 1c, 1d, 1c-epi e 1d-epi	88
3.11.3 Análises conformacionais de M1 a M13	90
3.12 Ensaios biológicos	92
3.12.1 Ensaios de atividade antipredatória	92

3.12.1.1 Bioensaio com <i>G. gallus domesticus</i>	92
3.12.1.2 Bioensaio com <i>Camponotus crassus</i>	93
3.13.1 Atividade inseticida	95
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.1 Uma visão panorâmica	97
4.2 Screening em escala reduzida: Microfracionamentos e estudos comparativos	99
4.2.1 Estudos cromatográficos comparativos	100
4.2.1.1 Estudo comparativo por CCDC: Detecção dos metabólitos biotransformados 3 e 4	100
4.2.1.1.1 Análises espectrométricas preliminares da subfração C3-B (3+4)	102
4.2.1.2 Estudo comparativo por CLAE-UV-DC-AFD e análise por CLAE-EM: Detecção das lignanas biotransformadas (17 e 18)	106
4.2.2 Estudos comparativos por RMN	111
4.3 Identificações por CG, RMN de ^1H e/ou CLAE	115
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	122
4.4.1 Ácido (-)-(5S,8R,9S,10R,13R)-8-hidroxi-labdan-15-óico (1) e seus derivados sintéticos (1a-1f)	122
4.4.1.1 Estrutura planar de 1	122
4.4.1.2 Configuração relativa do sistema bicíclico de 1	133
4.4.1.2.1 Considerações biossintéticas de diterpenos labdânicos	133
4.4.1.2.2 Considerações preliminares acerca dos comportamentos conformacionais da cis e trans-decalinas	136
4.4.1.2.3 Relações estereoquímicas entre os C5 e C-10 e C10 e C-9 de 1	137
4.4.1.2.4 Dados de RMN de ^{13}C : Relações estereoquímicas entre C5 e C-10 e C-10 e C-9 de 1	140
4.4.1.3 Configuração relativa em C-8 de 1	145
4.4.1.4 Confirmação das configurações relativas em C-5, C-8, C-9 e C-10: nOes e análises das multiplicidades	149
4.4.1.5 Configuração absoluta (CA) de 1	150
4.4.1.5.1 Atividade óptica de 1	150
4.4.1.5.2 Dicroísmo circular vibracional: Análise de diterpenos	154
4.4.1.5.3 Considerações sobre análises conformacionais de ácidos carboxílicos e determinação da configuração absoluta de 1d por DCV	155
4.4.1.5.4 Determinação da configuração em C-13 de 1	166
4.4.1.5.4.1 Diferenciação de epímeros por meio de dados de RMN	166
4.4.1.5.4.2 Configuração em C-13 de 1: Método PGME e predição de deslocamentos químicos de RMN	171
4.4.1.6 Atividade inseticida	186
4.4.2 Diterpenos biotransformados e seus derivados sintéticos	187

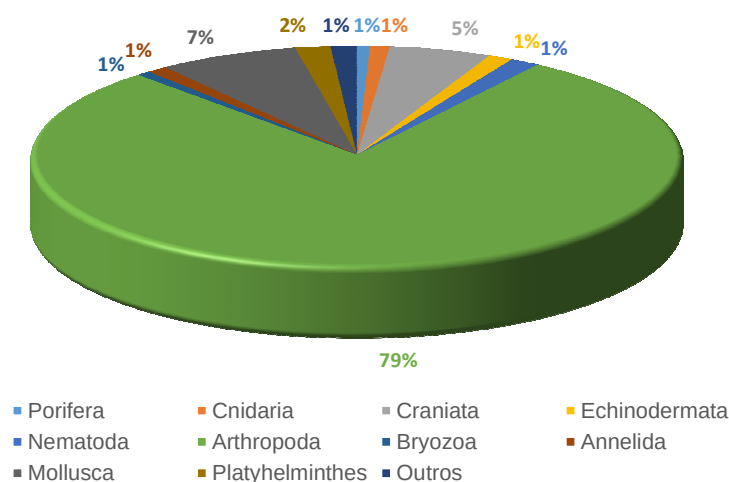
4.4.2.1 Ácido (-)-ent-8 β -hidroxi-labdan-15,18-diólico (4)	187
4.4.2.2 Atividade antipredatória	207
4.4.3 Ácido 8 β ,18 α -dihidroxi-labdan-15-óico (3)	209
4.4.4 Ácido 7 β ,8 β ,18 α -trihidroxi-labdan-15-óico (19)	222
4.4.5 Lignanas (2, 17, 17a, 18 e 18a)	229
4.4.5.1 Kusunoquinina (2)	229
4.4.5.2 Ácido (-)-(8S,8'R)-(3,4-metilenodioxí)-(3',4'-dimetoxi)-9'-O- β -glucopiranyl-lignan--9-óico (17)	238
4.4.5.2 Determinação da configuração absoluta de 17	249
5 CONCLUSÕES	257
REFERÊNCIAS	259

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade e filogenias de Arthropoda e Insecta

Até o fim de 2010, um total de 1.244.360 espécies eucarióticas (terrestres e marinhas) fora catalogado nas bases de dados *Catalogue of Life* e *The World's Register of Marine Species*.¹ Desse total, ao reino animal, o qual é consensualmente dividido em 40 filos², pertencem 953.434 espécies.¹ Em 2013, Zhang relatou que, ao todo, haviam sido descritas 1.659.420 espécies de animais, das quais 133.692 foram identificadas como fósseis.³ Esses números continuam a crescer ano após ano e são relativamente pequenos, se for considerado que as estimativas sugerem que existam cerca de 8,7 milhões de espécies no planeta e que, em média, serão anualmente descobertas 2.164 novas espécies (figura 1, p. 31).^{1,4}

Figura 1 - Principais filos do Reino animal, com as respectivas porcentagens em termos de números de espécies. Os valores foram calculados em relação ao número total de espécies de animais.



Fonte: Elaborado pelo autor. Ref. 3.

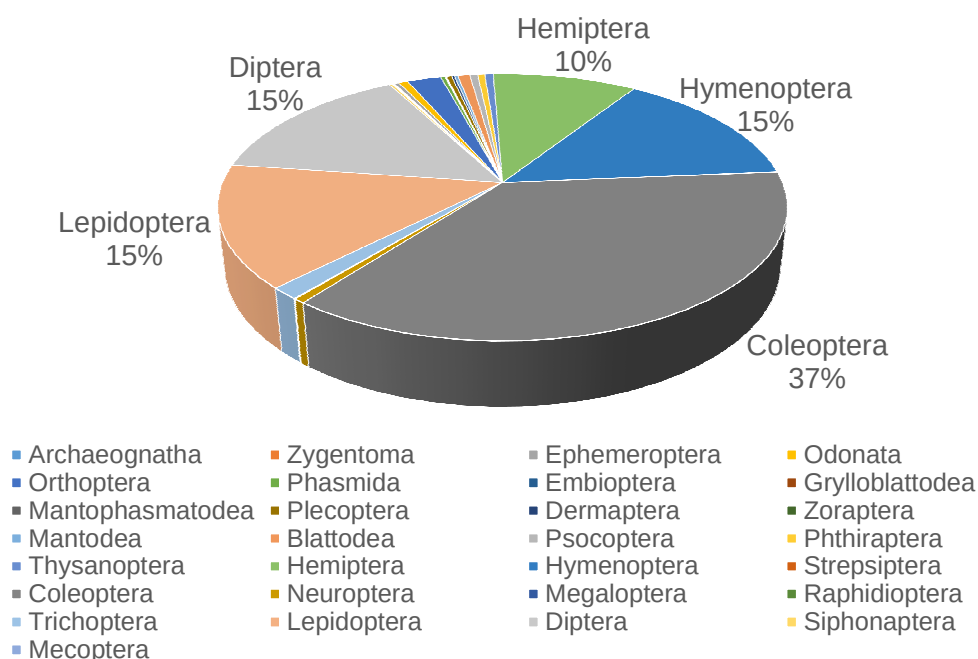
Com cerca de 1,3 milhões de espécies³, o que corresponde a quase 80 % da biodiversidade animal conhecida, os artrópodes, com certeza, podem ser considerados o epítome da imensa variedade de vida, isto é, da biodiversidade, que há na Terra. Esse filo – Arthropoda, o qual é um membro do Clado Ecdysozoa⁵⁻⁸ – divide-se em cinco subfilos: I) Hexapoda, II) Euchelicerata, III) Crustacea, IV) Myriapoda e V) Pycnogonida.⁵⁻⁸

Segundo Zhang (2013)³, sem considerar na contagem as 17.222 espécies de hexápodes descobertas em fósseis, o subfilo Hexapoda, onde estão inseridos os insetos, é composto por 1.063.538 espécies, distribuídas em quatro Classes: 1ª) Collembola (8.163 espécies), 2ª) Protura (816 espécies), 3ª) Diplura (975 espécies) e 4ª) Insecta (1.053.578 espécies).^{3,9,10}

A Classe Insecta representa cerca de 64 % da biodiversidade animal conhecida, sendo, portanto, o maior grupo em número de espécies do planeta.³ Atualmente, a maioria dos entomologistas concorda que esta é compreendida por 29 ordens (figura 2, p. 32).^{3,10-12} Tradicionalmente, reconheciam-se 30 ordens de insetos, porém, novas evidências de estudos filogenéticos moleculares colocaram os insetos da ordem Isoptera dentro de Blattodea.^{10,12,13} Além dessas 29 ordens, registros fósseis mostram que espécies de mais dez ordens, outrora, habitaram o nosso planeta.³

Os números totais de espécies, que incluem as fossilizadas, variam dentro das ordens de 23 a 392.415.³ Os coleópteros (Coleoptera) compõem a ordem de maior número de espécies; e a ordem dos lepidópteros (Lepidoptera), isto é, a das mariposas e borboletas, vem em terceiro lugar em número de espécies, contendo 158.570 espécies, das quais 147 foram identificadas em fósseis.^{3,14} Entretanto, sem contabilizar os fósseis, Lepidoptera ocupa o segundo lugar em número de espécies (figura 2, p. 32).³

Figura 2 - Percentagens de espécies nas ordens da Classe Insecta.



Fonte: Elaborado pelo autor. Ref. 3.

1.2 Lepidópteros (com ênfase em borboletas): biologia e diversidade

Lepidópteros são holometábolos, isto é, são insetos de desenvolvimento completo, apresentando as fases de ovo, larva, pupa ou crisálida e adulto.¹⁴ As espécies com hábitos noturnos são chamadas de mariposas, e aquelas com hábitos diurnos e vespertinos são chamadas de borboletas.^{14,15}

As lagartas – como esses fitófagos são denominados quando estão na fase larval – são mastigadoras, enquanto os adultos possuem um aparelho bucal do tipo espirotromba e são sugadores.¹⁴ Durante o período de crescimento da lagarta, esta troca de pele algumas vezes, isto é, sofre *ecdise*, e a cada período entre as mudas chama-se *instar* ou estágio.¹¹ No último estágio, a lagarta deixa de se alimentar e sofre a última muda, da qual surge a pupa, envolta pelo casulo ou crisálida. Após um certo período, completa-se a metamorfose e emerge o adulto, um animal com asas e pronto para a reprodução.^{11,14}

Embora algumas espécies, por exemplo, *Anticarsia gemmatilis* (lagarta-da-soja), *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) e *Helicoverpa zea* (lagarta-da-espiga do milho), tenham péssimas reputações e sejam consideradas insetos-praga, os lepidópteros são de grande importância para o equilíbrio do ecossistema, uma vez que são considerados os mais eficientes polinizadores depois das abelhas e desempenham funções vitais na cadeia alimentar (trófica).^{11,14}

As espécies pertencentes à Lepidoptera são predominantemente herbívoras.¹⁵ Pela diversidade de hospedeiros, os insetos podem ser categorizados em monófagos, oligófagos e polífagos.¹⁶ No seu sentido estrito, monófagos são insetos que se alimentam de apenas uma espécie vegetal (especialistas extremos), mas esse termo também tem sido estendido aos que se alimentam de plantas de um único gênero. Oligófagos, por sua vez, referem-se a insetos que se alimentam de diversas plantas de diferentes gêneros da mesma família, ou de poucas espécies de diferentes famílias. Finalmente, insetos polífagos são aqueles que se alimentam de um grande número de espécies vegetais de diferentes famílias.¹⁶

Segundo Bernays & Chapman (1994) cerca de 80 % dos insetos das cinco maiores ordens (figura 2, p. 32), incluindo Lepidoptera, são monófagos ou oligófagos.¹⁶ As íntimas associações existentes entre lagartas de lepidópteros com determinadas espécies vegetais tornam esses animais extremamente sensíveis às alterações

ambientais. Portanto, esses organismos são considerados excelentes indicadores da qualidade do ambiente e integridade de paisagens naturais.¹¹

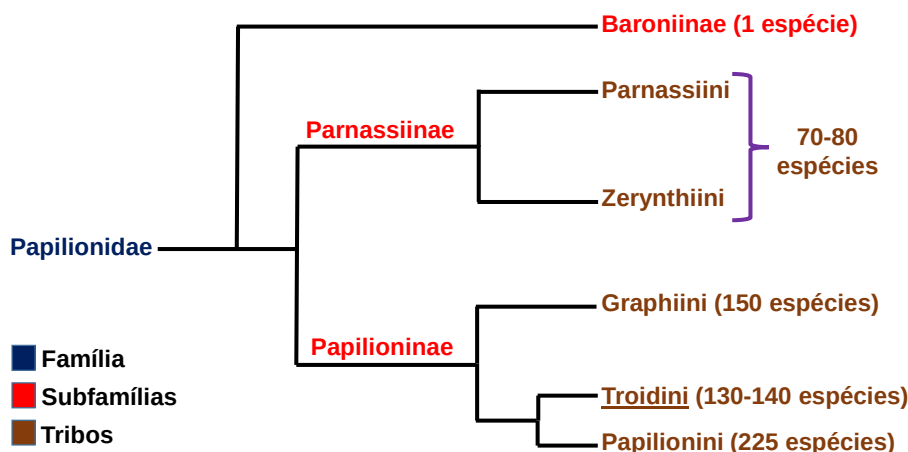
No sistema de classificação de Kristensen^{17,18}, as quase 160.000 espécies de Lepidoptera estão organizadas em 47 superfamílias, 124 famílias e 332 subfamílias. De acordo com Kawahara & Breinholt (2014)¹⁵, as borboletas compõem a superfamília monofilética Papilionoidea, a qual é constituída pelas famílias Papilionidae, Hedyliidae, HesperIIDae, Lycaenidae e Nymphalidae.¹⁵

As estimativas do número total de espécies de borboletas variam de 7.700 a 20.000.¹⁹ Em 1964, Erhlich e Raven estimaram que existiria de 12.000 a 15.000 espécies²⁰, enquanto que Shields, em 1989, sugeriu que deveria haver algo em torno de 17.280 espécies.¹⁹ Segundo a *Encyclopedia of insects*²¹, estima-se que, no mundo, existam de 15.000 a 20.000 espécies de borboletas. Só no Brasil, mais de 3.500 espécies já foram descritas, das quais cerca de 1.000 espécies ocorrem no Cerrado.²²

1.3 Família Papilionidae e *Battus polydamas*

Papilionidae (*Swallowtail butterflies*) possui distribuição cosmopolita, compreende entre 573 a 700 espécies e está dividida em três subfamílias: Papilioninae, Baroniinae e Parnassinae (figura 3, p. 34). Papilioninae é a mais numerosa, com cerca de 490 espécies, distribuídas dentro de três tribos: Troidini, Papilionini e Graphiini.^{23,24} Segundo Mare & Corseuil, cerca de 73 dessas espécies, de nove gêneros, ocorrem no Brasil.²⁵

Figura 3 - Filogenia da família Papilionidae.

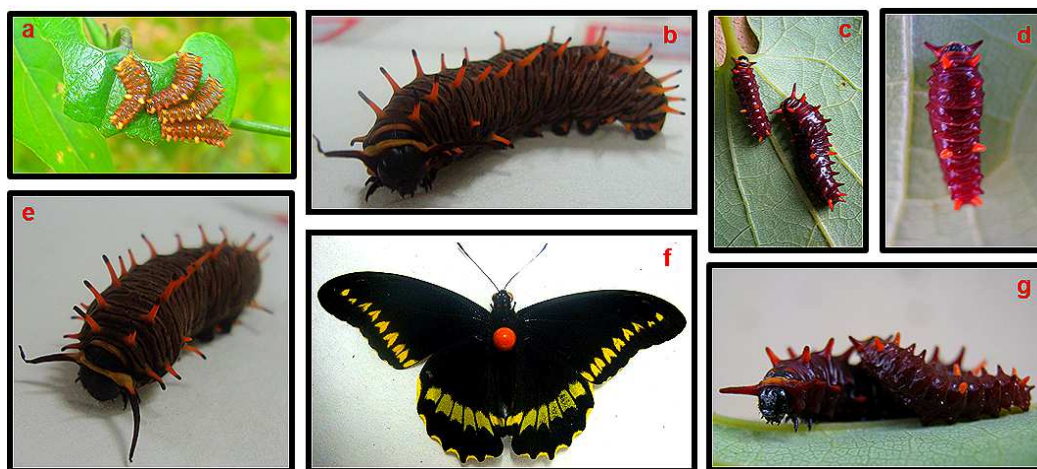


Fonte: Elaborado pelo autor. Refs. 23-29.

A tribo Troidini é predominantemente tropical, ocorrendo nas Américas Central e Sul e na região Indo-australiana.^{24,26} Dos doze gêneros reconhecidos, somente três deles ocorrem no Brasil: *Battus* (cinco espécies), *Euryades* (duas espécies) e *Parides* (22 espécies).³⁰ As lagartas das espécies neotropicais, que inclui *Battus polydamas* (Linnaeus, 1758), são especialistas e alimentam-se exclusivamente* de plantas da família Aristolochiaceae, as quais são reconhecidas por apresentarem toxicidade incomum para insetos em geral.³¹⁻³³

B. polydamas (Gold Rim ou *Polydamas Swallowtail*) é um inseto muito comum, que é frequentemente encontrado nas bordas das matas e em áreas urbanas, mas raramente no interior sombreado de florestas primárias úmidas.^{14,29,34,35} Com 13-21 subespécies^{29,36}, das quais uma se encontra extinta, esse fitófago distribui-se desde a Flórida e México até o Chile.^{34,35} *B. polydamas polydamas* (Linnaeus, 1758) é a subespécie que povoa a sub-região tropical da América do Sul (figura 4, p. 35).^{14,29,36-38}

Figura 4 – *B. polydamas polydamas*: **a)** lagarta de 2º instar, **b e e)** lagartas de 5º instar, **c)** lagartas de 2º e 3º instars, **d e g)** lagartas de 3º instar e **f)** inseto adulto.



Fonte: Fotografias tiradas pelo autor.

Segundo Brown *et al.* (1981)³⁹, as lagartas de *B. polydamas polydamas* passam por cinco instars. Como todos os papilionídeos, quando são perturbadas, as lagartas expõem uma glândula de cor alaranjada em forma de “Y”, chamada osmetério.¹⁴ Indubitavelmente, essa espécie é uma das Troidini mais bem estudada biologicamente, ecológica e quimicamente.^{24,31,32,39-43} As lagartas de *B. polydamas* desenvolvem-se muito bem em várias das espécies brasileiras de *Aristolochia* (Aristolochiaceae), por exemplo, em *A. elegans*, *A. esperanzae*, *A. melastoma*, *A. arcuata*, *A. galeata*, *A. triangularis* e *A. giberti*.^{14,24,31,32,39-40,43}

*Essa afirmação é válida apenas para as espécies neotropicais. Para mais detalhes acerca da preferência alimentar dos insetos da família Papilionidae, recomenda-se a leitura da referência 20, Ehrlich & Raven (1964).

1.4 Aristolochiaceae

1.4.1 Aspectos botânicos

Aristolochiaceae, considerada membro de Piperales⁴⁴⁻⁴⁶, compreende um grupo de plantas floríferas, com distribuição predominante nas regiões tropicais e subtropicais do planeta.^{47,48} Essa família é usualmente dividida em duas subfamílias: i) Aristolochioideae, constituída pelos gêneros *Aristolochia* sensu lato (s.l) e *Thottea*, e ii) Asaroideae, constituída pelos gêneros *Asarum* e *Saruma*.⁴⁹⁻⁵⁵

O gênero *Aristolochia* s.l. é o mais numeroso da família Aristolochiaceae, compreendendo cerca de 500 espécies (ervas, arbustos ou subarbustos e trepadeiras volúveis).^{56,57} Da flora brasileira foram catalogadas, como *Aristolochia*, cerca de 100 espécies, incluindo a descrição de *A. giberti* (figura 5, p. 36). Essa espécie, robusta e glabra, é conhecida popularmente como “patito” e “ipemi”, ocorrendo no Brasil, Argentina e Paraguai.^{58,59}

Figura 5 - *A. giberti* (folha e flor em destaque).



Fonte: Fotografias tiradas pelo autor.

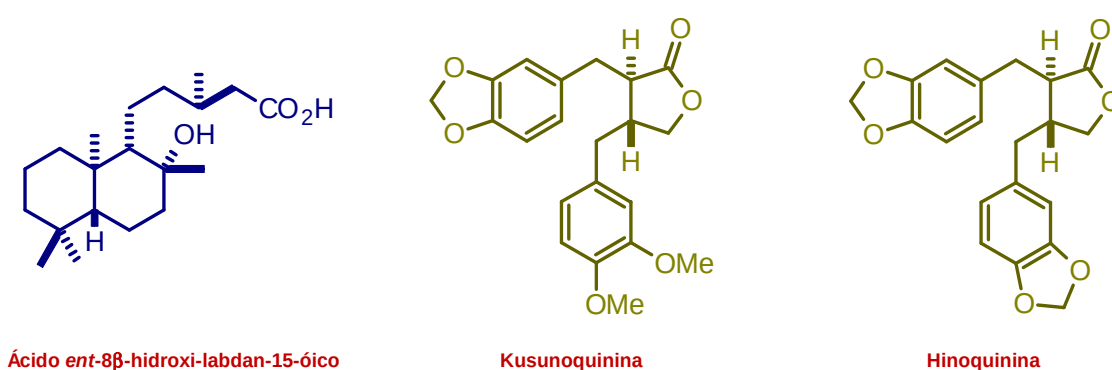
1.4.2 Aspectos metabólicos

A química de Aristolochiaceae tem sido amplamente estudada, e textos de revisão estão disponíveis na literatura.^{49,60-63} Os dados contidos nesses trabalhos fornecem, sobretudo, uma visão abrangente acerca da química das espécies pertencentes aos gêneros *Aristolochia* e *Asarum*. No gênero *Aristolochia* estão descritas diversas classes de metabólitos secundários (especiais), ocorrendo com maior frequência os lignoides, terpenoides, alcaloides, alcalmidas e flavonoides.^{49,60-63}

Os perfis químicos das espécies brasileiras de Aristolochiaceae diferem-se significativamente.⁶⁵ Embora, alantóina, ácidos aristolóquicos e lignanas furofurânicas e butirolactônicas ocorram em muitas espécies, estas também contêm classes de compostos específicas, tais como: bicubebinas em *A. lagesiana* e *A. pubescens*, lignanas ariltetralônicas em *Holostylis reniformis*, diterpenos caurânicos em *A. elegans*, diterpenos labdânicos e clerodânicos em *A. esperanzae*, neolignanas benzofurânicas e ácidos aristolóquicos esterificados com diterpenos caurânicos em *A. pubescens*, sesquiterpenos aristolânicos, alcalóides dibenzoquinolizidínicos e tetraidroisoquinolínico em *A. arcuata*, alcalóides benzilberberínicos em *A. gigantea*, alcalamidas em *A. gehrtii* e bi- e tetraflavonóides em *A. ridicula*.⁶⁵

Anteriormente, dos extratos hexânico de caules e etanólico de folhas de *A. giberti* foram isoladas catorze substâncias, dentre as quais, um triterpeno tetracíclico, (–)-onocera-8,8'-diol, o diterpeno ácido *ent*-8 β -hidroxi-labdan-15-óico e as lignanas dibenzilbutirolactônicas kusunoquinina e hinoquinina.⁶⁰ O ácido 8 β -hidroxi-labdan-15-óico é o principal constituinte das folhas, representando, ao todo, cerca de 17% em massa dos extratos etanólico e etanólico Sohlex.⁶⁰ Os diterpenos ácido copálico e ácido eperúico, e as lignanas kusunoquinina e hinoquinina também são substâncias abundantes nas folhas (figura 6, p. 37).

Figura 6 - Três dos principais constituintes de folhas de *A. giberti* Hook.⁵⁹



Das análises dos óleos essenciais de três amostras: uma brasileira, uma paraguaia e uma argentina, um total de 68 compostos foram identificados nas folhas e caules de *A. giberti*.^{59,64,65} Em 2009, Marchesini *et al.* demonstraram, por CG-EM e quimiometria, que havia grande similaridade entre as espécies cultivadas no Brasil e na Argentina.⁵⁹

Estudo anterior relatou que o extrato metanólico das folhas de *A. giberti* (coletadas no Paraguai) apresentou atividade antioxidante, uma vez que este protegeu membranas microssomais de ratos das peroxidações enzimática e não enzimática de lipídeos.⁶⁶ É conhecido também que extratos aquosos de folhas e etanólicos de raiz de *A. giberti* (coletadas na Argentina) exibem atividade pró-coagulante.⁶⁷

1.4.3 Substâncias bioativas: Atividades inseticida e “antialimentar”

Segundo Jaques (1987), o termo inseticida é empregado para designar qualquer material utilizado para matar insetos, independentemente deste ser aplicado ou ocorrer naturalmente.⁶⁸ A definição do *Glossary of terms relating to pesticides* da IUPAC é bem mais abrangente, definindo inseticidas como sendo pesticidas utilizados para o controle de insetos.⁶⁹ Dentro desse grupo, estão inclusos agentes químicos, naturais e sintéticos, bem como agentes de origem biológica.⁷⁰ De acordo com Randell (1977), o controle de insetos envolve tudo que suprime uma população de insetos ou previne o seu crescimento a níveis danosos, o que vai muito além da visão simplista de uma mera aplicação de substâncias químicas numa tentativa de eliminar uma determinada população de insetos.⁷¹

Algumas vezes, o termo inseticida tem sido indiscriminadamente empregado na literatura, sendo utilizado para substâncias que apresentam toxicidade direta e para aquelas que promovem o controle de forma indireta. Para alguns autores, entretanto, substâncias que não provocam a morte diretamente não são rigorosamente inseticidas.⁷³⁻⁷⁵ Jacobson (1989), por exemplo, classificou os constituintes químicos de plantas fisiologicamente ativos para insetos em seis categorias: i) atraentes, ii) repelentes, iii) letais, iv) esterilizantes, v) inibidores ou aceleradores de crescimento e vi) deterrentes. Na literatura, existem também exemplos de substâncias com mais de um tipo de atividade biológica comprovada, por exemplo, de toxicidade direta e repelente, as quais atuam de maneira sinérgica no controle de insetos-praga.^{76,77}

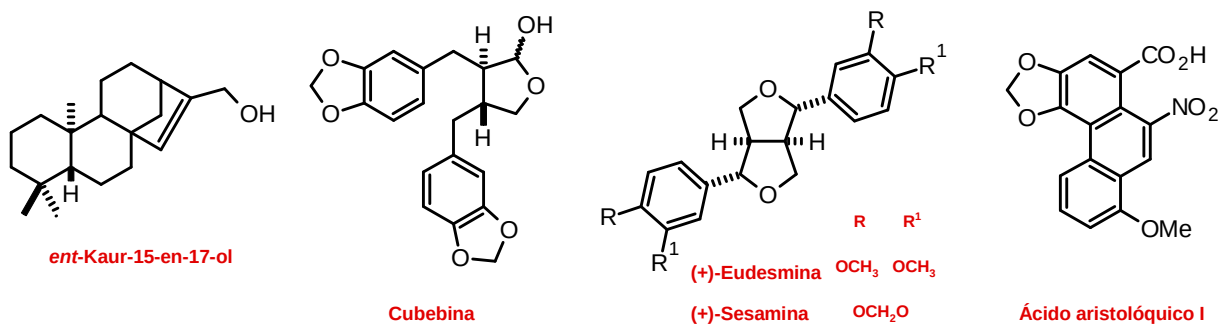
No processo de alimentação dos insetos estão envolvidas várias etapas comportamentais, que vão desde o reconhecimento e orientação do inseto até finalização da alimentação propriamente dita.⁷³ Segundo Munakata (1975), entre esses eventos inicial e final estão inclusas as seguintes etapas: i) início da alimentação e ii) manutenção da alimentação, sendo a busca de substâncias antialimentares focada nessas etapas.⁷³

De acordo com Spurr & McGregor (2003), os termos antialimentar, repelente, inibidor, deterrente e supressor possuem significados distintos.⁷⁷ Um repelente age antes que o artrópode tenha contato com a fonte de alimentação, enquanto um supressor impede que a alimentação ocorra após o contato com a fonte alimentar.⁷⁷ Deterrentes, por outro lado, agem impedindo a continuação da alimentação depois de iniciada.⁷⁷ Já os termos mais genéricos inibidores e antialimentares são, geralmente, empregados quando não se conhece o mecanismo de ação.⁷⁷

O emprego de substâncias inseticidas de origem natural para o controle de insetos, particularmente o emprego de micromoléculas secundárias isoladas de plantas, tem sido comumente reconhecido como uma alternativa atraente e ambientalmente correta à utilização de inseticidas sintéticos.⁷⁸ Dentro desse contexto, destaca-se que estudos biológicos efetuados com constituintes isolados de espécies da família Aristolochiaceae, sobretudo do gênero *Aristolochia*, têm resultado na descoberta de substâncias com atividades bastante promissoras para o controle de insetos, as quais apresentam potencial para serem utilizadas na agricultura.^{49,79,80} Essas substâncias pertencem a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, a dos lignoides, dos terpenos, dos alcaloides, dos derivados nitrados, entre outras.^{49,79,80}

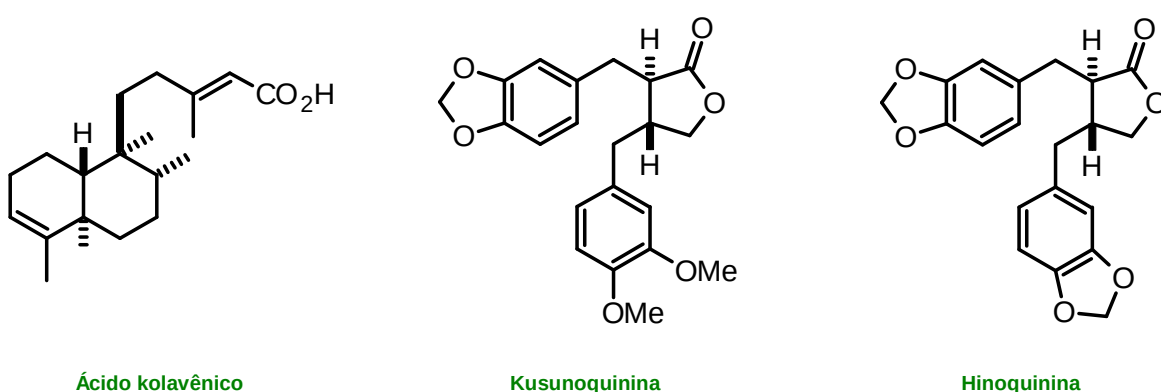
Em 2003, Nascimento *et al.* testaram cinco substâncias isoladas de *Aristolochia pubescens* (figura 7, p. 39) em bioensaios com lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. Nesse estudo, a lignana dibenzilbutirolactólica (–)-cubebina não apresentou atividade, mas os demais metabólitos foram ativos e reduziram a viabilidade larval.⁷⁹ Além disto, o diterpeno *ent*-kaur-15-en-17-ol e o ácido aristolóquico I prolongaram o período larval, resultando na má formação de insetos adultos.⁷⁹

Figura 7 - Constituintes químicos de *A. pubescens* testados para *A. gemmatalis*.⁷⁹



Messiano *et al.* (2008) avaliaram a atividade inseticida de extratos orgânicos de *Aristolochia malmeana*, bem como a atividade de substâncias isoladas desta planta, em bioensaios com lagartas-da-soja.⁸⁰ Dentre as substâncias obtidas, testaram-se três por aplicação tópica: i) ácido kolavênico, ii) hinoquinina e iii) kusunoquinina (figura 8, p. 40). Somente a lignana dibenzilbutirolactônica kusunoquinina exibiu atividade inseticida (DL_{50} = 230,1 μ g/ μ L) dose-dependente.⁸⁰

Figura 8 - Constituintes químicos de *A. malmeana* testados para *A. gemmatalis*.

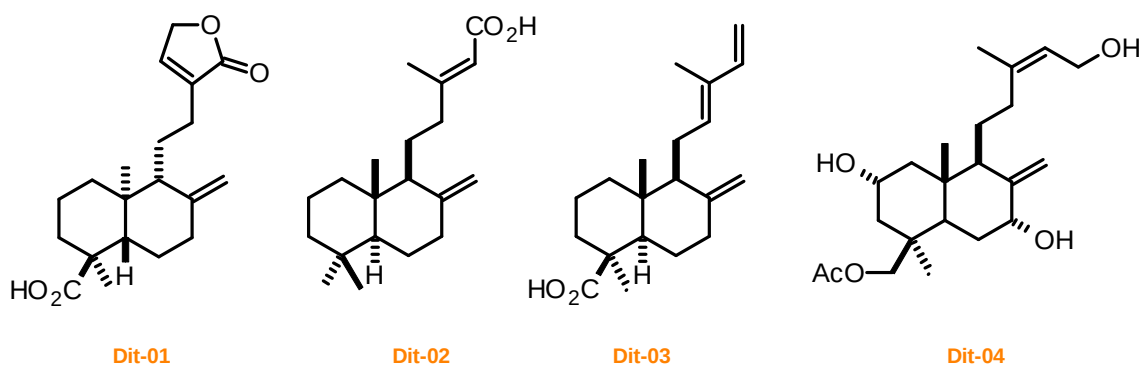


Apesar da cubebina e da hinoquinina terem sido inativas em bioensaios com *A. gemmatalis*, estas apresentaram atividade antialimentar em bioensaios com três coleópteros: i) *Sitophilus granarius* L. (Curculionidae), ii) *Tribolium confusum* Duv. (Tenebrionidae) e iii) *Trogoderma granarium* Ev. (Dermestridae).⁸¹ Nesses bioensaios foram testadas diversas lignanas.⁸¹ Correlacionando-se estrutura e atividade biológica, Harmatha & Nawrot (2002) verificaram que as lignanas menos polares que continham grupos metoxílicos e metilenodioxílicos como substituintes nos anéis aromáticos eram mais ativas e que a presença de substituintes mais polares, em especial grupos hidroxílicos e glicosídicos, acarretava na diminuição da atividade antialimentar.⁸¹

Uma outra classe de metabólitos secundários bastante comum em *Aristolochiaceae* é a dos diterpenos.⁴⁹ Nessa família ocorrem principalmente diterpenos labdânicos, clerodânicos e kaurânicos.⁴⁹ Diterpenos clerodânicos são conhecidos pelas potentes propriedades antialimentares para insetos.⁸² No artigo de revisão publicado por Gebbinck, Jansen e Groot (2002), por exemplo, foram compilados os resultados de testes de atividade antialimentar de 384 clerodanos, naturais e semi-sintéticos, e de compostos relacionados.⁸²

Relatos prévios na literatura evidenciam que diterpenos labdânicos exercem efeitos fisiológicos sobre insetos de diferentes ordens.⁸³ O diterpeno ácido 8(20),13-*ent*-labdadien-16,15-olídeo-19-óico (**Dit-1**), por exemplo, exibiu atividade antialimentar em bioensaios com o besouro *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) em teste de não-escolha⁸⁴, enquanto os ácidos anticopálico (**Dit-2**) e *trans*-commúnico (**Dit-3**) apresentaram atividade antialimentar em bioensaios com as mariposas *S. litura* e *S. frugiperda*, respectivamente.^{83,85} Fracionamento bioguiado para atividade inseticida de extratos da planta *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) resultou na obtenção de uma fração contendo sete diterpenos labdânicos.⁸⁶ Quando o labdano 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidro-xilabda-8(17),(13*Z*)-dieno (**Dit-4**) foi incorporado em uma dieta artificial e oferecido a lagartas de *Ostrinia nubilales* (Pyralidae), este mostrou uma atividade inibidora de crescimento significativa (figura 9, p. 41).⁸⁶

Figura 9 - Diterpenos labdânicos com atividade antialimentar ou inseticida.⁸³⁻⁸⁶



Atualmente, diversas abordagens racionais têm sido inseridas nas pesquisas científicas visando uma busca eficiente por substâncias bioativas.⁸⁷⁻⁹³ Dentre essas, a bioprospecção químico-ecológica merece ser destacada, porquanto esta tem se mostrado como sendo uma ferramenta poderosa na descoberta de novos candidatos a protótipos de interesse para a indústria farmacêutica, para a agricultura, para a navegação, entre outras.⁸⁷⁻⁹³

1.5 Ecologia química

A ciência que se dedica ao entendimento da função, da origem e da significância de substâncias químicas mediadoras de interações ecológicas intra- e interespecíficas (entre organismos do mesmo ou de diferentes níveis tróficos), bem como de in-

terações entre organismos e seus ambientes bióticos e abióticos, é chamada de Ecologia Química.⁹⁵⁻⁹⁷

Os estudos químico-ecológicos são tipicamente interdisciplinares e preocupam-se em entender: i) a comunicação química entre animais, e também entre plantas, ii) as interações mutualísticas entre organismos, por exemplo, o processo da polinização, iii) os mecanismos químicos de defesa e de proteção, por exemplo, os de defesa química de insetos contra predadores, patógenos e parasitóides, iv) os mecanismos de proteção contra estresses abióticos, por exemplo, contra danos causados, em plantas, por radiação solar, entre outras interações.⁹⁵⁻⁹⁷

1.6 Ecologia das interações entre insetos e plantas: significância dos metabólitos secundários contra a herbivoria e metabolização e sequestro de micromoléculas por insetos

Sem dúvida, as interações mais bem estudadas pela Ecologia Química são as que ocorrem entre plantas e animais, em particular, as interações entre plantas e insetos, que incluem a polinização de plantas com flores, a insetivoria e a herbivoria.^{97,98} Quando se observa os insetos fitófagos, verifica-se que a herbivoria não ocorre de forma randômica, pelo contrário, é frequentemente um processo sutil, o qual é limitado por diversos fatores, tais como, clima, predação e parasitismo, e pelas morfologias e composições químicas das plantas.⁹⁷

A significância das micromoléculas secundárias como barreiras químicas à herbivoria é tradicionalmente reconhecida.⁹⁷⁻¹⁰⁴ Inclusive, a função de defesa contra herbívoros em geral, *a priori*, foi considerada “a razão de ser” dessas substâncias⁹⁷⁻⁹⁹. Apenas para exemplificar, citam-se, aqui, dois exemplos clássicos do valor dos metabólitos secundários para as plantas: i) certas plantas respondem aos ataques por herbívoros com a síntese de substâncias deterrentes, as quais, em poucos dias, as tornam impalatáveis para a maioria dos insetos¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ e ii) certas plantas infestadas por insetos fitófagos emitem voláteis que provocam a produção dos metabólitos de defesa em espécimes próximos, preparando-os para o ataque iminente.¹⁰⁶

Naturalmente, em resposta às barreiras químicas impostas pelas plantas, os insetos fitófagos possuem uma diversidade de estratégias próprias para superá-las.⁹⁵⁻¹¹¹ Alguns insetos alimentam-se apenas das partes da planta que contêm quantidades baixas de metabólitos secundários, enquanto outros possuem intestinos impermeáveis a determinados aleloquímicos, o que facilita a excreção das “toxinas”. Há também

exemplos de insetos fitófagos que as toleram, muitas das vezes, acumulando-as em seus tecidos, na forma nativa ou modificada, para benefício próprio, por exemplo, para a proteção contra inimigos naturais. Outra forma (natural) desses organismos de lidar com as barreiras químicas impostas pelos vegetais é metabolizar seus constituintes, por meio de uma variedade de vias metabólicas ou com a ajuda de microorganismos endossimbióticos.⁹⁵⁻¹¹¹

Todo inseto, em seu genoma, carrega uma centena ou mais de genes que expressam proteínas (com atividade catalítica) da superfamília P450.^{108,111} No inseto, essas enzimas desempenham uma série de funções, por exemplo, biossíntese de hormônios juvenis, metabolização de inseticidas, geralmente, detoxificando-os, entre outras.¹⁰⁸ Muitas dessas enzimas são especificamente produzidas pelos insetos fitófagos para a metabolização de determinados constituintes de origem vegetal.^{108,111} Dessa maneira, o proteoma que um determinado inseto fitófago possui, de certa forma, determina quais espécies vegetais são hospedeiros em potencial.^{108,111}

1.7.1 Biotransformação/bioconversão

Uma biotransformação é uma modificação específica na estrutura de uma substância, realizada por uma enzima pura ou por tecidos ou células de organismos mortos contendo enzimas, para produzir um produto que tenha de razoável a alta similaridade estrutural com o substrato.^{110,112-114} Quando a modificação estrutural envolve a utilização de organismos vivos, o termo mais adequado é bioconversão.¹¹⁰ Pela natureza do processo, a bioconversão normalmente resulta em um número maior de modificações químicas, inclusive sequenciais.¹¹⁰ Embora existam essas diferenças conceituais entre biotransformação e bioconversão, o emprego desses termos são intercambiáveis na literatura.¹¹⁰ Esses dois processos diferem-se da fermentação, onde, geralmente, não há qualquer similaridade estrutural entre o reagente e o produto obtido, uma vez que ocorrem transformações mais complexas.¹¹⁰⁻¹¹⁴

Biotransformação e bioconversão são métodos práticos, seletivos e eficientes para a produção de substâncias bioativas inéditas, desempenhando, portanto, papéis importantes na descoberta de protótipos de novos fármacos e medicamentos.^{115,116} Essas abordagens têm sido especialmente introduzidas para resolver problemas em síntese orgânica e na resolução de misturas enantioméricas, mas também têm sido

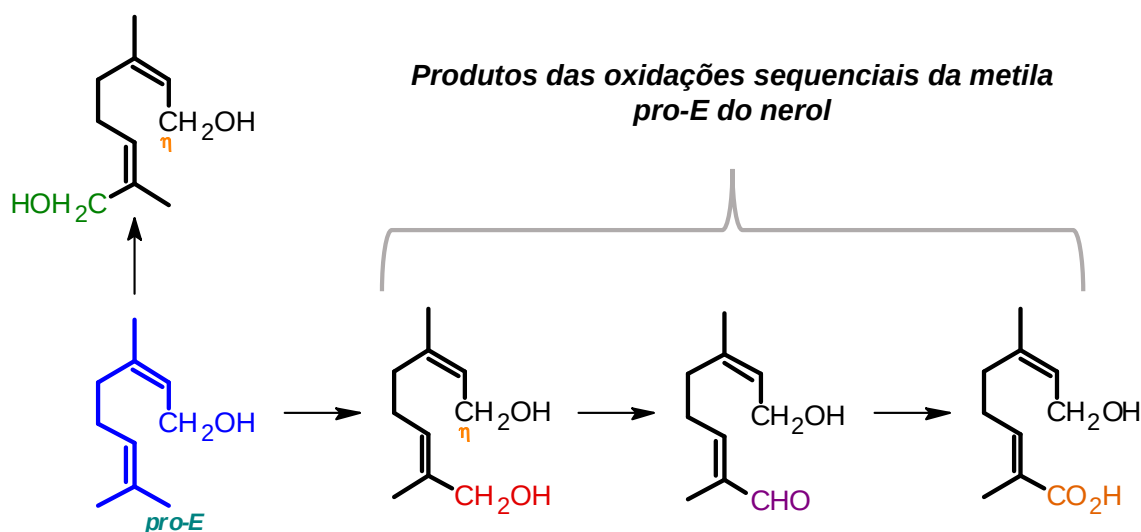
extensivamente utilizadas para a modificação estrutural de metabólitos secundários, inclusive daqueles com atividades biológicas reconhecidas e comprovadas.¹¹⁵⁻¹¹⁸

1.7.1 Biotransformação por insetos

Insetos, bem como suas enzimas clonadas, têm sido extensivamente utilizados para a modificação estrutural de metabólitos secundários, inclusive para a biotransformação de terpenos e lignoides.^{114,117} Em 2010, Noma & Asakawa catalogaram os dados disponíveis sobre a biotransformação de monoterpenos por microorganismos, mamíferos e insetos.¹¹⁷ Especificamente por insetos, foram descritos relatos acerca da metabolização de 33 substâncias pela mariposa *S. litura* (Lepidoptera).¹¹⁷ Essas metabolizações abrangeram vários tipos de modificações estruturais, incluindo epoxidações e dihidroxilações de ligações duplas carbono-carbono, hidroxilações alílicas, reduções de grupos carbonílicos e oxidações sequenciais de grupos metílicos.¹¹⁷

Os monoterpenos nerol, (+)-mentol e (-)-mentona são exemplos de substâncias sobre as quais há relatos de estudos de biotransformação por *S. litura*.¹¹⁷ Takeuchi & Miyazana, em 2004, relataram que a metabolização do nerol, um álcool alílico, produziu dois dióis diastereoisoméricos, *E,Z* e *Z,Z*, e um aldeído e um ácido carboxílico η -hidroxilados. Os autores observaram que a metila terminal *pro-Z* foi apenas monohidroxilada pelo inseto, enquanto a *pro-E* foi sequencialmente oxidada rendendo três produtos (figura 10, p. 44).^{117,118}

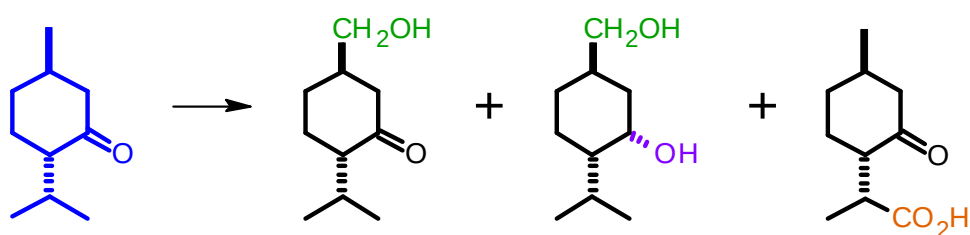
Figura 10 - Biotransformação de nerol por lagartas de *S. litura*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Refs. 121 e 123.

Segundo dados disponibilizados na literatura, ambos os enantiômeros do mentol são indiscriminadamente metabolizados pelas lagartas de *S. litura*.¹¹⁷ Na metabolização propriamente dita, esses monoterpenos são monohidroxilados na posição 10, isto é, no grupo metílico diretamente ligado ao anel ciclohexânico.¹¹⁷ Em comparação, a via metabólica da (-)-mentona, uma substância análoga do mentol que apresenta um esqueleto carbônico 1-oxo-2-isopropil-5-metil-ciclohexânico, é um pouco mais complexa, e três produtos oxidados são excretados pelas lagartas de *S. litura* (figura 11, p. 45).¹¹⁷

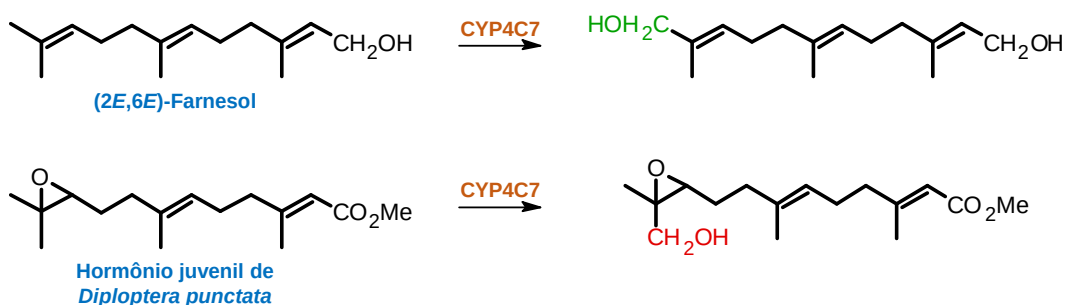
Figura 11 - Biotransformação da (-)-mentona por lagartas de *S. litura*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Ref. 121.

Em 1998, Sutherland *et al.* investigaram a metabolização do (2*E*,6*E*)-farnesol pela proteína CYP4C7.^{119,120} Essa enzima é expressa na glândula endócrina (*corpora allata*) do inseto *Diploptera punctata* (Blattodea), conhecido popularmente como barata-besouro-do-Pacífico. A proteína CYP4C7 foi produzida em *Escherichia coli*, isolada e, então, utilizada para o estudo de biotransformação. Nesse estudo, o sesquiterpeno (2*E*,6*E*)-farnesol foi regio- e diastereoseletivamente hidroxilado na metila terminal *pro*-*E*.^{119,120} De modo similar, a proteína CYP4C7 hidroxilou uma das metilas do hormônio juvenil produzido pelo inseto. Com base nesses resultados, Sutherland *et al.* deduziram que, no fim do ciclo gonotrófico de *Diploptera punctata*, essa via metabólica é ativada para suprimir a biossíntese do hormônio juvenil (figura 12, p. 45).^{119,120}

Figura 12 - Biotransformação pela proteína CYP4C7.

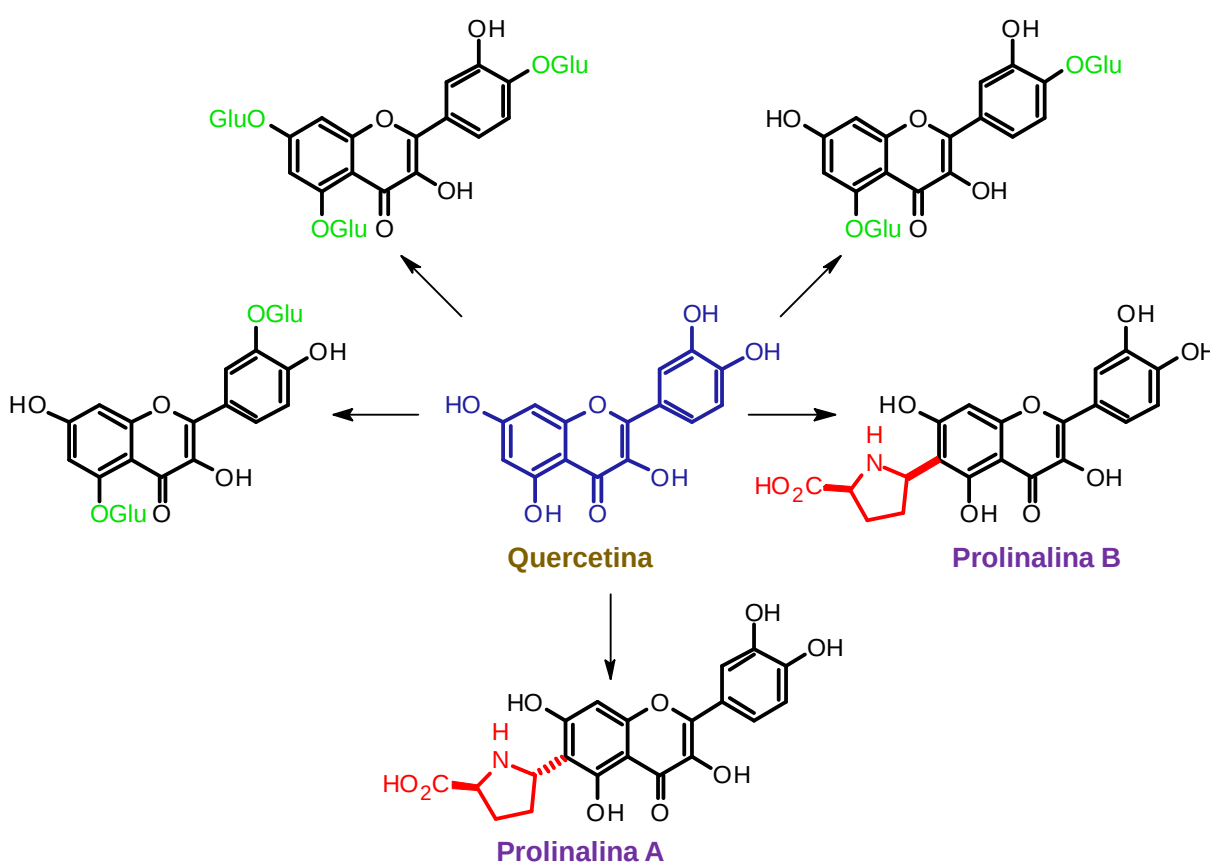


Fonte: Elaborado pelo autor. Ref. 119 e 120.

O metabolismo de flavonoides por lepidópteros da família Bombycidae tem sido largamente estudado.¹²¹⁻¹²⁵ Dos extratos do casulo da espécie *Bombyx mori* (lagarta-da-seda), foram relatadas as ocorrências de 17 flavonoides, dos quais 6 foram, então, descritos pela primeira vez na literatura e 14 não ocorrem naturalmente na planta hospedeira do inseto, *Morus alba* (Moraceae).¹²¹⁻¹²⁵ Dentre essas substâncias flavonóidicas, estão as prolinalinas A e B, dois derivados da quercetina (figura 13, p. 46).

123

Figura 13 - Biotransformação de flavonoides por *B. mori*.

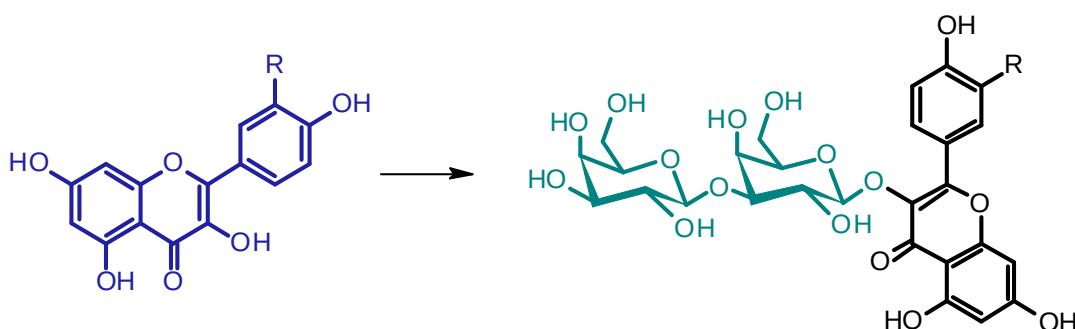


Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 121-125.

Recentemente, Hirayama *et al.* (2013) relataram as ocorrências de quatro flavonoides glicosilados no casulo da espécie *Rondotia menciana*, um inseto da mesma família de *B. mori*, além das ocorrências das agliconas quercetina e kaempferol.¹²⁵ Nesse estudo, foram isolados dois digalactosídeos, os quais não são biossintetizados pela planta (*Morus alba*) utilizada para a alimentação das lagartas. Com base nisso, Hirayama *et al.* (2013) sugeriram que esses produtos naturais seriam metabólitos

da biotransformação dos flavonoides conhecidos quercetina e kaempferol, duas substâncias abundantemente presentes na planta hospedeira desse inseto fitófago (figura 14, p. 47).¹²⁵

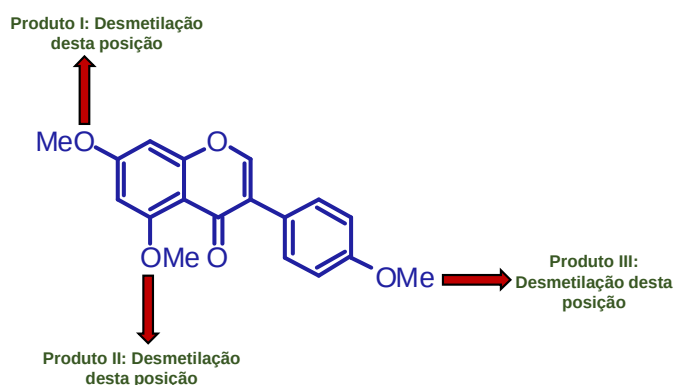
Figura 14 - Biotransformação de flavonoides por *R. mencia*. R=H ou OH.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 125.

A metabolização de isoflavonas por *S. litura* foi investigada, em 2006, por Takahashi *et al.*¹²⁶ Nesse estudo, três isoflavonas metoxiladas, 5,7,4'-trimetoxiisoflavona, 6,7,4'-trimetoxiisoflavona e 7,4'-trimetoxiisoflavona, foram incorporadas na dieta artificial de cem lagartas de *S. litura*, de 4º e 5º instars.¹²⁶ Dessas substâncias, somente a isoflavona trimetoxilada nos C-5, C-7 e C-4' foi biotransformada pelas lagartas da mariposa, sendo obtidos três produtos de monodesmetilação.¹²⁶ Segundo os autores, isso mostra que *S. litura* apresenta especificidade a substrato (figura 15, p. 47).¹²⁶

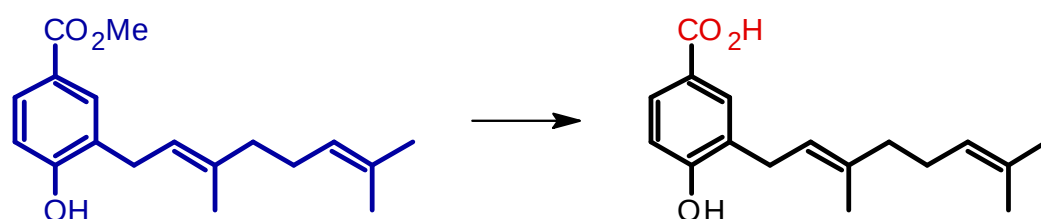
Figura 15 - Biotransformação de isoflavonas por *S. litura*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 126.

Embora relatos de estudos de biotransformação de micromoléculas do metabolismo especializado de plantas por lepidópteros e coleópteros sejam escassos¹²⁷, os resultados disponibilizados na literatura apontam que, em geral, os insetos convertem essas substâncias para derivados mais polares, os quais são normalmente menos tóxicos para a maioria dos insetos.¹²⁷ O besouro *Naupactus bipes* (Coleoptera), por exemplo, hidrolisa o principal constituinte das folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae), o 3-geranil-4-hidroxibenzoato de metila (figura 16, p. 48), excretando o respectivo derivado de ácido benzóico.¹²⁸

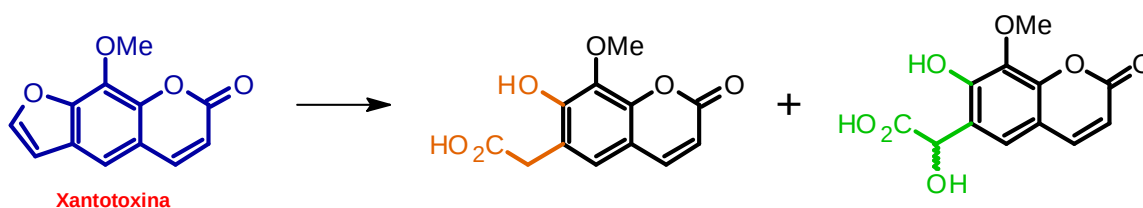
Figura 16 - Biotransformação do 3-geranil-4-hidroxibenzoato de metila por *N. bipes*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 128.

As espécies *Papilio polyxenes* (Lepidoptera) e *S. frugiperda* (Lepidoptera) podem metabolizar o psoraleno xantotoxina, uma substância que, na presença de luz, facilmente alquila o DNA, convertendo-o, mediante a abertura do anel furânico, em dois ácidos carboxílicos mais polares (figura 17, p. 48).¹²⁹ Isso foi confirmado por estudos de marcação isotópica com ¹⁴C, os quais também demonstraram que os metabólitos eram formados por vias bioquímicas diferentes e independentes.¹²⁹

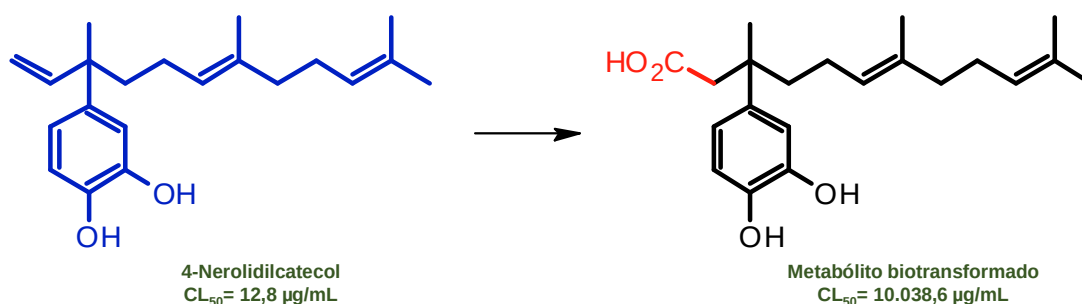
Figura 17 - Biotransformação do psoraleno xantotoxina por *P. polyxenes* e *S. frugiperda*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 129.

Lagartas da espécie *Heraclides brasiliensis* (Lepidoptera), alimentadas com folhas de *Piper umbellata* (Piperaceae), eliminam nas fezes o ácido *E*-2,3-dihidro-3-(3,4-dihidroxifenil)farnesóico, uma substância mais polar que não faz parte do metabóloma da planta hospedeira.¹³⁰ Ramos *et al.* (2012) sugeriram que esse ácido fosse produto da biotransformação do 4-nerolidilcatecol, o principal metabólito secundário das folhas de *P. umbellata*.¹³⁰ Ensaio biológicos com *Artemia salina* mostraram que, durante o processo digestivo de *H. brasiliensis*, o 4-nerolidilcatecol era detoxificado pelos imaturos, visto que a toxicidade da substância biotransformada foi mais de 780 vezes menor que a do constituinte vegetal mais apolar (figura 18, p. 49).¹³⁰

Figura 18 - Biotransformação do 4-nerolidilcatecol por *H. brasiliensis*.



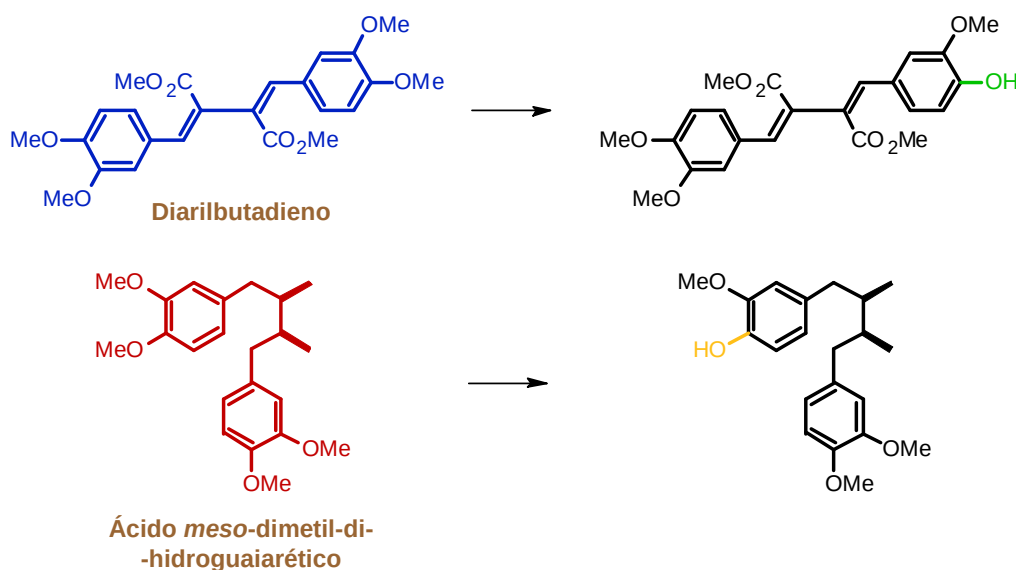
Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 130.

Alguns lignoides exibem atividade deterrente alimentar em insetos que é forte suficiente para mediar interações entre insetos e plantas.⁸¹ Exemplos de substâncias ativas incluem lignanas de ocorrência comum em Aristolochiaceae.^{49,81} Além de suprimir o apetite, são conhecidos metabólitos dessa classe que provocam mortalidade e/ou comprometem o ciclo de vida de insetos-pragas.⁸¹ Em geral, os lignoides com substituintes metoxílicos e/ou metilenodioxílicos são mais ativos que aqueles com grupos mais polares.⁸¹ Resultados anteriores mostram que as lagartas de lepidópteros, normalmente, metabolizam dímeros de unidades C₆-C₃ convertendo-os para derivados *O*-desmetilados no anel aromático, hidroxilados e/ou glicosilados, possivelmente, com a finalidade de superar as barreiras químicas impostas por essas substâncias, bem como facilitar as excreções destas.^{81,131}

Miyazawa, Kasahara e Kameoka (1995 e 1997) efetuaram estudos de biotransformação de lignanas por *S. litura*.^{132,133} Em um desses estudos, verificaram-se as desmetilações das posições *para* das lignanas dibenzilbutânicas diarilbutadieno e áci-

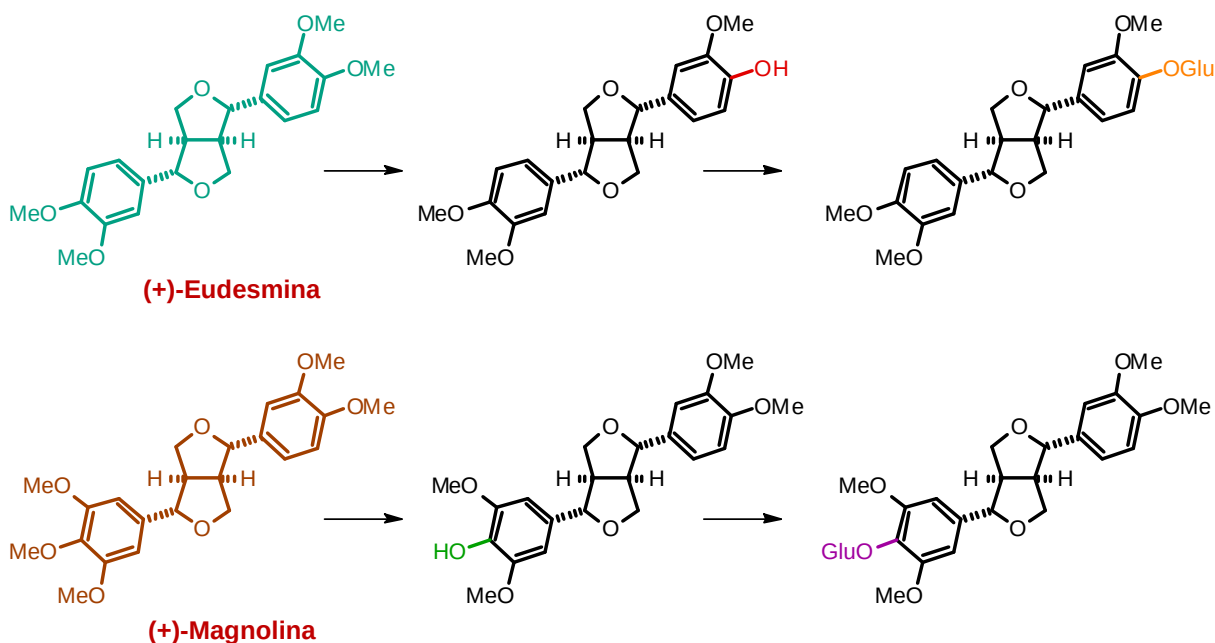
do meso-dimetil-dihidro-guaiarético (figura 19, p. 50).¹³² Eles também investigaram o metabolismo de duas lignanas furofurânicas: i) (+)-eudesmina e ii) (+)-magnolina.¹³³ Ambas as substâncias foram metabolizadas pelas lagartas de *S. litura*, e quatro lignanas biotransformadas foram isoladas das fezes (figura 20, p. 50).¹³³

Figura 19 - Biotransformação de lignanas dibenzilbutânicas por *S. litura*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 132.

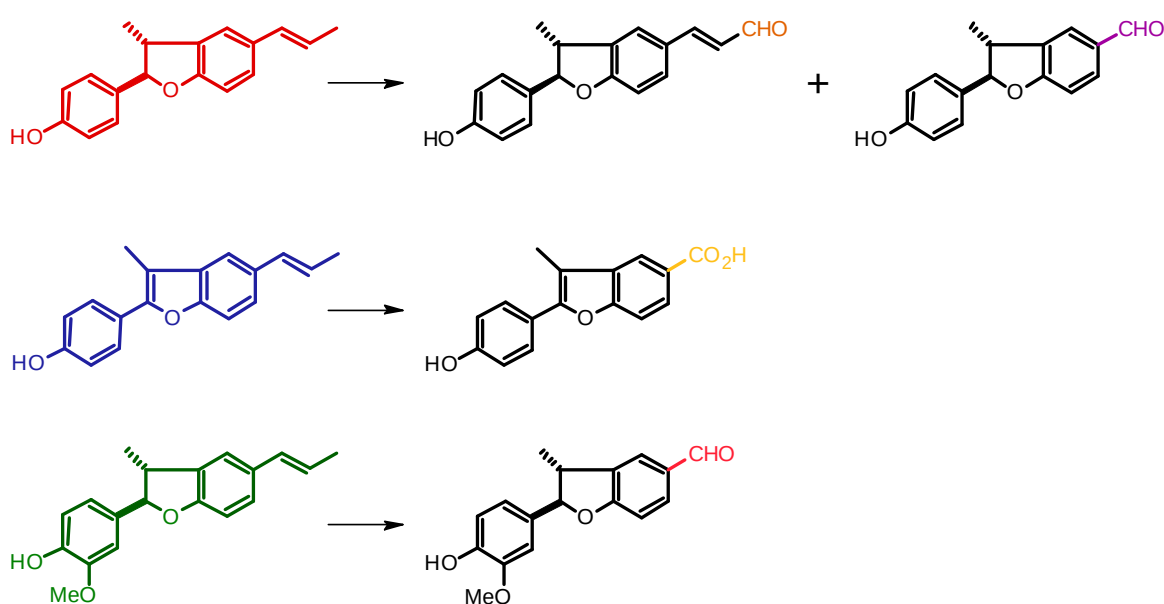
Figura 20 - Biotransformação de lignanas furofurânicas por *S. litura*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 133.

O metabolismo de quatro neolignanas pelo besouro *N. bipes* foi recentemente investigado por Ramos & Kato.¹³⁴ Segundo eles, as neolignanas selecionadas para os estudos de biotransformação ocorrem em grande quantidade na planta hospedeira do inseto, *Piper regnellii*, e apresentam atividade inseticida.¹³⁴ Nesse estudo, constataram que três substâncias foram biotransformadas pelo inseto, sendo detectados nas fezes de *N. bipes* três produtos de clivagem oxidativa de ligação dupla carbono-carbono e um produto de oxidação de grupo metílico (figura 21, p. 51).¹³⁴

Figura 21 - Biotransformação de neolignanas por *N. bipes*.

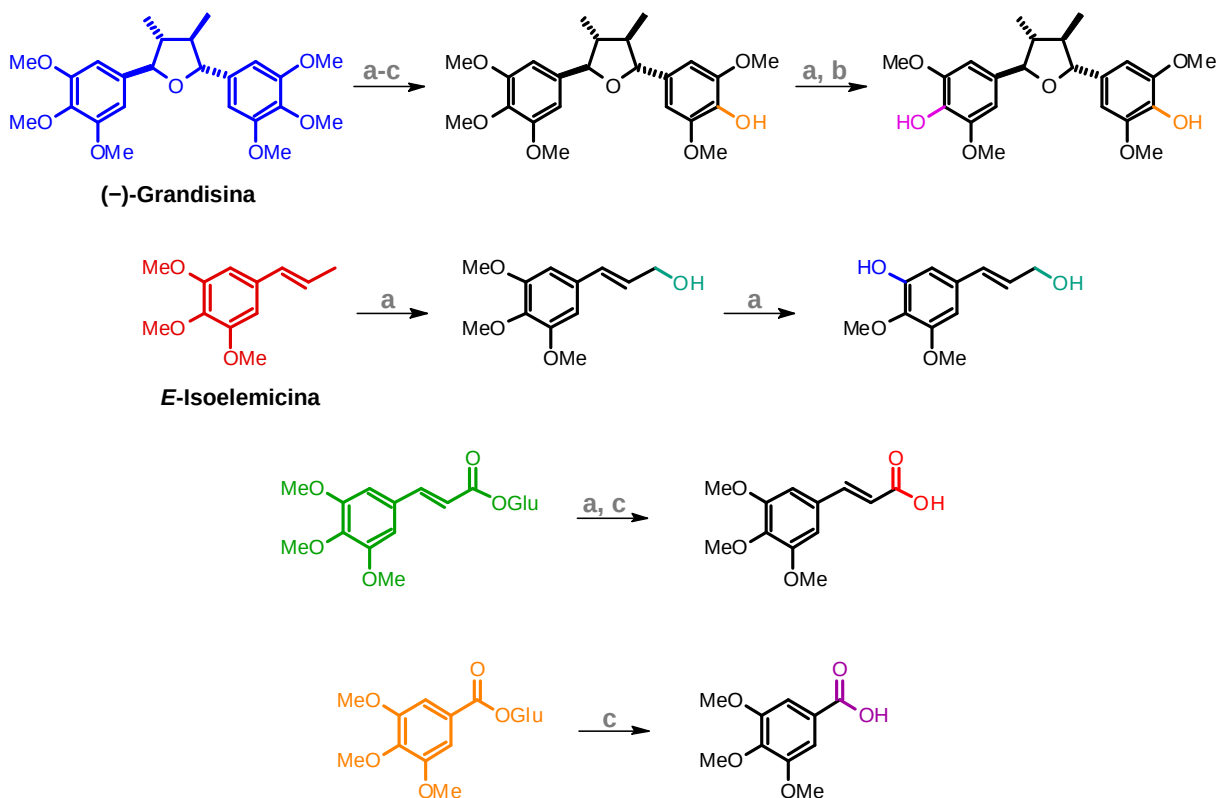


Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 134.

Em 2008, Ramos, Vanin e Kato realizaram um estudo de biotransformação dos constituintes majoritários das folhas de *Piper solmsianum* (Piperaceae) por três insetos: i) *N. bipes*, ii) *Heraclides hectorides* (Lepidoptera) e iii) *Quadrus u-lucida* (Lepidoptera).¹³¹ A lignana tetrahydrofurânica (–)-grandisina foi mono-*O*-desmetilada na posição *para* (4') por esses três organismos. Nas fezes de *N. bipes* e *Q. u-lucida*, detectaram também o produto de di-*O*-desmetilação das posições *para* dos dois anéis aromáticos dessa lignana (figura 21, p. 51).¹³¹ O D-glucosil-1-(3,4,5-trimetoxibenzoato) foi hidrolisado pelas lagartas da borboleta *H. hectorides*.¹³¹ De modo similar, o glicosídeo do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico foi hidrolisado pelo besouro *N. bipes* e por *H. hectorides*. Esse besouro também metabolizou o fenilpropanóide *E*-isoelemicina rendendo dois

produtos mais polares, um produto de hidroxilação do grupo metílico e um produto de hidroxilação/desmetilação (figura 22, p. 52).¹³¹

Figura 22 - Biotransformação de lignana, de fenilpropanóides e de derivado do ácido benzóico por: a) *N. bipes*, b) *Q. u-lucida* e c) *H. hectorides*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 131.

1.8 Aristolochiaceae e Papilionidae: Sequestro e biotransformação de micromoléculas

Tão sofisticadas e diversificadas quanto as barreiras anti-herbivoria impostas pelas plantas, são as táticas de defesa empregadas pelas lagartas de lepidópteros contra inimigos naturais.^{135,136} Na batalha contra parasitóides, microorganismos, predadores, entre outros, os insetos utilizam diferentes estratégias defensivas, que incluem as de cunho comportamentais (agregação, associação interespecífica, respostas evasiva e agressiva, construção de abrigos, regurgitação, alimentação em períodos e locais de menor exposição e vulnerabilidade), fisiológicas (barreiras tegumentares e intestinais à infecções, síntese de peptídeos e proteínas antibacterianos, ação coordenada de hemócitos e encapsulação de ovos de parasitóides), morfológicas

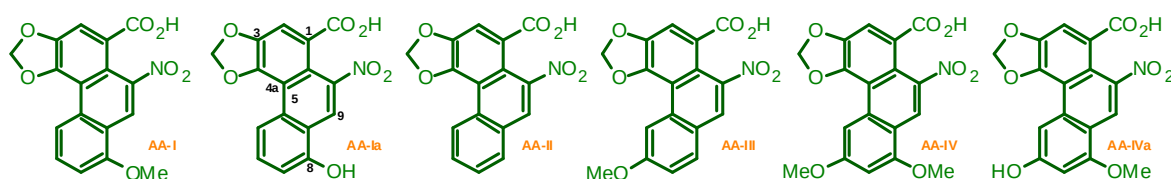
(glândulas tegumentares, coloração aposemática, camuflagem e mimetismo) e químicas (sequestro ou síntese *de novo* de micromoléculas e regurgitação de extratos de plantas).^{135,136} Essa diversidade de medidas anti-ataque e contra-atacante que os insetos possuem os tornam aptos a se defenderem antes, durante e/ou após o encontro com os inimigos.^{135,136}

Com certeza, as estratégias de defesa química, particularmente as que envolvem o sequestro de metabólitos secundários, são as mais bem investigadas e descritas.^{97,109,137-139} Segundo Duffey (1980)¹⁴², a palavra sequestro, dentro do contexto da Ecologia Química, denomina processos de captação e acúmulo de substâncias químicas visando defesa contra inimigos. Já de maneira um pouco mais geral, sequestro significa deposição de substâncias em tecidos, células e glândulas especializados.^{109,137}

Em 2009, Opitz & Müller publicaram um artigo de revisão que sumariza os relatos disponíveis na literatura sobre sequestros de micromoléculas por insetos.¹⁰⁹ No artigo foram descritas diversas classes de metabólitos secundários, incluindo alcaloides, lignoides, derivados contendo enxofre e terpenoides.¹⁰⁹ Entre os alcaloides, foram inclusos os ácidos aristolóquicos (AAs), os quais, reconhecidamente, exibem diversas atividades farmacológicas.⁴⁹

Em plantas, os AAs – derivados nitrofenantrênicos (figura 23, p. 53) – ocorrem apenas* em membros da família Aristolochiaceae.⁴⁹ Entretanto, essas substâncias nitradas, as quais têm se mostrado universalmente tóxicas e antialimentares para a maioria dos insetos não especializados⁴⁹, também ocorrem nos tecidos de lepidópteros das tribos Troidini (Papilioninae) e Zerynthiini (Parnassinae), bem como na mariposa *Mapeta xanthomelas* Walker (Pyrilidae) (tabela 1, p. 54). Relatos anteriores também evidenciam que metabólitos secundários (especiais) de outras classes químicas, tais como: i) mono- e sesquiterpenos, ii) aristolactamas, iii) alcaloides indólico e aporfínicos, iv) esteroides, v) benzenóides e vi) alantóina, ocorrem em insetos especialistas em Aristolochiaceae (figuras 23 e 24, p. 53 e 55).^{41,141-144}

Figura 23 - Estruturas dos AAs.



*Há um relato equivocado sobre as ocorrências do AA-I e do ácido aristólico numa espécie de Menispermaceae. Este foi decorrente de um erro de identificação botânica, onde a espécie *Cocculus trilobus* foi confundida com *Aristolochia fangchi*, como esclarecido por Jiao (2003).¹⁴⁰

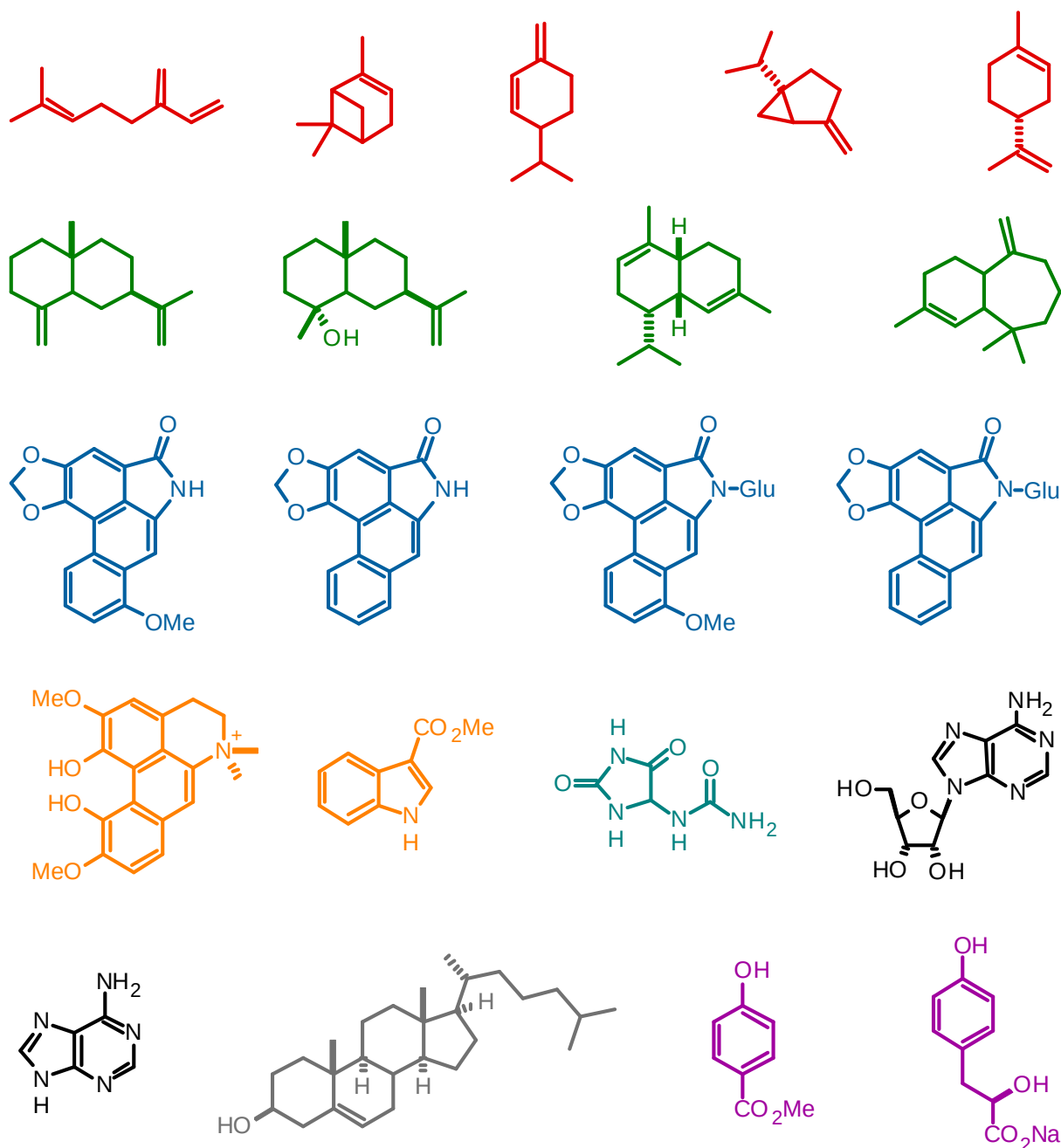
Introdução

Tabela 1 - Sequestro de ácidos aristolóquicos (AAs) de plantas por insetos.

Inseto (espécie)	Planta (s) hospedeira (s)	AA (s)	Referência (s)
<i>Antrophaneura neptunus</i>	<i>Thottea tricornis</i>	I e II	109
<i>Atrophaneura alcinous</i>	<i>A. debilis</i> , *	I, II, III, IV, VIIa, IIIa, IVa e E, AAs total	138, 31
<i>Atroponeura</i> sp.	*	AAs total	145
<i>Battus archidamas</i>	<i>A. chilensis</i>	I, Ia, II, IIIa e IVa	109, 33, 146
<i>Battus crassus</i>	*	AAs total	31
<i>Battus phylenor</i>	<i>A. macrophylla</i> , <i>A. californica</i>	I, II, Ia e IVa, Contêm AA (s)	109, 33, 147
<u>Battus polydamas</u>	* , <i>A. sessilifolia</i>, <i>A. melastoma</i>, <i>A. arcuata</i>, <i>A. triangularis</i>, <i>A. elegans</i>, <i>A. esperanzae</i>, <i>A. galeata</i>, <i>A. chilensis</i>, <i>A. máxima</i> e <i>A. argentina</i>	I, Ia, II, III, IIIa, IV, IVa, IVb, IaG, IIIaG, IVaG, IVbG e AAs total	109, 33, 31, 41, 148
<i>Battus polystictus</i>	<i>A. melastoma</i> , <i>A. arcuata</i> e <i>A. triangularis</i>	AAs total	31
<i>Battus zetides</i>	*	AAs total	31
<i>Byasa polyeuctes</i>	*	Papilistatina	149
<i>Euryades corethrus</i>	<i>Aristolochia sessilifolia</i>	AAs total	31
<i>Mapeta xanthomelas</i>	<i>A. pilosa</i>	AA-I	150
<i>Ornithoptera goliath</i>	<i>A. crassinervia</i> , *	I, II, IIIa	33, 138
<i>Ornithoptera paradisea</i>	*	AAs total	138
<i>Pachliopta aristolochiae</i>	<i>A. liukuensis</i> , <i>A. indica</i> e <i>A. cucurbitifolia</i>	I, II, III, IIIa e Ácido aristólico	138, 33, 143
<i>Pachliopta coon</i>	<i>T. tomentosa</i>	I e III	138
<i>Pachliopta neptunus</i>	<i>Thottea</i> ssp. "1"	II	138
<i>Pachliopta oreon</i>	*	I	138, 33
<i>Parides agavus</i>	<i>A. melastoma</i> , <i>A. arcuata</i> e <i>A. triangularis</i>	AAs total	31
<i>Parides alcinous</i>	<i>A. debilis</i>	I, II, III, IIIa, IVa, VIIa e E	33
<i>Parides anchises</i>	<i>A. melastoma</i> , <i>A. arcuata</i> , <i>A. triangularis</i> , <i>A. elegans</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>A. odora</i> e <i>A. cymbifera</i>	AAs total	31
<i>Parides ascanius</i>	<i>A. macroura</i>	AAs total	31
<i>Parides bunichus</i>	<i>A. melastoma</i> , <i>A. arcuata</i> e <i>A. triangularis</i>	AAs total	31
<i>Parides chabrias</i>	*	AAs total	31
<i>Parides neophilus</i>	<i>A. melastoma</i> , <i>A. arcuata</i> , <i>A. elegans</i> e <i>A. esperanzae</i> ,	AAs total	31
<i>Parides panares</i>	<i>A. maxima</i>	I e II	148
<i>Parides photinus</i>	*	AAs total	31
<i>Parides proneus</i>	<i>A. melastoma</i>	AAs total	31
<i>Parides tros</i>	<i>A. rumicifolia</i> e <i>A. cynanchifolia</i>	AAs total	31
<i>Parides zacynthus</i>	<i>A. macroura</i> , <i>A. odora</i> e <i>A. paulistana</i>	AAs total	31
<i>Sericinus montela</i>	<i>A. debilis</i>	I, II, III, IV, VIIa e IIIa	138
<i>Trogonoptera plateni</i>	*	AAs total	145
<i>Troides aeacus</i>	<i>A. zollingeriana</i>	I, II e IIIa	138
<i>Troides amphrysus</i>	<i>T. dependens</i>	I, II e IV	109
<i>Troides magellanus</i>	*	AAs total	145
<i>Troides rhadamantus</i>	<i>A. tagala</i> , *	AAs total	31
<i>Zerynthia polyxena</i>	<i>A. clematitis</i>	Ia e IIIa	33

*Espécie (planta hospedeira) desconhecida. AAs total=Determinação de conteúdo de AAs total, geralmente por espectrofotometria.

Figura 24 - Estruturas de substâncias sequestradas por insetos das tribos Troidini e Zerynthiini ou identificadas em extratos de tegumentos, de tecidos e do osmetério desses insetos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Refs. 41,141-144.

Estudos demonstraram que AAs são potentes inibidores alimentares em vertebrados e invertebrados.^{31,33,40,49,151} O ácido aristolóquico I, por exemplo, mostrou, em bioensaios com *S. litura*, um nível de inibição similar ao da azadirachtina, um limonoi-
de com potente atividade antialimentar comprovada.⁴⁹ Segundo Lajide *et al.* (1994)

¹⁵², o grupamento de ácido carboxílico e o grupo nitro são essenciais para a atividade antialimentar dessas substâncias nitradas. Dentre outras constatações, eles observaram que o ácido aristólico, um análogo do AA-I sem o grupo nitro, era inativo, bem como verificaram que a descarboxilação, redução ou metilação do grupo carboxílico do AA-I resultava em uma diminuição significativa da atividade biológica exibida por esse ácido.¹⁵² Todavia, estes metabólitos nitrados não têm valor comercial para o combate de pragas, uma vez que causam falhas renais em humanos^{49,152}, além de serem mutagênicos e citotóxicos.^{49,153}

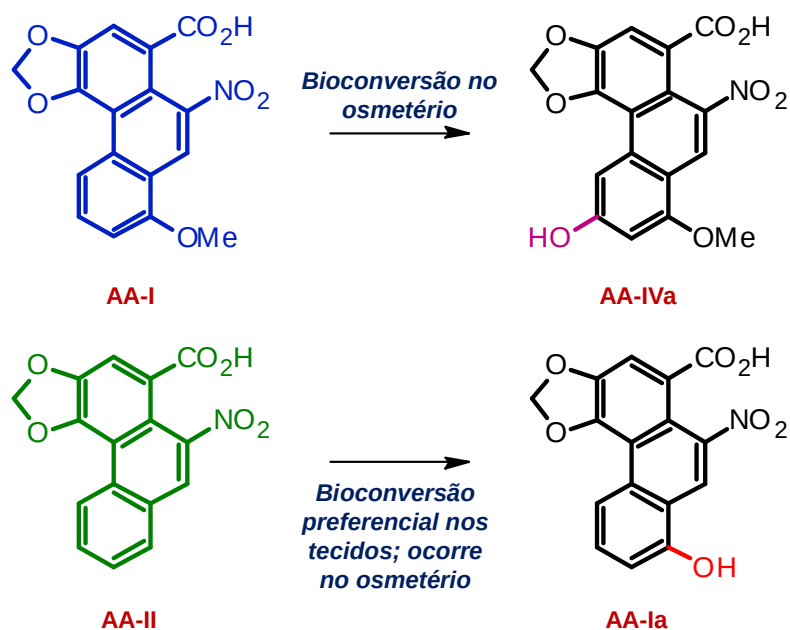
Várias evidências têm sugerido que AAs podem estar relacionados a defesa química de lagartas e insetos adultos contra predadores naturais.^{41,151} Dentro desse contexto, alguns trabalhos mostraram que borboletas das tribos Troidini e Zerynthini foram rejeitadas por pássaros insetívoros, como *Aphelocoma coerulescens*, *Cyanocitta cristata*, entre outros.⁴⁰ Afim de investigar a função defensiva dos AAs, Nishida & Fukani¹⁵⁴, em 1989, administraram grãos de arroz contendo AAs a pássaros japoneses (*Passer montanus*) e, então, observaram que tais ácidos atuavam como deterrenes alimentares para essa espécie de ave.¹⁵⁴ Concordantemente, Sime *et al.* (2002) verificaram que lagartas de *B. philenor*, as quais continham AAs, eram protegidas contra parasitismo.¹⁵⁵ Por outro lado, Moraes *et al.* (2013) constataram que esses ácidos nitrados, mesmo em concentração 100 vezes maior que as presentes em *B. polydamas*, não impediam a predação de larvas de *T. molitor* pelos seguintes organismos: i) *Camponotus crassus* e ii) *Gallus gallus domesticus*, o que os levaram a sugerir que o mecanismo químico de defesa dos papilionídeos deve ser mais complexo e que outras substâncias, por exemplo, mono-, sesqui- e diterpenos, podem ser responsáveis pela atividade antipredatória ou atuar sinergisticamente com os AAs.⁴⁰

Nem sempre o conteúdo de AAs do inseto é idêntico ao da planta hospedeira.^{41,49,156} Análises químicas comparativas sobre *B. archidamas* e sua planta hospedeira, *A. chilensis*, evidenciaram diferenças entre as composições químicas do inseto e a da planta.^{49,156} Enquanto os AA-I (metoxilado em C-8) e AA-Ia (hidroxilado em C-8) foram os componentes majoritários nas folhas e nos caules de *A. chilensis*, os AA-I e AA-IVa (metoxilado em C-8 e hidroxilado em C-6, respectivamente) foram os constituintes principais de *B. archidamas*.¹⁵⁶ De modo similar, Euw *et al.* (1972) observaram que exemplares de *Z. polyxena* continham apenas AAs hidroxilados, enquanto sua planta hospedeira, *A. clematidis*, continha principalmente o AA-I (metoxilado em C-8).

^{49,157} Esses relatos são indicações de que os insetos podem metabolizar os ácidos nitrofenantrênicos transformando-os em derivados, o que está de acordo com a sugestão de Urzúa *et al.* de que há um alto grau de seletividade e/ou transformação metabólica por parte dos insetos da tribo Troidini (figura 23, p. 53).^{49,156,157}

Em 2011, Pinto, Úrzua e Niemeyer demonstraram que lagartas da borboleta *Battus polydamas archidamas* hidroxilaram AAI e AAIL.¹⁵⁸ Neste sentido, esses ácidos foram oferecidos em dietas artificiais, e as composições químicas dos tecidos e do osmetério das lagartas foram analisadas. Nos tecidos, a razão entre as concentrações de AAI e AAIL foi maior no inseto do que na dieta merídica.¹⁵⁸ Além disso, a quantidade de AA-Ia foi bem maior do que a do AAIVa.¹⁵⁸ Isso evidenciou que, nos tecidos, o AA-Ia era preferencialmente formado a partir da metabolização do AAIL.¹⁵⁸ Em contrapartida, na secreção do osmetério, a razão entre as concentrações de AAI e AAIL foi similar no inseto e na dieta, ao mesmo tempo que a razão entre as concentrações dos AA-Ia e AAIVa foi de aproximadamente 1. Com base nisso, Pinto, Úrzua e Niemeyer sugeriram que, no osmetério, ocorria a bioconversão do AA-I para AA-IVa a uma mesma proporção que a hidroxilação do AA-II convertendo-o para AA-Ia (figura 25, p. 57).¹⁵⁸

Figura 25 - Biotransformação de AA-I e AA-II por *B. polydamas archidamas*.



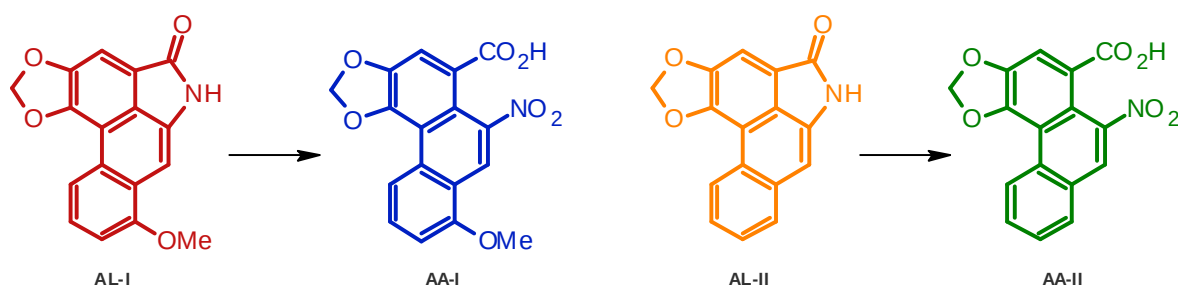
Fonte: Elaborado pelo autor. Ref. 158.

Em 2012, Priestap *et al.* observaram a glicosilação de AAs pelas lagartas da borboleta *B. polydamas*.⁴¹ Na planta hospedeira, *A. argentina*, foram detectados os seguintes derivados nitrofenantrênicos: AAs I, Ia, II, III, IIIa, IV, IVa e IVb, enquanto que no inseto foram detectados esses oito AAs e mais quatro glicosídeos: i) AA-IaG, ii) AA-IIIaG, iii) AA-IVaG e iv) AA-IVbG, resultantes da glicosilação de metade das substâncias sequestradas de *A. argentina*.⁴¹

Outro aspecto interessante acerca do metabolismo dos insetos da família Papilionidae foi, em 2000, observado por Klitzke e Brown.³¹ Em um trabalho onde foram quimicamente analisados indivíduos de dezessete espécies de borboletas neotropicais da tribo Troidini, Klitzke & Brown verificaram que *B. polydamas* pode utilizar precursores presentes na planta para biossintetizar AAs.³¹ Recentemente, Úrzua, Olguín e Santander (2013) propuseram que as aristolactamas I e II seriam as prováveis precursoras utilizadas por *B. polydamas archidamas* para a biossíntese dos AA-I e AA-II (figura 26, p. 58).¹⁴⁴ É conhecido também que *B. polydamas* pode efetuar a síntese *de novo* dos sesquiterpenos β -selineno e sellin-11-en-4 α -ol, desde que um estudo demonstrou que estes estavam presentes no inseto, mas não ocorriam em *A. elegans*.

141

Figura 26 - Biotransformação de AL-I e AL-II por *B. polydamas archidamas*.¹⁴⁴



Embora vários estudos químicos e biológicos estejam sendo conduzidos com espécies de Aristolochiaceae, o conhecimento sobre o metabolismo das substâncias secundárias destes vegetais por insetos especialistas ainda é muito limitado. Além disso, os trabalhos disponíveis na literatura focaram quase que exclusivamente em derivados nitrofenantrênicos. Sendo assim, é importante que se obtenha uma visão mais abrangente acerca dos mecanismos de “detoxicação” empregados por esses insetos, mediante administração de matrizes com grande diversidade química, por exemplo, folhas de plantas hospedeiras. Isso pode contribuir não só para a elucidação de vias de biotransformação, mas também conduzir à obtenção de substâncias bioativas com baixa toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a bioconversão das substâncias presentes nas folhas de um espécime de *A. giberti*, uma planta na qual não foram detectados AAs em folhas e caules, efetuada após o processo digestivo de lagartas da borboleta *B. polydamas polydamas*;
- Analisar o sequestro de micromoléculas de *A. giberti* por lagartas da borboleta *B. polydamas polydamas*;
- Investigar as propriedades biológicas dos metabólitos secundários (especiais) da planta hospedeira que foram metabolizados pelas lagartas, bem como dos constituintes presentes em lagartas de *B. polydamas polydamas*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos orgânicos de folhas de *A. giberti* e de fezes de *B. polydamas*;
 - Preparar extratos de lagartas de 4º e 5º instars de *B. polydamas*;
 - Desenvolver uma metodologia, rápida e eficiente, para o microfracionamento dos extratos de folhas e fezes;
 - Efetuar microfracionamentos dos extratos de folhas e fezes;
 - Comparar as composições químicas dos extratos de folhas, fezes e lagartas;
 - Determinar se as lagartas de *B. polydamas* biotransformam os constituintes das folhas de *A. giberti*;
 - Efetuar o fracionamento em escala ampliada do extrato de fezes;
 - Isolar os produtos da bioconversão dos metabólitos de *A. giberti*;
 - Determinar a composição química dos extratos de lagartas;
 - Determinar as estruturas químicas das substâncias isoladas;
 - Determinar a potencialidade das substâncias sequestradas pelas lagartas em ensaios para atividade antipredatória com pintinhos e formigas;
 - Verificar a toxicidade para lagartas de 3º instar da mariposa *S. frugiperda* das substâncias que foram metabolizadas pelas lagartas de *B. polydamas*.
-

3 EXPERIMENTAL

3.1 Especificação dos materiais, reagentes e equipamentos utilizados

3.1.1 Solventes

1. Os solventes orgânicos [hexanos, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , EtOAc, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, CH_3CN , EtOH e CH_3OH] empregados nos processos cromatográficos, na preparação dos extratos e nas partições líquido-líquido foram de grau cromatográfico (Tedia e J.T.Baker®).
2. Nas reações químicas utilizaram-se solventes das marcas Aldrich (THF, 1,4-dioxano, ciclohexilamina e 2-nitropropano) e J.T.Baker® (DMF e dietilamina). Dietilamina e DMF foram secas com peneira molecular 3A (ativada a 230° C por 8 horas e esfriada em dessecador) por 192 horas, enquanto os demais solventes foram utilizados tais como adquiridos, sem qualquer tratamento prévio.
3. Os solventes deuterados, CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, CD_3OD e D_2O — 99,8, 99,9 ou 99,98% de D, utilizados para as análises espectroscópicas por RMN foram das marcas Merck, Cambridge Isotopes e Aldrich. Para se obter solvente excepcionalmente livre de traços de ácido, antes da solubilização das amostras, o CDCl_3 era passado através de uma coluna contendo alumina neutra.
4. Utilizou-se água ultrapura — resistividade mínima de 18,2 M Ω .cm a 25° C. Assim, a água utilizada foi previa- e sucessivamente purificada em sistemas (conectados em série) de osmose reversa e de purificação de água Mili-Q® (Millipore, USA).

3.1.2 Reagentes

1. Vanilina (99 %), Na_2SO_4 anidro ($\geq 99,0$ %), NaCl (ACS reagent, Vetec), KCl (ACS reagent, Vetec), NaHCO_3 (ACS reagent, $\geq 99,5$ %), KOH (85 %), HCl (HEMIS), H_2SO_4 (95,0-98,0%, Synth), $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0,05 mol/L, Fluka), BaCO_3 (Aldrich), hidrocloreto dos ésteres metílicos de R- e S-fenilglicina ($\geq 95,0$ %, Aldrich e 97 %, Aldrich, respectivamente), PyBoP (98%, Aldrich), HOBt (% de água ≥ 14 %, 97%, Aldrich), NMM ($\geq 99,5$ %, Aldrich), Diazald (Sigma), peneira molecular 3A (4-8 mesh, ACROS), Amberlyst-
-

-15 (fortemente ácida, trocador catiônico, anidra, Fluka), ácido 2-etilhexanóico ($\geq 99\%$, Aldrich) e LiAlH_4 (1,0 mol/L, Aldrich) foram utilizados sem purificação prévia.

3.1.3 Cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna

1. Para CCDC foram utilizadas placas comerciais de sílica gel F₂₅₄ da Whatman, e para CCDP foi utilizada uma placa de sílica gel 60 PF₂₅₄. A placa preparativa (espessura indeterminada) foi manualmente preparada espalhando-se uma suspensão de sílica (16,9 g) em água deionizada (37,0 mL) sobre uma placa de vidro de 20 cm x 20 cm. As revelações das cromatoplas foram efetuadas com irradiações UV de λ de 254 e de 366 nm, vapores de iodo e/ou vanilina 1% (m/v; solução $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 9:9:2 v/v/v). As placas comparativas foram sucessivamente reveladas por esses três métodos de revelação, enquanto que a preparativa foi revelada somente com lâmpada UV. O iodo (I_2) adsorvido foi completamente sublimado antes das revelações das cromatoplas com solução de vanilina sulfúrica 1%. As cromatoplas borrifadas com essa solução foram reveladas em estufa a 100° C.

2. As separações e os fracionamentos cromatográficos em coluna ou por extração em fase sólida foram realizados utilizando-se sílica gel de 70-230 mesh (0,063-0,2 μm , Macherey-Nagel), sílica gel de fase reversa C-18 de 230-400 mesh (Merck) ou de 40 μm (7025-00, J.T.Baker®) e Sephadex LH-20 (Sigma), partículas de 25-100 μm .

3.1.4 Análises por RMN

1. Os espectros de RMN de ^1H (300, 500 ou 600 MHz) e de ^{13}C (75, 126 ou 151 MHz) uni- e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA 300 (7,05 T), Varian INOVA 500 (11,7 T) e Bruker Ascend™ 600 (14,1 T) empregando-se sequências de pulso tradicionais para os experimentos de correlação homo- e heteronucleares. Como referência interna, foram utilizados os sinais relativos aos hidrogênios residuais do solvente (CHCl_3 , $\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$, $\text{CD}_3\text{COCD}_2\text{H}$, CD_2HOD e DHO) para RMN ^1H e os dos carbonos do solvente para RMN de ^{13}C . Os valores de deslocamentos químicos (δ s) foram referenciados em relação ao do TMS [diluído ($\phi \leq 1\%$) em CDCl_3]. As escolhas dos deslocamentos químicos das referências interna foram baseadas na

análise de uma amostra padrão de etilbenzeno (0,1 %) em CDCl_3 (99,89 % de D) contendo TMS (0,01 %) e nas referências 159-161.

3.1.5 Análises e separações por CLAE-UV-DC-AFD

1. As análises por CLAE-UV-DC-AFD foram realizadas num cromatógrafo Jasco equipado com duas bombas modelo PU-2086*Plus*, forno termostatizado modelo CO-2060-*Plus*, com injetor automático modelo AS-2055*Plus* (alça de amostragem de 80 μL para separações analíticas e semi-preparativas), desaerador modelo DG-280-53, misturador modelo MX-2080-31 e com detectores de discoísmo circular modelo CD-2095-*Plus* e de arranjo de fotodiodos UV-Vis modelo MD-2018*Plus*. As separações em escala semi-preparativa também foram efetuadas nesse equipamento. As colunas cromatográficas foram das marcas Zorbax [analítica: RX-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e semi-preparativa: RX-C18 (250 x 9,4 mm, 5 μm)] e Varian [analítica: Omnisphere-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)].

3.1.6 Análise por CLAE-EM e obtenção dos EM de 1, 2 e 3+4

1. A análise por CLAE-EM foi conduzida num espectrômetro de massas LCQ Fleet LC/MS (HPLC-ESI/APCI-IT-MSⁿ, Thermo Analítica®) equipado com um dispositivo de inserção direta de amostra via análise por injeção em fluxo contínuo. Operou-se no modo de ionização por *electrospray* (ESI), e as fragmentações MS¹ foram realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). A separação cromatográfica foi efetuada em cromatógrafo Accela equipado com quatro bombas, detector de arranjo de diodos e injetor automático. Utilizou-se também esse espectrômetro para obter os espectros de massas de baixa resolução (infusão direta, ESI) das substâncias **1** e **2** e da mistura de **3+4** (figura 55, p. 103).

3.1.7 Análises por EM

1. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Bruker Daltonics ultratOFq (ESI-TOF), enquanto que a maioria dos espectros de massas de baixa resolução foram adquiridos em sistema CLAE-EM/EM 3200 QTRAP®

Experimental

(infusão direta, ESI). Essas análises foram efetuadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto, São Paulo, e no Laboratório de Espectroscopia de Massas (NDCOM) da Unesp, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, respectivamente.

2. As análises por CG-MS foram efetuadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP-5050A equipado com um injetor automático *split/splitless*, com razão de *split* de 1:10. Para a determinação dos índices de retenção linear, foram injetadas misturas de 24 padrões de hidrocarbonetos (*n*-alcanos, C₅-C₃₀, Aldrich), de dezenove padrões de ácidos graxos (C₅-C₃₀, Aldrich) e de padrões dos respectivos ésteres metílicos dos ácidos graxos (Aldrich). Ácido copálico (**5**), previamente isolado de folhas de *A. giberti* e identificado por análises espectrométricas de RMN e de EM, foi também utilizado como substância padrão.

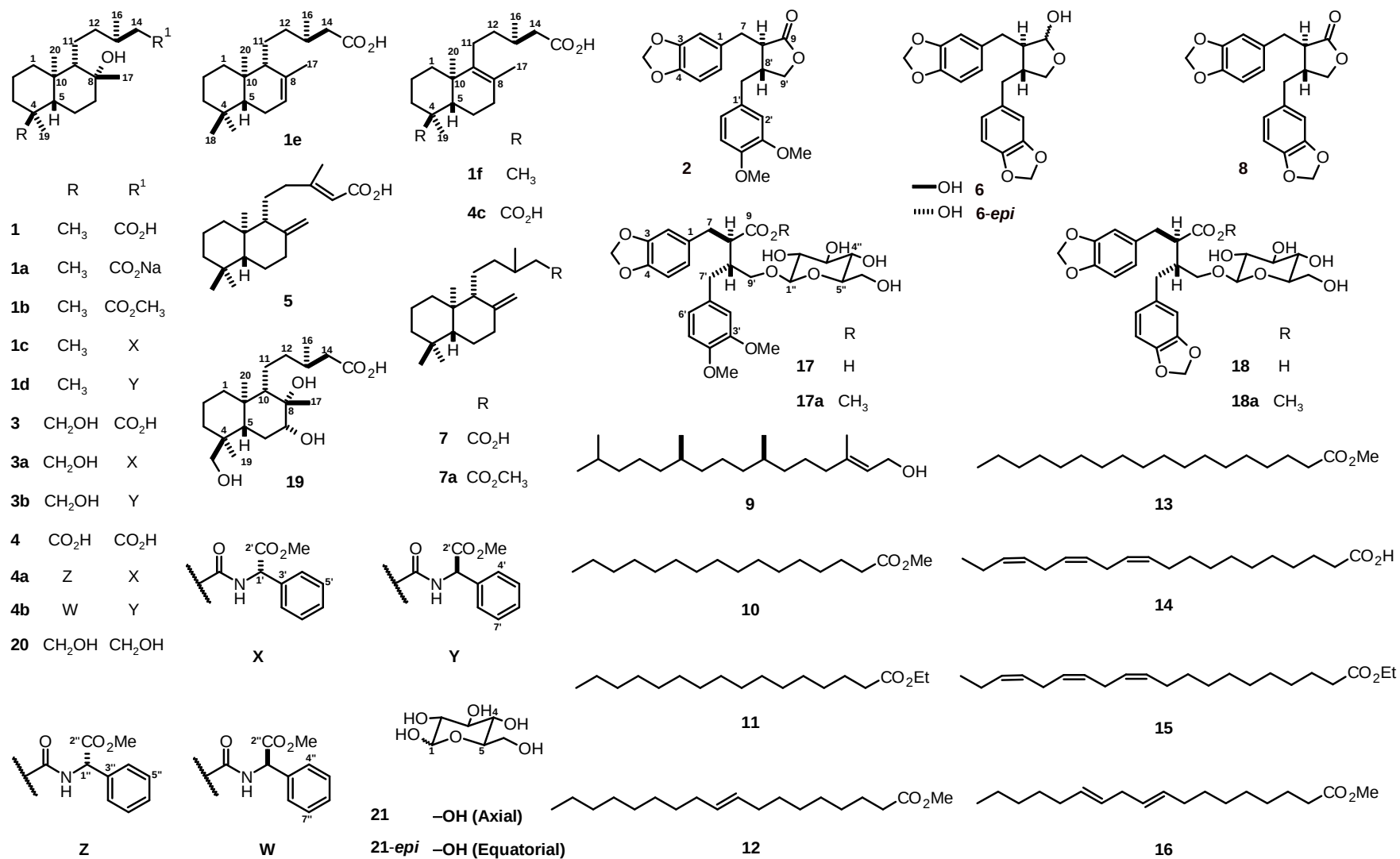
3.1.8 Análises quirópticas

1. As medidas de rotação óptica, $[\alpha]_D$, foram feitas em polarímetro digital Perkin ElmerTM 341 LC [equipado com lâmpadas de sódio (589 nm) e mercúrio (546 nm)] utilizando-se uma cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm. Para assegurar a exatidão das massas das amostras, estas foram devidamente secas em dessecador e pesadas até massa constante. As soluções das amostras foram preparadas em balões volumétricos de 2,0, 5,0 ou 10,0 mL da Pyrex®, previamente aferidos pelo método do cálculo da densidade da água. Somente substâncias com pureza espectroscópica foram analisadas, e aquelas que, em solução clorofórmica, exibiram reatividade foram, após à execução das medidas, secas, solubilizadas em CDCl₃ e analisadas por RMN de ¹H, afim de se certificar que não houve alteração química. Para a substância **1** efetuaram-se, dentro de um intervalo de 6 meses, duas medidas, e o valor relatado é o valor médio junto com o respectivo desvio padrão.

2. As curvas de dicroísmo circular eletrônico (DCE) foram obtidas em um espectropolarímetro dicrógrafo da Jasco j-815. Para as medidas, utilizou-se uma cubeta de 0,2 mm, e a varredura foi efetuada de 190 a 400 nm. As amostras foram solubilizadas em CH₃OH, e as soluções foram preparadas numa concentração de 0,21 mg/mL.

3.1.9 Evaporação dos solventes e medição de pH

Figura 27 - Estruturas das micromoléculas dos extratos de fezes e/ou lagartas e dos derivados semi-sintéticos.



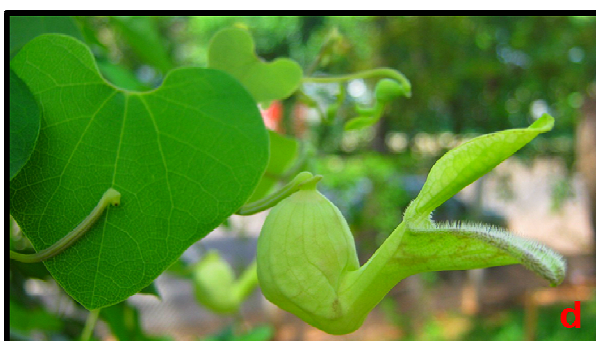
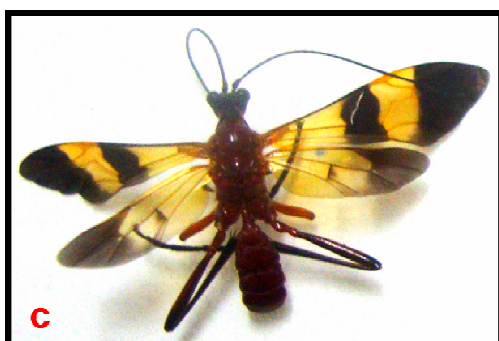
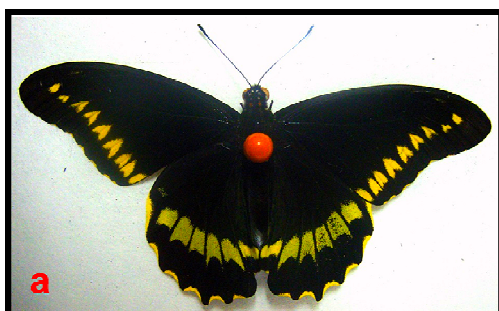
1. Os solventes dos extratos, fases, frações e subfrações obtidos foram eliminados sob pressão reduzida utilizando-se evaporador rotativo (Büchi™, RE111 e B461) e/ou em capela com exaustão.
2. As medidas de pH das soluções aquosas foram efetuadas em um pHmetro da marca Oríon 3 star, que fora previamente calibrado com soluções-tampão, utilizando-se um eletrodo de vidro combinado.

3.2 Identificação da borboleta e da planta hospedeira

A identificação do inseto, *Battus polydamas polydamas* (Linnaeus, 1758), bem como da vespa parasitóide, foram feitas pelo entomólogo e Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho (Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo) (figura 28, p. 65).

A planta hospedeira do lepidóptero, a qual se encontra cultivada nas dependências do Instituto de Química de Araraquara–SP, foi identificada como *Aristolochia giberti* Hook. pelo Dr. Condorcet Aranha, pelo Dr. Vinicius Castro Souza e pelo Dr. Lindolpho Capellari Júnior. Uma exsicata (ESA 88888) da espécie vegetal foi depositada no Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba–SP.

Figura 28 - *Battus polydamas* [a) adulto e b) lagarta], c) *Areoscelis rufa* (vespa parasitóide) e d) *Aristolochia giberti* (folha e flor em destaque).



3.3 Coleta, criação das lagartas e preparo dos extratos de fezes e de lagartas

Para o estudo de biotransformação, selecionaram-se lagartas de 2º a 5º *instars*. Estas foram coletadas de *A. giberti*, acondicionadas no laboratório em recipientes de vidro e, até o estágio de pupa ou crisálida, mantidas com uma dieta à base de folhas frescas de sua planta hospedeira, sob condições semi-controladas durante todo o experimento (luz artificial durante fotoperíodo natural e temperatura e umidade ambientes), que durou de abril de 2009 a agosto de 2010 (figura 29, p. 66).

Figura 29 - Lagartas da borboleta *B. polydamas* alimentando-se de folhas de *A. giberti*, em cativeiro.



Os recipientes de criação dos insetos foram mantidos em condições higiênicas e as folhas utilizadas como alimento foram substituídas diariamente. Com exceção de alguns exemplares, os quais foram reservados para as identificações entomológicas, os adultos e parasitóides que emergiram no laboratório foram devolvidos ao seu habitat original. Além disto, somente lagartas encontradas em até cerca de dois metros de altura em relação ao solo foram capturadas.

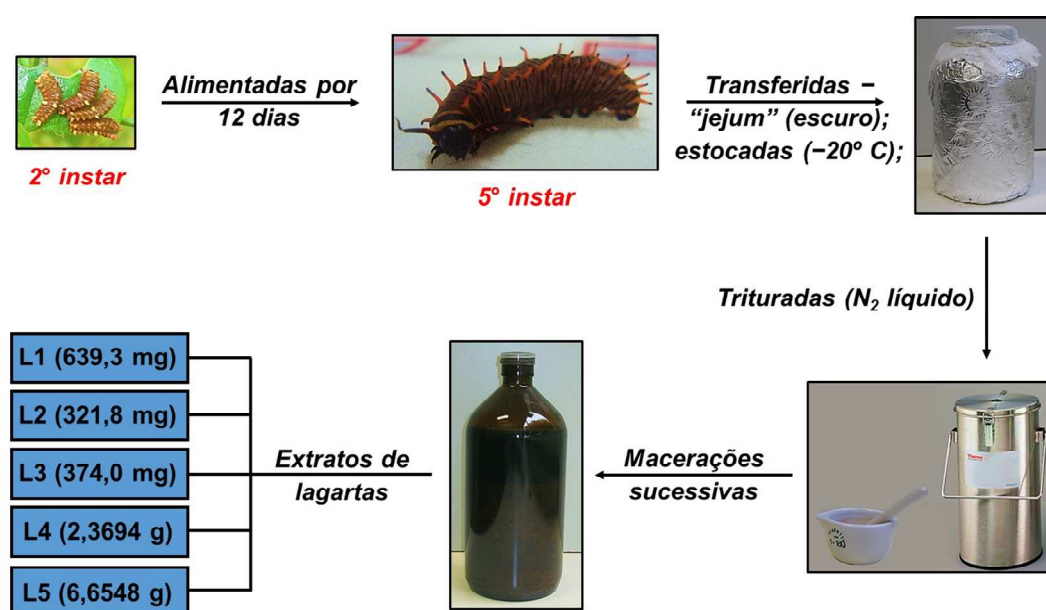
Para prevenir o surgimento e a proliferação de microrganismos, as fezes excretadas pelas lagartas (figura 30, p. 67) foram diariamente coletadas e, então, imersas em CH₃OH para extração exaustiva por maceração obtendo-se o extrato fecal (E-Ba; 61,0 g de extrato metanólico a partir de um total de 1,0 kg de fezes *in natura*). As fezes excretadas por um dado conjunto de lagartas durante as 24 horas iniciais de seu confinamento foram descartadas, afim de evitar contaminação por compostos não foliares.

Figura 30 - Resíduos (fezes) de lagartas de *B. polydamas*, após a extração exaustiva com CH_3OH .



Por em média doze dias consecutivos (do 2º ao 5º *instar*), as lagartas de *B. polydamas* (136 espécimes) utilizadas para o experimento de sequestro foram também alimentadas com folhas frescas de *A. giberti*, durante agosto de 2010. Após esse período, as lagartas eram transferidas para frascos protegidos da luz por papel alumínio visando atenuar qualquer estresse, onde ficavam em “jejum” por 48 h para a limpeza do organismo. Em seguida, as lagartas eram pesadas e devidamente estocadas em freezer a -20°C . Posteriormente, as lagartas (134,9 g) foram trituradas em N_2 líquido, e o material pulverulento obtido foi extraído com hexano (3×500 mL; sete dias cada etapa), seguido por sucessivas extrações com hexanos/EtOAc 4:1, EtOAc, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ e CH_3OH , obtendo-se os extratos L1 a L5, respectivamente (figura 31, p. 67).

Figura 31 - Preparação dos extratos de lagartas de *B. polydamas*.



3.4 Preparo do extrato representativo de folhas de *A. giberti*

Dado que as lagartas foram coletadas e alimentadas durante 2009 e 2010, com o intuito de obter uma amostra representativa para conduzir o estudo comparativo entre a composição química das folhas e a das fezes, folhas de *A. giberti* (590,5 g) foram regularmente* coletadas no decorrer de 2010. As folhas coletadas foram secas ao ar e em estufa a 40° C, sucessivamente. Mediante etapas de quarteamento, selecionou-se 55,0 g do material seco para a preparação do extrato metanólico anual representativo de folhas de *A. giberti* (E-Fol; 16,8 g; rendimento de 30,5 %).

3.5 Análises preliminares dos extratos de folhas, fezes e lagartas

Todos os extratos obtidos foram analisados por espectroscopia de RMN de ^1H ou de RMN de ^1H e de ^{13}C . Nessas análises, utilizou-se cerca de 30,0 mg de cada extrato orgânico. Os extratos foram separadamente solubilizados em CDCl_3 , e as partes solúveis foram encaminhadas para a obtenção dos espectros de RMN. Após a sua secagem, os resíduos (insolúveis) foram solubilizados em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e, então, encaminhados para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H .

3.6 Fracionamento em escala reduzida dos extratos E-Fol e E-Ba

3.6.1 Extrações líquido-líquido e extrações em fase sólida

Em busca de micromoléculas, possivelmente, biotransformadas, efetuaram-se, inicialmente, etapas de microfracionamento dos extratos brutos de folhas e de fezes. Assim, porções de 1,0 g dos extratos E-Fol e E-Ba foram individualmente submetidas à partição líquido-líquido, obtendo-se duas fases orgânicas (F-1 e Ba-1, respectivamente) e duas fases hidroalcoólicas (F-2 e Ba-2, respectivamente) (figura 31, p. 67).

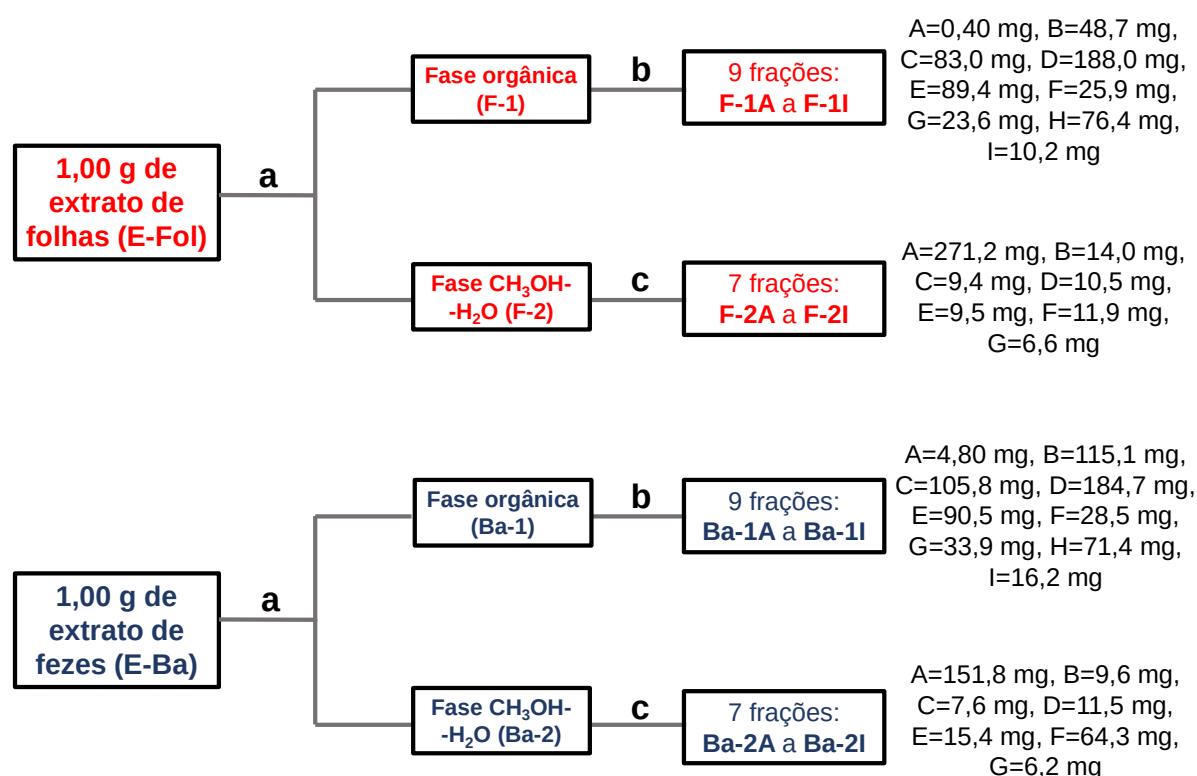
Depois da completa eliminação do solvente, os extratos orgânicos foram separadamente submetidas à extração em fase sólida utilizando-se sílica gel 70-230 mesh ($\Phi=2,0$ cm; $h=8,5$ cm; $m=10,0$ g). Em cada processo de extração por fase sólida, nove frações de 70,0 mL ($\approx 4 \times V_m$) foram coletadas resultando, ao todo, em dezoito frações (F-1A a F-1I e Ba-1A a Ba-1I). As frações contendo o caractere A no código fo-

*As folhas foram coletadas durante 01/04/2010 a 14/10/10. Somente nos seguintes períodos não se efetuaram coletas: i) 1 e 2 de maio, ii) 1 a 9 de julho e iii) 10 a 31 de agosto.

ram eluídas com hexanos, as frações B-F eluídas com hexanos-EtOAc (9:1, 4:1, 7:3, 3:2 e 1:1, respectivamente), as frações G foram eluídas com EtOAc, as frações H foram eluídas com EtOAc-MeOH 1:1 e as frações I foram eluídas com CH₃OH (figura 32, p. 69).

De modo similar, as “fases” (extratos) hidrometanólicas foram individualmente submetidas à extração em fase sólida utilizando-se sílica gel de fase reversa C-18 de 40 µm (Φ = 1,4 cm; h = 7,2 cm; m = 5,0 g). Um total de catorze frações (F-2A a F-2G e Ba-2A a Ba-2G) de 30 mL ($\approx 4 \times V_m$) foram coletadas; sete frações por extração. As frações contendo os caracteres A-F no código foram eluídas com misturas de CH₃OH-H₂O (1:19, 1:4, 3:7, 2:3, 1:1 e 4:1, respectivamente) e as contendo G foram eluídas com CH₃OH (figura 32, p. 69).

Figura 32 - Microfracionamentos dos extratos de folhas de *A. giberti* (E-Fol) e fezes de *B. polyamas* (E-Ba).



a) Partição líquido-líquido com hexanos-CHCl₃ 1:2/CH₃OH-H₂O 1:1 (35,0 mL de cada);

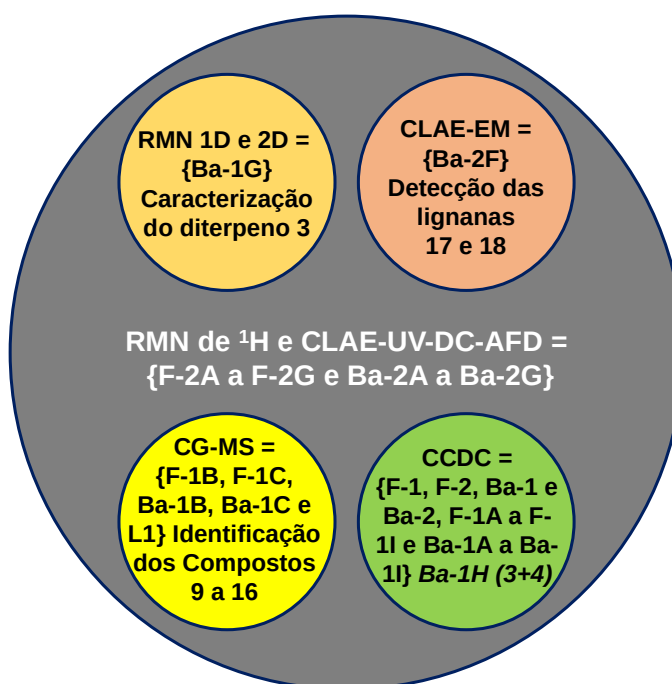
b) Extração em fase sólida utilizando-se sílica gel 70-230 mesh;

c) Extração em fase sólida utilizando-se sílica gel de fase reversa C-18 de 40 µm.

3.7 Screening por micromoléculas biotransformadas

- ✓ As quatro fases, F-1, F-2, Ba-1 e Ba-2, todas as frações obtidas, F-1A a F-1I, F-2A a F-2G, Ba-1A a Ba-1I e Ba-2A a Ba-2G, e os extratos L1 a L5 foram comparativamente analisadas por RMN de ^1H e CLAE-UV-DC-AFD;
- ✓ As fases F-1 e Ba-1 e as frações F-1A a F-1I e Ba-1A a Ba-1I foram comparadas por CCDC;
- ✓ A fração Ba-1G foi analisada por RMN uni- e bidimensionais;
- ✓ A fração Ba-2F foi analisada por CLAE-EM, com detecção nos modos positivo e negativo;
- ✓ As frações F-1B, F-1C, Ba-1B e Ba-1C e o extrato L1 foram analisados por CG-EM (figura 33, p. 70).

Figura 33 - Screening por micromoléculas biotransformadas.



3.7.1 Análises por RMN

As frações F-1A a F-1I e Ba-1A a Ba-1I foram solubilizadas em CDCl_3 , enquanto as frações F-2A a F-2G e Ba-2A a Ba-2G foram solubilizadas em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. As amostras foram preparadas numa concentração de 8,0 a 40,0 mg/mL, filtradas, inseri-

das em tubos de RMN de 5 mm e, então, analisadas por espectroscopia de RMN de ^1H (500 MHz). Com base no espectro da fração Ba-1G, esta foi extensivamente analisada por RMN, o que resultou na caracterização estrutural do diterpeno **3**.

3.7.2 Análises por CLAE-UV-DC-AFD

O gradiente (otimizado) utilizado nas análises das frações por CLAE consistiu inicialmente de uma rampa linear: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 1:19 até $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 4:1 em 30 min. A condição $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 4:1 foi mantida por 10 min (até 40 min), seguida pela alteração da composição da fase móvel para CH_3CN 100 % em 3 min. Por fim, eluiu-se a coluna com CH_3CN por 12 min (tempo total de eluição: 55 min).

As análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C e vazão de 1,0 mL/min utilizando-se coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, 250 × 4,6 mm, 5 μm). As amostras (fases e frações) foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL e, então, filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μm . Foram também preparadas soluções padrões de kusunoquina (**2**), ácido copálico (**5**) e cubebina (**6+6-epi**), na mesma concentração. O volume de injeção foi arbitrariamente padronizado em 20 μL (volume do *loop*: 100 μL).

3.7.3 Análises por CCDC

As fases, F-1, F-2, Ba-1 e Ba-2, e as frações menos polares, F-1A a F-1I e Ba-1A a Ba-1I, foram comparadas por CCDC. Nas análises por CCDC, empregou-se como fases móveis os seguintes sistemas de eluentes: i) hexanos-EtOAc 3:1, ii) hexanos-EtOAc 3:2, iii) hexanos-EtOAc 3:2 (2 % de AcOH e 2% de 2-propanol) e iv) hexanos-EtOAc 1:1 (4% de AcOH).

3.7.4 Análise por CLAE-EM

Baseando-se nos resultados das análises por RMN e CLAE-UV-DC-AFD, a fração Ba-2F foi também analisada por CLAE-EM. O gradiente (otimizado) utilizado foi: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 1:19 para $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 7:3 (0-30 min), $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 7:3 para CH_3CN (30-43 min) e CH_3CN (43-60 min). Coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, 250 x 4,6 mm, 5 μm) e vazão de 0,8 mL/min foram utilizadas nesta etapa.

O efluente da coluna foi analisado por EM-IES, nos modos negativo e positivo. No modo negativo, as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, temperatura do capilar 275 °C e N_2 como gás de arraste foram estabelecidas para a geração dos espectros; no modo positivo as condições foram: voltagem do capilar $+20$ V, temperatura do capilar 275 °C e N_2 como gás de arraste. A faixa de aquisição, em ambos os modos, foi de m/z de 50-1050.

3.7.5 Análises por CG-EM

Soluções das frações F-1B, F-1C, Ba-1B e Ba-1C, do extrato L1 e do padrão de ácido copálico (**5**) foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas [CG-EM (IE; 70 eV)]. As soluções foram preparadas numa concentração de 1 mg/mL em hexanos grau CG ($\geq 97,0$ %). Utilizou-se hélio ultrapuro (pureza mínima de 99,9999 %) como gás de arraste, a uma vazão de 0,8 mL/min. Os constituintes das amostras foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida VF-1MS (filme de dimetilpolisiloxano de 0,25 μ m), com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A programação da temperatura da coluna foi a seguinte: 60° C (5 min), de 60 - 280 °C (50 min; razão de aquecimento = 4° C/min) e 280 °C (10 min). A temperatura do injetor foi ajustada em 220 °C, e o volume de injeção foi de 2,0 μ L. Nessas análises foram identificados os compostos **9** a **16** (figura 27, p. 64), além de **2**, **5**, **7**, **7a** e **8**.

3.8 Isolamento dos diterpenos e das lignanas

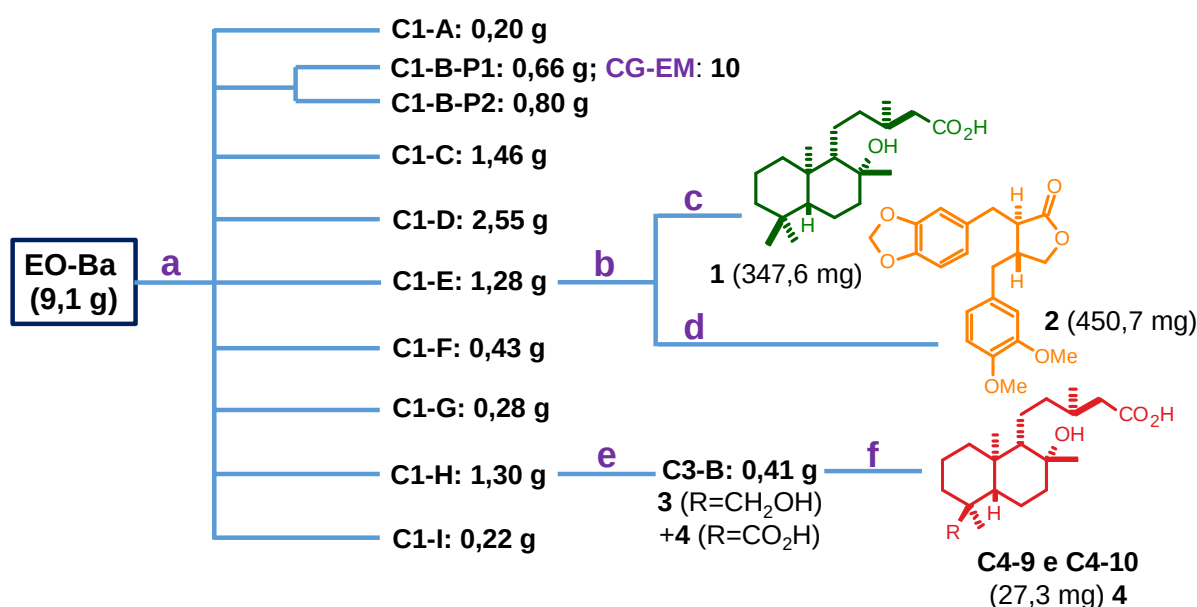
3.8.1 Fracionamento em escala ampliada do extrato fecal (E-Ba)

Uma porção do extrato E-Ba bruto (14,6 g) foi inicialmente submetida à partição líquido-líquido entre hexanos- $CHCl_3$ 1:2 (525,0 mL) e CH_3OH-H_2O 1:1 (525,0 mL). As fases obtidas foram concentradas e, então, secas em capela com exaustão rendendo um extrato orgânico (9,1 g; EO-Ba) e um extrato hidrometanólico (5,5 g; EHM-Ba) (figura 34, p. 73).

Posteriormente, o extrato EO-Ba e uma porção do extrato EHM-Ba (3,0 g) foram separadamente fracionados por extração em fase sólida. Nessa etapa, empregaram-

-se, essencialmente, as mesmas condições descritas para a escala reduzida – micro-fracionamento (item 3.6.1, p. 68), com a exceção das necessárias correções mássicas e volumétricas, além de um ajuste sutil na composição (de CH₃OH-H₂O 2:3 para 11:14) do eluente da fração 4 (procedente do fracionamento de EHM-Ba). Ajustou-se também o eluente da fração 1 proveniente do fracionamento do extrato EO-Ba, desde que se utilizou uma mistura binária de hexanos- EtOAc 98:2, ao invés de hexanos.

Figura 34 - Fracionamento do extrato EO-Ba.



- a)** Extração em fase sólida (sílica gel 70-230 mesh: gradiente hexanos-EtOAc-CH₃OH);
- b)** Extração líquido-líquido – ácido-base [CHCl₃/KOH (aq)] – rendendo duas fases líquidas;
- c)** Acidificação da fase aquosa básica, extração com CHCl₃ e secagem da fase clorofórmica;
- d)** Secagem da fase clorofórmica;
- e)** CC de Sephadex LH-20 (EtOAc-CH₃OH 4:1);
- f)** CC de sílica gel 70-230 mesh (60 subfrações: C4-01 a C4-60).

Do fracionamento da fase orgânica foram obtidas “9” frações (C1-A a C1-I), enquanto que do fracionamento da fase hidrometanólica foram obtidas 7 frações (C2-A a C2-G). A fração C1-B foi dividida em duas partes (C1-B-P1 e C1-B-P2) coletando-se a primeira metade do eluato separadamente da segunda metade. A fração C1-B-P1 foi analisada por CG-EM, o que levou à identificação do éster metílico do ácido hexadecanóico (**10**).

3.8.1.1 Fracionamento da fração C1-E

Uma porção da fração C1-E (821,2 mg; ~64,0 %) foi submetida a uma extração líquido-líquido (ácido-base). Primeiramente, solubilizou-se essa porção da fração C1-E com CHCl_3 (190,0 mL), e, em seguida, extraiu-se a solução clorofórmica obtida com uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH; pH = 12,10; $2 \times 190,0$ mL; a emulsão formada foi desestabilizada adicionando-se uma pequena porção de KCl). A fase inferior foi lavada com água (60,0 mL), e, após a completa evaporação do solvente, esta forneceu 450,7 mg da lignana **2** com significativo grau de pureza.

Em seguida, a solução básica (fase superior) foi acidificada (no próprio funil de separação) com uma solução de ácido clorídrico diluída (HCl; pH = 1,84; 520,0 mL; evitar desidratação) e, então, extraída com CHCl_3 ($2 \times 190,0$ mL). Após a lavagem com água, seguida pela eliminação total do solvente orgânico, a fase clorofórmica obtida forneceu 347,6 mg do diterpeno **1** puro.

3.8.1.2 Obtenção da lignana 2

Uma outra porção (22,4 mg; ~5,0 %) da fração C1-E foi fracionada por CCDP. Eluiu-se, por duas vezes consecutivas, a placa cromatográfica com hexanos/EtOAc 3:2 obtendo-se três subfrações. Obtiveram-se nas subfrações 2 (R_f de ~0,50) e 3 (R_f s de 0,00 a 0,47) a lignana **2** (7,1 mg) pura e o diterpeno **1** (13,8 mg) em mistura com diversos compostos aromáticos minoritários, respectivamente.

3.8.1.3 Fracionamento da fração C1-H

Sob sonicação por 30 minutos, a fração C1-H (1,3 g) foi parcialmente solubilizada com 40,0 mL de uma mistura de EtOAc- CH_3OH 4:1. Após a decantação dos sólidos em suspensão, o sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro Whatman nº 1 e, então, fracionado por CC de Sephadex LH-20 (EtOAc- CH_3OH 4:1, Φ = 3,0 cm, h = 174 cm) obtendo-se três subfrações (C3-A a C3-C: 900 e 2×300 respectivamente). O eluato foi coletado no frasco coletor da subfração 1 até a completa eluição da clorofila. Todas as subfrações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H e

CCDC. A subfração C3-B rendeu 413,3 mg de uma mistura (~ 2:1, respectivamente) dos diterpenos biotransformados **3+4**.

3.8.1.4 Fracionamento da subfração C3-B

A subfração C3-B foi inicialmente analisada por EM-IES (infusão direta; $c = 1,0$ mg/mL), no modo negativo. Em seguida, uma parte dessa subfração (150,0 mg) foi submetida a um fracionamento por CC de sílica gel 70-230 mesh ($\Phi = 2,0$ cm; $h = 9,7$ cm; $m = 12,0$ g), eluída isocraticamente e com misturas binárias de hexanos, EtOAc e CH_3OH , em gradiente de polaridade crescente. Desse processo cromatográfico, foram obtidas 60 subfrações de 12 mL cada (C4-1 a C4-60). Nas subfrações 9 e 10, obteve-se o diterpeno **4** (27,3 mg).

3.8.1.5 Fracionamento da fração C2-E

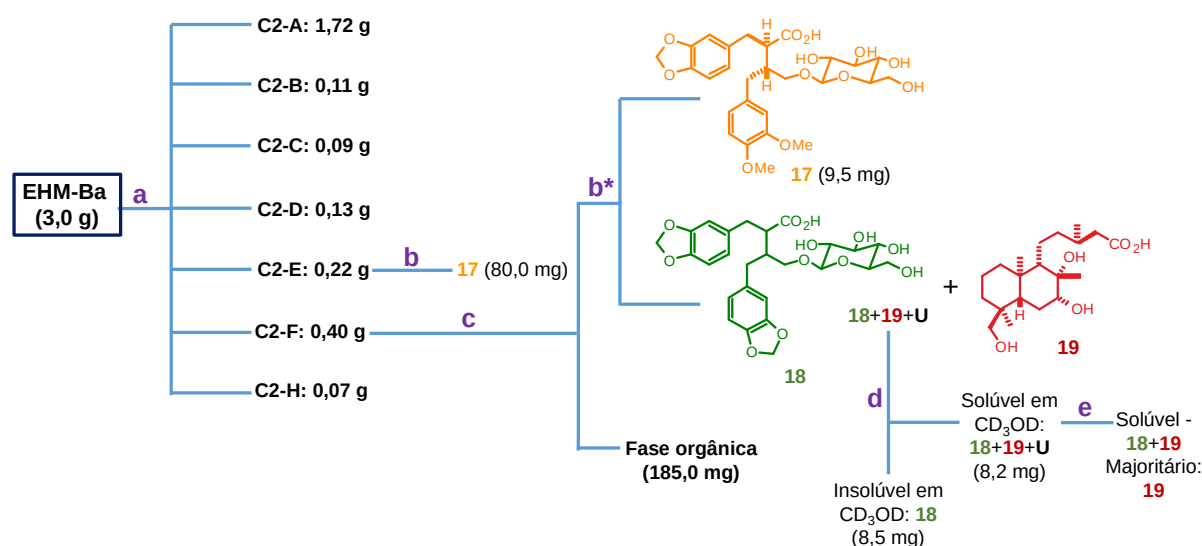
Uma porção (100 mg; 45,5 %) da fração C2-E foi fracionada por CLAE [coluna Zorbax RX-C18 (250x9,4 mm, 5 μm); vazão de 5,0 mL/min; λ de detecção de 210 nm; eluição por gradiente: I) 0-30 min de $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 1:4 para $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 9:11, II) 30-33 min de $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 9:11 para $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ e III) 33-45 min de $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$; $c_a = 33,3$ mg/mL; volume de injeção de 80 μL] obtendo-se seis subfrações. Na primeira subfração ($t_r \sim 21$ min), obteve-se a lignana dibenzilbutânica **17** (80,0 mg) (figura 35, p. 76).

3.8.1.6 Fracionamento da fração C2-F

A fração C2-F (405,0 mg) foi solubilizada com 30,0 mL de $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ 1:1, e extraiu-se a solução hidrometanólica obtida com 60,0 mL ($4 \times 15,0$ mL) de uma solução de hexanos- CHCl_3 1:2. O solvente da fase hidroalcolica foi removido rendendo 215,8 mg de um material amarronzado. Uma porção (50,0 mg) desse material foi fracionada por CLAE (mesmas condições descritas no item 3.8.1.5) obtendo-se a lignana **18** em mistura com dois compostos minoritários (16,7 mg). Além disto, reisolou-se a lignana **17** (9,5 mg). A mistura ternária contendo **18** foi cuidadosamente lavada com 0,7 mL

de CD₃OD, para dar uma porção solúvel (8,2 mg) e uma insolúvel (8,5 mg). Obteve-se na porção insolúvel a lignana **18** pura. Uma análise minuciosa dos dados espectrométricos de RMN obtidos para a porção solúvel permitiu propor a estrutura de um dos compostos minoritário (**19**). Depois disso, a porção solúvel foi seca, e, em seguida, o resíduo obtido foi lavado com (CH₃)₂CO (8,0 mL). Na porção solúvel, obtiveram-se os compostos **18+19** (2,5 mg) ainda em mistura, mas o diterpeno **19** passou a ser o constituinte majoritário desta.

Figura 35 - Fracionamento do extrato EHM-Ba.



- a)** Extração em fase sólida (sílica gel de fase reversa C-18: gradiente H₂O-CH₃OH);
b) Separação por CLAE, gradiente CH₃CN-H₂O; *apenas uma porção foi submetida a separação;
c) Partição líquido-líquido (CH₃OH-H₂O 1:1/hexanos-CHCl₃ 1:2);
d) Lavagem com 0,7 mL de CD₃OD;
e) Lavagem com 8,0 mL de (CH₃)₂CO;
U=Em fase de caracterização.

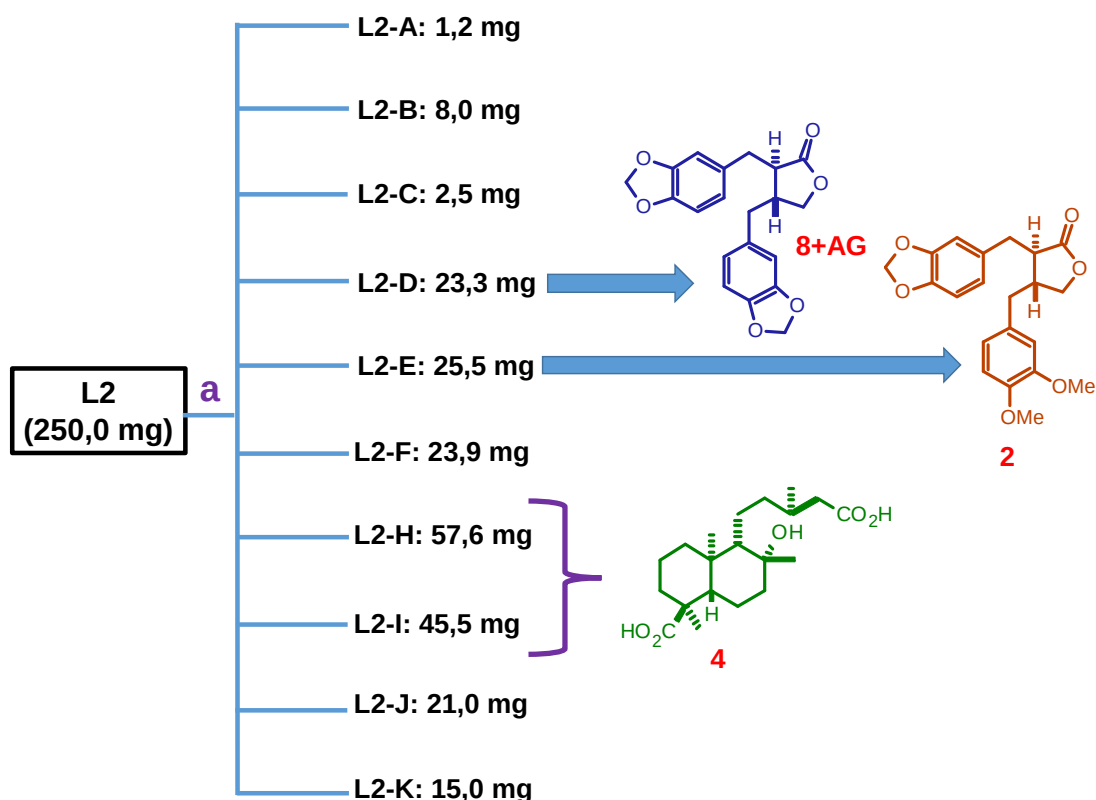
3.9 Sequestro de micromoléculas por lagartas de *B. polydamas*

3.9.1 Fracionamento do extrato L2

Uma porção do extrato L2 (250,0 mg) foi submetido à extração em fase sólida utilizando-se sílica gel 70-230 mesh (Φ = 1,9 cm; h = 10,0 cm; m = 12,0 g). Nessa eta-

pa, coletaram-se dez frações de 60,0 mL ($3,3 \times V_m$) cada. A fração 1 foi eluída com hexanos, as frações 2 a 6 foram eluídas com hexanos-EtOAc (9:1, 4:1, 7:3, 3:2 e 1:1, respectivamente), a fração 7 foi eluída com EtOAc, as frações 8 e 9 foram eluídas com EtOAc-CH₃OH (3:1 e 1:1, respectivamente) e a fração 10 foi eluída com CH₃OH (100 %). Na fração 4 (23,3 mg), identificou-se, em mistura com um ácido graxo, a lignana **8**. Obtiveram-se nas frações 5 (25,5 mg) e 8 (45,5 mg) a lignana **2** e o diterpeno **4**, respectivamente. O diterpeno **4**, com razoável grau de pureza, foi também obtido na fração 7 (57,6 mg) (figura 36, p. 77).

Figura 36 - Fracionamento do extrato L2.



a) CC (sílica gel 70-230 mesh).

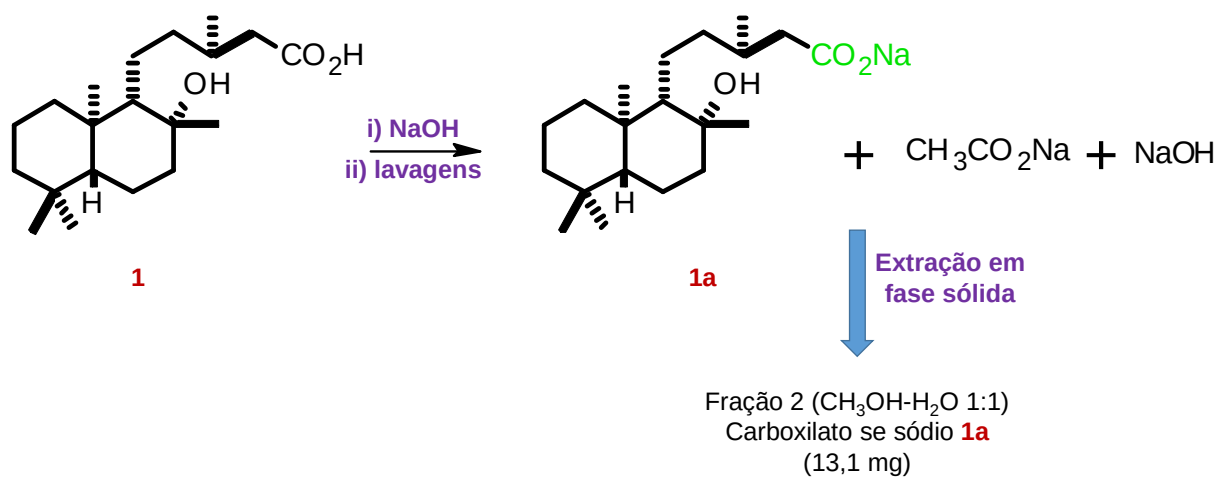
AG=Ácido graxo

3.10 Reações de derivatização e transformações químicas

3.10.1 Preparo e purificação do ent-8β-hidroxi-labdan-15-oato de sódio (1a)

Uma porção (52,3 mg) do diterpeno **1** foi dissolvida com 75,0 mL de CH₃OH, e a solução resultante tratada com solução aquosa de NaOH (75,0 mL), para dar, após secagem em capela com exaustão, um resíduo de 55,6 mg. A concentração da solução de NaOH, cujo pH era de 11,33, foi estimada ser de $2,14 \times 10^{-3}$ mol/L. Numa primeira etapa, lavou-se (com ~8,0 mL de cada solvente) o resíduo obtido com CH₂Cl₂, EtOAc e (CH₃)₂CO, sucessivamente. O resíduo insolúvel (**1a**+CH₃CO₂Na+NaOH) obtido foi purificado por extração em fase sólida utilizando-se um cartucho de fase reversa C-18 (Sep-Pak; Phenomenex; 55µm). O cartucho foi eluído com 6 mL (~8×V₀) de CH₃OH/H₂O 1:19, CH₃OH/H₂O 1:1 e CH₃OH, sucessivamente, obtendo-se na subfração 2 o *ent*-8β-hidroxi-labdan-15-oato de sódio (**1a**; 13,1 mg). Posteriormente, as porções que solubilizaram nos solventes orgânicos (38,8 mg ao todo) foram agrupadas, secas e, em seguida, solubilizadas com 5,0 mL de metanol. À solução metanólica obtida, acrescentou-se 5,0 mL de uma solução hidrometanólica de NaOH (CH₃OH-H₂O 9:1; ~1,0 mol.L⁻¹). Por fim, removeu-se o excesso de NaOH também por meio de extração em fase sólida, obtendo-se mais 40,0 mg de **1a** (figura 37, p. 78).

Figura 37 - Obtenção do carboxilato de sódio do diterpeno **1**.

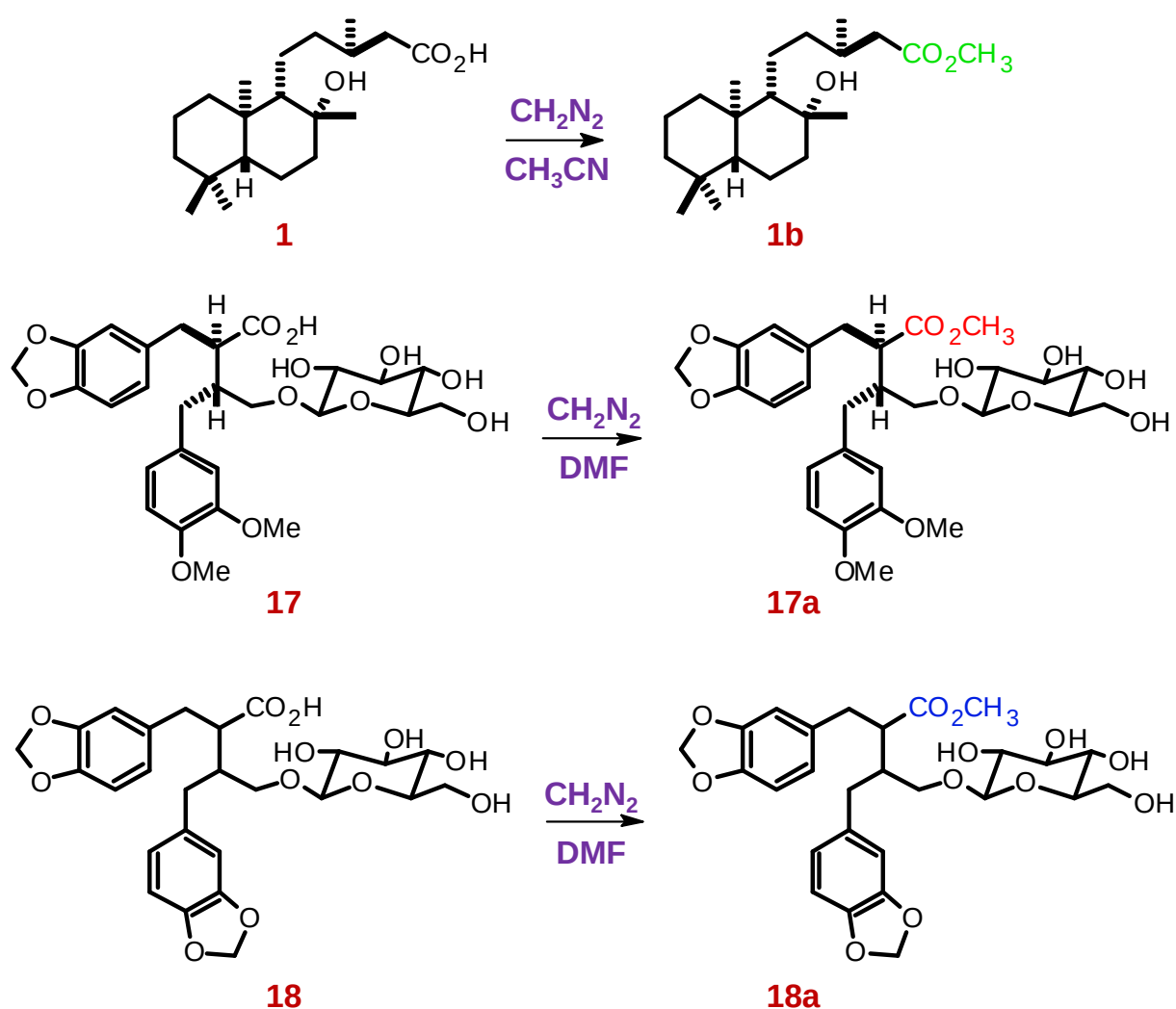


3.10.2 Metilação de **1**, **17** e **18** com diazometano (CH₂N₂)

A substância **1** (18,0 mg) foi dissolvida com acetonitrila (5,0 mL), e as substâncias **17** (8,9 mg) e **18** (5,0 mg) foram dissolvidas com dimetilformamida (5,0 mL), e, então, individualmente submetidas à metilação com CH₂N₂. A solução etérea de CH₂N₂

foi preparada empregando-se a metodologia tradicional descrita por Vogel¹⁶², que utiliza como reagente de partida a *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald). A solução de CH_2N_2 foi adicionada até persistência da coloração amarelo-esverdeada. As soluções resultantes foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por dez minutos e, logo em seguida, secas em capela com exaustão obtendo-se os derivados **1b** (18,8 mg; > 99 %), **17a** (9,1 mg; > 99 %) e **18a** (5,1 mg; > 99 %) (figura 38, p. 79).

Figura 38 - Metilação de **1**, de **17** e de **18** com diazometano.



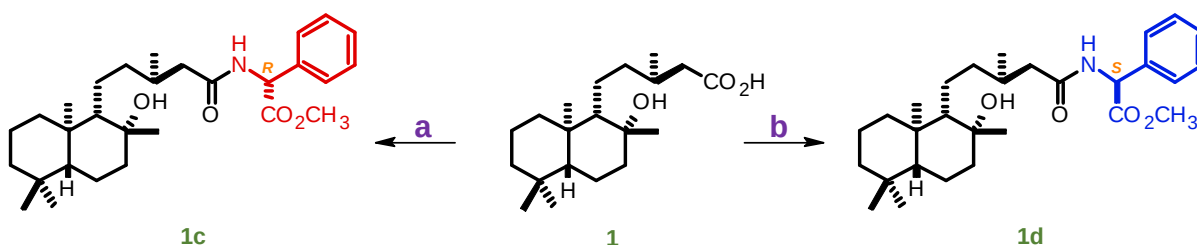
3.10.3 Derivatização de **1** e de 3+4 com reagentes quirais anisotrópicos [(*R*)- e (*S*)-PGME]

As amidas **1c**, **1d**, **3b**, **4a** e **4b** foram preparadas a partir da derivatização do diterpeno **1** e da mistura dos diterpenos **3+4** com o hidrocloreto do éster metílico de (*R*)-fenilglicina [(*R*)-PGME] e/ou com o hidrocloreto do éster metílico de (*S*)-fenilglicina [(*R*)-PGME] utilizando o procedimento descrito por Yabuuchi & Kusum (2000).¹⁶³

O diterpeno **1** (25,0 mg) ou uma mistura dos diterpenos **3+4** (73,0 mg) e o reagente anisotrópico [(*R*)- ou (*S*)-PGME; 20,0 mg para a derivatização de **1** ou 120,0 mg para a derivatização da mistura de **3+4**] foram, num balão de fundo redondo de 10,0 mL, dissolvidos com 0,6 mL ou 2,5 mL de DMF seca. A solução obtida foi resfriada a 0° C com banho de gelo, e, a seguir, sob agitação vigorosa, adicionou-se a esta (durante 10 minutos) PyBOP (52,4 mg ou 322,8 mg), HOBt (15,9 mg ou 96,0 mg) e NMM (55,0 µL ou 360,0 µL), sucessivamente.

Em seguida, manteve-se a solução sob agitação por 5 horas em temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se a mistura reacional 15,0 mL ou 25,0 mL de CHCl₃, e extraiu-se a fase orgânica obtida com solução de HCl (5% m/m) (3×15,0 mL ou 25 mL), de NaHCO₃ (saturada) (3×15,0 mL ou 25,0 mL) e de NaCl (15,0 mL ou 25,0 mL) (~1,1 mol.L⁻¹), sucessivamente. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em capela com exaustão, para render um resíduo (**1-R-PGME**: 51,0 mg, **1-S-PGME**: 56,4 mg, **3+4-R-PGME**: 238,4 mg ou **3+4-S-PGME**: 236,8 mg) contendo uma amida (**1c** ou **1d**) ou mais de um produto (pelo menos **4a** ou **3b+4b**) em mistura com a base nitrogenada pirrolidina (figuras 39 e 40, p. 80 e 81).

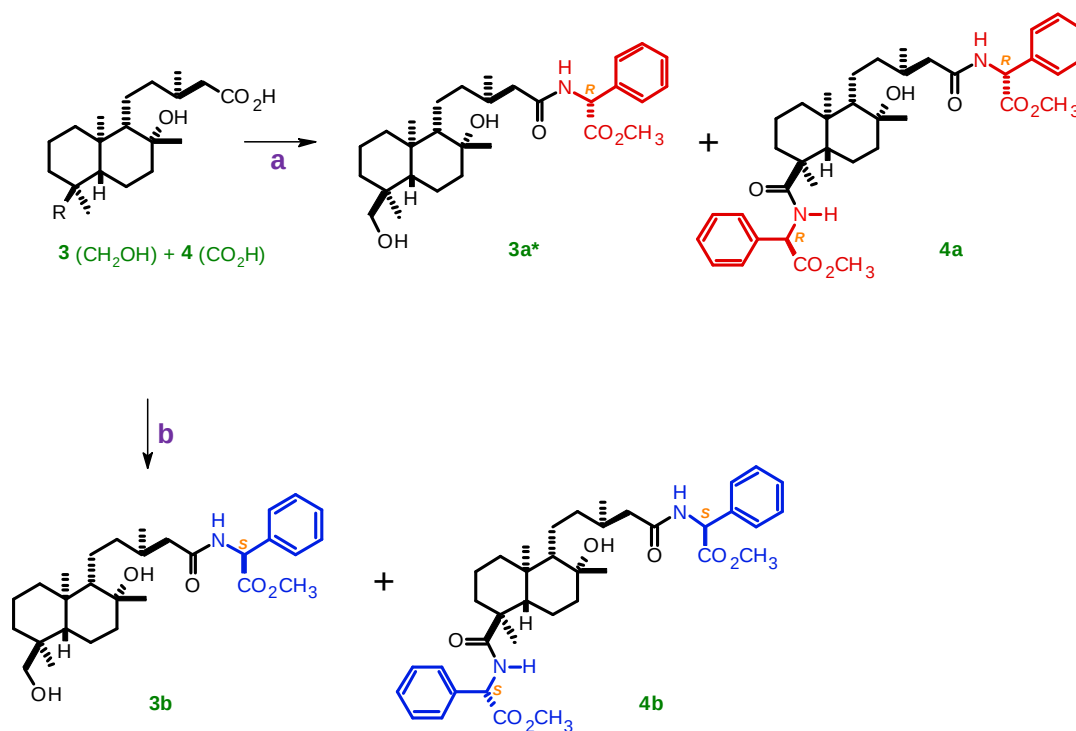
Figura 39 - Derivatizações de **1** com os hidrocloreto dos ésteres metílicos de *R*- e *S*-fenilglicina.



a) Hidrocloreto do éster metílico de (*R*)-fenilglicina, PyBOP, HOBt, NMM, DMF, 5 horas;

b) Hidrocloreto do éster metílico de (*S*)-fenilglicina, PyBOP, HOBt, NMM, DMF, 5 horas.

Figura 40 - Derivatizações de **3+4** com os hidrocloreto dos ésteres metílicos de *R*- e *S*-fenilglicina.



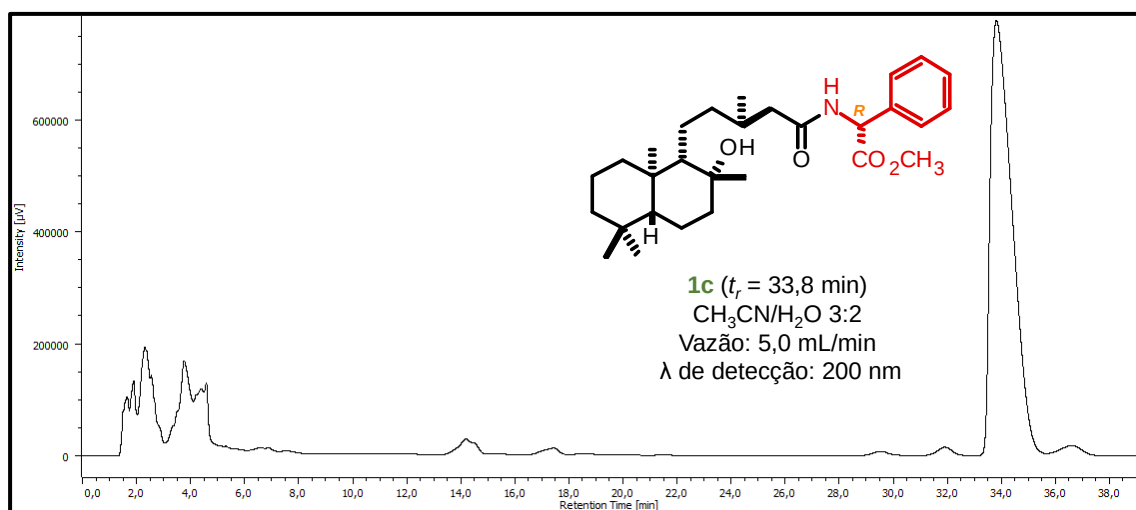
a) Hidrocloreto do éster metílico de (*R*)-fenilglicina, PyBOP, HOBT, NMM, DMF, 5 horas;

b) Hidrocloreto do éster metílico de (*S*)-fenilglicina, PyBOP, HOBT, NMM, DMF, 5 horas.

*Este produto foi formado, mas degradou durante o processo de purificação.

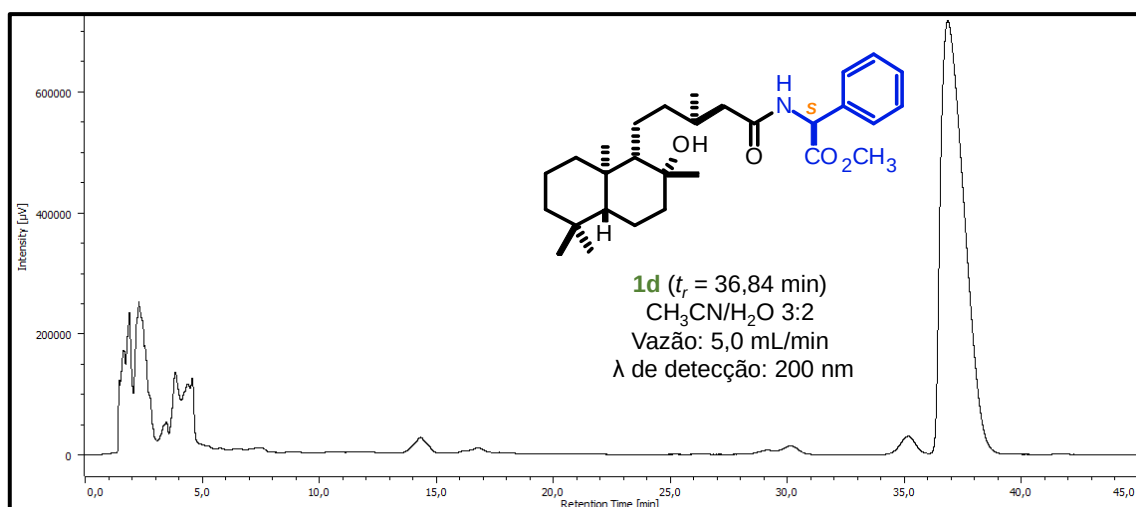
3.10.3.1 Purificação por CLAE das amidas diastereoisoméricas **1c** e **1d**

Figura 41 - Cromatograma preparativo de **1-R-PGME**.



As amostras **1-R-PGME** (51,0 mg) e **1-S-PGME** (56,4 mg) foram individualmente purificadas por CLAE utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: coluna Zorbax RX-C18 (250 x 9,4 mm, 5 μ m), vazão de 5,0 mL/min, λ de detecção de 200 nm, CH₃CN/H₂O 3:2, concentração da solução = 35,0 mg/mL e volume de injeção = 85,0 μ L. Assim, obtiveram-se as amidas diastereoisoméricas **1c** (30,0 mg; 82,6 %) e **1d** (32,0 mg; 88,1 %), respectivamente (figuras 41 e 42, p. 81 e 82).

Figura 42 - Cromatograma preparativo de **1-S-PGME**.



3.10.3.2 Purificação dos derivados amídicos **3b**, **4a** e **4d**

As amostras **3+4-R-PGME** (238,4 mg) e **3+4-S-PGME** (236,8 mg) foram individualmente fracionadas por CC de sílica gel 60 (70-230 mesh, Φ = 2,0 cm, h = 10,1 cm, m = 12,3 g). As colunas foram eluídas isocraticamente e com misturas binárias de hexanos, EtOAc e CH₃OH, em gradiente de polaridade crescente. Em cada fracionamento cromatográfico, doze subfrações de 60,0 mL ($3 \times V_0$) foram coletadas (subfrações 1 a 4: hexano-EtOAc 7:3, 3:2, 1:1 e 3:7, respectivamente; subfração 5: EtOAc; subfrações 6 a 11: EtOAc-CH₃OH 19:1, 9:1, 17:5, 4:1, 7:3 e 1:1, respectivamente; subfração 12: CH₃OH). Todas as subfrações obtidas foram pesadas, e aquelas que continham maior quantidade de massa ($\geq 60,7$ mg) foram analisadas por CLAE e RMN.

Uma porção (30,0 mg; 45,4–49,4 %) das frações que eluíram das colunas com hexanos-EtOAc 3:7 foram separadamente fracionadas por CLAE [coluna Zorbax RX-C18 (250x9,4 mm, 5 μ m); vazão de 3,5 mL/min; λ de detecção de 215 nm; tempera-

tura de 25° C; volume de injeção=42,5 µL; concentração das soluções=20,0 mg.mL⁻¹]. Nessas etapas, utilizaram-se as seguintes fases móveis: CH₃OH-H₂O 31:19 ou CH₃OH-H₂O 63,7:36,3, obtendo-se os derivados amídicos **4a** (15,8 mg), **2b** (6,6 mg) e **4b** (13,3 mg), respectivamente (figuras 43 e 44, p. 83).

Figura 43 - Cromatograma preparativo de **3+4-R-PGME**.

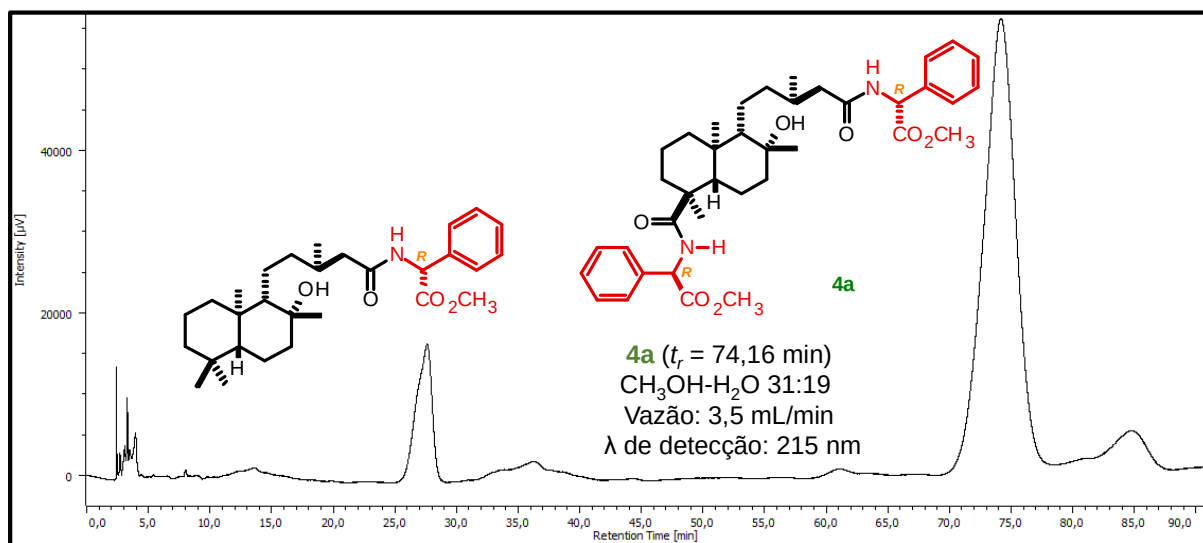
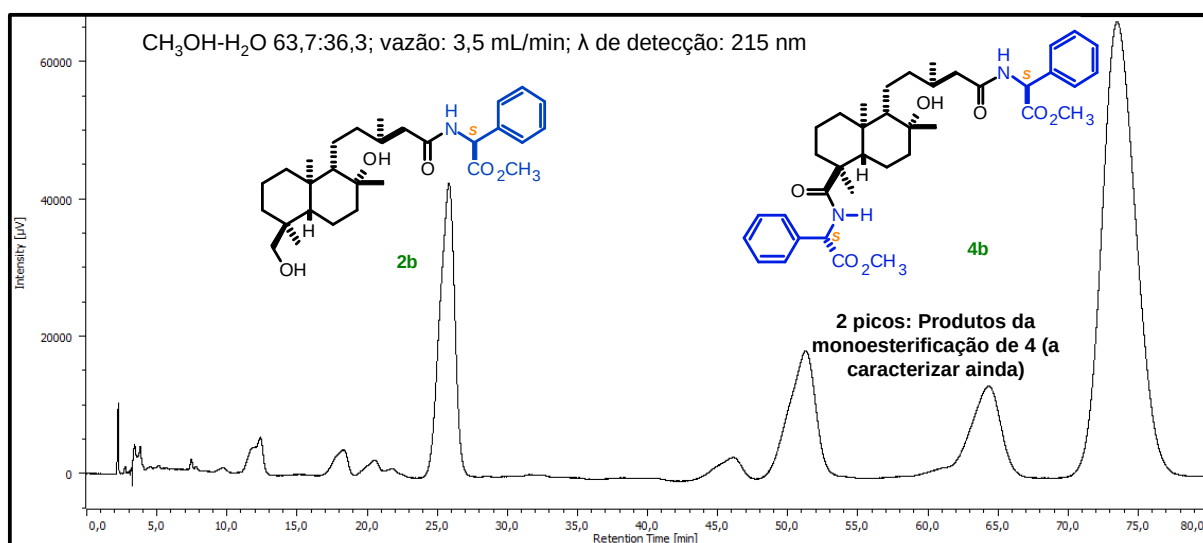


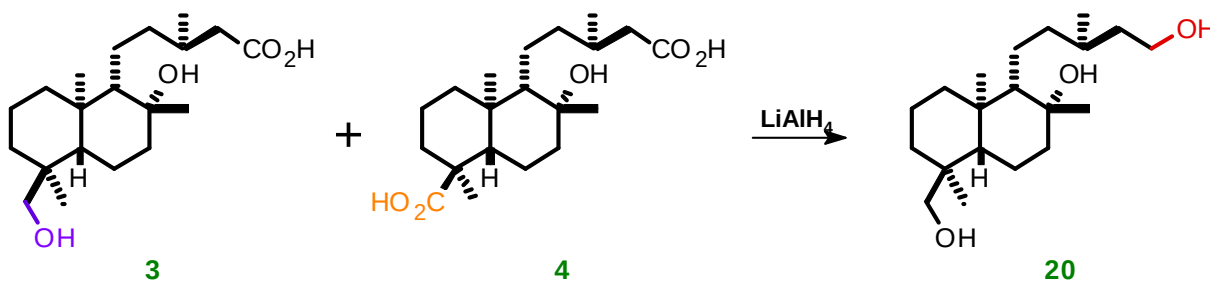
Figura 44 - Cromatograma preparativo de **3+4-S-PGME**.



3.10.4 Redução da mistura de **3+4** com LiAlH₄

A uma suspensão de LiAlH_4 em THF (1,0 mol/L; 1,5 mL), a 0 °C, adicionou-se, gota a gota (durante 15 minutos) e sob agitação vigorosa, uma solução da mistura de **3+4**. Essa solução foi preparada dissolvendo-se 10,0 mg da subfração C3-B com 2,0 mL de THF anidro, em um frasco hermeticamente fechado. Em seguida, refluxou-se a mistura reacional por 2 h e, então, cuidadosamente a resfriou a 0 °C. Essas quatro etapas foram conduzidas sob atmosfera inerte de N_2 . A mistura resfriada foi cautelosamente tratada com 10,0 mL de água, seguido pelo tratamento com 5,0 mL de uma solução aquosa de NaOH (10% m/m). Após a decantação da maior parte dos sólidos em suspensão, transferiu-se a solução básica obtida para um funil de separação. Depois disso, extraiu-se o resíduo do balão de reação com 20,0 mL de CHCl_3 . Após a partição líquido-líquido e separação das fases, a fase clorofórmica foi coletada e, subsequentemente, lavada com uma solução aquosa de NaCl (1,0 mol/L, 8,0 mL) fornecendo, após a evaporação do solvente em capela com exaustão, 6,0 mg do diterpeno trihidroxilado **20** em mistura com 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT). Esse diterpeno foi purificado por extração em fase sólida utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh, $\Phi = 1,0$ cm, $h = 4,5$ cm, $m = 1,6$ g). Nessa etapa, foram coletadas 10 subfrações de 10,0 mL cada ($4,4 \times V_0$). As subfrações 1-5 foram eluídas com misturas de hexanos-EtOAc (1:4, 3:7, 3:2 e 7:3, respectivamente), a subfração 6 foi eluída com EtOAc, as subfrações 7-9 foram eluídas com misturas de EtOAc- CH_3OH (9:1, 4:1 e 1:1) e a subfração 10 foi eluída com CH_3OH . Obteve-se o diterpeno **20** (5,2 mg) nas subfrações 5 e 6, com excelente pureza (figura 45, p. 84).

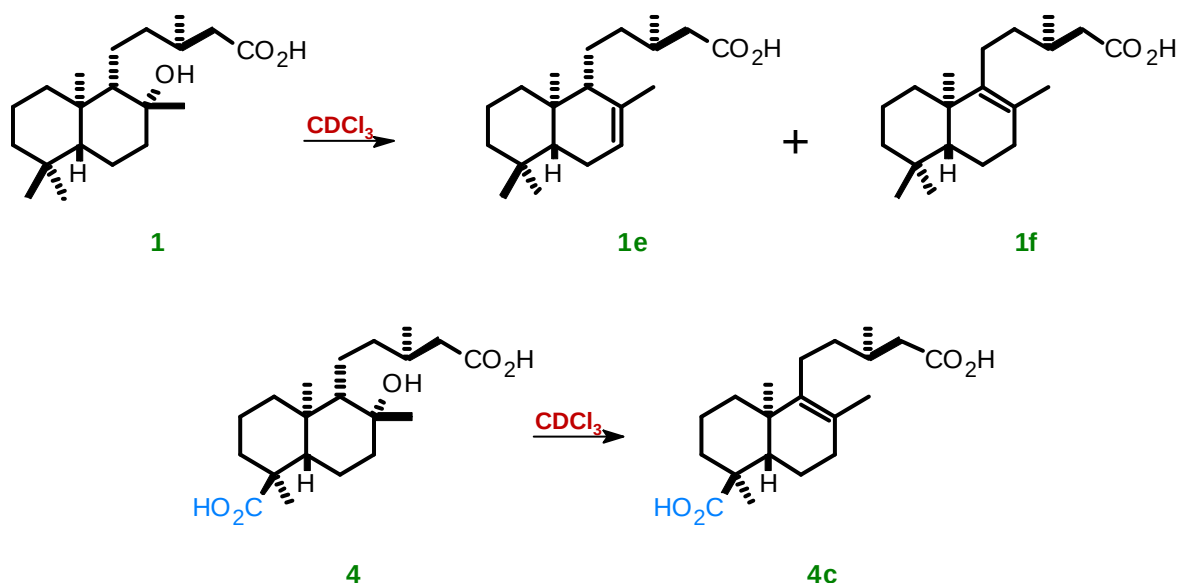
Figura 45 - Redução da mistura de **3+4**.



3.10.5 Desidratação dos diterpenos **1** e **4** em CDCl_3

Quando foram individualmente mantidas em CDCl_3 a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente (5-10 dias), porções dos diterpenos **1** (23,0 mg) e **4** (14,8 mg) desidrataram rendendo uma mistura de **1e+1f** e o ácido dicarboxílico **4c** com elevado grau de pureza. Nessa etapa, utilizou-se CDCl_3 da Sigma-Aldrich, o qual não havia sido desacidificado passando-o através de uma coluna cromatográfica contendo alumina neutra (figura 46, p. 85).

Figura 46 - Reações de desidratação dos diterpenos **1** e **4**.



3.10.5.1 Teste da acidez do CDCl_3

Um volume de 3 mL de CDCl_3 foi transferido para um tubo de ensaio de 20 mL contendo 6 mL de água deionizada. O tubo foi agitado num Agitador de tubos Vortex, e, após a completa separação das fases, transferiu-se a fase aquosa (superior) para um béquer de 10 mL e mediu-se o seu pH (3,32). A partir de outra alíquota de 6 mL da mesma água deionizada utilizada na extração líquido-líquido, preparou-se um branco e mediu-se também o seu pH (6,66). O CDCl_3 utilizado foi da marca Sigma-Aldrich, 99,8 % de D, sem adição de estabilizante e fio de prata. A alíquota de CDCl_3 testada foi retirada do mesmo frasco de solvente utilizado para as análises espectroscópicas e para as reações de desidratação. Mediu-se também o pH de uma fase aquosa após partição desta com 3,0 mL de CDCl_3 tratado com alumina neutra, e, nesse caso, o pH da solução aquosa foi praticamente idêntico ao do branco (6,61).

3.10.6 Procedimentos para a determinação da configuração absoluta da lignana dibenzilbutânica **17**

3.10.6.1 Abertura do anel lactônico de **2**

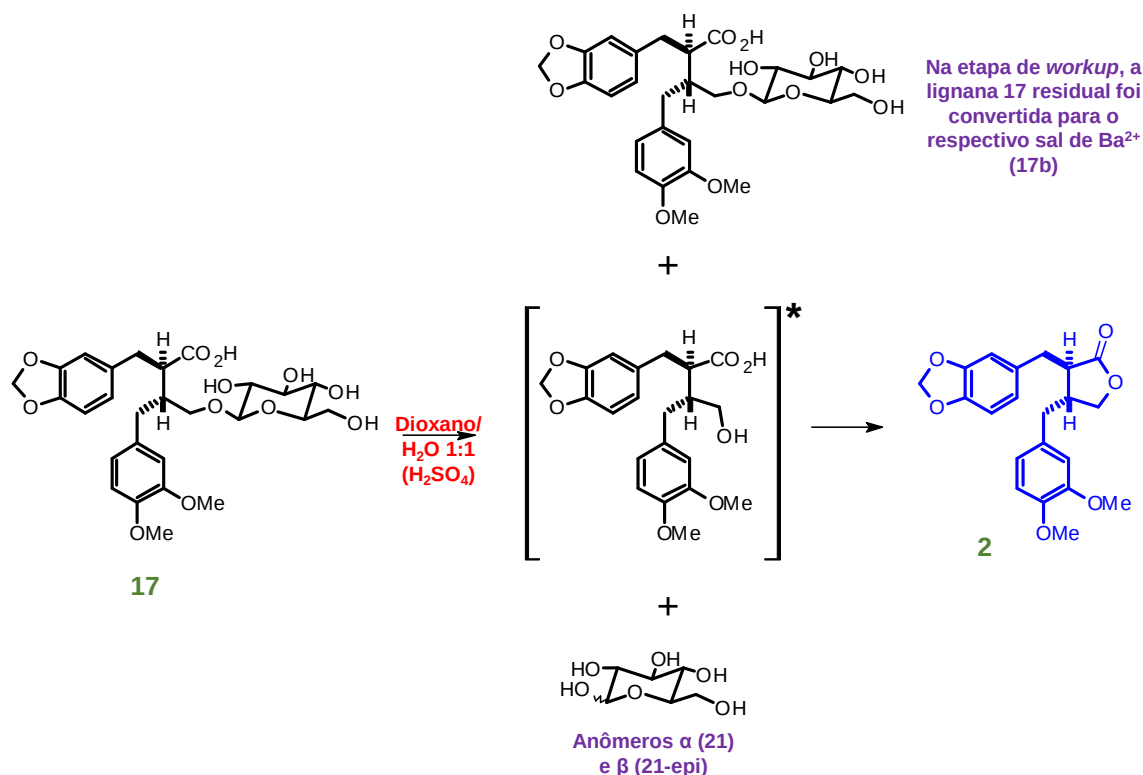
Para estabelecer a configuração absoluta da lignana **17**, propôs-se a sua obtenção partindo-se da lignana kusunoquinina (**2**). A primeira etapa da hemissíntese proposta consistia na abertura do anel lactônico de **2**. Cinco condições experimentais foram avaliadas com essa finalidade:

- ✓ Metanólise em meio ácido (2 % de H₂SO₄; 12 horas; refluxo);
- ✓ Metanólise em meio ácido (6 % de H₂SO₄; 24 horas; refluxo);
- ✓ Metanólise em meio ácido (Amberlyst-15; temperatura ambiente; 168 horas);
- ✓ Aminólise (Amberlyst-15; solvente e nucleófilo: dietilamina; 48 horas; refluxo) e
- ✓ Aminólise [solvente: 2-nitropropano; nucleófilo: dietilamina (10 equivalentes); catalisador: ácido 2-etilhexanóico (2 equivalentes); 38 horas de refluxo (a 120 °C) + 33 horas a temperatura ambiente].

3.10.6.2 Hidrólise ácida de **17**

Uma solução hidro-orgânica acidificada [10,0 mL; dioxano/H₂SO₄ aquoso (0,73 mol.L⁻¹) 1:1] de **17** (10,3 mg) foi aquecida a 88 °C por 8 horas, sob agitação e atmosfera inerte de N₂. Após esse período, a solução foi resfriada à temperatura ambiente, transferida para um funil de separação e, então, diluída com 30,0 mL de água deionizada. A solução obtida foi extraída com CHCl₃ (4×10,0 mL) obtendo-se a fase orgânica. Esta foi lavada com 10,0 mL de uma solução aquosa de NaCl (1,1 mol/L) e seca em capela com exaustão para dar **2** (4,3 mg; rendimento de 62,7 %). Já a solução aquosa ácida remanescente foi neutralizada, filtrada através de funis de placas porosas de 40-60 µm e 15-20 µm, sucessivamente, concentrada e seca. A neutralização foi efetuada em duas etapas: 1^a) neutralização parcial com 50,0 mL de uma solução de Ba(OH)₂ 0,05 mol/L e 2^a) neutralização com BaCO₃ (1,86 g; agitação; 30 minutos). Por fim, o resíduo obtido foi extraído com 10,0 mL de EtOH/H₂O 33:17, e a solução resultante filtrada através de filtro PVDF de 0,45 µm, para fornecer um resíduo praticamente incolor de 8,0 mg (**17b+21+21-epi**) (figura 47, p. 87).

Figura 47 - Hidrólise ácida de 17.



3.11 Cálculos teóricos

3.11.1 Dicroísmo circular vibracional associado a cálculos mecânico-quânticos: Determinação da configuração absoluta de 1

A análise do derivado (**1b**) por DCV, bem como a simulação das curvas teóricas por cálculos mecânico-quânticos (DFT) em nível B3LYP/6-31G(d) de teoria, foram feitas pela prestadora de serviços Biotoools (Florida, USA). Obtiveram-se também os espectros experimental e teóricos de absorção na região do infravermelho (IV).

Os espectros de absorção na região do IV e de DCV foram adquiridos num espectrômetro DCV-TF Chiral/R (BioTools, Inc.) equipado com dois MFEs. Para isso, utilizou-se uma cela de BaF₂ com caminho óptico de 0,1 mm. O retardo dos dois MFEs foi otimizado em 1400 cm⁻¹. O diterpeno **1b** (8,0 mg) foi solubilizado com 0,2 mL de CDCl₃, e o tempo de aquisição para ambos, amostra e solvente, foi de 20 h. A linha de base do espectro de DCV de **1b** foi corrigida subtraindo-se o espectro obtido para

o solvente. Os dados obtidos foram processados no programa Grams AI 9.0 (Thermo), e os espectros foram plotados no programa Origin Pro 8 (Origin Lab).

Os cálculos DFT, em fase gasosa a 298,15 K, foram efetuados no programa Gaussian 09 (Gaussian, Inc.).¹⁶⁴ Selecionaram-se duas configurações para a execução dos cálculos: I) C5-*R*, C8-*R*, C9-*S*, C10-*R* e C13-*R* (**1b**) e II) C5-*R*, C8-*R*, C9-*S*, C10-*R* e C13-*S* (**1b-epi**). As curvas de DCV teóricas dos respectivos enantiômeros foram obtidas pela multiplicação de cada uma das curvas calculadas por -1.

Inicialmente, realizaram-se buscas conformações em nível de mecânica molecular empregando-se o campo de força MMFF94, incorporado no programa ComputeVOA (BioTools, Inc., Jupiter, Florida).¹⁶⁵ Depois disso, os confôrmeros de menor energia, isto é, aqueles dentro de um intervalo de energia relativa de 12,6 kcal/mol em relação ao do mínimo global, foram geometricamente otimizados pelo nível B3LYP/6-31G(d) de teoria. Para o epímero C13-*R* (**1b**) foram feitas otimizações de 45 confôrmeros, enquanto para o C-13S (**1b-epi**) foram otimizados 54 confôrmeros. Todos esses confôrmeros foram utilizados nas simulações dos espectros de absorção na região do IV e das curvas de DCV. Os confôrmeros foram assegurados como sendo mínimos reais por meio de análises vibracionais.

O grau de confiança de atribuição foi calculado utilizando o programa CompareVOA (BioTools, Inc.). Esse programa permiti, entre outras funções, uma comparação quantitativa direta entre os espectros experimental (ais) e teórico (s), fornecendo, assim, uma medida do grau de correlação entre estes.^{165,166}

3.11.2 Análises conformacionais e cálculos de deslocamentos químicos de RMN dos derivados **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**

As análises conformacionais de **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**, assim como os cálculos de deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C desses derivados, foram feitos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector e do Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Laboratório de Cristalografia, Esterodinâmica e Modelagem Molecular.

As pesquisas conformacionais, em fase gasosa, foram executadas pelo método de Monte Carlo, implementado no programa MacroModel (versão 10.0).¹⁶⁷ Em cada busca conformacional, configurou-se para um número máximo de 30.000 etapas; 1.000 etapas por ligação rotacionável. Nas minimizações das energias das conformações geradas, utilizaram-se o gradiente conjugado Polak-Ribiere e o campo de força MM-

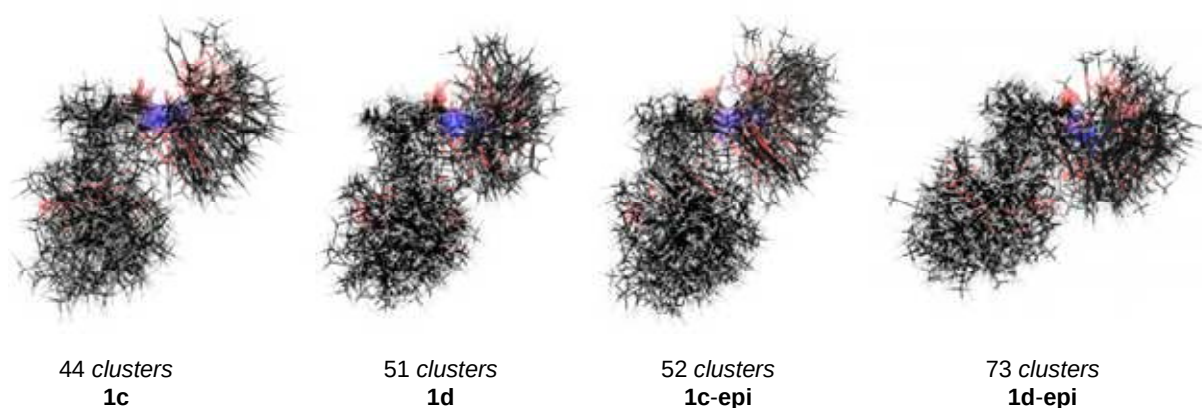
FF.^{168,169} Para a modelagem das interações não ligantes e o tratamento das interações eletrostáticas, uma distância *cutoff* normal e uma constante dielétrica foram, simultaneamente e respectivamente, empregadas.

Os confôrmeros redundantes foram eliminados baseando-se no valor do desvio atômico máximo. Para isso, utilizou-se um valor padrão de 0,5 Å, incluindo nesse teste todos os átomos pesados e hidrogênios ligados a heteroátomos. Somente os confôrmeros dentro de um intervalo de energia relativa de 5 kcal/mol, em relação a do mínimo global, foram retidos e salvos.

Cada pesquisa foi continuada até o mínimo global ser encontrado pelo menos 10–20 vezes, dando, assim, confiança de que todos os confôrmeros relevantes foram amostrados. Todas as ligações rotacionáveis, inclusive a ligação N—C (rigorosamente, N≡C) do grupo amidíco, foram inclusas nas pesquisas conformacionais.

Análises de agrupamento (*cluster analyses*) foram efetuadas utilizando um código píton (*python script*; linguagem de programação de alto nível), interfaceado ao programa Maestro (versão 9.4). A matriz RMS foi gerada incluindo-se todos os átomos pesados e os hidrogênios ligados a heteroátomos pelo método hierárquico médio. Essas análises resultaram em 44 *clusters* para o derivado **1c**, 51 para o **1d**, 53 para o **1c-epi** e 73 para o **1d-epi** (figura 48, p. 89). Após isso, submeteu-se a geometria de menor energia de cada *cluster* a uma otimização completa por cálculos de mecânica quântica – *ab initio* ao nível HF/6-31G de teoria – utilizando o pacote computacional Firefly (versão 8.0).¹⁷⁰ Os confôrmeros foram assegurados como sendo mínimos reais por meio de análises vibracionais. Cálculos de *single-point* com o modelo de solvatação COSMO¹⁷¹ (CHCl₃), em nível B3LYP/6-31G, foram executados para refinar a energia dos confôrmeros.

Figura 48 - *Clusters* de menor energia (sobrepostos) de **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**.

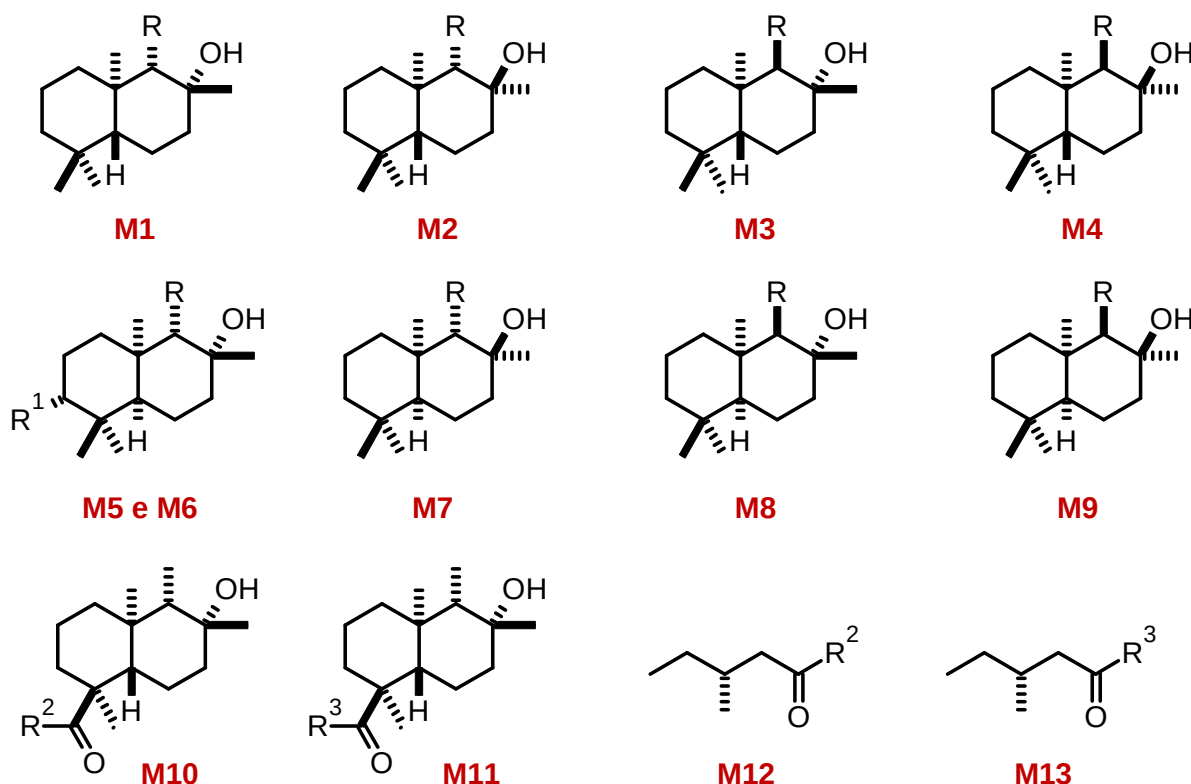


Além disto, computaram-se (no vácuo) *atomic chemical shielding tensors* (σ) pelo formalismo GIAO (*gauge independente atomic orbital*).^{172,173} Deslocamentos químicos isotrópicos (δ), em unidades de ppm, foram computados em relação ao do tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos calculados são valores ponderados e consideram as populações dos confôrmeros na distribuição de Boltzmann. Esses cálculos de deslocamentos químicos, bem como os de *single-point* em solução, foram efetuados no programa NWCHEM 6.1.11.¹⁷⁴

3.11.3 Análises conformacionais de M1 a M13

Cálculos de orbital molecular *ab initio* (em fase gasosa) de **2** e das moléculas-modelo **M1** a **M13** (figura 41) foram efetuados no programa Firefly (versão 7.1.G).¹⁷⁴ As pesquisas conformacionais foram realizadas por simulação de dinâmica molecular utilizando-se a interface gráfica Gabedit 2.4.8.¹⁷⁵ Os seguintes parâmetros foram selecionados nas buscas conformacionais: temperatura de 2000 K, tempo de aquecimento de 2,5 ps, tempo de equilíbrio de 2,5 ps, tempo de produção de 300,0 ps e tamanho de etapa de 0,5 fs (figura 49, p. 90).

Figura 49 - Estruturas das moléculas-modelo **M1** a **M13**. R=CH₂CH₂CH₃. R¹=H (**M5**) ou Br (**M6**). R²= {N-[(1R)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]}. R³= {N-[(1S)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]}.



Durante as simulações, selecionaram-se oito mil (**M10** e **M11**) ou dez mil geometrias (**2**, **M1** a **M9**, **M12** e **M13**); uma a cada 0,03 ou 0,04 ps. As geometrias foram iterativamente otimizadas por mecânica molecular. Para isso, empregou-se o campo de força Amber99, implementado em Gabedit 2.4.8.¹⁷⁵ Após as minimizações das geometrias selecionadas, 90 a 293 confôrmeros (Amber99) foram retidos para **2** e **M1** a **M13** (tabela 2, p. 91). Em seguida, esses confôrmeros foram geometricamente otimizados pelo potencial semi-empírico PM7¹⁷⁶ (**M1** a **M13**) ou pelo campo de força MMFF94 (**2**). Para os cálculos semi-empíricos utilizou-se o programa Mopac2012.¹⁷⁷ As palavras-chave escolhidas para gerar os arquivos *input* foram: PM7 GNORM=0.01 CYCLES= 20000 XYZ AUX. Já os cálculos MMFF94 foram efetuados no programa Avogadro.¹⁷⁸ Por fim, os confôrmeros (PM7 ou MMFF94) de menor energia de **2** e **M1** a **M13** foram otimizados pelo nível RHF/6-31G de teoria utilizando-se o programa Firefly (7.1.G) (tabela 2, p. 91).¹⁷⁶ Conduziram-se também análises vibracionais, afim de assegurar que os confôrmeros eram mínimos reais.

Tabela 2 - Cálculos teóricos de energia para confôrmeros de **2** e **M1** a **M13**.

Modelo	MM (Nº) [§]	ΔE_r (MM) ^η	RHF/6-31G (Nº) [*]	ΔE_r ^{**}
M1	90 confôrmeros	21,1 kcal/mol	11 confôrmeros	4,8 kcal/mol
M2	104 confôrmeros	23,6 kcal/mol	18 confôrmeros	4,9 kcal/mol
M3	135 confôrmeros	19,0 kcal/mol	10 confôrmeros	3,8 kcal/mol
M4	121 confôrmeros	15,6 kcal/mol	9 confôrmeros	3,0 kcal/mol
M5	170 confôrmeros	24,0 kcal/mol	21 confôrmeros	3,0 kcal/mol
M6	150 confôrmeros	20,1 kcal/mol	27 confôrmeros	3,0 kcal/mol
M7	232 confôrmeros	16,9 kcal/mol	16 confôrmeros	2,6 kcal/mol
M8	238 confôrmeros	22,7 kcal/mol	13 confôrmeros	3,0 kcal/mol
M9	235 confôrmeros	19,2 kcal/mol	16 confôrmeros	2,9 kcal/mol
M10	191 confôrmeros	17,0 kcal/mol	37 confôrmeros	5,0 kcal/mol
M11	292 confôrmeros	23,9 kcal/mol	20 confôrmeros	3,0 kcal/mol
M12	209 confôrmeros	22,6 kcal/mol	67 confôrmeros	5,0 kcal/mol
M13	193 confôrmeros	19,3 kcal/mol	47 confôrmeros	3,8 kcal/mol
2	93 confôrmeros	28,0 kcal/mol	30 confôrmeros	13,7 kcal/mol

§= Número de confôrmeros retidos após a minimização interativa pelo campo de força Amber99.

η= Intervalo de energia relativa após minimização pelo campo de força Amber99 (**M1** a **M13**) ou pelo campo de força MMFF94 (**2**).

* Número de confôrmeros selecionados para otimização pelo nível RHF/6-31G de teoria, após as otimizações preliminares pelo potencial semi-empírico PM7 (**M1** a **M13**) ou pelo campo de força MMFF94 (**2**).

** Intervalo de energia calculado a partir dos confôrmeros selecionados para otimização pelo nível RHF/6-31G de teoria.

3.12 Ensaios biológicos

3.12.1 Ensaios de atividade antipredatória

Os testes foram realizados na Universidade Estadual de Campinas, Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, em colaboração com o Prof. Dr. José Roberto Trigo e com a Dr^a. Kamila Ferreira Massuda Garcia. Para os bioensaios de antipredação, foram selecionados como predadores os seguintes organismos: i) filhotes de *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae) e ii) formigas cortadeiras da espécie *Camponotus crassus* (Formicinae).

3.12.1.1 Bioensaio com *G. gallus domesticus*

Vinte exemplares machos de *G. gallus domesticus* foram adquiridos de loja de animais, mantidos em grupo num viveiro e criados com ração e água até atingirem de duas a três semanas de idade. Após esse período, os pintinhos foram, por três dias consecutivos, individualmente treinados a preda larvas liofilizadas (desidratadas) do besouro *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae).

Primeiramente, o grupo dos pintinhos foi deixado em jejum por 2 horas. O treinamento foi conduzido da seguinte forma: um indivíduo de *G. gallus domesticus* era isolado do grupo, e três larvas liofilizadas de *T. molitor* lhe eram oferecidas (figura 50, p. 92). Nessa etapa, ofereceram-se larvas de tamanho correspondente àquelas que seriam utilizadas durante a avaliação da atividade antipredatória. Os indivíduos que, após os três dias de treinamento, rejeitaram as larvas não foram utilizados no bioensaio.

Figura 50 - Bioensaio com *G. gallus domesticus* – treinamento. Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Trigo e pela Dr^a. Kamila Ferreira Massuda Garcia.



Para o bioensaio de antipredação com *G. gallus domesticus*, selecionaram-se as substâncias **1**, **2** e **4** (**2** e **4** foram acumuladas pelas lagartas). Testaram-nas em uma concentração três vezes maior que aquela armazenada (~0,9 mg) de **4** por lagarta de *B. polydamas*. Na escolha da concentração (massa de substância/artropóde) a ser testada, levou-se em consideração a diferença intrínseca que há nas massas das larvas de *T. molitor* e das lagartas de *B. polydamas*. As substâncias hipoteticamente defensivas foram topicamente aplicadas sobre larvas liofilizadas de *T. molitor* de massa média de 20,0 mg. Sobre cada larva foi aplicado ~0,5 mg de substância. A massa de cada lagarta desidratada de quinto *instar* de *B. polydamas* foi considerada ser, como determinado por Klitzke & Brown³¹, de 110,0 mg, isto é, 5,5 vezes maior que a massa das larvas de *T. molitor* utilizadas neste bioensaio.

Neste sentido, prepararam-se soluções metanólicas de **1** e **4** e clorofórmica de **2** na concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ mg/ μ L. Com auxílio de uma seringa Hamilton de 25 μ L, aplicaram-se volumes dessas soluções sobre trinta e nove larvas liofilizadas de *T. molitor*, 25 μ L/larva, obtendo-se as larvas-tratamento. Os experimentos foram realizados com treze repetições, e cada substância foi testada num experimento individual.

Antes do início do experimento, o grupo de pintinhos foi deixado em jejum por 2 h. Em seguida, foram oferecidas a estes as larvas-controle e tratamento. A cada indivíduo foram oferecidas três larvas liofilizadas de *T. molitor*: i) uma larva-controle, sobre a qual fora aplicado 25 μ L de solvente (CH₃OH ou CHCl₃), ii) uma larva-tratamento, sobre a qual fora aplicado 25 μ L de solução contendo uma das substâncias a ser testada (**1**, **2** ou **4**) e iii) uma nova larva-controle (apenas liofilizada), sucessivamente. O solvente foi completamente evaporado antes das larvas serem oferecidas ao predador em potencial. A reação do predador às larvas foi observada por 45 segundos e registrada como: 1) não atacou, 2) atacou, mas não ingeriu e 3) atacou e ingeriu. O teste foi considerado válido somente quando o indivíduo ingeriu as duas larvas-controle.

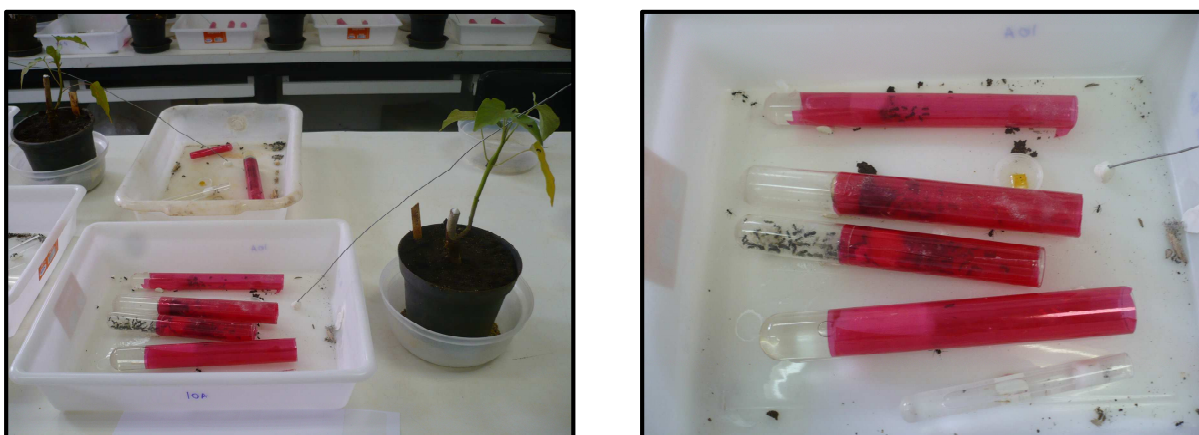
3.12.1.2 Bioensaio com *Camponotus crassus*

As colônias de formigas utilizadas no bioensaio foram coletadas em Itirapina (22°15'S 47°51'W), São Paulo. Estas foram mantidas dentro de bandejas de plástico (30 x 40 x 8 cm, largura x comprimento x altura) em laboratório, sob condições ambien-

te. As colônias foram continuamente alimentadas com água e uma solução de água e mel (1:1). Além disto, larvas de *S. frugiperda* foram semanalmente oferecidas como um alimento complementar.

Antes da realização dos bioensaios, a aptidão das colônias para predar larvas de *S. frugiperda* foi avaliada. Para isso, larvas (uma por ninho) de massa média de 4,0 mg foram oferecidas aos oito ninhos disponíveis 24 horas antes da realização dos testes. Nesse período, o comportamento dos predadores foi regularmente observado, e os ninhos que total- ou parcialmente consumiram a larva oferecida foram considerados ativos.

Figura 51 - Bioensaio com *C. crassus*. Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Trigo e pela Dr^a. Kamila Ferreira Massuda Garcia.



Neste ensaio de palatibilidade, larvas desidratadas (4,0 mg cada) da mariposa *S. frugiperda* foram utilizadas como iscas, e somente as substâncias **1** e **4** foram testadas. A cada ninho de formigas, ofereceram-se simultaneamente três lagartas: i) uma lagarta-controle, sobre a qual fora aplicado 5 μ L de CH_3OH e ii) duas lagartas-tratamento. Sobre uma das lagartas-tratamento, aplicou-se 5 μ L de uma solução metanólica de **1** ($2,0 \times 10^{-2}$ mg/ μ L), enquanto que sobre a outra aplicou-se 5 μ L de uma solução metanólica de **4** ($2,0 \times 10^{-2}$ mg/ μ L). Essas lagartas foram oferecidas aos predadores sobre folhas de *Aristolochia galeata*, as quais foram individualmente fixadas em recipientes de 25 mL. O pecíolo da folha foi mantido em água durante todo o experimento, e a abertura do recipiente foi vedada para facilitar o acesso das formigas às larvas. Mediante sorteios, as iscas foram aleatoriamente distribuídas sobre as folhas. Para fi-

xar a lagarta (isca) sobre a folha, esta foi cuidadosamente colada com supercola a base de cianoacrilato (figura 51, p. 94).

O comportamento do predador às larvas foi regularmente observado por 24 horas e registrado como: 1) predou totalmente, 2) predou parcialmente e 3) não predou. Durante esse período, os ninhos das formigas foram mantidos sob luz artificial e temperatura de 28 °C.

3.13.1 Atividade inseticida

Os testes de susceptibilidade foram realizados no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pelo Dr. Alexandre Carlos Menezes Netto e pelo MSc. Luan Alberto Odorizzi dos Santos, sob a orientação do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, quem também efetuou os tratamentos estáticos para determinar as porcentagens de mortalidade acumulada em sete dias.

As lagartas de *S. frugiperda* foram criadas com dieta artificial (figura 52, p. 95). Estas foram mantidas em ambiente controlado: temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 14:10 (luz artificial), inclusive durante a execução dos bioensaios, para os quais foram selecionadas lagartas de terceiro *instar* (10 dias de idade) (figura 52, p. 95).

Figura 52 - Bioensaio com *S. frugiperda*. Estas fotos foram cedidas pelo Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e pelo MSc. Luan Alberto Odorizzi dos Santos.



Inicialmente, efetuou-se um estudo para avaliar a toxicidade de alguns solventes orgânicos para as lagartas de *S. frugiperda*. Testaram-se os seguintes solventes: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ e EtOH. Nesse estudo, utilizaram-se 20 lagartas para cada um dos solventes testados, e aplicou-se sobre o mesotórax de cada lagarta de terceiro *instar* 1,0 μL de um dos solventes orgânicos. O solvente seria considerado “atóxico” se a mortalidade fosse $\leq 10\%$, isto é, estatisticamente baixa.

As substâncias **1** e **2** foram solubilizadas com $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, enquanto os extratos E-Ba e E-Fol foram solubilizados com EtOH. As soluções obtidas foram topicamente aplicadas sobre lagartas de *S. frugiperda* de terceiro *instar*, dispersas em placas de Petri que haviam sido esterilizadas com etanol e luz UV. Utilizaram-se microseringas Hamilton (de 5 e 25 μL) para aplicação das soluções acetônicas e pipeta automática (de 0,1 a 10,0 μL) para aplicação das soluções etanólicas.

Os extratos foram avaliados em oito concentrações: 10,0, 40,2, 80,3, 154,6, 291,2, 381,6, 427,5 e 534,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, enquanto as substâncias **1** e **2** foram testadas nas sete primeiras concentrações (excesso concentração de 427,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Sobre cada lagarta de *S. frugiperda*, aplicou-se 1,0 μL de uma das soluções a serem testadas, obtendo-se as lagartas-tratamento. Para cada concentração de uma determinada amostra, utilizaram-se 48 lagartas de 3º *instar*, o que foi considerado uma única réplica, mas com um número maior de repetições. Aplicando-se $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (1,0 $\mu\text{L}/\text{inseto}$) sobre 48 lagartas, e EtOH sobre outro grupo de mesmo número de indivíduos, obtiveram-se as lagartas-controle. Durante todo o experimento, manteve-se apenas uma lagarta por placa de Petri, e esta foi constantemente alimentada com dieta artificial.

As avaliações de susceptibilidade foram realizadas após 24, 72 e 168 horas da aplicação das amostras. Em cada ocasião, registraram-se as mortes e contabilizou-se o número de sobreviventes. As lagartas foram consideradas mortas quando não houve qualquer movimentação após cuidadosa estimulação mecânica por 10 segundos. Com base nesses dados, calcularam-se as percentagens de mortalidade acumulada em sete dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Uma visão panorâmica

Este capítulo divide-se em duas partes. Quando julgado necessário, antes da discussão propriamente dita dos resultados, incluiu-se uma breve introdução sobre o assunto em pauta. Na primeira parte deste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos dos estudos comparativos entre as composições químicas dos extratos de folhas e fezes. Fornecem-se, porém, informações detalhadas apenas acerca das diferenças mais conspícuas existentes entre esses dois extratos, as quais acabaram por nortear toda a dinâmica de desenvolvimento do presente trabalho, como certamente ficará evidente ao leitor durante a leitura deste texto.

Dentro desse contexto, enfatizam-se três aspectos: i) ressalta-se a imensa contribuição das etapas de microfracionamento para efetuar-se uma busca racional pelas micromoléculas, possivelmente, biotransformadas pelas lagartas, ii) destacam-se as principais evidências comprobatórias acerca da presença de determinadas substâncias somente nas fezes e iii) apresentam-se argumentos preliminares visando a caracterização estrutural dos metabólitos biotransformados; argumentos os quais tem o objetivo de mostrar que as micromoléculas isoladas do extrato fecal são as mesmas que foram detectadas durante os estudos comparativos.

O fracionamento em escala ampliada do extrato de fezes de lagartas da borboleta *B. polydamas* resultou no isolamento de três diterpenos labdânicos e duas lignanas dibenzilbutânicas inéditos: i) ácido (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-dihidroxi-labdan-15-óico (**3**), ii) ácido (–)-(4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15,18-dióico (**4**), iii) ácido 7β,8β,18α-trihidroxi-labdan-15-óico (**19**), iv) ácido (–)-(8*S*,8*R'*)-(3,4-metilenodioxo)-(3',4'-dimetoxi)-9'-*O*-β-glucopiraniil-lignan-9-óico (**17**) e v) ácido (–)-(8*S*,8*R'*)-[3,4:3',4'-bis(metilenodioxo)]-9'-*O*-β-glucopiraniil-lignan-9-óico (**18**). Desse mesmo extrato, foram ainda isoladas duas substâncias conhecidas: i) kusunoquinina (**2**) e ii) ácido (–)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-óico (**1**), cuja as ocorrências, em folhas de *A. giberti*, foram previamente descritas na literatura.⁵⁹ A hidrólise ácida da lignana **17** rendeu **2** e uma mistura contendo o sal de bário **17b** e os epímeros da glucose (**21** e **21-epi**). O diterpeno **4** e a lignana **2** também foram isolados do extrato L2. Dessas

dez substâncias, duas ou três foram testadas em bioensaios para avaliação de atividade inseticida (**1** e **2**) e/ou antipredatória (**1**, **2** e **4**).

Além das substâncias supracitadas, foram obtidos treze derivados semi-sintéticos: i) (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-oato de sódio (**1a**), ii) (-)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-oato de metila (**1b**), iii) (+)-(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'-*R*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15-amida (**1c**), iv) (-)-(5*R*,8*R*,9-*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15-amida (**1d**), v) ácido (5*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-labd-7-en-15-óico (**1e**), vi) ácido (5*R*,10*R*,13*R*)-labd-8-en-15-óico (**1f**), vii) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-8,18-diidroxi-labdan-15-amida (**3b**), viii) (-)-(4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8,18-di-hidroxi-labdan-15-ol (**20**), ix) (4*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*R*,1''*R*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-[*N*-(2''-metoxi-2''-oxo-1''-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15,18-diamida (**4a**), x) (4-*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,1'*S*,1''*S*)-[*N*-(2'-metoxi-2'-oxo-1'-feniletil)]-[*N*-(2''-metoxi-2''-oxo-1''-feniletil)]-8-hidroxi-labdan-15,18-diamida (**4b**), xi) ácido (4*S*,5*S*,10*R*,13*R*)-labd-8-en-15,18-dióico (**4c**), xii) (-)-(8*S*,8*R'*)-(3,4-metilenodioxi)-(3',4'-dimetoxi)-9'-*O*-β-glucopiranyl-lignan-9-oato de metila (**17a**) e v) (-)-(8*S*,8*R'*)-[3,4:3',4'-bis(metilenodioxi)]-9'-*O*-β-glucopiranyl-lignan-9-oato de metila (**18a**).

Neste trabalho, identificaram-se ainda, por CG-EM, RMN de ¹H e/ou CLAE, os diterpenos ácido copálico (**5**), ácido eperúico (**7**), eperuato de metila (**7a**) e *trans*-fitol (**9**), os policetídeos hexadecanoato de metila (**10**), hexadecanoato de etila (**11**), *trans*-octadec-9-eno-ato de metila (**12**), octadecanoato de metila (**13**), ácido (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrien-óico (**14**), (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienoato de etila (**15**), (9*E*,12*E*)-octadecadienoato de metila (**16**) e os epímeros da cubebina (**6+6-epi**).

Sendo assim, o restante deste capítulo é dedicado a identificação ou caracterização estrutural das substâncias identificadas ou obtidas, bem como a apresentação e discussão dos resultados dos ensaios biológicos. Neste sentido, a segunda parte deste capítulo está subdividida em três: 1ª) identificação por CG-EM, RMN de ¹H e CLAE, 2ª) caracterização estrutural dos diterpenos (naturais e semissintéticos) e 3ª) caracterização estrutural das lignanas (naturais e semissintéticas), respectivamente. Destaca-se que não foi destinada uma seção específica para os bioensaios, sendo os dados destes inseridos dentro do contexto considerado pertinente.

4.2 Screening em escala reduzida: Microfracionamentos e estudos comparativos

A metodologia inicialmente experimentada para os microfracionamentos dos extratos E-Fol e E-Ba envolveu lavagens destes com solventes de polaridade crescente: hexanos, CH_2Cl_2 , EtOAc, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ e CH_3OH . Contudo, não se obtiveram bons resultados, uma vez que, para um dado extrato, a maioria das frações obtidas, quando analisadas por RMN e CLAE, exibiu espectros e perfis cromatográficos muito similares.

Por essa razão, uma metodologia substitutiva, rápida e eficiente, foi então desenvolvida para os microfracionamentos dos extratos E-Fol e E-Ba. Essa metodologia consistiu numa partição líquido-líquido, seguida por extrações em fase sólida (item 3.6.1, p. 68). A primeira dessas etapas não apenas se mostrou seletiva, mas contribuiu, eficazmente, para que excelentes recuperações ($\geq 93\%$) fossem logradas nas etapas seguintes.

Todas as frações obtidas foram analisadas por RMN e CLAE, e, em busca de metabólitos, possivelmente, biotransformados, compararam-se entre si os seus espectros e os seus perfis cromatográficos. Com o mesmo objetivo, também compararam-se as frações menos polares, F-1A a F-1I e Ba-1A e Ba-1I, por meio de eluição em CCDC, em vários sistemas de eluente. Por duas ou três dessas técnicas, igualmente, analisaram-se as fases F-1, F-2, Ba-1 e Ba-2.

Diversas diferenças interessantes foram observadas entre as composições químicas das frações oriundas do E-Fol com as do E-Ba, dentre as quais, nos próximos dois itens, 4.2.1 e 4.2.2, se destacam duas das mais perceptíveis, que acabaram por nortear toda a dinâmica de desenvolvimento do presente trabalho, visto que, num primeiro momento, optou-se por investir esforços para isolar e caracterizar, inclusive estereoquimicamente, as substâncias biotransformadas majoritárias.

Mesmo essas diferenças majoritárias, não foram totalmente nítidas quando se compararam entre si os espectros e os perfis cromatográficos das fases F-1, F-2, Ba-1 e Ba-2, o que evidenciou a necessidade das etapas de microfracionamentos para efetuar-se uma busca racional e eficiente pelas micromoléculas, provavelmente, biotransformadas pelo fitofágo especialista *B. polydamas*.

As fases líquidas utilizadas para a partição líquido-líquido foram compostas por misturas de solventes. Ao clorofórmio foi adicionado hexano para diminuir a polaridade da fase orgânica e o consumo de solvente clorado, enquanto ao metanol foi adicio-

nado água para adequar a polaridade da outra fase. Os motivos para essas escolhas foram: i) *A. giberti* (folhas) é uma fonte rica em lignanas e diterpenos pouco funcionalizados⁵⁹ e ii) lepidópteros, em geral, hidroxilam e/ou oxidam grupos metílicos de terpenos¹¹⁷, assim como convertem lignóides em derivados O-desmetoxilados, hidroxilados e/ou glicosilados, produzindo, assim, substâncias de polaridades médias a altas.^{81,127, 131}

Após as extrações em fase sólida e análises das frações obtidas, constatou-se que, nas partições líquido-líquido, se obtivera ótimos coeficientes de partição para as micromoléculas em geral. No microfracionamento do E-Ba, por exemplo, verificou-se que as lignanas dibenzilbutirolactônicas e os diterpenos pouco funcionalizados, provenientes do metaboloma da planta, foram quantitativamente obtidos nas frações da fase orgânica (Ba-1), ao mesmo tempo que três das substâncias biotransformadas, **17**, **18** e **19**, foram quantitativamente obtidas nas frações da fase hidrometanólica (Ba-2). Somente os diterpenos **3** e **4** foram detectados em ambas as fases, porém, é importante mencionar que mais de dois terços destes (~69 %) foram obtidos em Ba-1.

4.2.1 Estudos cromatográficos comparativos

4.2.1.1 Estudo comparativo por CCDC: Detecção dos metabólitos biotransformados 3 e 4

As fases (F-1 e Ba-1) e as frações (F-1A a F-1I e Ba-1A a Ba-1I) foram intercaladamente aplicadas em placas de sílica gel F₂₅₄. Intercalou-se Fs-1 com Fs-3, F-1A com Ba-1A, F-1B com Ba-1B, e assim por diante (figuras 53 e 54, p. 101 e 102). Diversas fases móveis foram testadas, das quais as melhores foram: i) hexanos-EtOAc 1:1 (4 % de AcOH) e ii) hexanos-EtOAc 3:2 (2 % de AcOH e 2 % de isopropanol).

Em um primeiro momento, eluíram-se e revelaram-se placas nas quais haviam sido aplicadas apenas as frações e as fases. Numa etapa posterior, isso foi repetido aplicando-se também nas cromatoplasas a fração C3-B. Por conveniência, as figuras 53 e 54, p. 101 e 102, são das placas nas quais foi, concomitantemente, aplicada a fração C3-B.

Após as eluições, as cromatoplasas foram reveladas com luz UV, vapores de iodo e solução de vanilina sulfúrica 1%, sucessivamente. O último revelador permitiu vi-

sualizar algumas diferenças significativas entre as composições químicas das frações. As principais diferenças foram observadas entre F-1G e Ba-1G e entre F-1H e Ba-1H. Como pode ser verificado nas figuras 45 e 46, quando as placas cromatográficas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica, visualizaram-se para as frações Ba-1G e Ba-1H manchas rosadas não visualizáveis para as frações F-1G e F-1H. Verificou-se também que, ao se tentar comparar diretamente as fases, F-1 e Ba-1, o grau de sutileza de tais diferenças foi elevado, resultando em conclusões muito subjetivas.

A co-eluição das amostras (fases e frações) com a fração C3-B, a qual procedia do fracionamento em escala ampliada e era, segundo análises por RMN e EM (figuras 55-57, p. 103 e 104), uma mistura dos diterpenos labdânicos inéditos **3**+**4**, mostrou que os compostos exclusivamente revelados para as frações Ba-1G e Ba-1H tinham os mesmos R_f s dos compostos majoritários da fração C3-B, evidenciando, assim, que **3** e **4** estavam presentes somente em E-Ba, e, portanto, que estes deveriam ser produtos de biotransformação ou metabólitos genuínos do inseto.

Figura 53 - Cromatoplaça eluída em hexanos-EtOAc 1:1 (4% de AcOH) e revelada com vanilina sulfúrica. Os pontos de aplicação 1-21 correspondem às fases F-1 e Ba-1, às frações F-1A, Ba-1A, F-1B, Ba-1B, F-1C, Ba-1C, F-1D, Ba-1D, F-1E, Ba-1E, F-1F, Ba-1F, F-1G, Ba-1G, F-1H, Ba-1H, F-1I e Ba-1I e à subfração C3-B (mistura dos diterpenos biotransformados inéditos **3** e **4**), respectivamente. Note que **3** e **4** foram detectados somente nas frações oriundas do E-Ba.

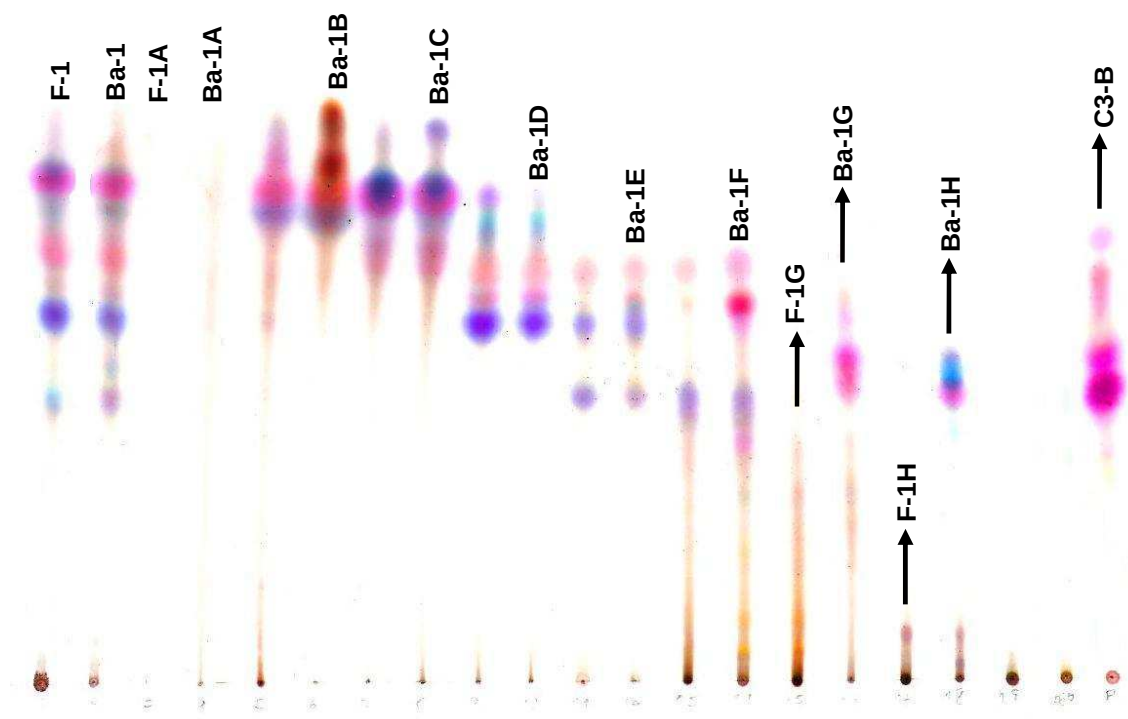
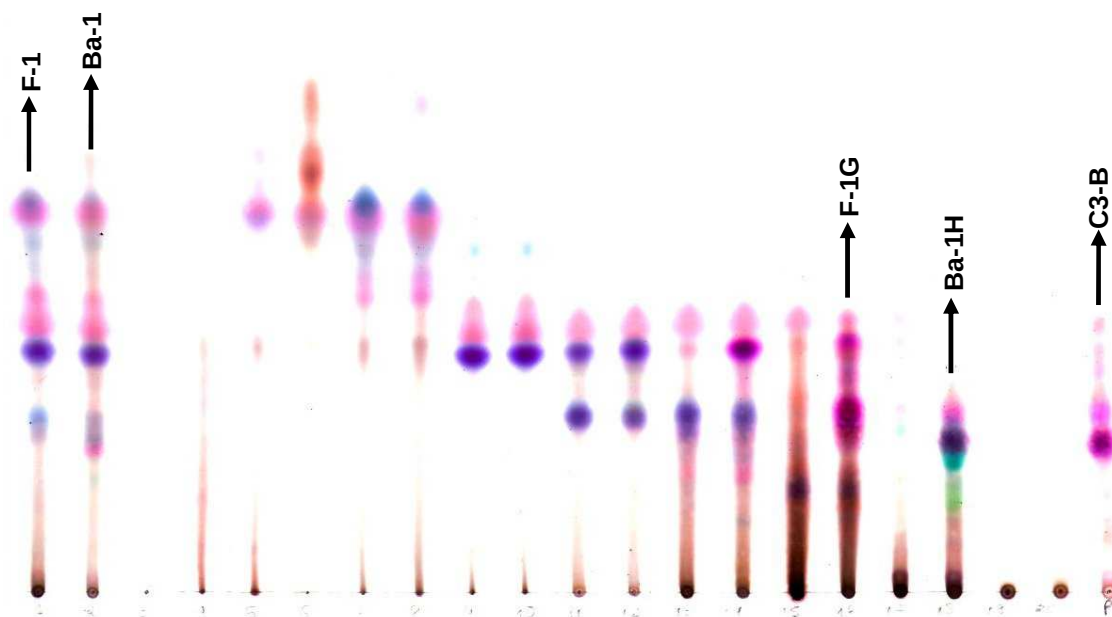


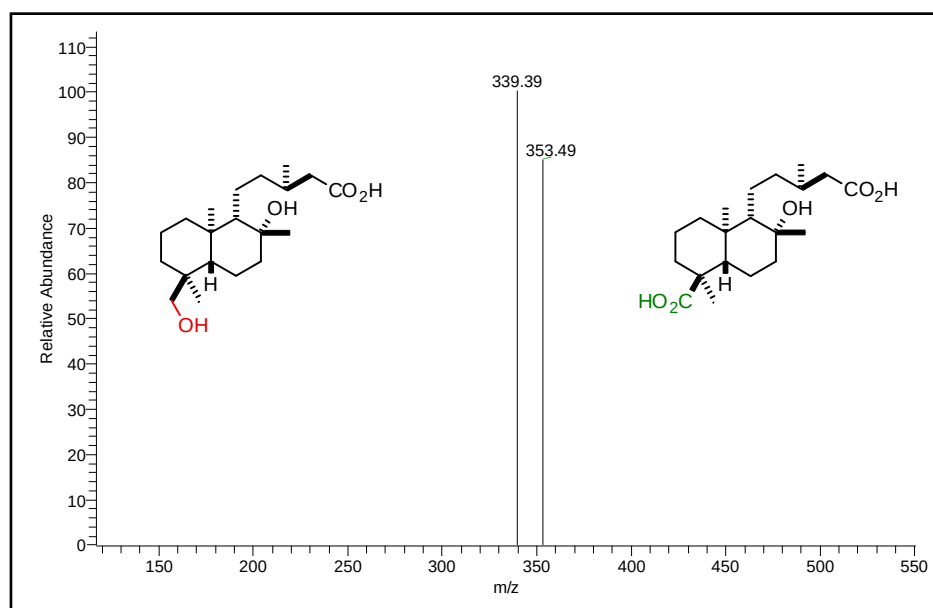
Figura 54 - Cromatoplaça eluída em hexanos-EtOAc 3:2 (2% de AcOH e mais 2% de álcool isopropílico) e revelada com vanilina sulfúrica. Os pontos de aplicação 1-21 correspondem às fases F-1 e Ba-1, às frações F-1A, Ba-1A, F-1B, Ba-1B, F-1C, Ba-1C, F-1D, Ba-1D, F-1E, Ba-1E, F-1F, Ba-1F, F-1G, Ba-1G, F-1H, Ba-1H, F-1I e Ba-1I e à subfração C3-B (mistura dos diterpenos biotransformados inéditos **3** e **4**), respectivamente. Note que **3** e **4** foram detectados somente nas frações oriundas do E-Ba.



4.2.1.1.1 Análises espectrométricas preliminares da subfração C3-B (3+4)

Preliminarmente, a constituição química da subfração C3-B foi investigada por RMN de ^1H e de ^{13}C e por EM-IES (figuras 55-58, p. 103-105). No modo negativo, o espectro de massas dessa subfração apresentou dois picos com razões massa-carga (m/z) de 339,39 e 353,49, os quais são aproximadamente 16 e 30 u maiores do que o do pico base, $[\text{M}-\text{H}]^-$, observado no espectro de massas de alta resolução do diterpeno **1**. Considerando tratarem-se das detecções de moléculas desprotonadas, esses picos foram, então, interpretados como sendo de dois metabólitos da oxidação de um dos cinco grupos metílicos ($-\text{CH}_3$) de **1**, mais provavelmente por etapas oxidativas sequenciais, convertendo-o para grupos hidroximetilênico ($-\text{CH}_2\text{OH}$) e carboxílico ($-\text{CO}_2\text{H}$), como comumente ocorre na metabolização de terpenos por lepidópteros.¹¹⁷

Figura 55 - Espectro de massas (baixa resolução; IES) da subfração MDB [diterpenos **3** (m/z 339,39) e **4** (m/z 353,49); infusão direta; modo negativo; -20 V].



O espectro de RMN de ^1H de **3+4** (figura 56, p. 104) apresentou diversos sinais entre δ 0,7 e 2,5, que incluíram singletos com integrações diferentes na região de absorção de grupos $-\text{CH}_3$ alifáticos, além de dois dubletos em δ 3,10 ($J = 10,9$ Hz) e 3,42 ($J = 10,9$ Hz), sugestivos de uma mistura de substâncias de natureza terpênica. Experimentos de irradiação seletiva (figura 58, p. 105), juntamente com os parâmetros – deslocamentos químicos, multiplicidades e constante de acoplamento – extraídos da análise dos sinais em δ 3,10 e 3,42, demonstraram que o constituinte minoritário (**3**) tinha um grupo hidroximetilênico ligado a um carbono não hidrogenado.

Além disto, no espectro de RMN de ^{13}C de **3+4** (figura 58, p. 105), entre outros, foram observados sinais para três grupos carboxílicos (δ 184,6, 178,6 e 178,6) e para três carbonos carbinólicos (δ 73,6, 73,4 e 71,7). Em harmonia com as análises precedentes, os dados espectrométricos de RMN de ^{13}C da fração C3-B mostraram que, majoritariamente, esta era mesmo constituída por dois compostos, uma vez que, com base nas intensidades relativas, os sinais presentes nesse espectro podem ser agrupados em dois conjuntos.

Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H da subfração C3-B (CDCl_3 , 500 MHz).

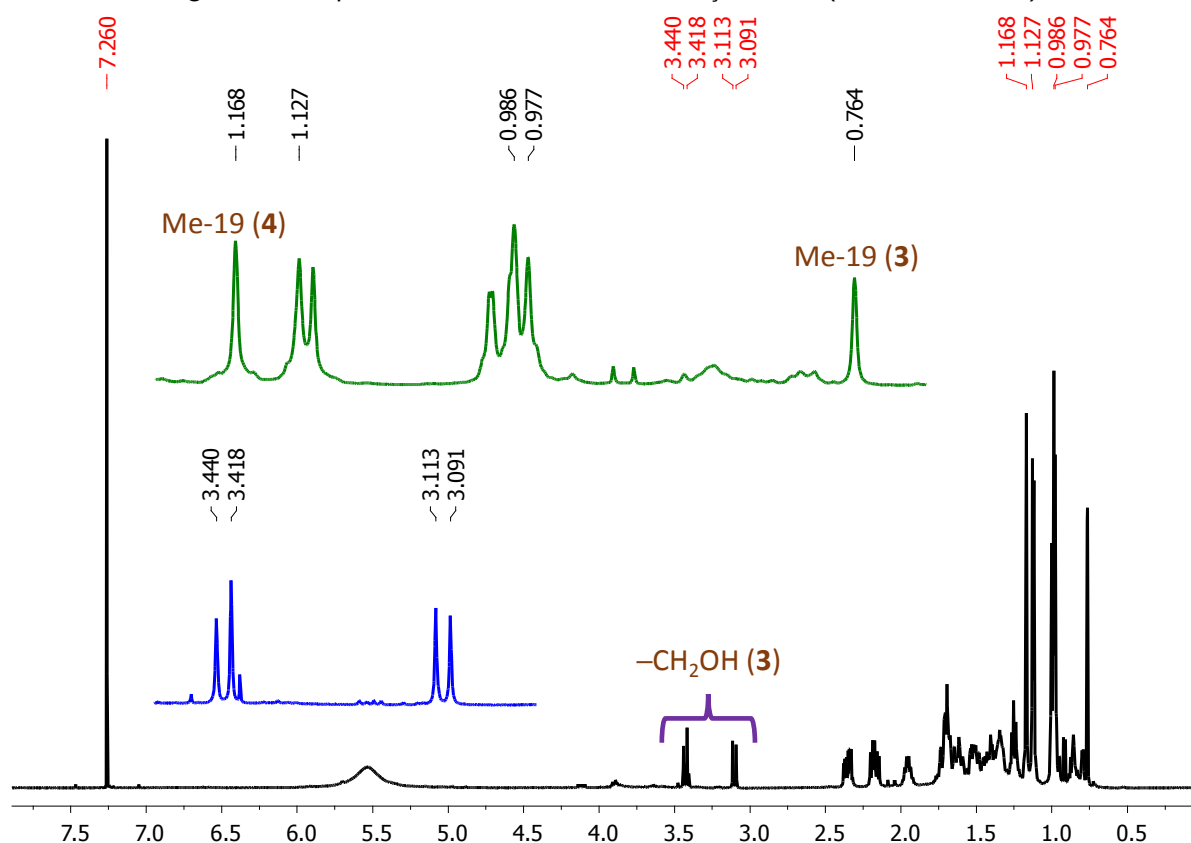


Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C da subfração C3-B (CDCl_3 , 126 MHz).

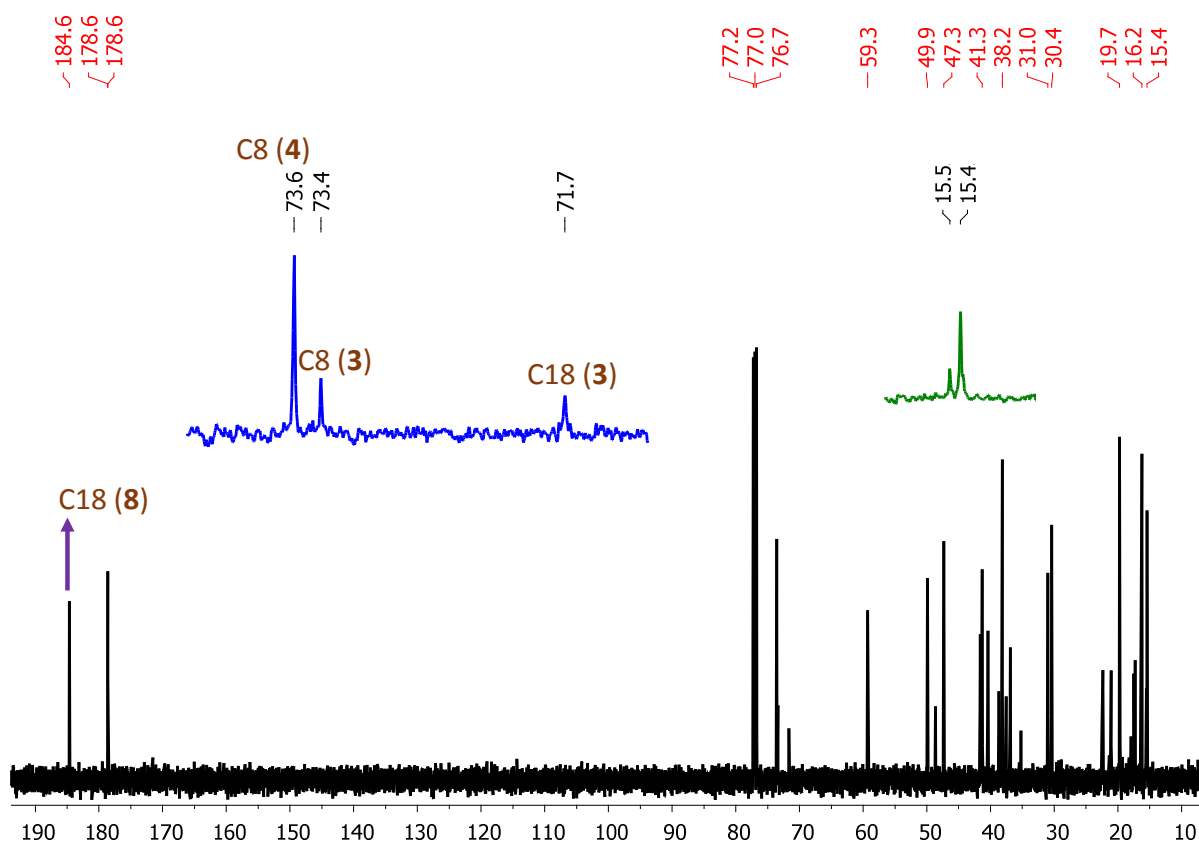
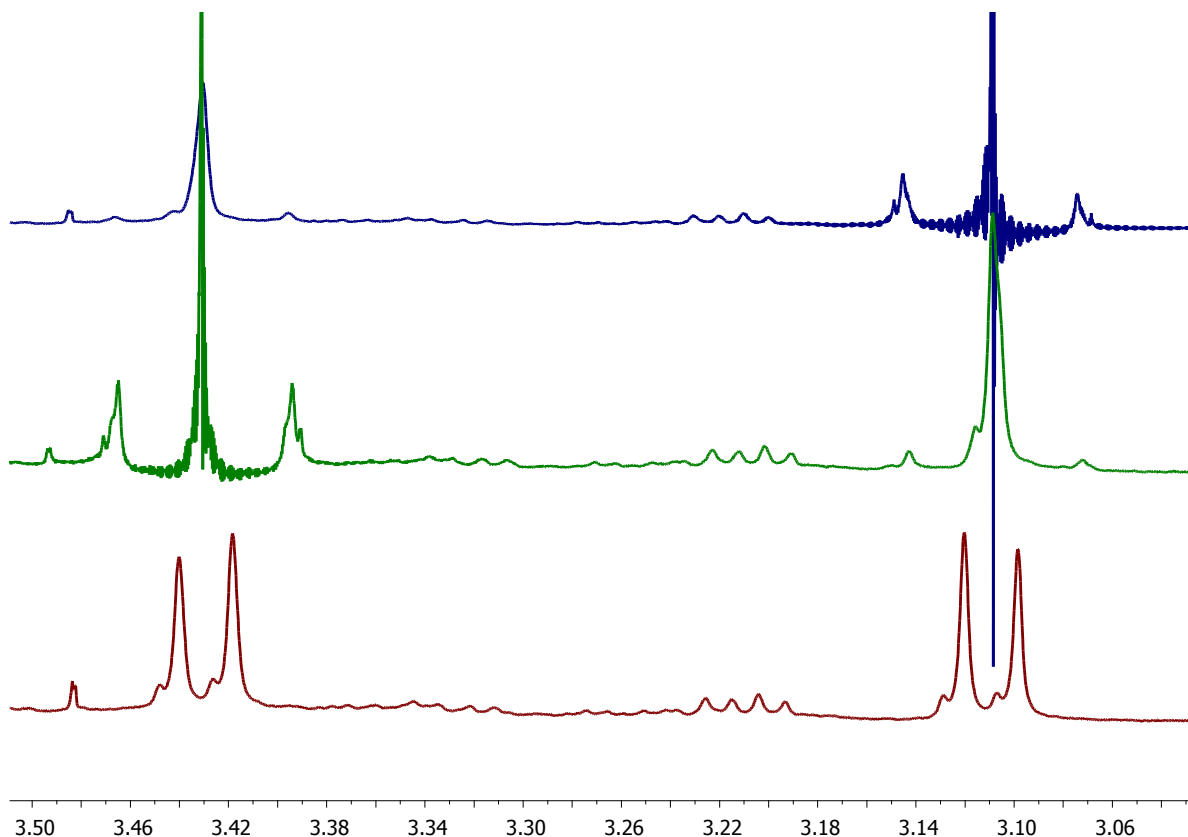


Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H da subfração C3-B (CDCl_3 , 500 MHz): Irradiação seletiva na frequência de absorção dos hidrogênios em δ 3,10 e 3,43.



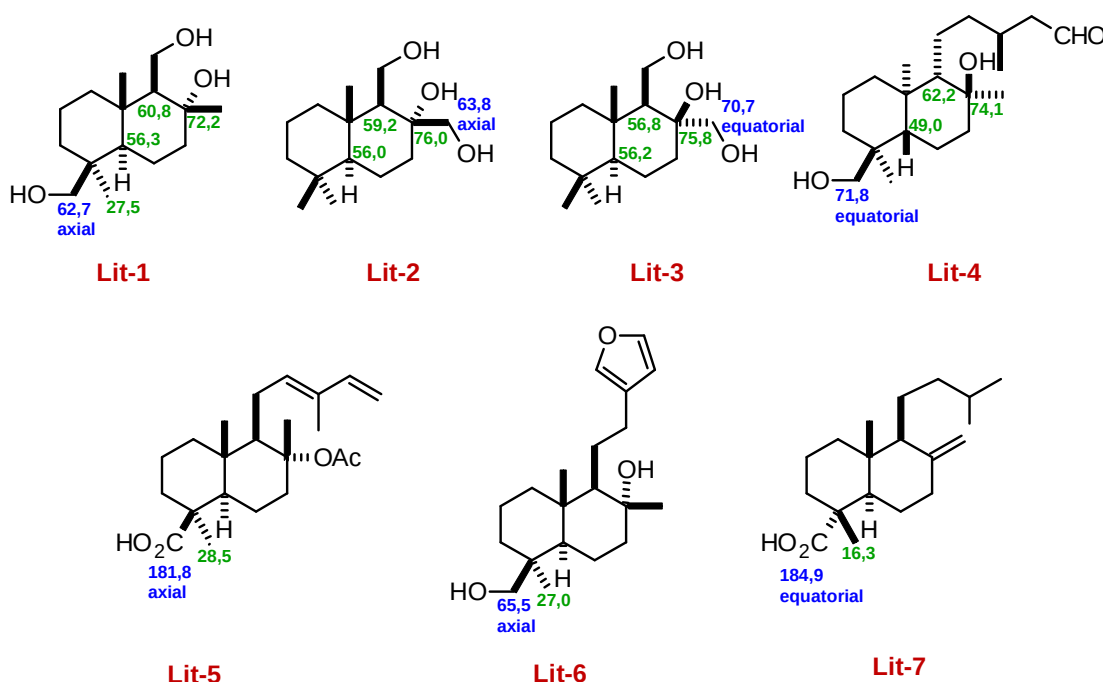
Mediante a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **3+4** com os de modelos disponibilizados na literatura (figura 59, p. 106)¹⁷⁹⁻¹⁸⁵, inclusive com os previamente relatados para **1**, embasou-se a hipótese de que **3+4** eram produtos do metabolismo de **1**, bem como se evidenciou que as oxidações teriam ocorrido na Me-18 de **1**. Assim, a discussão nos dois próximos parágrafos assume que a junção do anel é *trans* e que a Me-17 e a cadeia lateral de **1** estão em equatoriais.

Já que o grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ do constituinte minoritário (**3**) deveria estar ligado a um carbono não hydrogenado, a Me-16 foi excluída como sendo o sítio de reação. Como no espectro de RMN de ^{13}C de **3+4** estão presentes dois sinais em δ 15,52 e 15,43, descartou-se também a Me-20. Conforme os dados espectrométricos dos modelos **Lit-1 a Lit-7** (figura 59, p. 106), somente a monohidroxilação da Me-17 ou da Me-18 produziria um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ com deslocamento químico próximo ao do observado no espectro de **3+4**, porquanto a monohidroxilação da Me-19 resultaria em um grupo ocupando uma posição axial, com um deslocamento químico significativamente menor (62-66 ppm).

Embora o deslocamento químico do grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ seja compatível com a hidroxilação da Me-17 ou da Me-18 de **1**, os valores dos deslocamento químicos dos C-8 (δ 73,58 e 73,39) e C-9 ($2 \times \delta$ 59,3) de **3+4**, que foram sugeridos por comparação com os relatados para **1**⁵⁹ e são, por assim dizer, praticamente idênticos, excluíram a Me-17 como sendo o sítio de reação, já que a hidroxilação desta, assim como a oxidação para um grupo $-\text{CO}_2\text{H}$, levariam a uma desproteção em C-8 (efeito β) e a uma proteção em C-9 (efeito γ -gauche) (figura 59, p. 106).

Por fim, destaca-se que os sinais em δ 184,6 (C-18) e 16,2 (C-19), referentes a dois carbonos do constituinte majoritário, corroboraram com a proposta que o sítio de oxidação seria a Me-18, visto que esses deslocamentos químicos tem valores muito similares aos descritos para dois carbonos do norditerpeno **Lit-7**¹⁸⁵, o qual possui um grupo $-\text{CO}_2\text{H}$ ligado a C-4, equatorialmente posicionado, e um grupo metílico, em axial, ligado a este mesmo átomo de carbono (figura 59, p. 106).

Figura 59 - Dados espectrométricos de modelos disponibilizados na literatura.¹⁷⁹⁻¹⁸⁵



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 179-185.

4.2.1.2 Estudo comparativo por CLAE-UV-DC-AFD e análise por CLAE-EM: Detecção das lignanas biotransformadas (17 e 18)

As quatro fases, F-1, F-2, Ba-1 e Ba-2, e todas as frações obtidas, F-1A a F-1I, F-2A a F-2G, Ba-1A a Ba-1I e Ba-2A a Ba-2G, foram comparativamente analisadas

Resultados e discussão

por CLAE-UV-DC-AFD (item 3.7.2, p. 71); e várias diferenças foram observadas entre os perfis cromatográficos. Aqui, destaca-se aquela observada entre os perfis de F-2F e Ba-2F (figura 60, p. 107). Além de outros menos intensos, há no cromatograma de Ba-2F dois picos intensos que não estão presentes no de F-2F.

Figura 60 - Cromatogramas das frações F-2F (1ª linha) e Ba-2F (2ª linha; picos projetados para baixo).

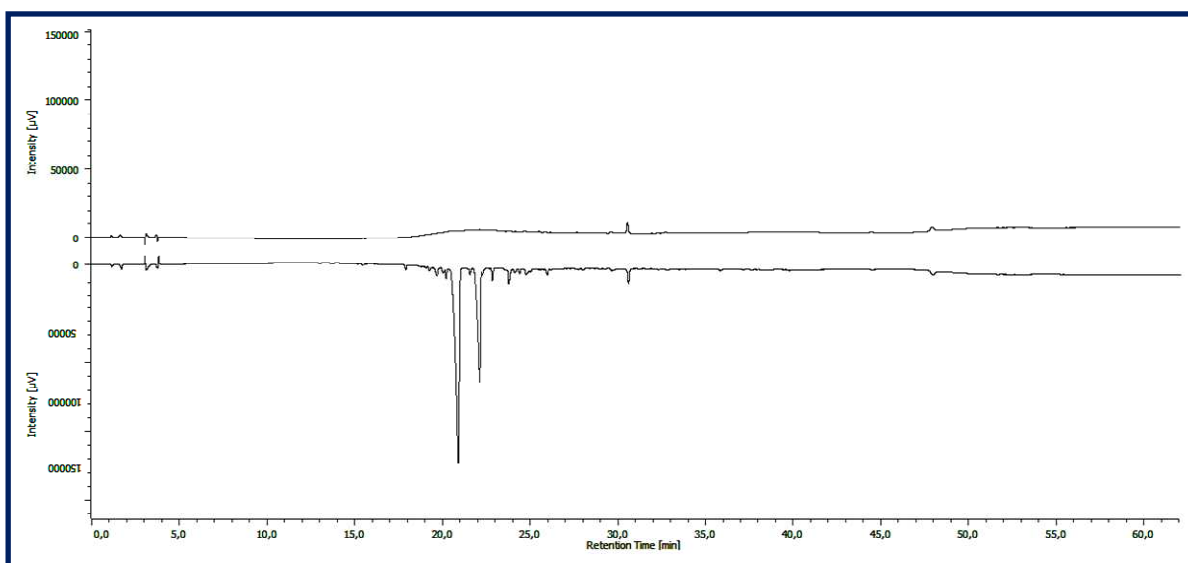
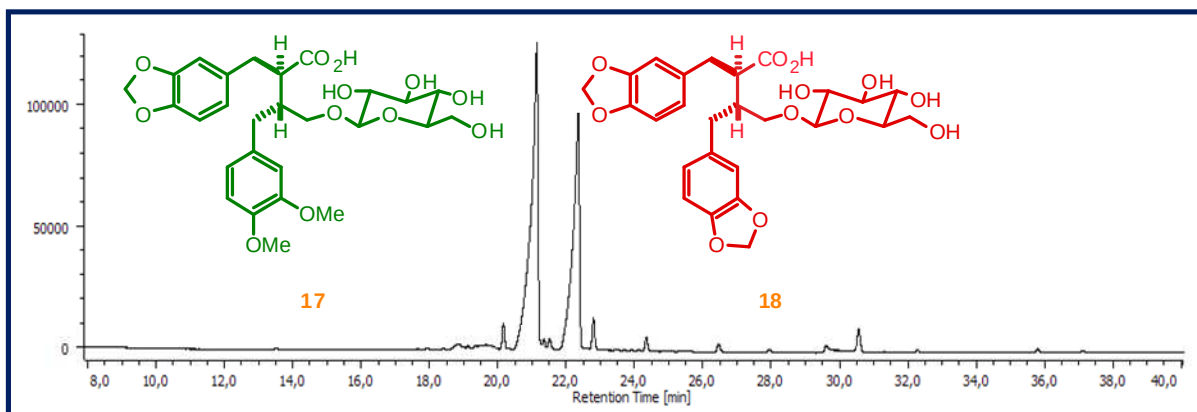


Figura 61 - Cromatograma da fração Ba-2F. Lignana **17** e lignana **18**.



Os espectros de absorção na região do UV registrados para os compostos que eluíram da coluna em 21,00 e 22,33 min foram muito similares aos das lignanas kusunquina (**2**, $t_r = 30,60$ min) e hinoquina (**8**, $t_r = 32,30$ min) (figura 62, p. 109). Esses espectros também foram muito parecidos com os dos seguintes derivados benzênicos: 1,2-dimetoxibenzeno e 1,2-metilenodioxo-4-butilbenzeno.^{186,187}

As lignanas **2** e **8** possuem um esqueleto carbônico dibenzilbutirolactônico. Os anéis aromáticos de **2** são substituídos por: Anel A) um grupo metilenodioxílico — posições 3 e 4 e Anel B) dois grupos metoxílicos — posições 3' e 4', enquanto os da lignana **8** por dois grupos metilenodioxílicos (3, 4, 3' e 4'). Porquanto o cromóforo —CO₂R absorve fracamente ($\epsilon \sim 40$) em torno de 200-215 nm¹⁸⁹, os espectros de UV de **2** e **8**, basicamente, refletem as absorções dos cromóforos dioxibenzílicos.

Essas evidências sugeriram que os compostos com tempos de retenção (t_r) de 21,00 min e 22,33 min seriam substâncias contendo anéis aromáticos trissubstituídos, especificamente grupo (s) piperonílico (s) e/ou veratrílico (s). Sugeriram ainda que estas poderiam ser produtos (mais polares) da metabolização de lignanas dibenzilbutirolactônicas e/ou dibenzilbutirolactólicas, as quais foram previamente isoladas de *A. giberti*.⁵⁹

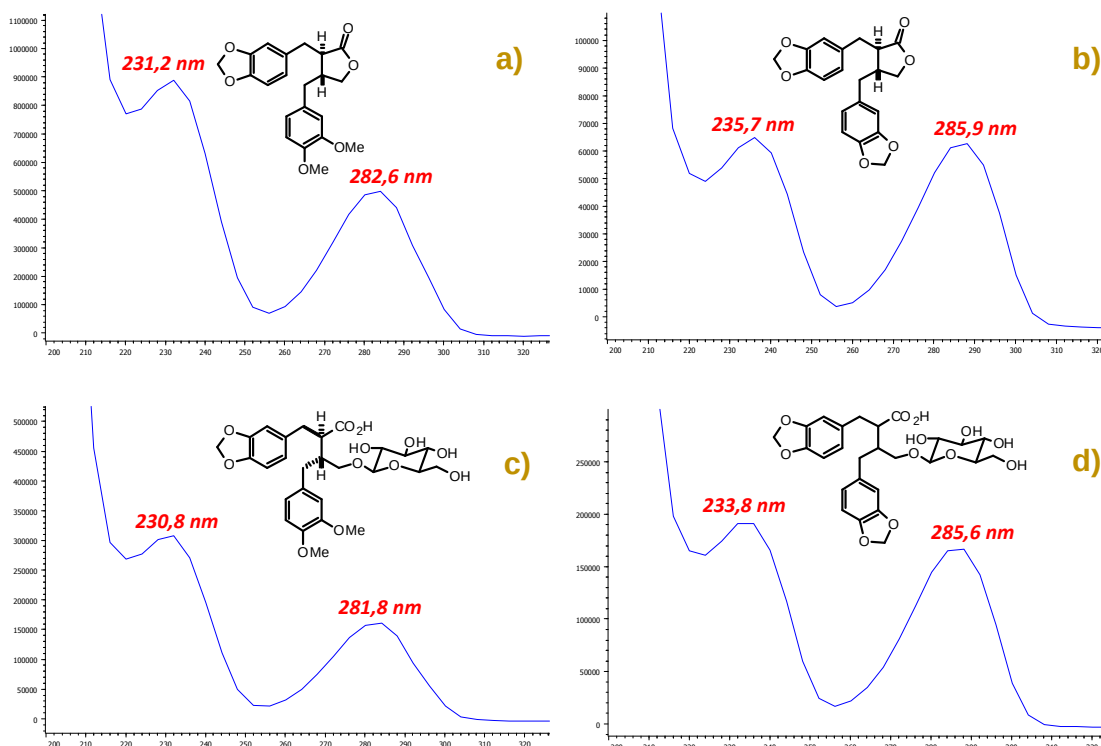
A fração Ba-2F foi analisada por CLAE-EM, e os espectros de massas obtidos para os dois picos intensos foram interpretados (figuras 63 e 64, p. 110). Em ambos os espectros, observou-se um pico referente a detecção de moléculas cationizadas com o íon NH₄⁺ [m/z 568,05 (t_r = 21,00 min) ou 551,94 (t_r = 22,33 min)], bem como um pico da perda de uma unidade de hexose (desidratada) a partir das moléculas protonadas ([M+H-C₆H₁₀O₅]⁺), m/z ~389 (t_r = 21,00 min) ou ~373 (t_r = 22,33 min). No espectro de massas do composto com t_r = 21,00 min, observou-se ainda o pico das moléculas protonadas ([M+H]⁺; m/z de 550,77). Os íons com razões massa-carga maiores que as dos adutos de [M+NH₄]⁺ foram considerados tratarem-se de fragmentos de agregados iônicos (*cluster ions*) ou de íons de impurezas, uma vez que estes não puderam ser facilmente explicados, nem tão logo esses dados puderam ser harmonizados com os demais.

Exatamente como a diferença que se calcula entre as massas de **2** e **8**, a diferença entre as massas moleculares dos adutos dos dois principais constituintes da fração Ba-2F foi de ~16 u, o que evidenciou que, estruturalmente, a única diferença entre esses compostos era que um tinha dois grupos piperonílicos enquanto o outro tinha um grupo veratrílico e mais um grupo piperonílico.

Essa suposição foi corroborada pelas informações fornecidas pelos espectros na região do UV, especificamente pelos deslocamentos batocrômicos (valor médio = 3,2 nm) dos máximos de absorção das bandas do composto com t_r = 22,33 min em relação as do com t_r = 21,00 min. Estudos prévios mostraram que a substituição de um

par de grupos metoxílicos (*ortos*) por um metilenodioxílico em um anel aromático desloca os máximos de absorção para comprimentos de onda maiores e intensifica as absorções.¹⁸⁹ Além disto, destaca-se que os valores dos comprimentos de onda dos máximos de absorção do composto com $t_r = 21,00$ min praticamente coincidem com os de **2**, enquanto os do com $t_r = 22,33$ min com o da lignana **8** (figura 62, p. 109).

Figura 62 - Espectros de absorção no UV de a) **2**, b) **8**, c) **17** e d) **18**.



Tendo-se em vista todas essas informações, sugeriu-se que as substâncias excretadas pelas lagartas seriam glicosídeos de dímeros de C₆-C₃, especificamente da glicosilação das lignanas previamente descritas para o espécime estudado neste trabalho, **2**, **6+6epi** e **8**.⁵⁹ Dentre essas, a primeira (**2**) é conhecida por causar alta mortalidade em lagartas da soja, *A. gemmatilis*⁸⁰, enquanto cubebina (**6+6epi**) e hinoquina (**8**) são substâncias deterrentes.⁸¹ Entretanto, é importante destacar que os íons das agliconas protonadas de **17** e **18** foram 18 u maiores que o observado para **2** (figuras 63 e 64, p. 110) ou o esperado para **8**. Isso indicou que também ocorreram clivagens, talvez via hidrólise ou abertura-oxidação de hemiacetal, dos anéis de cinco membros das lignanas da planta (substratos). Os encaudamentos (assimetria) observados para os picos cromatográficos sustentaram essa sugestão e apontaram que as

Resultados e discussão

substâncias presentes nas fezes poderiam conter um grupo carboxílico e, por conseguinte, uma ligação glicosídica do tipo C9'→C1'', o que, de fato, se comprovou depois que as duas lignanas glicosiladas (**17** e **18**) foram isoladas e suas estruturas inequivocamente estabelecidas.

Figura 63 - Espectro de massas do composto com $t_r = 21,00$ min.

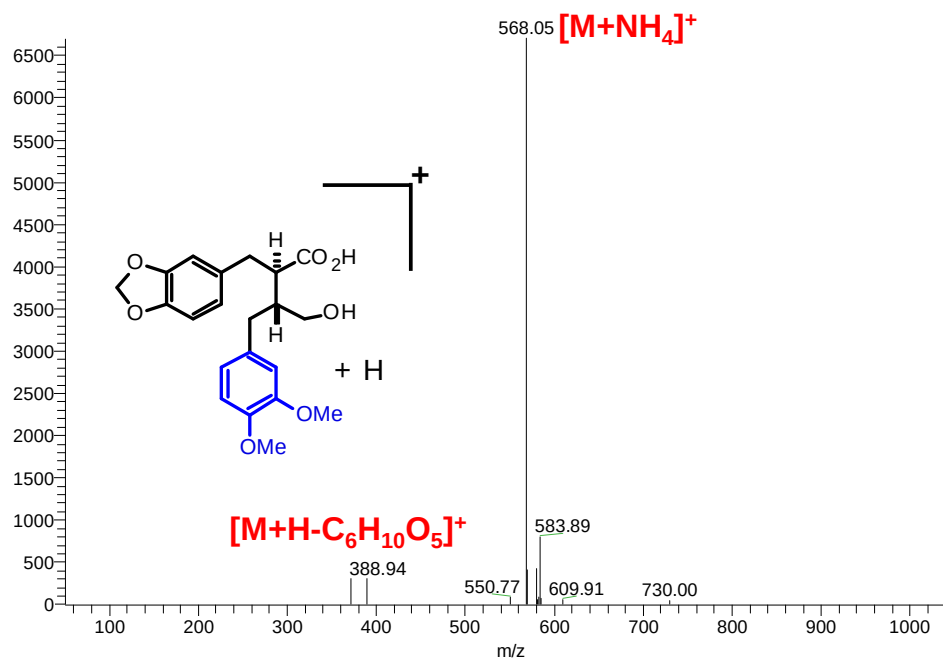
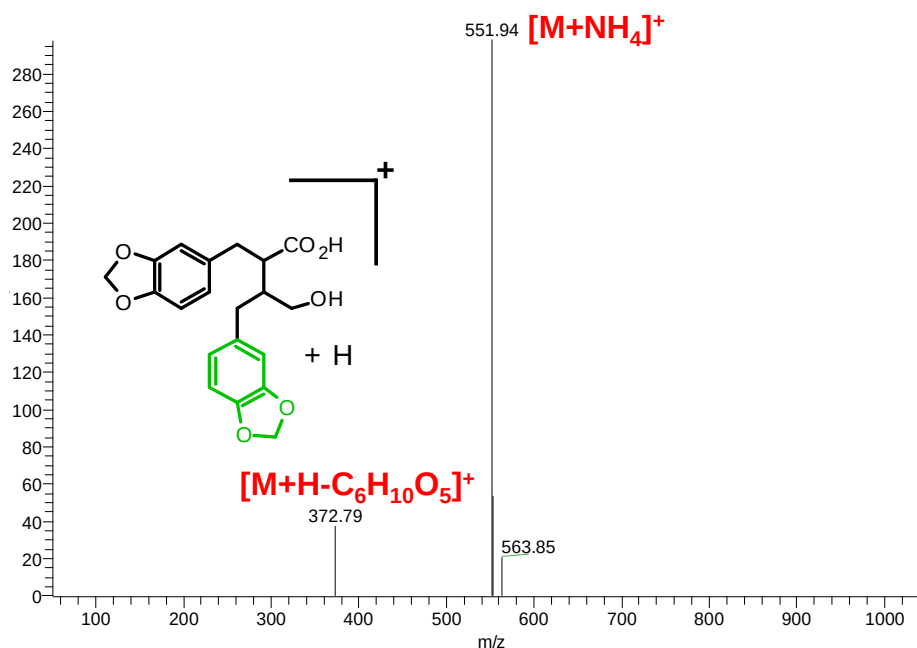


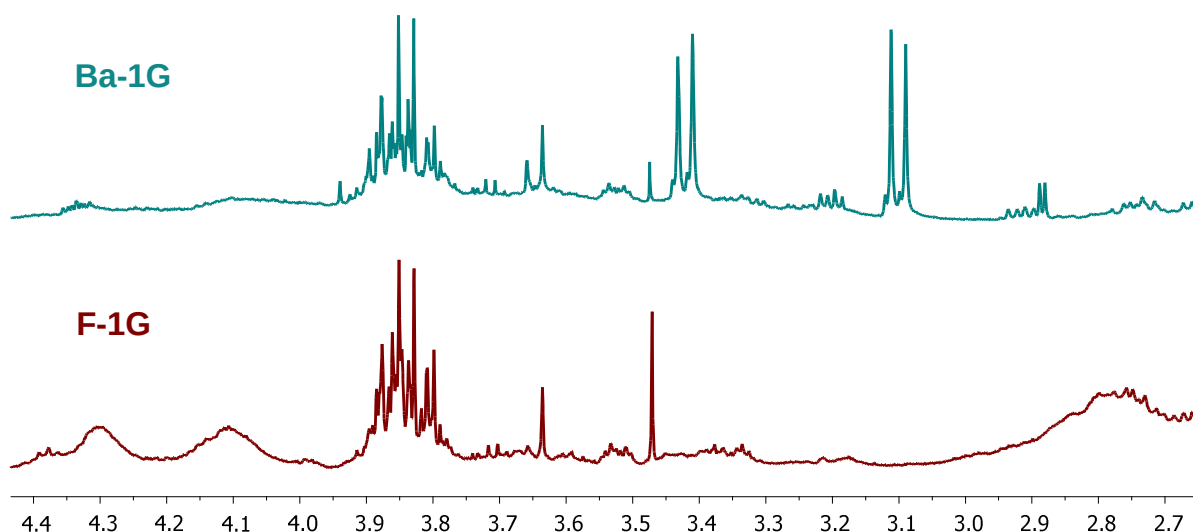
Figura 64 - Espectro de massas do composto com $t_r = 22,33$ min.



4.2.2 Estudos comparativos por RMN

Foram também observadas diferenças entre os espectros de RMN de ^1H das frações supracitadas — F-1G, F-1H, Ba-1G, Ba-1H, F-2F e Ba-2F. Ao se comparar o espectro de F-1G com o de Ba-1G, embora se notem grandes semelhanças, sobretudo na região entre δ 3,75 e 3,95, sobressaindo-se às similaridades, percebem-se às diferenças existentes entre esses dois espectros, das quais se destacam os dois dupletos em δ 3,10 e 3,43, presentes no espectro da Ba-1G, que estão ausentes no da F-1G (figuras 65 e 66, p. 111 e 112).

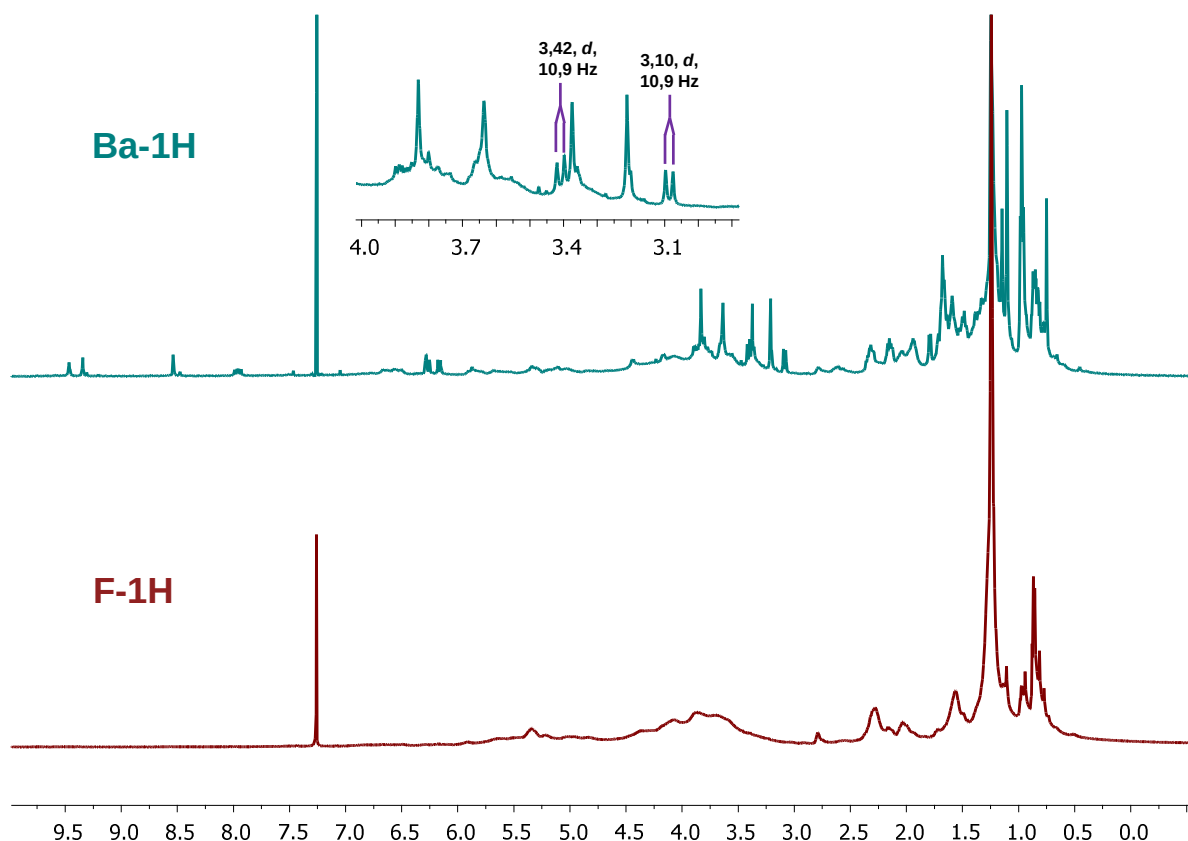
Figura 65 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das subfrações Ba-1G e F-1G (CDCl_3 , 500 MHz).



De modo similar, observaram-se também, por RMN de ^1H , diferenças entre as composições químicas de F-1H e Ba-1H. Mais detalhadamente, o espectro de Ba-1H apresentou sinais para um composto alifático de cadeia longa, sinais entre δ 6,1 a 6,3, um duplo dubleto em δ 7,96 ($J = 18,0$ e $11,6$ Hz), singletos em δ 9,46, 9,34, 8,54, 3,83, 3,63, 3,37 e 3,21, entre outros, característicos de clorofilas, além de outros sinais com deslocamentos químicos típicos de compostos de natureza terpênica. Como as clorofilas possuem unidades diterpênicas em suas estruturas, não se pode ter certeza das presenças dos compostos terpênicos nessa fração. Porém, depois da remoção da clorofila por CC de Sephadex-LH20, comprovou-se que essa sugestão estava correta (fi-

gura 56, p. 104). Em contrapartida, o espectro de F-1H apresentou apenas os sinais da substância de natureza “graxa” (figura 66, p. 112).

Figura 66 - Espectros de RMN de ^1H das frações Ba-1H e F-1H (CDCl_3 , 500 MHz).



Os espectros das frações F-2F e Ba-2F também são bem distintos entre si. Enquanto no espectro da fração F-2F estão presentes sinais bem definidos nas regiões de absorção de hidrogênios aromáticos, hidrogênios metoxílicos, hidrogênios metileno-dioxílicos, hidrogênios metílicos, hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, entre outros, o espectro da fração F-2F é relativamente pobre em diversidade de sinais (figuras 67-70, p. 113 e 114).

Em relação aos compostos majoritários, com certeza, a complexidade averiguada por RMN de ^1H para a fração Ba-2F (terpenos+lignanais) é maior do que a apurada por CLAE-UV-DC-AFD e CLAE-EM (lignanais). Isso demonstrou que os compostos terpênicos presentes nessa fração, que eram tão abundantes como as lignanais, absorvem fracamente em 200 nm, o que dificultou a interpretação dos resultados obtidos por essas técnicas analíticas. Há relato na literatura de um dímero formado pela

união de um lignoide com um diterpeno, o qual foi isolado de *Aristolochia constricta*.¹⁹⁶ Porém, as massas moleculares determinadas para os compostos aromáticos da fração Ba-2F não foram compatíveis com esse tipo de substância dimérica. Numa etapa posterior do trabalho, mostrou-se que os compostos terpênicos dessa fração eram os diterpenos **3**, **4** e **19**.

Figura 67 - Espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, 500 \text{ MHz}]$.

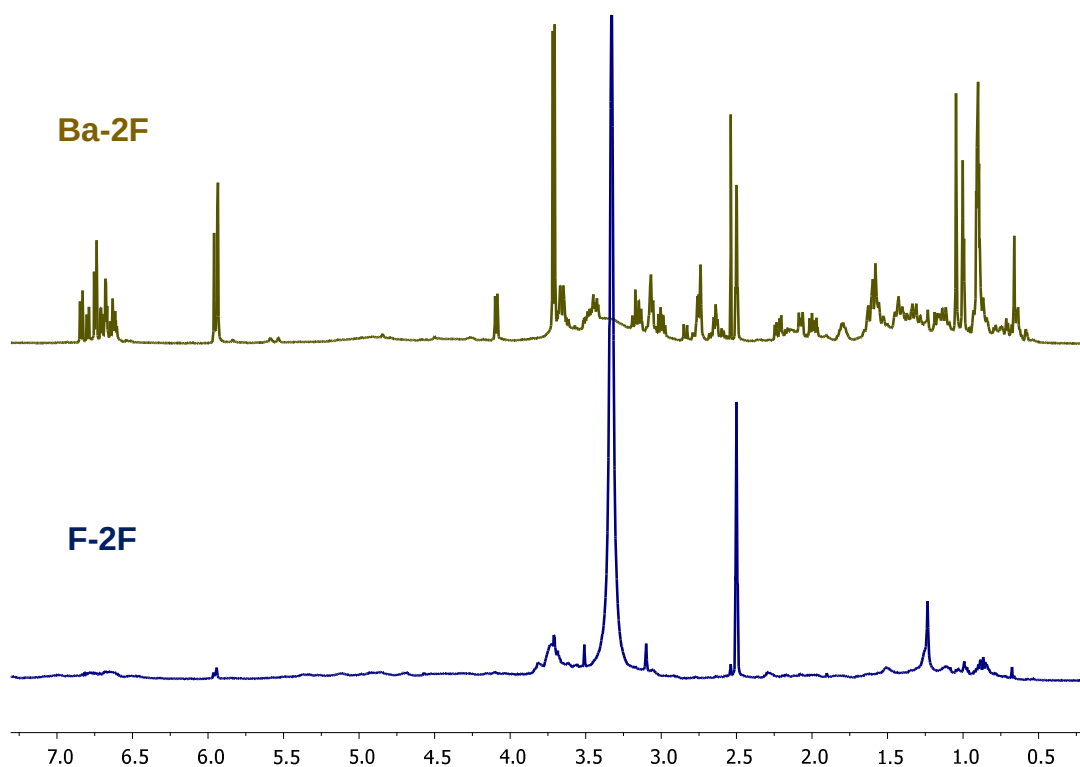


Figura 68 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, 500 \text{ MHz}]$.

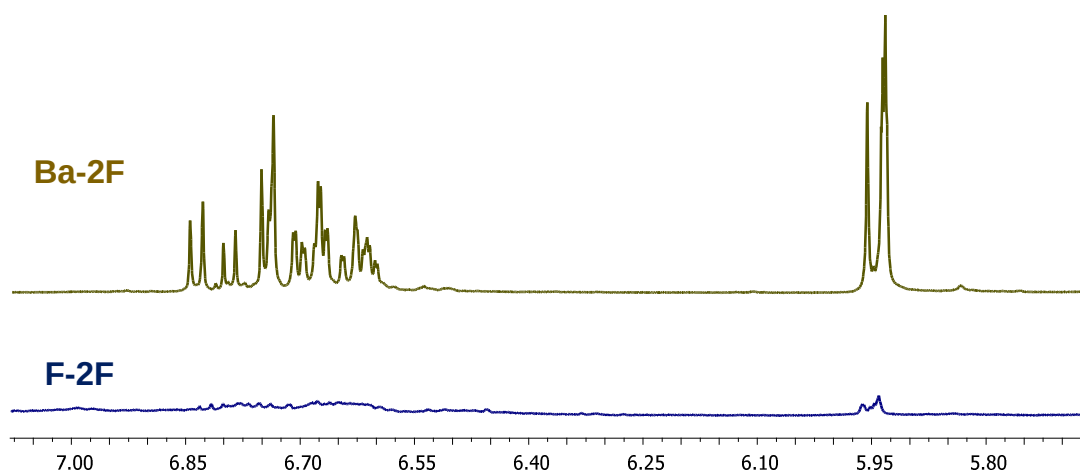


Figura 69 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, 500 \text{ MHz}]$.

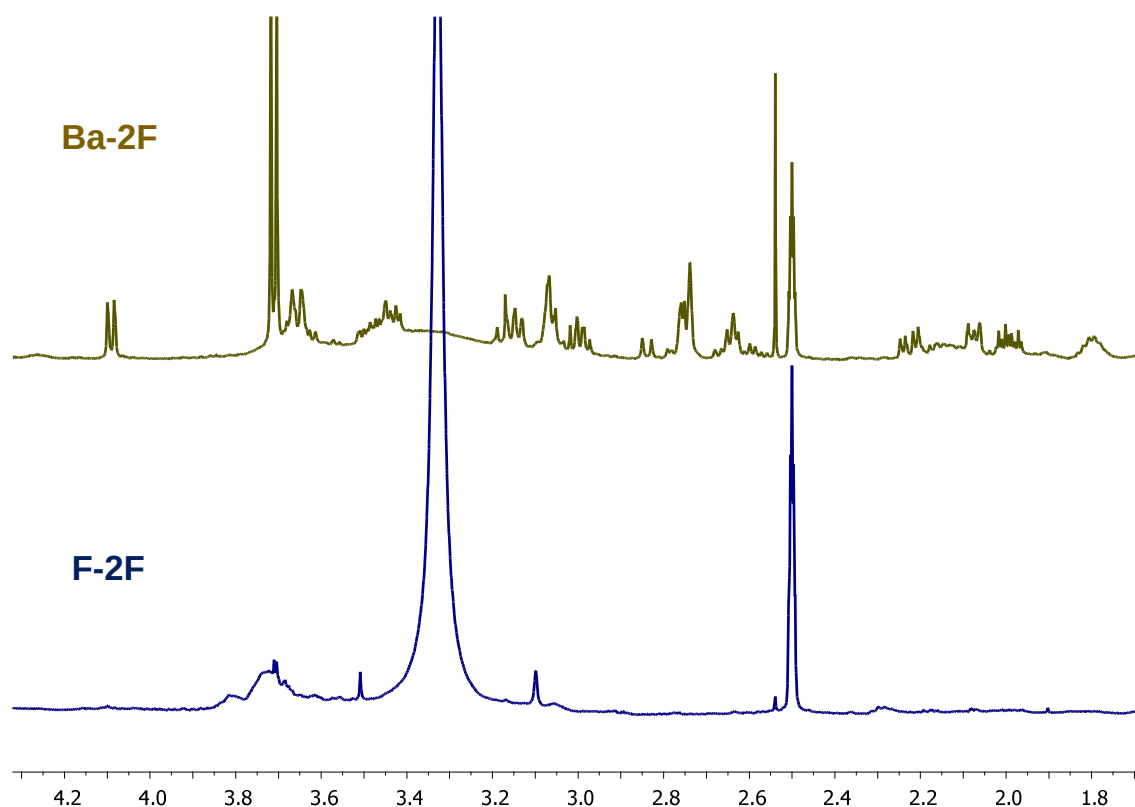
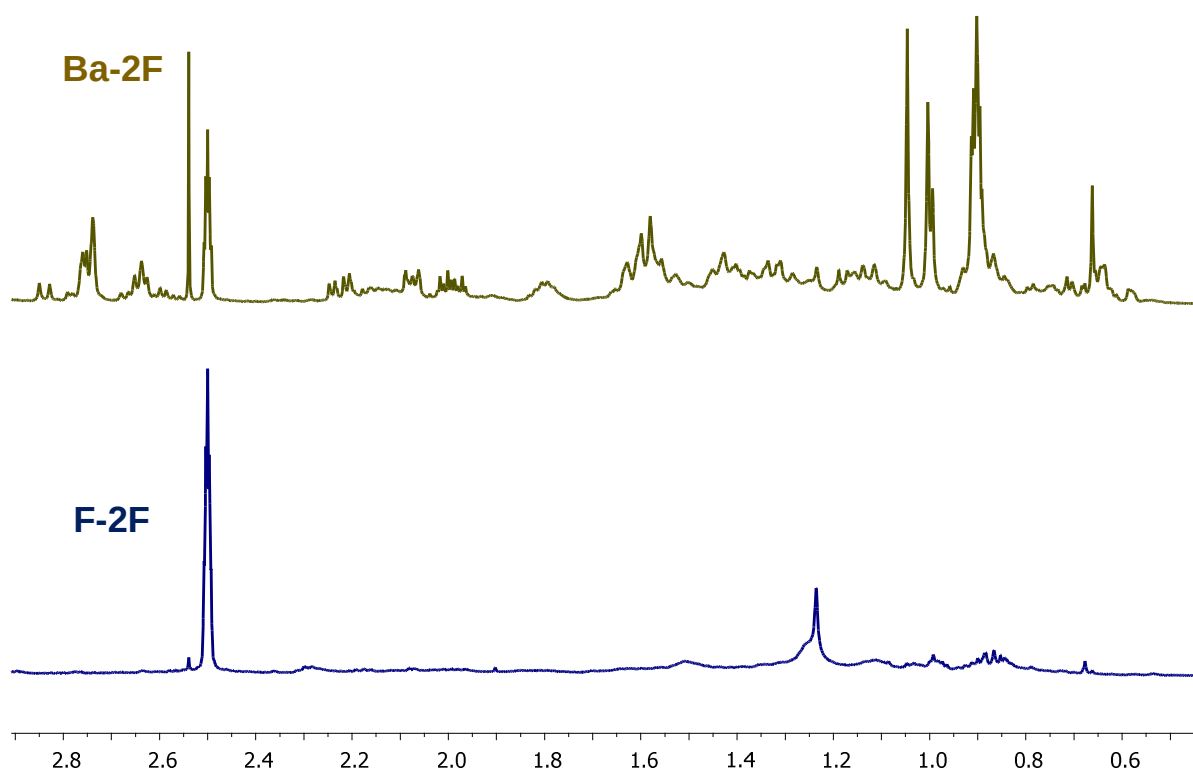


Figura 70 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H das frações Ba-2H e F-2H $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, 500 \text{ MHz}]$.



Apesar da variedade de compostos contidos na fração Ba-2F ser superior a determinada por cromatografia e espectrometria de massas, os dados espectrométricos de RMN de ^1H (figuras 67-70, p. 113 e 114) dessa fração corroboraram com a sugestão que esta conteria duas lignanas glicosiladas, as quais não estavam presentes na fração F-1F. Uma análise comparativa entre os espectros de Ba-2F e F-1F também demonstrou a clara diferença que havia entre as composições químicas dessas duas frações.

4.3 Identificações por CG, RMN de ^1H e/ou CLAE

Por CG-EM, RMN de ^1H e/ou CLAE, identificaram-se catorze compostos:

- ✓ A lignana kusunoquinina (**2**) foi identificada, por RMN de ^1H e CLAE, nos extratos E-Fol, E-Ba, L1 e L2 e nas seguintes frações: F-1D, F-1E, Ba-1D e Ba-2D. Esta também foi detectada no extrato L1 por CG-EM;
- ✓ Por RMN de ^1H e CLAE, a lignana hinoquinina (**8**) foi identificada nos extratos L1 e L2, bem como nas frações F-1D, Ba-1D e L2-D. Esta também foi identificada, por CG-EM, no extrato L1;
- ✓ Os epímeros da cubebina (**6+6-epi**) foram identificados nas frações F-1D e Ba-1D pelos seus tempos de retenção e espectros de absorção na região do UV, os quais foram comparados com os de uma amostra autêntica;
- ✓ Identificaram-se, por RMN de ^1H e CG-EM, os diterpenos ácido copálico (**5**) e ácido eperúico (**7**) nas frações F-1C e Ba-1C, enquanto que nas frações F-1B e Ba-1B se identificou, por CG-EM, o éster metílico **7a** (tabela 3, p. 115). Por CG-EM, identificou-se ainda neste trabalho o diterpeno fitol (**9**), além dos compostos **10 a 16** (tabela 3, p. 115).

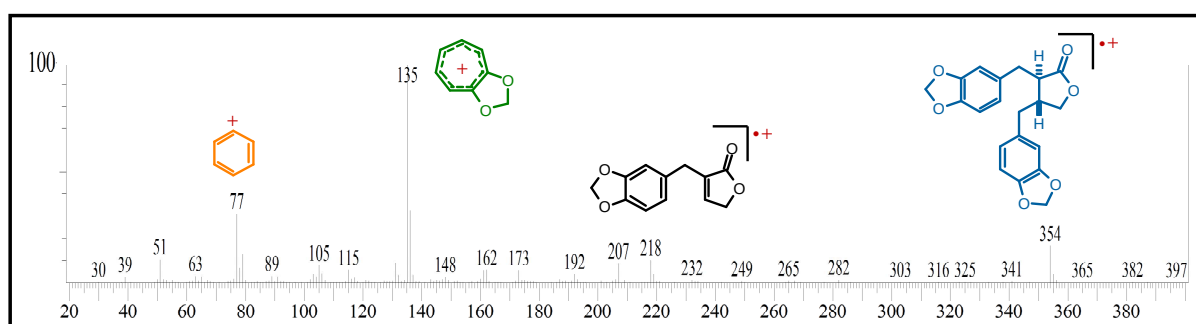
Tabela 3 - Análises por CG-EM das frações F-1B, F-1C, Ba-1B e Ba-1C e do extrato L1.

Composto	I^T (s)	I^T (s) ^{lit.*}	F-1B	F-1C	Ba-1B	Ba-1C	L1
2				X		X	X
5**	2339			X	X	X	
7	2275			X		X	
7a	2215	2137***	X		X		
8				X		X	X
9	2104	2045			X	X	
10	1912	1878	X		X		
11	1981	1978	X				X
12	2096	2085			X		
13	2114	2077			X		
14	2082	2101			X	X	X
15	2149	2201					X
16	2077	2093			X		

I^T =índice de retenção linear. *Referências 191 e 192. **Padrão. ***Isômero C13-S. X=O composto desta linha foi detectado na fração desta coluna da tabela.

O espectro de massas por impacto eletrônico de **8** (figura 71, p. 116) apresentou, dentre outros, picos em m/z 354, 135 (100 %) e 77. Estes foram interpretados como sendo relativos a detecção do íon molecular, $[M]^{+}$, do íon 1,2-metilenodioxi-tropílico e do íon fenílico, respectivamente. Essas informações, aliadas ao pico do fragmento em m/z 218, foram sugestivas de uma lignana dibenzilbutirolactônica contendo dois anéis piperonílicos.¹⁹³

Figura 71 - Espectro de massas por impacto eletrônico da lignana hinoquinina (**8**).



O espectro de RMN de ^1H da fração L2-D (**8** em mistura com um ácido graxo) (figuras 72 e 73, p. 117) mostrou sinais para dois anéis aromáticos trissubstituídos: i) quatro dubletos em δ 6,73 ($J = 8,0$ Hz), 6,70 ($J = 8,0$ Hz), 6,63 ($J = 1,5$ Hz), 6,46 ($J = 1,5$ Hz) e ii) dois duplos dubletos em δ 6,60 ($J=8,0$ e $1,5$ Hz) e 6,46 ($J= 8,0$ e $1,5$ Hz), sinais para quatro hidrogênios metilenodioxílicos entre δ 5,92 a 5,94, dois duplos dubletos de hidrogênios benzílicos em δ 2,98 ($J=14,0$ e $7,5$) e 2,83 ($J= 14,0$ e $5,0$), dois duplos dubletos de hidrogênios ligados a carbono carbinólico em δ 4,13 ($J=9,0$ e $7,0$) e 3,86 ($J = 9,0$ e $7,5$), um duplo duplo duplete em δ 2,54 ($J = 8,0$, $7,0$ e $5,0$), além de três multipletos e dos sinais do policetídeo (tabela 4, p. 118).

Assim, com base nesses dados, e pela comparação destes com os relatados na literatura⁸⁰, foi possível caracterizar a substância **8** como sendo a lignana dibenzilbutirolactônica hinoquinina, a qual exibe atividade antialimentar para besouros das espécies *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* e *Trogoderma granarium*.⁸¹ Esta foi previamente isolada de *A. giberti*, bem como de outras espécies de Aristolochiaceae.^{49,59} A configuração relativa de **8** foi confirmada a partir da não equivalência dos deslocamentos químicos dos H-9'a e H-9'b.^{193,194}

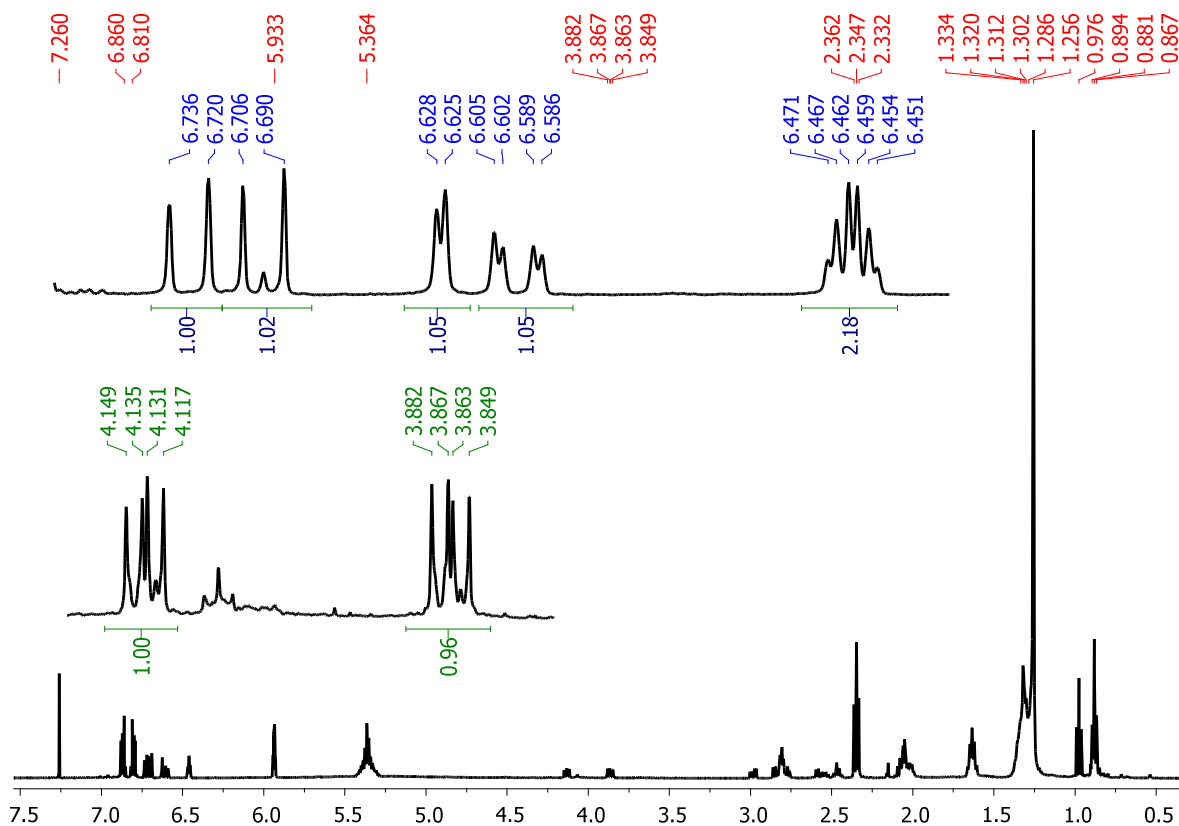
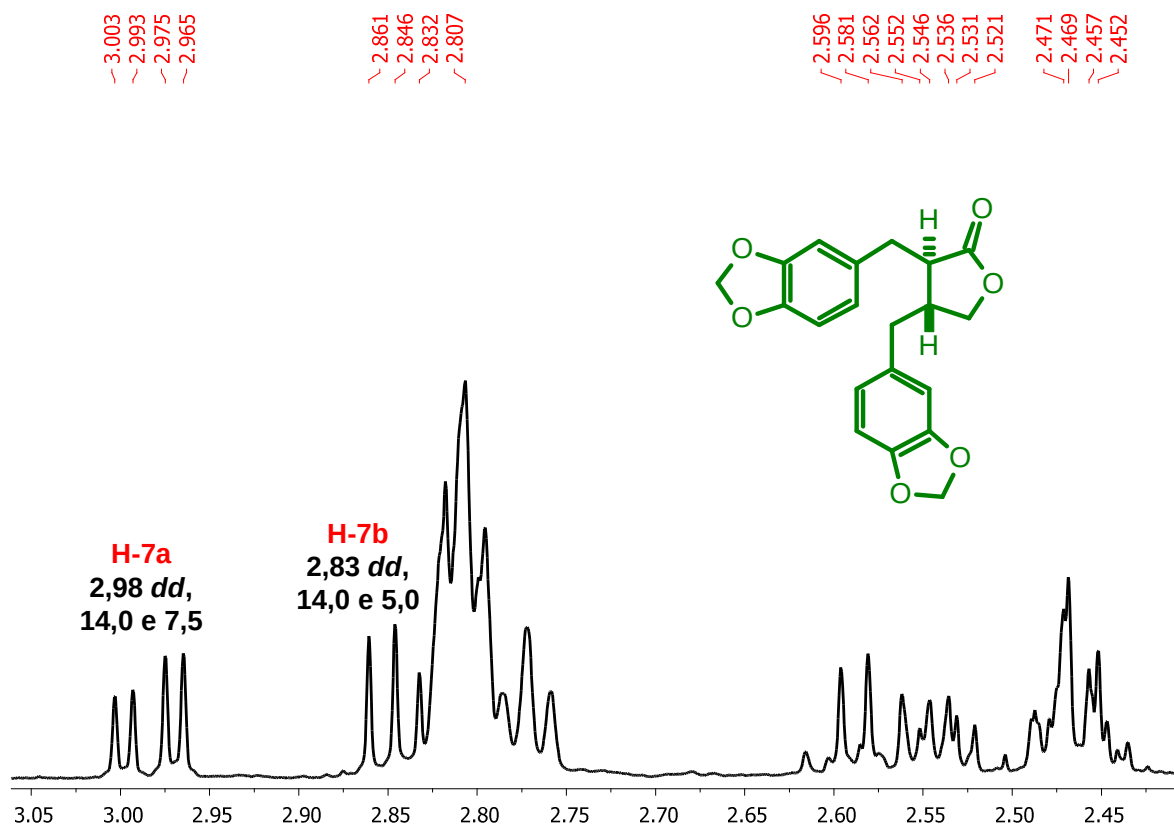
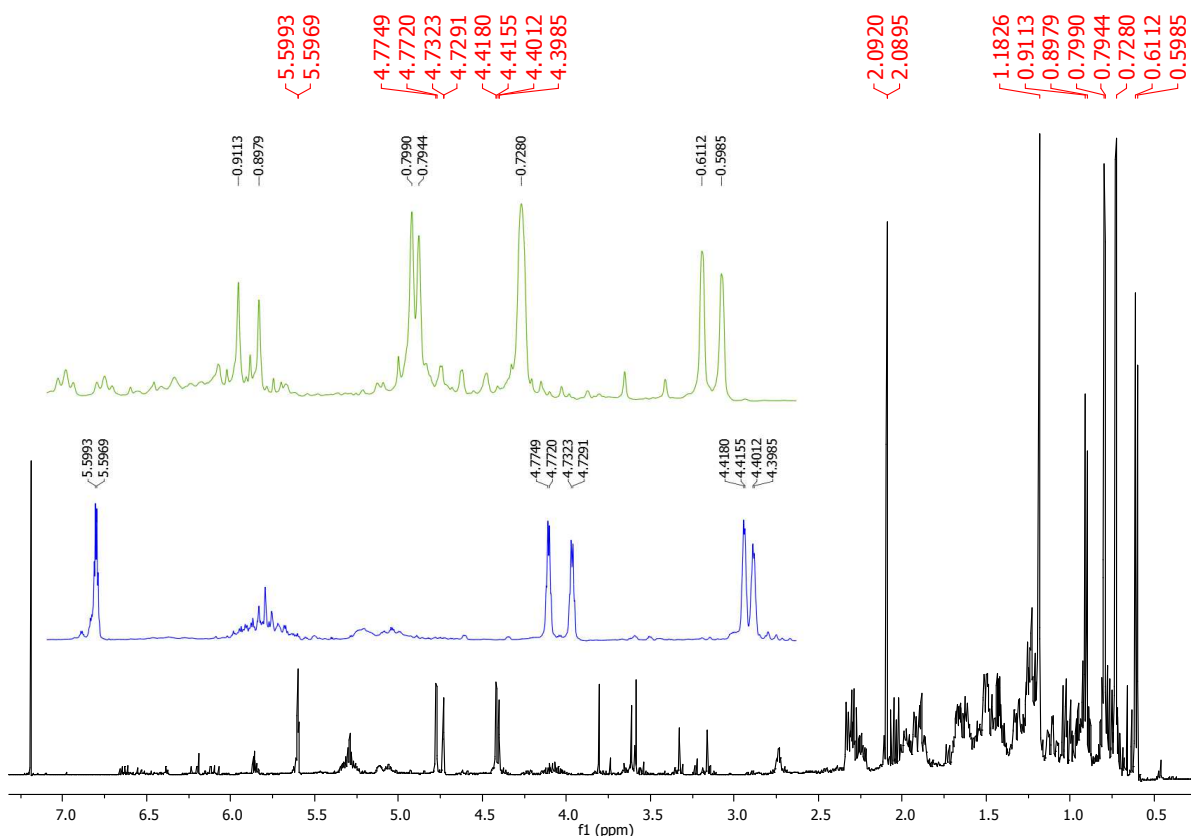
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração L2-D.Figura 73 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração L2-D.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H de **8** (CDCl_3 , 500 MHz, δ , J).

Posição	8	Hinoquinina (Lit.; Ref. 80)
	δ_{H}	δ_{H}
2	6,46 d, J = 1,5 Hz	6,39 d, J = 2,0 Hz
5	6,73 d, J = 8,0 Hz	6,66 d, J = 8,0 Hz
6	6,60 dd, J = 8,0 e 1,5 Hz	6,53 dd, J = 8,0 e 2,0 Hz
7 _a	2,98 dd, J = 14,0 e 7,5 Hz	2,91 dd, J = 14,0 e 7,5 Hz
7 _b	2,83 dd, J = 14,0 e 5,0 Hz	2,77 dd, J = 14,0 e 5,0 Hz
8	2,54 ddd, J = 8,0, 7,0 e 5,0	2,46 ddd, J = 8,0, 7,5 e 5,0
2'	6,63 d, J = 1,5 Hz	6,56 d, J = 2,0 Hz
5'	6,46 dd, J = 8,0 e 1,5 Hz	6,39 dd, J = 8,0 e 2,0 Hz
6'	6,70 d, J = 8,0 Hz	6,63 d, J = 8,0 Hz
7' _a	2,59 m	2,52 m
7' _b	2,47 m	2,39 m
8'	2,47 m	2,39 m
9' _a	4,13 dd, J = 9,0 e 7,0 Hz	4,13 dd, J = 9,0 e 7,0 Hz
9' _b	3,86 dd, J = 9,0 e 7,5 Hz	3,86 dd, J = 9,0 e 7,5 Hz

Figura 74 - Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da fração F-1C, a qual era majoritariamente uma mistura dos diterpenos **5** e **7**.

As estruturas dos diterpenos ácido copálico (**5**) e ácido eperuíco (**7**) foram estabelecidas com base em dados espectrométricos de RMN de ^1H (figura 74, p. 118), os quais foram idênticos aos relatados por Marchesini *et al.* (2009), bem como na interpretação dos seus espectros de massas por impacto eletrônico (figuras 75 a 78, p.

119). A identidade de **5** foi confirmada por comparação dos dados obtidos (RMN, EM, I^T e tempo de retenção em CLAE) com os de uma amostra autêntica, previamente isolada de *A. giberti*. Por outro lado, a estrutura de **7a** foi proposta baseando-se exclusivamente na interpretação do seu espectro de massas por impacto eletrônico (figura 77, p. 119). É importante destacar que o índice de retenção linear de **7a** diferiu significativamente ($\Delta I^T = 78$) do relatado para o epímero C-13S do éster metílico do ácido eperúico^{191,192}, o que sugeriu que **7a** seja o epímero C-13R. Os diterpenos **5** e **7** já haviam sido descritos em *A. giberti*⁵⁹, enquanto **7a** está sendo descrito pela primeira vez nessa espécie. Todavia, não se pode descartar a possibilidade que **7a** seja um artefato, já que os extratos E-Fol e E-Fz foram preparados por maceração das folhas e fezes com CH₃OH.

Figura 75 - Espectro de massas por impacto eletrônico do diterpeno ácido copálico (**5**).

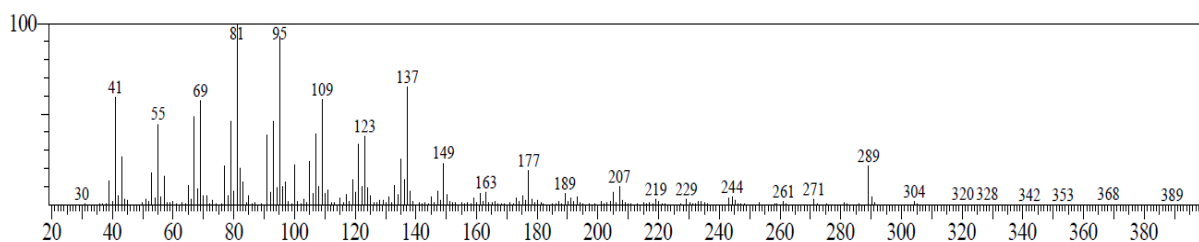


Figura 76 - Espectro de massas por impacto eletrônico do diterpeno ácido eperúico (**7**).

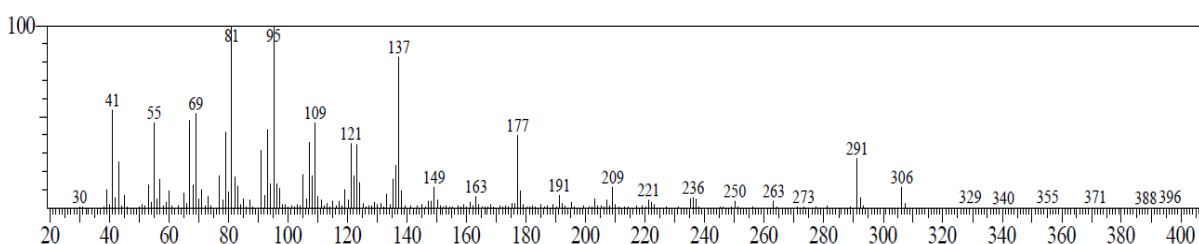


Figura 77 - Espectro de massas por impacto eletrônico do éster metílico do ácido eperúico (**7a**).

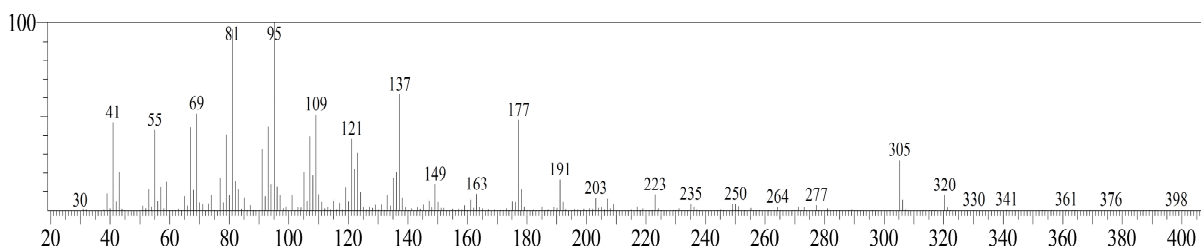
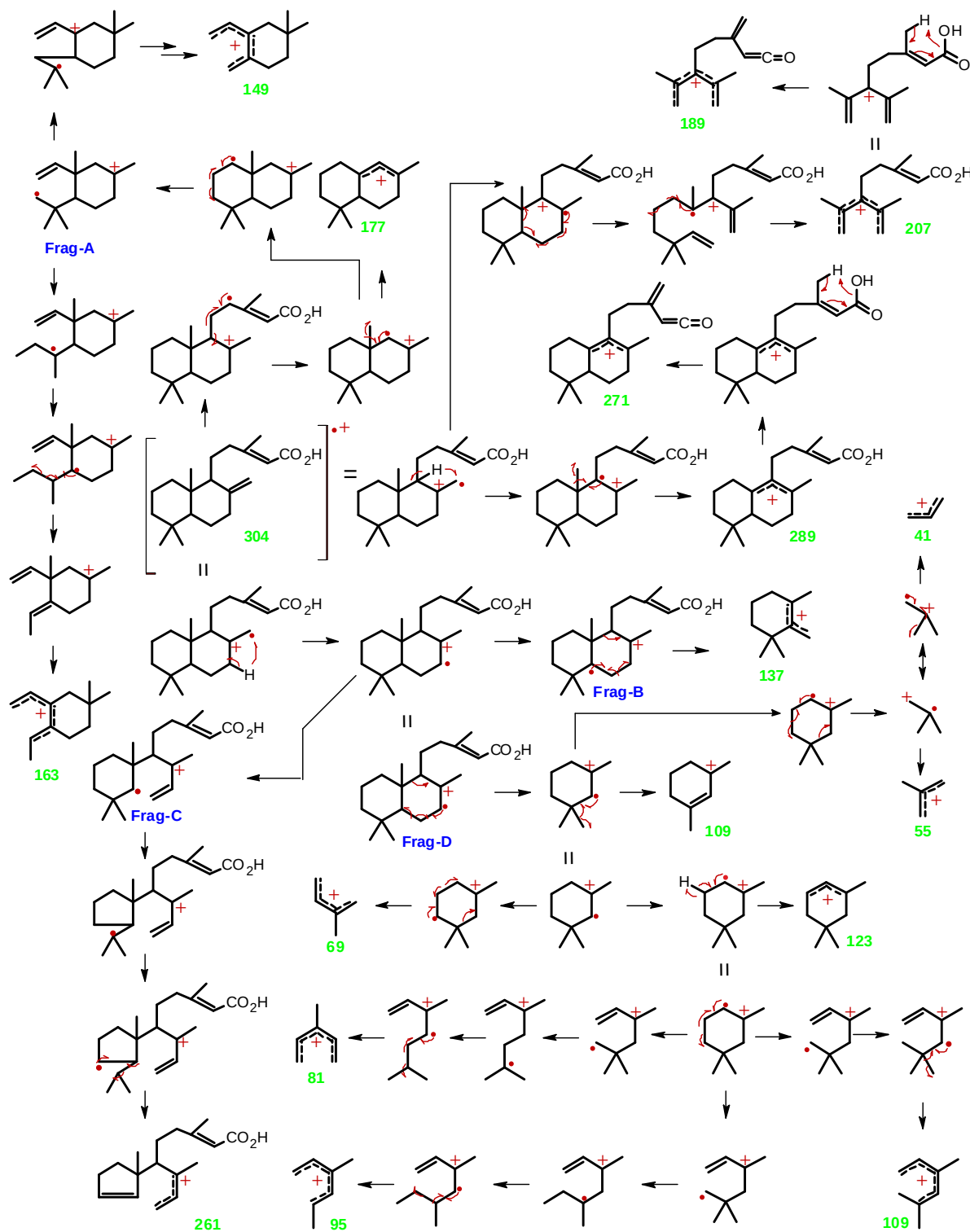


Figura 78 - Provável rota de fragmentação do diterpeno ácido copálico (**5**). Para simplificar, as espécies radicalares ou neutras liberadas na fragmentação de **5** foram omitidas nesta figura. As propostas para as fragmentações dos diterpenos **7** e **7a** foram bastante similares a destacada nesta figura para a fragmentação de **5**.



Os espectros de massas por ionização eletrônica de **5**, **7** e **7a** foram interpretados e uma rota de fragmentação foi proposta para o diterpeno **5** (figura 78, p. 120). A formação do carbocátion alílico de m/z 289, possivelmente, envolve um rearranjo 1,3 de hidrogênio radicalar ($H^\bullet$), seguido de eliminação de metila radicalar ($CH_3^\bullet$). Subsequente eliminação de uma molécula de H_2O produz o carbocátion alílico de m/z 271.

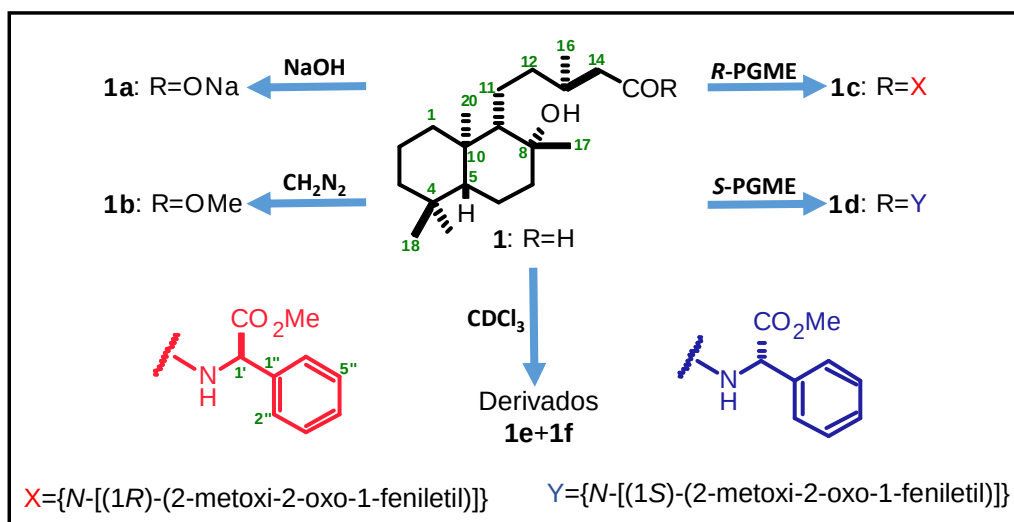
Alternativamente, o íon molecular $[M]^{*+}$, após a migração 1,3 de hidrogênio, pode, mediante reação de Retro Diels–Alder, sofrer ruptura do sistema *trans*-decalínico. O íon acíclico formado, por clivagem da ligação C1-C2, seguido de desidratação, pode, sequencialmente, gerar as espécies catiônicas de m/z 207 e 189.

O íon de m/z 177 deve ser gerado por meio de rearranjo 1,5 de $H^\bullet$, ruptura da ligação C9-C11 e perda de radical metílico, sucessivamente. Por outro lado, rearranjo 1,5 de $H^\bullet$ a partir do íon molecular, ruptura da ligação C9-C11, rearranjo 1,3 de $H^\bullet$ e quebra da ligação C2-C3, sucessivamente, leva a formação da espécie iônica **Frag-A**. Essa espécie por rearranjo radicalar de grupo alquílico e perda de radical isopropílico ou, alternativamente, por rearranjo de radical metílico, eliminação de grupo etílico radicalar e rearranjo Wagner-Meerwein de metila pode ser convertida nos íons de m/z 149 e 163, respectivamente.

O íon molecular (m/z 304) pode também ser rearranjado para outras três iônicas radicalares: **Frag-B**, **Frag-C** e **Frag-D**. Mediante reação de Retro Diels–Alder, a espécie **Frag-B** pode ser clivada para dar a de m/z 137. A formação do íon carbênio de m/z 261 deve envolver a perda de um radical isopropílico a partir de **Frag-C**. A etapa antes da eliminação do grupo isopropílico radicalar deve envolver um rearranjo de um radical terciário para um secundário. Embora resultados teóricos mostraram que as reações em fase gasosa geralmente ocorrem em múltiplas etapas¹⁹⁵, tal rearranjo energeticamente desfavorável pode ser compreendido propondo-se que a eliminação do grupo isopropílico radicalar ocorra concertadamente, não necessariamente de forma sincronizada, com o rearranjo 1,3 de $H^\bullet$. Cálculos teóricos em fase gasosa têm fornecido evidências substanciais sobre a importância de rearranjos diotrópicos e de etapas elementares concertadas na biossíntese de diterpenos.¹⁹⁶ Por fim, o fragmento **Frag-D**, por uma série de reações, incluindo reações de rearranjo, de migração de hidrogênio, de metila ou de grupo alquílico radicalares e de Retro Diels–Alder gera os carbocátions alílicos de m/z 41, 69, 109 e 123, os carbocátions dialílicos de m/z 81, 95 e 109 e a espécie de m/z 55.

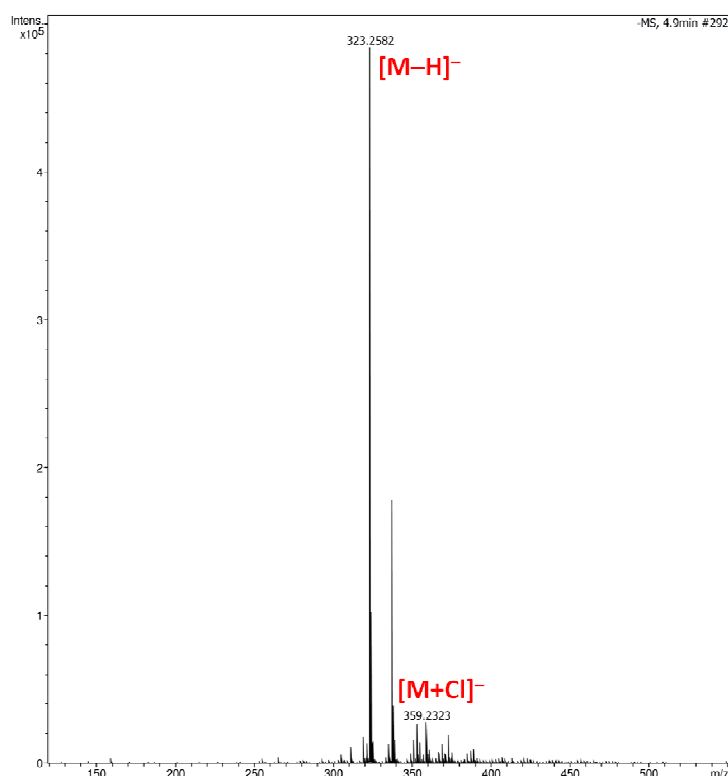
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

4.4.1 Ácido (-)-(5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-óico (**1**) e seus derivados sintéticos (**1a-1f**)



4.4.1.1 Estrutura planar de **1**

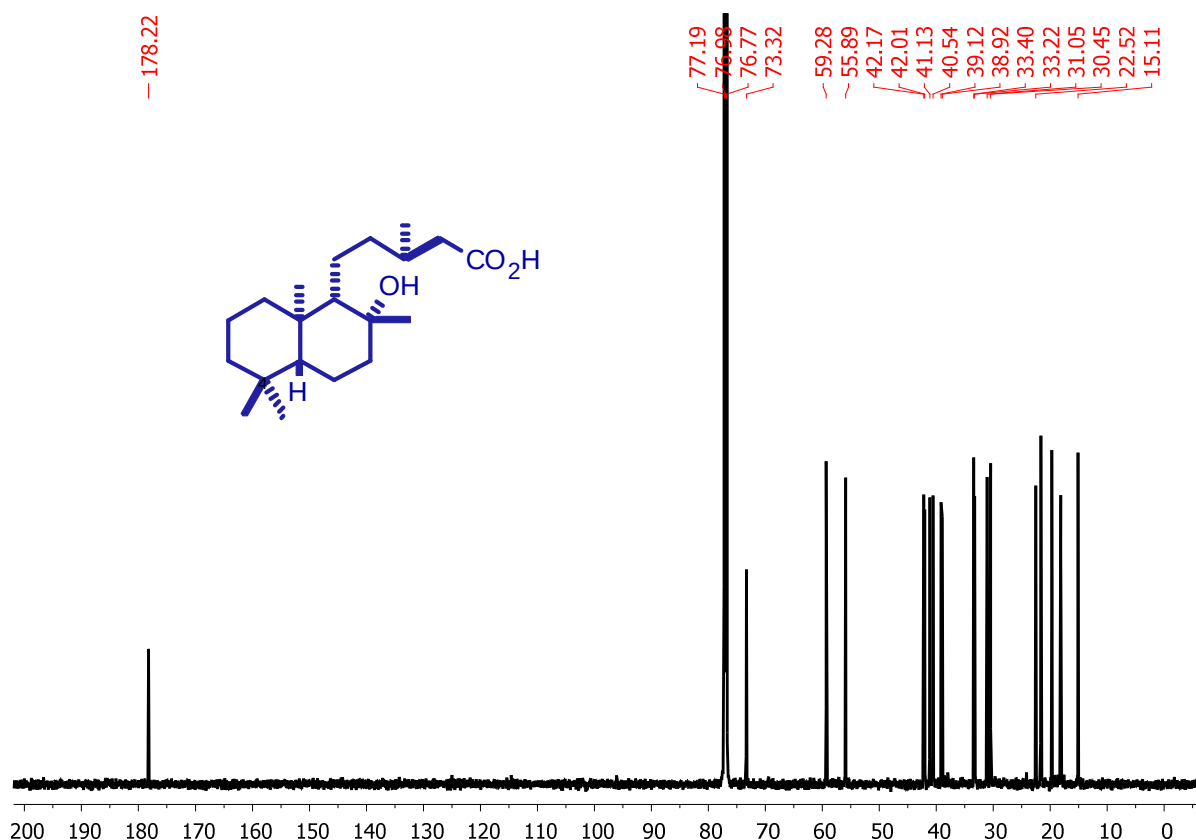
Figura 79 - Espectro de massas de alta resolução do diterpeno **1**.



O espectro de massas de alta resolução da substância **1**, adquirido no modo negativo, apresentou um pico (*IR* de 100 %) em m/z 323,2582, referente as moléculas desprotonadas, $[M-H]^-$, bem como um pico das moléculas anionizadas com o íon cloreto (Cl^-) em m/z 359,2323, consistentes com a fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_3$ (calculados para $C_{20}H_{35}O_3$: 323,2586 u e $C_{20}H_{36}O_3Cl$: 359,2353 u), para a qual se calcula um Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a três (figura 79, p. 122).

A substância **1** foi analisada por espectroscopia de RMN nos seguintes solventes deuterados: $CDCl_3$, $(CD_3)_2CO$ e CD_3OD . Nos espectros de RMN de ^{13}C , observaram-se sinais para vinte átomos de carbono, os quais, com o auxílio dos espectros de APT e/ou DEPT 90° e 135°, foram atribuídos a cinco carbonos metílicos alifáticos, a oito carbonos metilênicos sp^3 , a três carbonos metínicos alifáticos, a dois carbonos quaternários, a um carbono terciário oxigenado e a um carbono de grupo acílico (figura 80, p. 123).

Figura 80 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1** ($CDCl_3$, 151 MHz).



As reações de **1** com solução etérea de diazometano e com soluções de KOH e NaOH, além das derivatizações deste com os reagentes quirais anisotrópicos, *R*- e *S*-PGME, rendendo substâncias diastereoisoméricas contendo uma ligação amídica,

demonstraram que o carbono acílico era de um grupamento de ácido carboxílico. A presença do grupo hidroxílico na estrutura molecular foi evidenciada pela desidratação de **1** em CDCl_3 e pelo deslocamento químico do carbono da ligação $\text{C}=\text{O}$; δ 73,3 em CDCl_3 , por exemplo.

No espectro de RMN de ^1H de **1** (figura 82 a 84, p. 125 e 126), em CDCl_3 , observaram-se vários sinais com valores de deslocamentos químicos típicos de substância de natureza terpênica, destacando-se os sinais em δ 1,00 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 3H, Me-16), 1,11 (*s*, 3H, Me-17), 0,86 (*s*, 3H, Me-18), 0,82 (*s*, 3H, Me-19) e 0,95 (*s*, 3H, Me-20) e os sinais em δ 2,38 (*dd*, $J = 15,0$ e $6,0$ Hz, 1H) e 2,16 (*dd*, $J = 15,0$ e $8,2$ Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios de cinco grupos metílicos alifáticos e aos hidrogênios diastereotópicos de um grupo metilênico α -carboxílico, respectivamente.

Com base nos dados espectrométricos de RMN e EM, propôs-se que a substância **1** tratava-se de um diterpeno bicíclico contendo um grupo hidroxílico e um carboxílico. A ocorrência de diterpenos em Aristolochiaceae é comum⁴⁹, e os que ocorrem com maior frequência são os com esqueletos labdânico, clerodânico e kaurânico, dos quais os dois primeiros são bicíclicos.^{49,63} Espectroscopicamente, os dois esqueletos bicíclicos podem ser distinguidos pelos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos em geral, particularmente pelos deslocamentos químicos dos C-5 e C-9, pelas multiplicidades e deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos, pelas multiplicidades dos carbonos, bem como por correlações heteronucleares ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) a longa distância específicas, em especial pela correlação entre dois grupos metílicos, que não é comumente observada para um esqueleto clerodânico (figura 81, p. 124).

Figura 81 - Exemplos de dados espectrométricos de RMN de diterpenos *ent*-labdânico e clerodanos.

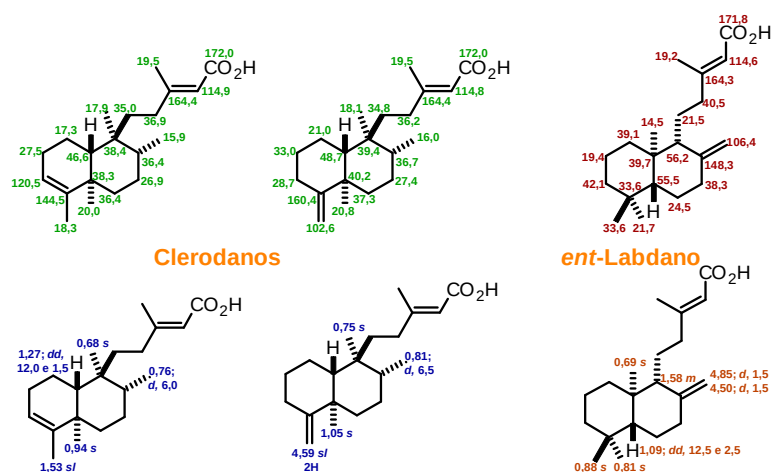


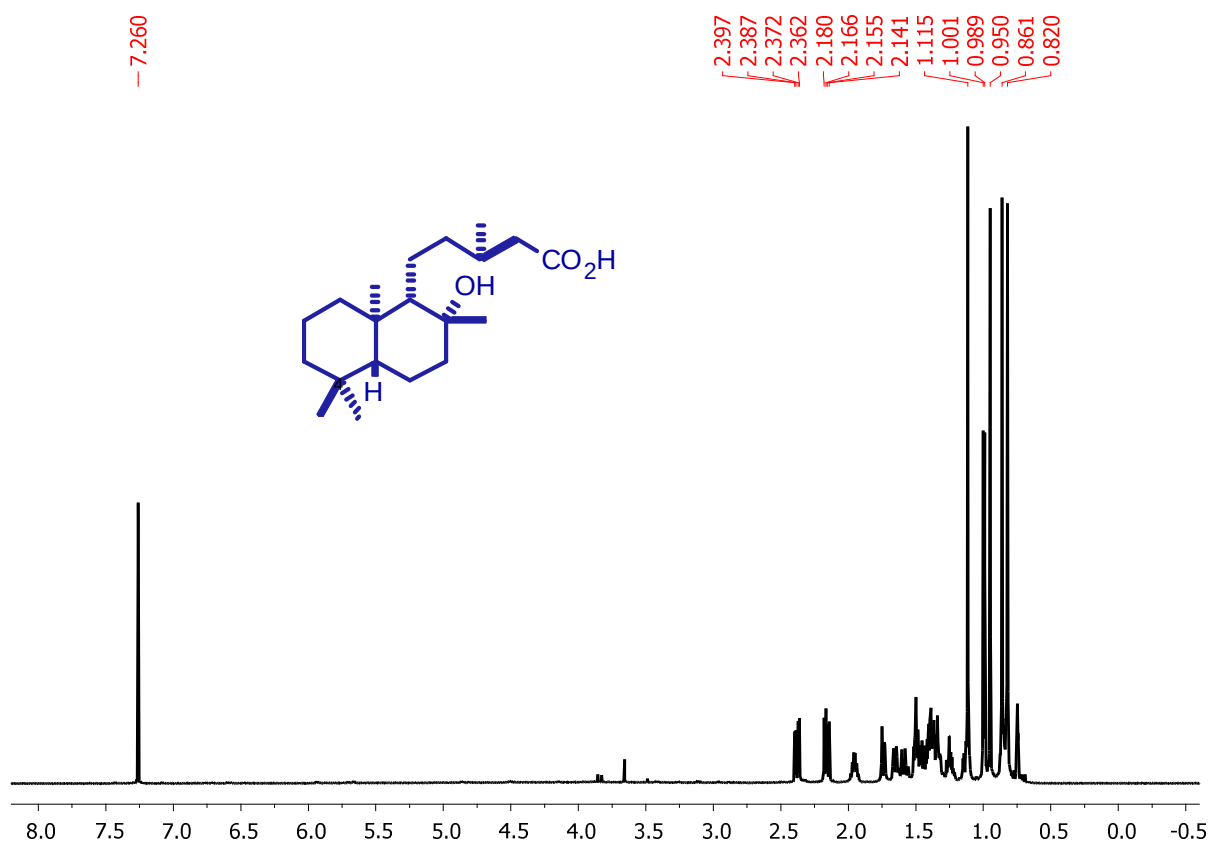
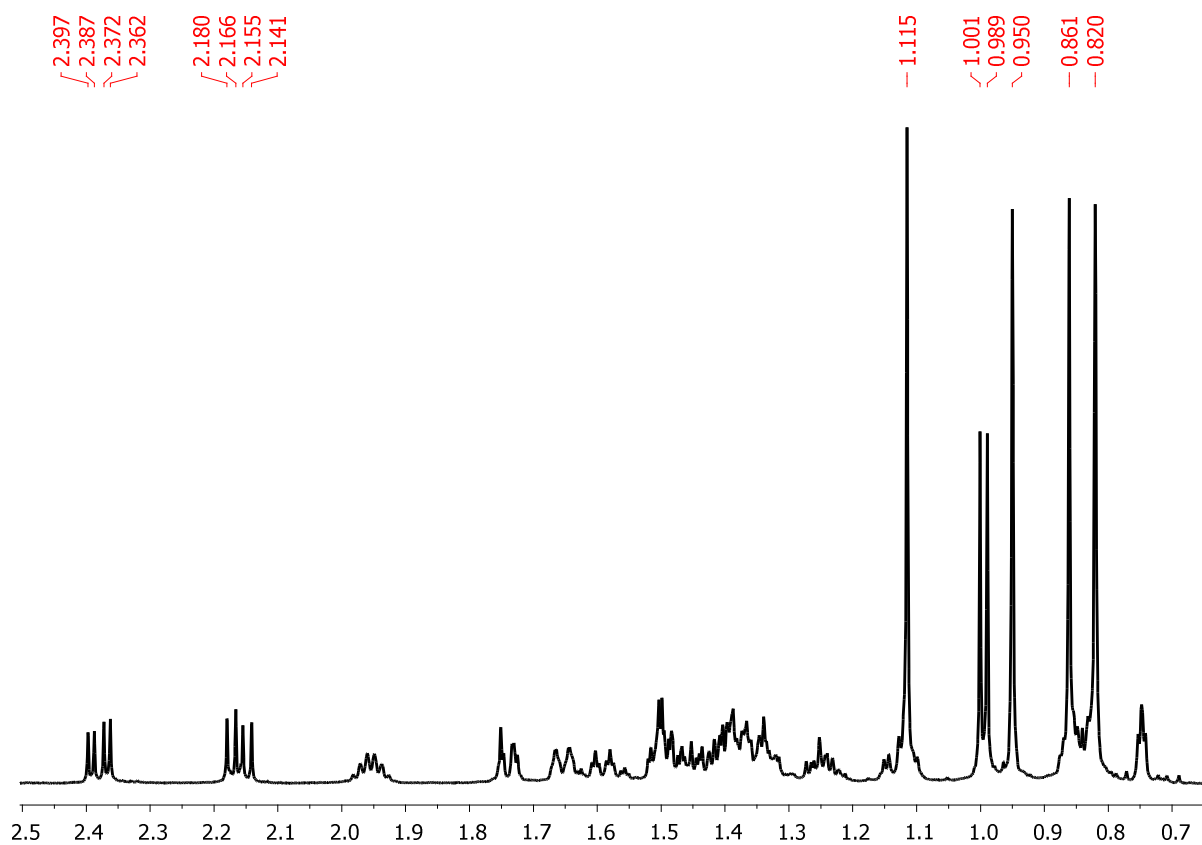
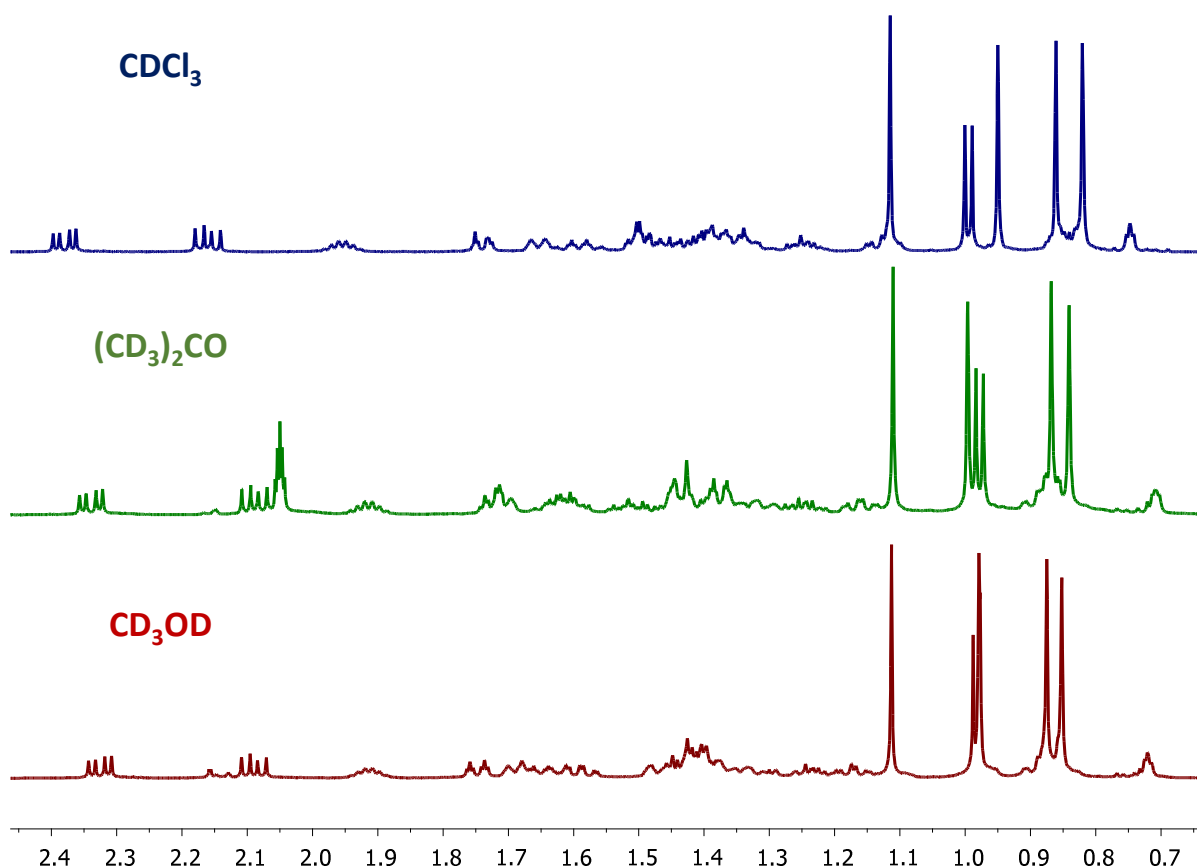
Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de **1** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 83 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **1** (CDCl_3 , 600 MHz).

Figura 84 - Espectros de RMN de **1** adquiridos nos três solventes deuterados (600 MHz).



No mapa de contornos *g*HSQC-TOCSY, em CDCl₃, de **1**, dentre outras, observaram-se correlações entre o carbono em δ 55,9 (C-5) e os hidrogênios em δ 1,74 (H-7_{eq}), 1,50 (H-6_{ax} e H-6_{eq}), 1,45 (H-7_{ax}) e 0,83 (H-5), o carbono em δ 39,1 (C-1) e os hidrogênios em δ 1,66 (H-1_{eq}), 1,59 (H-2_{ax}) e 1,13 (H-3_{ax}) e o carbono em δ 31,0 (C-13) e os hidrogênios em δ 2,38 (H-15_a), 2,16 (H-15_b), 1,95 (H-13), 1,41 (H-12_a), 1,34 (H-11_a e H-11_b), 1,24 (H-12_b), 1,00 (Me-16) e 0,75 (H-9). Esses dados, assim como as demais correlações heteronucleares observadas por esse experimento, seja em CDCl₃ ou nos outros solventes, quando foram devidamente interpretados com a assistência dos outros espectros de RMN, sobretudo os de RMN de ¹³C, DEPT 135° e *g*HSQC, evidenciaram três sistemas de *spin* independentes na estrutura molecular de **1**: i) constituído por três grupos metilênicos ligados em sequência (C1 a C-3), ii) constituído por dois grupos metilênicos e um metínico (C-5 a C-7) e iii) constituído por três grupos metilênicos (C-11, C-12 e C-14), dois metínicos (C-9 e C-13) e um metílico (C-16) (figuras 85-90, p. 127-129).

Figura 85 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).

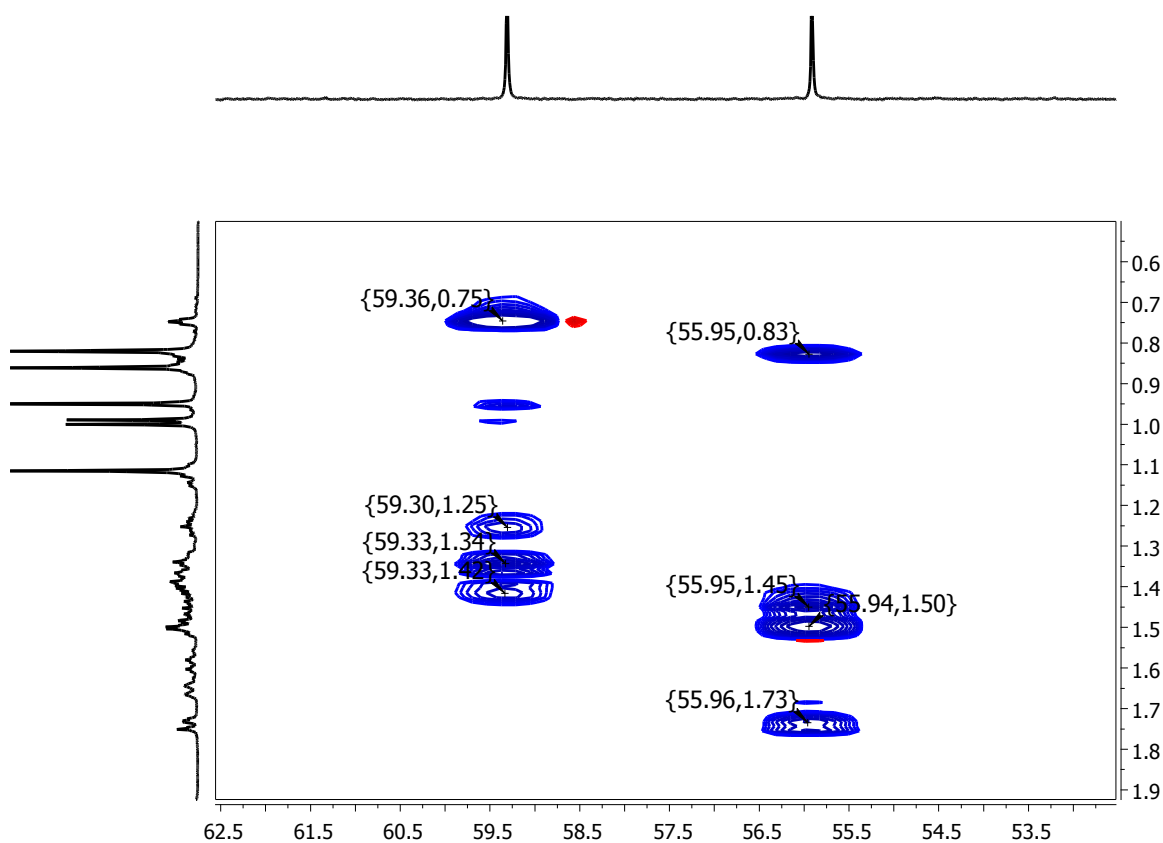


Figura 86 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).

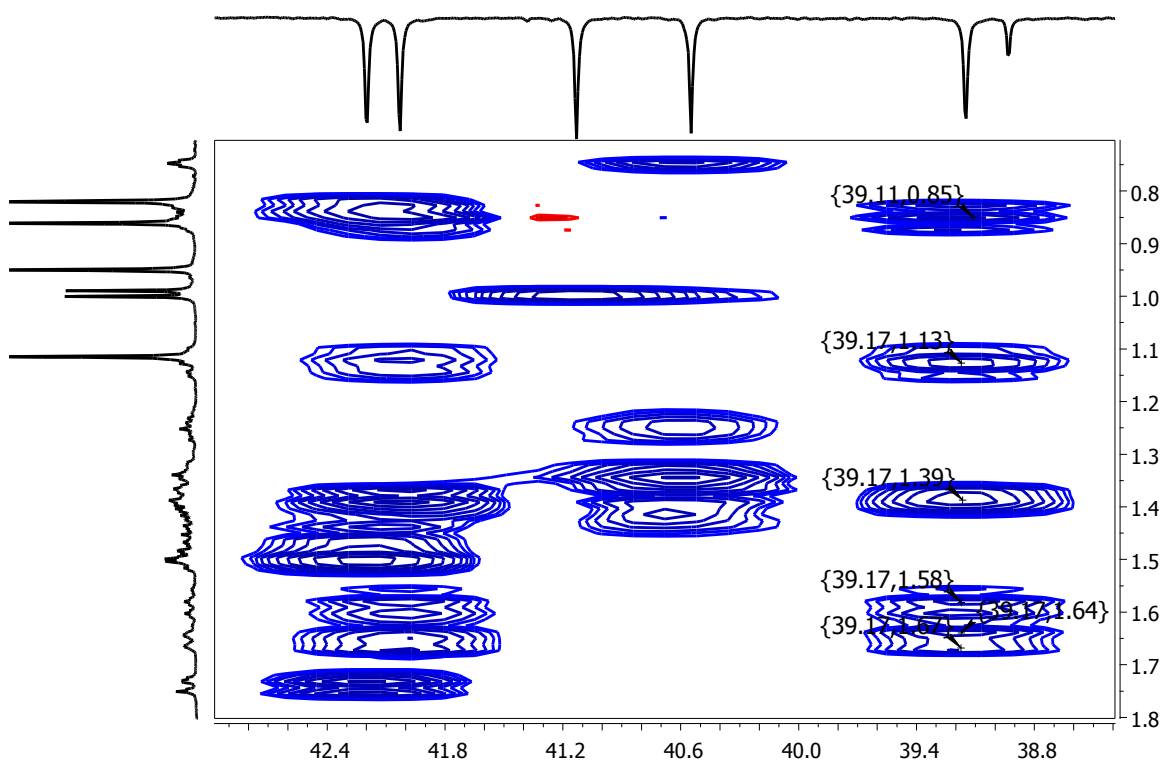


Figura 87 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).

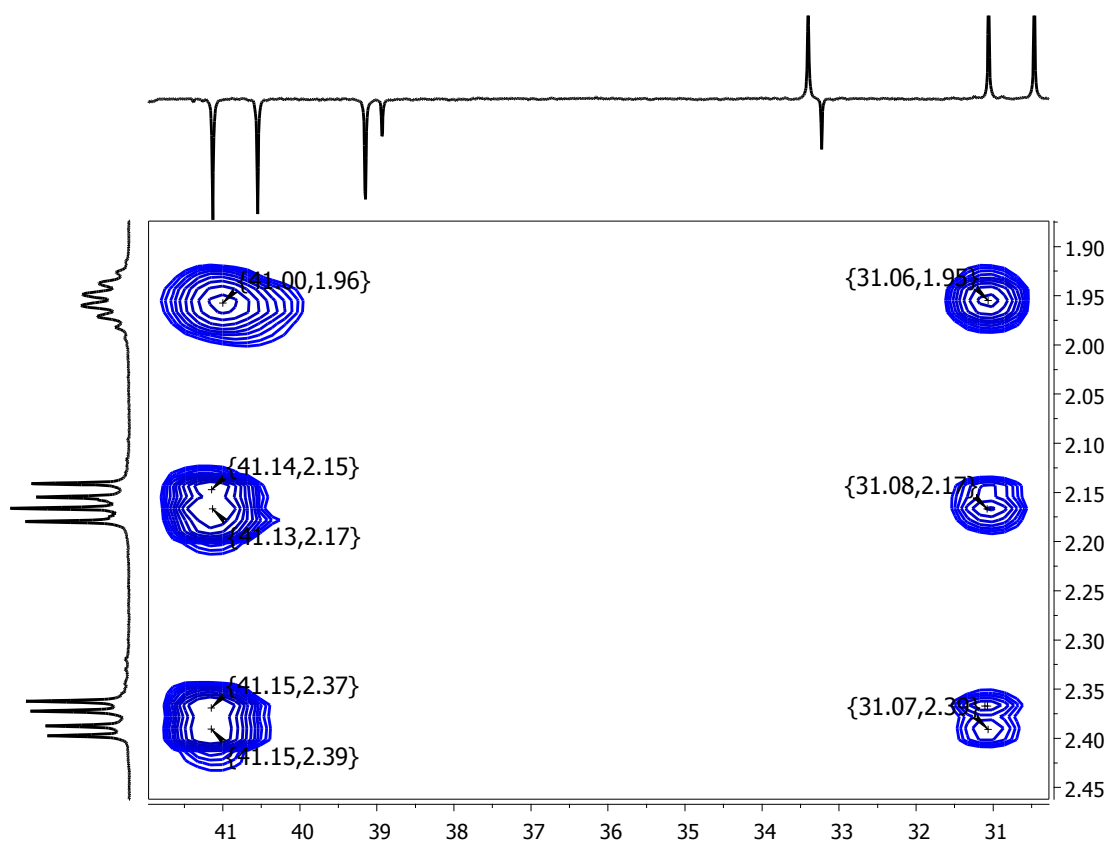


Figura 88 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).

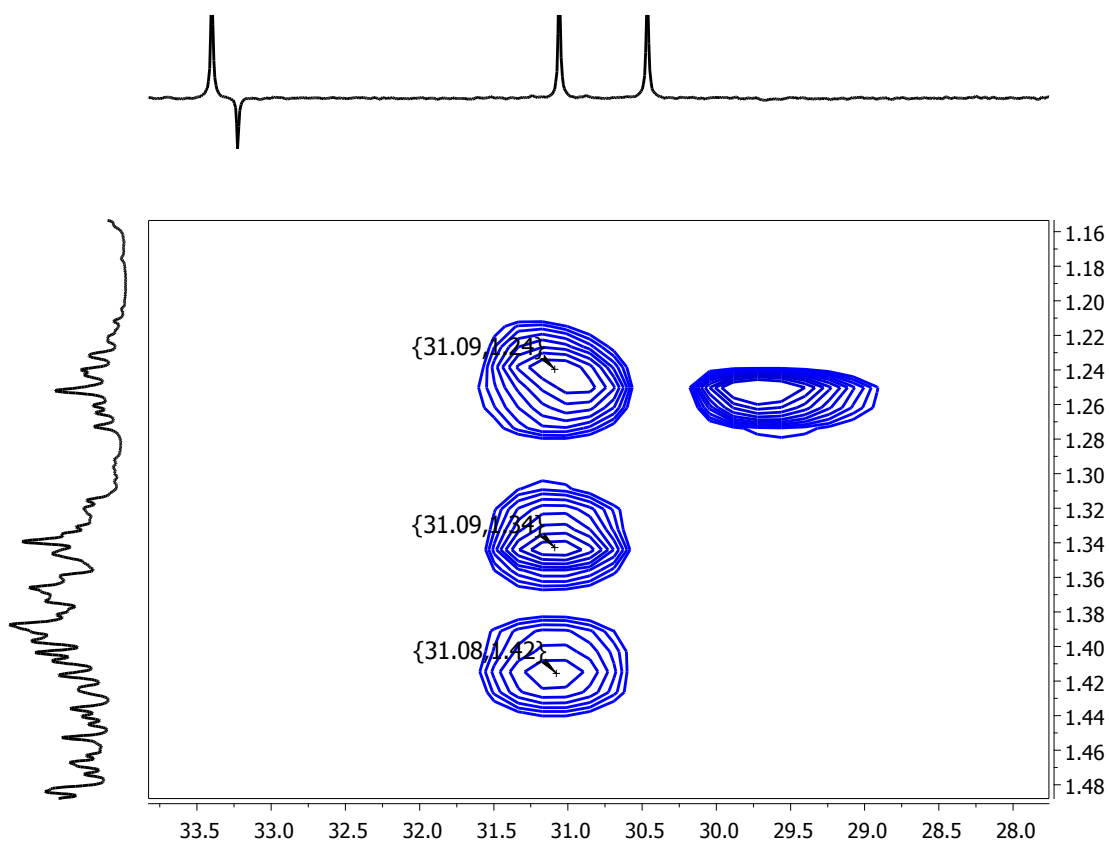


Figura 89 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).

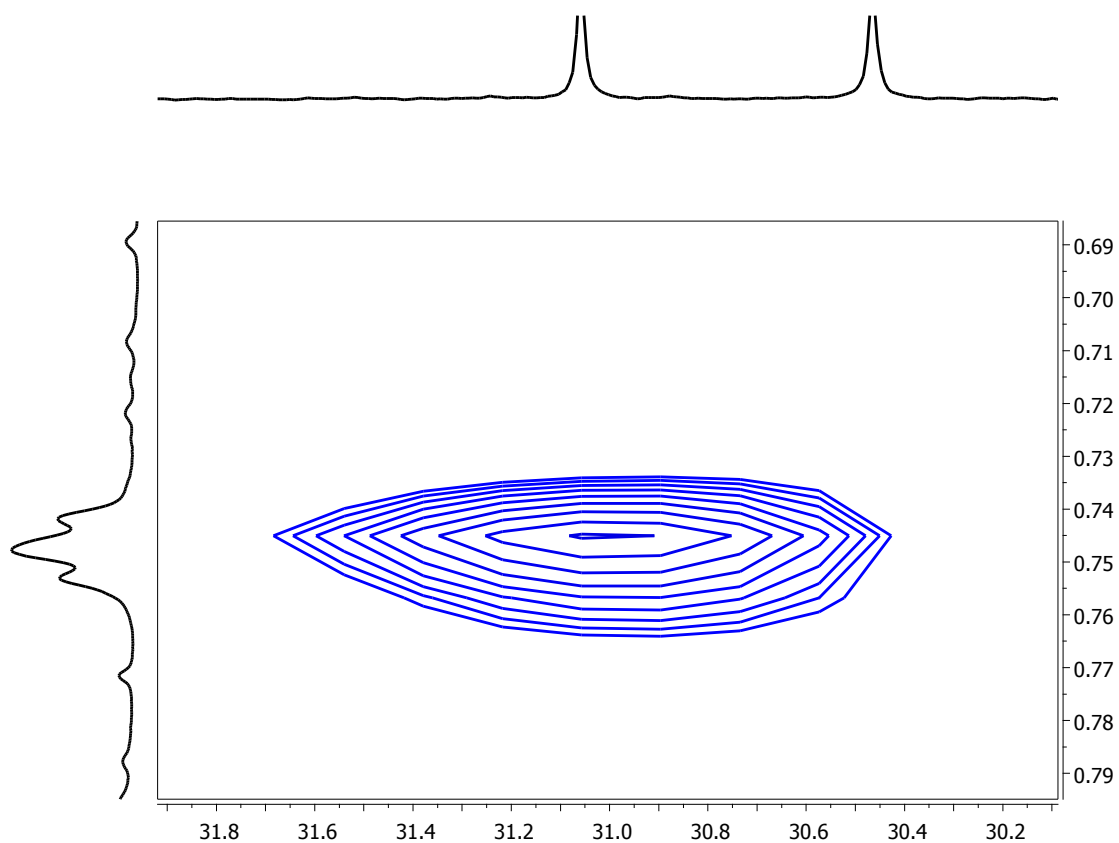
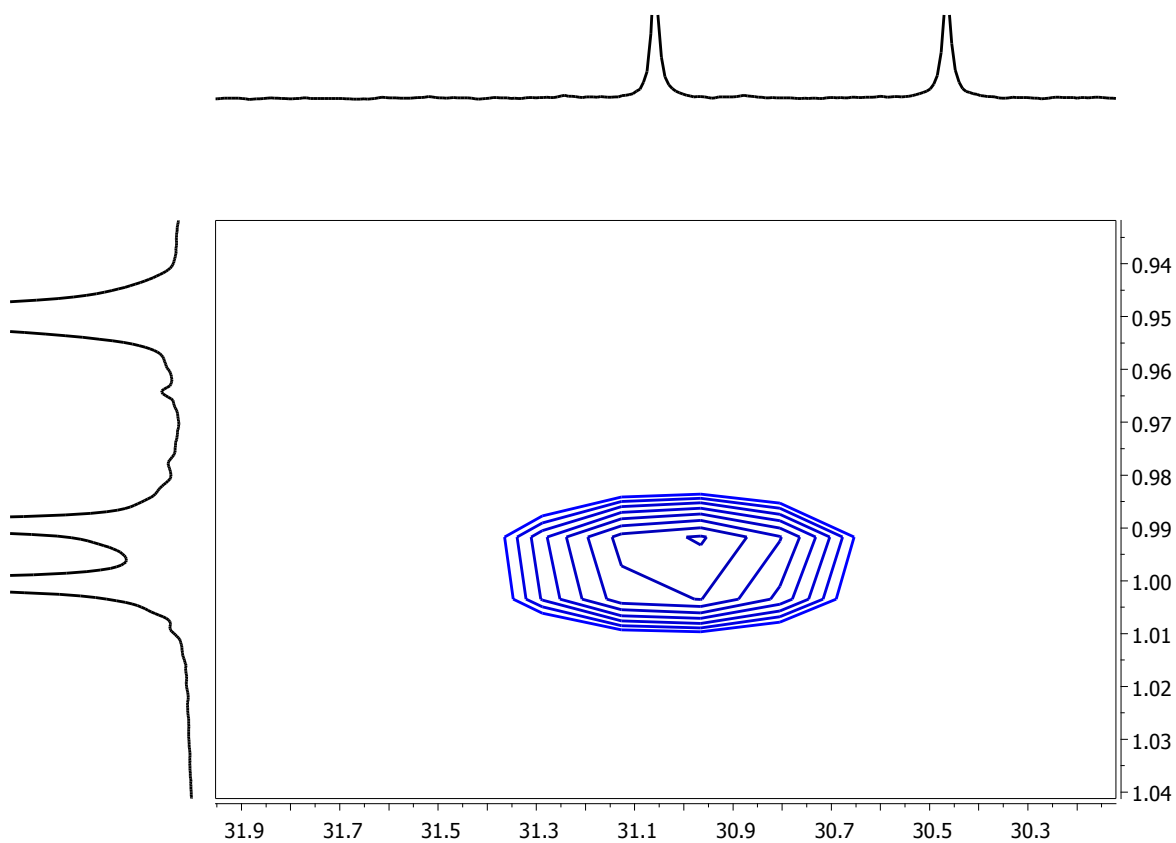


Figura 90 - Mapa de contornos (expansão) de gHSQC-TOCSY de **1** (CDCl₃, 14,1 T).



A subestrutura I, a qual contém o sistema de *spin* mais extenso, foi determinada com base em algumas das correlações a longa distância (J2 e J3) observadas por meio do experimento *g*HMBC (figuras 91 e 92, p. 130). Em CDCl_3 , destacaram-se as correlações entre o carbono em δ 59,3 (C-9) e os hidrogênios (2Hs) em δ 1,34 (H-11_a e H-11_b) e os carbonos em δ 178,2 (C-15), 40,5 (C-12), 31,0 (C-13) e 19,7 (C-16) e os hidrogênios em δ 2,38 (H-14_a) e 2,16 (H-14_b). E, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, destacaram-se as correlações entre o carbono em δ 23,3 (C-11) e o hidrogênio em δ 1,91 (H-13) e o carbono em δ 32,0 (C-13) e o hidrogênio em δ 1,25 (H-12_b) (figura 92, p. 130). As multiplicidades, as constantes de acoplamento e os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios desse sistema de *spin* foram totalmente compatíveis com a subestrutura proposta (tabela 5, p. 132). Igualmente compatíveis foram os acoplamentos escalares (homonucleares) observados pelo experimento ^1H - ^1H *g*COSY, dos quais se destacam alguns dos mais importantes e melhor resolvidos na figura 92, p. 130.

Figura 91 - Subestruturas I a III. A direita está a estrutura planar de **1**, e em destaque as correlações que conectam as subestruturas. O asterisco (*) significa que naquela posição há um carbono não hidrogenado.

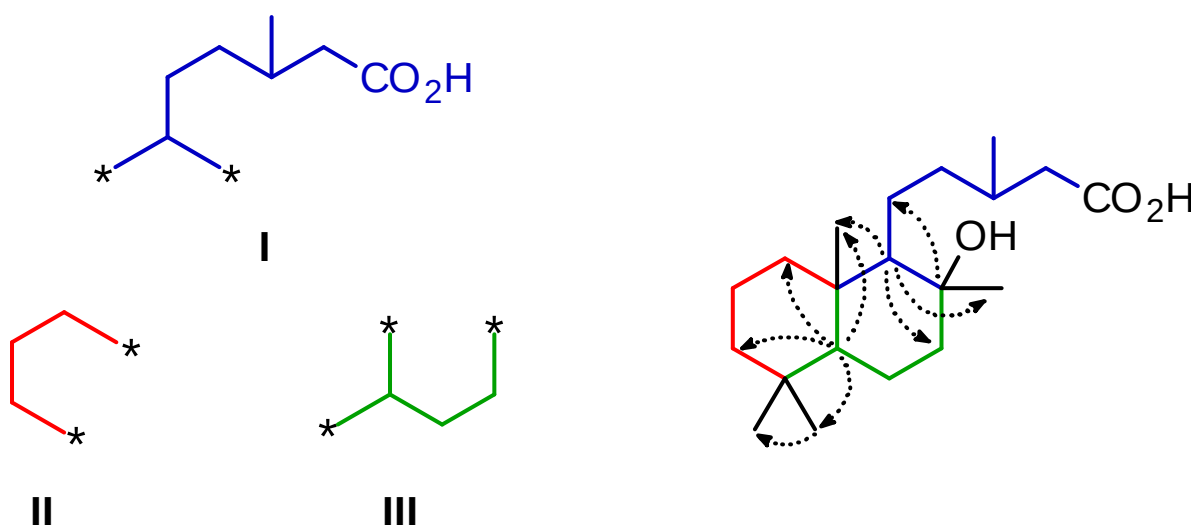
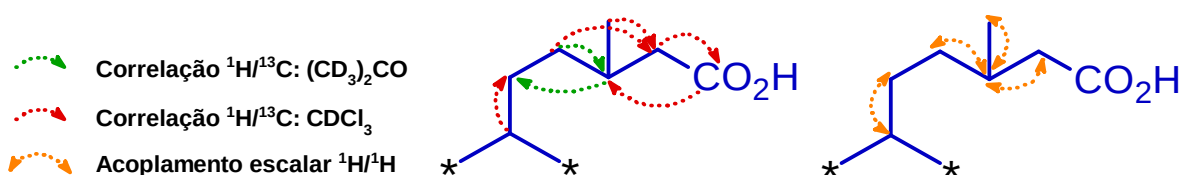


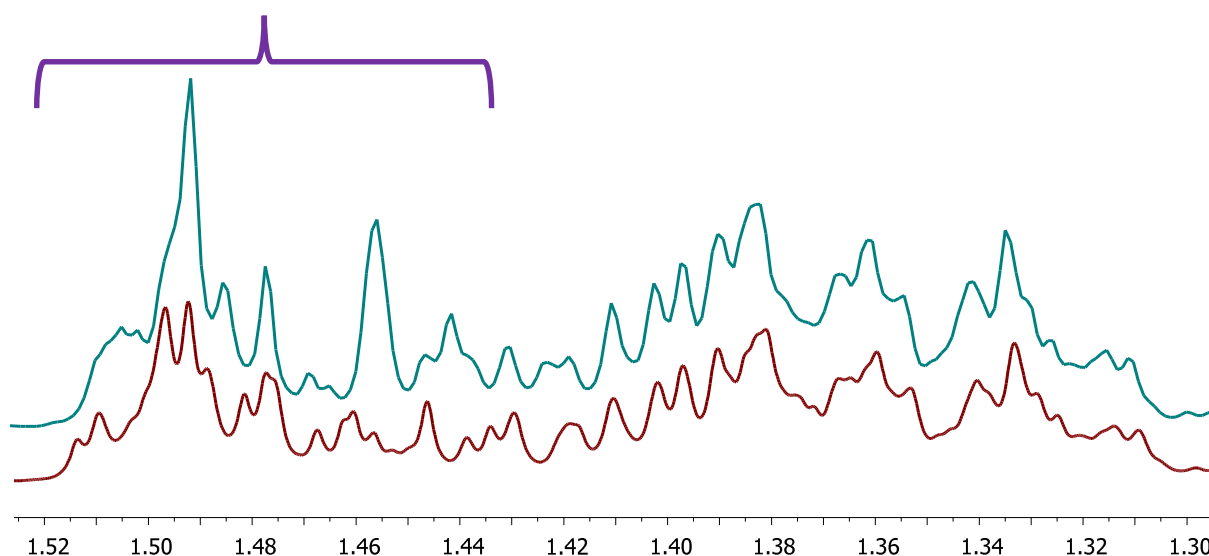
Figura 92 - Correlações homo- e heteronucleares observadas para a subestrutura I de **1**.



A subestrutura III, por outro lado, foi deduzida pela multiplicidade, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, do hidrogênio metínico (duplo dubleto, H-5), pelas multiplicidades, em CD_3OD , de dois dos hidrogênios metilênicos (δ 1,74: *dt ap*; δ 1,59: *td ap*; H-7_{eq} e H-6_{ax}, respectivamente) e por experimentos de irradiação seletiva, HOMODEC, os quais foram efetuados em CDCl_3 . Como esperado para uma sequência $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, ao invés de uma $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2$, irradiação em δ 1,74 resultou nas simplificações dos sinais em δ 1,50 (H-6_a e H-6_b) e 1,45 (H-7_{ax}) e em nenhuma alteração na feição do sinal em δ 0,83 (H-5) (figura 93, p. 131).

Figura 93 - Espectro (expansão) de RMN de ^1H (HOMODEC) irradiando-se na frequência de absorção do H-7_{eq} (δ 1,74).

Sinais com multiplicidades simplificadas



A conectividade entre as subestruturas I a III, a natureza do sistema bicíclico e a localização dos grupos metílicos e hidroxílico na estrutura molecular de **1** foram inferidas pelas demais correlações a longa distância presentes nos mapas de contornos *g*HMBC, especialmente pelas correlações, em CDCl_3 , entre o carbono em δ 73,3 (C-8) e os hidrogênios em δ 1,34 (H-11_a e H-11_b), o carbono em δ 59,3 (C-9) e os hidrogênios em δ 1,74 (H-7_{eq}), 1,11 (Me-17) e 0,95 (Me-20), o carbono em δ 55,9 (C-5) e os hidrogênios em δ 1,66 (H-1_{eq}), 1,37 (H-3_{eq}), 0,95 (Me-20) e 0,82 (Me-19) e entre o carbono em δ 21,6 (C-19) e os hidrogênios em δ 0,86 (Me-18) (figura 91, p. 130).

Resultados e discussão**Tabela 5** - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	1§		$1\ddagger$		1°	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 _{eq}	39,1	1,66 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 3,0 e 1,2	40,2	1,71 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 2,7 e 1,8	40,6	1,69 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 3,4 e 1,0
1 _{ax}		0,85 <i>comp</i>		0,89 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,1 e 3,2		0,88 <i>comp</i>
2 _{eq}	18,1	1,39 <i>m</i>	19,0	1,38 <i>m</i>	19,6	1,40 <i>m</i>
2 _{ax}		1,59 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,6 e 3,3		1,62 <i>m</i>		1,64 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,6 e 3,5
3 _{eq}	42,0	1,37 <i>m</i>	42,9	1,37 <i>m</i>	43,3	1,39 <i>m</i>
3 _{ax}		1,13 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,9 e 4,6		1,16 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 4,2		1,17 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 14,0 e 4,3
4	33,2	–	33,9	–	34,2	–
5 _{ax}	55,9	0,83 <i>comp</i>	56,9	0,87 <i>dd</i> , 12,0 e 1,8	57,5	0,87 <i>comp</i>
6 _{eq}	18,3	1,50 <i>m</i> (2H _s)	19,3	1,43 (2H _s)	19,3	1,47 <i>m</i>
6 _{ax}						1,59 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 12,8 e 3,2
7 _{eq}	42,2	1,74 <i>m</i>	43,3	1,72 <i>m</i>	43,1	1,75 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 3,0
7 _{ax}		1,45 <i>m</i>		1,44 <i>m</i>		1,43 <i>m</i>
8	73,3	–	72,6	–	73,9	–
9 _{ax}	59,3	0,75 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,4	60,5	0,71 <i>dd</i> , 4,2 e 2,4	61,0	0,72 <i>dd</i> , 4,3 e 2,7
10	38,9	–	39,8	–	40,2	–
11	22,5	1,34 <i>m</i> (2H _s)	23,3	1,52 <i>ddt ap</i> , 13,8, 12,8 e 4,4	23,6	1,43 <i>m</i>
				1,32 <i>m</i>		1,33 <i>m</i>
12	40,5	1,41 <i>m</i>	41,5	1,45 <i>m</i>	41,9	1,43 <i>m</i>
		1,24 <i>ddd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,8, 7,0 e 4,8		1,25 <i>ddd ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2, 7,2 e 5,0		1,24 <i>m</i>
13	31,0	1,95 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6	32,0	1,91 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6	32,5	1,92 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6
14	41,1	2,38 <i>dd</i> , 15,0 e 6,0	41,6	2,34 <i>dd</i> , 15,0 e 6,0	42,5	2,32 <i>dd</i> , 15,0 e 6,2
		2,16 <i>dd</i> , 15,0 e 8,2		2,09 <i>dd</i> , 15,0 e 7,8		2,09 <i>dd</i> , 15,0 e 8,0
15	178,2	–	174,2	–	177,2	–
16	19,7	1,00 <i>d</i> , 6,7	20,1	0,98 <i>d</i> , 6,7	20,2	0,98 <i>d</i> , 6,6
17 _{eq}	30,4	1,11 <i>s</i>	31,3	1,11 <i>s</i>	31,1	1,11 <i>s</i>
18 _{eq}	33,4	0,86 <i>s</i>	33,9	0,87 <i>s</i>	34,0	0,88 <i>s</i>
19 _{ax}	21,6	0,82 <i>s</i>	22,1	0,84 <i>s</i>	22,2	0,85 <i>s</i>
20 _{ax}	15,1	0,95 <i>s</i>	15,7	1,00 <i>s</i>	15,7	0,98 <i>s</i>

§ CDCl₃; ‡ (CD₃)₂CO; ° CD₃OD; *comp*=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente. Multiplicidade em *itálico*.

Assim, a substância **1**, cuja estrutura planar é mostrada na figura 91, p. 130, foi caracterizada como sendo um diterpeno labdânico, que apresenta um esqueleto carbônico 1-[1-carboxi-2-metil-butil]-2,5,5,8a-tetrametil-decahidronaftalênico e contém uma hidroxila ligada ao C8. Análises sistemáticas dos espectros uni- e bidimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1** permitiram efetuar as atribuições inequívocas de todos os deslocamentos químicos dos seus hidrogênios e carbonos, nos três solventes deuterados (tabela 5, p. 132). De acordo com essas análises, verificou-se que os deslocamentos químicos previamente publicados (em CDCl_3) para os hidrogênios ligados aos C-2, C-3, C-6, C-11, C-12 e C-13 necessitavam de correções.⁵⁹ Determinou-se ainda que as atribuições dos deslocamentos químicos dos C-2 e C-6 estavam trocadas.⁵⁹ Além disto, aprofundou-se nas atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios, uma vez que o deslocamento químico de um dado núcleo de hidrogênio, aqui, está sendo relatado juntamente com a posição, axial ou equatorial, que este ocupa no sistema bicíclico de **1**.

4.4.1.2 Configuração relativa do sistema bicíclico de **1**

4.4.1.2.1 Considerações biossintéticas de diterpenos labdânicos

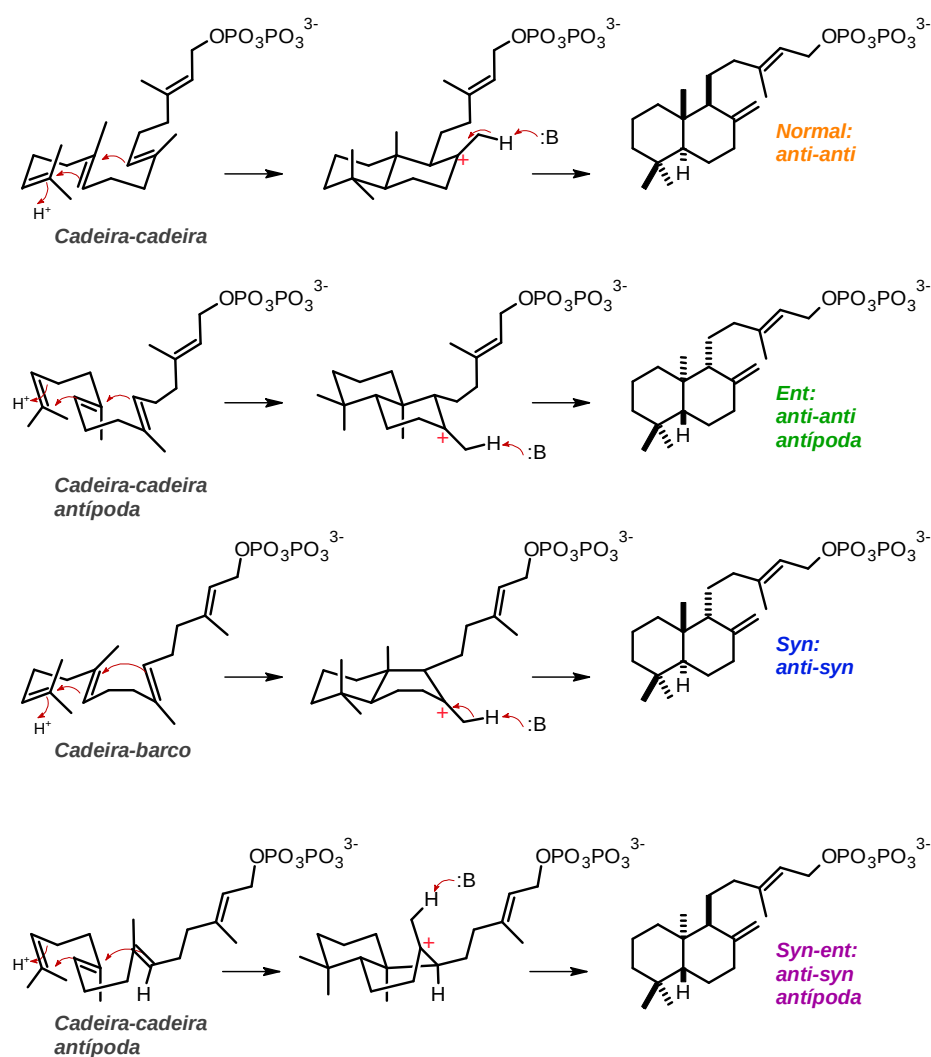
São conhecidos mais de 12.000 diterpenos – de pelo 200 esqueletos carbônicos distintos, dos quais cerca de 7.000 são policíclicos.^{197,198} Enquanto a maioria dos diterpenos pertence a um conjunto de vinte esqueletos carbônicos principais, que incluem o labdânico e aqueles relacionados a labdânicos, alguns dos esqueletos são representados por um único membro dessa classe de metabólitos secundários.¹⁹⁷

Esse número virtualmente ilimitado de diterpenos é biossintetizado a partir de um único precursor universal, o isoprenóide linear pirofosfato de (*E,E,E*)-geranilgeranila (GGPP; $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{P}_2\text{O}_7$), o qual é biossintetizado na natureza pela condensação, via uma reação de adição eletrofílica a ligação dupla $\text{C}=\text{C}$, de um difosfato alílico (DMAPP, GPP ou FPP) com o difosfato de isopentenila (*IPP*).¹⁹⁷⁻²⁰⁴

Diterpenos policíclicos são produzidos a partir das ciclizações enzimáticas do GGPP.^{198,205,206} O evento de ciclização pode ser induzido pela “ionização” de um grupo difosfato (ciclases de diterpenos classe I) ou pela protonação de um ligação $\text{C}=\text{C}$ (ciclases de diterpenos classe II).²⁰⁷ O íon carbênio “formado” sofre “uma cascata” de

ciclizações cátion- π rendendo um intermediário carbocatiônico, que é neutralizado por ataque nucleofílico ou desprotonação.^{198,205,206} A ciclização iniciada via “ionização” do grupo difosfato pode ser seguida por ciclização induzida por protonação de ligação C=C ou vice-versa, catalisadas pela mesma enzima (bifuncional) ou por mais de uma enzima.^{207,208} Além disto, os carbocátions inicialmente obtidos pela ciclização do GGPP podem ter os seus esqueletos carbônicos modificados por meio de rearranjos do tipo Wagner-Meerwein.^{198,205,206} Por fim, os diterpenos obtidos podem sofrer várias reações (enzimáticas) posteriores, tais como, oxidação, redução, epoxidação, glucosilação, entre outras, o que explica a incrível diversidade de diterpenos conhecidos.^{198,205,206}

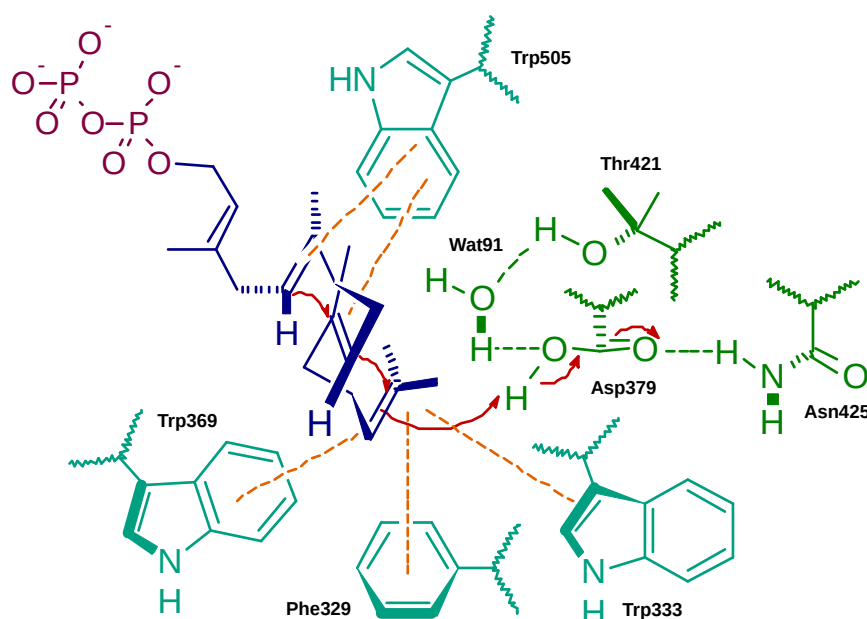
Figura 94 - Biossíntese dos quatro diastereoisômeros do difosfato de copaloila. Conformação cadeira-cadeira: série *normal*, conformação cadeira-cadeira enantiomérica (antípoda): série *ent*, conformação cadeira-barco: série *syn* e conformação cadeira-barco enantiomérica (antípoda): série *ent-syn*. Relações stereoquímicas *anti* e *syn* refere-se as configurações relativas entre a Me-20 e os H-5 e H-9.



Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 198,205,206.

A vastidão de esqueletos carbônicos e configurações absolutas que os diterpenos possuem resulta das possibilidades de ciclização do GGPP, que podem ser racionalizadas com base em implicações mecanísticas.^{198,205,206} Na biossíntese de diterpenos labdânicos, por exemplo, a configuração absoluta do produto obtido dependerá da conformação adotada pelo substrato *pro*-quirálico [GGPP] durante a ciclização (figura 94, p. 134).^{198,205} Quatro arranjos conformacionais são possíveis, dois cadeira-cadeira e dois cadeira-barco, resultando na produção de diterpenos das seguintes séries estereoquímicas: I) série *normal*, II) série *ent*, III) série *syn* e IV) série *ent-syn* (figura 94, p. yy). O mecanismo catalítico da ciclase de pirofosfato de *ent*-copaíla, um diterpeno da série *ent*, encontra-se bem compreendido (figura 95, p. 135).²⁰⁹

Figura 95 - Mecanismo enzimático da ciclase de pirofosfato de *ent*-copaloila.



Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 209.

Conforme destacado na figura 94, p. 134, os labdanos das quatro séries estereoquímicas possuem uma junção *trans* no sistema decalínico. Por causa disso, diterpenos labdânicos contendo uma junção *cis* entre os anéis de seis membros são considerados raríssimos na natureza. Exemplos incluem os produtos naturais peisonnol A²¹⁰ e *cis*-esclareol²¹¹, os quais foram isolados da alga marinha *Peyssonnelia* sp. e da planta *Leucas stelligera* (Lamiaceae), respectivamente. Embora fora proposto que

peisonnol A seria um diterpeno de esqueleto labdânico com junção *cis*, Snyder *et al.* (2010) demonstraram por síntese total que este tinha uma junção *trans*.²¹⁰

Até o momento, a configuração do *cis*-esclareol não foi refutada, porém, cabe salientar alguns aspectos controversos acerca da caracterização estrutural desse diterpeno. Primeiramente, destaca-se que foi sugerido que a conformação mais estável do sistema bicíclico do *cis*-esclareol adota uma conformação cadeira-barco, hipótese que não parece ser sustentada pelos resultados dos estudos teóricos realizados neste trabalho, nem pela maioria das evidências disponibilizadas na literatura.²¹²⁻²¹⁶ Em segundo lugar, menciona-se que há na literatura um relato anterior a este da ocorrência de um diterpeno com exatamente os mesmos deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C, para o qual uma configuração diferente, *anti-syn*, foi proposta.²¹⁷ Por fim, torna-se-á claro adiante que nem mesmo os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C são consistentes com a configuração relativa proposta para o *cis*-esclareol.

Apesar dos relatos sobre ocorrência e biossíntese restringiram as relações estereoquímicas entre os C5, C10 e C9 a, basicamente, três tipos comuns^{198,205,206}: i) *anti-anti*, ii) *ent-anti-anti* e iii) *anti-syn*, tais evidências não são suficientes para destacar as outras possibilidades por dois motivos principais: i) existem relatos de substâncias com configurações diferentes^{210,211} e ii) a título do que se tem observado na biossíntese de esteróides com junção *cis* entre os anéis A e B, substâncias com configurações ditas incomuns poderiam ser produzidas a partir das com configurações mais comuns, por exemplo, por epimerização, isomerização ou etapas de oxidação-redução.²⁰⁶ Desse modo, é mais seguro e útil avaliar todas as possíveis estereoquímicas, e decidir-se por uma com base em argumentos mais concisos, por exemplo, valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹³C e/ou Efeitos Overhauser Nuclear.

4.4.1.2.2 Considerações preliminares acerca dos comportamentos conformacionais da *cis* e *trans*-decalinas

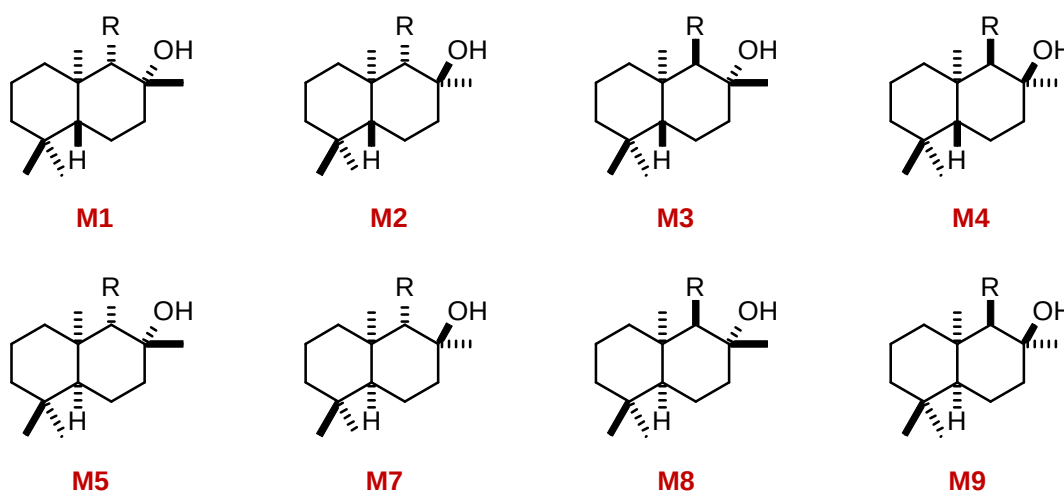
A *trans*-decalina é conformacionalmente “rígida”, existindo em uma única conformação cadeira-cadeira (grupo de ponto: C_{2h}).²¹⁸⁻²²⁰ Esse termo “rígida” foi questionado por Nasipuri (1994)²¹⁸, quem alertou que não se deve confundir habilidade de inversão com flexibilidade, dado que, no estado líquido, a variável entrópica (S) é me-

nor na *cis*-decalina, e, portanto, o isômero *trans*, dito rígido, possui maiores graus de liberdade. Em contrapartida, a situação para o isômero *cis* é um pouco mais complicada, visto que este pode adotar duas conformações cadeira-cadeira, que são enantioméricas e interconvertíveis a temperatura ambiente.²¹⁸⁻²²⁰

Diferentemente da *trans*-decalina, onde os hidrogênios em axial e equatorial são sempre distinguíveis por RMN de ^1H , para a *cis*-decalina se observa um espectro médio a temperatura ambiente.²¹⁸ Todavia, assim como para a *trans*-decalina^{221,222}, as demais conformações da *cis*-decalina são muito mais energéticas que a cadeira-cadeira.²¹⁸⁻²²⁰ Resultados anteriores de cálculos (clássicos) de mecânica molecular mostraram que a conformação cadeira-cadeira da *cis*-decalina é 5,57 kcal/mol mais estável que a cadeira-barco, 8,14 kcal/mol mais estável que a barco-barco e 6,63 a 7,34 kcal/mol mais estável que combinações da conformação barco-torcido com barco ou cadeira.^{218,220}

4.4.1.2.3 Relações estereoquímicas entre os C5 e C-10 e C10 e C-9 de 1

Figura 96 - Prováveis configurações relativas para o sistema decalínico do diterpeno **1**. Radical $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ equivale aos modelos **M1** a **M5** e **M7** a **M9**.



Além do C13, o diterpeno **1** possui quatro centros estereogênicos (C5, C8, C9 e C10), e, portanto, oito configurações relativas seriam possíveis para o sistema decalínico — biciclo[4.4.0]decano hexasubstituído — de **1** (figura 96, p. 135). Com a finalidade de compreender o efeito da configuração sobre o comportamento conformacional dos modelos **M1** a **M5** e **M7** a **M9**, efetuaram-se cálculos RHF/6-31G, em fase gasosa a 298,15 K, com essas moléculas (item 3.11.3, p. 90). Para garantir que os resultados

desses cálculos pudessem ser extrapolados aos possíveis estereoisômeros de **1**, e, ao mesmo tempo, agilizar os estudos computacionais, nas escolhas das moléculas a serem modeladas, conservou-se a maior parte da estrutura de **1**, apenas substituiu-se o radical 1-carboxi-2-metil-butílico por um propílico (figuras 97-102, p. 138-140).

Figura 97 - Confôrmers mais estáveis (RHF/6-31G) de **M1** a **M3**.

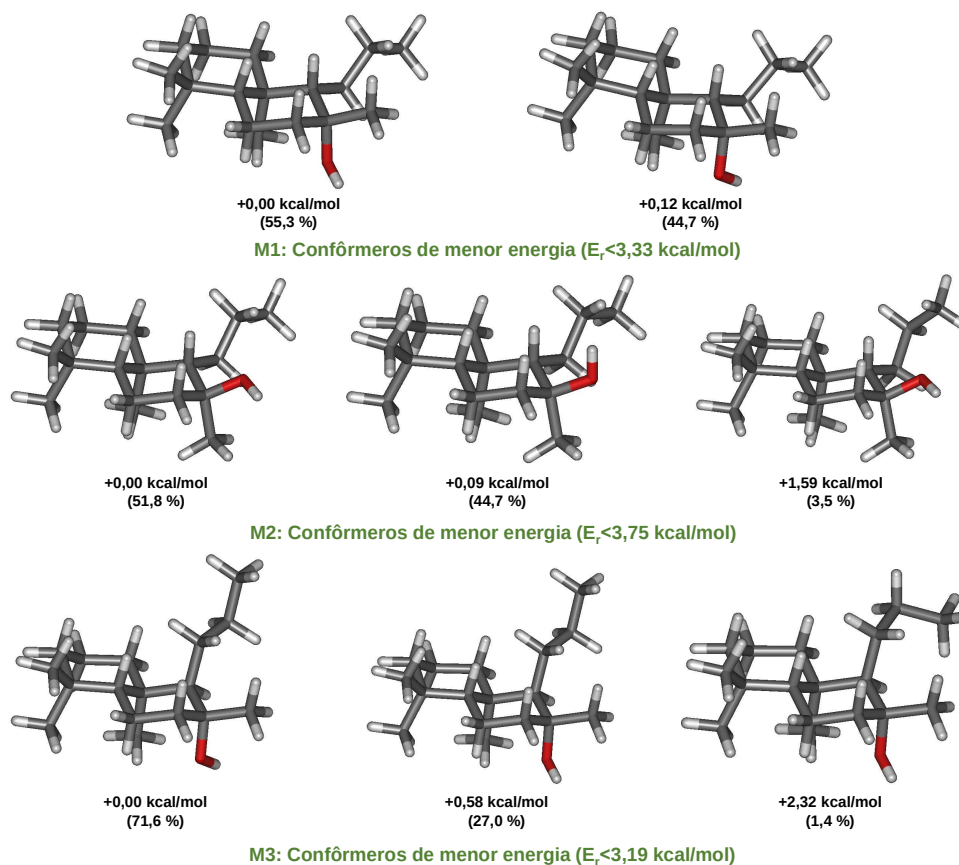


Figura 98 - Confôrmers mais estáveis (RHF/6-31G) de **M4**.

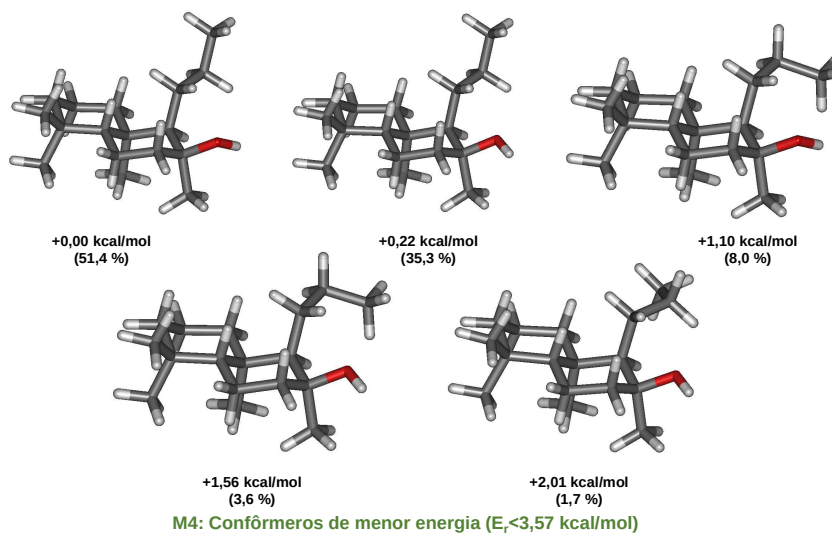


Figura 99 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de **M5** e **M6** (–Br).

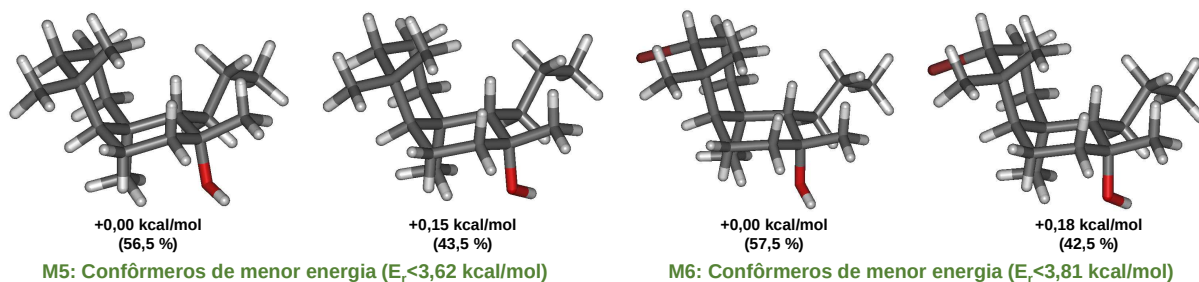


Figura 100 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de **M7**.

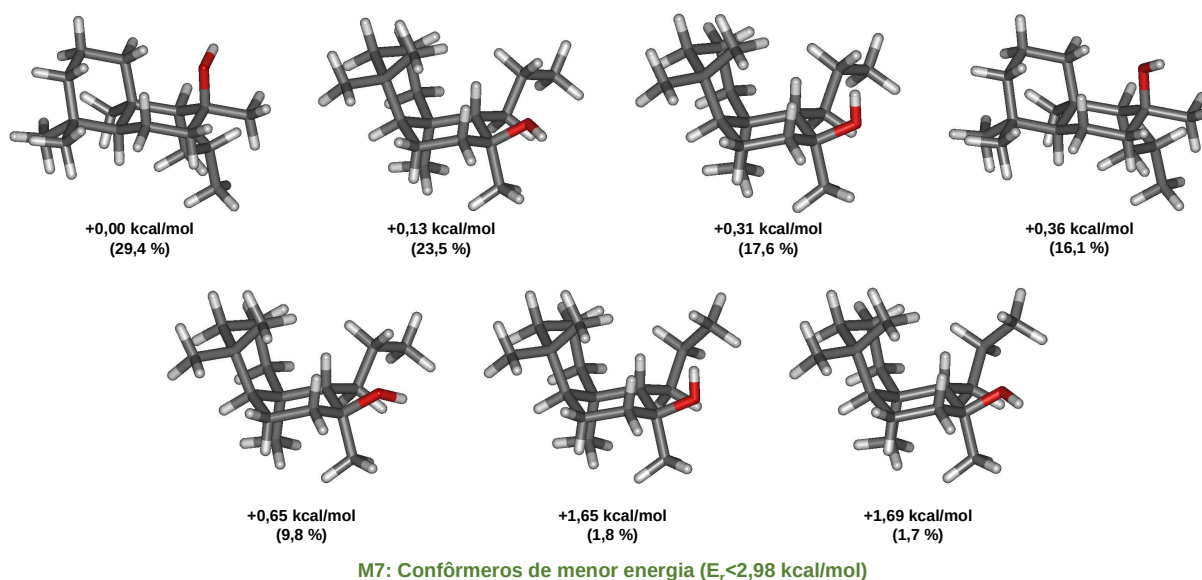


Figura 101 - Confôrmeros mais estáveis (RHF/6-31G) de **M8**.

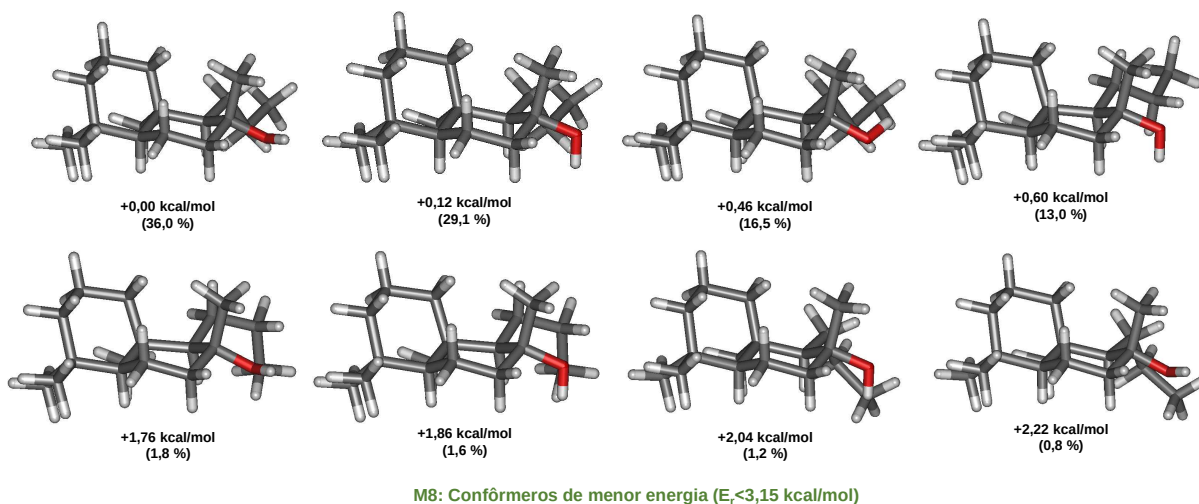
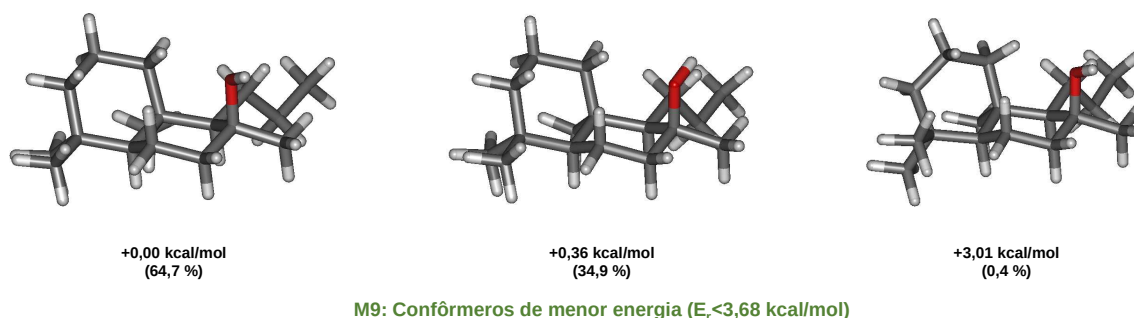


Figura 102 - Confômeros mais estáveis (RHF/6-31G) de **M9**.

Independentemente da configuração relativa ou da relação estereoquímica, *cis* ou *trans*, da junção dos anéis, os resultados dos cálculos *ab initio* mostraram que os confômeros de menor energia ($E_R < 2,98$ kcal/mol), pelo menos para os modelos selecionados, adotam uma conformação cadeira-cadeira (figuras 97-102, p. 138-140). Contudo, é importante salientar que os confômeros de **M8** e **M9** adotam conformações cadeira-cadeira inversas as de **M5** e **M6** (figuras 99, 101, 102, p. 139 e 140). Interessantemente, observou-se que **M7** sofre interconversão cadeira-cadeira, o que sugeriu que a interação estérica entre os dois grupos metílicos, aqueles ligados aos carbonos carbinólico e cabeça de ponte, deve ser intensa, diminuindo a energia de ativação para a interconversão cadeira-cadeira. Além disto, quando se comparou os resultados obtidos para **M5** com os de **M6** (figura 99, p. 139), evidenciou-se que a presença do substituinte –Br, mesmo em axial, exerce pouco efeito sobre os comportamentos dinâmicos dos sistemas bicíclicos de **M1** a **M9**.

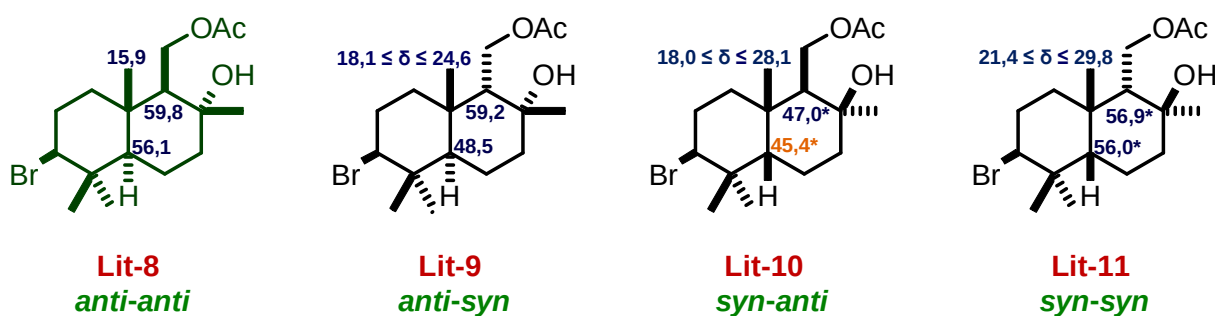
Sendo assim, assumir-se-á que, em solução, o (s) confômero (s) de menor (es) energia (s) do diterpeno **1**, tanto na forma monomérica como na dimérica (provavelmente a mais abundante), adota (m) uma conformação cadeira-cadeira, independentemente da sua configuração relativa. Além disto, a partir daqui, a menos que se especifique o solvente deuterado, quando um deslocamento químico for citado, deve-se assumir que se refere ao obtido para **1** em CDCl_3 .

4.4.1.2.4 Dados de RMN de ^{13}C : Relações estereoquímicas entre C5 e C-10 e C-10 e C-9 de **1**

Com o intuito de compreender melhor como os valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C podem ser utilizados para se determinar as configurações relativas em C5, C9 e C10, e, por conseguinte, dizer a qual série estereoquímica pertencem

cia o diterpeno **1**, analisaram-se os deslocamentos químicos das substâncias **Lit-8** a **Lit-11** (figura 103, p. 141). Esses modelos foram os únicos parecidos com **1** disponibilizados na literatura que atenderam aos seguintes critérios de seleção: i) as configurações relativas precisavam ter sido estabelecidas por cristalografia de raios-X ou síntese estereosseletiva, ii) ao “C-8” (vicinal ao da cadeia lateral) precisava estar ligado um grupo –OH, iii) a configuração em “C-8” poderia variar, exceto para o modelo *syn-ant*, onde o grupo –OH teria que estar necessariamente em axial, visto que os cálculos computacionais mostraram que o equilíbrio conformacional desse estereoisômero parece depender da configuração desse centro estereogênico, iv) considerando somente os C-5, C-9 e C-10, haver dados disponíveis para as quatro possíveis configurações relativas (junção *trans*: *anti-anti* e *anti-syn*; junção *cis*: *syn-anti* e *syn-syn*), v) serem diastereoisômeros, vi) a cadeia lateral (ligada em “C9”) tinha que apresentar, no mínimo, a demanda estérica de uma propila e vii) se houvesse algum outro substituinte na estrutura, seus efeitos sobre os deslocamentos químicos dos carbonos deveriam ser dedutíveis.

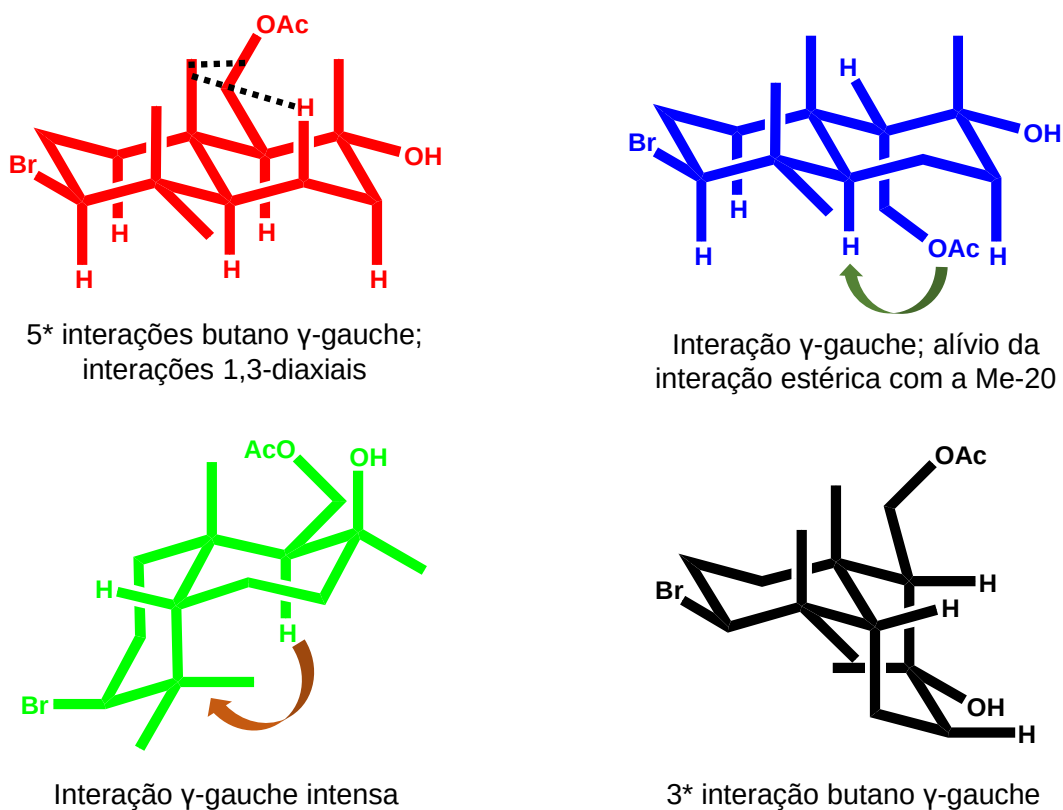
Figura 103 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de **Lit-8** a **Lit-11**. Ref. 216. Os deslocamentos químicos foram atribuídos neste trabalho. O asterisco (*) significa que as atribuições são intercambiáveis. Ref. 210.



Como mostrado na figura 103, p. 141, os diastereoisômeros podem ser diferenciados pelos deslocamentos químicos de três carbonos: i) –CH (“C-9”) em que está ligado a cadeia lateral, ii) –CH (“C-5”) cabeça de ponte e iii) –CH₃ (“C-20”) ligado ao outro carbono cabeça de ponte. O isômero *anti-anti* (**Lit-8**) pode ser distinguido dos demais pelo valor do deslocamento químico do “C-20”, o qual é pelo menos 2,1 ppm mais blindando do que em qualquer um dos demais estereoisômeros. O *anti-syn* (**Lit-9**) pode ser diferenciado do *syn-anti* (**Lit-10**) pelo valor do deslocamento químico do

“C-9”, e este [*anti-syn*] pode ser distinguido dos *anti-anti* (**Lit-8**) e *syn-syn* (**Lit-11**) pelo valor do deslocamento químico do “C-5”. O estereoisômero *syn-anti* (**Lit-10**) pode ser reconhecido pelo deslocamento químico do carbono “C-9”, o qual é significativamente mais blindado do que nos demais estereoisômeros. Embora os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos “C-5” e “C-9” do estereoisômero *syn-syn* (**Lit-11**) sejam, de certa forma, similares aos do *anti-anti* (**Lit-8**), os deslocamentos químicos dos “C-20” desses estereoisômeros diferem-se bastante entre si, o que permite distingui-los.

Figura 104 - Principais interações envolvidas nas diferenças de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C observadas entre **Lit-8** a **Lit-11**. Ref. 210. *Somando-se todas as interações observadas ao longo de todas as ligações envolvendo o carbono quartenário cabeça de ponte.

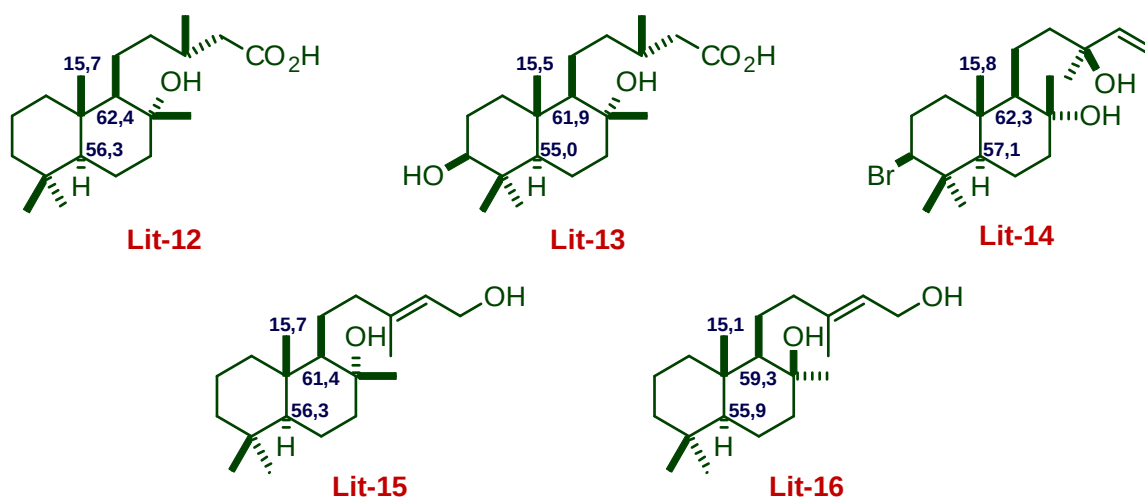


As diferenças supracitadas podem ser entendidas com base em efeitos muito bem conhecidos e estudados em espectroscopia de RMN de ^{13}C .²²³ A blindagem observada para o “C-5” do estereoisômero *anti-syn* (**Lit-9**), em relação ao do *anti-anti* (**Lit-8**), mostra que a inversão da configuração desse carbono força a cadeia lateral a se posicionar em axial, o que resulta numa interação 1,3-diaxial intensa. Além dis-

to, essa inversão de configuração anula a interação γ -gauche com o “C-20” desprotegendo-o. De modo similar, a blindagem significativa observada para o “C-9” do estereoisômero *syn-anti* (**Lit-10**) provém de uma interação γ -gauche severa com um “radical do tipo terc-butílico”. Por fim, a diferença entre os deslocamentos químicos dos “C_s-20” dos diastereoisômeros *anti-anti* (**Lit-8**) e *syn-syn* (**Lit-11**) reflete o número menor de interações butano γ -gauche exercidas sobre o “C-20” ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$) no isômero *syn-syn* (**Lit-11**); cinco versus três (figura 104, p. 142).

Para conferir se os modelos **Lit-8** a **Lit-9** atendiam ao critério VI, consideraram-se os efeitos do grupo $-\text{Br}$ sobre os carbonos α , β , γ , δ e ϵ . Para derivados 4-terc-butilciclohexânicos, a inserção de um grupo $-\text{Br}$ em equatorial desprotegeria os C α , C β e C γ em 25,00, 11,30 e 0,70 ppm, respectivamente, e protegeria os C δ e C ϵ em 2,02 e 0,33 ppm, respectivamente. Um grupo $-\text{Br}$ posicionado em axial, por outro lado, desprotegeria os C α e C β em 27,50 e 8,12 ppm, respectivamente, protegeria os C γ e C δ em 6,28 e 1,12 ppm, respectivamente, e exerceria o mesmo efeito de proteção de um em equatorial sobre o C ϵ (0,33 ppm) (figura 105, p. 143).²²⁴

Figura 105 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos “C γ e C ϵ e da $-\text{Me}\epsilon$ ” de **Lit-12** a **Lit-16**.



Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 225-231.

Considerando-se os resultados dos cálculos *ab initio* feitos neste trabalho, assumiu-se que o grupo $-\text{Br}$ em **Lit-8**, **Lit-9** e **Lit-11** estava em equatorial, e, portanto, este exerceu pouca influência sobre os deslocamentos químicos dos C γ e C ϵ e sobre

o da –Me ϵ , o que validou a escolha desses modelos apesar da presença do grupo –Br. Essa simplificação foi confirmada pelos dados espectrométricos dos diterpenos, com relação estereoquímica *anti-anti*, da figura 105, p. 143.²²⁵⁻²³¹

Entretanto, no modelo **Lit-10**, cuja a conformação cadeira-cadeira adotada pelo confôrmero mais estável foi inversa a de **Lit-11**, o grupo –Br ocupava uma posição axial, o que foi corroborado por meio da análise conformacional da molécula-modelo **M6** (figura 99, p. 139). Por causa disso, esse grupo exerceu um efeito significativo sobre o C γ . Sendo assim, o valor do deslocamento químico desse carbono estava subestimado para o propósito desejado neste trabalho, e concluiu-se que este por si só, sem as devidas correções de efeitos de substituintes, não serviria para auxiliar no diagnóstico de diterpenos (C-8 hidroxilados) com relação estereoquímica *syn-anti*. Contudo, como o valor do deslocamento químico do “C-9” é o que permiti diagnosticá-los, novamente, a validade do modelo escolhido foi confirmada.

Os dados da figura 105, p. 143, também deixam claro que o deslocamento químico do “C-9” dependerá da configuração do carbono carbinólico, –C–OH, bem como da natureza da cadeia lateral. Portanto, esses aspectos estruturais e suas implicações sobre o deslocamento químico do carbono “C-9” devem sempre ser considerados. A dependência decorrente da configuração do C–OH é detalhadamente discutida, dentro do contexto da determinação da configuração relativa do C-8 de **1**.

Já que os deslocamentos químicos dos carbonos podem mudar drástica e/ou arbitrariamente dependendo das presença e posição espacial de algum substituinte adicional na estrutura, a proposição de regras empíricas que tenham utilização universal nunca foi o objetivo do presente trabalho. Contudo, as observações feitas a partir de uma análise comparativa dos dados espectrométricos de **Lit-8** a **Lit-11**, quando empregadas em um contexto adequado, cobrirão um número expressivo de diterpenos. Além disso, a aplicabilidade das regras empíricas que emergiram a partir dessas observações pode ser expandida se associadas com as regras bem estabelecidas de efeitos de substituintes sobre os deslocamentos químicos de carbonos.²²³ Na discussão da caracterização estrutural do diterpeno **4** é fornecido um exemplo de como utilizar essas regras de forma expandida.

Os valores determinados para os deslocamentos químicos dos C-5 e C-9 e do carbono da Me-20 do diterpeno **1** foram δ 55,9, 59,3 e 15,1, respectivamente. Estes foram muito similares aos dos modelos da figura 105.²²⁵⁻²³¹ É importante enfatizar que

todos os modelos dessa figura tiveram suas configurações confirmadas por cristalografia de raios-X ou síntese estereosseletiva, e, por isso, foram escolhidos. Com base nessas evidências experimentais, e em tudo que foi exposto acima, tornou-se evidente que, como fora publicado por Marchesini *et al.*⁵⁹, o ácido (–)-*ent*-8β-hidroxi-labdan-15-óico tem configuração relativa *anti-anti*, uma vez que somente essa relação estereoquímica explicou os valores de deslocamentos químicos observados para os C-5 e C-9 e para o carbono da Me-20, em especial o deslocamento químico deste último (δ 15,1).

4.4.1.3 Configuração relativa em C-8 de **1**

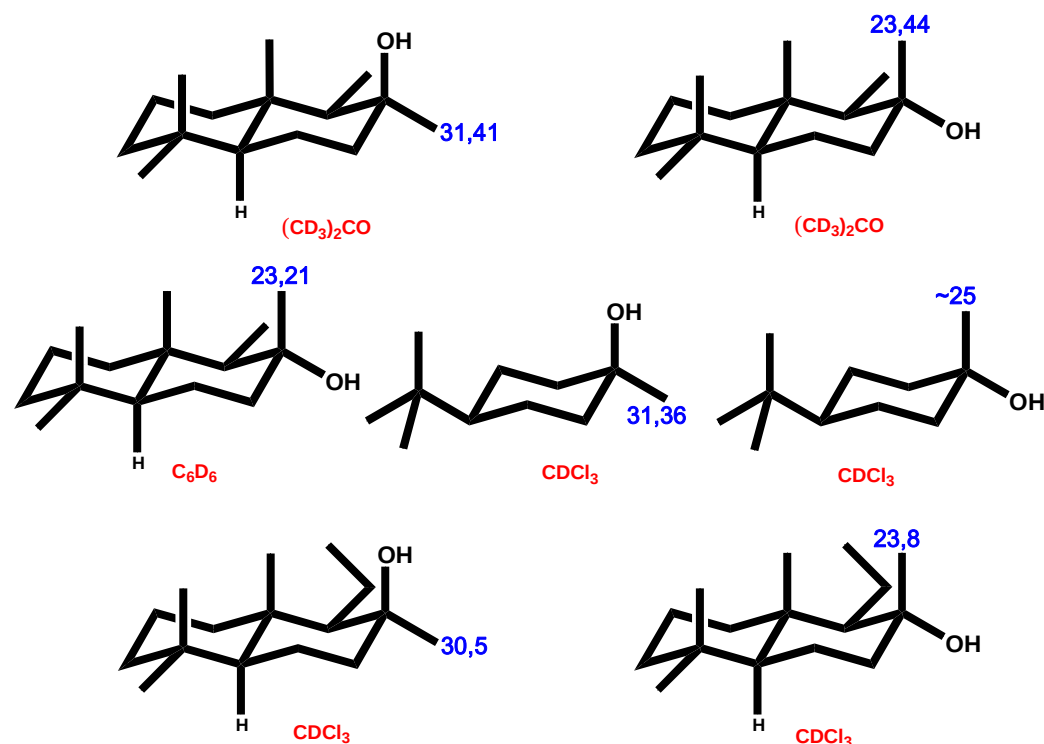
A determinação da configuração relativa em C-8 pôde ser feita baseando-se em várias argumentações e evidências experimentais. A primeira evidência foi o valor do deslocamento químico observado para o C-17 (δ 30,5) de **1**, o qual foi consistente com um grupo metílico ocupando uma posição equatorial. Consequentemente, o grupo hidroxílico (–OH) estava em axial.⁵⁹

Em 1977, Imamura *et al.*²³² relataram que a inversão da configuração em C-8 resultava numa mudança significativa do deslocamento químico do C-17. Relataram ainda que metilas em axial são mais blindadas que as em equatorial.²³² Especificamente, eles observaram que o C-17 do ácido labdanólico, que ocupa uma posição axial, era 7,4 ppm mais blindada que o C-17 do éster metílico do ácido *ent*-labdan-8β-ol-15-óico.²³² Efeitos de blindagem bem próximos a esse (6-8 ppm) foram calculados a partir dos dados espectrométricos dos modelos da figura 106, p. 146. Além disto, as similaridades entre o deslocamento químico do C-17 de **1** com os dos modelos com grupo metílico em equatorial confirmaram que o grupo –OH em C-8 de **1** estava axialmente posicionado.^{220,233-235}

O valor de deslocamento químico observado para os hidrogênios da Me-20 (δ 0,95) também estava de acordo com a configuração relativa determinada para o C-8 de **1**. Segundo Hugel, Oehlschlager e Ourisson (1966), quem primeiramente fizeram essa observação, os hidrogênios da Me-20 são relativamente mais blindados quando o grupo hidroxílico está em equatorial e a Me-17 em axial do que vice-versa.²³⁶ No diterpeno (13*S*)-*ent*-labdan-8α-ol-15-oato de metila, por exemplo, o valor do desloca-

mento químico (δ 0,81) dos hidrogênios da Me-20 é 0,14 ppm menor do que no seu epímero C-8 (δ 0,95).^{232,236}

Figura 106 - Deslocamentos químicos de grupos metílicos em axiais e equatoriais, em substâncias estruturalmente similares ao diterpeno 1.



Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 220, 233-235.

Os efeitos do grupo —OH e da sua orientação espacial sobre os deslocamentos químicos dos carbonos α , β , γ e δ foram extensivamente estudados para sistemas cíclicos, inclusive para decalinas.^{223,224,237} Em álcoois secundários, os efeitos de desproteção em $\text{C}\alpha$ e $\text{C}\beta$ são maiores quando um grupo hidroxílico está em equatorial do que em axial; $\text{C}\alpha$: 44,13 versus 38,93 ppm e $\text{C}\beta$: 8,52 versus 5,95 ppm, respectivamente.²²⁴ Em contrapartida, observou-se que um grupo hidroxílico (—OH) em axial exercia maior desproteção sobre o $\text{C}\delta$.²²⁴ Um exemplo disso são os efeitos exercidos sobre as metilas angulares em anéis peridro-ciclopentanofenantrênicos, onde um —OH em axial as desprotegem em 2,5 a 3,2 ppm, enquanto um em equatorial em 0,6 a 0,8 ppm.²³⁸ Já as posições γ são protegidas pelo grupo hidroxílico, por algo em torno de 6,9 ppm quando este está em equatorial e por ~2,3 ppm quando está em axial.²²⁴

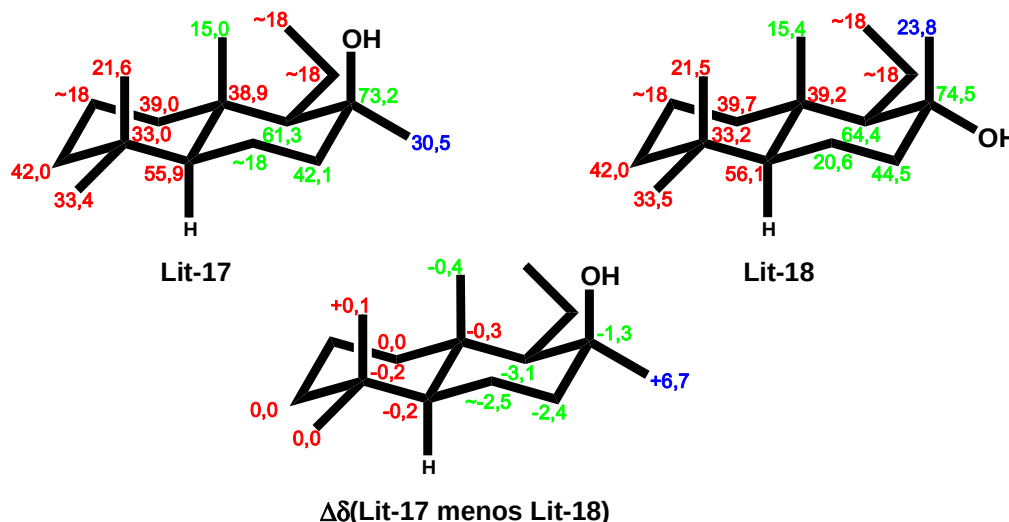
Os valores supracitados para os efeitos α , β e γ são relativos aos dos isômeros do 4-*terc*-butilciclohexan-1-ol, os quais não possuem substituintes nas posições β (2 e 6) e γ (3 e 5) e, por causa do substituinte anancomérico, são conformacionalmente rígidos, podendo estes, portanto, ser diferentes dependendo de aspectos estruturais e dinâmicos do álcool, bem como da natureza do sistema cíclico. Para derivados ciclohexânicos, resultados anteriores mostraram que as magnitudes e mesmo os sinais dos tais efeitos – α , β e γ – podem sofrer alteração caso haja um ou mais grupos alquílicos em uma ou mais dessas posições.²²⁴

De igual modo, em álcoois terciários, onde estão presentes interações estéril-cas severas, que podem ser realçadas pela existência de grupos nos $C\beta$ e $C\gamma$, as predições dos efeitos exercidos pelo grupo –OH sobre o $C\alpha$ e os carbonos vizinhos não são simples.^{224,239} Como exemplo, citam-se os efeitos do –OH nos isômeros *cis* e *trans* do 1-metil-4-*terc*-butilciclohexan-1-ol. Um –OH em equatorial desprotege os $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ e a metila em 43,82, 8,13, 3,57 e 7,79 ppm, respectivamente, e protege o $C\delta$ em 1,05 ppm. Um –OH em axial exerce efeitos de mesmos sinais sobre os $C\alpha$ (+36,26 ppm), $C\beta$ (+3,31 ppm) e $C\delta$ (-0,27 ppm) e sobre o grupo metílico (+8,71 ppm), mas de sinal contrário sobre o $C\gamma$ protegendo-o em 5,02 ppm. A desproteção causada no $C\gamma$ pelo –OH em equatorial contrasta com o que geralmente ocorre em álcoois secundários cíclicos, onde se observa uma proteção.²²⁴ Os valores citados para o isômero *cis* foram calculados em relação aos do isômero *trans* do 1-metil-*terc*-butilciclohexano, enquanto o do estereoisômero *trans* foram calculados em relação aos do *cis*-1-metil-*terc*-butilciclohexano.²²⁴

Posto isso, torna-se claro que as estimativas de deslocamentos químicos de carbonos visando a determinação da posição, equatorial ou axial, de um grupo hidroxílico em álcoois terciários cíclicos precisam ser efetuadas com muita cautela. Neste sentido, selecionaram-se os deslocamentos químicos dos carbonos dos modelos **Lit-17** e **Lit-18**, os quais são substâncias decalínicas com substituintes nas mesmas posições que as do diterpeno **1**. Contudo, diferentemente da metodologia adotada para avaliar os efeitos de proteção/desproteção do –OH sobre os carbonos dos isômeros do 1-metil-4-*terc*-butilciclohexan-1-ol, efetuaram-se cálculos entre os deslocamentos químicos dos carbonos dos dois álcoois epiméricos selecionados.²³⁵ Considerando-se os dados espectrométricos de RMN de ^{13}C de **Lit-17** e **Lit-18**, os quais foram adquiridos em CDCl_3 , e a subtração dos dados de **Lit-17** menos os de **Lit-18**, calculou-

-se um efeito de blindagem de 1,3 ppm para o C α , de 2,4 ppm para o C β , de 3,1 ppm para o C β' , de ~2,5 ppm para o CH γ e de 0,4 ppm para a Me δ (figura 107, p. 148).²³⁵

Figura 107 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de **Lit-17** e **Lit-18**. Valores de $\delta\Delta(\text{Lit-17 menos Lit-18})$.

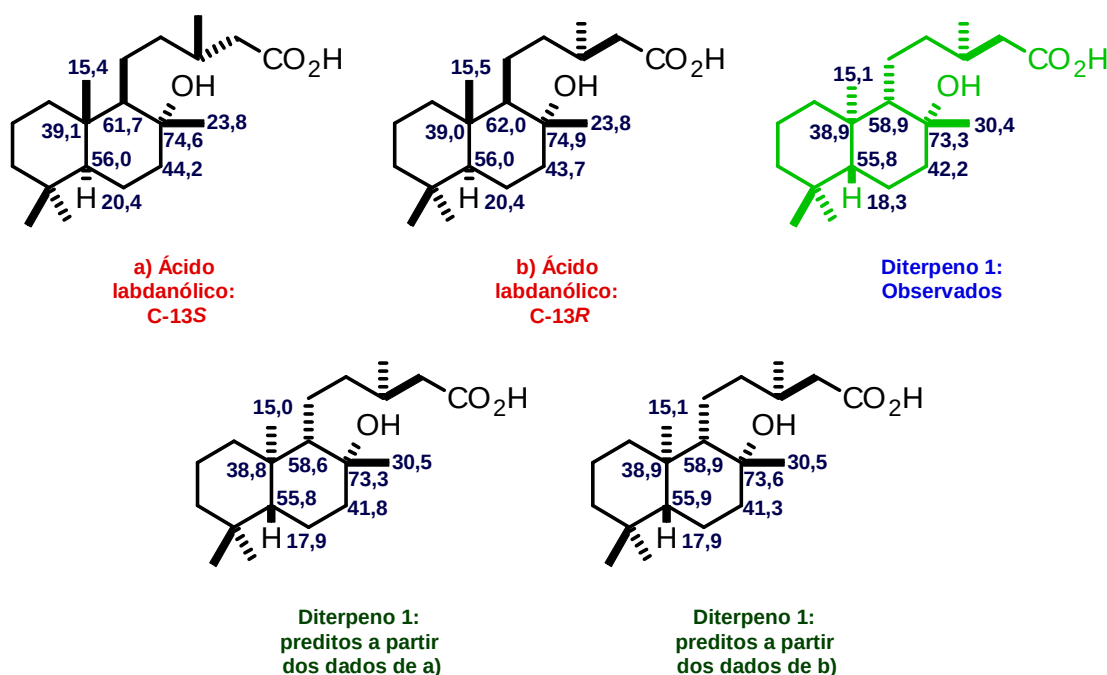


Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 235.

A partir dos valores calculados de $\delta\Delta(\text{Lit-17 menos Lit-18})$, os deslocamentos químicos dos C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-17 e C-20 de **1** foram preditos. Para isso, partiu-se dos valores relatados para ambos os epímeros C-13 do ácido labdanólico (figura 108, p. 149).²⁴⁰⁻²⁴² A configuração absoluta do epímero C-13S foi estabelecida por derivatização deste com brometo de *p*-bromo fenacila e subsequente análise cristalográfica do derivado obtido.²⁴² Para as predições partindo-se do correspondente epímero C-13R, utilizaram-se os dados recentemente publicados por García-Sánchez *et al.*, quem determinaram a configuração absoluta do ácido (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hidroxilabdan-15-óico por estudos de dicroísmo circular vibracional (VCD) associado com cálculos químico-quânticos do seu éster metílico.²⁴¹

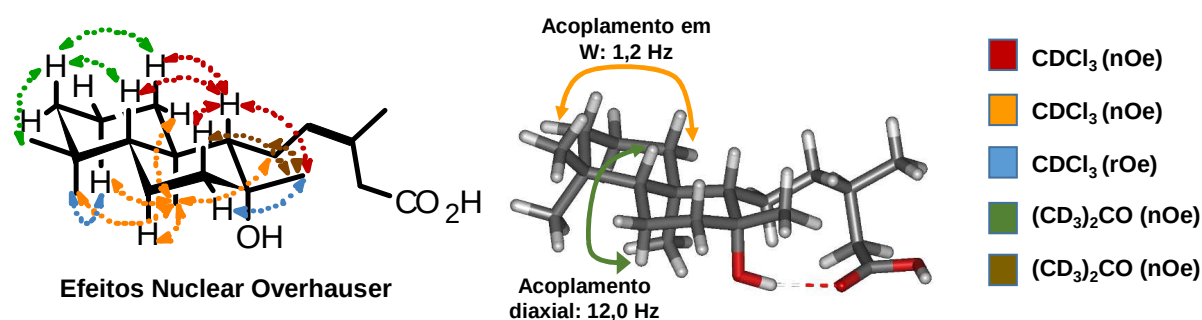
Como mostrado na figura 108, p. 149, independentemente da configuração da cadeia lateral, os valores dos deslocamentos químicos preditos para os C α (C-8), C β (C-9), C β' (C-7), C γ (C-6) e para a Me- δ (C-20) foram muito próximos aos valores observados experimentalmente para o diterpeno **1**, corroborando, assim, com a afirmação que o -OH em C-8 de **1** estava em axial. Por fim, os dados espectrométricos de RMN de ^{13}C dos epímeros C-8 **Lit-15** e **Lit-16** (figura 105, p. 143) confirmaram isso definitivamente.

Figura 108 - Predição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-17 e C-20 de **1** partindo-se dos dados dos epímeros do ácido labdanólico.^{240,241}



4.4.1.4 Confirmação das configurações relativas em C-5, C-8, C-9 e C-10: $n\text{Oes}$ e análises das multiplicidades

Figura 109 - Interações espaciais (selecionadas) e acoplamentos escalares $^1\text{H}/^1\text{H}$ chaves para a confirmação da configuração relativa do sistema decalínico de **1**.



Com o intuito de refinar as atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do sistema bicíclico de **1**, diferenciando-se as posições axiais e equatoriais que estes ocupavam, bem como obter evidências definitivas acerca das configurações relativas em C5, C8, C9 e C10, efetuaram-se análises sistemáticas das multiplicidades e constantes de acoplamentos (tabela 5, p. 130) desses hidrogênios e conduziram-

-se experimentos de NOESY e ROESY (figura 109, p. 149). Como mostrado na figura 109, onde os resultados obtidos nesta etapa são resumidos, as interações espaciais observadas pelos experimentos de NOESY e ROESY foram totalmente compatíveis com a configuração relativa proposta para o sistema decalínico de **1**. Algumas das multiplicidades e constantes de acoplamento descritas para **1**, e para as demais substâncias obtidas neste trabalho, foram estimadas ou determinadas por meio de simulações no programa FOMSC3.²⁴³

4.4.1.5 Configuração absoluta (CA) de **1**

4.4.1.5.1 Atividade óptica de **1**

O ácido 8β-hidroxi-labdan-15-óico (**1**), $[\alpha]_D^{25} -5,4 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$ (s=0,06; c. 0,2; CHCl_3), isolado dos excrementos de imaturos de *B. polydamas*, apresentou uma rotação óptica específica com cerca de metade da magnitude do previamente isolado das folhas do mesmo espécime de *A. giberti* utilizado para alimentar as lagartas, $[\alpha]_D^{25} -10,5 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$ (c. 0,2; CHCl_3).⁵⁹ Além disto, observaram-se diferenças quando se compararam os valores dos deslocamentos químicos obtidos para o diterpeno **1** com os previamente publicados.⁵⁹ Apesar dessas inconsistências, uma análise comparativa, efetuada entre os espectros de RMN de ^1H de F-1F, Ba-1F e **1**, revelou que a substância excretada pelas lagartas se tratava da mesma substância terpênica presente nas folhas (figuras 110 e 111, p. 150 e 151).

Figura 110 - Dados de RMN de ^1H de **1** obtidos e publicados por Marchesini *et al.* (2009).⁵⁹

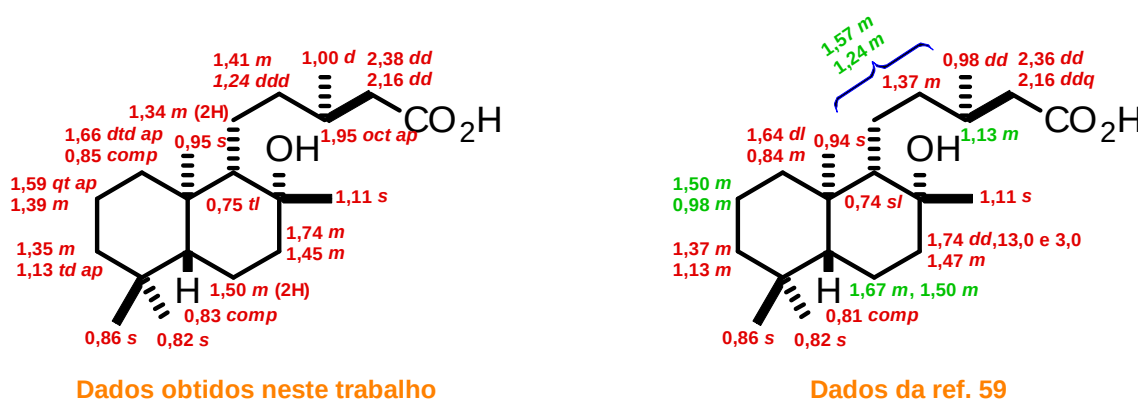
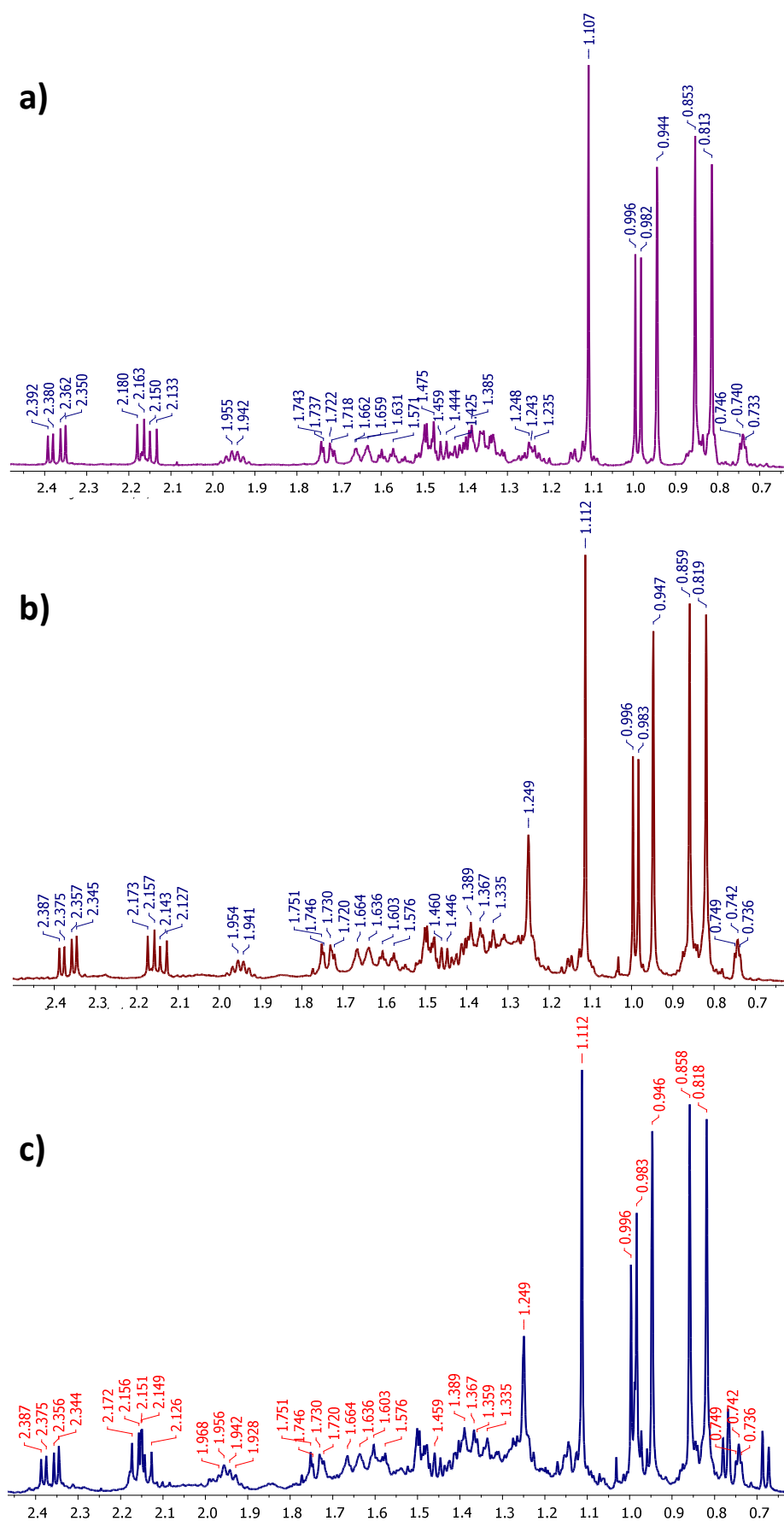


Figura 111 - Espectros de RMN de ^1H de a) **1**, b) F-1F e c) Ba-1F (CDCl_3 , 500 MHz).

Com base na magnitude e no sinal da rotação óptica específicos observados para **1**, foi anteriormente proposto que o diterpeno **1** pertencia a série *enantio* e que a configuração em C-13 seria S.^{43,59} A principal argumentação dada para sugerir a configuração em C-13 fora que **1** apresentara um valor de rotação óptica significativamente diferente de seu éster metílico C-13R.⁵⁹ Já a configuração absoluta (CA) do sistema *trans*-decalínico foi sugerida baseando-se no sinal negativo da atividade óptica observada para **1**.⁴³

Apesar da polarimetria estar, sobretudo com os avanços da química teórica e dos computadores, ressurgindo como uma ferramenta útil e confiável para a determinação de CA²⁴⁴⁻²⁵¹, dados de rotação óptica por si só devem ser utilizados com muito cuidado para esse fim.^{244,248,251,252} Estudos de correlações entre atividades ópticas de substâncias análogas, outrora largamente utilizados para inferir CAs, também possuem diversas limitações^{244,248,251-253}, visto que os sinais e as magnitudes das atividades ópticas podem variar de formas arbitrárias mesmo entre substâncias estruturalmente muito similares (figuras 112-115, p. 152 e 153).^{240,241,247,248,251,254}

Figura 112 - Atividades ópticas dos epímeros C-13 do ácido labdanólico. Refs 240 e 241.

Epímeros C-13 com sinais de atividade óptica inversas

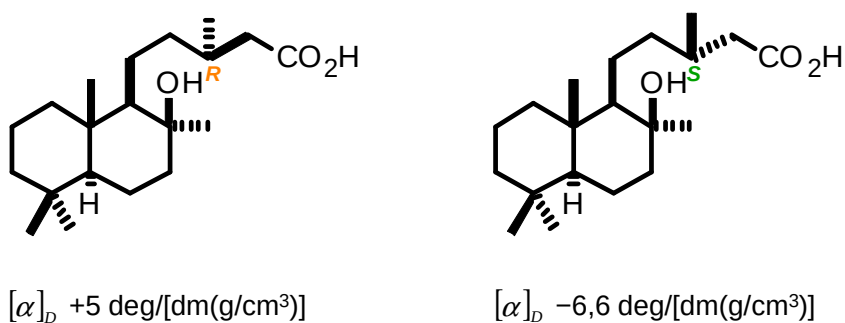


Figura 113 - Efeito da metilação de grupos $-\text{CO}_2\text{H}$ e $-\text{OH}$ sobre a magnitude da atividade óptica. Ref. 254.

Atividades ópticas de análogos

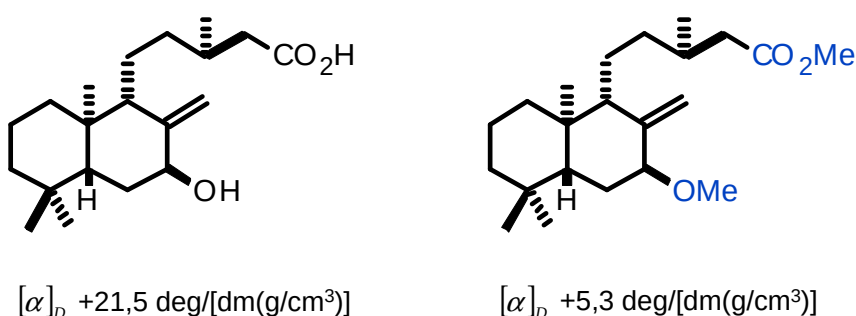


Figura 114 - Efeito da oxidação de um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ sobre a magnitude e sobre o sinal da atividade óptica. Ref. 251.

Diterpenos labdânicos da mesma série stereoquímicas com sinais de atividade óptica inversas

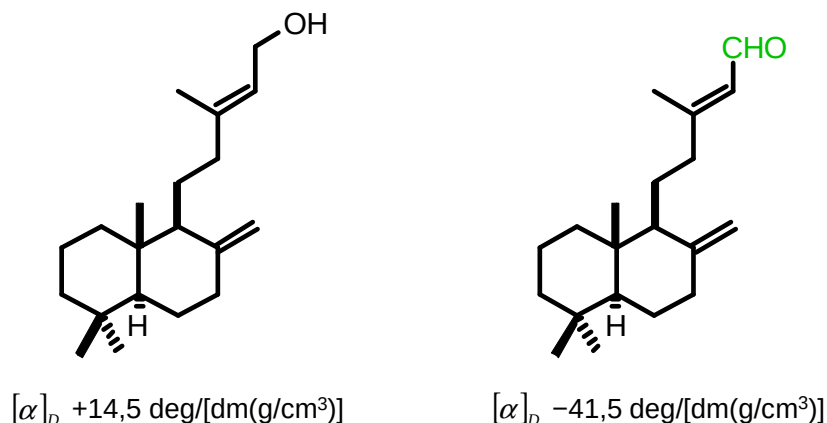
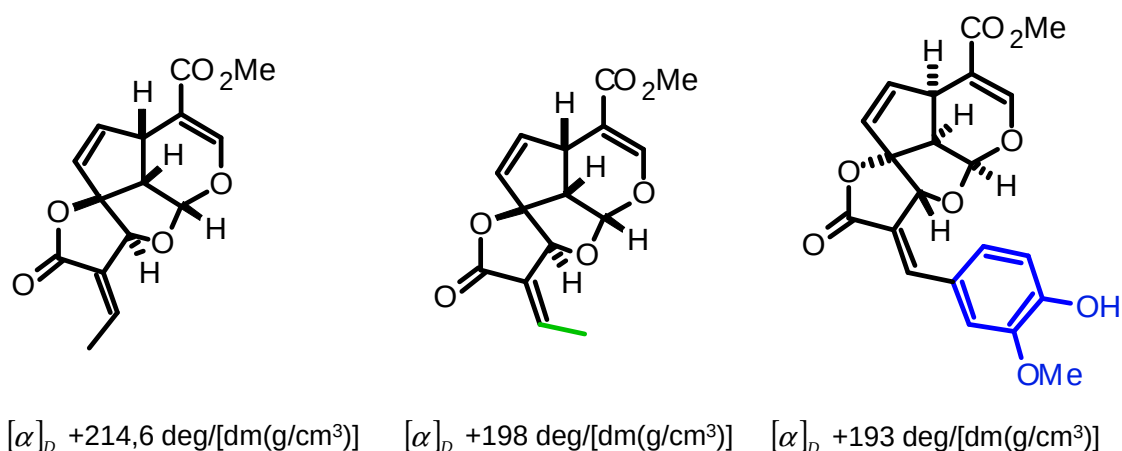


Figura 115 - Exemplo clássico dos iridóide isoplumericina, plumericina e oruvacina, respectivamente. Refs. 247 e 248.

Variação do sinal da atividade óptica



Sendo assim, neste trabalho, revisitou-se a CA do ácido 8 β -hidroxi-labdan-15-óico (**1**), o qual foi isolado de excrementos de lagartas da borboleta *B. polydamas* e havia sido previamente obtido das folhas do espécime utilizado para alimentá-las.⁵⁹ Embora fora comprovado que o diterpeno isolado de fezes era o mesmo que estava presente nas folhas de *A. giberti*, tomou-se, nesta etapa, o cuidado de utilizar apenas massa de **1** isolada do extrato fecal.

A configuração relativa do sistema decalínico de **1** foi minuciosamente estabelecida por análises espectroscópicas de RMN, enquanto que a configuração absoluta foi determinada por estudos de DCV associado com cálculos químico-quânticos [DFT:

B3LYP/6-31G(d)]. Embora com grau de confiança de atribuição muito baixo, os resultados obtidos pelos estudos de DCV sugeriram que a configuração em C-13 de **1** era *R*, ao invés de *S*. Por isso, empregaram-se diversas abordagens adicionais, que incluiu a aplicação de uma metodologia de RMN (método PGME) baseada na derivatização com reagentes quirais anisotrópicos¹⁶³, para se determinar a configuração em C-13 de **1**.

4.4.1.5.2 Dicroísmo circular vibracional: Análise de diterpenos

A propriedade dicroísmo circular (DC) refere-se a absorção diferencial das luzes circularmente polarizadas para a direita e esquerda, que ocorre quando uma molécula contém um ou mais cromóforos quirais.²⁵⁵ Diferentemente da polarimetria, que se baseia no fato que moléculas quirais exibem birrefringência circular, isto é, difratam desigualmente as duas componentes de uma luz linearmente polarizada, somente em comprimentos de onda (λ) nos quais ocorrem absorções é que se verifica o fenômeno do dicroísmo circular.²⁵⁵⁻²⁵⁷

A espectroscopia de dicroísmo circular vibracional (DCV) é uma técnica quiróptica que mede a propriedade DC, de moléculas quirais, em comprimentos de onda onde ocorrem transições vibracionais.²⁵⁷ A primeira medida de DCV foi efetuada em 1974 por Holzwarth *et al.*²⁵⁸ Logo em seguida, uma série de trabalhos utilizando essa técnica foi publicado por um grupo de pesquisa do Laboratório Stephens da Universidade do Sul da Califórnia (USC), quem analisaram 23 substâncias.²⁵⁷ Os resultados desses trabalhos evidenciaram o grande potencial da técnica DCV para se determinar a CA de substâncias quirais, principalmente daquelas que não atendiam aos critérios necessários para serem analisadas por dicroísmo circular eletrônico.²⁵⁷

Segundo Stephens, Devilin e Cheeseman (2012), os dois principais gargalos que limitaram a utilização de medidas de DC na região do IV nos primeiros anos da sua implantação foram: I) a instrumentação existente operava em uma faixa restrita de frequência ($\tilde{\nu} > 1.600 \text{ cm}^{-1}$) e II) uma metodologia teórica confiável precisava ser desenvolvida para simular espectros com valor prático.²⁵⁷ Com o passar dos anos, esses desafios foram, e continuam sendo, superados, e, hoje, a espectroscopia de DCV tem sido a cada dia mais utilizada na determinação de CAs, como foi constatado por um levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados Web of Science e Che-

mical Abstracts. Esse levantamento resultou na localização de 14 trabalhos que utilizaram essa técnica para a determinação ou para a revisão da CA de diterpenos, dos quais 3 foram especificamente com labdanos.^{241,254,259}

4.4.1.5.3 Considerações sobre análises conformacionais de ácidos carboxílicos e determinação da configuração absoluta de 1d por DCV

Ácidos carboxílicos são conhecidos pelas fortes associações intermoleculares que estabelecem, as quais estão presentes em soluções, mesmo diluídas, e nas fases líquida, sólida e gasosa.²⁶⁰ Ácido acético, por exemplo, forma, na fase gasosa abaixo de 150 °C, dímeros cíclicos centrossimétricos, com energia de dissociação de aproximadamente 15 kcal/mol.²⁶¹ Outras espécies, tais como, dímeros cíclicos de outras simetrias, dímeros acíclicos, trímeros e tetrâmeros, também têm sido detectadas para alguns ácidos carboxílicos.^{261,262}

Em solventes de baixas constantes dielétricas, como CCl₄ e CHCl₃, ácidos carboxílicos, inclusive os ácidos acético e fórmico, existem em equilíbrio nas formas monomérica e dimérica, mas, em geral, predomina o dímero cíclico centrossimétrico.²⁶³ Entretanto, é conhecido que uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo carboxílico e um doador de elétrons pode favorecer a formação da espécie monomérica tornando-a mais, ou tão estável quanto, a dimérica.²⁶⁰ Neste sentido, Kuppens *et al.*, em 2006, mostraram por DCV que, em CHCl₃ e CS₂, a proporção da espécie monomérica do ácido tetrahydrofuran-2-carboxílico é muito próxima a do dímero cíclico, devido à ligação de hidrogênio intramolecular que os confômeros monoméricos mais estáveis estabelecem em soluções de solventes apolares ou de baixas polaridades.²⁶⁰

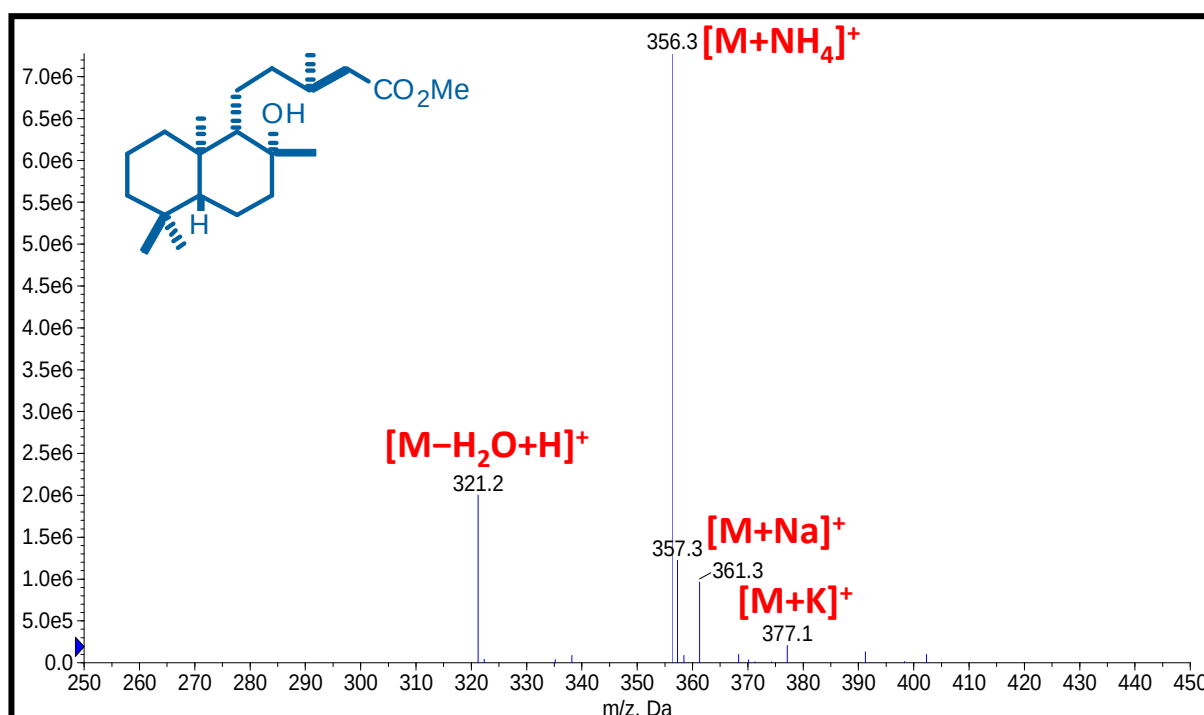
Além disto, para ácidos carboxílicos em soluções observaram-se também, teórica- e experimentalmente, associações heterodiméricas, ácido carboxílico–solvente, e formação de microfases.^{261,263} Soluções aquosas de ácido acético, por exemplo, formam duas microfases, uma rica em H₂O e outra rica em ácido acético.²⁶³ O mesmo comportamento também foi observado em metanol e etanol.²⁶³ Por outro lado, em soluções de solventes polares apróticos, como nitrilas e éteres, observaram-se duas espécies em equilíbrio para o ácido acético: i) a espécie monomérica e ii) uma espécie

dimérica constituída por uma molécula de ácido acético e uma do solvente.^{261,263} Isso evidenciou que os monômeros são preferencialmente formados nesses solventes.²⁶¹

É conhecido que, em estudos de DCV de ácidos carboxílicos, simulações de dímeros ou de adutos com ácido fórmico resultam numa melhor correlação entre os espectros de DCV e IV experimentais e calculados.²⁶¹ Todavia, como exposto acima, os ácidos carboxílicos exibem comportamentos dinâmicos bem complexos, o que torna as suas análises conformacionais muito custosas do ponto de vista computacional, principalmente quando a molécula a ser estudada possui várias ligações rotacionáveis. Sendo assim, para facilitar os estudos conformacionais e, por conseguinte, garantir as qualidades das curvas simuladas, como sugerido pelos autores dos trabalhos anteriores com diterpenos labdânicos^{241,254,259}, escolheu-se para efetuar o estudo por dicróismo circular vibracional (DCV) associado com cálculos DFT o éster metílico **1b**, o qual foi preparado pela metilação de **1** com diazometano.

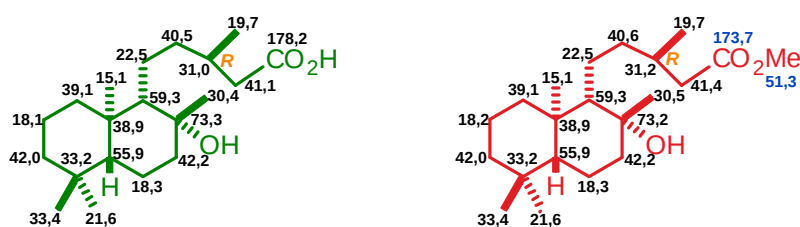
A formação do derivado **1b** foi confirmada por RMN e EM (figuras 116 a 120, p. 156 e 157). No espectro de massas de **1b**, com ionização por *eletrospray* no modo positivo, observaram-se picos de íons com m/z 321,2 ($[M-H_2O+H]^+$), 356,3 ($[M+NH_4]^+$), 361,3 ($[M+Na]^+$) e 377,1 ($[M+K]^+$), os quais foram compatíveis com a fórmula molecular $C_{21}H_{38}O_3$.

Figura 116 - Espectro de massas de **1b** (IES, +10 V, infusão direta).



O espectro de RMN de ^{13}C de **1b** (figura 119, p. 158) foi muito semelhante ao de **1**. As únicas diferenças observadas foram: i) houve uma mudança significativa no deslocamento químico do C-15 ($|\Delta\delta| = 4,5$ ppm) e ii) apareceu, no espectro de **1b**, um sinal com deslocamento químico típico de carbono metoxílico alifático. Os valores dos demais deslocamentos químicos dos carbonos de **1b** foram quase idênticos aos de **1** (figura 117, p. 157). O espectro de RMN de ^1H de **1b** também foi muito parecido com o do correspondente ácido, sendo a presença de um singlete de hidrogênios metoxílicos em δ 3,66, e a blindagem dos hidrogênios metílicos ligados em C-16 as diferenças mais perceptíveis entre os espectros (figura 118, p. 157).

Figura 117 - Dados de RMN de ^{13}C de **1** e **1b**, respectivamente.



A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de **1b** (tabela 6, 163) foi efetuada pela análise dos seus dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais, bem como pela comparação desses dados com os de **1** e com os de modelos disponibilizados na literatura.^{59,232,264}

Figura 118 - Espectros de RMN de ^1H de **1** e **1b** (CDCl_3 , 600 MHz), respectivamente.

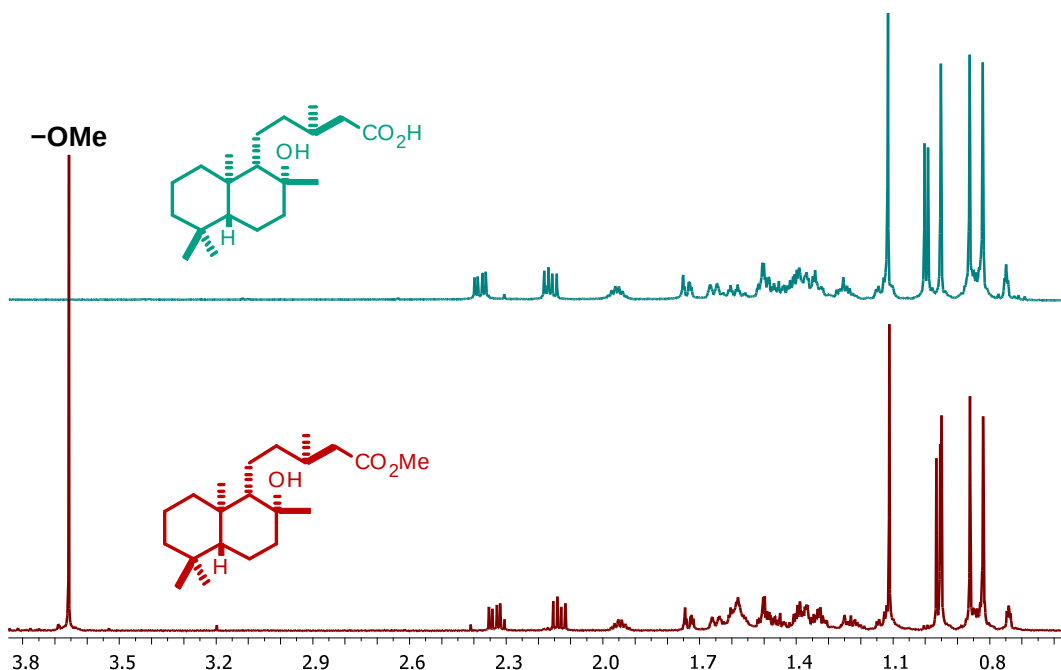
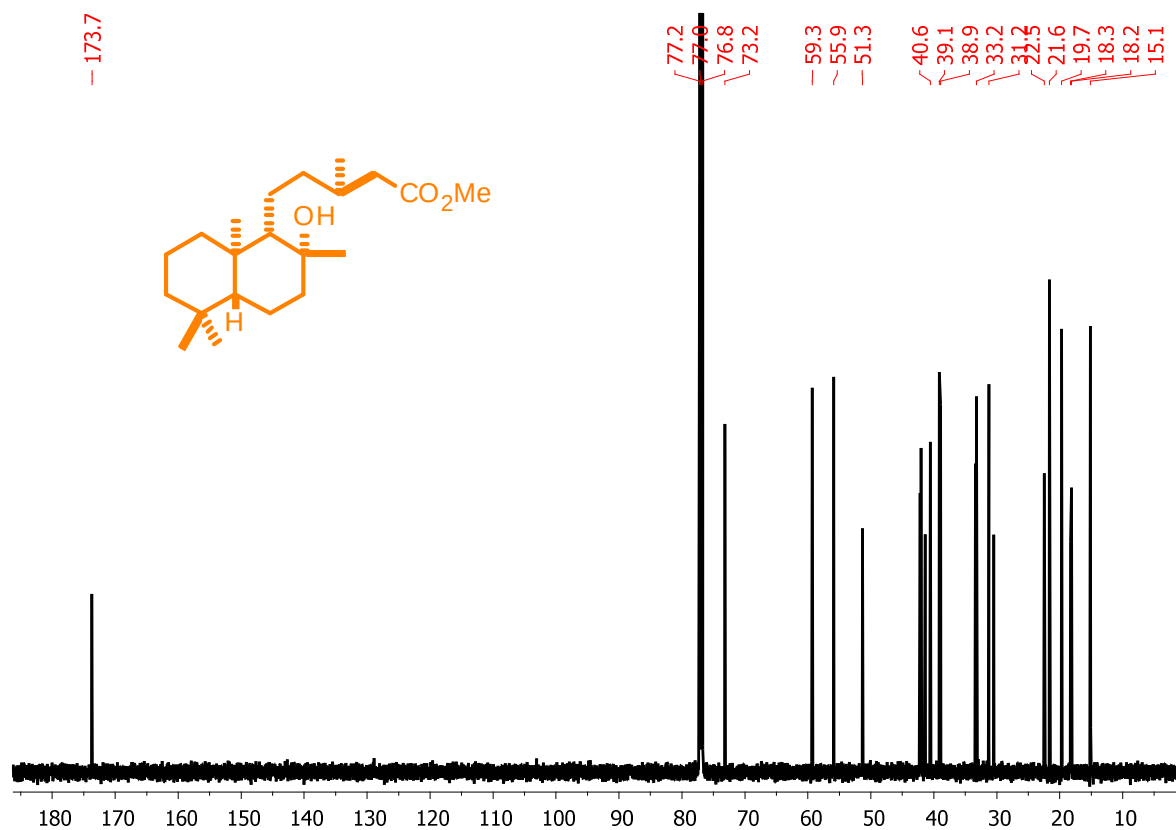
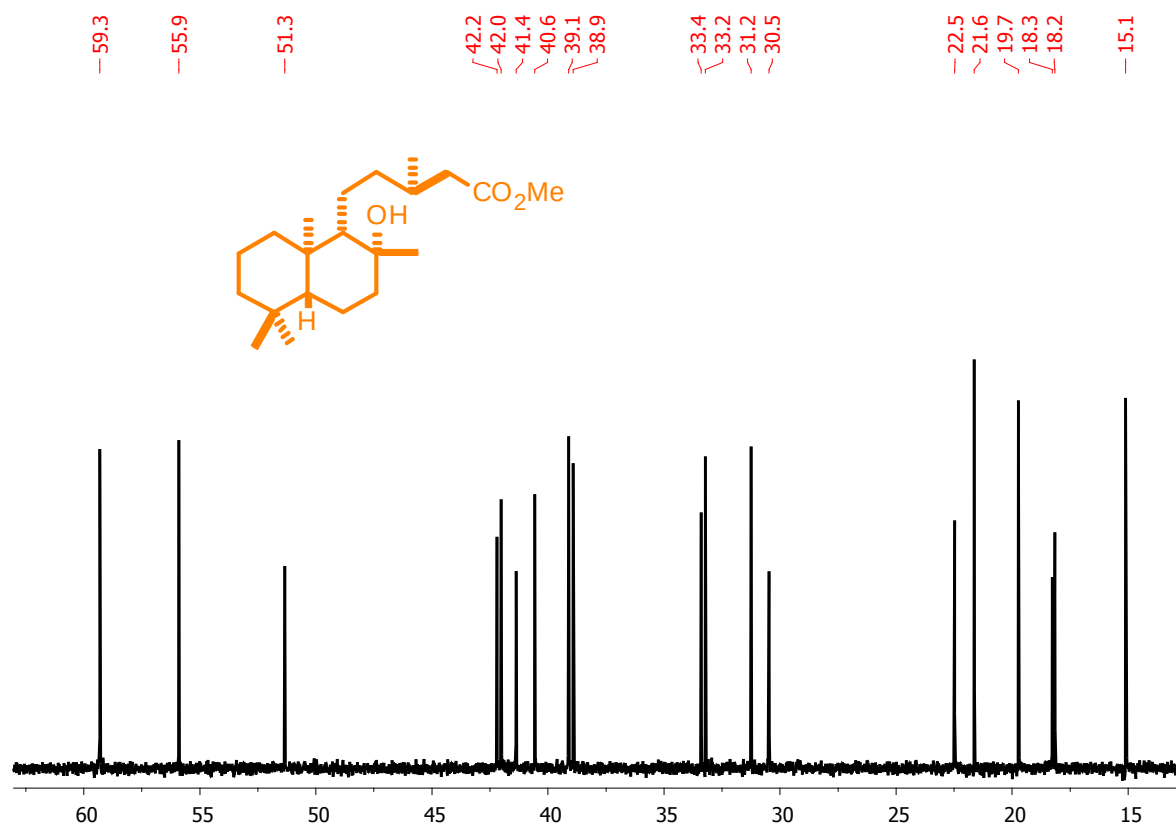
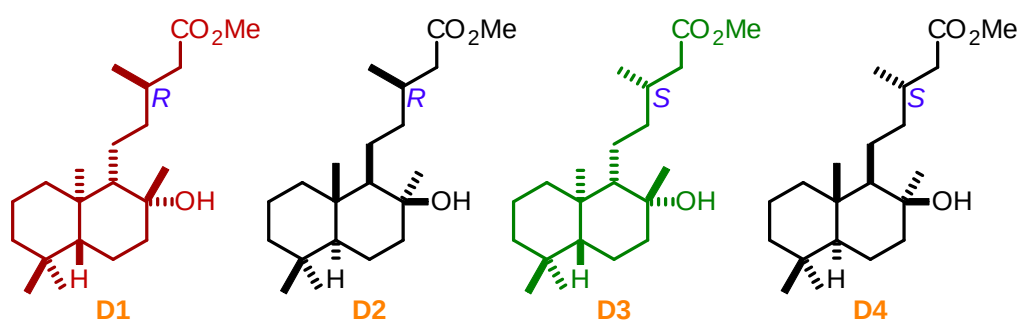


Figura 119 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1b** (CDCl_3 , 151 MHz).Figura 120 - Espectro (expansão) de RMN de ^{13}C de **1b** (CDCl_3 , 151 MHz).

O derivado **1b**, o qual é oleoso a temperatura ambiente, apresentou um valor de rotação óptica específica de $[\alpha]_D^{25} -7,3 \text{ deg/[dm(g.cm}^{-3})]$ (c. 0,2; CHCl_3). Para o epímero C-13S de **1b**, encontram-se relatos na literatura de valores de $-4,0$ a $-5,0 \text{ deg/[dm(g.cm}^{-3})]$ para essa propriedade quirótica e um intervalo de fusão de $82-83^\circ \text{ C}$.^{232, 264} Por causa dessas pequenas mas importantes discrepâncias, associadas ao fato das CAs de **1** e **1b** (C-13S) terem sido previamente estabelecidas por métodos empíricos, investigaram-se, por DCV associado a cálculos DFT, as configurações dos carbonos estereogênicos do sistema decalínico e da cadeia lateral de **1b**. As curvas teóricas dos quatro diastereoisômeros possíveis foram simuladas (figuras 124 e 125, p. 161 e 162). Os confôrmeros mais estáveis dos diastereoisômeros **D1** e **D3** são mostrados nas figuras 121-125, p. 159-163, junto com as suas populações segundo a distribuição de Boltzmann.

Figura 121 - Quatro possíveis diastereoisômeros de **1b** (**D1=1b**, **D2**, **D3** e **D4**).



Enquanto as curvas teóricas de DCV dos diastereoisômeros **D1** (C5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*) e **D3** (C5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*) assemelharam-se muito com a curva experimental do éster **1b**, as curvas simuladas para os demais diastereoisômeros, **D2** e **D4**, mostraram efeitos Cotton inversos (figuras 124 e 125, p. 161 e 162). Desse modo, concluiu-se que a configuração da subestrutura *trans*-decalínica de **1b** era C-5*R*, C-8*R*, C-9*S* e C-10*R*.

Principalmente com o objetivo de diferenciar os epímeros **D1** e **D3**, as curvas teóricas e experimentais de DCV foram comparadas utilizando o programa Compare VOA (BioTools, Inc.). Embora com grau de confiança de atribuição muito baixo, (C-13*R*: 100% versus C-13*S*: 84%), o que impossibilitou a determinação inequívoca da configuração em C-13 de **1b**, os resultados obtidos da análise efetuada nesse programa sugeriram que a configuração mais provável em C-13 de **1b** seria *R* (**D1**).

Figura 122 - Geometrias otimizadas [B3LYP/6-31G(d)] dos confôrmeros mais estáveis do epímero C-13R de **1b=D1**.

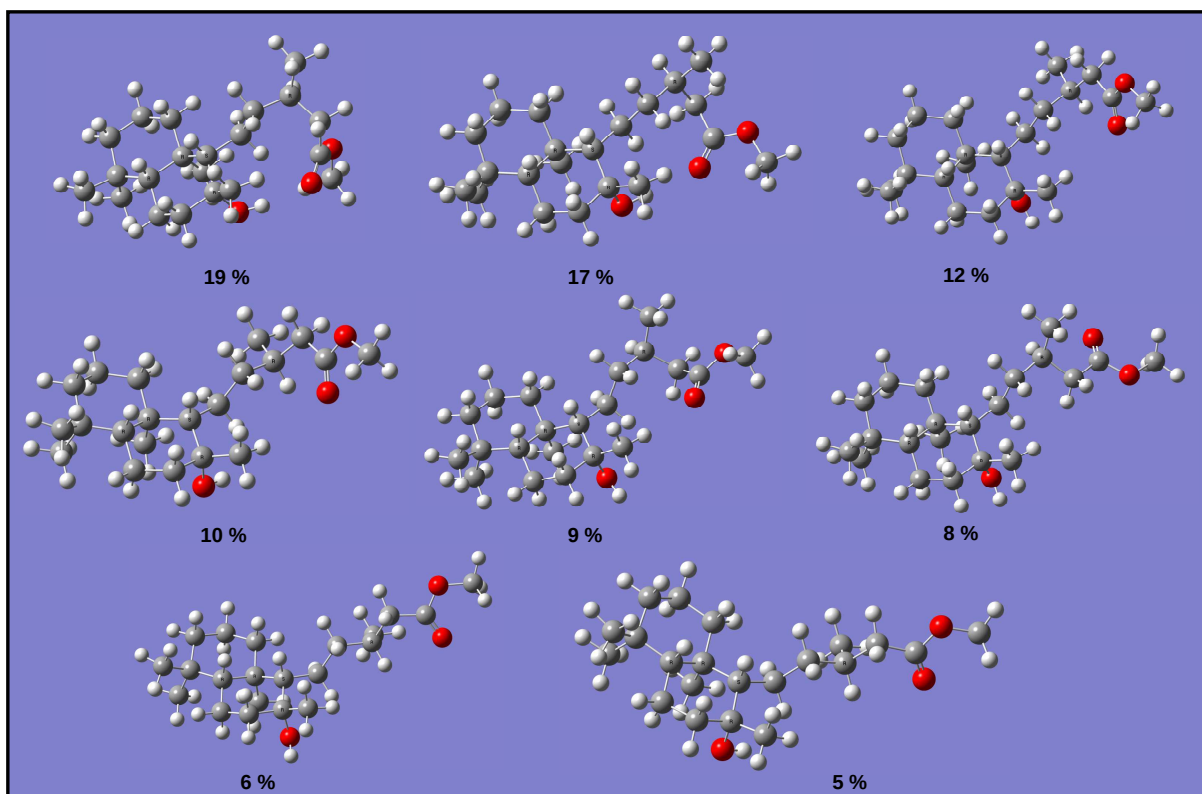


Figura 123 - Geometrias otimizadas [B3LYP/6-31G(d)] dos confôrmeros mais estáveis do epímero C-13S de **1b=D3**.

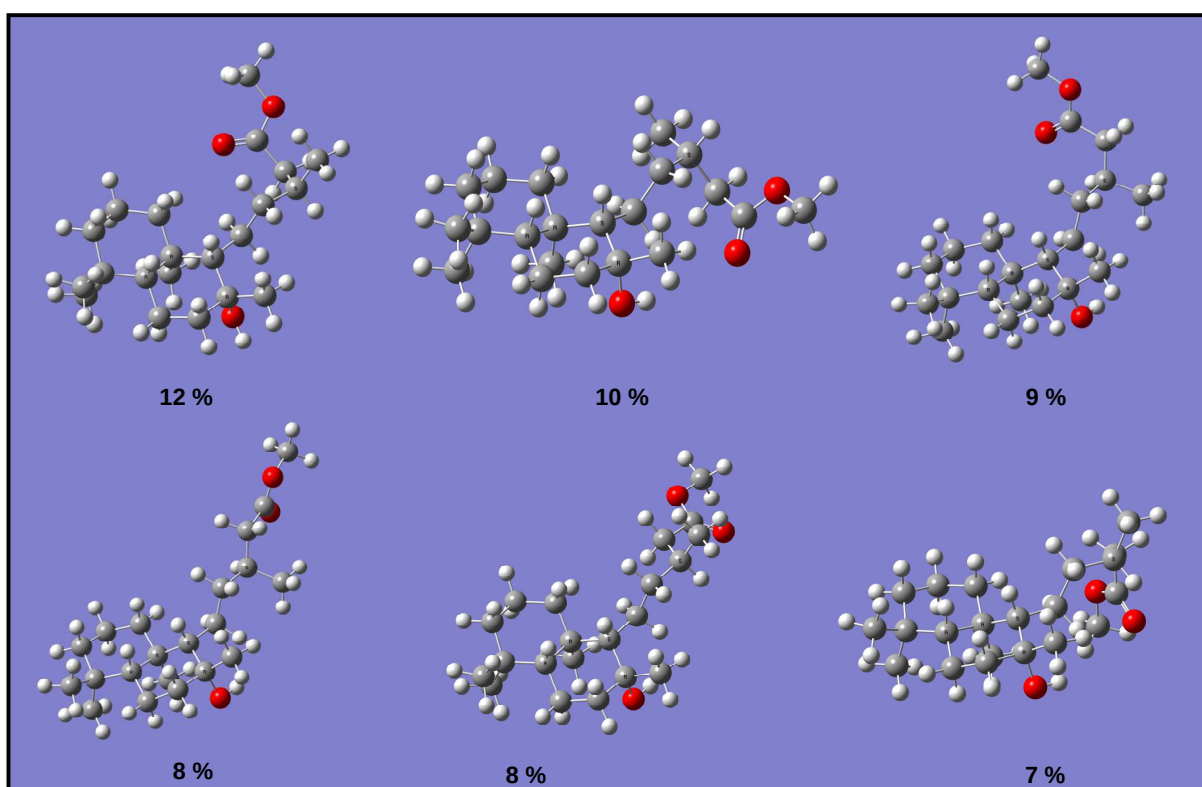
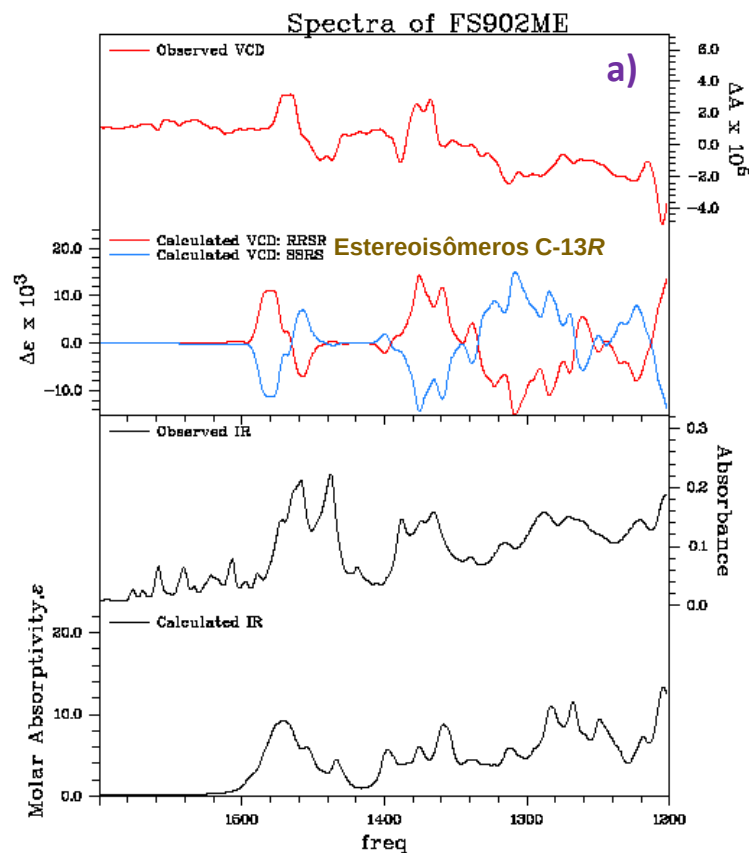
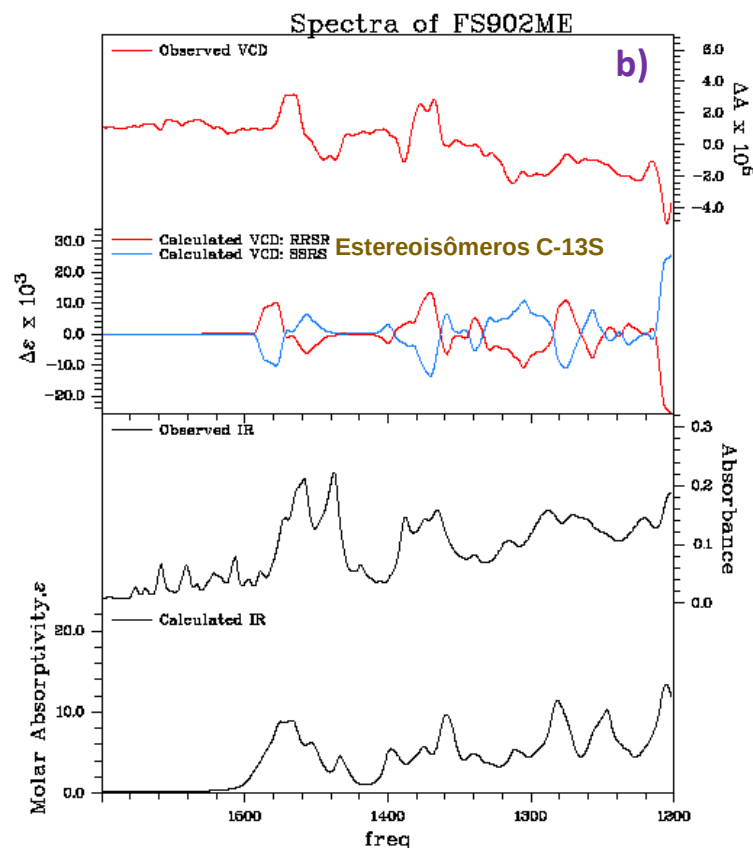


Figura 124 - Comparação entre os espectros de IV e DCV obtidos para **1b** (**D1**) com os calculados para **D1** a **D4**: a) Curvas de **D1** e **D2** (C-13R) e b) Curvas de **D3** e **D4** (C-13S). Abaixo das figuras estão os resultados dos estudos de correlação efetuados no programa CompareVoa (BioTools, Inc.).



Scale= 0.980
 TNS(IR)=94.9 TNS(VCD)= 57.9
 SNS(RRSRR)= 70.2 SNS(SSRSS)= 15.7 ESI= 54.5

The absolute configuration of FS902ME
 is RRSRR
 The Confidence level is 100%



Scale= 0.980
 TNS(IR)=95.0 TNS(VCD)= 53.4
 SNS(RRSRS)= 63.6 SNS(SSRSR)= 16.0 ESI= 47.6

The absolute configuration of FS902ME
 is RRSRS
 The Confidence level is 84%

Figura 125 - Comparação entre os espectros de IV e DCV obtidos para **1b** (**D1**) com os calculados para **D1** e **D3**: a) Curva de **D1** (C-13R) e b) Curva de **D3**.

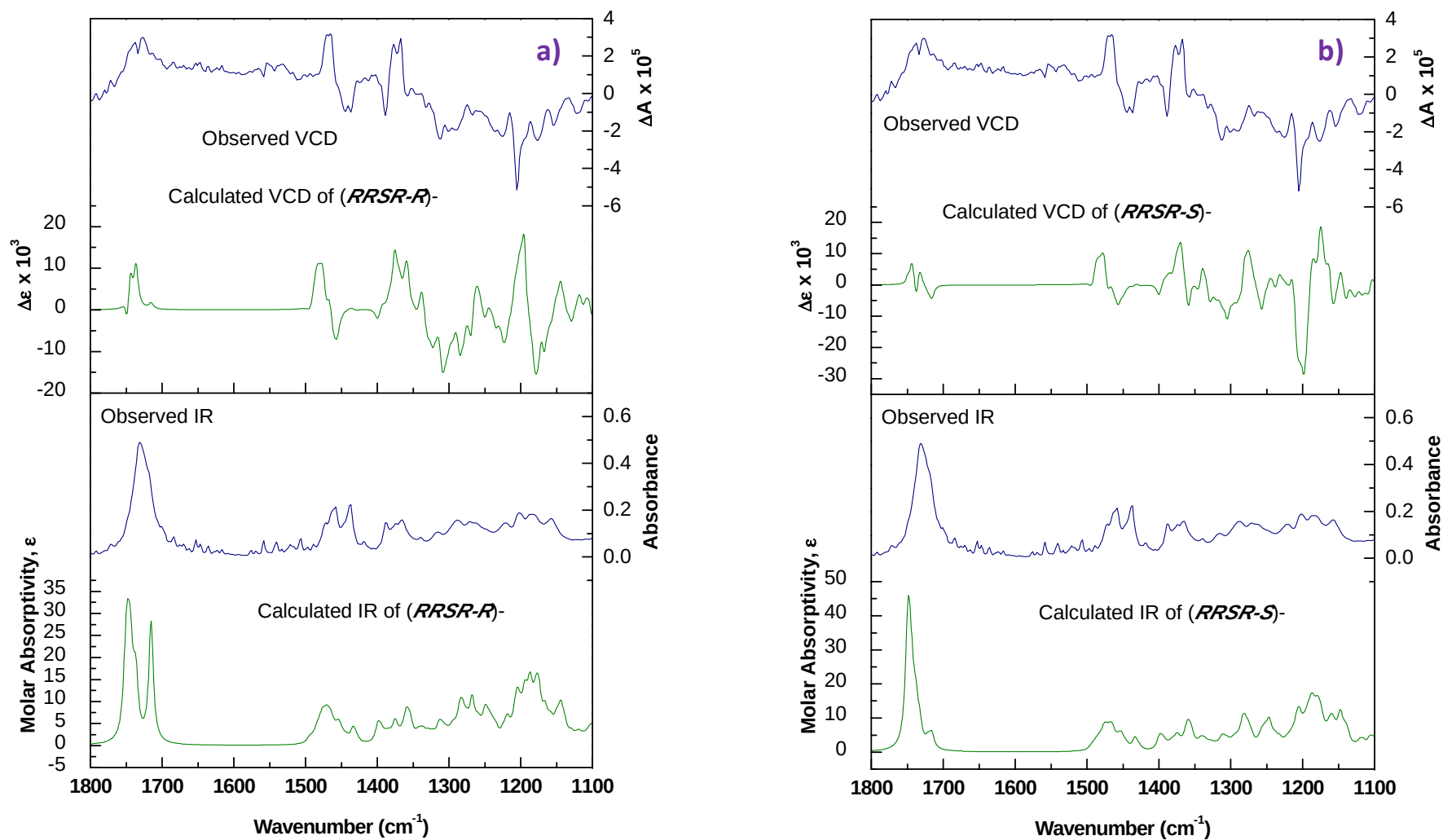


Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1a** e **1b** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	1§		1‡	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 _{eq}	40,6	1,70 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 3,6 e 0,6	39,1	1,65 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 3,0 e 1,8
1 _{ax}		0,89 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2 e 3,0		0,85 <i>comp</i>
2 _{eq}	19,3	1,39 <i>m</i>	18,2	1,39 <i>m</i>
2 _{ax}		1,64 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 3,6		1,59 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2 e 3,6
3 _{eq}	43,4	1,38 <i>m</i>	42,0	1,38 <i>m</i>
3 _{ax}		1,17 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6 e 3,9		1,13 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 4,2
4	34,2	–	33,2	–
5 _{ax}	57,5	0,86 <i>comp</i>	55,9	0,83 <i>comp</i>
6 _{eq}	19,6	1,46 <i>dddd*</i> , 13,2, 3,7, 2,4 e 1,8	18,3	1,50 <i>m</i> (2H _s)
6 _{ax}		1,58 <i>qd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6 e 3,6		
7 _{eq}	43,1	1,74 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,5 e 3,0	42,2	1,74 <i>m</i>
7 _{ax}		1,41 <i>m</i>		1,45 <i>m</i>
8	73,9	–	73,2	–
9 _{ax}	61,2	0,72 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,5	59,3	0,74 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,6
10	40,3	–	38,9	–
11	23,9	1,40 <i>m</i>	22,5	1,33 <i>m</i> (2H _s)
		1,35 <i>m</i>		
12	42,8	1,38 <i>m</i>	40,6	1,39 <i>m</i>
		1,21 <i>m</i>		1,22 <i>m</i>
13	33,4	1,91 <i>m</i>	31,2	1,95 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6
14	47,0	2,24 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 12,4 e 4,9	41,4	2,34 <i>dd</i> , 14,4 e 6,3
		1,92 <i>m</i>		2,14 <i>dd</i> , 14,4 e 8,1
15	182,4	–	173,7	–
16	20,6	0,96 <i>d</i> , 6,4	19,7	0,96 <i>d</i> , 6,6
17 _{eq}	31,1	1,12 <i>s</i>	30,5	1,11 <i>s</i>
18 _{eq}	34,0	0,87 <i>s</i>	33,4	0,86 <i>s</i>
19 _{ax}	22,2	0,85 <i>s</i>	21,6	0,82 <i>s</i>
20 _{ax}	15,8	0,98 <i>s</i>	15,1	0,95 <i>s</i>
OMe	–	–	51,3	3,66 <i>s</i>

‡CD₃OD; §CDCl₃; *comp*=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente; *multiplicidade determinada com auxílio do programa FOMSC3. Multiplicidade em itálico.

Para solucionar as dúvidas levantadas pela medida polarimétrica e pelo estudo de DCV, a configuração em C-13 de **1** foi investigada mais detalhadamente. Com o intuito de se obter um monocristal adequado para análise por cristalografia de raios-X, num primeiro momento, converteu-se o diterpeno **1** no respectivo carboxilato de sódio **1a**. Os dados espectrométricos de **1a** também foram muito semelhantes aos de **1**, sendo as desblindagens ($|\Delta\delta| \geq 1,4$ ppm) observadas para os C-12 a C-15 as diferenças mais notáveis (figuras 126-129, p. 164-165). Embora seja também necessário considerar o efeito do contra íon, é geralmente aceito que a desproteção observada para o carbono carboxílico é decorrente da alteração de um par de elétrons ligante para um não-ligante (tabela 6, p. 163).²⁶⁵

Todas as tentativas visando cristalizar **1a** foram mal sucedidas. Por isso, outras abordagens, as quais foram complementares entre si, foram empregadas para elucidar a configuração em C-13 de **1**: i) metodologia de derivatização com os reagentes

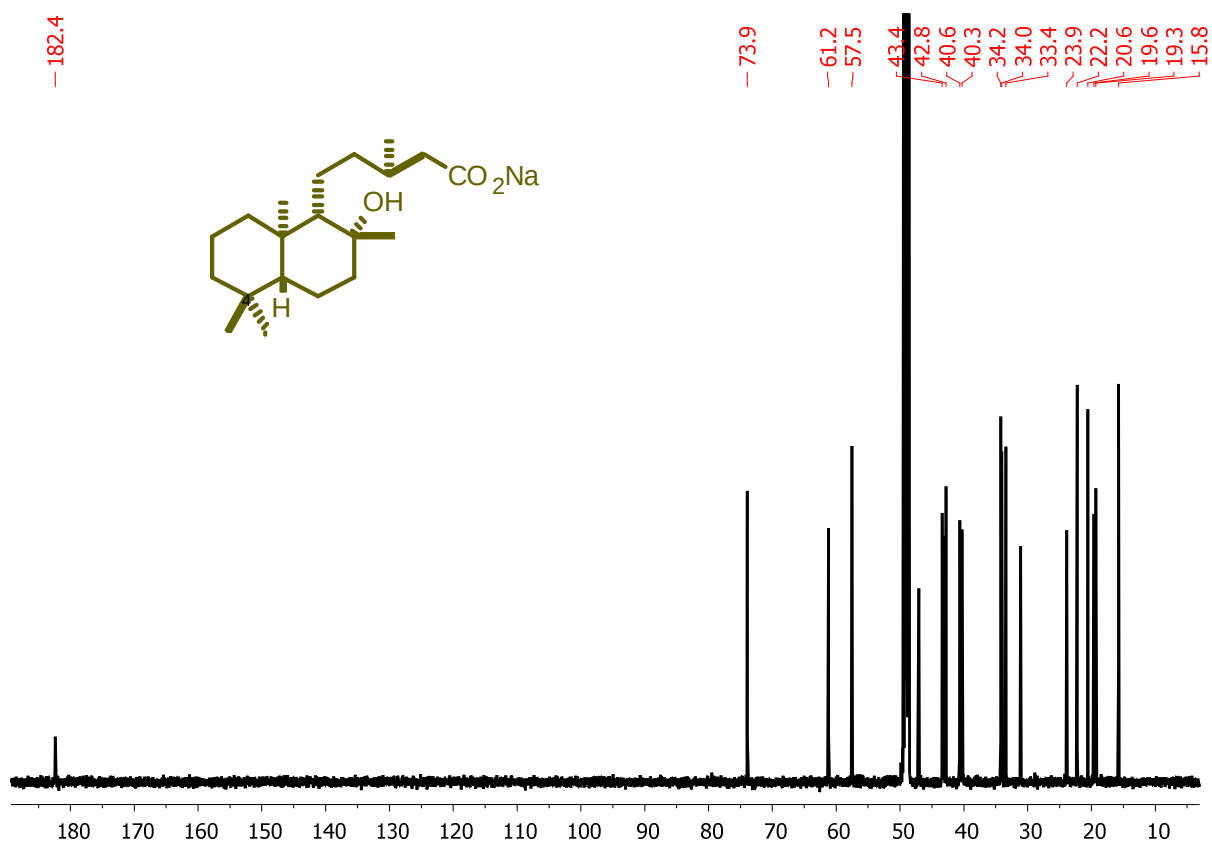
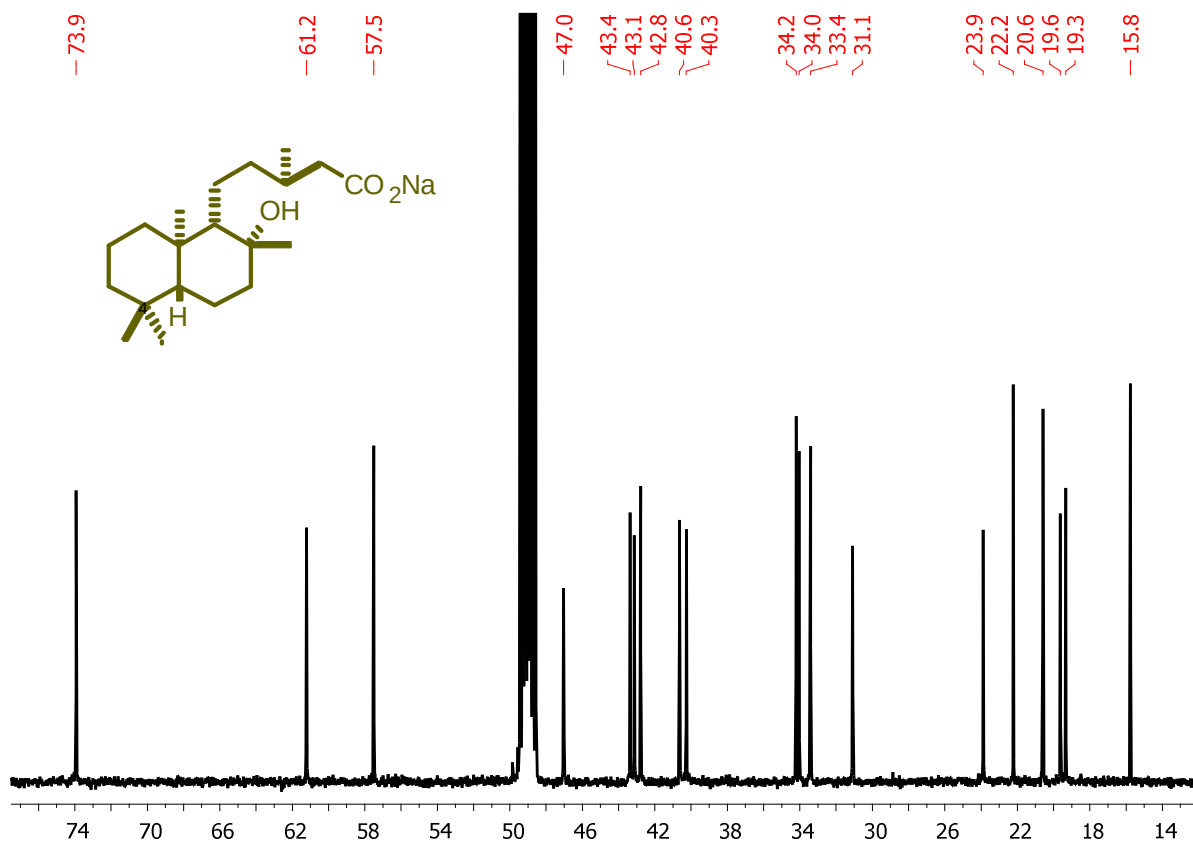
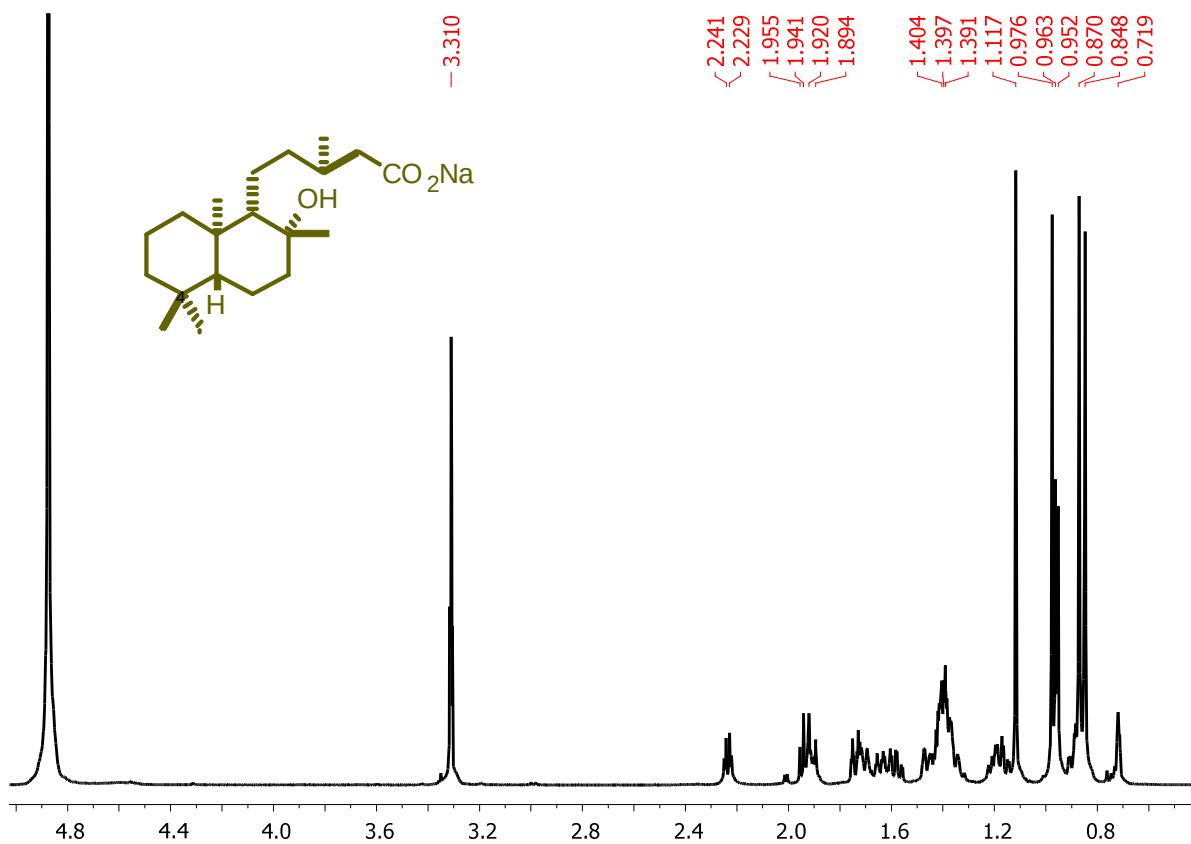
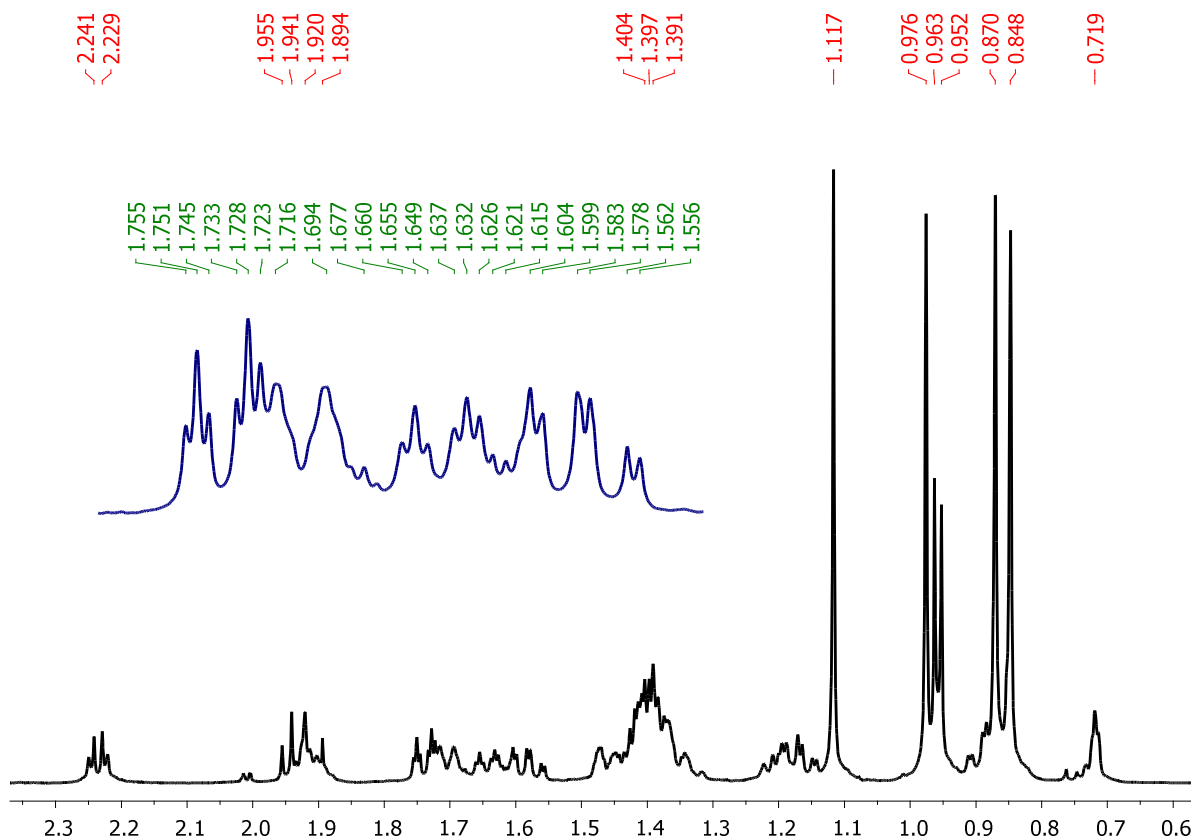
Figura 126 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1a** (CD_3OD , 151 MHz).Figura 127 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1a** (CD_3OD , 151 MHz).

Figura 128 - Espectro de RMN de ^1H de **1a** (CD_3OD , 600 MHz).Figura 129 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1a** (CD_3OD , 600 MHz).

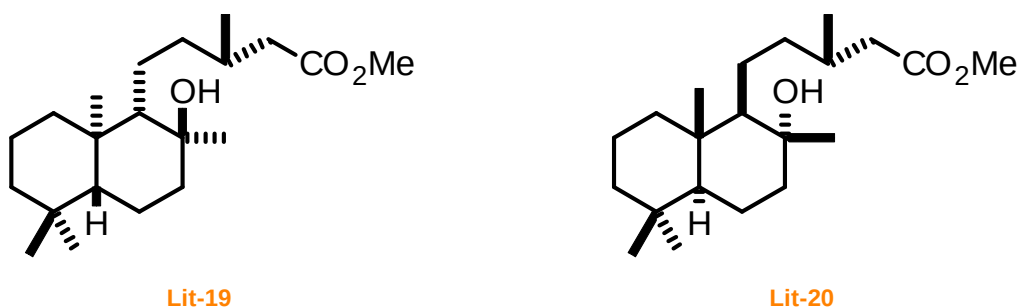
quirais anisotrópicos cloretos de *R*- e *S*-PGME, ii) estudos conformacionais de derivados amídicos PGME e iii) cálculos de deslocamentos químicos (δ s) de RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.4.1.5.4 Determinação da configuração em C-13 de 1

4.4.1.5.4.1 Diferenciação de epímeros por meio de dados de RMN

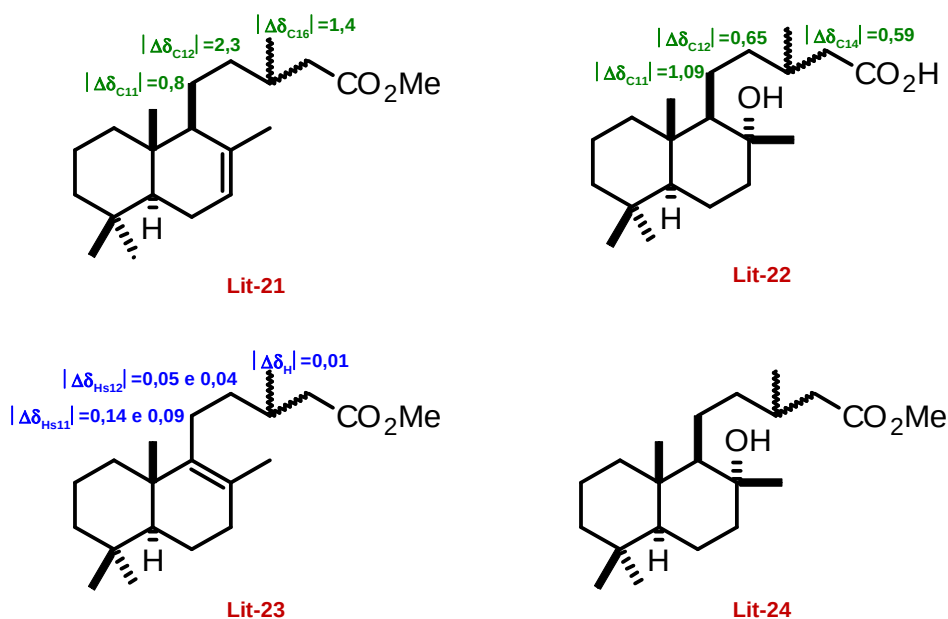
Os dois prováveis epímeros de **1**, 13*R* ou 13*S*, não são facilmente distinguíveis por aplicação de técnicas de RMN, inclusive por experimentos de NOESY. Esperar-se-ia, porém, que quando se comparasse os dados espectrométricos de RMN, se observasse diferenças entre os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios desses epímeros. Essas diferenças sutis foram, por exemplo, utilizadas para a distinção dos diastereômeros eperuato de metila e labdanoato de metila.²⁶⁶ Para isso, esses estereoisômeros foram sintetizados por síntese estereosseletiva e os seus dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os de amostras autênticas, cuja configuração em C-13 era conhecida (figura 130, p. 166).²⁶⁶

Figura 130 - Eperuato de metila (**Lit-19**) e labdanoato de metila (**Lit-20**).²⁶⁶



Recentemente, García-Sánchez *et al.* (2014) observaram que havia diferenças significativas entre alguns dos deslocamentos químicos dos carbonos e/ou hidrogênios dos epímeros dos seguintes diterpenos: i) labd-7-en-15-oato de metila (**Lit-21**), ii) ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**Lit-22**) e iii) labdan-8-en-15-oato de metila (**Lit-23**).²⁴¹ No entanto, constataram também que não era possível distinguir, por RMN, os epímeros do 8-hidroxiabdan-15-oato de metila (**Lit-24**) (figura 131, p. 167).²⁴¹

Figura 131 - Estruturas químicas de **Lit-21** a **Lit-24**. Os valores de $\Delta\delta$ correspondem as diferenças calculada entre os deslocamentos químicos dos epímeros.



Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 241.

No total, existem na literatura três relatos sobre a ocorrência de diterpeno (s) com esqueleto carbônico e configuração relativa do sistema bicíclico iguais aos de **1**.^{59,232,267} Apesar disso, dados espectrométricos confiáveis de RMN dos dois epímeros de **1** não estão disponíveis na literatura, uma vez que estes e/ou a configuração em C-13 foram omitidos nas publicações, ou a configuração em C-13 foi determinada baseando-se somente em correlações entre atividades ópticas de análogos.

Todavia, Imamura *et al.*, em 1977, publicaram os dados espectrométricos de RMN de ^{13}C do epímero de **1b**, cuja a configuração em C-13 fora determinada por redução deste com LiAlH_4 e comparação das propriedades físicas do produto formado com as previamente relatadas para (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*)-labdan-8,15-diol.^{232,264} Destacaram que os deslocamentos químicos atribuídos aos C-1, C-10 e C-14 seriam intercambiáveis, assim como os deslocamentos químicos atribuídos aos C-3 e C-7.²³⁸ Uma análise minuciosa, que envolveu a comparação dos dados publicados por Imamura *et al.* com os obtidos para **1** e **1b**, apontou que, na verdade, a permutação deveria ocorrer entre as atribuições feitas para C-7 e C-12, seguida por um novo intercambiamento entre os deslocamentos químicos dos C-12 e C-14.

Posto isso, os dados publicados para o éster metílico C-13S de **1** foram comparados com os obtidos para **1b**.²³² Para a maioria dos carbonos, a mudança da configuração em C-13 afetou muito pouco ($|\Delta\delta| \leq 0,2$ ppm) o valor do deslocamento químico. Contudo, para os C-12 e C-15 observaram-se valores de $|\Delta\delta|$ de 1,4 e 0,4 ppm, respectivamente. Essas diferenças, aliadas ao fato do derivado **1b** ser oleoso à temperatura ambiente enquanto o seu epímero (**D3**) funde a $\sim 80^\circ\text{C}$, sugeriram que a configuração em C-13 de **1b** seria inversa daquela do éster metílico publicado por Imamura *et al.*, isto é, a configuração em C-13 de **1b** seria *R*, o que estava em harmonia com as demais evidências obtidas neste trabalho. Além disto, destaca-se que os resultados teóricos efetuados com **1b** (=D1) e **D3** mostraram que os confôrmeros de menor energia de **1b** estabeleciam ligações de hidrogênio intramoleculares entre o grupo hidroxílico e carboxílico, enquanto os de **D3** não as estabeleciam. Com base nisso, seria razoável propor que a diferença existente entre os estados físicos de **1b** e **D3** possa estar relacionada com a facilidade em estabelecer ligações de hidrogênio intermoleculares no retículo cristalino, as quais, por não haver a necessidade de rompimento de uma ligação de hidrogênio intramolecular, devem ser formadas mais facilmente para o epímero C-13S (pf. $82-83^\circ\text{C}$).

Quando o diterpeno **1** foi dissolvido em CDCl_3 e, então, mantido em solução até a completa evaporação do solvente, este desidratou fornecendo os derivados olefínicos **1e** e **1f** (figura 46, p. 84). É conhecido que alcoóis secundários e terciários podem desidratar na presença de CDCl_3 , sendo a reação particularmente rápida quando um ácido carboxílico é adicionado à solução.²⁶⁸⁻²⁷⁰ Sabe também que o CDCl_3 pode se tornar ácido quando armazenado a temperatura ambiente por alguns meses.²⁶⁸ Este é considerado ácido quando provoca mudança na coloração ($\text{pH} < 6$) de uma solução aquosa contendo azul de bromotimol.²⁶⁸ Um teste para acidez demonstrou que o CDCl_3 utilizado nas análises espectroscópicas era ácido, porquanto 3 mL deste diminui o pH de 6 mL de água para metade em termos de unidade de pH. Sendo assim, sugeriu-se que a desidratação de **1** fora preponderantemente catalisada pelo ácido residual contido no CDCl_3 , mas também seria provável que uma auto-catálise ocorresse.

As estruturas de **1e** e **1f** foram caracterizadas por RMN uni- e bidimensionais (RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT 135° e 90° , *g*HQSC, *g*HMBC, *g*COSY e *g*HSQC-TOCSY), bem como por comparações dos dados espectrométricos obtidos com os disponibilizados na literatura (tabela 7, p. 170).²⁴¹ Assim como fora observado para o éster me-

tílico **1b**, os valores de deslocamentos químicos dos produtos de desidratação de **1**, em especial os da olefina trissubstituída **1e**, também foram consistentes com uma configuração *R* em C-13 de **1**. Segundo García-Sánchez *et al.* (2014), quem determinaram isso por estudos de RMN e de DCV associado com cálculos químico-quânticos, os epímeros C-13 do ácido labd-7-en-15-óico (**1e**) podem ser distinguidos pelos valores dos deslocamentos químicos dos C-11, C-12 e C-16.^{241,271} Mais especificamente, eles observaram que o C-11 do epímero 13*S* era 0,8 ppm mais protegido do que no epímero 13*R*, ao mesmo tempo que os C-12 e C-16 do epímero 13*S* eram 2,3 e 1,4 ppm, respectivamente, mais desprotegidos do que no epímero 13*R* (figura 131, p. 167).²⁴¹ Como os dados de RMN de ¹H e de ¹³C de **1e** foram idênticos aos relatados para o ácido (-)-(5*S*,9*S*,10*R*,13*S*)-labd-7-en-15-óico, o qual pertence à série normal e não à mesma série estereoquímica de **1e** (série *ent*), concluiu-se, novamente, que a configuração em C-13 de **1** era *R* (figura 132, p. 169).

Figura 132 - Espectro de RMN de ¹³C de **1e+1f** (CDCl₃, 126 MHz).

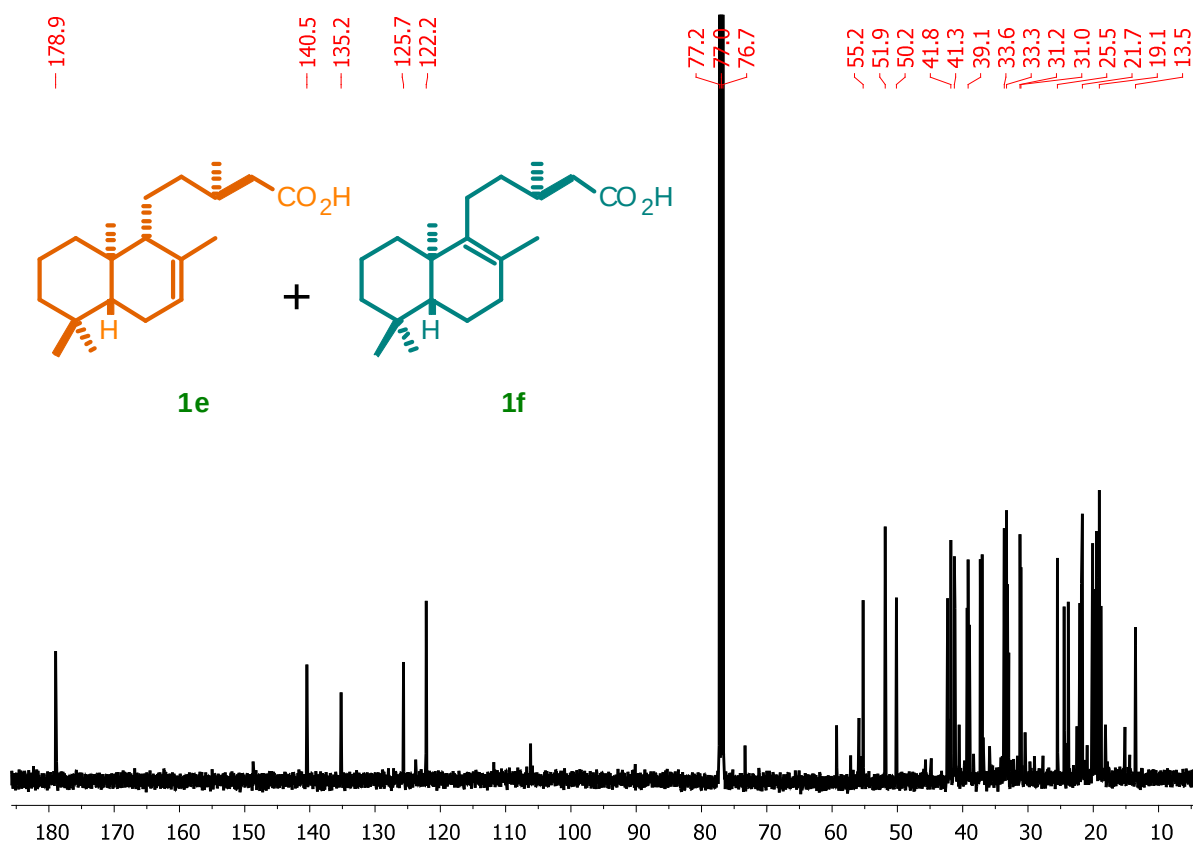


Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1e** e **1f** (14,1 T, CDCl_3 , δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	1e§		1e (Lit.; Ref. 247)		1e-Me (Lit.; Ref. 247)‡		1e-MeΔ		1f§		1f (Lit.; Ref. 247)	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	
1	39,1	1,83 <i>m</i> 0,95 <i>m</i>	39,1	1,83 <i>m</i> 0,94 <i>m</i>	39,1	1,83 <i>m</i> 0,94 <i>m</i>	39,2	37,0	1,77 <i>m</i> 1,13 <i>m</i>	37,0	1,76 <i>m</i> 1,11 <i>m</i>	
2	18,8	ND ND	18,8	1,52 <i>m</i> 1,46 <i>m</i>	18,8	1,54 <i>m</i> 1,45 <i>m</i>	19,0	19,1	1,59 <i>m</i> 1,48 <i>m</i>	19,1	1,61 <i>m</i> 1,43 <i>m</i>	
3	42,3	1,40 <i>m</i> 1,16 <i>m</i>	42,3	1,40 <i>m</i> 1,16 <i>m</i>	42,3	1,40 <i>m</i> 1,16 <i>m</i>	42,2	41,8	1,39 <i>m</i> 1,15 <i>m</i>	41,8	1,38 <i>m</i> 1,13 <i>m</i>	
4	32,9	–	32,9	–	33,0	–	32,7	33,3	–	33,3	–	
5	50,2	1,17 <i>m</i>	50,1	1,17 <i>m</i>	50,2	1,16 <i>m</i>	49,8*	51,9	1,10 <i>m</i>	51,9	1,11 <i>m</i>	
6	23,8	1,95 <i>m</i> 1,85 <i>m</i>	23,8	1,93 <i>m</i> 1,89 <i>m</i>	23,8	1,92 <i>m</i> 1,84 <i>m</i>	23,8	19,1	1,65 <i>m</i> 1,40 <i>m</i>	19,1	1,48 <i>m</i> (2Hs)	
7	122,2	5,38 <i>m</i>	122,1	5,38 <i>sl</i>	122,2	5,37 <i>sl</i>	122,1	33,6	1,94 <i>m</i> (2Hs)	33,6	1,95 <i>m</i> (2Hs)	
8	135,2	–	135,3	–	135,3	–	135,1	125,6	–	125,6	–	
9	55,2	1,56 <i>m</i>	55,2	1,57 <i>m</i>	55,2	1,56 <i>m</i>	54,7*	140,5	–	140,6	–	
10	36,8	–	36,8	–	36,8	–	36,6	38,9	–	39,0	–	
11	24,4	1,48 <i>m</i> 1,13 <i>m</i>	24,5	1,49 <i>m</i> 1,13 <i>m</i>	24,5	1,49 <i>m</i> 1,12 <i>m</i>	25,3	25,5	1,94 <i>m</i>	25,5	1,91 <i>m</i> (2Hs)	
12	39,3	1,56 <i>m</i> 1,18 <i>m</i>	39,3	1,56 <i>m</i> 1,18 <i>m</i>	39,4	1,51 <i>m</i> 1,14 <i>m</i>	37,1	37,3	1,39 <i>m</i> 1,28 <i>m</i>	37,3	1,30 <i>m</i> (2Hs)	
13	31,1	1,95 <i>m</i>	31,1	1,94 <i>m</i>	31,3	1,94 <i>m</i>	30,8	31,2	1,95 <i>m</i>	31,4	1,93 <i>m</i>	
14	41,3	2,40 <i>dd</i> , 15,0 e 5,6 2,15 <i>dd</i> , 15,0 e 8,4	41,3	2,39 <i>dd</i> , 14,9 e 5,8 2,14 <i>dd</i> , 14,9 e 8,3	41,4	2,33 <i>dd</i> , 14,6 e 6,0 2,11 <i>dd</i> , 14,6 e 8,2	41,7	41,2	2,37 <i>dd</i> , 15,1 e 6,0 2,17 <i>dd</i> , 15,1 e 8,2	41,5	2,33 <i>dd</i> , 14,7 e 6,2 2,14 <i>dd</i> , 14,7 e 8,0	
15	178,9	–	179,7	–	173,8	–	172,9	178,9	–	173,7	–	
16	19,9	0,99 <i>d</i> , 6,6	19,9	0,99 <i>d</i> , 6,6	19,9	0,95 <i>d</i> , 6,7	18,5	19,5	1,00 <i>d</i> , 6,7	19,6	0,96 <i>d</i> , 6,6	
17	22,1	1,65 <i>td ap</i> , <i>W</i> _{1/2} 2,7 e 1,0	22,1	1,65 <i>sl</i>	22,1	1,65 <i>s</i>	22,2	19,4	1,54 <i>sl</i>	19,4	1,54 <i>s</i>	
18*	33,1	0,85 <i>s</i>	33,1	0,85 <i>s</i>	33,1	0,85 <i>s</i>	33,1*	33,3	0,87 <i>s</i>	33,3	0,87 <i>s</i>	
19*	21,8	0,87 <i>s</i>	21,8	0,87 <i>s</i>	21,8	0,87 <i>s</i>	21,7*	21,7	0,82 <i>s</i>	21,7	0,82 <i>s</i>	
20	13,5	0,75 <i>s</i>	13,5	0,75 <i>s</i>	13,5	0,75 <i>s</i>	13,5	20,1	0,93 <i>s</i>	20,1	0,93 <i>s</i>	
OMe	–	–	–	–	51,4	3,66 <i>s</i>	51,7	–	–	51,3	3,66 <i>s</i>	

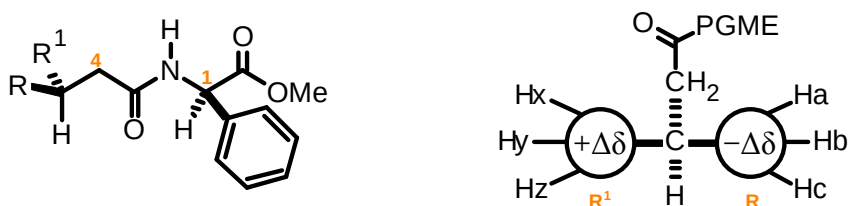
§Dados espectrométricos obtidos neste trabalho; ‡**1e-Me**=Éster metílico de **1e**; ΔDados de RMN de ^{13}C da ref. 277; ND=Valor de deslocamento químico não determinado; *ap*=aparente. Multiplicidade em *itálico*.

4.4.1.5.4.2 Configuração em C-13 de 1: Método PGME e predição de deslocamentos químicos de RMN

As derivatizações de ácidos carboxílicos com os seguintes reagentes quirais anisotrópicos: ésteres metílicos de (*R*)- e (*S*)-fenilglicina, fazem parte de uma metodologia para a elucidação, por RMN, da configuração absoluta de ácidos carboxílicos α,α -alquil-dissubstituídos, α -hidroxi-, α -alcoxi-, α -aciloxi- α,α -dissubstituídos e β,β -alquil-dissubstituídos.^{163,272,273}

Para se interpretar os efeitos de blindagem e desblindagem sobre núcleos de hidrogênio visando a determinação da configuração absoluta de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos, sugeriu-se o modelo da figura 133, p. 171. Segundo Yabuuchi & Kusumi, a coplanaridade dos átomos 1 a 5 e a preferência conformacional *anti*, com respeito à ligação CH–NH, dos grupos carboxílicos são asseguradas pela ligação amídica *s-trans*, pela ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio amídico e o grupo carboximetoxílico e pela interação dipolar (efeito de campo) repulsiva entre as duas carboxilas (–CONHR e –COOMe).¹⁶³

Figura 133 - Modelo proposto por Yabuuchi & Kusumi (2000) para a determinação da configuração absoluta de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos. Os valores de $\Delta\delta$ (em ppm) são referentes a seguinte subtração: $\delta R - \delta S$.



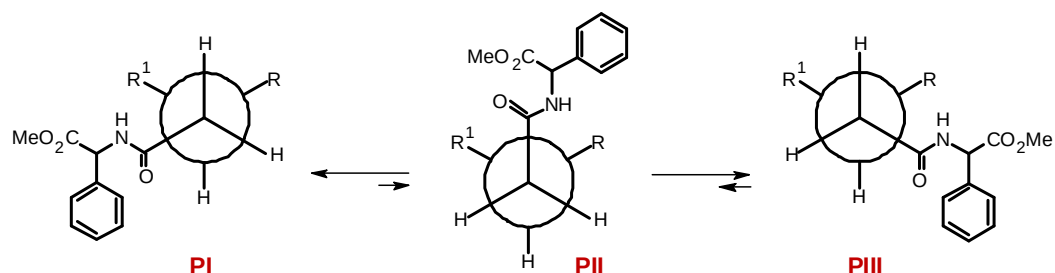
Arranjo espacial médio dos átomos;
considerando-se dois confôrmers principais

Modelo para interpretação de efeitos anisotrópicos

Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 163.

O arranjo conformacional da figura 133, o qual foi proposto após a avaliação de 3 projeções de Newman, **PI** a **PIII** (figura 134, p. 172), resultantes da rotação da ligação CH–CH₂, trata-se de uma média entre dois confôrmers de menor energia (**PI** e **PIII**). Sem fazer menção sobre a importância da natureza dos substituintes R e R¹, foi anteriormente proposto que os confôrmers **PI** e **PIII** possuíam aproximadamente a mesma energia.¹⁶³

Figura 134 - Projeções de Newman para derivados amídicos PGME de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos.



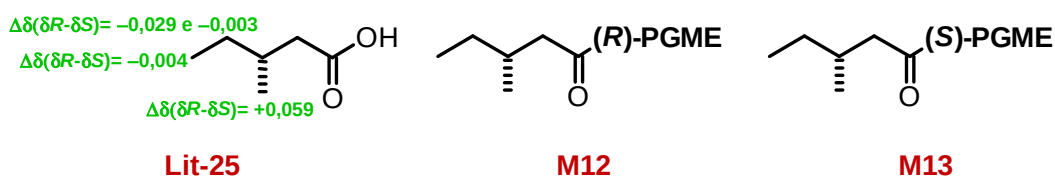
Fonte: Elaborada pelo autor. Ref. 163.

Considerando-se o modelo proposto por Yabuuchi & Kusumi (2000), esperar-se-ia que, devido ao efeito de anisotropia diamagnética do grupo fenílico, os hidrogênios do grupo R fossem mais blindados no derivado (R)-PGME do que no derivado (S)-PGME. Por conseguinte, para os hidrogênios do grupo R^1 , esperar-se-ia exatamente o inverso disso.¹⁶³

Embora a aplicabilidade do método PGME, como uma ferramenta para a determinação de configuração absoluta, tenha sido extensivamente discutida desde a sua proposição^{163,272,273}, ainda não foi publicado na literatura nenhum estudo teórico (conformacional) com derivados amídicos PGME de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos que comprove a importância dos confôrmeros sugeridos por Yabuuchi & Kusumi.¹⁶³ Na literatura, há um só trabalho sobre estudos teóricos com derivados PGME, cujo o foco foi compreender como o grupo PGME esterificado aos grupos carboxílicos benzílicos de um polímero de poli(fenilacetileno) controlavam a sua helicidade.²⁷⁴

Sendo assim, neste trabalho, o modelo proposto para a determinação da configuração absoluta de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos foi validado por meio de análises conformacionais dos respectivos derivados amídicos do ácido (3R)-metil-pentanóico (figura 135, p. 172). Em seguida, o método PGME foi aplicado para a determinação da configuração em C-13 do ácido (-)-ent-8 β -hidroxi-labdan-15-óico (**1**).

Figura 135 - Estruturas do ácido (3R)-metil-pentanóico e derivados (R)- e (S)-PGME deste. Ref. 163.



A busca conformacional foi feita por dinâmica molecular utilizando-se o campo de força Amber99.^{275,276} Durante a simulação por dinâmica molecular, selecionaram-se 10.000 geometrias, as quais foram iterativamente otimizadas pelo campo de força Amber99. Após isso, um total de 193 ou 209 confôrmers, dentro de um intervalo de E_r de 19,3 ou 22,6 kcal/mol, foram retidos. Em seguida, todos os confôrmers obtidos foram geometricamente otimizados pelo método semi-empírico PM7, incorporado no programa MOPAC2012.¹⁷⁷ Desse modo, obtiveram-se 160 (**M13**) ou 199 (**M12**) confôrmers, dos quais os 47 ou 67 de menor energia ($E_r \leq 3,8$ ou 5,0 kcal/mol) foram completamente otimizados pelo nível RHF/6-31G de teoria (tabela 2, p. 91).

PM7 é um método semi-empírico moderno de elevada acurácia, desenvolvido com o objetivo de expandir o intervalo de aplicabilidade de métodos semi-empíricos.¹⁷⁶ Esse método foi parametrizado utilizando-se dados experimentais e resultados de cálculos *ab initio* de mais de 9000 substâncias, e este tem gerado resultados melhores que seus antecessores, por exemplo, métodos AM1, PM3, PM5, RM1 e PM6 (na verdade, PM6 compete com PM7)²⁷⁷, e, quando aplicado a moléculas orgânicas simples, PM7 fornece resultados mais precisos do que alguns métodos *ab initio* populares.¹⁷⁶

Segundo Avaltroni & Corminboeuf (2012), a utilização do método PM6 em combinação com os *ab initio* leva a diminuição do custo computacional, sem, porém, comprometer significativamente a análise conformacional. Neste sentido, eles mostraram que, embora o número total de mínimos locais encontrados fora inferior ao que se obtinha mediante a otimização direta pelo cálculo químico-quântico, os confôrmers de menor energia eram, na maioria das vezes, localizados com sucesso.²⁷⁸

As análises conformacionais feitas com os derivados amídicos, *R*- e *S*-PGME, do ácido (*R*)-3-metilpentanóico revelaram que os equilíbrios conformacionais eram bem mais complexos do que se imaginava.¹⁶³ Para ambos os derivados, foram encontrados treze confôrmers de menor energia ($E_r \leq 2,0$ kcal/mol), dos quais os seis mais estáveis, em cada caso, que correspondem a 79,4 % e 81,5 % das populações dos derivados *R*- e *S*-PGME, respectivamente, são fornecidos nas figuras 136 e 137, p. 174.

Apesar dos comportamentos conformacionais serem bem mais complexos do que aquele proposto por Yabuuchi & Kusumi¹⁶³, mesmo para os derivados do ácido β,β -alquil-dissubstituído mais simples possível, é importante salientar que os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a validade do método PGME, para a determinação da configuração absoluta de ácidos β,β -alquil-dissubstituídos.

Figura 136 - Conformêros de menor energia do derivado amídico *R*-PGME do ácido (3*R*)-metil-pentanóico.

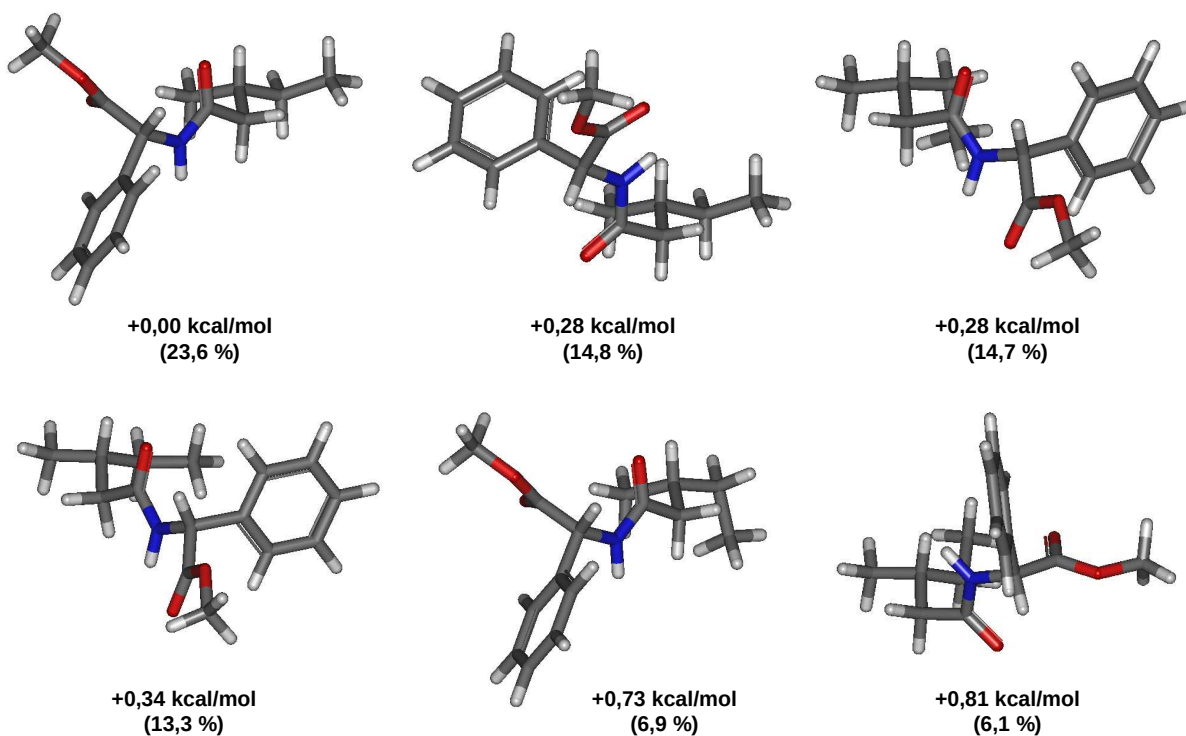


Figura 137 - Conformêros de menor energia do derivado amídico *S*-PGME do ácido (3*R*)-metil-pentanóico.

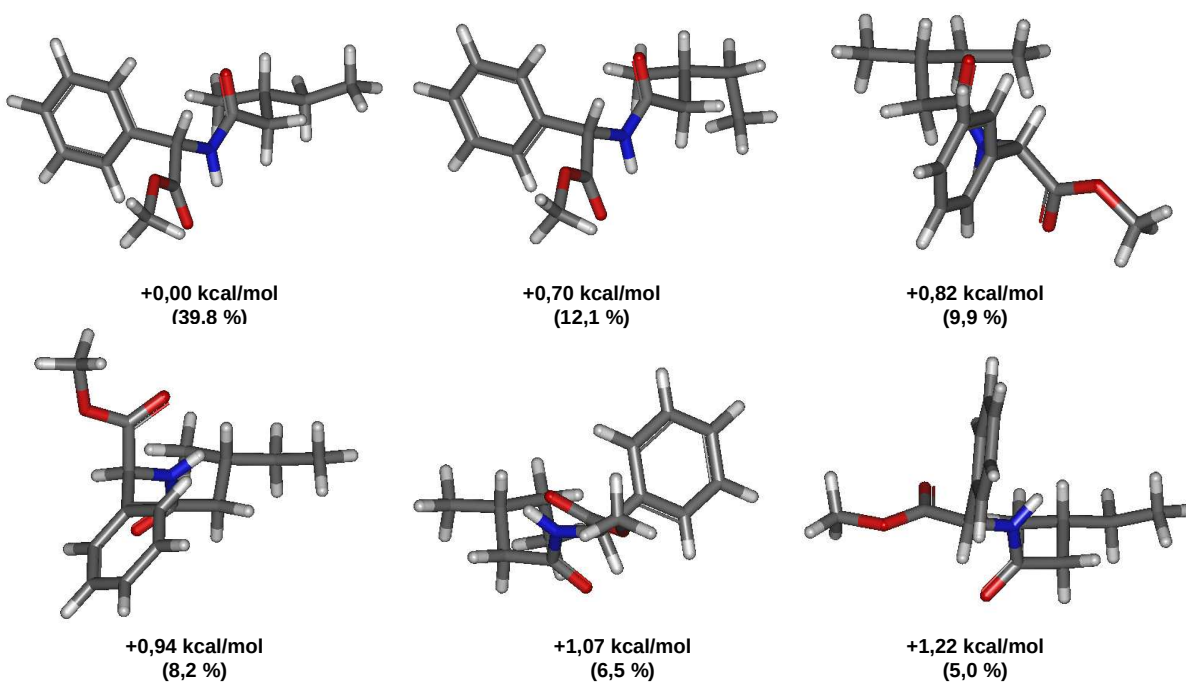
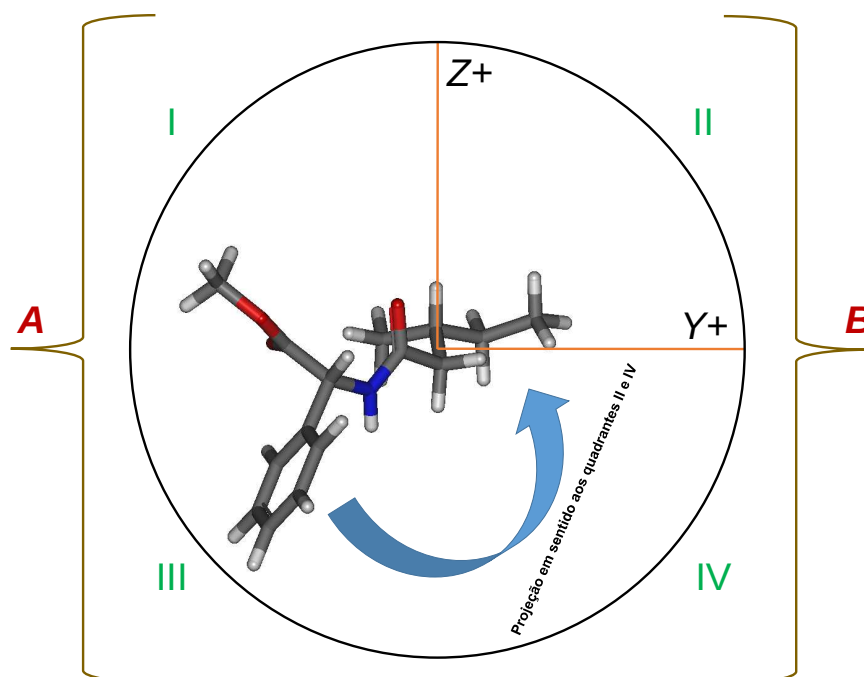


Figura 138 - Representação esquemática para facilitar a “visualização” de “confôrmeros médios” dos derivados PGME do ácido (*R*)-3-metilpentanóico.



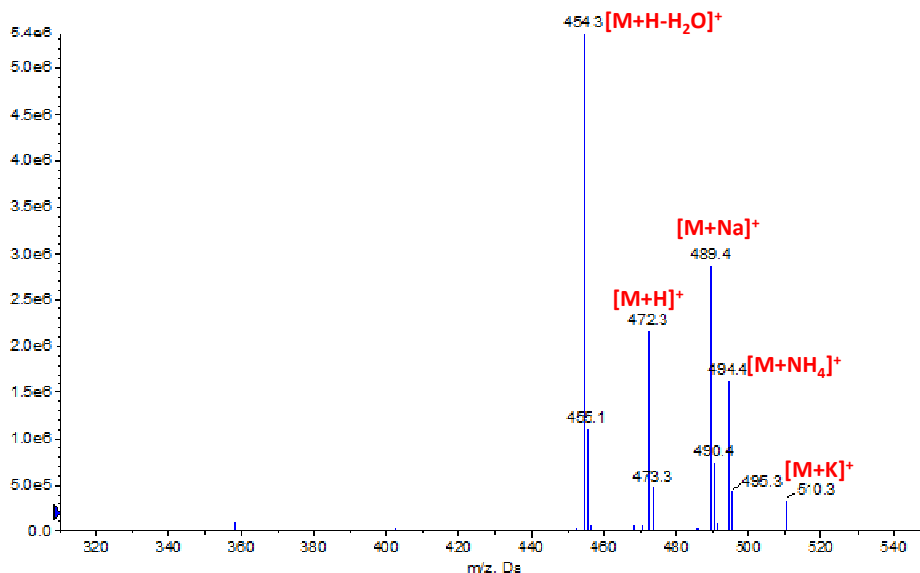
Embora não seja fácil “visualizar” confôrmeros médios, algumas considerações puderam ser feitas. Primeiramente, destaca-se que para o derivado *R*-PGME é possível notar que em três confôrmeros o substituinte {*N*-carbonil-*N*-[(1*R*)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]} está *gauche* ao radical metílico, enquanto que nos outros três este está *gauche* ao radical etílico (figura 136, p. 174). Portanto, na média, o hidrogênio β -carboxílico e a cadeia principal do radical {*N*-carbonil-*N*-[(1*R*)-(2-metoxi-2-oxo-1-feniletil)]} estariam no mesmo plano, o que condiz com o arranjo médio proposto por Yabuuchi & Kusumi (2000).¹⁶³ Em segundo lugar, observou-se que a posição espacial da carboxila amídica variou entre os setores A e B e entre os quadrantes, mas verificou-se também que na maioria dos confôrmeros esta estava posicionada no sentido do eixo Z+. Desse modo, no arranjo geométrico médio, o oxigênio da carboxila (-CONR) estaria aproximadamente eclipsada ao hidrogênio β -carboxílico. Igualmente, também foi possível observar que ocorria uma alteração significativa da posição espacial do grupo fenílico. Apesar disso, como na maioria dos confôrmeros o grupo -Ph estava nos quadrantes II e IV ou projetado em sentido a esses quadrantes, o efeito global foi que o grupo fenílico blindou os hidrogênios (e também os carbonos) do grupo etílico, uma

vez que, na média, o cone de proteção desse anel benzênico (–Ph) estaria projetado nos quadrantes II e IV (figura 138, p. 175).

Como mostrado na figura 137, p. 174, o comportamento conformacional do derivado *S*-PGME foi um pouco diferente do comportamento do derivado *R*-PGME. Porém, considerações similares às supracitadas foram feitas. Independentemente disso, a conclusão que se chegou foi que, no derivado *S*-PGME, o grupo fenílico blindaria os hidrogênios do grupo metílico. Sendo assim, esses hidrogênios estariam mais blindados no derivado *S* do que no *R*. Consequentemente, os hidrogênios do grupo etílico estariam mais blindados no derivado *R*, o que está de acordo com os valores de $\Delta\delta$ ($\delta R - \delta S$) descritos para os derivados do ácido (3*R*)-metil-pentanóico (figura 135, p. 172).¹⁶³

Depois de validar o método PGME por meio de cálculos químico-quânticos, este foi aplicado para a determinação da configuração em C-13 de **1**. Neste sentido, duas porções do diterpeno ácido (–)-*ent*-8β-hidroxi-labdan-15-óico foram individualmente derivatizadas com os sais dos ésteres metílicos de *R*- e *S*-fenilglicina rendendo, após purificação por CLAE, as substâncias amídicas **1c** e **1d**, respectivamente.

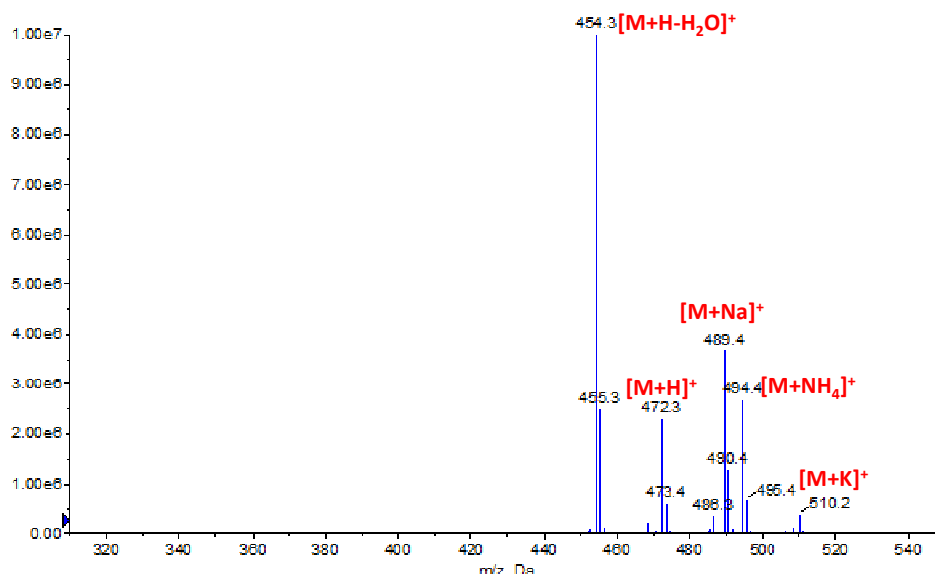
Figura 139 - Espectro de massas de **1c** (IES, +10 V, infusão direta).



As obtenções dos derivados **1c** e **1d** foram confirmadas por espectrometria de massas e por espectroscopia de RMN. Em ambos os espectros de massas (figuras 139 e 140, p. 176), no modo positivo, foram observados picos de moléculas protonadas (m/z 472,3), bem como picos relativos a moléculas cationizadas com os íons NH_4^+

(m/z 489,4), Na^+ (m/z 494,4) e K^+ (m/z 510,2 ou 510,3). Observou-se ainda picos referentes as detecções dos íons $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (m/z 454,4 ou 454,3) (figuras 139 e 140, p. 176 e 177).

Figura 140 - Espectro de massas de **1d** (IES, +10 V, infusão direta).



Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1c** e **1d** (figuras 141 a 146, p. 178 a 180) foram bem parecidos. Além dos sinais atribuíveis a subestrutura diterpênica, observaram-se, nesses espectros, sinais de hidrogênios [**1c**: δ 3,73 (s) e **1d**: 3,72 (s)] e carbonos metoxílicos alifáticos (**1c**: δ 52,7 e **1d**: 52,8) e dois dubletos em δ 6,40 (**1c**, $J=7,2$ Hz, NH) e 6,37 (**1d**, $J=7,1$ Hz, NH), atribuídos a hidrogênios amídicos. Foram ainda observados sinais para carbonos e hidrogênios de dois grupos fenílicos (tabela 8, p. 181), dois sinais de dois hidrogênios benzílicos em δ 5,59 (**1c**, $J=7,2$ Hz, H-1') e 5,58 (**1d**, $J=7,1$ Hz, H-1'), como evidenciado pelas correlações a longa distância (J_3) destes com os $\text{C}_5-4',8'$, além de sinais para quatro carbonos carboxílicos. Esses dados foram compatíveis com os das cadeias dos reagentes quirálicos anisotrópicos. Em ambos os casos, confirmou-se a formação da ligação amídica pela proteção observada para o C-15 (6,7 ppm), pelo acoplamento escalar entre os hidrogênios NH e H-1' e pelas seguintes correlações a longa distância (J_2 e J_3) observadas no mapa de contornos gHMBC: i) C-15 x H-14_a, H-14_b e NH e ii) C-2' x H-1'. As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios de **1c** e **1d** foram efetuadas por meio de análises dos seus espectros de RMN 1D e 2D (tabela 8, p. 181).

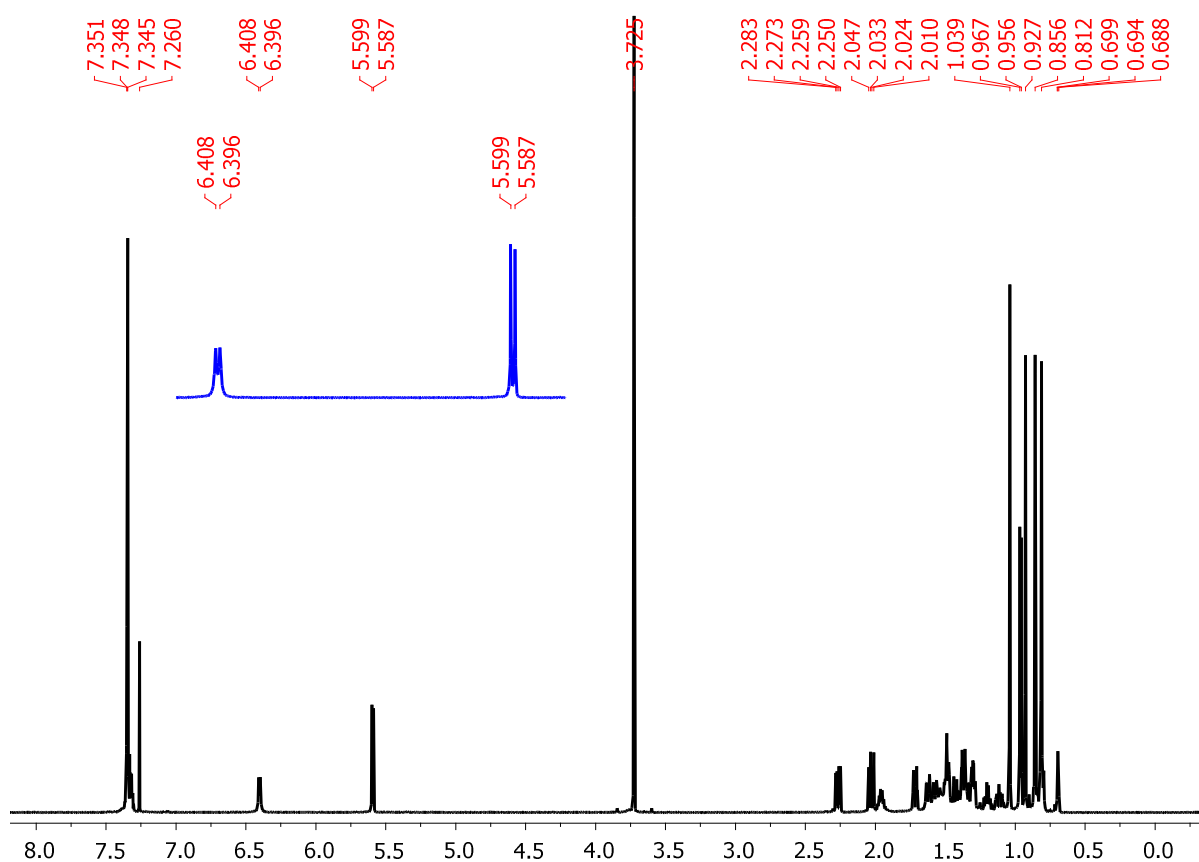
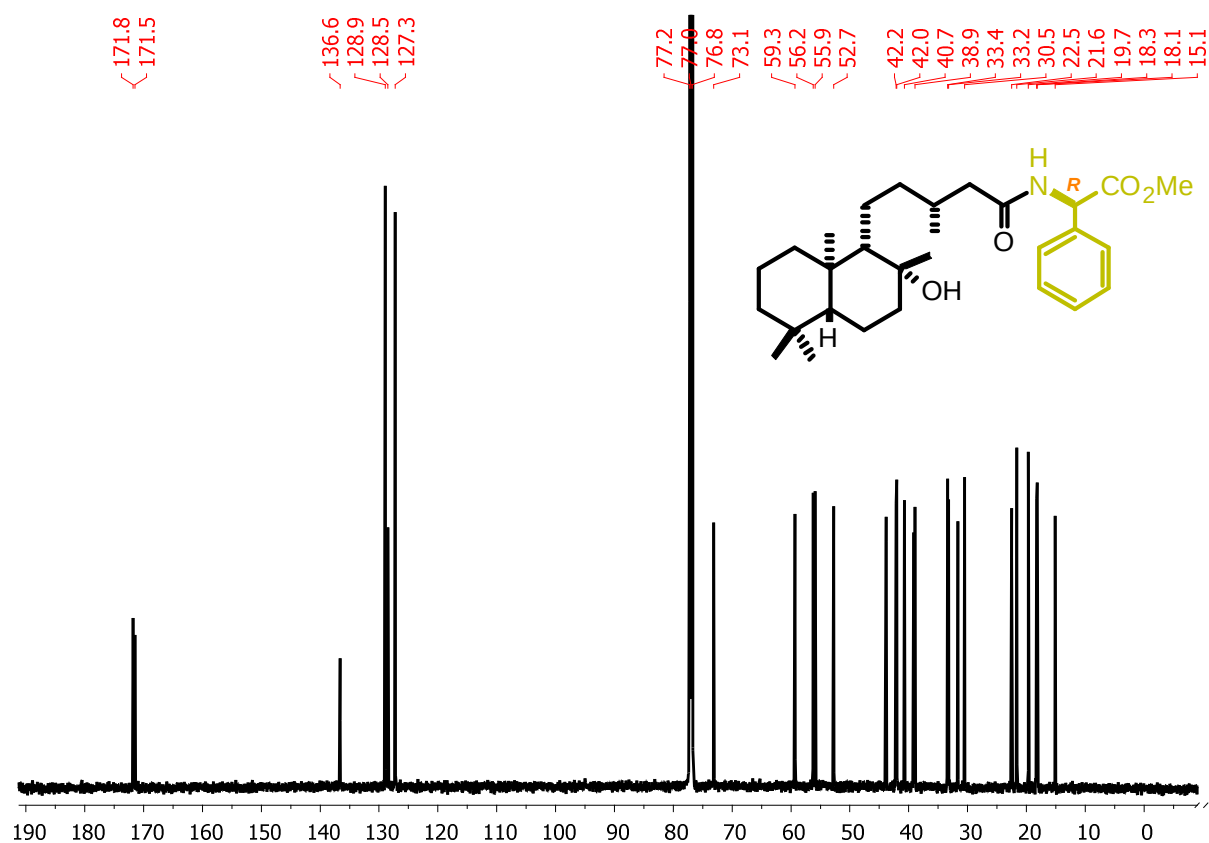
Figura 141 - Espectro de RMN de ^1H de **1c** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 142 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1c** (CDCl_3 , 151 MHz).

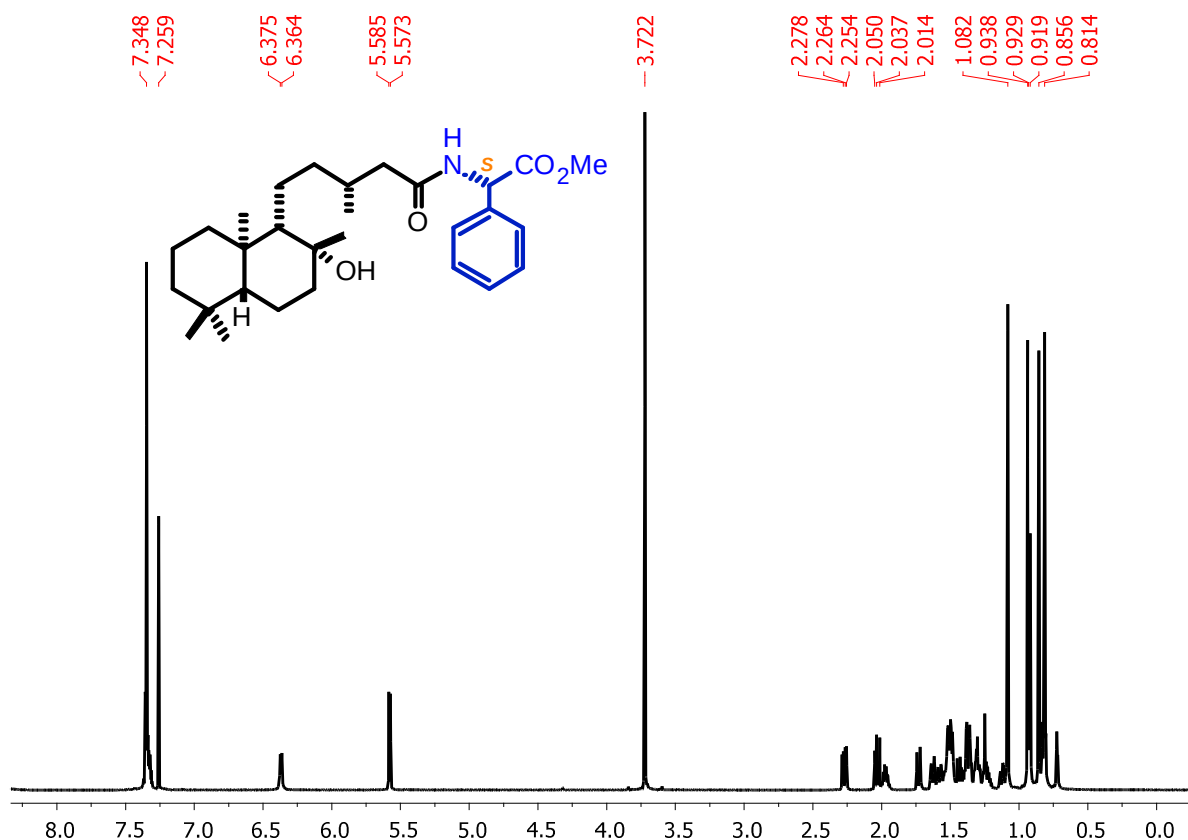
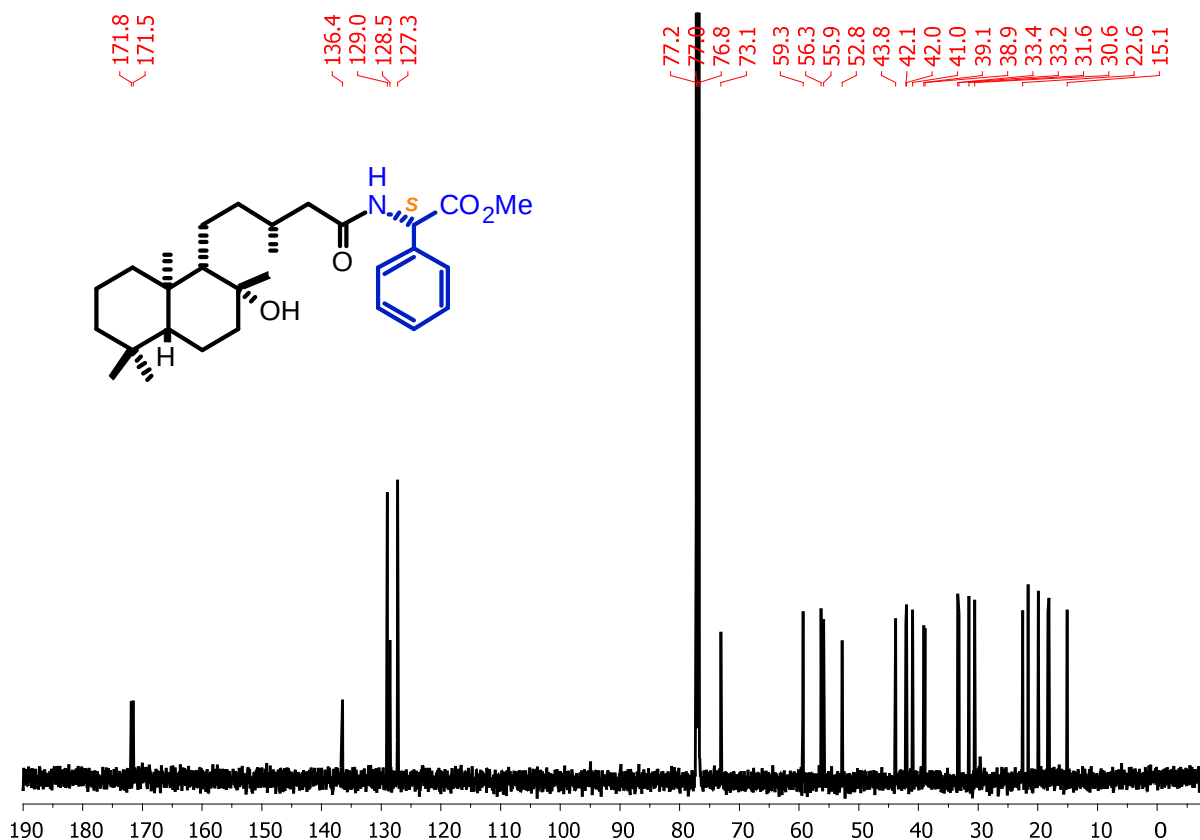
Figura 143 - Espectro de RMN de ^1H de **1d** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 144 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1d** (CDCl_3 , 151 MHz).

Figure 1 displays the ^1H NMR spectra of (R)-1 and (S)-1. The top spectrum is for (R)-1, showing a complex polycyclic structure with a chiral center (R) and a methyl ester group. The bottom spectrum is for (S)-1, showing the same structure with the opposite configuration (S). Both spectra are recorded in CDCl_3 and show characteristic peaks for the structure, including aromatic protons, aliphatic protons, and the methyl ester group. The x-axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 0.7 to 2.3.

Sistema de *spin* AA'BB'C

Resultados e discussão**Tabela 8** - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1c** (R-PGME) e **1d** (S-PGME) (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz, CDCl_3).

Posição	1c		1d	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 _{eq}	39,2	1,62 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 13,0, 3,2 e 1,3	39,1	1,63 <i>dtd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 3,0 e 1,8
1 _{ax}		0,82 <i>comp</i>		0,83 <i>comp</i>
2 _{eq}	18,1	1,36 <i>m</i>	18,1	1,37 <i>m</i>
2 _{ax}		1,57 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,9 e 3,3		1,58 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 3,0
3 _{eq}	42,0	1,37 <i>m</i>	42,0	1,37 <i>m</i>
3 _{ax}		1,11 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 14,3 e 4,5		1,12 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 4,2
4	33,2	–	33,2	–
5 _{ax}	55,9	0,81 <i>comp</i>	55,9	0,82 <i>comp</i>
6	18,3	1,48 <i>m</i> (2H _s)	18,3	1,49 (2H _s)
7 _{eq}	42,2	1,72 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,3 e 2,8	42,1	1,73 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2 e 2,4
7 _{ax}		1,42 <i>m</i>		1,42 <i>m</i>
8	73,1	–	73,1	–
9 _{ax}	59,3	0,69 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,4	59,3	0,72 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,3
10	39,1	–	38,9	–
11	22,5	1,30 <i>m</i> (2H _s)	22,6	1,30 <i>m</i> (2H _s)
12	40,7	1,35 <i>m</i>	41,0	1,37 <i>m</i>
		1,20 <i>m</i>		1,23 <i>m</i>
13	31,6	1,96 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,5	31,6	1,97 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6
14	43,8	2,27 <i>dd</i> , 13,9 e 5,8	43,8	2,27 <i>dd</i> , 13,9 e 6,0
		2,03 <i>dd</i> , 13,9 e 8,4		2,03 <i>dd</i> , 13,9 e 8,0
15	171,8	–	171,8	–
16	19,7	0,96 <i>d</i> , 6,5	19,9	0,92 <i>d</i> , 6,5
17 _{eq}	30,5	1,04 <i>s</i>	30,6	1,08 <i>s</i>
18 _{eq}	33,4	0,86 <i>s</i>	33,4	0,86 <i>s</i>
19 _{ax}	21,6	0,81 <i>s</i>	21,6	0,81 <i>s</i>
20 _{ax}	15,1	0,93 <i>s</i>	15,1	0,94 <i>s</i>
NCHPh	56,2	5,59 <i>d</i> , 7,2	56,3	5,58 <i>d</i> , 7,1
CO ₂ Me	171,5	–	171,5	–
OMe	52,7	3,73 <i>s</i>	52,8	3,72 <i>s</i>
C-1"	136,6		136,4	
C-2",6"	127,3		127,3	
C-3",5"	128,9	7,29-7,38 <i>m</i> (5H _s , AA'BB'C)	129,0	7,29-7,38 <i>m</i> (5H _s , AA'BB'C)
C-4"	128,5		128,5	
NH	–	6,40 <i>d</i> , 7,2	–	6,37 <i>d</i> , 7,1

comp=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente. Multiplicidade em *italico*. Sistema de *spin* entre parênteses.

Como mostrado na figura 146, p. 180, e pode ser constatado por meio de uma análise dos espectros de **1c** e **1d** (figura 145, p. 180), quando se subtraiu os deslocamentos químicos de **1c** com os de **1d**, observou-se uma distribuição consistente dos sinais positivo (+) e negativo (–). Destacaram-se os valores de $\Delta\delta(\delta_R - \delta_S)$ calculados para o H-9 (–0,04) e para os hidrogênios da Me-16 (+0,04) e Me-17 (–0,04). Além disso, é importante salientar que os sinais calculados de $\Delta\delta(\delta_R - \delta_S)$ para os demais hidrogênios do sistema bicíclico também foram negativos. Por conseguinte, como previsto pelo modelo proposto por Yabuuchi & Kusumi (2000) e aperfeiçoado neste trabalho,

o C-13 de **1** deve ter uma configuração *R*. Essa conclusão foi corroborada pelo trabalho publicado por Mambu *et al.* (2006)²⁷⁹, quem determinaram a configuração de diterpenos labdânico e clerodânico com configuração *S* em C-13, bem como pelo trabalho publicado por Chaio *et al.* (2013) sobre a determinação da configuração em C-24 do estereóide ácido paraminábico B.²⁸⁰

Como a configuração estabelecida para o C-13 de **1** diferiu daquela proposta anteriormente⁵⁹, afim de checar a confiabilidade dos resultados obtidos, efetuaram-se análises conformacionais dos derivados **1c** (*R*-PGME) e **1d** (*S*-PGME). Foram também efetuados estudos teóricos dos respectivos epímeros C-13 de **1c** e **1d**, nomeadamente **1c-epi** e **1d-epi**. De modo similar ao observado para os derivados do ácido (*R*)-2-metilpentanóico, verificou-se que os equilíbrios conformacionais desses derivados amídicos eram bastante complexos, como uma consequência da alta flexibilidade conformacional da cadeia lateral (figuras 147-150, p. 183-184). Dentro do intervalo de energia relativa de 1,3 a 2,2 kcal/mol, encontraram-se 10, 17, 11 e 18 cônformeros para os derivados **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**, respectivamente (tabela 9, p. 182). Desses cônformeros, os quatro de menor energia de **1c**, os cinco de menor energia de **1d** e de **1c-epi** e os seis de menor energia de **1d-epi** correspondiam a 78,0 %, 59,3 %, 81,5 % e 63,7 % das populações na distribuição de Boltzman, respectivamente (tabela 9, p. 182).

Tabela 9 - Cônformeros de menor energia de **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**.

1c	<i>Er.</i>	%	1d	<i>Er.</i>	%	1c-epi	<i>Er.</i>	%	1d-epi	<i>Er.</i>	%
clust-9	0,00	33	clust-22	0,00	17	clust-52	0,00	43	clust-19	0,00	39
clust-28	0,34	18	clust-45	0,06	15	clust-51	0,63	15	clust-71	0,87	9,1
clust-11	0,38	17	clust-25	0,29	10	clust-53	0,75	12	clust-14	1,3	4,6
clust-41	0,68	10	clust-11	0,37	8,8	clust-49	1,2	5,9	clust-8	1,4	4,0
clust-30	1,0	6,0	clust-2	0,41	8,4	clust-38	1,2	5,6	clust-11	1,4	3,7
clust-19	1,3	3,9	clust-36	0,87	3,8	clust-44	1,5	3,1	clust-13	1,5	3,3
clust-20	1,7	2,0	clust-50	0,88	3,8	clust-26	1,7	2,6	clust-4	1,5	3,0
clust-1	1,9	1,4	clust-12	0,92	3,5	clust-25	1,7	2,4	clust-36	1,7	2,4
clust-8	2,0	1,1	clust-42	0,95	3,3	clust-42	1,9	1,8	clust-34	1,7	2,3
clust-36	2,0	1,1	clust-38	0,96	3,3	clust-27	2,1	1,3	clust-9	1,8	1,8
			clust-21	1,0	3,0	clust-41	2,2	1,0	clust-46	1,8	1,8
			clust-40	1,0	2,9				clust-42	1,9	1,7
			clust-49	1,1	2,7				clust-69	2,0	1,4
			clust-51	1,2	2,3				clust-58	2,1	1,1
			clust-1	1,2	2,3				clust-72	2,1	1,1
			clust-7	1,2	2,2				clust-5	2,1	1,1
			clust-17	1,3	1,9				clust-59	2,1	1,1
									clust-10	2,1	1,0

**Er*=Energia relativa. %=População segundo a distribuição de Boltzmann.

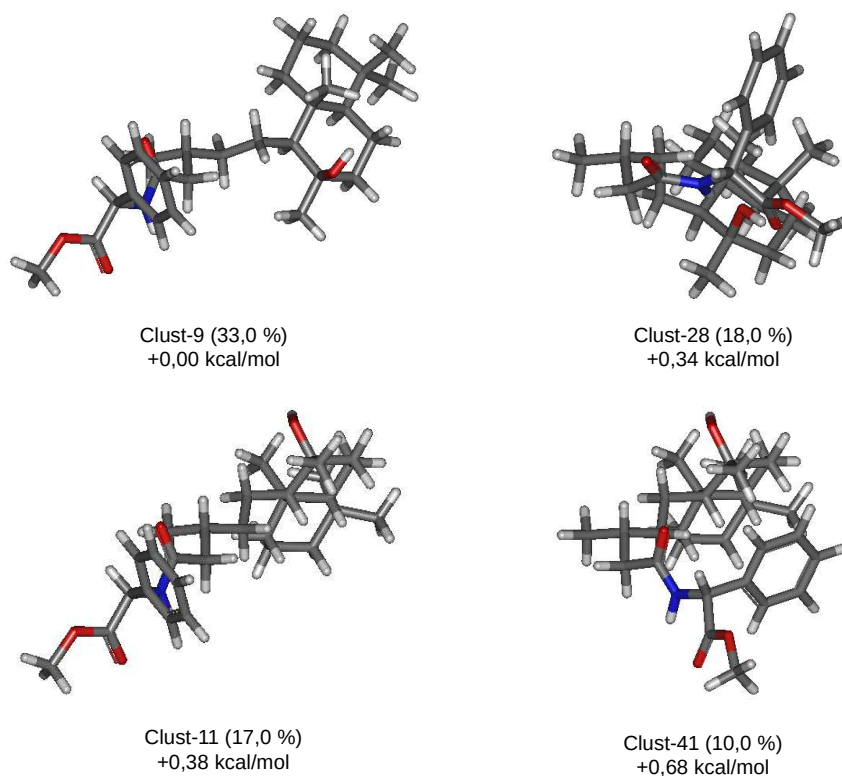
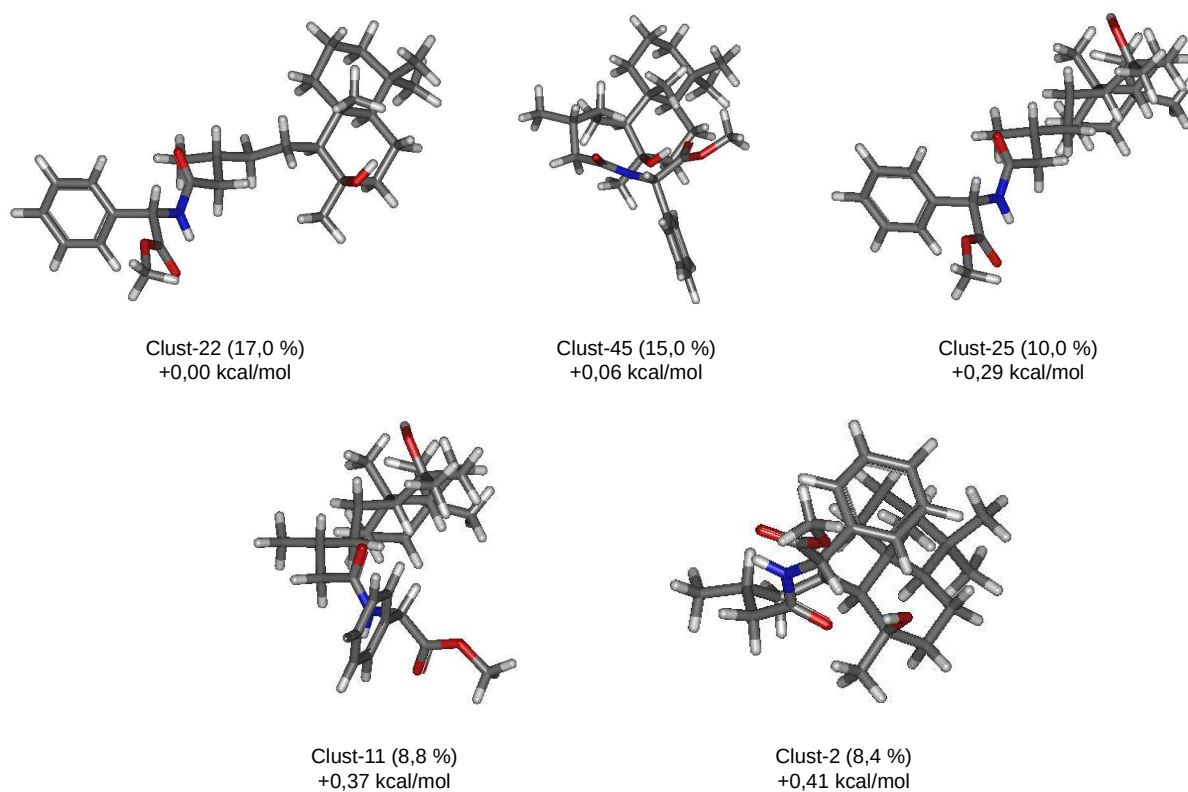
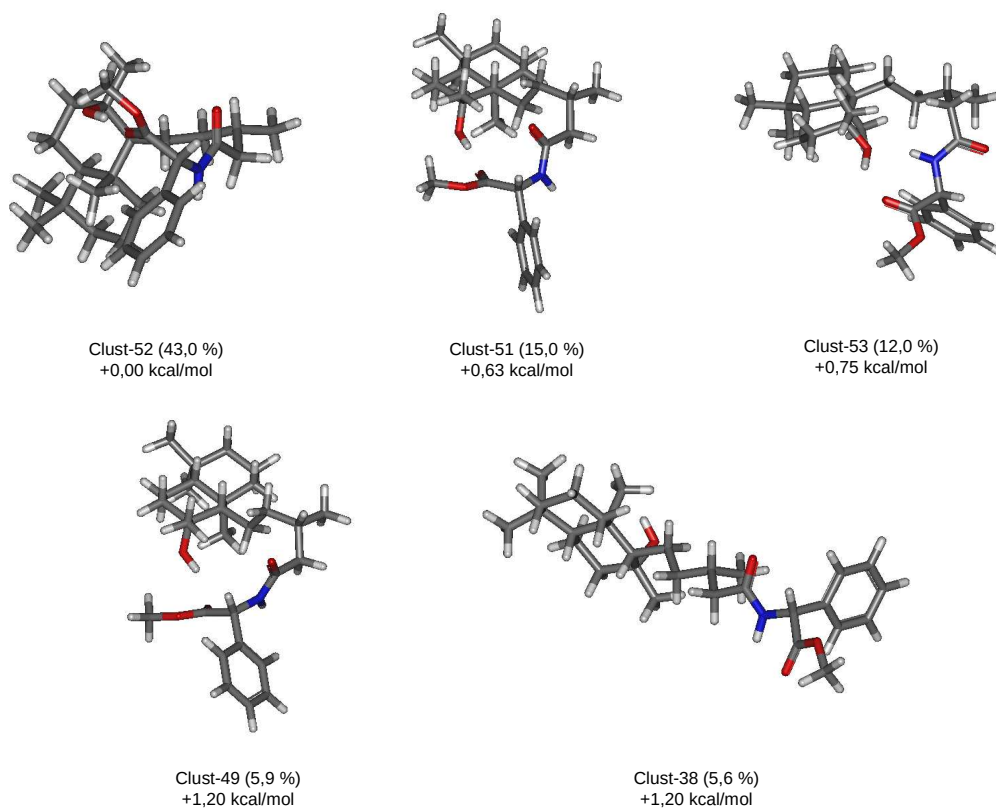
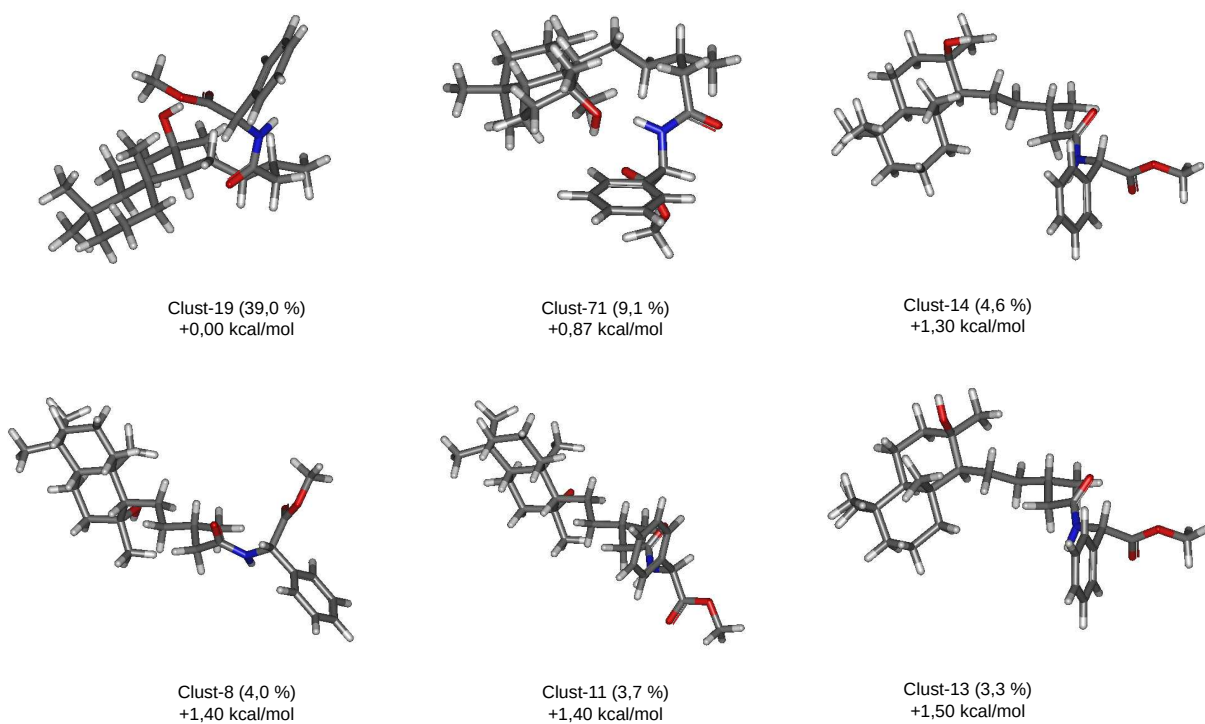
Figura 147 - Conformêros (RHF/6-31G) de menor energia de **1c**.**Figura 148** - Conformêros (RHF/6-31G) de menor energia de **1d**.

Figura 149 - Confômeros (RHF/6-31G) de menor energia de **1c-epi**.**Figura 150** - Confômeros (RHF/6-31G) de menor energia de **1d-epi**.

Os estudos teóricos efetuados com **1c** e **1d** mostraram que os comportamentos conformacionais destes foram similares aos dos derivados do ácido (3*R*)-metil-pentanóico (figuras 147-150, p. 182-184). Isso demonstrou que a aplicação do método PGME para a determinação da configuração em C-13 do epímero *R* de **1** resultaria em conclusões confiáveis, visto que uma distribuição consistente e compatível dos sinais + e – deveria ser observada. Os comportamentos dinâmicos de **1c-epi** e **1d-epi**, por outro lado, se diferenciaram significativamente dos observados para os derivados do ácido (3*R*)-metil-pentanóico, bem como do proposto por Yabucchi e Kusumi (2000). Portanto, não se pôde descartar a possibilidade que a configuração em C-13 de **1** fosse *S*. Por isso, cálculos DFT de deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C foram efetuados para as quatro amidas diastereoisoméricas, o que visou assegurar uma interpretação correta dos valores de Δδ(δ*R*-δ*S*) obtidos experimentalmente.

Cálculos teóricos de RMN têm sido utilizados com sucesso para predição de deslocamentos químicos em geral, para a determinação de configurações relativas, para a diferenciação de diastereoisômeros, inclusive para distinguir epímeros de diterpenos labdânicos, entre outras aplicações.²⁸¹⁻²⁸⁷ Para a diferenciação de epímeros, os parâmetros comumente empregados são os coeficientes de correlação (*R*) e a comparação dos erros médios absolutos (MAE). Os MAE são calculados a partir dos valores de deslocamentos químicos preditos e observados, mediante a utilização da equação 1, p. 185.

$$\text{MAE} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \delta_i^{\text{computado}} - \delta_i^{\text{observado}} \right| \quad \text{eq. 1.}$$

Quando se compararam os coeficientes de correlação linear (*R*) calculados a partir dos dados espectrométricos de **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**, observou-se que estes se diferiram no terceiro dígito após a vírgula para RMN de ¹³C e no terceiro ou segundo dígitos para RMN de ¹H. Portanto, o parâmetro *R* foi inconclusivo acerca das configurações em C-13 de **1c** e **1d**. Em contrapartida, uma comparação entre os MAE dos quatro diastereoisômeros revelou que as configurações em C-13 de **1c** e **1d** eram *R*. Enquanto os MAE calculados a partir de dados de RMN de ¹³C foram de 47 ou 49 para os derivados amídicos **1c** e **1d**, estes foram de 53 a 55 para **1c-epi** e **1d-epi**. Calcularam-se ainda, a partir de dados de RMN de ¹H, MAE de 3,2 a 3,7 para **1c** e

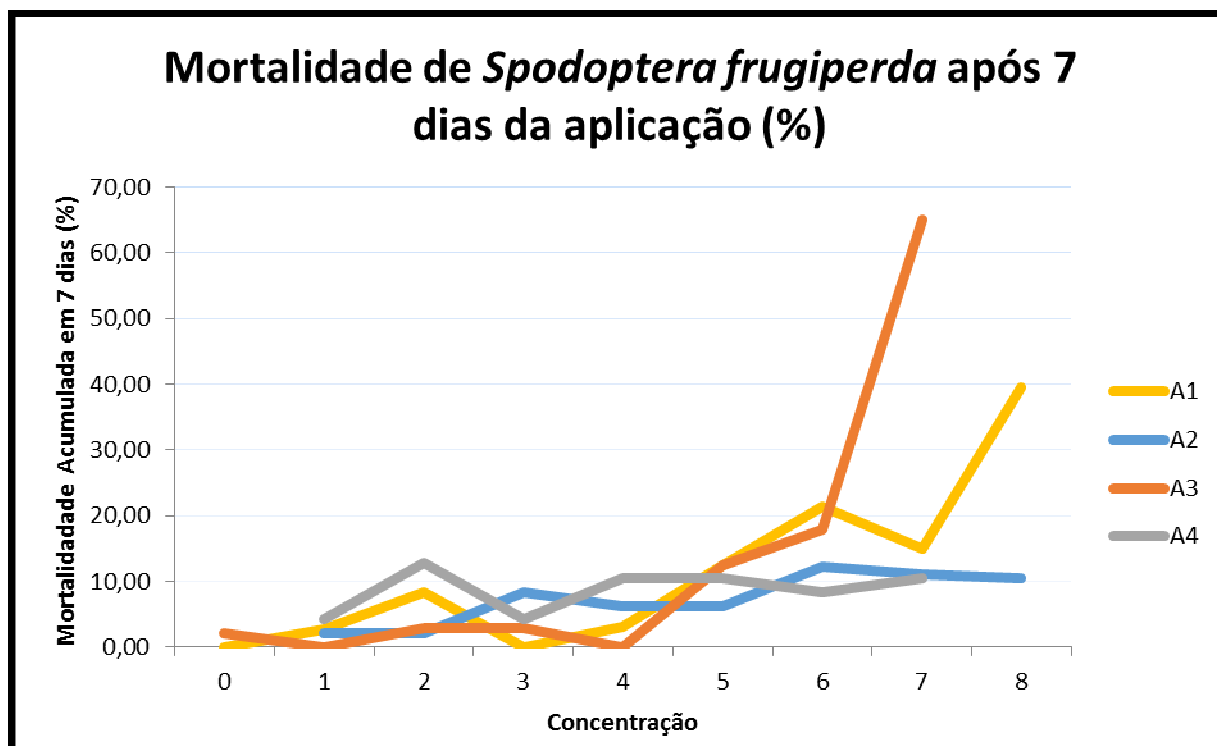
1d e de 3,9 a 4,6 para **1c-epi** e **1d-epi** (tabela 10, p. 186). Essas evidências, aliadas as demais obtidas neste trabalho, mostraram inequivocamente que a configuração em C-13 de **1** era *R*, ao invés de *S*, como previamente relatado na literatura.⁵⁹

Tabela 10 - Erros médios absolutos (MAE) calculados a partir dos dados computados e/ou observados para **1c**, **1d**, **1c-epi** e **1d-epi**.

			1c (calc.)	1d (calc.)	1c-epi (calc.)	1d-epi (calc.)
RMN de ¹ H	R	1c (exp.)	0,998	0,999	0,999	0,999
		1d (exp.)	0,998	0,999	0,999	0,999
	MAE	1c (exp.)	49	47	54	55
		1d (exp.)	49	47	53	54
RMN de ¹³ C	R	1c (exp.)	0,9918	0,9937	0,9847	0,9938
		1d (exp.)	0,9922	0,9942	0,9851	0,9940
	MAE	1c (exp.)	3,7	3,3	4,6	4,0
		1d (exp.)	3,6	3,2	4,5	3,9

4.4.1.6 Atividade inseticida

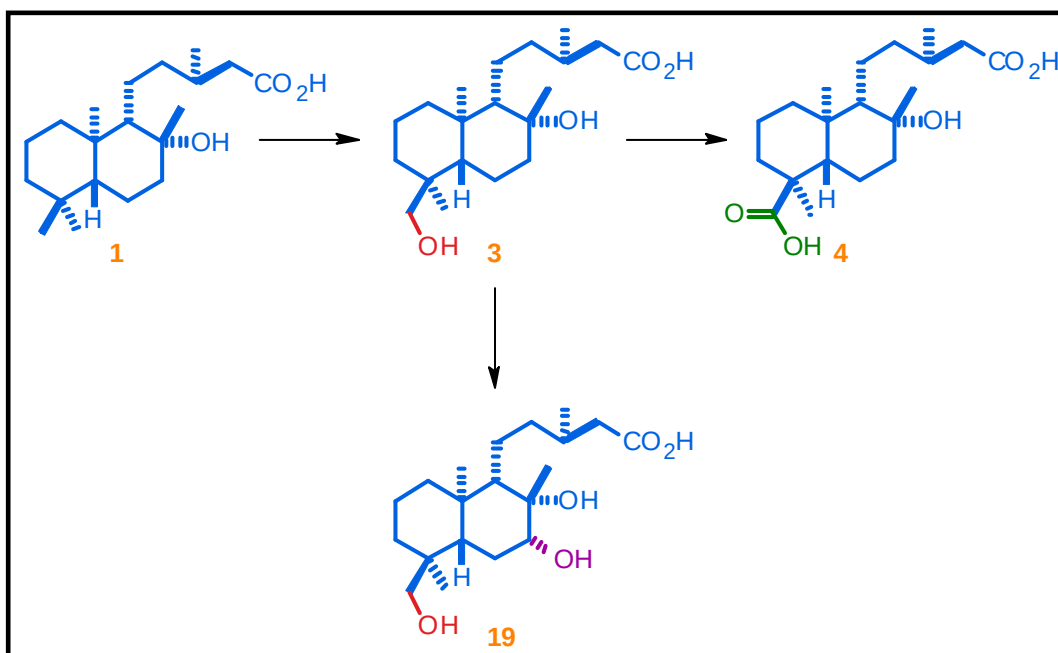
Figura 151 - Mortalidade acumulada em sete dias. A1=E-Fol, A2=E-Fz, A3=Diterpeno **1** e A4=Lignana **2**.



Conforme detalhado nos itens 3.12 e 3.13, p. 92, o diterpeno **1**, a lignana **2** e os extratos E-Fol e E-Ba foram testados para atividade inseticida em bioensaios com lagartas de 3^o instar da mariposa *Spodoptera frugiperda*. Somente o diterpeno **1** e o extrato de folhas exibiram atividades biológicas significativas, as quais foram dose-dependente. As mortalidades (acumuladas em 7 dias) causadas pela lignana **2** e pelo extrato de fezes foram de até 10%; valor que foi considerado como sendo estatisticamente baixo. Por outro lado, o extrato de folhas e o diterpeno labdânico **1** provocaram a morte de 39,6 % e 65,0 % das lagartas, respectivamente.

As propriedades inseticidas verificadas para **1** e o extrato de folhas mostraram que *A. giberti* biossintetiza substâncias que agem como barreiras químicas à herbivoria. Embora a lignana **2** tenha sido inativa no bioensaio realizado neste trabalho, um relato anterior mostrou que esta exibiu elevada atividade inseticida para lagartas-da-soja.⁸⁰ Além disto, destaca-se que a inatividade observada para o extrato de fezes evidenciou que as lagartas de *B. polydamas* podem detoxificar os constituintes presentes nas folhas de *A. giberti*.

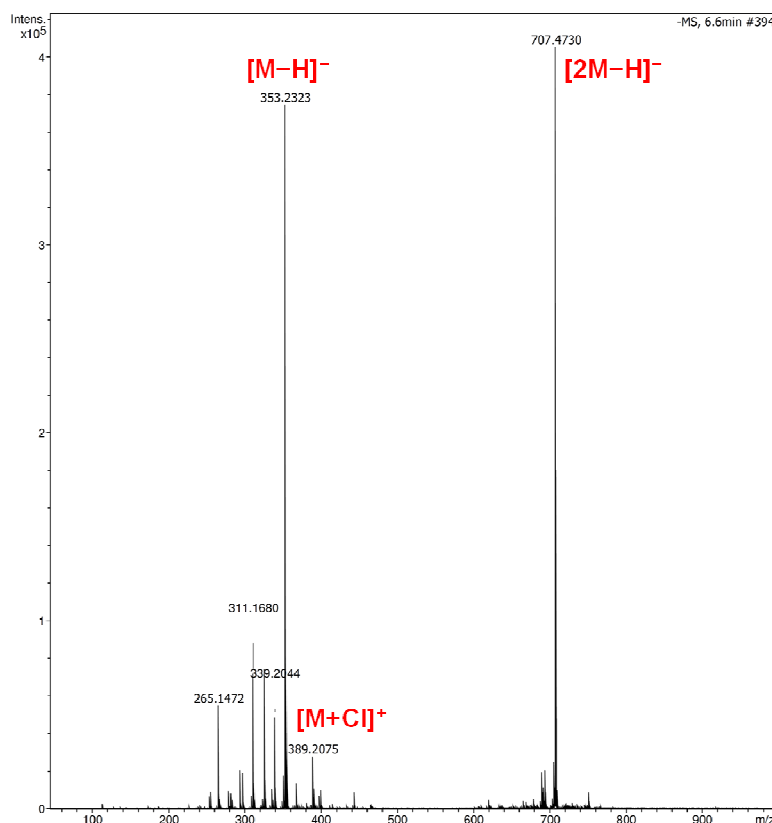
4.4.2 Diterpenos biotransformados e seus derivados sintéticos



4.4.2.1 Ácido (-)-ent-8β-hidroxi-labdano-15,18-dióico (4)

A substância **4** foi isolado dos extratos E-Fc e L2, conforme descrito nos itens 3.8.1.4 e 3.9.1. Sua fórmula molecular foi determinada, por espectrometria de massas com ionização por eletrospray, como sendo $C_{20}H_{34}O_5$. No espectro de massas (no modo negativo) de **4** foram observados picos de moléculas desprotonadas, $[M-H]^-$ (m/z 353,2323), de moléculas anionizadas com o íon Cl^- , $[M+Cl]^-$ (m/z 389,2075), entre outros (figura 152, p. 188).

Figura 152 - Espectro de massas de alta resolução de **4**.



Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de **4** foram muito similares aos de **1** (figuras 80 a 83, p. 125), o que sugeriu que **4** também seria uma substância de natureza terpênica. No espectro de RMN de 1H (figuras 153 e 154, p. 189) de **4**, destacaram-se três singletos em δ 1,17, 1,13 e 0,98, os quais foram atribuídos a três grupos metílicos alifáticos, além de um dubleto de metila alifática em δ 1,00 ($J = 6,7$ Hz), totalizando sinais para quatro grupos metílicos, ao invés de cinco sinais. Nesse espectro, destacaram-se ainda dois duplos dubletos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos α -carboxílicos em δ 2,34 ($W_{1/2} = 15,1$ e 6,8 Hz) e 2,21 ($W_{1/2} = 15,1$ e 7,4 Hz) e vários multipletos entre δ 0,80 e 1,95.

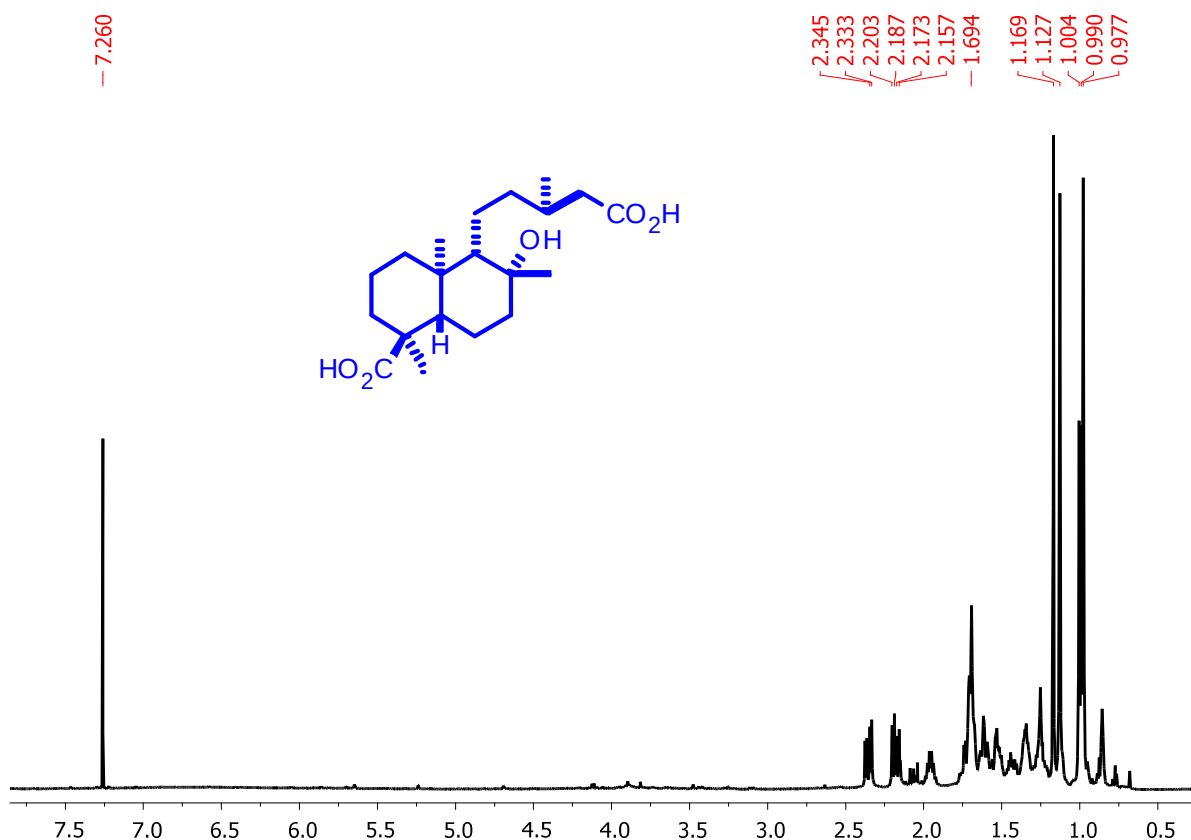
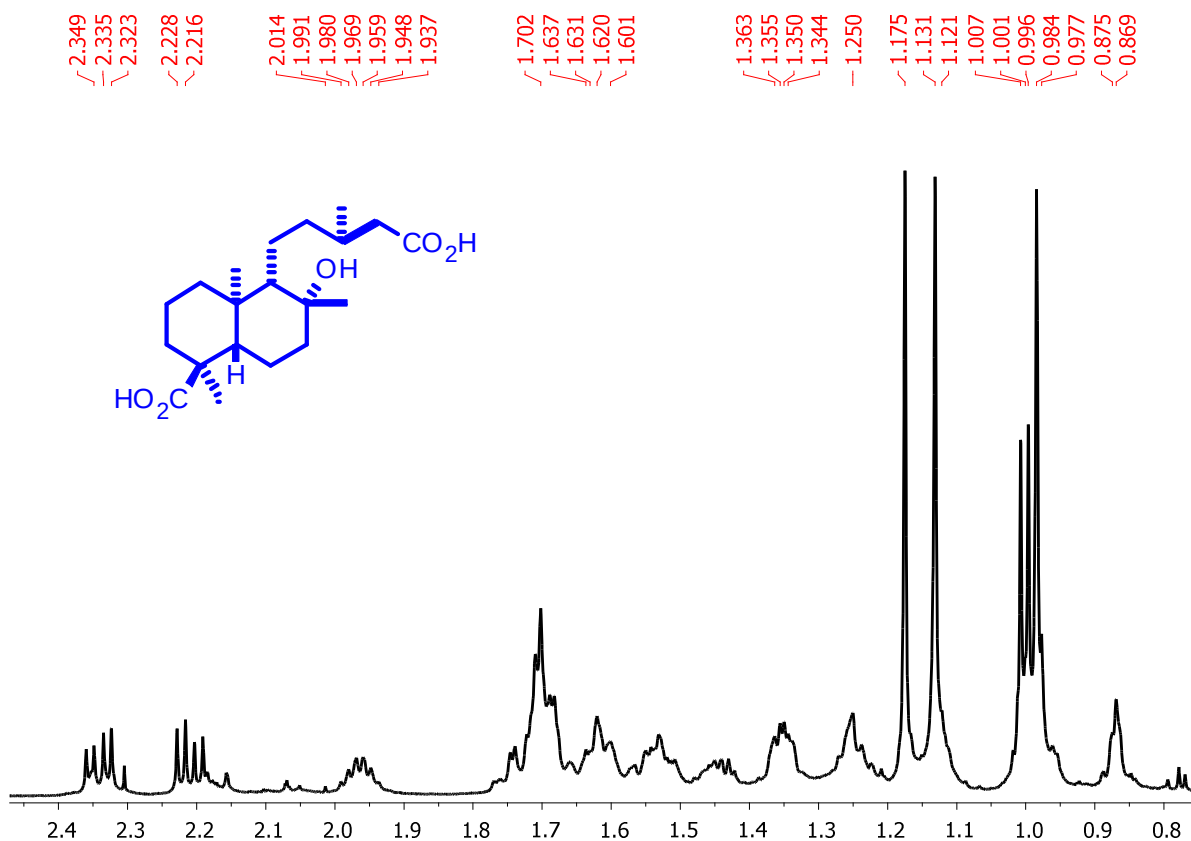
Figura 153 - Espectro de RMN de ^1H de **4** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 154 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4** (CDCl_3 , 600 MHz).

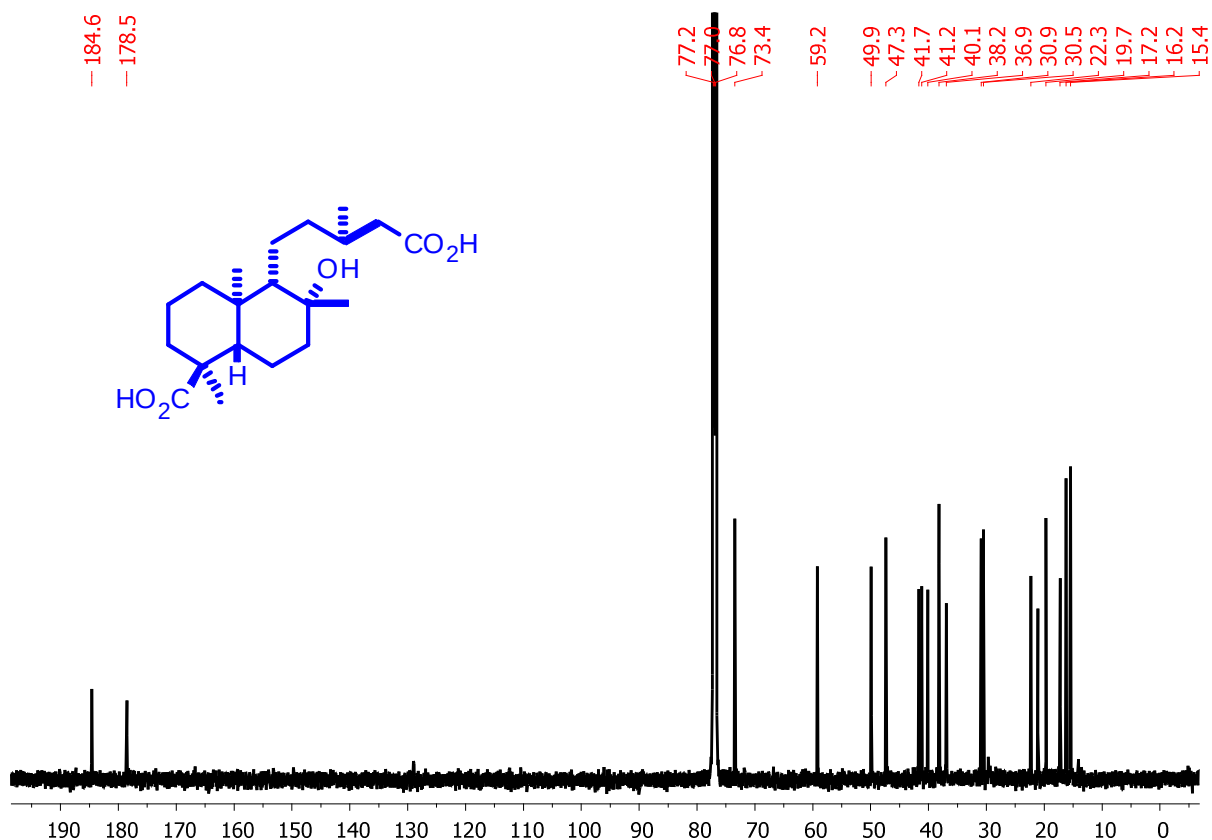
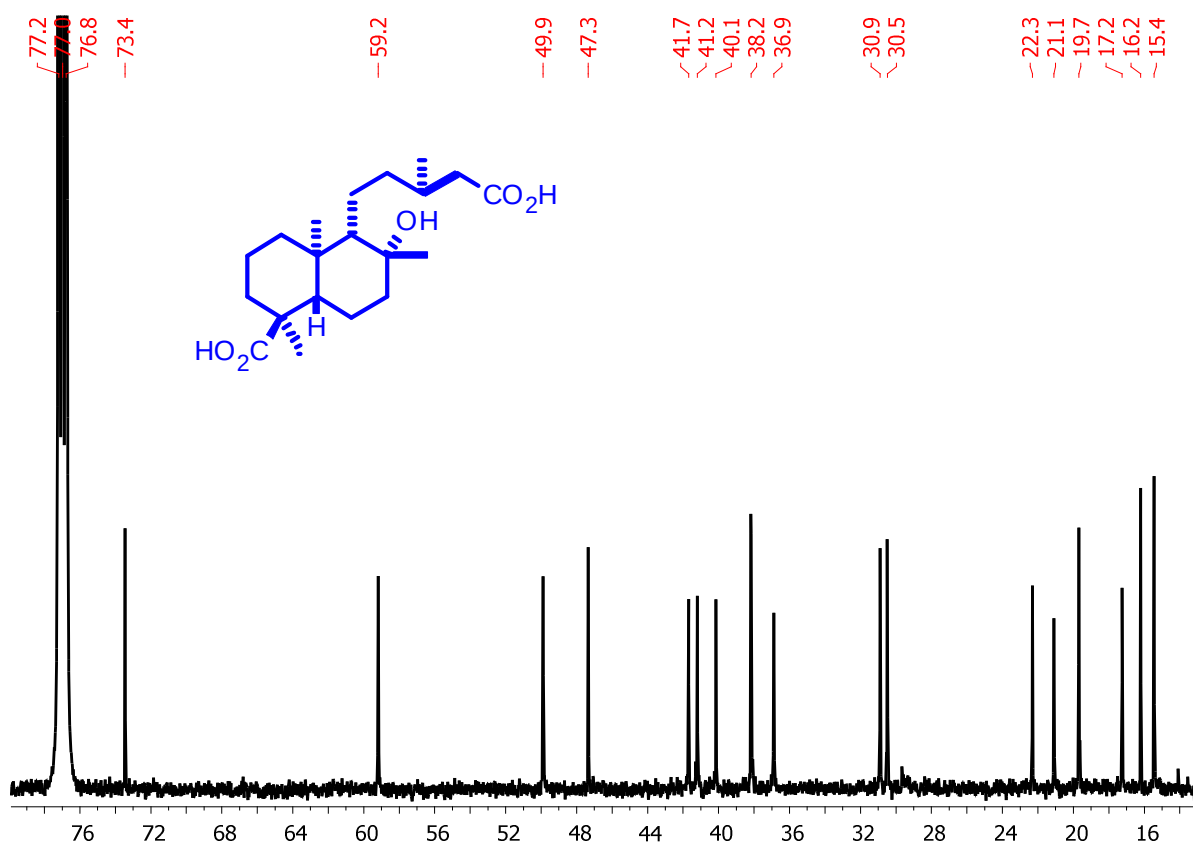
Figura 155 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4** (CDCl_3 , 151 MHz).Figura 156 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4** (CDCl_3 , 151 MHz).

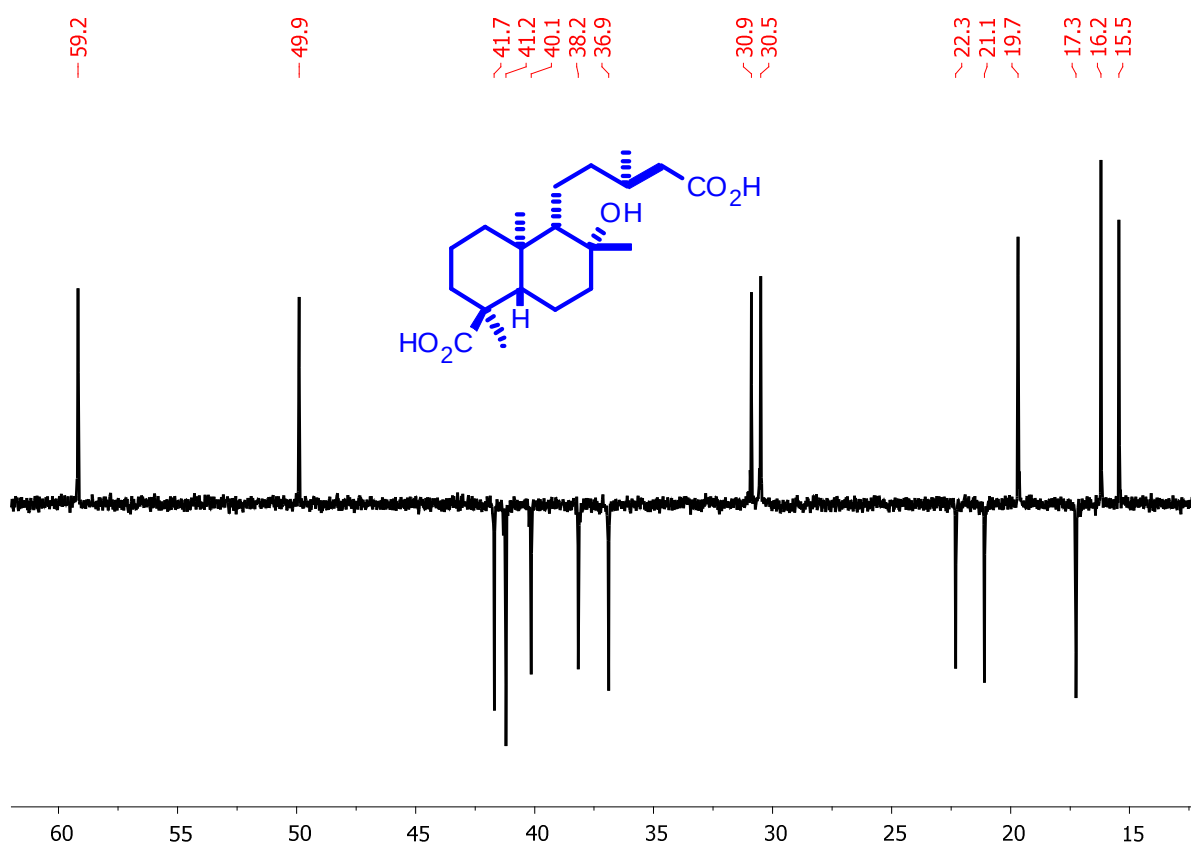
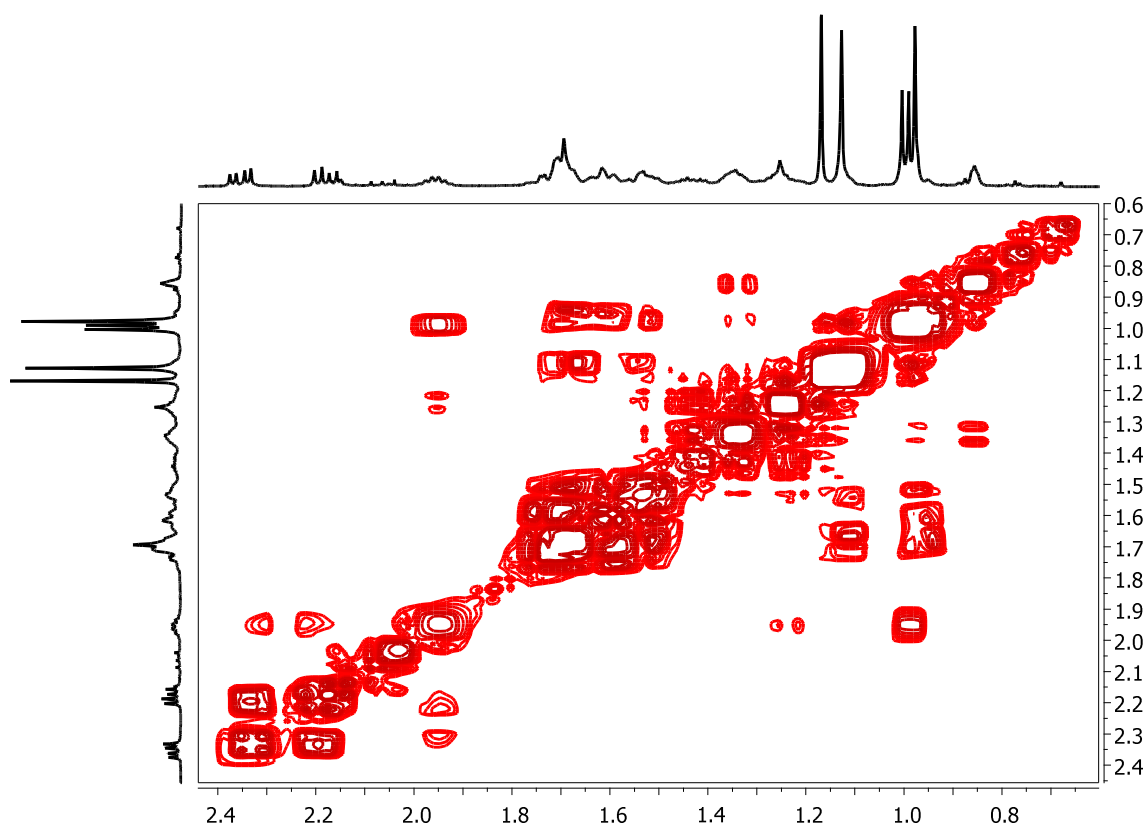
Figura 157 - Espectro de DEPT 135° de **4** (CDCl₃, 151 MHz).Figura 158 - Mapa de contornos gCOSY de **4** (CDCl₃, 14,1 T).

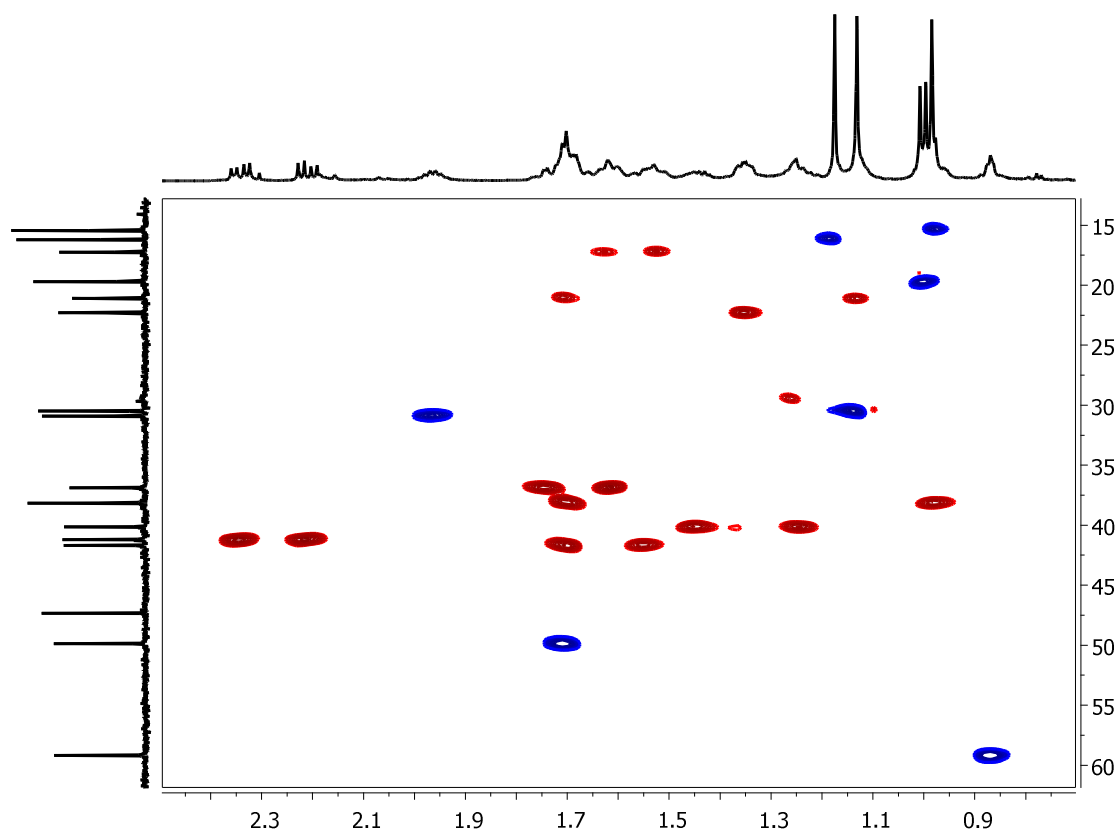
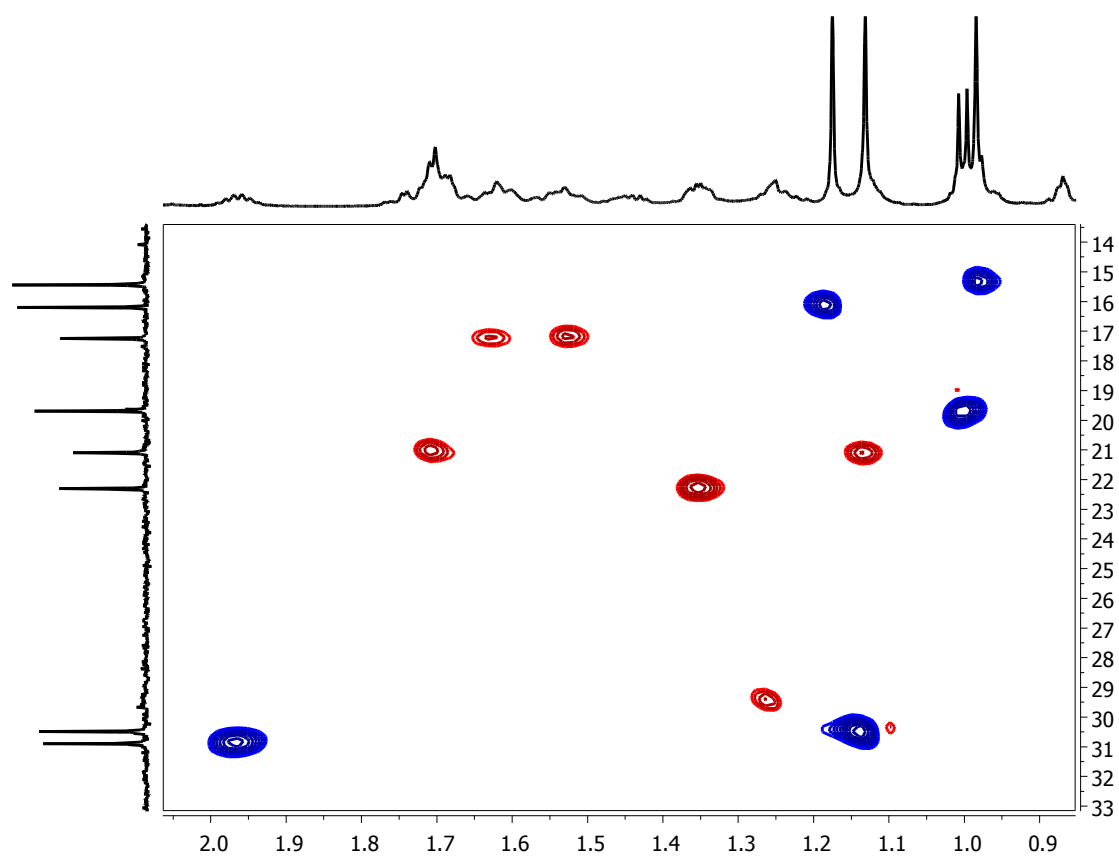
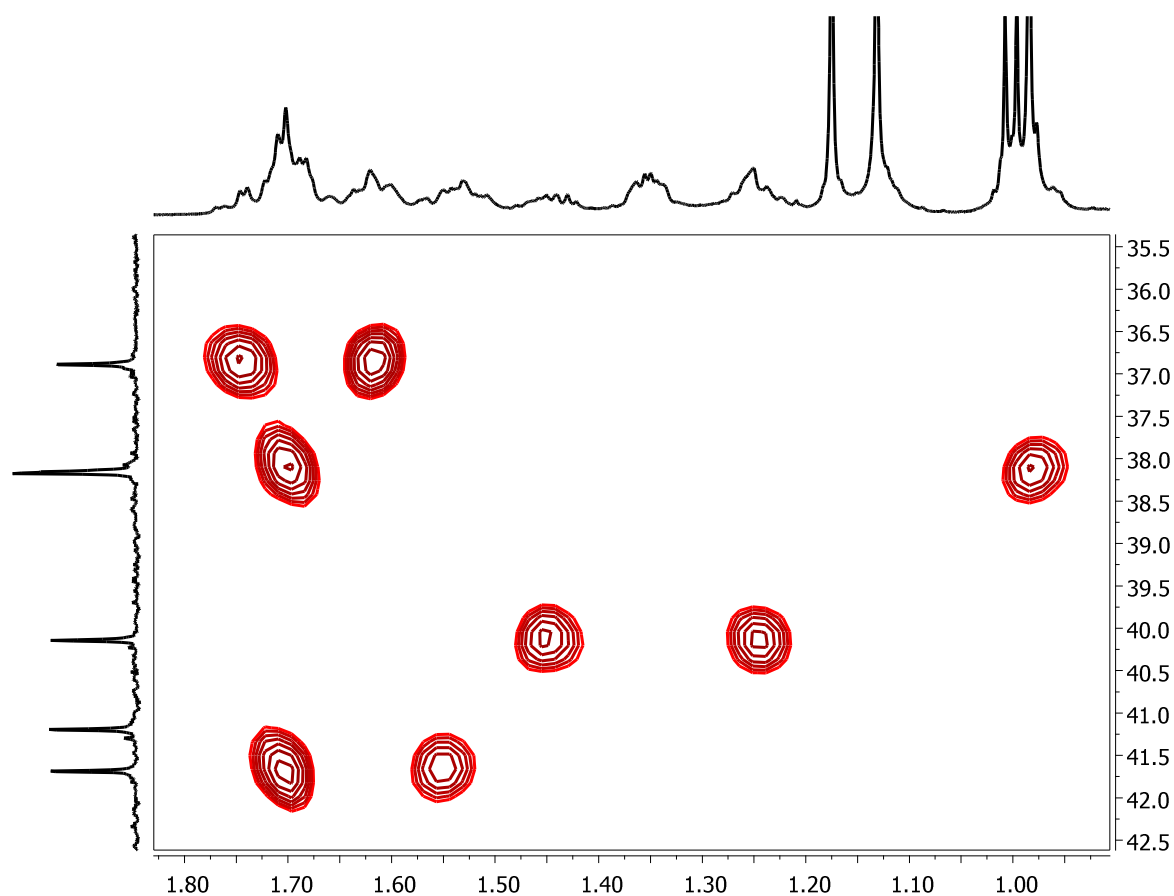
Figura 159 - Mapa de contornos gHSQC de **4** (CDCl₃, 14,1 T).Figura 160 - Mapa de contornos (expansão) gHSQC de **4** (CDCl₃, 14,1 T).

Figura 161 - Mapa de contornos (expansão) gHSQC de **4** (CDCl₃, 14,1 T).



A maioria (13 sinais) dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de **4** diferiu pouco [$\Delta\delta \leq 1,00$ ppm (todos os sinais); $\Delta\delta \leq 0,5$ ppm (11 sinais)] daqueles do diterpeno **1**. Entretanto, diferenças significativas foram também observadas entre os dois espectros. Com o auxílio dos espectros de DEPT 90° e 135° , APT com $1/(2J)$, gHSQC, bem como do espectro de RMN de ^1H , verificou-se no espectro de RMN de ^{13}C de **4** a presença de apenas quatro sinais referentes a grupos metílicos alifáticos e de um sinal em δ 185,0, inexistente no de **1**. Essas informações, associadas com os dados espectrométricos obtidos por EM, sugeriram que um dos grupos metílicos de **1** fora substituído por um grupo carboxílico.

Mediante uma análise sistemática dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais, demonstrou-se que a substância **4** era um diterpeno labdânico contendo um grupo hidroxílico (ligado ao C-8) e dois grupos carboxílicos, bem como se efetuaram as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos e dos hidrogênios de **4** (tabela 11, p. 194). Assim, concluiu-se, por exemplo, que os deslocamentos químicos dos C-5, C-8, C-9, C-16, C-17 e C-20 eram δ 49,9, 73,4,

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **4**, **4a** (*R,R*-PGME) e **4b** (*S,S*-PGME) (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	4		4a		4b	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 _{eq}	38,2	1,70 <i>m</i>	38,1	1,64 <i>m</i>	38,0	1,65 <i>comp</i>
1 _{ax}		0,98 <i>comp</i>		0,94 <i>comp</i>		0,96 <i>comp</i>
2 _{eq}	17,2	1,52 <i>m</i>	17,3	1,50 <i>m</i>	17,3	1,48 <i>m</i>
2 _{ax}		1,62 <i>m</i>		1,58 <i>m</i>		1,58 <i>m</i>
3 _{eq}	36,9	1,61 <i>m</i>	37,1	1,50 <i>m</i>	37,2	1,43 <i>m</i>
3 _{ax}		1,74 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6 e 4,2		1,74 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2 e 4,2		1,71 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,0 e 4,1
4	47,3	–	47,1	–	47,1	–
5 _{ax}	49,9	1,71 <i>m</i>	50,7	1,61 <i>m</i>	50,6	1,65 <i>m</i>
6	21,1	1,70 <i>m</i>	20,3	1,54 <i>m</i> (equatorial)	20,4	1,60 <i>m</i> (equatorial)
		1,13 <i>m</i>		0,91 <i>m</i> (axial)		1,14 <i>m</i> (axial)
7 _{eq}	41,7	1,70 <i>m</i>	41,5	1,53 <i>m</i>	41,6	1,65 <i>m</i>
7 _{ax}		1,55 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,3 e 5,6*		1,38 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,8 e 3,6		1,48 <i>comp</i>
8	73,4	–	73,2	–	73,2	–
9 _{ax}	59,2	0,86 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,6	59,3	0,77 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,0	59,3	0,83 <i>dd</i> , 4,7 e 2,6
10	38,2	–	38,3	–	38,4	–
11	22,3	1,35 <i>m</i> (2H _s)	22,5	1,28 <i>m</i> (2H _s)	22,5	1,30 <i>m</i> (2H _s)
12	40,1	1,45 <i>m</i> ; 1,24 <i>m</i>	40,6	1,33 <i>m</i> ; 1,16 <i>m</i>	40,9	1,38 <i>m</i> ; 1,22 <i>m</i>
13	30,9	1,96 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,7	31,6	1,94 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6	31,5	1,98 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,4
14	41,2	2,34 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 15,1 e 6,8	43,8	2,26 <i>dd</i> , 14,4 e 5,4	43,8	2,27 <i>dd</i> , 14,0 e 6,1
		2,21 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 15,1 e 7,4		2,02 <i>dd</i> , 14,4 e 8,4		2,03 <i>dd</i> , 14,0 e 7,8
15	178,5	–	171,8	–	171,9	–
16	19,7	1,00 <i>d</i> , 6,7	19,7	0,95 <i>d</i> , 7,2	20,0	0,92 <i>d</i> , 6,5
17 _{eq}	30,5	1,13 <i>s</i>	30,5	0,99 <i>s</i>	30,5	1,08 <i>s</i>
18 _{eq}	184,6	–	178,3	–	178,5	–
19 _{ax}	16,2	1,17 <i>s</i>	16,5	1,22 <i>s</i>	16,2	1,22 <i>s</i>
20 _{ax}	15,4	0,98 <i>s</i>	15,6	0,95 <i>s</i>	15,6	0,97 <i>s</i>
2'	–	–	56,3	5,59 <i>d</i> , 7,2	56,3	5,57 <i>d</i> , 7,1
2''	–	–	56,7	5,52 <i>d</i> , 6,6	56,8	5,50 <i>d</i> , 6,5
3',3''	–	–	171,6, 171,5	–	2x171,5	–
4',4''	–	–	136,6	–	136,4 [§] , 136,6 [§]	–
5',9',5'',9''	–	–	127,2, 127,3	–	127,3 [§] , 127,2 [§]	–
6',8',6'',8''	–	–	128,9, 129,0	7,28-7,43 <i>m</i> (10Hs, 2xAA'BB'C)	128,9, 129,0	7,29-7,40 <i>m</i> (10Hs, 2xAA'BB'C)
7',7''	–	–	128,5	–	128,5, 128,6	–
OMe-10',10''	–	–	52,8, 52,7	3,72 <i>s</i> (6Hs)	52,8, 52,7	3,72 <i>s</i> (6Hs)
NH-1'	–	–	–	6,42 <i>d</i> , 7,2	–	6,38 <i>d</i> , 7,1
NH-1''	–	–	–	6,71 <i>d</i> , 6,6	–	6,71 <i>d</i> , 6,5

comp=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente; *JResolved;

§=respectivamente. Multiplicidade em itálico. Sistema de spin entre parênteses.

59,3, 16,2, 30,5 e 15,4, respectivamente. O valor do deslocamento químico do C-10, o qual foi idêntico ao do C-1, foi confirmado por meio de experimento de APT com $1/(2J)$ (figura 162, p. 195) e pela correlação a longa distância entre o C-10 e os hidrogênios quimicamente equivalentes ligados ao C-11. As seguintes correlações a longa distância observadas no mapa de contornos $gHMBC$: i) δ 184,6 (C-18) $\times$ δ 1,74 (H-3_{ax}), 1,71 (H-5) e 1,17 (H_s-19), ii) δ 49,9 (C-5) $\times$ 0,98 (H_s-20) e 1,17 (H_s-19) e iii) δ 59,2 (H_s-19) $\times$ 1,35 (H_s-11) e 1,13 (H_s-17), juntamente com a desblindagem observada para o C-4 ($|\Delta\delta| = 14,1$ ppm), evidenciaram que um dos grupos metílicos ligados em C-4 tinha sido oxidado para um grupo carboxílico (figura 163, p. 195).

Figura 162 - Espectro de APT com $1/(2J)$ de 4 ($CDCl_3$, 14,1 T).

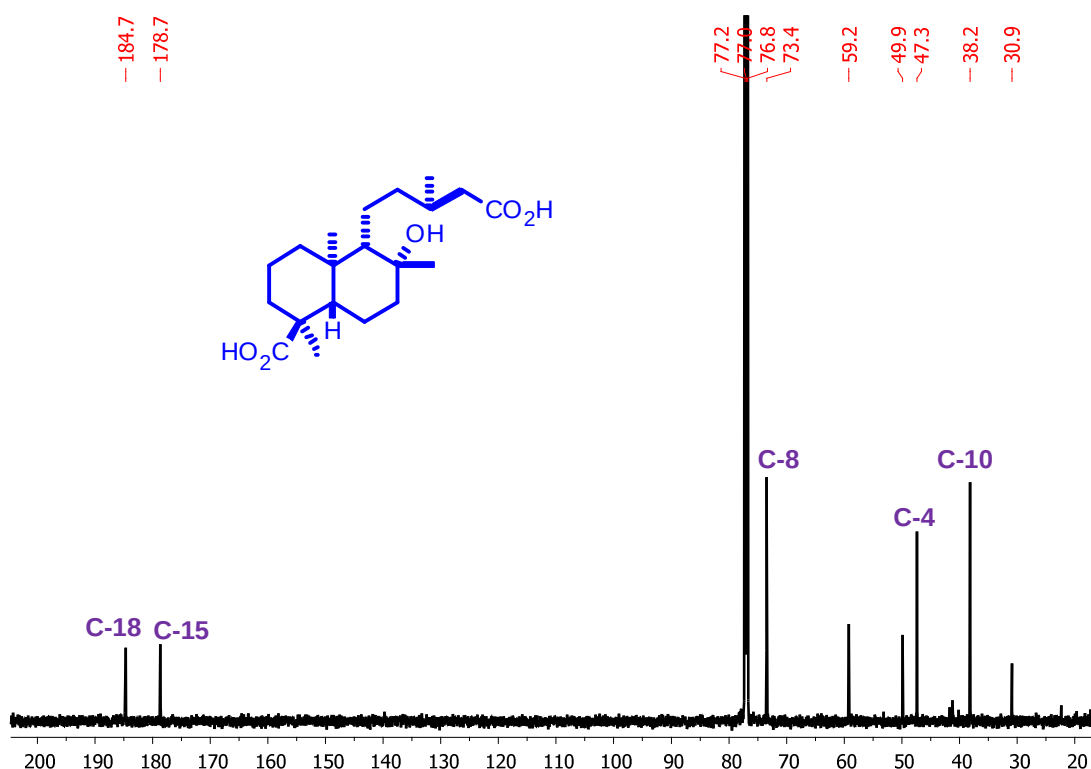
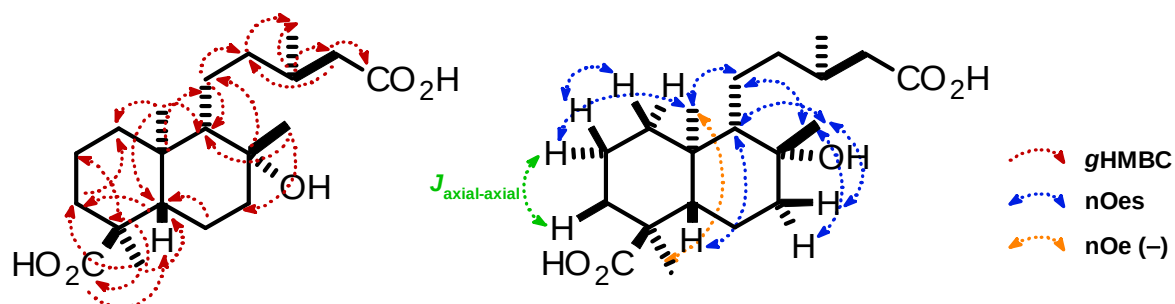


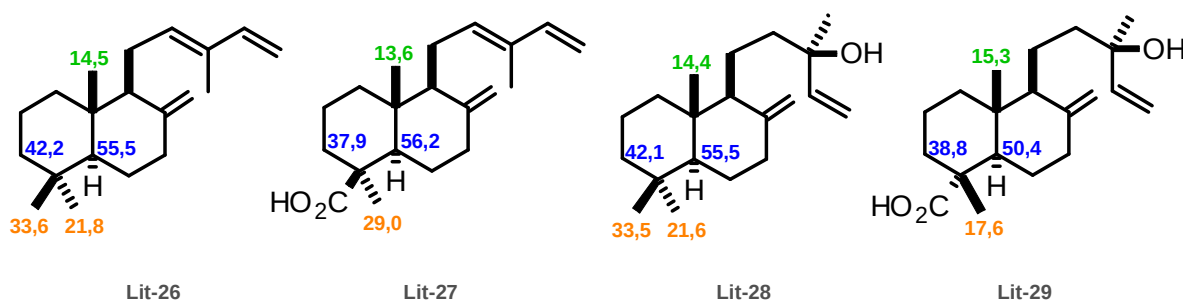
Figura 163 - Correlações à longa distância e interações espaciais selecionadas.



Considerando-se a discussão apresentada para **1**, o valor de deslocamento químico observado para o C-5 (δ 49,9) de **4** poderia levar a supor que a configuração em C-9 de **4** fosse inversa daquela do diterpeno **1**, uma vez que este carbono era 6,0 ppm mais blindado do que o C-5 de **1**. Contrário a isso, o valor de deslocamento químico observado para o C-20 (Me-20) foi de δ 15,4, o que não condiz com a inversão da configuração em C-9, desde que isso resultaria numa desproteção do C-20, devido à anulação da interação γ -gauche dessa metila com a cadeia lateral ligada a C-9. No entanto, apesar de ser sugestivo de uma relação *anti* entre os substituintes em C-9 e C-10, o valor de deslocamento observado para o C-20 não foi totalmente decisivo sobre a configuração em C-9, visto que a oxidação do C-19 colocaria um grupo carboxílico em axial. Isso intensificaria uma das interações butano γ -gauche e protegeria o C-20, compensando, assim, a anulação da interação γ -gauche decorrente da inversão da configuração em C-9. A partir dos dados espectrométricos do ácido hidroxilabda-8(17),14-dien-18-óico e do diterpeno fokihodgina E, por exemplo, calculou-se um efeito de proteção sobre o C-20 de ~ 3 ppm.^{85,288,}

Embora foram observados, por experimento de NOESY 1D e 2D, acoplamentos dipolares entre o hidrogênio em δ 0,86 (H-9) com o hidrogênio em δ 1,70 (H-1) ou 1,71 (H-5) e entre os hidrogênios em δ 1,35 (H_s-11) e 0,98 (H-1_{ax} ou H_s-20), estes também não foram decisivos sobre a configuração em C-9, já que, diante da inversão da configuração desse carbono, as interações espaciais supracitadas poderiam ser interpretadas como sendo provenientes dos acoplamentos dipolares do H-9 com o H-1_{eq} e do H-1_{ax} com os H_s-11, respectivamente.

Figura 164 - Alguns dados de RMN de ¹³C de Lit-26, Lit-27, Lit-28 e Lit-29.



Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 85, 289 e 290.

Contudo, os dados espectrométricos obtidos para o diterpeno **4**, sobretudo o valor do deslocamento químico do carbono da metila (δ 16,2) ligada ao C-4, não foram compatíveis com os de um grupo carboxílico ocupando uma posição axial. Conforme dados de modelos disponibilizados na literatura^{85,289,290}, a oxidação de um dos grupos metílicos ligados a C-4 de **1** resultaria, devido ao efeito de compressão estérica, numa proteção de 4-5 ppm do outro grupo metílico (figura 164, p. 196). No diterpeno **1**, os carbonos das Me-18 (axial) e Me-19 (equatorial) apresentaram deslocamentos químicos de δ 21,6 e 33,4, respectivamente. Sendo assim, o valor de deslocamento químico observado para o carbono do grupo metílico ligado ao C-4 de **4** foi compatível apenas com o de um grupo metílico ocupando uma posição axial, e, consequentemente, a carboxila estaria em equatorial.

Definida a posição equatorial do grupo carboxílico (C-18), o valor de deslocamento químico do C-20 passou a ser decisivo sobre a configuração relativa em C-9, e, desse modo, mostrou-se que o diterpeno dicarboxílico **4** também pertencia a série estereoquímica *anti-anti*, cuja junção dos anéis de seis membros é *trans* e a relação estereoquímica entre a Me-20 e o H-9 é *anti*. Como discutido para **1**, o sinal em δ 30,5, atribuído ao C-17, bem como os deslocamentos químicos dos C-7 (δ 41,7) e C-9 (δ 59,3), demonstraram que o grupo hidroxílico em C-8 de **4** estava em axial.

Portanto, a blindagem observada para o C-5 de **4** foi atribuída ao efeito γ -gauche exercido pela “carboxila” sobre o C-5, e não à inversão da configuração em C-9. Essa blindagem exercida sobre o C-5, assim como a desblindagem exercida sobre os H-3 e H-5, confirmaram que o grupo carboxílico estaria em equatorial, uma vez que uma carboxila em axial manteria uma relação estereoquímica antiperiplanar com o H-5 e, portanto, não afetaria significativamente o deslocamento químico do C-5 (figura 164, p. 196).^{85,289,290}

As similaridades entre os valores dos deslocamentos químicos de alguns dos hidrogênios do sistema bicíclico, aliadas aos padrões complexos de acoplamento observados para esses hidrogênios, dificultaram as atribuições de quais hidrogênios estavam em axiais e em equatoriais. Todavia, confirmou-se, por experimento de JResolved (figura 165, p. 198), que os hidrogênios em δ 1,55 (ligado a C-7) e 1,62 (ligado ao C-2) estavam em axial. Além disto, destaca-se que os parâmetros espectrais extraídos da análise do sinal em δ 1,74 (*td ap*, $W_{1/2}$ 12,6 e 4,2 Hz), juntamente com os acoplamentos dipolares observados entre os H-9 e H-5 e entre o hidrogênio em δ

1,52 (H-2_{eq}) com o hidrogênio em δ 0,98 (H-1_{ax}), demonstraram que os hidrogênios em δ 1,74 (H-3_{ax}), 1,71 (H-5), 0,98 (H-1_{ax}) e 0,87 (H-9) também ocupavam posições axiais.

Assim, a substância **4** foi caracterizada como sendo o ácido 8-hidroxi-labdan-15,18-dióico, ainda não descrito na literatura. Esse diterpeno, cuja a configuração absoluta foi determinada pelo método PGME, apresentou uma rotação óptica específica de $[\alpha]_{546}^{22} -24 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$ (c. 0,22; CHCl₃). As obtenções dos derivados amídicos **4a** e **4b** foram confirmadas por RMN e EM (figuras 166-172, p. 199-202). Nos espectros de massas de **4a** e **4b** observaram-se picos de moléculas protonadas (m/z 649,3 e 649,4), de moléculas cationizadas com os íons NH₄⁺ (m/z 666,4), Na⁺ (m/z 671,4) e K⁺ (m/z 687,3 ou 687,4), além dos picos referentes as detecções dos íons [M-H₂O+H]⁺ (m/z 631,3) (figuras 166 e 167, p. 199).

Figura 165 - Expansão do mapa de contornos de JResolved de **4** (CDCl₃, 14,1 T).

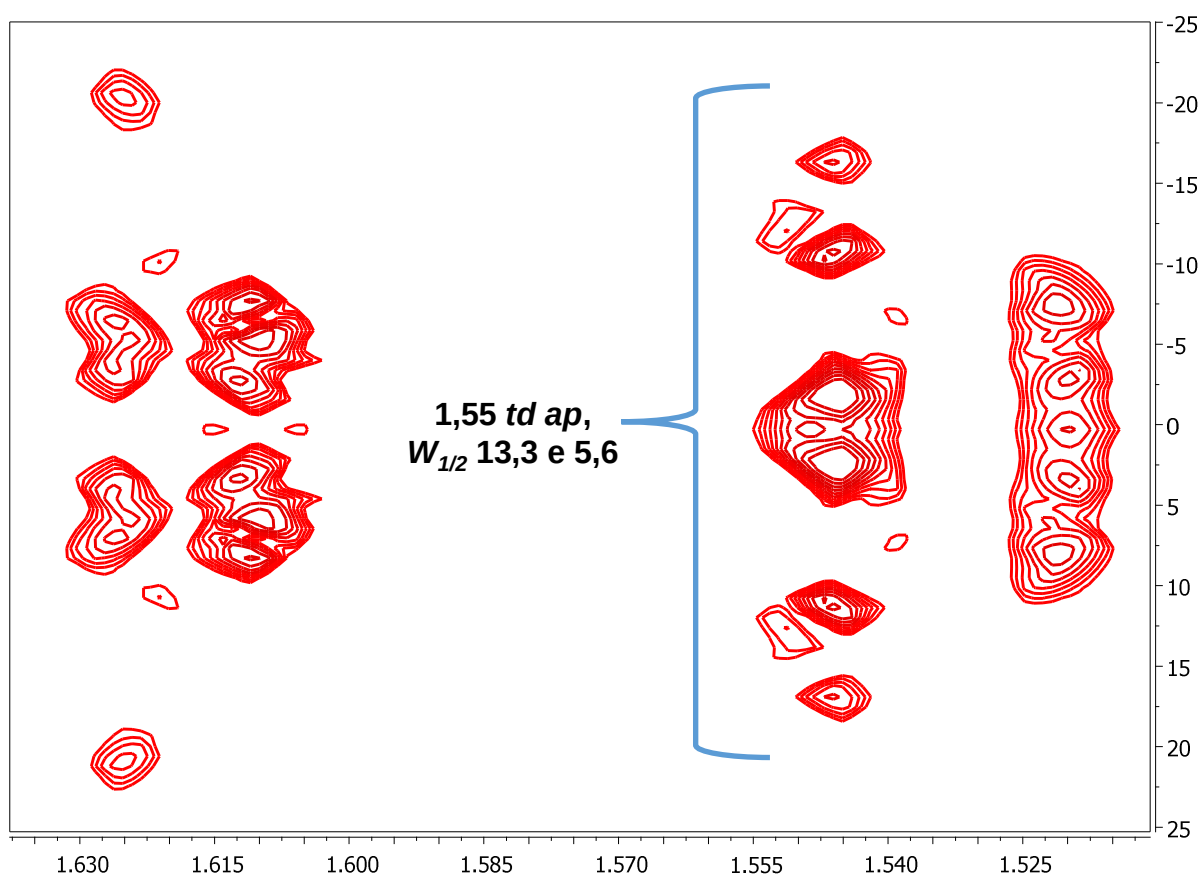


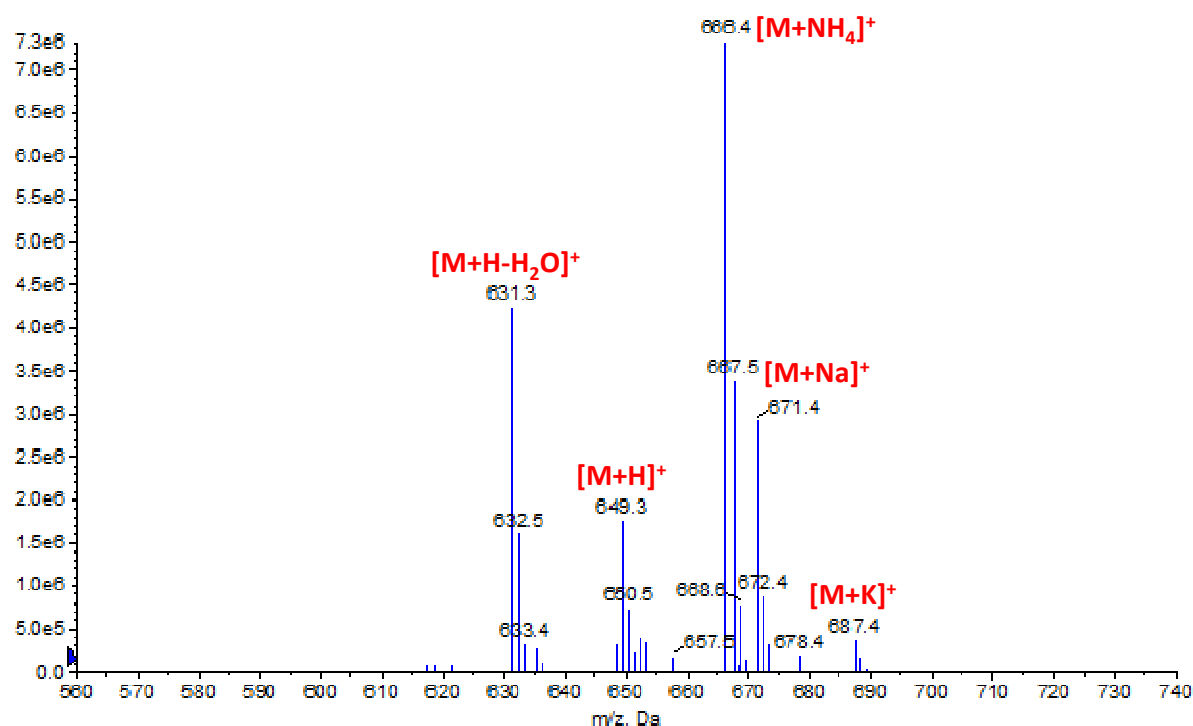
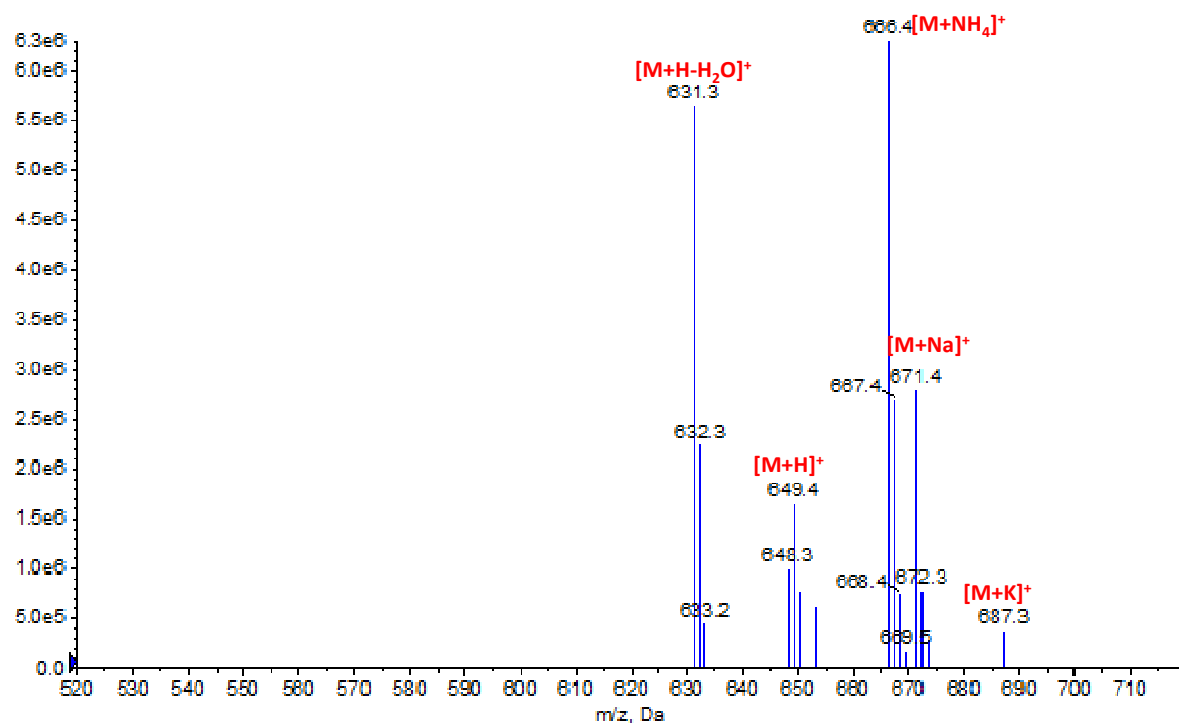
Figura 166 - Espectro de massas de **4a** (IES, +10 V, infusão direta).Figura 167 - Espectro de massas de **4b** (IES, +10 V, infusão direta).

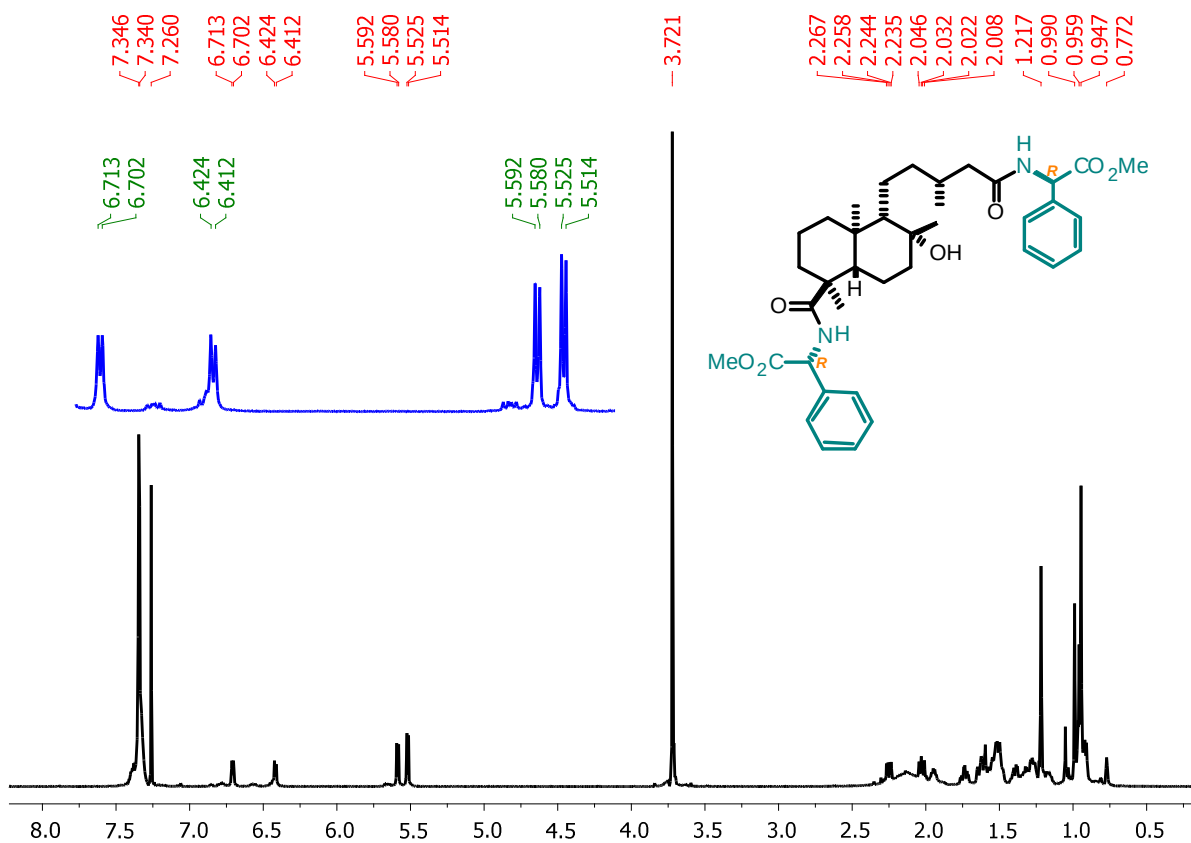
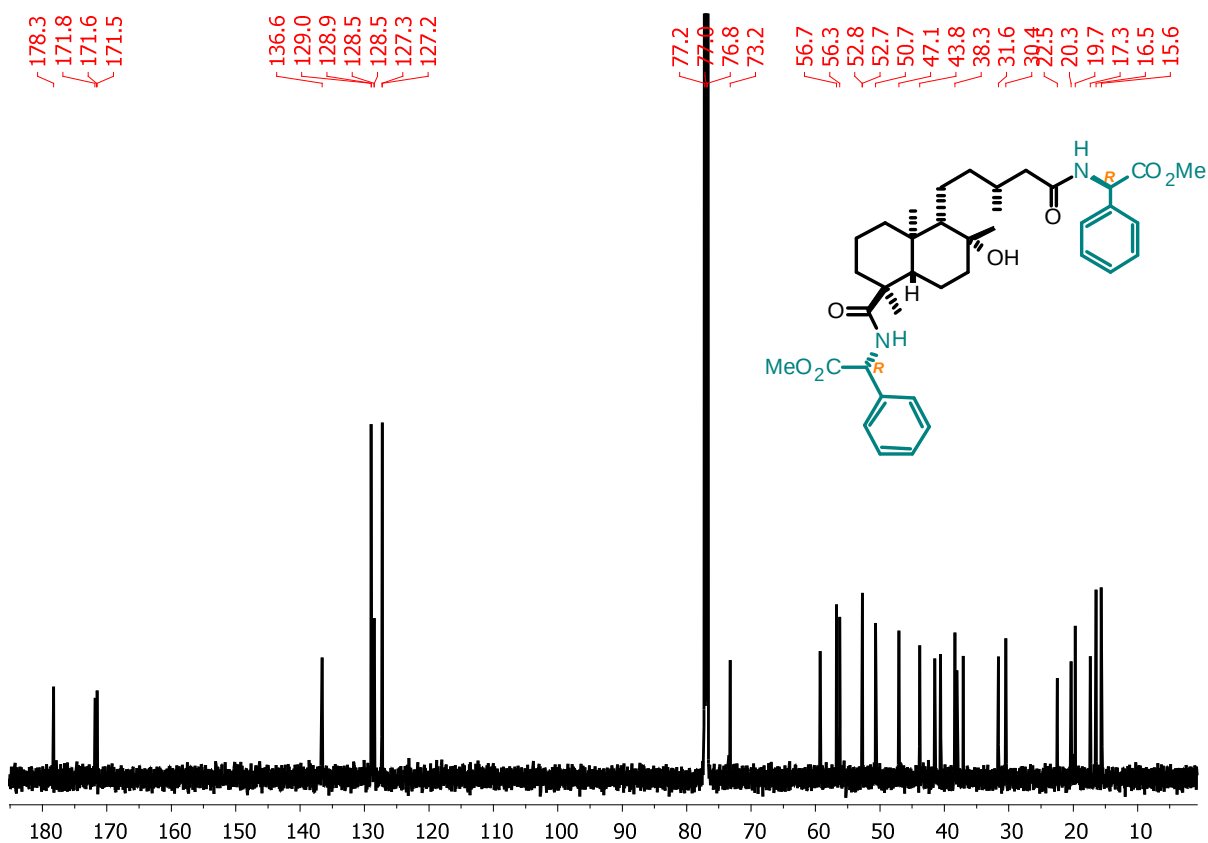
Figura 168 - Espectro de RMN de ^1H de **4a** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 169 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4a** (CDCl_3 , 151 MHz).

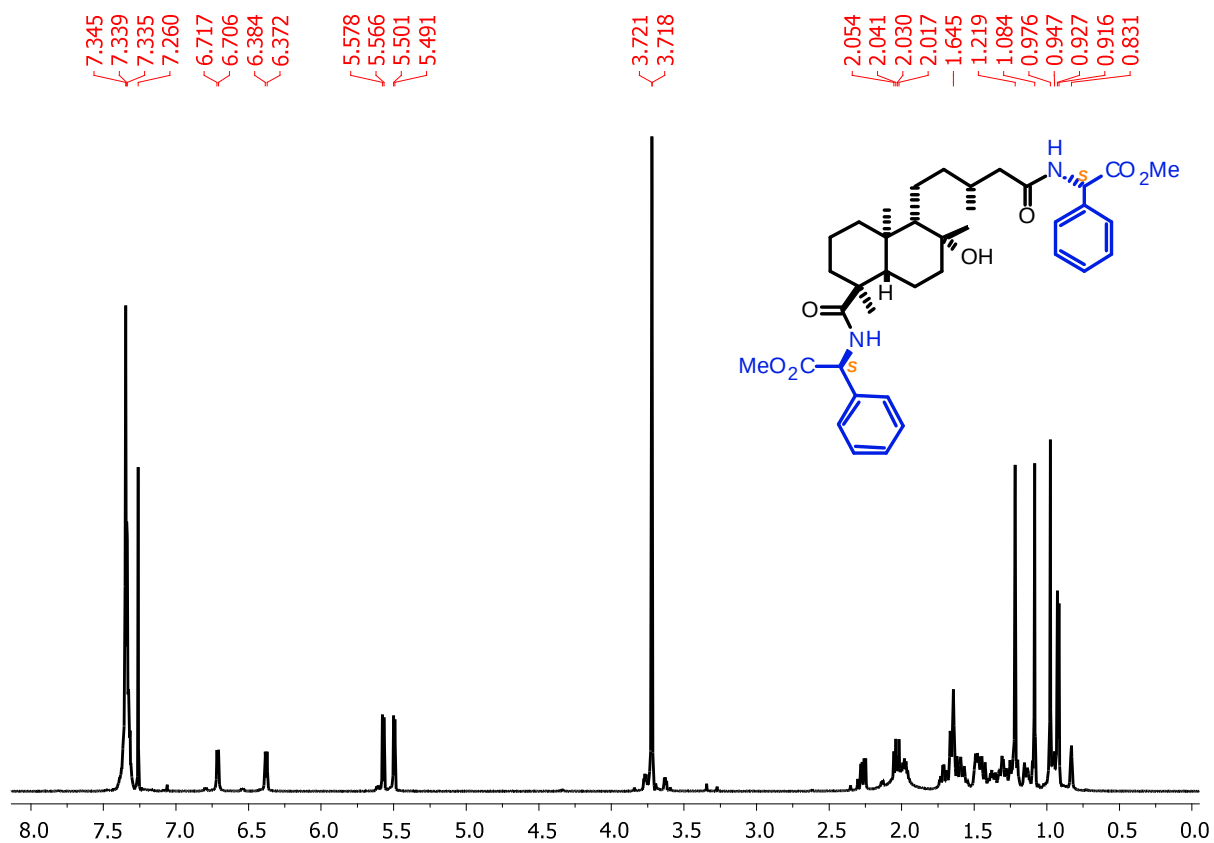
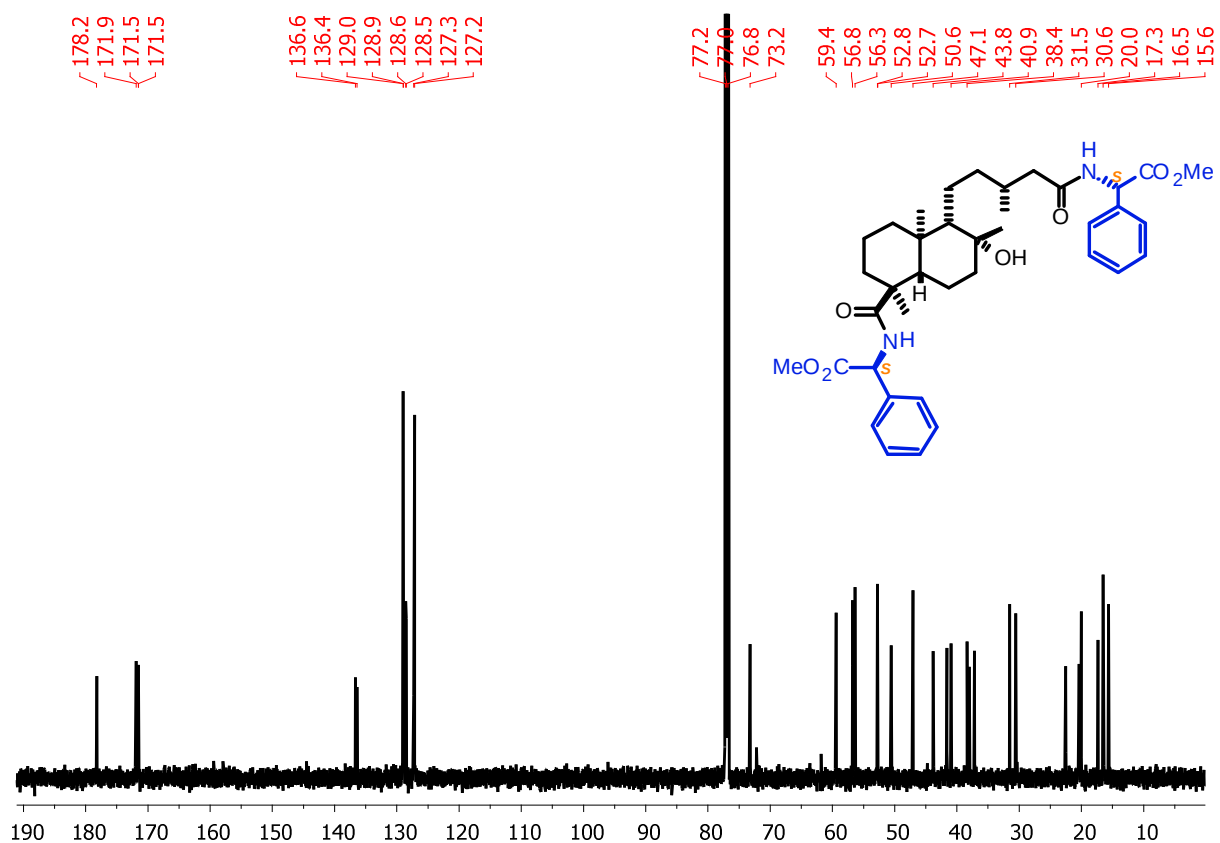
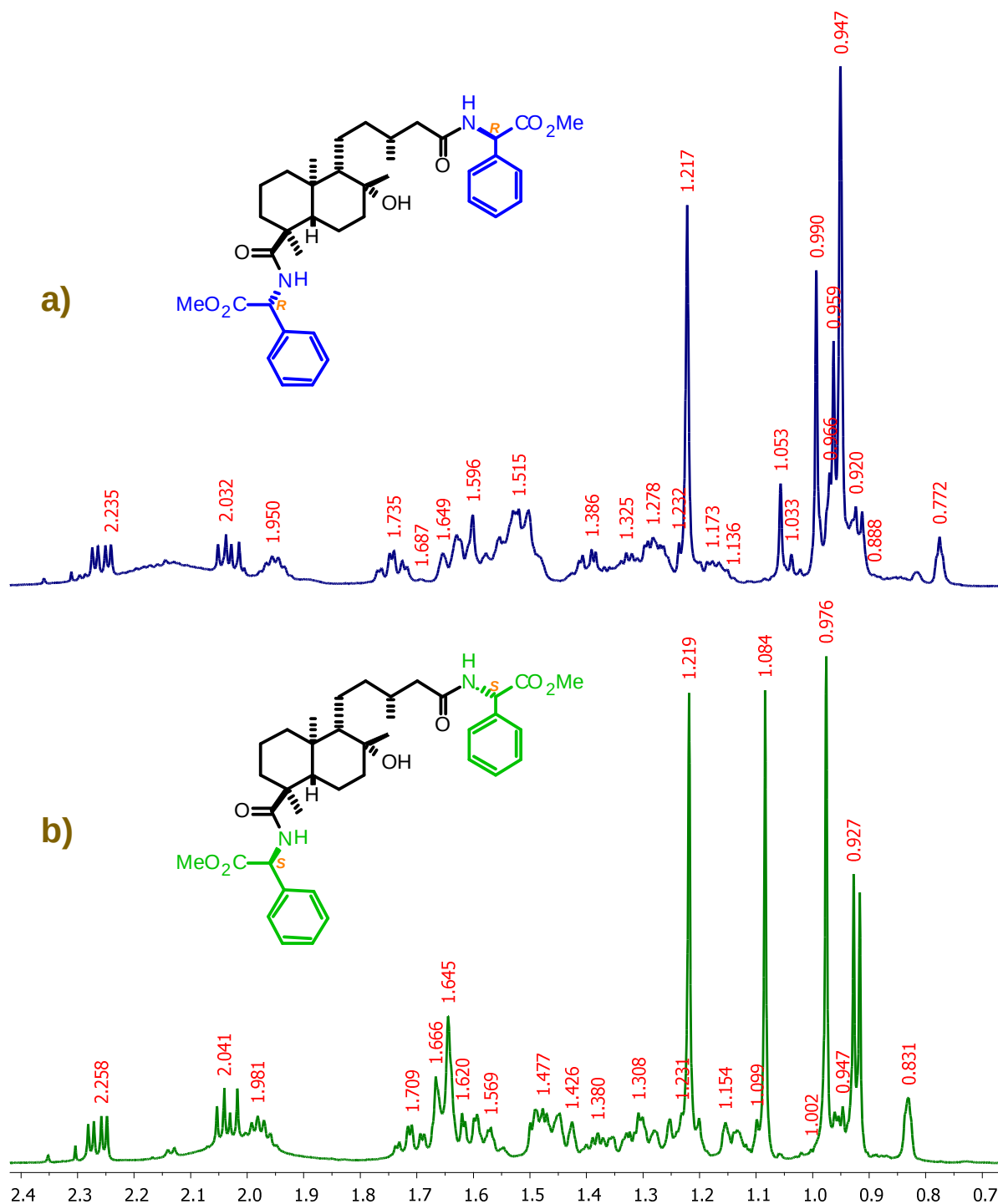
Figura 170 - Espectro de RMN de ^1H de **4b** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 171 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4b** (CDCl_3 , 151 MHz).

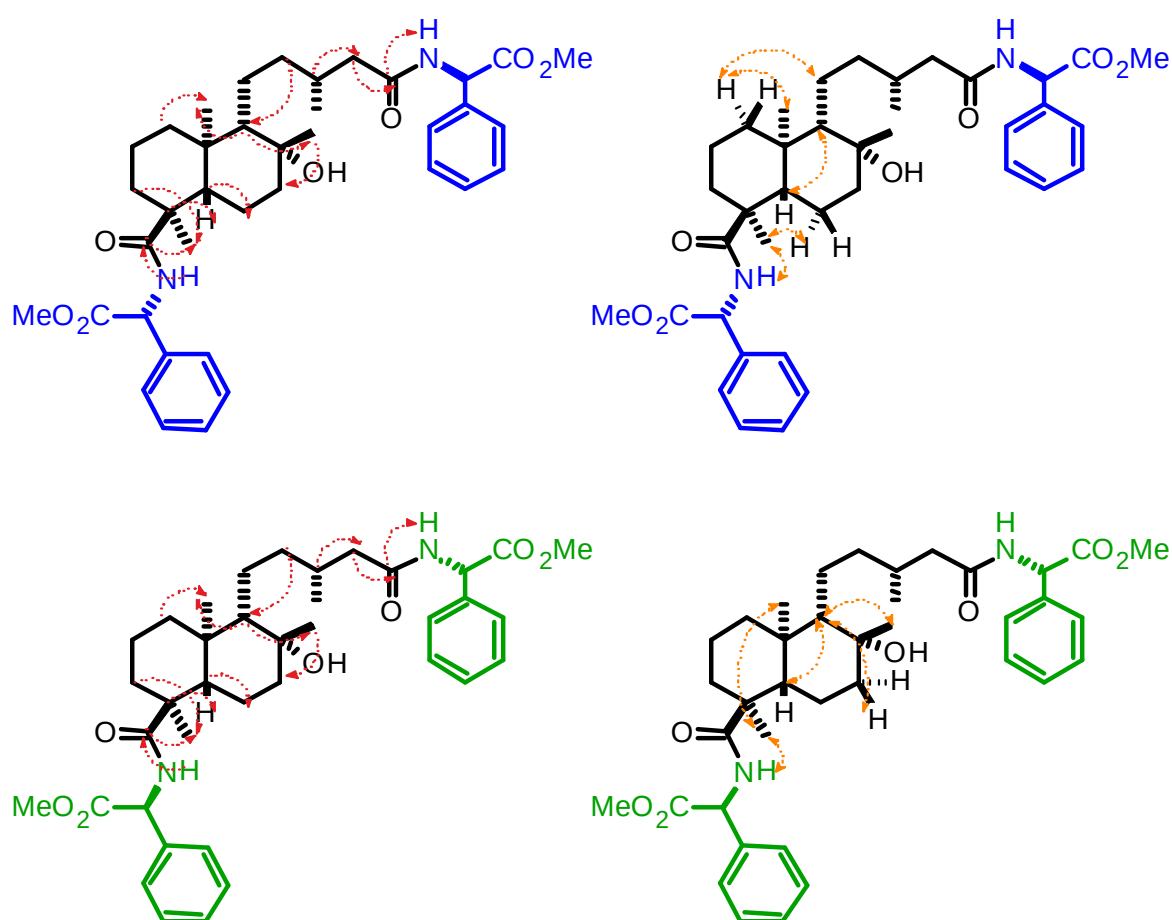
Figura 172 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H de a) **4a** e b) **4b** (CDCl_3 , 600 MHz).



Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (figuras 168-172, p. 200-202) de **4a** e **4b** mostraram sinais condizentes com os dos produtos esperados (tabela 11, p. 194). Nos espectros de RMN de ^1H , destacaram-se os sinais atribuídos aos hidrogênios amídicos [**4a**: δ 6,42 (d, J = 7,2 Hz) e 6,71 (d, J = 6,6 Hz) e **4b**: δ 6,38 (d, J = 7,1 Hz) e 6,71

(d , $J = 6,5$ Hz)], enquanto que nos espectros de RMN ^{13}C se destacaram os sinais referentes aos carbonos carboxílicos [**4a**: δ 178,3, 171,8, 171,6, 171,5 e **4b**: δ 178,5, 171,9, 171,5, 171,5]. As formações das ligações amídicas foram confirmadas pelas correlações observadas nos mapas de contornos entre os $\text{C}_\text{s-15}$ e $\text{C}_\text{s-18}$ com os hidrogênios amídicos, bem como pelas correlações a longa distância observadas entre essas carboxilas e os respectivos hidrogênios das posições α e β (figura 173, p. 203).

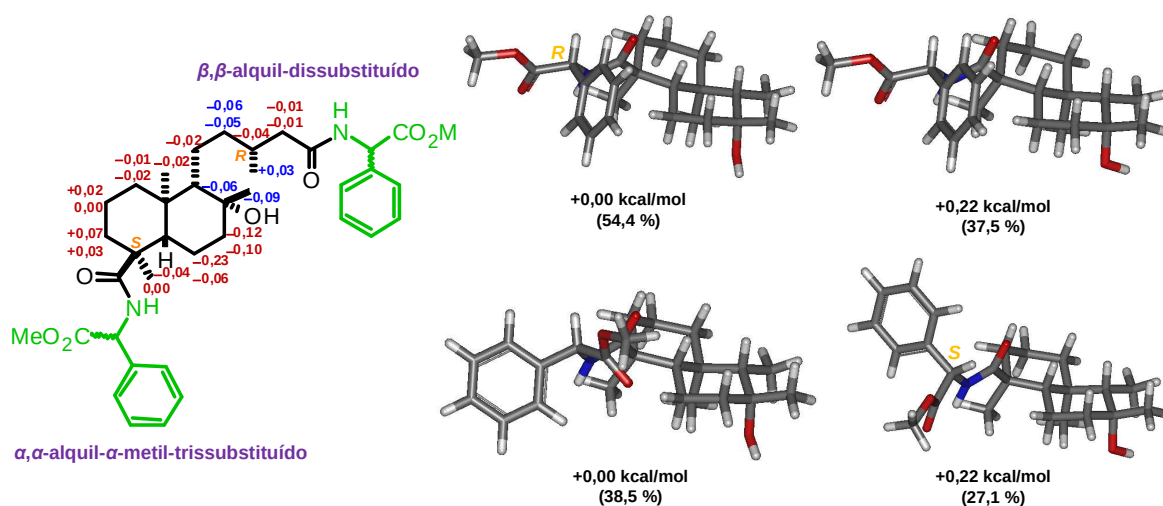
Figura 173 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas.



Como mostrado na figura 174, p. 204, quando se calculou os valores de $\Delta\delta$ a partir dos dados espectrométricos de RMN de ^1H de **4a** e **4b**, verificou-se uma distribuição consistente dos sinais + e -. Entretanto, é importante salientar que a esterificação da carboxila-18 resultou na formação de um grupo amídico α,α -alquil- α -metil-trissubstituído, enquanto que a reação de substituição nucleofílica na carboxila-15 levou a formação de um grupo amídico β,β -alquil-dissubstituído. Sendo assim, calcu-

laram-se os valores de $\Delta\delta(\delta R-\delta S)$ e $\Delta\delta(\delta S-\delta R)$. Além disto, destaca-se que foram efetuados estudos conformacionais com as moléculas-modelo **M10** e **M11**, afim de compreender o comportamento conformacional de derivados α,α -alquil- α -metil-trissubstituído, os quais não foram estudados por Yabucchi e Kusumi (2000).¹⁶³ Neste trabalho, constatou-se que o equilíbrio conformacional em derivados α,α -alquil- α -metil-trissubstituído foi muito similar ao previamente proposto para derivados de ácidos carboxílicos α,α -substituídos, já que somente diferenças mínimas foram observadas, quando se comparou entre si os arranjos geométricos dos confôrmeros de menor energia (figura 174, p. 204).

Figura 174 - Valores de $\Delta\delta(\delta R-\delta S)$, calculados a partir dos dados de RMN de ^1H de **4a e **4b**. Confôrmeros de menor energia de **4a** (*R*) e **4b** (*S*).**

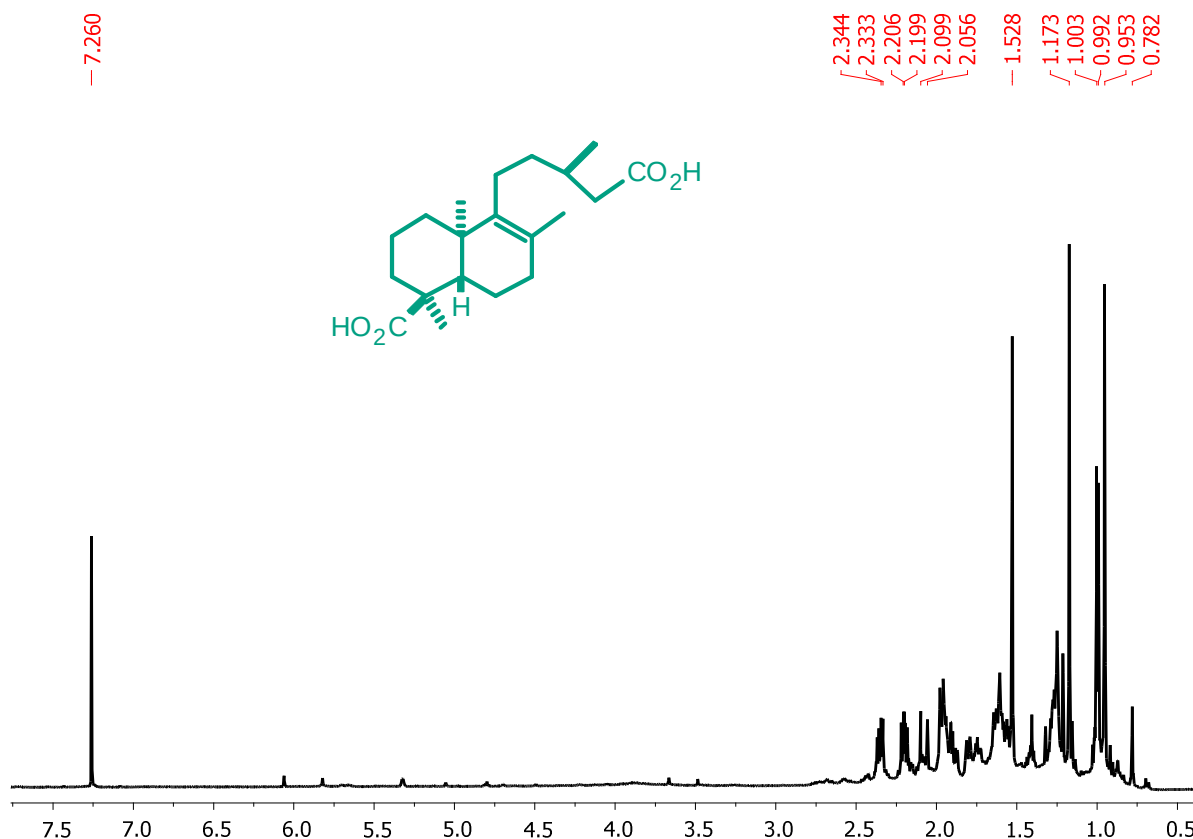


Segundo um levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados Scopus, Web of Science e Chemical Abstracts, este está sendo o primeiro relato da aplicação do método PGME para a determinação da configuração absoluta de um ácido dicarboxílico. Portanto, torna-se necessário discutir alguns pontos. Primeiramente, destaca-se que os sítios de reação se encontravam distantes um do outro, o que atenuou o efeito que uma fenila exerceu sobre os hidrogênios próximos da outra fenila. Essa conjectura foi ratificada por meio de uma comparação dos valores de $\Delta\delta(\mathbf{1c-1d})$ com os $\Delta\delta(\mathbf{4a-4b})$. Ressalta-se ainda que, na etapa de determinação da configuração em C-13 de **1**, já havia sido constatado que a fenila exercera pouco efeito sobre os des-

locamentos químicos dos H_s-1, H_s-2, H_s-3, H_s-6, H_s-7, H_s-18, H_s-19 e H_s-20. Portanto, os efeitos anisotrópicos exercidos sobre esses hidrogênios nos derivados **4a** e **4b** foram, basicamente, provenientes do efeito anisotrópico do anel benzênico ligado ao C-2". De modo similar, observou-se que o efeito do grupo fenílico ligado ao C-2" sobre os hidrogênios da Me-16 e sobre os H_s-11 e H_s-12 foi insignificante ou apenas ameno. Isso permitiu concluir que o efeito individual da fenila ligada ao C-2' daria valores de $\Delta\delta(\delta_R - \delta_S)$ negativos para os H_s-12 e positivo para os hidrogênios da Me-17. Por conseguinte, as configurações em C-4 e C-13 de **4** foram inequivocamente estabelecidas como sendo *S* e *R*, respectivamente.²⁹¹ Por fim, destaca-se que a configuração absoluta estabelecida para o diterpeno **4** está intimamente relacionada a do diterpeno **1**, porquanto foi mostrado que o ácido dicarboxílico **4** também pertencia a série *ent* e apresentava uma configuração *R* em C-13. Tal resultado, exatamente como a atividade inseticida observada para **1** sugeriu, foi uma evidência relevante a favor da suposição que **4** seja um produto da metabolização de **1** por lagartas de *B. polydamas*.

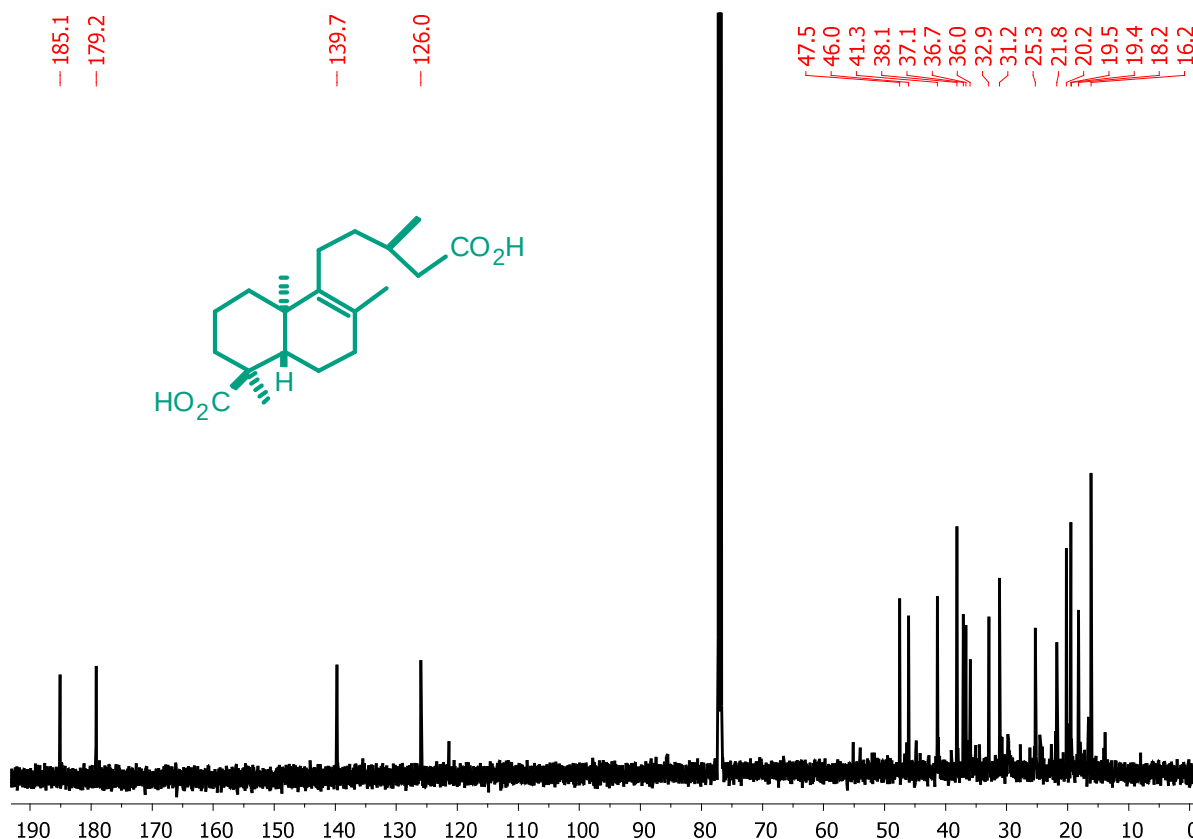
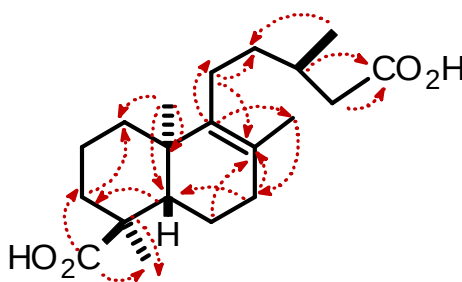
O diterpeno dicarboxílico **4**, quando foi mantido em solução de CDCl₃ até a completa evaporação do solvente, também sofreu reação de desidratação. Todavia, somente um produto de desidratação foi obtido nesta etapa, **4c**. No espectro de RMN de ¹H de **4c** foram, entre outros sinais, observados três singletos em δ 1,52, 1,17 e 0,95, um dubleto em δ 1,00 (*J* = 6,7 Hz) e dois duplos dubletos em δ 2,35 (*J* = 15,2 e 6,5 Hz) e 2,20 (*J* = 15,2 e 7,6 Hz), os quais foram atribuídos a três grupos metílicos, a um grupo metílico ligado a carbono *sp*² e a dois hidrogênios diastereotópicos α -carboxílicos, respectivamente. Já no espectro de RMN de ¹³C observaram-se vinte sinais, dos quais, com o auxílio dos espectros de DEPT 135° e gHSQC, dois foram atribuídos a carbonos carboxílicos, dois a carbonos olefínicos de uma ligação dupla tetrasubstituída, três a carbonos metílicos alifáticos, um a carbono metílico ligado a carbono *sp*², dois a carbonos quaternários, dois carbonos a carbonos metínicos e oito a carbonos metilênicos (figuras 175-177, p. 206 e 207).

Assim, baseando-se nessas informações e em análises dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C uni- e bidimensionais, bem como na comparação dos dados espectrométricos obtidos com os de modelos disponibilizados na literatura²⁹², a substância **4c** foi caracterizada como sendo o ácido (4*S*,5*S*,10*R*,13*R*) labd-8(9)-en-15,19-dióico, para o qual não se encontrou relato na literatura (tabela 12, p. 206).

Figura 175 - Espectro de RMN de ^1H de **4c** (CDCl_3 , 600 MHz).Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **4c** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1 _{eq}	36,0	1,80 <i>dtl</i> , $W_{1/2}$ 12,2 e 4,0	13	31,2	1,95 <i>m</i>
1 _{ax}		1,25 <i>m</i>			
2	18,2	1,60 <i>m</i> (2Hs)	14	41,3	2,35 <i>dd</i> , 15,1 e 6,5 2,20 <i>dd</i> , 15,1 e 7,6
3 _{eq}	36,7	1,62 <i>m</i> *	15	179,2	–
3 _{ax}		1,75 <i>m</i> *			
4	47,5	–	16	19,5	1,00 <i>d</i> , 6,7
5 _{ax}	46,0	1,97 <i>dd</i> , 12,7** e 1,5**	17 _{eq}	19,4	1,52 <i>s</i>
6	21,8	1,57 <i>comp</i> 1,28 <i>m</i>	18 _{eq}	185,1	–
7 _{eq}	32,9	2,09 <i>m</i>	19 _{ax}	16,2	1,17 <i>s</i>
7 _{ax}		1,90 <i>td</i> , $W_{1/2}$ 17,8 e 6,4	20 _{ax}	20,2	0,95 <i>s</i>
8	126,0	–			
9 _{ax}	139,7	–			
10	38,1	–			
11	25,3	1,93 <i>m</i> (2Hs)			
12	37,1	1,41 <i>m</i> 1,27 <i>m</i>			

comp=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente; *multiplicidade determinada com auxílio do programa FOMSC3. *Posição axial e equatorial definida por comparação dos valores de deslocamento químico com os do produto natural (**4**). **O valor provavelmente está aproximado devido a sobreposição com os sinais. Multiplicidade em itálico. Número de hidrogênios entre parênteses. 2Hs=Dois hidrogênios.

Figura 176 - Espectro de RMN de ^{13}C de **4c** (CDCl_3 , 151 MHz).Figura 177 - Correlações a longa distância (selecionadas) observadas no mapa de contornos gHMBC de **4c** (CDCl_3 , 14,1 T).

4.4.2.2 Atividade antipredatória

Neste trabalho, verificou-se que as lagartas de *B. polydamas* sequestraram as lignanas kusunoquinina (**2**) e hinoquinina (**8**), bem como se determinou que cada lagarta de 5º instar armazenou aproximadamente 1 mg do diterpeno dicarboxílico **4**. Isso sugeriu que essas micromoléculas poderiam mediar interações ecológicas. Para investigar essa hipótese, as substâncias **1**, **2** e **4** foram testadas em bioensaios de

antipredação, para os quais se selecionaram, como predadores em potencial, os seguintes organismos: i) filhotes de *G. gallus domesticus* e ii) formigas da espécie *C. crassus*, as quais têm sido frequentemente observadas predando lagartas de lepidópteros.^{40,293} Já os filhotes de *G. gallus domesticus* foram escolhidos como predadores, sobretudo, devido a observações anteriores em que estes rejeitaram lagartas da borboleta *B. polydamas*.^{293,294}

Inesperadamente, nenhuma das substâncias testadas exibiu atividade biológica, uma vez que estas não impediram a predação de larvas liofilizadas de *T. molitor* por *G. gallus domesticus* e *C. crassus*. Portanto, as funções ecológicas desses metabólitos ainda não estão claras e será, portanto, necessário avaliá-las mais minuciosamente. Entretanto, os resultados obtidos sugeriram novos questionamentos e hipóteses:

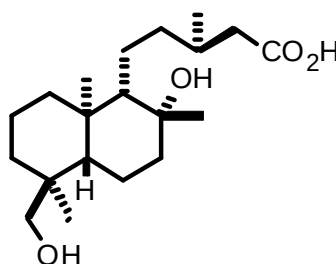
- Seriam as substâncias **2**, **4** e **8**, as quais foram armazenadas em grande quantidade por *B. polydamas*, responsáveis pela defesa química contra parasitóides ou microorganismos?
- O fato do galináceo ser um animal generalista poderia ter mascarado o efeito fisiológico exercido pelas substâncias **2** e **4**?
- As especificidades das substâncias testadas as tornam inativas para organismos para os quais estas não foram estocadas?
- Como sugerido por Morais *et al.* (2013), a defesa química de lagartas de *B. polydamas* é mais complexa do que se imaginou, e estas são impalatáveis devido a misturas de compostos que atuam de forma sinérgica?

Estudo anterior com AAs, os quais não evitaram a predação de larvas de *T. molitor* por filhotes de *G. gallus domesticus* e formigas da espécie *C. crassus*⁴⁰, mostrou que estes impediram o ataque de lagartas de *B. phyllenor* pelo parasitóide *Trogus pennator*.¹⁵⁵ Segundo Greeney, Dyer e Smilanich (2012)¹³⁶, parasitismo é o principal motivo da mortalidade da maioria dos insetos que se alimentam de plantas. O parasitóide mais comum de lagartas de *B. polydamas* é o da espécie *Areoscelis rufas* (figura 28, p. 65). Neste sentido, destaca-se que se observou parasitismo por *A. rufas* em algumas das lagartas criadas para os estudos de biotransformação. No entanto, é importante salientar que, embora os números de vespas parasitóides e de lagartas não foram contabilizados com precisão, verificou-se uma taxa de parasitis-

mo relativamente baixa, uma vez que apenas cerca de 10 vespas parasitóides emergiram das ~300 crisálidas obtidas durante todo o período de criação das lagartas.

Apesar das funções ecológicas das substâncias contidas nas lagartas de *B. polydamas* não terem sido elucidadas neste trabalho, é digno de nota mencionar que este está sendo o primeiro relato da ocorrência das substâncias **2**, **4** e **8** em imaturos da borboleta *B. polydamas*. Interessantemente, foi previamente relatado que as lignanas **2** e **8** exibiram atividades inseticida e antialimentar, respectivamente.^{80,81} Desse modo, seria pelo menos razoável propor que *B. polydamas* pode tolerá-las, porém, os parasitóides podem ser susceptíveis a esses dímeros C6-C3. Paradoxalmente, o provável produto – diterpeno **4** – de bioconversão de **1** também foi armazenado pelas lagartas de *B. polydamas*. Isso apontou quão racionais, arquitetados e inteligentes são os processos envolvendo interações em sistemas tritróficos, planta, inseto e inimigos naturais do inseto, uma vez que foi evidenciado que as lagartas de *B. polydamas* são especializadas para superar as barreiras químicas impostas pela planta e, ao mesmo tempo, para aproveitar parte do produto obtido em benefício próprio.

4.4.3 Ácido 8 β ,18 α -dihidroxi-labdan-15-óico (**3**)



O diterpeno **3** (33,9 mg) foi obtido na subfração Ba-1G, conforme descrito no item 3.7.1, p. 71. Esse diterpeno foi obtido em mistura com diversos compostos minoritários, inclusive em mistura com **4** e algumas lignanas. O espectro de RMN de ¹H da substância **3** (figuras 178-182, p. 210-212) foi similar ao do ácido dicarboxílico **4**, e as principais diferenças foram: I) o sinal em δ 1,12 (Me-19), o qual foi observado no espectro de **4**, foi substituído por um sinal em δ 0,70 e II) dois dubletos em δ 3,04 e 3,36, com constante de acoplamento de $J = 11$ Hz, foram observados somente no espectro de **3**. Poucas diferenças foram também verificadas comparando-se os es-

pectros de RMN de ^{13}C de **3** e **4**. A diferença mais notável é a ausência, no espectro de **3**, de um sinal em δ 185,0 (C-18 de **4**) e o aparecimento de um sinal em δ 71,9, atribuível a um carbono metilênico carbinólico (figuras 178-182, p. 210-212). Além disto, conforme mostrado na figura 55, o diterpeno **3** mostrou no espectro de massas um pico com 14 u a menos do que o de **4**.

Assim sendo, sugeriu-se que **3** seria um análogo de **4** contendo um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ no lugar do grupo $-\text{CO}_2\text{H}$. Essa proposta foi confirmada mediante análise dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais (DEPT, gHSQC, gHMBC, gCOSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ e gNOESY 1D) de **3** (tabela 13, p. 213). Os dados espectrométricos obtidos para **3** foram condizentes com os de uma configuração relativa para o seu sistema decalínico igual às dos diterpenos **1** e **4**. Além disto, os deslocamentos químicos observados para os grupos metilênico carbinólico e metílico ligados ao C-4 foram compatíveis com os de um grupo metílico ocupando uma posição axial. Logo, o outro grupo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, estaria em equatorial. Portanto, a blindagem observada para o C-5 foi interpretada como sendo devido ao efeito γ -gauche e não à inversão da configuração em C-9, exatamente como se discutiu para o diterpeno **4**.

Figura 178 - Espectro de RMN de ^1H de **3** (CDCl_3 , 600 MHz).

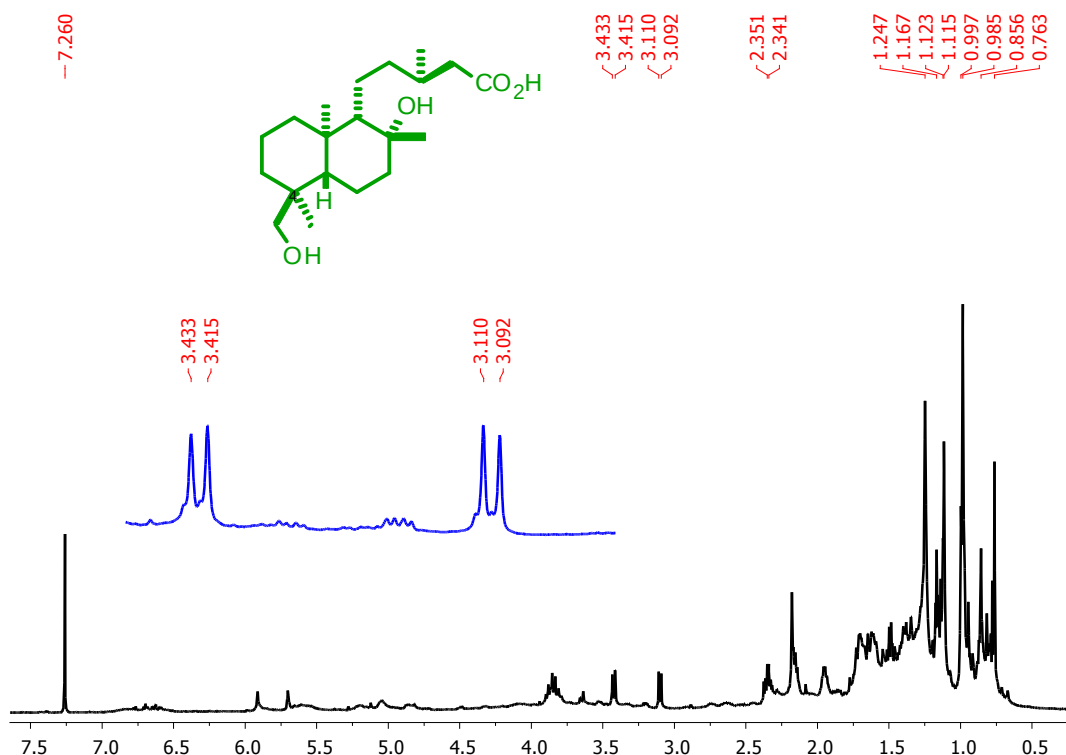


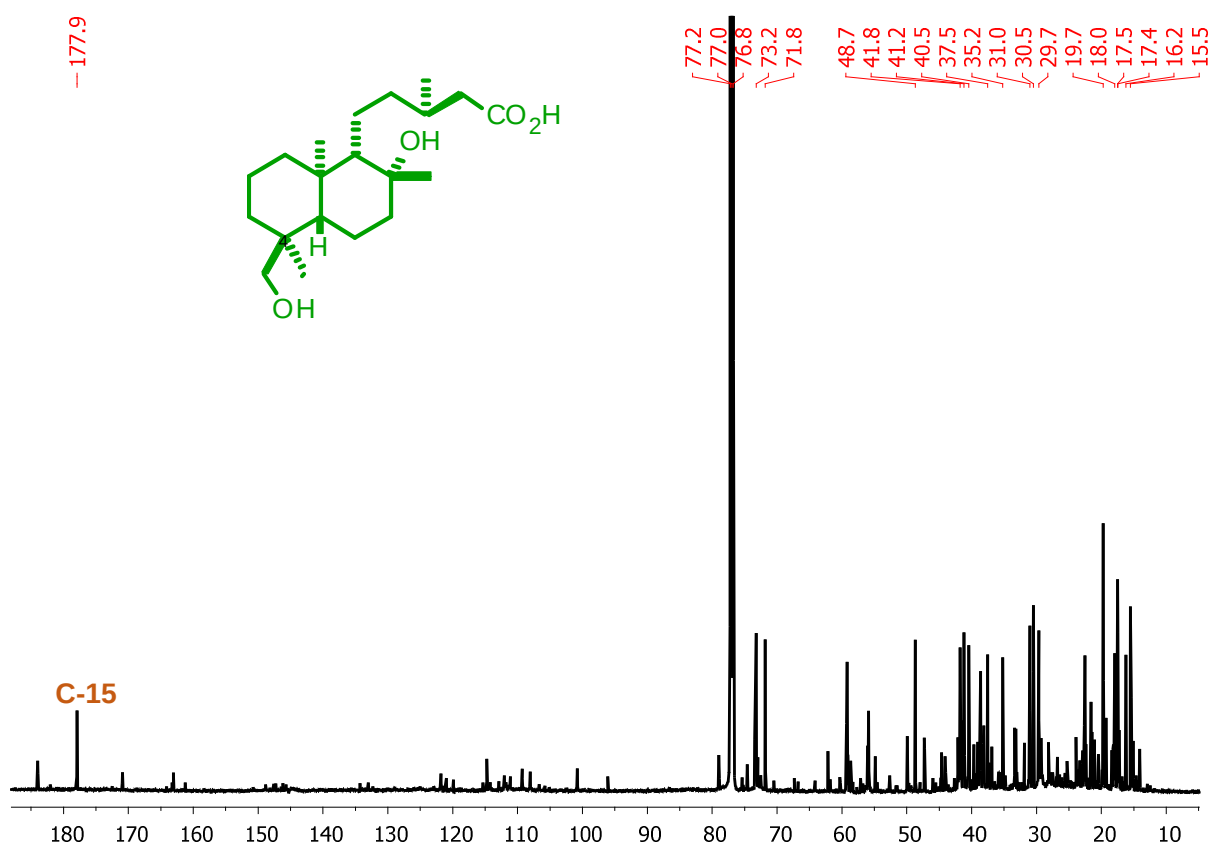
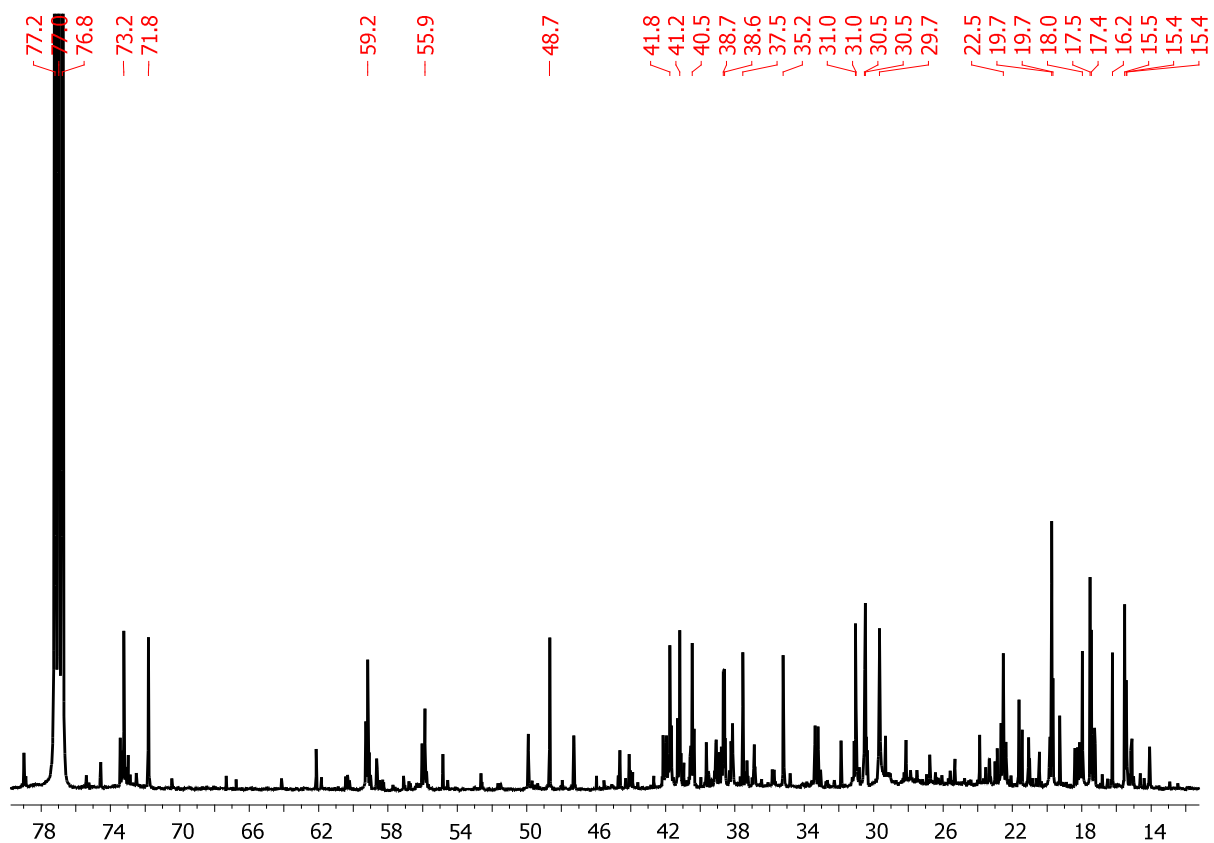
Figura 179 - Espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 151 MHz).Figura 180 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 151 MHz).

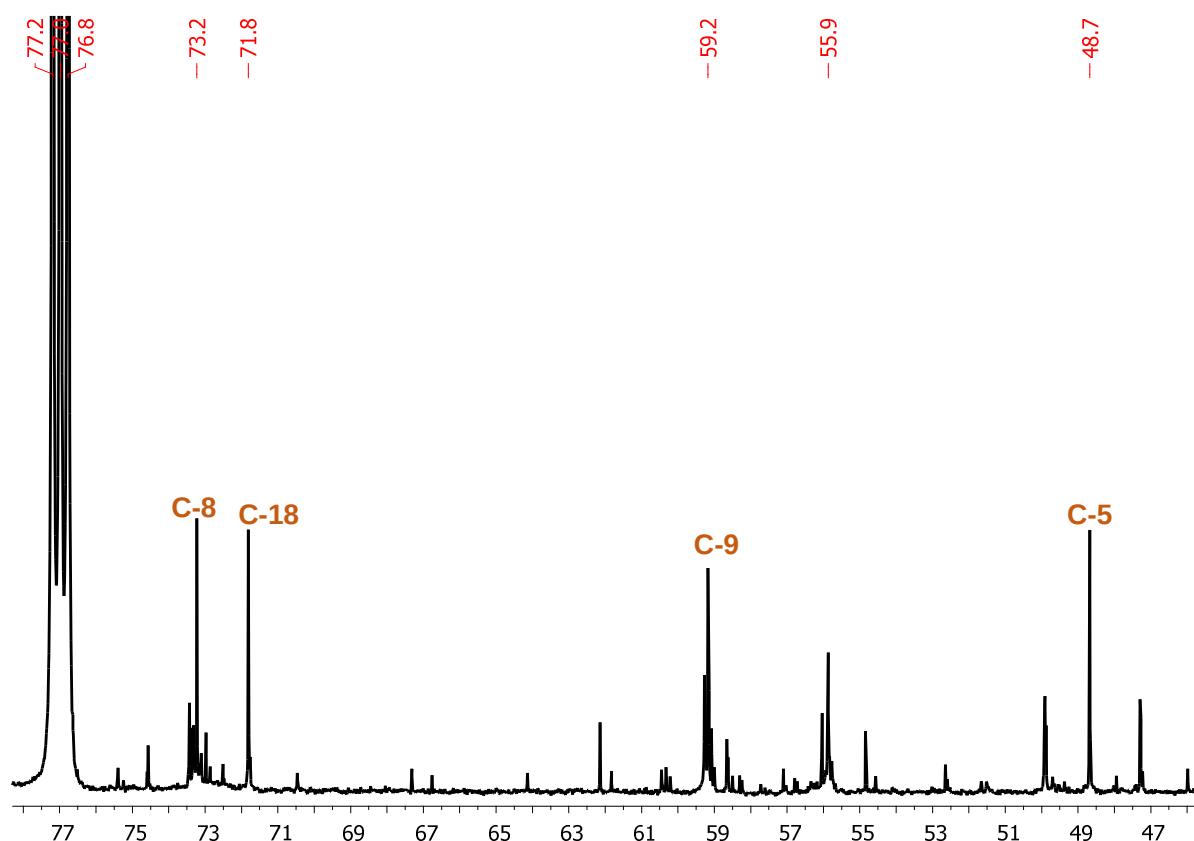
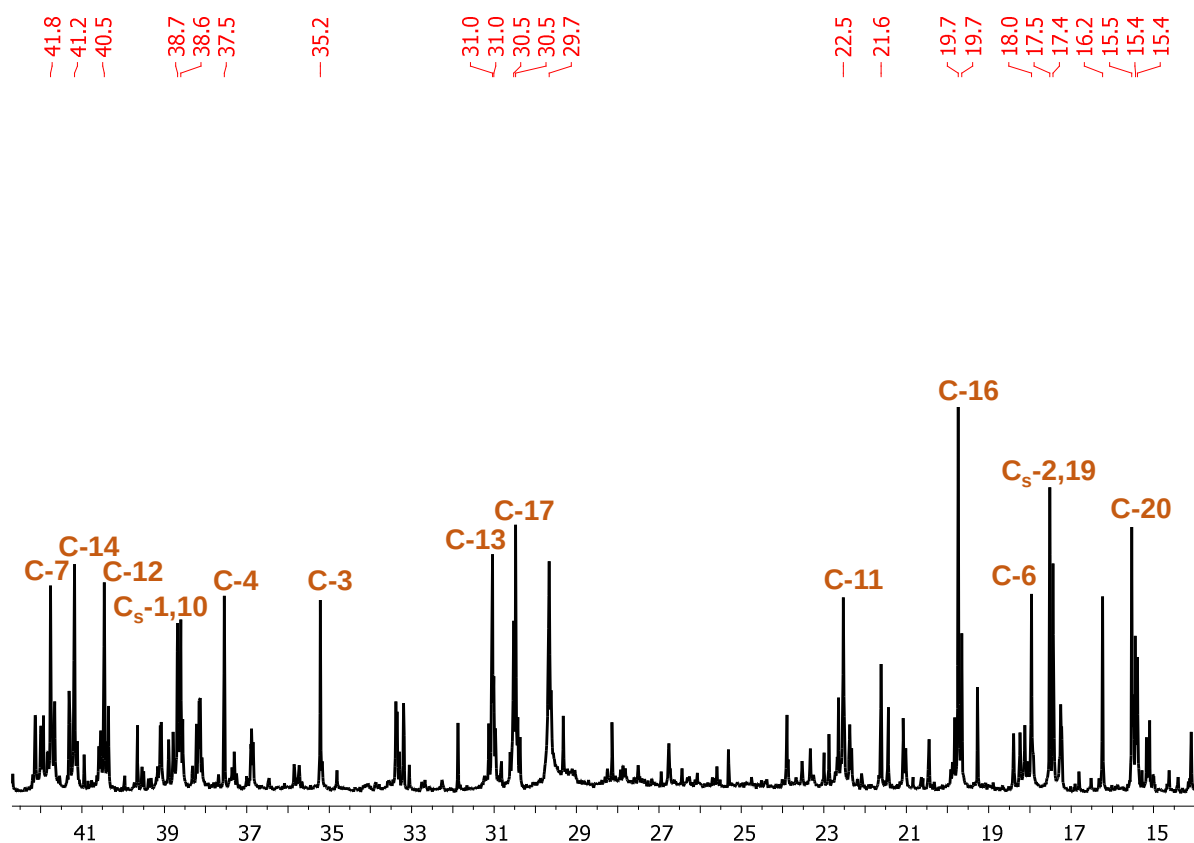
Figura 181 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 151 MHz).**Figura 182** - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 151 MHz).

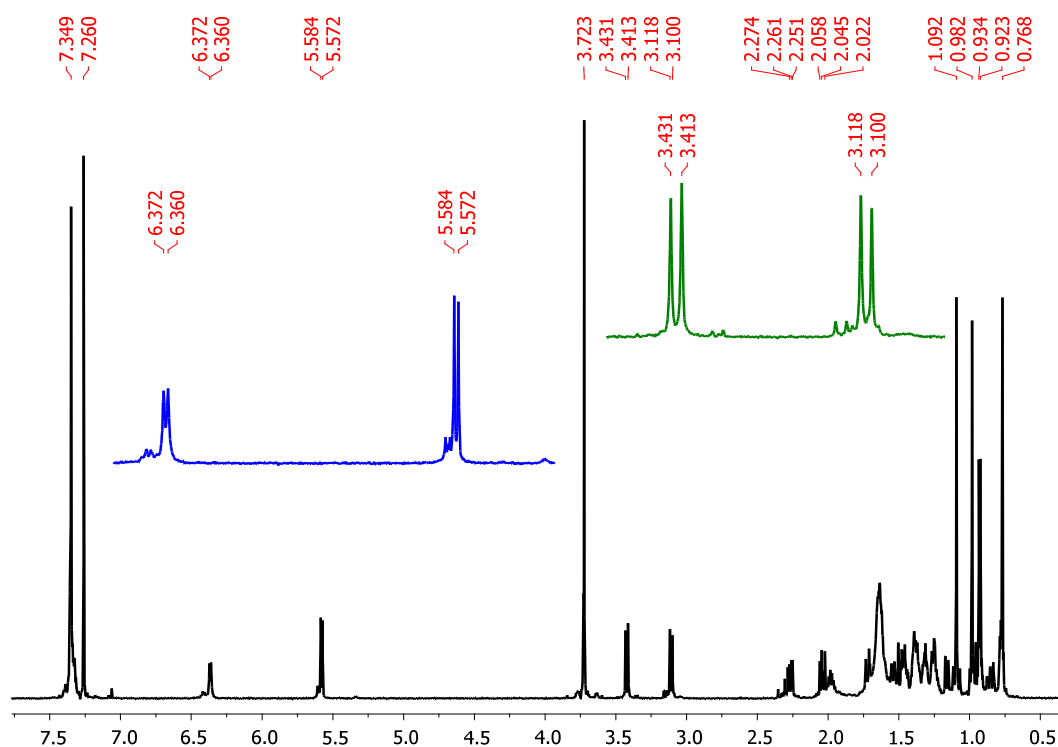
Tabela 13- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **3**, **3b** e **20** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	3§		3b§		20‡	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 _{eq}	38,7	1,64 <i>m</i>	38,7	1,64 <i>m</i>	40,0	1,70 <i>comp</i>
1 _{ax}		0,85 <i>comp</i>		0,85 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,4 e 3,7		0,88 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 12,7 e 3,2
2 _{eq}	17,4	1,47 <i>m</i>	17,4	1,46 <i>m</i>	18,5	1,43 <i>m</i>
2 _{ax}		1,62 <i>m</i>		1,63 <i>m</i>		1,66 <i>qt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,4 e 3,5
3 _{eq}	35,2	1,24 <i>m</i>	35,3	1,26 <i>m</i>	36,2	1,20 <i>m</i>
3 _{ax}		1,39 <i>m</i>		1,38 <i>m</i>		1,54 <i>comp</i>
4	37,5	–	37,6	–	38,4	–
5 _{ax}	48,7	1,16 <i>comp</i>	48,8	1,16 <i>dd</i> , 12,1 e 1,8	49,5	1,29 <i>dd</i> , 12,3* e 1,9
6 _{eq}	18,0	1,39 <i>m</i>	18,0	1,38 <i>m</i>	18,9	1,40 <i>m</i>
6 _{ax}		1,52 <i>m</i>		1,54 <i>qd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,7 e 3,2		1,59 <i>comp</i>
7 _{eq}	41,8	1,71 <i>m</i>	41,8	1,72 <i>dt ap</i> , $W_{1/2}$ 13,2 e 3,0	43,2	1,68 <i>comp</i>
7 _{ax}		1,49 <i>m</i>		1,45 <i>comp</i>		1,45 <i>comp</i>
8	73,2	–	73,0	–	72,6	–
9 _{ax}	59,2	0,78 <i>comp</i>	59,3	0,78 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 3,2	60,7	0,74 <i>dd</i> , 4,6 e 2,6
10	38,6	–	38,6	–	39,6	–
11	22,5	1,33 <i>m</i> (2Hs)	22,6	1,31 <i>m</i> (2Hs)	23,2	1,51 <i>m</i> ; 1,31 <i>m</i>
12	40,5	1,41 <i>m</i> ; 1,24 <i>m</i>	41,0	1,37 <i>m</i> ; 1,23 <i>m</i>	42,2	1,41 <i>m</i> ; 1,21 <i>m</i>
13	31,0	1,95 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,3	31,6	1,98 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,5	31,4	1,60 <i>m</i>
14	41,2	2,36 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 15,1 e 6,1; 2,16 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 15,1 e 7,8	43,9	2,26 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 13,9 e 6,1; 2,04 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 13,9 e 7,9	40,8	1,62 <i>m</i> 1,32 <i>m</i>
15	177,9	–	171,9	–	60,7	3,53-3,63 <i>m</i> (2Hs)
16	19,7	0,98 <i>comp</i>	20,0	0,93 <i>d</i> , 6,5	20,2	0,92 <i>d</i> , 6,7
17 _{eq}	30,5	1,12 <i>s</i>	30,6	1,09 <i>s</i>	31,4	1,11 <i>s</i>
18 _{eq}	71,8	3,42 <i>d</i> , 10,9; 3,10 <i>d</i> , 10,9	72,0	3,42 <i>d</i> , 10,9; 3,11 <i>d</i> , 10,9	71,8	3,37 <i>dd</i> , 10,6 e 5,5; 3,00 <i>dd</i> , 10,6 e 5,7
19 _{ax}	17,5	0,76 <i>s</i>	17,5	0,77 <i>s</i>	18,2	0,75 <i>s</i>
20 _{ax}	15,5	0,98 <i>s</i>	15,5	0,98 <i>s</i>	16,2	1,03 <i>s</i>
NCHPh	–	–	56,3	5,58 <i>d</i> , 7,1	–	–
CO ₂ Me	–	–	171,5	–	–	–
OMe	–	–	52,8	3,72 <i>s</i>	–	–
Ph-1'	–	–	136,4	–	–	–
Ph-2',6'	–	–	127,3	7,35 <i>m</i> (2Hs, AA'BB'C)	–	–
Ph-3',5'	–	–	129,0	7,35 <i>m</i> (2Hs, AA'BB'C)	–	–
Ph-4'	–	–	128,6	7,33 <i>m</i> (1Hs, AA'BB'C)	–	–
NH	–	–	–	6,36 <i>d</i> , 7,1	–	–
OH (C-8)	–	–	–	–	–	2,72 <i>s</i>
OH (C-15)	–	–	–	–	–	3,34 <i>tl</i> , $W_{1/2}$ 5,2
OH (C-18)	–	–	–	–	–	3,50 <i>dd</i> , 5,7 e 5,5

§ CDCl₃; ‡(CD₃)₂CO; *comp*=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente; *O valor provavelmente está aproximado devido a sobreposição parcial com outro sinal. Multiplicidade em Itálico. Número de hidrogênios e sistema de *spin* entre parênteses.

O diterpeno **3** também foi derivatizado com os reagentes quirálicos anisotrópicos *R*- e *S*-PGME, mas somente o derivado *S*-PGME (**3b**) foi isolado com pureza espectral, porquanto o derivado *R*-PGME degradou durante a evaporação no rota evaporador do solvente da fração coletada no CLAE. Desse modo, não foi possível determinar a configuração em C-13 de **3** pelo método PGME utilizando-se a abordagem tradicional baseada em valores de $\Delta\delta(\delta R - \delta S)$. Destaca-se, porém, que a obtenção do derivado **3b** permitiu confirmar a estrutura proposta para **3**, refinar a atribuição dos deslocamentos químicos feita para **3** e ratificar, por experimentos de RO-ESY 2D e análises sistemáticas das constantes de acoplamento homonucleares ^1H - ^1H , a configuração relativa do sistema decalínico de **3** (figuras 183-188, p. 214,215).

Figura 183 - Espectro de RMN de ^1H de **3b** (CDCl_3 , 600 MHz).



Embora os valores de $\Delta\delta(\delta R - \delta S)$ não puderam ser calculados, uma comparação dos dados espectrométricos de RMN de **3b** com os de **1c**, **1d**, **4a** e **4b** sugeriu que a configuração em C-13 de **3b** também era *R*. Neste sentido, observou-se que, quando a configuração em C-13 era *R*, nos derivados *S*-PGME os hidrogênios das Me_{s-16} estavam mais blindados que nos derivados *R*-PGME, **1c**: δ 0,96 versus **1d**: δ 0,92 e **4a**: δ 0,95 versus **4b**: δ 0,92, respectivamente. Por outro lado, constatou-se que os carbonos da Me_{s-16} eram mais desprotegidos nos derivados *S*-PGME do que nos *R*-PGME, **1c**: δ 19,7 versus **1d**: δ 19,9 e **4a**: δ 19,7 versus **4b**: δ 20,0, respectivamente.

Resultados e discussão

Como os deslocamentos químicos dos hidrogênios da Me-16 e do C-16 de **3b** foram δ 0,93 e δ 20,0, respectivamente, determinou-se que a configuração em C-13 de **3b** era *R*.

Figura 184 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **3b** (CDCl_3 , 600 MHz).

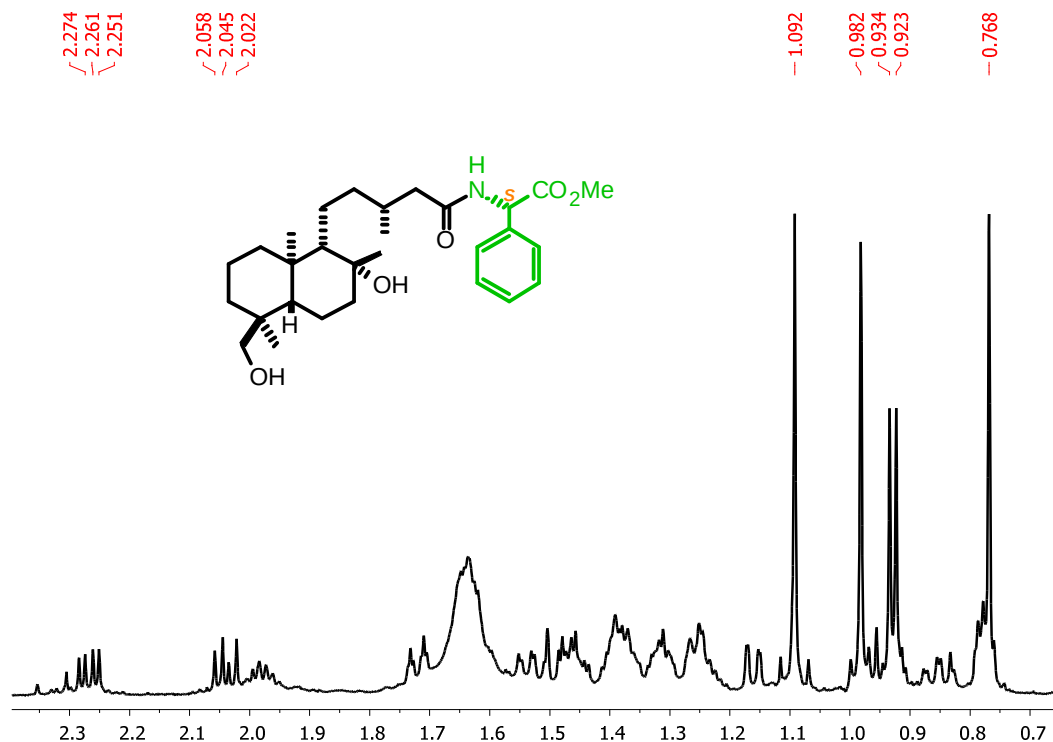


Figura 185 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **3b** (CDCl_3 , 600 MHz).

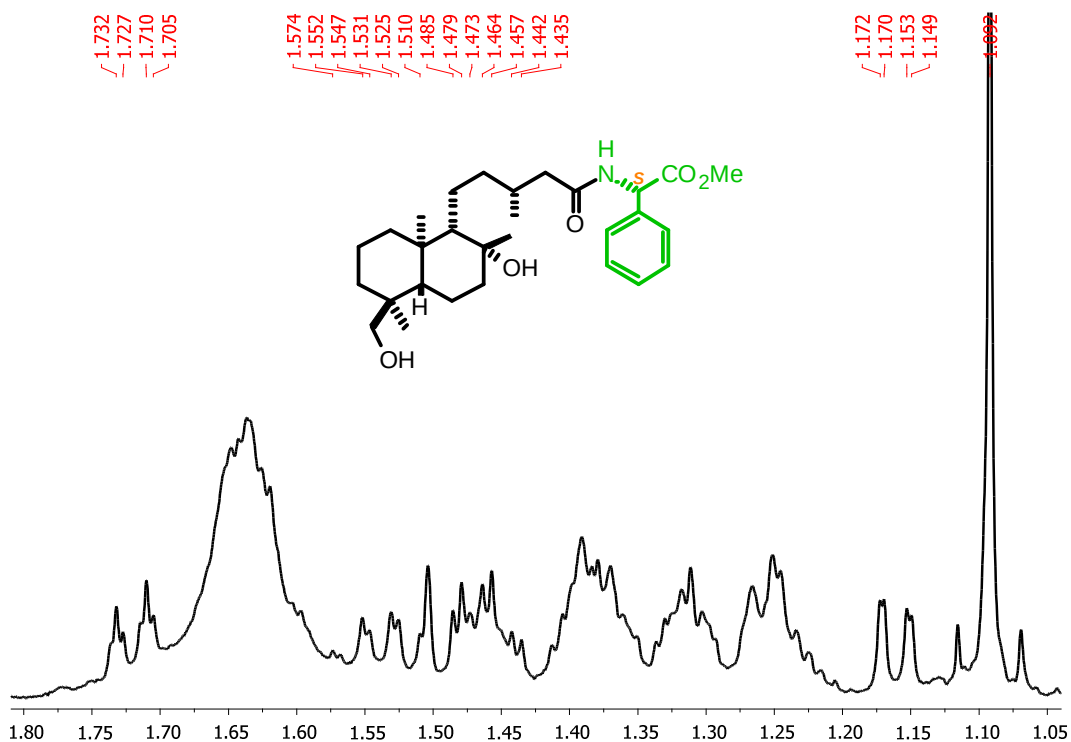


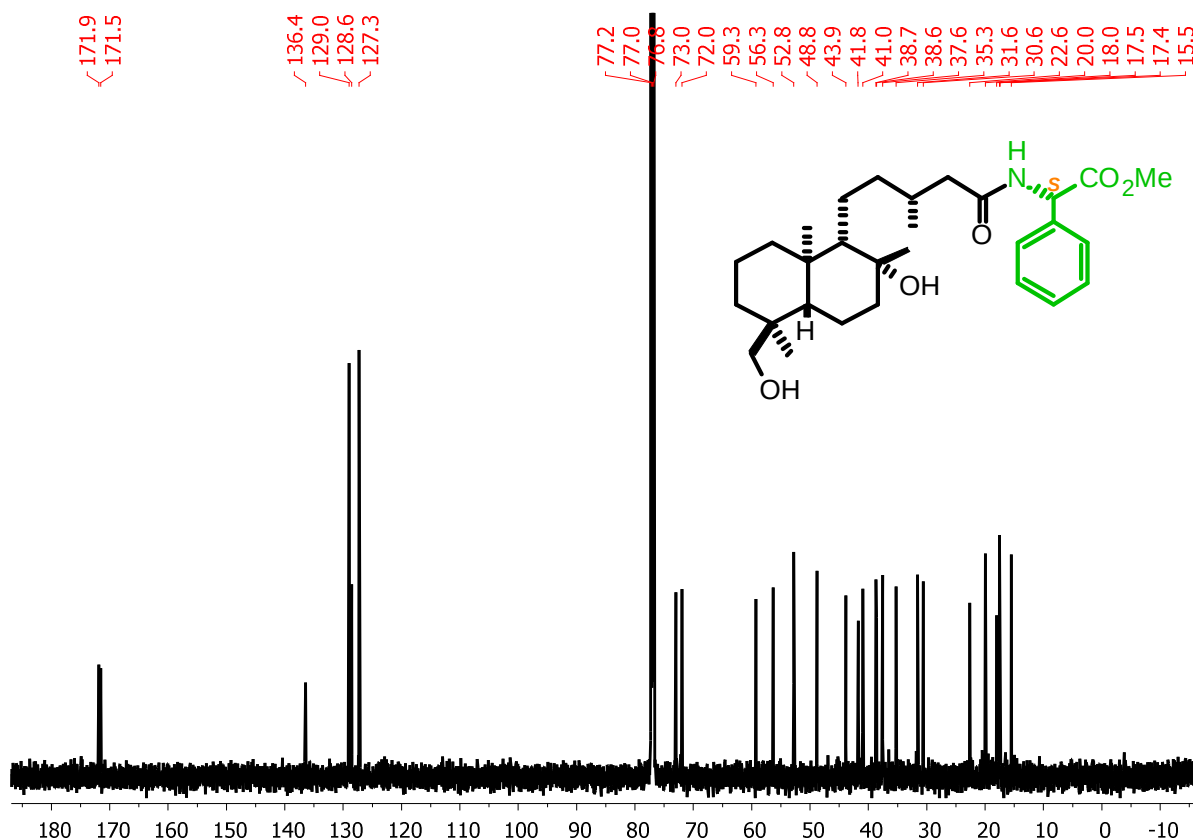
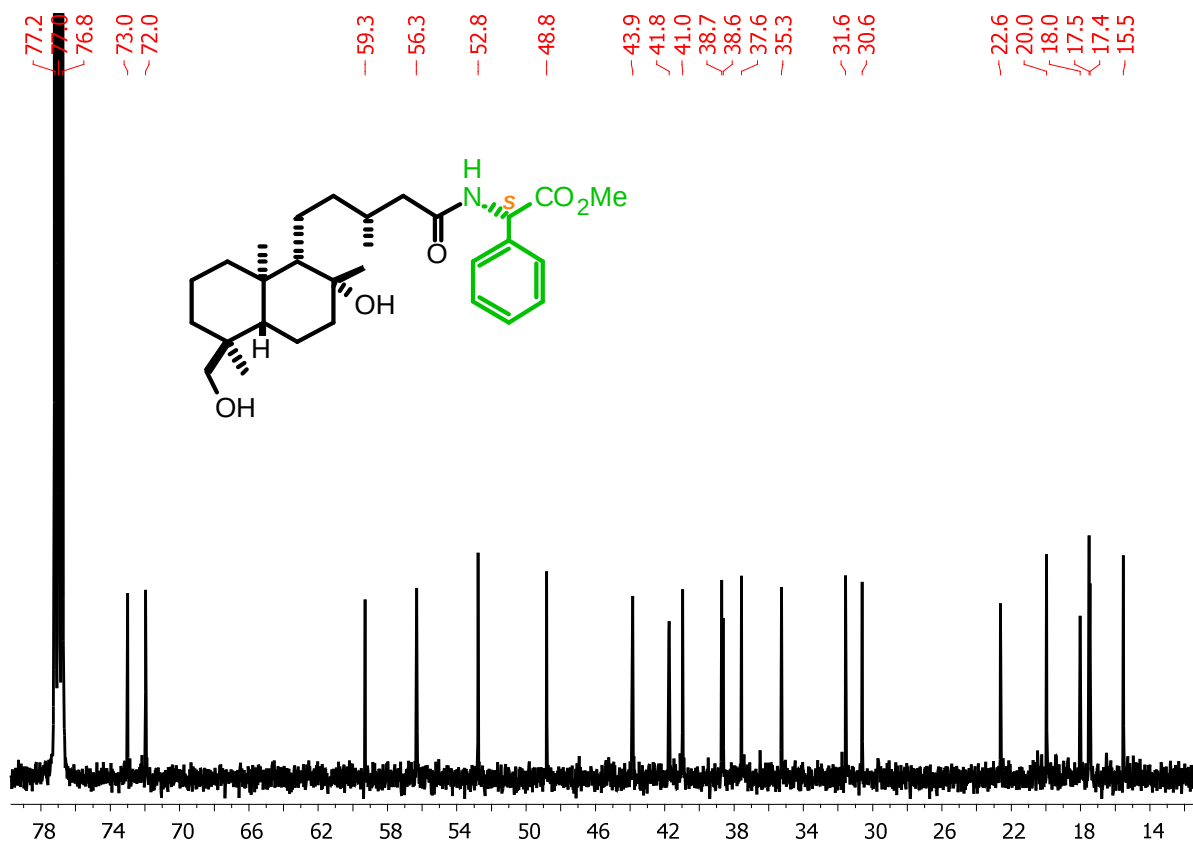
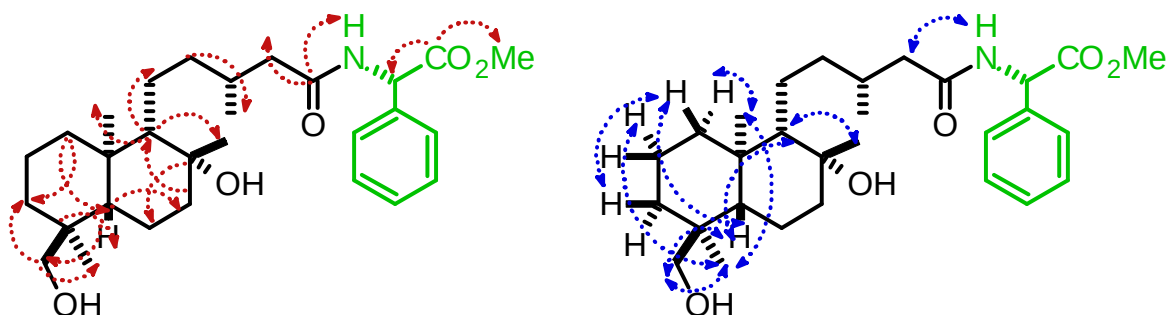
Figura 186 - Espectro de RMN de ^{13}C de **3b** (CDCl_3 , 151 MHz).Figura 187 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **3b** (CDCl_3 , 151 MHz).

Figura 188 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas (**3b**; CDCl₃, 14,1 T).



Com o intuito de ratificar a configuração em C-13 de **3b**, bem como estabelecer a configuração absoluta do seu sistema *trans*-decalínico, uma mistura de **3+4** foi submetida a redução com LiAlH₄. Nessa etapa, o triol **20** foi obtido em mistura com BHT. Em seguida, esse derivado foi purificado por CC de sílica gel obtendo-o com elevado grau de pureza. Considerando-se que somente sinais para uma substância diterpênica foram observados nos espectros de RMN, deduziu-se que o diterpeno **3** tinha a mesma configuração absoluta de **4**, isto é, C-4*S*, C-5*S*, C-8*R*, C-9*S*, C-10*R* e C-13*R* (figuras 189-193, p. 217-219).

Figura 189 - Espectro de RMN de ¹H de **20** [(CD₃)₂CO, 600 MHz].

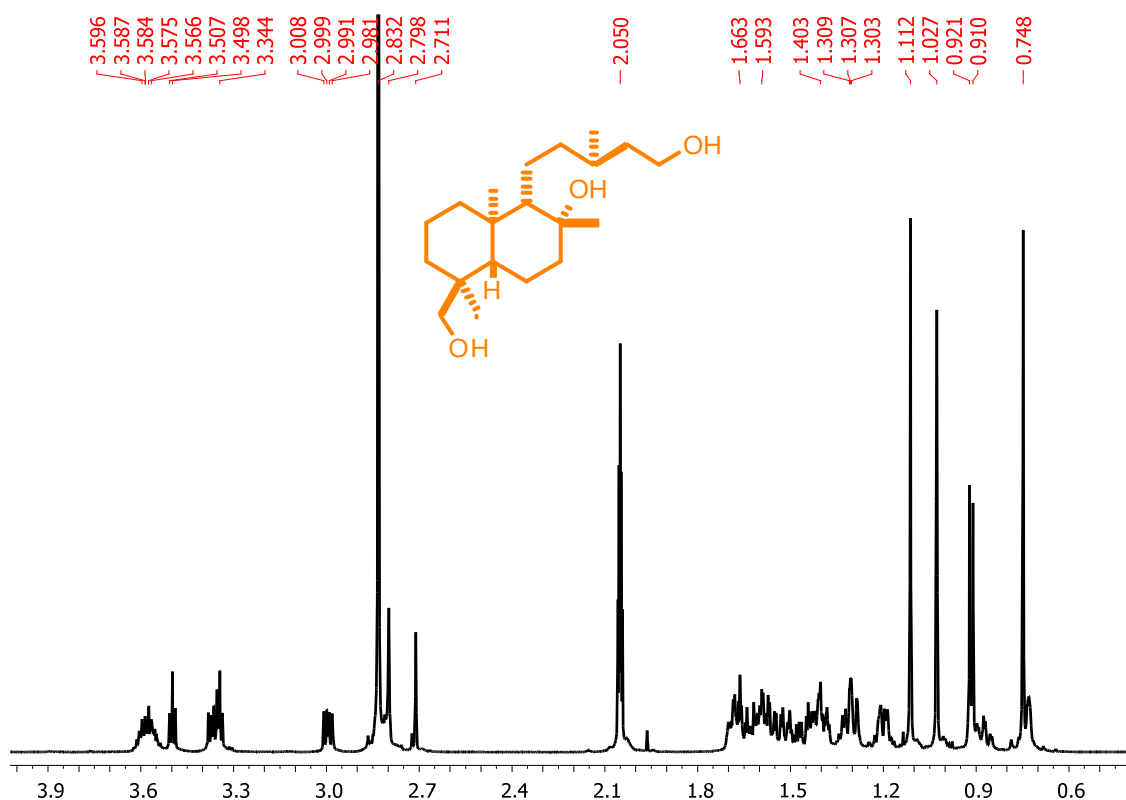


Figura 190 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **20** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 600 \text{ MHz}]$.

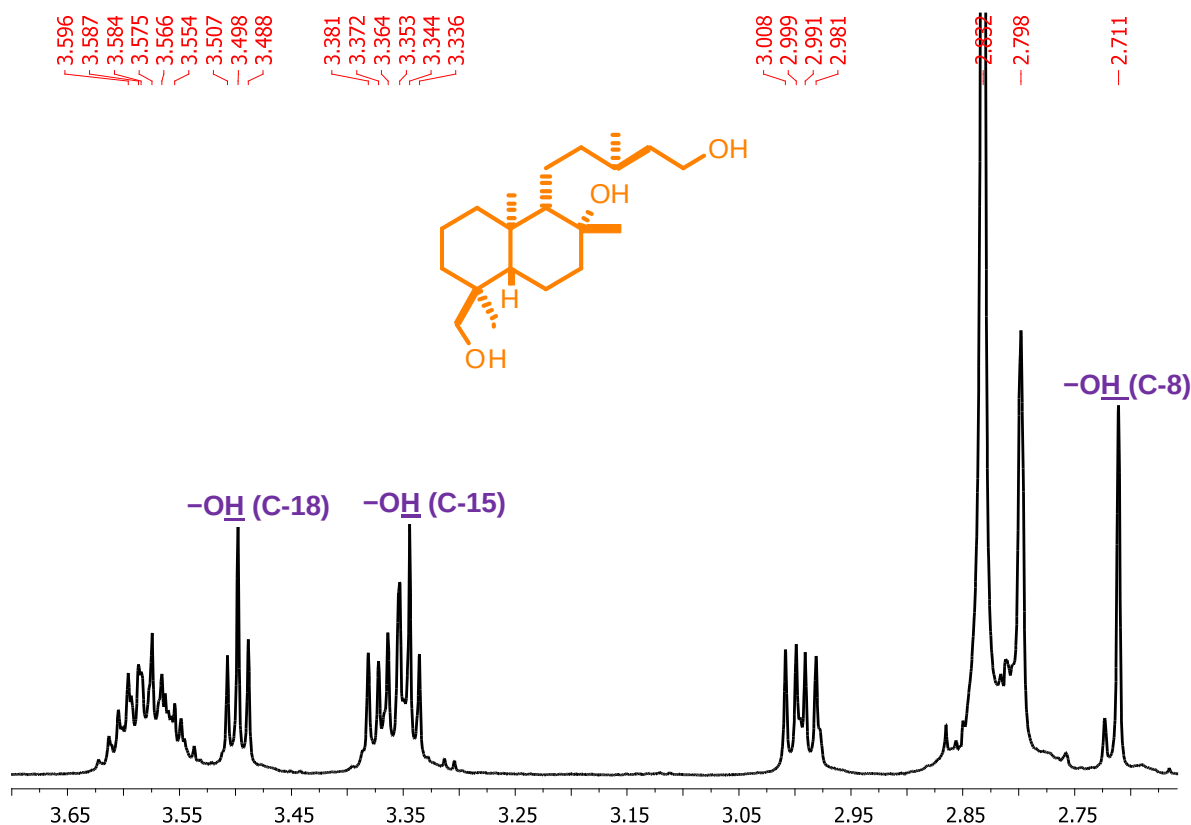


Figura 191 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **20** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 600 \text{ MHz}]$.

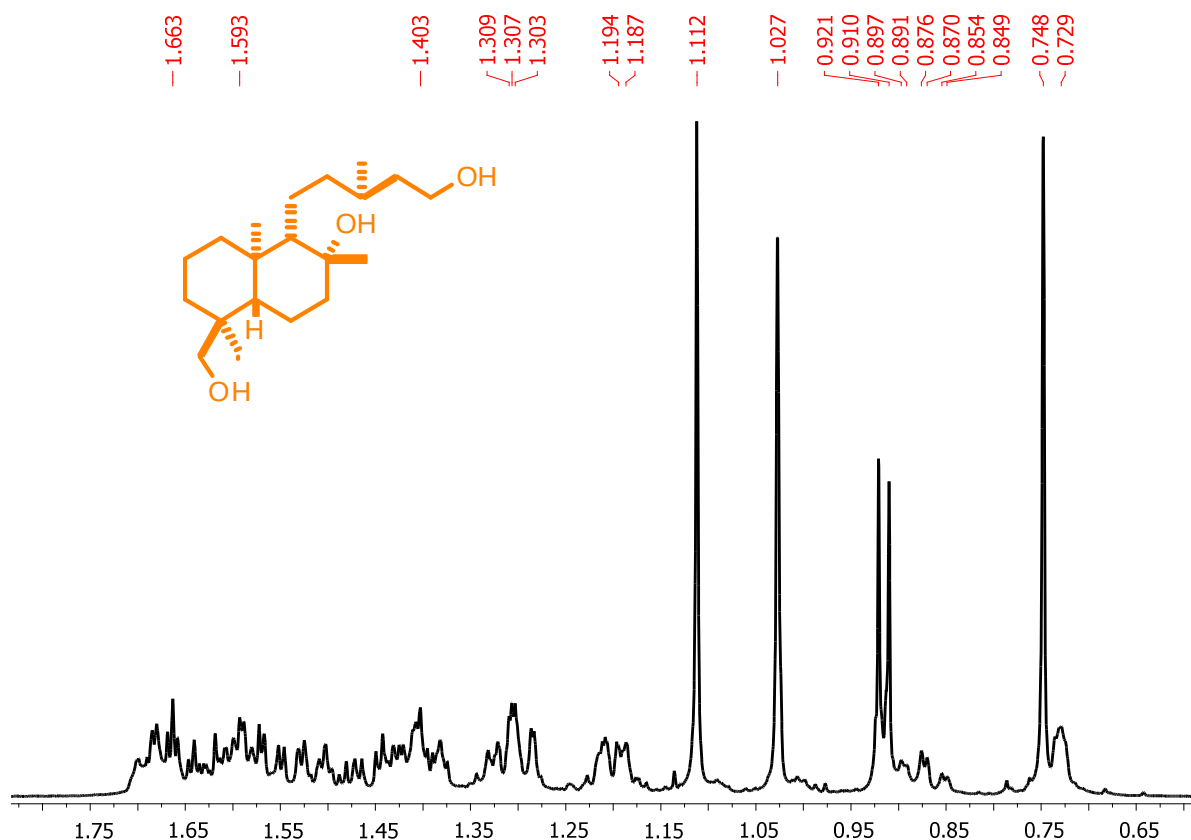
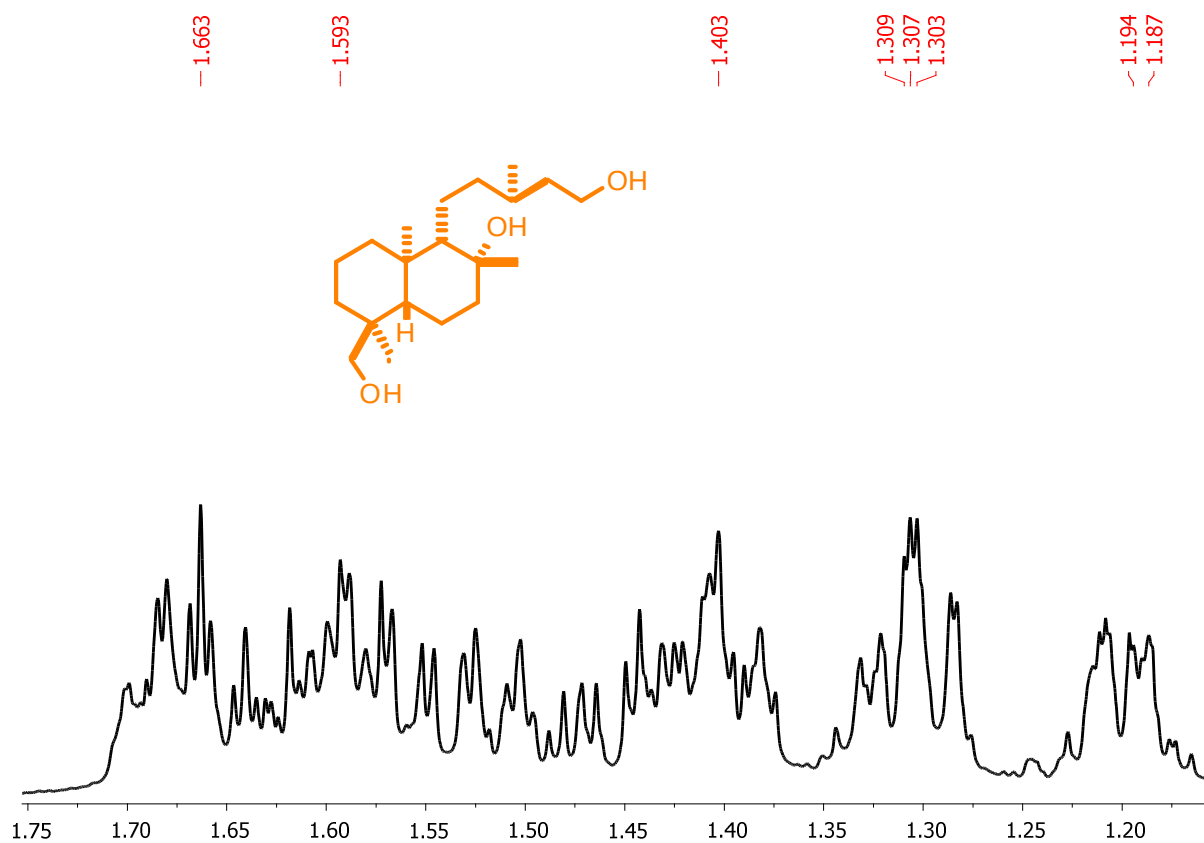
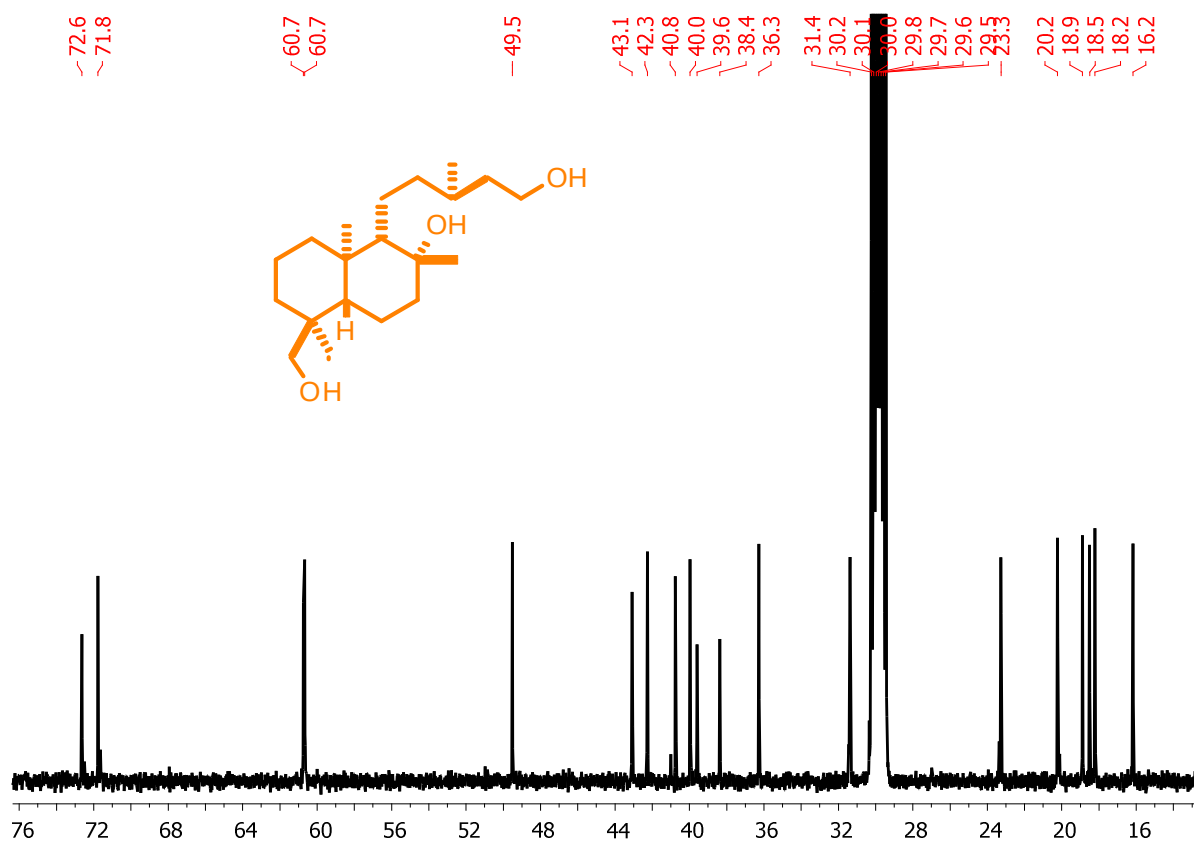
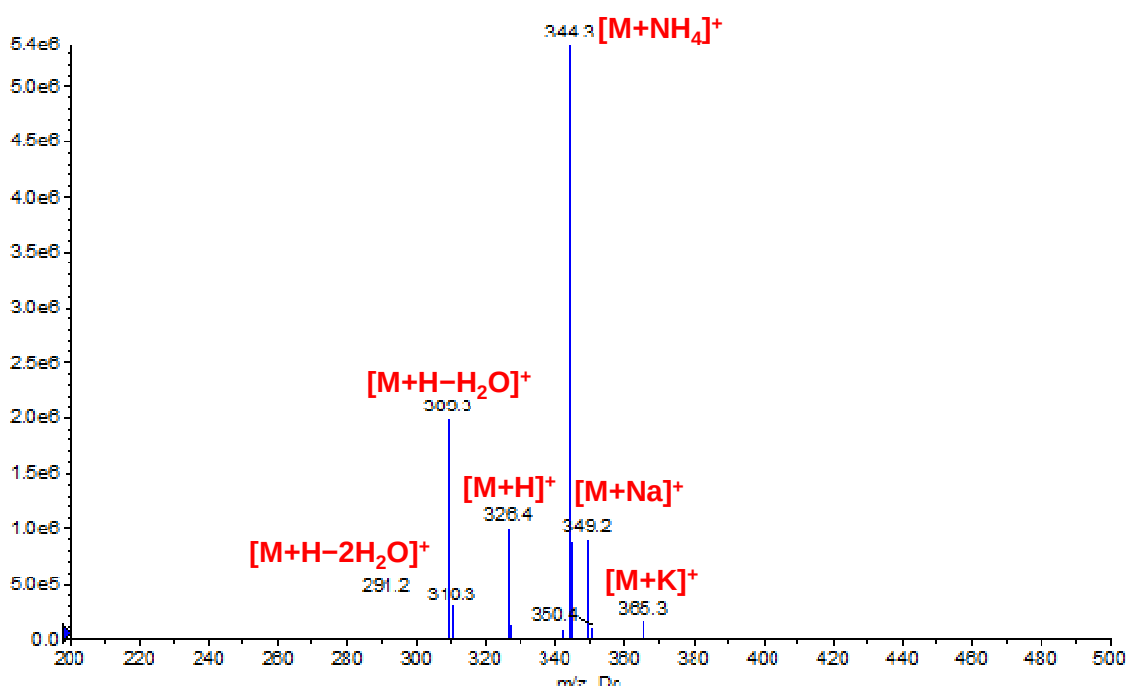


Figura 192 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **20** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 600 \text{ MHz}]$.**Figura 193** - Espectro de RMN de ^{13}C de **20** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 151 \text{ MHz}]$.

O espectro de massas de **20** (figura 194, p. 220) apresentou picos em m/z 326,4, 344,3, 349,2 e 365,3, os quais foram interpretados como sendo de moléculas protonadas e cationizadas com os íons NH_4^+ , Na^+ e K^+ . Foram ainda observados picos para os íons $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 309,3 e 291,2, respectivamente. Esses dados foram condizentes com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_3$, esperada para o produto de redução da mistura de **3+4**.

Figura 194 - Espectro de massas de **20** (IES, +10 V, infusão direta).

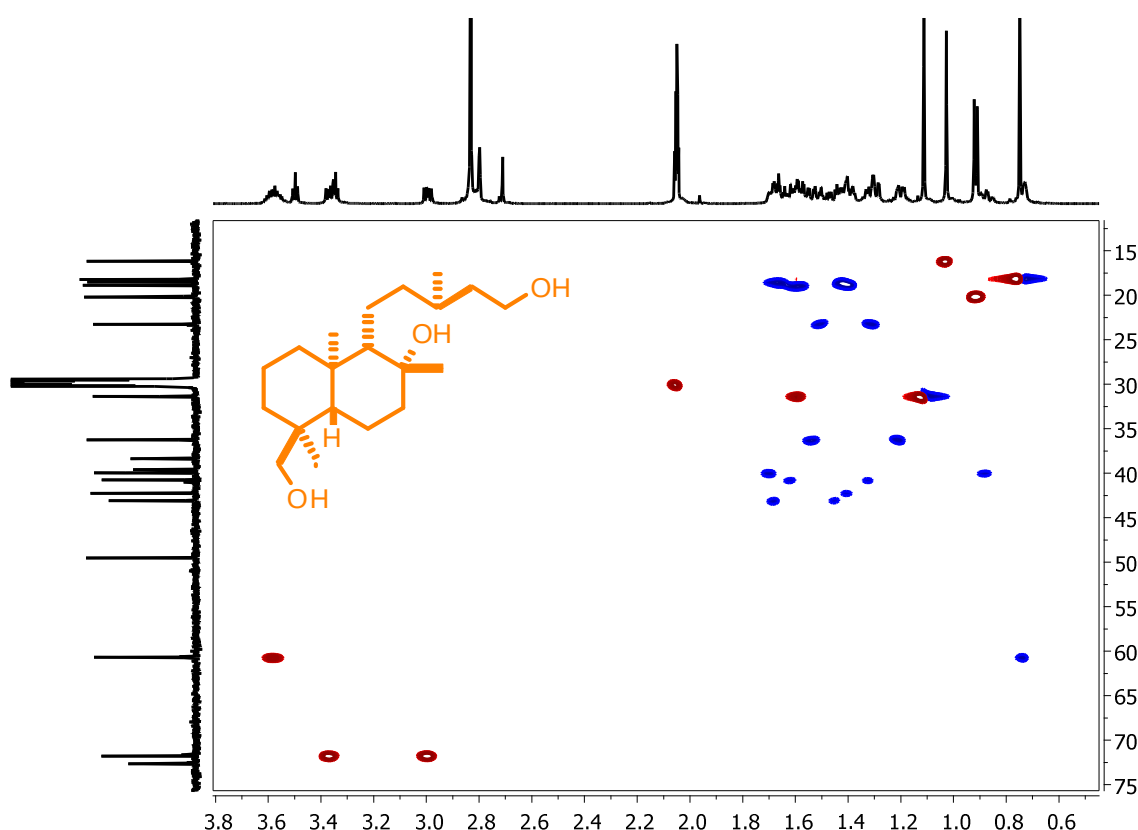


O espectro de RMN de ^1H de **20** (figuras 189-192, p. 217,219) mostrou sinais para quatro grupos metílicos alifáticos: i) três singletos em δ 1,11 (Me-17), 1,03 (Me-20) e 0,75 (Me-20) e ii) um dubleto em δ 0,92 ($J = 6,7$ Hz, Me-16), um triplo dubleto aparente em δ 0,88 ($W_{1/2} = 12,7$ e $3,2$ Hz, H-1_{ax}), um duplo dubleto em δ 0,74 ($J = 4,6$ e $2,6$ Hz, H-9), além de vários sinais entre δ 1,16 e 3,66. Mais especificamente, foram observados entre δ 2,7 e 3,7 um singleto em δ 2,72 ($-\text{OH}$ ligado a C-8), dois duplos dubletos em δ 3,37 ($J = 10,6$ e $5,5$ Hz, H-18_a) e 3,00 ($J = 10,6$ e $5,7$ Hz, H-18_b), um tripleto largo em δ 3,34 ($W_{1/2}=5,2$ Hz, $-\text{OH}$ ligado a C-18) e um duplo dubleto em δ 3,50 ($J = 5,7$ e $5,5$ Hz, $-\text{OH}$ ligado a C-15) (tabela 13, p. 213).

Como os sinais em δ 3,50, 3,34 e 2,72 não mostraram correlação com carbono no mapa de contornos $g\text{HSQC}$ (figura 195, p. 221), estes foram interpretados como

sendo de hidrogênios de três grupos hidroxílicos. As multiplicidades e as constantes de acoplamento ($J = 5,7$ ou $5,5$ Hz) extraídas a partir das análises desses sinais corroboraram com essa sugestão. Constantes de acoplamento vicinal (J_3) entre um hidrogênio hidroxílico (com lenta velocidade de troca) e um hidrogênio alifático variam de 4 a 10 Hz, sendo o valor típico de $\sim 5,0$ Hz.

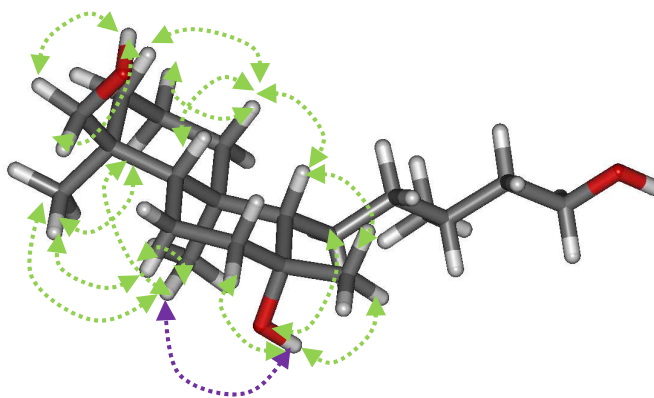
Figura 195 - Mapa de contornos gHSQC de **20** [(CD₃)₂CO, 14,1 T].



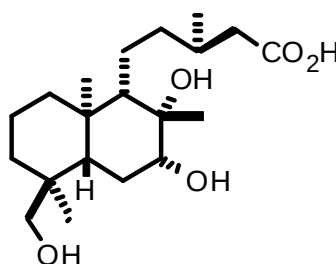
No espectro de RMN de ^{13}C de **20** (figura 193, p. 219) foram observados 20 sinais, os quais foram, com o auxílio dos experimentos de DEPT 135°, gHSQC, gHMBC e do espectro de RMN de ^1H , atribuídos a três carbonos carbinólicos: dois metilênicos (C-15: δ 60,7 e C-18: δ 71,8;) e um terciário (C-8: δ 72,6), três carbonos metínicos sp^3 (C_S-5,9,13: δ 49,5, 60,7 e 31,4, respectivamente), quatro carbonos metílicos alifáticos (C_S-16,17,19,20: δ 20,2, 31,4, 18,2 e 16,2 respectivamente), dois carbonos quaternários (C_S-4,10: δ 38,4 e 39,6, respectivamente) e oito carbonos metilênicos sp^3 (C_S-1,2,3,6,7,11,12,14: δ 40,0, 18,5, 36,2, 18,9, 43,2, 23,5, 42,2 e 40,8 respectivamente).

A configuração relativa do sistema decalínico de **20**, bem como as atribuições das posições axiais e equatoriais dos hidrogênios que o integravam, foram confirmadas por experimentos de NOESY 1D e 2D (figura 196, p. 222). Irradiação em $\sim\delta$ 0,75, isto é, na frequência do H-9 e dos hidrogênios da Me-19, resultou no aumento da intensidade dos sinais em δ 1,66 (H-2_{ax}), 1,59 (H-6_{ax}), 1,45 (H-7_{ax}), 1,29 (H-5), 1,20 (H-3_{eq}), 1,11 (H_s-17), 1,03 (H_s-20) e 0,88 (H-1_{ax}), enquanto que a irradiação em δ 0,88 (H-1_{ax}) levou ao aumento da intensidade dos sinais em δ 1,70 (H-1_{eq}), 1,53 (H-3_{ax}), 1,43 (H-2_{eq}), 1,30 (H-5) e 0,74 (H-9). Observou ainda, quando se irradiou na frequência de absorção dos hidrogênios metílicos da Me-20 (δ 1,03), aumento da intensidade dos sinais em δ 2,72 (–OH ligado a C-8), 1,66 (H-2_{ax}), 1,58 (H-6_{ax}), 1,31 (H-11_b) e 0,75 (H_s-19). O Efeito Nuclear Overhauser observado entre os hidrogênios das Me-19 e Me-20 confirmou a posição equatorial do grupo hidroximetilênico ligado a C-4, enquanto que o acoplamento dipolar entre o hidrogênio hidroxílico em δ 2,72 e os hidrogênios da Me-20 (δ 1,03) definiram que o grupo hidroxílico em C-8 estava em axial.

Figura 196 - Interações espaciais selecionadas.



4.4.4 Ácido 7 β ,8 β ,18 α -trihidroxi-labdan-15-óico (19)



O diterpeno **19** foi obtido em mistura com a lignana **18**, a qual era a substância majoritária na mistura. Lavagem dessa mistura com 8,0 mL de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ resultou na purificação parcial do diterpeno **19**, e este passou a ser o constituinte majoritário. Antes da etapa de lavagem, a subfração contendo **18+19** foi dissolvida em CD_3OD e, então, analisada por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C 1D e 2D, resultando na caracterização do composto **19**. Depois do fracionamento por lavagem, a mistura de **18+19** foi analisada por RMN em solução de $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (figuras 197-202, p 223-226).

Figura 197 - Espectros de RMN de ^1H de **18+19** (600 MHz).

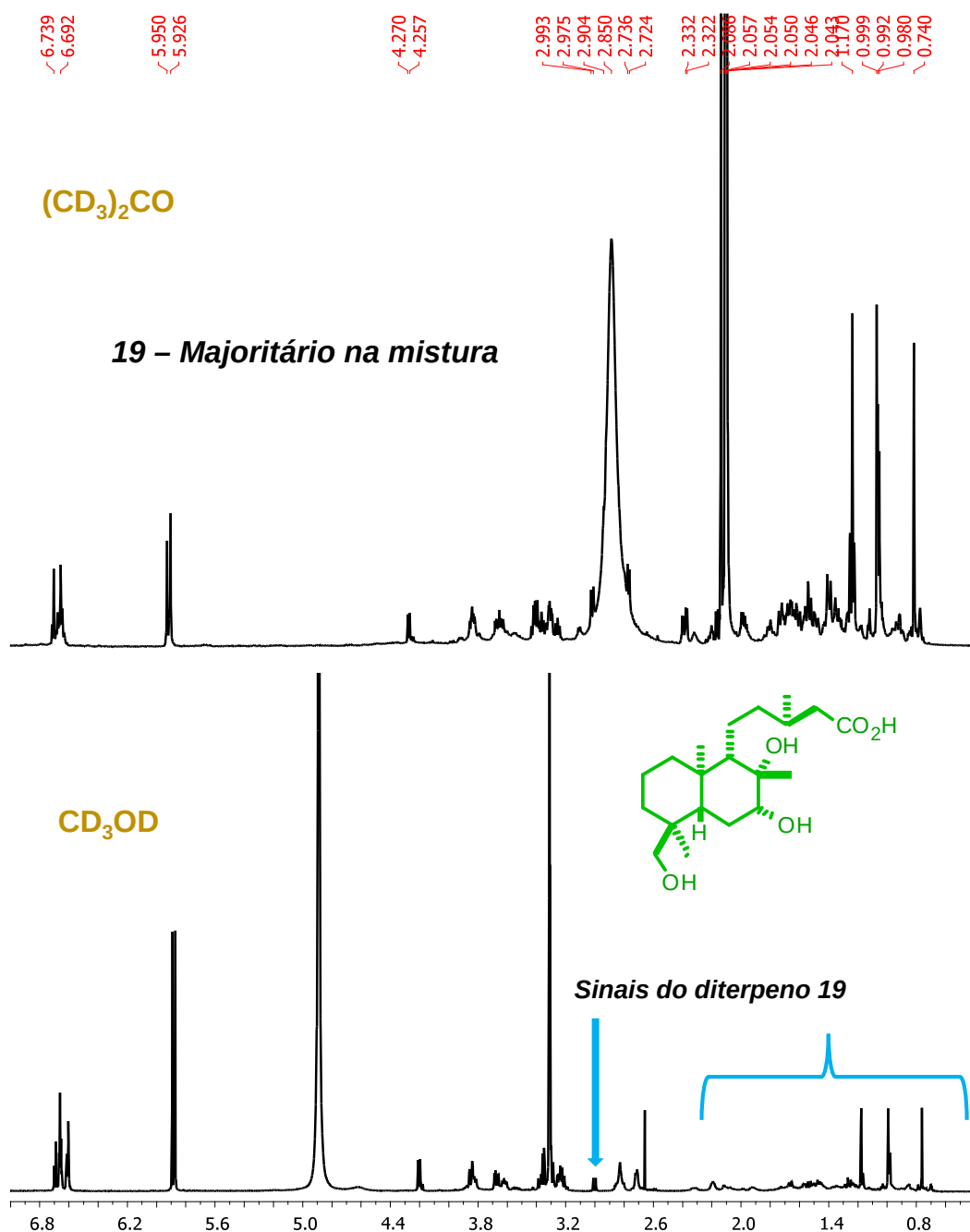


Figura 198 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **18+19** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 600 \text{ MHz}]$.

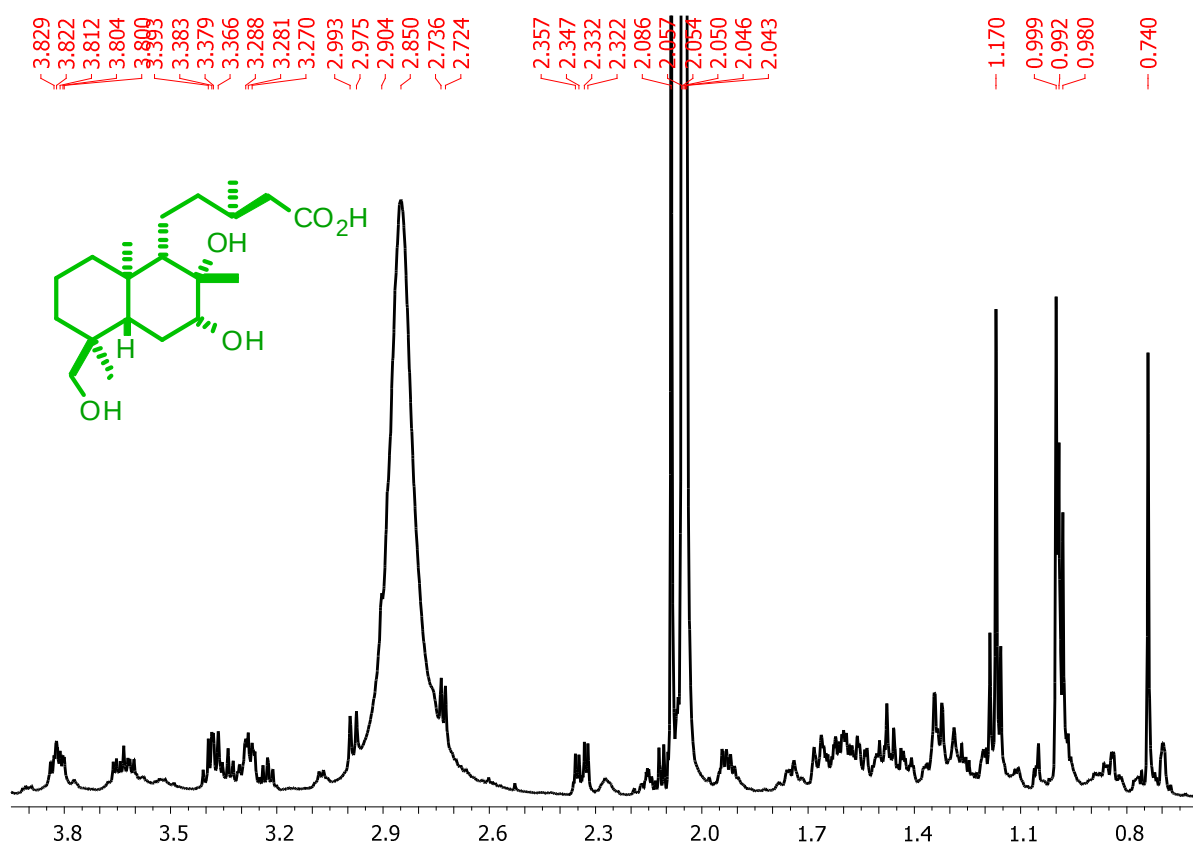


Figura 199 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **18+19** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 600 \text{ MHz}]$.

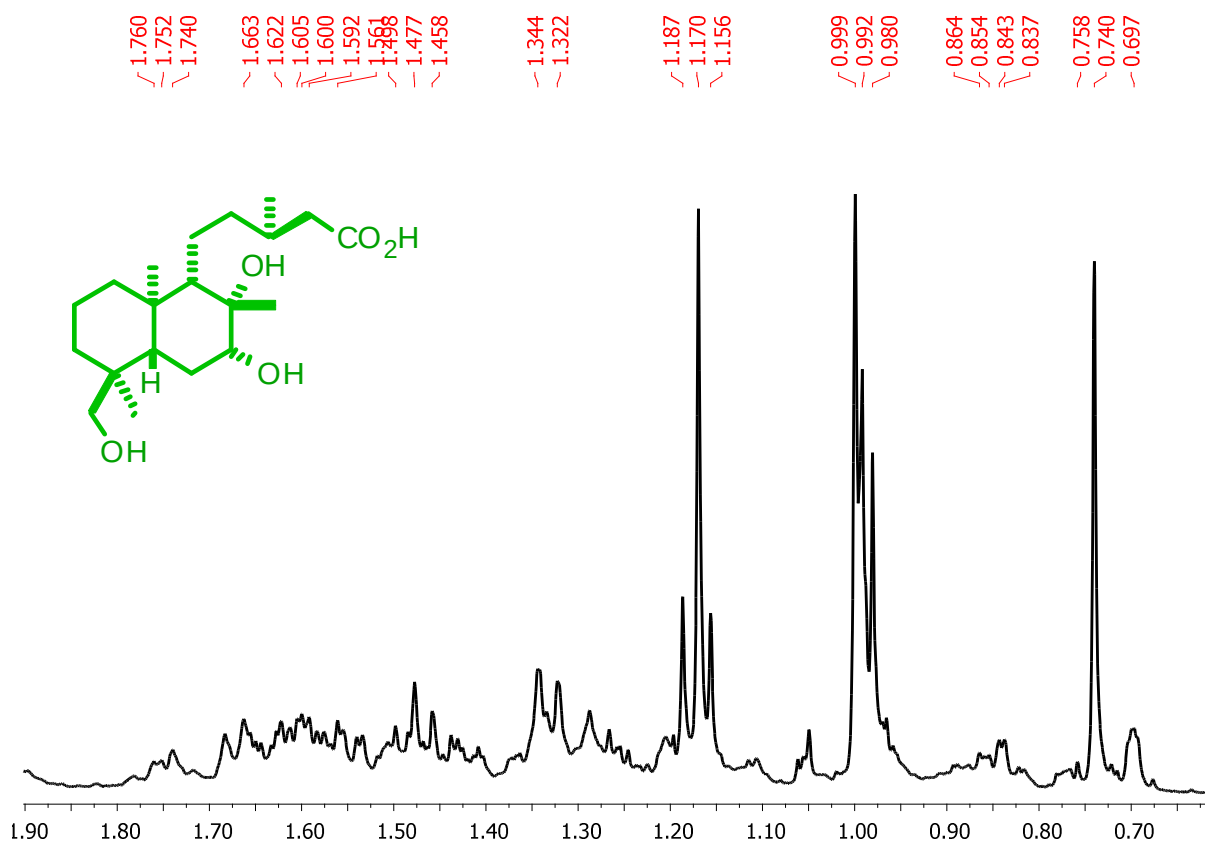


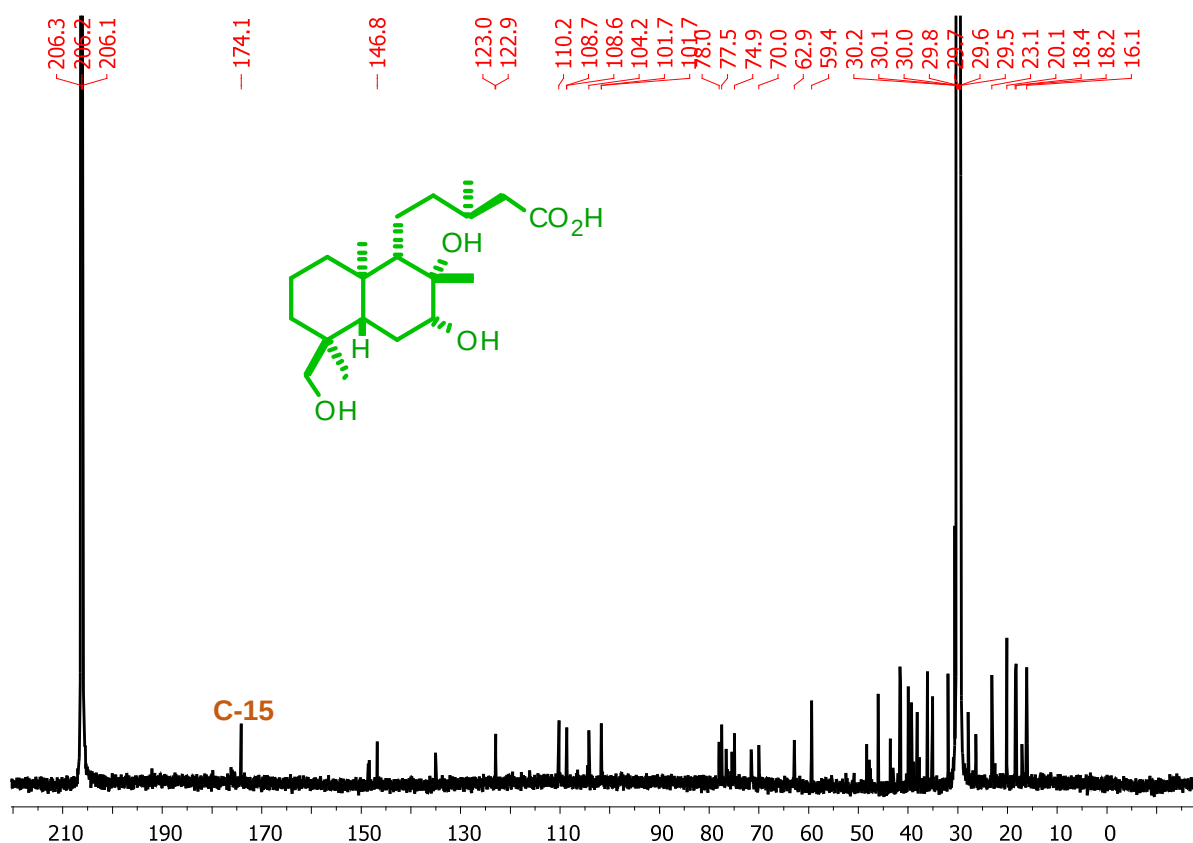
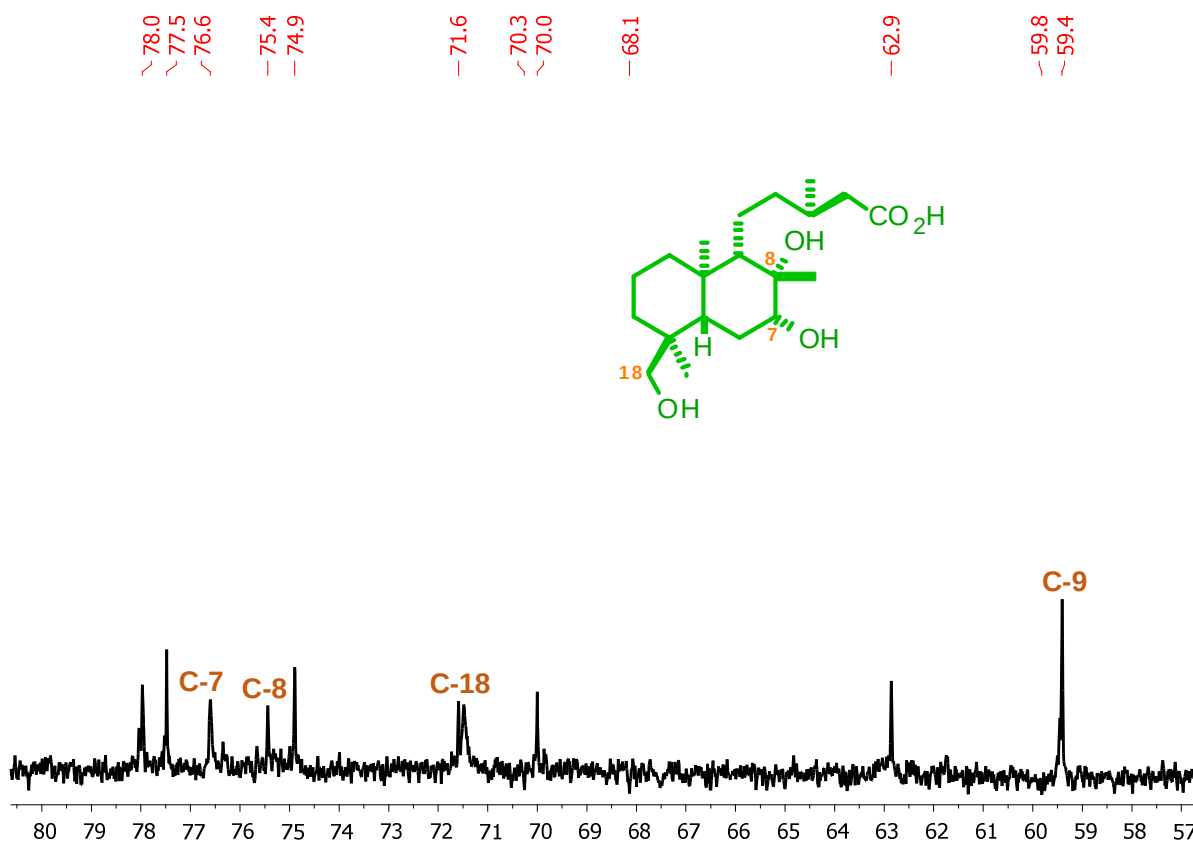
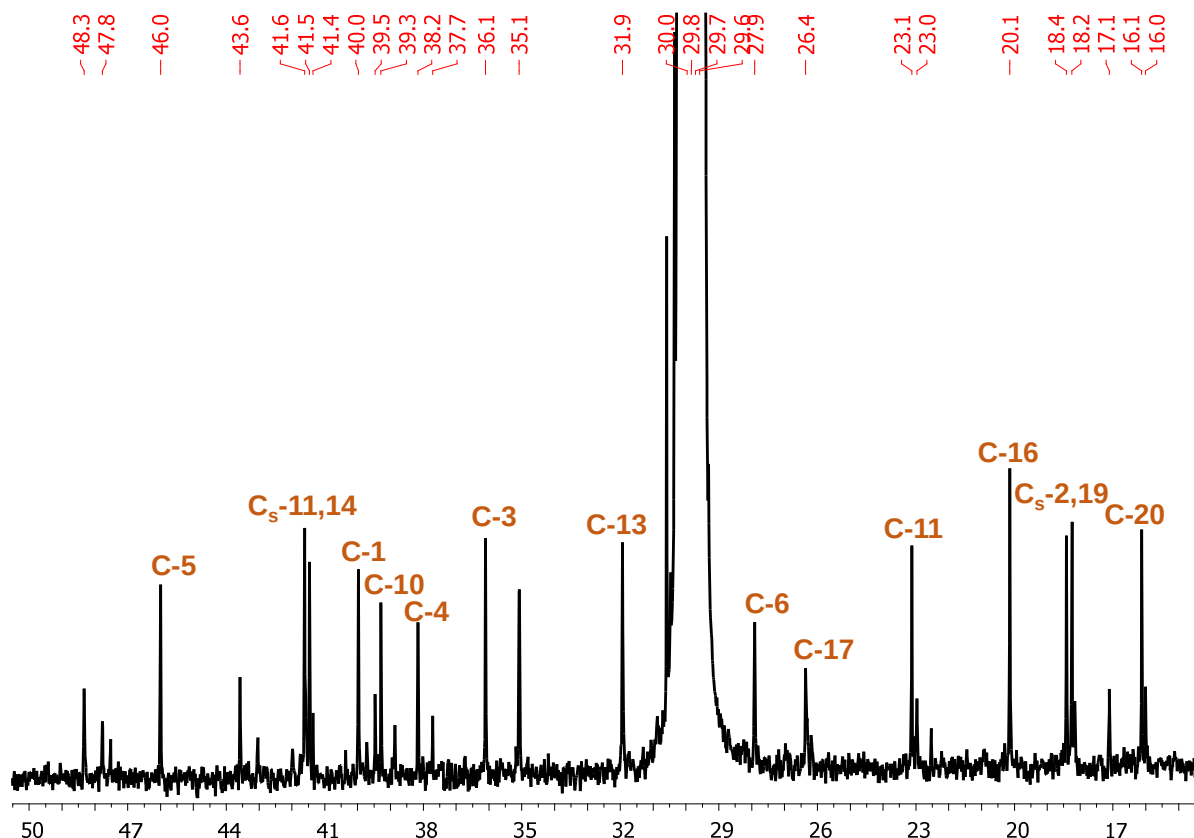
Figura 200 - Espectro de RMN de ^{13}C de **18+19** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 151 \text{ MHz}]$.Figura 201 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **18+19** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 151 \text{ MHz}]$.

Figura 202 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **18+19** $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 151 \text{ MHz}]$.

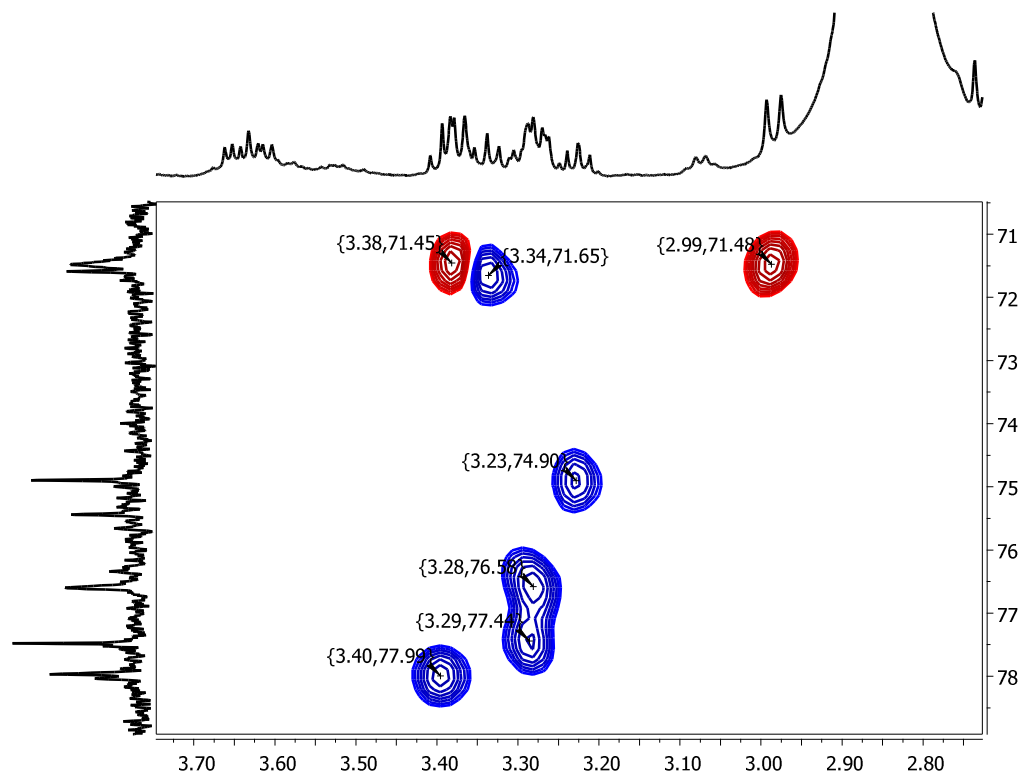


O espectro de RMN de ^1H de **18+19** (figuras 197-199, p. 223), em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, apresentou diversos sinais, dos quais se destacaram três singletos de hidrogênios metílicos em δ 1,17 (H_s -17), 1,00 (H_s -20) e 0,74 (H_s -19), um triplo dubleto aparente em 0,85 ($W_{1/2} = 12,9$ e 3,5, H -1 $_{ax}$), três duplos dubletos em δ 3,28 ($J = 11,0$ e 4,2 Hz), 1,33 ($J = 12,8$ e 1,3 Hz) e 0,70 ($J = 4,7$ e 2,3 Hz). Já no espectro de RMN de ^{13}C , destacaram-se dois sinais de carbonos metínicos em δ 59,4 e 46,0, três sinais de grupos metílicos alifáticos em δ 20,1, 18,2 e 16,1, um sinal de carbono acílico em δ 174,1 e três sinais de carbonos carbinólicos: um metínico em δ 76,6, um não hidrogenado em δ 75,4 e um metilênico em δ 71,5. Esses dados foram compatíveis com os de um di-terpeno contendo um grupo carboxílico e três grupos hidroxílicos (tabela 14, p. 228).

No mapa de contornos $g\text{HSQC}$ (figura 203, p. 227), observaram-se correlações entre os hidrogênios em δ 3,38 (H -18a) e 2,99 (H -18b) com o carbono em δ 71,5 (C-18) e o hidrogênio em δ 3,28 (H -7) e o carbono em 76,6 (C-7). Essas correlações, somadas as segintes correlações observadas no mapa de contornos $g\text{HMBC}$: i) C-7 x H -5 e H_s -17, ii) C-8 x H_s -11 e H -9 e iii) C-18 x H_s -19, evidenciaram que os grupos hidroxílicos estavam ligados aos C-7, C-8 e C-18. A posição da carboxila foi determi-

nada pelas correlações a longa distância do carbono em δ 174,1 (C-15) com os hidrogênios em δ 2,34 (H-14a) e 2,10 (H-14b) (figura 204, p. 228).

Figura 203 - Expansão do mapa de contornos gHSQC de **18+19** [(CD₃)₂CO, 14,1 T].



Embora os espectros de **19** e **3** tenham sido adquiridos em solventes deutera- dos distintos, a maioria dos dados espectrométricos de RMN de ¹³C de **19** foi muito similar aos dados de **3**. As principais diferenças ($|\Delta\delta| > 1,0$) foram observadas entre os deslocamentos químicos dos carbonos das posições 1 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = +1,3$ ppm], 5 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = -2,7$ ppm], 6 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = +9,9$ ppm], 7 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = +34,8$ ppm], 8 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = +2,2$ ppm], 17 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = -4,1$ ppm] e 15 [$\Delta\delta(\mathbf{19-3}) = -3,8$ ppm]. Essas diferen- ças podem ser explicadas por meio do efeito exercido pelo grupo hidroxílico ligado ao C-7 ou pela mudança de solvente. Neste sentido, verificou-se que o grupo hidroxílico desprotegeu o C-7/ α e os C_s-6,8/ β,β' e protegeu os C_s-5,17/ γ,γ' . A proteção observada para o C-15 foi decorrente principalmente da mudança de solvente, como pode ser constatado mediante uma análise comparativa dos dados espectrométricos do diter- peno **1** obtidos em CDCl₃ e (CD₃)₂CO. Em CDCl₃, predomina o dímero cíclico centro simétrico de ácidos carboxílicos, enquanto que em (CD₃)₂CO predomina a associação heterodimérica solvente-soluto, o que explica porque o C-15 de **19** estava 3,8 ppm mais protegido do que o C-15 de **3**.

Resultados e discussão

A configuração relativa do sistema decalínico de **19**, particularmente a configuração em C-7, foi determinada por experimento de NOESY 2D (figura 204, p. 228), pelas multiplicidades e constantes de acoplamento extraídas das análises dos sinais em δ 3,28 ($J = 11,0$ e $4,2$ Hz) e 1,33 ($J = 12,8$ e $1,3$ Hz) (tabela 14, 228) e por comparação dos dados espectrométricos obtidos com os de modelos disponibilizados na literatura (figura 205, p. 229).²⁹⁵⁻²⁹⁷ Considerando-se as similaridades estruturais entre **1**, **3**, **4** e **19** é razoável propor que a configuração absoluta de **19** seja 4*S*, 5*S*, 7*R*, 8*S*, 9*S*, 10*R* e 13*R*.

Figura 204 - Correlações a longa distância (seta de uma ponta) e interações espaciais (seta de duas pontas) selecionadas [**19**; (CD₃)₂CO, 14,1 T].

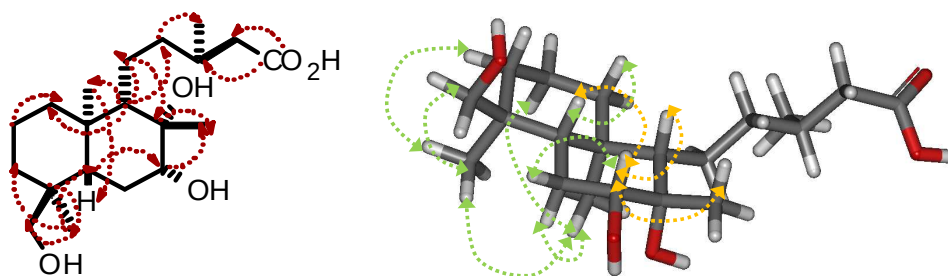
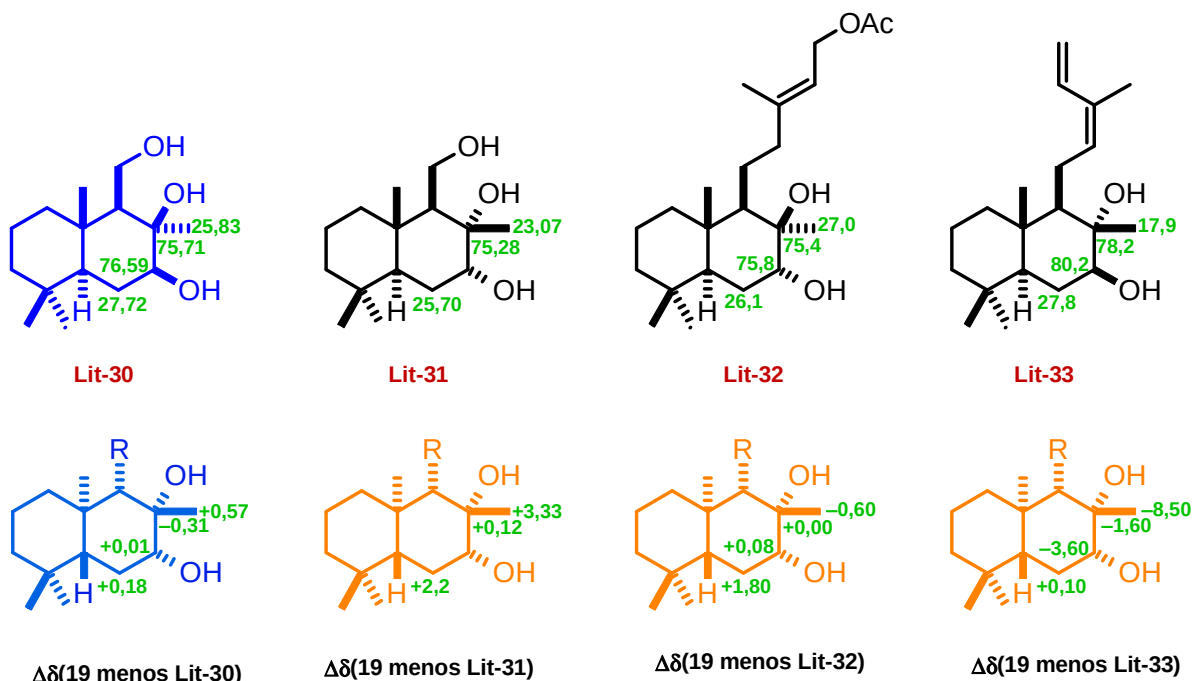


Tabela 14- Dados de RMN de ¹H e de ¹³C de **19** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	19[§]		19[‡]	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1 _{eq}	40,0	1,68 <i>m</i>	40,3	1,66 <i>m</i> **
1 _{ax}		0,85 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 12,9 e 3,5		0,85 <i>comp</i> **
2 _{eq}	18,4	1,42 <i>m</i>	18,4	1,45 <i>m</i> **
2 _{ax}		1,65 <i>m</i>		1,67 <i>m</i> **
3 _{eq}	36,1	1,20 <i>m</i>	36,4	1,22 <i>m</i> **
3 _{ax}		1,54 <i>td ap</i> , $W_{1/2}$ 13,3 e 3,3		1,48 <i>m</i> **
4	38,1	–	38,5	–
5 _{ax}	46,0	1,33 <i>dd</i> , 12,8 e 1,3	46,8	1,26 <i>ap</i> , $W_{1/2}$ 12,0 e 1,8
6 _{eq}	27,9	1,61 <i>comp</i>	27,9	1,57 <i>ddd ap</i> , $W_{1/2}$ 12,6, 5,4 e 3,0
6 _{ax}		1,47 <i>comp</i>		1,53 “ <i>dl</i> ”, $W_{1/2}$ 12,0
7 _{ax}	76,6	3,28 <i>dd</i> , 11,0* e 4,2*	77,4	3,29 <i>comp</i>
8	75,4	–	76,2	–
9 _{ax}	59,4	0,70 <i>dd</i> , 4,7 e 2,3	59,9	0,70 <i>dd</i> , 4,8 e 2,4
10	39,3	–	39,8	–
11	23,1	1,59 <i>m</i>	23,4	1,51 <i>m</i>
		1,35 <i>m</i>		1,35 <i>m</i>
12	41,5	1,48 <i>m</i>	41,9	1,45 <i>m</i>
		1,26 <i>m</i>		1,24 <i>m</i>
13	31,9	1,93 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,9	32,6	1,92 <i>oct ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6
14	41,6	2,34 <i>dd</i> , 15,1 e 6,0	42,8	2,32 <i>dd</i> , 15,0 e 5,4
		2,10 <i>dd</i> , 15,1 e 8,0		2,10 <i>comp</i>
15	174,1	–	Δ	–
16	20,1	0,98 <i>d</i> , 6,8	20,2	0,98 <i>d</i> , 6,6
17 _{eq}	26,4	1,17 <i>s</i>	26,0	1,18 <i>s</i>
18	71,5	3,38 <i>d</i> , 10,6	71,8	3,38 <i>d</i> , 10,8
		2,98 <i>d</i> , 10,6		3,00 <i>d</i> , 10,8
19 _{ax}	18,2	0,74 <i>s</i>	18,2	0,76 <i>s</i>
20 _{ax}	16,1	1,00 <i>s</i>	16,2	0,99 <i>s</i>

§(CD₃)₂CO; ‡CD₃OD; *comp*=Sinal complexo de difícil interpretação devido a sua multiplicidade e/ou sobreposição deste com um ou vários outros sinais; *ap*=aparente; *o valor provavelmente está aproximado devido a sobreposição com outros sinais; Δ =não determinado; **posições axiais e equatoriais foram propostas com base nos dados espectrométricos de **11** obtidos em (CD₃)₂CO; “*dl*”=na verdade é um quadrupeto de um sistema ABMX, com B tendendo a A’.

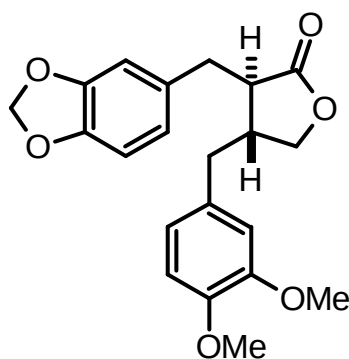
Figura 205 - Dados de RMN de ^{13}C de alguns carbonos de **Lit-30** a **Lit-33** e valores de $\Delta\delta$ calculados a partir dos dados de **19** e de cada um desses modelos.



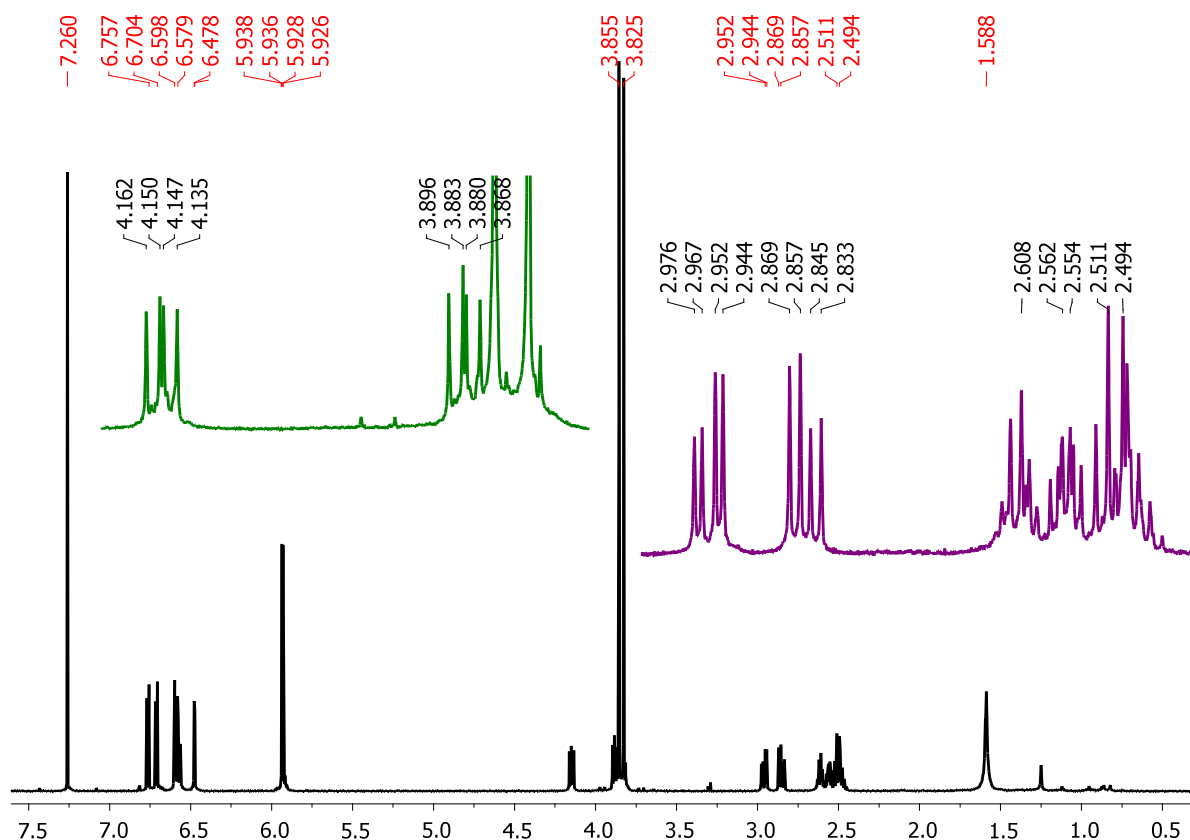
Fonte: Elaborada pelo autor. Refs. 295-297.

4.4.5 Lignanas (2, 17, 17a, 18 e 18a)

4.4.5.1 Kusunoquinina (2)



Identificou-se, por RMN de ^1H e pela comparação dos seus t_r e espectro de UV com os de uma amostra autêntica, o composto **2** no extrato E-FI e nas frações F-1D e F-1E. Por CG-EM e CLAE-UV-DC-AFD, este foi também identificado no extrato L1 (item 3.7.5). Além disto, a substância **2** foi isolada dos extratos E-Fz e L2 (itens 3.8.1.1 e 3.9.1).

Figura 206 - Espectro de RMN de ^1H de **2** (CDCl_3 , 600 MHz).

No espectro de RMN de ^1H da substância **4** (figura 206, p. 230) foram observados dois dubletos em δ 5,94 ($W_{1/2} = 1,2$ Hz) e 5,93 ($W_{1/2} = 1,2$ Hz), quatro duplos dubletos em δ 4,15 ($J = 9,0$ e $7,2$ Hz), 3,88 ($J = 9,0$ e $7,8$ Hz), 2,96 ($W_{1/2} = 14,4$ e $5,3$ Hz) e 2,85 ($W_{1/2} = 14,4$ e $7,2$ Hz), dois singletos em δ 3,86 e 3,82, um duplo duplo dubleto em δ 2,56 ($W_{1/2} = 8,2$, $7,2$ e $5,3$ Hz), um multipletto em δ 2,62, além de dois multiplettos entre δ 2,44-2,53. Nesse espectro, foram ainda observados dois dubletos em δ 6,76 ($J = 7,8$ Hz) e 6,48 ($J = 2,4$ Hz), um duplo dubleto em δ 6,71 ($W_{1/2} = 7,8$ e $0,6$ Hz) e sinais entre δ 6,55-6,61. As integrações dos sinais do espectro de RMN de ^1H , assim como as correlações presentes no mapa de contornos gHSQC, mostraram que os sinais na região entre δ 6,55-6,61 eram de três hidrogênios metínicos (figuras 206-208, p. 230,231). Com o auxílio de experimentos de JResolved e gCOSY (figuras 211, p. 234), esses sinais foram interpretados como sendo três duplos dubletos: I) δ 6,60 [$W_{1/2} = 1,8$ (acoplamento em *meta*) e $0,6$ ("acoplamento virtual" – sistema ABX) Hz], II) δ 6,59 [$J = 7,8$ (acoplamento em *orto*) e $1,8$ Hz] e III) δ 6,57 [$J = 7,8$ e $2,4$ (acoplamento em *meta*) Hz]. Esses dados foram condizentes com os de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos (tabela 15, p. 238).

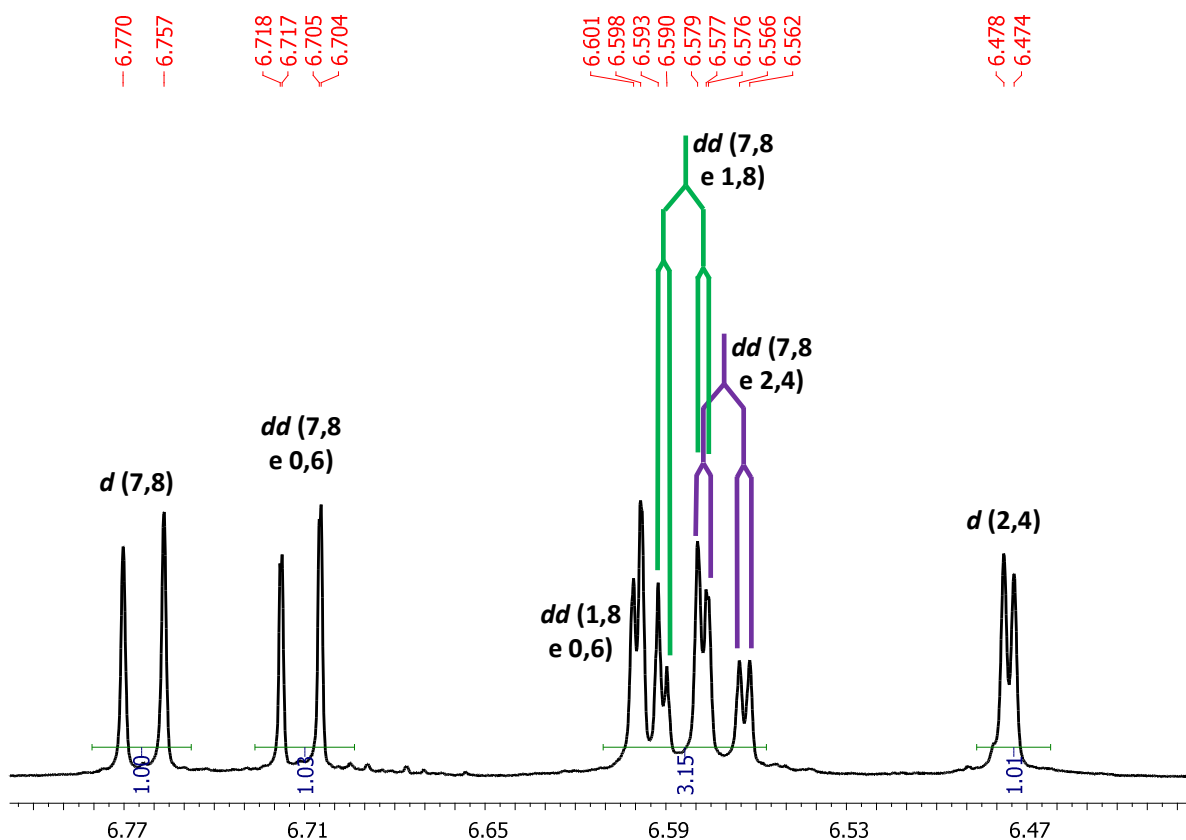
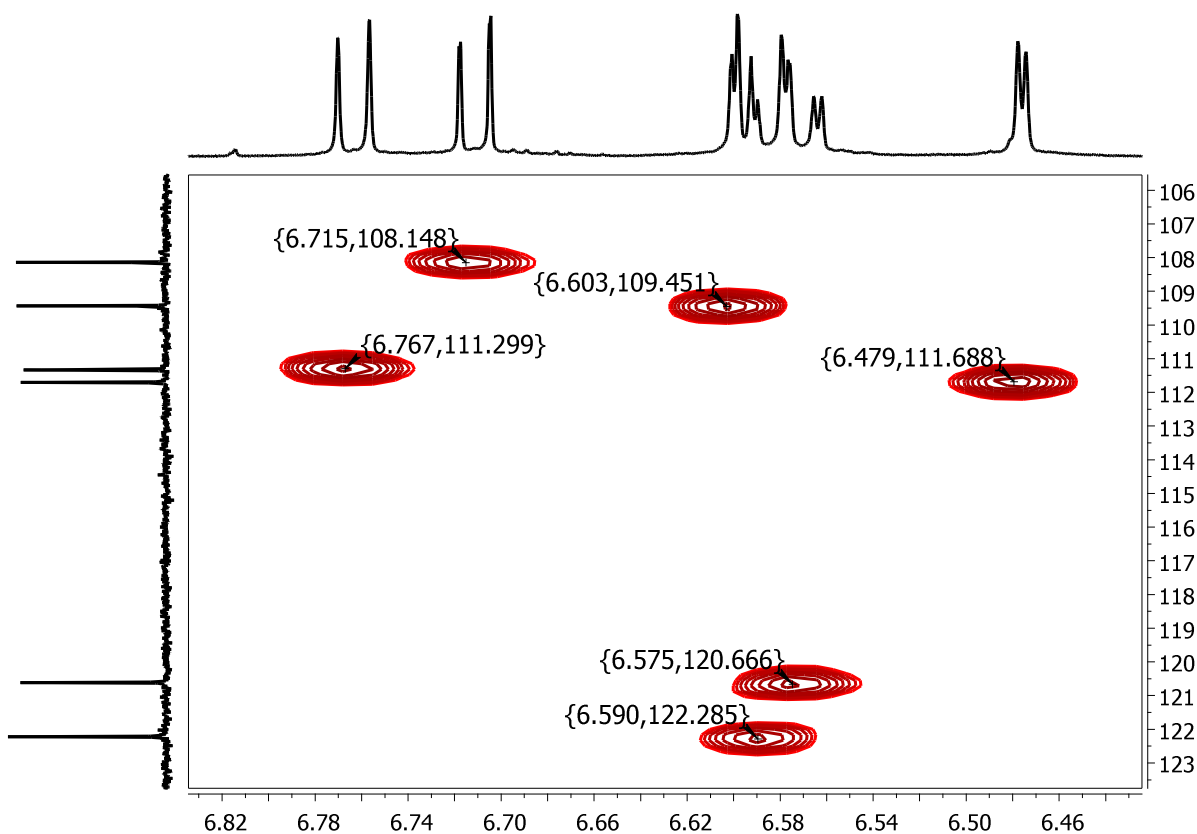
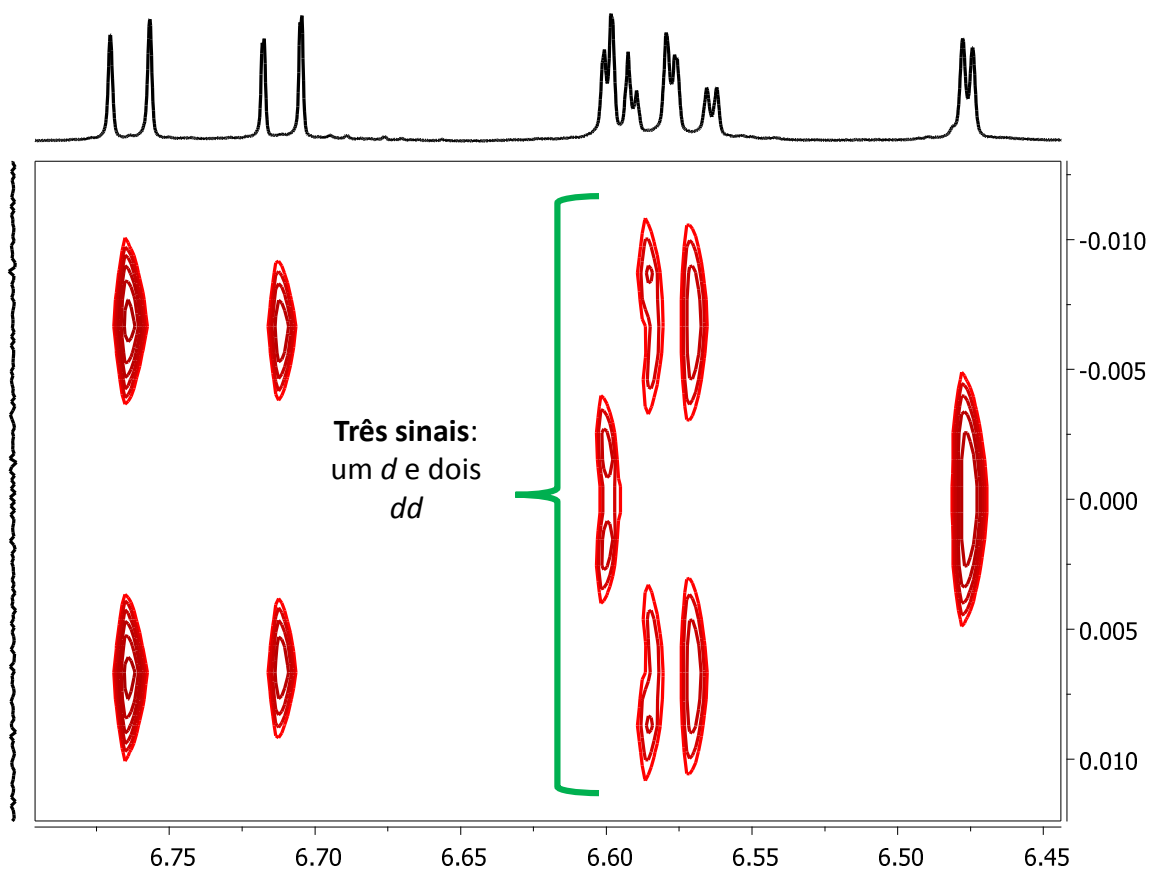
Figura 207 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **2** (CDCl_3 , 600 MHz).Figura 208 - Expansão do mapa de contornos gHSQC de **2** (CDCl_3 , 14,1 T).

Figura 209 - Expansão do mapa de contornos JResolved de **2** (CDCl₃, 14,1 T).

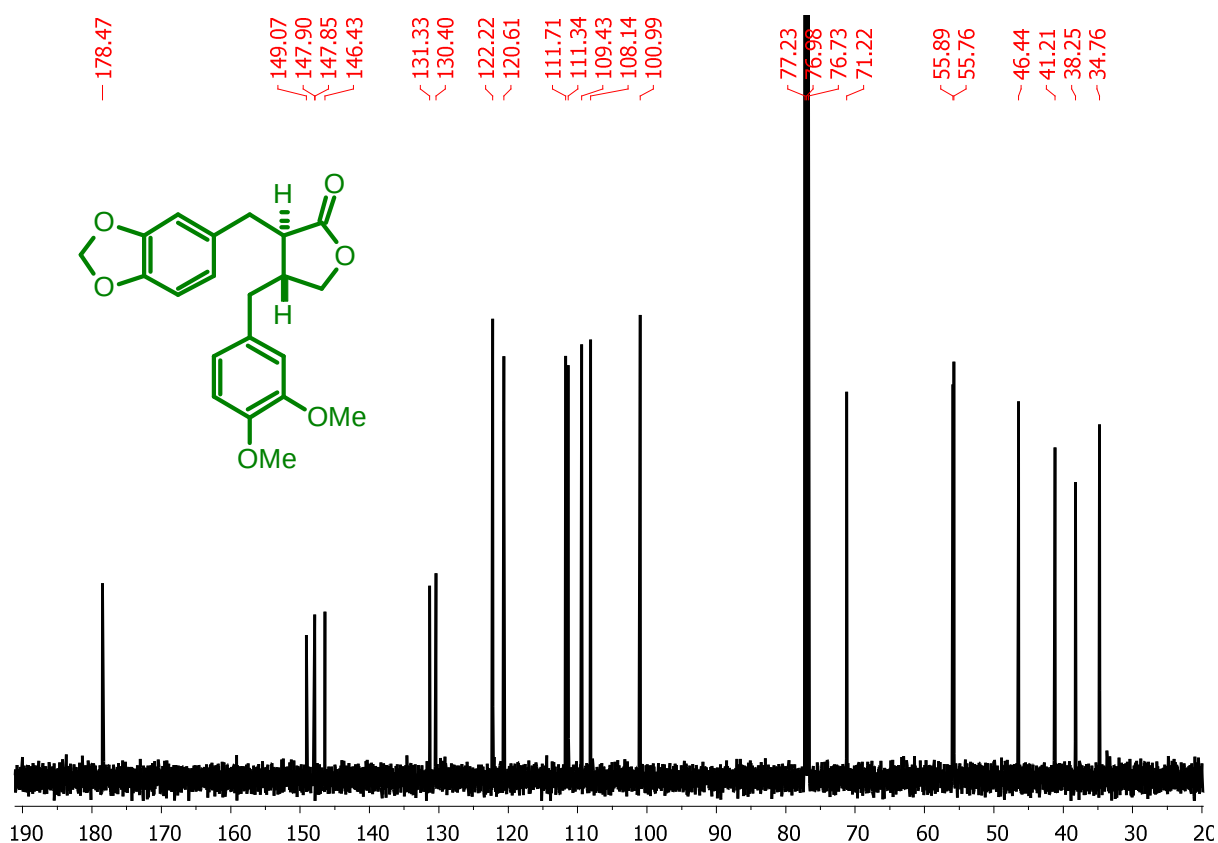


No mapa de contornos ^1H – ^1H gCOSY, o sinal em δ 2,56 (H-8) mostrou correlações com os sinais em δ 2,96 (H-7_a) e 2,85 (H-7_b). A partir dessa observação, determinaram-se, por meio de simulações no programa FOMSC3, a multiplicidade (*ddd*) e as constantes de acoplamento desse sinal. Para isso, partiu-se das constantes de 7,2 e 5,3 Hz e estimou-se a de 8,2 Hz. Por esse experimento bidimensional, também foram observadas correlações entre os hidrogênios metilênicos em δ 2,96 e 2,85, entre os hidrogênios oximetilênicos em δ 4,15 (H-9'_a) e 3,88 (H-9'_b), dos hidrogênios em δ 4,15 e 3,88 com o hidrogênio metínico em δ 2,48 (H-8'), entre os hidrogênios metilênicos em δ 2,61 (H-7'_a) e 2,50 (H-7'_b), do hidrogênio metínico em δ 2,56 com o hidrogênio metínico em 2,48, do hidrogênio em δ 6,76 (H-5') com o hidrogênio em δ 6,51 (H-6') e do hidrogênio em δ 6,71 (H-5) com o hidrogênio em δ 6,57 (H-6) (figura 211, p. 234).

O espectro de RMN de ^{13}C de **2** (figura 210, p. 233) apresentou 21 sinais. Desses sinais, segundo o espectro de DEPT 135°, quatro eram de carbonos metilênicos e sete de carbonos não hidrogenados incluindo um carbono acílico. Considerando-se as integrações dos sinais do espectro de RMN de ^1H , além das correlações observadas

no mapa de contornos *g*HSQC, inferiu-se que, dos outros dez sinais, oito eram de carbonos metínicos, que incluíam seis aromáticos, e dois (δ 55,9 e 55,8) eram de dois grupos metoxílicos aromáticos. As correlações a longa distância dos carbonos em δ 149,1 (C-3') e 147,9 (C-4') com os hidrogênios metoxílicos em δ 3,86 (s) e 3,82 (s), respectivamente, confirmaram a presença de duas metoxilas aromáticas na estrutura de **2**.

Figura 210 - Espectro de RMN de ^{13}C de **2** (CDCl_3 , 126 MHz).



Além dos valores de deslocamentos químicos, as correlações – J1 – do carbono em δ 101,0 com os hidrogênios em δ 5,94 (*d*) e 5,93 (*d*), e as correlações a longa distância dos carbonos em δ 147,9 (C-3) e 146,4 (C-4) com esses mesmos hidrogênios, indicaram que o sinal em δ 101,0 era relativo a um grupo metilenodioxílico aromático. De modo similar, as correlações a longa distância do carbono em δ 111,7 (C-2') com os hidrogênios em δ 2,61 (H-7'a) e 2,50 (H-7'b), juntamente com as do carbono em δ 109,4 (C-2) com os hidrogênios em δ 2,94 (H-7a) e 2,86 (H-7b), mostraram que os sinais em δ 34,8 (C-7) e 38,7 (C-7') eram de dois grupos metilênicos benzílicos (figura 211, p. 234).

A metilena com deslocamento químico de δ 71,2, a qual se correlacionou diretamente (J1) com os hidrogênios em δ 4,15 e 3,86, mostrou correlações a longa distância com os hidrogênios em δ 2,61 e 2,50. A multiplicidade dos hidrogênios em δ 4,15 e 3,86 e os acoplamentos escalares observados pelo experimento *g*COSY (figura 211, p. 234) demonstraram que as metilenas em δ 38,7 e 71,2 estariam unidas por um grupo metínico, o qual, por sua vez, estaria ligado a outro grupo também metínico, como evidenciado pela correlação observada no experimento *g*COSY entre os hidrogênios em δ 2,56 (H-8) e 2,48 (H-8') (figura 211, p. 234).

Figura 211 - Correlações a longa distância (*g*HMBC) e acoplamentos escalares homonucleares $^1\text{H}/^1\text{H}$ selecionados.

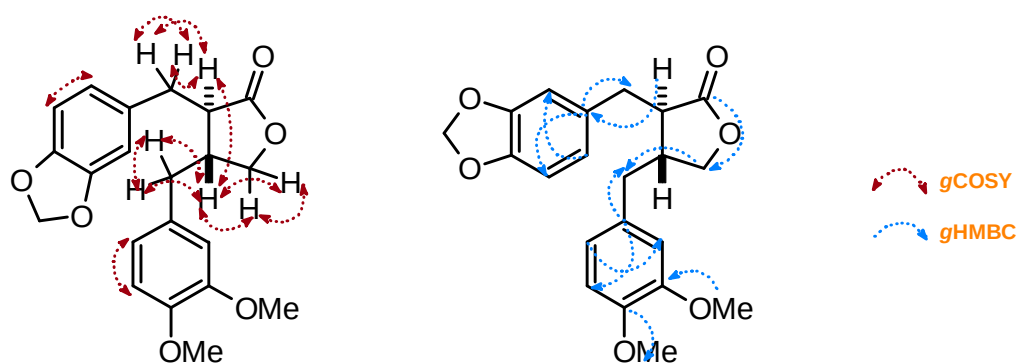
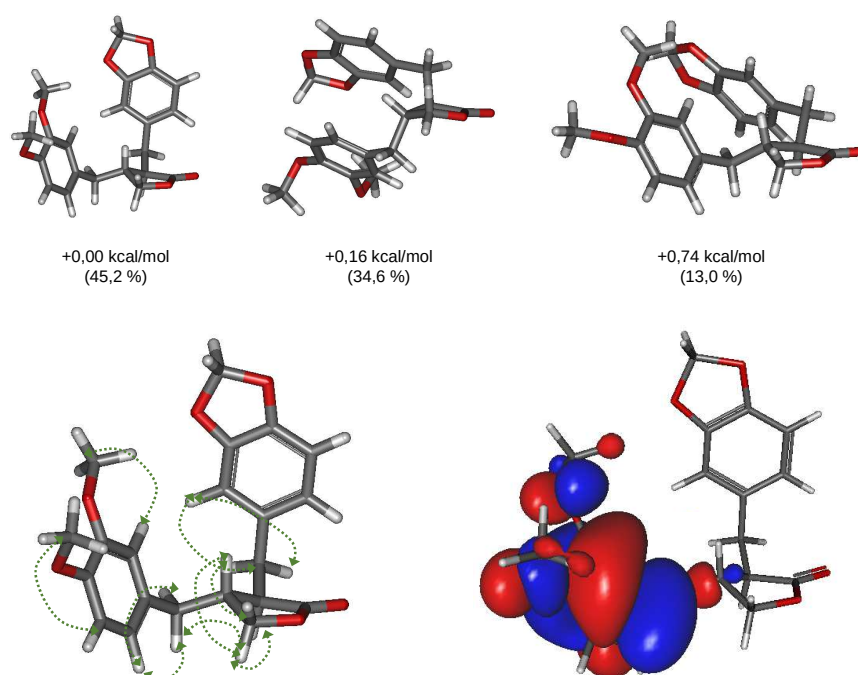


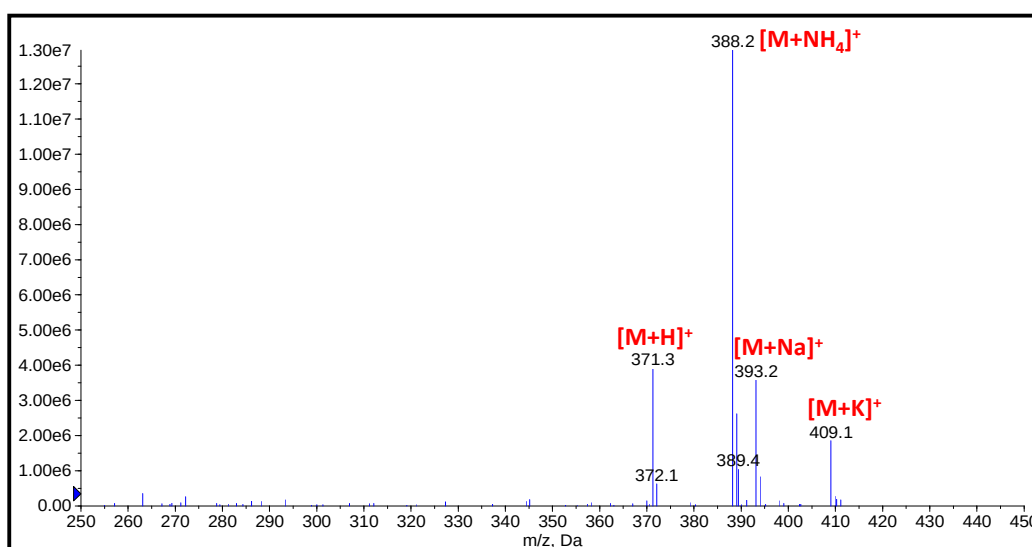
Figura 212 - Confôrmeros de menor energia²⁹⁸⁻³⁰⁰ de 2, interações espaciais selecionadas e HOMO.



Ademais, os acoplamentos escalares verificados pelo experimento *g*COSY entre o hidrogênio em δ 2,56 (H-8) com os hidrogênios em δ 2,94 (H-7_a) e 2,86 (H-7_b), as multiplicidades desses três hidrogênios (*ddd*, *dd* e *dd*, respectivamente), além das seguintes correlações observadas no mapa de contornos *g*HMBC: 1) δ 41,2 (C-8') x δ 2,94 e 2,86 e 2) δ 178,5 (C-9) x δ 4,15, 3,86, 2,94, 2,83, 2,56 e 2,48, demonstraram que o carbono metilênico com deslocamento químico de δ 34,8 estaria ligado aos carbonos acílico e metínico alifático (δ 41,2) por meio do carbono metínico α -carboxílico (δ 46,4). Com esses dados, evidenciou-se também que o grupo acílico era, mais especificamente, um grupo lactônico, o que condiz com o fato que a substância **2** não pôde ser extraída de uma solução clorofórmica por uma solução básica de KOH.

No espectro de massas da substância **2**, com ionização por *electrospray*, observaram-se quatro picos com razões massa-carga de 371,3, 388,2, 393,2 e 409,1, os quais foram interpretados como sendo das moléculas protonadas e cationizadas com os íons NH_4^+ , Na^+ e K^+ , respectivamente (figura 213, p. 235). Essas informações, somadas àquelas obtidas por espectroscopia de RMN, levaram a propor para **2** a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$, bem como mostraram que esta era uma lignana dibenzilbutirolactônica contendo um grupo piperonílico e um grupo veratrílico.

Figura 213 - Espectro de massas de **2** (IES, +10 V, infusão direta).



Pelas correlações a longa distância observadas no mapa de contornos *g*HMBC entre os carbonos aromáticos não hidrogenados (C-1, C-3, C-4, C-1', C-3' e/ou C-4') e/ou os hidrogênios metilenodioxílicos, hidrogênios metoxílicos, hidrogênios metíni-

cos aromáticos, hidrogênios metilênicos diastereotópicos benzílicos, além das correlações dos carbonos metilênico carbinólico (C-9') e acílico (C-9) com os hidrogênios benzílicos (figura 211), comprovou-se que a piperonila estaria ligada a C-7 e a veratril a C-7'. Por espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico, ratificou-se isso pelo padrão de fragmentação observado para a lignana **2**, em especial pelo fragmento de m/z 218 (figuras 214 e 215, p. 236 e 237).¹⁹³

Figura 214 - Proposta de fragmentação da lignana **2**.

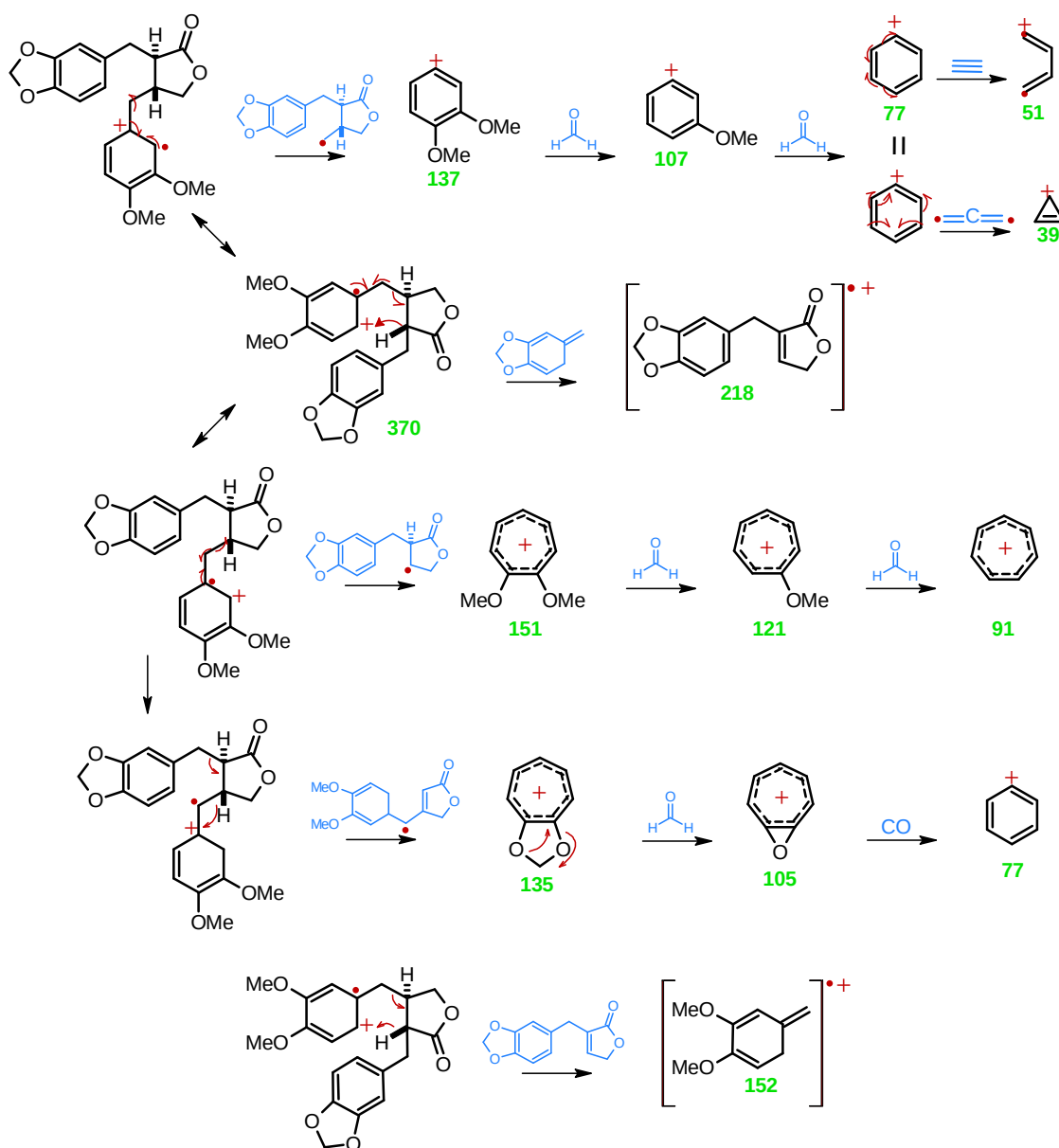
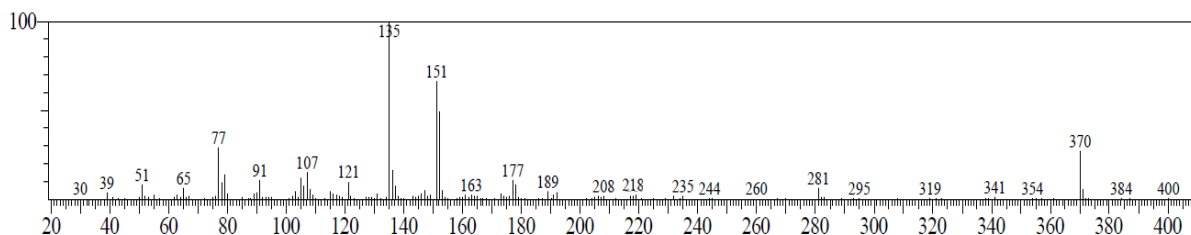


Figura 215 - Espectro de massas por impacto eletrônico de **2**.

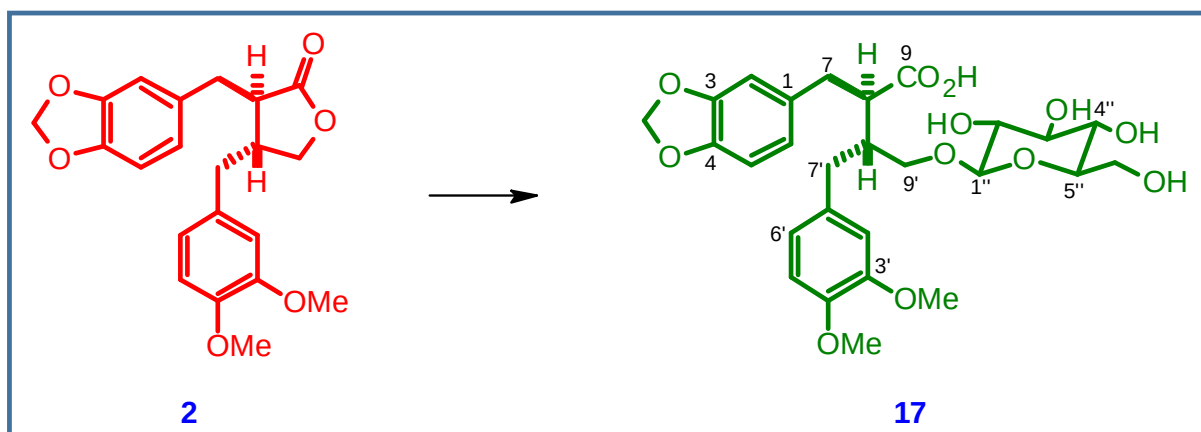
Em ambos os estereoisômeros, *cis* e *trans*, a constante de acoplamento entre os H-8 e H-8' é de 8-9 Hz, o que torna o seu valor pouco prático para distingui-los.¹⁹⁴ No entanto, as configurações relativas de 2,3-dibenzilbutirolactonas podem ser determinadas por RMN de ¹H, particularmente pelos parâmetros espectrais extraídos das análises dos sinais dos hidrogênios ligados ao $-\text{CH}_2\text{OR}$ (C-9'). Segundo Corrie *et al.* (1969), a equivalência dos deslocamentos químicos desses hidrogênios (diastereotópicos) indica a configuração *cis*, enquanto a não equivalência corresponde a configuração *trans*.^{193,194} Neste sentido, eles observaram que na hinoquinina (isômero *cis*) todos os hidrogênios benzílicos eram não equivalentes, ao mesmo tempo que os oximetilênicos eram equivalentes e geravam apenas um sinal em δ 4,02; um dubleto aparente de 3 Hz, que, na verdade, era um multipeto de um sistema AA'X. Porém, para a isohinoquinina, onde os substituintes estão em *trans*, a situação foi totalmente inversa a da hinoquinina.^{193,194} Já que no espectro de RMN de ¹H da lignana **2** (figura 206, p. 230) foram observados dois duplos dubletos em δ 4,15 e 3,86, a configuração relativa de **2** foi estabelecida como sendo *trans*. Isso foi confirmado por comparação dos dados espectrométricos obtidos para **2** com os publicados para os estereoisômeros *cis* e *trans*, bem como por experimentos de NOESY (figura 212, p. 234).¹⁹³

Baseando-se na magnitude e no sinal da rotação óptica específica observados para **2**, $[\alpha]_D^{25} -34,2$ (CHCl_3 , c. 0,16) e $[\alpha]_{546}^{23} -40$ deg/[dm(g.cm⁻³)] (c. 0,13; CHCl_3), estabeleceu-se que as configurações em C-8 e C-8' de **2** eram *R* e *S*, respectivamente. A configuração absoluta da lignana dibenzilbutirolactônica kusunoquinina (**2**) foi previamente estabelecida por estudos de dicroísmo circular eletrônico, por medidas de dispersão rotatória óptica e por sínteses estereocontroladas.^{193,301-307}

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **2** (CDCl_3 , 14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	2	2	Posição	2	2
	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
1	–	131,3	8'	2,48 <i>m</i>	41,2
2	6,60 <i>d</i> , $W_{1/2}$ 1,8 e 0,6	109,4	9'a	4,15 <i>dd</i> , 9,0 e 7,2	71,2
3	–	147,9	9'b	3,88 <i>dd</i> , 9,0 e 7,8	
4	–	146,4	OMe-3'	3,83 <i>s</i>	55,8
5	6,71 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 7,8 e 0,6	108,2	OMe-4'	3,86 <i>s</i>	55,9
6	6,59 <i>dd</i> , $W_{1/2}$ 7,8 e 1,8	122,2	OCH ₂ O	5,94 <i>d</i> , $W_{1/2}$ 1,2 e 5,93 <i>d</i> , $W_{1/2}$ 1,2	101,1
7 _a	2,96 <i>dd</i> , 14,4 e 5,3	34,8			
7 _b	2,85 <i>dd</i> , 14,4 e 7,2				
8	2,56 <i>ddd</i> , 8,2, 7,2 e 5,3	46,4			
9	–	178,5			
1'	–	130,4			
2'	6,48 <i>d</i> , 2,4	11,7			
3'	–	149,1			
4'	–	147,9			
5'	6,76 <i>d</i> , 7,8	111,3			
6'	6,58 <i>dd</i> , 7,8 e 2,4	120,6			
7'a	2,62 <i>m</i>	38,7			
7'b	2,50 <i>m</i>				

4.4.5.2 Ácido (–)-(8*S*,8'*R*)-(3,4-metilenodioxi)-(3',4'-dimetoxi)-9'-*O*-β-glucopiranyl-lignan-9-óico (**17**)



A substância **17** foi obtida após fracionamento por CLAE da fração C2-F, conforme descrito no item 3.8.1.5. A substância **17** é pouco solúvel em CHCl_3 , parcialmente solúvel em $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ e muito solúvel em CH_3OH e $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$.

Assim como fora observado no espectro da lignana **2**, o espectro de RMN de ^1H da substância **17** (figura 216, p. 239) também mostrou sinais atribuíveis a um grupo pi-

peronílico e um grupo veratrílico: dois singletos de hidrogênios metoxílicos em δ 3,81 e 3,77, dois dubletos de hidrogênios diastereotópicos de um grupo metilenodioxílico em δ 5,88 ($W_{1/2} = 1,2$ Hz) e 5,87 ($W_{1/2} = 1,2$ Hz), dois dubletos em δ 6,65 ($W_{1/2} = 7,8$ Hz) e 6,56 ($J = 1,8$ Hz), dois duplos dubletos em δ 6,74 ($W_{1/2} = 7,8$ e 1,8 Hz) e 6,59 ($W_{1/2} = 7,8$ e 1,8 Hz), um dubleto largo em δ 6,84 ($W_{1/2} = 7,8$ Hz) e um singlete largo em δ 6,74 (figuras 216 e 217, p. 240). As multiplicidades desses dois últimos sinais, adjetivados aqui de largos, foram mais complexas, desde que estes pertenciam a um sistema de *spin* ABX. Apesar do acoplamento de segunda ordem ter dificultado as análises dos sinais, a manifestação desse fenômeno forneceu informações valiosas. Primeiramente, este indicou que os três sinais mais desblindados do espectro pertenciam aos hidrogênios de um dos anéis aromáticos. Consequentemente, este mostrou também que os demais sinais, “na região de absorção de hidrogênios aromáticos”, pertenciam aos hidrogênios do outro anel aromático, o que foi confirmado pelo experimento de gCOSY (figuras 217-220, p. 240-242).

Figura 216 - Espectro de RMN de ^1H de **17** (CD_3OD , 600 MHz).

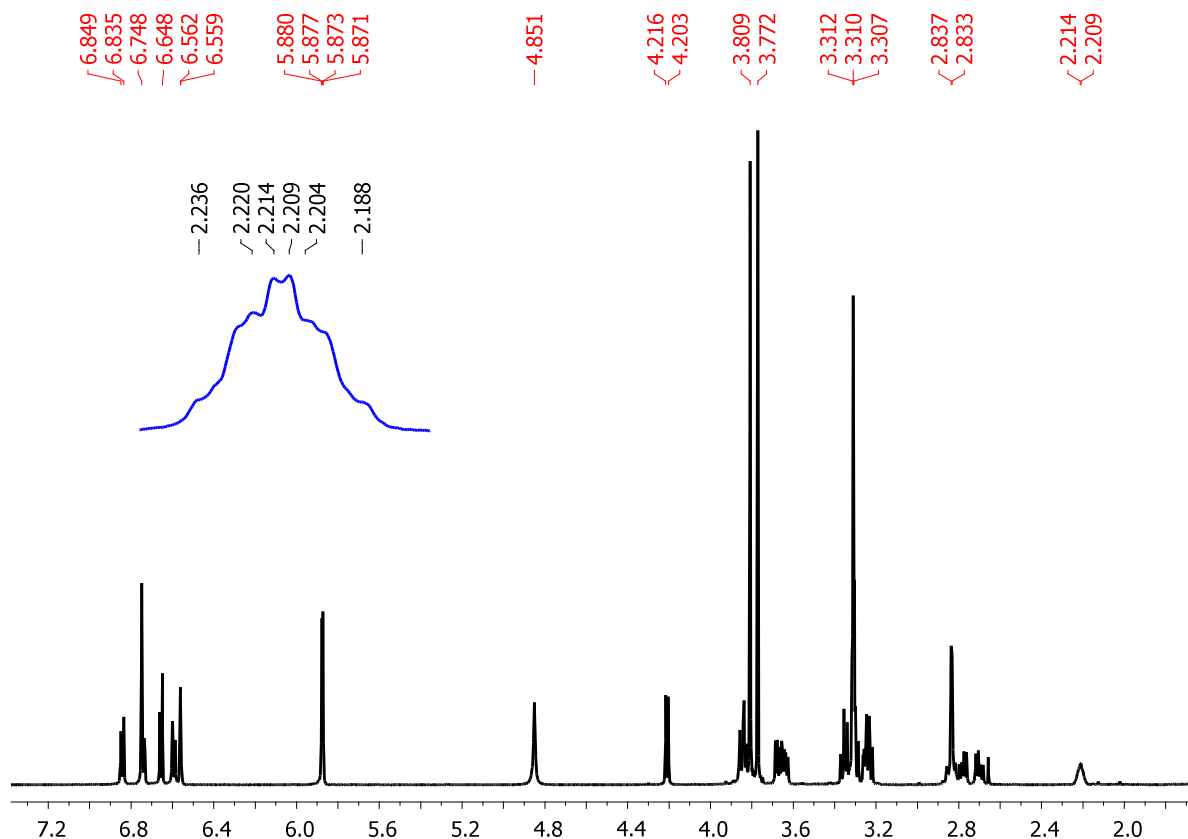


Figura 217 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **17** (CD_3OD , 600 MHz).

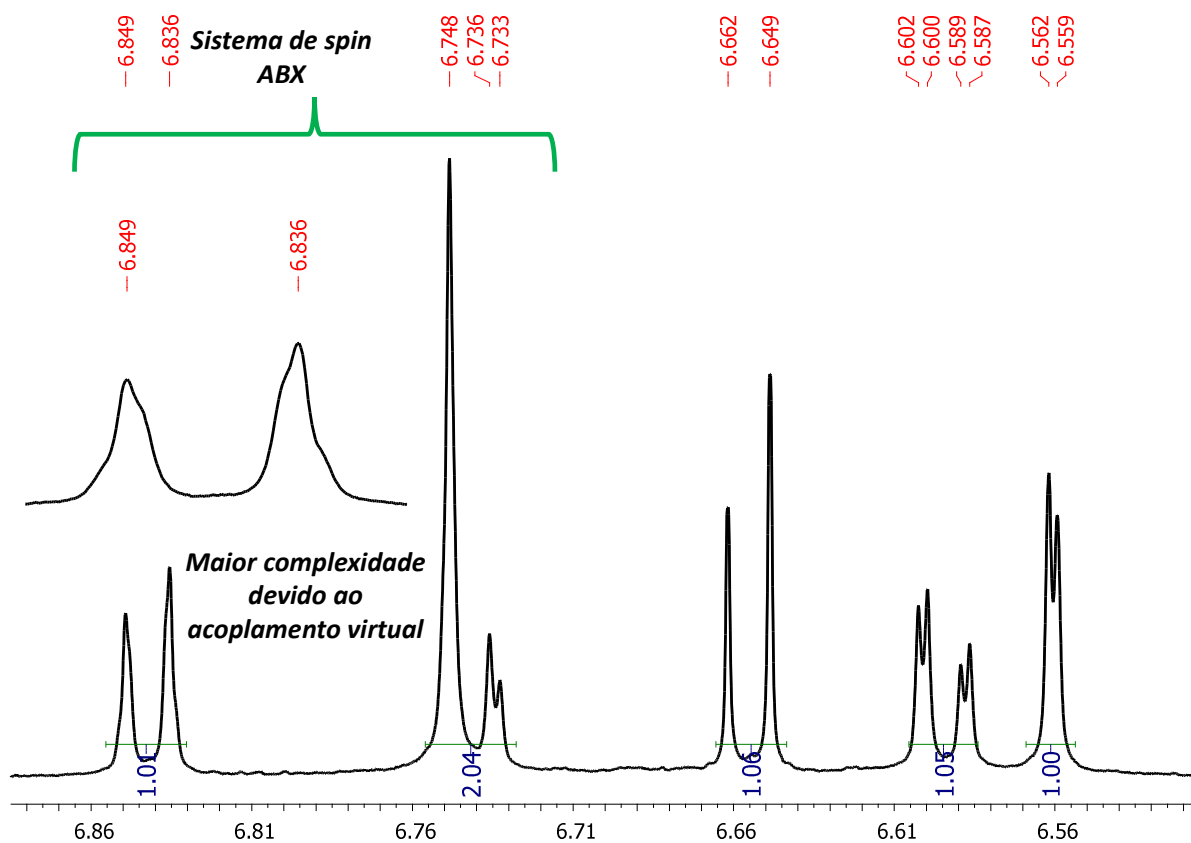
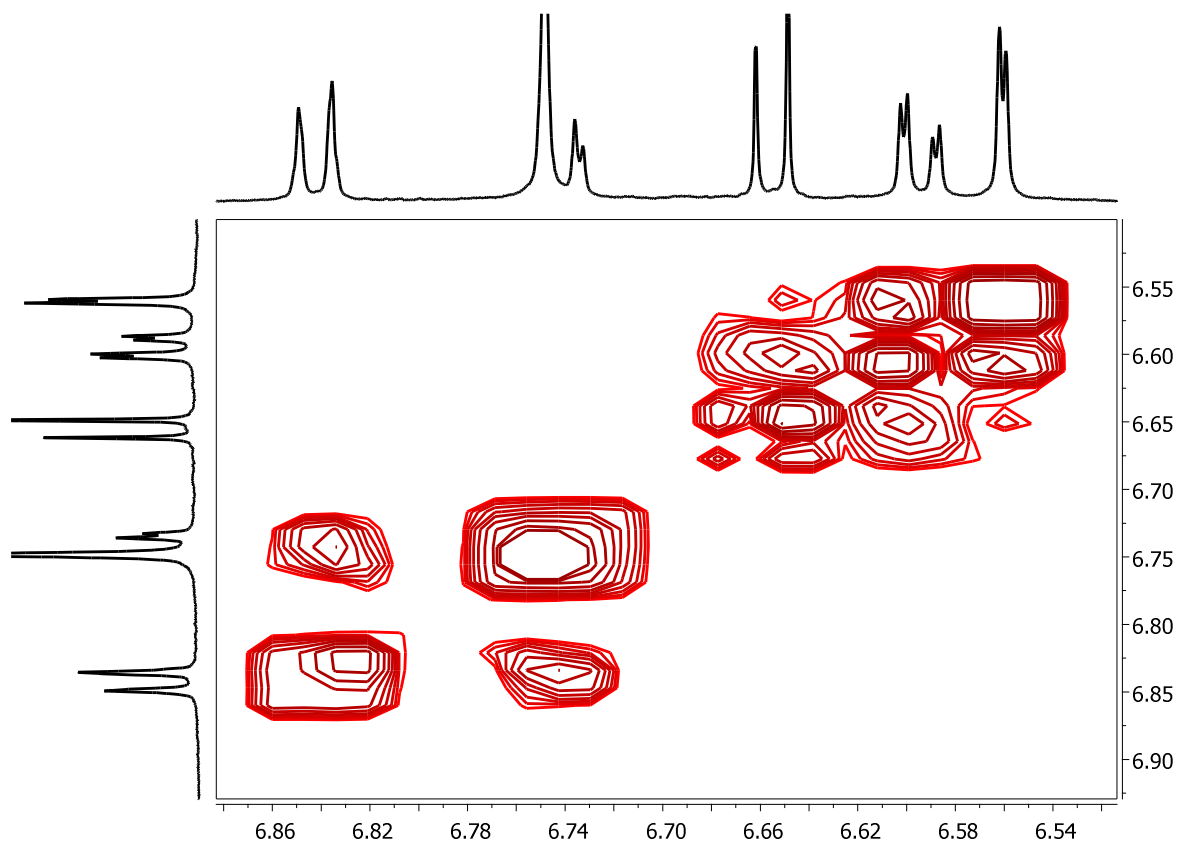


Figura 218 - Expansão do mapa de gCOSY de **17** (CD_3OD , 14,1 T).



No espectro de RMN de ^1H de **17** (figura 217, p. 239) foram ainda observados dois duplos dubletos em δ 2,78 e 2,70, dois multipletos em δ 2,84 e 2,83, três duplos dubletos em δ 3,23, 3,64 e 3,67, um duplo duplo dubleto em δ 3,24, um triplete em δ 3,35, um dubleto em δ 4,21, um sinal em δ 3,30, além de dois dubletos em δ 3,84 e 3,85, parcialmente sobrepostos. Análises sistemáticas e conjuntas dos espectros de *g*COSY, *g*HSQC e *g*HSQC-TOCSY revelaram que estes sinais compunham dois sistemas de *spin*. O primeiro era constituído pelos hidrogênios com deslocamentos químicos de δ 2,21 (H-8'), 2,70 (H-7'a), 2,78 (H-7'b), 2,84 (2H_s-7), 2,83 (H-8), 3,84 (H-9'a) e 3,86 (H-9'b) e o segundo pelos hidrogênios com deslocamentos químicos de δ 3,23 (H-2''), 3,24 (H-5''), 3,31 (H-4''), 3,36 (H-3''), 3,69 (H-6''a), 3,86 (H-6''b) e 4,22 (H-1''). Irradiando-se em δ 4,22, confirmou-se isso por experimento de TOCSY 1D (figura 221, p. 242).

Figura 219 - Expansão do mapa de *g*HSQC-TOCSY de **17** (CD₃OD, 14,1 T).

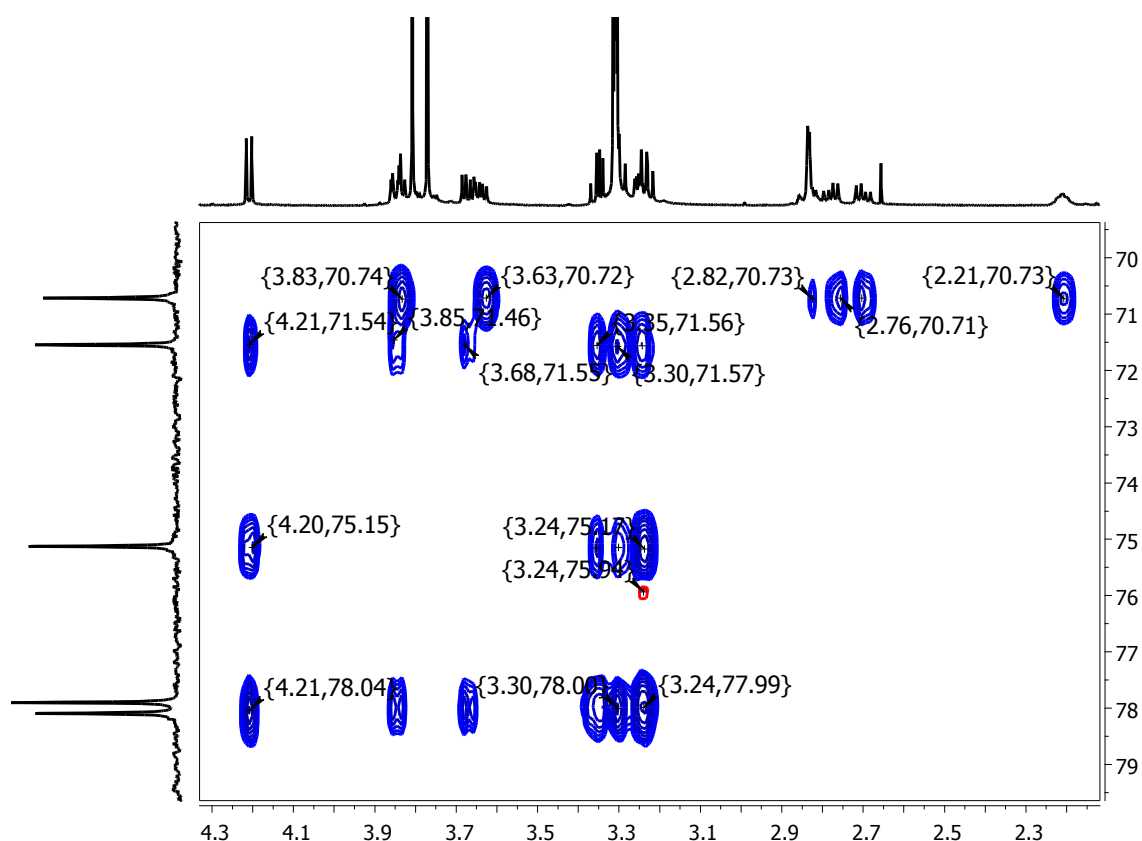


Figura 220 - Expansão do mapa de *g*H¹SQC-TOCSY de **17** (CD₃OD, 14,1 T).

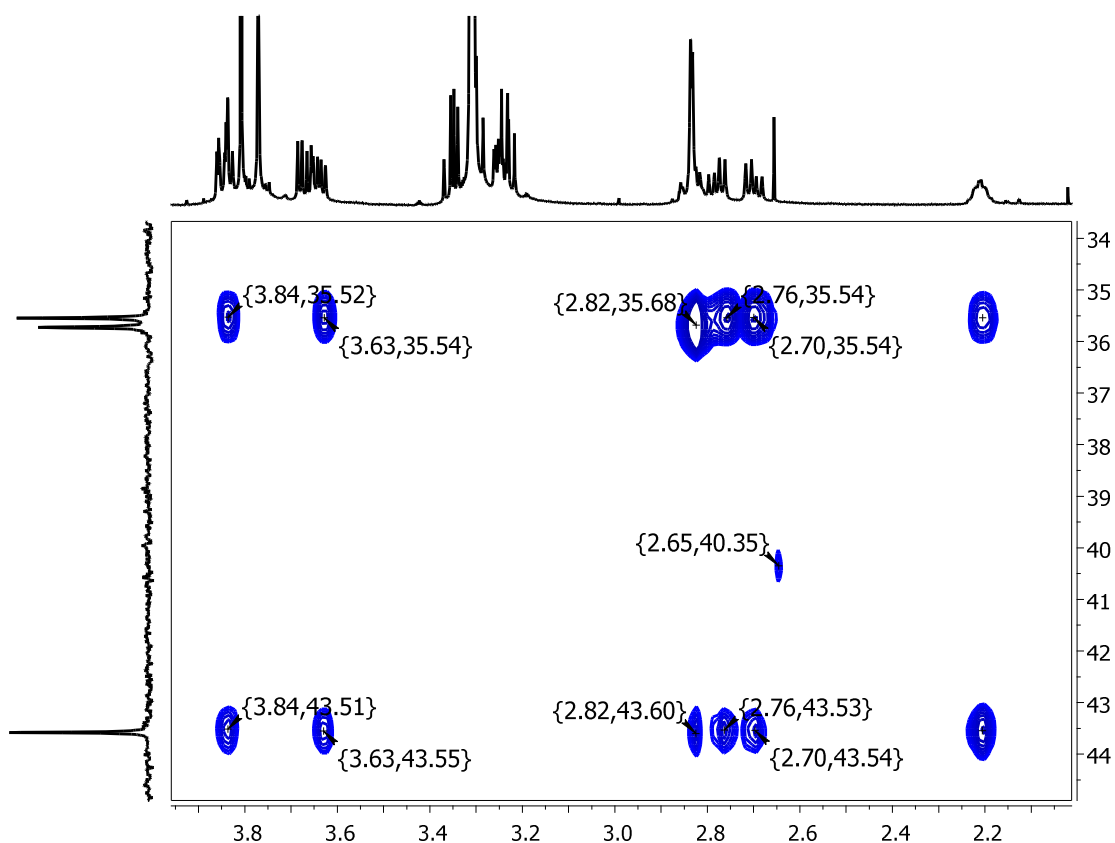
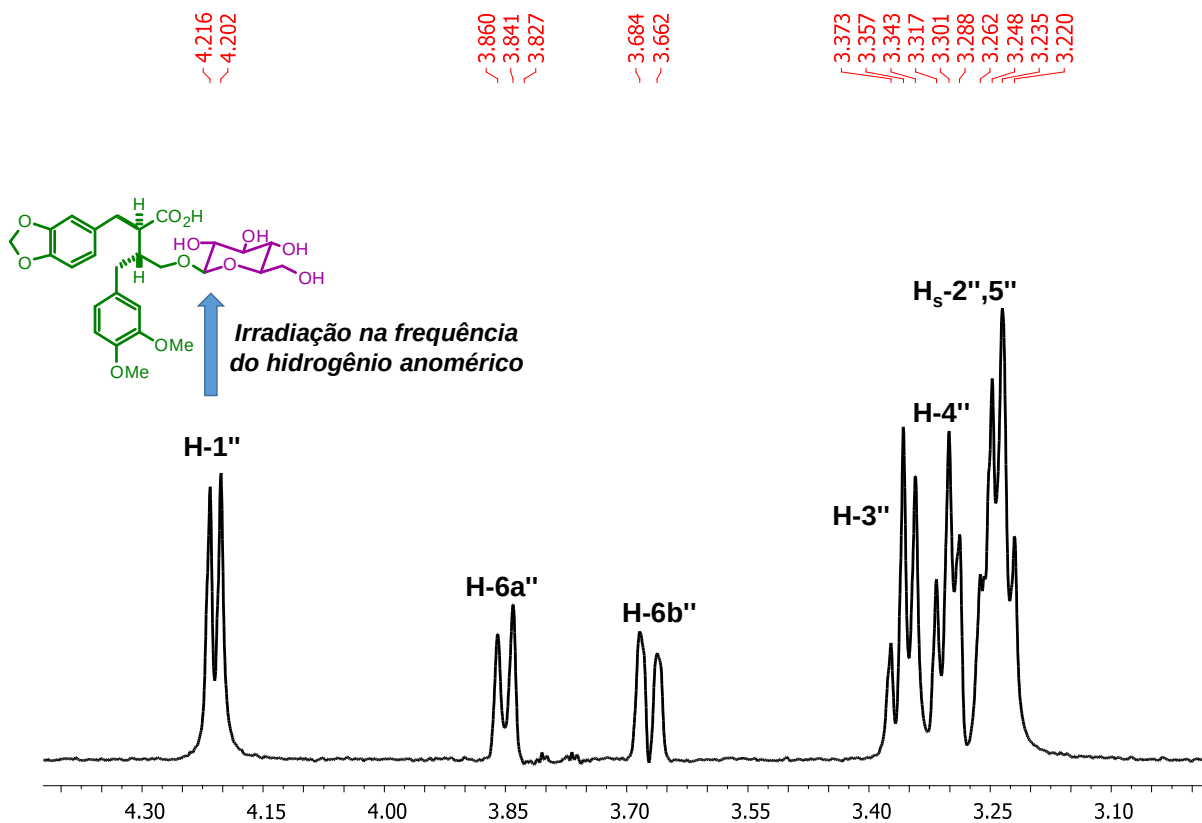


Figura 221 - Experimento de TOCSY 1D de **17** (CD₃OD, 600 MHz).



No espectro de APT da substância **17** (figuras 222-224, p. 243 e 244) observaram-se 26 sinais, os quais, mediante uma análise conjunta desse espectro com os mapas de contornos *g*HSQC e *g*HMBC e com o espectro de RMN de ^1H , foram atribuídos a dois carbonos metoxílicos aromáticos, a cinco carbonos metilênicos: dois benzílicos, dois carbinólicos e um metilenodioxílico, a sete carbonos não hidrogenados, dos quais um era acílico e quatro eram de carbonos aromáticos oxigenados, e a doze carbonos metínicos, que incluíam seis aromáticos e cinco carbinólicos. Além desses 26 sinais, mostrou-se que havia um sinal junto com o do solvente deuterado, como evidenciado pela correlação direta – 1J – do hidrogênio em δ 2,83 (H-8) com o carbono em δ 48,8 (C-8) e pelas correlações a longa distância desse carbono com os hidrogênios em δ 3,84 (H-9'a), 3,64 (H-9'b), 2,84 (2H_s-7), 2,78 (H-7'a), 2,70 (H-7'b) e 2,21 (H-8').

Figura 222 - Espectro de APT de **17** (CD₃OD, 151 MHz).

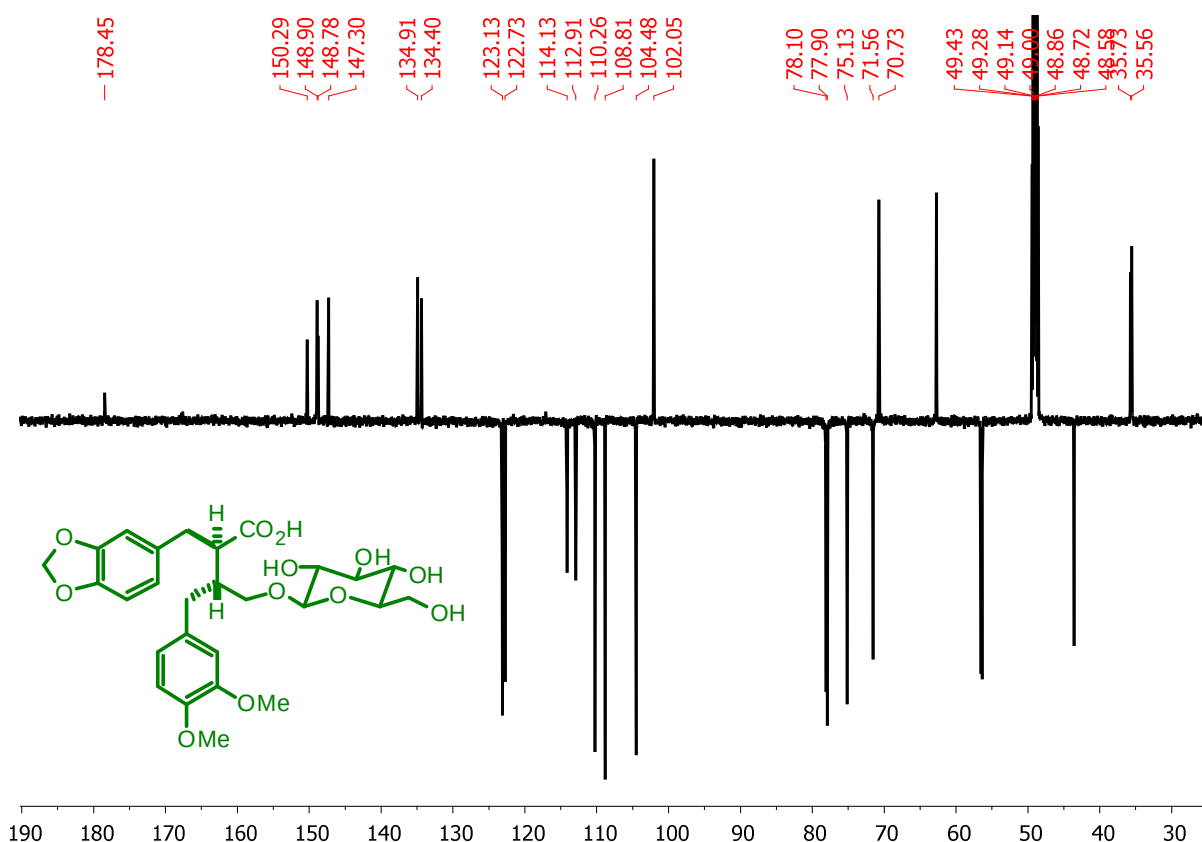
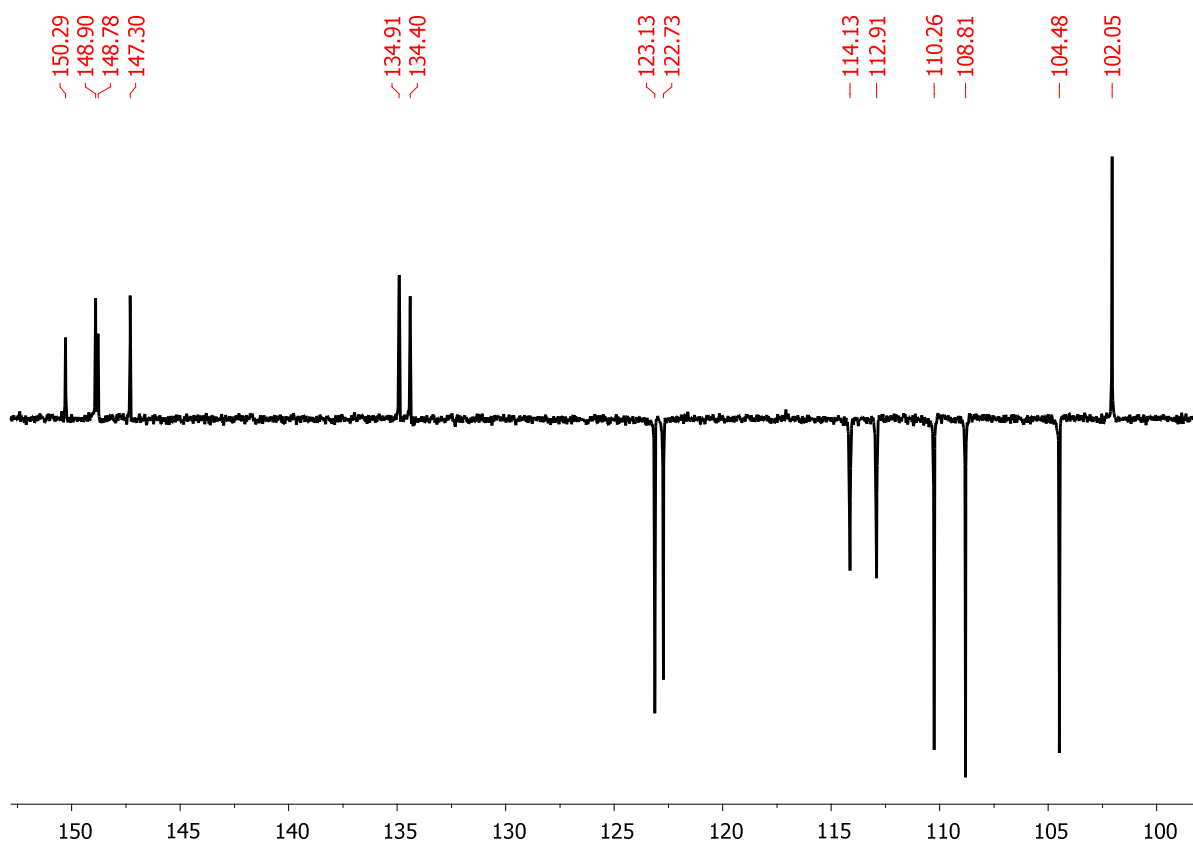
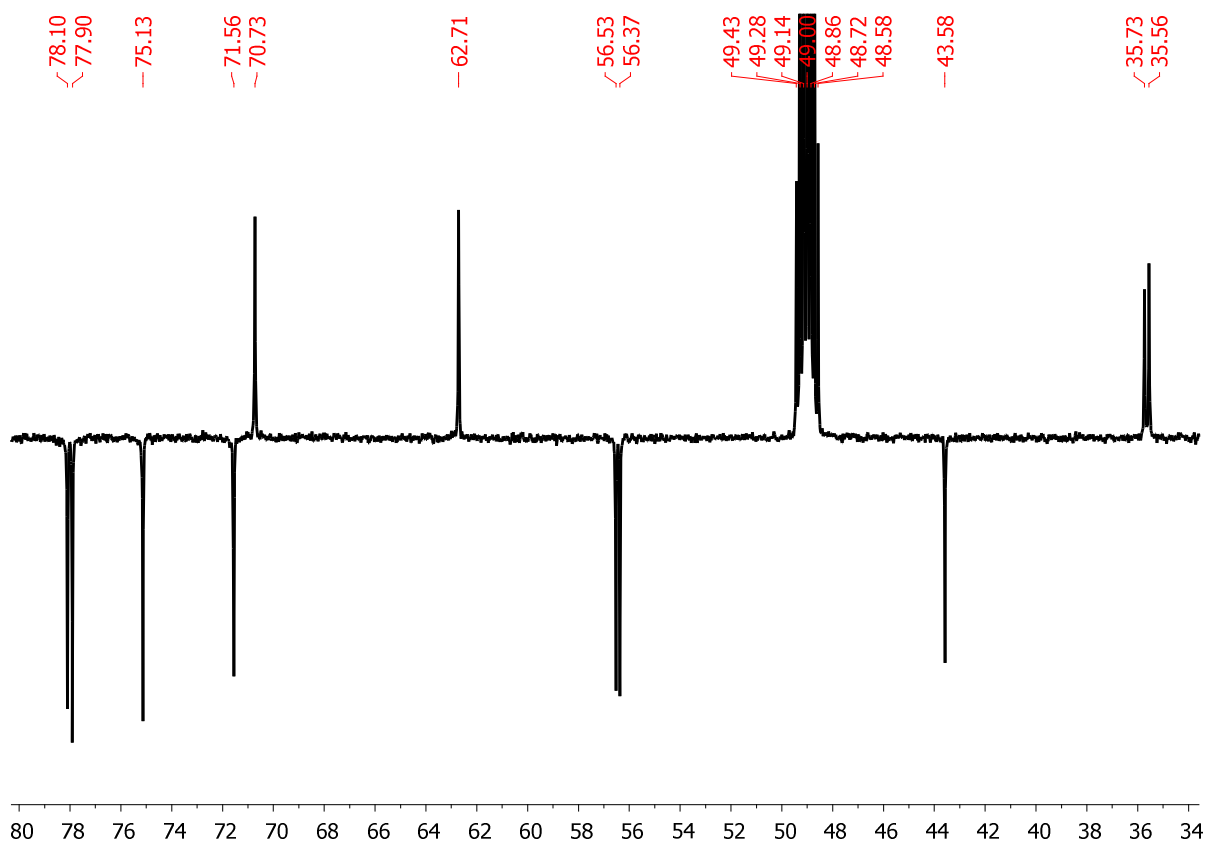
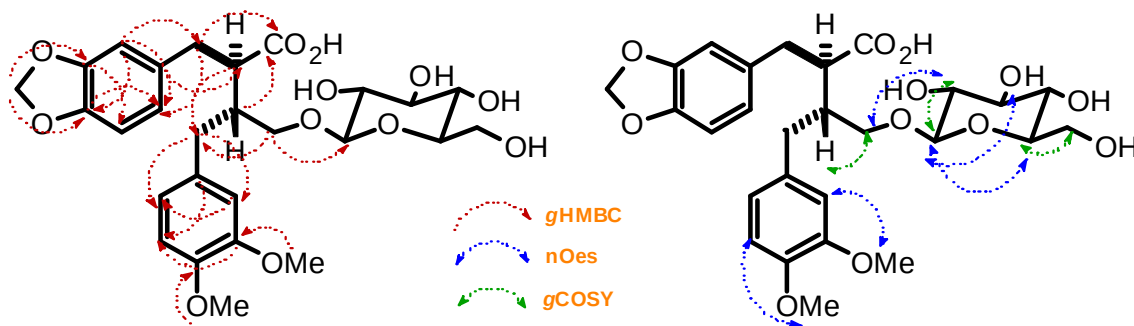


Figura 223 - Expansão do espectro de APT de **17** (CD₃OD, 151 MHz).Figura 224 - Expansão do espectro de APT de **17** (CD₃OD, 151 MHz).

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos (δ 104,5, 78,1, 77,9, 75,1, 71,6 e 62,7) que compunham o sistema de *spin* do qual o hidrogênio em δ 4,20 (H-1'') fazia parte, aliados aos parâmetros espectrais – deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento – extraídos das análises dos sinais dos hidrogênios que o [sistema de *spin*] integravam, foram sugestivos da presença de uma unidade glicosídica na estrutura molecular de **17**. Mais especificamente, esses dados sugeriram-na como sendo uma β -glucosila, uma vez que foram observadas constantes de acoplamentos diaxiais entre os H-1'' e H-2'', H-2'' e H-3'', H-3'' e H-4'' e H-4'' e H-5'' (tabela 16, p. 248). Além disto, irradiando-se na frequência de absorção do hidrogênio anomérico (H-1'') houve aumento da intensidade dos sinais dos H-3'' e H-5'', o que corroborou com a natureza proposta para a unidade glicosídica. A posição da glucosila foi estabelecida pela correlação a longa distância entre o C-4 e o H-1'', bem como pelas demais observadas por esse experimento (figura 225, p. 245).

A exemplo de **2**, os dados espectrométricos obtidos para **17** foram compatíveis com os de um dímero C₆-C₃. Análises detalhadas dos espectros uni- e bidimensionais, sobretudo, dos mapas de contornos *g*HMBC e *g*COSY, revelaram que i) as unidades C₆-C₃ estavam unidas, via dois carbonos metínicos, por uma ligação C8-C8', que ii) o grupo 3,4-metilenodioxibenzílico e o carbono acílico estavam ligados ao mesmo carbono metínico e que iii) o grupo 3,4-dimetoxibenzílico e o carbono metilênico em δ 70,7 estavam unidos pelo outro carbono metínico (figura 225, p. 245).

Figura 225 – Correlações a longa distância, acoplamentos escalares homonucleares $^1\text{H}/^1\text{H}$ e interações espaciais selecionadas.



O espectro de massas (figura 226, p. 246), no modo negativo, da lignana **17** apresentou um pico em m/z 549,1966, enquanto o espectro no modo positivo (figura 226, p. 246) apresentou vários picos incluindo aqueles de íons com m/z 573,1940, 589,1681 e 389,1588. Os picos em m/z 573,1940 e 589,1681 foram interpretados como sendo de moléculas cationizadas com os íons Na^+ e K^+ , o que, consequente-

mente, evidenciou que o pico em m/z 549,1966 era das moléculas desprotonadas. Partindo-se dessas premissas, foi proposto que o íon com m/z 389,1588, o qual é ~ 18 u maior do que o $[M+H]^+$ da lignana **2**, seria da aglicona protonada. Esses dados foram compatíveis com os de um glicosídeo de um dímero C₆-C₃ com fórmula molecular C₂₇H₃₄O₁₂ (figura 227, p. 246).

Figura 226 - Espectro de massas de alta resolução de **17**.

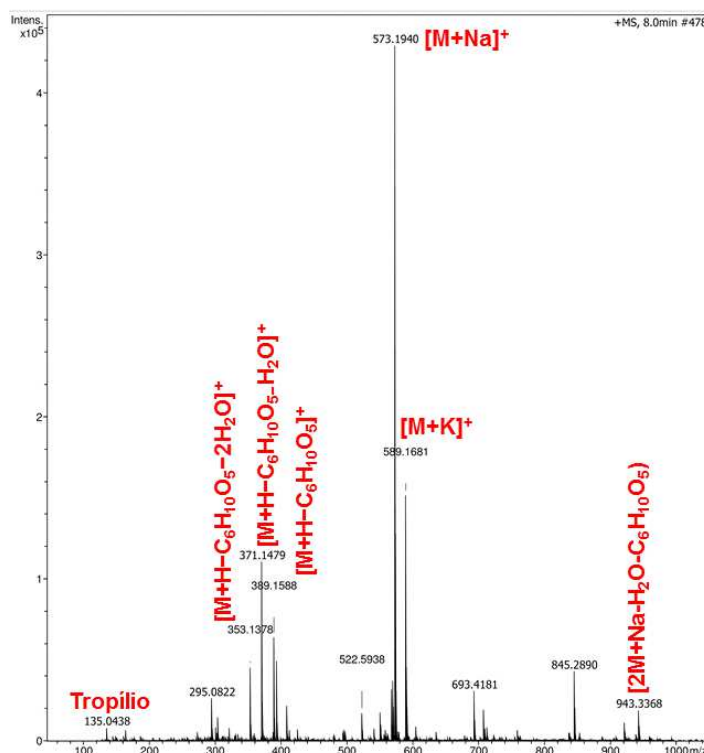
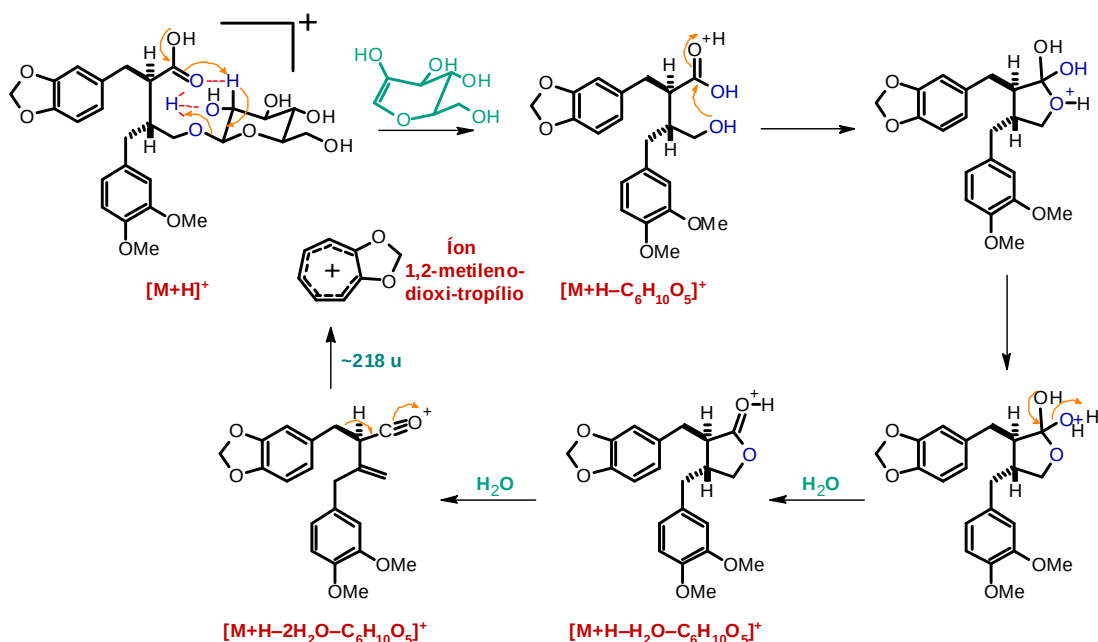
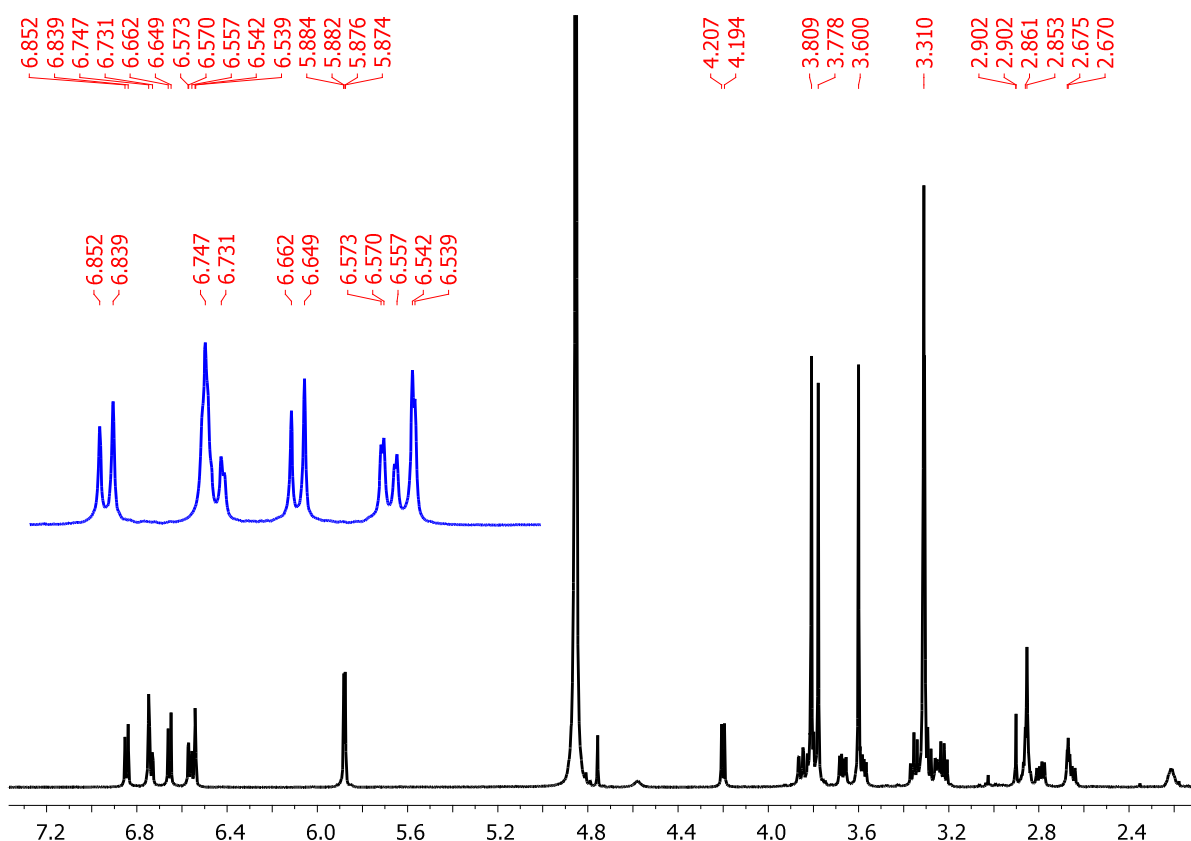


Figura 227 - Proposta de fragmentação da lignana **17**.



A ausência, no mapa de contornos *g*HMBC, de correlações entre o $-\text{CO}_2\text{R}$ e os H-9'a e H-9'b, as correlações a longa distância observadas entre o C-9 e os H-8, H-8' e H-7, juntamente com o valor de *m/z* determinado por EM-ESI para a aglicona protonada, $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6]^+$, sugeriram que a lignana **17** continha um grupamento de ácido carboxílico, o que foi confirmada por metilação de **17** com CH_2N_2 rendendo o respectivo éster metílico **17a**. A formação de **17a** foi confirmada pela blindagem de 1,6 ppm observada para o carbono carboxílico (C-9) e pelos sinais adicionais de carbono (δ 52,0) e hidrogênios (δ 3,62) metoxílicos presentes nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H , respectivamente (figuras 228 e 229, p. 247 e 249).

Figura 228 - Espectro de RMN de ^1H de **17a** (CD_3OD , 600 MHz).

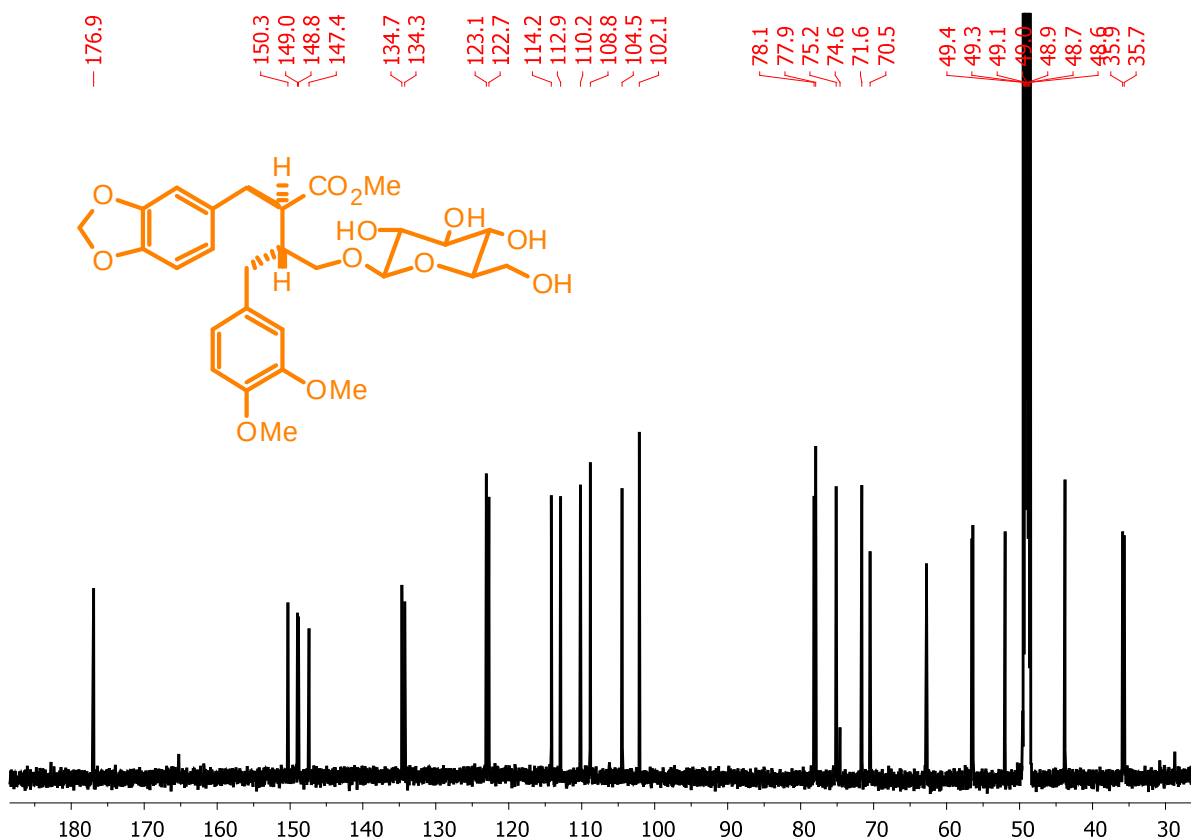
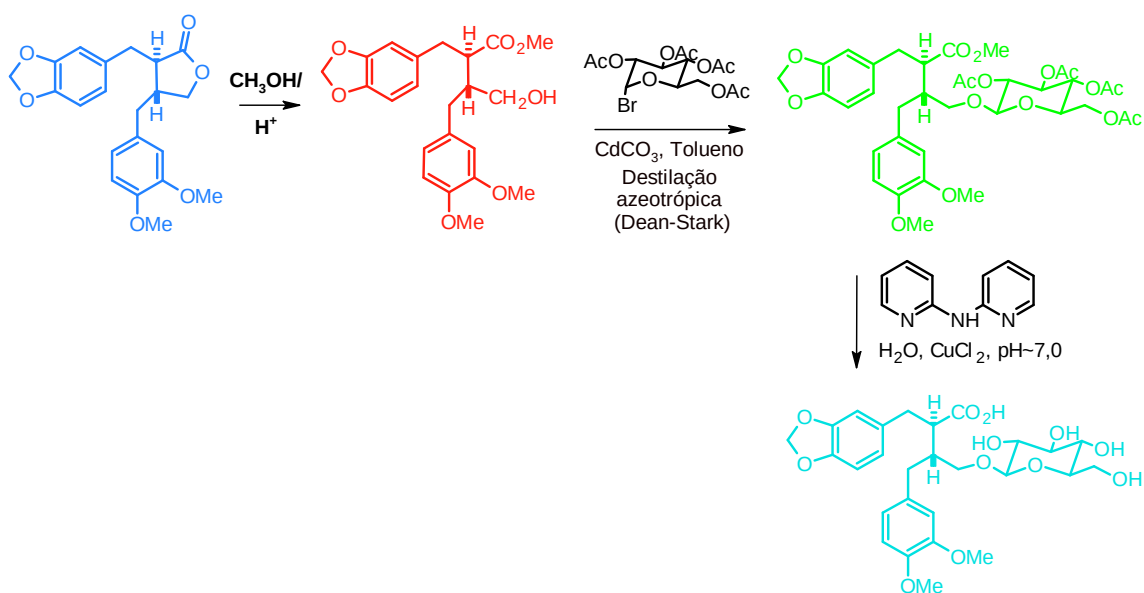


Assim, a substância **17** foi caracterizada como sendo a lignana dibenzilbutânica glicosilada ácido (3,4-metilenodioxi)-(3',4'-dimetoxi)-9'-O- β -glucopiranyl-lignan-9-óico (ácido 9'-O- β -glucopiranyl-battusóico A). As atribuições dos deslocamentos dos carbonos e hidrogênios de **17** e **17a** foram efetuadas por meio de análises sistemáticas dos espectros uni- e bidimensionais, bem como por comparação dos dados obtidos com os disponibilizados na literatura.³⁰⁸

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **17**, **17a**, **18** e **18a** (14,1 T, δ , $W_{1/2}$ ou J em Hz).

Posição	17	17	17a	18	18	18a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	134,9	—	134,7	135,0	—	134,7
2	110,2	6,56 <i>d</i> , 1,4	110,2	110,3	6,60 <i>m</i>	110,2
3	148,9	—	149,0	148,9*	—	149,0
4	147,3	—	147,4	147,3	—	147,4
5	108,8	6,65 <i>d</i> , $W_{1/2} = 7,9$	108,8	108,9	6,66 <i>m</i>	108,9
6	123,1	6,59 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 7,9$ e 1,4	123,1	123,1	6,61 <i>m</i>	123,1
7	35,7	2,83 <i>m</i>	35,9	35,7	2,83-2,85 <i>m</i>	37,8
8	48,7	2,83 <i>m</i>	48,9	48,9	2,83 <i>m</i>	48,9
9	178,5	—	176,9	178,8	—	176,9
1'	134,4	—	134,3	135,3	—	135,1
2'	114,1	6,75 <i>d</i> , $W_{1/2} = 1,8$	114,2	110,5	6,66 <i>m</i>	110,5
3'	150,3	—	150,3	149,0*	—	149,0
4'	148,8	—	148,8	147,3	—	147,3
5'	112,9	6,84 <i>d</i> , $W_{1/2} = 7,9$	112,9	118,9	6,70 <i>m</i>	118,9
6'	122,7	6,74 <i>d</i> , $W_{1/2} = 7,9$ e 1,8	122,7	123,4	6,66 <i>m</i>	123,4
7'	35,5	2,78 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 13,7$ e 7,5 2,70 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 13,7$ e 7,2	35,7	35,7	2,73 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 14,4$ e 7,8 2,69 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 14,4$ e 7,2	37,7
8'	43,6	2,21 <i>quind ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6 e 3,0	43,8	43,8	2,20 <i>quind ap</i> , $W_{1/2}$ 6,6	43,9
9'	70,7	3,84 <i>comp</i> 3,63 <i>dd</i> , 10,2 e 6,0	70,5	70,7	3,83 <i>dd</i> , 10,2 e 5,5 3,63 <i>dd</i> , 10,2 e 6,0	70,4
1''	104,5	4,21 <i>d</i> , 7,8	104,5	104,5	4,21 <i>d</i> , 7,8	104,5
2''	75,1	3,24 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 8,9$ e 7,8	75,2	75,2	3,22 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 8,7$ e 8,4	75,2
3''	78,1	3,36 <i>t</i> , $W_{1/2} = 8,9$	78,1	78,1	3,36 <i>t</i> , $W_{1/2} = 9,0$	78,1
4''	71,5	3,31 <i>dd</i> , $W_{1/2} = 9,4$ e 8,9	71,6	71,6	3,31 <i>t ap</i> , $W_{1/2} = 9,0$	71,6
5''	77,9	3,25 <i>ddd</i> , $W_{1/2} = 9,4$, 5,5 e 2,3	77,9	77,9	3,25 <i>ddd</i> , $W_{1/2} = 9,0$, 5,4 e 2,4	77,9
6''	62,7	3,85 <i>dd</i> , 12,0 e 2,3 3,68 <i>dd</i> , 12,0 e 5,5	62,8	62,7	3,85 <i>dd</i> , 12,0 e 2,4 3,68 <i>dd</i> , 12,0 e 5,4	62,7
OMe-3'	56,4	3,77 <i>s</i>	56,4	—	—	—
OMe-4'	56,5	3,81 <i>s</i>	56,5	—	—	—
OCH ₂ O-3,4	102,1	5,88 <i>d</i> , 1,5 e 5,87 <i>d</i> , 1,5	102,1	102,1*	5,88*	102,1
OCH ₂ O-3',4'				102,0*	5,87*	102,1
CO ₂ Me		—	52,0	—	—	52,0

comp=completo devido a sobreposição com um ou vários sinais. *Atribuições na mesma coluna que podem estar trocados.

Figura 229 - Espectro de RMN de ^{13}C de **17a** (CD_3OD , 151 MHz).4.4.5.2 Determinação da configuração absoluta de **17**Figura 230 - Rota proposta para a síntese de **17** a partir de **2**.

Com base na similaridades estruturais existentes entre as lignanas **2** e **17**, propôs-se a síntese de **17** partindo-se de **2** (figura 230, p. 249). A rota proposta para a hemissíntese de **17** consistia em três etapas: i) reação de transesterificação em meio ácido, ii) reação de glucosilação (Koenigs-Knorr) e iii) hidrólise em pH neutro, sucessivamente.³⁰⁸⁻³¹⁷ Entretanto, todas as tentativas de abertura do anel lactônico de **2** resultaram somente na obtenção de traços do respectivo éster metílico γ -hidroxílico. Essas observações estavam de acordo com as evidências disponíveis na literatura, as quais mostram que, em reações de transesterificação de anéis butirolactônicos, o equilíbrio geralmente está deslocado em sentido a lactonização, devido à variável entrópica.³⁰⁸⁻³¹⁷ É importante salientar que a escolha em se efetuar a reação em meio ácido não foi abirtrária, mas foi feita visando evitar a epimerização do centro estereogênio α ao grupo carboxílico.^{310,311}

Alternativamente, tentou efetuar-se a abertura do anel lactônico de **2** utilizando-se uma amina como nucleófilo. Segundo Foley e Jamison (2010), as constantes de equilíbrio (K_{eq}) em reações de aminólise de butirolactonas são de aproximadamente 1,5.³¹⁵ Neste sentido, avaliou-se duas condições para a aminólise de **2**, inclusive experimentou-se uma condição drástica que envolveu a reação desta com etilamina a alta temperatura por 38 horas. Todavia, destaca-se que mesmo sob essas condições extremas, não se observou a formação do produto desejado, sendo constatada apenas a isomerização do carbono α -carboxílico.

Por causa das dificuldades encontradas na abertura do anel lactônico de **2**, propôs-se então o caminho inverso, isto é, a obtenção de **2** a partir de **17**, visando a determinação da configuração absoluta de **17**. Para isso, uma porção de **17** foi submetida a hidrólise ácida a 88 °C por 8 horas. Sob essas condições, verificou-se que o produto inicial da hidrólise, o ácido γ -hidroxílico, sofreu lactonização espontânea restando a lignana **2**. Obteve-se ainda um mistura contendo o sal de bário de **17** (**17b**) e os anômeros, α e β , da glucopiranosose (**21** e **21-epi**). A identidade da unidade glicosídica foi confirmada por RMN de ^1H (figuras 232 e 233, p. 252) e de ^{13}C , por experimento de TOCSY 1D irradiando-se na frequência de absorção do hidrogênio anomérico da β -glucopiranosose (figura 233, p. 252) e por comparação com dados da literatura.²²³ Já a confirmação da obtenção de **2** foi efetuada por RMN de ^1H e de ^{13}C e por medida polarimétrica. Como a rotação óptica específica observada para o produto de lactonização da aglicona de **17** foi praticamente idêntica a da lignana kusunoquinina

Resultados e discussão

(2) isolada do extrato de fezes: $[\alpha]_{546}^{23} -40 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$ versus $[\alpha]_{546}^{20} -39 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$, deduziu-se que as configurações em C-2 e C-3 de **17** eram *R* e *S*, respectivamente (figura 231, p. 251).

Figura 231 - Espectros de RMN de ^1H de **2** (natural) e do produto de lactonização da aglicona de **17** (sintética) (CDCl_3 , 600 MHz).

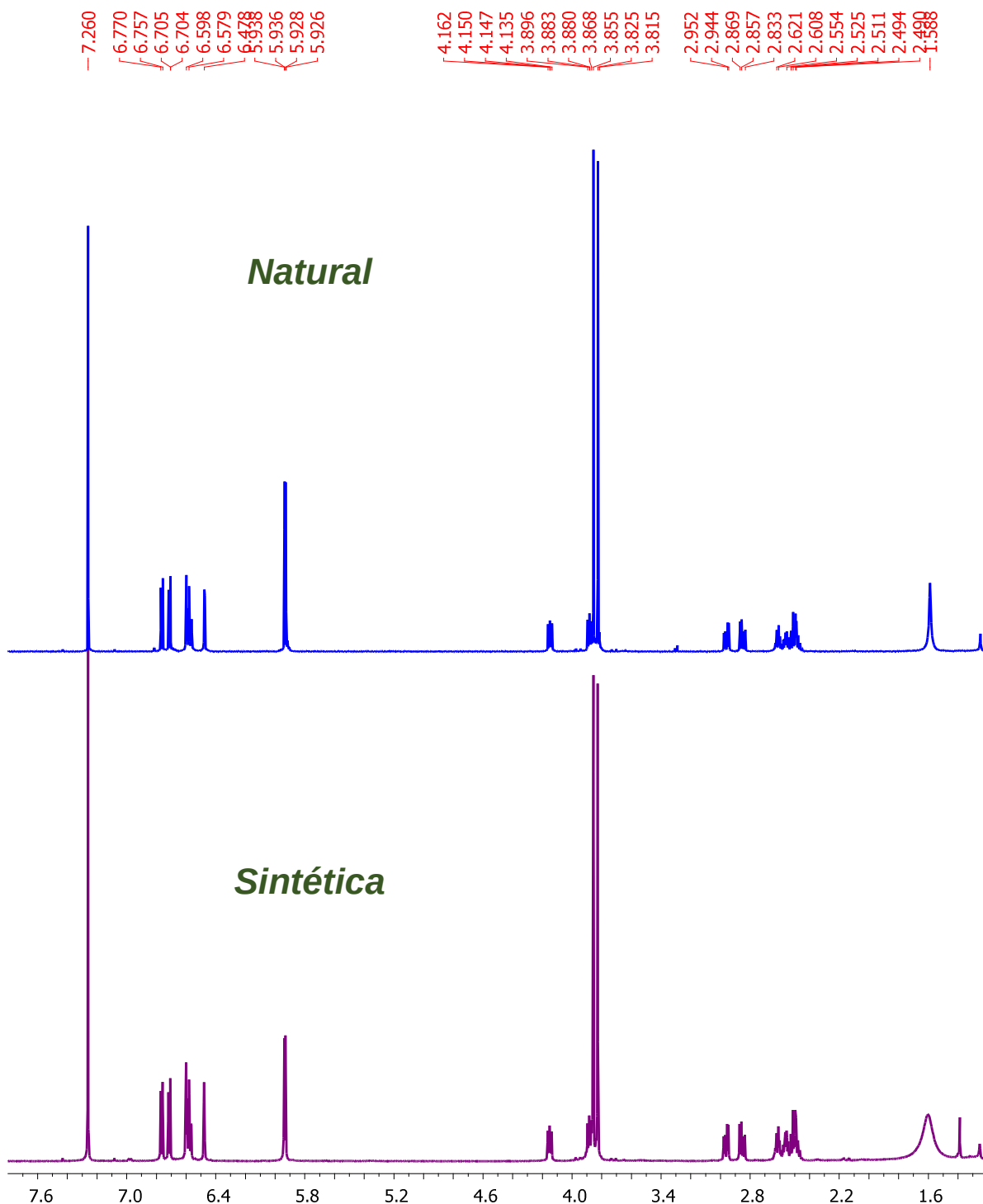
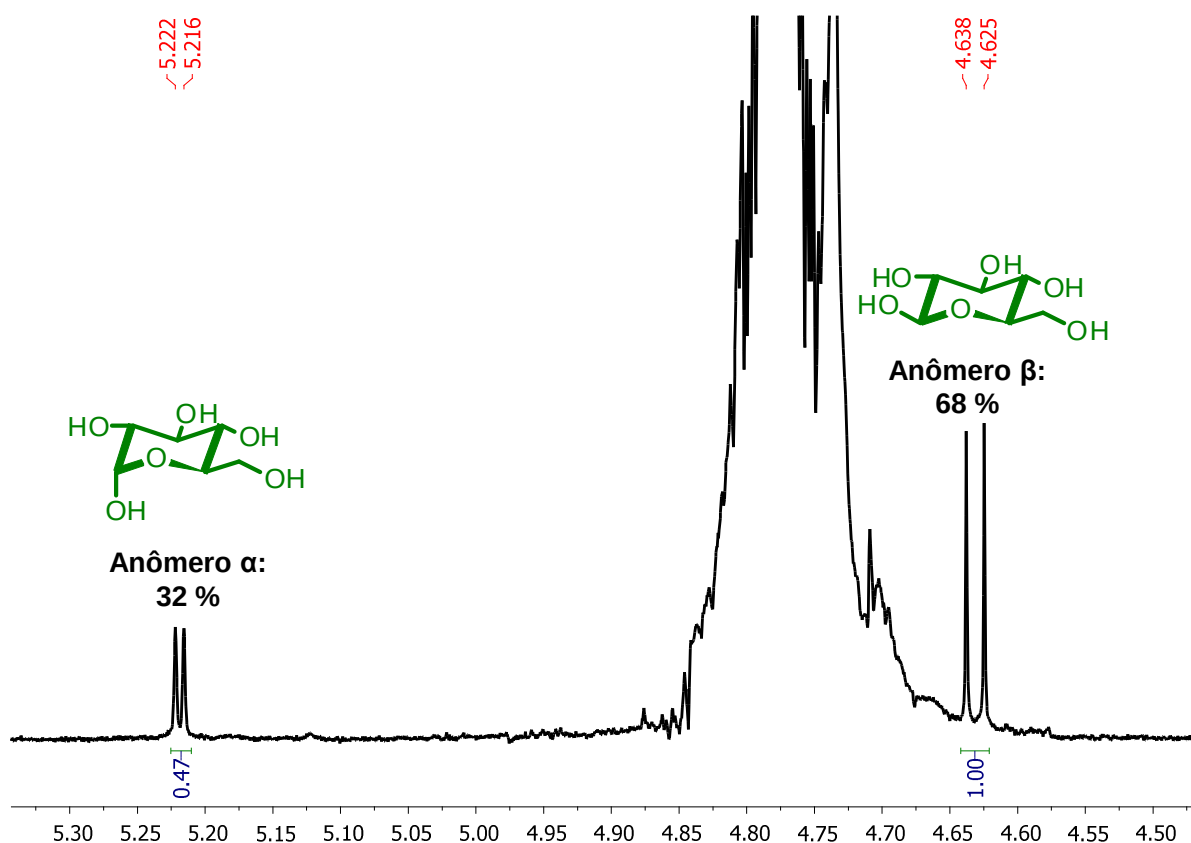
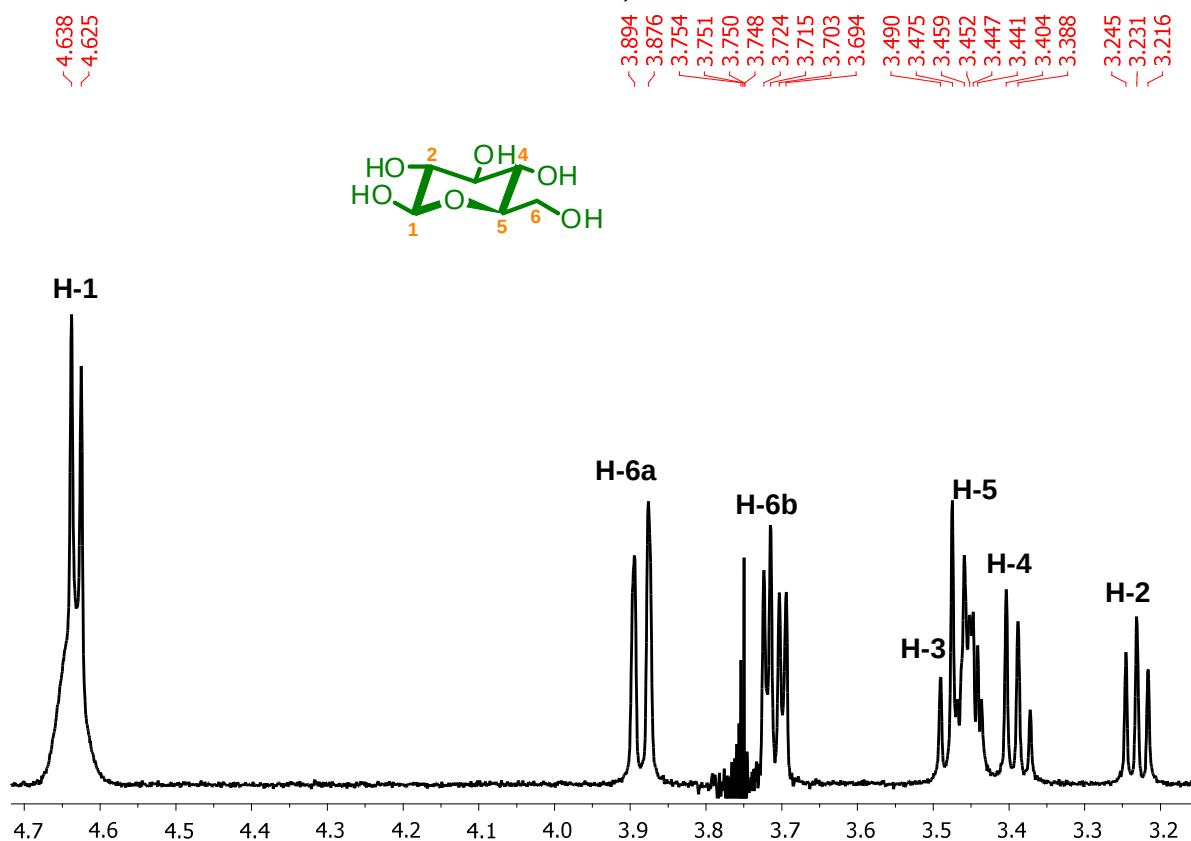
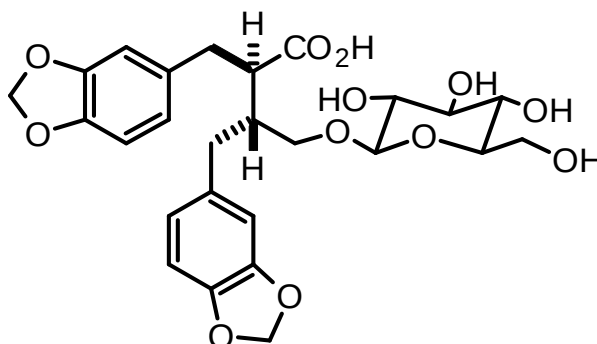


Figura 232 - Espectro de RMN de ^1H de **17b+21+21-epi** (D_2O , 600 MHz).Figura 233 - Experimento de TOCSY 1D irradiando na frequência do H-1 da β -glucose (D_2O , 600 MHz).

4.4.5.3 Ácido (8*R*,8*S'*)-[3,4:3',4'-bis(metilenodioxí)]-9'-*O*-β-glucopiraniil-lignan-9-óico (18)



Os espectros de RMN (figuras 234-238, p. 254-258) e UV de **18** foram muito semelhantes aos de **17**. As principais diferenças entre os espectros de RMN de **18** e **17** foram: i) a ausência dos sinais dos dois grupos metoxílicos no espectro de **18** e ii) a duplicação no espectro de **18** das intensidades dos sinais com deslocamentos químicos típicos de grupos metilenodioxílicos (figura 235, p. 254). Constatou-se ainda que as espécies iônicas detectadas na análise de **18** por EM foram 16 u menores das que as de **17**. Logo, a substância **18** foi caracterizado como sendo o ácido [3,4:3',4'-bis(metilenodioxí)]-9'-*O*-β-glucopiraniil-lignan-9-óico (ácido β-glucopiranosil-battusóico B), cuja a natureza do grupo acílico foi igualmente ratificada por metilação com diazometano.

O ácido 9'-*O*-β-glucopiranosil-battusóico B (**18**) apresentou uma rotação óptica bem próxima daquela observada para **17**; **17**: $[\alpha]_D^{23} -24 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$ e **18**: $[\alpha]_{546}^{21} -24 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})]$. Destaca-se ainda que não foram verificadas diferenças significativas entre as curvas de dicroísmo circular eletrônico de **17** e **18** (figura 239, p. 258). Como mostrado pela figura 239, p. 259, as curvas de **17** e **18** foram praticamente sobreponíveis, sendo observados efeitos Cottons de mesmos sinais. Além disto, a similaridade entre a feição do sinal do H-8' de **17** com o do H-8' de **18** sugeriu que a lignana **17** seria um estereoisômero *treo*. Sendo assim, sugeriu-se que as configurações em C-8 e C-8' de **18** seriam idênticas àsquelas de **17**, o que foi corroborado pelo fato que as configurações em C-8 e C-8' da kusunoquinina (**2**) são as mesmas das lignanas hinoquinina (**8**) e cubebina (**6+6epi**), as quais foram os prováveis substratos metabolizados pelas lagartas para dar **18**.

Figura 234 - Espectro de RMN de ^1H de **18** (CD_3OD , 600 MHz).

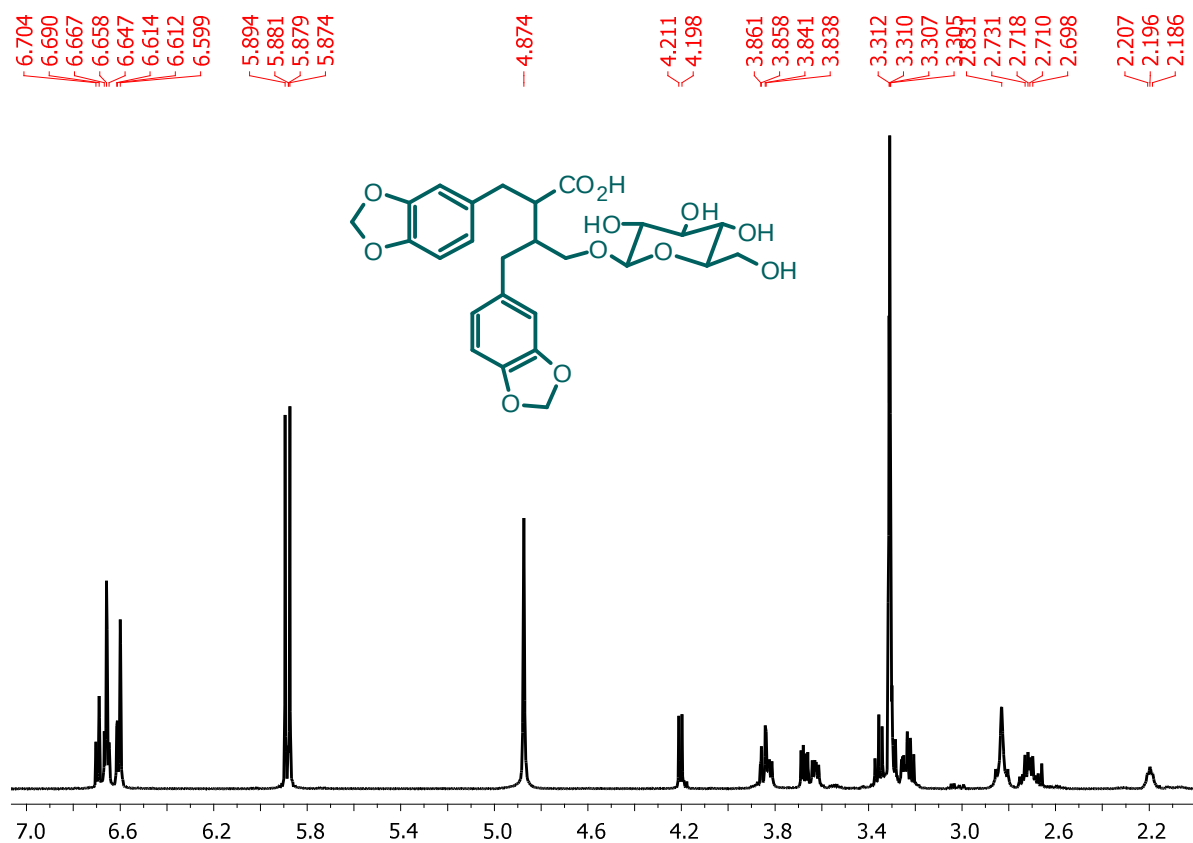


Figura 235 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **18** (CD_3OD , 600 MHz).

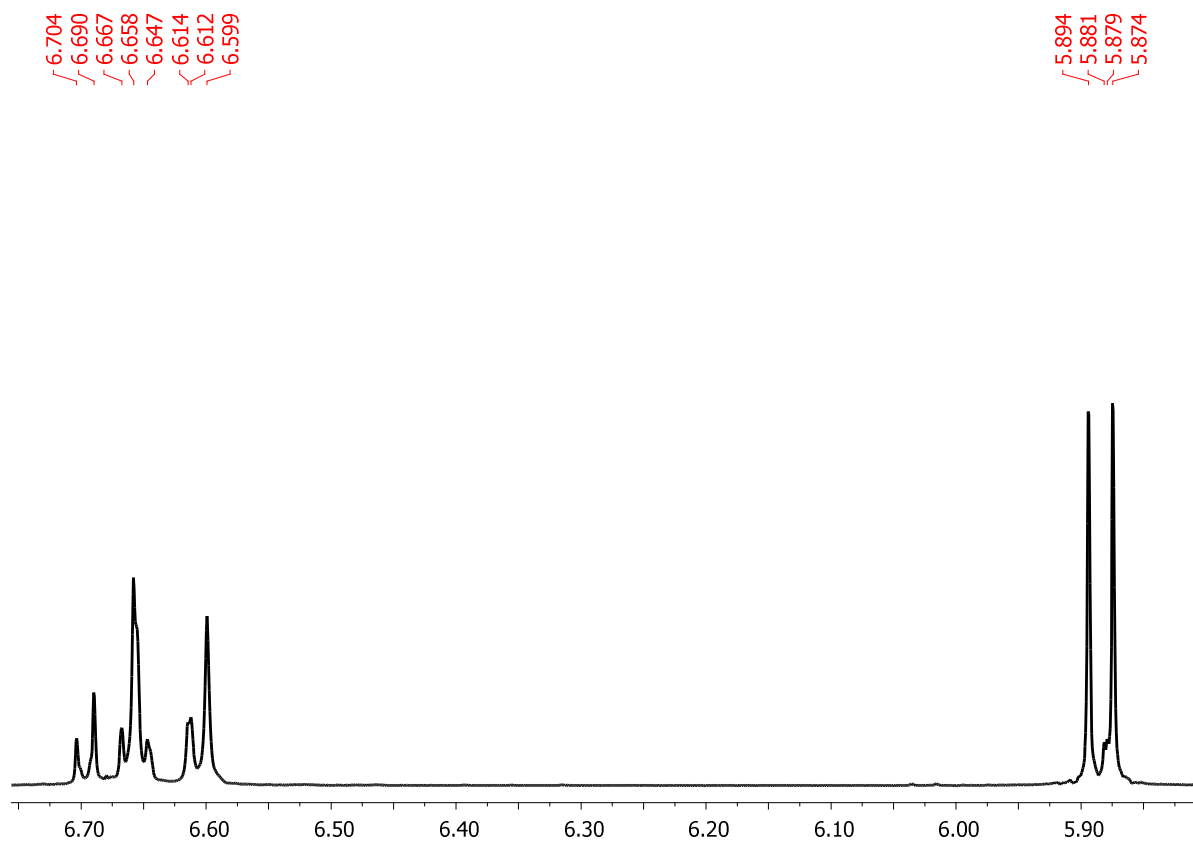


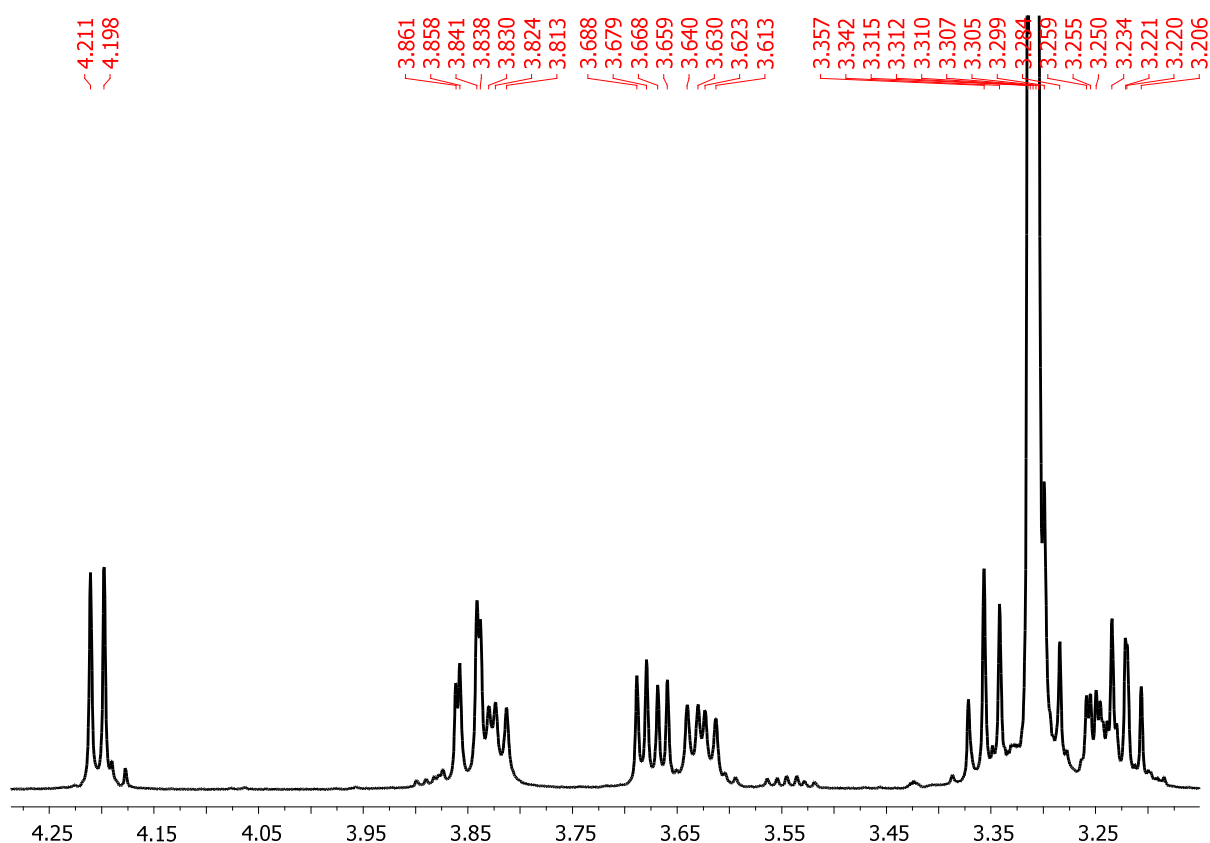
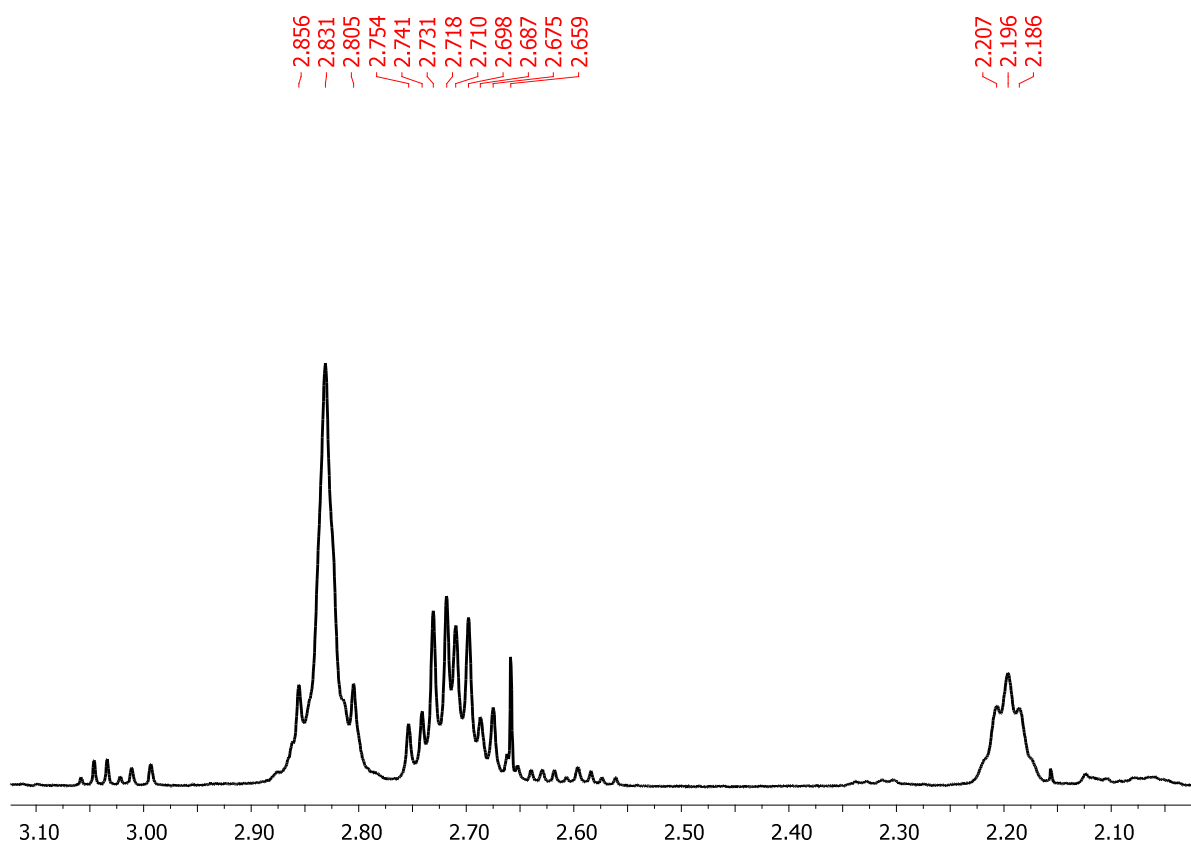
Figura 236 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **18** (CD_3OD , 600 MHz).Figura 237 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de **18** (CD_3OD , 600 MHz).

Figura 238 - Espectro de APT de **18** (CD₃OD, 600 MHz).

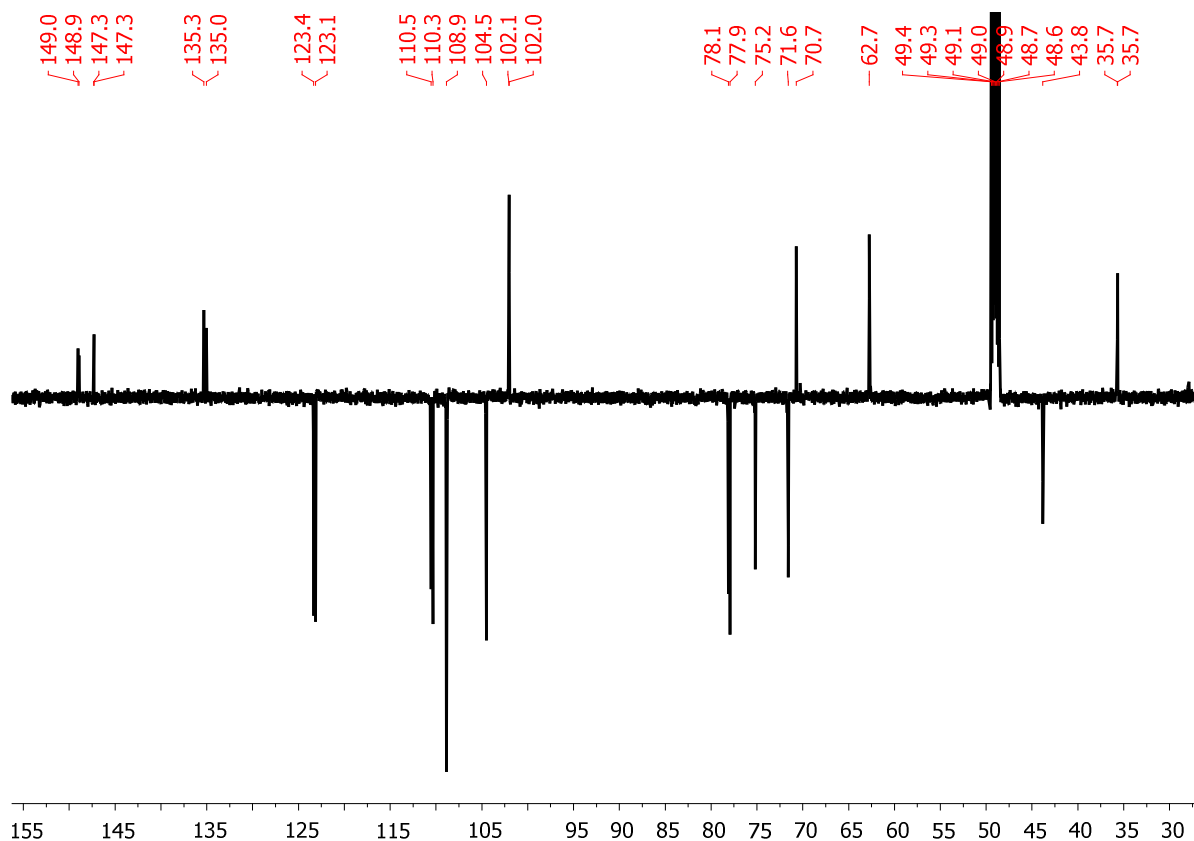
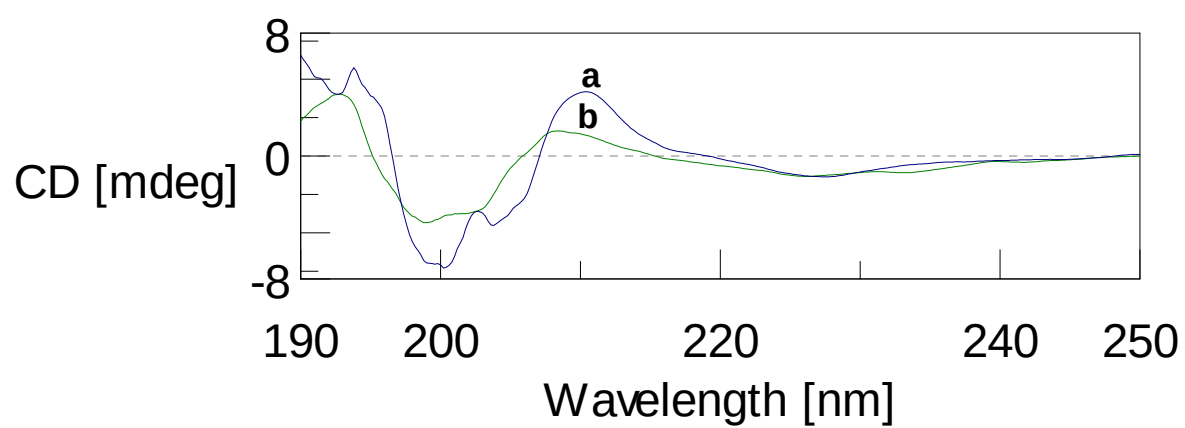


Figura 239 – Curvas de dicroísmo circular eletrônico (DCE) de **17** (curva a) e **18** (curva b) obtidas em CH₃OH.



5 CONCLUSÕES

Neste estudo, constatou-se, biológica- e quimicamente, que as lagartas do inseto fitófago especialista *B. polydamas polydamas* bioconverteram as micromoléculas majoritárias das folhas de *A. giberti*. Verificou-se ainda que o extrato de folhas e o diterpeno ácido (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*)-8-hidroxi-labdan-15-óico (**1**), cuja a configuração absoluta está sendo corrigida neste trabalho, exibiram atividade inseticida significativa em bioensaios com lagartas de *S. frugiperda*, enquanto que o extrato de fezes e a lignana kusunoquinina (**2**) foram inativos nas concentrações testadas.

É digno de nota mencionar que a metodologia de isolamento desenvolvida permitiu obter o diterpeno **1** em grande quantidade com elevado grau de pureza. Portanto, as folhas de *A. giberti* e as fezes das lagartas de *B. polydamas polydamas* se mostraram serem fontes ricas de **1**, o qual tem potencial para ser utilizado como material de partida em sínteses estereosseletivas e em estudos de modificação estrutural visando potencializar a atividade inseticida de **1**.

Diversas diferenças foram observadas entre as composições químicas dos extratos de folhas e fezes, sendo isoladas do extrato de excrementos de lagartas cinco substâncias inéditas, duas lignanas dibenzilbutânicas glucosiladas (**17** e **18**) e três diterpenos labdânicos (**3**, **4** e **19**), os quais não foram detectados no extrato metanólico de folhas da planta hospedeira do inseto, *A. giberti*. Portanto, estes devem ser produtos da metabolização dos constituintes químicos de *A. giberti* ou metabólitos sintetizados *de novo* pelo inseto fitófago.

Entretanto, considerando-se as similaridades estruturais existentes entre os metabólitos excretados pelas lagartas e os principais constituintes das folhas de *A. giberti*, inclusive estereoquimicamente, sugeriu-se que **3**, **4** e **19** seriam produtos de oxidações sequenciais de **1** e que **17** e **18** seriam produtos da metabolização de **2**, **6**, **6-epi** ou **8**. Essas propostas foram corroboradas pelas atividades biológicas determinada ou relatadas para esses metabólitos secundários. Assim, concluiu-se que as lagartas de *B. polydamas* possuem suas próprias estratégias para superar as barreiras químicas impostas por *A. giberti*, as quais consistem nas biotransformações dos constituintes dessa planta convertendo-os para substâncias mais polares, provavelmente menos tóxicas para insetos.

Embora as substâncias **1**, **2** e **4** foram inativas nos bioensaios de antipredação com formigas e pintinhos, é importante salientar que os sequestros das substâncias **2**, **4** e **8** apontaram para uma nova direção em sentido a compreender a defesa química de *B. polydamas* contra inimigos naturais, visto que essas substâncias pertencem a classes de metabólitos secundários diferentes daquelas tradicionalmente discutidas na literatura como sendo as responsáveis por essas interações ecológicas. Interessantemente, o sequestro de **4** evidenciou que as lagartas de *B. polydamas* são especializadas tanto para detoxificar **1** como para aproveitar parte do produto obtido (**4**) em benefício próprio.

Por fim, destaca-se ainda que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os insetos da tribo Troidini podem metabolizar outras substâncias além dos derivados nitrofenântrenicos, o que contribuiu para renovar as perspectivas sobre estudos com plantas da família Aristolochiaceae.

REFERÊNCIAS

- 1 MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean?. **PLOS Biology**, v. 9, n. 8, p. 1-8, Aug. 2011.
 - 2 PHILIPPE, H. et al. Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 11, p. 614-620, Aug. 2006.
 - 3 ZHANG, Z.-Q. **Animal biodiversity**: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Auckland: Magnolia Press, 2013. 82 p.
 - 4 MORA, C. et al. Comment on “can we name Earth’s species before they go extinct?”. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 237-237c, July 2013.
 - 5 ROTA-STABELLI, O. et al. A congruent solution to arthropod phylogeny: phylogenomics, microRNAs and morphology support monophyletic Mandibulata. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 278, n. 1703, p. 298-306, Jan. 2011.
 - 6 GIRIBET, G.; EDGECOMBE, G. D. The Arthropoda: a phylogenetic framework. In: MINELLI, A.; BOXSHALL, G.; FUSCO, G. (Ed.). **Arthropod Biology and Evolution**. Heidelberg: Springer, 2013. Chap. 2, p. 17-40.
 - 7 REGIER, J. C. et al. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. **Nature**, v. 463, p. 1079-1084, Feb. 2010.
 - 8 GIRIBET, G.; EDGECOMBE, G. D. Reevaluating the arthropod tree of life. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 167-186, Sept. 2012.
 - 9 ZHANG, Z.-Q. **Animal biodiversity**: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. Auckland: Magnolia Press, 2011. 237 p.
 - 10 TRAUTWEIN, M. D. et al. Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 449-468, Jan. 2012.
 - 11 FELIX, M. et al. **Insetos**: uma aventura pela biodiversidade. Rio de Janeiro: Otten, 2011. 376 p.
 - 12 INWARD, D.; BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. **Biology Letters**, v. 3, p. 331-335, Apr. 2007.
 - 13 DJERNAES, M. et al. Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling. **Systematic Entomology**, v. 37, n. 1, p. 65-83, Jan. 2012.
 - 14 BERTI FILHO, E.; CERIGNONI, J. A. **Borboletas**. Piracicaba: FEALQ, 2010. 94 p.
-

Referências

- 15 KAWAHARA, A. Y.; BREINHOLT, J. W. Phylogenomics provides strong evidence for relationships of butterflies and moths. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 281, n. 1788, p. 1-8, Aug. 2014.
- 16 BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York: Chapman and Hall, 1994. 305 p.
- 17 REGIER, J. C. et al. A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order Lepidoptera (moths and butterflies). **PLOS Biology**, v. 8, n. 3, p. 1-23, Mar. 2013.
- 18 KRISTENSEN, N. P. **Lepidoptera, moths and butterflies**. New York: Chapman and Hall, 1994. 305 p.
- 19 SHIELDS, O. World number of butterflies. **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 43, n. 3, p. 178-183, 1989.
- 20 EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, v. 18, n. 587-608, Dec. 1964.
- 21 RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. 2nd. ed. London: Elsevier Sciences, 2009. 1132 p.
- 22 SOUSA, E. dos S. **Borboletas e mariposas**. Brasília, DF: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_81_911200585235.html>. Acesso em: 17 set. 2014.
- 23 AUBERT, J. et al. Molecular phylogeny of swallowtail butterflies of the tribe Papilionini (Papilionidae, Lepidoptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 156-167, July 1999.
- 24 SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Phylogenetic relationships of the new world Troidini swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) based on COI, COII, and EF-1 α genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 3, p. 468-483, Sept. 2005.
- 25 DI MARE, R. C.; CORSEUIL, E.; SCHWARTZ, G. Morfometria de Papilioninae (Lepidoptera, Papilionidae) ocorrentes em quatro localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. I. Comparações com a massa corporal. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 4, p. 535-545, Dec. 2004.
- 26 HAUSER, C. L. Critical comments on the phylogenetic relationships within the family Papilionidae (Lepidoptera). **Nota Lepidopterologica**, v. 16, n. 1, p. 34-43, 1993.
- 27 NAZARI, V.; ZAKHAROV, E. V.; SPERLING, F. A. H. Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 1, p. 131-156, Jan. 2007.
-

Referências

- 28 BOGGS, C. L. et al. **Butterflies**: ecology and evolution taking flight. Chicago: University of Chicago Press, 2003. 756 p.
 - 29 COLLINS, N. M.; MORRIS, M. G. **Threatened swallowtail butterflies of the world**. Gland; Cambridge: IUCN, 1985. 331 p.
 - 30 SCALCO, V. W. **Biologia populacional de papilionídeos (Lepidoptera, Papilionidae) ocorrentes no Morro Santana e no Jardim Botânico de Porto Alegre, RS**. 2012. 75 f. Trabalho de Conclusão (Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
 - 31 KLITZKE, C. F.; BROWN, K. S. Jr. The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). **Chemoecology**, v. 10, n. 2, p. 99-102, Jan. 2000.
 - 32 MORAIS, A. B. B.; BROWN, K. S. Jr. Larval foodplant and other effects on Troidine guild composition (Papilionidae) in southeastern Brazil. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 30, n. 1/2, p. 19-37, Dec. 1992.
 - 33 SIME, K. R.; FEENY, P. P.; HARIBAL, M. M. Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail, *Battus philenor* (L.): evidence and ecological implications. **Chemoecology**, v. 10, n. 4, p. 169-178, Dec. 2000.
 - 34 TYLER, H. A.; BROWN, K. S. Jr.; WILSON, K. H. **Swallowtail butterflies of the Americas**: a study in biological dynamics, ecological diversity, biosystematics and conservation. Gainesville: Scientific Publishers, 1990. 376 p.
 - 35 MORAIS, A. B. B. **Interações tritróficas no sistema *Aristolochia arcuata* (Aristolochiaceae), *Battus polydamas* (Lepidoptera: Papilionidae: Troidini), e alguns de seus inimigos naturais**. 1997. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
 - 36 SVELA, M. ***Battus polydamas***. Disponível em: <<http://www.nic.funet.fi/pub/sci/bio/life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/papilionidae/papilioninae/battus/index.html>>. Acesso em: 16 set. 2014.
 - 37 PINHEIRO, C. E. G. et al. As borboletas (Lepidoptera, Papilionoidea) do Campus Universitário Darcy Ribeiro (Distrito Federal, Brasil). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4, p. 139-144, dez. 2008.
 - 38 BORBOLETA.ORG. **Tudo sobre borboletas**. Disponível em: <<http://www.borboleta.org/>>. Acesso em: 17 set. 2014.
 - 39 BROWN, K. S.; DAMMAN, A. J.; FEENY, P. Troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) in southeastern Brazil: natural history and foodplant relationships. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 19, n. 4, p. 199-226, Dec. 1981.
-

Referências

- 40 MORAIS, A. B. B. et al. Are aristolochic acids responsible for the chemical defence of aposematic larvae of *Battus Polydamas* (L.) (Lepidoptera: Papilionidae)? **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 558-564, Sept. 2013.
 - 41 PRIESTAP, H. A. et al. Secondary metabolite uptake by the *Aristolochia*-feeding papilionoid butterfly *Battus polydamas*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 126-137, Feb. 2012.
 - 42 NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. Sequestration and biotransformation of lignans from *Aristolochia giberti* by *Battus polydamas* larvae (Papilionidae: Troidini). **Planta Medica**, v. 79, p. 1196-1197, July 2013.
 - 43 NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. Determination of configuration at C-13 of (-)-ent-8 β -hydroxy-labdan-15-oic acid and its biotransformation by *Battus polydamas* larvae. **Planta Medica**, v. 79, p. 1116-1116, July 2013.
 - 44 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, n. 4, p. 531-555, 1998.
 - 45 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, n. 4, p. 399-436, Apr. 2003.
 - 46 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, Oct. 2009.
 - 47 WANKE, S.; GONZÁLEZ, F.; NEINHUIS, C. Systematics of pipevines: combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 167, n. 6, p. 1215-1227, 2006.
 - 48 SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: um guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
 - 49 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: MOHAN, R. M. (Ed.). **Research advances in phytochemistry**. Kerala: Global Research Network, 2001. v. 2, p. 19-108.
 - 50 WATANABE, K.; KAJITA, T.; MURATA, J. Chloroplast DNA variation and geographical structure of the *Aristolochia kaempferi* group (Aristolochiaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 3, p. 442-453, Mar. 2006.
 - 51 GONZÁLEZ, F.; STEVENSON, D. W. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 26, p. 25-60, 2002.
-

Referências

- 52 HUBER, H. Aristolochiaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 1993. v. 2, p. 129-137.
- 53 OHI-TOMA, T. et al. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, v. 31, n. 3, p. 481-492, Sept. 2006.
- 54 NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. X. Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 780-782, 2012.
- 55 NOGUEIRA, C. R. **Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso**: compostos nitrados. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 56 BERJANO, R. et al. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, n. 1/2, p. 219-227, July 2009.
- 57 HOEHNE, F. C. **Flora brasílica**: Aristolochiaceae. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1942. v. 15, 147 p.
- 58 FRANCISCO, C. S. et al. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 168-175, Jan. 2008.
- 59 MARCHESINI, A. M. et al. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1598-1608, Aug. 2009.
- 60 LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 65-75, 1992.
- 61 KUMAR, V. et al. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 20, n. 6, p. 565-583, Dec. 2003.
- 62 WU, T.-S. et al. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 21, n. 5, p. 594-624, Oct. 2004.
- 63 PACHECO, A. G. et al. ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1245-1262, Mar. 2009.
- 64 CANELA, N. et al. Chemical composition of the essential oil of *Aristolochia gibertii* Hooker from Paraguay. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 6, p. 566-567, Nov./Dec. 2004.
- 65 PRIESTAP, H. A. et al. Essential oils from aerial parts of *Aristolochia gibertii* Hook. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 67-71, Jan./Feb. 2002.
-

- 66 VELÁZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1/2, p. 91-97, Feb. 2003.
- 67 CAMARGO, F. et al. SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 5, p. 429-434, Sept. 2011.
- 68 JACQUES, R. P. Methods and effectiveness of distribution of microbial insecticides. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 217, n. 1, p. 109-119, June 1973.
- 69 STEPHENSON, G. R. et al. Glossary of terms relating to pesticides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.
- 70 WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An introduction to insecticides**. 4th ed. Willoughby: MeisterPro Information Resources, 2004. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 16 set. 2014.
- 71 RANDELL, R. Basic information on insecticides and their use. **Journal of Arboriculture**, v. 3, n. 2, p. 24-26, Feb. 1977.
- 72 ATWAL, A. S. The insecticides act of India. In: _____. **Agricultural pests of India and south-east Asia**. [S.l.]: kalyani publishers, 1976. p. 53-58. Disponível em: <http://el.doccentre.info/eldoc1/k34a/Insecticides_Act_India.pdf>. Acesso em: 13 set. 2014.
- 73 MUNAKATA, K. Insect antifeeding substances in plants leaves. **Pure and Applied Chemistry**, v. 42, n. 1/2, p. 57-66, 1975.
- 74 NATIONAL INSTITUTE OF MALARIA RESEARCH. Feasibility of bio-environmental strategy for malaria control and field evaluation of vector control tools: plant origin repellents and insecticides. In: _____. **A profile of malaria research centre**. Dwarka. Chap. 5, p. 172-174. Disponível em: <http://mrcindia.org/MRC_profile/alternate_strategy/plant_ins.pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.
- 75 JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present, and future. In: ARNASON, F. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. (Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. Chap. 1, p. 1-10.
- 76 FAULDE, M. K.; NEHRING, O. Synergistic insectidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated vednets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 755-765, Aug. 2012.
- 77 SPURR, E. B.; MCGREGOR, P. G. **Potential invertebrate antifeedants for toxic baits used for vertebrate pest control**: a literature review. Wellington: Department of Conservation, 2003. 36 p.
-

Referências

- 78 ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, Jan. 2006.
- 79 NASCIMENTO, I. R. et al. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. **Pest Management Science**, v. 60, n. 4, p. 413-416, Apr. 2004.
- 80 MESSIANO, G. B. et al. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2655-2659, Apr. 2008.
- 81 HARMATHA, J.; NAWROT, J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenepheryl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 51-60, July 2002.
- 82 GEBBINCK, E. A. K. et al. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 737-770, Dec. 2002.
- 83 GÓMEZ, C. V.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M.; ESQUIVEL, B. Antifeedant activity of anticopalic acid isolated from *Vitex hemsleyi*. **Zeitschrift für Naturforschung C: a Journal of Biosciences**, v. 64, n. 7/8, p. 502-508, Aug. 2009.
- 84 CIFUENTE, D. A. et al. Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 899-905, Dec. 2002.
- 85 FUKUSHIMA, J.-I.; YATAGAI, M.; OHIRA, T. Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtuse*. **The Japan Wood Research Society**, v. 48, n. 4, p. 326-330, July 2002.
- 86 FRAGOSO-SERRANO, M.; GONZÁLEZ-CHIMEO, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 45-50, Feb. 1999.
- 87 WANG, Q. et al. Application of an efficient strategy for discovery and purification of bioactive compounds from Chinese herbal medicines, a case study on the *Puerariae thomsonii* Flos. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 25-32, Mar. 2013.
- 88 HUANG, X. et al. Strategy for analysis and screening of bioactive traditional Chinese medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1/2, p. 71-84, Dec. 2004.
- 89 OMURA, S. (Ed.). **The search of bioactive compounds from microorganisms**. New York: Spring-Verlag, 1992. 354 p.
- 90 FELCZYKOWSKA, A. et al. Metagenomic approach in the investigation of new bioactivity compounds in the marine environment. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 4, p. 501-505, Dec. 2012.
-

Referências

- 91 KURSAR, T. A. et al. Ecologically guided bioprospecting in Panama. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n.1, p. 114-126, Jan. 1999.
- 92 BEATTIE, A. J. et al. Ecology and bioprospecting. **Austral Ecology**, v. 36, n. 3, p. 341-356, May 2011.
- 93 KURSAR, T. A; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, July 2012.
- 94 HARBORNE, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 18, n. 4, p. 361-379, May 2001.
- 95 HARTMANN, T. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 12, p. 4541-4546, Sept. 2008.
- 96 BERGSTRÖM, G. Chemical ecology = chemistry + ecology!. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2305-2323, 2007.
- 97 WRATTEN, E. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: Ed. USP, 1980. v. 27, 71 p.
- 98 FRAENKEL, G. S. The raison d'être of secondary plant substances. **Science**, v. 129, n. 3361, p. 1466-1470, May 1959.
- 99 BERENBAUM, M. R.; ZANGERL, A. R. Facing the future of plant-insect interaction research: le retour à la "raison d'être". **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 804-811, Mar. 2008.
- 100 HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 3, n. 4, p. 323-344, Aug. 1986.
- 101 HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 6, n. 1, p. 85-109, Feb. 1989.
- 102 HARBORNE, J. B. Advances in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 10, n. 4, p. 327-348, Feb. 1993.
- 103 HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 14, n. 2, p. 83-98, Apr. 1997.
- 104 HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 16, n. 4, p. 509-523, Aug. 1999.
- 105 KESSLER, A. Plant-insect interactions in the era of consolidation in biological sciences: *Nicotiana attenuata* as an ecological expression system. In: DICKE, M.; TAKEN, W.(Ed.) **Chemical ecology**: from gene to ecosystems. Wageningen: Springer, 2006. Chap. 3, p. 19-37.
-

Referências

- 106 BALDWIN, I. T. et al. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 812-815, Feb. 2006.
- 107 FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 507-533, 1999.
- 108 FEYEREISEN, R. Evolution of insect P450. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1252-1255, Dec. 2006.
- 109 OPITZ, S. E. W.; MÜLLER, C. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology**, v. 19, n. 3, p. 117-154, Sept. 2009.
- 110 COLLINS, A. M.; KENNEDY, M. J. Biotransformations and bioconversions in New Zealand: past endeavours and future potential. **Australasian Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 86-94, June 1999.
- 111 LILLY, M. D. Advances in biotransformation processes. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 2, p. 151-159, 1994.
- 112 DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, Aug. 2004.
- 113 LIU, J.-H.; YU, B.-Y. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1400-1406, Aug. 2010.
- 114 MIYAZAWA, M. Biotransformation of lignans and neolignans. **Current Organic Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 975-986, Sept. 2001.
- 115 RICO-MARTINEZ, M. et al. Biotransformation of diterpenes. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10627-10647, Feb. 2014.
- 116 GOPISETTY, S. R.; LOUIE, M. T.; SUBRAMANIAN, M. V. Microbial transformations of natural products. **Phytochemistry and Pharmacognosy**, p. 1-6. Disponível em: <<http://www.eolss.net/sample-chapters/c06/e6-151-12-00.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2014.
- 117 BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- 118 TAKEUCHI, H.; MIYAZAWA, M. Biotransformations of nerol by larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*) as a biocatalyst. **Proceedings of the 48th Symposium on the Chemistry of Terpene, Essential Oils and Aromatics**, p. 399-400, 2004.
- 119 ISHIDA, T. Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant-cultured cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 5, p. 569-590, May 2005.
-

Referências

- 120 SUTHERLAND, T. D. et al. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 12884-12889, Oct. 1998.
- 121 KURIOKA, A.; YAMAZAKI, M. Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 6, p. 1396-1399, June 2002.
- 122 TAMURA, Y. et al. Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 275-278, Feb. 2002.
- 123 HIRAYAMA, C. et al. C-prolinylquercetins from the yellow cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 579-583, Mar. 2006.
- 124 HIRAYAMA, C. et al. Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1141-1149, Mar. 2008.
- 125 HIRAYAMA, C. et al. Flavonoids from the cocoon of *Rondotia menciiana*. **Phytochemistry**, v. 94, p. 108-112, Oct. 2013.
- 126 TAKAHASHI, K.; ARAKI, H.; MIYAZAWA, M. Biotransformation of isoflavones by the larvae of the common cutworm (*Spodoptera litura*). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 5, p. 719-721, May 2006.
- 127 RAMOS, C. S. Biotransformation of secondary plant metabolites by lepidoptera. **Nova Science Publishers**, p. 203-216. Disponível em <https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=43210&osCsid=c3df1a4baa09b73517f8228b3680ed57>. Acesso em 17 set. 2014.
- 128 RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* Beetle. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 560-563, 2009.
- 129 IVIE, G. W. et al. Metabolic detoxification: mechanism of insect resistance to plant psoralents. **Science**, v. 221, n. 4608, p. 374-376, July 1983.
- 130 RAMOS, C. S. Biotransformation of 4-nerolidylcatechol by *Heraclides brasiliensis* (Lepidoptera: Papilionidae) reduces the toxicity of *Piper umbellata* (Piperaceae). **Chemoecology**, v. 22, n. 1, p. 39-45, Mar. 2012.
- 131 RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolismo of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2157-2161, Aug. 2008.
- 132 MIYAZAWA, M.; KASAHARA, H.; KAMEOKA, H. O-Demethylation of meso-dimethyl dihydroguaiaretic acid in *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1173-1175, Dec. 1997.
-

Referências

- 133 MIYAZAWA, M.; KASAHARA, H.; KAMEOKA, H. Biotransformation of lignans: metabolism of (+)-eudesmin and (+)-magnolol in *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1027-1030, July 1995.
- 134 RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Metabolism of neolignans from *P. negrelli* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). **Chemoecology**, v. 23, n. 3, p. 143-148, Sept. 2013.
- 135 BERNAYS, E. A. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. **Ecological Entomology**, v. 22, n. 1, p. 121-123, Feb. 1997.
- 136 GREENEY, H. F.; DYER, L. A.; SMILANICH, A. M. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: a review of caterpillars chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. **Invertebrate Survival Journal**, v. 9, n.1, p. 7-34, Feb. 2012.
- 137 DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 447-477, Jan. 1980.
- 138 NISHIDA, R. Sequestration of plant secondary compounds by butterflies and moths. **Chemoecology**, v. 5/6, n. 3/4, p. 127-138, 1994/1995.
- 139 NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 57-92, Jan. 2002.
- 140 SHE-DE, J.; MITCHELL, C. **Ten lecture on the use of medicinals from the personal experience of Jiao Shu-De**. Taos: Paradigm Publications, 2003. 711 p.
- 141 EISNER, T. et al. Sesquiterpenes in the osmeterial secretion of a papilionid butterfly, *Battus polydamas*. **Journal of Insect Physiology**, v. 17, n. 2, p. 245-250, Feb. 1971.
- 142 HONDA, K.; HAYASHI, N. Chemical nature of larval osmeterial secretions of papilionid butterflies in the genera *Parnassius*, *Sericanus* and *Pachliopta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 859-867, June 1995.
- 143 WU, T.-S.; LEU, Y.-L.; CHAN, Y.-Y. Aristolochic acids as a defensive substance for the aristolochiaceae plant-feeding swallowtail butterfly, *Pachliopta aristolochiae interpositus*. **Journal of the Chinese Society**, v. 47, n. 1, p. 221-226, Feb. 2000.
- 144 URZÚA, A.; OLGUÍN, A.; SANTANDER, R. Fate of ingested aristolactams from *Aristolochia chilensis* in *Battus polydamas archidamas* (Lepidoptera: Papilionidae). **Insects**, v. 4, n. 4, p. 533-541, Oct. 2013.
- 145 MEBS, D.; SCHNEIDER, M. Aristolochic acid content of South-East Asian Troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) and *Aristolochia* plant species (Aristolochiaceae). **Chemoecology**, v. 12, n. 1, p. 11-13, Mar. 2002.
-

Referências

- 146 URZÚA, A.; RODRÍGUEZ, R.; CASSELS, B. Fate of ingested aristolochic acids in *Battus archidamas*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 6, p. 687-689, Nov. 1987.
- 147 FORDYCE, J. A.; MARION, Z. H.; SHAPIRO, A. M. Phenological variation in chemical defense of the pipevine swallowtail, *Battus philenor*. **Journal of Chemical Ecology**, v.31, n. 12, p. 2835-2846, Dec. 2005.
- 148 CLARO, R. A. et al. Aproximación al estudio de la interacción entre *Aristolochia maxima* y larvas de las mariposas *Battus polydamas polydamas* y *Parides parares erythrus* mediada por ácidos aristolóquicos. **Acta Biológica Colombiana**, v. 12, n. 2, p. 59-68, 2007.
- 149 PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents. 573. Isolation and structure of papilistatin from the papilionid butterfly *Byasa polyeuctes termessa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 164-166, Jan. 2010.
- 150 DURÁN, J. et al. Sequestration of aristolochic acid I from *Aristolochia pilosa* by *Mapeta xanthomelas*. Walker, 1863. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 10, p. 1285-1288, Oct. 2012.
- 151 TRIGO, J. R. The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in Neotropical lepidoptera: facts, perspectives and caveats. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 551-561, Dec. 2000.
- 152 LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Antifeedant activity of metabolites of *Aristolochia albida* against the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 669-673, Apr. 1993.
- 153 SIMMONDS, M. S. J. The search for plant-derived compounds with antifeedant activity. In: RAI, M.; CARPINELLA, M. C. **Naturally occurring bioactive compounds**. Netherlands: Elsevier Sciences, 2006. Chap. 13, p. 291-324.
- 154 NISHIDA, R.; FUKAMI, H. Ecological adaptation of an aristolochiaceae feeding swallowtail butterfly, *Atrophaneura alcinous*, to aristolochic acids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 11, p. 2549-2563, Nov. 1989.
- 155 SIME, K. Chemical defence of *Battus philenor* larvae against attack by the parasitoid *Trogus pennator*. **Ecological Entomology**, v. 27, n. 3, p. 337-345, June 2002.
- 156 URZÚA, A. et al. Aristolochic acids in *Aristolochia chilensis* and the *Aristolochia*-feeder *Battus archidamas* (Lepidoptera). **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 48, p. 1513-1519, 1983.
- 157 EUW, J. V.; REICHSTEIN, T. Aristolochic acids stored by *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera). **Insect Biochemistry**, v. 2, n. 7, p. 334-343, Sept. 1972.
-

Referências

- 158 PINTO, C.; ARZÚA, A.; NIEMEYER, H. M. Sequestration of aristolochic acids from meridic diets by larvae of *Battus polydamas archidamas* (Papilionidae: Troidini). **European Journal of Entomology**, v. 108, n. 1, p. 41-45, Jan. 2011.
- 159 HARRIS, R. K. et al. Further conventions for NMR shielding and chemical shifts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 59-84, 2008.
- 160 HOFFMAN, R. E. Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 606-616, June 2006.
- 161 HOFFMAN, R. E. Variations on the chemical shift of TMS. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 163, n. 2, p. 325-331, Aug. 2013.
- 162 VOGEL, A. I. **A text-book of practical organic chemistry**. 3rd ed. London: Longmans, 1956.
- 163 YABUUCHI, T.; KUSUMI, T. Phenylglycine methyl ester, a useful tool for absolute configuration determination of various chiral carboxylic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 397-404, Jan. 2000.
- 164 FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09**: revision B.01. Wallingford: Gaussian 2009.
- 165 DEBIE, E. et al. A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or Raman optical activity. **ChemPhysChem**, v. 12, n. 8, p. 1542-1549, May 2011.
- 166 BATISTA JUNIOR, J. M. **Dicroísmo circular vibracional e eletrônico na determinação da configuração absoluta de benzopiranos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae)**: implicações biológicas e biossintéticas. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- 167 RICHARDS, N. G. J. et al. Macromodel-an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 440-467, Sept. 1990.
- 168 HALGREN, T. A. Merck molecular force fields. I Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5/6, p. 490-519, Apr. 1996.
- 169 HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 720-729, May 1999.
- 170 GRANOVSKY, A. A. **Firefly version 8**. Disponível em: <<http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>>. Acesso em: 16 set. 2014.
-

- 171 KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 1993, n. 5, p. 799-805, May 1993.
- 172 CAMMI, R. The Hartree-fock calculation of the magnetic properties of molecular solutes. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, n. 8, p. 3185-3196, Aug. 1998.
- 173 CAMMI, R.; MENNUCI, B.; TOMASI, J. Nuclear magnetic shieldings in solution: gauge invariant atomic orbital calculation using the polarizable continuum model. **Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 16, p. 7627-7638, Apr. 1999.
- 174 VALIEV, M. et al. NWChem: a comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. **Computer Physics Communications**, v. 181, n. 9, p. 1477-1489, Sept. 2010.
- 175 ALLOUCHE, A. R. Gabedit - a graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174-182, Jan. 2011.
- 176 STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1-32, Jan. 2013.
- 177 STEWART, J. J. P. **MOPAC2012**. Disponível em: <<http://openmopac.net/>>. Acesso em: 16 set. 2014.
- 178 AVOGADRO 2.0.7.2. **Free cross-platform molecule editor**. Disponível em: <http://avogadro.cc/wiki/Main_Page>. Acesso em: 10 set. 2014.
- 179 ZANG, L. Y. et al. Sesquiterpenoids from the mangrove-derived endophytic fungus *Diaporthe sp.* **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 10, p. 1744-1749, Sept. 2012.
- 180 SHAN, W.-G. et al. Sesquiterpenoids from *Fusarium sp.*, an endophytic fungus in *Agrimonia pilosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 1254-1259, Nov. 2011.
- 181 URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; MARTÍN, D. D. Transformation of labdanes into drimanes: obtention of 11-12-diacetoxy-7-drimene. Precursor of biologically active drimanes. **Tetrahedron**, v. 44, n. 14, p. 14, p. 4547-4554, Feb. 1988.
- 182 FAINI, F.; LABBE, C.; POLANCO, M. I. Diterpenoids from *Baccharis neaei*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3274-3276, Jan. 1992.
- 183 LIN, T.-C.; FANG, J.-M.; CHENG, Y.-S. Terpenes and lignans from leaves of *Chamaecyparis formosensis*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 793-801, Nov. 1998.
- 184 SU, W.-C.; FANG, J.-M.; CHEN, Y.-S. Labdanes from *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1109-1114, Mar. 1994.
-

Referências

- 185 TENG, J. et al. A new labdanic norditerpene from *Pinus sylvestris*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 17, p. 1587-1591, Jan. 2009.
- 186 AIBA, C. J. et al. Structure of porosin. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1031-1032, Nov. 1976.
- 187 PINDER, A. R.; PRICE, S. J. The chemistry of *Ottonia vahlii*, Kth. Part I. The volatile constituent. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 2597-2598, Jan. 1967.
- 188 SCOTT, A. I.; BARTON, D. H. R.; DOERING, W. **Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products**: international series of monographs on organic chemistry. Oxford: Pergamon Press, 1964. 445 p.
- 189 HRUBAN, L.; SANTAVY, F.; HEGEROVÁ, S. Ultraviolet spectra, methoxy and methylenedioxy groups of some aromatic compounds and alkaloids. III. Aromatic systems of the isoquinoline, protoberberine and benzophenanthridine types. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 35, n. 11, p. 3420-3444, Nov. 1970.
- 190 ZHANG, G. et al. Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p.1167-1172, June 2008.
- 191 NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Nist mass spectral search program, NIST 05**. Version 2.0d. Gaithersburg: The NIST Mass Spectrometry Data Center, 2005. CD-ROM.
- 192 ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th. ed. Carol Stream: Allured Publishing, 2007. 804 p.
- 193 LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1516-1518, 1983.
- 194 CORRIE, J. E. T. et al. The chemical constituents of *Australian Zanthoxylum* species. V. The constituents of *Z. Pluviatile* Hartley; the structures of two new lignans. **Australian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 133-145, Aug. 1969.
- 195 HUDSON, C. E.; McADOO, D. J. Characterization by theory of H-transfers and onium reaction of $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}=\text{CH}_2$. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n.2, p. 270-278, Feb. 2007.
- 196 HONG, Y. J.; TANTILLO, D. J. A potential energy surface bifurcation in terpene biosynthesis. **Nature Chemistry**, v. 1, p. 384-389, July 2009.
- 197 DZEROSKI, S. et al. Applying ILP to diterpene structure elucidation from ^{13}C NMR spectra. **Proceedings of the 6th International Workshop on Inductive Logic Programming**, p. 41-54, Aug. 1996. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=647996&picked=prox>>. Acesso em: 10 set. 2014.
-

- 198 PETERS, R. J. Two rings in the them all: the labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 1, p. 1521-1530, Nov. 2010.
- 199 MIYAQI, Y.; MATSUMURA, Y.; SAGAMI, H. Human geranylgeranyl diphosphate synthase is an octamer in solution. **Journal of Biochemistry**, v. 142, n. 3, p. 377-381, Sept. 2007.
- 200 VAN SCHIE, C. C. et al. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of giberellins. **The Plant Journal**, v. 52, n. 4, p. 752-762, Nov. 2007.
- 201 ARTZ, J. D. et al. Molecular characterization of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Plasmodium parasites*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3315-3322, Feb. 2011.
- 202 HEMMI, H. et al. An alternative mechanism of product chain-length determination in type III geranylgeranyl diphosphate synthase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 10, p. 2186-2194, May 2003.
- 203 SCHMIDT, A. et al. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 639-655, Feb. 2010.
- 204 KLOER, D. P. et al. Structure and reaction geometry of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Sinapis alba*. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15197-15204, Dec. 2006.
- 205 MacMILLAN, J.; BEALE, M. H. Diterpene biosynthesis. In: CANE, D. E. (Ed.) **Comprehensive natural products chemistry**. New York: Pergamon Press, 2000. v. 2.
- 206 DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 2009. 550 p.
- 207 CAO, R. et al. Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. **Proteins**, v. 78, n. 11, p. 2417-2432, Aug. 2010.
- 208 ZHOU, K. et al. Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6840-6850, Feb. 2012.
- 209 KÖKSAL, M. et al. Structure and mechanism of the diterpene cyclase *ent*-copalyl diphosphate synthase. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 7, p. 431-433, July 2011.
- 210 SNYDER, S. A.; TREITLER, D. S.; BRUCKS, A. P. Simple reagents for direct halonium-induced polyene cyclizations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 40, p. 14303-14314, Sept. 2010.
- 211 KUKLAMI, R. R. et al. Antimycobacterial labdane diterpenes from *Leucas stelligera*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 10, p. 1836-1841, Oct. 2013.
-

- 212 KAVOUNIS, C. A.; RENTZEPERIS, P. J. Structure of 9,10-bis(p-nitrobenzeneazo)-*cis*-decalin (PNPAD), $C_{22}H_{24}N_6O_4$. **Acta Crystallographic Section C**, v. 40, n. 8, p. 1434-1436, Aug. 1984.
- 213 MEHTA, G.; SEN, S.; KUMARA, T. H. S. Can the conformational flexibility of *cis*-decalins be modulated through intramolecular O-H...O hydrogen bonding? Profiling the molecular and supramolecular attributes of designer *cis*-fused polycyclitols. **Tetrahedron**, v. 67, n. 19, p. 3440-3447, May 2011.
- 214 RAMACHARY, D. B.; SAKTHIDEVI, R. Combining multi-catalysis and multi-component systems for the development of one-pot asymmetric reactions: stereoselective synthesis of highly functionalizes bicyclo[4.4.0]decane-1,6-diones. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 2488-2492, July 2008.
- 215 HAMOR, M. J.; HAMOR, T. A. Geometry of the fluorinated *cis*-decalin system: cristal and molecular structure of *cis*-perfluorobicyclo bicyclo[4.4.0]decane-1,6-diones. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 2488-2492, July 2008.
- 216 MIRZAYANS, P. M. et al. Stereocontrolled synthesis of the *cis*-hydroxydecalin system: towards biologically active 19-nor-clerodanes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 6, p. 1633-1638, Mar. 2012.
- 217 ONO, M. et al. Five new diterpenoids, viteagnusins A-E, from the fruit of *Vitex agnus-castus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 11, p. 1621-1624, Nov. 2008.
- 218 NASIPURI, D. **Stereochemistry of organic compounds**: principles and applications. 2nd. Ed. New Delhi: New Age Publishes, 2005. 567 p.
- 219 ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; DOYLE, M. P. **Basic organic stereochemistry**. New York: Wiley-Interscience, 2001. 704 p.
- 220 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry, part A**: structure and mechanisms. 5th Ed. New York: Springer, 2008. 1199 p.
- 221 EREMIN, R. et al. Molecular dynamics simulations on *trans*-and *cis*-decalins: the effect of partial atomic charges and adjustment of "real densities". **International Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 14-22, Feb. 2012.
- 222 ALLINGER, N. L. et al. Conformational analysis. LVII. The calculation of the conformational structures of hydrocarbons by the westheimer-hendrickson-wiberg method. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 17, p. 4345-4357, Aug. 1967.
- 223 BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR spectroscopy**: high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. 3rd. ed. New York: Wiley, 1987. 515 p.
-

Referências

- 224 SCHNEIDER, H.-J.; HOPPEN, V. Carbon-13 nuclear magnetic resonance substituent-induced shieldings and conformational equilibria in cyclohexanes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3866-3873, Sept. 1978.
- 225 FRIJA, L. M. T. et al. Short synthesis of the natural product 3 β -hydroxy-labd-8(17)-en-15-oic acid via microbial transformation of labdanolic acid. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 165-169, May 2013.
- 226 HOWARD, B. M.; FENICAL, W. Isoconcinndiol, a brominated diterpenoid from *Laurencia snyderae* var. *guadalupensis*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2772-2776, 1980.
- 227 RODRIGUEZ, M. L.; MARTÍN, J. D.; ESTRADA, D. The absolute configuration of (+)-isoconcinadiol. **Acta Crystallographica Section C**, v. 45, n. 2, p. 306-308, Feb. 1989.
- 228 MURAI, A.; ABIKO, A.; MASAMUNE, T. Total synthesis of ($\pm$)-aplysin-20. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 43, p. 4955-4958, 1984.
- 229 MATSINGOU, C. et al. Labdane-type diterpenes: thermal effects on phospholipid bilayers incorporation into liposomes and biological activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 138, n. 1/2, p. 1-11, Dec. 2005.
- 230 KOUKOULITSA, C. et al. Comparative docking studies of labdane-type diterpenes with forskolin at the active site of adenylyl cyclase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8237-8243, Sept. 2008.
- 231 VAN WYK, A. W. W.; DAVIES-COLEMAN, M. T. Semisynthesis of labdane diterpene metabolites from the nudibranch *Pleurobrancha meckelii*. **Tetrahedron**, v. 63, n. 49, p. 12179-12184, Dec. 2007.
- 232 IMAMURA, P. M. et al. ^{13}C NMR spectral analysis of eperuane diterpenes. **Phytochemistry**, v. 16, n. 11, p. 1842-1844, 1977.
- 233 YONEMURA, Y.; OHYAMA, T.; HOSHINO, T. Chemo-enzymatic synthesis of drimane-type sesquiterpenes and the fundamental core of hongoquercin meroterpenoid by recombinant squalene-hopene cyclase. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 440-446, Jan. 2012.
- 234 KITANO, Y.; CHIBA, K.; TADA, M. Highly efficient conversion of alcohols to isocyanides. **Synthesis**, v. 2001, n. 3, p. 437-443, 2001.
- 235 GEORGE, J. H. Biomimetic rearrangements of simplified labdane diterpenoids. **Tetrahedron**, v. 66, n. 33, p. 6321-6330, Aug. 2010.
- 236 HUGEL, G.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. The structure and stereochemistry of diterpenes from *Trachylobium verrucosum* oliv.-V. **Tetrahedron**, v. 22, n. 8, p. 203-216, 1966.
-

- 237 DALLING, D. K.; GRANT, D. M.; PAUL, E. G. Carbon-13 magnetic resonance. XXIII: the methyldecalins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 11, p. 3718-3724, May 1973.
- 238 KLEINPETER, E.; SEIDI, P. R. The γ - and the δ -effects in ^{13}C NMR spectroscopy in terms of nuclear chemical shielding (NCS) analysis. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 680-687, Mar. 2005.
- 239 IMAMURA, P. M. **Isolamento, reações e ressonância magnética nuclear de ^{13}C de diterpenes de *Hymenara***. 1978. 171 f. Tese (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1978.
- 240 CASTRO, J. M. Synthesis of Ambrox® from labdanolic acid. **Tetrahedron**, v. 58, n. 29, p. 5941-5949, July 2002.
- 241 GARCÍA-SÁNCHEZ, E. et al. Absolute configuration of (13*R*)- and (13*S*)-labdane diterpenes coexisting in *Ageretina jocotepecana*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1005-1012, Apr. 2014.
- 242 BJAMER, K.; FERGUSON, G.; MELVILLE, R. D. The configuration at C(13) in labdanolic and eperuic acids by an X-ray crystal structure analysis of the p-bromophenacyl ester of labdanolic acid. **Acta Crystallographica Section B**, v. 24, n. 6, p. 855-865, June 1968.
- 243 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Software FOMSC3**. Disponível em: <<http://artemis.ffclrp.usp.br/NMR.htm>>. Acesso em: 10 set. 2014.
- 244 POLAVARAPU, P. Optical rotation: recent advances in determining the absolute configuration. **Chirality**, v. 14, n. 10, p. 768-781, Oct. 2002.
- 245 McCANN, D. M.; STEPHENS, P. J.; CHEESEMAN, J. R. Determination of absolute configuration using density functional theory calculation of optical rotation: chiral alkanes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 25, p. 8708-8717, Dec. 2004.
- 246 McCANN, D. M.; STEPHENS, P. J. Determination of absolute configuration using density functional theory calculation of optical rotation and electronic circular dichroism: chiral alkanes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 16, p. 6074-6098, Aug. 2006.
- 247 STEPHENS, P. J. et al. Determination of the absolute configurations of natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism, electronic circular dichroism, and optical rotation: the iridoids plumericin and isoplumericin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 3521-3536, Apr. 2007.
- 248 STEPHENS, P. J. et al. Determination of the absolute configurations of natural products using TDDFT optical rotation calculations: the iridoid oruwacin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 285-288, Feb. 2008.
-

Referências

- 249 ANDRADE, R. R.; SILVA, C. O. Specific rotation as a property to validate monosaccharide conformations. **Carbohydrate Research**, v. 350, n. 1, p. 62-67, Mar. 2012.
- 250 ORLOVA, A. V. et al. Polarimetry as a tool for the study of solutions of chiral solutes. **European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 195- 207, Jan. 2014.
- 251 FRANÇA, B. A.; SILVA, C. O. Specific rotation of monosaccharides: a global property bringing local information. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 26, p. 13096-13102, July 2014.
- 252 RALDUGIN, V. A. An empirical correlation between structure and optical activity in a series of labdane diterpenoids. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 17, n. 2, p. 129-133, Mar./Apr. 1981.
- 253 KONDRU, R. K. et al. Synthetic and model computational studies of molar rotation additivity for interacting chiral centers: a reinvestigation of van't Hoff's principle. **Chirality**, v. 9, n. 5/6, p. 469-477, 1997.
- 254 MUÑOZ, M. A. et al. Determination of absolute configuration of salvic acid, an *ent*-labdane from *Eupatorium salvia*, by vibrational circular dichroism. **Phytochemistry**, v. 80, p. 109-114, Aug. 2012.
- 255 BEROVA, N. et al. **Comprehensive chiroptical spectroscopy**: instrumentation, methodologies, and theoretical simulations. New York: Wiley, 2012. 808 p.
- 256 DJERASSI, C. **Optical rotatory dispersion**: applications to organic chemistry. New York: McGraw-Hill, 1960. 293 p.
- 257 STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHEESEMAN, J. R. **VCD spectroscopy for organic chemists**. Boca Raton: CRC Press, 2012. 370 p.
- 258 HOLZWARTH, G. et al. Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes observations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 1, p. 251-252, Jan. 1974.
- 259 GÓMEZ-HURTADO, M. A. et al. Absolute configuration of labdanes and *ent*-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism. **Phytochemistry**, v. 72, n. 4/5, p. 409-414, Apr. 2011.
- 260 KUPPENS, T. et al. Intermolecular association of tetrahydrofuran-2-carboxylic acid in solution: a vibrational circular dichroism study. **Phytochemistry**, v. 110, n. 34, p. 10191-10200, Aug. 2006.
- 261 NAKABAYASHI, T.; NISHI, N. States of molecular associates in binary mixtures of acetic acid with protic and aprotic polar solvents: a Raman spectroscopic study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 14, p. 3491-3500, Jan. 2002.
-

Referências

- 262 TOMMASSO, D. D. The molecular self-association of carboxylic acids in solution: testing the validity of the link hypothesis using a quantum mechanical continuum solvation approach. **Crystengcomm**, v. 15, n. 33, p. 6564-6577, Sept. 2013.
- 263 NISHI, N.; NAKABAYASHI, T.; KOSUGI, K. Raman spectroscopic study on acetic acid clusters in aqueous solutions: dominance of acid-acid association producing microphases. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 50, p. 10851-10858, Nov. 1999.
- 264 MARSAIOLI, A. J. et al. Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1882-1883, 1975.
- 265 GIL, V. M. S.; GERALDS, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987. 1012 p.
- 266 HIROTA, H. et al. Stereoselective total synthesis of ($\pm$)-eperuane-8 β ,15-diol. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 61, p. 4023-4028, 1988.
- 267 LOPES, L. M. X.; BOLZANI, V. S. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2265-2278, 1988.
- 268 CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES. **Deuterated solvents for NMR**. 23 p. Disponível em: <<http://www.isotope.com/uploads/file/nmrnpriced-proof.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2013.
- 269 DUARTE, L. P. et al. Stereochemistry of 16 α -hydroxyfriedelin and 3-oxo-16-methylfriedel-16-ene established by 2D NMR spectroscopy. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 598-607, Feb. 2009.
- 270 SOUBLISBY, D.; ANNA, L. J.; WALNER, A. S. **NMR spectroscopy in the undergraduate curriculum**. Miami: ACS Press, 2013. 347 p.
- 271 DAVID, J. P. et al. New triterpene and antibacterial labdonoic acid derivatives from *Moldenhawera nutans*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1585-1589, 2007.
- 272 KUSUMI, T.; OHTANI, I. I. Determination of the absolute configuration of biologically active compounds by the modified Mosher's method. In: NAKANISHI, K. (Ed.). **The biology-chemistry interface**. New York: CRC Press, 1999. Chap. 5, p. 103-137.
- 273 SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 17-117, Jan. 2004.
- 274 LOUZAO, I. et al. Control of the helicity of poly(phenylacetylene)s: from the conformation of the pendant to the chirality of the backbone. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 8, p. 1430-1433, Feb. 2010.
-

275 AMBER HOME PAGE. **Assisted model building with energy refinement**. 2014. Disponível em: <<http://ambermd.org/>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

276 WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1157-1174, July 2004.

277 HOSTAS, J.; REZAC, J.; HOBZA, P. On the performance of the semiempirical quantum mechanical PM6 and PM7 methods for noncovalent interactions. **Chemical Physics Letters**, v. 568/569, p. 161-166, May 2013.

278 AVALTRONI, F.; CORMINBOEUF, C. Identifying clusters as low-lying minima-efficiency of stochastic and genetic algorithms using inexpensive electronic structure levels. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 502-508, Feb. 2012.

279 MAMBU, L. et al. Clerodane and labdane diterpenoids from *Nuxia sphaerocephala*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 444-451, Mar. 2006.

280 CHAO, C.-H. et al. Steroidal carboxylic acids from soft coral *Paraminabea acronocephala*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 1, p. 136-145, Jan. 2013.

281 BACHRACH, S. M. **Computational organic chemistry**. 2nd ed. New York: Wiley, 2014. 632 p.

282 CHEN, L. et al. *ent*-Labdane diterpenoid lactone stereoisomers from *Andrographis paniculata*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 5, p. 852-855, May 2008.

283 CHINI, M. G. et al. Quantitative NMR-derived interproton distances combined with quantum mechanical calculations of ^{13}C chemical shifts in the stereochemical determination of conicasterol F, a nuclear receptor ligand from *Theonella swinhoei*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 1489-1496, Feb. 2012.

284 BAGNO, A.; RASTRELLI, F.; SAIELLI, G. Toward the complete prediction of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of complex organic molecules by DFT methods: application to natural substances. **Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 5514-5525, July 2006.

285 WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (^1H and ^{13}C)NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, n. 3, p. 643-660, Mar. 2014.

286 JAIN, R.; BALLY, T.; RABLEN, P. R. Calculating accurate proton chemical shifts of organic molecules with density functional methods and modest bases sets. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 11 p. 4017-4023, June 2009.

287 NAPOLITANO, J. G. et al. Proton fingerprints portray molecular structures: enhanced description of the ^1H NMR spectra of small molecules. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 19, p. 9963-9968, Oct. 2013.

288 WU, X.-D. et al. Diterpenoids from the twigs and leaves of *Fokienia hodginsii*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1032-1038, June 2013.

289 HIEDA, T.; YOICHI, M.; OBI, Y. Microbial transformations of manool and (12Z)-labda-8(17),12,14-triene by *Rhodococcus erythropolis* JTS-131. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 787-794, 1983.

290 FELICIANO, A. S. et al. 8-Hydroxy-labdanes from *Juniperus thurifera*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1713-1717, May 1992.

291 JOSSANG, J. et al. Quesnoin, a novel pentacyclic *ent*-diterpene from 55 million years old oise amber. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 412-417, Jan. 2008.

292 SCHEMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Synthesis, gastroprotective effect and cytotoxicity of new amino acid diterpene monoamides and diamides. **Molecules**, v. 15, p. 7378-7394, 2010.

293 MASSUDA, K. F.; TRIGO, J. R. Chemical defence of the warningly coloured caterpillars of *Methona themisto* (Lepdoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). **European Journal of Entomology**, v. 106, n. 2, p. 253-259, May 2009.

294 GARCIA, K. F. M. **Mecanismos de defesa contra predadores em larvas da borboleta *Methona Themisto* (Nymphalidae:Ithomiinae)**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

295 PANASENKO, A. A. et al. ¹H and ¹³C NMR spectra of some drimanic sesquiterpenoids. **Russian Chemical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 2700-2705, Dec. 2004.

296 URONES, J. G. et al. Terpenoid compounds from *Parentucellia latifolia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2223-2228, 1990.

297 WAHLBERG, I. et al. Tobacco chemistry. 57.* Two new labdanic compounds from tobacco. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 36, n. 8, p. 573-576, Mar. 1982.

298 TASKINEN, A. et al. The molecular structure and some properties of hydroxymatairesinol. An *ab initio* study. **Journal of Molecular Structure**, v. 677, n. 1/3, p. 113-124, May 2004.

299 KIRALJ, R. et al. Conformational study of (8 α ,8' β)-bis(substituted phenyl)-lignano-9,9'-lactones by means of combined computational, database mining, NMR, and chemometric approaches. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 28, p. 6316-6333, July 2007.

300 ALEMÁN, C. et al. Thermodynamic control of the polymerizability of five-, six-, and seven-membered lactones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 6237-6244, Aug. 2009.

Referências

- 301 HE, H.; DAI, L.-X.; YOU, S.-L. Intramolecular Michael addition reaction for the synthesis of benzylbutyrolactones. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 14, p. 3207-3210, July 2010.
- 302 MANNI, G. L. et al. Systematic conformational search analysis of the SRR and RRR epimers of 7-hydroxymatairesinol. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 141-147, Feb. 2010.
- 303 PARK, S. et al. A new set of molecular mechanics parameters for hydroxyproline and its use in molecular dynamics simulations of collagen-like peptides. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 15, p. 1612-1616, Nov. 2005.
- 304 VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field (CGenFF): a force field for drug like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671-690, Mar. 2010.
- 305 BROWN, E.; DAUGAN, A. Lignanes: 10. Preparation des (R)-(+)-et (S)-(-)- β -piperonyl et β -veratryl- γ -butyrolactones et leur utilisation dans la synthese totale de lignanes optiquement actifs. **Tetrahedron**, v. 45, n. 1, p. 141-154, 1989.
- 306 BROWN, E.; DAUGAN, A. (R)-(+)- β -Veratryl- γ -butyrolactone. A new key-intermediate for the asymmetric synthesis of various lignans. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 32, p. 3719-3722, 1986.
- 307 BURDEN, R. S.; CROMBIE, L.; WHITING, D. A. The extractives of *Heliopsis scabra*: constitution of two new lignans. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 5, p. 693-701, 1969.
- 308 INSTITUT NEFTEKHIMII.; LATAÇOZA RAN. (Russia). V. R. RAKHIMOVNA et al. **Method of isolation of 1-O-2-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-carboxy-4-(3-methoxy-4-oxyphenyl)-butyl-beta-D-galatopiranoose from *Onopordum acanthium* L.** RU20060147192 20061220. 20 Dec. 2006, 20 Sept. 2008.
- 308 ANAND, R. C.; SELVAPALAM, N. A convenient and mild procedure for the preparation of hydroxyesters from lactones and hydroxyacids. **Synthetic Communications**, v. 24, n. 19, p. 2743-2747, 1994.
- 309 LAVIE, D. et al. Conformational studies on certain 6-membered ring lactones. **Tetrahedron**, v. 26, n. 9, p. 2221-2228, 1970.
- 310 MULZER, J.; ZIPPEL, M. A study on kinetic C-H-acidity; the α -epimerization of β -lactones. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 23, p. 2165-2168, 1981.
- 311 ROSENBERG, R. E. Enols and enolates of carboxylic acid derivatives. A G2(MP2) ab initio study. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 16, p. 5562-5567, Sept. 1998.
-

Referências

312 BLADT, D. et al. Acid-catalyzed preparation of biodiesel from waste vegetable oil: an experiment for the undergraduate organic chemistry laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 2, p. 201-203, Feb. 2011.

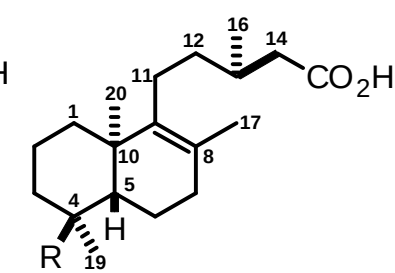
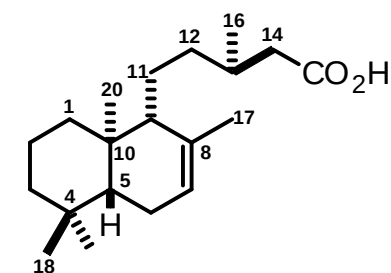
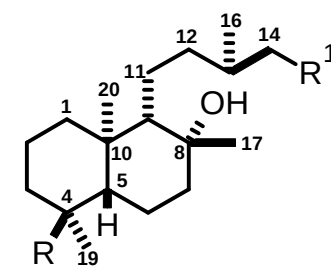
313 LI, W.-C. et al. Triterpenoid glycosides from *Anemoclema glaucifolium*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1175-1179, July 1995.

314 PHAN, H. D.; YOKOYAMA, T.; MATSUMOTO, Y. Direct participation of counter anion in acid hydrolysis of glycoside. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 36, p. 7382-7391, Sept. 2012.

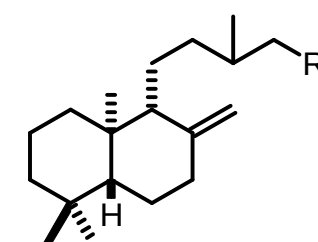
315 FOLEY, M. A.; JAMISON, T. F. Amide bond formation via reversible, carboxylic acid-promoted lactone aminolysis. **Organic Process Research and Development**, v. 14, n. 5, p. 1177-1181, Aug. 2010.

316 HEMESSY, S. A. et al. The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions. **Journal of Forensic Sciences**, v. 49, n. 6, p. 1220-1229, Nov. 2004.

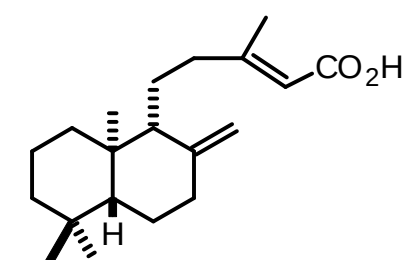
317 GRATIEN, J.; HECK, M-P.; MIOSKOWKI, C. C-2 epimerization of aldonolactones promoted by magnesium iodide: a new way towards non-enzymatic epimerization. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 18-30, Jan. 2008.



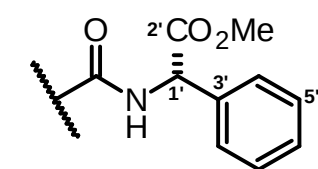
	R	R ¹
1	CH ₃	CO ₂ H
1a	CH ₃	CO ₂ Na
1b	CH ₃	CO ₂ CH ₃
1c	CH ₃	X
1d	CH ₃	Y
3	CH ₂ OH	CO ₂ H
3a	CH ₂ OH	X
3b	CH ₂ OH	Y
4	CO ₂ H	CO ₂ H
4a	Z	X
4b	W	Y
20	CH ₂ OH	CH ₂ OH



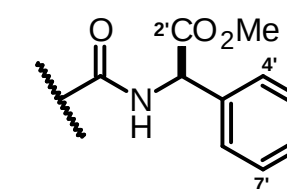
7 CO₂H
7a CO₂CH₃



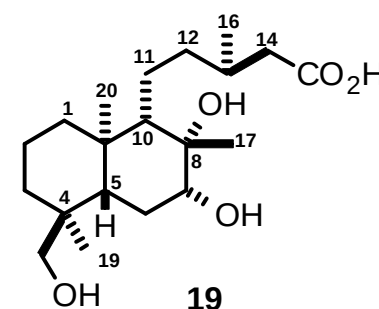
5



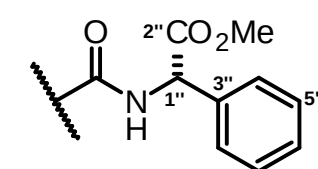
X



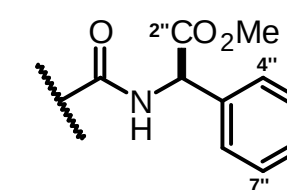
Y



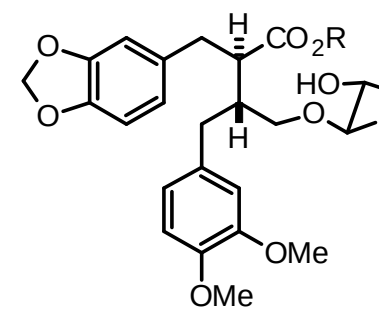
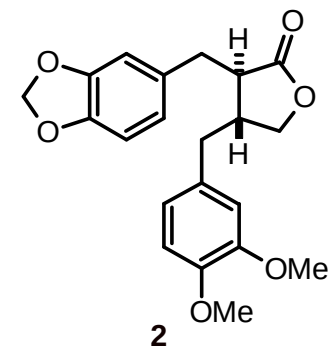
19



Z



W



1

1

