

MARIA CRISTINA VASCONCELLOS

**OBTENÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL
E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre do Curso de
Pós-Graduação em Química — Setor de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

**CURITIBA
2002**

MARIA CRISTINA VASCONCELLOS

OBTENÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL E SEUS DERIVADOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre do Curso de
Pós-Graduação em Química — Setor de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2002

TERMO DE APROVAÇÃO

OBTENÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL E DERIVADOS

por

MARIA CRISTINA VASCONCELLOS

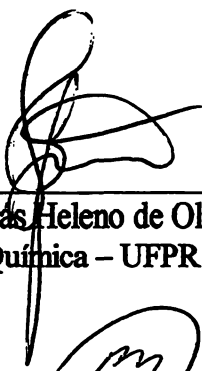
Dissertação aprovada como requisito

parcial para obtenção do grau de

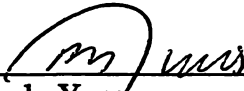
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof Dr Brás Heleno de Oliveira
Deptº de Química – UFPR



Prof. Dr. Rosendo Yunes
Deptº de Química - UFSC



Profª Drª Nádia Kriger
Deptº de Química – UFPR

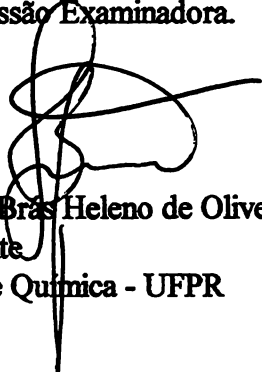
Curitiba, 08 de março de 2002.



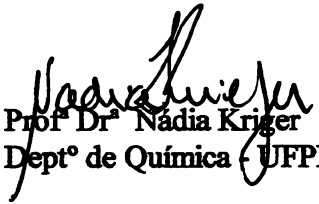
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Ata da vigésima sétima Sessão
Pública de Defesa de Dissertação de
Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal do Paraná,
realizada em 08/03/2002.

Aos oito dias do mês de março do ano de dois mil e dois, as quatorze horas, no Auditório do Departamento de Química da UFPR, foi realizada a sessão pública de defesa de Dissertação de Mestrado da aluna Maria Cristina Vasconcellos. Estavam presentes, além da candidata, os membros da Comissão Examinadora, o Sr. Presidente Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, Prof. Dr. Rosendo Yunes, Profª Drª Nádia Kriger. Após apresentação do trabalho da candidata, intitulado "**Obtenção e Biotransformação do Esteviol e Derivados**", a mesma foi argüida pela Comissão. Após reunião, a Comissão decidiu, por unanimidade, pela aprovação da candidata, condicionada a alterações na dissertação sugeridas pela mesma. O resultado foi, então, comunicado a candidata e aos presentes na sessão pública. A seguir o Presidente declarou encerrada a sessão da qual eu, Marcelino Câmara, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, lavrei a presente Ata que, depois de aprovada será assinada por mim, pelo Presidente, e pelos demais membros da Comissão Examinadora.



Prof Dr Brás Heleno de Oliveira
Presidente
Deptº de Química - UFPR



Profª Drª Nádia Kriger
Deptº de Química - UFPR



Prof. Dr. Rosendo Yunes
Deptº de Química - UFSC



Marcelino Câmara
Secretário PGDQ/UFPR

**Se FELICIDADE fosse uma planta,
eu daria uma muda
a todos que se aproximassem de mim.**

Ir. Myriam, OSB

**Obrigado Senhor,
Por todos aqueles que entraram em minha vida
e me ajudaram a tornar-me uma pessoa melhor.**

Most. N.S. Vitória - SE

A

Minha Mãe Laura

minha irmã Ileana

pela sua dedicação e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar-me para as pessoas que contribuíram para a minha formação

A minha família pelo constante apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, por sua dedicação e interesse dados ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores que participaram da banca examinadora.

A todos os Professores do Departamento de Química desta instituição que ministraram as disciplinas realizadas neste curso de Pós-graduação e àqueles que ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Dias de Souza Filho da UFMG, pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Sr. Ângelo R.S. Oliveira do Departamento de Química da UFPR pela realização dos espectros no Infravermelho.

Ao Sr. Marcelino Câmara, secretário da Pós-graduação pela atenção e apoio dados em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Aducto Belarmino de Pereira Netto, pela ajuda na elaboração do Ensaio do Hipocótilo.

A Profª Drª Ida Chapaval Pimentel pela ajuda em relação aos fungos.

A Denise Zelak Bastos, por sua amizade e companheirismo em todos os momentos de meu trabalho.

Ao Prof. Márcio Chimelli pelas fotos feitas para este trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório e todos os outros laboratórios pelo apoio prestado na parte experimental.

Aos Funcionários dos laboratórios do Departamento de Química, pela atenção.

Ao senhor Adécio de Souza Suék pelo fornecimento de fotos e textos sobre a *Stevia rebaudiana*.

A Diretoria do Curso de Química Industrial da PUC-PR, por sua ajuda.

Aos meus alunos, minha fonte de inspiração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Reguladores de Crescimento Vegetal.....	01
1.2 Diterpenóides Tetracíclicos.....	06
1.3 O Esteviosídeo.....	09
1.4 Biotransformação de Compostos Orgânicos.....	12
1.5 Fungos Endofíticos.....	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Descrição dos Materiais e Equipamentos.....	19
4. SÍNTESE QUÍMICA	21
4.1 Obtenção do Esteviol	21
4.2 Obtenção do Isoesteviol	21
4.3 Obtenção do Éster Metílico do Isoesteviol	22
4.4 Obtenção do <i>ent</i> -16-hidróxibaieran-19-oato de metila	22
4.5 Obtenção do <i>ent</i> -baier-15-en-19-oato de Metila (método com sílica/Cu(SO ₄) ₂).....	22
4.6 Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga com Nitrato de Prata.....	23
4.7 Obtenção do <i>ent</i> -baier-15-en-19-oato de Metila (método do tosilato).....	23
5. BIOTRANSFORMAÇÕES	23
5.1 Biotransformação do Esteviol.....	23
a) Ensaio em Escala Analítica.....	23
b) Biotransformação em Escala Preparativa.....	24

c) Preparação do Diazometano Etéreo.....	24
c.1) Esterificação com Diazometano.....	25
d) Isolamento do Metabólito.....	25
5.2 Biotransformação do <i>ent</i> -Baier-15-en-19-oato de Metila.....	25
a) Ensaio em Escala Analítica.....	25
b) Ensaio em Escala Preparativa.....	26
6. TESTE DO HIPOCÓTILO.....	27
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7.1 Obtenção do Esteviol.....	27
7.2 Obtenção do Isoesteviol e seus Derivados.....	30
7.2.1 Obtenção do Isoesteviol.....	30
7.2.2 Obtenção do <i>ent</i> -16-cetobaieran-19-oato de metila.....	31
7.2.3 Obtenção do <i>ent</i> -16-hidróxibaieran-19-oato de metila.....	33
7.2.4 Obtenção do <i>ent</i> -baier-15-en-19-oato de metila (método com sílica/Cu(SO ₄) ₂).....	35
7.2.5 Purificação com Nitrato de Prata.....	38
7.2.6 Obtenção do <i>ent</i> -baier-15-en-19-oato de metila (método do tosilato).....	40
7.3 Biotransformações.....	41
7.3.1 Biotransformação do Esteviol.....	41
a) Ensaio em Escala Analítica.....	41
b) Biotransformação em Escala Preparativa.....	41
7.3.2 Biotransformação do <i>ent</i> -Baier-15-en-19-oato de Metila.....	45
a) Ensaio em Escala Analítica.....	45
b) Ensaio em Escala Preparativa.....	45
7.4 Teste do Hipocótilo.....	47
8 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - PLANTAS MEDICINAIS CONTENDO DITERPENOS COM AÇÕES FARMACOLÓGICAS E SUAS ESTRUTURAS.....	06
TABELA 02 – HIDROXILAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DOS <i>ent</i> -CAURANOS, NO ANEL B.....	15
TABELA 03 - ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL.....	30
TABELA 04 - ATRIBUIÇÕES DO RMN ¹³ C PARA O <i>ent</i> -16-CETOBATERAN-19-OATO DE METILA.....	32
TABELA 05 - ATRIBUIÇÕES DO RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -16-HIDRÓXIBATERAN-19-OATO DE METILA.....	34
TABELA 06 - ATRIBUIÇÕES DO RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	37
TABELA 07 - ATRIBUIÇÕES DO RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA, PURO.....	40
TABELA 08 - ATRIBUIÇÕES DO RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXIBATER-16-EN-19-OATO DE METILA DA LITERATURA E DESTE TRABALHO.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLOS DAS CLASSES DE FITOHORMÔNIOS.....	01
FIGURA 2 – ROTA BIOSINTÉTICA DAS GIBERELINAS VIA ÁCIDO MEVALÔNICO.....	04
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DE OUTROS DITERPENOS TETRACÍCLICOS.....	05
FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS DITERPENOS TETRACÍCLICOS.....	06
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DOS DITERPENOS BIOATIVOS.....	07
FIGURA 6 – ÁCIDO ABIÉTICO.....	08
FIGURA 7 – ESTEVIOSÍDEO.....	09
FIGURA 8 – ESTEVIOL.....	10
FIGURA 9 – ISOESTEVIOL.....	10
FIGURA 10 - ROTA BIOSINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DOS DITERPENOS TETRACÍCLICOS E SUAS CICLIZAÇÕES.....	11
FIGURA 11 - HIDROXILAÇÃO DA DESOXYCORTICOSTERONA A CORTICOSTERONA.....	14
FIGURA 12 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA.....	17
FIGURA 13 - REARRANJO DE WAGNER-MEERWEIN.....	28
FIGURA 14 – ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL.....	28
FIGURA 15 - <i>ent</i> -16-CETOBAIERAN-19-OATO DE METILA.....	31
FIGURA 16 - <i>ent</i> -16-HIDRÓXIBAIERAN-19-OATO DE METILA.....	33
FIGURA 17 - <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	35
FIGURA 18 - FORMAÇÃO DO COMPOSTO SECUNDÁRIO.....	38
FIGURA 19 – <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.....	44
FIGURA 20 - EFEITO COMPARATIVO DO ÉSTER DE ESTEVIOL, <i>ent</i> -7 α ,13-DI- HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA E DO ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO	48
FIGURA 21 - EFEITO COMPARATIVO PARA O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (IMPURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO.....	49

FIGURA 22 - EFEITO COMPARATIVO PARA O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO.....	50
FIGURA 23 - EFEITO COMPARATIVO DO ÉSTER DE ESTEVIOL, <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA E DO ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DA RAIZ PRINCIPAL DA PLANTA DE ALFACE.....	51
FIGURA 24 - EFEITO COMPARATIVO PARA O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DA RAIZ PRINCIPAL DA PLANTA DE ALFACE.....	52
FIGURA 25 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DO INFRAVERMELHO DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL.....	66
FIGURA 26 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ÉSTER DE ESTEVIOL.....	66
FIGURA 27 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO ÉSTER DE ESTEVIOL.....	67
FIGURA 28 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO ÉSTER DE ESTEVIOL.....	67
FIGURA 29 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DO INFRAVERMELHO DO <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.....	68
FIGURA 30 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.....	68
FIGURA 31 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.....	69
FIGURA 32 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO <i>ent</i> -7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.....	69
FIGURA 33 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO <i>ent</i> -16-CETOBATERAN-19-OATO DE METILA.....	70
FIGURA 34 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO <i>ent</i> -16-CETOBATERAN-19-OATO DE METILA.....	70

FIGURA 35 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C <i>ent</i> -16-CETOBATERAN-19-OATO DE METILA.....	71
FIGURA 36 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO <i>ent</i> -16-CETOBATERAN-19-OATO DE METILA.....	71
FIGURA 37 - ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO <i>ent</i> -16-HIDRÓXI-BATERAN-19-OATO DE METILA.....	72
FIGURA 38 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO <i>ent</i> -16-HIDRÓXI-BATERAN-19-OATO DE METILA.....	72
FIGURA 39 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -16-HIDRÓXI-BATERAN-19-OATO DE METILA.....	73
FIGURA 40 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO <i>ent</i> -16-HIDRÓXI-BATERAN-19-OATO DE METILA.....	73
FIGURA 41 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	74
FIGURA 42 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	74
FIGURA 43 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	75
FIGURA 44 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA	75
FIGURA 45 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹ H DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO).....	76
FIGURA 46 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO).....	76
FIGURA 47 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C – DEPT DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO).....	77
FIGURA 48 – CROMATOGRAMA DO <i>ent</i> -BATER-15-EN-19-OATO DE METILA E O ISÔMERO.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	→ deslocamento químico
°C	→ grau Celsius
CCD	→ cromatografia em camada delgada
CCDC	→ cromatografia em camada delgada centrífuga
CLV	→ cromatografia líquida à vácuo
CDCl_3	→ clorofórmio deuterado
MeOD	→ metanol deuterado
DMSO	→ Dimetilsulfóxido
Hz	→ Hertz
P.D.A.	→ meio de cultura sólido composto de batata, dextrose e agar (mg/L)
RMN^{13}C	→ ressonância magnética nuclear de carbono - 13
RMN^1H	→ ressonância magnética nuclear de hidrogênio – 1
COSY	→ correlação homonuclear (H x H)
DEPT	→ espectro no RMN^{13}C utilizando transferência de polarização
HETCOR	→ correlação heteronuclear (C x H)
IV	→ infravermelho
Rf	→ razão de frente
S	→ simpleto
t	→ tripleto

RESUMO

Este trabalho teve como finalidade a obtenção de compostos orgânicos com possível atividade reguladora de crescimento vegetal. Para isso foram utilizados diterpenóides tetracíclicos naturais como material de partida e os produtos finais foram obtidos mediante transformações orgânicas clássicas e também por biotransformações. Para determinar a atividade reguladora vegetal dos produtos obtidos, estes foram submetidos a um ensaio com sementes de alface, com o intuito de verificar o crescimento do hipocótilo. Os resultados foram determinados por técnicas espectroscópicas, tais como IV, RMN ^1H e ^{13}C .

Palavras-chave: Diterpenóides; Biotransformação de Diterpenos; Biotransformação do esteviol; Regulador de crescimento vegetal.

ABSTRACT

This work had the objective of obtaining organic compounds with plant growth regulator properties. Natural tetracyclic diterpenoids were used as starting materials and the products were obtained by classical organic reactions or by biotransformations. The structural determinations were based on spectroscopical analysis. In order to determine the plant growth regulator activity, the compounds were submitted to the lettuce hypocotyl assay.

Key words: diterpenoids; stevioside; steviol; biotransformation; plant growth regulator.

1 INTRODUÇÃO

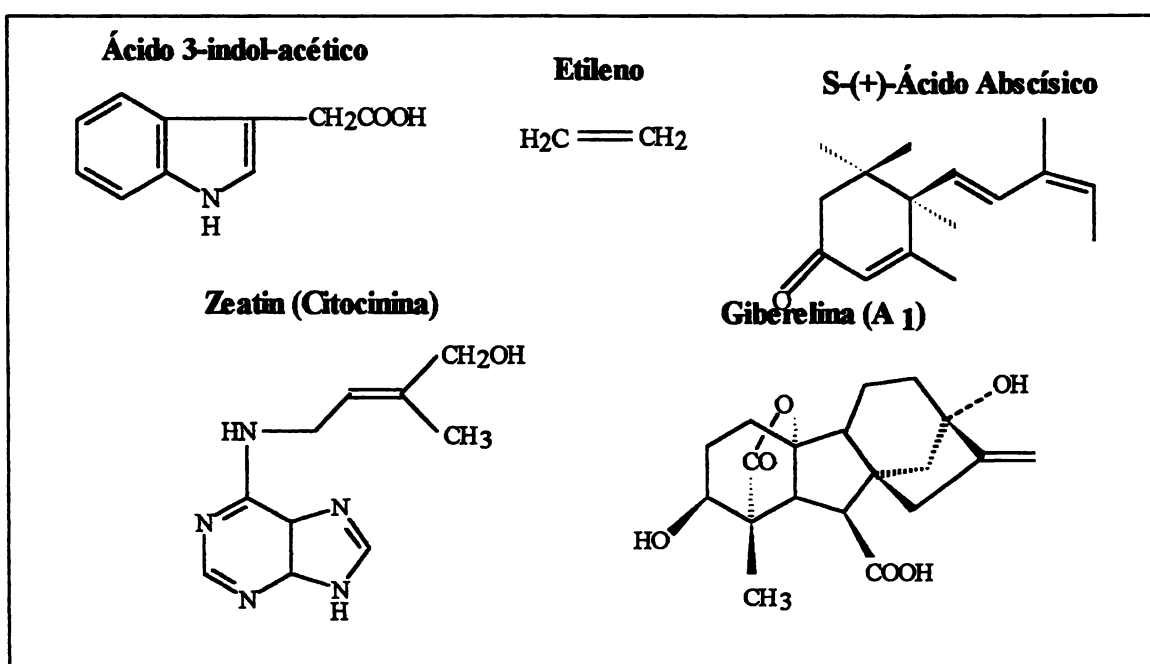
Este trabalho trata da obtenção de derivados do esteviol por métodos químicos e da *biotransformação por fungos*.

Considerando a atividade *reguladora de crescimento vegetal* do esteviol, um *diterpenóide tetracíclico*, pretendíamos realizar bioensaios utilizando sementes de alface, para verificar a existência de alguma atividade, relativa aos hormônios vegetais e compara-los com o ácido giberélico, que possui um ótimo efeito na atividade reguladora vegetal.

1.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

Os reguladores de crescimento vegetal ou fitohormônios têm a função de influir na maioria dos aspectos de crescimento, atuando na divisão celular, no aumento celular, na diferenciação de tecidos, no fenômeno de crescimento e desenvolvimento celular e na diferenciação de tecidos e órgãos de plantas. Os cinco principais tipos são: auxinas (IAA), citocininas, gás etileno, ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GA) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - EXEMPLOS DAS CLASSES DE FITOHORMÔNIO (KENDE & ZEEVAART, 1997).



As **auxinas** induzem o prolongamento de células na região subapical da planta, auxiliam no fototropismo, geotropismo, iniciam o processo de enraizamento, produzem o gás etileno e auxiliam no desenvolvimento das frutas. Por esta razão são consideradas como hormônios universais do controle de crescimento das plantas. O ácido 3-indolacético (IAA) é o principal exemplo desta classe. As **citocininas** como, por exemplo, a *zeatin* (6-(4-hidróxi-3-metil-trans-2-butenil-amino) purina), (FIGURA 1) são compostos com a função de promover a divisão celular. Além disso, elas estão envolvidas em outras funções de crescimento e desenvolvimento de uma planta, tais como o aumento do volume celular, diferenciação dos tecidos, dormência, florescimento, formação de frutos e envelhecimento. O **etileno**, outro regulador de crescimento vegetal, promove alteração no tropismo de raízes é bastante efetivo, na quebra de dormência da batata, muito efetivo na indução do amadurecimento de frutas, indução abscissa de folhas e indução ao florescimento em plantas do abacaxi e envelhecimento. Outro hormônio, o **ácido abscísico (ABA)**, é um isoprenóide produzido no cloroplasto. Ele possui a função de promover a embriogênese, armazenamento de proteínas e de inibir o crescimento.

As **giberelinas** são diterpenóides tetracíclicos. Elas estimulam o crescimento de plantas de modo muito mais expressivo que as auxinas. A aplicação de giberelina em arroz, por exemplo, causa um alongamento da folha e do caule. Plantas que respondem bem a este hormônio são as de caule curto ou anãs, tais como as espécies de roseta. Além do efeito de alongamento do caule, as giberelinas apresentam outros efeitos reguladores no desenvolvimento de plantas, como por exemplo, o estado de dormência do embrião e sementes, que pode ser interrompido; o florescimento de algumas espécies de plantas, que pode ser induzido; o crescimento e amadurecimento de algumas frutas; o envelhecimento de algumas partes da planta, especialmente as folhas. As giberelinas denominadas GA_{4/7} e GA₃ (ácido giberélico) são as de maior importância comercial (LEOPOLD & KRIDEMANN, 1975).

Apesar dos efeitos benéficos que as giberelinas podem proporcionar em várias culturas, seu uso é restrito a algumas poucas aplicações devido ao alto preço destes compostos. O GA₃, por exemplo, custa cerca de US\$ 1500.00/Kg. Para tentar resolver o problema do alto custo de produção, algumas abordagens têm sido consideradas. A maioria destas abordagens, pode ser resumida na tentativa de aumentar a eficiência dos processos fermentativos de produção daqueles compostos.

Uma abordagem alternativa seria a de utilizar outros compostos de mais fácil obtenção, que tenham propriedades semelhantes às das giberelinas. Dentre estes compostos, os diterpenóides tetracíclicos seriam bons candidatos, porque eles são semelhantes a intermediários naturais da biossíntese das giberelinas.

A rota biossintética das giberelinas (FIGURA 2) pode ser dividida em três estágios, que são (DEWICK, P.M., 1997):

Estágio 1: do geranil-geranil-difosfato para o *ent*-caurano:

O primeiro passo na biossíntese da giberelina é a ciclização do geranil-geranil-difosfato para o *ent*-copalil-difosfato, o qual é convertido no *ent*-caurano, um diterpeno tetracíclico.

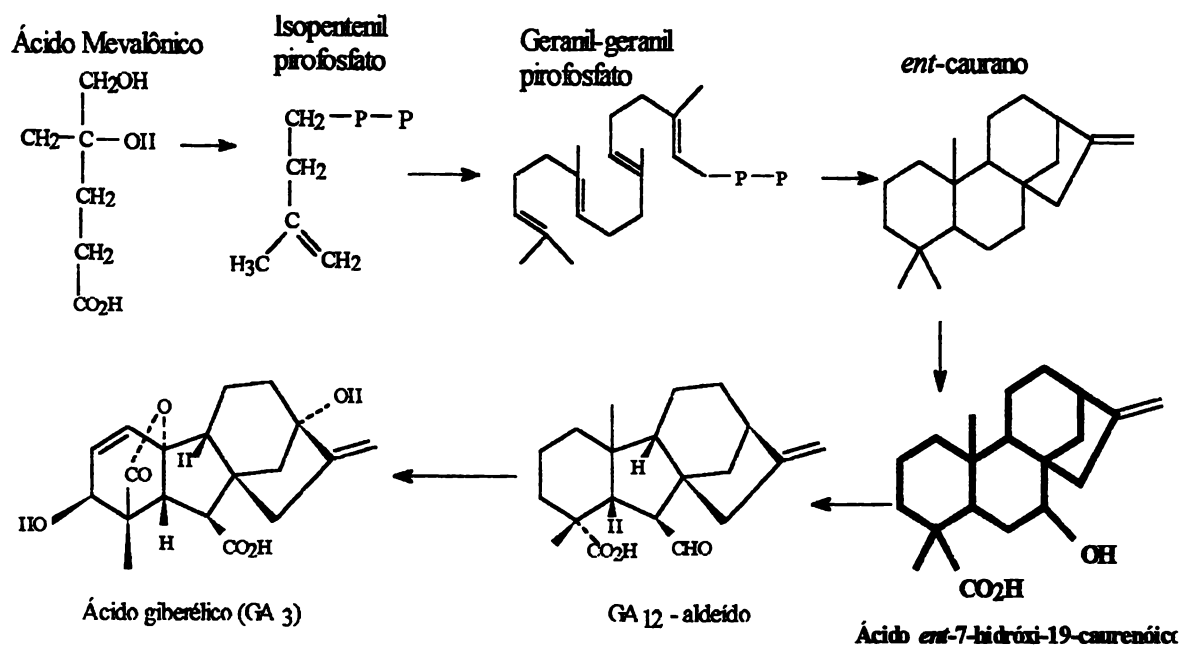
Estágio 2: do *ent*-caurano para o aldeído giberélico (GA₁₂)

As enzimas do segundo estágio são monooxigenases de membranas localizadas provavelmente no retículo endoplasmático. A sequência de oxidação do C-19 do *ent*-caurano via *ent*-caurenol e *ent*-caurenal para o ácido caurenóico é provavelmente catalisada por uma única enzima. A contração do anel B com extrusão do C-7 fornece o aldeído giberélico (GA₁₂). É interessante observar aqui que o esteviol, aglicona do esteviosídeo, pode ser considerado um derivado hidroxilado do ácido caurenóico.

Estágio 3: do aldeído giberélico (GA₁₂) a várias giberelinas (GAs):

O primeiro passo deste estágio envolve a oxidação do aldeído giberélico (GA₁₂). Além disso, o metabolismo deste aldeído giberélico (GA₁₂) varia entre espécies ou órgãos da mesma espécie com respeito à posição e sequência dos passos oxidativos.

FIGURA 2 – ROTA BIOSSINTÉTICA DAS GIBERELINAS VIA ÁCIDO MEVALÔNICO (GEISMANN, T.A., 1969; DEWICK, P.M., 1997).

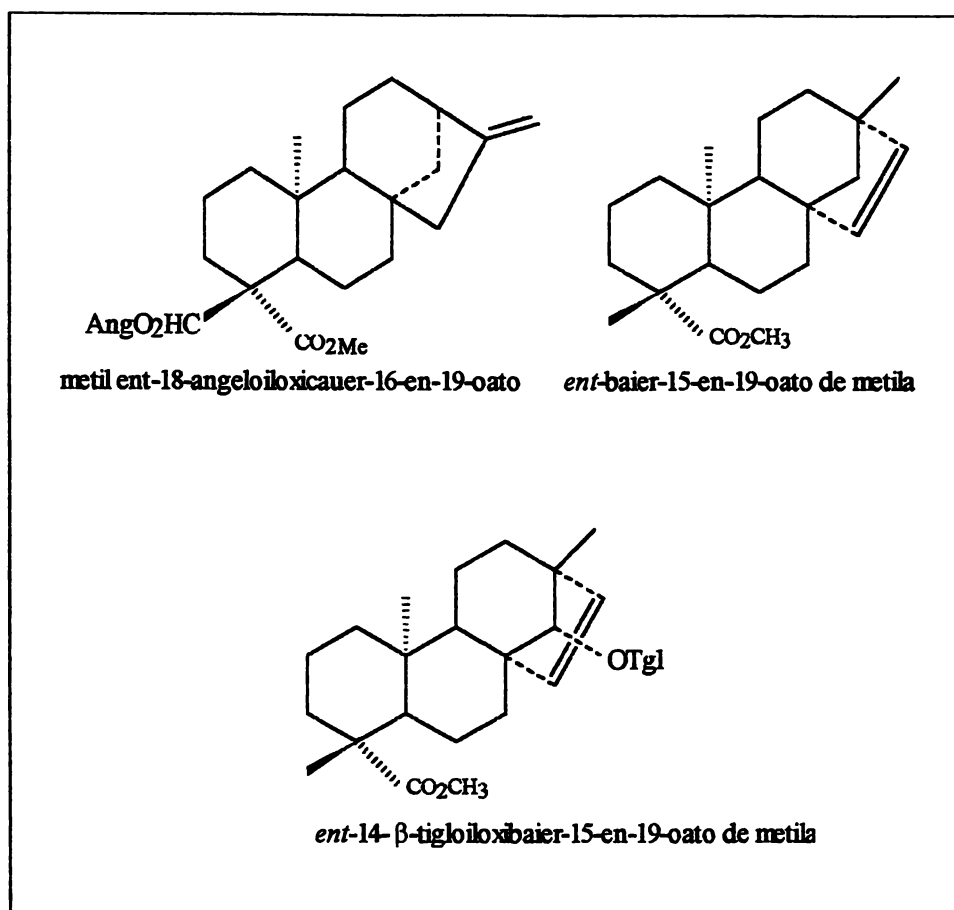


Além das classes descritas acima, mais recentemente os brassinosteróides, salicilatos e jasmonatos começam a ser aceitos como novas classes de reguladores de crescimento vegetal.

Alguns diterpenóides tetracíclicos, semelhantes ao ácido caurenóico, também possuem ação parecida com a das giberelinas. O esteviol (FIGURA 8), por exemplo, tem a capacidade de promover o crescimento dos mutantes de milho anão d-5 e an-1 da *Zea mays* (KATSUMI, M & PHINNEY, B. O., 1964).

Outros diterpenos tetracíclicos (FIGURA 3) possuem atividade reguladora de crescimento vegetal bastante pronunciada. Um estudo comparativo (VILLALOBOS *et al*, 1994) feito com vários compostos desta classe indicou que vários deles possuíam efeitos biológicos mais intensos do que o próprio GA₃. Os compostos foram testados em vários sistemas vegetais, por exemplo, em sementes de milho, para determinação de atividade reguladora de crescimento vegetal. Os compostos testados eram de origem vegetal e, portanto, obtidos em quantidades bastante reduzidas.

FIGURA 3 – ESTRUTURAS DE OUTROS DITERPENOS TETRACÍCLICOS (VILLALOBOS *et al*, 1994).

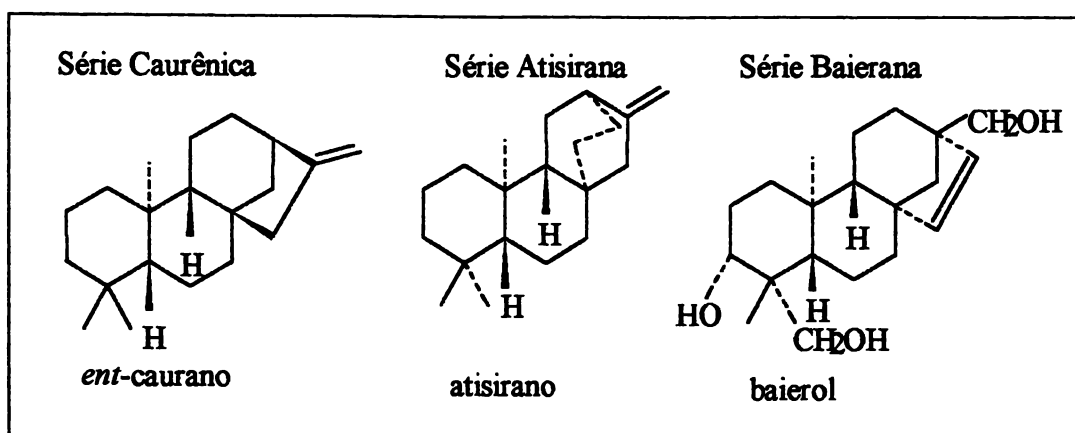


Um dos compostos descritos naquele trabalho, o *ent*-beier-15-en-19-oato de metila, despertou nossa atenção. Ele foi obtido de modo natural da planta *Elaeoselinum tenuifolium*, e sua atividade biológica foi marcante. Nos vários protocolos utilizados, foi mais ativo que o GA_3 . Devido à sua estrutura verificamos que seria possível obtê-lo a partir do isoesteviol (FIGURA 7). Desta forma resolvemos prepará-lo através de uma sequência curta de reações simples.

1.2 Diterpenóides Tetracíclicos

Os diterpenos tetracíclicos, objeto de estudo deste trabalho, são metabólitos secundários comumente encontrados na natureza. Eles estão classificados em Cauranos, Filocladenos, Atisiranos, Baieranos, Hibaeno e Giberelinas (GEISSMAN & CROUT, 1969). Na FIGURA 4, apresentamos algumas estruturas de Diterpenos Tetracíclicos.

FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS DITERPENOS TETRACÍCLICOS.

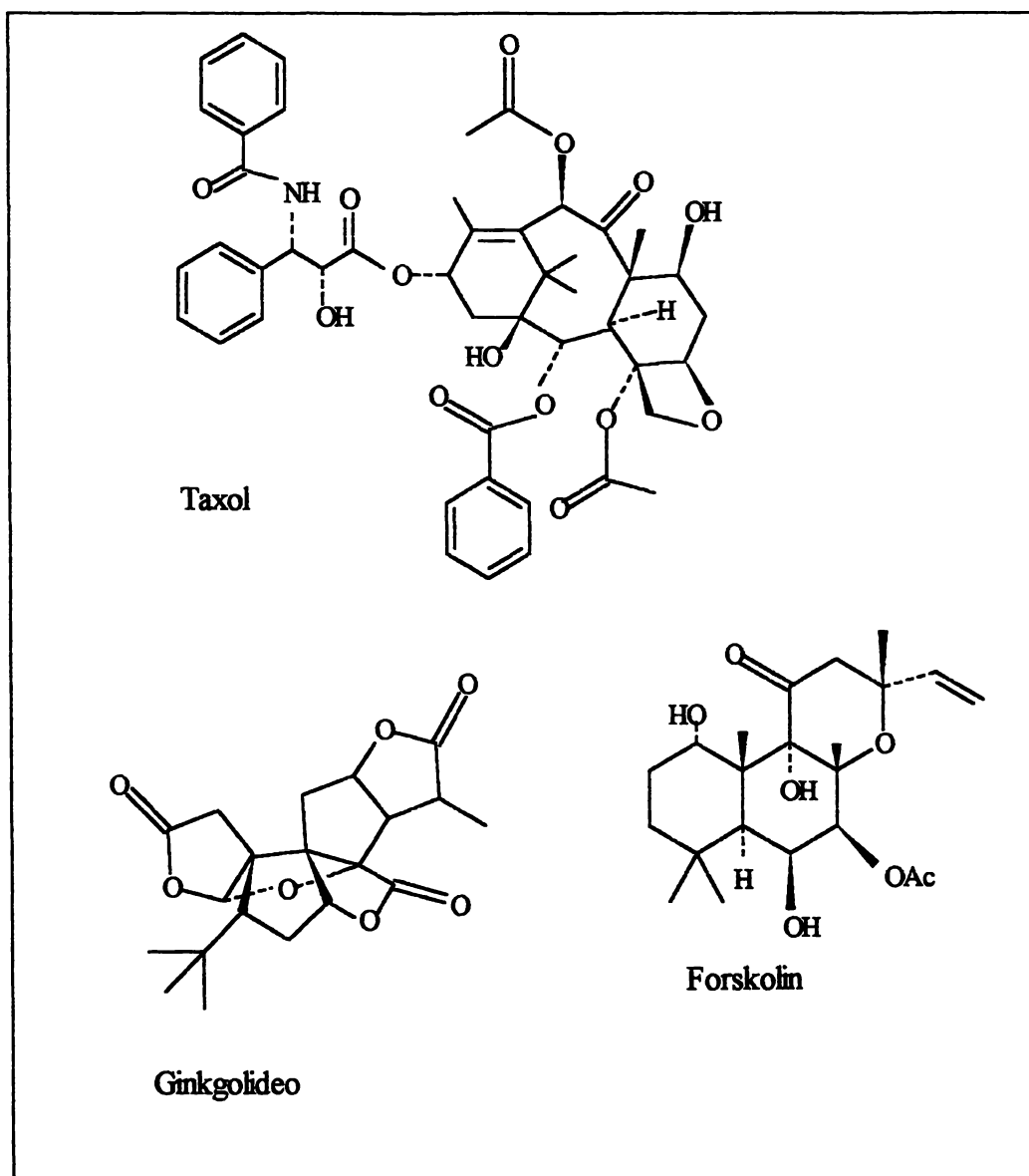


Os diterpenóides possuem uma vasta gama de atividades biológicas, podendo agir em vários sistemas biológicos, ocasionando várias respostas. Alguns exemplos encontram-se na Tabela 1 e FIGURA 5:

Tabela 1 - Plantas Medicinais contendo diterpenos com ações farmacológicas (Dewick,P.M., 1997).

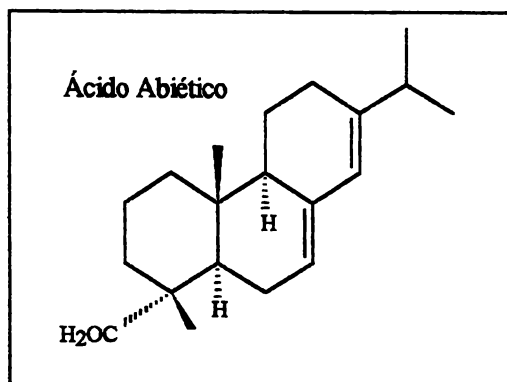
Espécie / Família	Efeito Terapêutico	Constituintes diterpenoídicos
<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	Anticancerígeno	Taxol
<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	Melhora a circulação periférica; utilizado contra doença vascular- cerebral e demência senil.	Ginkgolides Bilobalide
<i>Coleus forskohlii</i> (Labiatae)	Diminui a pressão sanguínea e possui propriedades cardiovasculares.	Forskolin

FIGURA 5 - Estruturas dos diterpenos Bioativos citados na TABELA 1
(DEWICK,P.M., 1997).



Além das propriedades farmacológicas, alguns diterpenos possuem atividade de proteção às plantas. Por exemplo, os ácidos resínicos (abiético) (FIGURA 6) são exudados da madeira das árvores, especialmente as coníferas, protegendo-as de infecções e do ataque de insetos (GHISALBERTI, E.L., 1997).

FIGURA 6 – ÁCIDO ABIÉTICO.



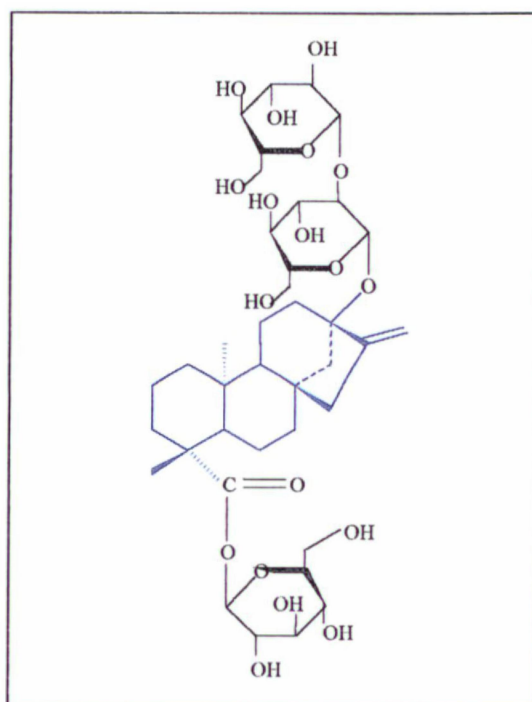
O esteviol (FIGURA 8) apresenta algumas atividades biológicas, tais como: promover o crescimento dos mutantes de milho anão d-5 e an-1 da *Zea mays*; evitar o desenvolvimento do pulgão *Shizaphis graminum*, uma praga do trigo, sorgo e outros grãos; inibir a fosforilação oxidativa na mitocôndria de ratos (GHISALBERTI, E.L., 1997).

O ácido caurenóico (FIGURA 2) também promove o crescimento dos mutantes de milho anão d-5 e an-1 da *Zea mays*. Possui também atividade antimicrobiana. Este ácido misturado ao ácido angeloilgrandiflorico inibe o crescimento dos fungos *Verticillium dahliae* e *Sclerotinium sclerotiorum* que são patogênicos do girassol; atua contra o protozoário flagelado *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas; pode ser utilizado como inseticida contra algumas pragas e na medicina pode agir contra algumas células cancerígenas como, por exemplo, o câncer de pele. Pode também ser aplicado como anticoncepcional e antiinflamatório em primatas (KATSUMI e PHINNEY, 1964; GHISALBERTI, 1997).

1.3 O Esteviosídeo

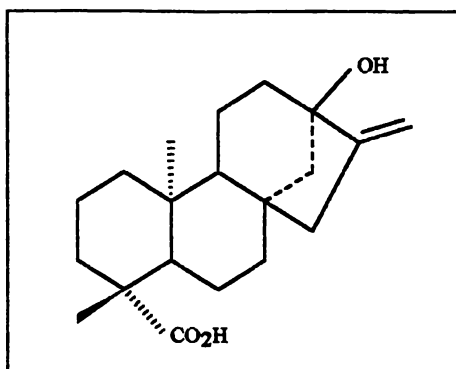
O esteviosídeo (FIGURA 7) é um glicosídeo do esteviol, isolado das folhas da *Stevia rebaudiana*. Ele é produzido comercialmente, sendo trezentas vezes mais doce que a sacarose. Por isso é utilizado como edulcorante natural. Estruturalmente a molécula do esteviosídeo é composta da aglicona, o esteviol, ao qual estão ligados uma unidade de glucose no C-19 e uma unidade de sofrorse no C-13 (FELIPPE, 1977).

FIGURA 7 – ESTEVIOSÍDEO



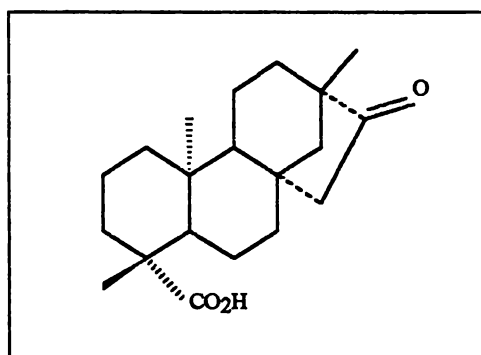
O esteviosídeo, ao ser hidrolisado, pode produzir diterpenóides tetracíclicos com esqueletos caurano e baierano. Esta hidrólise por ser enzimática ou química. Na hidrólise enzimática (GIANFANA *et al*, 1983) utilizou-se a enzima pectinase em uma solução de tampão citrato de pH 4 com incubação, acontece por um período de sete dias a uma temperatura de 36°C, produzindo o esteviol. Este composto pode ser obtido também por hidrólise química com periodato de sódio em presença de uma solução alcalina e em refluxo por uma hora (OGAWA, T. *et al*, 1980).

FIGURA 8 – ESTEVIOL



Por hidrólise ácida (AVENT, HANSON, & OLIVEIRA, 1990a), obtém-se um isômero do esteviol chamado isoesteviol que possui a seguinte fórmula estrutural:

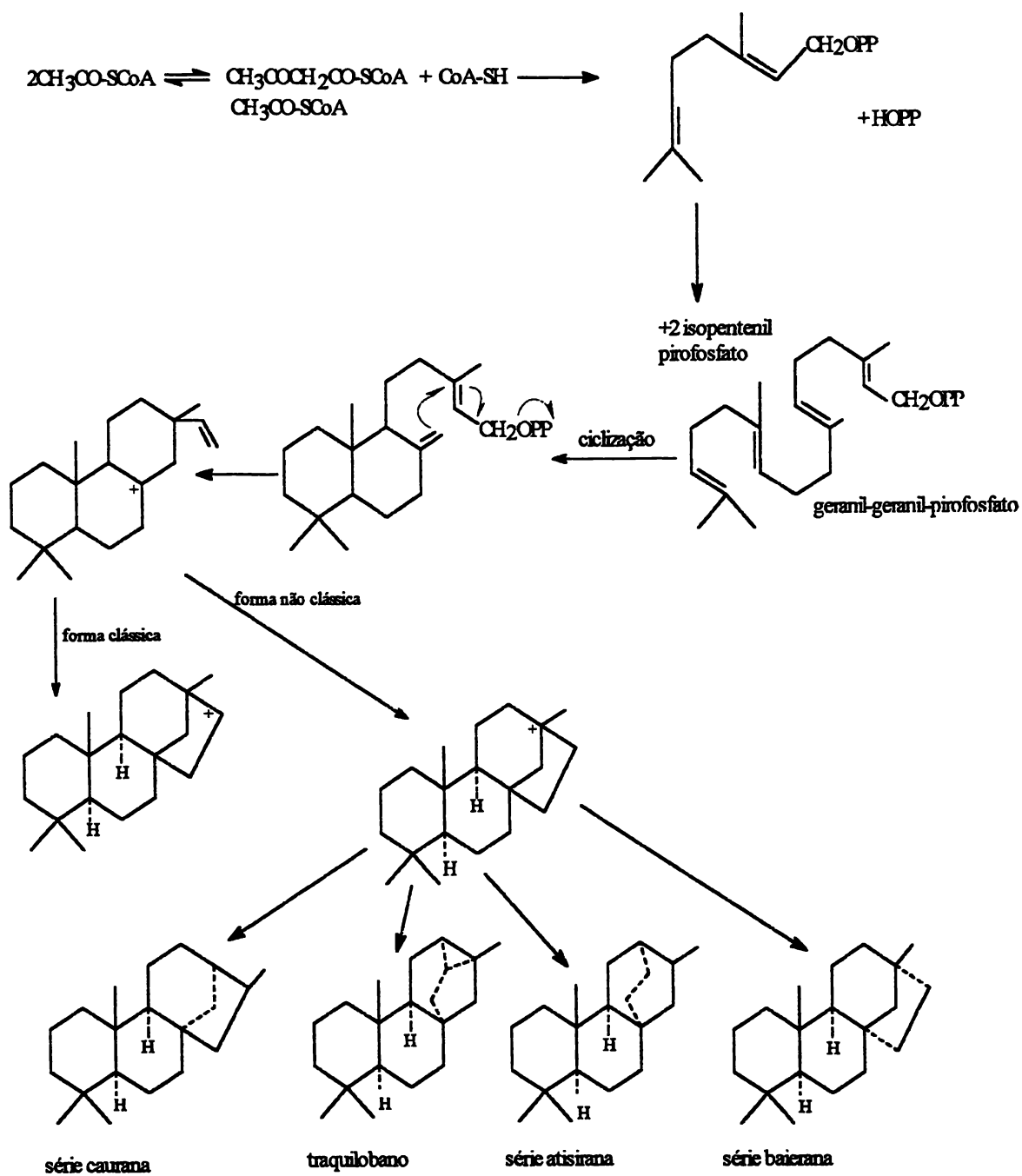
FIGURA 9 – ISOESTEVIOL



BIOSSÍNTESE DOS DITERPENOS

Os diterpenos são compostos de vinte carbonos. Eles podem ser lineares como, por exemplo, o fitol, macrocíclicos, como os cembranos ou policíclicos como os taxanos. A maioria dos diterpenos é produto de uma ciclização que dá lugar a um sistema do tipo decalina, que evolui via eliminação de um próton até um intermediário importante: o pirofosfato de labdadienila. Após a solvólise, o grupo pirofosfato origina um carbocátion alílico, que pode sofrer o ataque do metileno exo e chegar então, por uma série de combinações diversas aos diferentes esqueletos policíclicos diterpênicos conhecidos (GEISSMAN, 1969; BRUNETON, 1991). A FIGURA 10, mostra a rota biossintética para a produção dos diterpenos tetracíclicos.

FIGURA 10 - ROTA BIOSSINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DOS DITERPENOS TETRACÍCLICOS E SUAS CICLIZAÇÕES (GEISSMAN, 1969).



1.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Biotransformação de compostos orgânicos é uma das áreas da Biotecnologia e nesta técnica um composto orgânico é modificado a um produto recuperável, mediante reações simples e quimicamente definidas, ou seja, irão atuar diretamente em certas posições, catalisadas por enzimas contidas nas células. A transformação química pode ser resultado de uma única reação ou de uma sequência de reações enzimáticas (FABER, K., 1997).

Histórico da Biotransformação

A acidificação do vinho a vinagre foi praticada na Babilônia em 500 anos a.C., mas foi somente em 1862, que Louis Pasteur percebeu a oxidação do álcool a ácido acético pelo fungo *Bacterium xylinum*, o mesmo visto por Brown em 1886. Além destes outros trabalhos importantes são:

- a) A oxidação da glucose a ácido glucônico pelo *Acetobacter aceti*, feita por Boutroux em 1880;
- b) A oxidação do D-sorbitol a L-sorbose pelo *Acetobacter sp*, feita por Bertrand em 1896;
- c) Formação do aciloin do benzaldeído e acetaldeído através de fungos, por Neuberg em 1921 (BU'LOCK, J & KRISTIANSEN, B., 1991).

Bertrand (BU'LOCK, J & KRISTIANSEN, B., 1991), durante a última parte do século XIX, iniciou um estudo sistemático sobre as pesquisas referentes às transformações microbianas e numa revisão feita por ele, foram encontradas as seguintes reações:

- Oxidação:*
- do etanol ao ácido acético;
 - da glucose ao ácido glucônico;
 - dos poliálcoois aos correspondentes açúcares.

Redução: - do ácido málico a ácido succínico;
- da frutose ao manitol.

Hidrólise: - dos taninos ao ácido gálico;
- dos di e tri-sacarídeos aos monossacarídeos constituintes.

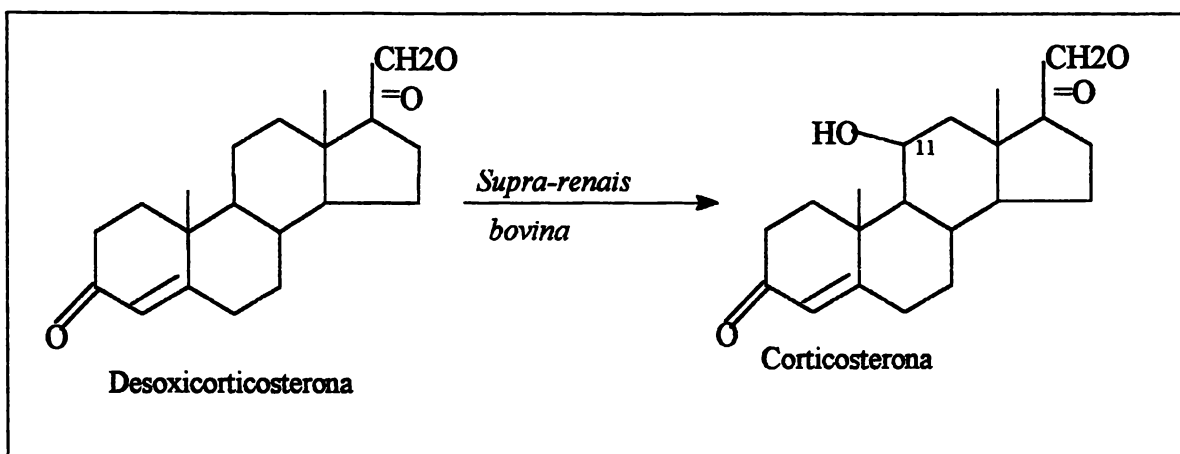
Resolução de misturas racêmicas de: - do ácido tartárico (experimento de Pasteur);
- dos ácidos láctico, mandélico e glicérico.

Embora estes procedimentos posteriormente tenham se desenvolvido para uma tecnologia de larga escala, somente muito mais tarde a biotransformação ganhou uma presença significativa, mediante a descoberta da transformação microbiológica de esteróides, tais como (KIELICH, K., 1984):

- a) Redução de androstenediona para testosterona através de leveduras, por Mamoli e Vercellone em 1937;
- b) 11 α -hidroxilação de progesterona pelo *Rhizopus arrhizus* por Peterson e Murray em 1952;
- c) Introdução de um Δ^1 – dupla ligação em 3-ceto-4-enesteróides pelo *Corynebacterium simplex* por Nobile e Charney em 1955;
- d) 11- β -hidroxilação do C₂₁- esteróides pela *Curvularia lunata* por Shull e Kita em 1955;
- e) 16- α -hidroxilação de 9 α -fluorhidrocortisona pelo *Streptomyces roseochromogenes* por Thomas e Fried em 1957.

Um exemplo da biotransformação de esteróis é hidroxilação da 11- β - da desoxicorticosterona a corticosterona (FIGURA 11), que foi o primeiro processo industrial para a transformação biológica da hidrocortisona (cortisol) a partir do composto S de Reichstein. Esta observação também incitou aos microbiólogos a buscar em microrganismos capazes da 11- β - hidroxilar esteróides e o processo com glândulas supra-renais bovinas foi prontamente substituído pelo processo microbiano, que era muito mais eficiente (BU'LOCK, J & KRISTIANSEN, B., 1991).

FIGURA 11 - HIDROXILAÇÃO DA DESOXCORTICOSTERONA A CORTICOSTERONA (BU'LOCK, J & KRISTIANSEN, B., 1991).



Atualmente a biotransformação pode ser considerada como uma:

- a) Modificação específica da estrutura do substrato via reações de transformação seletivas;
- b) Degradação parcial de substratos em um metabólito desejável, pelos recursos de reações microbianas controladas ou caminhos de reações;
- c) Aumento da estrutura do substrato por meio de reações biossintéticas formando estruturas artificiais (KIELICH, K., 1984).

Existem dois tipos de transformações microbiológicas (HANSON, J.R., 1992):

1ª) Transformações Xenobióticas: quando o substrato é completamente estranho ao microrganismo. Neste caso, o sistema enzimático atua com uma seletividade régio-específica, que é uma característica freqüente em microrganismos. Um exemplo deste tipo de transformação é a hidroxilação microbiológica dos esteróis, que envolvem um ou dois passos enzimáticos;

2ª) Biossinteticamente direcionadas: onde o substrato é semelhante ao intermediário biossintético e a transformação ocorre na condição de existir um caminho biossintético. Apresenta vários passos e, conseqüentemente, a eficiência do processo pode ser inferior à do processo Xenobiótico.

Exemplos de algumas hidroxilações microbiológicas de *ent*-cauranos, com funcionalização no anel B e estão apresentados na Tabela 2:

TABELA 2 – HIDROXILAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DOS *ent*-CAURANOS, NO ANEL B (HANSON, J.R., 1992).

Substrato	Fungos		
	<i>C. decora</i>	<i>R. nigricans</i>	<i>A. niger/ A. ochraceus</i>
	Posição	da	hidroxilação
<i>ent</i> -17-norcauran-16-ona	1 α , 6 β	3 α	3 α
	1 α , 7 β	1 α , 3 β	
		3 α , 7 α	
17-norcauran-16-ona	—	3 β	3 β
		3 β , 7 β	
		3 β , 7 α	
		3 β , 9 α	
<i>ent</i> -17-norcauran-3-ona	7 α	—	—
	13		
	7 α , 11 β		
<i>ent</i> -3 β -hidróxi-17-norcauran-16-ona	7 α	1 α	6 β
		7 α	7 α
<i>ent</i> -19-hidróxi-17-nor-cauran-16-ona	1 α	1 α	16 β -OH
	7 α	7 α	
Ácido <i>ent</i> -17-nor-16-oxocauran-19-óico	1 α	1 α	13
	7 α	7 α	13, 16 β -OH
	7 β	7 β	
Ácido <i>ent</i> -cauer-16-en-19-óico	7 α	7 β	16 α , 17
	15 α		
	7 α , 15 α		
Ácido <i>ent</i> -17-hidróxicauran-19-óico	7 α		
	7 β		

As reações enzimáticas geralmente apresentam algumas vantagens que podem ser definidas como da biotransformação:

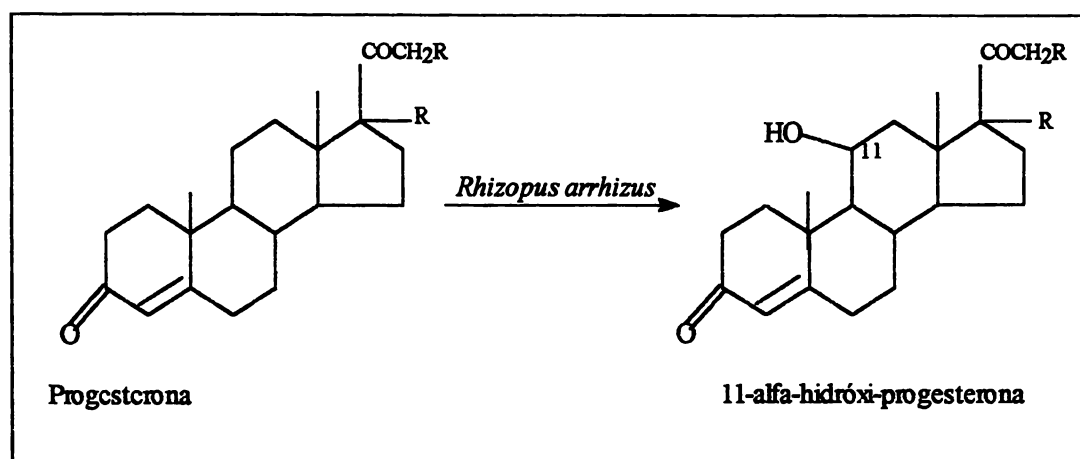
- a) Reação Específica: a atividade catalítica é normalmente restrita a um tipo de reação simples. Isto significa que reações laterais não são esperadas, contanto que uma enzima seja envolvida na biotransformação, num único substrato;
- b) Reação Regioespecífica: na qual a molécula do substrato é normalmente atacada no mesmo lado, ainda que diversos grupos equivalentes ou de reatividade similar estejam presentes;
- c) Reação Estereoespecífica: onde o centro reativo de uma enzima fornece um meio assimétrico, o qual permite distinguir entre os enantiômeros de um substrato racêmico. Portanto, somente um dos enantiômeros é atacado. Por outro lado, se uma reação com enzima produz um novo centro assimétrico, normalmente apenas um dos enantiômeros possíveis é formado e o produto é, entretanto opticamente ativo.
- d) Reações em condições brandas: a energia de ativação de uma reação química é distintivamente mais baixa do que as catálises químicas, devido à interação do substrato com a enzima e assim as biotransformações ocorrem sobre condições brandas (temperatura abaixo de 40°C, pH próximo de neutro e pressão atmosférica normal).

Devido a estas propriedades, a biotransformação proporciona um método para realizar passos de reações, o que quimicamente não ocorreria ou se o for será com muita dificuldade (KIELICH, K. ,1984).

Tanto na Biotransformação como nos Processos Fermentativos, os microrganismos são mantidos para crescer em meio de cultura, antes de ocorrer a própria conversão. O que os difere é que na Biotransformação existe apenas um passo entre o substrato e o produto final, enquanto que no processo fermentativo diversos passos são necessários para chegar-se ao produto final (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991).

Um dos exemplos clássicos para a utilização de microrganismos em biotransformação é a hidroxilação do 11-alfa-progesterona pelo *Rhizopus nigricans* e *R. arrhizus*, representada na Figura 12 (PETERSON et coll., 1952).

FIGURA 12 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991).



1.5 Os Fungos Endofíticos

Os fungos utilizados neste trabalho são endofíticos. Fungos endofíticos ocupam um nicho ecológico e exercem uma grande influência na distribuição, ecologia, fisiologia e bioquímica das plantas. São aqueles fungos que vivem no interior das plantas e habitam, normalmente as partes aéreas, tais como, folhas e caules sem causar qualquer doença para a planta (PIMENTEL, 2001). Alguns destes fungos podem originar compostos orgânicos que atuam como reguladores de crescimento vegetal. Dois fungos foram os que melhores resultados apresentaram. O primeiro *P. citrinum* é pertencente à classe morfológica dos fungos filamentosos chamados de Deuteromicetes, ou Fungos Imperfeitos, uma vez que as características do seu ciclo vital, as etapas de reprodução ainda não estão perfeitamente esclarecidas. Esta classe de microrganismos é abundante na natureza sendo que algumas espécies de *Penicillium* causam a deterioração de alimentos como frutas e pão, e outras são utilizadas na produção de aromas e na maturação de queijos específicos, chamados queijos azuis, tais como Roquefort, Camembert e Brie. A utilização mais importante deste gênero de fungos, entretanto, é na produção de penicilina, a partir de algumas estirpes de *P.* e *P.*, uma vez

que estas produzem ácido penicílico como metabólito secundário. A exemplo de muitas espécies de fungos, uma característica de *P.* é a produção de uma micotoxina como metabólito secundário, denominada citrinina, de coloração amarelo-pálida, cujos efeitos tóxicos ainda não estão perfeitamente conhecidos (KRIEGER, 1995).

O segundo fungo utilizado, o qual chamamos de Filamentoso ainda não foi identificado, mas sabe-se apenas que ele foi isolado das folhas da soja.

2 OBJETIVOS

De acordo com o que foi relatado analisou-se a possibilidade de verificar quais as ações que os fungos endofíticos, escolhidos para este trabalho, poderiam ter sobre o esteviol e alguns de seus derivados.

Os produtos que serão obtidos por métodos químicos, posteriormente sofrerão a ação de fungos para proceder a biotransformação. Espera-se conseguir aprimorar a metodologia de obtenção química do esteviol e seus derivados e que o processo de biotransformação forme produtos que apresentem alguma atividade reguladora vegetal.

Todos os compostos obtidos serão identificados primeiramente por CCD e posteriormente quando estiverem puros serão identificados por métodos espectroscópicos, tais como, ressonância magnética de prótons e de carbono 13 normais, além dos espectros COSY HxH, COSY HxC e DEPT. Utilizou-se também o Infravermelho para identificação das funções orgânicas presentes nos compostos produzidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o presente estudo, foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais:

a) Instrumentação Analítica

Os equipamentos analíticos utilizados foram:

- Espectrômetro no infravermelho BOMEM MB-100 (Departamento de Química, UFPR);
- Espectrômetro de RMN de próton e carbono-13 era da marca Varian, modelo Gemini, operando em 400 MHz, utilizando como solventes e padrão de referência interna clorofórmio e metanol deuterado, na Universidade Federal de Minas Gerais;
- Para medidas de pH foi utilizado um pHmetro EVLAB.

b) Cromatografia

O isolamento dos produtos foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga (CCDC) em Chromatotron. Utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art. 7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 2 mm.

Para cromatografia líquida à vácuo foi empregada sílica Si-60 (Merck, art. 7744), partículas de 5 – 40 μm e sílica Si-60 H (Merck, art. 7736).

Para Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizou-se como adsorvente sílica Si-60 F254 (Merck, art. 5554) com espessura de 0,2 mm. As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução metanólica de ácido sulfúrico (50%) e aquecimento e/ou irradiação no UV, com comprimento de onda 254 e 336 nm.

c) Fungos e Meios de Cultura

Os fungos escolhidos para esta pesquisa foram o *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2* (soja) e *P.citrinum*, fornecidos pela Prof. ^a Dr^a. Nádia Krieger do Departamento de Química desta instituição e outra coleção de fungos, cedidas pela Prof^a Dr^a. Ida Chapaval Pimentel do Departamento de Patologia Básica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os fungos endofíticos foram isolados da soja. Tanto a cepa do Fungo Filamentoso como do *Aspergillus* são provenientes da folha da soja, coletados em campo com 20 e 40 dias, respectivamente. A cepa dos fungos *Colletotrichum* e *Fusarium* foi isolada do caule da soja. O primeiro foi colhido em casa de vegetação com 40 dias de crescimento e o segundo, colhido em campo com 20 dias de crescimento. Cada fungo foi mantido em meio sólido de batata com glicose (Potato Dextrose Agar – PDA) em tubos inclinados na geladeira.

Os experimentos da biotransformação foram realizados em meio líquido com a seguinte composição: 8,0 g/L de corn steep liquor; 10 g/L de D – glucose (+); 2,0 g/L de extrato de levedura. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave vertical PHOENIX por 20 minutos a temperatura de 121°C e pressão de 110 kPa man.

Para os testes preliminares foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido. Frascos de 1000 mL contendo 200 mL de meio foram usados em escala preparativa.

d) Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados eram grau comercial e foram destilados antes do uso. O esteviosídeo foi fornecido pela Steviafarma Industrial S.A., situada em Maringá, Paraná. Os demais reagentes utilizados eram grau Analítico.

4 SÍNTESE QUÍMICA

4.1 Obtenção do Esteviol

O esteviosídeo (FIGURA 7) (7,5g) foi dissolvido em 750 mL de água acrescentou-se 10,5g de periodato de sódio. A mistura foi deixada em repouso por dezesseis horas no escuro. Após este período, adicionou-se hidróxido de potássio (5,0g) (até pH 11) e a mistura foi aquecida sob refluxo por uma hora. Após resfriamento à temperatura ambiente, acidulou-se com ácido acético glacial, até pH 4, adicionou-se bissulfito de sódio 1N (40 mL) e a mistura foi extraída com acetato de etila (3x250 mL). A fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado no evaporador rotatório (OGAWA *et al*, 1980).

O esteviol (FIGURA 8) (2,15g) foi recristalizado com metanol, por três vezes, o qual foi comparado com amostra autêntica de esteviol. Depois o esteviol foi esterificado com diazometano e purificado por recristalização com metanol. Tal produto foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item Objetivos.

4.2 Obtenção do Isoesteviol

O esteviosídeo (AVENT *et al*, 1990) (FIGURA 7) (10 g) foi dissolvido em água (500 mL), ácido clorídrico concentrado (50 mL) foi adicionado e a mistura foi aquecida sob refluxo por uma hora. Após resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi deixada em geladeira por 24 horas. Filtrou-se a mistura à vácuo, e o resíduo foi lavado com água destilada gelada. O produto foi recristalizado, uma vez, com acetona/hexano. O produto foi caracterizado por CCD, utilizando-se o padrão do isoesteviol (FIGURA 9) para a comparação.

4.3 Obtenção do Éster Metílico do Isoesteviol

Misturaram-se (VOGEL, 1989) 0,5g de isoesteviol com 10 mL de cloreto de tionila (SO_2Cl), que foi deixado em repouso à temperatura ambiente, tampado. Após 16 horas foram acrescentados 20 mL de metanol em banho de gelo, vagarosamente, sob agitação. Deixou-se em repouso por trinta minutos, no banho de gelo e o produto precipitado foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada gelada o produto, *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila, (FIGURA 15), foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item objetivos.

4.4 Obtenção do *ent*-16-hidróxbaieran-19-oato de metila

ent-16-cetobaieran-19-oato de metila (1,65g) (VOGEL, 1989) foi dissolvido em etanol (100 mL) boroidreto de sódio (1,71 g) foi adicionado e a mistura foi agitada por 5 horas. Após este período acrescentou-se 50 mL de ácido clorídrico 10%. Quando findou a efervescência, reduziu-se o volume em evaporador rotatório e procedeu-se extração do produto com acetato-de-etila (3x50 mL). O solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O *ent*-16-hidróxbaieran-19-oato de metila obtido (FIGURA 16) foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item objetivos.

4.5 Obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (método com sílica/ $(\text{CuSO}_4)_2$)

Para esta reação foi preparado um catalisador (NISHIGUCHI *et al*,1987) contendo sulfato cúprico pentaidratado e sílica-gel (230-400 mesh – Merck), na proporção de 1:3 e secado por uma hora a 250°C. Pesou-se 0,84g do *ent*-16-hidróxbaieran-19-oato de metila que foi dissolvido em tolueno (25 mL), previamente seco com sódio metálico, e acrescentado o catalisador de sulfato cúprico/sílica (2,3g). A mistura foi refluxada por dez horas. A olefina produzida foi filtrada. A sílica foi lavada com acetona e o solvente teve seu volume reduzido. O produto foi submetido à cromatografia líquida a vácuo, que foi caracterizada por métodos espectroscópicos. O *ent*-baier-15-en-19-oato de metila foi posteriormente isolado por cromatografia em sílica contendo nitrato de prata (FIGURA 17).

4.6 Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga com Nitrato de Prata

Preparou-se um disco do Chromatotron, utilizando-se 45 g de sílica (Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art. 7749)), 2 g de nitrato de prata e 45 mL de água destilada gelada. A mistura obtida no experimento anterior foi aplicada e a eluição foi feita com 99:1 (hexano/acetato de etila). O produto, *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (38,7 mg) (FIGURA 17), foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item objetivos.

4.7 Obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de Metila (método do tosilato)

O álcool (FIGURA 16) (2,0g) foi dissolvido em piridina (14 mL), adicionado cloreto de toсила (1,5g) e a mistura foi deixada em repouso, à temperatura ambiente, por 5 horas. Adicionou-se água, a mistura foi acidificada com ácido clorídrico diluído, extraída com acetato de etila e o solvente foi reduzido em evaporador rotatório. O resíduo (tosilato) foi redissolvido em piridina (14 mL) e a mistura foi aquecida sob refluxo por 75 horas. Ela foi, então, diluída em água (50 mL), acidificada com ácido clorídrico diluído e extraída com acetato de etila. Após a evaporação do solvente o sólido foi recristalizado em metanol, por duas vezes, fornecendo cristais do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila puro (FIGURA 17) (0,85 g).

5 BIOTRANSFORMAÇÕES

5.1 Biotransformação do Esteviol

a) Ensaio em Escala Analítica

Os fungos *P. citrinum*, *Penicillium sp1* e *Penicillium sp2*, provenientes de tubos com meio de PDA inclinado, foram inoculados em seis frascos contendo 50 mL de meio de cultura líquido. Em seguida os frascos foram levados a um agitador –incubador orbital e mantidos a 27°C e 110 rpm por 48 horas, para o desenvolvimento do microrganismo. Após este período, 30 mg de esteviol, previamente dissolvido em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), foram distribuídos em três frascos. Os outros três frascos

foram mantidos como controle, isto é, sem o substrato para poder verificar os metabólitos que o fungo produz sem a ação do substrato orgânico. Após a adição do esteviol, a fermentação foi conduzida por 7 dias. O conteúdo dos frascos foi então filtrado a vácuo e o líquido foi submetido à extração com acetato de etila (3 x 20 mL). O micélio, remanescente no papel filtro, foi lavado com o mesmo solvente e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio anidro. Após a filtração e evaporação, obteve-se o extrato bruto que foi analisado por CCD, utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1), comparando-se com o padrão do esteviol.

b) Biotransformação em Escala Preparativa

O procedimento foi o mesmo do descrito no item a, mas neste caso, utilizou-se apenas o fungo *P. citrinum*. Seis frascos de erlenmeyer de 1000 mL, contendo 200 mL de meio de cultura, com o fungo previamente crescido (48 horas) receberam 1 mL de solução, que foi preparada dissolvendo-se 300 mg de esteviol em 5 mL de DMSO, que foram distribuídos em cinco erlenmeyers. Um outro erlenmeyer, sem o esteviol, foi usado como controle. A fermentação foi conduzida como descrito no item a. A mistura foi então filtrada a vácuo e o líquido foi extraído com acetato de etila (3x 100 mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro evaporou-se o solvente e o resíduo foi derivatizado com diazometano etéreo, para poder-se ter uma maior facilidade na dissolução do produto, facilitando assim os ensaios espectroscópicos.

c) Preparação do Diazometano Etéreo

Para preparar o diazometano etéreo utilizou-se 5g de hidróxido de potássio que foram dissolvidos em 8 mL de água destilada e em 10 mL de etanol. Esta mistura foi colocada no frasco reacional com saída lateral e aquecida a temperatura de 65°C. Um funil de separação contendo solução a 5g de metil-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida (diazald), dissolvido em 50 mL de éter etílico foi acoplado sobre o frasco reacional e a medida que o diazometano se formava era condensado e recolhido num frasco coletor e resfriado (VOGEL, 1989).

c.1) Esterificação com Diazometano

O diazometano foi adicionado, lentamente, ao produto obtido, até a permanência de uma coloração amarelada, observando-se uma efervescência devida à liberação de N₂. A solução permaneceu amarelada, indicando um excesso de diazometano e término da reação. Este excesso de diazometano foi destruído com ácido acético, ficando apenas o éster produzido.

d) Isolamento do Metabólito

O produto obtido da biotransformação, que foi esterificado, foi submetido à cromatografia de camada delgada centrífuga, eluído com uma fase móvel de hexano/acetato de etila (3:2). Desta purificação, isolou-se 18 mg do *ent*-7 α ,13-dihidróxicauer-16-en-19-oato de metila. Tal produto foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item objetivos.

5.2 Biotransformação do *ent*-Baier-15-en-19-oato de Metila.

a) Ensaio em Escala Analítica

Foram utilizados os fungos *P. citrinum*, *Penicillium sp1*, Fungo Filamentoso, *Colletotrichum sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp* e Fungo MC2. Cada fungo, que era mantido em meio PDA em tubos inclinados, foi inoculado em erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura líquido, com dois erlenmeyers para cada fungo. Os frascos foram colocados em um agitador –incubador orbital a 110 rpm e a 27°C por 48 horas, para o desenvolvimento do microrganismo. Após este período, 70 mg do *ent*-Baier-15-en-19-oato de metila previamente dissolvido em acetona (7 mL) foram adicionados aos meios de cultivo. Adicionou-se 1 mL desta solução em sete erlenmeyers e os outros sete foram mantidos como controle, sem o composto e o cultivo foi conduzida por 7 dias.

O conteúdo dos frascos, após o período de fermentação, foi filtrado e extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). O micélio remanescente no papel filtro foi lavado com o mesmo solvente e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de

sódio anidro. Após a filtração e evaporação obteve-se os extratos brutos. Os extratos, do controle e experimento, de cada fungo foram comparados por CCD, utilizando-se o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila produzido como padrão e a fase móvel utilizada foi hexano / acetato de etila (3:1).

b) Biotransformação em Escala Preparativa

O procedimento geral foi o mesmo descrito no item a, mas neste caso, utilizaram-se os fungos *P. citrinum*, *Penicillium sp1* e Fungo Filamentoso, que apresentaram as melhores respostas de biotransformação na escala analítica. Para cada fungo trabalhou-se com seis frascos de erlenmeyer de 1000 mL, com 200 mL de meio de cultura, com os fungos previamente desenvolvidos. 275 mg de *ent*-Baier-15-en-19-oato de metila foram dissolvidos em 5 mL de acetona e 1 mL da solução foi distribuída para cada erlenmeyer, perfazendo um total de cinco frascos com o composto e um sem o composto orgânico, que era o controle. Cada um dos três fungos recebeu a mesma quantidade do baierano. A fermentação foi conduzida nas mesmas condições descritas no item a. A mistura foi então filtrada a vácuo e o filtrado foi extraído com acetato de etila (3x 100 mL), em seguida secos com sulfato de sódio anidro e o solvente teve seu volume reduzido em evaporador rotatório.

6 TESTE DO HIPOCÓTILO

Prepararam-se soluções-estoque na concentração de 1000 µg/mL, em acetona, para todos os compostos orgânicos obtidos das reações químicas e pela biotransformação. As diluições foram feitas em água destilada para atingir as concentrações de 10, 10^{-1} e 10^{-3} µg/ mL.

Sementes de alface (Boston Branca – ISLA S.A, Importadora de Sementes para Lavoura) foram imersas nas soluções por 12 horas, inclusive o controle, que era apenas de água destilada. Foram utilizadas 60 sementes para cada concentração, sendo que 20 sementes foram colocadas em cada placa de Petri, contendo um filtro de papel previamente umedecido com 2 mL de água destilada. Desta forma cada solução tinha três placas de Petri.

As placas foram então deixadas em uma câmara de crescimento vegetal com luz e temperatura controladas por três dias. Ao fim deste tempo os comprimentos do hipocótilo e da raiz de cada semente foram medidos com paquímetro. Os dados obtidos foram tabulados por meio de histogramas.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho consistiu de duas fases: a primeira compreendeu a otimização química da obtenção do esteviol, isoesteviol e seus derivados. Em seguida procedeu-se à biotransformação do esteviol e do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila. Para o primeiro composto, utilizou-se três cepas de *Penicillium* e para o segundo composto utilizou-se cepas de alguns fungos endofíticos. A biotransformação foi realizada em duas etapas, a primeira em escala analítica, para verificar se houve biotransformação e a segunda em escala preparativa, cuja finalidade é a de produzir massa suficiente para a purificação e proceder às análises necessárias de identificação do composto biotransformado.

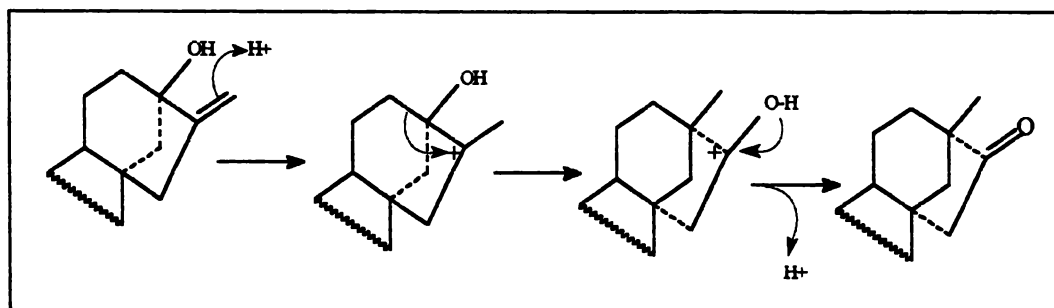
A segunda fase foi relacionada com a verificação de atividade reguladora de crescimento vegetal para os produtos obtidos por métodos químicos clássicos e pelo método da biotransformação. Este teste foi realizado com sementes de alface, medindo o tamanho do hipocótilo da alface. Para este ensaio utilizou-se o éster metílico do esteviol, *ent*-7 α ,13-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila e *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, comparando-se com o ácido giberélico. Trabalhou-se com três soluções de concentrações diferentes para cada um deles.

7.1 Obtenção do Esteviol

Após vários ensaios reacionais por via química com o método do periodato conseguiu-se chegar a um ótimo rendimento do esteviol. Constatou-se que o pH deve ser controlado (pH 11) o que muitas vezes não chega à quantidade da base indicada na referência de OGAWA *et al*, 1980. A ação que o periodato de sódio possui é de degradar as hidroxilas adjacentes de um glicosídeo, formando aldeído e eliminando ácido fórmico. Após o término do refluxo acidulou-se com ácido acético glacial, até pH

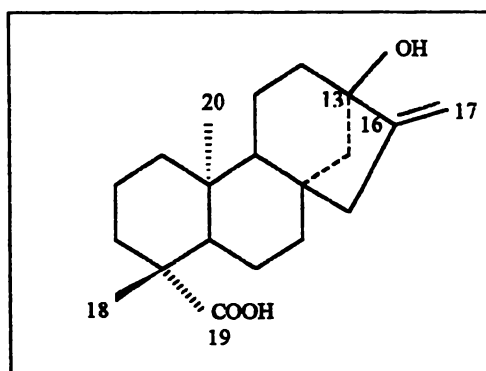
4, para evitar a formação do isoesteviol, obtendo-se apenas o esteviol. Caso o pH seja inferior a 4 o esteviol sofre um rearranjo Wagner-Meerwein (FIGURA 13), resultando na inversão do anéis C e D, originando o isoesteviol (DEWICK, P.M., 1997).

FIGURA 13 - REARRANJO DE WAGNER-MEERWEIN (DEWICK, P.M., 1997).



Posteriormente adicionou-se uma solução 1N (40 mL) de bissulfito de sódio, com a finalidade de retirar o excesso de iodo presente na solução. Após a extração com acetato de etila e redução do seu volume. O esteviol foi recristalizado com metanol por três vezes, obtendo-se um produto puro. Na técnica de Ogawa *et al*, (1980) o rendimento produzido era de aproximadamente 40%. Das 7,5g de esteviosídeo utilizadas obteve-se 2,15g de produto líquido, obtendo-se aproximadamente 72% de rendimento. A caracterização do produto foi feita por comparação com amostra autêntica por CCD. O esteviol formado foi então esterificado com diazometano etéreo (FIGURA 14), purificado por recristalização foi caracterizado por métodos espectroscópicos conforme descrito no item objetivos.

FIGURA 14 – ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL.



O espectro no infravermelho (FIGURA 25) do éster de esteviol apresentou uma banda larga em $3366,13\text{ cm}^{-1}$, característica da deformação axial da ligação (OH) de álcool; entre $2947,07\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a deformação axial da ligação C—H de metila; entre $2990,94$ e $2844,48\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a deformação axial C—H de metileno; em $1725,34\text{ cm}^{-1}$ observa-se a banda característica de deformação axial da ligação C=O do éster e em $1665,14\text{ cm}^{-1}$ a banda de deformação axial da C=C do alqueno.

O espectro de RMN¹H em CDCl₃ (FIGURA 26) mostrou a existência de três grupos metila com singletos em δ 0,83 (3H, *s*, H-20), 1,17 (3H, *s*, H-18) e 3,6 (3H, *s*, OMe) e ressonância do alqueno em 4,9 e 4,82 (cada 1H, *br, s*, H-17) (AVENT, A. G., HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990).

O espectro de RMN de ¹³C, feito em CDCl₃ (FIGURAS 27 e 28) mostrou a existência de 21 átomos de carbono, sendo que 18 sinais de carbono sp³ ligados a hidrogênio nos espectros de RMN de ¹³C-DEPT: três metílicos, dez metilênicos e dois metínicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas indicou a existência de seis sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp² carboxílico [δ_{C19} 178,0] um vinílico [δ_{C16} 156,1], um sp³ oxigenado [δ_{C13} 80,2] e três inseridos num esqueleto carbônico [δ_{C18} 28,7; δ_{C20} 15,3 e δ_{C21} 51,1]. Observou-se também outro vinílico [δ_{C17} 102,9].

Os valores, tanto para o RMN¹³C e o RMN¹H do éster de esteviol, encontram-se na Tabela 3 e os dados foram confirmados através de literatura. (AVENT, A. G., HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990).

TABELA 3 - DADOS DO RMN¹³C DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL.

C	δC_1	δC_2	C	δC_1	δC_2
1	40,60	40,7	12	39,28	39,2
2	18,99	19,1	13	80,05	80,2
3	37,94	38	14	47,38	47,4
4	43,68	43,8	15	46,82	47
5	56,86	56,9	16	155,90	156,1
6	21,77	21,9	17	107,81	102,9
7	41,25	41,3	18	28,59	28,7
8	41,52	41,6	19	177,78	178
9	53,74	53,8	20	15,19	15,3
10	39,14	39,2	OMe	51,00	51,1
11	20,31	20,4			

LEGENDA δC_1 . éster de esteviol de literatura (90,55 MHz, CDCl₃); δC_2 . éster de esteviol deste trabalho (CDCl₃).

Com os dados supra-citados chegou-se a uma excelente otimização do método sugerido por Ogawa et al, 1980, obtendo o esteviol em boa quantidade e com uma facilidade de purificação.

7.2 Obtenção Química do Isoesteviol e seus Derivados

7.2.1 Obtenção do Isoesteviol

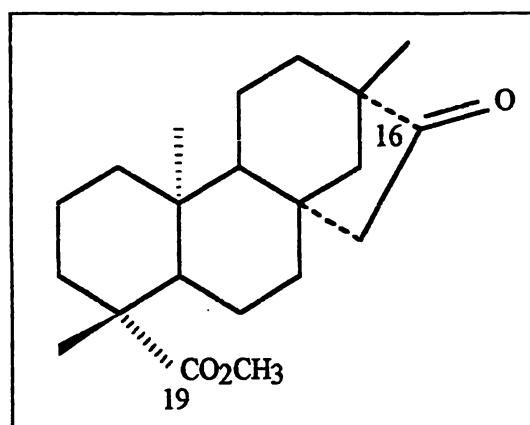
Após vários ensaios reacionais, chegou-se ao aperfeiçoamento da técnica de obtenção do ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico (isoesteviol). Inicialmente, o produto bruto era extraído com acetato de etila e posteriormente purificado por cromatografia em coluna. Posteriormente verificamos que, utilizando uma solução mais concentrada do ácido, era possível obter o produto bruto por precipitação após resfriamento da mistura reacional na geladeira. Após ter sido recristalizado, uma única vez com

acetona/hexano, obteve-se um rendimento líquido de aproximadamente 78,4%. A caracterização do produto foi feita por comparação com amostra autêntica por CCD, onde se observou uma única mancha com o mesmo Rf da amostra original.

7.2.2 Obtenção Química do *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila

Depois de algumas tentativas, obteve-se um rendimento bruto de 99,4%. O *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila (FIGURA 15) foi recristalizado, como descrito no item anterior. Não houve necessidade de purificar o composto por métodos cromatográficos, porque o produto encontrava-se com um alto grau de pureza.

FIGURA 15 - *ent*-16-CETOBAIERAN-19-OATO DE METILA.



O espectro no infravermelho (FIGURA 33) apresenta uma banda aguda em $1743,98\text{ cm}^{-1}$ referente à deformação axial C=O da carbonila do éster; em $1717,32\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se uma banda referente a carbonila cetônica; $2960,31$ e $2902,44\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a bandas deformação axial da metila; 2933 e $2862,56\text{ cm}^{-1}$ observou-se a deformação axial referente ao metileno (SILVERSTEIN, 1994).

No espectro de RMN¹H, feito em CDCl₃ (FIGURA 34) observou-se a existência de quatro grupos metila com singletos em δ 0,68 (3H,*s*, H-20), δ 0,997 (3H, *s*, H-17), δ 1,20 (3H, *s*, H-18) e δ 3,65 (3H,*s*,OMe) (AVENT, A. G., HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990).

No espectro de RMN¹³C, feito em CDCl₃ (FIGURAS 35 e 36) constatou-se a presença de 21 átomos de carbono, sendo que 18 sinais de carbonos sp³ ligados a hidrogênio nos espectros de RMN¹³C-DEPT: quatro metílicos, nove metilênicos e dois metínicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas indicou a existência de seis sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp² carboxílico [δ_{C19} 177,57], um cetônico [δ_{C16} 222,17] e quatro inseridos num esqueleto carbônico [δ_{C17} 19,89; δ_{C18} 28,89; δ_{C20} 13,23 e δ_{C21} 51,16]. Os valores encontram-se na Tabela 4 que foram confirmados através de dados obtidos na literatura (AVENT, A. G., HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990).

TABELA 4 - DADOS DO RMN¹³C PARA O *ent*-16-CETOBAIERAN-19-OATO DE METILA.

C	δ_{C_1}	δ_{C_2}	C	δ_{C_1}	δ_{C_2}
1	39,89	39,89	12	38	38,01
2	18,99	19	13	39,48	39,48
3	37,36	37,37	14	54,4	54,38
4	43,84	43,84	15	48,5	48,52
5	57,15	57,14	16	222,14	222,17
6	21,75	21,74	17	19,87	19,89
7	41,56	41,55	18	28,85	28,89
8	48,7	48,7	19	177,76	177,57
9	54,84	54,81	20	13,21	13,23
10	38	39,49	OMe	51,18	51,16
11	20,37	20,38			

LEGENDA

δ_{C_1} *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila;

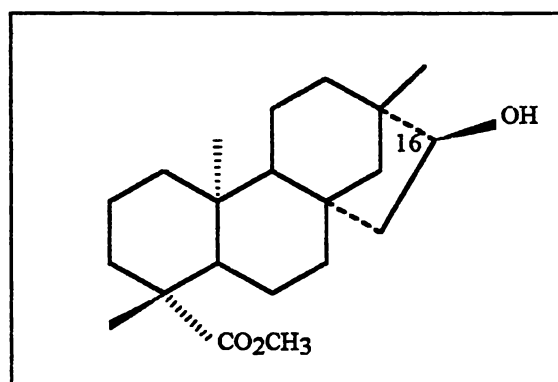
δ_{C_2} *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila.

Com estes dados conclui-se que a obtenção do *ent*-16-cetobaieran-19-oato de metila foi satisfatório, apresentando um alto rendimento e analisando os dados espectroscópicos comprova-se o produto obtido.

7.2.3 Obtenção Química do *ent*-16-hidróxbaieran-19-oato de metila

Esta reação foi repetida por algumas vezes até conseguir chegar-se a um bom rendimento, sem a necessidade de proceder a um processo de purificação, uma vez que esta reação não apresenta subprodutos. O produto bruto (FIGURA 16) foi analisado em CCD, que confirmou o resultado da reação, visto que o R_f da amostra e do padrão foram iguais. Conseguiu-se um rendimento de 93%.

FIGURA 16 - *ent*-16-HIDRÓXIBAIERAN-19-OATO DE METILA.



O espectro no infravermelho do produto (FIGURA 37) apresentou uma banda forte e aguda em $3531,68\text{ cm}^{-1}$ referente à hidroxila “livre”; em $2985,59$ e $2892,77\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a deformação axial da ligação C—H da metila, em $2923,71$ e $2841,21\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a deformação axial de C—H de metileno; em $1708,03\text{ cm}^{-1}$ é a deformação referente a carbonila do éster (SILVERSTEIN, 1994).

No espectro de RMN^1H , feito em CDCl_3 (FIGURA 38) mostrou a existência de quatro grupos metila com singletos em $\delta\ 0,71$ (3H, s, H-20), $\delta\ 0,91$ (3H, s, H-17), $\delta\ 1,16$ (3H, s, H-18) e $\delta\ 3,62$ (3H, s, OMe), $\delta\ 3,84$ (1H, s, H-16 α).

No espectro de RMN¹³C, feito em CDCl₃ (FIGURAS 39 e 40) mostrou a existência de 21 átomos de carbono, sendo que 18 sinais de carbonos sp³ ligados a hidrogênio nos espectros de RMN¹³C-DEPT: quatro metílicos, nove metilênicos e três metínicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas indicou a existência de cinco sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp² carboxílico [δ_{C19} 178,01] e quatro inseridos num esqueleto carbônico [δ_{C13} 42,04; δ_{C18} 28,89; δ_{C10} 38,10 e δ_{C8} 42,12; δ_{C4} 43,84]. Observou-se o aparecimento de um carbono metínico em [δ_{C16} 80,62] referente a redução da cetona. Devido ao aparecimento da hidroxila, o C-16 ficou mais protegido tendo seu deslocamento químico alterado para uma região de menor proteção (frequência baixa). Os valores encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5 - DADOS DO RMN¹³C DO *ent*-16-HIDRÓXIBAIERAN-19-OATO DE METILA.

C	δC	C	δC
1	39,98	12	38,08
2	18,97	13	42,04
3	33,75	14	42,90
4	43,83	15	55,30
5	57,26	16	80,62
6	21,79	17	24,91
7	41,77	18	28,90
8	42,12	19	178,01
9	55,89	20	13,14
10	38,10	OMe	51,13
11	20,5		

Desta forma pode-se concluir que o produto obtido o *ent*-16-hidróxibaieran-19-oato de metila, teve um rendimento satisfatório, com um grau de pureza. Os dados de Infravermelho, RMN ¹H e ¹³C, DEPT e HETCOR, analisados, indicaram o composto.

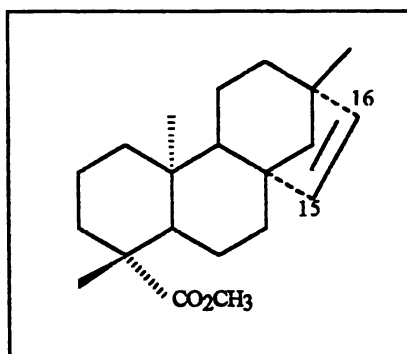
7.2.4 Obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (método com sílica/Cu(SO₄)₂)

Esta técnica foi inicialmente descrita por Nishiguchi (NISHIGUCHI, T. *et al.*, 1987). Ela envolve a preparação de um catalisador feito com sílica gel e sulfato de cúprico. Vários compostos foram reagidos com este catalisador, formando uma olefina, apresentando rendimentos variáveis. O metil-ciclododecano era o composto que mais aproximava-se da nossa estrutura em questão e desta forma realizou-se a reação.

No nosso caso, a técnica produziu um rendimento razoável (63,62%). Foi também observado que o catalisador deve ser recentemente preparado e não é possível reaproveitá-lo. Foi tentada reativação dele por 1 hora a 250° C, sem sucesso.

O produto bruto (FIGURA 17) foi purificado e posteriormente caracterizado por métodos espectroscópicos. Através da cromatografia líquida à vácuo, isolou-se o composto e mostrou aparentemente puro, apresentando apenas uma mancha em CCD.

FIGURA 17 - *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA.



O espectro no infravermelho (FIGURA 41) apresentou uma banda fraca em 3027,4 cm⁻¹ referente à deformação axial da ligação CH do alqueno, em 2924,52 cm⁻¹ encontrou-se a deformação axial da ligação C—H da metila, em 2950,18 e 2867,93 cm⁻¹ encontrou-se a deformação axial de C—H de metileno; em 1724,19 cm⁻¹ encontrou-se a deformação axial da carbonila do éster. (SILVERSTEIN, 1994).

No espectro de RMN¹H, feito em CDCl₃ (FIGURA 42) mostrou a existência de quatro grupos metila com singletos em δ 0,56 (3H, *s*, H-20), δ 1,01 (3H, *s*, H-17), δ 1,18 (3H, *s*, H-18) e δ 3,62 (3H, *s*, OMe). Verificaram-se também os seguintes sinais característicos do produto δ 5,71 (1H, *d*, *J* = 5,6, H-15), δ 5,44 (1H, *d*, *J* = 6, H-16). Outros sinais foram observados indicando a presença de outro produto. Além dos sinais do produto esperado, havia um multiplete em δ 5,58 ppm referente a um próton olefínico. Em δ 1,63 ppm havia um singlete com área de integração 3 vezes maior do que a do multiplete olefínico, indicando tratar-se de um grupo metila. O produto esperado estava, portanto, contaminado com outro de estrutura bastante semelhante.

No espectro de RMN¹³C, feito em CDCl₃ (FIGURAS 43 e 44) confirmou tratar-se de uma mistura. Ele continha quase o dobro do número de sinais esperados para o produto. Os sinais de carbonos sp³ ligados a hidrogênio nos espectros de RMN¹³C-DEPT: quatro metílicos, oito metilênicos e quatro metínicos, além de outros sinais em regiões próximas aos citados anteriormente. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas indicou a existência de cinco sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp² carboxílico [δ_{C19} 178,04] e quatro inseridos num esqueleto carbônico [δ_{C13} 38,26; δ_{C10} 33,2; δ_{C8} 43,93 e δ_{C4} 49,15]. Dos quatro metínico dois são relativos à eliminação de uma molécula de água, dando origem a insaturação entre o C-15 e C-16. Os deslocamentos químicos são [δ_{C15} 134,76] e [δ_{C16} 136,51].

Os outros sinais observados, os mais característicos, eram um sp² carboxílico [δ_{C19} 177,97]; [δ_{C15} 135,79] e [δ_{C16} 140,30] indicando a insaturação entre o C-15 e o C-16. Estes valores são atribuições.

Ao ter sido feita a análise em CLAE, observou-se, realmente, a existência de um outro composto que não o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (FIGURA 48), o que confirmou a duplicidade dos sinais em RMN de próton e carbono 13.

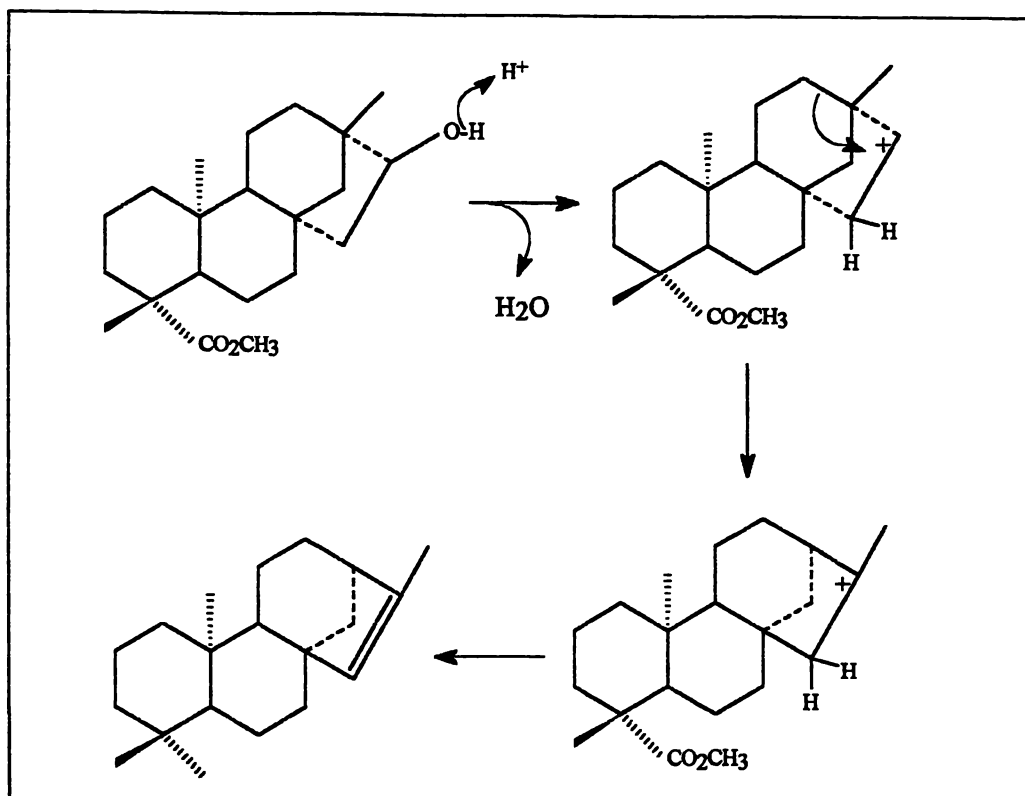
Caso tivéssemos isolado o isômero, poder-se-ia analisá-lo pelos métodos espectroscópicos e desta forma ter condições para poder dar uma melhor definição dos sinais. Os valores encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 - DADOS DO RMN¹³C DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA.

C	δC	C	δC
1	38,22	12	33,20
2	19,32	13	38,26
3	37,75	14	61,1
4	49,15	15	134,76
5	57,15	16	136,51
6	21,66	17	24,86
7	39,63	18	28,96
8	43,93	19	178,04
9	52,32	20	13,63
10	37,67	OMe	51,06
11	20,45		

Percebeu-se que o composto produzido apresentava um isômero. Uma hipótese para a formação do isômero Δ^{15} - do ácido caurenóico (FIGURA 12), seria a que envolve a formação de um carbocátion em C-16 (FIGURA 18). A perda de próton em C-15 levaria ao produto esperado. O carbocátion, entretanto, poderia sofrer um rearranjo (Wagner-Meerwein) dando origem a um novo carbocátion. Este último, por ser terciário, teria grande probabilidade de ser formado. Uma vez formado, ele perderia um próton em C-15 levando ao isômero Δ^{15} - do ácido caurenóico.

FIGURA 18 – FORMAÇÃO DO COMPOSTO SECUNDÁRIO.



É interessante notar a similaridade entre o mecanismo proposto acima e o mecanismo biossintético que dá origem aos vários esqueletos de diterpenóides tetracíclicos (FIGURA 12). Nos dois casos existe o envolvimento de carbocátions, os quais sofrem rearranjos de forma a originar os vários esqueletos. A formação do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila e do éster metílico do isômero Δ^{15} - do ácido caurenóico, portanto, parece ocorrer por um mecanismo biomimético.

Desta forma tornou-se necessário proceder a uma purificação cromatográfica utilizando nitrato de prata à sílica e então tentar separar o baierano do seu isômero.

7.2.5 Purificação com Nitrato de Prata

Para comprovar a obtenção do produto esperado, era importante isolá-lo na forma pura. O uso de sílica gel nestes casos não produz bons resultados, pois a resolução não é suficiente para uma separação. Nestes casos uma técnica de separação importante é a que utiliza sílica gel impregnada com nitrato de prata (AVENT et al, 1990a).

O uso de nitrato de prata em cromatografia se baseia na formação de complexos π de compostos insaturados com os íons Ag^+ . Os compostos que formam complexos relativamente mais estáveis são mais retidos, permitindo assim a separação do compostos. A técnica foi empregada com sucesso no nosso caso.

Utilizamos rotores de sílica gel, impregnado com nitrato de prata, sendo feita no Chromatotron. A eluição foi feita com hexano e foi repetida quatro vezes até conseguir uma massa suficiente para poder fazer as análises espectrométricas.

Nos dados provenientes de RMN^1H , RMN^{13}C , DEPT, COSY e HETCOR, do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, verificou-se uma maior clareza nos sinais, não aparecendo o isômero.

No espectro de RMN^1H mostrou os seguintes sinais característicos (FIGURA 45): quatro grupos metila com singletos em δ 0,56 (3H, *s*, H-20), δ 0,996 (3H, *s*, H-17), δ 1,17 (3H, *s*, H-18) e δ 3,6 (3H, *s*, OMe). Verificaram-se também os seguintes sinais característicos do produto δ 5,71 (1H, *d*, $J = 6$, H-15), δ 5,44 (1H, *d*, $J = 5,6$, H-16).

No espectro de RMN^{13}C (FIGURAS 46 e 47) constatou-se 18 sinais de carbonos sp^3 , onde quatro sinais são metínicos, quatro outros sinais são metílicos e oito sinais são metilênicos. Cinco sinais corresponderam aos carbonos quaternários, onde um era um carbono sp^2 carboxílico [$\delta_{\text{C}19}$ 178,09], quatro estavam inseridos no esqueleto carbônico, a saber [$\delta_{\text{C}13}$ 43,64; $\delta_{\text{C}10}$ 37,72; $\delta_{\text{C}8}$ 49,13 e $\delta_{\text{C}4}$ 43,90]. Com relação aos quatro carbonos metínicos, dois foram formados devido à eliminação de uma molécula de água, originando a insaturação no C-15 e C-16. Nestes dois carbonos observou-se que os valores encontraram-se bem próximos [$\delta_{\text{C}15}$ 134,75; $\delta_{\text{C}16}$ 136,50] (FIGURA 47). Os valores encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 - DADOS DO RMN¹³C DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA, PURO.

C	δC	C	δC
1	38,18	12	33,11
2	19,30	13	43,64
3	37,64	14	61,05
4	43,90	15	134,75
5	57,10	16	136,50
6	21,64	17	24,87
7	39,59	18	28,96
8	49,13	19	178,09
9	52,26	20	13,62
10	37,72	OMe	51,11
11	20,43		

Em face ao problema de formação de um subproduto, procuraram-se outros métodos de redução de álcoois. Uma das técnicas pesquisadas é a descrita abaixo.

7.2.6 Obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (método do tosilato)

Uma das formas de realizar a desidratação de álcoois é a conversão do grupo hidroxila em outro grupo que seja melhor grupo abandonador. O tosilato, por exemplo, é um bom grupo de saída, podendo-se desta forma proceder à reação de eliminação e formação da olefina (GREENE, T.W. & WUTS, P.G.M., 1991). O tempo de reação foi muito alto, levando 75 horas para conseguir desidratar as 1,2g do álcool. Foi necessário proceder a recristalização com metanol por três vezes. Confirmou-se o produto formado por CCD e CCD impregnada com nitrato de prata para ter-se certeza de não ter havido a formação do isômero. Apenas uma mancha apareceu na CCD.

Outras técnicas de desidratação utilizando hexametilfosfórico triamina (MONSON, 1971) ou utilizando-se cloreto de tionila em piridina (HANSON, J.R, *et al*, 1983), foram pesquisadas, mas apenas a técnica que leva cloreto de tionila foi realizada.

Observou-se que o produto, no tempo de 15 minutos, tinha sido desidratado, mas apresentou muito subproduto, pois na CCD constatou-se além do isoesteviol na forma de álcool outros três produtos.

Com o relatado, na parte de síntese do esteviol e seus derivados, conclui-se que as técnicas de obtenção e purificação dos produtos obtidos, foram otimizadas, com exceção da obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila que não apresentou um resultado satisfatório.

7.3 Biotransformações

7.3.1 Biotransformação do Esteviol

a) Escala Analítica

Os fungos foram transferidos do meio sólido para o meio líquido, crescendo previamente no agitador-incubador e depois de desenvolvidos os fungos foram transferidos para os erlenmeyers onde a biotransformação seria realizada.

Após a obtenção dos extratos dos experimentos e controles eles foram comparados por CCD. Para os fungos *Penicillium sp1* e *Penicillium sp2*, os cromatogramas do experimento e do controle eram indistinguíveis, mostrando não ter havido transformação. Com o *P. citrinum*, entretanto, o resultado foi positivo. O cromatograma com o experimento deste fungo mostrou duas manchas não presentes no controle. Elas apresentaram Razão de Frente (Rf) menor do que o do esteviol, indicando trataram-se de compostos mais polares. Desta forma, o experimento foi repetido em escala preparativa para isolamento e identificação dos produtos formados.

b) Escala Preparativa

Do fungo que apresentou resultado positivo nos testes preliminares foi realizado o experimento em escala preparativa para o *P. citrinum*. Dos dois produtos formados, apenas um foi obtido em quantidade suficiente para caracterização (18 mg). Este

composto foi esterificado com diazometano e caracterizado por métodos espectroscópicos.

O espectro no infravermelho (FIGURA 29) apresentou uma banda larga em $3432,17\text{ cm}^{-1}$ característica da deformação axial da ligação OH do álcool; entre $2987,26$ e $2874,23\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se a deformação axial da ligação C—H; em $1709,61\text{ cm}^{-1}$ notou-se uma banda referente a C=O do éster; em $1152,49\text{ cm}^{-1}$ tem-se uma banda de deformação axial de C—O secundário; entre $1444,56$ e $1331,29\text{ cm}^{-1}$ encontrou-se uma deformação angular do O—H para álcoois secundários, este fato é devido a que a deformação angular do plano (O—H) e a fora do plano (C—H), produz duas bandas. (SILVERSTEIN, 1994).

O espectro de RMN¹H, feito em MeOD (FIGURA 30) mostrou a existência de três grupos metila com singletos em δ 0,85 (3H, *s*, H-20), δ 1,15 (3H, *s*, H-18) e δ 3,6 (3H, *s*, OMe) e ressonância do alqueno em δ 4,9 e δ 4,8 (cada 1H, *br s*, H-17). Observou-se outro singlete relativo ao hidrogênio ligado ao C-7 δ 3,5. A multiplicidade da ressonância do H-7 (δ 3,5, *t*, $J = 2,4\text{ Hz}$), indicou que o grupo hidroxila possui uma configuração axial (HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990).

O espectro de RMN¹³C, feito em MeOD (FIGURAS 31 e 32) mostrou a existência de 21 átomos de carbono, sendo que 18 sinais de carbonos sp^3 ligados a hidrogênio. Os espectros no RMN¹³C-DEPT: três metílicos, nove metilênicos e três metínicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas indicou a existência de seis sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp^2 carboxílico [$\delta_{\text{C}19}$ 179,9], um vinílico [$\delta_{\text{C}16}$ 156,7], um sp^3 oxigenado [$\delta_{\text{C}13}$ 80,3] e três inseridos num esqueleto carbônico [$\delta_{\text{C}18}$ 28,9; $\delta_{\text{C}20}$ 15,9 e $\delta_{\text{C}21}$ 51,7]. Observou-se outro sinal de carbono vinílico em [$\delta_{\text{C}17}$ 103,5]. Outro carbono oxigenado em sp^3 com [$\delta_{\text{C}7}$ 77,5], indicou a hidroxilação ocorrida, visto que este carbono apresentou-se mais desprotegido (campo baixo) do em sua forma original. A ressonância em C-6 e C-8 apresentaram, também, uma desproteção de δ 21,77 para δ 30,3 e de δ 41,52 para δ 44,5, respectivamente. As ressonâncias de C-5 e C-9 deslocaram-se para uma região de proteção (campo alto), de δ 56,86 para δ 49,6 e de δ 53,74 para δ 48,3, respectivamente.

Os valores do *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila encontram-se na Tabela 8 e foram comparados com os dados de literatura (HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990). A diferença existente entre alguns sinais, variando de 1,00 a quase 3,00 ppm é relativa a diferença de frequência entre as análises e o tipo de solvente deuterado utilizado. Os dados da literatura foram obtidos num equipamento de 90,55 MHz, com clorofórmio deuterado e os resultados deste trabalho foram obtidos em metanol deuterado. Conclui-se que se conseguiu obter o *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila (FIGURA 19), através da biotransformação do éster de esteviol com o fungo *P. citrinum*. Os dados de RMN, encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8 - DADOS DO RMN¹³C DO *ent-7 α ,13*-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA DA LITERATURA E DESTE TRABALHO.

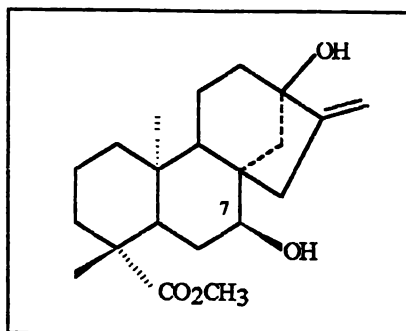
C	δC_1	δC_2	C	δC_1	δC_2
1	40,20	41,6	12	39,56	41,1
2	18,91	20,2	13	79,65	80,3
3	37,71	39,1	14	45,21	45,2
4	43,23	44,5	15	43,63	46,5
5	47,65	49,5	16	156,00	156,7
6	28,96	30,3	17	103,06	103,5
7	76,19	77,5	18	28,23	28,9
8	45,37	44,5	19	178,07	179,9
9	46,99	48,3	20	15,01	15,9
10	38,73	40,1	OMe	51,07	51,7
11	19,82	21,0			

LEGENDA

δC_1 *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila de literatura (CDCl₃);

δC_2 *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila, deste trabalho (MEOD).

FIGURA 19 - *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA.



O *ent*-7 α ,13-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila já foi obtido de outra biotransformação, onde foram utilizados os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Gibberella fujikuroi* (HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990). É interessante observar que as três espécies de fungos produziram a mesma enzima (hidroxilase) que possui a capacidade de hidroxilar o esteviol no anel B e na posição C-7.

Outro dado interessante a ser analisado é que na biossíntese das giberelinas, (FIGURA 12) o ácido caurenóico sofre hidroxilação semelhante produzindo o ácido *ent*-7-hidróxi-19-caurenóico, um intermediário obrigatório na biossíntese daqueles compostos. Portanto, a 7- α -hidroxilase presente nas plantas parece estar presente também em alguns fungos. Considerando que muitos dos fungos capazes de hidroxilar diterpenóides tetracíclicos estão presentes em plantas (endofíticos ou fitopatógenos), é razoável supor que tal relação fungo-planta pode, ao longo da história evolutiva, ter permitido a troca genética levando as duas classes de organismos a possuírem a capacidade de produzirem enzimas semelhantes. (HANSON e OLIVEIRA, 1990).

Dois exemplos reforçam a hipótese acima. O primeiro é o da capacidade de fungos do gênero *Fusarium* (ou *Gibberella*) de produzirem giberelinas, que são metabólitos secundários de plantas. Esses fungos são utilizados para a produção industrial de giberelinas. Outro exemplo é o da descoberta de fungos isolados de *Taxus* e capazes de produzir Taxol (DEWICK, P.M, 1997).

A finalidade desta biotransformação foi a de verificar a ação do fungo *P. citrinum* sobre um diterpenóide tetracíclico.

7.3.2 Biotransformação do *ent*-Baier-15-en-19-oato de Metila.

a) Ensaio Escala Analítica

Primeiramente a biotransformação do *ent*-Baier-15-en-19-oato de metila foi feita dissolvendo-o em DMSO, mas constatou-se que o composto orgânico em questão não tinha sido solubilizado. Desta forma repetiu-se o ensaio utilizando-se acetona à quente para solubilizar o composto em questão. Após o período de fermentação ter findado, observou-se que os fungos apresentavam colorações distintas, a saber:

Para o fungo Filamentoso o controle tinha uma tonalidade límpida e o experimento apresentou uma turvação; *Colletotrichum sp* no controle teve uma tonalidade salmão escuro e o experimento salmão claro; *P. citrinum* o controle apresentou uma coloração amarela intensa e o experimento um amarelo esbranquiçado; *Penicillium sp1* apresentou a mesma tonalidade do *P. citrinum*; *Aspergillus* o controle teve coloração amarelo escuro e o experimento amarelo claro; *Fusarium* tanto o controle como o experimento apresentando uma coloração verde escura e o MC2 o controle e o experimento apresentaram coloração vinho. Os extratos obtidos nos experimentos foram comparados por CCD e verificou-se que para os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Colletotrichum sp* e MC2, não havia distinção entre controle e experimento, indicando não ter havido biotransformação.

Para o *P. citrinum*, *Penicillium sp1* e Fungo Filamentoso, entretanto os resultados foram positivos. Em relação ao *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, os cromatogramas, dos experimentos, apresentaram um metabólito formado de Razão de Frente (Rf) inferior ao baierano indicando serem compostos menos apolares.

b) Ensaio Escala Preparativa

Dos fungos que apresentaram resultado positivo, no ensaio em escala analítica, realizou-se o experimento em escala preparativa para o *P. citrinum*, *P.sp1* e Fungo Filamentoso.

Para o *P. citrinum*, 275 mg do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, foram inoculados, 126,5 mg do produto não reagiram e 148,5 mg foram purificadas por CCDC, restando 78,2 mg que novamente foi purificada e o produto isolado rendeu 1,9 mg.

No *Penicillium sp1*, 275 mg do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, foram inoculadas, mas 260,2 mg não reagiram e apenas, 125,6 mg foram biotransformados. Esta massa foi purificada por CCDC, sendo utilizada como fase móvel 80:20 (hexano/acetato de etila). Uma massa de 17,2 mg apresentou o composto, mas impuro, que foi novamente purificado pelo mesmo método de CCDC, isolando-se 1,3 mg.

O Fungo Filamentoso também recebeu 275 mg do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila e após a biotransformação houve um rendimento de 349,3 mg. Este produto foi purificado por CCDC, com uma fase móvel de 85:15 (hexano/acetato de etila), isolando-se 6,2 mg que foi purificado novamente, por CCDC, com uma fase móvel de 100% de dicloro metano, rendendo 1,5 mg do metabólito isolado.

Para os três fungos o ensaio da biotransformação não apresentou um bom rendimento e os produtos isolados não apresentaram massa suficiente para poder se proceder às análises espectrométricas.

Devido ao fato de o baierano (*ent*-baier-15-en-19-oato de metila) ter apresentado uma isomerização na reação com sulfato cúprico e sílica, procedeu-se à uma purificação com nitrato de prata em CCDC e achou-se necessário repetir o ensaio em escala analítica da biotransformação para ter-se certeza de que o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila teria sido biotransformado e não o seu isômero. Desta repetição deduziu-se que o microrganismo produziu os mesmos metabólitos e desta forma o isômero produzido, não interferiu no processo de transformação biológica. Esta verificação foi feita por CCD, com fase móvel de 85:15 (hexano/acetato de etila).

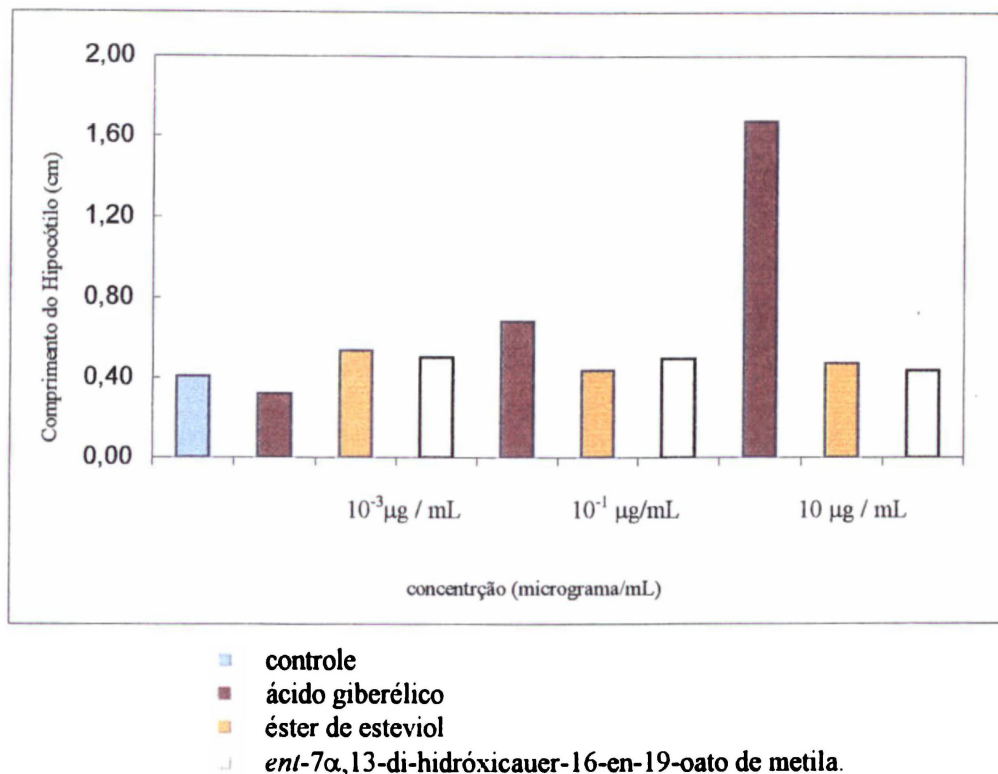
7.4 Teste do Hipocótilo.

O teste do hipocótilo é um dos bioensaios utilizados para testar atividade reguladora de crescimento vegetal. Neste trabalho testamos duas substâncias de esqueleto caurano, o *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila, obtido da biotransformação com o *P. citrinum* e o éster de esteviol e uma com o esqueleto baierano, o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila.

O ensaio se baseia na comparação do comprimento do hipocótilo de alface, parte da planta que fica entre as folhas e a raiz da planta, germinadas em água destilada (controle), e nas soluções de ácido giberélico (testemunha) e das substâncias em teste. Este teste foi realizado com 60 sementes, dispostas em três Placas de Petri, onde cada placa recebeu 20 sementes, e depois foram colocadas em uma câmara de crescimento vegetal com temperatura, umidade e iluminação controladas (VILLALOBOS *et al*, 1994). Após três dias de germinação os comprimentos dos hipocótilos e das raízes foram medidos com paquímetro. Observou-se também o desenvolvimento de raízes laterais. A resposta ao ácido giberélico foi dose-dependente como esperado, ou seja, aumentando a concentração do referido ácido ocasiona aumento proporcional no comprimento do hipocótilo.

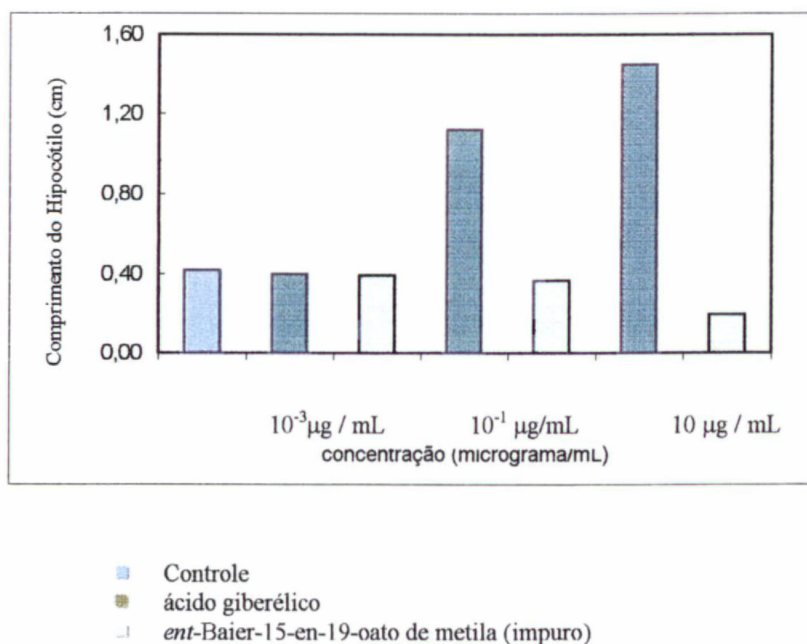
Para o éster metílico do esteviol (FIGURA 14) constatou-se que, na solução mais diluída, apresentou um resultado melhor que o do ácido giberélico, na mesma concentração (10^{-3} $\mu\text{g/mL}$). Para as demais concentrações, a atividade biológica foi inferior ao ácido giberélico. É interessante comentar que o artigo (VILLALOBOS *et al*, 1994), comenta que ao ser esterificado, o ácido carboxílico presente em C-19, ocorre um aumento da atividade. Para o composto *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila, que é um precursor na formação do ácido giberélico, não apresentou um resultado satisfatório, como é observado na FIGURA 20. O que se pode comentar de interessante é que este produto apresentou uma atividade semelhante ao éster de esteviol nas concentrações de 10^{-3} $\mu\text{g/mL}$ e 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$.

FIGURA 20 – EFEITO COMPARATIVO DO ÉSTER DE ESTEVIOL, *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA E DO ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO.



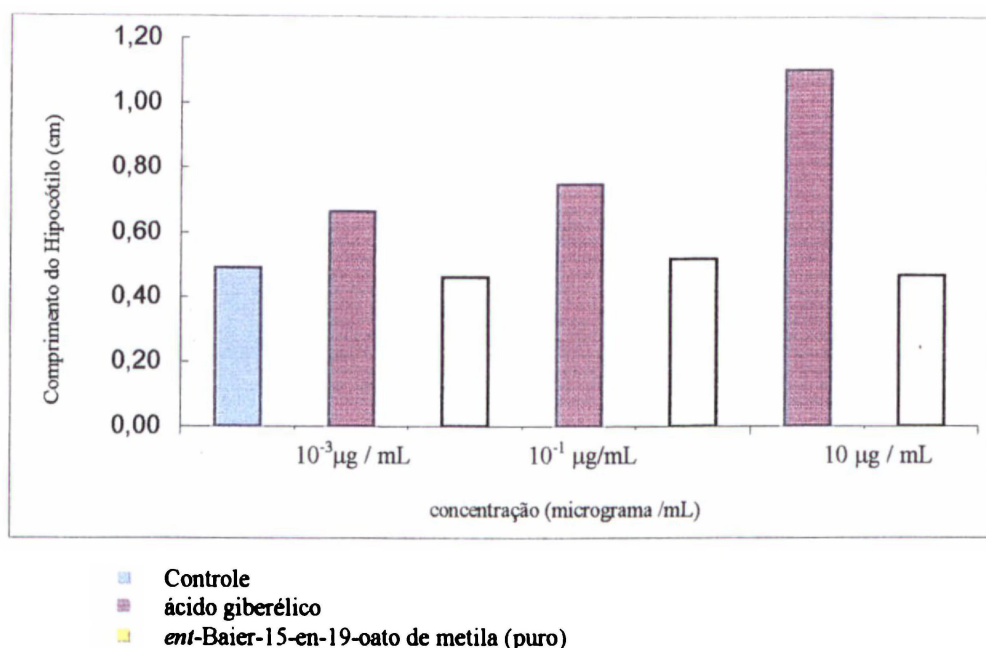
O bioensaio realizado com o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila impuro (FIGURA 17) com o ácido giberélico, não apresentou atividade como descrito em Villalobos (VILLALOBOS *et al*, 1994). Nas três concentrações utilizadas os comprimentos dos hipocótilos foram inferiores ao do controle. Considerando que o primeiro produto obtido não estava suficientemente puro, tal fato pode ter interferido no crescimento do hipocótilo.

FIGURA 21 - EFEITO COMPARATIVO PARA O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (IMPURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO.



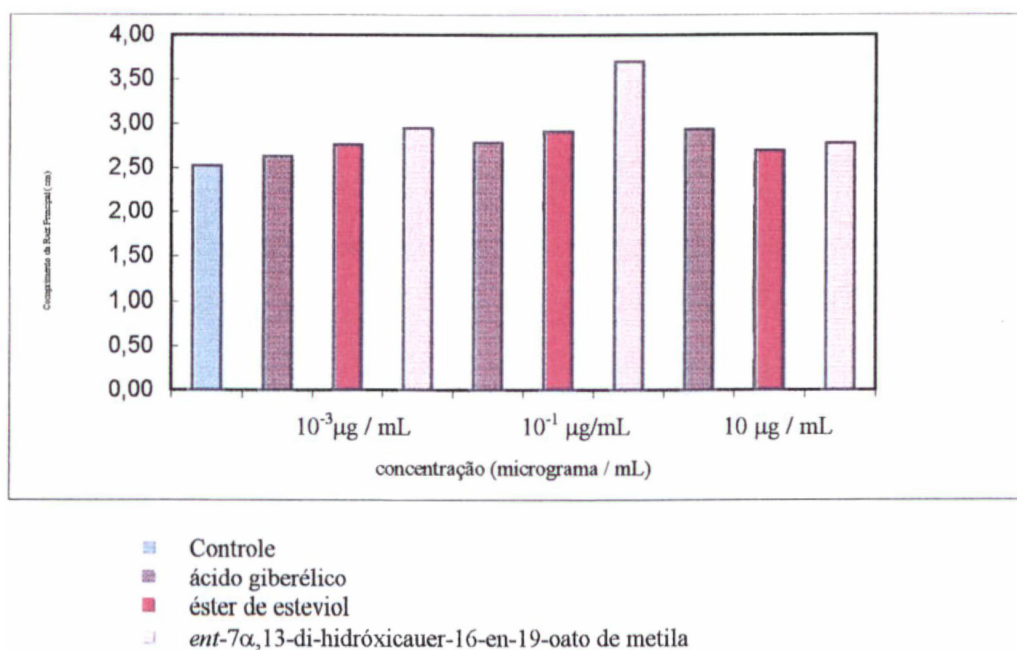
Após a obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila puro (FIGURA 17) outro bioensaio foi realizado, utilizando-se o ácido giberélico como testemunha. Observou-se uma melhor resposta no aumento do comprimento do hipocótilo, mas não foi comparável à atividade do ácido giberélico, como esperado. Conforme Villalobos (1999) o referido éster apresentou uma eficiência maior que o ácido giberélico, o que não aconteceu neste trabalho.

FIGURA 22 - EFEITO COMPARATIVO PARA O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO.



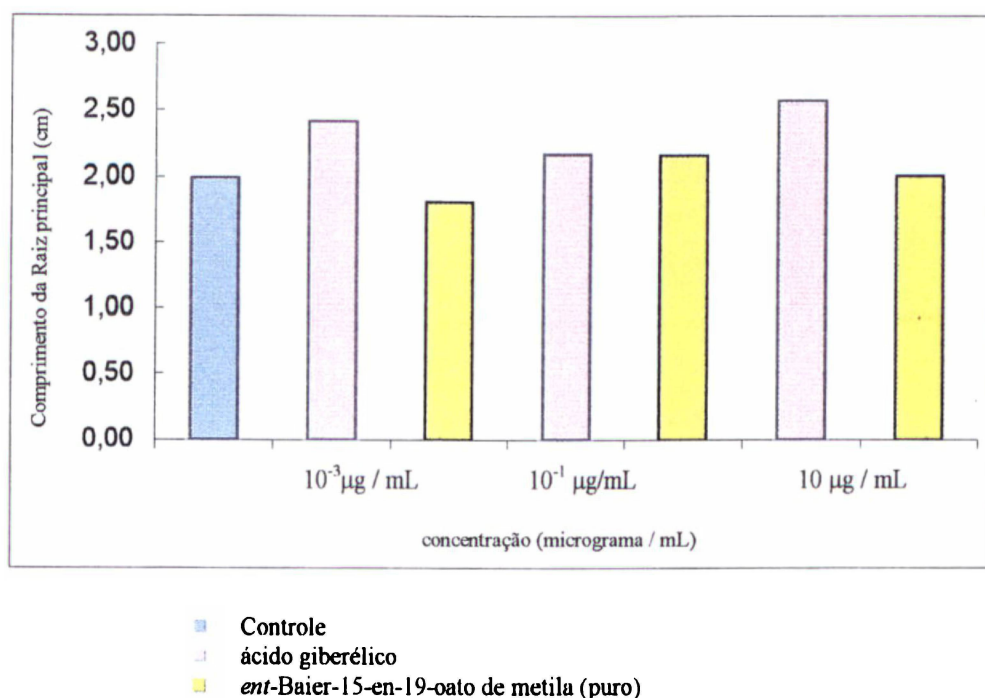
Um fato interessante observado foi o enraizamento das sementes de alface. Na concentração de $10^{-1} \mu\text{g/mL}$, tanto para o *ent*-7 α ,13-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila como para o éster de esteviol, apresentou um desenvolvimento um pouco maior do que com o ácido giberélico (FIGURA 23). Observou-se também a formação de muitas raízes laterais, e quanto maior sua quantidade, melhor as chances de desenvolvimento da planta, além de aumentar a ancoragem, absorção de água e nutrientes da planta.

FIGURA 23 - EFEITO COMPARATIVO DO ÉSTER DE ESTEVIOL, *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXICAUER-16-EN-19-OATO DE METILA E DO ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DA RAIZ PRINCIPAL DA PLANTA DE ALFACE.



O *ent*-baier-15-en-19-oato de metila (FIGURA 19) apresentou, na concentração de 10⁻¹ µg/mL, um desenvolvimento de raiz bem próximo ao ácido giberélico, na mesma concentração. Para as demais concentrações, o desenvolvimento da raiz principal não foi muito significativo. Para a concentração de 10⁻¹ µg/mL, o composto em análise, apresentou uma maior quantidade de raízes adventícias do que o ácido giberélico.

FIGURA 24 - EFEITO COMPARATIVO PARA O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO) E ÁCIDO GIBERÉLICO, SOBRE O ALONGAMENTO DA RAIZ PRINCIPAL DA PLANTA DE ALFACE.



Estes ensaios de hipocótilo realizados foram comparados com o artigo de Villalobos (1994), donde ao serem analisados não mostraram o efeito descrito no referido artigo sobre o desenvolvimento do hipocótilo. O que talvez possa explicar este motivo é que o *ent*-Baier-15-en-19-oato de metila foi obtido de uma planta da espécie *Elaeoselinum*, ou seja, um produto natural e o deste trabalho foi obtido sinteticamente.

5 CONCLUSÕES

Com relação ao aperfeiçoamento da metodologia de Ogawa (1980) na obtenção do esteviol, isoesteviol e seus derivados foram considerados satisfatórios, dando condições para poder ser testada em escala piloto, excetuando-se o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, que necessitou de alteração na técnica, devido ao problema de formação de um isômero. Desta forma, a reação de obtenção deste produto necessita ser reavaliada para tentar chegar à uma metodologia que apresente facilidade de reação, melhor rendimento e pureza do produto formado.

O produto obtido pela biotransformação do Esteviol, caracterizado por métodos espectroscópicos, forneceu o *ent*-7 α ,13-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila. Este composto foi obtido também através de biotransformação do esteviol pelos fungos *Rhizopus stolinifer* e *Gibberella fujikuroi* (HANSON, J.R. & OLIVEIRA, B.H., 1990). Mas, por outro lado, o fungo *P. citrinum*, respondeu de modo igual aos fungos supra citados e hidroxilou o Anel B na posição 7. Com isto conclui-se que os três fungos possuem a mesma enzima (hidroxilase) que apresenta a capacidade de adicionar uma hidroxila no C-7, em alfa.

Em literatura, é relatada a necessidade de proceder a esterificação do C-19 para evitar a contração do anel B e orientar a formação de um metabólito oxigenado na posição 7-, 11- e 15-. Tal situação não ocorreu visto que o *ent*-7 α ,13-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila foi esterificado após a biotransformação não acontecendo a contração do anel B. Notou-se que mesmo com a entrada do grupo hidroxila, a configuração permaneceu inalterada (HANSON, J.R., 1992).

A biotransformação do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila não apresentou massa suficiente para proceder às análises espectrométricas, apesar de em CCD ter sido observada a formação de um metabólito. Dos três fungos escolhidos, para a Escala Preparativa, o que melhor resposta apresentou foi o Fungo Filamentoso, que não possui dados morfológicos, até o momento, sendo que o mesmo foi enviado para um órgão competente com o intuito de proceder a sua identificação.

O Teste do Hipocótilo tanto para o *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila, como para o éster metílico do esteviol não apresentou boa atividade de crescimento vegetal em relação ao ácido giberélico, apesar dos caurenos possuírem a atividade de desenvolver os mutantes de milho anão (PHINNEY, B.O. & KATSUMI, M., 1964; VILLALOBOS *et al*, 1994). O éster de esteviol teve resposta aceitável nas concentrações de 10^{-3} μ g/mL, em relação ao ácido giberélico, o que não aconteceu nas demais concentrações. O *ent-7 α ,13*-di-hidróxicauer-16-en-19-oato de metila apresentou uma fraca atividade na concentração de 10^{-3} μ g/mL, em relação ao ácido giberélico e nas demais concentrações, os resultados foram inferiores ao ácido. Conclui-se que o produto biotransformado não apresentou resposta semelhante à de Villalobos (1994), com relação à atividade reguladora de crescimento vegetal. Mas, esse produto poderá ser convertido a ácido giberélico uma vez que, o mesmo é produzido nas plantas superiores, para dar origem ao referido ácido.

Para o *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, após o período de três dias na câmara de crescimento vegetal, também não se chegou aos resultados descritos no artigo de Villalobos (VILLALOBOS *et all*, 1994). O ensaio com as sementes de alface foi realizado duas vezes. No primeiro, o baierano encontrava-se impuro e, no segundo com alto grau de pureza. Apesar de no segundo ensaio o resultado ter sido melhor que no primeiro, o resultado esperado não foi obtido, porque se desejava que o baierano apresentasse uma atividade um pouco superior ao ácido giberélico. Os fatores que podem ter interferido neste resultado, podem estar relacionados com o preparo das soluções, erro nas medições feita com o uso de paquímetro, exposição à luz, uma vez que as placas são dispostas de modo aleatório e acondicionadas em sacos plásticos umas sobre as outras e vedados, falta de umidade nas placas de Petri, sendo que estas não foram tocadas durante o período de crescimento das sementes. Uma outra hipótese da falha do referido teste é que na referência de Villalobos os produtos eram naturais e o nosso produzido sinteticamente, apesar de a matéria-prima ser de origem natural.

Como perspectivas futuras, será necessário pesquisar novas metodologias ou aprimorar as técnicas trabalhadas para poder melhorar a obtenção do *ent*-baier-15-en-19-oato de metila, e desta forma proceder a outros ensaios de biotransformação e também de pesquisar a existência de alguma atividade reguladora do crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVENT, A. G., HANSON, J.R, OLIVEIRA, B.H. – *Phytochemistry*, vol. 29, nº 8, pp.2712-2715, 1990a.
- AVENT, A. G., HANSON, J. R., HITCHCOCK, P. B. & OLIVEIRA, B. H. de, *Journal Chemical Society Perkin Trans. I*, 2661, 1990b.
- BRIDEL, M. et LAVIEILLE, R. – Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana*) Bertoni, *Bulletin Societé chimique biologique*, vol. 13; 1931c.
- BU'LOCK, J & KRISTIANSEN, B. – *Bioteconología Básica*, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, Espanha, 1991.
- CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. V. 1.
- COSTA, Aloísio Fernandes – *Farmacognosia*, vol. 1. 4ª ed. fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 1989
- DEWICK, P.M. – *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. New York: John Wiley & Sons, 1997.
- FABER, K. – *Biotransformations in Organic chemistry* – A Textbook, 3rd ed. Ed.Springer, 1997.
- FELIPPE, G.M. – *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão, *Ciência e Cultura*, vol. 29, nº 11, pp. 1241-1248, 1977.
- GEISSMAN, T.A. & CROUT, D.H.- *Organic Chemistry of Secondary Metabolism*, Freeman, Cooper & Company, 1969.
- GHISALBERTI, E.L. – The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes, *Fitoterapia*, vol. LXVIII, nº4, pp. 303-325, 1997.
- GIANFAGNA, T.; ZEEVAART, J.A.D.; LUSK, W.J. – Synthesis of [²H] Gibberellins from steviol using the fungus *Gibberella fujikuroi*, *Phytochemistry*, vol. 22, nº. 2, pp. 427-430, 1983.
- GREENE, T.W.; WUTS, P.G.M. – *Protective groups in organic synthesis*, 2nd ed., Jonh Wiley & Sons, Inc, New York, 1991.
- HANSON, J.R.; PARRY, K.P.; TRIANA, J & WILLIS, C.L. – The inhibition of Gibberellin plant hormone biosynthesis by ent-7-norgibberella-5,16-dienes, *Phytochemistry*, vol. 22, nº. 1, pp. 99 - 101, 1983.

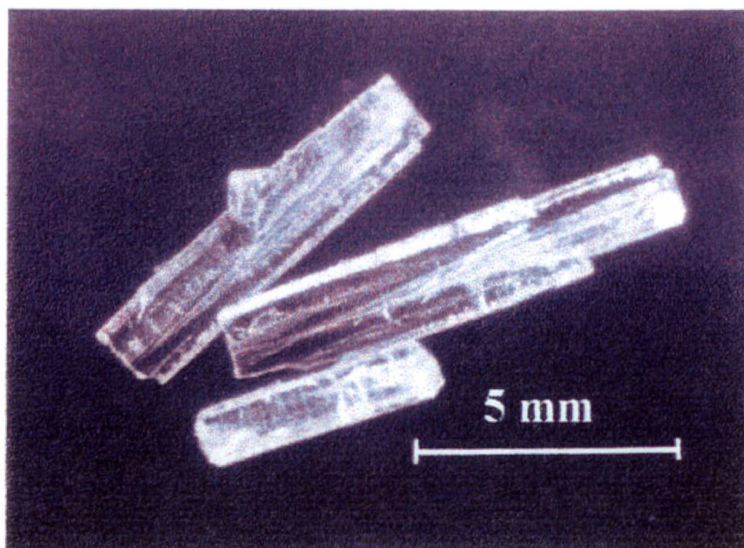
- HANSON, J.R.; OLIVEIRA, B.H. The Microbiological Transformation of Steviol derivatives by *Rhizopus stolonifer* and *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, Great Britain, v. 29, n. 12, p. 3805-3807, 1990.
- HANSON, J.R. – The Microbiological Transformation of Diterpenoids, *Natural Product Reports*, pp. 139-151, 1992.
- HANSON, J.R.; OLIVEIRA, B.H. – Stevioside and Related Sweet Diterpenoid Glycosides. *Natural Products Reports*, p. 301-309, 1993.
- JOLY, A. B. – *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 6ª.ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1983.
- JORGE, L.I.F.; PEREIRA, U. & SILVA, A. M. – *Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal*. Ver. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 47-51, 1991.
- KELLY, D.R. – *Biotechnology - Biotransformations I*, vol. 8a., Wiley – VCH, 2000.
- KENDE, H & ZEEVAART, J.A.D. – The Five “ Classical” Plant Hormones. *The Plant Cell*, vol 9, 1197-1210, 1997.
- KIESLICH, K. – *Biotechnology – Biotransformation*, vol. 6ª., Verlag chemie, 1984.
- KRIEGER, N. - *Produção, purificação e caracterização de Lipases de Penicillium citrinum*. Curitiba, 1995 Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná.
- LEOPOLD, A. C. & KRIEDEMANN, P.E. – *Plant Growth and Development*, 2ª edition. McGraw-Hill, 1975.
- MALIK, V.S. – Biotechnology – The Golden Age, *Advances in Applied Microbiology*, vol. 34ª. Ed. Academic Press, 1989.
- NISHIGUCHI, T.; NAKAHIRA, M.; YAMAMOTO, E. – Dehydration of alcohols catalyzed by copper (II) sulfate adsorbed on silica gel, *Tetrahedron Letters*, vol. 28, nº39, pp. 4565-4568, 1987.
- OGAWA, T.; NOZAKI, M.; MATSUI, M. – Total Synthesis of Stevioside, *Tetrahedron*, vol.36, pp. 2641-2648, 1980.
- KATSUMI, M & PHINNEY, B.O. – Growth response of the d-5 an-1 mutants of maize to some kaurene derivatives, *Science*, 849, 1964.
- PIMENTEL, I.C. – *Fungos Endofíticos do milho (Zea mays L.) e da soja (Glycine Max(L.)Merril) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas*

- agrícolas*. Curitiba, 2001.154f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- POMARET, M. et LAVIEILLE, R. – Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana*) Bertoni – IV Quelques propriétés physiologiques du Stévioside, *Bulletin Société chimique biologique*, vol. 13; 1931.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. – *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5ª ed. Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, 1994.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al – *Farmacognosia: da planta ao Medicamento*, 1ª.ed. Editora da Universidade UFRGS e da UFSC, 1999.
- SOCCOL, C.R. – *Physiologie et métabolisme de Rhizopus en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique*, These présentée à l'Université de Technologie de Compiègne, 1992.
- VILLALOBOS, N.; MARTÍN, L.; MACÍAS,M.J.; MANCHEÑO,B. E GRANDE,M. – Gibberellin-like activity of some Tetracyclic Diterpenoids from *Elaeoselinum* species and their Derivatives, *Phytochemistry*, vol.37, nº 3, pp. 635-639, 1994.
- VOGEL, A. – *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5ªed. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1989.

ANEXOS

ANEXO 01 – FOTO DOS CRISTAIS DO ESTEVIOL.....	59
ANEXO 02 – FOTO DOS CRISTAIS DO ISOESTEVIOL.....	59
ANEXO 03 – FOTO DOS CRISTAIS DO <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA.....	60
ANEXO 04 – <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	60
ANEXO 05 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/ mL.....	61
ANEXO 06 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 ⁻¹ µg/ mL.....	61
ANEXO 07 - ENSAIO DO HIPOCÓTILO; <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 ⁻³ µg/ mL.....	62
ANEXO 08 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E <i>ent</i> -7α,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/ mL.....	62
ANEXO 09 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E <i>ent</i> -7α,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/ mL.....	63
ANEXO 10 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E <i>ent</i> -7α,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/ mL.....	63
ANEXO 11 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; COM O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 ⁻³ µg/ mL.....	64
ANEXO 12 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; COM O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 ⁻¹ µg/ mL.....	64
ANEXO 13 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; COM O <i>ent</i> -BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO; CONCENTRAÇÃO DE 10µg/ mL.....	65

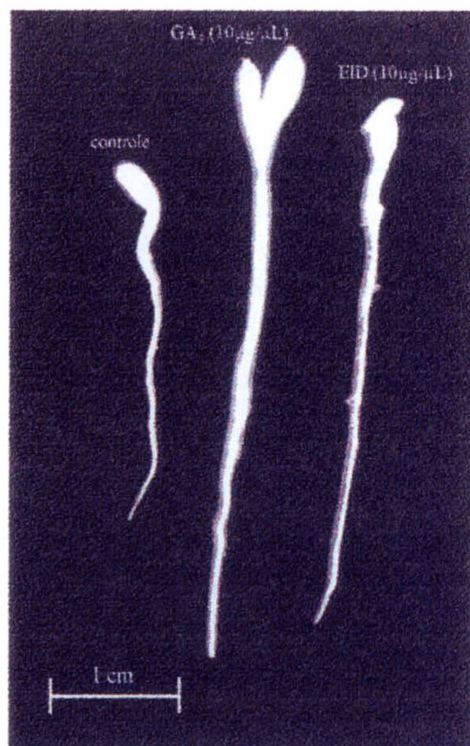
ANEXO 03 – FOTO DOS CRISTAIS DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA



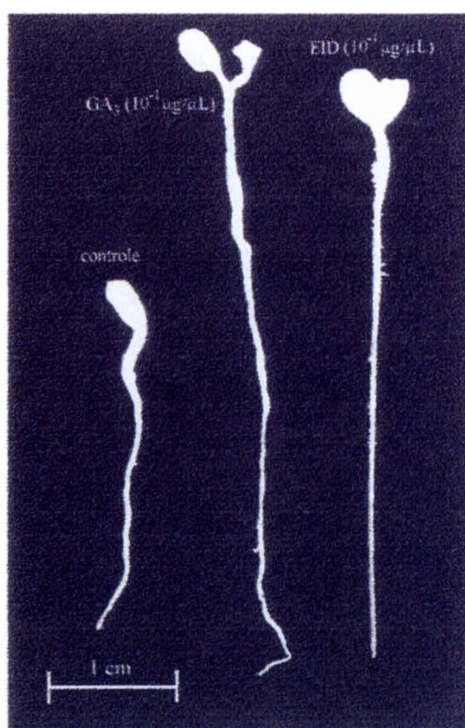
ANEXO 04 – *Stevia rebaudiana* Bertoni



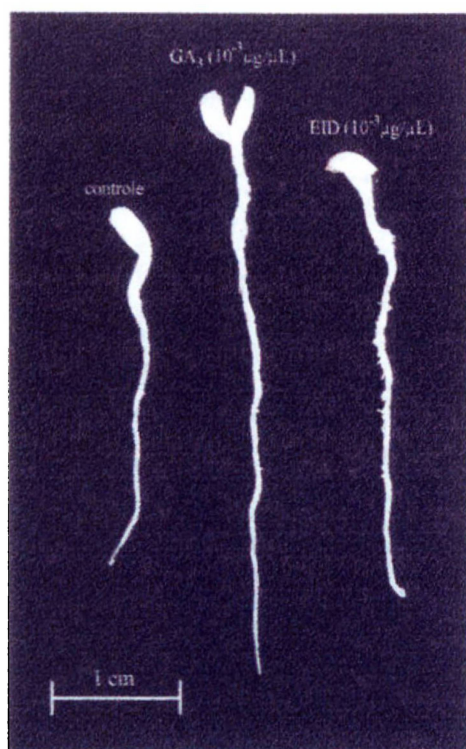
ANEXO 05 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 $\mu\text{g/ mL}$.



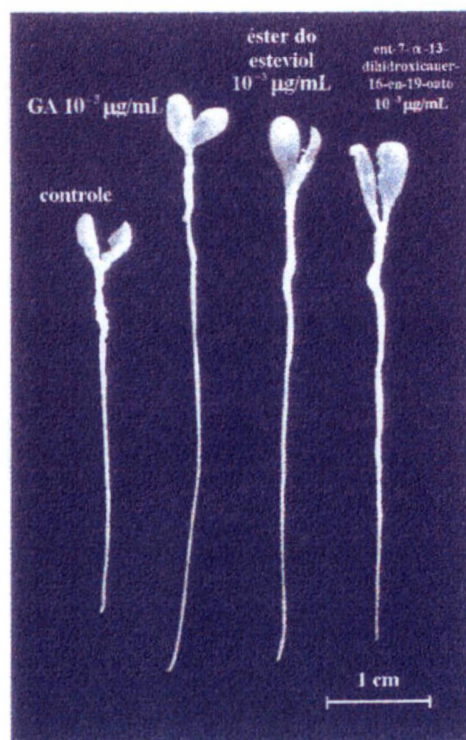
ANEXO 06 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO; CONCENTRAÇÃO DE 10⁻¹ $\mu\text{g/ mL}$.



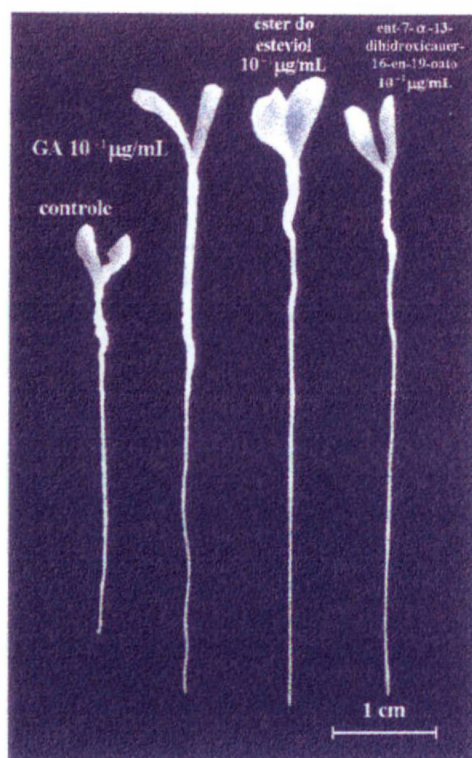
ANEXO 07 - ENSAIO DO HIPOCÓTILO; *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA IMPURO, CONCENTRAÇÃO DE $10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$



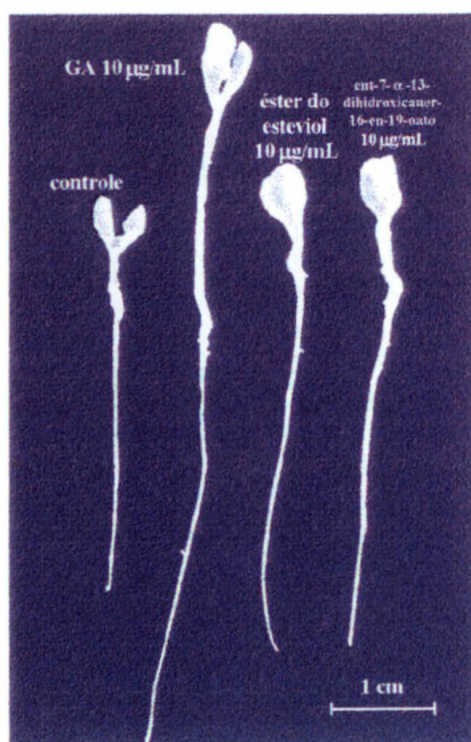
ANEXO 08 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE $10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$.



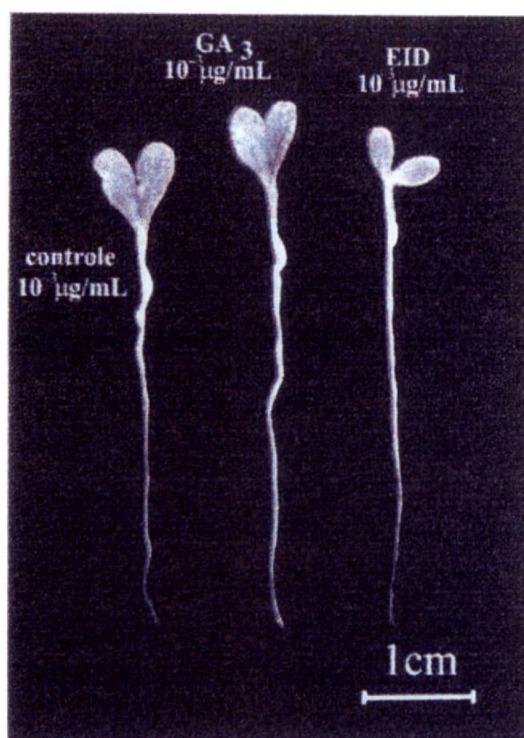
ANEXO 09 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E *ent-7 α ,13*-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE 10^{-1} μ g/ mL.



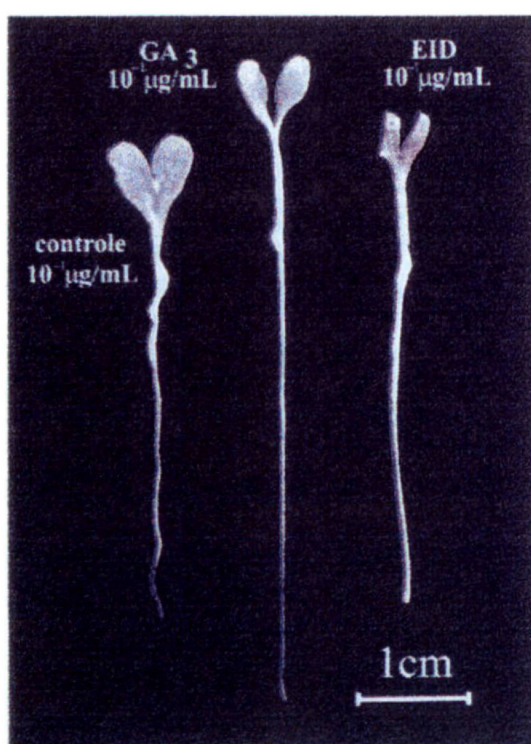
ANEXO 10 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO; ÉSTER DE ESTEVIOL E *ent-7 α ,13*-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA; CONCENTRAÇÃO DE 10 μ g/ mL.



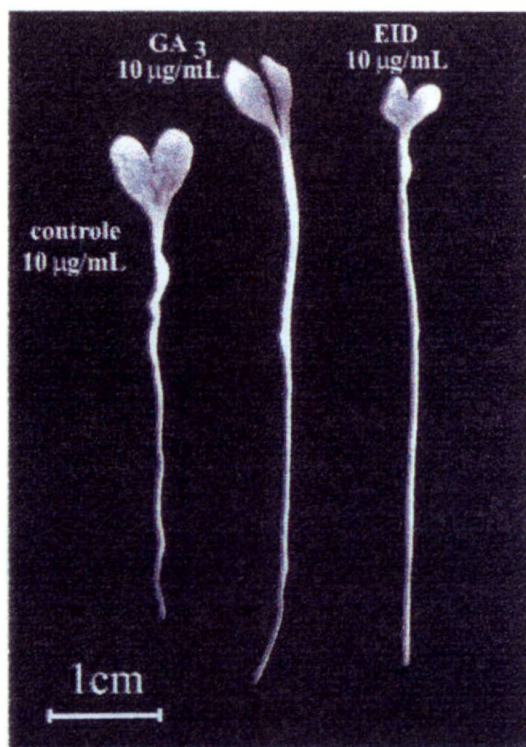
ANEXO 11 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO, COM O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO, CONCENTRAÇÃO DE $10^{-3} \mu\text{g/mL}$.



ANEXO 12 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO, COM O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO, CONCENTRAÇÃO DE $10^{-1} \mu\text{g/mL}$.



ANEXO 13 – ENSAIO DO HIPOCÓTILO, COM O *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA PURO; CONCENTRAÇÃO DE 10 μ g/ mL.



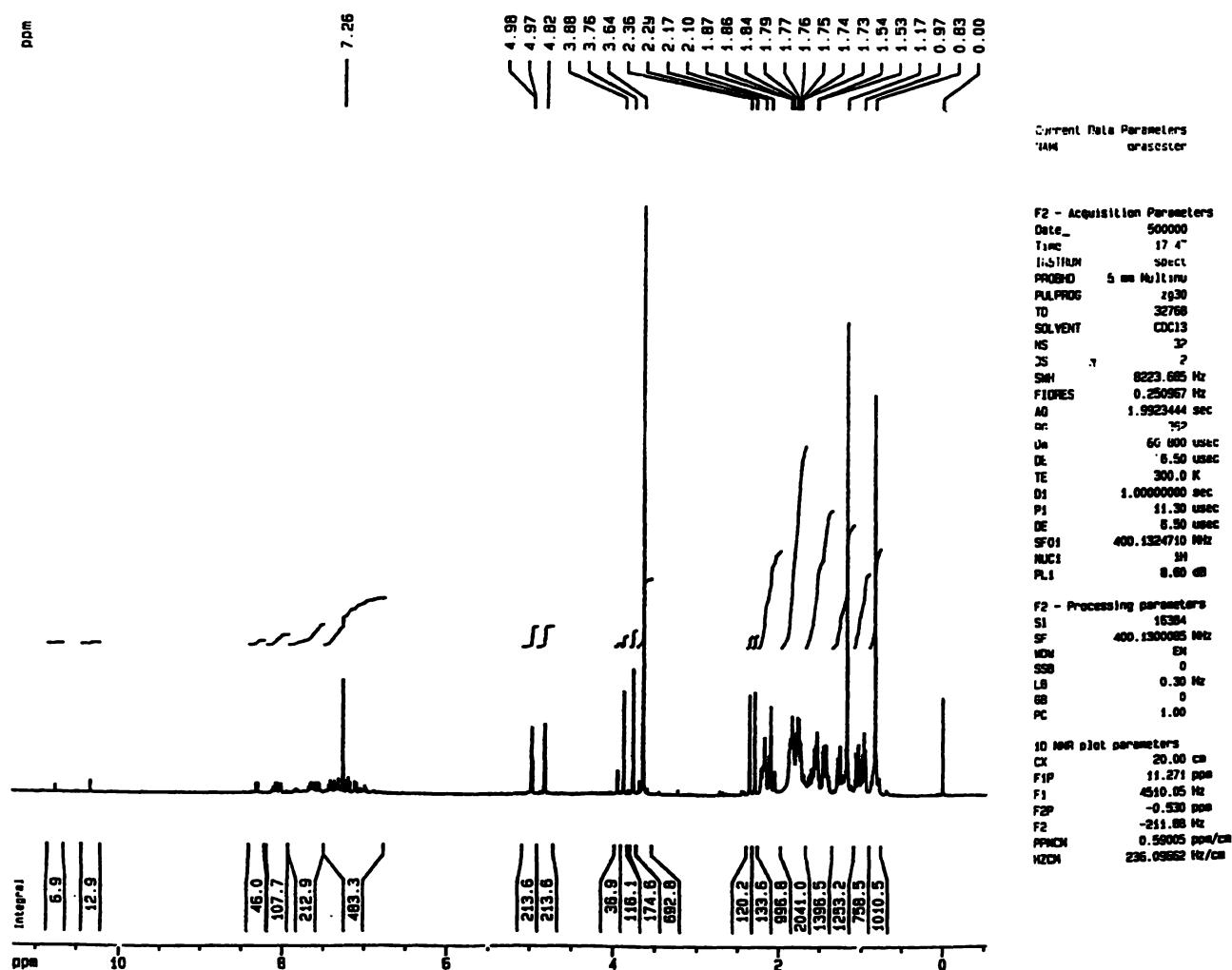
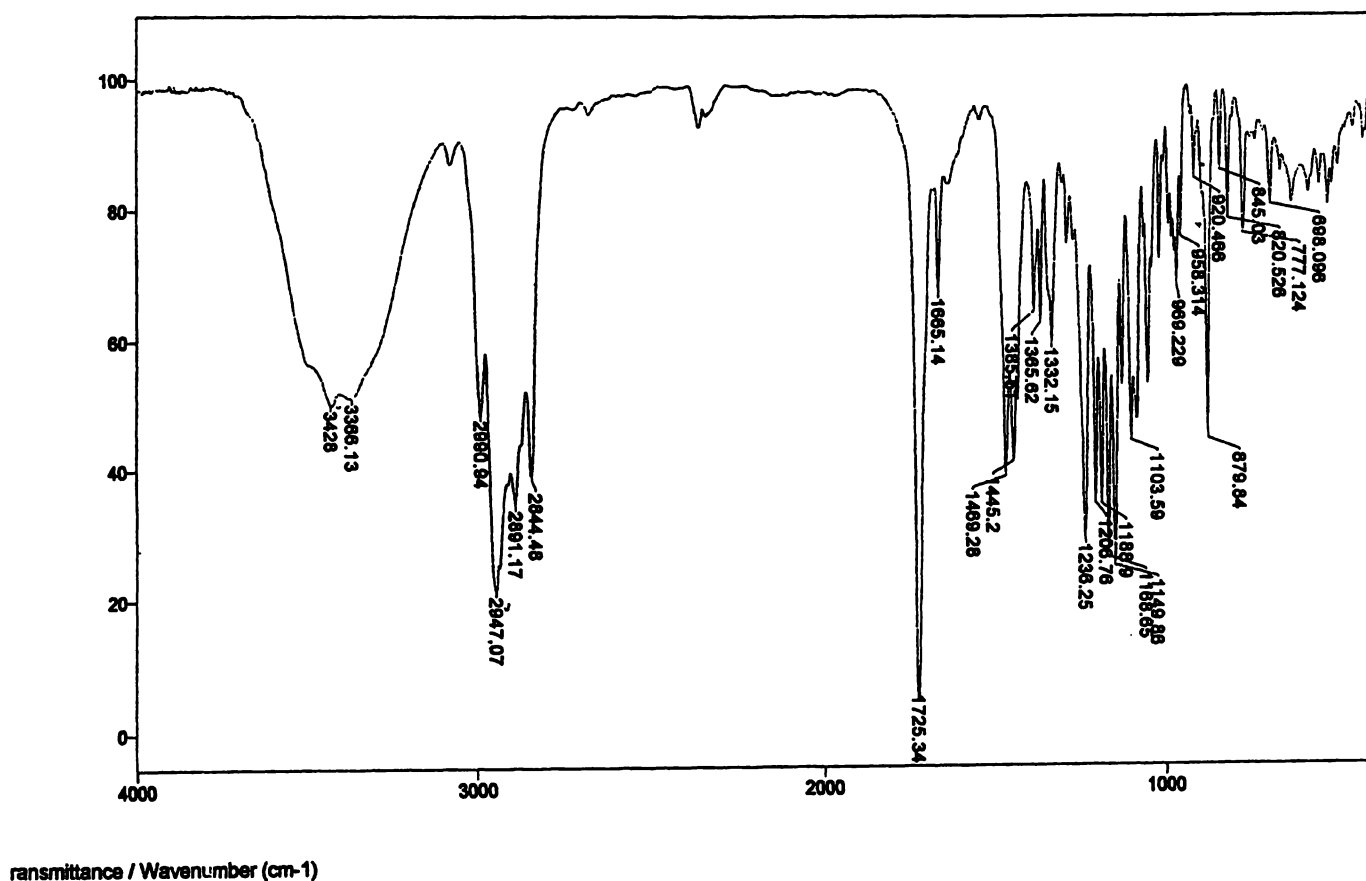


FIGURA 26 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹H DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL

FIGURA 27 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹³C DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL

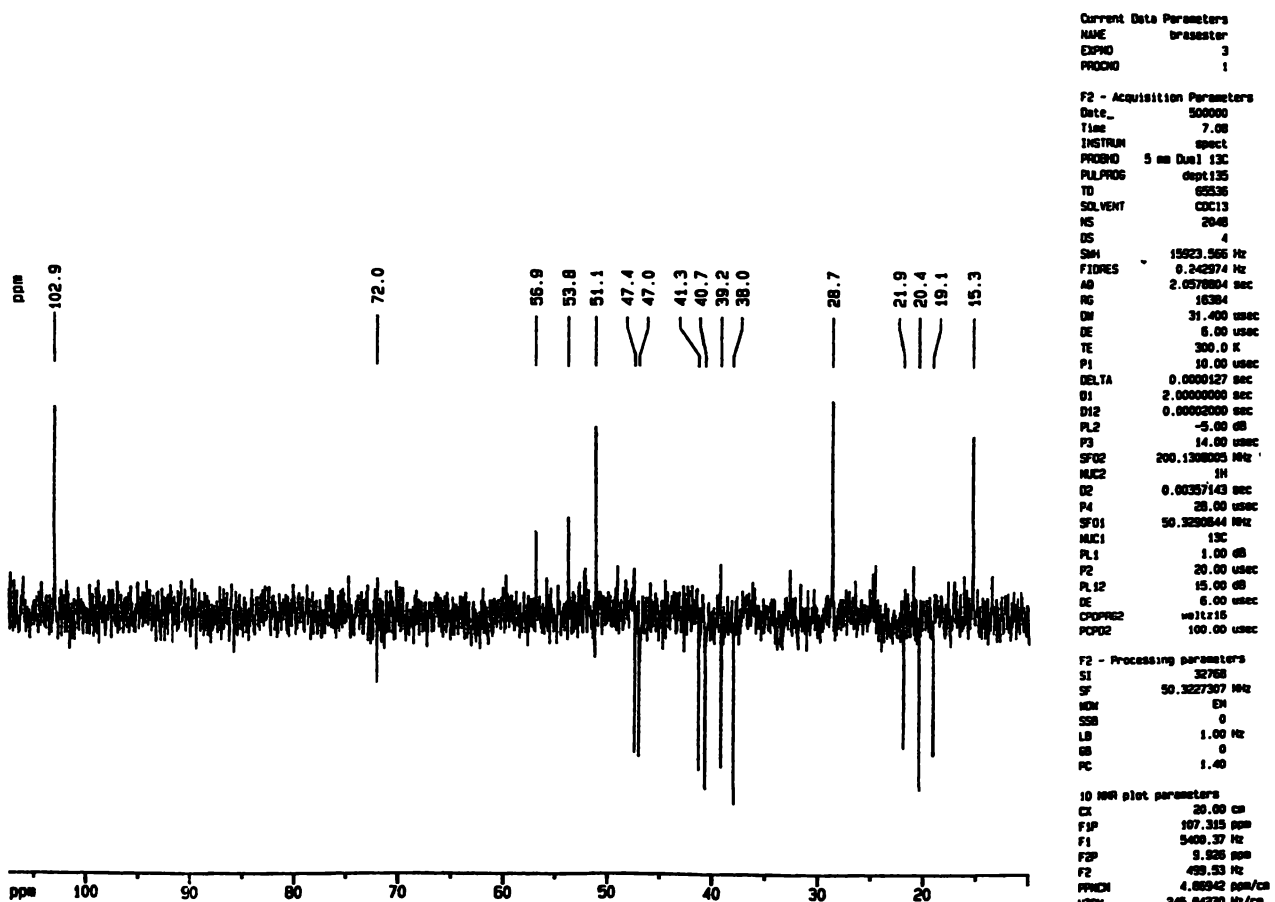
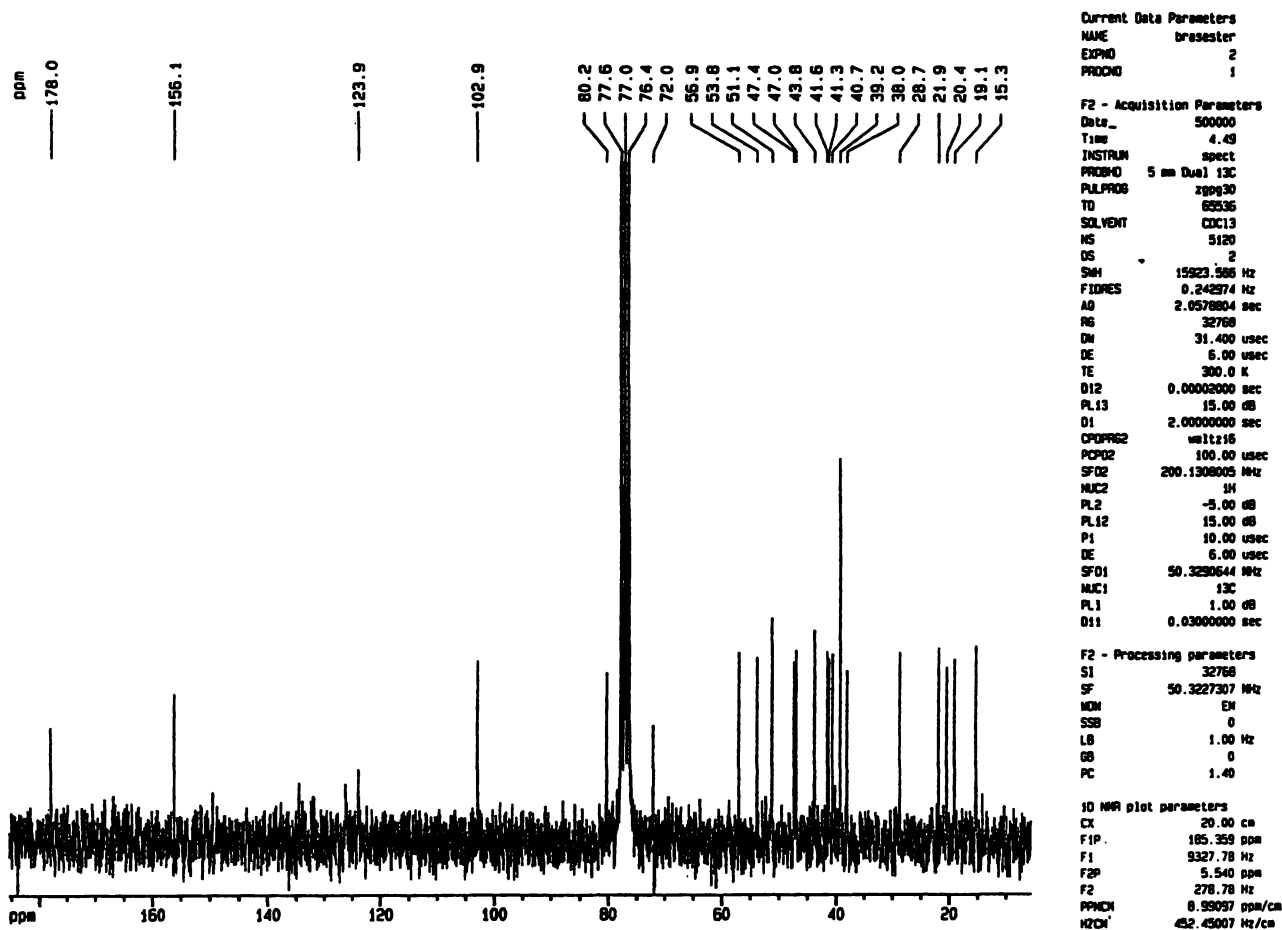


FIGURA 28 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO ÉSTER METÍLICO DO ESTEVIOL

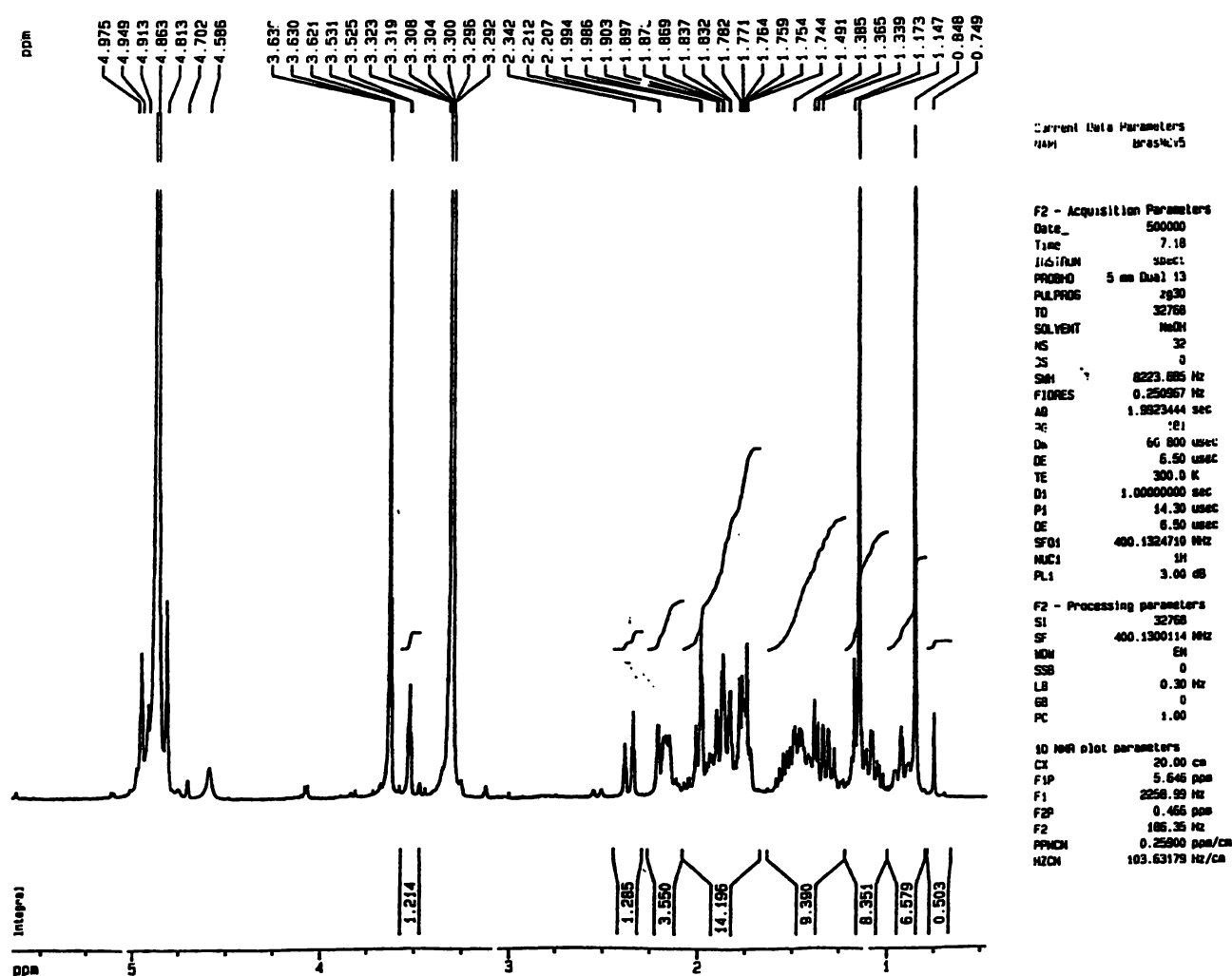
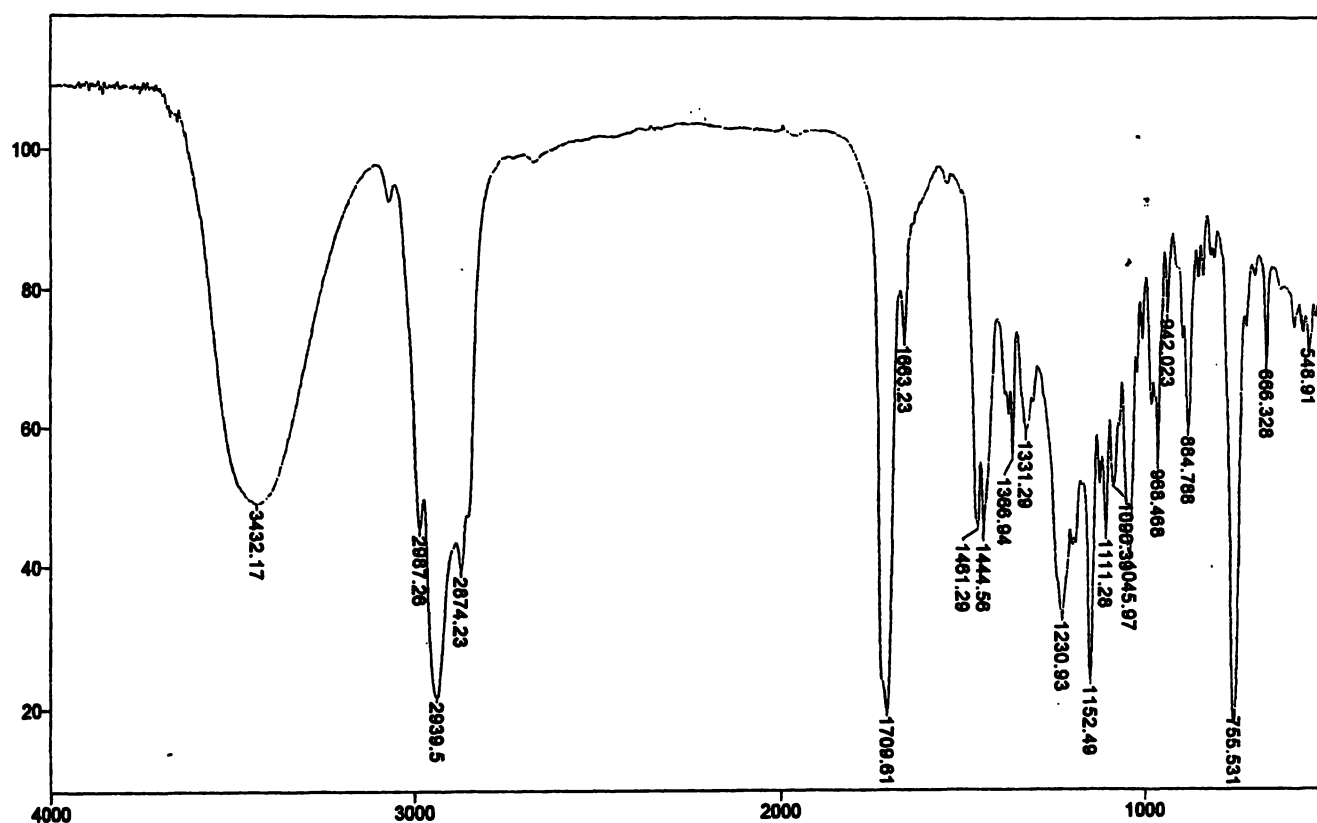
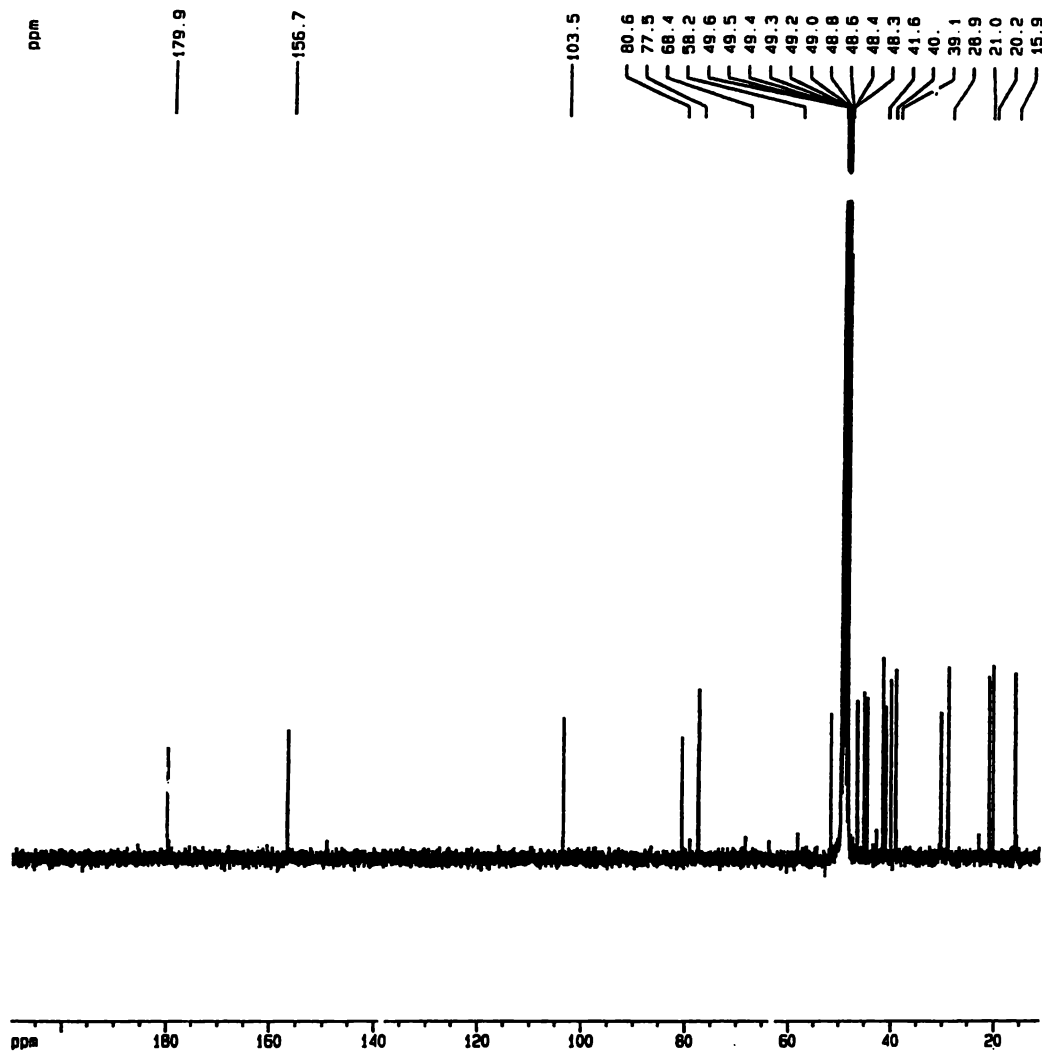


FIGURA 31 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹³C DO *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA



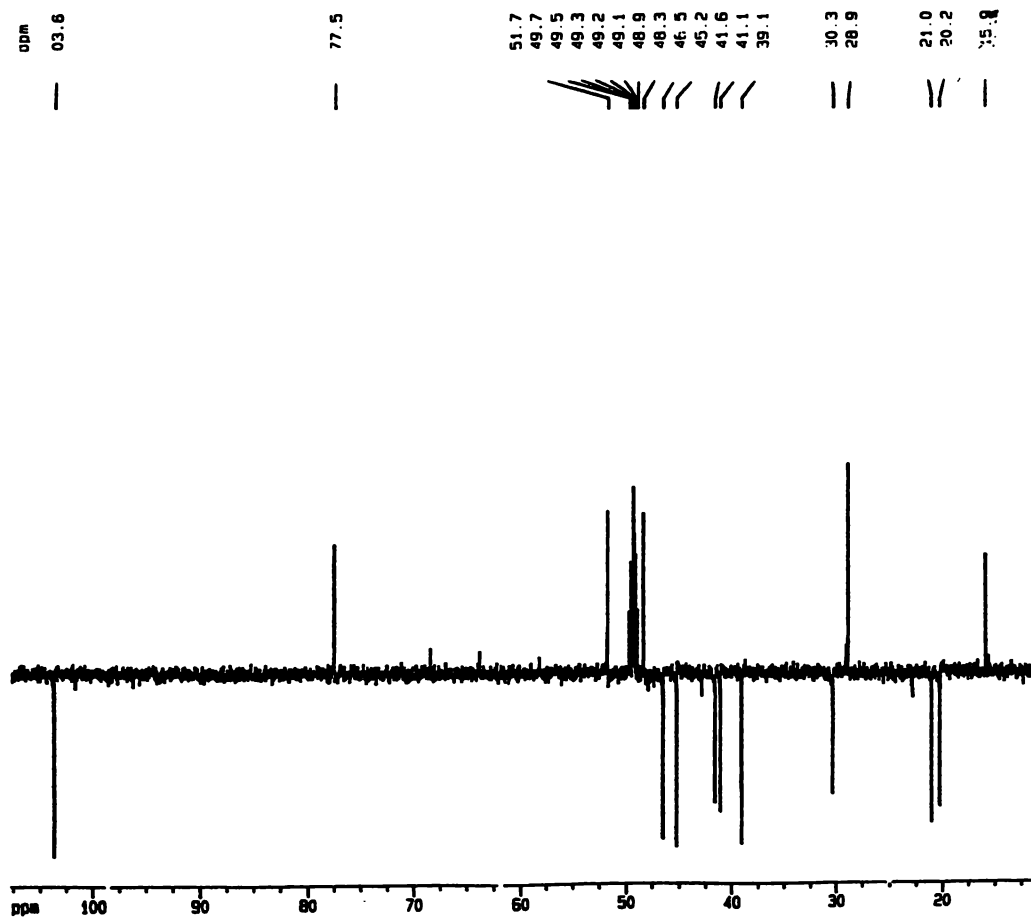
Current Data Parameters
NAME: 31847.133 Hz

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 500000
Time: 20 15
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: MeOH
NS: 15360
DS: 2
Shf: 31847.133 Hz
FIDRES: 0.485949 Hz
AQ: 1.0289552 sec
RG: 32768
TA: 12.100 sec
DE: 6.50 usec
TE: 300.0 K
D12: 0.00002000 sec
PL13: 17.00 dB
D1: 2.00000000 sec
CPDPRG2: waltz16
PCPD2: 90.00 usec
SF02: 400.1316005 MHz
NUC2: 1H
PL2: 2.00 dB
PL12: 15.00 dB
P1: 9.30 usec
DE: 6.50 usec
SF01: 100.6254358 MHz
NUC1: 13C
PL1: 3.00 dB
D11: 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 100.6126265 MHz
MDW: EN
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40

1D NMR plot parameters
CX: 20.00 cm
F1P: 209.642 ppm
F1: 21092.68 Hz
F2P: 11.167 ppm
F2: 1123.49 Hz
PPMCH: 9.92380 ppm/cm
HZCH: 998.45335 Hz/cm

FIGURA 32 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO *ent*-7 α ,13-DI-HIDRÓXI-CAUER-16-EN-19-OATO DE METILA



Current Data Parameters
NAME: 31847.133 Hz

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 500000
Time: 20 15
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: MeOH
NS: 15360
DS: 2
Shf: 31847.133 Hz
FIDRES: 0.485949 Hz
AQ: 1.0289552 sec
RG: 32768
TA: 12.100 sec
DE: 6.50 usec
TE: 300.0 K
D12: 0.0000150 sec
PL13: 2.00000000 sec
D1: 2.00000000 sec
CPDPRG2: waltz16
PCPD2: 90.00 usec
SF02: 400.1316005 MHz
NUC2: 1H
PL2: 2.00 dB
PL12: 15.00 dB
P1: 9.30 usec
DE: 6.50 usec
SF01: 100.6254358 MHz
NUC1: 13C
PL1: 3.00 dB
D11: 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 100.6126265 MHz
MDW: EN
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40

1D NMR plot parameters
CX: 20.00 cm
F1P: 107.089 ppm
F1: 10834.88 Hz
F2P: 10.854 ppm
F2: 1093.02 Hz
PPMCH: 4.84127 ppm/cm
HZCH: 487.83250 Hz/cm

70



¹H NMR spectrum of compound 10. The x-axis represents chemical shift in ppm (0 to 8), and the y-axis represents the integral. The spectrum shows a sharp singlet at 7.270 ppm (integral 1.0000), a multiplet between 1.4 and 3.7 ppm (integral 9.1357), and a small peak at 0.000 ppm (integral 1.0018).

Current Data Parameters
HAM BR153JC

F2 - Acquisition Parameters

```

Date_                500000
Time_                17.41
Instrum              366c1
PROBHD              5 mm Dual 13
PULPROG              zg30
TD                  32768
SOLVENT              CDCl3
NS                   16
DS                   0
SWH                  9223.685 KHz
FIDRES              0.25067 KHz
AQ                  1.9923444 sec
RG                   750
DS                   6C.600 use
TE                   300.0 K
DE                   2.00000000 sec
P1                   14.30 use
D1                   6.50 use
SF01                400.1324710 MHz
NUC1                 1H
PL1                 3.00 dB

```

F2 - Processing parameters

SI	15384
SF	400.1300055 MHz
WOM	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00

1D NMR plot parameters

CX	20.00	cm
F1P	7.688	ppm
F1	3076.09	Hz
F2P	-0.386	ppm
F2	-154.64	Hz
PPMCH	0.40371	ppm/cm
HZCH	151.53665	Hz/cm

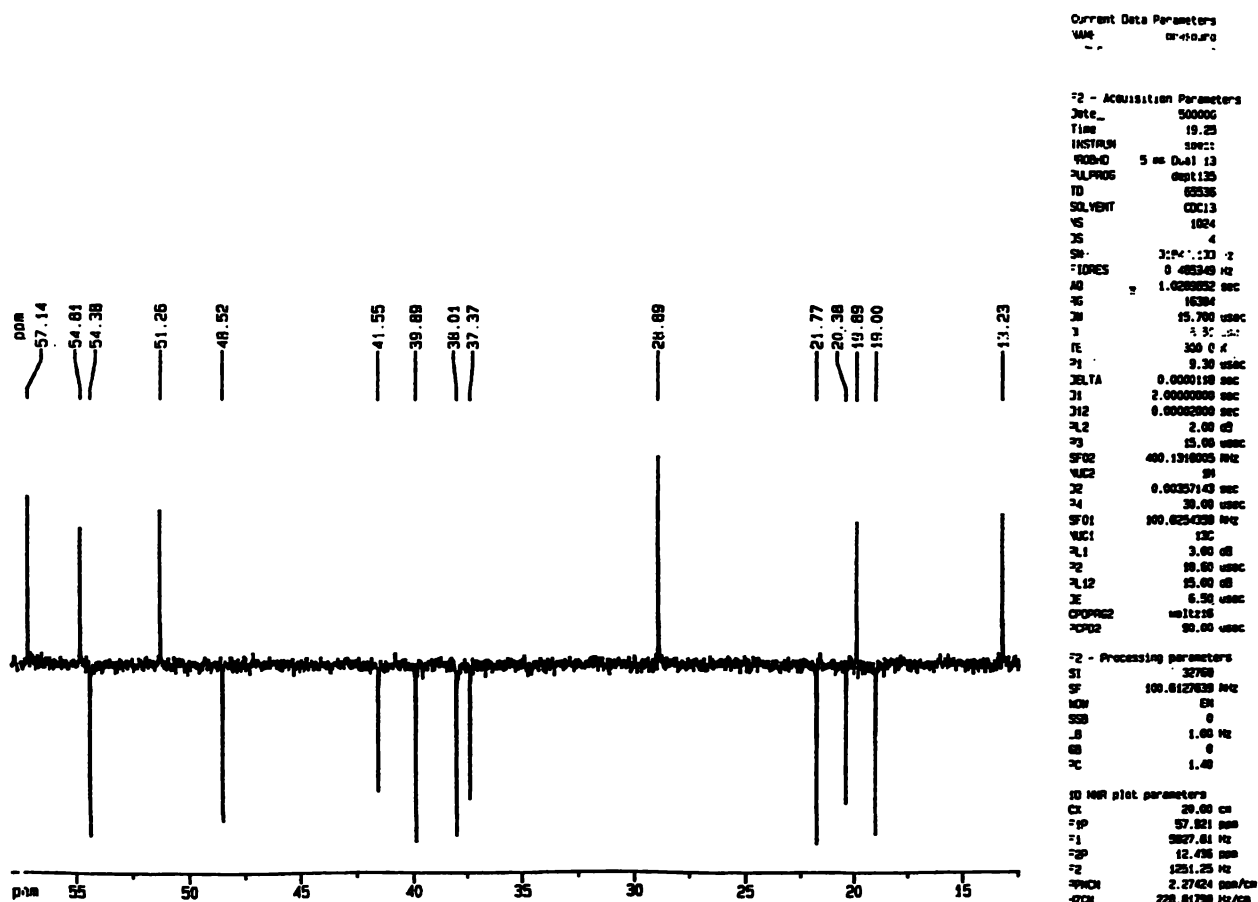
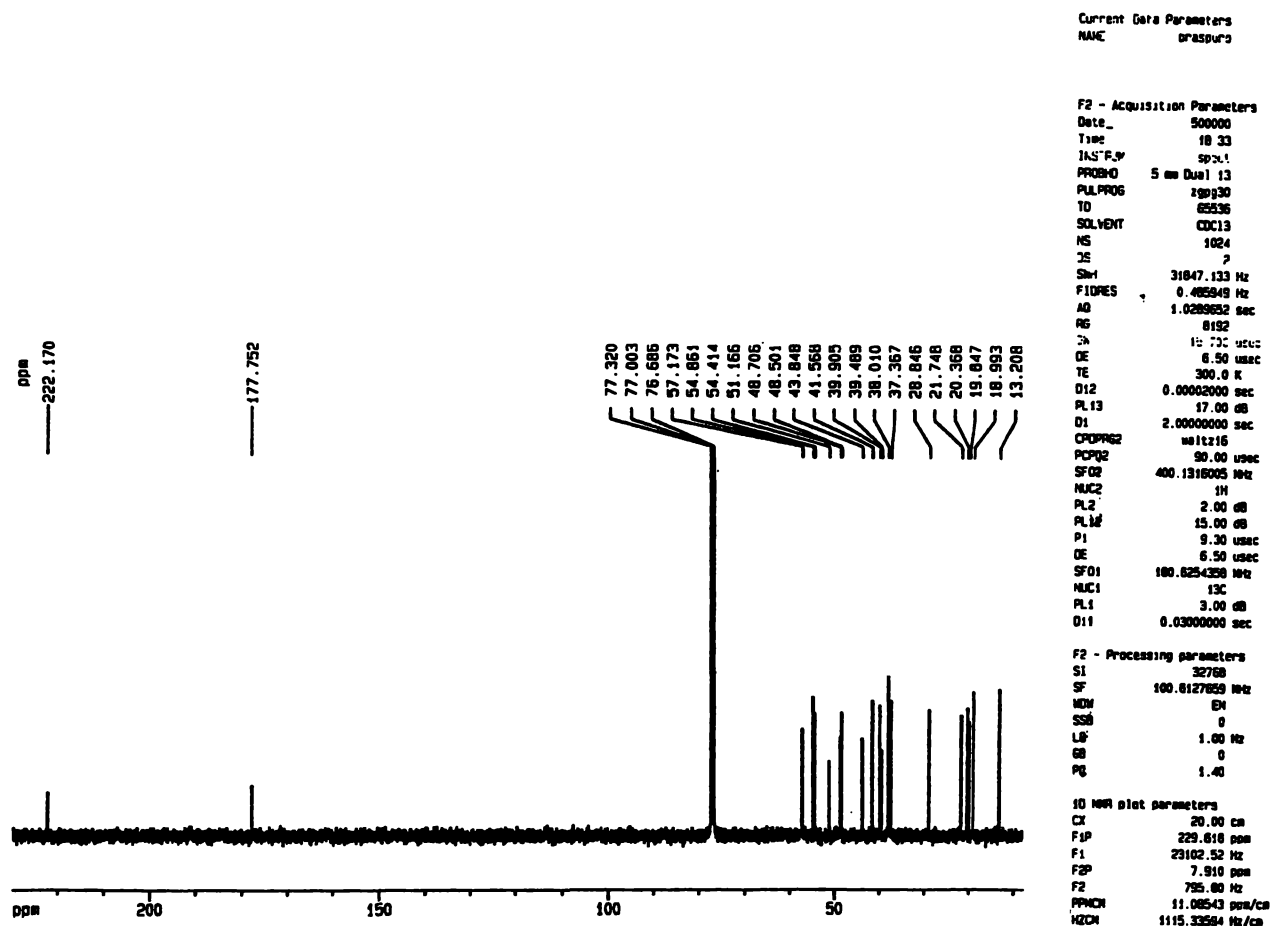
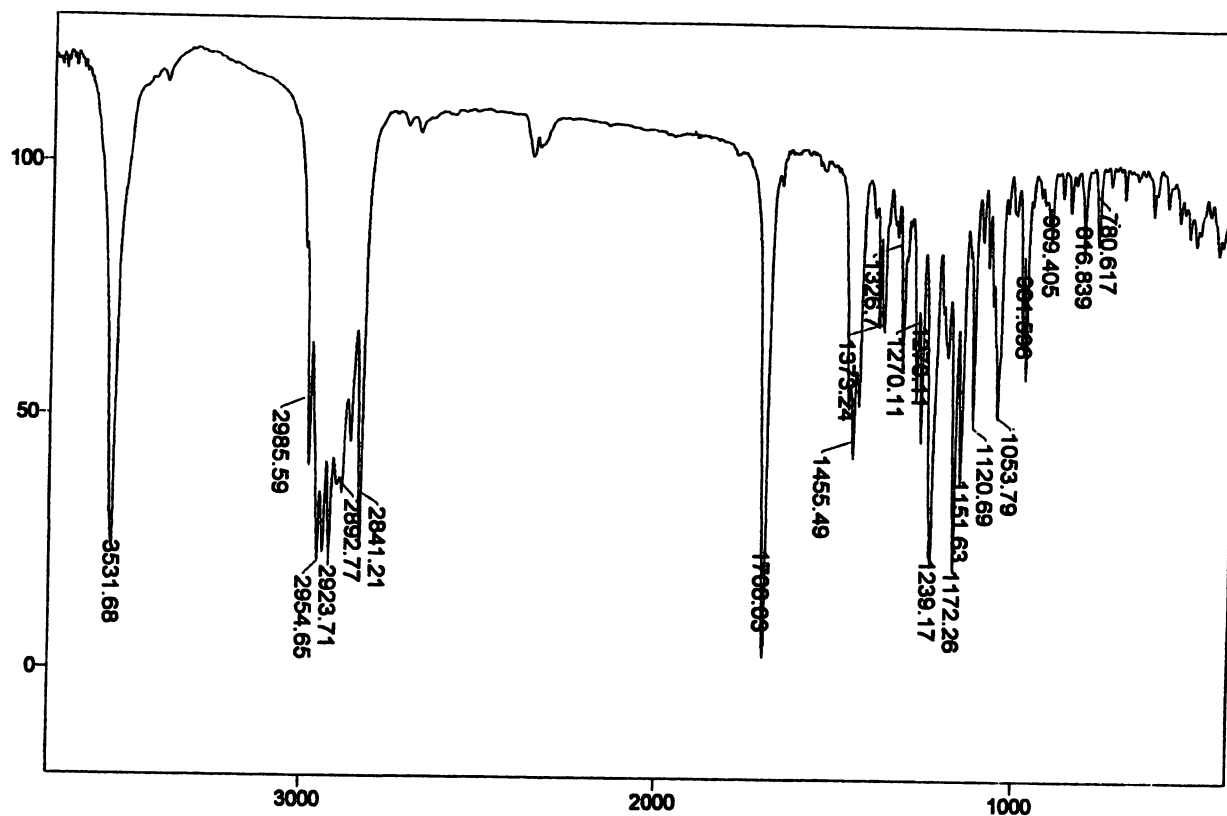


FIGURA 36 – ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO *ent*-16-CETOBAIERAN-19-OATO DE METILA



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

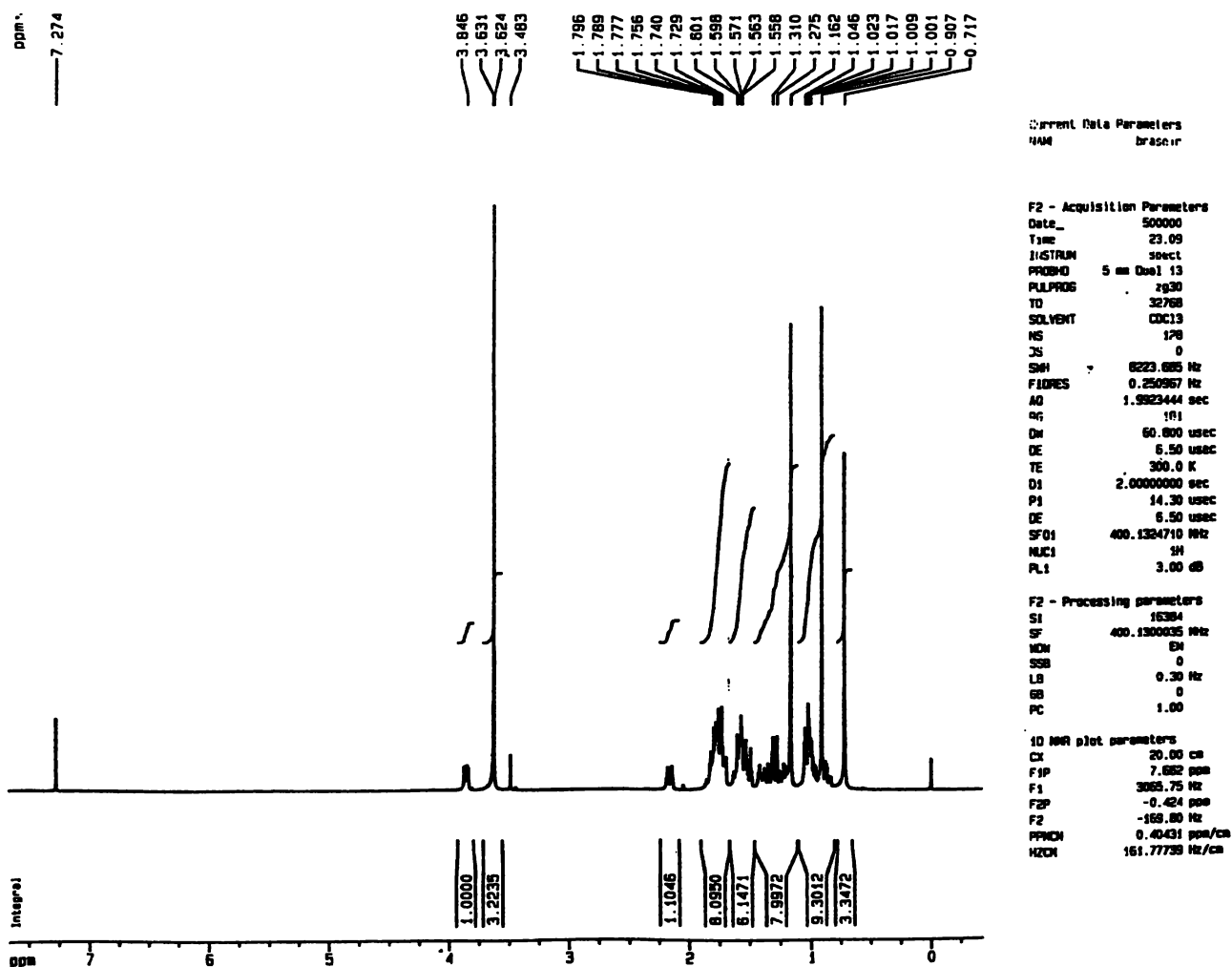


FIGURA 39 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C DO *ent*-16-HIDRÓXI-BAIERAN-19-OATO DE METILA

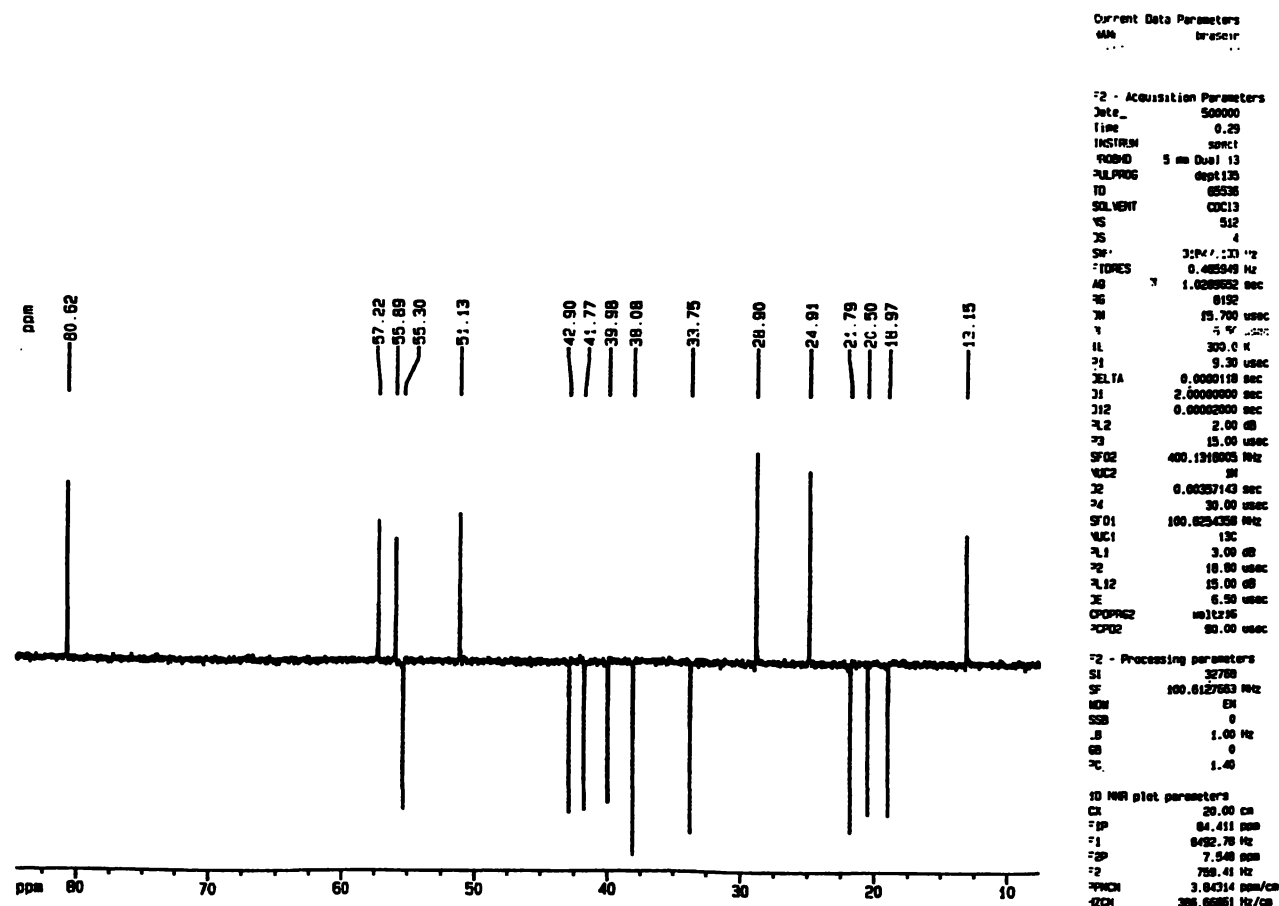
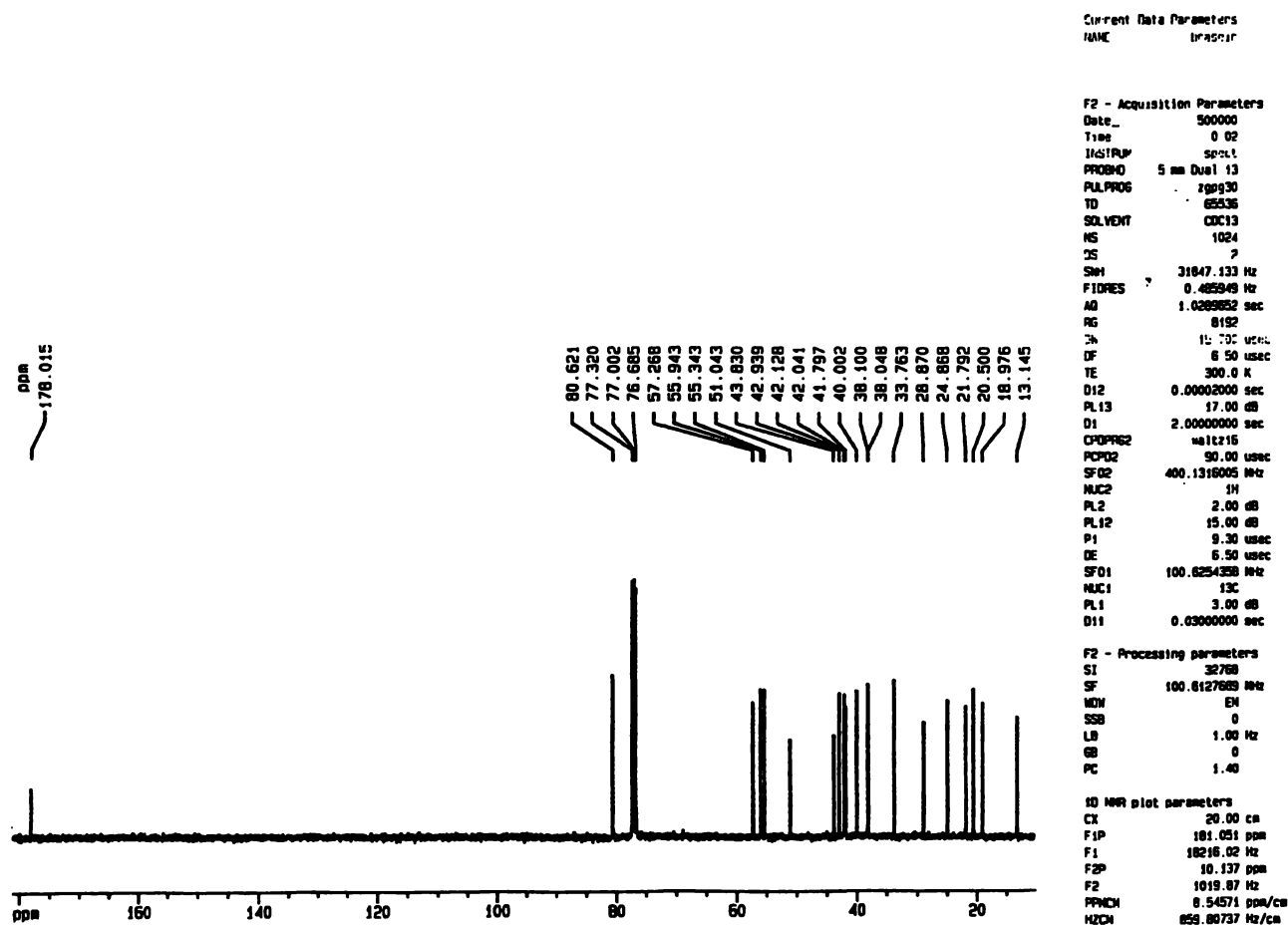
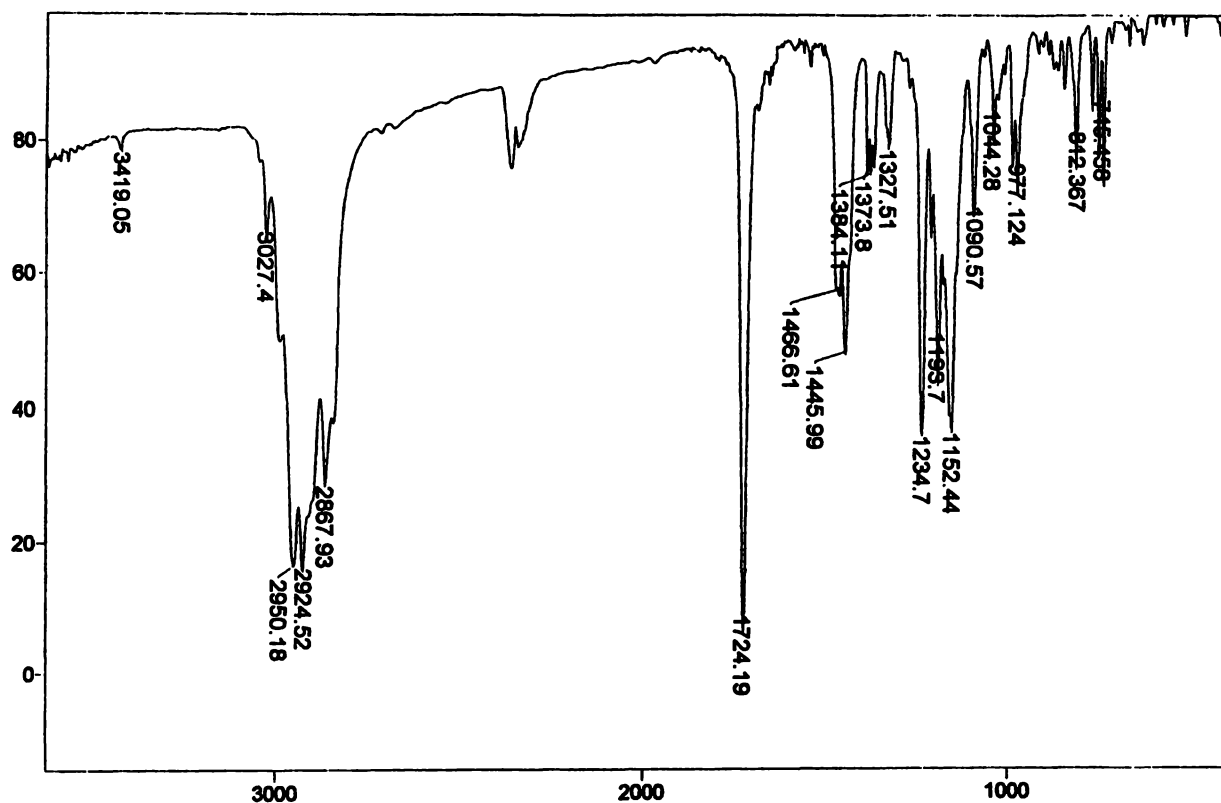


FIGURA 40 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO *ent*-16-HIDRÓXI-BAIERAN-19-OATO DE METILA

FIGURA 41 –ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

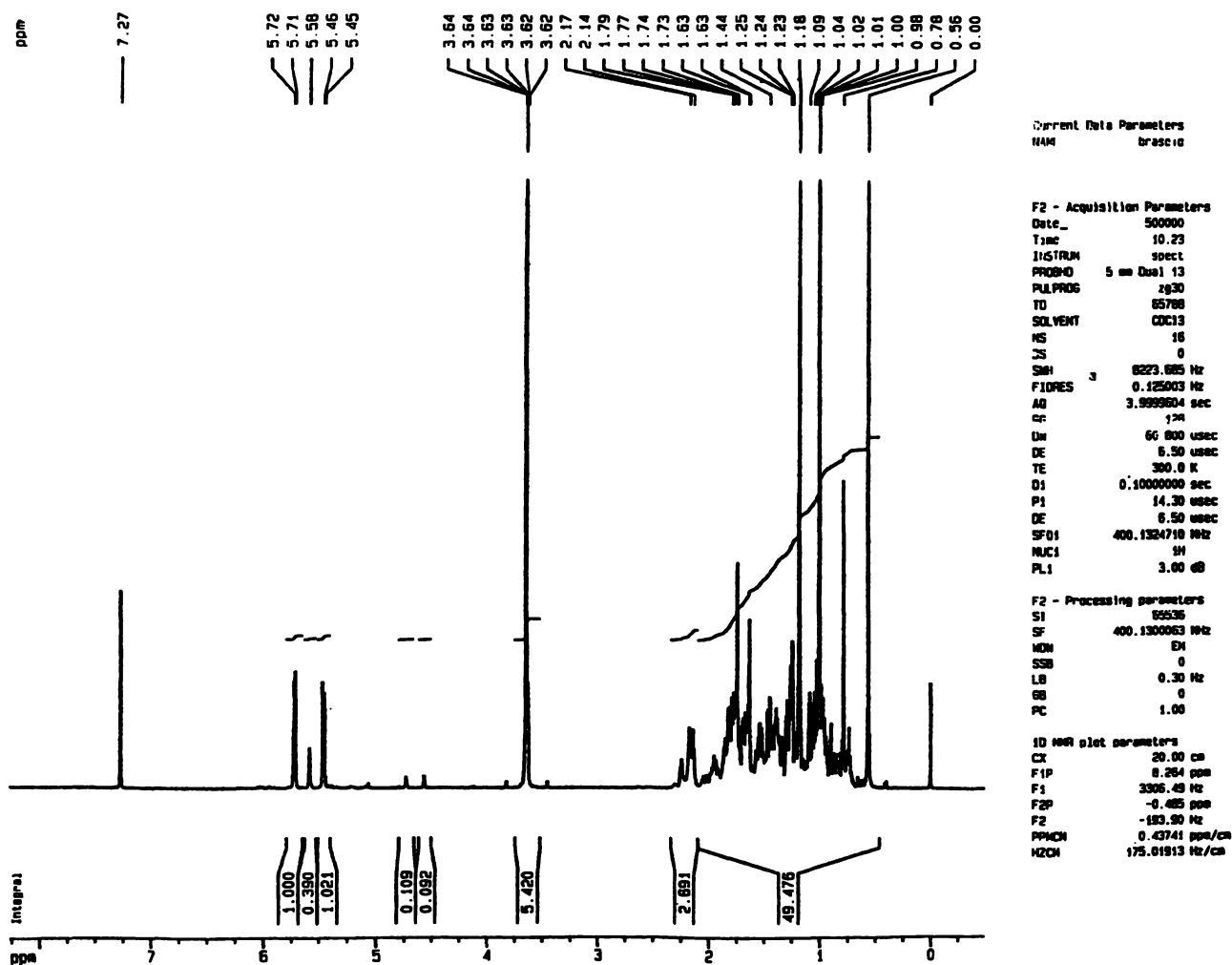
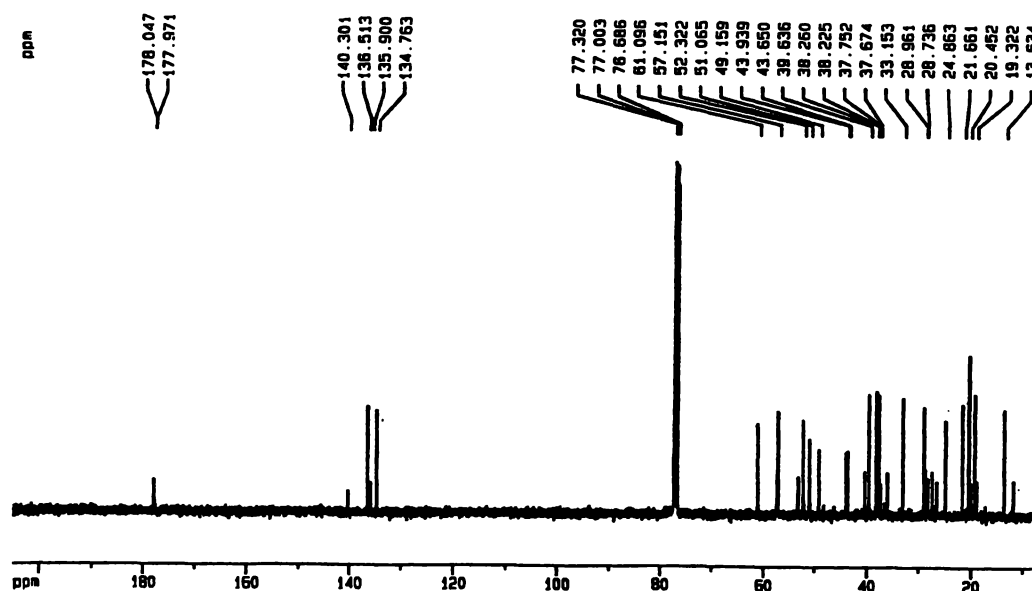


FIGURA 42 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹H DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA

FIGURA 43 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA

Current Data Parameters
NAME: brase13

F2 - Acquisition Parameters

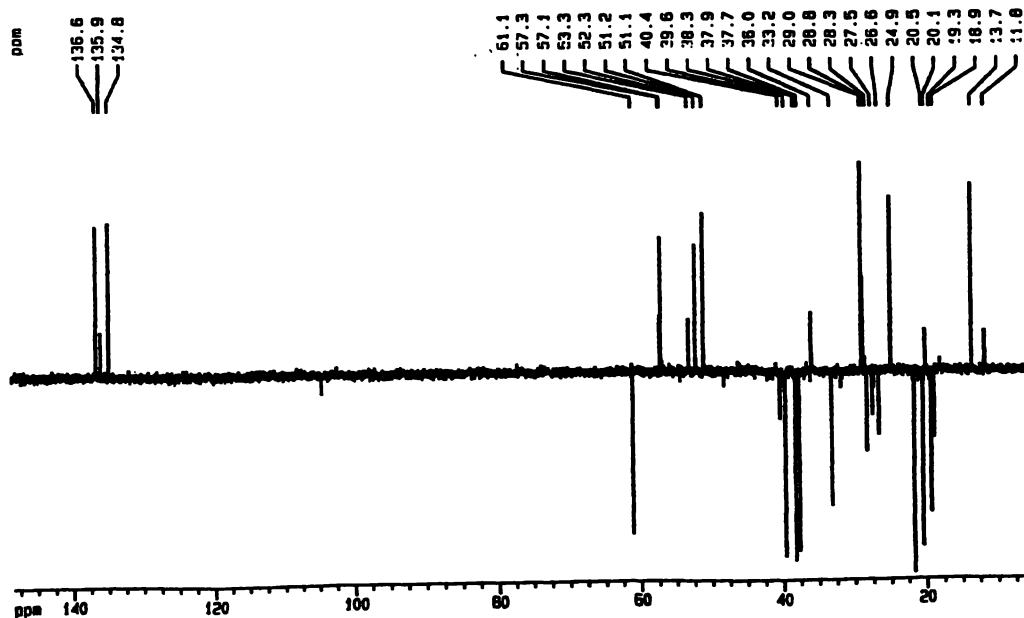
Date_: 500000
Time: 11 23
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 1024
DS: 2
SWH: 31847.133 Hz
FIDRES: 0.485949 Hz
AQ: 1.0289652 sec
RG: 32768
IN: 15.0000000
DE: 6.50 usec
TE: 300.0 K
B12: 0.00002000 sec
PL13: 17.00 dB
D1: 2.00000000 sec
CPDPRG2: waltz16
PCPD2: 90.00 usec
SF02: 400.1316005 MHz
NUC2: 13H
PL2: 2.00 dB
PL12: 15.00 dB
P1: 9.30 usec
DE: 6.50 usec
SF01: 100.6254358 MHz
NUC1: 13C
PL1: 3.00 dB
D11: 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters

SF: 32768
SF: 100.6127659 MHz
MDW: EN
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40

1D NMR plot parameters

CH: 20.00 cm
F1P: 205.060 ppm
F1: 20631.63 Hz
F2P: 7.227 ppm
F2: 727.17 Hz
PPMCH: 9.89162 ppm/cm
HZCH: 985.22284 Hz/cm



Current Data Parameters
NAME: brase14

F2 - Acquisition Parameters

Date_: 500000
Time: 11.36
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13
PULPROG: zgpg130
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 1024
DS: 4
SWH: 31847.133 Hz
FIDRES: 0.485949 Hz
AQ: 1.0289652 sec
RG: 32768
IN: 15.0000000
DE: 6.50 usec
TE: 300.0 K
B12: 0.00002000 sec
PL13: 17.00 dB
D1: 2.00000000 sec
CPDPRG2: waltz16
PCPD2: 90.00 usec
SF02: 400.1316005 MHz
NUC2: 13H
PL2: 2.00 dB
PL12: 15.00 dB
P1: 9.30 usec
DE: 6.50 usec
SF01: 100.6254358 MHz
NUC1: 13C
PL1: 3.00 dB
D11: 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters

SF: 32768
SF: 100.6127659 MHz
MDW: EN
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40

1D NMR plot parameters

CH: 20.00 cm
F1P: 148.473 ppm
F1: 14838.33 Hz
F2P: 5.957 ppm
F2: 595.87 Hz
PPMCH: 7.14584 ppm/cm
HZCH: 718.95277 Hz/cm

FIGURA 44 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA

FIGURA 45 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹H DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO)

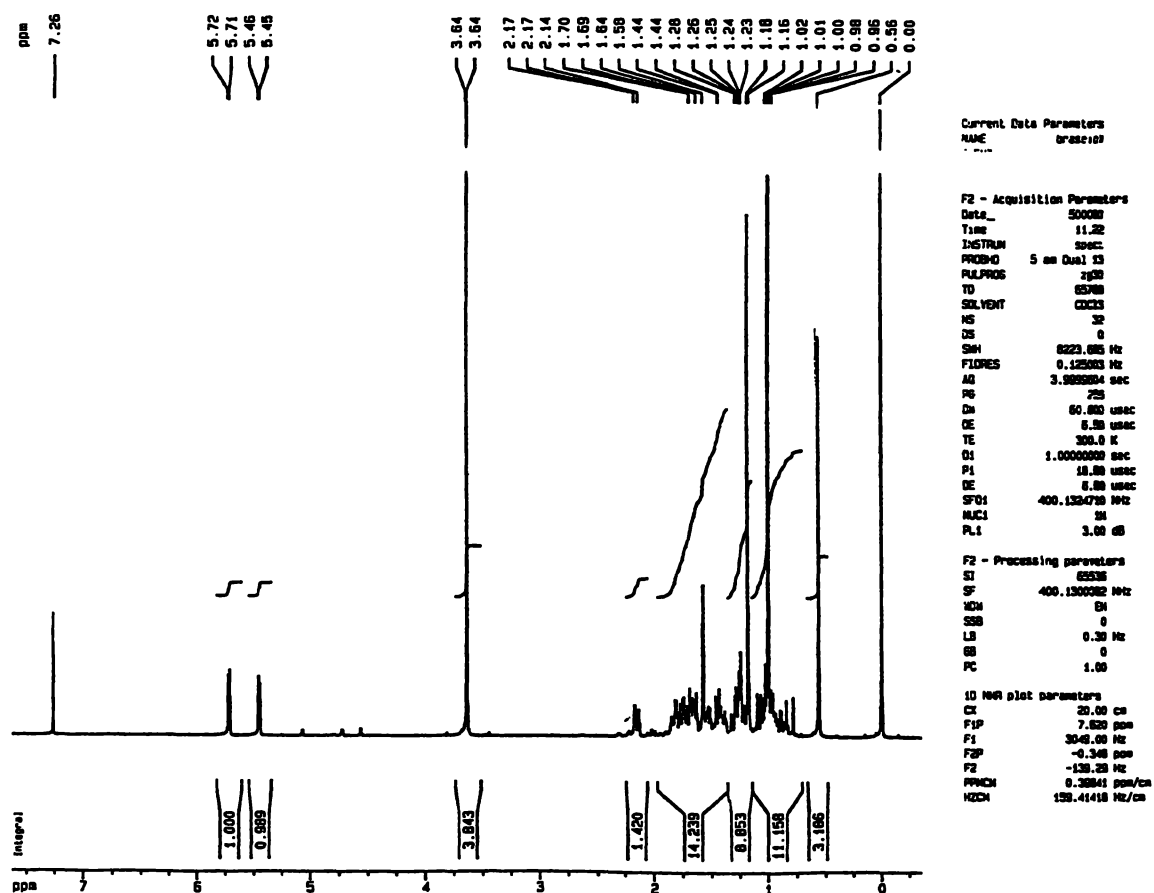
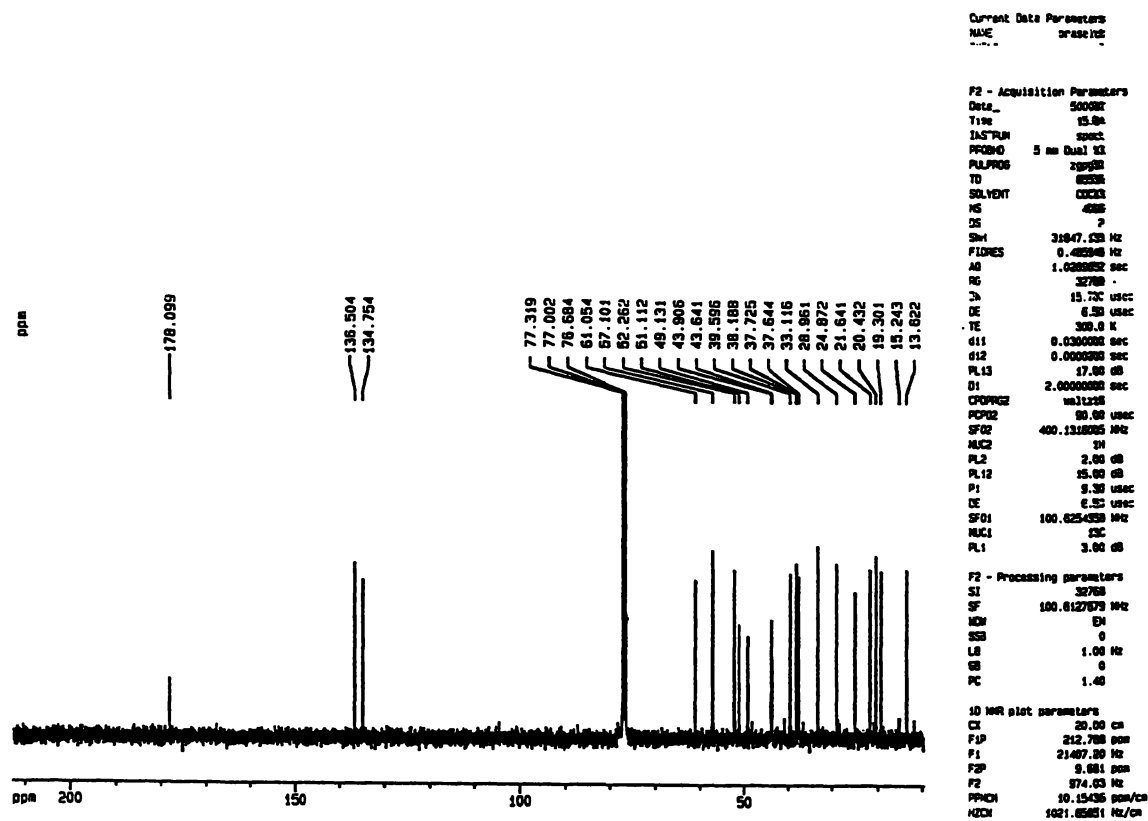
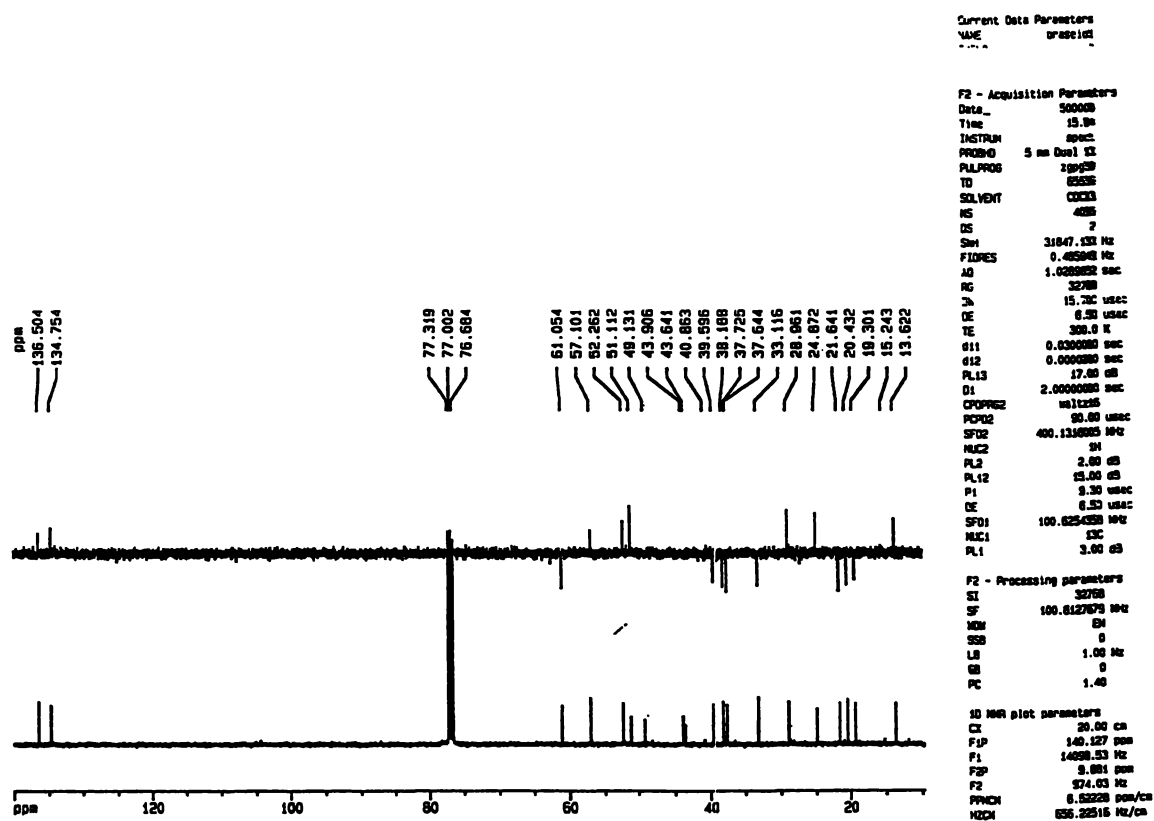


FIGURA 46 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO)

FIGURA 47 – ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN¹³C – DEPT DO *ent*-BAIER-15-EN-19-OATO DE METILA (PURO)



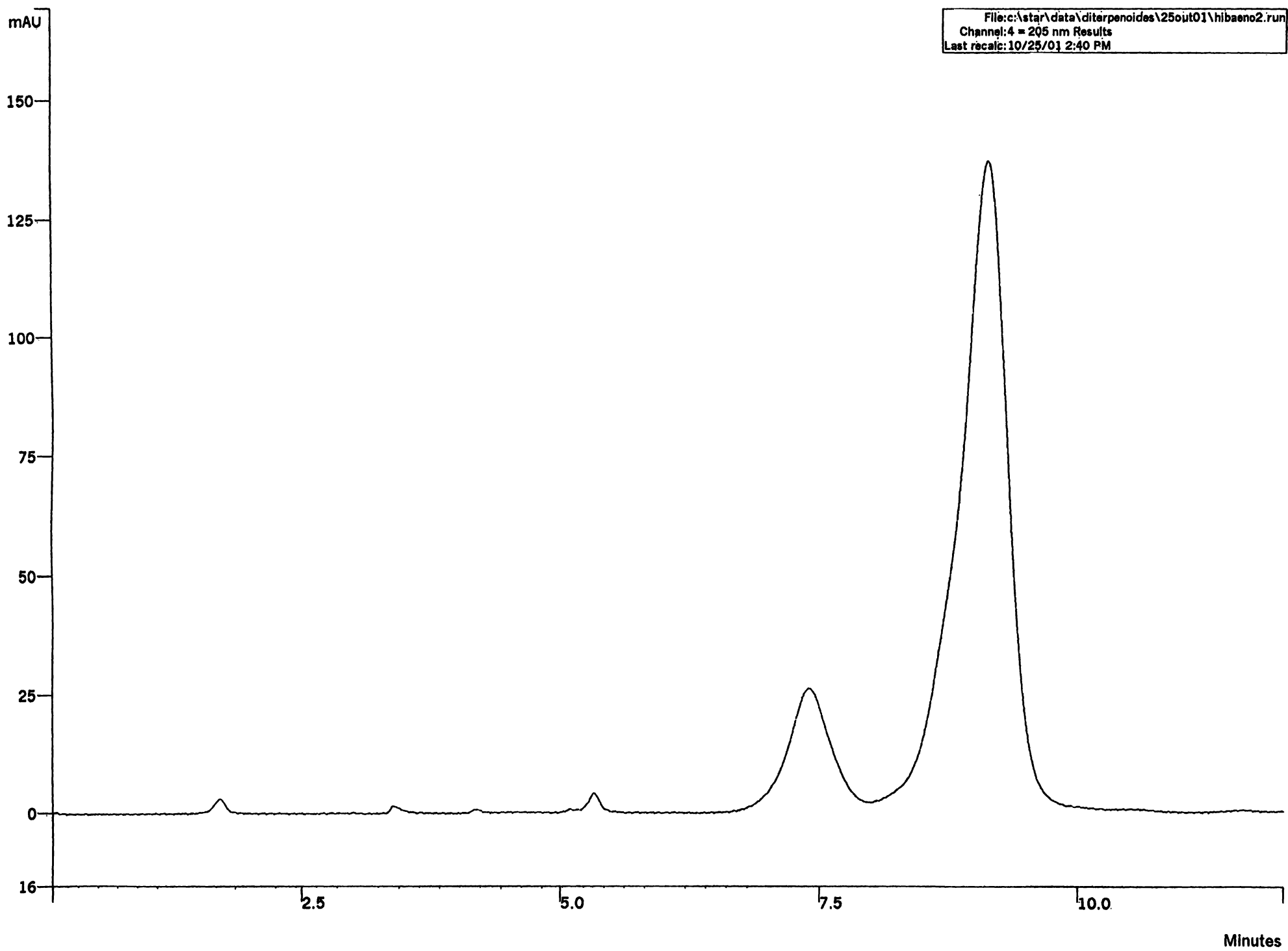


FIGURA 48 - CROMATOGRAMA DO *ent*-BAIER-15-*EN*-19-OATO DE METILA E O ISÔMERO