



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências

# Preparação de novos derivados de carvona, guaiol e bulnesol com aplicação biológica

**Sofia Maria Pombal da Silva**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em

**Química**

(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla

Covilhã, março de 2019



"Ser cientista é abdicar, e muito. Ser cientista é adorar o trabalho que se faz (cliché? mas é verdade). Ser cientista é ser-se um ginasta do tempo e esperar trabalhar longas horas sem picar o ponto.

(.....)

Ser cientista é rir e dar pulos de alegria quando temos aqueles resultados! É ter dias maus, muitos. Mas quando temos os bons? Ninguém nos pára. Ser cientista é nunca esquecer aquela primeira memória"

*Andreia Penado*



# Agradecimentos

Após meses de dedicação a este trabalho que culmina nesta tese, é com enorme emoção que escrevo estas poucas linhas de agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a levar este trabalho a bom porto.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Jesus Miguel L. Rodilla, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pela confiança que em mim depositou e deposita bem como por toda a orientação científica que me prestou. Sem ele não estaria a concluir este trabalho.

À Professora Doutora Maria Lúcia Silva, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pelo apoio prestado durante a realização deste trabalho e pelas palavras de incentivo nos momentos de derrota.

Ao Professor Catedrático Doutor David Díez Martín, do Departamento de Química Orgânica da Facultad de Ciências Química, da Universidade de Salamanca, pelo conhecimento científico transmitido, bem como ao Doutor César Raposo do Servicio General de Espectrometria de Massas, pela realização dos espectros de massa. Um grande agradecimento ao Professor Itabajara Vaz, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia Faculdade de Veterinária (Rio Grande do Sul, Brasil), Professor Carlos Logullo e ao Mestre Adriann Rebonato Universidade Estadual Norte Fluminense, Unidade de experimentação animal (Rio de Janeiro, Brasil) pela realização dos testes parasitários e à Professora Estela Guerrero, Yaiza Hernández, Eily Mondolis, Aldahir Mero, Juan Morán-Pinzón do Departamento de Farmácia da Universidade do Panamá, pela realização dos testes de atividade biológica.

Ao Dr. Daniel Ettlin da Unicam pela oportunidade de entrada no mercado de trabalho e a toda a equipa da AEMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade por me acolherem e ensinarem o verdadeiro sentido da responsabilidade de trabalho, por toda a ajuda e acima de tudo por toda a amizade.

Por fim, mas não menos importante, a minha família, em especial à minha mãe e ao meu irmão, pois sem o vosso espírito de sacrifício e sem o vosso incentivo nada seria possível.

A todos os amigos, Ubianos ou não, agradeço o apoio e a paciência que tiveram para comigo. Nestes anos, amizades foram feitas e outras desfeitas, mas os verdadeiros amigos perduraram.

***Palavras são poucas próximas de atos. Os atos de cada um muito me ajudaram, e com todo o carinho venho agradecer por isso. Muito obrigada!***



## Resumo

As reações químicas são utilizadas desde a antiguidade e ao longo dos anos novos conhecimentos têm sido adquiridos, permitindo assim melhorar os processos já existentes e a criação de novos métodos para serem aplicados nas mais diversas áreas científicas.

Este trabalho descreve a obtenção de produtos derivados da carvona, composto com abundância natural, através de reações com tricloreto de alumínio e peróxido de hidrogênio, n-bromosuccinimida e ácido p-toluenosulfônico, utilização dos catalisadores l-prolina, quinina, quinidina e difenilprolinol e por fim reações de epoxidação com carbonato de potássio. Nas reações realizadas obtiveram-se diversos compostos, num total de 21, contudo alguns desses compostos são já conhecidos bibliograficamente. Apenas 8 destes compostos são novos e descritos pela primeira vez. Os novos compostos obtidos neste trabalho são, essencialmente, bromoderivados da carvona que contêm também o grupo nitrobenzeno. Estas adições ocorreram na presença de catalisador permitindo assim uma melhor recepção dos grupos -Br provenientes da n-bromosuccinimida.

De modo a verificar a eficácia dos catalisadores, estes foram aplicados em reações que utilizaram com produto de partida guaiol ou bulnesol, contudo o resultados destas reações foram muito inconclusivos, uma vez que as frações obtidas apresentavam misturas bastante complexas e quase impossíveis de separar, estando-se ainda a analisar estas misturas pelas técnica de GC-MS, de modo a descobrir quais as suas massas e depois chegar a possíveis conclusões.

Foi também realizado o estudo da atividade biológica de 8 produtos obtidos nas reações com carvona, incluindo de 4 dos novos compostos obtidos e ainda utilizando guaiol, bulnesol e águas mães (essência bruta obtida da planta *Bulnesia sarmientoi* da qual se obtém o guaiol e o bulnesol). As atividades realizadas foram: atividade antioxidante frente a 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), avaliação da capacidade de remoção do anião superóxido (em sistema não enzimático e em anéis de aorta) e por fim atividade cardiovascular.

## Palavras Chave

Carvona, Guaiol, Bulnesol, Organocatálise, Atividade Biológica



# Abstract

The chemical reactions are used since antiquity and over the years new knowledge has been acquired, for improving processes that existing and create new methods to be applied in various scientific fields.

This work describes the production of naturally occurring carvone derivatives through reactions with aluminum trichloride and hydrogen peroxide, n-bromosuccinimide and p-toluenesulfonic acid, the use of the L-proline, quinine, quinidine and diphenylprolinol catalysts and finally epoxidation reactions with potassium carbonate. In the reactions performed several compounds were obtained, for a total of 21, however some of these compounds are already known bibliographically. Only 8 of these compounds are new and described for the first time. The new compounds obtained in this work are essentially brominated derivatives of the carvone which also contain the nitrobenzene group. These additions occurred in the presence of catalyst thus allowing better reception of the -Br groups from n-bromosuccinimide.

To verify the effectiveness of the catalysts, these were applied in reactions using guaiol or bulnesol starting materials, however the results of these reactions were very inconclusive, since the obtained fractions presented very complex and almost impossible to separate mixtures, being and to analyze these mixtures by GC-MS techniques, in order to find out their masses and then reach possible conclusions.

It was also carried out the study of the biological activity of 8 products obtained in the reactions with carvone, including 4 of the new compounds obtained and still using guaiol, bulnesol and mother waters (crude essence from which guaiol and bulnesol are obtained). The activities performed were: antioxidant activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), evaluation of the ability to remove superoxide anion (in a non-enzymatic system and in aortic rings) and finally cardiovascular atrophy.

## Keywords

Carvone, Guaiol, Bulnesol, Organocatalist, Biological activity



# Índice

1. Introdução e objetivos .....	1
1.1 Contextualização do trabalho .....	3
1.2 Oleos essenciais .....	4
1.2.1 Citotoxicidade.....	5
1.3 Carvona .....	6
1.3.1 Aplicações e potencialidades da carvona .....	7
1.3.2 Atividade biológica da carvona e seus derivados .....	8
1.3.3 Citotoxicidade de derivados da carvona .....	9
1.3.4 Reações mais importantes da carvona.....	9
1.4 <i>Bulnesia sarmientoi</i> .....	12
1.4.1 Guaiol e Bulnesol .....	13
1.4.1.1 Fontes de obtenção .....	13
1.4.1.2 Aplicações .....	13
1.4.1.3 Reações envolvendo guaiol .....	13
1.5 Epoxidação .....	16
1.5.1 A epoxidação .....	16
1.5.2 Reações de epoxidação assimétricas catalíticas .....	19
1.5.2.1 Reações de Epoxidação catalisadas por metais .....	19
1.5.2.2 Reações de epoxidação organocatalisadas.....	20
1.5.2.3 Epoxidação de sistemas $\alpha,\beta$ -insaturados .....	21
1.6 Objetivo deste trabalho .....	25
2. Organocatálise .....	29
2.1. Aspectos gerais .....	29
2.2. O porquê da organocatálise? .....	30
2.3 Catalisadores privilegiados .....	32
2.3.1 Prolina .....	33
2.3.2 Alcalóides de <i>Cinchona</i> .....	35
2.4 Aplicação da organocatálise na Química Medicinal e na Indústria .....	37
2.5 Catálise heterogénea .....	38
2.5.1 Catalisadores à base de zeólitos .....	39
2.5.2 Catalisadores à base de argila .....	40
2.5.3 Outros catalisadores heterogéneos .....	41
3.Publicações.....	43
4. Discussão de resultados .....	73
4.1 Obtenção de derivados de carvona por tratamento com $AlCl_3$ e $H_2O_2$ .....	73

4.1.2 Apresentação e discussão dos resultados.....	75
4.2 Derivados de carvona com ácido p-tolueno sulfônico e NBS .....	81
4.2.1 Apresentação e discussão dos resultados.....	82
4.3 Obtenção de derivados de carvona, guaiol e bulnesol com catalisador e NBS .....	85
4.3.1 Apresentação e discussão dos resultados.....	87
4.3.2 Reações com L-prolina como catalisador .....	89
4.3.3 Reações com Quinina como catalisador .....	91
4.3.4 Reações com Quinidina como catalisador .....	93
4.3.5 Reações com Difenilprolinol como catalisador .....	95
4.3.6 Reações Sem catalisador .....	98
4.3.7 Difração de raios-X e método computacional composto 12 e 13 .....	99
4.3.8 Reações de Guaiol e Bulnesol com catalisador .....	102
4.4.1 Apresentação e discussão dos resultados.....	106
4.5 Atividades Biológicas .....	109
4.5.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH .....	110
4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante frente ao anião superóxido .....	113
4.5.2.1 O anião superóxido num sistema não enzimático .....	113
4.5.2.2 Anião superóxido em sistema biológico .....	115
4.5.2.2.1 Estandarização da técnica para a avaliação da atividade antioxidante..	116
4.5.2.2.1.1 Comparação do controlo negativo com a substância de referência (Quercetina) .....	116
4.5.2.2.1.2 Comparação dos valores de RLU.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> nos anéis expostos a L-NAME, alopurinol e Indometacina.....	117
4.5.2.2.1.3 Comparação dos sinais de RLU.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + L-NAME .....	118
4.5.2.2.1.4 Comparação dos sinais de RLU.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + Indometacina.....	118
4.5.2.2.1.5 Comparação dos sinais de RLU.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + Alopurinol .....	119
4.5.2.2.2 Atividade frente a O <sub>2</sub> * na presença de Lucigenina .....	120
4.5.2.3 Atividade antioxidante frente a NO .....	123
4.5.3 Atividade Vascular .....	124
4.5.3.1 Avaliação do efeito vasodilatador <i>in vitro</i> , em anéis de aorta de ratos com endotélio íntegro.....	124
4.5.3.2 Avaliação do efeito vasodilatador <i>in vitro</i> , em anéis de aorta de ratos com endotélio desnudado .....	125
5. Conclusões.....	128
6. Parte experimental .....	135
6.1 Equipamentos.....	136
6.2 Reagentes .....	137

6.3 Procedimentos reacionais .....	138
6.3.1 Procedimento reacional com AlCl <sub>3</sub> .....	138
6.3.2 Procedimento reacional com p-TsOH e NBS .....	138
6.3.3 Procedimento reacional de carvona com catalisadores .....	139
6.3.4 Procedimento reacional de guaiol e bulnesol com catalisadores .....	140
6.3.5 Procedimento reacional para epoxidação .....	140
6.3.4 Cristalografia do Raio X (Difração de Raios-X) .....	140
6.3.5 Método computacional.....	141
6.4 Procedimento para separação dos compostos das águas mães .....	142
6.5 Procedimento para Atividades Biológicas.....	142
6.5.1 Produtos a estudar.....	142
6.5.2 Biomodelo experimental.....	143
6.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	143
6.5.4 Avaliação da capacidade de remoção do anião superóxido .....	143
6.5.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de eliminação do anião superóxido em sistema de não-enzimático .....	143
6.5.4.2 Atividade antioxidante por deteção do anião superóxido em anéis de aorta.....	144
6.5.4.3 Outras variantes deste método com lucigenina .....	144
6.5.4.4 Avaliação da capacidade de eliminação do óxido nítrico .....	145
6.5.5 Avaliação da atividade vascular .....	145
6.5.5.1 Preparação dos anéis de aorta e obtenção das amostras biológicas .....	145
6.5.5.2 Preparação dos anéis aórticos .....	145
6.5.3 Rastreamento da atividade vascular .....	146
6.5.3.1 Efeito vasodilatador dos produtos naturais na contração induzida por FE em anéis com endotélio intato. ....	146
6.5.3.2 Efeito vasodilatador dos produtos naturais em contração induzida por fenilefrina em anéis com endotélio intacto .....	146
6.6 Caracterização dos produtos .....	147
7. Bibliografia .....	161



## Lista de figuras

Figura 1. Estrutura dos enantiómeros da carvona. ....	7
Figura 2. Estrutura química da cianocarvona, hidroxihidrocarvona, 7,8-epoxicarvona e da 2,3-epoxicarvona. ....	9
Figura 3. Esquema representativo de exemplos de redução da carvona. ....	10
Figura 4. Esquema representativo de exemplos de oxidação da carvona. ....	11
Figura 5. Compostos majoritários da <i>Bulnesia sarmientoi</i> . ....	12
Figura 6. Epóxidos de guaiol. ....	14
Figura 7. Produtos de desidratação do guaiol. ....	15
Figura 8. Produto da oxidação do guaiol. ....	15
Figura 9. Reação entre um alceno e um peroxiácido. ....	16
Figura 10. Mecanismo da reação de epoxidação de alcenos com peroxiácidos. ....	16
Figura 11. Possíveis produtos de epoxidação da R-(-)-carvona. ....	17
Figura 12. Mecanismo de epoxidação de cetonas -insaturadas com hidrotalcita em meio bifásico. ....	18
Figura 13. Epoxidação de Sharpless. ....	19
Figura 14. Epoxidação de Shi. ....	20
Figura 15. Condensação de Darzens organocatalisada. ....	21
Figura 16. Epoxidação através de catálise por transferência de fase. ....	22
Figura 17. Catalisador de Juliá-Colonna. ....	22
Figura 18. Epoxidação via íon imínio/enamina. ....	23
Figura 19. Epoxidação de enonas via ativação não covalente. ....	24
Figura 20. Epoxidação de enais $\alpha$ -substituídos. ....	24
Figura 21. Exemplos de esqueletos carbonados quirais com estrutura privilegiada na catálise assimétrica. ....	33
Figura 22. Características que fazem da L-prolina um organocatalisador bifuncional. ....	34
Figura 23. Aplicação do derivado tetrazólico da L-prolina na reação de Mannich pelo grupo de Ley. ....	34
Figura 24. Reação de alfa-fluorinação desenvolvida por Jorgensen. <sup>24</sup> ....	34
Figura 25. Hidroxilação de cetaminas com novos derivados de prolina. <sup>125</sup> ....	35
Figura 26. Reações de adição de Michael assimétricas catalisadas por fosfano derivado da L-prolina <sup>126</sup> . ....	35
Figura 27. Estruturas químicas dos dois pares de diastereómeros dos alcalóides de Cinchona. ....	37
Figura 28. Catalisador de oxidação ideal. ....	39
Figura 29. Estrutura tridimensional do zeólito, faujasite. ....	40
Figura 30. Fórmulas estruturais de várias argilas. ....	41
Figura 31. Reação original estudada por Baeyer e Villiger, envolvendo a oxidação com monopersulfato de potássio. ....	74
Figura 32. Oxidação de Baeyer-Villiger para (a) formação de um éster a partir de uma cetona acíclica e (b) formação de uma lactona a partir de uma cetona cíclica. ....	74
Figura 33. Produtos resultantes das reações com $AlCl_3$ . ....	75
Figura 34. Produtos resultantes das reações I e II. ....	76
Figura 35. Mecanismo proposto para a síntese do composto 4 a partir da R-carvona (1). ....	77
Figura 36. Produtos resultantes na reação III. ....	78
Figura 37. Produtos resultantes das reações IV e V. ....	78
Figura 38. Produtos resultantes das reações VI e VII. ....	79
Figura 39. Exemplo de reação com NBS. ....	81
Figura 40. Produtos resultantes das reações carvona com ácido p-tolueno sulfônico e NBS. ....	82
Figura 41. Produtos resultantes da reação IX. ....	84
Figura 42. Produtos resultantes da reação X. ....	84
Figura 43. Organocatalisadores frequentemente utilizados em síntese orgânica. ....	86

<b>Figura 44.</b> Estrutura química da quinina (a) e da quinidina (b). .....	87
<b>Figura 45.</b> Estrutura química do difenilprolinol. ....	87
<b>Figura 46.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de catalisadores. ....	88
<b>Figura 47.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador e à temperatura ambiente. ....	89
<b>Figura 48.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador e a 39°C. ....	89
<b>Figura 49.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador, a 39°C e realizada em 3 dias. ....	91
<b>Figura 50.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de quinina a 2% como catalisador, à temperatura ambiente. ....	91
<b>Figura 51.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de quinina a 2% e 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C. ....	92
<b>Figura 52.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de quinidina a 2% e 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C. ....	93
<b>Figura 53.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C. ....	96
<b>Figura 54.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 2% como catalisador, a 39°C. ....	97
<b>Figura 55.</b> Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C. ....	97
<b>Figura 56.</b> Produtos obtidos na reação sem utilização de catalisador a 39°C. ....	99
<b>Figura 57.</b> Produtos obtidos na reação sem utilização de catalisador à temperatura ambiente. ....	99
<b>Figura 58.</b> Estruturas dos compostos 12 e 13 obtidas pela análise de difração de raio-x. ....	100
<b>Figura 59.</b> Varredura da superfície de energia potencial calculada ao longo do C8-C7-C4-C3 da R-carvona em um nível de teoria MP2 / 6-31 + G (d, p). ....	101
<b>Figura 60.</b> Mecanismo proposto para o resultado estereoquímico observado. ....	101
<b>Figura 61.</b> Síntese de epóxidos 7,8-carvona. ....	101
<b>Figura 62.</b> Estrutura dos produtos de partida. ....	102
<b>Figura 63.</b> Mecanismo da reação de epoxidação de um alceno por um peroxiácido. ....	105
<b>Figura 64.</b> Mecanismo da reação de epoxidação de uma cetona $\alpha,\beta$ - insaturada pelo $H_2O_2$ alcalino. ....	105
<b>Figura 65.</b> Produtos obtidos nas reações de epoxidação. ....	107
<b>Figura 66.</b> Representação gráfica da concentração vs % de inibição do DPPH produzido pelos compostos avaliados. ....	112
<b>Figura 67.</b> Curvas de Concentração vs Resposta da % de inibição do anião superóxido num sistema não enzimático. ....	115
<b>Figura 68.</b> Comparação do sinal RLU.mg-1.min-1 do controlo negativo com a quercetina a diferentes concentrações. ....	117
<b>Figura 69.</b> Comparação do sinal RLU.mg-1.min-1 do controlo negativo com diferentes substâncias que inibem enzimas pro-oxidantes. ....	117
<b>Figura 70.</b> Comparação do sinal de RLU.mg-1.min-1 da Quercetina a diferentes concentrações vs L-NAME + quercetina a diferentes concentrações. ....	118
<b>Figura 71.</b> Comparação do sinal de RLU.mg-1.min-1 da Quercetina a diferentes concentrações vs Indometacina + Quercetina a diferentes concentrações. ....	119
<b>Figura 72.</b> Comparação do sinal de RLU.mg-1.min-1 da Quercetina a diferentes concentrações vs Alopurinol + Quercetina a diferentes concentrações. ....	120
<b>Figura 73.</b> Efeito Antioxidante frente ao anião superóxido em anéis de aorta. ....	122
<b>Figura 74.</b> Curvas de Concentração-resposta de sesquiterpenos e terpeno em anéis de aorta de rato, pré contraídos com fenilefrina $3 \times 10^{-6}$ M. ....	125
<b>Figura 75.</b> Avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de rato com endotélio desnudado. ....	126

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Componentes dos óleos essenciais de maior consumo internacional. ....	5
Tabela 2. Exemplos de óleos essenciais testados quanto à sua capacidade citotóxica sobre organismos padrão <sup>6</sup> . ....	6
Tabela 3. Resumo geral das vantagens e desvantagens das três vertentes da catálise assimétrica. ....	32
Tabela 4. Rendimentos obtidos nas reações I e II. ....	76
Tabela 5. Rendimentos obtidos na reação III. ....	78
Tabela 6. Rendimentos obtidos nas reações IV e V. ....	79
Tabela 7. Rendimentos obtidos nas reações VI e VII. ....	80
Tabela 8. Rendimentos obtidos nas reações com p-TsOH e NBS. ....	83
Tabela 9. Rendimentos obtidos nas reações com L-prolina. ....	90
Tabela 10. Rendimentos obtidos nas reações com quinina. ....	92
Tabela 11. Rendimentos obtidos nas reações com quinidina. ....	94
Tabela 12. Rendimentos obtidos nas reações com difenilprolinol. ....	96
Tabela 13. Rendimentos obtidos nas reações sem catalisador. ....	98
Tabela 14. Produtos obtidos nas reações com bulnesol. ....	103
Tabela 15. Rendimentos obtidos nas reações de epoxidação. ....	107
Tabela 16. Eficácia (E <sub>max</sub> ) e potência (EC <sub>50</sub> ) antirradical versus dados de ....	124
Tabela 17. Condições de reação com AlCl <sub>3</sub> utilizando carvona. ....	138
Tabela 18. Condições reacionais das reações com p-TsOH e NBS. ....	139
Tabela 19. Condições reacionais de carvona com catalisadores. ....	139
Tabela 20. Condições de reação. ....	140
Tabela 21. Coordenadas do mínimo global: (MP2/6-31++G(d,p), E(Eh) = -463.43093). ....	142
Tabela 22. Ordem pela qual se adicionaram as soluções mães dos produtos. ....	146



# Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

$^{13}\text{C}$ -RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

$^1\text{H}$ -RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Protão

ACh - Acetilcolina

AIBN - azobisisobutironitrilo

BHA - hidroxianisole butilado

BHT - hidroxitolueno butilado

BPO - peróxido de dibenzoílo

CC - Cromatografia em coluna

CDR - Curva Dose Resposta

COX - Cicloxigenase

DCM - diclorometano

DDT - diclorodifeniltricloroetano

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

$\text{EC}_{50}$  - Potência máxima concentração que promove a extinção de 50% do radical

*E<sub>max</sub>* - *Eficácia Máxima*

EtOAc - acetato de etilo

EtOH - etanol

FE - Felilefrina

H, h - horas

Hz - Hertz

ILAR - Instituto de Recursos Animais de Laboratório

ISO - Organização Internacional de Padrões

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

IV - Infravermelho

J- Constante de acoplamento

MPCBA - ácido meta-cloroperoxibenzóico

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH oxidase - Nicotanamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidase

NBS - n-bromossucinimida

NBT - Nitrotetrazolio

NO - óxido nítrico

Nos - Óxido nítrico sintase desacoplada

NTP - Nitroprussiato de sódio

OD - Densidade Ótica

ONOO<sup>-</sup> - Peróxinitrito

PMS - Metosulfato de Fenazina

Ppm - parte por milhão

p-TsOH - ácido p-toluenosulfônico

RCO<sub>3</sub>H - peroxiácidos

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

T.a - temperatura ambiente

TBTH - Hidreto de tributilestanho

THF - Tetrahidrofurano

TLC- cromatografia em camada fina

XO - Xantina Oxidase

# 1. Introdução e objetivos

*“Muitas vezes as coisas que me pareceram verdadeiras quando comecei a concebê-las tornaram-se falsas quando quis colocá-las sobre o papel.”*

René Descartes



## 1.1 Contextualização do trabalho

Nas últimas décadas, o controlo estereoquímico aplicado na síntese de moléculas quirais tornou-se um dos principais objetivos e de maior interesse entre os químicos orgânicos mundiais, devendo-se grande parte ao facto da quiralidade ser uma das propriedades elementares dos sistemas vivos. A interação específica com os recetores biológicos quirais complementares resulta em diferentes efeitos biológicos, podendo chegar a apresentar resultados dramáticos, tendo em conta para isso “apenas” a configuração absoluta da molécula. Esta é responsável, por exemplo, pela diferença de sabores, de aromas e até mesmo de efeitos farmacológicos/tóxicos associados a um par de enantiómeros. Desta forma, a pureza enantiomérica de um composto é essencial e de uma importância extrema nas mais diversas áreas da química académica e industrial<sup>1</sup>.

Torna-se assim um grande objetivo o desenvolvimento de métodos mais eficientes de obter moléculas enantiomericamente puras, com um menor grau de toxicidade, menor custo associado e com métodos de produção mais simples.

Um dos mais apelativos meios utilizados para este fim é a síntese catalítica assimétrica, a qual revolucionou a química na segunda metade do século XX e que assenta em três principais pilares, a catálise mediada por complexos organometálicos, a biocatálise e, mais recentemente, a organocatálise<sup>2</sup>. É com cada uma destas ferramentas (com as respetivas vantagens e limitações) que os químicos orgânicos trabalham e desenvolvem diariamente novas estratégias e métodos, convergindo, através de cada um destes pilares, para o mesmo objetivo comum: síntese enantio-específica - obtenção sintética de apenas um enantiómero. Dada a elevada importância da síntese de compostos puros opticamente ativos, este objetivo crucial é partilhado pelos vários ramos da indústria, como a indústria farmacêutica, a agroquímica, a de fragrâncias, a alimentar, entre outras<sup>3</sup>.

O desafio científico é imenso, e a comunidade científica responde a essa necessidade da melhor forma. Muitos são os esforços de inúmeros grupos de investigação nesse sentido, e não menos importante, várias são as colaborações interdisciplinares que têm demonstrado ser essenciais na aquisição de novo conhecimento e posterior desenvolvimento de novos catalisadores mais robustos e eficientes, que possam ser utilizados em transformações químicas importantes nas mais diversas áreas.

## 1.2 Oleos essenciais

O uso de óleos e o conhecimento das suas características curativas provêm das civilizações antigas, podendo considerar-se um dos mais antigos métodos de medicina e de cosmética.

Os óleos essenciais são definidos pela Organização Internacional de Padrões (ISO) como produtos obtidos por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca ou por processos mecânicos, adequados, de uma planta ou de partes de uma planta<sup>4</sup>. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, usualmente odoríferas e líquidas ou sólidas à temperatura ambiente. Este tipo de óleo pode ainda ser definido por óleo etéreo ou essências. Estes nomes são baseados em algumas características físicas, bem como no seu aspeto oleoso à temperatura ambiente. No entanto, a sua característica mais acentuada é a volatilidade, o que os distingue dos óleos fixos que são caracterizados por misturas de substâncias lipídicas, normalmente obtidas de sementes<sup>4</sup>. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) e, portanto, extraídos dessas partes, onde são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares<sup>5,6</sup>.

Os óleos essenciais representam apenas uma pequena parte da composição da planta, contudo conferem a esta as características que permitem que as plantas aromáticas sejam utilizadas nas indústrias alimentares, cosméticas e farmacêuticas, na tabela 1 encontram-se os componentes dos óleos essenciais mais utilizados<sup>7</sup>.

As proporções dos componentes que constituem um óleo essencial variam muito, sendo que os principais componentes podem constituir até 85% dos óleos essenciais, enquanto que os restantes componentes podem estar presentes em quantidades residuais<sup>8</sup>. O aroma de cada óleo resulta da combinação dos aromas de todos os componentes, sendo que mesmo os que se apresentam em quantidades residuais podem ter um papel organolético importante a desempenhar<sup>9</sup>.

A grande parte destes apresenta um aroma agradável e intenso, são solúveis em álcoois e solventes orgânicos apolares, contudo, em água são muito pouco solúveis; a pequena parte solúvel em água permite dar o aroma à solução aquosa, que se designa por hidrolato ou água perfumada<sup>10</sup>. As essências de origem vegetal, para além de serem usadas em perfumes, podem ser aplicadas em massagens e podem ser inaladas ou ingeridas por via oral, tal como os medicamentos convencionais. Os óleos essenciais têm uma composição química complexa, podendo estes conter centenas de componentes. A grande maioria dos componentes identificados nos óleos essenciais incluiu terpenos, oxigenados ou não, prevalecendo os monoterpenos e os sesquiterpenos. No entanto compostos fenilpropanóides também são componentes importantes em alguns óleos essenciais<sup>11</sup>.

Tabela 1. Componentes dos óleos essenciais de maior consumo internacional.

Composto	Nome comum	Nome científico
Pineno	Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Mirceno	Pinus	<i>Pinus spp</i>
Mentol	Hortelã	<i>Mentha spp</i>
Eucaliptol	Eucalipto	<i>Eucalyptus spp</i>
Cariofileno	Erva-cidreira-brasileira	<i>Lippia alba</i>
Canfora	Ecanforeira	<i>Cinnamomun camphora</i>
Timol	Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>

A identificação dos componentes dos óleos essenciais é geralmente realizada por dados cromatográficos (índices Kováts, índices de retenção linear, tempo de retenção relativo, bloqueio do tempo de retenção) e / ou por dados espectrais, principalmente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), entre outros<sup>4</sup>.

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na atração de insetos para promover a dispersão do pólen, de sementes ou simplesmente para repelir outros insetos. Além disso, os óleos essenciais também podem atuar como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, herbicidas ou ter efeitos de dissuasão sobre os herbívoros, reduzindo assim o seu apetite por essas plantas<sup>12</sup>. Os óleos essenciais também têm um papel importante na comunicação alelopática entre as plantas<sup>6</sup>. A detecção de algumas das propriedades biológicas necessárias à sobrevivência das plantas tem sido a base para a pesquisa de propriedades similares para o combate de vários microrganismos responsáveis por algumas das doenças infecciosas em seres humanos e animais. Tem sido esta a busca que pretende responder à crescente resistência dos patogênicos aos antibióticos<sup>12</sup>.

### 1.2.1 Citotoxicidade

Devido ao elevado número de componentes, os óleos essenciais parecem não ter células alvo específicas<sup>13</sup>. Os óleos essenciais podem coagular o citoplasma, podendo danificar os lipídios e as proteínas; também a parede celular e a membrana celular podem sofrer danos, levando à lise celular de macromoléculas<sup>5,14</sup>.

A propriedade citotóxica tem um elevado interesse na aplicação dos óleos essenciais, não só para Humanos, mas também contra patogênicos em animais ou parasitas, e também para a preservação de produtos agrícolas ou marinhos. Os óleos essenciais têm uma elevada eficácia contra a grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas, ácaros, larvas, insectos e moluscos<sup>6</sup>.

Existe uma enorme variedade de óleos essenciais ou de compostos neles existentes que foram testados contra uma enorme variedade de organismos (tabela 2).

**Tabela 2.** Exemplos de óleos essenciais testados quanto à sua capacidade citotóxica sobre organismos padrão<sup>6</sup>.

Óleo essencial / componente	Organismo
Carvona	<i>Fusarium sulphureum</i> , <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Candida Albicans</i>
<i>Melissa officinalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Candida albicans</i>
Limoneno	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cânfora	<i>Aspergillus terréus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Penicillium ochrochloron</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Phonopsis helianthi</i> , <i>Trochoderma viride</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i>

Alguns óleos essenciais, ou mais concretamente, alguns dos seus constituintes, podem ser considerados como agentes secundários cancerígenos após a sua ativação no metabolismo. Existem outras moléculas fotossensibilizantes como flavonas, cianinas, porfirinas, hidrocarbonetos que podem causar eritema ou cancro da pele. Estas podem induzir o cancro da pele após uma grande exposição à luz ultravioleta<sup>15,16</sup>.

## 1.3 Carvona

A carvona, também conhecida como p-menta-6,8-dien-2-ona, é uma cetona monoterpénica encontrada na natureza na forma de enantiómeros: (S)-(+)-carvona e (R)-(-)-carvona, figura 1, caracterizada por possuir uma cor amarelo pálida e um odor penetrante, e são os constituintes de variados óleos essenciais. A (S)-(+)-carvona é o constituinte principal do óleo de cominho da espécie vegetal *Carum carvi*<sup>17</sup> e é o responsável pelo odor característico do cominho. A fonte mais conhecida de (R)-(-)-carvona é a hortelã, mais conhecida como *Mentha spicata*, sendo esta

a responsável pelo seu odor característico, este óleo é obtido por destilação a vapor das folhas da planta<sup>17</sup>.

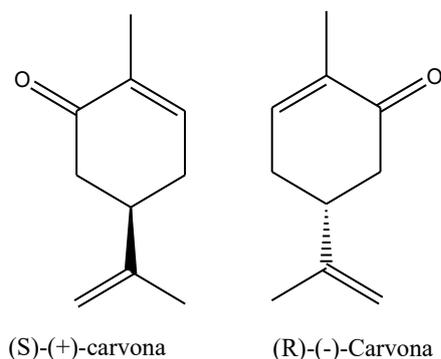


Figura 1. Estrutura dos enantiômeros da carvona.

Devido à presença de um centro quiral, no carbono ligado ao grupo isopropenilo, alguns vegetais biossintetizam a carvona nas suas formas enantioméricas, que podem coexistir na mesma planta nas suas formas racêmicas.

Este composto possui duas ligações C=C, estando uma localizada no grupo isopropenilo da cadeia lateral, e a outra constitui a cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada da ciclohexenona. A primeira ligação C=C é rica em elétrons enquanto a segunda é deficiente em elétrons. Ambos os grupos alceno podem sofrer reações de epoxidação originando epóxidos, podendo necessitar de diferentes condições e reagentes<sup>18</sup>.

### 1.3.1 Aplicações e potencialidades da carvona

A carvona possui atividade inseticida e é utilizada também como aromatizante, edulcorante e inibidor de germinação na indústria. Ambos os enantiômeros da carvona são eficazes frente a um amplo espectro de fungos e bactérias patogênicas, embora cada uma responda de forma diferente. Por exemplo a (R)-(-)-carvona mostrou-se mais eficaz que o seu enantiômero frente a *Campylobacter jejuni* enquanto que a (S)-(+)-carvona foi mais eficaz contra *Listeria monocytogene*<sup>19</sup>. Foi ainda demonstrado o potencial terapêutico da carvona contra infecções por *Candida albicans*, uma vez que poucos medicamentos são eficazes contras essas infecções, a maioria com limitações, em termos de eficácia e efeitos colaterais<sup>19</sup>.

Pouco se conhece quanto ao efeito da carvona no sistema imunológico, porém Raphael e Kuttan<sup>20</sup>, em 2003, demonstraram que a administração prolongada, de baixas doses de carvona em ratos, tipo camundongos, resultou no aumento da produção de leucócitos na medula óssea e no aumento da produção de anticorpos. Outro fator que aponta para o potencial imuno-farmacológico da carvona é o facto de estudos com monoterpenos de estrutura similar apresentar atividade anti-inflamatória e antiasmática<sup>21,22</sup>.

Adicionalmente, apesar da influência da quiralidade desta molécula resultar em diferenças no desencadeamento de algumas respostas biológicas, evidenciadas principalmente em estudos relacionados ao sistema nervoso central, não existem até ao momento, estudos que mostrem o efeito da enantiomeria da carvona no sistema imunológico.

### 1.3.2 Atividade biológica da carvona e seus derivados

Diversos estudos utilizando modelos de animais demonstraram que a carvona pode apresentar diferentes efeitos depressores no sistema nervoso central, tais como, a diminuição da deambulação e a reação ao toque, tal como um aumento do efeito sedativo<sup>23</sup>. Por outro lado, a investigação do grupo de Buchbauer G<sup>24</sup>, sobre o efeito da carvona quando inalada, chegou à conclusão de que a inalação de carvona leva a uma diminuição da atividade motora dos animais.

Num estudo realizado por Costa<sup>25</sup>, verificou que a cianocarvona (figura 2) mostrava potencial antioxidante em testes *in vitro*, devido à sua capacidade de inibir a formação de radicais de hidroxilo, de remover óxido nítrico e de impedir a produção de ácido tiobárbítico. Por outro lado, o mesmo Investigador Costa<sup>26</sup> mostrou ainda que a cianocarvona possuía ainda atividade anticonvulsivante, podendo esta então ser bastante útil na proteção neuronal.

Outro derivado de importância é a hidroxidihidrocarvona (figura 2), composto preparado pela hidratação da carvona. Este composto possui grupos funcionais e uma estrutura bastante semelhante a alguns monoterpenos que têm um efeito depressivo sobre o sistema nervoso central<sup>27</sup>, demonstrou que este derivado tem efeitos antinocicetivos (dependendo da dose administrada).

A 7,8-epoxicarvona tem um efeito anti ulcerativo gástrico *in vivo*. Em comparação com a carvona, esta exibe um efeito menor, indicando assim que a modificação da molécula “mãe” altera a atividade farmacológica<sup>28</sup>.

Por último a 2,3-epoxicarvona é um monoterpeno que é encontrado em diversos óleos essenciais, provenientes de inúmeras espécies de plantas; este produto além de existir naturalmente na natureza pode também ser obtido por síntese orgânica. Pode ter efeitos antidepressivos sobre o sistema nervoso central e também é conhecida pelos seus efeitos antimicrobianos e antioxidantes<sup>29</sup>. Este composto tem quatro isómeros cuja estereoseletividade farmacológica ainda é desconhecida.

Os derivados acima descritos podem ser obtidos utilizando os enantiómeros da carvona como materiais de partida, apesar destes apresentarem diferenças nas suas atividades, devido, possivelmente, à influência da configuração do seu centro estereogénico<sup>30</sup>.

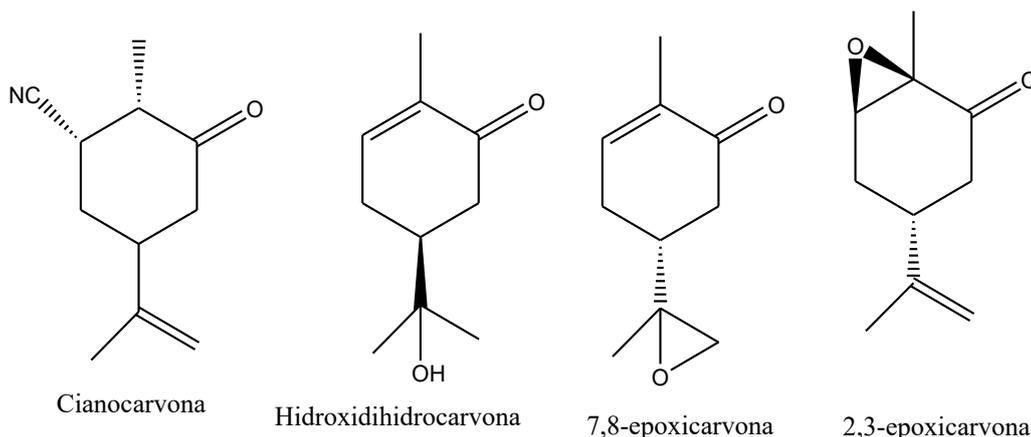


Figura 2. Estrutura química da cianocarvona, hidroxidihidrocarvona, 7,8-epoxicarvona e da 2,3-epoxicarvona.

### 1.3.3 Citotoxicidade de derivados da carvona

Quando o objetivo é avaliar a biocompatibilidade de um material, os primeiros testes a serem realizados são os testes de citotoxicidade *in vitro*. Nestes, para que o estudo possa prosseguir, o produto não pode causar morte celular nem afetar qualquer função celular. Ou seja, quando um composto químico provoca danos celulares graves pode comprometer a viabilidade celular perturbando a integridade estrutural e/ou metabólica das células, conduzindo a uma série de efeitos destrutivos<sup>31</sup>.

Muitos métodos *in vitro* foram normalizados e otimizados para avaliar a citotoxicidade dos biomateriais utilizando culturas celulares. Nestes testes, o material é colocado direta ou indiretamente em contato com uma cultura celular, monitorizando as alterações celulares por diferentes mecanismos, incluindo a incorporação de corantes vitais<sup>32</sup>.

### 1.3.4 Reações mais importantes da carvona

Foram os principais pioneiros na síntese da carvona: Linder e Greenspan (1957)<sup>33</sup> a descrever as primeiras sínteses da carvona a partir de diferentes materiais de partida, neste caso o limoneno como material de partida. Foi já no final dos anos 90 que Hareau<sup>34</sup>, sintetizaram ambos os isômeros da carvona com rendimentos superiores a 90%, a partir da reação de derivados 6-substituídos do (5R)-(tert-butildimetilsiloxi)-2-ciclohexenona e (5S)-(tert-butildimetilsiloxi)-2-ciclohexenona com (2-propenil)<sub>2</sub>Cu(CN)Li<sub>2</sub>, e posterior tratamento dos produtos obtidos com DBU (1.8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno).

Este composto possui duas ligações C=C, estando uma localizada no grupo isopropenilo da cadeia lateral, e a outra constitui a cetona α,β-insaturada da ciclohexenona. A primeira ligação C=C é rica em elétrons enquanto a segunda é deficiente em elétrons. Ambos os grupos alceno podem

sofrer reações de epoxidação originando epóxidos, podendo necessitar de diferentes condições e reagentes<sup>18</sup>.

### • Redução da carvona

Existem três ligações duplas na carvona capazes de se reduzir originando novos compostos. O produto da redução depende das condições e reagentes utilizados (figura 3). A hidrogenação catalítica da carvona (1) pode dar carvomentol (II) ou carvomentona (III). O zinco e ácido acético reduzem a carvona originando a dihidrocarvona (IV). A redução MPV (redução de Meerwein-Ponndorf-Verley) que usa propan-2-ol e isopropóxido de alumínio reduzindo apenas o grupo carbonilo, dando origem ao carveol (V). A hidrazina e o hidróxido de potássio originam o Limoneno (VI) através de redução de WolffKishner.

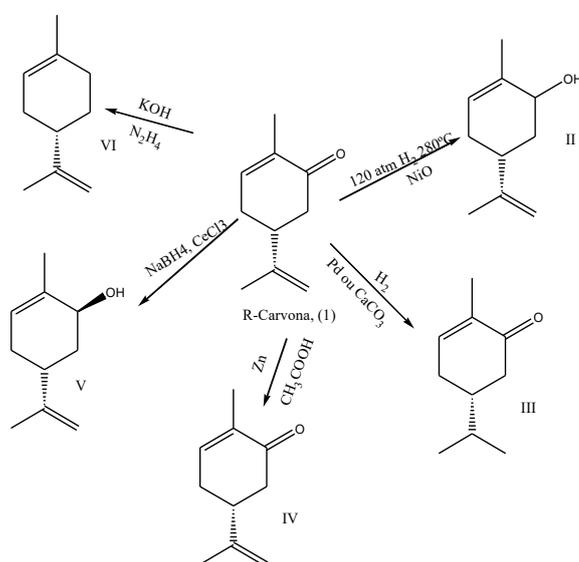


Figura 3. Esquema representativo de exemplos de redução da carvona.

### • Oxidação da carvona

A oxidação da carvona também pode levar a uma variedade de produtos (figura 4). Na presença de uma base, tal como Ba(OH)<sub>2</sub>, a carvona é oxidada pelo oxigênio originando a dicetona (VII). O epóxido (VIII) é formado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A carvona pode sofrer clivagem utilizando ozono seguido por vapor, dando a dilactona (IX), enquanto o KMnO<sub>4</sub> dá o produto (X)<sup>35</sup>.

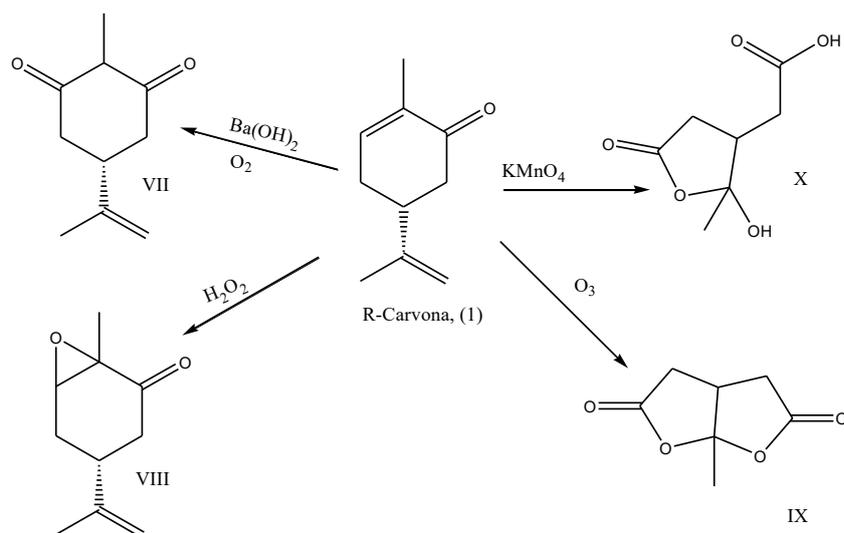


Figura 4. Esquema representativo de exemplos de oxidação da carvona.

As principais reações da carvona baseiam-se, essencialmente, na obtenção dos epóxidos já conhecidos, a 2,3-epoxicarvona e a 7,8-epoxicarvona, estes foram obtidos de reações a partir da carvona utilizando como reagentes:

- MPCBA/  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>18</sup>;
- Utilização de alumina como catalisador e  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>36</sup>;
- Complexo catiónico de manganês<sup>37</sup>;
- Sulfonylperóxi e peroxissulfato<sup>38</sup>; '
- Fosfotungstato substituído por divanádio<sup>39</sup>,  $[\gamma\text{-PW}_{10}\text{O}_{38}\text{V}_2(\mu\text{-OH})_2]^{3-}$ ;
- Complexo Dinuclear de Manganês (IV) com 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano<sup>40</sup>;

Entre outros.

## 1.4 *Bulnesia sarmientoi*

*Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb, é uma planta pertencente à ordem das *Zygophyllaceae*, família das *Zygophyllaceae* e ao género *Bulnesia*. É uma planta endémica da região do Chaco na Argentina e no Paraguai. É também conhecida como *Palo Santo* ou como *Pau-Santo* do Paraguai<sup>41,42,43</sup>.

É uma árvore com uma folhagem bastante verde, com uma altura que pode variar dos 8 aos 20 metros e 30 a 70 cm de diâmetro, produzindo uma madeira aromática de alta densidade (1280 Kg/m<sup>3</sup>)<sup>44</sup>. A sua madeira é considerada de elevada qualidade, contudo, é facilmente inflamável. Aquando da queima desta madeira é libertado um fumo bastante perfumado, sendo esta madeira usada como forma de incenso natural em rituais espirituais. Na indústria, são recuperadas as suas aparas, para posteriormente serem tratadas de modo a ser extraído o seu óleo essencial, designado de óleo de guaiaco. Este é usado como ingrediente em perfumaria, como por exemplo o acetato de guaiol, e em usos medicinais.

O óleo de guaiaco é obtido por destilação a vapor de uma mistura contendo pedaços de madeiras e as suas aparas, obtém-se um óleo semissólido, amarelo esverdeado que funde entre os 40-50°C. Quando fundido, se for deixado à temperatura ambiente, permanece ainda algum tempo no estado líquido, e, posteriormente, solidifica<sup>43</sup>.

O seu óleo apresenta uma enorme complexidade, sendo constituído por um importante número de sesquiterpenos estruturalmente semelhantes e com diversos isómeros. Este óleo é tipicamente isento de monoterpenos e contém níveis elevados de dois álcoois sesquiterpénicos de esqueleto guaiano (figura 5): o Guaiol e o Bulnesol, e, em menor quantidade, o Hanamyol, que é um derivado da ciclização do epóxido do bulnesol<sup>43</sup>.

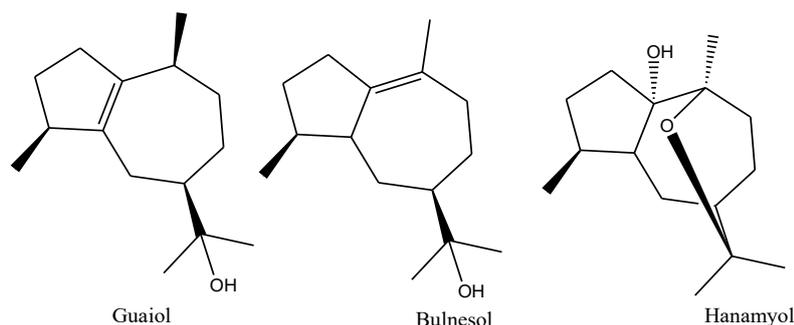


Figura 5. Compostos maioritários da *Bulnesia sarmientoi*.

No Paraguai o *Palo Santo* (árvore sagrada) é usado para variados fins, tais como domésticos, industriais e medicinais. Como usos domésticos é feita a queima da madeira de modo a atuar

como repelente de insetos; na indústria, é usado para produção de cercas de animais, construção de móveis ou para produção de artesanato; finalmente nos processos medicinais é utilizado através de infusões de folhas ou cascas de modo a funcionar como agente de limpeza de sangue, sudorífico, diurético, para tratamento da lepra, do reumatismo e para tratamento das feridas da pele; porém é também utilizada a infusão para aliviar casos de tensão ou depressão<sup>41-45</sup>.

## 1.4.1 Guaiol e Bulnesol

### 1.4.1.1 Fontes de obtenção

O guaiol e o bulnesol são isômeros e os principais constituintes da planta de *B. sarmientoi* e são álcoois terciários. São componentes isolados do óleo de guaiaco através de cromatografia em coluna, usando proporções de polaridade diferentes de n-hexano e de acetato de etilo.

O guaiol e bulnesol não são só extraídos da *B. sarmientoi*, e são também compostos maioritários presentes na *Callitris glaucophylla* (pinho cipreste) planta nativa da Nova Caledônia (Arquipélago da Oceânia) e a sua caracterização é efetuada por análise GC-MS<sup>46</sup>. O guaiol, por sua vez pode ser encontrado sem o seu isômero, bulnesol, em plantas como a: *Calycorectes sollowianus*, planta da América do Sul, que além de ter na sua principal composição o guaiol tem ainda β-cariofileno. Estes dados de análise foram obtidos por análise GC-MS. É ainda um dos principais componentes obtidos por análise GC-MS de *Salvia runcinata*, planta sul-africana. Pode ainda ser encontrado como composto maioritário em *Salvia lanígera*<sup>47</sup> e em *Helitta longifoliata*<sup>48,49</sup>.

Em contrapartida, o bulnesol pode ser encontrado em muitas outras plantas, mas numa percentagem muito pequena e também só por análise GC-MS, das quais se destaca: *Chromolaena odorata*, planta nativa da América do Norte<sup>50</sup>.

### 1.4.1.2 Aplicações

O guaiol e o bulnesol podem ter uma enorme diversidade de aplicação, desde anti-repelente fungicida, antiparasitário, entre outros<sup>12</sup>.

Alguns derivados dos constituintes da *B. sarmientoi* possuem um grande valor agregado - por exemplo, o acetato de guaiol que é utilizado como fixador na produção de perfumes. Podem também ser utilizados na preparação de azulenos para a indústria da perfumaria<sup>42,43</sup>.

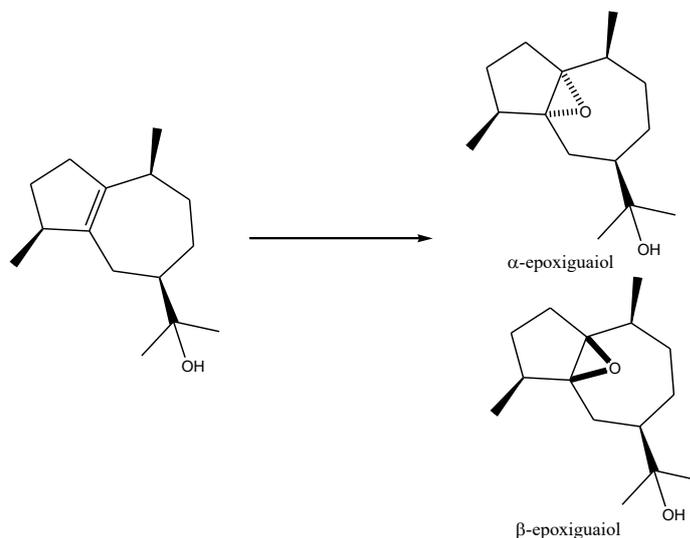
### 1.4.1.3 Reações envolvendo guaiol

O guaiol e o bulnesol são produtos bastantes instáveis e de difícil manuseamento, em termos reacionais.

A preparação de novos derivados destes produtos foi estudada durante algumas décadas, porém nos últimos anos poucas têm sido as tentativas de transformar este em novos derivados. Os

principais tipos de reações realizadas sobre estes produtos são a epoxidação, desidratação e oxidação<sup>51</sup>.

No caso das reações de epoxidação o principal reagente utilizado é o MPCBA. Um exemplo deste tipo de reação é o uso de guaiol para obtenção do  $\alpha$ - epóxido e  $\beta$ -epóxido de guaiol, utilizando o MPCBA<sup>52</sup> (figura 6).

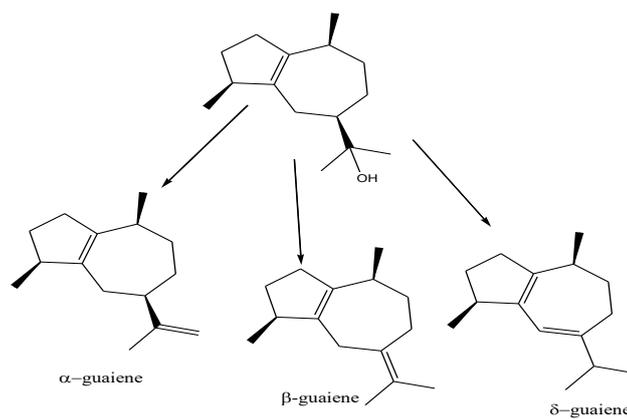


**Figura 6.** Epóxidos de guaiol.

Quando o guaiol é submetido a condições de desidratação utilizando diferentes tipos de reagentes, em contrapartida com a epoxidação que só é mais eficaz com o MPCBA, e diversas condições reacionais pode-se obter produtos como:  $\alpha$ -guaieno,  $\beta$ -guaieno,  $\delta$ -guaieno<sup>53,54</sup> (figura 7). Para a obtenção deste tipo de produtos podem ser utilizados como reagentes: Cloreto de mesilo / Trietilamina, Tricloreto de fosforilo / Piridina, Ácido sulfúrico, Ácido perclorídrico / ácido acético e Ácido polifosfórico.

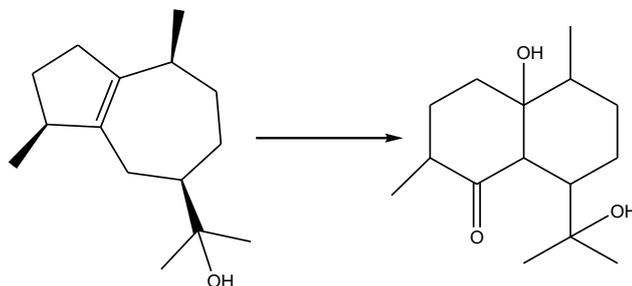
A oxidação do guaiol foi descrita com o uso de permanganato com outros reagentes de modo a obter novos derivados oxidados do guaiol<sup>55</sup>. As reações que foram realizadas utilizaram como reagentes:

- Permanganato em solução aquosa de acetona
- Permanganato em solução aquosa de Glyme



**Figura 7.** Produtos de desidratação do guaiol.

Com o uso destes e de outros reagentes o único produto obtido foi uma cetona que apresentava uma configuração química diferente do produto inicial (figura 8), observando assim que este tipo de reagente obriga o guaiol a sofrer uma completa modificação estrutural e podendo levar à obtenção de produtos de degradação, uma vez que o guaiol é um produto bastante instável tem uma enorme capacidade de degradação.



**Figura 8.** Produto da oxidação do guaiol.

# 1.5 Epoxidação

## 1.5.1 A epoxidação

Os epóxidos são éteres cíclicos com anéis de três membros, que segundo a nomenclatura IUPAC são designados de oxiranos. Estes são compostos químicos muito reativos devido à alta reatividade do anel oxirano. Apresentam elevado interesse na síntese química uma vez que, são intermediários de elevada importância.

O método mais largamente utilizado para a síntese de epóxidos é a reação de um alceno com um peroxiácido (algumas vezes chamado simplesmente de perácido), podendo ser, também, preparados através da oxidação catalítica do etileno ou tratamento básico de halohidrinás<sup>56</sup>.

Na figura 9 observa-se um exemplo de epoxidação, através da reação de um alceno e um peroxiácido, originando um epóxido e um ácido carboxílico<sup>57</sup>.

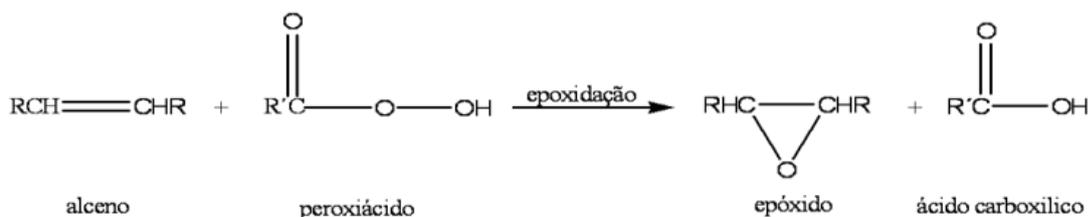


Figura 9. Reação entre um alceno e um peroxiácido.

Nesta reação, o peroxiácido transfere um átomo de oxigênio para o alceno num mecanismo cíclico de etapa única<sup>57</sup>, formando um complexo de transição bicíclico. A velocidade da reação aumenta para alkenos substituídos com grupos doadores de elétrons, tais como grupos alquila, diminuindo significativamente para grupos receptores de elétrons<sup>57</sup>. O mecanismo proposto está representado na figura 10.

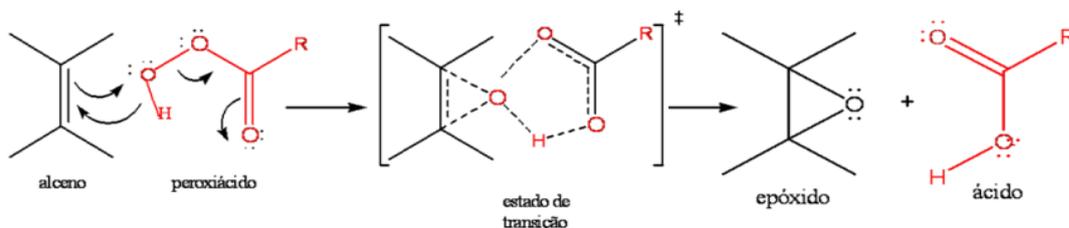


Figura 10. Mecanismo da reação de epoxidação de alkenos com peroxiácidos.

A conversão de alkenos deficientes em elétrons, como é o caso das cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, em epóxidos ( $\alpha,\beta$ -epóxicetonas) é extremamente útil nas sínteses orgânicas, devido à transformação

dos grupos funcionais e à utilidade sintética dos intermediários resultantes de transformações posteriores de cetonas. A epoxidação destes compostos é geralmente realizada com  $H_2O_2$  sob condições altamente alcalinas, usando bases ou sais, como o NaOH e o KOH ou  $Na_2CO_3$  e  $K_2CO_3$ . O uso dessas bases é indesejável por serem perigosas, levando à produção de uma vasta quantidade de resíduos<sup>18,58,59</sup>.

A seletividade da reação de epoxidação pode ser facilmente controlada através da escolha adequada de reagentes. Os peroxiácidos e o  $H_2O_2$  alcalino são dois reagentes geralmente utilizados nas reações de epoxidação, sendo que os peroxiácidos atuam melhor com alcenos ricos em eletrões, enquanto o  $H_2O_2$  alcalino reage preferencialmente com o eletrão deficiente de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas e de aldeídos<sup>60</sup>. A epoxidação de alcenos com ácido m-cloroperbenzóico (MPCBA) e  $H_2O_2$  alcalino tem sido aplicada ao longo dos anos. A seletividade dos respetivos peroxiácidos e  $H_2O_2$  alcalino, na epoxidação de alcenos ricos em eletrões e compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, pode ser demonstrada através da escolha de um substrato orgânico que contenha ambas as funcionalidades. Um substrato ideal para o ensaio é a (R)-(-) carvona. As reações da (R)-(-)-carvona com MPCBA e  $H_2O_2$  alcalino foram estabelecidas de modo a serem regiospecíficas com bons rendimentos de reação (figura 11) podendo originar a 7,8-epoxicarvona, a 2,3-epoxicarvona e a (1,6),(8,9)- diepoxicarvona. As posições dos anéis oxirano recém-formados podem ser facilmente identificados por espectroscopia de RMN de  $^1H$ <sup>18</sup>.

Com a crescente preocupação ambiental, o desenvolvimento de um "protocolo verde" usando um "oxidante verde", como o  $H_2O_2$ , numa combinação com catalisadores sólidos reutilizáveis, tem apresentado elevado interesse. No entanto, a substituição de bases líquidas por catalisadores básicos sólidos tem como vantagem a diminuição de problemas relacionados com a corrosão e o meio ambiente, permitindo a fácil separação e recuperação do catalisador<sup>18,59,60</sup>.

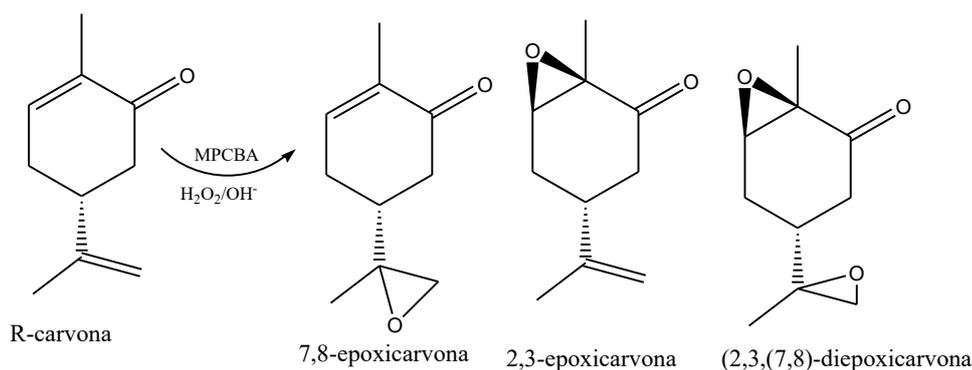


Figura 11. Possíveis produtos de epoxidação da R-(-)-carvona.

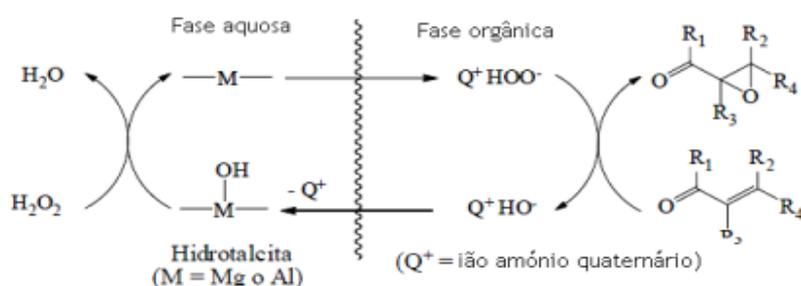
Os peroxiácidos ( $RCO_3H$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) são dois reagentes muito utilizados na epoxidação. Os peroxiácidos funcionam muito bem em reações com alcenos bastante ricos em eletrões; enquanto que o peróxido de hidrogénio é, usualmente, seletivo para os alcenos com défice de eletrões, como é o caso de cetonas e aldeídos,  $\alpha,\beta$  insaturados<sup>18</sup>. A seletividade destes

reagentes, em epoxidação, pode ser facilmente demonstrada pela escolha de um substrato que contenha na sua estrutura as duas funcionalidades, como é o caso da carvona<sup>18</sup>.

Nos últimos anos, a epoxidação seletiva e eficiente de alcenos tem atingido uma investigação considerável, pois os epóxidos resultantes são intermediários versáteis em diversas sínteses orgânicas, permitindo assim a sua aplicação na preparação de uma grande variedade produtos comerciais com grande interesse<sup>61</sup>. Existe também um elevado interesse no desenvolvimento de catalisador, que sejam mais estáveis, de modo a que possam ser utilizados na conhecida “química verde”<sup>62</sup>, de modo a reduzir a quantidade de subprodutos e o impacto ambiental do processo de síntese, levando assim ao uso de solventes não poluentes e ao uso de peróxido de hidrogénio como oxidante, uma vez que este é de fácil obtenção e o seu único subproduto é a água<sup>63</sup>.

Vários catalisadores heterogêneos básicos têm sido propostos para a epoxidação de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, tais como, suportes heteropoliácidos, materiais que contêm iões de titânio e hidrotalcitas, sendo a hidrotalcita a mais estudada<sup>64</sup>.

A hidrotalcita,  $Mg_{10}Al_2(OH)_{24}CO_3$ , na presença de um oxidante, constituído por  $H_2O_2$  e cianeto, tem uma alta atividade catalítica na epoxidação de alcenos não funcionalizados. Nesta epoxidação, o  $H_2O_2$  reage com o grupo hidroxilo na superfície da hidrotalcita formando uma espécie aniônica, o perhidroxilo ( $HOO^-$ ) que, por sua vez, ataca o nitrilo nucleofilicamente, originando um ácido peroxicarboxílico como oxidante intermediário ativo (figura 12)<sup>60</sup>.



**Figura 12.** Mecanismo de epoxidação de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas com hidrotalcita em meio bifásico.

A atividade deste catalisador pode ser melhorada através de um sistema líquido bifásico, formado por uma fase aquosa, onde o oxidante e o catalisador estão presentes, e uma fase orgânica, contendo o substrato e os produtos da reação. Este sistema exige um surfactante catiónico (DTMA = brometo de n-dodeciltrimetilamónio), que atua como reagente de transferência de fase e promove a epoxidação. A atividade pode ainda ser melhorada com a incorporação de aniões terc-butóxido nos intercalares da hidrotalcita por troca iónica, fornecendo uma melhoria significativa nas características básicas destes sólidos, tendo sido testados em diversas reações, incluindo na epoxidação de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas<sup>59</sup>. O zeólito TS-1 (titanosilicato-1) é um exemplo de um material que contém iões titânio. Incorpora Ti na estrutura da silicalite, sendo eficaz na oxidação de uma variedade de

pequenos substratos quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é usado como oxidante. Embora os zeólitos apresentem seletividade de forma notável, a difusão dos reagentes e produtos através da estrutura de poros é muitas vezes prejudicada<sup>65</sup>.

## 1.5.2 Reações de epoxidação assimétricas catalíticas

A reação de epoxidação assimétrica catalítica, é uma transformação bastante importante na química orgânica, isto uma vez que esta cria dois novos centros estereogênicos inseridos num altamente reativo, local onde se forma o epóxido. Nos últimos 30 anos têm ocorrido enormes avanços no desenvolvimento de métodos catalíticos para a formação de epóxidos, com elevada pureza enantiomérica<sup>65</sup>.

O elevado interesse na síntese estereo-controlada de epóxidos é devido à versatilidade que estes compostos apresentam como *building blocks*. A sua abertura é uma estratégia sintética bastante utilizada na síntese de produtos naturais e de outros compostos de interesse, como é o caso das lactonas<sup>66</sup>, das ozaxolidinonas<sup>67</sup> e dos tetrahidrofuranos<sup>68</sup>. Além disso, muitos compostos naturais possuem um epóxido que é uma parte fundamental da estrutura responsável pela atividade biológica<sup>69</sup>.

### 1.5.2.1 Reações de Epoxidação catalisadas por metais

Metais como o manganésio, o ferro, o titânio e a platina, são combinados com ligantes quirais, principalmente compostos azotados, são utilizados como catalisadores na síntese estereoseletiva de epóxidos a partir de alcenos<sup>70</sup>. A primeira reação de epoxidação assimétrica catalisada por um metal foi reportada por Katsuki e Sharpless em 1980<sup>71</sup> e é amplamente explorada na síntese orgânica. Atualmente conhecida como epoxidação de Sharpless, esta reação utiliza a epoxidação enantiosseletiva de álcoois alílicos pró-quirais aplicando  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$  como catalisador e t-BuOOH como o agente oxidante e um derivado de tartarato como indutor assimétrico figura 13. Este sistema catalítico permite a epoxidação de uma vasta gama de álcoois alílicos com bons rendimentos e com excessos enantioméricos superiores a 90%<sup>72</sup>. Adicionalmente, se o derivado de tartarato for enantiomericamente puro é possível obter-se os dois enantiómeros do epóxido a partir do mesmo substrato<sup>73</sup>.

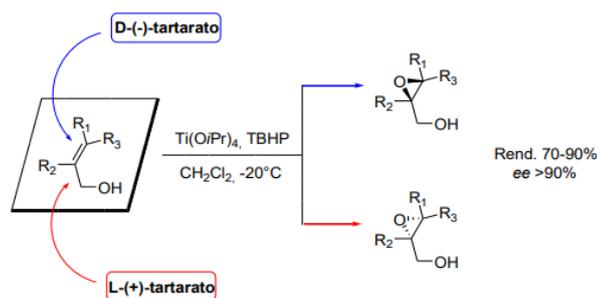


Figura 13. Epoxidação de Sharpless.

### 1.5.2.2 Reações de epoxidação organocatalisadas

As reações de epoxidação têm sido amplamente estudadas através da organocatálise. Shi e os seus colaboradores<sup>74</sup> descreveram a síntese estero-controlada de epóxidos a partir de diversos alcenos, nas quais utilizaram organocatalisadores quirais derivados de açúcar, como a frutose e a glucose, compostos que contêm grupos cetona na sua estrutura (figura 14). Nesta epoxidação, o agente oxidante vai oxidar a cetona formando a espécie reativa *in situ*, ou seja, um dioxirano quiral. Esta, por sua vez transfere o oxigénio para o alceno, resultando em epóxidos com elevados excessos enantioméricos. Na epoxidação de Shi é muito importante a utilização de um tampão que mantenha o pH básico, de modo a evitar uma reação lateral, reação de oxidação de Baeyer-Villiger, que destrói o catalisador, e aumenta a nucleofilicidade do oxónio e, conseqüentemente, a velocidade de reação<sup>75</sup>.

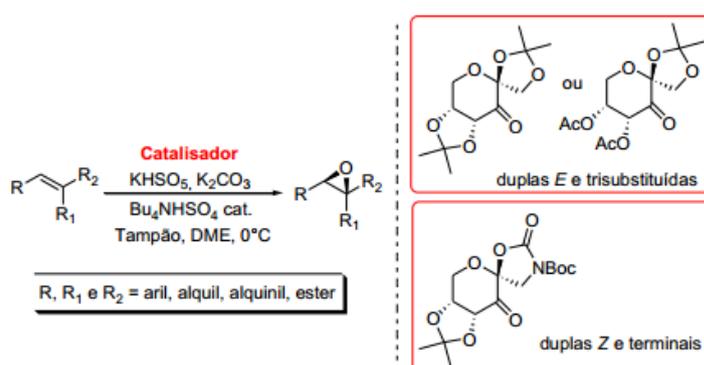


Figura 14. Epoxidação de Shi.

Diversos organocatalisadores, baseados no trabalho de Shi, têm sido reportados<sup>75</sup>. As oxaziridinas<sup>76</sup> e os sais de oxaziridínio<sup>77</sup> vêm sendo utilizados como catalisadores em reações de epoxidação de alcenos, porém os rendimentos obtidos e os excessos enantioméricos são mais baixos que os obtidos pela epoxidação de Shi.

Adicionalmente, existem duas reações clássicas de epoxidação que também tiveram as suas versões catalíticas descritas através da organocatálise por transferência de fase: a condensação de Darzens<sup>78</sup> e a epoxidação de Corey-Chaykovsky<sup>79</sup>.

Na epoxidação de Darzen<sup>79</sup>, existe a formação *in situ* de um enolato a partir de um composto  $\alpha$ -halocarbonílico e de uma base (figura 15). Seguidamente, ocorre a troca do contra-íão do enolato com o sal quaternário quiral de amónio, catalisador, formando assim um enolato quiral. Este reage com um aldeído formando um  $\alpha$ -alcoxialeto (produto aldólico). Este é um produto intermediário que cicliza espontaneamente, através do conformero antiperiplanar, formando o epóxido anti<sup>79</sup>.

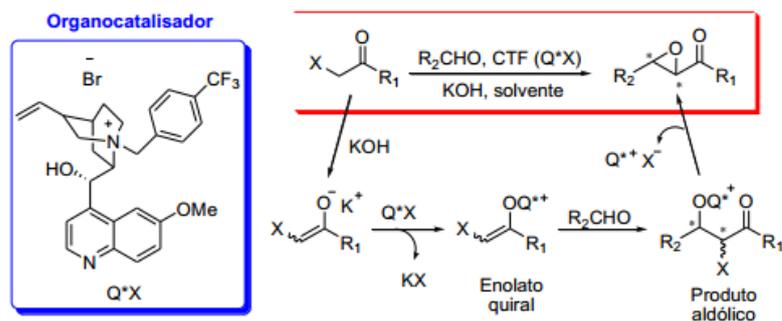


Figura 15. Condensação de Darzens organocatalisada.

A versão organocatalisada da reação de Corey-Chaykovsky<sup>80</sup> foi descrita utilizando como catalisadores ílidas de enxofre quirais, formandas *in situ* a partir de sulfetos de cânfora. Porém, os excessos enantioméricos reportados são considerados razoáveis, isto é, cerca de 47%<sup>80</sup>.

Recentemente, Miller e os seus colaboradores<sup>80</sup> reportaram o emprego de peróxidos quirais como catalisadores na epoxidação de alcenos. Os peróxidos quirais são formados *in situ* a partir de peptídeos de baixo peso molecular, e com a utilização de um agente oxidante, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta metodologia permite a epoxidação de diversos alcenos com elevados rendimentos e excessos enantioméricos<sup>81</sup>.

### 1.5.2.3 Epoxidação de sistemas $\alpha,\beta$ -insaturados

Apesar de alguns métodos para a epoxidação enantioselectiva de alcenos terem sido explorados, eficientemente, nas últimas três décadas, o desenvolvimento de metodologias para a epoxidação de alcenos electrodeficientes, como as enonas e os enais, com elevado estéreo-controlo foram apenas desenvolvidas na última década. Nestes casos, é necessário utilizar um agente oxidante nucleofílico para que a epoxidação possa ocorrer<sup>81</sup>.

Na epoxidação de calconas e Z-enonas destacam-se derivados de alcalóides, como a quinina e a cinchonina, na forma de sais de amónio. Esta metodologia é baseada na catálise por transferência de fase, na qual um par iónico quiral é formado entre o organocatalisador e a espécie oxidante, como por ser observado na figura 16<sup>82</sup>. De acordo com Corey e os seus colaboradores<sup>83</sup>, há uma aproximação do hipoclorito pela face mais acessível, formando um par iónico com o azoto quaternário (R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) do catalisador. Neste complexo, a calcona posiciona-se de maneira que o oxigénio carbonílico fique o mais próximo possível do catião. Dessa forma, o oxigénio nucleofílico do ClO<sup>-</sup> fica próximo do carbono  $\beta$  da enona permitindo a epoxidação nucleofílica via adição conjugada.

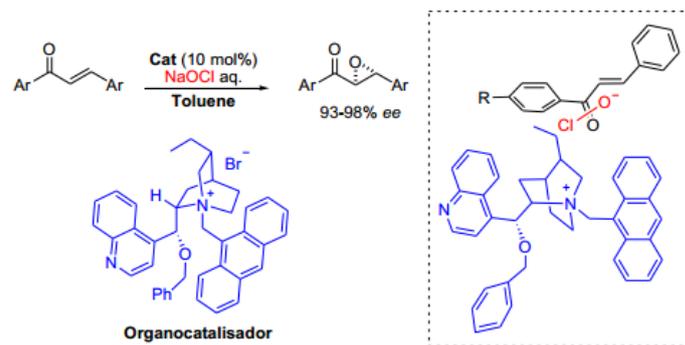


Figura 16. Epoxidação através de catálise por transferência de fase.

A primeira epoxidação assimétrica de calconas sob condições de catálise por transferência de fase foi reportada em meados de 1970 por Wynberg e os seus colaboradores<sup>83</sup>. Este grupo obteve excessos enantioméricos de até 55% empregando derivados do alcalóide cinchonina. Somente em 1999, Corey e os seus colaboradores conseguiram obter elevados níveis de enantioseleção para esta reação. Desde então, inúmeros pesquisadores têm desenvolvido novos organocatalisadores baseados em sais de amônio quaternário quiral e utilizado eficientemente em reações de epoxidação catalisadas por transferência de fase<sup>84</sup>.

Adicionalmente, as enonas acíclicas podem ser epoxidadas com elevados níveis de enantioseleção empregando o poliaminoácido mostrado na figura 17. Apesar do peso molecular deste polímero derivado da alanina ou da leucina ser elevado, ele é considerado um organocatalisador. Estas reações, conhecidas como epoxidação de Juliá-Colonna<sup>85</sup>, foram descritas inicialmente em 1980, e apesar de epoxidarem calconas com bons a excelentes excessos enantioméricos (50-99%)<sup>86</sup>, não foram muito utilizadas por um período por apresentarem longo tempo reacional, decomposição do agente oxidante e difícil extração.

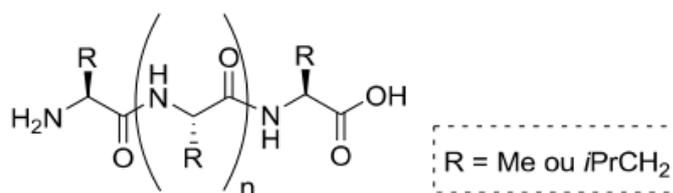


Figura 17. Catalisador de Juliá-Colonna.

Em 1997, Roberts e os colaboradores solucionaram os problemas da reação de Juliá, na qual imobilizaram o poliaminoácido derivado da leucina e utilizaram o mesmo em condições não aquosas. Assim, utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ureia em THF, e a base orgânica 2,3-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU), a epoxidação ocorre rapidamente e com elevados níveis de enantioseleção (83-95% de excesso enantioméricos em 30 minutos)<sup>87</sup>.

Os dois trabalhos pioneiros na epoxidação assimétrica de aldeídos conjugados empregando organocatálise foram publicados em 2005 por Jorgensen e os seus colaboradores<sup>88</sup>. No trabalho deles, é descrita a utilização de um organocatalisador derivado da prolina na epoxidação de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados com elevados rendimentos e excessos enantioméricos (figura 18, lado direito)<sup>89</sup>. Este organocatalisador ativa o enal por meio da formação de um íão imínio, que é epoxidado pelo peróxido de hidrogénio, um oxidante nucleofílico fraco (ativação covalente).

No ano seguinte MacMillan e os seus colaboradores<sup>89</sup> reportaram a epoxidação de enais utilizando sais de imidazolidinonas quirais como catalisadores e iodosobenzeno como agente oxidante, através da ativação covalente do substrato via íão imínio (figura 18, lado esquerdo)<sup>90</sup>. Recentemente, este mesmo autor reportou a síntese de epóxidos quirais terminais utilizando a organocatálise via ativação SOMO<sup>90</sup>.

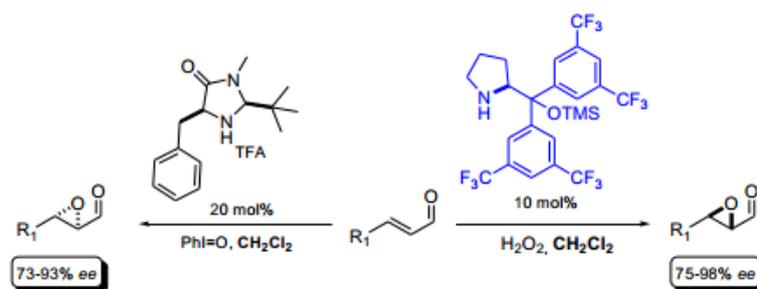


Figura 18. Epoxidação via íão imínio/enamina.

Nas duas reações mostradas acima, os autores fazem uso de uma reação organocatalítica dupla em cascata via íminio/enamina quirais, a qual permite o controlo simultâneo de dois estereocentros numa única etapa.

Adicionalmente, em 2006 Córdova e os seus colaboradores<sup>91</sup> sintetizaram diferentes catalisadores de Jorgensen, e obtivera bons resultados na epoxidação de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

Em 2006, Lattanzi e os seus colaboradores<sup>92</sup>, reportaram a utilização de amino-álcoois derivados da prolina na epoxidação de calconas (figura 19)<sup>93</sup>, resultando nos correspondentes epóxidos com rendimentos e excessos enantioméricos bons. Esta mesma autora estudou diversos  $\beta$ -amino-álcoois como catalisadores e expandiu a sua metodologia para a epoxidação de outras enonas e calconas  $\alpha$ -substituídas<sup>93</sup>.

Recentemente, uma publicação reforçou através de estudos teóricos, a hipótese de que o mecanismo que havia sido proposto na literatura para a reação de epoxidação de enonas organocatalisadas por  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diarilprolinóis<sup>94</sup>. No mesmo, o substrato é ativado pelo catalisador de maneira não covalente, através de interações do tipo ligação de hidrogénio.

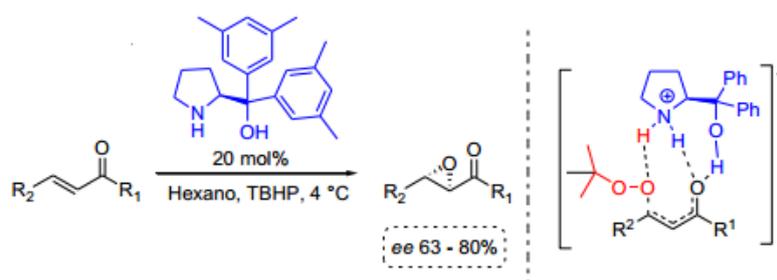


Figura 19. Epoxidação de enonas via ativação não covalente.

Recentemente, List e os seus colaboradores<sup>95</sup> descreveram a epoxidação assimétrica de enais utilizando sais de amónio quirais com ácidos de Bronsted quirais (fosfatos). Nestas reações, ocorre a formação do ião imínio aquiral e o controlo da estereoquímica da reação é direcionado pelo contra-ião quiral durante a formação do epóxido.

Este mesmo autor publicou em 2010, a síntese assimétrica de epóxidos a partir de aldeídos conjugados  $\alpha$ -substituídos utilizando aminas quirais derivadas da cinchonina como catalisadores e ácidos fosfóricos quirais como co-catalisadores (figura 20)<sup>96</sup>. Este sistema resultou em bons excessos enantioméricos, suprimindo a lacuna existente no que diz respeito à epoxidação de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados  $\alpha$ -substituídos.

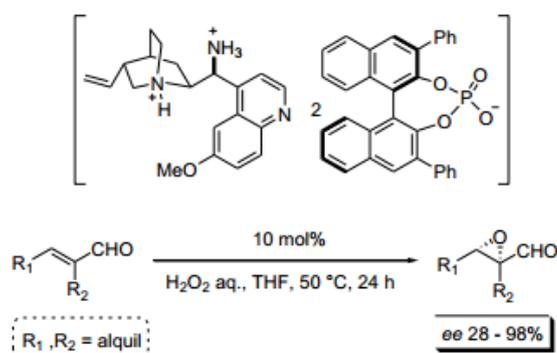


Figura 20. Epoxidação de enais  $\alpha$ -substituídos.

Apesar da reação de epoxidação de sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados ainda estar a ser amplamente estudada via organocatálise com diferentes catalisadores, o desenvolvimento de sistemas catalíticos brandos, eficientes e que esteja, de acordo com os princípios da Química Verde ainda representa um desafio dentro das reações de epoxidação organocatalisadas.

## 1.6 Objetivo deste trabalho

A carvona é um produto natural frequentemente usado como material de partida para a síntese de outros compostos de origem natural<sup>97</sup>. O interesse na molécula de carvona como “*Chiral pool*” é baseado na presença de um carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado num anel de ciclohexano com um centro quiral e uma dupla ligação extra na cadeia isopropílica<sup>98</sup>. A epoxidação regiospecífica da carvona tem sido um clássico na química orgânica<sup>99</sup>. A epoxidação da carvona na ligação dupla interna foi obtida em uma reação diastereoseletiva controlada pelo centro quiral em condições básicas. Entretanto, quando realizada a epoxidação do grupo isopropilideno com mCPBA, não é obtida a diastereosseletividade<sup>100</sup>. Recentemente, foram descritas aplicações biológicas muito interessantes da mistura de carvona com os epóxidos 7,8-epóxicarvona, aplicações como anti-inflamatórias<sup>101</sup>, antifúngicas e fitotóxicas<sup>102</sup>. Para obter estes derivados epoxidados, os oxidantes orgânicos usados para a reação de epoxidação são bastante caros, têm que ser usados de maneira estequiométrica e mesmo nessas condições os rendimentos da reação são bastante pequenos. Por estas razões, o interesse na síntese dos 7,8-epóxidos de carvona com catálise aumentou. Muitos metais têm sido utilizados nesta reação de oxidação catalisada: gálio<sup>104</sup>, alumínio<sup>103</sup>, vanádio e tungstênio<sup>104</sup>, e metais di- ou tetracoordenados com diaminas principalmente manganês<sup>98</sup> ou ferro<sup>105</sup>, ou quitosana à base de manganês, cobre, cobalto ou níquel<sup>106</sup>. Em todos os casos, a diastereosseletividade era muito pequena, ou mesmo insignificante. Nos últimos anos, tem havido grande interesse no uso de química mais verde para essa oxidação e foram alcançados por métodos quimioenzimáticos<sup>107</sup>, ou com hidrotalcitas e peróxido de hidrogênio<sup>108</sup>. Outra estratégia foi a utilização de NBS em DMSO e posterior adição de bases<sup>109</sup>. Em todos esses casos, não foi encontrada diastereosseletividade.

O principal objetivo deste trabalho de doutoramento foi de encontro a essa necessidade atual. Utilizando, principalmente, a carvona como produto de partida para a obtenção de novos compostos que possam vir a ter aplicações biológicas. Nesse sentido, propusemo-nos a sintetizar produtos derivados de carvona, guaiol e bulnesol a partir de organocatalisadores, especialmente a L-prolina, quinina, quinidina e difenilprolinol.

Utilizando catalisadores de fácil manuseio e de fácil obtenção. Estes catalisadores têm vindo a ser cada vez mais aplicados na síntese, isto porque, aumentam a capacidade de conversão do produto de partida, otimizando assim os rendimentos obtidos e na maioria dos casos otimizando também o tempo de reação. Contudo, a escolha deste permite ainda a redução da utilização de reagentes agressivos à saúde ou meio ambiente.

No entanto para nós a obtenção de produtos derivados de reações catalíticas não é tudo, ou seja, após a obtenção desses produtos o interesse deste trabalho leva a que seja aplicada uma nova síntese de obtenção dos epóxidos das carvona, isto é, utilizar os produtos derivados para a possível obtenção dos produtos que nunca foram possíveis de isolar separados. Isto leva-nos a um caminho de inovação para a obtenção dos conhecidos epóxidos da carvona.



## 2. Organocatalisadores

“Um dos requisitos fundamentais do verdadeiro cientista é a humildade. Ela baseia-se na certeza de que as nossas mais sólidas convicções se diluirão em algum momento do futuro.”

*Flávio Gikovate*



## 2. Organocatálise

### 2.1. Aspetos gerais

Um dos objetivos principais para os químicos orgânicos reside no estudo e desenvolvimento de métodos eficazes que possibilitem a obtenção de compostos opticamente puros devido às propriedades que cada enantiómero de mistura racémica apresenta<sup>110</sup>. Hoje em dia a obtenção de compostos enantiomericamente puros pode-se realizar por duas formas: resolução de racematos ou síntese assimétrica. Em termos de escala industrial, com algumas exceções, os compostos enantiopuros são usualmente obtidos por resolução de misturas racémicas, no entanto este processo revela lacunas relativamente graves<sup>111</sup>. O tempo utilizado neste processo e a limitação de rendimento na obtenção de um enantiómero, fixa-se usualmente nos 50%, levando a um elevado desperdício de material orgânico<sup>112</sup>. Assim, deste modo, a síntese assimétrica, que se pode dividir numa abordagem estequiométrica ou catalítica, tem vindo a assumir um papel importante nesta área, não só por resolver os principais problemas das misturas racémicas, mas por ser responsável pela criação de estereocentros.

A catálise assimétrica eleva-se como a solução ideal uma vez que, “é utilizada uma pequena quantidade de um catalisador enantiomericamente puro, podendo ser ele enzimático ou não enzimático, de modo a produzir grandes quantidades de um composto opticamente ativo a partir de um precursor quirais ou aquiral”<sup>113</sup> permitindo assim, elevadas vantagens económicas.

Até há muito pouco tempo, os catalisadores utilizados em catálise assimétrica baseavam-se, principalmente, em duas categorias: os complexos organometálicos com metais de transição e as enzimas. Porém, nos últimos anos, este dogma mudou. O grande avanço existente sobre a catálise assimétrica permitiu que as classificações modernas incorporassem uma nova categoria com extrema importância na química orgânica, a organocatálise assimétrica<sup>114</sup>.

A organocatálise teve o seu auge na comunidade científica no ano de 2000, devido, principalmente, ao trabalho realizado por dois grupos de investigação e às suas publicações. Ambos os trabalhos se concentraram no uso de moléculas quirais, de baixo peso molecular e sem qualquer metal na sua estrutura.

O trabalho de Benjamin List utilizou a L-prolina como organocatalisador em reações aldólicas enantioselectivas<sup>115</sup>, por sua vez o trabalho de MacMillan foi realizado na vertente assimétrica de cicloadições de Diels-Alder, utilizando imidazolidinonas como organocatalisadores<sup>116</sup>. Foi ainda o próprio McMillan que no mesmo ano introduziu e definiu o termo “Organocatálise” como sendo o “uso de moléculas puramente orgânicas de baixo peso molecular (e sem qualquer metal) como catalisadores em reações orgânicas<sup>106</sup>”.

O aparecimento da organocatálise trouxe consigo uma nova perspectiva de catálise, um fator importante e complementar relacionado com a redução de custos, tempo e energia, assim como procedimentos experimentais mais simples e a redução dos resíduos químicos. Estes benefícios surgem de três fatores vantajosos<sup>117</sup>:

1. Os catalisadores orgânicos, no geral, são estáveis quando expostos ao ar e à humidade atmosférica, logo não há a necessidade de se utilizar condições reacionais especiais nem de armazenamento, como por exemplo o uso de atmosfera inerte), além de ser também dispensável o uso de reagentes e solventes anidros no manuseamento destas moléculas;
2. Uma enorme diversidade de moléculas orgânicas (como açúcares, aminoácidos e hidroxiácidos, por exemplo) está disponível a partir de fontes biológicas naturais, na sua forma enantiomericamente pura. Deste modo, os organocatalisadores são de fácil acesso e acarretam baixos custos de produção, o que é bastante apropriado para ser possível trabalhar tanto em reações a nível laboratorial como a nível industrial;
3. A não existência de complexos metálicos na sua composição, permite que estes se tornem não-tóxicos e amigos do ambiente, aumentando assim a segurança quer para o operador quer para o ambiente.

A propriedade catalítica comum aos complexos metálicos e às enzimas, mas com a enorme vantagem de não possuir metal na sua composição e a sua fortaleza a diversas temperaturas e a vários solventes orgânicos, despertou o interesse de inúmeros grupos de investigação um pouco por todo o mundo, resultando assim num desenvolvimento e conhecimento inerente ao processo<sup>118</sup>. Em menos de uma década após o surgimento da organocatálise, esta já foi estendida praticamente a todas as áreas da química orgânica, desde a síntese de polímeros<sup>119,120</sup> à síntese total<sup>121,122</sup> empregando intermediários quer radicalares quer iónicos<sup>112</sup>, passando pela catálise homogénea até à heterogénea com os catalisadores imobilizados em diferentes suportes sólidos, utilizando diferentes métodos de ativação térmica ou fotoquímica, parecendo não existirem limites para a organocatálise, dado que é capaz de mediar inúmeráveis transformações químicas tais como: reações de adição, de substituição, eliminação e de rearranjo através de uma infinidade de processos<sup>99</sup>.

## 2.2. O porquê da organocatálise?

De entre as três ferramentas essenciais que estão ao dispor dos químicos orgânicos na catálise assimétrica temos a biocatálise (também chamada de catálise enzimática), a catálise organometálica e a organocatálise. Cada uma destas vertentes na sua utilização tem vantagens e desvantagens, no entanto é possível realçar enormes diferenças entre elas, talvez a diferença mais óbvia logo é o modo de ação; resumindo, um catalisador organometálico tem como centro catalítico um metal de transição, ao passo que um organocatalisador possui apenas uma estrutura

carbonada com heteroátomos que lhe confere propriedades individuais características de um centro ativo (por exemplo tioureias, aminas terciárias rígidas, aminas secundárias cíclicas, entre outras). Por outro lado, as enzimas apesar de conterem na sua composição centenas de aminoácidos, atuam como estruturas de reconhecimento e fixação de substrato e outros como elementos detentores de poder catalítico.

Relativamente à catalise intercedida por metais, que durante muito anos foi o domínio da síntese catalítica assimétrica, as principais vantagens relacionam-se com a possibilidade de utilizar diferentes metais de transição que permitam melhorar a estrutura do ligando e assim maximizar o rendimento e a enantiosseletividade. Os problemas por norma associados são essencialmente relacionados com os elevados custos do metal, a instabilidade da maioria dos catalisadores com metais à humidade e ao ar, como também problemas relacionados com os processos de purificação, isto além do facto dos produtos da indústria farmacêutica tolerarem apenas quantidades muito pequenas na contaminação com metais<sup>123</sup>.

No que respeita à catálise com enzimas, estas podem apresentar valores extremamente elevados de enantiosseletividade devido à estrutura proteica complexa (basta uma quantidade mínima destas biomoléculas), e não apresentam toxicidade<sup>124</sup>. No entanto, a utilização de solventes orgânicos, de temperatura ou até a concentração do substrato pode inibir ou até mesmo desnaturar a enzima. Além disso, devido às características especiais atuam numa gama de substratos muito limitada<sup>125</sup>.

Relembrando o que foi referido anteriormente sobre a organocatálise e os seus benefícios, é possível compreender as enormes vantagens que apresenta face à catálise convencional. Podendo verificar-se facilmente que os pontos fracos da biocatálise e da catálise mediada por metais são os pontos fortes apresentados pela organocatálise, onde se utilizam condições de reação simples, os organocatalisadores podem ser expostos ao ar e à humidade e apresentam custos muito baixos. Também é interessante o facto de partilhar algumas vantagens com as restantes vertentes, ou seja, tal como os catalisadores com metais, a organocatálise permite a obtenção de ambos os enantiómeros de um produto catalítico sem que existam grandes problemas. Até aos dias de hoje, o “calcanhar de Aquiles” da organocatálise é a quantidade de catalisador empregue numa reação assimétrica. Na tabela 3 é possível comparar de forma mais simples e imediata as vantagens e desvantagens de cada vertente da catálise assimétrica.

Outra perspetiva do assunto permite-nos pensar que para qualquer processo catalítico à grande escala, as considerações mais importantes a ter são os custos e a segurança de todo o processo, ou seja, se um organocatalisador nos oferece um custo mais reduzido, permite-nos que seja possível utilizar maiores quantidades de organocatalisador que os complexos metálicos pelo mesmo preço, e por consequente não apresenta impurezas no produto final devido à contaminação pelo metal<sup>126</sup>.

Finalizando, é de conhecimento diário que a remoção de resíduos tóxicos no tratamento de água residual acarreta custos bastantes elevados, sendo assim vantajoso optar pela utilização de organocatalisadores à escala industrial<sup>116</sup>.

**Tabela 3.** Resumo geral das vantagens e desvantagens das três vertentes da catálise assimétrica.

<b>Propriedades características</b>	<b>Catálise organometálica</b>	<b>Catálise enzimática</b>	<b>Organocatálise</b>
<b>Elevada atividade catalítica</b>	+	+	+
<b>Ampla gama de substratos</b>	+	-	+
<b>Simplicidade estrutural</b>	+	-	+
<b>Obtenção de ambos os enantiómeros</b>	+	-	+
<b>Custos reduzidos</b>	-	-	+
<b>Ausência de toxicidade</b>	-	+	+
<b>Estabilidade ao oxigénio</b>	-	+	+
<b>Estabilidade em meio aquoso</b>	-	+	+
<b>Estabilidade térmica</b>	+	-	+
<b>Estabilidade em solventes orgânicos</b>	+	-	+
<b>Reduzida quantidade de catalisador</b>	+	+	-

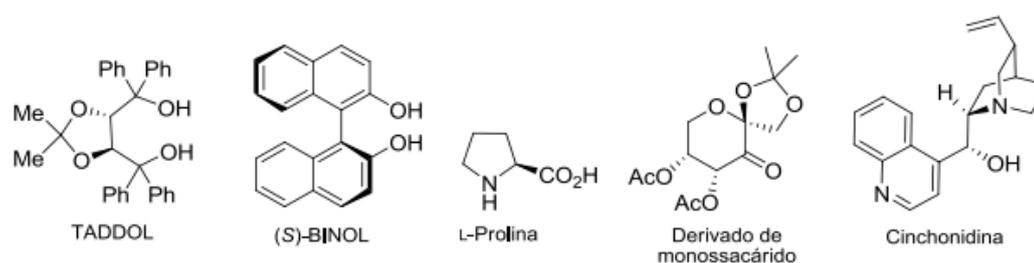
Deste modo, têm sido desenvolvidas e descobertas ao longo dos anos diversas estruturas com a finalidade de criar assim catalisadores eficazes para a aplicação industrial. Atualmente existe já um certo número de estruturas base com características especiais que estão a prender a atenção e fascínio dos químicos orgânicos no desenvolvimento de novos catalisadores orgânicos.

### 2.3 Catalisadores privilegiados

Existem catalisadores que são designados de “catalisadores privilegiados”, isto porque têm uma capacidade extraordinária de mediar enantiosseletivamente de forma bastante eficaz não só em uma, mas uma ampla gama de transformações químicas diferentes, que aparentemente não possuem qualquer tipo de relação<sup>115</sup>. Curiosamente, o termo “privilegiado” é por analogia, atribuído à prática farmacêutica para as classes de compostos que são ativas contra uma série de diferentes alvos biológicos<sup>115</sup>. Esta atribuição adjetiva deve-se, essencialmente, à estrutura altamente versátil e única que apresentam, permitindo-lhes a robustez necessária para a

aplicação em diversas reações assimétricas e que sejam manipuláveis de forma a potenciar a sua natureza catalítica.

Existe uma variedade de classes de compostos, de diferentes origens ou sinteticamente obtidas, que possuem esta propriedade estrutural e cujo número tem vindo a ser maior dia após dia devido à elevada competitividade na área, no entanto, é possível salientar que as principais “famílias” deste tipo que dominam como “catalisadores privilegiados” são os esqueletos carbonados dos organocatalisadores. São incluídos neste grupo os derivados de Tadol, Binol, Prolina, Açúcares e derivados de alcaloides de *Cinchona*<sup>115</sup> (figura 21).



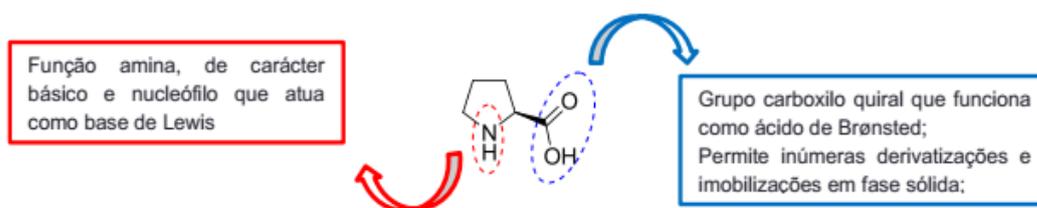
**Figura 21.** Exemplos de esqueletos carbonados quirais com estrutura privilegiada na catálise assimétrica.

### 2.3.1 Prolina

Da grande diversidade de organocatalisadores existente, a L-prolina é, possivelmente, o mais conhecido dos químicos orgânicos. Este organocatalisador foi conhecido no passado como um “catalisador universal” devido ao apresentar uma elevada diversidade numa grande gama de reações assimétricas<sup>127</sup>.

A prolina apresenta características estruturais que a tornam “especial”<sup>128</sup>:

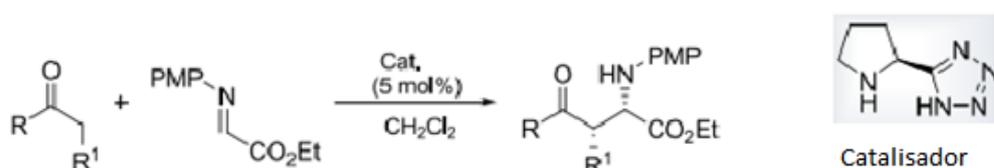
- É um aminoácido natural que comporta uma função de amina secundária genuína sob a forma de pirrolidina, deste modo por ser uma amina secundária, o valor de pKa do átomo de azoto presente neste aminoácido é muito maior que qualquer outro aminoácido, o que lhe confere maior poder nucleofílico quando comparada com os restantes aminoácidos;
- Apresenta um anel de pirrolidina que lhe confere uma rigidez conformacional que mais nenhum outro aminoácido possui, conferindo assim a uma elevada estabilidade à estrutura;
- A presença do grupo carboxilo permite que este possa atuar como um ácido de Bronsted promovendo assim a prolina a um organocatalisador bifuncional;
- O grupo carboxilo pode ainda ser facilmente derivatizado de modo a obter um maior número de catalisadores, com características alvo (figura 22).



**Figura 22.** Características que fazem da L-prolina um organocatalisador bifuncional.

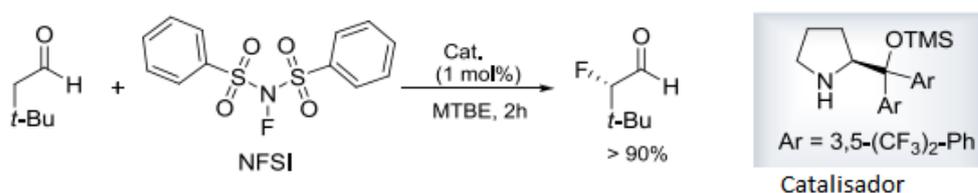
Além das capacidades referidas, há ainda duas características da prolina que lhe conferem toda a capacidade como “catalisador privilegiado”, ser uma molécula quiral abundante e com custos pouco dispendiosos e o ser um produto comercial, que pode ser adquirido nas duas formas enantioméricas<sup>118</sup>.

Com toda a expansão sobre a organocatálise, foi possível sintetizar um grande número de derivados da prolina, sendo os mais notáveis o derivado tetrazólico da prolina, introduzido por Ley<sup>129,130</sup> que estudou a aplicação destes organocatalisadores nas reações de Mannich, aldol e nitro-Michael (figura 23).



**Figura 23.** Aplicação do derivado tetrazólico da L-prolina na reação de Mannich pelo grupo de Ley.

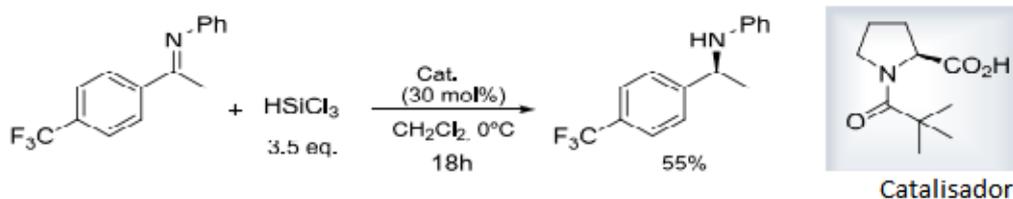
Um outro exemplo são os derivados de silil-prolinol apresentados por Jorgensen<sup>131,132</sup>, Hayashi<sup>133</sup> e Alexakis<sup>134</sup>. Estes investigadores aplicaram estes derivados em reações de alfa-funcionalização de aldeídos (figura 24) e em adições de Michael.



**Figura 24.** Reação da alfa-fluorinação desenvolvida por Jorgensen.<sup>24</sup>

Existem inúmeros exemplos na literatura sobre derivatizações e aplicações da prolina, sendo que se pode destacar o trabalho de Benaglia<sup>135</sup> no qual foi sintetizada uma lista de candidatos a organocatalisadores derivados da prolina e que foram aplicados na redução enantiosseletiva de cetaminas na presença de triclorosilano. Os resultados deste trabalho mostraram que estes

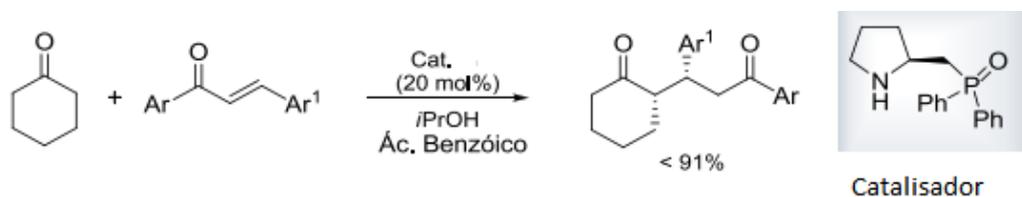
catalisadores são ativos na redução assimétrica de diferentes substratos, devido à obtenção de bons rendimentos (Figura 25)



**Figura 25.** Hidroxilação de cetaminas com novos derivados de prolina.<sup>125</sup>

Segundo Benaglia, a facilidade na síntese destes compostos aliada ao baixo custo da sua produção são os fatores que colocam estas estruturas num lugar privilegiado para que possam ser utilizadas como materiais de partida para futuro desenvolvimento de novos organocatalisadores<sup>125</sup>.

Um outro exemplo são os organofosfanos derivados da L-prolina, que foram aplicados pela primeira vez em adições de Michael assimétricas de ciclo-hexanonas e ciclopentanonas a chalconas (figura 26). Num trabalho publicado por Li Liu<sup>136</sup>, foi demonstrado que estes organocatalisadores conseguiam promover este tipo de reação para uma vasta gama de substratos e com elevados rendimentos.



**Figura 26.** Reações de adição de Michael assimétricas catalisadas por fosfano derivado da L-prolina<sup>126</sup>.

Deste modo, a prolina afirmou-se como uma estrutura de luxo, sendo capaz de assumir um papel de destaque numa diversidade de transformações químicas assimétricas enquanto catalisador puramente orgânico.

### 2.3.2 Alcalóides de *Cinchona*

Outra classe designada de “catalisador privilegiado” são os alcalóides de *Cinchona*, estes alcalóides estão presentes na casca de várias árvores tropicais do género *Cinchona*, nativas da América do Sul. Nos cerca de 30 alcalóides presentes no extrato desta casaca, quatro deles representam 50% da totalidade dos alcalóides extraídos, são eles<sup>137</sup>:

- Cinchonidina
- Cinchonina

- Quinina
- Quinidina

Historicamente, esta classe de moléculas está relacionada com a química orgânica e com a farmacêutica, sendo que têm sido de extrema importância para toda a humanidade.

Isto porque, a casca da *Cinchona* foi introduzida na Europa, no início do século XVII, para fins medicinais contra a malária. Esta planta já tinha no seu país nativo aplicações antipiréticas<sup>138</sup>.

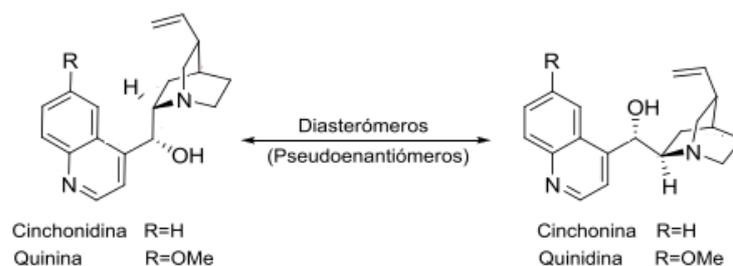
Na história do conhecimento dos compostos da casca da *Cinchona* houve um Português, Bernardino Gomes, que teve um enorme contributo no isolamento destes compostos naturais e que se destacou pela sofisticada recristalização do extrato alcoólico da casca da *Cinchona*. Para isto adicionou água a uma pequena quantidade de hidróxido de potássio, que lhe permitiu observar a formação de cristais a partir do extrato bruto. A este resultado o português deu o nome de cinchonina e o seu trabalho teve um enorme impacto na comunidade científica internacional<sup>128</sup>. No entanto, Pelletier e Caventou demonstraram de uma forma clara que a cinchonina que tinha sido isolada pelo português era na realidade uma mistura de dois alcalóides, que vieram a ser designados de quinina e cinchonina<sup>139,140</sup>. Alguns anos depois foram isolados os alcalóides designados de quinidina, por Delondre e Henry<sup>141, 142</sup> e cinchonidina, por Winckler<sup>143</sup> mas que apenas foi nomeada de cinchonidina por Pasteur.

Estes alcalóides são de extrema importância devido às suas aplicações:

- Quinina - indústria farmacêutica e indústria alimentar (agente aromático/amargo em água tônica e outras bebidas);
- Quinidina - utilizada na medicina como agente antiarrítmico;
- Cinchonidina - utilizada na resolução racémica do naproxeno.

Ao longo de décadas estes alcalóides têm tido papéis fundamentais na química orgânica, sendo utilizados como ligando e como catalisadores quirais<sup>144</sup>, aplicações estas com ligação direta à síntese assimétrica.

Estes alcalóides têm o privilégio de estarem disponíveis comercialmente e são de baixo custo, são compostos estáveis e recuperáveis. A família dos alcalóides de *Cinchona* consiste em dois pares de diastereómeros, cinchonina/cinchonidina e quinina/quinidina (figura 27). A importância destes alcalóides e a seu “sucesso” na organocatálise deve-se à sua riqueza estrutural que apresentam.



**Figura 27.** Estruturas químicas dos dois pares de diastereómeros dos alcalóides de Cinchona.

Com todas as características e a grande diversidade de aplicações destes alcalóides na organocatálise levaram ao seu grande uso na química medicinal e na indústria.

## 2.4 Aplicação da organocatálise na Química Medicinal e na Indústria

Todo o desenvolvimento de conhecimento dos organocatalisadores até ao momento, fez com que esta “tecnologia” ganhasse muita importância na indústria farmacêutica. No entanto, o desenvolvimento de processos catalíticos que sejam viáveis à escala industrial não é uma tarefa simples, pelo contrário, é uma tarefa bastante árdua e que requer uma enorme colaboração entre diversas áreas.

Nos últimos anos, a aplicação da organocatálise a nível industrial tem sido uma grande aposta, isto devido às diversas vantagens em relação à catálise organometálica e à biocatálise, desta forma, imensos tem sido os esforços por parte da indústria farmacêutica, como a nível académico, de modo a contornar as barreiras da organocatálise. Para tal têm sido abordadas questões como<sup>113</sup>:

- Inibição do produto;
- A quantidade de catalisador a utilizar;
- Gama de substratos onde podem ser utilizados.

A busca pelo “catalisador ideal” que permite a obtenção de enantiosseletividade com 100% de excesso enantiomérico e que permita o uso de reagentes e meios reacionais mais suaves, levando à designada “química verde”.

Muitas são as aplicações possíveis tanto na química medicinal como na indústria em geral, utilizando em, pelo menos, numa etapa do processo, estando estas disponíveis e descritas na literatura<sup>117,145,146</sup>. Atualmente, os catalisadores já se estendem à Obtenção enantioselectiva de, por exemplo, neuro-protetores, agentes anti tumorais ou antipiréticos. É ainda conhecida a utilização destes catalisadores orgânicos na síntese total de fármacos comercialmente conhecidos, como por exemplo:

- Oseltamivir, de nome comercial Tamiflu®<sup>147</sup>;
- Varfarina, anticoagulante<sup>148</sup>;
- Paroxetina, antidepressivo<sup>149</sup>;
- Blacofeno, relaxante muscular<sup>150</sup>;
- Maraviroc, é um antiviral<sup>151</sup>.

## 2.5 Catálise heterogénea

Os catalisadores homogéneos, heterogéneos e enzimáticos são usados na química orgânica desde há muito tempo. Os catalisadores heterogéneos fornecem uma série de vantagens em relação aos catalisadores homogéneos, tais como:

- modificam a tridimensionalidade do "espaço reação" (dimensão fractal);
- suportam altas temperaturas;
- são preparados com a textura desejada e removidos facilmente da mistura reacional;
- atuam como inibidores e aceleradores do catalisador;
- são facilmente reciclados e facilitam o acompanhamento do processo.

Obviamente que os catalisadores heterogéneos são geralmente menos seletivos do que os catalisadores homogéneos. No entanto, o maior defeito dos catalisadores heterogéneos está relacionado com a sua baixa enantiosseletividade, este defeito tem vindo ao longo dos anos a ser melhorado a passos largos em relação às reações de hidrogenação e, gradualmente, noutros processos. Os processos catalisados geralmente têm algumas vantagens em relação a sínteses orgânicas estequiométricas, incluindo redução do tempo de reação, maior seletividade, redução da formação de sais, condições reacionais mais suaves e redução de solventes perigosos e reagentes suscetíveis de envenenar o catalisador.

Com o decorrer dos anos, as normas ambientais estão a ser cada vez mais rigorosas, obrigando a que exista uma modificação nos processos de oxidação. Os métodos tradicionais de oxidação utilizam grandes quantidades e compostos inorgânicos que são altamente tóxicos, como é o caso do permanganato de potássio e do dicromato. De acordo com Jiménez-Sanchidrián<sup>152</sup>, os oxidantes ideais, amigos do ambiente, são o oxigénio molecular e o peróxido de hidrogénio, estes em combinação com catalisadores recicláveis e com o uso de reagentes não tóxicos. Na figura 28 resume-se o tipo de catalisação de oxidação ideal, que deve ser altamente seletivo e estável, e acima de tudo não ser prejudicial para o ambiente.



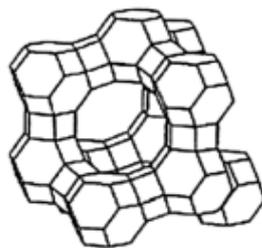
Figura 28. Catalisador de oxidação ideal.

Várias tem sido as tentativas de desenvolver catalisadores eficientes, sendo que até agora, apenas se tem focado em catalisadores que aumentam a nucleofilicidade do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de modo a facilitar o ataque pelas espécies oxidantes ao átomo de carbono do grupo carbonilo<sup>153</sup>. Recentemente, foram publicadas diversas pesquisas sobre os catalisadores heterogêneos utilizados na realização da oxidação. Estes catalisadores podem agir de três formas distintas<sup>154,155</sup>:

- ativar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aumentando, assim, a sua nucleofilicidade e facilitar o ataque das espécies oxidantes no átomo do carbono do grupo carbonilo;
- ativar o grupo carbonilo do substrato;
- ativar simultaneamente a ligação O-O e metade do carbonilo.

### 2.5.1 Catalisadores à base de zeólitos

Os zeólitos são aluminossilicatos cristalinos constituídos por uma rede tridimensional de fórmula geral  $x\text{M}_{2/n}\text{O} \cdot x\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot y\text{SiO}_2 \cdot z\text{H}_2\text{O}$ , onde M é um metal alcalino ou alcalino-terroso e z indica a quantidade de água retida nos vazios. Um número de compostos zeolíticos conhecidos como "zeotipos" ou "peneiros moleculares", foram preparados tendo como conteúdo átomos tetraédricos de Si, Al e P, para além de metais de transição e vários elementos de outras colunas da Tabela periódica, tais como B, Ga, Fe, Cr, Ti, Sn, V, Mn, Co, Cu e Zn, abrangendo valências de +1 a +5. Dependendo da sua composição particular, estes compostos são designados como  $\text{AlPO}_4\text{s}$  (fosfatos de alumínio), SAPOs (fosfatos silico-alumino), MeAlPOs (metal contendo fosfatos de alumínio), ou MeSAPOs (metal contendo fosfatos de silício-alumino)<sup>156,157</sup>. A característica estrutural mais saliente destes compostos é o seu aglomerado tetraédrico que forma sucessivamente redes tridimensionais cristalinas contendo canais e cavidades de dimensões moleculares<sup>1</sup> (figura 29).



**Figura 29.** Estrutura tridimensional do zeólito, faujasite.

Uma reação catalisada por zeólitos envolve tipicamente os seguintes passos<sup>142</sup>:

- (1) difusão das moléculas do reagente para locais ativos no zeólito através dos seus micróporos;
- (2) adsorção nos sítios ativos;
- (3) reação química originando o produto;
- (4) difusão do produto adsorvido por meio dos canais no zeólito.

Os zeólitos têm sido aplicados numa imensa diversidade de processos catalíticos incluindo as oxidações<sup>158,159</sup>. Ativam eficientemente a oxidação de cetonas por  $H_2O_2$ , mas não têm seletividade suficiente para o produto desejado, se a matéria-prima incluir grupos funcionais que não sejam o grupo cetona, estes atuam de forma menos eficiente na presença da ligação dupla carbono-carbono<sup>143</sup>. O Ti-Silicalite-1 (TS-1) foi um dos catalisadores que revolucionou o campo das oxidações orgânicas, este sólido consiste numa estrutura de zeólito (silicalite) ao qual é incorporado titânio; contém um elevado poder oxidativo derivado da capacidade, dos locais que possuem o metal titânio, formarem espécies peroxi-Ti podendo ativar o  $H_2O_2$  em diversas reações de oxidação. Estes catalisadores foram desenvolvidos através da inserção de outros metais oxidantes na estrutura do zeólito, embora com resultados mais baixos do que aqueles originalmente obtidos com titânio<sup>160,161, 162</sup>.

### **2.5.2 Catalisadores à base de argila**

Atualmente, são conhecidos vários materiais em camadas com possíveis aplicações como catalisadores. Estes materiais incluem argilas catiónicas (e silicatos relacionados) e argilas aniónicas, dado que ambas têm despertado um elevado interesse a nível laboratorial e industrial<sup>163</sup>. Este tema tem, assim, despertado comentários bastante interessantes. Algumas das argilas são minerais naturais, incluindo silicatos em camadas tipo esmectite (beidelite, hectorite, saponite) e hidróxidos de dupla camada (hidrotalcita, piroaurite, takovite, meixnerite). Contudo, o seu uso como catalisadores tem sido favorecido pela capacidade de sintetizá-los em laboratório, a fim de adaptar as suas propriedades com requisitos específicos<sup>142</sup>. A figura 30 demonstra a composição das diferentes argilas.

Argila	Formula
Montmorilonita	$\text{Na}_x(\text{Al}_{2-x}\text{Mg}_x)(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot z\text{H}_2\text{O}$
Beidelite	$\text{M}_x(\text{Al}_2)(\text{Al}_x\text{Si}_{4-x}\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot z\text{H}_2\text{O}$
Hectorite	$(\text{Na}_2\text{Ca})_{x/2}(\text{Li}_x\text{Mg}_{3-x})(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot z\text{H}_2\text{O}$
Saponite	$\text{Ca}_{x/2}\text{Mg}_3(\text{Al}_x\text{Si}_{4-x}\text{O}_{10}) \cdot z\text{H}_2\text{O}$
Hidrotalcita	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Piroaurite	$\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Takovite	$\text{Ni}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Meixnerite	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Figura 30. Fórmulas estruturais de várias argilas.

### 2.5.3 Outros catalisadores heterogêneos

Outros tipos de sólidos foram utilizados como catalisadores nas reações de oxidação, até ao momento, as poucas aplicações reportadas envolvem os seguintes tipos específicos:

- ✓ Óxidos metálicos:
  - O óxido de ferro tem sido utilizado na oxidação de cetonas cíclicas com mistura de  $\text{O}_2$ /aldeído e óxidos de magnésio<sup>164</sup>;
  - Os hidróxidos preparados por diferentes métodos têm proporcionado excelentes conversões na oxidação da ciclohexanona em  $\epsilon$ -caprolactona num sistema de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /nitrilo<sup>165</sup>;
- ✓ Catalisadores à base de resina ácida incluindo Nafion-H, resina Perfluorado e a Amberlite<sup>166</sup>;
- ✓ Catalisadores homogêneos heterogeneizados - estes abriram um campo em expansão na área da catálise. Assim, alguns catalisadores ligados ou com suportes na superfície sólida têm-se revelado eficazes nesta área. Os catalisadores são complexos de metais como estanho<sup>167</sup> ou platina<sup>168</sup> ligado ao suporte orgânico, e também, metiltrioxorhenium suportado em poli(4 vinilpiridina)<sup>169</sup>.

Outro catalisador heterogêneo que tem sido investigado é o  $\text{AlCl}_3$ <sup>170</sup>. Constatou-se que este é ativo na oxidação de cetonas cíclicas e acíclicas, uma vez que, sendo um ácido de Lewis, este vai ativar os grupos carbonilo. Trata-se de um catalisador não tóxico, estando disponível comercialmente. A oxidação da carvona com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , usando  $\text{AlCl}_3$  como catalisador, origina a formação da respetiva lactona com conversão total do substrato e seletividade superior a 95%<sup>171</sup>.

Este método tem como vantagens condições suaves de reação, ser um oxidante não prejudicial ao meio ambiente, ter um meio reacional livre de halogéneo, tempo de reação reduzido e excelente rendimento para diversas cetonas. O procedimento pode ser realizado sem a utilização de qualquer substância cara ou prejudicial<sup>161</sup>. Por estas razões, este foi um dos métodos escolhidos nesta investigação<sup>160</sup>.



### 3.Publicações

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

*Claude Lévi-Strauss*



Artigo 1:  
**Hydrotalcite catalysis for the synthesis of new  
chiral building blocks**

Jesus M. Rodilla, Patricia P. Neves, Sofia Pombal, Vicente Rives,  
Raquel Trujillano and David Díez

## Hydrotalcite catalysis for the synthesis of new chiral building blocks

Jesus M. Rodilla<sup>a</sup>, Patricia P. Neves<sup>a</sup>, Sofia Pomba<sup>a</sup>, Vicente Rives<sup>b</sup>, Raquel Trujillano<sup>b</sup> and David Díez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Ciências, Departamento de Química and UMTF-FibEnTech, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal; <sup>b</sup>GIR-QUESCAT-Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>c</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

### ABSTRACT

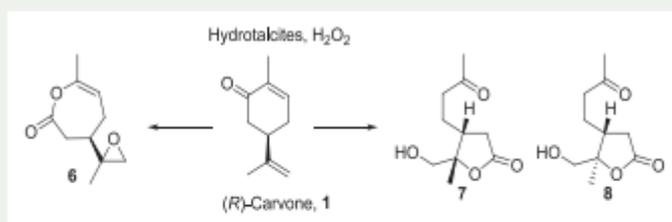
The use of hydrotalcites for the synthesis of two chiral building blocks in a simple way is described as a new and green methodology. The synthesis of these compounds implies a regioselective Baeyer–Villiger reaction in a very selective way with ulterior opening and lactonisation. This methodology should be considered green for the use of hydrogen peroxide as the only oxidant and hydrotalcites as the catalyst, and because no residues are produced apart from water. The procedure is very adequate for using in gram scale, in order to increase the value of the obtained compounds. The conditions are excellent and can be applied for nonstable compounds, as they are very mild. The synthesised compounds are magnific starting materials for the synthesis of biologically active or natural compounds. The use of a cheap, commercial and chiral compound as carvone disposable in both enantiomeric forms adds an extra value to this methodology.

### ARTICLE HISTORY

Received 13 May 2015  
Accepted 14 July 2015

### KEYWORDS

Hydrotalcites; natural products; terpenes; hydrogen peroxide; carvone



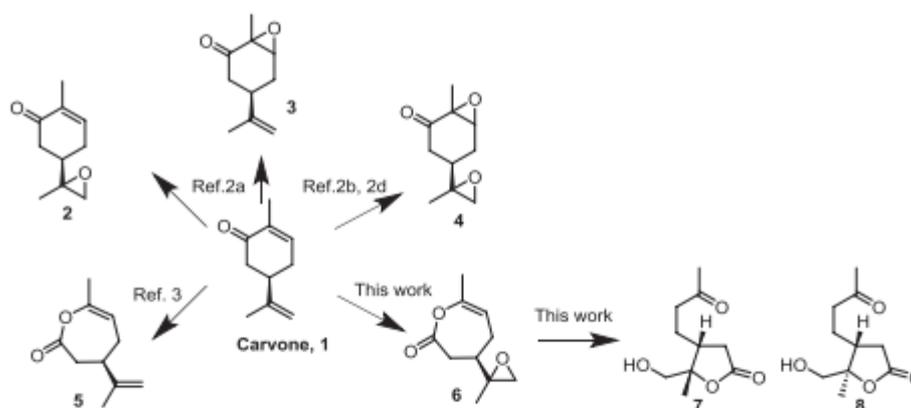
## 1. Introduction

Carvone **1** is a versatile starting material for the syntheses of biological active natural products and disposable in both enantiomeric forms, terpenes being the main objective from this natural product (Macaev 2013). One of the more important derivatisations of carvone structure is the epoxidation. This reaction can be done in a regioselective way with epoxidation of the exocyclic to give **2** or endocyclic double bond to give **3**, based on electron-rich

**CONTACT** Jesus M. Rodilla  rodilla@ubi.pt

The supplementary material for this paper is available online at <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1075525>.

© 2015 Taylor & Francis



**Figure 1.** Epoxidation and Baeyer–Villiger products obtained from (*R*)-carvone.

or electron-deficient epoxidation (Murphy et al. 2003; Mak et al. 2006; Uguina, Delgado, Carretero 2009; Uguina, Delgado, Carretero, Gomez-Diaz 2009). By contrary, diastereoselectivity in this class of epoxidations is not good (Figure 1).

Due to the importance of carvone as starting material, there has been much interest too in the synthesis of compound **5** by a Baeyer–Villiger type reaction (Frisone et al. 1993; Lei et al. 2007). This compound has been obtained from carvone by heterogeneous Baeyer–Villiger oxidation with  $\text{H}_2\text{O}_2$ /acetonitrile using Mg/Al hydrotalcite (Llamas et al. 2007) or by transition metals complexes as catalysts (Brunetta & Strukul 2004). These reactions were followed by GLC or by GC–MS analysis, so in order to obtain compounds as building blocks, it is necessary to isolate and determine them properly. The interest was to obtain a compound as **6**, using friendly reagents as oxygen peroxide and hydrotalcite as catalyst (Figure 1).

Layered double hydroxides, also known as hydrotalcite-like compounds, are layered compounds characterised by their interlayer space, chemical composition and sequence of layer stacking (Bookin & Drits 2001). Their general formula is  $[\text{M}^{2+}_{1-x}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2]^{x+}[\text{A}^{n-}]_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$ , where  $\text{M}^{2+}$  and  $\text{M}^{3+}$  are the di- and trivalent metal cations, respectively, and  $\text{A}^{n-}$  is the interlayer anion (Rives 2001). Its structure is similar to that of brucite,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , where each  $\text{Mg}^{2+}$  ion is octahedrally coordinated by six hydroxyl groups and the octahedra share edges forming infinite layers. These layers are stacked and bonded through hydrogen bond and contain water molecules between the layers. If some  $\text{Mg}^{2+}$  ions are isomorphically replaced by cations with a higher oxidation state, but similar radii, the brucite layers will become positively charged; the electrical balance is achieved by means of anions located in the interlayer space, together with water molecules. The easiness of their synthesis and the possibility of changing their chemical composition in a wide range make this layered solids and their derivatives very interesting as catalysts in different reactions. Their performance as catalysts in different catalytic reactions has been studied by changing their composition, molar ratio, synthesis method, etc. (Cavani et al. 1991; Rives et al. 1998; Monzón et al. 1999; Jiménez-Sanchidrián & Ruiz 2008; Rives et al. 2010).

## 2. Results and discussion

In order to have the required compounds, we start the study with a Lewis acid as  $\text{AlCl}_3$  using as oxidant hydrogen peroxide. In these conditions, entries 1 and 2 were observed that the

epoxidation only took place in the terminal double bond to give epoxide **2** and moderate yield of the desired compounds **7** and **8**. The absolute stereochemistry was determined by NOESY as one of the chiral centres is known in the starting material. As can be understood, these compounds are the result of terminal double bond epoxidation of carvone, Baeyer–Villiger oxidation of the ketone and opening of the epoxide by the acid group resulting of the lactone in compound **6**. With these compounds in hand, it was decided to proceed to obtain them not only in better yield but in more green procedure. For this reason, we decide to use hydrotalcite in order to obtain these useful compounds. When the reaction was done with hydrotalcite obtained as described before, using SDS and hydrogen peroxide as oxidant, the synthesis of compounds **7** and **8** was achieved in good yield entry 7 (Table 1), as it recovered an important quantity of the starting material, and complete recovering of the catalyst was achieved. It should be underlined that when using  $Mg_3Al-CO_3$  hydrotalcite as catalyst instead of  $AlCl_3$ , there is an important change in the nature of the catalyst as hydrotalcite has a strongly basic character. The catalyst was prepared by simple coprecipitation from Mg and Al nitrates at constant pH. SDS does not enter in the interlayer space, as there is a strong affinity of hydrotalcite for carbonate; moreover, such an affinity is larger for divalent (carbonate) than for monovalent (SDS) anions, so the catalyst active form is  $Mg_3Al-CO_3$ . It has to be signalled that compound **2** is an intermediate to the final compounds **7** and **8**. It was tried to the use of *m*-CPBA as oxidant and hydrotalcite as catalyst. In this case, we were able to obtain compound **6** although in low yield.

As we have said before, compound **2** is the intermediate for the target molecules **7** and **8**. So as it is a compound already known and easy to obtain, it was decided to use it as starting material and to test our conditions with this compound, using the same methodology, table 2. When used in conditions with  $AlCl_3$  and hydrogen peroxide as oxidant, entries 1 and 2, it was achieved only the desired compounds **7** and **8** in low yield and other compounds as the diol **9** and epoxide **10** resulting of the opening of the epoxide of **2** and epoxidation of the enol intermediate, respectively. Again the use of hydrotalcite increases considerably the yield of

**Table 1.** Screening of catalysts and conditions for the Baeyer–Villiger reaction of (*R*)-carvone.

Entry	Conditions	Temperature	Time	Yield*(%)					
				1	2	4	6	7	8
1	A	75	48 h	40.0	28.0	–	–	10.0	6.0
2	A	75	160 h	39.0	25.0	–	–	15.0	12.0
3	B	50	96 h	50.0	18.0	2.0	–	6.0	5.0
4	B	40	200 h	10.0	31.0	10.0	–	25.0	19.5
5	B	40	300 h	8.0	45.0	20.0	–	9.2	8.4
6	B	40	400 h	5.0	60.0	30.0	–	6.0	5.3
7	B	60	100 h	14.0	25.0	12.0	–	27.0	26.0
8	C	40	5 h	–	70.0	4.0	12.0	–	–

Conditions: A. EtOH (25 mL),  $AlCl_3$  (65 mg),  $H_2O_2$  30% (0.80 mL); B. Benzonitrile (1.50 mL),  $H_2O_2$  30% (1.30 mL), Hydrotalcite (29 mg), SDS (sodium dodecyl sulphate) (73 mg), EtOH (1.50 mL); C. Hydrotalcite (39 mg), *m*-CPBA (metachloroperbenzoic acid) (782 mg),  $CH_2Cl_2$  (15 mL).

\*The yield until 100% are decomposition or undetermined products.

**Table 2.** Screening of Baeyer–Villiger reaction of the epoxy-carvone.

Entry	Conditions	Temperature	Time	Yield*(%)					
				2	4	7	8	9	10
1	A	40	24 h	30.0	–	11.0	10.0	8.2	–
2	A	40	30 h	33.0	–	14.0	12.0	10.5	–
3	A	70	72 h	34.1	–	18.0	15.0	17.2	–
4	B	65	24 h	34.1	17.2	19.0	18.1	–	–
5	B	75	384 h	33.0	10.0	12.0	11.0	–	–
6	B	60	168 h	26.0	9.0	27.0	25.0	–	–
7	C	40	28 h	–	20.0	21.0	19.0	–	15.2

Conditions: A. EtOH (25 mL),  $\text{AlCl}_3$  (65 mg),  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (0.80 mL); B. Benzonitrile (1.50 mL),  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (1.30 mL), Hydrotalcite (29 mg), SDS (73 mg), EtOH (1.50 mL); C. Hydrotalcite (39 mg), *m*-CPBA (metachloroperbenzoic acid) (782 mg),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL).

\*The yield until 100% are decomposition or undetermined products.

the desired compounds **7** and **8**, taking in account the amount of recovered starting material (Table 2). The use of *m*-CPBA as oxidant not increases the yield in the required compounds.

### 3. Experimental

#### 3.1. General procedure for the reaction with $\text{AlCl}_3$

In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, carvone **1** (300 mg, 2 mmol),  $\text{AlCl}_3$  (60 mg, 0.45 mmol),  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (0.12 mL, ~2 eq) and 50 mL of EtOH were heated at 75 °C while stirring. The progress of the reaction was monitored TLC. After 48 h, the reaction was extracted with DCM, washed with water, dried and the solvent evaporated. Finally, the pure compound was obtained by flash chromatography on silica gel (hexane/EtOAc 8:2) to obtain **1** (39.0%), **2** (25.0%), **7** (15.0%) and **8** (12.0%).

#### (4*R*,5*S*)-5-(hydroxymethyl)-5-methyl-4-(3-oxobutyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one **7**

Compound **7** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 6:4). IR (film): 3419, 2976, 2937, 1746, 1709, 1663, 1382, 1220, 1058, 950  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.68 (1H, d, *J* 12.4 Hz, H-1''a), 3.64 (1H, d, *J* 12.4, H-1''b), 2.50 (2H, m, H-3), 2.40 (2H, m, H-2'), 2.21 (1H, m, H-4), 2.14 (3H, s, Me-4'), 1.83 (2H, m, H-1'), 1.29 (3H, s, Me-1''');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  208.1 C-3'; 177.2 C-2; 36.0 C-3, 44.6 C-4; 22.7 C-1'; 42.1 C-2'; 30.0 C-4', 88.4 C-5; 66.0 C-1''; 22.4 C-1'''; HRMS (EI) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$  requires (*M* + *Na*) 223.0940; found 223.0934.

#### (4*R*,5*S*)-5-(hydroxymethyl)-5-methyl-4-(3-oxobutyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one **8**

Compound **8** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 6:4).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.7$  (*c* = 0.4,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film): 3420, 2977, 2931, 1744, 1708, 1662, 1418, 1367, 1219, 1059, 950  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.74 (1H, d, *J* 12.4 Hz, H-1''a), 3.54 (1H, d, *J* 12.4 Hz, H-1''b), 2.58 (1H, m, H-4), 2.49 (2H, m, H-3'), 2.33 (1H, d, *J* 10.5 Hz, H-3a), 2.29 (1H, d, *J* 10.5 Hz,

H-3b), 2.17 (3H, s, Me-4'), 1.78 (1H, m, H-1'a), 1.57 (1H, m, H-1'b), 1.26 (3H, s, Me-1''');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  207.5 C-3'; 175.2 C-2; 34.8 C-3; 38.2 C-4; 23.4 C-1'; 41.9 C-2'; 30.3 C-4', 88.6 C-5; 66.8 C-1''; 17.6 C-1'''; HRMS (EI) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$  requires (M + Na)<sup>+</sup> 223.0940; found 223.0934.

The reaction was also performed from compound **2**, under the same conditions. By the flash CC in the same conditions, we have obtained the following compounds: **2** (34.1%), **7** (18.0%), **8** (15.0%) and **9** (17.2%).

### 8,9-dihydroxycarvone, **9**

Compound **9** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 7:3) as a mixture of isomers. IR (film): 3436, 2975, 2924, 1655, 1432, 1370, 1104, 1056, 745  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.79 (1H, m, H-6), 3.56 (2H, m, H-9), 2.80–2.20 (5H, m, H-3, 4 and 5), 1.78 (3H, s, Me-7) and 1.26 (3H, s, Me-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.5 C-1; 199.2 C-2; 38.6 C-3; 41.8 C-4; 26.4 C-5; 144.1 C-6; 15.8 C-7; 72.8 C-8; 57.8 C-9; 21.9 C-10; HRMS (EI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{Na}$  requires (M + Na) 438.1345; found 438.1349.

### 3.2. General procedure for the reaction with hydrotalcite and $\text{H}_2\text{O}_2$

In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, Carvone **1** (300 mg, 2 mmol), benzonitrile (0.82 mL, 8 mmol),  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (0.12 mL, 4 mmol), hydrotalcite  $\text{Mg}_2/\text{Al}-\text{CO}_3$  (17.0 mg), SDS (35 mg, 0.10 mmol) and EtOH (0.87 mL) were heated at 40–60 °C while stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After 50–250 h, the reaction was extracted with DCM, washed with water, dried and the solvent evaporated. Finally, the pure compound was obtained by flash column chromatography on silica gel, **1** (15.0%), **2** (25.0%), **4** (12.0%) **7** (27.0%) and **8** (26.0%).

The reaction was also performed with compound **2**, as starting material under the same conditions. By flash CC (in the same conditions), the following compounds were obtained: **2** (26.0%), **4** (9.0%), **7** (27.0%) and **8** (25.0%).

### 3.3. General procedure for the reaction with hydrotalcite and *m*-CPBA

In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, carvone **1** (505 mg, 3.4 mmol), hydrotalcite (39.0 mg), MCPBA (782 mg, 4.5 mmol) and DCM (15.0 mL) were heated at 40 °C while stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After 5 h, the reaction was extracted with DCM, washed with water, dried and the solvent evaporated. Finally, the pure compound was obtained by flash column chromatography on silica gel, **2** (70.0%), **4** (4.0%) and **6** (12.0%).

### 8,9-epoxycarvone-1,2-olide **6**

Compound **6** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 8:2) as a mixture of isomers. IR (film): 2973, 2930, 1715, 1660, 1381, 1223, 1058, 950  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.23 (1H, td,  $J_1$  7.3 Hz and  $J_2$  1.2 Hz, H-6), 2.68 (2H, dd,  $J_1$  7.0 Hz and  $J_2$  1.4 Hz, H-3), 2.64 (1H, dd,  $J_1$  4.0 Hz and  $J_2$  0.9 Hz, H-9a), 2.57 (1H, d,  $J$  4.5 Hz, H-9b), 2.31 (1H, t,  $J$  7.1 Hz, H-4), 2.20–2.10 (2H, m, H-5), 1.89 (3H, s, Me-7), 1.34 (3H, s, Me-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.2 C-1; 171.0 C-2; 34.7 C-3; 46.1 C-4; 23.8 C-5; 107.8 C-6; 19.3 C-7; 58.2 C-8, 52.9 C-9, 18.5 C-10; HRMS (EI) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{Na}$  requires (M + Na)<sup>+</sup> 205.0835; found 205.0832.

The reaction was also performed with compound **2**, as starting material under the same conditions. By flash CC (in the same conditions), we have obtained the following compounds: **4** (20.0%), **7** (21.0%), **8** (19.0%) and **10** (15.2%).

#### **1,6;8,9-Diepoxy-carvone-1,2-olide 10**

Compound **10** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 8:2) as a mixture of isomers. IR (film): 2974, 2927, 1720, 1418, 1380, 1229, 1100, 1069, 958, 750  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.15 (1H, dd,  $J_1$  8.6 Hz and  $J_2$  5.3 Hz, H-6), 2.83 (2H, dd,  $J_1$  8.4 Hz and  $J_2$  2.1 Hz, H-3), 2.66 (1H, dd,  $J_1$  4.5 Hz and  $J_2$  0.9 Hz, H-9a), 2.62 (1H, d,  $J$  4.5 Hz, H-9b), 2.45 (1H, dt,  $J_1$  13.9 Hz and  $J_2$  5.3 Hz, H-5a), 2.03 (1H, dddd,  $J_1$  13.9 Hz,  $J_2$  8.4 Hz,  $J_3$  5.3 Hz and  $J_4$  2.1 Hz, H-4), 1.71 (3H, s, Me-7), 1.38 (1H, dt,  $J_1$  13.9 Hz and  $J_2$  8.6 Hz, H-5b), 1.33 (3H, s, Me-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.5 (C-2); 83.2 (C-1); 58.9 (C-6); 58.6 (C-8); 53.5 (C-9); 37.6 (C-4); 34.8 (C-3); 29.1 (C-5); 20.4 (C-7); 18.0 (C-10); HRMS (EI) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_5$  (M + H) $^+$ , 458.1995; found 458.1978.

## 4. Conclusions

It has been demonstrated that the use of hydrotalcites made possible to obtain in good yield from a commercially available material in both enantiomeric pure forms chiral compounds such as lactones **7** and **8** that can be used in organic synthesis as valuable synthons (Valeev et al. 2010).

## Acknowledgements

C. Raposo is acknowledged for the Mass Spectra and Chemical Analyses.

## Funding

JMR, PPN, SF and DD thank the F.S.E. and Junta de Castilla y León [GR178], and VR and RT thank Ministerio de Ciencia e Innovación [grant number MAT2009-08526] for the financial support.

## References

- Bookin AS, Drits VA. 2001. In: Rives V, editor. Layered double hydroxides: present and future. Crystal structure and X-ray identification of layered double hydroxides. New York: Nova Sci. Pub. Co, Inc. Chapter 2. pp. 39–92.
- Brunetta A, Strukul G. 2004. Epoxidation versus Baeyer–Villiger oxidation: the possible role of Lewis acidity in the control of selectivity in catalysis by transition metal complexes. *Eur J Inorg Chem.* 2004: 1030–1038.
- Cavani F, Trifirò F, Vaccari A. 1991. Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. *Cat Today.* 11:173–301.
- Frisone MDT, Pinna F, Strukul G. 1993. Bayer–Villiger oxidation of cyclic ketones with hydrogen peroxide catalyzed by cationic complexes of platinum(II): selectivity properties and mechanistic studies. *Organometallics.* 12:148–156.
- Jiménez-Sanchidrián C, Ruiz JR. 2008. The Baeyer–Villiger reaction on heterogeneous catalysts. *Tetrahedron.* 64:2011–2026.
- Lei Z, Ma G, Jia C. 2007. Montmorillonite (MMT) supported tin (II) chloride: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for clean and selective Baeyer–Villiger oxidation with hydrogen peroxide. *Cat Commun.* 8:305–309.

- Llamas R, Jiménez-Sanchidrián C, Ruiz JR. 2007. Heterogeneous Baeyer-Villiger oxidation of ketones with  $H_2O_2$ /nitrile, using Mg/Al hydrotalcite as catalyst. *Tetrahedron*. 63:1435–1439.
- Macaev FZ. 2013. Bioactive natural products from enantiomeric carvones. *Stud in Nat Prod Chem*. 39:233–267.
- Mak KKW, Lai YM, Siu Y-H. 2006. Regiospecific epoxidation of carvone: a discovery-oriented experiment for understanding the selectivity and mechanism of epoxidation reactions. *J Chem Educ*. 83: 1058–1061.
- Monzón A, Romeo E, Royo C, Trujillano R, Labajos FM, Rives V. 1999. Use of hydrotalcites as catalytic precursors of multimetallic mixed oxides. Application in the hydrogenation of acetylene. *Appl Cat A Gen*. 185:53–63.
- Murphy A, Dubois G, Stack TDP. 2003. Efficient epoxidation of electron-deficient olefins with a cationic manganese complex. *J Am Chem Soc*. 125:5250–5251.
- Rives V, editor. 2001. Layered double hydroxides: present and future. New York, (NY): Nova Science Pub. Co Inc.
- Rives V, Carriazo D, Martin C. 2010. Heterogeneous catalysis by polyoxometalate-intercalated layered double hydroxides. In: Gil A, Korili S, Trujillano R, Vicente MA, editors. Pillared clays and related catalysts. New York, (NY): Springer; p. 319–397.
- Rives V, Labajos FM, Trujillano R, Romeo E, Royo C, Monzón A. 1998. Acetylene hydrogenation on Ni–Al–Cr oxide catalysts: the role of added Zn. *Appl Clay Sci*. 13:363–379.
- Uguina MA, Delgado JA, Carretero J. 2009. Regiospecific epoxidation of carvone  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone group with a basic resin. *Ind Eng Chem Res*. 48:10217–10221.
- Uguina MA, Delgado JA, Carretero J, Gómez-Díaz D, Rodríguez G. 2009. Regioselective synthesis of monoepoxides from terpenic diolefins over alumina at high temperature and pressure. *Ind Eng Chem Res*. 48:4671–4680.
- Valeev RF, Khasanova LS, Miftakhov MS. 2010. New orthogonally functionalized synthetic blocks from R-(–)-carvone. *Russ J Org Chem*. 46:670–673.

**Artigo 2:**

**Antioxidant Activity of Carvone and Derivatives  
against Superoxide Ion**

Sofia Pombal, Yaiza Hernández, David Diez, Eily Mondolis, Aldahir Mero, Juan Morán-Pinzón, Estela I. Guerrero and Jesús M. Rodilla

## Antioxidant Activity of Carvone and Derivatives against Superoxide Ion

Sofia Pombal<sup>a</sup>, Yaiza Hernández<sup>b</sup>, David Diez<sup>b</sup>, Eily Mondolis<sup>c</sup>, Aldahir Mero<sup>c</sup>, Juan Morán-Pinzón<sup>c</sup>, Estela I. Guerrero<sup>c</sup> and Jesús M. Rodilla<sup>a\*</sup><sup>a</sup>*Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais-FibEnTech, Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001- Covilhã, Portugal*<sup>b</sup>*Department of Organic Chemistry, Avda Los Caidos s/n, University of Salamanca, Salamanca, Spain, 37008*<sup>c</sup>*Department of Pharmacology, Avda Gustavo García de Paredes, Panama University, Panama, Panama*

rodilla@ubi.pt

Received: November 30<sup>th</sup>, 2016; Accepted: February 13<sup>th</sup>, 2017

Carvone has corroborated its versatility as starting material for building blocks synthesis in organic chemistry, being achieved a new chiral lactone. It has been done a study on the antioxidant activity against superoxide of carvone and a chloro derivative that show the potent activity of the natural product (*R*)-carvone, **1**.

**Keywords:** Carvone, Antioxidant activity, Superoxide ion, Building blocks.

Natural compounds are crucial in organic chemistry not only for their biological activities but for being starting materials in the synthesis of chiral drugs. Our group has been involved in the use of different natural product as sclareol [1] or *ent*-halimic acid [2] for the synthesis of biological active compounds. Recently we have been interested in carvone to made building blocks for organic chemistry [3], see figure 1, as is one of the monoterpenes most used for drugs or building blocks synthesis [4]. As several diseases are associated with oxidative stress caused by free radicals [5] we decide to test (*R*)-carvone **1** and the chloro-derivative **8**. The first because is a very available natural compound and the second because is obtained with the better yield in our reactions.

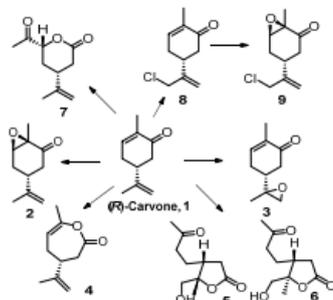


Figure 1: Some building blocks obtained from carvone.

Carvone oxidation for obtaining regioselective epoxidation products has been done for many years due to the importance of the obtained epoxides **2** and **3** and their applications [6, 7]. Following with this research we describe in this manuscript the synthesis of new building blocks as shown in Figure 1, using aluminum trichloride as catalyst and hydrogen peroxide as oxidant.

The methodology used to obtain the required compounds can be seen in table 1. When carvone is made to react with the oxidant

using aluminum trichloride as catalyst at room temperature no reaction takes place for a long time, only degradation of the starting material. When increasing temperature, entry 2, the desired compound, **7**, is obtained but in low yield, together with a very small amount of epoxide **2**, and starting material. Compound **7** is described for the first time and its stereochemistry is proposed based in the reaction mechanism and the coupling constants of H-6 in <sup>1</sup>H NMR spectrum, figure 2. It can be understood the synthesis of **7** by the mechanism proposed in figure 2. First of all, it is produced the epoxidation of the internal double bond followed by a Baeyer-Villiger reaction to give the corresponding intermediate, **10**, opening of the seven membered lactone induced by the coordination of aluminum trichloride with the epoxide oxygen and cyclization led to lactone **7**.

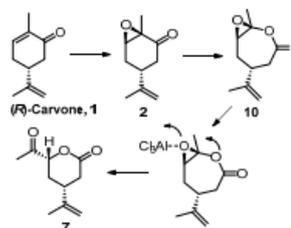


Figure 2: Proposed mechanism for synthesis of **7** from (*R*)-carvone.

Increase of oxidant ratio and reaction time, entry 3, table 1, increase the yield of lactone **7** and the allylic chlorination of the external double bond compound **8** [8] although in low yield. Increasing the temperature, entry 4, better yield of compounds, **8** and **2**, is obtained.

As our interest at this time was the isolation of different compounds for testing their biological activity, it was decided to do the reaction with a mixture of carvone, **1**, and epoxycarvone **2**, in a ratio 1.5/1, entry 1 of table 2, obtaining compounds **8** and **9**. These compounds have been obtained recently for the synthesis of (-)-incarvilleine

**Table 1:** Screening of catalysts and conditions for reaction of (*R*)-carvone.

Entry	Conditions	Temp.	Time	Yield <sup>a</sup> (%)			
				1	2	7	8
1	A	r. t.	144 h	75.9	7.87	-	-
2	A	45	24 h	42.9	8.3	10.0	-
3	B	45	72 h	36.2	2.5	12.0	6.5
4	B	70	40 h	25.3	8.4	-	15.0

Conditions: For 13.3 mmol of carvone. Method A. EtOH (50 mL), AlCl<sub>3</sub> (3 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (42.6 mmol); Method B. EtOH (50 mL), AlCl<sub>3</sub> (3 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (85.3 mmol). r. t.: room temperature. <sup>a</sup>The yield until 100% are decomposition or undetermined products.

[8]. If used only 1,6-epoxycarvone, **2**, entry 2, it was only obtained compound **9** in a better yield. All products were identified by NMR, IR and HRMS.

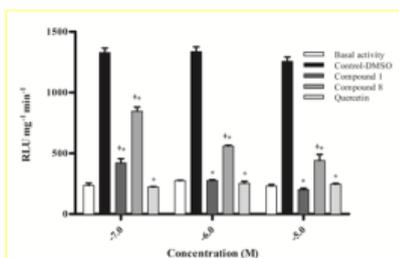
**Table 2:** Screening of catalysts and conditions for reaction of (*R*)-carvone with 1,6-epoxycarvone.

Entry	Cond.	Temp.	Time	Yield <sup>a</sup> (%)			
				1	2	8	9
1	C	45	144 h	30.1	19.4	12.3	8.3
2	D	45	144 h	-	58.7	-	10.1

Conditions: Method C: Mixture carvone (3.24 mmol) + 1,6-epoxycarvone (1.58 mmol); EtOH (20 mL), AlCl<sub>3</sub> (1.15 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (12.9 mmol); Method D: 1,6-epoxycarvone (1.67 mmol); EtOH (15 mL), AlCl<sub>3</sub> (0.84 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (3.77 mmol). <sup>a</sup>The yield until 100% are decomposition or undetermined products.

**DPPH radical scavenging activity:** To assess the in vitro antioxidant activity, we first examined whether compounds **1** and **8** possessed free radical activity by using DPPH• scavenging assays. Antioxidant activity of compounds **1** and **8** (25.9% and 22.6% respectively) was found to be similar to the one of ascorbic acid (21.4%). However, these samples showed significantly less scavenger activity when the reference compound was quercetin (61.8%).

**Nitric oxide radical scavenging activity:** Nitric oxide radical (NO•), play an important role in the control of various physiological and pathophysiological pathways [9]. The result of NO reducing assay revealed that compounds **1** and **8** showed minor antioxidant activity (13.24% and 14.08 % of inhibition) in comparison with curcumin control group (24.0 %). It was found that inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value obtained for standard curcumin was 1.8x10<sup>-7</sup> M while compounds **1** and **8** showed IC<sub>50</sub> values of 5.2x10<sup>-8</sup> and 2.3x10<sup>-7</sup> M, respectively.



**Figure 3:** Effect of quercetin and compound **1** and **8** (10<sup>-7</sup> - 10<sup>-9</sup> M) on the vascular superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production in aorta rings. \**p*<0.05 and †*p*<0.05 compared with lucigenin and basal activity, respectively.

**Vascular superoxide production assay:** The basal production of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in aortic rings incubated with lucigenin was significantly higher than in absence of lucigenin (1256.3±36.2 vs 230.3±12.7 RLU/min/mg) (Figure 3). Luminescence signal observed when tissues were incubated with compounds **1** and **8** at several concentrations, were lower than the basal production in lucigenin exposed vessels (201.7±12.0 and 441.0±49.1 RLU/min/mg, respectively). At concentration 10<sup>-6</sup> M no differences

were observed between compound **1** and the standard compound quercetin (245.0±7.6 RLU/min/mg).

**Conclusions:** A new lactone has been achieved by oxidation of (*R*)-carvone using aluminum trichloride as catalyst and hydrogen peroxide as oxidant. Increasing the oxidant amount, time reaction and temperature influence the results in carvone oxidation. The study on the antioxidant activity of compounds **1** and **8** using vascular superoxide production assay shows that (*R*)-carvone **1** has the most powerful effect on the O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging activity.

## Experimental

**General methods:** Unless otherwise stated, all chemicals were purchased as the highest purity commercially available and were used without further purification. IR spectra were performed on a Genesis® II ATR spectrophotometer. The samples were placed on the diamond, previously cleaned with isopropanol. The spectra were performed using the OMNIC software. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were performed in CDCl<sub>3</sub> and referenced to the residual peak of CHCl<sub>3</sub> at δ 7.26 ppm and δ 77.2 ppm, for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, respectively, using a Bruker® Avant 400, 400 MHz and 100 MHz spectrophotometer, respectively. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and coupling constants (*J*) are given in Hertz. Mass spectra are presented as *m/z* (% rel. int.). HRMS were recorded on a VG Platform (Fisons) spectrometer using chemical ionization (ammonia as gas) or Fast Atom Bombardment (FAB) technique. For some of the samples, QSTAR XL spectrometer was employed for electrospray ionization (ESI). The optical activity was determined on a Bellinghan + Stanley Ltd. ADP 222 polarimeter, with 5 ml cells in chloroform solution. The concentration and temperature varied from compound to compound and were specified in the presentation of the values of the optical activity.

**General procedure for the reaction with AlCl<sub>3</sub>:** Conditions Methods A and B: In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, (*R*)-carvone **1** (2 g, 13.3 mmol), AlCl<sub>3</sub> (400 mg, 3 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (1-2 mL, 42.6-85.3 mmol) and 50 mL of EtOH were heated at 45°C while stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After 24 h, the reaction was extracted with DCM, washed with water, dried and solvent evaporated. Finally, to flash chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) lead **1**, **2**, **7** and **8** in yields according table 1.

**Table 3:** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, Correlation HSQC and HMBC for compound **7**.

C	δ (ppm)	<sup>1</sup> H	HMBC
2	176.3	-	-
3	35.8	2.40 (2H, m)	4, 9
4	40.1	2.88 (1H, dt, <i>J</i> = 11.3 and 3.8 Hz)	5, 9
5	38.5	1.96 (1H, ddd, <i>J</i> = 14.5, 11.3 and 3.2 Hz)	3, 9
		1.76 (1H, ddd, <i>J</i> = 14.5, 10.9 and 3.8 Hz)	
6	62.1	4.05 (1H, dd, <i>J</i> = 10.9 and 3.2 Hz)	4, 7
7	203.0	-	-
8	26.3	2.23 (3H, s)	7
9	143.6	-	-
10	114.4	4.84 (2H, s)	4, 9, 11
11	17.8	1.60 (3H, s)	4, 9, 10

Compound **7** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 80:20).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +6.25 (c 1.7 mg/mL CHCl<sub>3</sub>).

IR (film): 2975, 2922, 1712, 1668, 1649, 1104, 900, 732 cm<sup>-1</sup>. HRMS (EI) calc. for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> requires (M+H) 183.1015; found 183.1012.

Compound **8** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 90:10).

IR (film): 2979, 2359, 1709, 1669, 1107, 900, 749 cm<sup>-1</sup>. See reference 8 for other of spectroscopic data.

**General procedure for the reaction with  $AlCl_3$ :** Conditions Methods C and D: In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, (*R*)-carvone (3.24 mmol) **1** and 1,6-epoxycarvone **2** (1.58 mmol),  $AlCl_3$  (150 mg, 1.15 mmol),  $H_2O_2$  30% (0.3 mL, 12.9 mmol) and 20 mL of EtOH were heated at 45°C while stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After 24 h, the reaction was extracted with DCM, washed with water, dried and the solvent evaporated. Finally, the pure compound was obtained by flash chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to obtain **1**, **2**, **8** and **9** in yields according table 2.

Compound **9** was purified by flash chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 90:10).

IR (film): 2975, 2927, 1707, 1669, 1375, 1258, 1088, 1059, 793  $cm^{-1}$ . See reference 8 for other of spectroscopic data.

**DPPH radical scavenging activity:** The DPPH free radical scavenging activity was estimated by assay based on the method described in the literature [10]. Compounds **1** and **8** were dissolved in DMSO at different concentration solutions ( $1 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-4}$  M). Quercetin and ascorbic acid were used as positive controls. The reaction mixtures contained 100  $\mu$ L of sample solution and 100  $\mu$ L DPPH methanol solution (0.3 mM), and then the absorbance was measured at 515 nm after incubated at 37 °C for 30 min. The DPPH radical scavenging effect was calculated using the following formula:

$$\% \text{ of free radical scavenging activity} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Comment: Where  $A_0$  is the absorbance of the DPPH instead of the sample, and  $A_1$  is the absorbance of sample.

**Nitric oxide radical scavenging activity:** Nitric oxide scavenging activity was estimated by assay based on Griess Illosvoy reaction [11]. About 50  $\mu$ L of the test sample ( $1 \times 10^{-9}$  –  $1 \times 10^{-4}$  M in DMSO)

was mixed with 50  $\mu$ L of sodium nitroprusside (10 mM), and 50  $\mu$ L of Griess reagent prepared in saline phosphate buffer (pH 7.4). The microplates were incubated for 150 min at room temperature and absorbance was recorded at 546 nm. Curcumin was used as a standard. The percentage of  $NO\cdot$  radical scavenging was calculated according to Eq. 1.

**Vascular superoxide production assay:** Vascular  $^{\circ}O_2^-$  production was measured in thoracic aorta segments using lucigenin-enhanced chemiluminescence, as previously described [12]. Vessels were incubated in a HEPES buffer (in mM: NaCl, 119; HEPES, 20;  $MgSO_4$ , 1; KCl, 4.6;  $KH_2PO_4$ , 0.4;  $Na_2HPO_4$ , 0.15;  $NaHCO_3$ , 5;  $CaCl_2$ , 1.2; glucose, 5.5; pH 7.4) aerated (95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ ) and maintained at 37°C for 30 min. After an equilibrated period samples were then transferred into fluorescence microplates containing 200  $\mu$ L of the HEPES buffer, 5  $\mu$ M lucigenin, and supplemented with the corresponding tested samples **1**, **8** and, quercetin ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) and the solvent DMSO. Under these conditions, superoxide levels were measured by chemiluminescence using a luminometer (Glomax Multi Detection System). Luminescence units were recorded every 30 s for 10 min. The relative values of  $^{\circ}O_2^-$  production were expressed as relative luminescence units per min and mg of dry tissue (RLU/min/mg).

**Statistical analysis:** Results of antioxidant activity are presented as mean  $\pm$  standard deviation (Mean  $\pm$  SD). Minimums of three independent experiments were carried out. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and significance of difference between the treatments was accepted at the level of significance  $p < 0.05$ .

**Acknowledgements** - C. Raposo is acknowledged for the Mass Spectra. Financial support of this work was provided by Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (INF11-054 and FID11-090), MINECO CTQ2015-68175-R, FEDER.

## References

- [1] (a) Marcos IS, Castañeda L, Basabe P, Diez D, Urones JG. (2009) Synthesis of (+)-leoporsin D. *Tetrahedron*, **65**, 9256-9263; (b) Marcos IS, Castañeda L, Basabe P, Diez D, Urones JG. (2008) Synthesis of sibiricinone A, sibiricinone B and leoheterin. *Tetrahedron*, **64**, 10860-10866; (c) Marcos IS, Castañeda L, Basabe P, Diez D, Urones JG. (2008) Synthetic studies to highly functionalised B ring labdanes. *Tetrahedron*, **64**, 8815-8829.
- [2] (a) Marcos IS, Escola, MA, Moro RF, Basabe P, Diez D, Sanz F, Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Sierra BG, Urones JG. (2007) Synthesis of novel antitumoral analogues of dysidiolide from ent-halimic acid. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **15**, 5719-5737; (b) Marcos IS, Pedrero AB, Sexmero MJ, Diez D, Basabe P, García N, Moro RF, Broughton HB, Mollinedo F, Urones JG. (2003) Synthesis of bioactive sesiterpenolides from ent-halimic acid. 15-Epi-ent-cladocoran A and B. *Journal Organic Chemistry*, **68**, 7496-7504; (c) Marcos IS, Pedrero AB, Sexmero MJ, Diez D, Basabe P, Hernández FA, Urones JG. (2003) Synthesis and absolute configuration of three natural ent-halimanolides with biological activity. *Tetrahedron Letters*, **44**, 369-372.
- [3] Rodilla, JM, Neves PP, Pombal S, Rives V, Trujillano R, Diez D. (2016) Hydrotalcite catalysis for the synthesis of new chiral building blocks. *Natural Product Research*, **26**, 486-492.
- [4] (a) Ghosh AK, Xi K. (2009) Total synthesis of (-)-platensimycin, a novel antibacterial agent. *Journal Organic Chemistry*, **74**, 1163-1170; (b) Valeev RF, Selezneva N K, Starikova ZA, Pankrat'ev EY, Miflakho MS. (2010) Chiral building blocks from *R*-(-)-carvone: *N*-bromosuccinimide-mediated addition – skeletal rearrangement of (-)-cis-carveol. *Mendeleev Communications*, **20**, 77-79; (c) Hagiwara H. (2013) Carvone as a versatile chiral building block for total syntheses of heterocyclic sesquiterpenoids. *Natural Product Communications*, **7**, 935-948.
- [5] Tahir I, Khan MR, Shah NA Aftab M. (2016) Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and amelioration of pulmonary fibrosis with *Phyllanthus emblica* leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**, 268-284.
- [6] Yazerski, VA, Spannring P, Gatineau D, Woerde CHM, Wiclawaska SM, Lutz M, Kleijn H, Gebbink RJMK. (2014) Making Fe(BPBP)-catalyzed C-H and C=C oxidations more affordable. *Organic and Biomolecular Chemistry Journal*, **12**, 2062-2070.
- [7] Mehta G, Chattopadhyay SK, Umariye JD. (1999) A new carvone based construction of the ring-A of taxoids, *Tetrahedron Letters*, **40**, 4881-4884.
- [8] Huang B, Zhang F, Yu G, Song Y, Wang X, Wang M, Gong Z, Su R, Jia Y. (2016) Gram scale syntheses of (-)-incarvilleine and its analogs. Discovery of potent analgesics for neuropathic pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, **59**, 3953-3963.
- [9] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, **87**, 315-424.
- [10] Lee YJ, Kim DB, Lee JS, Cho JH, Kim BK, Choi HS, Lee BY, Lee OH. (2013) Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. *Molecules*, **18**, 12937-12950.
- [11] Nagulendran KR, Velavan S, Mahesh R, Hazeena Begum V. (2007) *In vitro* antioxidant activity and total polyphenolic content of *Cyperus rotundus* rhizomes. *European Journal of Chemistry*, **4**, 440-449.
- [12] Kassar M, Montero MJ, Sevilla MA. (2010) *In vitro* antioxidant activity of pravastatin provides vascular protection. *European Journal of Pharmacology*, **630**, 107-111.

Artigo 3:  
**Diastereoselective Synthesis of 7,8-Carvone  
Epoxides**

Sofia Pombal, Ignacio E. Tobal, Alejandro M. Roncero, Jesus M. Rodilla, Narciso M. Garrido, Francisca Sanz, Alberto Esteban, Jaime Tostado, Rosalina F. Moro, Maria Jose Sexmero, Pablo G. Jambrina and David Diez

Article

# Diastereoselective Synthesis of 7,8-Carvone Epoxides

Sofia Pombal <sup>1</sup> , Ignacio E. Tobal <sup>2</sup> , Alejandro M. Roncero <sup>2</sup> , Jesus M. Rodilla <sup>1</sup> , Narciso M. Garrido <sup>2</sup>, Francisca Sanz <sup>3</sup>, Alberto Esteban <sup>2</sup>, Jaime Tostado <sup>2</sup> , Rosalina F. Moro <sup>2</sup>, Maria Jose Sexmero <sup>2</sup>, Pablo G. Jambrina <sup>4</sup>  and David Diez <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Departamento de Química, Faculdade de Ciências, FibEnTech—Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais, Universidade da Beira Interior, Rua Marques de Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal; sofia.pombal@gmail.com (S.P.); rodilla@ubi.pt (J.M.R.)

<sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, Plaza de los Caídos 1-5, 37008 Salamanca, Spain; ignaciotobal@usal.es (I.E.T.); alexmaron@usal.es (A.M.R.); nmg@usal.es (N.M.G.); aesteban@usal.es (A.E.); u158198@usal.es (J.T.); rfm@usal.es (R.F.M.); mjsex@usal.es (M.J.S.)

<sup>3</sup> Servicio de Difracción de Rayos X, Nucleus, Universidad de Salamanca, Plaza de los Caídos 1-5, 37008 Salamanca, Spain; sdrayox@usal.es

<sup>4</sup> Departamento de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; pablojambrina@gmail.com

\* Correspondence: ddm@usal.es; Fax: +34-923-294574

Received: 4 June 2018; Accepted: 16 June 2018; Published: 19 June 2018



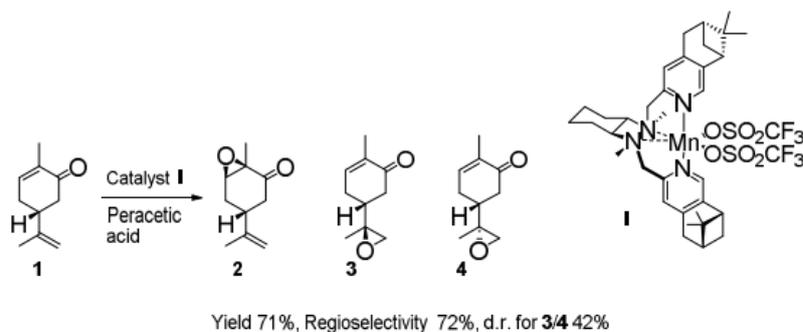
**Abstract:** The synthesis of the two 7,8-epoxides of carvone has been attained using organocatalysis in a two-step synthetic route through a bromoester intermediate. Among the different reaction conditions tested for the bromination reaction, moderate yields and diastereoselection are achieved using proline, quinidine, and diphenylprolinol, yielding the corresponding bromoesters that were transformed separately into their epoxides, obtaining the enantiopure products.

**Keywords:** organocatalysis; aminocatalysis; proline; carvone; epoxidation; epoxide

## 1. Introduction

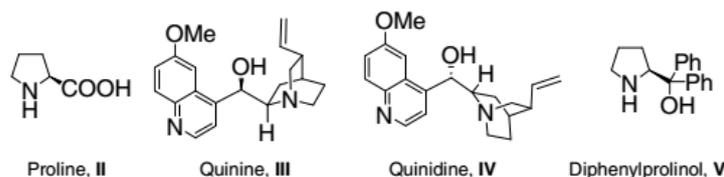
Carvone is a natural product frequently used as starting material for the synthesis of other naturally occurring compounds [1]. The interest in the carvone molecule as a chiral pool starting material is based on the presence of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl in a cyclohexane ring with a chiral centre and an extra double bond in the isopropyl chain [2–6]. Regiospecific epoxidation of carvone has been a classical challenge in organic chemistry [7]. Epoxidation of carvone in the internal double bond has been achieved in a diastereoselective reaction controlled by the chiral centre in basic conditions. However, when the epoxidation of the isopropylidene group with *m*-CPBA is carried out, no diastereoselection is obtained [8,9]. Recently, very interesting biological applications of the natural 7,8-epoxides mixture of carvone [10] have been described: of anti-inflammatory [10], antifedant, and phytotoxic [11] nature. To obtain these epoxy derivatives, the organic oxidants used for the epoxidation reaction are rather expensive and have to be used in a stoichiometric manner, and even in those conditions, the reaction yields are rather small. For these reasons, the interest in the synthesis of the 7,8-epoxides of carvone using catalysis has increased. Many metals have been used in this catalysed oxidation reaction: gallium [12]; aluminium [12]; vanadium and tungsten [13]; and di- or tetracoordinated metals with diamines, mainly manganese [14–16] (Scheme 1) or iron [17–20], or chitosan based with manganese, copper, cobalt, or nickel [21]. In all cases, the diastereoselectivity was very small or even negligible. An alternative method used for the synthesis of the 7,8-carvone epoxides consisted of the enzymatic oxidation of carvone by cytochrome P450<sub>cin</sub> [22]. In the last years, there

has been a great interest in the use of greener methods for this oxidation, and it has been achieved by chemoenzymatic methods [23] or with hydrotalcites and hydrogen peroxide [24]. Another strategy has been afforded, using *N*-bromosuccinimide (NBS) in DMSO and ulterior addition of bases [25]. In all these cases, no diastereoselectivity was found (0% diastereomeric ratio, d.r.)



**Scheme 1.** Synthesis of the epoxides with 42 d.r.

In the last years, there has been an increasing interest in metal-free reactions, with organocatalysis being one of the most interesting areas of research in organic chemistry [26–30]. An elevated number of chiral organocatalysts has been developed, where amines play an important role and comprise the main family of organocatalysts (Figure 1).



**Figure 1.** Organocatalysts frequently used in organic synthesis (proline, II; quinine, III; quinidine, IV; and diphenylprolinol, V).

We designed a different route based on the enantioselective halogenation of olefins by organocatalytic methods in order to obtain the required carvone epoxides. The halocyclization reactions have been a subject of interest for the organic chemist over the years [31]. Recently, the asymmetric halogenation of olefins has become an area of expansion, with many research groups interested in it [32–34].

Due to the importance of the natural epoxides 3 and 4 for the synthesis of natural products [35], where they act as starting materials, there has been a great interest in their synthesis. Notwithstanding this, to the best of our knowledge, they have not been separated or obtained separately. In this work, we report the synthesis of the 7,8-epoxyderivatives 3 and 4 separately from the bromoester derivatives of carvone 7 and 8 using an organocatalysed procedure.

## 2. Results and Discussion

Due to the different reactivity of the two double bonds of carvone, the enantioselective bromo-alcohol functionalization of the terminal double bond can be achieved using an organocatalyst in acidic conditions. It has been known for a long time that the use of amino acids with NBS produces a bromine transfer into the amino acid, which, if chiral, could be used for enantioselective bromination [36]. It is also known that quinidine and quinine derivatives form complexes with halogen that have been used in enantioselective halocyclization reactions [37]. For these reasons,

we selected the organocatalysts of Figure 1 (II–V) to obtain the corresponding bromoderivatives, listed in Table 1. In this case, we decided to use acidic media to open the corresponding bromonium intermediate. First of all, the bromination reaction of carvone, **1**, was carried out by reaction with NBS and *o*-nitrobenzoic acid in order to facilitate the ester hydrolysis afterwards, and different organocatalysts, such as proline **II**, quinine **III**, quinidine **IV**, or diphenylprolinol **V**, using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as the solvent (Table 1).

**Table 1.** Organocatalyst scope and optimization of reaction conditions for the synthesis of the bromoesters **7** and **8**.

Entry <sup>a</sup>	Catalyst, Load	T (°C)	Time (days)	Yield (%) <sup>b</sup>					d.r. (%) <sup>c</sup>
				1	5	6	7	8	
1	No catalyst	rt	6	15	28	-	15	12	11
2	No catalyst	39	3	15	27	-	18	16	6
3	Proline, <b>II</b> , 2%	rt	6	-	12	4	34	20	26
4	Proline, <b>II</b> , 20%	rt	6	-	13	5	36	18	33
5	Proline, <b>II</b> , 20%	39	6	-	17	-	34	18	31
6	Quinine, <b>III</b> , 2%	39	6	-	14	-	36	20	29
7	Quinine, <b>III</b> , 20%	rt	6	-	16	-	35	13	46
8	Quinine, <b>III</b> , 20%	39	6	-	17	-	36	16	38
9	Quinidine, <b>IV</b> , 2%	rt	6	-	13	-	56	11	67
10	Quinidine, <b>IV</b> , 2%	39	6	-	16	-	41	14	49
11	Quinidine, <b>IV</b> , 20%	rt	6	-	15	-	57	10	70
12	Quinidine, <b>IV</b> , 20%	39	6	-	11	-	54	16	54
13	Diphenylprolinol, <b>V</b> , 2%	rt	6	-	20	-	27	10	46
14	Diphenylprolinol, <b>V</b> , 2%	39	6	-	7	-	35	28	11
15	Diphenylprolinol, <b>V</b> , 20%	rt	6	-	21	-	50	17	50
16	Diphenylprolinol, <b>V</b> , 20%	39	6	-	23	-	44	24	29

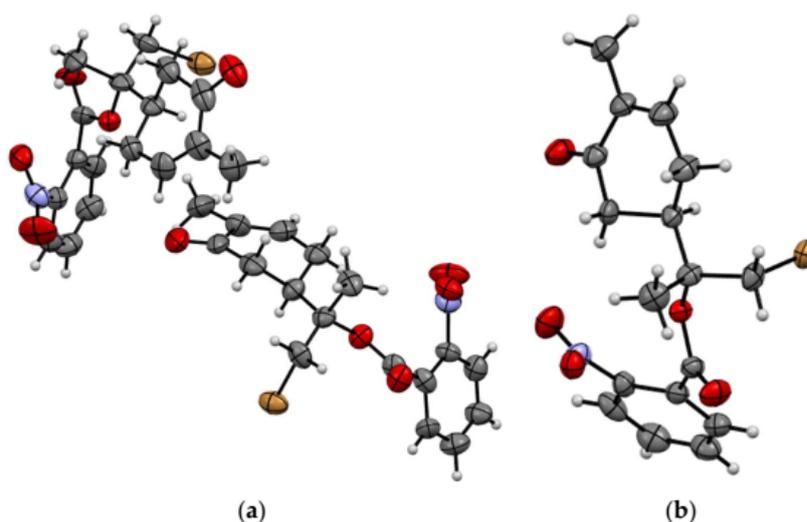
<sup>a</sup> All reactions were carried out in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at room temperature (rt.) or heating at 39 °C. Reaction conditions ratio: *R*-carvone/NBS/*o*-nitrobenzoic acid 1/1.4/1.4. <sup>b</sup> Yields refer to isolated compounds; the remaining proportion to 100% comprises decomposition products. <sup>c</sup> Diastereoselection in d.r. was based on isolated compounds **7** and **8**.

As displayed in Table 1, when the reaction shown in Table 1 is carried out without a catalyst at room temperature (entry 1), the reaction is quite slow, giving mainly the allyl bromoderivative **5** and the mixture of the bromoesters **7** and **8** in relatively low yield, with carvone recovered in a 15% yield. To increase the reaction rate, the reaction was heated to 39 °C, finding no substantial increase in the yield of **7** or **8** (entry 2). Then, we carried out the organocatalysed reaction using proline **II**, quinine **III**, quinidine **IV**, or diphenylprolinol **V** at different temperatures and changing the load of catalyst. When proline **II** was used (entries 3–5), the yield in the required bromoesters (**7** and **8**), was increased with a moderated d.r., and no recovery of carvone was observed, also with a decrease in the quantity of the bromoderivative **5** produced. When the temperature was raised to 39 °C, the yield of the bromoesters **7** and **8** decreased, and also the diastereoselectivity. It is worth noticing that a

larger amount of organocatalyst increased the diastereoselectivity moderately, but when heated, the diastereoselectivity decreased. A small quantity of a subproduct was identified as a mixture (3:1) of dibromoderivative **6** when proline was used as the organocatalyst (entries 3 and 4); due to the small amount obtained, the stereochemistry of the major diastereomer has not been determined. When quinine **III** is used as the catalyst (entries 6–8), it does not increase the yield for the obtention of **7** and **8**, but an increase in the diastereoselectivity is achieved when a 20% load is used (entry 7), leading to a global yield of 48% for the bromoesters and a diastereoselectivity of 46%. When quinidine **IV** was used, it led to an increase in the yield and diastereoselectivity (entries 9–12); in particular, if 20% of quinidine **IV** was used at room temperature (entry 11), the yield of the bromoesters rose to 67% with a diastereoselectivity of 70%. When diphenylprolinol **V** was used as the organocatalyst (entries 13–16) the best results were observed at room temperature and at a 20% load (entry 15).

To sum up, our results show that the use of an organocatalyst enhances the yield for the obtention of the bromoesters **7** and **8**, leading to moderate or good diastereocontrol, depending on the catalyst used and its load.

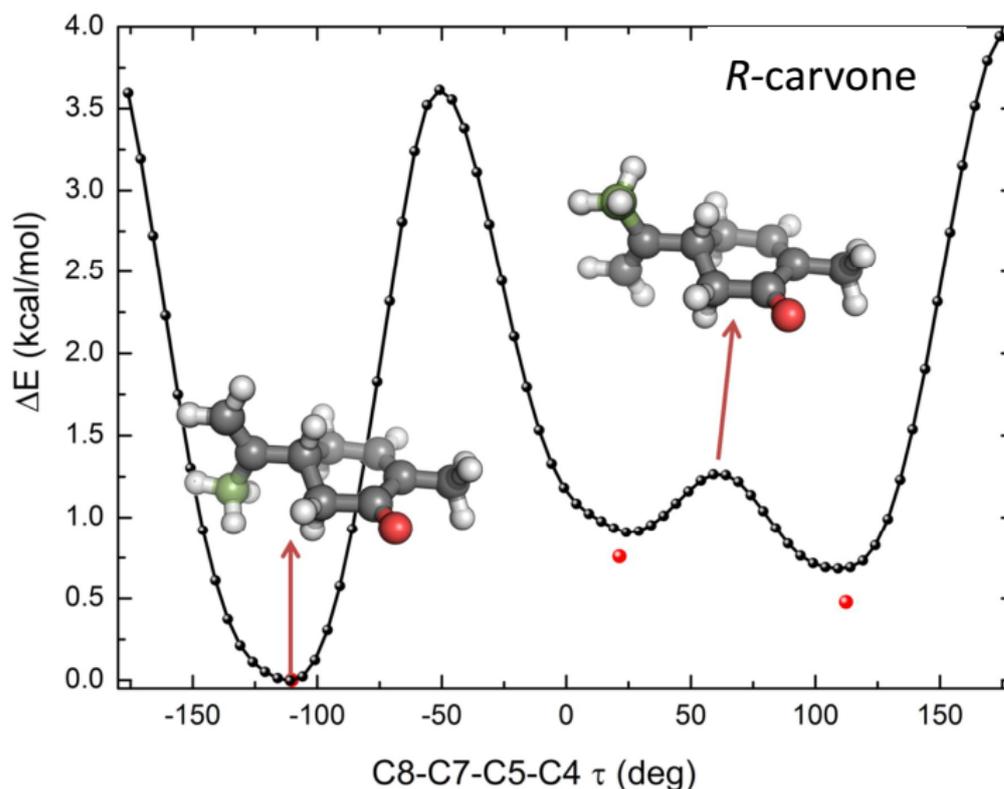
The structures of all the compounds were determined by their spectroscopic properties, and the stereochemistry was established by X-ray diffraction of the crystal structures of the bromoester **7** and **8** (Figure 2) [38]. In this manner, there was not any doubt about the stereochemistry of these compounds.



**Figure 2.** X-ray-determined structures of compounds: (a) bromoester **7** crystallised as dimers in the cell unit and (b) bromoester **8**. Atom colours: grey (C), white (H), blue (N), red (O) and light brown (Br).

To shed some light onto the mechanism of the reaction, we carried out a conformational study of the landscape associated with the dihedral angle between C8–C7–C4–C3 of *R*-carvone. In these calculations, the solvent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was simulated using the polarisable continuum model (see Methods for further details). The results, depicted in Figure 3, show that there are three minima separated by low energy barriers that could be easily crossed at room temperature, as expected for the rotation along a single C–C bond. The most stable conformation corresponds to that with the side chain perpendicular to the phenyl ring and with the methyl group *anti* to the H of C5. Interestingly, the structure with the methyl group *syn* to the H of C5 corresponds to a maximum (both structures are shown in Figure 3). The structure of the three minima correspond to those found by Avilés and coworkers [39] for *S*-carvone, although there are some differences in the barrier heights that separate them, probably due to the different *ab initio* method used and the fact that no solvent was included in the simulations of the Ref. [39].

Using the *ab initio* calculations, we could estimate that at 39 °C, *R*-carvone populates 58% of the lowest energy rotamer. These results are in good agreement with the experimental results in Table 1, explaining why only a modest stereoselectivity was achieved in the absence of catalysts.



**Figure 3.** Scan of the potential energy surface calculated along the C8–C7–C4–C3 of *R*-carvone at a MP2/6-31+G(d,p) level of theory (black points). The minima were further optimized at a MP2/6-311+G(d,p) level of theory and their relative energies are also shown as red points. The structures corresponding to the global minimum and the transition state between the two local minima are shown as spheres (red (O), white (H), grey (C), to highlight the difference between both conformers C9 is shown in green). (See text for further details).

Keeping in mind this conformational analysis, we suggest the reaction mechanism displayed in Figure 4, where a hydrogen bond between the carbonyl group of carvone and the hydroxyl group of the organocatalyst stabilizes the complex VI, leading to a bromination of the alpha side and the entry of the nucleophile by the beta side, as shown in Figure 4.

The bromoester derivatives 7 and 8 are intermediates in the synthesis of the epoxy derivatives of carvone. The hydrolysis reaction of 7 and 8 with alkali grants the synthesis of the epoxy derivatives 3 and 4, respectively (see Scheme 2).

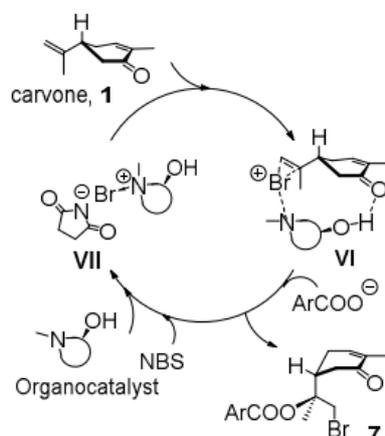
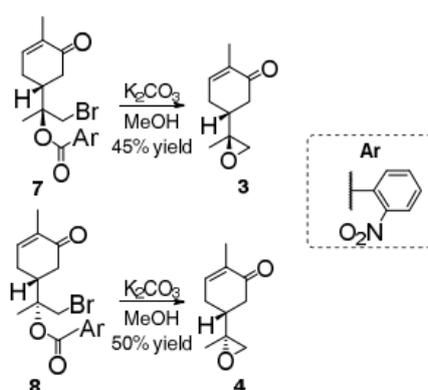


Figure 4. Proposed mechanism for the observed stereochemical outcome.



Scheme 2. Synthesis of 7,8-carvone epoxides 3 and 4. Further research using *S*-carvone is in process in order to test the possible match–mismatch diastereoselectivity.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Reagents

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased as the highest purity commercially available and were used without further purification. Diethyl ether, tetrahydrofuran and benzene were distilled from sodium and benzophenone under argon atmosphere; dichloromethane and pyridine were distilled from calcium hydride under argon atmosphere.

#### 3.2. Characterization

Melting points are uncorrected. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 400 MHz DRX (400 MHz <sup>1</sup>H and 100 MHz <sup>13</sup>C) (Bruker Biospin, Wissembourg, France) and a VARIAN 200 (200 MHz <sup>1</sup>H and 50 MHz <sup>13</sup>C) (Varian Inc, Palo Alto, California, USA). Chemical shifts are expressed in δ (ppm) and coupling constants (*J*) are given in Hz. All spectra were performed in CDCl<sub>3</sub> as solvent and referenced to the residual peak of CHCl<sub>3</sub> at δ = 7.26 ppm for <sup>1</sup>H and δ = 77.0 ppm for <sup>13</sup>C.

#### X-Ray Crystallography

Single crystals of 7 and 8 for XRD (X-ray diffraction) analysis were obtained by slow evaporation of a solution in hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (98:2) at room temperature. X-ray diffraction intensity data were collected for 7 and 8 compounds on a Bruker Kappa Apex II single crystal X-ray diffractometer (Bruker

AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA), equipped with graphite monochromator,  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) radiation and CCD detector. Suitable single crystals were mounted on a glass fiber using cyanoacrylate adhesive. The unit cell parameters were determined by collecting the diffracted intensities from 36 frames measured in three different crystallographic zones and using the method of difference vectors. Typical data sets consist of combinations of  $\omega$  and  $\phi$  scan frames with a typical scan width of  $0.5^\circ$  and an exposure time of 10 s/frame at a crystal-to-detector distance of  $\sim 4.0$  cm. The collected frames were integrated with the SAINT software package (SAINT, Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA) using a narrow-frame algorithm. Final cell constants were determined by the global refinement of reflections from the complete data set. Data were corrected for absorption effects using the multiscan method implemented in SADABS. Structure solutions and refinement were carried out using the SHELXTL software package (SHELXTL, Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA). The structures were solved by direct methods combined with difference Fourier synthesis and refined by full-matrix least-squares procedures, with anisotropic thermal parameters in the last cycles of refinement for all non-hydrogen atoms. The hydrogen atoms were positioned geometrically.

### 3.3. Computational Methods

Electronic structure calculations were carried out using the Gaussian09 [40] suite of programs on *R*-carvone. The dihedral angle between C8, C7, C5, and C4 was scanned at a MP2/6-31+G(d,p) level of theory, finding three minima whose structures were further optimized at a MP2/6-311++G(d,p) level of theory. The frequencies corresponding to the three structures were calculated to ensure that they correspond to minima of the potential energy surface. Solvation effects were included using the polarizable continuum model [41] with the standard dielectric constant of 8.93 for dichloromethane. The geometry of the global minimum is given in Table 2.

To rationalize the population of *R*-carvone in the surroundings of each minima, we calculated the canonical partition function, considering that each of the aforementioned scanned points corresponded to one different state.

**Table 2.** Coordinates of the global minimum: (MP2/6-31++G(d,p), E(Eh) =  $-463.43093$ ).

C	3.166	-0.027	1.285
C	2.926	0.247	-1.184
C	-3.461	-0.554	0.118
C	-1.150	-1.514	-0.146
C	0.348	-1.433	-0.231
C	0.098	1.040	-0.298
C	2.369	0.033	0.201
C	-1.967	-0.440	-0.014
C	-1.386	0.926	-0.015
C	0.872	-0.114	0.351
O	-2.090	1.917	0.171
H	0.447	2.017	0.051
H	0.223	1.001	-1.390
H	-3.961	-0.011	-0.690
H	-3.797	-0.111	1.060
H	-3.771	-1.601	0.089
H	-1.600	-2.507	-0.186
H	0.791	-2.283	0.303
H	0.654	-1.530	-1.284
H	0.638	-0.116	1.425
H	2.587	1.203	-1.599
H	4.019	0.254	-1.163
H	2.600	-0.538	-1.875
H	2.751	-0.168	2.280
H	4.246	0.062	1.197

## 4. Experimental Section

### 4.1. General Procedure for the Synthesis of the Bromoesters 7 and 8

To a solution of catalyst (2% or 20%) in 20 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, carvone **1** (1.00 g, 6.66 mmol), nitrobenzoic acid (1.56 g, 9.32 mmol), and *N*-bromosuccinimide (1.66 g, 9.32 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 6 days at room temperature or at 39 °C. After that, the solvent was evaporated and the resulting crude product was purified by chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc) to provide the isolated compounds: **5**, **6**, **7** and **8**.

Example of synthetic protocol to access diastereomers esters **7** and **8**, entry 3, Table 1:

Nitrobenzoic acid (1.56 g, 9.34 mmol) and *N*-bromosuccinimide (1.66 g, 9.38 mmol) were added to a solution containing proline **II** (15.3 mg, 0.13 mmol, 2% load) and carvone **1** (1.00 g, 6.66 mmol) in 20 ml of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The resulting mixture was stirred for 6 days at given temperature, and then the solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc, 7:3) to yield separately the desired bromoesters **7** (34%) and **8** (20%), d.r. 26%, and the side product was identified as the alkyl bromo derivative **5** (16%), together with the dibromoester compound **6** in a very low yield (4%).

#### 4.1.1. (5*R*)-9-Bromocarvone (**5**)

(*n*-hexane/EtOAc, 9:1) (243.2 mg, 16%).  $[\alpha]_D^{20} = -6.8$  ( $c = 1.46$  in CHCl<sub>3</sub>); IR (film)  $\nu$ : 3419, 2976, 2937, 1746, 1709, 1663, 1382, 1220, 1058, 950; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 6.72$  (1H, ddd,  $J = 6.1, 3.0, 1.6$  Hz, H-3), 5.26 (1H, s, Ha-8), 5.01 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, Hb-8), 3.97 (2H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-9), 2.97 (1H, ddd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0, 4.6 Hz, H-5), 2.61 (1H, m, Ha-6), 2.53 (1H, m, Ha-4), 2.34 (1H, dd,  $J = 16.0, 12.9$  Hz, Hb-6), 2.27 (1H, m, Hb-4), 1.74 (3H, s, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 199.0, 147.0, 144.2, 135.7, 115.8, 43.3, 38.2, 35.2, 31.6, 15.8$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrO 229.0223 (M + H<sup>+</sup>) found 229.0222.

#### 4.1.2. (5*R*,7*RS*)-7,8-Dibromocarvone (**6**)

(*n*-hexane/EtOAc, 95:5) (82.0 mg, 4%).  $[\alpha]_D^{20} = -10.6$  ( $c = 1.88$  mixture of diastereomers 3/1 in CHCl<sub>3</sub>); IR (film)  $\nu$ : 2980, 2923, 1668, 1380, 1257, 1083, 1060, 904, 711; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 6.71$  (1H, dt,  $J = 15.0, 4.6$  Hz, H-6), 3.93 (1H, m, Ha-8), 3.82 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz, Hb-8), 2.60 (2H, m, H-6), 2.42 (3H, m, H-5), 1.84 (3H, s, H-9), 1.76 (s, 3H, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 198.4, 143.4, 135.3, 71.0, 42.3, 40.7, 40.6, 28.8, 27.9, 15.6$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>O 308.9484 (M + H<sup>+</sup>) found 308.9479.

#### 4.1.3. (5*R*,7*R*)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoate)carvone (**7**)

(*n*-hexane/EtOAc, 7:3) (898.1 mg, 34%).  $[\alpha]_D^{20} = +41.7$  ( $c = 0.48$  in CHCl<sub>3</sub>); IR (film)  $\nu$ : 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 730; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.91$  (1H, dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-6'), 7.72 (1H, m, H-5'), 7.64 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.74 (1H, m, H-3), 4.06 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz, Ha-8), 4.01 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, m, Ha-6), 2.43 (1H, m, Ha-4), 2.29 (1H, m, Hb-6), 2.20 (1H, dd,  $J = 15.9, 14.2$  Hz, Hb-4), 1.74 (s, 3H, H-10), 1.72 (s, 3H, H-9); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 198.1, 164.4, 147.3, 144.5, 135.3, 133.4, 131.6, 129.7, 128.5, 124.0, 85.4, 41.0, 38.5, 35.4, 26.1, 19.0, 15.6$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>5</sub>Na 418.0260 (M + Na<sup>+</sup>) found 418.0265.

Crystal data for **7**: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>5</sub>, M = 396.23, monoclinic, space group P<sub>21</sub> (n° 4), a = 8.0408(6) Å, b = 28.336(2) Å, c = 8.1290(6) Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 103.603(4)^\circ$ , V = 1800.2(2) Å<sup>3</sup>, Z = 4, D<sub>c</sub> = 1.462 Mg/m<sup>3</sup>,  $\mu$  (Cu-K $\alpha$ ) = 3.340 mm<sup>-1</sup>, F(000) = 808. 10420 reflections were collected at  $3.12 \leq 2\theta \leq 67.40$  and merged to give 4916 unique reflections (R<sub>int</sub> = 0.0872), of which 2992 with I >  $\sigma$ (I) were considered to be observed. Final values are R = 0.0765, wR = 0.2113, GOF = 1.026, max/min residual electron density 0.703 and -0.652 e. Å<sup>-3</sup>.

#### 4.1.4. (5*R*,7*S*)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoate)carvone (8)

(*n*-hexane/EtOAc, 7:3) (528.3 mg, 20%).  $[\alpha]_D^{20} = +6.9$  ( $c = 1.44$  in  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film)  $\nu$ : 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 711;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.91$  (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-6'), 7.66 (1H, m, H-5'), 7.65 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.68 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, Ha-8), 3.90 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.58 (1H, m, Ha-6), 2.36 (1H, m, Ha-4), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.8, 14.7$  Hz, Hb-6), 2.19 (1H, m, Hb-4), 1.72 (3H, s, H-9), 1.71 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 198.5, 164.4, 147.1, 143.4, 135.6, 133.4, 133.1, 129.5, 128.5, 124.0, 85.2, 40.9, 38.2, 35.5, 26.3, 18.7, 15.6$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5\text{Na}$  418.0266 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) found 418.0265. See Figure 1 for X-ray.

Crystal data for 8:  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5$ ,  $M = 396.22$ , monoclinic, space group  $\text{P}_{21}$  ( $n^\circ 4$ ),  $a = 7.7282(4)$  Å,  $b = 13.9571(11)$  Å,  $c = 8.5804(6)$  Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 109.037(5)^\circ$ ,  $V = 874.89(11)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $D_c = 1.504$  Mg/m<sup>3</sup>,  $m = (\text{Cu-K}\alpha) = 3.437$  mm<sup>-1</sup>,  $F(000) = 404$ . 3704 reflections were collected at  $5.45 \leq 2\theta \leq 65.91$  and merged to give 2154 unique reflections ( $R_{\text{int}} = 0.0351$ ), of which 1799 with  $I > \sigma(I)$  were considered to be observed. Final values are  $R = 0.0491$ ,  $wR = 0.1280$ ,  $\text{GOF} = 1.062$ ,  $\text{max/min}$  residual electron density 0.417 and  $-0.716$  e. Å<sup>-3</sup>.

#### 4.2. Hydrolysis Reaction of Bromoesters 7 and 8

In a round-bottom flask equipped with a reflux condenser, compound 7 or 8, MeOH (20 mL), and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.1 mmol) were added. The resulting mixture was stirred at 35 °C and the progress of the reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC). The solvent was evaporated, and finally, the reaction product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc, 8:2) to obtain compound 3 (45%) or 4 (50%), respectively.

##### 4.2.1. (5*R*,7*S*)-7,8-Epoxy-carvone (3)

$[\alpha]_D^{20} = -13.5$  ( $c = 0.74$  in  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film)  $\nu$ : 2980, 2924, 1667, 1450, 1382, 1106, 901, 834, 704;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.72$  (m, 1H, H-3), 2.65 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, Ha-8), 2.61 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, Hb-8), 2.58 (m, 1H, Ha-6), 2.51 (m, 1H, Hb-6), 2.38 (m, 1H, Ha-4), 2.25 (m, 1H, Hb-4), 2.06 (m, 1H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-10), 1.29 (s, 3H, H-9);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 198.2, 144.2, 135.6, 58.0, 52.9, 41.3, 40.4, 27.7, 18.4, 15.7$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Na}$  189.0886 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) found 189.0891.

##### 4.2.2. (5*R*,7*R*)-7,8-Epoxy-carvone (4)

$[\alpha]_D^{20} = +12.8$  ( $c = 0.74$  in  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film)  $\nu$ : 2980, 2924, 1667, 1450, 1382, 1106, 901, 834, 704;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.73$  (m, 1H, H-3), 2.72 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, Ha-8), 2.58 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, Hb-8), 2.55 (m, 1H, Ha-6), 2.06 (m, 1H, H-5), 2.17 (m, 3H, Hb-6, Ha-4, Hb-4) 1.76 (s, 3H, H-10), 1.31 (s, 3H, H-9);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 199.1, 144.1, 135.6, 57.9, 52.4, 40.7, 39.9, 27.9, 19.0, 15.7$ ; HRMS (EI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Na}$  189.0886 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) found 189.0891.

## 5. Conclusions

Throughout this article, we have developed a novel method for the selective synthesis of 7,8-carvone epoxy derivatives. The diastereoselective synthesis of these epoxides from carvone in two steps with bromoester intermediates using organocatalysis has been achieved. To the best of our knowledge, it is the first time that these epoxides have been obtained separately; and due to their synthetic potential, this methodology can be used for the enantioselective synthesis of many natural products.

**Author Contributions:** Conceptualization: A.M.R and D.D.; investigation: S.P., I.E.T., A.M.R. and J.M.R.; methodology: S.P., N.M.G., R.F.M., M.J.S.; supervision: D.D. and J.M.R.; writing of original draft: A.M.R., I.E.T., A.E., J.T.; molecular modelling: P.G.J.; X-ray: F.S.

**Funding:** Financial support for this work came from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO/FEDER-CTQ2015-68175-R), the European Regional Development Fund (FEDER), the Regional

Government of Castilla y León (BIO/SA59/15, UIC21) and the Universidad de Salamanca. AMR and IET thank the Ministry of Education, Culture and Sports (MECD) and the Regional Government of Castile & León for their fellowships, respectively. P.G.J. gratefully acknowledges funding by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant MINECO/FEDER-CTQ2015-65033-P) and computing time allocation from the “Centro de Computación Científica” at Universidad Autónoma de Madrid.

**Acknowledgments:** The authors thank also Anna M. Lithgow for the NMR spectra and César Raposo for the mass spectra. This manuscript is dedicated to Isidro S. Marcos on the occasion of his 65th birthday.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References and Note

1. Finkbeiner, P.; Murai, K.; Röpke, M.; Sarpong, R. Total synthesis of terpenoids employing a “benzannulation of carvone” strategy: Synthesis of (–)-crotopogoudin. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11349–11352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nannini, L.J.; Nemat, S.J.; Carreira, E.M. Total synthesis of (+)-sarcophytin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 823–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kobayashi, K.; Kunimura, R.; Takagi, H.; Hirai, M.; Kogen, H.; Hirota, H.; Kuroda, C. Total synthesis of highly oxygenated bisabolane sesquiterpene isolated from *ligularia lankongensis*: Relative and absolute configurations of the natural product. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 703–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Senthil Kumaran, R.; Mehta, G. A versatile, rcm based approach to eudesmane and dihydroagarofuran sesquiterpenoids from (–)-carvone: A formal synthesis of (–)-isocelorbicol. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1718–1731. [[CrossRef](#)]
5. Abad, A.; Agulló, C.; Cuñat, A.C.; Llosá, M.C. Stereoselective construction of the tetracyclic scalarane skeleton from carvone. *Chem. Commun.* **1999**, 427–428. [[CrossRef](#)]
6. Abad, A.; Agulló, C.; Cuñat, A.; De Alfonso, I.; Navarro, I.; Vera, N. Synthesis of highly functionalised enantiopure bicyclo[3.2.1]-octane systems from carvone. *Molecules* **2004**, *9*, 287–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mak, K.K.W.; Lai, Y.M.; Siu, Y.-H. Regiospecific epoxidation of carvone: A discovery-oriented experiment for understanding the selectivity and mechanism of epoxidation reactions. *J. Chem. Ed.* **2006**, *83*, 1058. [[CrossRef](#)]
8. Masarwa, A.; Weber, M.; Sarpong, R. Selective c–c and c–h bond activation/cleavage of pinene derivatives: Synthesis of enantiopure cyclohexenone scaffolds and mechanistic insights. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6327–6334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Valeev, R.F.; Bikzhanov, R.F.; Selezneva, N.K.; Gimalova, F.A.; Miftakhov, M.S. Synthesis of 6-hydroxycarvone derivatives and their oxidative decyclization with lead tetraacetate. *Russ. J. Org. Chem.* **2011**, *47*, 1287. [[CrossRef](#)]
10. Sepúlveda-Arias, J.C.; Veloza, L.A.; Escobar, L.M.; Orozco, L.M.; Lopera, I.A. Anti-inflammatory effects of the main constituents and epoxides derived from the essential oils obtained from *tagetes lucida*, *cymbopogon citratus*, *lippia alba* and *eucalyptus citriodora*. *J. Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 186–193. [[CrossRef](#)]
11. Kimbaris, A.C.; González-Coloma, A.; Andrés, M.F.; Vidali, V.P.; Polissiou, M.G.; Santana-Méridas, O. Biocidal compounds from *mentha* sp. Essential oils and their structure–activity relationships. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mandelli, D.; Kozlov, Y.N.; da Silva, C.A.R.; Carvalho, W.A.; Pescarmona, P.P.; Cella, D.d.A.; de Paiva, P.T.; Shul’pin, G.B. Oxidation of olefins with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysed by gallium(III) nitrate and aluminum(III) nitrate in solution. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2016**, *422*, 216–220. [[CrossRef](#)]
13. Kamata, K.; Sugahara, K.; Yonehara, K.; Ishimoto, R.; Mizuno, N. Efficient epoxidation of electron-deficient alkenes with hydrogen peroxide catalysed by [γ-PW<sub>10</sub>O<sub>38</sub>V<sub>2</sub>(μ-OH)<sub>2</sub>]<sup>3–</sup>. *Chemistry* **2011**, *17*, 7549–7559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gomez, L.; Garcia-Bosch, I.; Company, A.; Sala, X.; Fontrodona, X.; Ribas, X.; Costas, M. Chiral manganese complexes with pinene appended tetradentate ligands as stereoselective epoxidation catalysts. *Dalton Trans.* **2007**, 5539–5545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Yu, S.; Miao, C.-X.; Wang, D.; Wang, S.; Xia, C.; Sun, W. Mnii complexes with tetradentate n4 ligands: Highly efficient catalysts for the epoxidation of olefins with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2012**, *353–354*, 185–191. [[CrossRef](#)]
16. Garcia-Bosch, I.; Ribas, X.; Costas, M. A broad substrate-scope method for fast, efficient and selective hydrogen peroxide-epoxidation. *Adv. Syn. Catal.* **2009**, *351*, 348–352. [[CrossRef](#)]
17. Spanning, P.; Yazerski, V.A.; Chen, J.; Otte, M.; Weckhuysen, B.M.; Bruijninx, P.C.A.; Klein Gebbink, R.J.M. Regioselective cleavage of electron-rich double bonds in dienes to carbonyl compounds with [Fe(OTf)<sub>2</sub>(mix-BPBP)] and a combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NaIO<sub>4</sub>. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 3462–3466. [[CrossRef](#)]
18. Odon, F.; Girgenti, E.; Lebrun, C.; Marchi-Delapierre, C.; Pécaut, J.; Ménage, S. Iron coordination chemistry of N<sub>2</sub>Py<sub>2</sub> ligands substituted by carboxylic moieties and their impact on alkene oxidation catalysis. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 85–96. [[CrossRef](#)]
19. Clemente-Tejeda, D.; López-Moreno, A.; Bermejo, F.A. Non-heme iron catalysis in C=C, C–H, and CH<sub>2</sub> oxidation reactions. Oxidative transformations on terpenoids catalysed by Fe(bpmen)(OTf)<sub>2</sub>. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2977–2986. [[CrossRef](#)]
20. Yazerski, V.A.; Spanning, P.; Gatineau, D.; Woerde, C.H.M.; Wieclawska, S.M.; Lutz, M.; Kleijn, H.; Klein Gebbink, R.J.M. Making Fe(BPBP)-catalysed C–H and C=C oxidations more affordable. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2062–2070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Thatte, C.S.; Rathnam, M.V.; Kumar, M.S.S. Synthesis, characterization and application of chitosan based schiff base-transition metal complexes (Mn, Cu, Co, Ni). *JOAC* **2013**, *2*, 1192.
22. Stok, J.E.; Yamada, S.; Farlow, A.J.; Slessor, K.E.; De Voss, J.J. Cytochrome P450<sub>cin</sub> (CYP176A1) D241N: Investigating the role of the conserved acid in the active site of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 688–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Méndez-Sánchez, D.; Ríos-Lombardía, N.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V. Chemoenzymatic epoxidation of alkenes based on peracid formation by a rhizomucor miehei lipase-catalysed perhydrolysis reaction. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1144–1148. [[CrossRef](#)]
24. Rodilla, J.M.; Neves, P.P.; Pombal, S.; Rives, V.; Trujillano, R.; Díez, D. Hydrotalcite catalysis for the synthesis of new chiral building blocks. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 834–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Majetich, G.; Shimkus, J.; Li, Y. Epoxidation of olefins by β-bromoalkoxydimethylsulfonium ylides. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6830–6834. [[CrossRef](#)]
26. Dalko, P.I.; Moisan, L. Enantioselective organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3726–3748. [[CrossRef](#)]
27. List, B. Asymmetric aminocatalysis. *Synlett* **2001**, *2001*, 1675–1686. [[CrossRef](#)]
28. Brown, S.P.; Brochu, M.P.; Sinz, C.J.; MacMillan, D.W.C. The direct and enantioselective organocatalytic α-oxidation of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10808–10809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Pidathala, C.; Hoang, L.; Vignola, N.; List, B. Direct catalytic asymmetric enolxo aldolizations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2785–2788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. MacMillan, D. *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005; p. 454.
31. Jiang, X.; Liu, H. 4.07 electrophilic cyclization a2-knochel, paul. In *Comprehensive Organic Synthesis II*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 412–494.
32. Bar, S. Organocatalysis in the stereoselective bromohydrin reaction of alkenes. *Can. J. Chem.* **2010**, *88*, 605–612. [[CrossRef](#)]
33. Castellanos, A.; Fletcher, S.P. Current methods for asymmetric halogenation of olefins. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5766–5776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tan, C.K.; Yeung, Y.-Y. Recent advances in stereoselective bromofunctionalization of alkenes using n-bromoamide reagents. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7985–7996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Valeev, R.F.; Bikzhanov, R.F.; Yagafarov, N.Z.; Miftakhov, M.S. Synthesis of the northern fragment of an epothilone d analogue from (–)-carvone. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6868–6872. [[CrossRef](#)]
36. Antelo, J.M.; Arce, F.; Crueiras, J. Kinetics of electrophilic bromine transfer from n-bromosuccinimide to amines and amino acids. *J. Chem. Soc. Perk. Trans.* **1995**, *2*, 2275–2279. [[CrossRef](#)]
37. Chen, G.; Ma, S. Enantioselective halocyclization reactions for the synthesis of chiral cyclic compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8306–8308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Crystallographic data for the structures reported in this paper has been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary material No. CCDC 1821654–1821653 the data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures).
39. Avilés Moreno, J.R.; Huet, T.R.; González, J.J.L. Conformational relaxation of s-(+)-carvone and r-(+)-limonene studied by microwave fourier transform spectroscopy and quantum chemical calculations. *Struct. Chem.* **2013**, *24*, 1163–1170. [[CrossRef](#)]
40. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 09 rev. B.01*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
41. Scalmani, G.; Frisch, M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## 4. Discussão de resultados

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

*George Bernard Shaw*



## 4. Discussão de resultados

### 4.1 Obtenção de derivados de carvona por tratamento com $\text{AlCl}_3$ e $\text{H}_2\text{O}_2$

Os compostos naturais são cruciais na química orgânica, não só pelas suas atividades biológicas, mas por serem bons materiais de partida para a síntese de fármacos quirais. Vários tem sido os estudos envolvendo o uso de diferentes produtos naturais como o esclareol para a síntese de compostos biologicamente ativos<sup>172, 173</sup>.

A oxidação da carvona para a obtenção de produtos de epoxidação regioselectiva foi realizada durante muitos anos devido à importância dos epóxidos, já conhecidos a 2,3-epoxicarvona (2) e a 8-9-epoxicarvona (3), e à sua aplicação<sup>174,175</sup>.

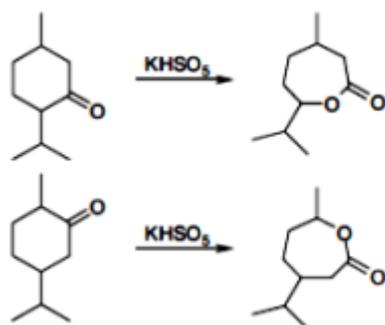
Nos últimos anos, o uso de catalisadores heterogêneos em reações químicas tem aumentado bastante devido às suas vantagens<sup>176</sup>:

- Elevada seletividade;
- Possível reutilização do catalisador;
- Facilidade na separação dos compostos;
- Entre outros.

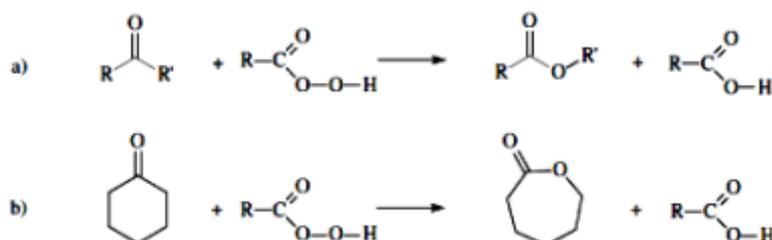
A epoxidação de ligações duplas isoladas é classicamente obtida pelo uso de peróxidos ou hidroperóxidos<sup>177</sup>. A epoxidação por oxidantes baratos continua a ser um problema bastante importante, no entanto, o peróxido de hidrogénio parece ser o reagente ideal, uma vez que apenas fornece água como subproduto<sup>167</sup>, ou seja, é um reagente que não leva à formação de outros subprodutos indesejáveis.

A oxidação de Baeyer-Villiger foi inicialmente descrita por Adolf Baeyer e Victor Villiger, em 1899, quando converteram cetonas cíclicas, como a cânfora, a mentona e a carvona nas lactonas correspondentes, por meio de uma transformação oxidativa usando ácido Caro's (mistura de monopersulfato de potássio e ácido sulfúrico concentrado) na ausência de solvente<sup>178</sup> (figura 31). As lactonas são importantes intermediários industriais, sendo aplicadas na produção de polímeros, fármacos, herbicidas e solventes<sup>179</sup>.

Esta reação foi posteriormente estendida a oxidações de aldeídos a ésteres ou aos seus produtos de hidrólise com outros reagentes, peróxidos e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre outros oxidantes<sup>180</sup>. Na figura 32 observa-se as conversões de uma cetona acíclica em éster e uma cetona cíclica em lactona, para a oxidação de Baeyer-Villiger.



**Figura 31.** Reação original estudada por Baeyer e Villiger, envolvendo a oxidação com monopersulfato de potássio.



**Figura 32.** Oxidação de Baeyer-Villiger para (a) formação de um éster a partir de uma cetona acíclica e (b) formação de uma lactona a partir de uma cetona cíclica.

A oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas fornece uma série de vantagens, tais como <sup>181, 182</sup>:

- Elevada tolerância à presença de uma variedade de grupos funcionais no substrato (por exemplo quando a ligação dupla é conjugada com o grupo carbonilo, a seletividade é direcionada no sentido da oxidação de Baeyer-Villiger, mas quando a ligação C=C não é conjugada, a seletividade depende da substituição desta dupla ligação);
- A regioquímica geralmente pode ser controlada através da capacidade de migração dos diferentes grupos - para alguns casos (por exemplo, para sistemas bicíclicos) - contudo, a regioseletividade do processo de inserção do oxigênio pode ser influenciada por vários fatores estereoeletrônicos;
- Permite o uso de uma ampla variedade de oxidantes. Devido à sua versatilidade, esta reação tornou-se numa das mais aplicadas em síntese orgânica, originando grande variedade de produtos químicos, que vão desde simples monómeros utilizados na indústria de poliésteres, a moléculas mais complexas aplicadas na síntese de produtos farmacêuticos (antibióticos, esteroides)<sup>183</sup>.

A diversidade da reação e a sua utilidade em processos técnicos, bem como na síntese de compostos naturais, tem levado a uma intensa pesquisa sobre novos reagentes, agentes oxidantes e sistemas catalíticos. Isto também resultou numa ampliação da variedade de compostos carbonílicos que podem ser utilizados como matérias primas para esta reação<sup>184</sup>. Deve-se ter em mente que os métodos catalíticos fornecem atualmente uma série de

vantagens sobre os métodos estequiométricos tradicionais, que vão desde condições operacionais mais simples ao uso de reagentes menos dispendiosos e maior compatibilidade ambiental (um resultado da utilização e produção de quantidades mínimas de produtos tóxicos e subprodutos, se houver)<sup>171</sup>.

#### 4.1.2 Apresentação e discussão dos resultados

Para realizar estas reações foi selecionado como material de partida a *R*-carvona (1) obtida comercialmente (Aldrich).

Estas reações foram realizadas utilizando diferentes condições, ou seja, alteração do tempo de reação, quantidade de catalisador, quantidade de oxidante e temperatura, permitindo assim verificar quais as melhores condições de reação. E foram ainda realizadas utilizando como produto de partida (*R*)-carvona (1); mistura de carvona (1) e 2,3-epoxicarvona (2).

De um modo geral, nas diferentes reações realizadas, obtiveram-se os produtos apresentados na figura 33 os produtos obtidos apresentam um rendimento variável dependendo das condições aplicadas na sua síntese, podemos verificar que o produto principal a ser obtido é a 2,3-epoxicarvona (2), podendo também ser obtida a 7,8-epoxicarvona (3). Na obtenção dos produtos é possível verificar que a variação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de AlCl<sub>3</sub> permitem uma melhoria nos rendimentos obtidos, assim como uma temperatura mais ou menos elevada e ainda um maior ou menor tempo de reação.

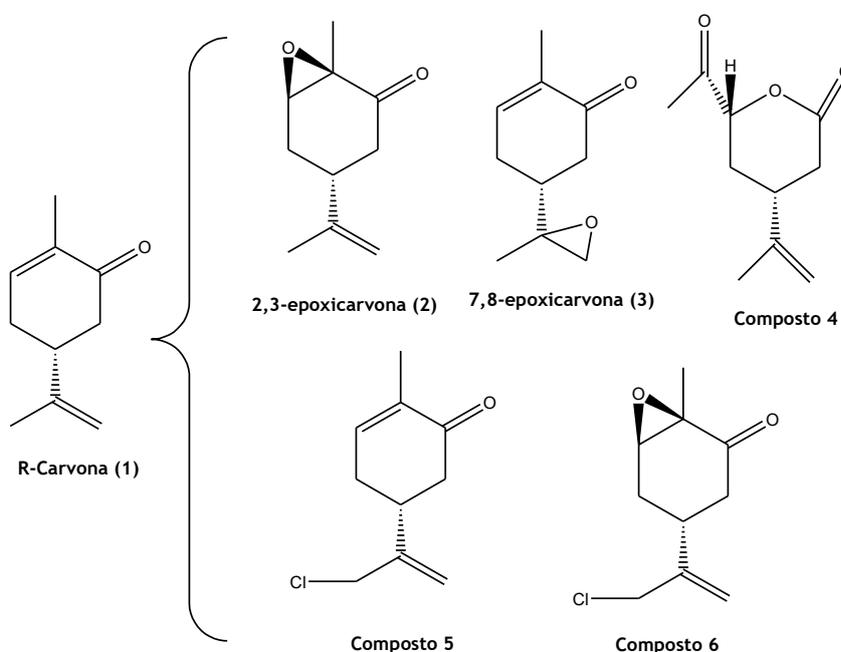


Figura 33. Produtos resultantes das reações com AlCl<sub>3</sub>.

Para a análise dos produtos obtidos nestas reações, os produtos resultantes das reações foram submetidos a cromatografia em coluna e analisados por técnicas de espectroscopia de

infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e massas de alta resolução.

Comparando a reação I e II pode-se verificar que os produtos obtidos são idênticos, contudo a grande diferença são as condições reacionais aplicadas apenas interferem nos rendimentos obtidos, como é possível verificar na figura 34.

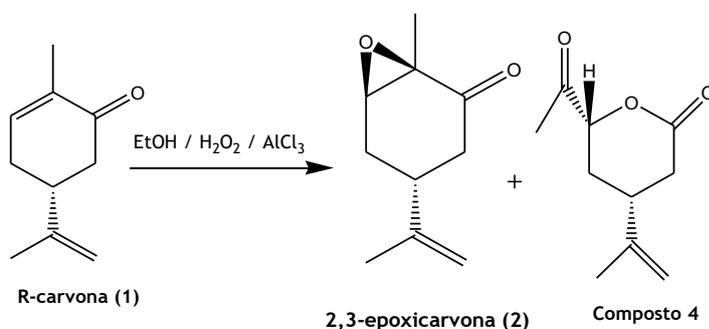


Figura 34. Produtos resultantes das reações I e II.

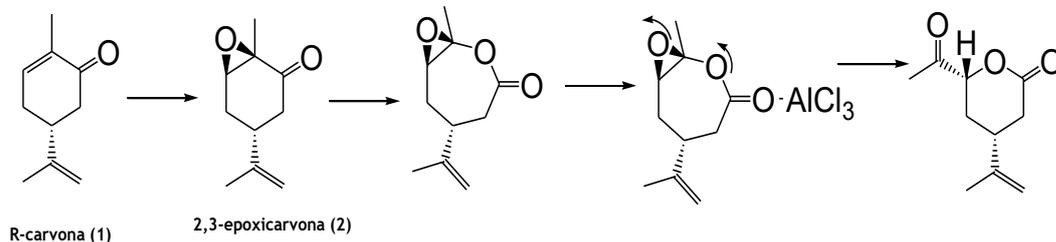
Pode-se verificar na tabela 4 que para a reação I, utilizando uma quantidade de 33.3 MMol de produto de partida, se obtém um rendimento de *R*-carvona (1) por reagir de 18.7%, sendo este rendimento bastante elevado o que indica uma reação com pouca eficácia, também o rendimento de 2,3-epoxicarvona (2) obtido é baixo, isto é apenas de 4.5%, isto é devido à quantidade de carvona que ficou por reagir, mas o maior problema desta reação está na mistura que se obtém de *R*-carvona (1) e de 2,3-epoxicarvona(2). Esta mistura apresenta um rendimento de 10.5%, a elevada quantidade desta mistura não permitiu tornar eficaz este procedimento.

Tabela 4. Rendimentos obtidos nas reações I e II.

Reação	Rendimento %		
	Composto		
	1	2	4
I	18.7	4.5	4.8
II	42.9	3.3	7.0

Contudo, foi possível obter um novo derivado, o composto 4, com um rendimento de 4.8%, rendimento baixo, porém, significativo para este trabalho. Este composto é descrito pela primeira vez neste trabalho, a estrutura deste composto foi proposta com base no mecanismo de reação e nas constantes de acoplamento do H-3 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Pode entender-se a síntese deste composto pelo mecanismo proposto na figura 35. Em primeiro lugar, é provocada a epoxidação da ligação dupla interna, seguida por uma reação de Bayer-Villiger de modo a formar o produto intermediário, uma lactona de sete; este produto intermediário é induzido pela

coordenação do tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) com o oxigénio, a sua ciclação levou à formação deste composto.



**Figura 35.** Mecanismo proposto para a síntese do composto 4 a partir da *R*-carvona (1).

Da reação II, para a reação I a diferença obtida apenas se encontra nos rendimentos dos produtos, como é possível verificar na tabela 4, isto é partindo de 13.3 mmol de *R*-carvona (1) obtém-se 42.8%, da mesma por reagir, sendo este rendimento muito superior ao anterior, contudo existe um ligeiro decréscimo no rendimento de 2,3-epoxicarvona (2) passando este a ser de 3.32%, o uso de uma menor quantidade de produto de partida levou não só à obtenção de rendimentos mais baixos dos produtos como levou também à obtenção de um rendimento mais baixo na mistura que se obtém de *R*-carvona (1) e de 2,3-epoxicarvona (2) sendo este apenas de 5.0%. Contudo, o mais significativo nesta reação foi uma vez mais a obtenção do composto 4 que se obteve com um rendimento de 7.0%, isto permite afirmar que as condições da reação II são mais indicadas para a obtenção deste composto.

A reação III foi realizada em tentativa de melhorar os rendimentos dos produtos obtidos (produtos apresentados na figura 36), como se observa na tabela 5, assim desta forma utilizou-se um tempo de reação de 3 dias e uma quantidade de produto de partida de 13.3mmol.

As condições aplicadas permitem ainda obter 36.2% de *R*-carvona (1), em contrapartida apenas se obtém a 2,3-epoxicarvona (2) em mistura com carvona, num rendimento de 2.5%, este rendimento é inferior aos anteriores. Em contrapartida obtém-se a 7,8-epoxicarvona (3) com um rendimento de 2.6%, verificando que estas condições são mais propícias à formação deste epóxido na ligação dupla fora do anel. Estas condições de reação são também favoráveis para a obtenção do composto 4, ainda que com um rendimento de apenas 4.0%, valor inferior ao obtido na reação II, mas ainda assim é um rendimento aceitável para estas condições de trabalho. A grande novidade nesta reação está na obtenção do composto 5, composto já conhecido da literatura, mas nunca obtido com estas condições de reação, este produto é obtido com um rendimento de 4,5%.

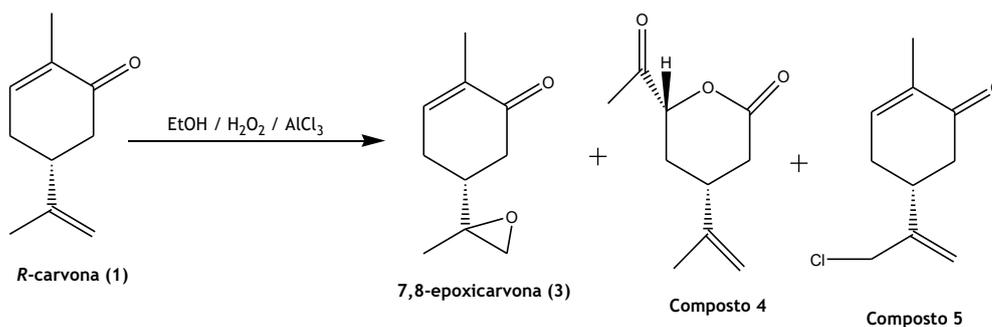


Figura 36. Produtos resultantes na reação III.

Tabela 5. Rendimentos obtidos na reação III.

Reação	Rendimento %			
	Composto			
	1	3	4	5
III	36.2	2.6	4.0	4.5

As reações IV e V foram realizadas como um teste de modo a conhecer o comportamento da mistura dos dois compostos, isto é, se tinham a capacidade de influenciar os produtos obtidos, e podemos verificar pela figura 37 que é possível obter um produto diferente dos que se obtiveram até aqui, a formação deste produto é influenciada pela presença de 2,3-epoxycarvona (2) no produto de partida.

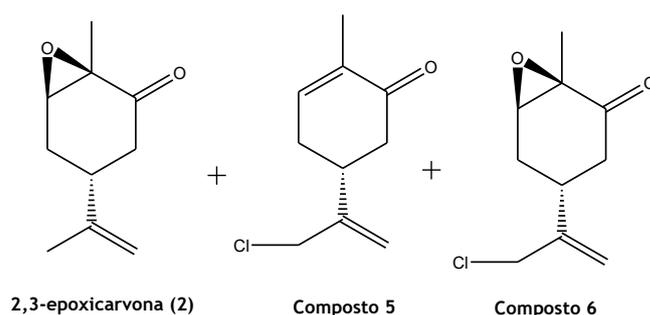


Figura 37. Produtos resultantes das reações IV e V.

Analisando a tabela 6 pode-se verificar que existem grandes variações nos rendimentos obtidos, isto devido à quantidade de produto inicial e restantes condições aplicadas. Deste modo verifica-se que para a reação IV se obtém 1.32% de R-carvona (1) por reagir, contudo a parte que existia de 2,3-epoxycarvona (2) foi transformada no composto 5 com um rendimento de 6.3%, a grande

“novidade” aqui é a obtenção do composto **6**, um produto que além da estrutura base do composto **5** acrescenta um epóxido no C-2 e C-3, com um rendimento de 2.3%. O composto **6** deriva da formação do composto **5** com a junção do composto **2**, levando assim à formação do epóxido na ligação dupla do anel do composto **5**, formando assim este novo composto. Nesta reação ainda é possível obter uma mistura de *R*-carvona (**1**) e de 2,3-epoxicarvona (**2**) com um rendimento de 23.4%.

A reação **V** varia nos produtos obtidos, isto é, obtém-se 2,3-epoxicarvona (**2**) com um rendimento de 31.4%, contudo obtém-se uma mistura de *R*-carvona (**1**) e de 2,3-epoxicarvona (**2**) com um rendimento de 27.3%, a grande vantagem desta reação é a obtenção do composto **6** com um rendimento de 4.7%.

Tabela 6. Rendimentos obtidos nas reações IV e V.

Reação	Rendimento %			
	Composto			
	1	2	5	6
IV	26.1	-	6.3	2.3
V	-	31.4	-	4.7

Para finalizar as reações deste género realizaram-se as reações **VI** e **VII**, estas deram origem aos produtos apresentados na figura 38. Nestas reações a diferença aplicada foi a temperatura de reação que foi aumentada para 75°C e 70°C, respetivamente, e a quantidade de produto de partida.

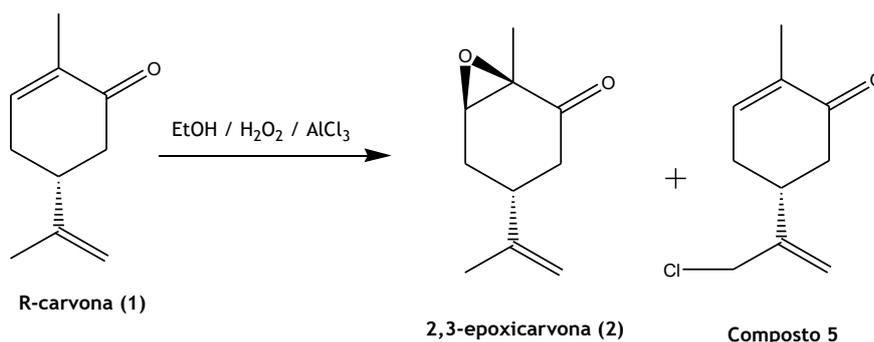


Figura 38. Produtos resultantes das reações VI e VII.

É possível observar na tabela 7 que os rendimentos obtidos são diferentes, uma vez que as condições de partida também eram bastante diferentes. Assim para a reação **VI** verifica-se a existência de 13.2% de *R*-carvona (**1**) por reagir, e a formação do composto **5**, composto com grupo -Cl na posição C-9, com um rendimento de 8.8%. No entanto não se verificou a existência

da 2,3-epoxicarvona (2). Na reação VII obtém-se a *R*-carvona (1) com um rendimento de 25.3%, forma-se também a 2,3-epoxicarvona (2) com um rendimento de 5.4%, porém nesta reação também não existe a evidência da mistura de *R*-carvona (1) e de 2,3-epoxicarvona (2). É possível ainda a formação do composto 5 com um rendimento de 7.9%. Verifica-se assim que para uma temperatura de reação tão alta e um tempo tão curto de reação estas condições não são favoráveis.

Tabela 7. Rendimentos obtidos nas reações VI e VII.

Reação	Rendimento %		
	Composto		
	1	2	5
VI	13.2	-	8.8
VII	25.3	5.4	7.9

Por fim foi realizada a reação VIII, esta reação foi realizada à temperatura ambiente, devido à falta de temperatura apenas se obtiveram misturas que não foram possíveis de separar, sendo a única possível de verificar a mistura de *R*-carvona (1) e de 2,3-epoxicarvona (2) com um rendimento de 7.9% e ainda 75.9% de *R*-carvona (1). Assim, é possível afirmar que este tipo de condição de reação não se deve aplicar.

## 4.2 Derivados de carvona com ácido p-tolueno sulfônico e NBS

A n-bromosuccinimida (NBS) é um agente oxidante bastante forte, que tem vindo a “encontrar” numerosas aplicações na química sintética e analítica, isto devido principalmente à sua elevada seletividade<sup>185</sup>. A NBS tem sido utilizada para bromar uma enorme variedade de compostos orgânicos, e também na oxidação de amins e de aminoácidos<sup>186</sup>. Nestas últimas reações, as amins são convertidas nos correspondentes aldeídos, enquanto que os aminoácidos formam um N-bromoaminoácido instável, que subseqüentemente descarboxila de modo a dar o aldeído ou nitrilo correspondente dependendo das condições de reação<sup>176</sup>.

A NBS por ser considerada um agente de bromação, isto devido à elevada capacidade para reação na posição alílica<sup>187</sup> (figura 39) e ao fácil manuseio. Tem vindo a ser utilizada cada vez mais para a bromação de compostos com grupos carbonilos<sup>188</sup>. No entanto, os catalisadores e os reagentes que acompanham a NBS devem também ser de fácil aquisição e de fácil manuseio. Foi relatado que as cetonas são  $\alpha$ -bromadas por reações com NBS iniciadas por azobisisobutironitrilo (AIBN) ou peróxido de dibenzoílo (BPO) em refluxo com  $\text{CCl}_4$ <sup>178</sup>.

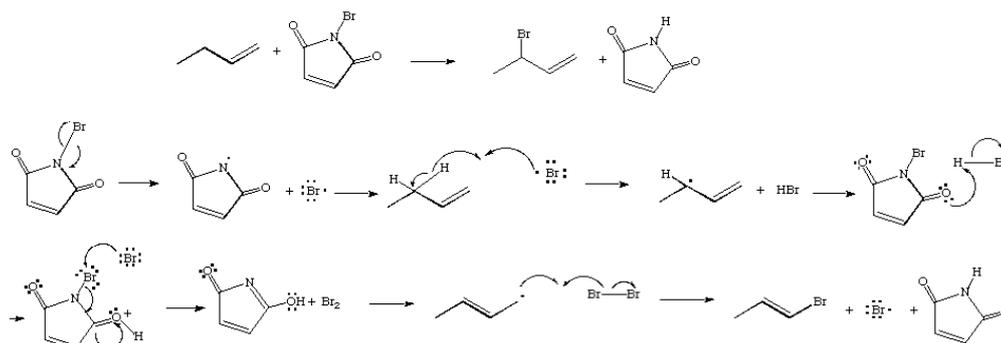


Figura 39. Exemplo de reação com NBS.

O NBS reage com alcenos em solventes aquosos para dar bromo-hidrinas, as condições preferidas são a adição em partes de NBS a uma solução do alceno em DMSO aquoso a 50%, DMF, THF ou *tert*-butanol a 0 °C. A formação de um ião bromo e o ataque imediato pela água dá a forte adição de Markovnikov com seletividades anti-estereoquímicas<sup>189</sup>.

A NBS está disponível comercialmente, mas, também pode ser sintetizada em laboratório. Para a sua preparação em laboratório é adicionado hidróxido de sódio e bromo numa solução de succinimida em água gelada. O produto n-bromosuccinimida precipita e é recolhido por filtração<sup>190</sup>. A partir da revisão bibliográfica verificou-se que a N-bromosuccinimida (NBS) tem sido utilizada em larga escala como agente bromador e oxidante de compostos orgânicos, mas seu uso para oxidar compostos inorgânicos e complexos metálicos tem recebido pouca atenção<sup>191</sup>.

O ácido p-tolueno sulfônico é um ácido orgânico forte, aproximadamente um milhão de vezes mais forte que o ácido benzoico. Este é um dos poucos ácidos que se encontra em estado sólido, desde que seja convenientemente protegido da humidade. Este tem ainda a particularidade de ser um agente oxidante. É utilizado na síntese orgânica como um catalisador ácido do tipo “organo solúvel” e é utilizado, principalmente, para acetilação de aldeído, esterificação de ácidos carboxílicos e na transesterificação de ésteres.

#### 4.2.1 Apresentação e discussão dos resultados

Para realizar estas reações foi selecionado como material de partida a *R*-carvona (**1**) obtida comercialmente (Aldrich).

De um modo geral, das diferentes reações realizadas, obtiveram-se os produtos apresentados na figura 40.

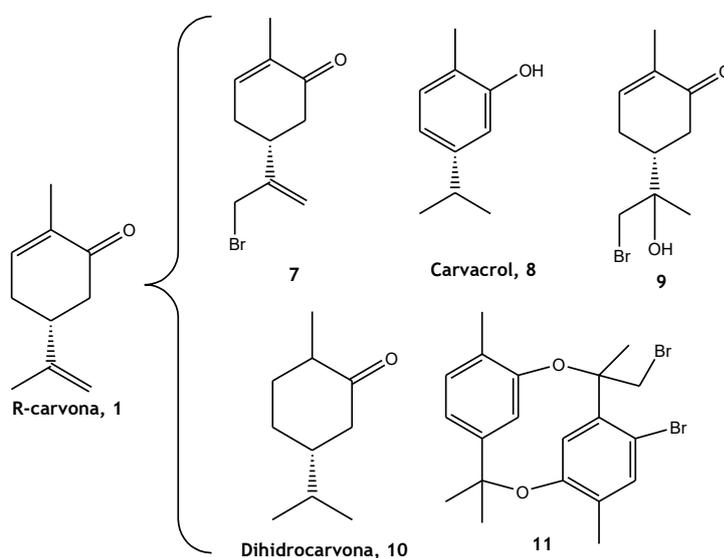


Figura 40. Produtos resultantes das reações carvona com ácido p-tolueno sulfônico e NBS.

Este tipo de reação permite obter dois tipos de produtos, ou seja, bromoderivado, composto **7**, **9** e **11**, e produtos já conhecidos da carvona, o carvacrol (**8**) e a dihidrocarvona (**10**). Sendo estas reações feitas em duas condições distintas, ou seja, à temperatura ambiente e a uma temperatura de 62°C.

Nos produtos obtidos verifica-se um rendimento idêntico apesar das condições aplicadas na sua síntese, podemos verificar através da tabela 8 que o produto principal a ser obtido é o composto **7** e o composto **8**, composto já há muito conhecido nas sínteses de carvona, no entanto os restantes produtos que se obtêm dependem da aplicação de temperatura à reação. Pela análise

verificar que a NBS é uma boa fonte de bromo formando assim os bromoderivados com um rendimento elevado e consideravelmente razoável.

Para a análise dos produtos obtidos nestas reações, os produtos resultantes das reações foram submetidos a cromatografia em coluna e analisados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , massas de alta resolução. Sendo descrita aqui a sua análise.

**Tabela 8.** Rendimentos obtidos nas reações com p-TsOH e NBS.

Condições de reação	Rendimento %						
	Tempo	T $^{\circ}\text{C}$	Composto				
			7	8	9	10	11
IX	4 horas	62	21.2	18.8	10.8	-	-
X	64 horas	T.a	20.1	12.3	-	5.3	6.3

Pela análise da reação IX, verificar-se que a formação dos bromoderivados é mais suscetível quando aplicada uma temperatura de  $62^{\circ}\text{C}$  e um tempo de reação menor, uma vez que a junção de NBS com P-TsOH permitem uma melhor adição alílica, que leva à formação de radicais conduzindo assim a uma adição de modo mais viável do grupo -Br, como se pode observar na figura 41.

Nesta reação é possível obter o composto **7** com um rendimento de 21.2%, este composto apresenta-se-nos pela primeira vez no decorrer do nosso trabalho, este é formado devido à presença de NBS na reação, já que esta é uma boa fonte de obtenção de grupos -Br, este composto é obtido a partir da carvona sendo adicionado à ligação C9 o grupo -Br. O carvacrol, composto **8** é obtido com um rendimento de 18.8%, este composto é obtido da carvona através da formação do anel aromático, passando a ligação dupla da posição C1 a um álcool; por sua vez é ainda obtido um composto que consegue juntar na sua constituição tanto o grupo -OH como o grupo -Br, isto é, parte da base do composto **7**, grupo -Br no C9 e ao mesmo tempo perde a ligação dupla C7-C8 passando a ter um grupo -OH na posição C7, este composto é obtido com um rendimento de 10.8%, apesar de ser um rendimento mais baixo, este demonstra que a sua formação ocorre como produto secundário.

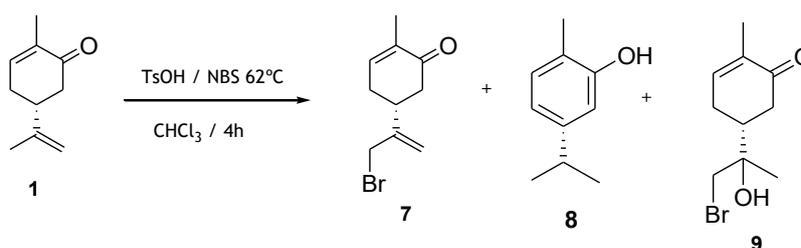


Figura 41. Produtos resultantes da reação IX.

Analisando a reação X, é possível verificar uma vez mais a obtenção do composto **7** e do carvacrol, **8**, no entanto são obtidos dois novos compostos, um já conhecido da literatura de síntese orgânica, o composto **10** conhecido como dihidrocarvona e é obtido pela primeira vez, da literatura o composto **11**, um dímero, produtos apresentados na figura 42, produtos obtidos quando a reação é feita à temperatura ambiente e com um tempo de reação de 64h.

Observando a tabela 8 verifica-se que o rendimento do composto **7** decresce, ligeiramente, para 20.1%, no entanto o carvacrol **8** decresce mais, passando para 12.3% de composto obtido. Por sua vez o composto **9** não é obtido. O composto **10** é obtido pela perda da ligação dupla na posição C2-C3, o seu rendimento de obtenção é muito baixo, sendo apenas de 5.3%, uma vez mais é considerado um composto secundário neste tipo de reação, no entanto é obtido o composto **11** com um rendimento de 6.3%, este composto deriva da “junção” do composto **7** e **8** e ainda da aquisição de mais um grupo -Br.

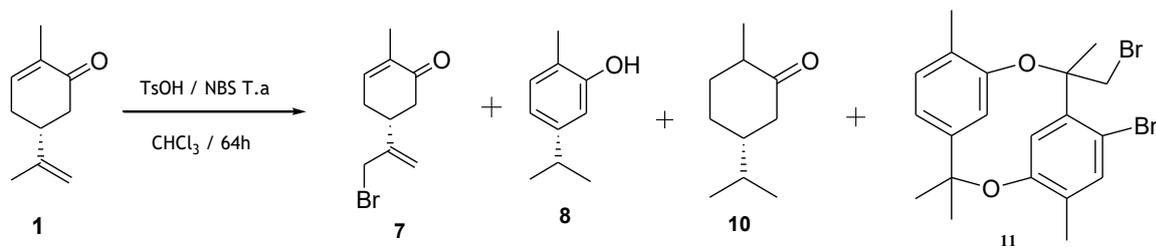


Figura 42. Produtos resultantes da reação X.

## 4.3 Obtenção de derivados de carvona, guaiol e bulnesol com catalisador e NBS

Devido ao atual panorama mundial de alterações climáticas e desequilíbrios ecológicos estão a ser direcionadas mudanças nos meios de produção de modo a que estes se tornem menos agressivos para o meio ambiente. A indústria química é a mais afetada em relação às restrições ambientais, assim sendo, estas restrições levaram a uma procura de novos métodos de produção que sejam “amigos” do ambiente<sup>192</sup>. As restrições impostas pelas novas regulamentações ambientais e tendências inovadoras da chamada “Química verde”, são os fatores que incitam a substituição necessária dos processos industriais tradicionais, que utilizam quantidades estequiométricas de reagentes inorgânicos, por métodos catalíticos alternativos conduzindo a uma melhoria no sistema e consequente aumento da eficácia do processo<sup>193</sup>.

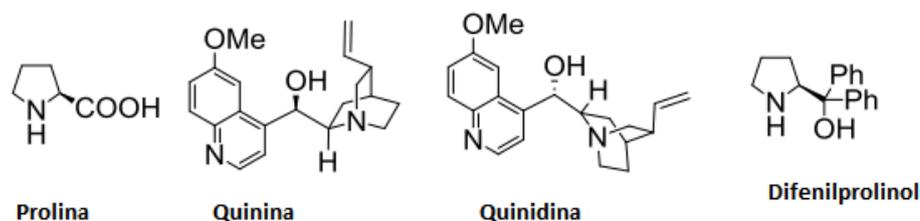
A maioria dos processos de oxidação utilizados em química orgânica fina, envolve o uso estequiométrico de reagentes metálicos ou metais de transição de elevado estado de oxidação, produzindo grandes quantidades de resíduos tóxicos. Muitos desses processos requerem alta pressão e temperatura, aumentando assim, os riscos ambientais através do aumento do consumo de energia, além disso os catalisadores metálicos frequentemente empregues são do tipo homogéneo, o que coloca problemas adicionais decorrentes da necessidade de isolar e recuperar o catalisador para posterior reutilização. No entanto, alguns dos processos podem ser conduzidos por catalisadores heterogéneos, contornando as deficiências anteriores. Assim, verifica-se um crescente interesse em sistemas catalíticos capazes de realizar estas reações de forma a proteger o ambiente, utilizando reagentes, oxidantes e solventes não tóxicos<sup>194,195</sup>.

O papel e a importância dos “*building blocks*” halogenados na síntese orgânica são desde há muito estabelecidos e incontestáveis, devido à diversidade de reações onde podem ser aplicados<sup>196</sup>. A  $\alpha$ -bromação de compostos carbonílicos é uma transformação de elevada importância na síntese orgânica, uma vez que, os produtos  $\alpha$ -bromados são utilizados como intermediários sintéticos bastante úteis<sup>197</sup>. No entanto, o produto mono-substituído obtido é frequentemente acompanhado por uma pequena quantidade do produto di-substituído quando na presença de um excesso de cetona<sup>198</sup>.

Os problemas da síntese total são definidos pelos produtos naturais que possuem novas “arquiteturas” moleculares, que oferecem oportunidades únicas na descoberta e invenção nas áreas da química, biologia e medicina<sup>199</sup>. A arte da síntese total incide não só na originalidade quanto na elegância pela qual as etapas individuais são preparadas dentro da estratégia sintética geral e na arquitetura dos projetos de análogos sintetizados com potenciais atividades biológicas<sup>200</sup>. As melhorias de performance da síntese total de moléculas, algumas bastante complexas, têm um grande impacto ao encontrar aplicações tanto a nível de desenvolvimento de medicamentos, na biologia, na química e na ciência de materiais, entre outras<sup>201</sup>.

Tal como a observação feita por William S. Knowles, no seu discurso ao prémio Nobel: “quando começamos este trabalho, esperávamos que esses sistemas sintéticos tivessem uma combinação muito específica entre substrato e ligando, tal como enzimas. Geralmente, em nossas mãos e nas mãos daqueles que nos seguiram, um bom candidato foi útil para uma grande variedade de aplicações”<sup>202</sup>. Na verdade, os melhores catalisadores sintéticos demonstram níveis vantajosos de enantiosseletividade para uma ampla gama de substratos.

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em reações livres de metal, sendo a organocatálise uma das áreas mais interessantes de pesquisa em química orgânica<sup>203,204,205</sup>. Assim, deste modo escolhemos aqueles que melhor se adequam às nossas exigências, não só pela sua fácil obtenção ou manuseamento, mas por pertencerem à principal família de organocatalisadores e acima de tudo por na sua composição conterem grupos aminas que desempenham um papel bastante importante na organocatálise, sendo os escolhidos para este trabalho a prolina, a quinina, a quinidina e o difenilprolinol, figura 43.



**Figura 43.** Organocatalisadores frequentemente utilizados em síntese orgânica.

Os alcalóides da Cinchona constituem uma classe, extraordinariamente versátil, de produtos naturais, que servem não só como importantes compostos medicinais<sup>190</sup>, mas também como catalisadores e ligandos privilegiados para a catálise assimétrica<sup>206</sup>. A Quinina (figura 43), em particular, também desempenhou um papel histórico na química orgânica como alvo de estruturação e determinação na síntese total, embora tenha sido apenas recentemente que a sua primeira síntese total estereosseletiva foi alcançada por Stork<sup>207</sup>. Os progressos realizados na metodologia sintética nos últimos anos permitem abordar alvos como os alcaloides de cinchona através de estratégias relativamente simples por meio de reações catalíticas altamente eficientes. Isto é ilustrado aqui, com as primeiras sínteses catalíticas, enantioselectivas de Quinina e Quinidina (figura 44).

O difenilprolinol, também conhecido como difenil-2-pirrolidinametanol (figura 45), podendo este ser encontrados os seus dois enantiómeros, ou seja (R)-difenilprolinol e (S)-difenilprolinol, sendo que a aplicação mais usual deste catalisador se verifique na área farmacológica com o enantiómero (R)-difenilprolinol<sup>208</sup>.

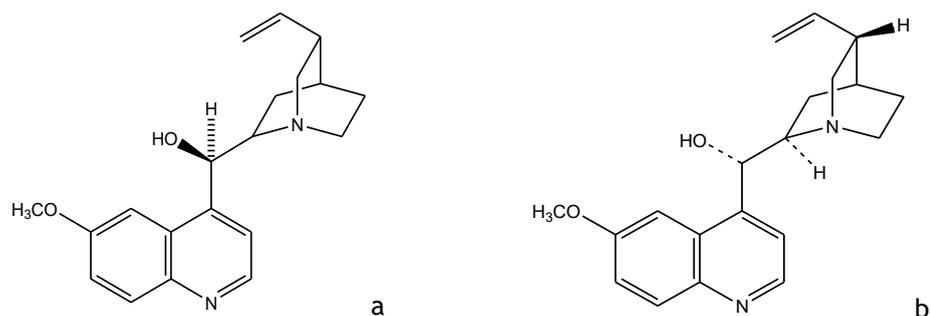


Figura 44. Estrutura química da quinina (a) e da quinidina (b).

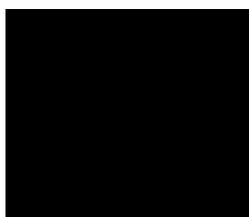


Figura 45. Estrutura química do difenilprolinol.

A utilização mais conhecida deste é para a preparação do catalisador CBS (Corey-Bakshi-Shibata), que é um catalisador derivado da prolina e utilizado na síntese orgânica enantiosseletiva<sup>209</sup>. Contudo, nos últimos anos tem-se vindo a verificar que este composto pode atuar como uma droga de recreio, sendo vários os estudos realizados em que demonstram os seus efeitos<sup>198, 210</sup>.

#### 4.3.1 Apresentação e discussão dos resultados

Devido à diferente reatividade das duas ligações duplas de carvona, a funcionalização enantiosseletiva do bromo da ligação dupla terminal pode ser alcançada usando um organocatalisador em condições ácidas. Sabe-se há muito tempo que o uso de aminoácidos com N-bromosuccinimida produz uma transferência de bromo para o aminoácido, que se este é quiral, poderia ser usado para a bromação enantiosseletiva<sup>211</sup>. Sabe-se também que os derivados de quinidina e quinina se formam complexos com halogénio que foram usados em reações de halociclização enantiosseletiva<sup>212</sup>. Neste caso, decidimos usar meios ácidos para abrir o intermediário bromo correspondente. Em primeiro lugar, a reação de brominação da carvona, **1**, foi realizada por reação com NBS em DCM na presença de diferentes organocatalisadores, como prolina, quinina, quinidina ou difenilprolinol.

Os produtos obtidos a realização das reações com diferentes catalisadores e com a NBS apresentam-se na figura 46.

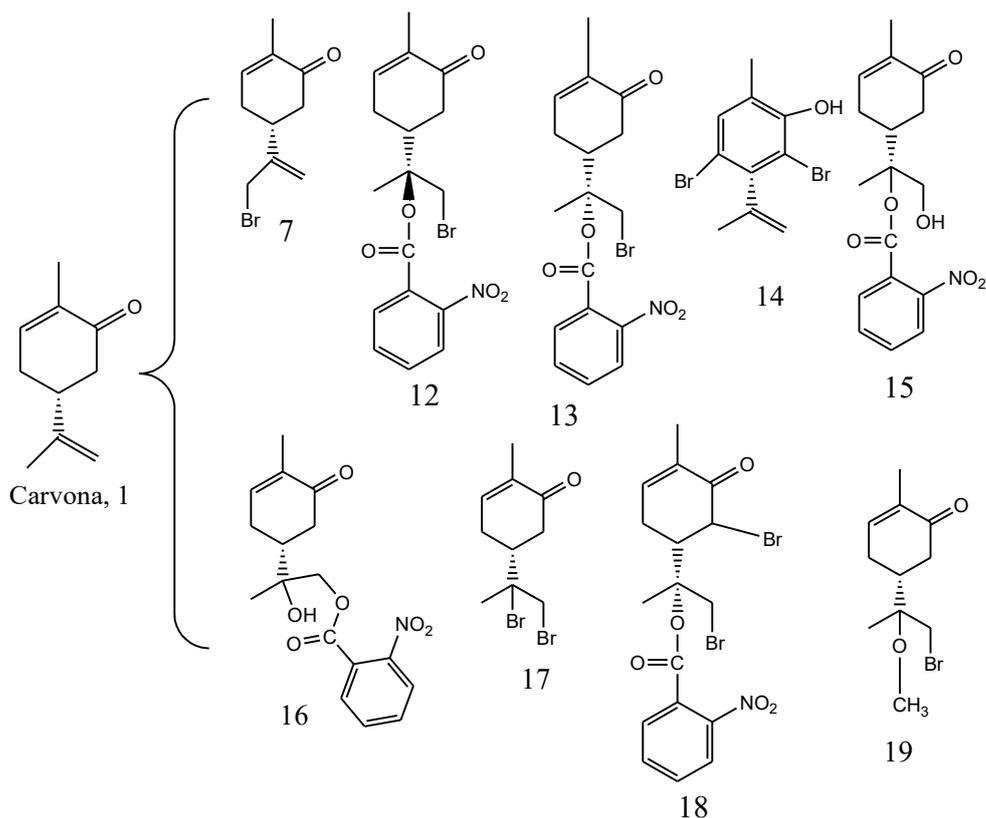


Figura 46. Produtos obtidos nas reações com uso de catalisadores.

Como é possível observar pela figura 46 os produtos obtidos neste tipo de reação são todos bromoderivados, isto devido ao uso da NBS. Uma vez que a NBS é uma fonte de  $\text{Br}^\cdot$  estes facilmente se adicionam via radicalar. O uso de catalisador permite apenas que a reação se torne mais eficaz e que seja aplicado um tempo de reação menor. Permitindo assim uma melhor formação dos radicais permitindo ainda uma melhor quebra da ligação dupla e assim adicionar o grupo  $-\text{Br}$ .

Como se poderá verificar os rendimentos obtidos são variáveis conforme o tipo de catalisador e a sua quantidade utilizada, bem como com a diferença de temperatura aplicada às reações, vemos também que há produtos secundários que se formam devido às condições aplicadas, mas estes com rendimentos menores.

No entanto, verifica-se que três compostos são sempre formados, os compostos 7, 12 e 13. A formação destes compostos apenas não ocorre em duas reações, ou seja, quando utilizada a quinina a 2% à temperatura ambiente e quando se faz a reação sem catalisador também a temperatura ambiente, ou seja este catalisador não será o ideal para este tipo de reação. Estes compostos variam com a adição do grupo  $-\text{Br}$ , podendo este estar na posição C-9, C-7 e C-8, ou apenas na posição C-8.

### 4.3.2 Reações com L-prolina como catalisador

Comparando as reações com uso de prolina pode-se observar nas figuras 47 e 48 existe a formação de quatro produtos, todos eles bromoderivados, no entanto verifica-se que quando a reação ocorre à temperatura ambiente deixa-se de obter o composto **17**, um composto dibromado, e passa-se a obter-se o composto **15** sendo este também um éster mas em vez de ser um bromoéster é um hidróxi-derivado, isto é o grupo -Br que estaria na posição C-8 passa para um grupo -OH.

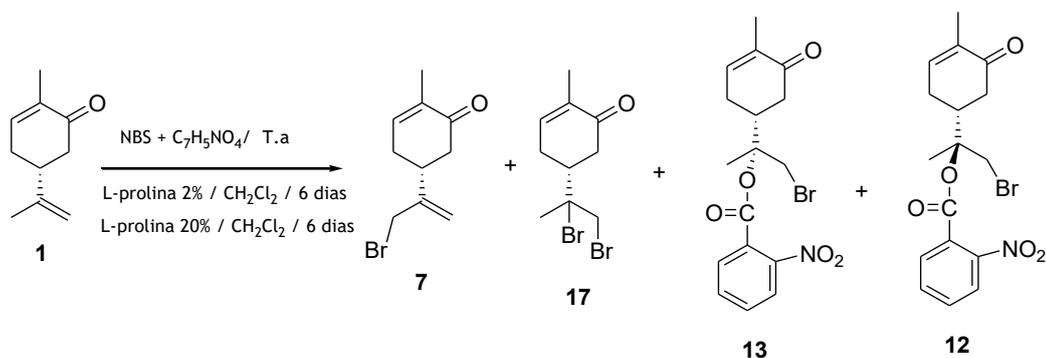


Figura 47. Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador e à temperatura ambiente.

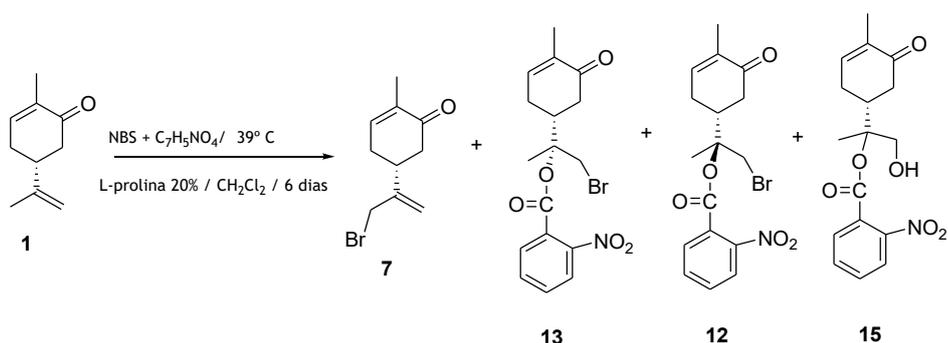


Figura 48. Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador e a 39°C.

Quando utilizado como catalisador a prolina, seja ela numa quantidade de 2% ou de 20%, e à temperatura ambiente verificamos que o rendimento obtido dos compostos não é muito variável, tabela 9. Observando os rendimentos da reação **XI** e **XII** verifica-se que não são muito variáveis, isto é, obtém-se para o composto **7**, composto obtido pela adição de um grupo -Br ao C-9, um rendimento de 15.0% na reação **XI**, e um rendimento de 14.6% na reação **XII**; o composto **12** é obtido para a reação **XI** com um rendimento de 15.9% e para a reação **XII** de 19.3%, neste existe uma ligeira diferença de rendimentos, mas o mesmo será devido à obtenção de uma mistura dos dois compostos mais reduzida que no caso da reação **XII**, ou seja, na reação **XI** temos um rendimento de mistura de 20.4%, o que na reação **XII** passa para um rendimento de apenas 17.0%, levando assim a uma diferença mais visível nestes rendimentos. Comparando, ainda, estas duas reações podemos verificar que a influência da falta de temperatura permite uma formação do composto **13** mais evidente, isto é, este composto pode ser obtido com um rendimento muito

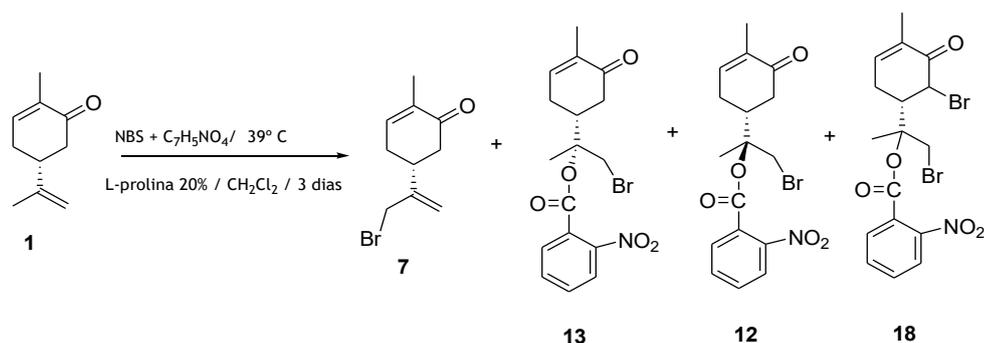
superior em relação ao seu isómero, composto **12**, permitindo assim obter um rendimento de 32.3 e de 32.7%, respetivamente para a reação **XI** e **XII**. Os compostos **12** e **13** formam-se pela adição de um grupo -Br ao C-8 e por um grupo nitrobenzeno ao C-7. Neste caso, como se realiza a reação à temperatura ambiente esta tem tendência a utilizar toda a “dádiva” de grupos -Br, levando assim à formação do composto **17**, apesar deste ter um rendimento mais baixo em ambas as reações, sendo ele de 3.7 e 3.5%, respetivamente.

Tabela 9. Rendimentos obtidos nas reações com L-prolina.

Condições de reação			Rendimento %					
			Composto					
		T°	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
		C						
<b>XI</b>	Prolina 2%	Ta	15.0	15.9	32.3	-	3.7	-
<b>XII</b>	Prolina 20%	Ta	14.6	19.3	32.7	-	3.5	-
<b>XIII</b>		39	16.3	13.9	30.2	2.3	-	-
<b>XIV</b>	Prolina 20%	39	22.7	7.6	11.0	-	-	1.0

Na realização da reação **XIII** é possível verificar que o uso de temperatura leva a uma melhoria do rendimento do composto **7**, que é de 16.3%, contudo leva a uma diminuição dos restantes rendimentos, sendo que o composto **12** é obtido com rendimento de 13.9%. O composto **13** também baixa ligeiramente para um rendimento de 30.2%, contudo a grande diferença numa obtenção de apenas 13.7% de rendimento da mistura dos dois isómeros, composto **12** e **13**. Nesta reação verifica-se que a existência de grupos -OH livres ao longo da reação permitiram a obtenção do composto **15**, este é obtido com um rendimento muito baixo, apenas de 2.3%. A existência deste composto permite-nos constatar que o uso da temperatura tenha sido a causa da sua transformação.

A realização da reação **XIV** permitiu verificar qual seria a diferença utilizando um tempo menor de reação, isto é, reação realizada em apenas 3 dias. Esta reação permitiu não só a obtenção do composto **7** com um rendimento muito superior, ou seja, passando dos 16.3% para 22.7%, esta diferença permite-nos dizer que este seria o tempo ideal para a obtenção deste composto utilizando a L-prolina como catalisador. Em contrapartida, verificou-se um grande decréscimo no rendimento do composto **12**, que apenas é obtido com 7.6%, e do composto **13**, que passa de um rendimento de 30.2% para um rendimento de apenas 11.0% esta diferença deve-se ao facto da diminuição do tempo de reação. Contudo, como se pode verificar pela figura 49 há a formação de um novo produto, desta vez o bromoéster, que já conhecíamos apresenta-se com uma adição no C-6 de um grupo -BR, apesar deste composto ser obtido só com um rendimento de 1.0%.

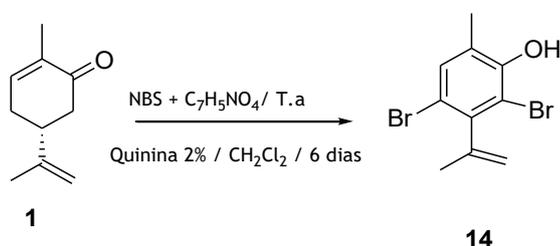


**Figura 49.** Produtos obtidos nas reações com uso de L-prolina como catalisador, a 39°C e realizada em 3 dias.

A utilização da L-prolina como catalisador permite não só obter rendimentos equiparáveis, mas também permite a obtenção de produtos secundários, sendo que a formação destes produtos não pode ser considerada um “erro”, mas sim uma nova abordagem sobre este catalisador com as condições aplicadas partindo a síntese da *R*-carvona (1). Os produtos secundários que se formaram futuramente podem vir a ter também aplicações importantes no cotidiano científico, porém para melhorar essa via de análise deve melhorar-se as condições de reação numa tentativa de otimização mais coerente dos produtos obtidos. Há que salientar que nestas reações existe sempre uma quantidade (ainda que muito baixa) de carvona por reagir e/ou misturas complexas que não permitem uma identificação eficaz.

#### 4.3.3 Reações com Quinina como catalisador

Analisando a reação XV, reação realizada com quinina a 2% e à temperatura ambiente podemos verificar que apenas há a formação de um composto, o composto 14, figura 50, sendo este um composto aromático com grupos -Br em 2 posições distintas: No C-4, C-6, contudo este forma ainda um grupo -OH na posição C-1, como se pode verificar pela figura 42. Este composto é obtido com um rendimento de apenas 4.3% (ver tabela 10), o grande problema desta reação é que este foi o único produto que foi possível de identificar, todas as restantes frações obtidas eram misturas complexas que não permitiram a identificação dos seus produtos.



**Figura 50.** Produtos obtidos nas reações com uso de quinina a 2% como catalisador, à temperatura ambiente.

Tabela 10. Rendimentos obtidos nas reações com quinina.

Condições de reação		Rendimento %				
		Composto				
		T°C	7	12	13	14
XV	Quinina 2%	Ta	-	-	-	4.3
XVI		39	12.2	5.5	33.5	-
XVII	Quinina 20%	Ta	15.6	14.2	21.7	-
XVIII		39	15.8	12.5	33.0	-

Quando realizadas reações com quinina a 2% e a uma temperatura de 39°C, reação XVI, e as restantes com a quinina a 20% variando apenas na temperatura (reação XVII - t. ambiente e reação XVIII a 39°C) obtiveram-se os compostos apresentados na figura 51.

Analisando a reação XVI, tabela 10, verifica-se que o composto 7 tem um rendimento de apenas 12.2%, sendo este uma vez mais a adição do grupo -Br ao C-9. Consequentemente, o rendimento do composto que mais varia é o composto 12, que necessita de uma maior quantidade de catalisador para se obter em maior quantidade, este composto apenas é obtido com um rendimento de 5.5%, sendo este até ao momento o que sofre uma enorme variação no rendimento obtido, porém o seu isómero, composto 13 é obtido num rendimento de 33.5%, levando a concluir que para este composto o uso de uma menor quantidade de quinina como catalisador é mais propícia para a obtenção de um melhor rendimento, contudo esta reação apresenta uma mistura dos dois isómeros com um rendimento de 25.6%, mistura esta que não é possível de purificar melhor, uma vez que estes compostos são bastante idênticos. Neste caso a diferença comparada com a reação XV deve-se à realização da reação à temperatura de 39°C, uma vez que quando realizada a frio apenas se obtém uma mistura e um composto aromático, o que neste caso não se verifica.

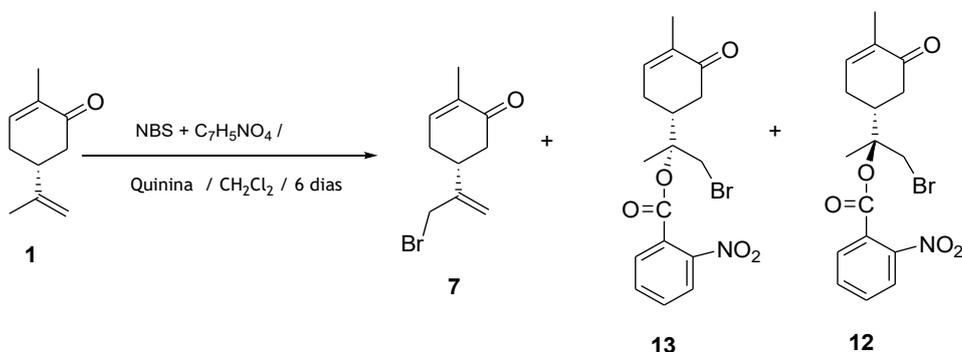


Figura 51. Produtos obtidos nas reações com uso de quinina a 2% e 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C.

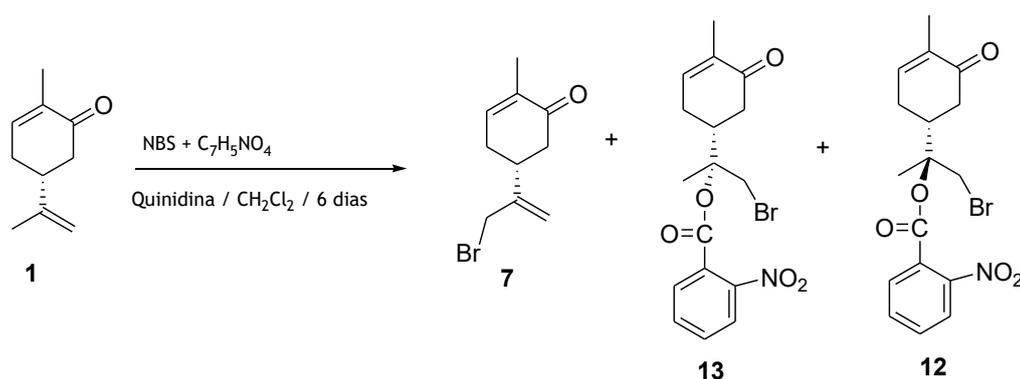
Comparando as reações com um catalisador a 2% com o mesmo a 20% (tabela 10), verifica-se diferenças bastante evidentes nos rendimentos obtidos. Isto é, para a reação XVII que é uma reação realizada à temperatura ambiente já é possível obter os compostos desejados, ou seja, o composto **7** (rendimento de 15.6%), **12** (rendimento de 14.2%) e **13** (rendimento de 21.7%), no entanto, podemos verificar que os rendimentos não são muito elevados, mas comparando com o obtido com o uso de catalisador a 2% e as restantes condições iguais verificamos que a quantidade de catalisador influencia a síntese destes compostos. No entanto, a quantidade de mistura dos isómeros obtida é bastante elevada, sendo de 30.4%, nestas condições verifica-se que a separação completa destes dois não é tão eficaz como com os restantes até ao momento.

Contrariamente a reação XVIII permite-nos uma vez mais concluir que o composto **13**, uma vez mais, é o composto mais favorável a uma temperatura de 39°C, permitindo que este seja obtido com um rendimento de 33.0%, os restantes compostos obtidos o seu rendimento não varia, pelo contrário o rendimento do composto **12** diminui ligeiramente para um rendimento de 12.5%.

Finalizando a análise da quinina como catalisador uma vez mais podemos verificar que não existe formação de produtos secundários, o que mostra uma reação mais otimizada, contudo há que salientar que também neste tipo de reação existe quantidade de *R*-carvona por reagir, em quantidades muito pequenas e/ou misturas complexas que não permitem uma análise eficaz e seletiva.

#### 4.3.4 Reações com Quinidina como catalisador

A quinidina neste trabalho veio demonstrar que apesar de ser estereoisómero da quinina atua de modo diferente na síntese da carvona para a obtenção de bromoderivados desejados como demonstra a figura 52, seja ela aplicada em condições de 2 ou 20% e com ou sem temperatura.



**Figura 52.** Produtos obtidos nas reações com uso de quinidina a 2% e 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C.

Estas reações demonstram factos interessantes em termos de rendimentos obtidos como se pode verificar pela tabela 11, olhando esta por alto sobressai uma variação bastante visível na obtenção dos compostos, variando estas da quantidade de catalisador e da temperatura aplicada.

Tabela 11. Rendimentos obtidos nas reações com quinidina.

Condições de reação		T°C	Rendimento %		
			Composto		
			7	12	13
XIX	Quinidina 2%	Ta	11.3	6.2	52.6
XX		39	15.3	6.2	38.1
XXI	Quinidina 20%	Ta	12.6	18.0	33.6
XXII		39	8.8	13.6	26.9

Analisando a reação XIX, percebe-se logo que a grande diferença em comparação com as reações descritas até este momento, salientando logo de início o rendimento do composto 13 tão elevado, sendo este obtido com de 52.6%, o que nos permite logo de início verificar que esta seria a condição ideal para a obtenção deste composto, sendo que com uma melhoria ainda das condições reacionais este pudesse ainda vir a ser superior, permitindo a sua obtenção a nível industrial. Contudo verifica-se que o seu isômero apenas se consegue obter com 6.2%, o rendimento mais baixo até ao momento, permitindo afirmar que esta condição favorece mais a reação quando o composto se transforma para a posição (5R,7S), isto é composto 13 do que a ocorrência da reação na posição (5R,7R), sendo que este seria o composto 12, obtido com um rendimento apenas de 6.2%. De salientar que este composto pode ser descrito em termos de análise espacial, uma vez que foram realizadas as análises de difração de raio-X, a cada um dos isômeros como se mostra na figura 52. Por sua vez, o composto 7, que até ao momento tinha sido obtido com rendimentos variáveis na gama de 22.7 a 12.2%, agora é obtido com um rendimento de apenas 11.3%. Contudo, esta reação uma mistura dos dois isômeros de 18.5%

A reação XX, reação com utilização de temperatura, já vem demonstrar resultados diferentes dos obtidos nas mesmas condições, mas sem a utilização de temperatura, como demonstra a tabela 11. Ou seja, nesta reação podemos verificar que um enorme decréscimo do composto 13, passando este a ser obtido novamente na gama dos 38.1%, esta baixa bastante significativa demonstra que a temperatura deixa de ser favorável à sua formação, contudo os restantes compostos esperados mantêm os rendimentos dentro dos valores que têm sido obtidos, isto é, 15.3% para o composto 7 e de 6.2 para o composto 12. Apesar deste último rendimento ser idêntico ao anterior apenas nos confirma que a utilização de temperatura para a sua obtenção é indiferente de usar, já que esta não influencia a sua transformação, contudo esta reação apresenta uma mistura dos dois com um rendimento de 13.6%.

O mesmo não pode ser dito para as reações com o uso de quinidina a 20% (tabela 11) que nestas não só o aumento de catalisador, mas também o uso de temperatura influencia o resultado

obtido. Observando os resultados da reação **XXI**, verifica-se já diferenças ao obtido anteriormente reação **XX**, que apresenta uma subida no rendimento do composto **7**, que passa de um rendimento de 11.3% para um de 12.6%, não é um aumento significativo, mas já é uma alteração relacionada com a quantidade de catalisador; os compostos onde se verifica uma mais discrepância nos rendimentos obtidos são os compostos **12** e **13**, respetivamente passando de 6.2% para 18.0% e de 52.6% para 33.6%, respetivamente. Esta diferença tão significativa está associada diretamente à mudança da quantidade de catalisador que foi aplicada. Não esquecendo de realçar que apesar das diferenças obtidas até na mistura obtida dos dois isómeros estas se notam, uma vez que o rendimento desta mistura baixa para os 9.8%, rendimento da mistura mais baixo até ao momento. Há que não deixar de referir que existe *R*-carvona e/ou misturas que não são possíveis de quantificar.

Finalizando o estudo com a quinidina, reação **XXII**, percebe-se que alterar conseqüentemente a quantidade de catalisador e aplicada uma temperatura, muda-se por completo os resultados obtidos, isto é, os compostos são uma vez mais os obtidos, contudo, o que varia significativamente e de forma linear é o rendimento de obtenção. Pela tabela 11 e comparando com os resultados da reação **XX** é possível verificar de maneira significativa um decréscimo acentuado do composto **7**, sendo que este tinha sido obtido com um rendimento de 15.3% para quinidina a 2% passa a ser obtido com um rendimento de 8.8%, passando esta para quase metade do que seria de esperar; no entanto verifica-se um aumento proporcional na obtenção do composto **12** passando este de 6.2% para 13.6%, o que aparentemente demonstra é que a baixa obtenção do composto **7** se verifica numa maior obtenção do composto **12**, o composto **13** apresenta uma baixa também considerável no rendimento, sendo este de apenas 26.9%. Outra contrapartida desta reação é a obtenção da mistura dos dois isómeros de 25.8% de rendimento.

Deste modo, é possível afirmar que para o uso deste catalisador não há uma condição concreta para afirmar se a reação é melhor ou não, ou seja as condições que devem ser aplicadas devem ser coerentes com o que se deseja, por outras palavras dependendo do composto que queremos obter em maior quantidade assim será escolhida a condição a aplicar com o uso de quinidina como catalisador reacional. No entanto, deve ter-se em atenção sempre a quantidade de produto por reagir e as misturas complexas que se obtêm.

#### **4.3.5 Reações com Difenilprolinol como catalisador**

A utilização do difenilprolinol como catalisador levou à obtenção dos produtos já conhecidos anteriormente, a curiosidade deste catalisador assenta apenas nos rendimentos obtidos, como é possível observar pela tabela 12. Uma vez mais se realça que os produtos obtidos não são só os apresentados, existem misturas que não se conseguiram identificar e também a existência de *R*-carvona por reagir, sendo que esta não é possível determinar o seu rendimento uma vez que está misturada com outros.

Tabela 12. Rendimentos obtidos nas reações com difenilprolinol.

Condições de reação		T°C	Rendimento %				
			Composto				
			7	12	13	14	16
XXIII	Difenilprolinol	Ta	17.7	7.1	25.0	3.2	-
XXIV	2%	39	5.3	25.9	32.5	-	14.7
XXV	Difenilprolinol	Ta	19.2	14.7	47.9	-	-
XXVI	20%	39	21.5	21.6	42.0	-	-

Analisando a reação XXIII, verifica-se que existe a formação de quatro compostos já identificados anteriormente, como se observa na figura 53. Esta reação permitiu não só a obtenção em discrepância dos produtos desejados como também uma vez mais se obteve o composto aromático 14, apesar deste ser obtido com um rendimento de apenas 3.2%, mais baixo que o obtido anteriormente este composto demonstra poder vir a ter uma grande importância futuramente uma vez que, a composição de três grupos -Br na sua estrutura pode vir a ser um composto halogenado de grande importância em atividade biológica. O produto que sofreu um aumento mais significativo na sua obtenção foi o composto 7, que até ao momento foi o rendimento mais elevado, sendo este de 17.7%. Em contrapartida, o composto 12 foi obtido com um rendimento mais inferior ao que se obteve em casos anteriores, mas ainda assim não é o pior rendimento obtido, sendo que nesta reação é obtido com 7.1%. Já o composto 13 uma vez mais, demonstra ser o composto com maior tendência a ser formado nas reações que envolvem o uso de catalisador, porém o seu rendimento é variável consoante as condições aplicadas, neste caso apenas é obtido com um rendimento de 25.0%. Contudo a mistura que se obtém destes dois isómeros apenas é de 11.8%, mas há que salientar que os restantes produtos obtidos estão em misturas que não se conseguiram identificar.

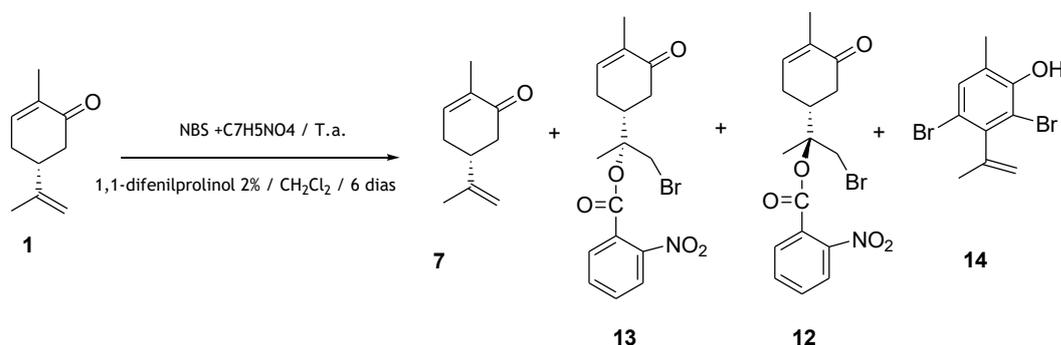
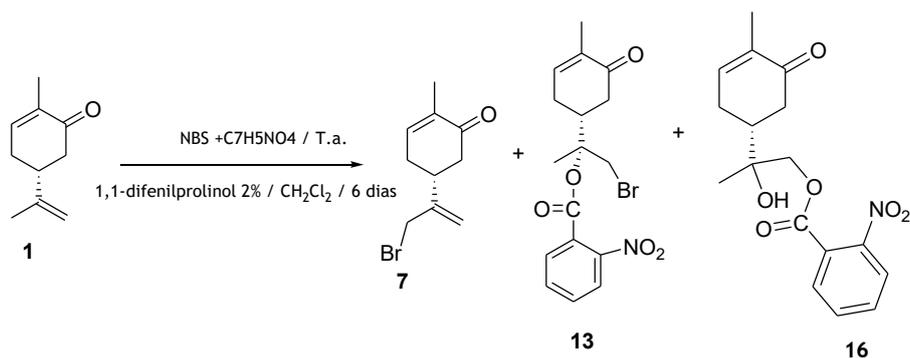


Figura 53. Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C.

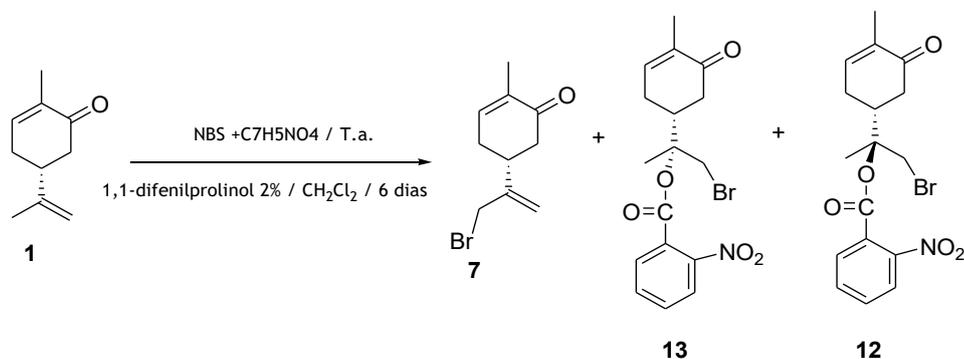
Ao contrário do que se verificou na reação anterior, a reação XXIV demonstrou grandes diferenças, esta derivadas da utilização de temperatura na reação de síntese. Isto é, como se

verifica na tabela 12 os produtos obtidos, são os que se têm obtido até aqui à exceção de um novo composto obtido, o composto **16**, como demonstra a figura 54. Nesta reação verifica-se um decréscimo, não esperado, da obtenção do composto **7**, isto é, até ao momento o rendimento menor que se tinha obtido era 8.8% na reação XXII, neste caso este apenas é obtido num rendimento de 5.3%, significando que com a quantidade de catalisador aplicada e o uso de temperatura não são as condições adequadas para a sua obtenção. Ao contrário do que tem acontecido com o composto **12** este nestas condições não é obtido, a sua obtenção apenas ocorre na mistura com o seu isómero, composto **13**, sendo esta mistura obtida com um rendimento de 25.4%, o isómero **13** por sua vez é obtido com um rendimento de 32.5%, sendo o segundo mais alto a ser obtido até ao momento. A não obtenção do composto **12** leva, possivelmente, à obtenção de um novo derivado, um hidroxiéster - composto **16**, que neste caso a conhecida adição do grupo -Br que ocorria no C-8 neste caso é alterada pela adição do nitrobenzeno a esta mesma ligação, é ainda alterada a ligação C-7 que era onde ocorria a adição do grupo nitrofenil passa a ser o local de ligação de um grupo -OH, este composto é obtido com um rendimento de 14.7%. É um rendimento elevado e a obtenção deste produto, pode no futuro vir a ter aplicações em atividades biológicas já que o mesmo produto tem na sua constituição grupo nitrofenil e grupo álcool.



**Figura 54.** Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 2% como catalisador, a 39°C.

Quando aplicada uma maior quantidade de catalisador na reação, independentemente do uso de temperatura ou não, verifica-se que os produtos obtidos são os já conhecidos como os 3 principais produtos de halogenação obtidos até ao momento, isto é: composto **7**, composto **12** e composto **13**. Como se pode verificar pela figura 55.



**Figura 55.** Produtos obtidos nas reações com uso de difenilprolinol a 20% como catalisador, à temperatura ambiente e a 39°C.

As reações XXV e XXVI são muito peculiares, isto porque neste caso tem-se uma grande revolução nos rendimentos obtidos dos 3 compostos. Se observarmos o composto 7 verifica-se que este é obtido com os rendimentos mais altos até ao momento, isto é, para a reação XXV de 19.2% e para a reação XXVI de 21.5%, neste caso o uso de temperatura influencia a sua transformação; em relação ao composto 12 verifica-se duas situações distintas, uma das situações é que sem temperatura este é obtido com um valor de 14.7%, valor não muito fora das gamas que se têm obtido até ao momento, isto para a reação XXV, o que se verifica contrariamente na reação XXVI é que a temperatura também influencia a sua transformação. A grande diferença alcançada com a utilização de catalisador na reação verifica-se na obtenção do composto 13, isto já que é com a utilização do difenilprolinol que se obtém para a reação XXV de 32.5% e para a reação XXVI de 42.0%. Apesar de serem rendimentos altos para este composto apenas o obtido na reação XXVI com o uso de temperatura é segundo rendimento mais alto. Em contrapartida destes rendimentos a mistura que se obtém dos dois isómeros é de 15.2% e de 5.1%, respetivamente reação XXV e XXVI. Porém pode-se afirmar que estas condições reacionais seriam as ideias para a obtenção do composto 7 e do 12.

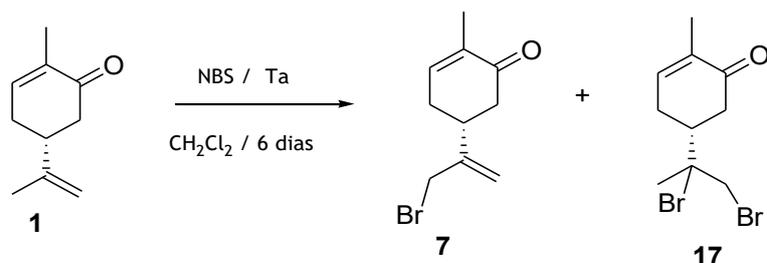
#### 4.3.6 Reações Sem catalisador

Foram ainda realizadas duas reações, uma à temperatura ambiente e outra a 39°C sem a utilização de catalisador. Como demonstra a tabela 13 os resultados destas reações são bastante peculiares.

Analisando a primeira reação sem catalisador e sem uso de temperatura (reação XXVII), verifica-se que os produtos obtidos são diferentes dos que se obtiveram até ao momento, como demonstra a figura 56. Nesta reação apenas é possível verificar a formação de dois produtos, o composto 7 já obtido até ao momento em todas as reações, exceto na reação XV onde não é obtido, contudo o seu rendimento é bastante significativo, ou seja, de 20.2%, demonstrando que se o nosso objetivo for a sua obtenção em maior quantidade esta pode ser uma via a seguir. No entanto, temos a formação de um composto com dois grupos -Br, produto já obtido nas reações XI e XII, mas que ainda assim é obtido com 26.6%. A síntese dos produtos que desejávamos não deve ser realizada sem que se utilize um catalisador, isto para a não utilização de temperatura.

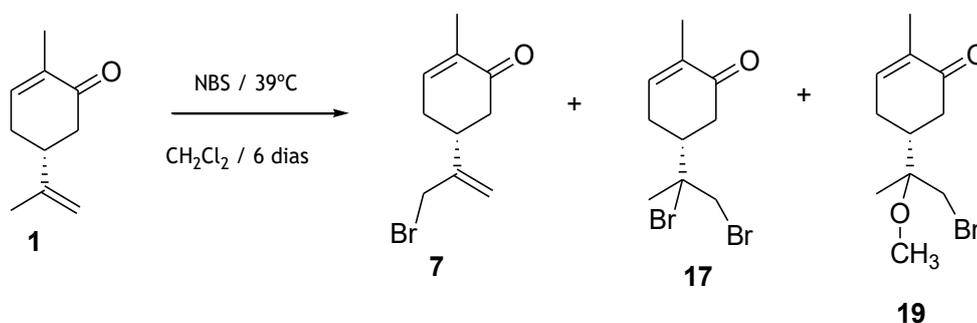
Tabela 13. Rendimentos obtidos nas reações sem catalisador.

Condições de reação		T°C	Rendimento %		
			Composto		
			7	17	19
XXVII	Sem	Ta	20.2	26.6	-
XXVIII	catalisador	39	25.6	19.2	3.2



**Figura 56.** Produtos obtidos na reação sem utilização de catalisador a 39°C.

Numa nova tentativa de identificar a diferença da utilização de catalisador neste tipo de reações levou-nos à realização da reação **XXVIII**, reação realizada à temperatura de 39°C. Ao contrário do que se observou na reação **XXVII** nesta os produtos que se obtiveram (figura 57) apresentam melhorias nos seus rendimentos, como demonstra a tabela 13. Neste caso verificamos um aumento significativo na obtenção do composto **7** passando este a ter um rendimento de 25.6%, sendo este o melhor rendimento obtido para a obtenção deste composto, assim sendo podemos afirmar que se o objetivo é a sua obtenção, deve-se utilizar estas condições reacionais. Porém, esta reação leva-nos também à obtenção do composto **17** com um rendimento de 19.2%, que apesar de ser obtido nestas condições sua obtenção é mais favorável quando não se aplica temperatura. A grande novidade nesta reação é a obtenção do composto **19**, com um rendimento de 3.2%, temos um composto que se apresenta com um grupo -Br no ligação do C-8 e onde anteriormente se ligava um grupo de nitrobenzeno, isto é no C-7, neste caso o grupo que lhe é adicionado é um -OCH<sub>3</sub>, este produto futuramente pode vir a ter importância em aplicação biológica.



**Figura 57.** Produtos obtidos na reação sem utilização de catalisador à temperatura ambiente.

#### 4.3.7 Difração de raios-X e método computacional composto **12** e **13**

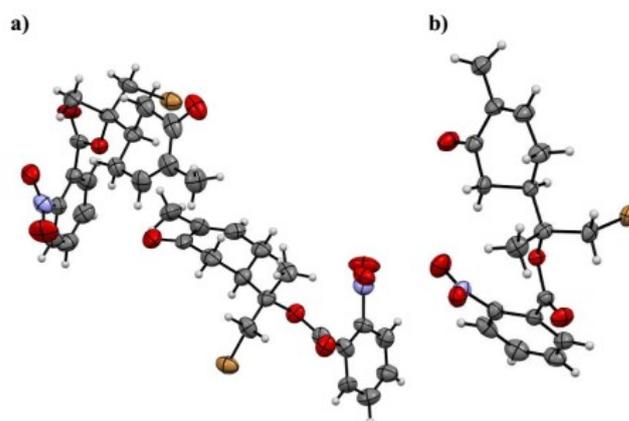
As estruturas de todos os compostos foram determinadas pelas suas propriedades espectroscópicas, e a estereoquímica foi estabelecida por difração de raios X das estruturas<sup>213</sup> cristalinas dos bromoésteres **12** e **13** (figura 58). Desta forma, não havia dúvidas sobre a estereoquímica desses compostos.

Para lançar alguma luz sobre o mecanismo da reação, realizou-se um estudo conformacional do panorama associado ao ângulo diédrico entre C8-C7-C4-C3 da *R*-carvona. Nestes cálculos, o solvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi simulado usando o modelo de polarização contínua. Os resultados, mostrados na Figura 59, mostram que há três mínimos separados por barreiras de baixa energia que poderiam ser facilmente cruzadas à temperatura ambiente, como esperado para a rotação ao longo de uma única ligação C - C. A conformação mais estável corresponde àquela com a cadeia lateral perpendicular ao anel fenílico e com o grupo metilo anti ao H da posição C5. Curiosamente, a estrutura com o grupo metilo sin ao H da posição C5 corresponde a um máximo (ambas as estruturas são mostradas na Figura 58). A estrutura dos três mínimos corresponde àquelas encontradas por Avilés et al. 2013<sup>204</sup>, para *S*-carvona, embora existam algumas diferenças nas alturas de barreira que os separam, provavelmente devido ao diferente método *ab initio* usado e ao fato de que nenhum solvente foi incluído nas simulações da Ref. <sup>214</sup>

Usando os cálculos *ab initio*, podemos estimar que a 39°C, a *R*-carvona preenche 58% do rotâmetro de menor energia. Estes resultados estão de acordo com os resultados experimentais, explicando porque apenas uma modesta estereoseletividade foi obtida na ausência de catalisadores.

60, onde uma ligação de hidrogénio entre o grupo carbonilo da carvona e o grupo hidroxilo do organocatalisador estabiliza o complexo I, levando a uma bromação do lado alfa e à entrada do nucleófilo pelo lado beta, como mostra a figura 60.

Tendo em mente a análise conformacional, sugerimos o mecanismo de reação exibido na figura 58. Os derivados bromoéster **12** e **13** são intermediários na síntese dos derivados epóxi da carvona. A reação de hidrólise de **12** e **13** com um alquilo garante a síntese dos derivados epóxi **22** e **23**, respetivamente, serão descritos estes resultados no capítulo 4.4 (ver figura 61).



**Figura 58.** Estruturas dos compostos **12** e **13** obtidas pela análise de difração de raio-x. a) composto **12** (5R,7R), b) composto **13** (5R,7S). Cores dos átomos: Cinzento (C), Branco (H), Blue (N), e castanho (Br).

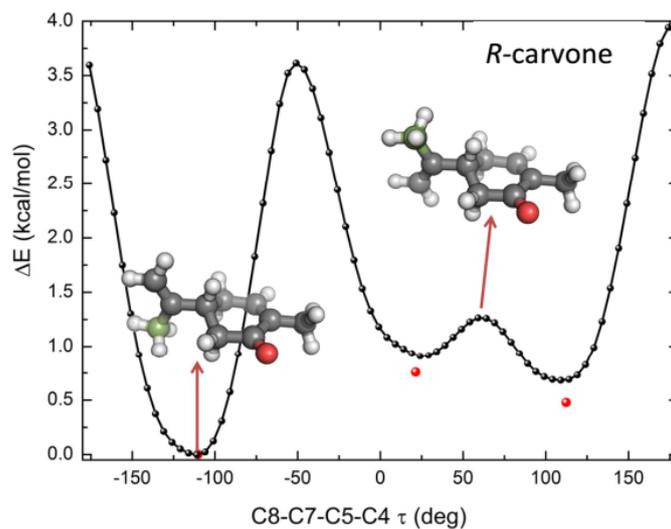


Figura 59. Varredura da superfície de energia potencial calculada ao longo do C8-C7-C4-C3 da R-carvona em um nível de teoria MP2 / 6-31 + G (d, p).

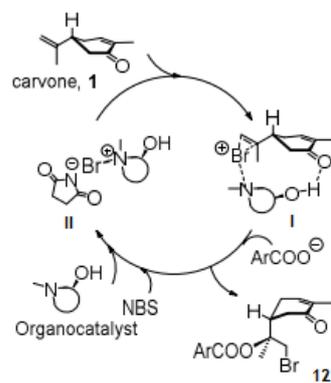


Figura 60. Mecanismo proposto para o resultado esterequímico observado.

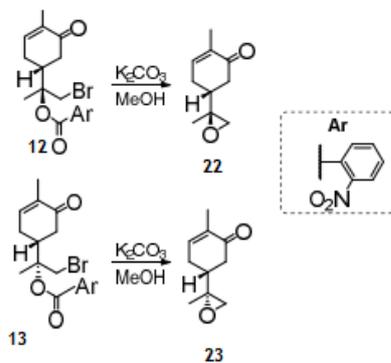


Figura 61. Síntese de epóxidos 7,8-carvona.

### 4.3.8 Reações de Guaiol e Bulnesol com catalisador

As diversas reações realizadas utilizando como produto de partida guaiol e bulnesol, produtos apresentados na figura 62, não tiveram o mesmo “sucesso” que as realizadas utilizando a carvona como produto de partida.

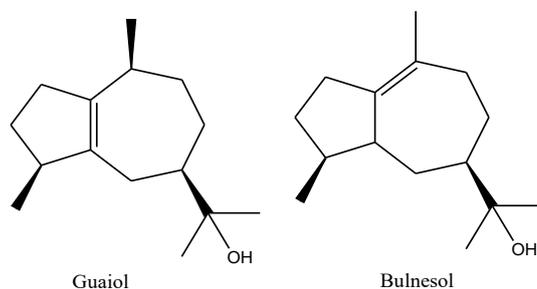


Figura 62. Estrutura dos produtos de partida.

Das diversas reações que foram realizadas utilizando catalisador, seja a 2% ou 5%, verificou-se que os produtos que obtiveram após a separação cromatográfica em coluna eram misturas bastante complexas que não permitiram a identificação dos produtos obtidos.

Estes produtos como não foram separados de modo a poder identificar os novos compostos obtidos, teve que se repensar uma estratégia de modo a que fosse possível identificar as alterações que aconteceram. Deste modo, optou-se pela análise em GC-MS destas misturas, permitindo assim a separação dos compostos pela massa molecular. Após esta separação os espectros obtidos foram colocados no *Software* equipado com bibliotecas de compostos. Devido a esta obtenção de mistura apenas foi possível a identificação das misturas obtidas nas reações que utilizaram o bulnesol como produto de partida.

Assim, foi possível começar a identificação dos produtos que dali se obtiveram, os quais de um modo geral se apresenta na tabela 14. De salientar que os compostos apresentados são apenas os compostos para os quais já existe identificação conhecida nas bibliotecas de massas, os restantes produtos encontram-se ainda em análise de modo a compreender quais as alterações que ali ocorreram.

Analisando os resultados obtidos nas reações que se realizam com o bulnesol como produto de partida é possível verificar a obtenção de misturas bastante complexas, misturas que não permitem uma identificação completa das alterações/novos produtos que possam ter ocorrido. Analisando a tabela 14, demonstram-se os produtos já identificados pela técnica de GC-MS com auxílio de bases de dados de massas. Como se pode verificar os compostos obtidos continuam a ser esqueletos sesquiterpênicos (C15).

Observa-se a obtenção de elemol, rosifoliol, cadineno, aristolona e derivados de eudesmol, porém os restantes compostos estão em análise, não só da sua estrutura química, mas também da possibilidade de procurar uma maneira de os poder obter separados de melhor forma.

Tabela 14. Produtos obtidos nas reações com bulnesol.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
<b>Cadineno</b>		<b>Rosifoliol</b>	
<b>Elemol</b>		<b>Selineno</b>	
<b>γ-eudesmol</b>		<b>Aristolona</b>	
<b>α-eudesmol</b>		<b>Nootkatona</b>	
<b>β-eudesmol</b>		<b>Hanamiol</b>	
<b>Isocalamendiol</b>			

## 4.4 Reação de epoxidação dos compostos 12 e 13

Na síntese orgânica, a transformação de alcenos em epóxidos é uma conversão bastante útil de um grupo funcional, uma vez que o anel oxirano, característico dos epóxidos, apresenta elevada reatividade. Por outro lado, a seletividade das reações de epoxidação pode ser controlada, entre outros fatores, pela escolha dos reagentes<sup>215</sup>.

Os epóxidos são de elevado interesse industrial, uma vez que são compostos intermediários para a produção de polímeros, adesivos, entre outros. Esta versatilidade está associada à alta reatividade do anel oxirano. Os epóxidos são também de interesse como intermediários úteis na síntese de diversos materiais e novos compostos<sup>216,217</sup>.

A epoxidação de alcenos deficientes em eletrões, como é o caso das cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, é de elevado interesse uma vez que as  $\alpha,\beta$ -epóxi cetonas são importantes *building blocks* na síntese orgânica, permitindo assim, a obtenção de vários grupos funcionais, incluindo:

- ✓ B-hidroxicetonas e compostos 1,3-diol, que estão presentes em várias prostaglandinas<sup>218</sup>;
- ✓ Grupos  $\alpha$ -hidroxilcetonas, que são encontrados em alguns antibióticos utilizados na quimioterapia<sup>219</sup>.

Para além da sua utilidade como *building blocks*, os epóxidos tornaram-se muito populares como intermediários sintéticos. Para além de serem compostos de fácil preparação através de uma grande quantidade de substratos, o anel oxirano característico dos epóxidos, é muito reativo e facilmente aberto sob uma ampla gama de condições, obtendo-se um largo espetro de produtos régio e estereoseletivos<sup>220</sup>.

A epoxidação destes compostos é normalmente realizada com peróxido de hidrogénio sob condições fortemente alcalinas utilizando bases ou sais tais como NaOH e KOH ou  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . No entanto, não é desejável usar bases solúveis, uma vez que, são perigosas e levam a uma grande produção de resíduos. A substituição de bases líquidas por catalisadores básicos sólidos tem a vantagem de diminuir a corrosão e os problemas ambientais, facilitando a separação e recuperação do catalisador<sup>208</sup>.

A seletividade de reações de epoxidação pode ser controlada, entre outros fatores, pela escolha dos reagentes. Os peroxiácidos ( $\text{RCO}_3\text{H}$ ) e o peróxido de hidrogénio alcalino ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são dois reagentes muito utilizados nas reações de epoxidação. Os peroxiácidos funcionam muito bem em reações com alcenos ricos em eletrões, enquanto que o peróxido de hidrogénio é, normalmente, seletivo para alcenos com défice de eletrões como é o caso de cetonas e aldeídos  $\alpha,\beta$  insaturados<sup>221</sup>.

Nas figuras 63 e 64, são apresentados os mecanismos propostos para a reação de epoxidação de um alceno por um peroxiácido e para a reação de epoxidação de uma enona pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  alcalino, respetivamente.

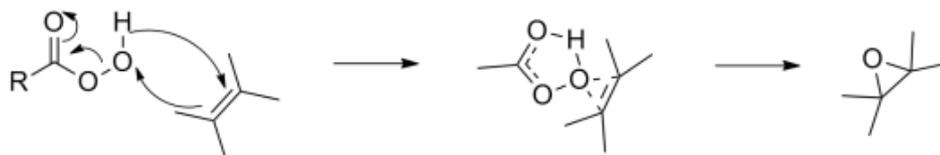


Figura 63. Mecanismo da reação de epoxidação de um alceno por um peroxiácido.

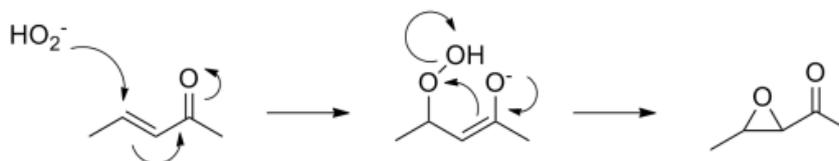


Figura 64. Mecanismo da reação de epoxidação de uma cetona  $\alpha,\beta$ - insaturada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  alcalino.

A seletividade destes reagentes na epoxidação de alcenos e compostos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados, pode ser demonstrada pela escolha de um substrato que contenha as duas funcionalidades, como é o caso da carvona, o substrato utilizado neste trabalho<sup>211</sup>. Mak e os seus colaboradores (2006) descreveram a reação da R-(-)-carvona com o ácido m cloroperoxibenzóico (MCPBA) demonstrando que esta era regiospecífica, sendo a transformação obtida na dupla ligação exocíclica presente no composto, tal como o esperado pela presença deste peroxiácido<sup>211</sup>.

Salvador et al. (2005)<sup>222</sup> descreveram um processo eficiente e muito versátil para a clivagem redutiva de  $\alpha,\beta$ -epóxi-cetonas com obtenção das  $\beta$ -hidroxi-cetonas correspondentes, sob condições suaves, utilizando hidrato de hidrazina ( $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) como catalisador da reação e etanol como solvente.

Excelentes resultados foram obtidos em epoxidações catalisadas por metais com hidroperóxidos, que levaram a um aumento do interesse no desenvolvimento de catalisadores heterogêneos para essas reações<sup>223</sup>.

A epoxidação catalítica assimétrica é uma poderosa transformação na síntese orgânica uma vez que leva à formação de epóxidos opticamente ativos, que são o motivo comum dos compostos biologicamente ativos, tornando os mesmos como intermediários biossintéticos bastante importantes<sup>224, 225</sup>. Da perspectiva do químico sintético, os epóxidos quirais são *building blocks* úteis e altamente versáteis para uma síntese direcionada para a diversidade<sup>226</sup>. A tensão do sistema de anel de três membros torna os epóxidos propensos a uma grande variedade de reações

nucleofílicas de abertura de anel. Esses processos favoráveis podem ser utilizados na formação de uma estrutura acíclica termodinamicamente mais estável ou um sistema de anel maior<sup>227, 228</sup>.

A reação de Sharpless foi pioneira no campo da epoxidação catalítica assimétrica com a epoxidação enantiosseletiva de álcoois alílicos usando os tartaratos de titânio como catalisadores<sup>229</sup>. Isto foi seguido por vários grupos, como o de Jacobsen<sup>230</sup> e Katsuki<sup>231</sup>, que se debruçaram sobre sistemas catalíticos eficientes que permitiram a epoxidação enantiosseletiva de alquenos isolados baseados em complexos de manganês<sup>16, 17</sup>. Nas décadas seguintes a essas descobertas, houve um progresso impressionante no desenvolvimento de reações de epoxidação assimétrica<sup>232,233</sup>.

A organocatálise assimétrica emergiu recentemente como uma abordagem sintética muito geral para as reações de epoxidação, sejam nucleofílicas ou eletrofílicas. Nos últimos anos muitos têm sido os protocolos experimentais que foram desenvolvidos para a reação de epoxidação de alcenos, como por exemplo:

- Epoxidação enantiosseletiva por catálise peptídica<sup>234</sup>;
- Epoxidação enantiosseletiva por cetonas quirais<sup>235,236</sup>;
- Epoxidação enantiosseletiva por catalisadores de aminas secundárias e primárias<sup>237</sup>;
- Epoxidação enantiosseletiva por catálise da ciclodextrina<sup>238</sup>.

Como resultado da enorme variedade de metodologias que se formaram à volta das reações de epoxidação hoje em dia é possível encontrar uma enorme variedade de classes de substratos que permitem ou se formam por intermédio deste tipo de reação<sup>239</sup>. As reações de epoxidação atingiram no presente um nível de maturidade bastante elevado e, como tal, existe cada vez a necessidade na procura de novos métodos de epoxidação, seja organocatalítica ou não<sup>229</sup>.

Por causa destas novas necessidades de metodologias, e após os produtos obtidos pela organocatálise, projetou-se uma nova abordagem às reações de epoxidação, isto é, partindo de um produto originado de uma reação com catalisadores, da qual se obteve um composto halogenado e com características catalíticas, resolveu-se utilizar este produto como substrato de partida para a obtenção de epóxidos derivados da carvona.

#### 4.4.1 Apresentação e discussão dos resultados

Devido à importância dos epóxidos naturais da carvona, composto **20** e **21** (figura 65), para a síntese de produtos naturais<sup>240</sup>, onde atuam como materiais de partida, tem existido um elevado interesse na sua síntese. Não obstante, e de acordo com o conhecimento obtido estes compostos não foram separados ou obtidos separadamente. Nesta secção relata-se a síntese destes derivados obtidos separadamente dos a partir dos compostos **12** e **13**, utilizando um procedimento organocatalisador<sup>241</sup>.

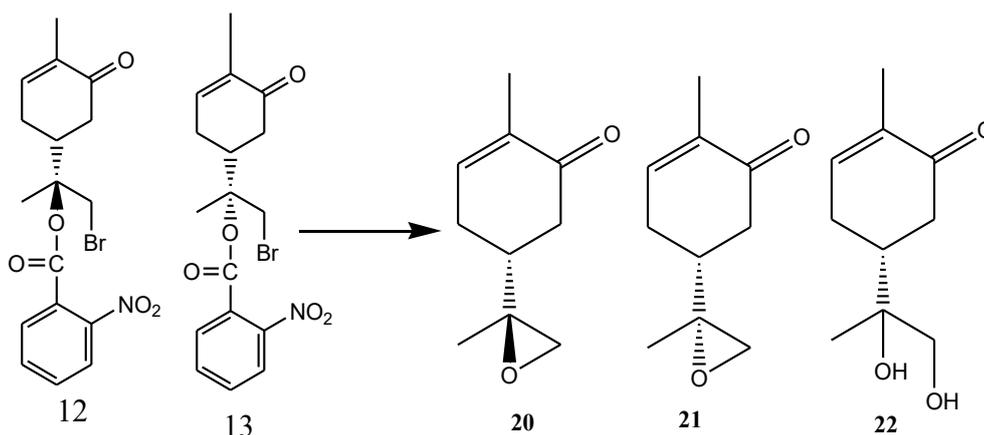


Figura 65. Produtos obtidos nas reações de epoxidação.

Pela tabela 15 é possível verificar que pela primeira vez estes dois compostos foram obtidos separadamente, apresentando rendimentos bastante elevados. Contudo, verifica-se que existe que o tempo de reação aplicado e a quantidade de  $K_2CO_3$  utilizado são os fatores que determinam a melhoria no rendimento obtido.

Tabela 15. Rendimentos obtidos nas reações de epoxidação.

Condições de reação	Rendimento %			
	12	20	21	22
Reação				
XXIX	12.9	50.0	-	-
XXX	-	-	24.9	-
XXXI	-	34.6	-	19.5
XXXII	-	-	14.6	-
XXXIII	-	-	30.1	-
XXXIV	-	41.0	-	-

Deste modo, analisando a tabela 15 para a reação **XXIX**, é possível verificar que a utilização do composto **12** como produto de partida, e com um tempo de reação de 1.5 dias, é obtido pela primeira vez o epóxido natural da carvona separado do seu isômero, isto é, obtém-se o composto **12**, com um rendimento de 50.0%. Apesar da existência de produto de partida por reagir (12.9%), pode-se afirmar que este método é o “ideal” para a obtenção destes isômeros sinteticamente e separados.

Aplicando as mesmas condições para o composto **13**, reação **XXX**, verifica-se a obtenção do segundo epóxido natural da carvona, composto **23**. Este epóxido é obtido também pela primeira vez isolado do seu isômero, composto **20**. No entanto a diferença que realça ao observar a tabela 15 é o rendimento com que este é obtido, ou seja, em contrapartida à reação anterior este

apenas é obtido com um rendimento de 24.9%. cerca de metade do que se obteve de composto **20**.

Numa expectativa de melhoria dos resultados obtidos realizaram-se mais duas reações, nas quais se fez aplicar um tempo de reação de 8 dias, permitindo assim deste modo perceber se um maior tempo de reação era ou não um fator para a melhoria dos resultados. Contudo, observando a tabela 15, verifica-se que para a reação **XXXI**, reação que utiliza como produto de partida o composto **12**, o rendimento que se obtém do composto **20** diminui significativamente, ou seja, passa de um valor de 50.0% a 1.5 dias de reação para 34.6% quando aplicado um tempo de reação de 8 dias, no entanto esta alteração reacional permite que se obtenha o composto **22**, composto que não seria expectável obter nestas condições, com um rendimento de 19.5%. É dito composto não expectável uma vez que o objetivo da utilização da base forte era a dissociação do grupo -Br e do anel arilo levando à formação de um epóxido e não à formação de dois grupos -OH. Para a reação **XXXII** verifica-se, reação que utiliza o composto **13** como produto de partida, o decréscimo no rendimento obtido é menor do que o que se verificou na reação anterior, ou seja, o rendimento obtido para composto **21** é de 14.6%.

Para terminar o estudo deste tipo de reação foram ainda realizadas mais duas reações, reação **XXXIII** e **XXXIV**, ambas realizadas em apenas 2h. Estas foram realizadas com o intuito de encontrar um “meio termo” nos rendimentos obtidos destes compostos, sem que ficasse produto de partida por reagir ou que se obtivessem compostos secundários, e esse “meio termo” foi encontrado, isto é, verifica-se que é possível obter o composto **21** com um rendimento de 30.1%, o rendimento mais elevado que se obteve para este composto, e um rendimento de 41.0% para o composto **20**, apesar deste rendimento ser um valor intermédio aos que se obtiveram para o mesmo composto.

## 4.5 Atividades Biológicas

Os óleos essenciais apresentam inúmeras potencialidades e são diversas as atividades biológicas que lhes podem ser atribuídas, tais como: antioxidantes, antivirais, antimicrobianas, inseticidas, antiparasitárias, anti-inflamatórias, cosmética, farmacêutica e indústria alimentar<sup>242,243</sup>. Devido às suas propriedades com interesse terapêutico os óleos essenciais são aplicados a nível da saúde humana e animal, isto resultado da interação de uma ou mais dos seus constituintes.

O uso das plantas ou extratos tem vindo a ser utilizado em todo o mundo na prevenção e tratamento de diversas patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, intestinais, diabetes, alergias, inflamatórias, artrite, doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, entre outras aplicações<sup>244</sup>. Devido a estes avanços, tornou-se crucial investir na avaliação científica das atividades biológicas, toxicidade no ser humano bem como na identificação da sua composição química, de modo a que estas possam vir a ser aplicadas de forma segura, tendo por base os critérios de qualidade, eficácia e de segurança.

Após a deterioração microbiana, a oxidação é a segunda maior causa de deterioração dos alimentos<sup>245,246</sup>. A degradação dos produtos alimentares durante o processamento, transporte e armazenamento dos alimentos está, muitas vezes relacionada com a produção de metabolitos tóxicos causados pela degradação oxidativa nos alimentos, causando grandes perdas económicas e constituindo, desta forma, um desafio para a indústria alimentar<sup>247,248</sup>.

Desta forma, os antioxidantes têm sido utilizados como aditivos alimentares de modo a proporcionar uma proteção contra a degradação oxidativa dos alimentos<sup>249</sup>. No entanto, alguns antioxidantes sintéticos utilizados no processamento de alimentos, tais como di-terc-butilmetilfenol (TBH) e a mistura dos isómeros 2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol conhecidos como BHA<sup>250</sup> apresentam efeitos secundários, nomeadamente efeitos carcinogénicos em organismos vivos<sup>251</sup>. Neste sentido, os óleos essenciais apresentam-se como uma alternativa de grande valor na preservação de alimentos, pela inibição da peroxidação lipídica dos alimentos contra os efeitos tóxicos dos oxidantes que provocam alterações destruidoras, como a perda de sabor, cor, valor nutricional e também a formação de radicais livres tóxicos, que têm efeitos tóxicos na saúde do consumidor<sup>252</sup>. Neste sentido a atividade antioxidante é uma das atividades biológicas dos óleos essenciais com interesse particular.

O efeito antioxidante dos óleos essenciais apresenta, também, um elevado interesse do ponto de vista da saúde humana. Estas moléculas são competentes na eliminação de radicais livres, desempenhando um papel crucial na prevenção de doenças associadas ao stresse oxidativo, tais como disfunção cerebral, cancro, doenças cardiovasculares, hepáticas e o declínio do sistema imunológico<sup>253</sup>. Neste contexto, o uso de antioxidantes naturais, nomeadamente óleos essenciais, constitui uma abordagem terapêutica promissora pela sua eficácia e segurança<sup>254</sup>.

### 4.5.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

Avaliou-se a atividade antioxidante com diferentes técnicas, para medir a capacidade captadora de radicais livres dos produtos do tipo terpenos e sesquiterpenos frente ao radical DPPH, anião superóxido e óxido nítrico. No rastreio inicial avaliou-se frente ao radical livre DPPH, já que este é um radical muito estável ao longo do tempo de todo o processo, o qual sofre uma alteração de cor imediata e permanente, isto é, passa de roxo a amarelo intenso, quando se encontra na presença de uma substância antioxidante que seja capaz de o reduzir. Estas características antes descritas para o DPPH permitem um desenrolar da técnica de modo mais preciso e exato, apesar de não ser um radical de importância biológica<sup>255</sup>.

Neste trabalho, usou-se a Quercetina e a curcumina como substâncias padrão. No entanto, apenas este último desenvolveu capacidade significativa contra o DPPH, com uma  $E_{max}$  de  $96,82 \pm 0,13\%$  e  $98,75 \pm 1,82$  para Quercetina e curcumina, respetivamente.

Comparando os produtos obtidos da síntese da carvona verifica-se que estes apresentam resultados bastante variados, como é possível observar pela tabela 16, é de realçar que os melhores resultados obtidos para cada produto variam na concentração de análise. No entanto comparando à mesma concentração das substâncias de referência ( $1 \times 10^{-4}$  M) verifica-se que os produtos que apresentam os melhores resultados de captura do radical de DPPH são: o composto 17 ( $61.55 \pm 8.03 \%$ ), composto 14 ( $57.38 \pm 3.18 \%$ ), composto 15 ( $54.84 \pm 2.25 \%$ ), composto 19 ( $47.57 \pm 3.99 \%$ ), composto 7 ( $27.12 \pm 2.22 \%$ ) e por fim o composto 13 ( $25.98 \pm 4.52 \%$ ). Em contrapartida, existem três produtos que em concentração inferior a  $1 \times 10^{-4}$  M, apresentam melhor % de inibição que as substâncias de referência, como é possível observar na figura 66. No caso da carvona 1 esta apresenta  $28.01 \pm 0.88 \%$  para uma concentração de  $1 \times 10^{-9}$  M, o composto 5 apresenta  $23.65 \pm 0.83 \%$  e o composto 12 apresenta  $15.58 \pm 0.28 \%$ , ambos para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M.

Embora não exista referência a estudos que avaliem a atividade antioxidante dos compostos avaliados contra DPPH, outros autores (Wojtunik, Ciesla e Waksmundzka, 2014<sup>256</sup>) mostram uma gama de atividade de variável intensidade para vários tipos de monoterpenos, frente a DPPH onde a carvona apresenta 95% de inibição, mas outros monoterpenos como eucaliptol têm 30% e o mentol tem 15% de inibição de DPPH, cujos valores são muito semelhantes aos obtidos neste trabalho. Os autores Wojtunik et al. 2014, propõem que os monoterpenos com mais ligações duplas no anel de ciclohexano, apresentam maior capacidade de captura de DPPH, em comparação com monoterpenos que não têm ligação dupla dentro do anel de ciclohexano. A ligação dupla dentro do anel poderá vir a influenciar a sua baixa capacidade de capturar o DPPH. No entanto, é necessário realizar mais testes com outros monoterpenos para validar esta hipótese de modo a permitir a indicação de uma possível relação estrutura vs atividade.

Um comportamento muito semelhante é observado para os sesquiterpenos, bulnesol, guaiol e águas Mães (mistura racêmica de ambos os compostos). Dos três o que apresenta maior capacidade é o Bulnesol com  $28.10 \pm 0.20 \%$ , e com valores muito idênticos o Guaiol e as Águas Mães, com  $25.72 \pm 1.27\%$  e  $25.70 \pm 0.67\%$ , respectivamente para uma concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M. No entanto observando a figura 66 verifica-se que para estes compostos que a uma concentração de  $1 \times 10^{-9}$  e de  $1 \times 10^{-8}$  M a sua % de Inibição é superior à curcumina.

Durante a pesquisa destes compostos verificou-se que não existem estudos sobre a avaliação antioxidante de sesquiterpenos puros frente a DPPH, os estudos que existem são sobre a avaliação em extratos de plantas com uma grande quantidade de sesquiterpenos na sua composição, os quais mostraram atividade antioxidante frente ao DPPH<sup>257</sup>.

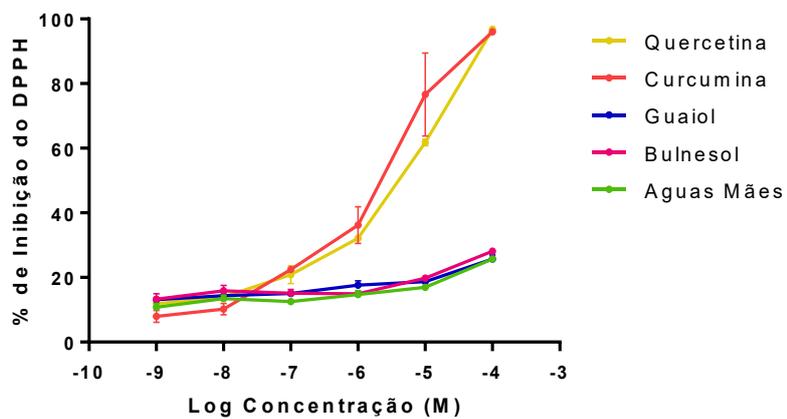
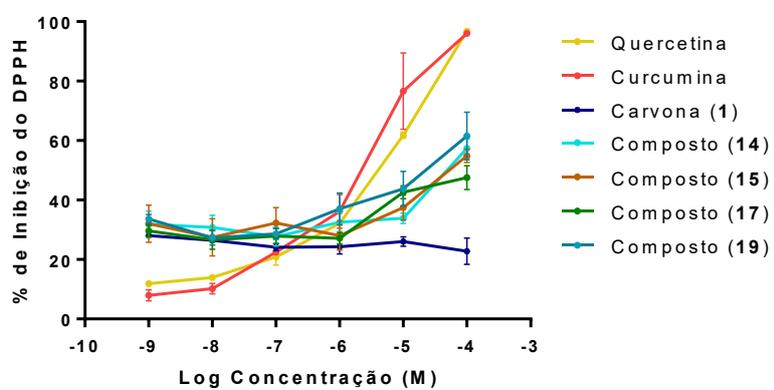
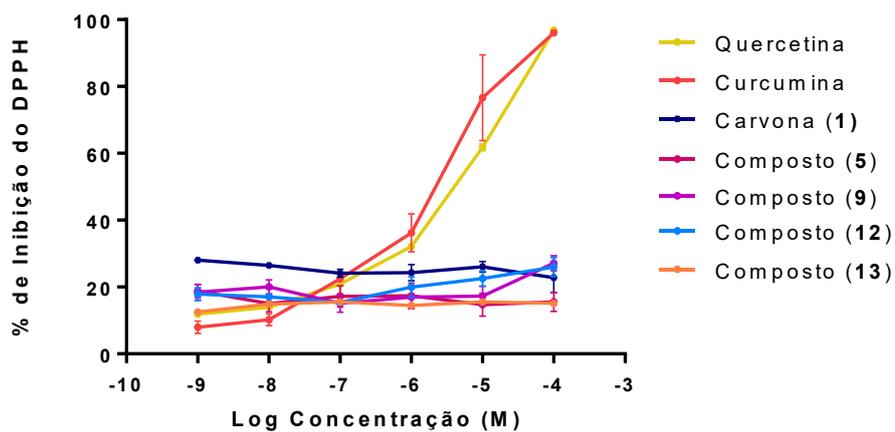


Figura 66. Representação gráfica da concentração vs % de inibição do DPPH produzido pelos compostos avaliados.

## 4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante frente ao anião superóxido

### 4.5.2.1 O anião superóxido num sistema não enzimático

Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é um radical livre de grande importância biológica porque é o radical encontrado na concentração mais elevada no corpo, tornando-se assim como o principal precursor de outras espécies reativas de oxigênio e azoto. No modelo testado foi produzido  $O_2^{\cdot-}$  quimicamente sem a presença de enzimas (modelo não enzimático), o que nos permite observar a percentagem de captação do anião superóxido. Que mostra que os compostos avaliados neste sistema podem ser apresentados como mecanismo antioxidante para reduzir a capacidade de  $O_2^{\cdot-}$ . A atividade antioxidante pode também ser doar ou receber elétrons e, assim, estabilizar elétrons desemparelhados no radical  $O_2^{\cdot-}$ .

Embora os produtos estudados apresentassem uma atividade relativamente discreta contra o radical DPPH, foi decidido continuar a avaliação dos mesmos com outros radicais, ao contrário do DPPH que era um radical sem importância biológica neste passo escolheram-se dois radicais com importância biológica: o anião superóxido e o óxido nítrico, de modo a verificar se existe uma atividade e afinidade maior do que a obtida com o DPPH.

Quando analisados os resultados obtidos observou-se uma enorme diferença em comparação aos resultados com o DPPH, isto é, obtiveram-se resultados para as substâncias de referência de  $31.32 \pm 0.61$  % e de  $13.10 \pm 0.87$  %, respetivamente para a Quercetina e para a Curcumina, para uma concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M. Para a mesma concentração das substâncias de referência verificou-se que nenhum dos compostos analisados tinha uma *E<sub>max</sub>* superior à Quercetina, no entanto há produtos que obtiveram valores de *E<sub>max</sub>* superiores ao valor obtido pela Curcumina, ou seja, obtiveram-se os seguintes valores, por ordem decrescente: composto **5** com  $16.18 \pm 1.33$  %, composto **15** com  $12.90 \pm 1.64$  %, carvona **1** com  $12.15 \pm 1.04$  %, composto **17** com  $7.97 \pm 0.98$  % e por fim o composto **12** com  $5.22 \pm 0.49$  %.

No entanto, foi possível verificar que para concentrações inferiores às das substâncias de referência, como para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M temos o composto **7** e **13** com uma *E<sub>max</sub>* de  $35.03 \pm 1.01$  e  $6.18 \pm 1.37$ , respetivamente. Para uma concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M obtém uma *E<sub>max</sub>* de  $15.99 \pm 0.69$  e de  $10.70 \pm 1.92$  para o composto **14** e **19**, respetivamente, como se pode observar na figura 67 tornando estes com maior poder de captura do anião superóxido a uma concentração menor.

Um estudo reportado por Quintans et al., 2013<sup>258</sup> mostra que o monoterpene (+)-canfeno possui uma atividade de captura do anião superóxido de maneira significativa, estes resultados vão de acordo com os obtidos neste trabalho, uma vez que apresentam uma potente atividade antioxidante frente ao anião superóxido. Embora esta atividade não possa ser atribuída a todos os monoterpenos como propriedade, como no estudo de Quintans et al., 2013; este também avaliou o geranilo, um monoterpene, que ao contrário do anterior apresentou uma atividade pro-oxidativa ao aumentar os níveis de anião superóxido.

No estudo efetuado com os compostos sesquiterpênicos, Guaiol, Bulnesol e Águas Mães, verificou-se que para uma concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M apenas o Bulnesol apresentou uma *E<sub>max</sub>* de  $14.62 \pm 0.70$ , no caso do Guaiol e das Águas Mães a concentração que melhor resultado apresenta é de  $1 \times 10^{-5}$  M apresentando estes uma *E<sub>max</sub>* de  $22.06 \pm 1.62$  e de  $23.43 \pm 0.64$ , respectivamente, como se pode observar na figura 67. Embora não tenha sido encontrado na literatura estudos com estes compostos, existe um estudo de Yoo et al., 2016<sup>259</sup> que sobressaiu na pesquisa deste trabalho; este estudo reportou a atividade de dois sesquiterpenos: Hisutenol E e F, estes mostraram uma potente e significativa atividade de captura do radical livre utilizando NBT como revelador, este descreve os sesquiterpenos como produtos naturais com interesse para serem estudados como produtos com possíveis efeitos antioxidantes do anião superóxido.

Curiosamente, um estudo reportado por Hazra et al, 2008<sup>260</sup> onde o sistema experimental para avaliar o anião superóxido foi similar a este trabalho, onde a Quercetina apresentou um *E<sub>max</sub>* de 29.6% de inibição do anião superóxido para uma concentração de 20 µg/mL, equivalente a  $6,62 \times 10^{-5}$  M. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, mostrando a reprodutibilidade e precisão da técnica utilizada.

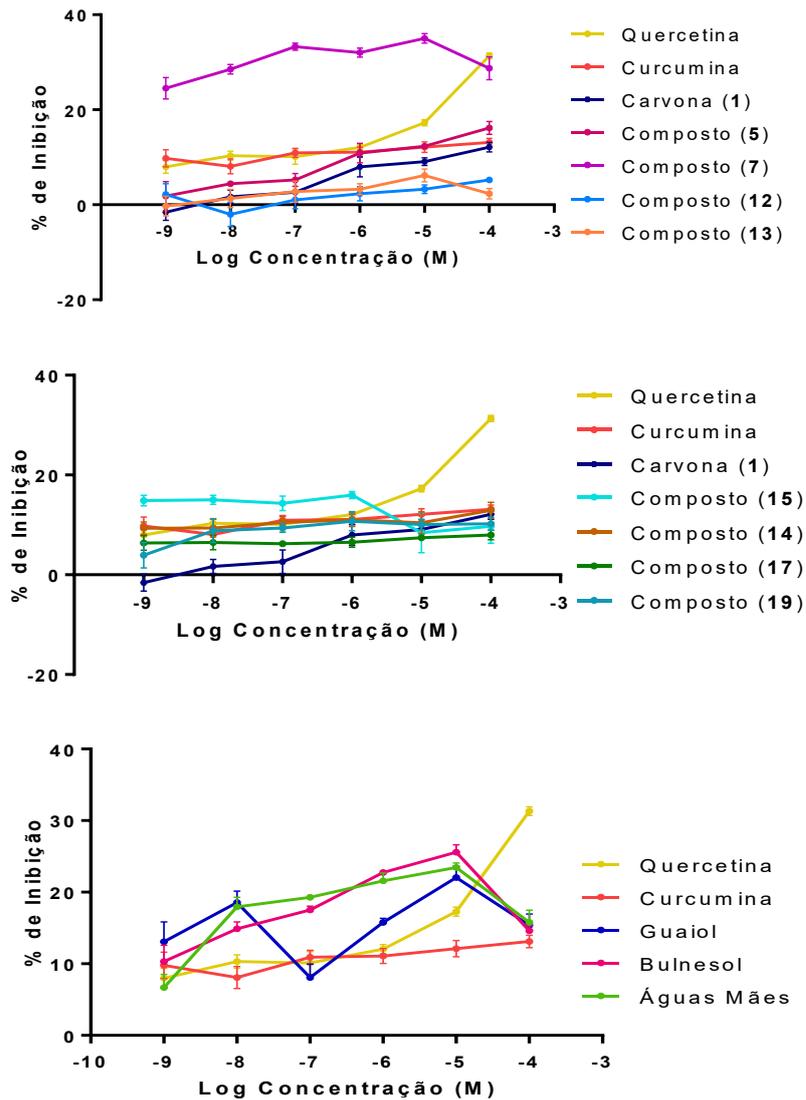


Figura 67. Curvas de Concentração vs Resposta da % de inibição do anião superóxido num sistema não enzimático.

#### 4.5.2.2 Anião superóxido em sistema biológico

Com os bons resultados obtidos no estudo anterior frente ao anião superóxido num sistema não enzimático, procedeu-se à estandarização da técnica para avaliação da atividade antioxidante mediante a deteção dos aniões de superóxido em anéis de aorta de ratos, na presença de lucigenina; constituindo-se numa técnica de avaliação da atividade antioxidante num sistema biológico.

Quando se avalia a atividade antioxidante frente ao anião superóxido com lucigenina, é importante mencionar que se necessita da presença de um sistema que contenha células vivas e enzimas, daí a escolha dos anéis de aorta. Estes anéis preservam-se viáveis numa solução de

Krebs-Hepes nutrida, sendo oxigenada com uma mistura de 95% oxigênio e 5 % dióxido de carbono. Conservada sempre a uma temperatura de 37°C e um pH=7.4.

Todas as condições descritas são necessárias para manter o tecido viável para a sua aplicação num sistema enzimático viável, já que a produção de anião superóxido no nosso sistema requerem-se que certas enzimas se mantenham presentes no sistema. Foram descritos vários sistemas enzimático pelos quais se gera o anião superóxido a nível vascular entre os quais tem-se<sup>261</sup>:

- Sistema enzimático com a Nicotanamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidase (NADPH oxidase);
- Óxido nítrico sintase desacoplada (Nos);
- Xantina oxidase (XO);
- E por meio das Ciclooxygenases.

Segundo reportou Li et al, 1998<sup>262</sup>, a lucigenina não pode exercer a sua ação quando se inibe a produção do anião superóxido dos sistemas enzimáticos, isto é, a sua inibição provoca a diminuição do sinal de luminescência induzida pela lucigenina.

#### **4.5.2.2.1 Estandarização da técnica para a avaliação da atividade antioxidante**

##### **4.5.2.2.1.1 Comparação do controlo negativo com a substância de referência (Quercetina)**

Para a estandarização da técnica fez-se uma comparação entre o controlo negativo, representado pelo solvente utilizado (DMSO) e o controlo positivo, representado pelo flavonoide com atividade antioxidante amplamente descrita, a Quercetina, a distintas concentrações de  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  e  $1 \times 10^{-7}$  M, ao tempo de 10, 15 e 20 minutos de leitura. O efeito antioxidante pode ser interpretado com a observação da diminuição dos sinais de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  às diferentes concentrações de Quercetina. Deste modo, o maior sinal de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  corresponde à maior concentração de anião superóxido produzida, e o menor sinal de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  corresponde à menor concentração de anião superóxido produzida.

Na figura 68 observam-se os resultados obtidos aos 10 minutos, onde a Quercetina mostrou a distintas concentrações uma diminuição significativa do sinal de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , comparada com o sinal do controlo DMSO com  $1321.7 \pm 51.0 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Observou-se que a Quercetina a uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M mostrou um sinal de  $245.0 \pm 7.6 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , à concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M mostrou um sinal de  $253.33 \pm 16.4 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  e a concentração de  $1 \times 10^{-7}$  M mostrou um sinal de  $223.3 \pm 3.3 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Evidenciando atividade antioxidante significativa independentemente da concentração para inibir a produção do anião de superóxido.

Ao tempo de 15 e 20 minutos, o sinal do controlo com DMSO diminuía ao longo que o tempo passava, no entanto, a Quercetina manteve o seu efeito antioxidante de forma significativa e independente da concentração, sem que alterasse muito o do valor obtido aos 10 minutos.

Os resultados obtidos revelam que o sinal máximo de luminescência se observa aos 10 minutos.

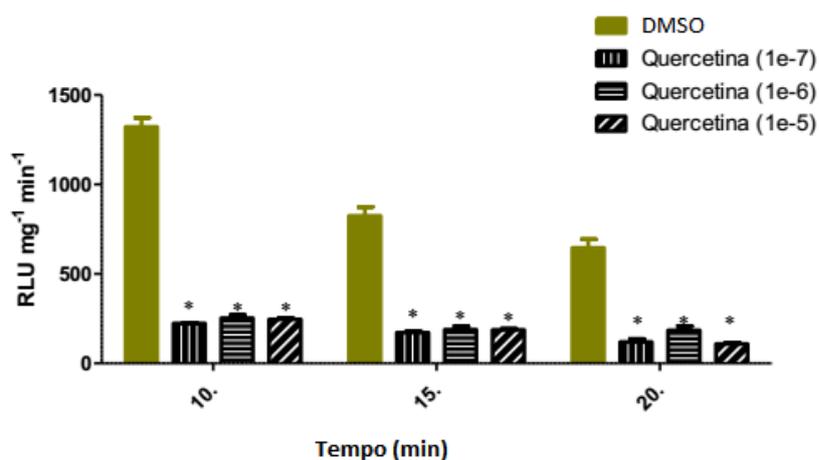


Figura 68. Comparação do sinal RLU.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> do controlo negativo com a quercetina a diferentes concentrações.

#### 4.5.2.2.1.2 Comparação dos valores de RLU.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> nos anéis expostos a L-NAME, alopurinol e Indometacina

Como segundo passo da estandarização comparou-se o controlo negativo com L-NAME, indometacina e alopurinol; que são substâncias que inibem diferentes enzimas pro-oxidantes da vasculatura.

Em todos os tempos de observação mantém-se diferenças entre os anéis expostos às substâncias padrão, como se pode observar na figura 69. A principal diferença verifica-se aos 10 minutos, esta deve-se a uma maior emissão de luminescência do controlo negativo e não a uma maior atividade inibidora dos agentes inibidores.

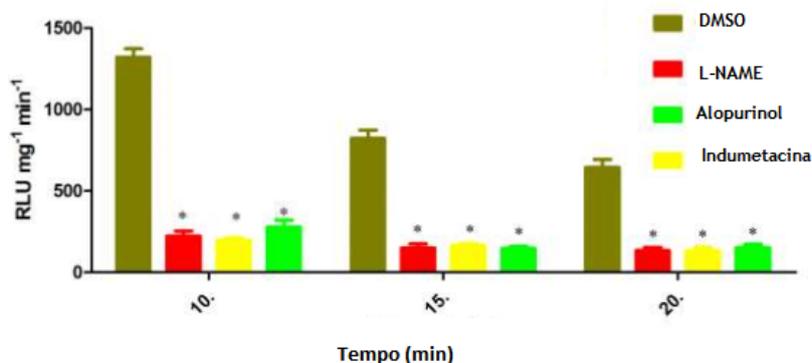


Figura 69. Comparação do sinal RLU.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> do controlo negativo com diferentes substâncias que inibem enzimas pro-oxidantes.

#### 4.5.2.2.1.3 Comparação dos sinais de $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + L-NAME

O primeiro que se pode destacar dos resultados obtidos, é que, após 10 minutos de observação, quando o anel aórtico é incubado com Quercetina ( $1\times 10^{-7}$ ) + L-NAME, de forma paradoxal (como se observa na figura 70) observa-se um aumento do sinal  $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  comparado com o da Quercetina, sendo de  $341.6 \pm 27.4\%$  e  $223.3 \pm 3.2\%$ , respetivamente.

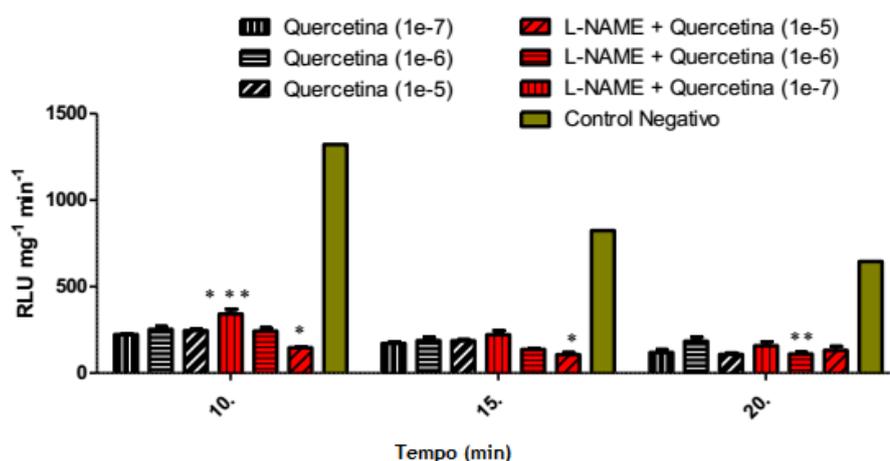


Figura 70. Comparação do sinal de  $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  da Quercetina a diferentes concentrações vs L-NAME + quercetina a diferentes concentrações.

Para este ensaio, é válido notar a potencialização da atividade antioxidante apresentada por L-NAME quando os anéis são expostos à concentração máxima de Quercetina, sendo estes resultados evidentes aos 10 minutos de observação; os valores de  $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  de Quercetina foram de  $245.0 \pm 7.6\%$  vs os valores de Quercetina + L-NAME que foram de  $146.7 \pm 4.4\%$ . para o restante tempo e concentrações.

#### 4.5.2.2.1.4 Comparação dos sinais de $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + Indometacina

A Indometacina é um inibidor da enzima pro-oxidativa COX (Cicloxiogenase). Neste ensaio foi exposto um grupo de anéis a uma mistura de Indometacina + Quercetina. Foi possível observar uma atividade inibidora do anião superóxido induzida pela Quercetina, a qual na presença de Indometacina, mostra uma ação em conjunto com o aumento da inibição aos 10 minutos onde as concentrações de  $1\times 10^{-5}$  e  $1\times 10^{-6}$  M, o agente inibidor COX consegue aumentar a capacidade antioxidante do flavonoide. A este respeito, observa-se para a Quercetina valores de  $\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $253.3 \pm 16.4$  ( $1\times 10^{-6}$ ) e  $245.0 \pm 7.6$  ( $1\times 10^{-5}$ ), enquanto que, nos anéis que se incubaram com a mistura de Quercetina + Indometacina ( $1\times 10^{-6}$ ) e de Quercetina + Indometacina ( $1\times 10^{-5}$ ),

apresentaram valores menores de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  de  $175.8 \pm 19.3$  e  $113.6 \pm 11.4$ , respectivamente, como se pode observar na figura 71.

Aos 15 minutos observou-se uma mudança de comportamento, isto é, a inibição por Quercetina foi de 2.4x maior do que a inibição a concentração de  $1 \times 10^{-5}$  do conjunto Indometacina + Quercetina à mesma concentração. O mesmo se observa para a concentração de  $1 \times 10^{-6}$  onde o incremento observado é de 2.2x, comparando a atividade antioxidante da Quercetina com a atividade antioxidante da mistura Quercetina + Indometacina à mesma concentração.

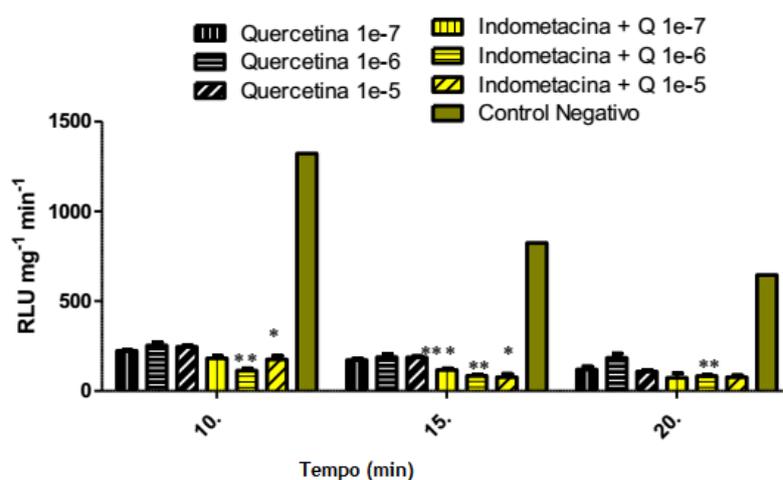
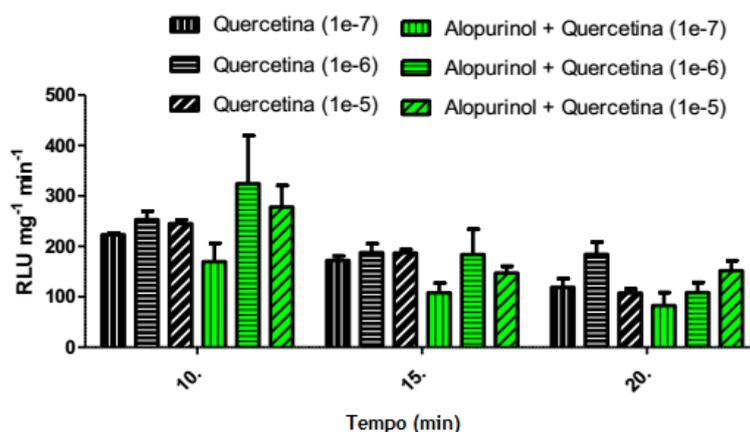


Figura 71. Comparação do sinal de  $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  da Quercetina a diferentes concentrações vs Indometacina + Quercetina a diferentes concentrações.

#### 4.5.2.2.1.5 Comparação dos sinais de $\text{RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ emitidos pelos anéis de aorta expostos a Quercetina vs Quercetina + Alopurinol

O Alopurinol é uma enzima pro-oxidativa OX (xantina oxigenase), a qual foi avaliada na presença de Quercetina a diferentes concentrações. Pela figura 72 pode-se observar que ao tempo de 10 minutos, existiu um aumento significativo do sinal de Alopurinol + Quercetina a  $1 \times 10^{-5}$  M, com valores de  $278.1 \pm 42.6 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , comparado com a Quercetina que apresenta um sinal de  $245.0 \pm 7.6 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , para a mesma concentração. Para uma concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M observou-se um aumento pouco significativo; apresentando um valor de  $342.2 \pm 95.1 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para a mistura Alopurinol + Quercetina e um valor de  $253.3 \pm 16.4 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para a concentração de  $1 \times 10^{-7}$  M a mistura de Alopurinol + Quercetina apresentou uma diminuição em comparação com a Quercetina, sendo de  $169.7 \pm 36.9$  e  $223.3 \pm 3.3 \text{ RLU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 72.** Comparação do sinal de RLU.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> da Quercetina a diferentes concentrações vs Alopurinol + Quercetina a diferentes concentrações.

A avaliação aos 15 minutos (figura 72) da mistura Alopurinol + Quercetina ( $1 \times 10^{-5}$  M) apresenta uma diminuição pouco significativa em comparação com a Quercetina. Mantendo-se sem mudanças significativas para a concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M. Para a concentração de  $1 \times 10^{-7}$  M a mistura de Alopurinol + Quercetina, houve uma diminuição significativa na produção de anião superóxido, comparada com a Quercetina, à mesma concentração.

Quando se analisam os resultados obtidos aos 20 minutos (figura 72) verifica-se um aumento significativo para a mistura Alopurinol + Quercetina à concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, diminuindo significativamente nas concentrações seguintes.

#### 4.5.2.2.2 Atividade frente a $O_2^{\bullet}$ na presença de Lucigenina

A avaliação da atividade antioxidante contra  $O_2^{\bullet}$  na presença de Lucigenina, é determinado medindo a formação de quimiluminescência, produto da formação de  $O_2^{\bullet}$  num meio biológico como são os anéis de aorta. É determinado com base no fato de que quanto mais o sinal de quimiluminescência diminui, menor concentração de  $O_2^{\bullet}$  existe no meio, resultando numa maior atividade antioxidante. Esse sistema permite avaliar outro mecanismo de ação antioxidante de forma indireta, como a possível modulação de sistemas enzimáticos pró-oxidativos, já que tem sido demonstrado que a incubação dos anéis com inibidores das enzimas (tais como oxidase de NADPH, óxido nítrico sintase (NOS), xantina-oxidase (XO) e a ciclo-oxigenase (COX)), interrompe a produção do anião superóxido, e a lucigenina é incapaz de gerar um bom sinal. Embora a Lucigenina possa aumentar a produção do radical do anião superóxido, sem a ação prévia de enzimas pró-oxidativas para a produção de este radical, a lucigenina é incapaz de gerar este anião de novo.

Os resultados obtidos por este modelo podem ser interessantes por duas razões (1) mede a atividade antiradicalar livre contra o radical principal, o  $O_2^{\cdot}$  e (2) Determinações num meio biológico permitem possíveis interações com uma grande variedade de alvos.

Para este teste, usaram-se concentrações de  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M, como se pode observar na figura 72, tanto dos padrões como dos compostos avaliados. O sinal base de produção é dado pelo grupo de anéis incubados com DMSO ( $1321,7 \pm 51,0$  RLU). Levando isso em consideração, observou-se que a Quercetina produziu uma redução do sinal de luminescência e, desde as concentrações mais baixas, o valor de RLU foi inferior a 250. Um padrão de atividade muito semelhante foi desenvolvido pelo outro composto de referência, a Curcumina. No caso dos derivados da Carvona (1), bem como para a própria Carvona (1), observa-se que a sua atividade antioxidante máxima se observa à mais baixa concentração estudada ( $1 \times 10^{-7}$  M), sendo, em todos os casos, significativamente inferiores ao DMSO. Note-se que para o Composto 7 e para a Carvona (1), a capacidade de reduzir a presença de  $O_2^{\cdot}$  foi ligeiramente maior do que a apresentada pelos restantes compostos.

Para o segundo grupo de compostos, cuja atividade está resumida na figura 73, também podemos observar maiores efeitos na concentração mínima testada, é de destacar o fato de que em concentrações mais altas os derivados de terpenos perdem atividade, tanto que para alguns, como o composto 15, o sinal emitido torna-se superior ao grupo incubado com DMSO.

Observa-se que, os compostos Guaiol e Bulnesol, bem como as a mistura águas-mães (figura 73), são tão eficazes quanto a Quercetina ou a Curcumina para redução da presença de  $O_2^{\cdot}$  no sistema biológico.

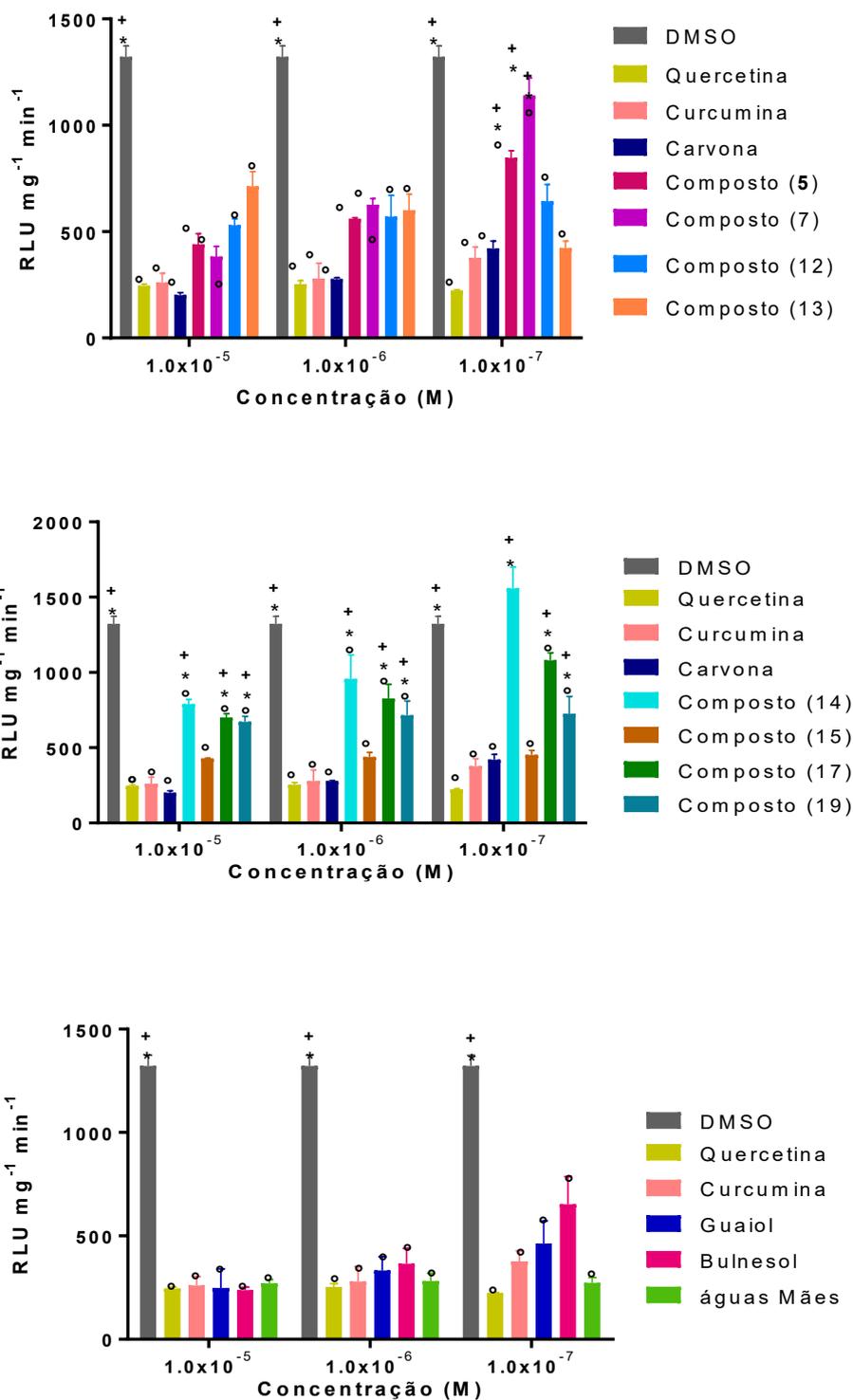


Figura 73. Efeito Antioxidante frente ao anião superóxido em anéis de aorta.

Como acontece anteriormente não foi encontrado na literatura estudos com estes compostos, contudo na literatura existe um estudo de interesse com o sesquiterpenos  $\beta$ -Eudesmol realizado por Sghaier et al., 2016<sup>263</sup>, que demonstra a atividade inibidora da produção de anião superóxido

em células tumorais de cancro do pulmão. Provando, assim, os efeitos antirradicalares contra o anião superóxido por parte dos compostos sesquiterpénicos em sistemas biológicos.

É importante ressaltar a importância deste radical livre, porque<sup>264</sup>:

- É um precursor do radical hidroxilo, que é um dos mais reativos e nocivo;
- Pode causar o desacoplamento de diferentes enzimas como a NOS e a XO, convertendo estas enzimas em produtoras de mais anião superóxido o que leva a aumento do stress oxidativo;
- Ao captar este anião evita-se uma cascata de eventos pró-oxidantes causados pelo anião superóxido.

#### 4.5.2.3 Atividade antioxidante frente a NO

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador químico gerado pelas células endoteliais, macrófagos e neurónios; que participa na regulação de diversos processos fisiológicos. Reconhece-se que a fragmentação do DNA, morte celular neuronal e dano celular, problemas que ocorrem devido à toxicidade da superprodução de NO. Em condições aeróbicas, o NO é muito instável e reage com oxigénio para produzir intermediários ((NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Nesta condição, o anião pode reagir com NO superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) para produzir peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

O modelo de atividade antirradicalar frente a NO utilizado neste trabalho, é uma forma indireta para prever a capacidade que possui um composto para capturar o excesso de NO e, desta forma prevenir a formação de um ONOO<sup>-</sup>.

Na tabela 21 apresentam-se os resultados obtidos na avaliação em relação ao radical NO. A % de captura de NO desenvolvida pela Quercetina e pela Curcumina, foi de 31,3 ± 2,5% e 29,2 ± 2,0%, respetivamente; o que pode ser considerada uma atividade discreta. Para a Quercetina, a atividade máxima foi registrada na concentração de 1x10<sup>-5</sup> M, enquanto para a Curcumina a C<sub>max</sub> foi de 1x10<sup>-4</sup> M. Tal como para os compostos padrões, a atividade dos terpenos para capturar o NO é inferior a 50%.

Observamos que tanto o Bulnesol como o Composto 7, desenvolveram uma atividade de *scavenger* de 40.13 ± 1.33% e 43.05 ± 1.32%, respetivamente, o que é significativamente superior ao valor obtido pela Quercetina ou pela Curcumina. Deve-se notar que a atividade desenvolvida pelos compostos não mostrou uma relação concentração-resposta, contudo, para obter os valores de EC50, realizou-se uma análise estimada usando o programa *Graphpad prism v.5 test Equation: log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope*.

Tabela 16. Eficácia (Emax) e potência (EC50) antirradical versus dados de

Composto	Emax (%)	Cmax (M)	EC <sub>50</sub>
<i>Guaiol</i>	30.52 ± 2.81	1x10 <sup>-5</sup>	1.1x10 <sup>-8</sup>
<i>Bulnesol</i>	40.13 ± 1.33	1x10 <sup>-6</sup>	3.8x10 <sup>-5</sup>
<i>Águas Mãe</i>	14.74 ± 5.49	1x10 <sup>-4</sup>	4.2x10 <sup>-5</sup>
<i>Carvona (1)</i>	13.44 ± 0.77	1x10 <sup>-8</sup>	9.1x10 <sup>-7</sup>
Composto (7)	43.05 ± 1.32	1x10 <sup>-7</sup>	8.1x10 <sup>-5</sup>
Composto (5)	13.70 ± 0.36	1x10 <sup>-8</sup>	1.6x10 <sup>-7</sup>
Composto (12)	20.96 ± 6.28	1x10 <sup>-7</sup>	9.7x10 <sup>-6</sup>
Composto (13)	34.35 ± 1.99	1x10 <sup>-4</sup>	7.7x10 <sup>-6</sup>
Composto (14)	27.23 ± 4.89	1x10 <sup>-5</sup>	1.6x10 <sup>-5</sup>
Composto (15)	37.87 ± 0.69	1x10 <sup>-6</sup>	3.2x10 <sup>-5</sup>
Composto (17)	27.00 ± 4.47	1x10 <sup>-4</sup>	9.5x10 <sup>-8</sup>
Composto (19)	33.78 ± 2.29	1x10 <sup>-5</sup>	4.1x10 <sup>-8</sup>
Quercetina	31.3±2.5	1x10 <sup>-5</sup>	9.1x10 <sup>-7</sup>
Curcumina	29.2±2.0	1x10 <sup>-4</sup>	4.9x10 <sup>-6</sup>

### 4.5.3 Atividade Vascular

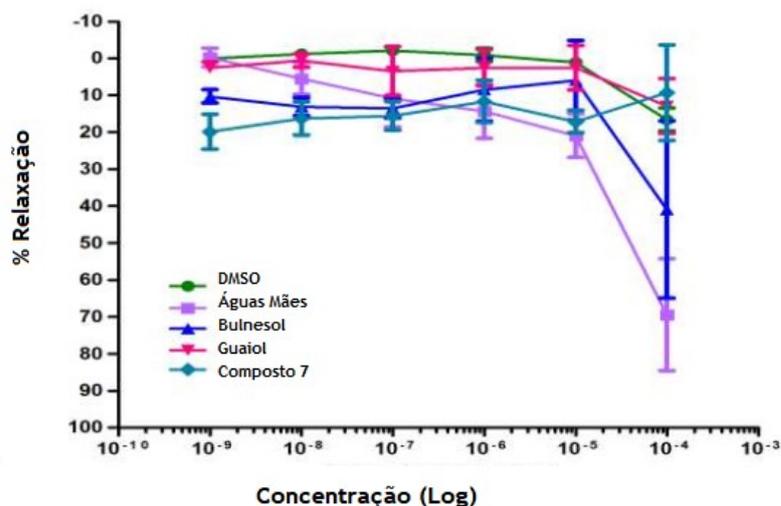
#### 4.5.3.1 Avaliação do efeito vasodilatador *in vitro*, em anéis de aorta de ratos com endotélio íntegro

Sobre a atividade vascular é importante mencionar que estes produtos, composto 7, Guaiol, Bulnesol e Águas Mães, não contam com reporte bibliográfico sobre o perfil de efeitos vasculares, pelo que estes resultados constituem a primeira informação originada a este respeito.

Nestes ensaios, resultados apresentados na figura 74, o veículo utilizado para dissolver os produtos, o DMSO, mostrou apenas um efeito vasodilatador de 16.5 ± 3.1% para a concentração de 1x10<sup>-4</sup>, porém a concentrações mais baixas não gera efeito relaxante.

Para as Águas Mães, observa-se um efeito vasorelaxante que é dependente da concentração e que alcança um efeito máximo de 69.40 ± 15.16% à concentração de 1x10<sup>-4</sup>, e que é estatisticamente significativo ao comparar com o DMSO.

No entanto, para o Bulnesol, os seus resultados não apresentam diferenças significativas, em comparação ao DMSO, para as primeiras doses, mas, alcança um efeito máximo de 40,9 ± 23,9 que, dado o desvio das medições frente ao DMSO, torna que este dado seja insignificativo. O guaiol não apresentou um efeito vasodilatador, já que ao ser comparado com o DMSO, não mostra diferenças estatisticamente significativas.



**Figura 74.** Curvas de Concentração-resposta de sesquiterpenos e terpeno em anéis de aorta de rato, pré contraídos com fenilefrina  $3 \times 10^{-6}$  M.

O composto 7 exerce um efeito de relaxação vascular à concentração inicial de  $1 \times 10^{-9}$ ; no entanto, a adição de concentrações mais elevadas do composto mostra uma diminuição no efeito vascular, que também não apresenta diferenças significativas com o controle DMSO.

Nenhum dos produtos testados parece exercer efeitos citotóxicos sobre o tecido vascular utilizado, pois ao ser exposto novamente ao agente de contração, fenilefrina, ocorre uma contração semelhante à obtida antes da formação da curva dose-resposta.

#### 4.5.3.2 Avaliação do efeito vasodilatador *in vitro*, em anéis de aorta de ratos com endotélio desnudado

Como as Águas Mães apresentaram efeito significativo nos anéis aórticos com endotélio íntegro, determinou-se o efeito desse produto nos anéis com endotélio desnudo. Como mostrado na figura 75, a resposta vascular inicial desenvolvida sob estas condições experimentais é do tipo de contracturante, no entanto, ao atingir a concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M, desenvolve-se um poderoso efeito vasodilatador que manifesta um *Emax.* de  $95,8 \pm 2,9$  %, o que é estatisticamente significativo em relação ao DMSO.

No estudo da atividade vascular com endotélio íntegro o único produto que apresentou uma relaxação significativa, comparada com o DMSO, foi as Águas Mães; enquanto que o bulnesol e o guaiol carecem de efeito vasorelaxante. Talvez essa diferença possa ser explicada por uma sinergia entre esses dois produtos que leva ao relaxamento vascular. O composto 7 também não mostrou efeito vasodilatador.

O relaxamento dos anéis da aorta envolve várias ações, dependendo do efeito direto sobre as células musculares lisas ou da ativação das células endoteliais. Esses mecanismos definidos para

promover a vasodilatação incluem a ativação de recetores de membrana, como recetores beta-2-adrenérgicos, bloqueio de recetores alfa-adrenérgicos, ativação da enzima endotelial do óxido nítrico, ativação de correntes de potássio ou bloqueio de canais de cálcio, entre outros<sup>17</sup>.

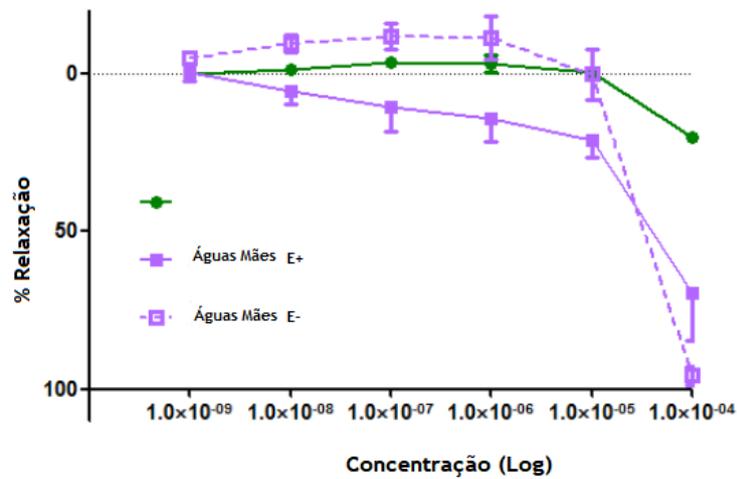


Figura 75. Avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de rato com endotélio desnudado.

À luz dos nossos resultados, é impossível propor um mecanismo para o efeito vasodilatador, uma vez que com os primeiros ensaios apenas provamos se este efeito existe ou não. Mais estudos serão necessários para determinar o possível mecanismo de ação envolvido no efeito vascular das Águas Mães, porém qualquer um dos mecanismos descritos anteriormente poderia ser responsável pela atividade vasodilatadora. Uma característica importante encontrada durante nosso estudo, é que nenhum dos produtos exerceu dano no tecido, já que ao se contrair novamente com fenilefrina, o tecido respondeu, o que nos permite concluir que o efeito é dependente dos componentes presentes em Águas Mães e utiliza mecanismos fisiológicos presentes no tecido.

## 5. Conclusões

Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe, aquilo que não se sabe, saber que não se sabe, na verdade é este o saber”

*Confúcio*

## 5. Conclusões

- **Reações com  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Para as reações que tiveram como produto de partida a *R*-carvona (1) e uma temperatura de 45°C, podemos verificar que quando aplicado um maior tempo de reação, 6 dias, os produtos obtidos são apenas o composto 2 e 4 e com rendimentos de 4.5 e 4.8 %, respetivamente. Se o tempo de reação for reduzido para 1 dia, verifica-se a formação dos mesmos produtos, o composto 2 e 4 e com rendimentos de 3.3 e 7.0 %, respetivamente. A diferença de tempo de reação permite alcançar um rendimento mais elevado do composto 4. No entanto alterando o tempo de reação para 3 dias, e aumentando ligeiramente a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizado obtém-se uma maior diversidade de produtos. Nestas condições verifica-se uma diminuição da quantidade de carvona reagida, mas levando à formação dos restantes produtos, compostos 3, 4 e 5, com os rendimentos de 2.6, 4.0 e 4.5 %, respetivamente.

Foram realizadas reações utilizando uma mistura de *R*-carvona (1) com 2,3-epoxicavona (2), nas mesmas condições que as reações derivadas só de carvona, na qual se aplicou uma temperatura de 45°C e um tempo de 6 dias. Nesta reação apenas se obteve um produto, o composto 5, com um rendimento de 7.9 %. Observando este resultado realizou-se mais uma reação apenas utilizando como produto de partida 2,3-epoxicavona (2) e as mesmas condições de reação. E uma vez mais apenas o composto 5 foi o produto obtido, com um rendimento de 8.8 %.

Na realização deste tipo de reação à temperatura ambiente, verifica-se que existe uma degradação dos produtos, ou seja, obtém-se misturas difíceis de separar na cromatografia em coluna levando à não caracterização dos produtos resultante. Assim este tipo de reação à temperatura ambiente não deve ser realizada. Já em contrapartida, utilizar temperaturas entre 70-75°C favorecem o aparecimento de outros produtos, ou seja, produtos cloro-derivados. Assim sendo, com uma temperatura mais alta e um tempo de reação variável de 40 a 48 horas temos a formação dos compostos 2, 5 e 6 com os rendimentos de 31.4, 6.3 e 4.7 %, respetivamente. Ou seja, a esta temperatura e tempo de reação os produtos desejados são obtidos com rendimentos elevados.

Deste modo, pode-se afirmar que qualquer das condições aplicadas é suficiente para atingir uma total transformação do produto de partida. Prevendo-se futuramente que estas condições sejam otimizadas, uma vez que é uma reação de fácil manuseio e que permite a obtenção de determinados compostos de maneira mais rápida e simples.

- **Reações com NBS e *p*-TsOH.**

Para estas reações podemos concluir que a aplicação de temperatura e um menor tempo de reação leva à obtenção do composto 7 em maior quantidade, apesar da diferença de rendimentos entre as duas reações não ser muito significativa, porém as condições aplicadas neste tipo de reação vão depender do objetivo que se pretende, ou seja, se o que é pretendido são compostos bromoderivados simples aconselha-se as condições da reação IX, temperatura de 62°C e tempo

de 4H de reação. Se o que se pretende é a obtenção de compostos mais simples as condições de reação X são mais indicadas, isto é, sem temperatura e maior tempo de reação.

No entanto para ambas as reações a obtenção de compostos secundários são mais prováveis, isto porque o TsOH é um reagente mais utilizado para acetilação de aldeído, esterificação de ácidos carboxílicos e na transesterificação de ésteres, daí a formação destes compostos.

As reações realizadas com catalisadores permitiram a obtenção de produtos com rendimentos consideráveis e com um tempo de reação menor.

- **Reações com catalisadores.**

A prolina é um catalisador de baixa eficiência, ou seja, apesar de permitir a formação dos principais bromoderivados, permite ainda o aparecimento de um álcool em vez de bromo. Assim para reações utilizando a prolina como catalisador o ideal a ser usado é uma quantidade de prolina de 20% e temperatura ambiente, uma vez que estas foram as condições que melhores rendimentos deram e que leva à obtenção de dibromo-derivado com um baixo rendimento, não afetando assim a separação e caracterização dos produtos, obtendo assim 14.6, 19.3, 32.7 e 3.5%, compostos **7**, **12**, **13** e **17**, respetivamente.

A quinina como catalisador apenas permite a formação de três compostos, os compostos **7**, **12** e **13**, no entanto este catalisador tem uma particularidade, ou seja, se for utilizada uma baixa quantidade de catalisador, 2%, e realizada à temperatura ambiente esta reação apenas permite a obtenção de misturas de produtos difíceis de separar. Contudo verifica-se que para este catalisador as condições ideais de utilização para este tipo de reação é com uma quantidade de 20% de catalisador e uma temperatura de reação de 39°C, já que é nestas condições que se obtém melhores rendimentos, 15.8, 12.5 e 33.0%, composto **7**, **12** e **13**, respetivamente.

O uso de quinidina como catalisador permite uma vez mais a formação de três compostos, os compostos **7**, **12** e **13**, no entanto há uma contrapartida com o uso deste catalisador, a obtenção de variâncias de rendimentos, isto é, quando aplicada uma baixa quantidade e uma temperatura ambiente os produtos são obtidos com uma grande diferença de rendimentos 11.3, 6.2 e 52.6%, para os compostos **7**, **12** e **13**, respetivamente, o que comparado com a utilização de uma temperatura de 39°C não faz grande diferença até porque sem temperatura ainda se tem o composto aromático como subproduto, composto **14**. Em termos da utilização de uma maior quantidade de catalisador verifica-se o mesmo que anteriormente, a temperatura ambiente é a condição mais propícia deste tipo de reação, levando à formação dos compostos, **7**, **12** e **13**, com rendimento de 12.6, 18.0 e 33.6%, respetivamente. Neste caso, são aceitáveis os resultados em ambas as quantias de catalisador, mas sempre com uso de temperatura ambiente.

O difenilprolinol como catalisador tem a sua vantagem, uma vez que, é o que permite os melhores rendimentos a uma quantidade de 20% e a uma temperatura de 39°C. Levando a que seja o que tem os rendimentos mais elevados em comparação aos restantes catalisadores sendo estes de

21.5, 21.6 e 42.0%, respetivamente composto **7**, **12** e **13**. Já quando utilizado em baixa quantia é o que apresenta pior condição de reação para a formação da bromocarvona, composto **7**.

Com a não utilização de catalisador verifica-se rendimentos relativamente idênticos aos obtidos noutras reações, à exceção do composto **17**, a exceção deste rendimento tanto é aplicável a reação que seja realizada à temperatura de 39°C ou à temperatura ambiente, com rendimento de 26.6% e 19.2%, respetivamente. Neste caso verifica-se a obtenção do composto **19**, mas com um rendimento muito baixo, de apenas 3.2%.

Assim sendo, é possível afirmar que para este tipo de reação as melhores condições para a obtenção dos bromoésteres (**12** e **13**) são com a utilização de difenilprolinol como catalisador e a uma temperatura de 39°C, sendo que os produtos apresentam altos rendimentos. No entanto se quisermos obter maiores quantidades de bromocarvona (**7**) ou dibromocarvona (**17**) não deve ser utilizado catalisador, mas sim apenas ter em consideração o uso ou não de temperatura.

- **Reações de guaiol e bulnesol.**

Analisando as reações que utilizaram bulnesol como produto de partida verifica-se que os produtos são uma vez mais misturas bastante complexas e de difícil separação. Com a análise de GC-MS verificou-se a transformação de produtos derivados de sesquiterpenos já conhecidos da bibliográfica de compostos orgânicos, dos quais se pode salientar o elemol, derivados de eudesmol e o cadineno. Porém todos os restantes produtos que não foram identificados necessitam ainda de uma longa análise para verificar as alterações ocorridas, análises ainda em curso.

- **Reações de epoxidação.**

Ao longo deste trabalho, foi desenvolvido um novo método para a síntese seletiva de derivados de 7,8-epóxicarvona. A síntese diastereoseletiva destes epóxidos de carvona é realizada em duas etapas, isto é, a primeira etapa é a formação dos intermediários bromoéster, obtendo assim os dois isómeros e numa segunda etapa aplicando uma base forte para que a formação dos epóxidos seja mais favorável e levando assim à obtenção dos epóxidos naturais separados pela primeira vez. Tanto quanto é do nosso conhecimento, esta foi a primeira vez que estes epóxidos foram obtidos separadamente; e devido ao seu potencial sintético, esta metodologia pode ser usada para a síntese enantiosseletiva de muitos produtos naturais.

Assim sendo, podemos concluir que das seis reações realizadas, todas com a obtenção dos produtos desejados com rendimentos bastante satisfatórios, as condições mais favoráveis de tempo de reação, base e produto de partida seriam as condições das reação **XXXIV** e **XXXV**, uma vez que foram as condições que melhores resultados apresentaram, isto porque, apesar da reação **XXX** apresentar um rendimento melhor do composto **20**, o elevado tempo de reação formou produtos secundários que não foram possíveis de identificar, e analisando o procedimento para aplicação a nível industrial para a obtenção dos mesmos é necessário ter em conta as melhores

condições comerciais, isto é, quanto menos tempo for necessário para a obtenção do composto com melhores rendimentos maior será a produtividade do mesmo, ou seja, menores seriam os gastos para a sua obtenção. No caso da obtenção do composto 21 verifica-se que para todas as reações realizadas estas condições foram as que melhores resultados apresentaram.

- **Atividades Biológicas**

Com esta avaliação podemos concluir que em relação à atividade antioxidante frente a DPPH temos que para a avaliação à concentração das substâncias de referência ( $1 \times 10^{-4}$  M) os resultados obtidos na análise aos compostos derivados de terpenos tem-se o composto 17 ( $61.55 \pm 8.03$  %), composto 14 ( $57.38 \pm 3.18$  %), composto 15 ( $54.84 \pm 2.25$  %), composto 19 ( $47.57 \pm 3.99$  %), composto 7 ( $27.12 \pm 2.22$  %) e por fim o composto 13 ( $25.98 \pm 4.52$  %); No caso dos sesquiterpenos tem-se o Bulnesol com  $28.10 \pm 0.20$  %, e com valores muito idênticos o Guaiol e as Águas Mães, com  $25.72 \pm 1.27$  % e  $25.70 \pm 0.67$  %. Para a avaliação a concentração inferior às substâncias de referências obteve-se a carvona  $28.01 \pm 0.88$  % para uma concentração de  $1 \times 10^{-9}$  M; o composto 5 com  $23.65 \pm 0.83$  % e o composto 12 com  $15.58 \pm 0.28$  %, para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M; no caso dos sesquiterpenos estudados é obtida uma % de inibição superior à obtida pela Curcumina à concentração de  $1 \times 10^{-9}$  e de  $1 \times 10^{-8}$  M.

Na análise contra o anião superóxido num sistema não enzimático foi possível observar uma enorme diferença em comparação com os resultados obtidos pelo teste com DPPH, isto é, os resultados obtidos à concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M para a Quercetina e para a Curcumina foram de  $31.32 \pm 0.61$  % e de  $13.10 \pm 0.87$  %, respetivamente. Observando os resultados obtidos verificou-se que à mesma concentração nenhum composto apresentava *E<sub>max</sub>* superior ao obtido pela Quercetina, em contrapartida comparando com o obtido com a Curcumina têm-se compostos com maior *E<sub>max</sub>*, obtendo assim: composto 5 com  $16.18 \pm 1.33$  %, composto 15 com  $12.90 \pm 1.64$  %, carvona 1 com  $12.15 \pm 1.04$  %, composto 17 com  $7.97 \pm 0.98$  % e por fim o composto 12 com  $5.22 \pm 0.49$  %. Contudo para concentrações inferiores à das substâncias de referência foi obtido para o composto 7 e 13 com uma *E<sub>max</sub>* de  $35.03 \pm 1.01$  % e  $6.18 \pm 1.37$  %, respetivamente, para a concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M e para a concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M uma *E<sub>max</sub>* de  $15.99 \pm 0.69$  % e de  $10.70 \pm 1.92$  % para o composto 14 e 19, respetivamente, levando a observar que estes são os que apresentam maior poder de captura do anião superóxido para concentrações menores. Para os produtos sesquiterpénicos obteve-se para a concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M o Bulnesol com uma *E<sub>max</sub>* de  $14.62 \pm 0.70$  %, e no caso do Guaiol e das Águas Mães à concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M apresentam uma *E<sub>max</sub>* de  $22.06 \pm 1.62$  % e de  $23.43 \pm 0.64$  %, respetivamente.

Analisando os dados obtidos na atividade frente a  $O_2^{\bullet}$  na presença de Lucigenina, observou-se que a Quercetina produziu uma redução do sinal de luminescência, mantendo os seus valores inferiores a 250 RLU. No caso dos derivados da Carvona (1), bem como para a própria Carvona (1), observa-se que a sua atividade antioxidante máxima se observa à mais baixa concentração estudada ( $1 \times 10^{-7}$  M), sendo, em todos os casos, significativamente inferiores ao DMSO. Note-se que para o Composto 7 e para a Carvona (1), a capacidade de reduzir a presença de  $O_2^{\bullet}$  foi ligeiramente maior do que a apresentada pelos restantes compostos. É de destacar o fato de que

em concentrações mais altas os derivados de terpenos perdem atividade, tanto que para alguns, como o caso do composto **15**, o sinal emitido torna-se superior ao grupo incubado com DMSO. Para os compostos Guaiol e Bulnesol, bem como as a mistura águas-mães, ambos apresentam valores que os tornam tão eficazes quanto a Quercetina ou a Curcumina para redução da presença de  $O_2^*$  no sistema biológico.

A avaliação da atividade antioxidante frente a NO permitiu verificar que o composto **7** e o Bulnesol foram os que desenvolveram uma atividade de *scavenger* de  $40.13 \pm 1.33\%$  e  $43.05 \pm 1.32\%$ , respectivamente, o que é significativamente superior ao valor obtido pela Quercetina à concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M ( $E_{max} = 31,3 \pm 2,5 \%$ ) e pela Curcumina à concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M ( $E_{max} = 29.2 \pm 2,0 \%$ ).

A atividade vascular foi analisada por duas vias, ou seja, uma primeira avaliação utilizando o endotélio da aorta íntegro e a outra via utilizando o endotélio desnudado. Neste estudo apenas as Águas Mães, apresentaram um efeito vasorelaxante que é dependente da concentração e que alcança um efeito máximo de  $69.40 \pm 15.16\%$  à concentração de  $1 \times 10^{-4}$ , e que é estatisticamente significativo ao comparar com o DMSO.

Devido ao efeito vasorelaxante manifestado pelas Águas Mães, foi realizado o protocolo de atividade vascular com endotélio desnudo. Nesse caso, o produto apresentou maior vasodilatação do que a encontrada em anéis com endotélio, o que indica que sua atividade vasodilatadora poderia ser independente do endotélio.

Embora mais estudos sejam necessários para estabelecer o mecanismo de ação, as informações obtidas até este ponto são importantes, uma vez que nenhum dos produtos possui estudos ou relatos de atividade vascular.

## Considerações finais

É necessário realizar novas reações de modo a otimizar os métodos e acima de tudo melhorar os rendimentos desejados. Delinear métodos que permitam uma melhor separação para a análise de misturas complexas, uma vez que nem todos os compostos são fáceis de separar devido às suas complexas características.

Criar melhorias no sistema de separação de compostos que permitam uma melhor obtenção dos compostos puros. Idealizando assim um aumento do conhecimento existente sobre estes compostos.

São necessários novos estudos biológicos com os restantes compostos de modo a verificar que a sua aplicação possa vir a ser futuramente mais utilizada, e permitindo assim melhores resultados e com métodos de preparação mais eficazes e acima de tudo menos duradouros.

Aplicar estes compostos noutras áreas de investigação como é o caso da veterinária, neste caso, já existem estudos a decorrer contra carrapatos por um grupo de investigação do Brasil. Assim, é necessário criar parceiras de modo a que possa ser estudada a sua aplicação a nível mundial, por exemplo, no caso do estudo a decorrer no Brasil contra uma espécie de carrapatos dever-se-á analisar a sua capacidade frente à mesma espécie existente noutro país, para assim ser possível comparar a eficácia da sua utilização.



## 6. Parte experimental

*“Muitas vezes as coisas que me pareceram verdadeiras quando comecei a concebê-las tornaram-se falsas quando quis colocá-las sobre o papel.”*

René Descartes

## 6.1 Equipamentos

**Placa de aquecimento:** Placa de aquecimento com controlo de temperatura para realização das reações, utilizando uma placa *IKAMAGA-RCT*<sup>®</sup> com agitação magnética.

**Cromatografia em coluna (CC):** cromatografia em coluna a pressão moderada realizada utilizando uma bomba *Büchi Pump Module C-601*<sup>®</sup>, sendo as frações recolhidas por um coletor automático *Büchi Fraction Collector C-660*<sup>®</sup>.

**Evaporador rotativo:** o solvente das frações e amostras recolhidas foi evaporado num evaporador com bomba *Büchi VAC V-500*<sup>®</sup> e controlador de pressão *Büchi Vacuum Controller V-850*<sup>®</sup> e colocadas em banho, a 40°C, num *Büchi 461 Water Bath*<sup>®</sup>.

**Espetros de infravermelho (IV):** as leituras foram realizadas num espectrofotómetro Thermo Scientific, modelo Nicolet IS 10. As amostras foram colocadas sobre o diamante, previamente limpo com isopropanol. O espectro foi realizado utilizando o *software OMNIC*.

**Espetros de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H-RMN) e carbono (<sup>13</sup>C-RMN):** realizaram-se num espectrofotómetro *Bruker*<sup>®</sup> *Avant 400*, a 400 MHz e 100 MHz, respetivamente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O solvente usado foi o clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>), sendo que o pico residual do solvente deuterado para o <sup>1</sup>H é a 7,26 ppm e para o <sup>13</sup>C é a 77,2 ppm.

**Massas de alta resolução:** Espectrómetro de tempo-quádruplo de voo da *Applied Biosystems QSTAR XL*. A técnica de ionização é por *electrospray*. As amostras introduzidas são dissolvidas em metanol e é utilizada uma voltagem de ionização de 4500 volts.

**Cromatografia em camada fina:** A cromatografia em camada fina (TLC) foi executada sobre placas de sílica gel de 0,2 mm. Os cromatogramas revelaram-se por imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico 5% (p/v) em etanol, sendo posteriormente colocadas na estufa a aproximadamente 120°C durante alguns minutos, a fim de se revelarem os produtos.

**Cromatografia em Coluna:** A cromatografia em coluna (CC) efetuou-se com a utilização de sílica gel *flash* de espessura de 0,04 - 0,06 mm, como sólido absorvente. Como fase móvel utilizaram-se misturas de solventes de n-hexano e acetato de etilo em proporções de polaridades crescentes.

**Separação dos componentes:** Para separar os componentes, foi realizada uma cromatografia em coluna. Para avaliar o grau de separação dos componentes ao longo da cromatografia em coluna, realizaram-se cromatografias de camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano e acetato de etilo com diferentes polaridades.

**Caracterização dos produtos:** Todos os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, massas de alta resolução.

## Cálculos

Rendimento:  $\frac{\text{Produto}}{\text{Substrato A}} \times 100$  Sendo: Substrato A = mmol de substrato adicionado na reação e

Produto = mmol de produto formado.

## 6.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

Reagente	% Pureza	Marca
L-prolina	--	Panreac
Quinina	99	Acros
Quinidina	98	Acros
Difenilprolinol	99	Acros
Ácido 2-nitrobenzóico	85-90	Acros
N-bromosuccinimida		Merck
Metanol	Comercial	J. M. Vaz Pereira
Carbonato de potássio	P.a.	Merck
Hidróxido de sódio		J. M. Vaz Pereira
Diclorometano	Comercial	J. M. Vaz Pereira
Ácido p-toluenosulfónico		Merck
Benzeno		Merck
Etanol	Comercial	J. M. Vaz Pereira
Tricloreto de alumínio	99	Aldrich
Peróxido de Hidrogénio	30	Merck
Azobisisobutironitrilo	98	Aldrich
Clorofórmio	Comercial	J. M. Vaz Pereira

## 6.3 Procedimentos reacionais

### 6.3.1 Procedimento reacional com $\text{AlCl}_3$

Para realizar a reação com  $\text{AlCl}_3$  procedeu-se do seguinte modo: num balão de fundo redondo com condensador de refluxo, coloca-se: Carvona,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e EtOH, nas condições da tabela 22, e colocado em agitação. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. Após conclusão da reação, o produto é extraído com  $\text{CHCl}_3$ , e lavado com água, seco com sulfato de sódio anidro e o solvente final evaporado num evaporador rotativo. O produto reacional obtido é, posteriormente realizada cromatografia em coluna com sílica-gel utilizando como solventes: hexano e misturas de hexano:EtOAc de polaridades crescentes.

Tabela 17. Condições de reação com  $\text{AlCl}_3$  utilizando carvona.

Reação	Carvona (mmol)	EtOH (mL)	$\text{H}_2\text{O}_2$ 30% (mmol)	$\text{AlCl}_3$ (mmol)	Tempo	Temperatura (°C)
I	33.28	100	128	5.17	6 dias	45
II	13.3	50	42.6	3	1 dia	45
III	13.3	50	85.3	3	3 dias	45
VI	13.3	50	85.3	3	40 Horas	70
VII	2.0	15	12.8	0.45	48 Horas	75
VIII	13.3	50	85.3	3	6 dias	T. ambiente

Reação	Carvona: 2,3-epoxicarvona (g)	EtOH (mL)	$\text{H}_2\text{O}_2$ 30% (mmol)	$\text{AlCl}_3$ (mmol)	Tempo	Temperatura (°C)
IV	0.760	20	12.9	1.14	6 dias	45

Reação	epoxicarvona (mmol)	EtOH (mL)	$\text{H}_2\text{O}_2$ 30% (mmol)	$\text{AlCl}_3$ (mmol)	Tempo	Temperatura (°C)
V	1.67	15	3.77	0.84	6 dias	45

### 6.3.2 Procedimento reacional com p-TsOH e NBS

Para realizar a reação com p-TsOH e NBS procedeu-se do seguinte modo: num balão de fundo redondo equipado com condensador, colocou-se *R*-carvona (1) (0.300 g, 2 mmol),  $\text{CHCl}_3$  (5 mL), TsOH (0.380 g, 2mmol), e NBS (0.356g, 2mmol). Colocado em agitação e a uma temperatura de 62°C (reação I) e outra reação com as mesmas condições, mas a temperatura ambiente (reação II), como se verifica na tabela 23. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. Após conclusão da reação, o produto é extraído com  $\text{CHCl}_3$ , e lavado com  $\text{NaHCO}_3$  e água, seco com sulfato de

sódio anidro e o solvente final evaporado num evaporador rotativo. O produto reacional obtido é, posteriormente, cromatografado em cromatografia em coluna com sílica-gel utilizando como solventes: hexano e misturas de hexano:EtOAc de polaridades crescentes.

**Tabela 18.** Condições reacionais das reações com p-TsOH e NBS.

Condições de reação	Rendimento %						
	Tempo	T°C	Composto				
			7	8	9	10	11
IX	4 horas	62	21.2	18.8	10.8	-	-
X	64 horas	T.a	20.1	12.3	-	5.3	6.3

### 6.3.3 Procedimento reacional de carvona com catalisadores

Num balão de fundo redondo equipado com um condensador de refluxo, colocou-se Carvona 1 (1g, 6,67 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), catalisador, ácido Nitrobenzóico (9,33 mmol) e n-bromosuccinimida (9,33 mmol) foram aquecidos a 39 °C ou temperatura, em agitação, ver tabela 24. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. A reação foi extraída com DCM e água, a fase orgânica foi, posteriormente, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente orgânico evaporado. Finalmente, o composto puro foi obtido por cromatografia flash em sílica gel (hexano / EtOAc).

**Tabela 19.** Condições reacionais de carvona com catalisadores.

Reação	Catalisador	Mmol	Temp. °C	Tempo (dias)
XI	Prolina 2%	0.133	Ta	6
XII	Prolina 20%	1.33	Ta	6
XIII			39	
XIV	Prolina 20%	1.33	39	3
XV	Quinina 2%	0.133	Ta	6
XVI			39	
XVII	Quinina 20%	1.33	Ta	6
XVIII			39	
XIX	Quinidina 2%	0.133	Ta	6
XX			39	
XXI	Quinidina 20%	1.33	Ta	6
XXII			39	
XXIII	Difenilprolinol 2%	0.133	Ta	6
XXIV			39	
XXV	Difenilprolinol 20%	1.33	Ta	6
XXVI			39	
XXVII	Sem catalisador	-	39	3
XXVIII			Ta	6

### 6.3.4 Procedimento reacional de guaiol e bulnesol com catalisadores

Num balão de fundo redondo, colocou-se 0,2g (0,9 mmol) de produto partida (guaiol ou bulnesol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) e o catalisador à temperatura ambiente e colocado em agitação durante 5 dias. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. A reação foi extraída com DCM e água, a fase orgânica foi, posteriormente, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente orgânico evaporado. Finalmente, o composto puro foi obtido por cromatografia flash em sílica gel (hexano / EtOAc)

### 6.3.5 Procedimento reacional para epoxidação

Num balão de fundo redondo, colocar o composto 12 ou 13 (ver tabela 25), metanol (20 mL), e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e colocar em agitação à temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. Após conclusão da reação o solvente final evaporado num evaporador rotativo. O produto reacional obtido é, posteriormente, cromatografado em cromatografia em coluna com sílica-gel utilizando como solventes: hexano e misturas de hexano:EtOAc de polaridades crescentes.

Tabela 20. Condições de reação.

Reação	Condições	Tempo
XXIX	Composto 12 (0.28 mmol); $\text{K}_2\text{CO}_3$ 0.087 mmol)	1.5 dias
XXX	Composto 13 (0.743 mmol); $\text{K}_2\text{CO}_3$ 0.217 mmol)	1.5 dias
XXI	Composto 12 (0.419 mmol); $\text{K}_2\text{CO}_3$ 0.217 mmol)	8 dias
XXXII	Composto 13 (0.63 mmol); $\text{K}_2\text{CO}_3$ 0.063 mmol)	8 dias
XXXIII	Composto 13 (0.68 mmol); NaOH 0.038 mmol)	2 h
XXXIV	Composto 12 (0.47 mmol); NaOH 0.019 mmol)	2h

### 6.3.4 Cristalografia do Raio X (Difração de Raios-X)

Para a obtenção dos cristais dos compostos 12 e 13, o produto foi dissolvido numa mistura de 98:2 hexano:DCM à temperatura ambiente e foi colocado a evaporar à temperatura ambiente, uma evaporação lenta de modo a permitir a obtenção de cristais individualizados. Os dados da intensidade de difração de raio-X foram obtidos num *Bruker Kappa Apex II single crystal X-ray diffractometer* (Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA), equipado com monocromador de grafite,  $\text{CuK}_\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) e com detetor CCD. Os monocristais foram colocados sobre uma fibra de vidro utilizando adesivo de cianoacrilato.

Os parâmetros da célula unitária foram determinados pela recolha das intensidades difratadas a partir de 36 quadros medidos em três zonas cristalográficas diferentes e utilizando o método dos

vetores de diferença. O conjunto de dados consiste em combinações no quadro de digitalização (*frame*) de  $\omega$  e de  $\varphi$ , com uma largura de varredura típica de  $0.5^\circ$  e com um tempo de exposição de  $10 \text{ s/frame}$  com uma distância entre o cristal e o detetor de  $\sim 4.0 \text{ cm}$ . As *frames* coletadas foram integradas com o *SAIN T Software* (*SAIN T, Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA*) utilizando um algoritmo de quadro estreito. As constantes finais das células foram determinadas pelo refinamento global das reflexões a partir do conjunto de dados completo.

Os dados foram corrigidos para efeitos de absorção usando o método *multiscan* implementado na *SADABS*. As soluções de estrutura e refinamento foram realizadas utilizando o pacote de *software SHELXTL* (*SHELXTL, Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA*). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos combinados com a síntese de *Fourier* e refinados pelo procedimento dos mínimos quadrados com matriz completa, com parâmetros térmicos anisotrópicos nos últimos ciclos de refinamento para todos os átomos não-hidrogênio. Os átomos de hidrogênio foram posicionados geometricamente.

### 6.3.5 Método computacional

Os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados usando o conjunto *Gaussian0940* de programas em R-carvone. O ângulo diédrico entre C8, C7, C5 e C4 foi passado em um nível de teoria MP2 / 6-31 + G (d, p), encontrando três mínimos cujas estruturas foram ainda otimizadas em MP2 / 6-311 ++ G (d, p) nível de teoria. As frequências correspondentes às três estruturas foram calculadas para garantir que correspondam aos mínimos da superfície de energia potencial. Os efeitos da dissolução foram incluídos usando o modelo contínuo polarizável com a constante dielétrica padrão de 8,93 para o diclorometano. A geometria do mínimo global é dada na tabela 26. Para racionalizar a população de *R-carvona* no entorno de cada mínimo, calculamos a função de partição canônica, considerando que cada um dos pontos passados acima mencionados correspondia a um estado diferente.

Tabela 21. Coordenadas do mínimo global: (MP2/6-31++G(d,p), E(Eh) = -463.43093).

C	3.166	-0.027	1.285	H	0.447	2.017	0.051
C	2.926	0.247	-1.184	H	0.223	1.001	-1.390
C	-3.461	-0.554	0.118	H	-3.961	-0.011	-0.690
C	-1.150	-1.514	-0.146	H	-3.797	-0.111	1.060
C	0.348	-1.433	-0.231	H	-3.771	-1.601	0.089
C	0.098	1.040	-0.298	H	-1.600	-2.507	-0.186
C	2.369	0.033	0.201	H	0.791	-2.283	0.303
C	-1.967	-0.440	-0.014	H	0.654	-1.530	-1.284
C	-1.386	0.926	-0.015	H	0.638	-0.116	1.425
C	0.872	-0.114	0.351	H	2.587	1.203	-1.599
O	-2.090	1.917	0.171	H	4.019	0.254	-1.163
				H	2.600	-0.538	-1.875
				H	2.751	-0.168	2.280
				H	4.246	0.062	1.197

## 6.4 Procedimento para separação dos compostos das águas mães

Colocar num erlenmeyer 300g das águas mães (essência bruta), adicionar 400 mL de n-hexano e deixar dissolver, aquecer entre 60-70°C (até dissolver, mas sem ferver).

Tapar o erlenmeyer e deixar arrefecer à temperatura ambiente. Colocar no frigorífico até a completa cristalização.

Após a cristalização colocar numa coluna e cromatografia e separar utilizando polaridades diferentes de n-hexano:acetato de etilo.

## 6.5 Procedimento para Atividades Biológicas

### 6.5.1 Produtos a estudar

Após a obtenção dos produtos naturais, estes foram diluídos em DMSO e levado a diferentes concentrações ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ), armazenados adequadamente em frascos EPPENDORF® de cor âmbar e protegidos da luz até à sua utilização.

**Os produtos a estudar foram:**

Terpenos: Carvona (1), composto 5, composto 7, composto 12, composto 13, composto 14, composto 15, composto 17 e composto 19;

Sesquiterpenos: Guaiol, Bulnesol e Águas mães.

### 6.5.2 Biomodelo experimental

Para realizar o estudo da avaliação vascular e antioxidante dos compostos sesqui-terpenóides, foram utilizados ratos machos (CD-1) com tempo de 12 e 14 semanas de idade, com um peso corporal de 25-30 gramas. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Panamá e abrigados num quarto acondicionado a 22 °C, sob ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam uma dieta padrão (Massury®, Canadá) e foram mantidos em jaulas com capacidade máxima para seis animais, tendo sempre acesso livre a comida e água.

Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram realizados seguindo as instruções do "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório "do Instituto de Recursos Animais de Laboratório (ILAR) do Conselho Nacional de Pesquisa.

### 6.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A determinação da percentagem de inibição do radical DPPH, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por de Oliveira et al., 2012<sup>265</sup>, com algumas modificações. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços, colocou-se 100µL de DPPH e 100 µL dos produtos obtidos dissolvidos em DMSO em concentrações de variáveis de 1x10<sup>-9</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M. Usaram-se como substâncias de referência a Quercetina e a Curcumina.

Cada microplaca foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após o período de incubação, foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 492 nm. Cada avaliação é realizada em triplicado, como uma atividade antioxidante, uma diminuição da absorvância do poço e uma mudança na cor do DPPH de roxo para amarelo. Os cálculos da percentagem de inibição (% Inibição) seguem a seguinte formula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[ OD_{DPPH} - \frac{OD_{Produto}}{OD_{DPPH}} \right] \times 100\% \quad OD: \text{Densidade ótica}$$

### 6.5.4 Avaliação da capacidade de remoção do anião superóxido

#### 6.5.4.1 Avaliação *in vitro* da capacidade de eliminação do anião superóxido em sistema de não-enzimático

A atividade inibitória foi avaliada usando o método descrito por Lin e Chou, 2004<sup>266</sup>, onde os radicais do anião superóxido foram gerados por via não enzimática, com um sistema contendo NADH e Metosulfato de Fenazina (PMS), na presença de oxigénio no meio e com um pH de 7.4. O radical do anião superóxido, formado no sistema NADH/PMS, reduz o Azul de Nitrotetrazolio (NBT) a azul-púrpura, no qual a absorvância foi medida no espectrofotômetro Glomax®.

Para a sua realização, foram utilizadas microplacas de 96 poços, colocando em cada poço 50 µL dos produtos nas diferentes concentrações (de  $1 \times 10^{-9}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M). Adicionando em cada poço 50 µL de PMS (120 µM), 50 µL de NADH (936 µM) e, finalmente, 50 µL de NBT (300 µM). Todos os reagentes foram dissolvidos numa solução tampão de fosfato 100mM (pH 7.4), com exceção dos produtos e das substâncias de referência, a Quercetina, que foram dissolvidos em DMSO.

Após preparação da microplaca, esta foi incubada durante 5 minutos ao escuro e à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 560 nm; cada avaliação é realizada em triplicado. A percentagem de inibição da formação do anião superóxido calculou-se com base na fórmula:

$$\left[ \% \text{ Inibição} = OD \text{ Poço com anião superóxido} - \frac{OD \text{ Produto}}{OD \text{ Poço com anião superóxido}} \right] \times 100\%$$

*OD: Densidade ótica*

#### **6.5.4.2 Atividade antioxidante por detecção do anião superóxido em anéis de aorta**

Com a finalidade de avaliar o possível efeito antioxidante dos produtos realizou mais um teste: determinação da produção do anião superóxido em aorta, quantificando a presença deste anião mediante quimiluminescência após exposição a lucigenina.

A determinação realizou-se em anéis da artéria aorta extraído de ratos CD-1 (20-25g), após o seu abate sob a influência de anestesia (Sevoflurano). A artéria foi colocada numa solução de Krebs-HEPES com a seguinte composição em mM: NaCl - 119; HEPES - 20; MgSO<sub>4</sub> - 1; KCl - 4.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.15; NaHCO<sub>3</sub> - 5; CaCl<sub>2</sub> - 1.2; glicose - 5.5; pH -7.4. Constantemente borbulhado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. O tecido conjuntivo e o tecido gorduroso foram removidos, obtiveram-se anéis de, aproximadamente, 2mm de comprimento, que foram incubados a 37°C durante 30 minutos, trocando a solução borbulhante HEPES nos primeiros 15 minutos e nos restantes 15 minutos trocou-se com solução HEPES sem ser borbulhada. Posteriormente, adicionou-se 50 µL dos produtos a avaliar e de substância de referência, neste caso Quercetina de modo a alcançar concentração nos poços de  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  e de  $1 \times 10^{-5}$ , deixou-se a incubar por mais 30 minutos. Terminado o tempo de incubação adicionou-se 50 µL de Lucigenina 5 µM. A quimiluminescência foi avaliada a cada 1,5 segundo durante 20 minutos. Todos os anéis obtidos foram colocados a secar durante 24 horas a 60-65°C. Os resultados são expressos em contagem por miligrama de tecido seco ( $RLU. \text{min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$ )<sup>267</sup>.

#### **6.5.4.3 Outras variantes deste método com lucigenina**

Realizaram-se três derivações do protocolo anterior, as quais consistiram em adicionar L-NAME, Alopurinol e Indometacina como parte da validação da técnica, uma vez que foi demonstrado que estas substâncias podem inibir a produção de anião superóxido atuando de diferentes formas<sup>268,269</sup>.

#### **6.5.4.4 Avaliação da capacidade de eliminação do óxido nítrico**

O radical de óxido nítrico (NO) é um radical que possui um eletrão desemparelhado numa das suas orbitais, e da mesma forma que o anião superóxido, estes radicais podem ser produzidos em processos inflamatórios, onde podem reagir e formar o peroxinitrito, o qual provoca danos celulares, como por exemplo a fragmentação de DNA e a oxidação lipídica<sup>270</sup>.

Para avaliar a capacidade de eliminadora dos produtos, o método utilizado baseou-se na metodologia utilizada por Lee et al. 2011<sup>271</sup>. Utilizaram-se microplacas de 96 poços, onde se adicionou a cada poço 100 µL dos produtos nas diferentes concentrações (de 1x10<sup>-9</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M). Posteriormente, adicionou-se 100 µL de solução de Nitroprussiato de sódio (NTP) a 10 mM dissolvida em solução tampão de fosfato, sendo a mistura incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos. Passado esse período adicionou-se 100 µL de Reagente de Griess, levando à formação de um complexo de cor rosa. Foi medida a absorvância a um comprimento de onde de 560 nm, de modo a determinar a percentagem de inibição (% Inibição) do NO após 90 minutos de reação. A substância de referência utilizada como referência foi a Quercetina em DMSO. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

$$\left[ \% \text{ Inibição} = OD \text{ Poço com NO} - \frac{OD \text{ Produto}}{OD \text{ Poço com N}} \right] \times 100\% \quad OD: \text{densidade ótica}$$

#### **6.5.5 Avaliação da atividade vascular**

##### **6.5.5.1 Preparação dos anéis de aorta e obtenção das amostras biológicas**

No dia da realização deste ensaio, os animais foram sacrificados por sangüinação carótida seguindo protocolos tratamento ético de animais. Seguidamente, extraiu-se a aorta torácica descendente e colocou-se numa placa de Petri contendo solução fria de Krebs. Esta solução manteve-se, constantemente, carbonatada com a dupla finalidade de manter o tecido oxigenado e conservado a pH=7.4. Sob essas condições, a aorta foi limpa, eliminando todo o tecido conjuntivo e gorduroso ao seu redor e, em seguida, cortado para obter segmentos de 2 mm.

##### **6.5.5.2 Preparação dos anéis aórticos**

Para a montagem dos anéis de aorta, utilizou-se o sistema de banho de órgão de Miógrafo de fio de 620m, o qual permitiu determinar a reatividade farmacológica dos compostos através da integração do sistema de resposta e do sistema de registro do sinal. O equipamento tem a capacidade para análises em simultâneo de 4 segmentos de aorta, e utiliza banhos de órgãos de 5 mL de capacidade, permitindo manter o tecido a uma temperatura 37±5°C e com oxigenação constante, durante todo o processo experimental.

Através da luz de cada segmento de aorta fez-se passar os cabos de aço inoxidável, um dos quais está diretamente conectado a um transdutor isométrico de força incorporado a um conversor num computador no *Software LabChart7*, o qual por sua vez, permite registar e armazenar os sinais do transdutor para a posterior análise.

O resultado é expresso como: a unidade de luz relativa (RLU)/mg de peso de aorta/ tempo (min).

### 6.5.3 Rastreamento da atividade vascular

#### 6.5.3.1 Efeito vasodilatador dos produtos naturais na contração induzida por FE em anéis com endotélio intato.

Para avaliar a capacidade máxima vasodilatadora dos compostos, os anéis de aorta tinham que estabilizar durante 60 minutos na solução de Krebs, sendo a solução renovada a cada 20 minutos para eliminar o excesso de metabolitos. Dada a importância do endotélio na regulação da resistência muscular, no início de cada avaliação comprovou-se a presença de endotélio; para o qual se adicionou ao banho FE ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) e na presença de plateau de concentração máxima adicionou-se uma concentração final submáxima de ACh ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ). Considera-se endotélio positivo ( $E^+$ ) quando a indução do relaxamento gera uma percentagem igual ou superior a 70%.

Após confirmar a presença de endotélio, seguiu-se um segundo período de estabilização de 60 minutos, após o qual foi adicionado ao banho FE ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) que, de acordo com testes anteriores, corresponde à concentração que causa 70% de contração máxima. Na presença do efeito máximo observado traçou-se a curva de dose de resposta (CDR) para cada um dos compostos estudados, adicionando concentrações crescente e acumulativas, tal como se descreve na tabela 27. Após cada concentração adicionada ao banho de órgãos, esperou-se por uma resposta estável, a formação de plateau e, em seguida, adicionou-se a concentração de produto seguinte.

Tabela 22. Ordem pela qual se adicionaram as soluções mães dos produtos.

Concentração final do produto (5mL)	Solução mãe adicionada ao banho
$1 \times 10^{-9}$	5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-6}$
$3 \times 10^{-9}$	1 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-5}$
$1 \times 10^{-8}$	3.5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-5}$
$3 \times 10^{-8}$	1 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-4}$
$1 \times 10^{-7}$	3.5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-4}$
$3 \times 10^{-7}$	1 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-3}$
$1 \times 10^{-6}$	3.5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-3}$
$3 \times 10^{-6}$	1 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-2}$
$1 \times 10^{-5}$	3.5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-2}$
$3 \times 10^{-5}$	1 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-1}$
$1 \times 10^{-4}$	3.5 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-1}$
$3 \times 10^{-4}$	10 $\mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-1}$

#### 6.5.3.2 Efeito vasodilatador dos produtos naturais em contração induzida por fenilefrina em anéis com endotélio intacto

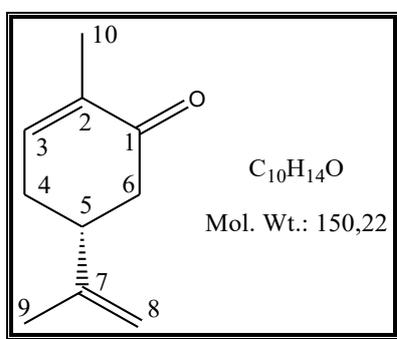
Com a finalidade de determinar se o efeito vasodilatador observado no estudo anterior dependia da presença do endotélio vascular, procedeu-se à remoção do mesmo fazendo passar uma agulha

de aço inoxidável com superfície rugosa através do lúmen da artéria. Considerou-se que a aorta estava desprovida de endotélio que se adicionou ACh ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), evidenciava-se uma percentagem menor ou igual a 10% de relaxação.

Uma vez confirmada a ausência de endotélio, procedeu-se à repetição do protocolo experimental anterior com os produtos que refletiram um efeito vasodilatador superior a 60%.

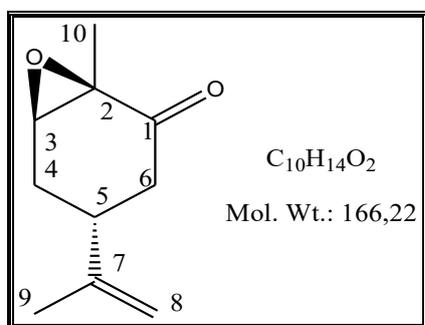
## 6.6 Caracterização dos produtos

Composto 1: Carvona



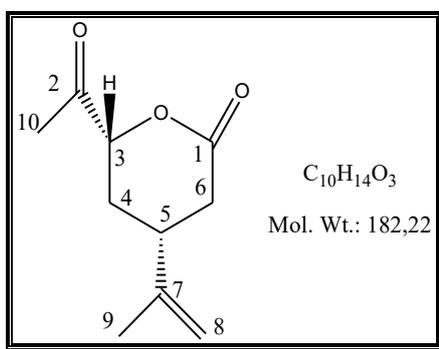
IV: 2922; 1668; 1644; 1433; 1365; 1109; 891  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.75 (1H; ddd,  $J = 5.9, 2.7, 1.4$  Hz, H-3), 4.80 (1H; t,  $J = 1.6$  Hz, Ha-8), 4.75 (1H; q,  $J = 1.6$  Hz, Hb-8), 2.67 (1H; ddd,  $J = 14.4, 9.3, 4.2$  Hz, H-5), 2.58 (1H; ddd,  $J = 16.0, 3.8, 1.6$  Hz, Ha-6), 2.44 (1H; m, Ha-4), 2.34 (1H; m, Hb-6), 2.28 (1H; m, Hb-4), 1.78 (3H; dt,  $J = 2.6, 1.3$  Hz, H-10), 1.74 (3H; t,  $J = 1.0$  Hz, H-9).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 199.2 (C-1); 146.9 (C-7); 144.4 (C-3); 135.1 (C-1); 109.9 (C-8); 43.0 (C-6); 42.4 (C-5); 31.1 (C-4); 20.2 (C-9); 15.3 (C-10).

Composto 2: 2,3-epoxicarvona



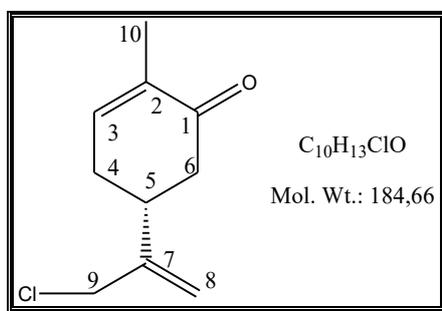
Composto 2 - 2,3-epoxiacrvona foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 9:1). IV: 2973; 2922; 1706; 1670; 1645; 1109; 810  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.69 (1H; t,  $J = 1.6$  Hz, Ha-8), 4.62 (1H; d,  $J = 1.6$  Hz, Hb-8), 3.34 (1H; dd,  $J = 3.2, 1.1$  Hz, H-3), 2.59 (1H; tt,  $J = 11.4, 4.5$  Hz, H-5), 2.44 (1H; ddd,  $J = 17.5, 4.6, 1.4$  Hz, Ha-6), 2.24 (1H; m, Ha-4), 1.92 (1H; dd,  $J = 17.6, 11.7$  Hz, Hb-6), 1.80 (1H; ddd,  $J = 14.8, 11.2, 1.2$  Hz, Hb-4), 1.61 (3H; s, H-9), 1.27 (3H; s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 205.1 (C-1); 146.5 (C-7); 110.1 (C-8); 61.2 (C-3); 58.5 (C-2); 41.7 (C-6); 34.9 (C-5); 28.6 (C-4); 20.1 (C-9); 15.0 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +37.5$  C = 1.6 mg/mL  $\text{CHCl}_3$ .

**Composto 4: 5-(prop-1-en-2-il)-2-oxo-hepta-1,3-olida**



Composto 4 -foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 8:2). IV: 2975; 2922; 1712; 1668; 1649; 1104; 900; 732  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.84 (2H; s, H-8), 4.05 (1H; dd,  $J = 10.9, 3.2$ , H-3), 2.88 (1H; dt,  $J = 7.5, 3.8$  Hz, H-5), 2.40 (2H; m, H-4), 2.23 (3H; s, H-10), 1.96 (1H; ddd,  $J = 14.5, 11.3, 3.2$ , Ha-6), 1.76 (1H; ddd,  $J = 14.5, 10.9, 3.2$ , Hb-6), 1.60 (3H; s, H-9).  $^{13}\text{C}$  RMN NMR (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 203.0 (C-2); 176.3 (C-1); 143.6 (C-7); 114.4 (C-8); 62.1 (C-3); 40.1 (C-5); 38.5 (C-4); 35.8 (C-6); 26.3 (C-10); 17.8 (C-9).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +6.2$  c = 1.7 mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$  requiere (M+H) 183.1015; encontrado 183.1012.

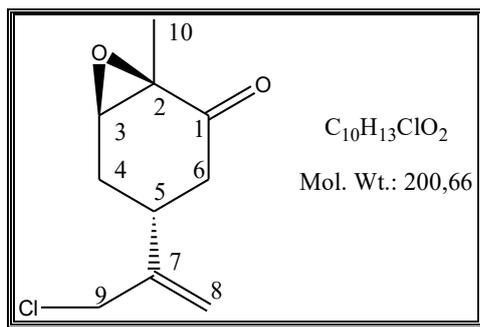
**Composto 5: (5R)-9-clorocarvona.**



Composto 5- foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 95:5). IV: 2979; 2359; 1709; 1669; 1107; 900; 749  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.73 (1H; ddd,  $J = 6.0, 2.9,$

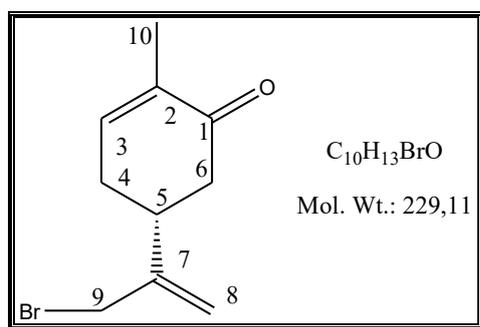
1.5 Hz, H-3), 5.24 (1H; s, Ha-8), 5.04 (1H; d,  $J = 1.3$  Hz, Hb-8), 4.07 (2H; t,  $J = 1.2$  Hz, H-9), 2.95 (1H; m, H-5), 2.63 (1H; m, Ha-6), 2.54 (1H; m, Hb-6), 2.36 (2H; dd,  $J = 16.1, 12.9$  Hz, H-4), 1.77 (3H; m, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 198.9 (C-1); 146.6 (C-7); 144.0 (C-3); 135.6 (C-2); 115.1 (C-8); 46.9 (C-9); 43.0 (C-6); 37.8 (C-5); 31.4 (C-4); 15.6 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = -15.5$   $\text{C} = 0.7$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{OCl}$  requiere (M+H) 185.13795; encontrado 185.0725.

#### Composto 6: 9-cloro-2,3-epoxicarvona



Composto 6- foi purificado em cromatografia em coluna (silica gel, hexano/EtOAc 8:2). IV: 2975, 2927, 1707, 1669, 1375, 1258, 1088, 1059, 793  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.23 (1H, s, Ha-8), 5.01 (1H, s, Hb-8), 4.05 (2H, s, Ha-9), 3.47 (1H, d;  $J=3.0$  Hz, Hb-9), 3.01 (1H, m, Ha-6), 2.69 (1H, ddd,  $J=17.6, 4.4, 0.8$  Hz, H-3), 2.47 (1H, dt,  $J= 14.8, 3.0$  Hz, Hb-6), 2.06 (1H, dd,  $J=17.6, 11.4$  Hz, H-5), 1.96 (1H, dd,  $J=14.8, 11.4$  Hz, H-4), 1.42 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 204.7 (C-1); 146.7 (C-7); 115.2 (C-8); 61.0 (C-2); 58.9 (C-3); 47.0 (C-9); 42.0 (C-6); 31.2 (C-5); 29.1 (C-4); 15.2 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +111.1$   $\text{C} = 3.6$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ .

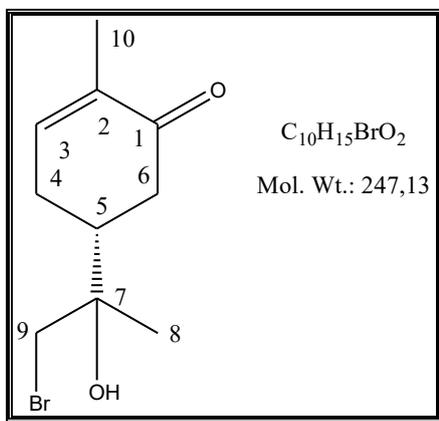
#### Composto 7: (5R)-9-bromocarvona



Composto 7 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 9:1). IV: 3419, 2976, 2937, 1746, 1709, 1663, 1382, 1220, 1058, 950  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.72 (1H, ddd,  $J = 6.1, 3.0, 1.6$  Hz, H-3), 5.26 (1H, s, Ha-8), 5.01 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, Hb-8), 3.97 (2H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-9), 2.97 (1H, ddd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0, 4.6 Hz, H-5), 2.61 (1H, m, Ha-6), 2.53 (1H, m, Ha-4), 2.34 (1H, dd,  $J = 16.0, 12.9$  Hz, Hb-6), 2.27 (1H, m, Hb-4), 1.74 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400

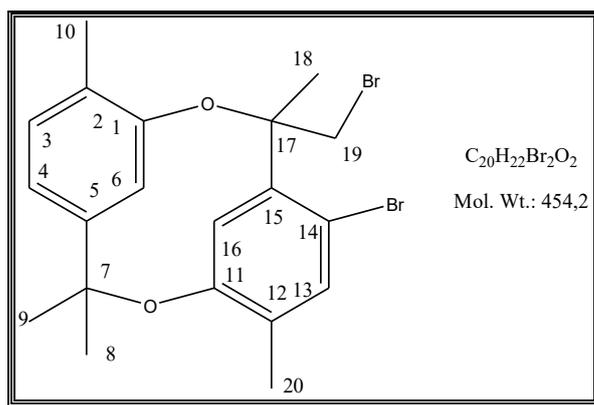
MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ: 199.0 (C-1), 147.0 (C-7), 144.2 (C-3), 135.7 (C-2), 115.8 (C-8), 43.3 (C-6), 38.2 (C-5), 35.2 (C-4), 31.6 (C-9), 15.8 (C-10). [α]<sup>20°C</sup> = -6.8 c = 1.46 mg/mL CHCl<sub>3</sub>. HRMS (EI) calculado para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Na requiere (M+Na) 229.0223; encontrado 229.0222.

### Composto 9: 9-bromo-7-hidroxicarvona



Composto 9 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 6:4). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.71 (1H; ddd; J= 5.8, 2.5, 1.4 Hz; H-3); 3.46 (2H; m; H-9); 2.63 (2H; ddd; J=15.2, 3.0, 1.7 Hz; Ha-6, Ha-4); 2.47 (1H; m; H-5); 2.35 (1H; m; Hb-6); 2.26 (2H; m; Hb-4); 1.74 (3H, m; H-10); 1.27 (3H; s; H-8). <sup>13</sup>C RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ: 199.0 (C-1); 144.2 (C-3); 135.5 (C-2); 72.0 (C-7); 43.4 (C-9); 42.1 (C-5); 38.5 (C-6); 27.4 (C-4); 22.4 (C-8); 15.6 (C-10).

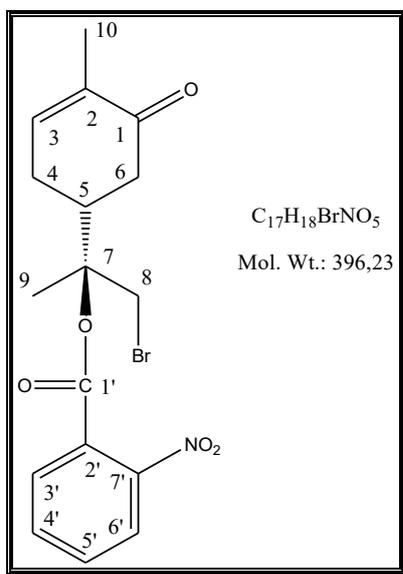
### Composto 11: Dimero aromático



Composto 11 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 7:3). IR: 3281; 2979; 2961; 2951; 1725; 1715; 1662; 1529; 1378; 1292; 1236; 1167; 1103; 1088; 946; 895; 812; 740 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.00 (1H; d; J= 7.8 Hz; H-3); 6.86 (1H; s; H-13); 6.72 (1H; dd; J= 7.8, 1.9 Hz; H-4); 6.60 (1H; s; H-6; H-16); 2.36 (1H; d; J= 12.9 Hz; Ha-19); 2.25 (3H; s; H-20); 2.14 (3H; d; J= 12.9 Hz; H-10, Hb-19); 1.62 (3H; s; H-8); 1.28 (3H; m; H-18); 1.03 (3H; s; H-

9).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 153.4 (C-1); 153.3 (C-11); 151.5 (C-5); 150.9 (C-15); 140.8 (C-12); 130.5 (C-3); 127.0 (C-13); 122.3 (C-2); 120.7 (C-14); 119.0 (C-4); 113.6 (C-6); 100.7 (C-16); 59.6 (C-19); 50.0 (C-17); 42.6 (C-7); 31.3 (C-8); 30.7 (C-9); 30.4 (C-18); 16.1 (C-20); 15.3 (C-10).  
 $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +17.2$   $c = 0.58\text{mg/mL CHCl}_3$ .

**Composto 12: (5R,7R)-8-bromo-7-(2-nitrobenzoato)carvona**

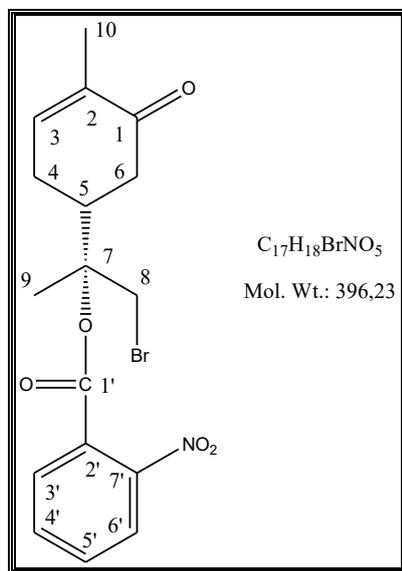


Composto 12 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 7:3).

IV: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 730  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.91 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-6'), 7.72 (1H, m, H-5'), 7.64 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.74 (1H, m, H-3), 4.06 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz, Ha-8), 4.01 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, m, Ha-6), 2.43 (1H, m, Ha-4), 2.29 (1H, m, Hb-6), 2.20 (1H, dd,  $J = 15.9, 14.2$  Hz, Hb-4), 1.74 (s, 3H, H-10), 1.72 (s, 3H, H-9)  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 198.1 (C-1), 164.4 (C-1'), 147.3 (C-7'), 144.5 (C-3), 135.3 (C-2), 133.4 (C-4'), 131.6 (C-5'), 129.7 (C-3'), 128.5 (C-2'), 124.0 (C-6'), 85.4 (C-7), 41.0 (C-5), 38.5 (C-6), 35.4 (C-8), 26.1 (C-4), 19.0 (C-9), 15.6 (C-10).  
 $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +41.7$   $c = 0.48$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calc for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5\text{Na}$  require (M+Na) 418.0260; encontrado 418.0265. Dados do cristal (raio-X):  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5$ ,  $M = 396.23$ , monoclinico, grupo espacial  $\text{P2}_1$  ( $n^\circ 4$ ),  $a = 8.0408(6)$  Å,  $b = 28.336(2)$  Å,  $c = 8.1290(6)$  Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 103.603(4)^\circ$ ,  $V = 1800.2(2)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $D_c = 1.462$  Mg/m<sup>3</sup>,  $m = (\text{Cu-K}\alpha) = 3.340$  mm<sup>-1</sup>,  $F(000) = 808$ . 10420 as reflexões foram coletadas em  $3.12 \leq 2\theta \leq 67.40$  e misturado para dar 4916 reflexões únicas ( $R_{\text{int}} = 0.0872$ ), das quais 2992 com  $I > \sigma(I)$  foram considerados como sendo observados. Valores finais

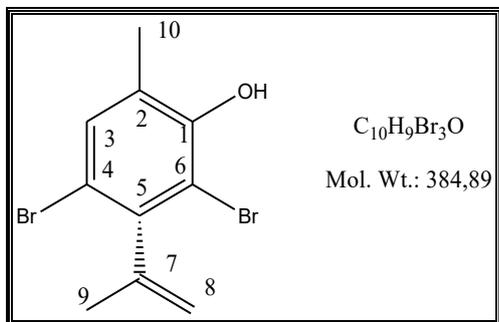
são  $R = 0.0765$ ,  $wR = 0.2113$ ,  $GOF = 1.026$ , max/min densidade eletrônica residual 0.703 and -0.652 e.  $\text{\AA}^{-3}$ .

**Composto 13: (5R,7S)-8-bromo-7-(2-nitrobenzoato)carvona**



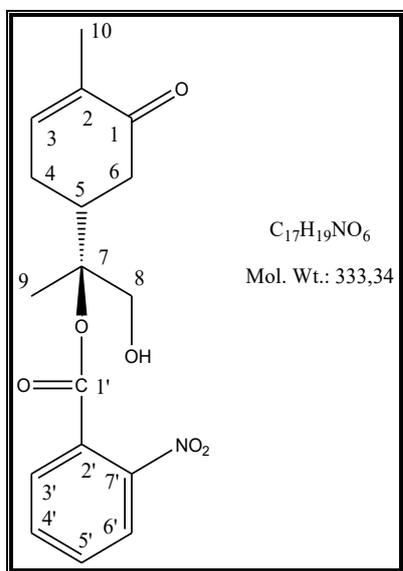
Composto 13 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 7:3). IV: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 711 $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.91 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-6'), 7.66 (1H, m, H-5'), 7.65 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.68 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, Ha-8), 3.90 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.58 (1H, m, Ha-6), 2.36 (1H, m, Ha-4), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.8, 14.7$  Hz, Hb-6), 2.19 (1H, m, Hb-4), 1.72 (3H, s, H-9), 1.71 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 198.5 (C-1), 164.4 (C-1'), 147.1 (C-7'), 143.4 (C-3), 135.6 (C-2), 133.4 (C-4'), 133.1 (C-5'), 129.5 (C-3'), 128.5 (C-2'), 124.0 (C-6'), 85.2 (C-7), 40.9 (C-5), 38.2 (C-6), 35.5 (C-8), 26.3 (C-4), 18.7 (C-9), 15.6 (C-10),  $[\alpha]^{20}_{\text{C}} = +6.9$   $c = 1.44$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calc for  $C_{17}H_{18}BrNO_5\text{Na}$  requiere (M+Na) 418.0266; encontrado 418.0265. Dados do cristal (raio-X):  $C_{17}H_{18}BrNO_5$ ,  $M = 396.22$ , monoclinico, grupo espacial  $P2_1$  ( $n^\circ$  4),  $a = 7.7282(4)$   $\text{\AA}$ ,  $b = 13.9571(11)$   $\text{\AA}$ ,  $c = 8.5804(6)$   $\text{\AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 109.037(5)^\circ$ ,  $V = 874.89(11)$   $\text{\AA}^3$ ,  $Z = 2$ ,  $D_c = 1.504$   $\text{Mg/m}^3$ ,  $m = (\text{Cu-K}\alpha) = 3.437$   $\text{mm}^{-1}$ ,  $F(000) = 404.3704$  as reflexões foram coletadas em  $5.45 \leq 2\theta \leq 65.91$  e misturado para dar 2154 reflexões únicas ( $R_{\text{int}} = 0.0351$ ), das quais 1799 com  $I > \sigma(I)$  foram considerados como sendo observados. Valores finais são  $R = 0.0491$ ,  $wR = 0.1280$ ,  $GOF = 1.062$ , max/min densidade eletrônica residual 0.417 and -0.716 e.  $\text{\AA}^{-3}$ .

**Composto 14: 4,6-dibromo-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)fenil**



Composto 14 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 95:5). IV: 3499; 2941; 1645; 1597; 1385; 1373; 1217; 1141; 1010; 904; 745; 630  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : .30 (1H; s; H-3); 5.70 (1H; d;  $J= 0.6$  Hz; OH); 5.32 (1H; t;  $J= 1.6$  Hz; Ha-8); 4.87 (1H; t;  $J= 1.2$  Hz; Hb-8); 2.27 (3H; d;  $J= 0.7$  Hz; H-10); 2.00 (3H; t;  $J= 1.3$  Hz; H-9).  $^{13}C$  RMN (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 149.9 (C-1); 145.0 (C-7); 141.7 (C-5); 133.3 (C-3); 125.5 (C-2); 117.3 (C-8); 111.8 (C-6); 110.9 (C-4); 22.3 (C-9); 16.3 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ C} = 0.0$   $c = 2.0$  mg/mL  $CHCl_3$ .

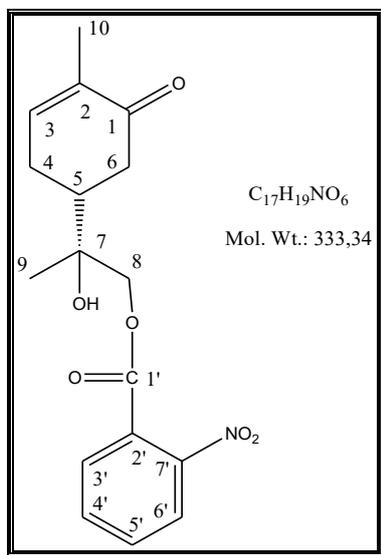
**Composto 15: 8-hidroxi-7-(2-nitrobenzoato)carvona**



Composto 15 foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 7:3). IV: 2980; 2887; 2654; 2543; 1659; 1527; 1488; 1362; 1291; 1149; 1073; 905; 778; 687  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.87 (2H; td;  $J= 7.1, 2.5$  Hz; H-14; H-3'); 7.69 (1H; dd;  $J= 6.5, 3.0$  Hz; H-5'); 6.64 (1H; m; H-4'); 3.55 (1H; d;  $J= 10.4$  Hz; H-3); 3.48 (2H; d;  $J= 10.5$  Hz; H-8); 2.70 (1H; dt;  $J= 15.0, 2.3$  Hz; Ha-6); 2.53 (2H; d;  $J= 3.2$  Hz; Ha-4; H-5); 2.28 (2H; m; Hb-6; Hb-4); 1.79 (3H; s; H-10);

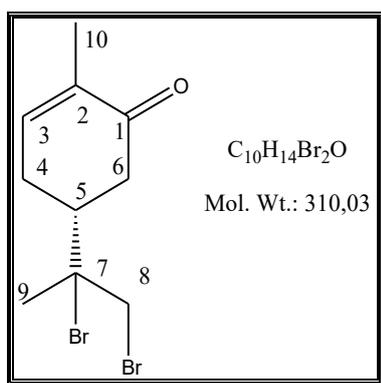
1.31 (3H; s; H-9).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 200.0 (C-1); 168.6 (C-1'); 151.9 (C-7'); 144.4 (C-3); 135.6 (C-2); 132.6 (C-4'); 132.5 (C-5'); 130.4 (C-3'); 126.1 (C-2'); 123.9 (C-6'); 72.1 (C-7); 43.4 (C-8); 42.4 (C-5); 38.5 (C-6); 27.4 (C-4); 22.4 (C-9); 15.6 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = -9.3$  c = 1.0 mg/mL  $\text{CHCl}_3$ .

**Composto 16: 7-hidroxi-8-(2-nitrobenzoato)carvona**



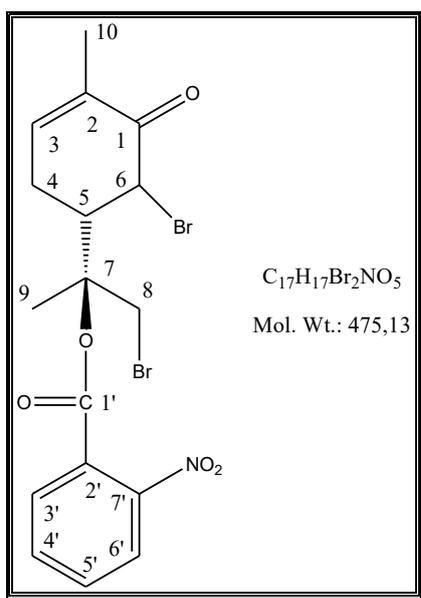
Composto **16** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 5:5). IV: 3435; 2979; 1707; 1657; 1578; 1530; 1349; 1289; 1253; 1125; 1072; 777; 733  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.80 (1H; m; H-6'); 7.71 (3H; ddd;  $J = 7.3, 2.2, 1.2$  Hz; H-12, H-15, H-4'); 7.61 (1H; m; H-3'); 6.74 (1H; m; H-3); 4.53 (1H, s; OH); 4.22 (2H; m; H-8); 2.64 (2H; m; H-4); 2.64 (1H; m; Ha-6); 2.31 (2H; m; Hb-6, H-5); 1.69 (3H; s; H-10); 1.19 (3H; d;  $J = 2.7$  Hz; H-9).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 200.6 (C-1); 179.1 (C-1'); 165.2 (C-7'); 145.4 (C-3); 135.1 (C-2); 133.1 (C-4'); 133.1 (C-5'); 132.2 (C-3'); 130.2 (C-2'); 123.8 (C-6'); 72.3 (C-7); 71.0 (C-8); 41.7 (C-5); 38.4 (C-6); 29.6 (C-4); 20.9 (C-9); 15.5 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = +5.5$  c = 1.98 mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calc for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5\text{Na}$  require (M+Na) 334.1285; encontrado 334.1286.

**Composto 17: (5R,7RS)-7,8-dibromocarvona**



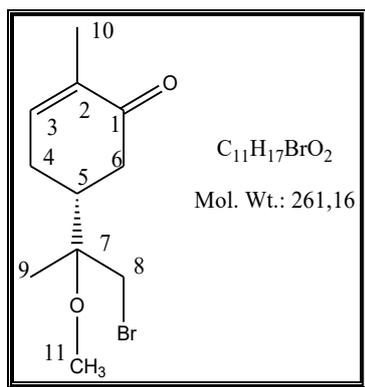
Composto **17** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 95:5). IV: 2980, 2923, 1668, 1380, 1257, 1083, 1060, 904, 711  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.71 (1H, dt,  $J = 15.0, 4.6$  Hz, H-6), 3.93 (1H, m, Ha-8), 3.82 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz, Hb-8), 2.60 (2H, m, H-6), 2.42 (3H, m, H-5), 1.84 (3H, s, H-9), 1.76 (s, 3H, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 198.4 (C-1); 143.4 (C-3); 135.3 (C-2); 71.0 (C-7); 42.3 (C-5); 40.7 (C-8); 40.6 (C-6); 28.8 (C-9); 27.9 (C-4); 15.6 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = -10.6$   $c = 1.88$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ . HRMS (EI) calc for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_5\text{Na}$  require (M+Na) 308.9484; encontrado 308.9479.

**Composto 18: 6,8-dibromo-7-(2-nitrobenzoato)carvona**



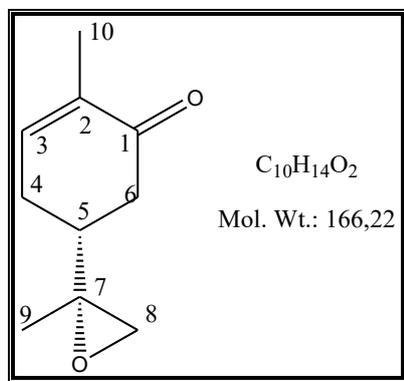
Composto **18** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 7:3). IV: 3231; 3101; 2923; 1779; 1279; 1673; 1530; 1348; 1288; 1248; 1123; 1070; 995; 767; 733  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.03 (dq,  $J = 8.2, 1.2$  Hz, 1H, H-6'), 7.71 (m, 1H, H-4'), 7.57 (dt,  $J = 7.5, 1.8$  Hz, 1H, H-3'), 6.87 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-5'), 6.55 (dq,  $J = 4.2, 1.4$  Hz, 1H, H-3), 4.51 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-5), 4.14 (dd,  $J = 11.2, 1.3$  Hz, 1H, Ha-8), 4.02 (dd,  $J = 11.2, 2.4$  Hz, 1H, Hb-8), 3.15 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-6), 2.92 (ddd,  $J = 20.4, 6.6, 3.0$  Hz, 1H, Ha-4), 2.52 (ddt,  $J = 20.3, 5.7, 1.4$  Hz, 1H, Hb-4), 1.77 (d,  $J = 2.0$  Hz, 3H, H-9), 1.52 (dt,  $J = 3.1, 1.4$  Hz, 3H, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 191.1 (C-1); 164.5 (C-1'); 146.8 (C-7'); 143.0 (C-3); 134.0 (C-4'); 133.1 (C-2); 133.0 (C-5'); 129.3 (C-3'); 128.8 (C-2'); 124.3 (C-6'); 86.5 (C-7); 48.7 (C-6); 47.2 (C-5); 35.3 (C-8); 22.9 (C-4); 21.1 (C-9); 15.9 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} = -6.8$   $c = 1.46$  mg/mL  $\text{CHCl}_3$ .

Composto 19: 8-bromo-7-metoxicarvona



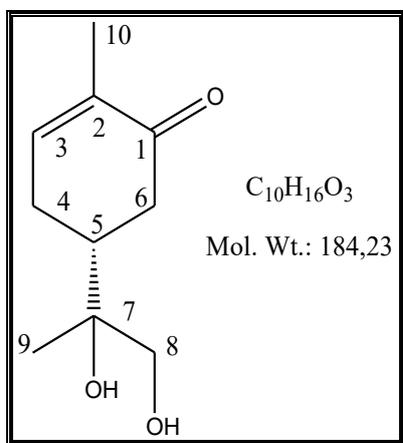
Composto **19** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 8:2). IV: 2976; 2829; 1667; 1450; 1369; 1101; 1081; 1064; 900; 710; 655  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.75 (1H; m; H-3); 3.44 (2H; q;  $J = 11.1$  Hz; H-8); 3.21 (3H; s; H-11); 2.50 (1H; m; H-5); 2.43 (2H; m; Ha-6; Ha-4); 2.22 (2H; dd;  $J = 16.0, 14.1$  Hz; Hb-6; Hb-4); 1.74 (3H; m; H-10); 1.23 (3H; s; H-9).  $^{13}C$  RMN (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 199.5 (C-1); 145.2 (C-3); 135.1 (C-2); 76.0 (C-7); 49.7 (C-11); 41.0 (C-5); 39.1 (C-6); 36.6 (C-8); 26.2 (C-4); 18.1 (C-9); 15.6 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ C} = +3.9$  c = 2.54 mg/mL  $CHCl_3$ . HRMS (EI) calc for  $C_{17}H_{18}BrNO_5Na$  requiere (M+Na) 283.0341; encontrado 283.0307.

Composto 20: 7,8-epoxicarvona.



Composto **20** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc 8:2). IV: 2980; 2924; 1667; 1450; 1382; 1106; 901; 834; 704  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.72 (m, 1H, H-3), 2.65 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, Ha-8), 2.61 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, Hb-8), 2.58 (m, 1H, Ha-6), 2.51 (m, 1H, Hb-6), 2.38 (m, 1H Ha-4), 2.25 (m, 1H, Hb-4), 2.06 (m, 1H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-10), 1.29 (s, 3H, H-9).  $^{13}C$  RMN (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 198.2 (C-1); 144.2 (C-3); 135.6 (C-2); 58.0 (C-7); 52.9 (C-8); 41.3 (C-5); 40.3 (C-6); 27.7 (C-4); 18.4 (C-9); 15.7 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ C} = -13.5$  c = 0.74 mg/mL  $CHCl_3$ . HRMS (EI) calc for  $C_{10}H_{14}O_2Na$  requiere (M+Na) 189.0886; encontrado 189.0891.

**Composto 22: 7,8-Dihidroxicarvona.**



Composto **22** foi purificado em cromatografia em coluna (sílica gel, hexano/EtOAc7:3). IR: 3420; 2973; 2923; 1653; 1370; 1105; 924; 655  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.78 (1H; m; H-3); 3.51 (2H; d;  $J = 10.5$  Hz; H-8); 3.47 (1H; d;  $J = 10.5$  Hz; Ha-6); 2.50 (1H; m; Ha-4); 2.36 (1H; m; H-5); 2.25 (2H; dd;  $J = 15.7, 14.0$  Hz; Hb-6; Hb-4); 1.78 (3H; d;  $J = 0.9$  Hz; H-10); 1.30 (3H; s; H-9).  $^{13}C$  RMN (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$  199.0 (C-1); 144.9 (C-3); 135.3 (C-2); 72.1 (C-7); 43.4 (C-8); 42.2 (C-5); 39.5 (C-6); 26.4 (C-4); 22.5 (C-9); 15.6 (C-10).  $[\alpha]^{20^\circ C} = -21.7$   $c = 0.46$  mg/mL  $CHCl_3$ . HRMS (EI) calc for  $C_{10}H_{16}O_3Na$  require (M+Na) 207.9916; encontrado 207.1008.



## 7. Bibliografia

“O triunfo pertence a quem mais se atreve...”.

Charles Chaplin



## 7. Bibliografia

- <sup>1</sup> Gaunt, M. J.; Johansson, C. C. C.; McNally, A.; Vo, N. T. *Drug Discovery Today* 2007, 12, 8-27.
- <sup>2</sup> List, B. *Chemical Reviews* 2007, 107, 5413-5415.
- <sup>3</sup> Busacca, C. A.; Fandrick, D. R.; Song, J. J.; Senanayake, C. H. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2011, 353, 1825-1864.
- <sup>4</sup> Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C.; *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25, 282-290.
- <sup>5</sup> Burt, S.; *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94, 223-253.
- <sup>6</sup> Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.M.; *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 446-475.
- <sup>7</sup> Pourmortazavi, S.M.; Hajimirsadeghi, S.S.; *Journal of Chromatography A*, 2007, 1163, 2-24.
- <sup>8</sup> Miguel, M.G; *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25, 291-312.
- <sup>9</sup> Sangwan, N.S.; Farooqui, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S.; *Journal of Plant Growth Regulation*, 2001, 34, 3-21.
- <sup>10</sup> Pinto C., Tese de Licenciatura em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2008.
- <sup>11</sup> Cavaleiro, C.M.F. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal, 2001.
- <sup>12</sup> Ibrahim, M.A.; Kainulainen, P.; Aflatuni, A.; Tiilikkala, K.; Holopainen, J.K; *Agricultural and Food Science in Finland* 2001, 10, 243-259.
- <sup>13</sup> Carson, C.F.; Mee, B.J.; Riley, T.V.; *Antimicrobial Agents Chemother*, 2002, 46, 1914-1920.
- <sup>14</sup> Ultee, A; Bennik, M.H.; Moezelaar, R.; *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, 1561-1568.
- <sup>15</sup> Averbeck, D.; Averbeck, S; *Photochemistry and Photobiology*, 1998, 68, 289-295.
- <sup>16</sup> Averbeck, D.; Averbeck, S; *Mutation Research/DNA Repair*, 1994, 315, 123-138.
- <sup>17</sup> Sousa, D; Raphael, E.; Brocksom, T.J; *Zeitschrift für Naturforschung*, 2010, 65b, 1381-1383.
- <sup>18</sup> Mak, K.K.W.; Lai, Y. M.; Siu, Y.H.; *Journal of Chemical Education*, 2006, 83, 1058-1061.
- <sup>19</sup> McGeady, P.; Wansley, D.L.; Logan, D.A.; *Journal of Natural Products*, 2002, 65 (7).
- <sup>20</sup> Raphael, T.J.; Kuttan, G.; *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2003, 25, 285-294.
- <sup>21</sup> Juergens, U.R; Dethlefsen, U.; Steinkamp, G.; Gillisen, A.; Repges, E.; Vetter, H.; *Respiratory Medicine*, 2003, 97, 250-256.
- <sup>22</sup> Juergens, U.R; Engelen, T.; Racké, K.; Stöber, M.; Gillissen, A.; Vetter, H.; *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 17, 281-287.
- <sup>23</sup> Sousa, D.P.; Nóbrega, F.F.F.; Almeida, R.N.; *Chirality*, 2007, 19, 264-268.
- <sup>24</sup> Buchbauer, G.; Jäger, W.; Gruber, A.; *Flavour and Fragrance Journal*, 2005, 20, 686-689.
- <sup>25</sup> Costa, D.A; Oliveira, G.A.L.; Lima, T.C.; Santos, P.S.; Sousa, D.P.; Freitas, R.M.; *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2012, 32(4), 633-640.
- <sup>26</sup> Costa, D.A.; Oliveira, G.A.L; Sousa, D.P.; Freitas, R.M.; *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 2012, 33 (4), 567-575.
- <sup>27</sup> Sousa, D.P.; Camargo, E.A.; Oliveira, F.S; Almeida, R.N.; *Journal of Biosciences*, 2010, 65 (9-10), 543- 550.
- <sup>28</sup> Sepúlveda-Arias, J.C; Veloza, L.A.; Mantilla-Muriel, L.E.; *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2014, 9 (3), 186-194.
- <sup>29</sup> Sepúlveda-Arias, J.C; Veloza, L.A.; Mantilla-Muriel, L.E.; *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2014, 9 (3), 186-194.
- <sup>30</sup> Salgado, P.R.R.; Fonseca, D.V; Braga, R.M.; Melo, C.G.F.; Andrade, L.N.; Almeida, R.N.; Sousa, D.P.; *Molecules*, 2015, 20, 19660-19673.
- <sup>31</sup> Costa, A.D.A.; Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2013.

- <sup>32</sup> Rogero, S.O.; Lugão, A.B.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S.; *Materials Research*, **2003**, 6(3), 317-320.
- <sup>33</sup> Linder, S.M.; Greenspan, F.P.; *Journal of Organic Chemistry*, **1957**, 22, 949-951.
- <sup>34</sup> Hareau, G.P.J.; Koiwa, M.; Hikichi, S.; Sato, F.; *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121, 3640-3650.
- <sup>35</sup> Llamas, R.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Ruiz, J.R.; *Applied Catalysis B: Environmental*, **2007**, 72, 18-25
- <sup>36</sup> Uguina, M.A.; Delgado, J.A.; Rodríguez, A.; Carretero, J.; Gómez-Díaz, D.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2006**, 256, 208-215.
- <sup>37</sup> Murphy, A.; Dubois, G.; Stack, T.D.P.; *Journal American Chemical Society*, **2003**, 125, 5250-5251.
- <sup>38</sup> Park, M.Y.; Yang, S.G.; Kim, Y.H.; *Heteroatom Chemistry*, **2002**, 13 (5), 431-436.
- <sup>39</sup> Kamata, K.; Sugahara, K.; Yonehara, K.; Ishimoto, R.; Mizuno, N.; *Chemical European Journal*, **2011**, 17, 7549-7559.
- <sup>40</sup> Mandelli, D.; Kozlov, Y.N.; Golfeto, C.C.; Shul'pin, G.C.; *Catalysis Letters*, **2007**, 118, 22-29.
- <sup>41</sup> Mereles, F.; Molas, L.P.; Lambaré, Paraguay, **2008**.
- <sup>42</sup> Dellacassa, E.; Martínez, N.; Davyt, D.; Castilla, L.; González-Colonea, A.; Giménez, C.; Cabrera, R.; Silva, L.; Rodilla J.M.; IV Simpósio Brasileiro de óleos essenciais, Fortaleza - Brasil **2007**.
- <sup>43</sup> Rodilla, J.M.; Silva, L.A.; Martínez, N.; Lorenzo, D; Davyt, D.; Castillo, C.; Giménez, C.; Cabrera, R.; González-Coloma, A.; Zrostliková, J.; Dellecassa, E.; *Industrial Crops and Products*, **2011**, 33, 497 - 503.
- <sup>44</sup> Waller, T.; Barros, M.; Draque, J.; Micucci, P.; *Medicinal Plant Conservation*, **2012**, 15, 1-9.
- <sup>45</sup> Janzen, K.; Paper presented at the International Conference "North African and Mediterranean Essential Oils and Aromas- International Federation of Essential Oils and Aroma Trades, London, **2010**.
- <sup>46</sup> Waikedre, J.; Vitturo, C.I.; Molinab, A.; Theodoro, P.N.E.T.; Silva, M.R.R.; L. S.; Maciuke, A.; Fournet, A.; *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, 9, 644-653.
- <sup>47</sup> Al-Howiriny, T. A.; *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2003**, 6, 133-135.
- <sup>48</sup> De-Moura, N.F.; Simionatto, E.; Porto, C.; Hoelzel, S.C.; Dessoy, E.C.; Zanatta, N.; Morel, A.F.; *Planta Medical*, **2002**, 68, 631-634.
- <sup>49</sup> Choudhary, M.I.; Siddiqui, Z.A.; Nawaz-Espindola, S.A.; Rahman, A.; *Journal of Natural Products*, **2006**, 69,1429 - 1434.
- <sup>50</sup> Pisutthanan, N.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S.; Baramée, A.; Apisariyakul, A.; Korth, J.; Bremer, J; *Product Research*, **2006**, 20, 636-640.
- <sup>51</sup> Gil, J. F.; Rodilla, J. M.; Silva, M. L.; Quiñones, W. F. Echeverri, W.; Efectos garrapaticidas in vitro de la esencia de Palo Santo y algunos de sus componentes - Productos naturales contra parasitos externos del ganado bovino y ovino, tales como mosca de los cuernos y garrapatas, Ediciones de la Universidad de Magallanes 88-98.
- <sup>52</sup> Craven, R.A.; Arp, N.W.; Johnson, E.; Waddell, T. G.; *Journal of Undergraduate Chemistry Research*, **2005**, 1, 81-83.
- <sup>53</sup> Kadival, M.V.; Nair, M.S.R.; Bhattacharyya, S.C.; *Tetrahedron*, **1967**, 23, 1241-1249.
- <sup>54</sup> Pombal, S.; Projeto de Licenciatura em Química Industrial- Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã -Portugal, **2012**.
- <sup>55</sup> Winter, R.E.K.; Zehr, R.J.; Honey, M.; Arsdale, W.V.; *Journal Organic Chemistry*, **1981**, 46, 4309-4312.
- <sup>56</sup> Solomons, T.W.G.; Fryhle, C.B; Química Orgânica, LTC, 8º edição, volume 1, pág.491-492, Rio de Janeiro, **2005**.
- <sup>57</sup> Gonzaga, J.C.; Tese de Doutorado, Universidade Complutense de Madrid, Espanha, **2008**.
- <sup>58</sup> Uguina, M.A.; Delgado, J.A.; Carretero, J.; *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, 48, 10217-10221.
- <sup>59</sup> Yamaguchi, K.; Mori, K.; Mizugaki, T.; Ebitani, K.; Kaneda, K.; *Journal of Organic Chemistry*, **2000**, 65, 6897-6903.

- <sup>60</sup> Goodwin, T. E. *Journal of Chemical Education*, **2004**, *81*, 1187-1190.
- <sup>61</sup> Fiege, H.; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2002**.
- <sup>62</sup> Anastas, P.T.; Bartlett, L.B.; Kirchhoff, M.M.; Williamson, T.C.; *Catalysis Today*, **2000**, *55*, 11-22.
- <sup>63</sup> Uguina, M.A.; Delgado, J.A.; Carretero, J.; Gómez-díaz, D.; Rodrigues, G.; *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, *48*, 4671-4680.
- <sup>64</sup> Cagnoli, M.V.; Casuscelli, S.G.; Alvarez, A.M.; Bengoa, J.F.; Gallegos, N.G.; Samaniego, N.M.; Crivello, M.E. Ghioneb, G.E.; Pérez, C.F.; Herrero, E.R.; Marchetti, S.G. *Applied Catalysis A: General*, **2005**, *287*, 227-235.
- <sup>65</sup> Faveri, G.D.; Ollyashenko, G.; Watkinson, M.; *Chemical Society Reviews*, **2011**, 1722-1760.
- <sup>66</sup> Nacro, K.; Gorrichon, L.; Escudier, J.M.; Baltas, M.; *European Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 4247-4258.
- <sup>67</sup> Martín, R.; Moyano, A.; Pericàs, M.A.; Riera, A.; *Organic Letters*, **2000**, *2*, 93-95.
- <sup>68</sup> Schomaker, J.M.; Pulgam, V.R.; Borhan, B.; *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, *126*(42), 13600-13601
- <sup>69</sup> Yang, D.; *Accounts of Chemical Research*, **2004**, *37*(8), 497-505.
- <sup>70</sup> Xia, Q.H.; Ge, H.Q.; Ye, C.P.; Liu, Z.M.; Su, K.X.; *Chemical Reviews*, **2005**, *105*(5), 1603-1662.
- <sup>71</sup> Katsuki, T.; Sharpless, K.B.; *Journal of the American Chemical Society*, **1980**, *102*(18) 5974-5976.
- <sup>72</sup> Johnson, R.A.; Sharpless, K.B.; *Contemporary Organic Synthesis*, **1991**, *7*, 389-436.
- <sup>73</sup> Johnson, R. A.; Sharpless, K. B. *Catalytic Asymmetric Synthesis*. VCH Publisher Inc., **1993**.
- <sup>74</sup> Wang, B.; Wong, O. A.; Zhao, M.-X.; Shi, Y.; *Journal of Organic Chemistry*, **2008**, *73*(24), 9539-9543.
- <sup>75</sup> Romney, D.K.; Miller, S.J.; *Organic Letters*, **2012**, *14*(84), 1138-1141.
- <sup>76</sup> Armstrong, A.; Draffan, A.G.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **2001**, 2861-2873.
- <sup>77</sup> Page, P.C.B.; Rassias, G.A.; Barros, D.; Ardakani, A.; Bukley, B.; Bethell, D.; Smith, T.A.D.; Slawin, A.M.Z.; *Journal of Organic Chemistry*, **2001**, *66*(21), 6926-6931.
- <sup>78</sup> Arai, S.; Shioiri, T.; *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1407-1413.
- <sup>79</sup> Furukawa, N.; Sugiara, Y.; Fujihara, H.; *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, *54*(17), 4222-4224.
- <sup>80</sup> Lichitor, P.; Miller, S.J.; *ACS Combinatorial Science*, **2011**, *13*(3), 321-326.
- <sup>81</sup> Guillena, G.; Ramón, D.J.; *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, *17*(10), 1465-1492.
- <sup>82</sup> Corey, E.J.; Zhang, F.Y. *Tetrahedron Letters*, **1976**, *21*: 1831-1834.
- <sup>83</sup> Wyngerb, H.; Greijdanus, B.; *Journal of The Chemical Society, Chemical Communications*, **1978**, 427-428.
- <sup>84</sup> Ooi, T.; Maruoka, K.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2007**, *46*, 4222-4266.
- <sup>85</sup> Juliá, S.; Masana, J.; Vega, J.C.; *Angewandte Chemie International Edition*, **1980**, *19*, 929-931.
- <sup>86</sup> Juliá, S.; Guixer, J.; Masana, J.; Rocas, J.; Colonna, S.; Annuziata, R.; Molinari, H.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1982**, 1317-1324
- <sup>87</sup> Kelly, D.R.; Roberts, S.M.; *Chemical Communications*, **2004**, *18*, 2018-2020.
- <sup>88</sup> Zhuang, W.; Marigo, M.; Jorgensen, K.A.; *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2005**, *3*, 3883-3885.
- <sup>89</sup> Lee, S.; Macmillan, D.W.C.; *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11413-11424.
- <sup>90</sup> Amatore, M.; Beeson, T.D.; Brown, S.P.; Macmillan, D.W.C.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, *48*(28), 5121-5124.
- <sup>91</sup> Sundén, H.; Ibrahim, I.; Córdova, A.; *Tetrahedron Letters*, **2006**, *47*, 99-103.
- <sup>92</sup> Lattanzi, A.; Russo, A.; *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 12264-12269.
- <sup>93</sup> Russo, A.; Lattanzi, A.; *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2010**, *8*, 2633-2638.

- <sup>94</sup> Capobianco, A.; Russo, A.; Lattanzi, A.; Peluso, A.; *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, 354, 2789-2796.
- <sup>95</sup> Wang, X.; List B.; *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(6), 1119-1122.
- <sup>96</sup> Lifchits, O.; Reisinger, C.M.; List, B.; *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(30), 10227-10229.
- <sup>97</sup> Finkbeiner, P.; Murai, K.; Röpke, M.; Sarpong, R.; *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139, 11349-11352.
- <sup>98</sup> Nannini, L.J.; Nemat, S.J.; Carreira, E.M.; *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57, 823-826.
- <sup>99</sup> Mak, K.K.W.; Lai, Y.M.; Siu, Y.H.; *Journal Chemical Education*, 2006, 83, 1058-1061.
- <sup>100</sup> Masarwa, A.; Weber, M.; Sarpong, R.; *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137, 6327-6334.
- <sup>101</sup> Sepúlveda-Arias, J.C.; Veloza, L.A.; Escobar, L.M.; Orozco, L.M.; Lopera, I.A.; *Journal of Essential Oil Research*, 2013, 25, 186-193.
- <sup>102</sup> Kimbaris, A.C.; González-Coloma, A.; Andrés, M.F.; Vidalí, V.P.; Polissiou, M.G.; Santana-Méridas, O.; *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14, e1600270.
- <sup>103</sup> Mandelli, D.; Kozlov, Y.N.; Silva, C.A.R.; Carvalho, W.A.; Pescarmona, P.P.; Cella, D.A.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2016, 422, 216-220.
- <sup>104</sup> Kamata, K.; Sugahara, K.; Yonehara, K.; Ishimoto, R.; Mizuno, N.; *Chemistry*, 2011, 17, 7549-7559.
- <sup>105</sup> Gebbink, R.J.M.K.; *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, 3462-3466.
- <sup>106</sup> Thatte, C.S.; Rathnam, M.V.; Kumar, M.S.S.; *Journal of Applicable Chemistry*, 2013, 2, 1192-1206.
- <sup>107</sup> Méndez-Sánchez, D.; Ríos-Lombardía, N.; Gotor, V., Gotor-Fernández, V.; *Tetrahedron*, 2014, 70, 1144-1148.
- <sup>108</sup> Rodilla, J.M.; Neves, P.P.; Pombal, S.; Rives, V.; Trujillano, R.; Díez, D.; *Natural Products Research*, 2016, 30, 834-840.
- <sup>109</sup> Majetich, G.; Shimkus, J.; Li, Y.; *Tetrahedron Letters*, 2010, 51, 6830-6834.
- <sup>110</sup> Mohr, J.T.; Krout, M.R.; Stoltz, B.M.; *Nature*, 2008, 455, 323-332.
- <sup>111</sup> Gaunt, M.J.; Johansson, C.C.C.; McNally, A.; Vo, N.T.; *Drug Discovery Today*, 2007 12, 8-27.
- <sup>112</sup> Trost, B.M.; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101, 5348-5355.
- <sup>113</sup> Nicolaou, K.C.; Sorensen, E. J.; Wiley-VCH, Weinheim, 1996.
- <sup>114</sup> Berkessel, A.; Gröger, H.; Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- <sup>115</sup> List, B.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F.; *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122, 2395-2396.
- <sup>116</sup> Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C.; *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122, 4243-4244.
- <sup>117</sup> MacMillan, D.W.C.; *Nature*, 2008, 455, 304-308.
- <sup>118</sup> Bertelsen, S.; Jørgensen, K.A.; *Chemical Society Reviews*, 2009, 38, 2178-218.
- <sup>119</sup> Tempelaar, S.; Barker, I.A.; Truong, V.X.; Hall, D.J.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Dove, A.P. *Polymer Chemistry*, 2013, 4, 174-183.
- <sup>120</sup> Kiesewetter, M.K.; Shin, E.J.; Hedrick, J.L.; Waymouth, R.M.; *Macromolecules*, 2010, 43, 2093-2107.
- <sup>121</sup> Marqués-López, E.; Herrera, R.P.; Christmann, M.; *Natural Product Reports*, 2010, 27, 1138-1167.
- <sup>122</sup> Dondoni, A.; Massi, A.; *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47, 4638-4660.
- <sup>123</sup> Busacca, C.A.; Fandrick, D.R.; Song, J.J.; Senanayake, C.H.; *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353, 1825-1864.
- <sup>124</sup> Seayad, J.; List, B. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2005, 3, 719-724.
- <sup>125</sup> Yoon, T.P.; Jacobsen, E.N.; *Science*, 2003, 299, 1691-1693.
- <sup>126</sup> MacMillan, D.W.C.; *Nature*, 2008, 455, 304-308.

- <sup>127</sup> Kumar, P.; Dwivedi, N.; *Accounts of Chemical Research*, **2013**, *46*, 289-299.
- <sup>128</sup> List, B.; *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 5573-5590.
- <sup>129</sup> Cobb, A.J.A.; Shaw, D.M.; Longbottom, D.A.; Gold, J.B.; Ley, S.V.; *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2005**, *3*, 84-96.
- <sup>130</sup> Kumarn, S.; Shaw, D.M.; Ley, S.V.; *Chemical Communications*, **2006**, 3211-3213.
- <sup>131</sup> Marigo, M.; Fielenbach, D. I.; Braunton, A.; Kjoersgaard, A.; Jørgensen, K.A.; *Angewandte Chemie-International Edition*, **2005**, *44*, 3703-3706.
- <sup>132</sup> Franzen, J.; Marigo, M.; Fielenbach, D.; Wabnitz, T.C.; Kjaersgaard, A.; Jørgensen, K.A.; *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, *127*, 18296-18304.
- <sup>133</sup> Hayashi, Y.; Gotoh, H.; Hayashi, T.; Shoji, M.; *Angewandte Chemie-International Edition*, **2005**, *44*, 4212-4215.
- <sup>134</sup> Belot, S.; Quintard, A.; Krause, N.; Alexakis, A.; *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2010**, *352*, 667-695.
- <sup>135</sup> Bonsignore, M.; Benaglia, M.; Raimondi, L.; Orlandi, M.; Celentano, G.; *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2013**, *9*, 633-640.
- <sup>136</sup> Liu, L.Y.; Zhu, Y.N.; Huang, K.M.; Chang, W.X.; Li, J.; *European Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 2634-2645.
- <sup>137</sup> Song, C.E. Wiley-VCH, Weinheim **2009**, 1-10.
- <sup>138</sup> Kaufman, T.S.; Rúveda, E.A.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 854-885.
- <sup>139</sup> Pelletier, P.; Caventou, J.; *Annales de Chimie et de Physique*, **1820**, *15*, 291.
- <sup>140</sup> Pelletier, P.; Caventou, J.; *Annales de Chimie et de Physique*, **1820**, *15*, 337.
- <sup>141</sup> Delondre, A.; Henry, H.; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **1833**, *19*, 623.
- <sup>142</sup> Delondre, A.; Henry H.; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **1834**, *20*, 157.
- <sup>143</sup> Winckler, F.L.; *Jahresbericht 1847*, 620
- <sup>144</sup> Lammerhofer, M.; Peters, E.C.; Yu, C.; Svec, F.; Frechet, J.M.J.; Lindner, W.; *Analytical Chemistry*, **2000**, *72*, 4614-4622.
- <sup>145</sup> King, H.D.; Meng, Z.X.; Denhart, D.; Mattson, R.; Kimura, R.; Wu, D.D.; Gao, Q.; Macor, J.E.; *Organic Letters*, **2005**, *7*, 3437-3440.
- <sup>146</sup> Figueiredo, R.M.; Christmann, M.; *European Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 2575-2600.
- <sup>147</sup> Rehak, J.; Hutka, M.; Latika, A.; Brath, H.; Almasy, A.; Hajzer, V.; Durmis, J.; Toma, S.; Sebesta, R.; *Synthesis-Stuttgart*, **2012**, *44*, 2424-2430.
- <sup>148</sup> Rogozinska, M.; Adamkiewicz, A.; Mlynarski; *Journal of Green Chemistry*, **2011**, *13*, 1155-1157.
- <sup>149</sup> Jensen, K.L.; Poulsen, P.H.; Donslund, B.S.; Morana, F.; Jørgensen, K.A.; *Organic Letters* **2012** *14*, 1516-1519.
- <sup>150</sup> Tsakos, M.; Kokotos, C.G.; Kokotos, G.; *Advanced Synthesis & Catalysis* **2012**, *354*, 740-746.
- <sup>151</sup> Zhao, G.; Lin, S.; Korotvicka, A.; Deiana, L.; Kullberg, M.; Cordova, A.; *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2010**, *352*, 2291-2298.
- <sup>152</sup> Jiménez-Sanchidrián, C.; Ruiz, J.R.; *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 2011-2026
- <sup>153</sup> Corma, A.; Nemeth, L.T.; Renz, Valência, S.; *Nature*, **2001**, *412*, 423-425.
- <sup>154</sup> Steffen, R.A.; Teixeira, S.; Sepulveda, J.; Rinaldi, R.; Schuchardt, U.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2008**, *287*, 41-44.
- <sup>155</sup> Lei, Z.; G.; Ma, Jia, C.; *Catalysis Communications*, **2007**, *8*, 305-309.
- <sup>156</sup> Liebau, F.; *Microporous Mesoporous Mater*, **2003**, *58*, 15-72.
- <sup>157</sup> Jiménez-Sanchidrián, C.; Romero, F. J.; Ruiz, J. R. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*; Hubbard, E. T., Ed.; Taylor and Francis: New York, NY, **2006**, 1143-1168.
- <sup>158</sup> Van-der-Waal, J. C.; Bekkum, H. J. *Porous Mater.* **1998**, *5*, 289-303.
- <sup>159</sup> Sen, E.; Smith, S. M.; Sullivan, K. A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12657-12698.
- <sup>160</sup> Cagnoli, M.V.; Casuscelli, S.G.; Alvarez, A.M.; Bengoa, J.F.; Gallegos, N.G.; Samaniego, N.M.; Crivello, M.E. Ghioneb, G.E.; Pérez, C.F.; Herrero, E.R.; Marchetti, S.G. *Applied Catalysis A: General*, **2005**, *287*, 227-235.

- <sup>161</sup> 10 Jiménez-Sanchidrián, C.; Hidalgo, J.M.; Llamas, R.; Ruiz, J.R.; *Applied Catalysis A: General*, **2006**, 312, 86-94.
- <sup>162</sup> Ruiz, J.R.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Llamas, R.; *Tetrahedron*, **2006**, 62, 11697-11703.
- <sup>163</sup> Varma, R. S. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 1235-1255.
- <sup>164</sup> Murahashi, S.; Oda, Y.; Naota, T. *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 7557-7560.
- <sup>165</sup> Llamas, R.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Ruiz, J. R.; *Applied Catalysis., B: Environmental*, **2007**, 72, 18-25.
- <sup>166</sup> Fischer, J.; Holderich, F. *Applied Catalysis A: General*, **1999**, 180, 435-443.
- <sup>167</sup> Zhang, Q.; Wen, S.; Lei, Z. *Reactive and Functional Polymers*, **2006**, 66, 1278-1283.
- <sup>168</sup> Palazzi, C.; Pinna, F.; Strukul, G.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2000**, 151, 245-252.
- <sup>169</sup> Bernini, R.; Mincione, E.; Cortese, M.; Saladino, R.; Gualandi, G.; Belfiore, M. C. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 4823-4825.
- <sup>170</sup> Lei, Z.; Wei, L.; Wang, R.; Ma, G.; *Catalysis Communications*, **2008**, 9, 2467-2469.
- <sup>171</sup> Lei, Z.; Ma, G.; Wei, L.; Yang, Q.; Su, B.; *Catalysis Letters*, **2008**, 124, 330-333.
- <sup>172</sup> Marcos, I.S; Castañeda, L.; Basabe, P.; Díez D.; Urones J.G.; *Tetrahedron*, **2009**, 65, 9256-9263.
- <sup>173</sup> Marcos, I.S; Castañeda, L.; Basabe, P.; Díez D.; Urones J.G.; *Tetrahedron*, **2008**, 64, 8815-8829.
- <sup>174</sup> Yazerski, V.A.; Spanring, P.; Gatineau, D.; Woerde, C.H.M.; Wieclawska, S.M.; Lutz, M.; Kleijn, H.; Gebbink, R.J.M.K.; *Organic and Biomolecular Chemistry Journal*, **2014**, 12, 2062-2070.
- <sup>175</sup> Mehta, G.; Chattopadhyay, S, K.; Umarye, J.D.; *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 4881-4884.
- <sup>176</sup> Dixit, A.B.; Yadav, G.D.; *Reactive & Functional Polymers*, **1996**, 31, 237-250.
- <sup>177</sup> Prandi, J.; Kagan, H.B.; Mimoun, H.; *Tetrahedron Letters*, **1986**, 23, 2617-2620.
- <sup>178</sup> Pillai, U.R.; Sahle-Demessie E.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2003**, 191, 93-100.
- <sup>179</sup> Frisone, M.T.; Pinna, F.; Strukul, G.; *Organometallics*, **1993**, 12, 148-156.
- <sup>180</sup> Jiménez-Sanchidrián, C.; Ruiz, J.R.; *Tetrahedron*, **2008**, 64, 2011-2026.
- <sup>181</sup> Jimenez-Sanchidrian, C.; Hidalgo, J.M.; Llamas, R.; Ruiz, J.R.; *Applied Catalysis A: General*, **2006**, 312, 86-94.
- <sup>182</sup> Ruiz, J.R.; Jimenez-Sanchidrian, C.; Llamas, R.; *Tetrahedron*, **2006**, 62, 11697-11703.
- <sup>183</sup> Lei, Z.; Zhang, Q.; Wang, R.; Ma, G.; Jia, C.; *Journal of Organometallic Chemistry*, **2006**, 691, 5767-5773.
- <sup>184</sup> Fischer, J.; Holderich, W.F.; *Applied Catalysis A: General*, **1999**, 180, 435-443.
- <sup>185</sup> Antelo, J.M.; Arce, F.; Crugeiras, J.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1995**, 2275-2279.
- <sup>186</sup> N. Konigsberg, G. Stevenson and J. M. Luck, *Journal of Biological Chemistry*, **1960**, 235, 1341-1345.
- <sup>187</sup> Wamser, C.C.; Scott, L.T.; *Journal of Chemical Education*, **1985**, 62 (8), 650-652.
- <sup>188</sup> Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K.; Horaguchi, T. *Chem. Commun.* **2004**, 470-471.
- <sup>189</sup> Inskeep, R.G.; Benson, M.; *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, **1961**, 20, 290-294.
- <sup>190</sup> Abdel-Khalek, A.A.; Sayyah, S.M.; Khalid, I.S.; *Transition Metal Chemistry*, **2004**, 18, 283-286.
- <sup>191</sup> Mohamed, A.; Ahmed, S.A.; El-Shahat, M.F.; *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, **2001**, 19, 297-311.
- <sup>192</sup> Steffen, R.; Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **2007**.
- <sup>193</sup> Gonzaga, J.C.; Tese de doutoramento, Universidad Complutense de Madrid, Espanha, **2008**.
- <sup>194</sup> Llamas, R.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Ruiz, J.R.; *Applied Catalysis B: Environmental*, **2007**, 72, 18-25.

- <sup>195</sup> Steffen, R.A.; Teixeira, S.; Sepulveda, J.; Rinaldi, R.; Schuchardt, U.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2008**, *287*, 41-44.
- <sup>196</sup> Spaggiari, A.; Vaccari, D.; Davoli, P.; Torre, G.; Prati, F.; *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72*, 2216-2219.
- <sup>197</sup> Das, B.; Venkateswarlu, K.; Mahender, G.; Mahender, I.; *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 3041-3044.
- <sup>198</sup> Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K.; Horaguchi, T. *Chemical Communications*, **2004**, 470-471.
- <sup>199</sup> Nicolaou, M.K.C.; Sorensen, E.J.; VCH Publishers, Weinheim, Germany, **1996**.
- <sup>200</sup> Nicolaou, K.C.; Snyder, S.A.; Wiley-VCH Publishers, Weinheim, Germany, **2003**.
- <sup>201</sup> Nicolaou, K.C.; *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 6683-6738.
- <sup>202</sup> Knowles, W.S.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2002**, *41*, 1999-2007.
- <sup>203</sup> Dalko P.I.; Moisan, L.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2001**; *40*, 3726-3748.
- <sup>204</sup> List, B.; *Synlett*, **2001**; 1675-1686.
- <sup>205</sup> Brown, S.P.; Brochu, M.P.; Sinz, C.J.; MacMillan, D.W.C.; *Journal American Chemical Society*, **2003**, *125*, 10808-10809.
- <sup>206</sup> Yoon, T.P.; Jacobsen, E.N.; *Science*. **2003**, *299*, 1691-1693.
- <sup>207</sup> Stork, G.; Niu, D.; Fujimoto, A.; Koft, E.; Balkovec, J.; Tata, J.R.; Dake, G., *Journal American Chemistry Society*, **2001**, *123*, 3239-3242.
- <sup>208</sup> Lidder, S.; Dargan, P.; Sexton, M.; Button, J.; Ramsey, J.; Holt, D.; Wood, D.; *Journal Of Medical Toxicology*, **2008**, *4*(3); 167-169.
- <sup>209</sup> Corey, E.J.; Bakshi, R.K.; Shibata S.; *Journal American Chemical Society*, **1987**, *109* (18): 5551-5553.
- <sup>210</sup> Wood, D.M., Davies, S., Puchnarewicz, M.; Johnston, A.; Dargan, P.I.; *European Journal of Clinical Pharmacology*, **2011**; *68* (5): 853-856
- <sup>211</sup> Antelo, J.M.; Arce, F.; Crugeiras, J.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1995**, 2275-2279.
- <sup>212</sup> Chen, G.; Ma, S.; *Angewandte Chemie International Edition*; **2010**, *49*, 8306-8308.
- <sup>213</sup> Dados cristalográficos para as estruturas relacionadas neste documento foram depositados no Cambridge Crystallographic Data Center como material suplementar, No. CCDC 1821654-1821653 Os dados podem ser obtidos gratuitamente no Cambridge Crystallographic Data Center via [www.ccdc.cam.ac.uk / getstructures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures).
- <sup>214</sup> Avilés Moreno, J.R.; Huet, T.R.; González, J.J.L.; *Journal of Structural Chemistry.*, **2013**, *24*, 1163-1170.
- <sup>215</sup> Cativiela, C.; Fraile, J.M.; Garcia, J.I.; Mayoral, J.A.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **1996**, *112*, 259-267.
- <sup>216</sup> Piazza, G. J.; Nuñez, A.; Foglia, T. A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, *21*, 143-151.
- <sup>217</sup> Rios, L. A.; Weckes, H. S.; Schuster, H.; Hoelderich, W. F.; *Applied Catalysis A: General*, **2005**, *284*, 1-2, 155-161
- <sup>218</sup> Uguina, M.A.; Delgado, J.A.; Carretero, J.; *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, *48*, 10217-10221.
- <sup>219</sup> Tamura, Y.; Annoura, H.; Yamamoto, H.; Kondo, H.; Kita, Y.; Fujioka, H.; *Tetrahedron Letters*, **1987**, *28*, 5709-5712.
- <sup>220</sup> Bahramian, B.; Mirkhani, V.; Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.; *Catalysis Communications*, **2006**, *5* (5), 289-296
- <sup>221</sup> Mak, K.K.W.; Lai, Y.M.; Siu, Y.H.; *Journal of Chemical Education*, **2006**, *83*, 1058-1061.
- <sup>222</sup> Salvador, J.M.; Mittelstadt, P.R.; Belova, G.I.; Fornace, A.J.Jr.; Ashwell, J.D.; *Nature Immunology*, **2005**, *6* (4), 396-402.
- <sup>223</sup> Fraile, J.M.; Garcia, J.I.; Mayoral, J.A.; Nèmorval, L.C.; Rachdi, F.; *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1995**, 539-540.
- <sup>224</sup> Crotti, P.; Pineschi, M.; Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 271 - 313.

- <sup>225</sup> Grschow, S.; Sherman, D.H.; Wiley-VCH, Weinheim, D. H., 349 - 398.
- <sup>226</sup> Galloway, W.R.J.D.; Isidro-Llobet, A.; Spring, D.R.; *Natural Communications*, **2010**, 1, 1 - 18.
- <sup>227</sup> Vilotijevic, I.; Jamison, T.F.; *Angewandte Chemie*, **2009**, 121, 5352 - 5385.
- <sup>228</sup> Vilotijevic, I.; Jamison, T.F.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48, 5250 - 5281.
- <sup>229</sup> Katsuki, T.; Sharpless, K.B.; *Journal of Chemical Society*, **1980**, 102, 5974 - 5976.
- <sup>230</sup> Zhang, W.; Leobach, J.L.; Wilson, S.R.; Jacobsen, E.N.; *Journal of Chemical Society*, **1990**, 112, 2801 - 2803.
- <sup>231</sup> Irie, R.; Noda, K.; Ito, Y.; Matsumoto, N.; Katsuki, T.; *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31, 7345 - 7348.
- <sup>232</sup> Cheong P.H.Y.; Legault, C.Y.; Um, J.M.; Celebi-Olcum, N.; Houk, K.N.; *Chemical Review*, **2011**, 111, 5042 - 5137
- <sup>233</sup> Faveri, G.; Ilyashenko, G.; Watkinson, M.; *Chemical Society Reviews*, **2011**, 40, 1722 - 1760.
- <sup>234</sup> Davie, E A.C.; Mennen, S.M.; Xu, Y.; Miller, S.J.; *Chemical Review*, **2007**, 107, 5759 - 5812.
- <sup>235</sup> Adam, W.; Curci, R.; Edwards J.O.; *Accounts of Chemical Research*, **1989**, 22, 205 - 211.
- <sup>236</sup> Hussain, H.; Green, I.R.; Ahmed, I.; *Chemical Review*, **2013**, 113, 3329 - 3371.
- <sup>237</sup> Ramachary, D.B.; Reddy, Y.V.; *European Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 865 - 887.
- <sup>238</sup> Bjerre, J.; Rousseau, C.; Marinescu, L.; Bols, M.; *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 81, 1 - 11.
- <sup>239</sup> Davis, R.L.; Stiller, J.; Naicker, T.; Jiang, H.; Jørgensen, K.A.; *Angewandte Chemie International Edition*, **2014**, 53, 7406.
- <sup>240</sup> Valeev, R.F.; Bikzhanov, R.F.; Yagafarov, N.Z.; Miftakhov, M.S.; *Tetrahedron*, **2012**, 68, 6868-6872.
- <sup>241</sup> Pombal, S.; Tobal, I.E.; Roncero, A.M.; Rodilla, J.M.; Garrido, N.M.; Sanz, F.; Esteban, A.; Tostado, J.; Moro, R.F.; Sexmero, M.J.; Jambriña, P.G.; Diéz, D.; *Catalysts*, **2018**, 8, 250.
- <sup>242</sup> Zuzarte, M.; Gonçalves, M.J.; Canhoto, J.; Salgueiro, L.; *Formatex*, **2011**, 1167-1178.
- <sup>243</sup> Miguel, G.M.; *Molecules*, **2010**, 15 (12), 9252-9287.
- <sup>244</sup> Juhás, S.; Bukovská, A.; Čikoš, S.; Czikková, S.; Fabian, D.; Koppel, J.; *Acta Veterinaria Brno*, **2009**, 78, 121-127.
- <sup>245</sup> Lindley, M.G.; *Food Science & Technology*, **1998**, 9, 336-340.
- <sup>246</sup> Zeng, W.C.; Zhu, R.X.; Jia, L.R.; Gao, H.; Zheng, Y.; Sun, Q.; *Food and Chemical Toxicology*, **2011**, 49, 1322-1328.
- <sup>247</sup> Prakash, B.; Singh, P.; Kedia, A.; Dubey, N.K.; *Food Research International*, **2012**, 49, 201-208
- <sup>248</sup> Prakash, B.; Mishra, P.K.; Kedia, A.; Dubey, N.K.; *Food Science and Technology*, **2014**, 56, 240-257.
- <sup>249</sup> Madsen, H. L.; Bertelsen, G.; *Trends in Food Science and Technology*, **1995**, 6, 271-277.
- <sup>250</sup> Pin-Der, D.; Gow-Chin, Y.; *Jornal of the American Oil Chemest's Society*, **1997**, 74 (6), 745-748.
- <sup>251</sup> Ames, B.N.; *Science*, **1983**, 221,1256-1264.
- <sup>252</sup> Friedman, M.; Henika, P.R.; Mandrell, R.E.; *Journal Food Protection*, **2002**, 65, 1545-1560.
- <sup>253</sup> Zhu, R.; Wang, Y.; Zhang, L.; Guo, Q.; *Hepato Research*, **2012**, 42, 741-749.
- <sup>254</sup> Zhang, A.; Sun, H.; Wang, X.; *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 63, 570-577.
- <sup>255</sup> Ionita, P.; *Chemical Papers*, **2005**, 59 (1), 11-16.
- <sup>256</sup> Wojtunik, K.; Ciesla, L.; Waksmundzka, M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**.
- <sup>257</sup> Svoboda, K.; Hampson, J.; *Plant Biology Department*, **1999**.
- <sup>258</sup> Quintans, L.; Moreira, J.C.F.; Pasquali, M.A.B.; Rabie, S.M.; Pires, A.S.; Schröder, R.; Rabelo, T.K.; Santos, J.P.A.; Lima, P.S.S.; Cavalcanti, S.C.H.; Araújo, A.S.; Quintans, J.S.S.; Gelain, D.P.; *Toxicology*, **2013**, 1-11.
- <sup>259</sup> Yoo, N.M.; Kim, J.P.; Yun, B.S.; Ryoo, I.J.; Lee, I.K.; Yoon, E.S.; Koshino, H.; Yoo, I.D.; *The Journal of Antibiotics*, **2016**, 59 (2), 110-113.

- 
- <sup>260</sup> Hazra, B.; Biswas, S.; Mandal, N.; *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2008**, *8* (63), 1-10.
- <sup>261</sup> Montezano, A.; Touyz, R.; *Antioxidants & Redox Signaling*, **2014**, *20* (1), 164-182.
- <sup>262</sup> Li, Y.; Zhu, H.; Kuppasamy, P.; Roubaud, V.; Zweier, J.L.; *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, *273* (4), 2015-2023.
- <sup>263</sup> Sghaier, B.M.; Mouslim, M.; Pagano, A.; Ammari, J.L.; Kovacic, H.; *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2016**, *46*, 227-233.
- <sup>264</sup> Menéndez, J.; En Introduccion a la Quimica Farmaceutica, de C Avendaño., 575-610. Madrid: Mc Graw Hill, **2001**.
- <sup>265</sup> Oliveira, C.; Comunello, L.; Lunardelli, A.; Amaral, R.; Pires, M.; Silva, G.L.; Manfredini, M.; Vargas, C.; Gnoatto, S.; Oliveira, J.; Gosmann, G.; *Molecules*, **2012**, *17*.
- <sup>266</sup> Lin, H.Y., Chou, C.C.; *Food Research International*, **2004**, *37*, 883-889.
- <sup>267</sup> Kassin, M.; Montero, M.J.; Sevilla, M.A.; *British Journal of Pharmacology*, **2009**, *158*, 541-547.
- <sup>268</sup> Judkins, C.; Sobey, C.; Dang, T.; Miller, A.; Disting, G.; Drummond, G.; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2006**, *317* (2), 644-650.
- <sup>269</sup> López- Sepúlveda, R.; Gómez, M.; Romero, M.; Sánchez, M.; Quintela, A.M.; Galindo, P.; O´Valle, F.; Tamargo, J.; Pérez-Vizacino, F.; Duarte, J.; Jimenez, R.; *Clinical Science*, **2011**, *120*, 321-333.
- <sup>270</sup> Parcher. P.; Beckman, J.; Liaudet, L.; *Physiological Reviews*, **2007**, *87*, 315-424.
- <sup>271</sup> Lee, S.H.; Sancheti, S.; Bafna, M.; Sancheti, S.; Seo, S.Y.; *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, *5* (2), 248-254.

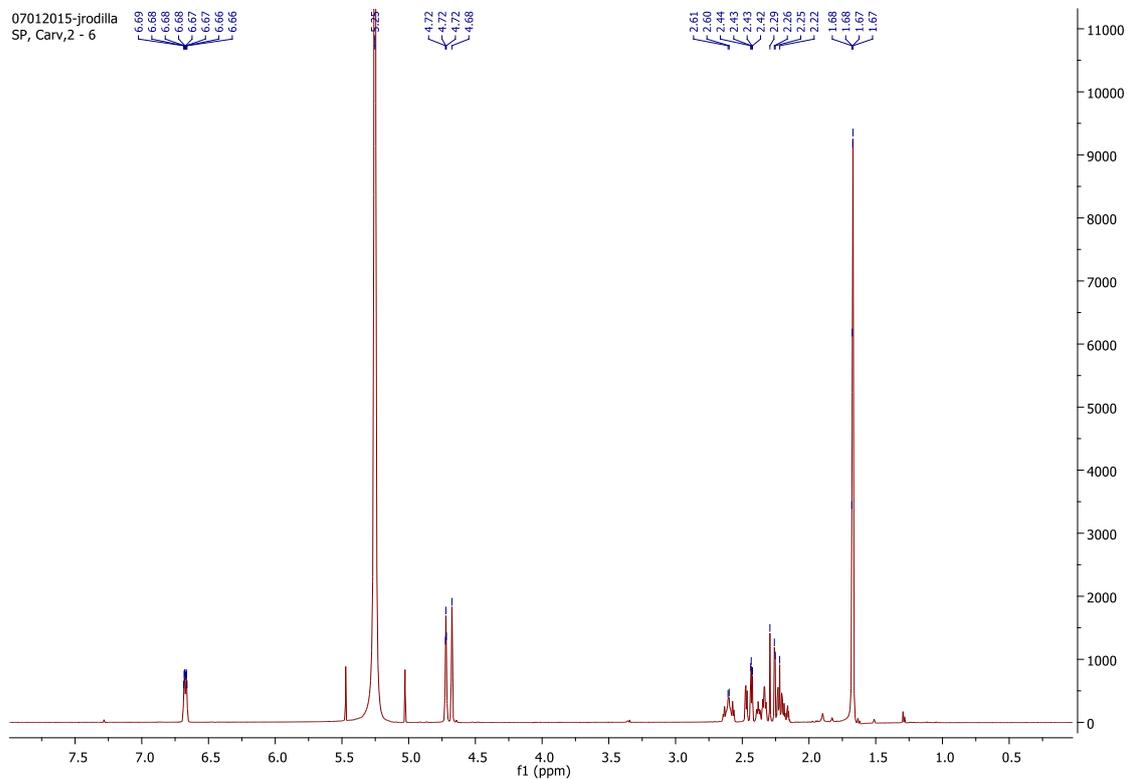


---

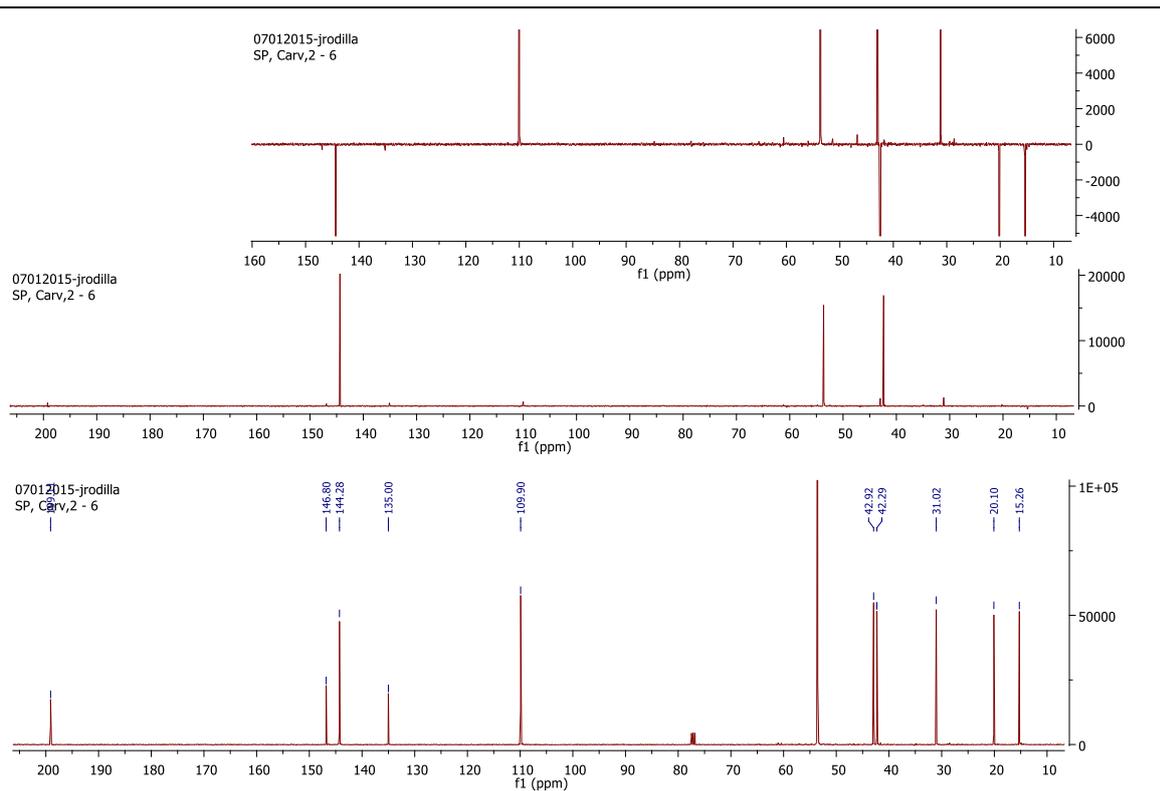
## **8. Anexos**



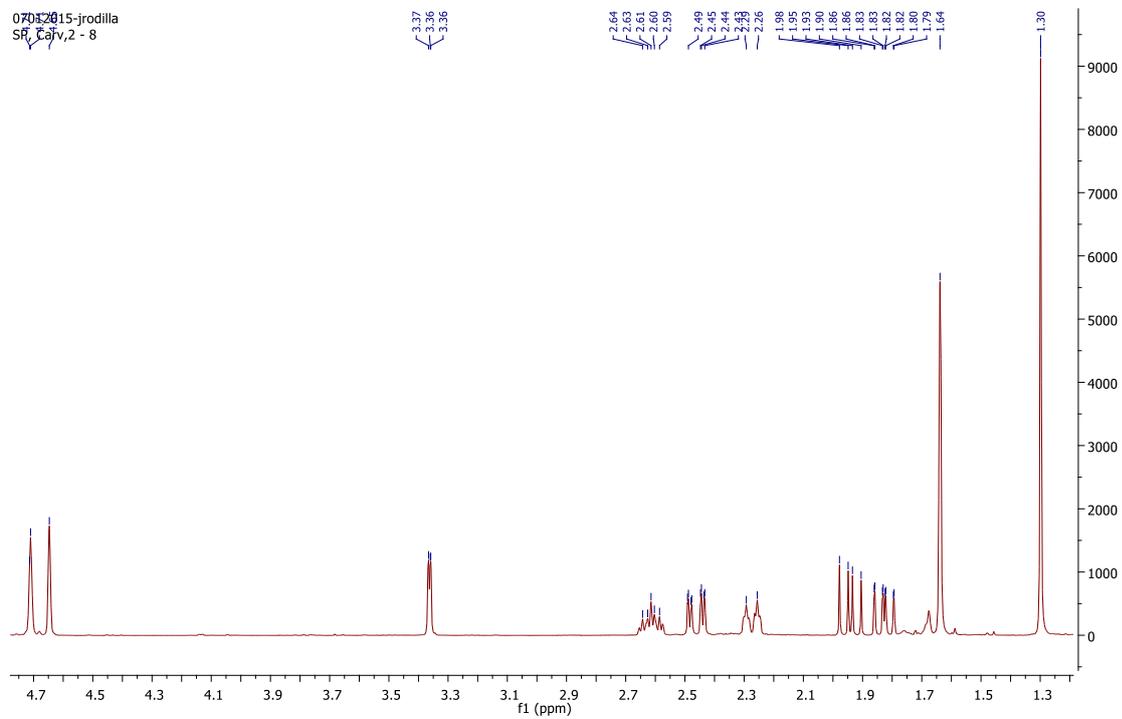
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 1



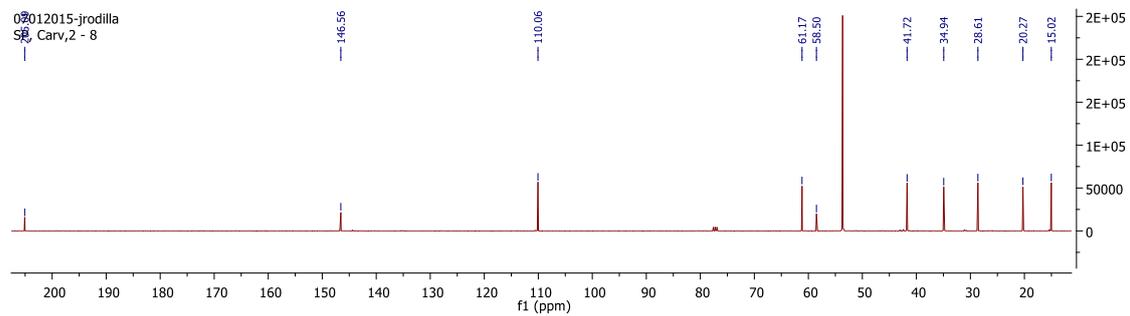
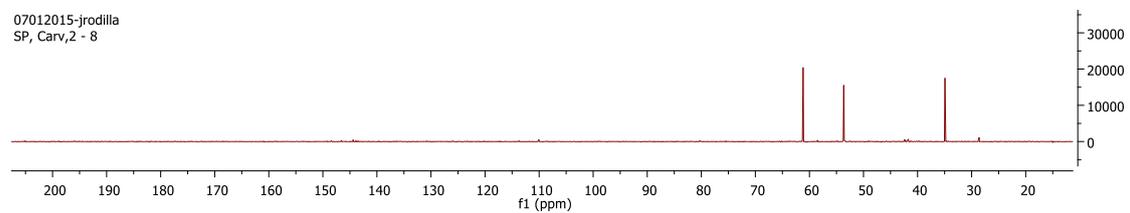
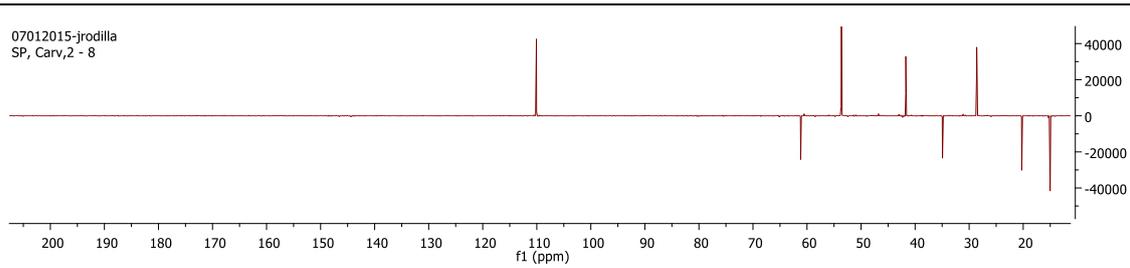
### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 1



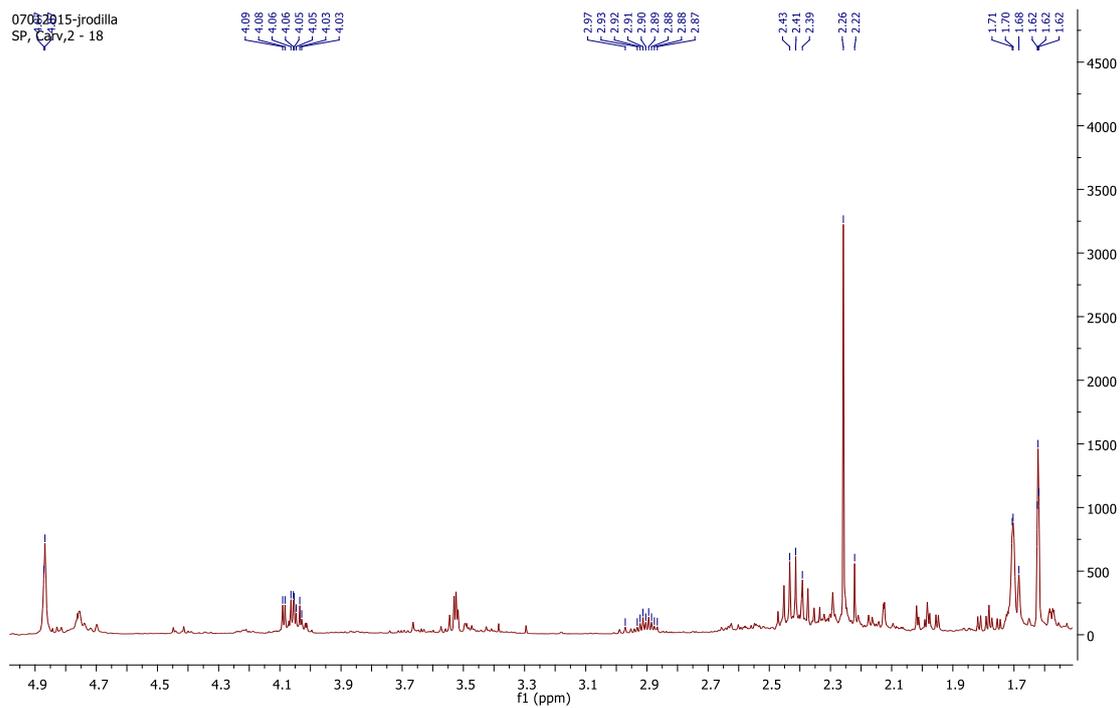
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 2



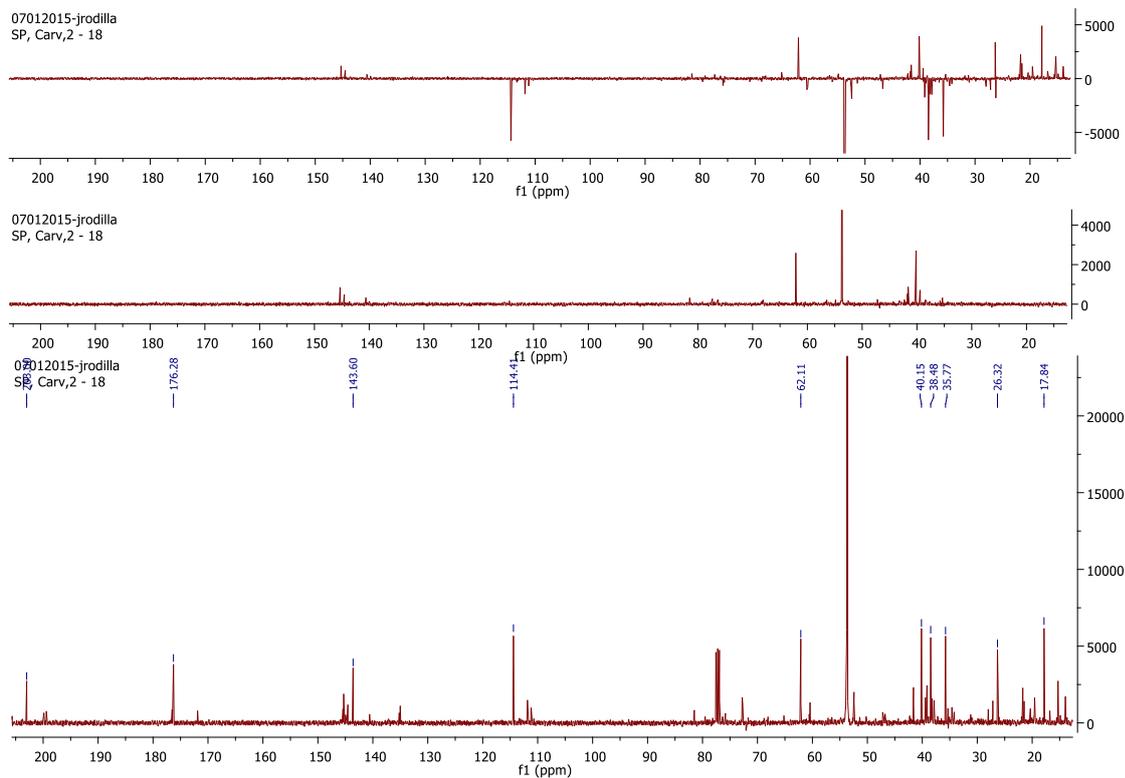
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 2



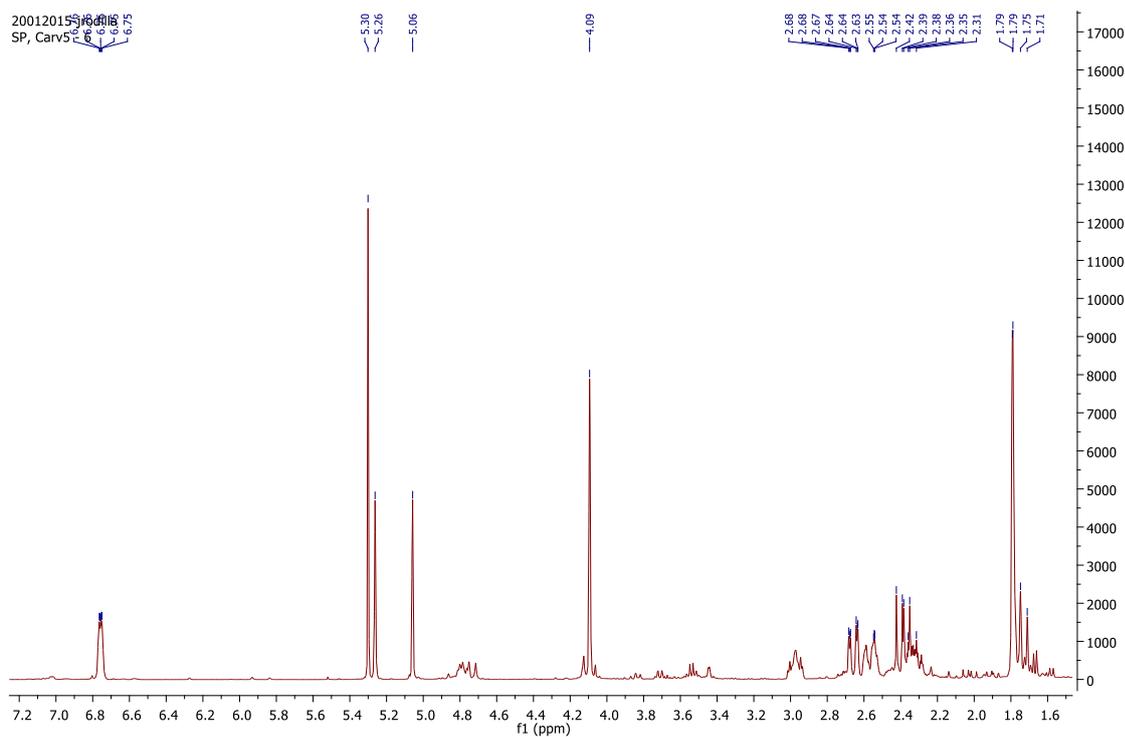
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 4



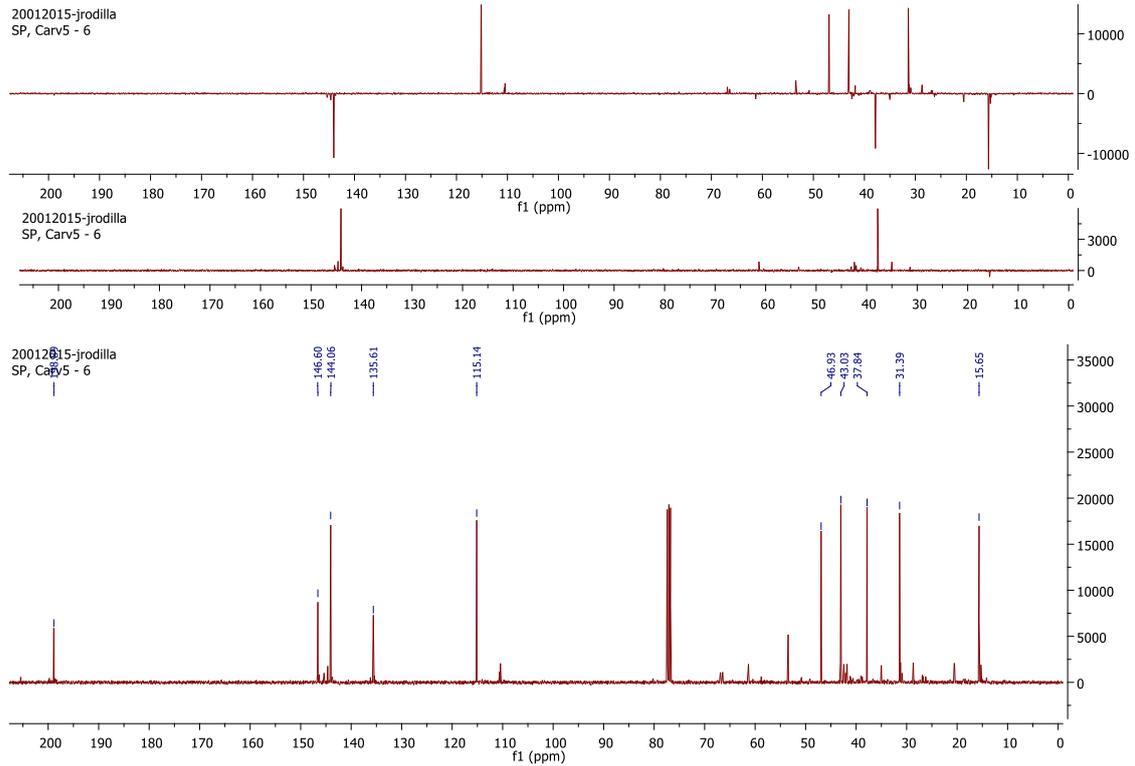
### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 4



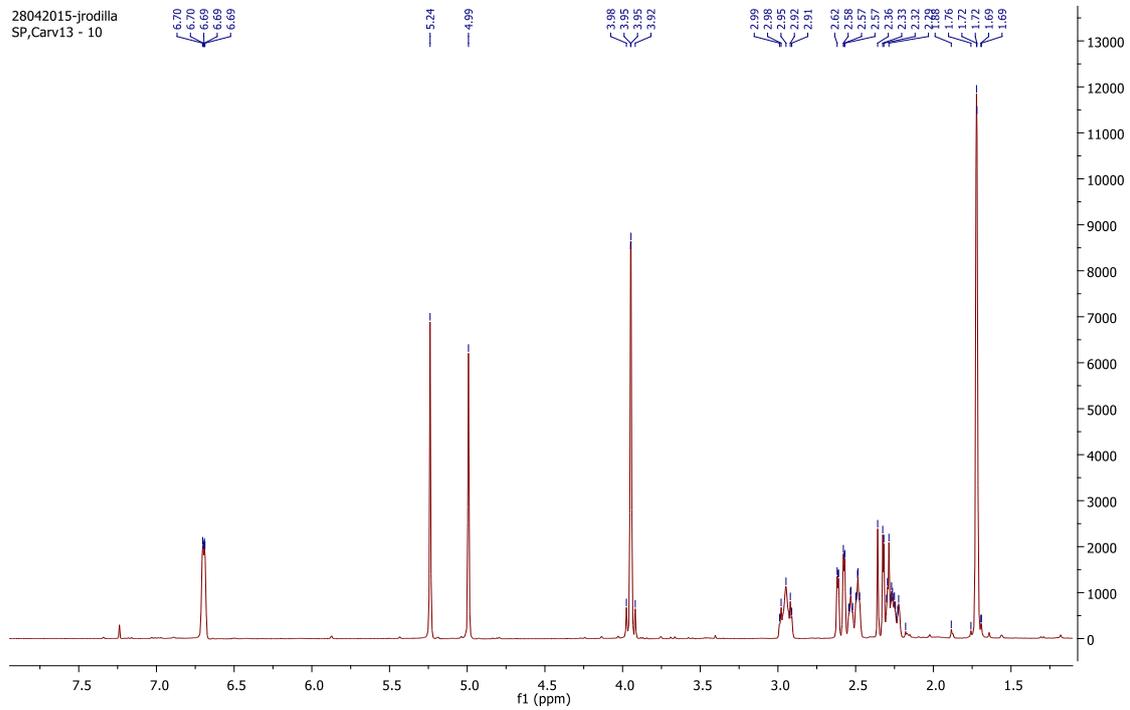
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 5



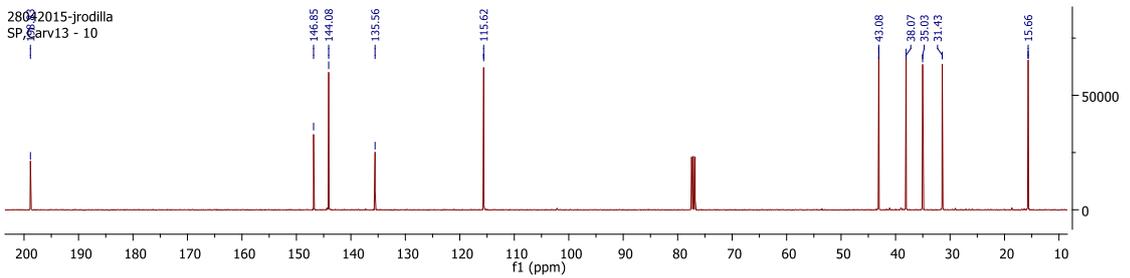
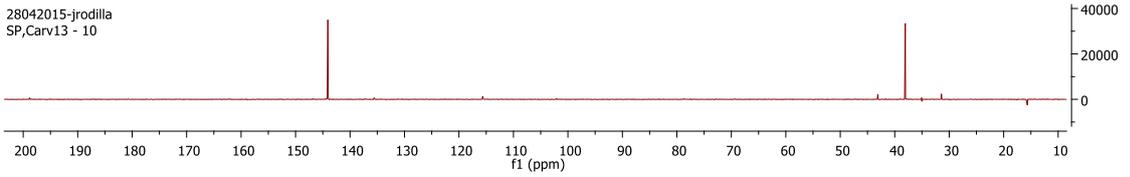
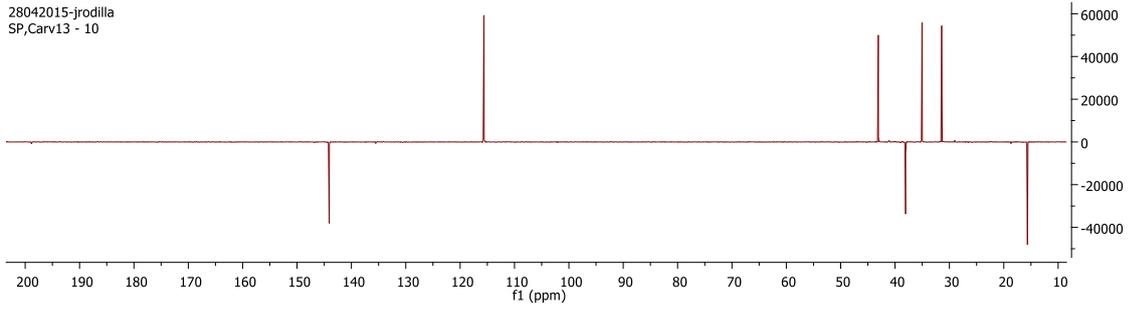
### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 5



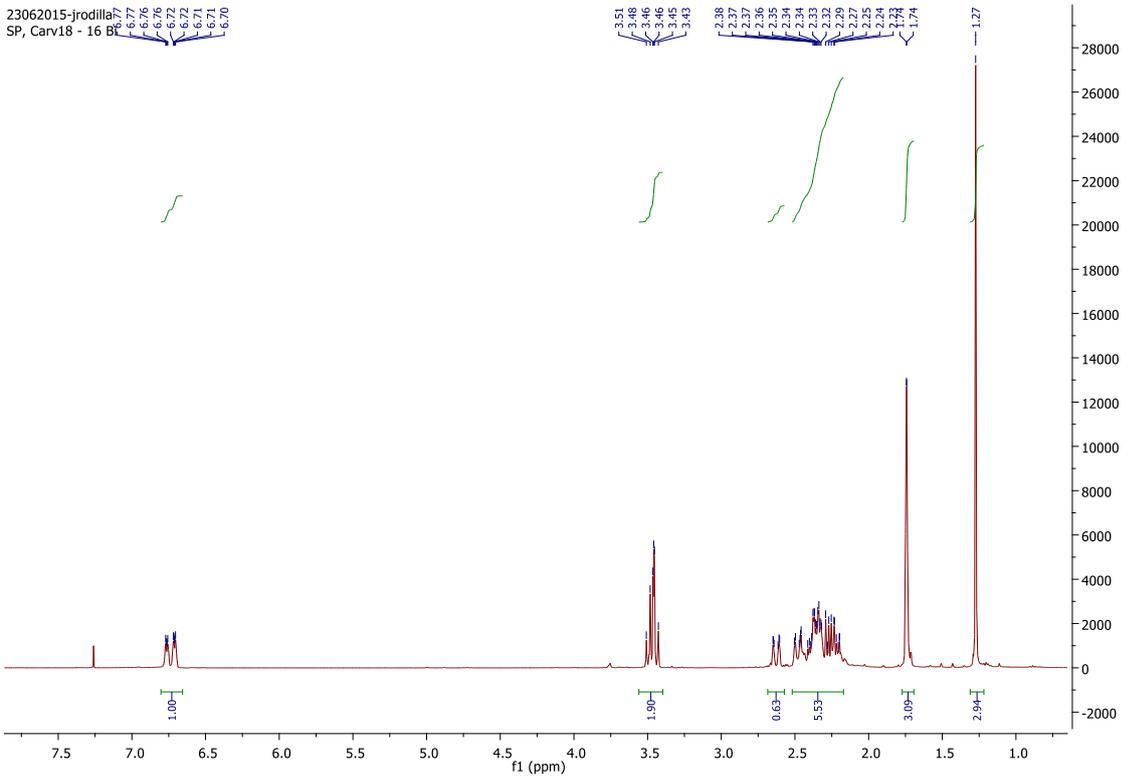
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 7



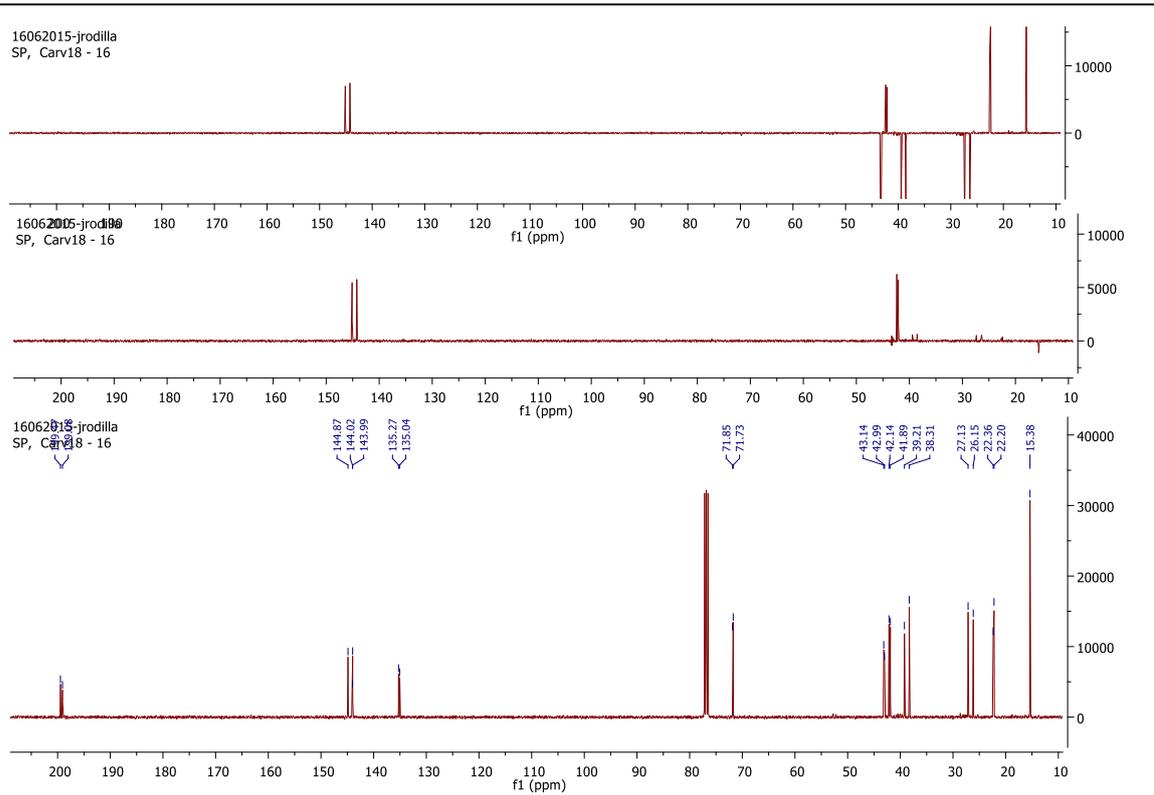
### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 7



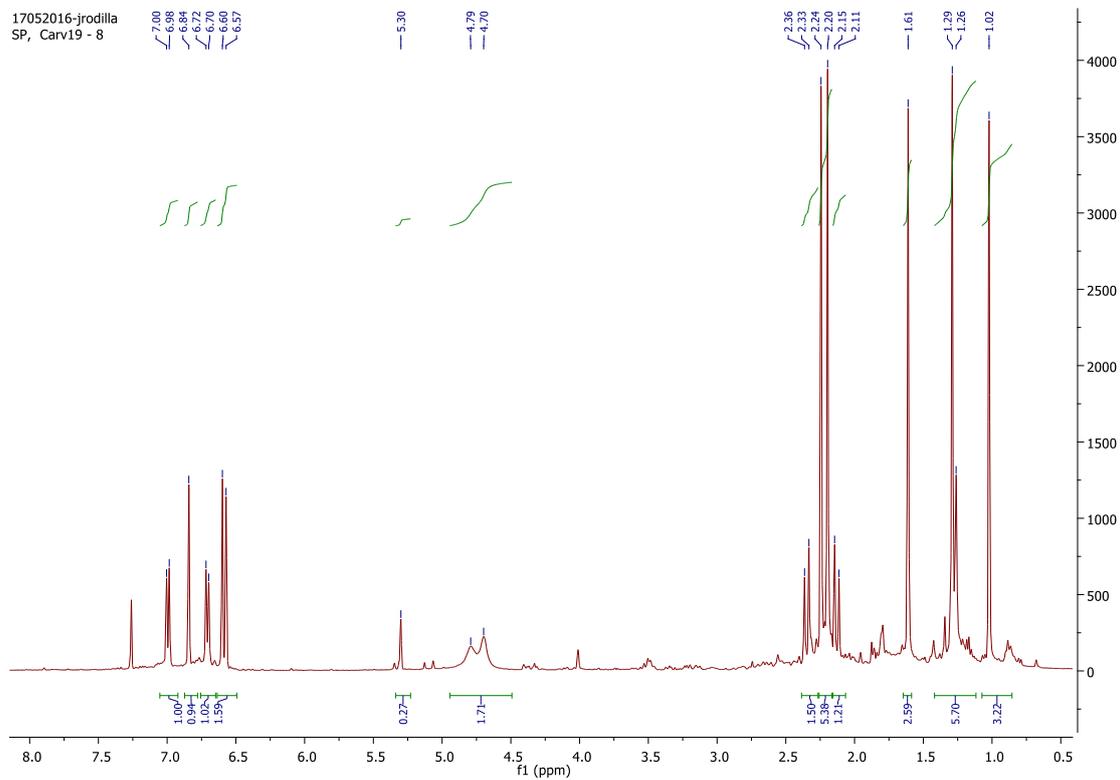
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 9



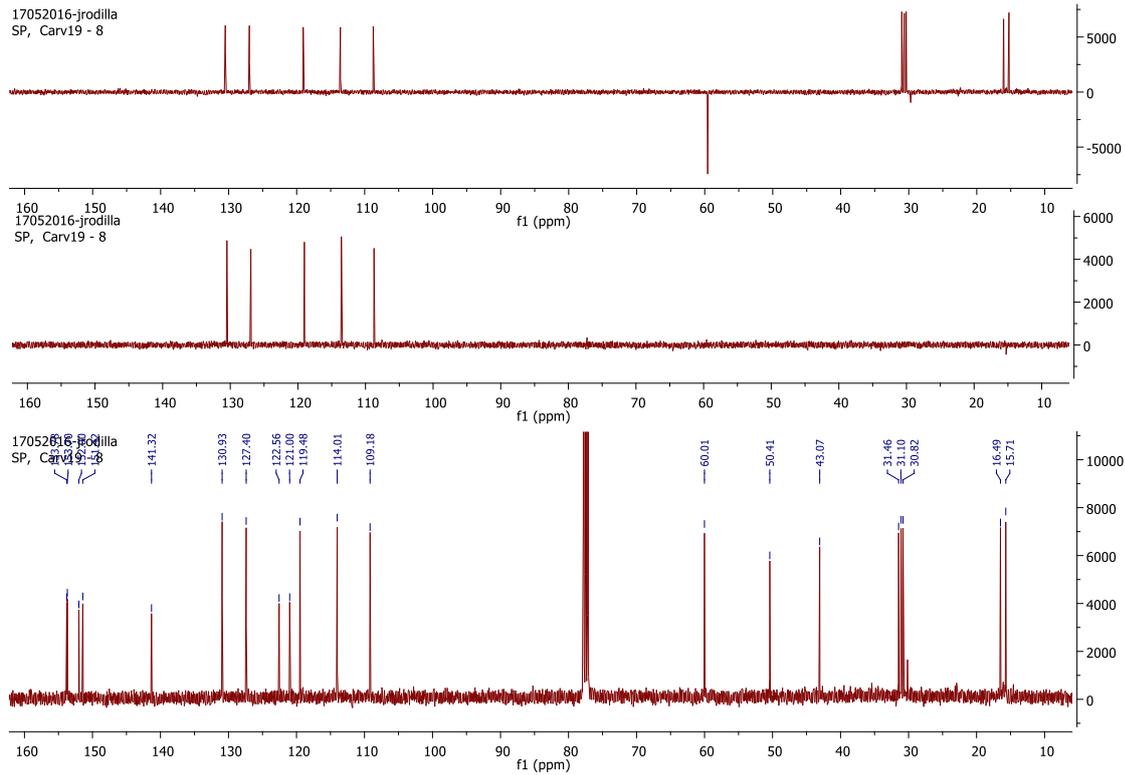
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 9



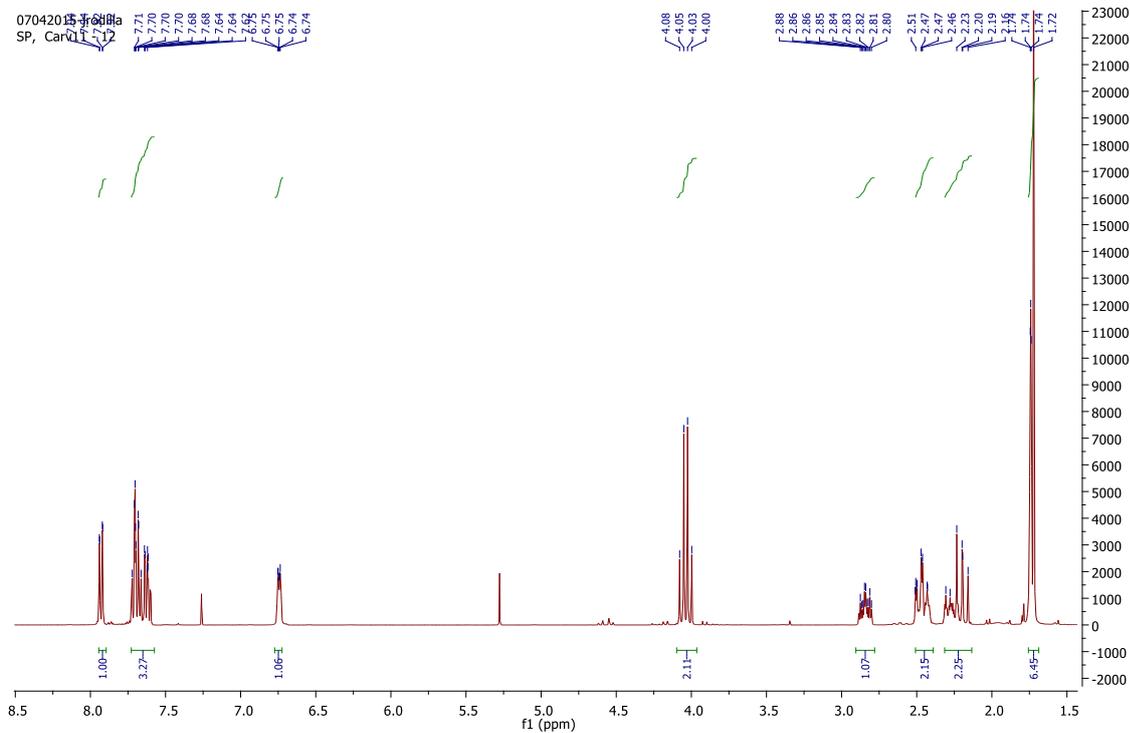
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 11



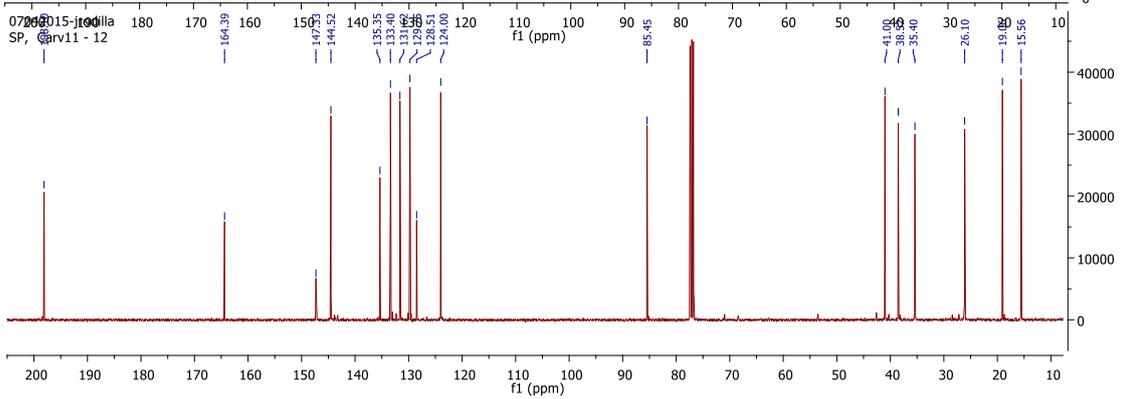
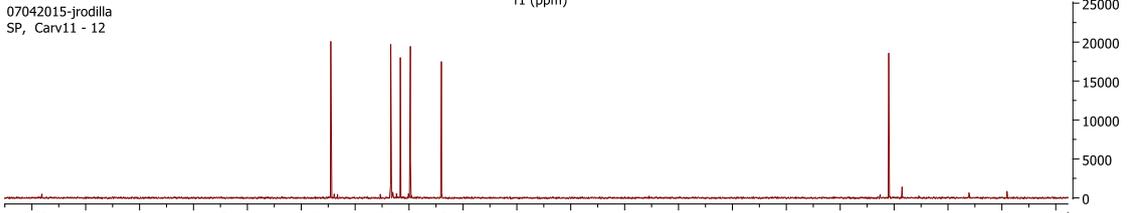
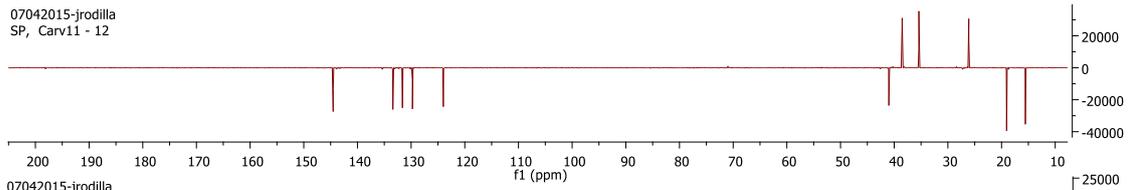
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 11



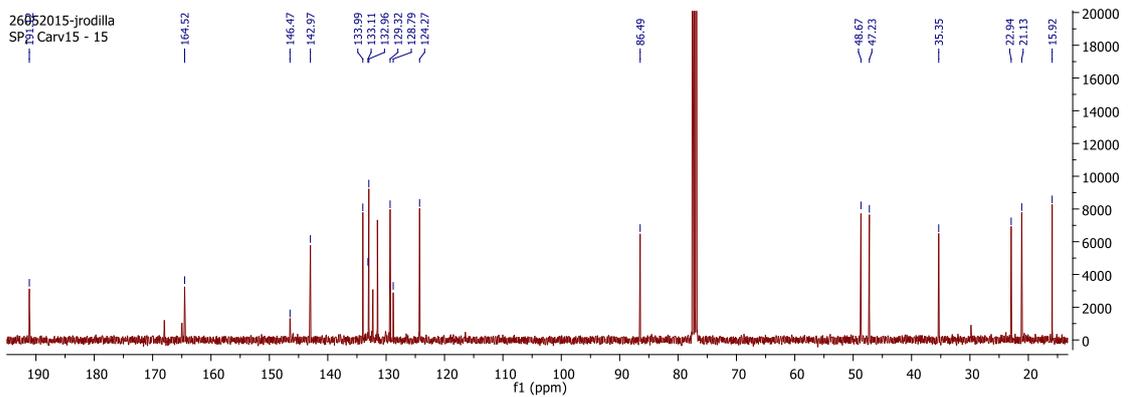
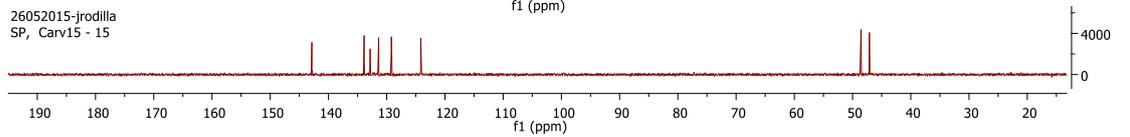
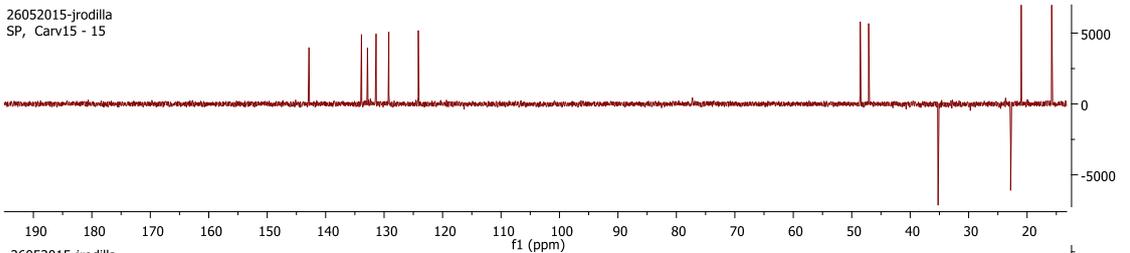
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 12



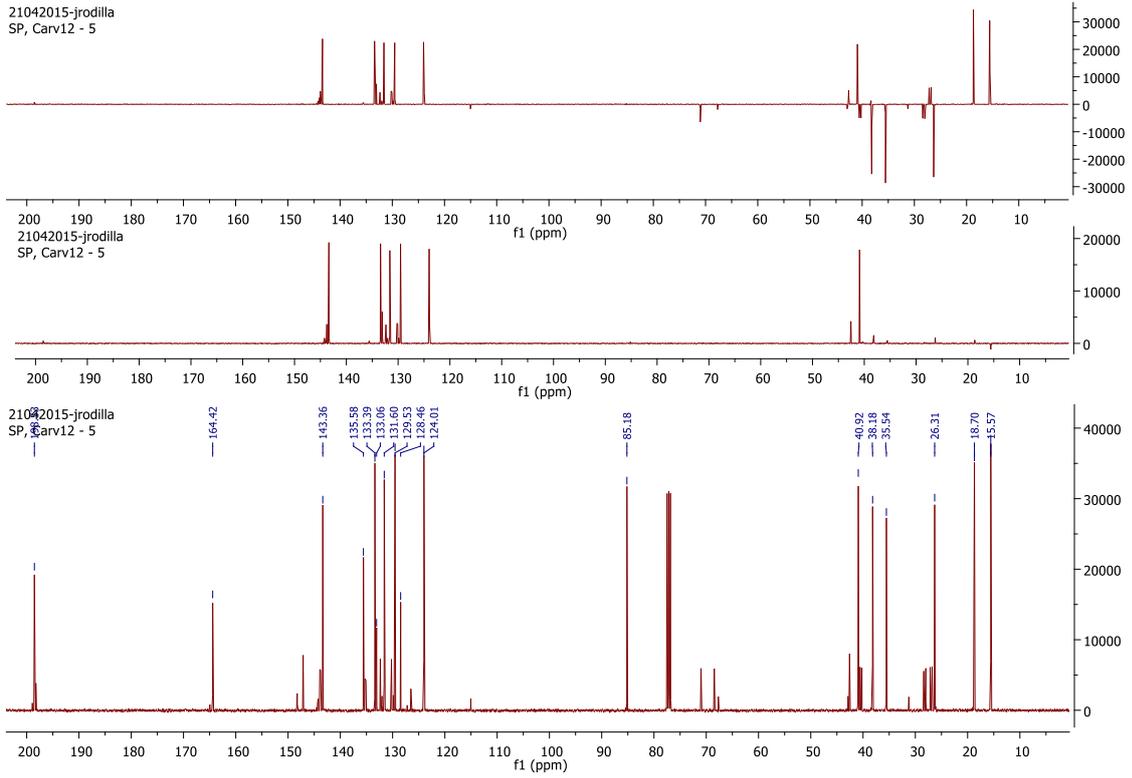
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 12



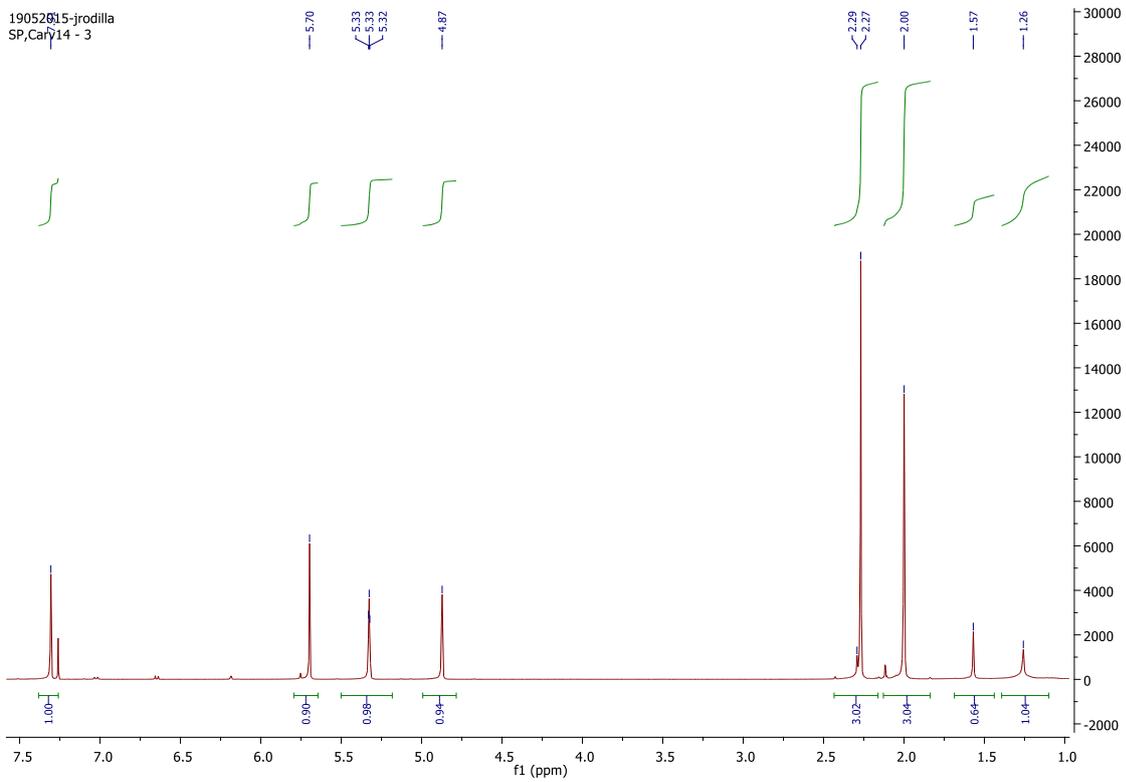
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 13



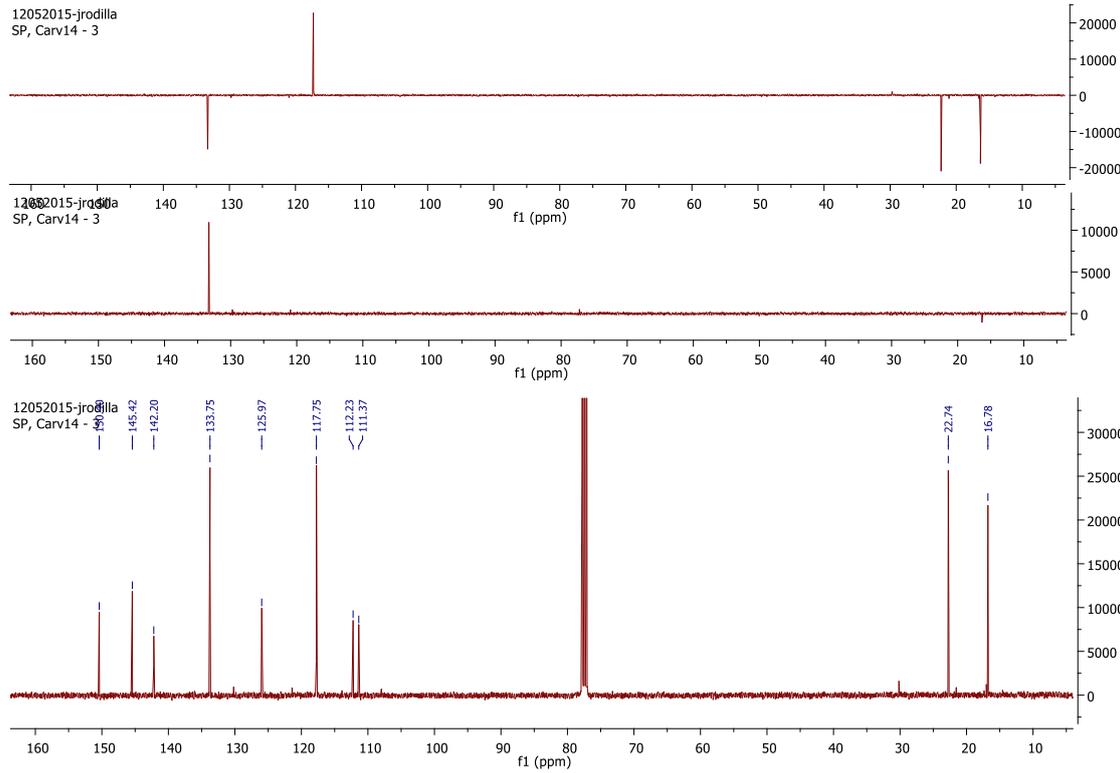
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 13



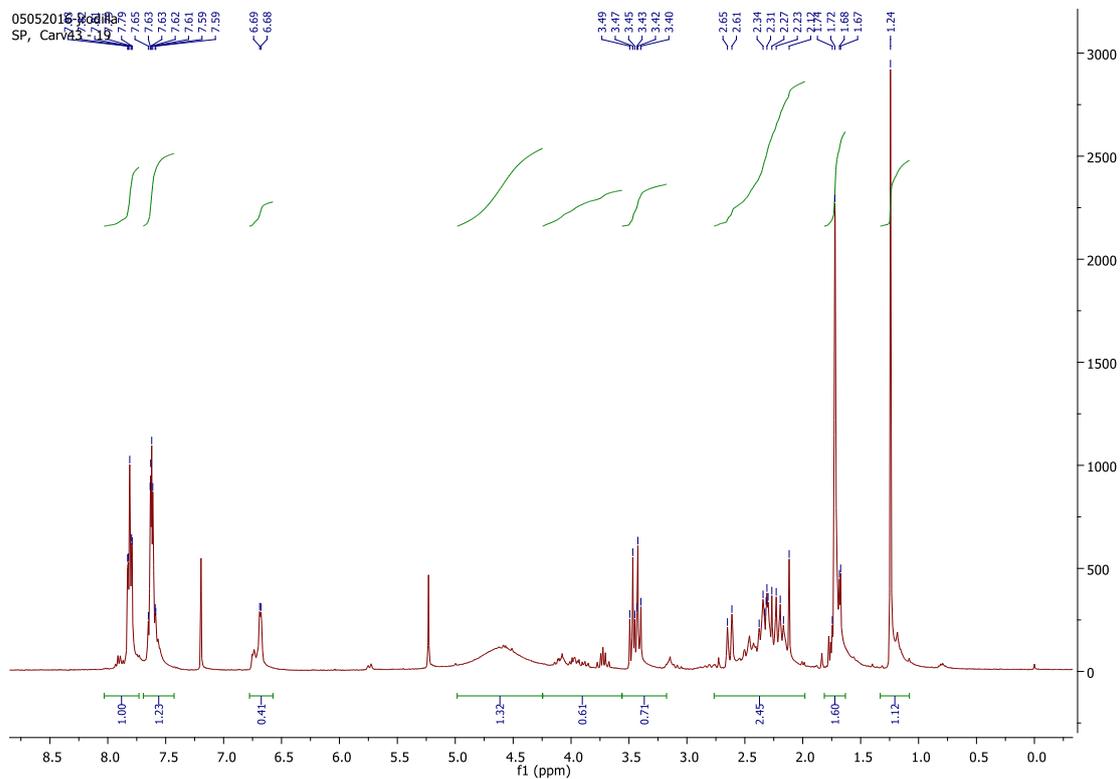
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 14



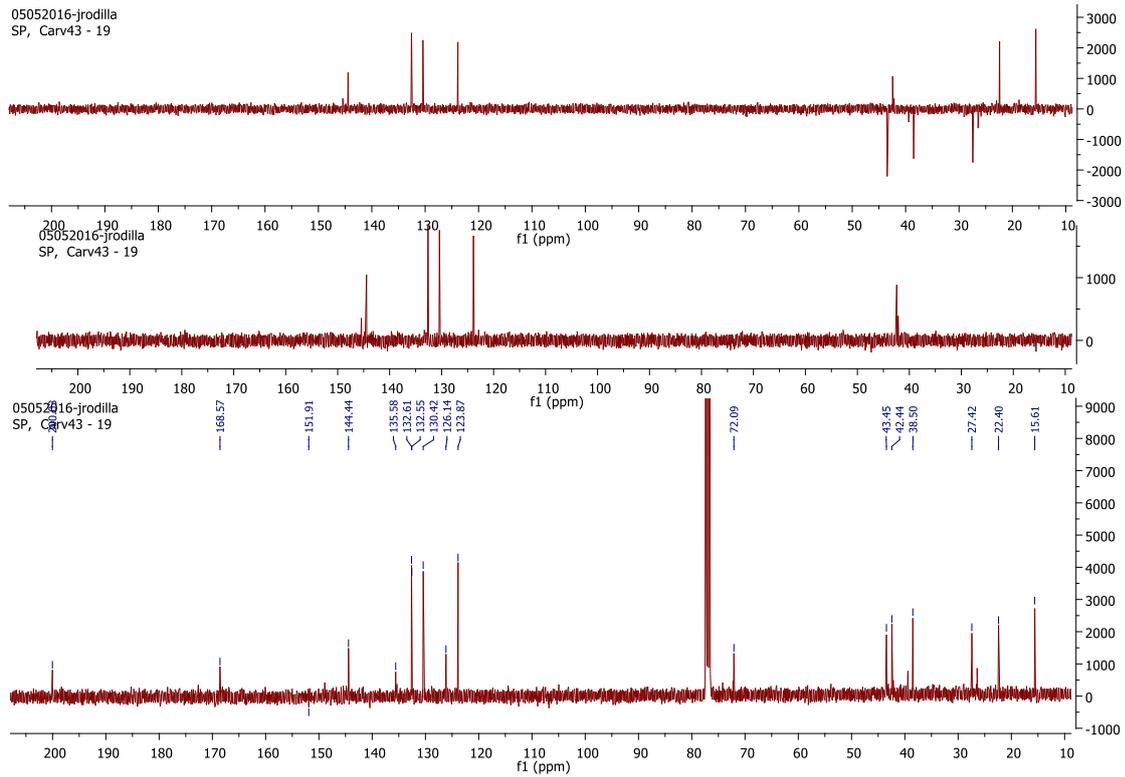
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 14



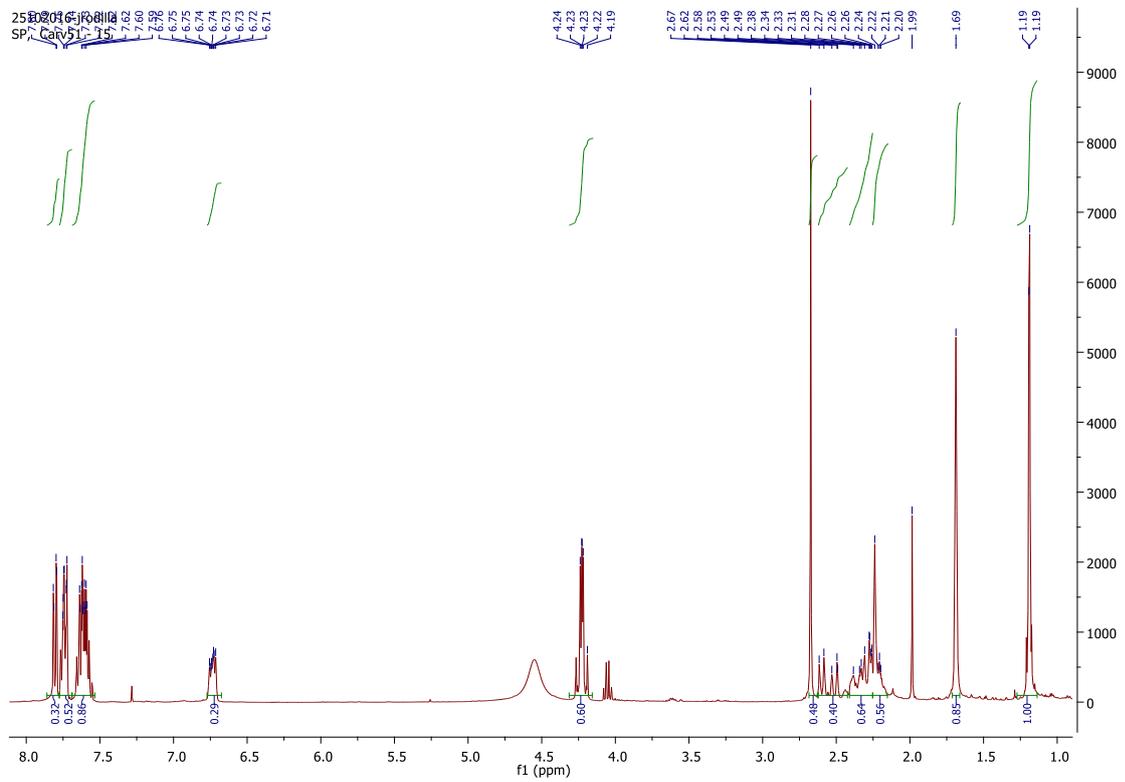
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 15



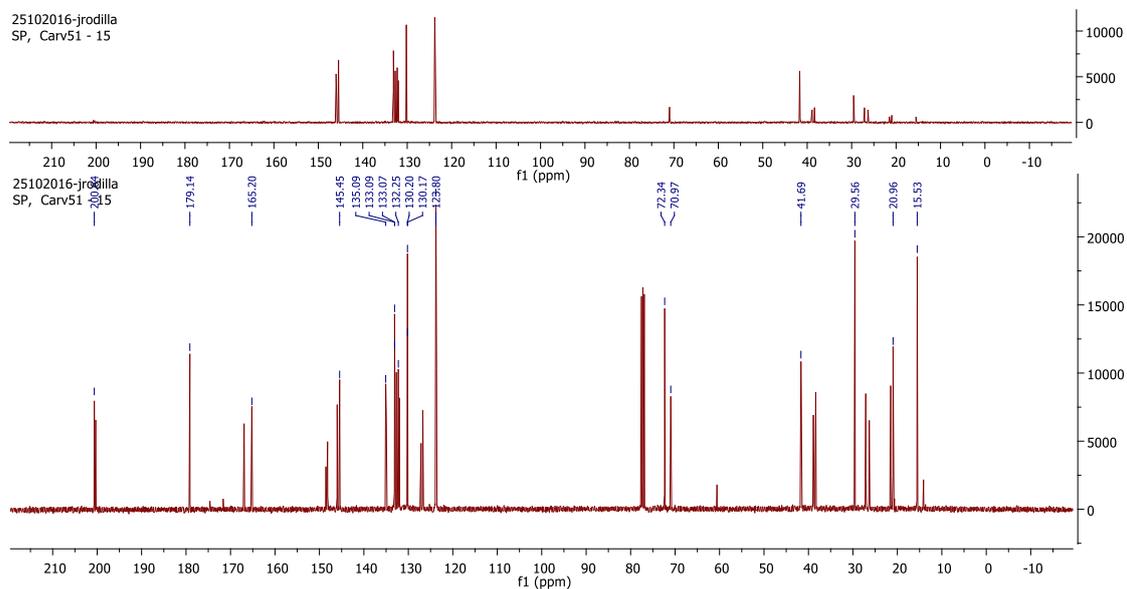
### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 15



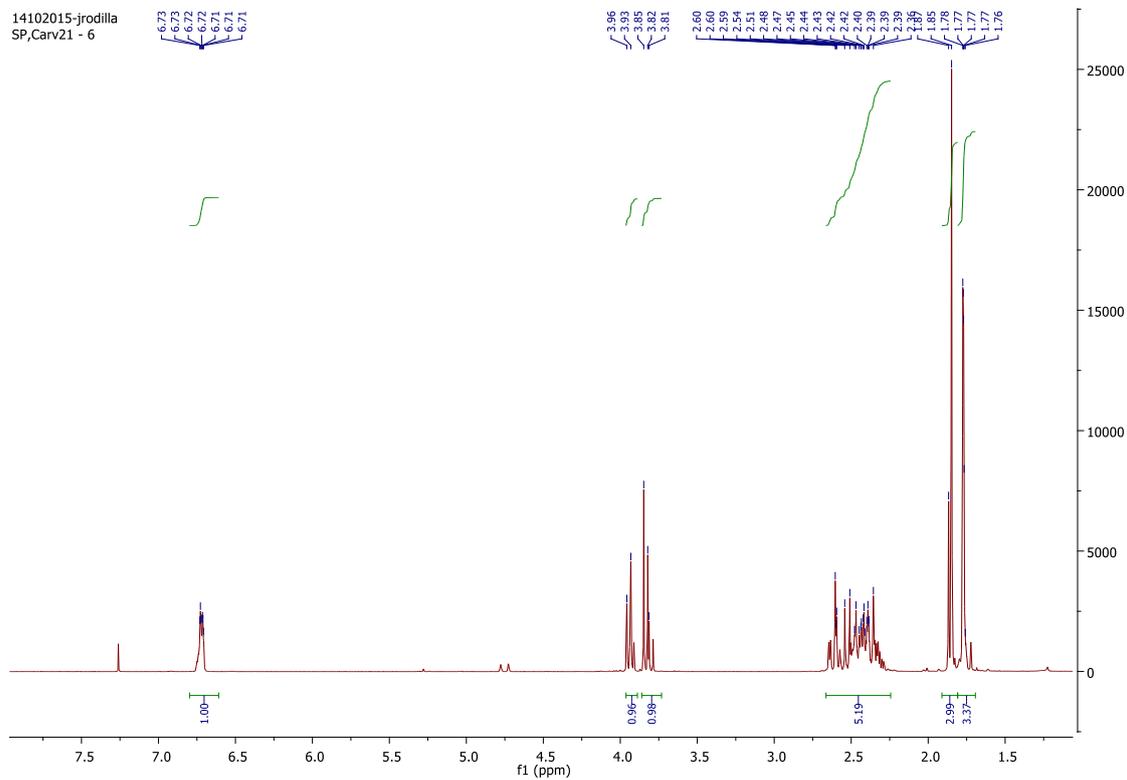
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 16



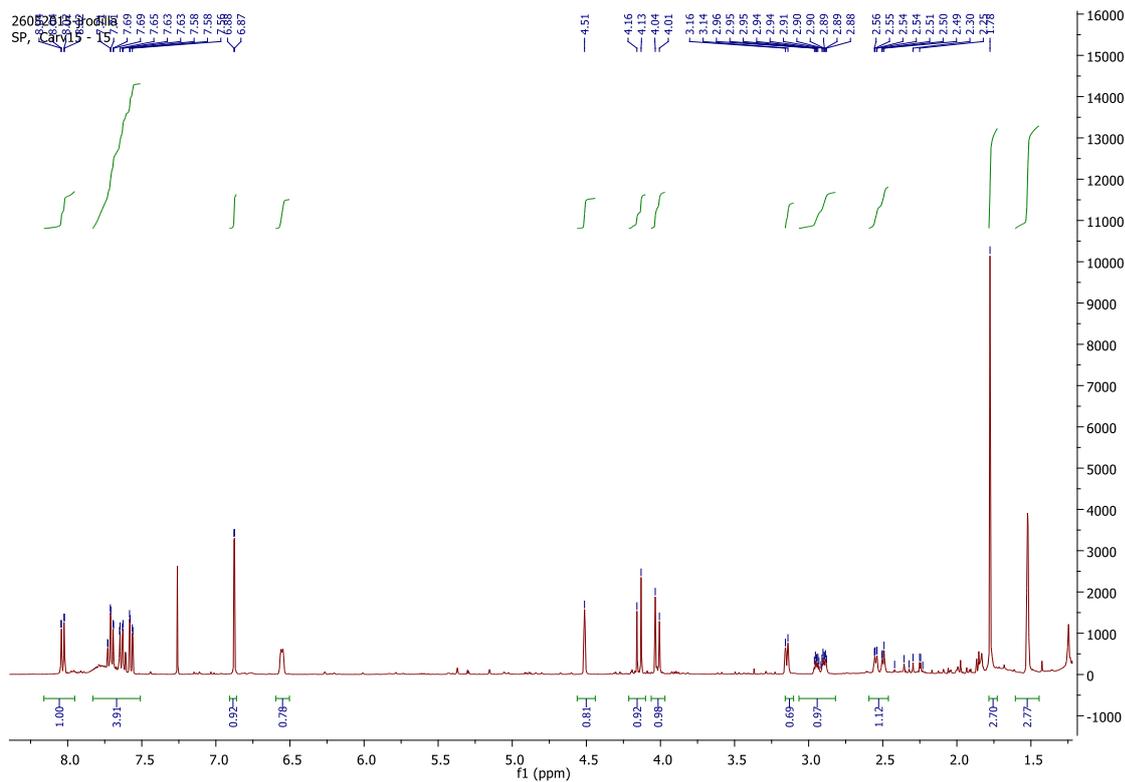
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 16



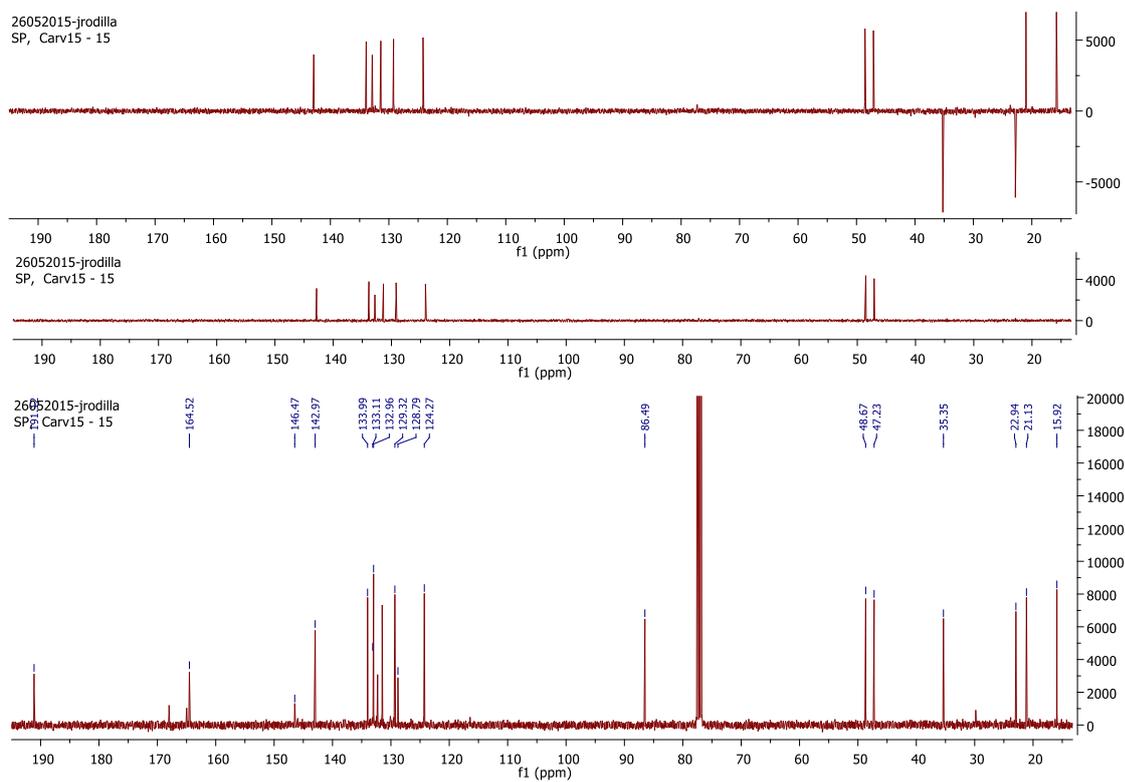
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 17



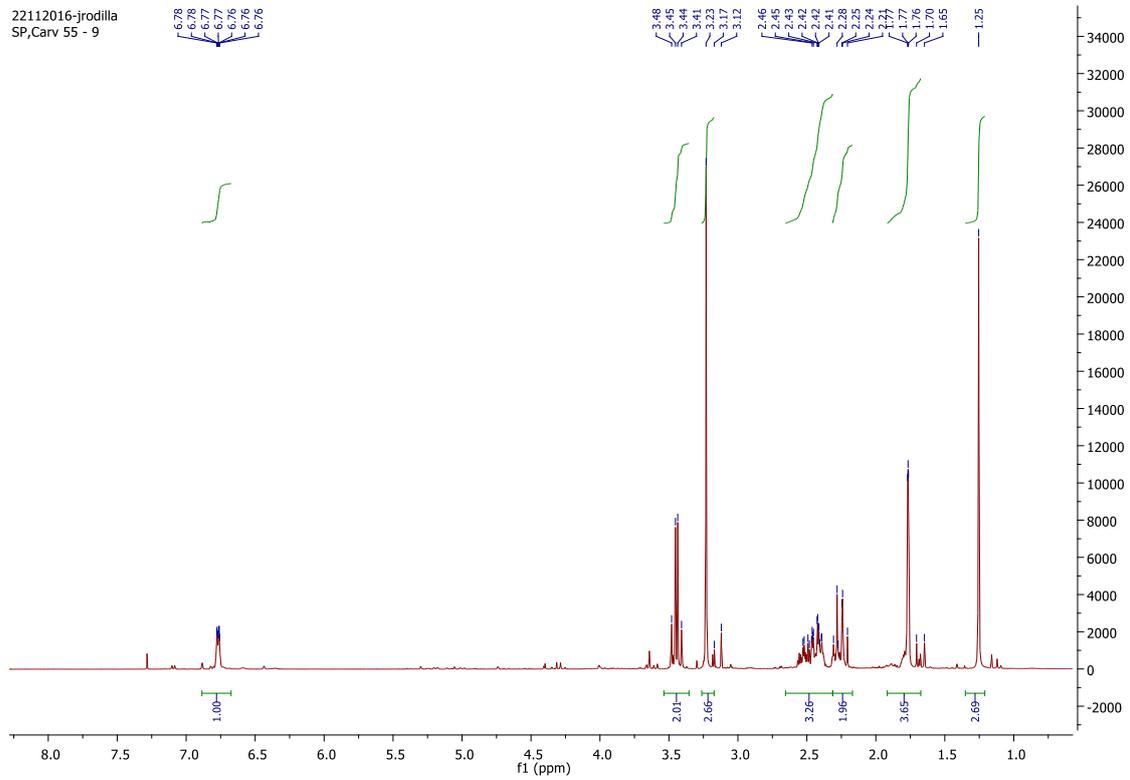
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 18



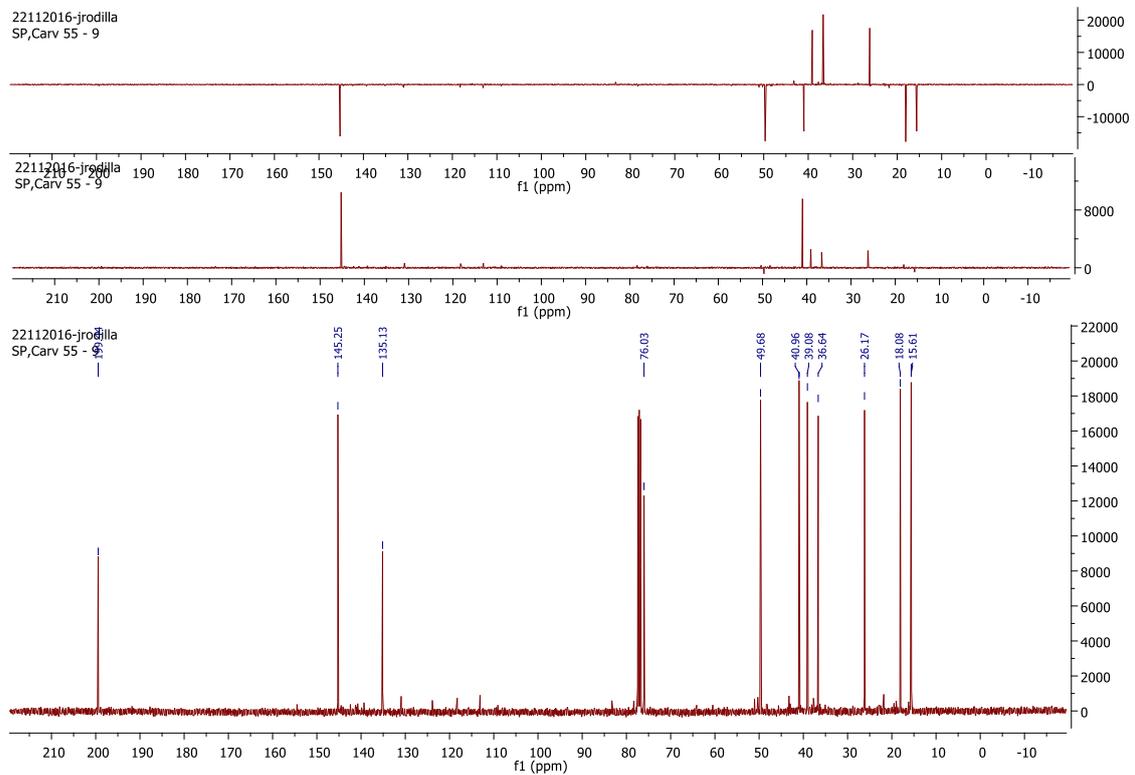
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 18



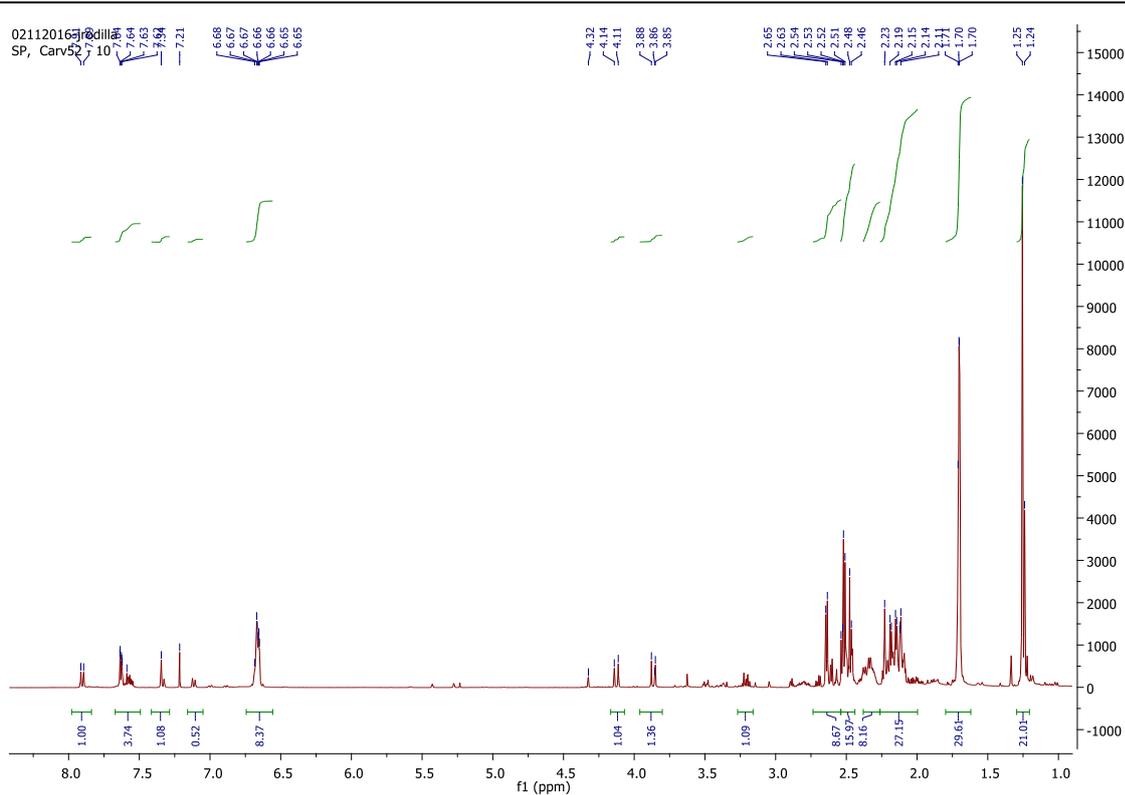
### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 19



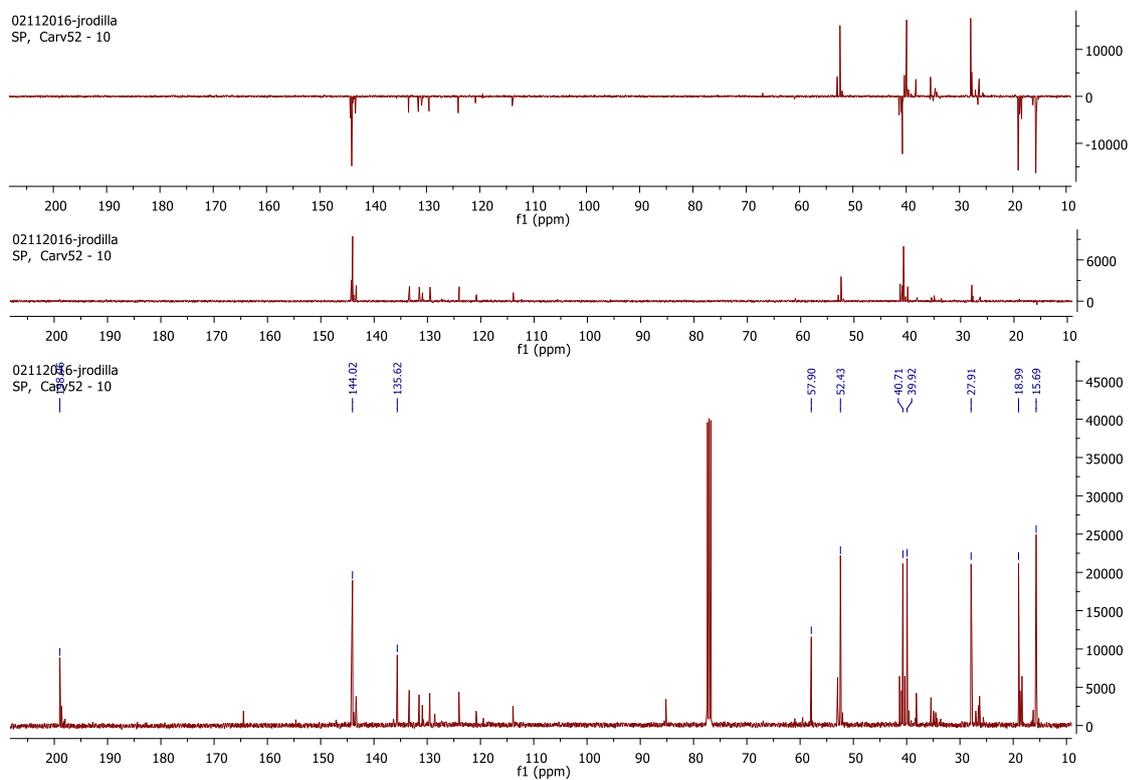
### Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto 19



### Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto 20

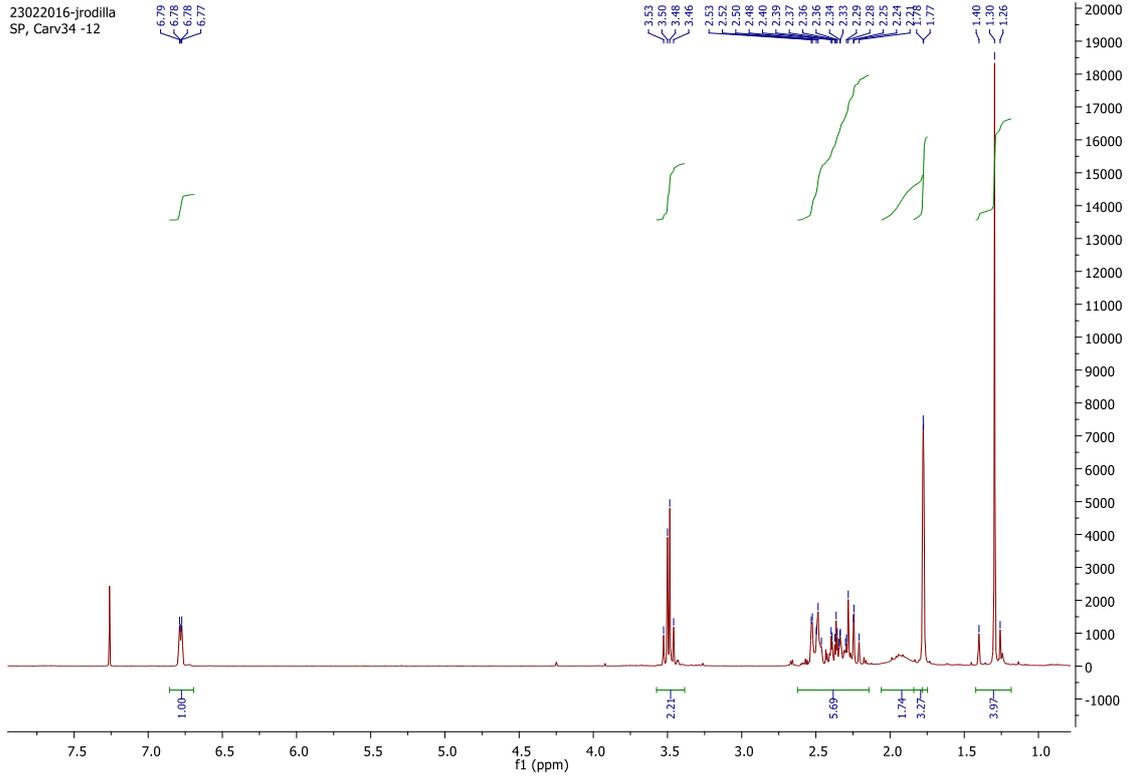


### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 20



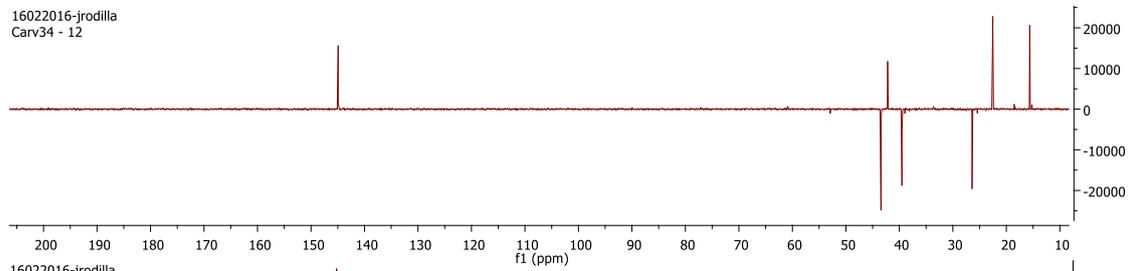
### Espectro $^1\text{H}$ -RMN do composto 22

23022016-jrodilla  
SP, Carv34 -12

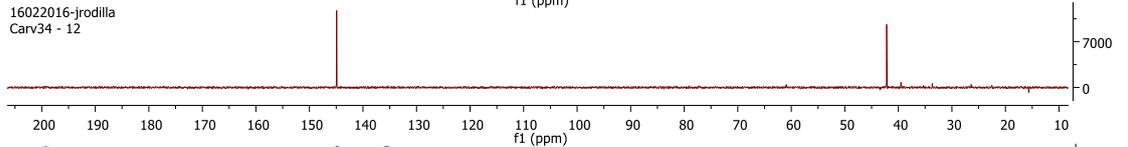


### Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 22

16022016-jrodilla  
Carv34 - 12



16022016-jrodilla  
Carv34 - 12



16022016-jrodilla  
Carv34 - 12

