

ÁCIDO *ENT*-16 α ,17-DIIDROXICAURAN-19-ÓICO ISOLADO DE *OURATEA SEMISERRATA* E OS DESAFIOS ESTEREOQUÍMICOS DOS CARBONOS QUIRAIS C-4 E C-16

Javier Rincón Velandía, Mário Geraldo de Carvalho

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - 23851-970 - Seropédica - RJ

Raimundo Braz-Filho

Setor de Química de Produtos Naturais - Laboratório de Ciências Química - CCT - Universidade Estadual do Norte Fluminense - 28015-620 - Campos - RJ

Recebido em 19/3/97; aceito em 8/10/97

***ENT*-16 α ,17-DIHYDROXYKAURAN-19-OIC ACID ISOLATED FROM *ORATEA SEMISERRATA* AND THE STEREOCHEMISTRY DEFIANCES OF THE CHIRAL CARBONS C-4 AND C-16.** Phytochemical investigation of the leaves and branches of a specimen of *Ouratea semiserrata* led to the isolation and characterization of *ent*-16 α ,17-dihydroxykauran-19-oic acid, along with other natural products. This diterpenoid and its derivatives were used to unambiguous ^1H and ^{13}C chemical shifts assignments and to indicate some mistake data described in the literature as consequence mainly of the stereochemicals of the chiral carbons C-4 and C-16. The HRMS spectra were also analysed.

Keywords: *Ouratea semiserrata*; Ochnaceae; *ent*-16 α ,17-dihydroxykauran-19-oic acid; ^1H and ^{13}C spectral data; HRMS spectra.

INTRODUÇÃO

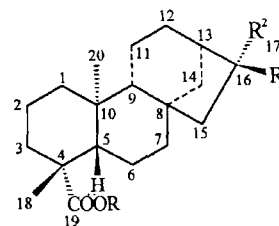
A investigação química de um espécimen de *Ouratea semiserrata*, família Ochnaceae, conduziu ao isolamento do ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1**), além de outros terpenóides, derivados da β -D-glicopiranosose, rutina (flavonóide glicosilado), biflavonóides e lignóides.

A família Ochnaceae apresenta-se constituída de 600 espécies distribuídas em 39 gêneros encontrados em regiões pantropicais. No Brasil podem ser encontradas 53 espécies^{1,2}. O nosso interesse pelo gênero *Ouratea* começou com a investigação química da espécie *Ouratea hexasperma*, que conduziu ao isolamento e elucidação estrutural de bisflavonóides³ e uma biflavona (**2**) com atividade inibidora do crescimento de células tumorais⁴.

Após a definição estrutural do diterpeno caurânico **1** com base na interpretação de dados espectrais, principalmente os fornecidos pelos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C) uni- (1D) e bidimensional (2D)⁵, verificou-se a existência de informações de RMN ^{13}C e estereoquímicas registradas na literatura que requerem reavaliação. Esta constatação promoveu a necessidade de preparar uma publicação restringindo-se particularmente ao ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1**) e seus derivados **1a-1c**, incorporando-se informações importantes para possibilitar avaliações de dados de RMN ^{13}C e estereoquímicos encontrados na literatura (e.g.)⁶⁻¹², na tentativa de evitar, ou no mínimo reduzir, a utilização de dados equivocados.

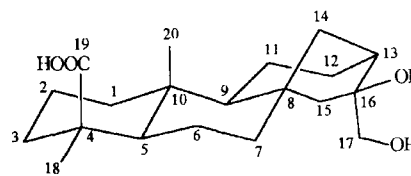
Artigos publicados em periódicos estrangeiros conceituados estabeleceram uma confusão sobre as estereoquímicas α (abaixo do plano estereoquímico) e β (acima) de grupo hidroxila localizado no átomo de carbono C-16 de diterpenos 16,17-diidroxicaurânicos e na definição dos carbonos 18 e 19 sustentados pelo carbono C-4. Estes fatos serviram como estímulo para uma abordagem destes aspectos estereoquímicos. A montagem de moléculas com modelo molecular permite definir com relativa facilidade estas configurações e afastar a confusão observada na literatura.

O prefixo *ent*- representa *enantio*- da palavra enantiômero e revela inversão de configuração de todos os centros quirais envolvidos numa substância com configuração absoluta definida; *rel*- (relativa), ou asterisco (*), é usado para indicar configuração relativa quando a absoluta ainda não se encontra

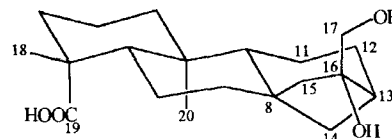


	R	R ¹	R ²
1	H	OH	CH ₂ OH
1a	H	OH	CH ₂ OAc
1b	Me	OH	CH ₂ OAc
1c	Me	OAc	CH ₂ OAc
3	H	CH ₂ OH	OH

estabelecida. Os estereoisômeros dos ácidos 16,17-diidroxicauran-19-óicos e 16,17-diidroxicauran-18-óicos podem ser analisados com base nas configurações absolutas (e.g.) dos ácidos 16 β ,17-diidroxicauran-19-óico (**1d**) e *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1e**, enantiômero de **1d**). No diterpeno **1d** o carbono C-16 tem configuração S e no **1e** R.



1d



1e

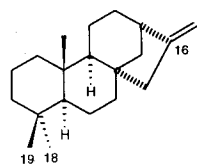
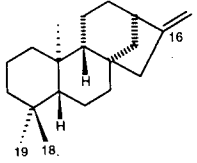
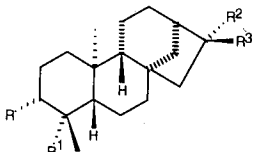
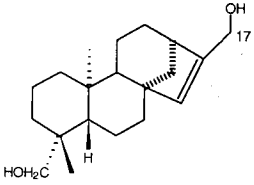
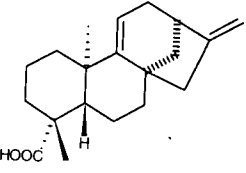
Os aspectos estereoquímicos dos ácidos 16,17-diidroxicauran-18- e 19-óicos destacados neste artigo podem ser analisados através do seguinte resumo: i) na configuração **1d** o grupo hidroxila localizado no C-16 (HO-16) ocupa posição β e o carbono C-16 tem configuração S; na configuração *ent-1e* (enantiômero de **1d**) o grupo HO-16 tem orientação α e o carbono 16 a configuração R; ii) a numeração correta dos carbonos 18 e 19 sustentados pelo átomo de carbono C-4 pode ser assegurada pelas orientações equatorial (C-18) e axial (C-19) e/ou pela estereoquímica *cis* (C-18) e *trans* (C-19) em relação a H-5, como se observa no Quadro 1 e nos estereoisômeros configuracionais **1d** e **1e**.

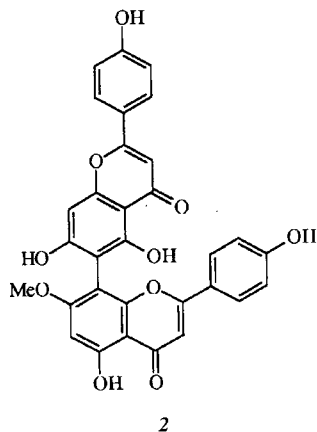
As configurações absolutas destes diterpenóides podem ser estabelecidas com base nos valores negativos (-) e positivos (+) da rotação específica ($[\alpha]_D$), já que podem ser correlacionadas com as configurações absolutas definidas para diterpenos análogos da mesma classe dos cauranóides. O Quadro 1 reúne alguns diterpenos caurânicos e caurênicos com configurações

absolutas estabelecidas e os correspondentes valores de $[\alpha]_D^{14a}$. Os exemplos relacionados (Quadro 1) revelam que os diterpenos que desviam a luz polarizada para a esquerda (-) pertencem à configuração *ent*- (e.g. **1e**). O ácido *ent*-caura-9(11),16-dien-19-óico foi inserido no Quadro 1 para demonstrar que a presença de uma ligação dupla entre os átomos de carbono 9 e 11 produz modificação suficiente para desviar a luz polarizada para a direita ($[\alpha]_D^+$), servindo como sinal de alerta para os cuidados que devem ser assumidos quando se utiliza como critério único a rotação específica $[\alpha]_D$.

Assim, as orientações α e β atribuídas ao grupo hidroxila sustentado pelo carbono 16 dos dois epímeros isolados de *Annona squamosa*⁶ devem ser corrigidas, sendo o ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico o responsável pela atividade contra HIV e não o seu epímero 16 β . Em outras palavras, a substância **2** descrita nesse artigo⁶ é o ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico, diterpeno idêntico ao relatado neste artigo (**1**) como constituinte de *Ouratea semiserrata*.

Quadro 1. Diterpenos caurânicos e caurênicos com configurações absolutas definidas^{14a}.

	$[\alpha]_D$	Nome
	+74,0°C(c, 2,8 em CHCl ₃) ^b	Caur-16-eno
	-80,0°C(c, 1,0 em CHCl ₃) ^b	<i>ent</i> -Caur-16-eno
		
R	-84,2°(c, 1,05 em CHCl ₃)	<i>ent</i> -Caur 16-en-19-al
H CHO CH ₂ H	-108,0°(c, 4,0 em EtOH)	Ácido <i>ent</i> -16 β -caurano-17,19-dióico
H COOH COOH H	-45°(c, 0,9 em CHCl ₃)	<i>ent</i> -16 β -Cauranol
H Me OH H	-39°(c, 1,35 em piridina)	<i>ent</i> -16 β -Caurano-3 β ,17,19-triol
OH CH ₂ OH CH ₂ OH H	-66°(c, 1,66 em CHCl ₃)	<i>ent</i> -Caur-16-eno-3 β ,19-diol
OH CH ₂ OH CH ₂		
	-37°(EtOH)	<i>ent</i> -Caur-15-eno-17,19-diol
	+32,1°(c, 0,39 em CHCl ₃)	Ácido <i>ent</i> -caura-9(11),16-DIEN-19-óico



O diterpeno caurânico **1** isolado de *Annona squamosa*, idêntico ao bioproduzido pela *Ouratea semiserrata*, revelou significativa atividade inibidora da replicação do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) em células linfócitas H9, com um valor de $EC_{50} = 0.8 \mu\text{g/ml}$ (índice terapêutico > 5)⁶. Estes resultados devem servir como estímulo adicional para despertar um maior interesse nas investigações biológicas das substâncias naturais bioproduzidas pelo quimismo envolvido no metabolismo secundário (especializado) dos organismos vivos. Este ácido foi descrito pela primeira vez em 1965 como bioconstituente de *Beyeria spp* e *Ricinocarpus stylosus*¹⁴. Uma substância natural conhecida desde 1965 foi submetida a investigação de atividade biológica somente em 1996 (31 anos depois!). Outros exemplos análogos poderiam ser citados mas escapam do objetivo principal deste artigo¹⁵.

O ácido *ent-16 α ,17*-diidroxicauran-19-óico (**1**) isolado de *Ouratea semiserrata* e seu derivados **1a-1c** obtidos por reações de acetilação e metilação, estão sendo utilizados neste artigo para incorporar dados corretos na literatura, que podem ser usados para avaliar comparativamente as informações contidas em outras referências bibliográficas. A tarefa irrecusável de revisão de dados que requerem modificação para manter atualizadas as informações na literatura, reconhece a contribuição importante dos artigos citados como mensageiros históricos para o desenvolvimento científico, particularmente para a química de produtos naturais.

Aproveitamos também este artigo para descrever uma metodologia para dedução de fórmula molecular através da análise de métodos espectrométricos e contribuir nos trabalhos de elucidação estrutural de substâncias orgânicas conhecidas e inéditas. Esta metodologia destina-se particularmente aos jovens envolvidos e empenhados nas atividades de pesquisa que incluem determinação estrutural.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

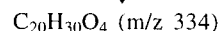
O diterpeno **1** foi isolado do extrato metanólico das folhas de *Ouratea semiserrata* após partição em CHCl_3 e a utilização de métodos cromatográficos. O espectro IV revelou bandas compatíveis com grupos hidroxila (ν 3346 cm^{-1}) e carboxílico [ν 1692 (C=O) e 3000-2500 (OH)].

Análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C de **1** com desacoplamento de hidrogênio (PND= Proton Noise Decoupled) e com a modulação de sinal do carbono pela interação com átomos de hidrogênio e transferência de polarização do ^1H para o ^{13}C [DEPT= Distortionless Enhancement by Polarization Transfer: $\theta=90^\circ$, somente sinais de CH; $\theta=135^\circ$, sinais de CH_2 em fase oposta de CH e CH_3 ; sinais de C (carbonos quaternários) deduzidos pela ausência nos espectros obtidos pelas experiências com $\theta=90^\circ$ e $\theta=135^\circ$]^{5,16} permitiu reconhecer a presença de vinte sinais no espectro de RMN ^{13}C -PND, observando-se a

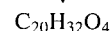
presença de quinze sinais de carbono sp^3 ligados a hidrogênio nos espectros de RMN ^{13}C -DEPT: três metínicos, dez metilênicos (um oxigenado: δ 69,44) e dois metílicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas (PND e DEPT) indicou a existência de cinco sinais ($20-15=5$) correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um sp^2 carboxílico [δ_{C} 178,98; IV: 1692 cm^{-1}], um sp^3 oxigenado (δ_{C} 78,95) e três sp^3 inseridos num esqueleto carbônico (δ_{C} 43,41; 43,14 e 39,50). Estas deduções resumidas na Tabela 1 e as informações adicionais oriundas da interpretação dos espectros IV (OH, COOH), de RMN ^1H (Tabela 2), obtidas através da interpretação dos deslocamentos químicos e da multiplicidade dos sinais de hidrogênio, e de RMN ^{13}C , considerando-se os efeitos que influem nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (Tabelas 1 e 2), forneceram dados para deduzir a fórmula "quasemolecular" através de análise elementar espectrométrica (Tabela 1). A fórmula molecular foi deduzida após a obtenção dos espectros de massas de **1** e **1a**, mesmo na ausência do pico correspondente ao íon molecular, como verificado nas condições operacionais (impacto eletrônico a 70 eV) usadas para obtenção do espectro do diterpeno **1**. No espectro de massas do diterpeno **1** observou-se os picos em m/z 318 (M- H_2O , 17%) e 305 (M- CH_2OH , 96%), que podem ser justificados através de íon molecular de m/z 336 (ausente) com relativa facilidade, principalmente contando com as informações contidas na Tabela 1.

Tabela 1. Atribuição dos sinais de átomos de carbono quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -PND e RMN ^{13}C -DEPT (em piridina- d_5) e informações para a dedução da fórmula molecular de **1**.

C	CH	CH_2	CH_3
178,98	56,36	69,44	28,92
78,95	56,13	52,57	15,61
43,41	40,63	41,95	
43,14		40,63	
39,50		37,99	
		37,99	
		26,94	
		21,85	
		19,15	
		18,85	
(COOH)	(CH) ₃	(O- CH_2)	(CH_3) ₂
(C-O)		(CH_2) ₉	
(C) ₃			
$\text{C}_5\text{C}_3\text{OH}$	C_3H_3	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$	C_2H_6



- i) Presença de heteroátomos deduzida pelos deslocamentos químicos dos sinais.
- ii) O número de átomos de oxigênio pode ser reduzido pela presença de funções éter e/ou lactona (IV importante), ausentes neste caso.
- iii) O número de átomos de hidrogênio pode ser aumentado pela presença de grupos hidroxila (IV importante), duas hidroxilas neste caso.



{ m/z 336 [M^{++}], ausente no espectro de massas mas deduzível com relativa facilidade [vide texto] }

Assim, a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$ deduzida através dos dados resumidos na Tabela 1 foi modificada para $C_{20}H_{32}O_4$ (m/z 336 [M.⁺], ausente no espectro de massas), incorporando-se os dois átomos de hidrogênio adicionais atribuídos à presença de dois grupos hidroxila. Com esta fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$ pode-se justificar com relativa facilidade os picos em m/z 318 ($C_{20}H_{32}O_4 - H_2O \rightarrow C_{20}H_{30}O_3$) e 305 ($C_{20}H_{32}O_4 - CH_2OH \rightarrow C_{19}H_{29}O_3$). A justificativa destes picos com base na fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$ (Tabela 1) implicaria nas diferenças de 16 daltons para a formação do fragmento com m/z 318 (M-O e/ou CH_4 , reações de fragmentação de ocorrência extremamente rara, que podem ser cogitadas somente em situações estruturais especiais que não oferecem outras alternativas) e de 29 daltons para m/z 305 (M-CHO e/ou M-Et e/ou M-CO-H e/ou M-H-CO e/ou M-H- $CH_2=CH_2$ e/ou M- $CH_2=CH_2-H$). Com base na interpretação dos dados disponíveis, a intensidade relativa do pico em m/z 305 (96%) não se coaduna com a fórmula molecular deduzida $C_{20}H_{30}O_4$ (Tabela 1), já que os de RMN 1H e ^{13}C não mostraram sinais compatíveis com a presença de

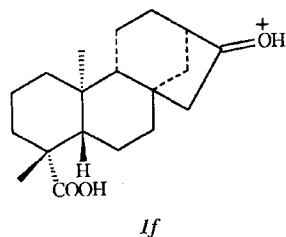
grupos etila (Et) e carbonila cetônica (C=O) ou aldeídica (CH=O) e o espectro de massas revelou a ausência de picos em M-28 e M-1. Além disto, o espectro IV indicou a presença de grupo hidroxila, justificando-se com relativa facilidade a presença do pico correspondente a M-18 (M- H_2O). Obviamente, a presença do pico correspondente ao ion molecular no espectro de massas, principalmente quando obtido sob condições de alta resolução (*vide infra*), torna mais fácil a interpretação conjunta com os dados espectrais contidos na tabela 1. A presença de pico correspondente a ion molecular de estabilidade relativamente baixa em espectrômetro de massas pode ser reconhecida através da utilização de técnicas de ionização mais suaves (FAB=Fast Atomic Bombardement→bombardeamento rápido com átomos; CI= Chemical Ionization→ionização química). O espectro de massas de alta resolução do derivado monoacetilado **1a** revelou o pico correspondente ao ion molecular em m/z 378,2725 [$C_{22}H_{34}O_5$ (m/z 378,2397; $\Delta m/z$ 0,0328), 0,8%] após a ampliação da intensidade pelo valor 10. Os picos em m/z 360 (M- H_2O), 318 (M-AcOH), 305,1964 [$C_{19}H_{29}O_3$ (m/z 305,2109;

Tabela 2. Dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C dos diterpenos **1** (DMSO- d_6) e **1b** (CDCl $_3$) [deslocamentos químicos em δ (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz]*

1				1b				
	$^1H \times ^{13}C$ -COSY- $^1J_{CH}$		$^1H \times ^{13}C$ -COSY- $^nJ_{CH}$		HMQC		HMBC	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
4	43,14	-	3H-18		43,72	-	H-5,3H-18	H-2
8	43,41	-	H-9		43,77	-	H-7,H-9,H-14	H-6
10	39,50	-	2H-17		39,45	-	H-1,3H-20	H-6
16	78,95	-	2H-17		78,56	-	2H-15,H-17b	
19	178,98	-		H-5,3H-18	178,07	-		H-5,3H-18,MeO
AcO-17		-			171,40	-	Me do Ac	2H-17
CH								
5	56,36	1,1-0,8(m)		3H-18	56,83	1,02		H-9,3H-18
9	56,13	1,1-0,8(m)		3H-20	55,98	1,08		H-1,H-7,3H-20
13	40,63	2,1-1,8(m)			41,27	2,03		H-17b
CH$_2$								
1	40,63			3H-20	40,67	1,88(m) 0,83(m)	H-2	3H-20
2	19,15				19,09	1,85(m) 1,45(m)	H-1	
3	37,99			3H-18	38,03	2,16(m) 1,05(m)		H-1,H-5,3H-18
6	21,85	1,7-1,5(m)			21,64	1,83(m) 1,67(m)	H-5	
7	41,95	1,4-1,2(m)			38,16	1,98(m) 1,05(m)		H-9,H-14,H-15
11	18,85				18,83	1,95(m) 1,62(m)	H-9	
12	26,94				26,65	1,78(m) 1,50(m)	H-11,H-13	
14	37,99				41,82	1,43(m)		
15	52,87	1,3-1,1(m)		2H-17	52,33	1,48(m)		H-7,H-13
17	69,44	3,3-3,0(m)			71,21	4,03(d,J=11,2) 3,92(d,J=11,2)		H-15
CH$_3$								
18	28,92	1,07(s)			28,74	1,16(s)		H-3,H-5
20	15,61	0,86(s)		H-5,H-9	15,24	0,83(s)		H-1,H-9
MeO-19	-				51,17	3,64(s)		
AcO-17	-				20,99	2,11(s)		
HO-16	-	3,83(sl)			-	-		
HO-17	-	4,53(sl)			-	-		
HO-19	-	11,94(sl)			-	-		

* A multiplicidade dos sinais dos átomos de carbono-13 foi deduzida por análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -PND e RMN ^{13}C -DEPT. Espectros de RMN $^1H \times ^1H$ -COSY foram também usados nas atribuições. Deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) dos átomos de hidrogênio foram obtidos dos espectros de RMN 1H unidimensionais.

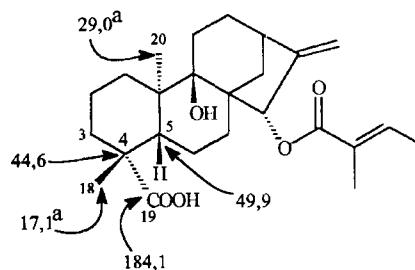
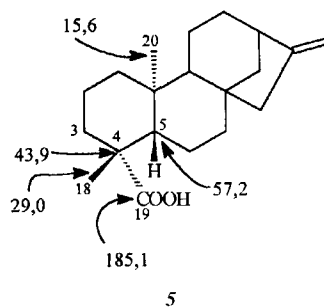
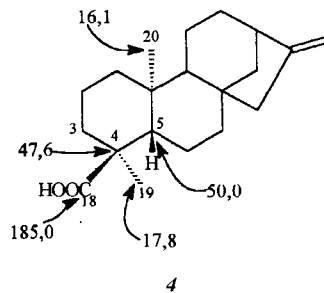
$\Delta m/z = 0,0145$), M-CH₂OAc, **1f**, 100%), 300 (M-H₂O-AcOH e/ ou M-AcOH-H₂O, 32%) e 259,1889 [C₁₈H₂₇O (m/z 259,2055; $\Delta m/z = 0,0166$), m/z 305,1964 - HCOOH, 40%] confirmaram a fórmula molecular C₂₂H₃₄O₅ para **1a** e, conseqüentemente, C₂₀H₃₂O₄ (C₂₂H₃₄O₅ - C₂H₂O) para o diterpenóide **1**. Este resultado serve também para demonstrar a importância de derivados preparados para obtenção de dados espectrais adicionais.



A fórmula molecular C₂₀H₃₂O₄ tem dez átomos de hidrogênio a menos quando comparada com a de uma molécula acíclica e sem insaturação (C₂₀H₄₂O₄ - C₂₀H₃₂O₄ = H₁₀), indicando a existência de cinco insuficiências: uma atribuída à função carbonílica do grupo carboxila (somente um sinal de carbono sp² registrado no espectro de RMN ¹³C) e as quatro restantes correspondendo a um esqueleto tetracíclico. O esqueleto básico caurânico, diterpeno tetracíclico, foi escolhido através de um processo de seleção pelas condições estruturais para fornecer um carbono quaternário hidroxilado usando um carbono metínico como precursor (-CH→C-OH), um grupo metilênico hidroxilado (álcool primário) pela oxidação de uma metila (-CH₃→CH₂OH), um carbono carboxílico (carbono quaternário COOH) pela oxidação de um grupo metila (-CH₃→COOH) e ainda dispor de (C)₃ (CH)₃ (CH₂)₉ (CH₃)₂. Assim, o esqueleto básico caurânico foi eleito pela disponibilidade de três carbonos quaternários (C-4, C-8 e C-10), quatro metínicos (CH-5, CH-9, CH-13 e CH-16), podendo um originar um carbono quaternário hidroxilado (CH-16→COH), nove metilênicos (CH₂-1, CH₂-2, CH₃-3, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-11, CH₂-12, CH₂-14 e CH₂-15), sendo o décimo resultante da transformação oxidativa de um grupo metila (CH₃-17→CH₂OH) e quatro metílicos (CH₃-17, CH₃-18, CH₃-19 e CH₃-20) que permitem a conversão de um em grupo carboxila (CH₃-19→COOH) e outro em álcool primário (CH₃-17→CH₂OH).

O espectro de RMN ¹H revelou os sinais dos grupos metila como singletos em δ 1,07 e 0,86 e os hidrogênios metilênicos do álcool primário representados por um sistema AB (*vide infra*). Os sinais deste sistema AB foram observados com relativa facilidade no espectro do derivado **1b** [δ 4,03 (d, J=11,2 Hz) e 3,92 (d, J=11,2 Hz)], já que nos espectros de **1** registrados em DMSO-d₆ e piridina-d₅ estão superpostos com o sinal intenso (δ _H 3,3-3,0) da molécula da H₂O. Os sinais simples das metilas indicaram a natureza terciária e permitiram localizar a hidroxila terciária no átomo de carbono C-16. A interação a longa distância (³J_{CH}) dos hidrogênios metilênicos do álcool primário (δ _H 3,3 - 3,0) com o átomo de carbono metilênico CH₂-15 (δ _C 52,57) observado no espectro bidimensional de correlação heteronuclear [¹Hx¹³C-COSY - ⁿJ_{CH} (n=2 e 3), COLOC = COrrrelation spectroscopy via LOng-range Coupling] de **1** permitiu confirmar a localização do grupo hidroxila primário no átomo de carbono C-17 (Tabela 2). Este espectro revelou também a presença do grupo carboxila (δ _C 178,98) no carbono C-4 através do seu acoplamento heteronuclear spin-spin (³J_{CH}) com os hidrogênios metílicos responsáveis pelo singlete em δ 1,07 (3H-18). Além disto, observou-se a interação do carbono CH-5 (δ _C 56,36) com os hidrogênios metílicos 3H-18 (δ _H 1,07, ³J_{CH}), do CH-9 (δ _C 56,13) com 3H-20 (δ _C 0,86, ³J_{CH}), do CH₃-20 (δ _C 15,61) com H-5 (δ _H 1,1-0,8) e/ou H-9 (δ _H 1,1-0,8). Outros acoplamentos heteronucleares de hidrogênio e carbono-13 encontram-se descritos na tabela 2.

A localização do grupo carboxila de **1** em posição axial *trans* em relação ao átomo de hidrogênio H-5 baseou-se no deslocamento químico do carbono C-5 (δ _C 56,36). Quando esta função carboxila ocupa posição equatorial *cis* em relação a H-5 o deslocamento químico do C-5 aparece em torno de δ _C 50, devido aos efeitos γ dos átomos de oxigênio do grupo carboxila. Os epímeros **4** e **5** podem ser citados como exemplos¹⁷. Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternário C-4 e metílicos CH₃-18, CH₃-19 e CH₃-20 devem ser também considerados nesta dedução estereoquímica, como demonstram os valores inseridos nas estruturas **4**, **5** e **6**¹⁷. Na substância **6** o deslocamento químico do carbono CH-5 (δ _C 49,90) pode ser justificado pelo efeito γ do átomo de oxigênio do grupo hidroxila sustentado pelo carbono C-9, sendo que os deslocamentos químicos dos átomos de carbono quaternário C-4 (δ _C 44,60) e metílicos CH₃-18 (δ _C 29,00) e CH₃-20 (δ _C 17,10) podem assegurar a estereoquímica indicada. Assim, as atribuições feitas pelos autores¹⁷ para os carbonos metílicos CH₃-19 (δ _C 17,50) e CH₃-20 (δ _C 29,00) devem ser corrigidas (*vide supra*) como indicado entre parênteses na própria estrutura **6**. A atribuição correta dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 3H-20 e do carbono grupo metílico CH₃-20 no diterpeno **1** (Tabela 2) baseou-se na interação heteronuclear a longa distância (³J_{CH}) do carbono metínico CH-9 (δ _C 56,13) com os 3H-20 [δ _H 0,86 (s)] e através de uma ligação (¹Hx¹³C-COSY-¹J_{CH}) do carbono metílico CH₃-20 (δ _C 15,61) e os 3H-20 (δ _H 0,86).



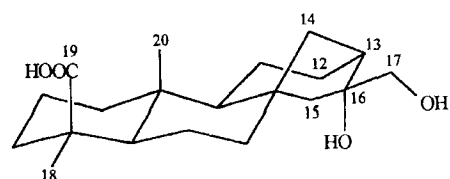
O espectro ¹Hx¹³C-HMQC (HMQC= Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), registro bidimensional de correlação

heteronuclear de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio através de uma ligação ($^1J_{CH}$), permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio ligados entre si do derivado metilado e acetilado **1b**. O espectro $^1Hx^{13}C$ -HMBC (HMBC= Heteronuclear Multiple Bond Correlation ou Heteronuclear shift correlations via Multiple Bond Connectivities) foi utilizado para a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono quaternários e confirmação da correlação de sinais de carbonos e hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos (Tabela 2).

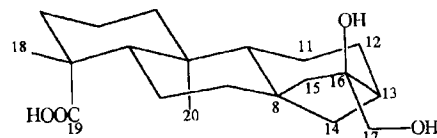
Atualmente, encontram-se disponíveis duas sequências de pulso úteis para correlação heteronuclear bidimensional de deslocamentos químicos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) através do acoplamento spin-spin via uma ligação ($^1J_{CH}$): i) a mais conhecida envolve transferência de polarização do núcleo de maior sensibilidade (1H) para o menos sensível (^{13}C), resumida como $^1Hx^{13}C$ -COSY- $^1J_{CH}$ (HETCOR=HETeronuclear CORrelation, encontrada também na literatura), sendo os sinais do núcleo (^{13}C) de menor sensibilidade detectados; ii) a mais recente envolve fenômeno quântico múltiplo heteronuclear de magnetização durante o período de evolução, resumido como $^1Hx^{13}C$ -HMQC, sendo os sinais do núcleo de maior sensibilidade (1H) detectados em método denominado como inverso, o que justifica a maior sensibilidade revelada pelos aparelhos mais modernos. Nestes aparelhos com probe inverso pode-se também obter o $^1Hx^{13}C$ -HMBC, que corresponde ao $^1Hx^{13}C$ -COSY- $^nJ_{CH}$ ($n=2$ e 3 , COLOC), espectro bidimensional de correlação de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio através de interação spin-spin via duas ($^2J_{CH}$) e três ligações ($^3J_{CH}$)¹⁸.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C do diterpeno **1** isolado de *Ouratea semiserrata* e dos dois epímeros em C-16 isolados de *Annona squamosa*⁶ encontra-se resumida na Tabela 4. Com base nos dados de RMN ^{13}C desta tabela e nas considerações estereoquímicas descritas (*vide supra*) pode-se avaliar os desafios provocados pelos átomos de carbono C-4 e C-16 dos estereoisômeros de ácidos *ent*-16,17-diidroxicaur-19- e -18-óico citados como referência neste artigo⁶⁻¹². Estes ácidos e as referências correspondentes foram selecionadas como consequência do trabalho de elucidação estrutural do diterpeno **1** isolado de *Ouratea semiserrata*. Na configuração *ent*:- a estereoquímica do carbono 16 em 16 α ,17-diidroxicauranos (*e. g.* **1e**) é *R*, o grupo HO-16 ocupa posição equatorial (HOCH₂ axial) em relação ao anel heptacarbocíclico e os sinais dos carbonos quaternário C-16 e metilênico CH₂-17 aparecem em torno de δ 79 e 70 ($\Delta\delta_C \cong 9$ ppm), respectivamente [*e. g.* C-16: δ_C 78,9 (**1**) e 79,8 (**1**)⁶; CH₂-17: δ_C 69,4 (**1**) e 70,5 (**1**)⁶; Tabela 4]; a estereoquímica do carbono C-16 em 16 β ,17-diidroxicaurânicos (*e. g.* **3b**) é *S*, o grupo HO-16 ocupa posição axial (HOCH₂ equatorial) em relação ao anel heptacarbocíclico e os carbonos quaternário C-16 e metilênico CH₂-17 absorvem em torno de δ 81 e 66 ($\Delta\delta_C \cong 15$ ppm), respectivamente [*e. g.* C-16: δ_C 81,7 (**3**); CH₂-17: δ_C 66,5 (**3**); Tabela 4]; a análise comparativa destes dados permite deduzir que estes estereoisômeros epiméricos (*e. g.* **1e** e **3b**) no átomo de carbono C-16 podem ser distinguidos com relativa facilidade. Na configuração **1d**, que fornece a *ent*- (**1e**) como antípoda ótica (enantiômero), a estereoquímica do C-16 é *S*, o grupo HO-16 ocupa posição equatorial (HOCH₂ axial) em relação ao anel heptacarbocíclico e os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternário C-16 e metilênico CH₂-17 são obviamente os mesmos observados no *ent*- **1e** (C-16: $\delta_C \sim 79$; CH₂-17: $\delta_C \sim 70$; $\Delta\delta_C \cong 9$ ppm), enquanto na **3a** (enantiômero de **3b**) o C-16 é *R*, o grupo HO-16 ocupa posição axial (HOCH₂ equatorial) e os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternário C-16 e metilênico CH₂-17 são também os mesmos registrados para os *ent*- 16 β ,17-diidroxicaurano **3b** (C-16: $\delta_C \sim 81$; CH₂-17 ~ 66 ; $\Delta\delta_C \cong 15$ ppm), já que RMN usando solvente aquiral não permite distinguir enantiômeros.

A definição da estereoquímica do carbono quiral C-16 baseou-se também na interpretação do espectro 2D- $^1Hx^1H$ -NOESY



3a



3b

(NOESY = Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy bidimensional = 2D)⁵ de **1b**, que revelou a interação espacial (acoplamento dipolar) dos hidrogênios metilênicos do carbono 17 [δ_H 4,03 e 2,92] com H-9 (δ_H 1,10), além dos deslocamentos químicos dos carbonos C-16 e C-17. Estes resultados permitiram localizar o grupo CH₂OH em posição α e, consequentemente, o grupo hidroxila HO-16 em β na configuração **1d** ou CH₂OH em β e OH em α na *ent*- **1e**. Dados adicionais obtidos deste espectro encontram-se resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Interpretação do espectro 2D-NOESY de **1b**.

		$^1Hx^1H$ -NOESY	
H	d_H	H	d_H
3eq	2,16	3ax	1,05
		18	1,16
9	1,08	2eq	1,45
		7ax	1,98
		15ax	1,48
15	1,48	1ax	0,83
		7ax	1,98
		9	1,08
17a	4,03	13	2,03
		15	1,48
17b	3,92	9	1,08
		15	1,48
18	1,16	9	1,08
		6eq	1,85
		3eq	2,16
		2ax	1,85
20	0,83	6ax	1,67
		11ax	1,95
		1eq	1,88

Nos diterpenos contendo o átomo de carbono C-4 quiral (*e. g.* **1** e **3**) a numeração correta dos substituintes (*vide supra*) define a estereoquímica. Os ácidos caurênicos epímeros *ent*-caur-16-en-18-óico (**4**) e *ent*-caur-16-en-19-óico (**5**) servem como exemplos adicionais. Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternário C-4, metínico CH-5 e metílicos CH₃-18, CH₃-19 e CH₃-20 inseridos nas estruturas **4** e **5** permitem distinguir estes epímeros. O carbono metílico CH₃-19 de **4** ocupando posição axial tem menor deslocamento químico (δ_C 17,80) do que o CH₃-18 (δ_C 29,00) em posição equatorial de **5**, devido aos efeitos γ dos átomos de carbono C-2 e C-6 sobre CH₃-19. Os átomos de oxigênio do grupo carboxila de **4** exercem efeito γ sobre o carbono metínico CH-5 (δ_C 50,00), o que não acontece no epímero **5** (CH-5: δ_C 57,20). Nos diterpenóides **1** e **3**, o grupo

Tabela 4. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do diterpeno **1** isolado de *Ouratea semiserrata* e dos epímeros em C-16 isolados de *Annona squamosa* (**1** e **3**)⁶.

	1		1 ⁶	3 ⁶
C	δCa	δCb	δCc	δCc
4	43,1	43,8	44,0	43,9
8	43,4	43,9	43,9	45,0
10	39,5	40,0	40,1	40,1
16	78,9	79,7	79,8	81,7
18	180,0	180,1	180,2	180,1
CH				
5	56,4	57,0	57,1	57,0
9	56,1	56,6	56,8	56,3
13	40,6	41,6	41,7	45,9
CH₂				
1	40,6	41,1	41,2	41,1
2	19,1	19,8	19,9	19,8
3	38,0	38,7	38,8	38,7
6	21,8	22,4	22,5	23,0
7	41,9	42,2	42,6	42,8
11	18,8	19,4	19,5	19,0
12	26,9	27,5	27,6	26,8
14	38,0	38,5	38,6	37,8
15	69,4	70,4	70,5	66,5
CH₃				
19	28,9	29,3	29,4	29,3
20	15,6	15,9	16,0	16,0

^aDMSO- d_6 como solvente; bpiridina- d_5 como solvente; c solvente não indicado (provavelmente piridina- d_5)

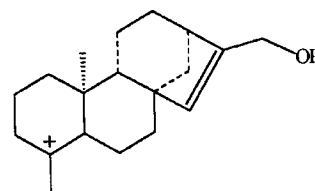
carboxila ocupa posição axial *trans* em relação ao H-5, como em **5**, justificando-se os deslocamentos químicos do CH-5 em $\delta_C \sim 57$ (Tabelas 2 e 4).

A rotação específica negativa ($[\alpha]_D = -105,96^\circ$) indica a configuração absoluta **1e** (*vide supra*), permitindo identificar o diterpeno isolado de *Ouratea semiserrata* como o ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1**).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do derivado metilado e acetilado (**1b**) do diterpeno **1**, isolado de *Ouratea semiserrata*, revelaram a presença do derivado diacetilado (**1c**), ácido *ent*-16 α ,17-di-O-acetilcauran-19-óico, em percentagem relativamente pequena. A presença deste diacetato foi reconhecida principalmente pelos sinais em δ_C 50,40 (CH₂-15), 86,90 (C-16) e 66,10 (CH₂-17), já que as modificações observadas nos deslocamentos químicos destes carbonos quando comparados com os correspondentes de **1b** revelaram-se em acordo com o previsto: desproteção do carbono 16 (maior efeito indutivo retirador de elétrons do grupo acetoxi e efeito β do carbono carbonílico) e proteção dos carbonos vizinhos C-15 e C-17 por efeito γ do carbono carbonílico do grupo acetoxila.

O espectro de massas de alta resolução (EMAR) do diterpeno **1** não revelou o pico correspondente ao ion molecular (m/z 336, ausente), observando-se os picos em m/z 318 (M-H₂O, 17%), 305,1774 (M-CH₂OH, 96%), atribuído ao fragmento catiônico **1f** [$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_3$ (m/z 305,2109; $\Delta m/z = 0,0335$)], 273,1992 (M-H₂O-COOH e/ou M-COOH-H₂O, 86%), interpretado como representante do fragmento iônico **1g** [$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}$ (m/z 273,2211; $\Delta m/z = 0,0219$)], 109,1005 [C_9H_{13} (m/z 109,1014; $\Delta m/z = 0,0009$)], 100%. Outros picos importantes observados neste espectro não foram registrados com m/z exata: m/z 300 (M-H₂O-H₂O, 22%), 287 (m/z 305-H₂O, 27%), 272 (m/z 300-CH₂=CH₂, 52%), 261 (m/z 305-CO₂, 47%), 259 (m/z 305-HCOOH, 67%), 123 (95%), 121 (50%), 119 (38%). Os picos em m/z 305,1774 (**1f**) e 273,1992 (**1g**) aliados com os dados de RMN ^1H (Tabela 2) e ^{13}C (Tabelas 1 e 2) permitiram confirmar a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$ para o diterpeno **1**. Confirmação

adicional foi obtida através da análise do espectro de massas de alta resolução do derivado monoacetilado **1a** (*vide supra*) e experimental.



1g

Recentemente, os dois epímeros no carbono 16, os ácidos *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1**), $[\alpha]_D = -160^\circ$ (C, 0,02 em MeOH), e *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-óico (**3**), $[\alpha]_D = -58^\circ$ (C, 0,05 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$), foram isolados do extrato metanólico dos frutos frescos de um espécimen de *Annona squamosa*, coletada em Chie Shan, Koohsiung, Taiwan, em junho de 1991⁶. Mais 10 diterpenos caurânicos e dois caur-16-ênicos foram isolados do mesmo material. Somente o ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (**1**) revelou atividade significativa na replicação de HIV de células linfócitas H 9⁶.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais. Os espectros IV foram registrados em pastilha de KBr num espectrômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600. Os espectros de RMN ^1H (400 e 200 MHz) e de ^{13}C (100 MHz e 50 MHz) uni- (1D) e bidimensional (2D) foram obtidos em espectrômetros Bruker AC-200 e WH 400, utilizando DMSO- d_6 , MeOH- d_4 , piridina- d_5 (**1**) e CDCl_3 (**1a**) como solventes e TMS ou sinal do solvente (em relação ao TMS) como referência interna. Os espectros de massas de alta resolução (EMAR) foram registrados num espectrômetro VG Auto Spec-300- Alta Resolução, operado a 70 eV. Para a obtenção dos dados de rotação específica foi utilizado o aparelho JASCO modelo DIP 370.

Material Vegetal. Galhos e folhas de *Ouratea semiserrata* foram coletados em Cachoeira Andorinhas, Município de Ouro Preto, Estado de Minas Gerais, em 28/09/93. A planta foi identificada pelo Técnico Herbário José Badini Jorge Luis da Silva, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Extração e isolamento do ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (1**).** As folhas foram secas à temperatura ambiente, pulverizadas (920 g) e extraídas a frio com hexano e depois com MeOH. A solução metanólica foi concentrada sob vácuo para fornecer 102,2 g de resíduo. Este resíduo foi fracionado por partição em CHCl_3 : MeOH/H₂O (8:2). A solução CHCl_3 forneceu 45 g de material, após tratamento com Na_2SO_4 anidro e a destilação do CHCl_3 sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se misturas de CHCl_3 e AcOEt em polaridade crescente e depois AcOEt, e em cromatografia em camada delgada preparativa forneceram **1** (253,8 mg).

Ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico (1**).** P.f. 290 $^\circ$ C, $[\alpha]_D^{19} = -105,96^\circ$ (C 0,235, MeOH). IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3346 (OH), 3000-2500 e 1692 (COOH). RMN ^1H : Tabela 2. RMN ^{13}C : Tabelas 1, 2 e 3. EMAR m/z (intensidade relativa): 336 ($[\text{M}]^+$, ausente), 318 (M - H₂O, 17%), 300 (M - H₂O - H₂O, 22%), 305,1774 [M - CH₂OH, $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_3$ (m/z 305,2109), **1f**, 96%], 287 (m/z 305 - H₂O, 27%), 273,1992 [M - H₂O - COOH e/ou M - COOH - H₂O, $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}$ (m/z 273,2211), **1g**, 86%], 272 (m/z 300 - CH₂=CH₂, 52%), 261 (m/z 305 - CO₂, 47%), 259 (m/z 305 - HCOOH, 64%), 123 (95%), 121 (50%), 119 (38%), 109,1005 [C_9H_{13} (m/z 109,1014), 100%].

Ácido ent-16 α -hidroxi-17-O-acetilcauran-19-óico (**1a**). O diterpeno **1** (85 mg) foi acetilado com anidrido acético (2 mL) na presença de piridina (2 mL) como usual para obter o derivado monoacetilado **1a** (80 mg). IV $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3375 (OH), 1722 (AcO). EMAR m/z (intensidade relativa): 378,2725 ([M]⁺, C₂₂H₃₄O₅ (m/z 378,2397; $\Delta m/z=0,0328$), 0,8%, observado claramente após a ampliação da intensidade pelo valor 10), 360 (M - H₂O, 7%), 318 (M - AcOH, 17%), 305,1964 [C₁₉H₂₉O₃ (m/z 305,2109; $\Delta m/z=0,0145$), M - .CH₂OAc, **If**, 100%), 300 (M-H₂O - AcOH e/ou M - AcOH - H₂O, 32%), 259,1889 [C₁₈H₂₇O (m/z 259,2055; $\Delta m/z$ 0,0166), m/z 305,1964 - HCOOH, 40%).

ent-16 α -Hidroxi-17-O-acetilcauran-19-oato de metila (**1b**). O derivado monoacetilado **1a** (40 mg) foi metilado em solução etérea de CH₂N₂ (preparado de N-nitrosometilureia por tratamento com solução aquosa de KOH) como usual, obtendo-se **1b** (43 mg). RMN ¹H e ¹³C: Tabela 2.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e PADCT/FINEP pelos auxílios concedidos, ao CNPq e CAPES pelas bolsas de pesquisa (R.B.F. e M.G. de C.) e de pós-graduação (J.R.V., doutorando). Agradecemos também ao especialista Jorge Luis da Silva, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, pela coleta e identificação do espécimen de *Ouratea semisserata*; ao Professor Edson Rodrigues Filho, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, pela obtenção dos espectros de RMN ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) e as experiências bidimensionais ¹Hx¹³C-HMQC e ¹Hx¹H-NOESY; ao Professor Afranio Aragão Craveiro, PADETEC, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, pelos espectros de massas registrados pela M.Sc. Maria José Cajazeiras Falcão. Ao instituto de Química da UFRJ pela leitura da rotação específica.

REFERÊNCIAS

1. Brito, N.R.J. de; *Tese de Doutorado*; Universidade de São Paulo; São Paulo, 1986.
2. Schultz, A.; *Introdução a Botânica Sistemática* (5ª edição); Editora da Universidade de Porto Alegre; Porto Alegre, 1985.

3. Moreira, I. C.; Sobrinho, D. C.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1567.
4. Grinsberg, N. F.; Martorelli, R. A.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; Moreira, I.C.; Santos, A.C.S.; Echevarria, A.; *Proceedings of the XVI International Cancer Congress* **1994**, *63*.
5. Sanders, J. K. M.; Hunter, B.K.; *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists 2nd Edition*; Oxford University Press; Oxford, 1993.
6. Wu, Y. -C.; Hung, Y. -C.; Chang, F. -R.; Consentino, M.; Wang, H. -K.; Lee, K. -H.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 635.
7. Ohtani, K.; Aikawa, K.; Kosal, R.; Chou, W.; Yamasaki, K.; Tanaka, O.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1553.
8. Etse, J. T.; Gray, A.I.; Waterman, P. G.; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 979.
9. Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, R.; Tanaka, O.; *Tetrahedron Lett* **1976**, *1005*.
10. Kim, Y. H.; Chung, B. S.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1080.
11. Werner, H.; Kulanthaivel, P.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1453.
12. Tan, R.X.; Hu, Y.H.; Liu, Z.L.; Pan, X.; *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1917.
13. Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, T.; Kaneda, N.; Kasai, R.; Tanaka, O.; Nishi, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2895.
14. Buckingham, J.; Donaghy, S. M. (Ed.); *Dictionary of Organic Compounds* (5th edition); Chapman and Hall; London, 1982; p. 1953 (substância D-04553); a) p 3500 (substância K-00028), 3501 (substâncias K-0038 e K-0039), 3502 (substâncias K-0041, K-0042 e K-0045), 3503 (substância K-0047).
15. Pettit, G. R.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 812.
16. Nakanishi, K. (Ed.); *One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques*, University Science Books; California, 1990.
17. Atta-ur-Rahman; Ahmad, V.U.; *¹³C-NMR of Natural Products: Diterpenes vol. 2*; Plenum Press; New York, 1992; p. 328, 362.
18. Günther, H.; *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry (2nd edition)*; John Wiley; New York, 1994; pp 477-486.