EUCLÉSIO SIMIONATTO

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS DO RIO GRANDE DO SUL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA

TESE DE DOUTORADO

UFSM

SANTA MARIA, RS - BRASIL

2004

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS DO RIO GRANDE DO SUL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA

por

EUCLÉSIO SIMIONATTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de DOUTOR EM QUÍMICA.

Santa Maria, RS – BRASIL

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

a comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese intitulada

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS DO RIO GRANDE DO SUL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA

elaborada por

EUCLÉSIO SIMIONATTO

como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel – Orientador – UFSM

Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques – IAC/Campinas

Profa. Dra. Ionara Irion Dalcol – UFSM

Prof. Dr. Elina Bastos Caramão – UFRGS

Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva – UPF

Santa Maria, 27 de outubro de 2004

UFSM
Biblioteca Central

Dedico este trabalho ao meu pai Euclides (in memoriam),

a minha mãe Clací, e meus irmãos Edésio e Elésia

por cada momento que estiveram ao meu lado.

Sem os quais este objetivo não seria alcançado.

Obrigado!

UFSM
Biblioteca Central

À Janaina Thomasi Facco, minha namorada, amiga e colega
por ter estado ao meu lado durante essa etapa de minha
vida, e sua família pela amizade e convivência.

UFSM
Biblioteca Central

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu sincero agradecimento,

pela orientação e estímulo durante a elaboração desta Tese.

Obrigado pela confiança e pela amizade.

UFSM
Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Ionara Irion Dalcol, minha co-orientadora e Ubiratan Flores da Silva, meus agradecimentos pela amizade e pelos incentivos para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas: Anderson S. Mallmann, Carla Porto da Silva, Eduardo M. Ethur, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: Gilvan de O. C. Dias, Ilmar B. Graebner, Wellington de Abreu Gonzaga, Sandro R. Giacommelli, Irene M. Alles, Vinicius Ilha, Enrique L. Larghi, Andréia D. Webber, Graciela Maldaner e Vanessa Gressler, Claudia Marasciulo, Caroline, Juliano, Álvaro, Adari, Vinicius Londero, pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas do departamento de Química da UFSM, pela amizade, tempo compartilhado e pelas ajudas prestadas.

Aos secretários do curso de Pós-Graduação em Química: Ademir e Valéria, pela confiança, amizade e eficientes serviços.

Aos Órgãos financiadores: CAPES, CNPq e FAPERGS, pelas concessões das bolsas e das verbas, que viabilizaram a execução deste trabalho.

UFSM
Biblioteca Central

RESUMO

Titulo: Estudo dos Constituintes Químicos de Óleos Voláteis de plantas Medicinais do Rio Grande do Sul: Isolamento, Determinação e Modificação Estrutural e Atividade Biológica

Autor: Euclésio Simionatto

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Os óleos essenciais de oito espécies de plantas medicinais, nativas e cultivadas, do Rio Grande do Sul, foram obtidos através de hidrodestilações e analisados quanto suas composições químicas e atividades antimicrobianas. As espécies selecionadas para este estudo foram: *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* (Asteraceae), *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), *Pluchea quitoc* (Asteraceae), *Aloysia sellowii* (Verbenaceae), *Aeollanthus suaveolens* (Lamiaceae), *Cunila microcephala* (Lamiaceae) e *Zanthoxylum hyemale* (Rutaceae). As espécies mencionadas foram selecionadas para este estudo por serem amplamente utilizadas medicinalmente pela população do Rio Grande do Sul. Neste trabalho, os óleos voláteis de cada espécie foram submetidos a procedimentos cromatográficos visando o isolamento de seus constituintes em suas formas puras. As análises estruturais dos componentes isolados puros foram realizadas através de técnicas cromatográficas quirais e aquirais, reforço com padrões puros, obtenção dos respectivos índices de retenção de Kovat's, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C utilizando-se de técnicas uni- e bidimensionais. Desta forma, identificou-se um componente sesquiterpênico inédito como componente do óleo essencial de *Zanthoxilum hyemale*, denominado neste trabalho de hyemalol. Do óleo essencial de *Calea clematidea*, isolou-se seu principal componente, o epóxido caleol, o qual pela abundância e pela estrutura multifuncional, foi submetido a várias transformações estruturais com a finalidade de se realizar um estudo estrutura-atividade biológica. Além dos óleos essenciais das plantas selecionadas, componentes de óleos voláteis de própolis de diferentes localidades do Rio Grande do Sul, foram também analisados. Como óleos essenciais, ao contrário de outros metabólitos secundários, são constituídos por substâncias quirais em suas duas formas enantioméricas, este trabalho teve como um de seus objetivo, a análise quiral destes constituintes. Para isso, foram utilizadas novas fases quirais derivadas de ciclodextrinas, obtidas pelo grupo do NPPN. Finalmente,

os óleos essenciais obtidos, assim como os componentes isolados através de métodos cromatográficos, foram testados quanto as suas possíveis atividades antibacterianas e antifúngicas, utilizando-se dos métodos de Microdiluição (CIM) e da Bioautografia, através dos quais observou-se que os óleos analisados foram ativos contra a maioria dos microorganismos utilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃOEM QUÍMICA
Titulo: Estudo dos Constituintes Químicos de Óleos Voláteis de plantas Medicinais do Rio Grande do Sul: Isolamento, Determinação e Modificação Estrutural e Atividade Biológica
Autor: Euclésio Simionatto
Tese de Doutorado em Química
Santa Maria, Outubro de 2004.

ABSTRACT

Title: Study of Chemical Constituents of Volatile Oils from Medicinal Plants of Rio Grande do Sul: Isolation, Structural Determination, Structural Modification and Biological Activity.

Author: Euclésio Simionatto

Academic Advisor: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

The essential oils of eight species of medicinal plants wild and cultivated in Rio Grande do Sul, pertaining to four botany family Asteraceae, Verbenaceae, Lamiaceae and Rutaceae were investigated as for its chemical composition and antibacterial activity. The selected species for this study were *Baccharis trimera* and *Baccharis articulata* (Asteraceae), *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), *Pluchea quitoc* (Asteraceae), *Aloysia sellowii* (Verbenaceae), *Aeollanthus suaveolens* (Lamiaceae), *Cunila microcephala* (Lamiaceae) and *Zanthoxylum hyemale* (Rutaceae). The species mentioned were selected for this study by to present extensive use in local medicine as remedy. In this work, the essential oil of each specie were submitted to chromatographic procedures with to aim to isolate its constituents in pure form. The structural analysis of isolated components were realized through chiral and achiral chromatographic technics, reinforcement with standards, obtainment of Kovat's indices, GC-MS and RMN of ^{1}H and ^{13}C uni- and bi dimensional. So that, were possible to identify a inedited sesquiterpene of essential oil from *Zanthoxilum hyemale* denominated in this work as hyemalol. From essential oil of *Calea clematidea* were isolated its principal constituent, the natural epoxid caleol, which by abundance and multifunctional structure, were submitted to structural transformations with purpose to realize a study structure-biologic activity. Moreover, the components of volatile oils of propolis from different regions of Rio Grande do Sul, were also analyzed by GC and Chiral-GC. As essential oil on the contrary of others secondary compounds, are constituted by chiral substances in its two enantiomeric form, because this, the present work have as aim, the chiral analysis of this components. For this, were used new stationary phases derived from ciclodextrins, obtained by NPPN group. In conclusion, the essential oil obtained as well as, the isolated components through chromatographic methods were

submitted to antibacterial and antifungical tests, using the microdiluition and bioautography methods, through which is possible to observe that the essential oils were active against a greater number of microorganisms.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Titulo: Study of Chemical Constituents of Volatile Oils from Medicinal Plants of Rio Grande do Sul: Isolation, Structural Determination, Structural Modification and Biological Activity.
Author: Euclésio Simionatto
Academic Advisor: Prof. Dr. Ademir Farias Morel
PhD Tesis in Organic Chemistry
Santa Maria, October, 2004.

ÍNDICE

RESUMO _____ *viii*

ABSTRACT _____ *x*

LISTA DE TABELAS _____ *xv*

LISTA DE FIGURAS _____ *xix*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS _____ *xxxi*

CAPITULO 1.- INTRODUÇÃO, OBJETIVOS _____ *1*

CAPITULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____ *6*

CAPITULO 3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS _____ *32*

3.1. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS OBTIDOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA DO RIO GRANDE DO SUL. _____ *33*

3.1.1. BACCHARIS TRIMERA **E** *BACCHARIS ARTICULATA* _____ *34*

3.1.1.1 Análise comprativa dos óleos _____ *34*

3.1.1.2. Variação no teor dos sesquiterpenos ledol e espatulenol, e do monoterpenoide acetato de carquejila nos óleos de folhas e flores de Baccharis trimera _____ *36*

3.1.1.3. Acetato de carquejila _____ *40*

3.1.1.4.Determinação da configuração absoluta do centro quiral C-1 do Acetato de carquejila _____ *41*

3.1.1.5. Análise quiral do óleo volátil de Baccharis articulata. _____ *42*

3.1.1.6. Determinação da atividade antibacteriana dos óleos de Baccharis trimera e Baccharis articulata _____ *44*

3.1.2 MATRICARIA CHAMOMILLA _____ *46*

3.1.2.1. Isolamento e identificação dos componentes dos óleos essenciais de Matricaria chamomila _____ *48*

3.1.2.2. Resultados dos experimentos de cultivo de Matricaria chamomilla ___ *51*

3.1.2.3. Atividade antimicrobiana _____ *53*

3.1.3. PLUCHEA QUITOC _____ *56*

3.1.3.1. Estudo da composição e análise química dos óleos voláteis de Pluchea quitoc _____ *56*

3.1.3.2 Atividade antibacteriana dos óleos voláteis de Pluchea quitoc _____ *66*

3.1.4. ALOYSIA SELLOWII _____ *68*

3.1.4.1. Óleo volátil de Aloysia sellowii 68
3.1.4.2 Degradação dos óleos de Aloysia sellowii 74
3.1.5 ***AEOLLANTHUS SUAVEOLENS*** 77
3.1.5.1. Óleo volátil de Aeollanthus suaveolens 77
3.1.5.2. Isolamento e caracterização dos componentes majoritários do óleo de Aeollanthus suaveolens 78
3.1.5.3. Atividade antibacteriana 85
3.1.6 CUNILA MICROCEPHALA. 87
3.1.6.1 Óleo volátil de Cunila microcephala 87
3.1.6.2. Degradação do observada no óleo volátil de Cunila microcephalla 90
3.1.6.3. Testes de atividade antibacteriana 95
3.1.7. ZANTHOXILUM HYEMALE 98
3.1.7.1. Obtenção do óleo volátil e análise 98
3.1.7.2. Analise dos constituintes quirais dos óleos obtidos: α-pineno, β-pineno, limoneno e nerolidol 102
3.1.7.3 Isolamento de ZY-1, nerolidol e cadinol 106
3.1.7.4. Atividade biológica 109
3.1.7.5. Determinação estrutural do sesquiterpeno ZY-1 110
3.1.7.8. HMQC do sesquiterpeno Hyemalol 115
3.1.7.9. HMBC do sesquiterpeno Hyemalol 116
3.1.7.10. COSY do sesquiterpeno Hyemalol 118
3.1.7.11. Determinação da configuração absoluta de ZY-1 pelo método de Horeau 119
3.1.7.12. Proposta biossíntética para sesquiterpeno hyemalol 120
3.1.7.13. Análise do extrato hexanico das folhas de Zanthoxylum hyemale 122
3.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS RESULTANTES DE MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS EM 1-(3',3'-DIMETIL-2'-OXIRANIL)-2,2-DIMETIL-3-BUTENIL ACETATO (CALEOL) 123
3.2.1. CALEA CLEMATIDEA 123
3.2.2. Obtenção e caracterização dos derivados do caleol 124
3.2.2.1. 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol (91) 124
3.2.2.2. 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-butenil-metil-éter (93) 127
3.2.2.3 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ona (94) 130

3.2.2.4 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol (92) ____ *132*
3.2.2.5. 3-[2,2-dimetil-1-2-(feniletoxi) –3- butenil-2,2-dimetiloxirano (95) __ *134*
3.2.2.6. 2,5,5-trimetil-6-hepteno-2,3,4-triol (96) ____ *137*
3.2.2.7. 4-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-6,7-dihidroxi-5,5-dimetilheptan-2-one (97) __ ____ *140*
3.2.2.8. 1-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-2-metil-2-oxiran-2-ilpropil acetato (98) __ *143*
3.2.3. Atividade biológica ____ *146*
3.3. ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS EM ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE PRÓPOLIS COLETADOS EM TRÊS REGIÕES DO RIO GRANDE DO SUL. ____ *150*
3.4. EMPREGO E ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE NOVAS FASES ESTÁCIONÁRIAS QUIRAIS CONFECCIONADAS PELO GRUPO NA ANÁLISE DA ESTEREOQUÍMICA DE COMPONENTES DE ÓLEOS VOLÁTEIS. ____ *156*
3.4.1 Avaliação de novas fases estacionárias quirais. ____ *159*
CAPITULO 4.PARTE EXPERIMENTAL ____ *173*
CAPITULO 5.CONCLUSÕES ____ *183*
CAPITULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ____ *185*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Nomenclatura dos terpenos por unidades de isopreno_____ 6

TABELA 2 – Rendimento dos óleos voláteis das Baccharis _____ 35

TABELA 3 - Composição do óleo volátil obtido das folhas de *Baccharis articulata* ***_____ 39***

TABELA 4 - Composição do óleo volátil de Baccharis trimera _____ _____ 40

TABELA 5- Distribuição enantionérica (%) dos monoterpenos nos óleos voláteis de Baccharis articulata _____ 43

TABELA 6 - Atividade antibacteriana dos óleos voláteis de *Baccharis articulata* ***e*** *Bacharis trimera* ***obtidos de folhas; CIM (concentração inibitória mínima) e CML (concentração mínima letal) em mg/mL_____ 44***

TABELA 7 - Determinação da quantidade de substancia ativa (μg), por bioautografia, do carquejol acetato *(58)* ***e carquejol*** *(59)* ***_____ 45***

TABELA 8 - Principais constituintes encontrados nos óleos essenciais *de Matricaria chamomilla,* ***obtidos de plantas adaptadas e cultivadas no Rio Grande do Sul_ 52***

TABELA 9 - Determinação da quantidade inibitória mínima (μg) através de bioautografia, dos óxidos de bisabolol A e B e do óleo de Matricaria chamomilla cultivada_____ 54

TABELA 10 - Composição dos óleos voláteis de Matricaria chamomilla avaliados quanto as suas atividades antimicrobianas_____ 54

TABELA 11 - Testes de atividade antimicrobiana dos óleos voláteis executados pelo método da microdiluição em caldo em mg/mL, CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CML (Concentração Mínima Letal)_____ 55.

TABELA 12 - Rendimento dos óleos voláteis de Pluchea quitoc, das duas regiões de coleta _____ 56

TABELA 13 - Composição dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc*_____ ***_____ 65***

TABELA 14 - Determinação da quantidade de substancia ativa (μg), por bioautografia, dosesquilavandulol acetato, sesquilavandulol álcool e da fração de sesquiterpenos de Pluchea quitoc _____ 66

TABELA 15 - CIM dos óleos voláteis de Pluchea quitoc em mg/ml_____ 67

TABELA 16 - Composição dos óleos voláteis de A. sellowii _____ 70

TABELA 17 – Distribuição enantiomérica dos monoterpenos do óleo essencial de A. sellowii _____ 73

TABELA 18 - Atividade antibacteriana dos óleos de *A. sellowii* ***em mg/mL CIM(concentração inibitória mínima) e CLM (concentração letal mínima). _ 74***

TABELA 19 - Rendimento dos óleos voláteis de Aeollanthus suaveolens ____77

TABELA 20 - Composição dos óleos voláteis de** Aeolanthus suaveolens **obtido de plantas nativas _____84

TABELA 21 - Composição do óleos voláteis de Aeolanthus suaveolens obtido de plantas cultivadas. _____84

TABELA 22 - Determinação da quantidade inibitória mínima (μg) através de bioautografia, dos componentes isolados e do óleo das folhas de** Aeolanthus suaveolens**. _____86

TABELA 23 - Atividade antibacteriana dos óleos de Aeolanthus suaveolens em mg/mL através do método de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima letal (CLM)_____86

TABELA 24 - Composição do óleo volátil de Cunila microcephalla _____90

TABELA 25 - Composição do óleo volátil de** Cunila microcephalla **após degradação. _____94

TABELA 26 - Testes de atividade antimicrobiana dos óleos voláteis executados pelo método da microdiluição em caldo em mg/mL, CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CML (Concentração Mínima Letal). _____96

TABELA 27 - Determinação da quantidade de substancia ativa (μg), por bioautografia, do mentofurano e da mintlactona _____97

TABELA 28 - Rendimento dos óleos voláteis de Zanthoxylum hyemale. _____98

TABELA 29 - Distribuição enantionérica (ee) dos monoterpenos nos óleos voláteis de** Zanthoxylum hyemale **_____ 103.

TABELA 30 - Determinação da atividade antibacteriana em μg por bioautografia dos compostos isolados dos óleos de** Z.hyemale **_____110

TABELA 31 - Concentração inibitória mínima em mg/ml (CIM) e concentração mínima letal (CLM) dos óleos voláteis de Z.hyemale. _____110

TABELA 32 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para o sesquiterpeno ZY-1 em $CDCl_3$_____114

TABELA 33 - Composição dos óleos essenciais de** Zanthoxylum hyemale**.___ 121

TABELA 34 - Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de (91) _____127

TABELA 35 - Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de (93) _____129

TABELA 36 - Dados de ressonância magnética da cetona (94) _____132

TABELA 37 - Dados de ressonância magnética do álcool (92) . _____134

TABELA 38 - Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de (95) _____137

TABELA 39 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para a o triol (96)

_____140

TABELA 40 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para a mistura diastereoisomerica dos dióis (97) _____ *143*

TABELA 41 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para a mistura diastereoisomerica dos epoxidos (98) _____ *146*

*TABELA 42 - Quantidade de substancia (μg) necessária para a inibição do crescimento bacteriano do caleol, por bioautografia.*_____ *147*

TABELA 43 - Quantidade de substancia (μg) necessária para a inibição do crescimento bacteriano dos derivados do caleol, por bioautografia. _____ *147*

TABELA 44 - Bactérias e fungos utilizados nos testes antibacterianos _____ *182*

TABELA 45 - Identificação das excicatas das amostras estudadas. _____*180*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estruturas de alguns terpenos típicos _____ 7

Figura 2 - ***Sistema para extração de óleos essenciais por microondas _____ 15***

Figura 3 - ***1,8-Cineol e os produtos de transformação deste monoterpeno pelos besouros das espécies Paropsisterna tigrina e Faex nigroconspersa _____ 19***

Figura 4 - Monoterpenos de Psiadia anchusifolia _____ 20

Figura 5 - ***Lactonas sesquiterpenicas de Achilea ligustica _____ 21***

Figura 6 - ***Derivados do esqueleto eudesmano e ciperano de Achillea clypeolata _____ 22***

Figura 7- ***Sesquiterpenos triciclicos isolados de Juniperus thurifera. _____ 22***

Figura 8 - ***Sesquiterpenos acetilados isolados de Leontopodium alpinum. ___ 22***

Figura 9 - ***Sesquiterpenos isolados de Parthenium argentatum e P. tomentosa. 23***

Figura 10 - ***Novos sesquiterpenos isolados do fungo Coprinopsis episcopalis. 23***

Figura 11 - ***Sesquiterpenos de Psiadia anchusifolia _____ 23***

Figura 12 - ***Humuleno e seus derivados isolados de Asteriscus vogelii _____ 24***

Figura 13 - ***Derivados de Humuleno em Woodsia scopulina _____ 24***

Figura 14 - ***Epóxidos Naturais derivados do sesquiterpeno humuleno _____ 25***

Figura 15 - ***Derivados do himachaleno e cadineno na composição feromonal do besouro Aphthona flava. _____ 26***

Figura 16 - ***α e β-trans-bergamotenos, feromônios sexuais do parasita Melittobia digitata _____ 26***

Figura 17 - ***Álcoois secundários quirais, presentes em óleos essenciais _____ 27***

Figura 18 - ***Regra de Horeau _____ 30***

Figura 19 - ***Moléculas de produtos naturais e de transformação que tiveram a configuração absoluta dos álcoois secundários determinadas pelo método de Horeau no NPPN _____ 31***

.FIGURA 20 – Cromatograma do óleo volátil de Baccharis articulata, em SE-54, 25 m, 7 psi H_2, 50-250℃ (4℃/min.); Numeração de acordo com a tabela 2 _____ 36

FIGURA 21 - Cromatograma do óleo volátil das flores** de Baccharis trimera**, em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250℃ (4℃/min.). _____ 37

FIGURA 22 - Cromatograma do óleo volátil das folhas de Baccharis trimera, em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250℃ (4℃/min.) _____ 37

FIGURA 23 - Cromatograma do sesquiterpeno ledol isolado do óleo volátil das flores de Baccharis trimera, em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250 ℃ (4 ℃/min.). 38

FIGURA 24 – Espectro de massas do ledol, isolado das flores de Baccharis trimera 38

FIGURA 25 – Determinação da estereoquímica do acetato de carquejila pelo método de Horeau. 42

FIGURA 26 -(A) Análise da fração de monoterpenos de Baccharis articulata na fase quiral 6-Me –2,3-Pe-β-CD. 6 psi H_2, 40-180 ℃ (3 ℃/min.). (B) Separação do (+/-)-β-pineno do óleo na fase lipodex-E. 6 psi H_2, 40-180 ℃ (3 ℃/min.). 43

FIGURA 27 – Espectro de ^{13}C do óxido de bisabolol-B, em $CDCl_3$, a 100 MHz 49

FIGURA 28 - Espectro de ^{13}C a 100MHz expandido do óxido de bisabolol-B 49

FIGURA 29 – . Espectro de ^{13}C óxido de bisabolol-A, em $CDCl_3$, a 100 MHz 50

FIGURA 30 – Espectro de ^{13}C a 100MHz expandido do óxido de bisabolol-A 50

FIGURA 31 - Cromatograma da amostra do óleo de Matricaria chamomilla oriundo da localidade de Ibarama-RS. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. 51

FIGURA 32 – Cromatograma do óleo volátil de Matricaria chamomilla, obtido de plantas cultivadas em estufa. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. 52

FIGURA 33 – Fotos dos testes antimicrobianos por biautografia dos óxidos de bisabolol A e B, comparado com o óleo de Matricaria chamomilla frente a Stafilococus áureos (A) e Micrococus luteos(B), onde 1. óxido de bisabolol A; 2. óleo de camomila; 3. óxido de bisabolol-B 53

FIGURA 34 – Cromatograma do óleo volátil de Pluchea quitoc da amostra B e identificação do sesquiterpeno α-gurguneno (68). Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2 57

FIGURA 35 – Espectro de massas α-gurguneno presente no óleo de Pluchea quitoc . 58

FIGURA 36 – Cromatograma do óleo volátil de Pluchea quitoc da amostra A e identificação dos sesquiterpenos α-gurguneno (68), Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2 58

FIGURA 37- Cromatograma do composto isolado do óleo volátil de** Pluchea quitoc**. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. 59

***FIGURA 38 - Espéctro de RMN ^1H a 400 MHz em $CDCl_3$, do composto isolado de** Pluchea quitoc 59*

FIGURA 39 - Espéctro de RMN ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do composto isolado de Pluchea quitoc 60

FIGURA 40 – Espéctro de RMN DEPT-135 a 100 MHz em $CDCl_3$ do composto isolado de Pluchea quitoc. 61

FIGURA 41 – Cromatograma do produto de hidrolise do sesquilavandulol acetato. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *62*

FIGURA 42 – Espectro de RMN ^1H a 400 MHz em $CDCl_3$ do produto de hidrólise do sesquilavandulol acetato. *63*

FIGURA 43 – Espectro de RMN ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do produto de hidrólise do sesquilavandulol acetato *63*

FIGURA 44 – Cromatograma da co-injeção do óleo de Pluchea quitoc coletada em Fortaleza dos Valos com o álcool sesquivalandulol. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *64*

FIGURA 45 – Cromatograma da amostra original do óleo de Pluchea quitoc coletada em Fortaleza dos Valos. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *65*

FIGURA 46 – Cromatograma do óleo volátil de A. sellowii obtido da amostra A. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *69*

FIGURA 47 – Cromatograma do óleo volátil de A. sellowii obtido da amostra B. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *69*

FIGURA 48 – Separação enantiomérica do (+/-)-α-pineno e (+/-)-β-pineno no óleo de A. sellowii da amostra A. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180 ℃, 3 ℃/min, 6 psi H_2. *72*

FIGURA 49 – Determinação da composição enantiomérica do linalol no óleo de A. sellowii da amostra A utilizando-se a fase quiral 2,6-Me-3-Pe-β-CD *73*

FIGURA 50 – Cromatograma do óleo volátil da amostra A de A. sellowii após 30 dias de armazenamento. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi *75*

FIGURA 51 – Cromatograma do óleo volátil da amostra B de A. sellowii após 30 dias de armazenamento. *75*

FIGURA 52 – Espectro de massas do óxido de cariofileno encontrado no óleo degradado das duas amostras de A. sellowii. *76*

FIGURA 53 – Espectro de massas do guaiol encontrado no óleo degradado das duas amostras de A. sellowii. *76*

FIGURA 54 – Cromatograma do óleo volátil das folhas nativas de Aeollanthus suaveolens. *78*

FIGURA 55– Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em $CDCl_3$ do sesquiterpeno β-farneseno isolado do óleo volátil de Aeolanthus suaveolens. *79*

FIGURA 56 – Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em $CDCl_3$ do sesquiterpeno isolado do óleo volátil de Aeolanthus suaveolens. *79*

FIGURA 57 – Cromatograma da lactona isolada de A. suaveolens. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *80*

FIGURA 58 – Espectro de RMN de ^{13}C, a 100 MHz em $CDCl_3$, da lactona isolada do óleo volátil de Aeolanthus suaveolens *81*

FIGURA 59 – Espectro de RMN de ^{1}H, a 400 MHz em $CDCl_3$, da lactona isolada do óleo volátil de Aeolanthus suaveolens. ***81***

FIGURA 60 - Separação enantiomérica dos padrões (+/-)-linalol. Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180 °C, 3 °C/min, 6 psi H_2. ***82***

FIGURA 61 – Separação enantiomérica do linalol no óleo volátil de *A.suaveolens*. ***Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180 °C, 3 °C/min, 6 psi H_2.*** ***83***

FIGURA 62 – Separação enantiomérica do linalol no óleo volátil de *Ocimun basilicum*. ***Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180 °C, 3 °C/min, 6 psi H_2.*** ***83***

FIGURA 63 – Cromatograma do oléo volátil de Cunila microcephala ***88***

FIGURA 64 – Espectro de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de *Cunila microcephalla.* ***88***

FIGURA 65 – Espectro de ^{13}C DEPT-135 a 100 MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de Cunila microcephalla. ***89***

FIGURA 66 – Espectro de RMN de ^{1}H a 400MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de Cunila microcephalla. ***89***

FIGURA 67 – Cromatograma do óleo volátil degradado de *Cunila microcephala*. ***Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2. .*** ***91***

FIGURA 68 – Cromatograma da lactona isolada do óleo degradado de *Cunila microcephala*. ***Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2.*** ***92***

FIGURA 69 – Espectro de ^{13}C a 100MHz em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de Cunila microcephala. ***92***

FIGURA 70 – Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de Cunila microcephala. ***93***

FIGURA 71 – Espectro de ^{1}H a 400MHz em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de Cunila microcephala. ***93***

FIGURA 72 – Cromatograma do óleo volátil das folhas adultas de Z. hyemale. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2. ***100***

FIGURA 73 – Cromatograma do óleo volátil das folhas jovens de Z. hyemale. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2 ***100***

FIGURA 74 – Cromatograma do óleo volátil das flores de Z. hyemale. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2 ***101***

FIGURA 75 – Cromatograma do óleo volátil dos frutos de Z. hyemale. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2 ***101***

FIGURA 76 – Separação enantiomérica do (+/-)-α-pineno no óleo da flor (A) e no óleo do fruto(B), na fase. Condições: 3-Bu-2,6-Pe-γ-CD, 40-180 °C, 2 °C/min, 6 psi H_2. ***102***

FIGURA 77 – Separação enantiomérica do (+/-)-limoneno no óleo da flor (A) e no óleo do fruto(B). Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180 °C, 3 °C/min, 6 psi H_2. ***103***

FIGURA 78 - Isômeros do nerolidol. _____ *104*

FIGURA 79 – Cromatograma do nerolidol isolado do óleo das folhas jovens de Zanthoxylum hyemale. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180 ℃, 2 ℃/min, 6 psi H_2. _____ *104*

FIGURA 80 – Separação enantiomérica dos padrões racêmicos de Z/E-nerolidol na fase 2,6-Me-3-Pe-β-CD. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180 ℃, 2 ℃/min, 6 psi H_2. _____ *105*

FIGURA 81 – Separação enantiomérica da co-injeção dos padrões racêmicos de Z/E-nerolidol com o óleo volátil de Zanthoxylum hyemale. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180 ℃, 2 ℃/min, 6 psi H_2. _____ *105*

FIGURA 82 – Cromatograma do sesquiterpeno isolado do óleo volátil das folhas adultas de Zanthoxylum hyemale. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. *106*

FIGURA 83 – Cromatograma do α–cadinol, isolado do óleo dos frutos de Zanthoxylum hyemale. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. _____ *107*

FIGURA 84 – Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de Zanthoxylum hyemale. _____ *107*

FIGURA 85 – Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 a 100 MHz em CDCl3, do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de Zanthoxylum hyemale _____ *108*

FIGURA 86 – Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_3$, do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de Zanthoxylum hyemale. _____ *108*

FIGURA 87 – Espectro de massas do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de Zanthoxylum hyemale. _____ *109*

FIGURA 88 – Teste de atividade antimicrobiana por bioautografia frente a Escherichia colli*, dos compostos isolados dos óleos voláteis de Z.hyemale onde; 3-sesquiterpeno ZY-1; 2-cadinol; 1-nerolidol.* _____ *109*

FIGURA 89 – Espectro de massas do sesquiterpeno ZY-1 isolado do óleo de Z.hyemale. _____ *111*

FIGURA 90 – Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_3$, do sesquiterpeno ZY-1. _____ *111*

FIGURA 91 – Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$, do sesquiterpeno ZY-1

_____ *112*

FIGURA 92 – Espectro de RMN de DEPT-135 em $CDCl_3$, do sesquiterpeno ZY-1

_____ *113*

FIGURA 93 – Espectro de HMQC de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz. _____ *115*

FIGURA 94 – Espectro de HMBC de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz. _____ *116*

FIGURA 95 – Expansão 1 do espectro de HMBC de ZY-1. _____ *116*

FIGURA 96 – Expansão 2 do espectro de HMBC de ZY-1. _____ *117*

FIGURA 97 – Espectro de COSY de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz. _____ 118

FIGURA 98 – Estrutura do metabolito ZY-1, baseado na correlações ^1H-^1H COSY e HMBC (COSY :↔; HMBC:→), e pelo método de Horeau _____ 119

FIGURA 99 – Cromatograma do extrato hexanico das folhas adultas de Zanthoxylum hyemale. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2 _____ 122

FIGURA 100 - ***Caleol (90) e seus derivados obtidos_____ 124.***

FIGURA 101 – Cromatograma do resultado da reação de hidrólise de (90). Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. _____ 125

FIGURA 102 – Espectro de RMN de ^1H do álcool (91), em $CDCl_3$, a 400 MHz

._____ 126

FIGURA 103 – Espectro de RMN de ^{13}C do álcool (91), em $CDCl_3$, a 100 MHz_ _____ 126

FIGURA 104 – Cromatograma do resultado da reação de metilação de (91). Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. _____ 128

FIGURA 105 – Espectro de RMN de ^1H de (93), a 400 MHz em $CDCl_3$_____ 128

FIGURA 106 – Espectro de RMN de ^{13}C de (93), a 100 MHz em $CDCl_3$ ____ 129

FIGURA 107 – Cromatograma do produto de oxidação de 4. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. _____ 130

FIGURA 108 – Espectro de RMN de ^1H do derivado oxidado (94) a 400 MHz, em $CDCl_3$. _____ 131

FIGURA 109 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado oxidado (94), em $CDCl_3$ a 100 MHz _____ 131

FIGURA 110 – Injeção do álcool obtido pela hidrolise do produto natural (4) com o álcool obtido da redução com $NaBH_4$ (5). Condições: 2,6-Me-2,3-Pe-β-CD, 50-180 ℃, 3 ℃/min, 6 psi H_2. _____ 133

FIGURA 111. ***Formas de entrada do hidreto, durante redução de (94) com $NaBH_4$, baseado no modelo de Felkin- Anh _____ 134.***

FIGURA 112 – Cromatograma do produto da reação de alquilação do álcool (91). Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. _____ 135

FIGURA 113 – Espectro de RMN de ^{13}C de (95), em $CDCl_3$, a 100 MHz. __ 135

FIGURA 114 – Espetro de RMN DEPT 135 de (95), em $CDCl_3$, a 100 MHz. 136

FIGURA 115 – Espectro de RMN de ^1H de (95), em $CDCl_3$, a 400 MHz.___ 136

FIGURA 116 – Cromatograma do produto da reação de abertuta de epóxido com HCl 2N, após isolamento. Condições: SE-54, 50-250 ℃, 4 ℃/min, 7 psi H_2. ___ 138

FIGURA 117 – Espectro de ^{13}C a 400Mhz do triol (96), em $CDCl_3$, a 100 MHz._ _____ 138

FIGURA 118 – Espectro de DEPT 135 do triol (96), em $CDCl_3$, a 100 MHz 139

FIGURA 119 – Espectro de RMN de ^1H a 400Mhz do triol (96), em $CDCl_3$, a 400 MHz. 139

FIGURA 120 – Espectro de massas do triol (96). 139

FIGURA 121 – Cromatograma da mistura isomérica de (97) após isolamento. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2. 140

FIGURA 122 – Espectro de RMN de ^{13}C de (97), em $CDCl_3$, a 100 MHz. 141

FIGURA 123 – Espectro de RMN de DEPT 135° de (97), em $CDCl_3$, a 100 MHz. 142

FIGURA 124 – Espectro de RMN de ^1H de (97) em $CDCl_3$, a 400 MHz. 142

FIGURA 125 – Cromatograma da mistura isomérica de (98), após isolamento. Condições: SE-54, 50-250 °C, 4 °C/min, 7 psi H_2. 144

FIGURA 126 – Espectro de RMN de ^{13}C de (98), em $CDCl_3$, a 100 MHz 144

FIGURA 127 – Espectro de RMN de DEPT 135 de (98), em $CDCl_3$, a 100 MHz 145

FIGURA 128 – Espectro de RMN de ^1H de (98), em $CDCl_3$, a 100 MHz 145

FIGURA 129 – Cromatograma na fase aquiral SE-54 do óleo obtido de própolis 151

FIGURA 130 – Separação enantiomerica dos padrões de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD (A) e (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E(B). 152

FIGURA 131 – Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de Jaguari. 152

FIGURA 132 – Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de São Francisco de Assis. 153

FIGURA 133 – Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de Santiago-RS. 153

FIGURA 134 – Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de Jaguari 154

FIGURA 135 – Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de São Francisco de Assis-RS. 154

FIGURA 136 – Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de Santiago-RS. 155

FIGURA 137 – Separação enantiomerica do (+/-)-mentol na fase 6-Bn-2,3-Pe-β-CD. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180 °C, 3 °C/min, 6 psi H_2 159

FIGURA 138 – Determinação da configuração do mentol presente no óleo de Menta arvensis (A) através da co-injeção do (+/-)-mentol com o óleo (B). Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,35-180 °C, 2 °C/min, 6 psi H_2. 160

FIGURA 139 – Separação enantiomerica do (+/-)-cis/trans-nerolidol. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180 ℃, 2 ℃/min, 6 psi H_2. ***160***

FIGURA 140 – Cromatograma do terpineol (A) e separação diastereoisomérica dos epoxidos (B), na fase 6-Bn-2,3-Pe-β-cd. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180 ℃, 3 ℃/min, 6 psi H_2. ***161***

FIGURA 141 – Determinação da ordem dos enantiômeros do (+/-)-mentol, com co-injeção de (-)-mentol, em: (A) 6-iBc-2,3-Pe-β-CD/OV 1701 1:1; e (B) e 6-iBc-2,3-Pe-γ-CD/OV 1701Condições: 40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2 ***163***

FIGURA 142 – Separações enantioméricas do (+/-)-a-pineno e (+/-)-limoneno no óleo volátil de Baccharis articulata. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe-β-CD,40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2. ***164***

FIGURA 143 – Separação enatiomérica do linalool no óleo volátil de Aelanthus suaveolens. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe-β-CD,40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2. ***165***

FIGURA 144 – Separação enantiomérica do (+/-)-mentol sintético no óleo adulterado de *Menta arvensis*. ***Condições: 6-Ibc-2,3-Pe-β-CD,40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2.*** ***165***

FIGURA 145 – Separação enantiomerica do (+/-)-α-pineno e determinação da pureza enantiomerica do (+)-limoneno, no óleo volátil das flores de Z.hyemale. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β-CD,40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2. ***166***

FIGURA 146 – Separação enantiomerica do (+/-)-α-pineno no óleo volátil dos frutos de Z. hyemale, na fase 6-Ibc-2,3-Pe-β-CD. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180 ℃, 1 ℃/min, 6 psi H_2. ***167***

FIGURA 147 – Separação enantiomérica do(+/-)-linalol na coluna empacotada com a fase quiral 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, 45 ℃, isoterma, 6 psi H_2. ***168***

FIGURA 148 – Separação enantiomérica da (+/-)-fenchona na coluna empacotada com a fase quiral 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, utilizando um programa com isoterma ***168***

FIGURA 149 – Determinação da ordem de eluição dos enantiomeros da cetona (+/-)-fenchona, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD.. ***169***

FIGURA 150 – Cromatograma do óleo de Foeniculum vulgare, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40 ℃ isoterma, 6 psi H_2. ***169***

FIGURA 151 – Separação enantiomerica de (+/-)-fenchona utilizando um programa com rampa de aquecimento. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40-180 ℃ ,1 ℃/min, 6 psi H_2. ***170***

FIGURA 152 – Co-injeção dos padrões de (+/-)-fenchona com o óleo de Foeniculum vulgare, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40 ℃ isoterma, 6 psi H_2. ***170***

FIGURA 153 – Separação enantiomerica de (+/-)-Cânfora, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40 ℃ isoterma, 6 psi H_2. _____ ***171***

FIGURA 154 – Cromatograma do óleo de Cinamomum cânfora, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40 ℃ isoterma, 6 psi H_2. _____ ***171***

FIGURA 155 – Cromatograma da co-injeção do óleo de *Cinamomum cânfora* ***com os padrões de (+/-)-Cânfora, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40 ℃ isoterma, 6 psi H_2.*** _____ ***172***

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	***Deslocamento químico***
λ	Comprimento de onda
°C	Graus Celcius
ATCC	American type culture collection.
Bc	Butiril (butanoil)
Bn	Benzil
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCP	Cromatografia em Camada Preparativa
CCSF	***Coluna Capilar de Sílica Fundida***
CD	Ciclodextrina
Col.	Colaborador(es)
COSY	Espectrometria de correlações – *do inglês: Correlated Spectroscopy*
d	Dubleto
EM	Espectrometria de Massas
DCM	Diclorometano
FID	Detector de Ionização de Chama – *do inglês: Flame Ionization Detector*
g	grama(s)
HMQC	(do inglês) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	(do inglês) Heteronuclear Multiple Bond Coherence
Hz	Hertz
iBc	Isobutiril (2-metilpropanoil)
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
p/v	Peso/volume
Pág.	Página
PF	Ponto de fusão
ppm	Parte(s) por milhão
Py	Piridina – *do inglês: Pyridine*

R_f	Fator de retenção – *do inglês: "Retention factor"*
s	Singleto
CCSF	Coluna Capilar de Sílica Fundida
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultra-Violeta
v/v	Volume/volume
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
$CDCl_3$	Clorofórmio Deuterado
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
mL	mililitros
min.	minutos
mmol	milimol(s)
m/z	Relação massa/carga elétrica
μg	microgramas
N	Concentração Normal
Na	Sódio
NA	Não Ativo
IK	Índice de Kovat's
$[\alpha]^{25}_D$	Rotação Ótica
d^{25}	Densidade
η_d^{25}	Índice de Refração
CG	Cromatografia Gasosa
NPPN-SM	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais de Santa Maria
t_r	Tempo de Retenção
t.a.	Temperatura Ambiente
THF	Tetrahidrofurano

CAPITULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Introdução e Objetivos

A importância e a ampla utilização de espécies vegetais aromáticas na medicina popular tem levado um grande número de espécies a participarem de Farmacopéias. Entretanto, considerando-se o grande número de plantas presentes, principalmente em florestas tropicais e subtropicais do planeta, pouco se sabe acerca dos constituintes químicos destes vegetais. Com base nesses argumentos, também a CEME (Central de Medicamentos) tem elaborado listas de espécies vegetais fitoterápicas de maior difusão, como prioritárias para investigação química, farmacológica e biotecnológica.[1] Atualmente, produtos de origem vegetal representam uma das principais fontes de insumos na indústria de medicamentos, sendo utilizados também como aditivos para o setor alimentício, na cosmética, produtos de higiene, etc, gerando um grande movimento na economia mundial.

O mercado mundial desse grupo de produtos atinge vários bilhões de dólares (30 a 40 bilhões anuais). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna tenham sido desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Só no período 1989-1994, cerca de 200 medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), agência americana de controle de medicamentos e alimentos, foram obtidos de fontes naturais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo veio dessas fontes. Se considerarmos as drogas anticancerígenas e os antibióticos isoladamente, esse percentual cresce, atingindo aproximadamente 70%. Embora até o momento apenas 10% da biodiversidade mundial tenham sido estudadas, cerca de 140 mil metabólitos, oriundos sobretudo de plantas superiores, já foram isolados e caracterizados. A maioria, no entanto, ainda não foi avaliada biologicamente.[2,3]

No Brasil estima-se que 25% do faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam de origem vegetal. Entretanto, o panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais.[4] Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram

estudadas em busca de compostos ativos e somente 1.100 espécies foram avaliadas quanto a suas propriedades medicinais.[5]

Estas informações revelam a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação aqueles praticados nos países desenvolvidos. Esses dados indicam claramente o quanto a rica biodiversidade dos países não desenvolvidos contribuem para gerar avanços na economia dos países desenvolvidos.

O mercado de óleos essenciais constitui uma forte atividade econômica. Isto é confirmado quando observamos o grande crescimento no cultivo de espécies aromáticas, utilizadas como fontes de matérias primas para a utilização industrial. Embora difícil de estimar, avalia-se que, para a obtenção de óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae, sejam cultivados mais de 500 mil hectares, destacando-se como espécies de maior utilização e respectiva produção mundial em toneladas/ano: *Mentha arvensis* L var. *piperascens* Holmes (8600), Mentha x piperita L. (2367), *Mentha spicata* L. (880), *Lavandula* x *intermedia* Emeric. Ex Loisel (768), *Mentha* x *glacilis* Sole (530) e *Rosmarinus officinalis* L. (295).[6]

Dentro de temas que tratam da utilização de óleos essenciais encontramos uma vasta gama de aplicações, envolvendo desde utilização em perfumes e fragrâncias até emprego em condimentos alimentares e produtos farmacêuticos. As pesquisas desenvolvidas nesta área incluem temas diversificados como: *i*) controle de qualidade de produtos utilizados como alimentos como, por exemplo, sucos de frutas, *ii*) elucidação das propriedades biológicas de óleos essenciais visando o descobrimento de novos agentes antimicrobianos e *iii*) estudos que envolvem interações planta-inseto. Devido ao grande interesse nesta área de pesquisas, observou-se na última década o desenvolvimento de novas e mais modernas técnicas de análises, como o aprimoramento dos métodos cromatográficos de análise de componentes voláteis dos óleos essenciais. O desenvolvimento de técnicas como a cromatografia gasosa enantiosseletiva com o uso de fases estacionárias quirais tem impulsionado pesquisas que visam analisar os componentes quirais de óleos essenciais, fornecendo importantes informações quanto a composição enantiomérica de compostos voláteis e, muitas vezes, informando sobre a possibilidade de adulteração de óleos essenciais comerciais.[7]

Os projetos que constituem esta linha de pesquisa apresentam uma importância fundamental em vista do caráter dinâmico da medicina popular e do desaparecimento de espécies vegetais e de práticas culturais; considerando-se, que o Brasil detém a maior diversidade genética vegetal do mundo, e que conta com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000.[2] É necessário, registrar e investigar cientificamente todas as informações possíveis sobre o emprego de plantas difundidas na medicina popular.

O estudo de constituintes químicos fixos e voláteis de espécies de interesse medicinal, principalmente da flora do Rio Grande do Sul, vem sendo desenvolvido de forma sistemática em nossos laboratórios. Dentre as plantas estudadas pode-se citar *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae), *Helietta longifoliataa* (Rutaceae), *Scutia buxifolia* Reiss e *Discaria americana* Gill & Hook, *Condalia buxifolia* (Rhamnaceae).[8-12], *Waltheria douradinha* (Sterculiaceae), *Blefarocalix salicifolium* (Myrtaceae). A investigação química destas plantas tem possibilitado o isolamento e a determinação estrutural de uma gama de substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos, como flavonóides, alcalóides, coumarinas e terpenos. Recentemente, através da criação do laboratório de microbiologia do NPPN, tornou-se possível a realização de "screenings" farmacológicos de extratos brutos e de substâncias puras, possibilitando a descoberta de novos produtos naturais com potenciais farmacologicos.[13,14]

O presente trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo principal a investigação química e antimicrobiana dos óleos essenciais de oito espécies medicinais pertencentes as seguintes famílias: Lamiaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Asteraceae. Estas famílias foram selecionadas entre outras estudadas pelo grupo, por apresentarem uma variedade de representantes nativos ou exóticos, amplamente utilizadas na medicina popular desta região. Assim, neste trabalho foram selecionadas para estudo as seguintes espécies medicinais:

Asteraceae

- *Baccharis trimera*
- *Baccharis articulata*
- *Matricaria chamomilla*

- *Pluchea quitoc*

Verbenaceae

- *Aloysia sellowii*

Lamiaceae

- *Aeollanthus suaveolens*
- *Cunila microcephala*

Rutaceae

- *Zanthoxylum hyemale*

O estudo destas espécies teve como objetivos específicos:

- Isolar os constituintes fixos ou voláteis (óleos essenciais) de folhas, flores, sementes e frutos das espécies selecionadas a partir de métodos de extração adequados como hidrodestilação e extração com solventes orgânicos.
- Identificar estruturalmente os compostos isolados através de métodos comparativos e da aplicação de métodos físicos, tais como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.
- Analisar a estereoquímica dos constituintes de misturas, ou isolados, por cromatrografia gasosa quiral enantioseletiva.
- Quantificar os compostos majoritários presentes nas frações voláteis de todas as espécies estudadas
- Realizar estudos farmacológicos dos óleos essenciais obtidos e/ou dos constituintes isolados puros, selecionando o óleo ou as moléculas bioativas
- Desenvolver parâmetros para estudos de relação estrutura-atividade, através de inclusão de diferentes grupos funcionais nas moléculas bioativas.
- Analisar os óleos essenciais obtidos de própolis produzidas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul.
- Realizar uma avaliação do potencial de aplicação de novas fases estacionárias quirais, na análise dos constituintes quirais de óleos essenciais.

4.1 CAPITULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terpenóides

Os terpenóides constituem a maior família de produtos naturais, dentro da qual são encontrados os componentes de óleos voláteis. Um número superior a 22.000 compostos desta classe estão descritos na literatura, e o número de estruturas definidas tem duplicado a cada década desde 1970.[15] Os terpenóides possuem diversas funções nas plantas como, por exemplo, hormônios (giberelinas, ácido abscisico), pigmentos fotossintéticos (fitol, carotenóides), carreadores de elétrons (umbiquinona, plastoquinona), mediadores na construção de polissacarídeos (poliprenil fosfatos) e componentes estruturais de membranas (fitosteróis).[16] Somado a estas funções fisiológicas, metabólicas e estruturais, muitos terpenóides vegetais apresentam funções especificas (freqüentemente nas famílias C_{10}, C_{15} e C_{20}), atuando como fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e moléculas de sinalização, por isso tem papel proeminente em ecologia química. Os terpenóides estão envolvidos em quase todas as interações possíveis entre plantas, entre plantas e animais e entre plantas e microorganismos.[16]

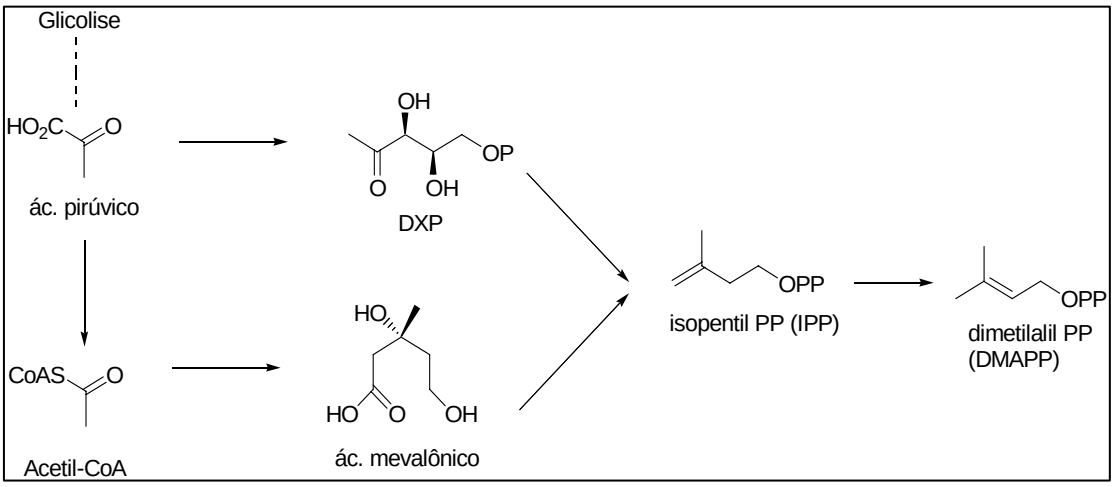
Disponíveis em quantidades significativas em óleos essenciais, resinas e ceras, os terpenóides são importantes recursos renováveis e estão presentes em uma variedade de produtos comerciais, incluindo solventes, flavorizantes e fragrâncias, adesivos e intermediários sintéticos. Membros da classe dos terpenóides também são úteis na indústria de polímeros (borracha), farmacêutica (artemisinina, taxol) e em agroquímicos (piretrinas, azadiractina).[17]

Apesar desta significante importância econômica dos terpenóides e suas variadas funções, relativamente pouco é conhecido sobre o metabolismo terpenóide e sua regulação em plantas. Existem muitas razões para isto, sendo um dos problemas predominantes as inúmeras mudanças de rumo dos terpenóides. Uma dada planta pode sintetizar muitos tipos diferentes de terpenóides (de C_5 até C_{40}), em diferentes tempos, localizações, por diferentes propósitos e por todo curso de seu desenvolvimento. Todos os terpenóides são produzidos por um caminho biossintético comum, por isto devem existir mecanismos sofisticados que

garantam a produção de níveis apropriados de cada um destes compostos. Rotas de elucidação para o metabolismo de terpenóides funcionalizados não são triviais e a determinação da enzimologia do metabolismo terpenóide tem demonstrado ser um estudo muito desafiador. Isto se deve a dificuldade em se obter informações através de estudos enzimáticos do metabolismo terpenóide, e porque muitas das reações envolvidas (mecanismos envolvendo íon carbônio) são distintas do metabolismo primário de carboidratos, proteínas e lipídios.[15]

2.2 Classificação e Biogênese

Os terpenóides são definidos como produtos naturais cuja estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno; por isso, esses compostos também são chamados de isoprenóides. As unidades de isopreno podem originar-se biogeneticamente de dois caminhos; via ácido mevalônico ou via 1-deoxi –D-xilulose-5-fosfato (DXP) (Esquema 1).



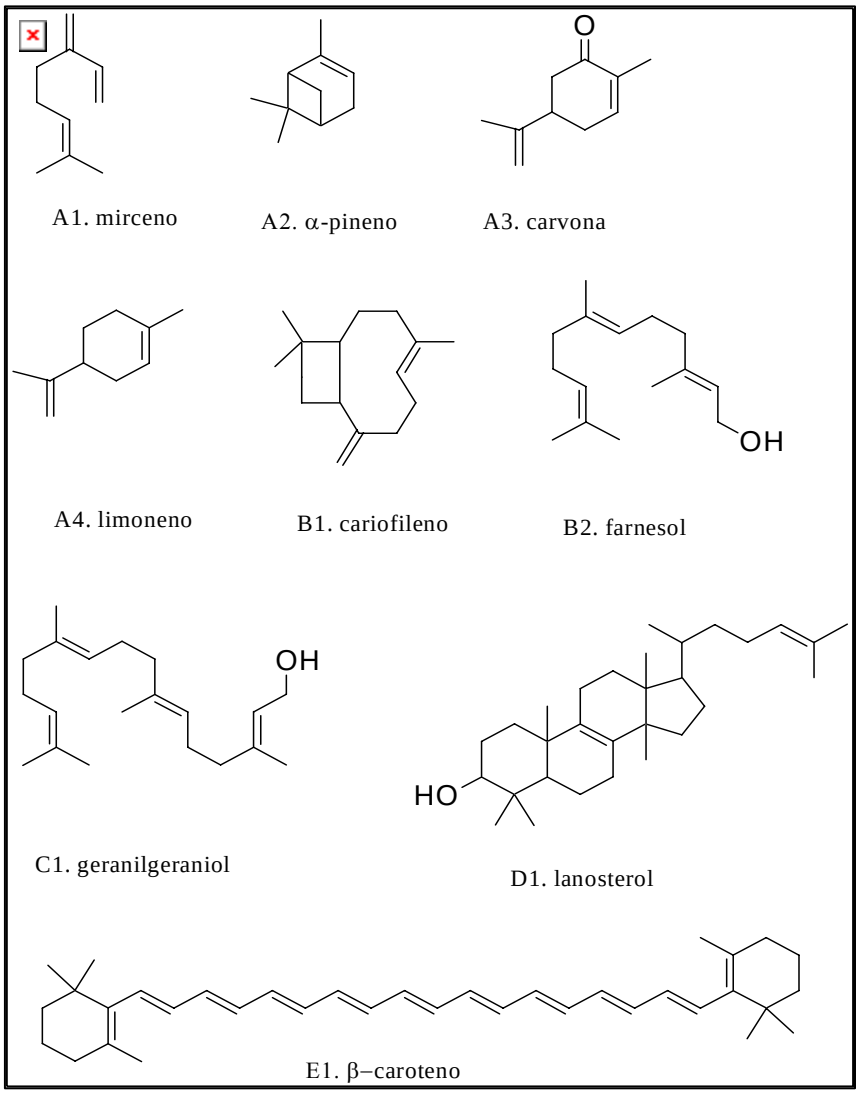
Esquema 1. Formação das unidades de isopreno a partir das rotas do DXP e ácido mevalônico.

O conceito de que os terpenóides são construídos a partir das unidades de isopreno recebe o nome de "regra biogenética do isopreno**",**[18] sendo desta maneira divididos conforme o número de unidades de isopreno que constituem a estrutura do terpeno de

acordo com a Tabela 1. A Figura 1 apresenta alguns terpenóides típicos encontrados em plantas.

Tabela 1. Nomenclatura dos terpenos por unidades de isopreno.

Átomos de carbonos	Unidades de isopreno	Nomenclatura
10	2	Monoterpenos
15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos



A1. mirceno A2. α-pineno A3. carvona

A4. limoneno B1. cariofileno B2. farnesol

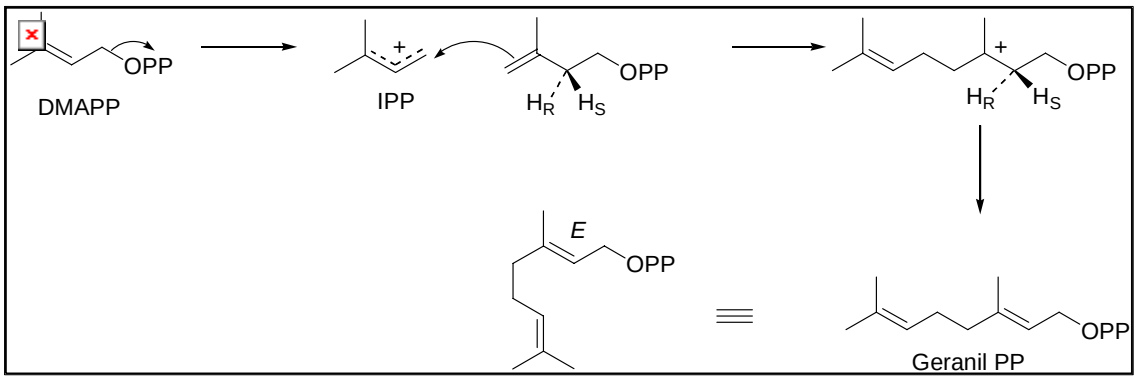
C1. geranilgeraniol D1. lanosterol

E1. β–caroteno

Figura 1. Estruturas de alguns terpenos típicos. (A) Monoterpenos: 1. mirceno, 2. α–pineno, 3. carvona, 4.limoneno, (B) Sesquiterpenos: 1. cariofileno, 2. farnesol, (C) Diterpenos: 1. geranilgeraniol, (D) Triterpenos: 1. lanosterol, (E) Tetraterpenos : β-caroteno

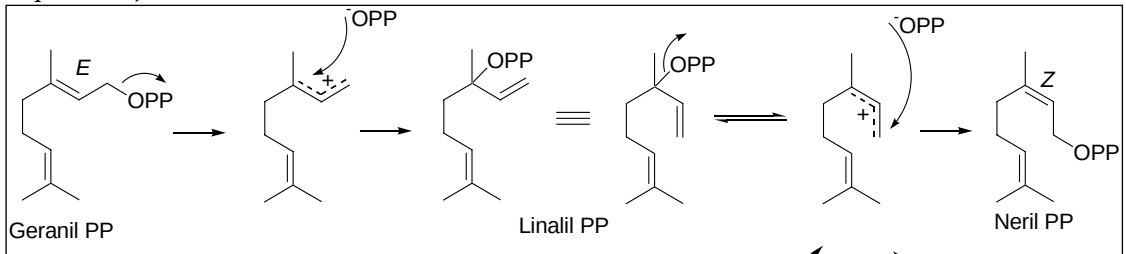
Conforme já mencionado, terpenóides voláteis são constituídos por dois grupos conforme sua biossíntese, os monoterpenos e os sesquiterpenos, ambos presentes simultaneamente em óleos voláteis e tendo como precursor biossintético o ácido mevalônico. Assim, a rota de biossíntese do mevalonato é empregada para explicar a origem biogenética de terpenos voláteis em plantas.[19]

O mevalonato é formado pela condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida então a mevalonato em uma reação irreversível. O mevalonato é convertido em isopentil–pirofosfato, ou isopreno-ativo, unidade básica na formação de terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato vai originar, conseqüentemente, moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco átomos de carbono. A combinação do dimetilalil difosfosfato (DMAPP) e isopentil difosfato (IPP), promovida pela enzima prenil transferase, fornece o geranil difosfato (GPP) (Esquema 2).

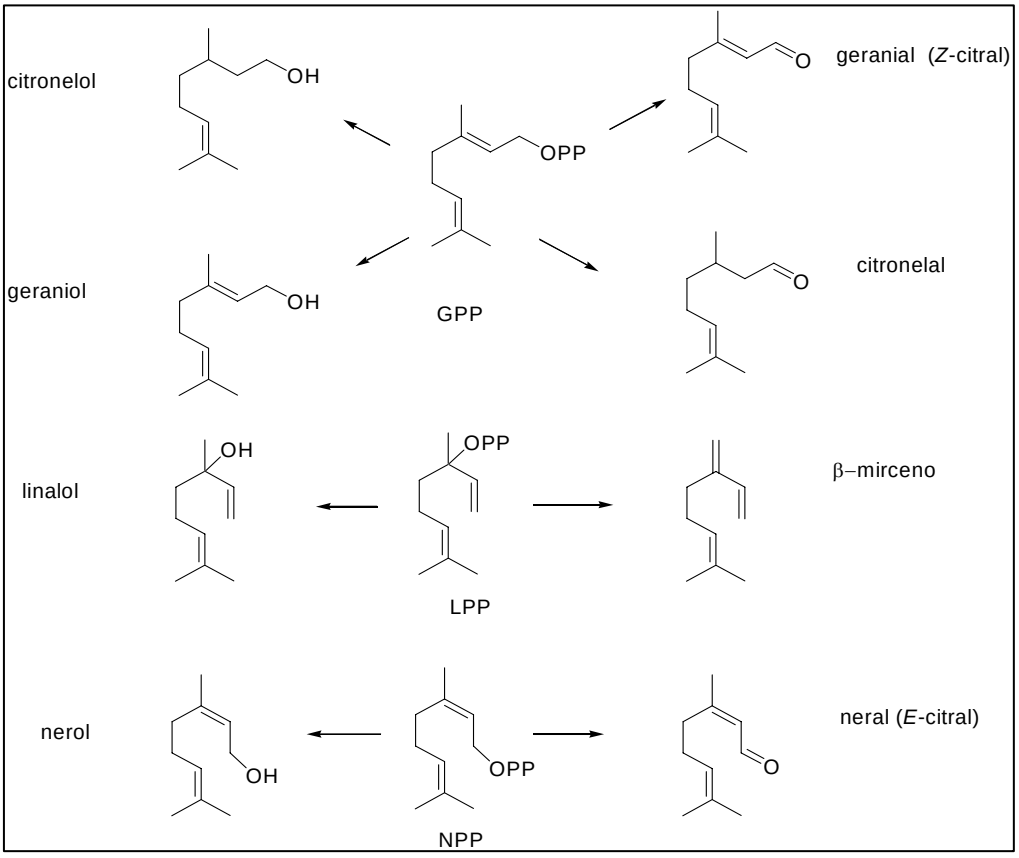


Esquema 2. Combinação do dimetilalil difosfosfato (DMAPP) e isopentil difosfato (IPP) formando o geranil difosfato (GPP).

É a partir do *trans*-geranil-pirofosfato(GPP) que se formam os intermediários Linalil-pirofosfato (LPP) e neril-pirofosfato (NPP) (Esquema 3). Estes três compostos (GPP, LPP, NPP) podem dar origem a uma extensa classe de monoterpenos lineares componentes de óleos voláteis, resultando assim em hidrocarbonetos, álcoois e aldeídos (Esquema 4).

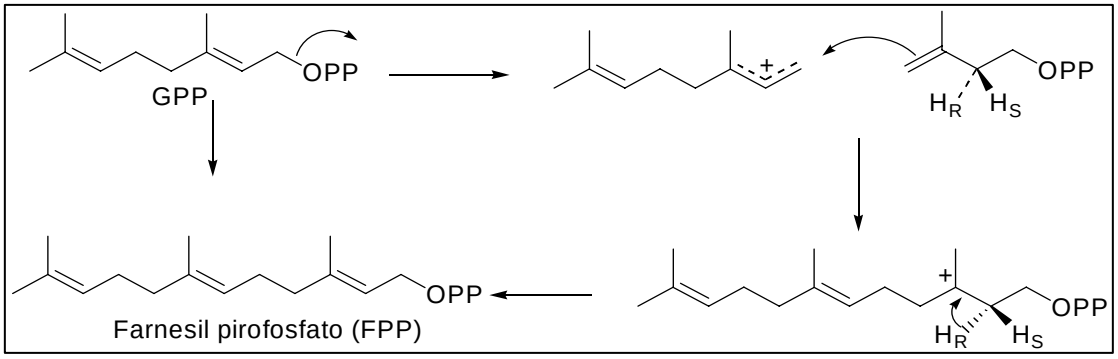


Esquema 3. Formação dos LPP e NPP a partir do GPP.



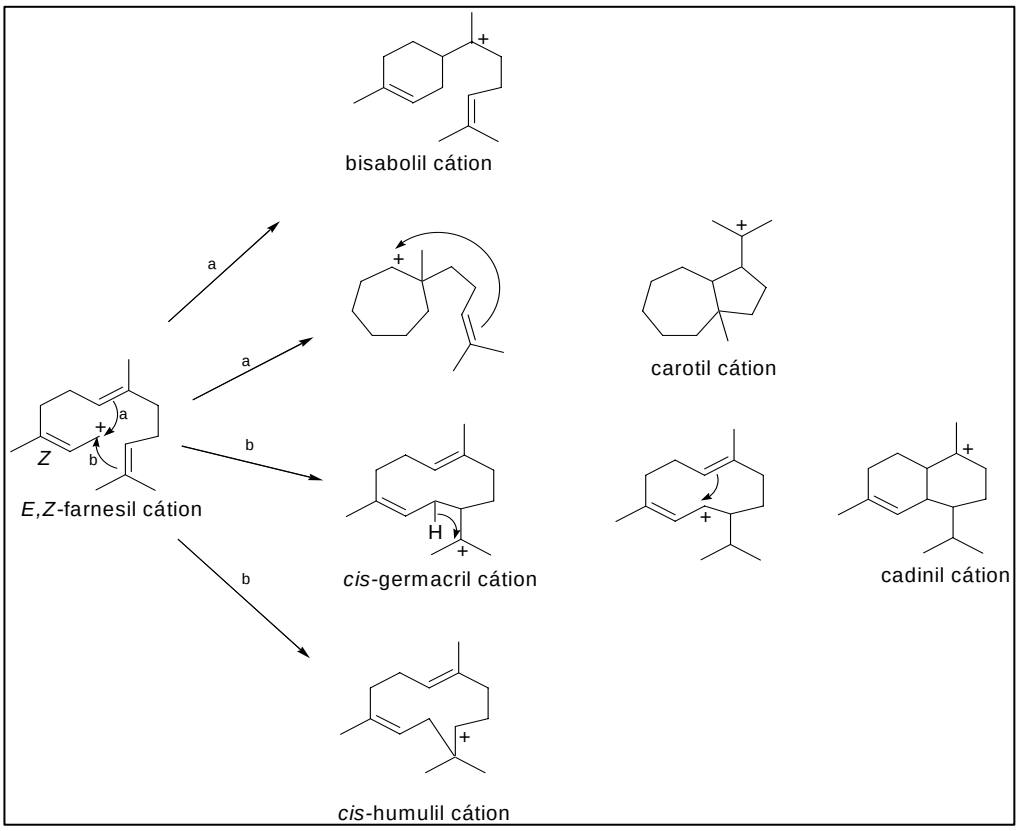
Esquema 4. Alguns monoterpenos originados pelo GPP, LPP e NPP.

Novas ligações cabeça-cauda entre geranil-pirofosfato (GPP) e isopentil-pirofosfato resultarão na formação do farnesil pirofosfato (FPP), o precursor fundamental de sesquiterpenos (C_{15}) (Esquema 5).

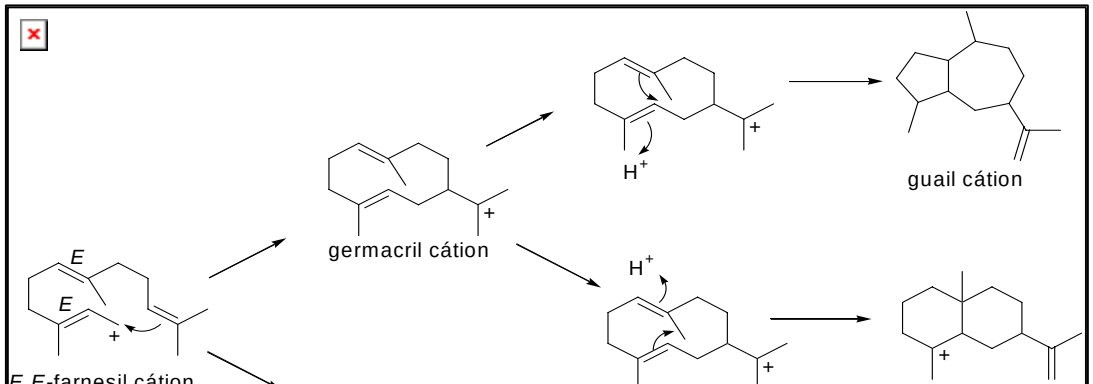


Esquema 5. Combinação do GPP com IPP formando o FPP.

As duas formas isoméricas do farnesil pirofostato (*E,E*-FPP e *E,Z*-FPP) podem originar diferentes rotas biossintéticas de obtenção de sesquiterpenos, dependendo do modo de ciclização, resultando assim em variados esqueletos carbônicos.(Esquemas 6 e 7).



Esquema 6. Alguns esqueletos de sesquiterpenos originados por ciclizações no *E,Z*-FPP.



Esquema 7. Alguns esqueletos de sesquiterpenos originados por ciclizações no *E,E*-FPP.

2.3 Localização

Os terpenos componentes de óleos voláteis são os princípios odoríferos encontrados em várias partes de plantas. Como evaporam quando expostos ao ar em temperaturas comuns são chamados óleos voláteis, etéreos ou essenciais, sendo o último termo usado porque os óleos voláteis representam essências ou componentes odoríferos das plantas. Dependendo da família botânica, estes óleos podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos capilares (Lamiaceae), células parenquimais modificadas (Piperaceae), tubos oleaginosos (Apiaceae) ou canais lisígenos ou esquizógenos (Pinaceae, Rutaceae). Podem ser formados diretamente pelo protoplasma, pela decomposição da camada de resina da parede celular, ou pela hidrólise de certos glicosídeos. Nas coníferas, os óleos voláteis podem ocorrer em todos os tecidos; na rosa aparecem em grande quantidade só nas pétalas das flores; na canela só no córtex e nas folhas; nos frutos apiáceos, apenas no pericarpo; nas mentas, somente nos pêlos glandulares dos caules e das folhas; na laranja, um tipo de óleo ocorre apenas nas pétalas das flores e outro somente na casca do fruto.[20]

Embora a constituição química dos óleos voláteis seja muito diferenciada, existem algumas propriedades físicas em comum. Possuem odores característicos, altos índices de refração e a maioria são oticamente ativos, sendo suas rotações específicas muitas vezes

uma propriedade útil do ponto de vista de caracterização. Em geral, os óleos voláteis são imiscíveis com água, mas são solúveis em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos.

2.4 Quimiotipos

> A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é freqüente em plantas ricas em óleos voláteis. Quimiotipos são vegetais da mesma espécie que são botanicamente idênticos mas que diferem quimicamente. Por exemplo, para Chrysantheumum vulgare (L.) Bernhardi (= Tanacetum vulgare L.), nome vulgar "catinga-de-mulata", apenas na Hungria foram caracterizados 26 quimiotipos, com diferenças significativas na composição dos óleos.[21]

Está provado cientificamente que o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos voláteis é mais constante. Exemplo disto é a hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), que, quando cultivada em períodos de dias longos e noites curtas, apresenta um maior rendimento de óleo, com teor aumentado de mentofurano; ao contrário, noites frias favorecem a formação de mentol. O grau de hidratação do terreno e a presença de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar na composição dos óleos voláteis. Não se pode, entretanto prever ou estabelecer um único padrão; já que cada espécie reage de forma diferenciada.[21]

2.5 Extração e conservação de óleos essenciais.

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com sua proposta de utilização do mesmo. Os métodos mais comuns estão citados a seguir.

2.5.1 Enfloração

Esse método é atualmente empregado por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo volátil de pétalas de flores.[22]

2.5.2 Arraste por vapor d'água

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Existem dois tipos de extrações distintas por arraste de vapor d'água. Esta distinção é feita pela forma da qual se estabelece o contato da amostra com a água. A primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água numa caldeira. Na segunda chamada de destilação por vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provem de um gerador.[23]

2.5.3 Extração com solventes orgânicos

Os óleos voláteis são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter ou hexano) que, entretanto extraem juntos outros compostos lipofílicos além dos óleos voláteis.

2.5.4 Prensagem

Esse método é empregado para a extração dos óleos voláteis de frutos cítricos e sementes. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é, então separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada.[22]

2.5.5 Extração por CO_2 supercrítico

Esse método permite extrair os aromas naturais e óleos essenciais de vários tipos de plantas, de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha bastante utilizado para a extração industrial de óleos voláteis. Nenhum traço de solvente permanece no produto final, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO_2 é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31^oC. Nessa temperatura, o CO_2 atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO_2 retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação.[23]

2.5.6 Extração por microondas

Muitos componentes de óleos essenciais, aromas, pesticidas, dioxinas, fenóis e outros compostos orgânicos tem sido extraídos de matrizes (principalmente de solos, sedimentos, tecidos animais, alimentos e plantas) por radiação de microondas. Todas estas aplicações mostram que o principal beneficio da extração por microondas é a redução do tempo de extração. Uma patente recente descreve este novo método de extração de produtos naturais sem o uso de solventes ou água, usando apenas a energia de microondas.[24] Em trabalho publicado por Reina,[25] foram comparados os métodos de extração por microondas e por hidrodestilação na obtenção dos óleos essenciais de espécies da família Labiateae, dentre as quais *Thymus vulgaris, Mentha crisp*a e *Ocimun basilicum.* Neste trabalho comprovou-se a redução do tempo de extração para a obtenção dos óleos essenciais das espécies estudadas. Concluiu-se que 4,5 horas de extração por

hidrodestilação equivalem a 30 minutos de extração por microondas.[26] O aparato para a extração de óleos essenciais por microondas é ilustrado na Figura 2.

.

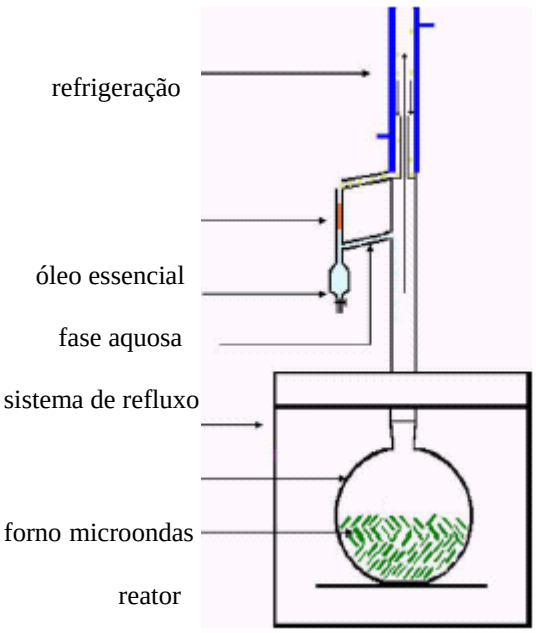


Figura 2. Sistema para extração de óleos essenciais por microondas.

2.5.7 Conservação

A relativa instabilidade dos terpenóides que constituem os óleos voláteis torna difícil sua conservação. A deterioração dos óleos voláteis reduz seu valor comercial, além de constituir um fator de risco quando eles são destinados ao uso externo, já que podem causar alergias ou dermatites de contato.

As alterações ocorrem principalmente por reações de oxidação e de polimerização. Um fenômeno particular de deterioração é conhecido como resinificação e consiste na oxidação ao ar, sob a luz, com conseqüente mudança de odor, sabor, cor e viscosidade da essência. Como exemplo destas mudanças podemos citar a degradação de terebentina (óleo-resina extraída de várias espécies de Pinus), que ocorre quando submetida a condições inadequadas de armazenamento.

Os óleos voláteis devem ser guardados dessecados (secos com Na_2SO_4 anidro) e livres de impurezas insolúveis. Para reduzir as degradações, deve-se empregar frascos de pequeno volume e embalagens neutras feitas de alumínio, aço inoxidável ou vidro âmbar, completamente cheios e hermeticamente fechados, que devem ser estocados a baixa temperatura ou, de preferência, em atmosfera de nitrogênio.

2.6 Atividade biológica de óleos voláteis

Várias indústrias estão à procura de fontes alternativas de matéria prima, afim de um ambiente natural e sustentável onde possam usufruir de compostos antimicrobianos, antioxidantes e protetores de alimentos. Tradicionalmente os óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Os óleos voláteis são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana,[26,27,28] esta atividade pode estar relacionada a defesa das plantas ao ataque de patógenos, pois desta forma os compostos voláteis se transformam em uma barreira para a adaptação do microorganismo patogênico. Deans e Ritchie[29] examinaram os óleos voláteis de 50 espécies de plantas aromáticas contra 25 bactérias. Como resultado deste estudo foram observadas várias reduções no crescimento de microorganismos, dependendo da concentração do óleo volátil utilizado. Em especial notou-se também a atividade de alguns destes óleos contra *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, bactérias causadoras de infecções alimentares.[30,31]

Muitas substâncias naturais tem sido alvo de interesse por possuírem propriedades antioxidantes, dentre as quais pode-se citar o β-caroteno, licopeno, albumina, flavanoides, e outros. Estudos realizados com óleos essenciais tem também evidenciado seus efeitos antioxidantes. Dorman[32] analisaram as propriedades antioxidantes dos óleos voláteis de *Pelargonium sp., Monarda citriodora var. citriodora, Myristica fragrans, Origanum*

vulgare ssp. hirtum e *Thymus vulgaris.* Estes óleos mostraram atividade antioxidante em níveis extremamente baixos de diluição, demonstrando o potencial destes produtos (óleos essenciais) como antioxidantes naturais.

2.7 Uso de compostos aromáticos no controle de patógenos em produtos acondicionados.

Problemas ambientais causados pelo uso excessivo de pesticidas, aliados a pressão por parte dos consumidores para reduzir o uso de aditivos químicos sintéticos em alimentos, tem causado o interesse e impulsionado pesquisas a fim de desenvolver métodos alternativos de controle de pestes ou pragas. Plantas com propriedades pesticidas são algumas das alternativas a serem utilizadas no controle de patógenos.[33,34] Os óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas tem sido extensivamente estudados com relação a suas atividades fungicidas e pesticidas, e avaliados quanto seu potencial de uso no controle de patógenos em alimentos, e como agroquimicos.[33] O interesse nesta área, devido a possibilidade de usar alternativas naturais para prevenir o crescimento de bactérias e fungos, tem notadamente aumentado. Plantas e produtos de plantas podem representar uma fonte de alternativa natural para aumentar o tempo de vida útil e a segurança de alimentos. Acreditando nesta alternativa, diversos autores mencionam em seus trabalhos os efeitos de substancias naturais nesta área. O fato de muitos destes produtos serem caracterizados por uma vasta gama de compostos voláteis, muitos dos quais substâncias com importante função na qualidade de aroma (“flavour”) do alimento, é mais um fator que provoca interesse por substancias aromáticas.[33] Muitos mecanismos de ação tem demonstrado que, quando submetidas a situações adversas como, por exemplo, o ataque de microorganismos patogênicos, a planta reage produzindo substancias para combater estes organismos invasores. Desta forma, os óleos voláteis e seus constituintes isolados tem sido testados quanto a sua potencialidade de aplicação como agentes antifúngicos e antimicrobianos naturais.[35,36,37]

2.8 Efeitos aleloquimicos de óleos essenciais

Existem muitos trabalhos relatando as propriedades fitotóxicas de óleos essenciais e terpenóides isolados. Extensas revisões podem ser encontradas a respeito deste tema, nas quais os autores descrevem experimentos de determinação do potencial bioherbicida de óleos voláteis. O efeito de óleos essenciais na inibição da germinação de sementes, e na inibição do crescimento de espécies é atribuído a ação individual dos componentes de óleos essenciais, mas em muitos casos a mistura de compostos em diferentes proporções podem ter efeito nestas interações. De acordo com An,[38] um aleloquimico pode assumir dois atributos complementares; inibição e estimulo. Estes atributos não necessitam ter os mesmos locais de ação. As mudanças de concentração alteram a dominância destes atributos, determinando a maior parte das propriedades biológicas. Se isto é verdade para um composto, pode-se dizer que a atividade biológica de uma mistura de compostos será determinada não somente pela sua concentração, mas também pelas interações entre si. Estas interações caracterizam as ações por sinergismo. Vários pesquisadores tem sugerido que as ações sinergisticas resultam da combinação de aleloquímicos, mas poucos trabalhos tem demonstrado claramente como estas ações sinergisticas ocorrem. Até o momento existem poucos experimentos envolvendo a combinação de terpenos, enquanto que combinações envolvendo diferentes proporções de substâncias são mais raras ainda.[39]

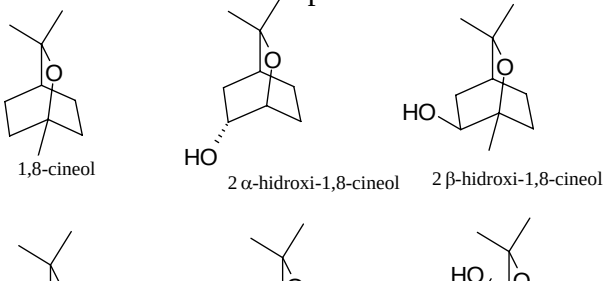
Os efeitos aleloquimicos de monoterpenóides podem ser bastante seletivos. O 1,8-cineol, por exemplo, demonstrou ser extremamente tóxico contra gramíneas da espécie *Schizachyrium scoparium* que ocorrem junto às comunidades de pinus, porém para a espécie *Leptochloa dúbia* o mesmo terpenóide demonstrou ser inativo.[40]

Vokou[41] e colaboradores, investigaram o potencial aleloquimico de 47 terpenóides de diferentes grupos afim de examinar o efeito destes compostos na germinação de sementes e no crescimento de espécies cultivadas de *Lactuca sativa.* Vinte e quatro compostos foram extremamente ativos na inibição do crescimento, em percentuais superiores a 85%, mas somente cinco compostos exibiram atividade na inibição de germinação de sementes. Os compostos que tiveram atividade em ambos os testes foram o

álcool terpinen-4-ol, e as cetonas dihidrocarvona e carvona (R e S). Neste estudo observou-se que o composto com maior atividade inibitória de germinação foi o álcool terpinen-4-ol, mas quando comparados por grupos, as cetonas foram mais ativas que os álcoois. A analise individual dos componentes com estruturas similares mostrou que, em casos comparativos como dihidrocarveol–dihidrocarvona e carveol–carvona, os produtos provenientes de oxidações resultaram em atividades mais severas. Entretanto, nos casos mentol–mentona, borneol–canfora não foram observadas mudanças. Efeitos similares, mas com poucas diferenças de atividade alelopática, foram observados quando o produto de oxidação era um aldeído em vez de cetona (por exemplo, analisando-se o par citronelol–citronelal) não demonstrando assim variações significativas.

Efeitos alelopáticos têm sido registrados para terpenos voláteis de *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *Arthemisia absinthium* L., *Arthemisia californica* Less., *Sassafrás albidum* Ness e *Salvia leucophylla* Greene., presentes no chaparral californiano, que geram um efeito inibitório tão intenso através de seus óleos voláteis, que outras plantas são totalmente inibidas em um raio de 1 a 2 metros, gerando zonas de solo nu em torno dos arbustos (ou grupo de arbustos) dessas espécies. Estudos apontaram os terpenos voláteis, tais como 1,8-cineol e cânfora (*S.leucophylla* Greene) e α-tujona e isotujona (*A.californica* Less), entre outros, como responsáveis por esse efeito inibitório.[42]

Existem também evidências de que alguns insetos utilizam óleos voláteis seqüestrados de plantas para se defenderem de seus predadores. Assim, os vapores de certas substâncias como o citronelal (utilizado por formigas) e α-pineno (utilizado por cupins), podem causar irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de um ataque. Certos himenópteros, por exemplo, seqüestram (sem alteração química) α- e β- pineno, entre outros componentes, de *Pinus sylvestris* L. (uma conífera européia). Dessa forma, estes insetos se defendem dos predadores como as formigas.[40] Outros insetos são capazes de transformar a substancia volátil ingerida, como ocorre com o besouro *Paropsisterna tigrina* e *Faex nigroconspersa*, que quando ingere o monoterpenóide 1-8-cineol, pelo consumo das folhas dos gêneros *Malaleuca* e *Eucalyptus* que contém um óleo volátil rico em 1-8-cineol, metabolizam o 1-8-cineol produzindo derivados deste monoterpeno[42] (Figura 3).



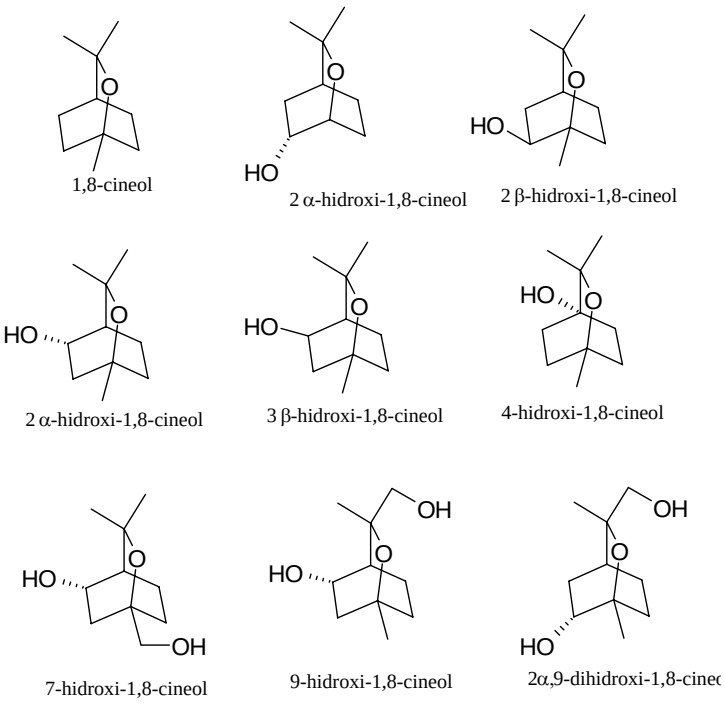


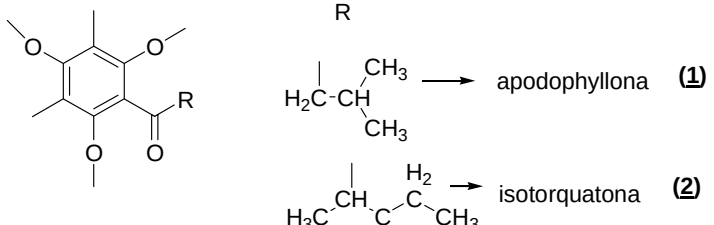
Figura 3. 1,8-Cineol e os produtos de transformação deste monoterpeno pelos besouros das espécies *Paropsisterna tigrina* e *Faex nigroconspersa*

2.9 Isolamento de novos monoterpenos e sesquiterpenos

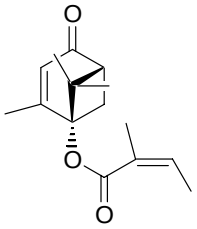
A partir do estudo fitoquímico, tem sido possível o descobrimento de novos representantes de mono e sesquiterpenos. Em muitos casos analisados, estes compostos são componentes dos óleos voláteis das espécies. Devido a isto, o estudo de óleos obtidos por hidrodestilações, somam-se aos procedimentos de fracionamento de extratos com solventes orgânicos nas análises fitoquímicas de espécies de plantas medicinais,[6] proporcionando em certos casos o isolamento de novos produtos naturais.[44]

a. Monoterpenos

O estudo do óleo essencial da espécie *Eucalyptus apodophylla*, obtido por hidrodestilação das folhas proporcionou o isolamento de novas cetonas arenicas, em óleos essenciais do gênero *Eucalyptus*, denominadas apodophyllona e isotorquatona.[45]

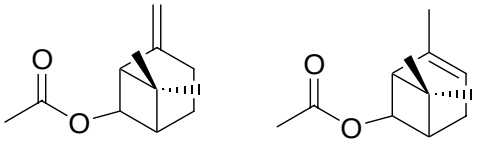


Através do estudo do óleo essencial de *Ferulago thirkeana* obtido por hidrodestilação, Baser e colaboradores[46] isolaram e identificaram um novo éster monoterpenico denominado ferulagona, o qual apresentou atividade antibacteriana.



Ferulagona **(3)**

O estudo do gênero *Psiadia* Jacq. (Asteraceae), uma espécie distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, forneceu o óleo essencial constituído por compostos bioativos. Gauvin,[47] em 2004 estudando extrato hexânico mencionou o isolamento de novos monoterpenos de *Psiadia anchusifolia* (Figura 4).



(4) **(5)**

Figura 4. Monoterpenos de *Psiadia anchusifolia.*

b. Sesquiterpenos

Diversos trabalhos publicados apresentam o isolamento de novos sesquiterpenos. Há muito tempo o estudo de sesquiterpenos tem desafiado o interesse de químicos e bioquímicos em relação a suas estruturas, síntese, origem e atividade biológica. Certamente, o estudo de sesquiterpenos tem contribuído particularmente com um rico capítulo no desenvolvimento da química orgânica com inúmeras novas estruturas químicas desta classe de produtos naturais. Até a década de 90 eram conhecidos mais de 200 esqueletos carbônicos distintos.[48] Representantes destes terpenóides podem ser

biossintetisados e conseqüentemente isolados de plantas marinhas e terrestres, bem como de fungos e outros microorganismos.[48] Por isso, muitos esforços voltados ao isolamento e identificação de novos sesquiterpenos está sendo realizado.

Ahmed[49] em 2004, estudando o extrato hexânico da espécie *Achilea ligustica*, mostrou o isolamento e identificação de novos derivados formados pela união de anéis com 5/6/5 membros. Entre os compostos, seis novas lactonas sesquiterpênicas foram identificadas, sendo duas destas lactonas halogenadas representadas na Figura 5.

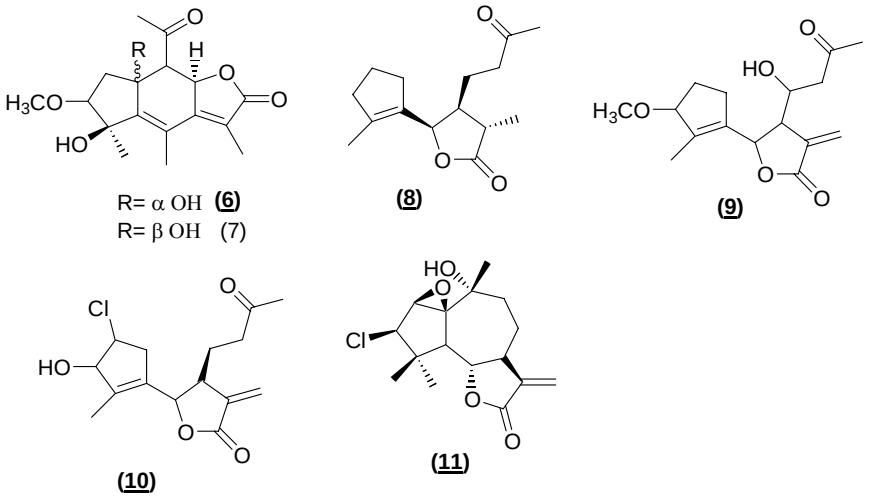


Figura 5. Lactonas sesquiterpenicas de *Achilea ligustica.*

Todorova e colaboradores,[50] através de fracionamentos dos extratos e do óleo volátil de *Achillea clypeolata*, relataram o isolamento de novos sesquiterpenóides (Figura 6). Destes compostos três foram derivados do esqueleto eudesmano (**12**-**14**) e um derivado do esqueleto do tipo ciperano(**15**).

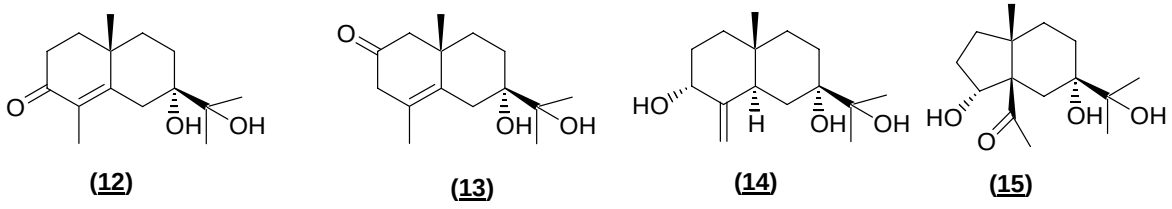
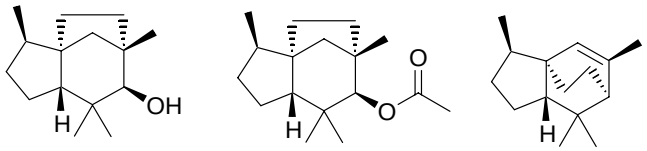


Figura 6. Derivados do esqueleto eudesmano e ciperano de *Achillea clypeolata.*

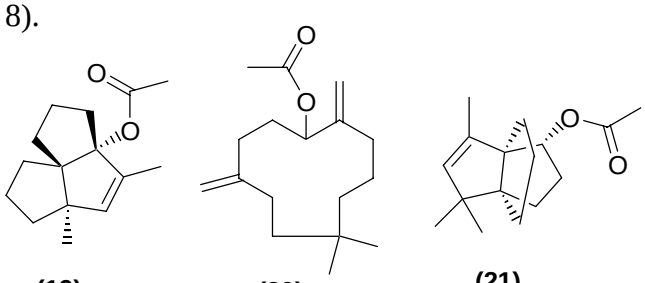
Em outro trabalho que cita o isolamento de novas estruturas de sesquiterpenos, Barrero,[51] estudando os óleos essenciais de *Juniperus thurifera*, mencionou o descobrimento de novos terpenos triciclicos (Figura 7).



(16) **(17)** **(18)**

Figura 7. Sesquiterpenos triciclicos isolados de *Juniperus thurifera.*

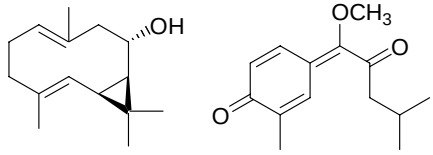
O óleo volátil de *Leontopodium alpinum* foi estudado por Comey[52] em 1999, sendo isolados novos derivados acetilados dos esqueletos sesquiterpênicos cariofileno e silfineno. (Figura 8).



(19) **(20)** **(21)**

Figura 8. Sesquiterpenos acetilados isolados de *Leontopodium alpinum.*

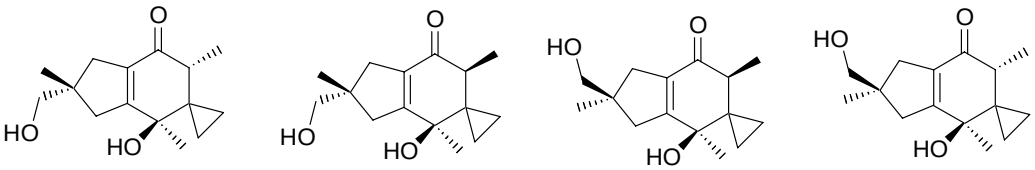
Através do estudo do óleo volátil das espécies *Parthenium argentatum* e *P. tomentosa,* Maatooq[53] citou o isolamento do sesquiterpeno parteniol **(22)** e de uma nova dicetona sesquiterpenica **(23)** (Figura 9), sesquiterpenos estes que apresentaram propriedades fungicidas. O parteniol sabe-se, hoje que apresenta uma atividade antifedante em níveis próximos a azadiractina, um potente inseticida natural.[53]



(22) **(23)**

Figura 9. Sesquiterpenos isolados de *Parthenium argentatum* e *P. tomentosa.*

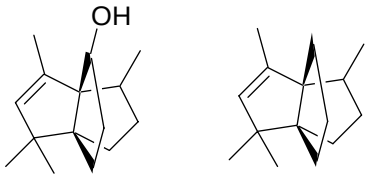
A partir do estudo dos constituintes produzidos pelo metabolismo do fungo *Coprinopsis episcopalis*, quatro novos sesquiterpenos derivados do esqueleto illudano, foram isolados por Reina[54] (Figura 10). Testes biológicos destes compostos demonstraram atividade antibiótica e citotóxica.



(24) **(25)** **(26)** **(27)**

Figura 10. Novos sesquiterpenos isolados do fungo *Coprinopsis episcopalis.*

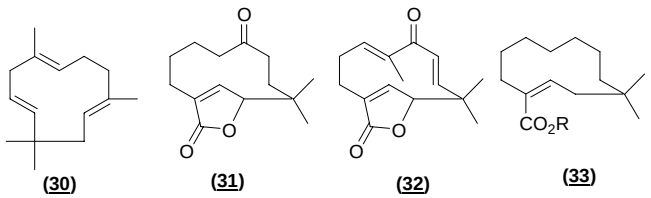
Gauvin , em 2004 relatou o isolamento de novos sesquiterpenos de *Psiadia anchusifolia.* Uma característica importante neste estudo foi a determinação da presença de esqueletos pouco comuns nos compostos isolados, pois foi identificado pela primeira vez o álcool sesquiterpênico **(28)**, junto com outro derivado do esqueleto carbônico propellano **(29)** (Figura 11).[47]



(28) **(29)**

Figura 11. Sesquiterpenos de *Psiadia anchusifolia.*

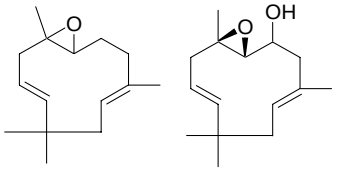
Derivados do esqueleto humuleno tem sido isolados a partir de óleos voláteis. Muitos destes compostos são biologicamente ativos, como os compostos isolados de *Asteriscus vogelii*, de onde foi isolado um novo sesquiterpeno **(33)** derivado do esqueleto carbônico humuleno **(30)**, junto com outros dois (**31**-**32)** sesquiterpenos conhecidos (Figura 12). A avaliação das propriedades biológicas destes compostos revelaram propriedades fitotóxicas e citotóxicas.[55]



(30) **(31)** **(32)** **(33)**

Figura 12. Humuleno e seus derivados isolados de *Asteriscus vogelii*

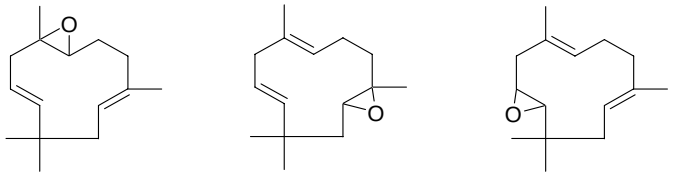
Economides[56] analisou o extrato diclorometano da pteridofita *Woodsia scopulina.,* sendo que, identificaram juntamente com flavonas, dois sesquiterpenos derivados do esqueleto humuleno (Figura 13), entre estes, o humuleno-6,7-epoxido **(34)** e um novo derivado deste esqueleto carbônico, o 6,7-epoxi-5-hidroxihumula-2,9-dieno **(35)**.



(34) **(35)**

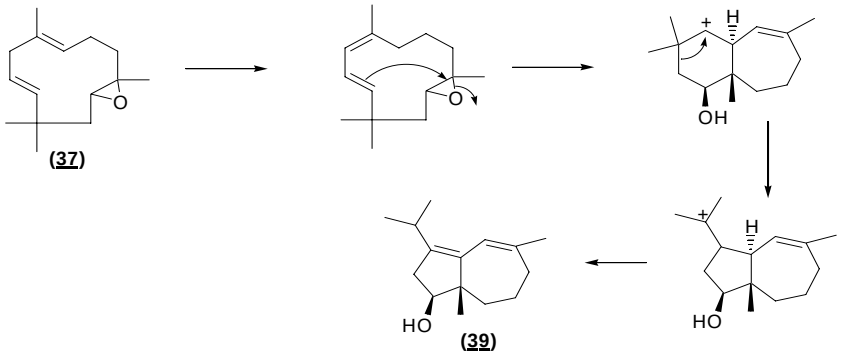
Figura 13. Derivados de Humuleno em *Woodsia scopulina.*

Os três mono-epóxidos do humuleno ocorrem naturalmente (Figura 14).[57] Devido às características estruturais deste esqueleto, propostas semi-sintéticas destas substancias naturais são estudadas com o intuito de promover ciclizações, visando a obtenção por síntese de novos sesquiterpenóides biciclícos (Esquema 7).[58]



(36) **(37)** **(38)**

Figura 14. Epóxidos Naturais derivados do sesquiterpeno humuleno.



(37) **(39)**

Esquema 8. Ciclização de um mono-epóxido derivado do humuleno formando um sesquiterpeno biciclico.

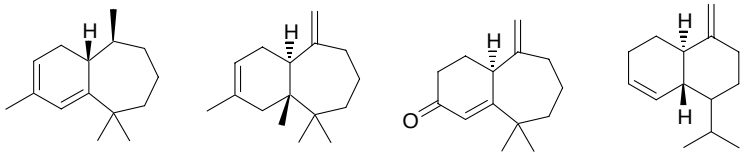
Devido ao importante papel do esqueleto carbônico humuleno em estudos de sesquiterpenos, a caracterização de novos compostos derivados deste esqueleto é de importância para a fitoquímica, devendo ser investigadas as propriedades biológicas destes compostos, e tentar elucidar sua rota biogenética, afim de acompanhar o seu metabolismo na planta. Em adição a estes estudos é mencionado neste trabalho, as propriedades antimicrobianas de um novo sesquiterpeno que foi denominado hyemalol, isolado do óleo volátil de *Zanthoxylum hyemale*.

2.10. Ocorrência de mono e sesquiterpenos em insetos – Feromônios

Muitos compostos voláteis encontrados em plantas, também são encontrados em insetos sendo utilizados como feromônios de atração ou repulsão. Esta evidência tem levado ao desenvolvimento de estudos ecológicos envolvendo substâncias voláteis com ocorrência simultânea em insetos e plantas. Muitos monoterpenos e sesquiterpenos são mencionados como responsáveis pelas características odoríferas de insetos. O S-(+)-linalol foi identificado como feromônio de atração da fêmea da espécie de abelha *Colletes cunicularius.* Este estudo revelou a distinção enantiomérica da espécie de abelha para os enantiomeros R-(-)-linalol e S-(+)-linalol, onde se observou um aumento muito superior da resposta eletroantenográfica quando o inseto estava em contato com o S-(+)-linalol, comprovando ser este composto responsável pela ação. Análises cromatográficas quirais revelaram que o S-(+)-linalol é produzido por *Colletes cunicularius* em excessos enantiomericos superiores a 99%.[59]

Barllet,[60] estudou os componentes voláteis do besouro masculino *Aphthona flava*, inseto este que é hospedeiro e se alimenta de folhas vegetais. As analises revelaram a presença de três sesquiterpenos derivados do esqueleto sesquiterpênico himachaleno (**40**-

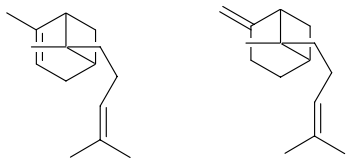
42) e o hidrocarboneto sesquiterpênico (+)-α -cadineno **(43)**, nas emissões voláteis deste inseto (Figura 15).



(40) **(41)** **(42)** **(43)**

Figura 15. Derivados do himachaleno e cadineno na composição feromonal do besouro *Aphthona flava.*

Os sesquiterpenos α e β-*trans*-bergamotenos (Figura16) foram também identificados como feromônios sexuais do parasita *Melittobia digitata.*[61]



β–trans-bergamoteno **(44)** α–trans-bergamoteno **(45)**

Figura 16. α e β-*trans*-bergamotenos, feromônios sexuais do parasita *Melittobia digitata.*

2.11. Técnicas de análise

A cromatografia gasosa é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos voláteis. Como os óleos são suficientemente voláteis, a amostra é somente solubilizada em solventes orgânicos voláteis, antes de ser injetada no cromatógrafo. Para a separação, utilizam-se, atualmente, colunas capilares. As colunas empacotadas são obsoletas para a análise de óleos voláteis. A identificação dos compostos individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões. Para ser mais independentes das variações do tempo de retenção sob condições diferentes de medida, foi introduzido o índice de Kovats (IK) que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Estes índices permitem uma comparação melhor dos dados entre laboratórios diferentes. Adams[62] tabelou uma grande lista de índice de Kovat's para compostos voláteis,

o que permite uma comparação com componentes conhecidos de amostras de óleos essenciais. Os valores encontram-se entre 900 (volátil) e 1900 (menos volátil), intervalo este, onde geralmente são encontrados os índices de Kovat's da maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos. Um valor de 950 significa que a substância esta eluindo entre nonano (IK=900) e decano (IK=1000). Como duas substancias diferentes podem ter, por acaso, o mesmo ou índice de Kovats muito parecidos em uma coluna, é recomendável usar pelo menos duas colunas de polaridades diferentes. Assim, as colunas mais usadas são DB–1 (uma fase apolar de polidimetilsiloxano) e Carbowax – 20 M (uma fase polar de polietilenoglicol).[63] Podem-se instalar duas colunas em um cromatógrafo e analisar uma amostra nas duas colunas ao mesmo tempo.[64] Se os índices de Kovats de uma substância e de um padrão são muito próximos, usando as duas colunas, é muito provável que seja a mesma substância. Para facilitar a comparação entre o cromatograma de uma amostra e o de um padrão, usando as mesmas condições de análise, pode-se superpor os dois cromatogramas, o que já é realizado através de programas específicos de computadores, que permitem fazer esse tipo de comparação.

Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Esse método permite, como a CG, a separação dos compostos e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massas geralmente indica a massa molar e o padrão de fragmentação. A massa molar já informa sobre a classe de substâncias. O padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas,[65] que, normalmente, é instalada no computador. Em alguns segundos, o espectro da amostra é comparado com os das substâncias da biblioteca e o computador faz propostas de probabilidade quanto à identidade da substância analisada. Mesmo que esse sistema constitua em um grande avanço, o analisador tem que decidir, se a resposta do computador é correta.

2.12 Cromatografia gasosa quiral no estudo de óleos essenciais.

Através de análise em cromatografia gasosa com o uso de colunas capilares, com fases estacionárias quirais como ciclodextrinas modificadas, a separação de estereoisômeros é possível.[66] Esta técnica é importante na detecção de falsificação**.** Este assunto vai ser tratado com maiores detalhes no capitulo 3, onde será discutido o emprego de novas fases quirais na análise de óleos voláteis.

2.13 Determinação da estereoquímica de álcoois secundários

Muitos compostos biológicamente ativos são quirais e apresentam em sua estrutura, uma hidroxila secundária. A determinação da configuração absoluta dos centros quirais contendo grupos hidroxila é, portanto, de grande importância. Nos óleos voláteis, a presença de álcoois secundários é comum, como também é comum a presença de isômeros destes componentes representantes de mono e sesquiterpenos (Figura 17),[62] sendo portanto, a determinação da estereoquímica uma importante ferramenta na determinação estrutural correta de produtos naturais.

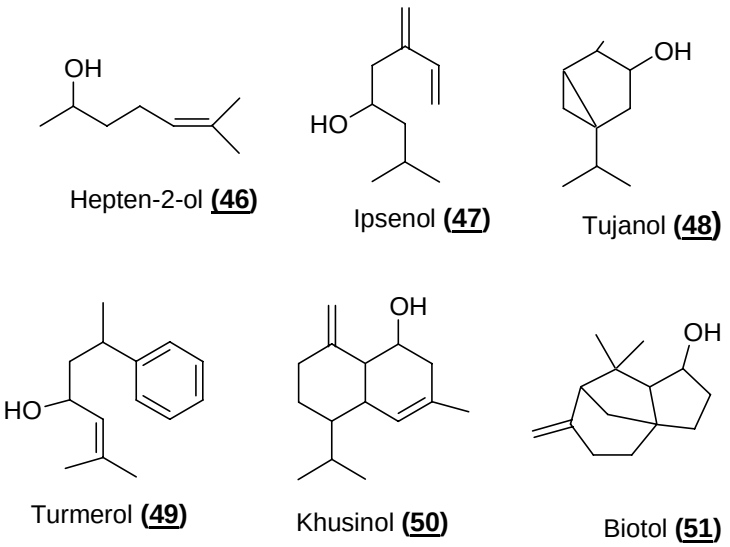


Figura 17. Álcoois secundários quirais, presentes em óleos essenciais.

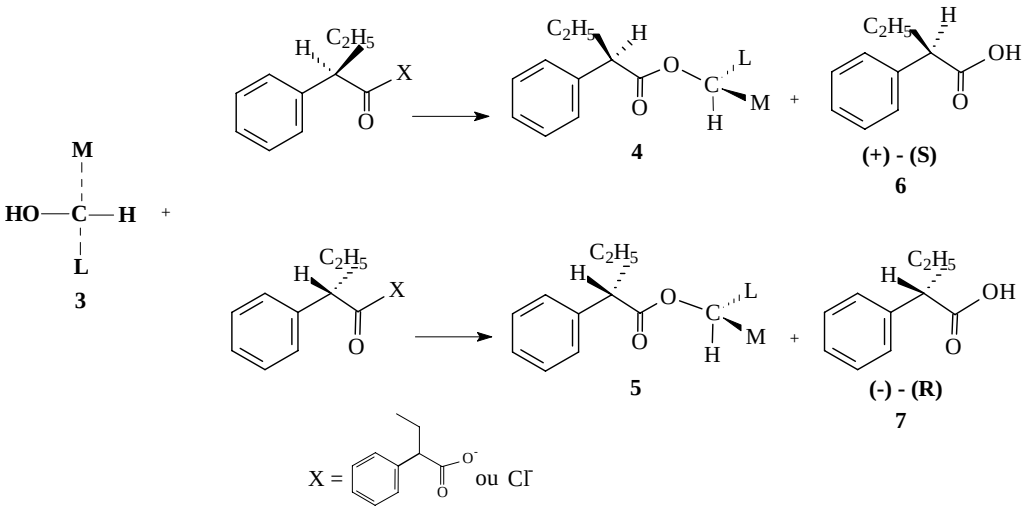
Muitos dos métodos aplicados a este tipo de análise, são métodos indiretos correlacionando a quiralidade com compostos de configuração absoluta conhecidas

(auxiliares quirais) através de reações de formação de diastereoisômeros, reagentes de troca quiral ou fases estacionárias quirais.[67]

2.13.1 Método de Horeau

Em 1961, Horeau[68] enunciou um método indireto de determinação de estereoquímica de álcoois secundários. Este método se baseia na reação de um álcool secundário opticamente ativo com um excesso de anidrido ou cloreto de ácido 2-fenilbutírico racêmico, em piridina. Esta reação se procede através de resolução cinética parcial formando ésteres diastereoisoméricos em diferentes proporções. De acordo com Horeau, a configuração do álcool pode ser determinada através da medida da rotação óptica do ácido 2-fenilbutírico em excesso na mistura reacional. Para isso se faz necessária a remoção completa das impurezas.

Na Figura 2, pode-se observar a reação de um álcool secundário genérico, puro e de estereoquímica desconhecida (**3**), cujos substituintes são L (substituinte com maior volume) e M (substituinte de volume médio) que foi submetido a uma reação com um anidrido ou cloreto de ácido 2-fenilbutírico racêmico formando dois ésteres diastereoisoméricos (**4** e **5**) e os dois ácidos enantioméricos (**6** e **7**), dos ácidos carboxílicos residuais.



Esquema 9. Esquema geral da reação de um álcool secundário e um derivado do ácido 2-fenilbutírico.

Regra de Horeau:

Tanto os ésteres diastereoisoméricos quanto os enantiômeros do ácido residual se formam em proporções distintas devido ao efeito estérico dos grupos volumosos do álcool e do cloreto ou anidrido (±)-2-fenilbutírico, proporcionando diferentes estados de transições para a reação. Por este motivo pode-se usar esta reação para se determinar a estereoquímica do álcool, sendo que para isso, se compara o valor da rotação óptica de um enantiômero puro com o da mistura de enantiômeros (ee).

Com estes dados, Horeau determinou a estereoquímica de álcoois secundários, aplicando a seguinte regra: se o excesso enantiomérico for de ácido (+)-(*S*)-2-fenilbutírico, o álcool terá a estrutura **8**, e se o excesso for de ácido (-)-(*R*)-2-fenilbutírico apresentará a estrutura **9**. Desta maneira aplicando a regra de prioridade segundo Cahn, Ingold e Prelog pode-se atribuir a estereoquímica absoluta para o álcool (Figura 18).

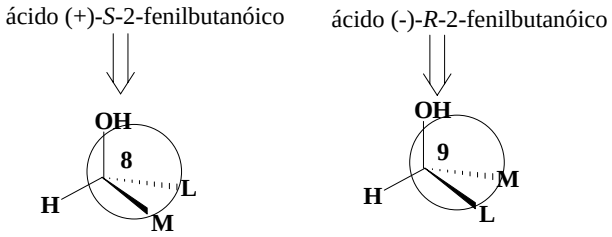


Figura 18. Regra de Horeau

A medida do excesso enantiomérico pode ser feita através de rotação óptica, cromatografia líquida ou cromatografia gasosa. Ainda pode ser utilizada a espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons, analisando-se os ésteres diastereoisoméricos resultantes da reação do álcool ou amina secundária com os derivados dos ácidos 2-fenilbutíricos puros, a comparação entre os espectros permite a determinação da estereoquímica.[66]

2.13.2 Método de Horeau Utilizando Cromatografia Gasosa

König e colaboradores[69] em 1994, enunciaram a aplicação de cromatografia gasosa para a determinação da proporção do ácido 2-fenilbutírico (*R* ou *S*) após sua metilação com diazometano, afim de diminuir sua retenção na coluna. Como se tratam de enantiômeros, é necessário o uso de fases estacionárias capazes de separar esses compostos. König utilizou

colunas quirais contendo (2,6-di-O-metil-3-O-pentil)-β-ciclodextrina para separar estes estereoisômeros. Devido a seletividade, neste método, ser bastante grande, a probabilidade de impurezas influenciarem na medida da proporção enantiomérica é bastante baixa. Através deste método König definiu a configuração absoluta de 15 álcoois secundários, demostrando a eficiência do método.[69]

Nos laboratórios do NPPN já são muitas as moléculas de produtos naturais cujos centros quirais foram determinados pelo método de Horeau,[44,70,71] (Figura 18) ocupando um papel importante como ferramenta de análise estereoquímica.

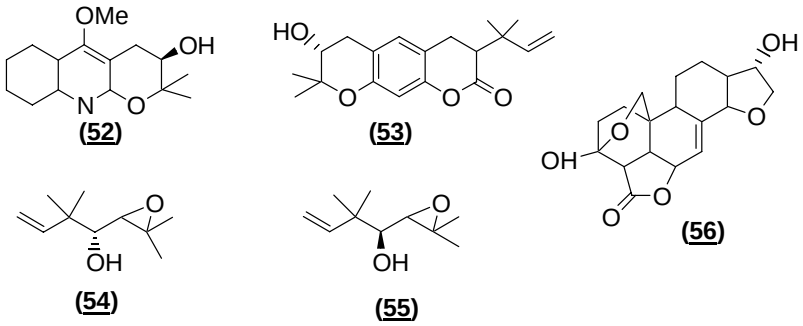


Figura 19. Moléculas de produtos naturais e de transformação que tiveram a configuração absoluta dos álcoois secundários determinadas pelo método de Horeau no NPPN.

CAPITULO 3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante o trabalho. Para melhor entendimento, dividimos o capítulo em quatro sub-capítulos, onde serão apresentados na seguinte ordem:

3.1. Análise química dos componentes voláteis dos óleos essenciais obtidos das espécies selecionadas, isolamento dos principais componentes e estudo de suas possíveis atividades antimicrobianas.

3.2. Modificações estruturais realizadas com a molécula do epóxido 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-butenil acetato (Caleol) e estudo da atividade antimicrobiana dos derivados obtidos.

3.3. Estudo dos componentes voláteis em óleos essenciais obtidos de própolis coletados em três regiões do Rio Grande do Sul.

3.4. Emprego e análise da eficiência de novas fases estácionárias quirais confeccionadas pelo grupo na análise da estereoquímica de componentes de óleos voláteis.

3.1. ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DAS ESPÉCIES SELECIONADAS, ISOLAMENTO DOS

PRINCIPAIS COMPONENTES E ESTUDO DE SUAS POSSÍVEIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.

As espécies de plantas estudadas neste trabalho, fazem parte de uma série de plantas selecionadas pelo grupo de pesquisa em produtos naturais de Santa Maria (NPPN), objetivando o estudo de seus constituintes fixos e voláteis. Todas as espécies selecionadas fazem parte da flora do Rio Grande do Sul, e são utilizadas popularmente como medicinais. Nesta parte do trabalho iremos discutir os componentes voláteis de oito espécies pertencentes a quatro famílias que são:

Asteraceae

3.1.1. Baccharis trimera e *Baccharis articulata*

3.1.2. Matricaria chamomilla

3.1.3 Pluchea quitoc

Verbenaceae

3.1.4. Aloysia sellowii

Lamiaceae

3.1.5. Aeollanthus suaveolens

3.1.6 Cunila microcephala

Rutaceae

3.1.7 Zanthoxylum hyemale

*3.1.1.*ESPÉCIES *BACCHARIS TRIMERA* E *BACCHARIS ARTICULATA*

O gênero *Baccharis* (Asteraceae) é constituído aproximadamente por 400 espécies, distribuídas por todo o continente americano. As espécies *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, ocorrem espontaneamente em quase todo o Brasil, crescendo abundantemente em regiões de campos e pastagens, beira de estradas, linhas de cercas, terrenos baldios, terrenos secos e pedregosos, e também nos lugares úmidos, ribanceira de rios.[72] Estas espécies possuem uma grande semelhança sendo muitas vezes confundidas, durante a coleta do material verde.

A reprodução se dá por sementes, mas de preferência através de estaquia, retiradas de uma planta adulta. Desenvolvem-se melhor em terrenos úmidos e expostos ao sol, sendo porém plantas muito resistentes, que se adaptam a condições bem agrestes (terrenos secos e pedregosos) e até a 2800m do nível do mar.

Em plantas deste gênero, primeiramente terpenos e flavanóides foram caracterizados por Bohlmann e Zdero.[73] A literatura menciona flavonóides, saponinas e resinas, além de óleos voláteis, como sendo os principais metabólitos secundários bioativos encontrados em espécies do gênero Baccharis no Brasil.[74] As espécies conhecidas como carqueja têm uso popular disseminado pela América Latina, principalmente como estomáquicas e em distúrbios hepáticos, pois agem como estimulante de secreção gástrica.[75] Recentemente, Torres[76] demonstrou o efeito relaxante na musculatura de ratos de uma lactona diterpênica da classe dos clerodanos, isolada de *Baccharis trimera*. Queiroga,[77] durante seus estudos envolvendo óleos voláteis de *Baccharis trimera*, identificou novos sesquiterpenos oxigenados derivados do esqueleto cadineno, além de sesquiterpenos do tipo guaieno e aromadendreno.

3.1.1.1 Análise comparativa dos óleos das duas espécies estudadas

As duas espécies de *Baccharis* selecionadas neste estudo, *B. trimera* e *B. articulata*, são encontradas no mercado farmacêutico, em preparações *in natura* ou sob a forma de extratos. Destas espécies, analisou-se os óleos voláteis das folhas e flores de de *Baccharis trimera* e de apenas folhas de *Baccharis articulata.* Para estas análises, foram coletadas amostras no período de dois anos (entre 2002 e 2004). As coletas foram realizadas na região central do estado, nos municípios de Santa Maria e São Pedro do Sul.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e as identificações dos componentes foram feitas através da obtenção dos índices de Kovat's dos constituintes e por GC/MS. Os rendimentos obtidos podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento dos óleos voláteis das *Baccharis*

Material utilizado	Rendimento %
Baccharis trimera flores	0,8
Baccharis trimera folhas	1,5-1,7
Baccharis articulata	0,35-0,49

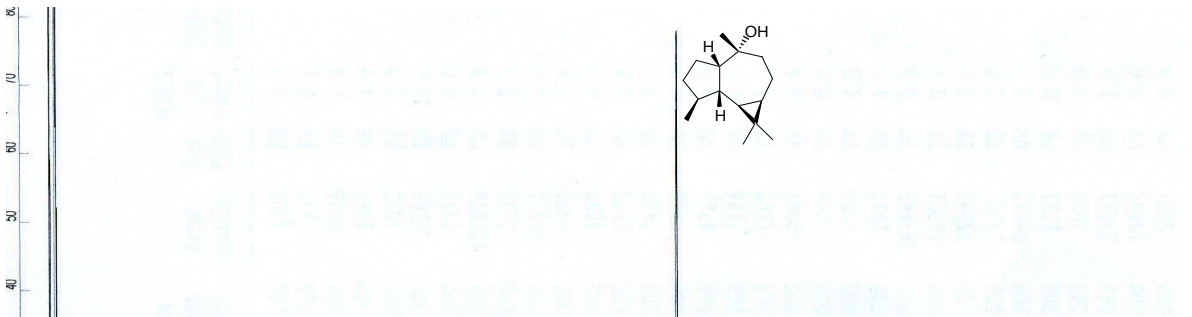
A análise dos óleos essenciais de ambas as espécies de *Baccharis*, realizadas em diferentes épocas, mostrou pequenas mudanças qualitativas e quantitativas na constituição de seus voláteis. Mudanças, desta vez mais significativas, foram observadas na constituição dos componentes voláteis do óleo das flores comparado com o óleo das folhas de *Baccharis trimera.*

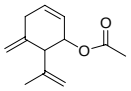
Comparando-se as duas espécies, observou-se uma grande diferença em suas composições químicas. Por exemplo, acetato de carquejila (58,5) é o principal componente no óleo das folhas de *B. trimera*, e o segundo principal componente no óleo das flores (13,8%). O óleo das flores é constituido principalmente pelo sesquiterpeno ledol (45,7%). O acetato de carquejila não foi encontrado no óleo de *B. articulata*, podendo ser este componente um marcador entre as duas espécies. Conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 20, os principais constituintes encontrados no óleo de *B. articulata* foram α-pineno, β-pineno, (38,8%), cis-β-guaieno (9,72%), γ–muuroleno (5,84%) e espatulenol (4,15%). Os demais constituintes deste óleo são encontrados na Tabela 3 (pág. 39).

Figura 20. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *Baccharis articulata,* em SE-54, 25 m, 7 psi H_2, 50-250°C (4°/min.); Numeração de acordo com a tabela 3.

3.1.1.2. Variação no teor dos sesquiterpenos ledol e espatulenol, e do monoterpenoide acetato de carquejila nos óleos de folhas e flores de *Baccharis trimera.*

Foram grandes as diferenças encontradas nos óleos essenciais obtidos de *Baccharis trimera,* comparado-se as diferentes épocas de coleta do material verde (Tabela 4). No período de floração o teor do acetato de carquejila diminui no óleo das folhas (58,5%), enquanto no óleo obtido das flores este composto apresenta-se em menor quantidade (13,8%). No óleo hidrodestilado das flores foi encontrado um alto teor do sesquiterpeno oxigenado ledol (45,7%), com menor quantidade no óleo das folhas (13,4%). Variações também foram observadas no acúmulo de espatulenol, onde se observou variações entre 4% e 10 % nos óleos de folhas e flores respectivamente. Com estas informações pode-se constatar um aumento no teor de sesquiterpenos durante o período de floração da espécie (Figuras 21 e 22). O sesquiterpeno ledol foi isolado e identificado através da obtenção dos índice de Kovat's (valor obtido de 1563; literatura 1565) e por espectrometria de massas (Figuras 23 e 24).





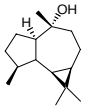


Figura 21. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das flores de *Baccharis trimera,* em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250°C (4°/min.).

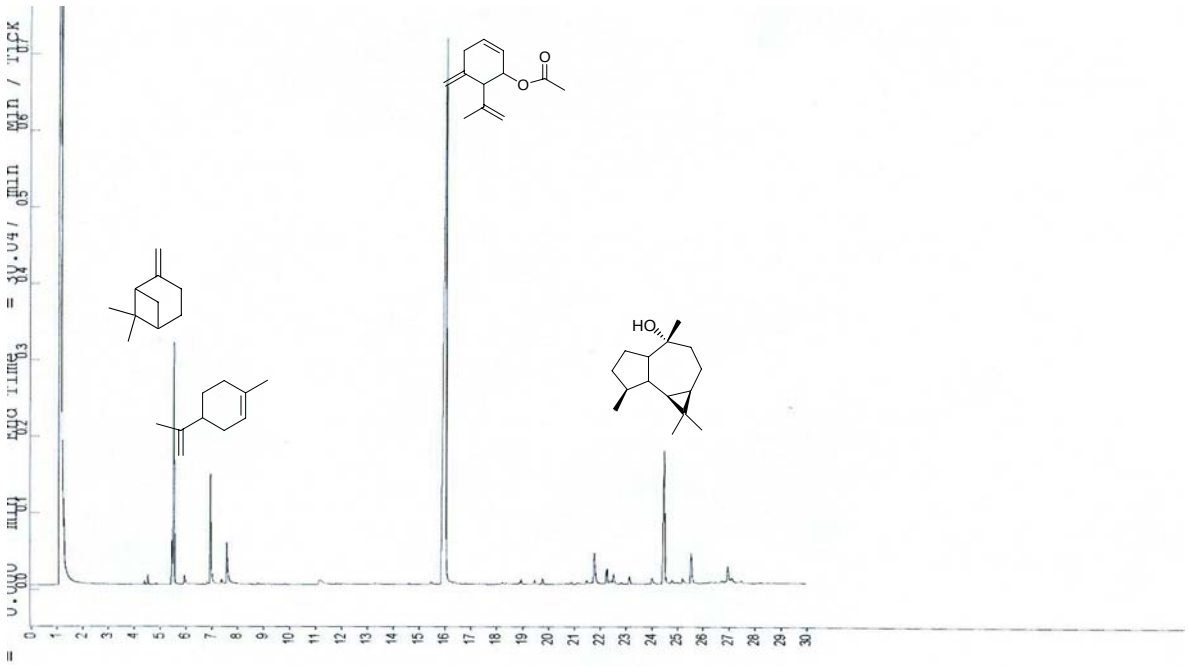


Figura 22. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das folhas de *Baccharis trimera,* em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250°C (4°/min.).

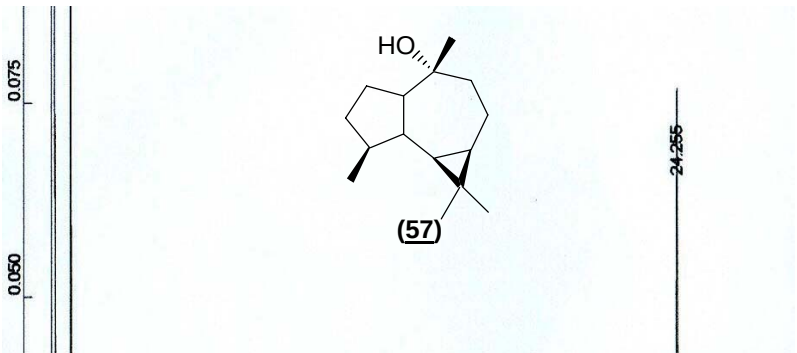


Figura 23. Cromatograma CG-FID do sesquiterpeno ledol isolado do óleo volátil das flores de *Baccharis trimera*, em SE-54 (25 m) 7 psi H_2, 50-250°C (4°/min**.).**

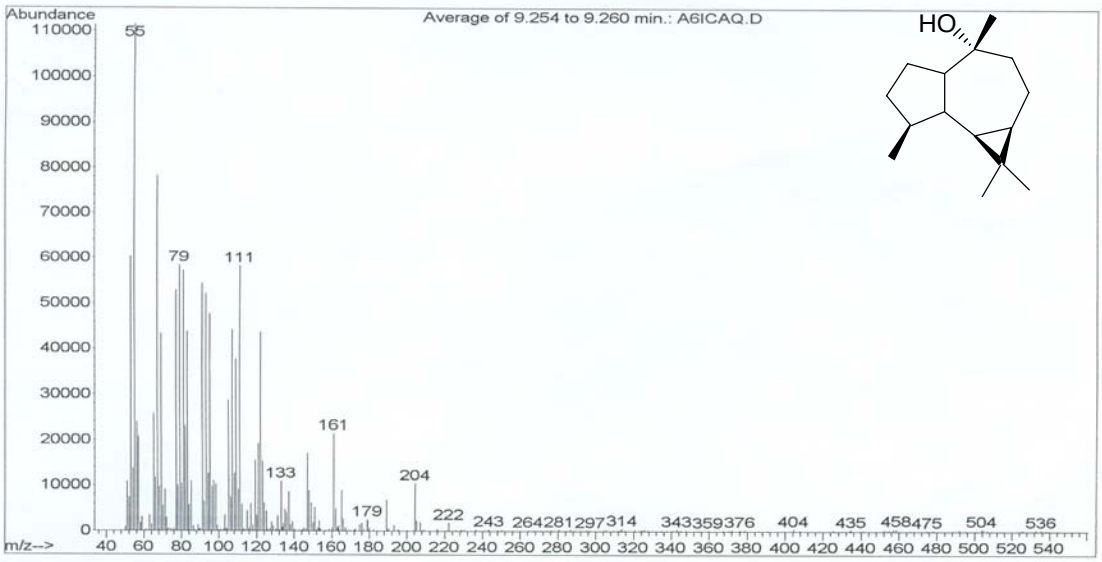


Figura 24. Espectro de massas do ledol, isolado das flores de *Baccharis trimera.*

Tabela 3. Composição do óleo volátil obtido das folhas de *Baccharis articulata.*

	Composto	%*	IK	Método de identificação
01	α-pineno	4,44	939	CG-EM, co
02	β–pineno	38,8	989	CG-EM, co
03	mirceno	0,25	998	CG-EM, co
04	limoneno	4,72	1031	CG-EM, co
05	1-8-cineol	0,53	1043	CG-EM, co
06	α-gurjuneno	4,4	1414	CG-EM
07	γ–muuroleno	5,84	1476	***CG-EM***
08	cis-β-guaieno	9,72	1491	CG-EM
09	Cis-calameneno	0,87	1519	CG-EM
10	espatulenol	4,15	1574	CG-EM, co
11	óxido de cariofileno	2,43	1578	CG-EM, co
12	globulol	1,85	1586	CG-EM
13	Guaiol	1,15	1598	CG-EM
14	α-eudesmol	1,07	1650	CG-EM
15	α-cadinol	1,65	1652	CG-EM
	TOTAL	81,87		

co: co-injeção com padrão autêntico; * Composição percentual considerando-se o mesmo fator de respostapara todos os componentes.

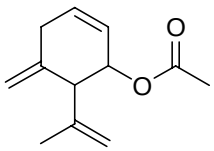
Tabela 4. Composição do óleo volátil de *Baccharis trimera.*

Compostos	Folhas %	Flores %	IK[b]	Método de identificação
β–pineno	4,8	0,48	989	CG-EM, co
limoneno	1,8	0,73	1029	CG-EM, co
terpineol		1,25	1186	CG-EM
acetato de carquejila	58,5	13,8	1286	CG-EM, co
ni		1,23		-
ni		1,19		-
ledol	13,4	45,7	1563	CG-EM
globulol	4,5	12,6	1598	CG-EM, co
β–eudesmol	2,42	2,7	1639	CG-EM
epi –α–cadinol	1,16	2,3	1640	CG-EM
TOTAL	82,48	81,98		

ni: não identificado; co: co-injeção com padrão autêntico; * Composição percentual considerando-se o mesmo fator de resposta para todos os componentes.

3.1.1.3. Acetato de carquejila.

Para o isolamento do principal componente do óleo das folhas de *Baccharis trimera*, o óleo foi cromatografado em coluna empacotada com sílica gel, utilizando-se um sistema de solvente hexano/acetato em ordem crescente de polaridade. Obteve-se desta forma um composto puro que foi analisado por RMN de ^{1}H e ^{13}C, que foi identificado como sendo o éster acetato de carquejila **(58).**

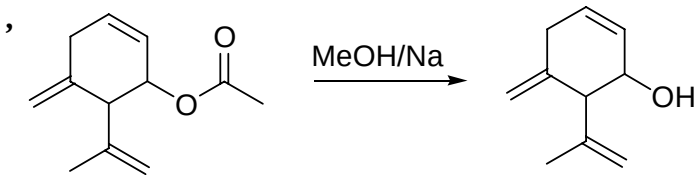


(58)

3.1.1.4. Determinação da configuração absoluta do centro quiral C-1 do acetato de carquejila.

Com o intuito de se determinar a estereoquímica do carbono 1, do acetato de carquejila, através de método de Horeau,[67] e comparar a estereoquímica com o produto natural conhecido, o éster foi transformado no correspondente álcool.

O álcool obtido (carquejol), é citado como sendo um dos componentes do óleo de *Baccharis trimera*,[81] portanto a obtenção deste álcool é importante para ser utilizado como padrão em CG, além de verificar a existência do mesmo como constituinte do óleo. Outra característica a ser investigada no produto de hidrólise, é a influência do grupo acetila do produto natural e do próprio álcool em testes amtimicrobianos. Para isto, o acetato de carquejila **(58)** foi submetido a hidrólise alcalina, obtendo-se o álcool 6-isopropenil-5-metileneciclohex-2-en-1-ol **(59)** (carquejol), o qual foi identificado através de cromatografia gasosa, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.



(58) **(59)**

Esquema 10. Hidrólise básica do acetato de carquejila.

Posteriormente, o álcool secundário teve a sua estereoquímica definida pelo método de Horeau, através da análise do excesso enantiomérico dos ésteres do ácido 2-fenil butirico (Figura 25), definindo desta forma, a configuração absoluta do centro quiral C-1 do acetato de carquejila presente no óleo de *Baccharis trimera.* Obteve-se um excesso do ácido *R*-fenil butirico. Aplicando-se a regra de Horeau, determinou-se a configuração absoluta do C-1 como sendo *R*.

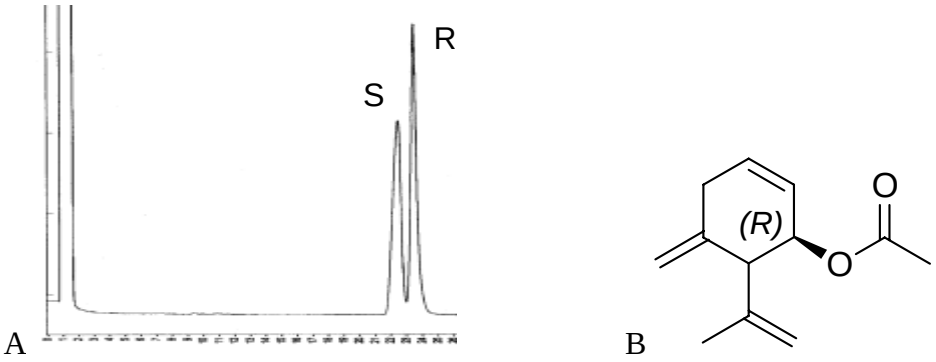


Figura 25. Determinação da estereoquímica do acetato de carquejila pelo método de Horeau:

A.Cromatograma dos ácidos-2-fenilbutíricos metil ésteres obtidos na reação do carquejol com anidrido 2-fenilbutírico racêmico. **B.** Estereoquímica do carbono 1 do acetato de carquejila.

3.1.1.5. Análise quiral do óleo volátil de *Baccharis articulata.*

A presença dos monoterpenos α-pineno, β-pineno e limoneno em elevados percentuais no óleo de *B. articulata,* nos levou a realizar um estudo estereoquimico destes componentes quirais. Para isso, utilizou-se fases estacionárias quirais a fim de se determinar suas composições enantioméricas. Este estudo foi realizado utilizando-se as fase estacionária quirais 6-Me-2,3-Pe-β-cd e lipodex-E. Através desta análise, pode-se observar uma mistura enriquecida dos enantiomeros do β-pineno e limoneno, com um percentual de 61,6 % em favor do enantiomero (–)–β-pineno e de 77,3% para o (+)-limoneno. Já na análise quiral do α-pineno, observou-se uma mistura racêmica (Figura 26 e Tabela 5).

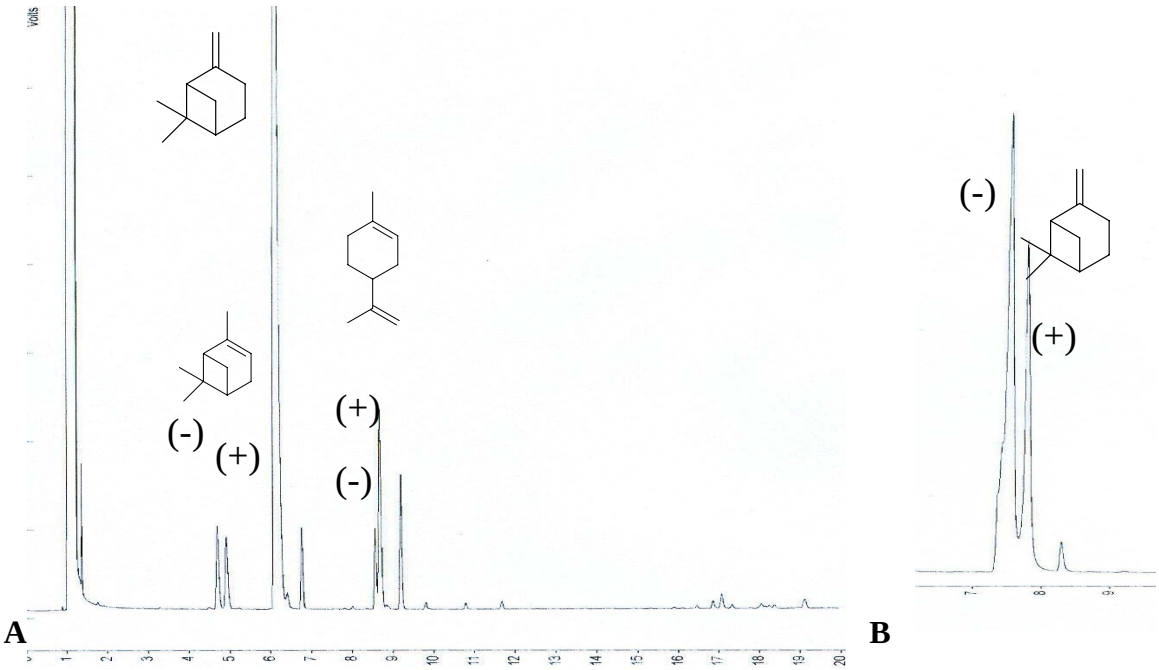


Figura 26. (A) Análise da fração de monoterpenos de *Baccharis articulata* na fase quiral 6-Me –2,3-Pe-β-CD. 6 psi H_2, 40-180°C (3°/min.). **(B)** Separação do (+/-)-β-pineno do óleo na fase lipodex-E. 6 psi H_2, 40-180°C (3°/min.).

Tabela 5. Distribuição enantionérica (%) dos monoterpenos nos óleos voláteis de *Baccharis articulata.*

composto	%
(+)–α-pineno	51,5
(–)–α-pineno	48,5
(+)–β-pineno	38,4
(–)–β-pineno	61,6
(+)–limoneno	77,3
(–)–limoneno	22,7

3.1.1.6. Determinação da atividade antibacteriana dos óleos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata.*

O óleo essencial de *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera*, os constituintes puros acetato de carquejila e carquejol, foram avaliados quanto suas propriedades antibacterianas e antifúngicas frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Escherichia. coli* (ATCC 11103), *Salmonella setubal* (ATCC 19196), *Candida albicans*, *sacaromiceae sereviseae.* Os resultados obtidos através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), revelaram que o óleo de *Baccharis articulata,* tem uma atividade bacteriostática superior ao óleo de *Baccharis trimera.* Conforme pode ser observado na Tabela 6, ambos os óleos apresentaram uma boa atividade contra todas as bactérias testadas. Além disso, o óleo de *Baccharis trimera* mostrou excelente atividade antifúngica, principalmente contra *Cryptococcus neoformans* e *Sacaromiceae cereviseae,* para as quais a concentração inibitória mínima é de 0,67 mg/ml, conforme a Tabela 6.

Tabela 6. Atividade antibacteriana dos óleos voláteis de *Baccharis articulata* e *Bacharis trimera* obtidos de folhas; CIM (concentração inibitória mínima) e CML (concentração mínima letal) em mg/mL.

Microorganismos	*Bacharis articulata*		*Bacharis trimera*		Padrão
	CIM	CML	CIM	CML	CIM
S.aureus	2,5	20	5	5	$6{,}25 \times 10^{-3}$
S. epidermidis	2,5	20	2,5	20	$3{,}12 \times 10^{-3}$
E. coli	2,5	20	1,25	0,675	$1{,}67 \times 10^{-3}$
P. aeruginosa	2,5	>20	2,5	20	$3{,}12 \times 10^{-3}$
K. pneumoniae	2,5	10	1,25	1,25	$1{,}67 \times 10^{-3}$
B. subtilis	2,5	20	5	10	$3{,}12 \times 10^{-3}$
S. setubal	2,5	20	2,5	12,5	$6{,}25 \times 10^{-3}$

C.albicans 591 L	NT	-	2,5	2,5	$6,25x10^{-3}$
C.neoformans	NT	-	0,67	0,675	$3,12x10^{-3}$
S.cereviseae	NT	-	0,67	0,675	$1,67x10^{-3}$
C.dublinensis	NT	-	5	5	$3,12x10^{-3}$
C. albicans	NT	-	2,5	2,5	$3,12x10^{-3}$

Os compostos puros, carquejol acetato e carquejol álcool, foram testados, através de bioautografia, quanto a suas atividades antimicrobianas, onde se observou um maior efeito inibitório embora fraco do acetato de carquejila o qual inibiu o crescimento de todas os microorganismos testados, enquanto o álcool foi fracamente ativo somente contra *E.coli*, conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Determinação da quantidade de substancia ativa (μg), por bioautografia, do carquejol acetato **(58)** e carquejol **(59)**.

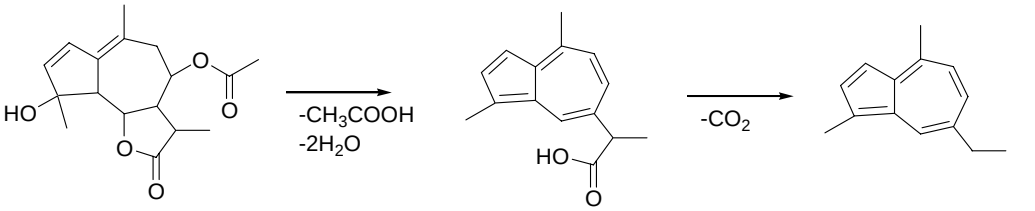
microorganismos	acetato de carquejila	álcool carquejol	Padrão
4.2 S. aureus	80	NA	0,7
S. epidermidis	80	NA	0,7
K.pneumoniae	20	NA	0,4
E.coli	40	80	0,6
S. setubal	40	NA	0,6
S, cerevisiae	10	NA	0,6
C. albicans	20	NA	0,5

NA: não ativo

3.1.2 *MATRICARIA CHAMOMILLA*

A espécie *Matricaria chamomilla,* outra espécie da família Asteraceae estudada nesta parte do trabalho, é usada popularmente no combate a inflamações, febres, diarréias, cólicas menstruais, tumores intestinais e hepáticos, é também um principio ativo de cosméticos.[78] Mais de cem metabólitos, entre os quais, flavanóides e cumarinas, são mencionados como componentes desta planta. Cerca de 28 terpenos são conhecidos por fazer parte da composição do óleo essencial de *Matricaria chamomilla,* sendo o bisabolol, camazuleno, óxidos de bisabolol os mais conhecidos.[79]

O óleo essencial de camomila, cujos rendimentos variam entre 0.24% a 1,9%,[80] apresenta uma coloração azulada, devido a presença do artefato camazuleno, originado da lactona sesquiterpênica matricina, pelo aquecimento durante o processo de extração,[81] conforme pode ser visto no esquema 11.



matricina **(60)** camazuleno-ácido carboxílico **(61)** camazuleno **(62)**

Esquema 11. Matricina e sua transformação para o camazuleno-ácido carboxílico e camazuleno.

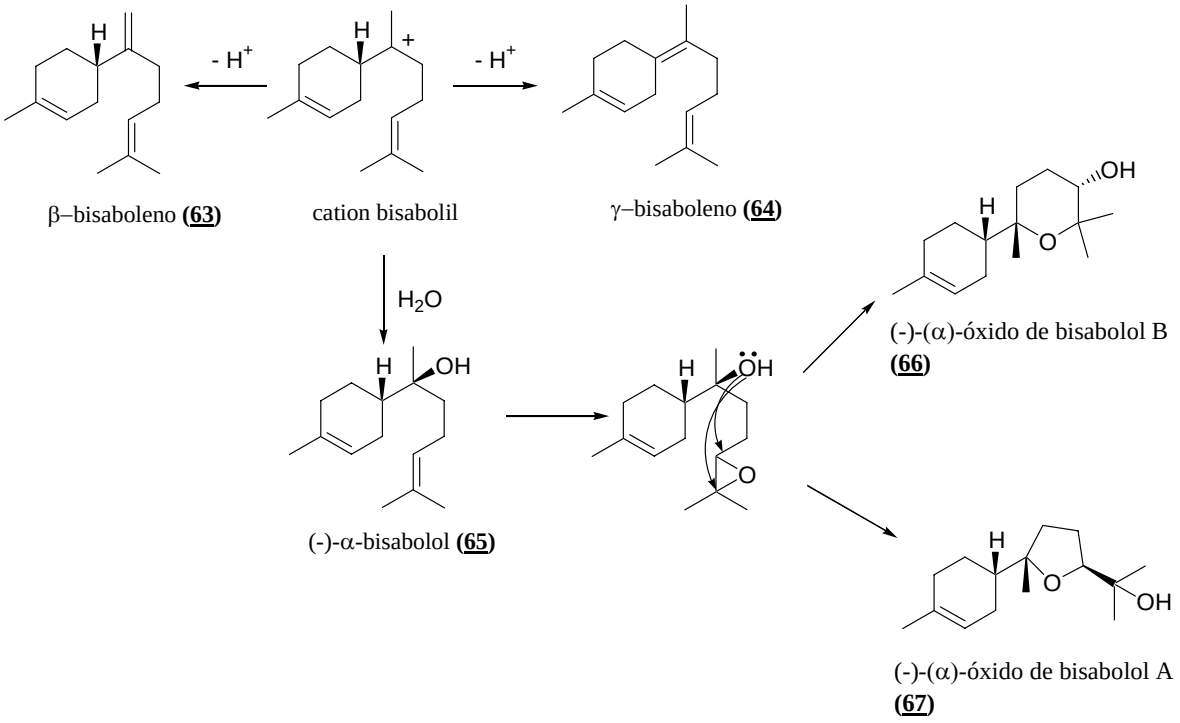
Estudos farmacológicos com componentes isolados dos óleos essenciais de camomila têm revelado resultados positivos, como é o caso dos sesquiterpenos matricina e camazuleno, que apresentaram atividade anti-inflamatória.[82] Além disso o efeito inibitório na formação de leucotrieno pelo camazuleno, lhe confere propriedades anti-oxidantes.[83] Recentemente, estudos mostraram o efeito do óleo essencial de camomila, no combate a esporos e células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus,* microorganismos patogênicos que atacam alimentos.[84]

O componente de maior importância no óleo de camomila, o sesquiterpeno α-bisabolol, tem sido objeto de estudos, e diversas citações da literatura citam suas propriedades biológicas como, na redução de inflamações e artrites, prevenção no

desenvolvimento de úlceras gástricas, e ação contra bactérias e fungos, sendo também um princípio ativo usado em cosméticos e no tratamento de dermatites.[85-89] Devido a estas atividades farmacológicas, mas principalmente por suas propriedades anti-inflamatórias, o α-bisabolol vem sendo submetido a estudos biotecnológicos. Os produtos de biotransformação deste sesquiterpeno monocíclico, quando submetido a transformação microbiana por *Glomerella cinoulata* e *Aspergillus niger*, foram reportados por Miyazawa.[90]

O α-bisabolol é uma substância muito lipofilica com grande tendência a oxidar-se. Os produtos de oxidação deste sesquiterpeno, como vimos são, os óxidos de bisabolol A e B, cuja atividade anti-inflamatória diminui aproximadamente 50%, quando comparada ao α-bisabolol.[91] Portanto é de interesse a integridade molecular do α-bisabolol nos óleos de *M. chamomilla,* utilizados comercialmente. Um aumento na estabilidade, frente a reações de oxidação do α-bisabolol, presente nos óleos de camomila e extratos, tem sido possível através da inclusão desta substância e dos óleos de camomila, em moléculas de ciclodextrinas, dados estes mostrados por estudos recentes.[92]

Durante o processo de biossíntese destes compostos, que compõem os óleos voláteis de camomila, o precursor biossintético destes, o α-bisabolol, sofre ciclizações que o levam a formação dos óxidos, conforme o Esquema 12.



β–bisaboleno **(63)** cation bisabolil γ–bisaboleno **(64)**

(-)-α-bisabolol **(65)**

(-)-(α)-óxido de bisabolol B **(66)**

(-)-(α)-óxido de bisabolol A **(67)**

Esquema 12. Biossintese dos óxidos de bisabolol A e B.

A literatura cita, até o momento, apenas o enantiomero (-)-α-bisabolol como componente de óleos essenciais obtidos de camomila. O epímero (+)-epi-α-bisabolol, é citado na literatura como constituinte de óleos essenciais de outras espécies como *Paperomia galioides*, uma *Piperaceae*, usada na medicina popular, devido a sua ação cicatrizante.[93]

3.1.2.1. Isolamento e identificação dos componentes dos óleos essenciais de *Matricaria chamomila*

No que se refere ao estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, em relação aos óleos voláteis de *Matricaria chamomilla*, foram analisadas as amostras de óleos essenciais, obtidas de plantas cultivadas sob diferentes condições, sendo possível realizar comparações entre espécies nativas e cultivadas. Além disso, alguns componentes foram isolados e testados biologicamente.

As extrações dos óleos voláteis tiveram rendimentos entre 0,18 à 0,35%. Os principais componentes identificados, são citados na Tabela 8 (pág. 52).

Os sesquiterpenos óxido de bisabolol A e B foram isolados através de CCD preparativa, sendo identificados através dos respectivos índices de retenção de Kovat's e por espectrocopia de RMN de ^{13}C. A utilização destas duas metodologias permite elucidar estruturas de substancias puras e até mesmo a identificação de componentes de misturas.[94]

As Figuras 27 e 28 mostram os deslocamentos químicos de ^{13}C do óxido derivado do bisabolol, cujo índice de Kovat's foi de 1653. Através de análise deste espectro, comparado aos dados da literatura, podemos atribuir com segurança que o componente isolado trata-se do óxido de bisabolol B, com índice de Kovat's de 1655. Através das Figuras 29 e 30 pode-se observar os espectros de ^{13}C do constituinte isolado que apresentou índice de retenção de Kovat's 1744. Através de analises destes dados, este componente foi identificado como sendo o sesquiterpeno óxido de bisabolol A.

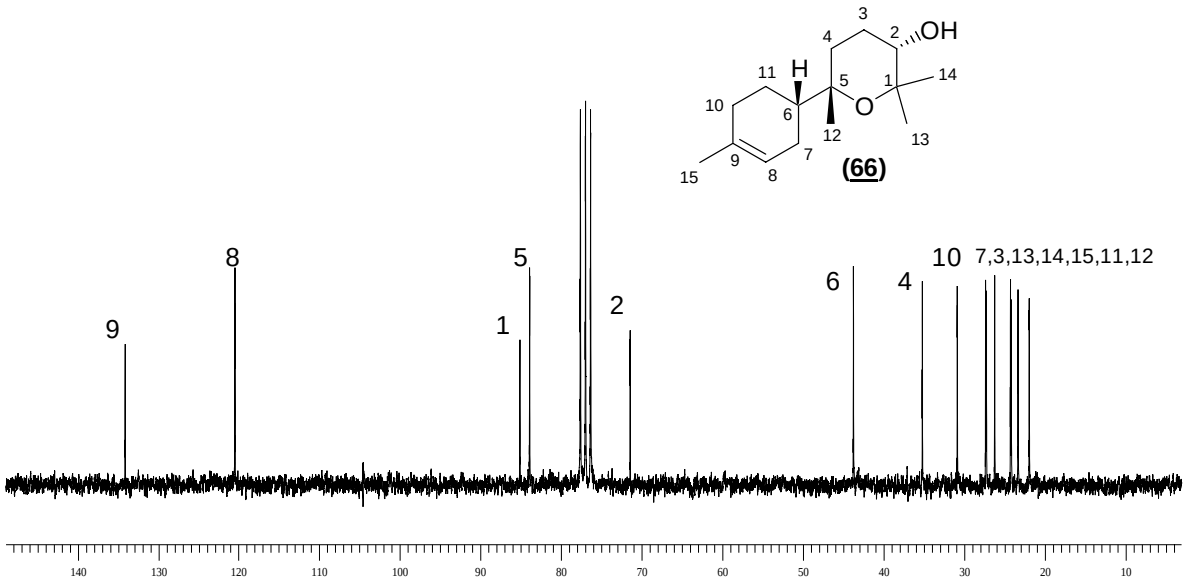


Figura 27. Espectro de ^{13}C do óxido de bisabolol-B, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

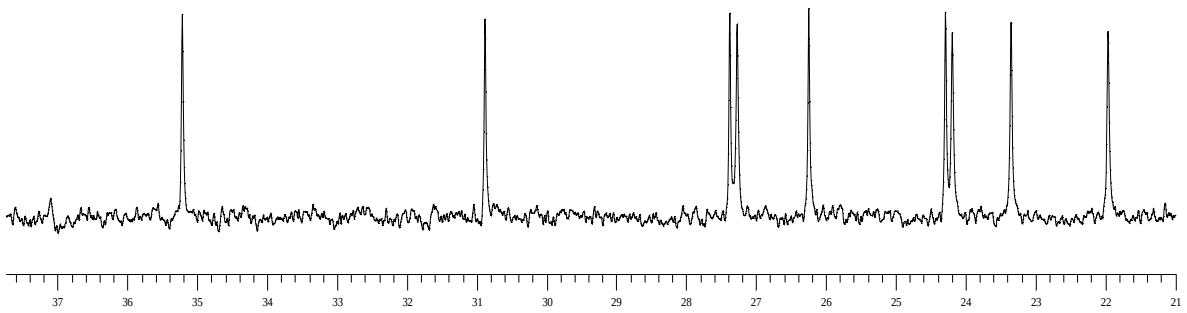
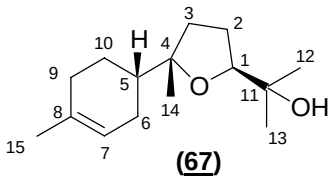


Figura 28. Espectro de ^{13}C a 100MHz expandido do óxido de bisabolol-B



(67)

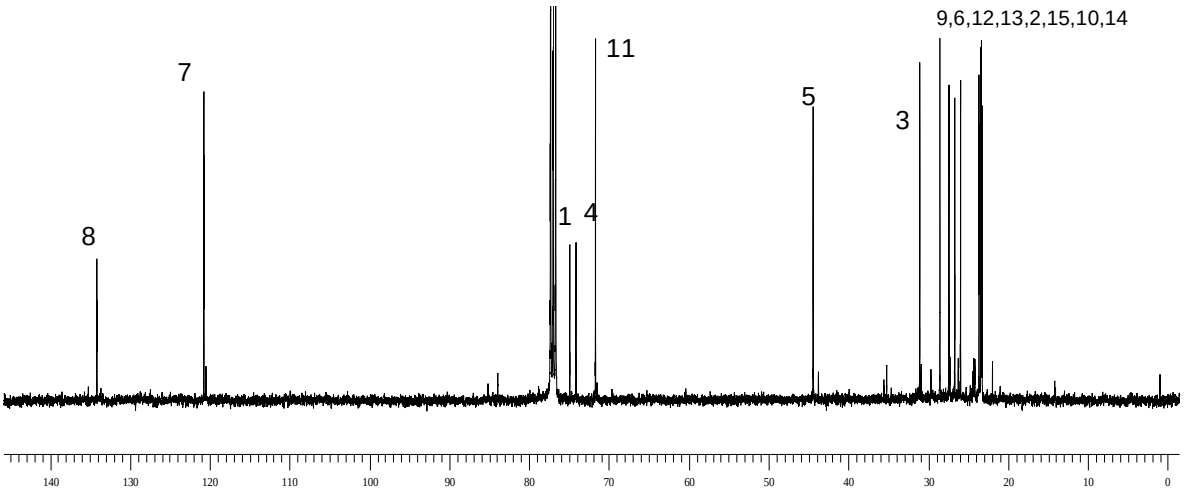


Figura 29. Espectro de ^{13}C óxido de bisabolol-A, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

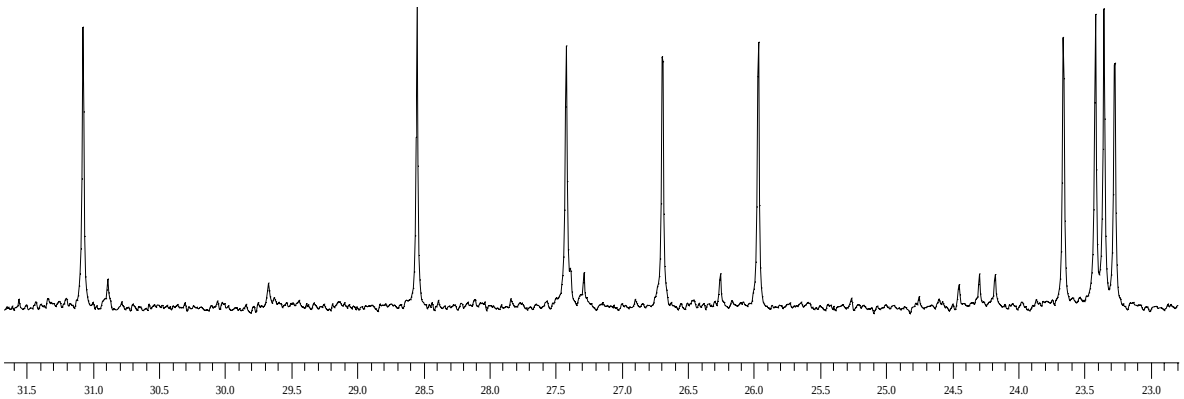


Figura 30. Espectro de ^{13}C a 100MHz expandido do óxido de bisabolol-A

3.1.2.2. Resultados obtidos dos experimentos de cultivo e análise de plantas nativas de *Matricaria chamomilla*

Os experimentos de cultivo desta espécie foram realizados pelo departamento de fitotecnia da UFSM e pela escola agrotécnica de São Vicente do Sul. As sementes foram obtidas de espécies cultivadas no Rio Grande do Sul, e da empresa especializada no cultivo de *Matricaria chamomilla* Mandirituba, no Paraná.

Das amostras nativas coletadas no Rio Grande do Sul destacou-se a amostra oriunda do município de Ibarama, região central do estado, devido o seu alto teor de camazuleno que atingiu 22%. Nesta amostra observou-se a ausência dos componentes α-bisabolol e óxido de bisabolol-A, apresentando somente o óxido B com 47%. Detetou-se também o sesquiterpeno farneseno (12%) e do monoterpeno ocimeno (5%) (Figura 31).

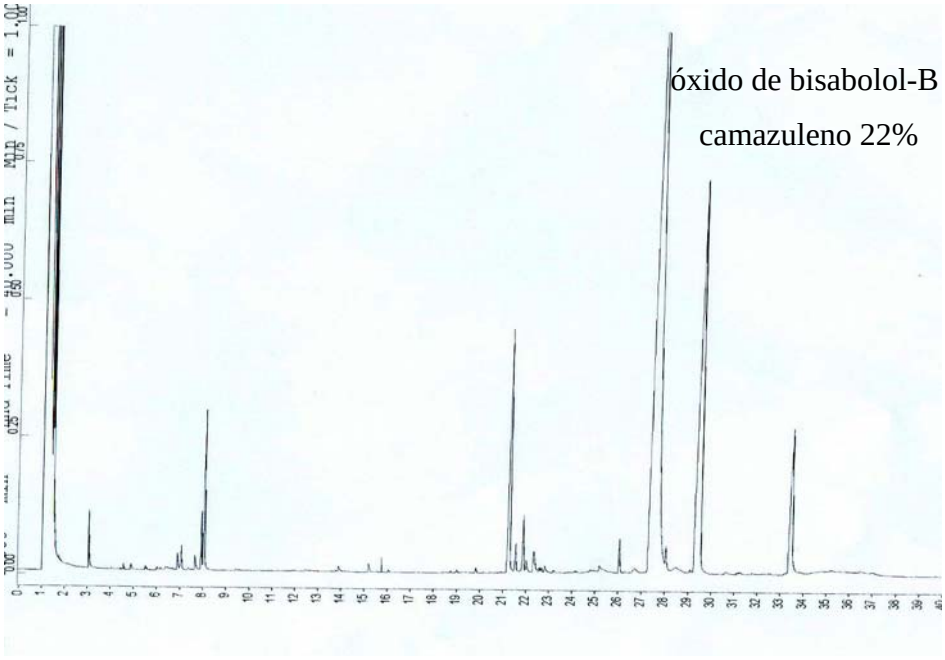


Figura 31. Cromatograma CG-FID da amostra do óleo de *Matricaria chamomilla* oriundo da localidade de Ibarama-RS. Condições: SE-54, 50-250°C, 4 °C/min, 7 psi H_2.

Diferenças foram observadas nas amostras submetidas a cultivo com adubação (correção com NPK) e sem adubação. Observou-se que quando cultivadas em solo

adubado, ocorreu um aumento no teor de camazuleno. Ocorreram também alterações mais sensíveis, visíveis no teor dos demais sesquiterpenos.

Outra variante analisada foi o cultivo de *Matricaria chamomilla* em estufas. Como resultado deste experimento, observou-se um aumento significativo no teor de óxido de bisabolol-A, chegando a teores de até 83% no óleo volátil, conforme o cromatograma (Figura 32). Entretanto, o componente camazuleno esta ausente nesta amostra, o que significa que nestas condições, a lactona sesquiterpênica matricina não foi biossintetisada pela planta.

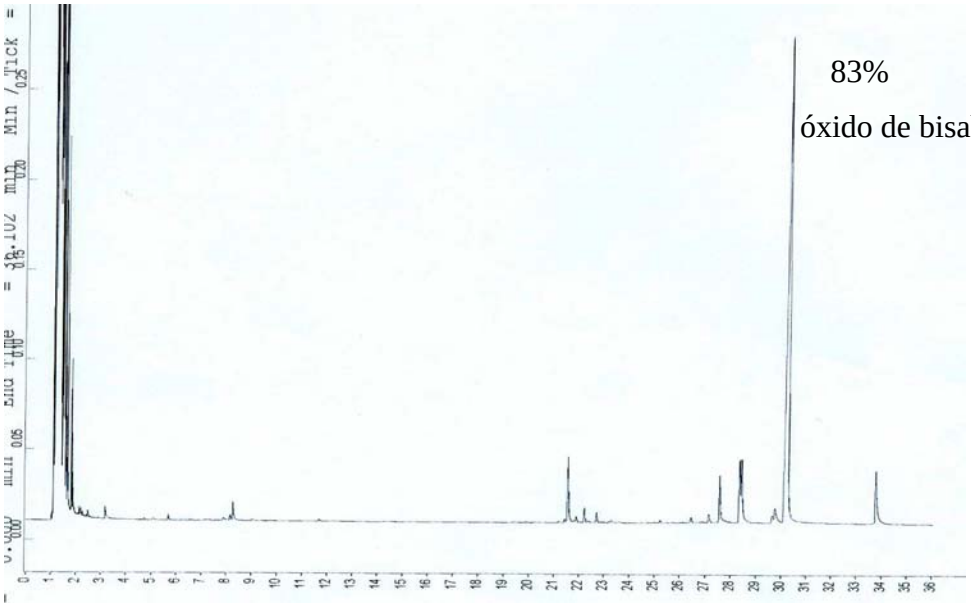


Figura 32. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *Matricaria chamomilla*, obtido de plantas cultivadas em estufa. Condições: SE-54, 50-250°C, 4 °C/min, 7 psi H_2.

Tabela 8. Principais constituintes encontrados nos óleos essenciais de *Matricaria chamomilla*, obtidos de plantas nativas e cultivadas no Rio Grande do Sul.

Compostos		IK	Método de identificação
01	ocimeno		CG-EM
02	β–elemeno	1392	CG-EM
03	β–farneseno	1457	CG-EM
04	Óxido de bisabolol-B	1653	CG-EM,RMN
05	α–Bisabolol	1679	CG-EM

06	Camazuleno	1725	CG-EM
07	Óxido de bisabolol-A	1744	CG-EM,RMN
08	Espiroéter acetilenico	1877	CG-EM

3.1.2.3. Atividade antimicrobiana.

Com estas analises, pode-se concluir que os principais componentes encontrados nos óleos voláteis de *Matricaria chamomilla* nativas e cultivadas no Rio Grande Sul são o óxido de bisabolol A e B, sesquiterpenos estes derivados do α-bisabolol. Com este dado, resolveu-se então investigar as propriedades antibacterianas destes compostos. Nos testes realizados pelo método de biautografia, observou-se que estes óxidos são substâncias que apresentam bons efeitos no controle do crescimento bacteriano, sendo ativos contra todos os microorganismos testados, conforme Tabela 9. Na Figura 33 pode-se observar os halos de inibição causados pelos compostos frente a bactéria testadas.

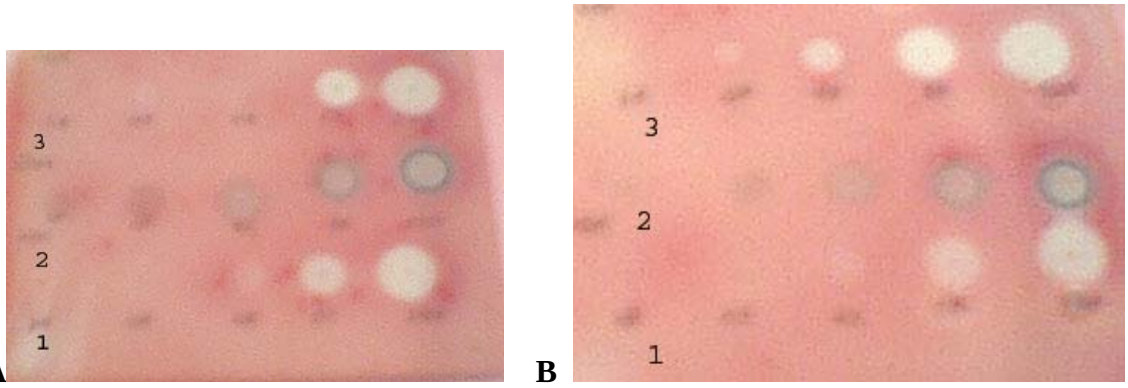


Figura 33. **Fotos dos testes antimicrobianos por biautografia dos óxidos de bisabolol A e B, comparado com o óleo de *Matricaria chamomilla* frente a *Stafilococus áureos* (A) e *Micrococus luteos*(B), onde 1. óxido de bisabolol A; 2. óleo de camomila; 3. óxido de bisabolol-B.**

Tabela 9. Determinação da quantidade inibitória mínima (μg) através de bioautografia, dos óxidos de bisabolol A e B e do óleo da amostra A de *Matricaria chamomilla* cultivada.

microorganismos	Amostra A	Óxido bisabolol A	Óxido bisabolol B	Padrão
S. aureus	50	25	25	0,7
S. epidermidis	50	25	50	0,7
E.coli	25	25	50	0,4
S. setubal	25	25	25	0,6
K. pneumoniae	50	50	50	0,6
M. luteos	25	6,25	12,5	0,6

Com as diferenças observadas na composição dos óleos, decidiu-se avaliar estes óleos quanto a suas atividades antimicrobianas e relaciona-los à sua composição. Para isto, selecionou-se duas amostras de óleos (amostras A e B) que apresentavam diferentes composições químicas, conforme a Tabela 10. Estas amostras de óleos foram obtidas de plantas submetidas a cultivo. Sendo a amostra A obtida de espécies cultivadas em solo não adubado, enquanto a amostra B foi obtida de plantas cultivadas em solo que foi submetido a adubação(correção) com nutrientes NPK (adubo químico).

Tabela 10. Composição dos óleos voláteis de *Matricaria chamomilla* avaliados quanto as suas atividades antimicrobianas.

Compostos	Amostra A %	Amostra B %
β–elemeno	0,1	3,0
β–farneseno	2,0	2,0
Óxido de bisabolol-B	10,0	25,0
α–Bisabolol	23,0	11,0
Camazuleno	4,0	21,0

Óxido de bisabolol-A	46,0	17,0
Espiro éter acetilenico	9,0	7,0

Tabela 11. Testes de atividade antimicrobiana dos óleos voláteis executados pelo método da microdiluição em caldo em mg/mL, CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CML (Concentração Mínima Letal).

Microorganismo	Amostra A		Amostra B		Padrão
	CIM	CML	CIM	CLM	CLM
S. aureus	5	5	5	>10	$6,25x\ 10^{-3}$
S. epidermidis	2,5	5	1,25	10	$3,12x10^{-3}$
M. luteus	5	10	5	5	$4,06x10^{-3}$
K.pneumoniae	5	5	2,5	>10	$6,25x\ 10^{-3}$
E.coli	5	>10	5	>10	$1,67x10^{-3}$
S. setubal	0,63	0,63	0,63	2,5	$1,67x10^{-3}$
B. subtilis	2,5	2,5	2,5	10	$3,12x10^{-3}$
P. aeruginosa	5	5	2,5	>10	$3,12x10^{-3}$

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CLM: Concentração Letal Mínima

Os resultados obtidos (Tabela 11) demonstraram que as duas amostras apresentam atividade antibacteriana com CIMs entre 5 e 0,6mg/mL, porém a amostra A de *M. chamomilla* apresentou um maior maior poder bactericida tanto para bactérias *Gram*(+) como para *Gram* (-). Dessa forma, pode-se relacionar a atividade bactericida ao alto teor de óxido de bisabolol A da amostra A, sendo este já mencionado na literatura como antimicrobiano e comprovado aqui neste trabalho anteriormente pelo método de bioautografia. Já na amostra B de *M. chamomilla* houve apenas a ação bacteriostática, que pode estar relacionada aos altos teores de camazuleno e óxido de bisabolol B.

3.1.3. *PLUCHEA QUITOC*

3.1.3.1. Estudo da composição e análise química dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc*

Pluchea quitoc DC (Asteraceae) é uma planta medicinal usada popularmente como expectorante, carminativo, digestivo e antireumático no norte e centro oeste do Brasil.[95] No sul do Brasil é usada popularmente como digestivo e expectorante.[95] Alguns autores tem estudado a composição química de extratos de espécies de *Pluchea* e tem demonstrado as propriedades biológicas exibidas por algumas das substancias isoladas destas espécies .[96-98] Guilhon[99] em 1996 publicou o isolamento de um novo derivado do esqueleto eudesmano, juntamente com outros compostos já conhecidos, a partir do extrato hexanico de *Pluchea quitoc*, coletada na região norte do Brasil. Os óleos voláteis desta espécie não são citados na literatura, fato que nos motivou a realizar um estudo dos componentes voláteis de plantas nativas dos campos do Rio Grande do Sul, onde é utilizada como erva medicinal pela população local.[95] Foram coletadas amostras de material verde (folhas) em dois locais do Rio Grande do Sul; em Santana do Livramento (amostra A) e Fortaleza dos Valos (amostra B). O resultado em termos de rendimentos em óleo, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Rendimento médio dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc*, das duas regiões de coleta.

óleo de *Pluchea quitoc*	Rendimento
amostra A	0,24
amostra B	0,19

Período de monitoramento do óleo: 09/2003-05/2004

Conforme pode ser observado na tabela acima, os rendimentos em óleos destas amostras foram pequenos, apesar do forte aroma da planta. Os óleos analisados

apresentaram uma composição somente de sesquiterpenos. Observou-se ainda uma variação quantitativa na composição do óleo conforme o local de coleta (Figuras 34 e 36).

Com o objetivo de se isolar os constituintes principais, o óleo obtido de plantas coletadas em Fortaleza dos Valos foi submetido a um fracionamento em CCD preparativa, utilizando-se um sistema de solvente hexano:acetato de etila 90:10. Após eluição e revelação da placa preparativa com o reagente de Godin, as frações reveladas com maior intensidade foram separadas e extraídas. Em uma das frações obteve-se de forma pura, uma substancia com índice de Kovat's de 1739 (Figura 37). Após as análises em CG, constatou-se que este composto corresponde ao principal componente do óleo volátil da amostra B equivalendo a 24% do óleo, entretanto corresponde apenas a 8%, no óleo da amostra A.

Outro componente identificado através de CG-EM (Figura 35) como sendo o sesquiterpeno α-gurguneno, foi encontrado nas duas amostras em concentração de 20% (Tabela 13, pág. 65), sendo um dos principais componentes das amostras de óleos voláteis de *Pluchea quitoc*.

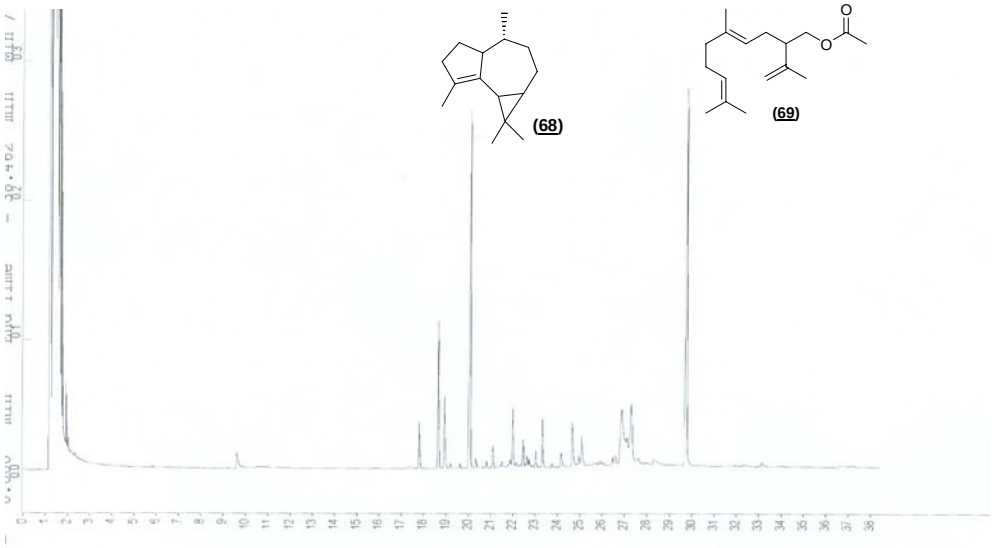


Figura 34. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *Pluchea quitoc* da amostra B e identificação do sesquiterpeno α-gurguneno **(68)**. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

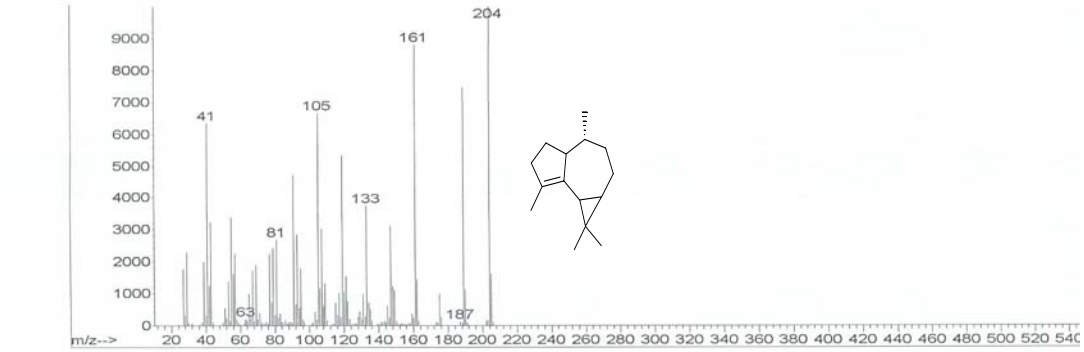


Figura 35. Espectro de massas α-gurguneno presente no óleo de *Pluchea quitoc*.

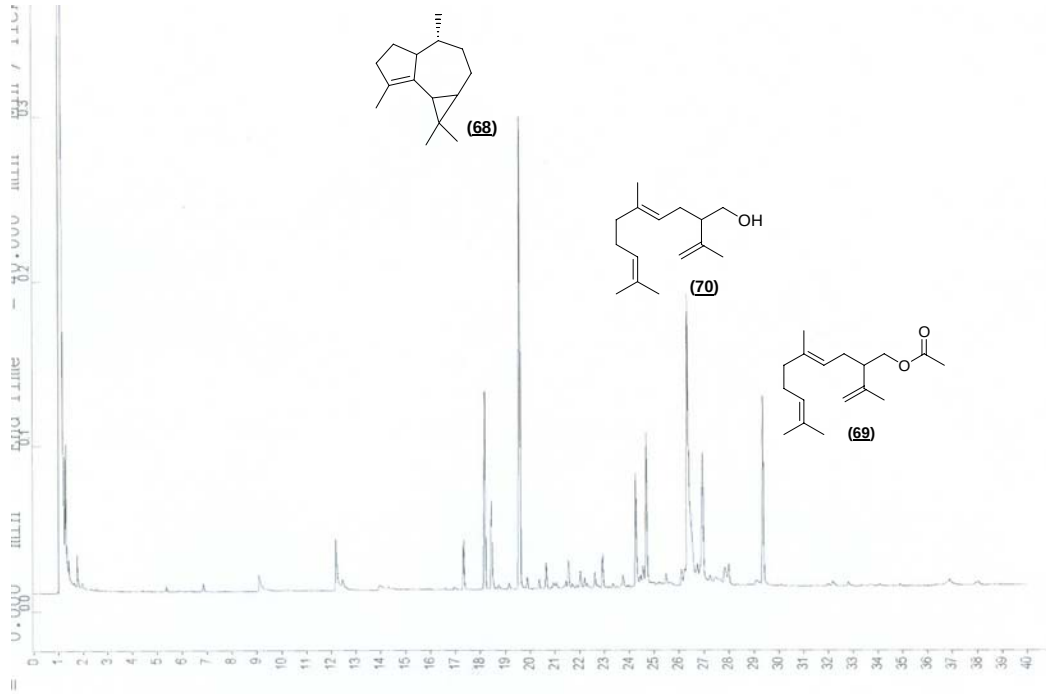


Figura 36. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *Pluchea quitoc* da amostra A e identificação dos sesquiterpenos α-gurguneno **(<u>68</u>),** Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

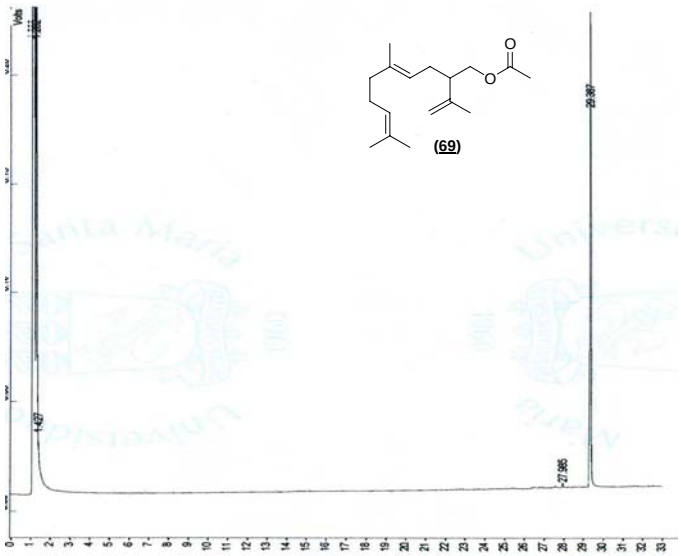


Figura 37. Cromatograma CG-FID do composto isolado do óleo volátil de *Pluchea quitoc.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

O composto isolado do óleo obtido de plantas coletadas em Fortaleza dos Valos foi submetido a análises espectroscópicas de determinação estrutural através de RMN de ^{1}H e ^{13}C. Conforme espectros a seguir.

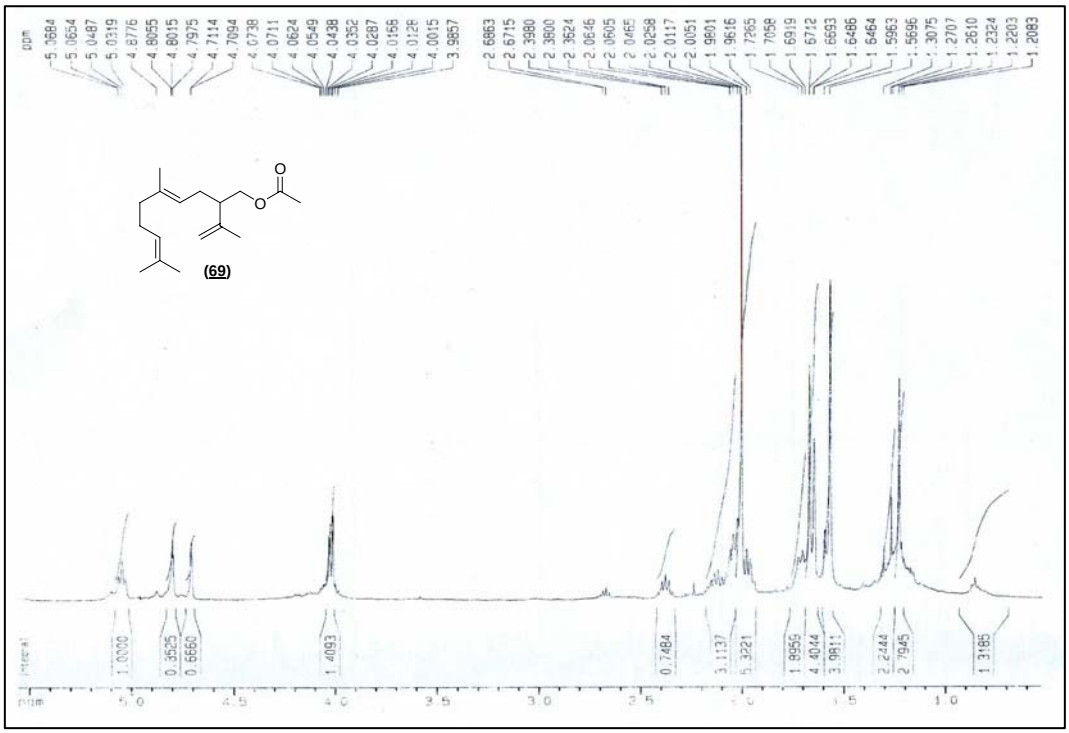


Figura 38. Espectro de RMN ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_3$, do composto isolado de *Pluchea quitoc.*

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (Figura 38) mostra cinco singletos, cada um com integração para três hidrogênios, correspondendo a cinco metilas na estrutura. Um destes sinais que absorve a δ 2, 06 ppm, corresponde a uma metila de um grupo acetila de éster. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) mostra que a estrutura é constituída de 17 carbonos, sendo um deles a δ 175,54 ppm, correspondente a carbonila de éster. Alem disso o espectro confirma a presença dos cinco grupamentos metilas a δ 16,0, δ 17,6, δ 19,9, δ 20,9, δ 25,6 ppm, alem da presença de de três carbonos metínicos a δ 46,1, δ 121,6, δ 124,2 ppm, e de três carbonos olefinicos desidrogenados a δ 131,3, δ 136,5, δ 144,9 ppm.

A analise do espectro de DEPT 135 (Figura 40) mostra a presença de cinco carbonos metilenicos a δ 26,6, δ 28,5, δ 39,7, δ 65,9 e δ 112,3 ppm, alem de confirmar, pela ausência no espectro, a presença de quatro carbonos desidrogenados.

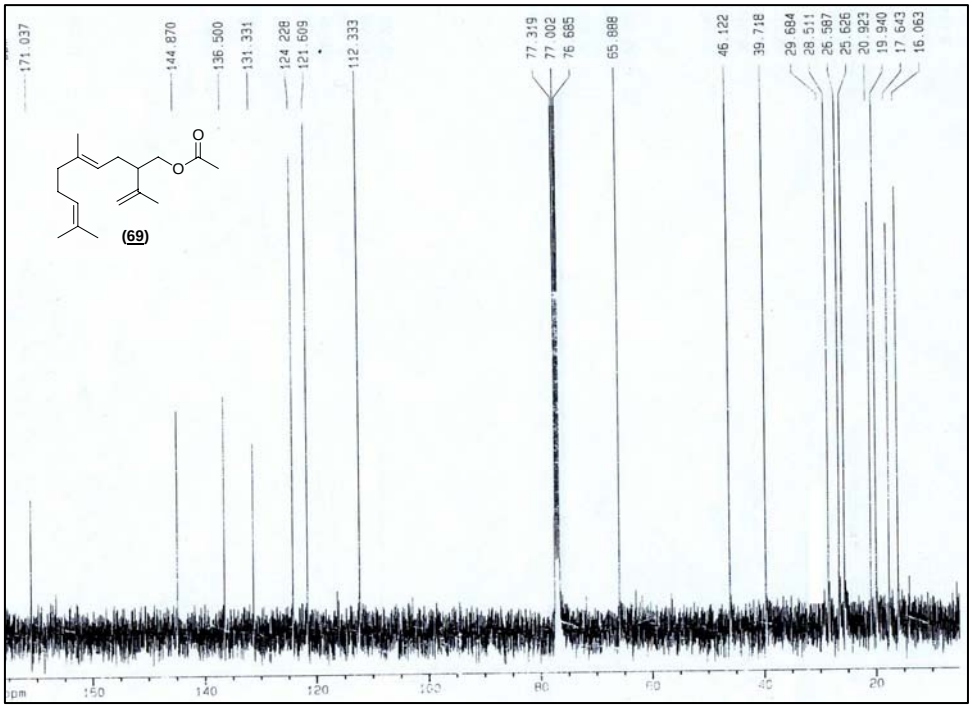


Figura 39. Espéctro de RMN ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do composto isolado de *Pluchea quitoc.*

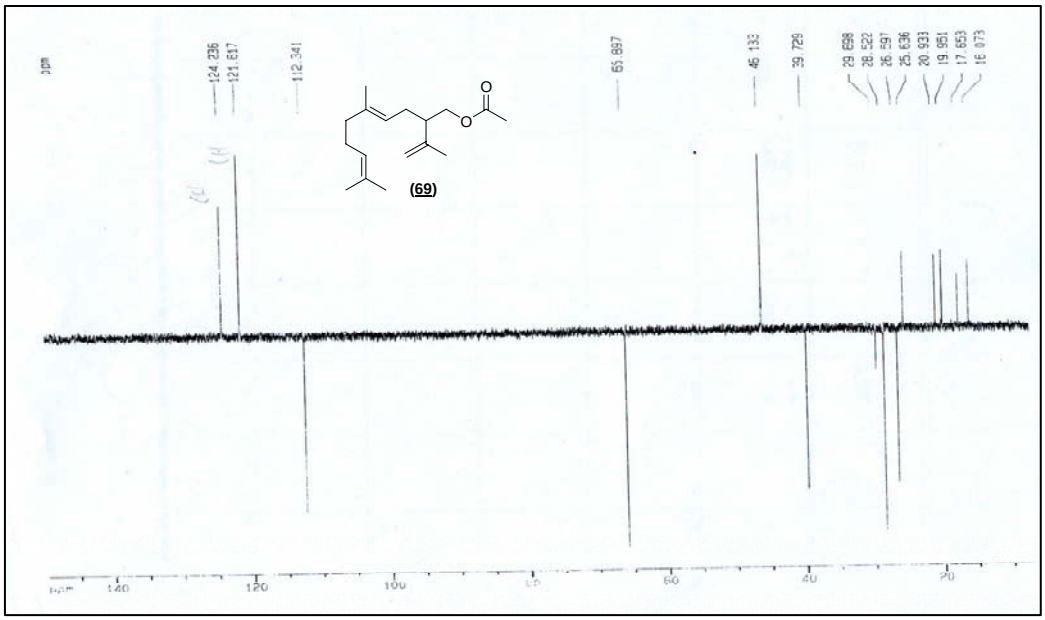
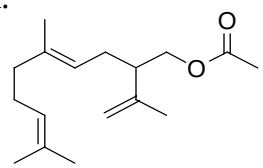


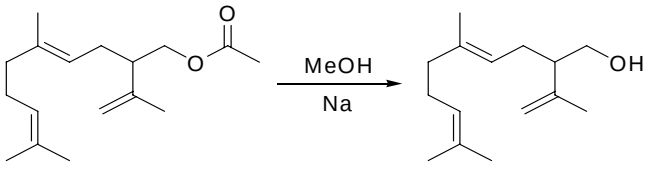
Figura 40. Espéctro de RMN DEPT-135 a 100 MHz em $CDCl_3$ do composto isolado de *Pluchea quitoc.*

Através da análise destes espectros, juntamente com a informação do índice de Kovat's, a estrutura deste componente foi atribuída como sendo do éster sesquiterpenico acetato de (Z)- sesquilavandulila.



acetato de (*Z*)-sesquilavandulila **(<u>69</u>)**

Com a definição estrutural do acetato de (Z)-sesquilavandulila decidiu-se, submeter este composto a uma hidrólise básica, a fim de se obter o álcool correspondente, o álcool sesquiterpenico sesquilavandulol (Esquema 27). Para isto, submeteu-se 25mg de sesquilavandulol acetato a uma reação de hidrólise frente ao metóxido de sódio que rendeu 17mg do produto de hidrólise.



(<u>69</u>) **(<u>70</u>)**

Esquema 12. Saponificação do sesquilavandulol acetato.

O álcool sesquiterpenico sesquilavandulol, é um composto acíclico insaturado encontrado em óleos voláteis.[100] Devido a esta evidência e a presença do derivado acetilado do álcool sesquilavandulol (acetato de sesquilavandulila) no óleo de *Pluchea quitoc*, a provável presença do álcool foi investigada através das comparações com o padrão obtido pela hidrólise do éster.

Conforme demonstrado na Figura 41, a reação ocorreu com sucesso, resultando em um produto com tempo de retenção diferente do substrato utilizado (Figura 37). Além disso os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Figuras 42 e 43) confirmaram que a hidrólise ocorreu, pela ausência nestes espectros dos sinais relativos ao grupo acetila do éster. No espectro de RMN de ^{13}C observa-se a ausência do grupo carbonila do éster, e o aparecimento de apenas quinze sinais.

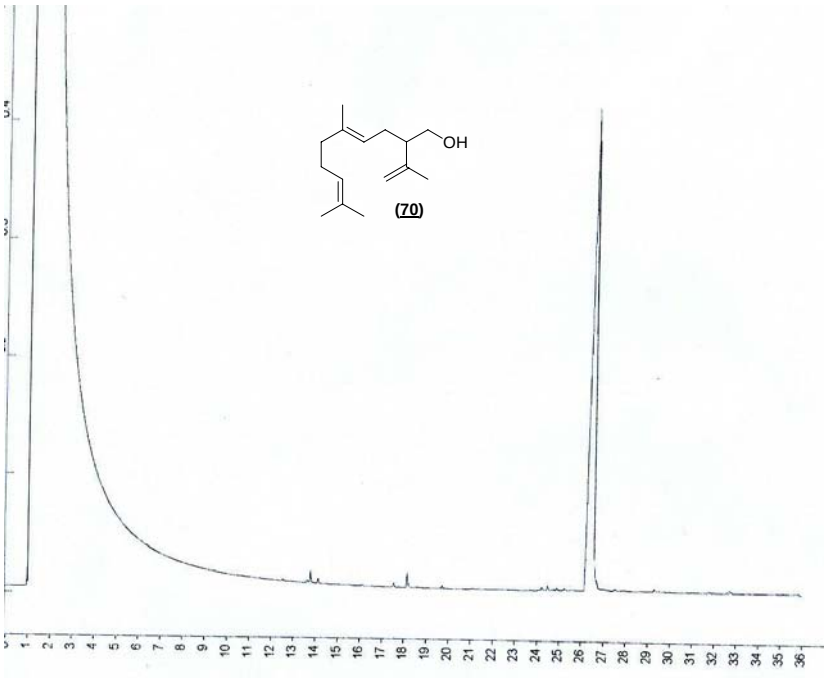


Figura 41. Cromatograma CG-FID do produto de hidrólise do sesquilavandulol acetato. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

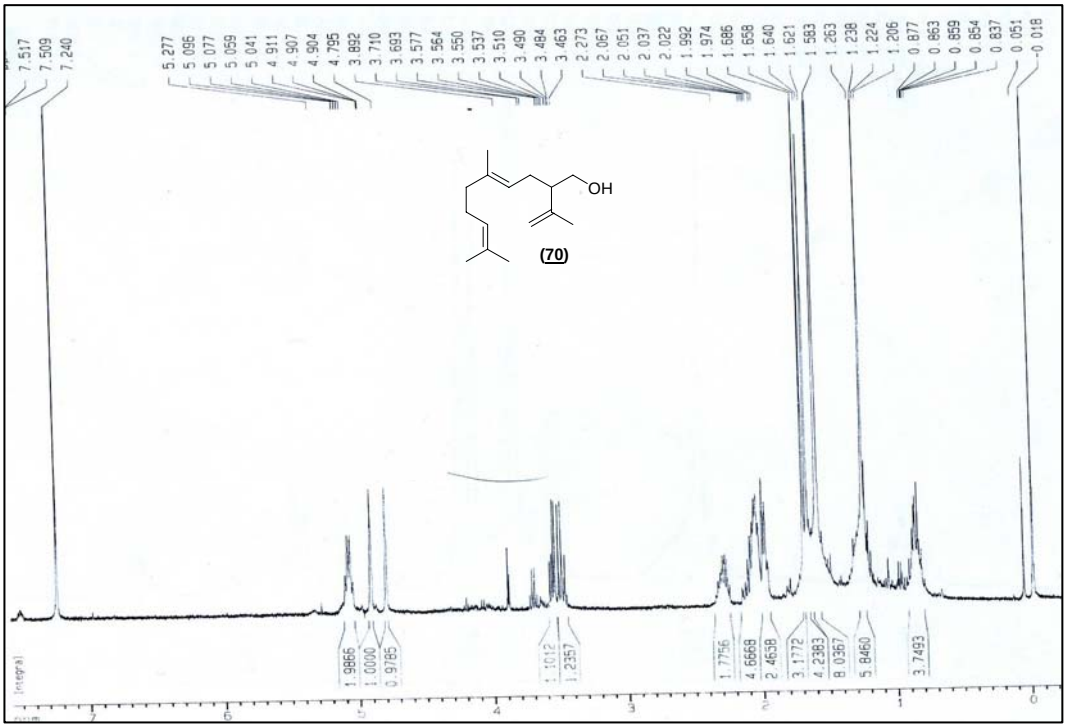


Figura 42. Espectro de RMN ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_3$ do produto de hidrólise do sesquilavandulol acetato.

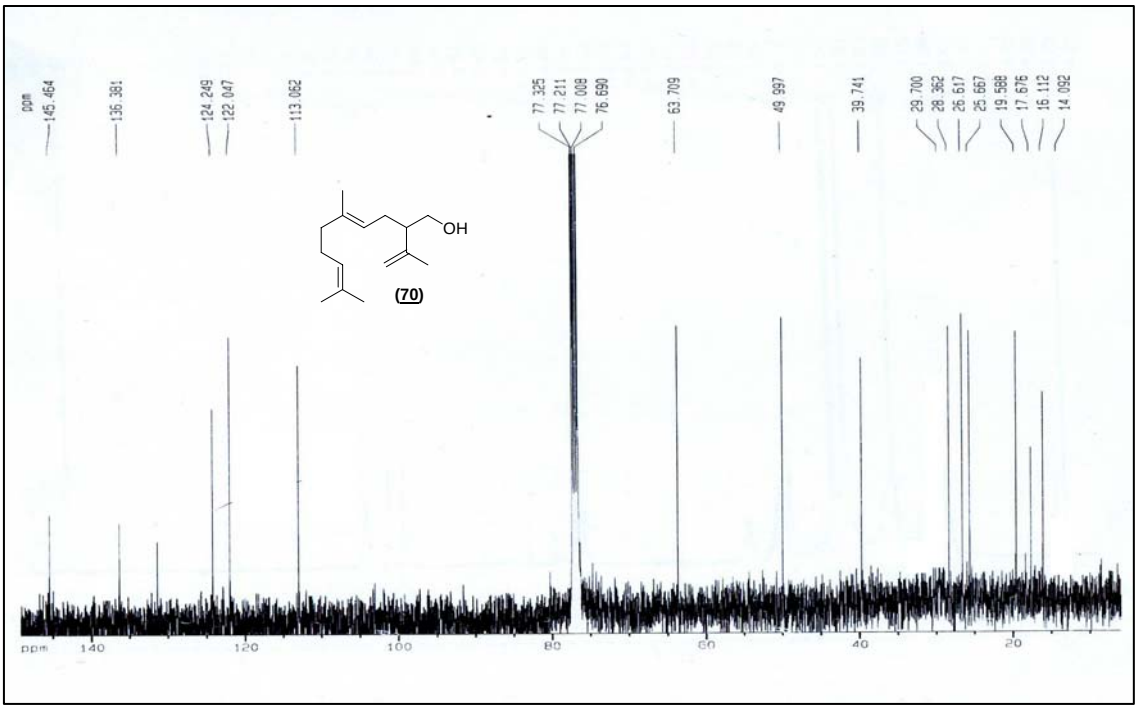


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do produto de hidrólise do sesquilavandulol acetato.

De posse do padrão do álcool sesquilavandulol, pode-se detectar a presença deste sesquiterpeno nos óleos obtidos, através do método do padrão interno, com a co-injeção deste sesquiterpeno com os óleos de *Pluchea quitoc* (Figura 44). Desta forma detectou-se a presença do álcool sesquiterpenico sesquilavandulol como sendo um dos componentes da amostra coletada em Santana do Livramento correspondendo a 24,3% do óleo, e a 8,2% no óleo da amostra coletada em Fortaleza dos Valos. Com a definição da composição volátil de *Pluchea quitoc*, observa-se que os derivados do esqueleto sesquilavandulano são responsáveis por percentuais superiores a 30% da composição dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc*, sendo os principais componentes seguidos pelo sesquiterpeno α-gurguneno (Tabela 13). Em conclusão, é possível atribuir pela obtenção dos IK a qual dos estereoisomeros pertencem às estruturas dos sesquiterpenos derivados do esqueleto sesquilavandulano. Com um índice de 1739 e 1635 pode-se confirmar que os compostos são respectivamente o *E*-acetato de sesquilavandulila e o álcool *E*-sesquilavandulol .

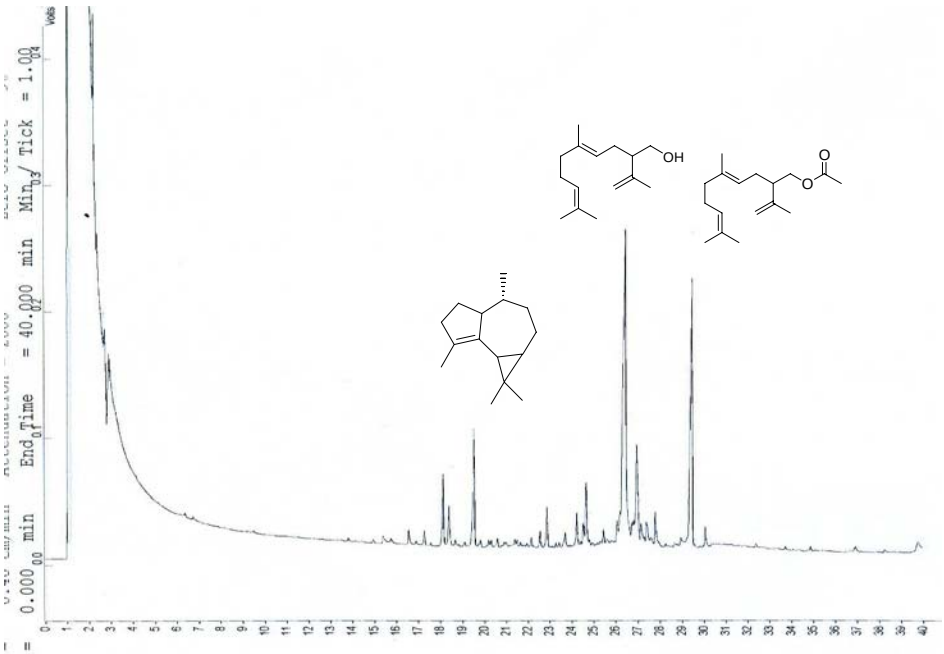


Figura 44. Cromatograma CG-FID da co-injeção do óleo de *Pluchea quitoc* coletada em Fortaleza dos Valos com o álcool sesquivalandulol. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

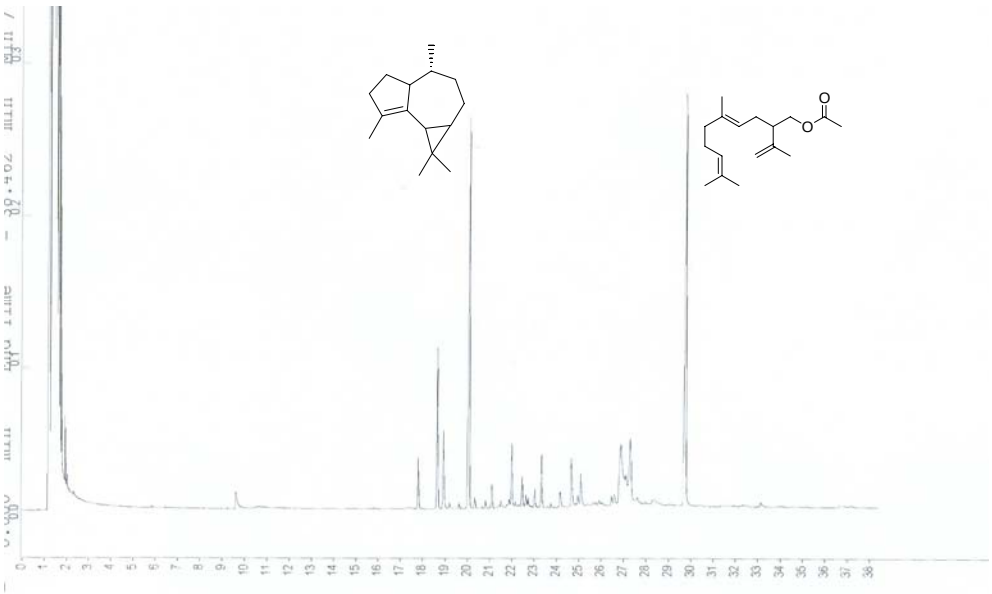


Figura 45. Cromatograma CG-FID da amostra original do óleo de *Pluchea quitoc* coletada em Fortaleza dos Valos. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

Tabela 13. Composição dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc.*

	Composto	Amostra A %	Amostra B %	IK[b]	Método de identificação
01	linalol	-	1,04	1098	CG-EM
02	terpineol	2,2	-	1098	CG-EM
03	δ-elemeno	1,8	2,24	1349	CG-EM, co
04	undecanol	7,4	7,15	1370	CG-EM, co
05	α-copaeno	3,5	3,6	1378	CG-EM
06	α-gurguneno	20,5	20,0	1412	CG-EM, co
07	nerolidol	4,5	2,86	1564	CG-EM
08	espatulenol	6,5	1,95	1577	CG-EM
09	*E*-sesquilavandulol álcool	24,3	8,16	1635	CG/EM, co, RMN
10	α-cadinol	7,5	6,9	1656	CG-EM, co,
11	*E*-sesquilavandulol acetato	7,6	24,1	1739	CG-EM, RMN
	TOTAL	83,6	76,96		

3.1.3.2 Atividade antibacteriana dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc.*

Os ensaios de atividade antibacteriana dos óleos obtidos pelo método de microdiluição (CIM) (Tabela 15) mostraram que estes óleos foram pouco ativos frente aos microorganismos testados. As substâncias puras isoladas e uma fração impura de sesquiterpenos, foram testadas contra os mesmos microorganismos, através do método de bioautografia. Este método (bioautografia) foi escolhido por exibir as quantidades necessárias de cada substância analisada, para inibir o crescimento microbiano. Estes métodos demonstraram a baixa atividade do óleo frente aos microorganismos testados, devido as altas concentrações necessárias para inibir o crescimento bacteriano. Através dos resultados encontrados na Tabela 14 observou-se que o álcool sesquiterpênico sesquilavandulol foi fracamente ativo contra três bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*), enquanto o seu éster foi ativo somente contra uma bactéria (*S. aureus*), verificando-se desta maneira que a acetilação do grupo OH diminui a atividade da estrutura. A fração de sesquiterpenos isolada, apresentou a menor atividade antibacteriana, quando comparada com as substâncias isoladas. Esta fração foi fracamente ativa somente contra *S. aureus*.

Tabela 14. Determinação da quantidade de substancia ativa (μg), por bioautografia, do sesquilavandulol acetato, sesquilavandulol álcool e da fração de sesquiterpenos de *Pluchea quitoc.*

microorganismos	sesquilavandulol acetato	álcool sesquilavandulol	hidrocarbonetos sesquiterpênicos*	Padrão
S. aureus	50	50	100	0,7
S. epidermidis	-	100	-	0,7
K.pneumoniae	-	-	-	0,4
E.coli	-	50	-	0,6
S. setubal	-	-	-	0,6

P. aeruginosa	-	-	-	0,6
B. subtilis	-	-	-	0,5

*Fração de sesquiterpenos, com ausência dos sesquiterpenos derivados do esqueleto sesquilavandulano (acetato e álcool).

Tabela 15. Testes de atividade antimicrobiana dos óleos voláteis de *Pluchea quitoc* executados pelo método da microdiluição em caldo em mg/mL, CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CML (Concentração Mínima Letal).

microorganismos	Amostra A		Amostra B		Padrão
	MIC	MBC	MIC	MBC	CIM
Staphylococcus aureus	20	>20	20	>20	$6,25x\ 10^{-3}$
Staphylococcus epidermidis	20	>20	20	>20	$3,12x10^{-3}$
Escherichia. coli	20	>20	20	-	$1,67x10^{-3}$
P. aeruginosa	20	>20	10	>20	$3,12x10^{-3}$
Klebsiella pneumoniae	10	>20	10	>20	$6,25x\ 10^{-3}$
B. subtilis	>20	>20	20	20	$3,12x10^{-3}$
Salmonella setubal	10	20	10	20	$1,67x10^{-3}$
Candida albicans	>20	-	20	-	$3,12x10^{-3}$
Cryptococcus neoformans	>20	>20	10	10	$4,06x10^{-3}$

3.4.1 ALOYSIA SELLOWII

3.1.4.1. Óleo volátil de *Aloysia sellowii*

A família Verbenaceae compreende aproximadamente 175 gêneros e 2300 espécies, distribuídas nos trópicos e subtrópicos, principalmente nas zonas temperadas e no hemisfério sul. As espécies relatadas são arbustos, árvores e ervas, sendo estas últimas predominantes na flora brasileira.[101] O gênero Aloysia inclui algumas espécies de ervas e arbustos. Estas espécies estão distribuídas principalmente nos países da América do Sul e Central. A maioria destas espécies são tradicionalmente utilizadas como remédios gastrointestinais e respiratórios.[102] Muitas espécies habitam o Brasil, como *Aloysia tryphilla,* que é cultivada como planta ornamental, e largamente usada na medicina alternativa devido a suas propriedades antiespasmodica e digestiva[103] *A. gratissima*, *A. virgata e A. sellowii,* tem sido pouco estudadas quanto ao seu potencial aromático. Com base neste interesse é discutido nesta sessão o estudo dos óleos voláteis obtidos das folhas de *A. sellowii.*

Aloysia sellowii conhecida como Garupá, cidrosinho ou erva de sepultura é um arbuto aromático de 1-2 m de altura, encontrado em grande parte do sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina.[101] No Rio Grande do Sul é tradicionalmente usada pela população local no combate a febres, gripes e bronquites.[103-104]

As amostras de *A. sellowii* foram coletadas diversas vezes e nas diferentes estações, durante o período de 2000-2001**,** em duas localidades do Rio Grande do Sul: Santa Maria e Santana do Livranento.

Os óleos das folhas de *A. sellowii* foram obtidos por hidrodestilação, com rendimentos que variaram de 1,2-1,4%. Os constituintes foram determinados por CG-EM e por co-injeção com padrões autênticos disponíveis no laboratório. Foram identificados 28 componentes, constituindo 92,75% do óleo coletado em Santa Maria (amostra A), e 34 componentes, constituindo 91,04% do óleo de Santana do Livramento (amostra B). Ambos os óleos apresentaram algumas diferenças quantitativas e qualitativas (Tabela 16 e Figuras 46 e 47).

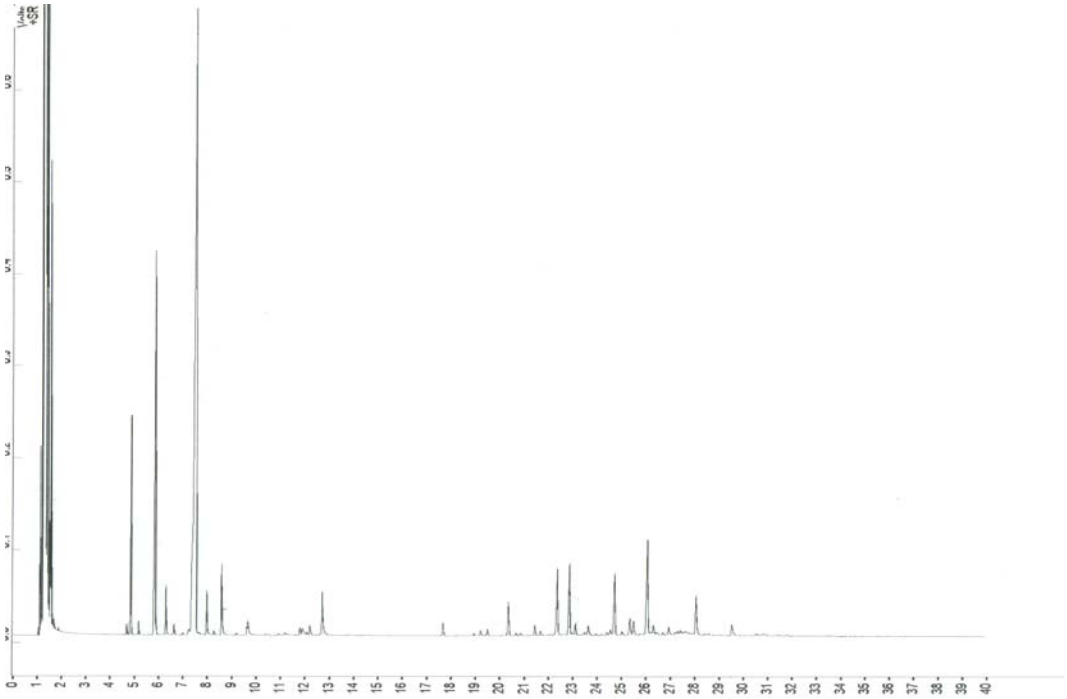


Figura 46. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *A. sellowii* obtido da amostra A. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

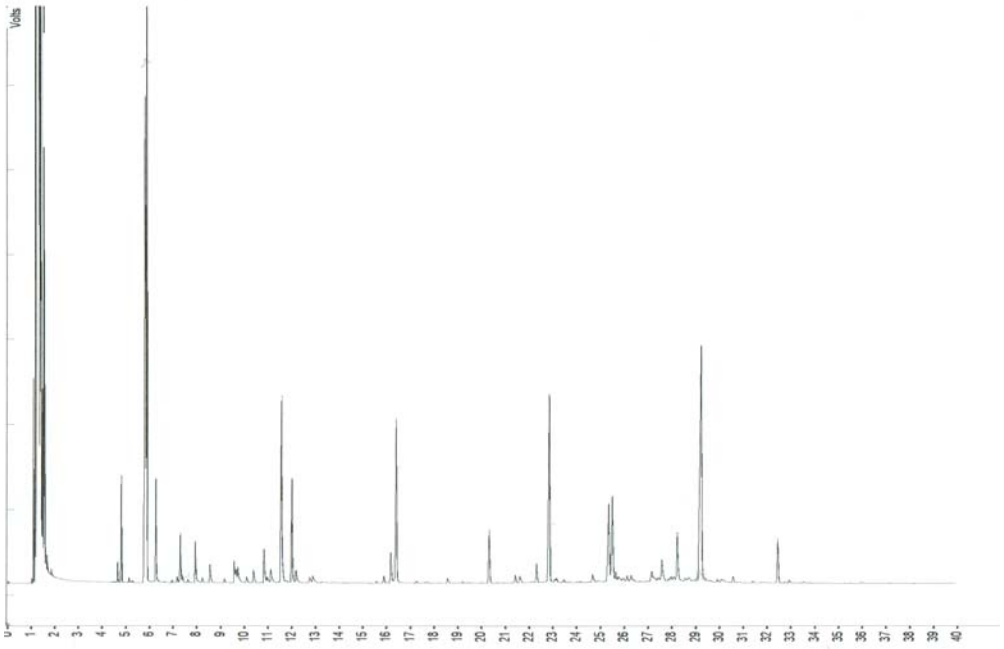


Figura 47. Cromatograma CG-FID do óleo volátil de *A. sellowii* obtido da amostra B. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

O componente principal presente no óleo da amostra A foi o monoterpenóide 1,8-cineol com 43%, que está presente na amostra B com um percentual de apenas 1,16%. O óleo da amostra B, apresentou um maior acúmulo de sesquiterpenos, que a amostra A, monoterpeno sabineno com 12,62%, e o sesquiterpenóide β-santalol com 12,88%. Estas diferenças químicas podem ser um indicativo que as amostras A e B são quimiotipos desta espécie: o quimiotipo 1,8-cineol (amostra A) e o quimiotipo sabineno- β-santalol (amostra B).

Tabela 16. Composição dos óleos voláteis de *A. sellowii.*

Composto		% nas amostras		Indices de Kovats		Identificação
		A	B	Apolar	Polar	
01	α-Tujeno	0.26	0.35	931	1007	RI, GC-MS, Co
02	α-Pineno	5.18	1.87	939	1016	RI, GC-MS, Co
03	Canfeno	0.33	-	953	1060	RI, GC-MS
04	β-Pineno	12.6	14.58	980	1114	RI, GC-MS, Co
05	Sabineno	-	12.62	976	1065	RI, GC-MS, Co
06	Mirceno	1.31	2.32	991	1160	RI, GC-MS, Co
07	δ-Careno	0.32	-	1001	1189	RI, GC-MS
08	Limoneno	1.27	1.13	1028	1193	RI, GC-MS, Co
09	1,8-Cineol	43.3	1.16	1033	1200	RI, GC-MS, Co
10	Linalol	0.72	0.58	1095	1562	RI, GC-MS, Co
11	Undecano	0.71	0.66	1100	1530	RI, GC-MS, Co
12	*cis*-β-Dihidroterpineol	-	1.08	1138	-	RI, GC-MS
13	Isoborneol	-	6.55	1156	1492	RI, GC-MS
14	Pinocanfeol	-	3.15	1167	1519	RI, GC-MS
15	Terpinen-4-ol	1.83	3.03	1177	1602	RI, GC-MS, Co
16	Isomentol	-	0.53	1178	-	RI, GC-MS
17	*cis*-Dihidrocarvona	-	0.25	1194	-	RI, GC-MS, Co

18	*trans*-Dihidrocarvona	-	0.36	1198	-	RI, GC-MS, Co
19	Carvacrol etil éter	-	1.03	1294	-	RI, GC-MS
20	Carvacrol	-	5.25	1297	1572	RI, GC-MS, Co
21	β-Bourboneno	0.22	-	1384	-	RI, GC-MS
22	Vanilina	0.25	-	1392	-	RI, GC-MS
23	*cis*-treo-Davanafuran	1.28	1.77	1414	1569	RI, GC-MS
24	etil-Vanilina	0.40	0.27	1452	-	RI, GC-MS
25	β-Farneseno (E)	-	0.34	1457	-	RI, GC-MS, Co
26	γ-Muuroleno	2.95	0.83	1477	1639	RI, GC-MS
27	γ-Curcumeno	-	0.78	1480	-	RI, GC-MS
28	*epi*-Cubebol	3.07	6.90	1492	1633	RI, GC-MS
29	α-Bisaboleno (Z)	0.60	-	1504	-	RI, GC-MS
30	*cis*-Calameneno	0.44	-	1521	-	RI, GC-MS
31	Timohidroquinona	2.75	-	1552	1794	RI, GC-MS
32	Óxido de Cariofileno	-	3.30	1574	1987	RI, GC-MS, Co
33	Turmerol	0.78	-	1577	-	RI, GC-MS
34	espatulenol	3.47	-	1579	2164	RI, GC-MS, Co
35	Globulol	0.69	-	1582	-	RI, GC-MS, Co
36	Viridiflorol	-	0.36	1591	-	RI, GC-MS
37	Guaiol	4.91	-	1595	2077	RI, GC-MS, Co
38	Cedrol	-	0.31	1597	2170	RI, GC-MS
39	Isobornil isobutirate	-	0.32	1602	-	RI, GC-MS
40	*epy*-Cedrol	-	0.40	1608	-	RI, GC-MS
41	α-Acorenol	0.44	-	1630	2207	RI, GC-MS
42	6-hidroxi-Isobornil Isobutirato	-	0.58	1638	-	RI, GC-MS

43	β-Eudesmol	0.32	-	1647	2240	RI, GC-MS
44	Isoamil geranato	-	1.34	1650	1707	RI, GC-MS
45	β-Bisabolol	2.02	2.62	1665	2189	RI, GC-MS
46	*epi*-α-Bisabolol	0.33	-	1688	2235	RI, GC-MS
47	β-Santalol (Z)	-	12.88	1703	2004	RI, GC-MS
48	β-Santalol acetato (Z)	-	1.54	1823	2378	RI, GC-MS
Total		92.75	91.04			

* Composição percentual considerando-se o mesmo fator de respostapara todos os componentes.

A composição enantiomérica dos monoterpenos quirais de ambos os óleos (Tabela 17 e Figuras 48 e 49), foi determinada através da análise em CG, utilizando um sistema dual de colunas,[43] usando como fases estacionarias quirais duas ciclodextrinas modificadas (2,6-Me-3-Pe-β-CD e 6-Me-2,3-Pe-β-CD). Dos monoterpenos quirais, foram identificados na amostra A: (+)-α-pineno(5,08%) e (+)-β-pineno (11,06%); na amostra B: (+)-β-pineno (12,98%) e (-) sabineno (12,62%).

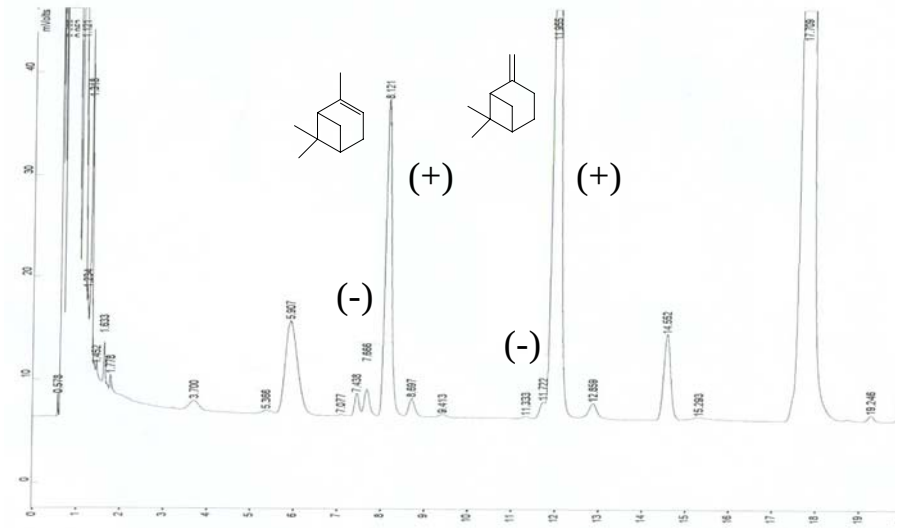


Figura 48. Separação enantiomérica do (+/-)-α-pineno e (+/-)-β-pineno no óleo de *A. sellowii* da amostra A. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

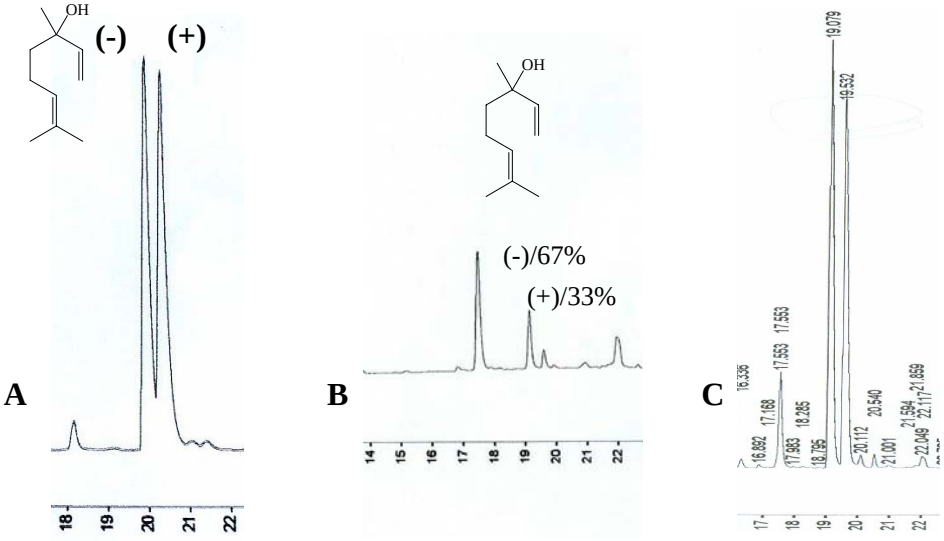


Figura 49. Determinação da composição enantiomérica do linalol no óleo de *A. sellowii* da amostra A utilizando-se a fase quiral 2,6-Me-3-Pe-β-CD, onde **A:** separação enantiomerica do padrões racêmicos de (+/-)-linalol; **B:** cromatograma do óleo volátil; **C:** separação enantiomerica da co-injeção do óleo com os padrões de (+/-)-linalol. (-)-linalol. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

Tabela 17. Distribuição enantiomérica dos monoterpenos do óleo essencial de *A. sellowii.*

Composto	Amostra A (%)[a]		Amostra B (%)[a]	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Tujeno	100	-	100	-
α-Pineno	92	08	98	02
β-Pineno	98	02	89	11
Sabineno	-	-	-	100
Limoneno	89	11	93	07
Linalol	33	67	11	89
Terpinen-4-ol	78	22	92	08

a : co-injeção com padrões autênticos

Os dois óleos essenciais foram analisados quanto a suas atividades biológicas usando o teste de letalidade de artemia salina.[105] As amostras A e B demonstraram alta toxicidade (LC= 2,85μg/ml). Os testes de atividade antimicrobiana das amostras A e B

foram determinados pelo método de microdiluição,[106-107] a fim de determinar a concentração inibitória mínima(CIM) e a mínima concentração fungicida ou bactericida (MCF ou MCB). A Tabela 17 mostra que ambas amostras apresentaram uma boa atividade antifúngica, principalmente contra *S. cerevisiae.* A Tabela 18 mostra que a amostra A foi mais ativa contra as bactérias *S. epidermidis* e *K. peneumoniae*, o que pode ser atribuído ao alto teor do monoterpeno 1,8-cineol,[108] onde foi relatada a atividade deste monoterpenóide a estas bactérias. O óleo da amostra B foi mais ativo contra *E. coli* e *M. luteos*, o que pode ser devido ao alto conteúdo de β-santalol na amostra B.

Tabela 18. Atividade antibacteriana dos óleos de *A. sellowii* em mg/mL CIM(concentração inibitória mínima) e CLM (concentração letal mínima).

microorganismos	Amostra A		Amostra B		cloranfenicol	nistatina
	CIM	CML	CIM	CML	CIM	CML
S. aureus ATCC 6538p	6.7	16	16	16	$2.50x10^{-2}$	-
S. epidermidis ATCC 12228	1.7	1.7	1.7	3.4	$6.25x10^{-3}$	-
M. luteus ATCC 9341	16	16	6.7	6.7	$6.25x10^{-3}$	-
K. pneumoniae ATCC 10031	6.7	6.7	6.7	>20	$1.25x10^{-2}$	-
E. coli ATCC 11103	8.0	>20	6.7	16	$1.25x10^{-2}$	-
S. setubal ATCC 19196	6.7	16	16	16	$1.25x10^{-3}$	-
C. albicans ATCC 10231	16	>20	16	16	-	$8.12x10^{-3}$
S. cerevisiae ATCC 2601	*4*	8	2	4	-	$4.06x10^{-3}$

3.1.4.2 Degradação dos óleos.

Um dos problemas observados durante as extrações de voláteis de plantas, e no armazenamento destes voláteis, é a possibilidade de degradação de muitos componentes das misturas. Esta possibilidade de degradação foi comprovada durante o armazenamento das amostras A e B aqui estudadas. Observou-se que em um período de 30 dias de armazenamento, houve um aumento dos sesquiterpenos espatulenol, óxido de cariofileno e

guaiol na amostra A (Figura 50), enquanto na amostra B (Figura 51) observou-se um aumento dos sesquiterpenos espatulenol e óxido de cariofileno. Portanto o que se observa é uma conversão quase que total dos constituintes monoterpênicos e sesquiterpênicos. Estes componentes majoritários após degradação, foram identificados através de seus espectros de massas e índices de Kovat's (Figuras 52 e 53).

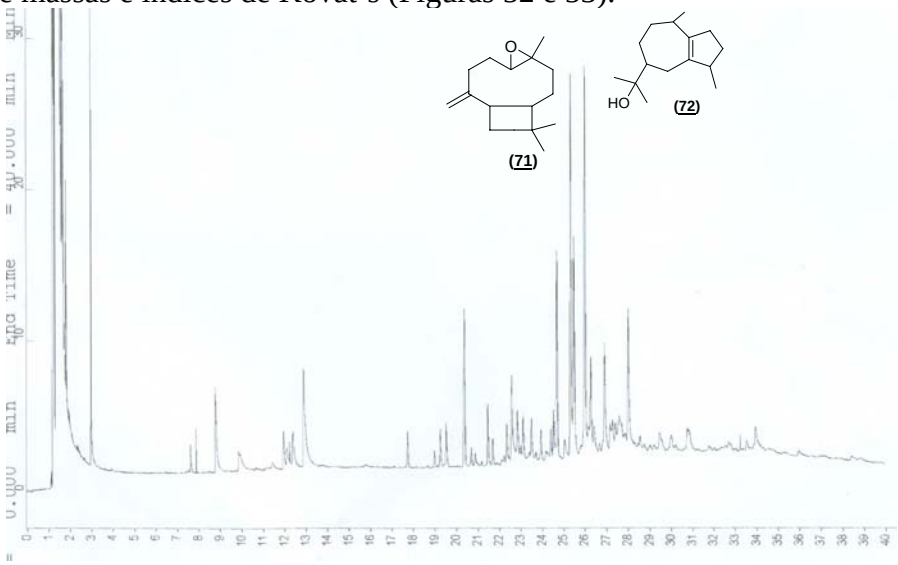


Figura 50. Cromatograma CG-FID do óleo volátil da amostra A de *A. sellowii* após 30 dias de armazenamento. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

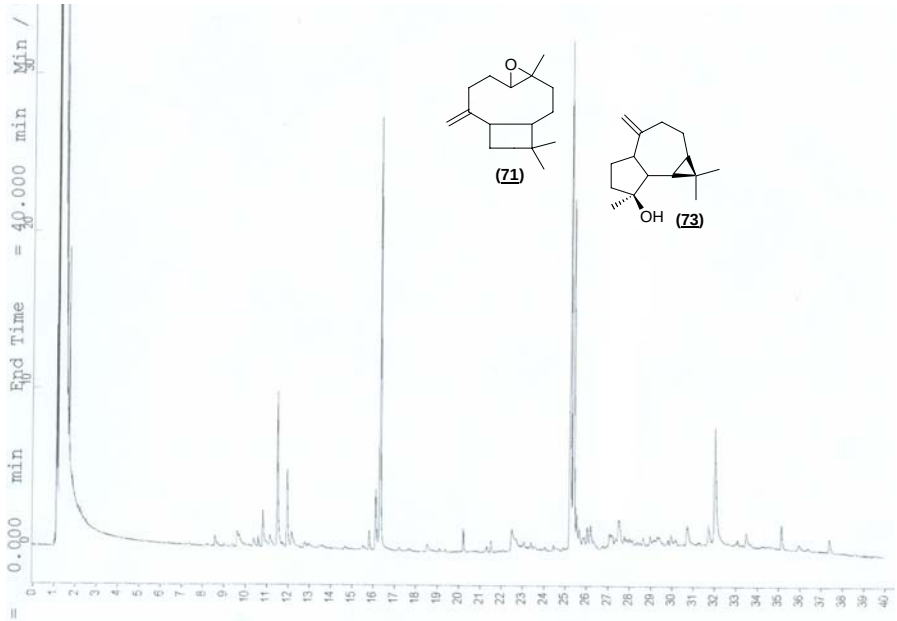


Figura 51. Cromatograma CG-FID do óleo volátil da amostra B de *A. sellowii* após 30 dias de armazenamento. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

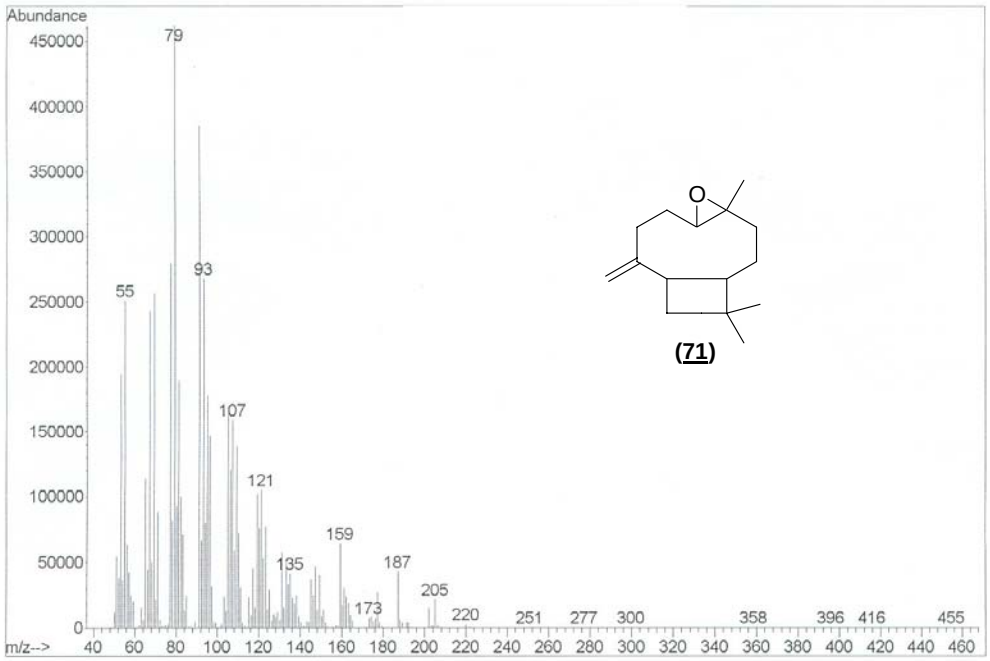


Figura 52. Espectro de massas do óxido de cariofileno encontrado no óleo degradado das duas amostras de A. sellowii.

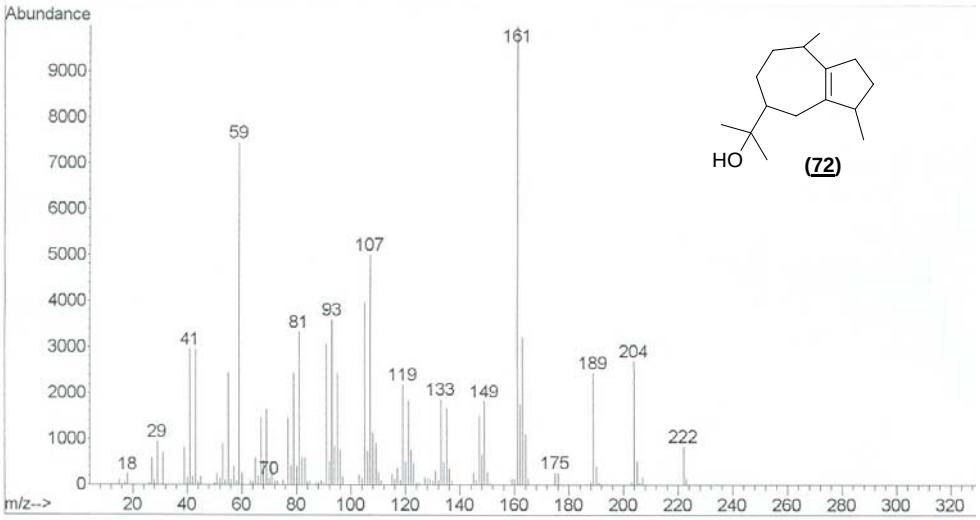


Figura 53. Espectro de massas do guaiol encontrado no óleo degradado das duas amostras de A. sellowii.

4.3

3.1.5. AEOLLANTHUS SUAVEOLENS

Lamiaceae é uma das famílias de plantas mais diversa e difundida em termos de etnomedicina, sendo que o valor medicinal de espécies desta familia se deve aos seus constituintes voláteis.[109] A respeito de seus efeitos no sistema nervoso central, estudos evidenciaram a atividade anticonvulsivante de três gêneros: *Aeollanthus, Leonorus e Salvia*, encontrados na flora do Rio Grande do Sul. Esta parte do trabalho discute a composição volátil da espécie *Aeollanthus suaveolens,* coletada no Rio Grande do Sul, na forma nativa e cultivada.

A espécie nativa de *Aeollanthus suaveolens* foi coletada em São Vicente do Sul, pela Prof. Emilia C.M. Dessoy, e identificada Prof. Adelino Alvarez Filho. As sementes obtidas das plantas nativas desta espécie, em setembro de 2002, foram utilizadas para experimentos de cultivo no departamento de fitotecnia da UFSM.

Esta espécie teve seu óleo essencial monitorado durante o período de 2002-2004, quando foram realizadas diversas extrações, nos meses de agosto a outubro, período este em que a planta se desenvolve.

3.1.5.1. Óleo volátil de *Aeollanthus suaveolens*.

Os óleos voláteis das amostras de espécies nativas e cutivadas de *Aeollanthus suaveolens*, flores e folhas, foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, obtendo-se bons rendimentos, conforme pode ser observado na Tabela 19. Pode-se observar praticamente que não houveram diferenças qualitativas entre plantas nativas e cultivadas.

Tabela 19. Rendimento médio dos óleos voláteis de *Aeollanthus suaveolens.*

Obtenção do óleo	Rendimento %
Aeollanthus suaveolens-flores nativas	0,4-0,5
Aeollanthus suaveolens-folhas nativas	0,6-0,8
Aeollanthus suaveolens-flores cultivadas	0,35-0,5
Aeollanthus suaveolens-folhas cultivadas	0,6-0,8

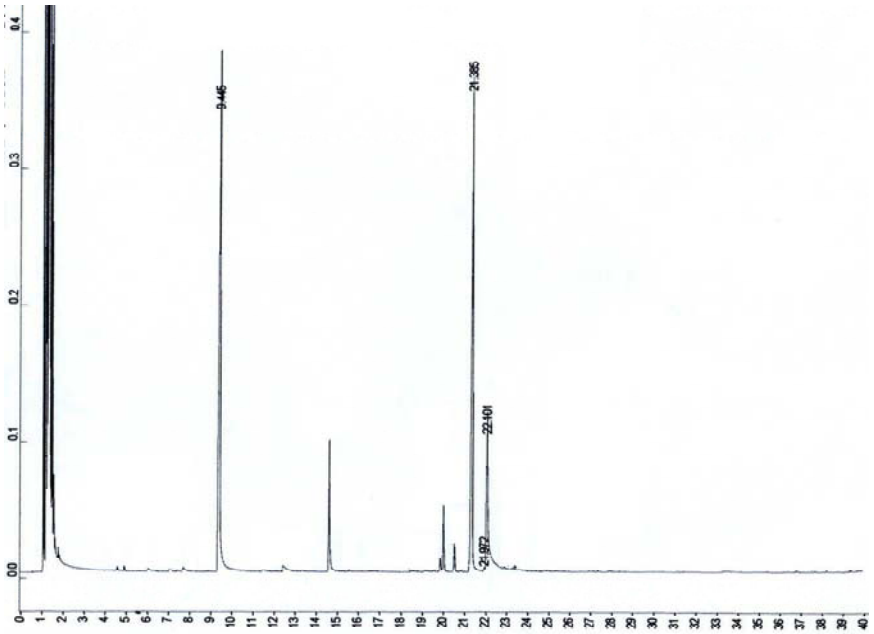


Figura 54. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das folhas nativas de *Aeollanthus suaveolens.*

3.1.5.2. Isolamento e caracterização dos componentes majoritários do óleo de *Aeollanthus suaveolens.*

Com a finalidade de se isolar os constituintes principais do óleo das folhas da espécie nativa de *Aeollanthus suaveolens,* o óleo obtido foi submetido a um fracionamento através de CCD. Desta maneira, foram isolados três componentes do óleo, que foram identificados através de RMN, EM e co-injeção com padrões, como sendo o monoterpeno linalol, o sesquiterpeno β-farneseno e uma lactona terpenica, conhecida como massoilactona.

O sesquiterpeno β-farneseno, que representa mais de 20% dos óleos voláteis de *A. suaveolens* apresenta um índice de Kovat's 1458. Para isolamento deste componente através de CCD preparativa, utilizou-se como sistema eluente hexano/acetato de etila 90:10. Após eluição da amostra na fase estacionária, a placa foi submetida a um "spray" com o reagente de Godin,[110] apenas nas laterais da placa, que após aquecimento, revelou uma coloração azulada, característico de terpenos. A faixa selecionada foi retirada, e o

composto extraído com Hexano. Desta forma foi possível o isolamento do sesquiterpeno que após foi analisado por RMN (Figuras 55 e 56).

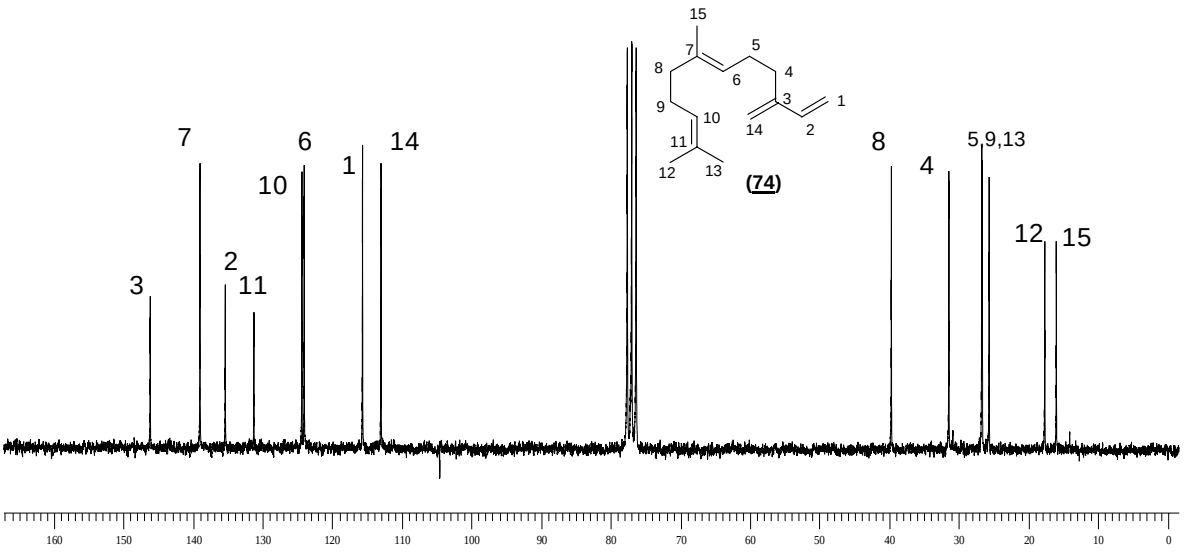


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em $CDCl_3$ do sesquiterpeno β-farneseno isolado do óleo volátil de *Aeolanthus suaveolens.*

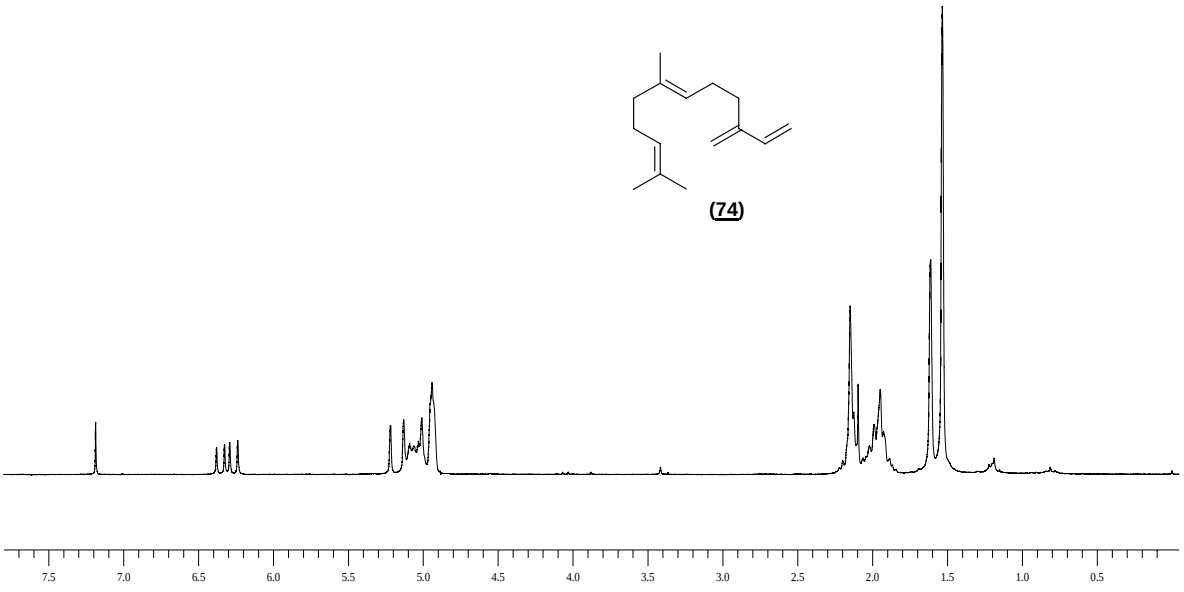
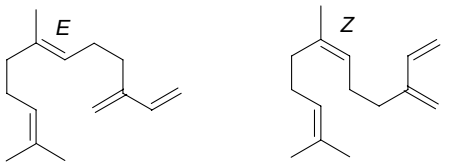


Figura 56. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz, em $CDCl_3$ do sesquiterpeno isolado do óleo volátil de *Aeolanthus suaveolens.*

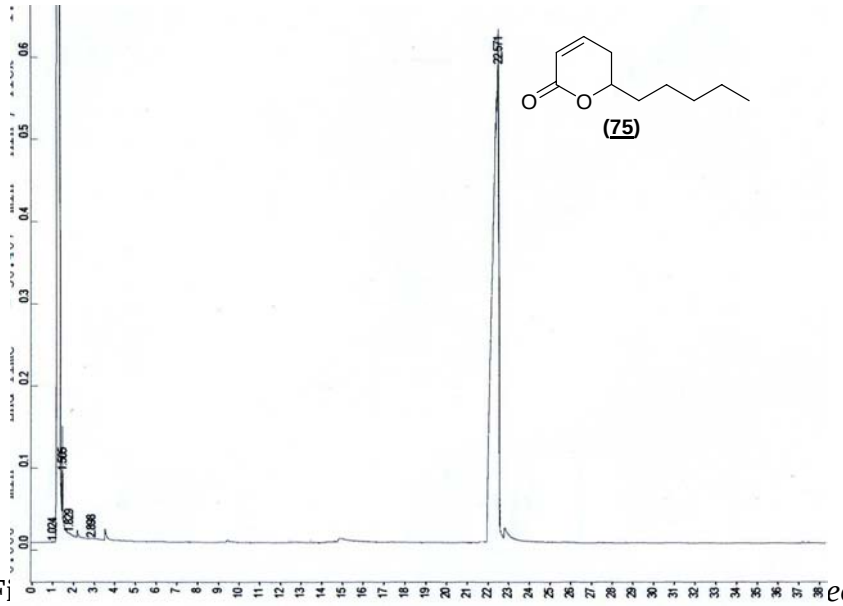
O espectro de RMN de ^{13}C foi útil para identificar a estrutura como um sesquiterpeno (15C), com vários carbonos olefinicos, enquanto o espectro de RMN de ^{1}H foi útil para confirmar o número de hidrogênios olefinicos e o número de metilas na estrutura. O índice de Kovat's desta substância (1458) corresponde exatamente ao sesquiterpeno β-farneseno em sua forma trans, já que a literatura cita seu estereoisomero cis com índice de Kovat's 1443. As análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C corroboram com esta estrutura.



(*E*)-β-farneseno
IK=1458

(Z)-β-farneseno
IK=1443

Uma outra fração da placa preparativa apresentou uma coloração alaranjada quando submetida ao reagente de Dragendorff. Normalmente este reagente é utilizado para revelar alcalóides, mas lactonas também formam complexos alaranjados com este reagente, muitas vezes dando resultados falso positivos para alcalóides. A substância foi isolada (Figura 57) e identificada, através de RMN de^{1}H e ^{13}C (Figuras 58 e 59), como sendo a lactona conhecida como massoilactona.[111]



(**75**)

Fi*eolens.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

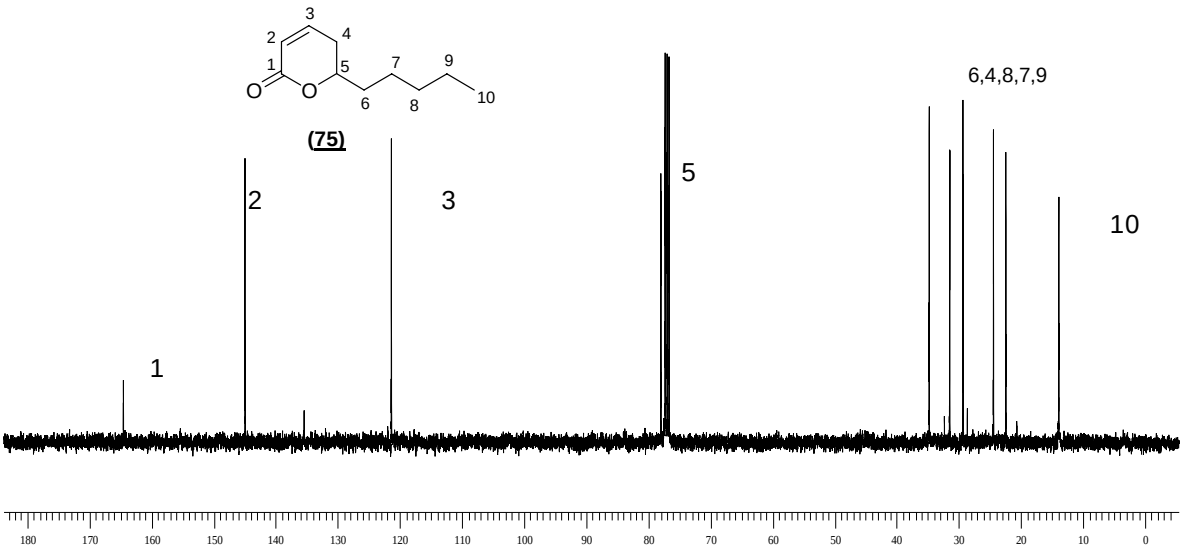
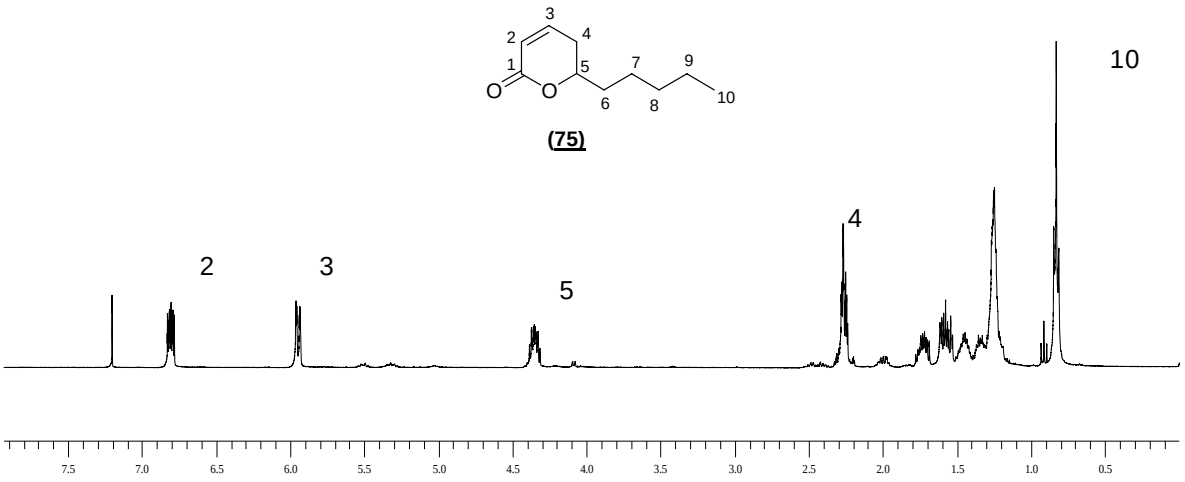
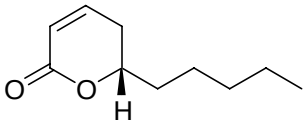


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C, a 100 MHz em $CDCl_3$, da lactona isolada do óleo volátil de *Aeolanthus suaveolens.*



Espectro 59. Espectro de RMN de ^{1}H, a 400 MHz em $CDCl_3$, da lactona isolada do óleo volátil de *Aeolanthus suaveolens.*

A análise polarimétrica deste componente, revelou um $[\alpha]^{20}_{D}$= -182^{o} , concordando com a literatura, que cita esta lactona como natural na forma (-), sendo a forma (+) obtida somente a partir de síntese.[112]



(-) -massoilactona **(75)**

O monoterpeno linalol foi isolado puro através do mesmo método anterior e foi identificado através de seu índice de Kovat's e através de co-injeção com uma amostra autêntica. Com o objetivo de identificar a configuração absoluta deste componente quiral, o mesmo foi analisado em CG enantioseletiva utilizando-se como fase estacionaria quiral 6-Me-2,3-Pe-β-CD. Esta análise revelou uma mistura de enantiômeros enriquecida da forma **S** (65%). Devido a relatos na literatura que o linalol pode racemizar durante o processo de extração, decidiu-se realizar uma extração do óleo com um solvente orgânico. Para isso, folhas de *Aeollanthus suaveolens* foram extraídas com hexano a frio. O extrato hexanico foi analizado em CG-enantioseletiva, revelando a mesma composição enantiomérica de linalol, comprovando que os dois enantiômeros são naturais.

Através da extracão por hidrodestilação do óleo essencial de *Ocimun basilicum*, planta conhecida por conter altos teores de linalol, obteve-se um óleo essencial contendo apenas o enantiomero (-)-(S)-linalol. Desta forma, comprovou-se que a mistura de enantiomeros do linalol, no óleo volatil de *A. suaveolens*, não se deve ao processo de hidrodestilação (Figuras 60-62). As Tabelas 20 e 21 mostram pequenas variações na distribuição enantiomérica do linalol, conforme a origem do óleo essencial (plantas nativas e cultivadas).

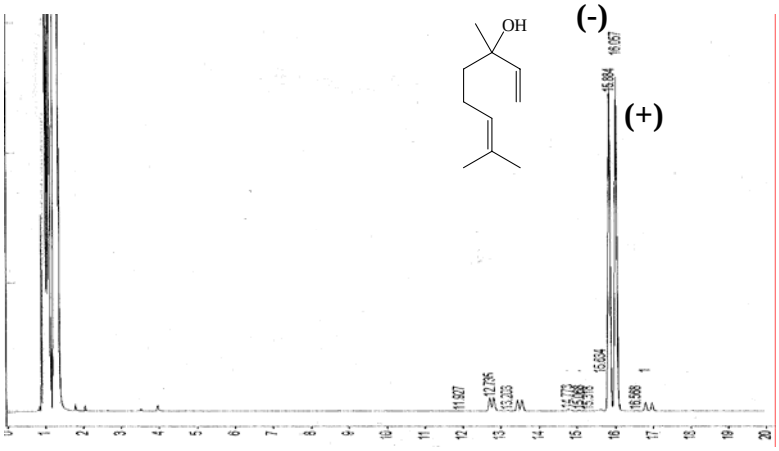


Figura 60. Separação enantiomérica dos padrões (+/-)-linalol. Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

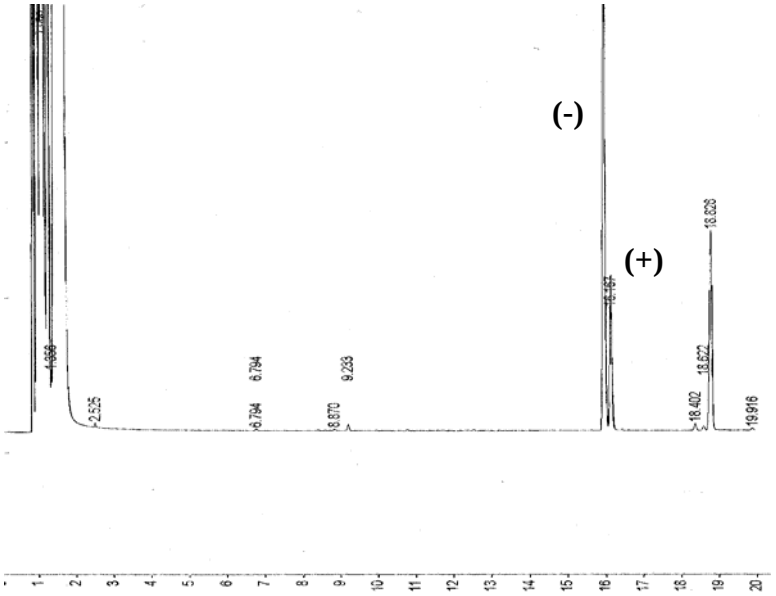


Figura 61. Separação enantiomérica do linalol no óleo volátil de *A.suaveolens.* Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

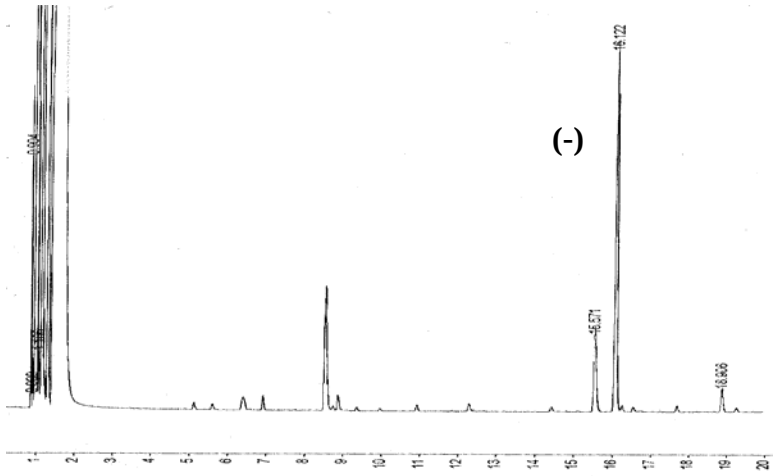


Figura 62. Separação enantiomérica do linalol no óleo volátil de *Ocimun basilicum.* Condições: 6-Me-2,3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

Após estas analises foi possível atribuir a composição dos óleos voláteis de *Aeollanthus suaveolens* obtidos das espécies nativas e cultivadas, conforme as Tabelas 20 e 21.

Tabela 20. Composição média dos óleos voláteis de *Aeolanthus suaveolens* obtido de plantas nativas.

	Compostos	% folhas	% flores	IK	Método de identificação
01	(-)-linalol	36,2	19,1	1098	CG-EM, co
	(+)-linalol	17	10	1098	CG-EM, co
02	(-)-Linalol acetato	6,07	4,98	1255	CG-EM
03	α-santaleno	1,04	1,69	1418	CG-EM
04	α-bergamoteno	0,7	0,82	1414	CG-EM
05	β-farneseno	21,8	36,48	1458	RMN, CG/EM
06	(-)-massoilactona	9,5	15,6	1476	RMN, CG/EM
	TOTAL	92,31	88,97		

.

Tabela 21. Composição média dos óleos voláteis de *Aeolanthus suaveolens* obtido de plantas cultivadas.

	Compostos	% folhas	% flores	IK	Método de identificação
01	(-)-linalol	22,5	21,6	1098	CG-EM, co
	(+)-linalol	12	14,3	1098	CG-EM, co
02	(-)-Linalol acetato	5,63	6,84	1255	CG-EM
03	α-santaleno	1,85	2,77	1418	CG-EM
04	α-bergamoteno	0,91	1,40	1414	CG-MS

05	β-farneseno	25,36	29,1	1458	RMN, CG/EM
06	(-)-massoilactona	25,88	16,93	1476	RMN, CG/EM
	TOTAL	93,65	92,7		

3.1.5.3. Atividade antibacteriana

Com a composição definida, o óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens*, assim como os componentes isolados, foram submetidos a testes antimicrobianos a fim de se determinar as propriedades inibitórias destes produtos contra fungos e bactérias. Os compostos isolados foram analisados por bioautografia e o óleo essencial teve sua atividade determinada pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM), resultados estes expostos nas Tabelas 22 e 23.

Os testes bioautográficos demonstraram uma excelente propriedade antibacteriana da lactona monoterpênica massoilactona, sendo ativa na mínima quantidade em que foi testada, para os microorganismos *S. setubal* e *B. subtilis.* Quando comparada com a atividade do óleo total, pode-se supor que esta lactona é o principal responsável pelo potencial antibacteriano do óleo. O β-farneseno, outro componente isolado, mostrou uma atividade bem inferior ao da lactona massoilactona. O linalol foi o composto menos ativo. A análise pelo método de CIM (concentração inibitória mínima) do óleo, mostrou que o óleo apresenta uma boa atividade contra a bactéria *Escherichia coli* e o fungo *Cryptococcus neoformans.*

Massoilactona é o componente principal do óleo volátil de *Cryptocarya massoia* (família Lauraceae), e das flores de *Polianthes tuberosa* (Amaryllidaceae). Cavill isolou massoilactona de duas espécies de formigas do gênero *Camponotus* coletadas no oeste da Austrália. O isolamento desta lactona a partir de secreções de insetos, resultou em estudos a fim de determinar sua ação fisiológica.[113] Massoilactona é um potente irritante da pele e causa paralisação dos batimentos cardíacos em anfíbios. Coelho de Souzal,[114] reportou a atividade anticonvulsivante de massoilactona em ratos, ressaltando seu uso como um novo agente anticovulsivante. Além da atividade anticonvulsivante, este estudo mostrou efeitos

dependentes de dose, onde se observou atividades hipnóticas e hipotérmicas desta lactona α-β-insaturada. Complementando estes estudos, descreve-se aqui a atividade antibacteriana desta lactona. Alem disso, observou-se que plantas cultivadas, produzem um aumento no teor desta lactona, com percentuais de até 25%, comparado com apenas 9,5% e 15,6%, nos óleos oriundos de folhas e flores respectivamente, de plantas adaptadas.

Tabela 22. Determinação da quantidade inibitória mínima (μg) através de bioautografia, dos componentes isolados e do óleo das folhas de *Aeolanthus suaveolens.*

microorganismos	óleo essencial	farneseno	linalol	massoilactona	Padrão
S. aureus	50	50	100	6,25	0,7
S. epidermidis	-	-	-	6,25	0,7
E.coli	50	-	-	6,25	0,4
S. setubal	50	50	-	3,125	0,6
P. aeruginosa	50	100	-	6,25	0,6
B. subtilis	25	12,5	-	3,125	0,6

Tabela 23. Atividade antibacteriana dos óleos de *Aeolanthus suaveolens* em mg/mL através do método de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima letal (CLM).

microorganismos	óleo essencial		Padrão
	CIM	CLM	CIM
Staphylococcus aureus	10	>20	$6,25x\ 10^{-3}$
Staphylococcus epidermidis	10	>20	$3,12x10^{-3}$
Escherichia coli	1,25	5	$1,67x10^{-3}$

P. aeruginosa	5	>20	$3,12x10^{-3}$
Klebsiella pneumoniae	10	>20	$6,25x\ 10^{-3}$
B. subtilis	10	>20	$3,12x10^{-3}$
Salmonella setubal	10	>20	$1,67x10^{-3}$
Candida albicans 591 L	2,5	5	$3,12x10^{-3}$
Cryptococcus neoformans	1,25	2,5	$4,06x10^{-3}$
Sacaromiceae cereviseae	2,5	5	$8,12x10^{-3}$
Cândida dublinensis	2,5	10	$8,12x10^{-3}$
Cândida albicans	5	10	$8,12x10^{-3}$

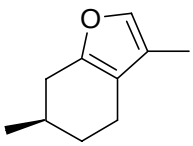
3.1.6 CUNILA MICROCEPHALA

O gênero *Cunila* pertencente a família Lamiaceae, compreende 22 espécies com dois centros de distribuição: México com 10 espécies e América do sul (sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) com 12 espécies.[115]

Cunila microcephala é nativa do sul do Brasil, Argentina, e Uruguai, sendo utilizada na forma de chás, onde são atribuídas propriedades estimulantes, antiespamódica, emenagoga, e eficiente no tratamento de infecções respiratórias.[116] Estudos etnobotânicos demonstraram que esta espécie é uma das plantas medicinais mais utilizadas pela população regional do Rio Grande do Sul. *Cunila microcephala* esta também incluída na farmacopéia brasileira e é popularmente conhecida como poejo.[117] Para estudar o óleo volátil de *Cunila microcephala*, foram coletadas amostras de folhas de espécies nativas e cultivadas, na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Para este estudo efetuamos análises no período entre 06/2003-06/2004, analisando-se os óleos obtidos por hidrodestilação. Os rendimentos variaram entre 0,7-1,2%.

3.1.6.1 **Óleo volátil de *Cunila microcephala.***

A analise do óleo através de CG e CG-EM demonstrou a presença de um componente em proporção de 88% (Figura 63). Reunindo as informações obtidas através dos índices de retenção de Kovat's e RMN de ^{1}H e ^{13}C (Figuras 64-66)**,** concluiu-se que este componente majoritário tratava-se do monoterpeno oxigenado mentofurano. A rotação ótica de α^{25}_{D}= +45, nos indicou que este composto corresponde ao isômero R. Os demais componentes foram determinados através de espectrometria de massas e de seus respectivos índices de Kovat's (Tabela 24).



(R)-(+)-mentofurano **(76)**

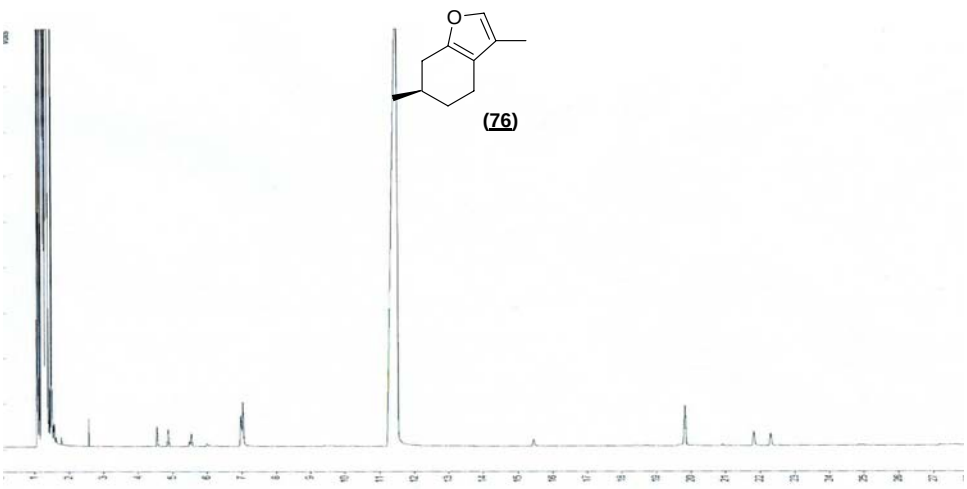


Figura 63. Cromatograma CG-FID do oléo volátil de *Cunila microcephala*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

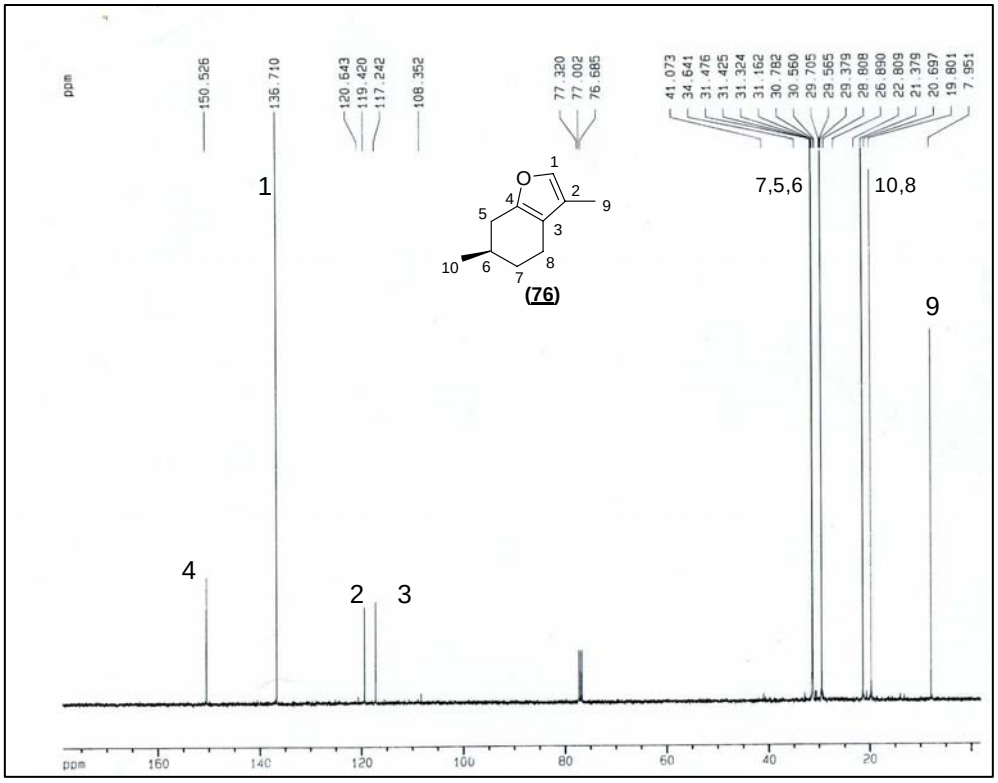


Figura 64. Espectro de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de *Cunila microcephalla.*

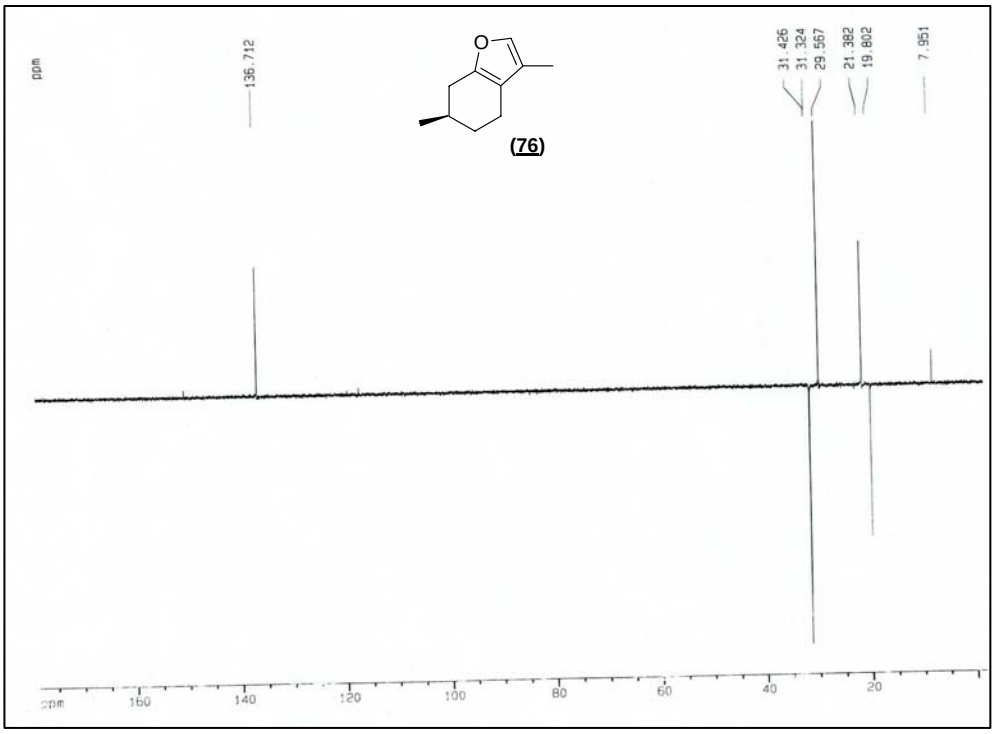


Figura 65. Espectro de ^{13}C DEPT-135 a 100 MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de *Cunila microcephalla.*

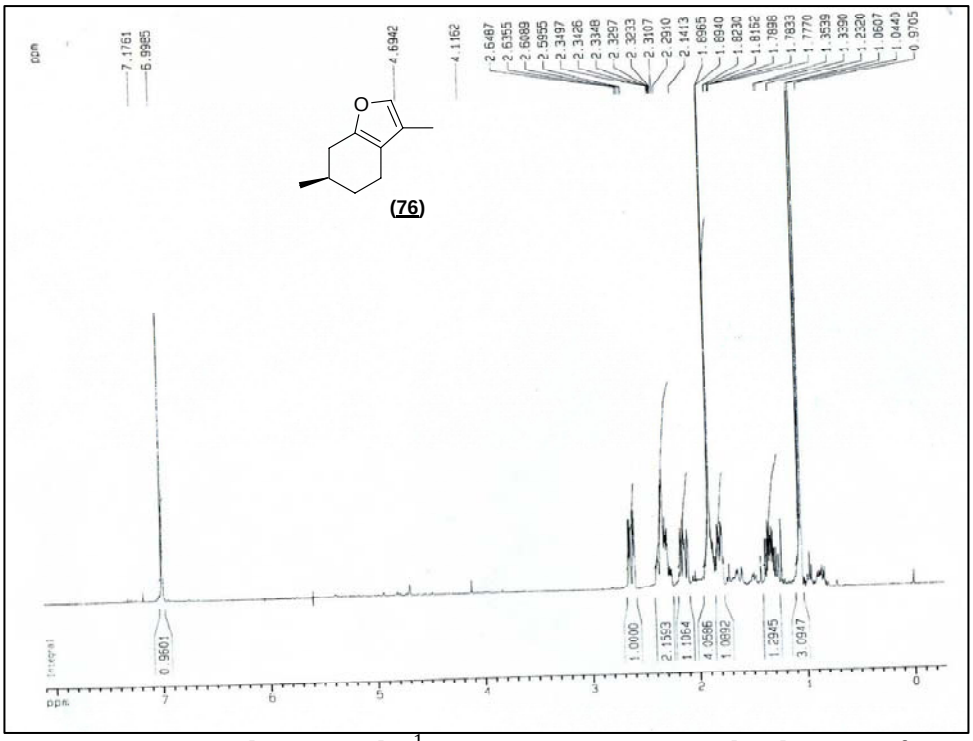


Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H a 400MHz em $CDCl_3$, do mentofurano do óleo de *Cunila microcephalla.*

Tabela 24. Composição do óleo volátil de *Cunila microcephalla.*

Compostos		%	IK[b]	Método de identificação
01	α-pineno	0,63	937	CG-EM, co
	canfeno	0,51	950	CG-EM, co
02	sabineno	0,18	974	CG-EM, co
03	β-pineno	0,51	982	CG-EM, co
04	1-p-menteno	1,62	1025	CG-EM
05	limoneno	2,22	1027	CG-EM, co
06	mentofurano	88,88	1160	RMN, CG/EM
97	ni	2,20	1414	-
08	ni	0,74	1476	-
09	mintlactona	0,63	1491	CG-EM
	TOTAL	98,12		

ni: não identificado

3.1.6.2. Degradação do observada no óleo volátil de *Cunila microcephalla.*

Após definição da composição química do óleo, e estocado sob refrigeração, observou-se uma mudança de coloração no óleo, após um período de aproximadamente 15 dias. Além de adquirir uma coloração esverdeada, observou-se a formação de cristais na parede do frasco. A suspeita de degradação se confirmou quando se analisou novamente o óleo em CG (Figura 67).

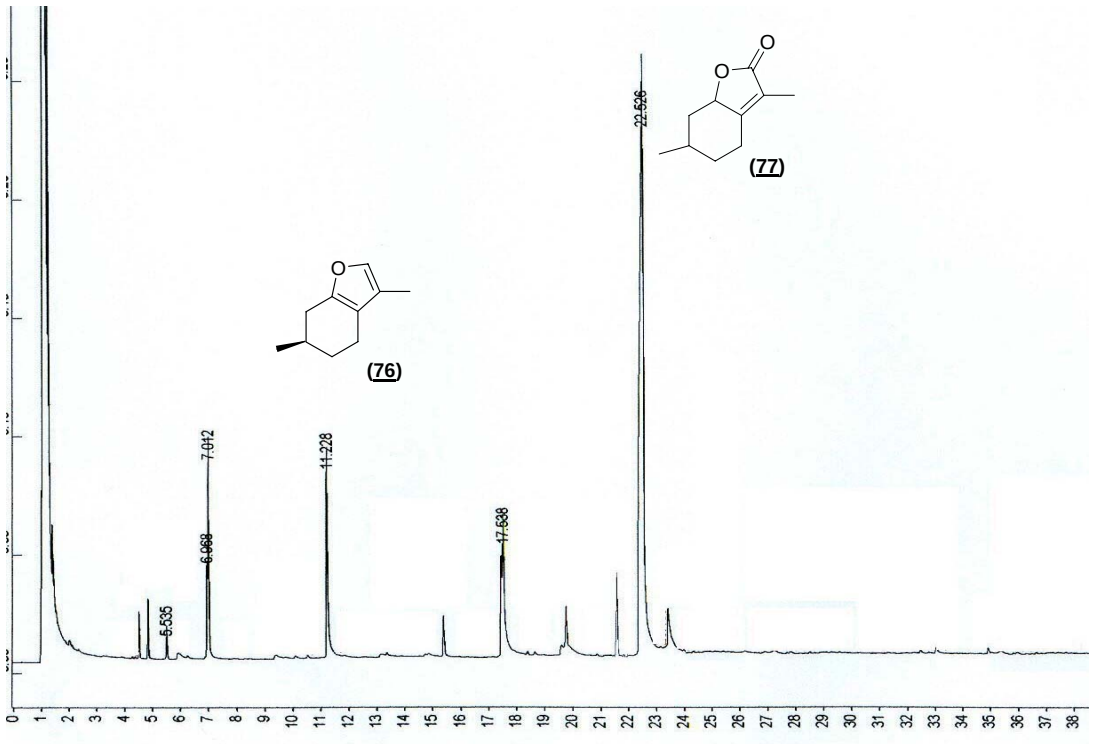


Figura 67. Cromatograma CG-FID do óleo volátil degradado de *Cunila microcephala.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

Observou-se que o conteúdo inicial de mentofurano havia diminuído, observando-se a presença de uma substancia com maior tempo de retenção, que predomina no óleo degradado. Este óleo decomposto, quando submetido a fracionamento qualitativo em CCD, mostrou que a nova substancia formada da decomposição do mentofurano reagia positivamente com o reagente de Dragendorff, sugerindo ser uma lactona. Com a finalidade de se determinar a estrutura desta lactona, o óleo foi submetido a um fracionamento em CCD preparativa, utilizando-se um sistema de solvente hexano:acetato de etila 85:15. Desta forma este componente foi isolado (Figura 68) e submetido aos procedimentos usuais de determinação estrutural. Após as análises dos espectros de ^{13}C e ^{1}H (Figuras 69-71) concluiu-se que o monoterpeno mentofurano se decompõe à lactona mintlactona.

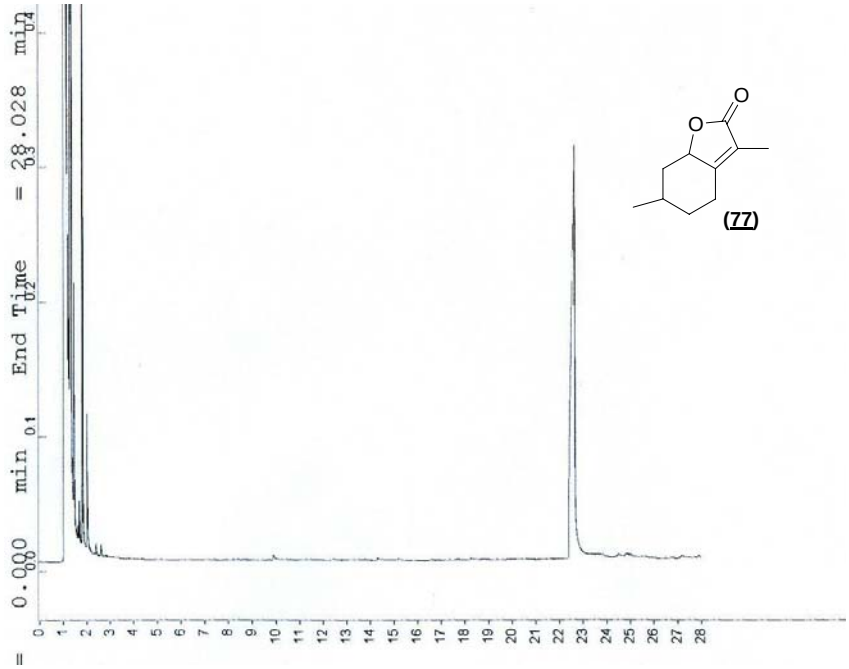


Figura 68. Cromatograma CG-FID da lactona isolada do óleo degradado de *Cunila microcephala.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

.

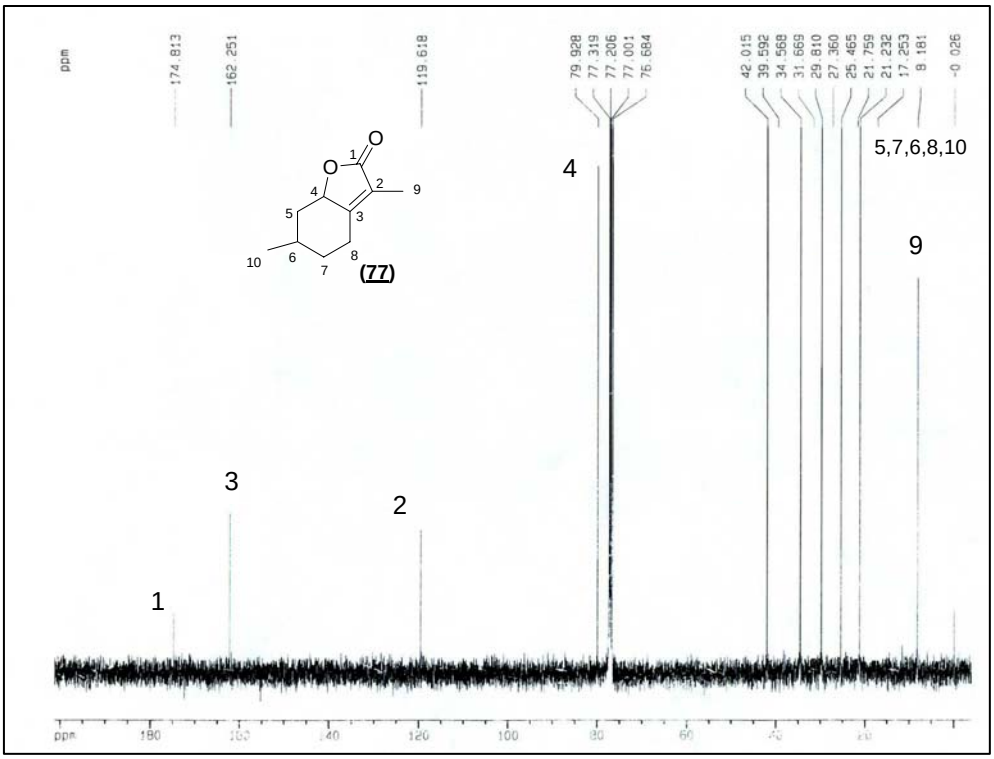


Figura 69. Espectro de ^{13}C a 100MHz em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de *Cunila microcephala.*

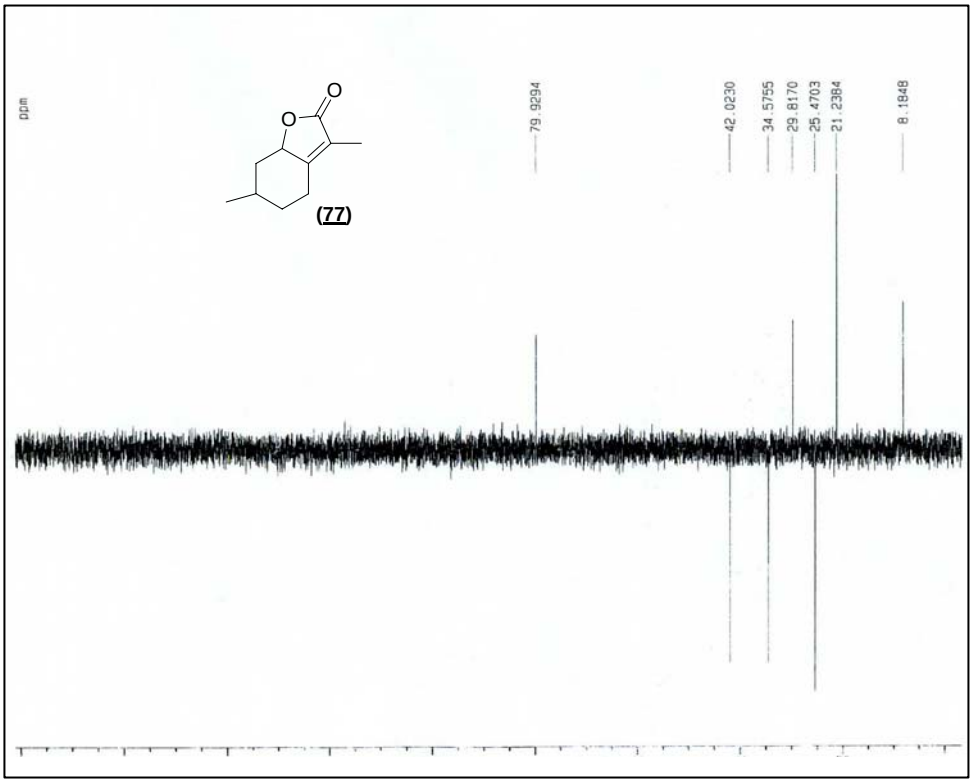


Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de *Cunila microcephala.*

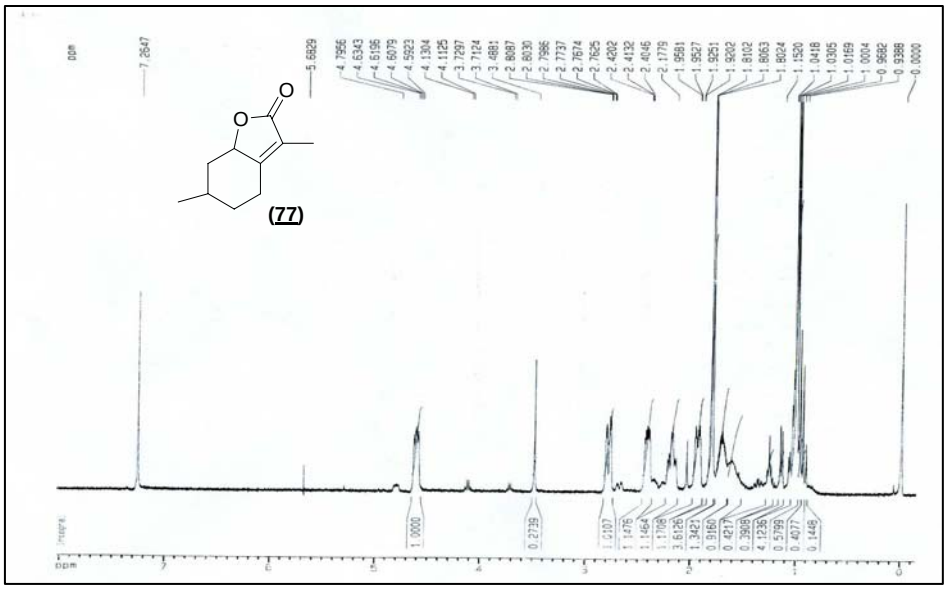


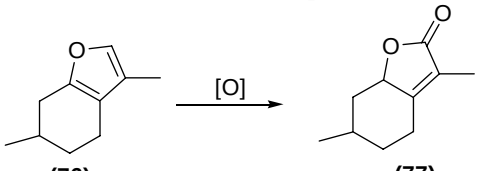
Figura 71. Espectro de ^{1}H a 400MHz em $CDCl_3$, da mintlactona isolada do óleo degradado de *Cunila microcephala.*

Tabela 25. Composição do óleo volátil de *Cunila microcephalla* após degradação.

Compostos		%	IK	Identificação
01	α-pineno	1,47	938	CG-EM, co
02	canfeno	1,66	951	CG-EM, co
03	sabineno	1,40	974	CG-EM, co
04	β-pineno	1,21	978	CG-EM, co
05	1-p-menteno	1,93	1023	CG-EM
06	limoneno	4,35	1028	CG-EM, co
07	mentofurano	5,69	1160	CG/EM
09	mentona	9,23	1150	CG/EM
08	pulegona	1,95	1235	CG/EM
10	ni	3,54	1424	-
11	mintlactona	53,0	1491	RMN, CG/EM
	TOTAL	85,43		

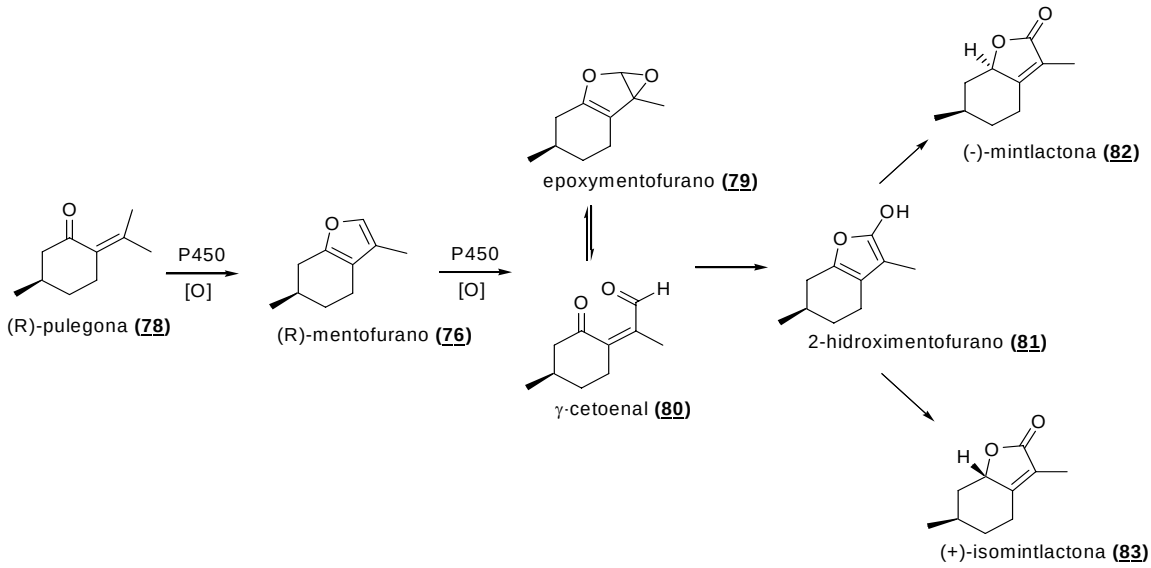
ni: não identificado

Com estas observações, decidiu-se analisar as condições em que ocorria esta degradação, uma vez que não existe relato na literatura da degradação do mentofurano em mintlactona, no óleo de *Cunila microcephala*. Para isto, submeteu-se o óleo, após obtenção por hidrodestilação, a diferentes condições de armazenamento. O óleo foi armazenado com e sem solvente sob refrigeração, e da mesma forma à temperatura ambiente. Observou-se que os óleos que estavam armazenados com solvente sofriam o processo de degradação mais lento, do que os que estavam armazenados puros. Porém quando os frascos eram abertos, rapidamente adquiriam a coloração esverdeada permanecendo desta forma. Com estes resultados, atribui-se que este processo de degradação se deve ao oxigênio presente no ar, devido ao mentofurano sofrer oxidações que o levam a mintlactona.



(76) **(77)**

O fato do mentofurano sofrer oxidações já é conhecido. Recentemente foi demonstrado o metabolismo do R-(+)-mentofurano no citocromo P-450 para formar o **(***R***)**-2-hidroximentofurano. Khojasteh-Bakht,[118] mostrou a tautomerização pela ação das glutation S-tranferase (GST) do **(***R***)**-2-hidroximentofurano para formar as lactonas não tóxicas mintlactona e isomintalactona (Esquema 13). As enzimas glutation S-tranferase (GST) são descritas pela literatura como responsáveis pela catálise de diversas isomerizações.[119]



Esquema 13. Metabolismo da (R)-pulegona, incluindo as estruturas do 2-hidroximentofurano, (+)-isomintlactona e (-)-mintlactona.

A ocorrência do mentofurano em altas concentrações no óleo de *Cunila microcephalla,* torna necessária a investigação de suas propriedades toxicológicas devido ao grande consumo das espécies de poejo. Mentofurano é considerado uma hepatotoxina, que quando ativado metabolicamente, reage com intermediários, sendo capaz de ligar-se covalentemente a proteínas celulares. Atualmente é também considerado o precursor de espécies elétrofilicas como a pulegona, substância responsável pela toxicidade do óleo de poejo.[120-121]

3.1.6.3. Testes de atividade antibacteriana

Após o estudo da composição dos óleos voláteis degradados e não degradados de *Cunila microcephalla*, realizou-se ensaios de atividade antimicrobiana dos óleos. Para isso foram utilizados dois métodos: concentração inibitória mínima (CIM) e bioautografia. Os óleos foram testados através do teste de concentração inibitória mínima (CIM), enquanto as substâncias isoladas de forma pura, mentofurano e mintlacona, foram investigadas quanto a suas propriedades antimicrobianas através de bioautografia.

Tabela 26. Testes de atividade antimicrobiana dos óleos voláteis executados pelo método da microdiluição em caldo em mg/mL, CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CML (Concentração Mínima Letal).

microorganismos	Óleo não degradado		Óleo degradado		padrão
	MIC	CML	MIC	CML	MIC
4.4 Staphylococcus aureus	10	>20	>20	-	$6{,}25 \times 10^{-3}$
Staphylococcus epidermidis	10	>20	20	>20	$3{,}12 \times 10^{-3}$
Escherichia. coli	10	>20	0,6	2,5	$1{,}67 \times 10^{-3}$
P. aeruginosa	10	>20	10	>20	$3{,}12 \times 10^{-3}$
Klebsiella pneumoniae	10	>20	10	>20	$6{,}25 \times 10^{-3}$
B. subtilis	10	>20	10	>20	$3{,}12 \times 10^{-3}$
Salmonella setubal	10	>20	>20	-	$1{,}67 \times 10^{-3}$
Candida albicans 591 L	-	-	5	5	$3{,}12 \times 10^{-3}$
Cryptococcus neoformans	-	-	1,25	2,5	$4{,}06 \times 10^{-3}$
Sacaromiceae cereviseae	5	>20	10	20	$8{,}12 \times 10^{-3}$
Cândida dublinensis	-	-	10	>20	$8{,}12 \times 10^{-3}$
Cândida albicans	5	>20	10	20	$8{,}12 \times 10^{-3}$

Os resultados demonstraram a alta concentração dos óleos necessária a inibição do crescimento microbiano (Tabela 26), mostrando não apresentarem fortes atividades antimicrobianas. O fenômeno de degradação do óleo altera a atividade, que pode ser observado pelos resultados de CIM. Das substâncias isoladas, analisadas por bioautografia (Tabela 27), a que demonstrou moderada atividade antibacteriana foi a lactona monoterpênica mintlactona, quando comparada ao mentofurano, que é inativo.

Tabela 27. Determinação da quantidade de substância ativa (μg), por bioautografia, do mentofurano e da mintlactona.

microorganismos	mentofurano	mintlactona.	Padrão
S. aureus	-	-	0,7
S. epidermidis	-	-	0,7
K.pneumoniae	-	-	0,4
E.coli	-	100	0,6
S. setubal	-	100	0,6
S. cerevisiae	-	-	0,6
C. albicans	-	100	0.5

-: Negativo

3.1.7. *ZANTHOXILUM HYEMALE*

Zanthoxylum hyemale, planta pertencente a familia Rutacea, é bastante comum no sul do Brasil, sendo conhecida vulgarmente como coentrilho. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com esta planta, revelaram a presença de alcalóides quinolínicos, compostos farmacologicamente ativos.[122] Na medicina popular esta planta é utilizada como agente antitérmico, antiespasmódico e tônico.[123]

Devido a estas características, aliada ao fato de não haver dados relacionados aos componentes voláteis desta espécie, realizou-se a análise dos óleos voláteis da espécie *Zanthoxylum hyemale,* coletada em Santana do Livramento no Rio Grande do Sul.

3.1.7.1. Obtenção do óleo volátil e análise

Foram analisados os óleos de folhas jovens e adultas além de flores e frutos desta espécie. Os rendimentos estão expostos na Tabela 28.

Tabela 28. Rendimento médio dos óleos voláteis de *Zanthoxylum hyemale.*

Obtenção do óleo	Rendimento
Flores	0,51
Frutos	0,15
Folhas jovens	0,23
Folhas adultas	0,35

Período de monitoramento do óleo: 2001-2004

Dados físicos dos óleos:

Frutos: d^{25}: 0,83g/ml η_d^{25}: $[\alpha]_D^{25}$: -14,9 (em Hexano, *c* =0,012)

Flores: d^{25}: 0,84g/ml η_d^{25}: $[\alpha]_D^{25}$: -11,6 (em Hexano, *c* =0,018)

Folhas jovens: d^{25}:0,90g/ml η_d^{25}: $[\alpha]_D^{25}$: -9,38 (em Hexano, *c* =0,016)

Folhas adultas: d^{25}: 0,80 g/ml η_d^{25}: $[\alpha]_D^{25}$: -19,3 em Hexano, *c* =0,013)

Os óleos voláteis de *Zanthoxylum hyemale* foram obtidos por hidrodestilação utilizando-se um aparelho de Clavenger modificado. A composição de cada óleo foi determinada através do cálculo do índice de retenção de Kovat's e comparação com os espectros de CG-EM, além de injeções com reforço de algumas substâncias padrões disponíveis em laboratório. Para isso, foi utilizado um equipamento VARIAN-3800 operando com uma coluna SE-54 (5 % fenil-polisiloxano), nas seguintes condições: 50-250°C com taxa de aquecimento de 4°C/min, injetor 220°C, detector 280°C e pressão de hidrogênio de 7 psi.

Estas análises revelaram uma grande variação na composição, entre os óleos obtidos das diferentes amostras (Figuras 72-75). Os óleos obtidos de folhas jovens mostraram um alto teor do sesquiterpeno nerolidol, entretanto as amostras de folhas adultas forneceram um alto conteúdo de sesquiterpeno desconhecido que foi denominado ZY-1, identificado através de métodos espectroscópicos como sendo um novo produto natural. A análise dos óleos de flores e frutos, também apresentaram diferenças bastante significativas. No óleo volátil das flores presenciamos um alto percentual do mesmo sesquiterpeno ZY-1, que predominava o óleo das folhas adultas. Já nos óleos obtidos dos frutos observamos uma grande presença de sesquiterpenos, mas sem uma presença acentuada de um deles, sendo o sesquiterpeno cadinol com 9,58% e o sesquiterpeno ZY-1 com 7%, os principais.

Interessante de se observar nos diferentes óleos, é o número pequeno de monoterpenos, sendo o α-pineno e β-pineno que somam 20,5, 35,06, 8,5 e 26,24 %, os principais representantes desta classe.

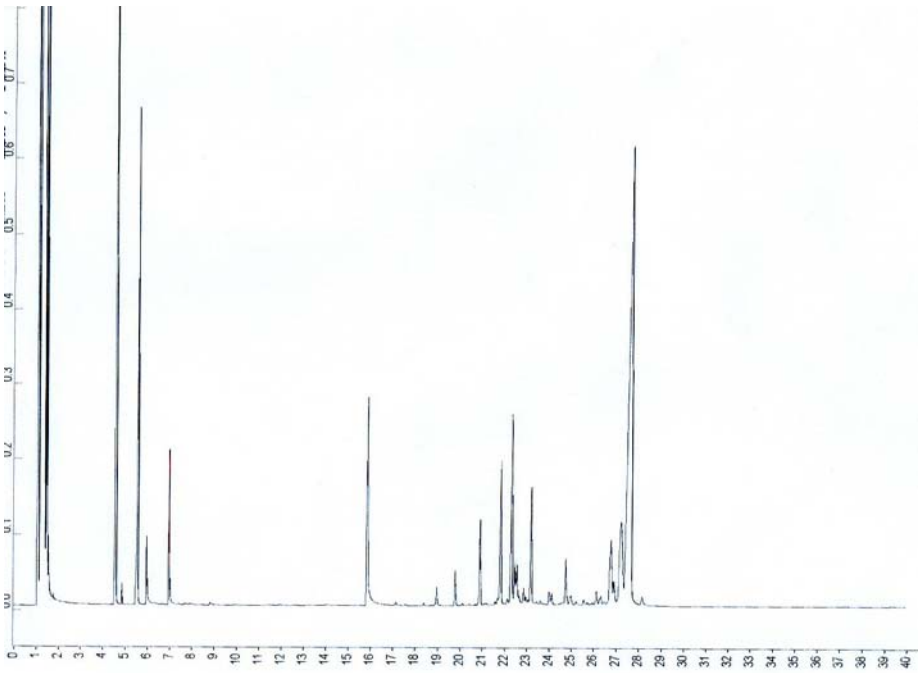


Figura 72. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das folhas adultas de *Z. hyemale*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

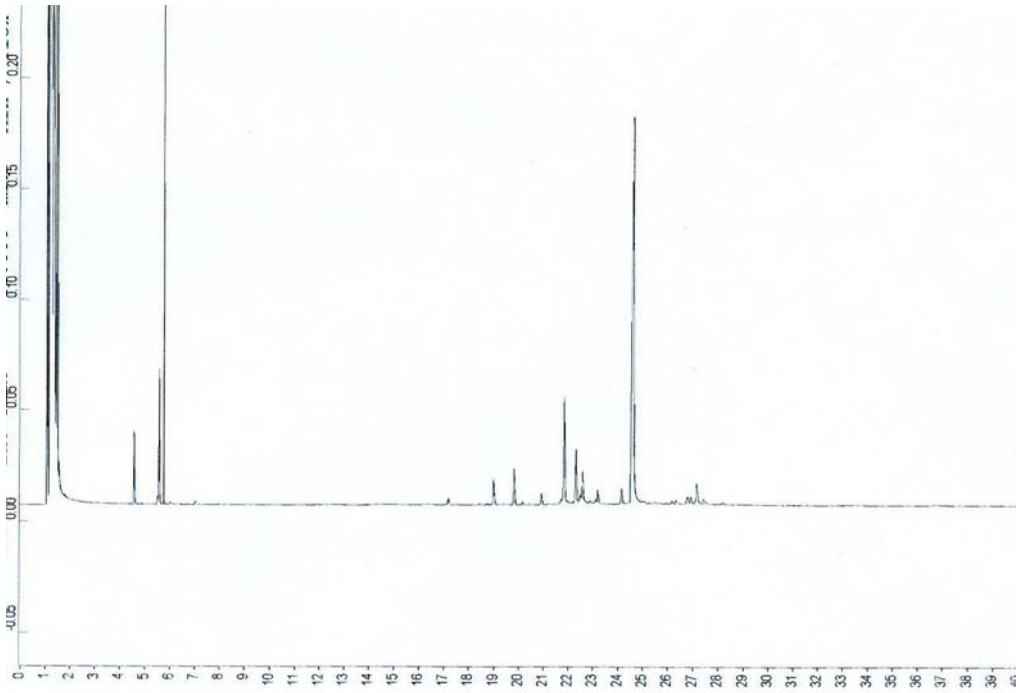


Figura 73. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das folhas jovens de *Z. hyemale*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

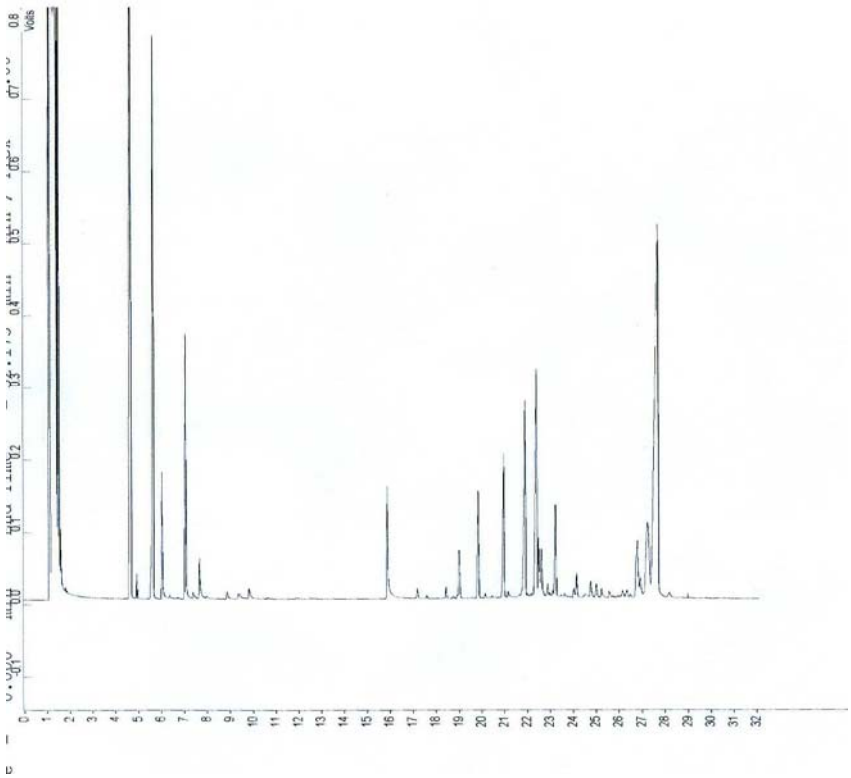


Figura 74. Cromatograma CG-FID do óleo volátil das flores de *Z. hyemale*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

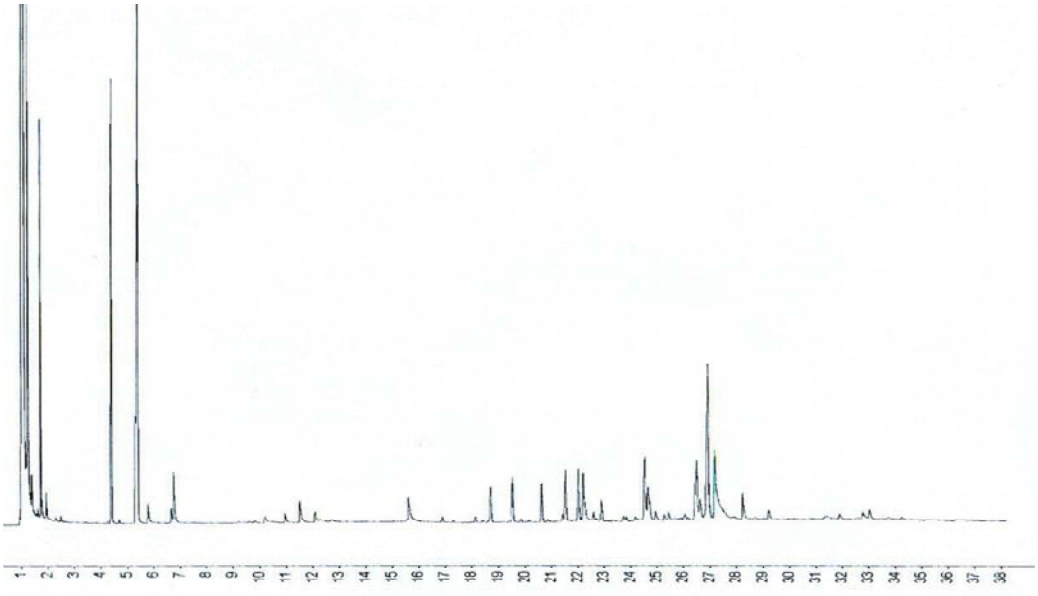


Figura 75. Cromatograma CG-FID do óleo volátil dos frutos de *Z. hyemale*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

3.1.7.2. **Análise dos constituintes quirais dos óleos obtidos: α-pineno, β-pineno, limoneno e nerolidol**

Os monoterpenos presentes nos óleos de *Zanthoxylum hyemale*, foram analisados por cromatografia gasosa enantioseletiva a fim de determinar suas composições enantioméricas. Esta análise foi realizada utilizando duas colunas capilares empacotadas com fases estacionárias quirais derivadas de ciclodextrinas sendo uma delas 3-Bu-2,6-Pe-γ-CD, conhecida comercialmente por Lipodex-E, e a 2,6-Me-3-Pe-β-CD. A utilização destas duas fases, se deve a seletividade que cada uma delas tem em relação aos hidrocarbonetos α-pineno, β-pineno e limoneno. Enquanto as análises de determinação da composição enantiomérica do β-pineno e α-pineno foram realizadas na fase 3-Bu-2,6-Pe-γ-CD, a mesma análise para o limoneno foi realizada na fase 2,6-Me-3-Pe-β-CD. Estas fases apresentam diferentes fatores de retenção para os hidrocarbonetos influenciando na resolução e na determinação da ordem de eluição dos enantiômeros.

Após estas análises chegou-se a um interessante resultado, o qual não era esperado. Observou-se uma mistura enantiomérica com excesso do enantiômero (–)–α-pineno (85%) no óleo das flores e um excesso de seu antipoda (+)–α-pineno (74%) no óleo dos frutos. Já na análise do hidrocarboneto β-pineno, foi observado elevados excessos enantioméricos do enantiomero (-)-β-pineno, acima de 97%. Estes dados podem ser observados na Tabela 29 e nas Figuras 76 e 77.

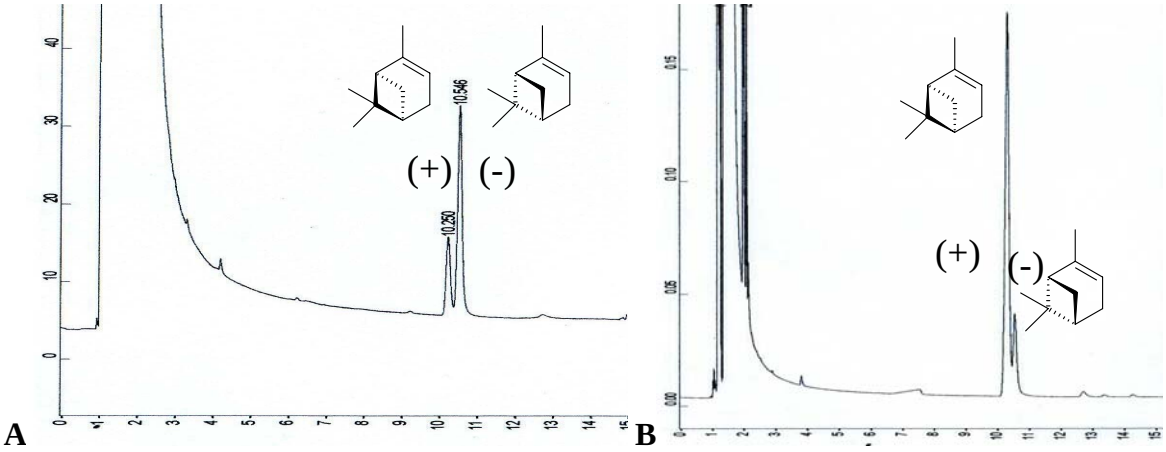
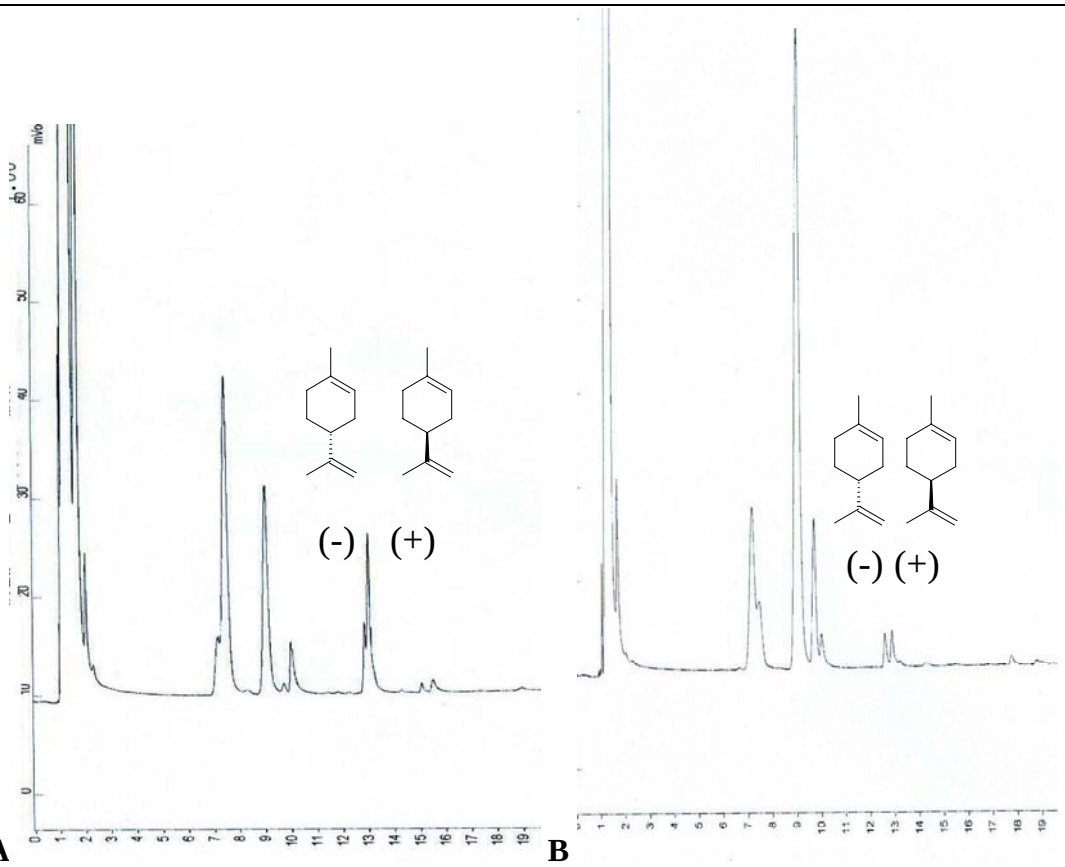


Figura 76. Separação enantiomérica do (+/-)-α-pineno no óleo da flor (**A**) e no óleo do fruto (**B**), na fase. Condições: 3-Bu-2,6-Pe-γ-CD, 40-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.



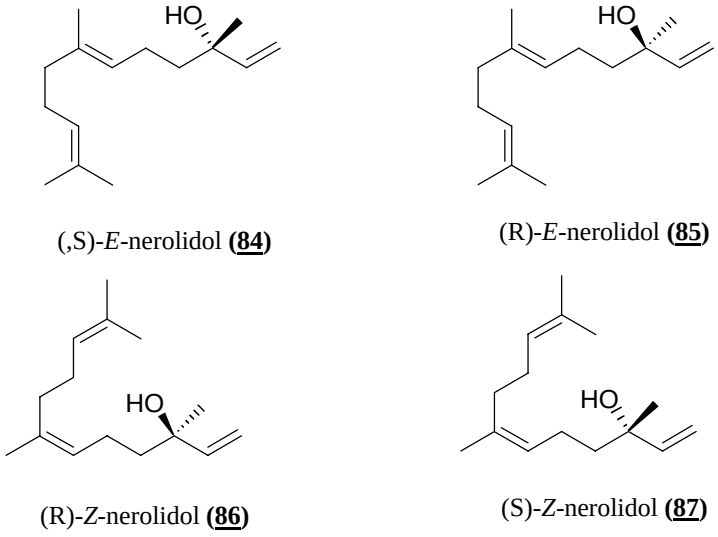
A **B**

Figura 77. Separação enantiomérica do (+/-)-limoneno no óleo da flor (**A**) e no óleo do fruto(**B**). Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

Tabela 29. Distribuição enantionérica (*ee*) dos monoterpenos nos óleos voláteis de *Zanthoxylum hyemale.*

composto	óleo da flor	óleo do fruto	óleo da folha adulta
(+)–α-pineno	15	74	29
(–)–α-pineno	85	26	71
(+)–β-pineno	2,5	0,6	2
(–)–β-pineno	97,5	99,4	98
(+)–limoneno	79,2	55	56
(–)–limoneno	20,8	45	44

O sesquiterpeno nerolidol que representava 51% da composição do óleo das folhas jovens de *Zanthoxylum hyemale*, foi isolado e identificado através de CG-EM e co-injeção com padrões autênticos de nerolidol. Com o intuito de determinar qual dos possíveis isômeros do nerolidol (Figura 78) é o componente do óleo, utilizou-se a CG-enantioseletiva a fim de determinar sua estereoquímica, com base nos dados da literatura.[124]



(,S)-*E*-nerolidol **(84)**

(R)-*E*-nerolidol **(85)**

(R)-*Z*-nerolidol **(86)**

(S)-*Z*-nerolidol **(87)**

Figura 78. Isômeros do nerolidol.

Para esta analise utilizou-se a fase 2,6-Me-3-Pe-β-CD. Desta forma, podemos atribuir a configuração absoluta do álcool sesquiterpenico como sendo (-)-(R)-*E*-nerolidol. Estes resultados foram concluídos pelas injeções de padrões de (+/-)-*E*/*Z*-nerolidol e co-injeções destes padrões com o álcool sesquiterpenico isolado do óleo. Conforme os cromatogramas das Figuras 79-81.

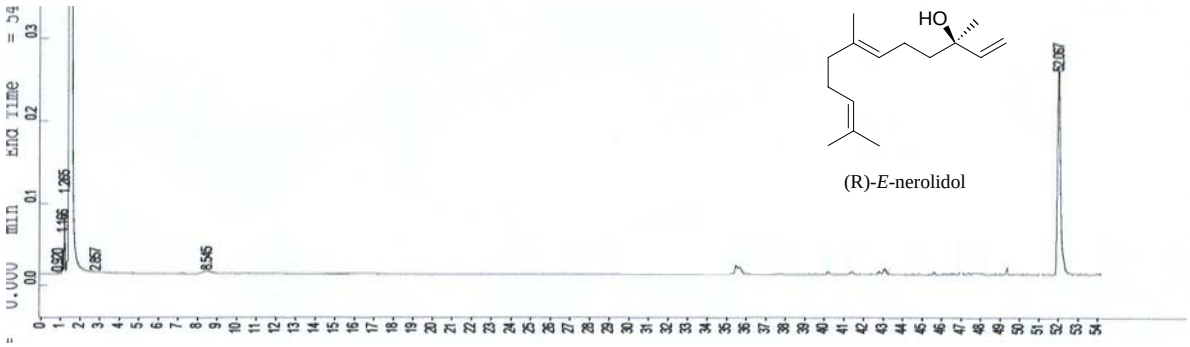


Figura 79. Cromatograma CG-FID do nerolidol isolado do óleo das folhas jovens de *Zanthoxylum hyemale*. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.

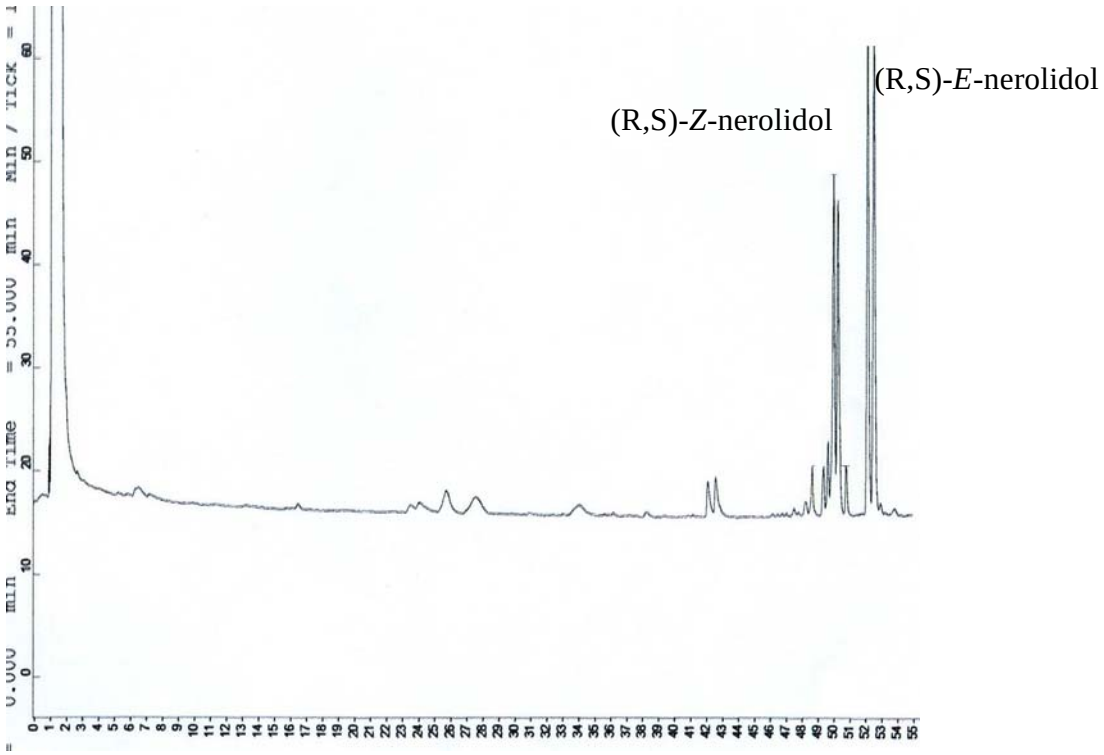


Figura 80. Separação enantiomérica dos padrões racêmicos de *Z/E*-nerolidol na fase 2,6-Me-3-Pe-β-CD. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.

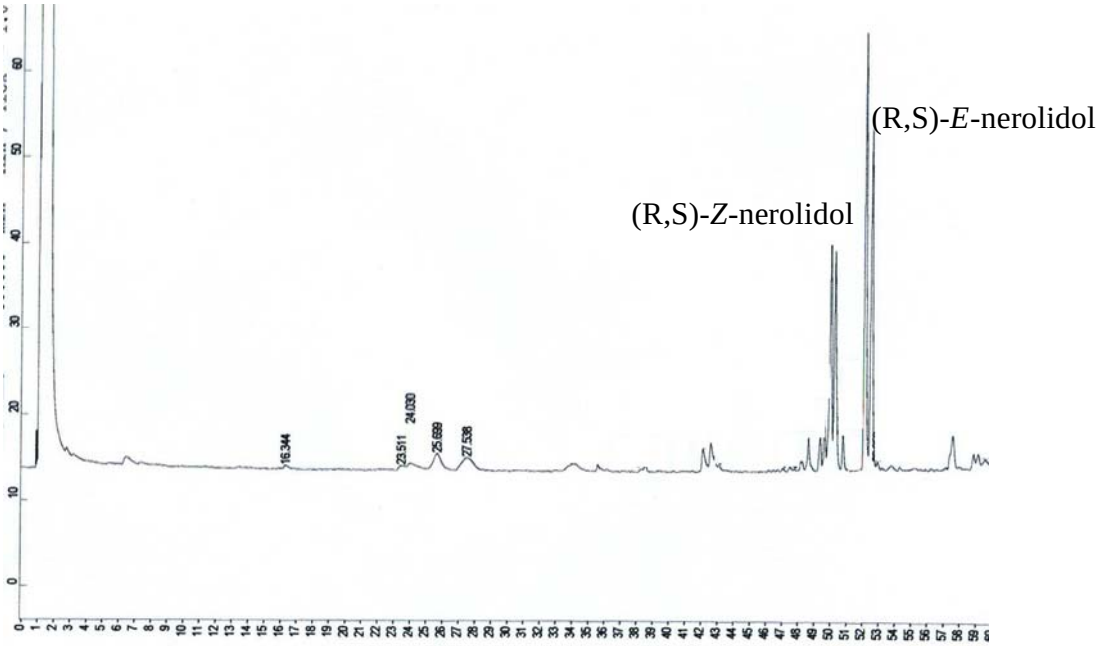


Figura 81. Separação enantiomérica da co-injeção dos padrões racêmicos de *Z/E*-nerolidol com o óleo volátil de *Zanthoxylum hyemale*. Condições: 2,6-Me-3-Pe-β-CD, 40-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.

3.1.7.3 Isolamento de ZY-1, nerolidol e cadinol.

O componente desconhecido codificado ZY-1, com índice de Kovat's 1664, foi isolado através de CCD preparativa, utilizando-se como sistema de solvente hexano/acetato 15%. Para isso foram utilizados os óleos de flores e folhas adultas. Para o isolamento aplicou-se 100mg do óleo na CCD preparativa, seguido de eluição, isolou-se este componente após revelação com o reagente de Godin, aplicado em uma das laterais da placa. Depois de retirada a faixa revelada foi extraída com clorofórmio, que após evaporação obteve-se um óleo incolor codificado como ZY-1 (Figura 82).

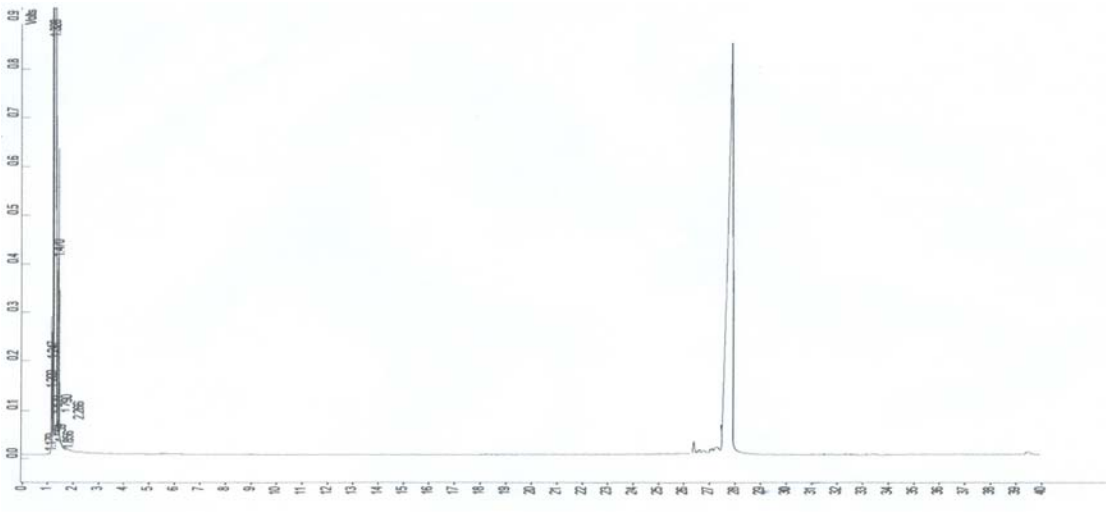


Figura 82. Cromatograma CG-FID do sesquiterpeno isolado do óleo volátil das folhas adultas de *Zanthoxylum hyemale.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

Através do mesmo método de isolamento, utilizando-se como sistema eluente hexano/acetato 10%, foi possível isolar um dos componentes do óleo dos frutos de *Zanthoxylum hyemale*, que apresentou um índice de Kovat's 1653. Este composto teve sua estrutura confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C e espectroscopia de massas. Após as análises destes dados pode-se atribuir que o principal constituinte dos óleos dos frutos de *Zanthoxylum hyemale* é o sesquiterpeno cadinol, que representa 9,6% da composição do óleo. Espectros a seguir nas Figuras 83-87.

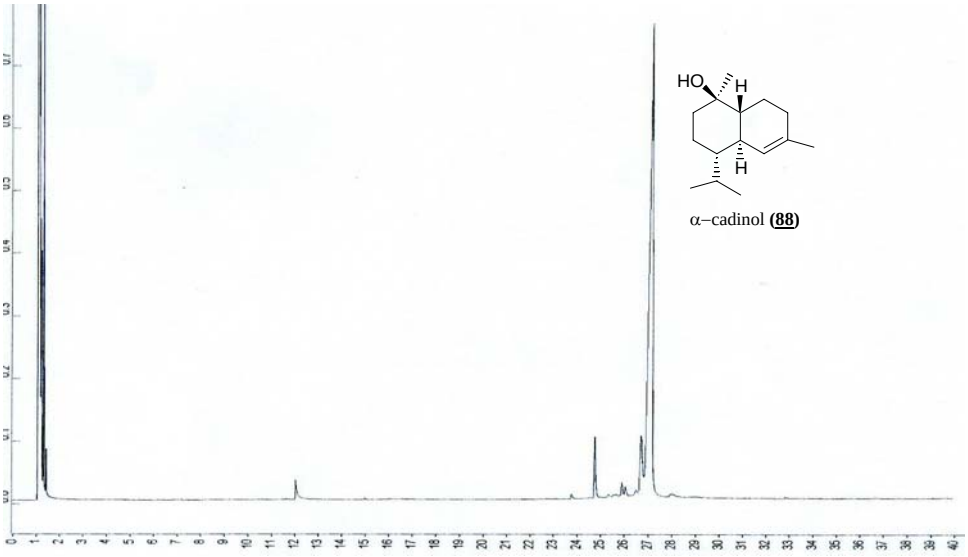


Figura 83. Cromatograma CG-FID do α–cadinol, isolado do óleo dos frutos de *Zanthoxylum hyemale.* Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

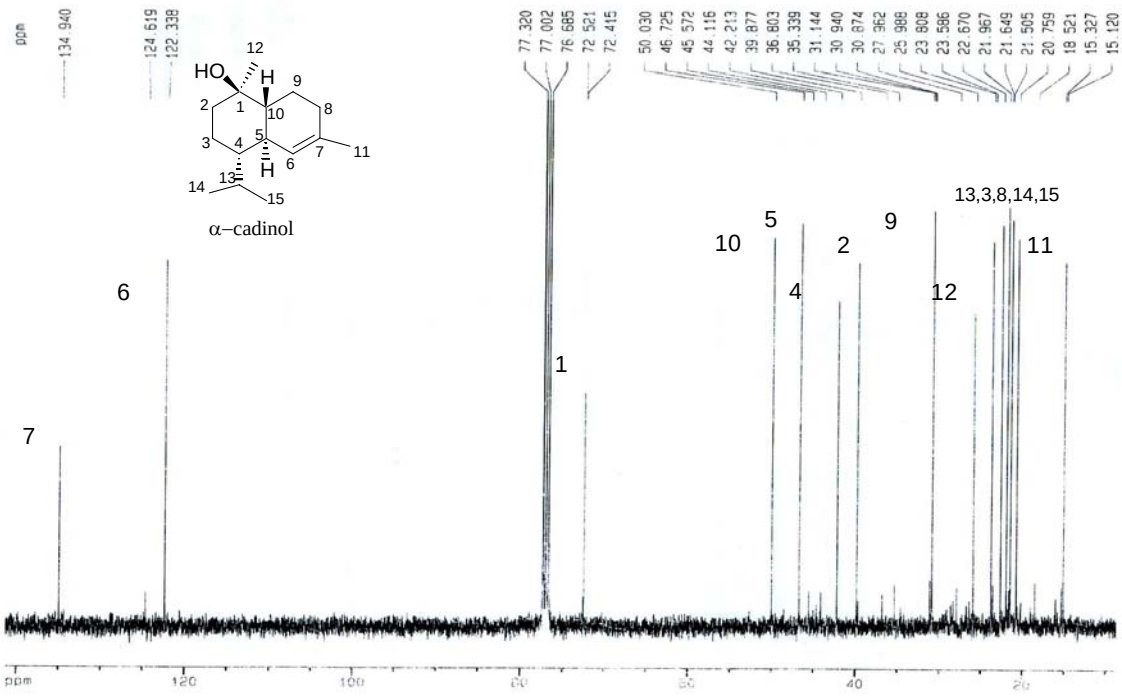


Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$ do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de *Zanthoxylum hyemale.*

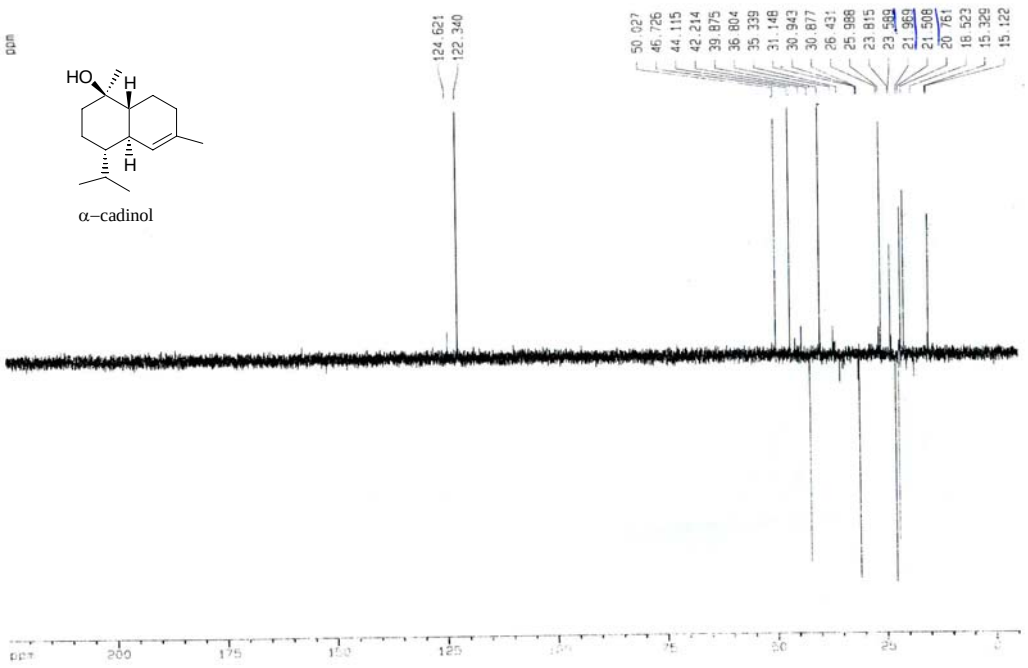


Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 a 100 MHz em CDCl3, do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de *Zanthoxylum hyemale.*

.

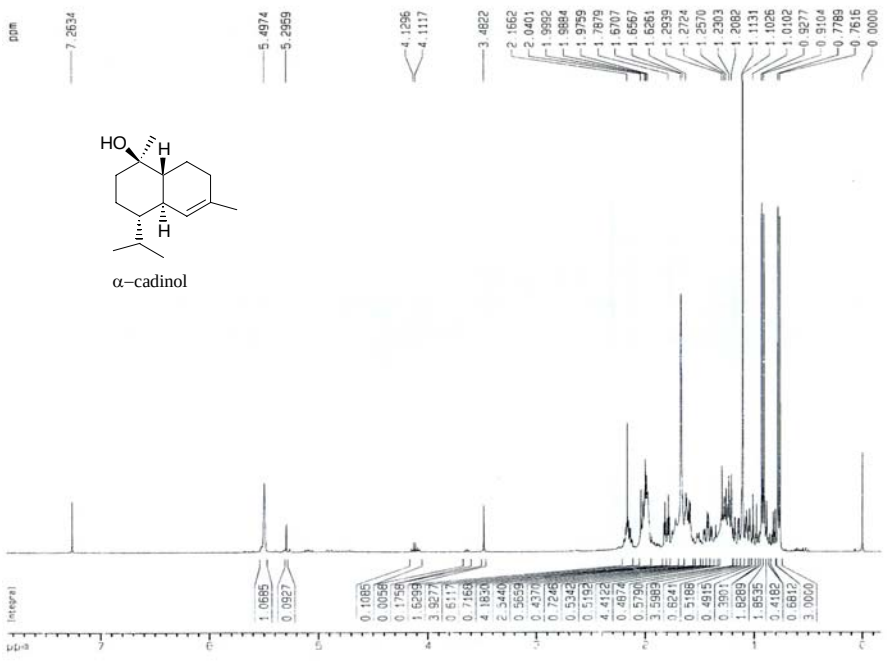


Figura 86. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_3$, do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de *Zanthoxylum hyemale.*

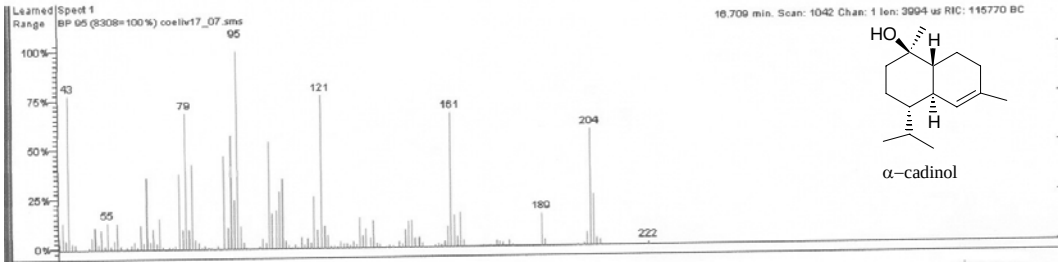


Figura 87. Espectro de massas do α–cadinol isolado do óleo volátil dos frutos de *Zanthoxylum hyemale.*

3.1.7.4. Atividade biológica

Após a definição dos constituintes dos óleos essenciais de *Zanthoxylum hyemale*, realizou-se testes de atividade antimicrobiana destes óleos. Foram realizados testes de atividade frente a bactérias gram-positivas e gram-netativas e fungos. Os métodos utilizados foram a bioautografia (Figura 88) e determinação da quantidade inibitória mínima (CIM) (Tabela 31). Os compostos isolados, devido à pequena quantidade, tiveram sua atividade antibacteriana analizada através do método de bioautografia (Tabela 30).

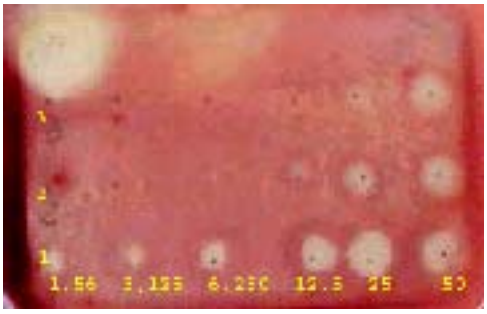


Figura 88. Teste de atividade antimicrobiana por bioautografia frente a *Escherichia colli*, dos compostos isolados dos óleos voláteis de *Z.hyemale* onde; 3-sesquiterpeno ZY-1; 2-cadinol; 1-nerolidol.

Tabela 30. Determinação da atividade antibacteriana em μg por bioautografia dos compostos isolados dos óleos de *Z.hyemale*.

microorganismos	hyemalol(ZY-1)	(-)-*trans*-nerolidol	cadinol	Padrão
S. aureus	50	12,5	12,5	0,7
S. epidermidis	25	(-)	25	0,7
K.pneumoniae	12,5	25	3,125	0,4
E.coli	50	1,56	25	0,6
S. setubal	50	50	50	0,6
P. aeruginosa	(-)	25	25	0,6
B. subtilis	50	(-)	50	0,7

Tabela 31. Concentração inibitória mínima em mg/ml (CIM) e concentração mínima letal (CLM) dos óleos voláteis de *Z.hyemale*.

Microorg.	F. jovens		F. adultas		Flores		Frutos		Padrão
	CIM[b]	CLM[b]	CIM[b]	CLM[b]	CIM[b]	CLM[b]	CIM[b]	CLM[b]	4.5 CIM
S. áureos	2,5	>20,0	5,0	>20	10,0	>20	2,5	20,0	$6,25x\ 10^{-3}$
S. epidermidis	10,0	20,0	10,0	20,0	10,0	10,0	5,0	5,0	$3,12x10^{-3}$
B. subtilis	5,0	20,0	5,0	20,0	5,0	5,0	2,5	>20	$1,67x10^{-3}$
E. coli	5,0	5,0	5,0	5,0	10,0	10,0	1,25	20,0	$3,12x10^{-3}$
S. setúbal	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	20,0	5,0	10,0	$6,25x\ 10^{-3}$
P. aeruginosa	1,25	>20,0	1,25	>20	5,0	5,0	2,5	>20	$3,12x10^{-3}$
K. peneumoniae	1,25	20	1,25	20,0	10,0	10,0	0,675	0,675	$1,67x10^{-3}$
C. albicans	20,0	20,0	20,0	20,0	>20	>20	10,0	10,0	$3,12x10^{-3}$
S. cerevisiae	2,5	2,5	2,5	2,5	10,0	10,0	2,5	2,5	$8,12x10^{-3}$

3.1.7.5. Determinação estrutural do sesquiterpeno ZY-1.

O composto codificado **ZY-1**, obtido de forma pura após tratamento do óleo essencial das flores e folhas adultas de *Z.hyemale* por CCD preparativa, teve sua estrutura

elucidada através da combinação de métodos como, a espectroscopia de massas e de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, homo e heteronucleares. Trata-se de um composto oticamente ativo, pois apresenta um $[\alpha]_D^{25}$: -106 (em $CHCl_3$, *c* = 0,003). Após as análises, o composto foi definido como um novo sesquiterpeno natural que se denominou hyemalol.

O espectro de massas (EI) de **ZY-1** (Figura 89) mostrou um íon molecular (M^{+}**.**) a m/z 222, correspondendo a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$, o que foi posteriormente confirmado pela interpretação dos espectros de RMN.

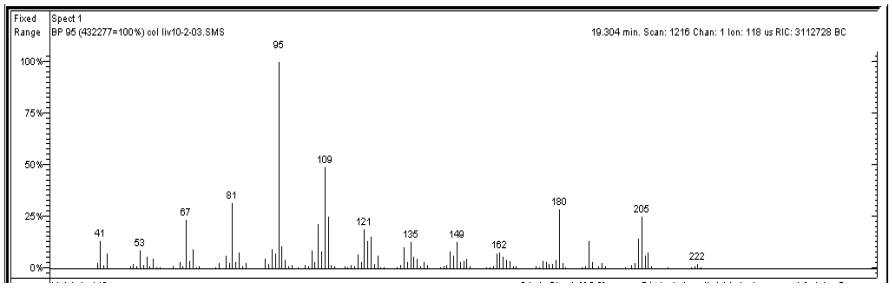


Figura 89. Espectro de massas do sesquiterpeno ZY-1 isolado do óleo de *Z.hyemale.*

3.1.7.6. Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H do sesquiterpeno Hyemalol.

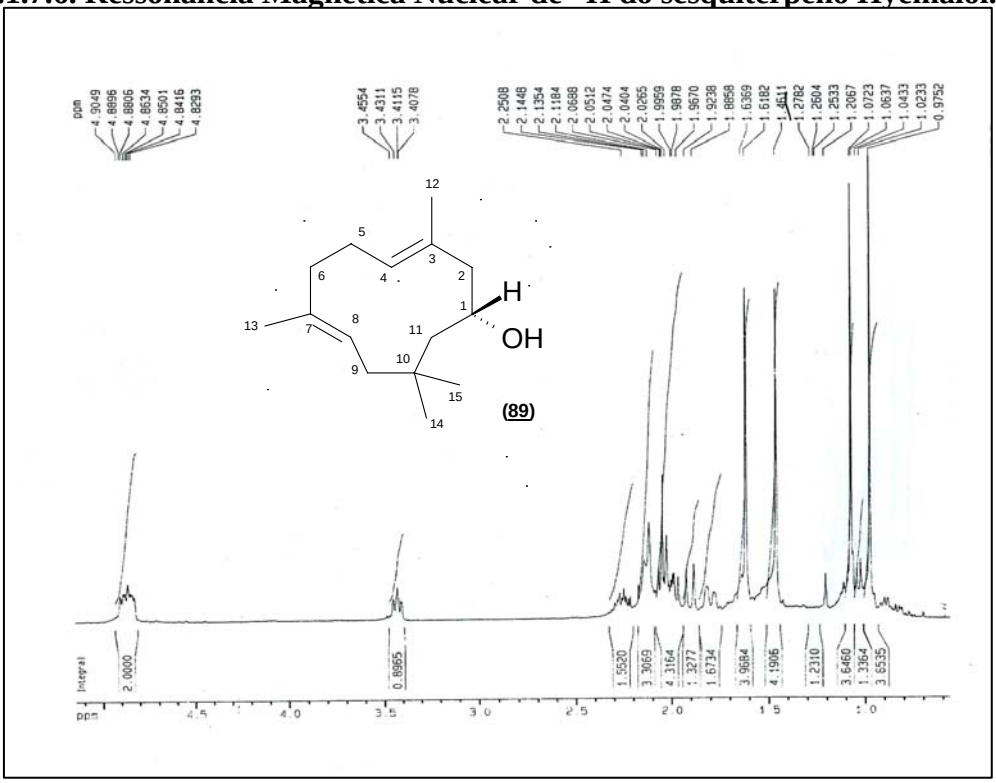


Figura 90. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz em $CDCl_{3,}$ do sesquiterpeno ZY-1.

O espectro de RMN ^{1}H deste composto (Figura 90) mostra, em adição aos sinais correspondentes a quatro grupos metílicos alifáticos, que absorvem a δ 0,97, 1,07 ppm como dois singletos e a δ 1,46 e 1,63 ppm também como dois singletos, os sinais correspondentes a dois hidrogênios vinílicos, que absorvem a δ 4,89 e 4,84ppm como dois tripletos. Além destes sinais, observou-se um sinal em δ 3,43, que acreditamos ser um sinal correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico.

A atribuição dos demais hidrogênios da estrutura foi possível pela análise de espectros heteronucleares, como HMQC e HMBC e homonucleares como COSY.

A Tabela 32 mostra os deslocamentos químicos para todos os hidrogênios da estrutura de ZY-1.

3.1.7.7. Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do sesquiterpeno Hyemalol.

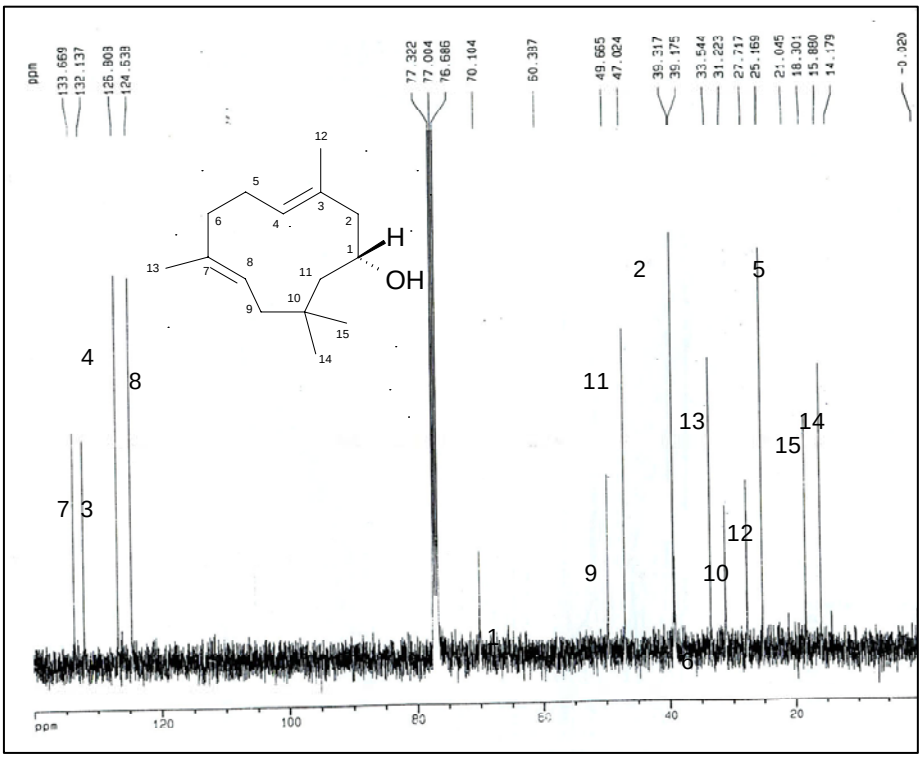


Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em $CDCl_3$, do sesquiterpeno ZY-1.

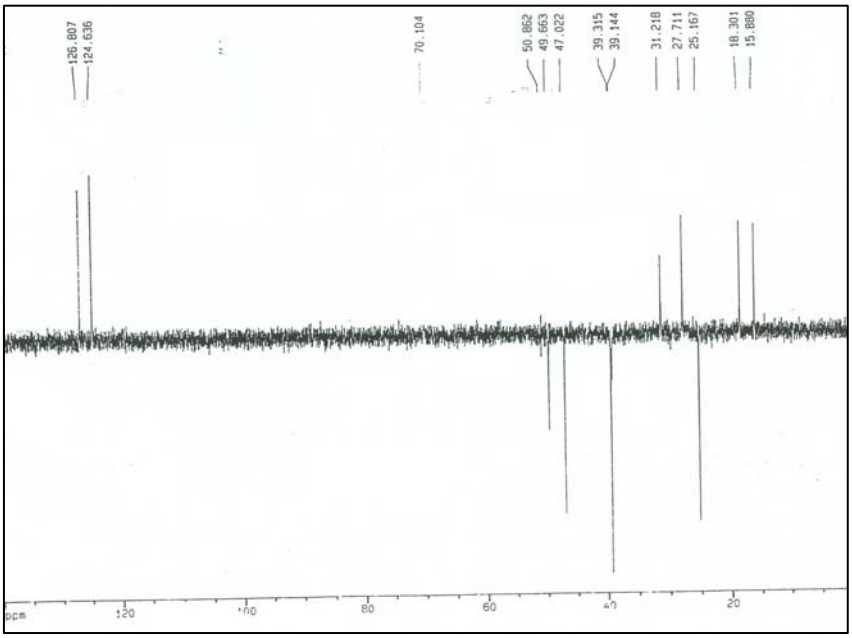


Figura 92. Espectro de RMN de DEPT-135 em $CDCl_3$, do sesquiterpeno ZY-1.

A atribuição de sinais de RMN^{13}C dos núcleos de carbono foi realizada através de técnicas de ressonância magnética nuclear de carbono totalmente desacoplados e DEPT (Figuras 91 e 92).

O espectro de carbono totalmente desacoplado permitiu identificar 15 sinais na região entre δ 14,18 e δ 133,67 ppm.

Através do experimento DEPT, verificou-se 5 sinais referentes a carbonos metilênicos (CH_2) com amplitudes negativas, e 7 sinais referentes aos carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) com amplitudes positivas. Desta forma constatou-se a presença de três carbonos quaternários na estrutura, sendo dois deles referentes aos carbonos vinilicos que absorvem a δ 132,13 e δ133,67 ppm. O terceiro carbono quaternário aparece em campo mais alto, a δ 33,54 ppm. Com estes dados, podemos atribuir a presença de duas duplas ligações e três insaturações, deduzindo a presença de um anel macrociclo.

Tabela 32. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para o sesquiterpeno ZY-1 em $CDCl_3$.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	3,43	70,176
2	2,02	39,340
3	-	132,13
04	4,89	126,83
05	2,13	25,176
06	2,06	39,24
07	4,84	133,66
08	-	124,63
09	2,04	49,67
10	-	33,553
11	1,92	47,07
12	1,46	27,69
13	1,63	31,26
14	0,97	14.18
15	1,07	15,88

3.1.7.8. HMQC do sesquiterpeno Hyemalol.

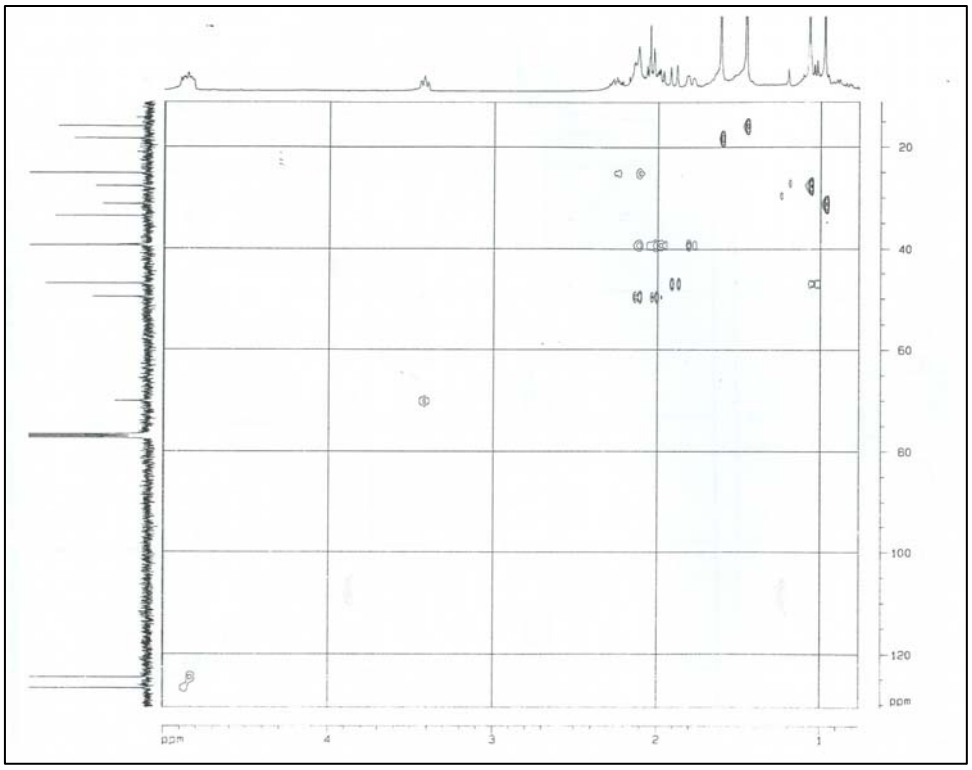


Figura 93. Espectro de HMQC de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz.

O espectro bidimenssional HMQC (Figura 93) possibilitou identificar os carbonos protonados, presentes em ZY-1, através da correlação dos deslocamentos químicos de cada carbono com o respectivo hidrogênio.

Analisando-se o espectro, observa-se a ausência de correlações com os carbonos que absorvem a δ 132,13, 133,67 e 33,54 ppm, confirmando o estado quaternário destes na estrutura de ZY-1. No mesmo espectro, observa-se ainda as correlações entre os hidrogenios metílicos que absorvem a δ 0,97, 1,07, 1,46 e 1,63 ppm e os carbonos que absorvem a δ 25,17, 27,71, 14,18 e 15,88 ppm, respectivamente. Desta forma, todos os carbonos presentes na estrutura de ZY-1 foram correlacionados com os respectivos hidrogênios.

3.1.7.9. HMBC do sesquiterpeno Hyemalol.

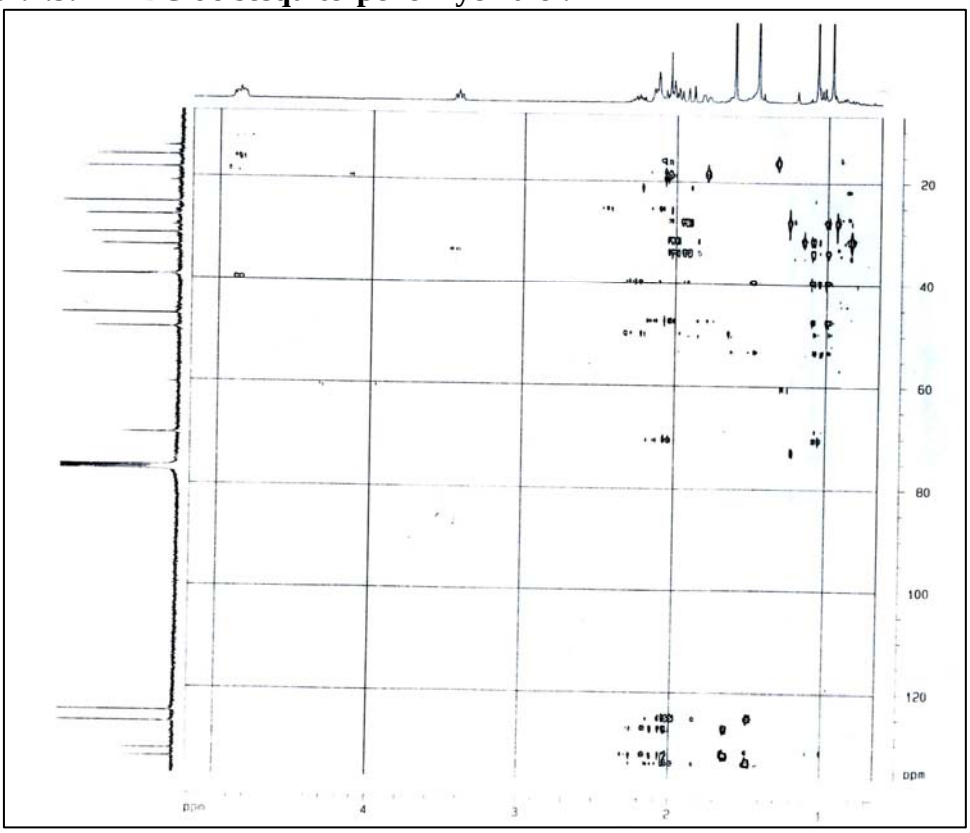


Figura 94. Espectro de HMBC de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz.

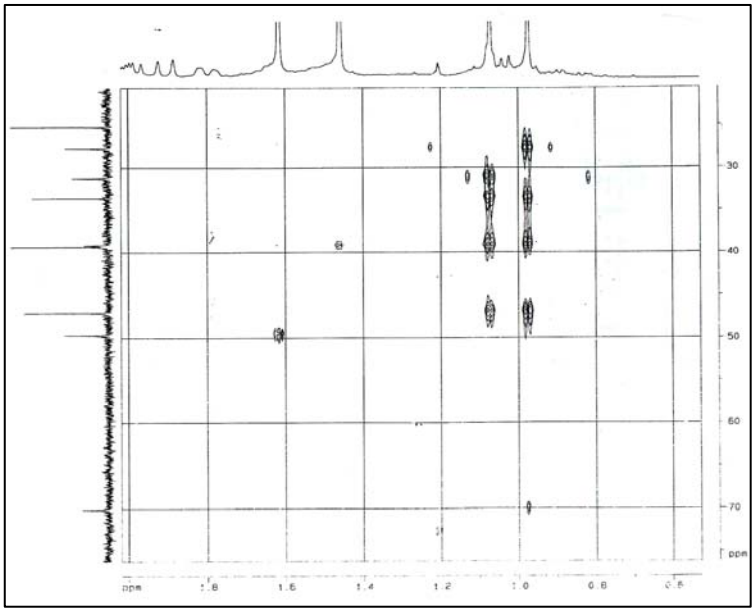


Figura 95. Expansão 1 do espectro de HMBC de ZY-1.

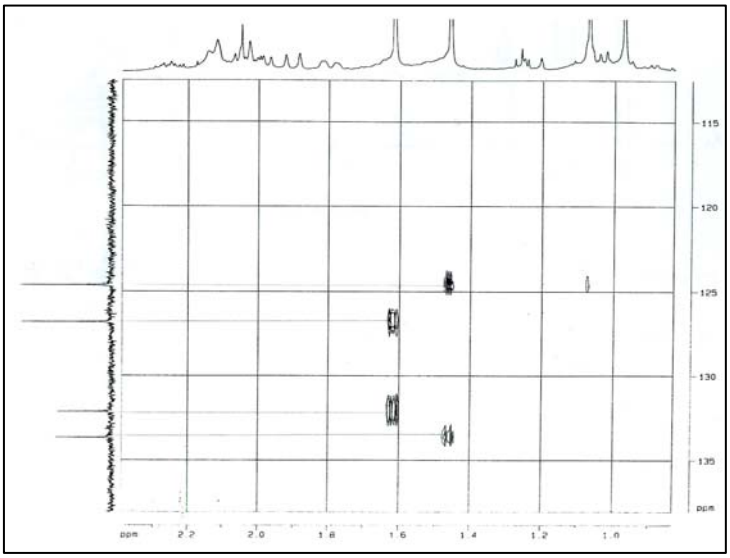


Figura 96. Expansão 2 do espectro de HMBC de ZY-1.

O sesquiterpeno ZY-1 foi submetido a uma análise através do experimento HMBC (Figuras 94-96). Os hidrogênios do grupo metila que absorvem a δ 0,97 e 1,07 ppm apresentam um cruzamento entre si e, com o carbono quaternário que absorve a δ 33,54 ppm, caracterizando as metilas geminais ligadas a este carbono. Estas metilas também apresentam correlação com os carbonos metilênicos que absorvem a δ 49,67 e 47,02 ppm. Desta forma atribui-se parte da estrutura como sendo -$CH_2C(CH_3)_2CH_2$-. A metila que absorve a δ 1,46 ppm tem correlação com os carbonos vinilicos que absorvem a δ 124,63 e 133,67 ppm, já a metila que absorve a δ 1,63 ppm apresenta correlação com os outros dois carbonos vinilicos, que absorvem a δ 126,80 e 132,14 ppm. Os prótons dos grupos metilas que absorvem a δ 1,46 e 1,63 ppm apresentam também, um cruzamento com os carbonos metilênicos que absorvem δ 39,31 e 49,66 ppm. Estas correlações, unidas com as informações prévias dos demais espectros, permitiram atribuir mais um fragmento da estrutura de ZY-1, como sendo -CH_2-$C(CH_3)$=CH-CH_2-CH_2-$C(CH_3)$=CH- CH_2- .

3.1.7.10. COSY do sesquiterpeno Hyemalol.

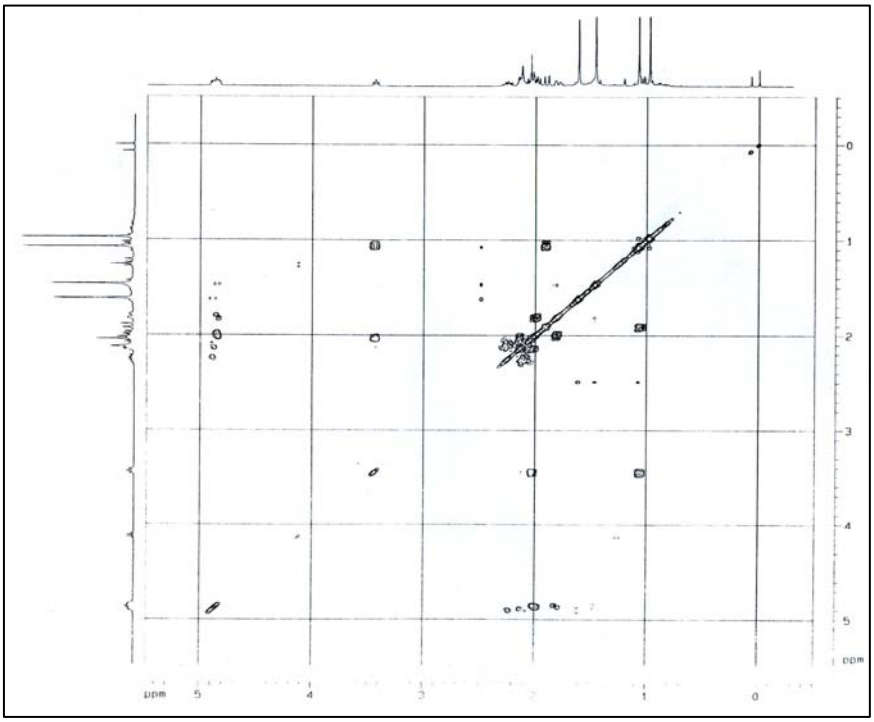


Figura 97. Espectro de COSY de ZY-1, em $CDCl_3$, a 400 MHz.

Neste espectro (Figura 97) observou-se três sistemas de spins. O primeiro sistema mostra acoplamento entre H-1 e H-2 e entre H-1 e H-11 (fragmento A). Alem disso, foram observados os acoplamentos entre H-4 e H-5 e entre H-5 e H_2-6, formando o segundo sistema de spins (fragmento B). O terceiro sistema de spins foi obtido através das correlações entre os hidrogênios H-8 e H-9 (fragmento C). Desta forma, os fragmentos A,B e C foram combinados de acordo com as correlações observadas no espectro de HMBC para formar a estrutura de ZY-1, como mostra a Figura 98. Desta forma, a estrutura de ZY-1 foi elucidada como sendo 3,7,10,10-tetrametilcicloundeca-3,7-dien-1-ol, um novo sesquiterpeno natural derivado do esqueleto humuleno, que foi denominado hyemalol.

3.1.7.11. Determinação da configuração absoluta de ZY-1 pelo método de Horeau.

O método de Horeau foi empregado a fim de se determinar a estereoquímica do carbono 1 de **ZY-1**. Para isto, **ZY-1** foi submetido a uma reação com o anidrido 2-fenilbutírico racêmico, obtendo-se desta forma, dois ésteres diastereoisoméricos, que foram descartados, e uma mistura de ácidos (+) e (-)-2-fenilbutíricos em proporções diferentes. A medida do excesso enantiomérico destes ácidos foi utilizada para a determinação da estereoquímica. A mistura destes ácidos foi derivatizada utilizando-se diazometano e após os ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa enantioseletiva.

Neste experimento obteve-se um excesso enantiomérico do ácido *R*-2-fenilbutírico. Com estes dados, aplicou-se a regra de Horeau à estrutura proposta determinando-se a estereoquimica absoluta do metabólito como sendo R.

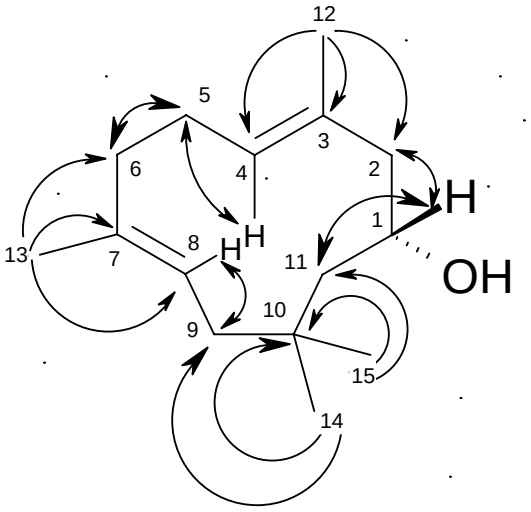
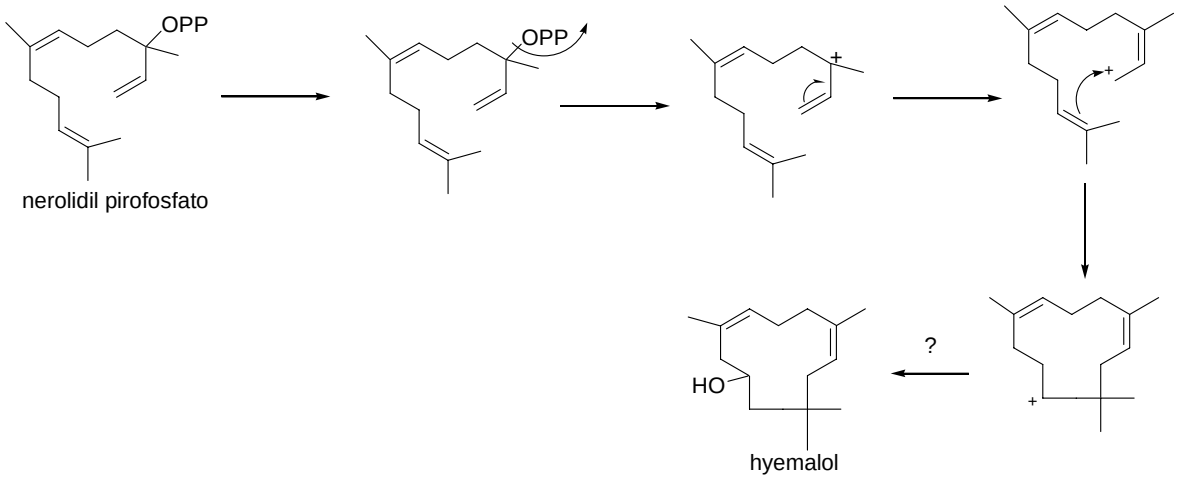


Figura 98. Estrutura do metabólito ZY-1, baseado nas correlações ^{1}H-^{1}H COSY e HMBC (COSY :↔ ; HMBC:→), e pelo método de Horeau.

Desta forma com a confirmação dos compostos isolados e determinação dos compostos com menor porcentagem, através de espectroscopia de massas e obtenção dos respectivos índices de retenção de Kovat's, atribui-se na Tabela 33 a composição química dos óleos voláteis de *Z.hyemale.*

3.1.7.12. Proposta biossíntética para sesquiterpeno hyemalol.



Esquema 14. Proposta de biossíntese do sesquiterpeno hyemalol, partindo do nerolidil pirofosfato**.**

Tabela 33. Composição dos óleos essenciais de *Zanthoxylum hyemale*.

Constituintes	Indice Kovat's	% no óleo da flor	% no óleo do fruto	% no óleo da folha jovem	% no óleo da folha adulta
α-pineno		19	10	2,9	17,3
β-pineno		10,5	25,06	5,6	9,12
limoneno	1025	4,35	1,83	-	2,68
ment-2-en-1-ol	1140	-	0,43	-	-
trans−β−terpineol	1163	-	1,11	-	-
neo-iso-isopulegol	1168	-	0,45	-	-
α-terpineol	1185	-	0.57	-	-
3-decanona	1190	-	0,35	-	-
decanal	1204	0,23	0,36	-	-
carvacrol<etil éter>	1295	2,90	2,14	-	5,60
<delta>Elemeno	1334	0.20	0,24	0,45	0,1
2-undecanona	1289	2,90	1,36	1,94	0,43
β-elemeno	1414	1,0	1,84	2,69	0,74
E −β-cariofileno	1449	2,36	1,58	1,05	2,0
α-acoradieno	1463	-	0,39	1,04	-
δ-himachaleno	1476	-	2,44	0,13	0,1
humeleno	1480	3,6	2,27	9,68	3,63
germacreno-D	1493	5,8	3,08	4,74	5,24
β-bisaboleno	1509	-	0,51	3,55	0,27
δ-cadineno	1513	-	0,24	0,64	0,41
biciclogermagreno	1520	6,60	0,98	1,55	0,22
elemol	1547	-	0,27	0,14	0,1
cadineno	1551	2,61	0,22	0,17	0,34
β-calacoraleno	1563	-	0,94	-	-
(-)-trans-nerolidol.	1566	0,28	1,44	51,53	-

cariofileno álcool	1571	-	3,29	-	1,28
óxido de cariofileno	1580	-	0,60	-	0,47
elemol	1640	0,7	4,1	0,93	2,90
epi-α-cadinol	1642	2,2	1,18	0,74	0,85
α-cadinol	1653	4,5	9,58	2,31	5,72
hyemalol	1664	22,31	7,0	0,66	31,8
epi-alfa -bisabolol	1687	0,17	1,47	0,24	0,32
Total		89,03	87,32	92,68	91,32

3.1.7.13. Análise do extrato hexânico das folhas de *Zanthoxylum hyemale*

Para constatar se o sesquiterpeno ZY-1 que foi identificado nos óleos de *Zanthoxylum hyemale*, era produto formado por aquecimento durante o processo de hidrodestilação, realizou-se uma comparação entre o óleo volátil obtido por hidrodestilação e o extrato hexanico das folhas adultas de *Zanthoxylum hyemale*. Desta forma pode-se constatar que o sesquiterpeno desconhecido, presente nos óleos voláteis, também faz parte da composição do extrato hexanico. Este experimento confirma que o sesquiterpeno ZY-1 não é artefato, formado durante o processo de hidrodestilação, conforme cromatograma a seguir (Figura 99).

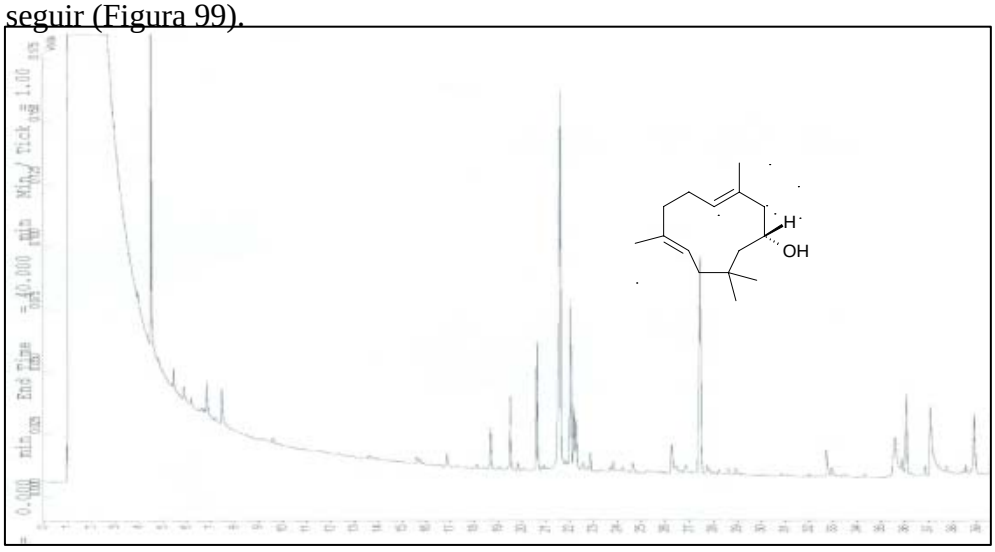


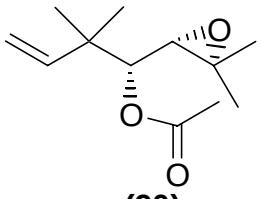
Figura 99. Cromatograma CG-FID do extrato hexânico das folhas adultas de *Zanthoxylum hyemale*. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

3.2. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS REALIZADAS COM A MOLÉCULA DO EPÓXIDO 1-(3,3-DIMETIL-2-OXIRANIL)-2,2-DIMETIL-3-BUTENIL ACETATO (CALEOL) E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS OBTIDOS.

3.2.1. CALEA CLEMATIDEA

O gênero *Calea* (Asteraceae) é constituído de 90 espécies distribuidas na América tropical e subtropical. Espécies pertencentes a este gênero são constituídas quimicamente principalmente por lactonas sesquiterpênicas e derivados do timol. A maior parte do estudo sobre este gênero, foi realizado por Bohlmann, utilizando plantas da Guatemala, México, Venezuela, além de plantas brasileiras, com interesse nas potencialidades destas espécies no uso farmacológico.[125-128]

Flach[129] em 2002 determinou a composição volátil do óleo essencial de folhas e flores de *Calea clematidea*, coletada no Rio Grande do Sul, um arbusto encontrado no sul do Brasil, Argentina e Uruguai. O interesse pela espécie se deve ao seu uso na medicina popular como antigripal, estomático e contra úlceras gástricas. Nesta oportunidade, um novo epóxido natural denominado caleol **(90)** foi isolado e sua estrutura determinada. Além disso, a atividade antifúngica do óleo e do composto isolado foram determinadas.



(90)

Devido as características estruturais da substância, com três grupos funcionais e dois centros quirais, associadas à disponibilidade de obtenção da substância naturalmente (> 60% do óleo), neste trabalho objetivou-se dar uma continuidade no trabalho iniciado por Flach, através de transformações estruturais na molécula, com a finalidade de se avaliar um estudo estrutura-atividade biológica.

Como resultado deste objetivo, a molécula de caleol **(90),** foi submetido a varias condições reacionais, resultando nas estruturas **(91-98)**, mostrados a seguir (Figura 100).

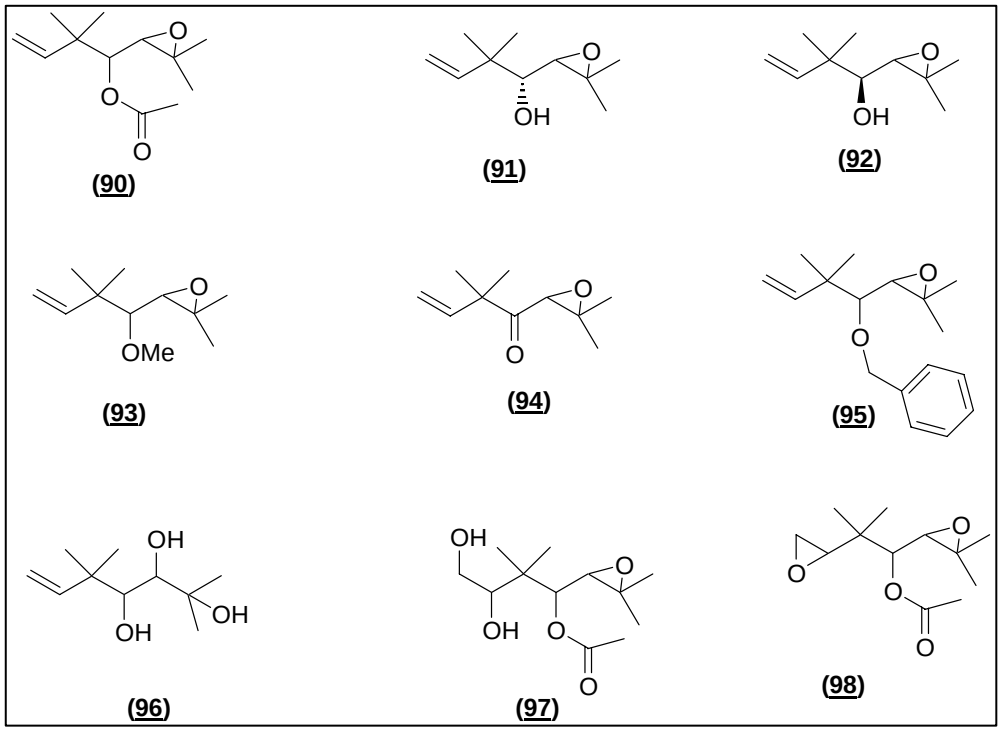


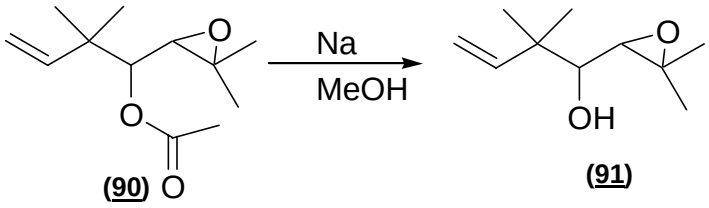
Figura 100. Caleol **(90)** e seus derivados obtidos.

3.2.2. Obtenção e caracterização dos derivados do caleol

3.2.2.1. *1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol (91)*

A primeira reação realizada com **(90)** foi uma reação de hidrólise do grupo éster (esquema 15), com o objetivo de se obter o correspondente álcool secundário. Para isto, **(90)** foi submetido a uma a hidrólise alcalina, utilizando-se metóxido de sódio, obtendo-se o álcool 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol **(91)**, que foi analisado através de cromatografia gasosa (Figura 101) e ressonância magnética de ^{1}H e ^{13}C (Figuras 102-103), provando a total hidrólise do éster. A função hidroxila livre foi

importante, pois possibilitou a determinação da configuração absoluta deste centro quiral através da aplicação do método de Horeau, adaptado à cromatografia gasosa enantiosseletiva.



(90) **(91)**

Esquema 15

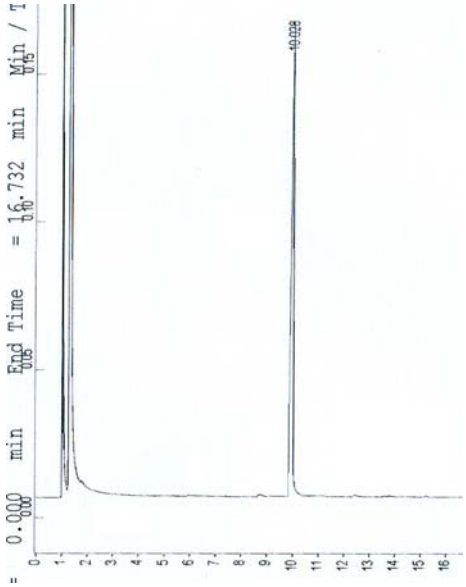


Figura 101. Cromatograma CG-FID do resultado da reação de hidrólise de **(90)**. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

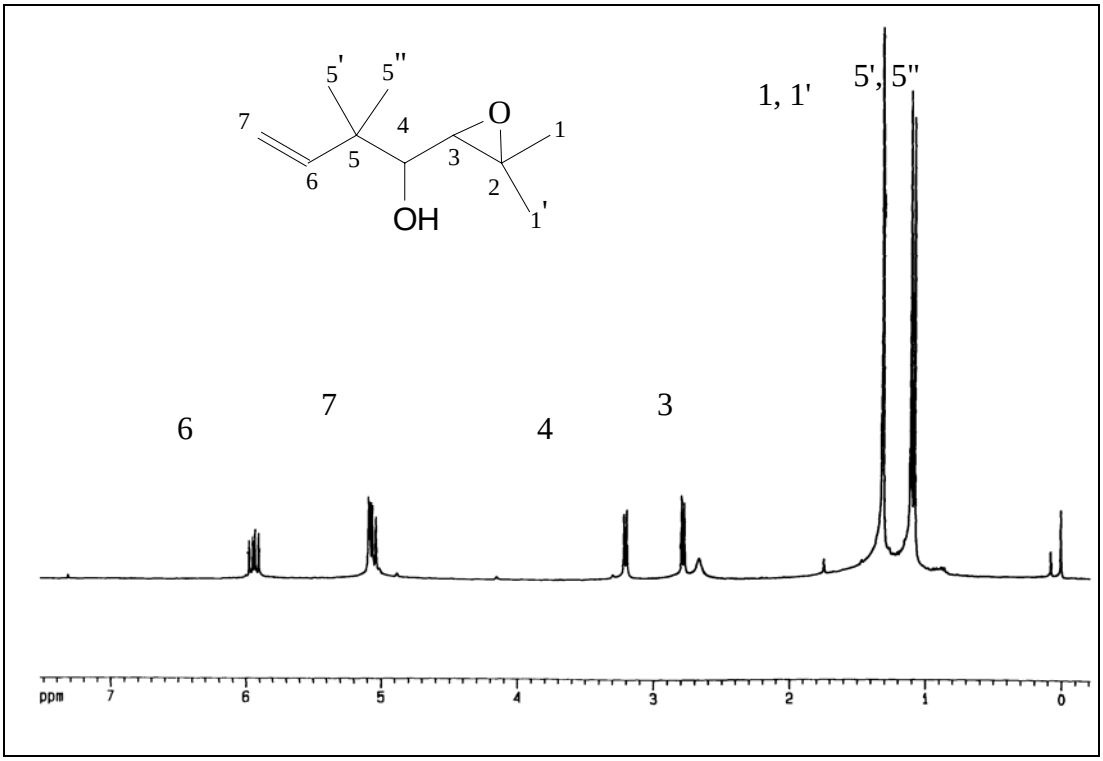


Figura 102: Espectro de RMN de ^1H do álcool **(91)**, em $CDCl_3$, a 400 MHz.

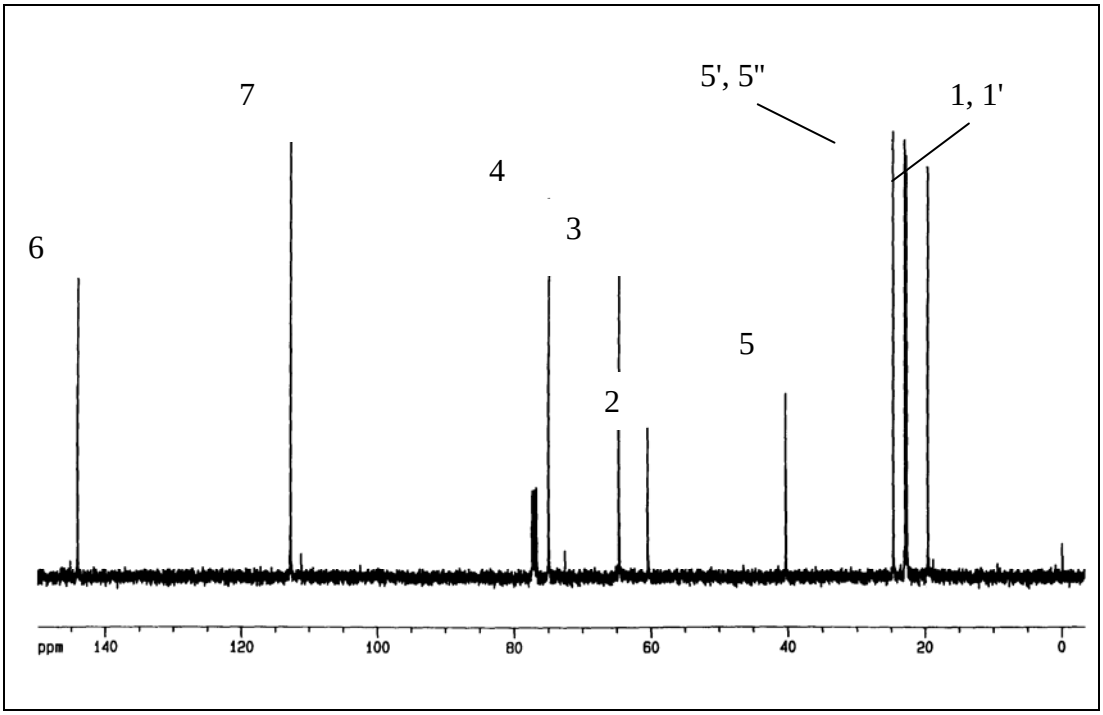


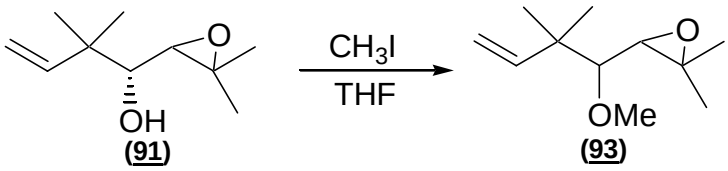
Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C do álcool **(91)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

Tabela 34: Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de **(91)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,31 (s)	22,5
1’	1,30 (s)	19,5
2	-	60,4
3	2,78 (d)	64,6
4	3,22 (d)	74,9
5	-	40,2
5’	1,07 (s)	24,5
5”	1,10 (s)	22,8
6	5,94 (dd)	144,0
7	5,05 (dd)	112,7

3.2.2.2. *1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-butenil-metil-éter (93)*

Continuando, a função hidroxila livre de **(91)** foi tranformada em seu éter metilico, utilizando-se CH_3I e THF (Esquema 16), fornecendo o derivado 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-butenil-metil-éter **(93),** que após purificação do resultado da reação (Figura 104), foi identificado por RMN de ^{1}H e ^{13}C. (Figuras 105-106)



Esquema 16

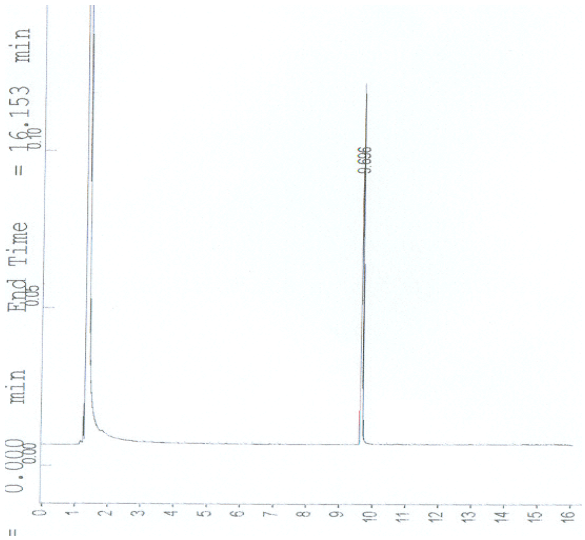


Figura 104. Cromatograma CG-FID do resultado da reação de metilação de **(<u>91</u>).** Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

O espectro de RMN de ^1H mostrou um singleto, com integração para 3 hidrogênios em δ 3,50 ppm, identificando o grupo metila da função éter (figura 105).

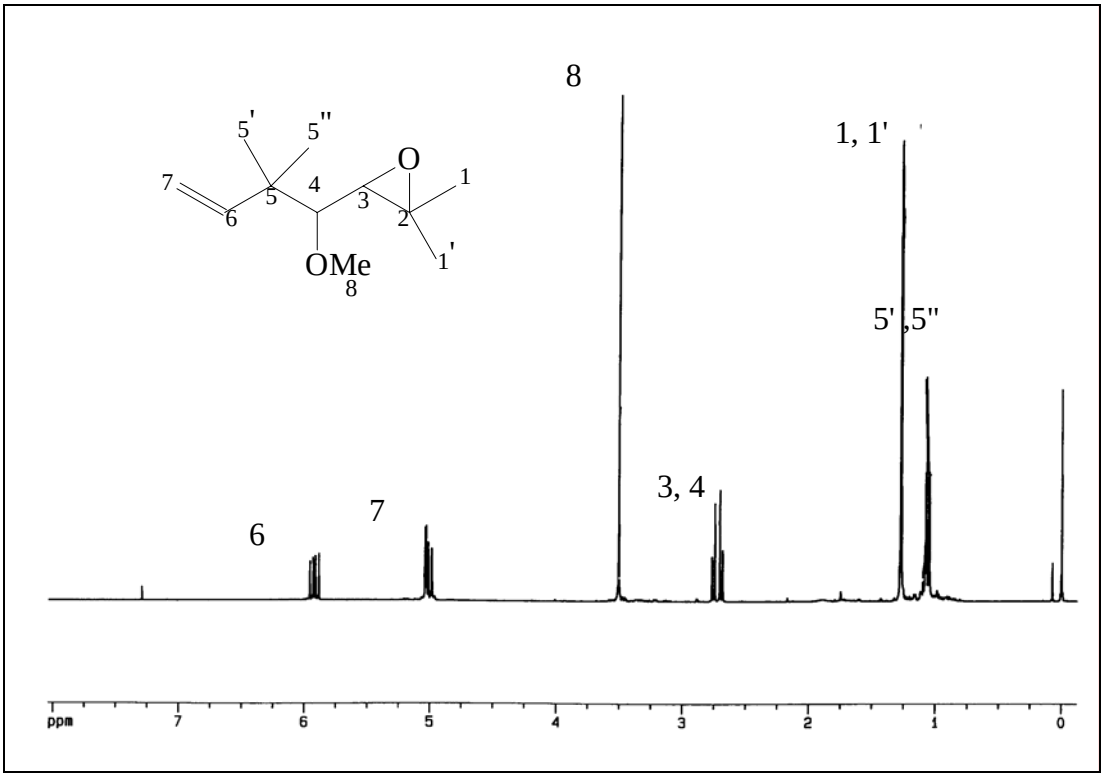


Figura 105 : Espectro de RMN de ^1H de **(<u>93</u>)**, a 400 MHz em $CDCl_3$

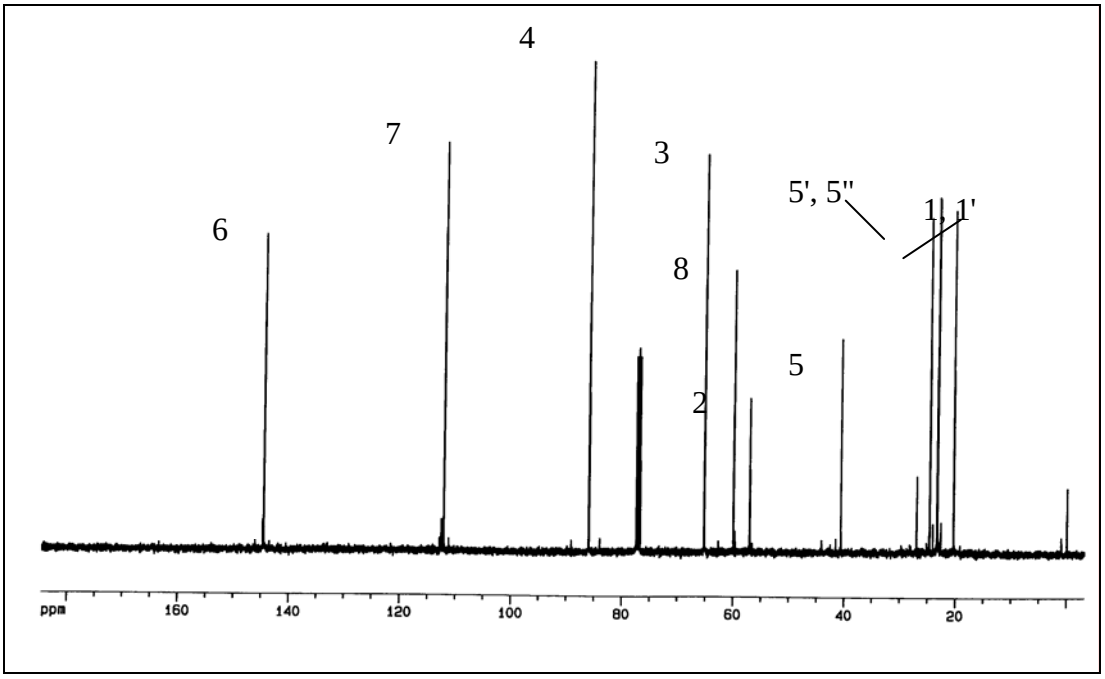


Figura 106 : Espectro de RMN de ^{13}C de **(93)**, a 100 MHz em $CDCl_3$.

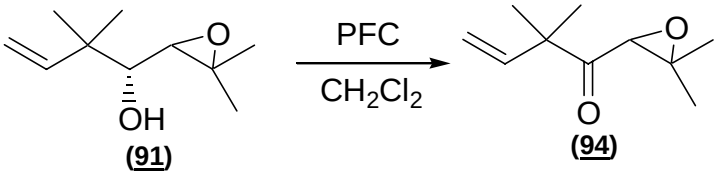
Tabela 35. Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de **(93)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J* (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,26 (s)	-	24,6
1’	1,27 (s)	-	23,2
2	-	-	57,0
3	2,69 (d)	9,2	65,2
4	2,75 (d)	9,2	85,9
5	-	-	40,6
5’	1,05 (d)	-	20,3
5”	1,07 (d)	-	20,3
6	5,91 (dd)	17,4	144,6
7	5,00 (dd)	17,4	112,0
8	3,50 (s)	-	59,9

3.2.2.3 *1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ona (94)*

O álcool **(91)**, foi submetido a uma reação de oxidação com PFC (piridinium fluor cromato), com a finalidade de se obter a cetona correspondente (Esquema 17). Esta substância, após purificação por cromatografia em coluna (Figura 107), foi obtida com alta pureza e a sua estrutura confirmada pelos métodos usuais de análise (RMN de ^{1}H e ^{13}C) (Figuras 108-109). .

No espectro de RMN de ^{1}H, deste derivado, observa-se a ausência do dubleto correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono do álcool de partida. Mais conclusiva foi a análise do espectro de RMN de ^{13}C, por mostrar um sinal a δ=206,3 ppm confirmado a carbonila de uma cetona (Figura 109).



(91) **(94)**

Esquema 17

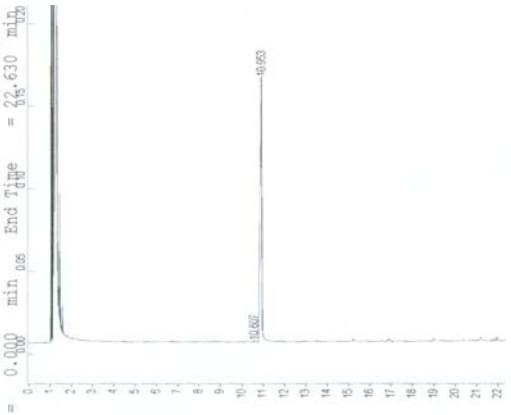


Figura 107. Cromatograma CG-FID do produto de oxidação de 4. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

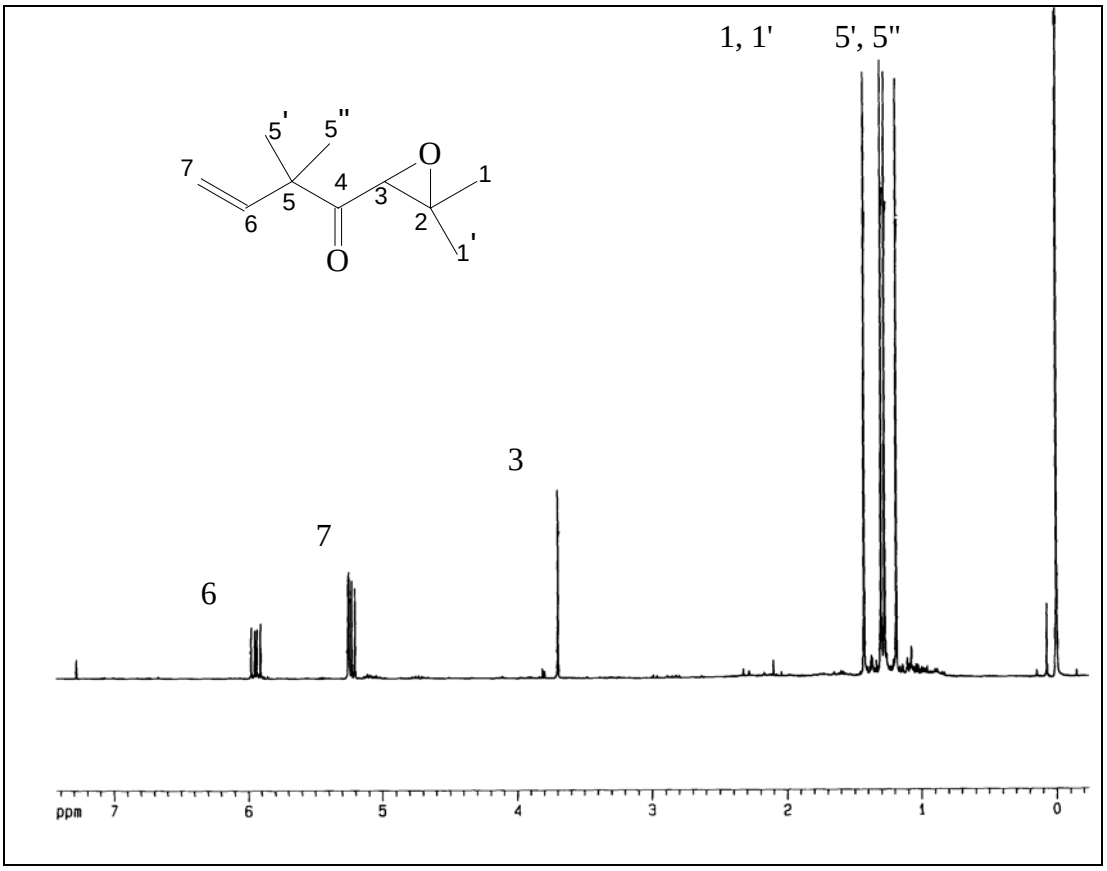


Figura 108 : Espectro de RMN de ^1H do derivado oxidado **(<u>94</u>)** a 400 MHz, em $CDCl_3$.

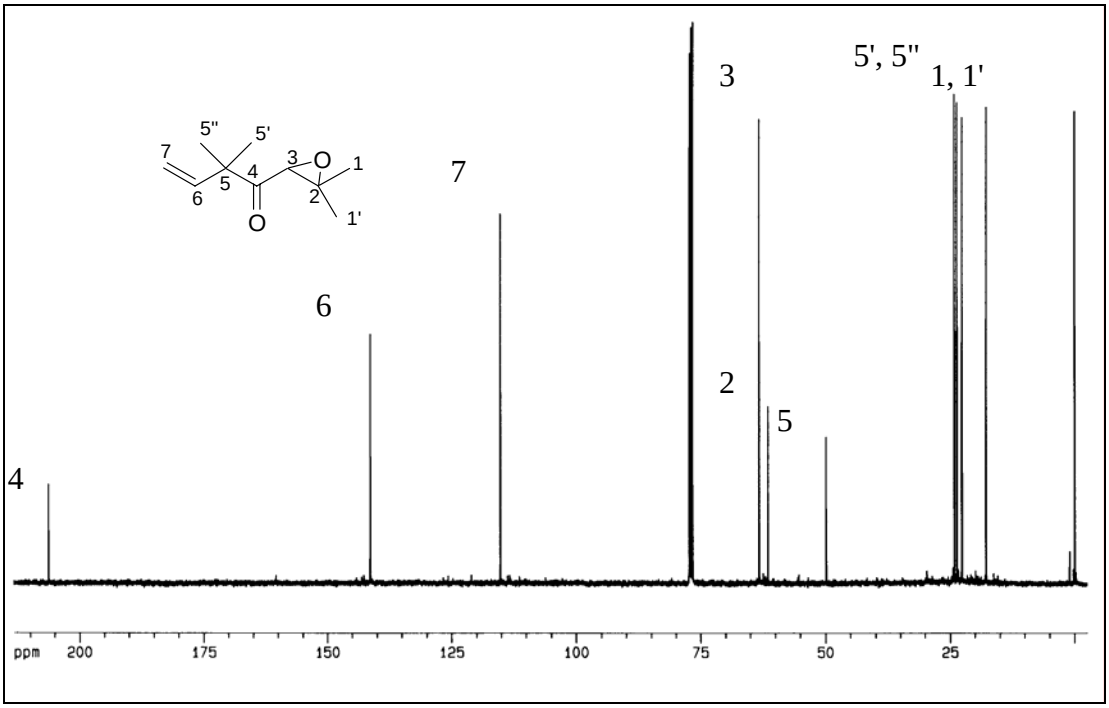


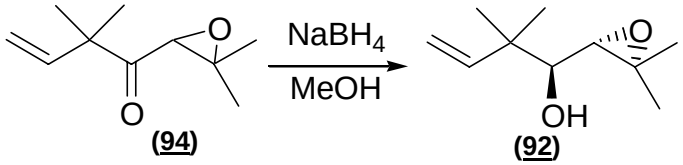
Figura 109: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado oxidado **(94)**, em $CDCl_3$ a 100 MHz.

Tabela 36. Dados de ressonância magnética da cetona **(94)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J* (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,29 (s)	-	22,8
1’	1,42 (s)	-	23,4
2	-	-	61,5
3	3,69 (d)	-	63,3
4	-	-	206,3
5	-	-	49,9
5’	1,18 (s)	-	17,8
5”	1,27 (s)	-	22,6
6	5,95 (dd)	14	142,7
7	5,22 (dd)	17	113,8

3.2.2.4 *1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ol (92)*

Com a finalidade de se observar a influências dos substituintes na reação de redução da carbonila diastereotópica, a cetona foi submetida a uma reação de redução, utilizando-se borohidreto de sódio (Esquema 18), normalmente uma redução de baixa estereoseletividade. Obteve-se um único álcool como produto, cuja análise por cromatografia gasosa quiral, mostrou um tempo de retenção diferente do álcool **(91)** (Figura 110).



(94) **(92)**

Esquema 18

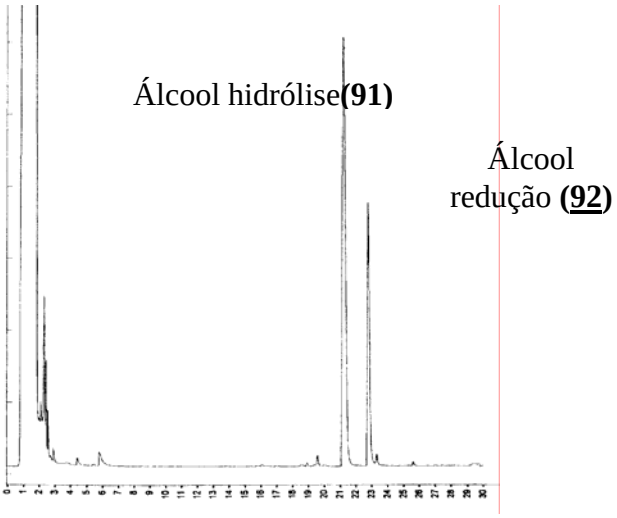


Figura 110. Cromatograma da injeção do álcool obtido pela hidrólise do produto natural **(91)** com o álcool obtido da redução com $NaBH_4$ **(92).** Condições: 2,6-Me-2,3-Pe-β-CD, 50-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

Análises dos espectros de RMN (Tabela 37) mostraram a estrutura de um álcool semelhante ao álcool **(91)**. A análise de sua estereoquímica através do método de Horeau mostrou como resultado, um excesso de ácido (*S)*-2-fenilbutírico, ao contrário do

observado para o álcool **(91)**, cujo excesso foi do álcool (*R*)-2-fenilbutirico. Aplicando-se a regra de Horeau, a estereoquímica do álcool secundário **(92)** foi determinada como sendo *S***.** Portanto, a reação de redução ocorreu com alta enantiosseletividade, com total inversão de configuração do carbono 4.

Este resultado nos leva a sugerir que durante a redução da carbonila diastereotópica com $NaBH_4$, ocorre uma complexação entre o átomo de boro, o oxigênio da carbonila e o oxigênio do anel oxirano. Apesar desta possibilidade de complexação, o produto obtido é anti-Cram. Portanto, a redução deve ocorrer através de um modelo cíclico tipo Felkin-Anh.[130] Os modelos A e B da Figura 111 referem-se às duas aproximações do hidreto às faces da carbonila. O produto obtido se formou através de um estado de transição conforme o modelo A, possivelmente formando uma complexação do boro com os dois oxigênios, e o hidreto atacando a carbonila anti ao grupo mais volumoso.

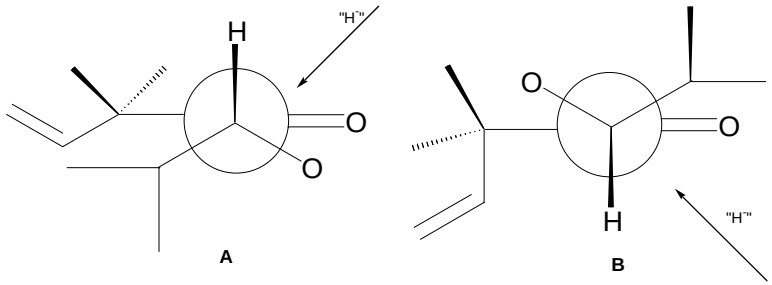


Figura 111. Formas de entrada do hidreto, durante redução de (**94)** com $NaBH_4$, baseado no modelo de Felkin- Anh.

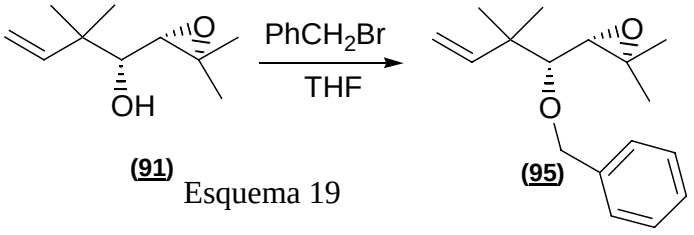
Tabela 37. Dados de ressonância magnética do álcool **(92)** .

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J* (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,25 (s)	-	24,6
1’	1,20 (s)	-	24,0
2	-	-	57,4

3	2,73 (d)	8,4	62,7
4	3,14 (d)	8,4	76,9
5	-	-	41,7
5’	1,11 (s)	-	19,1
5”	1,13 (s)	-	21,6
6	5,92 (dd)	17,6	144,3
7	5,15 (dd)	17,6	114,5

3.2.2.5. *3-[2,2-dimetil-1-2-(feniletoxi) –3- butenil-2,2-dimetiloxirano (95)*

Com o objetivo de avaliar substituintes com sistemas aromáticos, transformou-se o álcool **(91)** em um éter benzílico. Para isso, o álcool foi submetido a uma reação de alquilação com brometo de benzila em tetrahidrofurano (Esquema 19), resultando no 3-(1-Benziloxi-2,2-dimetil-but-3-enil)-2,2-dimetil-oxirano **(95).**



(91) Esquema 19 **(95)**

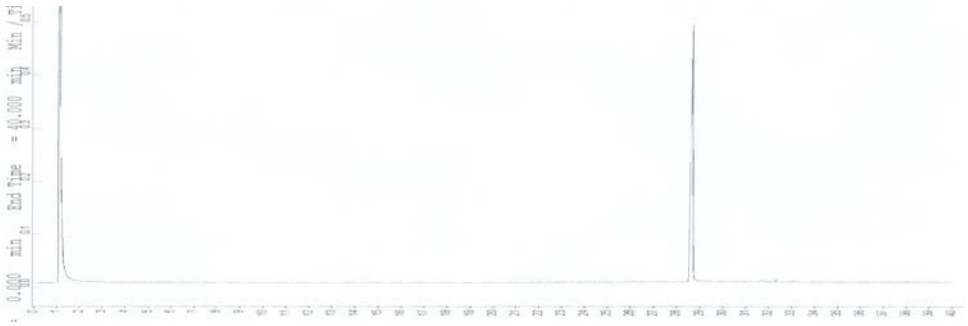


Figura 112. Cromatograma CG-FID do produto da reação de alquilação do álcool **(91)**. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Figuras 113-115) confirmaram o sucesso da reação. Ambos espectros mostraram, além dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e

carbonos característicos da estrutura da principal, a inclusão do sistema benzílico no novo derivado.

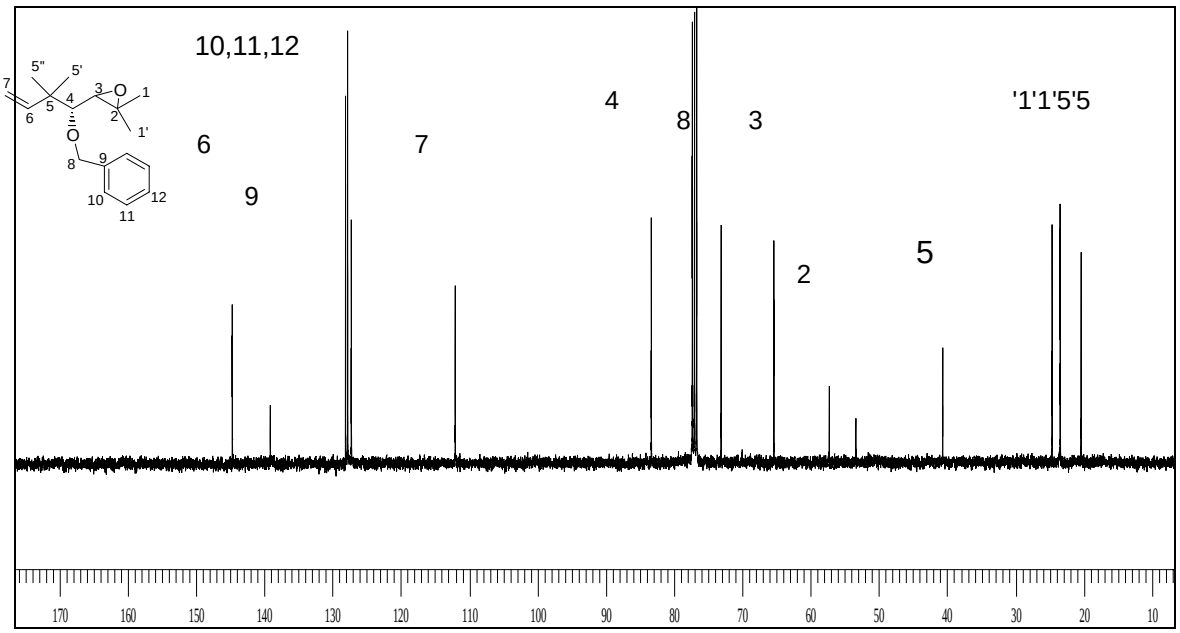


Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C de **(95)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

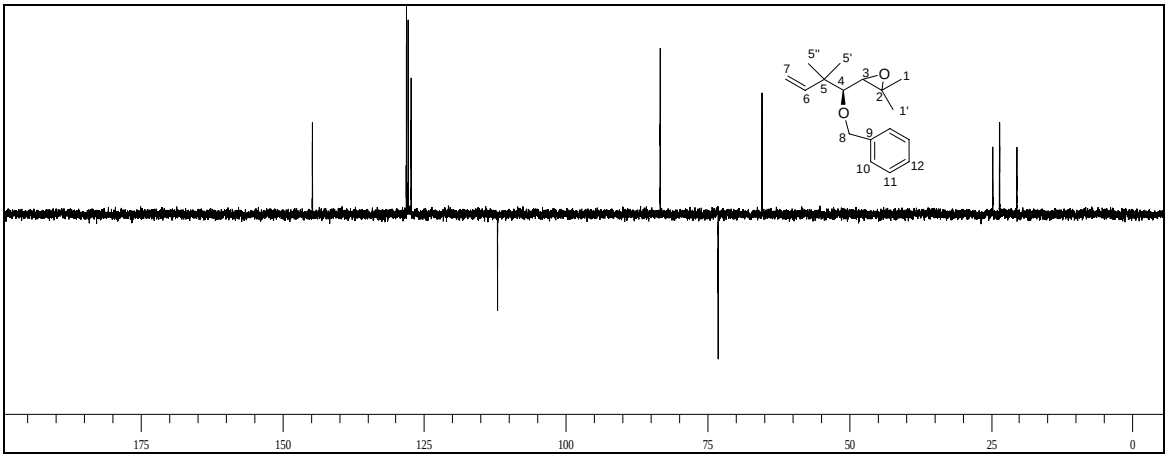


Figura 114. Espetro de RMN DEPT 135 de **(95)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

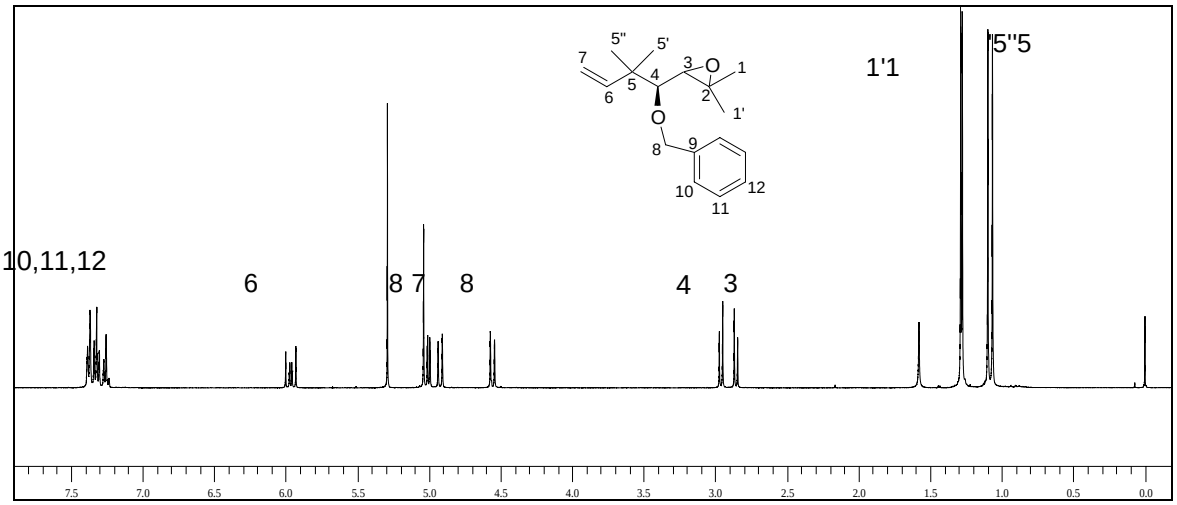


Figura 115. Espectro de RMN de ^1H de **(95),** em $CDCl_3$, a 400 MHz.

Tabela 38. Deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C de **(95)**.

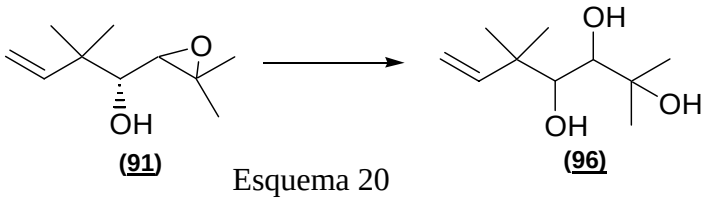
Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J*(Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,27	-	23,47
1’	1,30	-	24,65
2		-	57,24
3	2,86	9,4	65,38
4	2,97	9,4	83,32
5		-	40,66
5’	1,06	-	20,4
5”	1,11	-	23,44
6	5,97	11,6	144,69
7	5,0	11,6	112,04
8	5,03	8,4	73,11
9	-		139,12
10	-		127,8
11	-		128,1
12	-		127,26

3.2.2.6. ***2,5,5-trimetil-6-hepteno-2,3,4-triol (96).***

Uma outra função submetida à transformação nas estruturas derivadas de **(90)** foi o epóxido. A abertura do mesmo teve a finalidade, não só de determinação da configuração absoluta de C-3, mas também de se observar a importância desta função na atividade da estrutura natural.

Inicialmente submeteu-se a estrutura **(91)** à abertura do epóxido em meio ácido (HCl 2N), para obtenção do derivado trihidroxilado **(96).** Esta substância após purificação em CCD preparativa (Figura 116), foi caracterizada por RMN de ^{1}H, ^{13}C (Figuras 117,119)

e espectrometria de massas (Figura 120). O método mais conclusivo foi a RMN de ^{13}C, cuja análise mostra três sinais de carbonos ligados a oxigênios, a δ 58,5, δ 73,9, δ 74,3 ppm, sendo que o sinal a δ 58,5 ppm, desaparece co espectro de DEPT 135° (Figura 118), caracterizando a hidroxila ligada a um carbono desidrogenado.



(91) **(96)**

Esquema 20

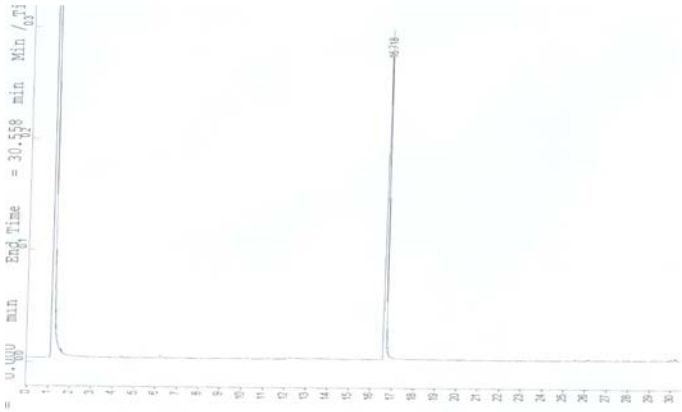


Figura 116. Cromatograma CG-FID do produto da reação de abertuta de epóxido com HCl 2N, após isolamento. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

.

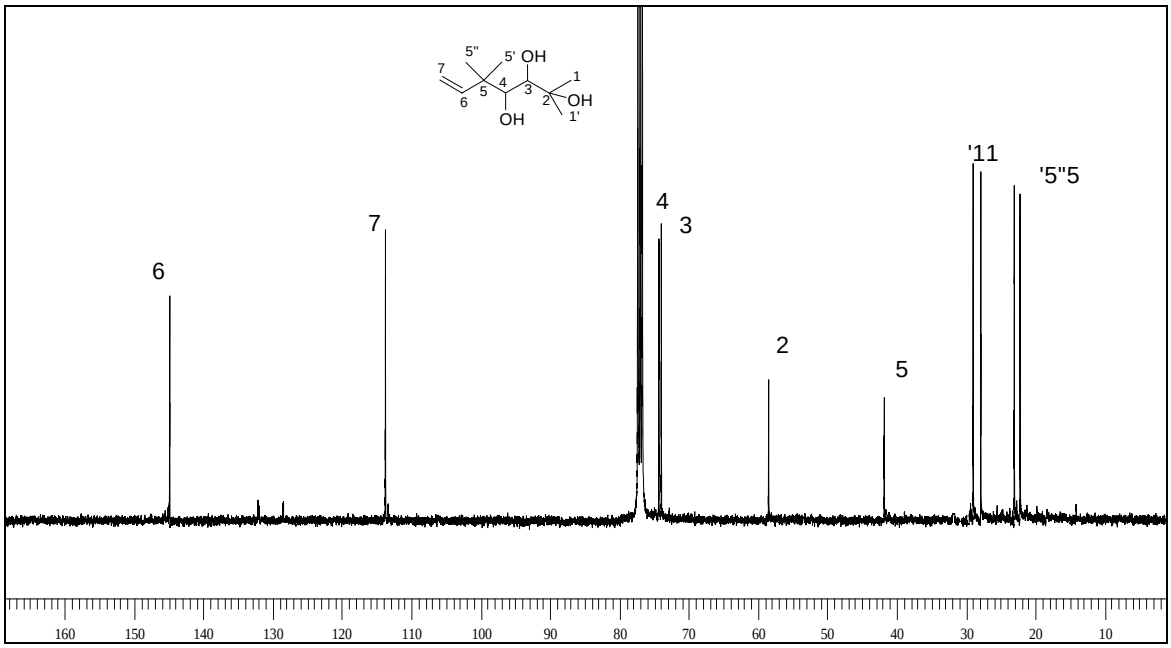


Figura 117. Espectro de ^{13}C a 400MHz do triol **(96)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

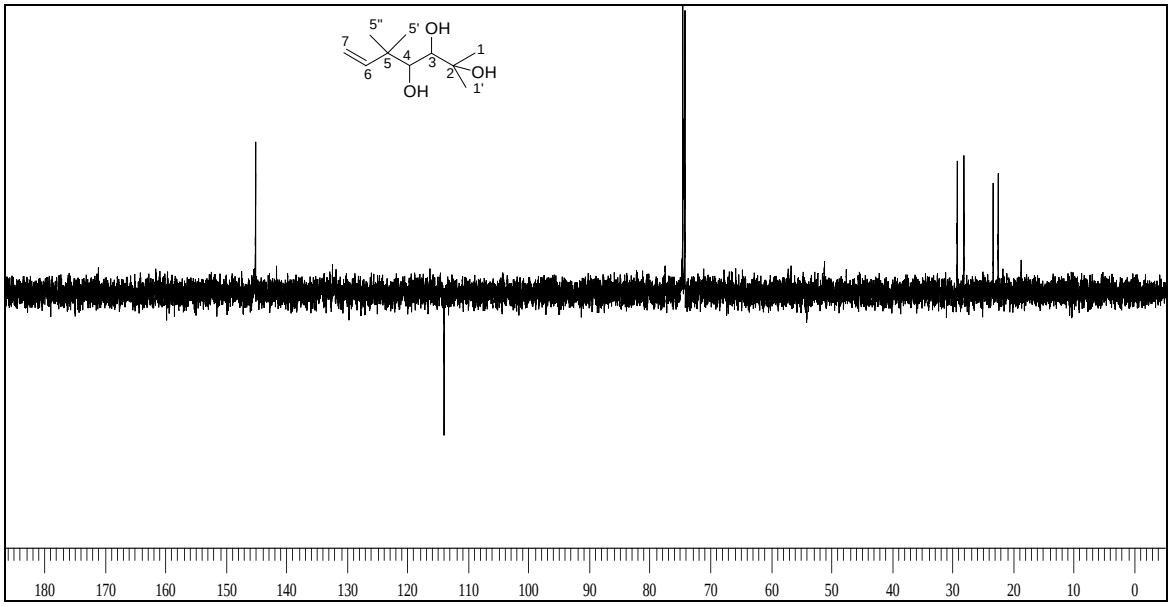


Figura 118. Espectro de DEPT 135 do triol **(96),** em $CDCl_3$, a 100 MHz.

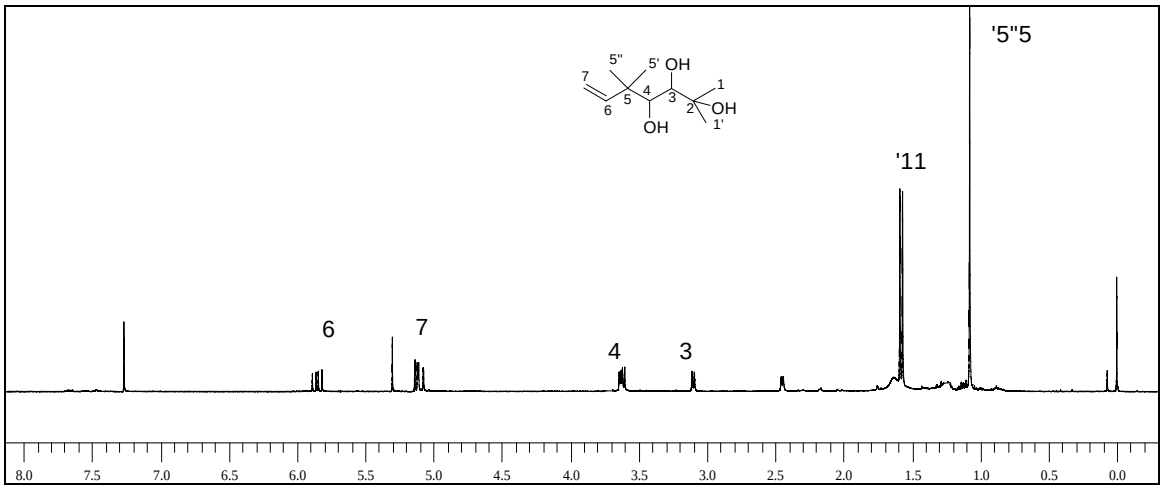


Figura 119. Espectro de RMN de ^1H a 400Mhz do triol **(96),** em $CDCl_3$, a 400 MHz.

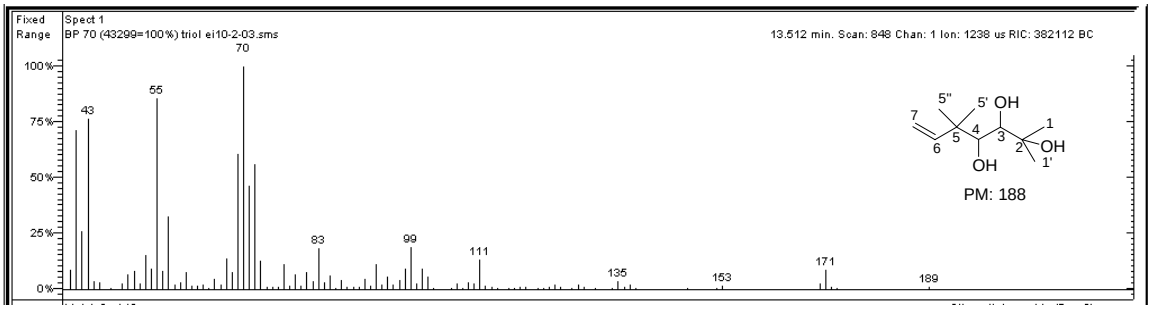


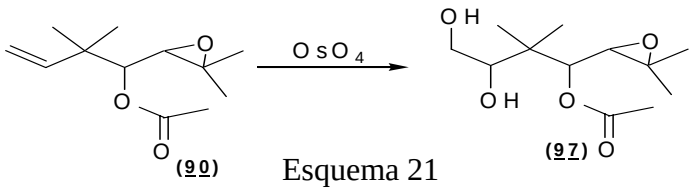
Figura 120. Espectro de massas do triol **(96)**.

Tabela 39. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para a o triol **(96)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J*(Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,56	-	27,8
1’	1,58	-	28,9
2	-	-	58,5
3	3,09	7,2	73,9
4	3,69	7,2	74,3
5	-	-	41,8
5’	1,22	-	22,2
5”	1,26	-	23,0
6	5,90	11,6	144,8
7	5,07 / 5,13	11,6	113,7

3.2.2.7. *4-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-6,7-dihidroxi-5,5-dimetilheptan-2-one (97)*

Com o objetivo de se obter um derivado totalmente oxigenado (Esquema 21), a dupla ligação da estrutura **(90)** foi submetida a adição com tetróxido de ósmio, abtendo-se o derivado **(97)**, que foi isolado da reação, conforme mostra o cromatograma (Figura 121).



Esquema 21

Figura 121. Cromatograma da mistura isomérica de **(97)** após isolamento. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 122 e 123) deste derivado mostram a ausência dos sinais dos carbonos metínicos e metilênicos da dupla ligação, comprovando a reação. Pode-se observar neste espectro, pela duplicação de sinais que a reação ocorreu com baixa estereosseletividade, com a formação de dois estereoisômeros. Portanto as duas faces da dupla ligação foram dihidroxiladas, com excesso diastereoisomérico de uma das faces.

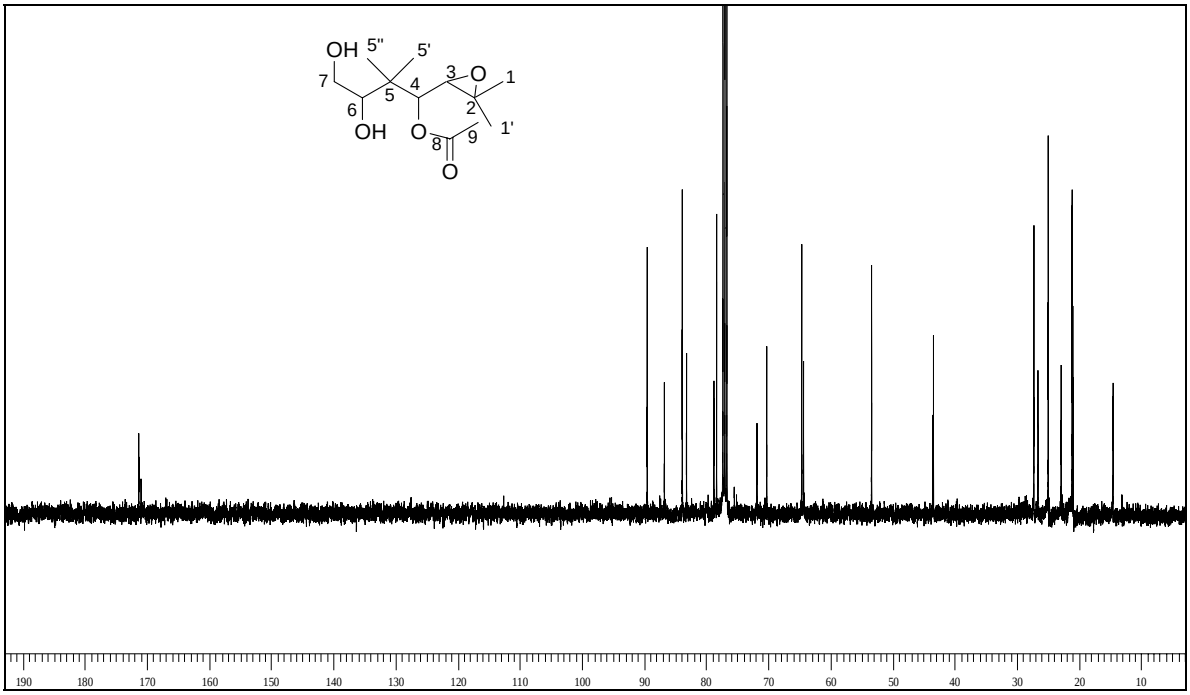


Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C de **(97)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

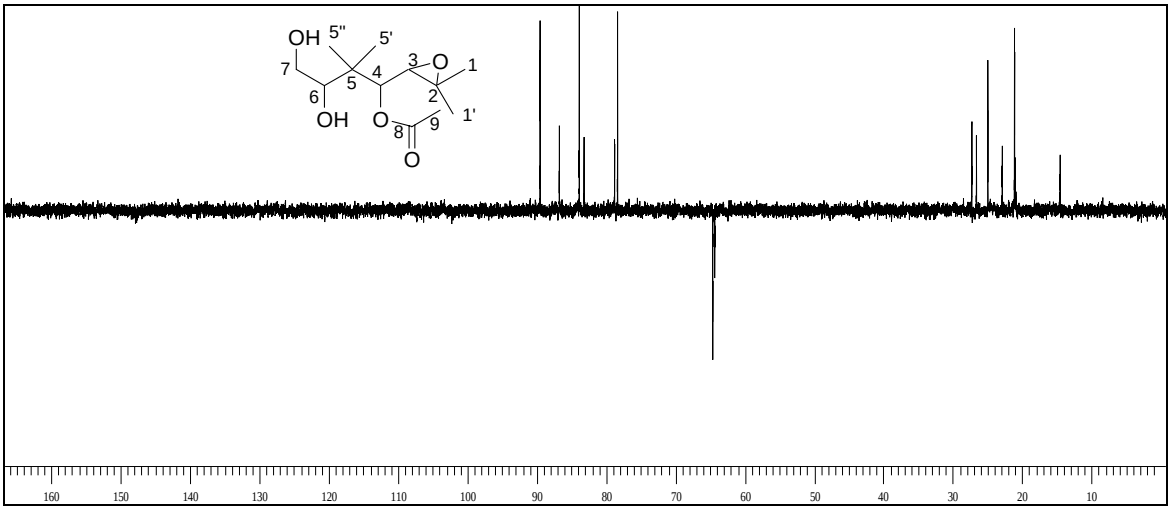


Figura 123. Espectro de RMN de DEPT 135° de **(97)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

No espectro de hidrogênio (Figura 124) pode-se observar a ausência dos hidrogênios da insaturação inicial.

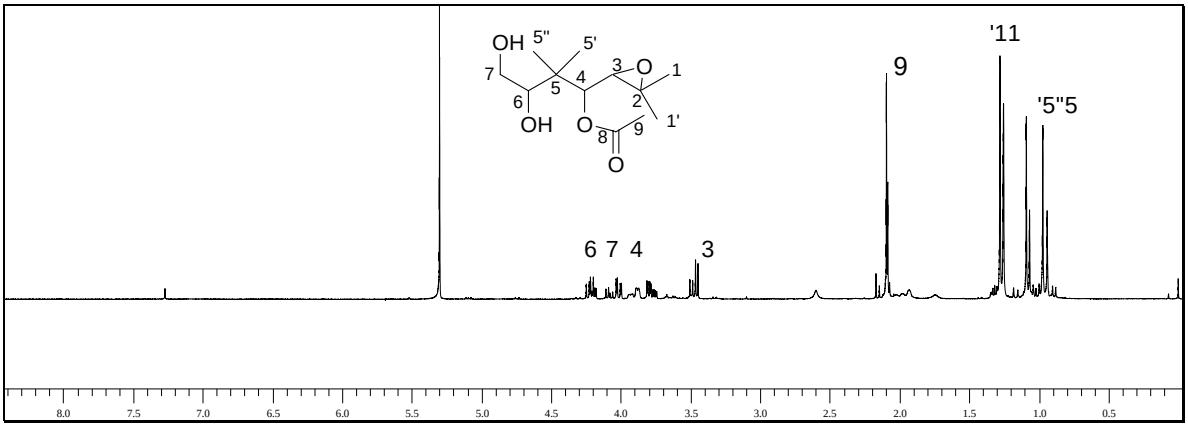


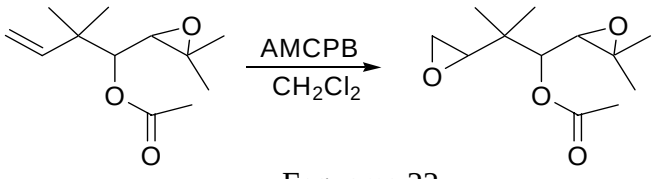
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H de **(97)** em $CDCl_3$, a 400 MHz.

Tabela 40. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos dióis **(97)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J* (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,09	-	26,6 / 27,3
1’	1,06	-	24,9
2		-	71,8 / 70,2
3	3,46 / 3,76	3,2	78,3 / 78,8
4	4,18 / 4,24	3,2	89,5 / 86,7
5	-	-	43,5 / 43,4
5’	0,97	-	14,5 / 20,9
5”	0,94	-	20,9 / 21,0
6	4,08 / 4,03	7,2	83,8 / 83,1
7	3,88 / 3,80	7,2	64,6 / 64,3
8	-	-	171,3 / 170,9
9	2,14 / 2,12	-	22,8 / 21,2

3.2.2.8. *1-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-2-metil-2-oxiran-2-ilpropil acetato (98)*.

Uma outra transformação estrutural da função olefina foi obtida através do tratamento de **(90)** com AMCPB (Esquema 22), o que originou o diepóxido da estrutura natural. Para esta epoxidação da dupla ligação submeteu-se **(90)** a reação com ácido metacloro perbenzóico em CH_2Cl_2. Esta transformação teve como objetivo observar a influência de grupos epóxidos na atividade da estrutura.



(90) Esquema 22. **(98)**

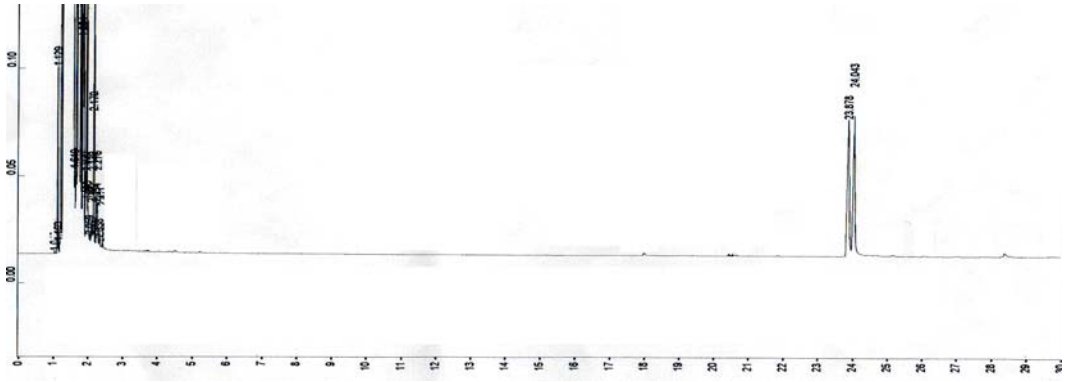


Figura 125. Cromatograma da mistura isomérica de **(98)**, após isolamento. Condições: SE-54, 50-250°C, 4°C/min, 7 psi H_2.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 126 e 127) mostra que a reação de epoxidação com AMCPB ocorreu com ausência de diastereosseletividade, com a formação de uma mistura de dois diastereoisômeros como pode ser observado através da duplicação da função carbonila a δ 169,6 e a δ170,3 ppm.

O espectro de hidrogênios (Figura 128) deste derivado mostra, além de duplicação de sinais dos dois diastereoisômeros formados, a ausência dos sinais dos hidrogênios da insaturação da estrutura de partida.

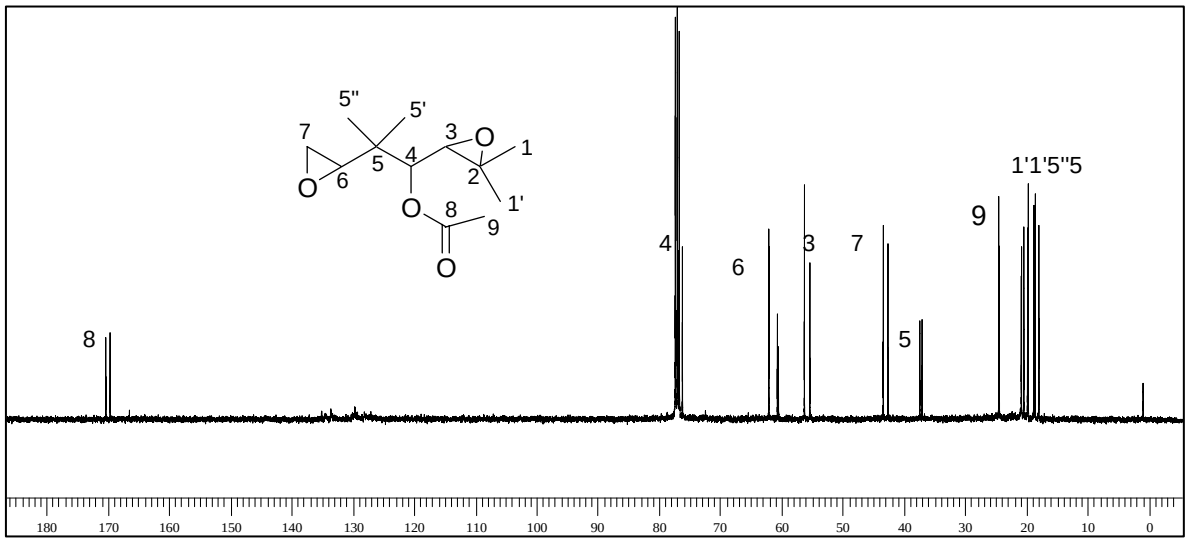


Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C de **(98),** em $CDCl_3$, a 100 MHz.

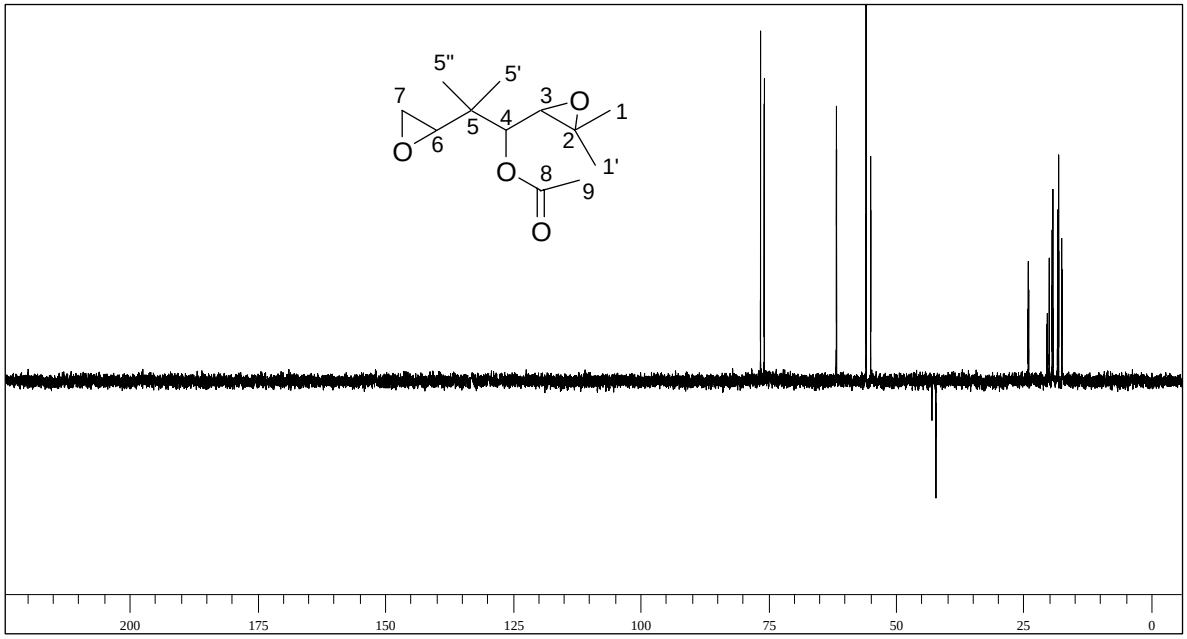


Figura 127. Espectro de RMN de DEPT 135 de **(98)**, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

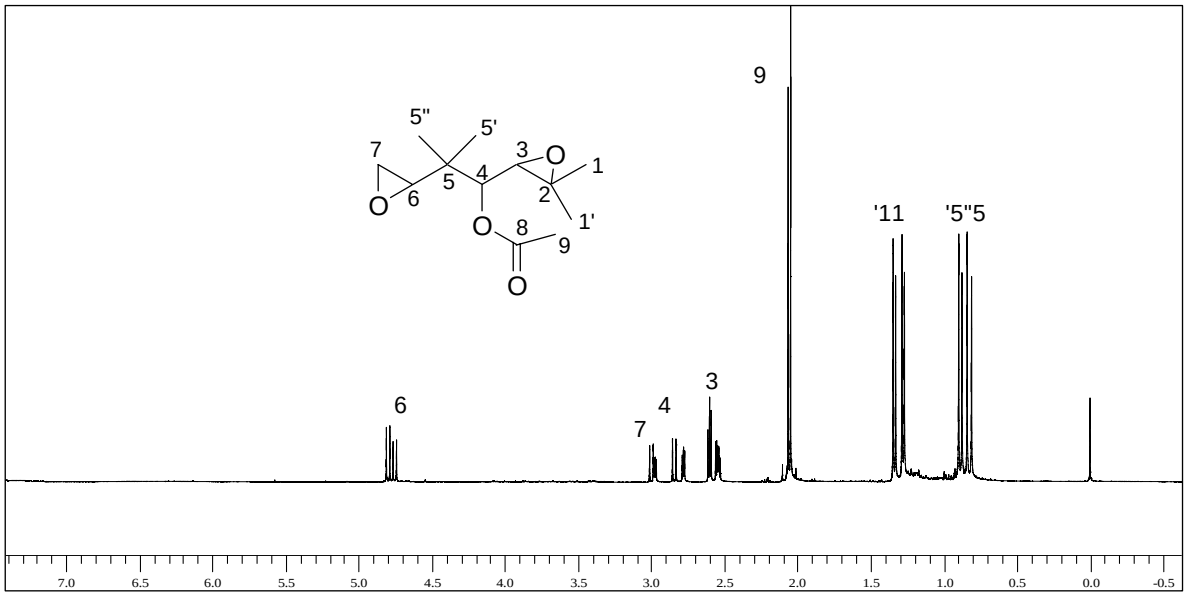


Figura 128. Espectro de RMN de ^1H de **(98),** em $CDCl_3$, a 100 MHz.

Tabela 41. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C em $CDCl_3$ para a mistura diastereoisomérica dos epóxidos **(98)**.

Posição	δ ^{1}H (ppm)	*J*(Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	1,27 / 1,29	-	17,9 / 18,5
1’	1,33 / 1,35	-	19,8 / 20,4
2	-	-	60,5 / 60,6
3	3,0 / 2,98	9,6	55,4 / 56,2
4	4,79 / 4,76	9,6	76,4 / 75,7
5	-	-	37,0 / 37,4
5’	0,81 / 0,84	-	18,5 / 19,6
5”	0,87 / 0,89	-	20,7 / 20,8
6	2,83 / 2,85	9,6	62,0 / 62,05
7	2,6 / 2,55	9,6	42,6 / 43,4
8	-	-	169,6 / 170,3
9	2,05 / 2,07	-	25,5 / 24,4

3.2.3. Atividade biológica

Após a obtenção dos derivados e confirmação de suas estruturas, os mesmos foram submetidos a uma série de testes antimicrobianos, com a finalidade de se estudar uma relação estrutura – atividade frente a fungos e bactérias. O método escolhido foi bioautografia, e os resultados podem ser observados nas tabelas 42 e 43.

Tabela 42. Quantidade de substância (μg) necessária para a inibição do crescimento bacteriano do caleol, por bioautografia.

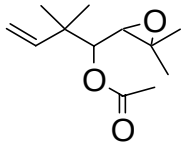
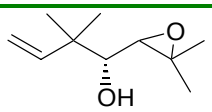
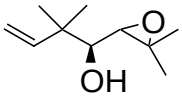
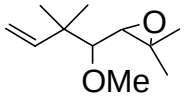
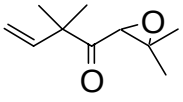
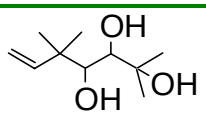
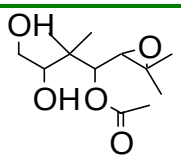
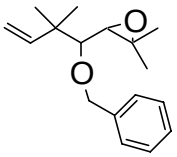
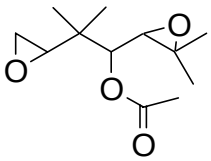
microorganismos		Padrão
S. aureus	50	0,7
S. epidermidis	100	0,7
K.pneumoniae	25	0,4
E.coli	6,25	0,6
S. setubal	-	0,6
P. aeruginosa	-	0,6
B. subtilis	-	0,5

Tabela 43. Quantidade de substância (μg) necessária para a inibição do crescimento bacteriano dos derivados do caleol, por bioautografia.

microorganismos				
4.6 S. aureus	25 μg	25 μg	-	-
S. epidermidis	25 μg	25 μg	-	3,125 μg
K.pneumoniae	-	-	12,5 μg	50,0 μg
E.coli	25 μg	25 μg	-	-

S. setubal	-	-	25 μg	-
P. aeruginosa	-	-	-	3,125 μg
B. subtilis	25 μg	25 μg	50 μg	25 μg

Continuação tabela

microorganismos				
S. aureus	-	-	-	25
S. epidermidis	-	-	-	3,125
K.pneumoniae	-	-	-	50
E.coli	100	50	100	50
S. setubal	-	-	-	25
P. aeruginosa	-	-	-	3,125
B. subtilis	-	-	-	100

Com os resultados obtidos, pode-se observar que as variações na molécula natural, obtida do óleo essencial de *Calea clematidea*, provocou mudanças na atividade antibacteriana, como esperávamos. Algumas considerações sobre estrutura–atividade dos derivados podem ser feitas a partir destes experimentos como:

- O álcool obtido por hidrólise de **(90)** foi mais ativo para *S. aureos* e *S. epidermidis*, mas foi inativo contra *K. pneumoniae* e menos ativo que **(90)** contra *E. coli*. Por outro lado, o álcool foi ativo contra B. subtilis enquanto **(90)** foi inativo.
- Os dois álcoois diastereoisoméricos **(91)** e **(92)** mostraram a mesma atividade, contra os mesmos microorganismos, mostrando que neste caso, a estereoquímica não influencia na atividade.

- O produto de metilação do álcool **(91)** provocou aumento na atividade contra *K. pneumoniae* e *S. Setúbal*, já para as demais bactérias foi menos ativo.
- A cetona **(94)** apresentou uma boa atividade contra as bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, na concentração de 3,125μg, porém foi fracamente ativa para as demais bactérias.
- Os derivados **(95), (96)**, **(97)** foram os menos ativos, apresentando apenas fracos efeitos antibacterianos somente contra *E.coli.* A oxigenação não teve o efeito esperado.
- O derivado obtido pela reação de epoxidação do produto natural **(98)**, foi o que melhor respondeu os testes antibacterianos, apresentando atividade contra todos os microorganismos testados. Destas atividades, cabe ressaltar o efeito deste derivado contra as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* onde a quantidade de substância necessária a inibição do crescimento bacteriano é 3,125μg, comparado ao derivado cetônico.
- As únicas substâncias que apresentaram atividades contra bactéria P. aeruginosa foram a cetona 7 e o diepóxido 11, ambos nas quantidades mínimas de 3,125 μg.

3.3. ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS EM ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE PRÓPOLIS COLETADOS EM TRÊS REGIÕES DO RIO GRANDE DO SUL.

Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, administrada sob diversas formas. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 A.C.; "cera negra") era utilizado como um dos materiais para embalsamar os mortos. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite.

Vários trabalhos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis como, por exemplo, as antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante e antiviral.[131] Hoje a própolis vem sendo largamente empregada na medicina popular, em cosméticos e dermocosméticos.[132]

Apresentando coloração e consistência variada, a própolis é formada por ceras e resinas, coletadas por abelhas de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudados resinosos. Sua composição depende da origem do material coletado; isto é, reflete a variedade de vegetação próxima à colméia. No geral, a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e 5% de pólen. Dependendo da origem, pode conter acima de 400 substâncias químicas com funções ainda desconhecidas na fisiologia humana.[133]

Como vimos, os teores de óleos essenciais que podem ser obtidos de própolis são muito superiores aos normalmente obtidos de plantas. Devido a este fato, aliado ao interesse em identificar os componentes voláteis e o teor de óleo, foram coletadas amostras de própolis, produzidas por abelhas da espécie *Apis melifera*, durante o período de agosto/2003 até janeiro/2004. As amostras foram coletadas nos municípios de Jaguari, São Francisco de Assis e Santiago, no Rio Grande do Sul, região que se destaca pela produção de fitoterápicos, usando como matéria prima a própolis. As respectivas amostras foram

submetidas a hidrodestilação, da mesma maneira como foram obtidos os óleos essenciais de plantas. Após extraídos e secados, estes óleos foram submetidos a análises cromatográficas.

O isolamento dos óleos essenciais das diferentes própolis coletadas, forneceram rendimentos máximos de 3,8%. As análises destes óleos mostrou um perfil cromatográfico muito semelhante entre os óleos, não apresentando variações nas diferentes épocas de coleta. A análise em CG mostrou um elevado teor de monoterpenos, responsáveis por quase 80% da composição total dos óleos. Os monoterpenos mais abundantes foram identificados como sendo os hidrocarbonetos α-pineno e β-pineno.

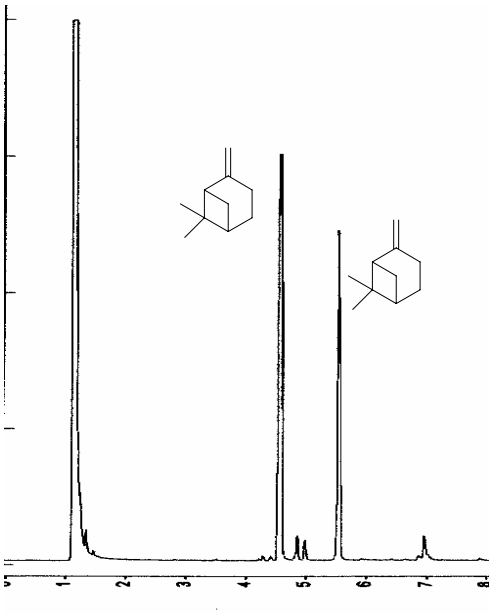
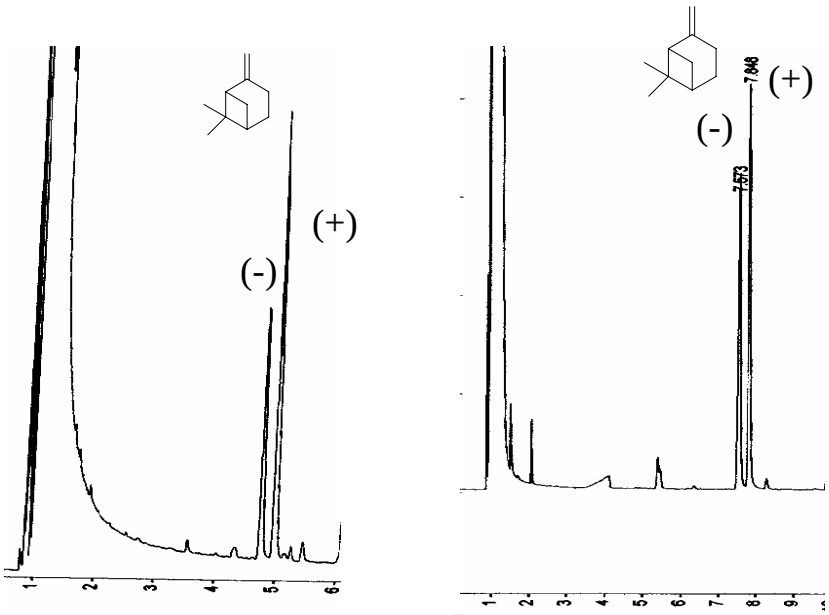


Figura 129. Cromatograma na fase aquiral SE-54 do óleo obtido de própolis. Condições: SE-54 50-250 4°C/min; 7 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

Com estes resultados, decidiu-se investigar a composição enantiomerica destes constituintes. Para isto fez-se uso da cromatografia gasosa quiral, utilizando-se 6-Me-2,3-Pe-β-CD e Lipodex-E como fases estacionárias. Apartir destas analises, pode-se observar as diferentes composições enantiomericas dos terpenos nos óleos analisados. A análise quiral mostrou excessos enantioméricos de (-)-α-pineno nas amostras de óleos de própolis de Jaguari, enquanto o enantiômero de (+)-α-pineno foi o principal componente encontrado nos óleos voláteis obtidos do material coletado em São Francisco de Assis e de Santiago.

Quanto ao teor de β-pineno, foi encontrado somente a presença do enantiômero (-), em todas as amostras estudadas conforme mostram os cromatogramas.



A **B**

Figura 130. Separação enantiomerica dos padrões de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD (A) e (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E(B). Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

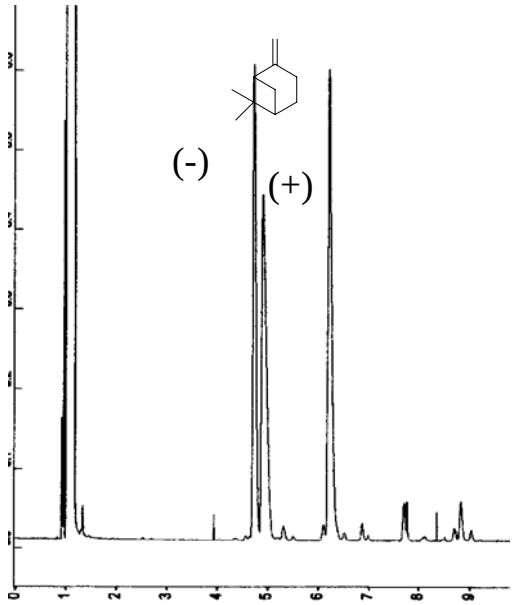


Figura 131. Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de Jaguari.Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

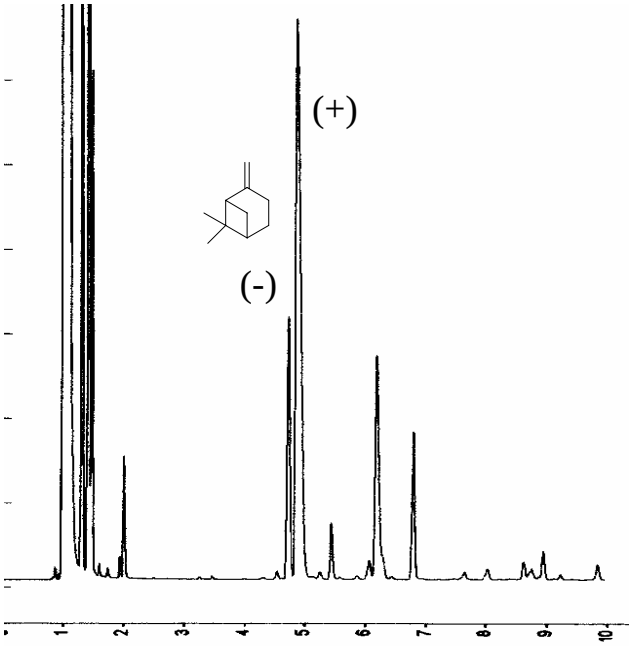


Figura 132. Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de São Francisco de Assis. Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

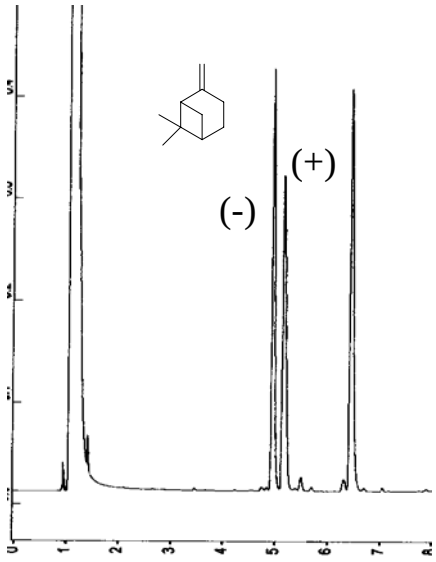


Figura 133. Separação enantiomerica de (+/-)-α-pineno na fase 6-Me-2,3-Pe-CD, no óleo de própolis oriundo da localidade de Santiago-RS. Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

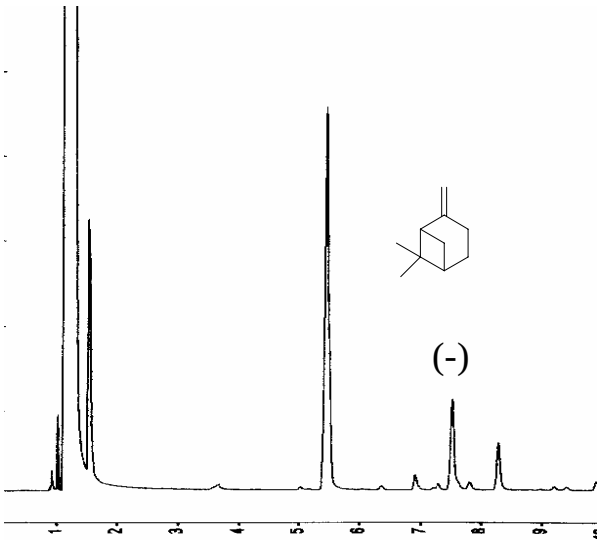


Figura 134. Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de Jaguari. Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

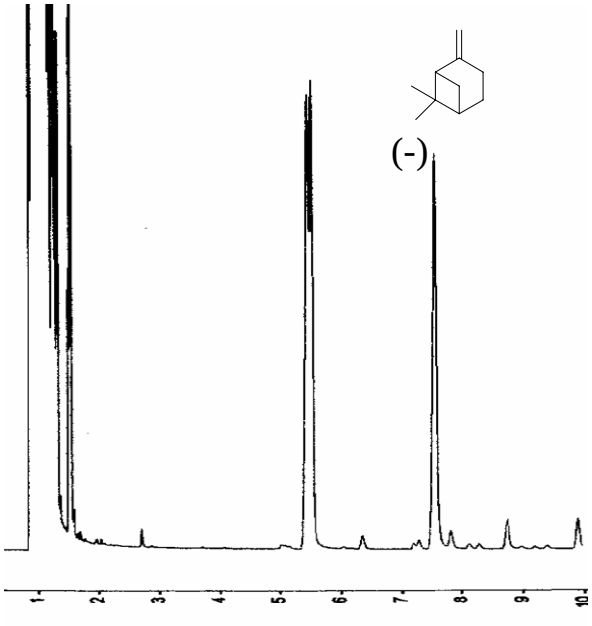


Figura 135. Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de São Francisco de Assis-RS. Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

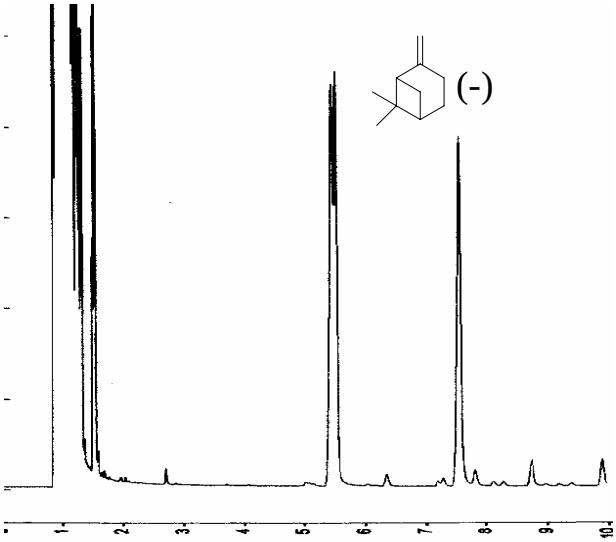


Figura 136. Separação enantiomerica de (+/-)-β-pineno na fase Lipodex-E, no óleo de própolis oriundo da localidade de Santiago-RS. Condições: 40-180, 1°C/min; 6 psi H_2; T_{inj}: 220°C; T_{det}: 280°C.

Com estes resultados, pode-se observar que para os enantiomeros do terpeno α–pineno, não existe um parâmetro de seleção, pois são encontrados excessos enantioméricos dos dois isômeros deste componente. Entretanto a analise do β–pineno demonstrou somente a presença do enantiomero (-). A partir destes dados pode-se supor que as abelhas apresentam um sistema de seleção para estes enantiomeros, uma vez que estes compostos são amplamente encontrados na natureza, nas duas formas enantioméricas.

3.4. EMPREGO E ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE NOVAS FASES ESTÁCIONÁRIAS QUIRAIS CONFECCIONADAS PELO GRUPO NA ANÁLISE DA ESTEREOQUÍMICA DE COMPONENTES DE ÓLEOS VOLÁTEIS.

Separações quirais usando CG podem ser realizadas de forma direta ou indireta. A forma indireta envolve a derivatização de um composto com um auxiliar quiral, resultando em diastereoisomeros que são subseqüentemente separados, utilizando-se uma fase estacionaria aquiral. O método direto utiliza uma fase estacionaria quiral como seletor, a qual forma um complexo com o composto quiral analisado, resultando em um par de diastereoisomeros transientes, fazendo com que os enantiomeros de uma mistura enantiomerica sejam eluídos com distintos tempos de retenção, proporcionando a separação quiral.

A principal aplicação da separação de enantiômeros através da cromatografia gasosa está relacionada com a determinação precisa da composição enantiomérica de substâncias químicas quirais, tais como: intermediários de reações, auxiliares quirais, metabólitos, precursores, drogas, pesticidas, fungicidas, herbicidas, feromônios, aromas, fragrâncias, etc. Nessas áreas, o desenvolvimento de métodos seguros para a determinação do excesso enantiomérico (ee) até 99,9% é de grande importância, adequando novas tecnologias às legislações que tratam sobre compostos quirais.

O uso de fases estácionarias quirais em CG teve seu uso acentuado através do trabalho de Gil-Av et al. em 1966,[134] até então os trabalhos desenvolvidos nesta área eram mencionados como “frustração”, ninguém acreditava no sucesso destes estudos. Ainda em 1967 Gil-Av,[135] com o seu trabalho pioneiro, mostrou o uso de uma coluna empacotada para a separação semi-preparativa de enantiomeros de aminoácidos utilizando CG.

No inicio destes trabalhos, poucos compostos quirais foram separados enantiomericamente em fases estacionárias quirais, principalmente aminoácidos. Atualmente, com o desenvolvimento de tecnologias nesta área, existem aproximadamente 24000 separações enantioméricas envolvendo 8000 compostos, documentados em 2400 publicações, efetuadas em cromatografia gasosa, de acordo com a banco de dados do Chirbase[137]. Uma enorme extrapolação e popularidade é observado no uso de CG capilar

quiral em laboratórios de pesquisas europeus, e no ambiente industrial,[137] comprovando que este método, pode de fato, ser empregado como técnica analítica de análise quiral. Entre as vantagens do emprego da CG-quiral são citadas como principais: a alta eficiência e velocidade das análises; detecção direta; alta sensibilidade; uso de programas de temperatura como auxiliar nas análises; possibilidade de hifenação com demais técnicas (ex.: com EM, uso múltiplo de colunas). O uso universal de fases quirais é restringido por fatores como volatilidade, estabilidade térmica, integridade estereoquimica e sensibilidade do seletor quiral a altas temperaturas. Quando enantiômeros são analisados em matrizes não complexas, pode-se utilizar colunas pequenas, utilizando temperaturas brandas, resultando em análises com reduzido tempo de eluição, desta forma seu campo de aplicação pode ser ampliado para compostos menos voláteis.[138]

O desevolvimento de novas fases estacionárias pode ser visto como uma pesquisa que visa, melhorar as propriedades conferidas por estas fases estacionárias quando utilizadas em cromatografia gasosa. Desta forma o desenvolvimento destas linhas de pesquisa tem como objetivos (i) produzir fases mais estáveis térmica e quimicamente (ii) proporcionar grande seletividade na separação dos componentes em diferentes fases (ex.: pelo desenvolvimento de fases com diferentes polaridades) (iii) obter maior eficiência através da confecção de superfícies mais regulares e colunas com estreito diâmetro interno, (iv) incorporar componentes específicos a fase, proporcionando novas interações como as observadas com seletores quirais, (v) usar diferentes tecnologias a fim de optimisar a fase disponível a diferentes analises as quais requerem melhor resolução, como por exemplo o acoplamento de diferentes fases durante as análises.

A cromatografia gasosa enantioseletiva usada nas análises de óleos essenciais é uma ferramenta que tem proporcionado a elaboração de vários trabalhos desde sua descoberta e aprimoramento, permitindo a determinação da composição enantiomérica de terpenóides presentes em óleos essenciais. Mas apesar deste desenvolvimento estima-se que de todos os trabalhos envolvendo óleos voláteis, apenas 4% fazem uso desta ferramenta, em suas analises.[139]

As análises quirais de óleos essenciais estão se tornando vitais no ambiente industrial, onde é capaz de fornecer informações quanto a detecção de adulterantes, caracterização do perfil, controle de qualidade e quando acoplada com técnicas bioquímicas

avançadas, tem facilitado a investigação de mecanismos fundamentais associados com a biossíntese de terpenóides.[140]

Separações de misturas racêmicas de compostos voláteis utilizando heptaquis(2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina, como fase estacionária quiral, foram realizadas por Bicchi *et al*[141] com o objetivo de testar a reprodutibilidade e estabilidade da performance das colunas capilares revestidas com esta fase. Em 1992, König[142] desenvolveu novas fases estacionárias derivadas de ciclodextrinas seletivamente substituídas para análise de óleos essenciais. A heptaquis(2,6-di-O-metil-3-O-pentil)-β-ciclodextrina e octaquis(2,6-di-O-metil-3-O-pentl)-γ-ciclodextrina são exemplos destas novas fases, as quais apresentam excelentes resultados na separação dos enantiômeros de álcoois mono- e sesquiterpênicos que se encontram em óleos essenciais. Em outro trabalho, a identificação de (+)-β-cariofileno no óleo essencial de musgos com atividade hepática foi realizada com sucesso por König,[143] usando para tanto a fase estacionária heptaquis(2,6-di-O-metil-3-O-pentil)-β-ciclodextrina em GC enantiosseletiva. Um estudo sobre adulterações em variedades naturais de óleos essenciais, com valor comercial, foi realizado em 1997 pelo grupo de pesquisa de König,[144] com o objetivo de ressaltar o potencial da GC enantiosseletiva no controle de qualidade de óleos essenciais. Utilizando as fases estacionárias quirais derivadas de CDs modificadas em GC enantiosseletiva, foram detectadas adulterações em amostras de óleos essenciais com diferentes procedências, adulterações estas, fruto de variações nos processos de produção. A influência da diluição da fase quiral 2,6-di-O-metil-3-O-pentil-β-ciclodextrina em fases aquirais com diferentes polaridades na análise de misturas de compostos voláteis foi o objetivo de um trabalho desenvolvido por Bicchi.[145] Este grupo observou que a separação enantiomérica é influenciada pela diluição da fase quiral na fase aquiral, sendo que a fase aquiral OV-1701 apresentou os melhores resultados.[146]

3.4.1 *Avaliação de novas fases estacionárias quirais.*

Nesta etapa do trabalho, dando continuidade ao estudo e emprego de colunas quirais na análise de óleos essenciais, realizou-se um estudo sobre a aplicação de novas fases estacionárias quirais deridadas de ciclodextrinas na análise de amostras de óleos essenciais de plantas estudadas pelo grupo e de componentes isolados. Para isto, foram investigadas as propriedades de seleção quiral de quatro novas fases quirais, obtidas pelo NPPN.

- Heptaquis-6-Bn-2,3-Pe-β-CD
- Heptaquis-6-iBc-2,3-Pe-β-CD
- Octaquis-6-iBc-2,3-Pe-γ-CD
- Octaquis-3-iBc-2,6-Pe-γ-CD

A fase 6-Bn-2,3-Pe-β-CD foi obtida por Mallmann[147] durante a realização de sua dissertação de mestrado. Esta fase foi avaliada frente a alguns componentes quirais comuns em óleos essenciais, mostrando seleção quiral para alguns álcoois, como mentol e nerolidol (Figuras 137,138 e 139).

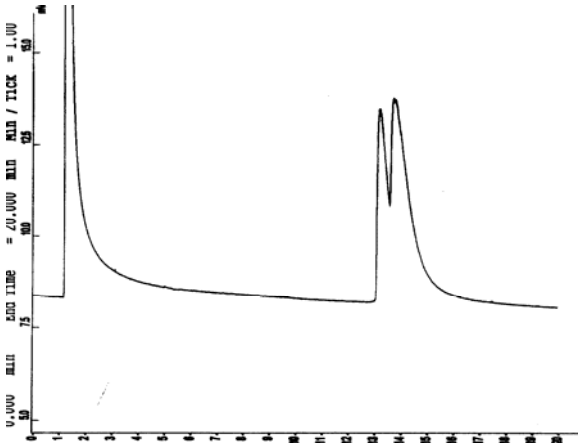


Figura 137. Separação enantiomerica do (+/-)-mentol na fase 6-Bn-2,3-Pe-β-CD. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

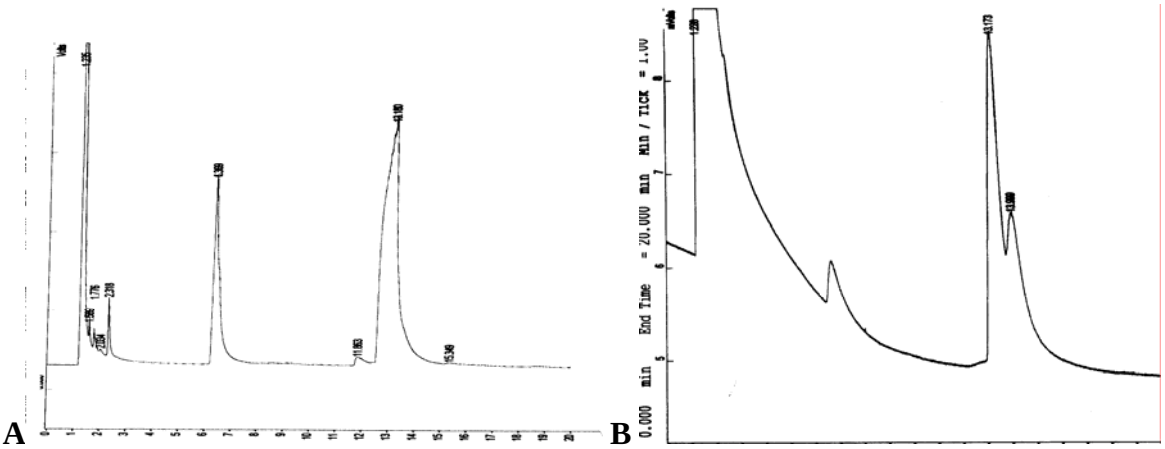


Figura 138. Determinação da configuração do mentol presente no óleo de *Menta arvensis* (A) através da co-injeção do (+/-)-mentol com o óleo (B). Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,35-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.

.

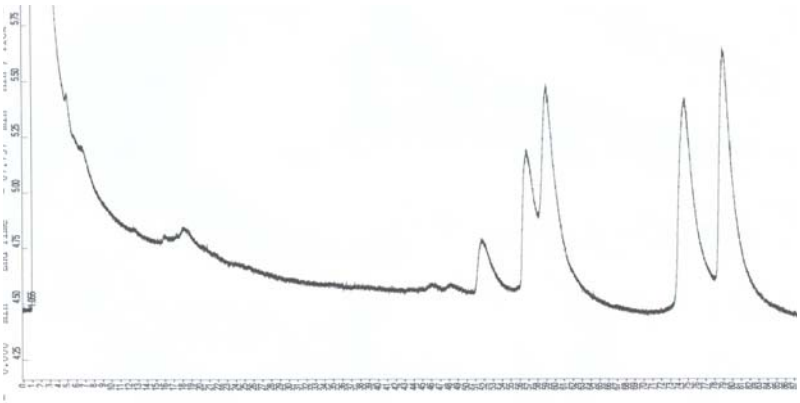


Figura 139. Separação enantiomerica do (+/-)-*cis/trans*-nerolidol. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180°C, 2°C/min, 6 psi H_2.

Apesar desta separação, pode-se considerar uma fase trivial não apropriada para esta finalidade, devido separar enantiomeros apenas de alguns álcoois quirais, e não reconhecer enantiomeros de outra funções orgânicas, como hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas, comuns em óleos essenciais. Na tentativa de se separar uma mistura de epóxidos nesta coluna, obteve-se uma excelente separação aquiral, não reconhecendo a mistura enantiomérica dos dois epóxidos, resultado da reação de epoxidação (Figura 139).

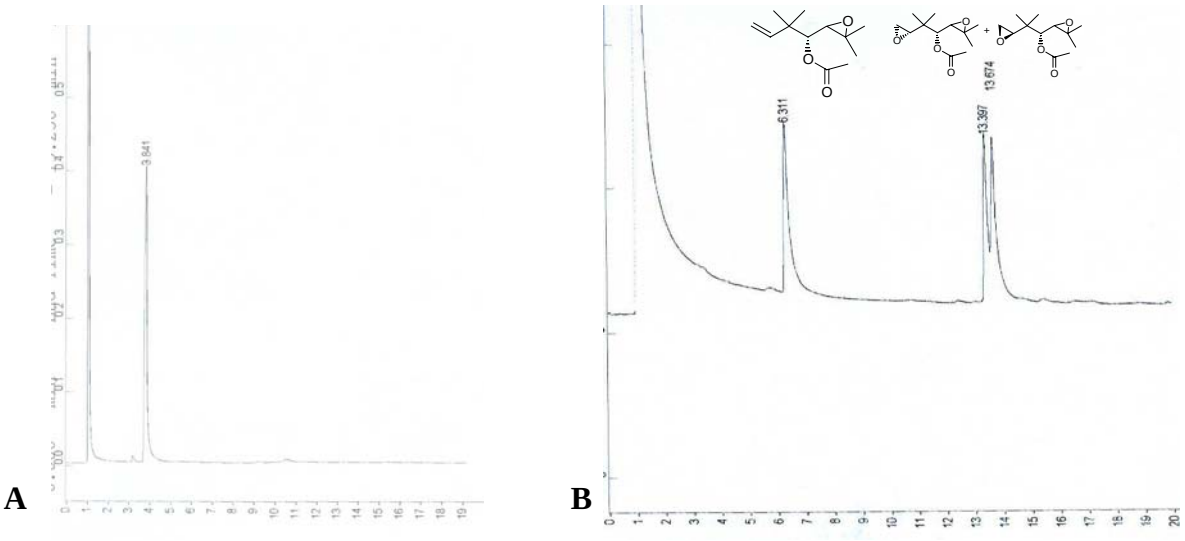


Figura 140. Cromatograma do terpineol (A) e separação diastereoisomérica dos epoxidos (B), na fase 6-Bn-2,3-Pe-β-cd. Condições: 6-Bn-2,3-Pe-β-CD,40-180°C, 3°C/min, 6 psi H_2.

Dando continuidade a esta parte do trabalho, a segunda fase quiral analisada foi a 6-iBc-2,3-Pe-β-CD. Esta fase foi obtida por Ethur,[148] e testada frente a diferentes padrões de constituintes de óleos essenciais e também foi analisado seu emprego na analise de óleos essências obtidos de própolis e das espécies *Zanthoxylum hyemale, Aeolhantus suaoveolens, Ocimun basilicum, Baccharis articulata.* Nestes óleos foram analisados os hidrocarbonetos α–pineno, limoneno e os álcoois mentol e linalol. Desta forma, foi possível a determinação da composição e identificação enantiomérica do alfa-pineno em óleos de própolis. O alfa-pineno também foi investigado por esta fase estacionária nos óleos das folhas, flores e frutos de *Zanthoxylum hyemale*. A utilização no estudo da proporção enantiomérica do linalol em óleos essenciais de espécies *Aeolhantus suaoveolens* e *Ocimun basilicum* foi realizado, sendo possível observar a pureza enantiomérica do *R*-linalol no óleo de *Ocimun basilicum,* enquanto no óleo de *Aeolhantus suaoveolens* encontramos uma proporção enântiomérica de 65%(-) / 35%(+). O óleo de *Baccharis articulada* foi analisado na fase 6-iBc-2,3-Pe-β-cd obtendo a resolução da mistura racêmica do (+) e (-)-alfa pineno, e a composição enantiomérica dos (+) e (-) limonenos.

As condições de temperatura e pressão em cromatografia gasosa quiral, são fundamentais durante as injeções em colunas quirais influenciando no resultado das separações quirais dos compostos analisados. Exemplos destes fatos são as condições de temperatura e pressão necessárias para a separação dos enantiômeros de álcoois quirais, onde se utilizou condições muito brandas durante as análises, quando comparadas com as análises de rotina. As melhores separações destes álcoois foram obtidas com temperatura isotérmica da coluna a 25°C e pressão do gás de arraste a 4 psi. Estas condições mostraram-se fundamentais, para a detecção da seletividade quiral da fase quiral 6-Ibc-2,3-pe- β - CD frente a alguns álcoois.

A concentração da amostra no momento da injeção pode muitas vezes interferir na forma de resolução dos sinais, referentes aos enântiomeros. Amostras com alta concentração proporcionam sinais arredondados, desta forma não podem ser detectados os excessos enantiomericos ou a resolução das misturas racêmicas.

A influência das derivatizações das moléculas de β e γ ciclodextrinas na posição 6 pelo grupamento isobutiril e nas posições 2 e 3 pelo grupamento pentil na separação quiral, foi investigada através da análise das duas fases obtidas por estas derivatizações. Das novas fases obtidas testadas, todas apresentaram seletividade quiral. A 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD apresentou um indicativo de maior aplicação para hidrocarbonetos e álcoois conforme pode-se observar pelas separações obtidas.

Dentre os compostos analisados na fase quiral 6-Ibc-2,3-Pe-γ-CD, obteve-se a resolução do mentol. Observou-se que ocorria inversão na ordem de eluição dos isômeros do mentol dependendo do tamanho do cone da molécula de ciclodextrina que estava derivatizado. Os cromatogramas da Figura 141 demonstram esta inversão através da injeção do padrão com mistura enriquecida do enantiomero (-).

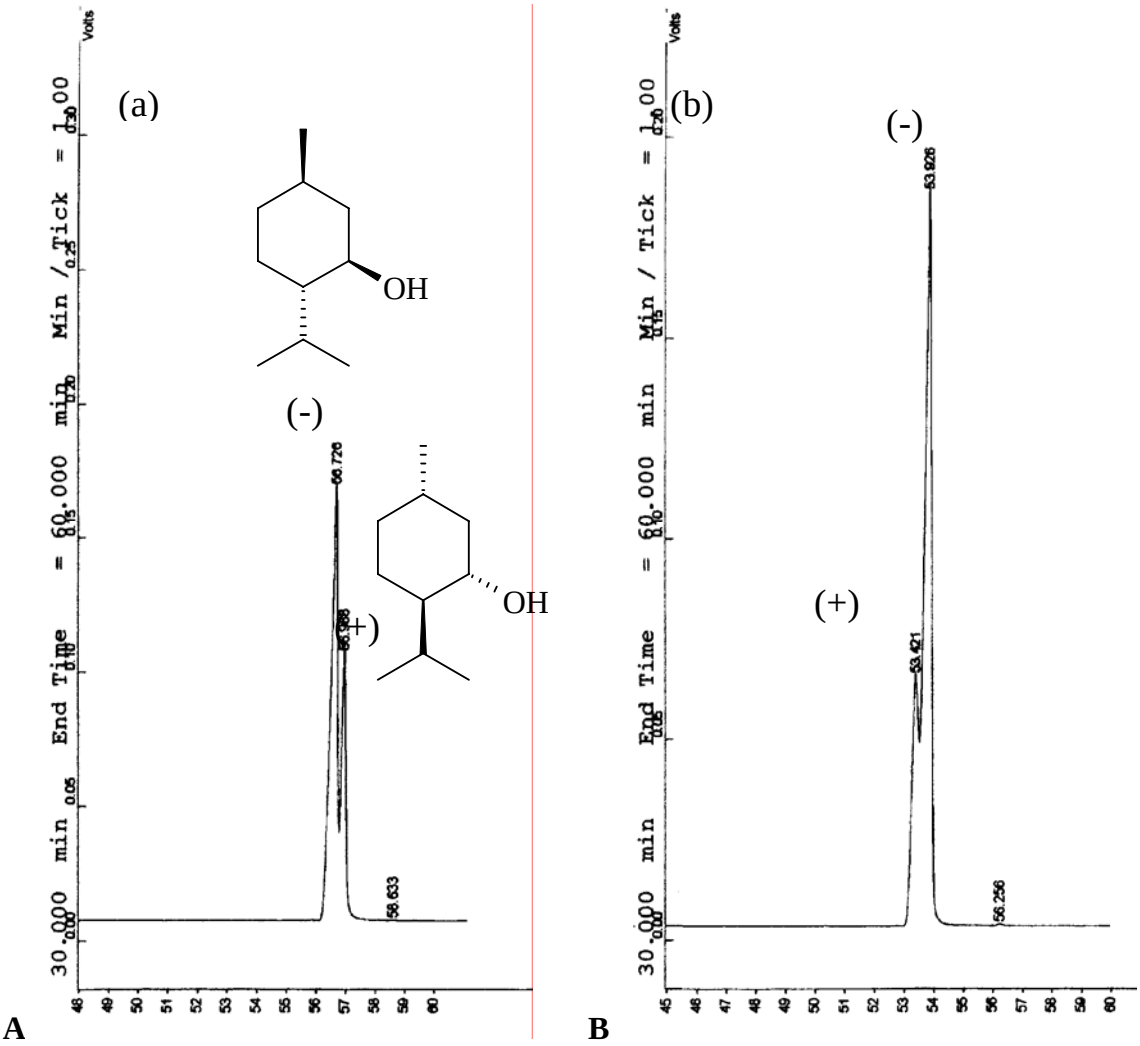


Figura 141: Determinação da ordem dos enantiômeros do (+/-)-mentol, com co-injeção de (-)-mentol, em: (A) 6-iBc-2,3-Pe-β-CD/OV 1701 1:1; e (B) e 6-iBc-2,3-Pe-γ-CD/OV 1701

Condições: 40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

Com as primeiras informações sobre as possibilidades de aplicação, destas novas fases estacionárias derivadas de ciclodextrinas, passou-se a utilizá-las na análise de óleos

essenciais. Para isto realizaram-se análises com os óleos voláteis que foram discutidos durante o trabalho.

Os óleos de *Baccharis articulata* foram investigados na fase 6-Ibc-2,3-pe- β -cd, onde foi possível a determinação enantiomérica dos monoterpenos (+/-)- α-pineno, (+/-)-limoneno(Figura 142).

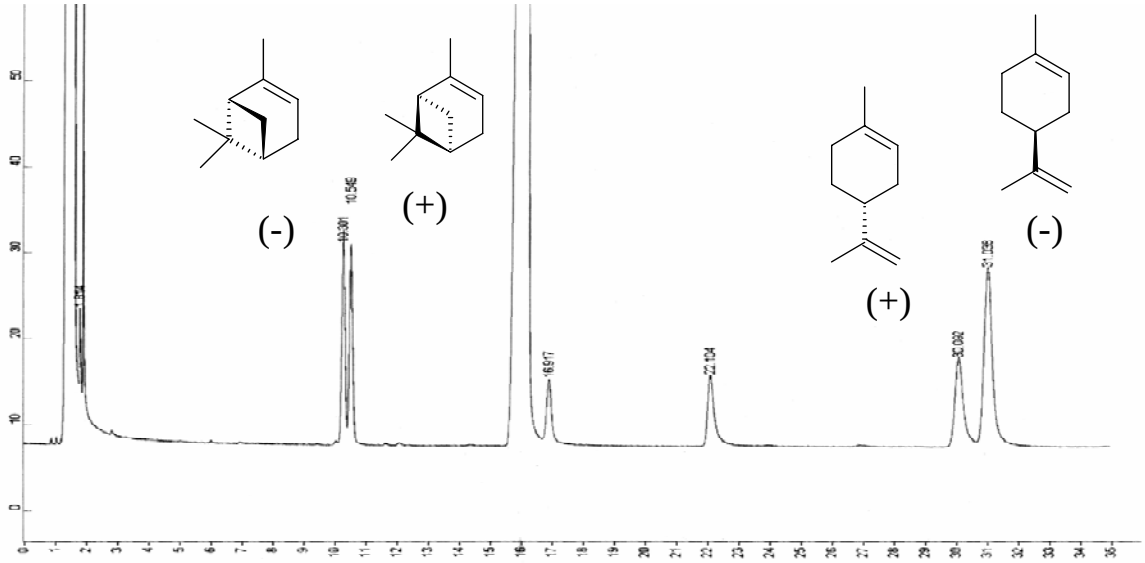


Figura 142. Separações enantioméricas do (+/-)-a-pineno e (+/-)-limoneno no óleo volátil de *Baccharis articulata.* Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

O óleo volátil de *Aeolanthus suaveolens* teve a composição enantiomérica de linalol definida, através da análise dos óleos essenciais nesta fase quiral (Figura 143).

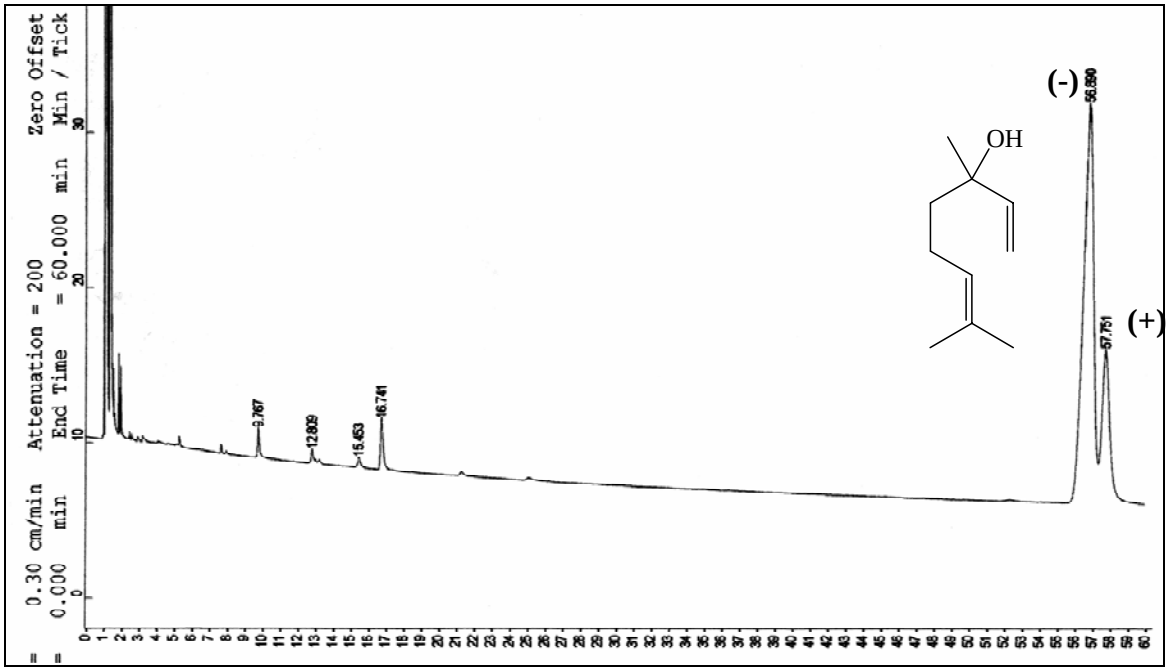


Figura 143. Separação enatiomérica do linalool no óleo volátil de *Aelanthus suaveolens.* Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

A separação da mistura racêmica do mentol permite a investigação de adulterações deste composto em óleos, como o de *Menta arvensis* que apresenta altos teores de mentol e mentona. O óleo analisado foi adulterado pela adição de uma mistura racêmica sintética de mentol, que é observada, eluindo próximo à mentona (Figura 144).

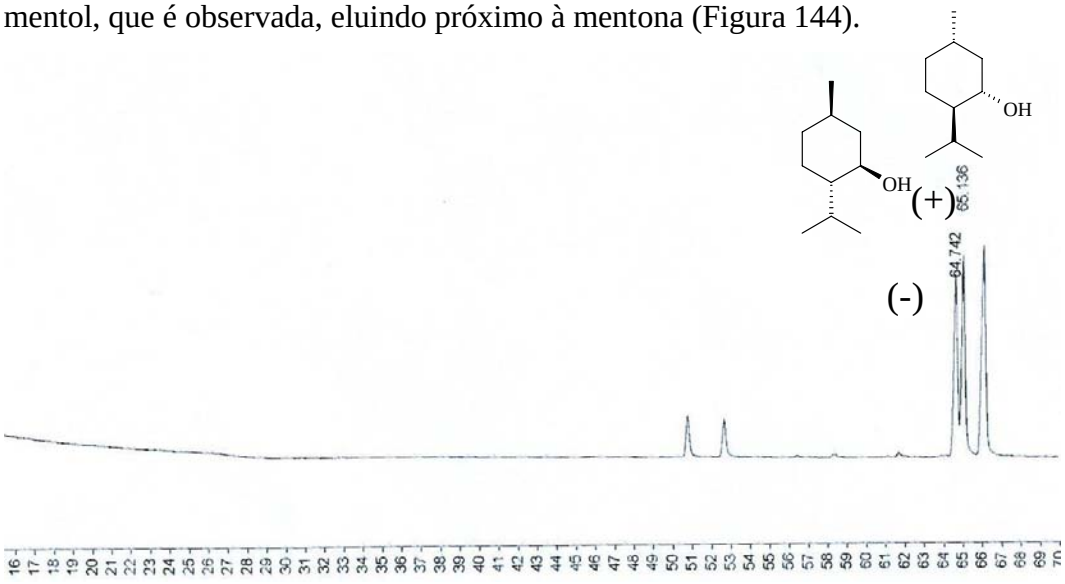


Figura 144. Separação enantiomérica do (+/-)-mentol sintético no óleo adulterado de *Menta arvensis.* Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

Nos óleos voláteis de *Zanthoxylum hyemale*, pode-se observar a inversão dos enantiomeros do terpeno α-pineno no óleo de flores e frutos e determinar a pureza enantiomérica do (+)-limoneno no óleo das flores, através de análise dos óleos essenciais, nesta nova fase quiral (Figuras 145 e 146).

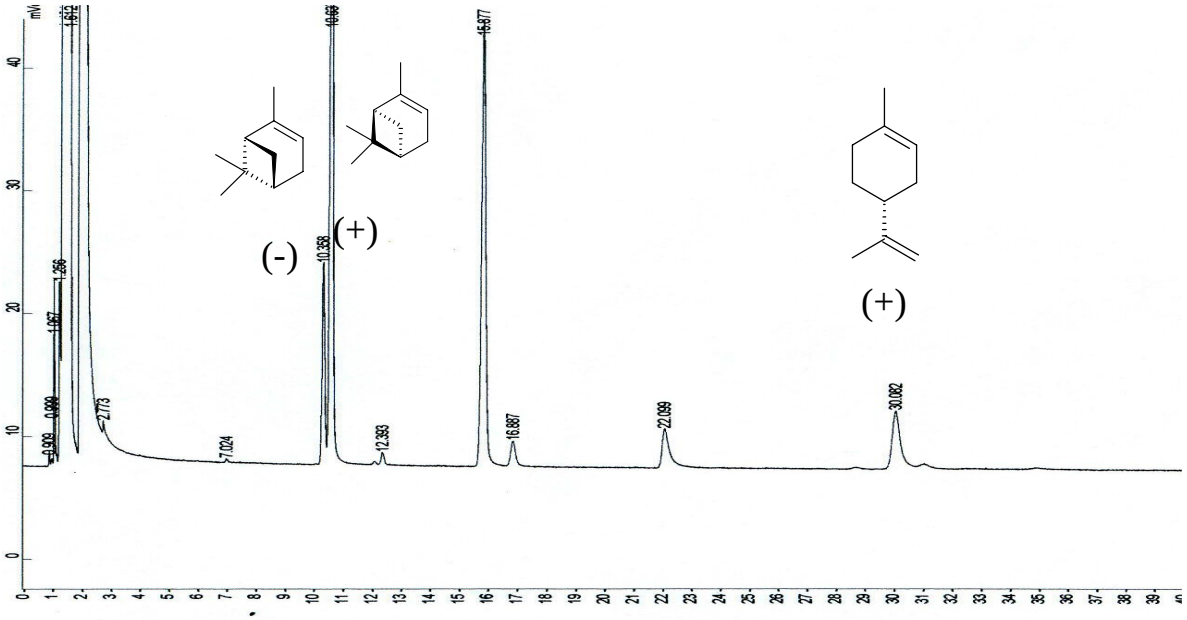


Figura 145. Separação enantiomerica do (+/-)-α-pineno e determinação da pureza enantiomerica do (+)-limoneno, no óleo volátil das flores de *Z.hyemale*. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

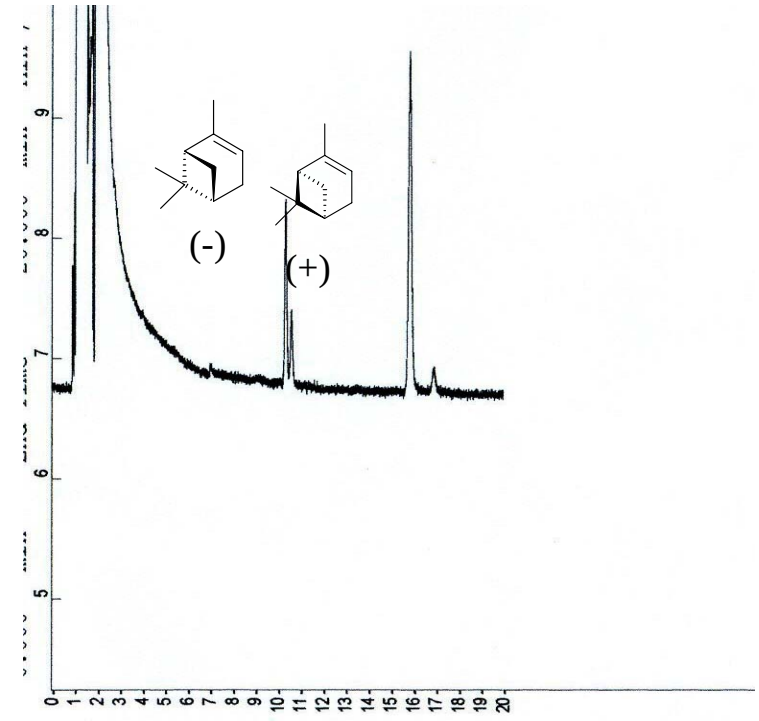


Figura 146. Separação enantiomerica do (+/-)-α-pineno no óleo volátil dos frutos de *Z. hyemale*, na fase 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD. Condições: 6-Ibc-2,3-Pe- β -CD,40/20 min -180°C, 1°C/min, 6 psi H_2.

A coluna empacotada com a fase quiral 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, apresentou resultados satisfatórios na seletividade quiral do lilalol e das cetonas cíclicas fenchona e cânfora. Os cromatogramas das Figuras 147 a 155 demonstram as separações e determinações destes compostos em óleos voláteis de espécies como *Foeniculum vulgare* e *Cinamomum cânfora.*

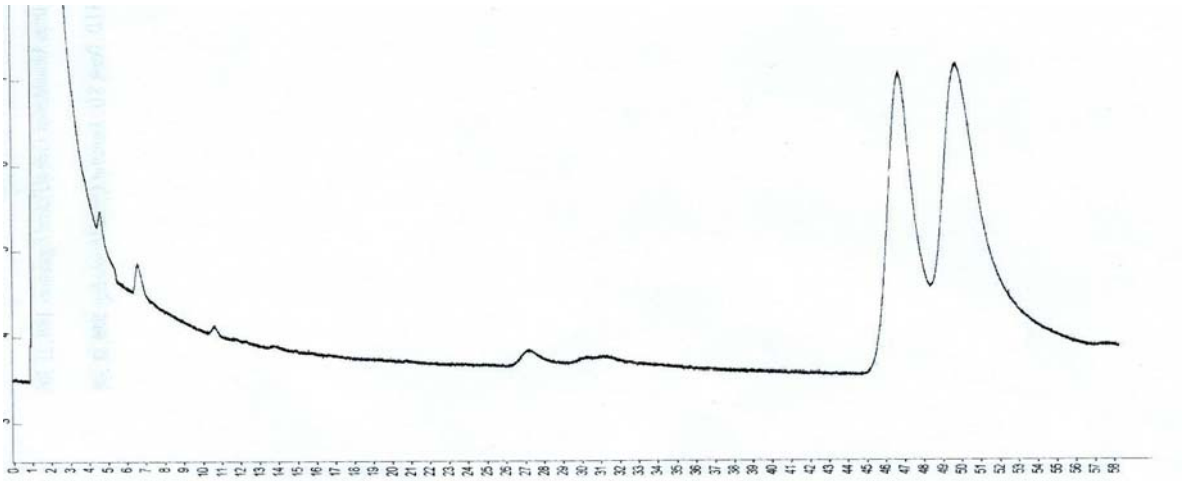


Figura 147. Separação enantiomérica do(+/-)-linalol na coluna empacotada com a fase quiral 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, 45°C, isoterma, 6 psi H_2.

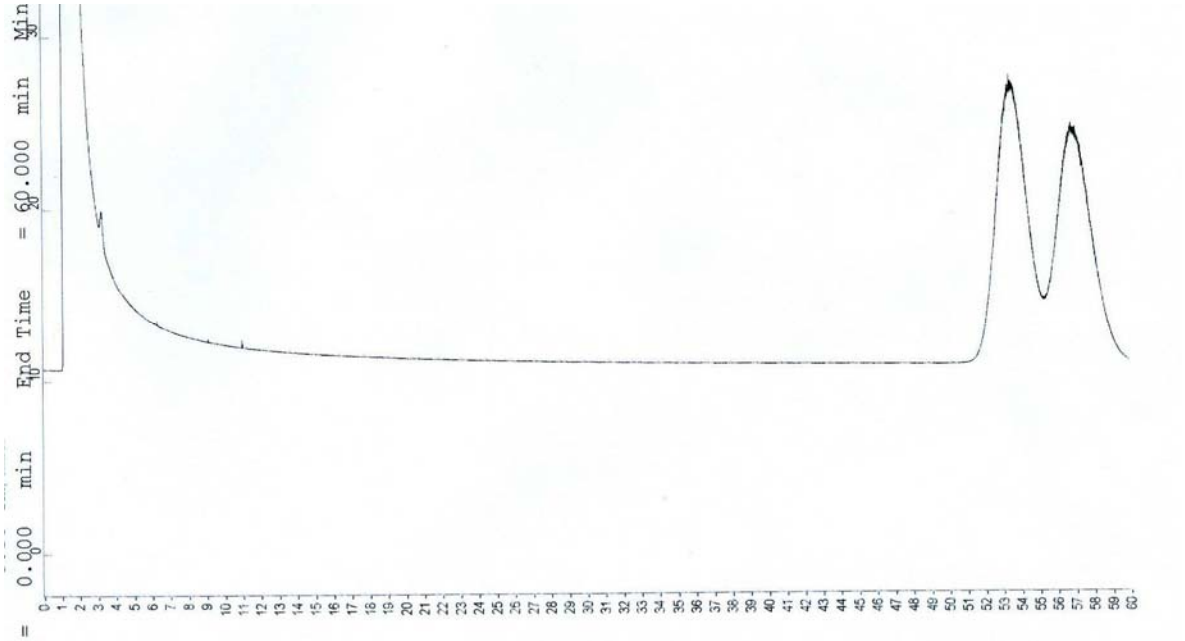


Figura 148. Separação enantiomérica da (+/-)-fenchona na coluna empacotada com a fase quiral 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, utilizando um programa com isoterma. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD, 45°C, isoterma, 6 psi H_2.

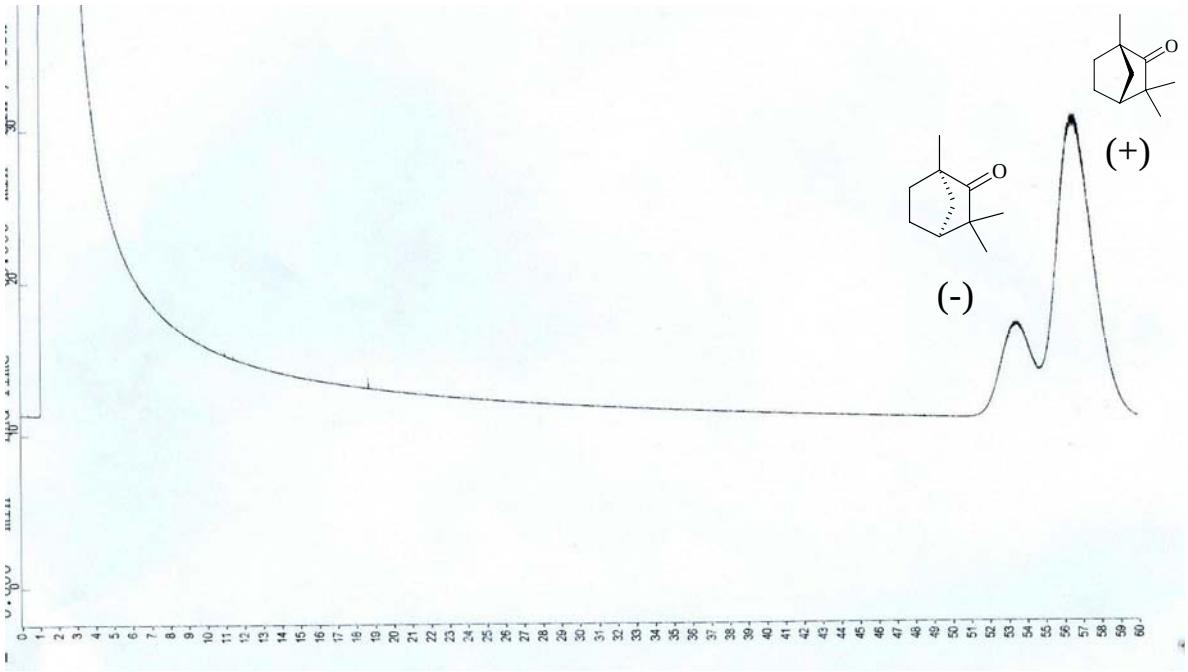


Figura 149. Determinação da ordem de eluição dos enantiomeros da cetona (+/-)-fenchona, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD.

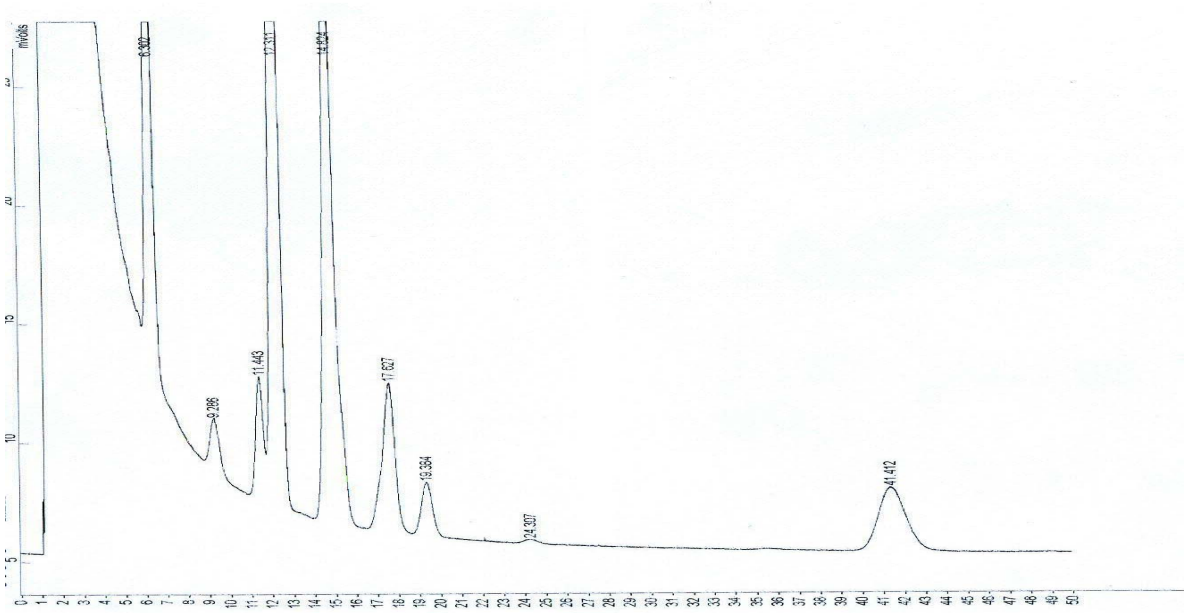


Figura 150. Cromatograma do óleo de *Foeniculum vulgare,* na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40°C isoterma, 6 psi H_2.

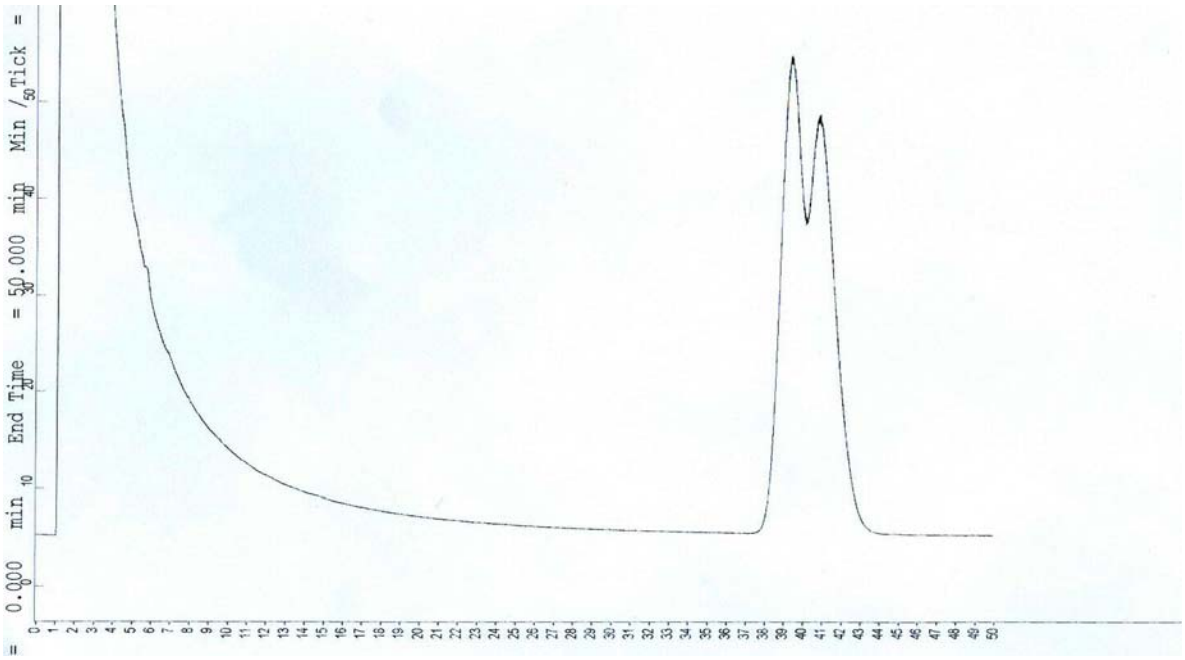


Figura 151. Separação enantiomerica de (+/-)-fenchona utilizando um programa com rampa de aquecimento. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40-180°C ,1°C/min, 6 psi H_2.

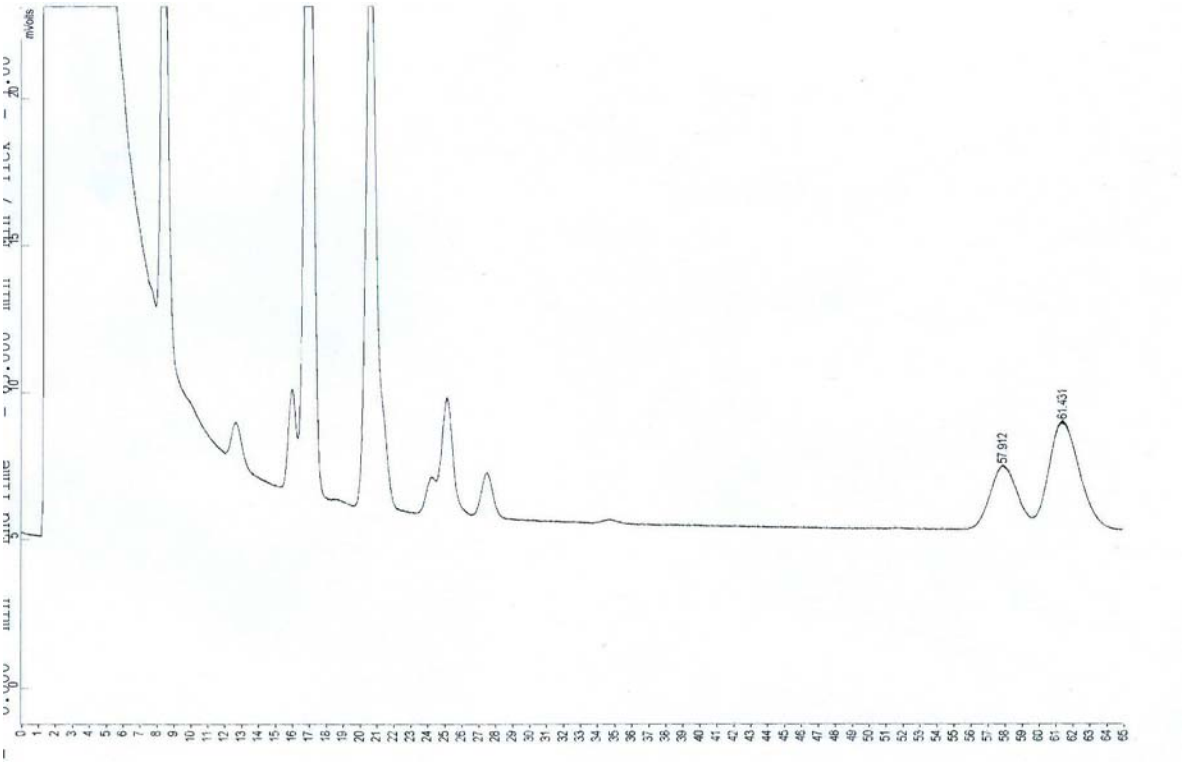


Figura 152. Co-injeção dos padrões de (+/-)-fenchona com o óleo de *Foeniculum vulgare*, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40°C isoterma, 6 psi H_2.

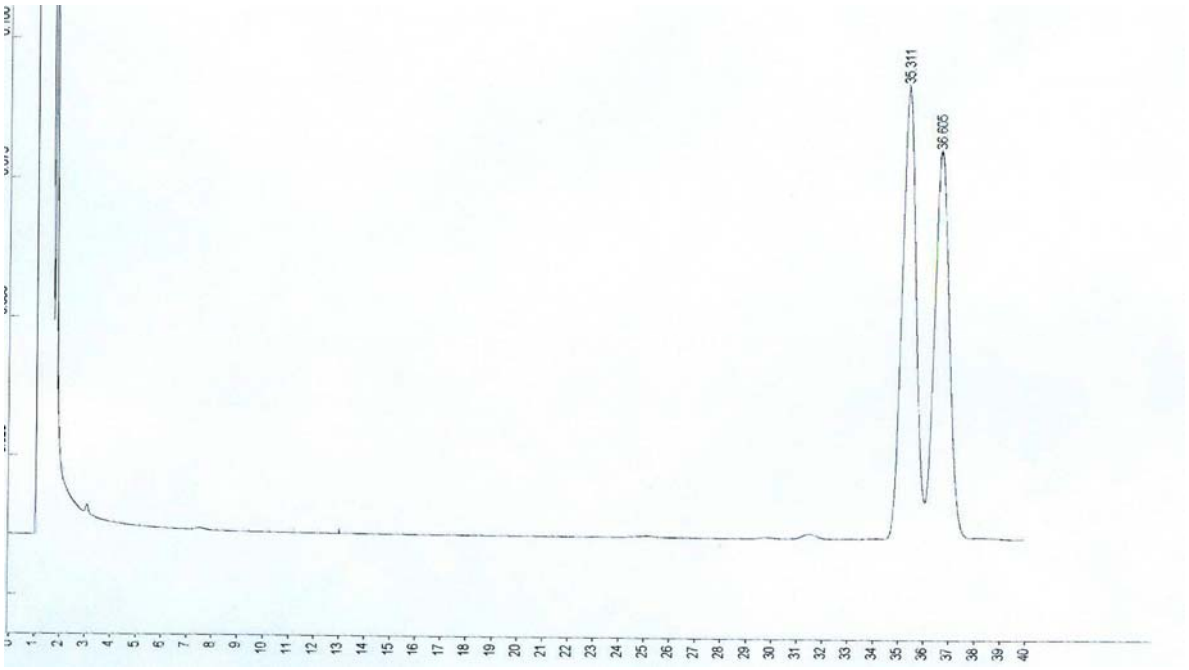


Figura 153. Separação enantiomerica de (+/-)-Cânfora, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40°C isoterma, 6 psi H_2.

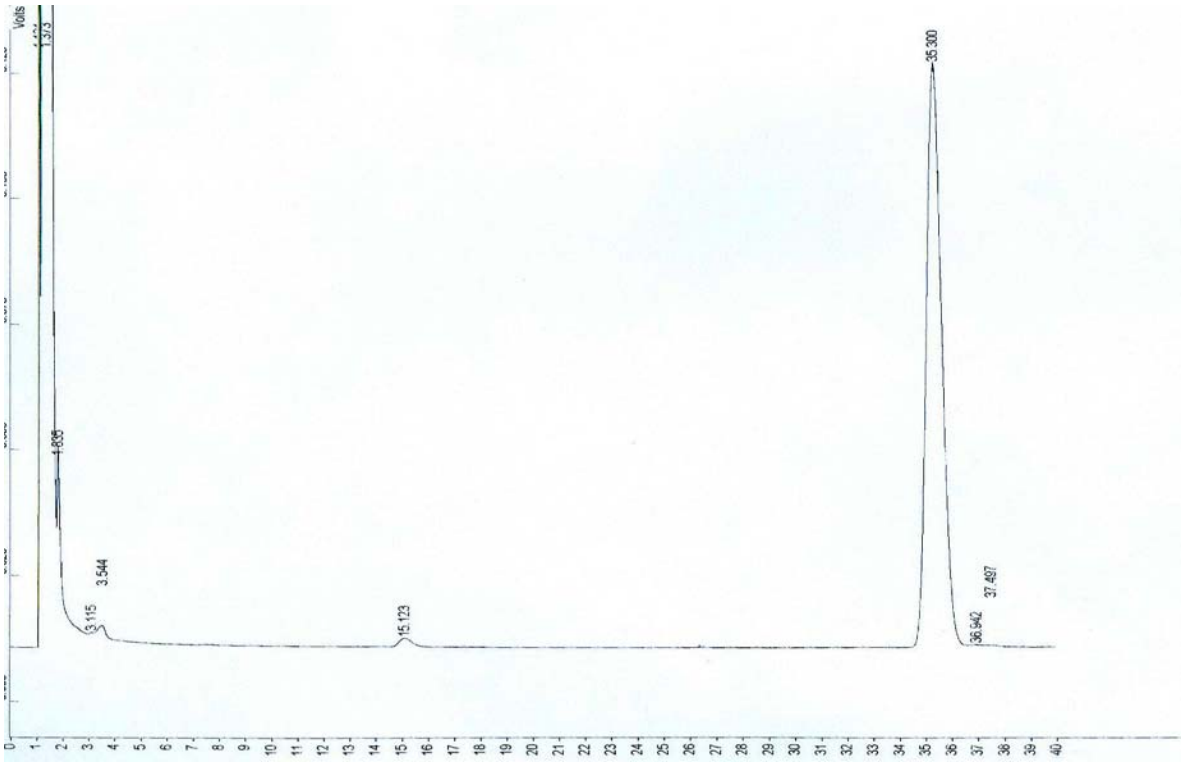


Figura 154. Cromatograma do óleo de *Cinamomum cânfora,* na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD**.** Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40°C isoterma, 6 psi H_2.

Como não tínhamos disponível nem um dos padrões enantioméricamente puros da cetona cânfora, realizou-se uma analise polarimétrica da cânfora obtida do óleo de *Cinamomum cânfora*, obtendo-se um valor de $[\alpha]^{D}$= -35 em $CHCl_3$, evidenciando a presença do enantiomero (-) no óleo, desta forma, através da co-injeção do óleo com o padrão racêmico, determinou-se a ordem de eluição desta cetona na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD (Figura 155).

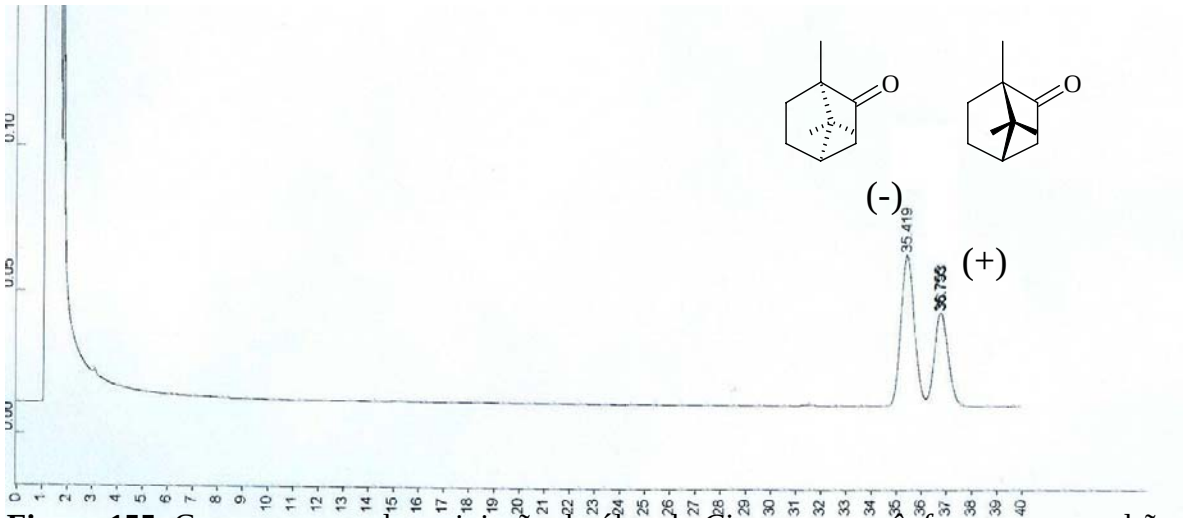


Figura 155. Cromatograma da co-injeção do óleo de *Cinamomum cânfora* com os padrões de (+/-)-Cânfora, na fase 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD. Condições: 3-iBc-2,6-Pe-γ-CD,40°C isoterma, 6 psi H_2.

CAPITULO 4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram registrados em um Espectrômetro BRUCKER DPX-400, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria, que opera a 400 MHz para ^{1}H e 100 MHz para ^{13}C, em tubos de 5 mm. Utilizando-se como solvente o clorofórmio deuterado ($CDCl_3$). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em "ppm", em relação ao TMS ($\delta = 0,00$).

Além destes, foram feitos, também, outros experimentos bi-dimensionais (COSY ^{1}H-^{1}H e HMQC) que nos auxiliaram na elucidação das estruturas obtidas.

4.1.2 Espectrometria de Massas

Foi utilizado um cromatógrafo à gás marca HP modelo 6890 equipado com injetor automático, injetor split-splitless, coluna capilar HP5, 30 m, 0,32 mm de diâmetro interno, acoplado a espectrômetro de massas marca HP 5973, interfaciado por um computador HP pentium equipado com impressora laser HP. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultra puro.

4.1.3 Técnicas cromatográficas

4.1.3.1 Cromatografia de coluna preparativa (CCP)

Nas purificações cromatográficas foram utlizadas colunas com sílica-gel 60 (230-400 mesh), utilizando uma quantidade de sílica 80 vezes superior a massa a ser fracionada. As purificações tiveram como eluente gradientes de hexano e acetato de etila.

As frações foram coletadas em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL utilizando um coletor automático.

4.1.3.2 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 F_{254} sobre alumínio, como fase estacionária. As fases móveis correspondem as mais variadas misturas de solventes, descritas na literatura, ou criadas no decorrer deste trabalho, para a adequação a problemas específicos. A revelação foi realizada com luz UV (λ = 254 nm) e, como é comum para carboidratos, através da borrifação com solução etanólica de H_2SO_4 a 10% e reagente de Godin, seguida de tratamento térmico.

4.1.3.3 Análise por Cromatografia Gasosa

As análises foram realizadas em dois cromatógrafos a gás Varian 3800, sendo o primeiro destes equipado com detector de ionização de chama (FID), utilizando hidrogênio como gás de arraste, equipado com modo de injeção split-splitless (operando no modo split) e colunas capilares de sílica fundida. O segundo aparelho operou com um sistema dual de colunas, sendo os demais parâmetros semelhantes ao modo de operação do equipamento anterior. A composição percentual dos componentes foi calculada considerando-se o mesmo fator de resposta do detector para todos os componentes.

4.1.4 Solventes e reagentes purificados

Todos os solventes utilizados em colunas cromatográficas, extrações e cromatografia de camada delgada, foram solventes de nível técnico que receberam tratamentos para melhorar suas condições tanto de umidade como também de possíveis contaminantes.

Hexano: refluxado e destilado sobre óxido de cálcio.

Acetato de etila: seco sobre $CaCl_2$ e destilado.

Diclorometano: seco sobre $CaCl_2$ e destilado.
Éter etílico: destilado.
THF: refluxado sobre sódio metálico e destilado.
NaH: lavado com pentano.
Metanol: refluxado com magnésio e iodo e destilado.

Os solventes utilizados na preparação de amostras para cromatografia gasosa foram solventes de grau cromatográfico.

4.1.5 Preparação do diazometano

Em um balão de fundo redondo , colocou-se 12 g de KOH, 15 mL de água, 50 mL de metanol e 50 mL de etanol e em um funil de adição, 21 g de Diazald® solubilizado em éter dimetílico do etileno glicol e éter etílico. Aqueceu-se o balão a 60 -70 °C e gotejou-se o conteúdo do funil de adição. O diazometano foi recebido em um balão contendo éter etílico resfriado com gelo seco e acetona. Os resíduos foram destruídos com ácido acético.

4.1.6 Preparação do MeOH/HCl 1,6 N

Em um balão colocou-se cloreto de cálcio e adaptou-se ao mesmo um funil de adição contendo ácido sulfúrico. Manteve-se o conteúdo do balão sob agitação magnética e gotejou-se o ácido sulfúrico lentamente. O ácido clorídrico gasoso foi recebido em um balão contendo metanol anidro (resfriado a 0 °C). Amostras foram retiradas e tituladas com hidróxido de sódio 0,1 N, até que a solução de MeOH/HCl atingisse a a concentração de 1,6 N. A solução foi armazenada em frasco de vidro em geladeira.

4.1.7 Preparação de Piridinium fluor cromato (PFC)

Sobre uma solução de 25 g (0,25 mol) de óxido de cromo VI (CrO_3) em 45 mL de ácido fluorídrico 6 N, adicionou-se, durante 10 minutos e a 40°C, 19,8 g (0,25 mol) de piridina. Resfriou-se a 10°C até formar um precipitado laranja. Aqueceu-se novamente a 40°C e adicionou-se sob agitação 208 g de alumina neutra. Retirou-se a água em

rotaevaporador e deixou-se à 100°C sob vácuo por 2 horas. O equivalente de oxidação médio equivale a 1 mmol/g. O reagente foi guardado em frasco escuro e protegido da umidade.

4.1.8 Saponificação do éster de *Calea serrata Less.*

Em 15 mL de metanol anidro a 5°C, colocou-se 200 mg (8 mmol) de sódio metálico e após completada a reação adicionou-se a 1 g de óleo *de calea serrata Less.* A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por uma hora e acompanhada através de CCD utilizando-se como eluente, hexano e acetato de etila (9:1). Encerrada a reação, neutralizou-se com HCl 1 M e evaporou-se o metanol. Dissolveu-se o resíduo em água e extraiu-se com 15 mL de éter etílico (3 vezes). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada, obtendo-se 0,80 g de um óleo que foi analisado através de cromatografia gasosa. Purificou-se através de coluna cromatográfica, obtendo-se uma fração contendo 700 mg (4 mmol) que foi analisada através de cromatografia gasosa apresentando alta pureza. Rendimento: 87,5%.

4.1.9 Obtenção do 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)2,2-dimetil-3-butenil metil éter

1 g (5 mmol) de álcool foi solubilizado em tetrahidrofurano anidro e sob agitação e a 0°C adicionou-se 10 mg de NaH (4 mmol), após gotejou-se iodeto de metila em excesso. A reação foi mantida a temperatura ambiente e acompanhada por CCD, utilizando-se hexano e acetato de etila (9:1) como sistema eluente. Após 14 horas, encerrou-se a reação destruindo-se o NaH com metanol. Evaporou-se o solvente, dissolveu-se o resíduo em água e extraiu-se com 15 mL éter etílico (3 vezes). Secou-se sobre sulfato de sódio, o solvente foi eliminado. Obteve-se 0,95 g de um óleo que foi analisado por cromatografia gasosa e purificado através de coluna cromatográfica utilizando gradientes de hexano e acetato de etila. Rendimento: 80,5%.

4.1.10 Obtenção do 3-[2,2-dimetil-1-2-(feniletoxi) but-3-enil-2,2-dimetiloxirano

Para obtenção do éter benzilíco, 1mmol do álcool foi solubilizado em tedrahidrofurano anidro (5ml) sob agitação e mantendo-se à temperatura ambiente adicionou-se 2,2 mmol de NaH. Quando não mais observou-se a produção de gás adionou-se brometo de benzila em excesso. A reação foi acompanhada por CCD. Após 2 horas de reação, destruiu-se o excesso de hidreto com água, evaporou-se o solvente e extraiu-se com éter etílico. Obteve-se um óleo que foi analisado por CG. O 3-[2,2-dimetil-1-2-(feniletoxi) but-3-enil-2,2-dimetiloxirano foi purificado através de CCD preparativa utilizando-se um sistema 10% hexano/acetato.
Rendimento: 85%

4.1.11 Obtenção do 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)2,2-dimetil-3-butenil metil éter

Para obtenção do metil éter 1g (5 mmol) de álcool foi solubilizado em tetrahidrofurano anidro e sob agitação e a 0°C adicionou-se 10 mg de NaH (4 mmol), após gotejou-se iodeto de metila em excesso. A reação foi mantida a temperatura ambiente e acompanhada por CCD, utilizando-se hexano e acetato de etila (9:1) como sistema eluente. Após 14 horas, encerrou-se a reação destruindo-se o NaH com metanol. Evaporou-se o solvente, dissolveu-se o resíduo em água e extraiu-se com 15 mL éter etílico (3 vezes). Secou-se sobre sulfato de sódio, o solvente foi eliminado. Obteve-se 0,95 g de um óleo que foi analisado por cromatografia gasosa e purificado através de coluna cromatográfica utilizando gradientes de hexano e acetato de etila. Rendimento: 80,5%.

4.1.15 Reação de obtenção da 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2,2-dimetil-3-buten-1-ona

Dissolveu-se 900 mg (5 mmol) do álcool **2** em 10 mL de diclorometano e adicionou-se 1200 mg de PFC (piridinium fluor cromato sob alumina). Manteve-se sob agitação, à temperatura ambiente e acompanhamento por CCD, utilizando hexano e acetato de etila (8,5:1,5) como eluente. Após 36 horas filtrou-se a reação sob um suporte de sílica gel e diclorometano como solvente de lavagem. Após o solvente foi evaporado. Para eliminar a piridina residual, dissolveu-se a mistura em éter etílico e extraiu-se com solução

de ácido cítrico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, evaporada, obtendo-se 750 mg de um óleo que foi analisado por cromatografia gasosa indicando a presença de um componente principal. Rendimento: 83 %.

4.1.13 Reação de obtenção do 2,5,5-trimetil-6-hepteno-2,3,4-triol.

Sobre uma solução de HCl 1,5 N (10 ml) adicionou-se o álcool (**91**) (100 mg, 0,59 mmol). Manteve-se sob agitação, à temperatura ambiente e acompanhamento por CG. Através deste acompanhamento por CG observou-se o consumo total do álcool após 3h. Extraiu-se com 15 mL de éter etílico (3 vezes). A fase orgânica foi seca com com Na_2SO_4, evaporada e o produto reacional foi cromatografado em CCD preparativa, utilizando-se Hexano/AcOEt 10% como sistema de solvente, fornecendo o triol (**96**). Rendimento de 35%.

4.1.14 Reação de obtenção do 1-(3,3-dimetil-2-oxiranil)-2-metil-2-oxiran-2-propil acetato

Sobre uma solução da olefina (**90**) (200 mg, 0,94mmol) em 15 ml de diclorometano, adicionou-se o acido metacloro perbenzóico (30 mg, 0,19mmol), mantendo-se sob agitação a temperatura ambiente. A reação completa ocorreu após 6 h. Uma vez completada a reação transferiu-se a mistura para um funil de extração, onde foi lavada 4 vezes com 5 ml de uma solução 5% de $NaHSO_3$, e 5,0 ml de solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com com Na_2SO_4, evaporada e o produto reacional foi cromatografado em CCD preparativa, utilizando-se Hexano/AcOEt 15% como sistema de solvente, fornecendo a mistura diastereoisomérica dos epóxidos (**98**). Rendimento de 85%.

4.1.15 Reação de obtenção 1-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetilbutil acetato

Uma solução de caleol (**90**) (146,0 mg, 0,69mmol.) em *t*-BuOH (1,5ml) foi adicionada sobre uma suspensão (resfriada 0° C) contendo K_2CO_3 (285,7 mg, 2,06mmol), K_3FeCN_6 (680mg, 2,06mmol), $MeSO_2NH_2$ (65mg, 0,69mmol) e OsO_4 (como solução 0,0014 mmol em *t*-BuOH) em 0,5 ml de H_2O/*t*-BuOH 1:1. O sistema foi agitado por 24h e extraído co Et_2O (4 x 15 ml). A fase etérea foi seca com Na_2SO_4, evaporada e purificada por CCD preparativa, eluindo com mistura de Hexano/AcOEt 50%, fornecendo a mistura diastereoisomérica dos diois (**97**). Rendimento de 65%.

4.1.16 Saponificação do acetato de carquejila.

Em 15 mL de metanol anidro a 5°C, colocou-se 200 mg (8 mmol) de sódio metálico e após completada a reação adicionou-se a 1 g de acetato de carquejila. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por uma hora e acompanhada através de CCD utilizando-se como eluente, hexano e acetato de etila (9:1). Encerrada a reação, neutralizou-se com HCl 1 M e evaporou-se o metanol. Dissolveu-se o resíduo em água e extraiu-se com 15 mL de éter etílico (3 vezes). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada, obtendo-se 0,77 g de um óleo que foi analisado através de cromatografia gasosa. Purificou-se através de coluna cromatográfica, obtendo-se uma fração contendo 700 mg (4 mmol) que foi analisada através de cromatografia gasosa apresentando alta pureza.
Rendimento: 70,5%.

4.1.17 Saponificação do sesquilavandulil acetato.

Em 15 mL de metanol anidro a 5°C, colocou-se 200 mg (8 mmol) de sódio metálico e após completada a reação adicionou-se a 25 mg de acetato de sesquilavandulila . A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por uma hora e acompanhada através de CCD utilizando-se como eluente, hexano e acetato de etila (9:1). Encerrada a reação, neutralizou-se com HCl 1 M e evaporou-se o metanol. Dissolveu-se o resíduo em água e extraiu-se com 15 mL de éter etílico (3 vezes). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada, obtendo-se 18 mg de um óleo que foi analisado através de cromatografia gasosa. Purificou-

se através de coluna cromatográfica, obtendo-se o produto reacional que foi analisado através de cromatografia gasosa apresentando alta pureza.
Rendimento: 75,5%.

4.1.18 Procedimento geral para determinação da estereoquímica de álcoois secundários pelo método de Horeau.

À aproximadamente 15 μmol do álcool secundário acrescentou-se 20 μmol de anidrido 2-fenil butírico racêmico em 50 μmol de piridina anidra. Manteve-se sob agitação, a temperatura ambiente por uma hora. Para a hidrólise do excesso de anidrido, acrescentou-se, sob agitação, 20μL de água, deixando-se à temperatura ambiente por trinta minutos. Após acrescentou-se 500 μL de clorofórmio, algumas gotas de uma solução de fenolftaleína em etanol e hidróxido de sódio 0,1 M até que a solução adquira a cor violeta. Agitou-se vigorosamente e a fase clorofórmica foi separada. Extraiu-se novamente com mais 500 μL de clorofórmio. As fases orgânicas foram descartadas.

Foram adicionados mais 500 μL de clorofórmio e a fase aquosa foi neutralizada com HCl 1 M e após vigorosa agitação a fase clorofórmica foi separada e a fase aquosa extraída novamente com 500 μL de clorofórmio. As fases orgânicas foram secas sobre sulfato de sódio, a fase orgânica filtrada e evaporada. Desta maneira obteve-se a mistura de ácidos 2-fenilbutíricos que foram submetidos a uma reação de metilação da seguinte maneira: em um frasco de vidro com tampa de silicone, foram adicionados 1 mL de diazometano ou MeOH.HCl 1,6 N sobre a mistura de ácidos. Após 30 minutos a temperatura ambiente, evaporou-se o solvente através de uma corrente de nitrogênio e o resíduo foi analisado por cromatografia gasosa quiral.

4.1.19 Matéria prima-vegetal

As plantas foram coletadas e armazenadas no herbário da universidade Federal de Santa Maria, onde foram identificadas, e posteriomente catalogadas, conforme a tabela.

Tabela 43. Identificação das excicatas das amostras estudadas**.**

Espécie	Excicata	Nome Comum
Baccharis trimera	FDNC- 064	Carqueja amarga
Baccharis articulata	FDNF- O63	Carqueja doce
Matricaria chamomilla	CHLL- 1256	Camomila
Pluchea quitoc	EKRE- 2347	Quitoco
Aloysia sellowii	HDFI - 0166 e HDFI- 0167	Garupa
Aeollanthus suaveolens	FOET- 0504	Catinga de mulata
Cunila microcephala	BGRA- 2398	Poejo
Zanthoxylum hyemale	SMDB 5687-5690	Coentrilho

4.1.20 Obtenção dos óleos voláteis.

Para a extração dos óleos voláteis das folhas e flores, devidamente pesadas, utilizou-se o processo de hidrodestilação utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, onde a fração de óleo é coletada diretamente em éter etílico. O tempo de extração foi de 4 horas. Uma vez extraído, o óleo volátil foi seco com agente secante, Na_2SO_4 anidro, o qual foi separado do restante da mistura por filtração simples. Após a filtração o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O óleo essencial foi então devidamente pesado e armazenado, sob atmosfera de gás nitrogênio, em frasco apropriado com tampa de silicone ou revestida com papel alumínio, abrigado da luz, e guardado em geladeira sob temperatura media de 4°C.

4.1.21 Polarimetria

Os dados de rotação ótica foram obtidos em polarimetro digital Perkin Helmer 243 (589nm, linha D do sódio). As medidas foram realizadas à 20°C, em cubeta de 1dm de comprimento.

4.1.22 Procedimentos gerais para determinação da atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas dos óleos voláteis citados neste trabalho foram determinadas pelos métodos de concentração inibitória mínima (CIM)[149] e por bioautografia.[150-153] Para estas análises testou-se a capacidade antimicrobiana contra 13 cepas Gram-positivas e Gram-negativas (Tabela 44). Utilizou-se estes microorganismos por se tratarem de patógenos causadores de uma série de enfermidades. Os procedimentos utilizados nestas analises foram de acordo com os descritos na literatura.

4.1.23 Microorganismos indicadores da ação antimicrobiana

Para verificação da atividade antimicrobiana dos óleos voláteis, utilizou-se as cepas padrão (Tabela 44) ATCC (American type culture collection).

Tabela 44. Bactérias e fungos utilizados nos testes antibacterianos.

Microorganismos	características	Padrão utilizado
Staphylococcus aureos	Gram-positivo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Staphylococcus epidermidis	Gram-positivo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Escherichia Coli	Gram-negativo	Amoxicilina/ cloranfenicol

Pseudomonas aeruginosa	Gram-positivo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Klebsiella pneumoniae	Gram-negativo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Bacilus subtilis	Gram-positivo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Salmonella setubal	Gram-negativo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Micrococcus luteos	Gram-positivo	Amoxicilina/ cloranfenicol
Candida albicans	Fungo	Nistatina
Sacharomyces cerevisiae	Fungo	Nistatina
Criptococus neoformans	Fungo	Nistatina
Candida dublinensis	Fungo	Nistatina
Candida albicans 591 L	Fungo	Nistatina

4.1.24 Substâncias utilizadas como referências nos ensaios biológicos microbiológicos.

Os padrões de antibióticos, amoxicilina, cloranfenicol e nistatina foram utilizados como referência nos ensaios de determinação da atividade antimicrobiana, padrões primários USP, foram preparados conforme FDA.[154]

CAPITULO 5. CONCLUSÕES.

A partir dos dados analisados neste trabalho, conclui-se que:

1 - Os óleos analisados são compostos, principalmente, por mono-e sesquiterpenos na forma de hidrocarbonetos e oxigenados, principalmente cetonas e álcoois. Na maioria dos óleos analisados, o conteúdo de sesquiterpenos foi superior ao de monoterpênos, com exceção do óleo de *Aloisia selowii*, que apresentou um excesso de monoterpenos (> 60%).

2 - Os óleos essenciais são constituídos por componentes quirais, muitos deles presentes nas duas formas enantioméricas (+ e -).

3 - A presença das duas formas enantioméricas de uma substância quiral componente de óleos essenciais correspondem, no presente trabalho, a produtos genuíno de plantas e não a artefatos, desde que através de diferentes formas de isolamentos, como a extração com solventes a frio, constatou-se a mesma constituição enantiomérica quando comparado com os componentes do óleo obtido através de hidrodestilação.

4 - A análise dos diferentes própolis mostrou uma constituição de componentes hidrocarbonetos monoterpênicos, sem muita variação na composição das diferentes regiões de coleta, mostrando a preferência das abelhas por plantas que produzem estas substâncias. Nestas regiões, a espécie *Baccharis articulata* é uma das plantas preferidas pelas abelhas *Apis mellifera* . A análise do óleo desta planta mostrou uma composição de hidrocarbonetos monoterpenicos com os mesmos constituintes encontrados nas própolis analisadas.

5 - A cromatografia gasosa enantioseletiva mostrou-se uma excelente ferramenta na composição enantiomérica destes componentes voláteis, assim como as colunas quirais, confeccionadas e empacotadas no laboratório, foram eficientes neste tipo de análise.

6 - Os óleos essenciais das espécies estudadas apresentaram resultados positivos contra a maioria dos microorganismos testados, corroborando com o uso popular destas espécies.

A espécie *Baccharis trimera* mostrou excelente atividade antifúngica, principalmente contra *Cryptococcus neoformans* e *Sacaromiceae cereviseae,* para as quais a concentração inibitória mínima foi de 0,67 mg/ml. O óleo obtido do fruto de *Zanthoxylum hyemale* foi ativo, principalmente, contra *K. peneumoniae*, com uma CIM de 0,67mg/ml. A espécie

Matricaria chamomila apresentou uma boa atividade para a bactéria *Salmonela setubal* com um CIM de 0,63 mg/mL.

7 - Os componentes isolados puros foram analisados pelo método da Bioautografia, devido a pequena quantidade disponível e a baixa solubilidade no meio utilizado. O componente massoilactona, isolado do óleo de *Aeolanthus suaveolens* foi o componente mais ativo contra *B. Subitilis* e *S. setúbal*, nas quantidades de 3.125 μg.

8 - Modificações estruturais, como as realizadas com a molécula do epóxido caleol (**90**), mostraram que a função epóxido da estrutura é importante na relação estrutura-atividade. O derivado que mostrou maior atividade, contra a maioria dos microorganismos utilizados foi o diepóxido (**98**), comprovando a importância desta função na estrutura.

9 - Alguns óleos sofreram decomposição durante um certo período, mostrando a importância dos cuidados necessários ao armazenamento deste material. Alguns dos produtos da decomposição foram identificados: No óleo da espécie *Cunila microcephala*, o monoterpeno oxigenado mentofurano sofreu oxidação gerando a lactona monoterpenica mintlactona. Nos óleos essenciais de *A. sellowii* observou-se, durante 30 dias, um aumento do teor dos componentes espatulenol e óxido de cariofileno, com uma diminuição do conteúdo de monoterpenos.

10 - Neste trabalho, um novo sesquiterpeno foi isolado e identificado como sendo um sesquiterpeno com um esqueleto derivado do humuleno.

11- Entre as espécies nativas estudadas, apenas a espécie *Aloysia sellowii***,** apresentou composições com acentuadas diferenças dependendo do local de coleta. A amostra coletada em Santa Maria mostrou um alto conteúdo de 1,8-cineol, quase inexistente nas amostras coletadas em Santana do Livramento, sugerindo tratar-se de dois quimiotipos: o quimiotipo 1,8-cineol (amostra A) e o quimiotipo sabineno- β-santalol (amostra B).

CAPITULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1.Ferreira, S. H., Barata, L. E., Salles Filho, S. L.M., Queiroz, S. R. R., Medicamentos a partir de plantas Medicinais do Brasil. Academia Brasileira de Ciências, **1997**.

2. Calixto, J. B. Ciência Hoje **2000**,167, 36- 43.

3. Strobl, W. R., *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 29-41.

4.Alves, T. M. A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, 95, 367-373.

5. Garcia, E. S., Silva, C. P., Gilbert, B., Correa, C. B. V., Cavalheiro, M. V.S., Santos, R. R., Tomasini, T., Fitoterápicos: André Toselo, **1996**.

6. Serafini, L. A., Barros, N., Azevedo, J. L., Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. 1 Ed. Livraria Editora Agropecuária. Guaíba-RS, **2001**.

7. Marriott, P. J., Shellie, R., Cornwell, C., *Journal of Chromatography A* **2001**, 936, 1–22.

8. Moura, N. F., Morel, A. F., Dessoy, E. C., Zanatta, N., Burger, M., Ahlert, N., Porto, G., Baldisserotto B., *Planta Medica* **2002**, 68, 534.

9. Morel, A. F., Dessoy, E. C., Azevedo, C. A., Silva, U. F.,Hoelzel, S. M, Zachia, R., N. Bastos, N. R., *Phytochemistry* **2002**, 9, 721.

10. A. Morel, A. F., Giacomelli, S. R., Maldaner, G., Gonzaga, W. A., Garcia, C. M., Silva, U. F., Dalcol, I. I., *Phytochemistry* **2004**, 65, 933.

11. S. Giacomelli, S. R., Missau, F., Mostardeiro, M. A., Dalcol, I. I., Zanatta, N., A Morel, A. F., *J. Nat. Prod*. **2001**, 64, 997.

12. Weber, A. D., Giacomelli, S. R., E. Simionatto, E., Dalcol, I. I., Dessoy, E. C., Morel, A. F., *Planta Medica* **2003**, 69, 773.

13. Moura, N. F., Simionatto, E., Porto, C., Hoenzel, S. C. S., Dessoy, E. C. S. Zanatta N., Morel, A. F., *Planta Medica* **2002**, 68, 631-634.

14. Gonzaga, W. A., Weber, A . D., Giacomelli, S. R., Dalcol, I. I., Hoenzel, S. C, S, Morel, A. F., *Planta Medica* **2003**, 69, 371.

15. McGarvey, D. J., Croteau, R.; *The Plant Cell* **1995**, 7, 1015-1021.

16. Harborne, J. B., Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Ed. Oxoford: Claredon Press. **1991**, pp. 399-426.

17. Dawson, F. A., The amazing terpenes. Naval Stores Rev.**1994**; March/April, 6-12.

18. Ruzicka, L., *Experimentia* **1953**, 9, 357-367.

19. Dewick, P. M., Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, **2002**.

20. Wink., M *Phytochemistry* **2003**, 64, 3–19.

21. Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E., Farmacognosia e Biotecnologia. Willians & Wilkins; Baltimore, MA-USA, **1997.**

22. Chaintreau, A., *Flavour Frag. J.* **2001**, 16, 136.

23. Cherchi, G., Deidda, D., de Gioannis, B., Marangiu, R., Reverchon, E., *Flavour Frag. J.* **1999**,14, 214.

24. F. Chemat, J. Smadja, M.E. Lucchesi, European Patent Demand, 03001183.7, **2003**.

25. Lucchesi, M. E., Chemat., F., Smadja, J., *Journal of Chromatography A* **2004**,1043, 323–327.

26. Deans, S.G., Svoboda, K.P., Gundidza, M., Brechany, E.Y.,. *Acta Hortic.* **1992**, 306, 229 – 232.

27. Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S.G., Eaglesham, E., *Ind. Crops and Prod.* **1993**, 2, 47 – 50.

28. Burt, S., *International Journal of Food Microbiology* **2004**, 94, 223– 253.

29. Deans, S.G., Ritchie, G.,. *International Journal of Food Microbiology* **1987**, 5, 65 – 180.

30. Tassou, C.C., Drosinos, E.H, Nychas, G.J.E.,. *Journal of Applied Bacteriology* **1995**, 78, 593 – 600.

31. Fyfe, L., Armstrong, F., Stewart, J.,. *International Journal of Antimicrobial Agents* **1998**, 9, 195 – 199.

32. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Noble, R.C., Surai, P.,. *J. Essent. Oil Res.* **1995**, 7, 645 – 651.

33. Utama, I. M. S., Willis, R. B. H., Ben-Yehoshua, S., Kuek, C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 6371–6377.

34. Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J.,. Constitutive and induced resistance of citrus fruits against pathogens. In G. I. Johonson, E. Highly, D. C. Joyce (Eds.), Disease

resistance in fruits. ACIAR Proceeding. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research. **1998**, 80, 78–89

35. Karatzas, A. K., Bennik, M. H. J., Smid, E. J., Kets, E. P. W., *Journal of Applied Bacteriology* **2000**, 89, 296–301.

36. Vazquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Vazquez, M. J., Cepeda, A.. International Journal of Food Microbiology **2001**, 67, 157–163.

37. Adam, K., Sivropoulos, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, 1739–1745.

38. An, M., Johnson, I. R., and Lovett, J. V., *Journal of Chemical Ecology* **1993**, 19, 2379–2389.

39. Kubo, I., Muroi, H., and Himejima, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 245–248.

40. Fischer, N. H., Tanrisever, N., and Williamson, G. B. Allelopathy in the Florida scrub community as a model for natural herbicide actions, pp. 239–249 in G. R. Waller (ed.). Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. ACS Symposium Series 330. American Chemical Society, Washington, DC. **1988.**

41. Vokou, D., Douvli, P., Blionis, G. J., Halley, J. M., *Journal of Chemical Ecology* **2003**, 29, 2281.

42. Harborne, J. B. and Baxter, H.. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor and Francis, London. **1993**.

43. Southwell, I. A., Russell, M. F., Maddox, G. D. A., Wheeler, G. S., *Journal of Chemical Ecology*, **2003**, 29, 83-94.

44. Flach A, Simionatto E, Silva UF, Zanatta N, Morel AF, Linares CE. *Planta Medica* 2002, 68, 836-2.

45. Menut, C., Bessiere, J.M., Samate, A.D., Rasolodimby, J. M., Nacro, M., *Phytochemistry* **1999**, 51, 975-978

46. Baser, K.H.C., Demirci, B., Demirci, F., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Noma, Y., *Planta Medica* **2002**, 68, 564-567.

47. Gauvin, A., Susperregui, J., Barth, P., Louis, R., Deleris, G., Smadja, J., *Phytochemistry* 65 (2004) &–&

48. Cane, D., *Chemical Reviews* **1990**, 7, 1089-1103.

49. Ahmed A., Gati, T., Hussein, T. A., Ali, A. T., Tzakou, O. A., Couladis, M. A., Mabryd, T. J., Toth, G., *Tetrahedron* **2003**, 59, 3729–3735.
50. Todorova, M. N.,. Tsankova, E. T., *Phytochemistry* **1999**, 52, 1515-1518.
51. Barrero, A. F., Manzaneda, E. A., Lara, A., *Tetrahedron Letters* 1996, 37, 3757-3760.
52. Comey, N., Grey, A. I., Hook, I. L., James, P., Sheridan, H., *Phytochemistry* **1999**, 50, 1056-1060
53. Maatooq, G. T., Hoffmann, J. J. *Phytochemistry* **1996**, 43, 67-69.
54. Reina, M., Orihuela, J. C., Gonzalez-Coloma, A., de Inés, C., de la Cruz, M., del Val, A. G., Torno, J. R., Fraga, B. M., *Phytochemistry* **2004**, 65, 381-385.
55. Rauter, A . P., Branco, I., Bermejo, J., Gonzalez, A. G., García-Gravalos, M. D., Feliciano, A. S., *Phytochemistry* **2001**, 56, 167-171.
56. Economides, C., Adam, K. P., *Phytochemisrry* **1998**, 49, 859-862.
57. Smith, R. J., Mahiou, B., Deinzer, M. L., *Tetrahedrom* **199l** ,41, 933-940.
58. Corey, E. J., Daigneault, G., Dixon, B. R., *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 3675-3678.
59. Karlson, A . K. B., Tengo, J., Valterova, I., Unelius, C. R., Taghizadeh, T., Tolasch, T., Francke, W., *Journal of Chemical Ecology* **2003**, 29, 1-14.
60. Bartelt, R. J., Cosse, A. A., Zilkowski, B. W., Weisleder, D., and Momany, F. A., *Journal of Chemical Ecology* **2001**, 27, 2397.
61. Consoli, F. L., Williams, H. J., S. Vinson, B., Matthews, R. W., Cooperband, M. F., *Journal of Chemical Ecology* **2002**, 28, 1675.
62.Adams, R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, **1995**. Allured Publishing Corporation, Illinois0,
63. van Asten, A ., *Trends in analytical chemistry* **2002**, 21, 698-708.
64. Konig WA, Icheln D, Runge T. Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils. Part I. Monoterpene hidrocarbons. *J High Resolut Chromatogr* **1992**, 15, 184 -5.
65. Massada Y. Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry. John Wiley & Sons, New York, **1976**.
66. Konig WA, Icheln D, Runge T., *Journal High Resolution Chromatography* **1992**, 15, 184 -185.
67. Horeau, A., *Tetrahedron Letters* **1961**, 15, 505-512

68. Christensen, S.B., *Journal of Organic Chemistry* **1993**, 48, 396-399.
69. König, W.A., Ghercke, B. E., Weseloh, G., *Chirality* **1994**, 6, 141-146.
70. Moura, N. F., Tese de Doutorado. UFSM, **2001**.
71. Graebner, I, Ethur, E. M., Morel, A. F., Burrow, R. A., Phytochemistry **2000**, 53, 955.
72. Alice, C. B., Siqueira, N.C.S., Mentz, L. A., Silva, G. A.A., José, K. F. D., Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmagnóstico. Canoas: Ed. Da Ulbra, **1994**.205p.
73. Bohlmann, F., Zdero, C., *Tetrahedron Letters* **1969**, 28, 2419-2421.
74. Corrêa, M. P., Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas Vol. I. Imprensa Nacional, Instituto Brasileiro de desenvolvimento florestal, Rio de Janeiro. 1984. 74p.
75. Castro, H. G. de, Ferreira, F. A. Contribuição ao estudo das plantas madicinais: carqueja. Viçosa: Suprema, 2000. 158p.
76. Torres, L. M. B., *Phytochemistry* **2000**, 55, 617.
77. Queiroga, C. L., *Phytochemistry* **1996**, 42, 1097-1103.
78. Mann, C., Staba, E., Herbs, Spices and Medical Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, vol. 1. Food Products Press, USA. **1986.** pp. 235_ 280.
79. Lawrence, M.B., Tobacco, R.J.R., *Perfumer and Flavorist* **1996**, 21, 55–68.
80. Trease, G., Tratado de Farmacognosia, 2nd ed.. Interamericana, México, **1986** pp. 245-248.
81. Sousa, M. P., Matos, M. E .O., Matos, F .J. A., Machado, M. I. L., Craveiro, A. A., Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras, Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza, **1991**, 414p.
82. Jakovlev, V., Issac, O., Flaskamp, E., *Planta Medica* **1983**, 49, 67- 73.
83. Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, R., *Planta Medica* **1994**, 60, 410- 413.
84. Marino, M., Bersani, C., Comi, G., *International Journal of Food Microbiology* **2001**, 67, 187–195.
85. Jakovlev, V., Issac, O., Thiemer, A., Kunde, R., *Planta Medic*a **1979**, 35, 125- 140.
86. Torrado, S., Agis, A., Jimenez, M., Cadorniga, R. *Pharmazie* **1995**, 50, 141-143.
87. Szelenyi, I., Issac, O., Thiemer, K. *Planta Medica* **1979**, 35, 218- 227.
88. Villegas, L. F., Marcalo, A., Martin, J., Fernandez, I.D., Maldonado, H., Vaisberg, A. J., Hammond, G.B. *J. Natatural. Products* **2001**, 64, 1357- 1358.

89. Grassi, A., Palermi, G., Paradisi, M. *Clin. Ter*. **2000**, 151,77- 80.
90. Miyazawa, M., Nankai, H., Kameoka, H. *Phytochemistry* **1995**, 39, 1077-1080.
91. Schilcher, H. Pharmakologie und Toxikologie in: Die Kamille, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany, **1987**, p. 66.
92. Waleczek, K. J., Marques, H.M.C., Hempel, B., Schmidt, P.C., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003.**
93. Villegas, L. F., Marcalo, A., Martin, J., Fernandez, I. D., Maldonado, H., Vaisberg, A. J., Hammond, G. B., *Journal of Natural Products* **2001**, 64, 1357.
94. Ferreira, M. J. P., Constantin, M. B., Sartorelli, P., Rodrigues, G. V., Limberguer, R., Henriques, A. T., Kato, M. J., Emerenciano, V. P. *Analytica chimica Acta* 2001,125-134.
95. Maia, J. G. S., Silva, M. H. L. *Potencial Economico de Plantas Aromaticas do Para.* Museu Paraense Emilio Goeldi, Belem (PA), **1995**.
96. Nakanishi, K., Crouch, R., Miura, I., Dominguez, X., Zamudio, A., Villarreal, R. *J. Am. Chem. Soc*. **1974**, 96, 609–611.
97. Bohlmann, F., Mahanta, P. K. *Phytochemistry* **1978**, 17, 1189–1190.
98. Chiang, M. T., Bittner, M., Silva, M., Watson, W. H., Sammes, P. G. *Phytochemistry* **1979**, 18, 2033.
99. Guilhon, G., Muller, A. *Phytochemistry* **1996**, 43, 417-421
100. Schmaus, G., Schultke, W., Kubeczka, K, -H., *Planta Medica* **1988**, 55, 482-487.
101. Burkart A. Coleccion Científica del I.N.T.A. *Flora Ilustrada de Entrerios* (V), Buenos Aires, Argentine. **1979.**
102. Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánches, M. D. S., Vollar, A. *J Etnopharmacol.* **2001**, 76, 201-13.
103. Somavilla, N., Dorow, T. S. C. Levantamento das plantas medicinais utilizadas em bairros de Santa Maria. *Ciência e Natura* **1996**, 18, 131-17.
104. Castro, O. Importância social e econômica das plantas medicinais e nativas do RS. *Fórum pela vida-Projeto Plantas Vivas,* Assembléia Legislativa do RS, Brazil, **2001**, 17-11.
105. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., MacLaughlin, J. L. *Planta Medica* **1982**, 45, 31-3.
106. Dorman, H. J. D., Deans, S. G. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 88, 308-316.

107. Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Pinto, E., Oliveira, S. C., Tavares, C., Salgueiro, L. C. Cavaleiro C, M. J. Gonsalves, J. M. Oliveira; *Journal European Academy of Dermatology and Venereology*. **2004**, 18, 73-5.

108. Tzakou, O., Pitarokili, D., Chimou, I. B., Harvala, C. *Planta Medica* 2001, 67, 81-3.

109. Moerman, D. E. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, 31, 1-42.

110. Godin, P. *Nature* **1954**, *174*, 134.

111. Bernreuter, A., Lander, V., Huffer, M., Schreier, P. *Flavour Frag. J.* **1990**, 5, 71.

112. Kaiser, R., Lamparsky, D. *Tetrahedron letters* **1976**, 20,1659-1660.

113. Cavill, G.W.K., Clark, D.V., Whitfield, F. B. *Aust. J. Chem.* **1968**, 21, 2819.

114. de Souza, G.P.C., Elisabetsky, E., Nunes, D. S., Rabelo, S. K. L., da Silva, M. N. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, 58, 175-181.

115. Cantino, P. D., Harley, R. M., Wagstaff, S. J. Advances in Labiateae science, eds R.M. Harley and T. Reynolds, Royal Botanic Gardens, KEW, U.K., **1992**, pp511-522.

116. Simões, C. M. O., Mentz, L. A., Shenkel, E. P., Irgang, B. E., Stehmann, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 5. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, **1998**.173p.

117. Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., Spitzer, V. *Phytochemistry* **1997**, 44, *1283-1286.*

118. Khojasteh-Bakht, V., Nelson, S. D., Atkins, W. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 370, 59–65.

119. Kubal, G., Meyer, D. J., Norman, R. E., Sadler, P. J. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8, 780–791.

120. Khojasteh-Bakht, S. C., Koenigs, L. L., Peter, R. M., Trager, W. F., and Nelson, S. D. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, 6, 701–704.

121. Thomassen, D., Knebel, N., Slattery, J. T., McClanahan, R. H., Nelson, S. D. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 123–130.

122. A. F. Morel, N. F. Moura, E.C.M Dessoy, R. Zachia, M.M. Burger, N. Ahlert, B. Baldisserotto, *Planta medica* **2002**, 69(6), 534-538.

123. Cruz, G. L., Dicionário de plantas úteis do Brasil **1985,** pp. 597-598.

124. König, W. A., Gas Chromatogratographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, **1992**.

125. Bohlmann, F., Zalero, C. *Phytochemistry* **1977**, 16, 1065-1068.

126. Bohlmann, F., Gupta, R. K. *Phytochemistry* **1981**, 20, 1635-1637.

127. Bohlmann, F., Fritz, U. *Phytochemistry* **1984**, 20, 743-749

128. F.Bohlmann, R. Mathur; *Phytochemistry* **1982**, 21(8), 2045-2048.

129. Flach, A., Simionatto, E., Silva, U.F., Zanatta, N., Morel, A. F., Linares, C. E. *Planta Medica* **2002**, 68, 836-838.

130. Smith, M. B., Organic Synthesis. Second Edition, McGraw-Hill, New York, 2002.

131. Santos Pereira, S., Seixas, F. R. M. S., de Aquino Neto, F. R. *Quim. Nova* **2002**, 25, 321-326.

132. Custodio, A. R., Ferreira, M. M.C., Negri, G., Salatino, G, A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 354-357.

133. El-Khatib, A. S., Agha, A. M., Mahran, L. G., Khayyal, M. T. *Zeitschrift fur Naturforschung* **2002**, 57, 379-385.

134. Gil-Av, E., Feibush, B., Charles-Sigler, R. *Tetrahedron Letters* 1966, 1009.

135. Gil-Av, E. *J. Mol. Evol.* **1975**, 6, 131.

136. Koppenhoefer, B., Graf, R., Holzschuh, H., Nothdurft, A., Trettin, U., Piras, P., Roussel, C. *J. Chromatogr.* **1994**, 666, 557.

137. LC.GC Int. April, **1997,** 252.

138. Schurig, V. *Trends in analytical chemistry* **2002**, 21, 647- 73.

139. Pinto, A. C., Rezende, C. M. *Química Nova* **2003**, 26, 966-971.

140. Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* **2002**, 20, 341.

141. Bicchi, C., Artufo, G., D'Amato, V., Manzin, V., Galli, A., Galli, M., *J. Hihg Resol. Chromatogr.* **1992**, 15,710-714.

142. Konig, W. A., Gehrcke, B., Icheln, D., Evers, P., Donnecke, J., Wang, W., *J. Hihg Resol. Chromatogr.* **1992**, 15, 367-372.

143. Konig, W. A., Fricke, A., Rieck, A., Hardt, I. H., *Phytochemistry* **1995**, 39, 1119-1121.

144. Konig, W. A., Fricke, A., Saritas, Y., Momeni, B., Hobenfeld, G., *J. Hihg Resol. Chromatogr.* **1997**, 20, 55-61.

145. Bicchi, C., Artufo, G., D'Amato, V., Manzin, V., Galli, A., Galli, M., *J. Hihg Resol. Chromatogr.* **1993**, 16, 209-214

146. Bicchi, C., Artufo, G., D'Amato, V., Manzin, V., Galli, A., Galli, M., *J. Chromatography A* **1994**, 666, 137-146.
147. Mallmann, A. S., Derivatização de β e γ Ciclodextrinas e sua Aplicação em Cromatografia Gasosa Capilar Enantiosseletiva como Fases Estacionárias Quirais. Dissertação de Mestrado,UFSM, 2003.
148. Ethur, E. M., Síntese e Aplicação de β e γ Ciclodextrinas Modificadas como fases estacionárias em Cromatografia Gasosa Capilar Enantiosseletiva. Tese de Doutorado, UFSM, **2004**.
149. Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., *Journal of Applied Microbiology* **1999**; 86: 985.
150. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method of broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Standard M77-T, NCCLS 1995, Villanova.
151. Homans A. L., Fuchs A., *Journal of Chromatography A* **1970**; 51:327.
152. Hamburger, M.O., Cordell A. G. *Journal of Natural Products* **1987**; 50: 19.
153. Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. *Phytochemical Analysis* **1991**, 2, 199.
154. Food and Drug Administration: Code of Federal Regulation. **1999**, 21. 300-499.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

a comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese intitulada

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS DO RIO GRANDE DO SUL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA

elaborada por

EUCLÉSIO SIMIONATTO

como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel – Orientador – UFSM

Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques – IAC/Campinas

Profa. Dra. Ionara Irion Dalcol – UFSM

Prof. Dr. Elina Bastos Caramão – UFRGS

Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva – UPF

Santa Maria, 27 de outubro de 2004

UFSM
Biblioteca Central

Dedico este trabalho ao meu pai Euclides (in memoriam),

a minha mãe Clací, e meus irmãos Edésio e Elésia

por cada momento que estiveram ao meu lado.

Sem os quais este objetivo não seria alcançado.

Obrigado!

UFSM
Biblioteca Central

À Janaina Thomasi Facco, minha namorada, amiga e colega
por ter estado ao meu lado durante essa etapa de minha
vida, e sua família pela amizade e convivência.

UFSM
Biblioteca Central

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu sincero agradecimento,

pela orientação e estímulo durante a elaboração desta Tese.

Obrigado pela confiança e pela amizade.

UFSM
Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Ionara Irion Dalcol, minha co-orientadora e Ubiratan Flores da Silva, meus agradecimentos pela amizade e pelos incentivos para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas: Anderson S. Mallmann, Carla Porto da Silva, Eduardo M. Ethur, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: Gilvan de O. C. Dias, Ilmar B. Graebner, Wellington de Abreu Gonzaga, Sandro R. Giacommelli, Irene M. Alles, Vinicius Ilha, Enrique L. Larghi, Andréia D. Webber, Graciela Maldaner e Vanessa Gressler, Claudia Marasciulo, Caroline, Juliano, Álvaro, Adari, Vinicius Londero, pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas do departamento de Química da UFSM, pela amizade, tempo compartilhado e pelas ajudas prestadas.

Aos secretários do curso de Pós-Graduação em Química: Ademir e Valéria, pela confiança, amizade e eficientes serviços.

Aos Órgãos financiadores: CAPES, CNPq e FAPERGS, pelas concessões das bolsas e das verbas, que viabilizaram a execução deste trabalho.

UFSM
Biblioteca Central