

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO  
HEXÂNICO DA CASCA DO CAULE DE *Schinus  
lentiscifolius***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Adriano Ferraz**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA  
DO CAULE DE *Schinus lentiscifolius***

**Adriano Ferraz**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do  
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em  
Química Orgânica, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**Orientador: Dr. Ademir Farias Morel**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ferraz, Adriano

Estudo do Óleo Essencial e Extrato Hexânico da Casca do Caule de *Schinus lentiscifolius* / Adriano Ferraz.-2015.

82 p. ; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2015

1. Isolamento 2. Identificação Estrutural 3. Atividade Biológica I. Farias Morel, Ademir II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

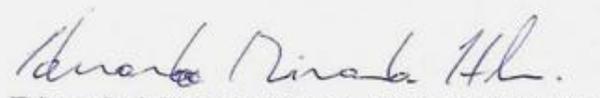
**ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA  
DO CAULE DE *Schinus lentiscifolius***

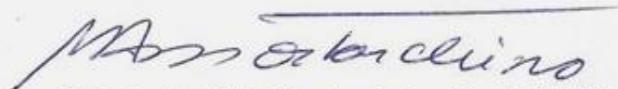
elaborada por  
**Adriano Ferraz**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Ademir Farias Mord, Dr.  
Presidente/Orientador

  
Eduardo Miranda Ethur, Dr. (UNIVATES)

  
Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 06 de Abril de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe Elci Ferraz e minha irmã Jaqueline Ferraz, pelas palavras de apoio nos vários momentos de dificuldade.

Ao meu orientador professor Dr. Ademir Farias Morel.

Ao colega Alexandre, pela realização das atividades biológicas.

A professora Graciela Maldaner e Denise Russowski, por suas contribuições na qualificação.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, com auxílios, conselhos, empréstimos.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DO CAULE DE *Schinus lentiscifolius*

Autor: Adriano Ferraz

Orientador: Dr. Ademir Farias Morel

Data e Local da Defesa: 06 de Abril de 2015, Santa Maria.

Muitos avanços na ciência e na indústria foram inspirados pela pesquisa em produtos naturais, além de desempenhar um papel importante na evolução da síntese orgânica, pois muitos métodos foram inseridos pelos esforços na síntese total de compostos naturais. Os escassos estudos com a espécie *Schinus lentiscifolius* e por ser amplamente encontrada no Rio Grande do Sul contribuíram para sua escolha como objeto de estudo. Utilizando para tanto o óleo essencial extraído por hidrodestilação da casca do caule e o extrato hexânico. A análise destes revelou a presença de estruturas básicas como mirceno e  $\alpha$ -pineno, no entanto, quando há o aquecimento do material vegetal que os contêm, ocorre a transformação destas em estruturas mais complexas como o biciclogermacreno, este, se transformou em espatulenol durante o processo de isolamento. O estudo do extrato hexânico revelou a presença de uma mistura de quatro isômeros com polaridade similar, sendo necessária a esterificação para auxiliar na separação. E a verificação de um acoplamento no experimento cosy que não era esperado, sugerindo uma alteração na estereoquímica do ácido morônico. Obteve-se também, um metabólito constituído por uma lactona de cinco membros com um substituinte de cadeia linear composto por dezesseis carbonos. Os derivados originados do ácido morônico foram uma tentativa de potencializar sua atividade antimicrobiana através da inserção de uma tripla ligação e posteriormente de um triazol. As atividades antimicrobianas revelaram que apenas o ácido morônico apresenta uma atividade significativa frente às bactérias testadas e que a tentativa de potencializar essa atividade com os derivados foi ineficaz.

**Palavras-chave:** *Schinus lentiscifolius*. óleo essencial. triterpenos.

## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **STUDY ESSENTIAL OIL AND EXTRACT HEXANE OF STEM BARK OF *Schinus lentiscifolius***

Author: Adriano Ferraz

Academic Advisor: Dr. Ademir Farias Morel

Date and Place of Defense: April 6, 2015, Santa Maria.

Many advances in science and industry were inspired by research in natural products, and play an important role in the evolution of organic synthesis, as many methods have been inserted by the efforts in the total synthesis of natural compounds. The few studies with *Schinus* species *lentiscifolius* and be widely found in Rio Grande do Sul contributed to their choice as object of study. Using for this purpose the essential oil extracted by hydrodistillation of the stem bark and the hexane extract. The analysis revealed the presence of these basic structures such as  $\alpha$ -pinene and myrcene, however, when there is heating the plant material that contain the transformation occurs in more complex structures such as bicyclogermacrene, this turned into during spathulenol isolation process. The study of extract revealed the presence of a mixture of four isomers of similar polarity, requiring esterification to aid in separation. And check of a coupling in the cosy experiment that was not expected, suggesting a change in stereochemistry of morônico acid. Obtained also a metabolite comprises a five-membered lactone with a linear chain substituent comprising sixteen carbons. The originated derivatives morônico acid were an attempt to enhance their antimicrobial activity by inserting a triple bond and later a triazole. The antimicrobial activity revealed that only the morônico acid has a significant activity against the bacteria tested and that the attempt to enhance this activity with derivatives was ineffective.

Keywords: *Schinus lentiscifolius*. Essential oil. Triterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos da árvore (a), frutos (b), tronco (c) e ramos (d) de <i>S. lentiscifolius</i> . .....	13
Figura 2 – Processo biosintético para formação de unidades de isopreno. ....	16
Figura 3 – Atuação da enzima mevalonato 5-difosfato descarboxilase (vi).....	16
Figura 4 – Ação da enzima ipp-isomerase.....	17
Figura 5 – Exemplos da formação de terpenos acíclicos e cíclicos.....	18
Figura 6 – Perfil cromatográfico óleo essencial da casca do caule de <i>S. lentiscifolius</i> , coletada em março de 2013.....	24
Figura 7 – Estruturas dos principais picos encontrados no cromatograma do óleo essencial de <i>Schinus lentiscifolius</i> e seus rendimentos percentuais.....	24
Figura 8 – Cromatograma da fração isolada a partir do óleo coletado em março de 2013, o pico em 25,03 min. corresponde a 71,0% dos sinais.....	25
Figura 9 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H (400MHz) (a) e RMN <sup>13</sup> C (100MHz) (b) para o espatulenol isolado a partir do óleo coletado em março de 2013, em CDCl <sub>3</sub> .....	26
Figura 10 – Proposta para conversão do biciclogermacreno em espatulenol.....	27
Figura 11 – Perfil cromatográfico do óleo essencial coletado em novembro de 2014.....	27
Figura 12 – Cromatograma da fração destilada à pressão reduzida e a 75,0°C.....	28
Figura 13 – Cromatograma e espectros de massas da mistura de estruturas do óleo.....	29
Figura 14 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H. (a) e de RMN <sup>13</sup> C (b), da mistura de compostos encontrados no óleo, em CDCl <sub>3</sub> à 400MHz. ....	30
Figura 15 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR <sup>2,3</sup> J <sub>C-H</sub> COLOC da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos da estrutura A.....	31
Figura 16 – Espectro 1D HOMONUCLEAR DEPT135 da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. Em destaque, os carbonos da estrutura A. ....	32
Figura 17 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR <sup>1</sup> J <sub>H-H</sub> COSY da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos da estrutura A. ....	33
Figura 18 – Acoplamentos verificados no COLOC (a) e no COSY (b).....	33
Figura 19 – Espectro 1D HOMONUCLEAR DEPT135 da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. Em destaque, os carbonos da estrutura B. ....	34
Figura 20 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR <sup>1</sup> J <sub>H-H</sub> COSY da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos referentes à estrutura B. ....	35
Figura 21 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR <sup>2,3</sup> J <sub>C-H</sub> COLOC da mistura de compostos do óleo, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. Em destaque os acoplamentos referentes à estrutura B. ....	36
Figura 22 – Acoplamentos verificados no COLOC (a) e no COSY (b).....	36
Figura 23 – Cromatograma dos ésteres sintetizados a partir da mistura de isômeros (estrutura 30A-b e estrutura 30B-a).....	38
Figura 24 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (a) e RMN <sup>13</sup> C (b) do composto 30A, em CDCl <sub>3</sub> .....	39
Figura 25 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 30A, expandido (δ 5,86 a δ 6,10ppm) em CDCl <sub>3</sub> . ....	40
Figura 26 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR <sup>1</sup> J <sub>H-H</sub> COSY do composto 30A, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz.....	41
Figura 27 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR <sup>2,3</sup> J <sub>C-H</sub> HMBC acoplamento do Hidrogênio 23, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz.....	41
Figura 28 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR <sup>2,3</sup> J <sub>C-H</sub> HMBC acoplamento dos carbonos das duplas ligações, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz. ....	42
Figura 29 – Composto 30A com os acoplamentos observados. ....	42
Figura 30 – Difração de raio x do composto 30A .....	43
Figura 31 – Espectro RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o composto 30B, em CDCl <sub>3</sub> , a 400MHz.....	44

Figura 32 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR $^{2,3}J_{C-H}$ HMBC composto B, em $CDCl_3$ , a 400MHz.....	45
Figura 33 – Parte da estrutura B evidenciada pelos acoplamentos da figura 32 .....	45
Figura 34 – Composto 30B com os acoplamentos observados .....	46
Figura 36 – Espectro RMN $^1H$ composto 30C, em $CDCl_3$ a 400MHz.....	47
Figura 36 – Espectro RMN $^{13}C$ composto 30C a 100,62 MHz .....	47
Figura 37 – Composto 30C, ácido morônico.....	48
Figura 38 – espectro RMN $^1H$ do composto 30D, em $CDCl_3$ , a 400MHz.....	48
Figura 39 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR $^1J_{H-H}$ , COSY composto 30D, em $CDCl_3$ , a 400MHz.....	49
Figura 40 – Difração de raio-x do composto 30D, epímero do ácido morônico.....	50
Figura 41 - Espectro RMN $^1H$ para o composto IH2, em $CDCl_3$ , á 400MHz.....	50
Figura 42 – Espectro de RMN $^{13}C$ para o isolado IH2, em $CDCl_3$ , a 100MHz .....	51
Figura 43 – Espectro de RMN 2D $^1J_{H-C}$ HMQC, do isolado IH2, em $CDCl_3$ .....	52
Figura 44 – Espectro de RMN 2D $^{2,3}J_{H-C}$ HMBC, do isolado IH2, em $CDCl_3$ .....	52
Figura 45 – Estrutura e acoplamentos observados para o isolado IH2.....	53
Figura 46 – Estrutura sintetizada a partir do ácido morônico, denominada DM1.....	54
Figura 47 - Espectro RMN $^1H$ do derivado do ácido morônico DM1, em $CDCl_3$ , a 400MHz.....	54
Figura 48 - Estrutura sintetizada a partir do DM1, denominada DM2.....	55
Figura 49 – Espectro de RMN $^1H$ para o derivado DM2, em $CDCl_3$ , a 400MHz.....	55
Figura 49b – Espectro de RMN $^1H$ , expansão ( $\delta$ 5,00ppm a $\delta$ 5,68ppm) do derivado DM2, em $CDCl_3$ .....	56
Figura 50 – Espectro de RMN $^{13}C$ do derivado DM2, em $CDCl_3$ , a 100MHz.....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 A Família Anacardiceae: suas características, fitoquímica e atividades biológicas ...</b>	<b>11</b>
<b>2.2 A espécie <i>Schinus lentiscifolius</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Biossíntese de Terpenos .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Coleta e preparação do material vegetal .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Espectrometria de ressonância magnética (RMN) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Cromatografia Gasosa .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Procedimento para esterificação e obtenção dos derivados do ácido morônico .....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Esterificação da mistura de isômeros .....	21
3.4.2 Obtenção dos derivados do ácido morônico .....	21
<b>3.5 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Estudo do óleo essencial .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2- Estudo do extrato hexânico .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Derivados do ácido Morônico .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Atividades antimicrobiana.....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido investigados e utilizados para combater doenças desde o início da história humana. Antes de 1900 a maioria dos medicamentos eram de origem natural perfazendo um total de 80%, extraídos de cascas, folhas, frutos, e de outras partes de plantas<sup>1</sup>. Entre 1981 e 2010 quase 48,6% das drogas inseridas no mercado tinham origem natural, no caso de anticancerígenos e anti-infecciosos esse número é ainda maior, sendo dois terços derivados de produtos naturais<sup>2</sup>.

Muitos avanços na ciência e na indústria foram inspirados pela pesquisa em produtos naturais, além de desempenhar um papel importante na evolução da síntese orgânica, pois muitos métodos foram inseridos pelos esforços na síntese total de compostos naturais<sup>3</sup>.

No entanto, novos produtos farmacêuticos de origem natural levam cerca de uma década para serem desenvolvidos e comercializados, isso é visto como um empecilho na pesquisa de produtos naturais<sup>1</sup>. Outra barreira encontrada é a quantidade de produto químico requerido para torna-lo um fármaco. Por exemplo, considerando a menor concentração de um composto ativo presente no material vegetal (0,001%); o isolamento e determinação da estrutura química exige no mínimo de 50,0 mg do composto ativo, sendo necessário cerca de 5,0kg de material vegetal, o que muitas vezes não está disponível para pesquisa<sup>4</sup>.

Contudo, os estudos com produtos naturais serão sempre visto como uma possível fonte de novos fármacos, devido a diversidade de compostos encontrados em plantas<sup>5</sup>. Por exemplo, alcaloides, flavonoides, terpenos e lignanas, compõem algumas das classes de metabólitos secundários, cada uma dessas, apresenta uma diversidade gigantesca de estruturas, podendo revelar-se com alguma aplicação na indústria.

Neste cenário, podem-se inserir espécies como a *Schinus lentiscifolius*, amplamente encontrada no Rio Grande do Sul, com poucos estudos relatados e o mais importante, faz

---

<sup>1</sup> MCCHESENEY, D. J.; VENKATARAMAN, K. S.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68. p. 2015-2022, 2007.

<sup>2</sup> NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75. p. 311-335, 2012.

<sup>3</sup> WILSON, R.M.; DANISHEFSKY, S. Small Molecule Natural Products in the Discovery of Therapeutic Agents: The Synthesis Connection. **J. Org. Chem.** v. 71, p. 8329-8351, 2006.

<sup>4</sup> CREMIN, P.A.; ZENG, L. High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC-MS evaporative light scattering detection. **Anal. Chem.** v. 74, p. 5492-5500, 2002.

<sup>5</sup> WATERMAN, P.G. Secondary metabolites: their function and evolution. **Ciba Foundation Symposium**, v. 171. p. 255-275, 2002.

parte de um gênero que apresenta algumas atividades farmacológicas significantes, ou seja, o fato de algumas espécies deste gênero apresentar atividades demonstra indícios que esta espécie também possa apresentar<sup>6,7,8</sup>.

Levando em consideração a ampla utilização da espécie *Schinus lentiscifolius* na medicina popular e a escassez de estudos científicos<sup>9,10</sup>, torna esta espécie interessante para pesquisa, o que justifica o seu uso neste estudo, tendo como objetivo avaliar a composição química do óleo essencial e do extrato hexânico da casca do caule.

### 1.1 Objetivos específicos

Estudar a composição química do óleo essencial da casca do caule da espécie *Schinus lentiscifolius*, utilizando procedimentos distintos na preparação do material vegetal;

Isolar compostos presentes no óleo essencial; verificar as atividades biológicas dos mesmos;

Estudar a composição química do extrato hexânico da casca do caule e sua atividade biológica, bem como de seus constituintes;

Obter derivados a partir do ácido morônico.

---

<sup>6</sup> GOMES, V. et al. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 222-227, 2013.

<sup>7</sup> MARTINS, M. R. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 485-492, 2014.

<sup>8</sup> WHEELER, G. S.; CHAWNER, M.; WILLIAMS, D. A. Predicting the host range of *Nystalea ebalea*: Secondary plant chemistry and host selection by a surrogate biological control agent of *Schinus terebinthifolia*, **Biological Control**, v. 73, p. 39-49, 2014.

<sup>9</sup> LUZ, C. L. S. **Anacardiaceae R. Br. Na flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

<sup>10</sup> PAWLOWSKI, A. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**. v. 88, p. 198-203, 2013.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Família Anacardiceae: suas características, fitoquímica e atividades biológicas

Esta família é composta por 80 gêneros e aproximadamente 600 espécies, encontradas principalmente em terras baixas, nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. Nas Américas existem aproximadamente 32 gêneros nativos; no Brasil estão catalogados 14 gêneros com 57 espécies de Anacardiceae<sup>11</sup>.

Tal família compreende um grupo de plantas lenhosas e resiníferas, cujas partes novas exalam aroma e sabor característicos. Um exemplo bastante conhecido é o fruto da manga (*Mangifera indica* L.). As folhas são simples ou compostas, e as flores são dialipétalas, produzindo frutos secos ou carnosos.

Algumas espécies de Anacardiceae têm uso na medicina popular pela potencial atividade antifúngica<sup>12</sup>. Aproximadamente 32 gêneros causam dermatites, essas podem ser causadas pela presença de compostos fenólicos e catecólicos<sup>13</sup>. Além disso, a busca pela origem dessas atividades revelaram conjuntos de compostos como lipídios, flavonóides, esteroides, xantonas, compostos terpênicos, como os triterpenos e os encontrados nos óleos essenciais<sup>14,15</sup>.

Esta família abriga grande diversidade de metabolitos secundários, que estão estreitamente relacionadas com as propriedades biológicas de algumas das suas espécies, o que a torna uma família bastante promissora na busca de substâncias bioativas<sup>16</sup>. As frutas e

---

<sup>11</sup> FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. V. 1, 2010.

<sup>12</sup> FENNER, R. et al. Plantas Utilizadas na Medicina Popular Brasileira com Potencial Atividade Antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, p. 369-394, 2006.

<sup>13</sup> MITCHELL, J. D. The Poisonous Anacardiaceae Genera of the World. **Advances in Economy Botany**. v. 8, p. 103-129, 1990.

<sup>14</sup> BANDYOPADHYAY, C.; GHOLAP, A. S.; MANDAPUR, V. R. Caracterização de Látex alkenylresorcinol em manga (*Mangifera indica* L.). **J. Agric. Food. Chem.** v. 33, p. 377-379, 1985.

<sup>15</sup> KHAN, M. N. I.; NIZAMI, S. S. KHAN, M. A. New Saponins From *Mangifera indica*. **J. Nat. Prod.** v. 56, p. 767-770, 1993.

<sup>16</sup> CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 15, p. 158-169, 2013.

pseudo-frutos de muitas espécies constituem um importante recurso alimentar exemplificado pelo caju (*Anacardium occidentale*), manga (*Mangifera indica*) e pistache (*Pistacia vera*)<sup>17</sup>.

Do ponto de vista químico, os gêneros mais frequentemente estudados da família Anacardiaceae são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirirae* e *Melanorrhoea*<sup>18</sup>.

Para exemplificar tal diversidade de metabólitos e de suas atividades biológicas correspondentes, uma análise fitoquímica de *Schinus terebinthifolius*, revelou, por exemplo, compostos fenólicos como galato de metila e etila, além de flavonoides (miricetina, miricetrina e quercitrina), isolados do extrato polar das folhas, cuja ocorrência está associada à elevada atividade antirradicalar. A análise química das cascas do tronco mostrou a existência de antraquinonas, xantonas e esteroides livres. Os óleos essenciais de folhas, flores e frutos são compostos basicamente por derivados mono e sesquiterpênicos, sendo que estes óleos apresentaram atividades alelopáticas, citotóxica e tripanocida. Além disso, o estudo do extrato etanólico das folhas apresentou potencial *in vitro* frente a células tumorais humanas de melanoma (A2058), adenocarcinoma de mama (MCF7), leucemia (HL-60) e carcinoma cervical (HeLa)<sup>19</sup>.

A família Anacardiaceae se caracteriza por apresentar quantidades consideráveis de óleos voláteis em seus frutos e folhas, os quais são responsáveis por inúmeras propriedades biológicas<sup>20</sup>.

Óleos voláteis extraídos de exemplares desta família são conhecidos por apresentarem atividade antibacteriana: óleo de *Pistacia lentiscus* foi mais ativo contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas; óleo de folhas de *S. terebinthifolius* exibiu atividade antifúngica e antibacteriana, enquanto que o de *S. polygamus*, o qual apresenta composição variável, conforme o local de coleta, também apresentou diferentes atividades antibacterianas. O óleo essencial extraído de *Schinus molle* apresenta atividade contra *Salmonella anatum* e *S. enteritidis*. Este mesmo óleo, em baixas concentrações apresentou atividade bacteriostática, enquanto que em altas concentrações, uma atividade bactericida tornou-se pronunciada<sup>21</sup>.

---

<sup>17</sup> MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**. v. 17, p. 9728-9740, 2012.

<sup>18</sup> CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 15, p. 158-169, 2013.

<sup>19</sup> SANTANA, J. S. et al. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 2245-2248, 2012.

<sup>20</sup> MONTANARI, R. M. loc. cit.

<sup>21</sup> COLE, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 821-828, 2014.

Assim sendo, investigações alusivas às propriedades biológicas e à composição dos óleos encontrados em membros da família Anacardiaceae representam uma abordagem racional para identificação de novas substâncias com valor medicinal/econômico potencial. De modo geral, óleos voláteis das folhas de espécies da família Anacardiaceae variam entre 0,3% a 0,7% (m/m)<sup>7</sup>.

## 2.2 A espécie *Schinus lentiscifolius*

Espécie nativa da América do sul, no Brasil é conhecida como aroeira-cinzenta, considerada uma espécies bastante rústica (figura 1). É uma árvore com 4 a 6 metros de altura, apresenta flores esbranquiçada, femininas e masculinas. O fruto é esférico de cor violeta.



Figura 1 – Fotos da árvore (a), frutos (b), tronco (c) e ramos (d) de *S. lentiscifolius*<sup>22</sup>.

<sup>22</sup> FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, Martin Molz, 2009, disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=1580](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1580)>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

Além disso, estudos recentes têm relatado que *S. lentiscifolius* tem se revelado como um excelente bioindicador de elementos raros, sendo capaz de armazená-los em suas folhas e raízes<sup>23</sup>.

Na medicina popular a planta é utilizada para limpeza de ferimentos, a casca produz uma essência balsâmica que é utilizada para dores nos pés. A parte aérea é utilizada para o tratamento antipirético<sup>24</sup>.

O óleo essencial das folhas é composto principalmente por sesquiterpenos, tendo como composto majoritário o  $\delta$ -cadineno. Outros terpenos presentes em quantidade significativas são o limoneno, sabineno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -pineno, terpinen-4-ol. Este óleo tem ação alelopática frente à germinação de algumas sementes, por exemplo, alface (*Lactuca sativa*). O crescimento celular em plantas depende de um processo mitótico normal, o óleo essencial, neste caso, diminui o índice mitótico das células do meristema da raiz, isso sugere que a exposição ao óleo essencial de *Schinus lentiscifolius* conduz a perturbações no ciclo celular, diminuindo o número de células e a divisão mitótica<sup>25</sup>.

Um exemplo, de triterpeno isolado desta espécie é o ácido morônico, extraído com acetato de etila das folhas, apresenta-se como um sólido branco com ponto de fusão de 210,0°C. Apresentando uma atividade antimicrobiana para diversas bactérias, semelhante ao padrão utilizado, além disso, estudos revelaram que seu modo de ação é bacteriolítico<sup>26</sup>. Outros estudos revelaram a presença de ácido morônico na casca do caule desta mesma espécie, além da presença de uma mistura de quatro compostos com mesmo íon molecular, sugerindo tratar-se de uma mistura de isômeros de triterpenos<sup>27</sup>.

---

<sup>23</sup> LIMA E CUNHA, M. C.; NARDI vs LAURO, MULLER, I. F. Biogeochemistry of REE elements and tetrad effect in the soil-plant system: a study on volcanic rock covers in southernmost Brazil. **An Acad Bras Cienc**, v. 84, p. 911-918, 2012.

<sup>24</sup> LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, p. 49-59, 2002.

<sup>25</sup> PAWLOWSKI, Â. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 198–203, 2013.

<sup>26</sup> GEHRKE, I. T. S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 486–491, 2013.

<sup>27</sup> MOREL, A. F. et al. Identificação do triterpeno ácido morônico em extratos e frações obtidas da espécie *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) por CG. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves.

### 2.3 Biossíntese de Terpenos

Os terpenos são o maior grupo de produtos naturais, compreendendo, pelo menos 30 mil compostos<sup>28</sup>, além disso, contêm a maior variedade estrutural, centenas de monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e triterpenos (C30) são conhecidos<sup>29</sup>. Esta variedade, pode ser atribuída a uma classe de enzimas conhecidas como terpeno-sintases, que convertem acíclico prenil difosfato em uma infinidade de estruturas cíclicas e acíclicas, além de existirem um grande número de terpeno-sintases, que favorecem, à esta diversidade<sup>30</sup>.

A biossíntese tem início na condensação entre acetil-CoA com acetoacetil-CoA, para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), catalisada pela enzima HMG-CoA sintase (II). A próxima etapa é a desacilação redutiva de HMG-CoA em mevalonato (MVA) empregando a enzima HMG-CoA redutase (III) e dois equivalentes de NADPH como redutor<sup>31</sup>.

Mevalonato quinase (IV) catalisa a fosforilação do mevalonato, gerando mevalonato 5-fosfato (MVA 5-fosfato). A ação da enzima fosfomevalonato quinase (V) catalisa a formação do mevalonato 5-difosfato (MVA 5-difosfato). A sequência é a atuação da enzima mevalonato 5-difosfato descarboxilase (VI), dando origem ao isopentil difosfato (IPP), que sofre isomerização pela enzima IPP isomerase (VII) produzindo assim unidades de isopreno, o difosfato dimetilalilo (DMAPP)<sup>32</sup>. Todo o processo biosintético descrito acima pode ser verificado na figura 2.

---

<sup>28</sup> CONNOLLY, J.D., Hill, R.A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 22, p. 487–503, 2005.

<sup>29</sup> FRAGA, B.M. Natural sesquiterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 943–972, 2006.

<sup>30</sup> DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T. G., GERSHENZON, J., Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**. v. 70, p. 1621–1637, 2009.

<sup>31</sup> DEWICK, P.M., 1999. The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.** v. 16, p. 97–130, 1999.

<sup>32</sup> CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids, **Nat. Prod. Rep.** v. 22, p. 487-503, 2005.

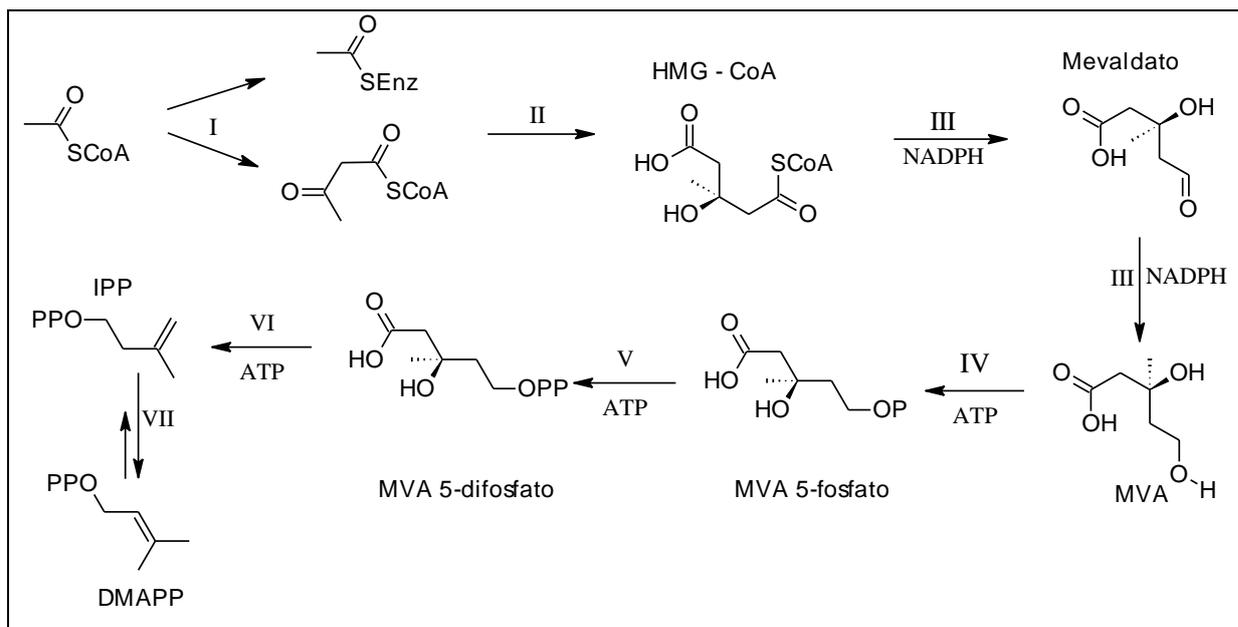


Figura 2 – Processo biosintético para formação de unidades de isopreno.

A figura 3 ilustra detalhes da ação da enzima mevalonato 5-difosfato descarboxilase (VI), este mecanismo ainda aguarda esclarecimento, no entanto, há a fosforilação de uma hidroxil terciário e uma molécula de ATP facilita a descarboxilação-eliminação, gerando IPP, gás carbônico e ácido inorgânico<sup>15</sup>.

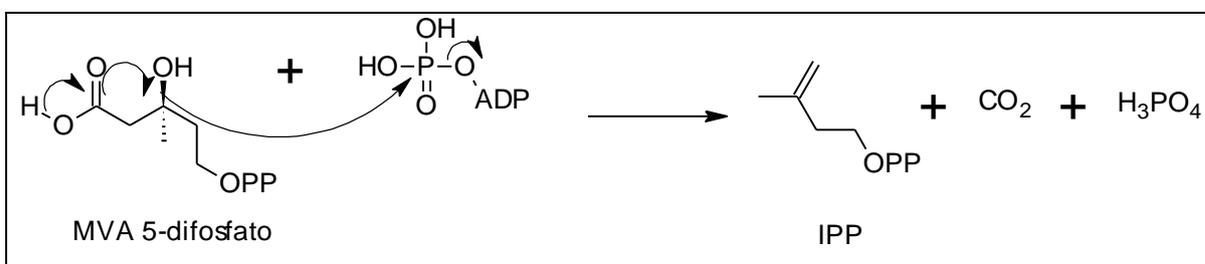


Figura 3 – Atuação da enzima mevalonato 5-difosfato descarboxilase (vi).

A figura 4 mostra a atuação da enzima IPP isomerase (VII), essa enzima catalisa o rearranjo 1,3-alfílico que converte IPP em DMAPP, através do mecanismo postulado duas-bases catiônico, resultando na transposição de hidrogênio<sup>15</sup>.

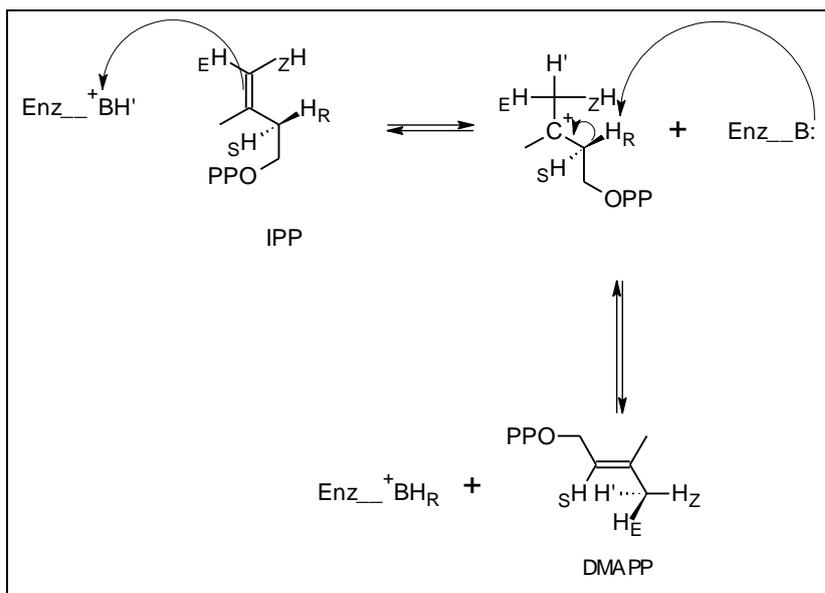


Figura 4 – Ação da enzima ipp-isomerase.

O mecanismo para síntese de terpenos passa por um intermediário carbocátion comum, este intermediário passa por uma serie de ciclizações, ou outras mudanças, como rearranjos, adição de hidretos, terminada pela perda de prótons ou adição de nucleófilos. A formação de produtos cíclicos é impedida pela conformação E, no entanto ocorre à conversão do geranyl cátion para linalil difosfato (cis), possibilitando a formação de anéis de seis membros, como é possível verificar na figura 5, além de demonstrar algumas transformações até a obtenção de terpenos<sup>14</sup>.

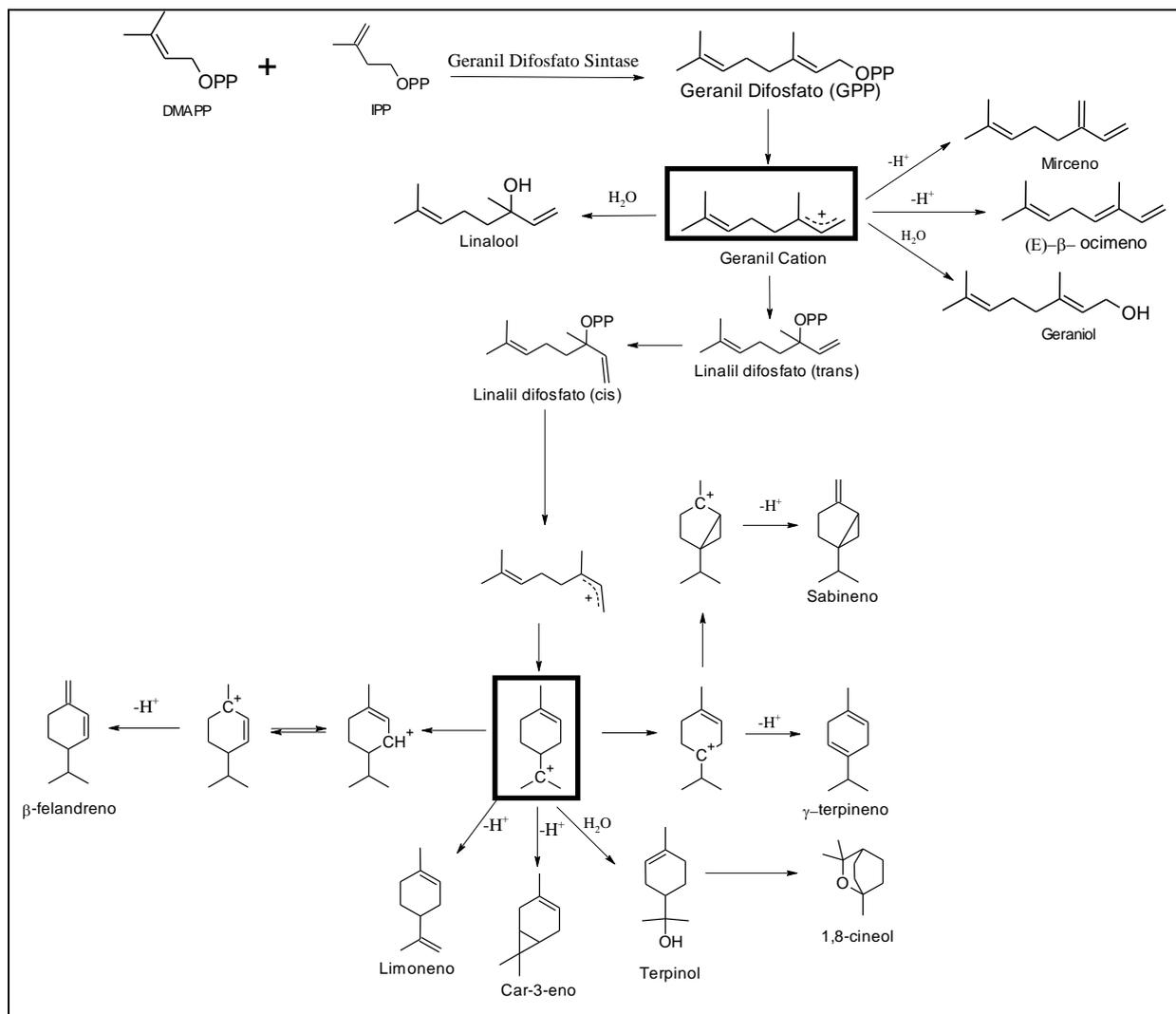


Figura 5 – Exemplos da formação de terpenos acíclicos e cíclicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e preparação do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no interior do município de Santana do Livramento-RS (30°50'25.3"S 55°29'49.5"W) em duas ocasiões, uma no mês de março de 2013 e outra no mês de novembro de 2014. O material coletado refere-se à casca do caule da espécie *Schinus lentiscifolius* (registro 6376).

O material vegetal coletado em março de 2013 foi seco em estufa por 72 h a 40,0°C, moído em triturador de facas e dividido em duas partes (200,0 g e 400,0 g), sendo que a parte contendo 200,0 g foi submetida à hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger, por um período de 3 à 4 h consecutivas. Os óleos foram coletados em frasco contendo éter etílico, a fase orgânica foi extraída. O óleo volátil foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado para eliminar resíduos sólidos, e o solvente orgânico eliminado através de fluxo de nitrogênio até massa constante. Parte deste (aproximadamente 1 mg) foi submetido a análise por cromatografia á gás e o restante empregou-se na separação cromatográfica em coluna, utilizadou-se 120,0 g de sílica gel (70-30 mesh), como fase estacionária e como sistema eluente iniciou-se com hexano puro passando para a mistura hexano/acetato de etila, com um aumento crescente de polaridade até acetato de etila puro, cada fração coletada continha 10 mL, analisou-se as frações por cromatografia em camada delgada (CCD) e reuniu-se as frações semelhantes, originando 25 frações. As frações eluidas com hexano/acetato de etila (90:10) continham um material viscoso amarelado, o restante das frações foram analisadas por cromatografia á gás.

A outra parte do material vegetal coletado em março de 2013 foi submetido à extração com hexano em um aparelho de Soxhlet por aproximadamente doze horas, obtendo o extrato hexânico. Este foi cromatografado em coluna, utilizou-se 300,0 g de sílica gel (70-30 mesh), como fase estacionária, e como sistema eluente iniciou-se com hexano puro passando para a mistura hexano/acetato de etila, com um aumento crescente de polaridade, até acetato de etila puro. Cada fração foi coletada com um volume de aproximadamente 75,0 mL sendo analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas, originando oito frações.

As frações eluídas com hexano/acetato de etila (75:25) continham uma mistura de isômeros e as frações hexano/acetato de etila (95:5) originaram um sólido branco com ponto de fusão de 75,0°C.

O material vegetal coletado em novembro de 2014 foi fragmentado com auxílio de uma tesoura e submetido à hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger por um período de 3 à 4 h consecutivas. Os óleos foram coletados em frasco contendo éter etílico, a fase orgânica foi extraída. O óleo volátil foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado para eliminar resíduos sólidos, e o solvente orgânico eliminado através de fluxo de nitrogênio até massa constante. Parte deste (aproximadamente 1 mg) foi submetido a análise por cromatografia a gás e o restante passou por um processo de destilação a pressão reduzida em banho maria, obteve-se um destilado à 75,0°C.

### 3.2 Espectrometria de ressonância magnética (RMN)

Os espectros de ressonância magnética foram obtidos de um espectrômetro Bruker Advance 400 MHz, no Departamento de Química na Universidade Federal de Santa Maria. Operando-se a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Para preparação das amostras, utilizou-se de 15 a 30 mg de amostras em 0,4 mL de Clorofórmio Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) em tubos de 5,0 mm de diâmetro. O experimento 2D Dossy foi obtido de um espectrômetro Bruker Advance 600 MHz. Todos os experimentos foram processados com o *software* TOPSPIN-NMR 1.0.

### 3.3 Cromatografia Gasosa

As análises de cromatografia a gás foram realizadas em um equipamento Varian, modelo 3400, coluna capilar DB5 (30 m, i.d. 0,25 mm, filme 0,25  $\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor 220°C, operando com rampa de aquecimento temperatura inicial 60°C, com rampa de 3,0°C  $\text{min}^{-1}$  até 250°C, gases:  $\text{N}_2$  1,5  $\text{ml min}^{-1}$ , hidrogênio 30  $\text{ml min}^{-1}$  e ar sintético 300  $\text{ml min}^{-1}$ .

Os índices de retenção dos compostos do óleo hidrodestilado foram obtidos utilizando-se uma solução de 1,0% em hexano (v/v) de padrões de alcanos lineares ( $\text{C}_7\text{-C}_{23}$ ) e uma solução hexânica de mesma concentração de óleo essencial. Os tempos de retenção dos

hidrocarbonetos e do componente do óleo essencial foram empregados para calcular o Índice de Kovats (IK) dos constituintes majoritários do óleo, de acordo com a literatura<sup>33,34</sup>. A identificação dos constituintes majoritários presentes no óleo essencial foi realizada pela comparação do Índice de Kovats calculado com a literatura<sup>35</sup>.

### 3.4 Procedimento para esterificação e obtenção dos derivados do ácido morônico

Houve a necessidade de realizar-se a esterificação da mistura de isômeros encontrado no extrato hexânico para obter as quatro estruturas isoladas. Também foram obtidos dois derivados do ácido morônico.

#### 3.4.1 Esterificação da mistura de isômeros

Em 90 mg da mistura adicionou-se 9 mL de uma solução de cloreto de hidrogênio em metanol à 2 mol L<sup>-1</sup>, deixou-se em agitação por aproximadamente 12 h. Monitorou-se a reação através de CCD, utilizando como eluente Hexano/Acetado de etila (9:1). Após este período os produtos foram extraídos com éter etílico (3x20 mL), secando-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporando-se o solvente em rota-evaporador. Os produtos da reação foram separados utilizando cromatografia em placa preparativa.

#### 3.4.2 Obtenção dos derivados do ácido morônico

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 0,08 mmol de ácido morônico, 1 mL de THF, 0,16 mmol de carbonato de cálcio e 0,4 mmol de brometo de propargila. Deixou-se a mistura com agitação por 8h à temperatura ambiente, a reação foi monitorada por CCD. Após este período extraiu o produto com éter etílico (3x20 mL) e purificou-se com cromatografia em placa preparativa, originando assim o derivado DM1.

---

<sup>33</sup> LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa, São Carlos, 1993.

<sup>34</sup> COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos Cromatográficos, Editora da Unicamp, 1997.

<sup>35</sup> ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

O derivado DM2 foi sintetizado a partir do DM1: em um balão de fundo redondo adicionou-se 0,03 mmol do composto DM1, 2 mL de uma solução de t-BuOH:H<sub>2</sub>O (2:1), 0,006 mmol de ascorbato de sódio e 0,0045mmol de sulfato de cobre. A esta mistura adicionou-se 0,06 mmol de 1-(azidometil)-4-metilbenzeno, deixou-se em refluxo por 24 h, extraiu-se o produto com éter etílico (3x30 mL) e purificou-se com cromatografia em placa preparativa.

### 3.5 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os testes foram realizados baseando-se pela *National Committee for Clinical Laboratory Standarts* (NCCLS)<sup>36</sup> em microplacas de poliestireno, com uma série de diluições das amostras em meio ao caldo caseína de soja e Sabouraud, contendo 2,0% do surfactante Tween 80, iniciando-se com a concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup> de amostra. Os poços foram incubados com a suspensão microbiana com intensa homogeneização e as placas incubadas por um período de 24 horas a 35-37°C para bactérias. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado pelo aparecimento de turvação.

As atividades antimicrobianas foram realizadas utilizando cepas padrão da *American Type Culture Colection* (ATCC), constituídas de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos. As substâncias utilizadas como referência foram ampicilina e azitromicina.

---

<sup>36</sup> NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow AeroBically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Esta parte da dissertação tem como objetivo, descrever de forma detalhada, os resultados obtidos do trabalho realizado com a casca do caule de *Schinus lentiscifolius*, bem como, a discussão dos mesmos. Para tanto, este capítulo segue abordando o estudo com o óleo essencial, posteriormente o estudo do extrato hexânico, os dois derivados sintetizados a partir do ácido morônico e finalmente as atividades biológicas.

### **4.1 Estudo do óleo essencial**

O objetivo deste estudo era evidenciar os principais constituintes do óleo, o isolamento dos mesmos e a atividade biológica que estes compostos possam apresentar. O perfil cromatográfico do óleo essencial coletado em março de 2013 está representado na figura 6, à análise do tempo de retenção e do Índice de Kovats revelam que os sinais em destaque correspondem às estruturas demonstradas na figura 7, esta figura também traz informações referentes ao percentual destes compostos no óleo essencial.

Através da cromatografia em coluna obteve-se uma fração isolada (F25) com tempo de retenção de 25,028 min (figura 8) sendo que o mesmo encontra-se no óleo com um percentual de 4,85%, sendo inferior as demais sinais, ou seja, teoricamente dever-se-ia isolar as estruturas com maior percentual no óleo. Além disso, a análise por cromatografia á gás de todas as frações coletadas não revelou a presença de nenhum dos tempos de retenção do óleo essencial.

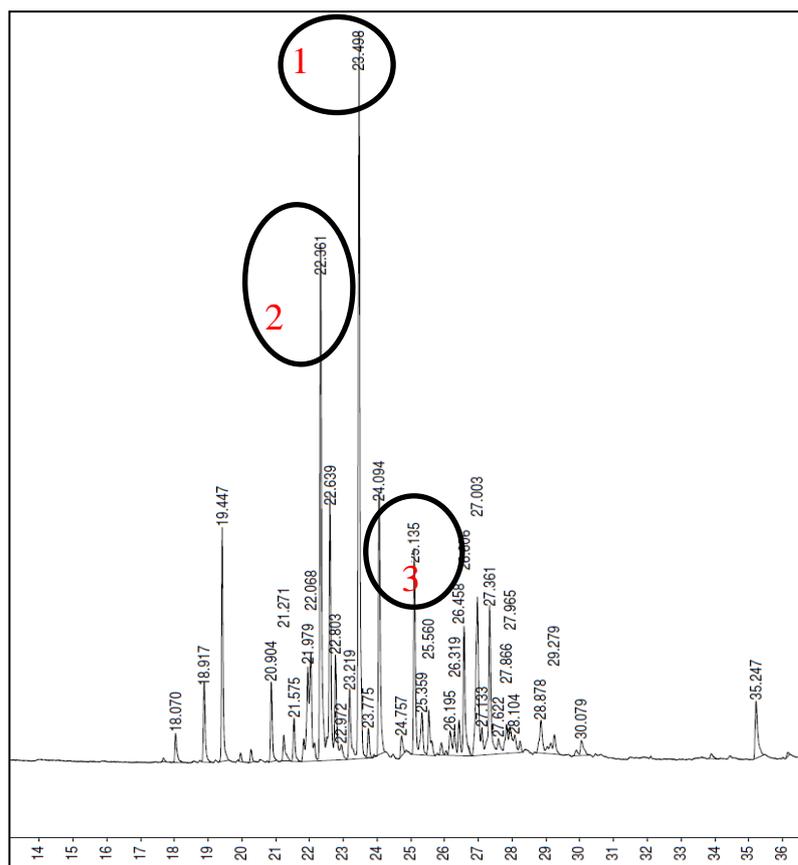


Figura 6 – Perfil cromatográfico óleo essencial da casca do caule de *S. lentiscifolius*, coletada em março de 2013.

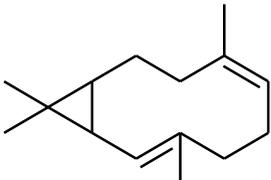
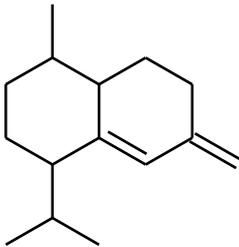
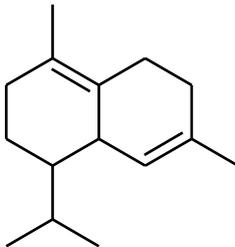
	1	2	3
			
IK calculado	1496	1459	1520
IK literatura	1500	1460	1524
Composto	Biciclogermacreno	Muurola	Δ-cadineno
Percentual no óleo	17,33%	12,51%	6,54%

Figura 7 – Estruturas dos principais picos encontrados no cromatograma do óleo essencial de *Schinus lentiscifolius* e seus rendimentos percentuais.

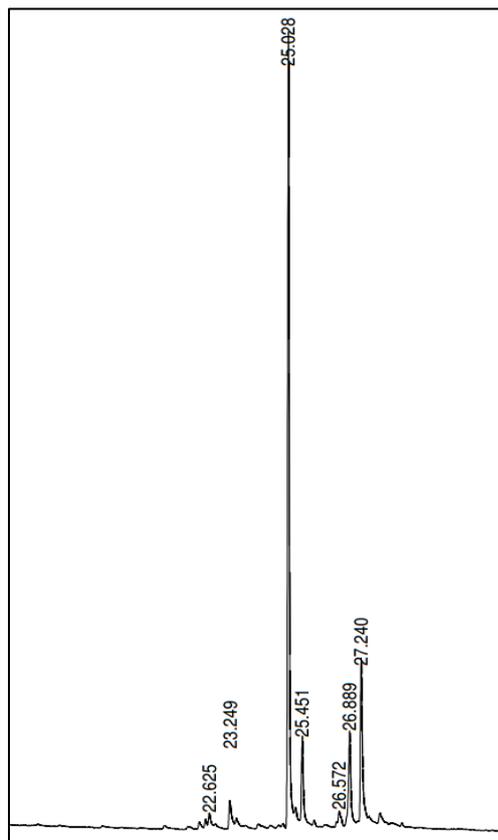


Figura 8 – Cromatograma da fração isolada a partir do óleo coletado em março de 2013, o pico em 25,03 min. corresponde a 71,0% dos sinais.

Obteve-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F25 (figura 9a), o sinal H15 com deslocamento químico de 4,66 ppm e integração para dois hidrogênios é característico de hidrogênios de ligação dupla exocíclica, os sinais H-12 ( $\delta$  1,04 ppm), H-13 ( $\delta$  1,06) e H-14 ( $\delta$  1,28 ppm) correspondem a de acordo com a integração correspondem a hidrogênios de metilas. No espectro de  $^{13}\text{C}$  (figura 9b) pode-se verificar 15 átomos de carbono, os quais confirmam a presença da dupla ligação terminal (C-10 e C-15), do carbono carbonílico desidrogenado (C-4) e a presença de dois CH (C-1 e C-5). Esta análise inicial e a comparação dos deslocamentos químicos com a literatura<sup>37</sup> confirma que a fração F25 trata-se do espatulenol.

<sup>37</sup> IWABUCHI, H.; YOSHIKURA, M.; KAMISAKO, W. Studies on the sesquiterpenoids of *Panax ginseng* C. A. Meyer III. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 509-510, 1989.

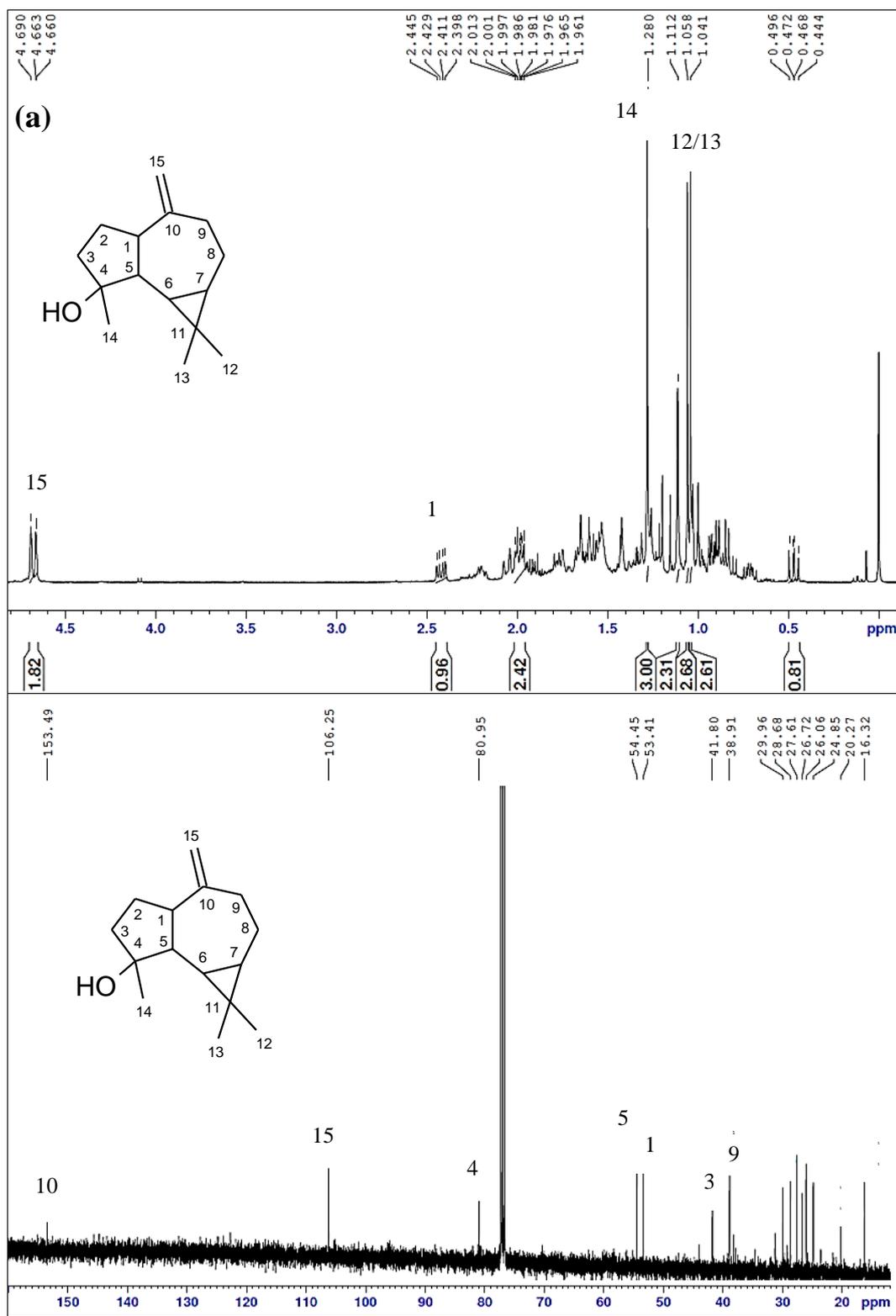


Figura 9 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) (a) e RMN  $^{13}\text{C}$  (100MHz) (b) para o espatulanol isolado a partir do óleo coletado em março de 2013, em  $\text{CDCl}_3$ .

Após várias tentativas de isolamento não se obteve os constituintes majoritários do óleo essencial, o que leva a supor que esses constituintes venham a transformar-se no espatulanol durante o processo de separação, com a presença de água e o meio levemente

ácido. Assim propõem-se uma rota de transformação como verificada na figura 10. Estruturas como o biciclogermacreno (1) dificilmente são isolados, pois podem sofrer isomerização em condições levemente ácidas, tornando-se um precursor do espatulenol (2)<sup>38</sup>. Onde ocorre primeiramente o ataque nucleofílico dos pares de elétrons  $\pi$  de uma das duplas ligações, originando dois ciclos um sete e outro de cinco membros, além do carbocátion onde ocorrerá o ataque nucleofílico de uma molécula de água, introduzindo assim a hidroxila.

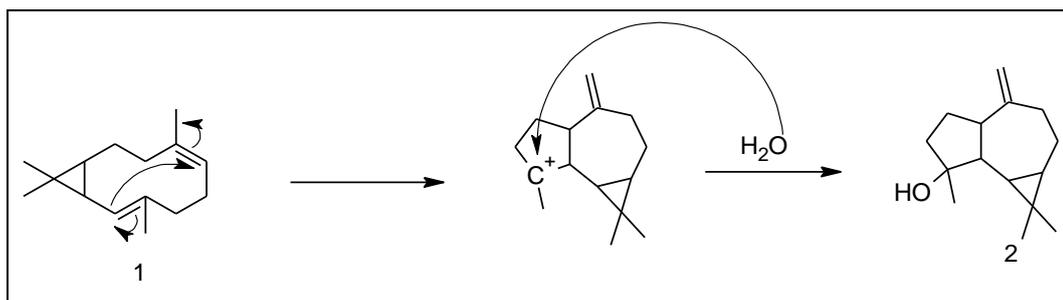


Figura 10 – Proposta para conversão do biciclogermacreno em espatulenol.

Em novembro de 2014 foi realizada outra coleta e uma nova extração de óleo, a qual originou o cromatograma apresentado na figura 11.

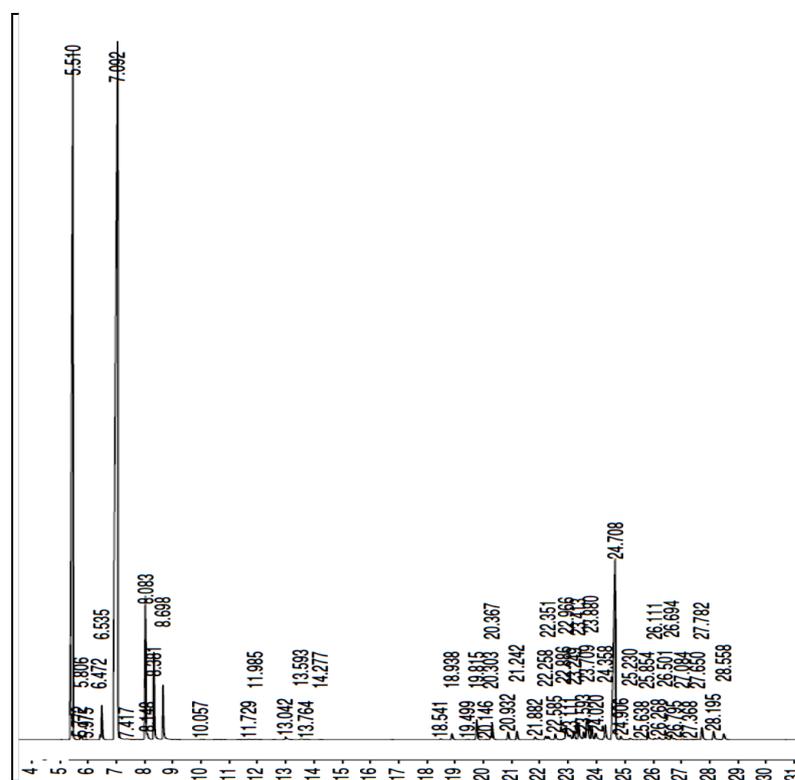


Figura 11 – Perfil cromatográfico do óleo essencial coletado em novembro de 2014.

<sup>38</sup> NISHIMURA, K. et al. A New Sesquiterpene, Bicyclogermacrene. **Tetrahedron Letters**. v. 36, p. 3097-3100, 1969.

Verifica-se a diferença de composição do óleo essencial entre as duas amostras, onde, neste caso (figura 11) as estruturas majoritárias encontram-se com um tempo de retenção de 5,510 e 7,092 min.

Procedeu-se a separação dos compostos por destilação à pressão reduzida. Coletou-se uma fração (F1), de aproximadamente 1,50 g, destilado a 75,0°C, contudo, esta fração continha a mistura de dois componentes (figura 12), com os mesmos tempos de retenção encontrados no óleo essencial.

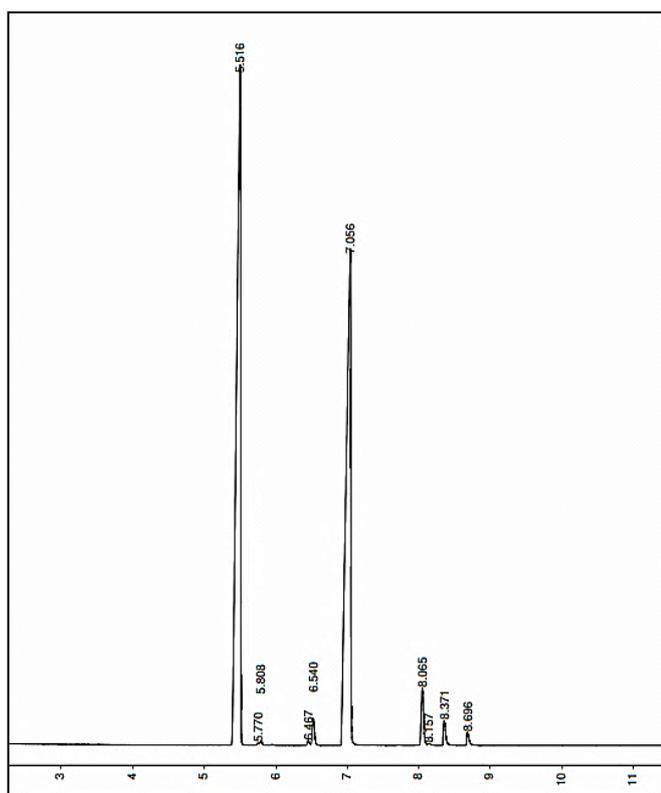


Figura 12 – Cromatograma da fração destilada à pressão reduzida e a 75,0°C.

O resíduo da destilação, também foi submetido à análise por GC e revelou a presença de compostos que não estavam presentes no óleo antes de iniciar a destilação, sugere que, com aquecimento (aproximadamente 75,0°C) as duas estruturas originaram compostos com massa molecular maior, portanto, ponto de ebulição superior. A partir desta constatação realizou-se a secagem de parte da casca coletada em novembro de 2014, e o óleo essencial extraído é similar ao coletado pela primeira vez (março de 2013), o qual também foi extraído após a secagem da casca. Dessa forma, pode-se inferir que o procedimento prévio de secagem da casca para posterior extração ocasiona a modificação do perfil cromatográfico do óleo essencial, sendo assim, modifica a composição do mesmo, pois seus tempos de retenção de

5,510 e 7,092 min são alterados. Em outras palavras, estas estruturas que apresentam tais tempos de retenção supracitados originam todas as outras encontradas no óleo essencial.

Através de experimentos de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , hetcor, coloc, cosy, dept e dosy) e GC-MS, foi possível determinar os compostos que fazem parte desta mistura. A figura 13 é resultado da análise por GC-MS, que revela a massa de  $326\text{ g mol}^{-1}$  para ambos os compostos.

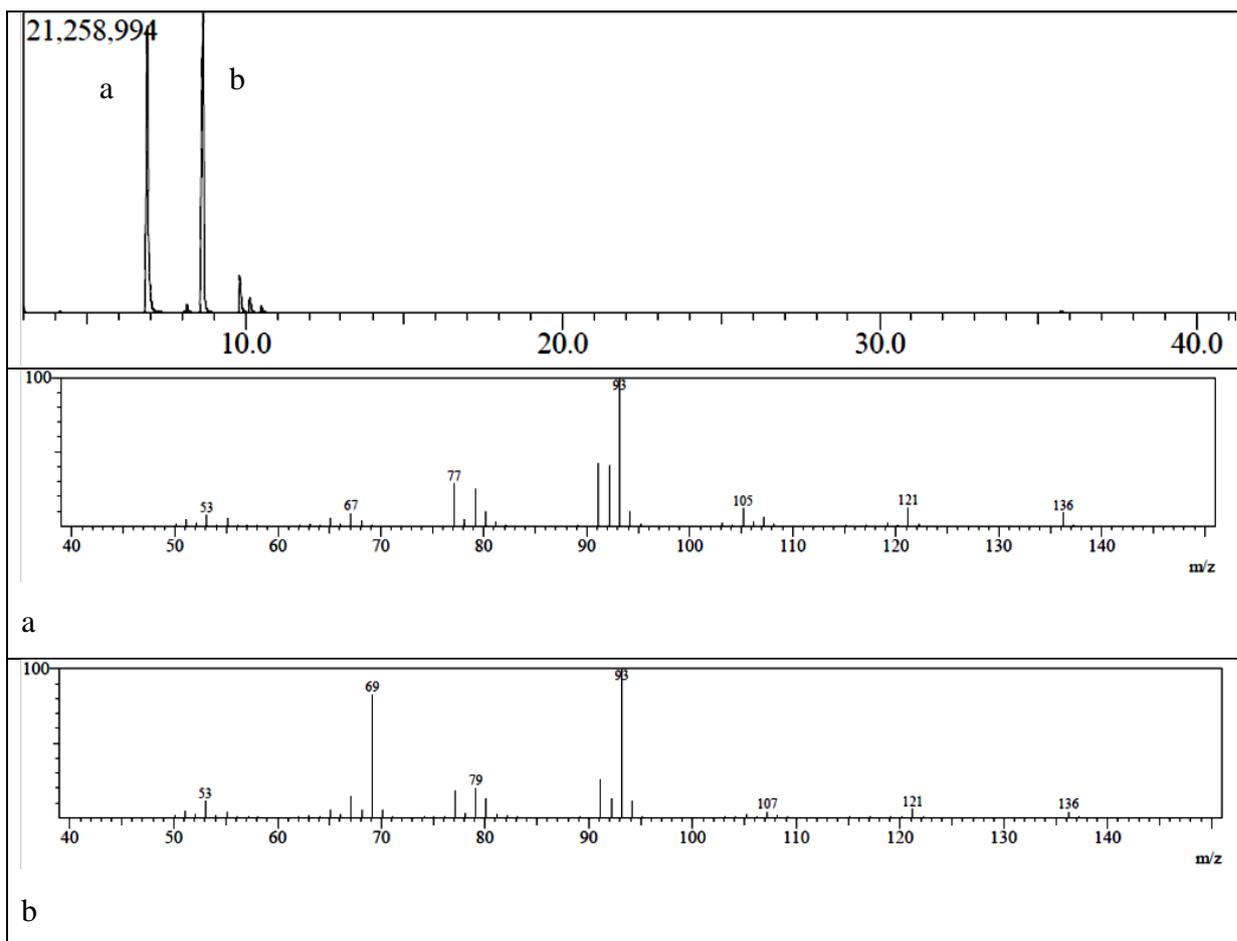


Figura 13 – Cromatograma e espectros de massas da mistura de estruturas do óleo.

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figuras 14a e 14b), revelou poucas informações a respeito de quais são as estruturas que compõem o óleo, no entanto, pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível perceber a presença de vinte átomos de carbono, considerando que a massa das estruturas são iguais pode-se afirmar que a fórmula molecular é  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$  para ambas.

Com os experimentos acima citados não é possível definir o conjunto de átomos que fazem parte de cada estrutura. Portanto, houve a necessidade de utilizar outro experimento que fornece mais informações para elucidação das estruturas dessa mistura, no caso, o experimento heteronuclear  $^{2,3}\text{J}_{\text{C-H}}$  COLOC (figura 15)

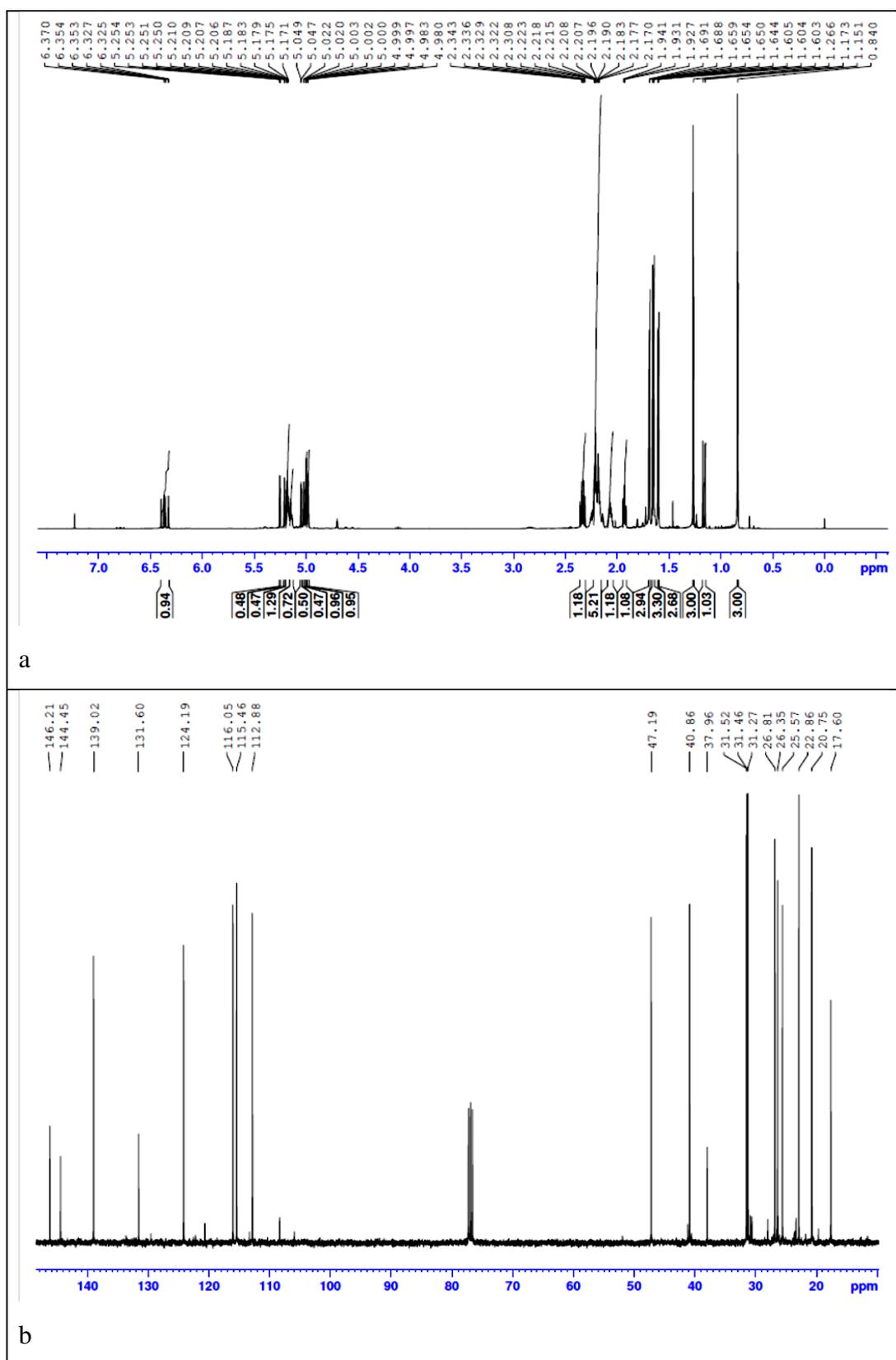


Figura 14 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$ . (a) e de RMN  $^{13}\text{C}$  (b), da mistura de compostos encontrados no óleo, em  $\text{CDCl}_3$  à 400MHz.

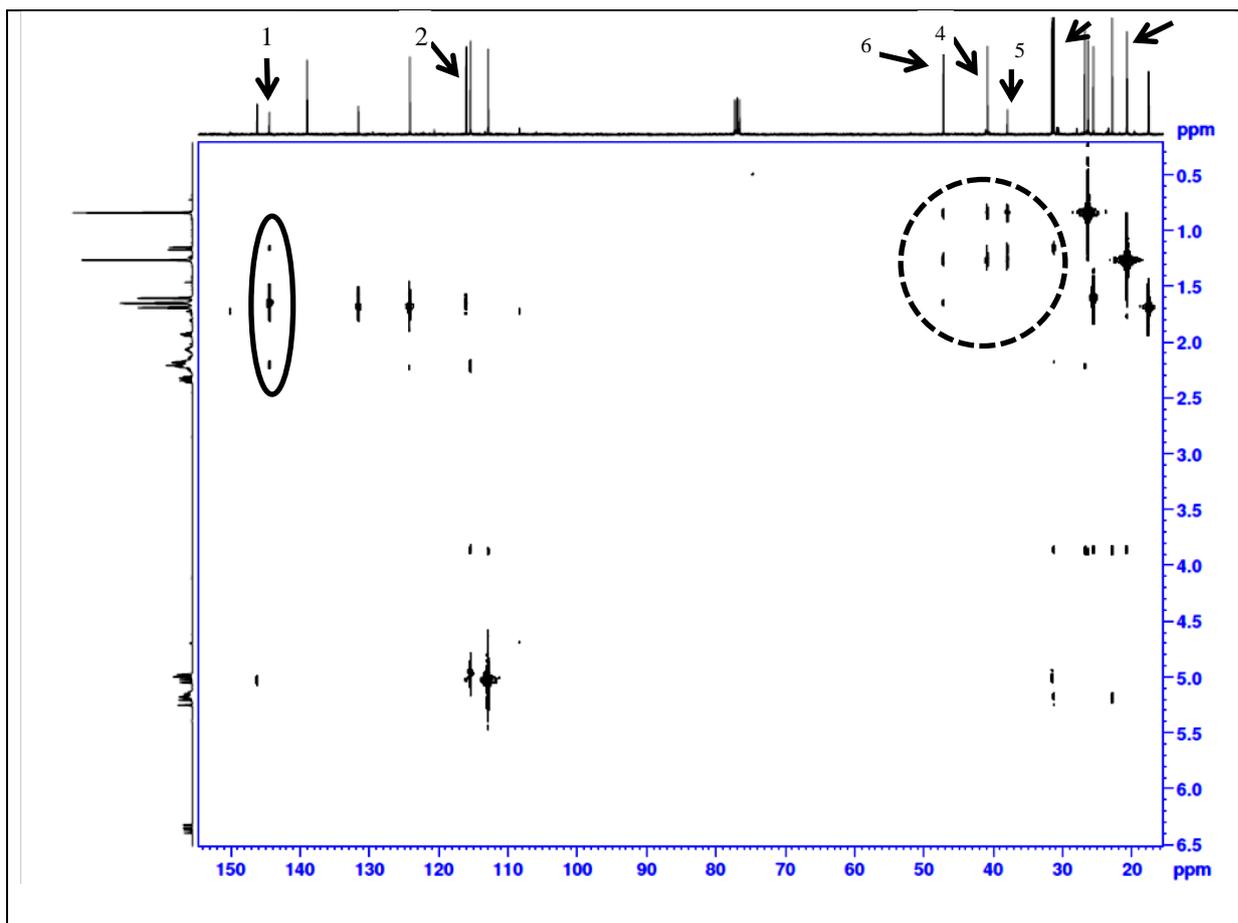


Figura 15 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR  $^{2,3}J_{C-H}$  COLOC da mistura de compostos do óleo, em  $CDCl_3$ , a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos da estrutura A.

Os acoplamentos gerados pelo experimento COLOC (figura 15) ocorrem através das ligações, ou seja, os carbonos da estrutura A (denominada inicialmente por A) só apresentarão acoplamentos com os hidrogênios da estrutura A e vice-versa, sendo assim, escolhendo o carbono 1 (na figura 15) verifica-se com quais hidrogênios este tem acoplamento (círculo de linha contínua na figura 15), através destes hidrogênios é possível verificar os carbonos com que estes acoplam, sendo assim estes carbonos também compõem a estrutura A (círculo de linha tracejada na figura 15). Os carbonos apontados na figura 15 constituem a estrutura A, associando esta informação com a análise do espectro homonuclear DEPT135 (figura 16) conclui-se que a estrutura A é composta por dois  $CH_2$ , três  $CH$ , dois  $C$  e três  $CH_3$ . As regiões do espectro demarcadas com um círculo (figura 16) correspondem aos carbonos desidrogenados, pois como se trata de um experimento DEPT135 esses não aparecem. As duas setas apontadas na fase negativa do espectro correspondem a carbonos  $CH_2$ , pois esses ficam nessa fase no experimento DEPT135.

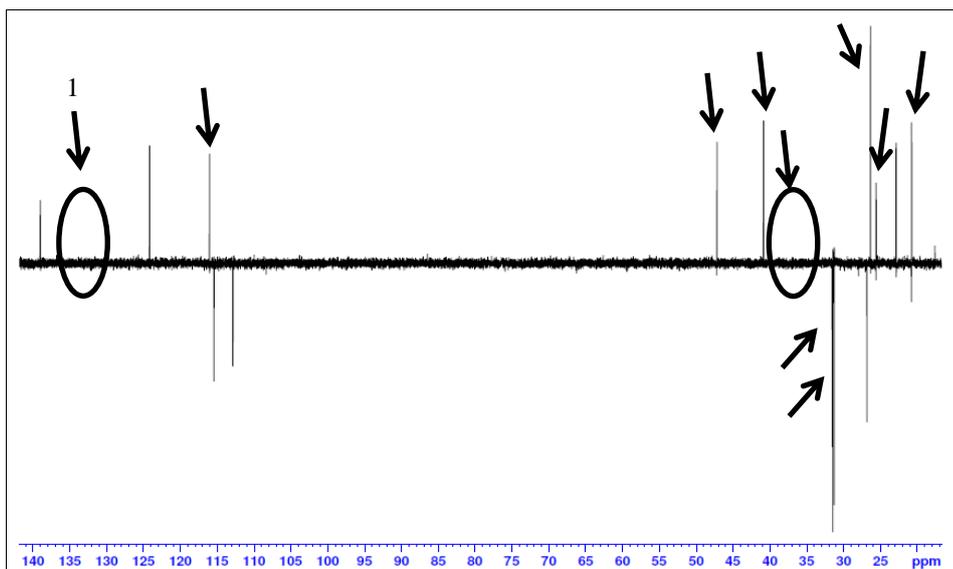


Figura 16 – Espectro 1D HOMONUCLEAR DEPT135 da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz. Em destaque, os carbonos da estrutura A.

O espectro 2D homonuclear COSY (figura 17) forneceu informações a respeito dos sistemas de spins dos hidrogênios da estrutura A. Verificou-se que um dos hidrogênios do carbono 7 (hidrogênio denominado 7\*) tem acoplamento com os hidrogênios do carbono 4, 6 e 7; apresentando a mesma constante de acoplamento para 7\*-4 e 7\*-6 e uma constante de acoplamento maior para 7\*-7, além disso, não verificou-se o acoplamento do outro hidrogênio do carbono 7 com os hidrogênios 4 e 6, como pode ser verificado nas figuras 17 e 18b.

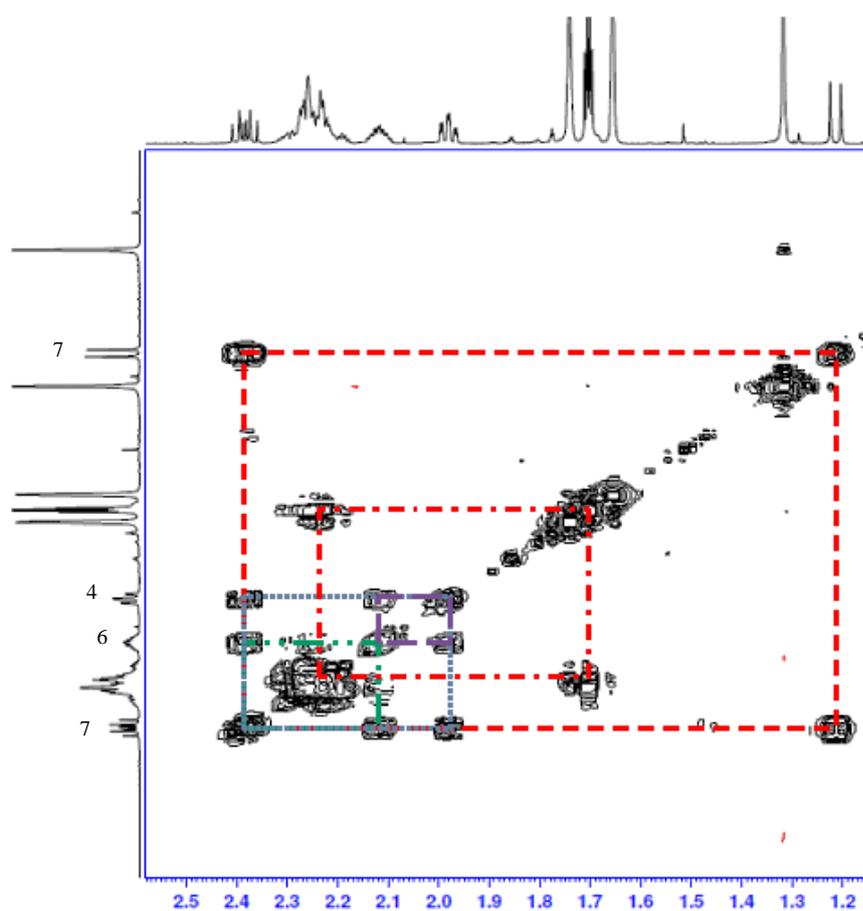


Figura 17 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR  $^1J_{H-H}$  COSY da mistura de compostos do óleo, em  $CDCl_3$ , a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos da estrutura A.

Após analisar todos os experimentos conclui-se que a estrutura A é o  $\alpha$ -pineno. A figura 18 demonstra a sua estrutura e os acoplamentos verificados, no experimento 2D heteronuclear  $^{2,3}J_{C-H}$  COLOC (figura 18a) e 2D homonuclear  $^1J_{H-H}$  COSY (figura 18b).

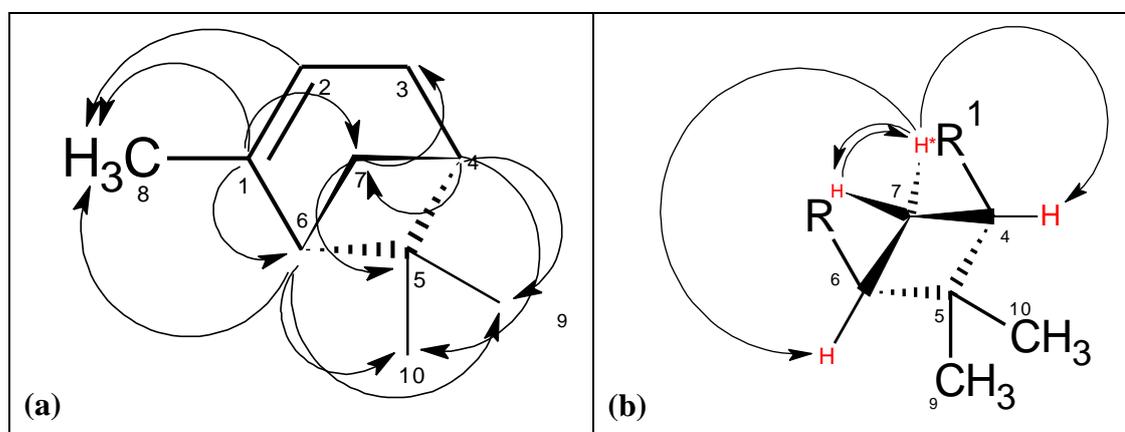


Figura 18 – Acoplamentos verificados no COLOC (a) e no COSY (b).

A outra estrutura que presente no óleo essencial denominada inicialmente de estrutura B, é composta por dois  $\text{CH}_3$ , quatro  $\text{CH}_2$ , dois  $\text{CH}$  e dois  $\text{C}$ , sendo assim  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ . A análise dos carbonos assinalados na figura 19 revela que a estrutura B apresenta dois  $\text{CH}_2$  terminais, pois estão na fase negativa do espectro e em um deslocamento químico característico de carbonos de duplas ligações. Os carbonos apontados (setas) na figura 19 correspondem a outros dois  $\text{CH}_2$  pertencentes à estrutura B.

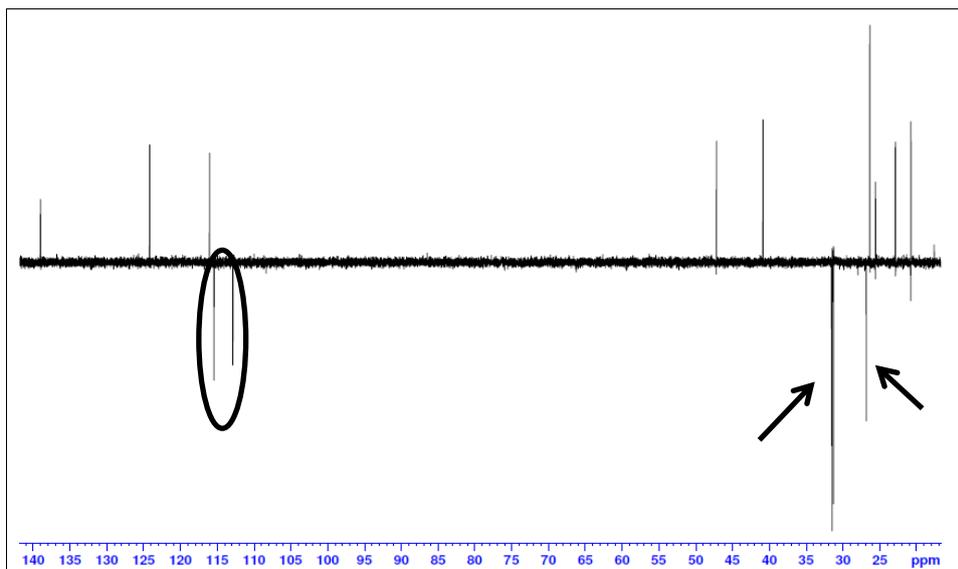


Figura 19 – Espectro 1D HOMONUCLEAR DEPT135 da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz. Em destaque, os carbonos da estrutura B.

O experimento 2D homonuclear  $^1\text{J}_{\text{H-H}}$  COSY (figura 20) destaca o acoplamento do hidrogênio 2 ( $\delta$  6,32 ppm) com os hidrogênios 1 ( $\delta$  5,3 ppm) e 10 ( $\delta$  5,10 ppm), portanto devem estar no máximo à uma ligação, ambos (H-1 e H-10) pertencentes a  $\text{CH}_2$  terminais. Os acoplamentos do hidrogênio 6 (figura 20) com as metilas 8 e 9, sendo assim essas devem estar ligadas ao mesmo carbono desidrogenado de dupla ligação (C-7) e o hidrogênio 6 ligado ao outro carbono da dupla (C-6).

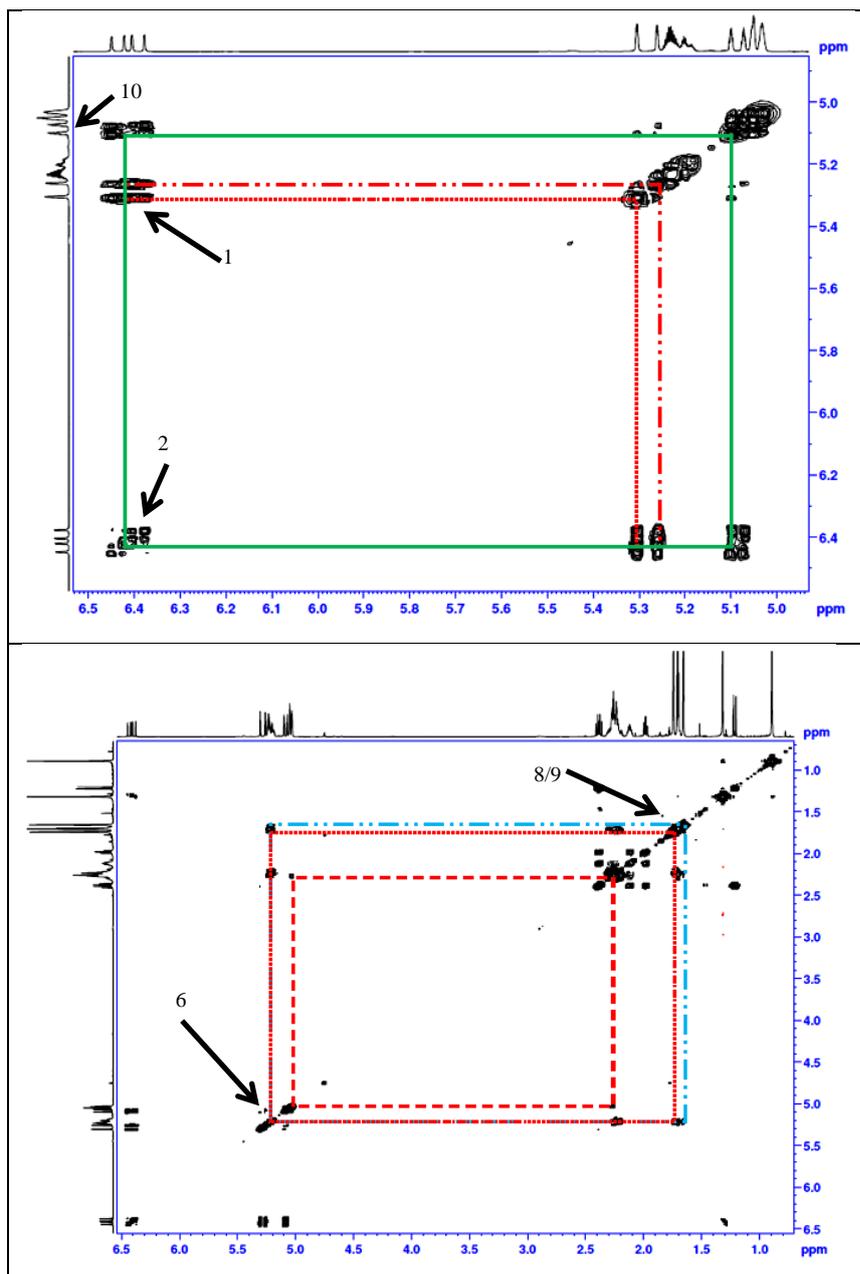


Figura 20 – Espectro 2D, HOMONUCLAR  $^1J_{H-H}$  COSY da mistura de compostos do óleo, em  $CDCl_3$  a 400MHz. Em destaque, os acoplamentos referentes à estrutura B.

No experimento 2D heteronuclear COLOC (figura 21) observa-se o acoplamento do carbono 3 com os hidrogênios do carbono 10, os acoplamentos dos C-6 e C-7 com os hidrogênios das metilas C-8 e C-9 e os acoplamentos do C-10 com os hidrogênios do C-4 e C-10.

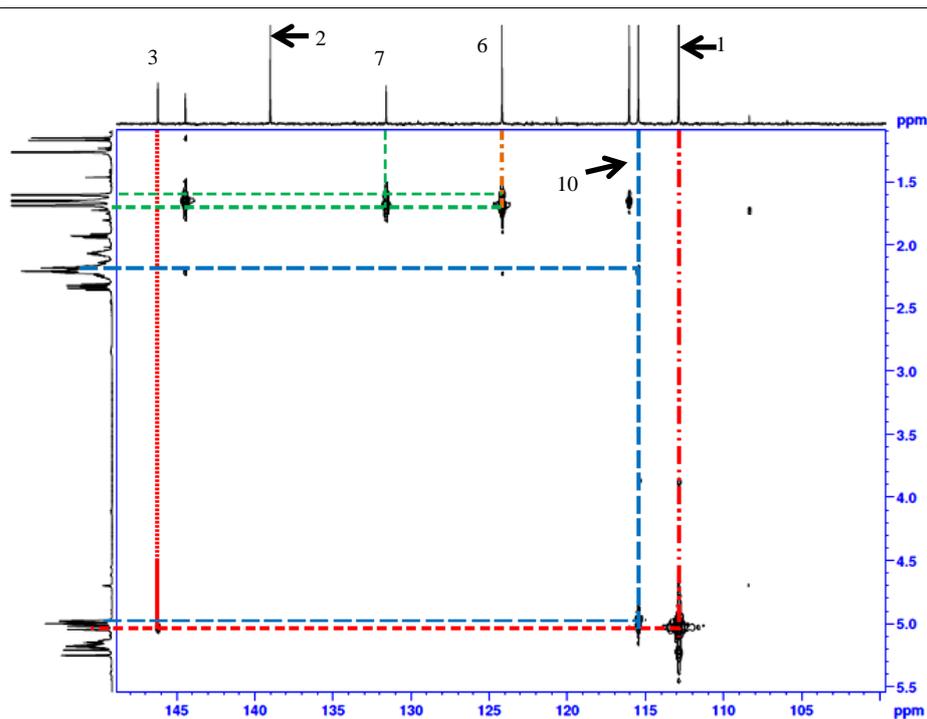


Figura 21 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR  $^{2,3}J_{C-H}$  COLOC da mistura de compostos do óleo, em  $CDCl_3$ , a 400MHz. Em destaque os acoplamentos referentes à estrutura B.

Após análise destes espectros concluiu-se que a estrutura B é o Mirceno, o qual pode ser observado na figura 22, bem como os seus acoplamentos. Apresentando quatro  $CH_2$  sendo dois terminais (1 e 10), dois carbonos desidrogenados de duplas ligações sendo que um deles (C-7) está ligado a duas metilas (C-8 e C-9).

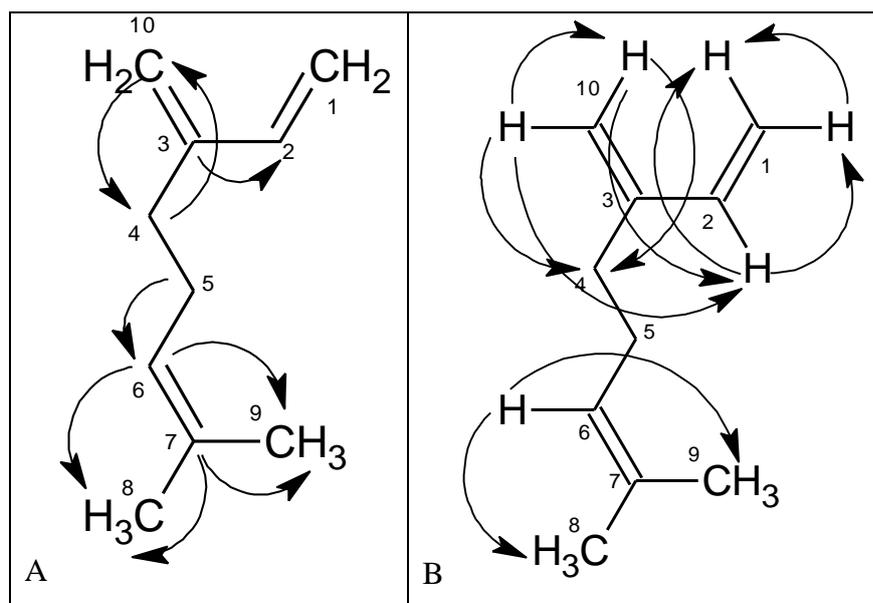


Figura 22 – Acoplamentos verificados no COLOC (a) e no COSY (b).

Para ter certeza de quais hidrogênios compõem cada estrutura foi realizado o experimento de difusão conhecido como DOSY, através desse é possível verificar a constante de difusão de cada sinal de hidrogênio, ou seja, sinais com mesma constante de difusão pertencem à mesma estrutura. Cada sinal apresenta uma curva de decaimento de sua intensidade, através dessa o *Software Topspin* calcula a constante de difusão. A tabela 1 demonstra alguns deslocamentos químicos de hidrogênio e a suas constantes de difusão presentes nas estruturas da fração F1.

Tabela 1 – Deslocamentos químicos presentes no espectro de hidrogênio para a mistura de estruturas do óleo essencial, a estrutura que o sinal pertence e sua posição e a respectiva constante de difusão.

Deslocamento Químico (ppm)	Estrutura/posição*	Constante de difusão ( $m^2 s^{-1}$ )
0,84	A/9 ou 10	<b>8,99. 10<sup>-12</sup></b>
1,15	A/7	<b>9,07. 10<sup>-12</sup></b>
1,26	A/9 ou 10	<b>9,00. 10<sup>-12</sup></b>
1,60	B/8 ou 9	7,30. 10 <sup>-10</sup>
1,65	A/8	<b>8,88. 10<sup>-12</sup></b>
1,69	B/8 ou 9	7,28. 10 <sup>-10</sup>
1,90	A/4	<b>8,92. 10<sup>-12</sup></b>
2,06	A/6	<b>8,95. 10<sup>-12</sup></b>
5,05	B/10	7,29. 10 <sup>-10</sup>
5,25	B/1	7,32. 10 <sup>-10</sup>
6,32	B/2	7,39. 10 <sup>-10</sup>

\*Estrutura A corresponde ao  $\alpha$ -pineno e B ao mirceno.

Os valores de constante de difusão diferem entre os compostos ( $\alpha$ -pineno e mirceno) em aproximadamente cem vezes, o que garante que há diferença de difusão e a possibilidade de utilizar esse experimento para determinar os constituintes de uma mistura. Além disso, a tabela 1 comprova que os sinais atribuídos para cada composto anteriormente são verdadeiros, ou seja, os componentes majoritários do óleo essencial da casca de *Schinus lentiscifolius* são o  $\alpha$ -pineno e o mirceno.

Algumas expansões dos espectros RMN ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COLOC, etc.) podem ser verificados no apêndice A.

As estruturas encontradas no óleo essencial já são conhecidas, no entanto, abre a possibilidade de um estudo para verificar as condições e quais compostos são sintetizados a partir do  $\alpha$ -pineno e do mirceno. E o estudo de como a planta utiliza estes compostos, ou seja, se ocorre a biotransformação dependendo da necessidade da planta a partir destes, ou esta composição é permanente.

## 4.2-Estudo do extrato hexânico

O extrato hexânico foi submetido à separação cromatográfica, onde, a análise das frações eluídas com hexano/acetato de etila (75:25) revelou a presença de quatro estruturas, com mesma massa molecular, com mesmo fator de retenção e com semelhanças no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Com os espectros mencionados, foi possível verificar que as quatro estruturas possuem carbonos de cetona, carbonos de ácido carboxílico, carbonos na região de duplas ligações e os demais carbonos com deslocamento químico abaixo de 55,00 ppm. Em um trabalho anterior com a casca do caule dessa espécie encontrou-se a mesma mistura de isômeros<sup>39</sup>, sendo que um deles foi identificado como o ácido morônico.

A partir da verificação da presença de ácidos carboxílicos promoveu-se a síntese dos respectivos ésteres, com o objetivo de isolar os quatro compostos, no entanto, obtiveram-se os ésteres de apenas dois ácidos. Estes foram analisados por GC e o perfil cromatográfico encontra-se nas figuras 23a e 23b.

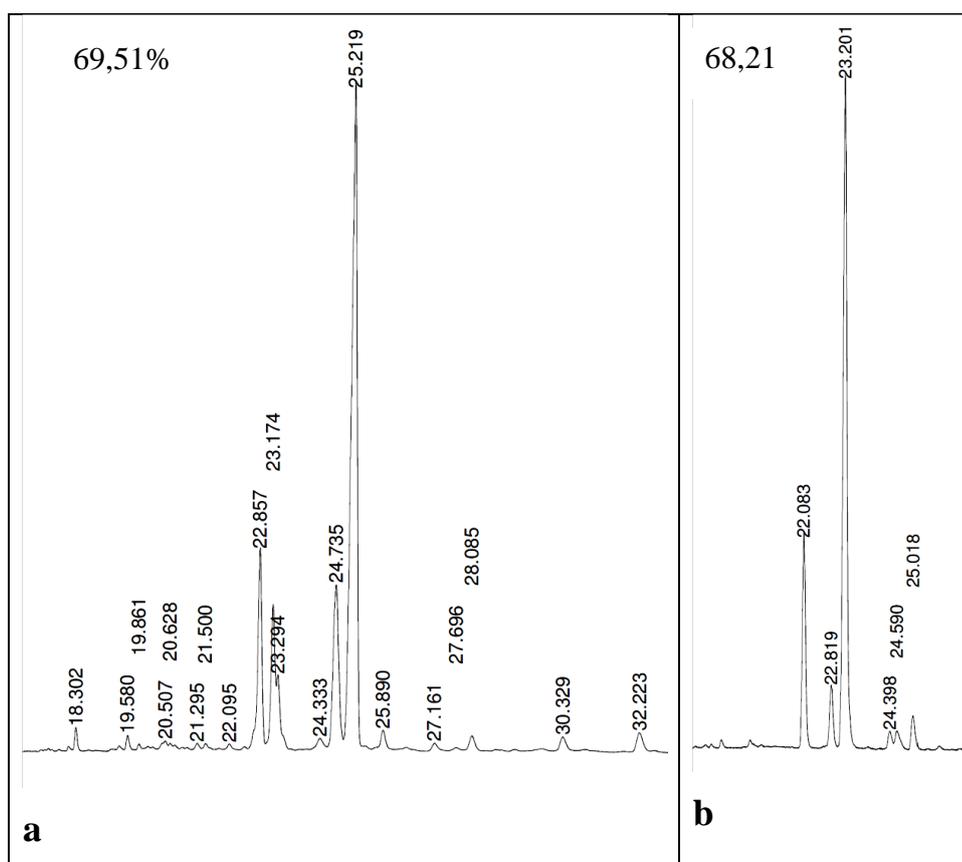


Figura 23 – Cromatograma dos ésteres sintetizados a partir da mistura de isômeros (estrutura 30A-b e estrutura 30B-a).

<sup>39</sup> MOREL, A. F. et al. Identificação do triterpeno ácido morônico em extratos e frações obtidas da espécie *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) por CG. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves.

A sequência deste capítulo é a apresentação dos experimentos que foram realizados para determinar as estruturas dos compostos mencionados anteriormente. A primeira estrutura apresentada foi denominada de 30A e possui um tempo de retenção de 25,22 min (figura 23a).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 24a) nota-se a presença dos hidrogênios da metila do éster (apontado na figura 24a), confirmando o sucesso da síntese. Além disso, verifica-se no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 24b), destacado com um círculo a presença de duas duplas ligações.

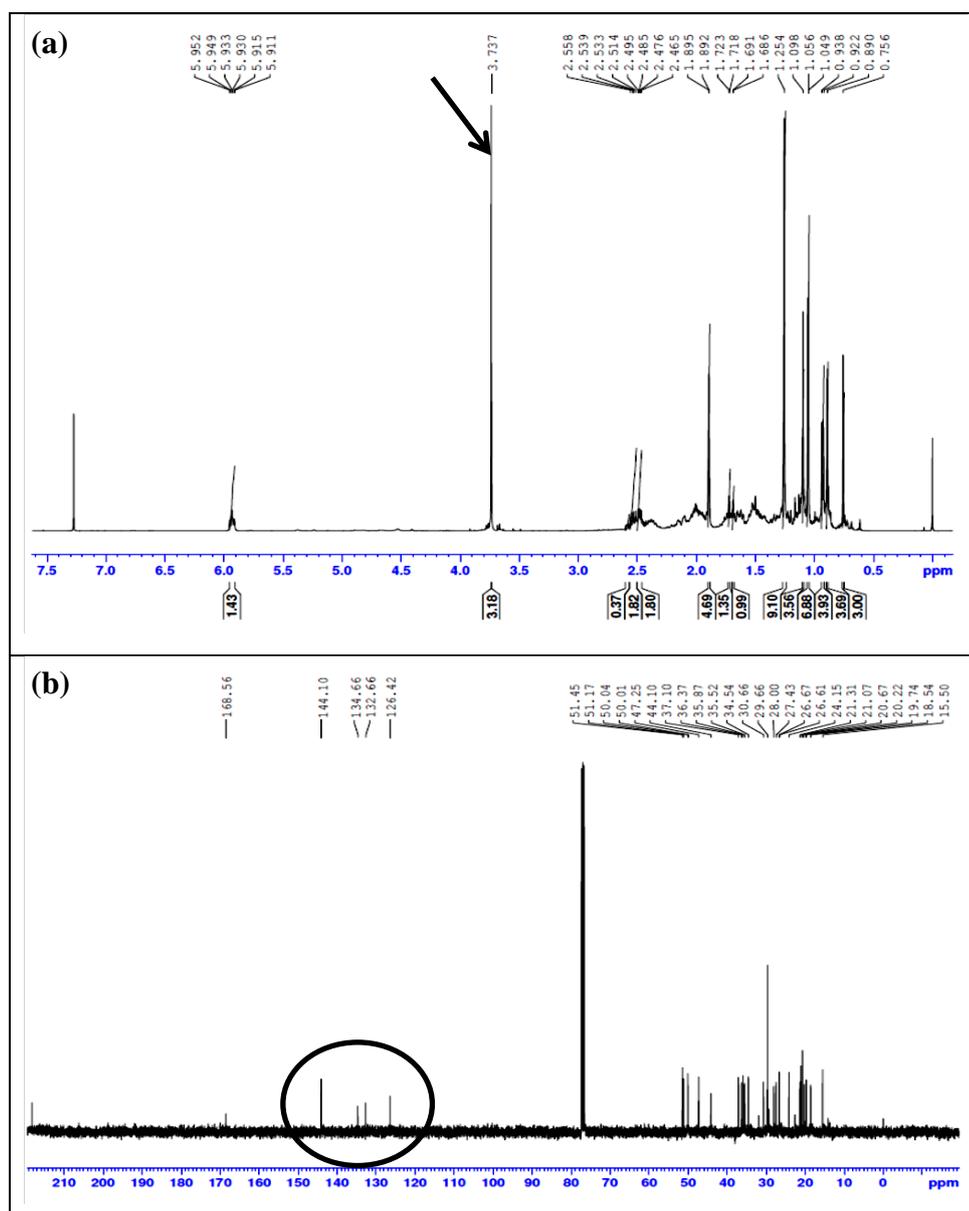


Figura 24 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (a) e RMN  $^{13}\text{C}$  (b) do composto 30A, em  $\text{CDCl}_3$ .

A expansão do espectro de hidrogênio (figura 25) mostra que este sinal corresponde a um hidrogênio (hidrogênio do carbono 23), seu deslocamento químico ( $\delta$  5,90 ppm) é característico de hidrogênio ligado a carbono de duplas ligações e sua multiplicidade caracteriza que o carbono vizinho contém uma metila.

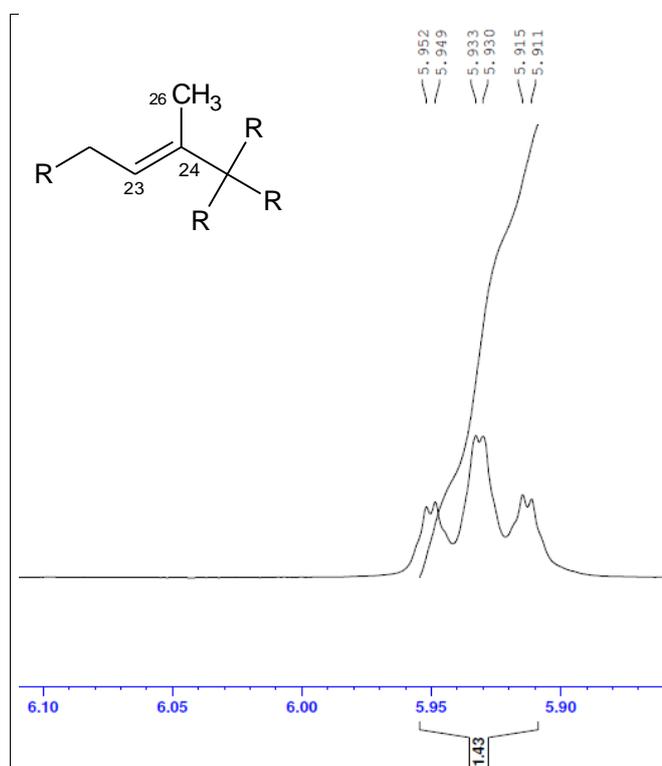


Figura 25 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 30A, expandido ( $\delta$  5,86 a  $\delta$  6,10ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

Em destaque na expansão do experimento 2D homonuclear  $^1\text{J}_{\text{H-H}}$  COSY (figura 26) estão os acoplamentos que o hidrogênio (H-23) da dupla ligação realiza, apontado (figura 26a) por uma seta tracejada o acoplamento com os hidrogênios de uma metila (H-26) e por uma seta contínua, o acoplamento com hidrogênios de carbono  $\text{CH}_2$ , esses por sua vez tem acoplamentos com hidrogênios de outro carbono  $\text{CH}_2$  apontados (figura 26b) por setas contínuas, ou seja, essa região da estrutura é composta por uma cadeia aberta.

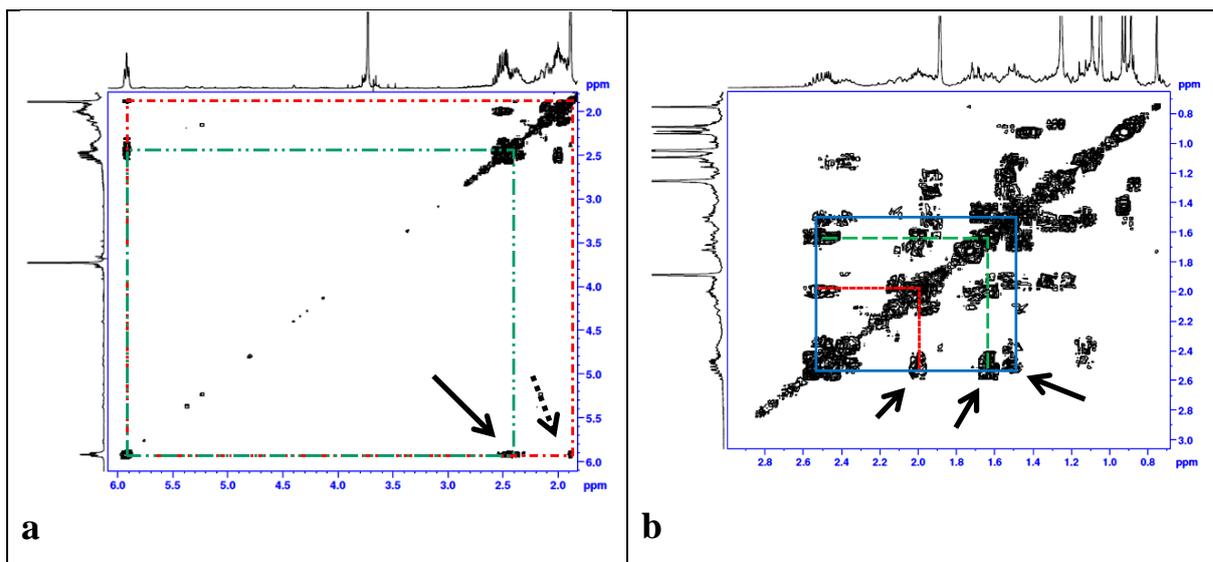


Figura 26 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR  $J_{H-H}$  COSY do composto 30A, em  $CDCl_3$ , a 400MHz.

A próxima figura (figura 27), define como é a vizinhança do hidrogênio 23, por se tratar de um experimento 2D heteronuclear  $^{2,3}J_{C-H}$  HMBC. Entre as informações relevantes, verifica-se o acoplamento deste hidrogênio com a carbonila do éster (C-25) e o acoplamento desta com os hidrogênios da metila (C-26), ou seja, estão separados por no máximo três ligações. Revelando assim, que uma das duplas está próxima a carbonila do éster e que a sequência da cadeia é aberta e com pelos menos dois  $CH_2$ .

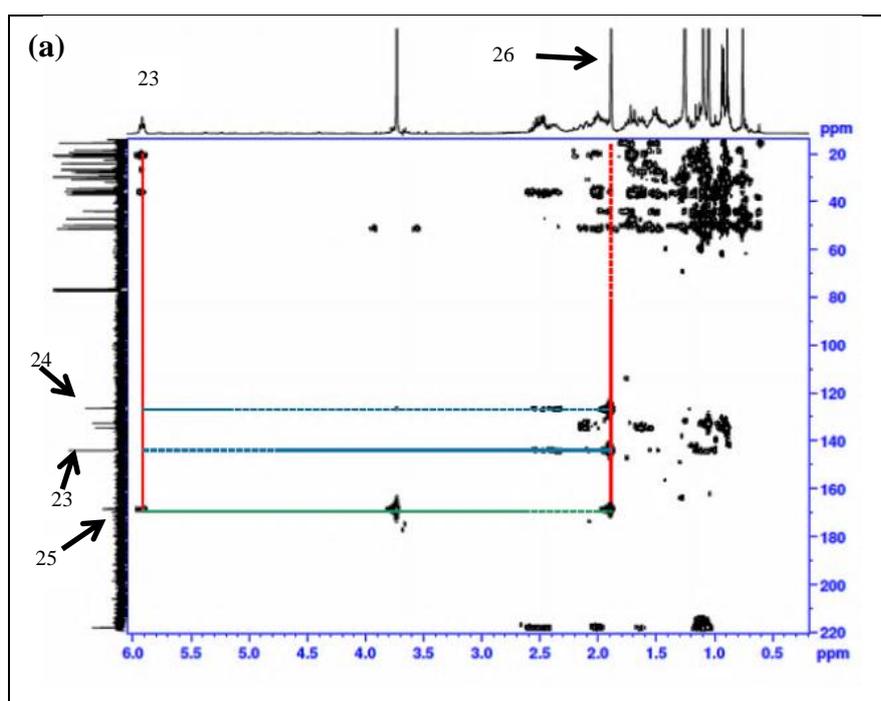


Figura 27 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR  $^{2,3}J_{C-H}$  HMBC acoplamento do Hidrogênio 23, em  $CDCl_3$ , a 400MHz

A outra dupla ligação está em um anel e verifica-se o acoplamento de metilas distintas (C-19 e C-30) em cada carbono da dupla, apontados (figura 28) por setas tracejadas, também há o acoplamento de hidrogênios de um CH<sub>2</sub> (C-7 e C-11) com ambos os carbonos da dupla, apontados (figura 28) por setas contínuas.

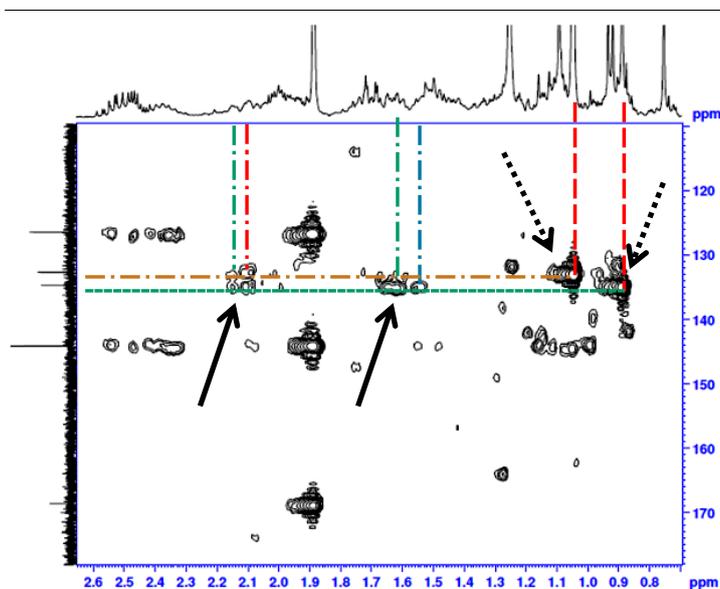


Figura 28 – Espectro 2D, HETERONUCLEAR  $^{2,3}J_{C-H}$  HMBC acoplamento dos carbonos das duplas ligações, em CDCl<sub>3</sub>, a 400MHz.

Com as informações apresentadas, definiu-se que o composto 30A é equivalente ao apresentado na figura 29, demonstrando também, os acoplamentos relacionados anteriormente.

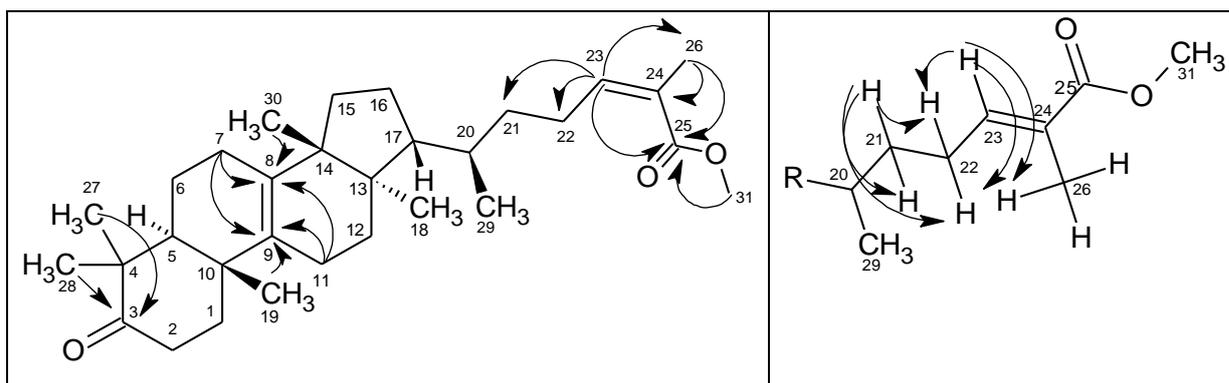


Figura 29 – Composto 30A com os acoplamentos observados.

A confirmação da estrutura foi realizada por difração de raio x (figura 30), sendo o cristal obtido em metanol a quente. Expansões de espectros de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC, HMQC, COSY) podem ser encontrados no apêndice B.

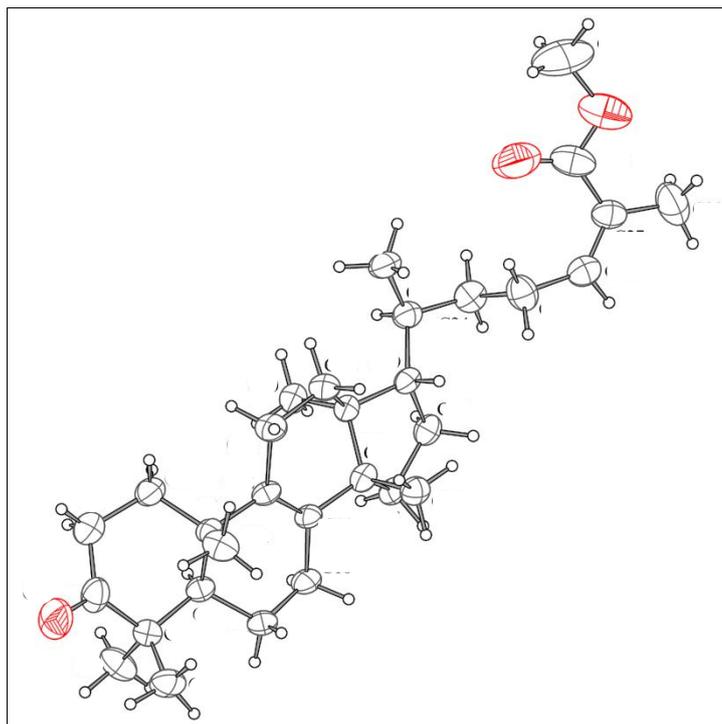


Figura 30 – Difração de raio x do composto 30A

A através da difração de raio-x (figura 30) fica comprovado que se trata da estrutura elucidada anteriormente, sendo que a dupla ligação (C-23 – C-24) está na conformação Z e que os centros quirais são C5-R, C10-S, C13-S, C14-S, C17-S e C20-S. Sendo assim, essa estrutura já foi relatada na literatura e é conhecida como ácido pistagremico. No entanto, é a primeira vez que esse é isolado da espécie *Schinus lentiscifolius*. Já foi isolado, por exemplo, da espécie *Pistacia integerrima* pertencente à mesma família (anacardiceae). Esse composto apresentou uma forte inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase revelando-se assim como o agente responsável pela atividade contra diabete<sup>40</sup>. Também há relatos de forte atividade antinociceptiva e antiinflamatória<sup>41</sup>.

O segundo composto esterificado foi denominado de 30B e seu perfil cromatográfico (figura 23b) revela um tempo de retenção de 23,20 min. Esse é similar ao ácido pistagremico, pois apresenta duas duplas ligações e um hidrogênio com deslocamento químico e multiplicidade equivalente. No entanto, os tempos de retenção (figura 23a e 23b) indicam que são diferentes. A figura 31 mostra essas semelhanças relatadas anteriormente e mostra também (destacado com um círculo), uma diferença de deslocamento químico para os carbonos da dupla ligação interna, neste, a diferença é de aproximadamente 5,0 ppm e para o

<sup>40</sup> UDDIN, G. et al. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. **Fitoterpia**. v. 83, p. 1648-1652, 2012.

<sup>41</sup> RAUF, A. et al. In-vivo antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of pistagremic acid isolated from *Pistacia integerrima*. **Phytomedicine**. v. 21, p. 1509-1515, 2014.

ácido pistagremico é de aproximadamente 2,0 ppm, confirmando a diferença entre as duas estruturas.

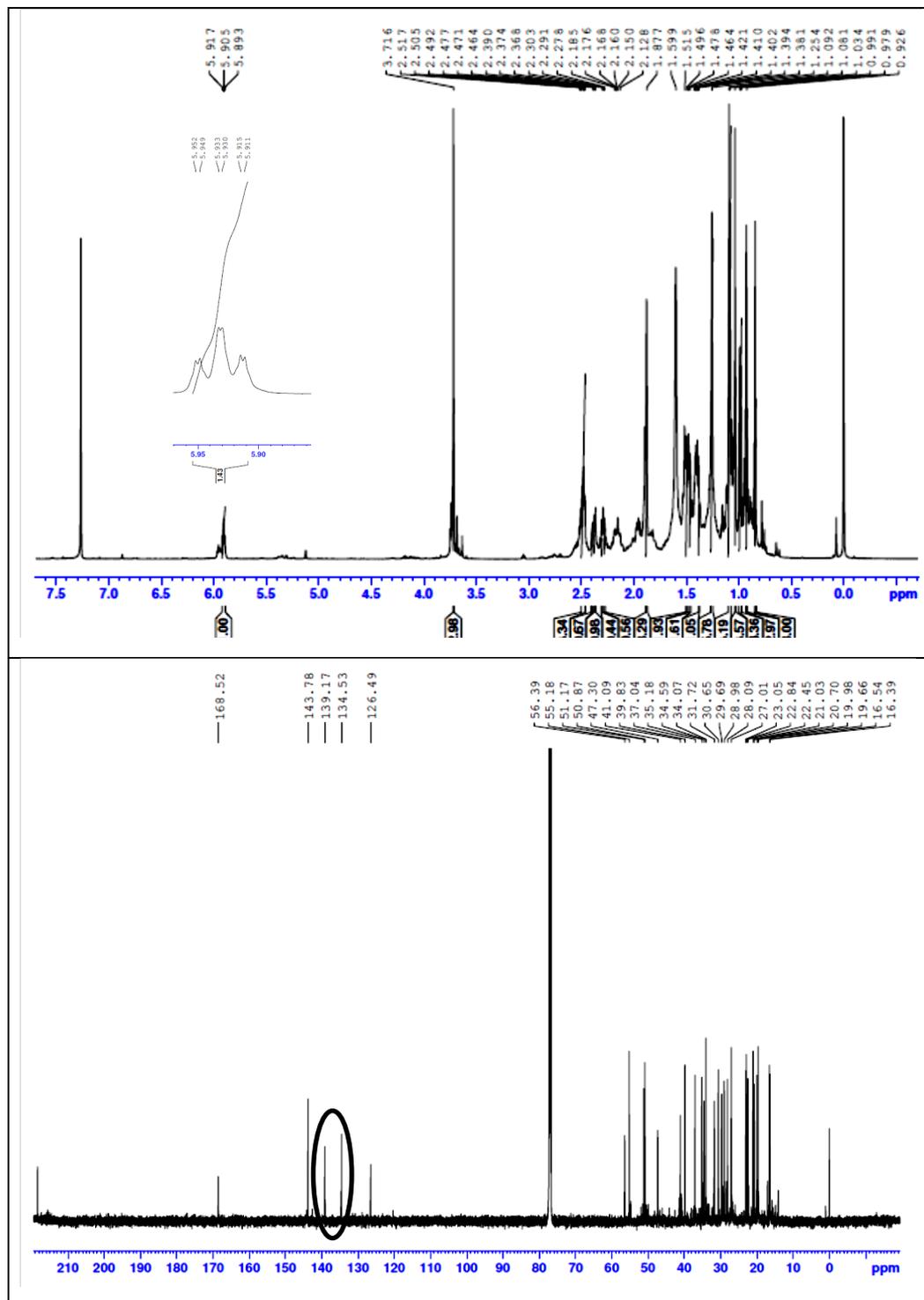


Figura 31 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto 30B, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz.

Podemos observar no espectro 2D heteronuclear  $^{2,3}\text{J}_{\text{H-C}}$  HMBC (figura 32) as diferenças entre as duas estruturas. Onde se percebe que, os acoplamentos apontados por setas

contínuas correspondem aos realizados por hidrogênios de CH<sub>2</sub> (C-25), sendo que os mesmos hidrogênios que acoplam com o carbono hidrogenado da dupla (C-24), acoplam com um carbono da outra dupla (C-17), ou seja, as duplas estão separadas por dois átomos. Além disso, os acoplamentos sinalizados por setas tracejadas correspondem aos hidrogênios de três metilas que acoplam com os carbonos das duplas desidrogenadas (C-13 e C-17). Esses acoplamentos descritos levam a uma parte da estrutura B (figura 33).

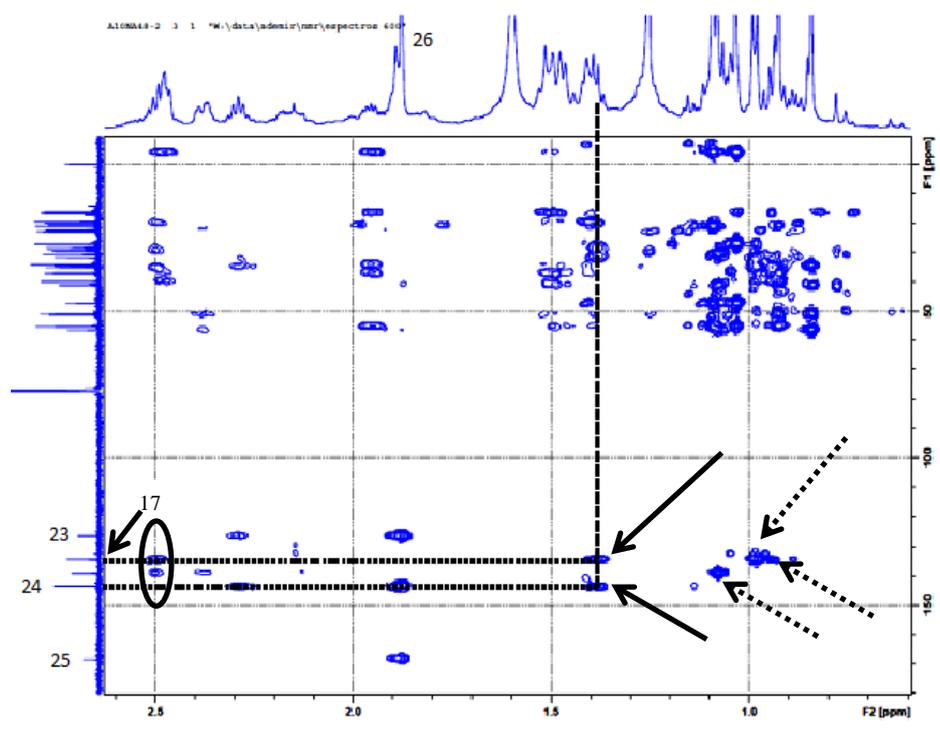


Figura 32 – Espectro 2D, HETEROCLUCLEAR  $^{2,3}J_{C-H}$  HMBC composto B, em CDCl<sub>3</sub>, a 400MHz.

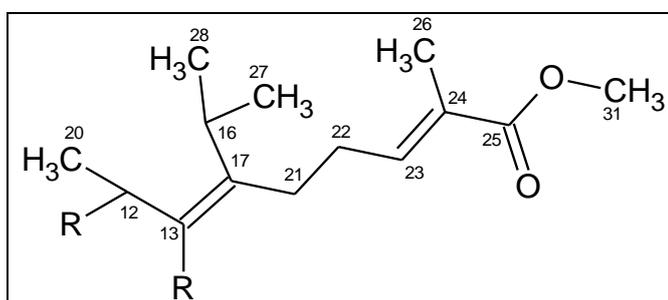


Figura 33 – Parte da estrutura B evidenciada pelos acoplamentos da figura 32

Percebem-se também (na figura 32) que os acoplamentos circunscritos correspondem aos de hidrogênios de CH<sub>2</sub> que acoplam com carbonos de dupla ligação (C-13 e C-17), ou seja, os carbonos 12 e 16 (na figura 33) estão ligados a um CH<sub>2</sub> (C-15) formando assim, um anel de

cinco membros. O restante da estrutura é equivalente ao ácido pistagremico, ou seja, as posições representadas por R (figura 33) são substituídas gerando a estrutura 30B (figura 34).

Expansões de espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, COSY) podem ser encontrados no apêndice B.

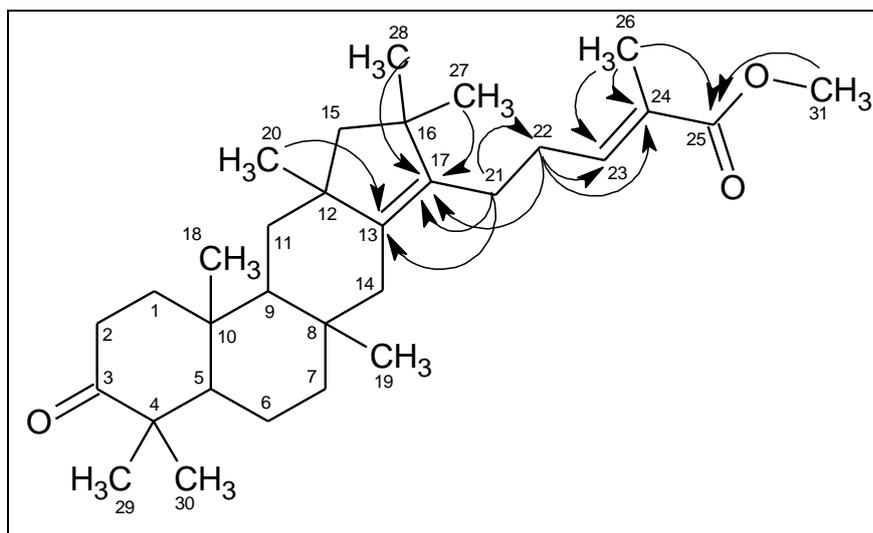


Figura 34 – Composto 30B com os acoplamentos observados

A posição da dupla ligação C-13 e C-17 pode gerar dúvidas quanto à possibilidade em termos de biossíntese, no entanto, existem alguns relatos na literatura de estruturas com dupla ligação semelhante<sup>42</sup>, gerando ainda mais confiabilidade a interpretação dos espectros. É a primeira vez que esta estrutura é isolada, e receberá o nome trivial de ácido lentiscifólico, uma alusão ao nome científico *Schinus lentiscifolius*.

A sequência do capítulo tratará do composto denominado inicialmente de 30C, esse já foi isolado desta mesma planta, no nosso grupo de pesquisa, porém, neste estudo ele foi isolado da casca do caule, a partir da mistura dos quatro compostos, sendo uma das estruturas que não foi possível esterificar, isolando-o na forma de ácido carboxílico. Para identifica-lo foram necessários apenas os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figuras 35 e 36 respectivamente) e o seu ponto de fusão de 211,0°C similar ao encontrado na literatura (210,0°C), sendo que os deslocamentos químicos coincidem com a estrutura já determinada, conhecida como ácido morônico (figura 37).

<sup>42</sup> NUGROHO, A. E. et al. Dysotriflorins A-M, triterpenoids from *Dysoxylum densiflorum*, **Tetrahedron**, v. 70, p. 9661-9667, 2014.

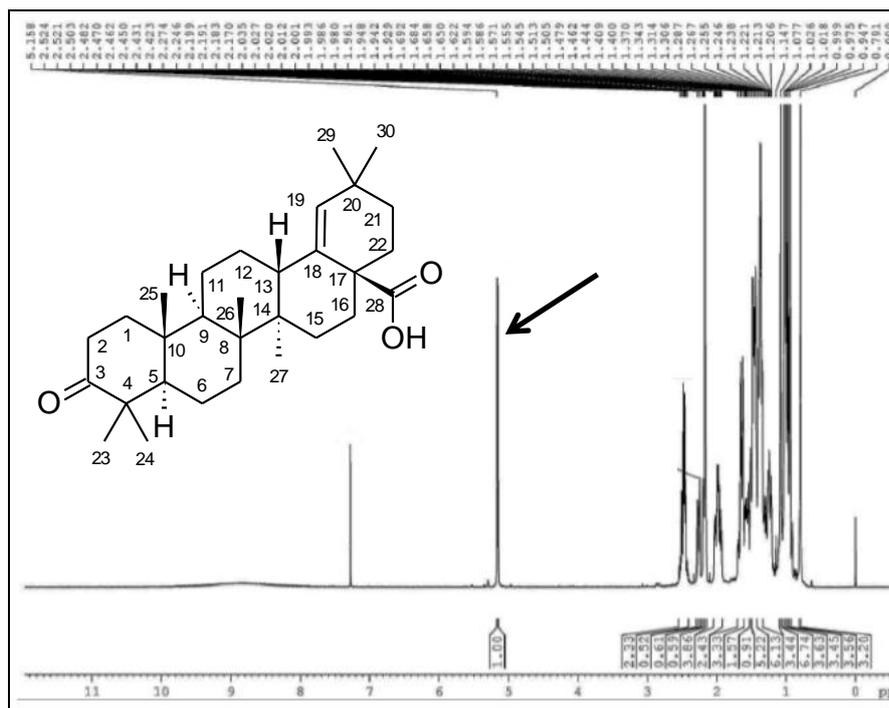


Figura 36 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  composto 30C, em  $\text{CDCl}_3$  a 400MHz.

O sinal apontado por um seta (figura 36) corresponde a um hidrogênio, tendo como multiplicidade um singlete e como deslocamento químico 5,16 ppm, e está ligado ao carbono 19 (mostrado na figura 37).

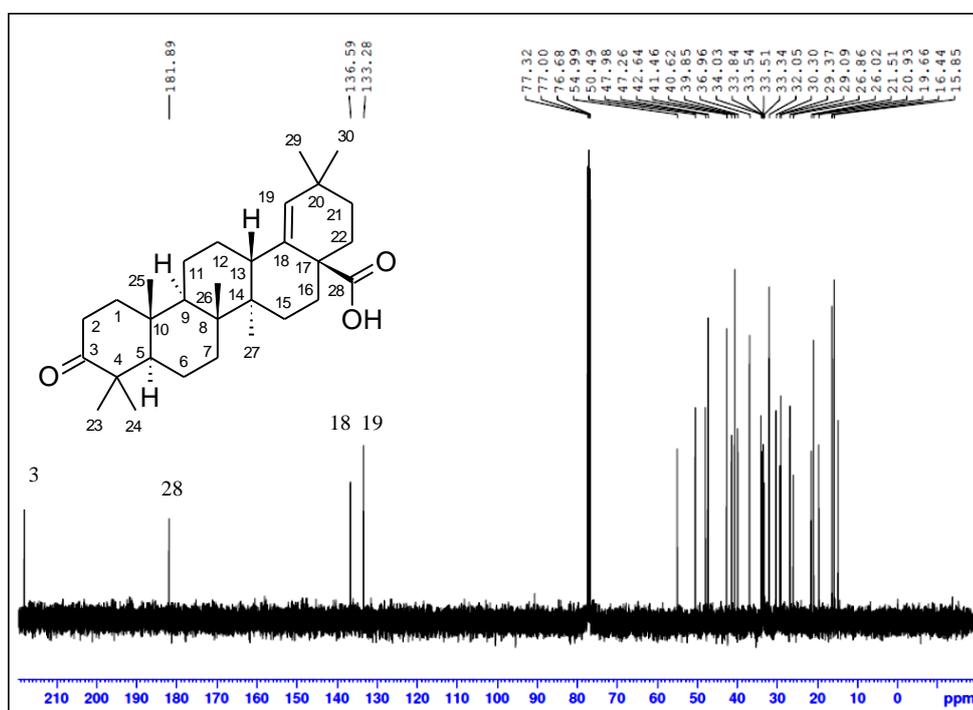


Figura 36 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  composto 30C a 100,62 MHz

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 36) mostra a presença de uma carbonila de cetona (C-3), uma carbonila de ácido carboxílico (C-28), e dois carbonos de dupla ligação (C-18 e C-19)

sendo que C-18 é desidrogenado. O ponto de fusão, os sinais observados nos espectros mostrados e a comparação com a literatura<sup>43</sup> levam à confirmação de se tratar do ácido morônico.

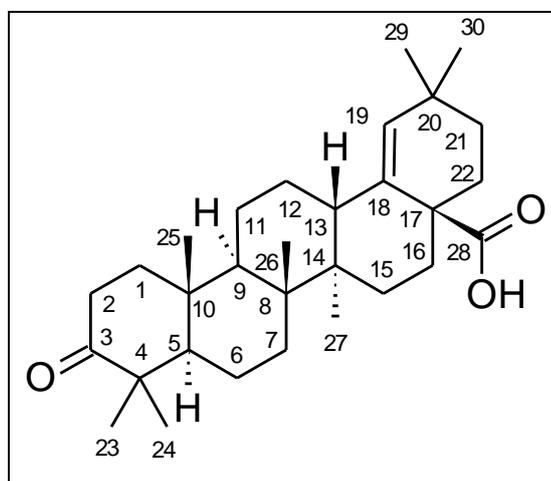


Figura 37 – Composto 30C, ácido morônico

A continuação do capítulo tratará do último composto isolado da mistura de isômeros, sendo denominado inicialmente por 30D, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  é similar ao apresentado anteriormente, no entanto, há diferença na multiplicidade do H-19, não sendo um singlete (figura 38).

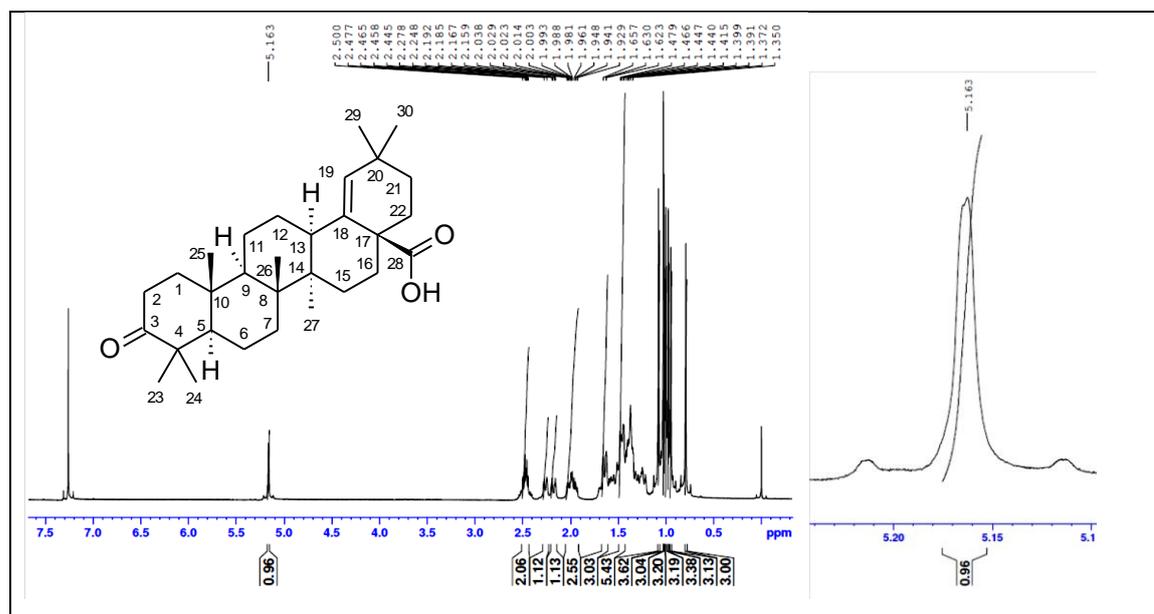


Figura 38 – espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto 30D, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz.

<sup>43</sup>GEHRKE, I. T. S. **Estudo Fitoquímico e Biológico das Espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinhtifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus***, 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

Sendo assim, é esperado que H-19 mostre acoplamento no experimento homonuclear 2D  $^1J_{H-H}$  COSY (figura 39), este experimento, associado com o heteronuclear 2D  $^{2,3}J_{C-H}$  COLOC, revelou que a estrutura do composto 30D é equivalente ao ácido morônico. A explicação para a presença de acoplamento no experimento COSY, pode estar relacionado com estereoquímica do C-13 (figura 37), no ácido morônico isolado anteriormente este centro é definido como sendo S, a mudança de conformação para R contribui para o acoplamento a longa distância do H-19 com o H-13. A confirmação desta informação pode ser verificada com a difração de raio-x (figura 40).

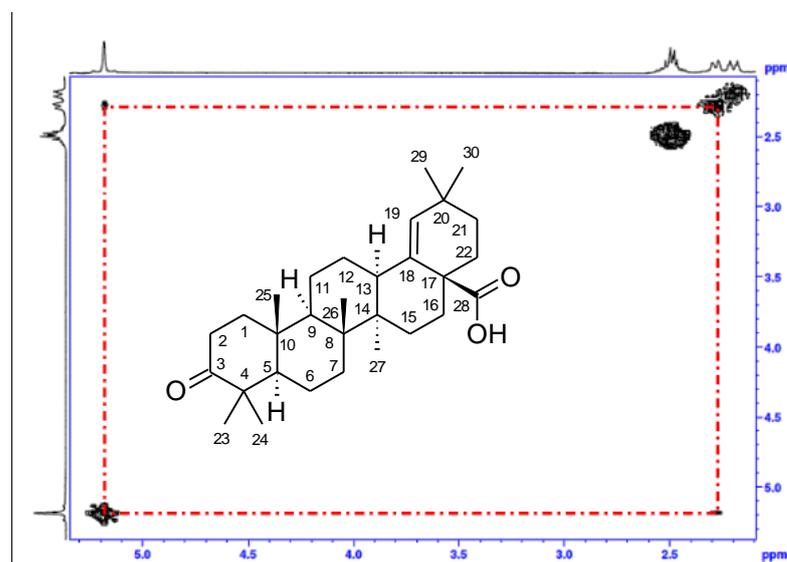


Figura 39 – Espectro 2D, HOMONUCLEAR  $^1J_{H-H}$ , COSY composto 30D, em  $CDCl_3$ , a 400MHz.

Pela análise da imagem de raio-x (figura 40) verifica-se que o C-13 tem orientação R, e os outros carbonos quirais C5-R, C10-R, C9-R, C8-R, C14-R e C17-S. Confirmando que a estrutura 30D é um epímero do ácido morônico, pois com exceção do C13 os demais apresentam a mesma orientação.

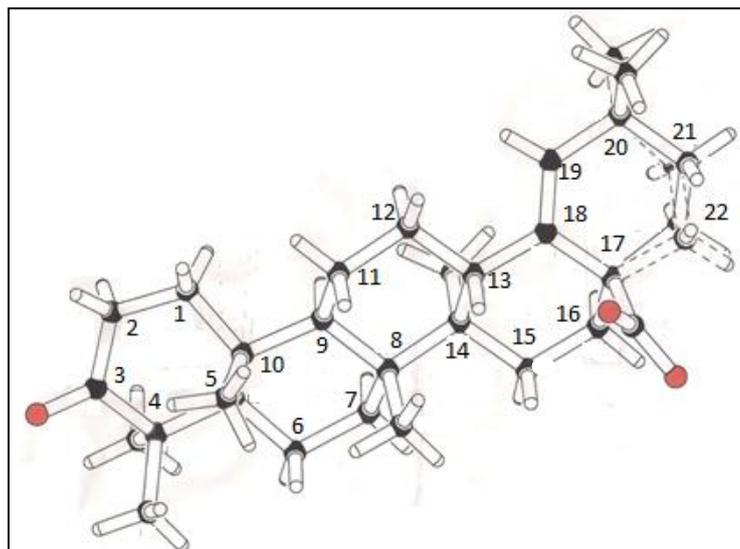


Figura 40 – Difração de raio-x do composto 30D, epímero do ácido morônico

O último isolado obtido, não fazia parte da mistura de isômeros, foi isolado das frações eluídas com hexano/acetato (95:5) do extrato hexânico, este foi denominado IH2.

Analisando o espectro RMN  $^1\text{H}$  (figura 41) foi possível verificar a presença de uma metila ( $\delta$  0,881ppm) e a presença de 17  $\text{CH}_2$ , sendo que o sinal intenso em  $\delta$  1,26ppm corresponde à 28 hidrogênios, ou seja, 14  $\text{CH}_2$ , mais três  $\text{CH}_2$ , um em  $\delta$  1,60 ppm outro em  $\delta$  2,30 ppm e o último em  $\delta$  4,16 ppm esse provavelmente ligado a um heteroátomo O sinal em  $\delta$  1,26 ppm provavelmente corresponde a uma cadeia linear.

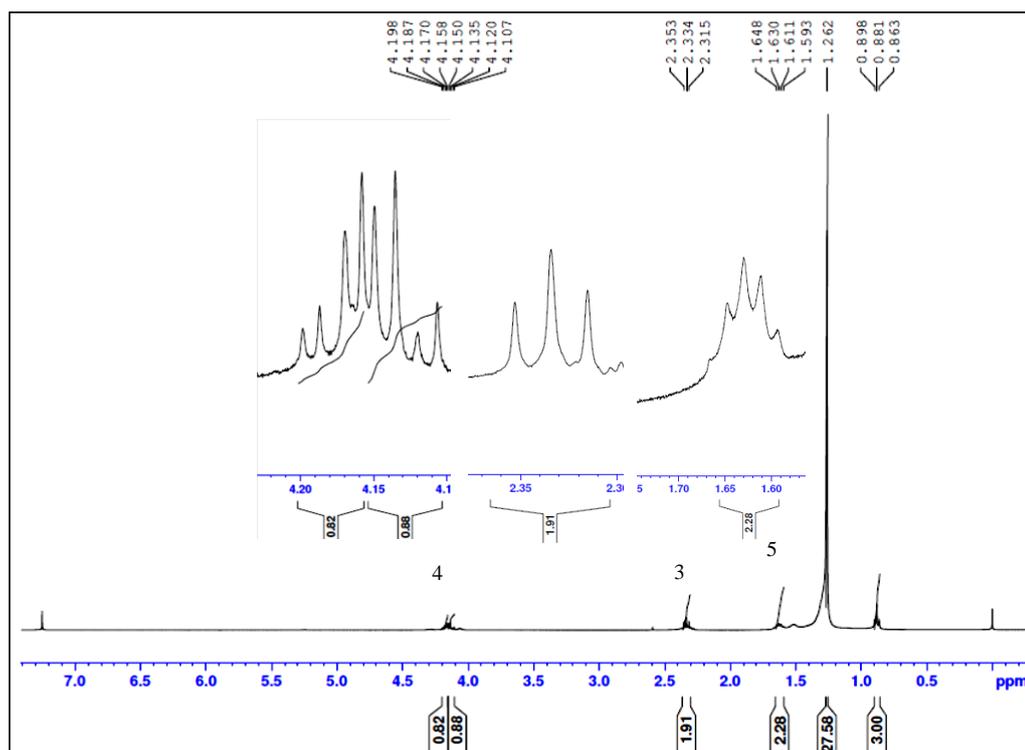


Figura 41 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  para o composto IH2, em  $\text{CDCl}_3$ , á 400MHz.

Com auxílio do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obteve-se mais informações a respeito do isolado IH2 (figura 42).

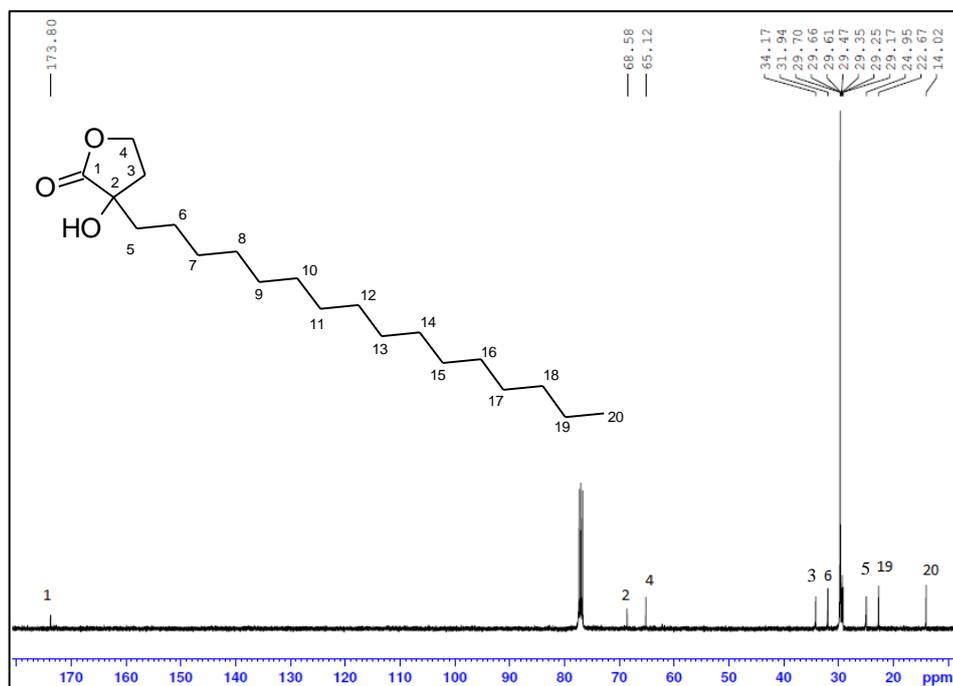


Figura 42 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o isolado IH2, em  $\text{CDCl}_3$ , a 100MHz

Verifica-se a presença de um carbono de éster (C-1 -  $\delta$  173,8 ppm), dois carbonos ligados à heteroátomos (C-2 -  $\delta$  68,58 ppm e C-4 -  $\delta$  65,12 ppm), além dos carbonos que provavelmente compõem a cadeia linear (C-7 a C1-8 -  $\delta$  29,17 ppm a  $\delta$  29,70 ppm). Com isso podemos dizer que a formula molecular para IH2 é  $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_3$ .

Com o experimento heteronuclear HMQC (figura 43) foi possível confirmar a presença de um carbono quaternário em  $\delta$  68,58 ppm, ligado provavelmente á um heteroátomo. Também é possível afirmar que o isolado IH2 é composto por: um  $\text{CH}_3$ , dezessete  $\text{CH}_2$  e dois C.

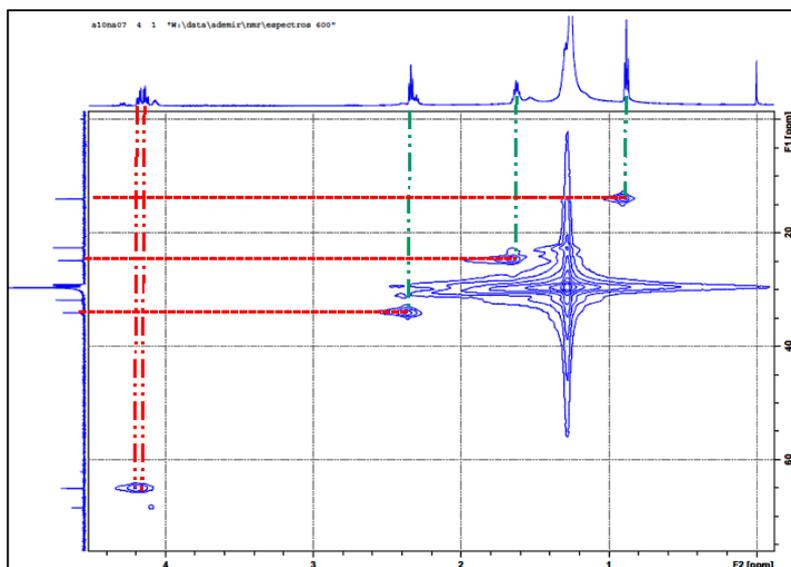


Figura 43 – Espectro de RMN 2D  $^1J_{H-C}$  HMQC, do isolado IH2, em  $CDCl_3$ .

Temos através do espectro HMBC (figura 44) apontado com setas contínuas os três acoplamentos da carbonila do éster com três  $CH_2$  (C-4, C-3 e -C5), sendo que um dos  $CH_2$  (C-4) que realiza este acoplamento também acopla com um carbono quaternário (C-2) ligado a heteroátomo (acoplamento apontado na figura 44 por uma seta tracejada), ou seja, estes carbonos estão próximos. Os hidrogênios da metila realizam dois acoplamentos com carbonos  $CH_2$ , isto sugere que ela esteja ligada ao final da cadeia linear. Com isso chega-se a estrutura da figura 45, que mostra também os acoplamentos observados.

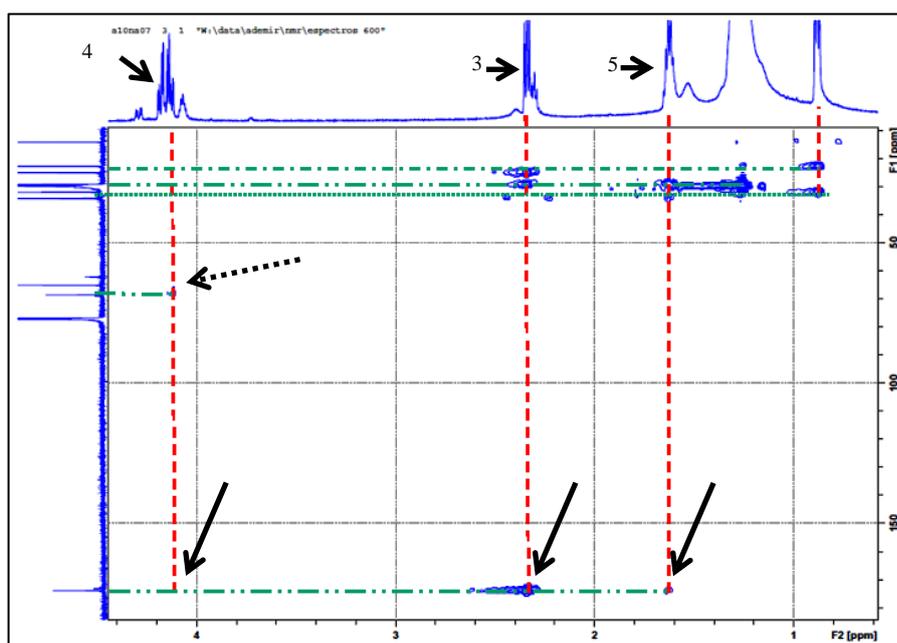


Figura 44 – Espectro de RMN 2D  $^{2,3}J_{H-C}$  HMBC, do isolado IH2, em  $CDCl_3$ .

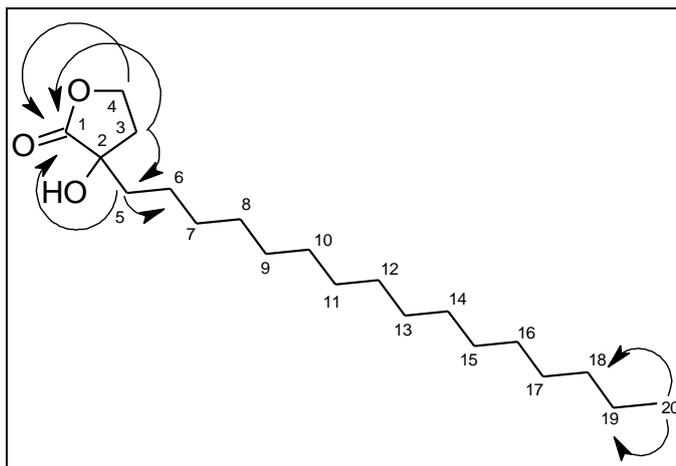
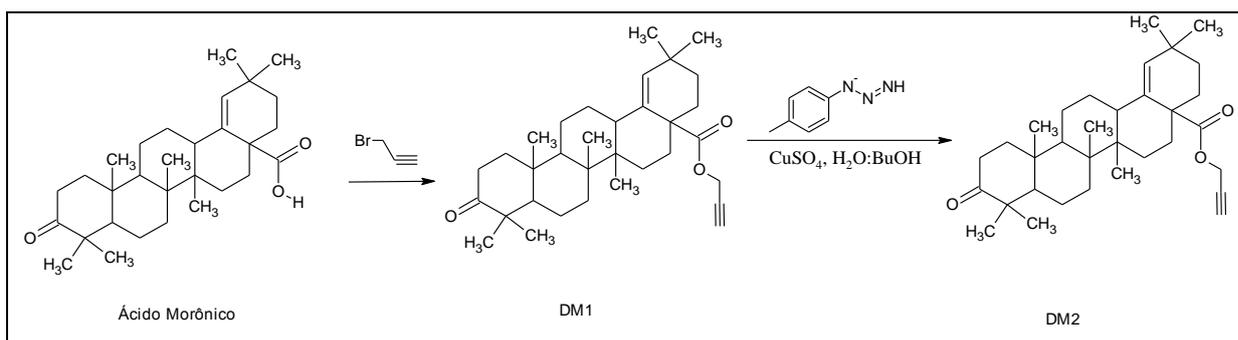


Figura 45 – Estrutura e acoplamentos observados para o isolado IH2.

Uma busca na literatura revelou que é a primeira vez que essa estrutura é isolada, no entanto, existem estruturas similares a essa, obtidas a partir de síntese<sup>44</sup> caracterizada como furanona, devido ao éster cíclico de cinco membros com uma hidroxila. Sendo assim essa estrutura receberá o nome trivial de esquinofuranona.

### 4.3 Derivados do ácido Morônico

Neste trabalho foram sintetizados dois derivados usando o ácido morônico como material de partida (equação 1 e 2).



Equação 1 – Representação dos derivados sintetizados a partir do ácido morônico

O primeiro, denominado DM1 (figura 46) é a inserção de uma tripla ligação. O segundo, DM2 (figura 48) utiliza como ponto de partida o DM1, sintetizando um triazol. Para confirmar a síntese do composto DM1 foi realizado apenas o espectro de RMN<sup>1</sup>

<sup>44</sup> VEDEJS, E.; ENGLER, D.; TELSCHOW, J. E. Transition-Metal Peroxide Reactions. Synthesis of  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl Compounds from Enolates. *J. Org. Chem.*, v. 43, p. 188-196, 1978.

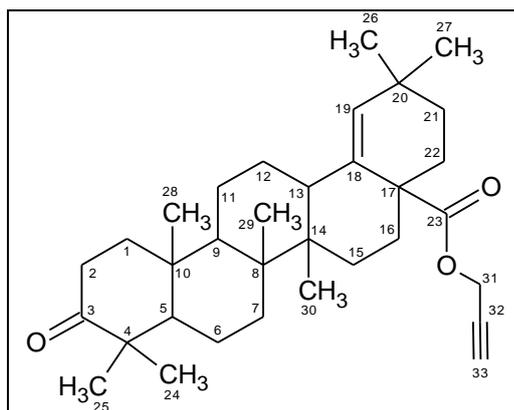


Figura 46 – Estrutura sintetizada a partir do ácido morônico, denominada DM1.

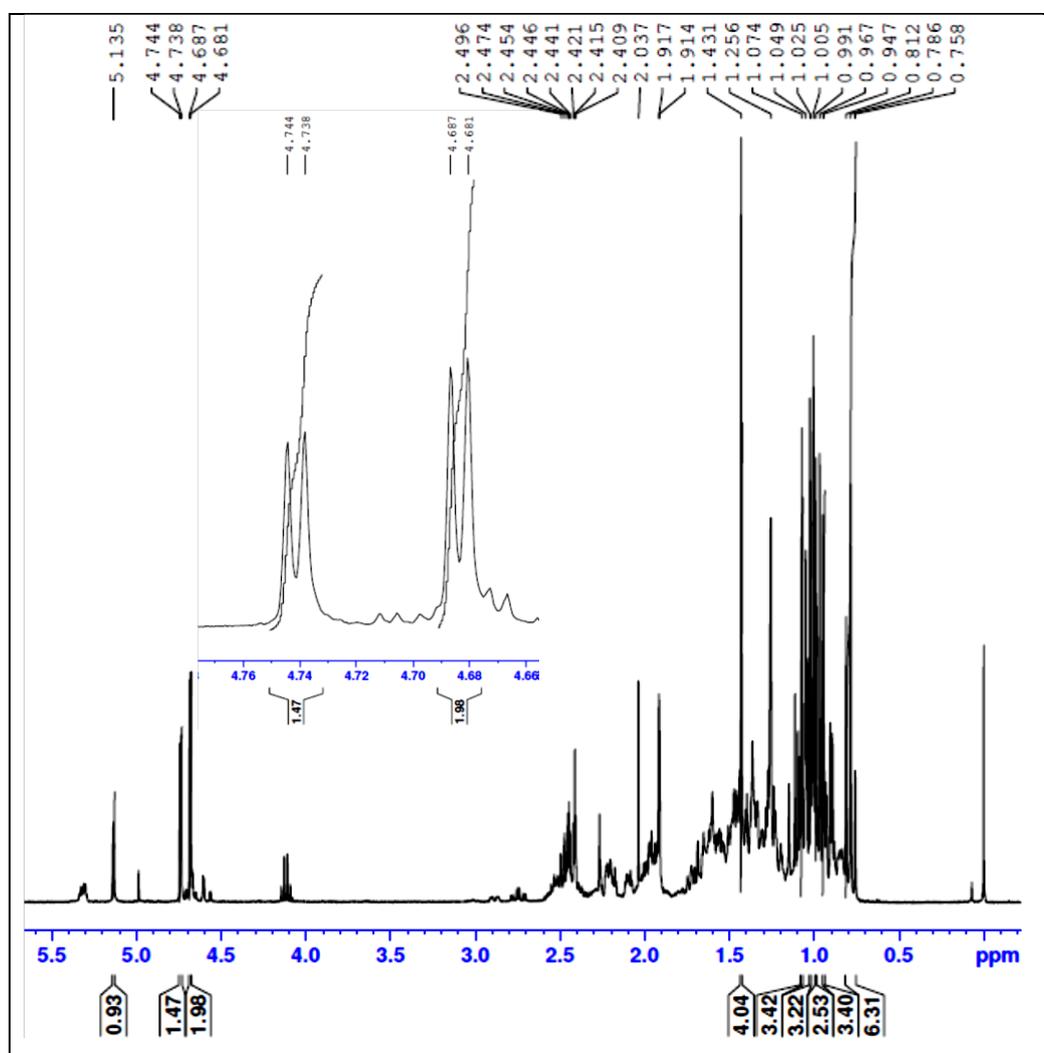


Figura 47 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do derivado do ácido morônico DM1, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz.

Os sinais em 4,68 ppm e 4,75 ppm, com a integração para dois hidrogênios e um hidrogênio respectivamente, correspondem aos H-33 e H-31 (figura 46) respectivamente. Garantindo assim a presença da tripla ligação, confirmando o produto.

A partir do DM1 sintetizou-se o composto DM2 (figura 48) sua estrutura foi confirmada pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figuras 49 e 50 respectivamente).

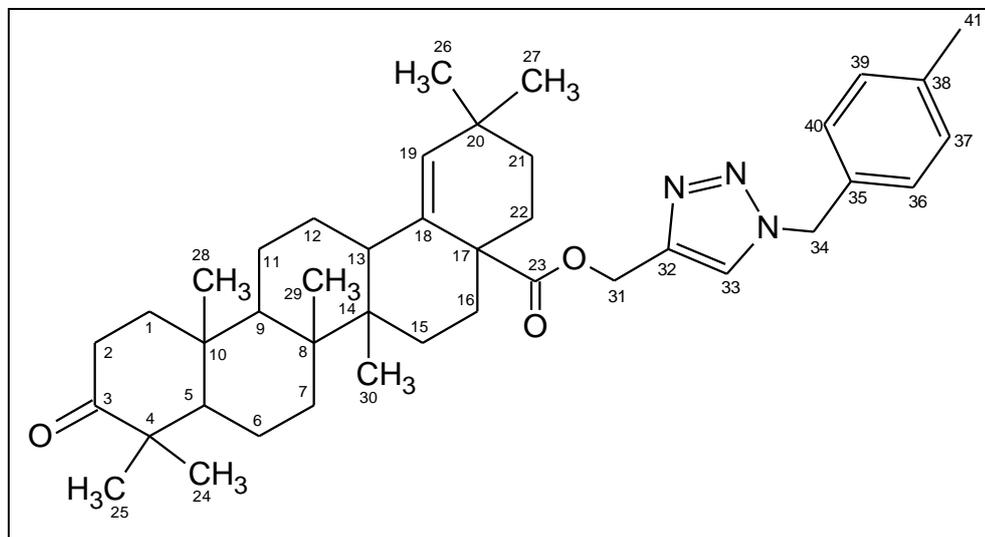


Figura 48 - Estrutura sintetizada a partir do DM1, denominada DM2.

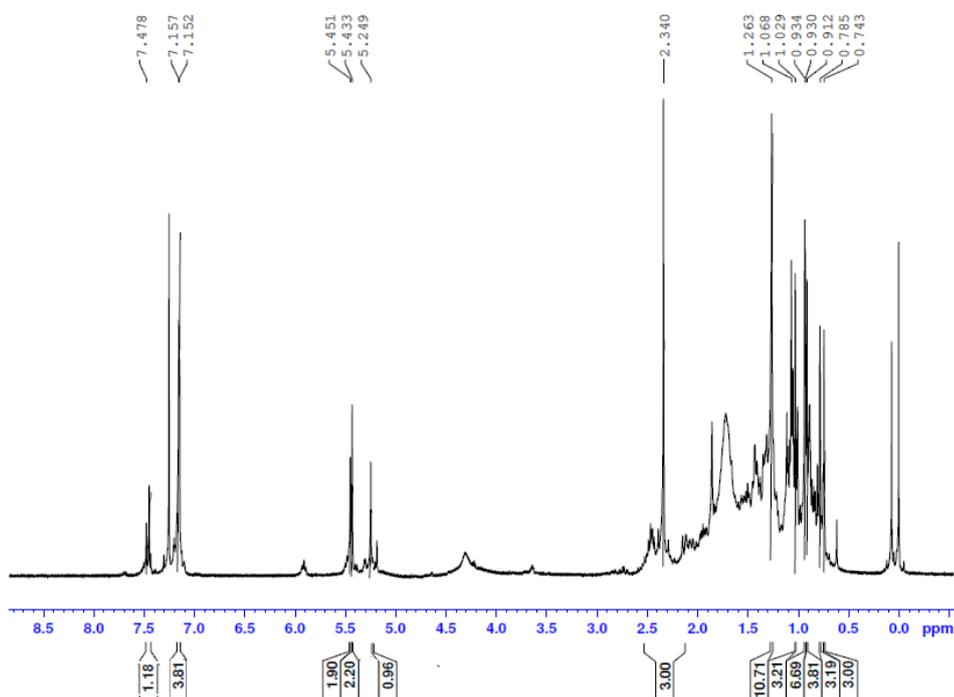


Figura 49 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o derivado DM2, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz.

A expansão da região dos hidrogênios, 19, 31 e 34 (figura 49a); bem como sua integração confirma a presença do triazol.

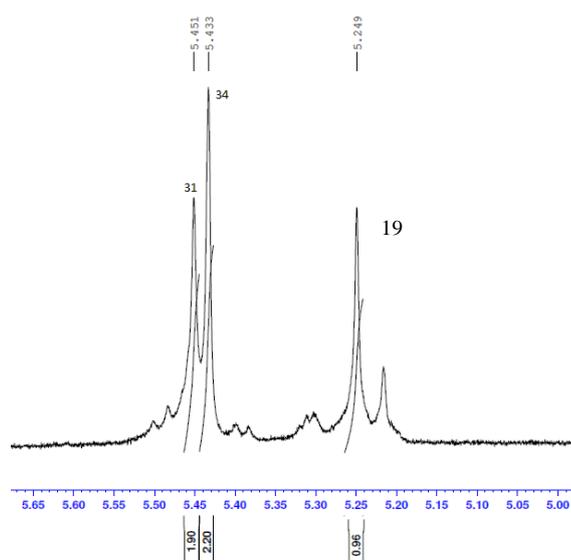


Figura 49b – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , expansão ( $\delta$  5,00ppm a  $\delta$  5,68ppm) do derivado DM2, em  $\text{CDCl}_3$

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 50) reafirma a presença do triazol e confirma a síntese do produto, uma vez que há a presença dos carbonos aromáticos (C-35, C-36; C-40, C-37; C-39 e C-38), dos carbonos do triazol (C-32 e C-33) e os carbonos com maior intensidade C-18 e C-19 correspondente a dupla ligação. Esses deslocamentos foram comparados com artigos que relatam a síntese de vários triazóis<sup>45</sup> a partir do ácido ursólico, confirmando que o derivado DM2 equivale ao apresentado.

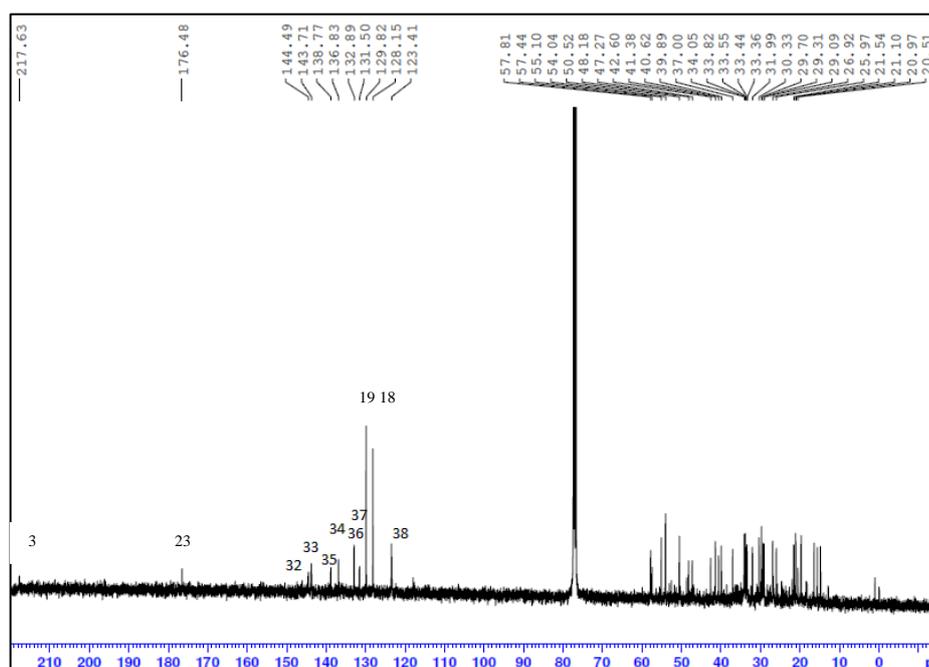


Figura 50 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado DM2, em  $\text{CDCl}_3$ , a 100MHz.

<sup>45</sup> RASHID, S. et al. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti cancer agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 238-245, 2013.

#### 4.4 Atividades antimicrobiana

A tabela a seguir (tabela 2) demonstra as atividades para o ácido morônico e seus derivados.

Tabela 2. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do ácido morônico, de seus derivados e dos padrões usados, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Micro-organismos	Ác. Morônico 30C CIM/CLM		Derivado DM1 CIM/CLM		Derivado DM2 CIM/CLM		Ampicilina CIM/CLM		Azitromicina CIM/CLM	
<b>Gram-positivos</b>										
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,1	50	50	>100	>100	-	0,77	50	0,77	50
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3,1	100	100	>100	100	>100	0,77	50	0,77	0,77
<i>B. cereus</i> ATCC 33019	100	100	100	>100	100	>100	50	50	1,55	1,55
<i>Enteroc. spp.</i> ATCC 6589	3,1	100	100	100	>100	-	25	50	1,55	6,2
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	100	100	100	>100	>100	-	50	50	12,5	12,5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	50	100	100	100	>100	-	12,5	50	3,1	6,2
<b>Gram-negativos</b>										
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,1	50	50	100	100	>100	3,1	25	1,55	3,1
<i>E. cloacae</i> ATCC 1304	100	100	100	>100	>100	-	50	50	0,77	1,55
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	100	100	>100	100	>100	25	50	12,5	25
<i>B. cepacia</i> ATCC 17759	3,1	100	100	>100	>100	-	50	50	1,55	3,1
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	3,1	100	100	100	>100	-	25	50	3,1	3,1
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	50	100	100	100	100	>100	0,77	0,77	3,1	6,2
<i>M. morgani</i> ATCC 25829	50	100	100	>100	>100	-	0,77	6,2	3,1	6,2

A atividade antimicrobiana do ácido morônico (30A) frente a algumas bactérias como *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enteroc. Spp*, *E. coli*, *B. cepacia* e *S. sonnei* pode ser considerada equivalente à dos padrões utilizados (ampicilina e azitromicina), em alguns casos específicos, como para a bactéria gram-positiva *Enterococcus spp* e gram-negativas *Burkholderia cepacia* e *Shigella sonnei*, a sua atividade é superior a do padrão ampicilina, ou seja, a concentração inibitória mínima do ácido morônico é menor do que a do padrão.

Observa-se também, que houve um aumento na concentração inibitória mínima quando testado os derivados, ou seja, as modificações estruturais realizadas no ácido morônico diminui de maneira geral sua atividade antimicrobiana. Outras modificações já foram relatadas como ineficazes no aumento de sua atividade frente às bactérias reladas na

tabela 2, como por exemplo, redução do carbono 3 (carbonila) e esterificação<sup>46</sup>. A tabela 3 refere-se às atividades antimicrobiana dos outros isolados.

Tabela 3. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) de alguns isolados e dos padrões usados, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Micro-organismos	Ác. Lentiscifolico		Espatulenol		Ác. Pistagremico		Ampicilina		Azitromicina		Esquinofuraron	
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM	
<b>Gram-positivos</b>												
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>100	-	100	>100	>100	-	0,77	50	0,77	50	100	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<b>50</b>	>100	100	>100	100	>100	0,77	50	0,77	0,77	100	>100
<i>B. cereus</i> ATCC 33019	100	100	100	>100	100	>100	50	50	1,55	1,55	100	>100
<i>E. spp.</i> ATCC 6589	100	>100	<b>50</b>	100	>100	-	25	50	1,55	6,2	100	100
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	100	>100	100	>100	>100	-	50	50	12,5	12,5	100	>100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	>100	-	<b>50</b>	100	>100	-	12,5	50	3,1	6,2	100	>100
<b>Gram-negativos</b>												
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>100	-	<b>50</b>	100	100	>100	3,1	25	1,55	3,1	100	100
<i>E. cloacae</i> ATCC 1304	100	>100	100	>100	>100	-	50	50	0,77	1,55	100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	>100	100	>100	100	>100	25	50	12,5	25	100	>100
<i>B. cepacia</i> ATCC 17759	>100	-	<b>50</b>	>100	>100	-	50	50	1,55	3,1	100	>100
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	100	>100	<b>50</b>	100	>100	-	25	50	3,1	3,1	100	>100
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	100	100	<b>50</b>	100	100	>100	0,77	0,77	3,1	6,2	100	100

A análise da Tabela 2 revela que a melhor atividade é a do espatulenol frente à bactéria gram-negativa *Burkholderia cepacia* sendo equivalente ao padrão ampicilina quando observado a concentração inibitória mínima, ou seja,  $50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para outras bactérias como *Enterococcus spp* e *Shigella sonnei* a concentração inibitória mínima do espatulenol é o dobro da encontrado para o padrão ampicilina, considerando assim, uma baixa atividade antimicrobiana. Considerando os outros isolados percebe-se, a maioria dos casos, valores acima de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ou seja, uma concentração inibitória várias vezes superior a dos padrões.

<sup>46</sup>GEHRKE, I. T. S. Estudo Fitoquímico e Biológico das Espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinhtifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus*, 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial da casca do caule de *Schinus lentisfolius*, apresenta uma composição bastante variada, dependendo do procedimento de extração. Visto que o aquecimento da casca para secagem, antes da extração do óleo, proporciona a transformação do mirceno e do  $\alpha$ -pineno em estruturas mais complexas, como o biciclogermacreno, este pode gerar, durante os métodos de isolamento estruturas como espatulenol, comprovado por este trabalho e anteriormente relatada na literatura.

A análise do extrato hexânico da casca do caule revelou, principalmente, a presença de uma mistura de isômeros, composta por quatro estruturas com polaridades similares, dificultando sua separação, sendo necessário realizar uma esterificação, obtendo dois ésteres com uma diferença de aproximadamente dois minutos de tempo de retenção, quando analisado por cromatografia á gás.

Com auxílio de experimentos de ressonância magnética nuclear foi possível definir as estruturas desta mistura, evidenciando que os produtos de esterificação eram similares e que a principal diferença entre eles era a posição de uma dupla ligação. Além disso, observou-se um acoplamento inesperado no experimento homonuclear COSY para o ácido morônico, o que sugere que há uma mudança na orientação do carbono 13 em relação ao isolado anteriormente. Esta orientação (R) favorece o acoplamento a longa distância do hidrogênio 19 com o hidrogênio 13, originando a correlação.

Outro composto obtido do extrato hexânico trata-se de uma lactona (esquinofuranona) de cinco membros ligada a uma cadeia linear de dezesseis carbonos, ainda não relatada pela literatura. Estrutura similar foi isolada pelo grupo de pesquisa em um estudo anterior, no entanto tratava-se de um álcool graxo linear de dezenove carbonos<sup>47</sup>.

As atividades antimicrobianas mostram que apenas o ácido morônico apresenta uma atividade significativa, ou seja, próxima ao padrão. A inserção de uma tripla ligação (derivado DM1) e a formação do triazol (DM2), não foi eficaz para potencializar esta atividade. Portanto, o ácido morônico é o único apresentado neste trabalho que demonstra atividade antimicrobiana significativa para as bactérias testadas, ou seja, próxima ao padrão.

---

<sup>47</sup> GEHRKE, I. T. S. **Estudo Fitoquímico e Biológico das Espécies *Schinus lentisfolius*, *Schinus terebinhtifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus***, 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Illinois: Allured Publishing Corporation**, 2001.

BANDYOPADHYAY, C.; GHOLAP, A. S.; MANDAPUR, V. R. Caracterização de Látex alkenylresorcinol em manga (*Mangifera indica* L.). **J. Agric. Food. Chem.** v. 33, p. 377-379, 1985.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 15, p. 158-169, 2013.

COLE, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 821-828, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos Cromatográficos, Editora da Unicamp, 1997.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids, **Nat. Prod. Rep.** v. 22, p. 487-503, 2005.

CREMIN, P.A.; ZENG, L. High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC-MS evaporative light scattering detection. **Anal. Chem.** v. 74, p. 5492-5500, 2002.

DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T. G., GERSHENZON, J., Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry.** v. 70, p. 1621-1637, 2009.

DEWICK, P.M., 1999. The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.** v. 16, p. 97-130, 1999.

FENNER, R. et al. Plantas Utilizadas na Medicina Popular Brasileira com Potencial Atividade Antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** . v. 42, p. 369-394, 2006.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, Martin Molz, 2009, disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=1580](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1580)>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. V. 1, 2010.

FRAGA, B.M. Natural sesquiterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 943-972, 2006.

GEHRKE, I. T. S. **Estudo Fitoquímico e Biológico das Espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus***, 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GEHRKE, I. T. S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 486–491, 2013.

GOMES, V. et al. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 222-227, 2013.

IWABUCHI, H.; YOSHIKURA, M.; KAMISAKO, W. Studies on the sesquiterpenoids of *Panax ginseng* C. A. Meyer III. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 509-510, 1989.

KHAN, M. N. I.; NIZAMI, S. S. KHAN, M. A. New Saponins From *Mangifera indica*. **J. Nat. Prod.** v. 56, p. 767-770, 1993.

LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa, São Carlos, 1993.

LIMA E CUNHA, M. C.; NARDI vs LAURO, MULLER, I. F. Biogeochemistry of REE elements and tetrad effect in the soil-plant system: a study on volcanic rock covers in southernmost Brazil. **An Acad Bras Cienc**, v. 84, p. 911-918, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, p. 49-59, 2002.

LUZ, C. L. S. **Anacardiaceae R. Br. Na flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MARTINS, M. R. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 485-492, 2014.

MCCHESENEY, D. J.; VENKATARAMAN, K. S.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68. p. 2015-2022, 2007.

MITCHELL, J. D. The Poisonous Anacardiaceae Genera of the World. **Advances in Economy Botany**. v. 8, p. 103-129, 1990.

MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**. v. 17, p. 9728-9740, 2012.

MOREL, A. F. et al. Identificação do triterpeno ácido morônico em extratos e frações obtidas da espécie *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) por CG. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-

486-4. **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* v. 75. p. 311-335, 2012.

NISHIMURA, K. et al. A New Sesquiterpene, Bicyclogermacrene. **Tetrahedron Letters.** v. 36, p. 3097-3100, 1969.

NUGROHO, A. E. et al. Dysotriflorins A-M, triterpenoids from *Dysoxylum densiflorum*, **Tetrahedron**, v. 70, p. 9661-9667, 2014.

PAWLOWSKI, Â. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany.** v. 88, p. 198-203, 2013.

RASHID, S. et al. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti cancer agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 238-245, 2013.

RAUF, A. et al. In-vivo antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of pistagremic acid isolated from *Pistacia integerrima*. **Phytomedicine.** v. 21, p. 1509-1515, 2014.

SANTANA, J. S. et al. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), **Química Nova**, v. 35, p. 2245-2248, 2012.

UDDIN, G. et al. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. **Fitoterpia.** v. 83, p. 1648-1652, 2012.

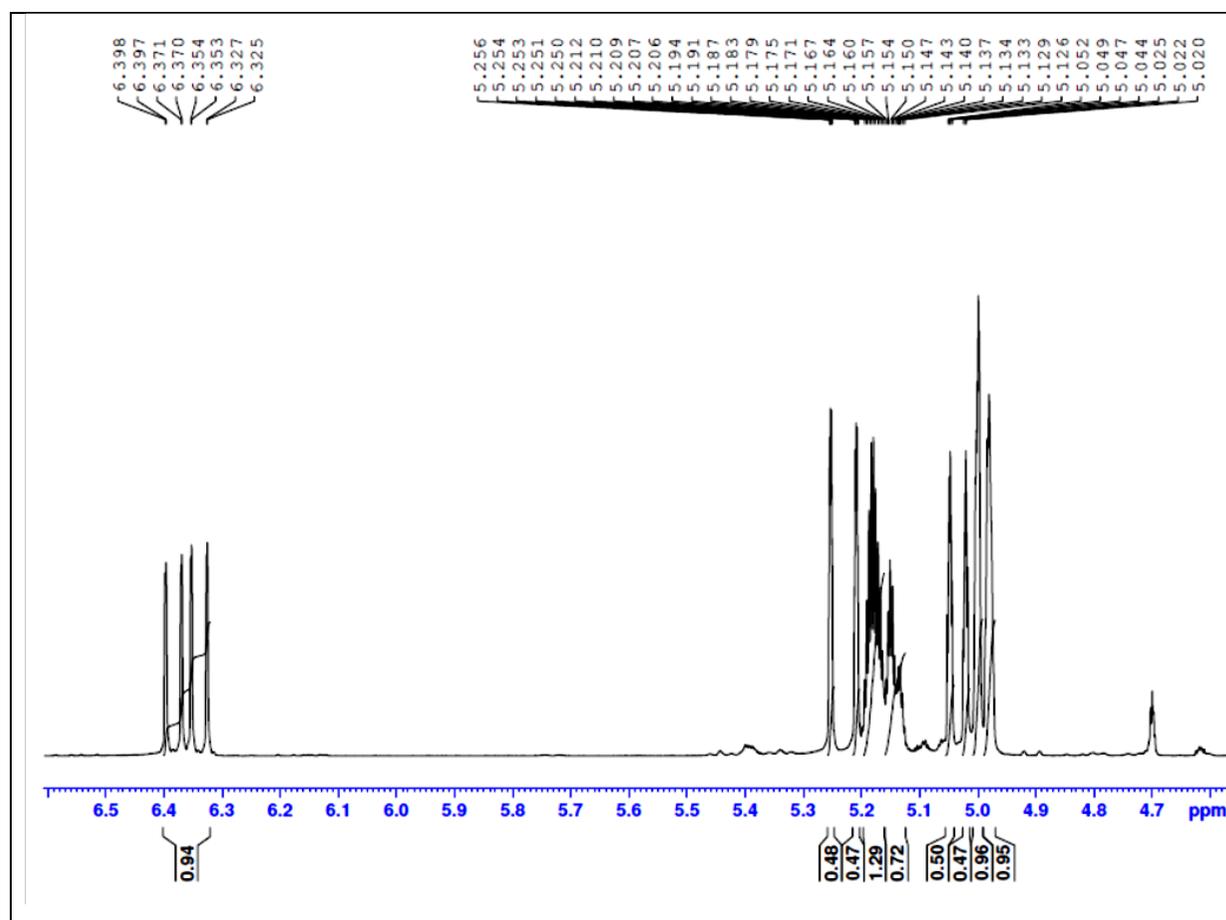
VEDEJS, E.; ENGLER, D.; TELSCHOW, J. E. Transition-Metal Peroxide Reactions. Synthesis of  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl Compounds from Enolates. **J. Org. Chem.**, v. 43, p. 188-196, 1978.

WATERMAN, P.G. Secondary metabolites: their function and evolution. **Ciba Foundation Symposium**, v. 171. p. 255-275, 2002.

WHEELER, G. S.; CHAWNER, M.; WILLIAMS, D. A. Predicting the host range of *Nystalea ebalea*: Secondary plant chemistry and host selection by a surrogate biological control agent of *Schinus terebinthifolia*, **Biological Control**, v. 73, p. 39-49, 2014.

WILSON, R.M.; DANISHEFSKY, S. Small Molecule Natural Products in the Discovery of Therapeutic Agents: The Synthesis Connection. **J. Org. Chem.** v. 71, p. 8329-8351, 2006.

## Apêndice A – Espectros de RMN 1D e 2D com expansões da mistura dos compostos encontrados no óleo.

Figura 51 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos do óleo, expandido ( $\delta$  4,6 a  $\delta$  7,0ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

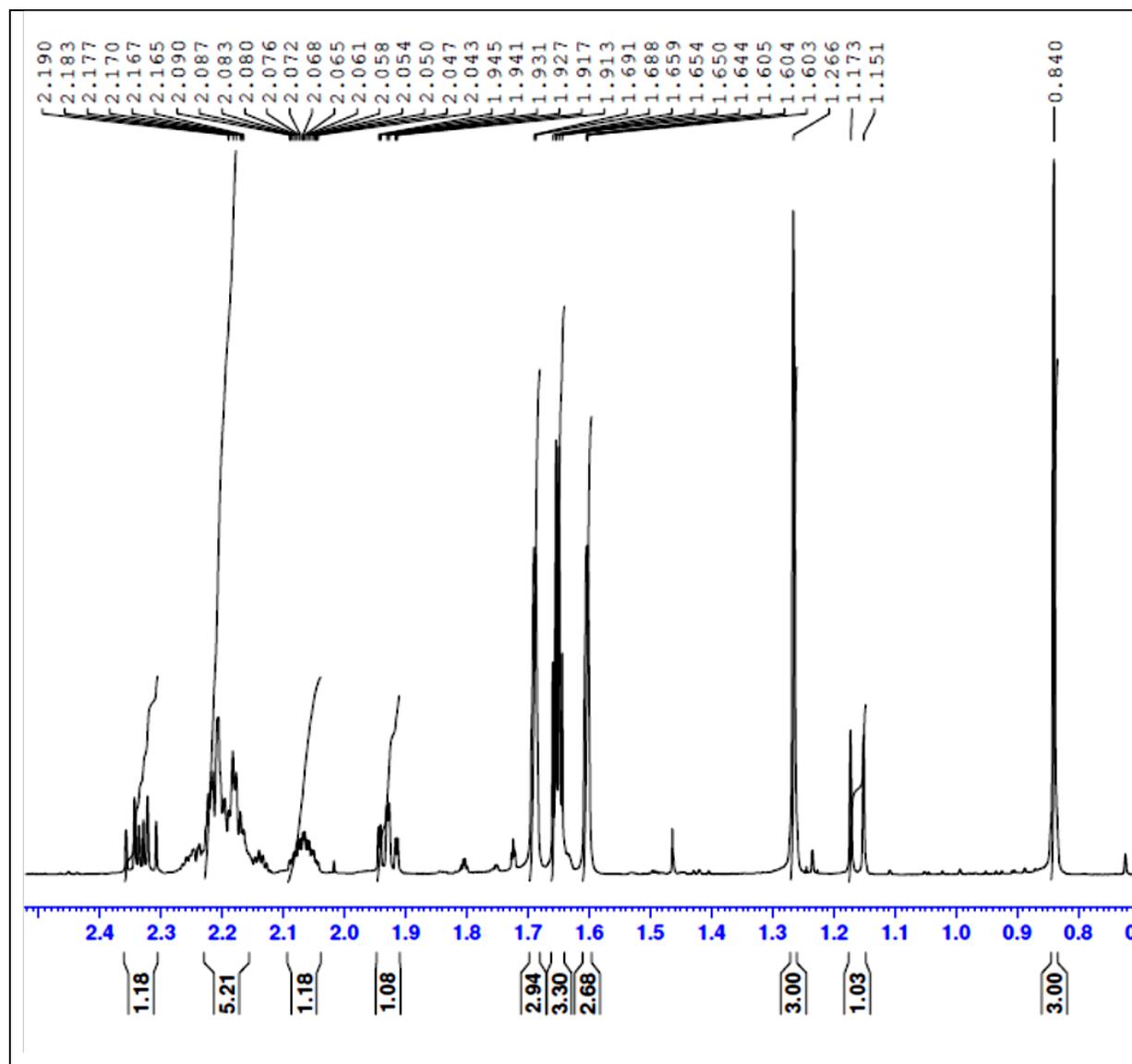


Figura 52 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos do óleo, expandido ( $\delta$  0,7 a  $\delta$  2,5ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

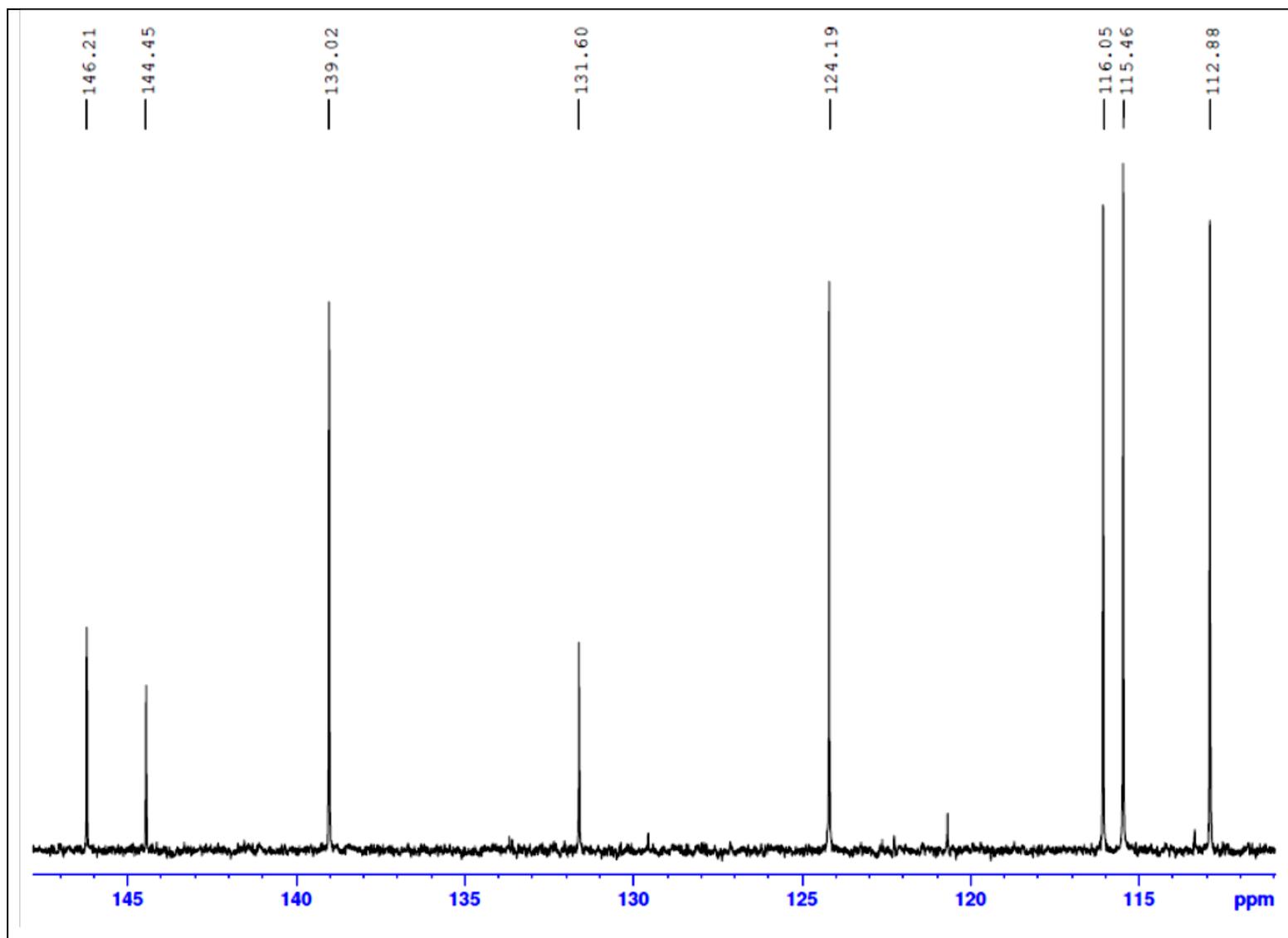


Figura 53 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos compostos do óleo, expandido ( $\delta$  111 a  $\delta$  148ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

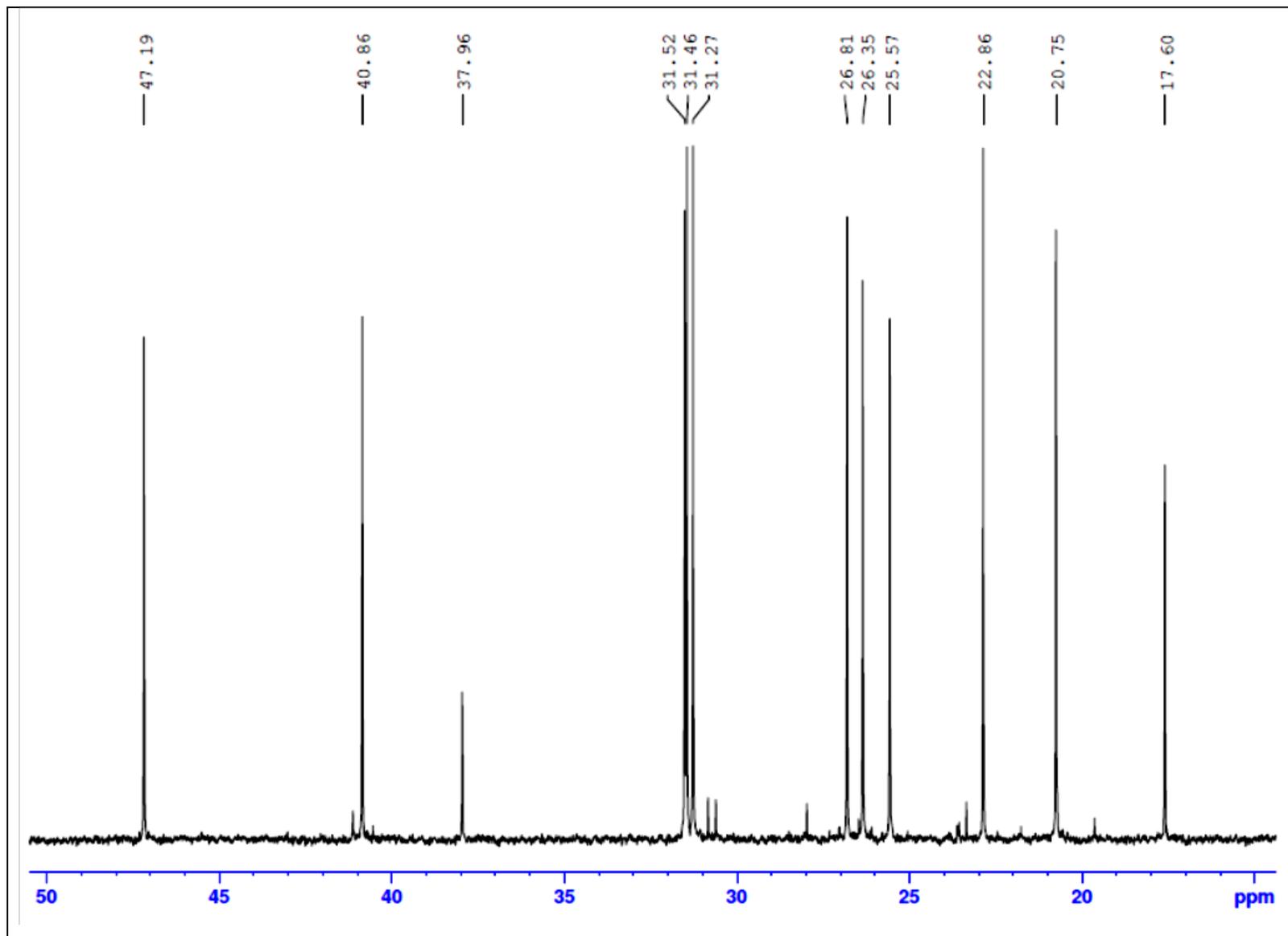


Figura 54 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos compostos do óleo, expandido ( $\delta$  0 a  $\delta$  50ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

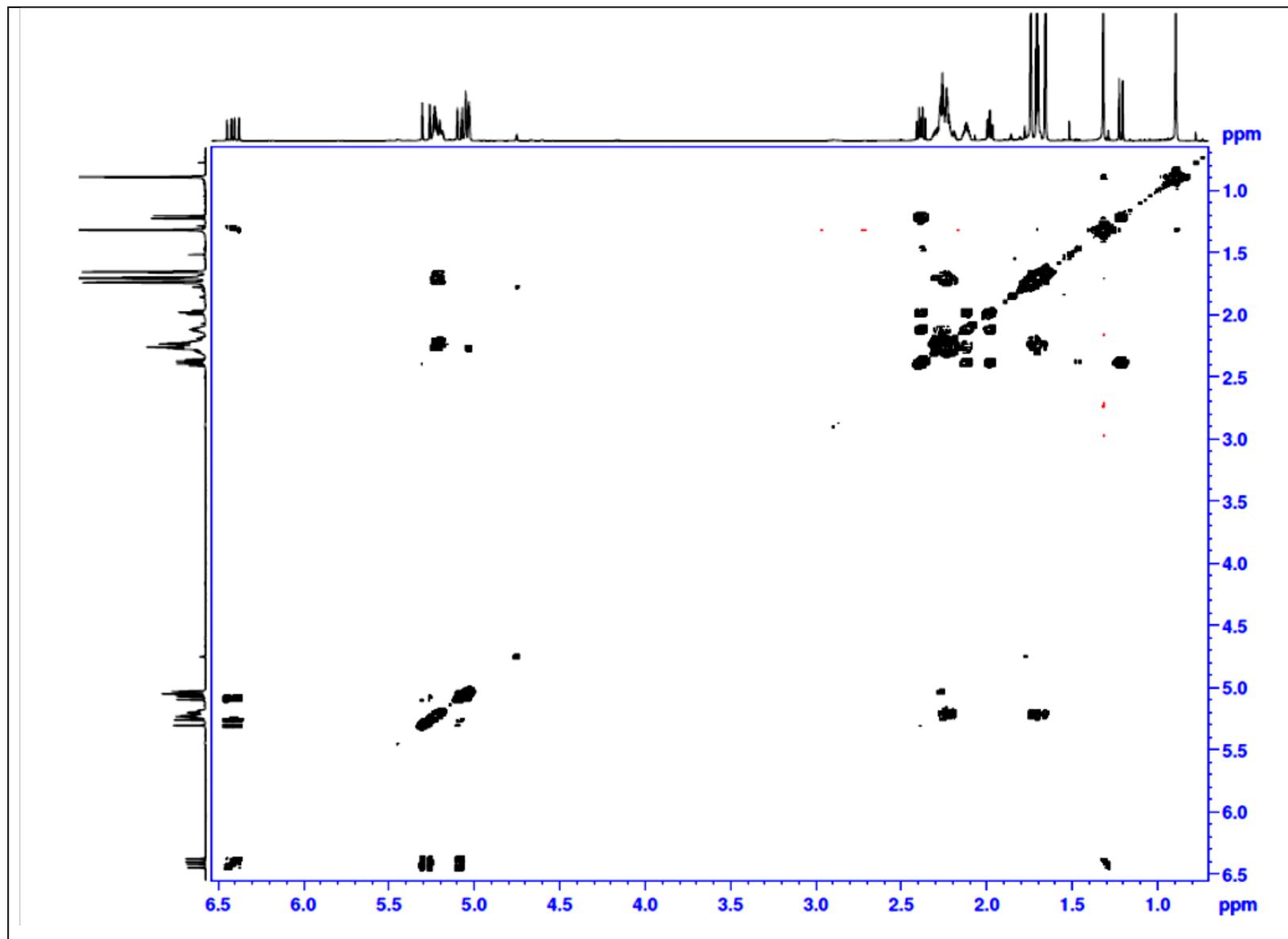


Figura 55 – Espectro RMN 2D HOMONUCLEAR  $^1J_{\text{H-H}}$  COSY da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400MHz.

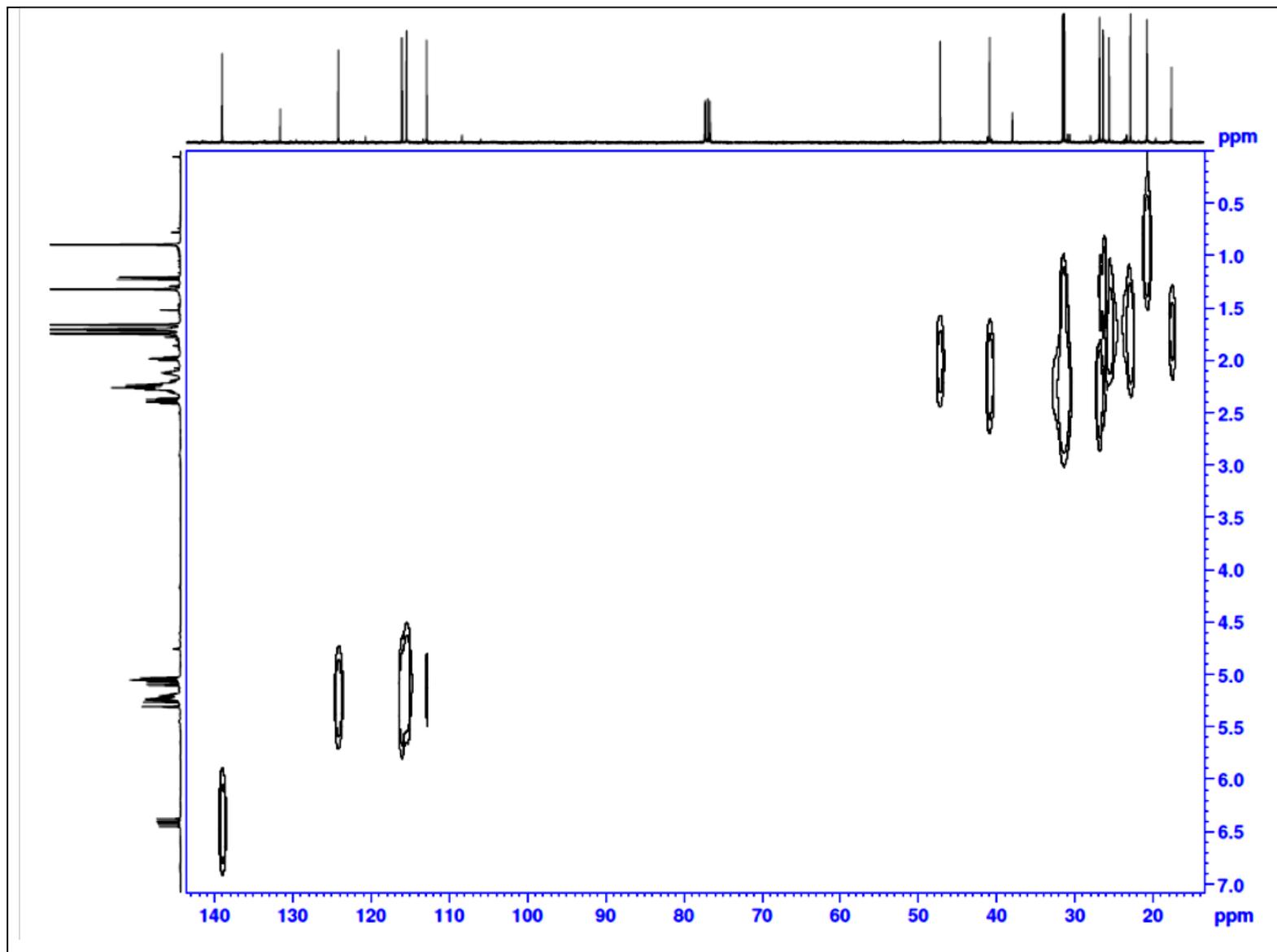


Figura 56 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^1\text{J}_{\text{C-H}}$  HETCOR da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

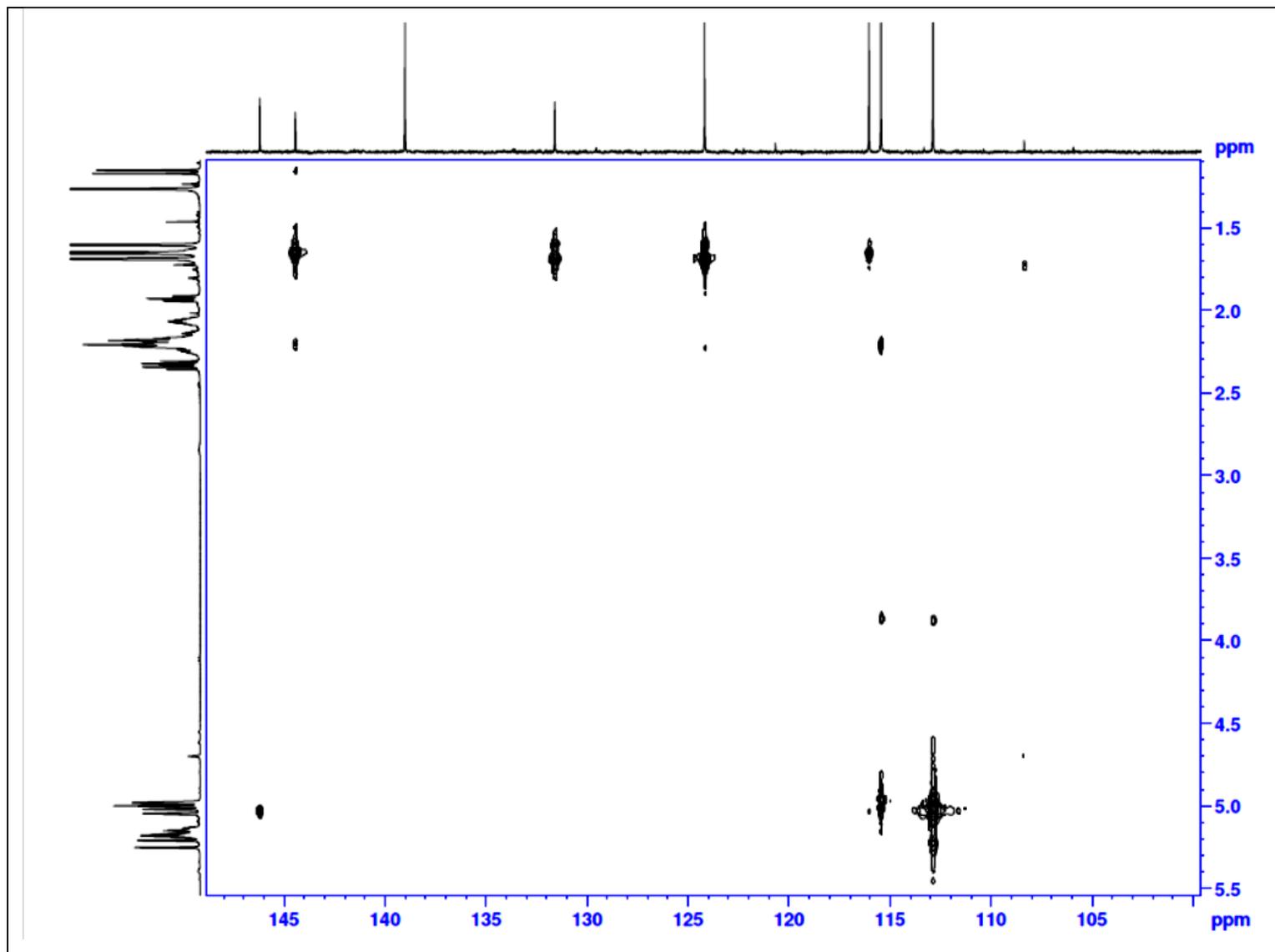


Figura 57 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{C-H}}$  COLOC, expandido ( $\delta$  1,5 a  $\delta$  5,5ppm) da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

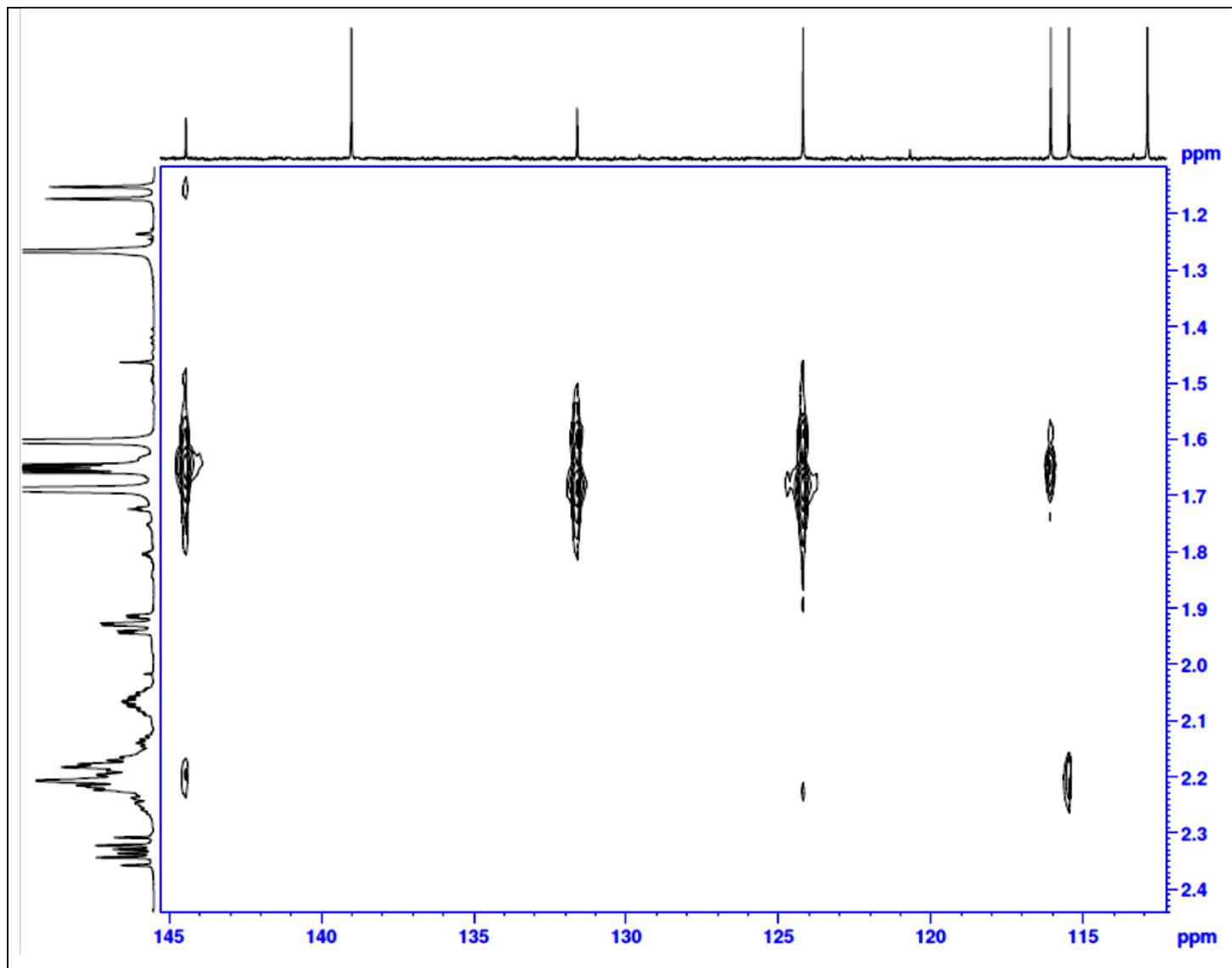


Figura 58 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^{2-3}J_{\text{C-H}}$  COLOC, expandido ( $\delta$  1,1 a  $\delta$  2,4ppm) da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

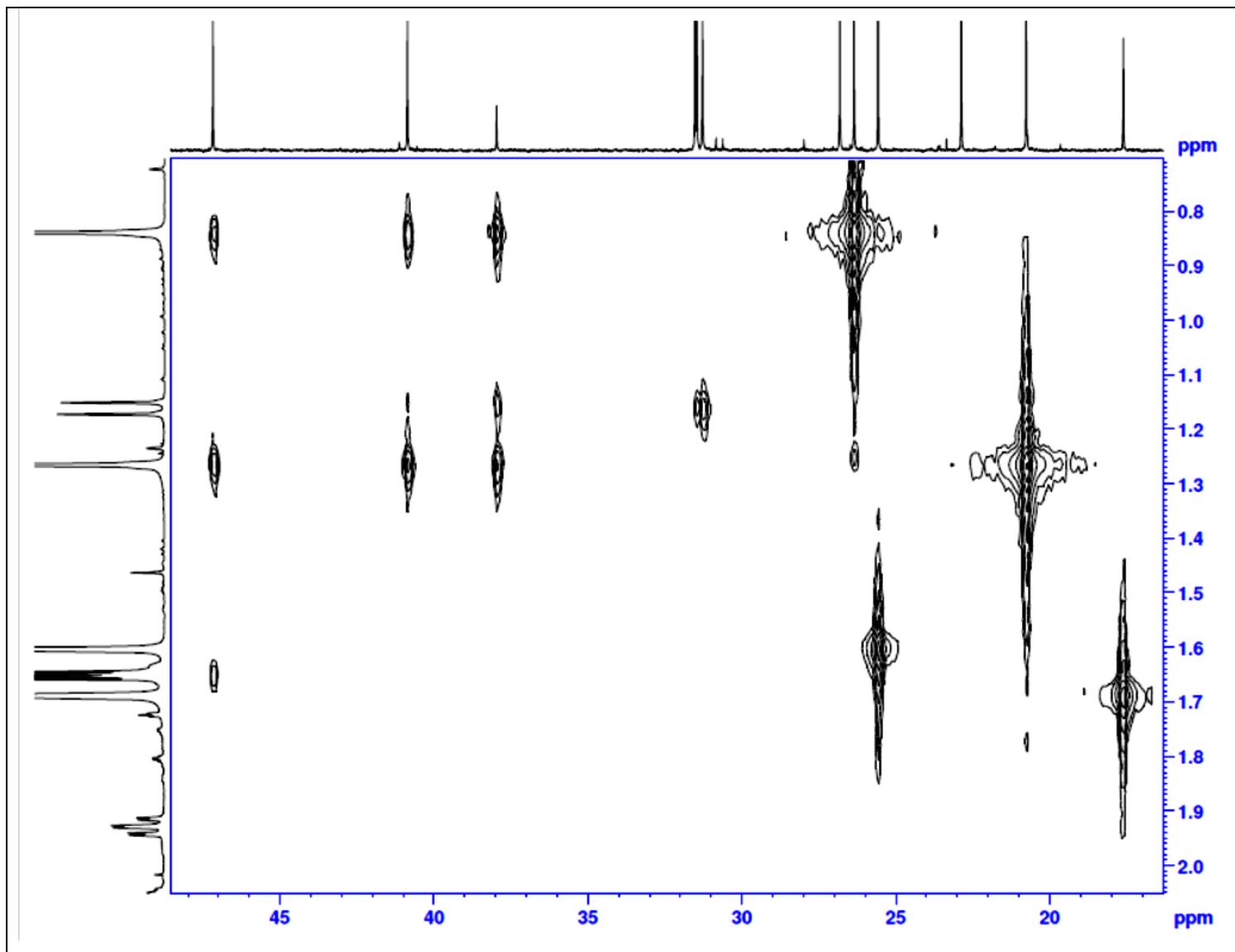


Figura 59 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^{2,3}\text{J}_{\text{C-H}}$  COLOC, expandido ( $\delta$  0,8 a  $\delta$  2,0ppm) da mistura de compostos do óleo, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

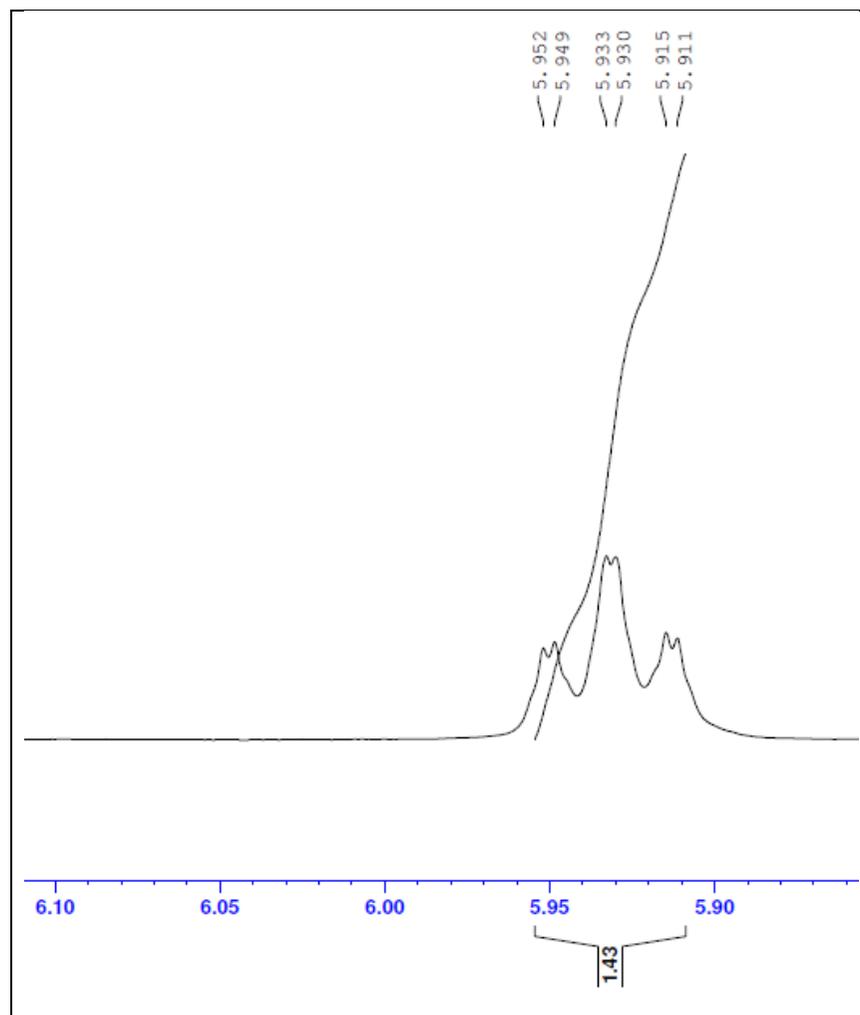
**Apêndice B – Espectros de RMN 1D e 2D com expansões do composto 30A.**

Figura 60 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 30A, expandido ( $\delta$  5,86 a  $\delta$  6,10ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

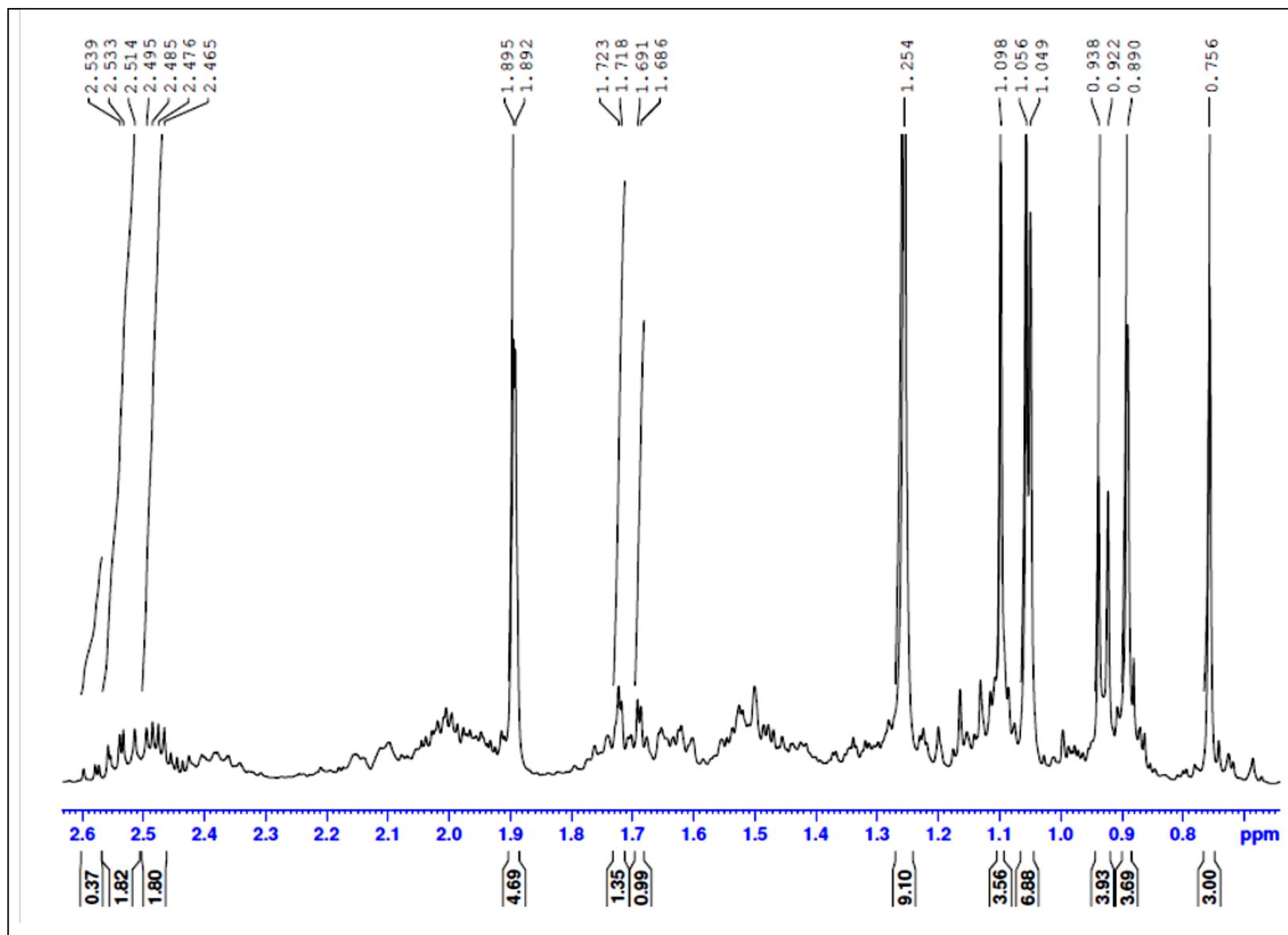


Figura 61 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 30A, expandido ( $\delta$  0,7 a  $\delta$  2,60ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

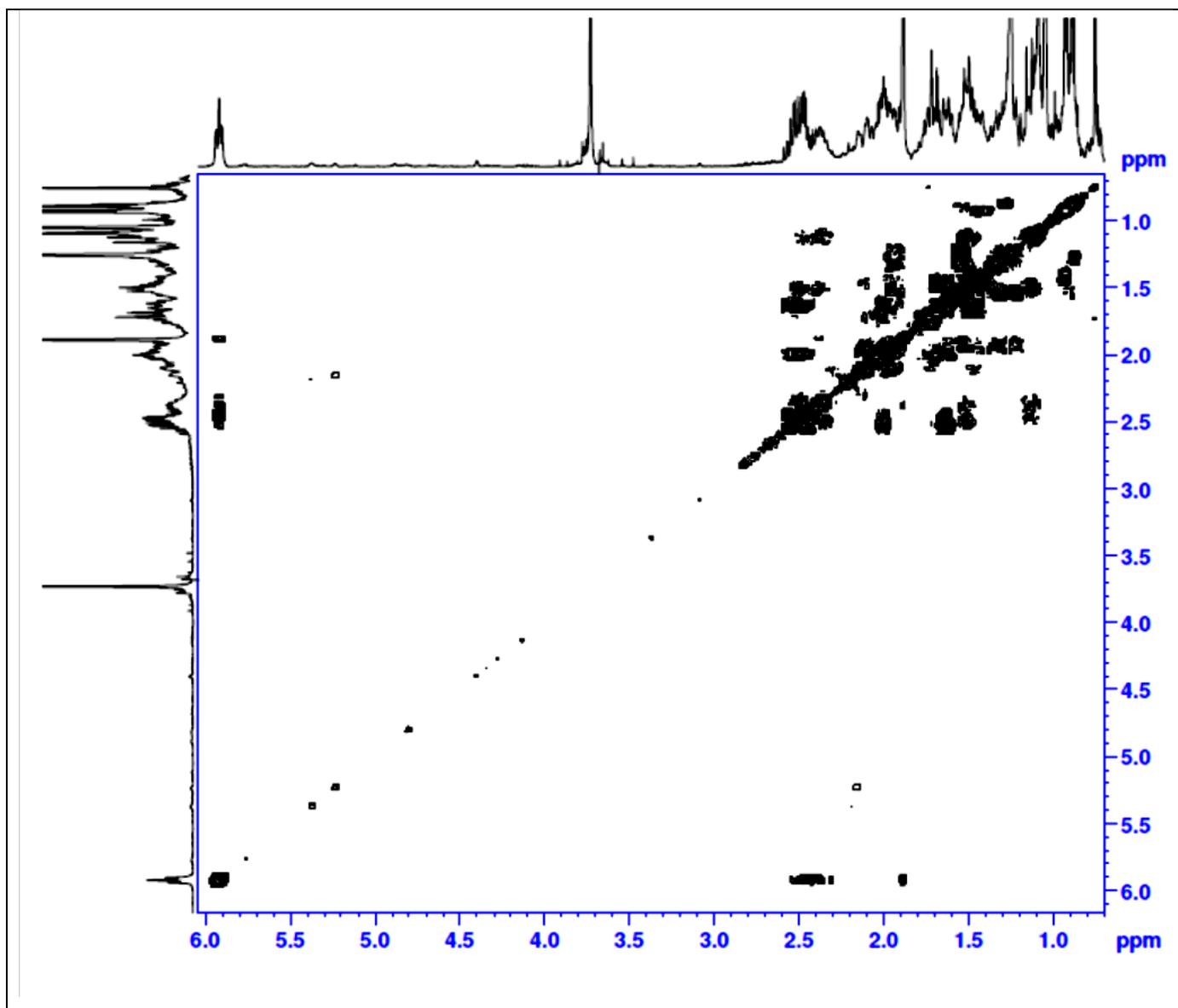


Figura 62 – Espectro RMN 2D HOMONUCLEAR  $^1J_{\text{H-H}}$  COSY do composto 30A, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

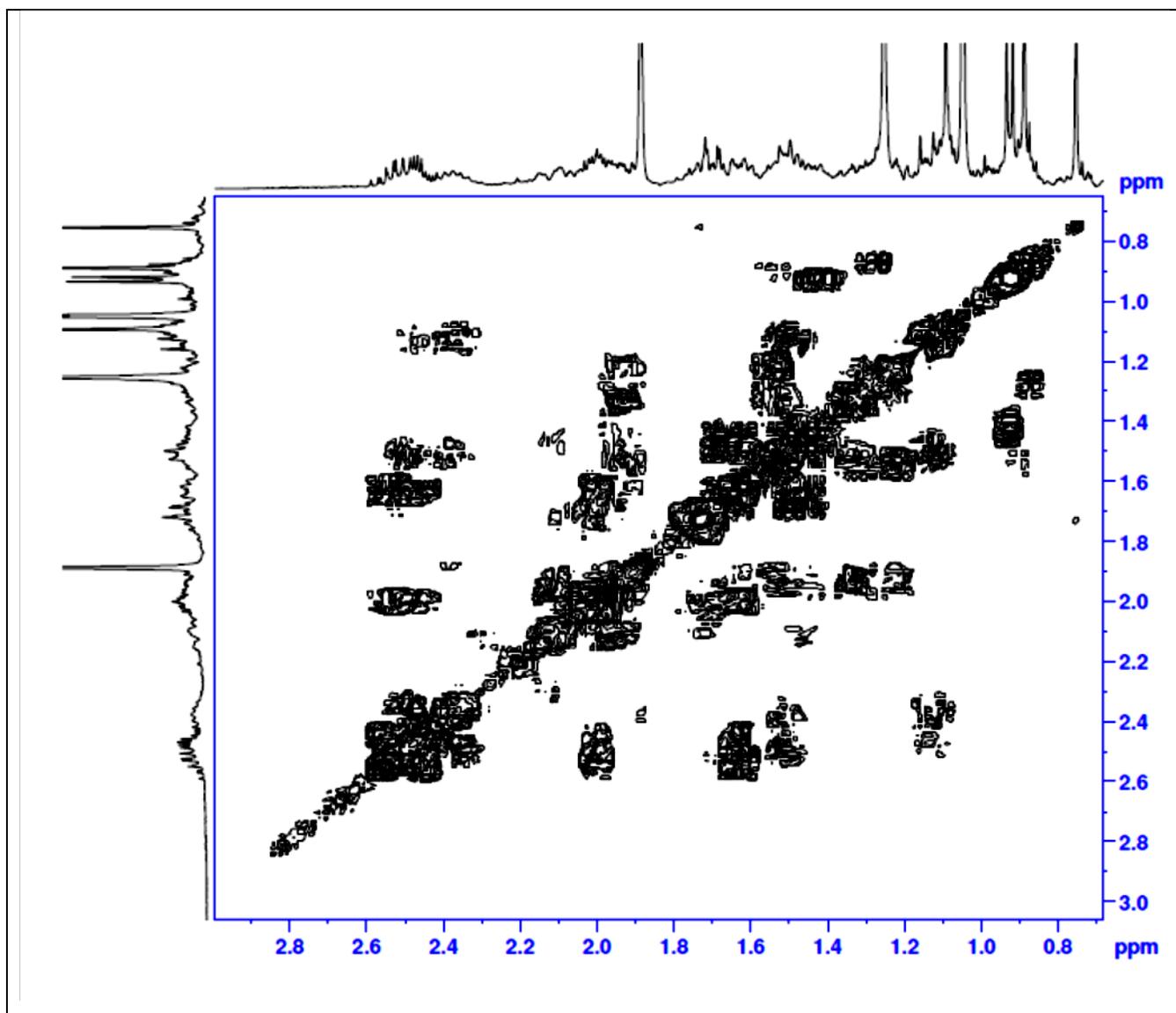


Figura 63 – Espectro RMN 2D HOMONUCLEAR  $^1J_{\text{H-H}}$  COSY do composto 30A, expandido ( $\delta$  0,7 a  $\delta$  3,0ppm), em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

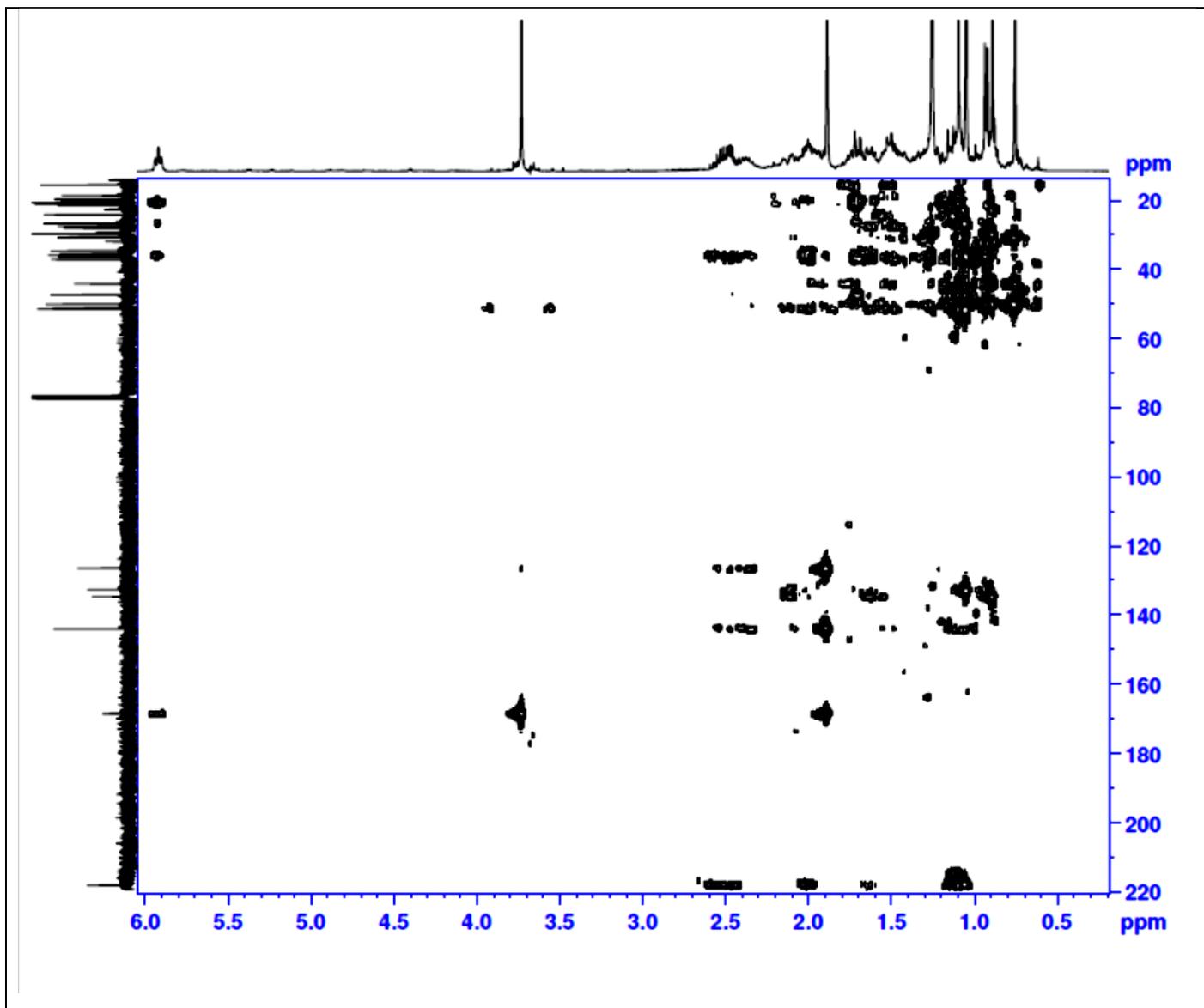


Figura 64 - Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^2\text{-}^3 J_{\text{H-C}}$  HMBC do composto 30A, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

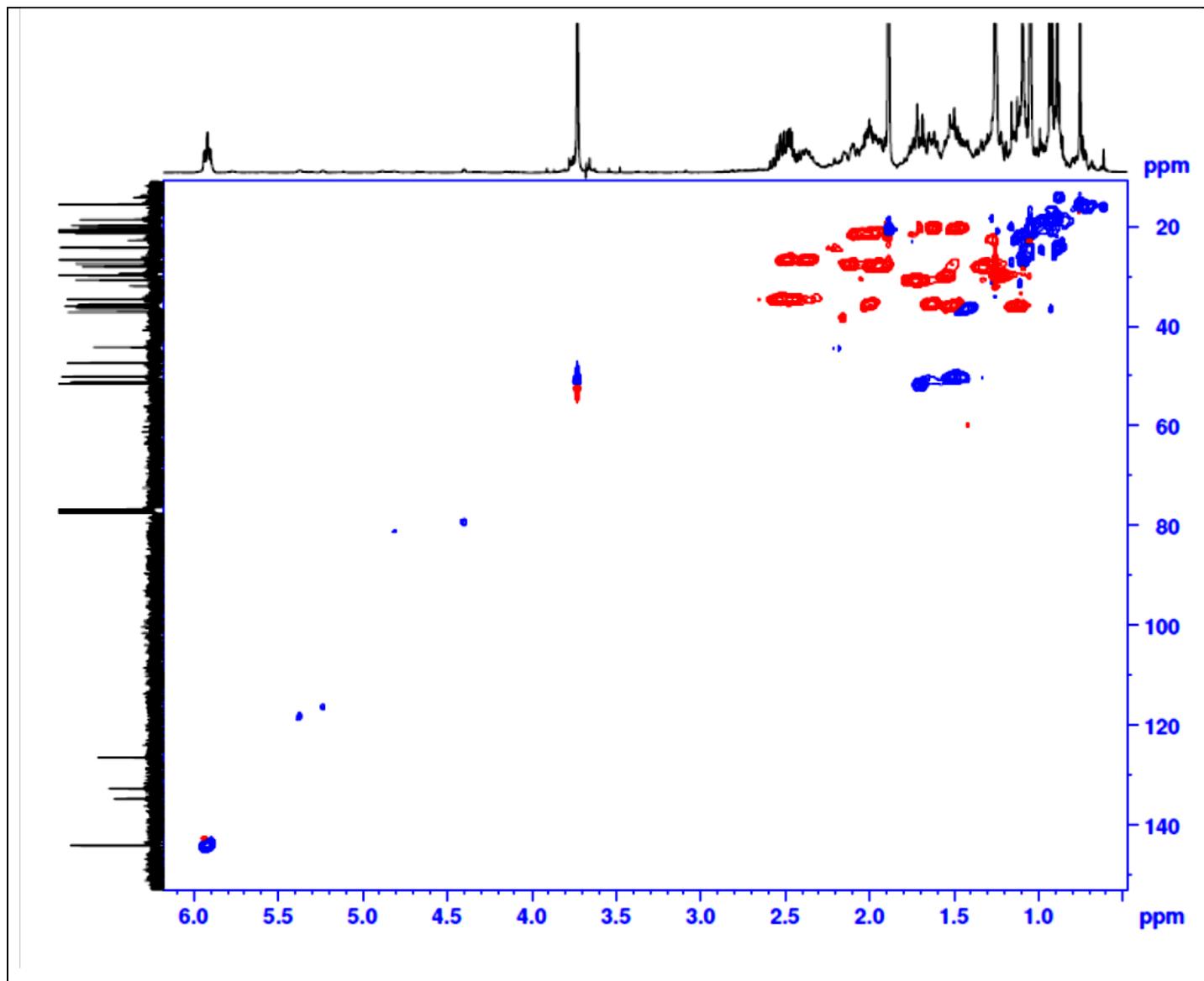
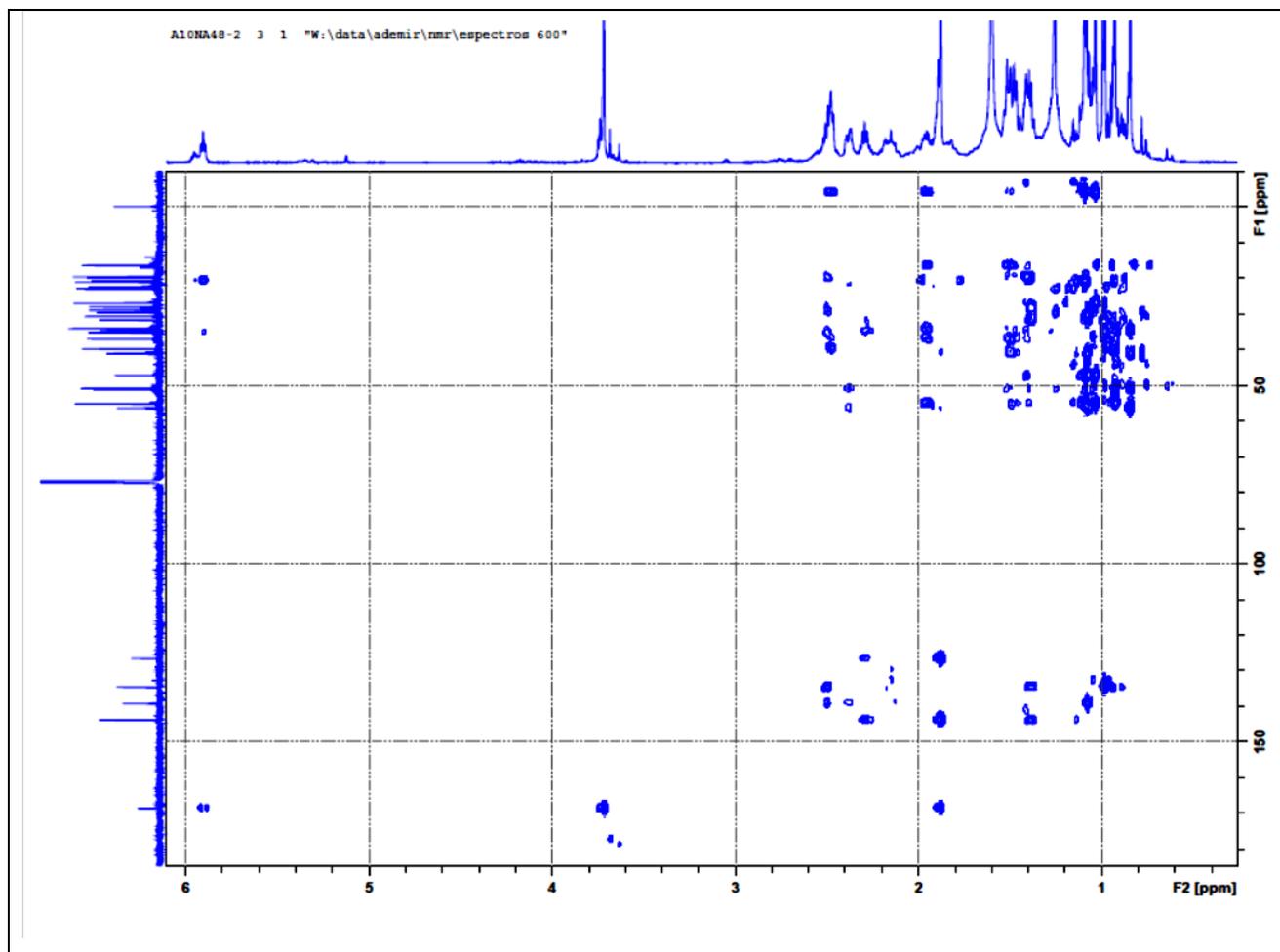


Figura 65 – Espectro RMN 2D HETERONUCLAR  $^1\text{J}_{\text{H-C}}$  HMQC do composto 30B, em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

## Apêndice C – Espectros de RMN 1D e 2D com expansões do composto 30B.

Figura 66 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^{2-3}J_{H-C}$  HMQC do composto 30B, em  $CDCl_3$ , a 400 MHz.

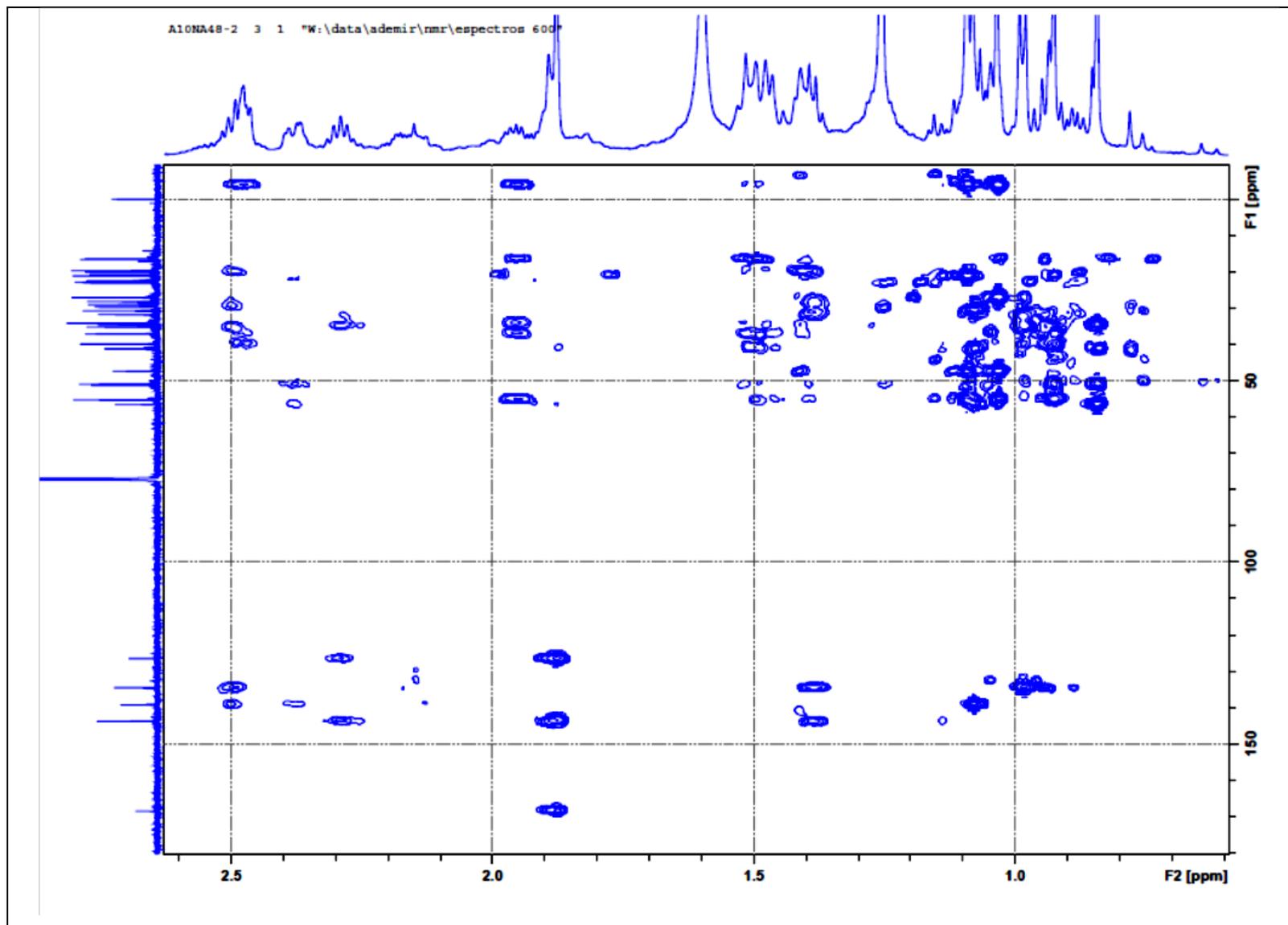


Figura 67 - Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^{2,3}J_{H-C}$  HMQC do composto 30B, expandido ( $\delta$  0 a  $\delta$  2,6ppm) em  $CDCl_3$ , a 400 MHz.

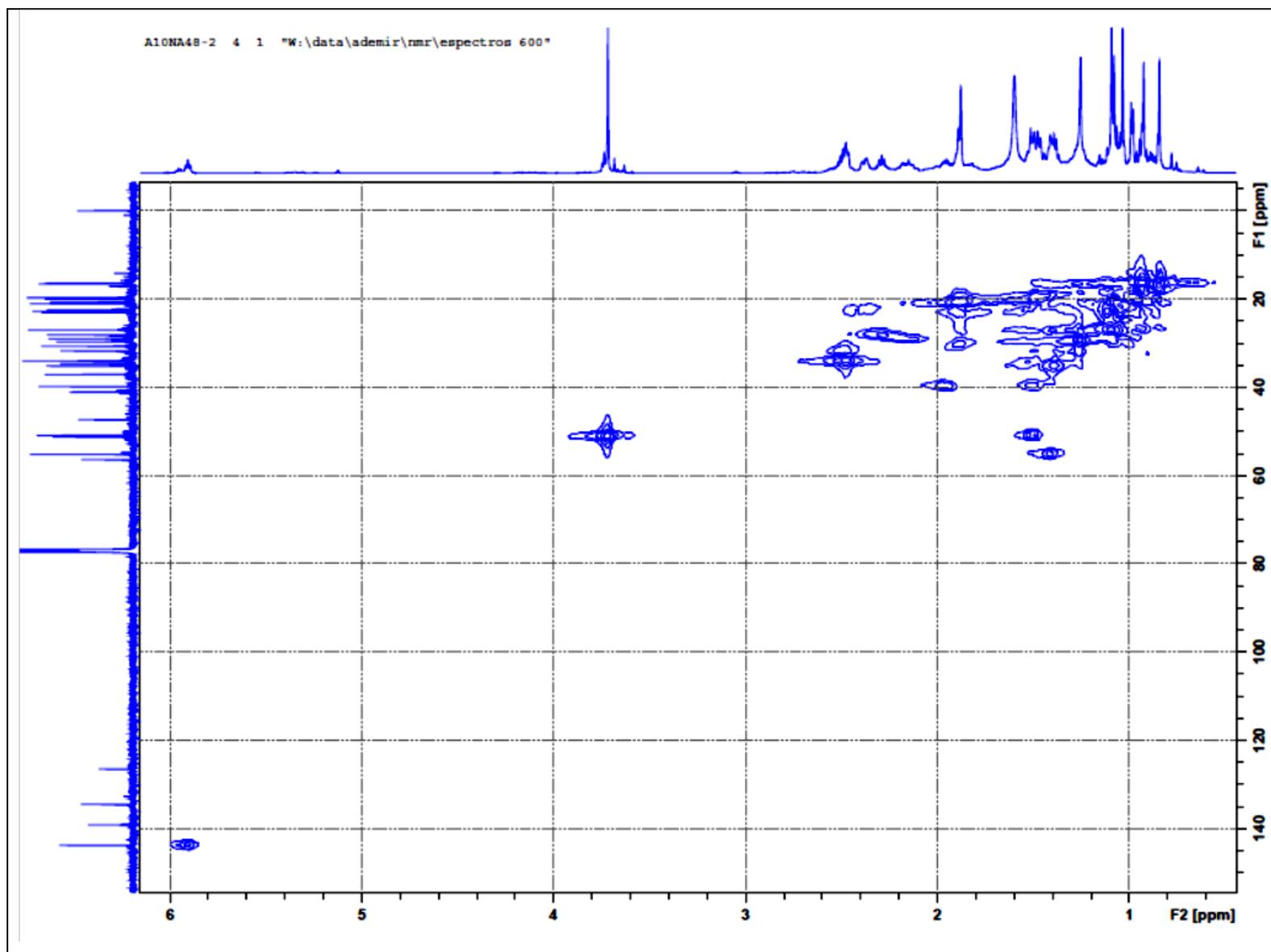


Figura 67 – Espectro RMN 2D HETERONUCLEAR  $^1J_{H-C}$  HMQC do composto 30B, em  $CDCl_3$ , a 400 MHz.