UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA LAGO LEITE

Estudo químico e atividade antifúngica de *Anemia tomentosa* (Anemiaceae) e voláteis de *Schinus terebinthifolius* (Anacardeaceae).

JEQUIÉ-BA

Agosto/ 2017

JULIANA LAGO LEITE

Estudo químico e atividade antifúngica de *Anemia tomentosa* (Anemiaceae) e voláteis de *Schinus terebinthifolius* (Anacardeaceae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Co-orientadora: Profª. Drª. Rosane Moura Aguiar

JEQUIÉ-BA

Agosto/2017

DEDICATÓTIA

Ao meu orientador, pela dedicação, paciência e ensinamentos
ao longo do período de elaboração deste trabalho
e a minha família, pelo incomensurável amor e apoio.

AGRADECIMENTO

A Deus, por guiar cada passo meu, por fortalecer meu coração e iluminar minha mente e por colocar em meu caminho pessoas que são meu suporte e minha companhia.

Aos meus pais, Dolival e Gildete, que mesmo não com pouco estudo, muito me ensinaram: que o conhecimento é o nosso maior patrimônio e que a honestidade é a nossa maior virtude. Obrigada por tudo!

A minha irmã Fabiana, pela força contínua e irrestrita. Que mesmo com nossas divergências somos dependentes uma da outra. A minha sobrinha – como ela me chama: “tia, dinda e amiga”, Maria Vitória, pelo amor incomensurável, tia Ju te ama muito!

A toda minha família e amigos, muito obrigada, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Djalma Menezes de Oliveira, pela valiosa orientação e constante incentivo; porque por meio de suas palavras, ensinamentos e de suas experiências que tão bem sabe transmitir, me foi possível aprender muito mais que estudando por muitos livros. Obrigada Djalma por ser esse ser humano incrível e especial de uma sensibilidade belíssima. Palavras não são suficientes para expressar toda minha gratidão! A minha co-orientadora, Drª Rosane Moura Aguiar, agradeço pelo seu zelo, amizade e ensinamentos. Pelo seu sorriso de sempre (sua marca registrada®), confiança e carinho que me deram forças para enfrentar as dificuldades encontradas no mestrado. Obrigado Rosane por ser tão especial! Sou muito grata por ter tido a oportunidade de me formar ao lado de vocês.

Ao Laboratório de Óleos Essenciais (LOE) por me acolher com tanto carinho. Ao meus colaboradores e amigos de laboratório; Carla Larissa, Jucélia (apesar de pouco tempo), Vilissaimon, Luan, José Marcio, Kakau, Naiara, Jéssica – e aos que chegaram depois – Ivana, Rosangela, Adílio e Maria da Luz. Obrigada pelo incansável apoio, colaboração e permanente disponibilidade, me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução desta dissertação. Os momentos no LOE, mesmo nos finais de semana, eram sempre os melhores com a presença e resenha de vocês.

Ao meu amigo MSc. Lauro José Caires, pela amizade, por me ensinar a “caminhar” em um laboratório e pelos seus ensinamentos de fitoquímica.

As minhas amigas Cheilane e Luana, pela amizade sincera, pelas palavras de apoio e convivências sempre agradáveis.

Ao técnico de laboratório Marcio, pela boa vontade e colaboração de sempre nas análises de IV e operação do CG-EM.

A professora Drª. Susana Johann do Laboratório de Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia/ ICB da Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, pela atenção e colaboração nos testes microbiológicos.

A Drª Ivana Lula do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG, bela boa vontade e colaboração nas análises de RMN.

Ao Herbário da UESB pela identificação das plantas, na pessoa da professora Guadalupe Edilma Licona.

Aos Laboratórios de Químico Analítica na pessoa dos professores Dr. Marcos Bezerra e Dr. Valfredo Lemos pela colaboração com materiais, reagentes e equipamentos.

A todos os professores do PGQUI-UESB que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Aos secretários do PGQUI-UESB e todos os funcionários do departamento e instituição pela atenção no serviço prestado.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e PGQUI por toda infraestrutura disponibilizada.

A banca examinadora pelas contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho. Meu muito OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Biossíntese dos terpenóides via Mevalonato (SIMÕES et al., 2007).....22
Figura 2. Schinus terebinthifolius Raddi 25
Figura 3. Gráfico climático com os dados de chuvas em mm e temperaturas em ºC entre novembro de 2015 e outubro de 2016 no município de Jequié-Ba. 27
Figura 4. Hidrodestilação em Clevenger modificado. 33
Figura 5. Constituintes majoritários dos OE's OFr-11, OFr-05 e OFr-08. 34
Figura 6. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-11....35
Figura 7. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-05....35
Figura 8. Cromatograma parcial de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-08. 36
Figura 9. Porcentagem de compostos mono e sesquiterpenos obtidos dos óleos essenciais OFr-11, OFr-05, OFr-08.....37
Figura 10. Ciclo de rearranjo intermoleculares de monoterpenos que apresentam esqueletos relacionados.....39
Figura 11. Esquemas das possíveis rotas biosssintéticas dos monosterpenóides presentes nas amostras de óleos essenciais da S. terebinthifolius.....41

CAPITULO 2

Figura 1. Espécime de Anemia tomentosa que forneceu material para os estudos fitoquímicos. 52
Figura 2. Biossíntese e exemplos de sesquiterpenos, adaptado de Simões et al, (2007).....55
Figura 3. Primeira proposta de biossíntese do esqueleto presilfiperfolano. 56
Figura 12. Principais correlações NOE observadas no experimento NOESY de **10** ($CDCl_3$, 400 MHz).....79
Figura 13. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **10** 81
Figura 14. EM associado ao pico em t_R= 20,081 min do TIC de **10** e seus respectivos fragmentos. 81
Figura 15. Fotografia eletrônica da cromatoplaca CCD de **10** e OEAT 82
Figura 16. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **22** 83
Figura 17. EM associado ao pico de t_R= 29,968 min do TIC de **22**. 83
Figura 18. Principais picos da fragmentação do ácido hexadecanóico. 84

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Dados climáticos entre novembro de 2015 e outono de 2016 no município de Jequié-Ba. 32

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* obtidos em várias estações. 38

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória(CMI) em µg.mL^{-1} de Óleo Essencial da *S.terebinthifolius* contra fungos de interesse médico. 43

CAPITULO 2

Tabela 1. Frações obtidas na coluna 1 (C-1). 61

Tabela 2. Frações obtidas da coluna 4 (C-4). 62

Tabela 3. Composição química do óleo essencial da *A. tomentosa.* 67

Tabela 4. Atribuições de sinais de RMN de ^{13}C de OEAT a carbonos olefínicos e oxigenados pertencentes a alguns constituintes deste OE. 68

Tabela 5. Dados espectrais de ^{1}H e ^{13}C em RMN, com auxílio das demais técnicas, do composto 10 em $CDCl_3$ (400 MHz para RMN de ^{1}H e 100 MHz para RMN ^{13}C, δ em ppm, *J* em Hz). 74

Tabela 6. Concentração Mínima Inibitória de extratos e óleo essencial de folhas da *A. tomentosa* (µg.mL^{-1}) contra espécies de *Candida spp. e Cryptococcus spp.* 85

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de Etila

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCL: Coluna de Cromatografia Líquida

$CDCl_3$: Clorofórmio Deuterado

CG/EM: Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas.

CG: Cromatografia Gasosa

CGAR-EM: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplado a Espectrometria de Massas.

CMI: Concentração Mínima Inibitória

CL: Cromatografia Líquida

CLMP: Cromatografia Líquida de Média Pressão

COSY: COrrelated SpectroscopY

d.i.: Diâmetro interno

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMAPP: DiMetilAlil difosfato

DMSO: DiMetilSulfÓxido

DXPS : Deoxi-D-xilulose-5-fosfato

EM: Espectrometria de Massas

EMAT: Extrato Metanólico da Anemia tomentosa

FMAT: Fase Metanólica *Anemia tomentosa*

FPP: Farnesil difosfato

GPP: Geranil difosfato

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HUESB: Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Hz: Hertz

IE: Impacto Eletrônico

IPP: Isopentenil difosfato

IR: Índices de Retenção

IV:	Infravermelho
LPP:	Disfosfato Linalílico
m/z:	Razão entre a massa e a carga elétrica de um íon
MEP:	Metilritrinol fosfato
MH:	Monoterpenos Hidrogenados
MHz:	Mega Hertz
MO:	Monoterpenos Oxigenados
ND:	Não Determinado
NOESY:	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
OE:	Óleo essencial
OEAT:	Óleo Essencial da *Anemia tomenteosa.*
OEFrST's:	Óleos Essenciais dos Frutos da *Schinus terebinthifolius*
OFr-05:	Óleo do Fruto de maio
OFr-08:	Óleo do Fruto de agosto
OFr-11:	Óleo do Fruto de novembro
PPF:	Pirofosfato de farnesilo
Ppm:	Parte por Milhão
R_f:	Fator de Retenção em cromatografia em camada delgada
RMN:	Ressonância Magnética Nuclear
SH:	Sesquiterpenos Hidrogenados
SO:	Sesquiterpenos Oxigenados
TIC:	Cromatograma de Íons Totais, do inglês
TMS:	Tetrametilsilano
t_R:	Tempo de Retenção
VCD:	Voltametria Cíclica

Estudo químico e atividade antifúngica de *Anemia tomentosa* (Anemiaceae) e voláteis de *Schinus terebinthifolius* (Anacardeaceae).

Autora: Juliana Lago Leite; Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira; Co-orientadora: Profª. Drª. Rosane Moura Aguiar

Resumo: Esta dissertação trata do estudo químico e farmacológico das plantas, *Schinus terebinthifolius* e *Anemia tomentosa,* coletadas de espécimes encontradas no município de Jequié, região Sudoeste da Bahia. Os óleos essenciais dos frutos de três acessos de *S. terebinthifolius* foram extraídos, quantificados e identificados por CG-EM em três períodos de frutificação da planta no ciclo de um ano. Os principais voláteis foram: *α*-pineno, *β*-pineno, *β*-ocimeno e δ^3-careno como os constituintes majoritários. O óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentou atividade fungicida frente aos fungos *Cryptococcus gatti e C. neoformans* e atividade moderada frente as cinco linhagens de *Candida spp.* O estudo químico das folhas de *A. tomentosa* permitiu a identificação e quantificação de 21 componentes do óleo essencial por CG-EM e análise por espectroscopia de RMN, destacando como constituintes majoritários os sesquiterpenos: (–)-presilfiperfolan-1*β*-ol, presilfiperfolan-8*α*-ol e silfiperfol-6-eno. O fracionamento cromatográfico de extratos de folhas de *A. tomentosa* permitiu isolar dois compostos, o sesquiterpeno (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol (**10**), encontrado no OEAT e na fração em acetato de etila e o ácido graxo hexadecanoico (**22**) na fração em hexano. A elucidação estrutural do sesquiterpeno foi determinada por técnicas espectrométricas de RMN de ^{1}H e ^{13}C (1D e 2D), IV e CG-EM. O ácido graxo hexadecanóico foi identificado por CG-EM. O extrato metanólico e o óleo essencial das folhas de *A. tomentosa* apresentaram atividade biológica frente aos fungos patogênicos oportunistas: *Cryptococcus gatti e C. neoformans.*

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius, Anemia tomentosa, Óleo essencial, prelisperfolan-1-ol.*

Keywords*: Schinus terebinthifolius, Anemia tomentosa, Essential oil, presilperfolan-1-ol*

Chemical study and antifungal activity of *Anemia tomentosa* (Anemiaceae) and volatile *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae).

Author: Juliana Lago Leite; Advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira; Co-Advisor: Profª. Drª. Rosane Moura Aguiar

Abstract: This dissertation reports the phytochemical study of two plants: *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) and *Anemia tomentosa* (Anemiaceae), both collected from specimens found in the municipality of Jequié, Bahia. The essential oils of the fruits of three accessions (11/2015, 05/2016 and 08/2016) of *S. terebinthifolius* extracted by hydrodistillation and and constituents quantified/identified by GC-FID/GC-MS, as well, tested against pathogenic fungi of genera *Candida* (five strains) and *Cryptococcus* (two strains). The constituents of *β*-caryophyllene oxide (6.84%), α-pinene (22.0%) *β*-pinene (31.4%) were major in the essential oil samples of fruits collected in November (11/2015). The *α*-pinene (15.8%), *β*-myrcene (13.3%) and *β*-ocimene (35.4%) were significant in the essential oil of fruits collected in May (05/2016). However, in the essential oil of the fruits collected in August (08/2016) predominated in δ^3-carene (83.4%), followed by *β*-myrcene (5.10%). Samples of essential oil of fruits of *S. terebinthifolius* rich in α-pinene and *β*-pinene showed relevant activities against pathogenic fungi strains of *Cryptococcus gattii* (15.6 μg L^{-1}), *C. neoformans* (7.8 μg L^{-1}), and other five *Candida spp.*, including *C. albicans* (125 μg L^{-1}). This study also found the chemical constituents and evaluated the antifungal potential of leaves of *Anemia tomentosa* that occurs in Jequié. Essential oil of *A. tomentosa* (EOAT) with a delightful citrus-woody smell was obtained by hydrodistillation in Clevenger apparatus and submitted to GC-MS and ^{1}H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques, allowig the identification of 21 components, highlighting as the sesquiterpenes: (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol (35.53%), presilfiperfolan-8α-ol (15.19%), silfiperfol-6-ene (14.04%), *β*-caryophyllene (6.72%) and presilfiperfol-7-ene (5.20%). The sesquiterpene (-)-*presilfiperfolan*-1*β*-ol was obtained pure by liquid chromatography from the *A. tomentosa* leaves, moreover, their tricyclic structure and stereochemistry unambiguously elucidated by 1D and 2D NMR techniques, including unpublished data NOESY data. The methanol extract of the leaves of *A. tomentosa* showed modest biological activity (up to 125 μg L^{-1}) against *Cryptococcus gatti, C. neoformans*. The purity of EOAT in sesquiterpenes of pleasant odors makes this essential oil a potential input for cosmetic applications.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 17
CAPÍTULO I 19
Ação antifúngica de óleo essencial extraído de frutos de *Schinus terebinthifolius* sobre linhagens de *Cryptococcus spp. e Candida spp.* 19
1.0 INTRODUÇÃO 20
1.1 Óleos Eessenciais 20
1.2 Óleos Essenciais do Gênero *Schinus* Empregados como Fungicidas 23
1.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi 24
2.0 OBJETIVOS 28
2.1 OBJETIVO GERAL 28
2.2 Objetivos Específicos 28
3.0 PARTE EXPERIMENTAL 29
3.1 Material Vegetal 29
3.2 Extrações dos Óleos Essenciais 29
3.3 Análise por Cromatografia Gasosa 30
3.4 Avaliação da Atividade Biológica 30
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
4.1 Óleos Essenciais de *S. terebinthifolius* 32
4.2 Atividade Antifúngica 41
5.0 CONCLUSÕES 44
6.0 PERSPECTIVAS 45
7.0 REFERÊNCIAS 46
CAPITULO II 51
Estudo químico e farmacológico da *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* (Anemiaceae) .. 51
1.0 INTRODUÇÃO 52
1.1 *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw* 52
1.2 Biossíntese de Terpenóides 54
2.0 OBJETIVOS 58
2.1 Objetivo Geral 58
2.2 Objetivos Específicos 58
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS 59
3.1 Coleta e Extração do Óleo Essencial de Folhas de *A. tomentosa* 59
3.2 Análises do Óleo Essencial de *A. tomentosa* 59
3.3 Estudos Fitoquímicos 60
3.4 Análises Cromatográficas 62
3.5 Análise Espectroscópicas 63
3.6 Avaliação da Atividade Biológica 63

4.0 RESULTADO E DISCUSSÃO 65
4.1 Óleo Essencial *A. tomentosa* 65
4.2 Estudo Fitoquímico do Extrato das Folhas de *A. tomentosa.* 71
4.2.1 Presilfiperfolan-1*β*-ol (10) 71
4.2.2 Ácido hexadecanóico 82
4.3 Ensaio Biológico do Óleo e extratos de *A. tomentosa*. 84
5.0 CONCLUSÃO 86
6.0 PESPECTIVAS 87
7.0 REFERÊNCIAS 88
CONCLUSÕES GERAIS 92
APÊNDICES 93
Apêndice A 93
Apêndice B 94
Apêndice C 95
Apêndice D 96
Apêndice E 97
Apêndice F 98

INTRODUÇÃO GERAL

A química dos produtos naturais é a sub-área mais antiga da Química Orgânica. O Brasil se encontra em uma posição privilegiada para a ciência dos produtos naturais, por ser um país com uma rica biodiversidade e por ter consolidado um corpo de pesquisadores de produtos naturais principalmente na primeira década do século XXI [1]. Porém, a escassez de investimentos em tecnologias e ciências nos últimos anos é um dos principais motivos que podem levar ao declínio a contribuição da ciência brasileira no âmbito mundial em pesquisas na área de produtos naturais. Embora desigualmente distribuídas pelo Brasil, o avanço de pesquisas envolvendo produtos naturais abrange os mais diversos ramos por suas propriedades; medicinais, cosméticas, aromáticas, corantes ou nutracêuticas de diversos extratos de plantas.

O uso de plantas medicinais e seus substratos ativos, com finalidades terapêuticas, é uma rica tradição e é conservada por diversos povos. Fitoterápicos estão sendo amplamente utilizados como alternativa ou substitutos de substâncias sintéticas no tratamento de inúmeras doenças, devido ao seu baixo custo e ser menos agressivo ao organismo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimas que 65-80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas como única forma de acesso aos básicos de saúde. Esses números tendem a um crescente com a evolução dos estudos dos recursos naturais e o interesse por alimentos, aditivos e medicamentos de origem natural pelos consumidores [2].

O desenvolvimento de pesquisas fitoquímicas com uso de substratos vegetais vem sendo motivadas pela diversidade de substâncias ativas encontradas em plantas no intuito de explorar as propriedades medicinais, tanto dos voláteis, quanto de suas substâncias fixas. Os óleos essenciais vêm despertando interesse e ganhando destaque devido suas várias aplicações como produtos farmacológicos, cosméticos e alimentar. Metabólitos secundários de plantas, os óleos essenciais possuem diversas propriedades: antioxidante, antimicrobianos, antissépticos, antifúngicos, repelente, termogênicos entre outras que agregam e aumentam o valor e o interesse por esse recurso natural. Esses são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides e podem ser extraídos de várias partes das plantas por diversas técnicas, hidrodestilação, arraste a vapor, prensagem entre outras.

A *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como “pimenta-rosa” pertencente à família das anacardeaceaes, apresentou em estudos preliminares, rica constituição química de metabólitos monoterpenicos, destacando a alta concentração de *α* e *β* pinenos que são relatados como responsáveis pela atividade antifúngica de óleos essenciais de outras espécies de plantas.

Jequié é conhecida por um clima seco e quente durante quase todo o ano. *Anemia tomentosa* é um vegetal típico de regiões rochosas e úmidas e uma especime foi encontrada na região rural do município de Jequié se adaptando ao clima da região. Está espécime pode ter sofrido modificação quanto a sua constituição química com relação a espécie de origem em regiões úmidas despertando assim curiosidade científica, assim como sua composição química rica em compostos sesquiterpenóides incomuns.

CAPÍTULO I

Ação antifúngica de óleo essencial extraído de frutos de *Schinus terebinthifolius* sobre linhagens de *Cryptococcus spp. e Candida spp.*

1.0 INTRODUÇÃO

Espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gatti* são as principais causadoras da criptococose, uma infecção micótica sistêmica que afeta principalmente indivíduos imunodeficientes. A busca por novos fármacos para o tratamento da criptococose é contínua, pois os antifúngicos utilizados na terapêutica são escassos e apresentam problemas como toxicidade e baixa eficácia fungicida. Atualmente, os antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol. Espécies de leveduras *C. gattii* apresentam aptidão em promover infecções que são resistentes a estes fármacos, o que reduz a eficiência nas intervenções terapêuticas [1-4]. Cepas da levedura *Candida albicans* também são relacionadas com infecções oportunistas, sendo um dos principais causadores de infecções urinárias, que apresentam resistências a vários antibióticos disponíveis. [5]

O uso de plantas medicinais e seus substratos ativos estão sendo amplamente utilizados como modelos ou substitutos de substâncias sintéticas, no tratamento de inúmeras doenças, incluindo as patologias causadas por fungos. O alto custo dos medicamentos industrializados, a dificuldade de acesso pela população à assistência médica e farmacológica, e os inúmeros efeitos colaterais causados por drogas sintéticas são alguns dos fatores que contribui para o aumento do uso de fitoterápicos e fármacos originários de plantas [6,7].

1.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias voláteis provindas dos metabólitos secundários de plantas (Fitogênicos). Os OE’s são solúveis em solventes apolares e quando expostos ao ar à temperatura ambiente evaporam rapidamente, por isso são chamados de óleos voláteis, simplesmente. Também são conhecidos como óleos essenciais e/ou etéreos, por seu aroma agradável e intenso, e por serem solúveis em solventes apolares como o éter. Em meio aquoso, OE’s formam uma dispersão denominada de hidrolato, apesar de apresentar uma solubilidade limitada em água, os OE’s geram aromaticidade a mesma [8], produzindo água perfumada ou odoríferas.

Os OE's podem ser extraídos de diferentes partes de uma planta das flores, folhas, cascas do caule, raízes, rizomas, frutos e sementes, e suas composições químicas podem variar segundo essa localização. Os métodos de extração de óleos voláteis também variam conforme o material obtido, bem como sua proposta de utilização ou aplicação. O método de extração dos OE's mais comum é por arraste a vapor d'água, a hidrodestilação. Durante a destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações dos constituintes químicos dos óleos extraídos. Outras técnicas muito comuns utilizadas são: a prensagem de pericarpos, extração com solventes orgânicos e a extração por gás CO_2 em condições supercríticas [8].

Na sua maioria os OE's são líquidos incolores, apresentam sabor acre e picantes, apresentam índice de refração baixo e são opticamente ativos. Os OE's também se caracterizam por sua instabilidade, em geral, na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais. OE's podem sofrem reações de degradação e essa instabilidade química dificulta sua conservação tornando o processo de armazenamento fundamental para a manutenção de sua qualidade [8].

Os óleos essenciais sintéticos são imitações dos naturais, porém para uso farmacêutico a farmacopeia permite apenas o uso de óleos fitogênicos, óleos essenciais provindos de plantas. Os óleos fitogênicos, na sua maioria, apresentam compostos de estruturas químicas formadas basicamente por carbono, hidrogênio e oxigênio. Esses óleos são constituídos de hidrocarbonetos da classe dos terpenos, monoterpênos (C_{10}) e sesquiterpênos (C_{15}), seus derivados oxigenados (álcoois, ésteres, aldeídos, fenóis, óxidos e cetonas) e, eventualmente, estes apresentam compostos benzenóides originados da rota dos fenilpropanóides. Os óleos voláteis ricos em monoterpenos oxigenados e/ou fenilpropanoides apresentam várias atividades biológicas, no tratamento as ações contra fungos, bactérias, insetos entre outras. [7,9]

Quimicamente os terpenoides são biossintetizados, pela condensação de unidades isoprênicas ativas (IPP) (estrutura química pentacarbonada e fosforilada), que por sua vez, origina-se do ácido mevalônico (MEV). A biossíntese dos terpenos ocorre via ácido mevalônico (MEV). O ácido mevalônico (Figura 1, p.22) é formado da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA que após condensação aldólica é hidrolisado a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, e à qual

é reduzida ao ácido mevalônico em uma reação irreversível. Este intermediário, o ácido mevalônico, é pirofosforilado e desidratado para formar o isopentenil pirofosfato (IPP), unidade básica da formação dos terpenos. A molécula do IPP e seu isômero tautômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) se unem por meio de reações que constituem a rota do metileritrinol fosfato (MEP), formando uma molécula de 10 carbonos, a geranil difosfato (GPP), que dá origem aos monoterpenos. A ligação do IPP com uma molécula GPP forma o farnesil difosfato (FPP), composto por 15 carbonos precursor da maioria dos sesquiterpenos. A biossíntese dos terpenóides vão de ligações sucessivas de IPP até sesterpenos (C_{25}) [8].

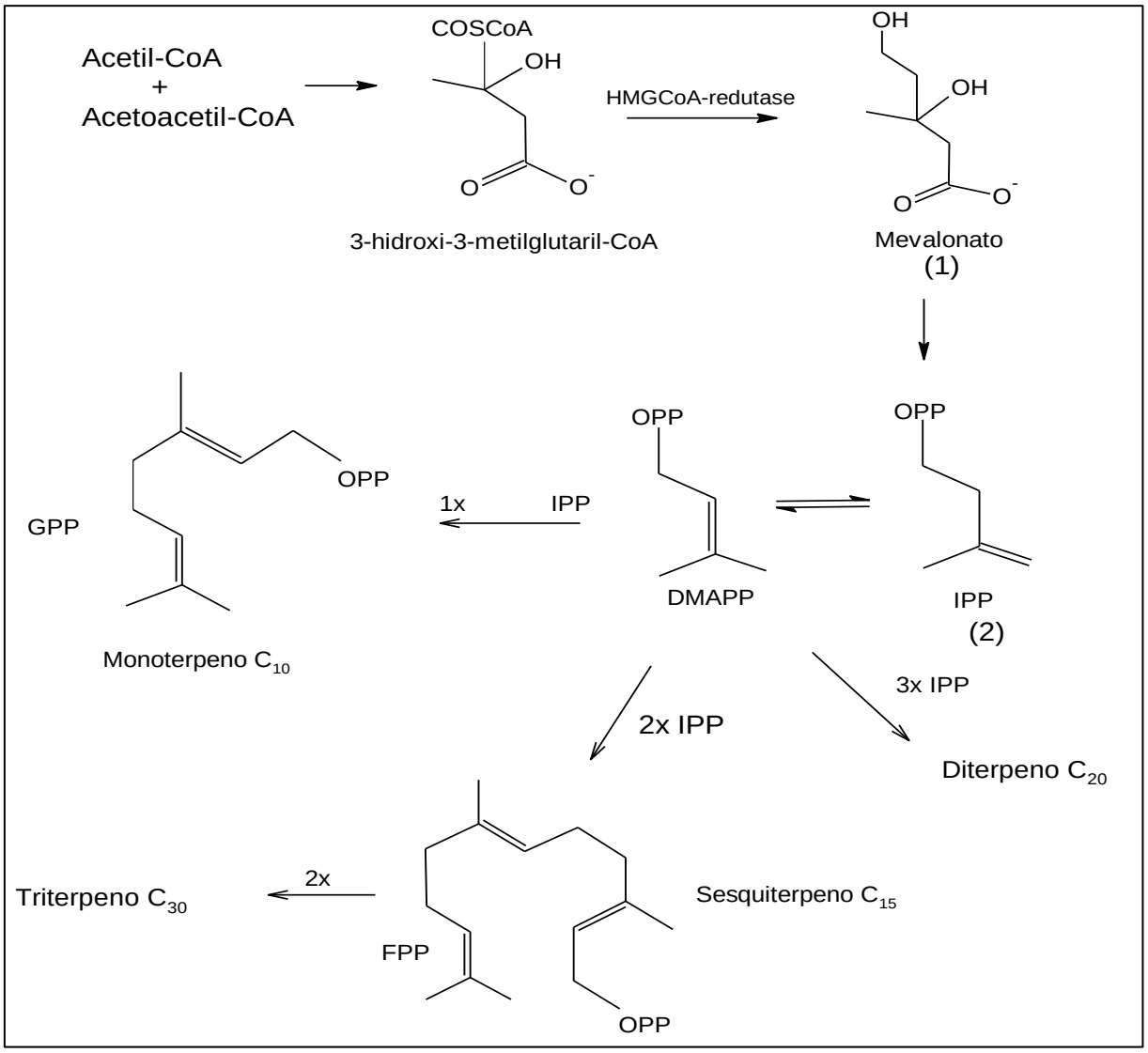


Figura 1. Biossíntese dos terpenóides via Mevalonato (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os terpenos são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos

(C_{30}) e politerpenoides com 40 ou mais átomos de carbonos. Os terpenos são constituintes de uma grande variedade de substâncias vegetais sendo os OE's constituídos, em sua maioria, por monoterpenos. [8]

A composição química dos OE's podem sofrer variações devido a fatores genéticos, ambientais e de manejos quando se trata de plantas cultivadas. Os fatores genéticos são específicos para cada espécie, já os fatores ambientais e de manejo que influenciam o princípio ativo de uma planta, dependem diretamente do clima, solo umidade, temperatura, ambiente, altitude, idade da planta, herbivoria, ataques de patógenos, disponibilidade de macros e micros nutrientes e água, fotoperíodo radiação UV, composição atmosférica, ritmo circadiano, índice pluviométrico, aspectos sazonais, horário e condições de colheita, estocagem, tempo de extração, estado de maturação dos frutos, entre outros. A constância de concentração de metabólitos secundários em plantas é praticamente inexistente e são diretamente influenciadas por fatores climáticos sazonais e por flutuações climáticas diárias [10].

1.2 Óleos Essenciais do Gênero *Schinus* Empregados como Fungicidas

Os óleos voláteis são misturas complexas de compostos químicos que podem variar sua composição, por diversos fatores dificultando assim a determinação exatas dos compostos responsáveis pelas atividades farmacológicas apresentadas. Porém, algumas propriedades farmacológicas de óleos voláteis são bem estabelecidas como a ação antisséptica, propriedade que inibe o crescimento de bactérias e fungos [8]. Essa propriedade está ligada a composição química dos OE's que é basicamente formado por monoterpenóides, metabólitos secundários que apresentam alta atividade antimicrobiana, a exemplo dos *α-β* pinenos.

Pinenos são monoterpenos que podem ser encontrados nos óleos essenciais de vários vegetais. Diversas atividades biológicas são associadas aos isômeros *α* e *β*-pinenos incluindo as atividades inseticidas e fungicidas. Estes dois compostos, também podem existir como isômeros ópticos ou enantiômeros e seus isômeros podem apresentar diferentes propriedades biológicas e toxicidades. Sendo os enantiômeros dextrógenos dos *α* e *β*- pinenos os que apresentam atividade contra os fungos *Candida albicans, Cryptococcus neoformans e Rhizopus oryzae* [11].

Os óleos essenciais de *Schinus* são usados na medicina popular para tratar distúrbios respiratórios, micose e infecções invasivas. E essas características são atribuídas a presença de altos níveis de monoterpenóides nessas espécies [12], incluindo os compostos *α* e *β*- pinenos. Para avaliar a eficácia dos voláteis dos frutos de *Schinus* como antissépticos, testes são relatados na literatura por diversos pesquisadores.

O óleo essencial dos frutos maduros da *S. terebinthifolius* extraído por Cole *et al* (2014) [13] exibiu um alto potencial antibacteriano contra cepas de *Escherichia coli; Bacillus sp.; Pseudomonas sp.; Klebsiella oxytoca; Corynebacterium sp.; Nocardia sp.; Staphylococcus aureus; Enterobacter sp.; E. agglomerans e Streptococcus group D*. com algumas espécies demonstrando maior sensibilidade ao OE quando comparadas ao valor do Gram-positivo. Assim como para o estudo de Dannenberg *et al.* (2016) [14] onde o OE dos frutos da *Schinus terebinthifolius* em duas fases de amadurecimento (maduros e verdes) apresentaram atividade frente a 15 bactérias sendo que os frutos maduros apresentaram para 10 casos uma inibição 67% maior que o OE dos frutos verdes.

As propriedades fungicidas dos OE's vão além do uso medicinal. Santos *et al* (2010) [15] estudaram o efeito do OE's de *S. terebinthifolius* e *S. molle* contra doenças causadas por fungos fitopatogênicos que afetam produções agrícolas e o OE da *S. terebinthifolius* apresentou uma promissora atividade antifúngica contra *Botytis ssp* isolado de "gerberas" e rosas.

1.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Anacardiaceae é uma pequena família de plantas que apresenta cerca de 70 gêneros com 600 espécies. O gênero *Schinus* exibe cerca de 29 espécies [16]; é um gênero nativo da América do Sul e endêmica na Argentina, Paraguai e na costa brasileira [17], principalmente na região de Mata Atlântica, desde o nordeste até o sul do país. Dentre as espécies mais comuns do gênero *Schinus* está *S. terebinthifolius* Raddi.

Figura 2. *Schinus terebinthifolius* Raddi

S. terebinthifolius Raddi, conhecida popularmente por “aroeira-vermelha”, “pimenta-rosa”, “aroeira da praia” é encontrada não só na América do Sul, mas também na Europa Mediterrânea, Sul da Ásia, África, América Central em regiões tropicais ou semitropicais [17]. Na região sul dos EUA principalmente na Flórida e nas Ilhas Hawaiina a *S. terebinthifolius* é considerada uma erva daninha, uma praga colonizadora de habitats que ameaça a biodiversidade da região [16]. Em Jequié essa espécie é conhecida genericamente como “aroeira”.

É uma árvore de 4 a 7,5 metros de altura, tronco espesso, copa densa com folhas compostas de 3 a 10 pares de folíolos e serreadas, flores pequenas de coloração amarelas-claras e aromáticas como os frutos que são do tipo drupa e têm coloração inicialmente verde e depois torna-se vermelhos; a semente é única, marrom-escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro [17,18] é uma arvore que suporta uma grande variação de condições ambientais e seus frutos são prolíferos. No Brasil devido as suas características e aparência a aroeira-vermelha é uma árvore ornamental bastante utilizada na recuperação de áreas degradadas e arborização [7,18].

A resina da aroeira foi utilizada pelos jesuítas para preparar o "Bálsamo das Missões", famoso no Brasil e no exterior. Já seus frutos são utilizados para azia e gastrite [19]. Ainda na medicina popular seus frutos são usados como anti-inflamatório, no tratamento de feridas, reumatismo e nos tratamentos de problemas respiratórios e urinários, principalmente os causados por *Candida spp*. [5,20]. Vale ressaltar que nem todas essas propriedades descritas pela cultura popular foram comprovadas cientificamente.

Os frutos da *S. terebinthifolius,* conhecido no mercado de especiarias como ‘pimenta-rosa’ é de grande interesse na indústria de alimentos por seu aroma e sabor picante e vem sendo muito estudos quanto a sua composição química e atividades farmacológicas. Seus frutos são ricos em óleo essencial e apresentam uma composição química predominante em compostos terpenoides.

Estudos químicos descritos na literatura sobre óleos essenciais de folhas, flores e frutos de *Schinus* de diferentes regiões demonstram que esses são constituídos basicamente de mono e sesquiterpênicos [5,17]. Barbosa *et al.* (2007), em seu estudo verificou que o OE dos frutos maduros se difere do OE dos frutos não maduros. Foi observado no OE dos frutos maduros a predominância de metabólitos secundários da classe dos monoterpenos (90%). Os frutos verdes apresentaram como componentes majoritários compostos da classe dos sesquiterpenos (78%) [17]. Relatos anteriores indicam que os óleos essenciais extraídos de frutos da *S. terebinthifolius* são constituídos majoritariamente de monoterpenos, principalmente de α ou β-pineno, os quais apresentaram várias atividades biológicas, tais como, aleopática [17], tripanocida [22] e citotóxica [23].

O município de Jequié, localiza-se no centro-sul do estado da Bahia. Situada em uma zona limítrofe entre Mata Atlântica e Caatinga (predominante), se destaca por possuir temperaturas elevadas durante quase todo ano. Nos solos salinos, característicos da caatinga, predomina a vegetação xerófita e espécies típicas como a *S. terebinthifolius* [21]. A *S. terebinthifolius* da região de Jequié apresenta seu período frutífero entre os meses de maio a novembro. Período este que exibe uma grande variação climática na região com baixa pluviosidade, onde o mês mais seco (novembro) apresentou uma diferença de precipitação de mais de 300 mm, a menos, em relação ao mês mais chuvoso, janeiro, esses meses foram os que apresentaram as temperaturas mais altas. As temperaturas médias variaram 5,8 °C ao longo do ano. O mês de maio, período do outono, as temperaturas variaram de 17,0 a 34,0°C, já nos meses de novembro e seguintes, os termômetros chegam a marcar temperaturas de verão acima de 40°C na sede do município, como mostra o gráfico da Figura 3 (p.28) [24]. O fator climático pode distinguir, quanto a composição química, a espécie de aroeira (*S. terebinthifolius*) da cidade de Jequié das demais que ocorrem em outras regiões que possuem um micro clima mais ameno.

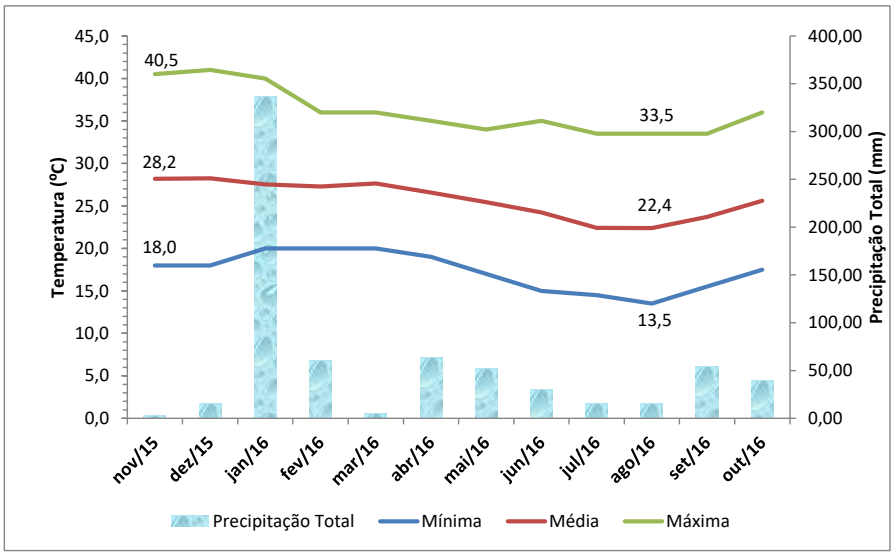


Figura 3. Gráfico climático com os dados de chuvas em mm e temperaturas em ºC entre novembro de 2015 e outubro de 2016 no município de Jequié-Ba. Disponível em http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp.

Considerando que não foram encontrados relatos sobre as propriedades antifúngica do óleo essencial da *S. terebinthifolius* da região de Jequié este estudo objetiva caracterizar e avaliar os OE's de frutos da *S. terebinthifolius*, da área urbana de Jequié, quanto a sua composição química e avaliar a atividade antifúngica do volátil frente a duas linhagens de fungos oportunistas do gênero do *Cryptococcus* e outras cindo espécies do gênero *Candida.*

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a constituição química dos OE's dos frutos maduros da *Schinus terebinthifolius* da região de Jequié, Bahia, Brasil, coletados em três períodos do ano, e avaliar por teste microbiológico, o óleo essencial, contra fungos patogênicos oportunistas do gênero *Cryptococcus e Candida*.

2.2 Objetivos Específicos

1.1 Extrair e quantificar os óleos essenciais dos frutos de *Schinus terebinthifolius.*

1.2 Identificar e quantificar os constituintes químicos dos óleos essências de *Schinus terebinthifolius* por cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

1.3 Avaliar a ação inibitória sobre o crescimento de cinco linhagens de *Candida spp.* e duas de *Cryptococcus spp.,* o óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius.*

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material Vegetal

As amostras de frutos de *S. terebinthifolius* Raddi, num total de três, foram coletadas na zona urbana do município de Jequié em três períodos frutíferos do ano em que as temperaturas ambientes são consideradas frias, moderada e quente para os padrões locais. Sendo a coletas realizadas nos meses de maio/2016, agosto/2016 e novembro/ 2015. A primeira coleta foi no dia quinze do mês de novembro do ano de 2015, uma amostra de fruto foi coletada de uma árvore na calçada de via pública, frente a mercearia Sr. do Bonfim, localizada na Avenida Senhor do Bonfim, no bairro Pau Ferro. Após a extração do óleo, a amostra pura do OE dos frutos foi denominada de OFr-11, em referência ao mês da coleta, novembro; Em vinte e cinco de maio do ano de 2016, foi feita a segunda coleta de frutos foi feita na Rua da Luz, no bairro do Km 03. Após a extração, uma amostra desse óleo codificada com o acrônimo OFr-05. A terceira e última amostra foi coletada no dia vinte e um de agosto do ano 2016 nos jardins do prédio onde funciona o Curso de Pós-graduação em Relações Étnicas da UESB, situado à rua João Rosa, no bairro Pau-Ferro, Bahia, Brasil. Após a extração, a amostra do óleo da terceira coleta foi codificada pelo acrônimo OFr-08. Exsicatas das plantas estudadas foram encaminhadas para o Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a qual foi depositada sob o registro da espécie de *Schinus terebinthifolius,* HUESB 10578.

3.2 Extrações dos Óleos Essenciais

Os trabalhos foram realizados nos Laboratório de Óleo Essencial/DQE da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- UESB, sob a supervisão da Dra. Rosane Moura Aguiar e a análise química dos voláteis de *Schinus terebinthifolius* foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt/DQE da UESB.

Foram coletados 745,295 g de frutos maduros frescos para a extração de OFr-11; 942,514 g para o OFr-05 e 915,386 g para OFr-08. Em seguida, cada amostra, foi limpa e triturada em almofariz, sendo transferida para um balão com água destilada, conectado a um sistema extrator tipo Clevenger permanecendo por 3 horas. Os hidrolatos extraídos formam secos em sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Os óleos

essenciais obtidos foram analisados para a obtenção das massas específicas e rendimentos.

3.3 Análise por Cromatografia Gasosa

As análises cromatográficas de OEFrST foram conduzidas em um cromatógrafo a gás, Schimadzu, modelo QP2010-SE, acoplado a um detector por espectrometria de massa (CG-EM) equipado com um detector de filtro de íons por quadrupolo simples, que opera no modo impacto eletrônico (70 eV.), ajustado com velocidade de scan (scan speed) de 1000; e detecção de fragmentos de *m/z* entre 45 para 800 Da. Foi empregada uma coluna capilar OV-5 (OVSC, Ohio, USA) de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, dotada de uma fase estacionária composta por um filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano com fenila (5%). O Hélio (CG-EM) foi utilizado como gás de arraste a 1,8 $mL.min^{-1}$. Foram utilizadas as seguintes temperaturas: injetor 220 ºC, detector 240 ºC. O aquecimento do forno/coluna foi programado para iniciar a 40 ºC (mantido por 1 min), a uma razão de 3 $ºC.min^{-1}$ até 280 ºC (permanecendo por 4 min). O volume de injeção foi de 1µL de solução da amostra (5% em CH_2Cl_2) e divisor de fluxo (split de 1:10). A identificação de cada componente detectado foi realizada por comparação entre os espectros de massas obtidos no cromatograma de íons totais (TIC) por consulta ao banco de dados NIST 11 residente no programa computacional do aparelho e também por dados espectrais da literatura (NIST-EUA: http://www.nist.gov/) [26], bem como pela comparação de índices cromatográficos calculados com os respectivos dados para a colunas similares a OV-5 (Adams, 2007) [25]. Os índices de retenção (IR) foram calculados aplicando os dados de análises CG-EM de OE's de *S. terebinthifolius* e de uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C_8-C_{28}).

3.4 Avaliação da Atividade Biológica

Ensaios para avaliar atividade antifúngica dos óleos essenciais da *S.terebinthifolius* (OFr-11) foram realizados no Laboratório de Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia/ ICB da Universidade Federal de Minas Gerais sob a supervisão da Profa. Susana Johann.

O OE foi testado contra *C. albicans* (SC5314), *C. tropicalis* (ATCC 750*), C. krusei* (ATCC 20298), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 22019),

Cryptococcus gattii (ATCC 24065) e *C. neoformans* (ATCC 24067). Estas leveduras foram mantidas em ultrafreezer a – 80 °C.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 24 horas, a 35°C em 5 mL de solução salina estéril. A suspensão resultante foi agitada por 15s e a densidade celular foi ajustada pelo método espectrofotométrico a uma concentração final de 1,5-1,0 x103 células/mL (CLSI, 2008).

O teste de CMI foi realizado seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). Assim, o OE foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640. As diluições testadas foram de 500-0,97 µg/mL. Posteriormente 100 µL de cada diluição foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, Detroid, MI, USA). O controle de crescimento e esterilidade foi constituído de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e como controle de toxicidade do solvente foi utilizado o meio RPMI acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração correspondente em cada experimento. O fluconazol foi incluído como controle positivo do antifúngico. O controle negativo foi composto por 200 µL de meio de cultura. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 ou 72 horas (48 h para leveduras do gênero *Candida* e 72 h para o gênero *Cryptococcus*) e a leitura foi realizada visualmente, sendo que a CMI foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Óleos Essenciais de *S. terebinthifolius*

Os óleos essenciais dos frutos da *S. terebinthifolius* foram obtidos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Figura 4, p.34) modificado e apresentaram forte odor, sabor picante e incolor. Os respectivos rendimentos, dos OE's dos frutos frescos, medidos em relação ao peso dos frutos secos utilizados nas extrações foram: OFr-11 1,2% w/w, OFr-05 1,4% w/w e OFr-08 1,5% w/w apresentando um valor médio de 1,4% w/w.

Tabela 1. Dados climáticos entre novembro de 2015 e outono de 2016 no município de Jequié-Ba.

Data	Mínima (°C)	Média (°C)	Máxima (°C)	Precipitação Total (mm)	UR (%)
Nov/15	18,0	28,2	40,5	2,50	62,5
Dez/15	18,0	28,3	41,0	15,87	55,3
Jan/16	20,0	27,5	40,0	336,48	ND
Fev/16	20,0	27,3	36,0	60,63	ND
Mar/16	20,0	27,6	36,0	4,86	ND
Abr/16	19,0	26,6	35,0	63,75	ND
Mai/16	17,0	25,4	34,0	52,38	ND
Jun/16	15,0	24,2	35,0	30,61	85,3
Jul/16	14,5	22,4	33,5	15,25	75,4
Ago/16	13,5	22,4	33,5	15,25	79,0
Set/16	15,5	23,7	33,5	54,17	73,7
Out/16	17,5	25,6	36,0	39,25	73,1
Média	17,3	25,8	36,2	691,00	72,0

Fonte: AGRITEMPO - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico

Rendimentos dos OE's variam em virtude de fatores abióticos como nível de nutrição da planta, disponibilidade de água, luminosidade, temperaturas e por tempo de extração. Os rendimentos dos OE's apresentados correlacionados com os dados meteorológicos mostrados na Tabela 1 permite aferir que a combinação de fatores típicos das estações mais fria na região (temperaturas amenas, baixos índices de umidade relativa do ar e precipitação) favorece o aumento de óleos essenciais. O rendimento do OFr-11 (1,20%) coletado na primavera apresentou valor inferior aos rendimentos das amostras coletadas no outono e no inverno. Esse período no município de Jequié-Ba é caracterizado por altas temperaturas e baixa pluviosidade, um período quente e seco que levam aos vegetais a redução de níveis fotossintéticos,

crescimento e redução de biomassa. Restrições que afetam a síntese e o acumulo de óleos essenciais nos vegetais [27].

Cole *et al* (2014) em seu estudo obteve OE do fruto de *S. terebinthifolius* com rendimento de 6,54 ± 1,06% (w/w) para 6 horas de extração sob refluxo em Clevenger [13] e Barbosa *et al* (2007) obteve OE's de frutos não maduros e maduros com rendimentos de 3,98% e 4,65% w/w, respectivamente [17]. Em comparação com os rendimentos apresentados na literatura verifica-se que a baixa produção dos OE's das amostras de *S. terebinthifolius* deste estudo pode está diretamente ligada a adaptação dos vegetais ao clima da região. Baixa umidade, altas temperaturas durante longo período do ano associado ao longo fotoperíodo, incidência de luminosidade, que desfavorece o acúmulo dos óleos essenciais [27].

Figura 4. Hidrodestilação em Clevenger modificado.

Os OE's de diferentes amostras de *S. terebinthifolius* apresentaram uma variedade em suas composições químicas com alguns terpenos comuns para os óleos voláteis deste estudo, já outros se apresentam em grandes quantidades apenas para um OE como é o caso do *β*-ocimeno e *α*-terpineno (Figura 5, p. 35).

A análise qualitativa e quantitativa das amostras de OE's foram realizadas por CG-EM e permitiu a identificação de 36 componentes, conforme cromatogramas mostrados nas Figuras 6, 7 (p. 35) e 7 (p. 36) e Tabela 2 (p.38).

Para a amostra de OFr-11 foi considerado como constituintes majoritários, aqueles que apresentam o percentual da área do pico para cada composto maior ou igual 5,0 % da área total, os seguintes compostos: *β*-pineno (31,37%) (**8**), *α*-pineno (22,00 %) (**3**) e óxido de cariofileno (6,84%) (**40**). Na amostra OFr-05 foram

identificados seis componentes principais: *β*-ocimeno (35,36%) (**14**), *α*-pineno (15,83%) (**3**), limoneno (5,98%) (**16**) e *β*-mirceno (13,32%) (**9**). Na amostra OFr-08 foram identificados um total de seis compostos sendo que dois apresentaram percentual em área de pico aproximadamente maior ou igual a 5,0 % que foram o δ^3-careno (83,40%) (**11**) e *β*-mirceno (5,10%) (**9**). Considerando que as amostras foram coletadas em diferentes épocas do ano e locais, há uma diferença de composição entre seus respectivos OE's.

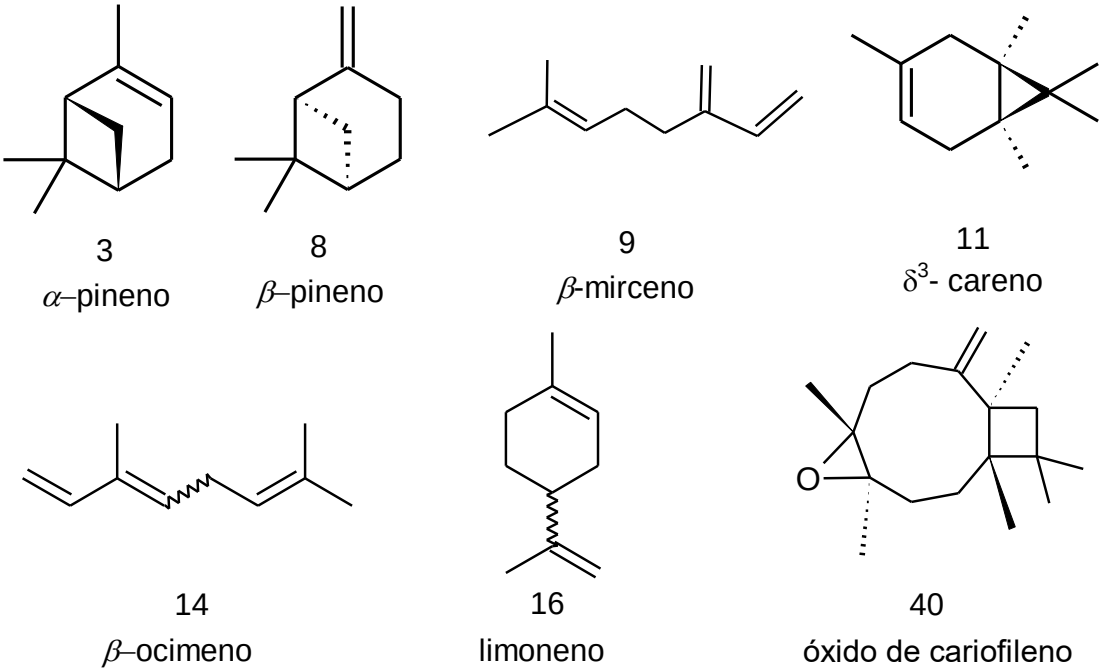


Figura 5. Constituintes majoritários dos OE's OFr-11, OFr-05 e OFr-08. Numeração referente aos picos nos cromatogramas.

A análise da distribuição de massa dos componentes das três amostras de óleos essenciais brutos, apesar das diferenças individuais na constituição de seus metabólitos secundários, indicou a predominância de compostos monoterpenicos nos três OE's analisados, como mostra o gráfico (Figura 9, p.38).

Os óleos voláteis extraídos de *S. terebinthifolius* se caracterizam por apresentar altos teores de compostos monoterpênicos. Esta classe de compostos monoterpênicos são divididos em dois subgrupos: os hidrocarbonetos monoterpenicos (HM) e os monoterpenos oxigenados (OM). No OFr-11 foram identificados 66,10 % de HM dos 77,12% totais de monoterpenos ao passo que dos 85,03% dos monoterpenos identificado para o OFr-05 81,80% são HM. Já para o OFr-08 o total de compostos identificados, 99,27%, foram de HM. As baixas concentrações

de monoterpenos oxigenados e de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH, %) para os óleos voláteis concordam com os dados relatados na literatura para óleos essenciais de *S. terebinthifolius* [17,2].

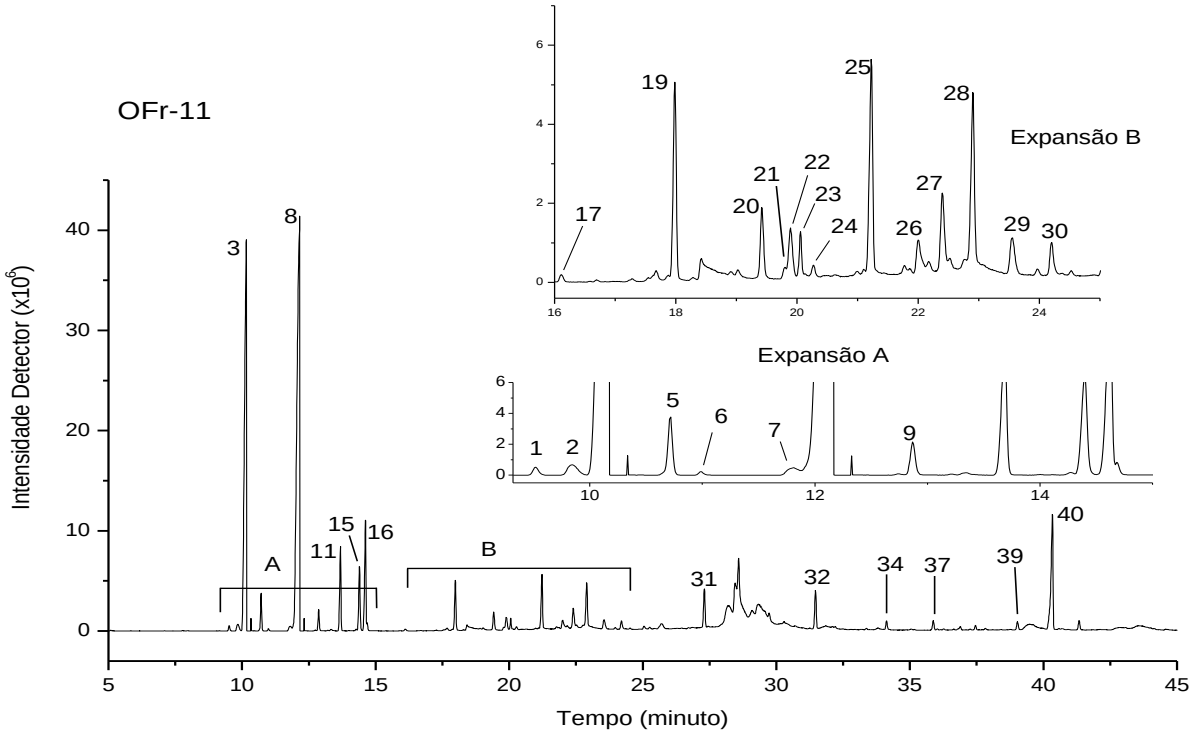


Figura 6. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-11. Condições: Coluna OV-51, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila (5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 280 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

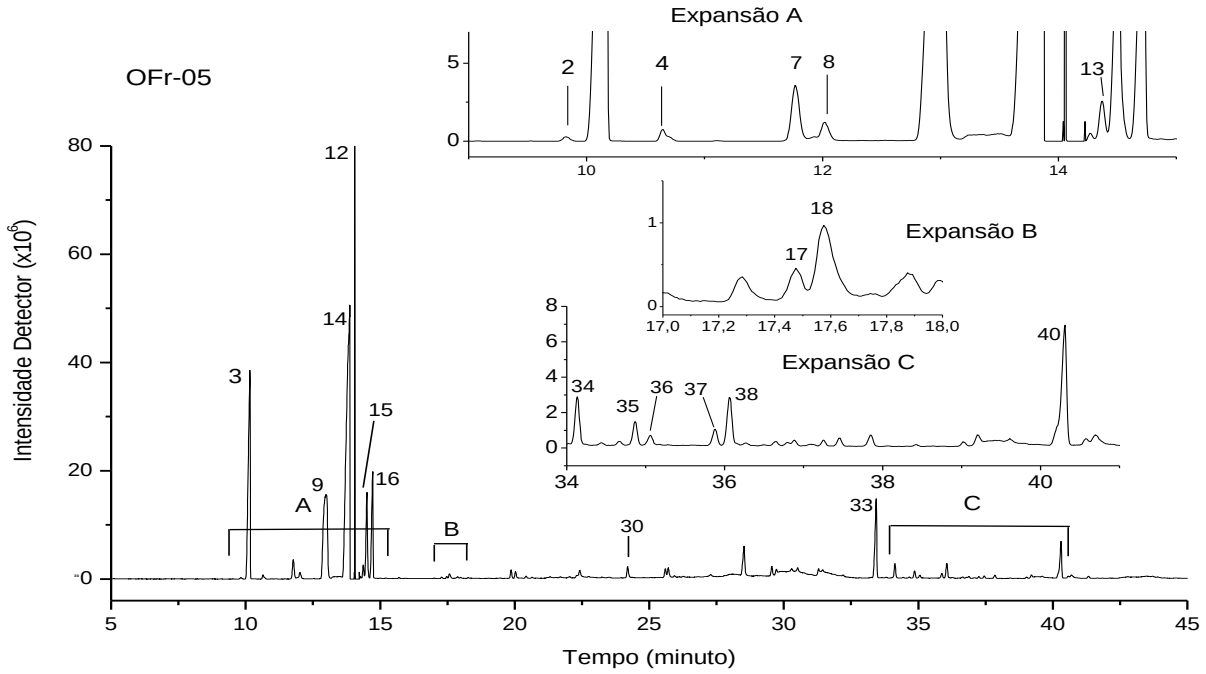


Figura 7. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-05. Condições: Coluna OV-51, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila

(5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 280 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Os OE dos frutos da *Schinus* de Jequié apresentam diferenças entre seus constituintes majoritários ocorrendo pequenas similaridades entre o OFr-11 e OFr-05. O *β*- pineno se mostra como o constituinte majoritário do OFr-11 (31,37%) enquanto que no OFr-05 se apresenta em quantidade traço (0,33%) e o mesmo não é observado no OFr-08. O α-pineno exibe uma percentagem de 22,00% no OFr-11 e 15,83% para o OFr-05. Esse aumento pode estar ligado à versatilidade catalítica das enzimas terpeno-sintetases, que frequentemente produzem múltiplos produtos a partir de um único substrato.

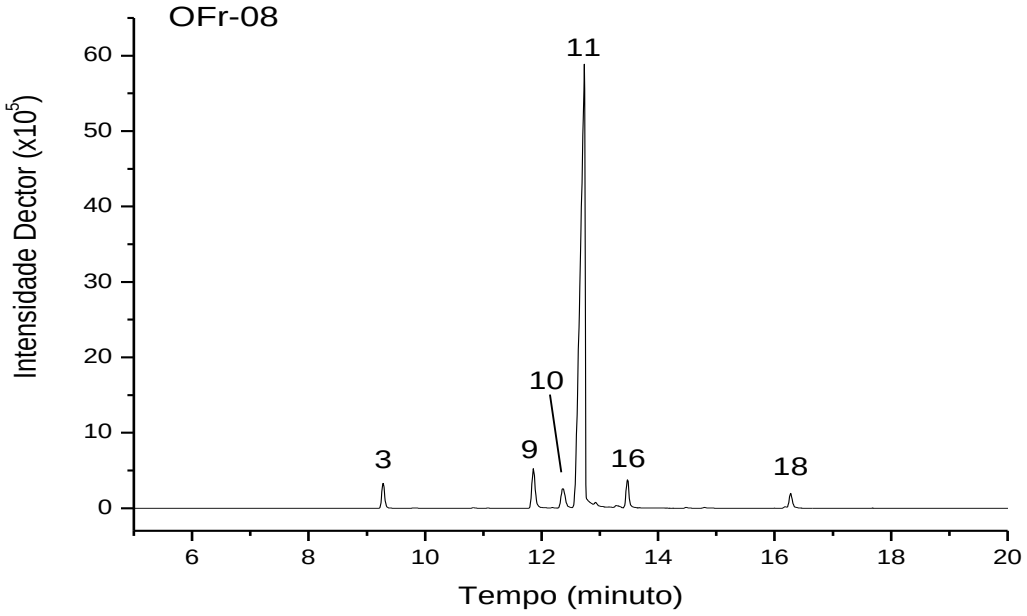


Figura 8. Cromatograma parcial de íons totais (TIC) obtidos por CGAR-EM de OFr-08. Condições: Coluna OV-51, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila (5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 280 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Em análise comparativa dos estudos da composição química dos óleos essências dos frutos da *Schinus terebinthifolius*, do Brasil e de outros países de clima quentes como Tunísia, com os dados obtidos nesta pesquisa pode se observar que o OFr-08 apresenta uma concordância dos seus constituintes majoritários com o que está descrito para os OE's dos frutos de *S. terebinthifolius* da Bahia [28], Minas Gerais [17] e Espirito Santo [13], onde os seus constituintes majoritários foram o δ^3-careno (41,01%, 29,22% e 30,37%), respectivamente.

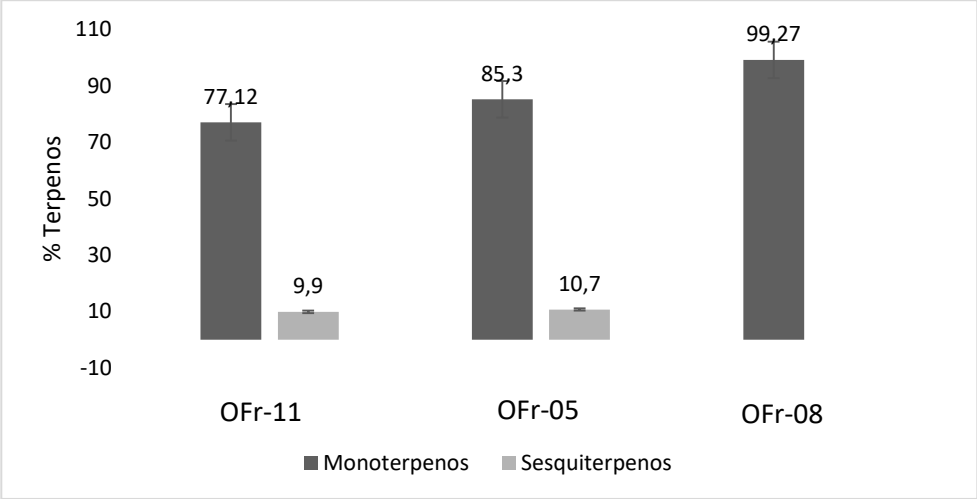


Figura 9. Porcentagem de compostos mono e sesquiterpenos obtidos dos óleos essenciais OFr-11, OFr-05, OFr-08.

Barbosa *at al* (2007), em estudos com *S. terebinthifolius* cultivadas no estado de Minas Gerais, obteve para o OE dos frutos maduras o δ^3-careno (29,22%), *β*-felandreno (18,08%), *α*-felandreno (13,04%) e o *α*-pineno (12,94%) como constituintes majoritários [17]. Ao passo que Gois (2014) identificou os δ^3-careno (41,01%), *α*-felandreno (14,40%), limoneno (12,36%) e *α*-pineno (10,36%) [28], concordando parcialmente com os dados obtidos nessa pesquisa, visto que os compostos *α* e *β*-felandreno não foram identificados nesse estudo e o δ^3-careno não foi determinado em todos as três amostras, apenas o *α*-pineno e o limoneno.

Cole *et al* (2014) em análise por CG-EM, identificam o δ^3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), *α*- felandreno (12,60%) e *α*-pineno (12,59%) para os frutos do obtidos no Espirito Santo e Sartorelli *et al* (2012) (-)-*α*-pineno (38,92%), *α*-terpineol (14,39%), δ^3-careno ne (12,75%) e o limoneno (12,02%) [13, 22]. Esses resultados se assemelham muito com os obtidos por Barbosa *et al (2007)* e Gois (2014) e coincide com o OFr-11 deste experimento com alguns constituintes incomuns [17,28].

Na Tunísia Bendaoud *et al* (2010) determinou α-felandreno (34.38%), *β*-felandreno, *γ*-cadineno (18.04%) (10.61%), α-terpineol (5.60%), α-pineno (6.49%) e *p*-cimeno (7.34%) [23] enquanto Piras e*t al* (2017) recentemente determinou os seguintes terpenoides α-felandreno (39,6 %) e *β*-felandreno (22,9 %), α-pineno (18,4 %) [29].

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* obtidos em várias estações.

Picos	COMPOSTOS	IR lit.	OFr-11	OFr-05	OFr-08	IR cal.
			%	%	%	
1	tricicleno	926	0,2			**920**
2	*α*-tujeno	931	0,4	0,1		**926**
3	*α*-pineno	932	22,0	15,8	2,8	**932**
4	*α*-fencheno	941		0,3		**940**
5	canfeno	946	1,1			**941**
7	1,3,5-cicloheptatrieno, 3,7,7-trimetila	970	0,2	1,3		**960**
8	*β*-pineno	974	31,4	0,3		**966**
9	*β*-mirceno	991	0,7	13,3	5,1	**979**
10	*α*-felandreno	1004			3,2	**1007**
11	δ^3-careno	1011	3,0		83,4	**1012**
12	*α*-terpineno	1018		3,5		**1018**
13	*o*-cimeno	1020		0,7		**1023**
14	*β*-ocimeno	1023		35,4		**1015**
15	*p*-cimeno	1026	2,5	4,8		**1022**
16	limoneno	1027	4,5	5,9	3,2	**1027**
18	*α*-terpinoleno	1088		0,2	1,6	**1079**
19	oxido de *α*-pineno	1095	1,9			**1081**
20	*α*-canfolenol	1130	0,7			**1123**
21	oxido de limoneno	1133	0,1			**1129**
22	*α*-pinocarvenol	1139	0,3			**1134**
23	(*1R*)-(+)-Nopinona	1142	0,5			**1131**
25	pinocarvona	1164	2,1			**1153**
26	terpinen-4-ol	1177	0,3			**1165**
27	criptona	1183	0,8			**1172**
28	mirtenal	1193	1,8			**1180**
29	*cis*- verbenona	1204	0,4			**1222**
30	eucarvona	1222	0,3	0,7		**1231**
31	acetato de Bornil	1285	1,6			**1271**
32	*α*-copaeno	1376	1,6			**1364**
33	isocariofileno	1428		2,1		**1420**
34	*trans*-*α*-bergamoteno	1433	0,4	5,4		**1433**
35	*α*-humuleno	1436		0,8		**1445**
36	*cis*-*β*-farneseno	1455		0,4		**1449**
37	*γ*-muuroleno	1457	0,4			**1463**
38	germacreno-D	1465				**1467**
40	óxido de cariofileno	1561	6,8	2,6		**1569**
	TOTAL		**90,1**	**91,6**	**98,7**	

$IR_{Calc.}$= Índice de Retenção calculado pela equação de Kolvets (Admas, 2007). $IR_{Lit.}$= Índice de Retenção da literatura. A%= Porcentagens fornecidas pelo CG-EM.

A predominância dos monoterpenos *α* e *β*-pineno na amostra OFr-11 aponta um potencial valor comercial a este óleo volátil devido ao alto conteúdo desses monoterpenos. Diferentemente dos OE de frutos de *S. terebinthifolius* apresentados na literatura, o óleo proveniente de espécimes de Jequié com alto teor *β*-pineno (OFr-

11), indicou a possibilidade de um novo e promissor geo/quimiotipo, onde os vegetais são idênticos botanicamente, mas se diferem quimicamente, pois o metabólito *β*-pineno se apresenta descrito por antecessores para OE's dos frutos em pequena concentração [20], indicando que plantas de diferentes regiões podem apresentar diferentes composição química e diferentes atividades biológicas.

Os resultados desse estudo indicam que a sazonalidade afeta diretamente a porcentagem relativa dos constituintes individuais dos OE's. Levantando a hipótese que as plantas, através do mecanismo de rota biossintética, favoreça a produção dos seus metabólitos secundários de acordo com suas necessidades [10]. Sechnee *et al* (2002) na terpeno-sintetase, na qual produziu alguns terpenos como o linolol, determinou que a faixa de temperatura ótima de reação para a síntese desses terpenos está entre 30 e 37 °C [29]. Tal vez a temperatura se caracterize como um importante fator para a atividade enzimática, justificando assim o aumento de metabólitos secundários nos óleos essenciais em épocas do ano em que se observa temperaturas mais elevadas, já que a temperatura é uma variável da sazonalidade.

Esta variabilidade química entres os constituintes voláteis das espécimes coletadas em Jequié é também influenciada pelas condições climáticas que está diretamente ligada as interconvenções químicas sofridas pelos monoterpenos de mesmos esqueletos (Figura 10), rearranjos intramoleculares, que levaram a variação química dos OE's desses frutos.

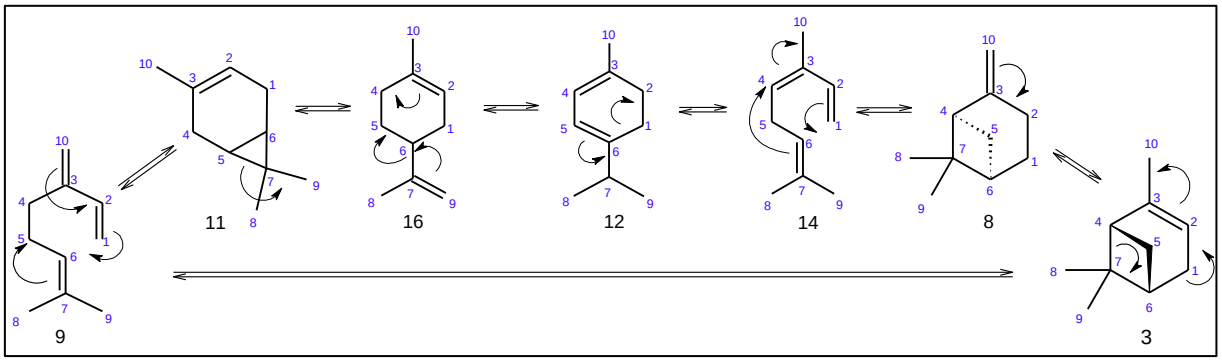


Figura 10. Ciclo de rearranjo intermoleculares de monoterpenos que apresentam esqueletos relacionados.

A configuração absoluta dos compostos e dos intermediários não pode ser determinados devido a metodologia de análise empregada para óleos voláteis, deste modo são apresentadas apenas suas estruturas planas. A simetria que ocorre nos mecanismos de reação possibilita a formação dos diferentes enantiômeros por meio de rotas paralelas [30].

A biossíntese dos monoterpenoídes (Figura 11, p. 42) se inicia pela ionização do difosfato de geranila (GPP) (I) formando o cátion linalílico (Ia) que ao sofrer desprotonação no C4 gera o *β*-ocimeno (14). O disfosfato linalílico (LPP) (II) é formado pela isomerização do GPP (I) com a migração do grupo disfosfato do C1 para o C3 [31]. Por apresentar características espaciais favoráveis à ciclização molecular o disfosfato linalílico sofre rotação da ligação C2-C3 levando ao cátion linalíco (IIa) que ao sofrer ionização forma o seu isômero IIb, esqueleto precursor na formação do *β*-mirceno (9) pela perda de próton no C10 [31]. O isômero do cátion linalílico (IIb) é um intermediário chave da biossíntese dos monoterpenos cílcicos, pois a ciclização, entre o C1 e C6, deste cátion gera o cátion *α*-terpinílico (III) (Figura 10, p. 40) [30, 31].

A desprotonação do C8 do cátion *α*-terpinílico (III) leva a formação do limoneno **16** que, por isomerização pode formar o *α*-terpineno **12**. Este também pode ser formado via perda de próton no C6 de III, está perda de H gera o terpinoleno **18** que, por isomerização forma o *α*-terpineno **12**. A formação do cátion pinílico (IIIa) ocorre via rearranjo por ciclização eletrofílica de cátion *α*-terpinílico (III). A desprotonação do cátion pinílico (IIIa) em C4 e/ou C10 conduz a produção de *α* ou *β*-pineno, **3** e **8**, respectivamente. A ciclização eletrofílica do cátion (III) em C7-C5 leva a formação do δ^3-careno **11** [30,31].

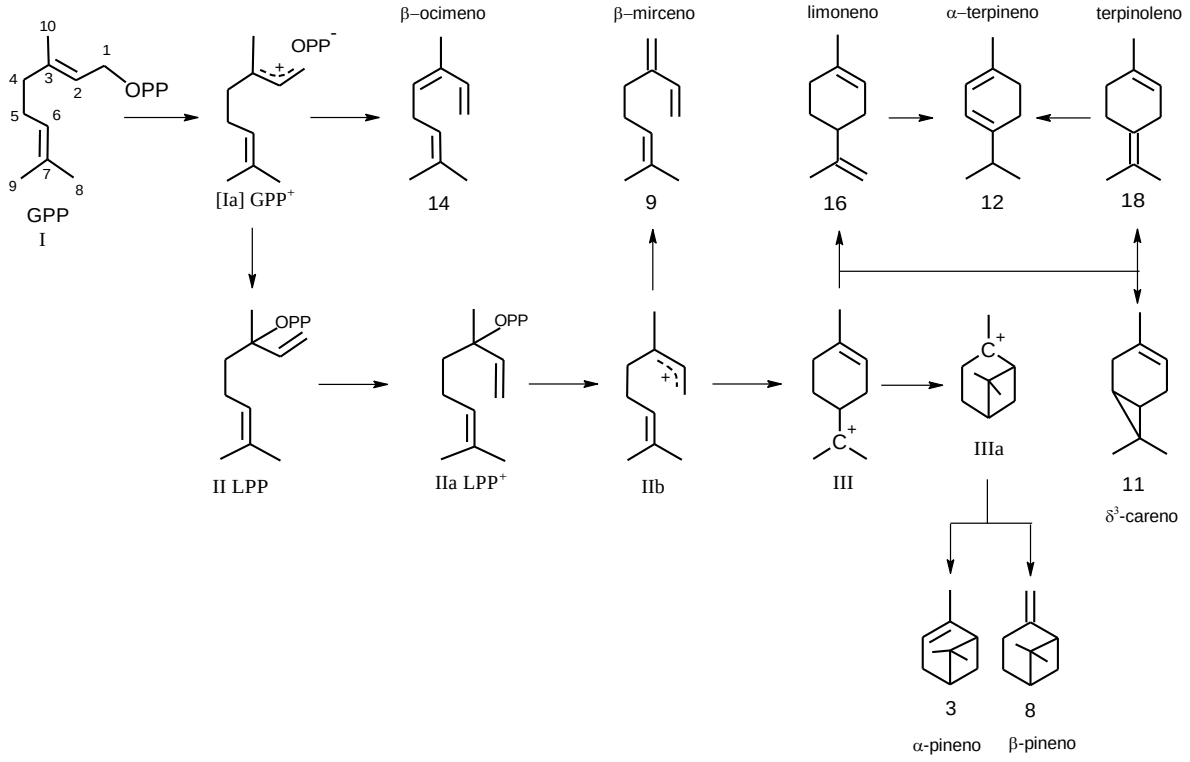


Figura 11. Esquemas das possíveis rotas biosssintéticas dos monosterpenóides presentes nas amostras de óleos essenciais da *S. terebinthifolius*. Nomes dos constituintes e dos intermediários: Difosfato de geranila (GPP) (I); Cátion linalílico (Ia); Cátion linalílico/isômero (IIb); *E-β*-Ocimeno **14**; Difosfato de linalila (LPP) (II); Difosfato de linalila (LPP)/isômero (IIa); *β*-Mirceno **9**; Cátion α-terpinílico (III); Limoneno **16**; *α*-terpineno **12**; Cátion pinílico (IIIa); *β*-pineno **8**; α-Pineno **3**; δ^3-careno **11**; terpinoleno **18**, adaptado de Barros *et al, 2009* e Kollner *et al, 2004* [30 e 31].

A rota biossintética dos monoterpenóides assim como os rearranjos intermoleculares sofridos sugere que em épocas de temperaturas mais baixas ocorra o favorecimento da produção do δ^3-careno. Já em temperaturas mais altas, ocorra a rota inversa e a volatilização direcione o substrato GPP para ser transformado nos monoterpenóides intermediários como *α* e *β*-pineno, *β*-ocimeno, mirceno e limoneno. O anel de três membros do δ^3-careno não deve permanecer estável em temperaturas altas de verão.

4.2 Atividade Antifúngica

A criptococose é uma infecção causada pelos fungos invasivos *C. neoformans* ou *C. gattii* que podem levar a situações clinicas como insuficiência respiratória e pneumonia grave. Em pacientes imunocomprometidos, as infecções podem chegar ao cérebro desencadeando doenças neurológicas e a morte. A candidíase é também uma doença infecciosa que vem apresentando resistências a tratamentos terapêutico.

C. albicans são espécies responsável por inúmeras infecções urinárias, por isso a importância da busca incansável para o desenvolvimento e/ou descobertas de fármacos e tratamentos alternativos para essas doenças [1,2].

O efeito tóxico dos monoterpenóides de acordo com Koyama et al. (1997) está ligado a capacidade dos componentes dos óleos essenciais em romper ou penetrar a estrutura lipídica presente em bactérias Gram-negativas [35]. Esse rompimento resulta da expansão da membrana com fluidez e permeabilidade, inibindo a respiração celular do microorganísmo e o processo de transporte iônico [36]. No entanto, não é possível atribuir um mecanismo de ação específico ao OE, uma vez que os óleos voláteis são misturas complexas de compostos químicos que podem atuar em diferentes localidades das células dos microorganismos [37]. Os monoterpenóides majoritários presentes no OE dos frutos de *S. terebinthifolius* são, provavelmente, os responsáveis pela alta atividade antifúngica deste OE diante das espécies testadas, sendo agentes alternativos para novos fármacos no combate aos fungos oportunistas.

Com base em evidências mostradas sobre o potencial biológico do óleo essencial dos frutos de espécies de *Schinus*, foram realizados ensaios para se avaliar atividade antifúngica do OFr-11 mediante a determinação da CMI, devido ao teor elevado de pinenos na amostra OFr-11 diferentemente das amostras OFr-05 e OFr-08. O OFr-11 apresentou uma composição química rica nos monoterpenóides *α e β* pinenos. Essas substâncias apresentam atividades inseticidas, fungicidas e atividade antimicrobiana contra *C. albicans, C. neoformans e R. oryzae* [11]. Os resultados da atividade antifúngica para o óleo essencial de frutos da *S. terebinthifolius* estão descritos na Tabela 3 (p. 43).

O ensaio de atividade fungicida realizado pelo método de microdiluição em poços mostrou que o OE dos frutos da *S. terebinthifolius* foi ativo contra quatro das sete espécies de microorganismos testados (Tabela 3, p.44). A maior atividade antifúngica do OE foi contra o fungo *Cryptococcus neoformans* com CMI de 7,8µg mL^{-1} e, foi ativo também contra cepas de *C. gattii,* CMI de 15,63 µg mL^{-1}, cujo os CMI foram os mais baixos entre as espécies testadas. Diante das cepas de *Candida,* o óleo apresentou uma alta atividade contra as espécimes de *C. krusei (*31,25 µg mL^{-1}) e *C. parapsilosis* (62,5 µg mL^{-1}), sendo que o fungo *C. krusei* se mostrou mais sensível ao OFr-11 quando comparado ao controle. Para o fungo *C. tropicalis* o OE apresentou

CMI de 250µg mL^{-1}, um valor pouco expressivo para se considerar esse óleo como, quando comparado com o valor do controle, fluconazol.

Os resultados desta pesquisa são coerentes com os encontrados por Cole *et al* (2014) onde os testes para o OE de frutos da *S. terebinthifolius* exibiu um alto potencial inibitório contra cepas selvagens de origem hospitalar com valores de CMI para o OE inferiores ao do controle [13].

Piras *et al* (2017), em seu estudo recente obtiveram para voláteis dos frutos da *S. terebhintifolius* da Tunísia, resultados que indicam atividade antifúngica ao OE de *S. terebinthifolius* com CMI de 0,32-0,64 mg mL^{-1} para *C. neoformans* e valores de 2,5; 5; 5; 5 mg mL^{-1} para as espécies *Candida albicans, C. tropicalis, C. krusei e C. parapsilosis*, respectivamente [32].

Estudos com extratos hidroalcoólicos dos frutos da *S. terebinthifolius* desenvolvido por Degáspari *et al* (2005), demonstrou ação contra linhagens de *S. aureus* ATCC 6538 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. Mas esse poder inibitório do extrato hidroalcoólico dos frutos não foi observado sobre todas as espécies de bactérias testadas, tais como: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 [34].

Tabela 3. Concentração Mínnima Inibitória(CMI) em µg.mL^{-1} de Óleo Essencial da *S.terebinthifolius* contra fungos de interesse médico.

Levedura/Substância	OFr-11 (µg.mL^{-1})	Controle Fluconazol (µg.mL^{-1})
Candida albicans	**125,0**	**0,125**
C.glabrata	**125,0**	**4,0**
C. tropicalis	**250,0**	**2,0**
C. parapsilosis	**62,5**	**1,0**
C.krusei	**31,3**	**32,0**
Cryptococcus gatti	**15,6**	**2,0**
Cryptococcus neoformans	**7,8**	**2,0**

5.0 CONCLUSÕES

O processo de extração dos EO's dos frutos da *S. terebinthifolius* por hidrodestilação apresentou baixos rendimentos e variações na composição química quanto aos observados na literatura. Essas variações podem estar relacionadas a variação climática da região em que a amostra foi coletada indicando a possibilidade de um geo/quimiotipo para a *S. terebinthifolius.*

O OE apresentou atividade no estudo das propriedades antifúngica contra as cepas de fungos oportunistas testadas *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti, Candida albicans, C. tropicalis, C. krusei e C. parapsilosis*. Os resultados obtidos neste estudo químico e biológico reforça o uso de *Schinus terebinthifolius* na medicina popular, bem como enfatizam a diversidade de constituintes químicos que são responsáveis por estas ações, como os terpenos *α* e *β*-pinenos os principais constituintes químicos do OE de *S. terebinthifolius*.

6.0 PERSPECTIVAS

Este estudo atendeu o objetivo inicial da dissertação e devido à grande variação química dos óleos essenciais da *Schinus terebinthifolius* é necessário a continuidade de novos estudos químicos e biológicos que contribuirão no desenvolvimento da ciência dos Produtos Naturais e suas pesquisas.

No estudo realizado foi realizada a qualificação dos OE's de *S. terebinthifolius* por CG-EM sendo importante a quantificação por CG-FID desses óleos essenciais. Diante disso, melhores investigações sobre as atividades biológicas antifúngica para cada OE poderão ser realizadas, bem como novos testes biológicos poderão analisar os potenciais carrapaticidas e inseticidas para os OE's e em parceria com graduandos de farmácia, desenvolver um enxaguante bucal, a partir do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* em virtude de suas atividades biológicas.

Enfim, existe necessidade de novos estudos físico-químico e biológicos dos óleos essenciais dos frutos da *S. terebinthifolius* da espécie encontrada na região de Jequié-Ba.

7.0 REFERÊNCIAS

Introdução Geral

[1] BERLINCKA. R. G. S.; BORGESB, W. DE S; SCOTTIC, M.T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p.706-710, 2017.

[2] MIRANDA, C.A.S.F. **Atividade antioxidante das folhas de diversas plantas**, 2010, p.138, Dissertação (Mestrado Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

Capitulo 1

[1] DESNOS-OLLIVIER, M., PATEL, S., SPAULDING, A. R., CHARLIER, C., GARCIA-HERMOSO, D., NIELSEN, K., DROMER, F. Mixed infections and in vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. ***MicroBiology*,** v.*1*, n.1, p. 00091-10, 2010.

[2] DEL POETA, M. & CASADEVALL, A. Ten challenges on Cryptococcus and Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v.173, n. 1, p. 303–310, 2012.

[3] PEREIRA, C.B.; OLIVEIRA, D.M.; HUGHES, A.F.S.; KOHLHOFF, M.; VIEIRA, M.L.A.; VAZ, A.B.M.; FERREIRA, M.C.; CARVALHO, C.R.; ROSA, L.H.; ROSA, C.A.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JOHANN, S.; COTA, B.B. Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **The Journal of Antibiotics**, v.68, n. 6, p. 436-444, 2015.

[4] BRITO, E.O.D. **Susceptibilidade frente a drogas antifúngicas de amostras de *Cryptococcus neoformans* de origem ambiental e clínica, isoladas no estado de Minas Gerais.** 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

[5] EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from Schinus terebinthifolius leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 57, n. 5, p. 5265-70, 2009.

[6] MARTORELLI, S. B. de F.; PINHEIRO, A.L.B.; SOUZA, I.A.; BRAVO, F. Efeito antiimflamtório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*

Raddi (AROEIRA) a 30 em orabase – estudo "*In vivo*". **International Journal of Dentistry**, v. 10, n. 2, p.80-90, 2011.

[7] GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos,** v. 6, n. 1, p.43-56, 2011.

[8] SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia:da planta ao medicamento.** Editora UFRGS, Porto Alegre, 6.ed, 2007, p. 1104.

[9] CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Brazilian Journal of Medical Plants,** v.15, n. 1, p. 158-169, 2013.

[10] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30. n. 2, p. 374-381, 2007.

[11] SILVA, A.C.R.da; LOPES, P.M.; AZEVEDO, M.M.B.de; COSTA, D.C.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Biological Activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. **Molecules**, v.17n. , p. 6305-6316, 2012.

[12] LIMA, L. B.; VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; LEITE, V. R.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, B. A.; ARAÚJO, E. L.; XAVIER, H. S.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of Schinus terebinthifolius bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 468-73, 2009.

[13] COLE, E.R; dos SANTOS, R.B.; LACERDA JÚNIOR, V.; MARTINS, J.D.L.; GRECO, S.J., CUNHA NETO, A. 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, n.3, p.821-828, 2014.

[14] DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G.D.; MATTEI, F.J.; SILVA, W.P.; FIORENTINI, A.M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v.36, p.120-127, 2016.

[15] SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais

de Schinus molle L. e Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 154-9, 2010.

[16] BARKLEY, F.A. Schinus L. **Brittonia**, v. 5, n. 2, p. 160-198, 1944.

[17] BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D., PAULA, V.F DE; ISMAIL, F.M.D. Seasonal Variation in the Composition of Volatile Oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1959-1965, 2007.

[18] CUDA, JIM; ***Florida's Brazilian Peppertree Management Plan***: Interagency Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius*) Management plan for Florida. 2ND ed. Florida: Editora IFAS, 2006, 82p.

[19] TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**, 2010, p.138, Dissertação (Mestrado Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

[20] MELO JÚNIOR, E.J.M. DE; RAPOSO, M.J.; LISBOA NETO, J.A.; DINIZ, M.F.A.; MARCELINO JÚNIOR, C.A.C.; SANT'ANA, A.E.G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v.9, n.2, p.109-116, 2002.

[21] SANTOS, M.C dos. ***Formação continuada para professores de ciências biológica e o ensino sobre o bioma caatinga***. 2013. 183. Dissertação (Mestrado em Educação Científica e Formação de Professores do Programa de pós-graduação) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2013.

[22] SARTORELLI, P.; SANTANA, J.S.; GUADAGNIN, R. C.; LAGO, J.H.G.; PINTO, E. G.; TEMPONE, A.G.; STEFANI, H.A.; SOARES, M.G.; SILVA, A.M. DA; *In vitro* trypanolcidal evaluation of pinane derivatives from essenctial oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v.35, n.4, p. 743-747, 2012.

[23] BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J.; J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle L.* and *Schinus* terebinthifolius Raddi barriers essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p.466-472, 2010.

[24] AGRITEMPO - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Disponível em: http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp. Acessado em 04/03/2017.

[25] ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy.** 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 469 p.

[26] LISTROM, P.J.; MALLARD, W.G. **NIST Chemistry WebBook**, NIST standard reference database number 69. Disponível em: http://webbook.nist.gov/chemistry. October- January 2016-2017.

[27] LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.71-77, 2003.

[28] GOIS, D. F.; **ÓLEO ESSENCIAL DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) COMO ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO PARA LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS,** 2014, p.67, Dissertação (Mestrado Ciências Animal) - Universidade Federal da Bahia, Ilhéus, 2014.

[29] SCHNEE, C.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J.; The Maize Gene *terpene synthase* 1 Encodes a Sesquiterpene Synthase Catalyzing the Formation of *(E)-β*-Farnesene, (*E*)-Nerolidol, and (*E,E*)-Farnesol after Herbivore Damage. **Plants physiology***,* v.130, p.2049, 2002.

[30] BARROS, F.M.C.; ZAMBARDA, E.de O.; HEINZMANN, B.M. Variabilidade szonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. BROWN (VERBENACEAE). **Química Nova,** v.32, n.4, p.861-867, 2009.

[31] KOLLNER, T.G.; SCHNEE, C., GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The Variability of Sesquiterpenes Emitted from Two *Zea mays* Cultivars Is Controlled by Allelic Variation of Two Terpene Synthase Genes Encoding Stereoselective Multiple Product Enzymes. **The Plant Cell**, v.16, p.1115-1131, 2004.

[32] PIRAS, A., MARZOUKI, H., FALCONIERI, D., PORCEDDA, S., GONÇALVES, M. J., CAVALEIRO, C., & SALGUEIRO, L. Chemical Composition and Biological Activity of Volatile Extracts from Leaves and Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi from Tunisia. **Records of Natural Products**, v.11, n.1, p.9-16, 2017.

[33] ULIANA, M.P.; FRONZA, M.; SILVA, A. G.; VARGAS, T.S.; ANDRADE, T.U. de; SCHERER, R.Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v.83, p. 235-240, 2016.

[34] DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J.; Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi. **Visão Acadêmica,** v. 05, n.02, p. 83-90, 2004.

[35] KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of japanase traditional tree (kisohinoki), Chamaecyparis obtusa. **General Pharmacology,** v. 28, p.797- 804, 1997.

[36] BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49. p. 2474-2478, 2005.

[37] CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanisms of Action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother,** v.46, p.1914-1920, 2002.

CAPITULO II

Estudo químico e farmacológico da *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* (Anemiaceae)

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw*

O gênero *Anemia* é o único gênero pertencente à família da Anemiaceae, ele apresenta entre 100-120 espécies sendo que cerca de 70 espécies são encontradas no Brasil e ocorre na região sudeste e central do país. Espécies de *Anemia* são endêmicas de regiões tropicais úmidas como Ásia e Austrália e também são encontradas na América Central (México) e América do Sul (Argentina, Bolívia, Andes do Perú, Brasil) principalmente em regiões rochosas [1,2]. A espécie *Anemia tomentosa* (SAV) *Sw.,* uma pteridófita terrestre da ordem das Schizaeales é uma geófita rizomatosa de distribuição limitada à América do Sul. No Brasil a *A. tomentosa* é uma planta frequentemente encontrada em regiões rochosas do estado do Rio de Janeiro popularmente conhecida como 'espiga-de-ferrugem' [2,3]. Seus rizomas escuros ou laranjas, suas folhas grandes e divididas são hemidimórficas. Muitas espécies de *Anemia* são aromáticas e produzem substâncias voláteis a partir de suas folhas, são conhecidas no Brasil como samambaias.

Figura 1. Espécime de Anemia tomentosa que forneceu material para os estudos fitoquímicos. Rocha na estrada da região de Poços Dantas, Jequié-Bahia.

Na Argentina, as folhas da *A. tomentosa* são usadas como auxiliar digestivo, expectorante e antigripal [7]. Em trabalhos sobre plantas aromáticas da Argentina e seus óleos essenciais, Gillij *et al* (2008) e Demo *et al* (2005) observaram que a *A. tomentosa* apresentara atividade repelente contra mosquitos e atividade antimicrobiana, respectivamente [8,9].

Apesar das espécies do gênero *Anemia* apresentarem um forte aroma, indicativo da presença de compostos voláteis, o óleo essencial de *A. tomentosa* do Brasil é pouco estudado. Pinto *et al* (2007, 2009 e 2009) estudou a composição química dos óleos essenciais de partes aéreas de espécimes *A. tomentosa* coletadas em Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brasil e Vila Velha, Espirito Santo, Brasil. Posteriormente, esse autor verificou a atividade antimicrobacteriana do óleo essencial (OE). Em seu primeiro estudo (2007) para a caracterização química do óleo, os seguintes sesquiterpenos foram identificados: silfiperfolano, pre-silfiperfolano, isocumeno, cariofileno, prenopsano. Estudos adicionais de Pinto *at al* (2009) identificou trinta substâncias desse óleo. O silfiperfol-6-eno e o *(-)*-presilfiperfolan-1-ol foram os componentes majoritários sendo o (-)-presilfiperfolan-1-ol em seguida isolado e identificado como um novo sesquiterpenóide triquinano [4,5,6].

Santos *et al* (2006), em sua pesquisa, identificaram o isoafricanol como constituintes majoritário do OE das folhas de *A. tomentosa* coletadas no Rio de Janeiro, RJ, Brasil [28] e Juliani *et al* (2004) para espécie coletada na Argentina relata o *α*-bisabolol [23]. Um levantamento bibliográfico do OE de espécie do gênero *Anemia* mostra que, em sua maioria, os OE's dessas espécies apresentam compostos sesquiterpenóides como constituintes majoritários.

A investigação da atividade biológica de compostos secundários de plantas vem sendo muito estudada nas últimas décadas visando a substituição de produtos sintéticos por subprodutos de plantas medicinais, extraídos tanto dos seus óleos essenciais quanto dos seus extratos, uma vez que esses apresentam em sua composição, substâncias químicas com várias ações biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonoides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteroides, entre outras [10].

Jequié fica situada em uma região de transição de biomas, onde predominam Caatinga e Mata Atlântica nas extremidades, permeada por regiões internas uma região de mata cipó de clima semi-árido com poucas chuvas e altas temperaturas durante a maior parte do ano. É uma região circundada de montanhas não rochosa. No período do verão é comum chuvas torrenciais que torna o clima e o solo mais úmido, favorecendo o crescimento da *A. tomentosa* em afloramentos rochosos da região. Isso é observado entre a primavera e início do outono, passando por todo período do verão. A falta de chuvas e umidade, durante o maior período do ano na região afeta diretamente o crescimento da *A. tomentosa* e eleva o interesse de estudos a partir desse vegetal encontrado em poucos lugares na região e épocas no ano [11].

1.2 Biossíntese de Terpenóides

Os terpenóides constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários encontrados em vegetais. Uma das principais funções dos metabólitos secundários nas plantas é a biossíntese de estruturas complexas como os terpenóides. A biossíntese dos terpenóides (mono, sesqui, di e sesterpenóides) segue via condensação de unidades de pirofosfato de dimetila ou grupos geranila ou farnesila com uma unidade isoprênica ativa de pirofosfato de isopentenila (PPI). A condensação ocorre unindo as extremidades no sentido cabeça-cauda, seguidos de mecanismos idênticos entre si. A ligação do PPI com uma molécula PPG, pirofosfato de geranilo C_{10}, da origem ao pirofosfato de farnesilo (PPF) formado por 15 carbonos e o precursor da maioria dos sesquiterpenoides (C_{15}). Os compostos sesquiterpenos se apresentam majoritariamente com estrutura mono ou bicíclica, havendo também sesquiterpenoides tricíclicos. O PPF pode isomerizar o pirofosfato de nerolidila (PPN), substrato de várias enzimas da família das ciclases. (Fig. 2, p. 56) [12].

Os compostos do metabolismo secundário como os sesquiterpenos são responsáveis pela defesa dos vegetais, como agentes defensivos, contra predadores e em situações de estresses bióticos ou abiótico, sofridas pelos vegetais, pode desencadear a formação de diversas substâncias químicas a partir de novas rotas biossintéticas dos metabólitos primários. A diversidade estrutural de sesquiterpenóides se dá na capacidade reativa do seu precursor, o pirofosfato de farnesila (PPF). Entre os isoprenóides, os sesquiterpenos representam a maior classe

de diversificação estrutural. Possuem mais de 7000 compostos diferentes com diversas funções biológicas e hoje já se tem relatados que existem mais 300 esqueletos de sesquiterpenóides, incluindo os cíclicos, decorrentes das amplas variedades de rearranjos e biossínteses a partir do precursor PPF [13,14].

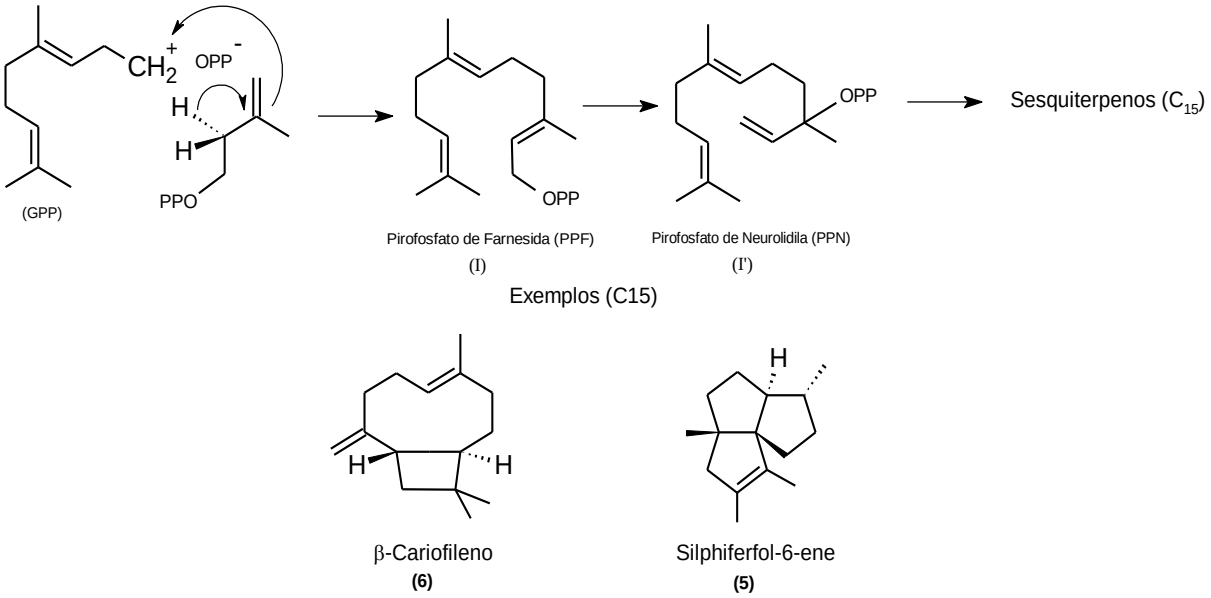


Figura 2. Biossíntese e exemplo de sesquiterpenos, adaptado de Simões *et al, (2007)*.

Os primeiros estudos de origem biossintética do esqueleto de sesquiterpenos policíclicos foi realizado por Bohlmann e seu grupo em 1980, ao observarem a frequência de compostos triquinanos em produtos naturais. Este estudo demonstrou que os alguns poliquinanos se originavam de uma via biossintética comum [15]. Bohlmann *et al* (1980) propôs que o PPF sofra policiclilização enzimática, originando o cátion cariofilenila. Hanson *et al* (1981), em trabalhos simultâneos, chegaram a via biossintética dos presilfiperfolanos através de pesquisas de RMN com o ácido mevalônico, o precursor da biossíntese dos terpenóides [16]. Estudos subsequentes, de diversos grupos de pesquisas em todo o mundo, por meio de técnicas bioquímicas, espectroscópicas e computacionais detalharam ainda mais a origem dos mecanismos biossintéticos desses sesquiterpenóides policíclicos [15].

O esqueleto do presilfiperfolano é o ponto de partida da biossíntese de diversos sesquiterpenóides. O cátion presilfiperfolanila apresenta uma estrutura de alta energia que sofre rearranjos por migrações da ligação C-C. Esses sesquiterpenóides raros em produtos naturais foram relatados, inicialmente, por Bohlmann *et al.* e Hanson. Foram os primeiros a propor uma rota biossintética para o presilfiperfolano e seus rearranjos

(Figura 3). Posteriormente, vários grupos de pesquisas estudaram esta via biossintética e agregaram informações das suas rotas biossintéticas chegando à conclusão que estes sesquiterpenoides policíclicos de esqueleto persilfiperfolano são conectados a uma mesma via biossintética. Partindo da policiclização enzimática do PPF gerando o cátion cariofenila (2), seguido da expansão do ciclobutano (3) e da ciclização do alqueno (4). Esses esqueletos de produtos naturais são importantes precursores de diversos sesquiterpenóides [16,17,18].

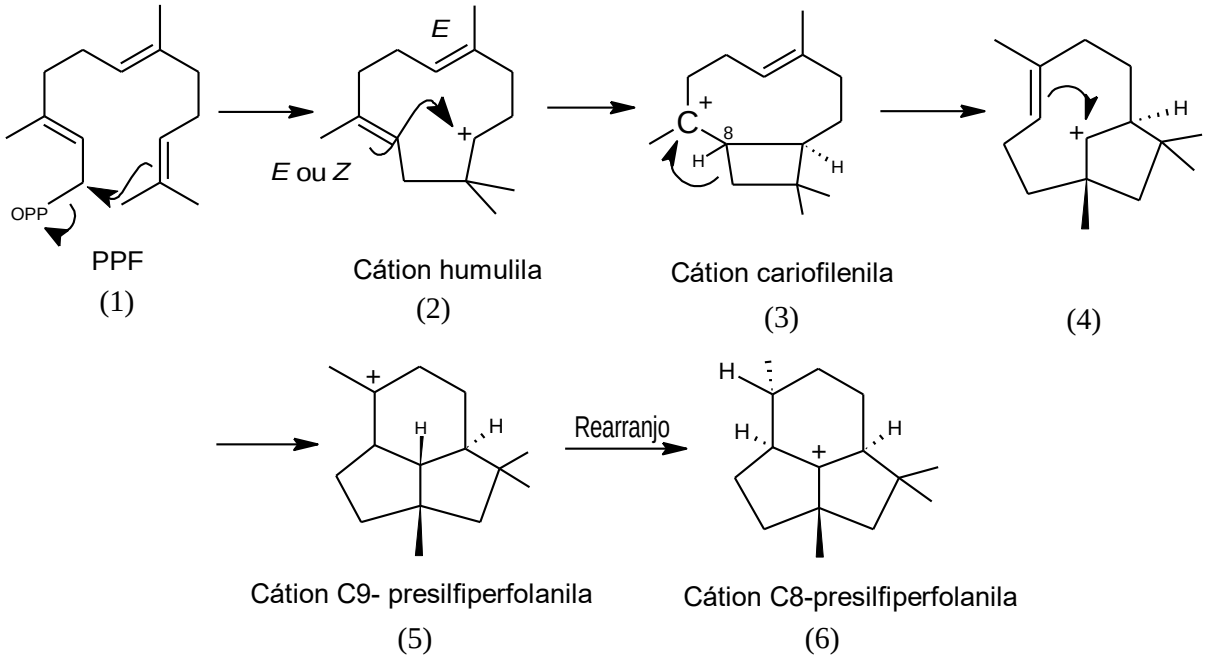


Figura 3. Primeira proposta de biossíntese do esqueleto presilfiperfolano.

Os presilfoperfolanoides foram relatados, anteriormente, para o óleo essencial de *A. tomentosa* por Pinto *et al.* (2009). Além de sua importância em fitoquímica e o grande interesse científico na síntese orgânica desse sesquiterpenóide tricíclico, os presilfoperfolanoides apresentam propriedades biológicas antibacterianas que foi descrita por Pinto *et al.* (2009) para o 9-presilfiperfolan-1-ol; atividade antialimentar para insetos relatada por Gonzalez-Coloma *et al*. (2009), assim como, propriedades antifúngicas determinada para os compostos presilfiperfolanos sintéticos [5,19,20].

O desenvolvimento de pesquisas fitoquímicas com uso de substratos vegetais vem sendo motivadas pela diversidade de substâncias ativas encontradas em plantas no intuito de explorar as propriedades medicinais, tanto dos voláteis, quanto de suas substâncias fixas. Na literatura a planta estudada apresentou poucos estudos fitoquímicos sobre sua constituição química.

Portanto, por meio de técnicas cromatográficas (cromatografia líquida, CG-EM e espectroscopia de RMN) foi realizado o estudo fitoquímico das folhas de *A. tomentosa,* bem como, o estudo biológico dos compostos fixos e voláteis desta planta, para avaliar suas propriedades antifúngicas contra sete espécies de fungos patológicos oportunistas: *Candida albicans*, *C. tropicalis, C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans.*

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a constituição química do óleo essencial e de extratos orgânicos de folhas da *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.*, bem como avaliar as ações antifúngicas desses extratos e óleo essencial contra fungos patogênicos oportunistas do gênero *Cryptococcus* e *Candida*.

2.2 Objetivos Específicos

1.1 Extrair e quantificar o óleo essencial das folhas *Anemia tomentosa* por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM) e técnicas auxiliares como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C.

1.2 Obter extrato das folhas da *A. tomentosa* e realizar fracionamento por cromatografia planar e líquida à pressão atmosférica e de media pressão (CLMP) dos extratos de folhas de *Anemia tomentosa (SAV.) Sw.*

1.3 Elucidar as estruturas dos compostos isolados ou identificados nos estudos fitoquímicos por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

1.4 Avaliar a ação inibitória sobre o crescimento de linhagens de *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.* quando submetidas às amostras de óleos essenciais e extratos alcoólicos extraídos de folhas de *Anemia tomentosa*.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Extração do Óleo Essencial de Folhas de *A. tomentosa*

Folhas de *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* foram coletadas em março de 2015 na zona rural do município de Jequié, Bahia, na região de Poços Dantas, Jequié, Bahia, (latitude -13.8575 longitude -40.0836). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o código de registro HUESB 8934.

Uma massa de 249,7 g de folhas frescas de *Anemia tomentosa (*SAV) Sw. foram limpas e trituradas. A massa foi transferida para um balão de capacidade 5 L com 500 mL de água destilada conectado a um sistema extrator tipo Clevenger. A hidrodestilação se procedeu até a obtenção do óleo essencial da *Anemia tomentosa* (OEAT). O hidrolato extraído foi seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e o óleo essencial obtido foi determinado o rendimento (mg de óleo por 100mg de material vegetal) e levado para análise.

3.2 Análises do Óleo Essencial de *A. tomentosa*

Os trabalhos foram realizados nos Laboratório de Óleo Essencial/DQE da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- UESB, sob a supervisão da Dra. Rosane Moura Aguiar e a análise química dos voláteis do OEAT foi realizado no Laboratório de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt/DQE da UESB.

A análise cromatográfica do OEAT foi conduzida em um cromatógrafo a gás, Schimadzu, modelo QP2010-SE, acoplado a um detector por espectrometria de massa (CG-EM) equipado com um detector de filtro de íons por quadrupolo simples, que opera no modo impacto eletrônico (70 eV.), ajustado com velocidade de scan (scan speed) de 1000; e detecção de fragmentos de *m/z* entre 45 para 800 Da. Foi empregada uma coluna capilar OV-5 (OVSC, Ohio, USA) de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, dotada de uma fase estacionária composta por um filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano com fenila (5%) o Hélio (CG-MS) foi utilizado como gás de arraste a 1,8 $mL.min^{-1}$. Foram utilizadas as seguintes temperaturas: injetor 220 ºC, detector 240 ºC. O aquecimento do forno/coluna foi programado para iniciar a 40 ºC (mantido por 1 min), a uma razão de 3 $ºC.min^{-1}$ até 280 ºC (permanecendo por 4 min).

O volume de injeção foi de 1µL de solução da amostra (5% em CH_2Cl_2) e divisor de fluxo (split de 1:10). A identificação de cada componente detectado foi realizada por comparação entre os espectros de massas obtidos no cromatograma de íons totais (TIC) por consulta ao banco de dados NIST 11 residente no cromatógrafo utilizado e também por dados espectrais da literatura (NIST-EUA: http://www.nist.gov/) [22], bem como pela comparação de índices cromatográficos calculados com os respectivos dados para a colunas similares a OV-5 (Adams, 2007) [21]. Os índices de retenção (IR) foram calculados aplicando os dados de análises CG-EM de OEAT e de uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C_8-C_{28}).

3.3 Estudos Fitoquímicos

Folhas de *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* foram coletadas na região de Poço Dantas de afloramentos rochoso (latitude -13.8575, longitude -40.0836), zona rural do município de Jequié, Bahia. A coleta foi realizada no dia trinta de setembro do ano de 2015. Após a coleta, as folhas passaram por processos de limpeza e separação e levadas para a extração a frio dos seus constituintes.

Uma massa de 1 Kg de folhas da *A. tomentosa* foi submetida a extração por maceração com metanol (P.A.) por um período de dez dias. Após a evaporação a pressão reduzida do solvente, obteve-se o extrato (39,8g) em metanol codificada pelo acrônimo de EMAT (Extrato Metanólico da *Anemia tomentosa*).

Uma alíquota do extrato EMAT (29,9g) foi submetida a fracionamento preliminar em coluna filtrante (C-1, sílica gel 60 70-230 Mesh), utilizando pressão reduzida para eluição da fase móvel. Foram obtidas 4 frações (F1 a F4, Tabela 1, p.62) em gradiente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Os perfis cromatográficos das frações foram obtidos por CCD.

Tabela 1. Frações obtidas na coluna 1 (C-1).

Sistema de eluentes	Frações	Massas (g)
Hexano	F1	2,0
Clorofórmio	F2	0,3
Acetato de Etila	F3	2,1
Metanol	F4	20,7

Cromatografia líquida da fração em hexano de C-1.

A fração F1 (2,0g) após análise por CCD foi submetida a fracionamento por uma coluna de cromatografia líquida (C-2), CCL (ϕ= 2,6 cm) empacotada com 72g de sílica gel 60 da qual coletou-se 54 frações de 15 mL cada, eluída em gradiente de polaridade, utilizando eluentes formados por hexano:acetato de etila nas seguintes proporções: 10:0; 9:1; 8:2; 7:3 e 1:1. Em seguida, as frações de C-2 foram agrupadas (G-1 a G-8) segundo o perfil cromatográfico obtido por CCD.

Purificação do grupo G8 (41 a 54).

A purificação das frações 41 a 54 de C-2 (79,4 mg) foi feita por cromatografia líquida (C-3) tipo *flash*, em uma coluna (ϕ= 15,0 mm) empacotada com sílica (230-400 Mesh) e eluída com hexano:acetato de etila (9:1). Foram coletadas 56 frações de 5 mL analisadas por CCD e agrupadas. O grupo (G-4a) contendo as frações 44 a 50 de C-3 forneceu um sólido branco com massa de 19 mg que, ao ser levado para análise em CG-EM, foi identificado como sendo o ácido graxo hexadecanóico (**22**).

Cromatografia líquida da fração em acetato de etila de C-1.

Parte da fração em acetato de etila (F3, 1,2636g) de folhas de *A. tomentosa.* Foi fracionada por CCL (C-4) em uma coluna (ϕ=35 mm) empacotada com sílica gel 60 (70-230 Mesh), utilizando o gradiente de polaridade mostrado na Tabela 2 (p.63). Foram coletadas 95 frações de 10 mL cada.

Tabela 2. Frações obtidas da coluna 4 (C-4).

Sistemas de eluição	Frações
Hexano 100%	1-9
Hexano: AcOEt [9,5: 0,5]	10-28
Hexano: AcOEt [9:1]	29-67
Hexano: AcOEt [8:2]	68-90
Hexano: AcOEt [7:3]	91-96

A partir das frações 37 a 39 de C-4 foi obtida uma substância oleoso de coloração amarela (4,6mg) solúvel em diclorometano e clorofórmio. A análise da cromatoplaca indicou ser uma substância pura. Esse grupo de frações foi submetida a análise espectroscópicas de infravermelho (IV), CG-EM e RMN.

3.4 Análises Cromatográficas

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para a determinação do perfil fitoquímico e como critério de pureza por meio da visualização de uma única mancha na cromatoplaca utilizando eluentes de diversas polaridades e ao menos dois reveladores. As cromatoplacas foram preparadas utilizando-se uma suspensão de sílica gel Merck 60 em água na proporção de 7g de sílica para 17 mL de água, sobre suporte de vidro formando uma camada de 0,25 mm de espessura. Após a secagem em temperatura ambiente, tais placas forma levadas ao aquecimento por cerca de 60 minutos a 100ºC, para serem ativadas. Como reveladores foram utilizados luz ultravioleta, iodo e pulverização de vanilina etanólica 1% com ácido sulfúrico 10% nas proporções de 1:1 v/v, seguida de aquecimento a 100ºC.

Na cromatografia líquida em coluna, sob pressão atmosférica, foi utilizada sílica gel Merck 60 (70-230 Mesh), adotando a proporção média de 1,0g de extrato para 30-50g de fase estacionária para o empacotamento das colunas. Nas colunas cromatográficas utilizadas para purificação de frações foi utilizado uma proporção 70-100g de fase estacionária (sílica Flash 250-400 Mesh) para cada 1g de amostra. Os solventes utilizados no processo de fracionamento e purificação foram todos de grau analítico (P.A.) e previamente destilados quando necessário.

3.5 Análise Espectroscópicas

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi obtido utilizando o espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, instalado no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do Departamento de Química da UESB. Esse espectro foi obtido pelo método da refletância atenuada, submetendo 1,0 mg de amostra ao feixe de radiação do aparelho.

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE DRX-400 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, UFMG. Como referência interna foi utilizado o sinal do tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e suas constantes de acoplamento (*J*), em Hertz (Hz). Os solventes deuterados utilizados encontra-se indicado em cada caso.

As análises por CG-EM de amostras foram obtidos nas seguintes condições: Equipamento Shimadzu com coluna capilar OV-5 (OVSC, Ohio, USA) de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, com filme de 0,25 µm/ polidimetilsiloxano-fenila (5%) e fluxo de gás de arraste (He) a 1,8 $mL.min^{-1}$. Foram aplicadas as seguintes temperaturas: 290 ºC no injetor, 290 ºC no detector e programação de aquecimento do forno/coluna entre 70 ºC (por 1 min) a 5 $ºC.min^{-1}$ até 290 ºC (20 min). O volume de injeção de cada amostra (5% em $CH2Cl_2$) 1µL e divisor de fluxo de 1:20. A identificação dos componentes detectados foi realizada segundo o método descrito acima e consultas a literaturas específicas [4,21,22,23].

3.6 Avaliação da Atividade Biológica

Ensaios para avaliar atividade antifúngica do óleo essencial e do extrato metanólico da *Anemia tomentosa* (OEAT, EMAT) foram realizados no Laboratório de Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia/ ICB da Universidade Federal de Minas Gerais sob a supervisão da Profa. Susana Johann.

Micro-organismos utilizados

O extrato e o OE foram testados contra *C. albicans* (SC5314), *C. tropicalis* (ATCC 750*), C. krusei* (ATCC 20298), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *Cryptococcus gattii* (ATCC 24065) e *C. neoformans* (ATCC 24067). Estas leveduras encontram-se mantidas em ultrafreezer a – 80 °C.

Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 24 horas, a 35°C em 5 mL de solução salina estéril. A suspensão resultante foi agitada por 15s e a densidade celular foi ajustada pelo método espectrofotométrico a uma concentração final de 1,5-1,0 x103 células/mL (CLSI, 2008).

Teste da Concentração Mínnima Inibitória(CMI)

O teste de CMI foi realizado seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). Assim, o extrato e o OE foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640. As diluições testadas foram de 500-0,97 µg/ml. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, Detroid, MI, USA). O controle de crescimento e esterilidade foi constituído de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e como controle de toxicidade do solvente foi utilizado o meio RPMI acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração correspondente em cada experimento. O fluconazol foi incluído como controle positivo do antifúngico. O controle negativo foi composto por 200 µL de meio de cultura. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 ou 72 horas (48 h para leveduras do gênero *Candida* e 72 h para o gênero *Cryptococcus*) e a leitura foi realizada visualmente, sendo que a CMI foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle.

4.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Óleo Essencial *A. tomentosa*

O óleo essencial das folhas da *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado e apresentou um rendimento de 0,4% w/w para folhas frescas. A *Anemia tomentosa* é uma espécie muito aromática, não observado o uso etnobotânico dessa espécie na região de Jequié-Bahia. Estudos anteriores sobre óleos essenciais de *A. tomentosa, A. radiana, A. hirstuta* mostraram rendimentos de 0,2% [23], 0,04% e 0,03% [1], respectivamente. As folhas desta samambaia possuem um aroma característico com tons de mentol e madeiras. Pinto *et al* e Juliani *et al* atribuíram o aroma do OE de *A. tomentosa* a presença de compostos sesquiterpênicos [4,23].

As análises por CG-EM e RMN (Apêndices A e B) permitiram a identificação de 21 constituintes para o OEAT, conforme mostrado no cromatograma TIC na Figura 4 (p. 67) e na Tabela 3 (p.68), incluindo os índices cromatográficos. Foram identificados como compostos majoritários para o OEAT os sesquiterpenóides: *(–)*-presilfiperfolan-1*β*-ol (35,53%, **10**), presilfiperfolan-*8α*-ol (15,19%, **16**), silfiperfol-6-eno (14,04%, **5**), o (*β*)-cariofileno (6,72%, **6**) e presilfiperfol-7-eno (5,20%, **2**). De modo geral, o OEAT apresentou uma predominância em sesquiterpenos oxigenados com 61,10% e 30,90% de hidrocarbonetos sesquiterpenos. Interessante observar que os conteúdos dos compostos majoritários perfazem 76,68% do total de OEAT.

A identificação dos voláteis por similaridade dos espectros pela biblioteca NIST 11 não foi eficiente para o OEAT, por se tratar de sesquiterpenóides incomuns. Foi necessário identificar tais compostos por comparação da fragmentação iônica por espectrometria de massa (EM) em bibliotecas específicas [21;22], índice de retenção (IR) em bibliotecas específicas [4;21;22;23] e a comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C RMN das substâncias com seus deslocamentos já descritos na literatura (Tabela 4, p. 69). A análise preliminar do espectro de ^{13}C RMN de OEAT mostrou um conjunto de sinais com intensidades relativas as suas áreas em TIC permitindo a identificação, também, por concentração.

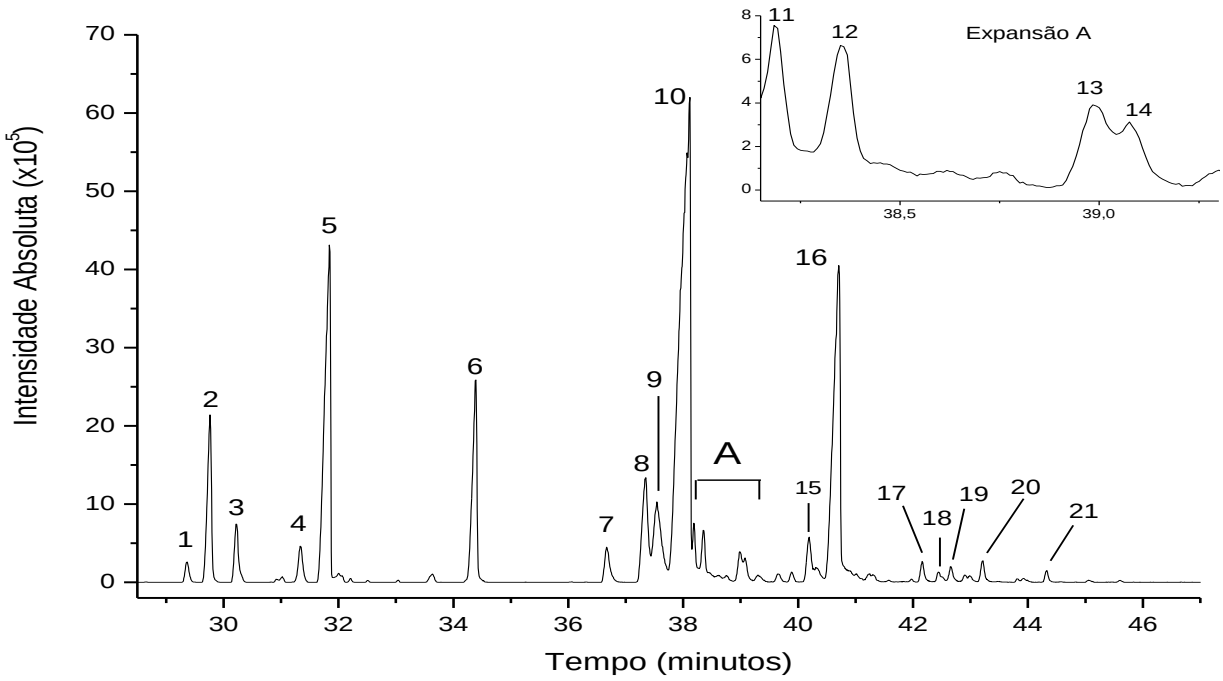


Figura 4. Cromatograma parcial de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de OEAT. Condições: Coluna OV-51, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila (5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 280 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

A análise do espectro de RMN ^{13}C de OEAT apresentou sinais de deslocamentos químicos de carbonos em regiões características de carbonos hidrogenados de sesquiterpenos álcoois [32], o sinal de carbono em *δ* 84,90 (C-1) foi atribuído ao *(-)*-presilfiperfolan-1*β*-ol (**10**) substância majoritária do OEAT; o sinal em *δ* 97,11, atribuído a C8 de **16,** (segunda substância de maior concentração); um sinal *δ* 89,69 (C-7); um em *δ* 81,51(C-4) e um sinal *δ* 76,09 (C-9) referentes aos sesquiterpenos oxigenados presilfiperfolan-8*α*-ol (**16**), cameroonan-7α-ol (**9**), neopsan-4-ol (**12**) e presilfiperfolan-9*α*-ol, respectivamente. Utilizando essa metodologia foi possível identificar os carbonos olefínicos dos constituintes **1, 2, 3, 6** conforme mostrado na Tabela 4 (p.69). Os demais sinais de RMN de ^{13}C dos constituintes contidos na Tabela 3 (p.68) foram observados na análise detalhada dos espectros de RMN ^{13}C e ^{1}H (Apêndice A e B).

Tabela 3. Composição química do óleo essencial da *A. tomentosa.*

PICOS	IR Cal.	IR Lit.	COMPOSTO		A%	Identificação*
1	1327	1328	**Silfiperfol-5-ano**	SH	0,6	RMN, IR, EM
2	1334	1336	**Presilfiperfol-7-ano**	SH	5,2	RMN, IR, EM
3	1343	1348	**7-*epi*-Silfiperfol-5-ano**	SH	1,8	RMN, IR, EM
4	1363	1367	**Isolongifolano**	SH	1,2	IR, EM
5	1372	1378	**Silfiperfol-6-ano**	SH	14,0	IR, EM
6	1428	1421	**(*β*)-Cariofileno**	SH	6,7	RMN, IR
7	1479	1482	***α*- Muuroleno**	SH	1,3	IR
8[a]	1503	ND	**ND**		4,6	
9	1516	1511	**Cameroonan-7*α*-ol**	SO	4,5	RMN, IR, EM
10	1517	1518	**(–)-Presilfiperfolan-1*β*-ol**	SO	35,5	RMN. IR, EM
11[b]	1528	ND	**ND**		1,1	
12	1531	1531	**Nopsan-4-ol**	SO	1,0	RMN, EM, IR
13	1544	1547	**Silfiperfolan-6*β*-ol**	SO	0,9	EM, IR
14[c]	1545	ND	**ND**		0,6	
15	1567	1577	**Prenopsan-8-ol**	SO	1,1	IR
16	1577	1584	**Presilfiperfoln-8*α*-ol**	SO	15,2	RMN, EM, IR
17	1628	1627	**1-*epi*-Cubenol**	SO	0,6	IR
18	1633	1633	**(*E*)-Sesquilavandulol**	SO	0,4	IR
19	1637	1640	**Cariofila-4(14),8(15)-dien-5-α-ol**	SO	0,4	IR
20	1649	1648	**Guaia-3,10(14)-dien-11-ol**	SO	0,6	IR
21	1671	ND	**Longipinocarvona**	SO	0,3	IR
			Total		**97,73**	
			Sesquiterpenos		**92,00**	
			Sesquiterpenos Hidrogenados (SH)		**30,90**	
			Sesquiterpenos Oxigenados (SO)		**61,10**	

$IR_{Calc.}$= Índice de Retenção calculado pela equação de Kolvets (Admas, 2007). $IR_{Lit.}$= Índice de Retenção da literatura. A%= Porcentagens fornecidas pelo CG-EM. ND= Não determinado. a) m/z 222; (b) m/z 222; (c) m/z 204; (*) Referencias [4;21;22;23].

Na identificação do composto **5,** foi necessário a análise da fragmentação do espectro de massa, devido à falta de informação na literatura dos dados de deslocamento químico de RMN de ^{13}C. O silfiperfol-6-eno exibiu o íon molecular $[M^+]$ em *m/z* 204.10 o que confirma a formula molecular $C_{15}H_{24}$ e indica que este íon/fragmento é precursor dos íons em *m/z* 175 ($[M^+]$ - C_2H_5, pico base) em *m/z* 189 ($[M^+]$ - CH_3; 24%), em *m/z* 147 ($[M^+]$ - C_4H_9; 61%) e em *m/z* 122 ($[M^+]$ - C_4H_{10}; 87%) corroborando com os fragmentos relatados anteriormente por Bohlmann e Jakufovic (1980) para esse composto [18].

O OEAT apresentou uma rica e incomum coleção de sesquiterpenos biologicamente tangenciados a mesma via biossintética. Os primeiros estudos para a determinação da origem de sesquiterpenos policíclicos, tais como esses triquinanos infrequentes foram realizados por Bohlmann e Jakufovic (1980), os quais forneceram

relevantes informações sobre a origem biossintética da classe dos presilfiperfolonóides [18]. Esses mecanismos biossintéticos foram refinados em diversos estudos subsequentes realizados por outros grupos de pesquisas, utilizando técnicas bioquímicas, espectroscópicas e computacionais. Com base nesses estudos a Figura 5 (p.71) sumariza as rotas biossintéticas dos sesquiterpenoide constituites em OEAT.

Tabela 4. Atribuições de sinais de RMN de ^{13}C de OEAT a carbonos olefínicos e oxigenados pertencentes a alguns constituintes deste OE.

RMN (δ_C)	NC	Composto	Referências
133,11 e 142,43	C5 e C6	**1**	[18]
131,55 e 161,07	C8 e C7	**2**	[26]
133,46 e 140,80	C5 e C6	**3**	[18]
112,37 e 154,18	C13 e C8	**6**	[16]
124,38 e 135,93	C5 e C4	**6**	[16]
89,69	C7	**9**	[16]
84,90	C1	**10**	Este estudo
81,51	C4	**12**	[24]
97,11	C8	**16**	[16]

(NC=Número do carbono), estruturas Figura 5 (p.71).

Conforme a Figura 5 (p.71) a rota biossintética dos sesquiterpenos de OEAT tem início com uma molécula de PPF (I), a qual sofre policiclização enzimática para formar o cátion cariofilenila, precursor da classe dos cariofilenos. A ciclização que envolve o acoplamento de C1-C11 gerando o cátion humulila (II), seguida pela ciclização entre C2 e C10 leva ao cátion cariofenila (III), esse cátion ao ser desprontonado forma o *β*-cariofileno (**6**). A desprotonação, seguindo de rearranjos de **6,** promovem a formação do cátion C9-presilperfolanila (V), o qual também pode ser originado via cátion cariofenila (III), a partir da reação de deslocamento 1,2 (Wagner-Meerwein) no anel ciclo butano para formar o cátion (IV), dotado de um anel ciclo pentila. Uma subsequente ciclilização do cátion (IV), ocorrida com o ataque esterioespecífico da dupla ligação ao cátion ciclopentila (C8), leva a formação do novo cátion triquinano (V) onde o hidrogênio ligado a C8 fica na posição pra cima do plano da molécula (*β*). Este cátion (V) sofre múltiplas reações de rearranjo, hidratação e de eliminação as quais produzem os demais compostos sesquiterpenóides constituintes de OEAT. A obtenção de diferentes substâncias a partir do mesmo cátion

presilfiperfolanila (V), destaca a importância deste na via biossintética dos sesquiterpenos em produtos naturais [15-18, 23-27].

Este estudo corroborou com os dados encontrados na literatura que indicaram a predominância de sesquiterpenóides incomuns no óleo essencial das folhas de *Anemia tomentosa*. Na caracterização do óleo essencial de *a. tomentosa,* Pinto *et al* (2007, 2009) chegaram aos seguintes compostos majoritários além do *epi*-presilfiperfolan-1-ol (30,6%): silfiperfol-6-ene (14,7%) e presilfiperfolan-8-ol (8,3%) [4,6]. Dentre outros estudos para o óleo essencial de *Anemia tomentosa* de espécies brasileiras descritos, Pinto *et al.* (2009) verificaram a presença de um sesquiterpeno oxigenado como constituinte majoritária para duas amostras de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* que apresentou em análises por CG-EM, 31,2 % e 30,6% em área, mas não foram capazes de serem identificados permitindo apenas a determinação da massa molecular *m/z* 222 dos compostos [5]. A elucidação estrutural deste composto teve continuidade por combinação de análise de difração de raio-X em cristal e análise espectral de voltametria cíclica (VCD) cominando no *(-)-(1S,4S,7R,8R,9S)-9-epi*-presilfiperfolan-1-ol [29] sendo sua estrutura posteriormente corrigida por Stoltz e Hong (2012) [27].

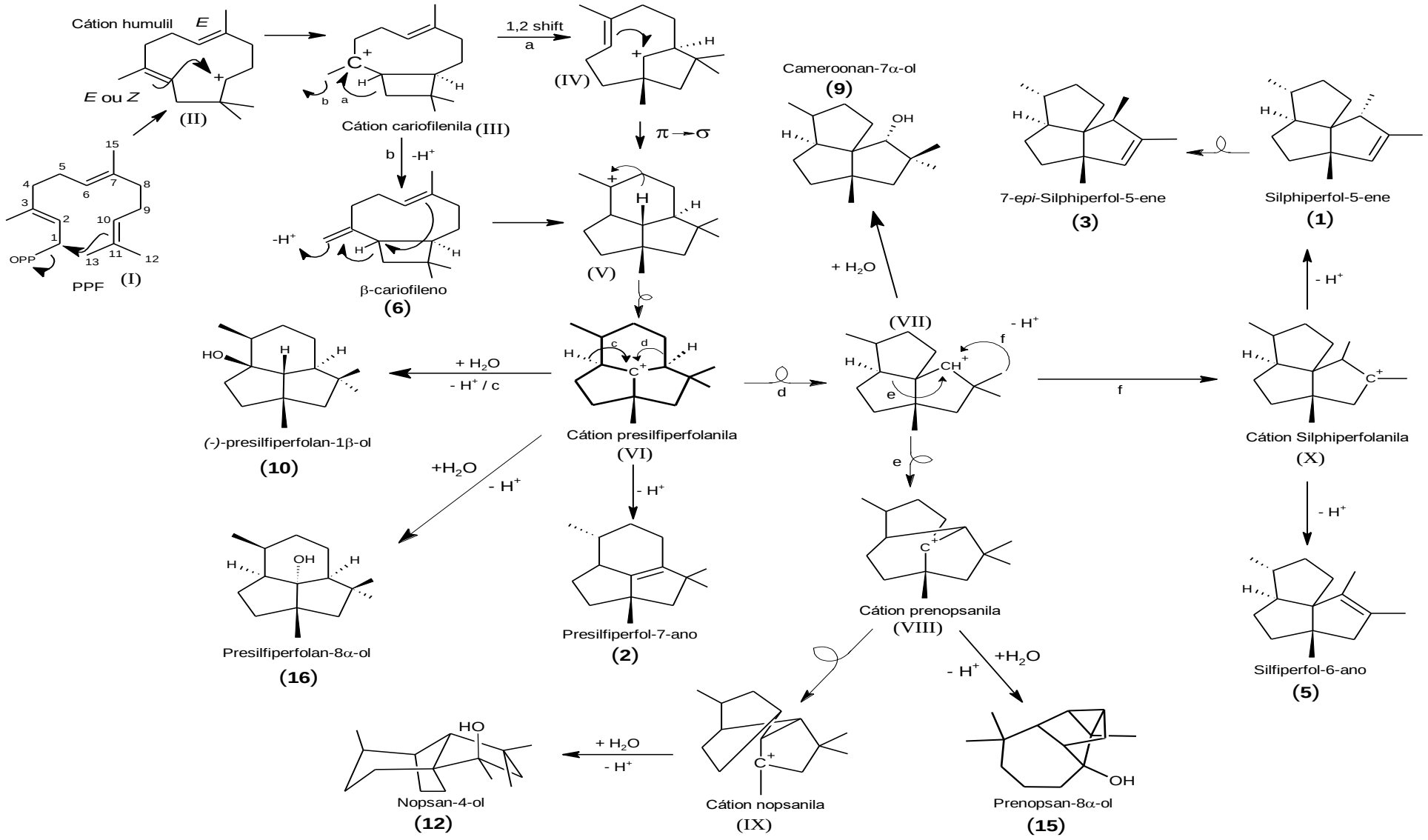


Figura 5. Rota biossintética dos sesquiterpenóides presentes no OEAT. (As letras *a, b, c, d, e, f* são sub-rotas), adaptado de [15-18, 23-27].

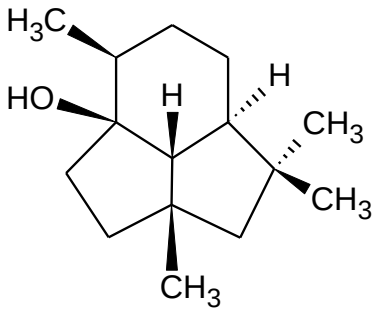
4.2 Estudo Fitoquímico do Extrato das Folhas de *A. tomentosa.*

A fração em clorofórmio (F2) e fração em metanol (F4) após análise por CCD, foram consideradas impróprias para fracionamento. A fração F2 apresentou uma complexidade elevada, além de possuir pouco material e a fração F4, foi considerada impropria para o fracionamento em sílica gel fase normal devido à alta polaridade e complexidades reveladas por CCD. Essas frações foram reservadas para estudos posteriores. Já as frações em hexano (F1) e a fração em acetato de etila (F3) foram submetidas a processos de isolamentos das substâncias presentes.

As frações 47 e 48 obtidas da coluna de fracionamento da F3 (fração em AcEtO) forneceu um óleo amarelo-esverdeado, solúvel em diclorometano e clorofórmio, que após análise em CG-EM foi identificado pela biblioteca NIST 11 (*match* 79%) como sendo um diterpeno com esqueleto similar ao do ácido pimárico. As análises por RMN de ^{1}H e ^{13}C não foram conclusivas para a elucidação completa desse composto. A elucidação estrutural foi deixada para estudos posteriores.

Utilizando métodos cromatográficos e espectrométricos, foram identificadas e elucidas as estruturas de 2 constituintes químicos obtidos a partir de extratos das folhas de *A. tomentosa* o presilfiperfolan-1β-ol (**10**) e o ácido hexadecanóico (**2**).

4.2.1 Presilfiperfolan-1*β*-ol (10)



(10)

Figura 6. Estrutura proposta para o sesquiterpeno **10** (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol.

O constituinte **10** foi isolado do fracionamento por cromatografia líquida da fração em acetato de etila (F3) de folhas da *A. tomentosa.* Esse composto se apresentou viscoso, de cor amarela e solúvel em solventes clorados. Análise por CCD,

10, usando a mistura de eluentes hexano: acetato de etila [9:1], originou uma única mancha (Figura 7) de cor púrpura (RF em ~0,5) ao ser revelada em vanilina ácida 1%. O isolado apresentou atividade óptica rotatória $[\alpha]_D^{25}$ -52,00° (25°C, c 2.0, $CHCl_3$) e sua estrutura foi determinada através de análises dos dados de IV, CG-EM e de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D, corroborando com a literatura [5;15;18;27;29].

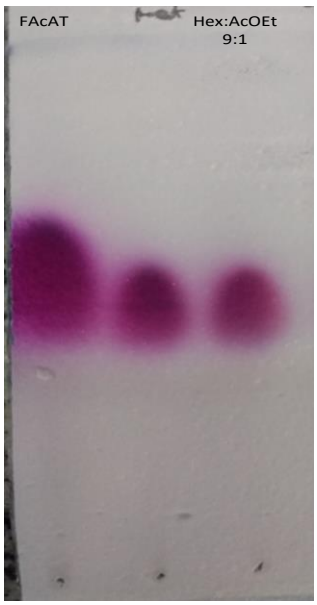


Figura 7. Fotografia eletrônica, cromatoplaca CCD em sílica gel 60G em triplicata, utilizando como eluentes a mistura Hex:AcOEt (9:1 v/v) e revelada em vanilina alcóolica 1% e ácido sulfúrico 5% (1:1 v/v), R_f= 0,5.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **10** (Figura 8, p.74) apresentou uma banda de absorção em 3458 cm^{-1} que indicou a presença do grupo hidroxila de álcool, confirmada pela presença de bandas na região de impressão digital entre 1130- 1035 cm^{-1} característica de deformação angular δ(O-H). Também foram observadas absorções centradas em 2960 a 2840 cm^{-1} (υ CH) que foram atribuídas a estiramentos C-H de grupos CH_2 e CH_3 confirmadas pela presença das bandas de deformação angular desses grupos em 1456 e 1369 cm^{-1}, indicando que **10** trata-se de um composto alifático hidroxilado [30].

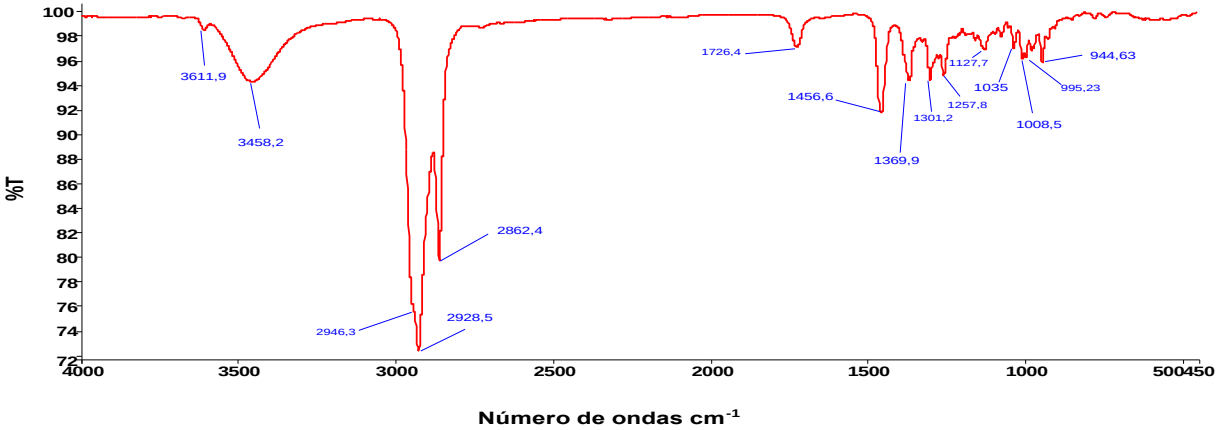


Figura 8. Espectro de absorção do composto **10** na região do infravermelho, em ATR- FTIR.

A comparação com a literatura dos dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C e HMBC forneceram informações que ajudaram na determinação do composto **10** [5,27,29]. Sendo a elucidação estrutural de **10** confirmada mediante a obtenção de dados espectrais COSY e NOESY, inéditos para este composto.

As análises dos espectros de RMN ^{13}C e do DEPT-135 (Figura 10, p.77) e a comparação com os dados da literatura [5;15;27] permitiram a observação de dois sinais de carbonos quaternários (C4, δ_C 46,04; C6, δ_C 40,43), quatro grupos metilas (C12, δ_C 22,16/C13, δ_C 28,59/C14, δ_C 31,06/C15, δ_C 15,42), cinco metílicos (C2, δ_C 39,48/C3, δ_C 42,25/C5, δ_C 59,12/ C10, δ_C 29,63/C11, δ_C 19,91) e três metínicos (C7, δ_C 51,51/C8, δ_C 63,67/C9, δ_C 36,52). O espectro também apresentou um sinal em δ_C 85,03 típico de carbono quaternário hidroxilado, sinal característico de álcoois, atribuído ao carbono C1.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 9, p.76) apresentou valores de deslocamentos químicos de hidrogênios na região de hidrocarbonetos alifáticos onde foram observados dois singletos δ_H 0,82 (H-12) e δ_H 0,94 (H-13), atribuídos a duas metilas, ambas ligadas ao carbono C6, um singleto a δ_H 1,23 (H-14), referente a uma metila ligada ao carbono C4 e um sinal dupleto metílico atribuível aos hidrogênios da metila H-15 em δ_H 0,96 (*d*, *J*= 7.0 Hz, 3H) ligada ao carbono C9. A análise espectral de RMN de ^{1}H e do mapa de contorno HSQC permitiram atribuir três sinais em: δ_H 1,26 (*m,* 1,24 – 1,29, 1H), δ_H 1,64 (*d*-largo*, J*=8,5 Hz, 1H) e δ_H 1,84 (*m*, 1,82 – 1,87, 1H), os quais foram dos grupos metínicos C7, C8 e C9, respectivamente. Dez sinais de RMN de ^{1}H em δ_H 1,74 (*ddd*-largo, *J*=12,5, 8,5, 1,5 Hz, 1H), δ_H 2,00 (*dtd-largo, J*=12,5, 3,5, 3,5 Hz, 1H), δ_H 1,65 (*m*, 1,61 - 1,69, 1H), δ_H 1,80 (*m,* 1,75 – 1,85, 1H), δ_H

1,50 (*m,* 1,47 – 1,52, 1H), δ_H 1,52 (*m,* 1,50 – 1,56, 1H), δ_H 1,27 (*m,* 1,24 – 1,30, 1H), δ_H 1,48 (*m,* 1,44 – 1,51, 1H), δ_H 1,24 (*m,* 1,18 – 1,30, 1H), δ_H 1,42 ((*m,* 1,36 – 1,47 1H), correspondem aos hidrogênios metilênicos de C2, C3, C5, C10 e C11 (Tabela 5).

Tabela 5. Dados espectrais de ^{1}H e ^{13}C em RMN, com auxílio das demais técnicas, do composto **10** em $CDCl_3$ (400 MHz para RMN de ^{1}H e 100 MHz para RMN ^{13}C, δ em ppm, *J* em Hz).

Nº.	δ C, tipo	δ_H[multiplic., *J* (Hz)]	HMBC (H-C)	COSY	NOESY
1	85,03, C-OH				
2	39,48, CH_2	*α:* 2,00 (*dtd*-l, *J*=12,5, 3,5, 3,5 Hz, 1H)	3	2*β*, 3*α*, 9 (w)	H-2*β*, H-7, H-9, $C\underline{H}_3$-15
		β: 1,74 (*ddd, J*=12,5, 8,5, 1,5 Hz, 1H)	1,3,4,8	2*α*, 3*β*	H-2*α*, H-3*β*, $C\underline{H}_3$-14
3	42,25, CH_2	*α*: 1,65 (*m*, 1,61 - 1,69, 1H)	2, 5	2*α*, 3*β*	H-3*β*
		β: 1,80 (*m*, 1,75 - 1.85, 1H)	2,4,14	3*α*, 2*α*	H-2*β*, H-3*α*, $C\underline{H}_3$-14
4	46,04, C				
5	59,12, CH_2	*α*: 1.50 (*m,* 1,47 – 1,52, 1H)	12,14	13, 14	$C\underline{H}_3$-13, $C\underline{H}_3$-14
		β: 1.53 (*m*, 1,50 – 1,56, 1H)	3,4,11,12,13,14	3*β*(w), 12	$C\underline{H}_3$-14
6	40,43, C				
7	51,51, CH	1,26 (*m,* 1,24 – 1,29, 1H)	4,8,11,12	8, 11*α*, 13	H-2*α*
8	63,67, CH	1.64 (*d*-largo, *J*=8,5 Hz, 1H)	1,2,4,5,11,14	3*β*(W), 7, 11*α*	H-10*β*, H-11β, CH_3-14
9	36,52, CH	1,84 (*m*, 1,82 – 1,87, 1H)	1,8	15, 10*β*, 11*α* (W)	H-2*α*, H-10*α*, H-10*β*, $C\underline{H}_3$-15
10	29,63, CH_2	*α:* 1,48 (*m*, 1,44 – 1,51, 1H)	7	10*β*	H-9
		β: 1,27 (*m*, 1,24 – 1,30, 1H)	11	9, 15	H-8, H-9
11	19,91, CH_2	*α:* 1,42 (*m*, 1,36 – 1,47 1H)	7,8,10	7, 8, 9, 11*β*	H-13
		β: 1,24 (*m,* 1,18 – 1,30, 1H)	7	8, 10*α*	H-8, $C\underline{H}_3$-12, $C\underline{H}_3$-15
12	22,16, CH_3	0,82 (*s*-l, 3H)	5,6,7,13	5, 7, 13	$C\underline{H}_3$- 11, $C\underline{H}_3$- 13, $C\underline{H}_3$- 14
13	28,59, CH_3	0,94 (*s*-l, 3H)	5,6,7,12	12	H-5*α*, H*α*- 11, $C\underline{H}_3$-12
14	31,06, CH_3	1,23 (*s*-l, 3H)	3,4,5,8	5α, 3*β*	H-2*β*, H-3*β*, H-5*α*, H-5*β*, H-8, $C\underline{H}_3$- 12
15	15,42, CH_3	0,96 (*d, J*=7,0 Hz, 3H)	1,9,10	9	H-9, H-11*β*

(w)= conformação em w. *s*-l: Singleto largo; *d*-l: dupleto largo; *dtd*-l duplo tripleto duplo largo.

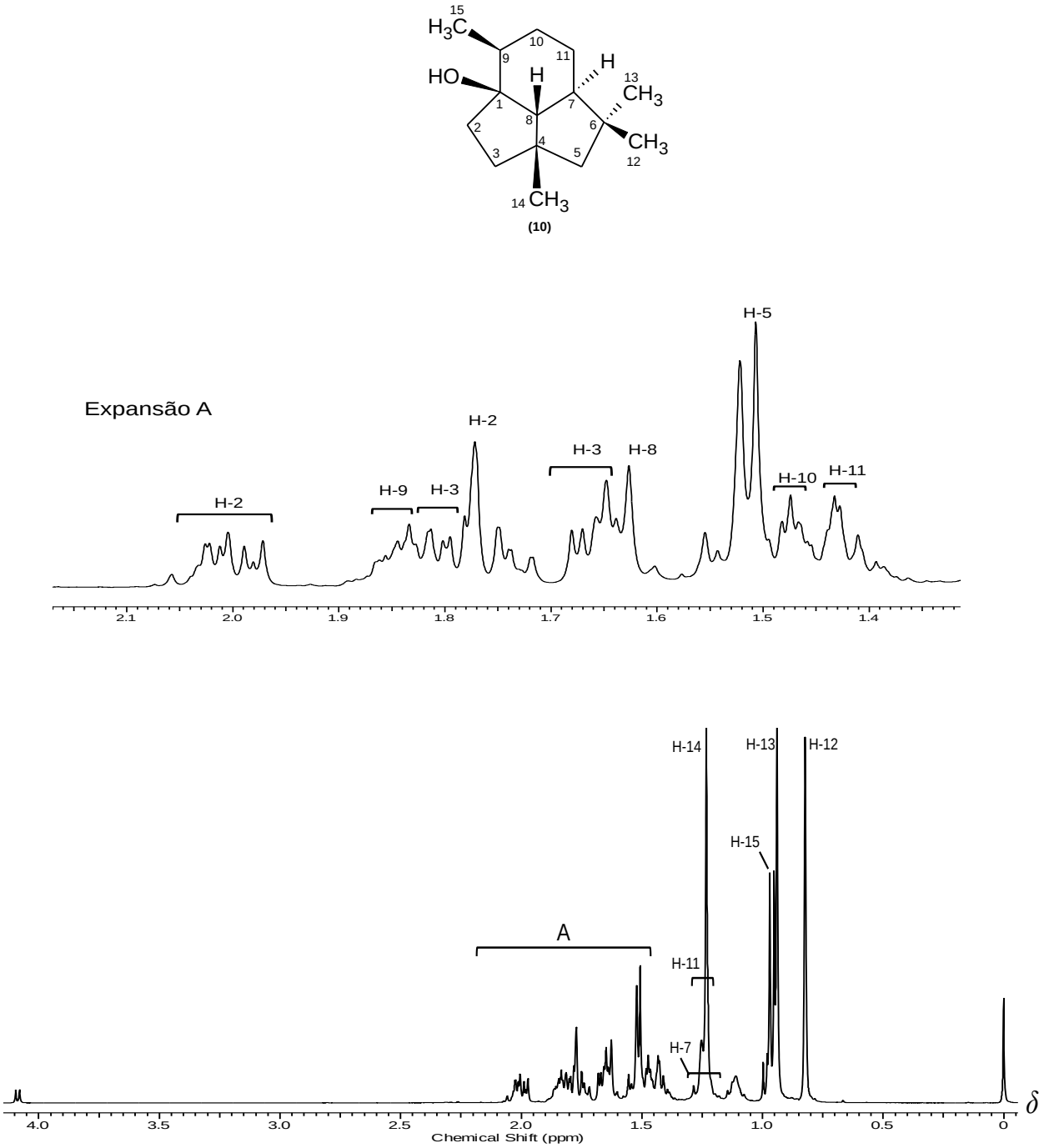


Figura 9. Espectro de RMN de ^{1}H de **10.** ($CDCl_3$, 400MHz)

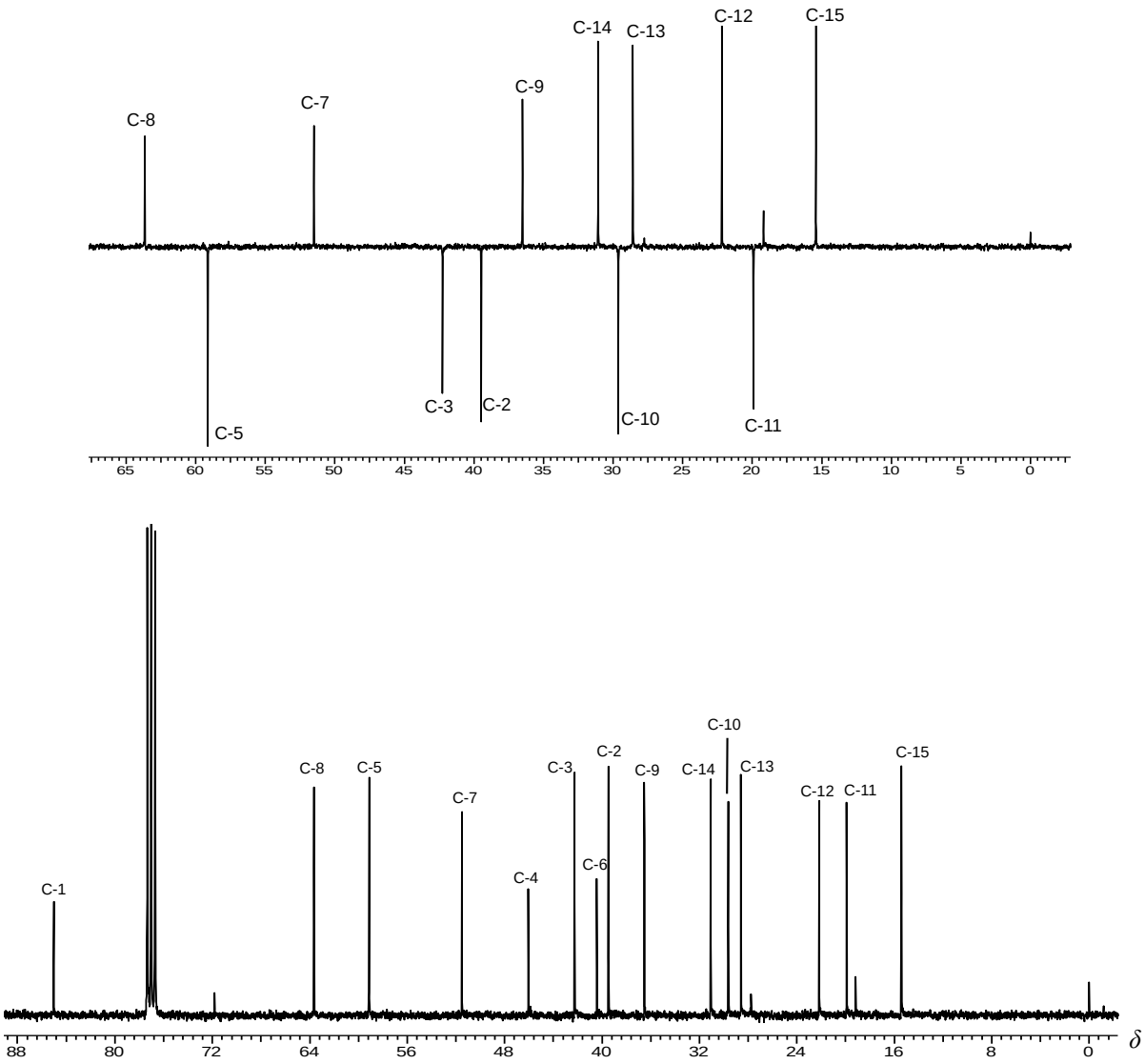


Figura 10. Espectros de RMN ^{13}C (a) e (b) DEPT-135 de **10.** ($CDCl_3$, 100MHz).

A análise do espectro COSY (Apêndice F, p. 99) mostrou que a estrutura do composto **10** apresentava um único sistema de *spin* com importantes acoplamentos $^{2\text{-}4}J_{H\text{-}H}$ que contribuíram à identificação de várias conectividades entre os quinze átomos de carbono que formam o complexo esqueleto de três anéis conjugados do sesquiterpeno 10. O mapa de contornos COSY mostrou que o sinal do hidrogênio metínico H-8 em δ_H 1,64 (*d*-l, *J*=8,5 Hz) acoplou com o sinal vicinal de H-7 em δ_H 1,26 (*m*, 1,24-1,29 ppm); H-8 também apresentou acoplamento de longo alcance ($^4J_{H\text{-}H}$) com o sinal de H-2*β* em 1,74 (*ddd*, *J*=12,5; 8,5; 1,5 Hz). O acoplamento via 4 ligações ocorreu devido a conformação em W formada pelos átomos H8-C8-C1-C2-H2*β* [32]. Geralmente, o valor da constante de acoplamento $^4J_{HH}$ ocorre entre 1-2 Hz, o efeito desse acoplamento foi observado no espectro de RMN de ^1H de **10** por um discreto

efeito de alargamento dos sinais de H*β*. Na análise conformacional do composto **10**, onde foi utilizado o software Perch-NMR (University of Kuopio, Finlândia, http://www.perchsolutions.com/) foi possível confirmar a conformação-W descrita acima, bem como prever outras possibilidades de acoplamentos do mesmo tipo no esqueleto rígido de **10**, como por exemplo, a ocorrência de $^4J_{HH}$ entre H-9 (*m*, δ_H 1,84) e H-11α (*m*, δ_H 1,42). Prosseguindo com a análise do espectro COSY, foi observado que o sinal de H-2α em δ_H 2,00 (*dtd*-l, *J*=12,5; 3,5; 3,5 Hz) acoplou fortemente com o sinal em 1.74 (*ddd*, *J*=12,5; 8,5; 1,5 Hz) de H-2*β* e este último acoplou com os sinais de H-3*β* e H-3α em δ_H 1,80 (*m*, 1,75-1,85 ppm) e δ_H 1,65 (*m*, 1,61-1,69 ppm), respectivamente. O espectro COSY mostrou que o grupo metila (H-15), situado em C-9, ressonando em δ_H 0,96 (*d*, *J*=7,0 Hz), acoplou unicamente com o sinal de H-9 em δ_H 1,84 (8, 1,82-1,87 ppm) e H-9 acoplou com os sinais de H-10α (δ_H 1,48) e com H-11α (δ_H 1,42), sendo esta última do tipo $^4J_{HH}$ como previsto na modelagem molecular. Os sinais dos grupos metilas H-12 e H-14 apresentaram moderados acoplamentos $^{2-3}J_{HH}$ COSY uteis para atribuir conectividades entre os átomos dos dois anéis de cinco membros do sesquiterpeno 10. O sinal de H-12 em δ_H 0,82 (*s*-l, 3H) mostrou acoplamentos de baixa magnitude (1-3 Hz) com os sinais em δ_H 1,53 (*m*, 1,50 – 1,56 ppm, H-5*β*) e em δ_H 0,94 (*s*-l, 3H, H-13). O singleto largo (*s*-l) em δ_H 1,23 (H-14) também acoplou fracamente com o sinal de H-5*β* (*m*, δ_H 1,53) e com o sinal em δ_H 1,80 (H-3*β*). A Tabela 5 mostra as correlações observadas na análise do espectro COSY de **10**.

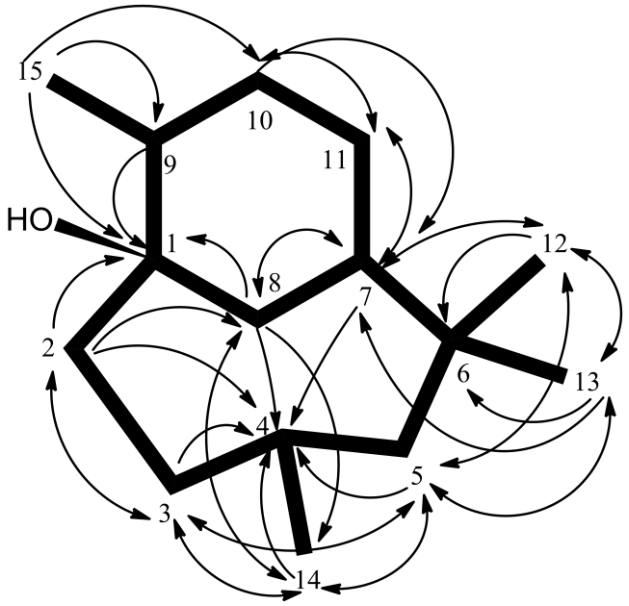


Figura 11. Principais correlações observadas nos mapas de contornos de RMN-2D ($CDCl_3$, 400 MHz e 100 MHz). COSY (linhas cheias) e HMBC (linhas com sestas) de **10**.

As correlações através de acoplamentos heteronucleares de duas e três ligações ($^{2\text{-}3}J_{CH}$) observadas no espectro HMBC (Apêndice C, p.96 e Tabela 5, p. 75) permitiram encontrar importantes conectividades entre átomos de carbono que contribuíram para a elucidação da estrutura do composto **10**. O sinal de hidrogênio do grupo metila Me-15 em 0,96 (*d*, *J*=7,0 Hz) apresentou correlações com os sinais de carbono em δ_C 85,03 (C1), δ_C 36,52 (C9) e δ_C 29,63 (C10). O multipleto H-9 em δ_H 1,84 (*m*, 1,82 – 1,87) também mostrou correlação $^3J_{CH}$ com o sinal de C8 (δ_C 63,67) e de C1 (δ_C 85,03), assim como, os dois multipletos mitilênicos relativos a H-10 em δ_H 1,27 (*m*, 1,24-1,30, H-10*β*) e 1,48 (*m*, 1,44-1,51, H-10α) mostraram acoplamentos com os sinais em δ_C 19,91 (C11) e 51,51 (C7), respectivamente. No mapa de contornos HMBC foram observadas correlações entre o sinal de H-2*β* em δ_H 1,74 (*ddd*, *J*=12,5; 8,5; 1,5 Hz) com os sinais dos carbonos C1 (δ_C 85,03), C3 (δ_C 42,25), C4 (δ_C 46,04) e C8 C8 (δ_C 63,67) e ainda correlações HMBC entre o sinal de H-11α (δ_H 1,42) com C7 (δ_C 51,51), C8 (δ_C 63,67) e C10 (δ_C 29,63), assim como o sinal de H-11*β* (δ_H 1,24) acoplou com δ_C 51,51 (C7). Foram observadas outras correlações significativas entre o sinal de H-8 em δ_H 1,64 (*d*-l, *J*=8,5 Hz) com os sinais dos carbonos de C1 (δ_C 85,03), C4 (δ_C 46,04), C11 (δ_C 19,91) e C14 (δ_C 31,06). O sinal em δ_H 1,23 (*s*-l) de H-14 mostrou correlações HMBC com os sinais dos carbonos C3 (δ_C 42,25), C4(δ_C 46,04), C5 (δ_C 59,12) e C-8 (δ_C 63,67). As correlações $^{2\text{-}3}J_{CH}$ HMBC e os acoplamentos $^{2\text{-}4}J_{HH}$ COSY descritos acima permitiram encontrar as conectividades C-C da estrutura de **10**, principalmente entre os seis átomos de carbonos da porção ciclohexano (C1, C8, C7, C11, C10 e C9). Além disso, as correlações descritas acima permitiram localizar a conexão do grupo hidroxila em C1 e atribuir aos carbonos C-1, C-4, C-7 e C-8 como átomos localizados em cabeças de ponte, sendo C-8 o átomo central da molécula, aquele que estabelece as conexões comuns aos três anéis da estrutura de **10**. As análises dos espectros COSY e HMBC permitiram também atribuir a localização dos grupos metilas, Me-14, Me-15 e Me-12/Me-13 em C-4, C-9 e C-6, respectivamente.

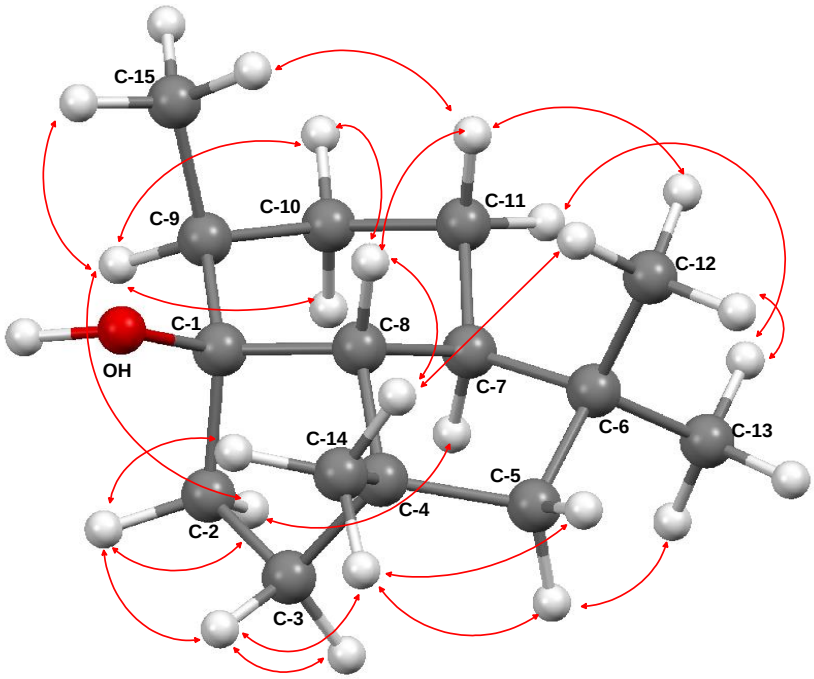


Figura 42. Principais correlações NOE observadas no experimento NOESY de **10** ($CDCl_3$, 400 MHz). O modelo molecular 3D foi construído com otimização energética pelo método Merck Molecular Force Field (MMFF94) com base em campos de força avançados utilizando o programa MMS da Perch NMR, V. 2014.

A análise do espectro NOESY ajudou a confirmar as atribuições feitas a partir dos dados dos mapas de contornos COSY e HMBC quanto à correta estereoquímica do composto **10**. Devido a posição central do hidrogênio H-8 na estrutura molecular e por critérios biogenéticos (ver Figura 5, p.71), o lado da molécula que contém H-8 foi considerado como sendo beta (*β*), por conseguinte, a face oposta a H-8 foi considerada como o lado alfa (α). O sinal de H-8 em δ_H 1,64 (*d*-l, *J*=8,5 Hz) apresentou correlações NOE com os sinais de H-5*β* (*m*, δ_H 1,53), H-11*β* (δ_H 1,24), H-12 (*s*-l, δ_H 0,82) e H-14 (*s*-l, δ_H 1,23). O sinal em δ_H 1,26 (*m*, H-7) não mostrou correlação com H-8, indicando que H-7 está do lado alfa da molécula; por outro lado, H-7 acoplou com o sinal em δ_H 2,00 (*dtd*-l, *J*=12,5, 3,5, 3,5 Hz) que foi atribuído a H-2α. Além disso, o sinal de H-2α, juntamente com os sinais em 0,96 (*d*, *J*=7,0 Hz, H-15), em δ_H 1,27 (m, 1,24-1,30, H-10) e δ_H 1,48 (*m*, 1,44-1,51) se correlacionaram com o sinal em δ_H 1,84 de H-9 (*m*), permitindo confirmar a atribuição desses três últimos sinais como pertencentes a H-15 e aos H's metilênicos de H-10α e H-10*β*, respectivamente. Os acoplamentos NOE do sinal de H-9 com os sinais dos hidrogênios do grupo CH_2-10, bem como as correlações COSY apresentadas por H-9, indicaram que este hidrogênio

se encontrava em posição α-equatorial na porção cicloexano em forma de cadeira, logo, a metila H-15, ligada em C-9, se localizava em posição *β*-axial e H-7 (*m*, δ_H 1,26) estava na posição α-axial e localizado em *trans*-1,4 em relação a H-15 na outra extremidade da cadeira do anel. A correlação NOE de H-7 e H-9 com H-2α corroboraram estas atribuições. A estrutura molecular de energia mínima do composto **10**, obtida mediante o estudo conformacional utilizando o software Sistema de Modelagem Molecular (MMS) da suíte Perch-NMR (www.perchsolutions.com) e os dados de RMN indicaram que o sesquiterpeno **10** é formado por três anéis conjugados, sendo um de seis átomos em conformação de cadeira e dois anéis de cinco membros em forma de envelope. A estrutura 3D obtida é mostrada na Figura 12 (p. 80) com as principais correlações NOESY detectadas. A Tabela 5 e a Figura 12 mostram os dados de RMN de ^{13}C e ^{1}H, bem como as correlações COSY, HMBC e NOESY observadas. Os Apêndices C, E e F constam os espectros de RMN 2D obtidos nesse estudo.

A análise do composto **10** por CG-EM levou a confirmação da estrutura da substância. O cromatograma de íons totais (TIC, Figura 13), obtido por análise em CG-EM de **10,** apresentou um único pico com um t_r= 20,081 min. A análise do EM associado ao pico mostrou o íon molecular $[M]^+$ em *m/z* 222.050 (Figura 14, p.82) e o íon-fragmento em *m/z* 207.050 (19,7%) foi atribuído a $[M–CH_3]^+$ e o fragmento em *m/z* 189.050 (3%) foi atribuído após a perda de $[M-CH_3OH]^+$. Aos fragmentos em *m/z* 123 (100%), *m/z* 151 (88,1%), *m/z* 97 (69,8%), *m/z* 166 (63,4%), *m/z* 165 (56,7%), *m/z* 41 (58,7%) foram atribuídos os fragmentos mostrados na Figura 14 (p.82). A consulta ao banco de dados de EM da biblioteca, não possui o espectro da substância relativo ao composto **10**, não sendo possível a identificação do mesmo por similaridade dos espectros.

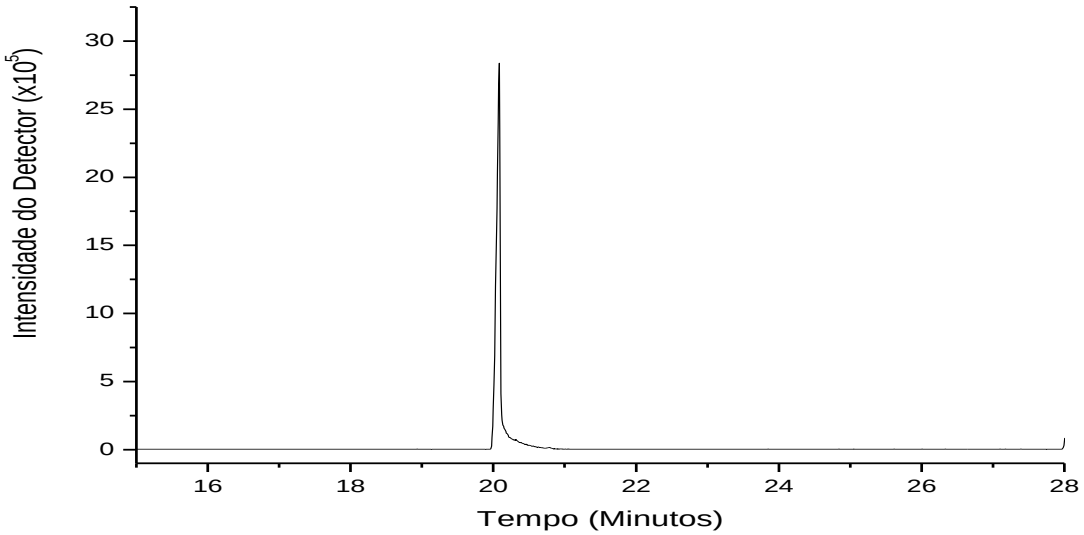


Figura 53. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **10**. Condições: Coluna OV-5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila (5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 70 °C, final até 290 °C por 20 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

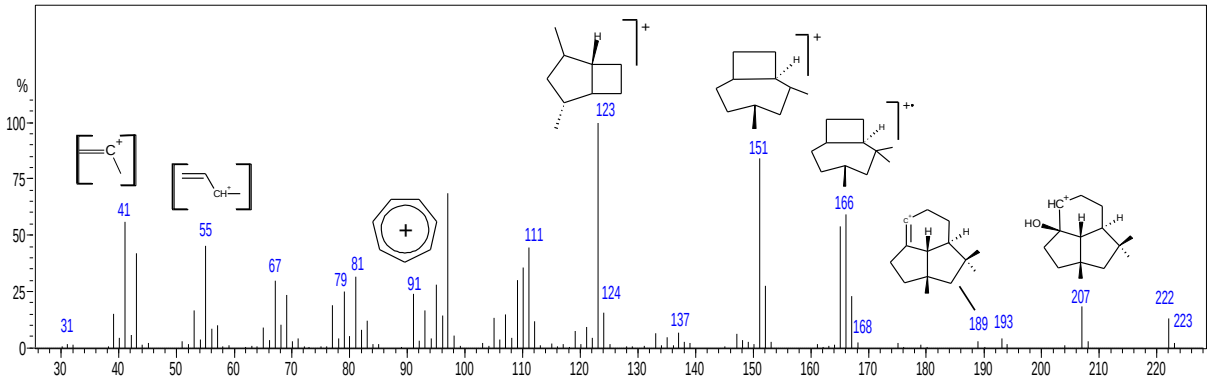


Figura 64. EM associado ao pico em t_R= 20,081 min do TIC de **10** e seus respectivos fragmentos.

A detecção do íon molecular [$M^{+\cdot}$] em *m/z* 222.05 obtido no EM, permitiu atribuir a formula molecular $C_{15}H_{26}O$ para o sesquiterpeno **10.** A estrutura correta deste composto também isolado de *Anemia tomentosa*, quanto a estereoquímica e configuração absoluta, foi relatada anteriormente por NATAN, *et al* (2010) utilizando técnicas de raios raio-X e espectroscopia VCD [29].

Neste estudo foi confirmado a presença da substância **10** no OEAT com base em análises por CCD (Figura 15) e comparação dos dados de espectrométricos de EM e RMN de ^{1}H e ^{13}C. No espectro de RMN de ^{1}H e ^{13}C de OEAT os sinais com maior intensidade foram atribuídos ao composto **10**, o que indicou que esse metabólito

estava presente tanto no óleo essencial como no extrato em acetato de etila das folhas de *A. tomentosa*. Os resultados das análises espectrais e a comparação com os dados da literatura permitiram identificar o composto **10** como sendo o sesquiterpeno (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol (Figura 7, p.72).

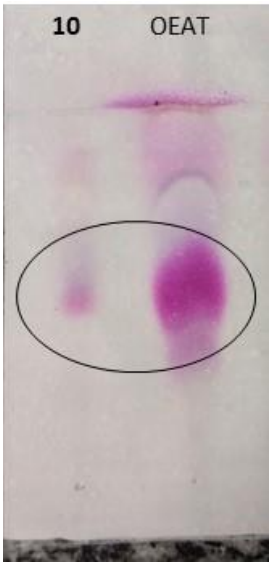
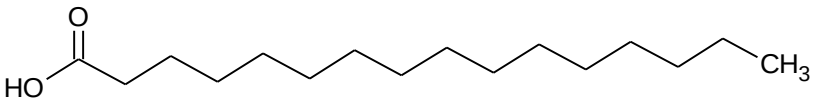


Figura 75. Fotografia eletrônica da cromatoplaca CCD de amostras de **10** e OEAT, em sílica gel 60G, R_f= 0,5, eluida com Hex:AcOEt (9:1 v/v) e revelada por vanilina sulfúrica (1%).

4.2.2 Ácido hexadecanóico



(**22**)

A partir da fração em hexano (F1) da *A. tomentosa* foram realizados dois procedimentos de fracionamento que levaram ao isolamento do ácido hexadecanóico, obtendo um composto sólido, branco e opaco. A análise por CG-EM da amostra, Figura 16 (p. 84), identificadou por similaridade na biblioteca NIST 11 o composto **22** como o ácido hexadecanóico.

O ácido graxo saturado hexadecanóico ou ácido palmítico é um dos ácidos mais comuns em plantas e animais. É uma substância citotóxica [31].

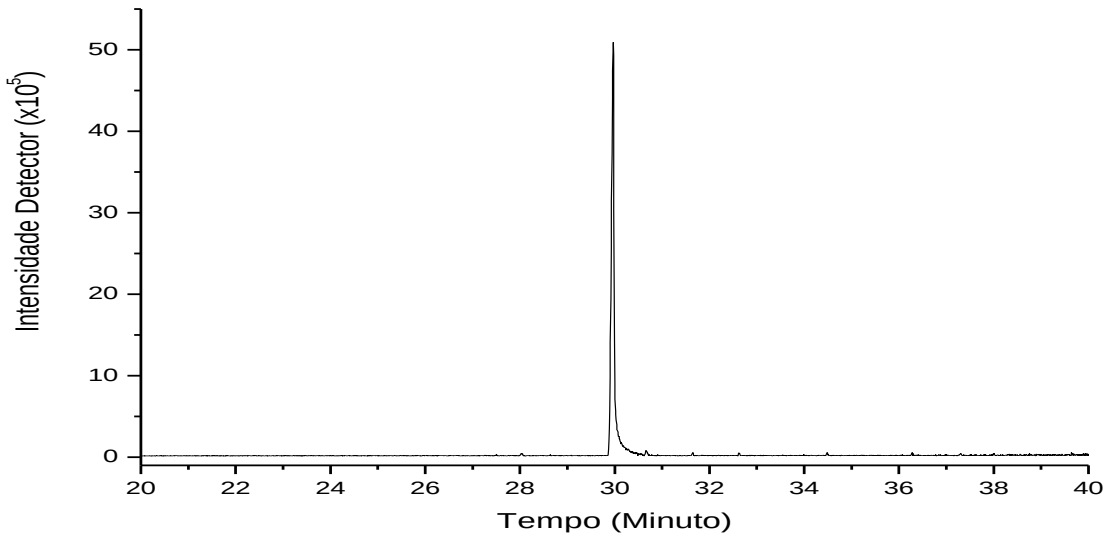


Figura 86. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **22**. Condições: Coluna OV-5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano com fenila (5%, OVSC, USA). Temperaturas: coluna: Inicial a 70 °C, final até 290 °C por 20 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

O cromatograma de íons totais (TIC, figura 16) adquirido por CG-EM exibiu um pico em um tempo de retenção de t_r= 29,968 min. O espectro de massa (Figura 17, p.85) deste pico apresentou as seguintes fragmentações *m/z* 43 (100%, pico base), *m/z* 73 (87,87%), *m/z* 41 (82,18%), *m/z* 60 (76,19%), *m/z* 57 (61,85%). Os valores desses íons coincidem com os da literatura para o ácido hexadecanóico tanto para o banco de dados NIST 11 residente no cromatógrafo que apresentou 96% de similaridade, quanto para outros bancos de dados [21,22]. A figura 18 (p.85) traz a proposta de fragmentação para os principais íons por espectrometria de massas por impacto de elétrons (EM-IE).

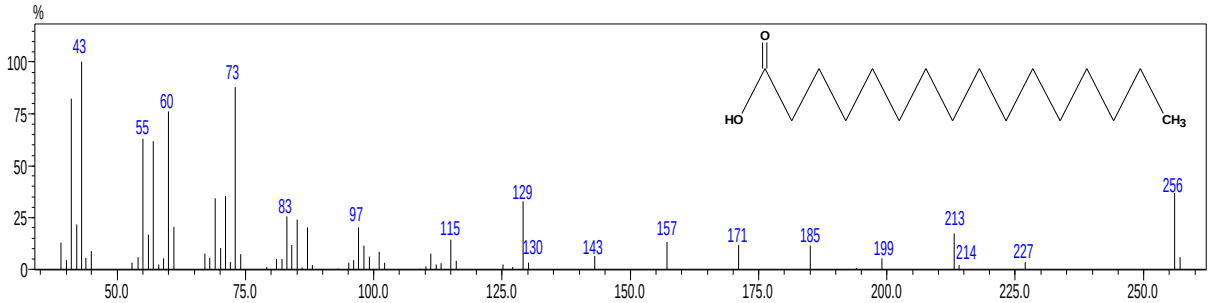


Figura 97. EM associado ao pico de t_R= 29,968 min do TIC de **22**.

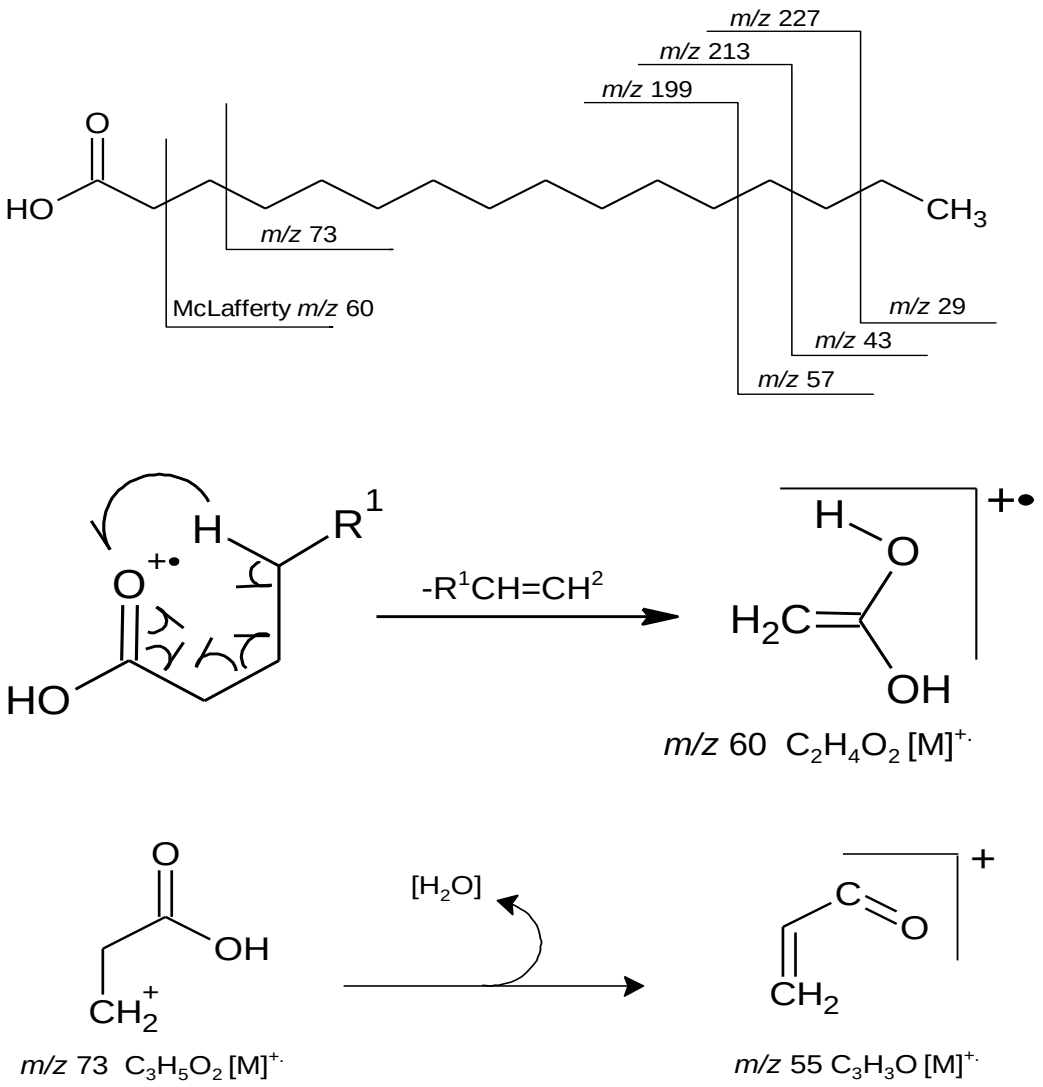


Figura 108. Principais picos da fragmentação do ácido hexadecanóico.

4.3 Ensaio Biológico do Óleo e extratos de *A. tomentosa*.

No ensaio para estabelecer a atividade antifúngica do OEAT, do extrato (EMAT) e da fração metanólica (FMAT) das folhas de *A. tomentosa* foi medido o grau de resistência ou sensibilidade de *Candida spp e Cryptococcus spp,* frente as amostras testadas mediante a determinação da CMI. Dos resultados descritos na Tabela 6 (p.86) pôde se observar que o EMAT apresentou CMI de 125 μg mL^{-1} contra os fungos *C. gatti e C. neoformans* e FMAT demonstrou um CMI de 125 μg mL^{-1} diante da espécie de *C. neoformans*. Já frente a cepas de *Candida spp* foram obtidos valores pouco expressivos para se considerar esses extratos como antifúngico contra espécies de *Candida spp.*

O resultado da atividade fungicida para o OEAT descrito (Tabela 6) apresentou valores de CMI igual ou superior a 500 µg mL^{-1} mostrando assim que este óleo foi inativo frente as sete espécies de fungos testados indicando que o mesmo não foi capaz de inibir o crescimento das leveduras.

Tabela 6. Concentração Mínima Inibitória de extratos e óleo essencial de folhas da A. tomentosa (µg mL-1) contra espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.

Levedura/Substância	**EMAT** µg.mL^{-1}	**FMAT** µg.mL^{-1}	**OEAT** µg.mL^{-1}	**Controle Fluconazol** (µg.mL^{-1})
Candida albicans	>500	>500	>500	**0,125**
C.glabrata	>500	>500	>500	**4,0**
C. tropicalis	>500	>500	>500	**2,0**
C. parapsilosis	>500	>500	>500	**1,0**
C.krusei	>500	>500	>500	**32,0**
Cryptococcus gatti	125	250	>500	**2,0**
Cryptococcus neoformans	125	125	500	**2,0**

EMAT- Extrato bruto metanólico de *A. tomentosa;* FMAT- Fração Metanólica de *A. tomentosa*; OEAT- Óleo Essencial da *A. tomentosa*.

5.0 CONCLUSÃO

O estudo químico das folhas de uma espécie de *Anemia tomentosa* (SAV.) *Sw.* coletadas na região, levou a identificação de 21 sesquiterpenos incomuns no óleo essencial sendo os sesquiterpenos *(–)*-presilfiperfolan-1*β*-ol (35,53%), presilfiperfolan-8α-ol (15,19%) e silfiperfol-6-eno (14,04%) os constituintes majoritários, correspondendo a 64,76% do OEAT. O estudo fitoquímico das folhas levou ao isolamento do sesquiterpeno (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol e do ácido hexadecanóico. Este é o primeiro registro de isolamento do sesquiterpeno (-)-presilfiperfolan-1*β*-ol do extrato metanólico de *Anemia tomentosa*, antes apenas isolado do óleo essencial dessa planta. Os resultados obtidos no estudo químico-farmacológico de folhas da *Anemia tomentosa* reforçam os dados científicos existente para essa planta como também originam novos conhecimentos relativos aos constituintes químicos presentes nos extratos metanólicos que não apresentou atividade antifúngica frente a linhagens de *Candidas spp.* e uma atividade moderada contra *Cryptococcus gatti e C.neoformans* promovendo incrementos relativos a atividade biológica. O óleo essencial da *A. tomentosa*, quimicamente rico em sesquiterpenos, apresentou uma atividade fungicida moderada conforme previsto na literatura, mas se destaca com um grande potencial para a indústria de fragrâncias devido a presença dos sesquiterpenos. As contribuições fornecidas por este estudo são significativas para as áreas de Química dos Produtos Naturais como de Farmácia, pois o constituinte químico identificado e isolado das folhas da *A. tomentosa* ainda não foi descrito para o extrato da *A. tomentosa* apenas para o óleo essencial.

6.0 PESPECTIVAS

O presente estudo atendeu o objetivo inicial da dissertação e devido ao grande potencial da *Anemia tomentosa* é necessário a continuidade de novos estudos químicos e biológicos que contribuirão no desenvolvimento de novas tecnologias a partir desse material vegetal.

No estudo realizado foi identificado apenas constituintes dos extratos em hexano e em acetato de etila, sendo importante isolar mais compostos puros desses extratos e elucidar as estruturas, como também, dos extratos em fases mais complexas e polares. Diante disso, novos estudos sobre as atividades biológicas e as ações farmacológicas dos compostos isolados poderão ser realizados. Em parceria com graduandos de farmácia, desenvolver um produto usando o OEAT, devido ao seu potencial odorífero, na área de cosméticos e fragrâncias.

Enfim, existe necessidade de novos estudos químicos e farmacológicos sobre os compostos isolados e o OE da espécie de *A. tomentosa* encontrada na região de Jequié-Ba.

7.0 REFERÊNCIAS

[1] SANTOS, M. G., KELECOM, A., PAIVA, S. R., MORAES, M. G., ROCHA, L., & GARRETT, R. Phytochemical studies in pteridophytes growing in Brazil: A review. **American Journal of Plants Sciences Biotechnology**, v.4, n.1, 113-125, 2010.

SANTOS, M. G., FERNANDES, C. P., TIETBOHL, L. A. C., GARRETT, R., LOBO, J. F. R., KELECOM, A., & ROCHA, L. Chemical Composition of Essential Oils from Two Fern Species of Anemia. **American Fern Journal**, v.103, v.4, 215-224, 2013.

[2] ERIK GOTFREDSEN. **A guia incompleta das plantas medicinais**. Liber Herbarum II. Disponível em: http://www.liberherbarum.net/Pn7277.HTM. Acessado em: 24 mar. 2017.

[3] SANTOS, M. G., & SYLVESTRE, L. D. S. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.115-124, 2006.

[4] PINTO, S. C., LEITAO, G. G., DE OLIVEIRA, D. R., BIZZO, H. R., RAMOS, D. F., COELHO, T. S., LEITAO, S. G. Chemical composition and antimycobacterial activity of the essential oil from Anemia tomentosa var. anthriscifolia. **Natural product communications**, v.4, n.12, 1675-1678, 2009a.

[5] PINTO, S. C., LEITÃO, G. G., BIZZO, H. R., MARTINEZ, N., DELLACASSA, E., DOS SANTOS, F. M., LEITÃO, S. G. *(−)-epi*-Presilphiperfolan-1-ol, a new triquinane sesquiterpene from the essential oil of Anemia tomentosa var. anthriscifolia (Pteridophyta). **Tetrahedron Letters**, v. 50, n.33, 4785-4787, 2009b.

[6] PINTO, S. C., LEITÃO, G. G., BIZZO, H. R., OLIVEIRA, D.R., LEITÃO, S. G. Isolamento do silfiperfol-6-eno do óleo essencial de *Anemia tomentosa* por cromatografia em camada preparativa de gel de sílica impregnada com $AgNO_3$. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina,** v. 5 n.1-2, p.65, 2007.

[7] MARTINEZ, G. J. Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento Santa María, provincia de Córdoba, Argentina. **Acta Farmacéutica Bonaerense,** v.24, v.4, p.575, 2005.

[8] DEMO, M., OLIVA, M. D. L. M., LÓPEZ, M. L., ZUNINO, M. P., & ZYGADLO, J. A. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. **Pharmaceutical biology,** v. 43, n.2, p.129-134, 2005.

[9] GILLIJ, Y. G., GLEISER, R. M., & ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource technology**, v. 99, n.7, p. 2507-2515, 2008.

[10] DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L.C. (Ed.). Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar. São Paulo: Universidade Paulista, 1996. p.109-127.

[11] SANTOS, M.C dos. ***Formação continuada para professores de ciências biológica e o ensino sobre o bioma caatinga***. 2013. 183. Dissertação (Mestrado em Educação Científica e Formação de Professores do Programa de pós-graduação) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2013.

[12] SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia:da planta ao medicamento.** Editora UFRGS, Porto Alegre, 6.ed, 2007, p. 1104.

[13] ASADOLLAHI, M. A., MAURY, J., MØLLER, K., NIELSEN, K. F., SCHALK, M., CLARK, A., & NIELSEN, J. Production of plant sesquiterpenes in Saccharomyces cerevisiae: effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. **Biotechnology and bioengineering**, v.99, n.3, p. 666-677, 2008.

[14] DICKSCHAT, J. Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. **Natural product reports**, v. 28, n. 12, p.1917 -1936, 2011.

[15] HONG, A. Y.; STOLTZ, B.M.; Biosynthesis and Chemical Synthesis of Presilphiperfolanol Natural Products. **Angewandte Chemie International Edition,** v.53, p. 2-15, 2014.

[16] BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON; H.; Eriolanolides, eudesmanolides and a rearranged sesquiterpene from eriophyllum species. **Phytochemistry,** v. 20, p. 2239 – 2244**,** 1981.

[17] HANSON, J. R.; The biosynthesis of some sesquiterpenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 53, n.6, p. 1155 – 1162, 1981.

[18] BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; Neue sesquiterpen-kohlenwasserstoffe mit anomalen kohlenstoffgerüst aus Silphium-arten. **Phytochemistry,** v.19, n.2, p.259-265, 1980.

[19] GONZÁLEZ-COLOMA, A.; VALENCIA, F.; MARTÍN, N.; HOFFMANN, J. J.; HUTTER, L.; MARCO, J. A.; REINA, M. Silphinene sesquiterpenes as model insect antifeedants. **Journal of chemical ecology**, v.28, n.1, p.117-129, 2002.

[20] COLLADO, I. G.; ALEU, J.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Synthesis and antifungal activity of analogues of naturally occurring botrydial precursors. **Journal of chemical ecology**, v.20, n.10, p.2631-2644, 1994.

[21] ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy.** 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 469 p.

[22] LISTROM, P.J.; MALLARD, W.G. **NIST Chemistry WebBook**, NIST standard reference database number 69. Disponível em: http://webbook.nist.gov/chemistry. October- January 2016-2017.

[23] JULIANI, H. R., ZYGADLO, J. A., SCRIVANTI, R., DE LA SOTA, E., & SIMON, J. E. The essential oil of Anemia tomentosa (Savigny) Sw. var. anthriscifolia (Schrad.) Mickel. **Flavour and fragrance journal**, v.19, n.6, p. 541-543, 2004.

[24] WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SEELMANN, I.; & JAKUPOVIC, J.; Cameroonane, prenopsane and nopsane, three new tricyclic sesquiterpene skeletons. **European journal of organic chemistry**, v.6, p.1205-1212,1998.

[25] MELCHING, S; KÖNIG, WILFRIED A. Sesquiterpenes from the essential oil of the liverwort Conocephalum conicum. **Phytochemistry**, v. 51, n. 4, p. 517-523, 1999.

[26] COATES, R. M., HO, Z., KLOBUS, M., WILSON, S. R. Stereochemistry and reactions of presilphiperfolanol: a branch point marker in triquinane sesquiterpene biogenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 39, p. 9249-9254, 1996.

[27] HONG, A. Y.; STOLTZ, B. M.; Enantioselective Total Synthesis of the Reported Structures of (−)-9-epi-Presilphiperfolan-1-ol and (−)-Presilphiperfolan-1-ol: Structural Confirmation and Reassignment and Biosynthetic Insights. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 38, p. 9674-9678, 2012.

[28] SANTOS, M. G., ROCHA, L. M., CARVALHO, E. S., & KELECOM, A. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na pteridófita Anemia tomentosa var. anthriscifolia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, p.71-75, 2005.

[29] JOSEPH-NATHAN, P., LEITÃO, S. G., PINTO, S. C., LEITÃO, G. G., BIZZO, H. R., COSTA, F. L. P., PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; Structure reassignment and absolute configuration of 9-epi-presilphiperfolan-1-ol. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 15, p. 1963-1965, 2010.

[30] BARBOSA, L.C.de A., **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** 1ed, Viçosa: Editora UFV, 2007, p.189.

[31] HARADA, H., YAMASHITA, U., KURIHARA, H., FUKUSHI, E., KAWABATA, J., & KAMEI, Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer research**, v.22, n. 5, p. 2587-2590, 2001.

[32] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L.; **Spectrometric identification of organic compounds**. 7ed, New York: Editora Seventh, 2014, p. 501.

CONCLUSÕES GERAIS

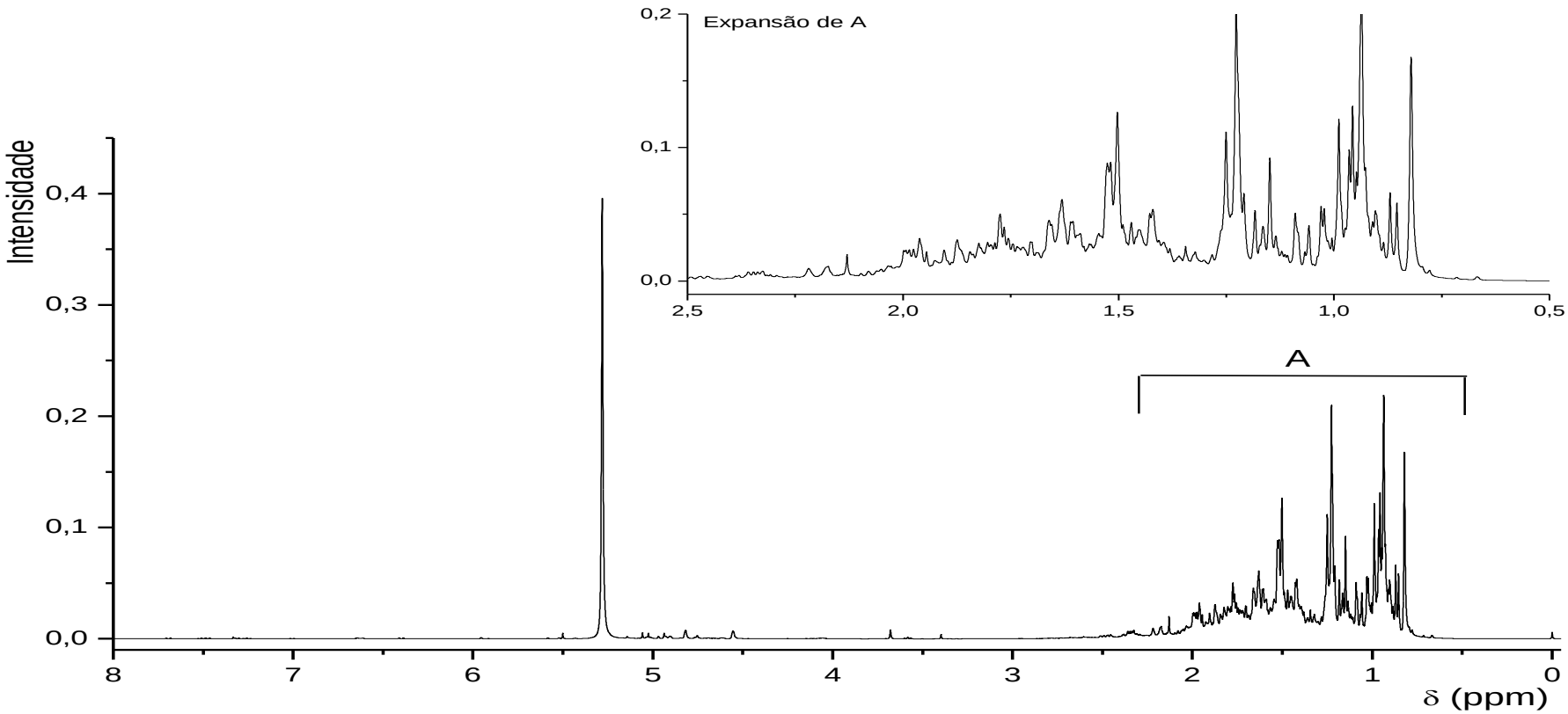
Os resultados apresentados na presente dissertação contribuem significativamente para os estudos químicos e biológico de *Schinus terebinthifolius e Anemia tomentosa*, porque origina novos conhecimentos coerentes aos constituintes químicos voláteis dessas plantas, a atividade antifúngica frente a diferentes linhagens de fungos, bem como, novos conhecimentos relativos aos constituintes fixo da *A. tomentosa*.

Por outro lado, a pesquisa sistemática desenvolvida durante o mestrado permitiu, de forma abrangente, atingir a formação acadêmica e profissional da mestranda, porque envolveu conhecimentos teórico-práticos relacionados à execução/interpretação de dados e técnicas espectrométricas de análise química, tais como, CG-EM, RMN de ^{1}H e ^{13}C (1D e 2D), IV, técnicas de extração de compostos, hidrodestilação, cromatográfica líquida a baixa e média pressão e ensaios farmacológicos de avaliação antifúngica utilizando compostos derivados de plantas.

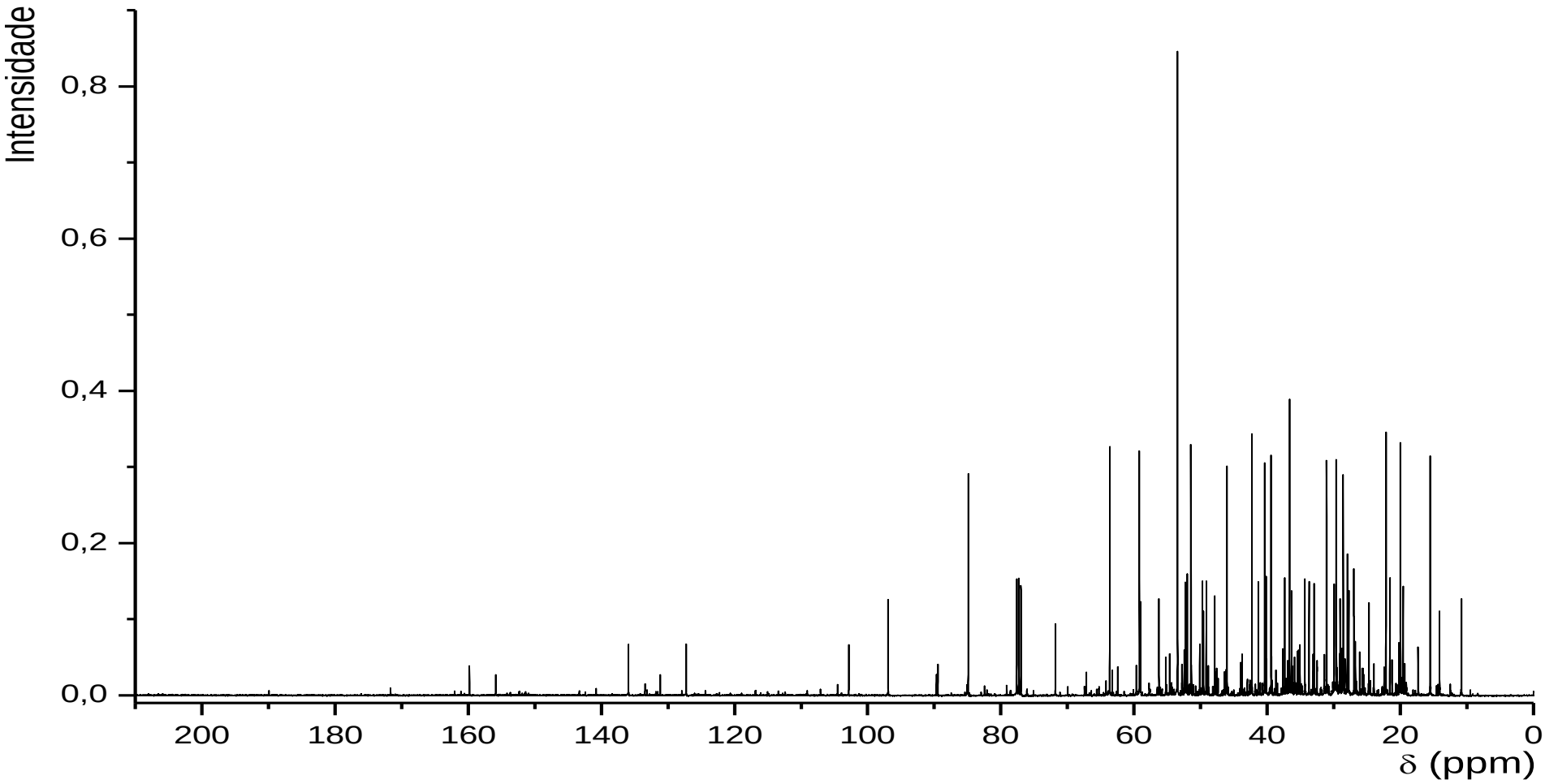
APÊNDICES

DADOS SUPLEMENTARES

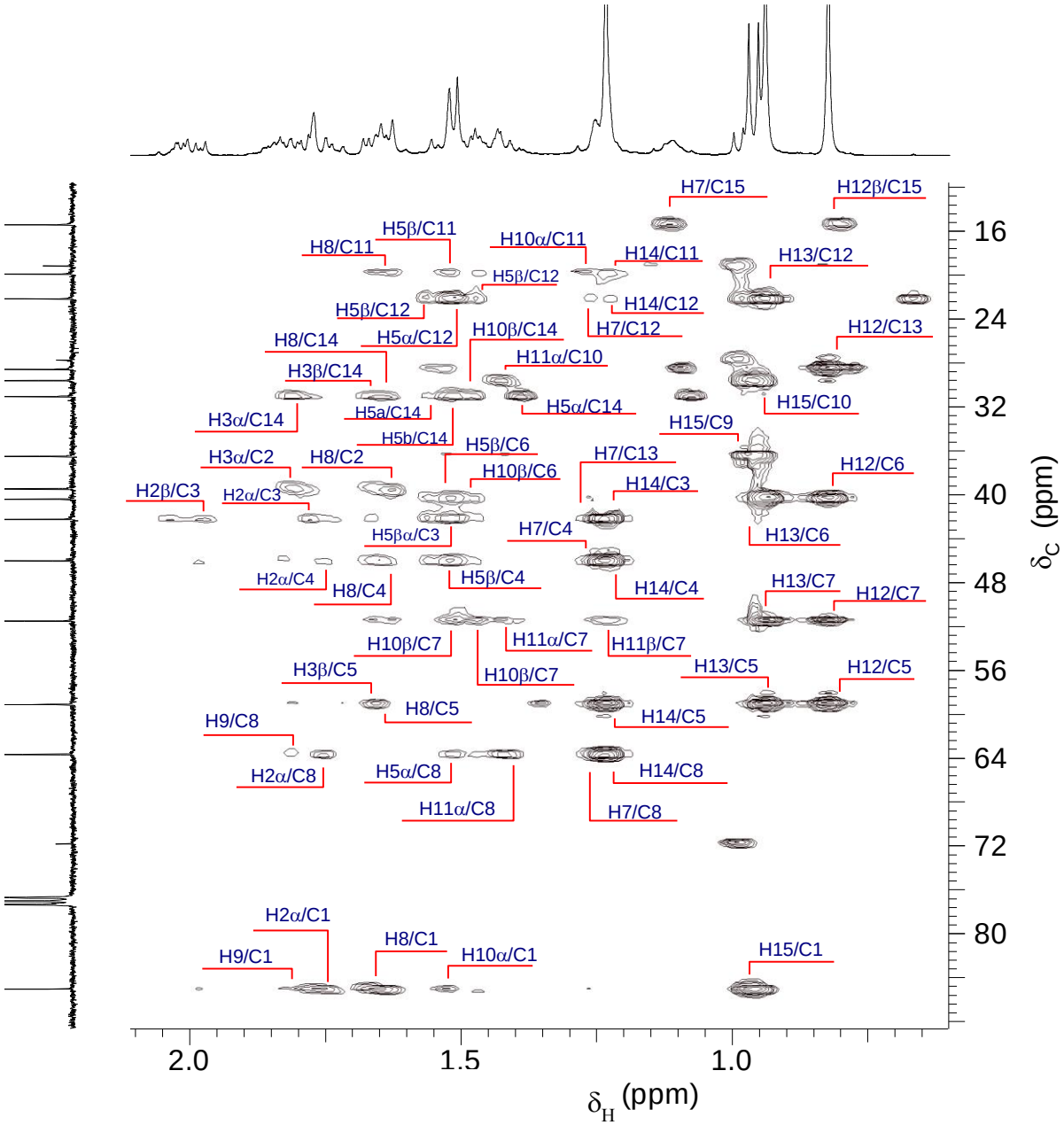
Apêndice A- Espectro de RMN de ^{1}H de OEAT.

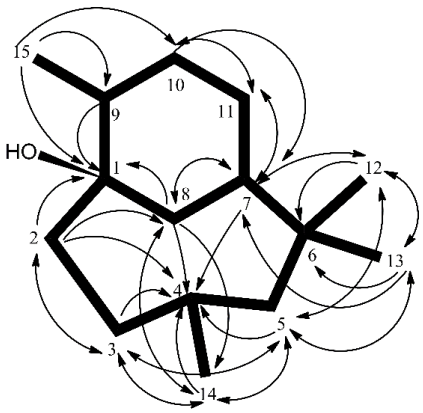


Apêndice B – Espectro de RMN de ^{13}C de OEAT.

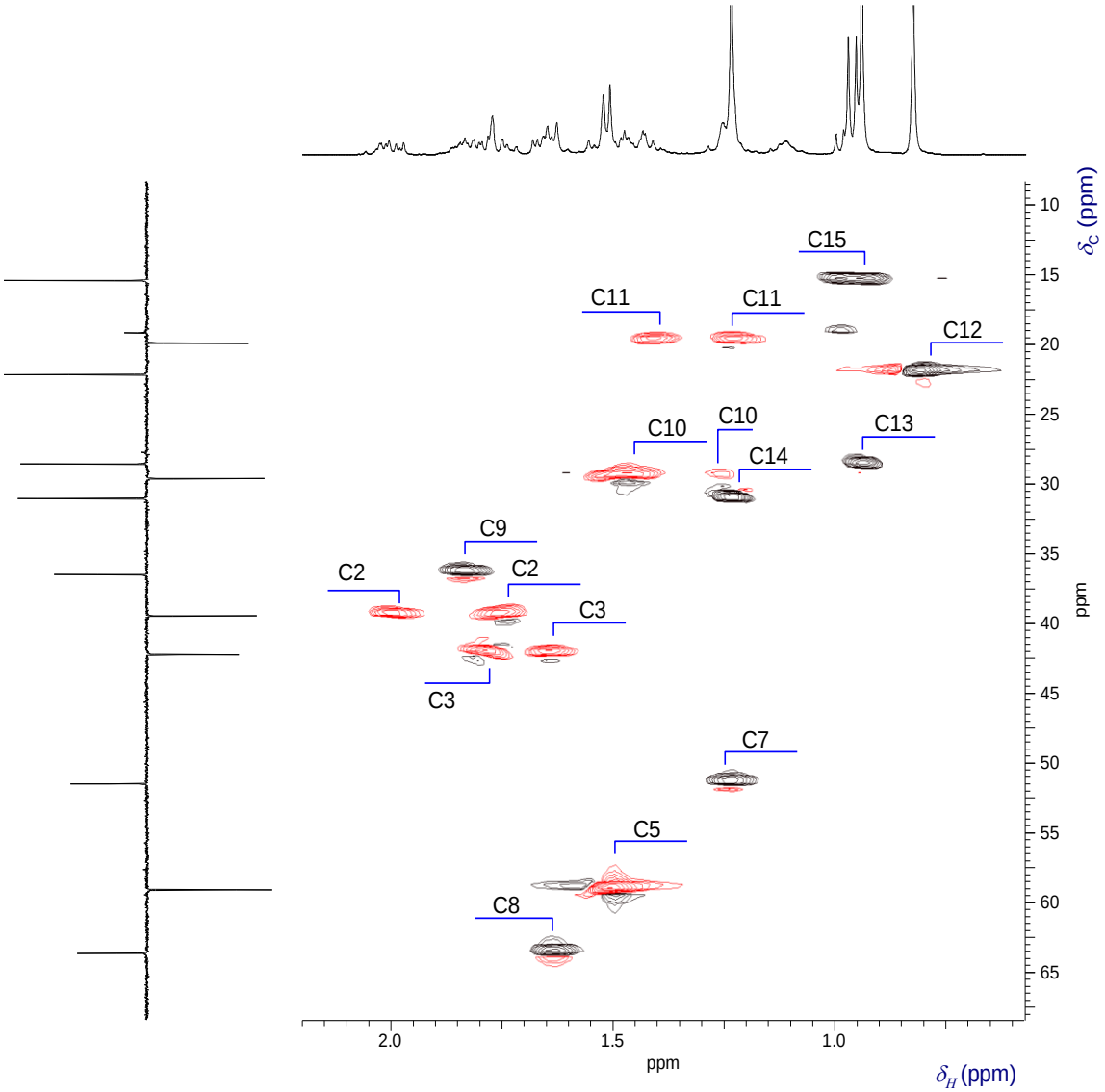


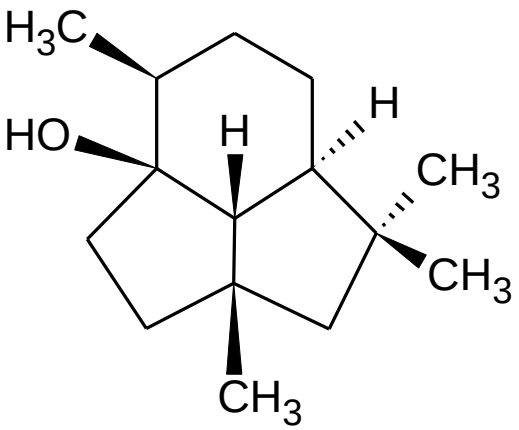
Apêndice C – Mapa de contornos HMBC de 10, expansão da região de δ_H (0,2 a 2,2) e δ_H (10,0 a 88,0) ($CDCl_3$, 400 MHz).





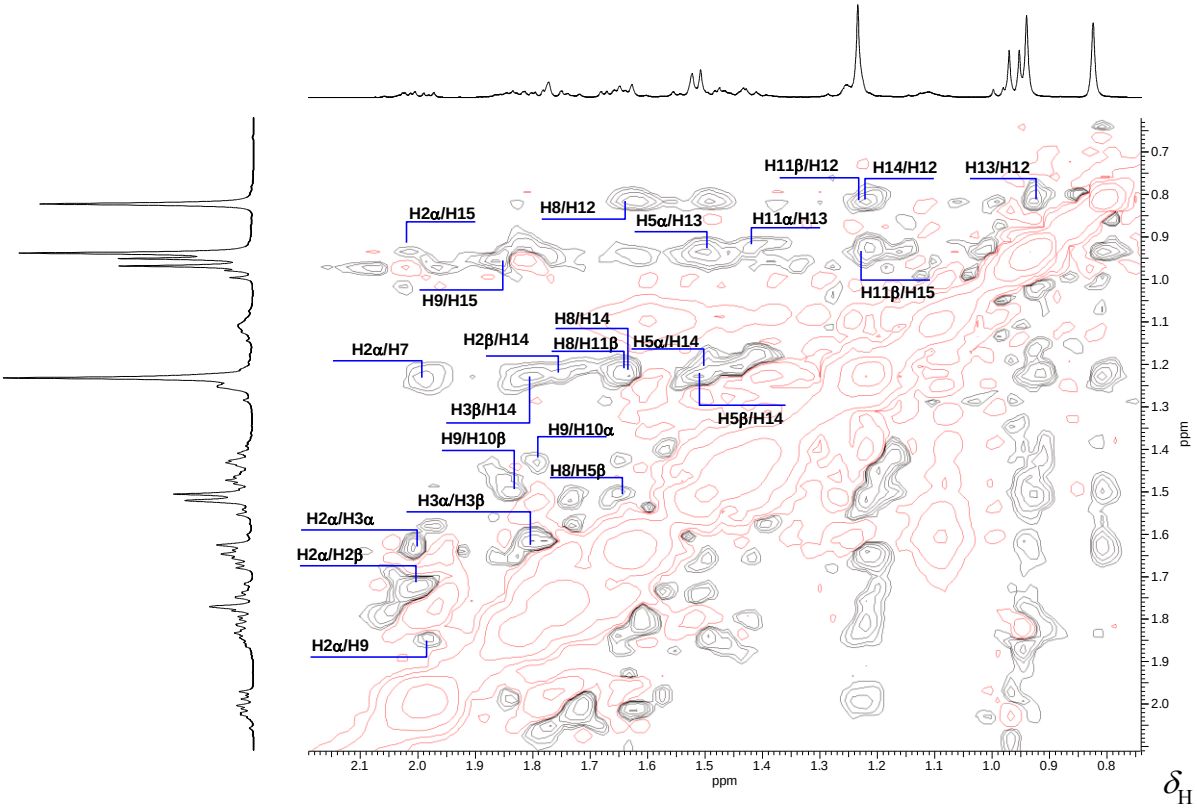
Apêndice D – Mapa de contornos HSQC de 10, expansão da região de δ_C (0,0 a 2,5) e δ_H (10,0 a 67,5) ($CDCl_3$, 400 MHz)

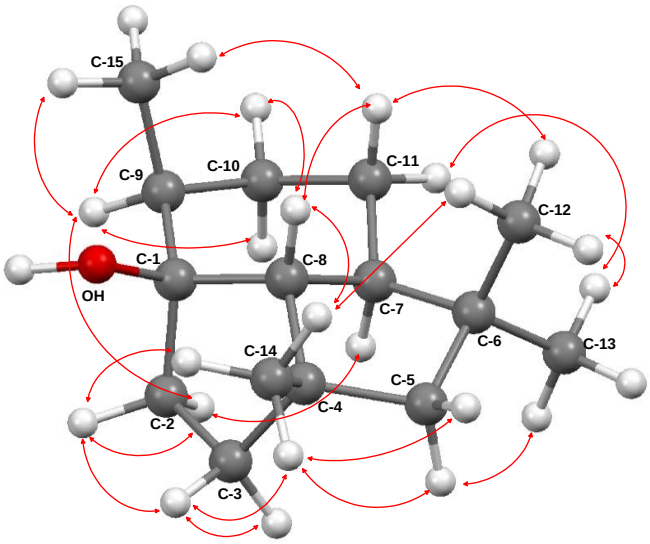
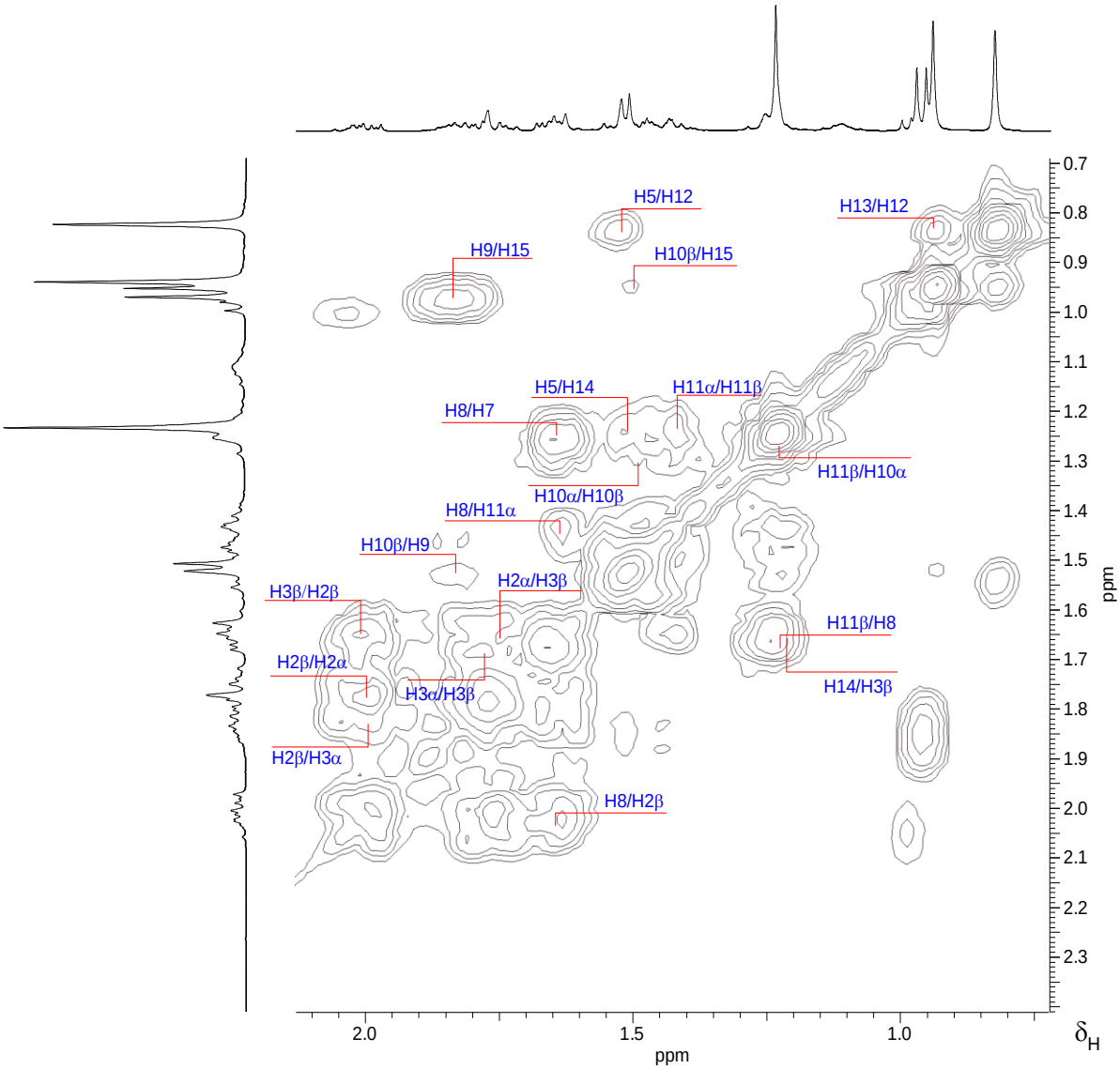
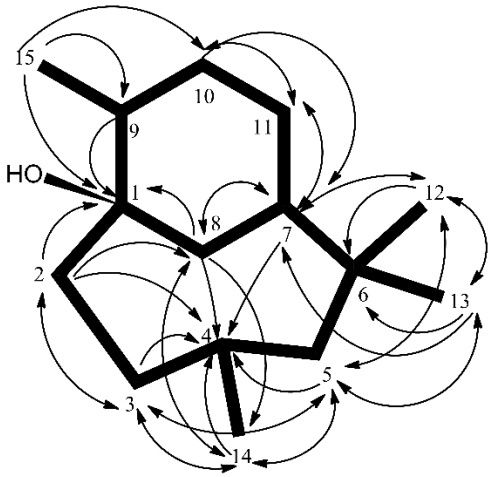




(10)

Apêndice E – Mapa de contornos NOESY de 10, expansão da região de δ_H (0,5 a 3,0) e δ_H (0,7 a 2,2) ($CDCl_3$, 400 MHz).





Apêndice F – Mapa de contornos COSY de 10, expansão da região de δ_H (0,0 a 2,5) e δ_H (0,5 a 2,5) ($CDCl_3$, 400 MHz).