

LISETH SUÁREZ OSORIO

ISOLAMENTO DO ÁCIDO HIDNOCÁRPICO DE SEMENTES DE *Carpotroche brasiliensis* (SAPUCAINHA), SÍNTESE DE DERIVADOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S939i
2015 Suáirez Osorio, Liseth, 1986-
Isolamento do ácido hidnocárpico de sementes de
Carpotroche brasiliensis (sapucainha), síntese de
derivados e avaliação da atividade antibacteriana /
Liseth Suáirez Osorio. - Viçosa, MG, 2015.
xii, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Marcelo Henrique dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.74-77.

1. Ácidos. 2. Ácidos ciclopentênicos - Síntese.
3. *Carpotroche brasiliensis*. 4. Antibióticos em
medicina veterinária. 5. Mastite. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa
de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.037

LISETH SUÁREZ OSORIO

ISOLAMENTO DO ÁCIDO HIDNOCÁRPICO DE SEMENTES DE *Carpotroche brasiliensis* (SAPUCAINHA), SÍNTESE DE DERIVADOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de Julho de 2015.

Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Elson Santiago de Alvarenga

Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Antônio Jacinto Demuner
(Coorientador)

Marcelo Henrique dos Santos
(Orientador)

Dedico a Deus, que ilumina e
abençoa o meu caminho, a minha
família, aos meus pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica (Departamento de Química), pela oportunidade de realização deste trabalho, e ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela disponibilização da infraestrutura para realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao orientador Marcelo Henrique dos Santos e co-orientador Antônio Jacinto Demuner, (Departamento de Química – UFV), por toda amizade, dedicação, boa vontade e incentivo na orientação deste trabalho.

Aos professores que participaram da minha banca avaliadora pelas sugestões e pelo direcionamento do trabalho final.

À doutoranda Natasha Lagos e a mestranda Martha Realpe do Departamento de Veterinária, pela colaboração com o ensaio antimicrobiano.

Aos técnicos José Luiz, Márcio e Cristiane, pela aquisição dos espectros e pela disponibilidade.

Aos integrantes do LASA, pelo acolhimento, gentileza, colaboração, convivência agradável e amizade, especialmente a Dayana Alves, Ricardo Montanari, Diego Rodriguez e Sandra Bonilla.

À professora Gloria Edith Guerrero, pelo apoio e por sempre acreditar em mim. Aos meus colegas e amigos colombianos, Diego Mosquera e Nelson Contreras, pela amizade. A minha amiga Adriana Esquivel, pela amizade e apoio incondicional. As minhas amigas Mariane, Josi e Ariane pela força e pelo incentivo.

Aos meus queridos pais Martha e Humberto, e ao meu irmão Adrián, pela fortaleza, pelo apoio, amor e sacrifício, por acreditar em mim e por estarem por perto mesmo na distância.

Aos familiares e todos os amigos que, mesmo de forma indireta, também contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>vi</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>vii</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Plantas como agentes antimicrobianos	3
2.2. Espécie <i>Carpotroche brasiliensis</i> (Sapucainha)	4
2.3. Compostos bioativos	6
2.3.1. Ácidos graxos ciclopentênicos	6
2.3.2. Ésteres	9
2.3.3. Amidas	9
2.4. Generalidades da mastite bovina	10
2.5. Generalidades das bactérias estudadas	11
2.5.1. Bactérias Gram-negativas	11
2.5.2. Bactérias Gram-positivas	12
3. OBJETIVOS	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Técnicas experimentais	15
4.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	15
4.1.2. Separação cromatográfica em coluna de sílica-gel	15
4.2. Caracterização estrutural das substâncias	15
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho	15
4.2.2. Espectrometria de Massas	15
4.2.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	16

4.2.3. Temperatura de fusão _____	16
4.3. Obtenção do extrato das sementes _____	16
4.4. Isolamento dos ácidos graxos _____	17
4.5. Obtenção dos derivados bioativos _____	17
4.5.1. Procedimento geral para a obtenção dos ésteres _____	17
4.5.2. Procedimento geral para a obtenção das amidas _____	17
4.5.3. Procedimento para derivatização por sililação _____	18
5.4.3. Procedimento para derivatização por transesterificação _____	18
4.6. Dados físicos e experimentais do composto isolado e dos derivados de <i>Carpotroche brasiliensis</i>. _____	18
4.6.1. Ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) _____	18
4.6.2. Derivados do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) _____	19
4.7. Avaliação de atividade antibacteriana _____	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	26
5.1. Caracterização do extrato das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i> _____	27
5.2. Caracterização do óleo obtido do extrato das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i> _____	33
5.3. Caracterização do Ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) _____	36
5.4. Caracterização dos derivados do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) _____	40
5.4.1. Ésteres _____	40
5.4.2. Amidas _____	48
5.4.3. Avaliação de atividade antibacteriana _____	68
6. CONCLUSÕES _____	73
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	74

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia de gás acoplada a espectrômetro de massas
CY	Anel ciclopentênico
DCC	<i>N,N</i> -díciclo-hexilcarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPC	di(2-piridil) carbonato
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
m/z	Relação massa/carga dos fragmentos do EM
RMN	Ressonância magnética nuclear
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TMS	Tetrametilsilano
T_f	Temperatura de fusão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto da sapucainha. (<i>Carpotroche brasiliensis</i>).....	4
Figura 2. Sementes da sapucainha. (<i>Carpotroche brasiliensis</i>).	5
Figura 3. Ácidos graxos ciclopentênicos reportados na literatura.....	6
Figura 4. Reação de esterificação de Fischer.	9
Figura 5. Reação de esterificação com TBTU.....	9
Figura 6. Reação de formação de amidas com TBTU.....	10
Figura 7. Mecanismo de esterificação de ácido com álcool catalisado por TBTU.	26
Figura 8. Mecanismo de formação de amidas com TBTU.....	27
Figura 9. Espectro no infravermelho (KBr) do extrato obtido por maceração em hexano das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	28
Figura 10. Cromatograma dos ésteres e trimetilsilil éster dos ácidos graxos presentes no extrato obtido por maceração em hexano das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i> . ..	28
Figura 11. Espectro de massas do palmitato de metila (A).	29
Figura 12. Espectro de massas do ácido hidnocárpico (B).	30
Figura 13. Espectro de massas do ácido palmítico (C).	30
Figura 14. Espectro de massas TMS-éster do ácido hidnocárpico (D).	31
Figura 15. Espectro de massas do ácido oléico (E).	31
Figura 16. Espectro de massas do ácido górlico (F).	32
Figura 17. Espectro de massas do ácido chaulmúgrico (G).	32
Figura 18. Espectro no infravermelho (KBr) do óleo obtido do extrato das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	33
Figura 19. Cromatograma dos ácidos graxos ciclopentênicos sililados presentes no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	34
Figura 20. Espectro de massas do ácido hidnocárpico (H) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	35
Figura 21. Espectro de massas do ácido górlico (I) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	35
Figura 22. Espectro de massas do ácido chaulmúgrico (J) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	36

Figura 23. Espectro no infravermelho (KBr) do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) ou ácido hidnocárpico obtido do extrato das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	37
Figura 24. Espectro de massas do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) ou ácido hidnocárpico presente no extrato das sementes de <i>Carpotroche brasiliensis</i>	38
Figura 25. Fragmentos característicos do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).	38
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).	39
Figura 27. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , δ _{CDCl₃} 77,0) do ácido (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).	40
Figura 28. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).	41
Figura 29. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).	42
Figura 30. Fragmentos característicos do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).	43
Figura 31. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2).	43
Figura 32. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2).	44
Figura 33. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3)	45
Figura 34. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3).	46
Figura 35. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4).	47
Figura 36. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4).	48
Figura 37. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -etilundecanamida (1A).	49

Figura 38. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -etilundecanamida (1A).....	50
Figura 39. Fragmentos característicos para o (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -etilundecanamida (1A).....	51
Figura 40. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -isobutilundecanamida (2A).	51
Figura 41. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -isobutilundecanamida (2A).....	52
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -isobutilundecanamida (2A).	53
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do (<i>R</i>)-11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -isobutilundecanamida (2A).....	54
Figura 44. Espectro no infravermelho (KBr) do <i>N</i> -ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).	55
Figura 45. Espectro de massas do derivado <i>N</i> -ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).....	56
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do <i>N</i> -ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).	57
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do <i>N</i> -ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).....	58
Figura 48. Espectro no infravermelho (KBr) do (<i>R</i>)- <i>N</i> -benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).	59
Figura 49. Espectro de massas do derivado (<i>R</i>)- <i>N</i> -benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).....	60
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (<i>R</i>)- <i>N</i> -benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).	61
Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do (<i>R</i>)- <i>N</i> -benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).....	62
Figura 52. Espectro no infravermelho (KBr) do 11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -fenilundecanamida (5A).....	63
Figura 53. Espectro de massas do derivado 11-(ciclopent-2-enil)- <i>N</i> -fenilundecanamida (5A).	64

Figura 54. Espectro no infravermelho (KBr) do <i>N</i> -(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A).	65
Figura 55. Espectro de massas do derivado <i>N</i> -(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A).	66
Figura 56. Espectro no infravermelho (KBr) do <i>N</i> -(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A).	67
Figura 57. Espectro de massas do derivado <i>N</i> -(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A).	68
Figura 58. Zona de inibição atribuída ao éster metílico do ácido hidnocárpico na concentração de 1 mg mL ⁻¹	69

RESUMO

SUÁREZ OSORIO, Liseth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Isolamento do ácido hidnocárpico de sementes de *Carpotroche brasiliensis* (sapucainha), síntese de derivados e avaliação da atividade antibacteriana.** Orientador: Marcelo Henrique dos Santos. Coorientador: Antônio Jacinto Demuner.

A mastite é uma doença que causa muitos prejuízos aos rebanhos leiteiros gerando inúmeras perdas econômicas. No Brasil, é a doença de maior impacto para a bovinocultura, pois reduz a produção e qualidade de leite e compromete o animal, podendo causar sua morte precoce. O seu controle é realizado com o uso de antimicrobianos comerciais aos quais as bactérias podem desenvolver resistência. Ao mesmo tempo, tem-se buscado alternativas de controle e dentre estas, o uso de compostos naturais com propriedades antimicrobianas. Das sementes do fruto da espécie *Carpotroche brasiliensis* é extraído um óleo com propriedades antimicrobianas. Neste sentido, este trabalho constituiu-se no isolamento do ácido graxo ciclopentênico majoritário (ácido hidnocárpico) que constitui o óleo fixo do extrato hexânico das sementes e obtenção de derivados semissintéticos potencialmente ativos. Foram obtidos onze derivados, dos quais quatro ésteres e sete amidas a partir do ácido hidnocárpico, sendo seis inéditos estruturalmente, ainda não relatados na literatura. Todos os derivados e o composto isolado foram caracterizados a partir de técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e CG-EM). Tanto o ácido hidnocárpico como seus derivados foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana sobre as bactérias *S. agalactiae* e *E. coli*, dois patógenos que causam mastite contagiosa e ambiental, respectivamente. O éster metílico do ácido hidnocárpico (derivado éster 1) apresentou inibição de *S. agalactiae* na concentração de 1 mg mL^{-1} . Para a *E. coli*, os compostos não apresentaram atividade. Este estudo serve de base para o conhecimento da composição química das sementes de *C. brasiliensis* e seu uso potencial como material de partida para a preparação de novos derivados bioativos e uma possível aplicação destes compostos como antibacterianos.

ABSTRACT

SUÁREZ OSORIO, Liseth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Isolation of hydnocarpic acid of *Carpotroche brasiliensis* seeds (sapucainha), derived synthesis and evaluation of antibacterial activity.** Adviser: Marcelo Henrique dos Santos. Co-adviser: Antônio Jacinto Demuner.

Mastitis is a disease that causes a lot of damage on the dairy herds, producing innumerable economic losses. In Brazil, it is the disease of greatest impact on the cattle, which reduces production and quality of milk and compromises the animal health, probably causing his untimely death. The control is performed using antibiotics that the bacteria developed resistance. Consequently, it has been sought alternative control, as the use of fixed oil with antimicrobial properties. Oil with antimicrobial properties is extracted from the seed of the fruit *Carpotroche brasiliensis* species. Therefore, this study has proposed to isolate the majority cyclopentenyl fatty acid which is the oil, and obtain derived bioactive of hexane extract from the seeds. Were obtained eleven derivatives of which four ester derivatives and seven amide derivatives from isolated cyclopentenyl fatty acid, including six structurally unpublished, and not reported in the literature. All the derivatives and isolated compound were characterized from spectroscopic and spectrometric techniques (IR, ^1H and ^{13}C NMR and CG-MS). Both derivatives and the substance isolated (hydnocarpic acid) were submitted to antimicrobial activity tests on the bacteria *S. agalactiae* and *E. coli*, two infectious pathogens that are responsible to cause contagious mastitis and environmental mastitis respectively. The hydnocarpic acid methyl ester (ester derivative 1) showed inhibition on the *S. agalactiae* at a concentration of 1 mg mL^{-1} . For *E. coli*, the compounds have not showed activity. This study provides information on the phytochemicals present in *C. brasiliensis* as starting material for the preparation of bioactive derivatives and a possible application of these compounds as antibacterials.

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo as plantas medicinais e seus derivados têm sido utilizados para fins terapêuticos. Atualmente, o interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem sido incrementado em função dos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos e a crescente prevalência de bactérias multirresistentes (Guzmán-Blanco et al., 2000). O conhecimento sobre espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado para o desenvolvimento de novos agentes efetivos contra infecções que são comumente difíceis de tratar (Eloff, 1998).

Entre as plantas usadas na medicina popular, temos as plantas da família das flacurtiáceas que estão bem representadas nas florestas tropicais asiáticas e o gênero *Hydnocarpus* destaca-se como o mais abundante. Das sementes do fruto é extraído um óleo, chamado óleo de chaulmugra, que apresenta propriedades antilepróticas, sendo utilizado contra a hanseníase (Santos et al., 2008; Oliveira et al., 2009). O óleo também tem função inseticida, parasiticida e é indicado no combate à caspa, aos piolhos e às manifestações herpéticas (Corrêa, 1984; Oliveira et al., 2009).

No Brasil, a principal espécie fornecedora do óleo de chaulmugra, aqui amplamente conhecido como óleo de sapucainha, é *Carpotroche brasiliensis*. *Carpotroche brasiliensis* é uma árvore brasileira nativa, pertencente à família *Flacourtiaceae*, sendo seus frutos consumidos por animais silvestres e partes da planta usadas na medicina popular (Oliveira et al., 2009).

Estudos anteriores apresentam que *Carpotroche brasiliensis* tem propriedades medicinais, sendo a polpa do fruto empregada como peitoral, os frutos verdes usados em lavagens no controle biológico aos insetos, as sementes reduzidas à pasta e o óleo essencial são empregados externamente contra diversas afecções da pele, sendo utilizada nos processos de cicatrização em hanseníase. A planta possui ação específica contra o bacilo da lepra, devido à presença dos ácidos graxos ciclopentênicos que são os constituintes principais desse óleo: ácido hidnocárpico, ácido chaulmúgrico e ácido górlico (Possolo, 1945; Jacobsen, 1973).

Dentre as doenças por bactérias encontra-se a mastite. A mastite é uma doença, que afeta os bovinos, causada principalmente por microrganismos que invadem o parênquima da glândula mamária produzindo um processo inflamatório leve ou grave, caracterizando-se por modificações no parênquima mamário e alterações físico-químicas do leite (Andresen, 2001). Os microrganismos que causam mastite podem ser agrupados em duas categorias de acordo com sua origem: patógenos contagiosos e patógenos ambientais. Os principais patógenos

contagiosos são: *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma*. Os principais patógenos ambientais incluem dois tipos de bactérias: as bactérias coliformes e várias espécies de estreptococos, diferentes do *S. agalactiae*, chamados estreptococos ambientais (Andresen, 2001; Benedette, 2008).

No mundo, a mastite causa perdas econômicas por volta de 35 bilhões de dólares por ano. No Brasil, é a doença de maior impacto para a bovinocultura, pois reduz a produção e qualidade do leite, comprometendo o animal na sua produção, o que suscita a preocupação de resolver o problema (Tozzetti et al., 2008; Benedette et al., 2008).

Tendo em mente a necessidade de se desenvolver novas estratégias no controle da mastite e considerando-se as atividades antibacteriana e anti-inflamatória apresentadas pelo óleo extraído das sementes de sapucainha e por compostos contendo grupos éster e amida, se propõe neste trabalho isolar os ácidos graxos que constituem o óleo e obter os derivados bioativos do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis* com a finalidade de avaliar sua atividade antibacteriana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Plantas como agentes antimicrobianos*

As plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos por séculos, existindo relatos em manuscritos chineses de 500 a. c. (Duarte et al., 2006), além de achados arqueológicos em civilizações do Antigo Egito, Grécia, Índia e Arábia que já faziam um amplo uso das substâncias ativas das plantas com fins medicinais (Lopez, 2010). Durante muito tempo as plantas medicinais e seus derivados constituíram a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 30% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% deles são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (Yunes et al., 2001).

O interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem sido incrementado em função dos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos comerciais, incluindo efeitos colaterais no hospedeiro, tais como hipersensibilidade, imunossupressão, reações alérgicas e o surgimento de resistências bacterianas, geralmente ocasionadas pelo uso indiscriminado e inadequado de antibióticos (Guzmán-Blanco et al., 2000; Pannuti et al., 1995). Com a crescente prevalência de bactérias multi-resistentes, tem sido revisto e ampliado o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas que oferecem potencial considerável para o desenvolvimento de novos agentes efetivos contra infecções (Eloff, 1998; Ahmad et al., 1998).

Os produtos naturais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos. Assim, a possibilidade de explorar o mercado de medicamentos de origem natural é bastante atrativa para a indústria, pois este setor tem crescido muito, e representa cerca de 30% do faturamento bruto das indústrias. A indústria pode encontrar nas plantas medicinais novas estruturas químicas a serem descobertas e, diante disso, desenvolver fármacos que serão alternativas terapêuticas mais eficazes para o tratamento ou prevenção de patologias (Alves, 2000; Lopes, 2010). Assim, existe a necessidade de novas pesquisas com extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade, que podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos (Corrêa et al., 1998).

Muitas plantas provindas de biomas brasileiros como o Cerrado, a floresta Amazônica e Mata Atlântica, têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de doenças tropicais, incluindo leishmaniasis, malária, esquistossomose e infecções fúngicas e bacterianas (Alves et al., 2000). Diversos autores relatam o pequeno número de espécies Amazônicas estudadas quando

comparadas com a riqueza de espécies existentes neste bioma, mesmo sendo muitas delas utilizadas constantemente no tratamento de uma variedade de doenças por nativos da região. (Duarte et al., 2006).

2.2. Espécie *Carpotroche brasiliensis* (Sapucainha)

O bioma brasileiro apresenta muitas espécies nativas que são utilizadas na medicina popular. As plantas conhecidas pela designação de chaulmugras pertencem à família das Flacourtiaceae, os gêneros dessa família conhecidos como chaulmoogras são: *Hydnocarpus*, *Carpotroche*, *Caloncoba*, *Oncoba*, *Lindackeria* e *Mayna*, tendo sido, estes dois últimos, pouco empregados no tratamento da lepra. O gênero *Hydnocarpus* corresponde à maior parte das espécies das chaulmoogras e inclui as espécies que possuíam maior valor no tratamento da lepra (Santos et al., 2008). A *Carpotroche brasiliensis*, pertencente à família das Flacourtiaceae, é uma árvore brasileira nativa de médio a grande porte, que produz frutos de casca rígida e polpa carnuda. É conhecida popularmente como “sapucainha” e o fruto é muito apreciado por cotias e macacos, dando-lhe os nomes populares de fruta de cotia ou fruta de macaco. Também é conhecida por resedá-do-mato, papo-de-anjo, mata-piolho e ruchuchu. É encontrada nas florestas montanhosas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Piauí (Figura 1) (Lima et al., 2005; Oliveira et al., 2009).



Figura 1. Fruto da sapucainha. (*Carpotroche brasiliensis*).

A polpa do fruto de *Carpotroche brasiliensis* envolve cerca de 80 a 100 sementes de 1,5 cm (Figura 2). O óleo extraído das sementes é mais conhecido como óleo de chaulmugra. Nos anos 90, alguns estudos apresentaram a proporção dos constituintes principais desse óleo como ácidos graxos ciclopentênicos: ácido hidnocárpico (45,5%), ácido chaulmúgrico (24,4%) e ácido górlico (15,4%), acompanhados de 6,6% de ácido palmítico, 6,3% de ácido

oléico e de uma série homóloga de ácidos ciclopentênicos de cadeia carbônica menor. Os ácidos graxos ciclopentênicos são conhecidos pela sua atividade farmacológica e a sua utilização como agentes antilepróticos. O óleo de *C. brasiliensis* foi usado no tratamento da lepra, doença que causa uma resposta inflamatória, indicando que o óleo tem atividade analgésica e anti-inflamatória. Além disso, estudos anteriores relatam que o óleo extraído da *C. brasiliensis* tem funções inseticidas e parasiticidas, é eficaz no combate à caspa, piolhos e nas manifestações herpéticas (Oliveira et al., 2009; Levy, 1975). Até o aparecimento das sulfas, em 1940, esses óleos foram a principal droga indicada para o tratamento da hanseníase (Oliveira et al., 2009).



Figura 2. Sementes da sapucainha. (*Carpotroche brasiliensis*).

As descrições do uso medicinal do óleo de chaulmugra são anteriores à era cristã. A chaulmugroterapia foi implementada no ocidente apenas no século XIX. Theodoro Peckolt, farmacêutico alemão que em 1848 se radicou no Rio de Janeiro, foi o primeiro a sugerir o uso do óleo de *C. brasiliensis* no tratamento de leproso. Todos os ácidos obtidos por Peckolt eram misturas, embora ele os tivesse denominado com nomes específicos como ácidos carpotróchico, carpotrochínico e carpotrolênico e avaliou o perfil farmacológico do óleo de chaulmugra brasileiro usando diferentes vias de administração e formas farmacêuticas. Confirmou que os ésteres etílicos eram mais bem tolerados que os ácidos graxos livres e concluiu que os ácidos graxos ciclopentênicos saturados eram os responsáveis pela ação contra o bacilo da lepra (Oliveira et al., 2009; Cole et al., 1938).

Nesta época, Paulo Seabra, então farmacêutico pela Universidade do Brasil, iniciou seus estudos com o óleo da espécie *C. brasiliensis* a pedido de seu mestre Orlando Rangel. Seus resultados foram apresentados à Academia Nacional de Medicina por Belmiro Valverde, em 1922, mostrando as primeiras observações científicas de leproso tratados com derivados do óleo. Seabra produziu os sais cúpricos coloidais dos ácidos, produto que veio a ser

conhecido como *Karpotran*, baseado na ação do cobre no tratamento da hanseníase (Oliveira et al., 2009).

Todos estes estudos culminaram na preparação e comercialização de diversos derivados da mistura de ácidos, como o *Antileprol* (mistura dos ésteres benzílicos) da Bayer e o *Antileprina* da Casa Granado (ésteres etílicos acrescidos de óleo de fígado de bacalhau, cânfora e timol) (Oliveira et al., 2009).

2.3. Compostos bioativos

2.3.1. Ácidos graxos ciclopentênicos

Um grande número de sementes contêm ácidos palmítico, oleico, linoleico e linolênico, por vezes em proporções variáveis. As sementes das plantas pertencentes à mesma família botânica muitas vezes mostram semelhança na sua composição de ácidos graxos.

Os ácidos graxos com um anel terminal ciclopent-2-enila são encontrados em óleos de sementes de várias espécies de plantas da família Flacourtiaceae (Tabela 1). Os óleos fixos extraídos das sementes da maior parte dos membros desta família são utilizados extensivamente na medicina popular para o tratamento da lepra e outras doenças cutâneas. O óleo de chaulmugra é extraído de sementes de *Hydnocarpus (Taraktogenus) kurzii*. Os três ácidos graxos mais comuns deste tipo são: ácido 11-ciclopent-2-enilundecanóico (ácido hidnocárpico), ácido 13-ciclopent-2-eniltridecanóico (ácido chaulmúgrico) e ácido 13-ciclopent-2-eniltridec-6-enóico (ácido górlico), ácidos que não parecem ocorrer em quaisquer outras plantas além das sementes da família Flacourtiaceae (Figura 3) (Christie et al., 1989).

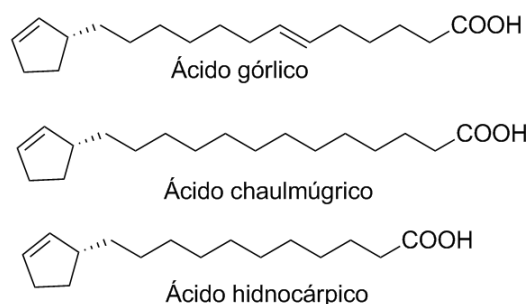


Figura 3. Ácidos graxos ciclopentênicos reportados na literatura.

Todos esses ácidos graxos têm estereoquímica *R* no carbono 1 do anel do ciclopent-2-enila. Pouco se sabe sobre a via de biossíntese destes ácidos graxos, mas as evidências apontam para ciclopentenilglicina como o precursor do ácido ciclopent-2-enilcarboxílico (ácido aleprólico), que é então submetido à dessaturação da cadeia alongada por sistemas de enzimas específicas (Christie et al., 1989).

Tabela 1. Alguns óleos que contém ácidos graxos ciclopentênicos (Mangold 1977)

Espécies	Ocorrência	Nome do óleo
<i>Hydnocarpus anthelminthica</i>	Laos	Óleo de Lukrabo
	Tailândia	
	Vietnã	
	Ceilão ^a	
	Uganda ^a	
	EUA. (Hawaii) ^a	
<i>H.Kurzii</i> (<i>Taraktogenos Kurzii</i>)	Bangladesh	Óleo de Chaulmugra
	Birmânia	
	Índia (Assam)	
	Ceilão ^a	
	Brasil (Minas Gerais) ^a	
	EUA. (Hawaii) ^a	
<i>Caloncoba echinata</i>	Guiné	Óleo Górlico
	Costa Do Marfim	
	Senegal	
	Serra Leoa	
	Brasil (São Paulo) ^a	
	Cuba ^a	
<i>Carpotroche brasiliensis</i>	Brasil (Bahia)	Óleo de Sapucainha
	(Espírito Santo)	
	(Minas Gerais)	
	(Piauí)	
	(Rio de Janeiro)	
	(São Paulo)	

^a Introduzida e cultivada

2.3.2. Ésteres

Os ésteres são importantes produtos ou produtos intermediários nas indústrias química e farmacêutica. Em geral, a formação de éster a partir de ácidos carboxílicos requer a ativação do grupo carboxila, que pode ser obtido por conversão em grupos funcionais mais reativos, tais como haletos de acila, anidrido ou por ativação *in situ* por reagentes de acoplamento. Os ácidos carboxílicos reagem com álcoois na presença de um catalisador ácido para formar ésteres e água (reação de esterificação de Fischer) (Figura 4).

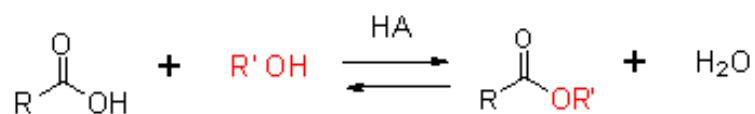
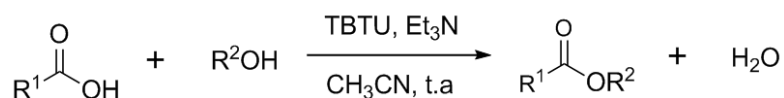


Figura 4. Reação de esterificação de Fischer.

Para a produção de ésteres por ativação *in situ* por reagentes de acoplamento, vários reagentes são relatados, como, *N,N*-díciclo-hexilcarbodiimida (DCC) ou DCC / DMAP, di(2-piridil) carbonato (DPC), *O,O*-di(2-piridil) tiocarbonato/DMAP, 4-(trifluorometil) anidrido benzoico/TiCl₄/2AgClO₄, Me₃SiCl, TBTU 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico e vários outros reagentes de acoplamento por ativação dos ácidos carboxílicos na coexistência de uma base de Lewis ou ácido, respectivamente. Como exemplo, temos a esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois e fenóis com TBTU 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico como um sal de urônio e um reagente de acoplamento eficiente na presença de trietilamina em acetonitrila, à temperatura ambiente (Balalaie et al., 2008) (Figura 5).



R¹ = R² = Alquila ou arila

Figura 5. Reação de esterificação com TBTU.

2.3.3. Amidas

As amidas são importantes como produtos farmacêuticos e agroquímicos. As amidas são geralmente de natureza neutra no que diz respeito à sua reatividade em comparação com os ácidos ou aminas dos quais são obtidas. As amidas simples de ácidos carboxílicos alifáticos

são sólidas à temperatura ambiente, enquanto as amidas substituídas de ácidos carboxílicos alifáticos podem ser líquidas, com temperatura de ebulição relativamente elevada.

Em geral, a formação de ligação amida a partir de ácidos carboxílicos requer diretamente a ativação do grupo carboxila. A ativação de um grupo carboxila pode ser feito pela conversão em grupos funcionais mais reativos, tais como haletos de acila. Os reagentes de acoplamento podem ser usados para a ativação *in situ* do grupo carboxila, tais como: *N,N*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), TiCl_4 , fosfato ativado, $\text{Sn}[\text{N}(\text{TMS})_2]_2$, *N*-halo-succinimida / Ph_3P , $\text{Cl}_3\text{CCN} / \text{Ph}_3\text{P}$, $\text{ArB}(\text{OH})_2$, o reagente de Lawesson, $\text{Me}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$ e *N,N*-dimetilamina, SO_2ClF , isocianato de cloro-sulfonila, cloreto de tosila, em condições livres de solvente, e sais de urônio baseados na 2-mercaptopiridina-1-óxido. Recentemente, foram relatados novos reagentes para a síntese de uma ligação amida. Nas últimas décadas, algum sai de fosfônio e de urônio foram utilizados como reagentes de acoplamento para a síntese de péptidos, tais como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), HATU, HBTU, BOP, HOAt, TCTU, HCTU e TBTU (Balalaie et al., 2007) (Figura 6).

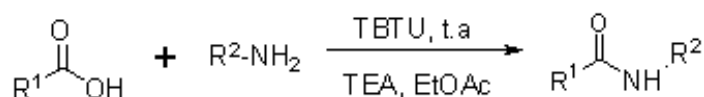


Figura 6. Reação de formação de amidas com TBTU.

2.4. Generalidades da mastite bovina

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária relacionado a agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas, (Brito et al., 2000). Tem por características uma série de alterações físicas e químicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular. As alterações mais importantes observadas no leite são a descoloração, o aparecimento de coágulos e a presença de grande número de leucócitos. A glândula mamária apresenta aumento de volume e elevação da temperatura (Radostits, 2000).

Philpot & Nickerson (1997) apontam que 90% das mastites são causadas por bactérias. Além destes patógenos, fungos, leveduras, algas e vírus também podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém a ocorrência é baixa.

Com base no agente infeccioso, a mastite pode ser dividida em duas grandes categorias: contagiosa e ambiental. No caso de mastite contagiosa, as principais bactérias envolvidas são *S. agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma*. *S. agalactiae* é o parasita obrigatório da glândula mamária de ruminantes, vive nos soros do leite e úbere. A

infecção pode se espalhar rapidamente em estabelecimentos. O único reservatório conhecido é o úbere ou lesões infectadas. *S. aureus* e *Mycoplasma* são capazes de colonizar e persistir em diversos locais do hospedeiro (pele e trato respiratório). O meio de transmissão mais comum desses microrganismos envolve a falta de higienização do maquinário (Benedette, 2008).

Os patógenos ambientais causadores de mastite incluem a espécie de estreptococos, sendo *S. uberis* e *S. dysgalactiae* os mais comuns. No grupo dos coliformes ambientais, encontram-se as bactérias Gram-negativas: *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. faecalis* e *E. faecium* (Benedette, 2008).

Existem também patógenos incomuns que podem causar mastite grave e são de origem fúngica ou viral (Radostits, 2000). Outros agentes infecciosos que causam mastite são: *Mycoplasma bovis*, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Benedette, 2008).

A mastite é uma doença que causa muitos prejuízos, estima-se que, mundialmente as perdas causadas pela doença são por volta de 35 bilhões de dólares por ano. Por serem uma doença altamente prejudicial aos rebanhos leiteiros, muitos estudos sobre essa doença são feitos, e programas de manejo tentam melhorar a saúde da glândula mamária (Almeida, 1999).

2.5. Generalidades das bactérias estudadas

2.5.1. Bactérias Gram-negativas

✓ Parede de bactérias Gram-negativas:

A parede das bactérias Gram-negativas é constituída por uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa contendo fosfolipídios, lipopolissacarídeo (LPS), característico destas bactérias e proteínas (proteína da membrana externa). Esta camada está intimamente ligada ao peptidoglicano e é considerado um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas.

A membrana externa também contém numerosas proteínas, constituindo canais, chamados porins. Estes poros permitem a passagem de moléculas de baixa massa molecular, tais como nutrientes. As moléculas hidrófilas de baixa massa molecular passam facilmente através dos porins, ao passo que as moléculas hidrofóbicas se difundirem através da membrana em bicamada. As moléculas grandes não atravessam a membrana externa, de modo que essas bactérias, ao contrário das Gram-positivas, não são sensíveis à enzima lisozima que destrói o

peptidoglicano. Antibióticos, incluindo alguns de elevada massa molecular não podem atravessar a membrana externa e, por conseguinte, as bactérias não são sensíveis a eles (Cabrera et al., 2007).

- *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, frequentemente agrupada com outras bactérias coliformes da família *Enterobacteriaceae*. *E. coli* e outras bactérias coliformes são encontradas em concentrações elevadas em matéria orgânica. Nos bovinos, os úberes podem ser infectados com coliformes através do contato com a matéria orgânica no ambiente ou durante a ordenha. Uma vez dentro do úbere, *E. coli* se multiplica rapidamente, resultando um influxo de células inflamatórias.

As endotoxinas encarregadas de ingerir e matar as bactérias são liberadas para a corrente sanguínea e, juntamente com outros mediadores inflamatórios resultam inflamação local severa. Esta resposta inflamatória é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, alterações na composição do leite e danos para as células epiteliais mamárias. No entanto, os sintomas clínicos são resultado do processo inflamatório e, frequentemente, incluem febre, dureza ou inflamação do úbere (Wenz et al. 2004).

2.5.2. Bactérias Gram-positivas

- ✓ Parede de bactérias Gram-positivas:

Apresenta uma espessa camada de peptidoglicano na forma de múltiplas camadas. A superfície externa do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas é geralmente coberta de proteína. O peptidoglicano é um polímero constituído por açúcares e aminoácidos que originam uma espécie de malha na região externa à membrana celular das bactérias. O polissacárido que constitui o peptidoglicano consiste em resíduos alternados de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, unidos por ligações β -(1,4) (Cabrera et al., 2007).

- *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae é um agente comum de mastite. É um parasita obrigatório da glândula mamária que significa que na natureza só pode viver e reproduzir-se na glândula mamária. A maioria das vacas infectadas mostram poucos sinais clínicos de mastite, tais como leite anormal, mas geralmente têm contagens celulares somáticas elevadas.

S. agalactiae infecta principalmente a cisterna e o sistema ductal da glândula mamária, produzindo uma toxina que provoca inflamação da glândula. A acumulação de produtos residuais bacterianos intensifica a resposta inflamatória, resultando na destruição do tecido produtor de leite, causando agalaxia. *S. agalactiae* raramente causa doenças graves, mas o dano extenso no úbere pode causar queda nas lactações subsequentes (Benedette, 2008; Radostits, 2000).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Isolar o ácido graxo majoritário (ácido hidnocárpico) do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis* e obter os derivados semissintéticos com potencial atividade antibacteriana em dos agentes isolados de mastite bovina.

Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.
- ✓ Isolar os principais compostos, incluindo ácido graxo majoritário (ácido hidnocárpico), e caracterizá-los a partir de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- ✓ Obter e caracterizar derivados ésteres e amidas a partir do ácido hidnocárpico isolado.
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana do ácido graxo isolado e de seus derivados sobre bactérias isoladas de mastite bovina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Técnicas experimentais*

4.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) analítica foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio POLYGRAM-UV254 0,20 mm MACHEREY – NAGEL (20 x 20 cm). As placas de CCD foram reveladas com vanilina, após visualização em câmara de luz ultravioleta.

4.1.2. Separação cromatográfica em coluna de sílica-gel

As separações cromatográficas em coluna foram feitas utilizando-se sílica-gel (70-230 Mesh, SIGMA-ALDRICH) e eluente apropriado. As amostras foram previamente incorporadas à sílica em evaporador rotatório, transferidas para o topo da coluna e eluídas com mistura de solventes adequados para separação. As frações coletadas foram analisadas por meio de CCD analítica.

4.2. *Caracterização estrutural das substancias*

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - UFV), por meio de pastilhas de KBr contendo 1% (m/m) do composto.

4.2.2. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A, do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV.

4.2.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300 ($B_0 = 7,05 \text{ T}$) operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros foram referenciados pelo sinal do clorofórmio ($\delta = 7,26$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

4.2.3. Temperatura de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 da Microquímica Ind. e Com. Ltda após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel e por recristalização empregando-se os devidos eluentes e solventes para cada composto. As temperaturas registradas não foram corrigidas.

4.3. *Obtenção do extrato das sementes*

As sementes, retiradas do fruto da Sapucainha, foram lavadas para retirada da polpa. Em seguida foram colocadas em estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas e posteriormente deixadas resfriar em dessecador. As sementes foram quebradas e seus interiores retirados e triturados em liquidificador. O material triturado foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL ao qual foram adicionados 200 mL de hexano. O sistema foi fechado e deixado em repouso por 48 horas. Em seguida o sistema foi filtrado a vácuo e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para se obter o extrato bruto. O material sólido retido pelo filtro foi novamente transferido para um Erlenmeyer, ao qual foi adicionado mais 200 mL de hexano, o sistema foi fechado e novamente mantido em repouso por mais 48 horas, filtrado e concentrado. O processo foi repetido até que não houvesse nenhum resíduo após a evaporação do solvente (Oliveira et al., 2009).

4.4. *Isolamento dos ácidos graxos*

Uma alíquota do extrato bruto foi analisada por cromatografia em camada delgada, testando-se diferentes misturas de fases móveis para obter uma separação de componentes adequada. Após definir a fase móvel, hexano: acetato de etila (95:5 v/v), a separação foi feita por cromatografia em coluna de sílica-gel até obtenção dos ácidos graxos puros. O ácido hidnocárpico foi o composto de interesse, eluído nas frações 20 até 30 (2,10 g). O ácido graxo isolado foi caracterizado por meio de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectroscopia no Infravermelho e Espectrometria de Massas.

4.5. *Obtenção dos derivados bioativos*

4.5.1. Procedimento geral para a obtenção dos ésteres

A um balão de fundo redondo, contendo o respectivo ácido (334 mg, 2 mmol), o TBTU (2,2 mmol, 706 mg) e 40 mL de acetonitrila, foi adicionada trietilamina (0,56 mL, 4 mmol). A mistura foi mantida sob agitação durante 5 minutos à temperatura ambiente, depois foi adicionado o respectivo álcool (326 mg, 2 mmol) e o sistema reacional mantido sob agitação por mais 30 minutos. O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada. Ao término da reação foi adicionada água (20 mL) e extraído com CH_2Cl_2 (2 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada sob pressão reduzida em rotavapor. O produto bruto foi purificado por recristalização em álcool etílico (Balalaie et al., 2008). Na Figura 7 é apresentado o mecanismo de esterificação com TBTU.

4.5.2. Procedimento geral para a obtenção das amidas

A um balão de fundo redondo, foi adicionado o respectivo ácido (1 mmol), o TBTU (323 mg, 1 mmol), a trietilamina (0,27 ml, 2 mmol) e 30 ml de acetato de etila. A mistura foi mantida sob agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente, depois foi adicionada a respectiva amina (2 mmol) e o sistema reacional mantido sob agitação por mais 20 minutos. O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada. Ao término da reação foi adicionada água (20 mL) e a fase orgânica foi separada, seca com sulfato de

magnésio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por recristalização com mistura de hexano: acetato de etila (5:1) (Balalaie et al., 2007). A Figura 8 representa o mecanismo de amidação com TBTU.

4.5.3. Procedimento para derivatização por sililação

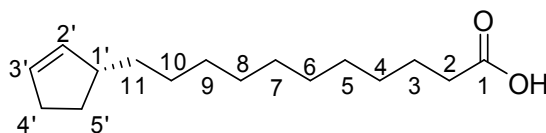
Foi diluído 3 mg de amostra com 60 mL de piridina seca e 100 uL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida em 1% de trimetilclorosilano (Fluka Chemika-BSTFA). A mistura foi aquecida 70 °C durante 30 min. Depois, uma alíquota de 1 mL da solução resultante foi utilizada para análise por GC-MS (Oliveros-Bastidas et al., 2013).

5.4.3. Procedimento para derivatização por transesterificação

Foram adicionados ao tubo de ensaio 50 mg de óleo, 2 mL de hexano e 0,2 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio 2M. A mistura foi mantida sob agitação durante 5 minutos. Depois foram adicionados 2 ml de solução saturada cloreto de sódio, até que a fase orgânica foi separada. Depois, uma alíquota de 1 mL da solução resultante foi utilizada para análise por GC-MS (Oliveros-Bastidas et al., 2013).

4.6. Dados físicos e experimentais do composto isolado e dos derivados de *Carpotroche brasiliensis*.

4.6.1. Ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH)



Composto isolado, conhecido como ácido hidnocárpico.

Característica: Sólido branco

Massa molecular: 252,39 g mol⁻¹

T_f = 55,7 – 56,5 °C

CCD, R_f = 0,22 (hexano: acetato de etila (95:5 v/v))

IV (KBr, cm⁻¹) ν⁻ max: 3049, 2917, 2850, 1701, 1472, 1429, 1409, 1207, 1180, 717.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 5,68 (m, 2H); 2,34 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H); 2,02 (ddd, $J = 12,0 ; 8,1 ; 3,5$ Hz, 1H); 1,70 – 1,56 (m, 1H); 1,45 – 1,12 (m, 16H).

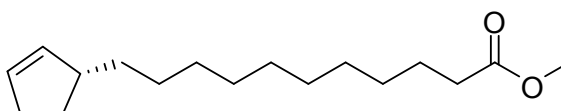
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (atribuição): 179,87 (C1); 135,43 (C2'); 129,93 (C3'); 45,58 (C1'); 36,14 (C11); 34,00 (C5'); 31,95 (C4'); 30,14 – 28,90 (C4-C9); 24,27 (C3).

EM (IE), m/z (%): 252 (3) $[\text{M}]^+$; 235 (2); 123 (2); 95 (4); 87 (20); 67 (100); 41(30).

4.6.2. Derivados do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH)

4.6.2.1. Ésteres

4.6.2.1.1. (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1)



Característica: Óleo amarelo

Massa molecular: 266 g mol^{-1}

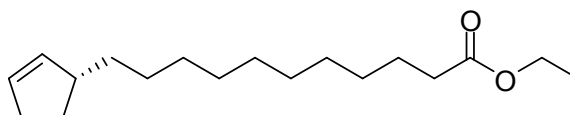
CCD, Rf = 0,55 (hexano: acetato de etila (9:1 v/v))

Rendimento: 85,40%

IV (KBr , cm^{-1}) $\bar{\nu}$ max: 3048, 2920, 2850, 1740, 1459, 1435, 1194, 1167, 718.

EM (IE), m/z (%): 266 (2) $[\text{M}]^+$, 235(3), 185 (3), 153 (4), 95 (5), 82 (20), 67 (100), 41 (37).

4.6.2.1.2. (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2)



Característica: Óleo amarelo

Massa molecular: 280,45 g mol^{-1}

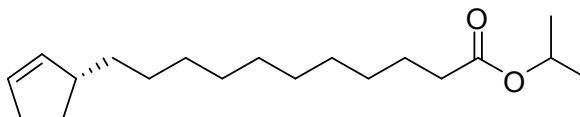
CCD, Rf = 0,62 (hexano: acetato de etila (9:1 v/v))

Rendimento: 84,92%

IV (KBr, cm^{-1}) $\bar{\nu}$ max: 3050, 2920, 2851, 1736, 1462, 1371, 1177, 1098, 718.

EM (IE), m/z (%): 280 (2) $[\text{M}]^+$, 235 (3), 199 (3), 153 (4), 95 (6), 67 (100), 41 (47).

4.6.2.1.3. (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3)



Característica: Sólido amarelo cristalino

Massa molecular: 294,47 g mol⁻¹

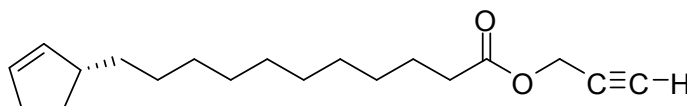
CCD, Rf = 0,71 (hexano: acetato de etila (9:1 v/v))

Rendimento: 85,70%

IV (KBr, cm^{-1}) $\bar{\nu}$ max: 2977, 2921, 2852, 1729, 1465, 1373, 1178, 1108, 720.

EM (IE), m/z (%): 294 (1) $[\text{M}]^+$, 251 (5), 235 (4), 213 (1), 178 (1), 123 (3), 95 (6), 83 (24), 67 (100), 43 (62).

4.6.2.1.4. (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4)



Característica: Óleo amarelo

Massa molecular: 290,44 g mol⁻¹

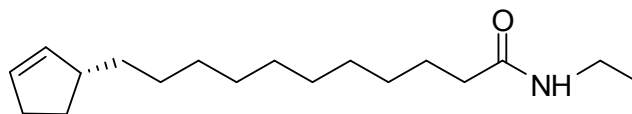
CCD, Rf = 0,69 (hexano: acetato de etila (9:1 v/v))

Rendimento: 82,56%

IV (KBr, cm^{-1}) $\bar{\nu}$ max: 2922, 2852, 1739, 1459, 1437, 1417, 1157, 1098, 719, 668, 628.

EM (IE), m/z (%): 234 (1) $[\text{M}]^+$, 175 (1), 135 (2), 119 (5), 98 (10), 81 (12), 67 (100), 41 (37).

4.6.2.2. Amidas

4.6.2.2.1 (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida (1A)

Característica: Sólido branco

Massa molecular: 279,46 g mol⁻¹

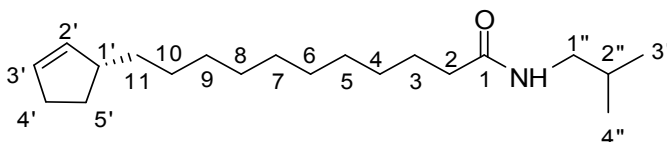
CCD, R_f = 0,30 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

T_f = 52,5 – 53,2 °C

Rendimento: 54,18%

IV (KBr, cm⁻¹) ν⁻ max: 3304, 2915, 2847, 1638, 1545, 1467, 716.

EM (IE), m/z (%): 279 (5) [M]⁺, 198 (4), 142 (4), 114 (5), 87 (80), 67 (100), 41 (88).

4.6.2.2.2. (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A)

Característica: Sólido branco

Massa molecular: 307,51 g mol⁻¹

CCD, R_f = 0,46 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

T_f = 50,2 - 51,0 °C

Rendimento: 82,07%

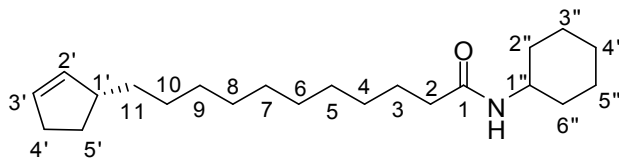
IV (KBr, cm⁻¹) ν⁻ max: 3311, 2915, 2847, 1642, 1547, 1468, 715.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (mult., J/Hz): 5,73 – 5,60 (m, 1H); 3,07 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,42 – 1,86 (m, 4H); 1,80 – 1,55 (m, 3H); 1,44 – 1,11 (m, 16H); 0,92 (t, J = 8,9 Hz, 4H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (atribuição): 173,15 (C1); 135,43 (C2'); 129,94 (C3'); 46,76 (C1''); 45,58 (C1'); 36,98 (C11); 36,14 (C5'); 31,94 (C4'); 30,05 – 29,01 (C4-C9); 28,49 (C3); 20,06 (C3', C4'').

EM (IE), m/z (%): 307 (20) $[M]^+$, 264 (4), 226 (5), 170 (5), 142 (4), 115 (81), 67 (100), 41 (61).

4.6.2.2.3. *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A)



Característica: Sólido branco

Massa molecular: 333.55 g mol⁻¹

CCD, Rf = 0,57 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

Tf = 55,4 – 56,2 °C

Rendimento: 75,66%

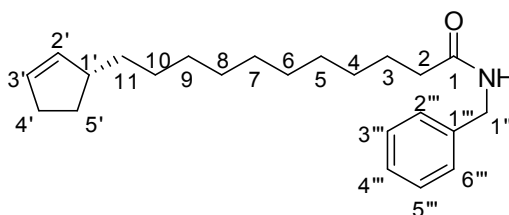
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}$ max: 3298, 2916, 2848, 1635, 1544, 1468, 1446, 718.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (mult., J /Hz): 5,66 (s, 1H); 5,38 (s, 1H); 3,74 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 2,34 (ddd, J = 42,4; 30,9; 27,7 Hz, 6H); 1,65 (dd, J = 23,7; 10,5 Hz, 5H); 2,16 – 1,78 (m, 2H); 1,65 (dd, J = 23,7; 10,5 Hz, 5H); 1,40 – 0,98 (m, 20H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (atribuição): 172,22 (C1); 135,41 (C2'); 129,92 (C3'); 47,99 (C1''); 45,57 (C1'); 37,07 (C11); 36,13 (C5'); 33,22 (C4'); 31,93 (C2'', C6''); 30,33 – 29,03 (C4-C9); 24,85 (C3'', C5'').

EM (IE), m/z (%): 333 (22) $[M]^+$, 290 (1), 235 (2), 252 (5), 224 (3), 210 (5), 224 (3), 210 (5) 168 (5) 141 (70), 100 (38), 67 (100), 41 (38).

4.6.2.2.4. (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A)



Característica: Sólido branco

Massa molecular: 341,53 g mol⁻¹

CCD, Rf = 0,71 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

Tf = 72,8 - 73, 7 °C

Rendimento: 81,29%

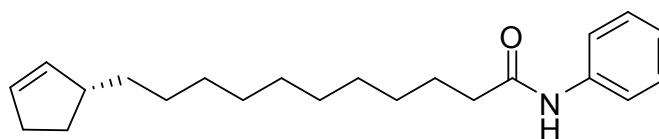
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}$ max: 3294, 2917, 2848, 1638, 1533, 1470, 1454, 1236, 1211, 1186, 743, 716, 693.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (mult., J/Hz): 7,37 – 7,27 (m, 5H); 5,74 (d, J = 30,6 Hz, 1H); 4,43 (d, J = 5,6 Hz, 2H); 2,37 – 2,12 (m, 3H); 2,12 – 1,91 (m, 4H); 1,86 – 1,51 (m, 3H); 1,49 – 1,15 (m, 16H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (atribuição): 172,98 (C1); 138,41 (C1''); 135,43 (C2'); 130,41 (C3'); 129,95 (C3'', C5''); 128,67 (C4'', C2'', C6''); 45,59 (C1'); 43,55 (C1'); 36,15 (C5'); 31,95 (C4'); 30,06 – 29,11 (C4-C9).

EM (IE), m/z (%): 341 (18) [M]⁺, 298 (1), 260 (3), 233 (2), 204 (4), 162 (35), 149 (50), 91 (90) 67 (100), 41 (30).

4.6.2.2.2.5. 11-(ciclopent-2-enil)-N-fenilundecanamida (5A)



Característica: óleo branco

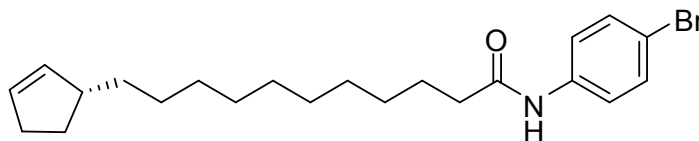
Massa molecular: 327,50 g mol⁻¹

CCD, Rf = 0,71 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

Rendimento: 77,06%

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}$ max: 3303, 3059, 2916, 2849, 1969, 1958, 1943, 1928, 1659, 1598, 1530, 1498, 1470, 1440, 1309, 1248, 1178, 755, 717, 691.

EM (IE), m/z (%): 327 (3) [M]⁺, 135 (15), 120 (3), 93 (96), 67 (100), 41 (51).

4.6.2.2.6. *N*-(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A)

Característica: Sólido amarelo

Massa molecular: 406,40 g mol⁻¹

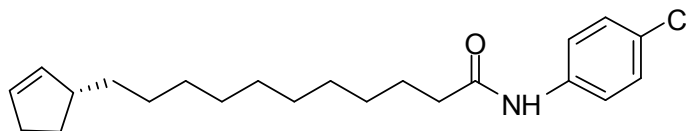
CCD, Rf = 0,8 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

Tf = 53,0 – 53, 5 °C

Rendimento: 86,94%

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}$ max: 3288, 3049, 2916, 2847, 1887, 1932, 1655, 1587, 1525, 1487, 1461, 1393, 1242, 1176, 816, 717

EM (IE), *m/z* (%): 407 (2) [M]⁺, 326 (1), 234 (2), 213 (4), 173 (85), 67 (100), 41 (40).

4.6.2.2.7. *N*-(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A)

Característica: Sólido branco

Massa molecular: 361,95 g mol⁻¹

CCD, Rf = 0,82 (hexano: acetato de etila (7:3 v/v))

Tf = 75,2 - 75,5 °C

Rendimento: 76,70%

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}$ max: 3288, 3047, 2916, 2847, 1987, 1966, 1654, 1593, 1524, 1491, 1469, 1395, 1279, 1242, 1172, 818, 714.

EM (IE), *m/z* (%): 361 (2) [M]⁺, 326 (1), 182 (3), 169 (5), 127 (100), 67 (58), 41 (25).

4.7. Avaliação de atividade antibacteriana

Bactérias utilizadas: Para avaliação da atividade antibacteriana foram utilizados isolados bacterianos sendo, *Streptococcus agalactiae* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativo) obtidos de mastite bovina.

Atividade antimicrobiana: Foi realizada a técnica de difusão em ágar para avaliar a bioatividade dos compostos obtidos. As culturas bacterianas foram semeadas por espalhamento em superfície, em placas de Petri de 9 cm descartáveis previamente preparadas com uma camada inferior de 10 mL de ágar bacteriológico (Himedia, Mumbai, Índia), e outra superior com 10 mL de ágar Müeler Hinton (Himedia, Mumbai, Índia). Com o uso de ponteiras estéreis foram feitos orifícios no ágar Müeler Hinton distribuídos equidistantes nas placas, nos quais 40 µL das soluções teste foram depositadas na concentração de 1 mg mL⁻¹. Os compostos foram solubilizados de acordo com sua polaridade, sendo testados os solventes: DMSO, Tween 80, hexano, diclorometano e acetato de etila. No ensaio de solubilidade foi observado que os compostos foram solúveis apenas no DMSO, portanto foi o solvente empregado no ensaio. Após preparadas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24/48 h. A atividade antimicrobiana foi identificada pela formação de zonas de inibição bacteriana ao redor dos orifícios. Foram considerados resultados positivos zonas de inibição de qualquer tamanho ao redor do orifício.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho iniciou com a coleta de frutas de *Carpotroche brasiliensis* nativas na região de Viçosa. A partir de frutas maduras foram obtidas as sementes (236,60 g) que foi o material de partida para obtenção do óleo de sapucainha.

Assim, após maturação das sementes com hexano foram obtidas 87,4 g de um óleo viscoso que ao deixar em repouso se transformou em um sólido branco. Esse sólido foi fracionado empregando cromatografia em coluna que forneceu o ácido hidnocárpico (2,10 g) como substância pura. O ácido hidnocárpico isolado foi utilizado como material de partida para a preparação dos ésteres e amidas derivados. Foram preparados 4 derivados esterificados (metila, etila, isopropila, propargila) e 7 derivados contendo grupos amida (etila, isobutila, ciclohexila, benzila, fenila, 4-bromofenila e 4-clorofenila) os quais foram caracterizados e identificados por métodos espectroscópicos e espectrométricos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM,). A seguir são apresentados os mecanismos de esterificação e formação de amidas catalisados por TBTU (Figura 7 e Figura 8).

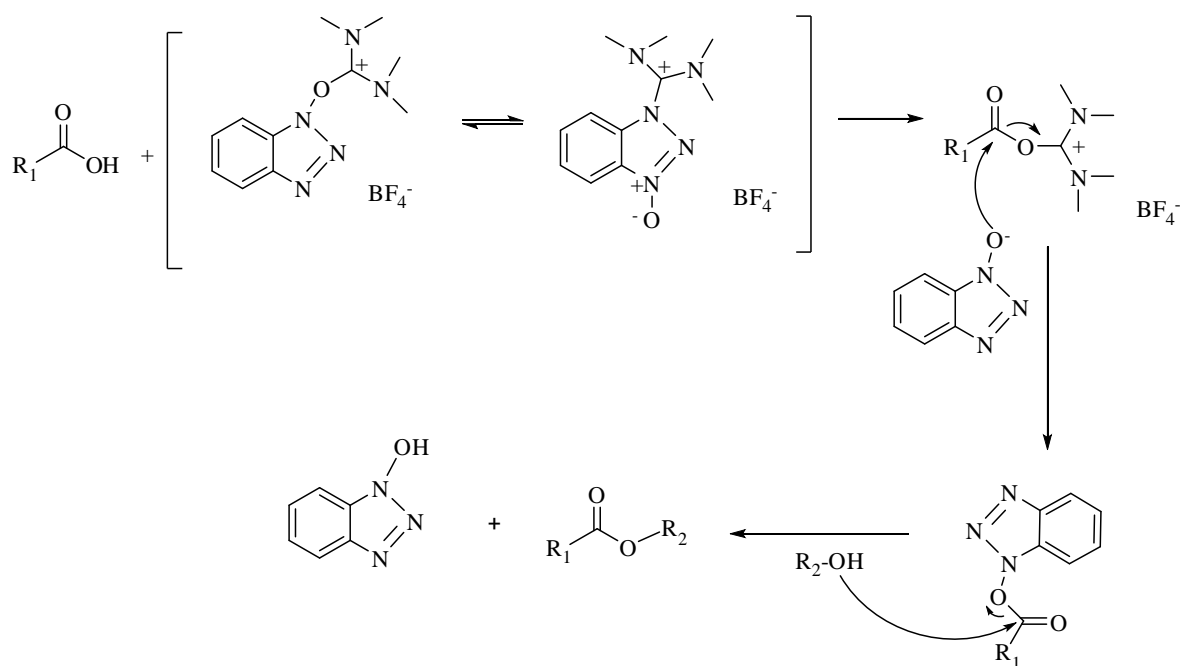


Figura 7. Mecanismo de esterificação de ácido com álcool catalisado por TBTU.

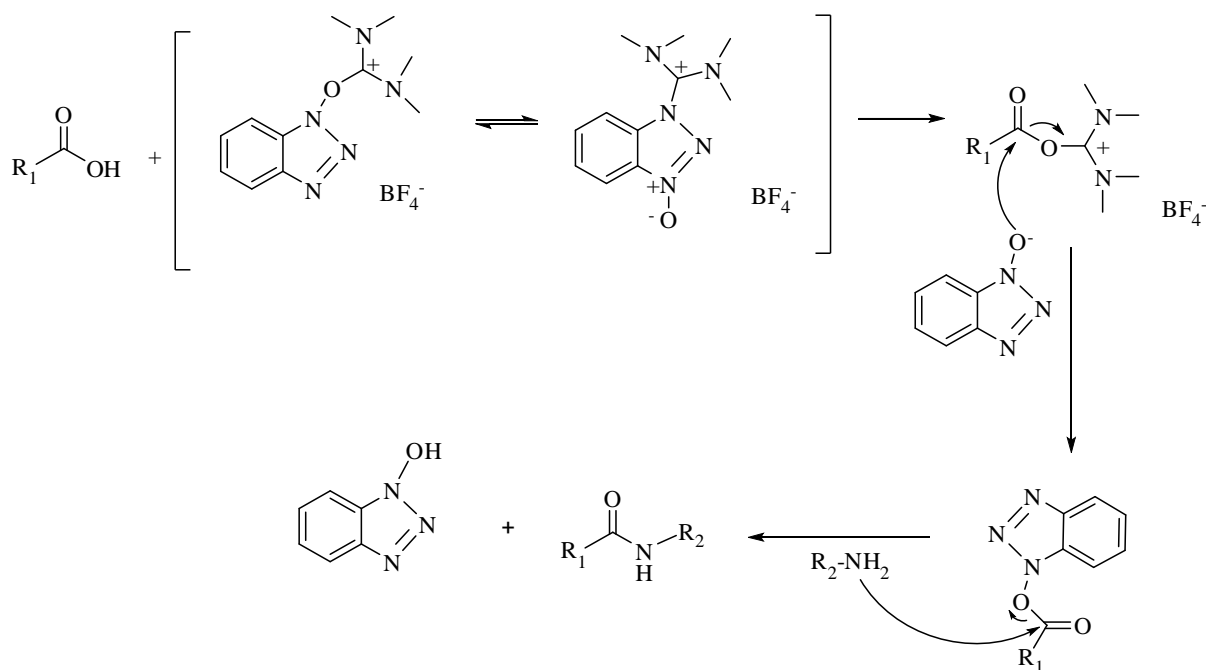


Figura 8. Mecanismo de formação de amidas com TBTU.

A caracterização do extrato das sementes, óleo da mistura de ácidos graxos, composto isolado e dos derivados preparados será descrita individualmente, a seguir.

5.1. Caracterização do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*

Pela análise do espectro do extrato das sementes no IV (Figura 9), um padrão de ácido carboxílico com uma banda na região de $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, devida ao estiramento OH. Banda na região de $1744 - 1707 \text{ cm}^{-1}$ são referentes ao estiramento C=O de ésteres e ácidos. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2} - \text{H}$ e $\text{C}_{\text{sp}3} - \text{H}$ são em $3048 - 3003 \text{ cm}^{-1}$ e $2919 - 2850 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. A banda em 1612 cm^{-1} é referente ao estiramento de ligação C=C. As bandas em 1470 cm^{-1} e 1409 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 , respectivamente. A banda na região de $1185 - 1162 \text{ cm}^{-1}$ é produzida pelo estiramento de C-O. A banda em 912 cm^{-1} é referente à deformação angular fora do plano de =C-H. Finalmente, a banda em 717 cm^{-1} é devida à deformação angular fora do plano de CH_2 , banda característica de cadeia carbônica longa $(\text{CH}_2)_n$ com $n \geq 4$ (Barbosa, 2007).

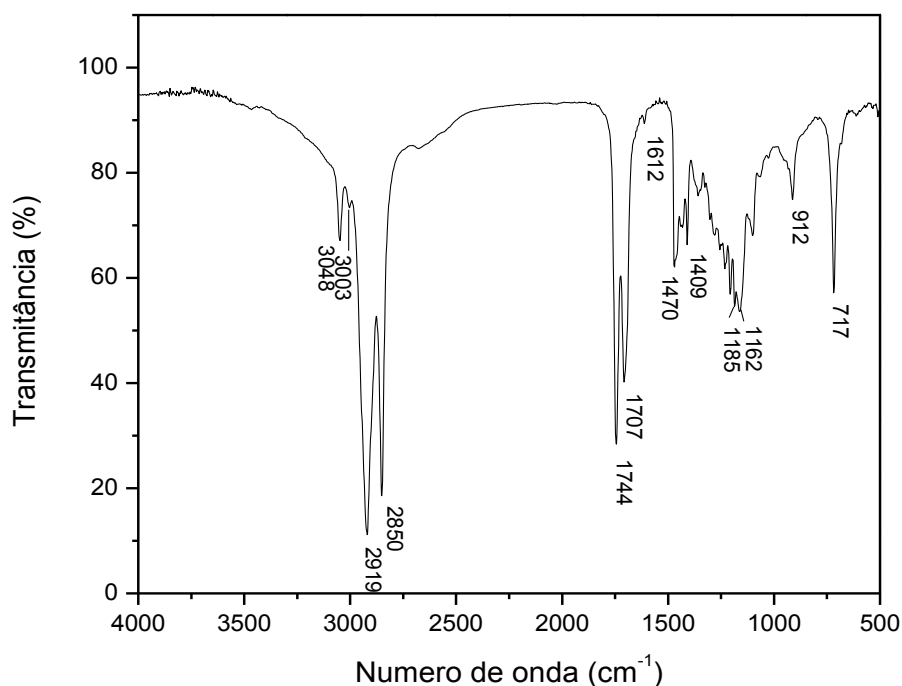


Figura 9. Espectro no infravermelho (KBr) do extrato obtido por maceração em hexano das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

O extrato das sementes apresentou o espectro de IV característico de ésteres (banda em 1744 cm^{-1}) e ácidos carboxílicos (1707 cm^{-1}), fato que levou à realização de derivatização por sililação para se conhecer os componentes da mistura (Oliveros-Bastidas et al., 2013). Foi obtido o cromatograma do extrato (Figura 10) e observou-se a presença de sete picos os quais correspondem aos ésteres e trimetilsilil éster dos ácidos graxos.

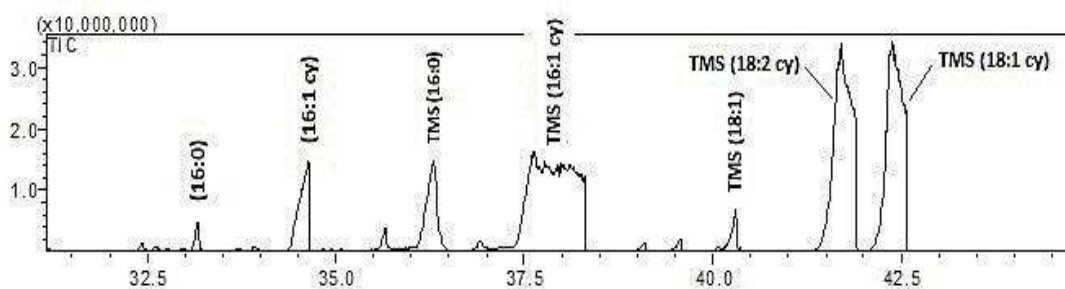


Figura 10. Cromatograma dos ésteres e trimetilsilil éster dos ácidos graxos presentes no extrato obtido por maceração em hexano das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

Os espectros de massas, obtidos do extrato das sementes permitiram identificar os compostos como: **A.** Palmitato de metila (Figura 11), **B.** Ácido hidnocárpico (Figura 12), **C.** Ácido palmítico (Figura 13), **D.** TMS-éster do ácido hidnocárpico (Figura 14), **E.** Ácido oléico (Figura 15), **F.** Ácido górlico (Figura 16), **G.** Ácido chaulmúgrico (Figura 17).

Esta identificação foi feita por comparação dos espectros de massas dos compostos presentes no extrato com a biblioteca do CG-MS, obtendo uma similaridade dentre 93 - 88% na biblioteca Wiley na maioria dos compostos. Também foram comparados com os espectros da livraria de lipídeos da AOCS.

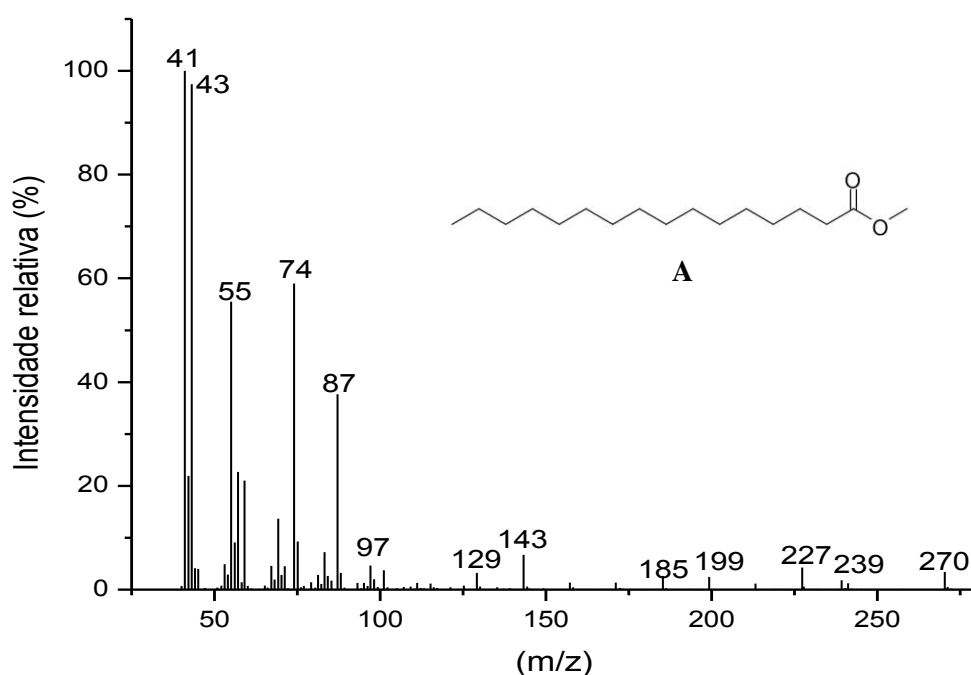


Figura 11. Espectro de massas do palmitato de metila (A).

Estudos anteriores determinaram o teor dos ácidos graxos presentes no extrato de *Carpotroche brasiliensis*, que foi descrito como tendo 24,4% de ácido chaulmúgrico, 45,5% de ácido hidnocárpico, 15,4% de ácido górlico, acompanhados de 6,6% de ácido palmítico, 6,3% de ácido oléico e de uma série homóloga de ácidos ciclopentênicos de cadeia carbônica menor. Nesta análise, foi usada a técnica de destilação fracionada dos ésteres etílicos acompanhada da cristalização fracionada, que é o método empregado até hoje para o isolamento destes ácidos em escala preparativa (Oliveira et al., 2009; Sebedio, 1989).

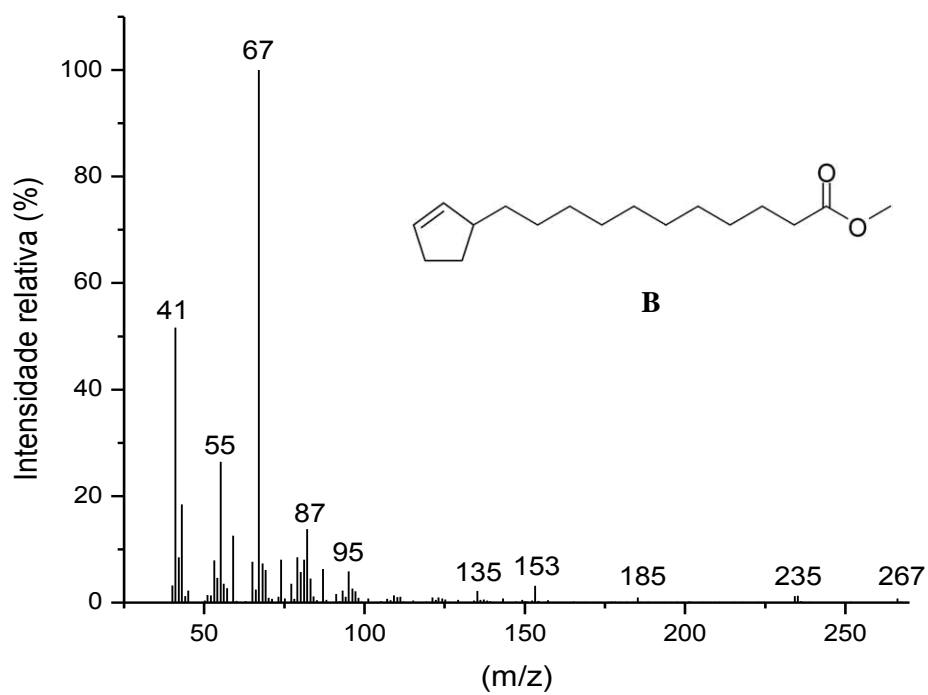


Figura 12. Espectro de massas do ácido hidnocárpico (B).

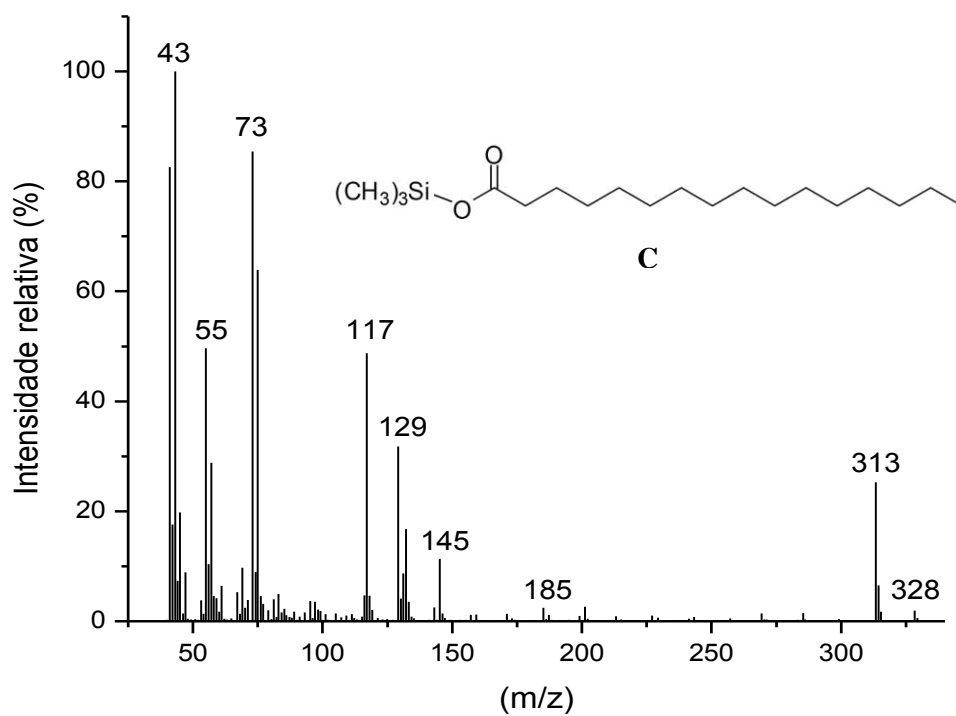


Figura 13. Espectro de massas do ácido palmítico (C).

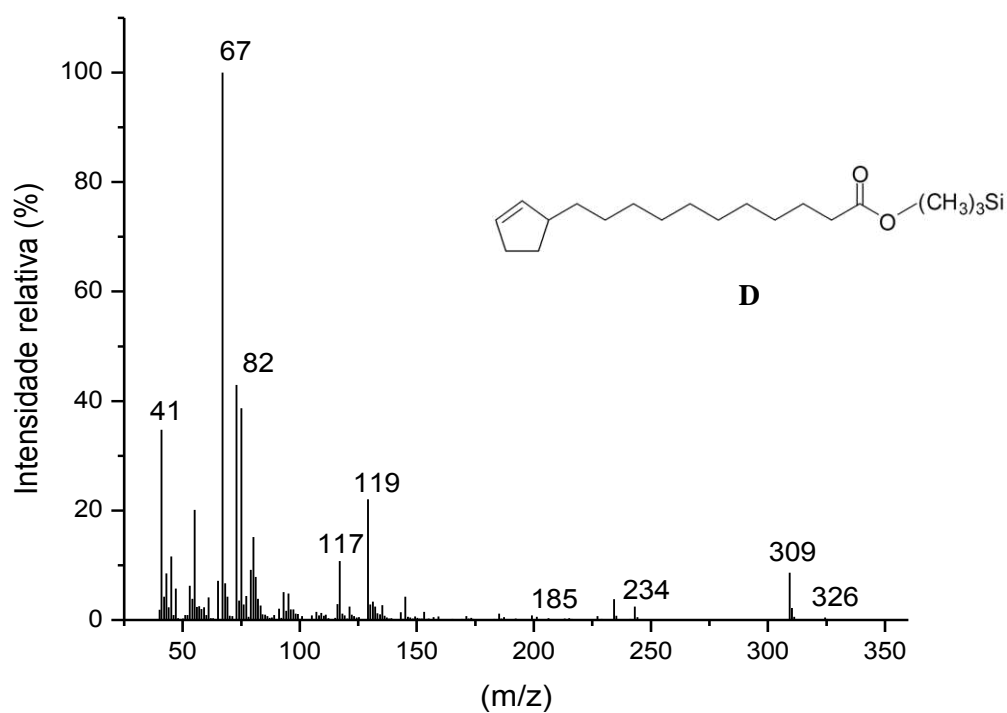


Figura 14. Espectro de massas TMS-éster do ácido hidnocárpico (D).

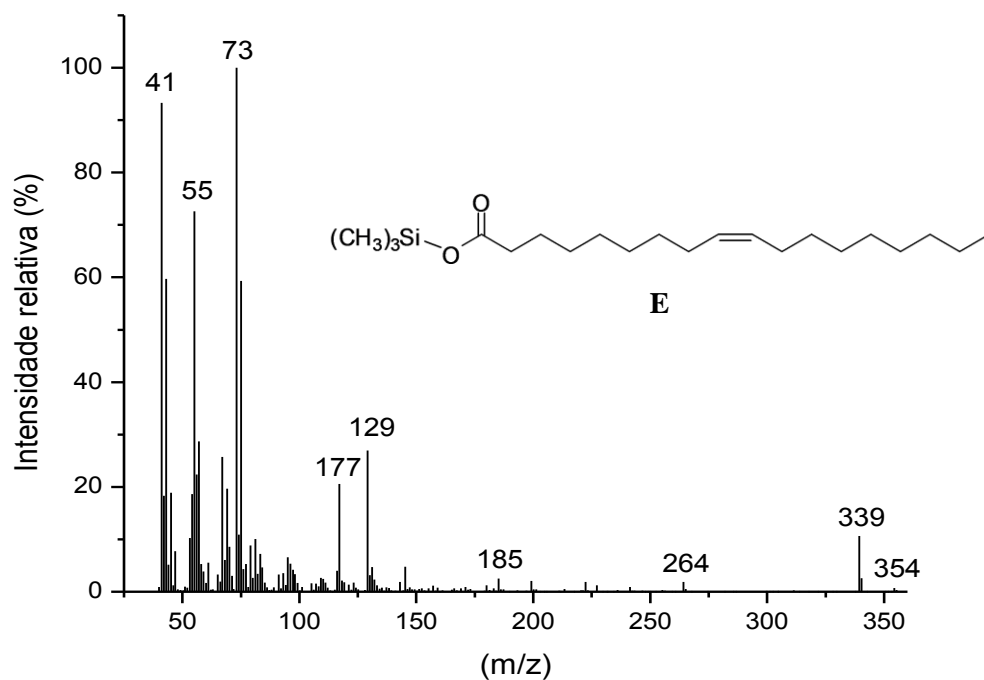


Figura 15. Espectro de massas do ácido oléico (E).

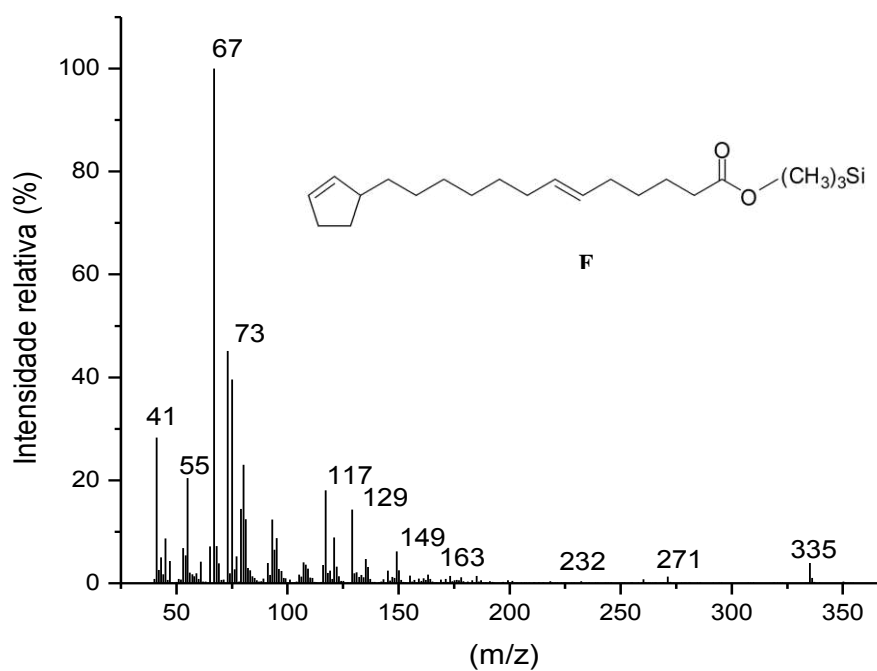


Figura 16. Espectro de massas do ácido górgico (F).

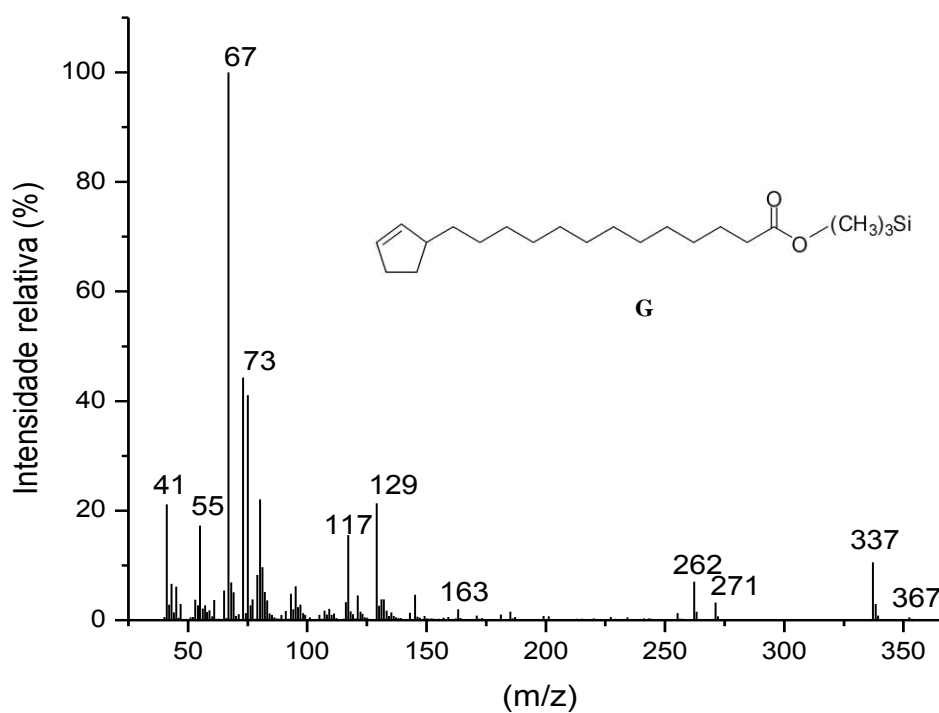


Figura 17. Espectro de massas do ácido chaulmúrgico (G).

5.2. Caracterização do óleo obtido do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*

Observa-se no espectro IV do óleo obtido (Figura 18), uma banda em 1741 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de éster. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$ e $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ são em 3049 cm^{-1} e $2918 - 2849\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. As bandas em 1459 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. A banda na região de 1152 cm^{-1} é produzida pelo estiramento C-CO-O e a banda em 1097 cm^{-1} pelo estiramento O-C-C. A banda em 911 cm^{-1} é referente à deformação angular fora do plano de =C-H e, finalmente, a banda em 716 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de $(\text{CH}_2)_n$ com $n \geq 4$ (Barbosa, 2007).

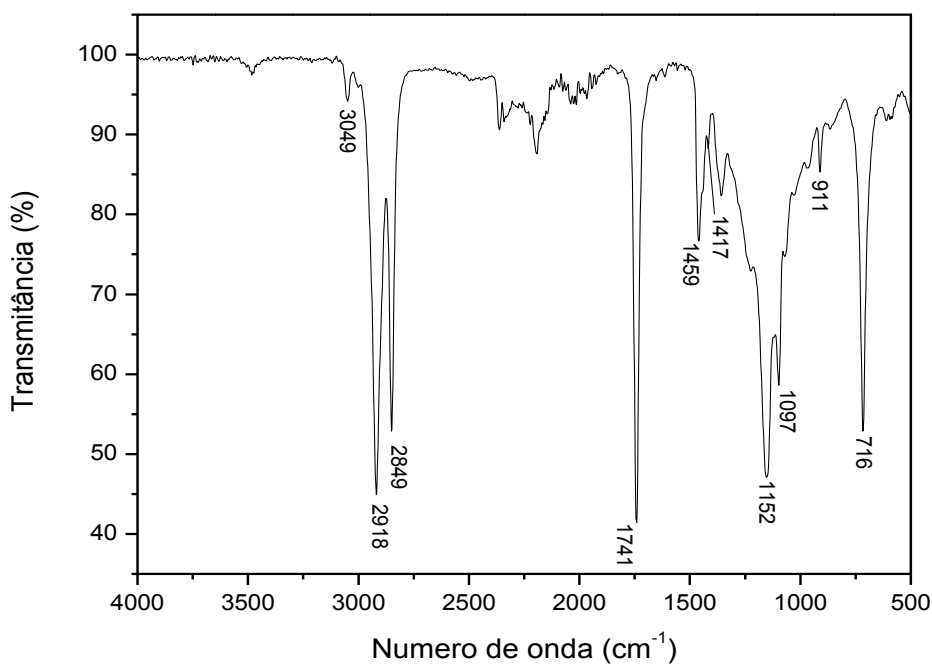


Figura 18. Espectro no infravermelho (KBr) do óleo obtido do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

O óleo obtido apresentou o espectro de IV característico de ésteres, fato que levou à realização de transesterificação para se conhecer os componentes da mistura (Oliveros-Bastidas et al., 2013). Após a obtenção do cromatograma do óleo (Figura 19) pode-se notar a presença de três sinais, os quais correspondem aos derivados sililados dos ácidos graxos ciclopentênicos: ácido hidnocárpico (16:1 cy), ácido górlico (18:2 cy) e ácido chaulmúgrico (18:1 cy). Os espectros de massas obtidos são apresentados nas Figuras 20, 21 e 22. Esta

identificação foi feita por comparação dos espectros de massas dos compostos presentes no óleo com a biblioteca do CG-MS, obtendo uma similaridade de 94% na biblioteca Wiley na maioria dos compostos.

Os ácidos graxos com um anel terminal de ciclopent-2-enila são encontrados em óleos de sementes de várias espécies de plantas da família Flacourtiaceae. O óleo de Chaulmugra é extraído das sementes de *Hydnocarpus* e é utilizada na medicina popular para o tratamento da lepra. Os três ácidos graxos mais comuns deste tipo são: ácido 11-ciclopent-2-enilundecanóico (hidnocárpico), ácido 13-ciclopent-2-eniltridecanóico (chaulmúgrico) e ácido 13-ciclopent-2-eniltridec-6-enóico (górlico). Todos têm a estereoquímica *R* no carbono 1 do anel de ciclopent-2-enila (Christie et al., 1969).

Estudos anteriores apresentam que o óleo tem como constituintes majoritários os ácidos graxos ciclopentênicos: hidnocárpico, chaulmúgrico, górligo, encontrados no óleo de chaulmugra extraído das sementes de varias espécies de *Hydnocarpus* e *C. brasiliensis*. Esses ácidos são conhecidos pela atividade farmacológica e seu uso como agentes antilepróticos. Além disso, são responsáveis pela atividade anti-inflamatória e analgésica do óleo (Lima et al., 2005).

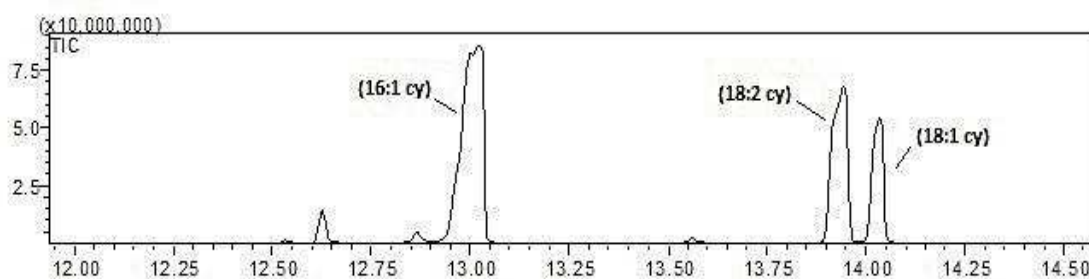


Figura 19. Cromatograma dos ácidos graxos ciclopentênicos sililados presentes no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

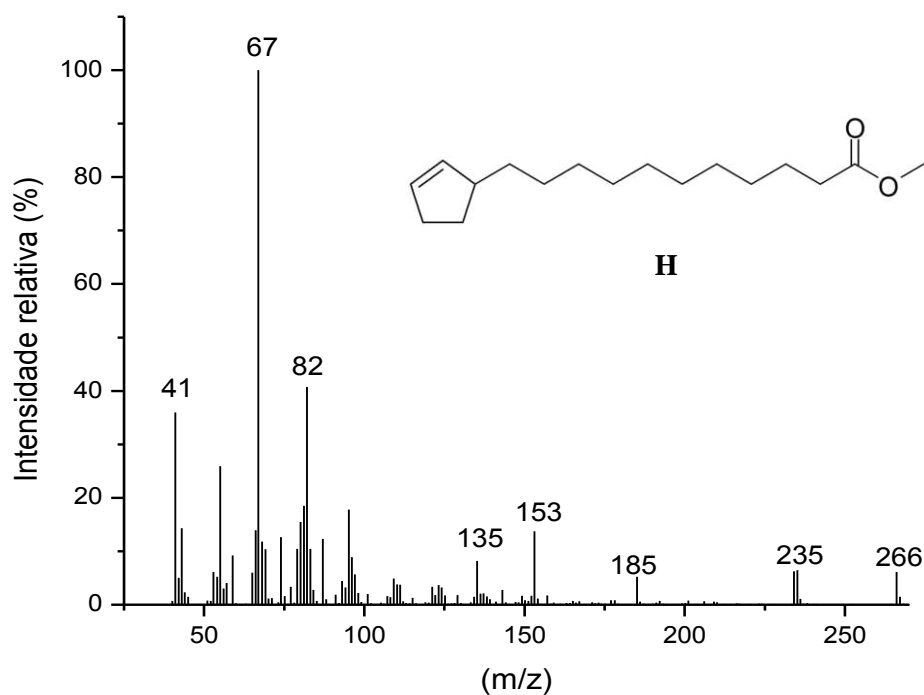


Figura 20. Espectro de massas do ácido hidnocárpico (H) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

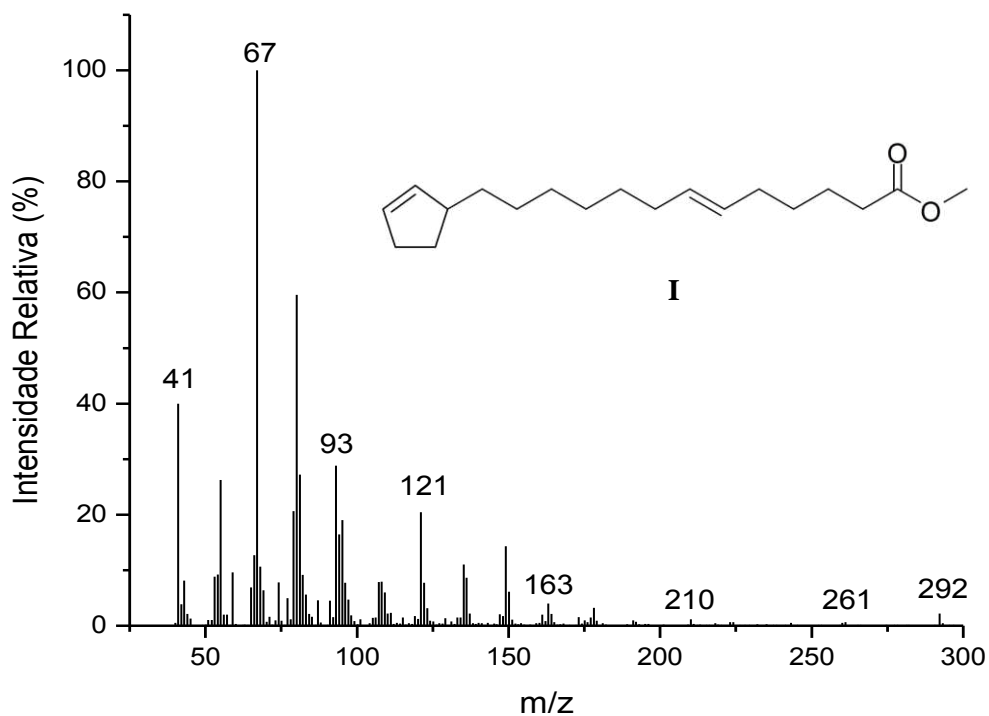


Figura 21. Espectro de massas do ácido góricico (I) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

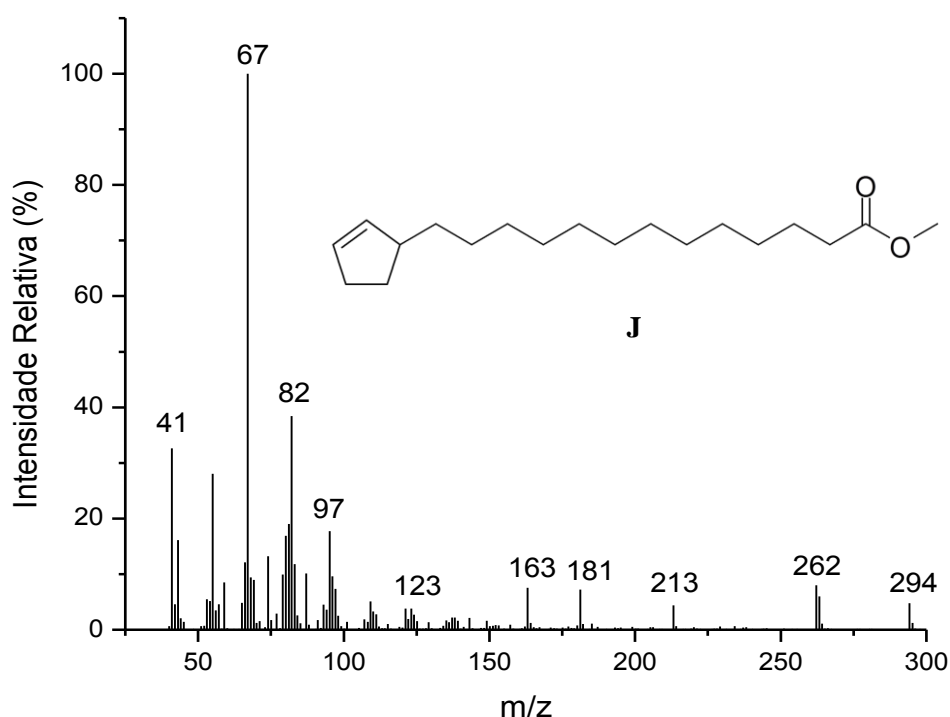


Figura 22. Espectro de massas do ácido chaulmúgrico (J) presente no óleo obtido do extrato hexânico das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

5.3. Caracterização do Ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 23), um padrão característico de ácidos carboxílicos com uma banda na região de $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, devidas ao estiramento OH. A banda em 1701 cm^{-1} é referente ao estiramento C=O. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2} - \text{H}$ e $\text{C}_{\text{sp}3} - \text{H}$ são em 3049 cm^{-1} e $2917 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ respectivamente. As bandas em 1472 cm^{-1} e $1429 - 1409 \text{ cm}^{-1}$ são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. As bandas na região de $1207 - 1186 \text{ cm}^{-1}$ são produzidas pelo estiramento de C-O e finalmente, a banda em 717 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de CH_2 .

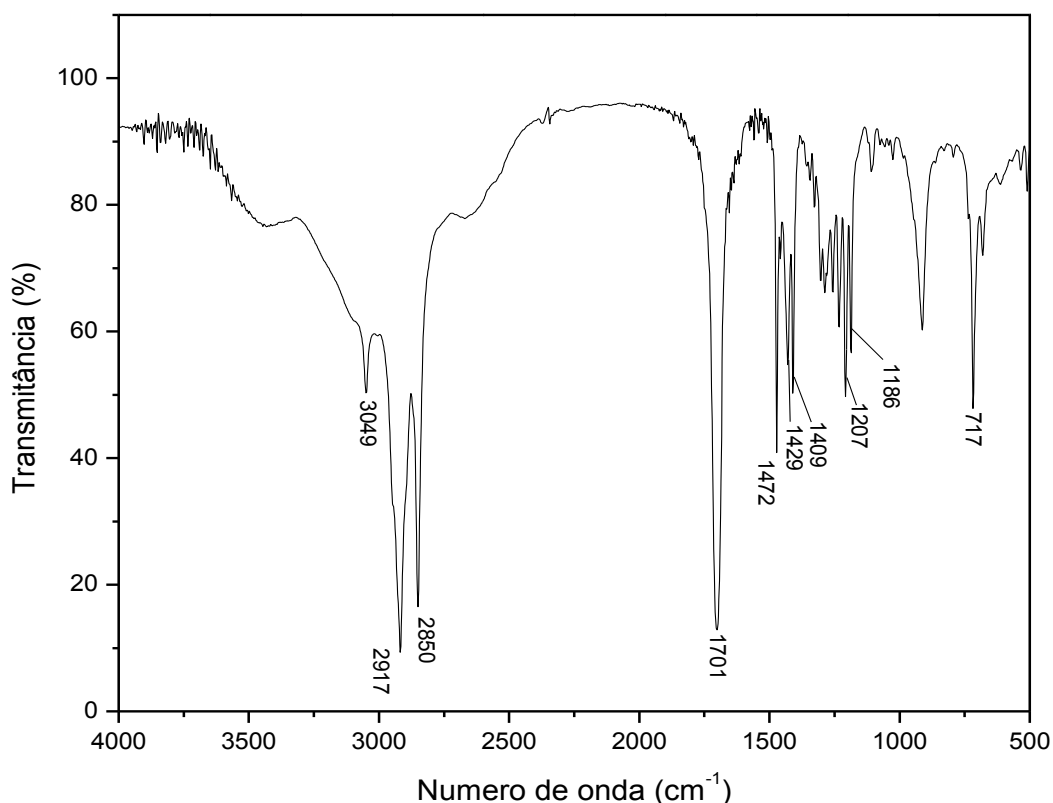


Figura 23. Espectro no infravermelho (KBr) do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) ou ácido hidnocárpico obtido do extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

No espectro de massas (Figura 24) observou-se que o composto possui pico do íon molecular em 252 [M^+]. O pico base é o $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 235$ representa a perda do grupo hidroxila a partir do pico do íon molecular. O composto foi identificado como ácido hidnocárpico. Na Figura 25 são apresentados os fragmentos característicos para o ácido mencionado (Zhang, 1989; Silverstein, 2000; Christie, 1969).

Estudos anteriores apresentam a análise por CG-EM que permitiu observar o íon $m/z = 67$ como pico base do espectro, característico do cátion ciclopentenila, o que levou a propor a presença de ácidos ciclopentênicos (Oliveira et al., 2009; Zhang, 1989).

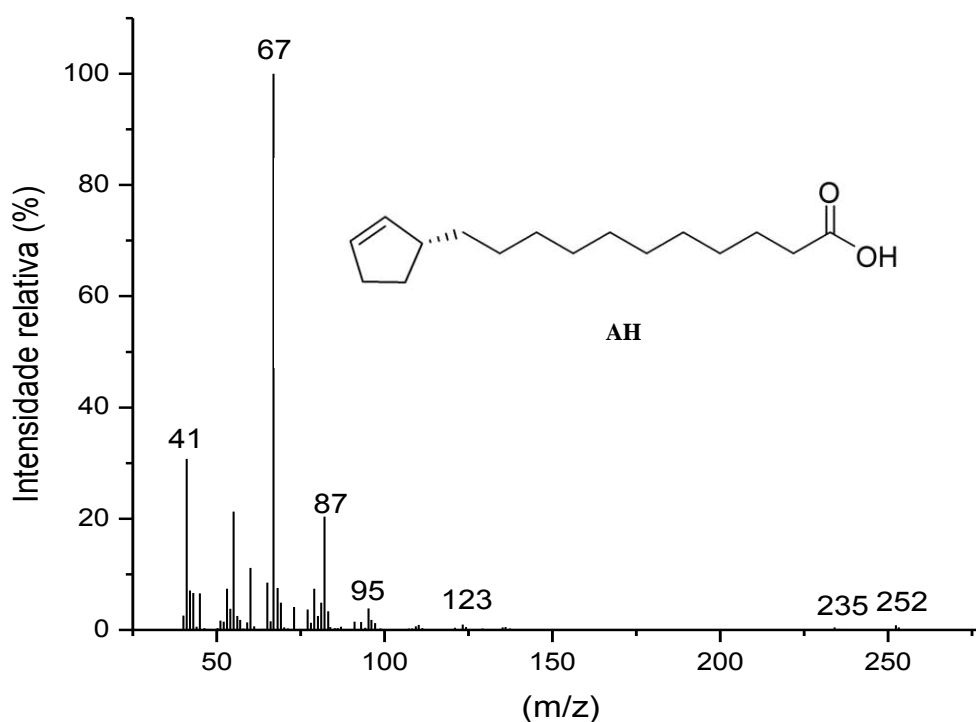


Figura 24. Espectro de massas do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH) ou ácido hidnocárpico presente no extrato das sementes de *Carpotroche brasiliensis*.

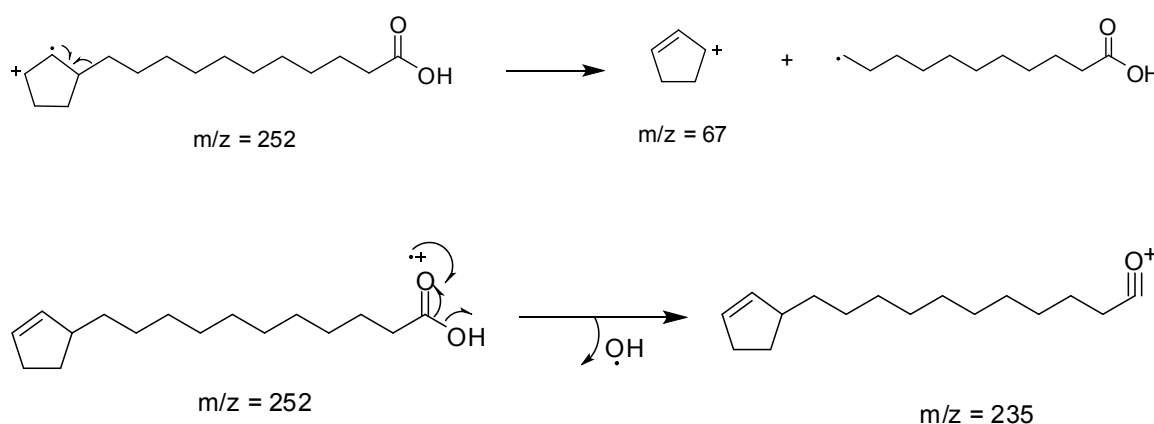


Figura 25. Fragmentos característicos do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).

Para complementar a determinação de estrutura do composto foram realizados espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

No espectro de RMN de ^1H (Figura 26), observa-se um multipletto em δ 5,68 (s, 1H), correspondente a H3', um hidrogênio ligado ao carbono olefínico C3'. Um triplete em δ 2,34 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), relativo ao hidrogênio H2 ligado ao carbono C2 e um multipletto em δ 2,02 (ddd, $J = 12,0; 8,1; 3,5$ Hz, 1H) referente ao hidrogênio H5'. Finalmente, observam-se singletos referentes aos hidrogênios metínicos dos carbonos (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) em δ 1,70 – 1,56; 1,45 – 1,12 (Blaise et al., 1997).

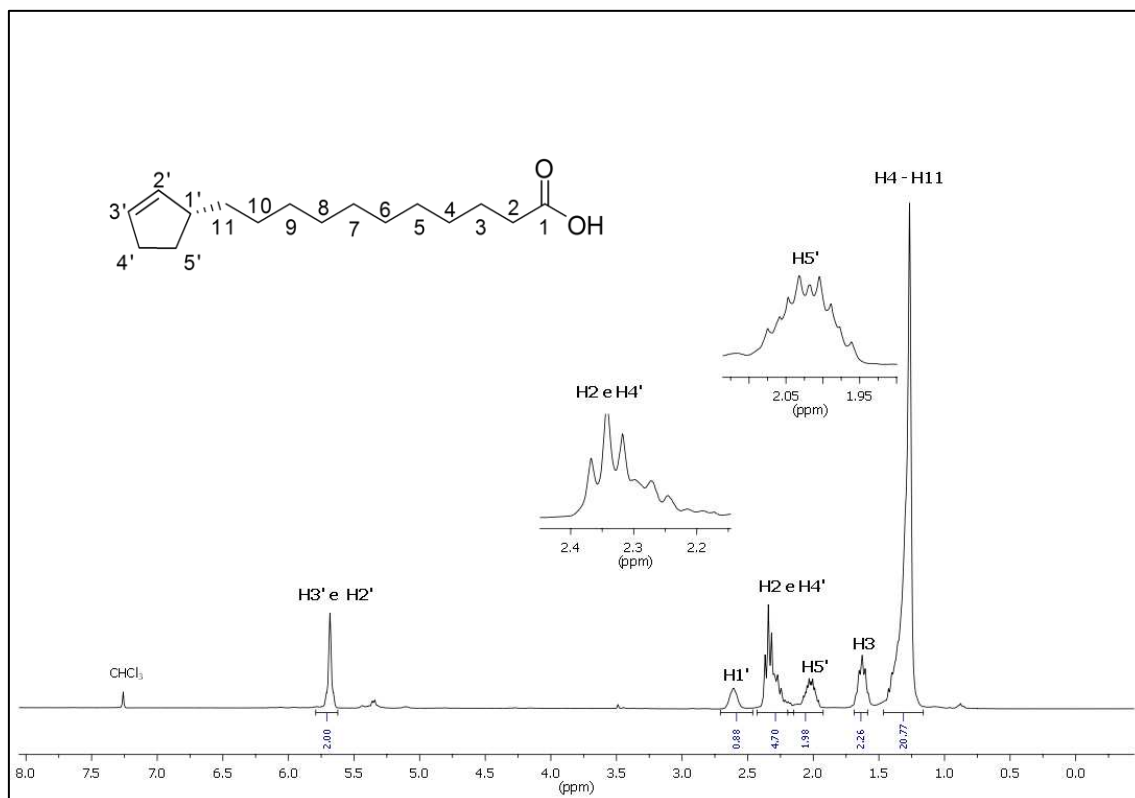


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 27), nota-se um sinal em δ 179,87 correspondente ao carbono da carbonila (C1). Além disso, são observados dois sinais em $\delta = 135,43$ e δ 129,93, relativos a C2' e C3' respectivamente, atribuídos aos carbonos da ligação dupla. Finalmente, é observado um sinal em $\delta = 45,58$ devido ao C1' do anel ciclopentênico (Blaise et al., 1997).

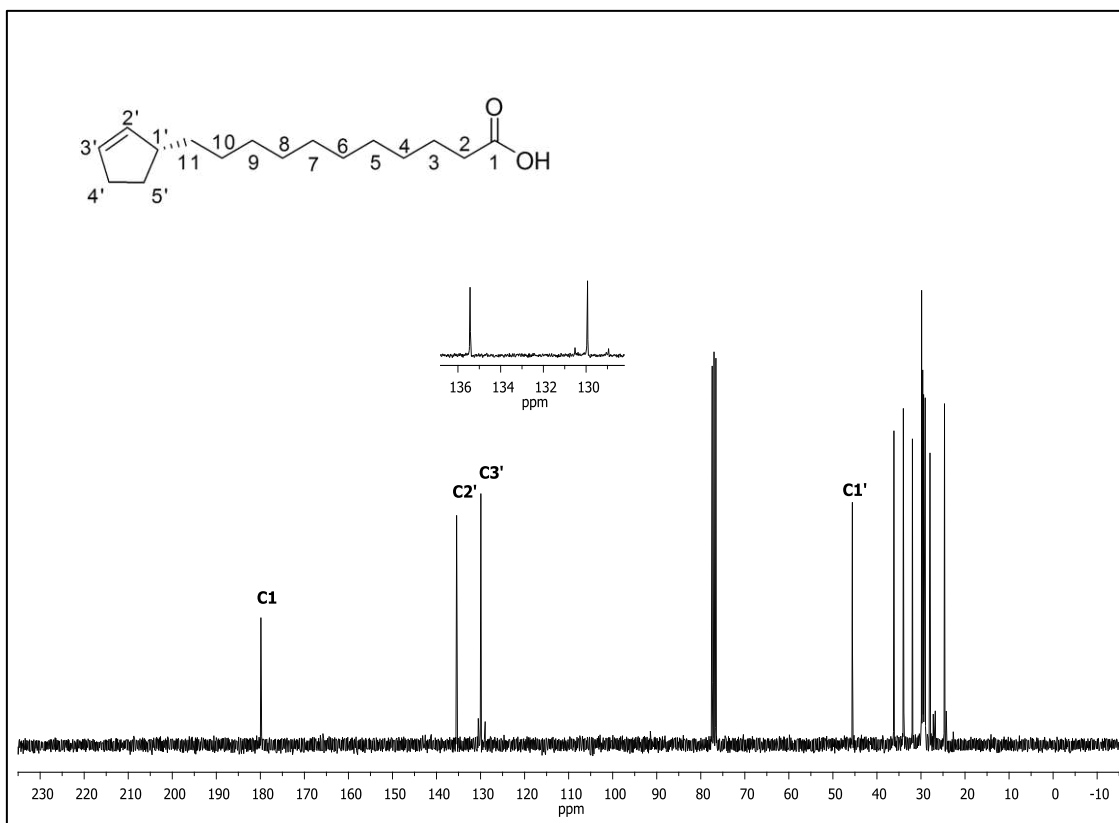


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH).

5.4. Caracterização dos derivados do ácido (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanóico (AH)

5.4.1. Ésteres

5.4.1.1. Caracterização de (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1)

Verifica-se no espectro IV do composto 1 (Figura 28) um padrão característico de éster. A banda na região de 1740 cm^{-1} é referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2}-\text{H}$ e $\text{C}_{\text{sp}3}-\text{H}$ são em 3048 cm^{-1} e $2920 - 2850\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. As bandas em 1459 cm^{-1} e 1435 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. A banda na região de 1194 cm^{-1} é produzida pelo estiramento $\text{C}-\text{CO}-\text{O}$ e a banda em 1167 cm^{-1} pelo estiramento $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ e, finalmente, a banda em 718 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de CH_2 .

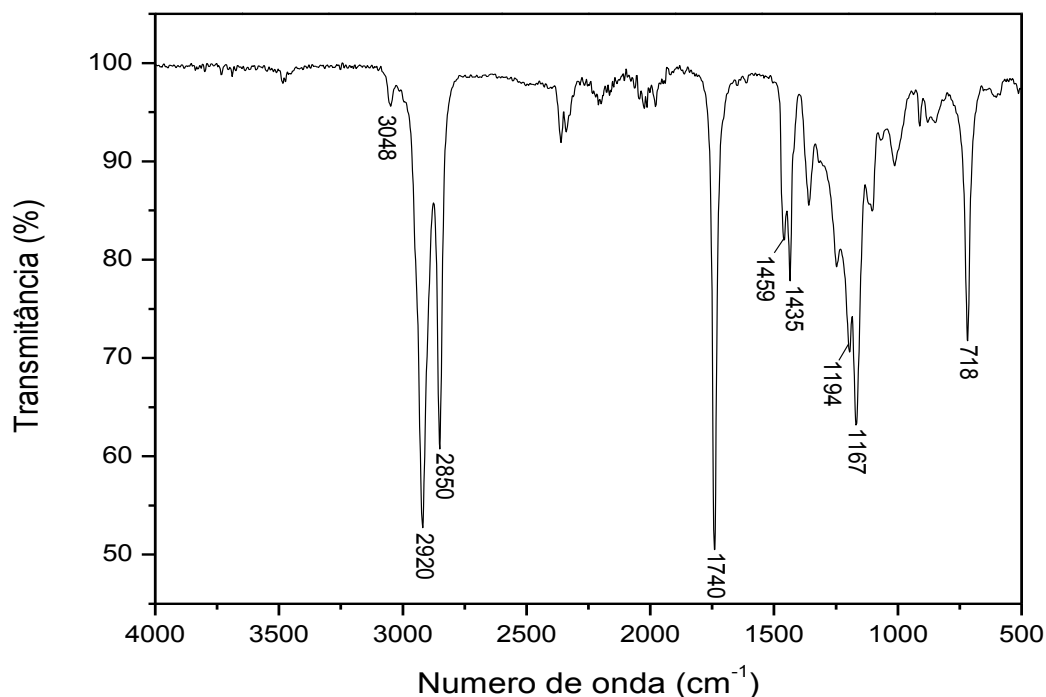


Figura 28. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).

No espectro de massas (Figura 29) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 266 [M^+] e o pico base em $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 185$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel e o m/z em 153 representa a perda de um grupo metoxila a partir do fragmento $m/z = 185$. O fragmento em $m/z = 235$ representa a perda de um grupo metoxila a partir do pico do íon molecular. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila. Na Figura 30 são apresentados os fragmentos característicos para o composto mencionado (Silverstein, 2000; Christie, 1969). Esta identificação foi feita por comparação do espectro de massa do derivado obtido com a biblioteca do CG-MS, obtendo uma similaridade de 91% na biblioteca Wiley.

Estudos anteriores apresentam a análise por CG-EM que permitiu observar o íon $m/z = 67$ como pico base do espectro, característico do cátion ciclopentenila, o que levou a propor a presença de compostos ciclopentênicos (Oliveira et al., 2009). O espectro de massas do éster metílico do ácido hidnocárpico apresenta o pico do íon molecular 266 [M^+]. O fragmento em $m/z = 185$ representa a clivagem β do anel ciclopentênicos. O fragmento em $m/z = 153$ ($CH_2 = CH(CH_2)_7CO^-$) (Christie, 1969).

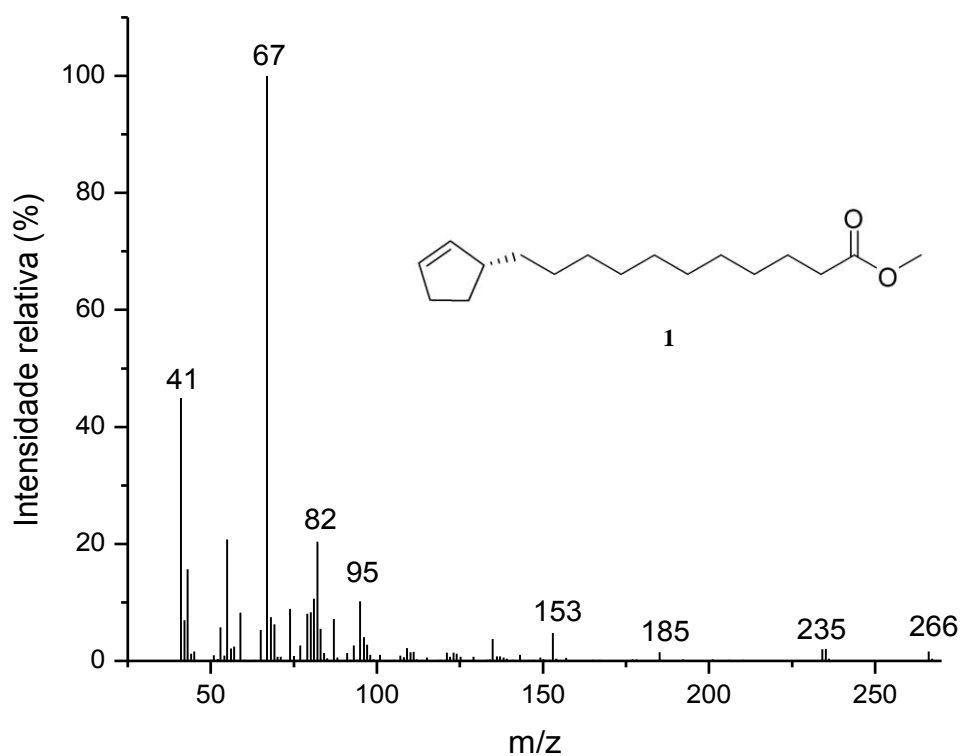
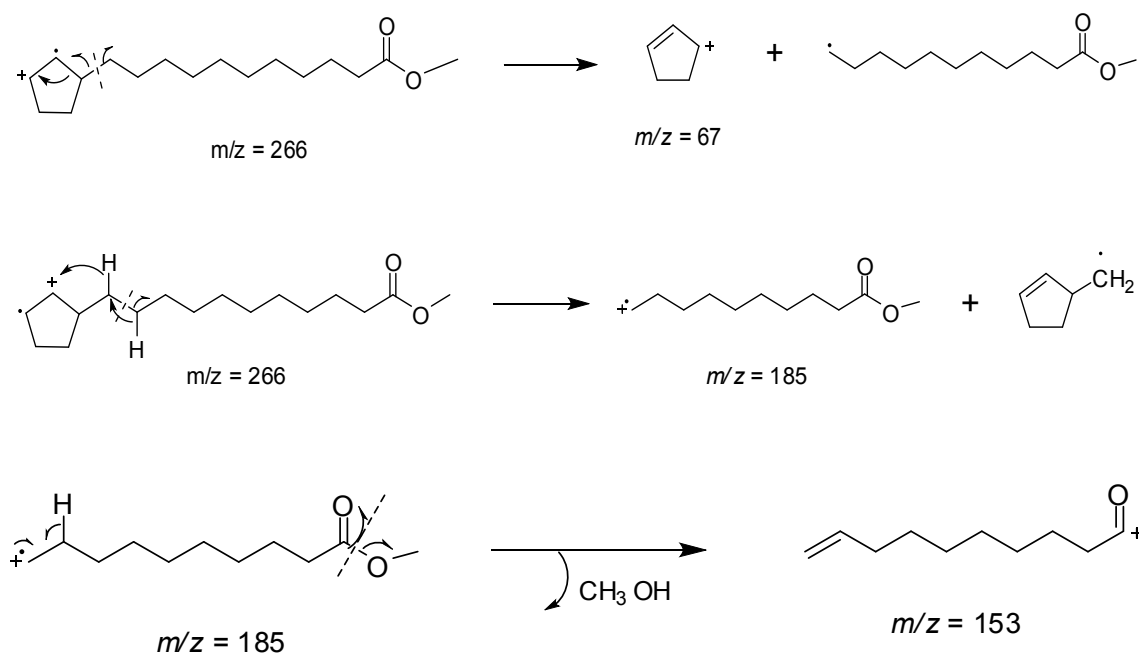


Figura 29. Espectro de massas do derivado (R)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).



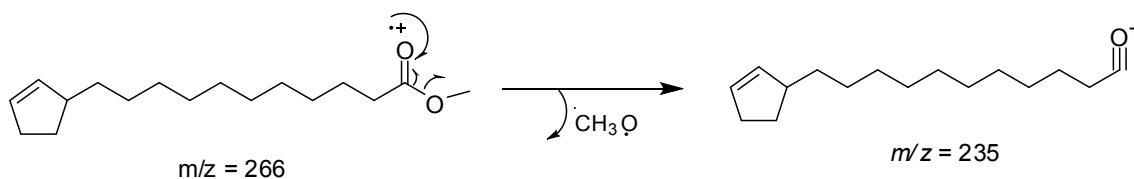


Figura 30. Fragmentos característicos do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de metila (1).

5.4.1.2. Caracterização de (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2)

Observa-se no espectro IV do composto (Figura 31) uma banda na região de 1736 cm^{-1} referente ao estiramento C=O. As bandas de vibrações de estiramento de $C_{sp^2}\text{-H}$ e $C_{sp^3}\text{-H}$ são em 3050 cm^{-1} e $2920 - 2851\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. As bandas em 1462 cm^{-1} e 1371 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. A banda na região de 1177 cm^{-1} é produzida pelo estiramento C-CO-O e a banda em 1098 cm^{-1} pelo estiramento O-C-C e, finalmente, a banda em 718 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de CH_2 .

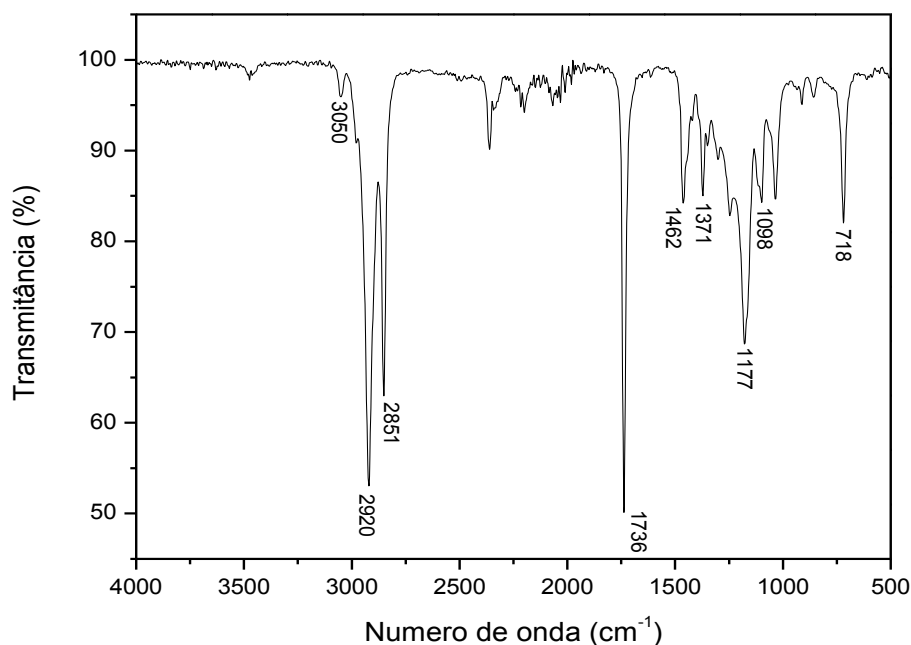


Figura 31. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2).

Para o espectro de massas do composto (Figura 32) verifica-se o pico de íon molecular de 280 $[M^+]$, e fragmentos em ($m/z = 235, 153, \text{ e } 67$), que são característicos de ácidos ciclopentênicos. O fragmento $m/z = 67$ é característico do íon do anel ciclopentênico. Observa-se o fragmento em $m/z = 235$ que representa a perda do grupo etoxila a partir do pico do íon molecular. O fragmento em $m/z = 199$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel e o $m/z = 153$ representa a perda do grupo etoxila a partir desse fragmento. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2).

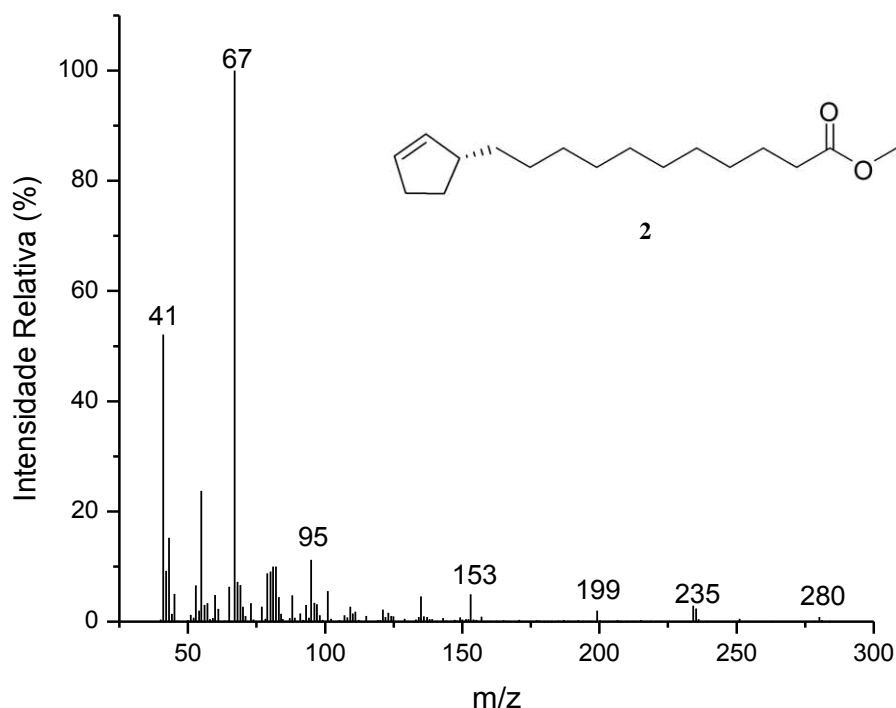


Figura 32. Espectro de massas do derivado (*R*)- 11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de etila (2).

5.4.1.3. Caracterização de (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3)

Observa-se no espectro IV do composto (Figura 33) uma banda na região de 1729 cm^{-1} referente ao estiramento $C=O$. As bandas de vibrações de estiramento de $C_{sp^2}-H$ e $C_{sp^3}-H$ são em 2977 cm^{-1} e $2921 - 2852\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. As bandas em 1465 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. A banda na região de 1178 cm^{-1} é produzida pelo estiramento $C-CO-O$ e a banda em 1108 cm^{-1} pelo

estiramento O-C-C e, finalmente, a banda em 720 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de CH_2 .

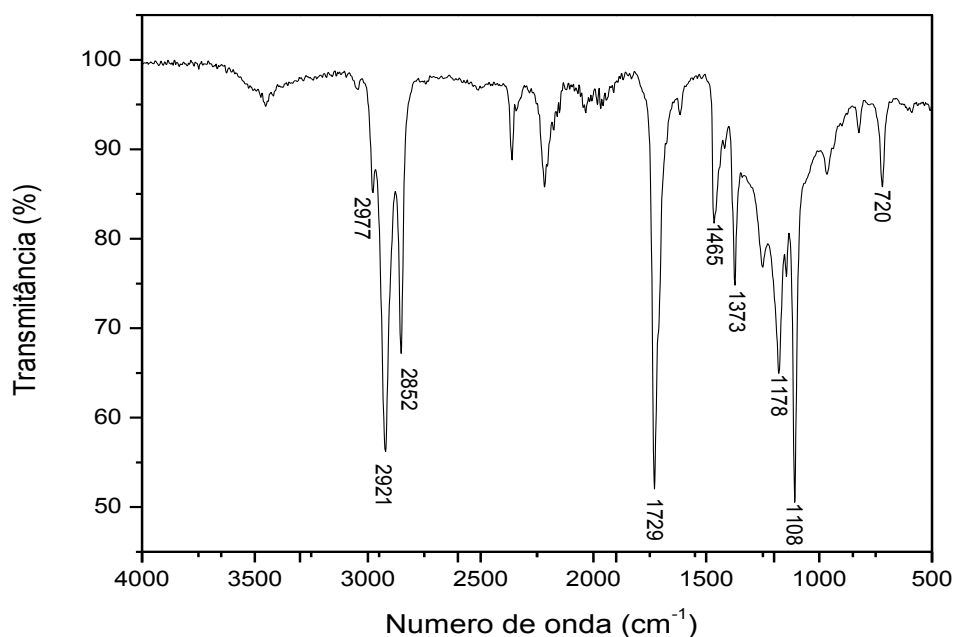


Figura 33. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3)

Para o espectro de massas do composto (Figura 34) verifica-se o pico de íon molecular de 294 [M^+] e o fragmento $m/z = 67$ característico para o anel ciclopentênico. O fragmento em $m/z = 83$ resulta da quebra da ligação C-C da carbonila, com retenção da carga pelo fragmento que contém oxigênio. O fragmento em $m/z = 213$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel. Observa-se o fragmento em $m/z = 235$ que representa a quebra da ligação C-O da carbonila. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila.

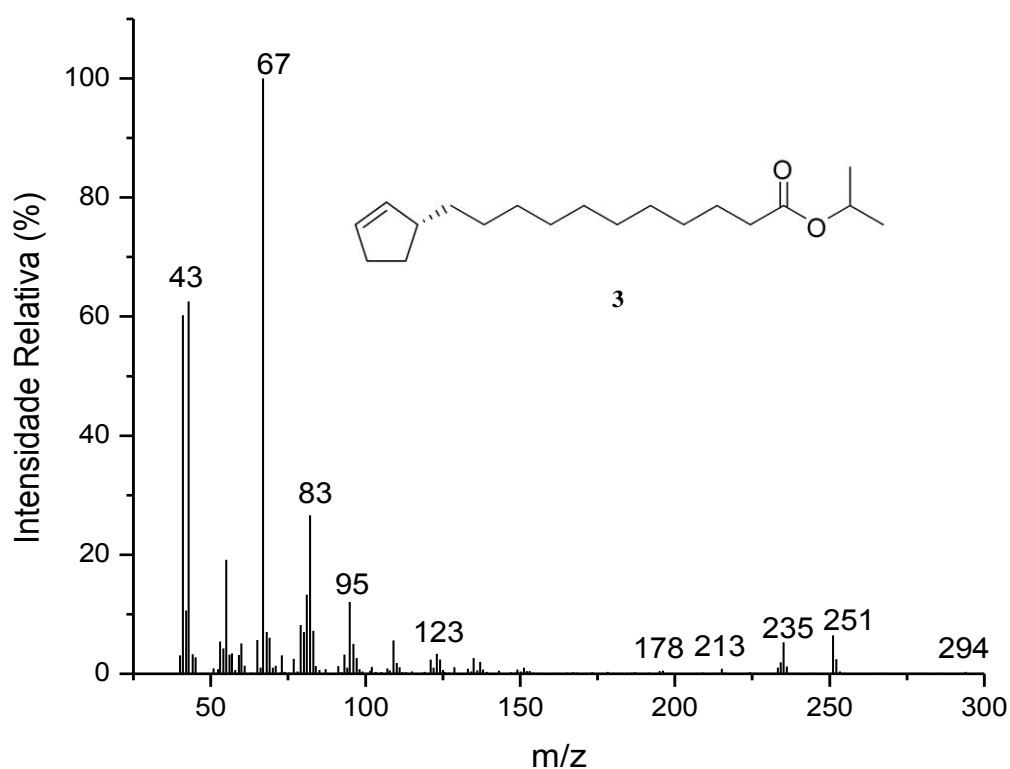


Figura 34. Espectro de massas do derivado (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de isopropila (3).

5.4.1.4. Caracterização (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4)

Observa-se no espectro IV do composto (Figura 35) uma banda na região de 1739 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$ e $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ são em 2922 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} respectivamente. As bandas em 1459 cm^{-1} e $1437 - 1417\text{ cm}^{-1}$ são referentes às vibrações de deformação angular de CH_2 e CH_3 respectivamente. A banda na região de 1157 cm^{-1} é produzida pelo estiramento C-CO-O e a banda em 1098 cm^{-1} pelo estiramento O-C-C , a banda em 719 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano de CH_2 , e, finalmente, as bandas em $668 - 628\text{ cm}^{-1}$ devida á deformação angular da ligação $\equiv\text{C-H}$.

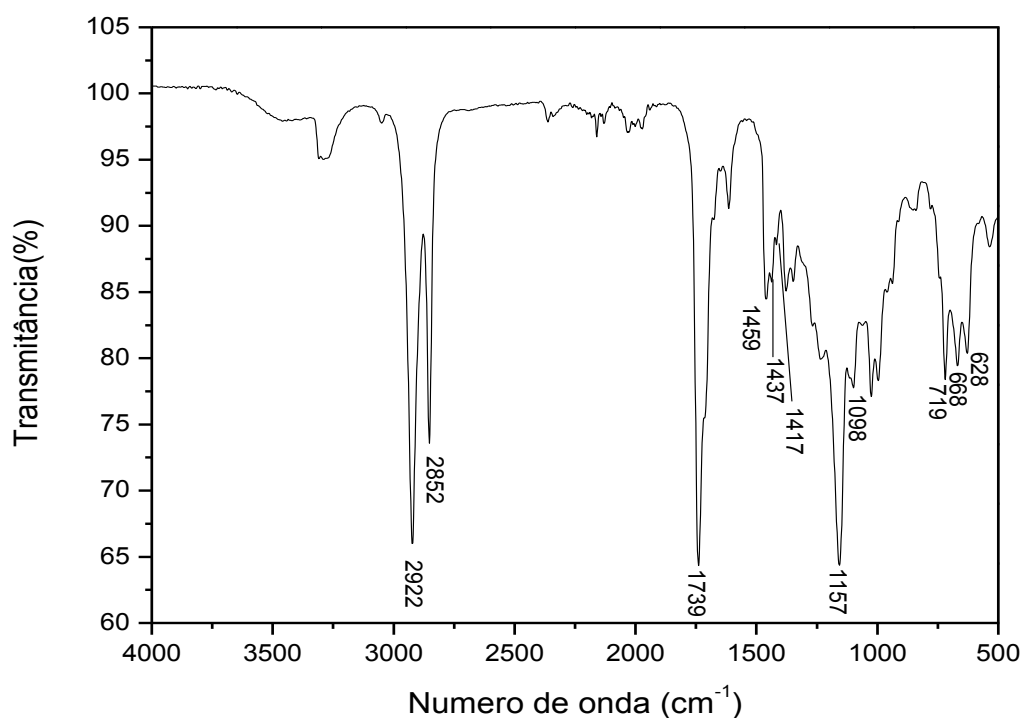


Figura 35. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4).

Para o espectro de massas do composto (Figura 36) verifica-se o pico de íon molecular de 289 [M^+] e o fragmento em $m/z = 67$ característico para o anel ciclopentênico. O fragmento em $m/z = 98$ provém do rearranjo de McLafferty, com quebra da ligação beta em relação ao grupo C=O. Observa-se o fragmento em $m/z = 234$ que representa a quebra da ligação C-O da carbonila. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila.

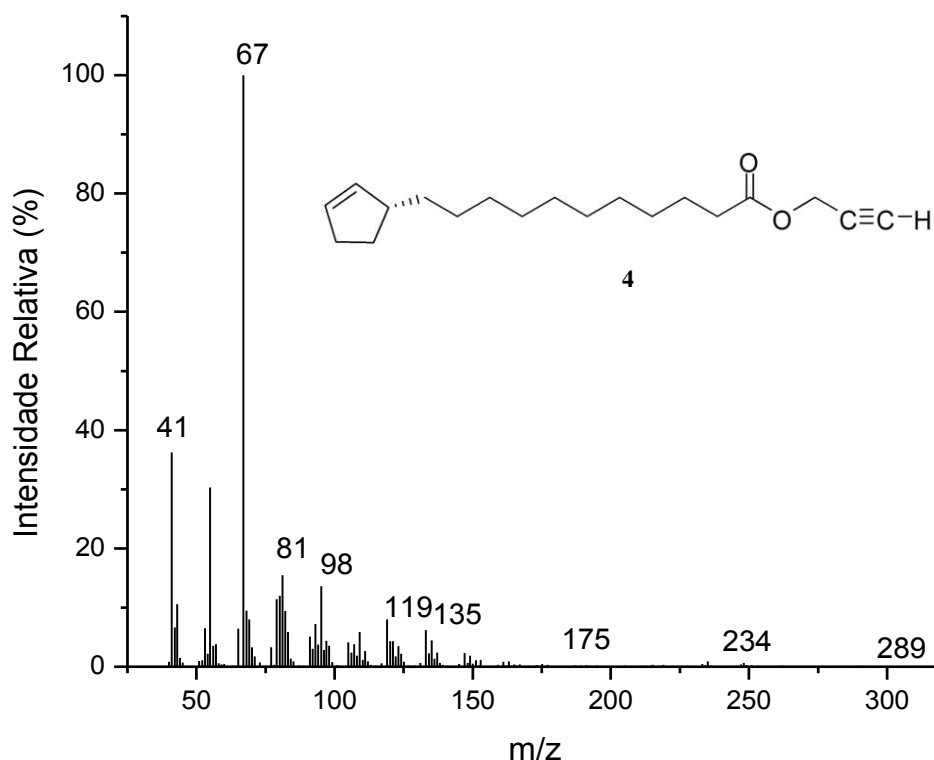


Figura 36. Espectro de massas do derivado (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)undecanoato de prop-2-inila (4).

A caracterização dos ácidos graxos obtidos do óleo de *C. brasiliensis* e seus derivados ésteres deve ser continuada com vistas à obtenção de compostos antibacterianos e anti-inflamatórios.

5.4.2. Amidas

5.4.2.1. Caracterização de (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida (1A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 37), uma banda na região de 3304 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ são em $2915 - 2847\text{ cm}^{-1}$. A banda presente em 1638 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O. A banda em 1545 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H e a banda em 1467 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-N e finalmente, a banda em 716 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H.

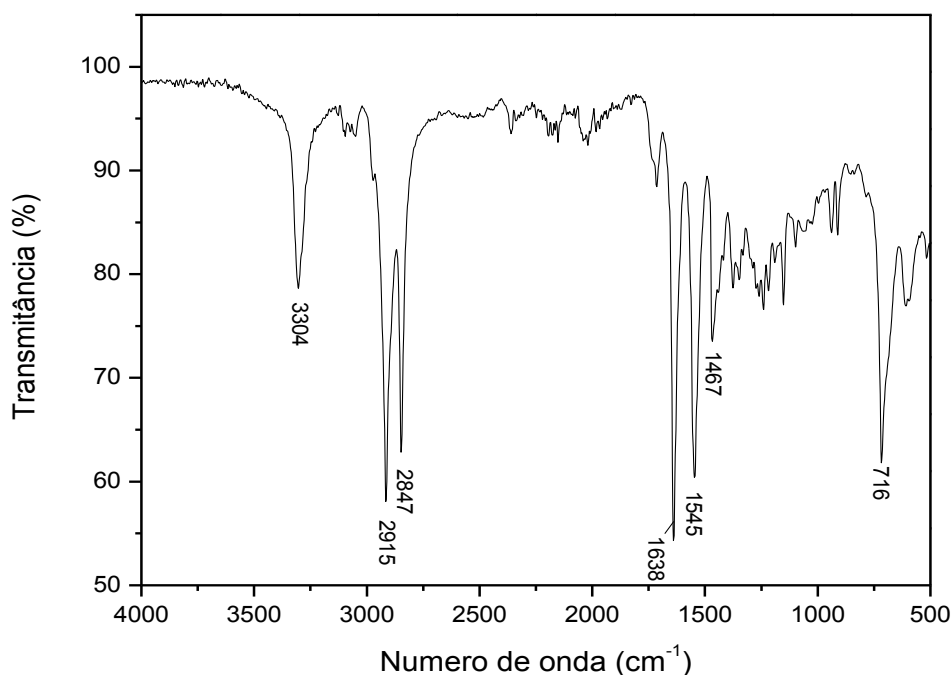


Figura 37. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida (1A).

No espectro de massas (Figura 38) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 279 [M^+]. Presume-se que o pico base é o $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 198$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel. O fragmento em $m/z = 87$ provém do rearranjo de McLafferty, com um hidrogênio no carbono gamma do grupo acila e grupos metila no átomo de nitrogênio. O fragmento em $m/z = 235$ corresponde à quebra da ligação C-N a partir do íon molecular. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida. Esta identificação foi feita por comparação do espectro de massa do derivado obtido com a biblioteca do CG-MS, obtendo uma similaridade de 92% na biblioteca Wiley na maioria dos compostos. Na Figura 39 são apresentados os fragmentos característicos para o composto mencionado (Silverstein, 2000; Christie, 1969).

Estudos anteriores apresentam a análise por CG-EM que permitiu observar o íon $m/z = 67$ como pico base do espectro, característico do cátion ciclopentenila, o que levou a propor a presença de compostos ciclopentênicos (Oliveira et al., 2009).

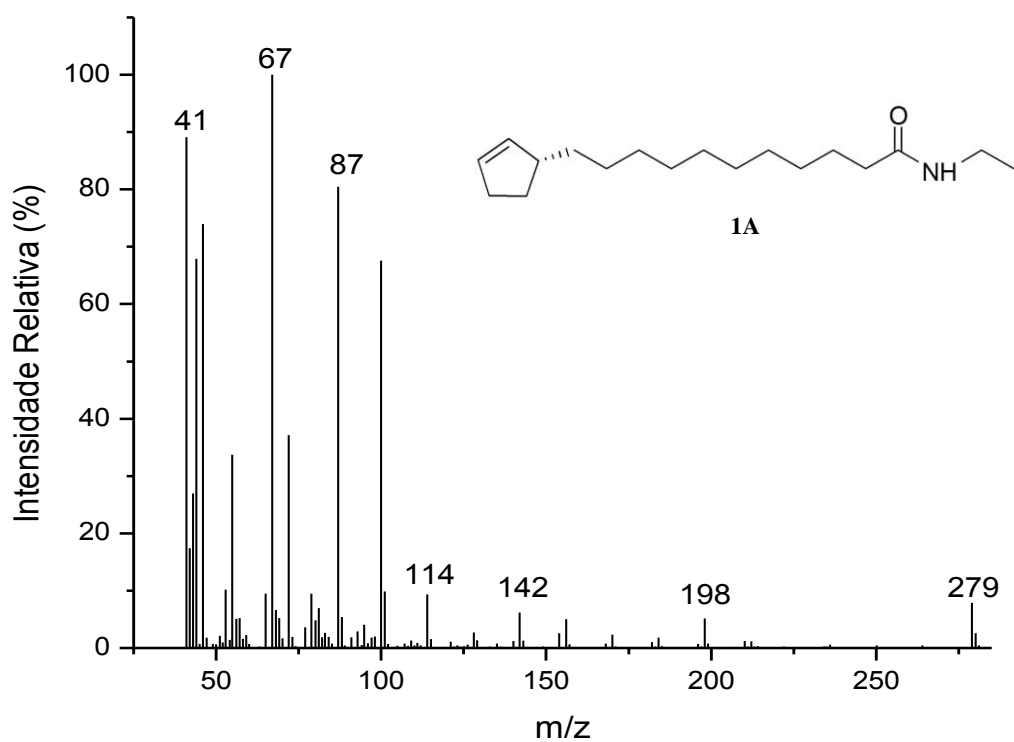
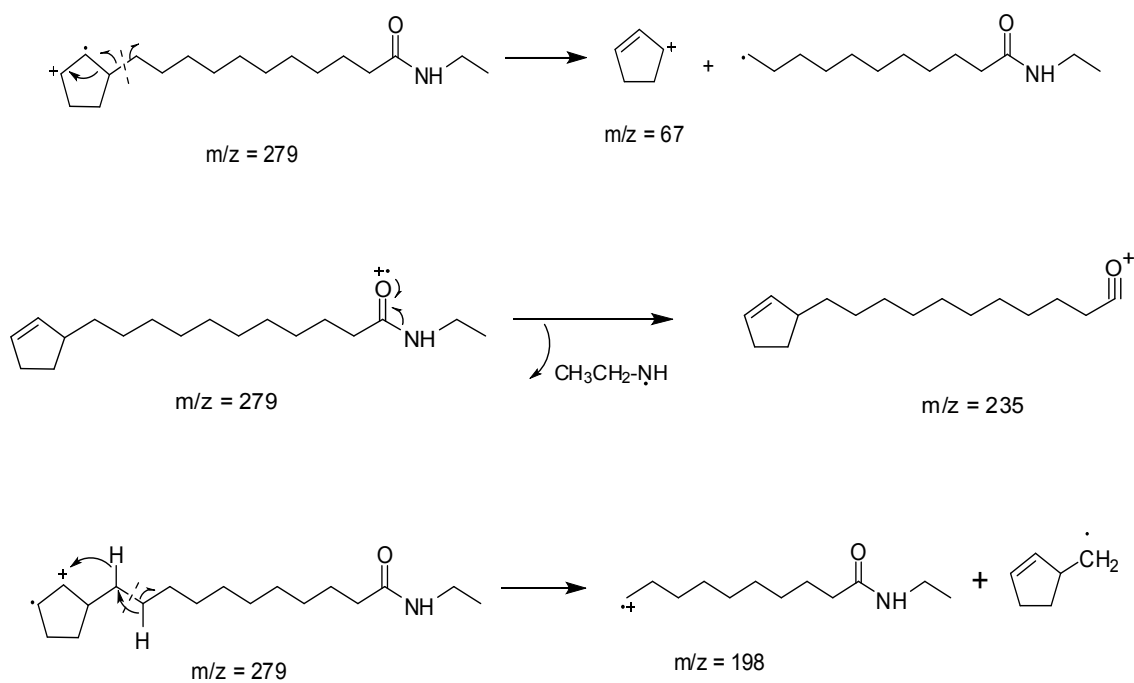


Figura 38. Espectro de massas do derivado *(R)*-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida (1A).



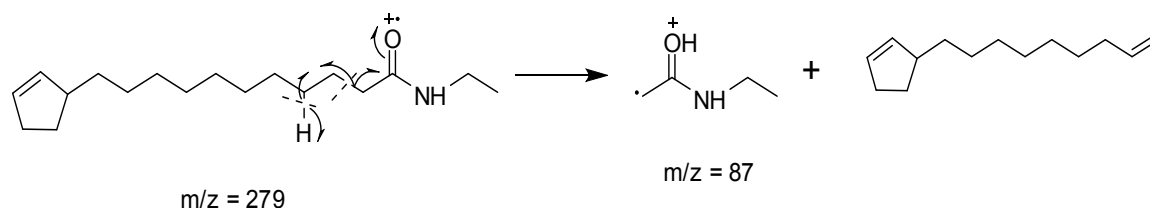


Figura 39. Fragmentos característicos para o (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-etilundecanamida (1A).

5.4.2.2. Caracterização de (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 40), uma banda na região de 3311 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ são em $2915 - 2847\text{ cm}^{-1}$. A banda presente em 1642 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O. A banda em 1547 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H e a banda em 1468 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-N e finalmente, a banda em 715 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H.

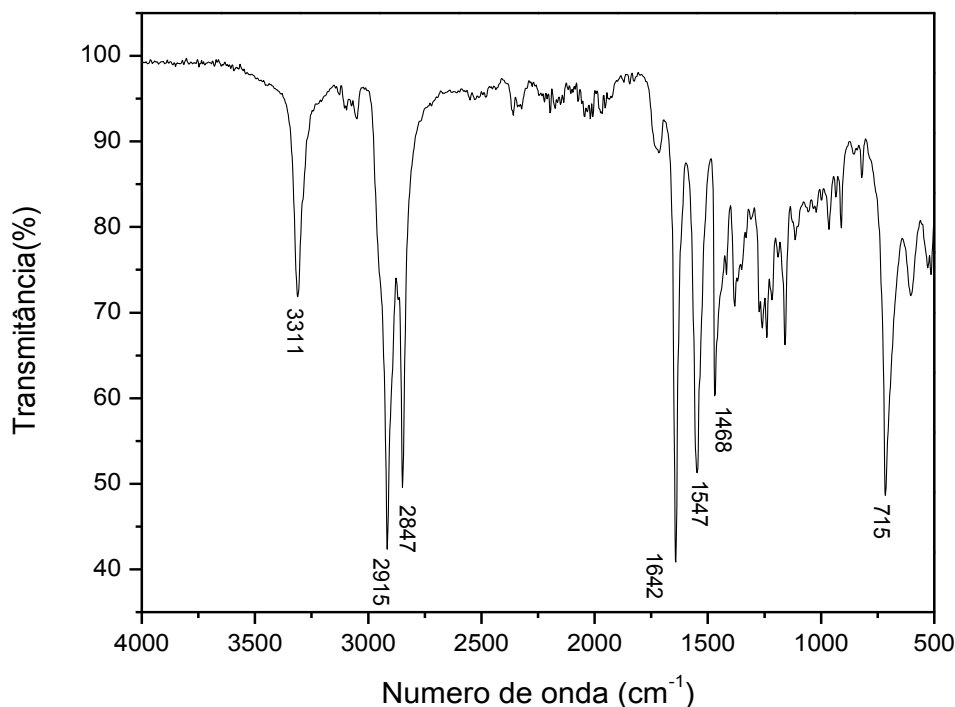


Figura 40. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A).

No espectro de massas do composto (Figura 41) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 307 [M^+]. Presume-se que o pico base é o $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 226$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel. O fragmento em $m/z = 115$ provém do rearranjo de McLafferty. O composto foi identificado como (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida.

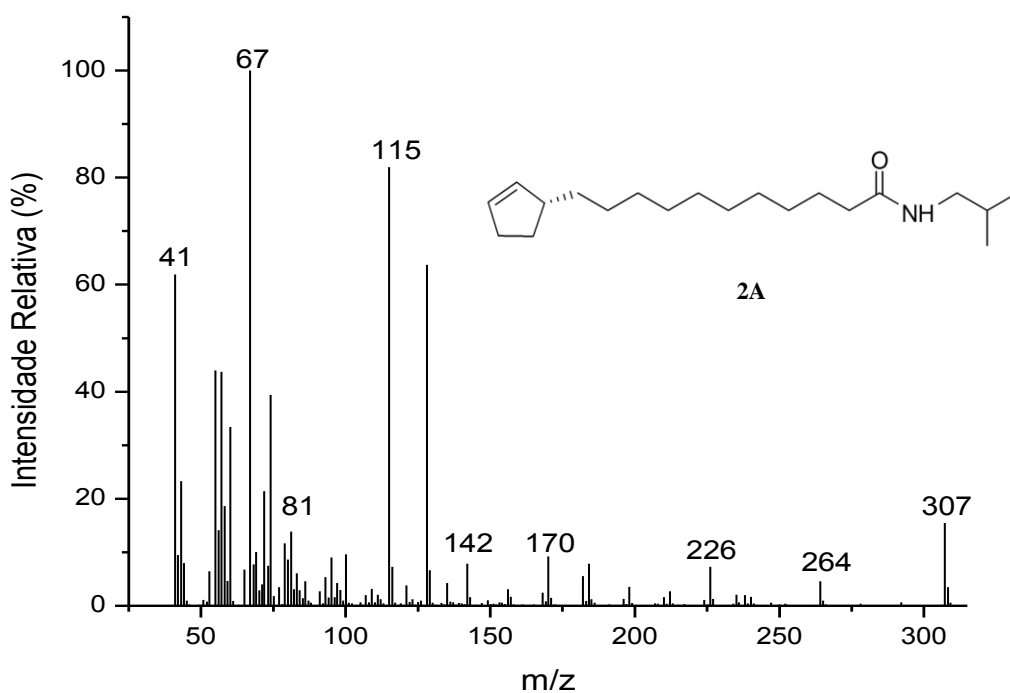


Figura 41. Espectro de massas do derivado (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 42) apresenta um multipletto em δ 5,73 e 5,60 (m, 1H), referente aos hidrogênios H2' e H3' da dupla ligação. Pode-se observar um tripleto em δ 5,54 referente ao N-H da amida. O tripleto δ 3,07 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H) é atribuído aos hidrogênios H1'' ligados ao carbono C1''. Observam-se singletos referentes aos hidrogênios metílicos dos carbonos (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) δ 2,42 – 1,86, δ 1,80 – 1,55, δ 1,44 – 1,11 e finalmente um tripleto em δ 0,92 (t, $J = 8,9$ Hz) correspondente aos hidrogênios H3''' e H4'''.

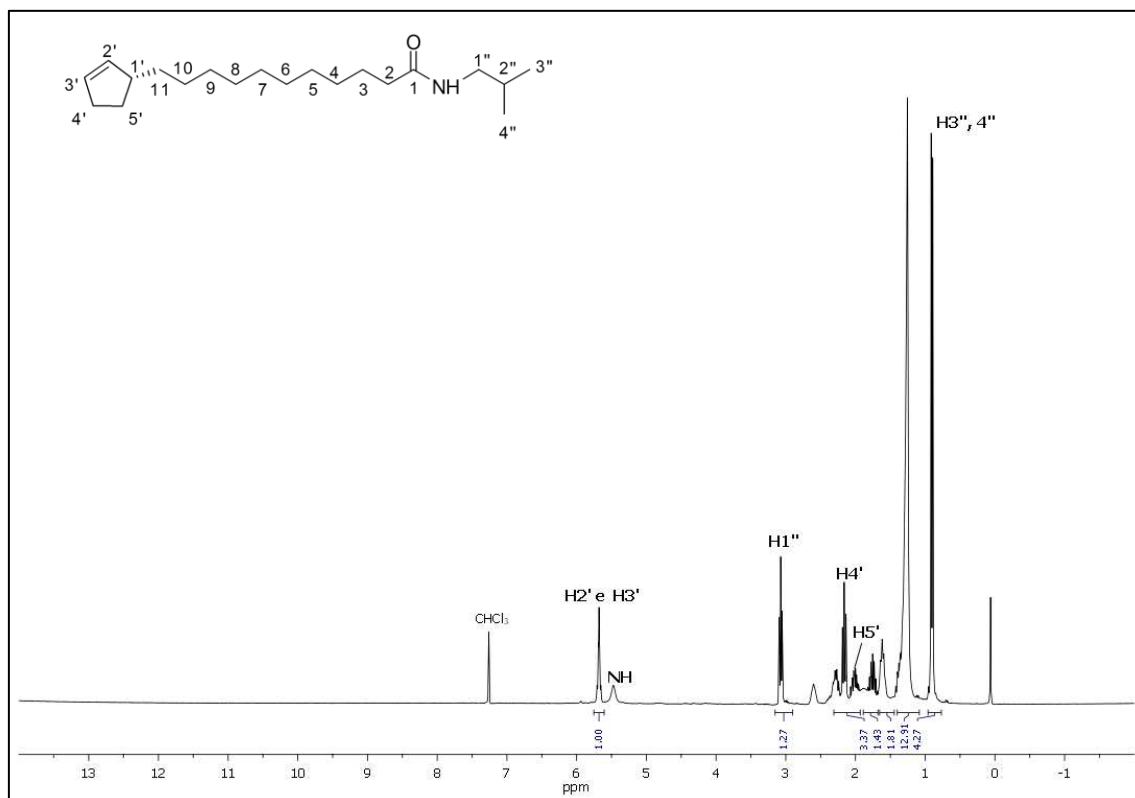


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A).

No RMN de ^{13}C (Figura 43) observa-se um sinal em δ 173,15 referente a carbonila do grupo amida (C1). Os carbonos da dupla ligação (C2' e C3') aparecem em δ 135,43 e 129,94 respectivamente. O sinal em δ 46,76 foi atribuído ao carbono (C1'') ligado ao nitrogênio da amida. Um sinal observado em δ 45,58 é devido ao C1' do anel ciclopentênico ligado à cadeia carbonada. Finalmente, aparece um sinal em δ 20,06 atribuído aos carbonos C3', C4''.

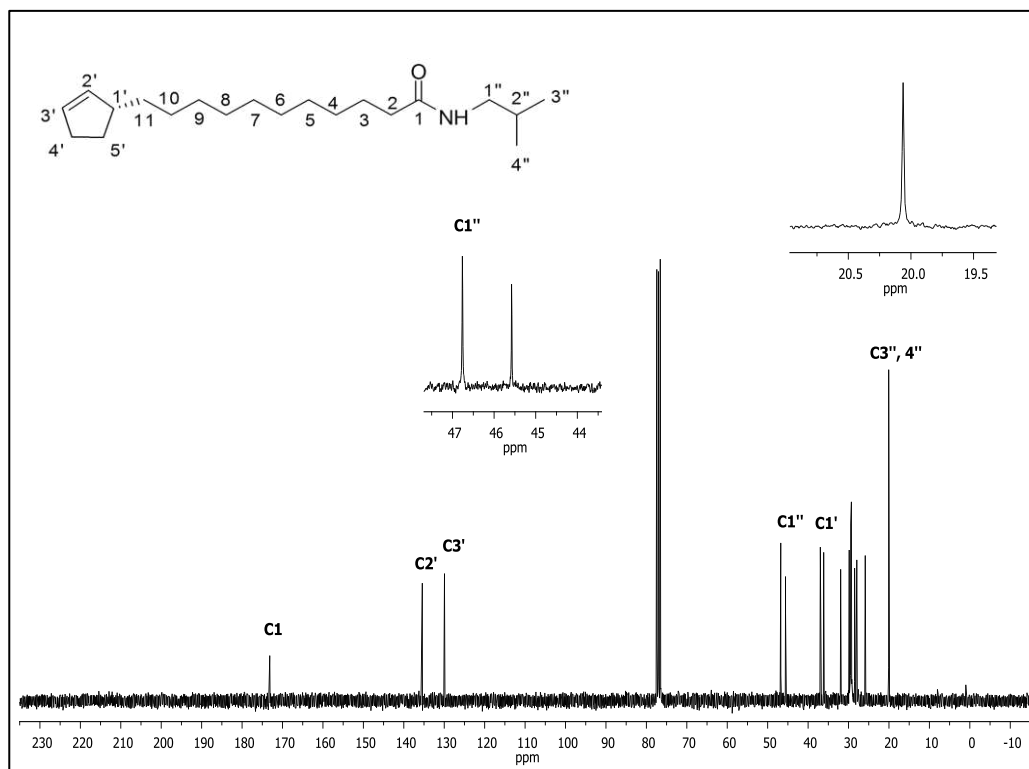


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do (*R*)-11-(ciclopent-2-enil)-*N*-isobutilundecanamida (2A).

5.4.2.3. Caracterização de *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 44), uma banda na região de 3298 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ são em $2916 - 2848\text{ cm}^{-1}$. A banda presente em 1635 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O. A banda em 1544 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H, as bandas na região $1468 - 1446\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação C-N e finalmente, a banda em 718 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H.

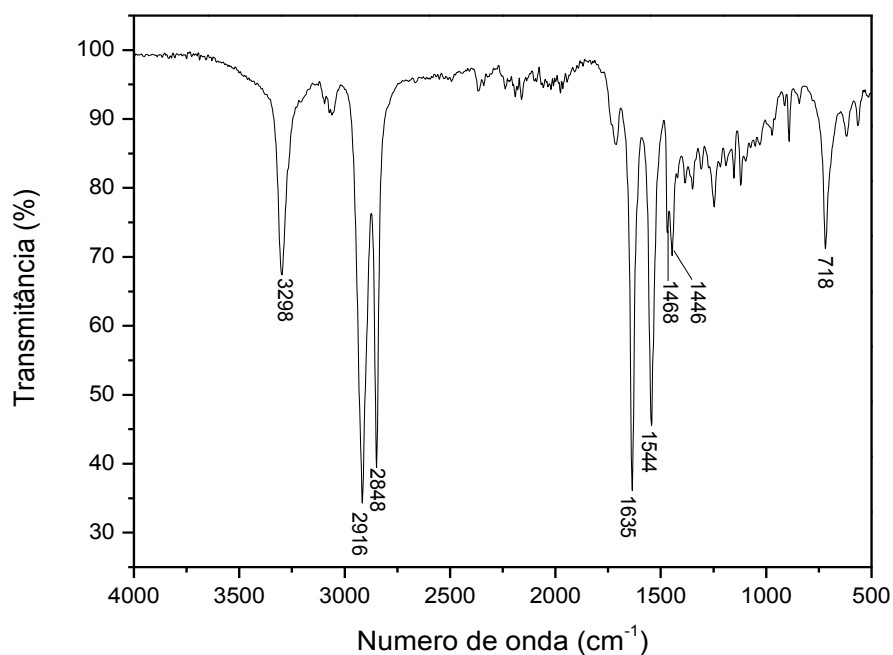


Figura 44. Espectro no infravermelho (KBr) do *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).

No espectro de massas (Figura 45) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 333 [M^+]. O pico base corresponde ao $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 141$ provém do rearranjo de McLafferty. O fragmento em $m/z = 252$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel. O fragmento em $m/z = 235$ representa a quebra de ligação C-N da carbonila. O composto foi identificado como *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida.

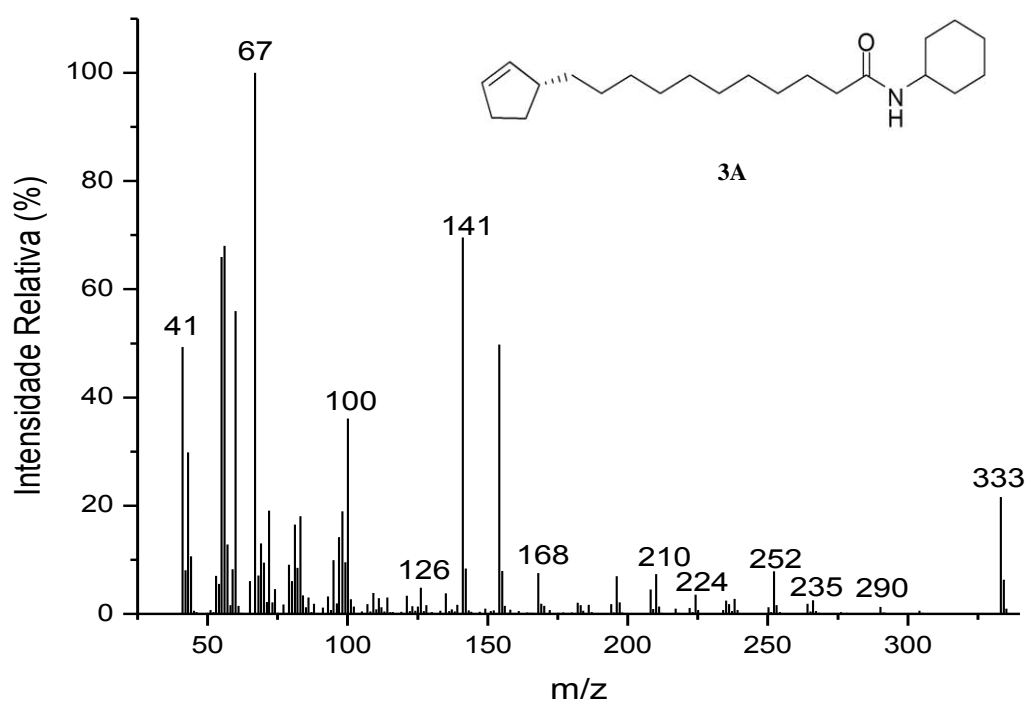


Figura 45. Espectro de massas do derivado *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).

No espectro de RMN de ^1H , observa-se um singlete em δ 5,66 (s, 1H), correspondente a H2' e H3'. Um tripleto em δ 5,53 referente ao N-H da amida. Um duplete em δ 3,74 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H) em δ relativo ao hidrogênio H1''. Finalmente observam-se um duplo duplete em δ 1,65 (dd, $J = 23,7; 10,5$ Hz, 5H) referente aos hidrogênios metílicos dos carbonos (2'', 4'', 6'') (Figura 46).

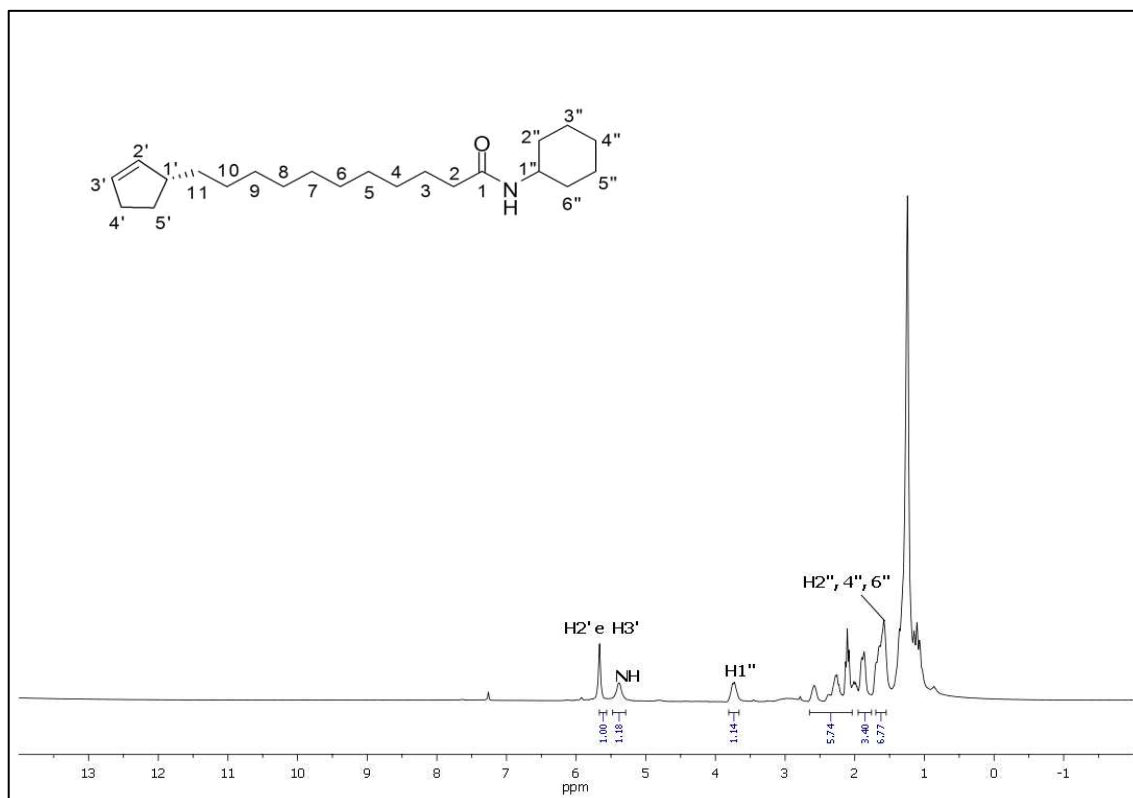


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).

No RMN de ^{13}C (Figura 47) observa-se um sinal em δ 172,22 referente à carbonila do grupo amida (C1). Além disso, são observados dois sinais em δ 135,41 e δ 129,92, que correspondem aos carbonos C2' e C3' respectivamente, que correspondem os carbonos da ligação dupla. O sinal em δ 47,99 foi atribuído ao carbono (C1'') ligado ao nitrogênio da amida. Um sinal observado em δ 45,57 é devido ao C1' do anel ciclopentênico ligado à cadeia carbonada. Finalmente, aparecem sinais em δ 31,93 atribuído aos carbonos C2'' e C6'' e em 24,85 referentes aos C3'', C5''.

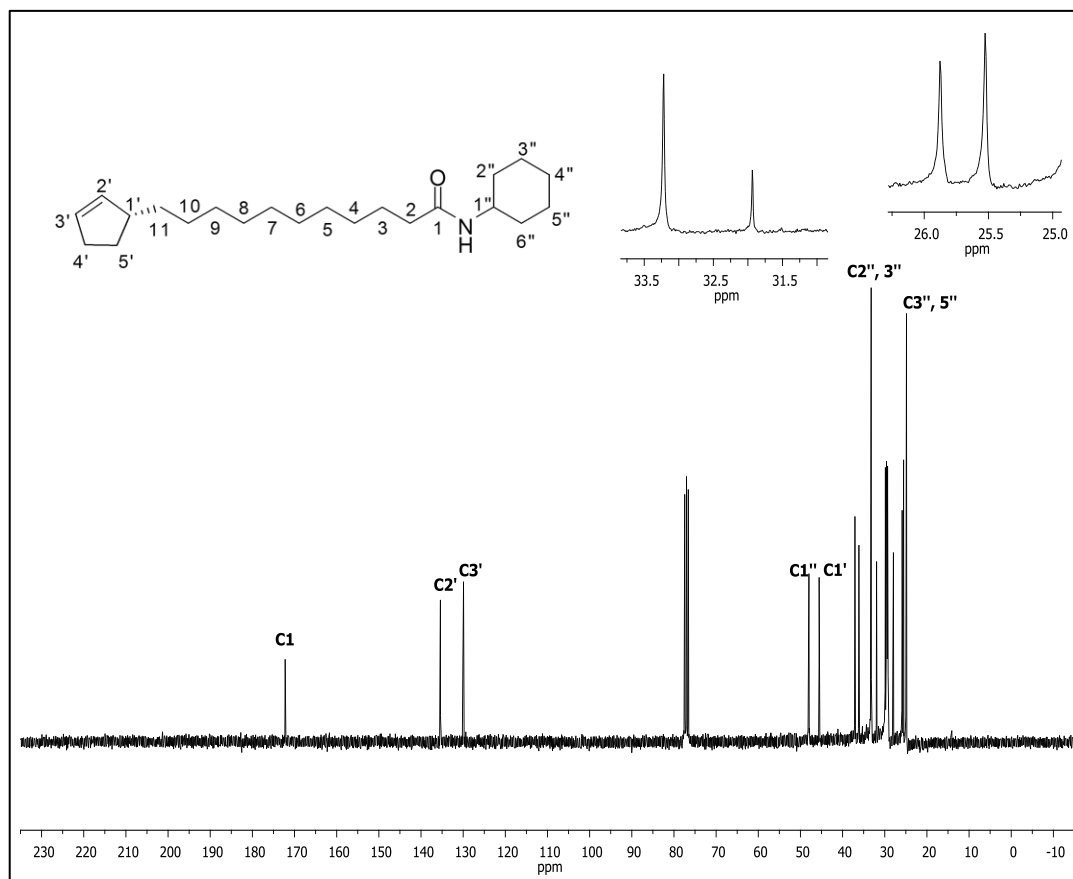


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do *N*-ciclohexil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (3A).

5.4.2.4. Caracterização de (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 48), uma banda na região de 3294 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ são em $2917 - 2848\text{ cm}^{-1}$. A banda presente em 1638 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O. A banda em 1533 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H, as bandas na região $1470 - 1454\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação C-N. As bandas na região de $1236, 1211$ e 1186 cm^{-1} são produzidas pela deformação angular no plano do anel para ligações =C-H, a banda em $743 - 716\text{ cm}^{-1}$ devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H e, finalmente a banda em 693 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano próprio do anel de ligações =C-H.

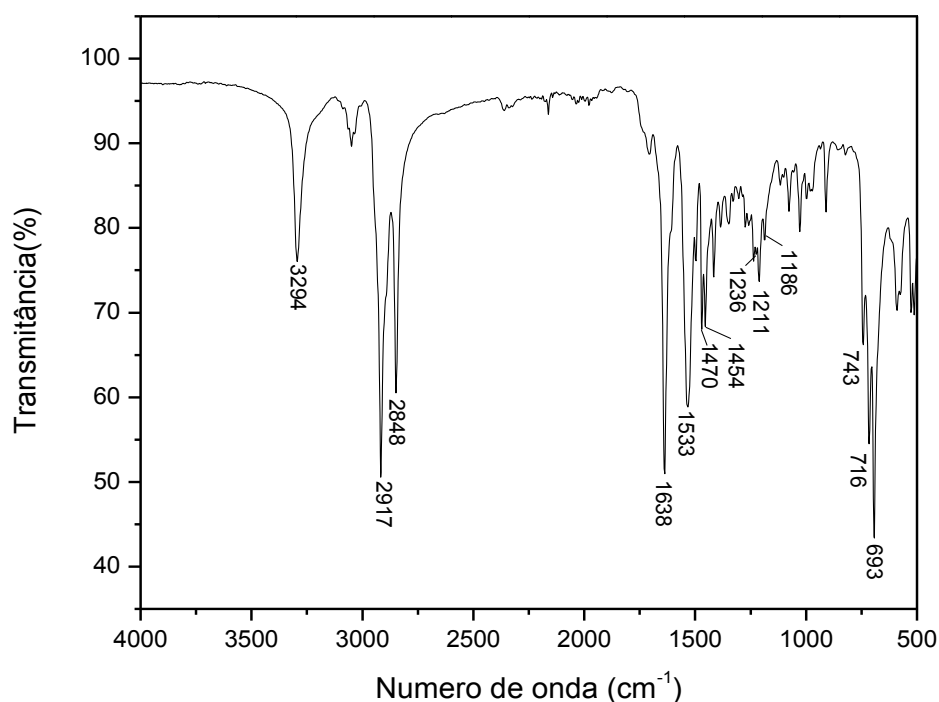


Figura 48. Espectro no infravermelho (KBr) do (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).

No espectro de massas (Figura 49) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 341 [M^+]. O pico base é o $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 260$ representa o restante da molécula com a clivagem beta em relação ao anel. O fragmento em $m/z = 91$ ($C_6H_5CH_2^+$) é indicativo de um anel de benzeno com cadeia lateral alquila (íon tropílio). O fragmento em $m/z = 162$ é devido ao rearranjo de McLafferty. O composto foi identificado como (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida.

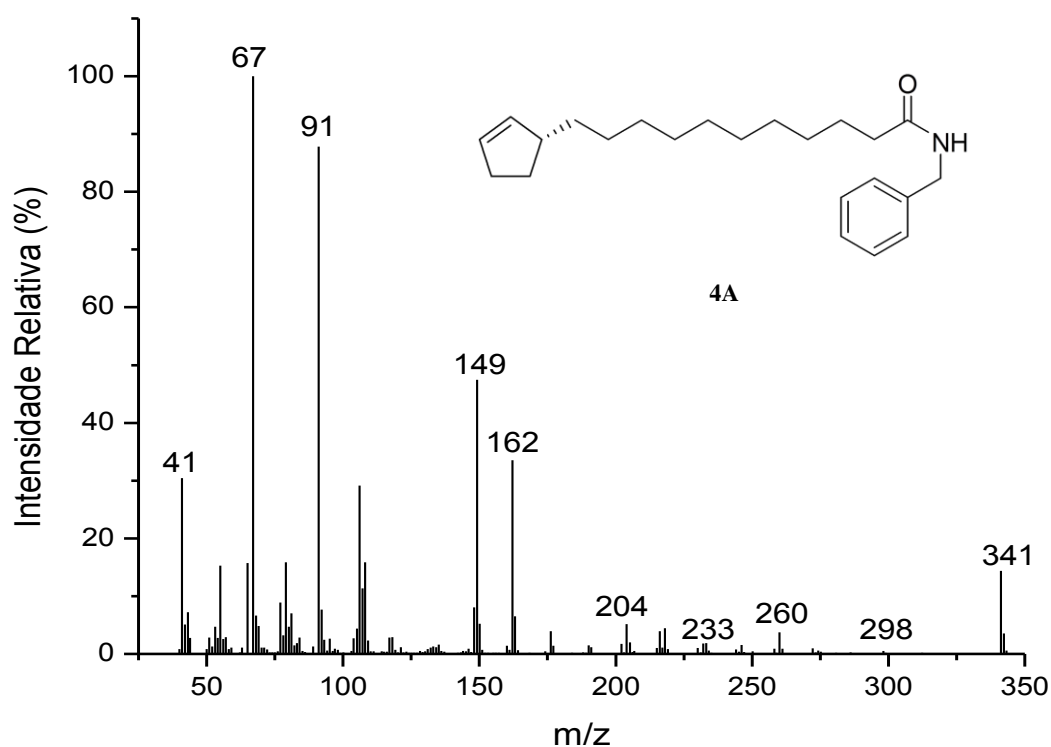


Figura 49. Espectro de massas do derivado (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).

No espectro de RMN de ¹H observa-se um mutipletto em δ 7,37 – 7,27 (m, 5H), correspondente aos hidrogênios do anel benzênico, um dupletto em 5,74 (d, $J = 30,6$ Hz, 1H) correspondente aos hidrogênios olefínicos ligados ao carbono C2' e C3'. Pode-se observar um triplete em δ 5,58 referente ao N-H da amida e um dupletto em δ 4,43 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H) relativo ao hidrogênio H1'' (Figura 50).

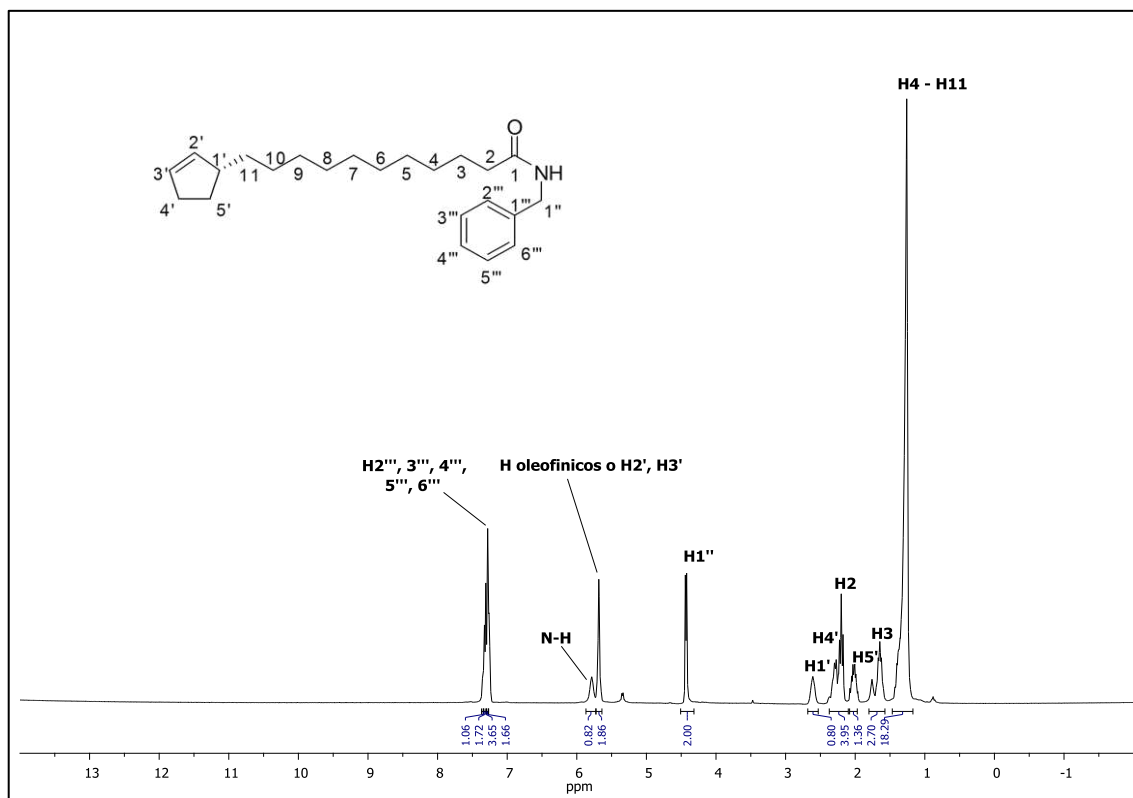


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do (*R*)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).

No RMN de ^{13}C (Figura 51) observa-se um sinal em δ 172,98 referente à carbonila do grupo amida. É observado um sinal em δ 138,41 que corresponde ao carbono ($\text{C}1''''$). Além disso, são observados dois sinais em δ 135,43 e δ 130,41, que correspondem aos carbonos $\text{C}2'$ e $\text{C}3'$ respectivamente, que correspondem os carbonos da ligação dupla. Os sinais em 128,67 correspondem aos carbonos ($\text{C}4''''$, $\text{C}2''''$, $\text{C}6''''$) do anel benzênico. O sinal em δ 45,59 é atribuído ao carbono ($\text{C}1''$) ligado ao nitrogênio da amida, e finalmente, um sinal observado em δ 43,55 é devido ao $\text{C}1'$ do anel ciclopentênico ligado à cadeia carbônica.

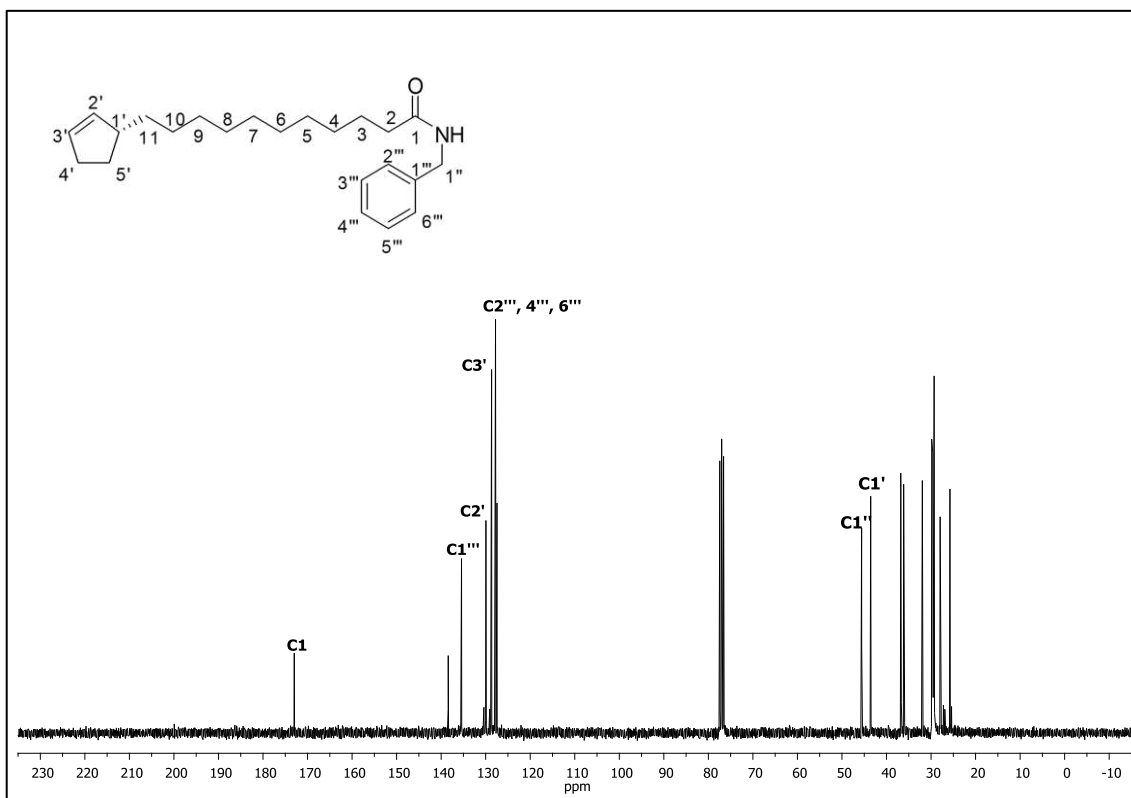


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) do (R)-*N*-benzil-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (4A).

5.4.2.5. Caracterização de 11-(ciclopent-2-enil)-*N*-fenilundecanamida (5A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 52), uma banda na região de 3303 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. Uma banda na região de 3059 cm^{-1} é referente ao estiramento $=\text{C}-\text{H}$. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H}$ são em $2916 - 2849\text{ cm}^{-1}$. As bandas entre $1969 - 1958$ e $1943 - 1928\text{ cm}^{-1}$ correspondem à banda harmônica ou de combinação. A banda presente em 1659 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$. A banda em 1598 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H. As bandas em $1530 - 1498\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento de ligação $\text{C}=\text{C}$. As bandas na região $1470 - 1440\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação C-N. As bandas na região de $1309, 1248$ e 1178 cm^{-1} são produzidas pela deformação angular no plano do anel para ligações $=\text{C}-\text{H}$, a banda em $755 - 717\text{ cm}^{-1}$ devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H e, finalmente a banda em 691 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano próprio do anel de ligações $=\text{C}-\text{H}$.

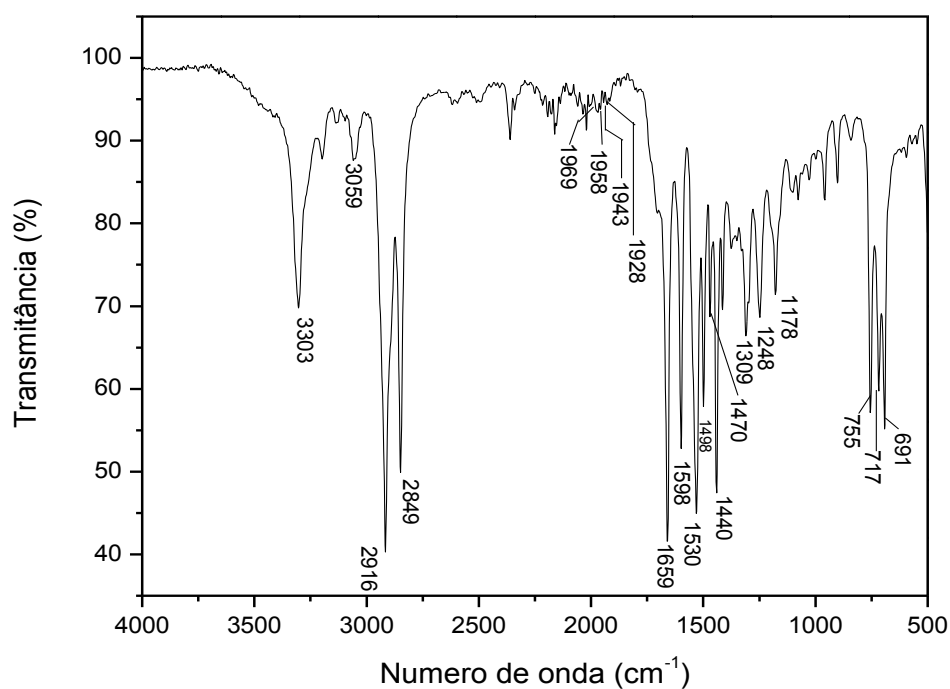


Figura 52. Espectro no infravermelho (KBr) do 11-(ciclopent-2-enil)-*N*-fenilundecanamida (5A).

No espectro de massas (Figura 53) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 327 [M^+]. Presume-se que o pico base é o $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 135$ é devido ao rearranjo de McLafferty. O fragmento em $m/z = 120$ é devido à perda de (CH_3) a partir do íon $m/z = 135$. O fragmento em $m/z = 93$ é devido à quebra de ligação C-N da carbonila com migração de um átomo de hidrogênio-alfa no grupo acila. O composto foi identificado como 11-(ciclopent-2-enil)-*N*-fenilundecanamida.

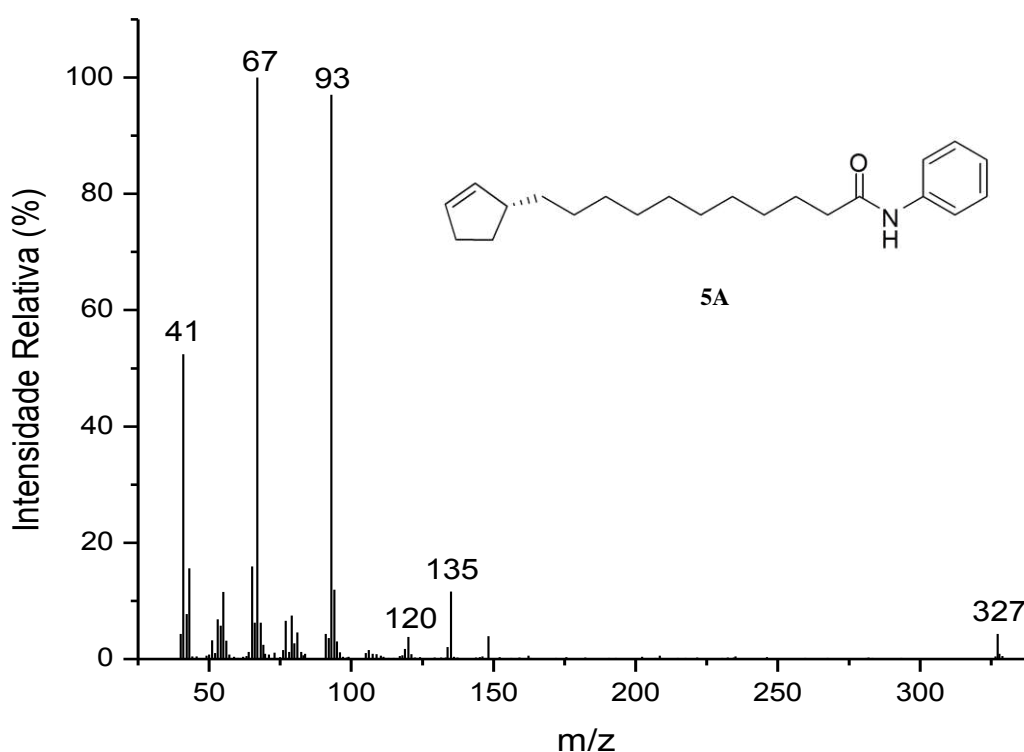


Figura 53. Espectro de massas do derivado 11-(ciclopent-2-enil)-*N*-fenilundecanamida (5A).

5.4.2.6. Caracterização de *N*-(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 54), uma banda na região de 3288 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. Uma banda na região de 3049 cm^{-1} è referente ao estiramento =C-H. As bandas de vibrações de estiramento de C_{sp^3} -H são em $2916 - 2847\text{ cm}^{-1}$. As bandas entre $1887 - 1932$ e $1962 - 1932\text{ cm}^{-1}$ correspondem à banda harmônica ou de combinação. A banda presente em 1655 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O. A banda em 1587 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H. As bandas em 1525 cm^{-1} correspondem ao estiramento de ligação C=C. As bandas na região $1487 - 1461\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação C-N. As bandas na região de $1393, 1242$ e 1176 cm^{-1} são produzidas pela deformação angular no plano do anel para ligações =C-H, a banda em 816 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H e, finalmente a banda em 717 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano próprio do anel de ligações =C-H.

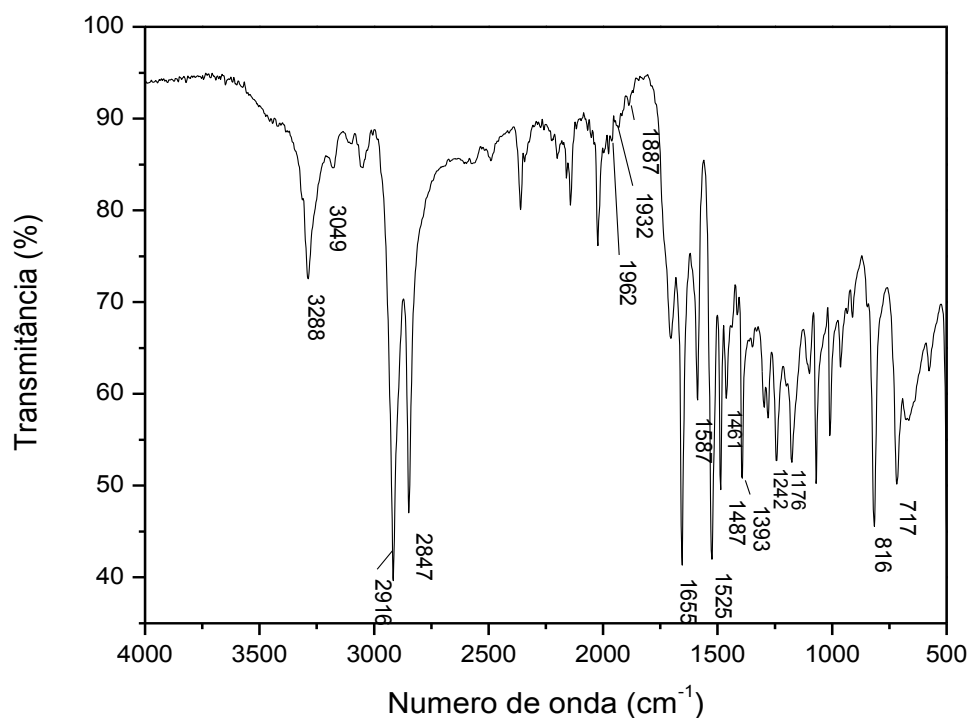


Figura 54. Espectro no infravermelho (KBr) do *N*-(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A).

No espectro de massas (Figura 55) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 407 [M-1]. O pico base corresponde ao $m/z = 67$ para o anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 213$ é devido ao rearranjo de McLafferty. O fragmento em $m/z = 234$ é devido à quebra de ligação C-N da carbonila. O fragmento em $m/z = 173$ é devido à quebra de ligação C-N da carbonila com migração de um átomo de hidrogênio-alfa no grupo acila. O fragmento em $m/z = 326$ é devido à perda do halogeneto (Br) a partir do íon molecular. O composto foi identificado como *N*-(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida.

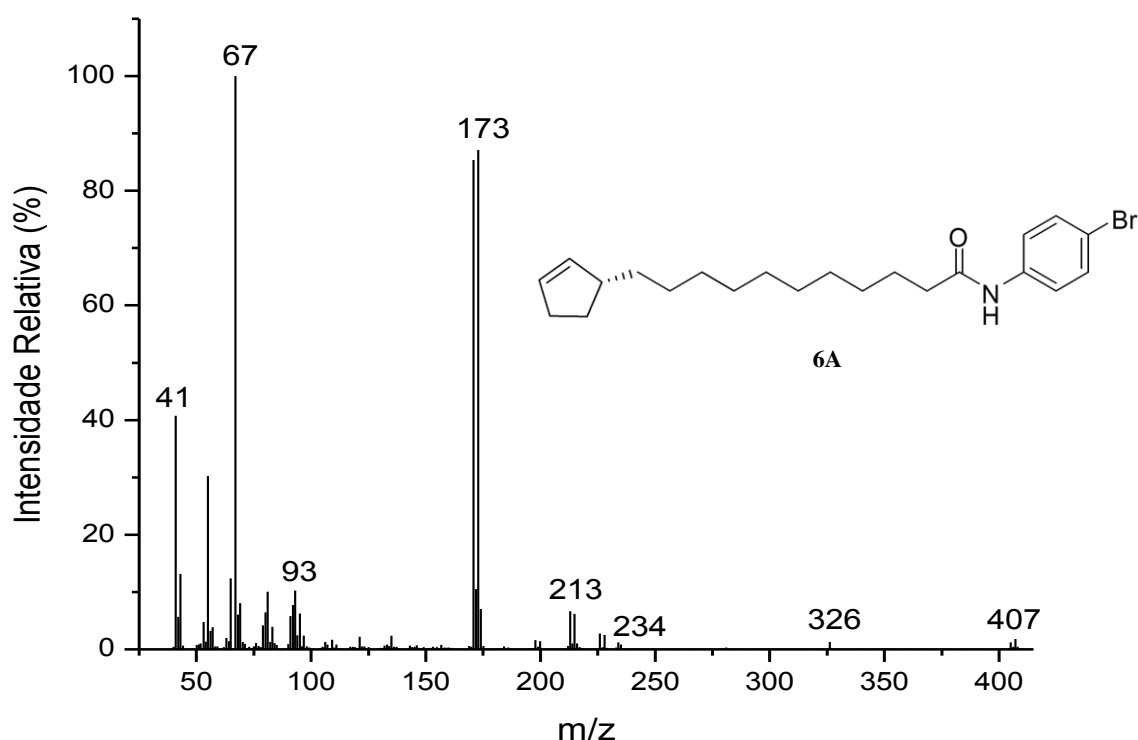


Figura 55. Espectro de massas do derivado *N*-(4-bromofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (6A).

5.4.2.7. Caracterização de *N*-(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A)

Verifica-se no espectro IV do composto (Figura 56), uma banda na região de 3288 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H associadas por ligações de hidrogênio. Uma banda na região de 3047 cm^{-1} é referente ao estiramento $=\text{C}-\text{H}$. As bandas de vibrações de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H}$ são em $2916 - 2847\text{ cm}^{-1}$. As bandas entre $1987 - 1966\text{ cm}^{-1}$ correspondem à banda harmônica ou de combinação. A banda presente em 1654 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$. A banda em 1593 cm^{-1} é referente à deformação angular de N-H. As bandas em 1524 cm^{-1} correspondem ao estiramento de ligação $\text{C}=\text{C}$. As bandas na região $1491 - 1469\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$. As bandas na região de $1395, 1279 - 1242$ e 1172 cm^{-1} são produzidas pela deformação angular no plano do anel para ligações $=\text{C}-\text{H}$, a banda em 818 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano da ligação N-H e, finalmente a banda em 714 cm^{-1} devida á deformação angular fora do plano próprio do anel de ligações $=\text{C}-\text{H}$.

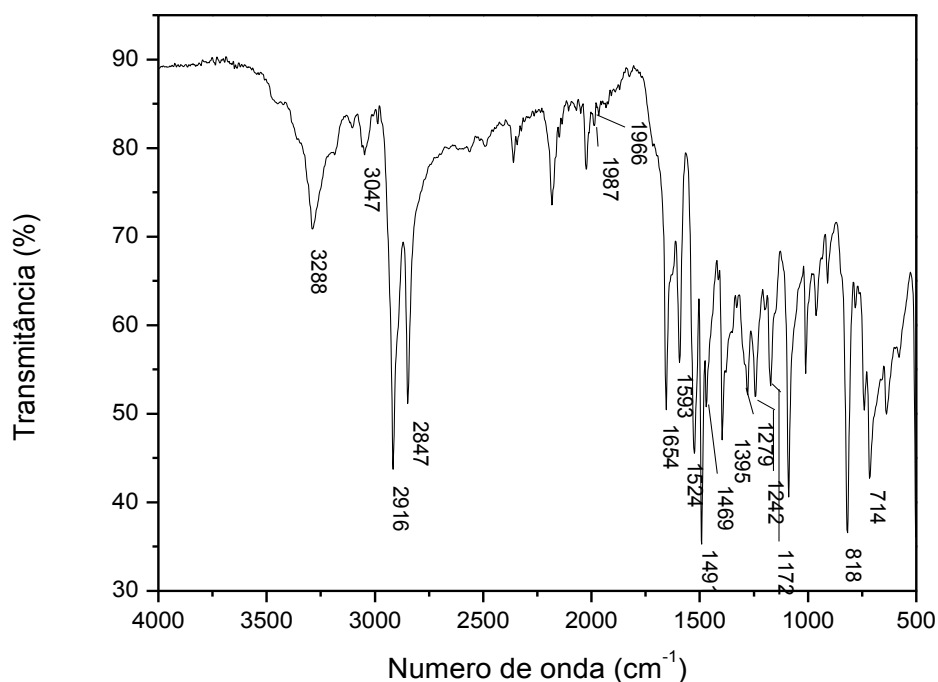


Figura 56. Espectro no infravermelho (KBr) do *N*-(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A).

No espectro de massas (Figura 57) observou-se que o composto possui pico do íon molecular de 361 [M^+]. O pico $m/z = 67$ corresponde ao anel de ciclopenteno. O fragmento em $m/z = 127$ é devido à quebra de ligação C-N da carbonila com migração de um átomo de hidrogênio-alfa no grupo acila. O fragmento em $m/z = 169$ é devido ao rearranjo de McLafferty. O fragmento em $m/z = 326$ é devido à perda do halogeneto (Cl) a partir do íon molecular. O composto foi identificado como *N*-(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida.

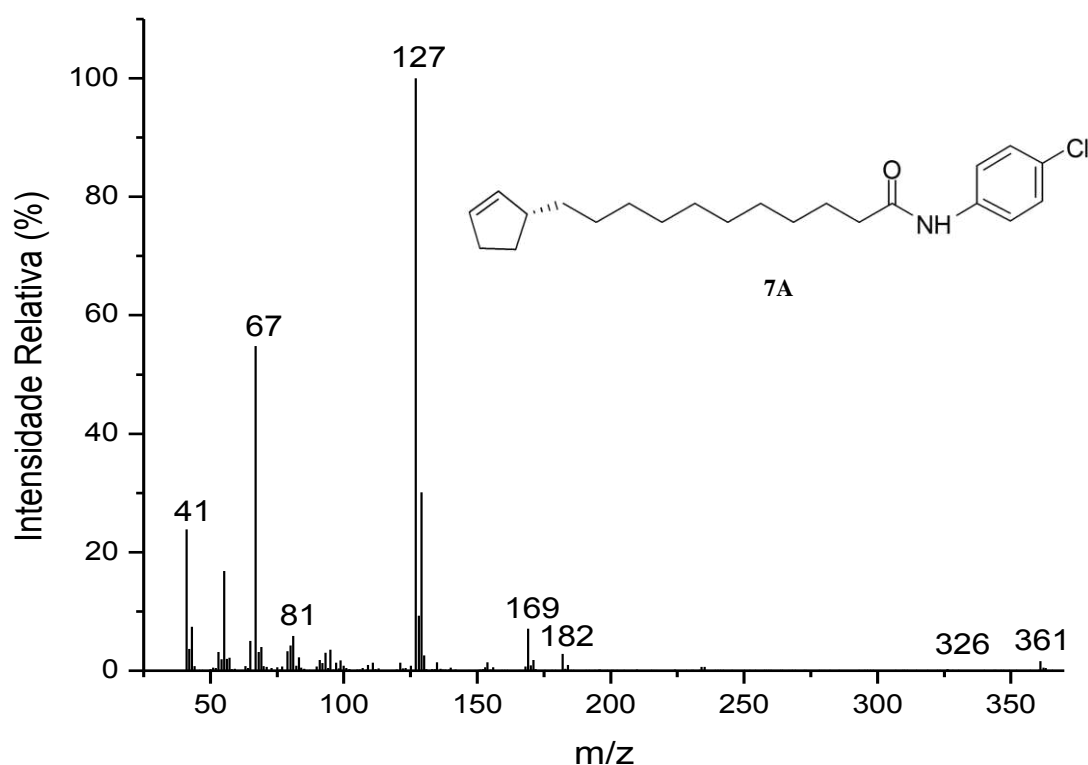


Figura 57. Espectro de massas do derivado *N*-(4-clorofenil)-11-(ciclopent-2-enil)undecanamida (7A).

A caracterização dos derivados amidas preparados a partir do óleo de *C. brasiliensis* deve ser continuada com vistas à obtenção de compostos antibacterianos e anti-inflamatórios.

5.4.3. Avaliação de atividade antibacteriana

Foram submetidos a ensaios de atividade antibacteriana tanto a substância isolada (Ácido hidnocárpico) como seus derivados éster e amida. Verificou-se que o éster metílico do ácido hidnocárpico (derivado éster EM) inibiu o crescimento de *S. agalactiae* na concentração de 1 mg mL^{-1} (Figura 58). Para a *E. coli*, os compostos não apresentaram inibição na concentração testada.

A atividade antimicrobiana foi identificada pela formação de zonas de inibição ao redor dos orifícios, sendo considerados resultados positivos zona de inibição maior que 1 mm.



Figura 58. Zona de inibição atribuída ao éster metílico do ácido hidnocárpico na concentração de 1 mg mL^{-1} .

Esses resultados abrem perspectivas para a realização de novos ensaios com outras bactérias e outros alvos, com o fim de desenvolver novas estratégias de combate a parasitas causadores de danos à produção pecuária, bem como o uso de fontes naturais de baixo impacto para o rebanho e o meio ambiente.

Estudos anteriores relatam que a espécie *C. brasiliensis* é fornecedora do óleo de chaulmugra, o qual é extraído das sementes e cujos constituintes majoritários são os ácidos graxos ciclopentênicos: chaulmúgrico, hidnocárpico e górlico. Estes óleos, durante muito tempo até o aparecimento das sulfas em 1940, foram o principal remédio para o tratamento da lepra.

Jacobsen (1973) confirmaram a atividade bacteriostática do ácido hidnocárpico, que foi capaz de inibir *in vitro* 38 linhagens de bactérias diferentes. Dois anos depois, os sais sódicos do óleo de chaulmugra e do ácido chaulmúgrico mostraram-se potentes inibidores na multiplicação de *Mycobacterium leprae* em patas de ratos infectadas com este bacilo. Avaliaram o perfil farmacológico do óleo de chaulmugra brasileiro usando diferentes vias de administração e formas farmacêuticas. Confirmou que os ésteres etílicos eram mais bem tolerados que os ácidos graxos livres. Concluíram que os ácidos graxos ciclopentênicos saturados eram os responsáveis pela ação contra o bacilo da lepra.

Em outras pesquisas, a mistura dos ácidos graxos ciclopentênicos foi administrada por via oral em ratos com edema nas patas. O ensaio mostrou que a mistura apresenta atividade anti-inflamatória inibindo o edema em cerca de 30-40% (Lima et al., 2005).

Na literatura, tem sido reportada a preparação e comercialização de diversos produtos derivados da mistura de ácidos, como o *Antileprol* (mistura dos ésteres benzílicos) da Bayer e o *Antileprina* da Casa Granado (ésteres etílicos acrescidos de óleo de fígado de bacalhau e

cânfora). Atualmente, o óleo das sementes de *C. brasiliensis* (sapucainha) é usado no tratamento das afecções da pele como a dermatoses (Oliveira et al., 2009).

O estudo fitoquímico das sementes de *C. brasiliensis* abre perspectivas para novos ensaios com outras bactérias ou outros alvos, bem como a síntese de novos derivados. Além do uso de metodologias alternativas para isolamento de outros compostos presentes no extrato na forma de misturas.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a caracterização do extrato hexânico das sementes de *C. brasiliensis* onde foram identificados os compostos: palmitato de metila, ácido hidnocárpico, ácido palmítico, ácido oléico, ácido górlico e ácido chaulmúgrico.

Além disto, foi isolado o seu constituinte majoritário de interesse, o ácido hidnocárpico, que foi submetido a transformações químicas possibilitando a obtenção de onze derivados, dos quais quatro ésteres e sete amidas, sendo seis inéditos estruturalmente, ainda não relatados na literatura. As estruturas foram caracterizadas empregando as técnicas espectroscópicas e espectrométricas usuais (IV, CG-EM, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C).

Foi realizado o ensaio de atividade antibacteriana do ácido graxo ciclopentênico isolado e seus derivados ésteres e amidas sobre as bactérias isoladas de mastite bovina, sendo o éster metílico do ácido hidnocárpico ativo contra *S. agalactiae* na concentração de 1 mg mL^{-1} . Para *E. coli*, os compostos não apresentaram inibição na concentração testada.

Estes estudos auxiliam na maior compreensão da relação da estrutura química e da atividade biológica de ácidos graxos ciclopentênicos estimulando a ampliação da série química na obtenção de derivados mais ativos e avaliação em outros alvos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnofarmacology*, v.62, p. 183- 193, 1998.

ALMEIDA, A.C.; FONSECA, Y.M.; SOARES, T.M.P.; SILVA, D.B.S.; BUELTA, T.T.M.; SILVA, G.L.M. Tratamento de Mastite Subclínica Em Bovinos Utilizando Bioterapia. *R. Un. Alfenas, Alfenas*, 5: 199-203,1999.

ALVES, T.M.; SILVA, A.F.; BRANDAO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMANIA, E.F.A.; JUNIOR, A.S.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medical Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 367-373, 2000.

ANDRESEN, H. Mastitis: prevención y control. *Rev. Inv. Vet*, 12(2): 55-64, Perú. 2001.

BALALAIE, S.; MAHDIDOUST, M.; ESHAGHI-NAJAFABADI, R. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as na Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazation of Carboxylic Acids at Room Temperature. *J. Iran. Chem. Soc.*, Vol. 4, No. 3, pp. 364-369, 2007.

BALALAIE, S.; MAHDIDOUST, M.; ESHAGHI-NAJAFABADI, R. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Tetrafluoro Borate (TBTU) as an Efficient Coupling Reagent for the Esterification of Carboxylic acids with Alcohols and Phenols at Room Temperature. *Chinese Journal of Chemistry*, 26, 1141-1144, 2008.

BARBOSA, L.C.A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Universidade Federal de Viçosa, Editora UFV, 2007.

BENEDETTE, M.F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.C.; SANTOS, D.A.N.; COSTA, E.A.D.A. Mastite bovina. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, Ano VI, Número 11, ISSN: 1679-7353, 2008.

BLAISE, P.; FARINES, M.; SOULIER, J. Identification of cyclopentenyl fatty acids by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 727-730, 1997.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Mastite bovina, São Paulo: Manole, p. 114-129, 2000.

CABRERA, C.E.; GÓMEZ, R.F.; ZÚÑIGA, A.E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, Vol. 38 N° 2, 2007.

COLE, H.I.; CARDOSO, H.T. Analysis of chaulmoogra oils. I. *Carpotroche brasiliensis* (Sapucainha) oil. *Journal of the American Chemical Society*, v.60, p.614-617, 1938.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, vol. II, 496-498, 1984.

CHRISTIE, W.W. Mass Spectrometry of Derivatives of Cyclopentenyl Fatty Acids. *Lipids*, vol. 4, no. 3, 1969.

CHRISTIE, W.W.; BRECHANY, E.Y.; SHUKLA, V.K.S. Analysis of Seed Oils Containing Cyclopentenyl Fatty Acids by Combined Chromatographic Procedures. *Lipids*, vol. 24, no. 2, 1989.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais* 7, 2006.

ELOFF, J.N. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, p. 1-8, 1998.

GUZMÁN-BLANCO, M.; CASELLAS, J.M.; SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. *Infectious Disease Clinical North America*, v.14, p. 67-81, 2000.

JACOBSEN, P.L.; HERMAN, N.G.; LEVY, L. The susceptibility of *Mycobacteria* to hydnocarpic acid. *American Review of Respiratory Disease*, 107: 1022-1029, 1973.

LEVY, L. The activity of chaulmoogra acids against *Mycobacterium leprae*. *American Review of Respiratory Disease*, 111: 703- 705, 1975.

LIMA, J.A.; OLIVEIRA, A.S.; MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seeds of *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) (Flacourtiaceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (38): 1095-1103, 2005.

LOPEZ, P.V.A. Bioprospecção de extratos de *Croton urucurana* Bail e seus fungos endofíticos. Dissertacao de Mestrado. Curitiba. Universidade Federal do Parana, 137p, 2010.

MANGOLD, H.K.; SPENER, F. The Cyclopentenyl Fatty Acids. Chapter 5. Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants. Berlin, 1977.

OLIVEIRA, A.S.; LIMA, J.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Ácidos ciclopentênicos do óleo da sapucainha (*Carpotroche brasiliensis* Endl, Flacourtiaceae): o primeiro antileprótico usado no Brasil. *Química Nova*, v.32, p.139-145, 2009.

OLIVEROS-BASTIDAS, A.J.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A. Chemical characterization by GC-MS and phytotoxic potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dioteryx odorata* (Aubl.) Willd. from venezuelan regions. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 4, 502-506, 2013.

PANNUTI, C.S.; GRINBAUN, R.S. An Overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infection Control Hospital Epidemiology*, v. 16, p. 170-174, 1995.

POSSOLO, H. *As Flacourtiáceas Antilepróticas*, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo: São Paulo, 1945.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis: Counter attack. Naperville, Illinois: Babson Bros, 150 p, 1997.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária. Um tratado de Doenças dos Bovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9ªed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541-629, 2000.

SANTOS, S.D.; SOUZA, L.P.A.; SIANI, A.C. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.29-47, 2008.

SEBEDIO, J.L.; GRANDGIRARD, A. Cyclic fatty acids: natural sources, formation during heat treatment, synthesis and biological properties. *Lipid Res.* Vol. 28, pp. 303-336, 1989.

SILVERSTEIN. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Editor John Wiley and Sons. Sexta edição, 2000.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, Ano VI – Número 10. ISSN: 1679-7353, 2008.

WENZ. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 219 (7): 976-981, 2004.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. *Plantas Mediciniais sob a Óptica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó, SC: Argos, p. 17-46, 2001.

ZHANGA, J.Y.; WANG, H.Y.; HUANGO, Z.H. The Structures of Cyclopentenyl Fatty Acids in the Seed Oils of Flacourtiaceae Species by GC-MS of their 4,4-Dimethyloxazoline Derivatives. *JAOCs*, Vol. 66, no, 2, 1989.