

NILTON CÉSAR RIBEIRO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE TRÊS
ESPÉCIES DE *Plumeria L.* E DE SEU HOSPEDEIRO
*Pseudosphinx Tetrio L.***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

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

T

R484c
2018
Ribeiro, Nilton César, 1974-
Composição química e ensaios biológicos de três espécies
de *Plumeria l.* e de seu hospedeiro *Pseudosphinx tetrio l.* / Nilton
César Ribeiro. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 123f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Apocinaceae. 2. Câncer. 3. Anti-microbiano.
4. LC-RMN. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Química. Doutorado em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 572.2

NILTON CÉSAR RIBEIRO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE TRÊS
ESPÉCIES DE *Plumeria L.* E DE SEU HOSPEDEIRO
*Pseudosphinx Tetrio L.***

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

APROVADA: 4 de abril de 2018.

Elson Santiago de Alvarenga

Antônio Lelis Pinheiro

Patrícia Fontes Pinheiro

Marcelo Henrique dos Santos
(Coorientador)

Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha saúde e por tudo que tenho conquistado ao longo desta jornada.

Aos meus grandes orientadores, Antônio Jacinto Demuner e Marcelo Henrique dos Santos, pelos ensinamentos e pelas palavras de incentivo ao longo do caminho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, e a todo o seu corpo docente e administrativo, que me concederam está grande oportunidade.

A todos da North Carolina State University, em especial aos professores Slavko Komarnytsky e Debora Esposito.

A todos os estudantes e técnicos do Laboratório de Síntese de Agroquímica (LASA) da Universidade Federal de Viçosa.

Agradecimentos especiais ao IFMT-Campus Rondonópolis-MT

A minha esposa e a meu filho, pelas renúncias para seguirmos juntos nesta conquista.

Aos meus ilustres pais, Aécio Paulo Ribeiro e Maria Helena Ribeiro, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos, pelas palavras motivadoras.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para transformar tudo isto em realidade.

BIOGRAFIA

NILTON CÉSAR RIBEIRO, filho de Aécio Paulo Ribeiro e de Maria Helena Ribeiro, nasceu em 28 de fevereiro de 1974, em Rondonópolis, estado de Mato Grosso.

Em 2002, graduou-se em Química Industrial, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

Em 2006, obteve o título de especialista em Nutrição Mineral de Plantas, pela Universidade Federal de Lavras, estado de Minas Gerais.

Em 2008, foi aprovado em concurso público para o cargo de professor no Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), em Rondonópolis, MT.

Em 2012, obteve o título de Mestre, pela Universidade de Brasília, Distrito Federal.

Em agosto de 2013, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em 2016, participou do Programa de Doutorado Sanduíche na North Carolina State University (NCSU), Estados Unidos.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
<i>Plumeria</i> L.....	4
<i>Pseudosphinx tetrio</i> L.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO 1.....	12
HS-SPME/CG-EM ANÁLISE DE VOLÁTEIS FLORAIS DIURNOS E NOTURNOS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Plumeria</i> COMO POSSÍVEIS INDICADORES DE RELAÇÃO PLANTA-INSETO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1 Coleta de material.....	14
2.2 HS-SPME.....	14
2.3 CG-EM.....	14
2.4 Determinação quantitativa de linalool.....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4 CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2.....	24
ESTUDO FITOQUÍMICO DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Plumeria</i> , DA LARVA E DA MARIPOSA HOSPEDEIRA.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
2.1. Coleta do material vegetal e preparação dos extratos.....	26
2.2. Cromatografia em coluna.....	26
2.3. Teor de umidade.....	27
3. ANÁLISE DOS COMPOSTOS.....	29
3.1 CG-EM.....	29
3.2. Infravermelho.....	29
3.3. LC-MS.....	29
3.4. RMN.....	30
3.5. Temperatura de fusão.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Separação de compostos.....	31
4.2. Cromatografia em coluna aberta.....	31
4.3. Composto E1.....	33
4.4. Composto C1.....	36
4.5. Teor de umidade.....	39
4.6. LC-MS.....	40
4.6.1 Perfil cromatográfico.....	40
4.7. Uso do RMN na identificação dos constituintes principais do extrato de acetato de etila de <i>Plumeria alba</i> e de <i>P. tetrio</i>	46

5. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO 3.....	65
COMPLEXOS METÁLICOS FORMADOS COM ÁCIDO OLEANÓLICO.....	65
1 INTRODUÇÃO	65
2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	67
2.1 Isolamento do ácido oleanólico	67
2.2 Temperatura de fusão	68
2.3 Reação de complexação.....	68
2.4 Extração do RNA e qPCR	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CAPÍTULO 4.....	78
ENSAIOS BIOLÓGICOS UTILIZANDO BACTÉRIAS GRAM-POSITIVA, GRAM-NEGATIVA E PCR.....	78
1. INTRODUÇÃO	78
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	80
2.1 Ensaio antibacteriano com <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) e <i>Escherichia coli</i> (UPEC)	80
2.2 Ensaio biológico pelo método de difusão em disco	80
2.3. PCR.....	80
2.3.1 Extração de RNA e QPCR	80
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	82
4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	82
4.2 Resultados de PCR	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CONCLUSÃO GERAL.....	89
ANEXOS	90
ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA: INTERNATIONAL JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, v. 8, p. 160-169, 2018 – METALS COMPLEXES FORMED WITH OLEANOLIC ACID.....	91
Abstract.....	91
Introduction	91
Experimental.....	93
General procedures and equipment	93
Isolation of oleanolic acid.....	93
Melting temperature	94
Complex Reaction	94
RNA extraction and qPCR	94
Results and Discussion	95
Conclusions	99
Acknowledgements	99
References	100
ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CHEMISTRY & BIODIVERSITY EM 2018. HS-SPME/CG-EM Analysis of diurnal and nocturnal floral scent volatiles from three <i>Plumeria</i> species as possible indicators of plant- insect relationship	101
Abstract.....	101
Introduction	102

Results and discussion	104
Material and Methods	109
Conclusions	111
Acknowledgements	111
References	111
Anexo III – ARTIGO SENDO FINALIZADO PARA SUBMISSÃO. Vibrational analysis of the linalool molecule using the complementary techniques of infrared, raman and dft calculation.....	115
Abstract.....	115
Introduction	115
Experimental.....	117
Results and discussion	117
Methyl group vibrations	117
Alkene group vibrations	118
Hydroxyl group vibrations.....	118
Other featured peaks	119
Conclusion.....	119
Acknowledgements	122
References	122

LISTA DE ABREVIACOES

ATR	Attenuated Total Reflectance
CAR-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano
CCD	Cromatografia de camada delgada
DFT	Density Functional Theory
EI	Impacto de elétrons
GC-MS	Cromatógrafo Gasoso acoplado com Espectrmetro de Massas
HS	Head Space
IR ou IV	Infrared ou Infravermelho
LC-MS-QTOF	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Quadrupole Time of Flight
<i>m/z</i>	Massa/carga
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina; H = forma reduzida
NCSU	North Carolina University State
PA, EUA	Pensilvânia, Estados Unidos da América
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
ppm	Parte por milhão
RMN ou NMR	Ressonância magnética nuclear
SPME	Solid phase microextraction
VCD	Dicrosimo circular vibratório
G6P	Glucose 6 Phosphatase
PEPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
FAS	Fatty Acid Synthase

RESUMO

RIBEIRO, Nilton César, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Composição química e ensaios biológicos de três espécies de *Plumeria L.* e de seu hospedeiro *Pseudosphinx tetrio L.*** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientador: Marcelo Henrique dos Santos.

O presente trabalho trata do estudo entre as espécies de *Plumeria rubra*, *Plumeria alba* e *Plumeria obtusa* com *Pseudosphinx tetrio L.* Sobre a *P. tetrio* são apresentadas informações sobre tamanho, formas de alimentação e suas características. O estudo dos voláteis emitidos pelas flores das três *Plumerias* em dois períodos, foi empregado o sistema HS-SPME e CG-EM para a identificação dos compostos presentes na composição química. Foram identificados um total de 26 voláteis presentes nas três espécies. O composto linalool e o salicilato de metila foram os mais abundantes nos dois períodos de coleta, variando o linalool de 71% diurno 86,5% noturno e o salicilato de metila com variação de 20% noturno e 30% diurno. No estudo fitoquímico das amostras das folhas, foram obtidos três compostos isolados (hexacosano, ácido ferúlico e ácido oleanólico) e com o uso do LC-MS e RMN de ^{13}C e de ^1H foi possível obter os perfis cromatográficos das amostras, identificando cinco compostos. Foi possível estabelecer um possível fator de escolha alimentar da *P. tetrio* com estes compostos. Além disso foram sintetizados cinco novos complexos do o ácido oleanólico, isolado de *Plumeria obtusa*, com os metais cálcio, magnésio, zinco, cobre e níquel. Foram realizados ensaios biológicos com os compostos isolados, com os complexos sintetizados e com todas as frações obtidas dos extratos das folhas das três espécies de *Plumeria*. Os ensaios biológicos foram realizados com *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* (UPEC), PEPCK, G6P e FAZ. Com *Staphylococcus aureus* os resultados foram significativos para algumas frações do extrato bruto e um resultado bastante satisfatório para o complexo de magnésio frente ao gene G6P. A variação dos compostos presentes nos voláteis junto com as análises dos perfis formados com LC-MS e RMN permitiu estabelecer uma relação de escolha de *P. tetrio* por *P. alba* como fonte alimentar. Os compostos formados através da complexação do ácido oleanólico abre novas expectativas de estudos para outras atividades biológicas.

ABSTRACT

RIBEIRO, Nilton César, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018. **Chemical composition and biological assays of three species of *Plumeria L.* and its host *Pseudosphinx tetrio L.*** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-adviser: Marcelo Henrique dos Santos.

The present work deals with the study of the species *Plumeria rubra*, *Plumeria alba* and *Plumeria obtusa* with *Pseudosphinx tetrio L.* About *P. tetrio* are presented information about size, feeding forms and their characteristics. The study of the volatiles emitted by the flowers of the three plumerias in two periods, the HS-SPME and GC-MS system was used to identify the compounds present in the chemical composition. A total of 26 volatiles were identified in all three species. The linalool compound and the methyl salicylate were the most abundant in the two collection periods, ranging from linalool of 71% diurnal to 86.5% nocturnal and methyl salicylate with variation of 20% nocturnal and 30% diurnal. In the phytochemical study of the leaf samples, three isolated compounds (hexacosane, ferulic acid and oleanolic acid) were obtained and using the LC-MS and ^{13}C and ^1H NMR, it was possible to obtain the chromatographic profiles of the samples, identifying five compounds. It was possible to establish a possible food choice factor of *P. tetrio* with these compounds. In addition, five new complexes of oleanolic acid, isolated from *Plumeria obtusa*, were synthesized with the metals calcium, magnesium, zinc, copper and nickel. Biological assays were performed with the isolated compounds, with the complexes synthesized and with all the fractions obtained from the leaf extracts of the three *Plumeria* species. The biological assays were performed with *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* (UPEC), PEPCCK, G6P and FAZ. With *Staphylococcus aureus* the results were significant for some fractions of the crude extract and a very satisfactory result for the magnesium complex against the G6P gene. The variation of the compounds present in the volatiles together with the analyzes of the profiles formed with LC-MS and NMR allowed to establish a relation of choice of *P. tetrio* by *P. alba* as food source. Compounds formed through the complexation of oleanolic acid opens new expectations of studies for other biological activities.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas como medicamentos e no combate a pragas e doenças na agricultura a partir de conhecimentos populares ocorre desde a antiguidade. Na agricultura é comum encontrar uma receita ou formas de manejo agrícola que são passados de geração para geração. Plantas como alho (*Allium sativum*), fruta-do-conde (*Annona squamosa*), artemisia (*Artemisia ludoviciana*), cravo-de-defuntos (*Tagetes sp*), urtiga (*Urtiga urens*), erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) e muitas outras são utilizadas no controle de pragas e doenças, ainda que de forma empírica, na agricultura (CARRASCO et al., 2015).

Os primeiros relatos sobre plantas medicinais foram encontrados nos papiros de Georg Ebers, traduzidos pela primeira vez em 1890, por H. Joachin. Nesses papiros estavam listadas cerca de 100 doenças e um grande número de drogas provindas de natureza animal e vegetal (WIMALARATNE et al., 1996). Por volta do ano 400 a.C o pó-da-Pérsia, obtido a partir do crisântemo (*Crysanthemum cinerariaefolium*) foi utilizado no controle de pragas (LINK et al., 1987; COSTA et al., 1997; CUI et al., 2015). A nicotina (Figura 1-A) extraída de *Nicotiana tabacum*, a rianodina (Figura 1-B) obtida da *Ryania speciosa*, alcaloides de *Schoenocaulon officinale*, piretrinas obtidas de *C. cinerariaefolium* e rotenona (Figura 3-B) obtida de *Derris spp* e de *Lonchocarpus spp* são alguns exemplos de precursores da utilização de plantas como método alternativo de combate a pragas e doenças na agricultura (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2012).

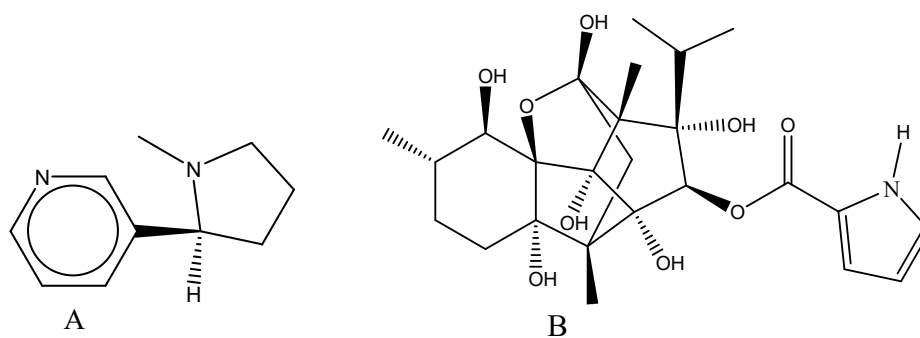


Figura 1 – Fórmula estrutural dos compostos nicotina (A) e rianodina (B).

Entre as várias plantas conhecidas tem-se a *Azadirachta indica*, da família Meliaceae, comum nas regiões tropicais e subtropicais de alguns continentes. De origem asiática, é considerada a planta inseticida mais importante atualmente (Brunherotto et al., 2001). Dentre os seus diversos compostos com atividade biológica, destaca-se a azadiractina

(Figura 2) que possui atividade de repelência, inibi a alimentação e o crescimento de insetos (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993), agindo de forma a bloquear os impulsos advindos de receptores que respondem a fagoestimulantes, como também podem atuar de forma a estimular as células envolvidas na inibição alimentar (CHAPMAN, 1974).

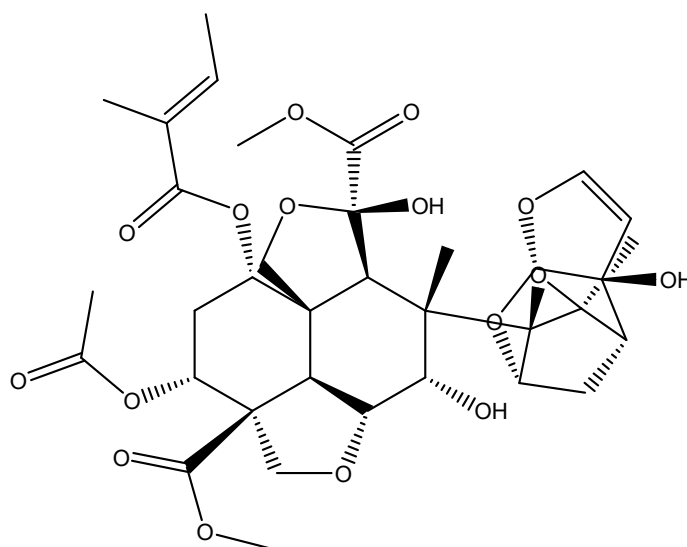


Figura 2. Fórmula estrutural do composto Azadiractina.

A piretrina (Figura 3-A), outro composto já conhecido e bem estabelecido no mercado agrícola, é extraída de sementes ou de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum cineum* (Asteraceae). Pertence ao grupo dos piretroides e atua nos canais de sódio, mantendo-os abertos, causando hiperexcitabilidade, interrompendo a transmissão do impulso nervoso. Possui efeito residual de curta duração, degradando-se rapidamente quando exposta à luz e ao ar, sendo necessário um maior número de aplicações em ambientes abertos (PARR, 1975). Em virtude dessa natureza de curto efeito residual, a piretrina tem sido utilizada em locais fechados, principalmente em residências, para o controle de pragas domissanitárias. Ela atua sobre um grande número de artrópodes, como pulgas, baratas, mosquitos, pulgões, tripes, mosca das frutas, gafanhotos, lagartas, cochonilhas, percevejos, besouros, piolhos e ácaros (CASIDA; McLAUGHLIN, 1975; PARR, 1975).

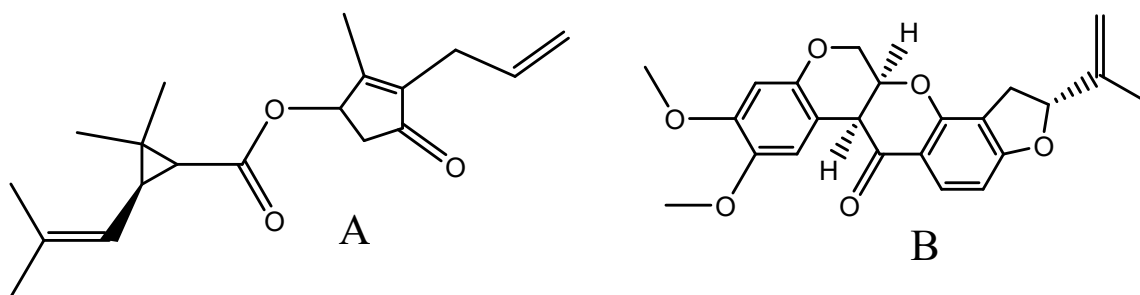


Figura 3. Fórmula estrutural dos compostos Piretrina (A) e Rotenona (B).

A rotenona (Figura 3-B) é um composto inseticida presente em *Lonchocarpus spp.*, encontrada na América do Sul, e em *Derris spp.*, encontrada na Ásia. No extrato da raiz da planta há uma série de compostos conhecidos como rotenoides. A rotenona possui efeito tóxico nos músculos e nervos, interrompendo a alimentação dos insetos e causando sua morte após a exposição. Também inibe a respiração celular, bloqueando a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, ligando-se ao NADH:Q oxirredutase e, consequentemente, impedindo a oxidação do NADH₂ (POZZA et al., 2001). Possui uma das mais altas toxicidades agudas entre os inseticidas botânicos, sendo mais tóxica a insetos do que muitos inseticidas de natureza sintética. Age por meio da ingestão e do contato, sendo instável à luz, ao calor e ao ar. Diante da luz, a rotenona tem um período de vida médio de até três dias. Quando aplicada em pulverizações sobre a superfície das plantas, promove proteção por aproximadamente sete dias (COSTA et al., 1997).

Um aspecto importante e com uma vasta abrangência no ramo científico é a interação mútua, que envolve muitas vezes relações entre membros de diferentes reinos que oferecem serviços complementares como proposta de benefício mútuo (LEIGH, 2010). Uma classe proeminente de exemplos é o mutualismo, um intercâmbio entre animais e plantas. As plantas são os produtores primários em muitos ecossistemas e fornecem alimentos e outros recursos para os animais, mas essa interação ocorre na maioria das vezes de forma bidirecional, pois os animais podem dispersar pólen e ou sementes das plantas que visitam; eles podem, portanto, facilitar a reprodução e a contribuição para a diversidade genética das plantas.

Quase três quartos de todas as plantas florescendo existentes (*angiospermas*) recebem serviços de polinização de animais (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2007), e a polinização animal é considerada uma forma ancestral de polinização em *angiospermas* (HU et al., 2008).

Análogo a um mercado com produtores e consumidores (NOË; HAMMERSTEIN, 1994), as plantas oferecem recompensas aos animais e os que escolhem entre as ofertas disponíveis e retribuem com a polinização ou distribuição de sementes ou ainda obtendo outros diferentes benefícios oriundos da planta escolhida. Já observado por Smith (1776), o mutualismo com base em mercado não resulta da “benevolência” dos “indivíduos”, mas, da consideração ao seu próprio interesse.

Insetos e plantas estão intimamente associados, alguns insetos são vitalmente importantes para muitas plantas, assistindo na sua reprodução, através da polinização, ou na sua dispersão espalhando suas sementes. Como exemplo, tem-se as formigas que se beneficiam de associações com mirmecófitas que fornecem abrigo para seus ninhos e recursos alimentícios facilmente disponíveis. Assim, beneficiam-se da proteção dada pelas formigas que defendendo seu território mantém a planta livre de herbívoros (RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007).

Uma forma comum de relação entre planta e inseto, ocorre quando atacados por herbívoros, as plantas produzem metabólitos secundários tóxicos que funcionam como defesas diretas, bem como defesas indiretas que atraem e recompensam predadores dos herbívoros ofensivos. Essas defesas indiretas incluem recompensas nutricionais como o néctar extra floral, bem como recompensas informativas, como a produção e a liberação de compostos voláteis que revelam a localização da alimentação de herbívoros para seus predadores (STORK et al., 2011).

Muitos insetos possuem a capacidade de se alimentarem de plantas que contêm substâncias tóxicas, sem nenhum tipo de prejuízo, utilizando principalmente mecanismos enzimáticos para inativação dos princípios ativos ou evitando os estágios e as partes da planta onde as substâncias estão presentes em maiores concentrações (DEQUECH et al., 2008; SOUSA et al., 2014).

Plumeria L.

Plumeria L. é um gênero botânico da família Apocynaceae, pertencente à divisão *Magnoliophyta*, na classe *Magnoliopsidas* ou dicotiledôneas, da ordem das *Gentianales*. As espécies conhecidas são: *Plumeria alba*, *Plumeria inodora*, *Plumeria obtusa*, *Plumeria pudica*, *Plumeria rubra* (conhecida vulgarmente como jasmim-manga no Brasil), *Plumeria stenopetala*, *Plumeria stenophylla* e *Plumeria lancifolia*, que é popularmente conhecida como agoniada (MARTÍNEZ GUERRA et al., 2000).

Os primeiros relatos sobre as plumerias foram feitos pelo famoso monge Franciscano Charles Plumier (1646 a 1704), que durante sua vida fez 31 manuscritos, relatando mais de 4.300 plantas e 1.200 animais. O monge fez descobertas notáveis que incluem a *Begonia*, *Fuchsia*, *Lobelia*, *Magnolia* e *Plumeria*. Os registros com *Plumeria* foram feitos durante uma viagem na região do Caribe. Atualmente as *Plumerias* ocorrem principalmente na região das Américas. Elas não possuem tolerância a regiões de frio intenso (OMATA et al., 1991; ZAHEER et al., 2010).

A *Plumeria alba* (Figura 4) é muito utilizada em jardinagem, e talvez pela beleza de suas flores e por sua fragrância ela tenha recebido o título de planta do amor. Na literatura seu emprego medicinal é citado de várias formas, desde regulador do ciclo menstrual até no tratamento de câncer (ZOUA et al., 2014).

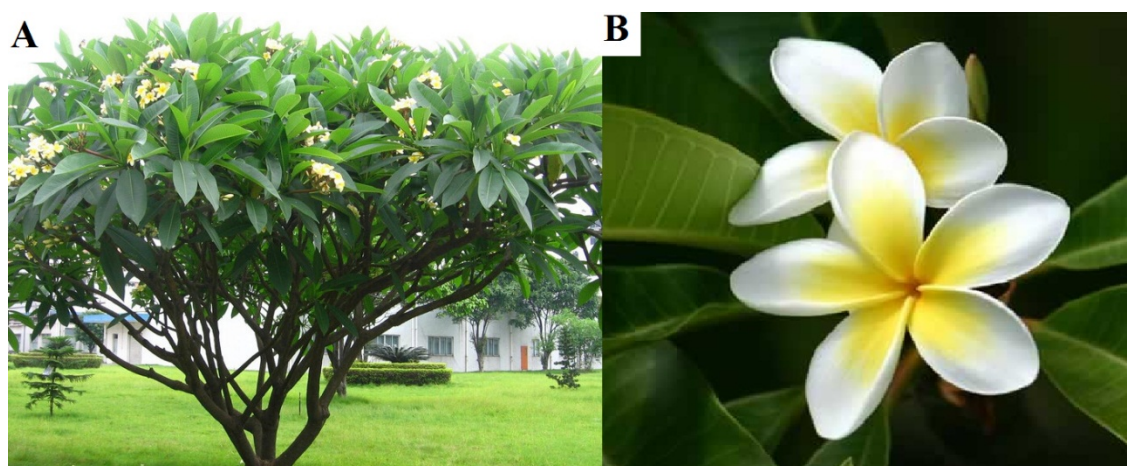


Figura 4 – Árvore de *Plumeria alba* (A) e destaque da flor de *Plumeria alba* (B).

Possui uma folha espessa de cor verde, com filamentos firmes, de tamanho variando de 6,0 a 12 cm. Seu caule libera um líquido branco viscoso, com caráter leitoso, como um látex. Suas flores têm aproximadamente 2,0 cm, com cinco pétalas, e sua coloração varia de acordo com a espécie, sendo branca (Figura 4-B), rosa, amarelo (Figura 5-A), vermelho (Figura 5-B) ou ouro. A ocorrência de florada acontece no final do inverno e perdura por alguns meses (HAMBURGER et al., 1991; SHINDE et al., 2014).

Considerando que a *P. alba* é o alimento preferencial na alimentação de *P. tetrio* na fase larval e na sua forma adulta promove a polinização das flores de *P. alba*, verifica-se a existência de uma possível relação de troca mútua na interação planta-inseto.

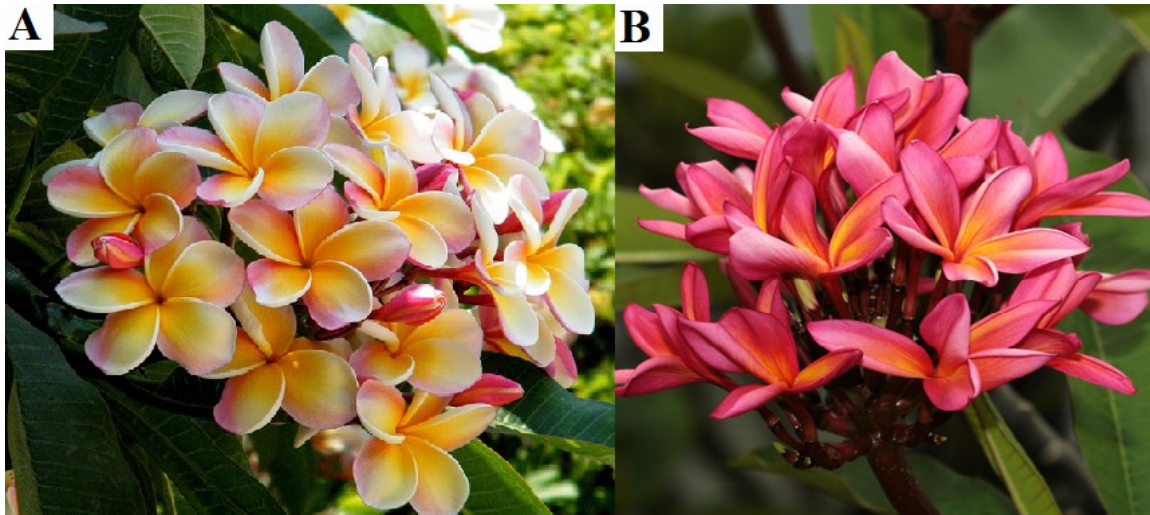


Figura 5 – Flores de *Plumeria obtusa* (A) e flores de *Plumeria rubra* (B).

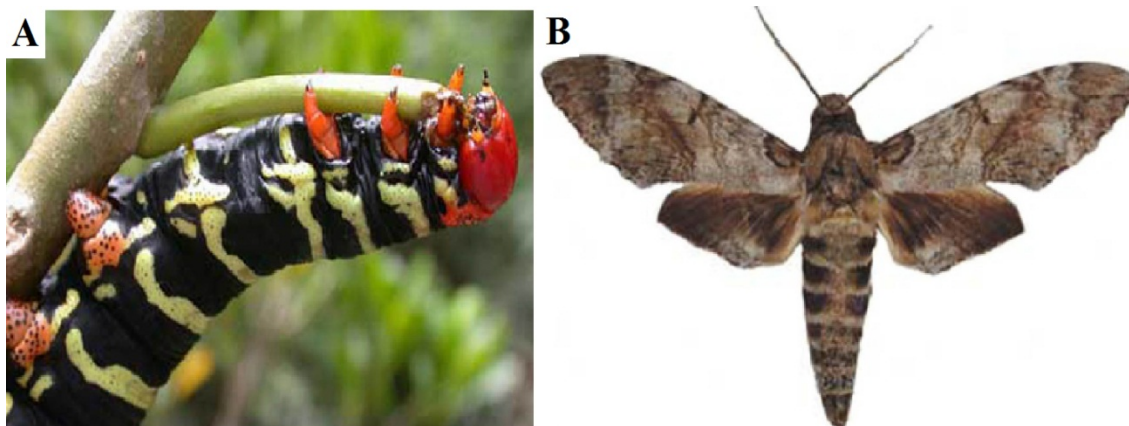
Pseudosphinx tetrio L.

Pseudosphinx tetrio L., é um inseto que na fase larval (Figura 6-A), possui cores amarela e preta intensas, em formato de listra. Suas cores são em um tom aveludado, com anéis amarelos e a cabeça de cor laranja intensa. O padrão de cor larval é um sinal de aviso típico aposemático de que elas são potencialmente tóxicas para seus predadores. Podem atingir comprimentos de até cerca de 15 centímetros. Possuem pernas torácicas com diferentes tamanhos, sendo as de tamanho menor de cor laranja com manchas pretas (DUNFORD; BARBARA, 2005; SQUYRES, 2014).

A mariposa possui a asa anterior dorsal marrom, com uma mancha escura na base da margem costal e marcações de cinza e branco borradas. A asa posterior dorsal é castanho-escuro, com branco ao longo da margem interna e na metade inferior da margem exterior. O corpo é listrado, com faixas transversais cinza e branco, sendo as mais largas pretas (Figura 6-B). Possui uma envergadura média é de 12,7 a 14 cm (as fêmeas são geralmente maiores que os machos e de cores mais claras). Os ovos não apresentam forma específica, exceto para punções diminutas na superfície, são verde-pálidos, elipsoidais e medem entre 2,2 e 2,5 mm (DUNFORD; BARBARA, 2005; SQUYRES, 2014).

Pode ser encontrada ao longo dos trópicos e subtropicais americanos. Seu alcance se estende do sul do Brasil até a América Central, México, Antilhas e Bahamas indo até ao sul da Flórida. Se alimentam preferencialmente das folhas de *Plumeria alba*, mas, na sua ausência também se alimentam das outras espécies. Relatos indicam sua presença também em outras espécies vegetais tais como: *Alamanda cathartica* L., *Himatanthus succuba*,

Adenium sp., *Habdadenia biflora* (Jacq.), *Echites umbellata* Jacq. (DUNFORD; BARBARA, 2005; SLOAN et al., 2007; SQUYRES, 2014).



Fonte: Dunford e Barbara (2005).

Figura 6 – Exemplar de *Pseudosphinx tetrio* L. Fase de larva (A) e fase adulta (B).

As fêmeas chegam a depositar de 50 a 100 ovos em aglomerados, em folhas da árvore hospedeira. As mariposas eclodem de pupas na serapilheira ou em câmaras subterrâneas. Existe registros de *Pseudosphinx tetrio* L. polinizando *Caryocar brasiliense* Cambess no Brasil, o que indica que a mariposa pode ser um polinizador também dessa espécie (SQUYRES, 2014).

Sendo as mariposas adultas tipicamente solitárias, enquanto as lagartas vivem em grupos e podem ser vistas na planta hospedeira. Sobretudo, as mariposas adultas vivem de uma a duas semanas. No entanto, os registros mostram que na fase adulta elas sobrevivem cerca de 10 dias em cativeiro. O período de vida da *Pseudosphinx tetrio* L. pode ser considerado longo quando somados todos os estágios de vida, nomeadamente o ovo, larva, pupa e fase adulta que corresponde em média há 90 dias (DUNFORD; BARBARA, 2005).

As plantas hospedeiras da família Apocynaceae produzem látex branco, tóxico, no qual a *Pseudosphinx tetrio* L. é capaz de desintoxicar e possivelmente sequestrar para fins de defesa (Squyres, 2014). Alguns pássaros, contudo, não são desencorajados e foram relatados alimentando-se dessas lagartas.

Em um estudo preliminar (DUNFORD; BARBARA, 2005) foram realizados testes para definir as interações e propriedades bioativas de *Pseudosphinx tetrio* L. na fase larval e a *Plumeria* L. Experimentos em laboratório demonstraram a preferência alimentar da *Pseudosphinx tetrio* L. pela *Plumeria* L. e uma rejeição com as folhas de *Alamanda blanchetii* A. e *Nerium oleander* L. (INDIES; AMERICA, 2008).

Considerando os dados já reportados na literatura e somada as observações feitas entre a *Pseudosphinx tetrio* L. e a *Plumeria alba*, sugere-se a existência de uma relação entre a planta e o inseto, onde a *Plumeria alba* promove a atração da mariposa para fins de polinização e o inseto obtém benefícios alimentando-se do néctar floral e das folhas (na fase de larva) ganhando uma determinada proteção com os compostos obtidos nas folhas da planta.

Com o objetivo de identificar e entender essa relação planta-inseto o presente trabalho teve como proposta a análise dos voláteis das flores de três espécies de *Plumeria* L. (*Plumeria alba*, *Plumeria rubra* e *Plumeria obtusa*) e de um estudo fitoquímico de suas folhas e da *Pseudosphinx tetrio* L. na fase de larva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNHEROTTO, Rogério; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 13, p. 455-459, 2001.

CARRASCO, D.; LARSSON, M. C. M. C.; ANDERSON, P. Insect host plant selection in complex environments. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 1-7, 2015.

CASIDA, J. E.; McLAUGHLIN, G. A. History of Pyrethrum. *In: Pyrethrum*. v. 3, p. 32-38, 1975.

CHAPMAN, R. F. The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 64, 3, p. 339, 1974.

COSTA, J. P. C.; BELO, M.; BARBOSA, J. C. Efeitos de espécies de timbós (*Derris spp.*: Fabaceae) em populações de *Musca domestica* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, 1, p. 163-168, 1997.

CUI, H.; ZHANG, X.; ZHOU, H.; ZHAO, C.; LIN, L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. **Botanical Studies**, v. 56, 16, p. 2-8, 2015.

DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C. G.; EGEWARTH, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 21, 1, p. 41-46, 2008.

DUNFORD, J. C.; BARBARA, K. A. Tetro sphinx, giant gray sphinx, frangipani hornworm, *Pseudosphinx tetrio* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae). **Entomology Circular**, August, p. 1-5, 2005.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal plants of Thailand XVII Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, 3, p. 289-292, 1991.

HU, S.; DILCHER, D. L.; JARZEN, D. M.; WINSHIP TAYLOR, D. Early steps of angiosperm pollinator coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, 1, p. 240-245, 2008.

INDIES, W.; AMERICA, C. **Pseudosphinx tetrio (Frangipani Sphinx Moth)**. 2008.

LEIGH, E. G. The evolution of mutualism. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, 12, p. 2507-2528, 2010.

LINK, D.; COSTA, E. C.; JURENA, L. F.; MEYER CACHAPUZ, L. M.; LINK, F. M.; LINK, D.; LINK, H. M. Controle da formiga preta pastadeira, *Acromyrmex* sp., com inseticidas em pó. **Mirmecologia Tropical, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia**, v. 23, p. 156, 1987.

MARTÍNEZ GUERRA, M. J.; LÓPEZ BARREIRO, M.; MOREJÓN RODRÍGUEZ, Z.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus*

terebinthifolius Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 5, 1, p. 23-25, 2000.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, 11, p. 903-924, 1993.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Status of pollinators in North America**, p. 322, 2007.

NOË, R.; HAMMERSTEIN, P. Biological markets: supply and demand determine the effect and mating mutualism of partner choice in cooperation. **Behavioral Ecology**, v. 35, 1, p. 1-11, 1994.

OMATA, A.; YOMOGIDA, K.; NAKAMURA, S.; HASHIMOTO, S.; ARAI, T.; FURUKAWA, K. Volatile components of plumeria flowers. part 1. *Plumeria rubra* forma *Acutifolia* (poir.) woodson cv. common yellow. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 6, 4, p. 277-279, 1991.

PARR, J. F. Pyrethrum: The natural insecticide. **Agriculture and Environment**, v. 2, 3, p. 288-290, 1975.

POZZA, A. A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; CAIXETA, S. L.; CARDOSO, A. A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA, E. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, 1, p. 53-60, 2001.

RICO-GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. Relação entre diferentes espécies de formigas e a mirmecófito *Cordia nodosa* Lamarck (Boraginaceae) em áreas de mata ripária na Amazônia mato-grossense. **Acta Amazonica**, v. 41, 3, p. 355-360, 2007.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (Online) Sch. Acad. J. Pharm**, v. 3, 2, p. 2320-4206, 2014.

SLOAN, S. A.; ZIMMERMAN, J. K.; SABAT, A. M. Phenology of *Plumeria alba* and its herbivores in a tropical dry forest. **Biotropica**, v. 39, 2, p. 195-201, 2007.

SOUSA, T. P.; NETO, E. P. S.; SILVEIRA, L. R. S.; FILHO, E. F. S.; MARACAJÁ, P. B. Utilização de plantas como repelentes e inseticidas naturais: Alternativa de produção orgânica e sustentável na agricultura familiar. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, 4, p. 1-4, 2014.

SQUYRES, S. The tropical frangipani caterpillar, *Pseudosphinx tetrio*, can grow up to 6 inches in length. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 25, 1, p. 127-128, 2014.

STORK, W. F. J.; WEINHOLD, A.; BALDWIN, I. T. Trichomes as dangerous lollipops: Do lizards also use caterpillar body and frass odor to optimize their foraging? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, 12, p. 1893-1896, 2011.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Integrated pest management. **Private Pesticide Applicator Training Manual**, p. 1-34, 2012.

WIMALARATNE, P. D. C.; SLESSOR, K. N.; BORDEN, J. H.; CHONG, L. J.; ABATE, T. Isolation and identification of house fly, *Musca Domestica* L, repellents from pepper tree, *Schinus Molle* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, 1, p. 49-59, 1996.

ZOUA, K.; BATOMAYENA, B.; KOSSI, M.; LAWSON-EVI, P.; KWASHIE, E.-G.; KODJO, A.; MESSANVI, G. Effects of *Plumeria alba* Roots Hydro Alcoholic Extract on some Parameters of Type 2 Diabetes. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 8, 3, p. 140-148, 2014.

CAPÍTULO 1

HS-SPME/CG-EM ANÁLISE DE VOLÁTEIS FLORAIS DIURNOS E NOTURNOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Plumeria* COMO POSSÍVEIS INDICADORES DE RELAÇÃO PLANTA-INSETO.

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 1.700 compostos voláteis foram isolados de mais de 90 famílias de plantas, constituindo cerca de 1% de todos os metabólitos secundários em plantas. (MAFFEI, 2010). Diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos para determinar constituintes voláteis presentes em flores, mel e diferentes partes de plantas (FLAMINI et al., 2002; ROBOTTI et al., 2017). CG-EM é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de compostos voláteis em plantas. Tem sido utilizada para caracterizar o perfil e realizar estudos voláteis de diferentes variedades de frutas e vegetais, como maçã, maracujá, banana e manga (PONTES et al., 2009; FACUNDO et al., 2012; KULKARNI et al., 2012; VERES et al., 2012). A técnica de micro extração em fase sólida (SPME) é isenta de solventes, rápida e barata para a extração de metabólitos voláteis (GHOLIVAND et al., 2013). Combina os passos de extração e pré-concentração em um único passo, que é realizado por um dispositivo tipo seringa modificado. Esta técnica fornece uma preparação muito mais rápida da amostra do que as mais tradicionais (PONTES et al., 2009). Vários tipos de fibra estão comercialmente disponíveis para a extração de compostos voláteis. O princípio da partição do *head space* (HS) e SPME envolve o equilíbrio analítico entre a fibra e a amostra (LORD; PAWLISZYN, 2000; PONTES et al., 2009).

Artigo científicos relatam que os compostos orgânicos voláteis desempenham um papel importante na comunicação das plantas, mas pouco se sabe sobre as funções biológicas da maioria dessas substâncias. As fragrâncias emitidas pelas flores servem como meio de orientação e atração para seus polinizadores de interesse. Alguns compostos voláteis emitidos pelas plantas atuam como um material defensivo, seja para afastar predadores, promover interações alelopáticas ou atrair insetos para agir em seu benefício (MEEKIJAROENROJ et al., 2007). Cada espécie e subespécie de planta pode emitir diferentes odores compostos de metabólitos voláteis que são produzidos por diversas rotas metabólicas, levando a distintas sensações olfativas. Além disso, os aromas de diferentes flores têm composições alteradas dependendo do seu estágio de crescimento, clima,

disponibilidade de nutrientes ou ataques de predadores. (RAGUSO et al., 2003; STEENHUISEN et al., 2012). Portanto, a composição e o tempo dessas impressões digitais voláteis são variáveis e intrinsecamente ligadas a diversas condições ecológicas. (HASSAN et al., 2008; CARRASCO et al., 2015; GRULOVA et al., 2015)

Plumeria L. é um gênero da família Apocynaceae pertencente à divisão Magnoliophyta da classe Magnoliopsidas ou dicotiledôneas da ordem de Gentianales. Estes arbustos ou pequenas árvores são nativos do México e são bem conhecidos por suas flores fortemente perfumadas que aparecem em cores diferentes (CHATTERJEE et al., 2013). Várias espécies deste gênero foram descritas, por exemplo, *P. alba*, *P. inodoro*, *P. obtusa*, *P. pudico*, *P. rubra*, *P. stenopetala*, *P. stenophylla* e *P. lancifolia* que são popularmente chamadas de amor. flores. Muitas espécies de *Plumeria* são conhecidas por terem propriedades medicinais e têm sido usadas por grupos indianos e tribais na Índia como agentes antiúlceras, antitumoral e analgésica (SHINDE et al., 2014). *Plumeria* é também o principal hospedeiro da *Pseudosphinx tetrio L.* (SQUYRES, 2014).

Múltiplas rotas metabólicas podem produzir compostos voláteis, e várias espécies e subespécies de *Plumeria* emitem aromas distintos que levam a sensações olfativas alteradas. Propriedades farmacológicas como a cicatrização ansiolítica, anti-inflamatória, antidiarreica e cutânea também foram relatadas para os óleos essenciais das espécies de *Plumeria*. (SIDDIQUI et al., 1989; HAMBURGER et al., 1991; TOHAR et al., 2006). O Linalool é um constituinte primário do aroma floral de *P. alba*, sendo um monoterpene enantiomérico que ocorre naturalmente como duas formas ópticas isoméricas: *R*-(-)-linalol e *S*-(+)-linalool que exibem propriedades sensoriais inteiramente diferentes, bem como diferentes efeitos fisiológicos. O *R*-(-)-linalool tem um aroma fresco e lavanda que lembra o lírio do vale, enquanto o *S*-(+)-linalool tem um cheiro herbáceo e mofado, mais próximo de uma nota cítrica. O *R*-(-)-linalool tem efeitos sedativos semelhantes à lavanda sobre a atividade nervosa autônoma e estados de humor em intensidade muito baixa, enquanto o *S*-(+)-linalool mostra os efeitos opostos (SIANI et al., 2002). Na agricultura, o linalool já demonstrou capacidade de induzir redução no tamanho das células e germinação anormal e aumentar a permeabilidade da membrana (VARONA et al., 2009).

Neste estudo, foi realizada a análise por HS-SPME/CG-EM dos compostos voláteis de aromas florais de três espécies de *Plumeria* (*P. alba*, *P. obtusa* e *P. rubra*) coletadas em diferentes períodos para compreender a variação temporal nos voláteis e identificação de seus principais constituintes voláteis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de material

As flores de *P. alba*, *P. rubra* e *P. obtusa* foram coletadas em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram coletadas no período da manhã e à noite, durante o mês de fevereiro, quando estavam em plena floração. Os vouchers de todas as espécies foram depositados no herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, sob os exemplares de voucher VIC: 47840, VIC: 47841 e VIC: 47847.

2.2 HS-SPME

A extração foi realizada com o carboxen-polidimetilsiloxano (CAR / PDMS) de 85 µm, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm e Supelco divinilbenzeno-Carboximetidilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 µm (Bellefonte, PA, USA) fibras. As flores (2 g) foram inseridas em vials individuais. As fibras foram expostas aos voláteis por 30 min no head space (HS) e avaliadas em três diferentes temperaturas: 26 °C (ambiente), 30 °C e 40 °C. Após a exposição, as fibras foram inseridas no injetor CG-EM para posterior análise (SERRANO et al., 2015).

2.3 CG-EM

Um cromatógrafo gasoso com detector de massa Shimadzu QP 5050A equipado com uma coluna SE-54 (comprimento 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm) foi usado para a análise CG-EM. A fibra contendo os voláteis foi exposta ao injetor por 5 min a 250 °C no modo splitless, aumentando em 5 °C a cada minuto até atingir 150 °C, depois aumentando 15 °C por minuto até atingir 250 °C, permanecendo durante 5 min a 250 °C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa constante de 1,2 mL/min⁻¹. O modo de ionização por impacto de elétrons (EI) foi usado para medições, e a varredura foi realizada a 40-470 m/z (CHOU; LEE, 2005).

Os compostos voláteis foram identificados por comparação de seus espectros de massa com espectros padrão nas bibliotecas analíticas de NiST11 e Wiley, e também comparando seu índice de retenção (RI), calculado usando a série padrão de hidrocarbonetos

C₇-C₃₀ (Bellefonte, PA, EUA) (ADAMS, 2007). As quantidades relativas de cada composto foram calculadas integrando a área do pico (ÁLVAREZ et al., 2015).

2.4 Determinação quantitativa de linalool

A amostra padrão de linalol, (*R*)-(-)-3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (98%) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EUA) foi usada para curva de analítica, traçando áreas de pico contra diferentes concentrações correspondentes em quintuplicata. A quantidade total de linalool emitida pelas flores foram quantificadas em ppm usando cinco soluções diluídas nas concentrações de 500, 1.000, 2.000, 4.000 e 6.000 ppm em uma solução estoque de linalool 10.000 ppm em diclorometano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise inicial de *head space* (HS) e micro extração em fase sólida (SPME) foi realizada para verificar a melhor fibra de SPME para uso na extração de componentes voláteis de flores de *Plumeria*. Três fibras foram pré-selecionadas com base na natureza do seu revestimento e afinidade com a polaridade. Os cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos com fibras de 50/30 µm de DVB-CAR-PDMS e detecção de CG-EM resultaram em maior número e intensidade de picos individuais de metabólitos (Figura 1). Todas as identificações subsequentes de voláteis das flores foram, portanto, realizadas a 40 °C com a fibra de DVB-CAR-PDMS SPME 50/30 µm.

Um total de 18 voláteis foram identificados nas flores de *P. alba* coletadas à noite, múltiplos metabólitos de monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1). Estas moléculas desempenharam papel importante na sinalização volátil durante as interações planta-planta e planta-inseto, sua detecção e quantificação foram, portanto, críticas para o estudo do metabolismo volátil das plantas (STEENHUISEN et al., 2012; PINTO-ZEVALLOS et al., 2016). Entre todos os compostos voláteis, o linalool e o phenylethanol foram os principais constituintes diurnos, representando 86,5% e 5,8% da TIC, respectivamente, da área total do cromatograma.

À noite, a proporção de linalool presente na fração volátil do aroma floral diminuiu para 71,0%, enquanto o feniletanol e o 2-fenilacetaldéido aumentaram para 15,4% e 2,4%, respectivamente (Figura 2). Ambos os derivados do ácido chiquímico demonstram ser os principais contribuintes para o aroma floral no período noturno. Eles também atuam como poderosos atraentes de insetos e cada um atrai diferentes conjuntos de insetos polinizadores e predadores. (TIEMAN et al., 2006).

Uma curva analítica foi construída usando um padrão de linalool que forneceu uma resposta linear com a seguinte equação: $Y = 194321X + 1,108$, com $R^2 = 0,9923$, onde Y é uma área do pico e X é a concentração do metabolito em ppm. Assim, foi possível determinar a concentração de linalool de 1660,7 ppm nas flores de *P. alba* coletadas durante o dia e 773,6 ppm durante a noite.

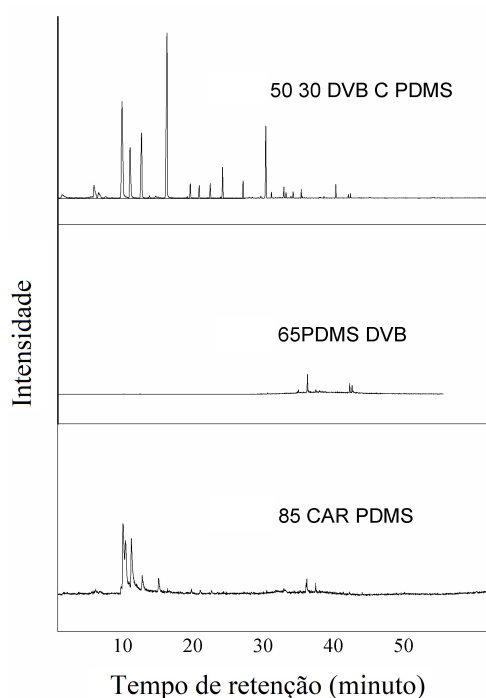


Figura 1 – Análise comparativa de cromatogramas de íons totais (TICs) obtidos por uma combinação de *head space* (HS) e micro extração em fase sólida (SPME) com cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massas (EM) de *P. obtusa* usando o (A) 85 Fibra μm CAR-PDMS, (B) fibra PDMS 65 μm /DVB e (C) fibra 50/30 μm DVB-Carboxen-PDMS.

Tabela 1 – Conteúdo (%) de compostos voláteis identificados de três espécies de *Plumeria*.

Compostos	TR ^a	IA ^b	IA ^c	<i>P. alba</i>		<i>P. obtusa</i>		<i>P. rubra</i>	
				Dia	Noite	Dia	Noite	Dia	Noite
<i>E</i> -hex-3-enol	5,83	853	850	1,0	1,3	-	-	-	-
benzaldeído	8,30	951	952	-	-	2,4	2,7	-	-
álcool benzílico	10,54	1033	1026	-	-	4,4	4,7	1,6	-
β -ocimene	10,67	1039	1044	0,1	-	-	-	-	-
2-fenilacetaldeído	10,80	1040	1036	-	2,3	0,8	1,3	0,6	0,8
<i>E</i> -óxido de linalool	12,28	1091	1084	0,5	1,2	-	-	-	-
metil benzoato	12,58	1095	1088	-	-	14,6	27,2	55,9	62,3
linalool	12,79	1102	1095	86,5	71,0	-	-	8,3	13,0
feniletanol	13,17	1110	1106	5,8	15,4	10,3	9,6	21,7	13,0
epoxilinalool	14,90	1176	1170	-	0,5	-	-	-	-
2- ácido metil ester fenil acético	14,99	1179	1175	0,5	0,4	-	-	0,7	-
Metil salicilato	15,52	1196	1190	0,1	0,3	30,2	20,6	2,2	2,5
álcool cinamil	17,20	1254	1259	-	0,4	-	-	-	-
eugenol	20,25	1359	1356	-	0,04	-	-	-	-
α -copaeno	20,86	1380	1374	0,08	0,09	1,2	3,4	-	-
β -elemeno	21,29	1393	1389	0,08	0,07	-	-	-	-
β -farneseno	22,08	1438	1440	-	0,08	-	2,4	-	-
β -cariofileno	22,09	1421	1417	0,05	-	-	-	-	-
pentil benzoato	22,45	1474	1476	-	-	4,7	8,9	1,2	0,9
α -farneseno	23,86	1509	1505	0,2	0,2	0,4	1,6	-	-
δ -cadineno	24,20	1523	1522	0,07	-	-	-	-	-
pentil salicylato	24,36	1570	1574	-	-	3,8	-	-	-
dendrolasina	25,00	1573	1570	2,1	2,8	-	-	-	-
benzoato de benzila	27,31	1751	1759	0,04	0,2	10,7	5,9	0,6	-
salicilato de benzila	28,32	1869	1864	-	0,08	0,8	-	-	-
Total				97,5	96,8	86,0	88,8	92,4	92,8

^a tempo de retenção em minutos; ^b índice aritmético calculado; ^c índice aritmético tabelado

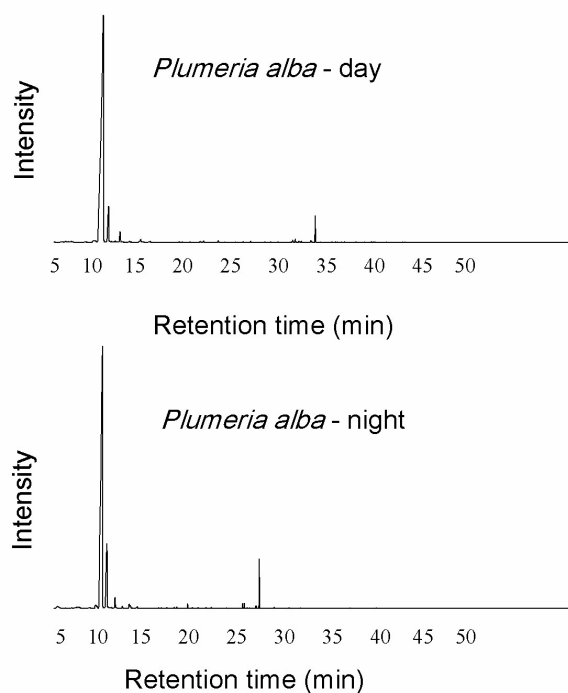


Figura 2 – Emissão dos voláteis de flores de *P. alba*. Cromatogramas CG-EM de voláteis coletados de flores durante o dia (A) e (B) período noturno.

Os voláteis de flores vermelhas de *P. rubra* coletados durante o dia compreendem em nove compostos, sendo: benzoato de metil (55,9%), feniletanol (21,7%), e linalool (8,3%) como constituintes principais (Figura 3). A coleta noturna não alterou esse perfil para o benzoato de metila e o linalool, detectados em 62,3% e 13,0%, respectivamente (Tabela 1). No entanto, a produção de feniletanol foi encontrada em metade dos níveis diurnos (13,0%). Níveis baixos de produção de linalool comparados a *P. alba*, bem como uma grande diferença do feniletanol durante a noite, poderiam explicar a preferência da *P. tetrio* pela *P. alba*.

Um total de 12 compostos foram detectados nos voláteis de *P. obtusa* durante o dia, como: salicylato de metila (30,2%), benzoato de metila (14,6%), benzoato de benzila (10,7%) e feniletanol 10,3% sendo os constituintes majoritários (Figura 4). Uma observação interessante foi a completa ausência de linalool nos voláteis dessa espécie (Tabela 1). Estes compostos foram também derivados do ácido chiquímico formando os ácidos benzóico e salicílico que são precursores diretos para a síntese de importantes aromas florais, salicilato de metilo e benzoato de metila. Observamos também um aumento significativo do benzoato de metila (27,2%) e uma diminuição respectiva do salicilato de metila (20,6%) nos voláteis de *P. obtusa* coletado à noite. Além disso, o salicilato de pentila apareceu apenas nos voláteis da coleta diurna, enquanto o β -farneseno estava presente apenas nas flores coletadas à noite.

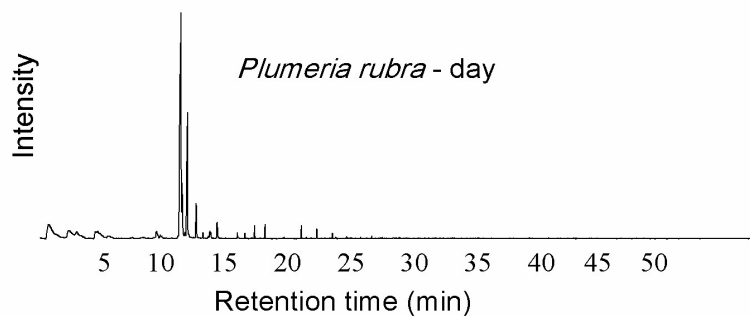
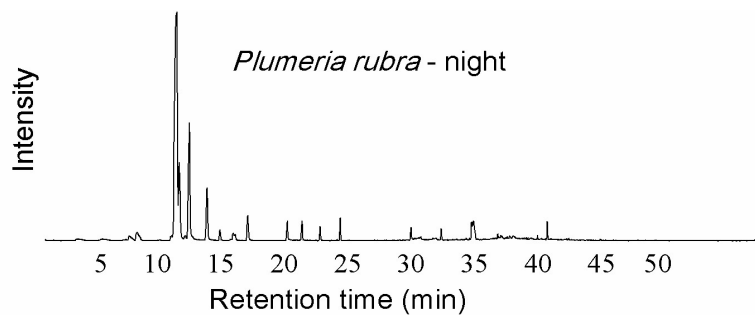


Figura 3 – Emissão dos voláteis de flores de *P. rubra*. Cromatogramas CG-EM de voláteis coletados de flores durante o dia (A) e (B) período noturno.

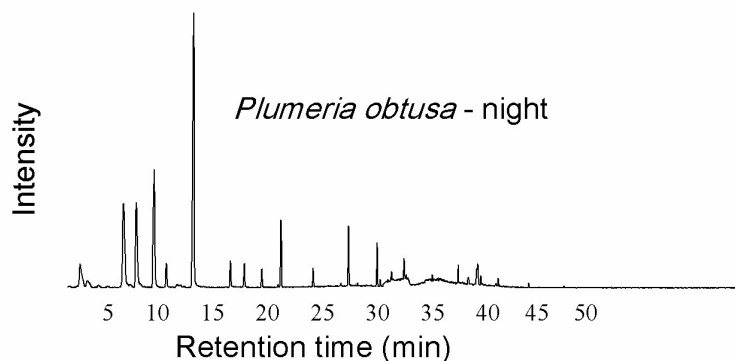
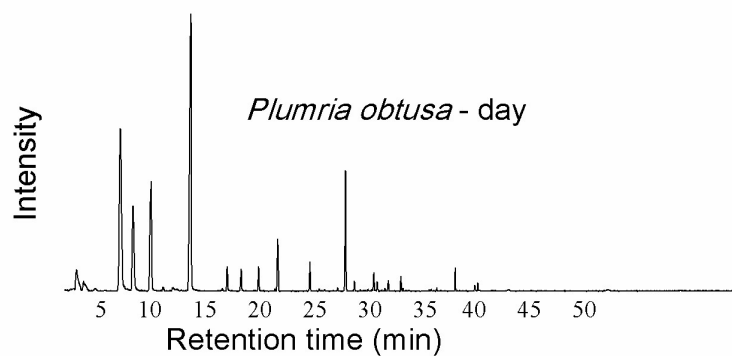


Figura 4 – Emissão volátil de flores de *P. obtusa*. Cromatogramas CG-EM de voláteis coletados de flores durante o dia (A) e (B) período noturno.

4 CONCLUSÕES

Um total de 26 compostos foram identificados nos aromas florais de três espécies de *Plumeria* coletadas durante o dia e à noite. Todas as espécies apresentaram variações diurnas e noturnas na composição relativa de seus metabólitos voláteis. A diferença foi mais proeminente quando comparamos os aromas florais das flores de *Plumeria alba*. Linalool em *P. alba*, methyl salicylate em *P. obtusa*, e methyl benzoate em *P. rubra* estiveram presentes nas maiores quantidades em ambos os períodos de coleta. As diferenças nas composições sugerem a existência de diversos mecanismos utilizados pela *Plumeria* para atrair insetos como seus polinizadores. Entender as várias mudanças na emissão de voláteis e suas interações com plantas-insetos pode ajudar no desenvolvimento de novos produtos e boas práticas de manejo agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ÁLVAREZ, G.; AMMAGARAHALLI, B.; HALL, D. R.; PAJARES, J. A.; GEMENO, C. Smoke, pheromone and kairomone olfactory receptor neurons in males and females of the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 82, p. 46-55, 2015.

CARRASCO, D.; LARSSON, M. C. M. C.; ANDERSON, P. Insect host plant selection in complex environments. **Curr. Opin. Insect Sci.**, v. 8, p. 1-7, 2015.

CHATTERJEE, M.; VERMA, R.; LAKSHMI, V.; SENGUPTA, S.; VERMA, A. K.; MAHDI, A. A.; PALIT, G. Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 6, 2, p. 113-118, 2013.

CHOU, C.-C.; LEE, M.-R. Determination of organotin compounds in-water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1064, p. 1-8, 2005.

FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; DIAS, C. T. S.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Res Int.**, v. 49, p. 626–633, 2012.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 4647-4652, 2002.

GRULOVA, D.; MARTINO, L.; MANCINI, E.; SALAMON, I.; FEO, V. De. Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha x piperita* L. **J. Sci. Food Agric.**, v. 95, 3, p. 621-627, 2015.

GHOLIVAND, M. B.; PIRYAEI, M.; ABOLGHASEMI, M. M.; MAASSOUMI, S. M. Rapid analysis of volatile components from *Teucrium polium* L. by nanoporous silica-polyaniline solid phase microextraction fibre. **Phytochem Anal.**, v. 24, p. 69-74, 2013.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal plants of Thailand XVII Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, 3, p. 289-292, 1991.

HASSAN, E. M.; SHAHAT, A. A.; IBRAHIM, N. A.; VLIETINCK, A. J.; APERS, S.; PIETERS, L. A new monoterpene alkaloid and other constituents of *Plumeria acutifolia*. **Planta Med.**, v. 74, p. 1749-1750, 2008.

KULKARNI, R. S.; CHIDLEY, H. G.; PUJARI, K. H.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Geographic variation in the flavour volatiles of Alphonso mango. **Food Chem.**, v. 130, p. 58-66, 2012.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **J. Chromatogr. A**, v. 885, p. 153-193, 2000.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, 4, p. 612-631, 2010.

MEEKIJJAROENROJ, A.; BESSIÈRE, J. M.; ANSTETT, M. C. Chemistry of floral scents in four *Licuala* species (Arecaceae). **Flavour Fragr J.**, v. 22, p. 300-310, 2007.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; STRAPASSON, P.; ZARBIN, P. H. G. Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 70-74, 2016.

PONTES, M.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. *N.*, v. 93, p. 1-11, 2009.

RAGUSO, R. A.; LEVIN, R. A.; FOOSE, S. E.; HOLMBERG, M. W.; McDADE, L. A. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes“ in *nicotiana*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 265-284, 2003.

ROBOTTI, E.; CAMPO, F.; RIVIELLO, M.; BOBBA, M.; MANFREDI, M.; MAZZUCCO, E.; GOSETTI, F.; CALABRESE, G.; SANGIORGI, E.; MARENGO, E. Optimization of the extraction of the volatile fraction from honey samples by SPME-GC-MS, experimental design, and multivariate target functions. **J. Chem.**, p. 101-114, 2017.

SERRANO, M.; SILVA, M.; GALLEGO, M. Determination of 14 haloketones in treated water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1407, p. 208-215, 2015.

SHINDE, P. R.; PATIL P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy(Online) Sch. Acad. J. Pharm**, v. 3, n. 2, p. 2320-4206, 2014.

SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; RAMOS, M. F. S.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. C. K. V.; DE AQUINO NETO, F. R.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3518-3521, 2002.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUM, S. Pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3143-3147, 1989.

SQUYRES, S. The tropical frangipani caterpillar, *Pseudosphinx tetrio*, can grow up to 6 inches in length. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 25, 1, p. 127-128, 2014.

STEENHUISEN, S. L.; RAGUSO, R. A.; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, v. 84, p. 78-87, 2012.

TIEMAN. D.; TAYLOR, M.; SCHAUER, N.; FERNIE, A. R.; HANSON, A. D.; KLEE, H. J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles

2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 8287-8292, 2006.

TOHAR, N.; AWANG, K.; MOHD, M. A.; JANTAN, I. Chemical composition of the essential oils of four Plumeria species grown on Peninsular Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 6, p. 613-617, 2006.

VARONA, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, 6, p. 1121-1128, 2009.

VERES, K.; CSUPOR-LÖFFLER, B.; LÁZÁR, A.; HOHMANN, J. Antifungal Activity and Composition of Essential Oils of Conyza canadensis Herbs and Roots. **Sci World J.**, p. 1-5, 2012.

CAPÍTULO 2

ESTUDO FITOQUÍMICO DE TRÊS ESPÉCIES DE *Plumeria*, DA LARVA E DA MARIPOSA HOSPEDEIRA

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, sendo ainda hoje a única fonte de tratamento para algumas comunidades. De geração em geração o homem foi transmitindo e aprimorando seus conhecimentos sobre o uso de plantas medicinais. Assim, os produtos naturais têm influenciado as descobertas de novos fármacos e contribuído de forma bastante efetiva na medicina moderna (BACALLAO et al., 2002; VEIGA et al., 2005).

Há diversas razões pelas quais os estudos com extratos vegetais continuam sendo fontes de pesquisas em diversas áreas do conhecimento, considerando que muitos dos medicamentos disponíveis hoje são de origem natural ou derivados deles (TULP; BOHLIN, 2002).

Cabe mencionar que dados da literatura indicaram que, os consumidores dos Estados Unidos chegam a pagar mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. No mercado mundial estima-se que cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades (FILHO; YUNES, 1998).

O gênero *Plumeria L.* (Apocynaceae) contém oito espécies, que podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Algumas espécies vêm sendo utilizadas como remédio para a cura de diarreia, gonorreia, sífilis, feridas venéreas e lepra (SHARMA; KUMAR, 2012). As espécies desse gênero possuem propriedades anti-inflamatórias e diuréticas e são usadas como agente indutor de menstruação, febrífugo, purgante e como tônico e expectorante (HERNANDEZ-GALICIA et al., 2002). Os extratos aquosos da espécie *Plumeria rubra* demonstraram atividades antimicrobianas (GUPTA et al., 2006), anti-inflamatórios (SIDDIQUI et al., 1989) e também são utilizados no tratamento de doenças respiratórias (CASE et al., 2006). Um dos principais compostos presente nas folhas de *Plumeria rubra* é um iridoide conhecido como plumericina, do qual vem sendo utilizado como agente antimicrobiano (HERNANDEZ-GALICIA et al., 2002). Há relatos de seu uso no tratamento de doenças de pele, como agente antipsicótico, antitumoral e ainda como inibidores de imunodeficiência do vírus tipo-1 (SHARMA; KUMAR, 2012).

O presente capítulo tem como proposta o isolamento e a caracterização de compostos a partir do extrato das folhas de *Plumeria alba*, *Plumeria rubra*, *Plumeria obtusa* e dos extratos da lagarta *Pseudosphinx tetrio* e suas fezes.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

As folhas das *Plumeria alba*, *Plumeria obtusa* e *Plumeria rubra* foram coletadas nos jardins da cidade de Viçosa, Minas Gerais, no qual ocupa a posição geográfica: latitude: 20° 45' 20.916" S e longitude: 42° 52' 35.54" W; entre os meses de janeiro e fevereiro, no período de plena floração. Uma exsicata de cada espécime foi depositada no herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, sob os números VIC 47840 (*Plumeria alba*), VIC 47841 (*Plumeria obtusa*) e VIC 47847 (*Plumeria rubra*).

As folhas foram secas em estufa a 40 °C, até peso constante. Após a secagem as folhas foram trituradas em um moinho de facas até atingir a característica de pó. Esse pó foi submetido à extração com etanol, por um período de sete dias.

As lagartas de *Pseudosphinx tetrio* L. foram coletadas em plantas da espécie *Plumeria alba*. Durante um período de cinco dias, as lagartas foram alimentadas em cativeiro e suas fezes foram coletadas. A *Pseudosphinx tetrio* foi identificada pelo entomologista Doutor Vitor Osmar Becker, diretor de pesquisa no Instituto Uiraçu e pesquisador associado ao Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília.

As lagartas e suas fezes foram trituradas em recipientes separados e submetidas à extração nas mesmas condições dos extratos das folhas. Ao final de sete dias o material foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida de em uma rota vapor a 40 °C, conforme ilustra (Figura 1).

A massa de cada extrato etanólico foi determinada e acondicionada em frascos e conservados em geladeiras até a etapa de purificação/separação em coluna cromatográfica clássica com sílica-gel.

2.2. Cromatografia em coluna

Cada extrato etanólico seco foi incorporado à sílica, até a completa homogeneização. Posteriormente o material incorporado livre de solvente foi colocado em uma coluna filtrante (Figura 2) de sílica-gel 60 (0,063-0,2 mm/70-230 mesh ASTM) (NAKANISHI, 1997) (Macherey-nagel, Alemanha) e submetido ao fracionamento com um litro de cada um dos seguintes eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. As soluções obtidas foram concentradas e analisadas por CCD. Os extratos pré-selecionados foram

submetidos a cromatografia clássica com sílica-gel e Sephadex[®] LH-20, para o isolamento e a purificação de compostos.

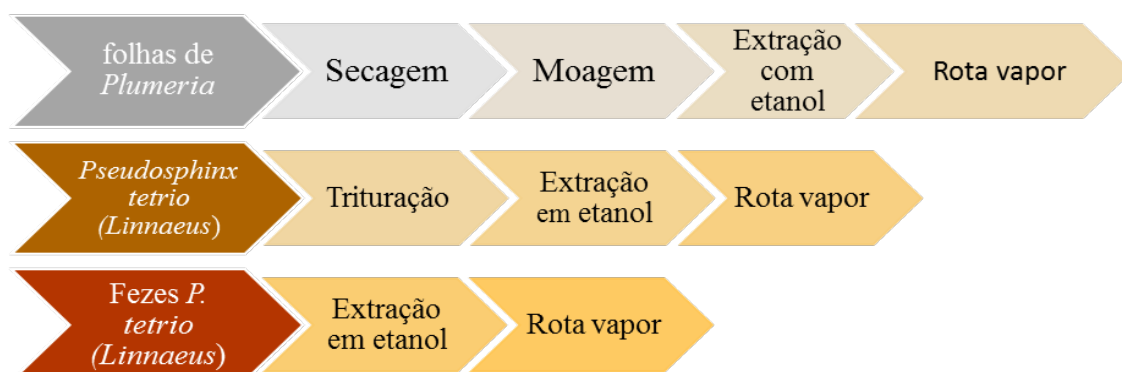


Figura 1 – Esquema de preparação dos extratos de *Plumeria* spp. e *P. tetrio* L.

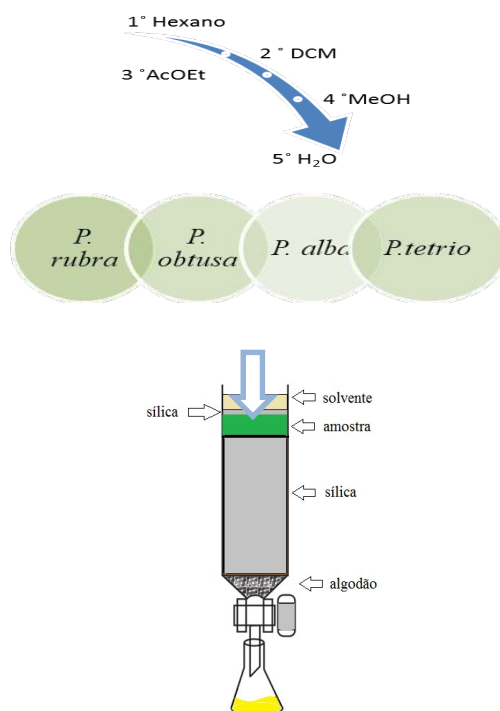


Figura 2 – Sistema de coluna filtrante para o fracionamento dos extratos de *Plumeria* e do seu hospedeiro.

2.3. Teor de umidade

O método utilizado foi à secagem em estufa (103 ± 2 °C), baseado na remoção da água por aquecimento. As amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana, com massas previamente determinadas, permanecendo em estufa até a secagem. Os cadinhos contendo as

amostras foram, então, resfriados à temperatura ambiente, em dessecador, sendo sua massa novamente determinada. Foi calculada, então, a porcentagem de umidade das amostras. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas (AOAC, 1997).

3. ANÁLISE DOS COMPOSTOS

3.1 CG-EM

Os espectros foram obtidos em um cromatógrafo a gás com detector de massa Shimadzu QP 5050 A, equipado com uma coluna SE-54 (95% metil/5% de fenil, comprimento 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm) para a análise GC-MS. A ionização foi feita por impacto de elétrons (EI) e a varredura foi realizada de 40-470 razão massa/carga (m/z). As amostras foram injetadas no modo split no injetor a 250 °C, aumentando em 5 °C a cada minuto até atingir 150 °C, depois aumentando 10 °C por minuto até atingir 200 °C, permanecendo durante 5 min a 200 °C, indo até a temperatura de 250 °C permanecendo por cinco minutos.

3.2. Infravermelho

Os espectros de IR foram registados em um espectrofotômetro Perkin Elmer Paragon 1000 IVFT, pelo modo ATR, faixa de 400 a 4.000 cm^{-1} . Cerca de 2,0 mg de amostra foi depositado sob o de incidência do cristal do equipamento.

3.3. LC-MS

As análises foram realizadas em um LC-MS-QTOF- 6530 modelo L 1200, marca Agilent e com o *software* Profinder série B.06.00, no laboratório de “Estudo e Identificação de Metabólitos de Plantas” da North Carolina University State (NCSU), na cidade Kannapolis, nos Estados Unidos da América. As condições utilizadas foram: fluxo 0,6 mL/min – coluna C18 – 1,8 μM , 3 mm x 100 mm, em ESI (+) – MS (espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo positivo). Fase móvel A: 0,1% ácido fórmico em água, fase móvel B: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila, seguindo a seguinte variação (Tabela 1).

Tabela 1 – Variação de tempo e porcentual de fase móvel (FM) para separação do composto C1 dos extratos de *Plumeria* e da *P. tetrio*, obtidas a partir do extrato em acetato de etila

Tempo (minutos)	Porcentual de FM B (%B)
0,0	2
1,0	2
21,0	98
23,0	98
23,5	2
25,0	2
25,0	1

3.4. 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 MHz, do Departamento de Química da UFV. Clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado CD_3OD foram utilizados como solventes. Também foram realizados experimentos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , COSY e HMBC no Departamento de Química da UFSCar, onde foram obtidos em um espectrômetro Bruker 600 MHz com uso do solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3). A amostra de *P. tetrio* proveniente da fração de acetato de etila foi previamente submetida a uma purificação utilizando hexano para remoção do excesso de ácidos graxos.

3.5. Temperatura de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas em equipamento MQAPF 320, da empresa Microquímica Equipamentos Ltda. As amostras foram analisadas em triplicatas, com variação da temperatura em $1\text{ }^\circ\text{C}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação de compostos

Após o uso da coluna filtrante e o uso de rotavapor para retirada do solvente, foram obtidas as quantidades e as frações (Tabela 2; Figura 3) a partir dos extratos etanólicos.

Tabela 2 – Massa, em gramas, das diferentes frações obtidas das partes de cada espécie de *Plumeria L.*, *P. tetrio L.* e fezes de *P. tetrio L.*, a partir do extrato etanólico, após separação em coluna filtrante

Solvente	<i>Plumeria alba</i> (g)	<i>Plumeria rubra</i> (g)	<i>Plumeria obtusa</i> (g)	<i>P. tetrio L.</i> (g)	Fezes - <i>P. tetrio L.</i> (g)
Extrato etanólico	22.30	22.60	15.66	741.10	246.36
Hexano	2.45	2.78	0.19	0.15	0.05
Diclorometano	5.90	6.36	4.67	2.56	1.08
Acetato de etila	6.12	5.88	4.33	6.06	2.57
Metanol	4.21	3.65	2.50	7.56	2.98
Água	3.80	3.44	1.70	5.67	1.78

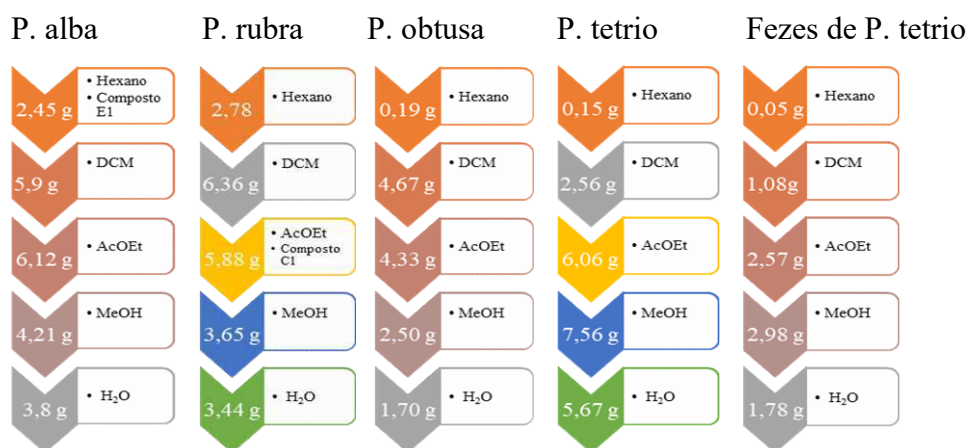


Figura 3 – Fluxograma de obtenção das diferentes frações a partir do extrato com etanol para as amostras de *P. alba*, *P. rubra*, *P. obtusa*, *P. tetrio L.* e fezes de *P. tetrio L.*

4.2. Cromatografia em coluna aberta

As frações obtidas a partir da coluna filtrante foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD), com o objetivo de encontrar a melhor fase móvel (FM). Após o uso

de três colunas cromatográficas com diferentes fases móveis e o acompanhamento da separação por CCD e com os reveladores ácido fosfomolibdico e vanilina, obteve-se o composto E1. Uma pequena quantidade do composto foi enviada para análises em IV, CG-EM e RMN, a fim de determinar a estrutura química do composto (Figura 4).

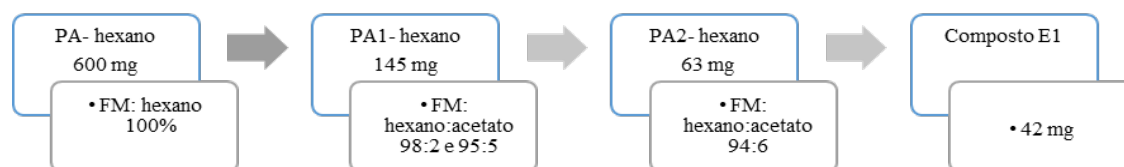


Figura 4 – Esquema de purificação do composto a partir da fração de hexano de *Plumeria alba*.

Outra fração analisada foi a proveniente do solvente acetato de etila da amostra da *Plumeria rubra* (Figura 5), inicialmente analisada com CCD e em seguida submetida a colunas cromatográficas com sílica-gel e sephadex como fase estacionária.

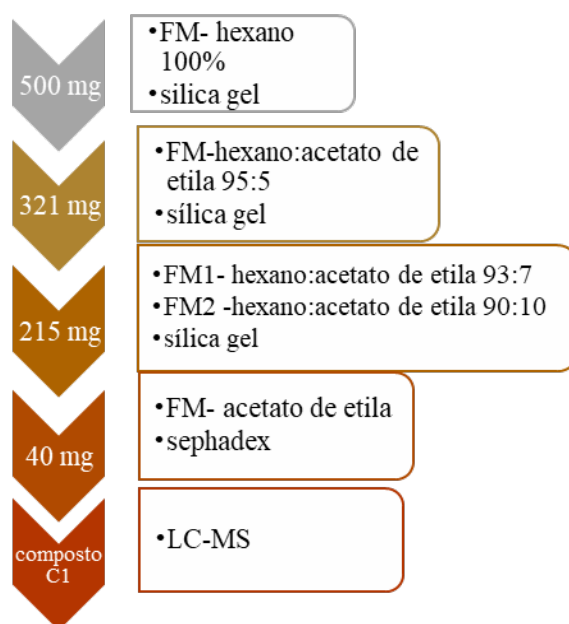


Figura 5 – Esquema de purificação do composto 'C1' a partir da fração de acetato de etila de *Plumeria rubra*.

A fração obtida do extrato em acetato de etila foi submetida ao uso da coluna cromatográfica com sílica como fase estacionária, e a fase móvel foi predeterminada utilizando a cromatografia de camada delgada (CCD) e o revelador ácido fosfomolibdico. Após o uso de três colunas cromatográficas com diferentes fases móveis e o acompanhamento da separação por CCD e reveladas com ácido fosfomolibdico e vanilina e o uso de uma coluna preenchida

com sephadex seguido do uso de LC-MS, obteve-se o composto C1. Uma pequena quantidade do composto foi enviada para análise em IV, GC-MS, LC-MS, RMN e ponto de fusão (Tabela 3), para elucidação da estrutura química do composto.

4.3. Composto E1

O perfil formado pelo cromatograma do é do composto hexacosano, que se assemelha à maioria dos perfis formados por hidrocarbonetos (Figura 6), devido a perdas consecutivas de (-CH₂), ou seja, perda de uma massa de 14 u.m.a., sendo perceptível nos fragmentos a formação desse padrão, onde se vê nas diferenças de m/z o valor referente à fragmentação de CH₂, cujo espectro de massa apresentou íon molecular m/z 366, com fragmentação característica de hidrocarboneto linear, com perdas sucessivas de 14 (m/z 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197).

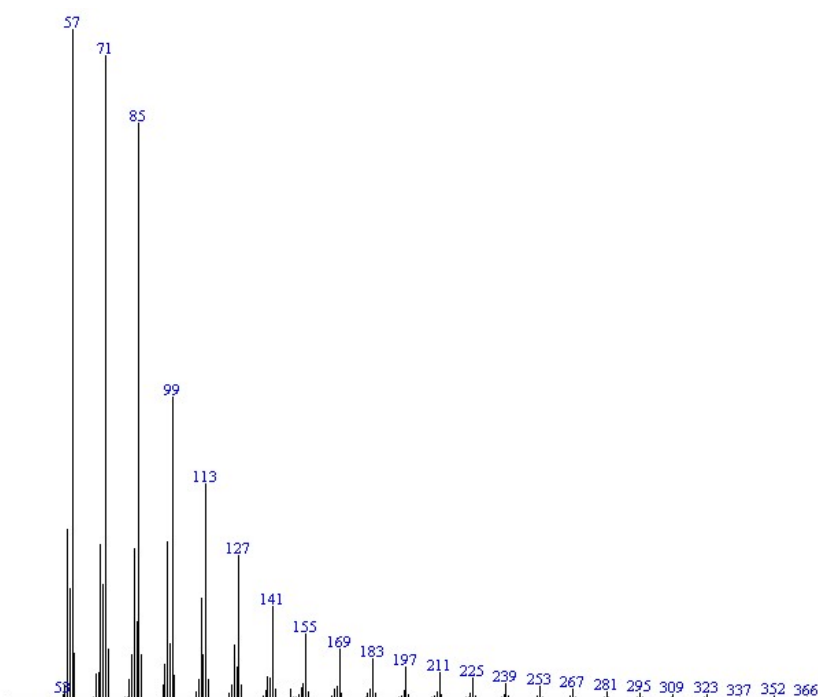


Figura 6 – Espectro de massas do composto E1 (hexacosano).

Os picos característicos de alcanos ocorrem entre 3.000 e 2.840 cm⁻¹, devido ao estiramento assimétrico do H ligado ao carbono sp³, com intensidade variando de média à forte (νCsp³-H, 3.000 a 2.840 cm⁻¹).

Os picos na região de 1.375 cm^{-1} estão relacionados com a deformação simétrica de CH_3 . Na região entre 1.450 e 1.480 cm^{-1} ocorrem as bandas de deformação assimétrica de CH_3 e deformação fora do plano do CH_2 (LOPES; FASCIO, 2004).

É possível identificar a presença de picos no espectro de infravermelho (Figura 7), característicos da estrutura de alcanos. Também semelhante aos alcanos, tem-se a deformação simétrica de CH_3 na região de 1.300 cm^{-1} . Na região de 1.470 cm^{-1} é possível notar a média intensidade de picos formados em consequência de uma deformação assimétrica de CH_3 . Destaca-se que ocorre a deformação fora do plano de CH_2 , possivelmente sobreposta por outros picos nessa mesma região, devido a outras vibrações. A banda em 718 cm^{-1} é indicativo de cadeia carbônica longa $(\text{CH}_2)_n$ com $n > 4$.

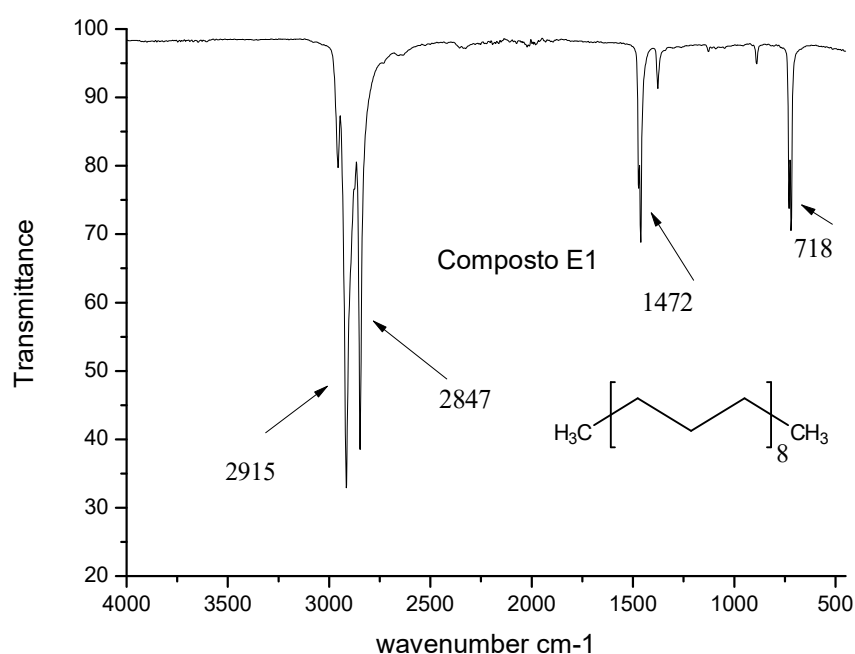


Figura 7 – Espectro no infravermelho do hexacosano (composto E1).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 8) podemos perceber os deslocamentos em δ 0.93 como um tripleto ($J = 6,5\text{ Hz}$) integrado para três hidrogênios e atribuídos às duas metilas. Um multiplete em δ 1,25-1,31 integrado para 48 hidrogênios e atribuídos aos 24 CH_2 .

Diante dessas informações e com o auxílio dos dados do IV, CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível confirmar que a estrutura do composto E1 é o hexacosano com fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$. A determinação da faixa de fusão indicou a pureza do composto isolado.

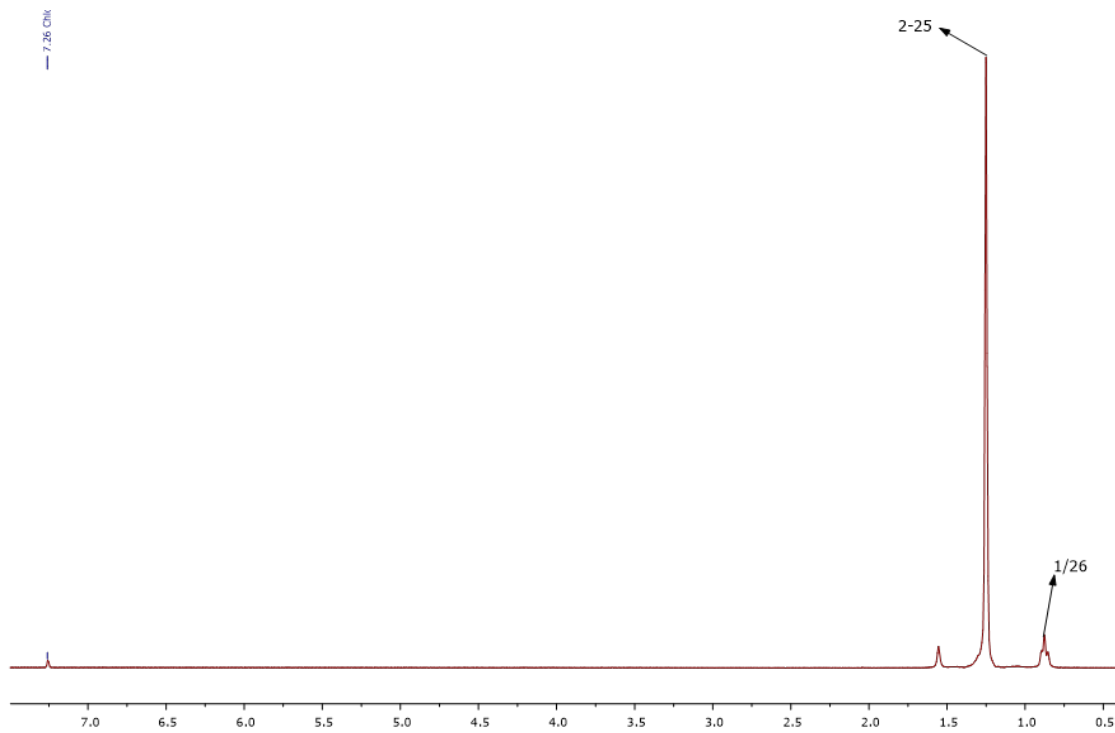


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto E1 (hexacosano).

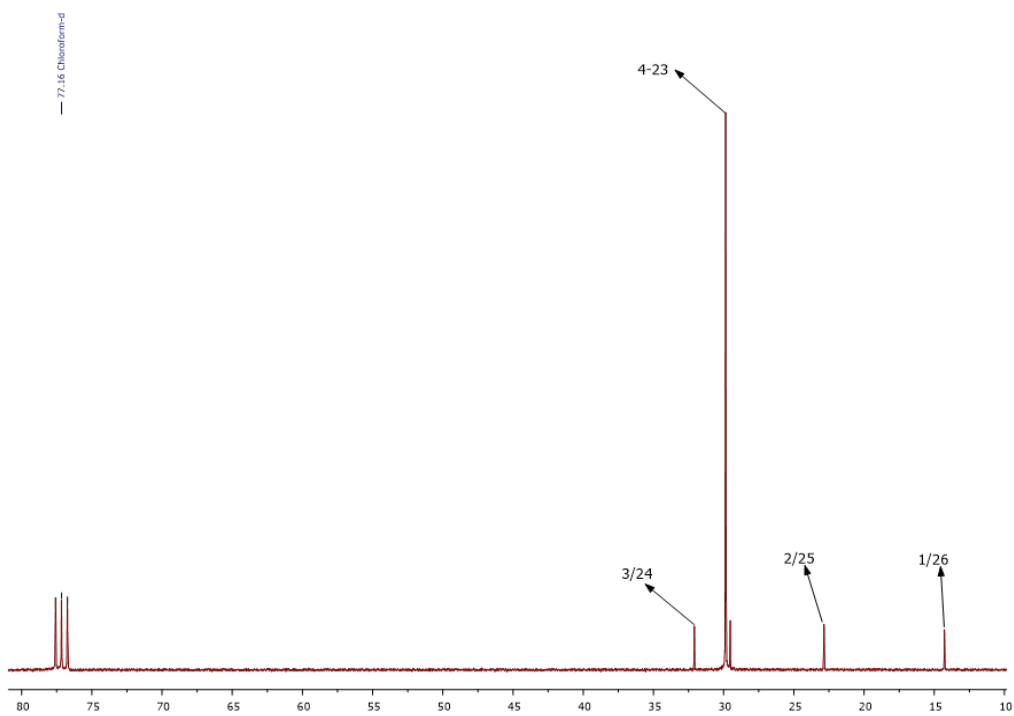


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto E1 (hexacosano).

4.4. Composto C1

Em análise ao espectro de massas do composto C1 (Figura 10), tem-se o fragmento de m/z 77 em virtude da ruptura das ligações nas posições 4, 3 e 1 junto ao anel aromático; o fragmento de m/z 149 corresponde à fragmentação entre os carbonos 1' e 2' (conforme composto na Figura 11). A relação massa/carga de 193 ocorre em virtude da perda de um hidrogênio, conforme destacado na Figura 10.

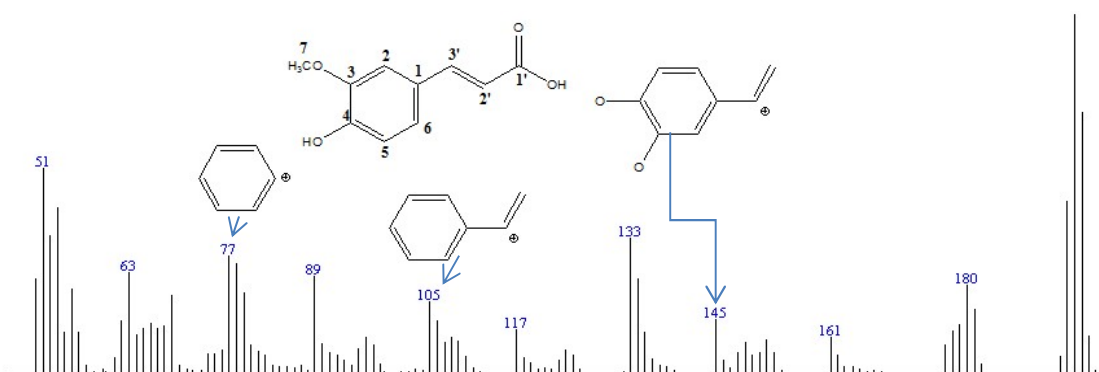


Figura 10 – Espectro de massas do composto C1 (ácido ferúlico).

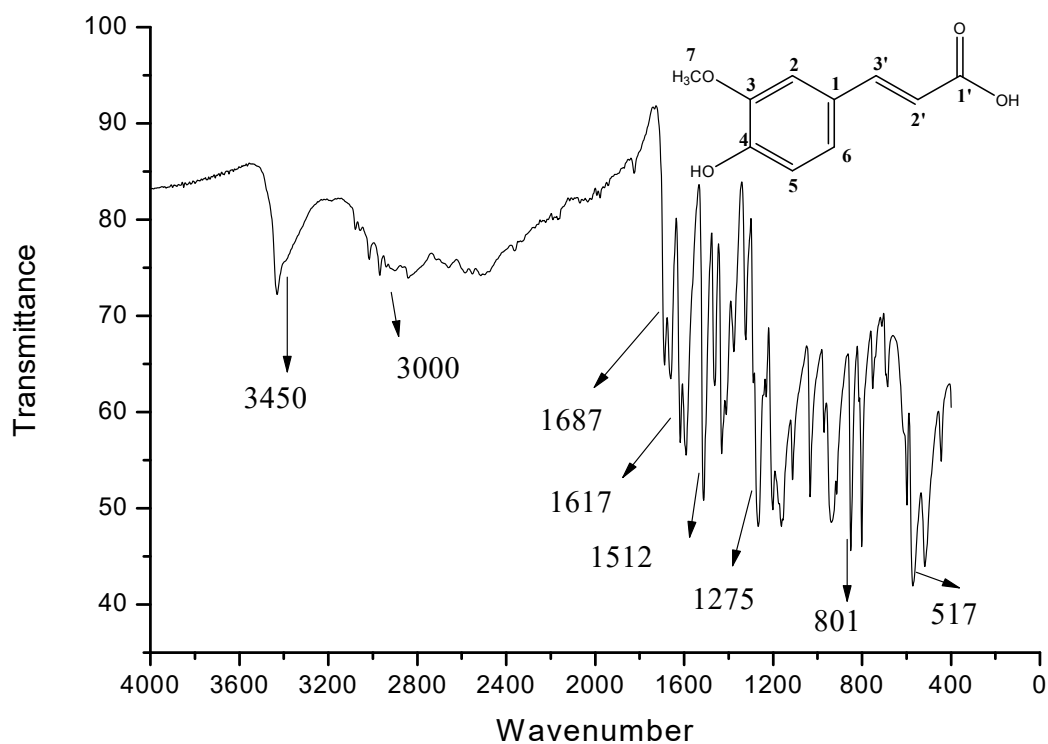


Figura 11 – Espectro no infravermelho do composto C1 (ácido ferúlico).

No espectro de infravermelho (Figura 11) é possível identificar a banda de carbonila ligada ao carbono número 1' em 1.687 cm^{-1} . Entre 3.030 e 3.080 cm^{-1} é possível notar a presença de bandas provenientes do (v) estiramento de ($=\text{C-H}$) do anel aromático. O espectro de IV, com os picos a 3.450 cm^{-1} , refere-se ao estiramento de O-H de ácido carboxílico; em 1.275 cm^{-1} ao estiramento de C-O de ácido carboxílico; e em 1.510 a 1.605 cm^{-1} ao estiramento de ($\text{C}=\text{C}$ aromático).

Constata-se no espectro obtido no LC-MS (Figura 12) a presença do fragmento m/z 193, sendo o de maior intensidade (pico base) e, conseqüentemente, o de maior estabilidade. O fragmento com m/z 134 também pode ser visto no espectro, e o íon molecular foi identificado com m/z 194, indicando, dessa forma, que o fragmento m/z 193 é obtido pela perda de 1 H.

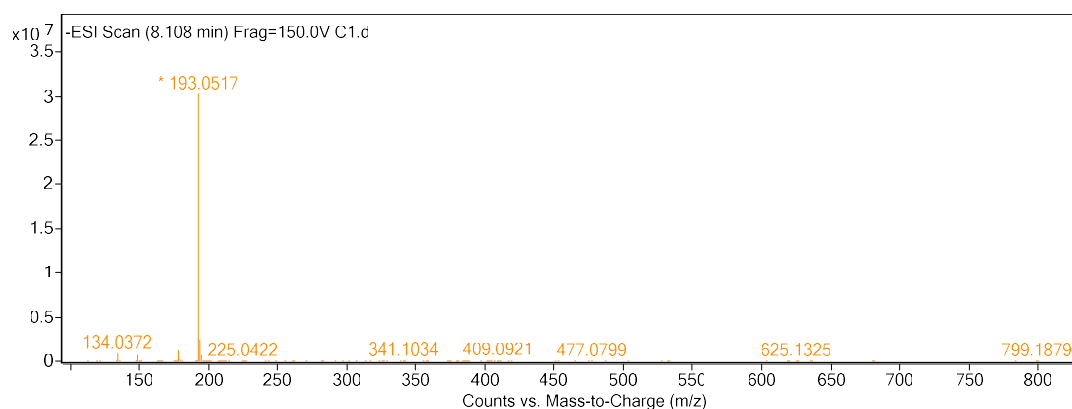


Figura 12 – Espectro ESI (+) - MS da fragmentação composto C1 (ácido ferúlico).

A análise dos dados do LC-MS no modo positivo para amostra C1 (Figura 13) mostrou um pico intenso no cromatograma de íons totais (TIC) logo após o oitavo minuto. A análise foi realizada até o tempo de 25 minutos, onde se constata a ausência de outros picos, portanto é possível verificar a pureza do composto C1 obtida na separação com o uso do LC-MS. A separação do composto foi obtida depois de repetidas corridas e coletas da amostra em vial, seguidas da remoção do solvente com o uso do rota vapor.

O resultado do RMN de ^{13}C (Figura 14) obtém-se deslocamentos que são compatíveis para a estrutura do ácido ferúlico, onde temos um total de dez carbonos: δ 55,1 (3-OCH₃ (C7)), 110,2 (C2); 115,8 (C2'); 116,4 (C5); 122,6 (C6); 126,4 (C1); 145,5 (C3'); 147,9 (C3); 149,1 (C4); 169,6 (C1').

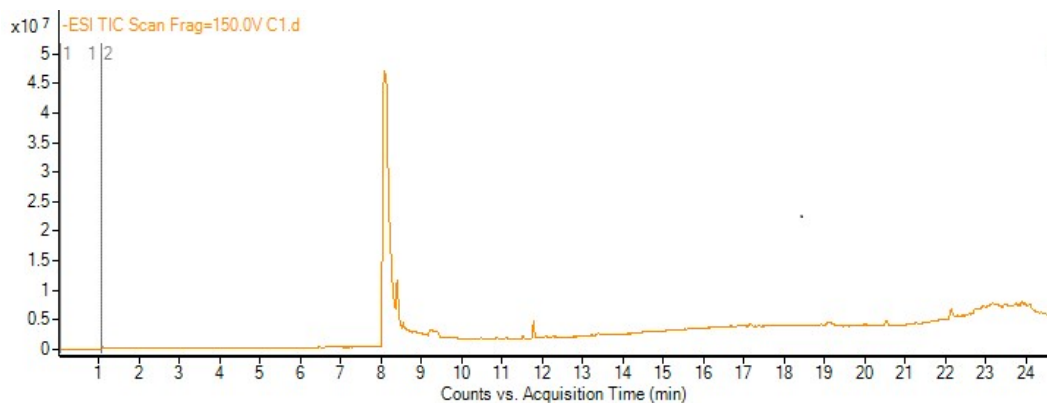


Figura 13 – Cromatograma de íons totais do composto C1 (ácido ferúlico).

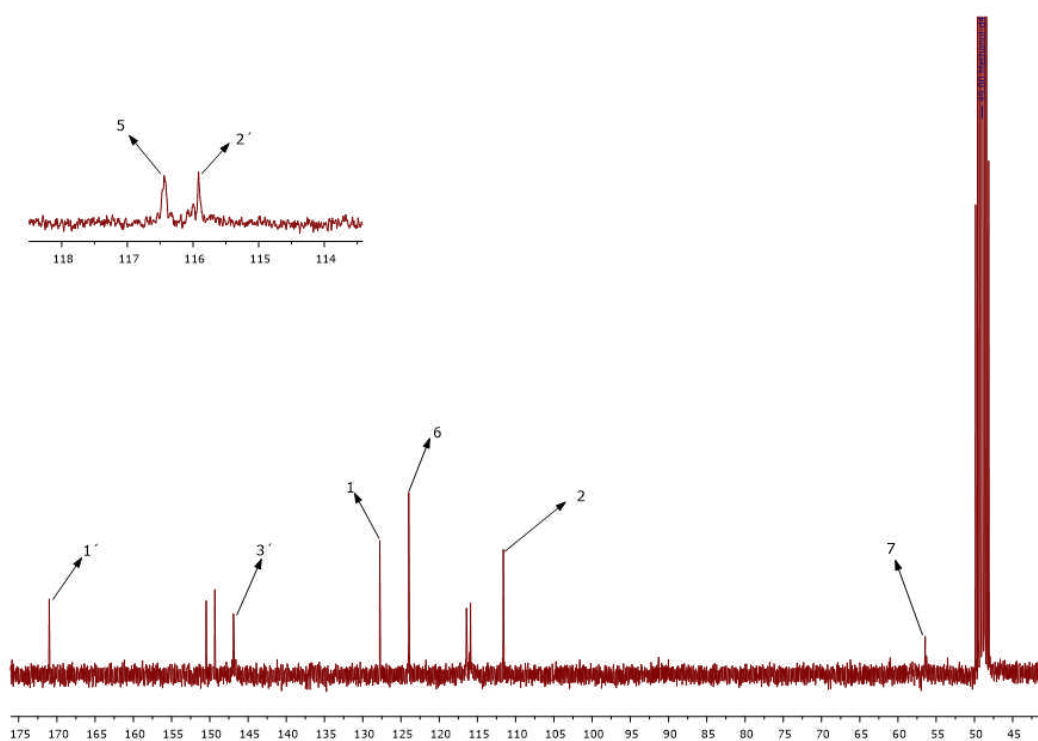


Figura 14 – Subespectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto C1 (ácido ferúlico).

O RMN de ^1H do ácido ferúlico (Figura 15), inicialmente denominado C1, apresentou os seguintes deslocamentos δ : 3,89 (s, 3H, OCH_3 (H7)); 6,31 (d, 1H, $J=15,9$ Hz, H2'); 6,80 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H5); 7,06 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H6); 7,17 (s, 1H, H2); 7,59 (d, 1H, $J=15,9$ Hz, H3'). Esses valores são compatíveis com a estrutura do ácido ferúlico (WORANUCH; YOKSAN, 2013).

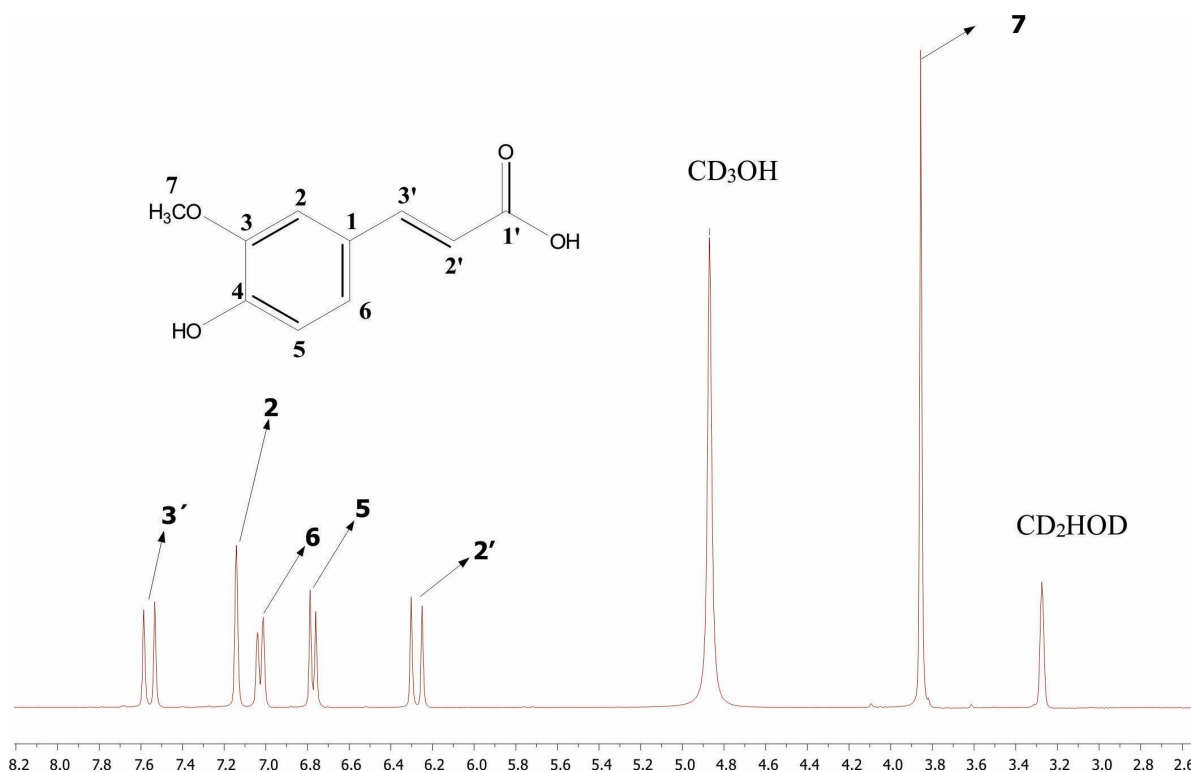


Figura 15 – Subspectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto C1 (ácido ferúlico).

Por meio das informações obtidas com os RMN de ^1H e ^{13}C e com os dados obtidos do CG-MS, IV, LC-MS, foi possível elucidar a estrutura do composto C1 como o (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propenóico (ácido ferúlico) 16 (LOPES; FASCIO, 2004), a determinação da faixa de fusão indicou a pureza do composto isolado.

4.5. Teor de umidade

O teor de umidade, em porcentagem (Tabela 4), é dado pela diferença entre a massa da amostra úmida e a massa da amostra seca, considerando a média das três amostras do mesmo material multiplicado por 100; os valores encontrados são próximos das médias dos teores de umidade de outros trabalhos na literatura (AOAC, 2012).

Tabela 4 – Percentual de umidade das amostras avaliadas

	<i>P. alba</i>	<i>P. rubra</i>	<i>P. obtusa</i>	<i>P. tetrio L.</i>	Fezes <i>P. tetrio L.</i>
Umidade %	81,67	80,90	80,80	85,22	85,57

4.6. LC-MS

4.6.1 Perfil cromatográfico

Com o uso do LC-MS foi feito o perfil cromatográfico (Figura 18) das frações obtidas a partir do acetato de etila na coluna filtrante, com as amostras de todas as *Plumeria* e com a amostra da *P. tetrio L.* Com as mesmas amostras e condições, foram realizadas as análises com o RMN, a fim de elucidar os principais componentes presentes em cada amostra.

As amostras foram dissolvidas em uma solução de 50% de metanol com 50% de acetonitrila, ambos em grau HPLC, sendo todas as amostras feitas em triplicatas. Os resultados foram obtidos pelo modo positivo. Com o auxílio do *software* Profinder (série B.06.00) foi possível identificar a massa exata de cada um dos picos presentes nas amostras.

Foi identificado um total de 2.073 compostos presentes nas quatro amostras. Cada corrida cromatográfica foi obtida com o tempo de 25 minutos. Somente a partir do sexto minuto foram identificados compostos na amostra de *P. tetrio L.*; nas demais amostras eles se mostraram presentes já a partir do minuto inicial. As massas exatas identificadas variam entre 104,50 e 2076,10 u. Do total dos compostos, 413 são comuns nas três amostras de *Plumeria*, ou seja, somente 19,9% dos compostos são os mesmos, tendo assim uma diferença nos demais 80,1% dos compostos; 89 compostos se apresentaram exclusivamente na *Plumeria obtusa*; 81 exclusivamente na *Plumeria rubra*; 173 compostos foram encontrados exclusivamente na amostra de *Plumeria alba*; e na amostra da lagarta *P. tetrio L.* foram encontrados 46 compostos. As amostras de *Plumeria alba* e *P. tetrio L.* possuem em comum um total de 524 compostos, fato já esperado, tendo em vista que as folhas de *Plumeria alba* é o principal alimento da *P. tetrio L.* na fase de larva.

Por meio da análise do cromatograma de íons totais, constata-se que existem semelhanças nos perfis realizados com o uso do LC-MS, devendo ser ressaltado que as três espécies de *Plumeria* possuem maior coincidência nos perfis nas regiões entre 18,89 e 23,52 minutos. Outros picos se repetem em diferentes pontos, como em 12, 17 e 19 em todas as amostras analisadas. De forma clara, é possível identificar que no minuto 20,92 todas as amostras possuem um pico de alta intensidade, sendo o pico de maior área para ambas as amostras. Picos não coincidentes, ou seja, que não se repetem nas outras amostras, são visíveis, como é o caso da amostra de *P. tetrio L.*, que não apresenta nenhum pico abaixo do

minuto 17, quando é possível verificar a presença de diversos picos nas demais amostras. De modo geral, as frações possuem áreas de coincidências e áreas específicas para cada uma das amostras, evidenciando seus diferentes aspectos e compostos em seus perfis (Figura 16).

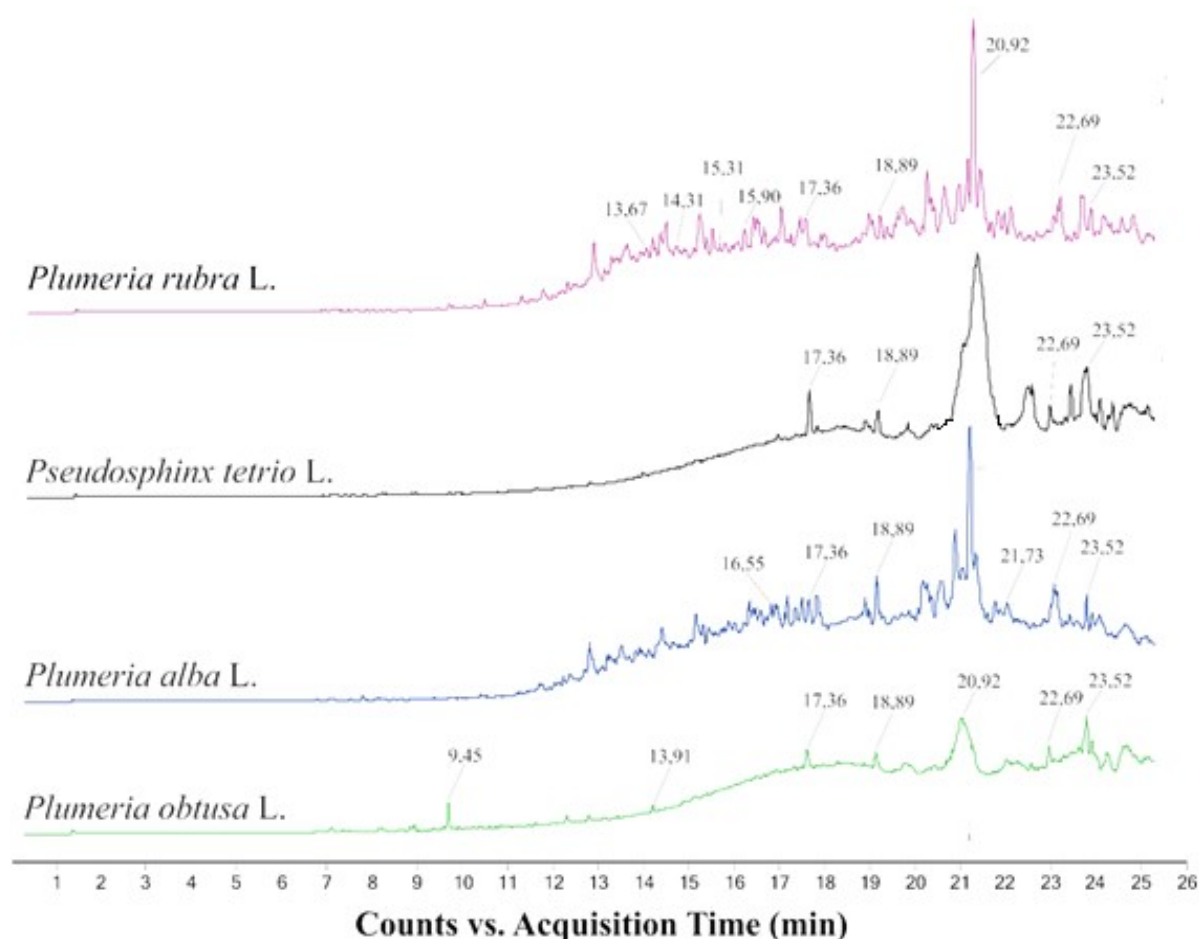


Figura 16 – Cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de *Plumeria rubra*, *P. obtusa*, *P. alba* e *P. tetrio* L.

Os dados obtidos por meio do LC-MS foram submetidos ao banco de dados de massas (Massa Hunter software) (Tabela 5).

Em análise aos dados obtidos na Tabela 5, podemos notar que devido ao fato de o composto grayanotoxina III não estar presente nas amostras de *P. tetrio* L. e da *Plumeria alba*, mas presente nas amostras provenientes das folhas das outras duas espécies de *Plumeria*, evidencia que o fator da escolha alimentar pode estar diretamente ligado ao composto em questão. O composto grayanotoxina III (Figura 17) ainda não foi reportado em *Plumeria*. O composto grayanotoxina III talvez venha a exercer uma importante relação no fator alimentar da *P. tetrio* L. Em 1991, James A. Klocke et al. isolaram o composto grayanotoxina III a partir de flores de *Rhododendron molle* e conduziram ensaios com

Leptinotarsa decemlineata e *Spodoptera frugiperda*, nos quais foram capazes de demonstrar que o composto influenciava a opção alimentar dos insetos na fase larval, ou seja, ele possui um efeito denominado *antifeedants*, fazendo que o inseto escolha amostra que não contenha o referido composto (KLOCKE et al., 1991).

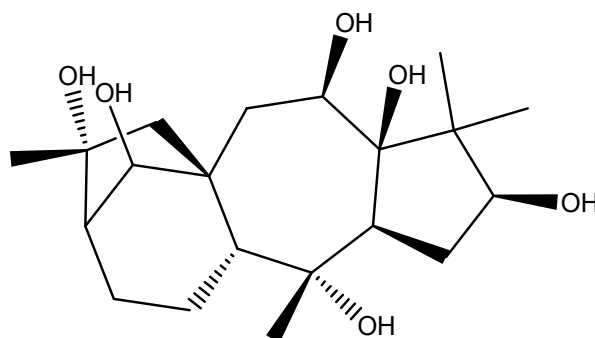


Figura 17 – Estrutura do composto grayanotoxina III.

Observa-se que na amostra da *P. tetrio* L. o composto 12-hidroxioleanolico lactona (Figura 18) está em maior quantidade, quando comparado ao da amostra de *Plumeria alba*, o que indica uma certa tolerância da *P. tetrio* L. ao composto. Sugere-se um acúmulo do composto, sem prejuízo ao seu metabolismo, ou ainda o possível uso em sua defesa diante de seus predadores. As concentrações maiores presentes nas outras duas espécies de *Plumeria* L. pode influenciar a escolha alimentar da *P. tetrio* L. Thoison et al. (2004), utilizando o composto 12-hidroxioleanolico lactona, produziram ensaios semelhantes e com os mesmos resultados usando larvas de *Ctenopseustis obliquana* com tamanho de cinco instar, no qual o composto foi capaz de alterar a opção alimentar da lagarta (THOISON et al., 2004).

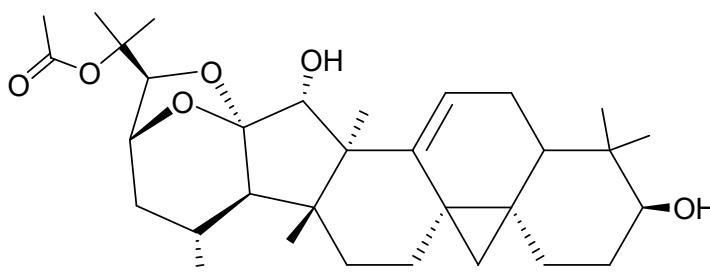


Figura 18 – Estrutura do composto 12-hidroxioleanolico lactona.

Tabela 5 – Compostos identificados nas amostras de três espécies de *Plumeria* e *P. tetrio L.*, por meio do uso do LC-MS e *MassaHunter software*

Tempo de retenção	<i>P. tetrio L.</i> (%)	<i>P. alba</i> (%)	<i>P. obtusa</i> (%)	<i>P. rubra</i> (%)	Nome do composto	Fórmula	Massa
8.30	0	0.60	0.16	1.10	Ácido Ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.1800
9.45	0.11	2.00	0.16	0.33	10-Deoxyeucommiol	C ₉ H ₁₆ O ₃	172.1099
13.67	0	0	6.00	2.79	Ligurobustosideo A	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₀	462.2464
13.91	0	0	2.70	3.61	Icarisideo C1	C ₂₁ H ₃₈ O ₈	418.2566
14.31	0	0	1.40	5.55	Graianotoxina III	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	370.2355
14.42	0	0	4.12	7.34	(-)-Alatosideo A	C ₂₁ H ₃₆ O ₈	416.2410
15.31	0	0	3.21	1.33	Dictamosideo I	C ₂₁ H ₃₈ O ₉	434.2515
15.95	0	0	2.46	5.26	20-Hidroxitingenona	C ₂₈ H ₃₆ O ₄	436.2613
16.25	0.03	0.87	0.25	0	1-Hidroxi-xanthona	C ₁₃ H ₈ O ₃	212.0473
16.55	0.03	0.03	5.08	4.42	12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> -Hidroxiandrografolideo	C ₂₀ H ₃₂ O ₆	368.2198
16.88	0.08	0.21	4.65	3.00	(13 <i>E</i>)-11- α -hidroxi-9,15-dioxoprost-13-enoato	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.2249
17.36	0.05	1.21	5.95	1.28	(-)-1 <i>S</i> ,9 <i>R</i> -9-Hidroxi-2,2,5,9-tetrametilbicyclo[6.3.0]undeca-4,7-dien-6-ona	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.1619
18.89	0.56	0.84	0.17	0.16	(-)-Epingaiona	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.1568
20.92	93	81.2	57.00	48.00	Stigmasta-5,7,22-trien-3-ol	C ₂₉ H ₄₆ O	410.3155
21.06	0	0	0.19	2.42	óxido de ent-19-Acetoxi-14,15,16-triidroximanoil	C ₂₂ H ₃₈ O ₆	398.2668
21.73	0.14	0.29	0.79	2.37	1,3,5-Triidroxi-4,8-di(3-metilbut-2-enil) xantona	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	380.1623
22.17	0.10	0.08	0	3.87	24-Epiteasterona	C ₂₈ H ₄₈ O ₄	448.3552
22.69	0.36	0.71	0.84	1.28	Alangiobussina	C ₂₂ H ₂₀ N ₄ O	356.1637
23.51	0.55	1.16	0.08	0.13	Ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-oico	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	452.3290
23.52	1.94	1.93	0.28	0.05	Ácido 3,11-Dioxoolean-12-en-28-oico	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.3239
23.88	1.54	2.62	1.07	2.20	Cordianol C	C ₃₁ H ₅₂ O ₆	520.3763
23.98	0.41	1.96	1.81	0.48	2-Deoxi-28-homocasterona	C ₂₉ H ₅₀ O ₄	462.3709
24.12	0.27	2.41	0	0	Ácido Acantrifoico A	C ₃₂ H ₄₈ O ₇	544.3400
24.52	0.48	0.10	1.82	4.19	12-Hidroxioleanolico lactona	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.3552

Vale considerar que o composto 12-hidroxioleanolico lactona está em uma quantidade muito superior nas amostras de *Plumeria obtusa* e *Plumeria rubra*; na amostra de *Plumeria alba* ele se apresenta em uma quantidade relativamente pequena

O composto 1-hidroxixantona está presente nas amostras de *Plumeria alba* e em pequena quantidade nas amostras da lagarta, o que indica uma habilidade da *P. tetrio L.* em metabolizar ou ainda de eliminar o referido composto.

O composto 1-hidroxixantona (Figura 19), pertencente ao grupo xantona, foi utilizado com sucesso por Ondeyka et al. (2006) para demonstrar atividade inseticida e anti-helmíntica, utilizando larvas de *Lucilia sericata*, *Aedes aegypti* e *Haemonchus contortus* (ONDEYKA et al., 2006).

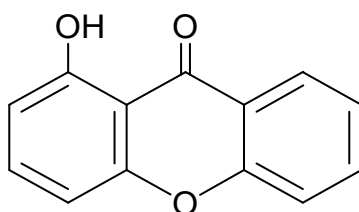


Figura 19 – Estrutura do composto 1-hidroxixanthona.

O composto (-)-epingaiona (Figura 20), já isolado a partir de folhas de *Bontia daphnoides L* (*Myoporaceae*); e em ensaios com *Boophilus microplus* demonstrou alta toxicidade ao inseto (WILLIAMS et al., 2007). O composto ainda não foi reportado em *Plumeria L.*, mas é possível identificar a presença do composto em todas as amostras, sendo as quantidades bem próximas nas amostras de *P. tetrio L.* e *P. alba*, o que evidencia um certo benefício do composto para a lagarta *P. tetrio L.*

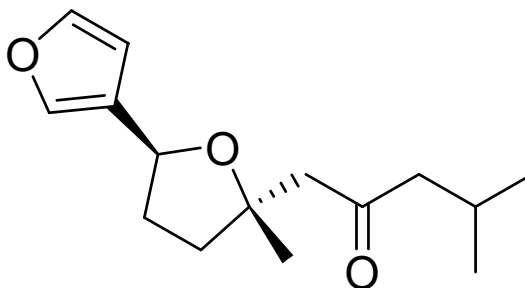


Figura 20. Estrutura do composto (-)-epingaiona.

Dentre os 25 compostos identificados com o uso do LCMS, o composto 2-deoxi-28-homocasterona (Figura 21) também se destaca por seu caráter de fitormônio; é

possível identificá-lo em todas as amostras presentes. Essa nova classe de hormônios vegetais com estrutura esteroídica polioxigenada, dotados de pronunciada atividade reguladora do crescimento vegetal e exercendo acentuadas relações com alguns insetos (“Brassinosteróides: um novo grupo de fitohormonas”, 1991), é classificada como ‘brassinosteroides’. Esse efeito já foi demonstrado por Smagghe et al. (2002), utilizando larva de *Spodoptera littoralis* (SMAGGHE et al., 2002).

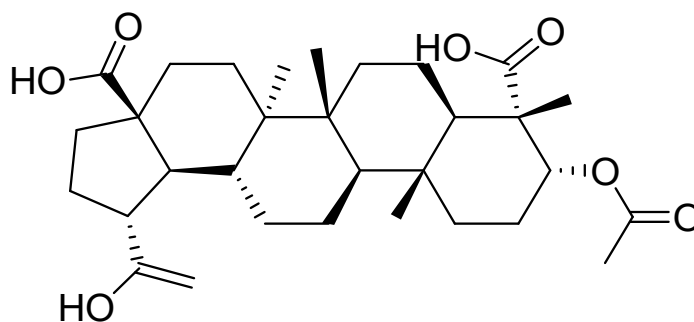


Figura 21 – Estrutura do composto 2-deoxi-28-homocasterona.

O composto stigmasta-5,7,22-trien-3-ol (Figura 22) é o de maior ocorrência em todas as amostras, tendo a maior quantidade relativa na amostra de *P. tetrio L.*, com 93,08% do total. Considerado um esteroide, ele tem sido diversas vezes reportado em artigos nos quais sua identificação quase sempre é descrita em presença do sitosterol (SAEIDNIA, 2014). O Stigmasta-5,7,22-trien-3-ol é um dos compostos responsáveis pela adaptação das plantas em mudanças de temperatura e também regula os processos biológicos e sustenta a estrutura do domínio das membranas celulares, onde são considerados como reforçadores de membrana (SCHAEFFER et al., 2001).

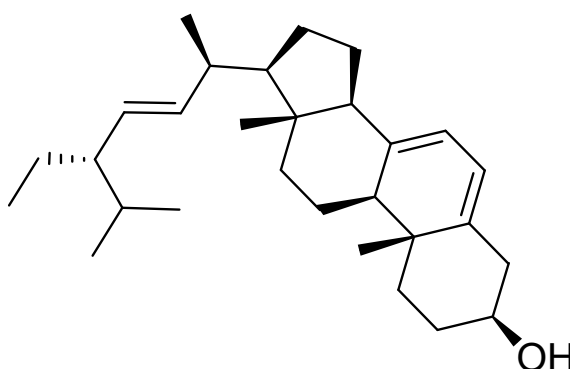


Figura 22 – Estrutura do composto stigmasta-5,7,22-trien-3-ol.

4.7. Uso do RMN na identificação dos constituintes principais do extrato de acetato de etila de *Plumeria alba* e de *P. tetrio*

Após o uso das técnicas de LC combinada com MS (LC-MS) e informações obtidas através do banco de dados instalado no espectrômetro de massas (Massa Hunter *software*); as amostras foram submetidas a análises de espectrometria de RMN de ^{13}C e de ^1H para a identificação dos principais compostos presentes nas frações de acetato de etila para as amostras de *Plumeria alba* e de *P. tetrio*. Considerando que a *Plumeria alba* é o alimento preferido de *P. tetrio*, ambas amostras, foram analisadas por RMN para identificação e dos compostos listados na tabela 5. Algumas diferenças nos valores de deslocamentos se devem ao fato de que os compostos presentes na mistura sofrem influência no deslocamento promovido pelos demais compostos presentes na amostra.

É possível observar na Figura 24, a semelhança entre os espectros de RMN de ^{13}C da amostra de *P. tetrio* e da *Plumeria alba*. Observando as regiões compreendidas entre 1 e 50 ppm podemos verificar que os sinais presentes no espectro da amostra obtida de *P. tetrio* estão também presentes no espectro de *P. alba* na mesma região. Nas regiões entre 100 e 150 ppm e nas regiões acima de 170 até 200 ppm é possível observar que esses picos estão presentes tanto na amostra de *P. tetrio* e na amostra de *P. alba*. Assim, pode-se considerar através dos espectros de RMN de ^{13}C , que parte dos compostos presente na amostra de *P. tetrio* estão presentes na amostra de *P. alba* e que ambas as amostras possuem regiões com picos distintos, o que leva a diferentes compostos. Isso nos permite demonstrar utilizando os dados obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C e no LC-MS que há uma semelhança entre as amostras, o que sugere uma metabolização de parte dos compostos pela *P. tetrio* presente nas folhas de *P. alba* e que alguns dos compostos presentes nas folhas de *P. alba* não sofrem nenhuma alteração após ingeridos pela *P. tetrio* e que de alguma forma os compostos ingeridos podem trazer algum benefício para *P. tetrio* (JOACHIM-BRAVO et al., 2004).

De acordo com os resultados obtidos através do software Massa Hunter o composto ácido ferúlico (GRAF, 1992; KUMAR; PRUTHI, 2014) se mostrou presente nas três amostras de *Plumeria* e ausente na amostra de *P. tetrio*, sendo também isolado e identificado na fração de acetato de etila da *Plumeria rubra*, conforme já demonstrado no item 4.2.3.3.

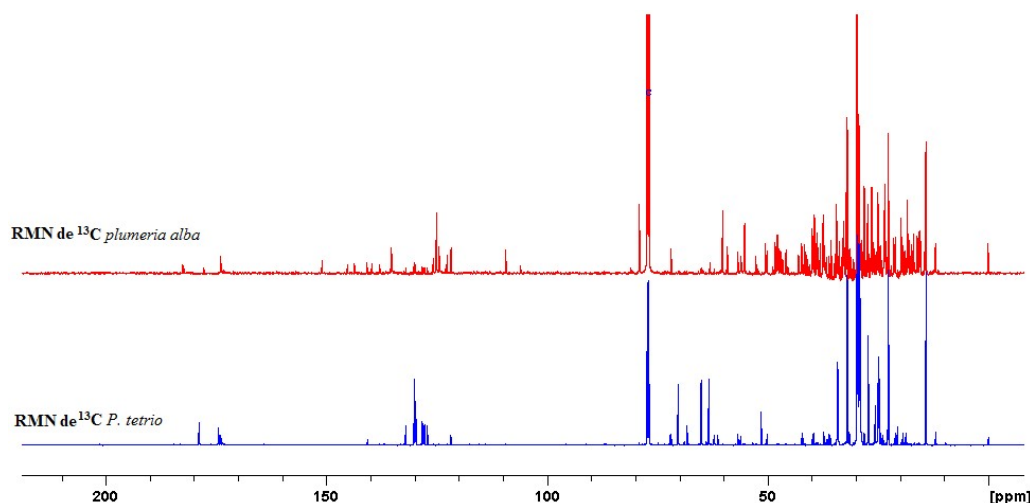


Figura 23 – Espectros de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) das frações de acetato de etila de *Plumeria alba* e *P. tetrio*.

A Tabela 6 ilustra os dados obtidos para os deslocamentos do ácido ferúlico isolado e os deslocamentos químico do ácido ferúlico na fração de acetato de etila.

Tabela 6 – Valores de deslocamento (δ) de RMN de ^{13}C e de ^1H do composto ácido ferúlico isolado e presente na fração de acetato de etila da amostra da *Plumeria alba*

C	Ácido Ferúlico Purificado		Ácido Ferúlico Mistura	
	δ C	δ H	δ C	δ H
1'	169,6	-	171,06	-
2'	115,8	6,31	115,97	6,28
3'	145,5	7,59	145,14	7,62
1	126,4	-	127,09	-
2	110,2	7,17	110,48	7,09
3	147,9	-	148,16	-
4	149,1	-	148,91	-
5	116,4	6,80	112,92	6,87
6	122,6	7,06	123,19	7,04
7	55,10	3,89	55,62	3,78

Conforme ilustram as Figuras 24 e 25 foi possível identificar a presença do ácido ferúlico na fração de acetato de etila da amostra de *P. alba*, cada um dos deslocamentos de ^{13}C e de ^1H são devidamente destacados de acordo com os respectivos espectros. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C estão dispostos na Tabela 7, onde pode-se verificar uma pequena variação nos valores devido a natureza das amostras, ou seja, o valores dos deslocamentos presente na fração de acetato de etila sofrem influências devido a presença de outros compostos na amostra (KUMAR; PRUTHI, 2014).

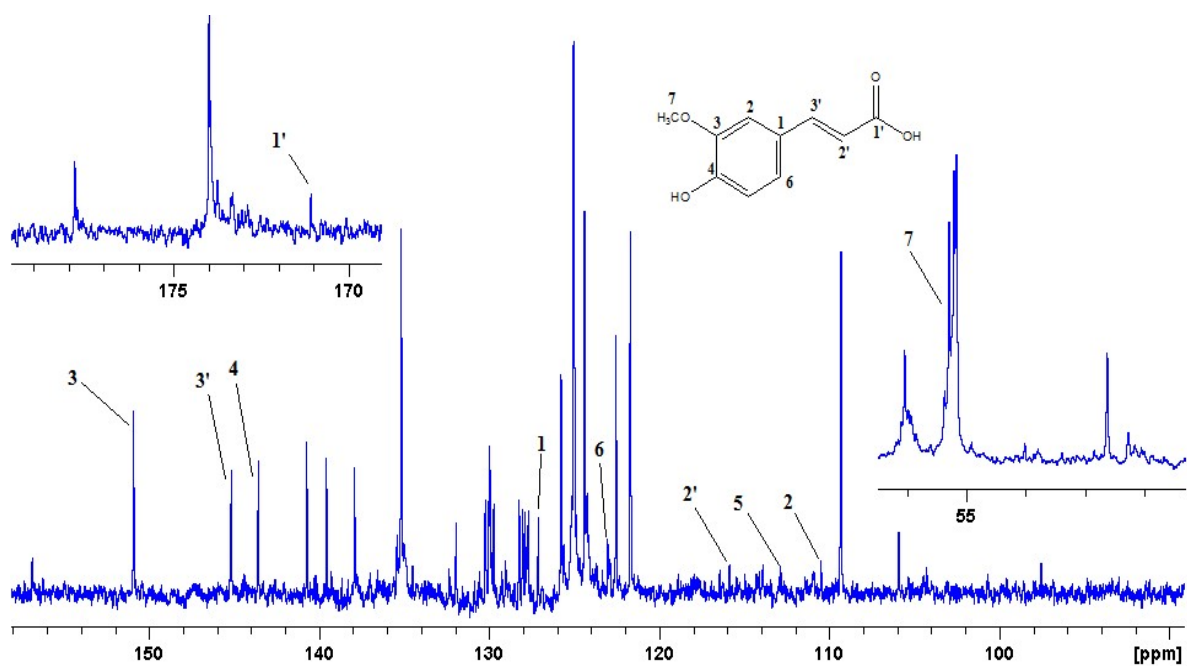


Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*. Os sinais indicados no espectro são do ácido ferúlico.

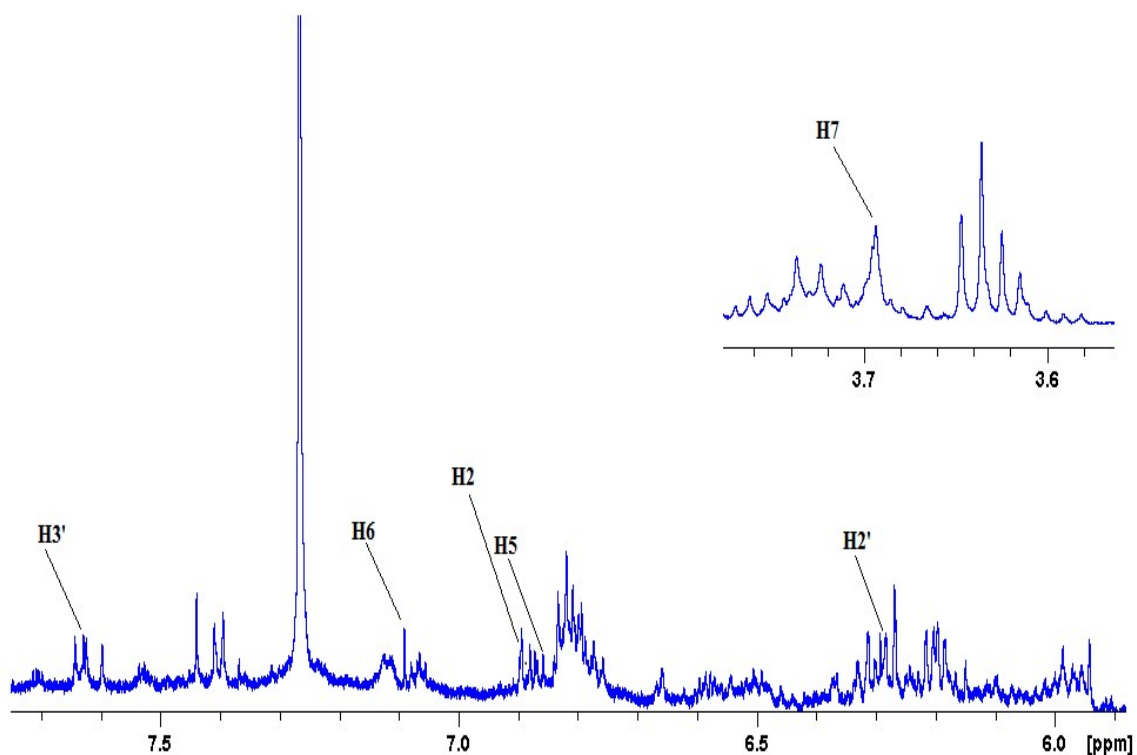


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^1H em (600 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*. Os sinais indicados no espectro são do ácido ferúlico.

A identificação do composto 10-deoxieucomiol foi realizada por comparação dos sinais de RMN de ^{13}C e de ^1H , (Tabela 7) obtidos da literatura com os experimentais e por espectrometria de massas obtidos pela análise de LC-MS (STEINBECK et al., 2003; CASTILLO et al., 2014).

Tabela 7 – Valores de deslocamento (δ) de RMN de ^{13}C e ^1H do composto 10-deoxieucomiol obtidos da literatura e da na fração de acetato de etila da amostra da *Plumeria alba*

C	10-Deoxieucomiol Literatura		10-Deoxieucomiol Mistura	
	δ C	δ H	δ C	δ H
1	158,3	-	156,98	-
2	139,8	-	139,60	-
3	44,3	2,91	45,34	2,45
4	78,6	4,17	79,00	4,17
5	46,9	2,45	46,87	2,91
6	35,1	3,39	35,65	3,39
7	62	3,39	62,13	3,39
8	57,2	4,02	56,73	4,02
9	16,3	1,75	16,99	1,75

Os dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto 10-deoxieucomiol são mostrados na Tabela 8, os valores da literatura são próximos aos valores encontrados nos espectros obtidos da fração de acetato de etila da *Plumeria alba*. Conforme se verifica na Figura 26, os valores de deslocamento químicos de RMN de ^{13}C , estão enumerados de acordo com a estrutura do composto 10-deoxieucomiol, onde cada um dos picos é compatível com a estrutura do 10-deoxieucomiol.

Considerando os dados para o composto ligurobustosideo A já obtido com o uso do LC-MS e com os dados obtidos em artigos científicos, foi possível verificar os sinais de RMN de ^{13}C e de ^1H na fração de acetato de etila da *Plumeria alba* (TIAN et al., 1998; HE et al., 2003), conforme Tabela 8.

Conforme os dados obtidos e ilustrados na tabela 8, de acordo com os picos em destaque conforme demonstrados nas Figuras 27, 28 e 29 e com o auxílio de fontes da literatura foi possível identificar na amostra obtida pela fração de acetato de etila das folhas de *Plumeria alba* a presença do composto ligurobustosideo A (TIAN et al., 1997; LI et al., 2011).

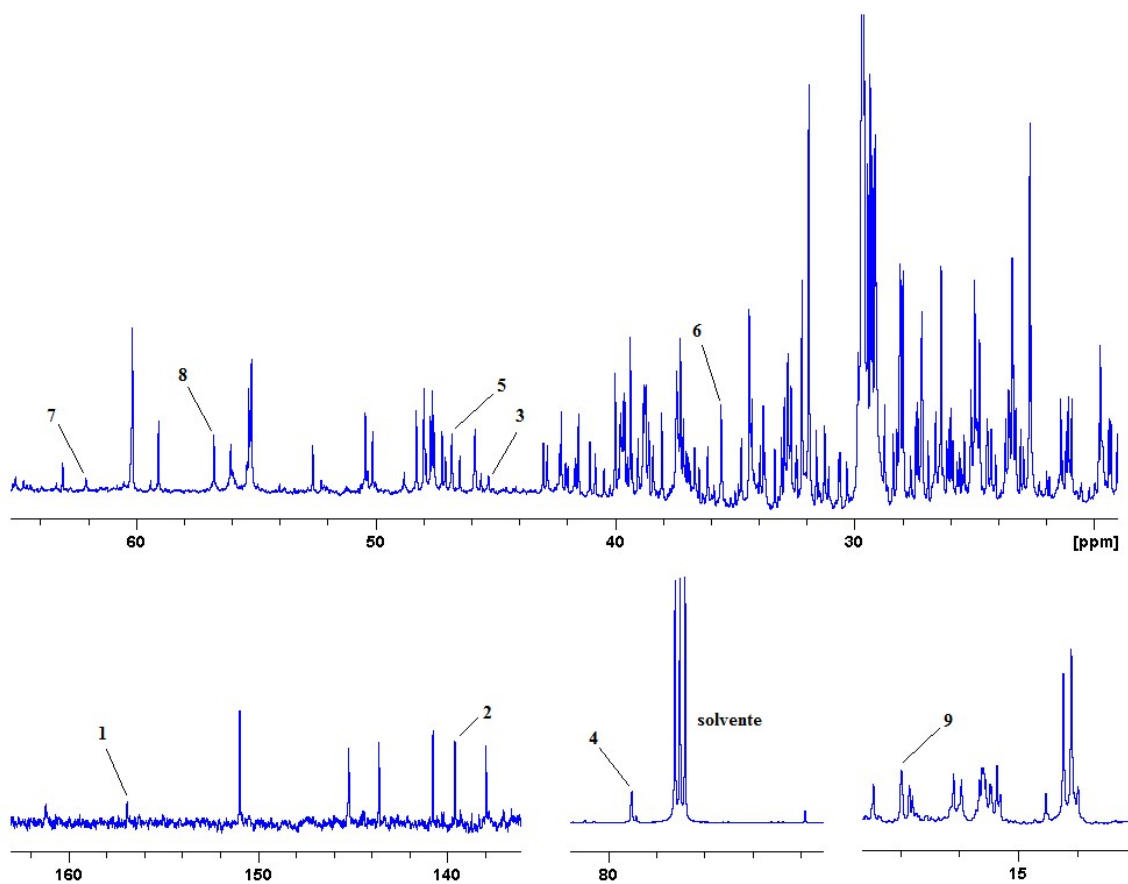


Figura 26 – Subespectro de RMN de ¹³C em (600 MHz, CDCl₃) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*, deslocamentos do composto 10-deoxieucomiol.

O composto stigmasta-5,7,22-trien-3-ol foi identificado na fração de acetato de etila nas três amostras de *Plumeria* e também na amostra de *P. tetrio*, sendo também o composto de maior abundância relativa em todas as amostras.

Tabela 8 – Valores de deslocamento (δ) de RMN de ^{13}C e de ^1H do composto ligurobustosideo A, da literatura e presente na fração de acetato de etila da amostra da *Plumeria alba*

C	ligurobustosideo A literatura		ligurobustosideo A mistura	
	δ C	δ H	δ C	δ H
1	75,40	3,52	-	3,50
2	69,77	3,35	69,88	3,25
3	82,40	3,35	81,47	3,27
4	71,70	3,31	72,10	3,30
5	103,5	4,44	104,37	4,40
6	103,5	4,32	104,37	4,31
7	74,12	3,17	75,05	3,22
8	72,20	3,49	72,77	3,51
9	73,03	3,13	73,22	3,00
10	70,31	3,55	70,81	3,60
11	18,25	1,27	18,75	1,30
12	62,11	3,82	62,66	3,90
13	68,62	3,90	68,92	3,92
14	119,09	5,25	115,89	5,30
15	140,82	-	140,73	-
16	38,03	2,08	38,40	2,10
17	26,48	2,20	26,62	2,21
18	124,17	5,23	123,76	5,25
19	131,71	-	132,40	-
20	21,84	1,53	22,60	1,60
21	21,84	1,53	22,60	1,63
22	17,20	1,70	17,46	1,80

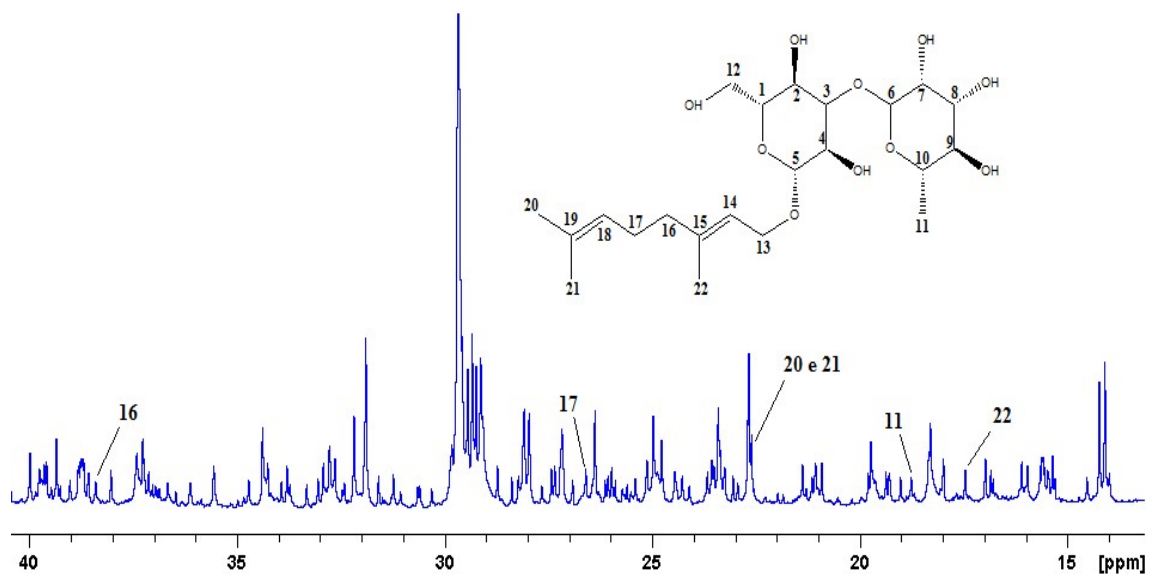


Figura 27 – Subespectro de RMN de ^{13}C em (600 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*, deslocamentos do composto ligustosideo A.

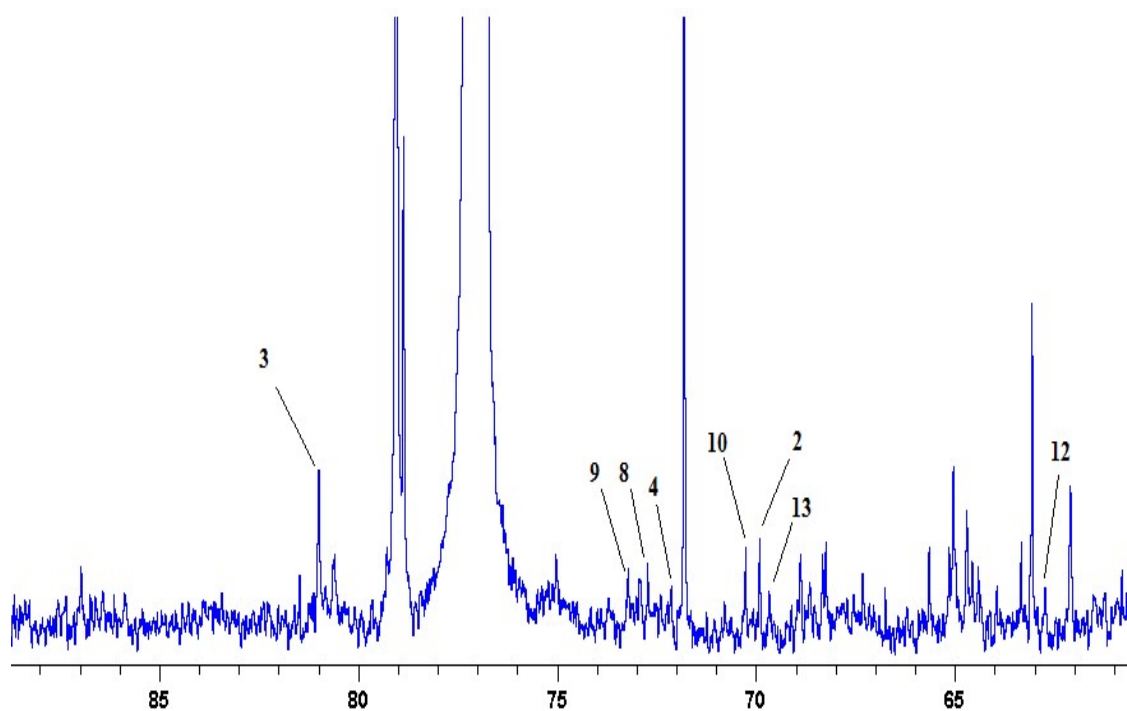


Figura 28 – Subespectro de RMN de ^{13}C em (600 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*, deslocamentos do composto ligustosideo A.

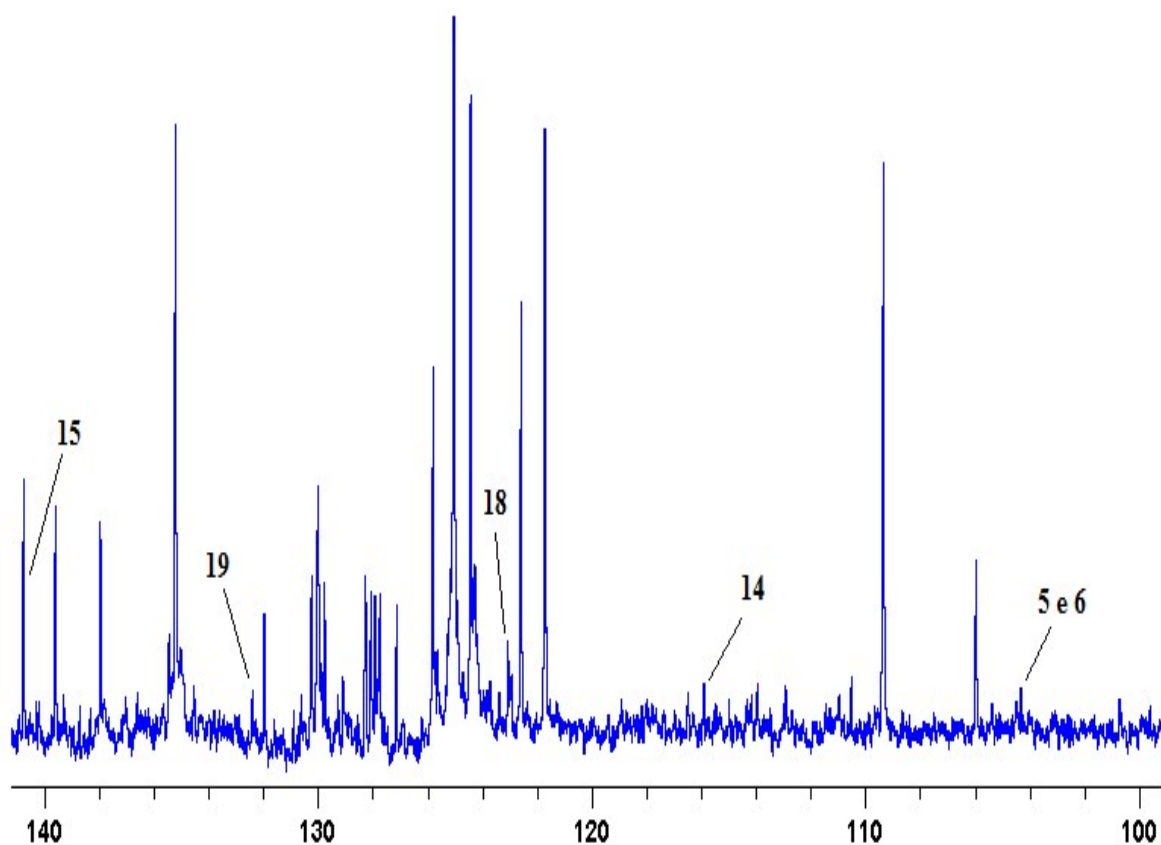


Figura 29 – Subspectrum de RMN de ^{13}C em (150 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *Plumeria alba*, deslocamentos do composto ligustosideo A.

A Tabela 9 mostra o resultado para os deslocamentos de RMN de ^{13}C e de ^1H nas amostras de *Plumeria alba*, *P. tetrio* e para os valores encontrados na literatura (SRIVASTAVA, 1980; SHAH et al., 1996). Os valores são próximos em ambas às amostras e possuem uma pequena diferença devido a composição de cada uma das amostras, onde promove deslocamentos diferentes do composto isolado.

Tabela 9 – Valores de deslocamento (δ) de RMN de ^{13}C e ^1H do composto stigmasta - 5,7,22-trien-3-ol, da literatura* e presente na fração de acetato de etila da amostra da *Plumeria alba* e *P. tetrio*

C	Stigmasta-5,7,22-trien-3-ol*		Stigmasta-5,7,22-trien-3-ol (<i>P. alba</i>)		Stigmasta-5,7,22-trien-3-ol (<i>P. tetrio</i>)	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	38,60	1,50	39,02	1,51	39,72	1,44
2	32,43	1,79	32,94	1,69	32,90	1,68
3	71,16	4,19	70,27	4,29	72,20	4,23
4	41,10	2,56	41,05	2,58	42,40	2,53
5	140,60	-	140,94	-	140,75	-
6	116,70	5,90	116,61	5,70	115,49	5,88
7	116,70	5,90	116,61	5,60	115,49	5,88
8	140,60	-	140,94	-	140,75	-
9	46,50	2,50	46,85	2,39	47,61	2,51
10	37,20	-	37,99	-	37,27	-
11	16,00	1,26	16,12	1,16	16,82	1,22
12	21,20	1,42	21,40	1,48	21,24	1,40
13	39,01		39,59		39,72	
14	44,23	-	45,24	-	45,96	-
15	54,60	2,23	55,14	2,20	55,35	2,18
16	23,10	1,42	23,05	1,40	24,00	1,49
17	28,27	1,42	28,75	1,40	28,27	1,38
18	56,17	1,42	56,08	1,41	56,69	1,39
19	11,64	0,90	11,84	0,98	11,84	0,85
20	40,64	2,26	40,91	2,20	42,00	2,13
21	20,40	1,12	20,83	1,10	20,69	1,09
22	134,15	5,59	134,43	5,57	133,12	5,45
23	134,61	5,50	135,50	5,40	133,36	5,38
24	41,10	2,03	41,05	2,00	42,40	2,10
25	26,21	1,42	26,63	1,32	26,14	1,37
26	11,96	0,80	12,02	0,77	12,48	0,78
27	32,11	1,40	32,61	1,33	32,53	1,39
28	19,73	0,80	19,84	0,81	19,42	0,82
29	19,73	0,80	19,84	0,81	19,42	0,81

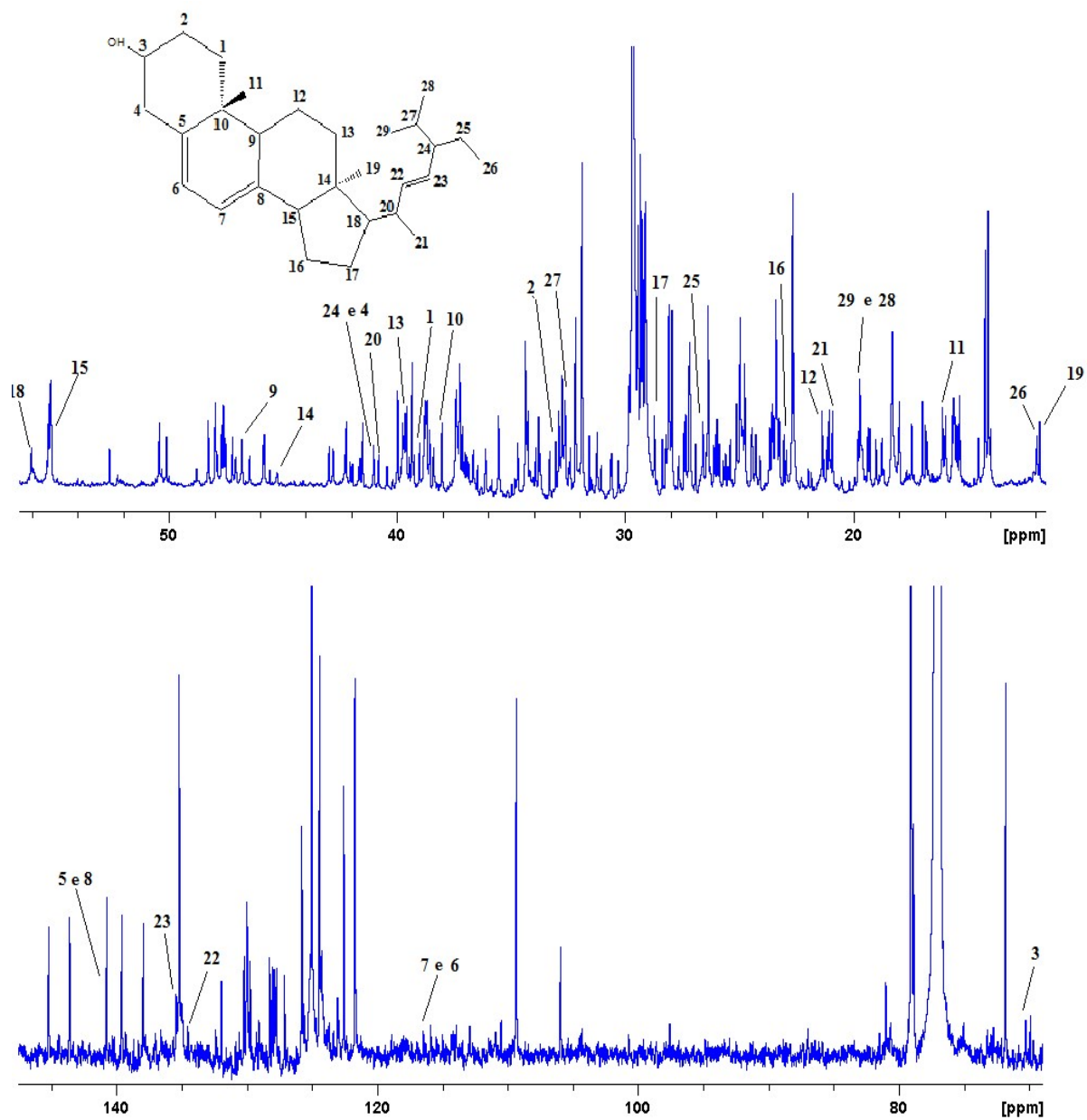


Figura 30 – Subespectros de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila da *plumeria alba*, deslocamentos do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol.

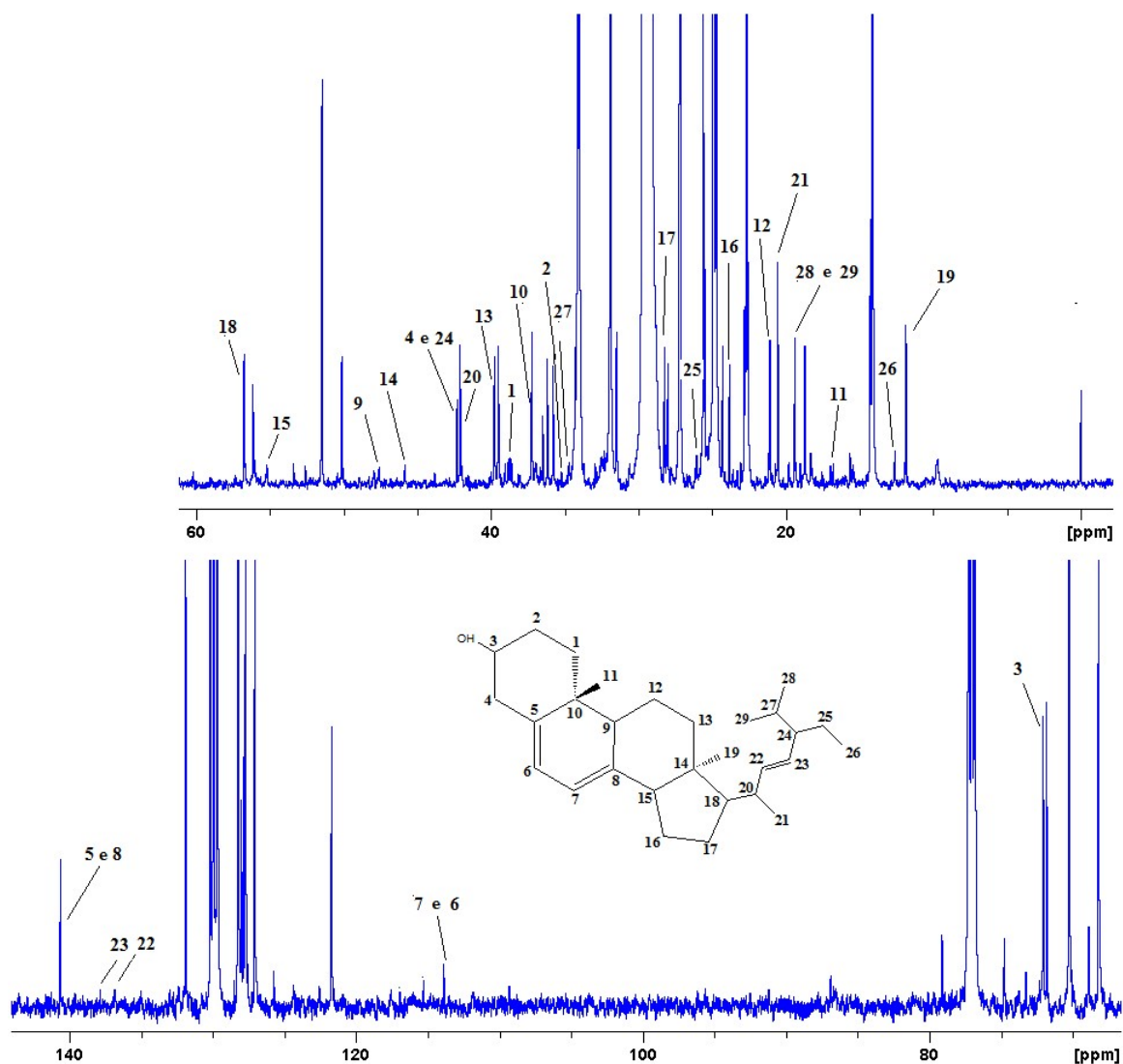


Figura 31 – Subespectros de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila de *P. tetrio*, deslocamentos do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol.

Também como forma de confirmação da presença do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol nas duas amostras as Figuras 32 e 33 mostram os mapas de contorno com os resultados dos experimentos em espectro bidimensional da correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – Cosy (600 MHz) do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol da amostra de acetato de etila de *P. tetrio* e do espectro bidimensional da correlação homonuclear de hidrogênio e carbono $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (600 MHz) do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol na amostra de acetato de etila de *P. tetrio*.

O ácido 3-oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico foi encontrado em todas as amostras de *Plumeria* e também na amostra de *P. tetrio* conforme ilustrado na Tabela 10. Também nos experimentos de RMN de ^{13}C e de ^1H o composto ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico se mostrou presente de acordo com os resultados da Tabela 10.

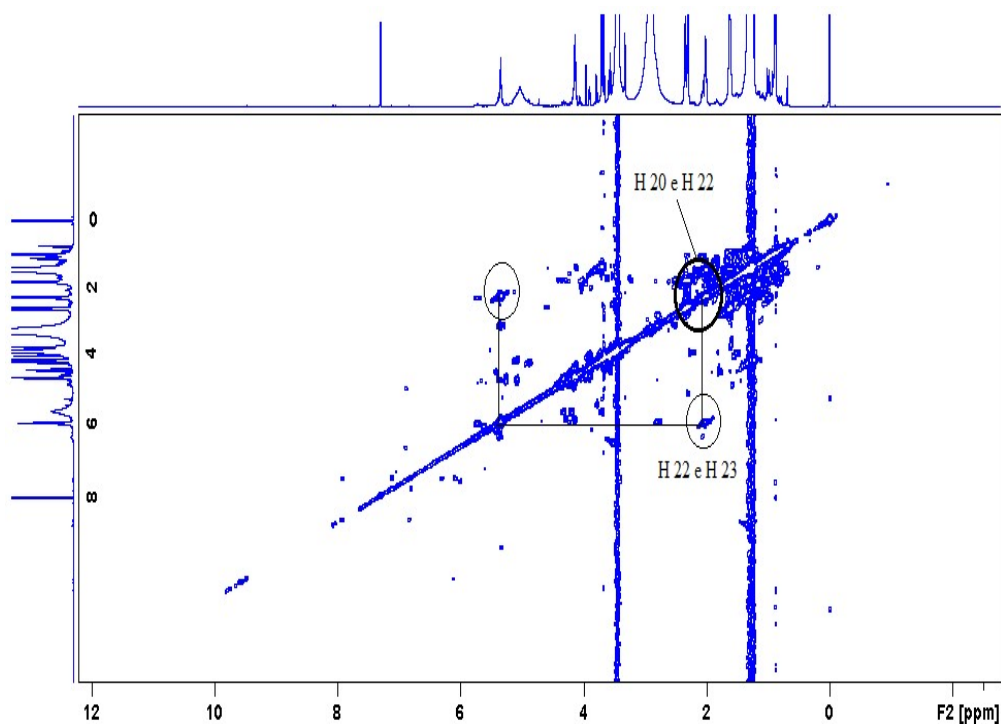


Figura 32 – Mapa de contornos COSY - (600 MHz) do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol na amostra de acetato de etila de *P. tetrio*.

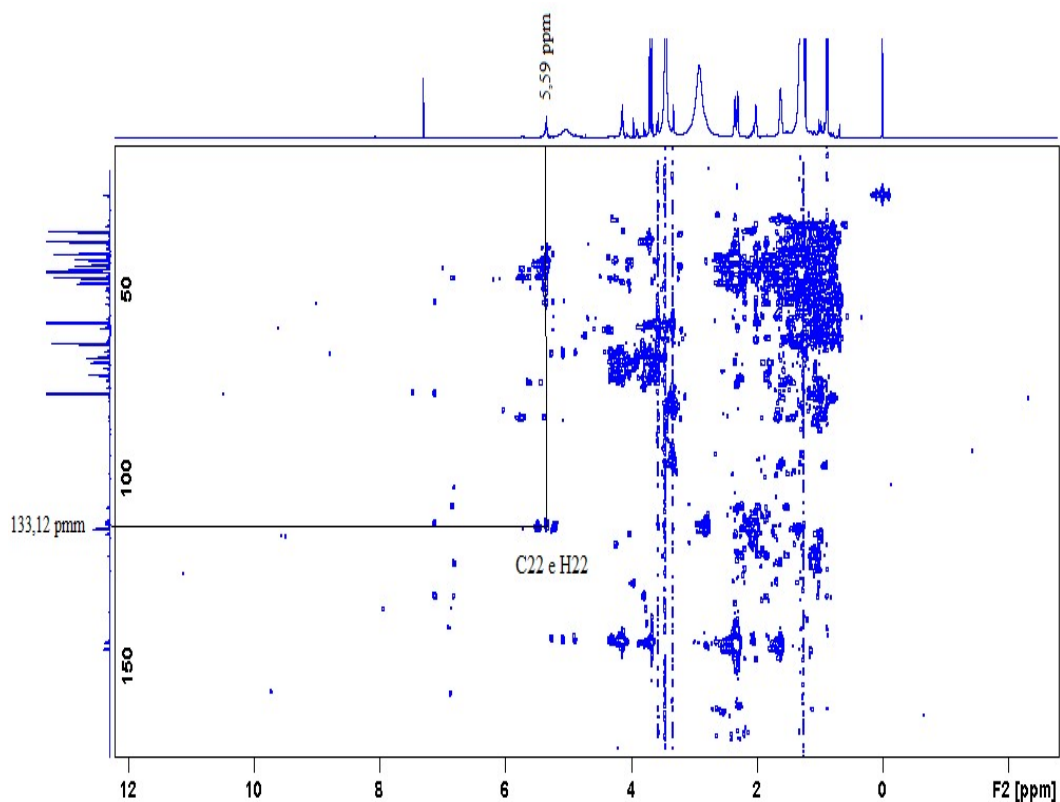


Figura 33 – Mapa de contornos HMBC correlação 1J . (600 MHz) do composto stigmaster-5,7,22-trien-3-ol na amostra de acetato de etila de *P. tetrio*.

Na correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - Cosy (Figura 33) nota-se o acoplamento entre os hidrogênios numerados como H20 e H22 de acordo com a estrutura do composto na Figura 33. Na correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (Figura 34) para os compostos stigmasta-5,7,22-trien-3-ol verifica-se o acoplamento entre o C22 e H22 nos deslocamentos de 5,59 ppm do H22 e de 133,12 ppm para o C22.

Tabela 10 – Valores de deslocamento do RMN de ^{13}C e de ^1H do composto ácido 3-oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico, da literatura* e presente na fração de acetato de etila da amostra da *Plumeria alba* e *P. tetrio*

C	Ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico *		Ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico (<i>P. alba</i>)		Ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico (<i>P. tetrio</i>)	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	38,70	1,79	39,00	1,70	38,97	1,69
2	34,29	2,37	34,79	2,42	34,77	2,39
3	203,83	-	204,6	-	201,14	-
4	47,47	-	47,99	-	47,51	-
5	54,70	1,57	55,23	1,60	55,12	1,54
6	19,46	1,41	19,38	1,39	19,03	1,29
7	31,50	1,41	31,24	1,38	31,42	1,33
8	40,50	-	40,81	-	40,42	-
9	53,70	2,20	52,98	2,18	53,39	2,10
10	36,40	-	36,73	-	36,50	-
11	125,60	6,16	125,60	6,20	125,70	6,11
12	126,60	6,16	127,10	6,20	127,20	6,12
13	136,80	-	137,80	-	136,98	-
14	42,00	-	42,23	-	42,03	-
15	24,90	1,41	25,00	1,38	25,60	1,30
16	32,50	1,41	32,53	1,38	32,34	1,33
17	48,00	-	48,31	-	48,03	-
18	131,60	-	131,90	-	131,90	-
19	40,60	2,37	41,07	2,40	40,67	2,55
20	32,60	-	32,92	-	32,54	-
21	36,80	1,41	37,32	1,38	36,84	1,32
22	35,50	2,12	35,65	2,13	35,75	2,13
23	23,68	1,00	23,65	0,98	23,75	1,01
24	23,68	1,00	23,65	0,91	23,75	1,08
25	18,40	0,89	18,84	0,90	18,28	0,91
26	16,10	0,90	16,13	0,95	16,66	0,99
27	19,70	1,40	19,81	1,50	19,78	1,43
28	180,80	-	182,20	-	181,30	-
29	27,93	0,96	28,03	1,05	27,96	1,00
30	27,93	0,96	28,03	1,00	27,96	0,91

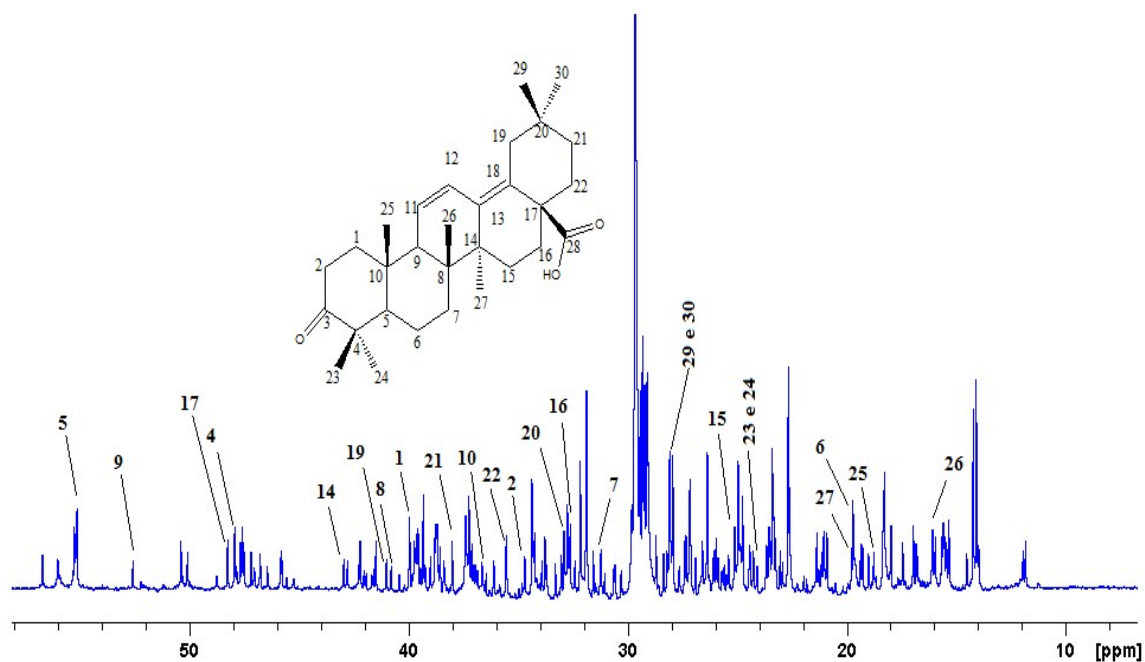


Figura 34 – Subespectros de RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) da fração acetato de etila de *Plumeria alba*, deslocamentos do composto ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico.

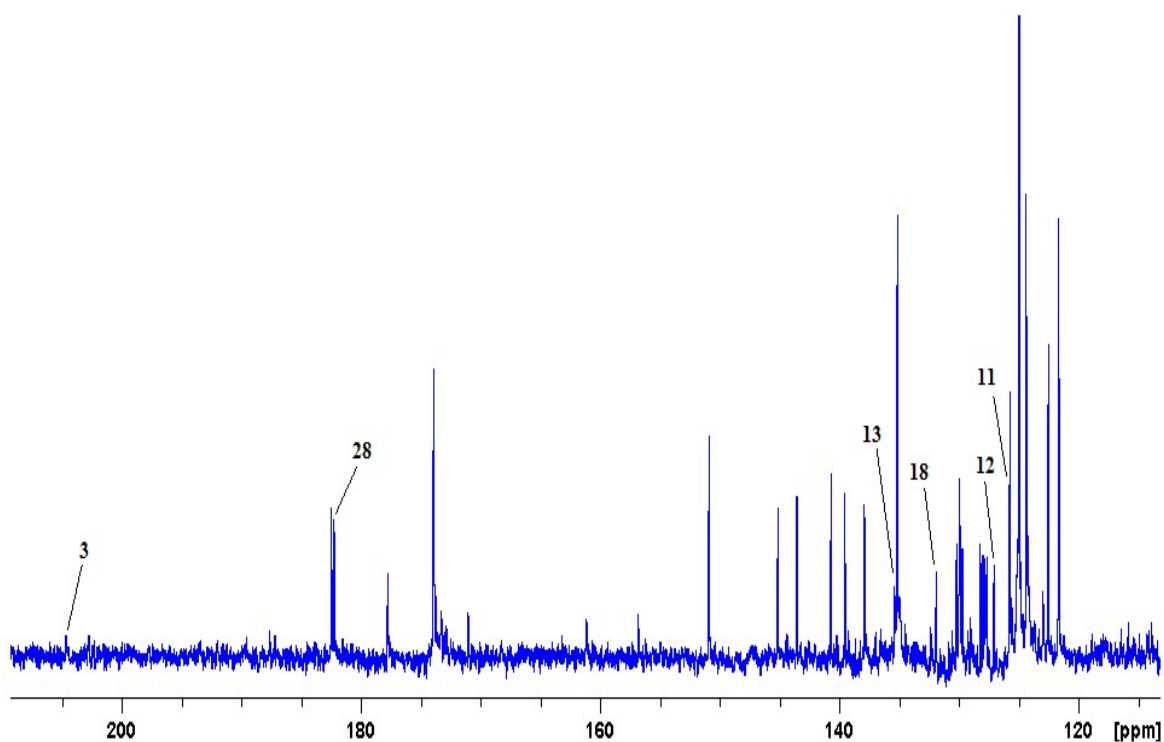


Figura 35 – Subespectros de RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) da fração acetato de etila de *Plumeria alba*, deslocamentos do composto ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico.

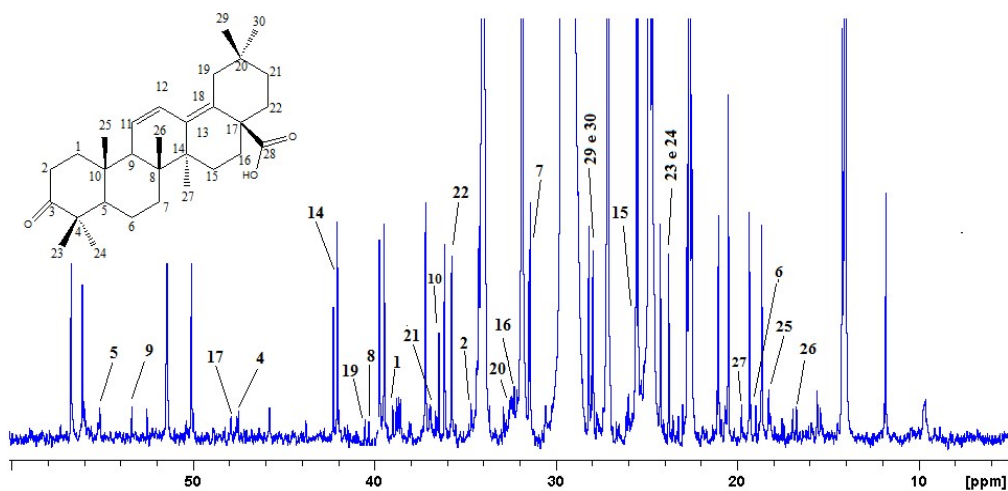


Figura 36 – Subespectros de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila de *P. tetrio*, deslocamentos do composto ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico.

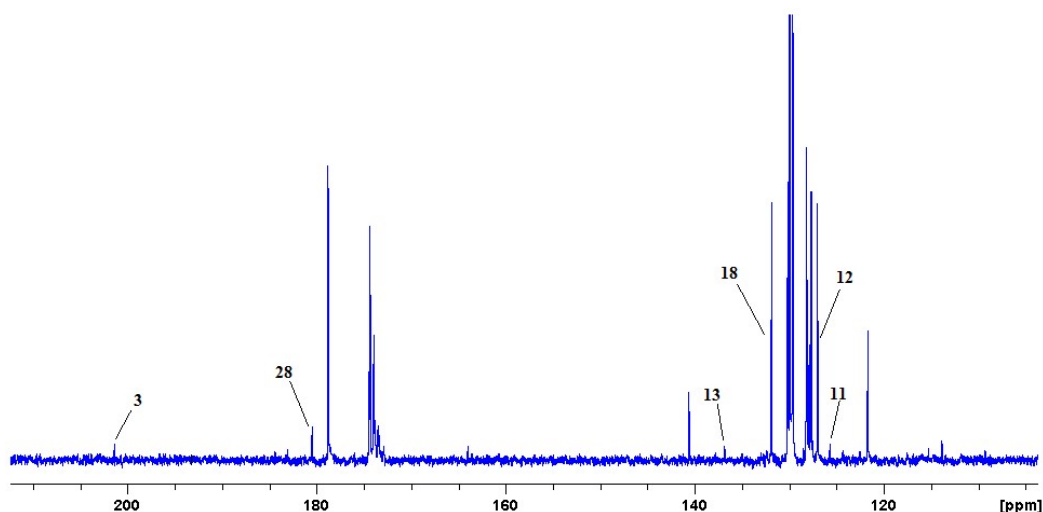


Figura 37 – Subespectros de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da fração acetato de etila de *P. tetrio*, deslocamentos do composto ácido 3-Oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico.

Conforme os dados obtidos na Tabela 10 e ilustrados nas Figuras 35, 36, 37 e 38 verifica-se a presença dos deslocamentos químicos do composto ácido 3-oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico obtidos a partir da fração de acetato de etila da *Plumeria alba* e de *P. tetrio* (WON et al., 2007; WANG et al., 2009; MOHAMED et al., 2016). Os valores dos deslocamentos estão de acordo com os valores reportados na literatura, podendo assim através dos dados de LC-MS e dos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H confirmar a presença do composto ácido 3-oxo-11,13(18)-oleandien-28-óico nas amostras analisadas (LIU, 1995; EULITZ et al., 1999; RAPHAEL; KUTTAN, 2003; JANICSÁK et al., 2006).

5. CONCLUSÃO

O uso das técnicas de purificação de compostos utilizadas tal como a cromatografia em coluna de sílica-gel, LC-MS, associada ao uso do banco de dados de LC-MS em conjunto com os deslocamentos obtidos através dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos nas frações de acetato de etila; das amostras de *P. alba* e *P. tetrio*, possibilitou demonstrar uma relação fitoquímica entre as amostras analisadas. É possível verificar um grande número de compostos coincidentes entre as duas amostras através das informações obtidas junto ao banco de dados do LC-MS, e com o auxílio confirmação da presença dos principais compostos em ambas as amostras através dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H . Através do conjunto de dados obtidos com as diferentes técnicas utilizadas foi possível identificar que ambas as amostras possuem de acordo com o perfil obtido pelo RMN de ^{13}C e ^1H e com o perfil cromatográfico do LC-MS, compostos diferentes, ou seja, alguns dos compostos que estão presentes na amostra de *P. alba* não estão presentes na amostra de *P. tetrio*, o que indica uma possível metabolização ou exclusão de alguns compostos pela *P. tetrio*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17, p. 2-66, 2012.

BACALLAO, L. G.; DOMÍNGUEZ, D. M. R.; GÓMEZ, L. V. G.; ÁNGEL, M. H. Plantas con propiedades antiinflamatorias. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v. 21, 3, p. 214-216, 2002.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006.

CASTILLO, A. M.; BERNAL, A.; PATINY, L.; WIST, J. A new method for the comparison of ¹H NMR predictors based on tree-similarity of spectra A new method for the comparison of ¹H NMR predictors based on tree-similarity of spectra. **Journal of Cheminformatics**, v.11, p.78-81, 2014.

EULITZ, K.; YURAWECZ, M. P.; SEHAT, N.; FRITSCH, J.; ROACH, J. A.; MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K.; ADLOF, R. O.; KU, Y. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8,10- through 11,13-18:2. **Lipids**, v. 34, 8, p. 873-877, 1999.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quimica Nova**, v. 21, 1, p. 99-105, 1998.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 13, 4, p. 435-448, 1992.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.; GOMATHI, P.; SELVAN, V. T. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, 1, p. 36, 2006.

HE, Z.-D.; LAU, K.-M.; BUT, P. P.-H.; JIANG, R.-W.; DONG, H.; MA, S.-C.; FUNG, K.-P.; YE, W.-C.; SUN, H.-D. Antioxidative glycosides from the leaves of *Ligustrum robustum*. **Journal of natural products**, v. 66, 6, p. 851-4, 2003.

HERNANDEZ-GALICIA, E.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; AGUILAR-SANTAMARIA, L.; ROMAN-RAMOS, R.; CHAVEZ-MIRANDA, A A; GARCIA-VEGA, L. M.; FLORES-SAENZ, J. L.; ALARCON-AGUILAR, F. J. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 118-124, 2002.

JANICSÁK, G.; VERES, K.; KAKASY, A. Z.; MÁTHÉ, I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, 5, p. 392-396, 2006.

JOACHIM-BRAVO, I. S.; SILVA-NETO, A. M.; SOUZA, A. F.; VEIGA, L.; PAULO, J.; MELO, R.; MOREIRA, M. D.; PORTO, A. Aspectos Morfológicos da Forma

Imatura de *Pseudosphinx tetrio* (LINNAEUS, 1771) (LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE). **B. Industr. Anim.**, v. 94, 2, p. 79-99, 2004.

KLOCKE, J. A.; MEI-YING, H.; SHIN-FOON, C.; KUBO, I. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle*. **Phytochemistry**, v. 30, 6, p. 1797-1800, 1991.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, 1, p. 86-93, 2014.

LI, L.; PENG, Y.; LIU, Y.; XU, L. J.; GUO, N.; SHI, R. B.; XIAO, P. G. Two new phenethanol glycosides from *Ligustrum robustum*. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, v. 3, p. 326-329, 2011.

LIU, J. Review article pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quimica Nova**, v. 27, p.670-673, 2004.

MOHAMED, M. E.; PAHIRULZAMAN, K. A. K.; LAZARUS, C. M. Production of 3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic Acid in the Fungus *Aspergillus oryzae*: A Step Towards Heterologous Production of Pyrethrins in Fungi. **Molecular Biotechnology**, v. 58, 3, p. 172-178, 2016.

NAKANISHI, K. Pore structure control of silica gels based on phase separation. **J. Porous Mat.**, v. 4, 2, p. 67-112, 1997.

ONDEYKA, J. G.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISHOOK, J. P.; FELCETTO, T.; SHOOP, W. L.; GUAN, Z. Q.; SINGH, S. B. Isolation and insecticidal/anthelmintic activity of xanthonol, a novel bis-xanthone, from a non-sporulating fungal species. **Journal of Antibiotics**, v. 59, 5, p. 288-292, 2006.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 10, v. 6-7, p. 483-489, 2003.

SAEIDNIA, S. The story of beta-sitosterol - A review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, 5, p. 590-609, 2014.

SCHAEFFER, A.; BRONNER, R.; BENVENISTE, P.; SCHALLER, H. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;i. **Plant Journal**, v. 25, 6, p. 605-615, 2001.

SHAH, W. A.; QURISHI, M. A.; KOUL, S. K.; DHAR, K. L. 5 β ,24 α -stigmasta-8,22-dien-3 β -ol, a sterol from *Koelpinia Linearis*. **Phytochemistry**, v. 41, 2, p. 595-597, 1996.

SHARMA, S. K.; KUMAR, N. Antimicrobial potential of *Plumeria rubra* Syn *Plumeria acutifolia* bark. **Der Pharma Chemica**, v. 4, 4, p. 1591-1593, 2012.

- SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUM, S. Pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3143-3147, 1989.
- SMAGGHE, G.; DECOMBEL, L.; CARTON, B.; VOIGT, B.; ADAM, G.; TIRRY, L. Action of brassinosteroids in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 199-204, 2002.
- SRIVASTAVA, S. K. Stigmasta-5,24(28)-diene-3 β -O- α -l-rhamnoside from *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v. 19, 11, p. 2510-2511, 1980.
- STEINBECK, C.; KRAUSE, S.; KUHN, S. NMRShiftDB - Constructing a Free Chemical Information System with Open-Source Components. **J. Chem. Inf. Comput. Sci**, v. 43, n. 6, p. 1733-1739, 2003.
- THOISON, O.; SÉVENET, T.; NIEMEYER, H. M.; RUSSELL, G. B. Insect antifeedant compounds from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio*. **Phytochemistry**, v. 65, 14, p. 2173-2176, 2004.
- TIAN, J.; ZHANG, H. J.; SUN, H. D.; PAN, L. T.; YAO, P.; CHEN, D. Y. Five new glycosides, ligurobustosides E, F, I, J and K from *Ligustrum robustum*. **Chinese Chemical Letters**, v. 8, 2, p. 417-423, 1997.
- TIAN, J.; ZHANG, H. J.; SUN, H. D.; PAN, L. T.; YAO, P.; CHEN, D. Y. Monoterpenoid glycosides from *Ligustrum robustum*. **Phytochemistry**, v. 48, 6, p. 1013-1018, 1998.
- TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: Is biodiversity important for drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, 5, p. 225-231, 2002.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, 3, p. 519-528, 2005.
- WANG, X.; ZHAO, G.; CHEN, Y.; XU, X.; ZHONG, W.; WANG, L.; LI, S. 1-Oxo-3-substitute-isothiochroman-4-carboxylic acid compounds: Synthesis and biological activities of FAS inhibition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, 3, p. 770-772, 2009.
- WILLIAMS, L. A. D. et al. In vitro anti-proliferation/cytotoxic activity of epingaione and its derivatives on the human SH-SY5Y neuroblastoma and TE-671 sarcoma cells. **West Indian Medical Journal**, v. 56, 1, p. 5-10, 2007.
- WON, J. E.; KIM, H. K.; KIM, J. J.; YIM, H. S.; KIM, M. J.; KANG, S. B.; CHUNG, H. A.; LEE, S. G.; YOON, Y. J. Effective esterification of carboxylic acids using (6-oxo-6H-pyridazin-1-yl)phosphoric acid diethyl ester as novel coupling agents. **Tetrahedron**, v. 63, 51, p. 12720-12730, 2007.
- WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, 2, p. 495-502, 2013.

CAPÍTULO 3

COMPLEXOS METÁLICOS FORMADOS COM ÁCIDO OLEANÓLICO

1 INTRODUÇÃO

O ácido oleanólico (OA) é um triterpeno pentacíclico que ocorre naturalmente em várias plantas, seja como ácido livre ou como saponinas (JIE, 1995). OA é encontrado em altas concentrações nas folhas, frutos e óleo de *Olea europaea* L. (JÄGER et al., 2009; SHANMUGAM et al., 2014). OA pode ser extraído de maçãs (HE; RUI, 2007) ou de plantas como a *Plumeria obtusa* (GAMBHAVA et al., 2013). OA tem sido extraído de mais de 1620 espécies de plantas diferentes e usado para fins alimentares e medicinais (OVESNA et al., 2006). OA tem ganho interesse significativo, e vários estudos têm demonstrado a importância de seu uso como hepatoprotetores^{7,8}, anti inflamatório (HSU et al., 1997; LEE et al., 2013), e atividades anti-cancer (MENGONI et al., 2002). OA também é um inibidor da fosforilase (DZUBAK et al., 2006). Na China, a OA tem sido usada oralmente para tratar doenças do fígado (LIU, 2005), e é um medicamento registrado utilizado por via intravenosa no tratamento da hepatite B e câncer de fígado (CHEN et al., 2008).

Uma vez que a OA possui diversas propriedades farmacológicas, é considerada como um bom material de partida para a criação de novos compostos (PLACE et al., 2003). OA possui três pontos ativos: C3, onde o hidroxila é armazenado; as ligações duplas presentes no anel entre os carbonos C12 e C13; e C28, onde o ácido carboxílico está ligado (Figura 1); esses pontos permitem modificações, que levam à criação de novos compostos químicos (BEDNARCZYK–CWYNAR et al., 2012; GARCIA-GRANADOS et al., 2006).

No entanto, o OA tem biodisponibilidade limitada e não fornece uma boa meia-vida plasmática devido à sua baixa solubilidade em água (CHEN et al., 2015; ZHANG et al., 2013). Vários estudos demonstraram que as alterações estruturais na OA podem ter um impacto significativo nas atividades biológicas (ACEBEY-CASTELLON et al., 2011). As melhorias nas atividades biológicas, como antiinflamatório, antidiabético, nefropatia e citotoxicidade, foram alcançadas pela alteração de alguns pontos na estrutura da OA. (SUH et al., 1999; MASULLO et al., 2017). Os complexos de terpenos foram muito eficazes em várias doenças (PARTAL UREÑA et al., 2009).

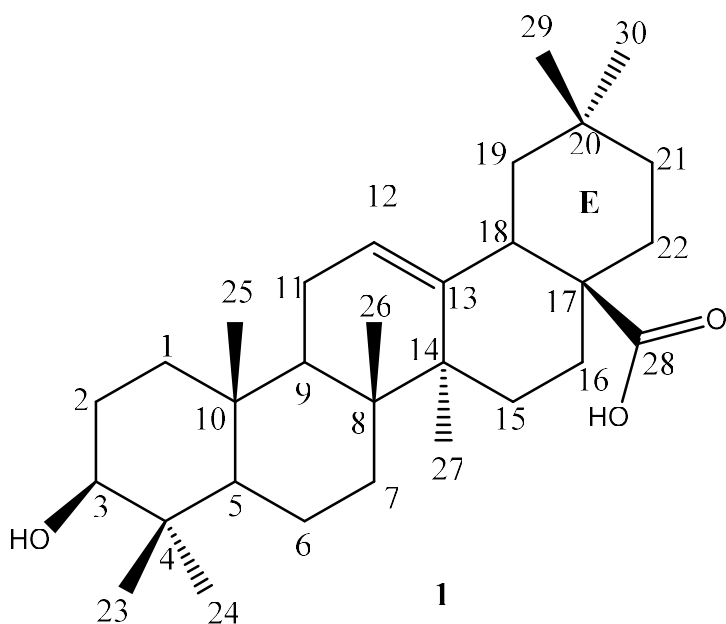


Figura 1 – Estrutura molecular do ácido oleanólico

Tabrizi e Chiniforoshan (2016) mostraram que complexos de p-cimeno de rutênio (II) derivados de naftoquinona funcionaram poderosamente para combater melanomas em humanos. Bukhari et al., 2009 demonstraram a atividade antioxidante do complexo quercetina-magnésio, e benefícios semelhantes foram registrados para a complexação de cobre com quercetina. O uso das propriedades bactericidas de complexos de cálcio e cobre contra bactérias gram-positivas também foi demonstrado (JADEJA et al., 2012).

Levando em consideração os usos médicos citados e potenciais da OA e seus derivados, cinco novos compostos foram sintetizados usando o OA.

2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos RMN ^1H e ^{13}C foram realizados num equipamento Bruker 600-MHz NMR spectrometer, equipado com um console AVANCE II, e uma sonda resfriada criogenicamente DCH. As condições para os experimentos de ^1H foram as seguintes: sequência de pulsos de Bruker = zg30; o número de pontos de aquisição = 65.536; o número de aquisições = 128; largura de varredura = 20,55 ppm; atraso de reciclagem = 2 s; frequência = 600,13 MHz. As condições para as experiências ^{13}C foram as seguintes: Sequência de pulsos de Bruker = zgpg30; o número de pontos de aquisição = 65.536; o número de aquisições = 4096; largura de varredura = 238,9 ppm; atraso de reciclagem = 2 s; frequência = 150,9 MHz. Metanol deuterado, CD_3OD , foi usado como solvente.

Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer Paragon 1000 FTIR no modo ATR na faixa de 400-4000 cm^{-1} .

As análises foram realizadas no LC-MS-QTOF-6530 modelo L-1200 (marca Agilent) com o software Profinder série B.06.00; fluxo: 0,6 mL / min - coluna C18 - 1,8 μM , 3 mm x 100 mm. A fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água, fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo.

2.1 Isolamento do ácido oleanólico

As folhas de *Plumeria alba* foram coletadas e secas em casa de vegetação, após secagem foram submetidas à extração com etanol na proporção 6: 1 de solvente para a amostra. Após 7 dias, o material foi filtrado e o solvente foi removido usando pressão reduzida. A amostra foi submetida à coluna de filtração de sílica gel 60 (0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM) (HENCH; WEST, 1990; TUBERT-BROHMAN et al., 2013) (Macherey-Nagel, Germany) e fracionado com um litro de cada um dos seguintes eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. As soluções obtidas foram concentradas e analisadas pelo CCD. Os extratos pré-selecionados foram submetidos a cromatografia clássica em sílica gel e Sephadex[®] LH-20 para o isolamento e purificação de compostos.

2.2 Temperatura de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas em equipamentos MQAPF 320 da Microquímica Equipamentos Ltda., todas amostras foram feitas em triplicatas.

2.3 Reação de complexação

Um frasco de fundo redondo (500 mL) foi preenchido com 1 eq. de sulfato do metal para 2 eq. de OA e 300 mL de metanol. A mistura reacional resultante foi vigorosamente agitada a 57 °C durante 6 horas. A solução foi arrefecida até à temperatura ambiente e o metanol foi removido usando pressão reduzida para obter os compostos (Figura 1) (MANENTE et al., 2011). O material foi medido e calculado o rendimento da reação.

2.4 Extração do RNA e qPCR

O RNA total foi isolado de células H4IIE ou de tecido de ratos mantidos em nitrogênio líquido, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). O RNA total foi isolado a partir de células utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). O ARN foi quantificado utilizando a configuração da placa Synergy H1/Take 3 (BioTek). Os ADNs foram sintetizados utilizando 2 de ARN para cada amostra utilizando kit de transcrição inversa de cDNA de alta capacidade (Life Technologies) com ABI GeneAMP 9700 (Life Technologies).

O cDNA resultante foi amplificado em duplicado por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando mistura principal de PCR SYBR green (Life Technologies). Para evitar a interferência devido à contaminação do DNA genômico, apenas os primers com sobreposição de intron foram selecionados usando o software Primer Express versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) como segue: β -actin (gene housekeeping), primer forward: 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3', iniciador reverso: 5'-GCG GCA GTG GCC ATC TC-3'; G6Pase, primer direto: 5'-TGT TCC TCT TAA TCC TGC CCA-3', primer reverso: 5'-CCA ACC TGC ACA AGT TCC CTT-3'. As amplificações qPCR foram realizadas em uma PCR em tempo real ABI 7500 Fast (Life Technologies) usando 1 ciclo a 50 °C por 2 min e 1 ciclo de 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15s a 95 °C e 1 min a 60. A curva de dissociação

foi completada com um ciclo de 1 min a 95 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 95 °C. A expressão do mRNA foi analisada pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ e normalizada quanto à expressão da β -actina utilizando o *software* ABI 7500 Fast System SDS v1.3.0 (Life Technologies). A amplificação de transcritos específicos foi ainda confirmada pela obtenção de perfis de curvas de fusão. Todos os resultados foram expressos como *fold*-change a partir dos controles de Dex-cAMP induzidos. Para os ensaios, foram utilizadas amostras na concentração de 5,0 mg/100 μl com 5,0 μl do cDNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o uso de três colunas cromatográficas com diferentes fases móveis e monitoramento da separação com cromatografia em camada delgada e com os promotores de ácido fosfomolibdico e vanilina, obteve-se o composto ácido oleanólico, onde foi confirmado de acordo com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H na Tabela 1.

Os compostos sintetizados foram analisados utilizando a técnica de RMN, e os dados de ^{13}C e ^1H para OA foram inicialmente obtidos para comparação com os dados de RMN dos compostos.

Os resultados da Tabela 1 mostram que o C28 para os compostos com Ca, Mg, Cu, Zn e Ni tem um valor de deslocamento diferente do obtido com OA. Considerando o C28 como um dos possíveis pontos de reação (GARCIA-GRANADOS et al., 2006; BEDNARCZYK–CWYNAR et al., 2012), e os dados obtidos pela técnica IR que mostram a ausência da banda para ácido carboxílico ligado a C28, sendo clara a reação formada junto ao oxigênio da carbonila. Ainda é possível discernir uma pequena variação no deslocamento dos carbonos C12 e C13 onde é formada a dupla ligação. Isto sugere que o deslocamento de elétrons é promovido pelo efeito de retirada exercido por ambos os metais quando eles estão ligados ao oxigênio hidroxila do grupo ácido carboxílico.

As estruturas dos compostos sintetizados são também suportadas pelos seguintes dados.

C₃₀H₄₈O₃. (Ácido oleanólico) Sólido branco, 0,621 g do composto puro, p.f. 307-309 °C, IR (ATR) $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3455, 3048, 2932, 2859, 1689, 1460, 1382, 1271, 1031, 954, 658.

C₆₀H₉₄CaO₆. Foi obtido com 71% de rendimento (0,1150 g, 0,1209 mmol) via reação de 1,0 eq. de sulfato de cálcio para 2,0 eq. de ácido oleanólico. Sólido branco, IR (ATR) $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3370, 2928, 2865, 1537, 1465, 1387, 1136, 1029, 995. LC-MS [M+ H]⁺ calculado para C₆₀H₉₅CaO₆: 951.6755, encontrado 951.6750.

C₆₀H₉₄MgO₆ It foi obtido com rendimento de 68% (0,1120 g, 0,1198 mmol) via reação de 1,0 eq. de sulfato de magnésio para 2,0 eq. de ácido oleanólico. Sólido branco, IR (ATR) $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3244, 2926, 1526, 1385, 1089, 1029, 771. LC-MS [M+ H]⁺ calculado para C₆₀H₉₅MgO₆: 935.6979, encontrado 935.6976 (NOVOTNY et al., 2003).

C₆₀H₉₄CuO₆ oi obtido com rendimento de 70% (0,0989 g, 0,1015 mmol) via reação de 1,0 eq. de sulfato de cobre para 2,0 eq. de ácido oleanólico. Sólido verde, IR (ATR) $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3395, 2938, 2862, 1537, 1386, 1094, 995, 728. LC-MS [M+ H]⁺ calculado para C₆₀H₉₄CuO₆: 973.6346, encontrado 973.6344.

C₆₀H₉₄ZnO₆ Foi obtido com rendimento de 68% (0,101g, 0,1036 mmol) via reação de 1,0 eq. de sulfato de zinco para 2,0 eq. de ácido oleanólico. Sólido branco, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3299, 2940, 2864, 1595, 1461, 1084, 736, 677. LC-MS [M+H]⁺ calculado para C₆₀H₉₄ZnO₆: 974.6342, encontrado 974.6341.

C₆₀H₉₄NiO₆ Foi obtido com rendimento de 69% (0,0899g, 0,0928 mmol) via reação de 1,0 eq. de sulfato de níquel para 2,0 eq. de ácido oleanólico. Sólido verde, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3320, 2928, 2863, 1534, 1453, 1373, 1029, 772. LC-MS [M+ H]⁺ calculado para C₆₀H₉₄NiO₆: 968.6404, encontrado 968.6401.

Tabela 1 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹H e ¹³C para OA e complexos (δ , ppm)

C	OA		Ca-OA		Mg-OA		Cu-OA		Zn-OA		Ni-OA	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	38,43	0,99	38,44	1,01	38,44	1,02	38,43	1,00	38,44	0,99	38,44	0,98
2	26,47	1,79	26,49	1,75	26,49	1,77	26,46	1,76	26,47	1,77	26,5	1,75
3	78,32	3,33	78,41	3,33	78,34	3,33	78,32	3,33	78,36	3,33	78,41	3,33
4	38,43	-	38,48	-	38,44	-	39,02	-	38,47	-	38,49	-
5	55,36	0,84	55,45	0,89	55,41	0,89	55,38	0,88	55,4	0,89	55,57	0,87
6	18,10	1,41	18,17	1,58	18,18	1,57	18,16	1,59	18,17	1,59	18,18	1,58
7	32,41	1,57	32,78	1,53	32,81	1,54	32,78	1,53	32,81	1,55	32,8	1,53
8	39,16	-	39,13	-	39,18	-	39,12	-	39,11	-	39,13	-
9	48,01	1,71	48,02	1,72	48,02	1,71	48,01	1,72	48,03	1,71	48,01	1,72
10	36,77	-	36,81	-	36,82	-	36,81	-	36,8	-	36,82	-
11	22,56	1,92	22,94	1,93	22,88	1,91	22,83	1,93	22,9	1,92	22,98	1,93
12	122,26	5,26	121,08	5,23	121,21	5,22	121,2	5,24	121,16	5,25	120,96	5,23
13	143,81	-	145,25	-	145,18	-	145,25	-	145,29	-	145,39	-
14	41,49	-	42,06	-	41,87	-	41,78	-	41,77	-	42,13	-
15	27,33	1,18	27,38	1,16	27,38	1,17	27,4	1,17	27,52	1,18	27,39	1,16
16	22,65	2,03	23,16	1,93	23,17	1,91	23,03	1,94	23,05	1,95	23,17	1,93
17	46,23	-	46,77	-	46,71	-	46,75	-	47,01	-	46,78	-
18	41,33	3,17	41,62	3,32	41,68	3,32	41,72	3,32	41,73	3,31	41,64	3,28
19	45,84	1,74	46,77	1,87	46,71	1,69	46,77	1,88	46,64	1,87	46,85	1,85
20	30,20	-	30,40	-	30,38	-	30,36	-	30,38	-	30,43	-
21	33,50	1,43	34,12	1,44	34,06	1,44	33,96	1,43	33,4	1,45	34,18	1,44
22	32,15	1,76	32,54	1,87	32,44	1,74	32,42	1,88	32,54	1,87	32,6	1,87
23	27,43	0,96	27,87	1,14	27,75	1,33	27,71	1,13	27,72	1,12	27,91	1,14
24	14,90	0,93	14,92	1,093	14,96	1,03	14,97	1,09	15,08	1,08	14,94	1,09
25	14,47	0,84	14,50	0,96	14,54	0,99	14,52	0,98	14,57	0,97	14,51	0,96
26	16,31	0,80	16,79	1,097	17,00	0,90	17,00	1,09	17,02	1,08	16,84	1,07
27	24,98	1,34	25,08	1,34	25,04	1,35	25,03	1,35	25,14	1,36	25,12	1,37
28	180,43	-	184,45	-	185,65	-	187,63	-	187,89	-	184,82	-
29	32,61	1,33	32,99	0,79	33,21	0,96	33,06	0,78	33,03	0,78	33,05	0,78
30	23,11	0,92	23,16	0,99	23,20	0,80	23,13	0,99	23,15	0,99	23,2	0,99

O deslocamento de deslocamento promovido pela ligação entre o metal (Ca/Mg/Zn/Ni/Cu) com o oxigênio do hidroxila em C28 indica a formação dessa nova ligação.

O estiramento ν (C = O) em C28 a 1691 cm^{-1} (Figura 2) presente na OA está ausente nos espectros IV para todo o complexo formado. Também mostra a ausência de estiramento característico ν (C = O) na região do número de onda entre $1715\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$, e a ausência de banda resultante da deformação angular da ligação ν (OH) do ácido carboxílico em a região entre $955\text{ e }875\text{ cm}^{-1}$ (KALOĐERA; SOFIĆ, 2009). No entanto, essas bandas estão presentes no espectro de IV da OA e reforçam a formação do complexo; portanto, cinco novos complexos com OA foram sintetizados.

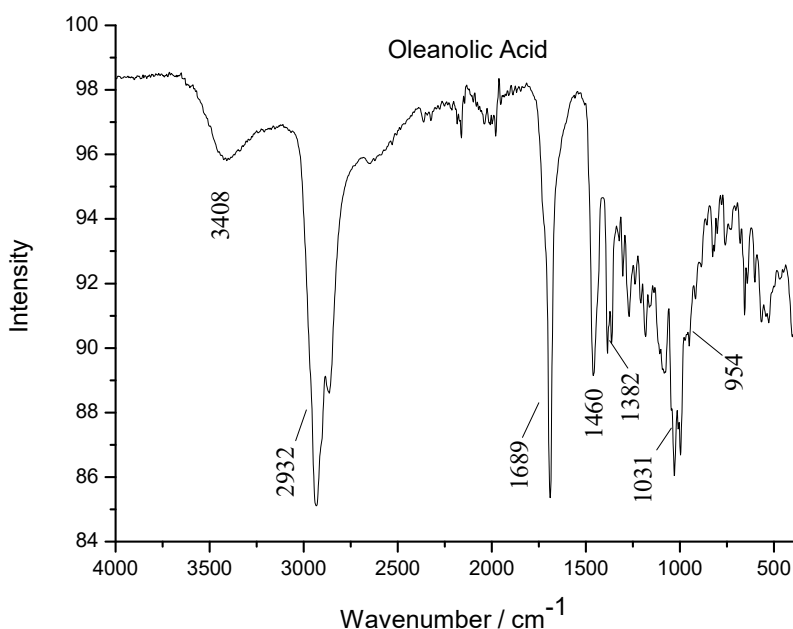


Figura 2 – Espectro de infravermelho do ácido oleanólico.

Como mostrado (Figura 3) é possível identificar a formação dos complexos com o metal e OA, a ligação entre o metal e o átomo de oxigênio promove um deslocamento de elétrons, desta forma os valores de RMN (Tabela 1) aumentam, tal como os valores obtidos para C28. A mesma ligação, suprime a banda obtida em 1689 cm^{-1} para OA nos experimentos IV.

Os valores de alteração da dobra mostram a atividade dos compostos isolados em ensaios em que foram utilizados três genes diferentes (Tabela 2). O composto sintetizado a partir do ácido oleanólico e cálcio apresentou pouca eficiência no controle desses genes, apresentando valores menores quando comparado ao ácido oleanólico puro,

ou seja, houve diminuição da atividade biológica do composto sintetizado. Diferentes resultados foram obtidos para o composto formado a partir de ácido oleanólico e magnésio; os valores foram superiores ao resultado do ácido oleanólico puro e do composto formado com cálcio. Maior sucesso foi alcançado com o gene G6P atingindo um valor de mudança de dobra próximo a 9,0, para o gene PEPCK, há também um valor significativo. Não sendo tão eficaz para o gene FAS (KIM et al., 2011; NORDGREN et al., 2012).

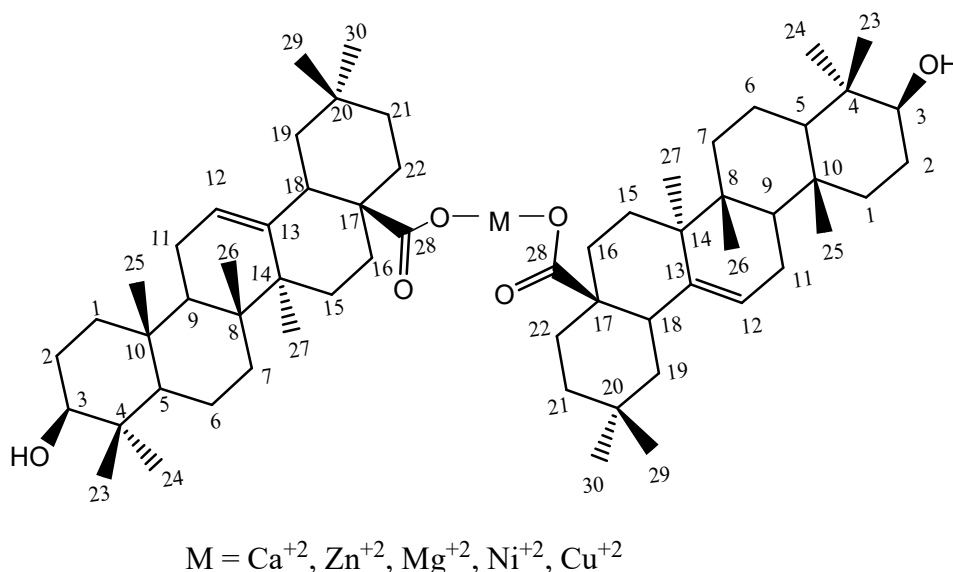


Figura 3 – A estrutura molecular do complexo formado com cálcio, magnésio, cobre, zinco e níquel com ácido oleanólico.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de PCR para os complexos e ácido oleanólico

Amostras	G6P	PEPCK	FAS
Ácido oleanólico	3,6	3,9	1,8
Complexo de Ca	0,8	0,9	1,1
Complexo de Mg	9,0	6,5	3,9
Complexo de Cu	0,1	0,6	0,3
Complexo de Zn	0,0	0,5	0,9
Complexo de Ni	0,7	0,4	0,6

4 CONCLUSÃO

Cinco novos compostos foram sintetizados utilizando OA como material de partida, as estruturas novas e inéditas foram confirmadas por experiências de RMN, IV e LC-MS. Os dados de RMN, IV e LC-MS suportam os dados da literatura para os pontos passivos de reações na molécula de OA. Entre os cinco novos compostos sintetizados, o complexo formado com magnésio, apresentou melhores resultados para os ensaios realizados, de 9,0, 6,5 e 3,9 para G6P, PEPCK e FAS, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEBEY-CASTELLON, I. L. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 74, 2, p. 163-168, 2011.

BEDNARCZYK-CWYNAR, B.; ZAPRUTKO, L.; RUSZKOWSKI, P.; HŁADOŃ, B. Anticancer effect of A-ring or/and C-ring modified oleanolic acid derivatives on KB, MCF-7 and HeLa cell lines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 2201, 2012.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; MAHROOF-TAHIR, M.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. **Spectrochimica acta part a-molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 71, n. 5, p. 1901-1906, 2009.

CHEN, H.; GAO, Y.; WANG, A.; ZHOU, X.; ZHENG, Y.; ZHOU, J. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents **Eur. J. Med. Chem.**, v. 92, p. 648, 2015.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications **J. Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 394, 2006.

GAMBHAVA, N. S.; EZHAVA, S. B.; RATHOD, I. S.; CHHABRIA, M. T.; PATWARI, A. H. Estimation of ursolic acid and oleanolic acid from leaves of *Plumeria obtusa* by HPTLC method after iodine derivatization. **Der Pharma Chem.**, v. 5, n. 44, 2013.

GARCIA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P. E.; MELGUIZO, E.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. Reactivity of chiral sesquiterpene synthons obtained by the degradation of maslinic acid from olive-pressing residues. **Synthetic Communications**, v. 36, 20, p. 3001-3018, 2006.

HE, X.; RUI, H. L. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 11, p. 4366-4370, 2007.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, 1, p. 33-72, 1990.

HSU, H. Y.; YANG, J. J.; LIN, C. C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. **Cancer Letters**, v. 111, v. 1-2, p. 7-13, 1997.

JADEJA, R. N.; VYAS, K. M.; GUPTA, V. K.; JOSHI, R. G.; RATNA PRABHA, C. Syntheses, characterization and molecular structures of calcium(II) and copper(II) complexes bearing O₂-chelate ligands: DNA binding, DNA cleavage and anti-microbial study. **Polyhedron**, v. 31, 1, p. 767-778, 2012.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, 6, p. 2016-2031, 2009.

JIE, L. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, v. 2-1, p. 57-68, 1995.

KIM, H. J.; JEE, H. J.; YUN, J. DNA damage induces down-regulation of PEPCCK and G6P gene expression through degradation of PGC-1. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, 8, p. 589-594, 2011.

LEE, W.; YANG, E. J.; KU, S. K.; SONG, K. S.; BAE, J. S. Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 94-102, 2013.

LIU, J. J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1-2, p. 92-4, 2005.

MANENTE, F. A.; ALMEIDA MELLO, L. R.; KHALIL, O. A. K.; CARVALHO, C. T.; BANNACH, G.; VELLOSA, J. C. R. Efeito da complexação de metais aos antiinflamatórios na ação contra agentes oxidativos e radicais livres: Ação do cetoprofeno. **Ecletica Química**, v. 36, 2, p. 107-127, 2011.

MASULLO, M.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Oleanane derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, 3, p. 237-255, 2017.

MENGONI, F.; LICHTNER, M.; BATTINELLI, L.; MARZI, M.; MASTROIANNI, C. M.; VULLO, V.; MAZZANTI, G. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta Medica**, v. 68, 2, p. 111-114, 2002.

NORDGREN, J.; NITIEMA, L. W.; SHARMA, S.; OUERMI, D.; TRAORE, A. S.; SIMPORE, J.; SVENSSON, L. Emergence of unusual G6P[6] rotaviruses in children, Burkina Faso, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, 4, p. 589-597, 2012.

OVESNA, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVA, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutat Res**, v. 600, v. 1-2, p. 131-137, 2006.

PARTAL UREÑA, F.; MORENO, J. R. A.; LÓPEZ GONZÁLEZ, J. J. Conformational study of (R)-(+)-limonene in the liquid phase using vibrational spectroscopy (IR, Raman, and VCD) and DFT calculations. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2009.

PLACE, A. E. et al. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2798-2806, 2003.

SHANMUGAM, M. K.; DAI, X.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K. H.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. **Cancer Letters**, v. 346, 2, p. 206-216, 2014.

SUH, N. et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. **Cancer Research**, v. 59, 2, p. 336-341, 1999.

TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. Ruthenium(II) p-cymene complexes of naphthoquinone derivatives as antitumor agents: A structure-activity relationship study. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 822, p. 211-220, 2016.

TUBERT-BROHMAN, I.; SHERMAN, W.; REPASKY, M.; BEUMING, T. Improved docking of polypeptides with glide. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, 7, p. 1689-1699, 2013.

ZHANG, H.; LI, X.; DING, J.; XU, H.; DAI, X.; HOU, Z.; ZHANG, K.; SUN, K.; SUN, W. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, v. 1-2, p. 261-268, 2013.

CAPÍTULO 4

ENSAIOS BIOLÓGICOS UTILIZANDO BACTÉRIAS GRAM-POSITIVA, GRAM-NEGATIVA E PCR

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2003, cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento não eram capazes de pagar pelos medicamentos farmacêuticos, contando apenas com os medicamentos tradicionais de conhecimento popular, principalmente à base de plantas para manter seus cuidados de saúde de primeira necessidade (SHINDE et al., 2014a,b). Dos 92 medicamentos anticancerígenos aprovados entre os anos de 1983 e 1994 para uso comercial, aproximadamente 62% estão diretamente relacionados à origem natural. Os produtos naturais derivados de plantas como: flavonoides, terpenoides, alcaloides, entre outros, receberam uma atenção considerável nos últimos anos devido às suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo efeitos purgativos e formas preventivas ao câncer (SHINDE et al., 2014b). Das mais variadas e diferentes plantas e espécies tem-se obtido resultados de ações anticâncer, em particular destacamos as *Plumerias L.* (SIDDIQUI et al., 1989; KARDONO et al., 1990; TOHAR et al., 2006; HASSAN et al., 2008; SHARMA; KUMAR, 2012; ZHANG et al., 2013; SHINDE et al., 2014b; ZOUA et al., 2014). As diferentes aplicações e usos na medicina popular, a grande ocorrência territorial e a facilidade de cultivo, fez da espécie *Plumeria L.* uma fonte de estudo em vários países com os mais diversos interesses medicinais (KARDONO et al., 1990; SAHU et al., 2008; KAMBOJ; SALUJA, 2010; CHOUDHARI et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2012; DEVPRAKASH et al., 2012; SUCHITRA et al., 2013; BAIS et al., 2014; SHINDE et al., 2014b). Alguns estudos com o uso de *Plumeria L.* reportam com sucesso a atividade de seus compostos isolados ou de extratos perante as bactérias gram-negativas e gram-positivas (MARTÍNEZ GUERRA et al., 2000; ACEBEY-CASTELLON et al., 2011; SHARMA; KUMAR, 2012; SHINDE et al., 2014b; CUI et al., 2015). Os princípios da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram descritos pela primeira vez em 1971, mas foi em 1985, com a introdução de uma polimerase de DNA termostável, que os primeiros dados experimentais usando essa técnica foram publicados. Desde então, o uso da PCR tem sido descrito em centenas de milhares de

publicações científicas. A técnica de PCR tem sido aplicada em muitas áreas científicas diferentes, devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade (SIGURDSSON et al., 2012).

PCR é uma abreviatura de “reação em cadeia da polimerase”. A PCR é um método para amplificar o DNA, portanto uma molécula de DNA pode ser multiplicada por milhares de moléculas em poucas horas. Esse fato ocorre devido a uma enzima chamada DNA polimerase e à matéria-prima ou "blocos de construção" do DNA. A enzima copia a molécula de DNA original para formar duas moléculas (NUMBER, 2005; SOME et al., 1996). A PCR consiste em três etapas: desnaturação, recozimento e extensão. Cada fase duplica o número de moléculas de DNA. O processo é continuado por muitos ciclos, para gerar um grande número de cópias. O processo é realizado em um ciclador de PCR ou em uma máquina de PCR. O ciclador de PCR aquece ou arrefece a mistura de PCR no momento apropriado, para permitir a desnaturação, o recozimento ou a extensão (HEID et al., 1996). No que se refere a forma de expressar aos valores obtidos com PCR, temos que valor do eixo Y expresso em *fold change* é uma medida que descreve o quanto uma quantidade muda de um valor inicial para um valor final. Por exemplo, um valor inicial de 30 e um valor final de 60 correspondem a uma mudança de 1 (ou, de forma equivalente, uma alteração para duas vezes), ou em termos comuns, ao aumento de uma vez. A alteração é calculada simplesmente como a relação entre a diferença entre o valor final e o valor inicial sobre o valor original. Assim, se o valor inicial for A e o valor final for B, a alteração será $(B-A)/A$, ou, de forma equivalente, $B/A-1$. Como outro exemplo, uma mudança de 80 para 20 seria uma variação de -0,75, enquanto uma mudança de 20 para 80 seria uma mudança de 3, partindo-se do valor original (HEID et al., 1996; PFAFFL; NUMBER, 2001).

De acordo com as informações disponíveis na literatura sobre atividades anti-câncer e resultados positivos sobre ação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram desenvolvidos ensaios biológicos a fim de confirmar e descobrir novas atividades com os diferentes extratos obtidos a partir de *Plumeria alba*, *Plumeria rubra*, *Plumeria obtusa*, *P. terio* e fezes de *P. tetrio*.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Ensaio antibacteriano com *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Escherichia coli* (UPEC)

2.2 Ensaio biológico pelo método de difusão em disco

Foram preparados discos de papel-filtro de 6 mm, usando perfurador e autoclave, placas LB e soluções-mãe dos agentes de ensaio (50 mg mL⁻¹ em DMSO). Em seguida foram preparados os controles positivos (antibióticos – cefalosporinas terceira geração – a 5 mg mL⁻¹ em DMSO). A cultura de bactérias em 2 ml de líquido LB foi deixada na incubadora de agitação a 37 °C, durante uma noite. Em seguida, as culturas bacterianas foram diluídas para 10 mL, adicionando 8 mL de LB fresco ao tubo (diluição 5x). Foram propagados na superfície 100 µl de cultura bacteriana diluída na placa LB, e em seguida foram adicionados 3, 10 e 30 µL de controle positivo e agentes de teste a discos de papel em duplicata. Seis discos de papel (três concentrações em duplicata) foram posicionados uniformemente sobre a superfície da placa LB. Eles foram então selados com parafilme e incubados por 12 horas, a 37 °C. Em seguida mediu-se o diâmetro da zona de inibição em mm.

Todas as frações originadas nas colunas preparativas com as cinco amostras iniciais foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana com *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Escherichia coli* (UPEC).

2.3. PCR

2.3.1 Extração de RNA e QPCR

O RNA total foi isolado de células H4IIE ou a partir tecido de ratos mantidos com nitrogênio líquido, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). O RNA foi quantificado por meio da configuração de placas Synergy H1/Take 3 (BioTek). Os cDNAs foram sintetizados com 2 µg de RNA para cada amostra, utilizando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Life Technologies) em ABIP Gene AMP 9700 (Life Technologies).

O cDNA resultante foi amplificado em duplicado por *real-time* quantitativo PCR (qPCR), utilizando SYBR-green® PCR Master Mix (Life Technologies). Para evitar a interferência devido à contaminação por DNA genômico, apenas *intron-overlapping primers* foram selecionados, utilizando o *software* Primer Express versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), da seguinte forma: β -actin (housekeeping gene), iniciador direto: 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3', iniciador inverso: 5'-GCG GCA GTG GCC ATC TC-3'; G6Pase, iniciador direto: 5'-TGT TCC TCT TAA TCC TGC CCA-3', iniciador inverso: 5'-CCA ACC TGC ACA AGT TCC CTT-3'; PEPCK, iniciador direto: 5'-GCA GAG CAT AAG GGC AAG GT-3', iniciador inverso: 5'-TTG CCG AAG TTG TAG CCA AA-3'; síntese de ácidos graxos (FAS), iniciador direto: 5'-GGC ATC ATT GGG CAC TCC TT-3', iniciador inverso: 5'-GCT GCA AGC ACA GCC TCT CT-3'. As qPCR amplificações foram realizadas em ABI 7500 *Fast real-time* PCR (Life Technologies), utilizando um ciclo a 50 °C durante 2 minutos e um ciclo de 95 °C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A curva de dissociação foi formada com um ciclo de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos a 95 °C.

A expressão de mRNA foi analisada pelo método $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001) e normalizada em relação à expressão da β -actina, usando o *software* ABI 7500 *Fast System* SDS v1.3.0 (Life Technologies). A amplificação de transcritos específicos foi ainda confirmada pela obtenção de perfis de curva de fusão. Todos os resultados foram expressos como uma *fold change*, a partir dos controles inferidos de Dex-AMPC.

Para os ensaios foram utilizadas amostras com concentração de 5,0 mg/100 μ l utilizando o protocolo PCR Klab (Figura 1).

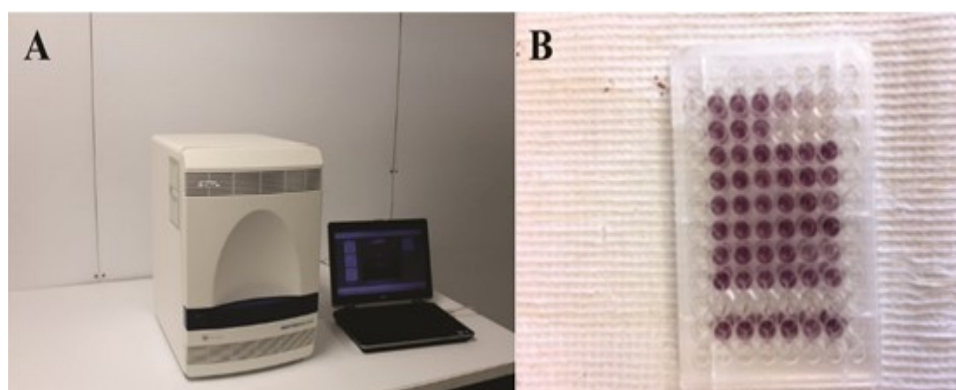


Figura 1 – ABI 7500 Fast real-time PCR - Life Technologies (A), placa de 96 poços (B).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 *Staphylococcus aureus*

De acordo com a dimensão do halo, os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menor que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo em mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle negativo, empregou-se o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (OSTROSKY et al., 2008).

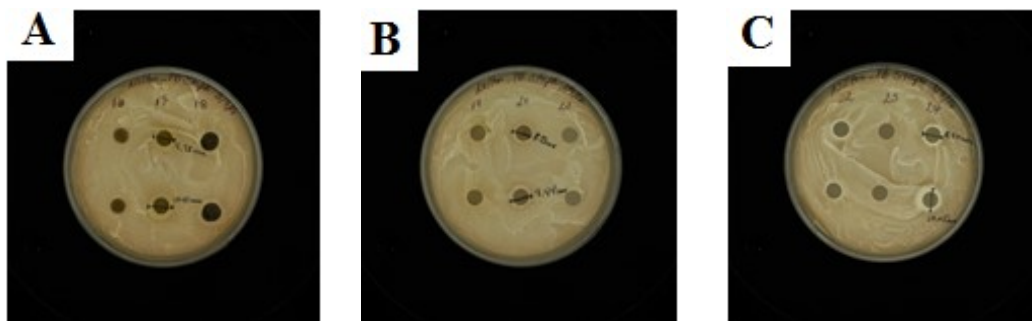


Figura 2 – Placa de Petri com o resultado positivo para inibição de *Staphylococcus aureus*, a partir da fração metanólica das fezes de *P. tetrio* L. (A), fração metanólica de *P. tetrio* L. (B) e fração diclorometano de *Plumeria alba* (C) em concentração de 50 mg mL⁻¹ em DMSO.

Os resultados obtidos mostram (Figura 2) que a fração proveniente do diclorometano da *Plumeria alba*, a fração proveniente do metanol da *P. tetrio* L. e a também fração originada das fezes da *P. tetrio* L. com metanol são ativas (OSTROSKY et al., 2008) no controle de *Staphylococcus aureus* (gram-positiva). É importante destacar que a *P. tetrio* L., em sua fase larval (lagarta), prefere se alimentar das folhas de *Plumeria alba*, portanto o experimento indica que é possível que a atividade encontrada para o controle de *Staphylococcus aureus* seja adquirida nas folhas da *Plumeria alba* e repassada para lagarta, que, por sua vez, excreta em suas fezes. Rawani et al. (2011) já haviam obtido resultado semelhante em 2011. Os autores obtiveram também resultado positivo para o controle de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Mata et al. (2015) demonstraram os mesmos efeitos utilizando compostos de *Plumeria* complexados com prata. Em uma avaliação das propriedades antimicrobianas com o uso de extratos crus de *Plumeria obtusa*, Mata et al. (2015) obtiveram sucesso no controle

de *Staphylococcus aureus* (Mata et al., 2015). Não houve nenhum resultado satisfatório para os ensaios com *Escherichia coli*.

4.2 Resultados de PCR

Os resultados obtidos para PEPCK, G6P e FAS, conforme ilustra a Tabela 1, mostram que nenhuma das frações utilizadas nos ensaios obtiveram resultados expressivos para o controle dos genes propostos. A fração que melhor mostrou atividade foi obtida das fezes de *P. tetrio* L. – acetato de etila. Algumas frações, como a obtida com hexano nas fezes *P. tetrio* L. foram totalmente incapazes de demonstrar algum tipo de atividade.

Tabela 1 – Resultado de PCR em fold-change para os extratos da *P. tetrio* com os genes G6P (glucose-6-fosfatase), PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxikinase) e FAS (ácido graxo sintase)

Amostras	PEPCK Fold change	G6P Fold change	FAZ Fold change
Hexano – <i>P. tetrio</i> L.	0,0	0,0	0,0
DCM- <i>P. tetrio</i> L.	0,0	0,0	0,0
Acet. de etila - <i>P. tetrio</i> L.	5,9	1,8	1,0
Metanol - <i>P. tetrio</i> L.	3,3	1,9	0,7
Hexano – fezes <i>P. tetrio</i> L.	0,0	0,0	0,0
DCM – fezes <i>P. tetrio</i> L.	0,0	0,0	0,0
Acet. et.- fezes <i>P. tetrio</i> L.	6,2	5,8	2,8
Metanol – fezes <i>P. tetrio</i> L.	4,7	2,4	1,6

Na Tabela 2 é possível constatar que os resultados obtidos para atividades com os genes G6P e FAS são valores de pouca expressão ou de nenhum valor na atividade de controle dos referidos genes. Com relação ao gene PEPCK, algumas frações não apresentaram nenhum resultado, o que pode ser constatado para as frações de *P. alba* Hex, *P. rubra* DCM e ainda para a fração de *P. rubra* Hex. O resultado mais significativo foi constatado na fração de *P. rubra* DCM, em que o *fold change* é próximo de 9.

Tabela 2 – Resultado de PCR em fold change para os extratos de *Plumeria obtusa*, *P. alba* e *P. rubra* com os genes G6P (glucose-6-fosfatase), PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxikinase) e FAS (ácido graxo sintase)

Amostras	PEPCK Fold change	G6P Fold change	FAZ Fold change
Hexano - <i>Plumeria obtusa</i>	5,5	1,4	1,0
DCM - <i>Plumeria obtusa</i>	5,5	2,1	0,8
Acetato de etila - <i>Plumeria obtusa</i>	2,2	0,8	0,9
Metanol - <i>Plumeria obtusa</i>	3,6	0,9	0,85
Hexano - <i>Plumeria alba</i>	0,0	0,0	0,0
DCM - <i>Plumeria alba</i>	0,0	0,0	0,0
Acetato de etila - <i>Plumeria alba</i>	5,0	1,1	0,8
Metanol - <i>Plumeria alba</i>	2,8	1,0	0,1
Hexano - <i>Plumeria rubra</i>	0,0	0,0	0,0
DCM - <i>Plumeria rubra</i>	8,7	1,8	1,2
Acetato de etila - <i>Plumeria. rubra</i>	7,8	5,1	1,6
Metanol - <i>Plumeria rubra</i>	3,8	1,7	0,8

Na Tabela 3 estão os resultados obtidos com os complexos formados entre o ácido oleanólico e os metais Ca, Zn, Cu, Ni, e Mg. Os resultados com o complexo formado com Mg foi o de maior expressão em ambos os genes, obtendo um alto valor de *fold change* com o gene G6P próximo a 9, também se manifestando com os maiores valores para ambos os genes PEPCK e FAS.

Tabela 3 – Resultado de PCR em percentual para os compostos (hexacosano), (ácido ferulico), ácido oleanólico e dos complexos; com os genes G6P (glucose-6-fosfatase), PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxikinase) e FAS (ácido graxo sintase)

Amostras	G6P Fold change	PEPCK Fold change	FAZ Fold change
Hexacosano	3,3	3,8	1,2
Ácido ferúlico	2,8	3,3	1,4
Ácido oleanólico	3,6	3,9	1,8
Complexo Ca	0,8	0,9	1,1
Complexo Mg	9,0	6,5	3,9
Complexo Cu	0,1	0,6	0,3
Complexo Zn	0,0	0,5	0,9
Complexo Ni	0,7	0,4	0,6

Considerando que a G6P é uma enzima que hidrolisa a glicose-6-fosfato, resultando na criação de um grupo fosfato e glicose livre, a glicose é então exportada da célula através de proteínas de membrana transportadoras de glicose (WILLIAMS et al., 1998). Essa catálise completa o passo final na gluconeogênese e glicogenólise, portanto desempenha um papel fundamental na regulação homeostática dos níveis de glicose no sangue (NORDGREN et al., 2012; SHERIF et al., 2011; WILLIAMS et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2011) e que o PEPCK atua na junção entre a glicólise e o ciclo de Krebs. É possível que o complexo formado a partir do ácido oleanólico e o Mg possa ser efetivo no controle do gene G6P, no entanto, são necessários estudos mais específicos para avaliar melhor esses resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBEY-CASTELLON, I. L. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 74, 2, p. 163-168, 2011.
- BAIS, S.; GILL, N. S.; RANA, N.; SHANDIL, S. A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: *Juniperus communis*. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 634-723, 2014.
- CHAKRABORTY, A. K.; GAIKWAD, A. V.; SINGH, K. B. Phytopharmacological review on *Acanthospermum Hispidum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 1, p. 144-148, 2012.
- CHOUDHARI, A. B.; NAZIM, S.; GOMASE, P. V.; KHAIRNAR, A. S.; SHAIKH, A.; CHOUDHARI, P. Phytopharmacological review of Arjuna bark. **Journal of Pharmacy Research**, v.3, p.117-119, 2011.
- CUI, H.; ZHANG, X.; ZHOU, H.; ZHAO, C.; LIN, L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. **Botanical Studies**, v. 56, n. 16, p. 2-8, 2015.
- DEVPRAKASH, T. R.; GURAV, S.; SENTHIL KUMAR, G. P.; TAMIZH MANI, T. An review of phytochemical constituents & pharmacological activity of *Plumeria* species. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2012.
- HASSAN, E. M.; SHAHAT, A. A.; IBRAHIM, N. A.; VLIETINCK, A. J.; APERS, S.; PIETERS, L. A new monoterpene alkaloid and other constituents of *Plumeria acutifolia*. **Planta Medica**, v. 74, 14, p. 1749-1750, 2008.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- KAMBOJ, A.; SALUJA, A. Phytopharmacological review of *Xanthium strumarium* L. (Cocklebur). **International Journal of Green Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 129-139, 2010.
- KARDONO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Studies on Indonesian Medicinal-Plants .2. Cytotoxic Constituents of the Bark of *Plumeria-Rubra* Collected in Indonesia. **Journal of Natural Products**, v. 53, 6, p. 1447-1455, 1990.
- MARTÍNEZ GUERRA, M. J.; LÓPEZ BARREIRO, M.; MOREJÓN RODRÍGUEZ, Z.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.
- MATA, R.; REDDY NAKKALA, J.; RANI SADRAS, S. Catalytic and biological activities of green silver nanoparticles synthesized from *Plumeria alba* (frangipani) flower extract. **Materials Science and Engineering C**, v. 51, p. 216-225, 2015.

NORDGREN, J.; NITIEMA, L. W.; SHARMA, S.; OUERMI, D.; TRAORE, A. S.; SIMPORE, J.; SVENSSON, L. Emergence of unusual G6P[6] rotaviruses in children, Burkina Faso, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 589-597, 2012.

NUMBER, C. Real-time PCR: Understanding C. **System**, v. 43, 5, p. 1-6, 2005.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.28, p. 301-307, 2008.

PFAFFL, M. W.; NUMBER, C. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **System**, v. 43, n. 5, p. 1-6, 2001.

RAWANI, A.; PAL, S.; CHANDRA, G. Evaluation of antimicrobial properties of four plant extracts against human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, Suppl. 1, 2011.

SAHU, A. N.; DAMIKI, L.; NILANJAN, G.; DUBEY, S. Phytopharmacological review of Boerhaavia diffusa Linn. (Punarnava). **Pharmacognosy Reviews**, v. 2, n. 4, Suppl., p. 14-22, 2008.

SHARMA, S. K. R.; KUMAR, N. Pharmacognostical standardisation of Plumeria acutifolia (Poir) bark. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, Suppl. 5, p. 54-57, 2012.

SHERIF, M. El; ESONA, M. D.; WANG, Y.; GENTSCH, J. R.; JIANG, B.; GLASS, R. I.; BAKER, S. A.; KLENA, J. D. Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain from a child with diarrhea in Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1436-1442, 2011.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of Plumeria species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy(Online) Sch. Acad. J. Pharm**, v. 3, n. 2, p. 2320-4206, 2014a.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological review of Plumeria species. **Sch. Acad. J. Pharm.**, v. 3, p. 2320-4206, 2014b.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A, BEGUM S. Pentacyclic triterpenoids from the leaves of Plumeria obtusa. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3143–3147, 1989.

SIGURDSSON, E. M.; CALERO, M.; GASSET, M. **Methods in Molecular Biology**, v. 54, p. 261-274, 2012.

SOME, P.; BARRIER, L.; GUALBERTO, J.; HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

SUCHITRA, N. T.; EMMANUEL, S.; SHEEBA, R. M. A Phytopharmacological review on Ichnocarpus frutescens L. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 6, p. 607-609, 2013.

TOHAR, N.; AWANG, K.; MOHD, M. A.; JANTAN, I. Chemical composition of the essential oils of four Plumeria species grown on Peninsular Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 6, p. 613-617, 2006.

WILLIAMS, J. H.; WARD, C. W.; SPANGENBURG, E. E.; NELSON, R.; STAVRIANEAS, S.; KLUG, G. A. Glucose 6-phosphate alters rat skeletal muscle contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum function. **Exp Physiol**, v. 83, n. 4, p. 489-502, 1998.

YAMAMOTO, D.; KAWAGUCHIYA, M.; GHOSH, S.; ICHIKAWA, M.; NUMAZAKI, K.; KOBAYASHI, N. Detection and full genomic analysis of G6P[9] human rotavirus in Japan. **Virus Genes**, v. 43, n. 2, p. 215-223, 2011.

ZHANG, H.; LI, X.; DING, J.; XU, H.; DAI, X.; HOU, Z.; ZHANG, K.; SUN, K.; SUN, W. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 261-268, 2013.

ZOUA, K.; BATOMAYENA, B.; KOSSI, M.; LAWSON-EVI, P.; KWASHIE, E.-G.; KODJO, A.; MESSANVI, G. Effects of Plumeria alba Roots Hydro Alcoholic Extract on some Parameters of Type 2 Diabetes. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 8, n. 3, p. 140-148, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho tem com resultado o isolamento de três compostos (hexacosano, ácido ferúlico e ácido oleanólico), a partir do ácido oleanólico foram sintetizados cinco novos complexos utilizando os metais cálcio, magnésio, zinco, cobre e níquel. Foi identificado um total de 25 compostos presentes os voláteis das flores das três plumerias estudadas, os dois principais compostos presentes nos voláteis quantificados a partir de uma curva analítica utilizando GC-MS, onde foi possível estabelecer um dos fatores de escolha de *P. tetrio* para a *P. alba*.

Com o uso do LC-MS e RMN de ^{13}C e ^1H foram identificados diversos compostos presentes nas frações de acetato de etila das plumerias (rubra, alba e obtusa) sendo possível estabelecer a influência dos compostos na relação entre a *P. tetrio* e *P. alba*. Ensaio biológicos apontaram resultados significativos para o uso do complexo formado com magnésio e do potencial uso de alguns compostos presentes nas frações, no tratamento do câncer quando testados com os genes PEPCCK, G6P e FAS. No anexo I é demonstrado um estudo vibracional da molécula de linalool com o uso de técnicas de IR, Raman e cálculo teórico.

O trabalho possibilitou identificar compostos voláteis que promovem a atração do inseto para a planta, a semelhança no perfil químico das amostras frente ao uso de LC-MS e RMN e do potencial da planta no tratamento de genes cancerígenos, abrindo novas perspectivas sobre a formação de complexos com o ácido oleanólico e de novos estudos na interação planta-inseto.

ANEXOS

**ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA: INTERNATIONAL
JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, v. 8, p. 160-169, 2018 – METALS
COMPLEXES FORMED WITH OLEANOLIC ACID**

Abstract

The oleanolic acid possesses diverse pharmacological properties, it is considered as a good starting material for creating new compounds. The oleanolic acid isolated of *Plumeria obtusa* leaves was used as raw material to obtain calcium, magnesium, zinc, nickel and copper complexes. The structures of complexes were confirmed by HRMS, ¹H NMR, and ¹³C NMR. Five new compounds were synthesized to promote increased biological activity of oleanolic acid and PCR assays for the different type of cancer.

Keywords: Oleanolic acid, Complex, PCR

Introduction

Oleanolic acid (OA) is a pentacyclic triterpenoid that occurs naturally in several plants either as a free acid or as an aglycone of saponins¹. OA is found in high concentrations in the leaves, fruits, and oil of *Olea europaea L.*^{2,3}. OA can be extracted from apples⁴ or plants such as the *Plumeria obtusa*⁵. OA has been extracted from more than 1620 different plant species and used for food and medicinal purposes⁶. OA has gained significant interest, and several studies have demonstrated the importance of its use in hepatoprotective^{7,8}, anti-inflammatory^{7,8}, and anticancer activities⁹. OA is also a phosphorylase inhibitor¹⁰. In China, OA has been used orally to treat liver disorders¹¹, and it is a registered drug used intravenously in the treatment of hepatitis B and liver cancer¹².

Since OA possesses diverse pharmacological properties, it is considered as a good starting material for creating new compounds¹³. OA comprises three active points: C3, where hydroxyl is stored; the double bonds present in the ring between the C12 and C13 carbons; and C28, where carboxylic acid is stored (Figure 1); these points enable modifications, which lead to the creation of new chemical compounds^{14,15}.

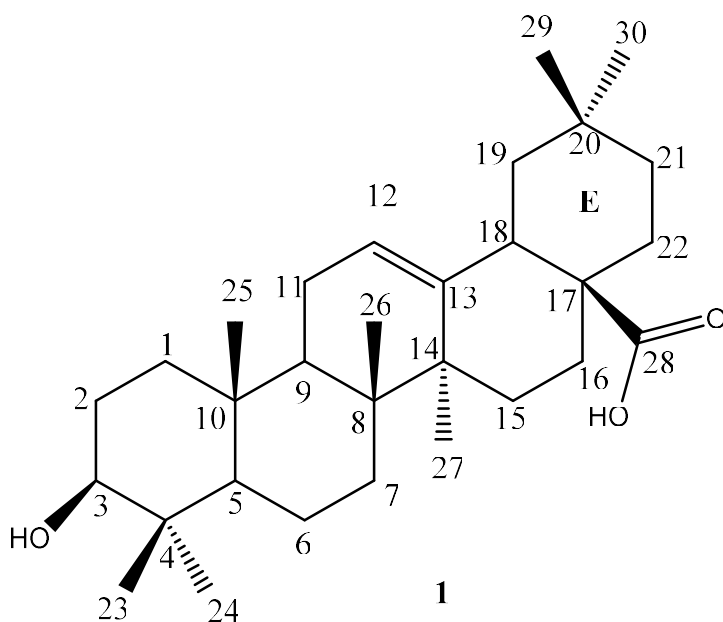


Figure 1. Molecular structure of oleanolic acid

However, OA has limited bioavailability and does not provide a good plasma half-life because of its low solubility in water^{16,17}. Several studies have demonstrated that the structural alterations in OA can have a significant impact on biological activities¹⁸. The improvements in biological activities, such as anti-inflammatory, antidiabetic, nephropathy, and cytotoxicity, have been achieved by changing some points in the OA structure^{19,20}. Terpenes complexes were very effective in several diseases²¹.

Tabrizi et al.²² showed that ruthenium (II) *p*-cymene complexes of naphthoquinone derivatives worked powerfully to combat melanomas in humans. Ghosh et al.²³ demonstrated the antioxidant activity of the quercetin–magnesium complex, and similar benefits were recorded for the complexation of copper with quercetin. The use of the bactericidal properties of calcium and copper complexes against gram-positive bacteria has also been demonstrated²⁴.

Taking into consideration the aforementioned and potential medical uses of OA and its derivatives, five new compounds were synthesized using the OA.

Experimental

General procedures and equipment

The ^1H and ^{13}C experiments were performed on a Bruker 600-MHz NMR spectrometer equipped with an AVANCE III console, and a DCH cryogenically cooled probe. The conditions for ^1H experiments were as follows: Bruker pulse sequence = zg30; the number of acquisition points = 65,536; the number of acquisitions = 128; sweep width = 20.55 ppm; recycle delay = 2 s; frequency = 600.13 MHz. The conditions for ^{13}C experiments were as follows: Bruker pulse sequence = zgpg30; the number of acquisition points = 65,536; the number of acquisitions = 4096; sweep width = 238.9 ppm; recycle delay = 2 s; frequency = 150.9 MHz. Deuterated methanol, CD_3OD , was used as the solvent.

The IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Paragon 1000 FTIR spectrophotometer in the ATR mode over the range 400–4000 cm^{-1} .

The analyses were performed on LC-MS-QTOF-6530 model L-1200 (Agilent brand) with the software Profinder series B.06.00; flow: 0.6 mL/min - C18 column - 1.8 μM , 3 mm \times 100 mm. The mobile phase A: 0.1% formic acid in water, mobile phase B: 0.1% formic acid in acetonitrile.

Isolation of oleanolic acid

The leaves of *Plumeria alba* were collected and dried in a greenhouse, after drying were submitted to extraction with ethanol in the ratio 6: 1 solvent for the sample. After 7 days, the material was filtered, and the solvent was removed using reduced pressure. The sample was subjected to the silica gel 60 (0.063-0.2 mm / 70-230 mesh ASTM) filter column^{25,26} (Macherey-Nagel, Germany) and fractionated with one liter of each of the following eluents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and water. The solutions obtained were concentrated and analyzed by CCD. The pre-selected extracts were subjected to classical silica gel chromatography and Sephadex® LH-20 for the isolation and purification of compounds.

Melting temperature

The melting temperatures were determined on MQAPF 320 equipment from Microquímica Equipamentos Ltda.

Complex Reaction

A round bottom flask (500 mL) was charged with 1 eq. of metal sulfate to 2 eq. of OA and 300 mL methanol. The resulting reaction mixture was vigorously stirred at 57 °C for 6 hours. The solution was cooled to room temperature, and the methanol was removed using reduced pressure to obtain the compounds (Figure 1)²⁷. The material was measured and calculated the yield the reaction.

RNA extraction and qPCR

Total RNA was isolated from H4IIE cells or from tissue from rats maintained with liquid nitrogen, using the TRIzol reagent (Life Technologies). The total RNA was isolated from cells using TRIzol reagent (Life Technologies). RNA was quantified using Synergy H1/Take 3 plate setup (BioTek). The cDNAs were synthesized using 2 µg of RNA for each sample using high-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) on an ABI GeneAMP 9700 (Life Technologies).

The resulting cDNA was amplified in duplicate by real-time quantitative PCR (qPCR) using SYBR green PCR Master Mix (Life Technologies). To avoid interference due to genomic DNA contamination, only intron-overlapping primers were selected using the Primer Express version 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) as follows: β-actin (housekeeping gene), forward primer: 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3', reverse primer: 5'-GCG GCA GTG GCC ATC TC-3'; G6Pase, forward primer: 5'-TGT TCC TCT TAA TCC TGC CCA-3', reverse primer: 5'-CCA ACC TGC ACA AGT TCC CTT-3'. qPCR amplifications were performed on an ABI 7500 Fast real-time PCR (Life Technologies) using 1 cycle at 50 °C for 2 min and 1 cycle of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The dissociation curve was completed with 1 cycle of 1 min at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 95 °C. mRNA expression was analyzed using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method, and normalized concerning the expression of the β-actin using ABI 7500 Fast System SDS Software v1.3.0 (Life

Technologies). Amplification of specific transcripts was further confirmed by obtaining melting curve profiles. All results were expressed as fold change from the induced Dex-cAMP controls. For the assays, samples at the concentration of 5.0 mg / 100 μ l were used with 5.0 μ l of the cDNA.

Results and Discussion

After the use of three chromatographic columns with different mobile phases and monitoring the separation with thin layer chromatography and with the developers phosphomolybdic acid and vanillin, the oleanolic acid compound was obtained, where it was confirmed according to the ^{13}C and ^1H NMR data in Table 1.

The synthesized compounds were analyzed using the NMR technique, and the ^{13}C and ^1H data for OA were initially obtained for comparison with the NMR data of the compounds.

The results in Table 1 show that C28 for the compounds with Ca, Mg, Cu, Zn, and Ni has a different displacement value compared to that obtained with OA. Considering C28 as one of the possible reaction points ^{14,15}, and the data obtained by the IR technique which show the absence of the band for carboxylic acid bound to C28, it is clear that the reaction is formed together with a carboxylic acid group. It is still possible to discern a small variation in the displacement of the C12 and C13 carbons and those carrying the double bond. This suggests that electron displacement is promoted by the withdrawal effect exerted by both metals when they are bound to the hydroxyl oxygen of the carboxylic acid group.

The structures of the synthesized compounds are also supported by the following data.

C₃₀H₄₈O₃. (Oleanolic acid) White solid, 0.621g of the pure compound, m.p. 307-309 °C, IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3455, 3048, 2932, 2859, 1689, 1460, 1382, 1271, 1031, 954, 658.

C₆₀H₉₄CaO₆ It was obtained in 71% yield (0,1150 g, 0,1209 mmol) via reaction of the 1.0 eq. of calcium sulfate to 2.0 eq. of oleanolic acid. White solid, IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3370, 2928, 2865, 1537, 1465, 1387, 1136, 1029, 995. LC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculate for C₆₀H₉₅CaO₆: 951.6755, found 951.6750.

C₆₀H₉₄MgO₆ It was obtained in 68 % yield (0,1120 g, 0,1198 mmol) via reaction of the 1.0 eq. of magnesium sulfate to 2.0 eq. of oleanolic acid. White solid, IR (ATR)

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3244, 2926, 1526, 1385, 1089, 1029, 771. LC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculate for $\text{C}_{60}\text{H}_{95}\text{MgO}_6$: 935.6979, found 935.6976²⁸.

$\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{CuO}_6$ It was obtained in 70% yield (0,0989 g, 0,1015 mmol) via reaction of the 1.0 eq. of copper sulfate to 2.0 eq. of oleanolic acid. Green solid, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3395, 2938, 2862, 1537, 1386, 1094, 995, 728. LC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculate for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{CuO}_6$: 973.6346, found 973.6344.

$\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{ZnO}_6$ It was obtained in 68 % yield (0,101g, 0,1036 mmol) via reaction of the 1.0 eq. of zinc sulfate to 2.0 eq. of oleanolic acid. White solid, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3299, 2940, 2864, 1595, 1461, 1084, 736, 677. LC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculate for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{ZnO}_6$: 974.6342, found 974.6341.

$\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{NiO}_6$ It was obtained in 69 % yield (0,0899g, 0,0928 mmol) via reaction of the 1.0 eq. of nickel sulfate to 2.0 eq. of oleanolic acid. Green solid, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3320, 2928, 2863, 1534, 1453, 1373, 1029, 772. LC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculate for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{NiO}_6$: 968.6404 , found 968.6401.

C	OA ^a		Ca-OA		Mg-OA		Cu-OA		Zn-OA		Ni-OA	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	38.43	0.99	38.44	1.01	38.44	1.02	38.43	1.00	38.44	0.99	38.44	0.98
2	26.47	1.79	26.49	1.75	26.49	1.77	26.46	1.76	26.47	1.77	26.5	1.75
3	78.32	3.33	78.41	3.33	78.34	3.33	78.32	3.33	78.36	3.33	78.41	3.33
4	38.43	-	38.48	-	38.44	-	39.02	-	38.47	-	38.49	-
5	55.36	0.84	55.45	0.89	55.41	0.89	55.38	0.88	55.4	0.89	55.57	0.87
6	18.10	1.41	18.17	1.58	18.18	1.57	18.16	1.59	18.17	1.59	18.18	1.58
7	32.41	1.57	32.78	1.53	32.81	1.54	32.78	1.53	32.81	1.55	32.8	1.53
8	39.16	-	39.13	-	39.18	-	39.12	-	39.11	-	39.13	-
9	48.01	1.71	48.02	1.72	48.02	1.71	48.01	1.72	48.03	1.71	48.01	1.72
10	36.77	-	36.81	-	36.82	-	36.81	-	36.8	-	36.82	-
11	22.56	1.92	22.94	1.93	22.88	1.91	22.83	1.93	22.9	1.92	22.98	1.93
12	122.26	5.26	121.08	5.23	121.21	5.22	121.2	5.24	121.16	5.25	120.96	5.23
13	143.81	-	145.25	-	145.18	-	145.25	-	145.29	-	145.39	-
14	41.49	-	42.06	-	41.87	-	41.78	-	41.77	-	42.13	-
15	27.33	1.18	27.38	1.16	27.38	1.17	27.4	1.17	27.52	1.18	27.39	1.16
16	22.65	2.03	23.16	1.93	23.17	1.91	23.03	1.94	23.05	1.95	23.17	1.93
17	46.23	-	46.77	-	46.71	-	46.75	-	47.01	-	46.78	-
18	41.33	3.17	41.62	3.32	41.68	3.32	41.72	3.32	41.73	3.31	41.64	3.28
19	45.84	1.74	46.77	1.87	46.71	1.69	46.77	1.88	46.64	1.87	46.85	1.85
20	30.20	-	30.40	-	30.38	-	30.36	-	30.38	-	30.43	-
21	33.50	1.43	34.12	1.44	34.06	1.44	33.96	1.43	33.4	1.45	34.18	1.44
22	32.15	1.76	32.54	1.87	32.44	1.74	32.42	1.88	32.54	1.87	32.6	1.87
23	27.43	0.96	27.87	1.14	27.75	1.33	27.71	1.13	27.72	1.12	27.91	1.14
24	14.90	0.93	14.92	1.093	14.96	1.03	14.97	1.09	15.08	1.08	14.94	1.09
25	14.47	0.84	14.50	0.96	14.54	0.99	14.52	0.98	14.57	0.97	14.51	0.96
26	16.31	0.80	16.79	1.097	17.00	0.90	17.00	1.09	17.02	1.08	16.84	1.07
27	24.98	1.34	25.08	1.34	25.04	1.35	25.03	1.35	25.14	1.36	25.12	1.37
28	180.43	-	184.45	-	185.65	-	187.63	-	187.89	-	184.82	-
29	32.61	1.33	32.99	0.79	33.21	0.96	33.06	0.78	33.03	0.78	33.05	0.78
30	23.11	0.92	23.16	0.99	23.20	0.80	23.13	0.99	23.15	0.99	23.2	0.99

Table 1. ¹H and ¹³C NMR chemical shifts to OA and complexes (δ , ppm)

^a – oleanolic acid isolated

The shift in displacement promoted by the bonding between the metal (Ca/Mg/Zn/Ni/Cu) with the oxygen of the hydroxyl at C28 indicates the formation of that new bond.

The stretch ν (C=O) at C28 at 1691 cm^{-1} (Figure 2) present to OA is absent in the IR spectra for all complex formed. Also shows the absence of characteristic stretching ν (C=O) band in the wave-number region between 1715–1680 cm^{-1} , and the absence of band resulting from the angular deformation of the ν (OH) bond of the carboxylic acid in the region between 955–875 cm^{-1} ²⁹. However, these bands are present in the IR spectrum of OA and reinforce the formation of the complex; therefore, five new complexes with OA are created.

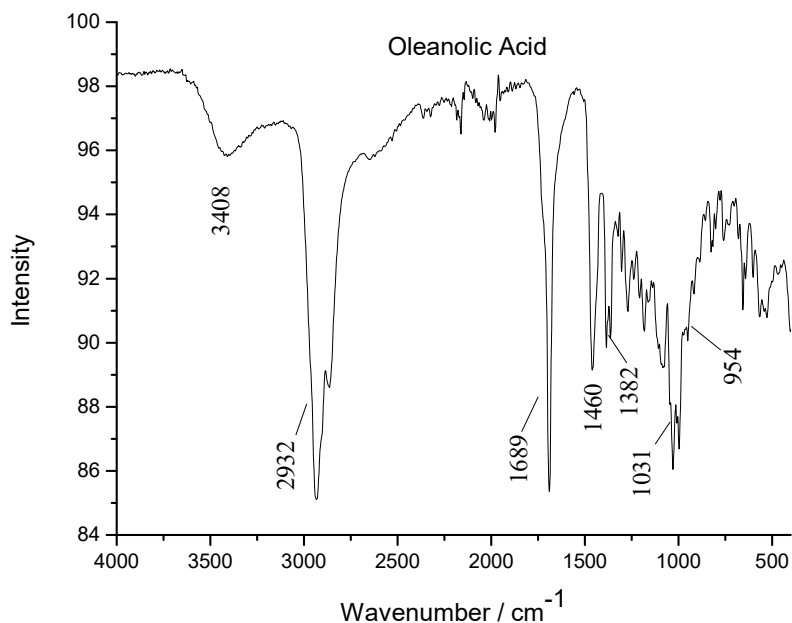


Figure 2. The infrared spectrum of oleanolic acid.

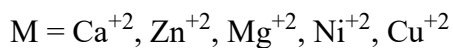
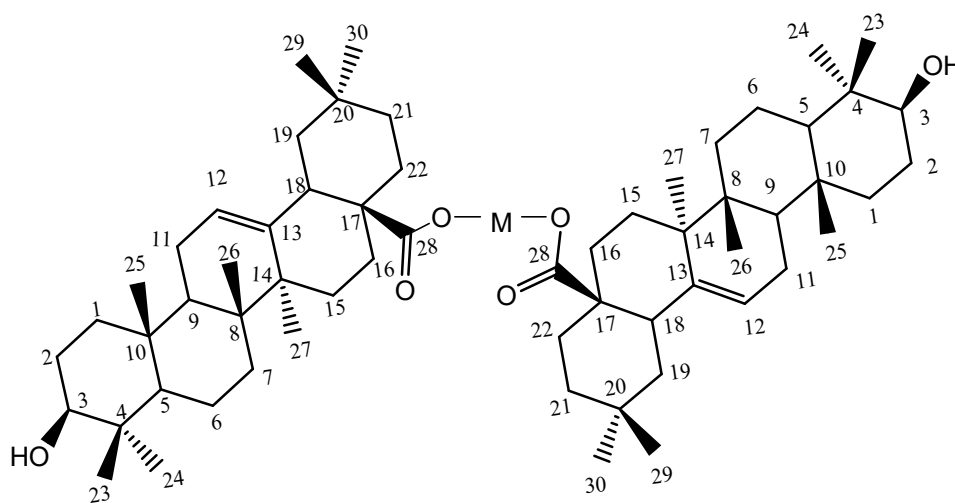


Figure 3. The molecular structure of the complex formed with calcium, magnesium, copper, zinc, and nickel with oleanolic acid.

As shown (Figure 3) it is possible to identify the formation of the complexes with the metal and OA, the bond between the metal and the oxygen atom promotes a displacement of electrons, in this way the NMR values (Table 1) increase, such as the values obtained for C28. The same bond, suppresses the band obtained in 1689 cm^{-1} for OA in the IR experiments.

The fold change values show the activity of the compounds isolated in trials where three different genes were used (Table 2). The compound synthesized from oleanolic acid and calcium showed little efficiency in the control of these genes, presenting lower values when compared to pure oleanolic acid, that is, there was a decrease in the biological activity of the synthesized compound. Different results were obtained for the compound formed from oleanolic acid and magnesium; the values were higher than the result of the pure oleanolic acid and the compound formed with calcium. Greater success was achieved with the G6P gene reaching a fold change value close to 9.0, for the PEPCK gene, there is also a significant value. Not being so effective for the FAS gene^{30,31}.

Amostras	G6P	PEPCK	FAS
Oleanolic acid	3,6	3,9	1,8
Complex Ca	0,8	0,9	1,1
Complex Mg	9,0	6,5	3,9
Complex Cu	0,1	0,6	0,3
Complex Zn	0,0	0,5	0,9
Complex Ni	0,7	0,4	0,6

Table 2. Results of PCR assays for the complexes of calcium, magnesium, and oleanolic acid.

Conclusions

Five novel compounds were synthesized using OA as starting material, the novel and inedited structures were confirmed by NMR, IR and LC-MS experiments. The NMR, IR, and LC-MS data support the literature data for the passive points of reactions in the OA molecule. Among the five new compounds synthesized, the complex formed with magnesium, showed better results for the tests performed.

Acknowledgements

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (research fellowships to AJD, LCAB, ESA, MHS), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), RQ-MG, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (research fellowship to NCR).

References

1. Jie, L. ;*J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, 57.
2. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M. N.; Scheffler, A. ;*Molecules* **2009**, *14*, 2016.
3. Shanmugam, M. K.; Dai, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G.; Bishayee, A. ;*Cancer Lett.* **2014**, *346*, 206.
4. He, X.; Rui, H. L. ;*J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4366.
5. Gambhava, N. S.; Ezhava, S. B.; Rathod, I. S.; Chhabria, M. T.; Patwari, A. H.;*Der Pharma Chem.* **2013**, *5*, 44.
6. Ovesna, Z.; Kozics, K.; Slamenova, D. ;*Mutat Res* **2006**, *600*, 131.
7. Lee, W.; Yang, E. J.; Ku, S. K.; Song, K. S.; Bae, J. S. ;*Inflammation* **2013**, *36*, 94.
8. Hsu, H. Y.; Yang, J. J.; Lin, C. C. ;*Cancer Lett.* **1997**, *111*, 7.
9. Mengoni, F.; Lichtner, M.; Battinelli, L.; Marzi, M.; Mastroianni, C. M.; Vullo, V.; Mazzanti, G. ;*Planta Med.* **2002**, *68*, 111.
10. Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. ;*Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394.
11. Liu, J. ;*J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 92.
12. Chen, J.; Gong, Y.; Liu, J.; Hua, W.; Zhang, L.; Sun, H. ;*Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 1304.
13. Place, A. E.; Suh, N.; Williams, C. R.; Risingsong, R.; Honda, T.; Honda, Y.; Gribble, G. W.; Leesnitzer, L. M.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Rosen, E.; Sporn, M. B. ;*Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2798.
14. Bednarczyk-Cwynar, B.; Zaprutko, L.; Ruszkowski, P.; Hładoń, B. ;*Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2201.
15. Garcia-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeó, Y. ;*Synth. Commun.* **2006**, *36*, 3001.
16. Chen, H.; Gao, Y.; Wang, A.; Zhou, X.; Zheng, Y.; Zhou, J. ;*Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 648.
17. Zhang, H.; Li, X.; Ding, J.; Xu, H.; Dai, X.; Hou, Z.; Zhang, K.; Sun, K.; Sun, W. ;*Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 261.
18. Acebey-Castellon, I. L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Doan Thi Mai, H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; Le Magrex Debar, E.; Gangloff, S. C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; Hung, N. Van; Lavaud, C. ;*J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 163.
19. Masullo, M.; Pizza, C.; Piacente, S. ;*Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 237.
20. Suh, N.; Wang, Y.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Dmitrovsky, E.; Hickey, W. F.; Maue, R. A.; Place, A. E.; Porter, D. M.; Spinella, M. J.; Williams, C. R.; Wu, G.; Dannenberg, A. J.; Flanders, K. C.; Letterio, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Nathan, C. F.; Nguyen, L.; Porter, W. W.; Ren, R. F.; Roberts, A. B.; Roche, N. S.; Subbaramaiah, K.; Sporn, M. B. ;*Cancer Res.* **1999**, *59*, 336.
21. Partal Ureña, F.; Moreno, J. R. A.; López González, J. J. ;*Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 89.
22. Tabrizi, L.; Chiniforoshan, H. ;*J. Organomet. Chem.* **2016**, *822*, 211.
23. Bukhari, S. B.; Memon, S.; Mahroof-Tahir, M.; Bhanger, M. I. ;*Spectrochim. acta part a-molecular Biomol. Spectrosc.* **2009**, *71*, 1901.
24. Jadeja, R. N.; Vyas, K. M.; Gupta, V. K.; Joshi, R. G.; Ratna Prabha, C. ;*Polyhedron* **2012**, *31*, 767.
25. Hench, L. L.; West, J. K. ;*Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33.

26. Tubert-Brohman, I.; Sherman, W.; Repasky, M.; Beuming, T. ;*J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1689.
27. Manente, F. A.; De Almeida Mello, L. R.; Khalil, O. A. K.; De Carvalho, C. T.; Bannach, G.; Velloso, J. C. R. ;*Eclat. Quim.* **2011**, *36*, 107.
28. Novotny, L.; Abdel-Hamid, M. E.; Hamza, H.; Masterova, I.; Grancai, D. ;*J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 961.
29. Kalođera, Z.; Sofić, E. ;*Bosn. J. basic Med. Sci.* **2009**, *9*, 31.
30. Kim, H. J.; Jee, H. J.; Yun, J. ;*Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **2011**, *43*, 589.
31. Nordgren, J.; Nitiema, L. W.; Sharma, S.; Ouermi, D.; Traore, A. S.; Simpore, J.; Svensson, L. ;*Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 589.

ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CHEMISTRY & BIODIVERSITY EM 2018. HS-SPME/CG-EM Analysis of diurnal and nocturnal floral scent volatiles from three *Plumeria* species as possible indicators of plant-insect relationship

Abstract

The identification and characterization of volatile metabolites has become an important strategy to obtain insight into volatile signaling in plant-plant and plant-animal interactions. The species of genus *Plumeria* are known for strong pleasant fragrance, however its volatile composition and scent variation are largely unknown. To detect volatile scent metabolites emitted by three *Plumeria* species using a combination of headspace and solid-phase micro extraction analysis with gas chromatography and mass spectrometry. Diurnal and nocturnal variation in scent metabolites produced by flowers of *P. alba*, *P. rubra*, and *P. obtusa* were determined using HS-SPME/CG-EM analysis. This method was applied to determine the contents and variation of 26 volatile compounds detected in *Plumeria* flower scent. All *Plumeria* species showed diurnal and nocturnal variations in the relative composition of the floral volatile metabolites. Linalool, a terpene alcohol, was identified as the major constituent of *P. alba* floral

scent (86.5% during the day and 71.0% at night). This compound was only a minor component of *P. rubra* floral scent and was absent from *P. obtusa* fragrance. Instead, methyl benzoate was a major component of *P. rubra* floral scent (55.9% and 62.3%), while methyl salicylate was most abundant in *P. obtusa* flowers. HS-SPME/CG-EM analysis of diurnal and nocturnal floral scent volatiles was proposed and validated in 3 *Plumeria* species. The differences in the volatile compositions suggested the existence of dissimilar mechanisms used by *Plumeria* species to attract insects as their pollinators and might explain the preferential infestation of *P. alba* plants by tetro sphinx moth, and possible indicator to develop a new trap to insect.

Keywords: HS-SPME/GC-MS, *Plumeria L*, Apocynaceae, *Pseudosphinx tetrio L*.

Introduction

Approximately 1,700 volatile compounds have been isolated from more than 90 families of plants, constituting around 1% of all secondary metabolites in plants [1]. Different analytical methods have been developed to determine volatile constituents present in flowers, honey, and different parts of plants [2,3]. CG-EM is one of the most commonly used techniques for the analysis of volatile compounds in plants. It has been used to characterize the profile and perform volatile study of different varieties of fruits and vegetables, such as apple, passion fruit, banana, and mango [4–7]. Solid-phase micro extraction (SPME) technique is free of solvents, rapid, and inexpensive for the extraction of volatile metabolites [8]. It combines the extraction and pre-concentration steps in a single step, which is performed by a modified syringe-type device. This technique provides much faster preparation of the sample than most traditional ones [4]. Several fiber coatings are commercially available for the extraction of volatile compounds. The principle of partition of the headspace (HS) and SPME involves the analytical equilibrium between the fiber and the sample [4,9].

Volatile organic compounds have been reported to serve some important roles in plant communication, but little is known about the biological functions of most of these substances. Fragrances emitted by flowers serve as the means of orientation and attraction for their pollinators of interest. Some volatile compounds emitted by plants

act as a defensive material, either to ward off predators, promote allelopathic interactions, or attract insects to act on their behalf [10]. Each plant species and subspecies can emit different scents composed of volatile metabolites that are produced by diverse metabolic routes, thus leading to distinctive olfactory sensations. In addition, the scents of different flowers have altered compositions depending on their growth stage, climate, nutrient availability, or predator attacks [11,12]. Therefore, the composition and timing of these volatile fingerprints is variable and intrinsically linked to diverse ecological conditions [13–15]

Plumeria L. is a genus of the family Apocynaceae belonging to the Magnoliophyta division of Magnoliopsidas class or dicots from the order of Gentianales. These shrubs or small trees are native to Mexico and are well known for their strongly scented flowers that appear in different colors [16]. Several species of this genus have been described, for example, *P. alba*, *P. odorless*, *P. obtusa*, *P. prudish*, *P. rubra*, *P. stenopetala*, *P. stenophylla*, and *P. lancifolia* that are popularly called the love flowers. Many *Plumeria* species are known to have medicinal properties and have been used by Indian and tribal groups in India as antiulcer, antitumor, and analgesic agents [17]. *Plumeria* is also the main host of tetro sphinx moth *Pseudosphinx tetrio L.* [18].

Multiple metabolic routes may produce volatile compounds, and various *Plumeria* species and subspecies emit distinctive scents that lead to altered olfactory sensations. Pharmacological properties such as anxiolytic, anti-inflammatory, antinociceptive, anti-diarrheal, and skin healing have also been reported for the essential oils of *Plumeria* species [19–21] Linalool, a primary constituent of *P. alba* floral scent, is an enantiomeric monoterpene that occurs naturally as two isomeric optical forms: *R*-(-)-linalool and *S*-(+)-linalool that exhibit entirely different sensorial properties as well as different physiological effects. *R*-(-)-linalool has a fresh, lavender aroma that is reminiscent of lily of the valley, whereas *S*-(+)-linalool has an herbaceous, musty smell, closer to a citric note. *R*-(-)-linalool has lavender-like sedative effects on the autonomic nervous activity and mood states at a very low intensity, whereas *S*-(+)-linalool shows the opposite effects [22]. In agriculture linalool has already demonstrated an ability to induce reduction in cell size and abnormal germination and increase membrane permeability [23].

In this study, we performed HS-SPME/CG-EMdetermination of the volatile compounds from floral scents of three *Plumeria* species (*P. alba*, *P. obtusa*, and *P.*

rubra) collected at different periods to understand the temporal variation in the floral scent production of *Plumeria* and identified their major volatile constituents.

Results and discussion

The initial headspace (HS) and solid-phase micro extraction (SPME) analysis was performed to verify the best SPME fiber for use in the extraction of volatile components from *Plumeria* flowers. Three fibers were shortlisted based on the nature of their coating and affinity to the volatile polarity. Total ion chromatograms (TIC) obtained with 50/30 μm DVB-CAR-PDMS fiber and CG-EM detection resulted in a larger number and intensity of the individual metabolite peaks (Figure 1). All subsequent identifications of volatiles from the flowers was therefore performed at 40 $^{\circ}\text{C}$ with the SPME 50/30 μm DVB-CAR-PDMS fiber.

A total of 18 volatiles were identified in the flowers of *P. alba* collected at nighttime, multiple monoterpene and sesquiterpene metabolites (Table 1). These molecules played important role in volatile signaling during plant-plant and plant-animal interactions, their detection and quantification were therefore critical for study of plant volatile metabolism [12], [24]. Among all volatile compounds, linalool and phenylethanol were the major diurnal constituents accounting for 86.5% and 5.8% of TIC, respectively of the total chromatogram area.

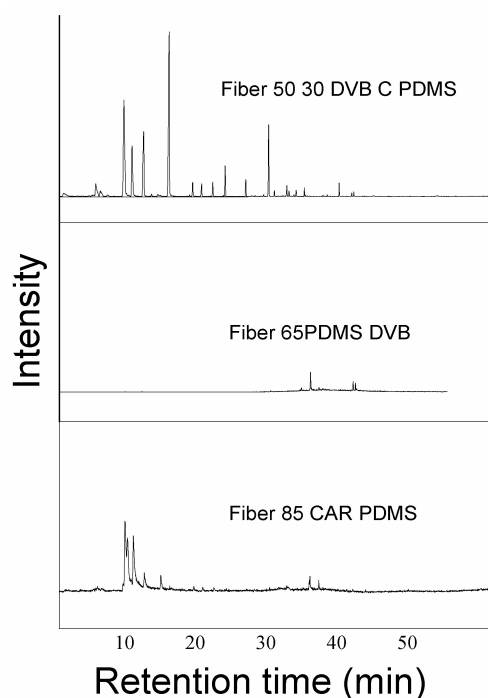


Figure 1. Comparison analysis of total ion chromatograms (TICs) obtained by a combination of headspace (HS) and solid-phase micro extraction (SPME) with gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) from *P. obtusa* floral scent using (A) 85 μm CAR-PDMS fiber, (B) 65 μm PDMS/DVB fiber, and (C) 50/30 μm DVB-Carboxen-PDMS fiber.

At nighttime, the proportion of linalool present in the floral scent volatile fraction decreased to 71.0%, while phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde increased to 15.4% and 2.4%, respectively (Figure 2). Both phenylpropanoid pathway derivatives seemed to be major contributors to the enhanced floral scent at night. They also act as powerful insect attractants and each attracts different sets of pollinating and predatory insects [25].

Table 1. Content (%) of volatiles compounds identified of three *Plumeria* species.

Compounds	RT ^a	IA ^b	IA ^c	<i>P. alba</i>		<i>P. obtusa</i>		<i>P. rubra</i>	
				day	night	day	night	day	night
<i>E</i> -hex-3-enol	5.83	853	850	1.0	1.3	-	-	-	-
benzaldehyde	8.30	951	952	-	-	2.4	2.7	-	-
benzyl alcohol	10.54	1033	1026	-	-	4.4	4.7	1.6	-
β -ocimene	10.67	1039	1044	0.1	-	-	-	-	-
2-phenylacetaldehyde	10.80	1040	1036	-	2.3	0.8	1.3	0.6	0.8
<i>E</i> -linalool oxide	12.28	1091	1084	0.5	1.2	-	-	-	-
methyl benzoate	12.58	1095	1088	-	-	14.6	27.2	55.9	62.3
linalool	12.79	1102	1095	86.5	71.0	-	-	8.3	13.0

phenylethanol	13.17	1110	1106	5.8	15.4	10.3	9.6	21.7	13.0
epoxylinalool	14.90	1176	1170	-	0.5	-	-	-	-
2-phenylacetic acid methyl ester	14.99	1179	1175	0.5	0.4	-	-	0.7	-
methyl salicylate	15.52	1196	1190	0.1	0.3	30.2	20.6	2.2	2.5
cinnamyl alcohol	17.20	1254	1259	-	0.4	-	-	-	-
eugenol	20.25	1359	1356	-	0.04	-	-	-	-
α -copaene	20.86	1380	1374	0.08	0.09	1.2	3.4	-	-
β -elemene	21.29	1393	1389	0.08	0.07	-	-	-	-
β -farnesene	22.08	1438	1440	-	0.08	-	2.4	-	-
β -caryophyllene	22.09	1421	1417	0.05	-	-	-	-	-
pentyl benzoate	22.45	1474	1476	-	-	4.7	8.9	1.2	0.9
α -farnesene	23.86	1509	1505	0.2	0.2	0.4	1.6	-	-
δ -cadinene	24.20	1523	1522	0.07	-	-	-	-	-
pentyl salicylate	24.36	1570	1574	-	-	3.8	-	-	-
dendrolasin	25.00	1573	1570	2.1	2.8	-	-	-	-
benzyl benzoate	27.31	1751	1759	0.04	0.2	10.7	5.9	0.6	-
benzyl salicylate	28.32	1869	1864	-	0.08	0.8	-	-	-
Total				97.5	96.8	86.0	88.8	92.4	92.8

^a retention time in minutes; ^b arithmetic index calculated; ^c arithmetic index tabled.

An analytical curve was constructed using a linalool standard that provided a linear response with the following equation: $Y = 194321X + 1.108$, with $R^2 = 0.9923$, where Y is an area of the peak and X is a concentration of the metabolite in ppm. Thus, it was possible to determine the concentration of linalool of 1660.7 ppm in the flowers of *P. alba* collected during daytime and 773.6 ppm during the nighttime.

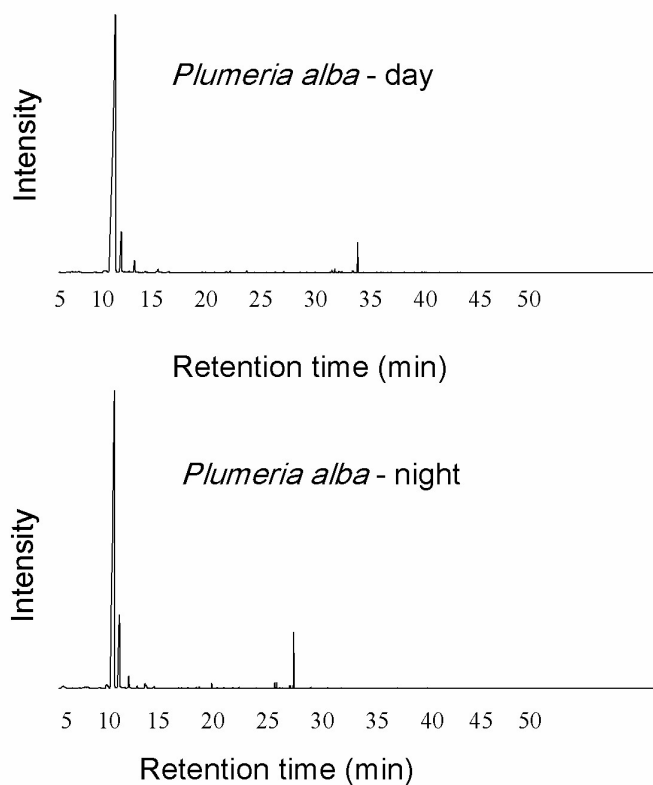


Figure 2. Volatile emission from flowers of *P. alba*. GC–MS chromatograms of volatiles collected from flowers during (A) day and (B) night time.

The volatiles of red flowers from *P. rubra* collected during the day comprised a total of 9 compounds, with methyl benzoate (55.9%), phenylethanol (21.7%), and linalool (8.3%) as the major constituents (Figure 3). Nighttime collection has not changed this profile for methyl benzoate and linalool, detected at 62.3% and 13.0%, respectively (Table 1). However, phenylethanol production was measured at half the diurnal levels (13.0%). Low levels of linalool production comparing to *P. alba*, as well as a strong decrease in phenylethanol during the nighttime, could possibly explain tetrio sphinx moth’s preference to damage and defoliate *P. alba*.

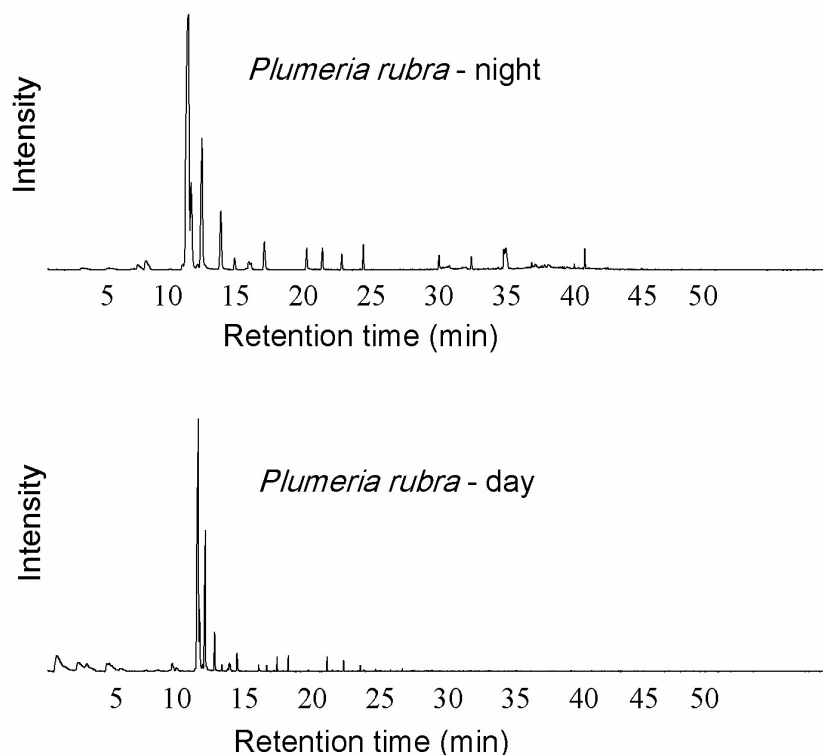


Figure 3. Volatile emission from flowers of *P. rubra*. GC–MS chromatograms of volatiles collected from flowers during (A) day and (B) night time.

A total of 12 compounds were detected in the volatiles of *P. obtusa* during the day-time, with methyl salicylate (30.2%), methyl benzoate (14.6%), benzyl benzoate (10.7%) and phenylethanol (10.3%) being the major constituents (Figure 4). An interesting observation was a complete lack of linalool in the floral scents from this species (Table 1). These compounds were also derived from the phenylpropanoid pathway via formation of *trans*-cinnamic acid following a branching point to benzoic and salicylic acids that are direct precursors for the synthesis of important floral scents methyl salicylate and methyl benzoate. We also observed a significant increase in methyl benzoate (27.2%) and a respective decrease in methyl salicylate (20.6%) in *P. obtusa* floral scent collected at night. In addition, pentyl salicylate appeared only in volatiles of the day-time collection, while β -farnesene was present only in flowers collected at night.

Tetrio sphinx moth prefers to feed on the leaves of *P. alba* and considering that the white color of the flowers facilitates the approach for the adult insect with nocturnal habit, it is suggested that the combination of linalool and phenylethanol together with

the color of the flowers could influence the plant-animal relationship, where these substances would have actions such as that by a hormone that influences this approach.

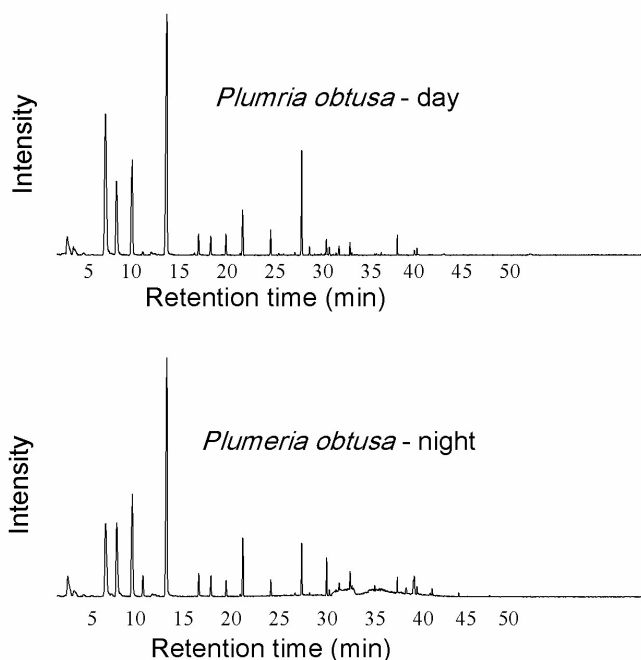


Figure 4. Volatile emission from flowers of *P. obtusa*. GC–MS chromatograms of volatiles collected from flowers during (A) day and (B) night time.

Material and Methods

Plant material

The flowers of *P. alba*, *P. rubra*, and *P. obtusa* were collected in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The samples were collected in the morning and in the evening, during the month of February when they were in full bloom. Voucher specimens of all species were deposited at the herbarium of the Department of Botany, Federal University of Viçosa, under voucher specimen 47840, 47841 and 47847.

HS-SPME analysis

The extraction was performed with the 85- μm carboxen-polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), 65- μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and 50/30-

μm Supelco divinylbenzene-Carboxen- polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Bellefonte, PA, USA) fibers. The flowers (2 g) were inserted into individual vials. The fibers were exposed to floral scent volatiles for 30 min in the headspace (HS) and evaluated at three different temperatures: 26 °C (ambient), 30 °C, and 40 °C. Following the exposure, the fibers were inserted into the CG-EMinjector for further analysis [26].

GC-MS analysis

A gas chromatograph with mass detector Shimadzu QP 5050A equipped with a SE-54 column (length 30 m, internal diameter 0.25 mm) was used for the CG-EManalysis. The fiber containing the volatiles was exposed to the injector for 5 min at 250 °C in the splitless mode, increasing by 5 °C every minute until reaching 150 °C, then increasing 15 °C per minute until reach 250 °C, remaining during 5 min at 250 °C. Helium was used as the carrier gas at a constant rate of 1.2 mL min⁻¹. The electron impact ionization (EI) mode was used for measurements, and the scanning was performed at 40-470 *m/z* [27].

The volatile compounds were identified by comparison of their mass spectra with standard spectra in the NiST11 and Wiley analytical libraries, and also by comparing their retention index (RI), calculated by using the standard series of C₇-C₃₀ hydrocarbons (Bellefonte, PA, USA) (Adams, 2007). The relative amounts of each compound were calculated by integrating the peak area [28].

Quantitative determination of linalool

The standard sample of linalool, (*R*)-(-)-3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol (98% pure) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA) was used to establish the analytical calibration curve by plotting peak areas against different corresponding concentrations in quintuplicate. The total release of linalool from flower was quantified in ppm using five solutions diluted in the concentrations of 500, 1000, 2000, 4000 and 6000 ppm were made from a stock solution of linalool 10000 ppm in dichloromethane.

Conclusions

A total of 26 compounds were identified in the floral scents of three *Plumeria* species collected during the day and at night. All species showed diurnal and nocturnal variations in the relative composition of their volatile metabolites. The difference was most prominent when we compared floral scents from *Plumeria alba* flowers. Linalool in *P. alba*, methyl salicylate in *P. obtusa*, and methyl benzoate in *P. rubra* were present in the largest quantities for both collection times. The differences in the compositions suggested the existence of diverse mechanisms used by *Plumeria* to attract insects as their pollinators. Understanding the various changes in the emission of volatiles and their animal plant interactions can help in the development of new products and good practices of agricultural management.

Acknowledgements

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (research fellowships to AJD, LCAB, ESA, MHS), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), RQ-MG, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (research fellowship to NCR).

References

- ¹ Maffei ME. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African J Bot* 2010; 76: 612–631
- ² Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4647–4652
- ³ Robotti E, Campo F, Riviello M, Bobba M, Manfredi M, Mazzucco E, Gosetti F, Calabrese G, Sangiorgi E, Marengo E. Optimization of the Extraction of the Volatile Fraction from Honey Samples by SPME-GC-MS, Experimental Design,

- and Multivariate Target Functions. *J Chem* 2017; 101–114
- 4 Pontes M, Marques JC, Câmara JS. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. *Microchem J* 2009; 93: 1–11
- 5 Facundo HV de V, Garruti D dos S, Dias CT dos S, Cordenunsi BR, Lajolo FM. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. *Food Res Int* 2012; 49: 626–633
- 6 Kulkarni RS, Chidley HG, Pujari KH, Giri AP, Gupta VS. Geographic variation in the flavour volatiles of Alphonso mango. *Food Chem* 2012; 130: 58–66
- 7 Veres K, Csupor-Löffler B, Lázár A, Hohmann J. Antifungal Activity and Composition of Essential Oils of *Conyza canadensis* Herbs and Roots. *Sci World J* 2012; 2012: 1–5
- 8 Gholivand MB, Piryaei M, Abolghasemi MM, Maassoumi SM. Rapid analysis of volatile components from *Teucrium polium* L. by nanoporous silica-polyaniline solid phase microextraction fibre. *Phytochem Anal* 2013; 24: 69–74
- 9 Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J Chromatogr A* 2000; 885: 153–193
- 10 Meekijjaroenroj A, Bessièrè JM, Anstett MC. Chemistry of floral scents in four *Licuala* species (Arecaceae). *Flavour Fragr J* 2007; 22: 300–310
- 11 Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, McDade LA. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination „syndromes“ in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 2003; 63: 265–284
- 12 Steenhuisen SL, Raguso RA, Johnson SD. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function.

- Phytochemistry 2012; 84: 78–87
- ¹³ Carrasco D, Larsson MCMC, Anderson P. Insect host plant selection in complex environments. *Curr Opin Insect Sci* 2015; 8: 1–7
- ¹⁴ Grulova D, De Martino L, Mancini E, Salamon I, De Feo V. Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha x piperita* L. *J Sci Food Agric* 2015; 95: 621–627
- ¹⁵ Hassan EM, Shahat AA, Ibrahim NA, Vlietinck AJ, Apers S, Pieters L. A new monoterpene alkaloid and other constituents of *Plumeria acutifolia*. *Planta Med* 2008; 74: 1749–1750
- ¹⁶ Chatterjee M, Verma R, Lakshmi V, Sengupta S, Verma AK, Mahdi AA, Palit G. Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Asian J Psychiatr* 2013; 6: 113–118
- ¹⁷ Shinde PR, Patil P. S., Bairagi VA. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. *Sch Acad J PharmacyOnline) Sch Acad J Pharm* 2014; 3: 2320–4206
- ¹⁸ Squyres S. The tropical frangipani caterpillar, *Pseudosphinx tetrio*, can grow up to 6 inches in length. *Wilderness Environ Med* 2014; 25: 127–128
- ¹⁹ Hamburger MO, Cordell GA, Ruangrunsi N. Traditional medicinal plants of Thailand XVII Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. *J Ethnopharmacol* 1991; 33: 289–292
- ²⁰ Siddiqui S, Siddiqui BS, Naeed A, Begum S. Pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry* 1989; 28: 3143–3147
- ²¹ Tohar N, Awang K, Mohd MA, Jantan I. Chemical composition of the essential oils of four *Plumeria* species grown on Peninsular Malaysia. *J Essent Oil Res* 2006; 18: 613–617

- 22 Siani AC, Tappin MRR, Ramos MFS, Mazzei JL, Ramos MCK V, De Aquino Neto FR, Frighetto N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3518–3521
- 23 Varona S, Martín Á, Cocero MJ. Formulation of a natural biocide based on lavender essential oil by emulsification using modified starches. *Chem Eng Process Process Intensif* 2009; 48: 1121–1128
- 24 Pinto-Zevallos DM, Strapasson P, Zarbin PHG. Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. *Phytochem Lett* 2016; 16: 70–74
- 25 Tieman D, Taylor M, Schauer N, Fernie AR, Hanson AD, Klee HJ. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 8287–8292
- 26 Serrano M, Silva M, Gallego M. Determination of 14 haloketones in treated water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2015; 1407: 208–215
- 27 Chou C-C, Lee M-R. Determination of organotin compounds in-water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1064: 1–8
- 28 Álvarez G, Ammagarahalli B, Hall DR, Pajares JA, Gemeno C. Smoke, pheromone and kairomone olfactory receptor neurons in males and females of the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Coleoptera: Cerambycidae). *J Insect Physiol* 2015; 82: 46–55

Anexo III – ARTIGO SENDO FINALIZADO PARA SUBMISSÃO. Vibrational analysis of the linalool molecule using the complementary techniques of infrared, raman and dft calculation

ABSTRACT

In this study, we used both infrared and Raman spectroscopy to detect the vibrations of linalool, a volatile constituent of the floral scent *Plumeria alba*. We directly compared the frequencies of the experimentally measured IR and Raman spectra with our calculated values to identify the spectral bands of linalool. We found these complementary techniques to be of great use in identifying bands in the region known as the fingerprint. This spectroscopy combination can be used to identify the bands of other constituents in regions that are difficult to analyze, such as those with a large number of or overlapping bands. They can also be used to identify new compounds or bands not yet identified in known compounds. To our knowledge, this paper is the first to report the use of complementary techniques such as Raman, infrared, and density functional theory in the identification of linalool stretching modes.

INTRODUCTION

Linalool (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol) is a monoterpene that is common in the essential oils of many plants. It is an important chemical component in the formulation of aromas and is often used as a fragrance in the cosmetic industry.¹ It also is characterized by a range of biological activities, including having anti-microbial, antidepressant, antitumoral, pesticidal, antioxidant, and anti-inflammatory effects.^{2,3} Linalool prevents oxidative stress in activated protein kinases in single UVB-exposed human skin cells.⁴ Psychopharmacological *in vivo* evaluations of linalool have shown this compound to have dose-dependent sedative effects on the central nervous system, including sedative, hypnotic, anticonvulsant, and anxiolytic properties. It is found in many plants, including *Cananga odorata*, *Citrus aurantium*, *Citrus bergamia*, *Coriandrum sativum seed oil*, *Melissa officinalis*, *Pelargonium roseum*, and *Salvia sclarea*.^{5,6,7}

Linalool is an enantiomeric monoterpene that occurs naturally in two isomeric optical forms *R*-(-)-linalool and *S*-(+)-linalool—that exhibit entirely different sensorial

properties as well as different physiological effects. *R*-(-)-linalool has a fresh, lavender aroma reminiscent of lily of the valley, whereas *S*-(+)-linalool has a herbaceous, musty smell, which is often described as having a citric note. *R*-(-)-linalool has low-intensity sedative effects on the activity of autonomic nerves and mood states, whereas *S*-(+)-linalool has opposite effects.^{8,9}

Infrared (IR) and Raman spectral analyses, combined with theoretical calculations, have been successfully used to differentiate two limonene conformations based on the position of the isopropenyl group, which is critical in the analysis of chiral molecules of this type.¹⁰

Raman spectroscopy has also been used in a practical way to distinguish between oleanolic and ursolic acids, due to their very similar structures, which, in some cases, occur as isomeric mixtures.¹¹

The combined use of Raman and IR spectroscopies for the identification of natural products has been reported for carotenes. The spectra of several plant species have been observed by focusing on the location of the C=C stretching vibrations. The authors concluded that these can be influenced with respect to their length, the terminals of the carotenoid chain substituents, and by the presence of other compounds in the plant.¹² Raman spectrometry is unique in providing detailed and comprehensive information about the chemical components of plants in evaluations of both fresh and processed materials, thereby facilitating differentiation based on the major bands present in the different spectra of plant species and even between chemotypes of the same species.^{13,14}

Complementary Raman and IR spectroscopic techniques have also been used to characterize the essential oils in various plant species.^{15,16} Studies have obtained vibrational spectra using both techniques on essential hydro-distillated oils from dry plant material that show the characteristic bands of the main individual volatile components (e.g., carvacol, thymol, *p*-cymene, γ -terpinene, camphor, 1,8-cineole, α - and β -pinene).^{15,17} Using principal component analysis to analyze spectral data has allowed for a clear distinction between species and has confirmed the potential of vibrational techniques in replacing conventional methods in the quality control assessments of current distillation processes.^{15,18} IR and Raman spectroscopy techniques have also been used in the identification of essential oils.^{15, 19, 20}

The monoterpene linalool (Figure 1) is the major volatile constituent of the floral scent *Plumeria alba*, which plants produce diurnally and nocturnally. To investigate the

molecular characteristics of the bonds responsible for the molecular interactions in linalool, we used the above combined vibrational spectral analyses together with density functional theory (DFT) to calculate the structural and electronic effects such as induction and hyperconjugation to completely assign all bands in the spectra.

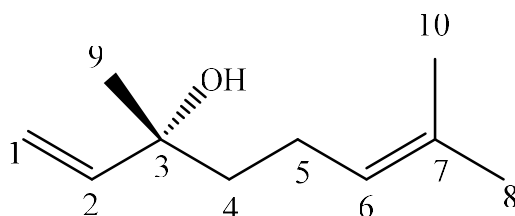


Figure 1. Structure of *R*-(-)-linalool

EXPERIMENTAL

We recorded IR spectra on a Perkin Elmer Paragon 1000 Fourier transform infrared (FTIR) spectrophotometer in the attenuated total reflection mode, scanning in a range from 400 to 4000 cm^{-1} . Using the linalool standard (Sigma Aldrich), we recorded Raman spectra on a Renishaw inVia spectrometer equipped with three excitation lines (514.5 nm, 633 nm, and 785 nm) and mapping and controlled polarization. Linalool structure was drawn in GaussView (<http://www.gaussian.com>) and cleaned by a native tool. The structure was optimized using Gaussian 09.²¹ before IR and Raman spectra calculations using the hybrid functional B3LYP and the basis set 6-31+G(d,p). Molecular vibrations (stretching and bending) is visualized by opening the output file (log file) in GaussView. The theoretical frequency values were corrected by multiplying by a scaling factor of 0.964 as determined from data in the Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase. This was done to better match experimental vibrational frequencies. This scaling compensates for the approximate electronic structure calculation.

RESULTS AND DISCUSSION

METHYL GROUP VIBRATIONS

Based on our IR and Raman data, and confirmed by our calculations, the three methyl groups showed different types of vibrations. The CH₃ (C8 and C10) presented an asymmetric deformation with a medium intensity peak in the IR spectra at 978 cm⁻¹, which was absent in the Raman data. A medium intensity peak was observed at 1359 cm⁻¹ in the IR spectra, while in the Raman this peak was even of lower intensity. This peak was assigned to deformation of CH₃ (C9, movement like the closing petals of a flower). The peaks at 2965 and 2924 cm⁻¹ are due to CH₃ symmetric stretch (C8 and C10). These peaks are the most intense in the Raman spectrum.

ALKENE GROUP VIBRATIONS

Angular deformation of the methylene group resulted in a band of low intensity in the IR at 670 cm⁻¹. IR tables in text books describe bands in 995-980 cm⁻¹ and 915-905 cm⁻¹ for terminal alkenes. A medium intensity band at 1392 cm⁻¹ was due to the scissoring movement of the methylene (deformation of the CH₂). The strongest peak at the IR was provided by the methylene wagging vibration at 917 cm⁻¹ (out-of-plane bending).

Low-intensity peaks occur at 1642 cm⁻¹ in the IR spectra and at 1641 cm⁻¹ in the Raman spectra due to the stretching vibration of C1 and C2 double bond. The C=C stretching vibration of C6-C7 (1672 cm⁻¹) arises at higher wavenumber than C1-C2 vibration (1642 cm⁻¹). This can be explained by the force constant of the C6-C7 double bond (11.4) which is greater than the force constant of the C1-C2 double bond (8.1).

HYDROXYL GROUP VIBRATIONS

In the IR spectrum, a broadband appears at 3389 cm⁻¹ due to the O-H stretching vibration. Although the calculated Raman activity (normalized value of 38.2) was greater than the IR intensity (normalized value of 19.8), the band due to O-H absorption was not observed in the experimental Raman.²² According to theoretical calculations, the O-H vibration absorption occurs at 3668 cm⁻¹, which is typical of molecules with no hydrogen bonding. The difference between the experimental (3389 cm⁻¹) and the calculated wavenumber (3668 cm⁻¹) is because the theoretical calculation was performed for a single molecule in the vacuum.

OTHER FEATURED PEAKS

Four other peaks were evident in the IR spectrum, which were of low intensity or not present at all in the Raman spectrum, but all of which we confirmed by theoretical calculation. Low intensity peaks occur in the IR spectrum at 520 and 747 cm^{-1} , due to CH_2 of C4 and C5 deformation (CH_2 twist). A peak at 834 cm^{-1} of medium intensity is present in the IR due to $=\text{CH}$ (of C6) deformation.

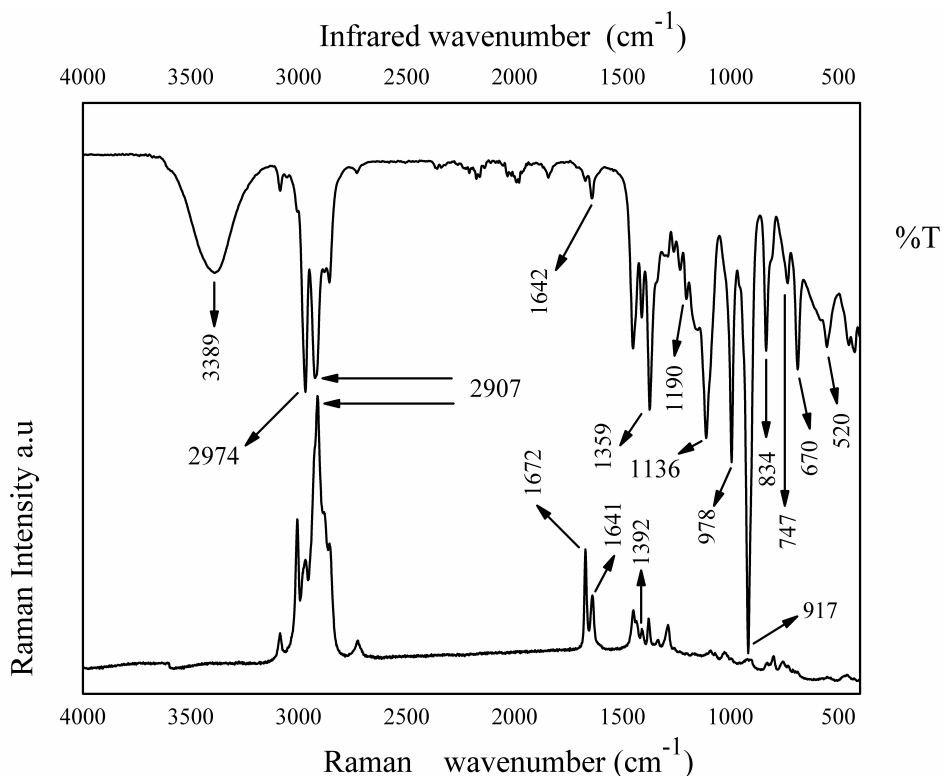


Figure 2. Experimental Raman and Infrared spectra of *R*-(-)-linalool.

CONCLUSION

In this study, we combined the use of IR and Raman spectral analyses together with DFT theoretical calculations to yield 20 vibration peaks characteristic of linalool. Using this combined approach, some of the peaks could be easily identified, including the CH_3 stretches between 2924 and 2969 cm^{-1} and the well-known O-H vibration at 3389 cm^{-1} .

Compared to the use of individual analysis methods, the proposed combined use of IR and Raman spectral analysis and DFT calculations offer an alternative approach to study the wealth of information characteristic of linalool. The IR was richer in details than the Raman spectrum of linalool because the peaks in the IR were more defined and distinct. However the combination of IR, Raman and theoretical calculation could be a more definitive form of identification of this natural product.

Table 1. Comparison of theoretical and experimental IR and Raman vibrational frequencies and assignments of the bands for linalool.

ν Calculated cm ⁻¹ *	ν IR exp. cm ⁻¹	ν Raman exp. cm ⁻¹	IR intensity**	Raman activity**	Depolar (μ)	Depolar (p)	Force constant	Assignments
520	520	-	7.9	0.4	0.8542	0.7455	0.4789	δ CH ₂ (C ₅)
672	670	-	26	0.1	0.8430	0.7286	0.5211	δ =CH ₂ (C ₁)
749	747	-	7.5	2.4	0.1010	0.0532	0.7141	δ CH ₂ (C ₄ and C ₅)
831	834	-	17	1.2	0.8565	0.7491	0.6400	δ CH (C ₆)
917	917	-	59	1.3	0.7976	0.6633	0.7229	δ =CH ₂ (C ₁)
935	938	-	37	2.8	0.6100	0.4388	1.2234	δ CH ₃ (C ₈ and C ₁₀)
978	978	-	6.1	0.4	0.6968	0.5347	0.7768	δ CH ₃ (C ₈ and C ₁₀)
1139	1136	-	14.8	0.5	0.8567	0.7494	1.5677	δ CH ₂ (C ₄ and C ₅)
1189	1190	-	31.9	0.9	0.5114	0.3435	2.4473	δ CH ₂ (C ₄ and C ₅)
1212	1213	-	6.0	3.0	0.4568	0.2960	1.6290	δ CH ₂ (C ₅)
1248	1247	-	5.7	2.1	0.5537	0.3828	1.4233	δ CH ₂ (C ₄)
1332	1336	-	22	2.9	0.6265	0.4562	1.5281	δ CH (C ₆)
1359	1359	1359	18.0	0.4	0.2639	0.1520	1.4707	δ CH ₃ (C ₉)
1391	1392	1392	5.9	6.9	0.4086	0.2568	1.4745	δ =CH ₂ (C ₁)
1641	1642	1641	12.8	29.7	0.1600	0.0870	8.1136	ν C=C (C ₁ and C ₂)
1671	1672	1672	2.6	37.3	0.3052	0.1801	11.422	ν C=C (C ₆ and C ₇)
2905	2907	2907	51	41.6	0.2687	0.1552	5.5586	ν CH ₃ (C ₈)
2913	2915	2915	100	100	0.1166	0.0619	5.6060	ν CH ₃ (C ₁₀)
2976	2974	2974	20.8	12.1	0.8571	0.7499	6.1650	ν CH ₂ (C ₄)
3668	3389	-	19.8	38.2	0.3722	0.2286	9.0978	ν O-H

ν = stretching; δ = deformation

*the calculated wavenumbers were corrected by multiplying by 0.964. ** IR intensity and Raman activity were normalized.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research fellowships (AJD, LCAB, ESA, MHS). Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and RQ-MG for financial support and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for research fellowship (NCR). We would like to thank Dr Slavko Komarnytsky from North Carolina State University for proofreading the manuscript.

REFERENCES

1. Pragadheesh, V. S.; Chanotiya, C. S.; Rastogi, S.; Shasany, A. K. *Phytochemistry* **2017**, *140*, 83.
2. Elsharif, S. A.; Banerjee, A.; Buettner, A. *Front. Chem.* **2015**, *3*, 1.
3. dos Santos, F. M.; de Souza, M. G.; Miller Crotti, A. E.; Martins, C. H. G.; Ambrósio, S. R.; Veneziani, R. C. S.; Andrade e Silva, M. L.; Cunha, W. R. *Brazilian J. Microbiol.* **2012**, *43*, 793.
4. Gunaseelan, S.; Balupillai, A.; Govindasamy, K.; Ramasamy, K.; Muthusamy, G.; Shanmugam, M.; Thangaiyan, R.; Robert, B. M.; Nagarajan, R. P.; Rathinaraj, P. *PLoS One* **2017**, *12*(5), 1.
5. Cheng, B. H.; Sheen, L. Y.; Chang, S. T. *J. Tradit. Complement. Med.* **2015**, *5*, 27.
6. Adiguzel, A.; Ozer, H.; Sokmen, M.; Gulluce, M. **2009**, *58*, 69.
7. Pinto-Zevallos, D. M.; Strapasson, P.; Zarbin, P. H. G. *Phytochem. Lett.* **2016**, *16*, 70.
8. Siani, A. C.; Tappin, M. R. R.; Ramos, M. F. S.; Mazzei, J. L.; Ramos, M. C. K. V; De Aquino Neto, F. R.; Frighetto, N. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3518.
9. Rustaiyan, A.; Masoudi, S. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 440.
10. Partal Ureña, F.; Moreno, J. R. A.; López González, J. J. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 89.
11. Andrade, L.; Furtado, N. A. J. C.; Cunha, L. C. S.; Martins, C. H. G.; Ademar, A.; Filho, S.; Vinho, A. H. C.; Cunha, W. R. **2007**, *62c*, 668.

12. Baranska, M.; Roman, M.; Cz. Dobrowolski, J.; Schulz, H.; Baranski, R. ;*Curr. Anal. Chem.* **2013**, *9*, 108.
13. Roman, M.; Baranski, R.; Baranska, M. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2011**, *59*, 7647.
14. Trafela, T.; Strli, M.; Kolar, J.; Lichtblau, D. A.; Anders, M.; Mencigar, D. P.; Pihlar, B. ;*Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6319.
15. Schulz, H.; Zkan, G.; Baranska, M.; Krger, H.; Zcan, M. ;*Vib. Spectrosc.* **2005**, *39*, 249.
16. Tankeu, S. Y.; Vermaak, I.; Kamatou, G. P. P.; Viljoen, A. M. ;*Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 234.
17. Sandasi, M.; Kamatou, G. P. P.; Gavaghan, C.; Baranska, M.; Viljoen, A. M. ;*Vib. Spectrosc.* **2011**, *57*, 242.
18. Schulz, H.; Baranska, M.; Belz, H. H.; Rösch, P.; Strehle, M. A.; Popp, J. U. In *Vibrational Spectroscopy.* **2004**, *35*, 81.
19. Asif, M.; Nawaz, H.; Naz, S.; Mukhtar, R.; Rashid, N.; Ahmad, I.; Saleem, M. ;*Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *182*, 168.
20. Vanloot, P.; Bombarda, I.; Kister, J.; Dupuy, N. **2016**, *85*, 79.
21. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, D. J. F.
22. Hu, S.; Smith, K. M.; Spiro, T. G. ;*J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12638.