

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL  
DA ESPÉCIE *Eugenia ovalifolia* Camb.



*Eugenia ovalifolia* Camb.

AURILÚCIA DE ARAÚJO DUARTE

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL  
DA ESPÉCIE *Eugenia ovalifolia* Camb.

AURILÚCIA DE ARAÚJO DUARTE

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:

Dra. LEILA VILELA ALEGRIO

Co-Orientação do Dr. Ronoel Luíz de Oliveira Godoy.

Tese submetida como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
de *Magister Scientiae* em Química  
Orgânica.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO, 1997

TÍTULO DA TESE


**IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL  
DA ESPÉCIE *Eugenia ovalifolia* Camb.**

AUTORA

**AURILÚCIA DE ARAÚJO DUARTE**

APROVADA EM:   /  /  

Prof. Dra. Leila Vilela Alegrio ( DQ-UFRRJ ).



Prof. Dra. Rosane Nora Castro ( DQ-UFRRJ).



Dra. Isabela Miranda de Castro (EMBRAPA-CTAA).



Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima ( DQ-UFRRJ ).



*Dedico à Deus, pois Ele é Aquele  
que me conduz.*

*Para Deus, o sacrifício puro e aceitável é um  
coração contrito. Eis a Oblação agradável!*  
*(Stª Tereza)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo carinho e dedicação.

À Professora Leila Vilela Alegrio pela orientação.

Ao Pesquisador Ronoel Luíz de Oliveira Godoy pela sua co-orientação.

À Dra.Graziela.M.Barroso pela classificação da Espécie estudada.

As irmãs do Carmelo S. Coração de Jesus e Madre Tereza, pela amizade e incentivo; Madre Terezinha e a D. Vital pelo apoio.

Aos amigos(as) do alojamento da Pós-Graduação.

Aos amigos(as) do mestrado, Valter, Denise, Patrícia, Raquel, Celeste e Javier.

Aos amigos(as) da Graduação, Sérgio e Marcela.

Aos amigos (as) do Morro do Cruzeiro.

Aos funcionários da EMBRAPA-CTAA pela colaboração e incentivo.

Aos amigos e professores do Departamento de Química, da Coordenação da Pós-Graduação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xiv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
ABREVIATURAS	xxi
OBJETIVO	xxii
PARTE 1	
INTRODUÇÃO	1
1.1-Família Myrtaceae.	6
1.2-Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Eugenia</i> .	8
1.3-Espécies do gênero <i>Eugenia</i> mais estudadas.	10
1.4-Índice de Kováts.	14
PARTE 2	
DISCUSSÃO	17
2.1-Cromatografia gasosa utilizando coluna capilar polar na análise do óleo essencial de <i>Eugenia ovalifolia</i> Camb.	18
2.2-Cromatografia gasosa utilizando coluna capilar apolar na análise do óleo essencial de <i>Eugenia ovalifolia</i> Camb.	20

	Página
2.3-Análise das tabelas.	21
2.4-Espectros de massas.	25
2.5- Discussão dos espectros de massas através dos principais íons de fragmentação de massas.	29
PARTE 3	
3.0-PROPOSTA BIOSINTÉTICA DOS SESQUITERPENOS.	77
3.1-Correlação biossintética entre os componentes identificados em <i>Eugenia ovalifolia</i> Camb.	97
PARTE 4	
4.0- MATERIAL E MÉTODOS.	100
4.1- Métodos experimentais.	101
4.2- Obtenção do óleo essencial.	101
4.3- Parte instrumental.	102
4.4- Métodos físico-químicos.	103
4.4.1-Índice de refração.	103
4.4.2-Rotação óptica.	103
4.4.3-Cálculo da umidade.	104
4.5-Padrões utilizados.	104
PARTE 5	
5.0- CONCLUSÃO.	105



Página

PARTE 6

**6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

107

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Substâncias predominantes nas espécies <i>Eugenias</i> .	14
Tabela 2 - Constituintes do óleo essencial de <i>E. ovalifolia</i> Camb., identificados por CGAR em coluna polar.	22
Tabela 3 - Constituintes do óleo essencial da <i>E. ovalifolia</i> Camb., identificados por CGAR em coluna apolar.	23
Tabela 4 - Constituintes do óleo essencial de <i>E. ovalifolia</i> Camb., identificados através da comparação do IK ou EM.	24
Tabela 5 - Principais íons de fragmentações de massas encontrados nos sesquiterpenos.	26
Tabela 6 - Os componentes identificados.	28
Tabela 7 - Principais íons de fragmentações do palustrol, globulol, viridiflorol, ledol e epi-globulol.	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1- <i>Eugenia ovalifolia</i> Camb.	8
Figura 2- Distribuição geográfica das espécies estudadas.	9
Figura 3- CGAR do óleo essencial de <i>E. ovalifolia</i> Camb. coluna capilar polar fase estacionária polietileno-glicol (Innowax ) com temperatura programada 1min a 60°C, 4°C/min até 200°C durante 4 min.	19
Figura 4- CGAR do óleo essencial de <i>E. ovalifolia</i> Camb. coluna capilar apolar de fase estacionária 5% difenil e 95% dimetil polisiloxane (Ultra -2 ) com temperatura programada: 1 min a 60 ° C, 4 ° C/min até 200 o C durante 4 min.	20
Figura 5- Espectro de massas do $\alpha$ -pineno.	33
Figura 6- Espectro de massas do limoneno.	34
Figura 7- Espectro de massas do $\beta$ -felandreno.	35
Figura 8- Espectro de massas do $\delta$ -elemeno.	36
Figura 9- Espectro de massas do.germacreno B.	37
Figura 10- Espectro de massas do $\alpha$ -copaeno.	38
Figura 11- Espectro de massas do $\beta$ -maalieno.	39
Figura 12- Espectro de massas do. $\beta$ -bourboneno.	40
Figura 13- Espectro de massas do isocomeno.	41

	Página
Figura 14- Espectro de massas do $\alpha$ -gurjuneno.	42
Figura 15- Espectro de massas do <i>trans</i> -cariofileno.	43
Figura 16- Espectro de massas do $\gamma$ -elemeno.	44
Figura 17- Espectro de massas do longifoleno.	45
Figura 18- Espectro de massas do $\alpha$ -guaiano.	46
Figura 19- Espectro de massas do $\alpha$ -himachaleno.	47
Figura 20- Espectro de massas do $\alpha$ -humuleno.	48
Figura 21- Espectro de massas do allo-aromadendreno.	49
Figura 22- Espectro de massas do viridifloreno	50
Figura 23- Espectro de massas do valenceno.	51
Figura 24- Espectro de massas do $\alpha$ -muuroleno.	52
Figura 25- Espectro de massas do $\beta$ -bisaboleno.	53
Figura 26- Espectro de massas do $\delta$ -cadineno.	54
Figura 27- Espectro de massas do calameneno.	55
Figura 28- Espectro de massas da cadina -1,4- dieno.	56
Figura 29- Espectro de massas do $\alpha$ -cadineno.	57
Figura 30- Espectro de massas do palustrol.	58
Figura 31- Espectro de massas do palustrol <sup>(39)</sup> .	58
Figura 32- Espectro de massas do $\alpha$ -calacoreno.	60
Figura 33- Espectro de massas do espatulenol.	61

	Página
Figura 34- Espectro de massas do globulol.	62
Figura 35- Espectro de massas do viridiflorol.	63
Figura 36- Espectro de massas do ledol.	64
Figura 37- Espectro de massas epi-globulol.	65
Figura 38- Espectro de massas do T-muurolol.	66
Figura 39- Espectro de massas do $\delta$ -selineno.	67
Figura 40- Espectro de massas do $\alpha$ -muuroleno.	68
Figura 41- Espectro de massas do $\beta$ -eudesmol.	69
Figura 42- Espectro de massas do T-cadinol.	70
Figura 43- Espectro de massas do $\alpha$ -muurolol.	71
Figura 44- Espectro de massas do $\beta$ -bisabolol.	72
Figura 45- Espectro de massas do juniper canfor.	73
Figura 46- Espectro de massas do thujsano 2- $\alpha$ -ol.	74
Figura 47- Espectro de massas do 4- $\beta$ -hidroxigermacrena 1(10),5-diene.	75
Figura 48- Espectro de massas do 4- $\beta$ -hidroxigermacrena 1(10),5-diene <sup>(43)</sup> .	75

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -pineno.	33
Esquema 2- Principais íons de fragmentação de massas do limoneno.	34
Esquema 3- Principais íons de fragmentação de massas do $\beta$ -felandreno.	35
Esquema 4- Principais íons de fragmentação de massas do $\delta$ - elemeno.	36
Esquema 5- Principais íons de fragmentação de massas do germacreno B.	37
Esquema 6- Principais íons de fragmentação de massas $\alpha$ -copaeno.	38
Esquema 7- Principais íons de fragmentação de massas do $\beta$ -maalieno.	39
Esquema 8- Principais íons de fragmentação	

	Página
de massas do $\beta$ -bourboneno.	40
Esquema 9- Principais íons de fragmentação de massas do isocomeno.	41
Esquema 10 -Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -gurjuneno.	42
Esquema 11- Principais íons de fragmentação de massas do <i>trans</i> - cariofileno.	43
Esquema 12- Principais íons de fragmentação de massas do $\gamma$ -elemeno.	44
Esquema 13- Principais íons de fragmentação de massas do longifoleno.	45
Esquema 14- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -guaieno.	46
Esquema 15- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -himachaleno.	47
Esquema 16- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -humuleno.	48
Esquema 17- Principais íons de fragmentação de massas do allo-aromadendreno.	49
Esquema 18- Principais íons de fragmentação de massas do viridifloreno.	50

	Página
Esquema 19- Principais íons de fragmentação de massas do valenceno.	51
Esquema 20- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -muuroleno.	52
Esquema 21- Principais íons de fragmentação de massas do $\beta$ -bisaboleno.	53
Esquema 22- Principais íons de fragmentação de massas do $\delta$ -cadineno.	54
Esquema 23- Principais íons de fragmentação de massas do calameneno.	55
Esquema 24- Principais íons de fragmentação de massas da cadina - 1,4 dieno.	56
Esquema 25- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -cadineno.	57
Esquema 26- Principais íons de fragmentação de massas do palustrol.	59
Esquema 27- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -calacoreno.	60
Esquema 28- Principais íons de fragmentação de massas do espatulenol.	61



	Página
Esquema 29- Principais íons de fragmentação de massas do globulol.	63
Esquema 30- Principais íons de fragmentação de massas do viridiflorol.	63
Esquema 31- Principais íons de fragmentação de massas do ledol.	64
Esquema 32- Principais íons de fragmentação de massas do epi-globulol.	65
Esquema 33- Principais íons de fragmentação de massas do T-muurolol.	66
Esquema 34- Principais íons de fragmentação de massas do $\delta$ -selineno.	67
Esquema 35- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -muuroleno.	68
Esquema 36-Principais íons de fragmentação de massas do $\beta$ -eudesmol.	69
Esquema 37- Principais íons de fragmentação de massas do T-cadinol.	70
Esquema 38- Principais íons de fragmentação de massas do $\alpha$ -muurolol.	71

Esquema 39-Principais íons de fragmentação de massas do $\beta$ -bisabolol.	72
Esquema 40- Principais íons de fragmentação de massas do juniper canfor.	73
Esquema 41- Principais íons de fragmentação de massas do thujano -2- $\alpha$ -ol.	74
Esquema 42- Principais íons de fragmentação de massas do 4 $\beta$ -hidroxigermacrena 1(10) ,5-diene.	76

## RESUMO

O óleo essencial do espécimen *Eugenia ovalifolia* Camb. família Myrtaceae (Tribo Myrteae), extraído das folhas através do método de arraste com vapor (coobação) foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) utilizando-se duas colunas de polaridades diferentes, seus componentes foram identificados através da comparação dos índices de Kováts (IK), tempo de retenção ( $t_R$ ) obtidos na literatura, espectros de massas da espectroteca Willey e NIST, auxiliados pela análise dos fragmentos de massas. A separação dos componentes por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Temperatura Programada (CGARTP), permitiu a visualização de três regiões distintas correspondentes aos monoterpenos, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados. Além de revelar 2 componentes majoritários, globulol e viridiflorol, de maiores concentrações. Propostas biossintéticas dos sesquiterpenos permitiram correlacionar todos os componentes identificados.

## ABSTRACTS

The essential oil from a specimen of *Eugenia ovalifolia* Camb. family Myrtaceae (Tribo Myrteae), extracted from the leaves on steam - distillation was analysed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) using two columns of different polarities. The components of this oil were identified through comparison with literature data of the Kovats indexes, retention times, mass spectra from Wiley and NIST collections and also by the fragmentation analyses. The separation of the components by High Resolution Gas Chromatography with Programmed Temperature altered the identification of three different regions corresponding to the monoterpene, identified sesquiterpenes and oxygenated, hydrocarbon sesquiterpenes along with two major components, globulol with lower concentrations and viridiflorol. So substances were also. Biosynthetic proposals for the sesquiterpenes allowed the identification of all identified components.

## ABREVIATURAS

- CG - Cromatografia gasosa.
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.
- CGS - Cromatografia gás-sólido.
- GS - Cromatografia supercrítica.
- CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.
- CCF - Cromatografia de camada fina.
- GA - Ácido giberélico.
- HMG-CoA- 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA.
- HMGS - 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA sintase.
- MVA - Ácido mevalônico.
- NADPH - Nicotinamida adenida dinucleotídeo.
- Pi- Fosfato inorgânico.
- ATP - Adenina trifosfato.
- I PP - Isopentenil difosfato.
- DMAPP - Dimetil alil pirofosfato.
- GPP - Geranil difosfato sintase.
- FPP - Farnesil difosfato sintase.
- R-NPP- R-Nerolidil pirofosfato.
- S-NPP - S-Nerolidil pirofosfato.
- NPP- Nerolidil pirofosfato.
- CGAR - EM-C - Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas computadorizada.
- eV - Elétrons Volts.
- IK- Índice de Kováts.
- $t_{R,}$  - Tempo de retenção ajustado.
- $t_R$  - Tempo de retenção.
- $T_M$ - Tempo de permanência da fase móvel na coluna.
- CGARTP-Cromatografia gasosa de alta resolução com temperatura programada.
- m/z - Relação massa carga.
- um - Microns.
- o.e - óleo essencial.

## OBJETIVO

O presente trabalho de Tese tem como objetivo, a identificação dos componentes voláteis do óleo essencial de *Eugenia ovalifolia* Camb. utilizando a técnica de cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massas e comparação dos índices de Kovats com os citados na literatura e comparação dos espectros de massas com aqueles existentes nas espectrotecas Willey e NIST.

## **PARTE 1**

### **INTRODUÇÃO**

# INTRODUÇÃO

A utilização de produtos extraídos de plantas, vem de culturas e civilizações que precedem a nossa era. Como parte de rituais religiosos, na cura de doenças, no uso de essências e perfumes, na conservação de alimentos e de múmias. Os nobres e ricos das antigas civilizações gregas e romanas apreciavam principalmente os perfumes de flores de rosas e laranjeiras.

O óleo essencial extraído das flores de laranjeiras era conhecido pelos romanos como "Óleo de Nelori" em homenagem a princesa de Nelora, da Itália<sup>(1)</sup>.

No final do século passado e início do nosso século, estas substâncias despertaram o interesse dos pesquisadores. Notadamente, as substâncias que foram alvo destes pesquisadores eram aquelas envolvidas em princípios de terapia medicamentosa, ou que possuíam propriedades venenosas ou ainda as que faziam parte dos condimentos. As plantas que continham tais substâncias, encontravam-se largamente distribuídas no comércio e eram facilmente cultiváveis.

O isolamento destas primeiras substâncias foi feito através de reações que envolviam a formação de sais. Uma vez que na sua grande maioria tratava-se de bases nitrogenadas, ou seja alcalóides. O isolamento passava por processos de destilação (como no caso dos óleos essenciais e aromas). A determinação estrutural era feita através de reações que envolviam a obtenção de derivados e reações de degradação e, em última instância, partia-se para a tentativa da síntese. Assim nascia a fitoquímica, que tinha como ferramenta de isolamento e determinação estrutural, os métodos químicos.



A necessidade de isolamento e determinação estrutural de outros componentes diferentes daqueles (alcalóides e componentes voláteis) levaram rapidamente ao desenvolvimento dos métodos físico-químicos e mais recentemente dos métodos físicos.

Os processos físico-químicos tiveram início em 1889 com o surgimento da cromatografia de placa, seguida pela cromatografia de papel<sup>(2)</sup>.

O termo cromatografia foi usado pela primeira vez pelo russo Tswett, em 1906, quando separou componentes de extratos de folhas e de gema de ovo. Tal método de separação deu-se através do uso de colunas de vidro recheadas, (com vários recheios) e utilizando-se como eluente, éter de petróleo<sup>(2)</sup>.

O avanço da cromatografia iniciou-se a partir da década de 20, quando Kuhn<sup>(2)</sup> e colaboradores, aperfeiçoaram os trabalhos desenvolvidos por Tswett. Em 1952, foi reintroduzida a cromatografia em papel por Consden e Gordon, dando origem a cromatografia líquida com fase reversa<sup>(2)</sup>.

A cromatografia gás-sólido (CGS), também surgiu em 1941 com Hesse e colaboradores, onde o objetivo era a separação de ácidos graxos, tendo como gás de arraste dióxido de carbono<sup>(2)</sup>.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) teve seu início em 1969 através do protótipo idealizado por Ragner e colaboradores<sup>(3)</sup>. Tornou-se uma arma poderosa na identificação de compostos voláteis, sendo um sistema analítico de virtual importância; onde o CG separa, o EM fornece o peso molecular, e a partir deste, a fórmula estrutural.

Antes do surgimento do CG-EM, a cromatografia gasosa era utilizada basicamente na análise de óleos vegetais derivatizados, óleos essenciais e

hidrocarbonetos derivados do petróleo (que exigiam o uso de padrões e técnicas de co-injeções).

A cromatografia evoluiu muito nestes últimos anos, permitindo a separação e análise de uma grande variedade de substâncias. A partir do aperfeiçoamento das colunas (que inicialmente eram de vidro e empacotadas, que passaram a ser capilares e constituídas de fibra óptica), foi possível um aumento na eficiência e na resistência a altas temperaturas. Com a evolução de fases líquidas tem sido possível a análise de substâncias mais polares.

A partir de 1972 a técnica CG-EM foi considerada completa e confiável na identificação de compostos em misturas complexas.

A confiabilidade dos resultados veio assim gradativamente despertando o interesse para a análise de outras classes de substâncias. Em 1976, um total de 33 derivados trimetilsilanos de iridóides e secoiridóides glicosídeos foram analisados e identificados por CG-EM. Isto possibilitou ainda, propostas da rota biossintética dos componentes identificados, como a aucubina, monotropeina, glicídeos e também secoiridóides<sup>(4)</sup>.

Em 1984, com o uso do CG-EM, foram identificados nos extratos de embriões de sementes de *Cucurbita maxima*, mais de 30 componentes derivados do ácido giberélico (GA). Entre eles o 12  $\alpha$ -hidroxi GA<sub>12</sub>, GA<sub>14</sub>, GA<sub>37</sub> e os 12  $\beta$ -hidroxi-derivados do ácido 6,7-hidroxi caurenóico. Com esta técnica, estes hormônios foram identificados em épocas diferentes de maturação, tanto para a semente como para o fruto<sup>(5)</sup>.

Usando ainda derivados silanizados, triterpenos pentacíclicos do grupo dos ursanos e oleananos, saponinas e ácidos oleanólicos foram identificados do extrato das sementes de *Chenopodium quinoa* Willd.<sup>(6)</sup>

Patitucci e colaboradores<sup>(7.8)</sup>, têm investigado a composição de extratos brutos vegetais ricos em terpenos, com a utilização de padrões e a técnica CG-EM.

O acoplamento do cromatógrafo com fase gasosa ao espectrometro de massas, tem sido fundamental na detecção, identificação, e elucidação estrutural de compostos presentes em extratos vegetais (mesmo em quantidades traços). Um exemplo importante que merece ser citado, vem da identificação de ferômonios presentes em *Samia cynihiaricim* Donovan (*Lepidoptera Satumiidae*).<sup>(9.10)</sup>

A partir do extrato bruto de *Populus augustifolia* James identificou 60 compostos fenólicos e terpenóides<sup>(11)</sup>. Do extrato de *Populus euphratica* Oliv. 55 componentes foram separados e identificados<sup>(12)</sup>, e do extrato de *Populus ciliata* Wall.<sup>(13)</sup>, 50 componentes. A maioria destes compostos foram caracterizados como ácidos, aldeídos e ésteres fenólicos.

## 1.1. FAMÍLIA MYRTACEAE

A família das Myrtaceae apresenta cerca de 100 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. Sua ocorrência mais comum se dá em climas tropicais, subtropicais e regiões marítimas. São conhecidos dois centros de diversificação: os trópicos da América e a Austrália. No Brasil desenvolveu-se principalmente na região sudeste<sup>(16)</sup>.

Seu habitat é muito variado, podendo ser arbusto na Restinga, como árvore de 15-20 metros na Mata Atlântica. São árvores de desenvolvimento lento, mas com 2-3 metros de altura já produzem flores e frutos.

Quase todas as Myrtaceae são nativas da América, exceto o gênero *Tepualia*. Uma das características das Myrtaceae, é que elas apresentam ovário ínfero e frutos carnosos. Outra característica de plantas desta família é o fato de serem lenhosas.

A taxonomia desta família e seu estudo sistemático é muito complexo, devido a falta de informações. As referências utilizadas datam de aproximadamente ,100 anos atrás.

O gênero *Eugenia* caracteriza-se por possuir espécies tetrâmeras, com embrião conferruminado e cotilédone branco. Apresentam hipanto globuloso ou ovóide aderente ao ovário, sendo este bilocular. A maioria dos ovários aparecem agrupados, de placentação axial média e pouca placentação subapical. Os pedúnculos unifloros com bracteólas ou prófilos, são estéries.

Segundo o sistema de A. Cronquist<sup>(17)</sup> apresenta-se da seguinte forma.

Divisão: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida.

Sub-Classe: Rosidae.

Ordem: Myrtales.

Família: Myrtaceae.

Sub-família: Myrtoideae.

Gênero: *Eugenia*.

Espécie: *Eugenia ovalifolia* Camb.

*Eugenia ovalifolia* Camb. (figura 1) - Arbusto pequeno, folhas opostas, inteiras, ovais, quase sésseis e glabras. Flores brancas, dispostas aos pares. Fruto ovóide, pequeno, roxo, adstringente, muito perseguido pelos animais. Encontra-se distribuída pelos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (figura 2). Nomes vulgares: murta, murtinha<sup>(18)</sup>.



Figura 1. *Eugenia ovalifolia* Camb.

## 1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia*.

*Eugênias* são espécies pantropicais. Estima-se que existam aproximadamente 537 espécies. Deste total, cerca de dois terços são brasileiras. Na Índia Ocidental foram encontradas 100 espécies e outra centena na América, (pouquíssima no Uruguai, Argentina e poucas nos Andes e nenhuma espécie nativa no Chile).

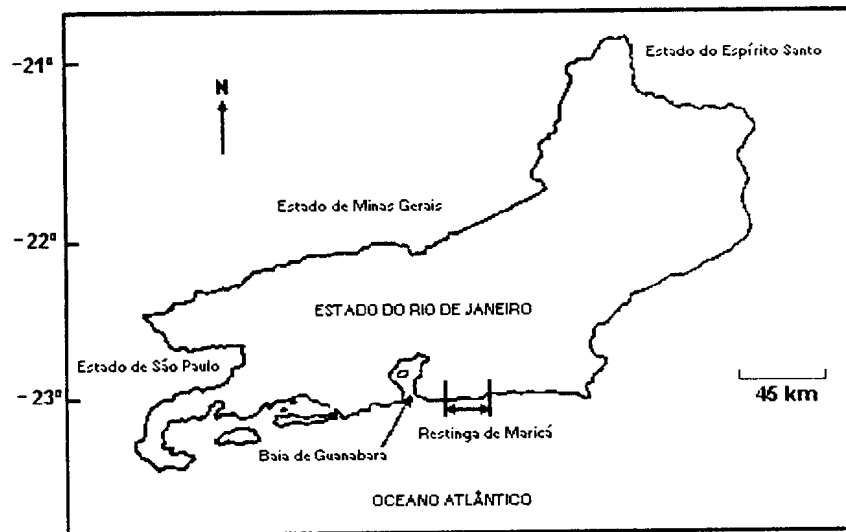


Figura 2. Distribuição geográfica da espécie estudada.

No Brasil em 1994, foi feito um levantamento na Reserva de Macaé de Cima sendo coletadas 15 espécies de *Eugênia*<sup>(19)</sup>. A espécie *Eugenia ovalifolia* Camb. tem sido coletada em restingas do litoral de Maricá, Barra da Tijuca e Recreio dos Bandeirantes. Dez espécies de *Eugenias* têm sido estudadas quanto a anatomia e micromorfologia foliar<sup>(20)</sup>. Na tabela 1 (página 14) são representadas as substâncias predominantes destas *Eugenias*.

### 1.3- ESPÉCIES DO GÊNERO *EUGENIA* MAIS ESTUDADAS.

#### a. *Eugenia uniflora* L.

Ela é encontrada na Austrália e na América. É conhecida como pitangueira, sendo comum em quase todo o território brasileiro, principalmente nas regiões semi-úmida e semi-árida. Desenvolve-se em regiões de clima quente e úmido. Na Nigéria é conhecida como planta ornamental.

Atividades antimicrobiais tem sido encontradas nos óleos voláteis das folhas e frutos frescos de *E. uniflora* L<sup>(21)</sup>. Quanto aos estudos da composição química dos óleos essenciais, dois trabalhos são descritos na literatura<sup>(22,23)</sup>, que descrevem os sesquiterpenos furânicos e os derivados oxigenados selinênicos. Estudos analíticos e físicos em polpa e sementes têm sido feitos<sup>(24)</sup>, o que vem mostrar o interesse no estudo desta espécie.

#### b. *Eugenia javanica* Lamk.

É natural da Tailândia sendo comum na Índia, Malásia, Indonésia e países vizinhos.

Do óleo essencial das folhas de *E. javanica* Lamk, foram identificadas 61 substâncias, Em maiores concentrações os terpenos,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cimeno e terpineno-4-ol, o cariofileno, cadinol e muurolol<sup>(25)</sup>.



Do extrato etanólico das flores foram isolados flavanóides e  $\beta$ -sistosterol.<sup>(26)</sup>

c. *Eugenia banderensis* Urb.

É uma árvore de 15 metros, natural do Brasil, mas pode ser encontrada em Cuba, Austrália e outros países da América do Sul.

Do óleo essencial das folhas foram identificados 18 componentes, sendo em maior proporção o T-muurolol<sup>(27)</sup>.

d. *Eugenia jambos* L.

É uma planta nativa do Oeste da Índia e cultivada no sudeste da Flórida. É conhecida pelo aroma doce. Os componentes voláteis dos frutos identificados em maiores quantidades foram: *cis* 3-hexen-1-ol, hexalinalol, 3-fenil, 1-propanol, álcool cinamílico, e o cinamaldeído<sup>(28)</sup>.

e. *Eugenia caryophyllata* Thumb.

Iwamuro e colaboradores<sup>(29)</sup>, identificaram 110 compostos; entre eles humaladienona, humalol, humuleno, epóxido II, humulenol II, alguns sesquiterpenos, o  $\beta$ -cariofileno e o cariofila-3-(12) e 6 dien-4-ol. O componente predominante foi o acetato de eugenol.

f. *Eugenia kurzii* Duthie.

Nativa da Índia cresce no Himalaia. Da parte aérea foram isolados os seguintes compostos: 3-C-metilapegenina 5-0-ramnose, 3-C-metiluteolina, 5-0 ramnose, o 7,4 dimetil-3-C metil-apegenina e 7, 3', 4' trimetil 3-C metiluteolina<sup>(30)</sup> .

g. *Eugenia cachoeirensis* Berg.

Do extrato etanólico bruto da madeira da *E. cachoeirensis* Berg foi isolada uma mistura de dois triterpenóides pertencentes ao grupo oleanano e ursano.<sup>(31)</sup>

Henrique e colaboradores<sup>(32)</sup>, estudaram a composição química de 6 espécies de *Eugenia* que ocorrem no Brasil, entre elas a *E.scuechiana* Berg.

h. *Eugenia biflora* (L.) DC.

O seu nome vulgar é murta e encontra-se principalmente em Manaus. Foi analisada pelo método CG-EM e outras técnicas convencionais. As substâncias identificadas foram  $\beta$ -amirina e eucaliptina.<sup>(33)</sup>

i. *Eugenia jambolana* Lamk.

É uma planta nativa dos trópicos que foi introduzida no Brasil. A análise do óleo essencial extraído das folhas e frutos permitiu a identificação de 15 componentes, sendo 10 monoterpenos e 5 sesquiterpenos.<sup>(34)</sup>

j. *Eugenia brasilienses* Lam.

O óleo volátil extraído das folhas por hidrodestilação, e investigado por CG-EM, revelou a presença de limoneno (13%),  $\alpha$ -pineno (10,9%), 1,8-cineol (7,4%)  $\beta$ -pineno (6,1%) e linalool (6%) como componentes majoritários.<sup>(35)</sup>

Tabela 1. Substância predominantes nas espécies *Eugenias*.

Nome	Substâncias	Referências
<i>Eugenia uniflora</i> L.	furanodieno	22,23
<i>Eugenia javanica</i> Lamk.	$\alpha$ -pineno	25
<i>Eugenia banderensis</i> Urb.	T-muurolol	27
<i>Eugenia jambos</i> L.	<i>cis</i> -3-hexen-1ol	28
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	humuleno	29
<i>Eugenia kurzii</i> Duthie.	3-C-metilapegenina	30
<i>Eugenia cachoeirensis</i> Berg.	triterpenoides	
	oleanânicos	31
<i>Eugenia biflora</i> (L) DC.	$\beta$ -amirina	33
<i>Eugenia jambolana</i> Lamk	$\beta$ -pineno	34
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	limoneno	35

#### 1.4. ÍNDICE DE KOVÁTS.

O índice de Kováts é um método usado para auxiliar na identificação dos componentes dos óleos essenciais. Analisa a relação entre os valores de retenção relativa e a temperatura em colunas em condições isotérmicas.

Este trabalho pioneiro começou em 1954 com Kováts<sup>(36)</sup>, que criou um método de comparação dos índices de retenção ( $t_{R,i}$ ) da série de n-parafinas. Kováts

considerou que a distância entre as parafinas seria igual a  $I = 100 n$ , com aumento proporcional dos átomos de carbonos de acordo com seu peso molecular.

A equação idealizada foi a seguinte:

$$I_b^a = \frac{\log t_R'(\text{substância}) - \log t_R'(n)}{\log t_R'(n+1) - \log t_R'(n)} + N \times 100$$

onde:  $I$  = índice de retenção de Kováts;

$a$  = fase estacionária;

$b$  = temperatura da coluna;

$t_R'$ (Substância) = tempo de retenção ajustado da substância a ser identificada;

$t_R'$ ( $n$ ) = tempo de retenção ajustado do padrão anterior;

$t_R'$ ( $n + 1$ ) = tempo de retenção ajustado do padrão posterior;

$N$  = número de átomos de carbono do padrão anterior;

$t_R'(n) \leq t_R'(\text{substância}) \leq t_R'(n + 1)$ .

Para uma melhor comprovação dos valores são utilizados vários gases no ajuste entre eles: ar, metano, etano, propano, butano e outros.

Calcula-se  $t_R'$  pela equação:

$$t_R' = t_R - t_M$$

onde:  $t_R'$  = tempo de retenção ajustado;

$t_R$  = tempo de retenção;

$t_M$  = tempo de permanência da fase móvel na coluna.

Após vários anos de estudos, analisando a relação entre os valores de retenção relativa e temperatura em colunas capilares (em condições isotérmicas), os pesquisadores concluíram que ocorre uma dependência dos valores dos índices com a temperatura. Nas análises de Kováts não era considerada esta dependência. Uma generalização da definição de Kováts foi logo aprimorada por vários pesquisadores e transformadas em equações de Van Dool e Kratz, Guiochon, Habgood e Harris, Giddings, Golovnya e Uraletz<sup>(37)</sup>. A partir daí, sugeriram várias equações em temperaturas isotérmicas como também em condições de temperaturas programadas, conhecidas por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Temperatura Programada (CGARTP).

A cromatografia gasosa com temperaturas programadas tem auxiliado na comprovação de drogas no corpo humano, na farmacologia, na identificação da origem do petróleo, nos alimentos, no ramo da perfumaria e na identificação de componentes presentes em pequenas quantidades em misturas complexas.<sup>(38)</sup>

## **PARTE 2**

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 2. DISCUSSÃO

Para o cálculo do IK (índice de Kováts) e tempo de retenção ( $t_R'$ ) das substâncias, foram utilizadas duas colunas de polaridades diferentes.

### 2.1. CGAR UTILIZANDO COLUNA CAPILAR POLAR NA ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugênia ovalifolia* Camb.

Destilação por arraste a vapor (coobação) das folhas frescas de *E. ovalifolia* Camb., produziu 0,70% de óleo essencial, calculado com base no peso úmido. Exame do cromatograma de íons totais (figura 3, página 19) revelou três regiões distintas, a primeira representada pelos monoterpenos  $C_{10}H_{15}$  a segunda pelos sesquiterpenos hidrocarbonetos  $C_{15}H_{24}$  e a terceira pelos sesquiterpenos oxigenados  $C_{15}H_{24}O$  e  $C_{15}H_{26}O$ , e ainda a presença de mais de 100 componentes; dos quais 53 foram identificados. A tabela 2, na página 22 mostra dados apresentados em ordem de eluição dos componentes na coluna Innowax. No cromatograma de íons totais observamos ainda que o óleo caracteriza-se pela sua riqueza em sesquiterpenos, contendo mais altas concentrações de globulol  $t_R' = 31.970$ , IK = 2.105 com (12,8%), viridiflorol com  $t_R' = 32.208$  e IK = 2.115 (11,3%), epi-globulol,  $t_R' = 30.781$  e IK=2.057 (5%),  $\alpha$ -cadinol  $t_R' = 35.834$ , IK= 2.263 (3,6%), a-guaieno com  $t_R' = 18.220$  e IK=1.609 (3,4%) e o monoterpeno foi o  $\alpha$ -pineno com  $t_R' = 3.248$ , IK 1.042 (1,9%).



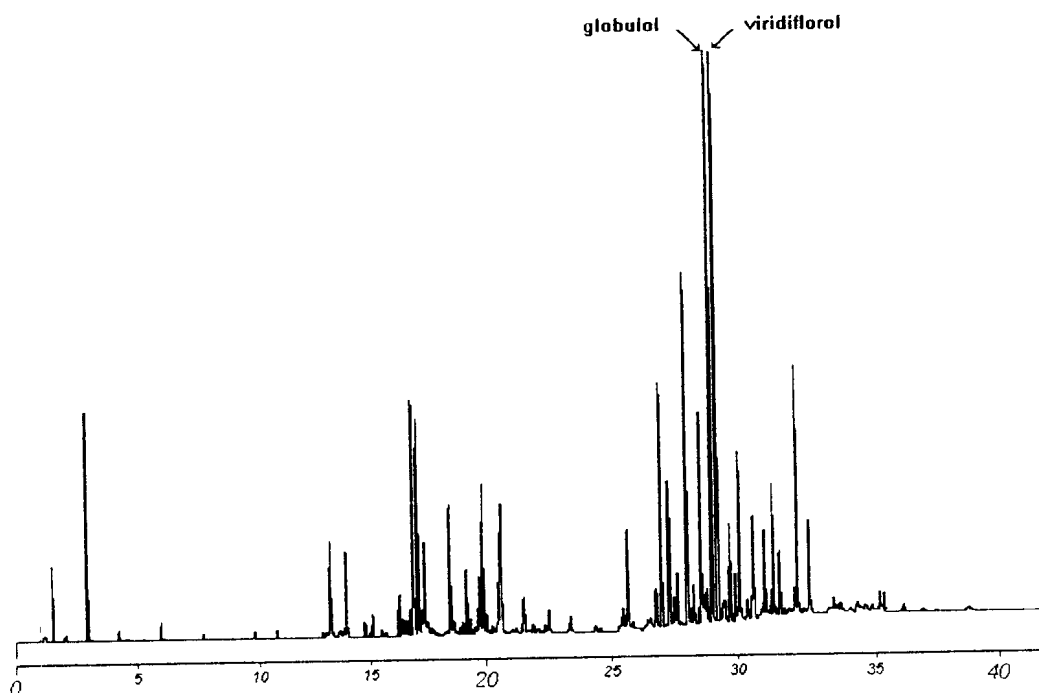


Figura 3- Cromatograma de fase gasosa do óleo essencial de *E. ovalifolia* Camb. coluna capilar polar fase estacionária polietileno-glicol (Innowax) com temperatura programada, 1min a 60° C, 4° C/min até 200° C durante 4min.

Dos outros 53 componentes identificados no óleo, somente  $\delta$ - elemeno (1,4%),  $\beta$ -maalieno (1,1%), longifoleno (1,8%),  $\gamma$ - muuroleno (1,1%),  $\alpha$ - selineno (1,9%) ,palustrol (1,5%),  $\gamma$ - eudesmol (1,4%),  $\alpha$ - muurolol (1,6%)  $\beta$ - bisabolol (1,5%), estão presentes com intensidades superiores a 1%, enquanto  $\alpha$ - muuroleno e viridifloreno apresentaram concentração em torno de 2%. Outros componentes com concentração

inferiores a 1% também foram identificados como o valenceno (0,15%) e o  $\delta$ -cadineno (0,14%).

## 2.2. CGAR UTILIZANDO COLUNA CAPILAR APOLAR NA ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia ovalifolia* Camb.

A coluna apolar utilizada foi com fase estacionária 5% difenil 95% dimetil polisiloxano, e não mostrou uma boa distinção das regiões (figura 4).

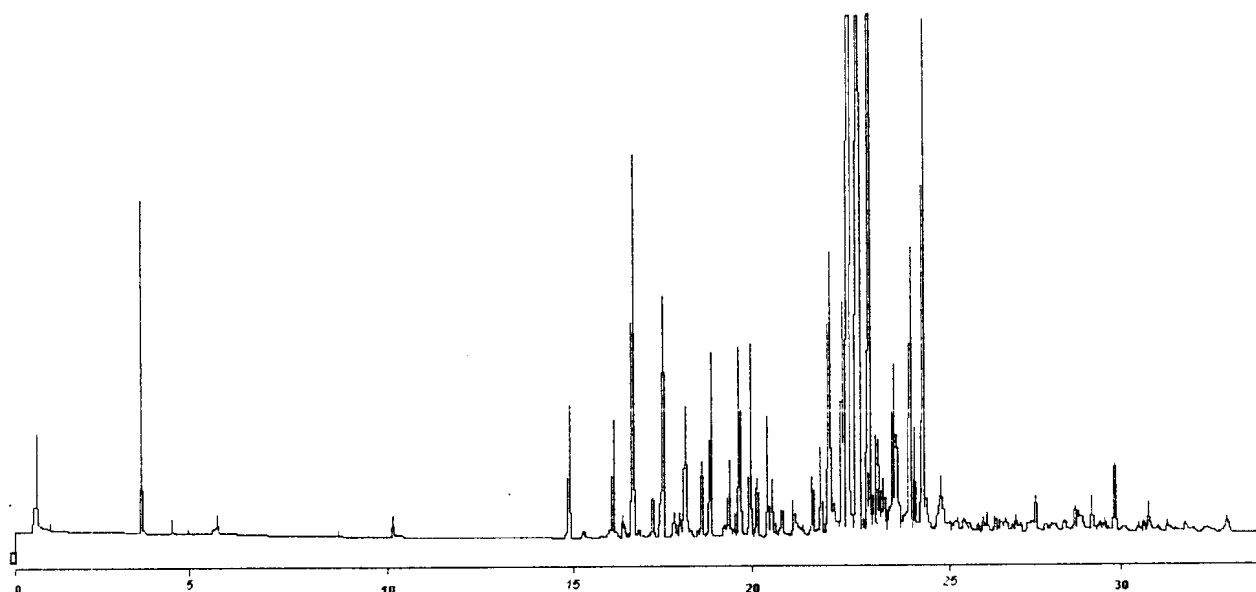


Figura 4- Cromatograma do óleo essencial de *E.ovalifolia* Camb. coluna apolar de fase estacionária 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano (Ultra-2) com temperatura programada: 1min a 600 C, 4°C/min até 200°C durante 4 min.

Foram detectadas aproximadamente 90 substâncias. Nesta coluna 20 substâncias apresentaram concentrações superiores a 1%, sendo o de maior intensidade globulol com  $t_R' = 22.924$ ,  $IK = 1.584$  com (19,8%), seguido de viridiflorol  $t_R' = 23.152$ ,  $IK = 1.592$  com (15,10%), e nesta mesma região surge ainda epi-globulol com  $t_R' = 22.709$ ,  $IK = 1.577$  com 2,56%.

O perfil cromatográfico do óleo essencial obtido nas análises dos cromatogramas de íons totais nas colunas Innowax e Ultra-2, permitiram identificar a maioria dos componentes presentes. O que se pode observar nitidamente, é que no caso do uso da coluna Innowax a separação entre os componentes sesquiterpênicos foi muito mais eficiente, enquanto que na coluna Ultra-2 existe uma aglomeração entre estas substâncias.

### 2.3. ANÁLISE DAS TABELAS

O índice de Kováts associado ao espectro de massa e dados coletados na literatura favoreceu a identificação de componentes presentes na mistura do óleo essencial de *E. ovalifolia* Camb.

Nas tabelas 2 e 3, constam 42 substâncias identificadas, através de comparações entre os índices de Kováts calculados com os (IK) obtidos na literatura com colunas de polaridade similar á Innowax citadas na literatura; tais como a DB-WAX.

Tabela 2. Constituintes do o.e. de *E. ovalifolia* Camb. ident.por CGAR em coluna polar

$\alpha$ -pineno	3.248	1.042	CG-EM	1.036	1.021	W/NBS
$\beta$ -pineno	4.656	1.129	CG-EM	1.120	1.108	
limoneno	6.630	1.218	CG-EM	1.206	1.195	W/NBS
$\beta$ -felandreno	8.575	1.291	CG-EM	1.216	1.202	W/NBS
$\delta$ -elemeno	14.430	1.486	CG-EM	1.469	1.472	W/NBS
$\alpha$ -copaeno	15.003	1.504	CG-EM	1.526	1.492	W/NBS
$\beta$ -maalieno	15.139	1.509	CG-EM			
$\beta$ -bourboneno	15.980	1.532	CG-EM	1.529		W/NBS
isocomeno	16.260	1.547	CG-EM			Ramaswani
$\alpha$ -gurjuneno	16.763	1.564	CG-EM	1.529	1.528	Davies W/NBS
<i>trans</i> -cariofileno	17.597	1.590	CG-EM	1.617	1.588	Ramaswani W/NBS
$\gamma$ -elemeno	17.731	1.597	CG-EM	1.642		W/NBS
$\alpha$ -guaiano	18.220	1.609	CG-EM	1.651		Ramaswani W/NBS
$\alpha$ -himachaleno	19.925	1.618	CG-EM	1.649		Ramaswani W/NBS
$\alpha$ -humuleno	20.654	1.690	CG-EM	1.672		W/NBS
allo aromaden- dreno	20.830	1.695	CG-EM	1.683		W/NBS Davies
$\gamma$ -muuroloeno	21.223	1.708	CG-EM	1.692		Davies Ramaswani
viridifloreno	21.423	1.716	CG-EM	1.697		Davies
valenceno	22.049	1.739	CG-EM	1.722	1711	Ramaswani W/NBS
$\gamma$ -selineno	22.195	1.744	CG-EM			Davies NIST
$\alpha$ -muuroloeno	22.295	1.747	CG-EM	1.730		Davies W/NBS
<i>trans</i> - $\beta$ -guaiano	22.705	1.761	CG-EM			Ramaswani Davies
$\delta$ -selineno	22.924	1.769	CG-EM			NIST
$\beta$ -bisaboleno	23.316	1.782	CG-EM	1.745		Davies W/NBS
$\delta$ -cadineno	23.720	1.794	CG-EM	1.761	1.754	W/NBS
calameneno	23.905	1.802	CG-EM	1.837	1.826	Ramaswani Davies
cadina-1,4 dieno	24.268	1.836	CG-EM	1.786		Ramaswani Davies
$\alpha$ -cadineno	25.336	1.855	CG-EM			Ramaswani Davies
palustrol	27.235	1.923	CG-EM			NIST
$\alpha$ -calacoreno	28.067	1.955	CG-EM	1.916	1914	W/NBS Davies
espatulenol	29.340	2.002	CG-EM	2.153	2120	Ramaswani W/NBS
ledol	30.181	2.036	CG-EM		1914	W/NBS
epi-globulol	30.781	2.057				NIST
globulol	31.970	2.105	CG-EM	2.104		
viridiflorol	32.208	2.115	CG-EM	2.112		W/NBS
T-cadinol	32.471	2.126	CG-EM	2.136	2.166	W/NBS Davies
T-muurolol	32.752	2.135	CG-EM		2.181	W/NBS Davies
$\alpha$ -muurolol	33.185	2.152	CG-EM			W/NBS Davies
$\beta$ -eudesmol	33.709	2.173	CG-EM	2.248		Davies
$\alpha$ -cadinol	33.804	2.179	CG-EM	2.224		W/NBS Davies
$\beta$ -bisabolol	34.191	2.194	CG-EM			Davies
juniper camphor	34.395	2.200	CG-EM			Davies

Tabela 3. Constituintes do o.e.de *E. ovalifolia* Camb. ident por CGAR em coluna apolar

$\alpha$ -pineno	3.439	940	CG-EM	939	942	938	W/NBS
$\beta$ -pineno	4.309	981	CG-EM	980	981	976	
limoneno	5.450	1.029	CG-EM	1.031	1.030	1.030	W/NBS
$\beta$ -felandreno	5.551	1.032	CG-EM	1.031	1.025	1.030	W/NBS
$\delta$ -elemeno	15.195	1.338	CG-EM	1.339	1.381	1.342	W/NBS
$\alpha$ -copaeno	16.322	1.373	CG-EM	1.376	1.369	1.375	Ramaswani W/NBS
$\beta$ -maalieno	16.416	1.375	CG-EM	1.380			Ramaswani W/NBS
$\beta$ -bourboneno	16.699	1.384	CG-EM	1.384	1.406		W/NBS
isocomeno	16.970	1.391	CG-EM	1.386			Ramaswani Davies
$\alpha$ -gurjuneno	17.509	1.408	CG-EM	1.409	1.400	1.403	W/NBS
<i>trans</i> -cariofileno	17.793	1.418	CG-EM	1.418	1.428	1.413	Ramaswani W/NBS
$\gamma$ -elemeno	18.266	1.433	CG-EM	1.433	1.425		W/NBS
$\alpha$ -guaieno	17.504	1.438	CG-EM	1.439	1.454	1.455	Ramaswani W/NBS
$\alpha$ -himachaleno	18.758	1.448	CG-EM	1.447	1.442		Ramaswani W/NBS
$\alpha$ -humuleno	18.865	1.452	CG-EM	1.454	1.465	1.447	W/NBS
allo aromaden- dreno	19.098	1.460	CG-EM	1.459	1.478	1.463	W/NBS
$\gamma$ -muuroloeno	19.482	1.472	CG-EM	1.477		1.473	Davies Davies
viridifloreno	19.630	1.476	CG-EM	1.480	1.484		Ramaswani Davies
valenceno	19.740	1.480	CG-EM	1.491	1.482	1.488	Ramaswani W/NBS
$\alpha$ -selineno	19.899	1.484	CG-EM		1.484	1.497	Davies NIST Davies
$\alpha$ -muuroloeno	20.193	1.493	CG-EM	1.499			W/NBS
bulneseno							Ramaswani
$\delta$ -selineno	20.667	1.506	CG-EM				NIST
$\beta$ -bisaboleno	20.781	1.509	CG-EM	1.509			Davies W/NBS
$\delta$ -cadineno	20.922	1.514	CG-EM	1.513	1.524	1.519	W/NBS
calameneno	21.065	1.518	CG-EM	1.521	1.502	1.510	Ramaswani Davies
cadina 1,4 dieno	21.401	1.536	CG-EM	1.532	1.518		Ramaswani Davies
$\alpha$ -cadineno	21.912	1.551	CG-EM	1.538		1.556	Ramaswani Davies
$\beta$ -calacoreno	22.370	1.566	CG-EM	1.563		1.537	Davies
espatulenol	22.510	1.571	CG-EM	1.576		1.570	Ramaswani W/NBS
globulol	22.709	1.577	CG-EM	1.583			W/NBS Davies
viridiflorol	22.924	1.584	CG-EM	1.583		1.582	W/NBS
ledol	23.152	1.592	CG-EM	1.565		1.584	W/NBS
$\beta$ -eudesmol	24.214	1.628	CG-EM	1.649		1.639	NIST W/NBS Davies
T-cadinol	24.480	1.638	CG-EM	1.640		1.637	W/NBS Davies
T-muurolol	24.605	1.642	CG-EM	1.641		1.637	W/NBS Davies
$\alpha$ -muurolol	24.725	1.646	CG-EM	1.645		1.632	W/NBS
$\alpha$ -cadinol	24.967	1.655	CG-EM	1.649		1.649	Davies
$\beta$ -bisabolol	25.426	1.670	CG-EM	1.671			Davies
juniper camphor	26.060	1.691	CG-EM	1.691			Davies

Destas 53 substâncias, 4 substâncias foram identificadas somente pela comparação dos IK calculados com os tabelados na literatura, (tabela 4) que são: o *cis* thujopseno, cedrol, 3-iso-thujopsenona e o bulnesol.

Quatro substâncias foram identificadas pela comparação dos espectros de massas com os contidos na espectroteca NIST e W/NBS que são os espectros de massas do esterpureno, isolongifol-8-ol e o 4 $\beta$ -hydrogermacrena, identificado por comparação direta com o espectro de massas citado na literatura (43) e ainda o capnellano 5  $\alpha$ -ol, (tabela 4).

Tabela 4. Constituintes do óleo essencial de *Eugenia ovalifolia* Camb. identificados através da comparação do IK ou

Substância	Tempo de retenção	Índice de Kovalts	Identificação	Referência <sup>(40)</sup>	Referência <sup>(41,42)</sup>	Referência.
<i>cis</i> - thujopseno	18,107	1.428	IK	1.429	1.430	Davies
cedrol	23.625	1.607	IK	1.596	1.609	Davies
3-iso- thujopsanona	24.411	1.635	IK	1.637		Davies
bulnesol	25.342	1.657	IK	1.666		Davies
esterpureno			EM			Wiley
isolongifol 8-ol			EM			Wiley
4 $\beta$ -hidroxi germacrena			EM			43
capnellano-5- $\alpha$ -ol			EM			Wiley

Os espectros de massas dos 49 componentes identificados foram comparados com os publicados nos artigos de Ramaswani e colaboradores<sup>(39)</sup>,

Adams<sup>(40)</sup> e diversos artigos publicados no Journal Essent.Oil Res<sup>(23,27,32,35)</sup> e Flavour and Fragrance<sup>(25,39)</sup>.

A exceção destes casos, todas as substâncias foram identificadas pelos IK calculados e comparados aos citados na literatura, pelas espectotecas Wiley e NIST e interpretação dos espectros de massas.

#### 2.4. ESPECTROS DE MASSAS

A grande dificuldade encontrada na identificação dos componentes através de comparação dos espectros de massas de sesquiterpenos, parte da observação da invariabilidade dos íons de fragmentação de massas como: m/z 204, 189, 161, 159, 147, 134, 133, 119, 111, 107, 105, 104, 95, 93, 91, 81, 79, 69, 67, 55. As diferenciações, podem ser feitas através das intensidades dos íons que correspondem a maior ou menor estabilidade dos íons formados. A tabela 5, na página 26 mostra a origem dos principais fragmentos de massas e as perdas de massas correspondentes, na tabela 6, página 28 uma lista com todos os componentes identificados, na tabela 7 página 32, podemos verificar a complexidade do problema.

Tabela 5-Principais íons de fragmentações de massas encontrados nos sesquiterpenos.

Íon de origem	Massa perdida	Fragmentação registrado
222	18	H <sub>2</sub> O
204	15	CH <sub>3</sub>
189	43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
202	43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
189	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>
162	28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
161	28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
159	28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
161	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>
134	15	CH <sub>3</sub>
133	16	CH <sub>4</sub>
147	40	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub>
133	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
147	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>
121	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
136	43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
133	40	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
121	28	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
133	42	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
119	26	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
107	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
121	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>
105	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
81	2	H <sub>2</sub>
93	16	CH <sub>4</sub>
95	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
93	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
81	26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

De um modo geral estes fragmentos podem ser perdidos pela ruptura simples de uma ligação ou após rearranjo 1,4 de hidrogênio seguida de ruptura. Em outras



situações pode-se também encontrar fragmentações do tipo, retro Diels-Alder e McLacfferty.

Alguns compostos, no entanto, apresentam picos correspondentes a fragmentações muito características. Desta forma podemos citar alguns exemplos importantes. O  $\beta$ -bourboneno (figura 12, página 40) apresenta como pico base o íon  $m/z$  81, que tem como origem o íon  $m/z$  123, obtido após rearranjo 1,4 de hidrogênio do íon molecular  $M^+$  204, com subsequente perda de propeno segundo a proposta de fragmentações de massas no (esquema 8).

No espectro de massas do calameneno (figura 27, página 55), o íon de  $m/z$  159 corresponde ao pico base, e as demais fragmentações, com pequenas intensidades demonstra a perda fácil do radical isopropila  $m/z$  43 dando origem a carbocátion benzílico que pode ser estabilizado pelos elétrons do anel aromático que justifica a estabilidade deste íon (esquema 23). Semelhante ao calameneno é o espectro de massas do  $\alpha$ -calacoreno (figura 32, página 60), onde pode-se observar a perda fácil do radical isopropila criando um carbocátion benzílico de  $m/z$  157, que correspondente ao pico base, bastante estabilizado (esquema 27).

Estes são exemplos de fácil identificação através da comparação direta dos espectros de massas, outros casos semelhantes podem ser encontrados, mas a grande maioria exige habilidade e experiência na análise destes espectros e requer desta forma outros parâmetros de comparação como por exemplo os cálculos de índices de Kováts em duas colunas de polaridades diferentes para evitar dúvidas para uma proposta estrutural.

**Tabela 6-** Os componentes identificados

1. $\alpha$ -pineno	27. cadina-1,4 dieno
2. $\beta$ -pineno	28. $\alpha$ -cadineno
3. limoneno	29. palustrol
4. $\beta$ -felandreno	30. $\alpha$ -calacoreno
5. $\delta$ -elemeno	31. espatulenol
6. $\alpha$ -copaeno	32. globulol
7. $\beta$ -maalieno	33. viridiflorol
8. $\beta$ -bourboneno	34. ledol
9. isocomeno	35. eudesmol < 10-epi- $\gamma$ >
10. $\alpha$ -gurjuneno	36. $\gamma$ -eudesmol
11. <i>trans</i> -cariofileno	37. T-cadinol
12. $\gamma$ -elemeno	38. T-muurolol
13. $\alpha$ -guaieno	39. $\alpha$ -muurolol
14. $\alpha$ -himachaleno	40. $\beta$ -eudesmol
15. $\alpha$ -humuleno	41. $\alpha$ -cadinol
16. allo-aromadendreno	42. $\beta$ -bisabolol
17. $\gamma$ -muuroleno	43. juniper camphor
18. viridifloreno	44. cedrol
19. valenceno	45. epi-globulol
20. $\alpha$ -selineno	46. 3-iso-thujopseno.
21. $\alpha$ -muuroleno	47. cis- thujupseno
22. <i>trans</i> - $\beta$ -guaieno	48. bulnesol
23. $\delta$ -selineno	49. esterpureno
24. $\beta$ -bisaboleno	50. isolongifol-8-ol
25. $\delta$ -cadineno	51. 4 $\beta$ -hidroxigermacrena
26. <i>trans</i> -calameneno	52. capnellano 5- $\alpha$ -ol / 53-thujpsan-2 $\alpha$ -ol

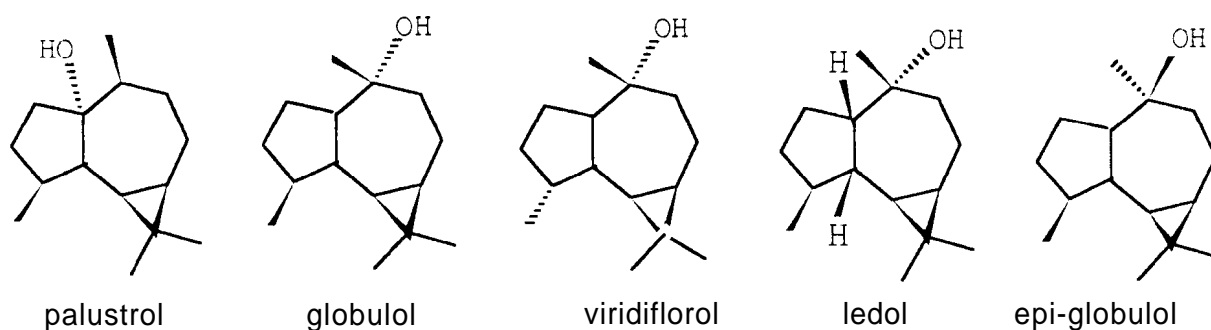
## 2.5-DISCUSSÃO DOS ESPECTROS DE MASSAS ATRAVÉS DOS PRINCIPAIS ÍONS DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS.

Das 53 substâncias identificadas, 32 estruturas foram propostas através das análises por comparação das espectrotescas, comparação dos íons dos IK e interpretação dos espectros de massas.

No espectro de massas do  $\alpha$ -pineno, na (figura 5, página 33) observa-se os principais íons de fragmentação de massas em  $M^+$  136 íon molecular,  $m/z$  121 que corresponde a perda de um íon radical  $CH_3$  a partir do íon molecular,  $m/z$  93 íon correspondente ao pico base e os íons  $m/z$  79 e  $m/z$  77 que aparecem representados pelos fragmentos mostrado no esquema 1.

No espectro de massas do  $\delta$ -elemeno (figura 8, página 36) e do  $\gamma$ -elemeno (figura 16, página 44) pode-se observar íons de fragmentações idênticas em ambos os espectros como  $m/z$  204, 189, 161, 121, 93, 67 e 41 sendo diferenciados pelo íon de  $m/z$  136 que aparece com 50% de intensidade no espectro do  $\delta$ -elemeno. As propostas dos principais íons de fragmentação encontram-se representados nos (esquema 4) e (esquema 12) para o  $\delta$ -elemeno e o  $\gamma$ -elemeno respectivamente.

No espectro de massas dos isómeros como : palustrol (figura 30, página 58), globulol (figura 34, página 62 ), viridiflorol (figura 35, página 63), ledol (figura 36, página 64), epi-globulol (figura 37, página 65); pode-se observar a semelhança dos principais íons de fragmentações de massas.



Na tabela 7 estão indicados para os isômeros : palustrol, globulol, viridiflorol, ledol e epi-globulol; seus principais íons de fragmentações de massas e suas correspondes abundâncias relativas.

Na análise dos espectros de massas, através dos principais íons de fragmentação dos isômeros acima citados, que se encontram relacionados na tabela 7, não levaremos em consideração aqueles que apresentam-se com frequência para todos os isômeros. Nossa análise vai se deter as principais diferenças encontradas nestes espectros.

Palustrol apresenta espectro de massas muito diferenciado dos demais isômeros o que não permite margem de erros. Por outro lado poderia ser confundido com óxido- cariofileno que também apresenta pico base com  $m/z$  111. Este portanto é um exemplo típico, da necessidade do uso de outros parâmetros que levam a solução do problema. Desta forma, indiscutivelmente análise comparativa dos índices de Kováts torna-se um fator importante e indispensável. Após comparação dos espectros de massas e dos índice de Kováts pode-se concluir tratar-se do palustrol.

Viridiflorol diferencia-se dos isômeros palustrol e ledol pela ausência do íon de fragmentação de massas de  $m/z$  107, que está presente nos espectros dos outros dois. Diferencia-se do epi-globulol principalmente pela alta intensidade do pico  $m/z$  119 (53,4%) em viridiflorol e somente (34%) em epi-globulol, e da alta intensidade do pico  $m/z$  82 (56,9%) em epi-globulol e (17,5%) em viridiflorol. Em relação ao globulol o espectro do viridiflorol apresenta íon de  $m/z$  119 (53,4%), muito superior ao globulol com intensidade igual a (18,9%) . Enquanto, a principal diferença do espectro de massas do ledol (figura 36, página 64) pode ser verificada pela presença do íon de fragmentação de massas em  $m/z$  179 que embora esteja presente no espectro de massas do palustrol, este último apresenta espectro muito característico, com íon de  $m/z$  111 correspondente ao pico base, enquanto ledol o pico base aparece com  $m/z$  43, (esquema 31).

Globulol (figura 34, página 62) e epi-globulol (figura 37, página 65) diferenciam-se entre si pelo íon de fragmentação de massas tal como:  $m/z$  207 presente em globulol e ausentes no espectro do epi-globulol. Epi-globulol apresenta ainda íon de  $m/z$  82 (56,9%), muito característico, que embora apareça nos demais isômeros este é muito mais intenso para o epi-globulol (esquema 32).

Todas as propostas estruturais foram feitas pelas análises criteriosas de comparação dos espectros de massas e dos índices de Kováts, permitindo assim uma margem de erro muito pequena. Outros recursos poderiam ser utilizados, como o isolamento de componentes majoritários e o uso de substâncias padrões, que dificilmente são encontrados principalmente no caso dos sesquiterpenos.

**Tabela 7** -Principais íons de fragmentações do palustrol, globulol, viridiflorol, ledol e epi-globulol, e suas correspondentes abundâncias relativas.

222	5,1	3,4	3,4	5,1	6,9
207	---	<b>7,0</b>	3,4	5,1	---
204	43,0	20,7	22,4	20,7	36,2
189	20,7	24,0	31,0	18,9	29,3
179	6,9	---	---	<b>5,1</b>	---
175	---	8,6	5,1	---	5,0
161	39,0	43,0	50,0	36,2	50,0
147	32,0	17,5	17,2	32,7	15,8
135	---	<b>17,2</b>	14,0	10,5	12,3
133	---	15,8	17,5	16,7	<b>17,2</b>
122	84,5	27,6	25,8	51,7	17,5
121	31,6	25,8	25,8	31,0	32,7
119	24,5	18,9	<b>53,4</b>	17,5	34,0
111	<b>100,0</b>	10,5	5,2	29,8	10,5
109	43,0	41,4	54,4	55,1	55,1
107	46,5	38,0	34,5	44,8	32,7
105	39,6	31,0	36,2	29,5	50,0
95	51,7	31,0	18,9	36,2	33,0
93	43,0	34,5	36,2	41,4	46,5
91	27,6	24,1	25,8	27,6	31,0
83	<b>36,2</b>	12,3	8,7	17,5	17,5
82	22,8	15,8	17,5	28,0	<b>56,9</b>
81	44,8	39,6	38,5	48,2	32,7
79	31,0	19,0	25,8	34,5	29,3
77	20,7	15,8	19,0	19,3	22,4
69	38,0	34,5	50,0	51,0	43,0
67	38,0	35,0	36,2	41,0	41,4
55	53,4	32,7	31,0	34,5	39,6
43	55,1	100,0	100,0	100,0	100,0
41	72,4	55,5	58,6	67,2	56,9

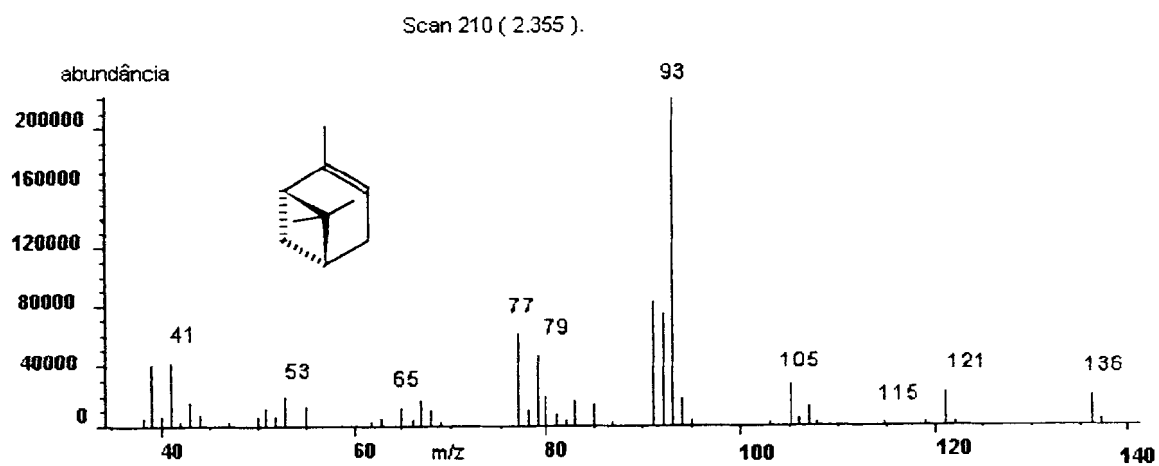
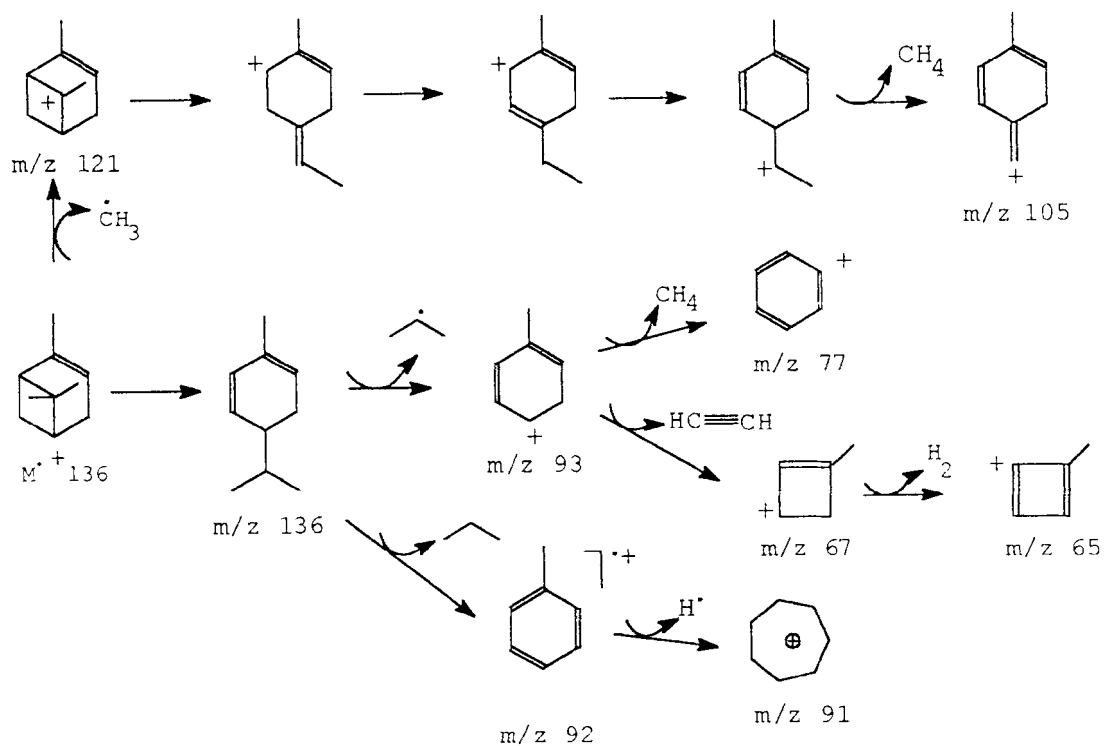


Figura 5- Espectro de massas do  $\alpha$ -pineno.



Esquema 1-Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -pineno.

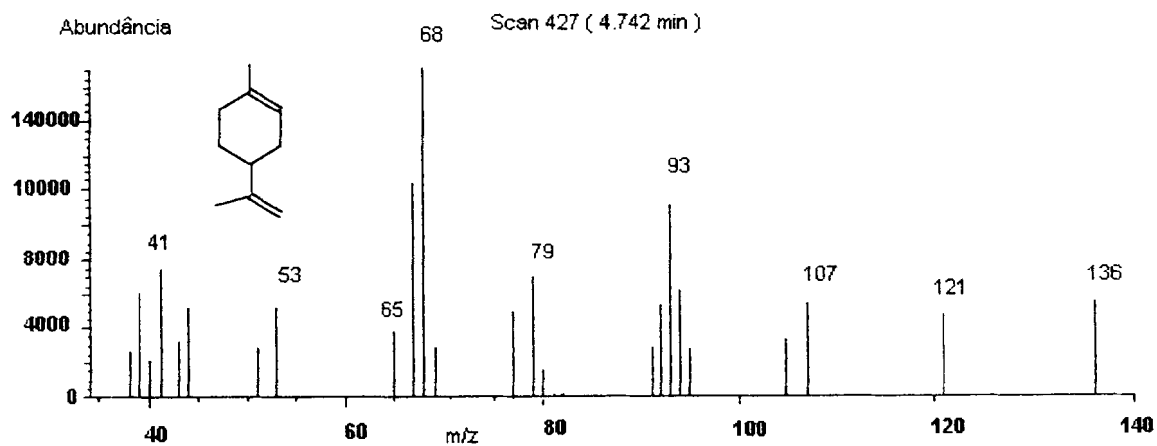
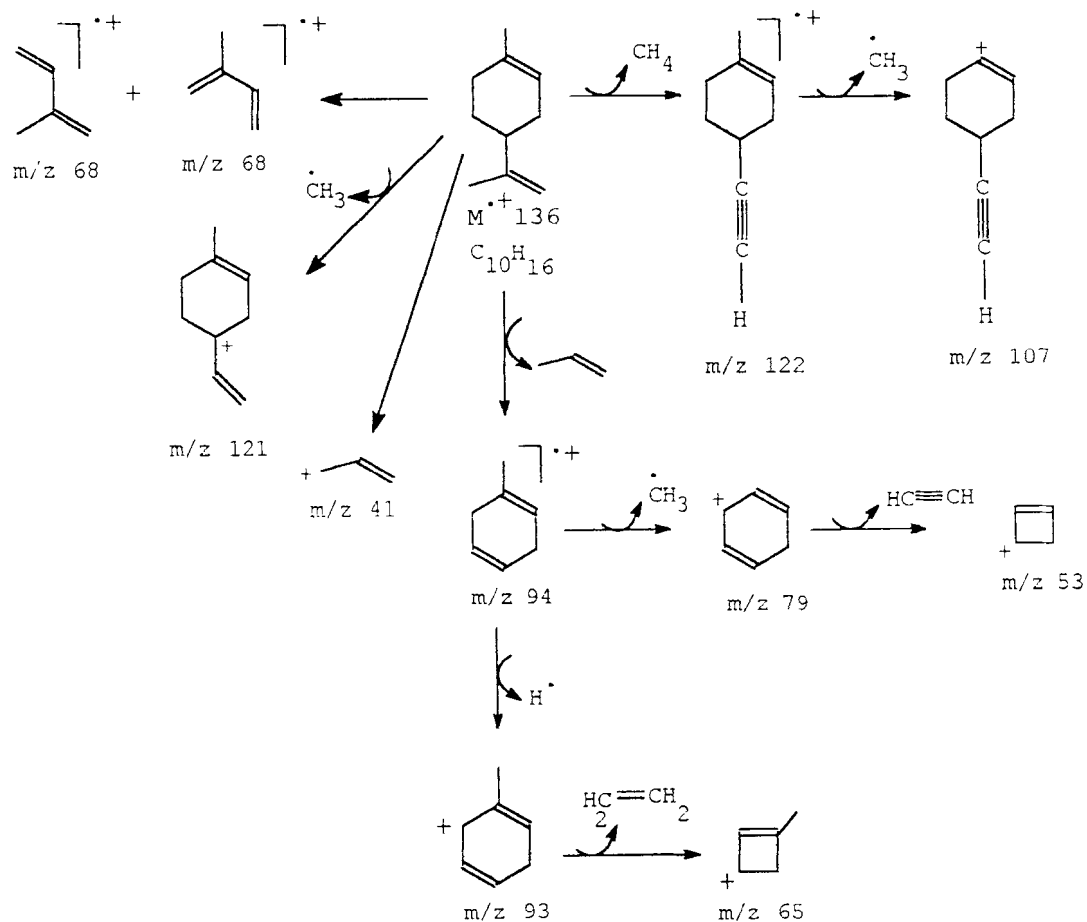


Figura 6- Espectro de massas do limoneno .



Esquema 2- Principais íons de fragmentação de massas do limoneno



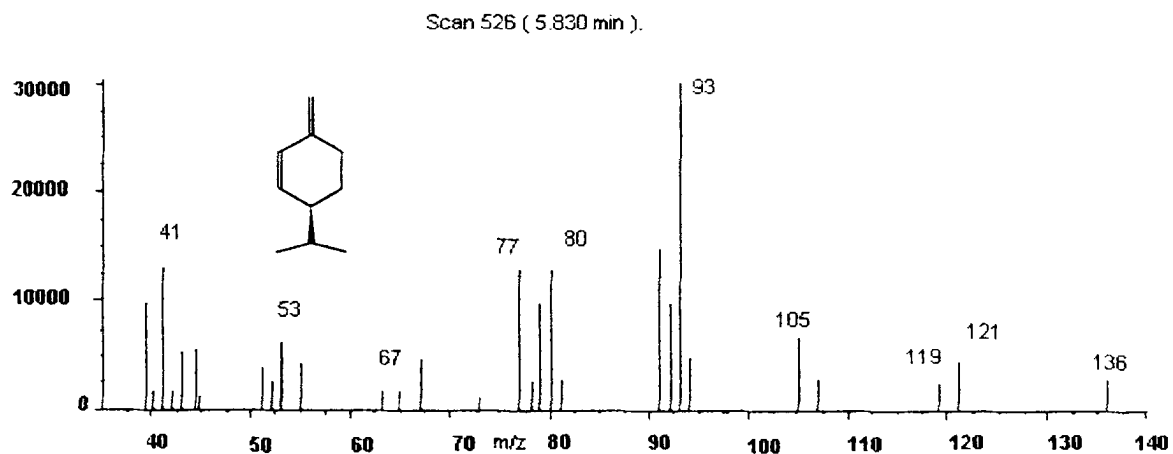
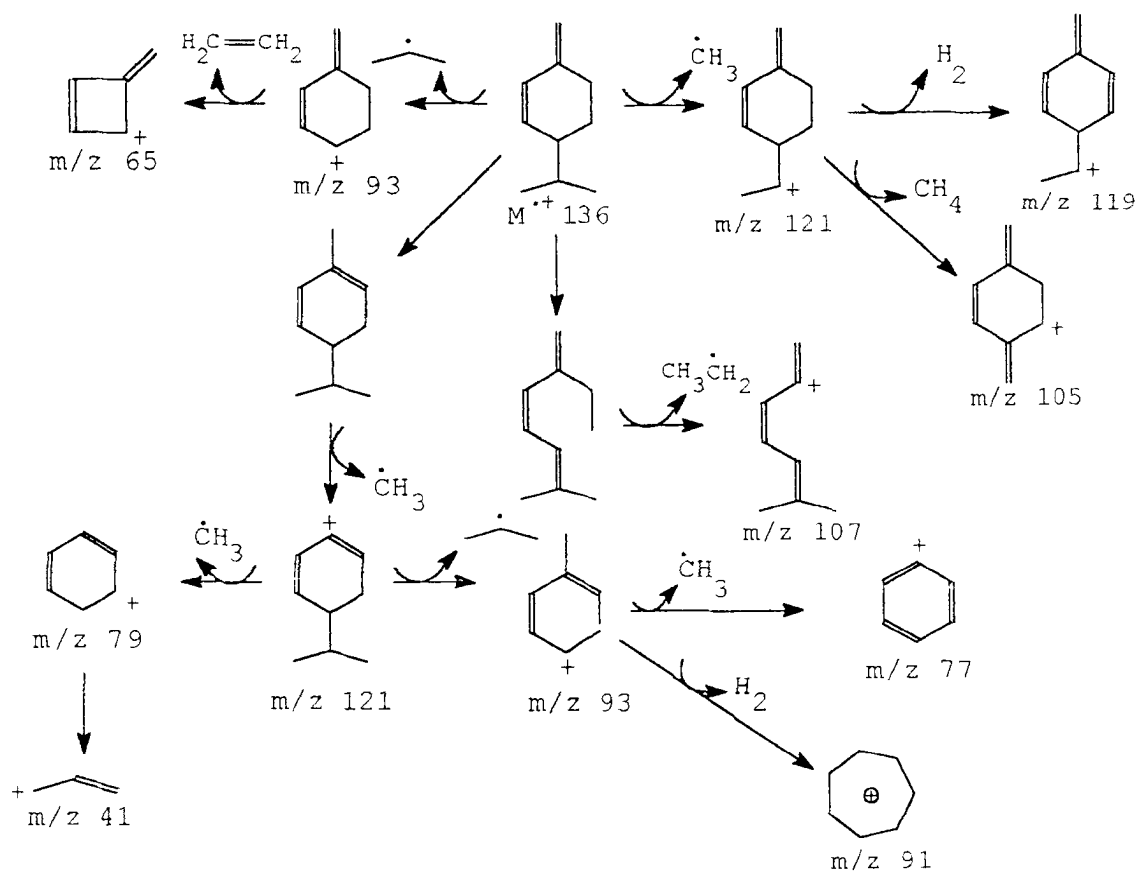


Figura 7- Espectro de massas do  $\beta$ -felandreno



Esquema 3- Principais íons de fragmentação de massas do  $\beta$ -felandreno

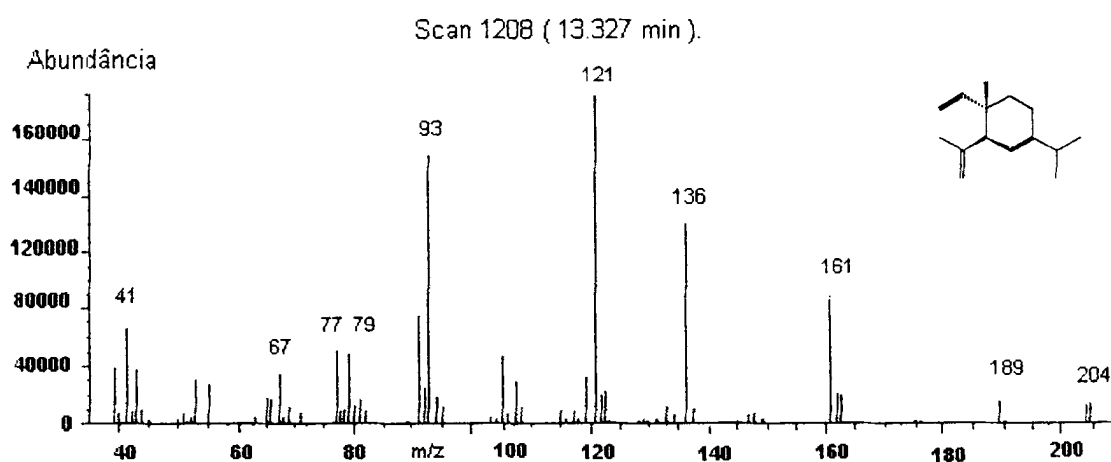
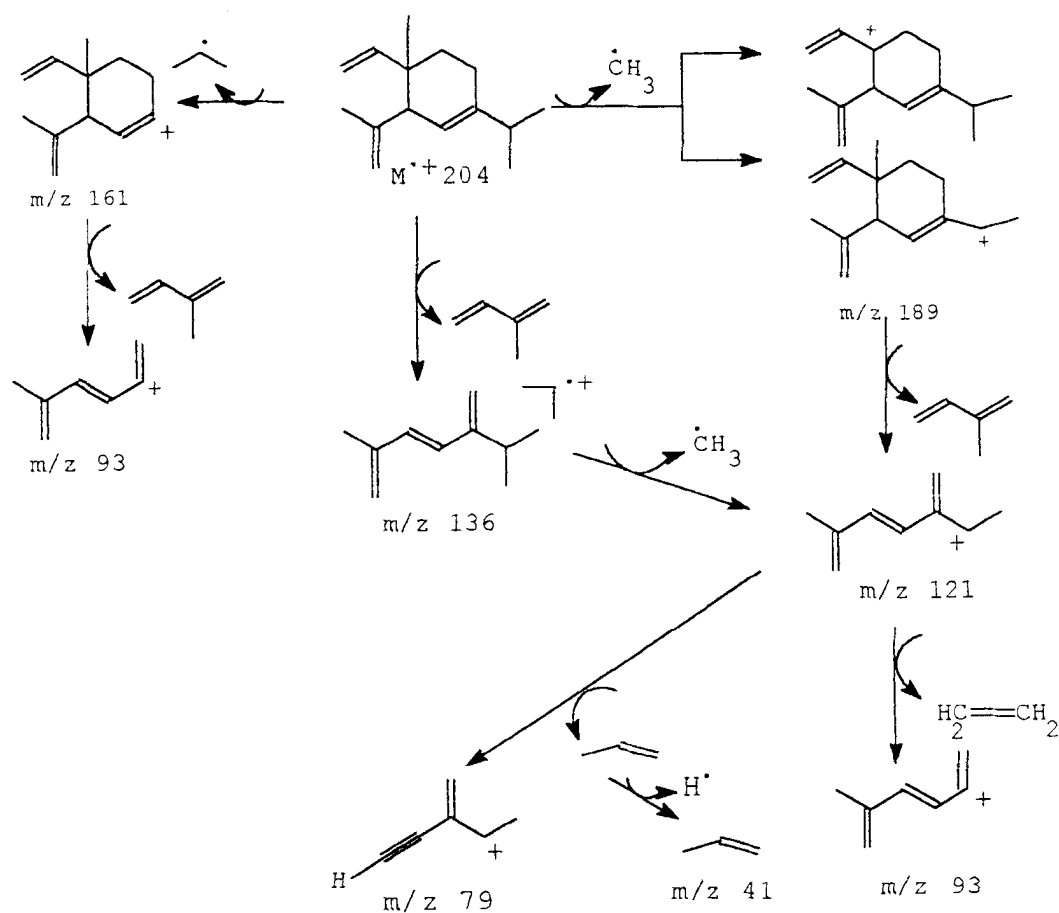


Figura 8 -Espectro de massas do  $\delta$ -elemeno.



Esquema 4 -Principais íons de fragmentação do  $\delta$ -elemeno.

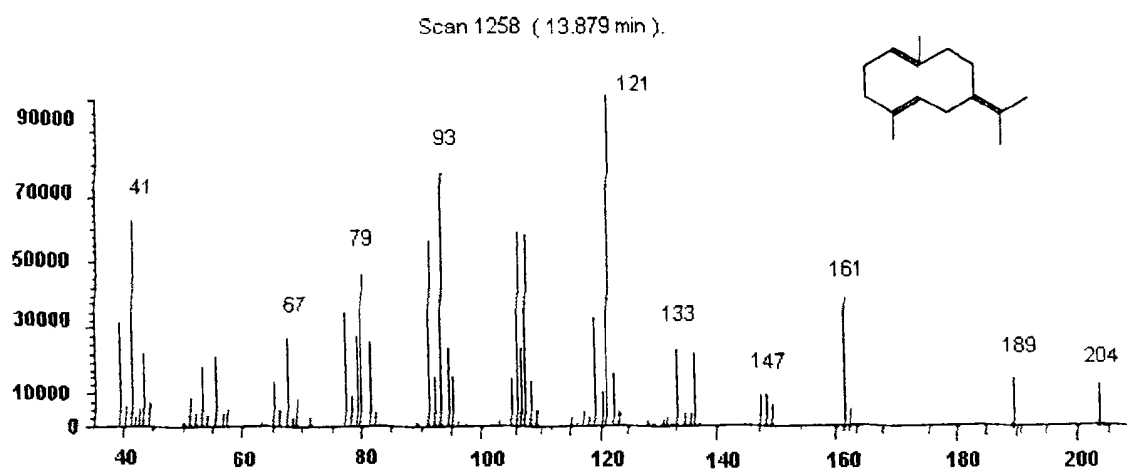
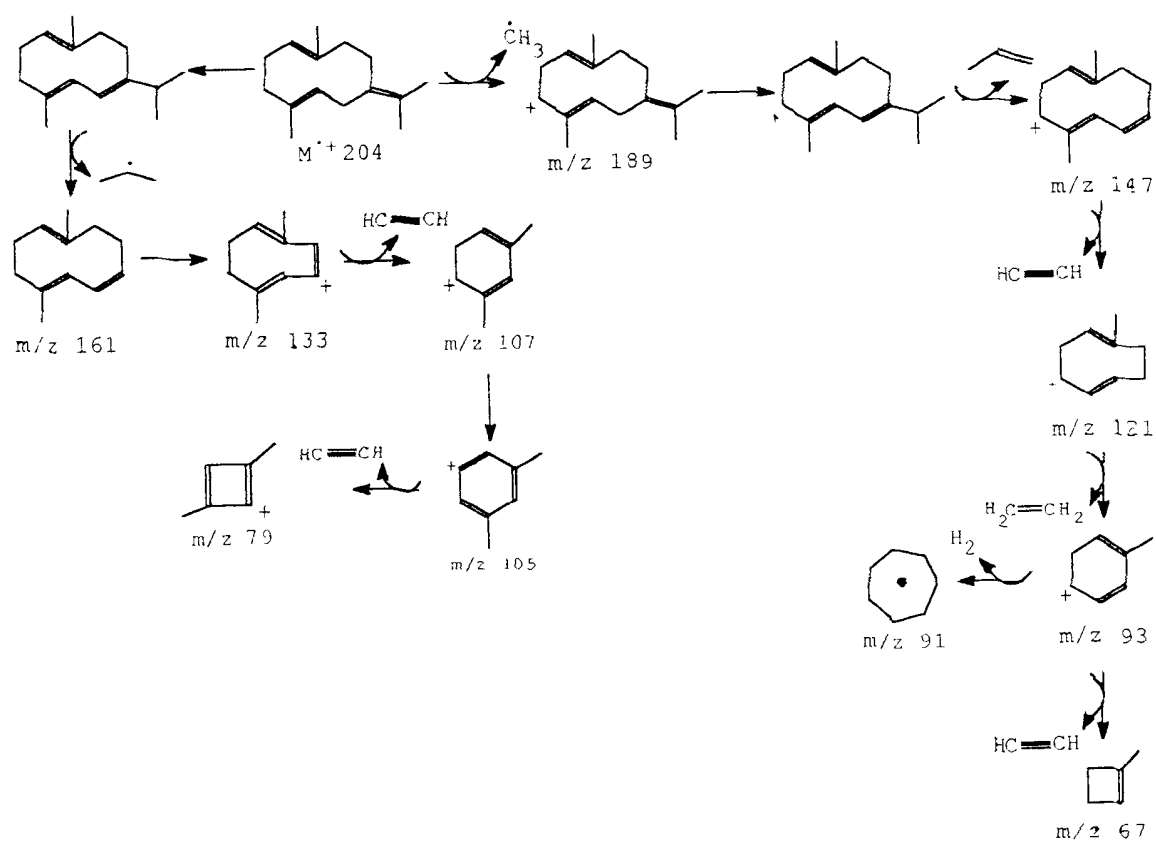


Figura 9- Espectro de massas do germacreno B.



Esquema 5- Principais íons de fragmentação de massas do germacreno B.

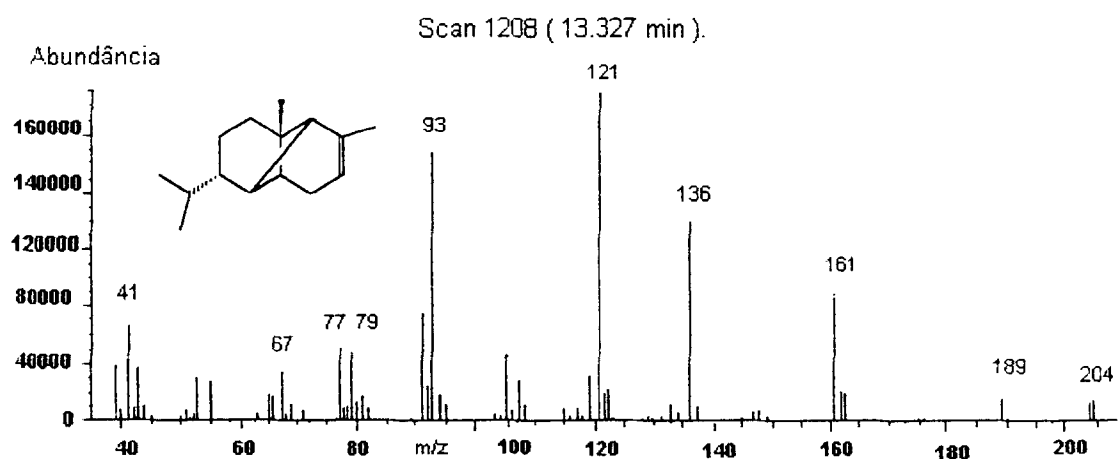
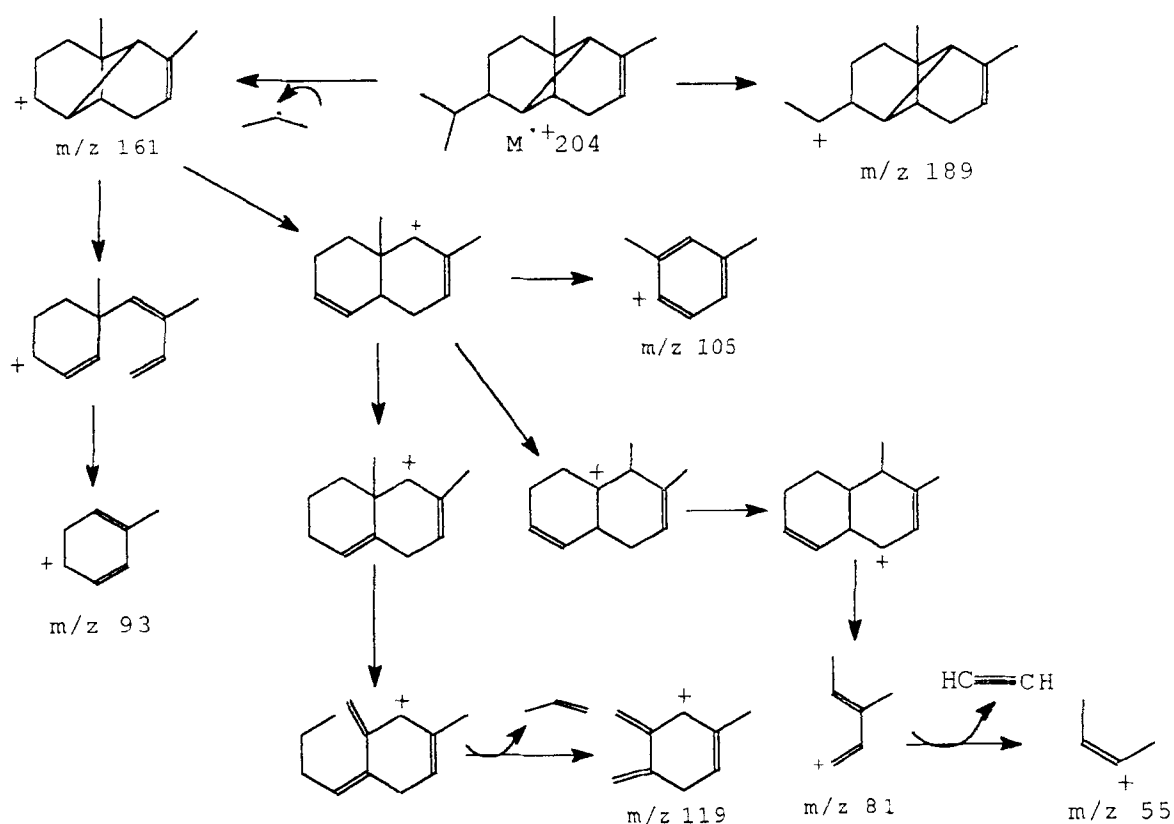


Figura 10- Espectro de massas do  $\alpha$ -copaeno.



Esquema 6- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -copaeno.

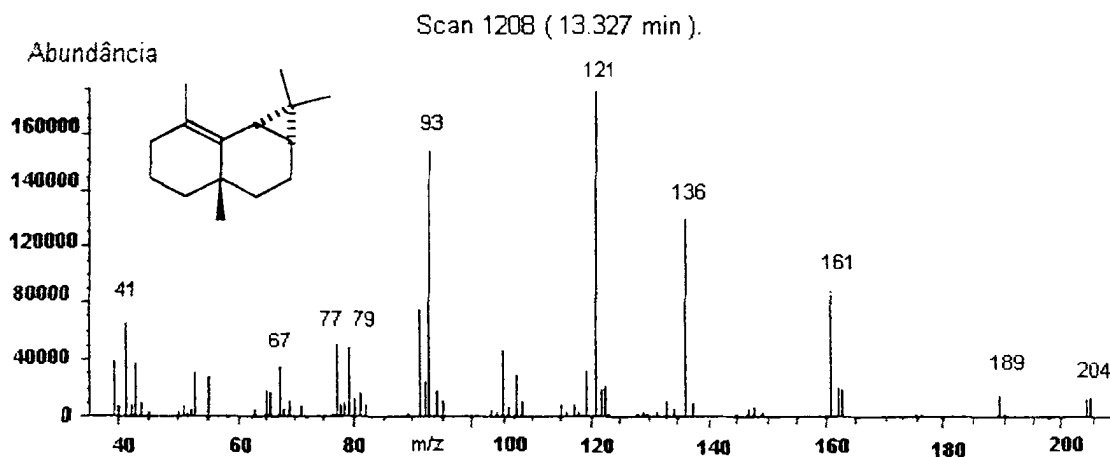
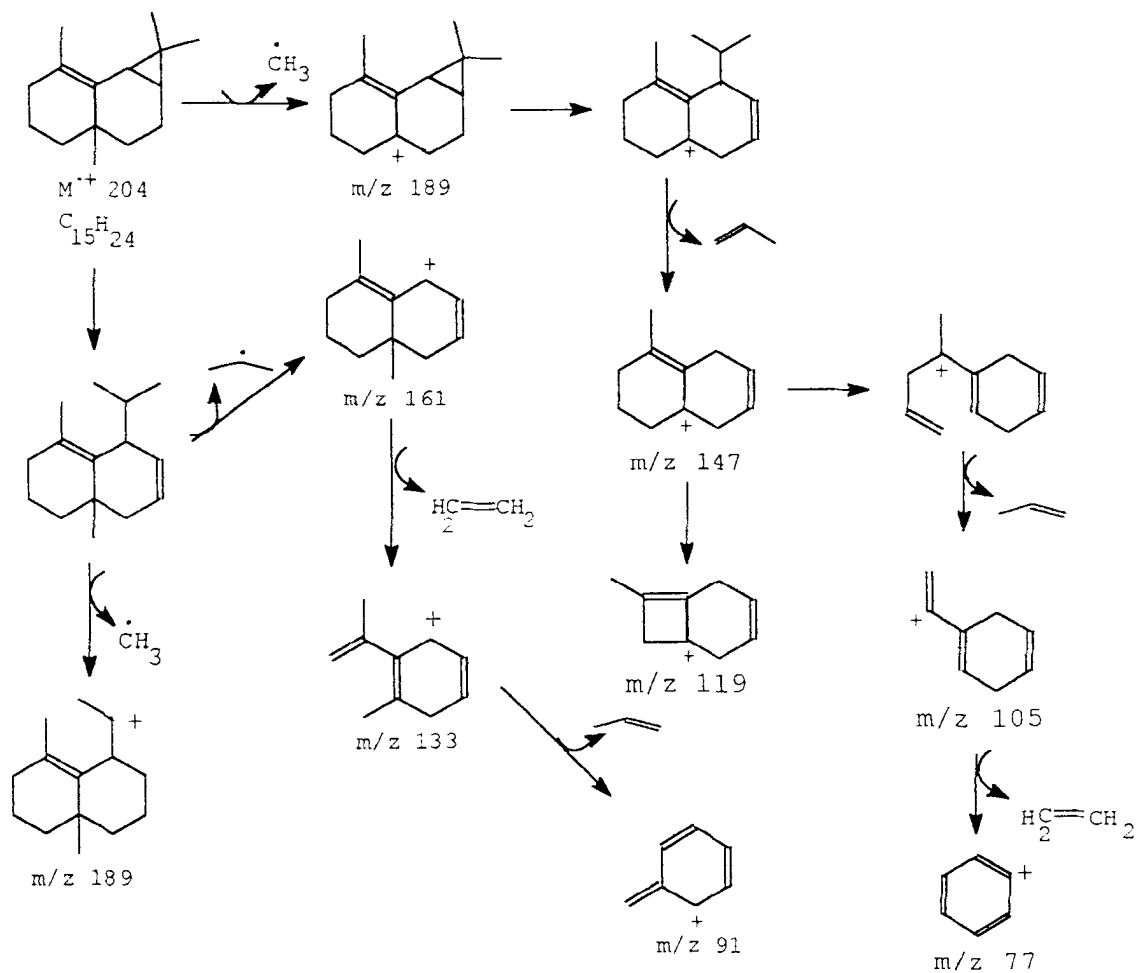


Figura 11- Espectro de massas do  $\beta$ -maaliene.



Esquema 7- Principais íons de fragmentação de massas do  $\beta$ -maaliene

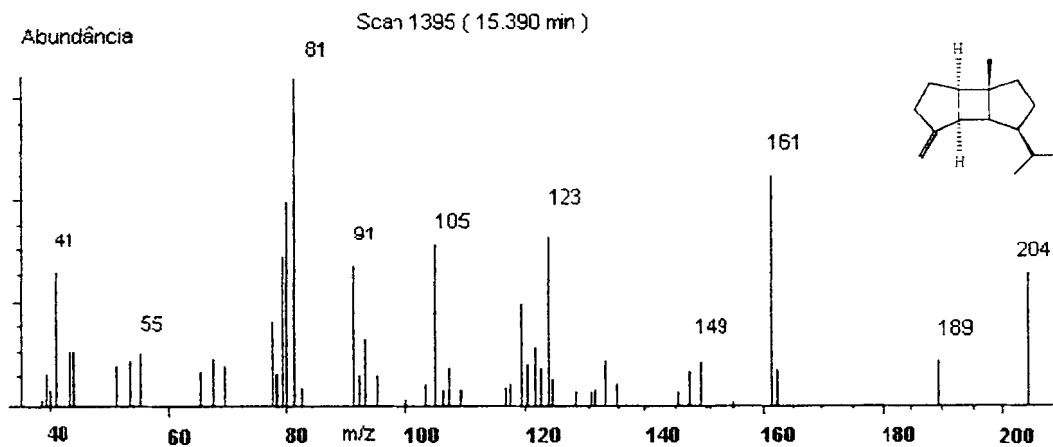
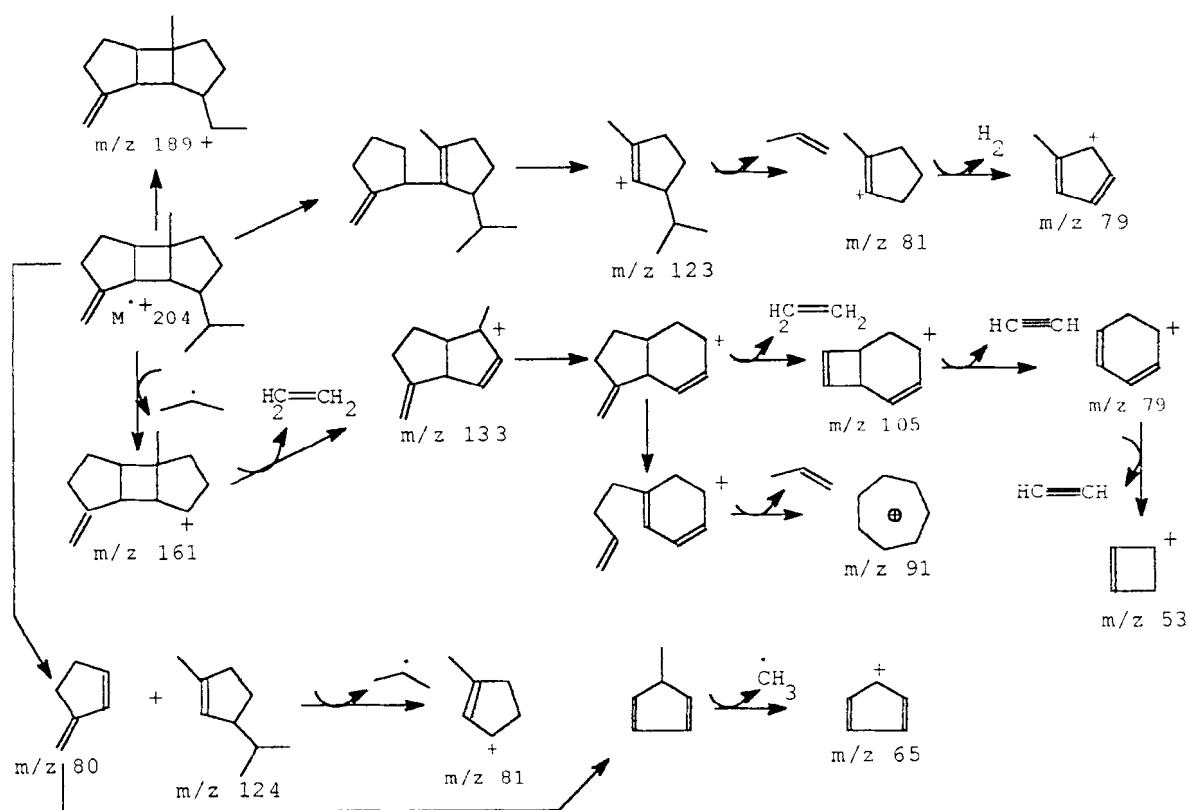


Figura 12-Espectro de massas do  $\beta$ -bourboneno.



Esquema 8-Principais íons de fragmentação de massas do  $\beta$ -bourboneno.

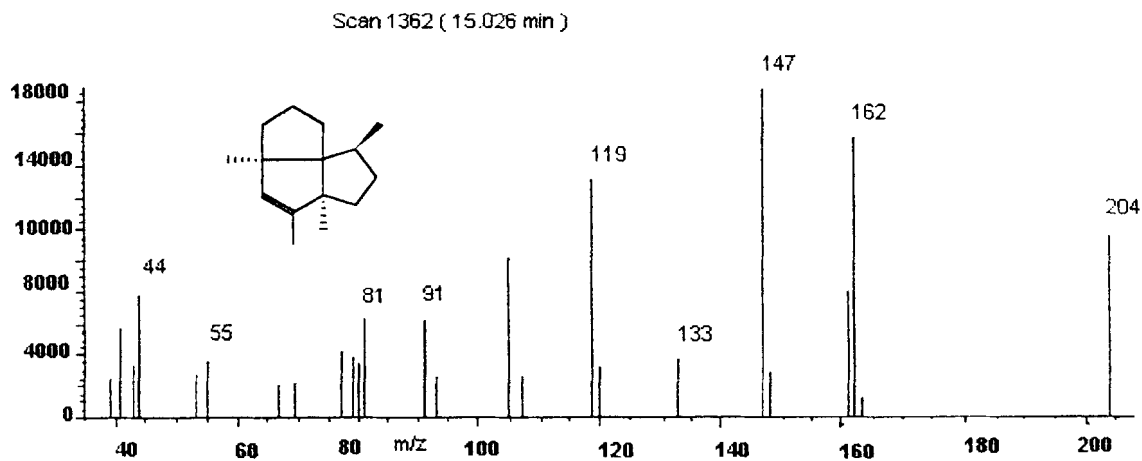
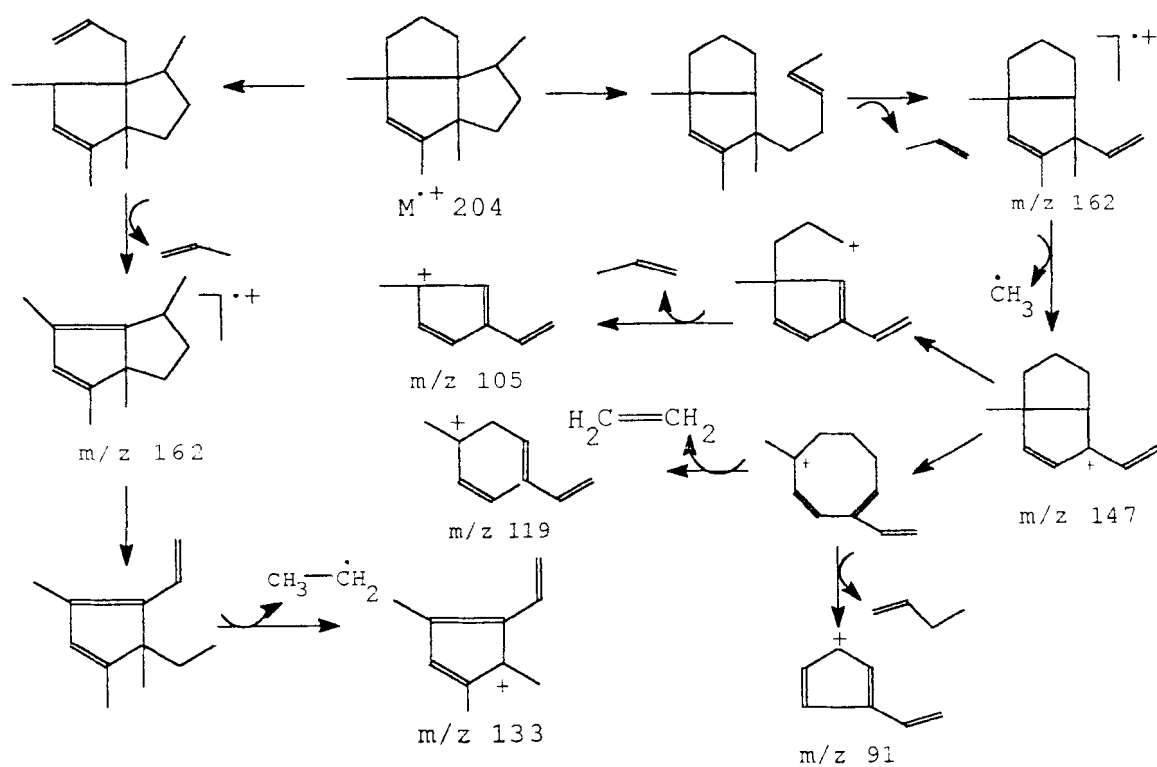


Figura 13- Espectro de massas do isocomeno



Esquema 9- Principais íons de fragmentação de massas do isocomeno.

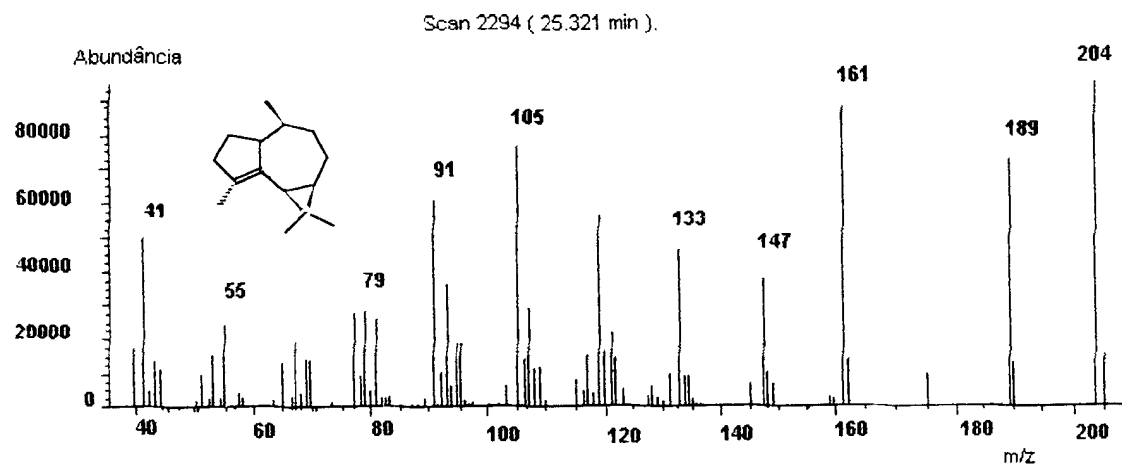
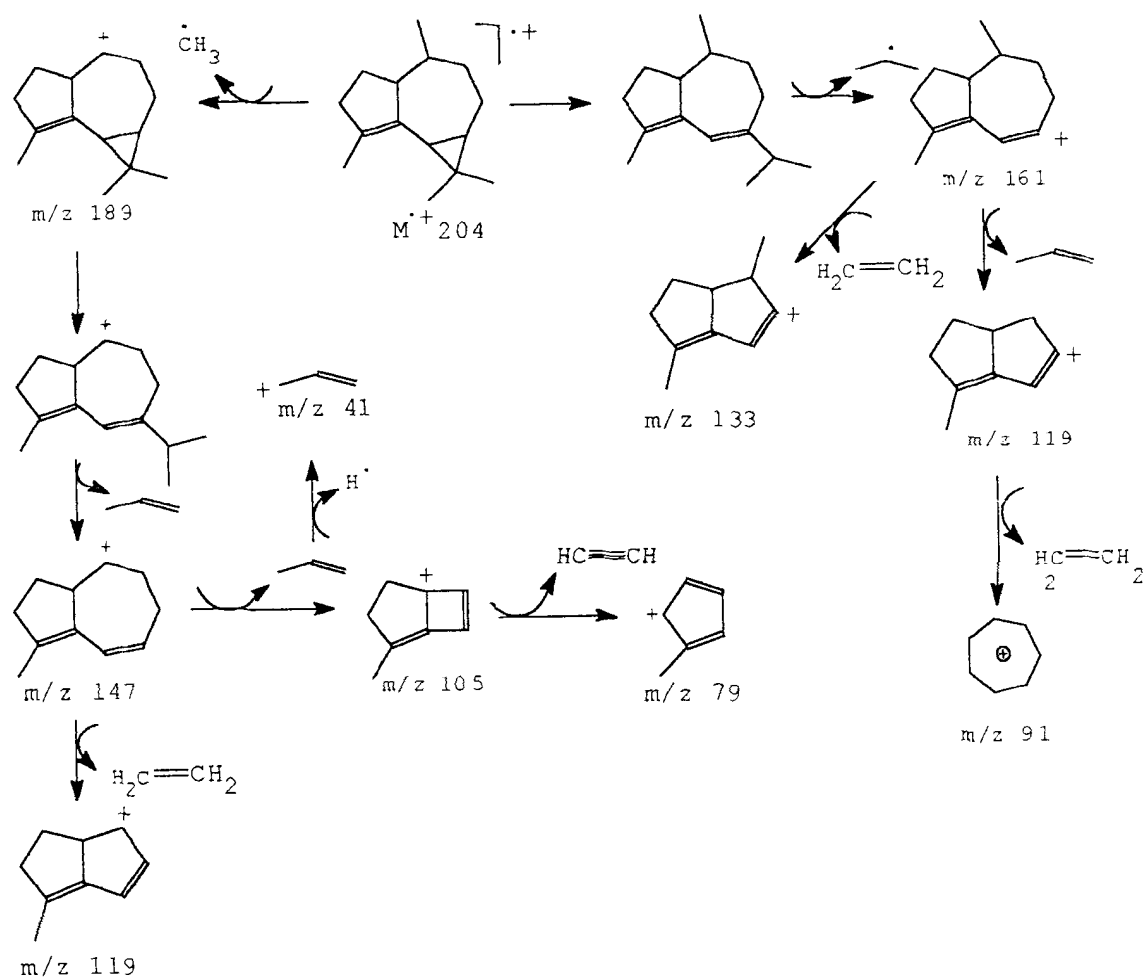


Figura 14- Espectro de massas do  $\alpha$ -gurjuneno



Esquema 10- Principais ions de fragmentação de massas do  $\alpha$ -gurjuneno.



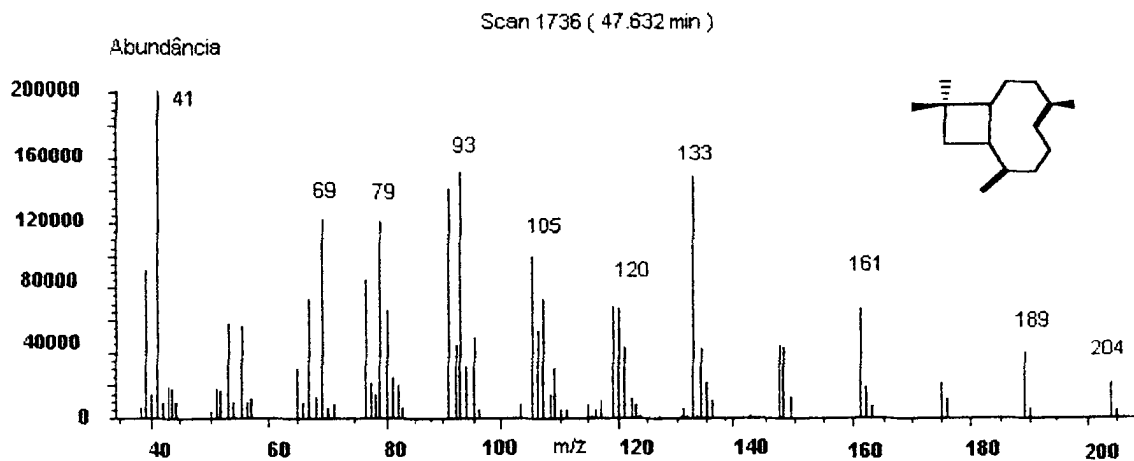
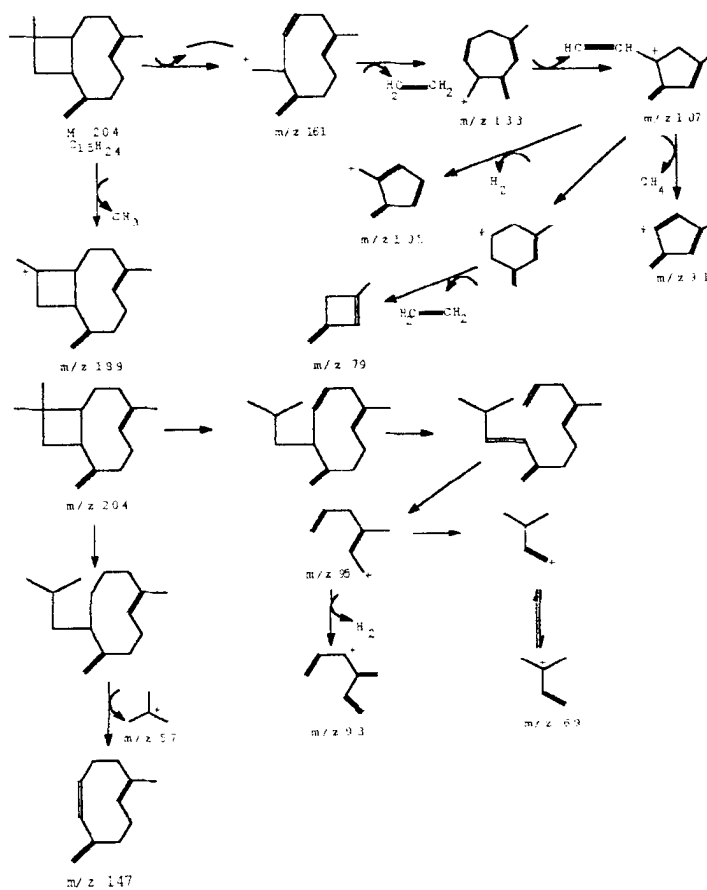


Figura 15- Espectro de massas do *trans*-cariofileno.



Esquema 11- Principais íons de fragmentação de massas do *trans*-cariofileno.

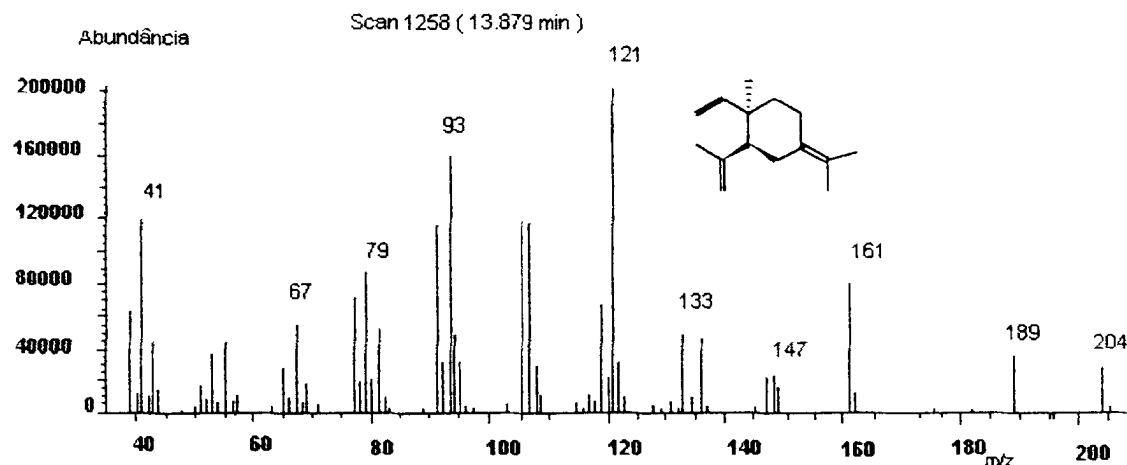
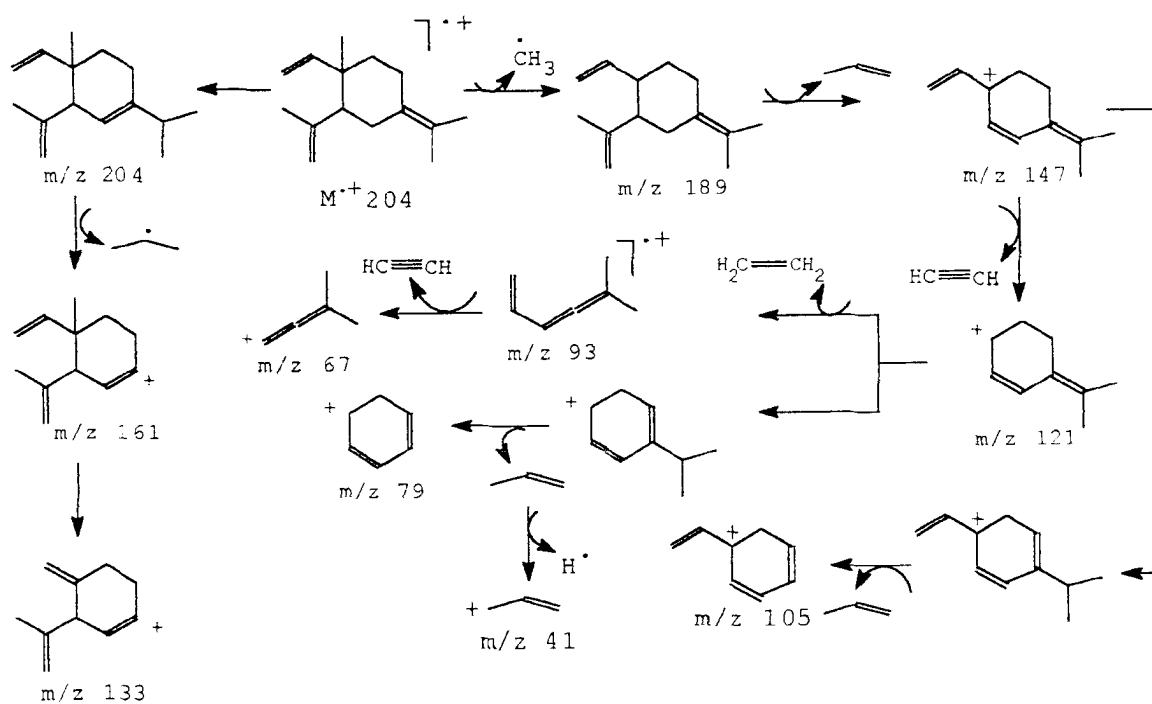


Figura 16- Espectro de massas do  $\gamma$ -elemeno.



Esquema 12-Principais íons de fragmentação do  $\gamma$ -elemeno.

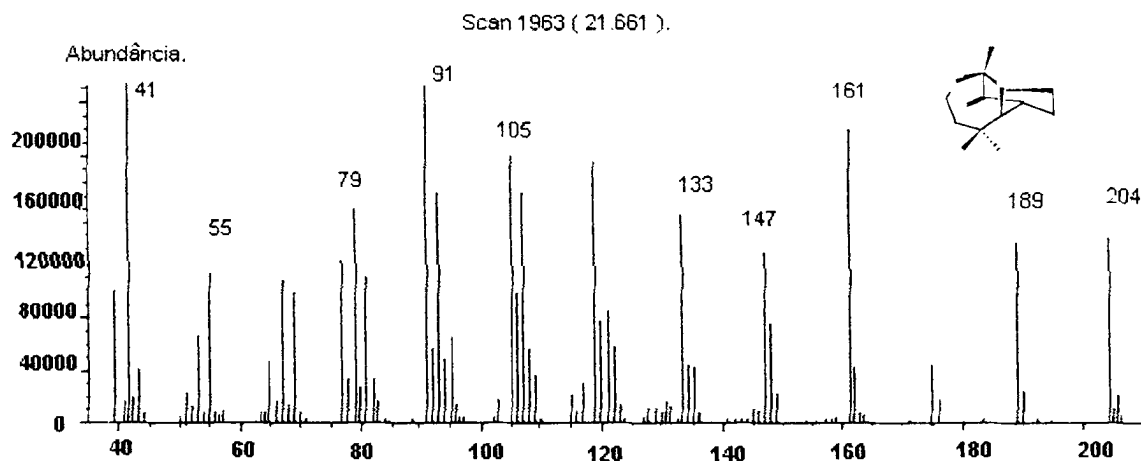
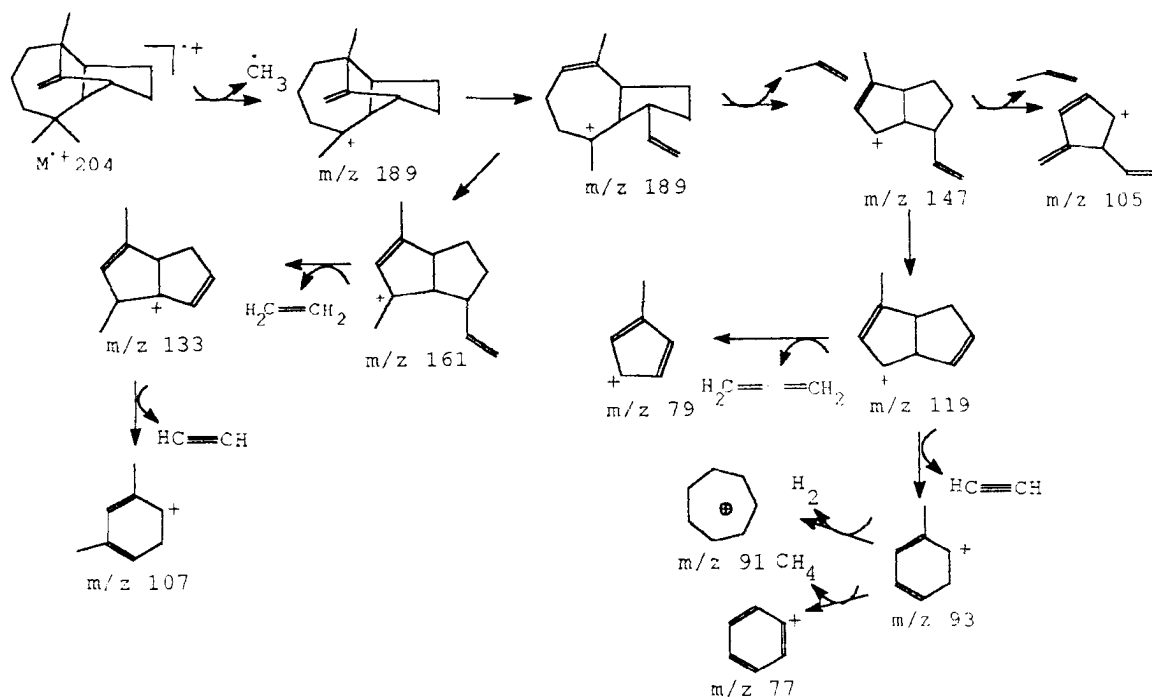


Figura 17- Espectro de massas do longifoleno.



Esquema 13- Principais íons de fragmentação de massas do longifoleno.

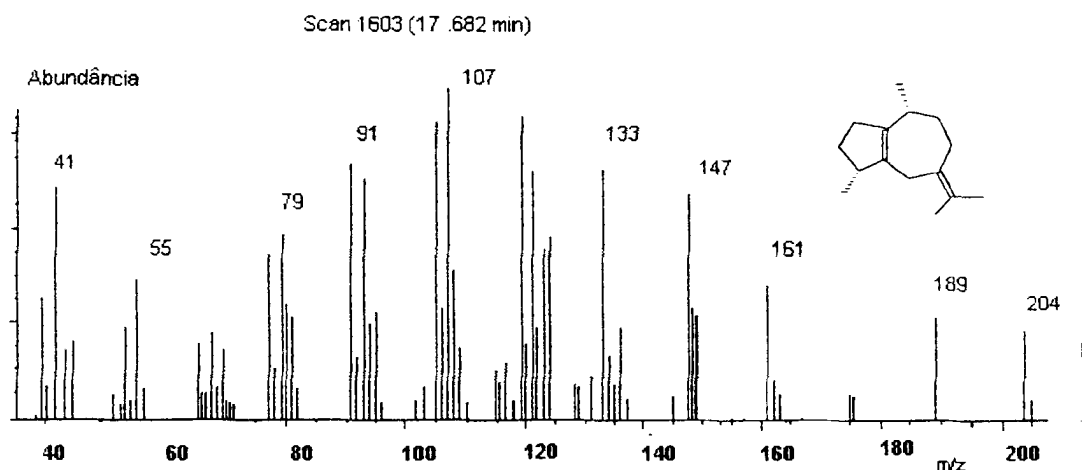
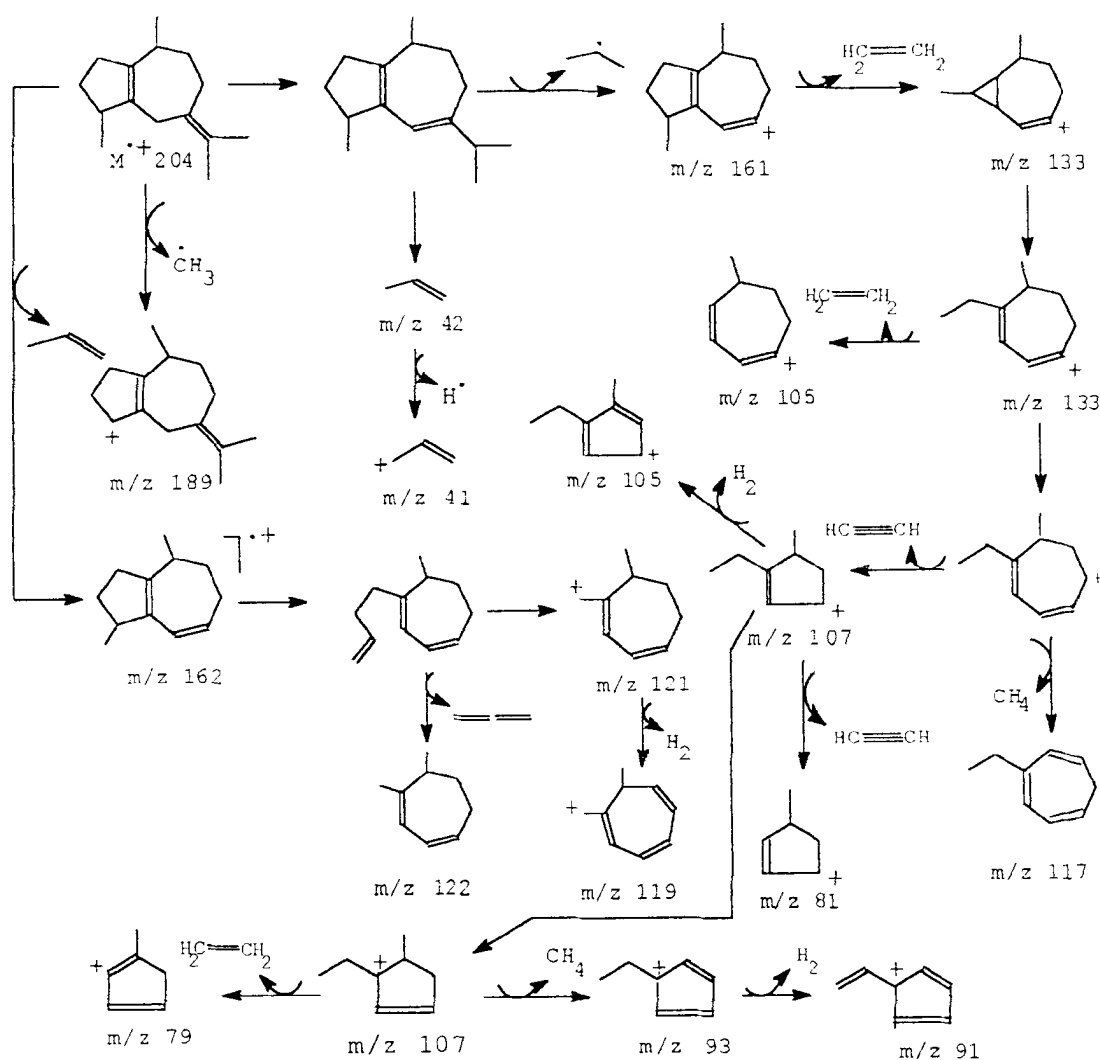


Figura 18- Espectro de massas do  $\alpha$ -guiieno



Esquema 14- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -guiieno.

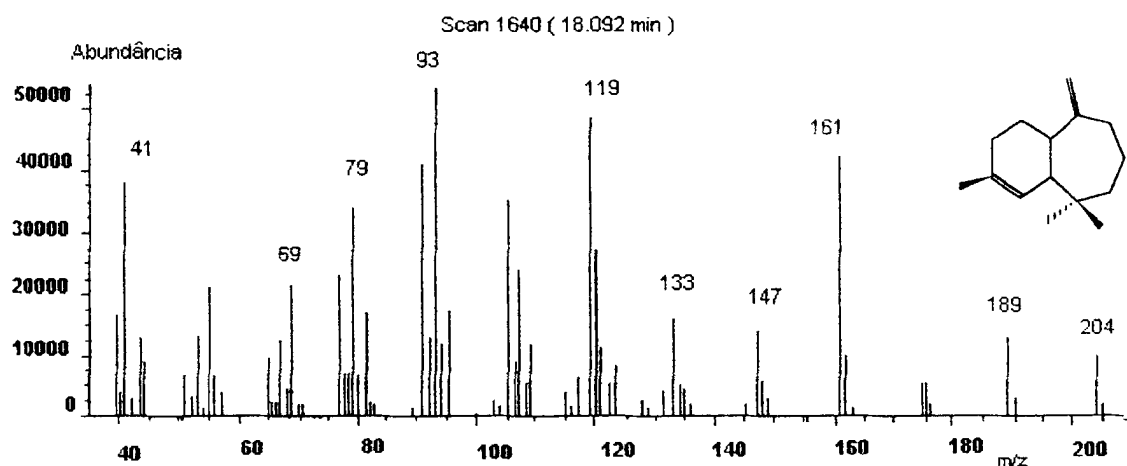
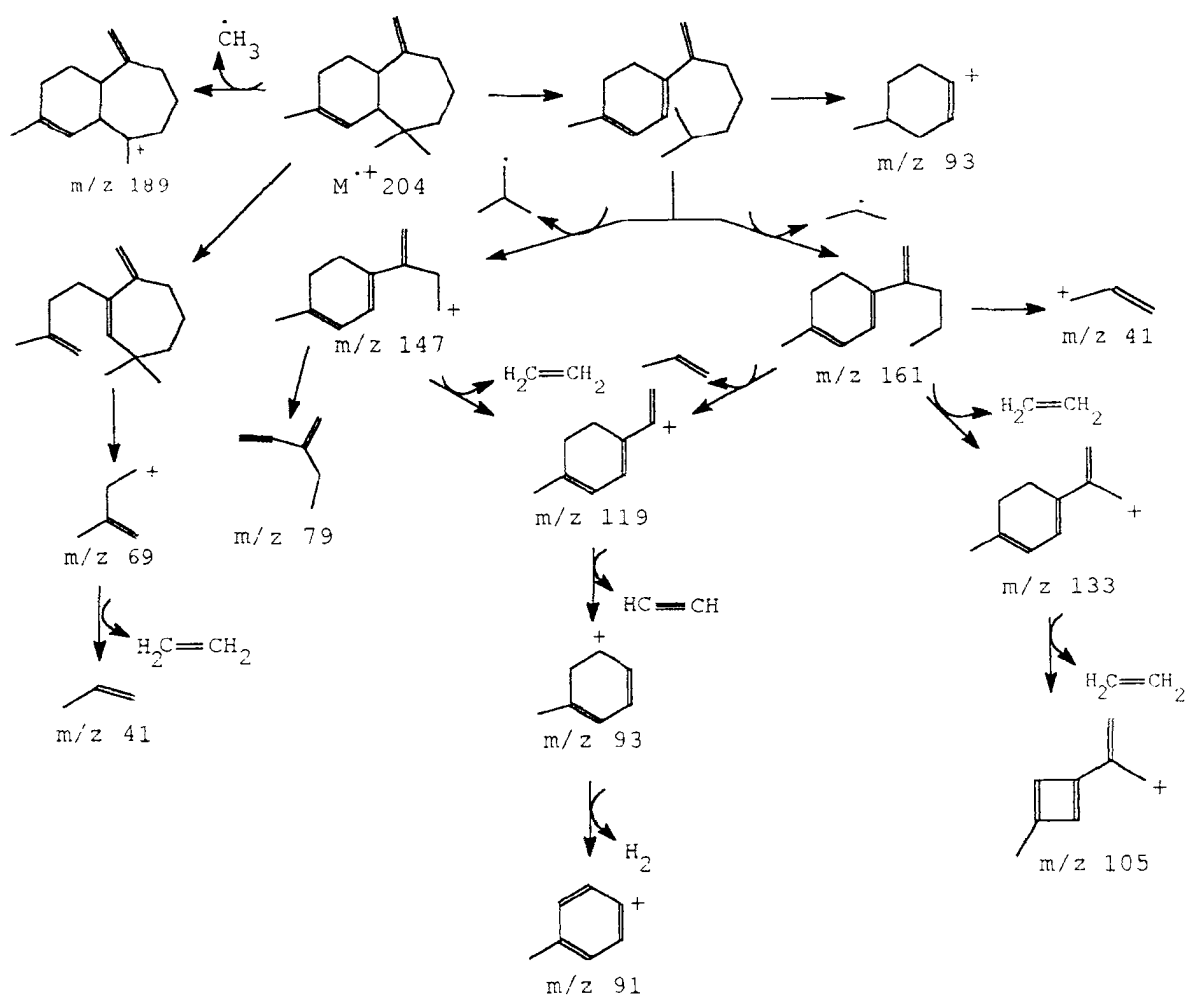


Figura 19- Espectro de massas do  $\alpha$ -himachaleno.



Esquema 15- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -himachaleno.

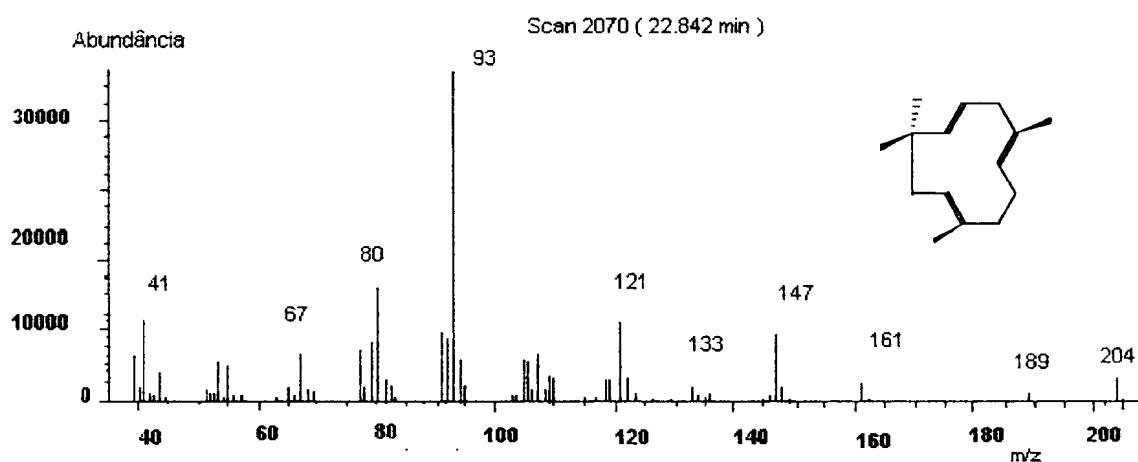
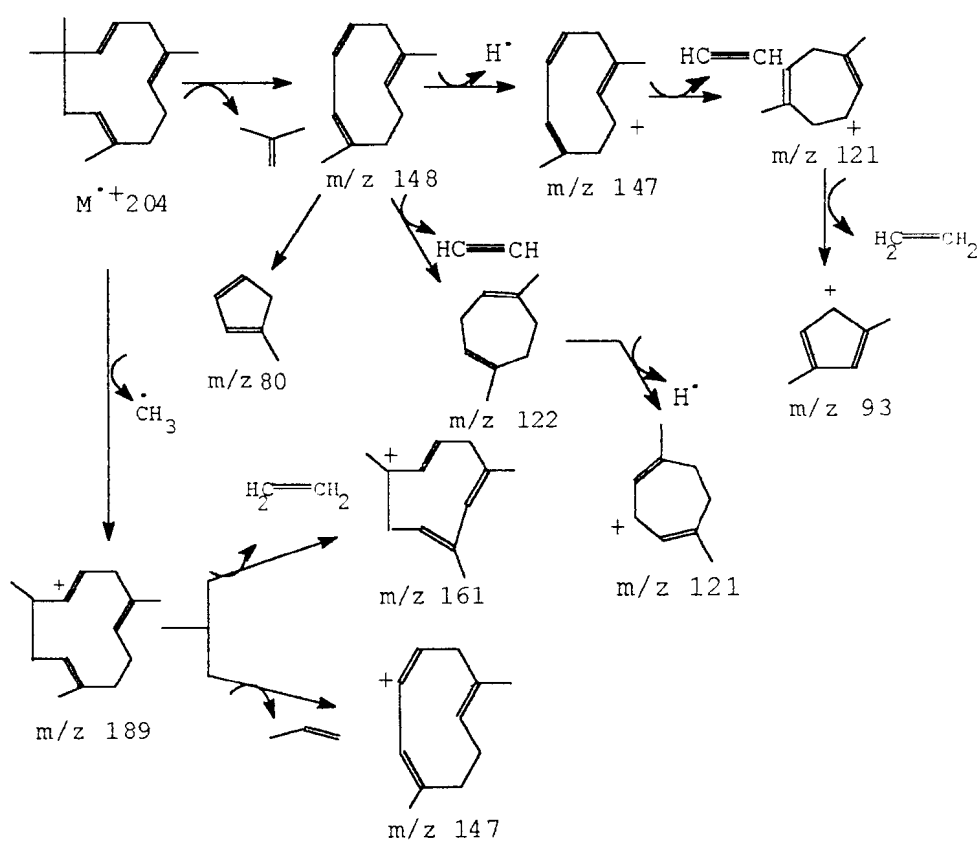


Figura 20-Espectro de massas do  $\alpha$ -humuleno.



Esquema 16- Principais íons de fragmentação do  $\alpha$ -humuleno.

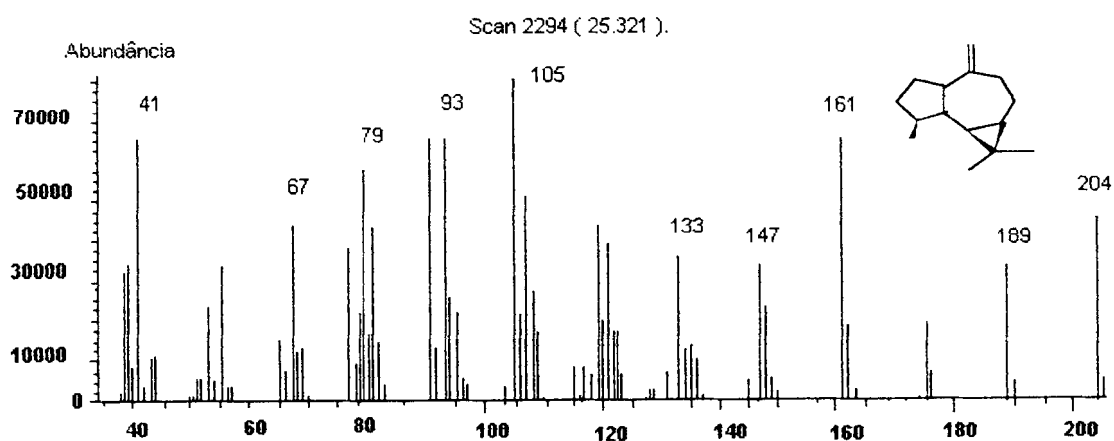
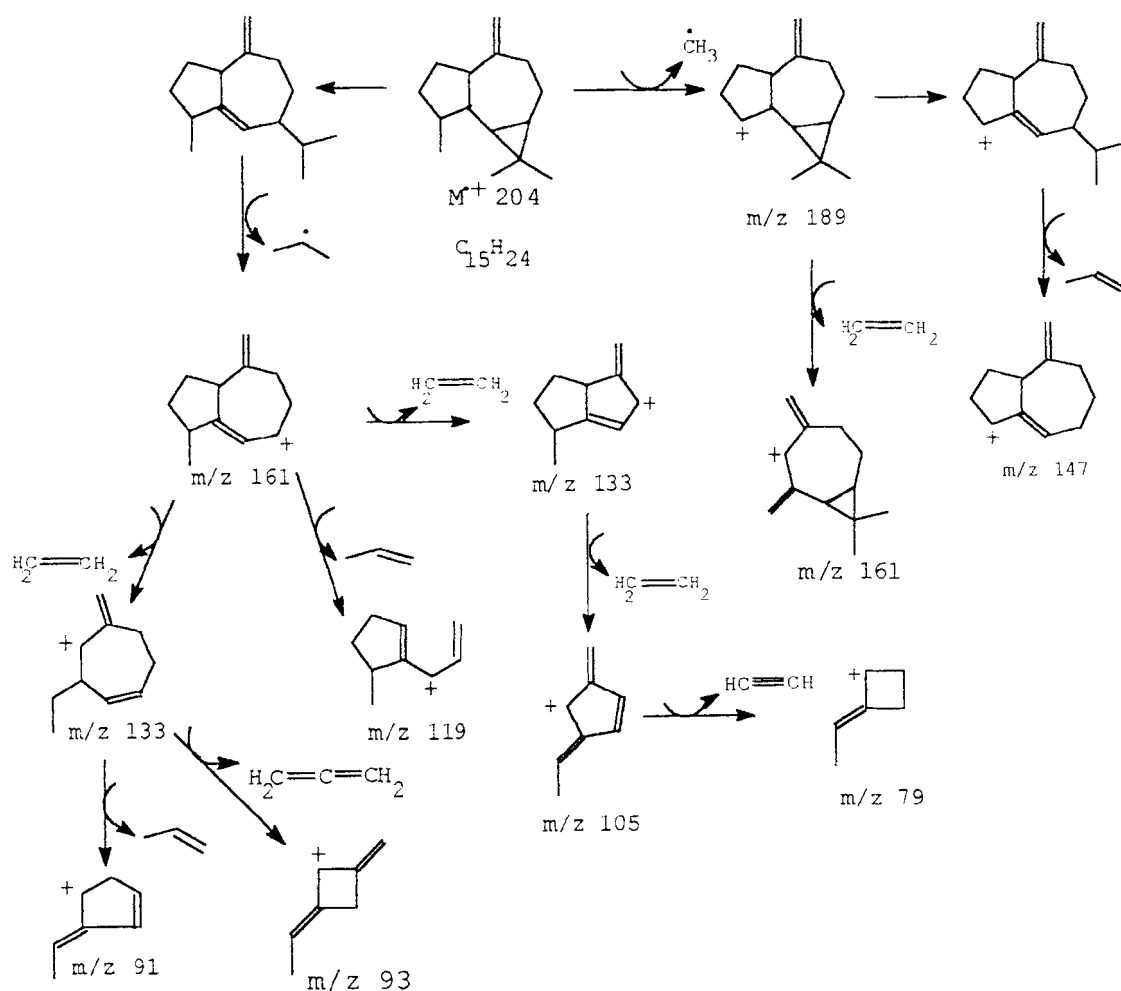


Figura 21- Espectro de massas do allo-aromadendreno.



Esquema 17- Principais íons de fragmentação de massas do allo-aromadendreno.

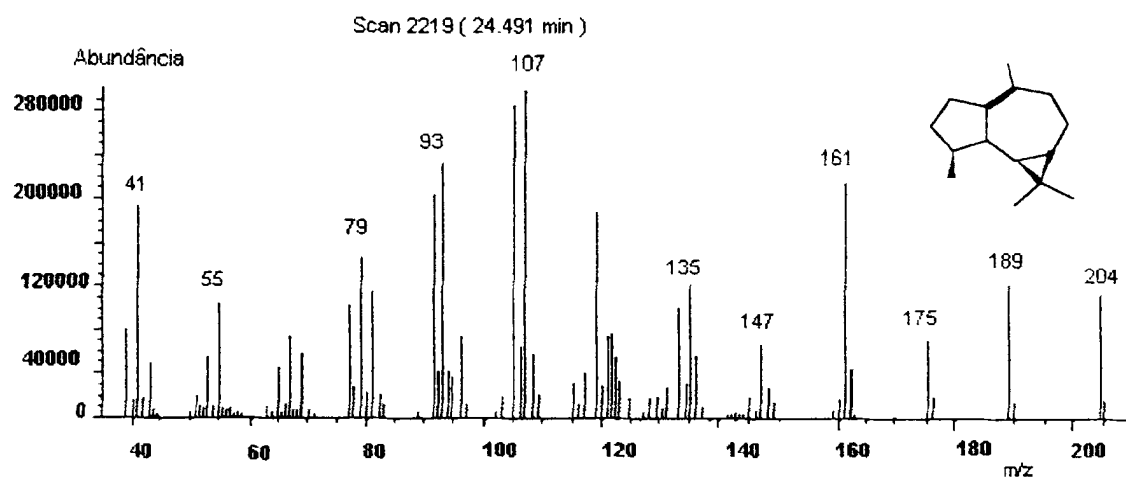
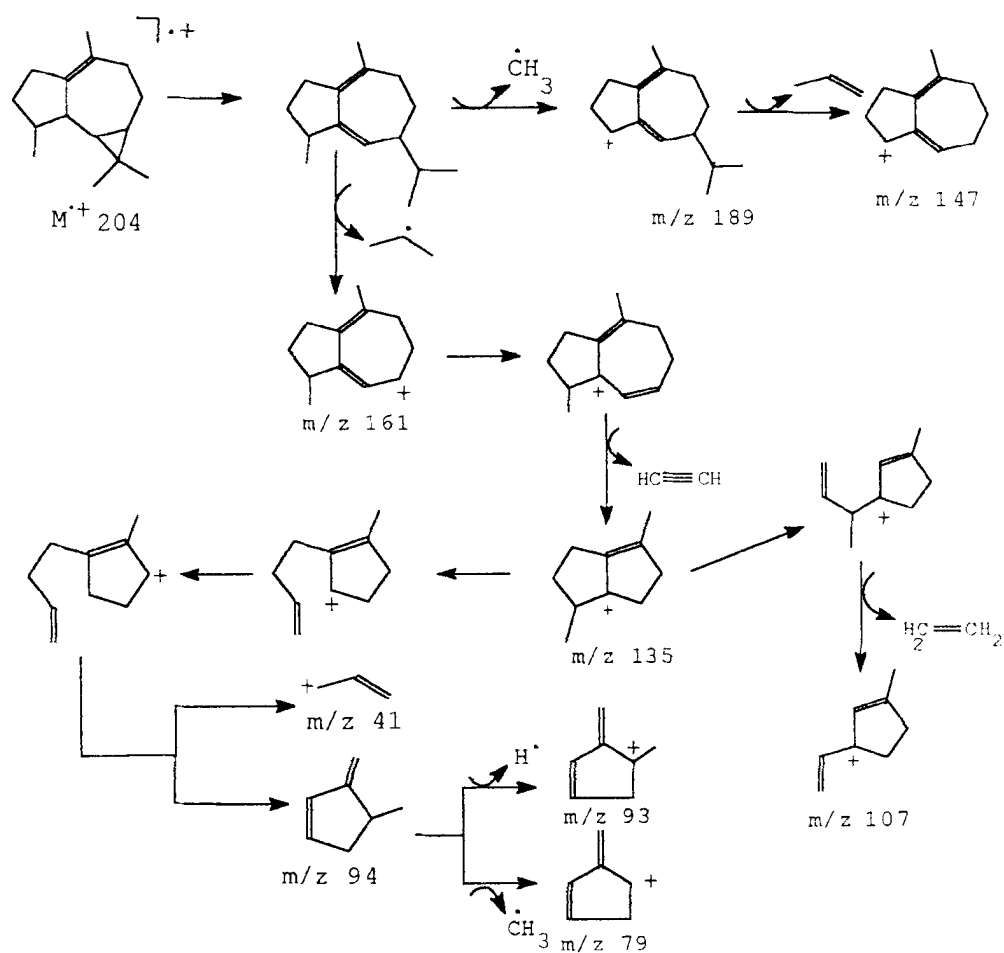


Figura 22- Espectro de massas do viridiflorenol.



Esquema 18- Principais íons de fragmentação de massas do viridiflorenol.



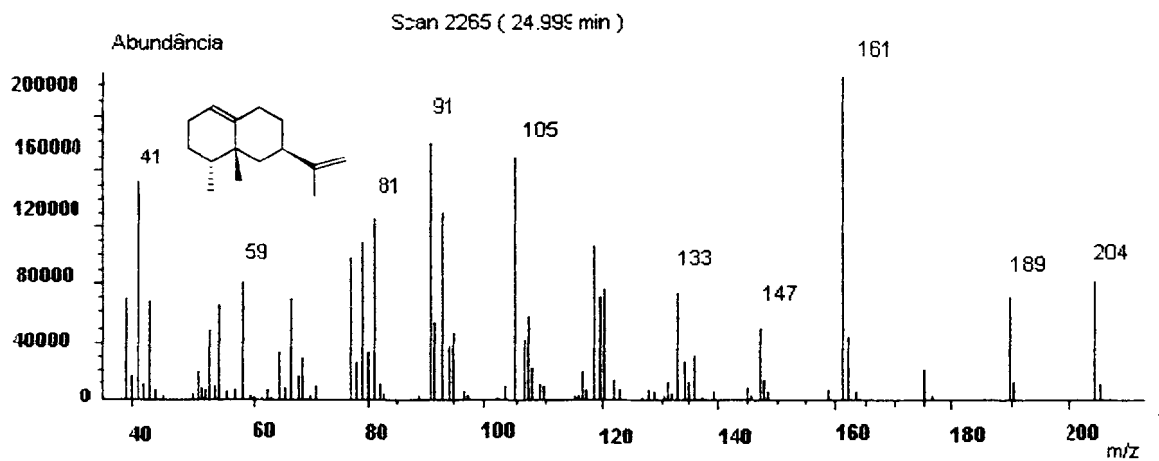
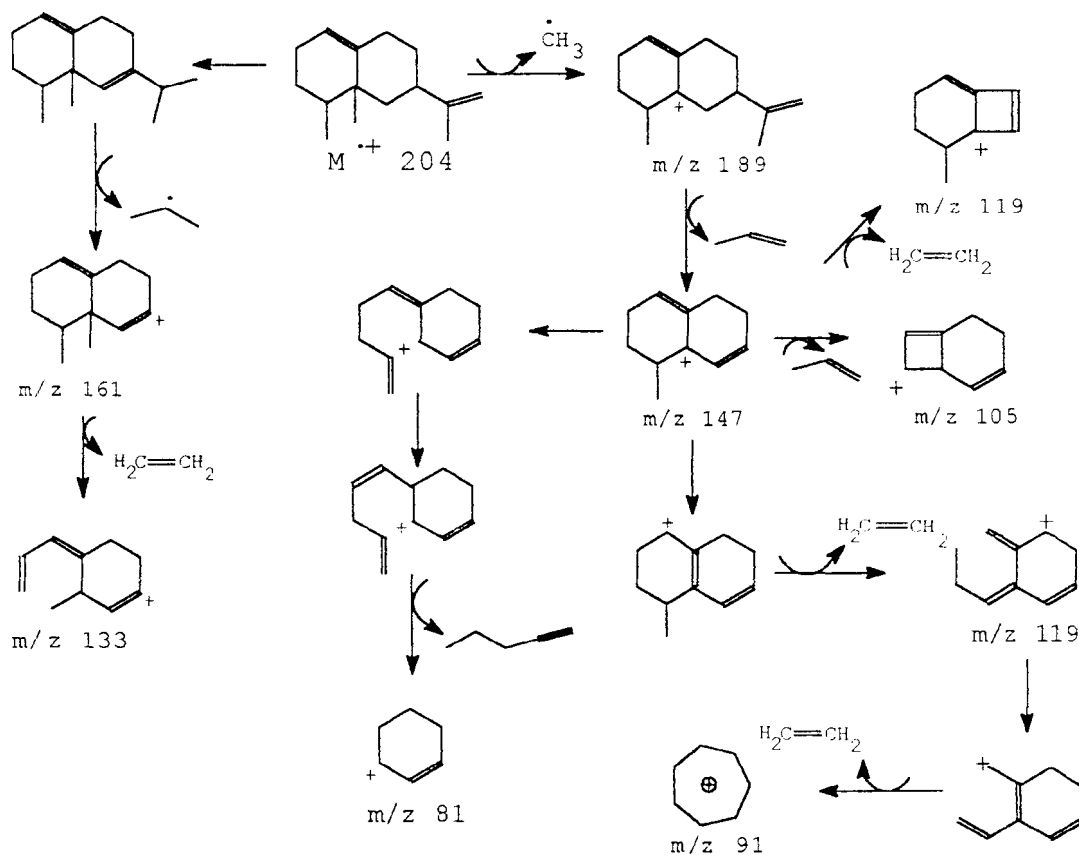


Figura 23- Espectro de massas do valenceno.



Esquema 19- Principais íons de fragmentação de massas do valenceno.

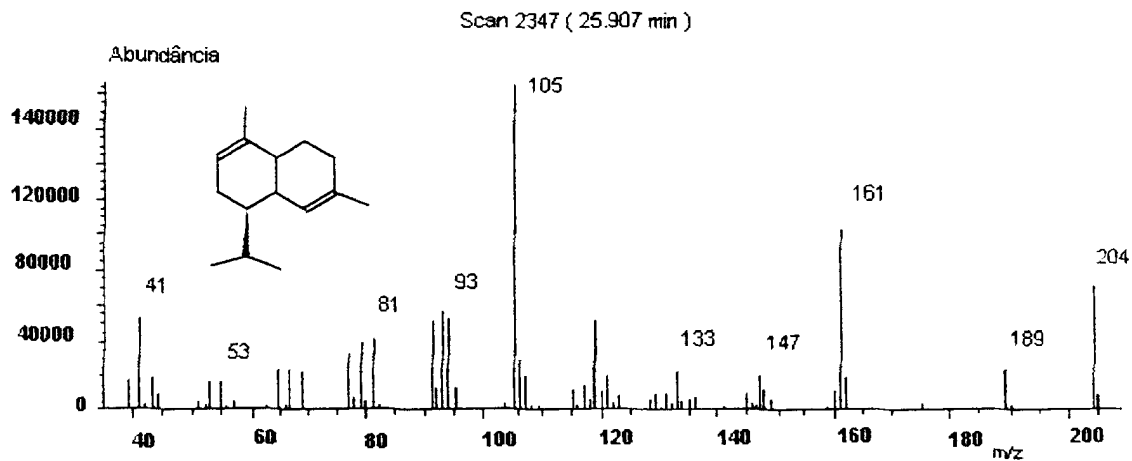
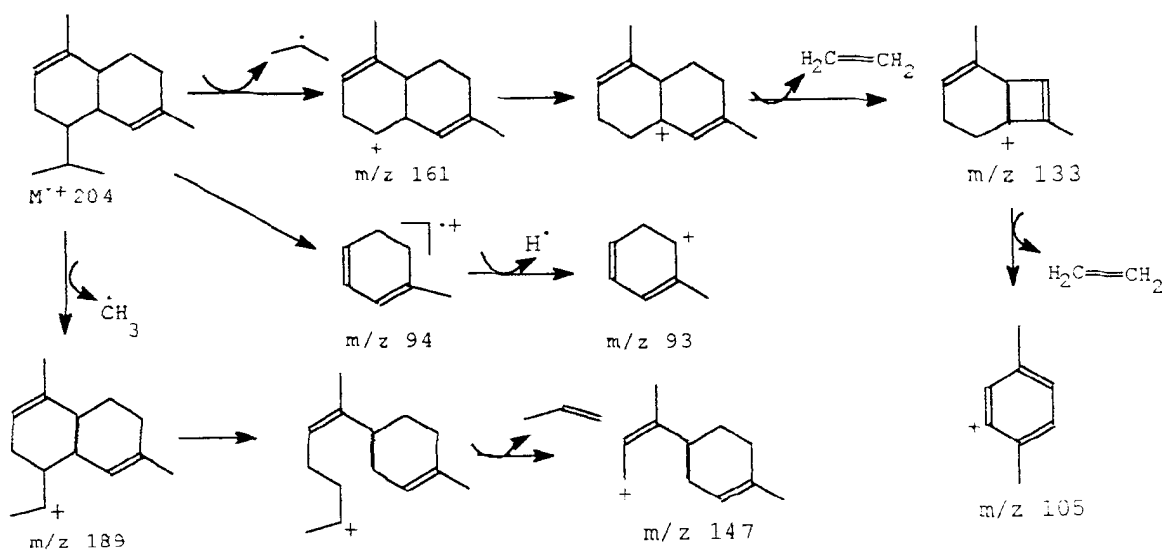


Figura 24- Espectro de massas do  $\alpha$ -muuroleno.



Esquema 20- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ - muuroleno.

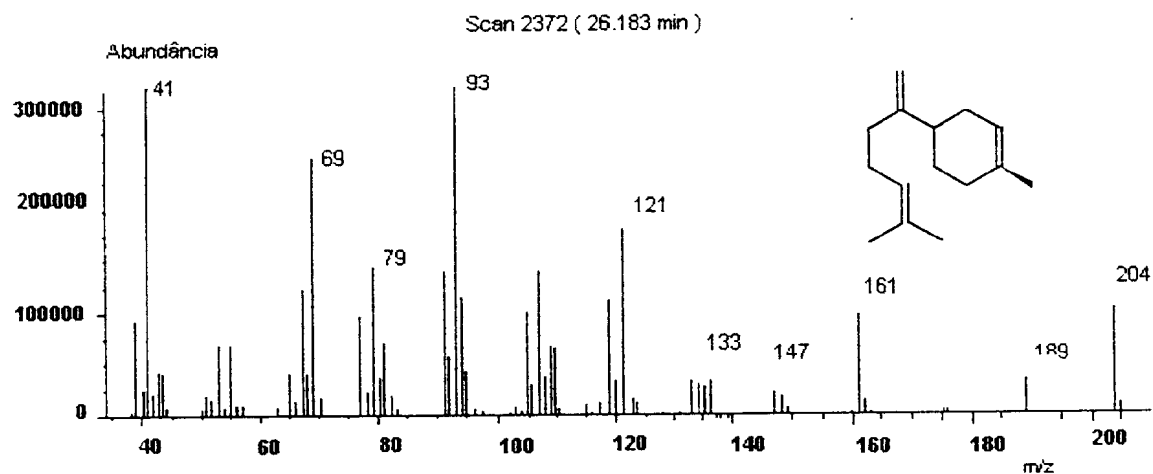
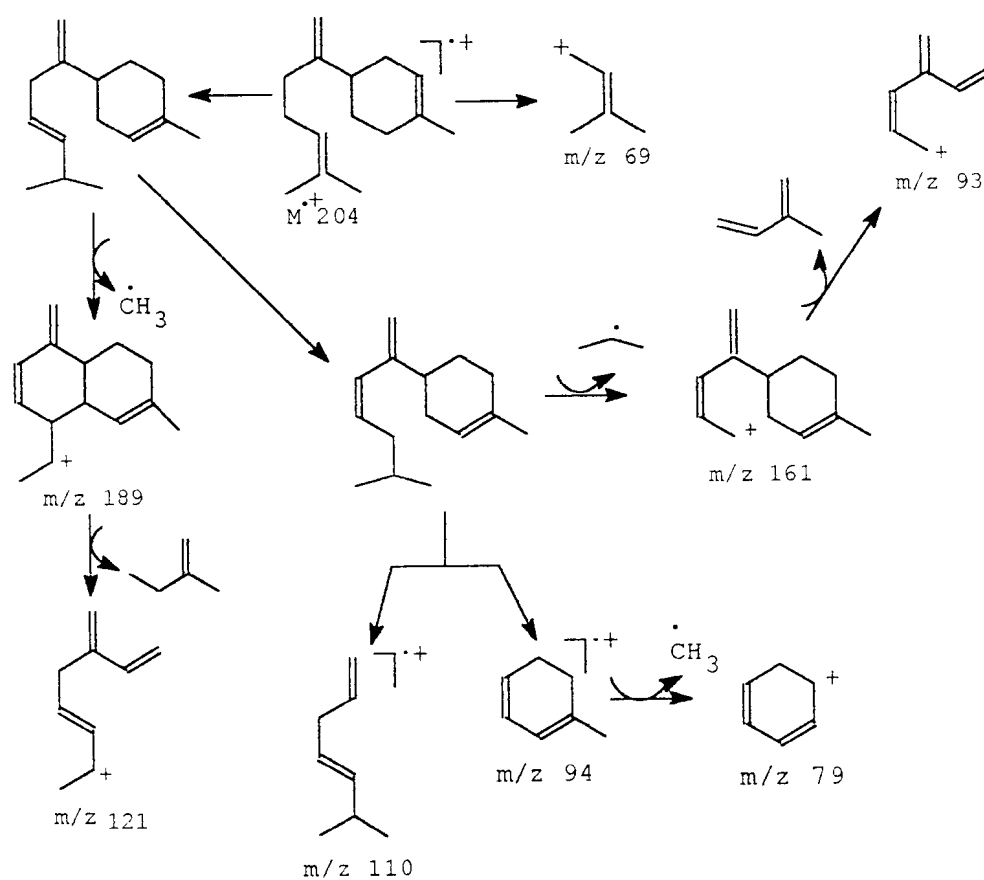


Figura 25- Espectro de massas do  $\beta$ -bisaboleno.



Esquema 21- Principais íons de fragmentação de massas do  $\beta$ -bisaboleno.

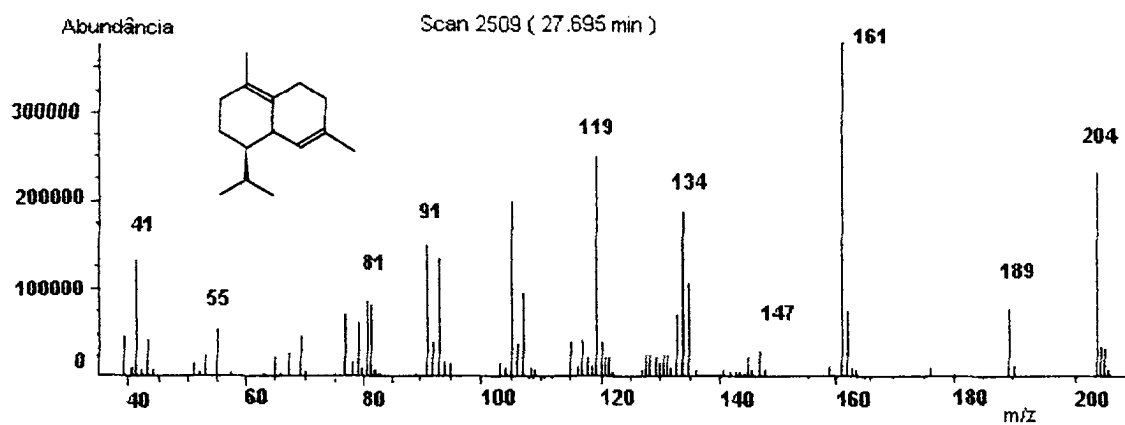
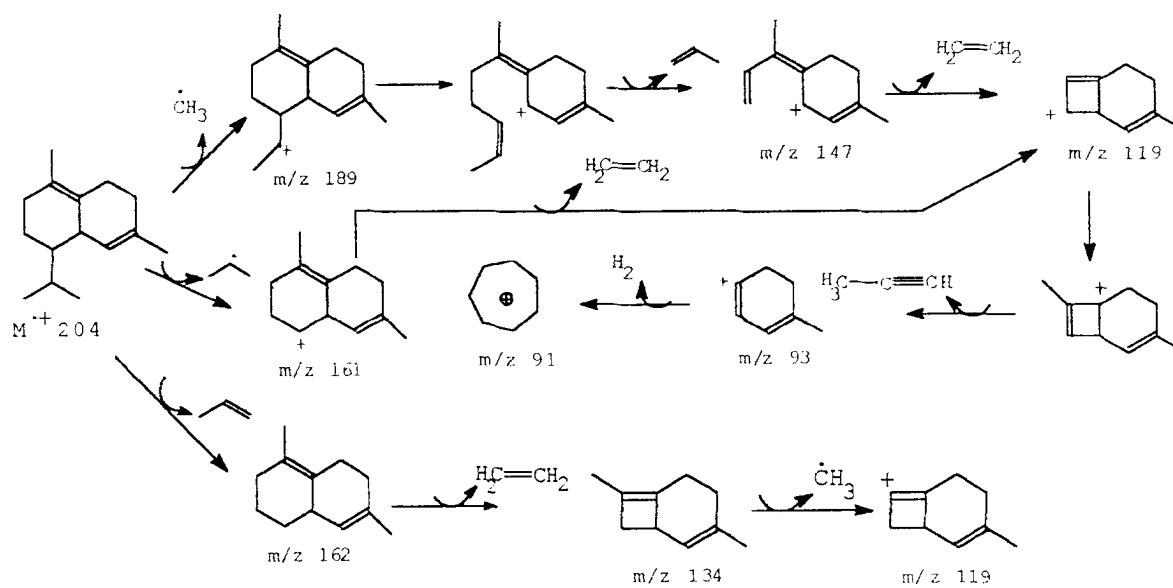


Figura 26- Espectro de massas do  $\delta$ -cadineno.



Esquema 22 - Principais íons de fragmentação de massas do  $\delta$ -cadineno.

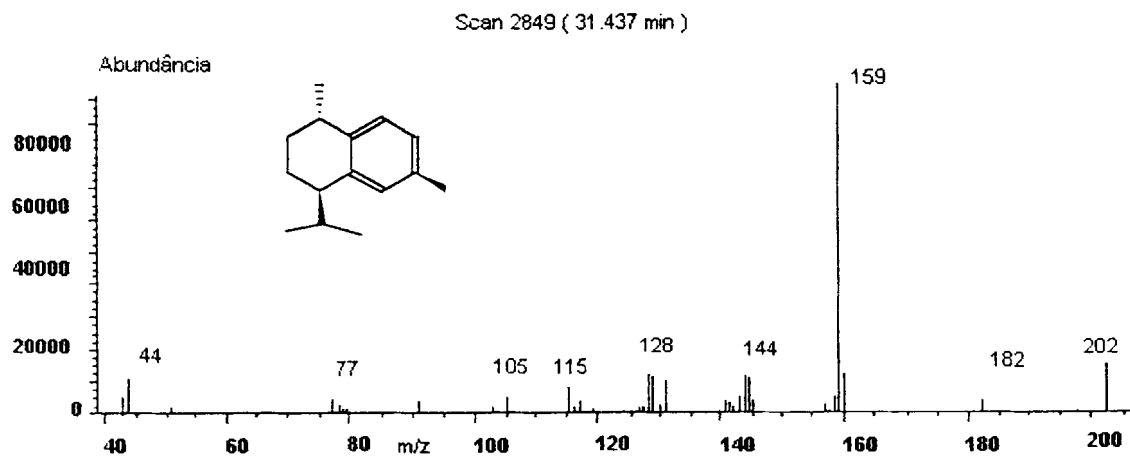
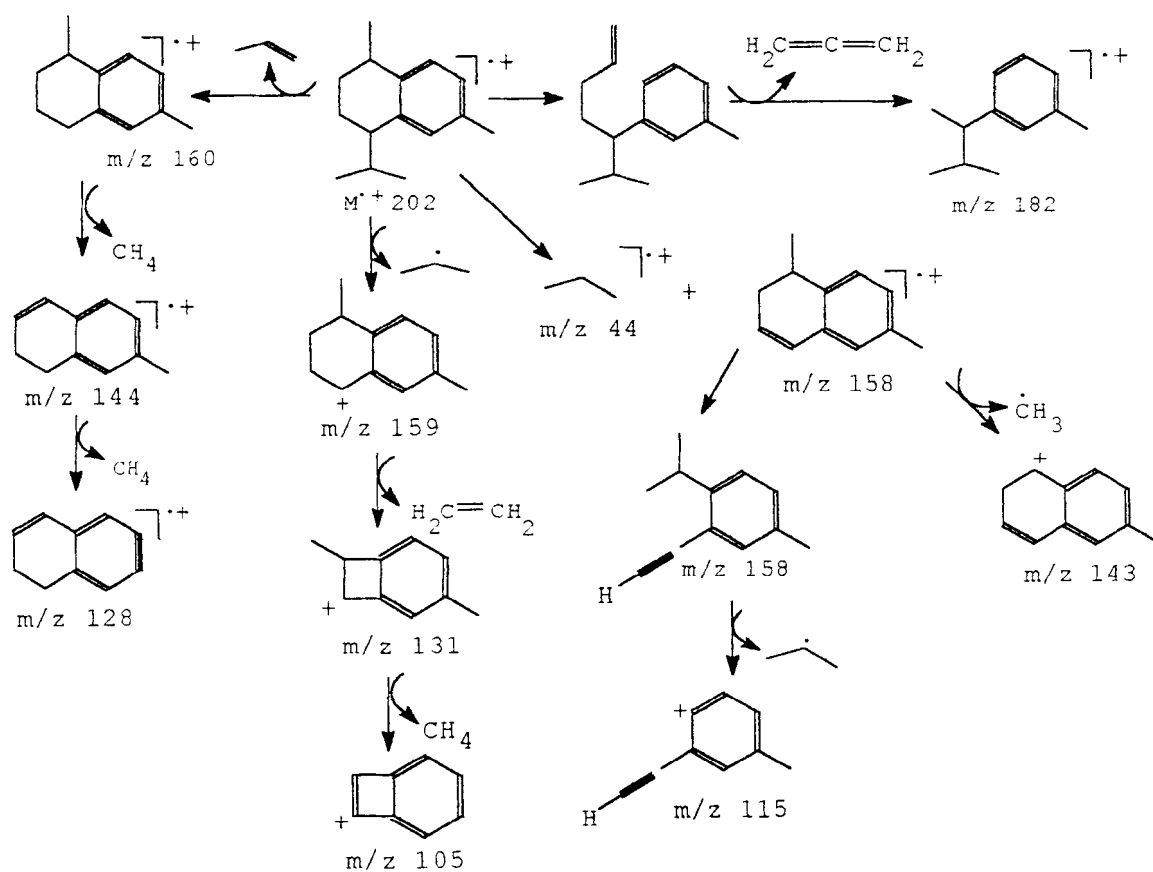


Figura 27- Espectro de massas do calameneno.



Esquema 23- Principais íons de fragmentação de massas do calameneno.

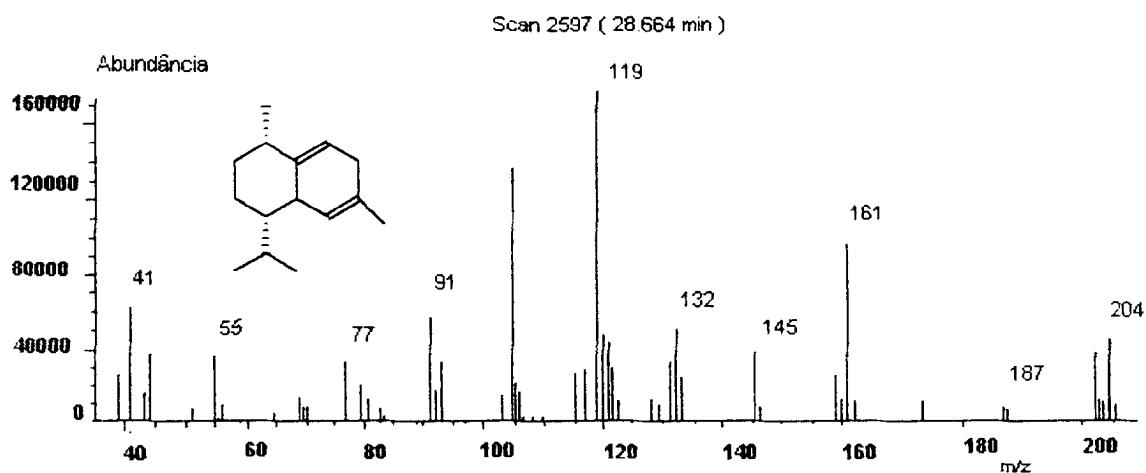
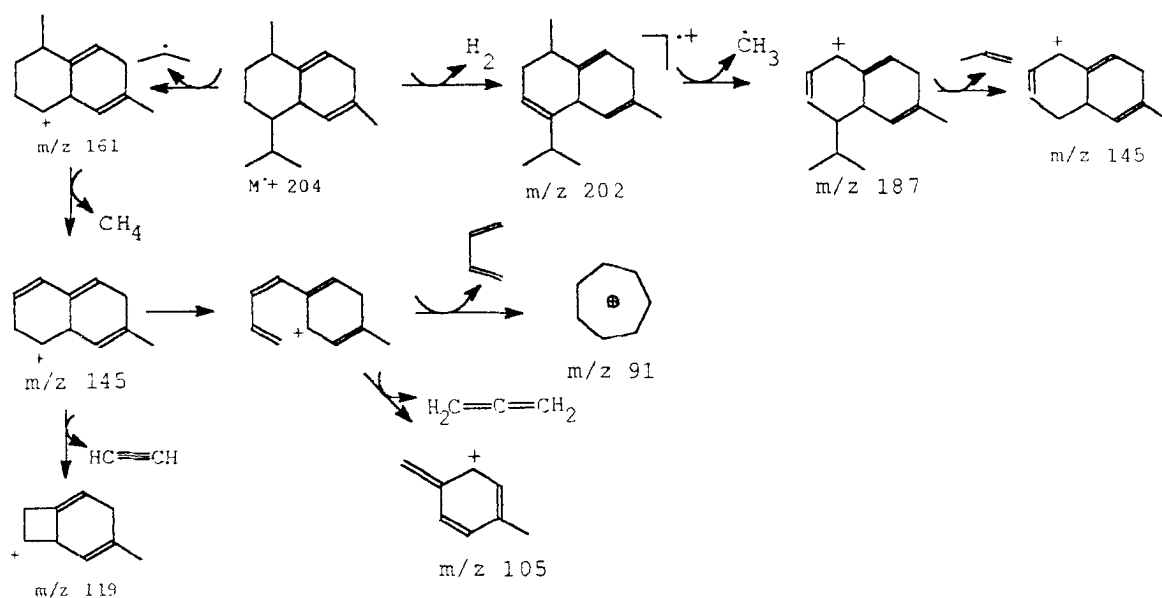


Figura 28- Espectro de massas da cadina -1,4 dieno.



Esquema 24- Principais íons de fragmentação de massas da cadina -1,4 dieno.

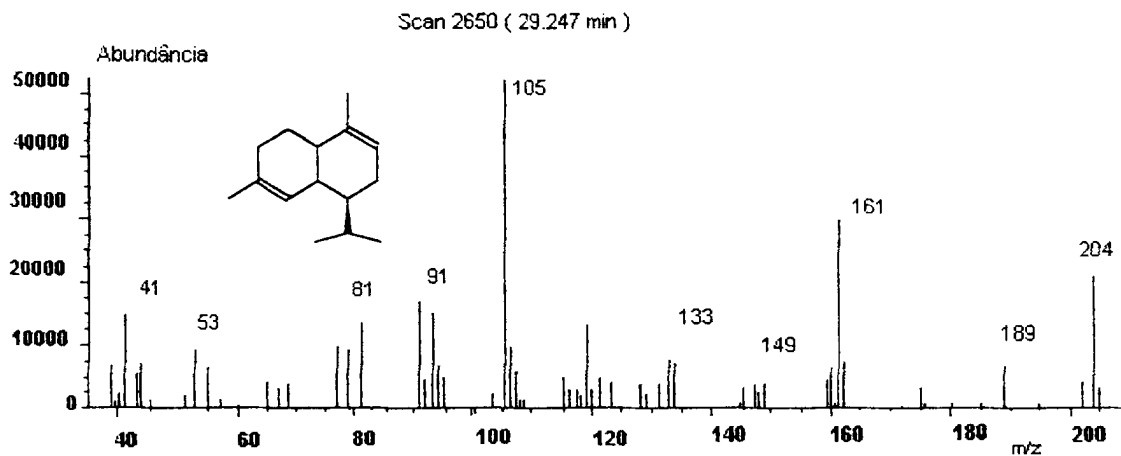
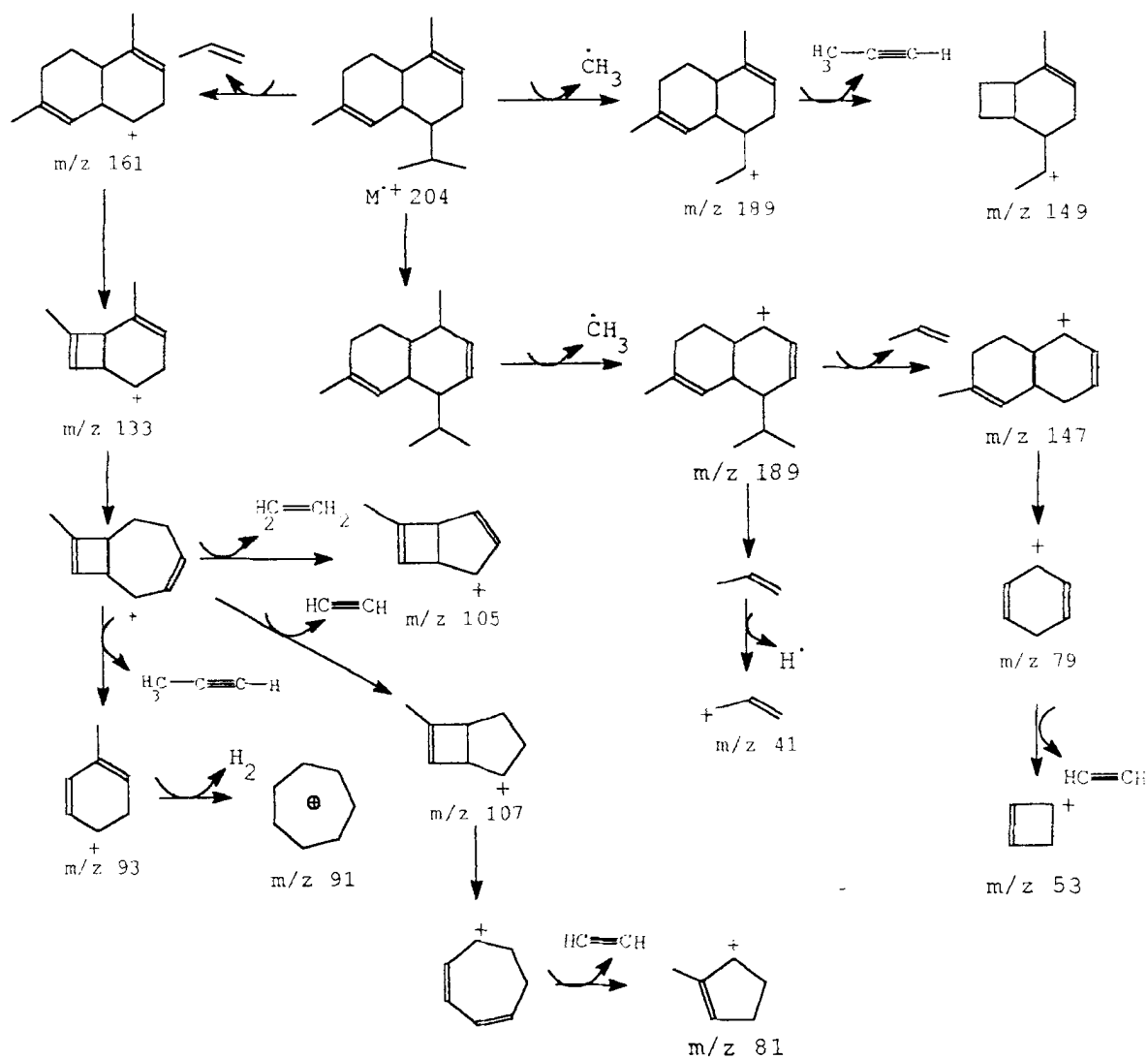


Figura 29- Espectro de massas do  $\alpha$ -cadineno.



Esquema 25- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -cadineno.

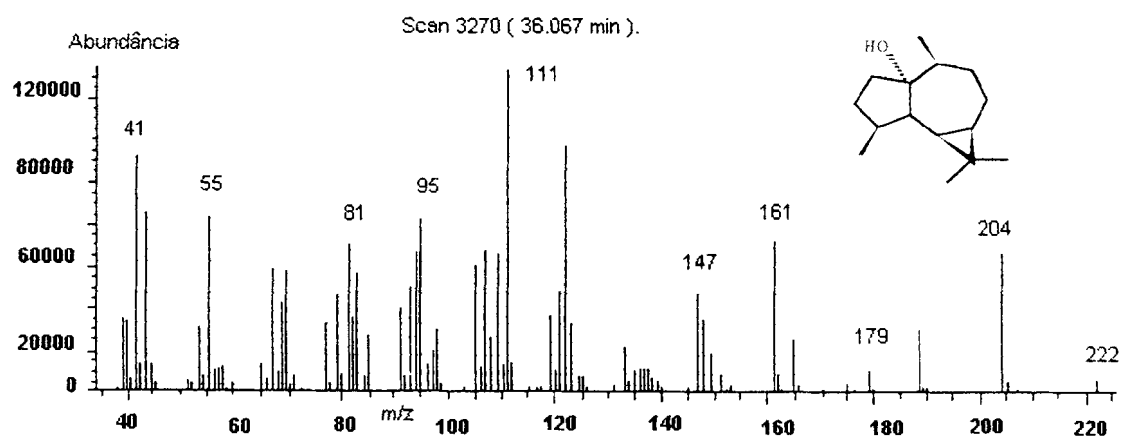


Figura 30- Espectro de massas do palustrol.

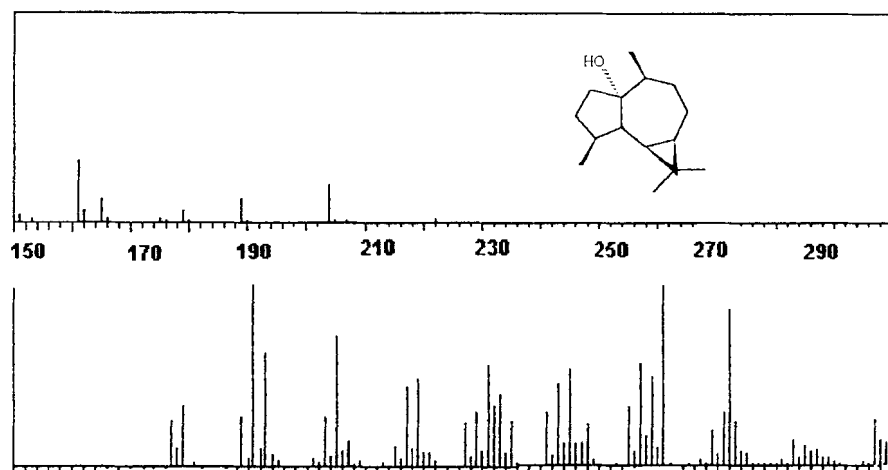
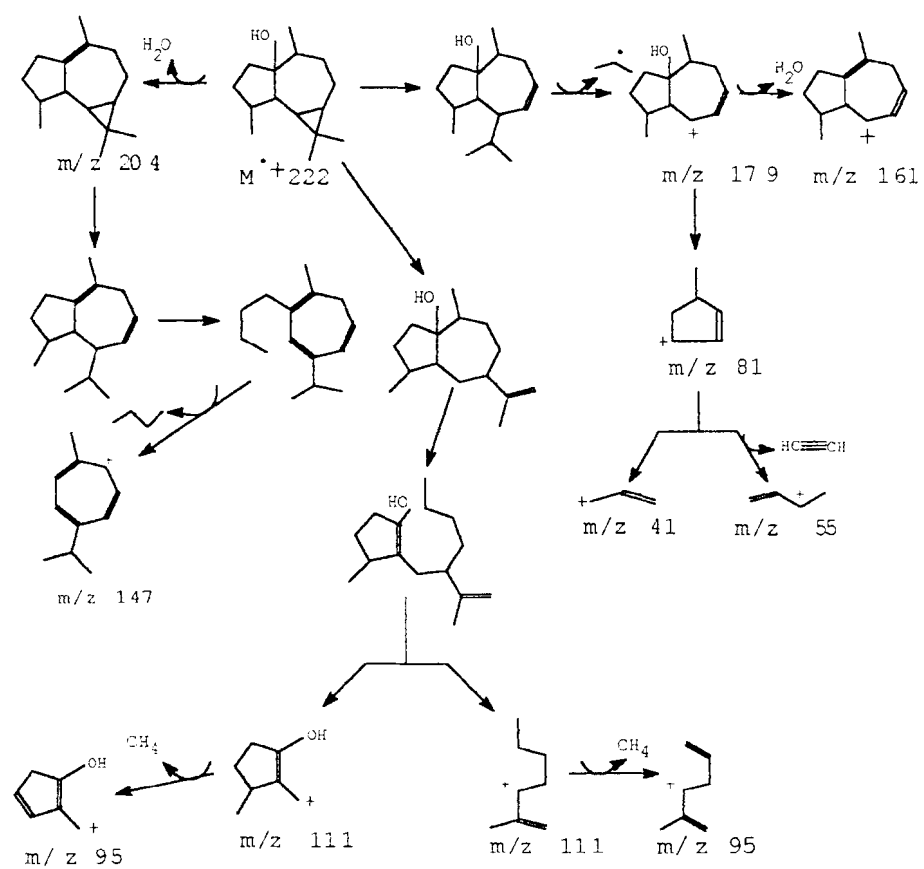


Figura 31- Espectro de massas do palustrol , obtido da espectroteca NIST.





**Esquema 26-** Principais íons de fragmentação de massas do palustrol.

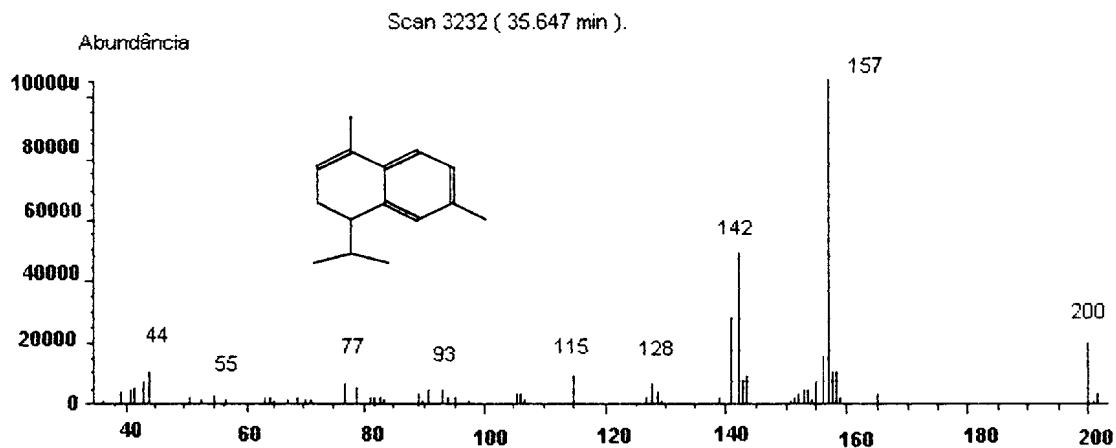
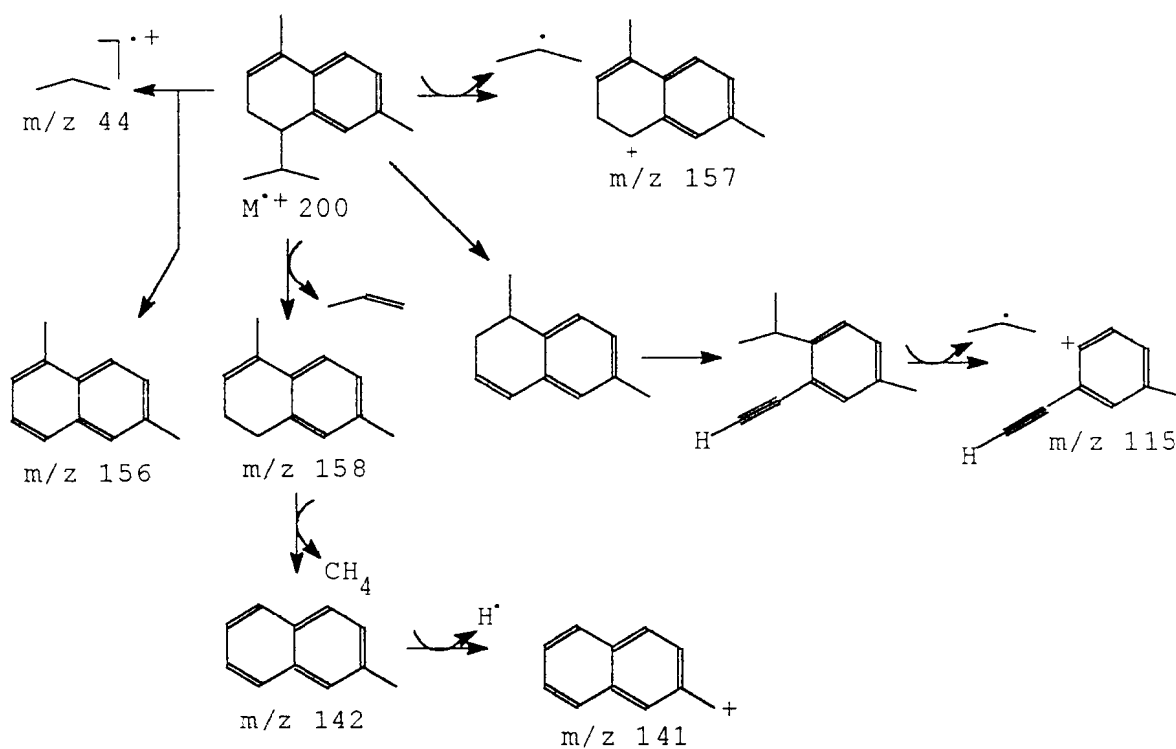


Figura 32- Espectro de massas do  $\alpha$ - calacoreno.



Esquema 27- Principais íons de fragmentação de massas do  $\alpha$ -calacoreno.

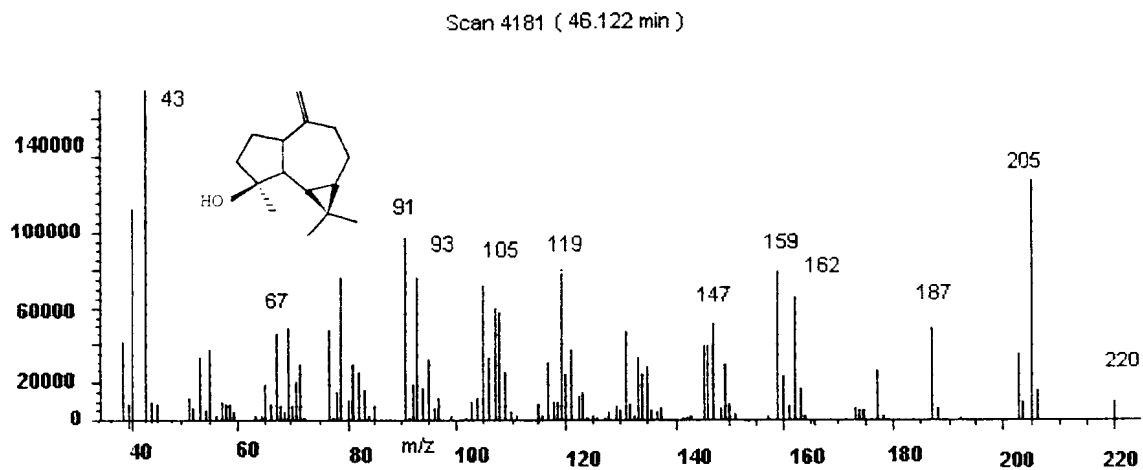
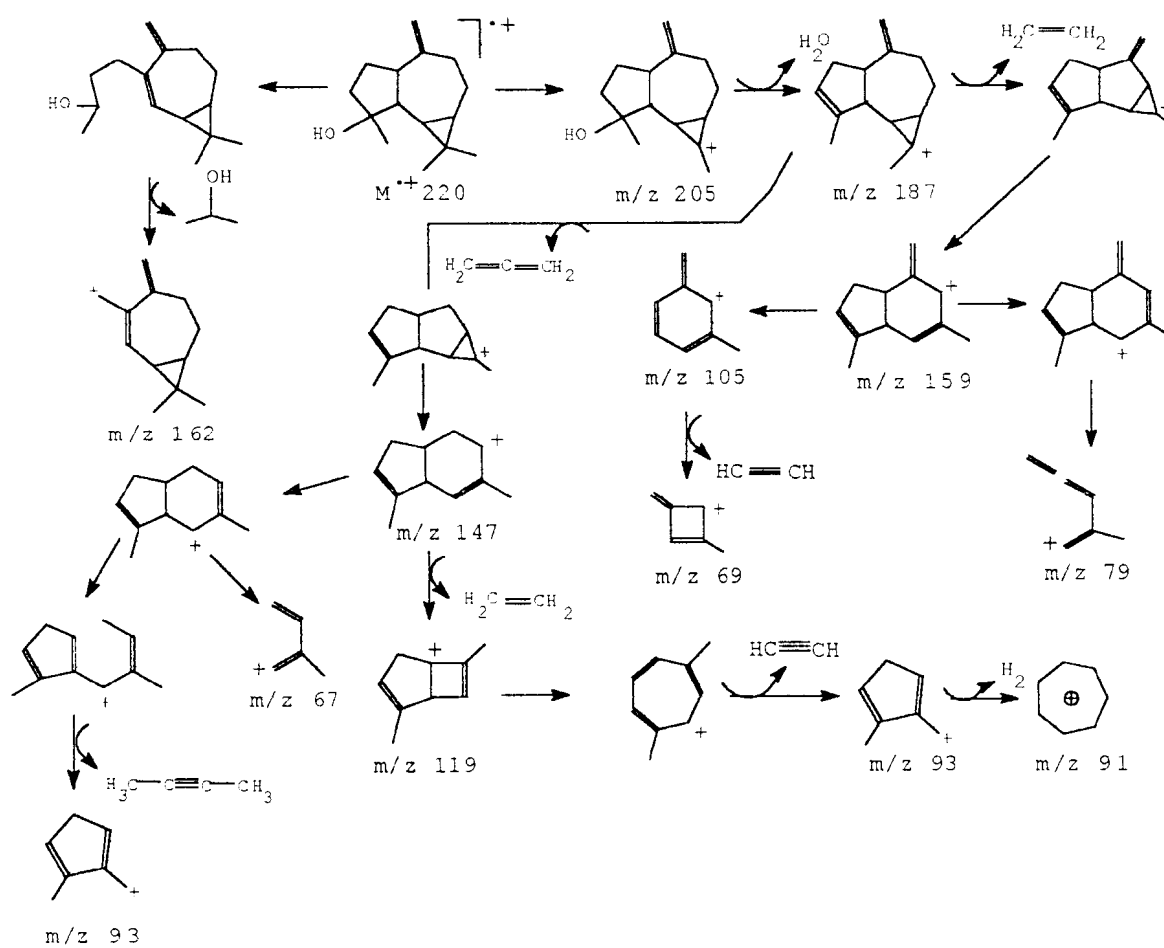


Figura 33 - Espectro de massas do spatulenol.



Esquema 28-Principais íons de fragmentação de massas do spatulenol.

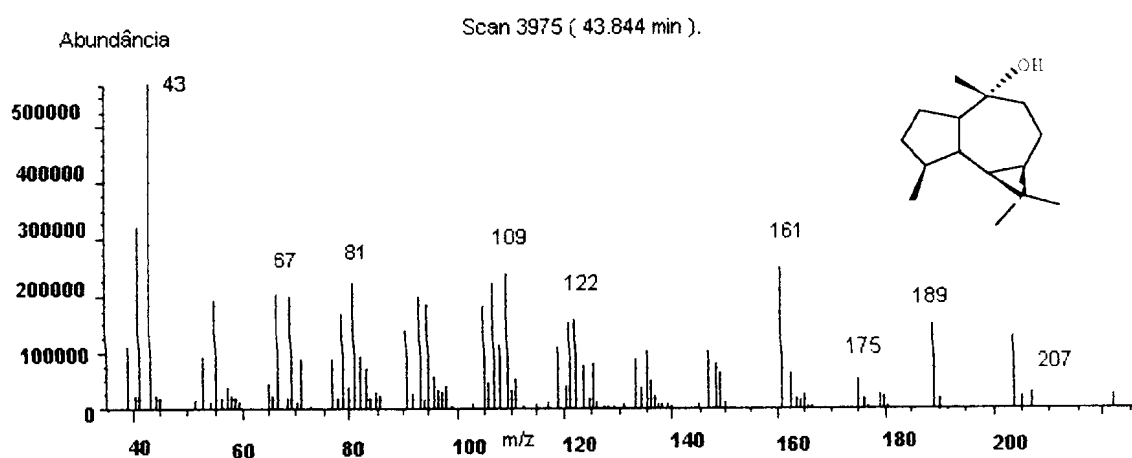
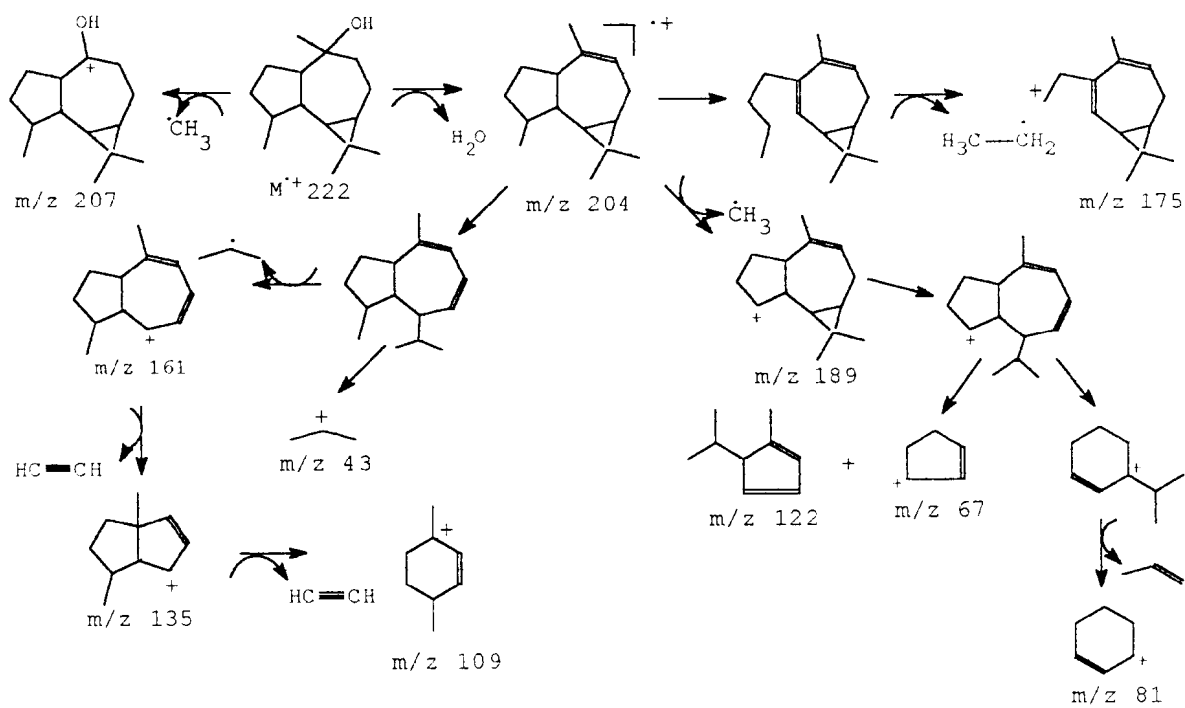


Figura 34- Espectro de massas do globulol.



Esquema 29- Principais íons de fragmentação de massas do globulol

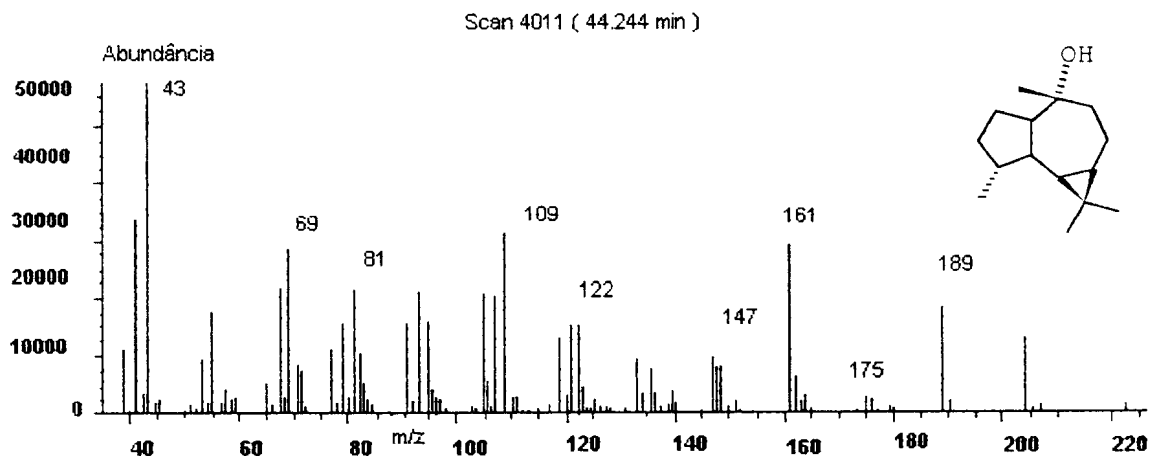
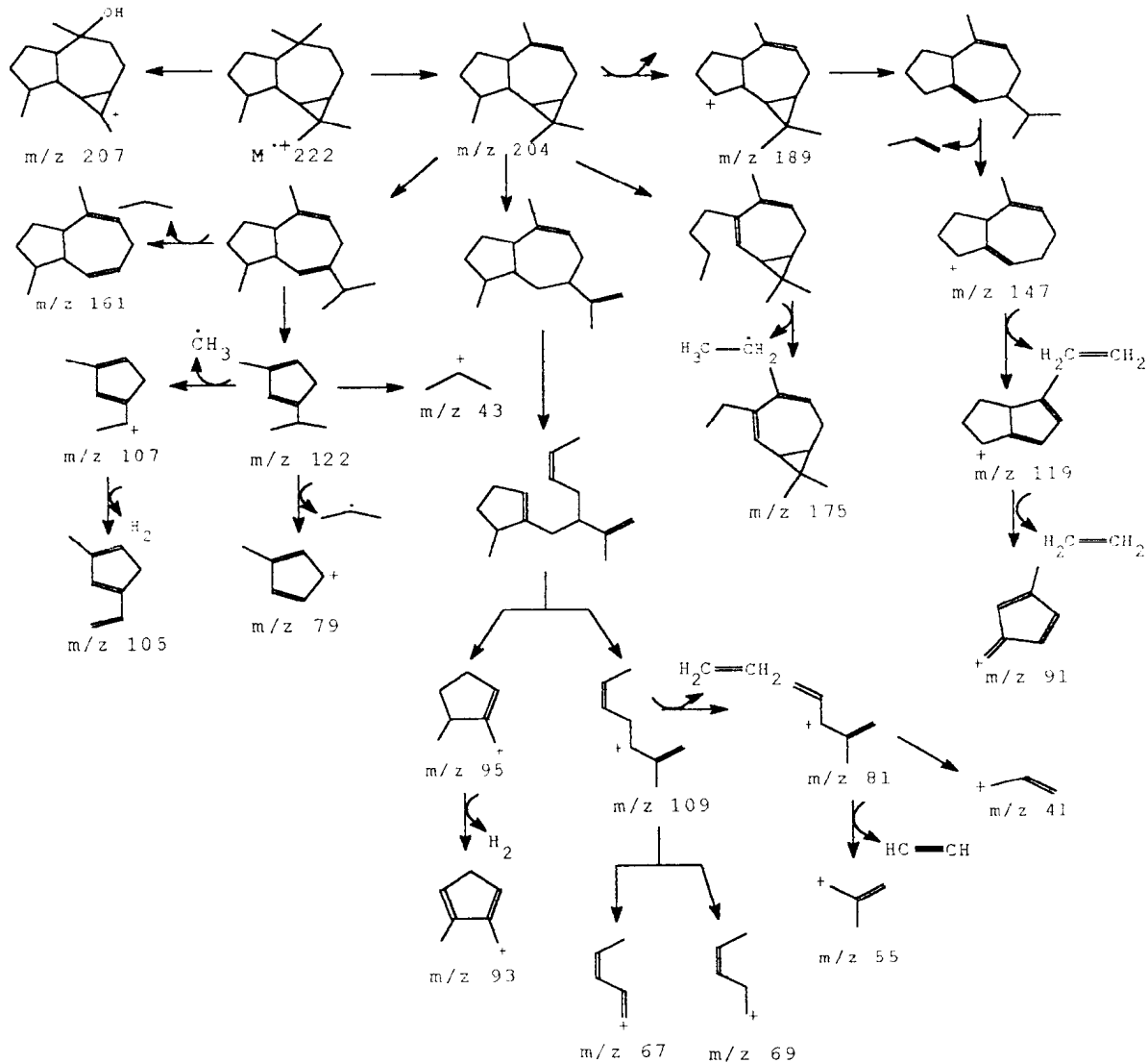


Figura 35- Espectro de massas do viridiflorol.



Esquema 30- Principais íons de fragmentação de massas do viridiflorol.

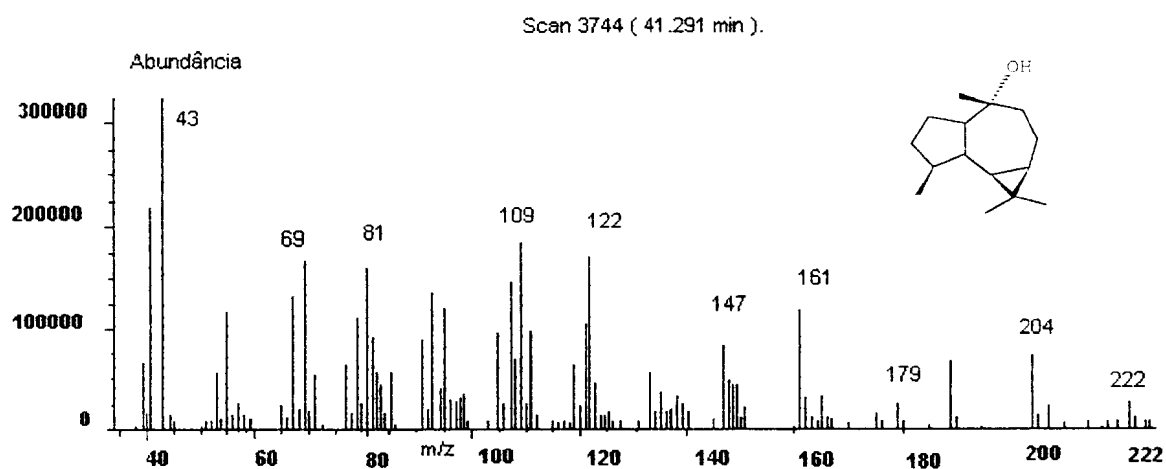
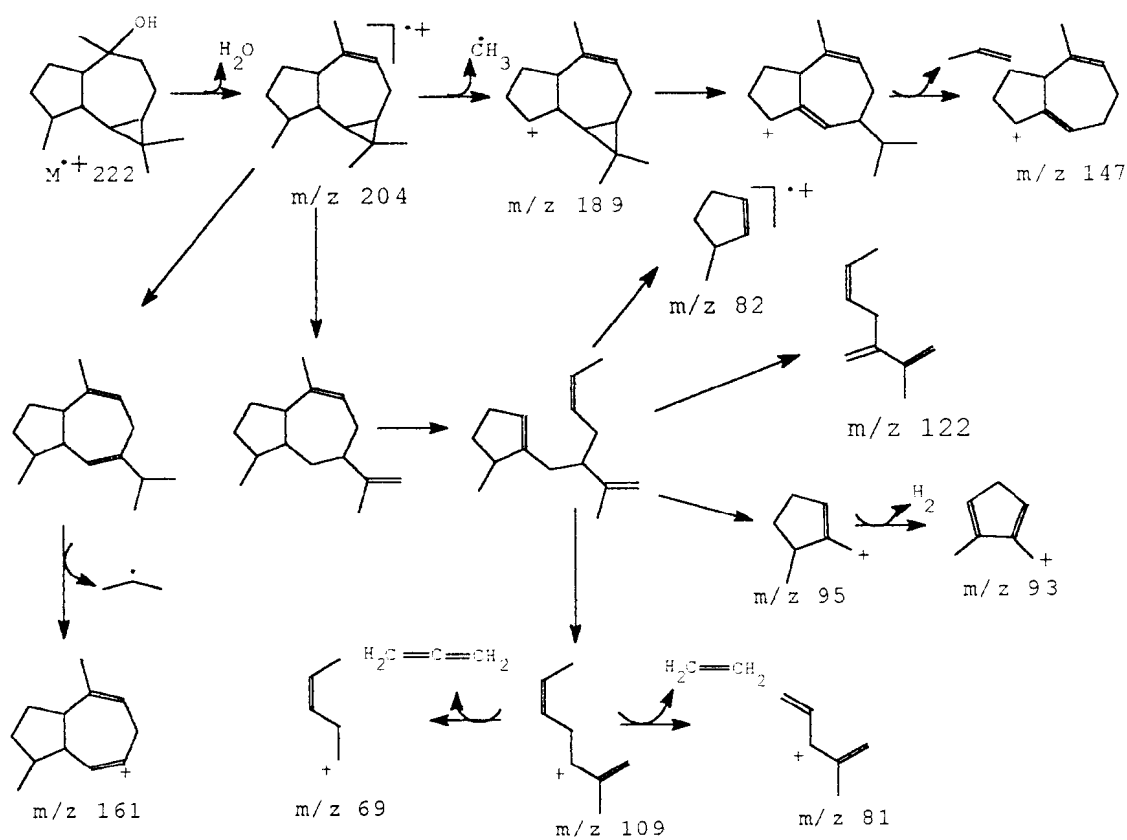


Figura 36- Espectro de massas do ledol.



Esquema 31- Principais íons de fragmentação de massas do ledol.

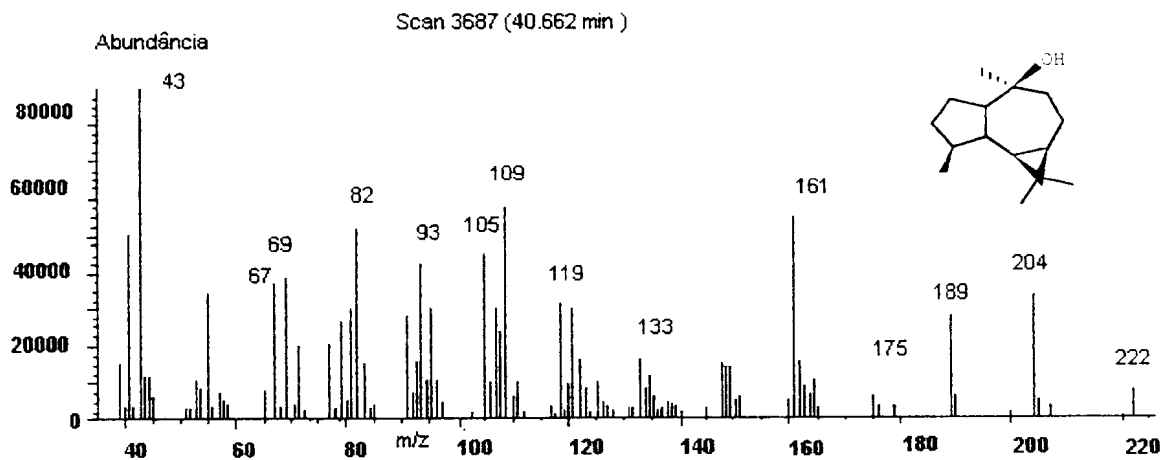
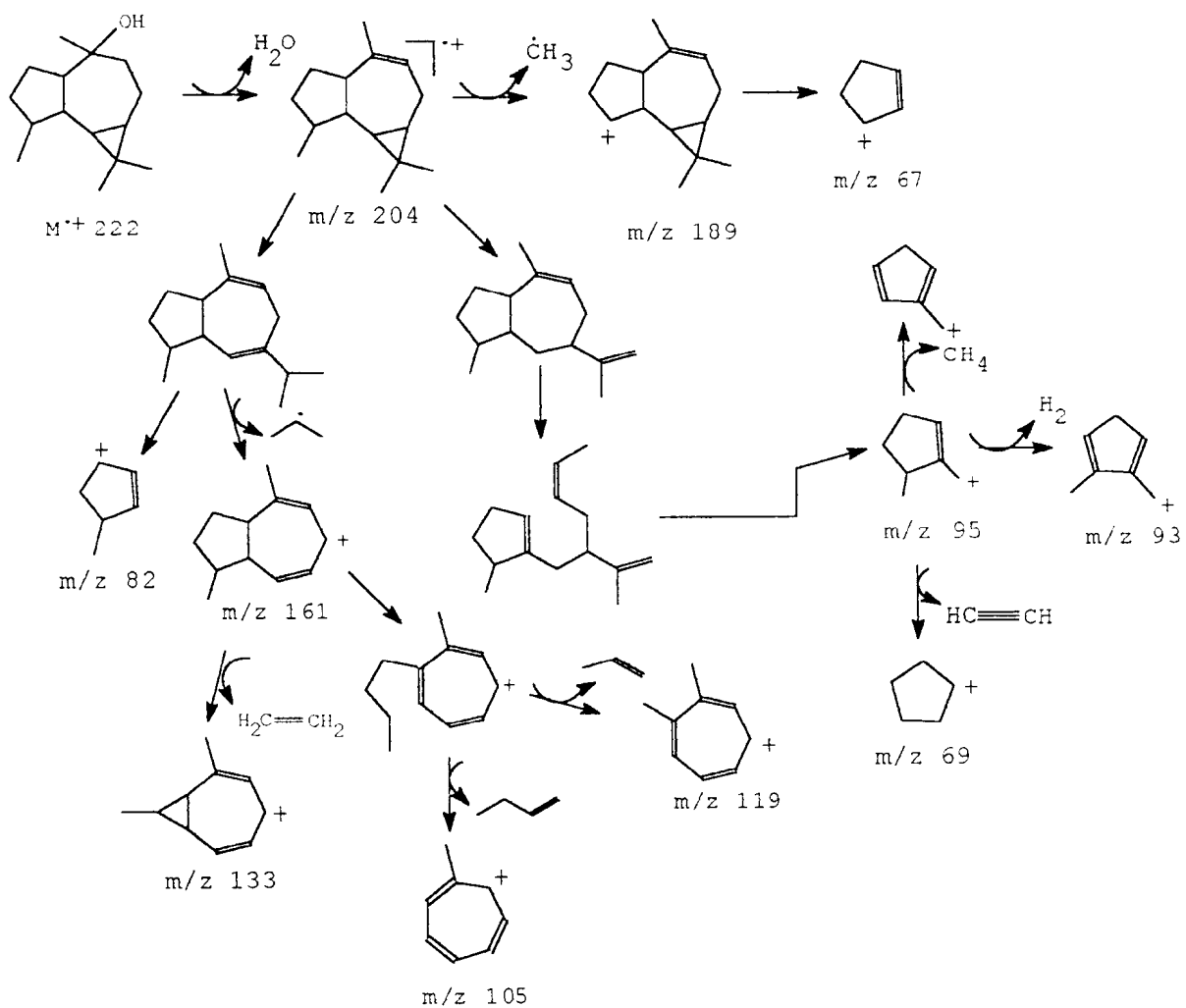


Figura 37- Espectro de massas do epi-globulol.



Esquema 32- Principais íons de fragmentação de massas do epi-globulol.

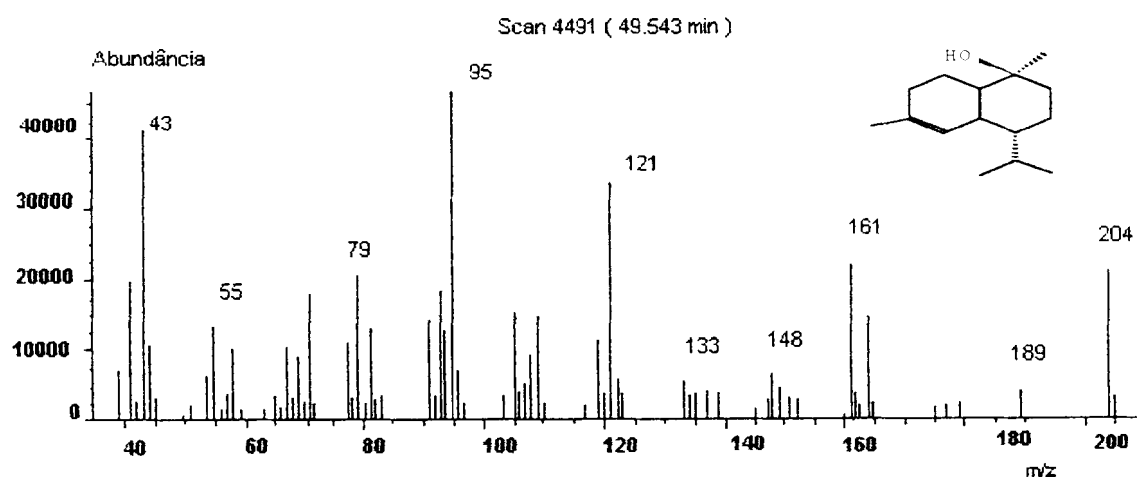
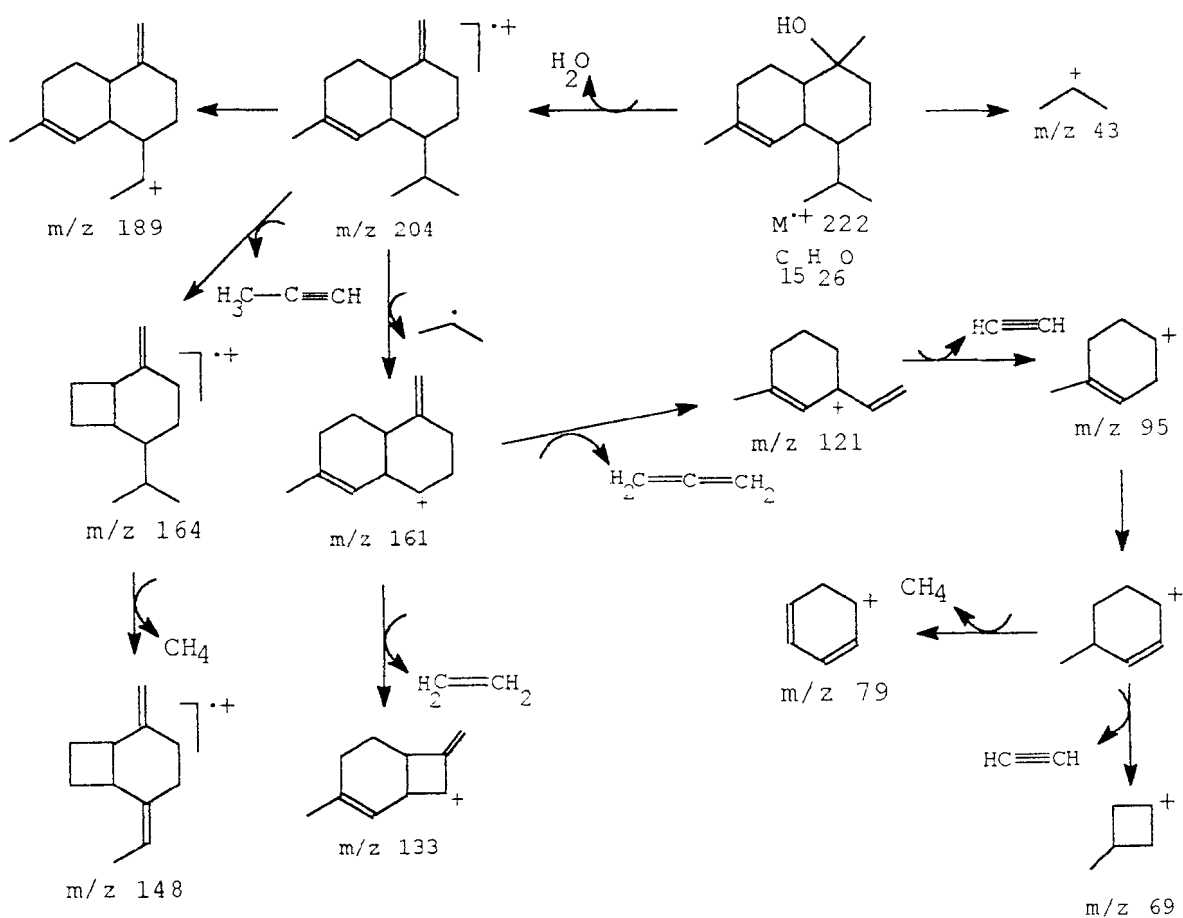


Figura 38- Espectro de massas do T- murolol.



Esquema 33- Principais íons de fragmentação de massas do T- murolol.



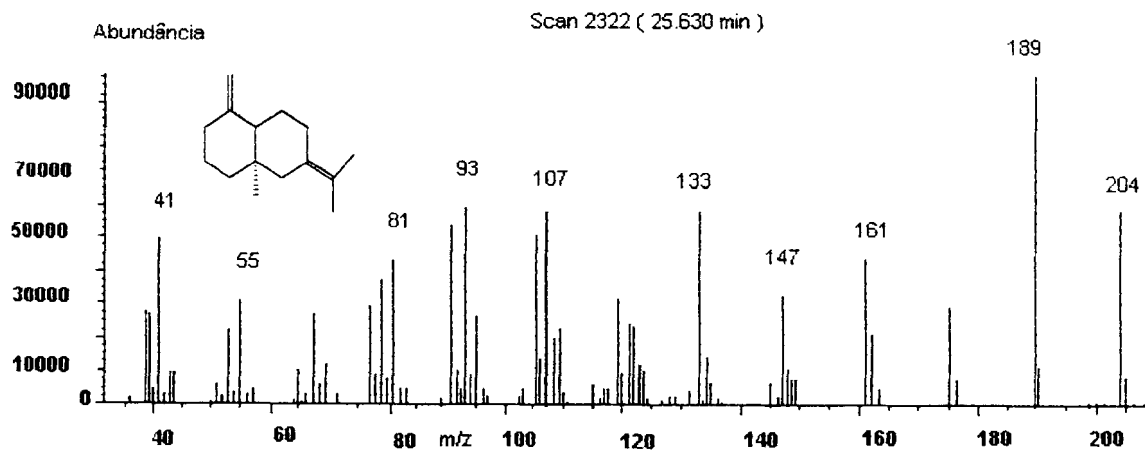
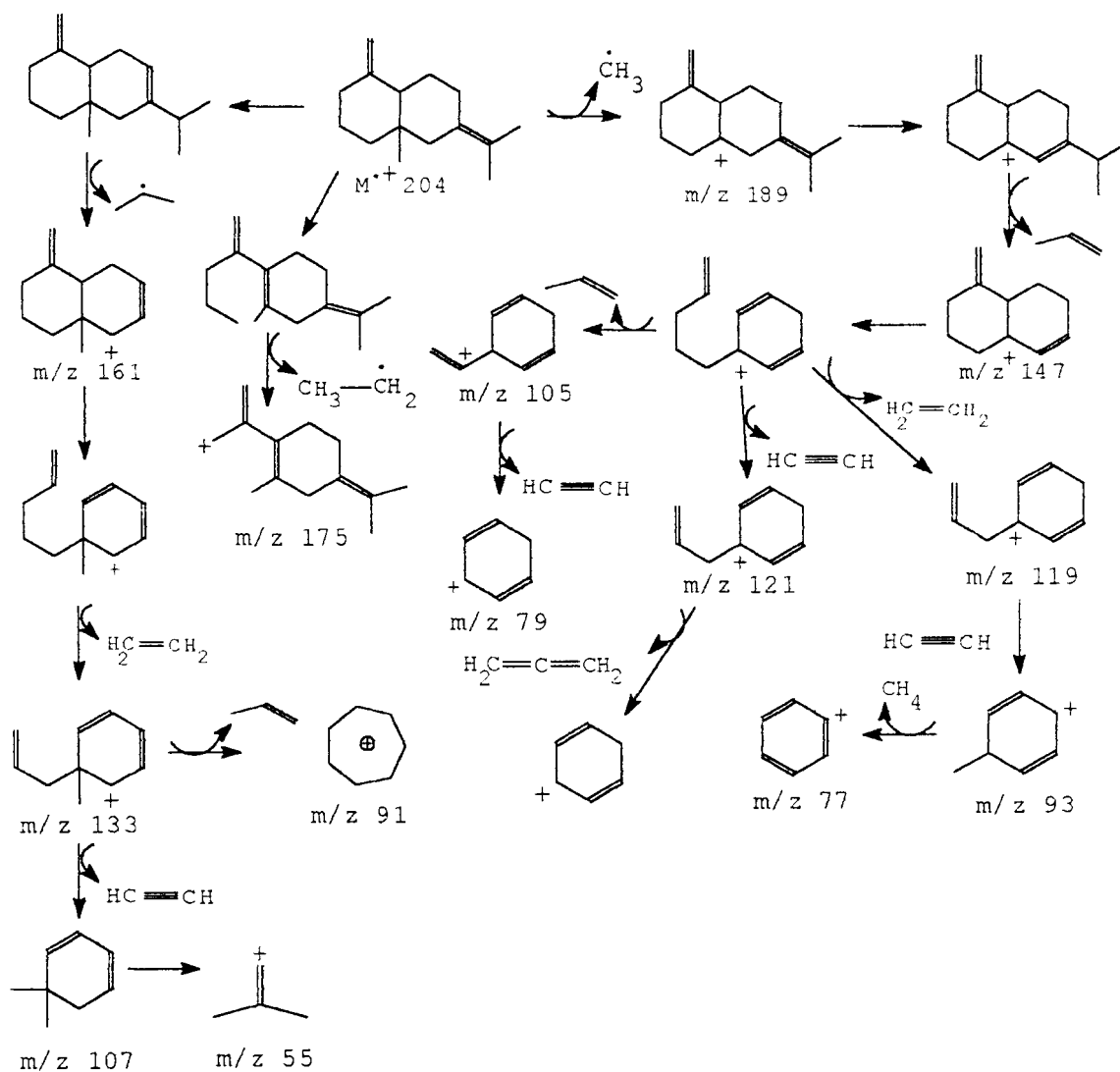


Figura 39- Espectro de massas do  $\delta$ -selineno.



Esquema 34 - Principais íons de fragmentação de massas do  $\delta$ -selineno .

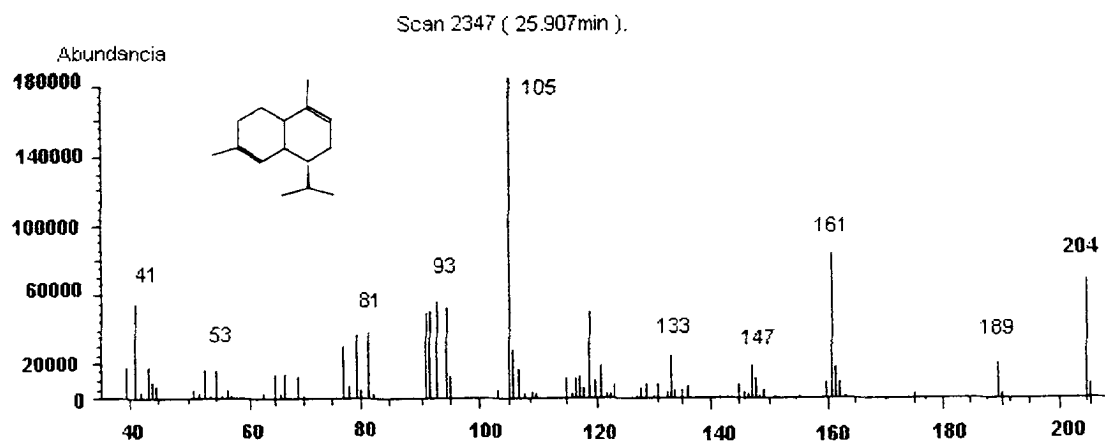
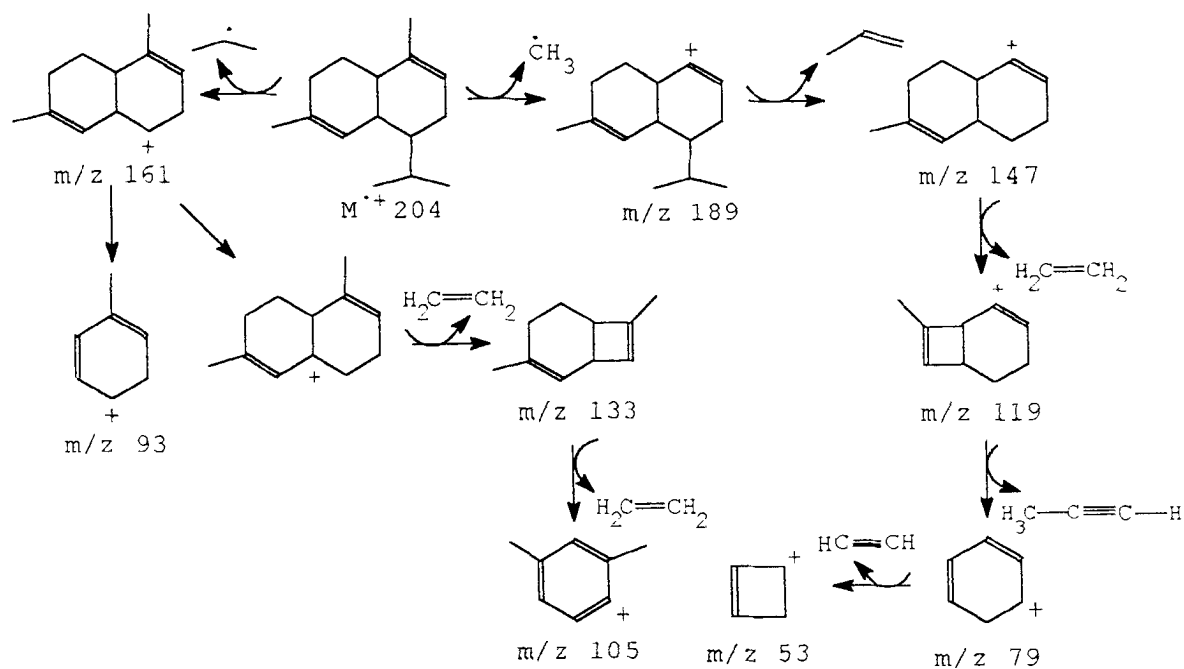


Figura 40- Espectro de massas do  $\alpha$ - muroleno.



Esquema 35- Principais íons de massas do  $\alpha$ - muroleno.

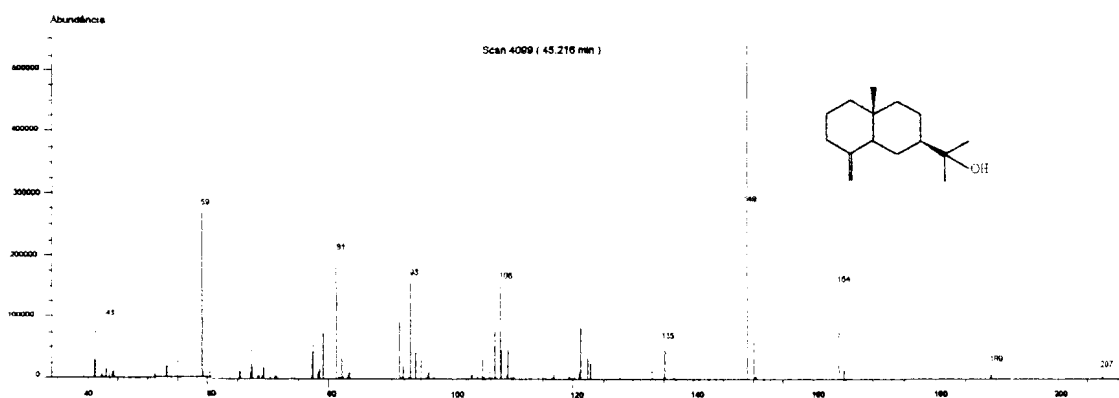
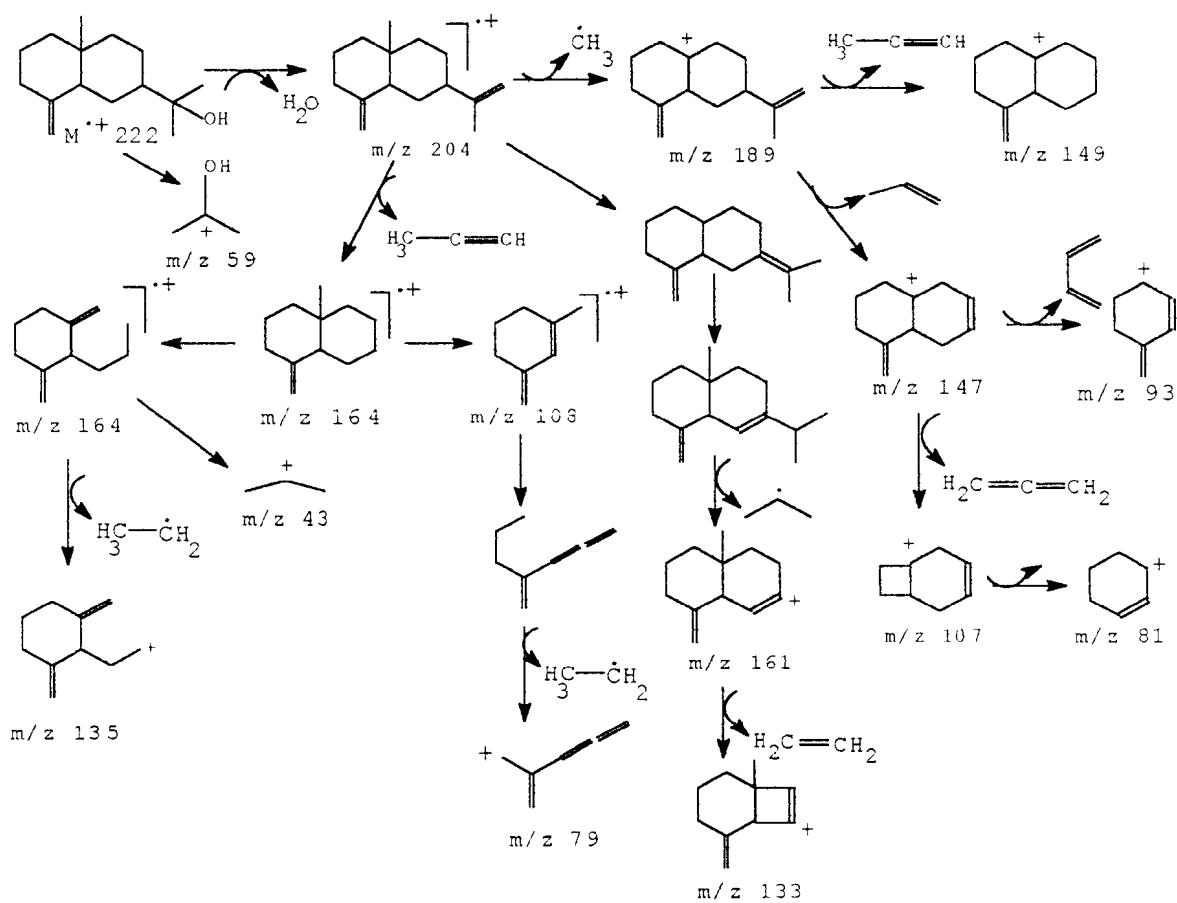


Figura 41- Espectro de massas do  $\beta$ -eudesmol.



Esquema 36- Principais íons de fragmentação de massas do  $\beta$ -eudesmol.

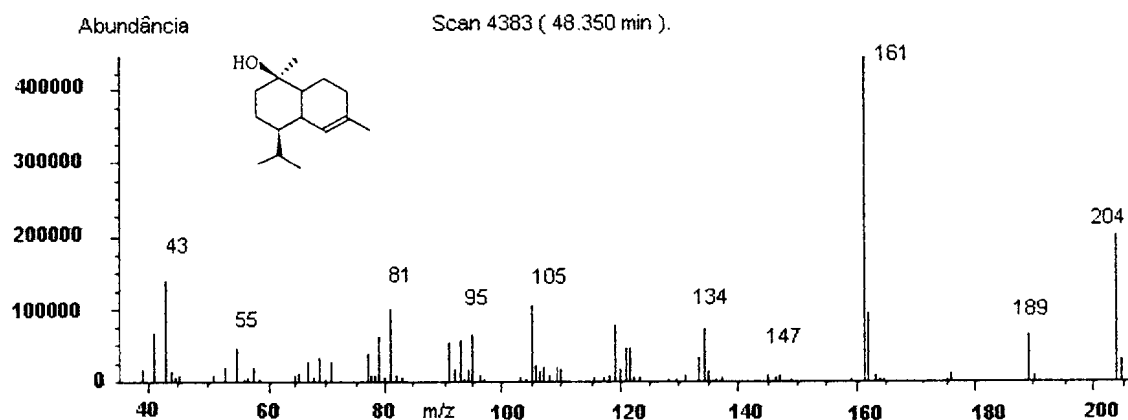
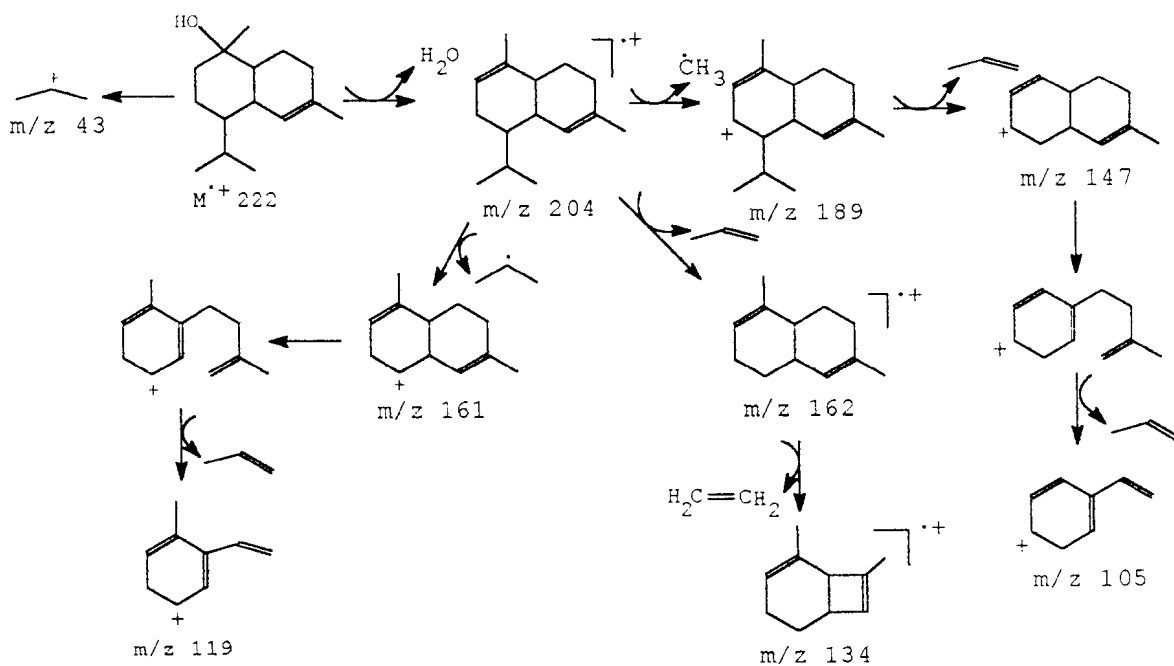


Figura 42- Espectro de massas do T- cadinol.



Esquema 37- Principais íons de fragmentação de massas do T-cadinol.

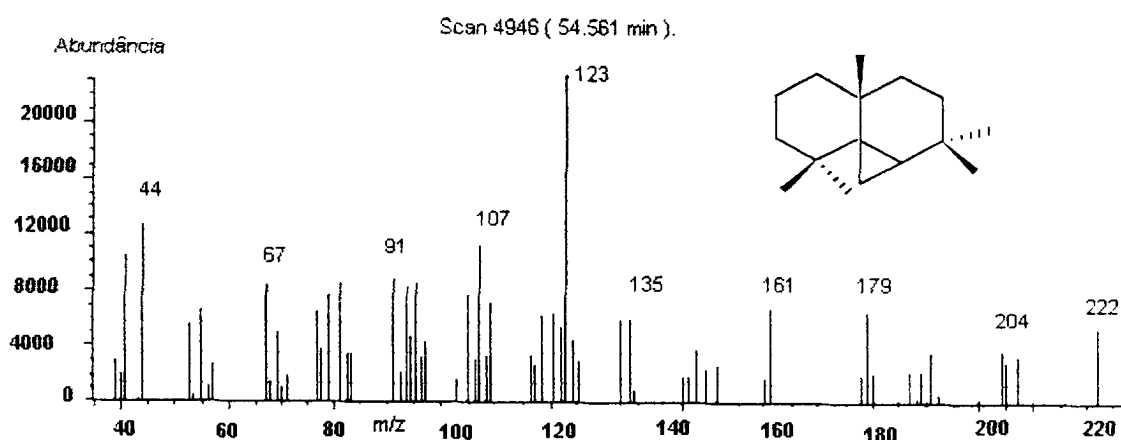
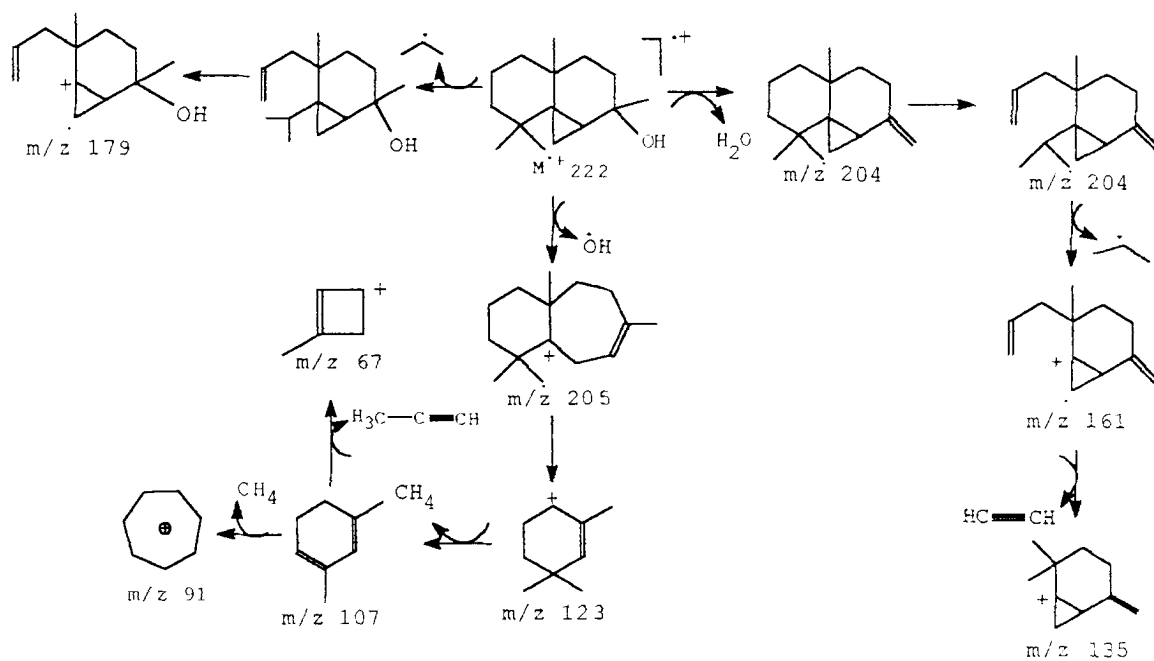


Figura 46- Espectro de massas do thujano-2 $\alpha$ -ol.



Esquema 41- Principais íons de fragmentação de massas do thujano-2 $\alpha$ -ol.

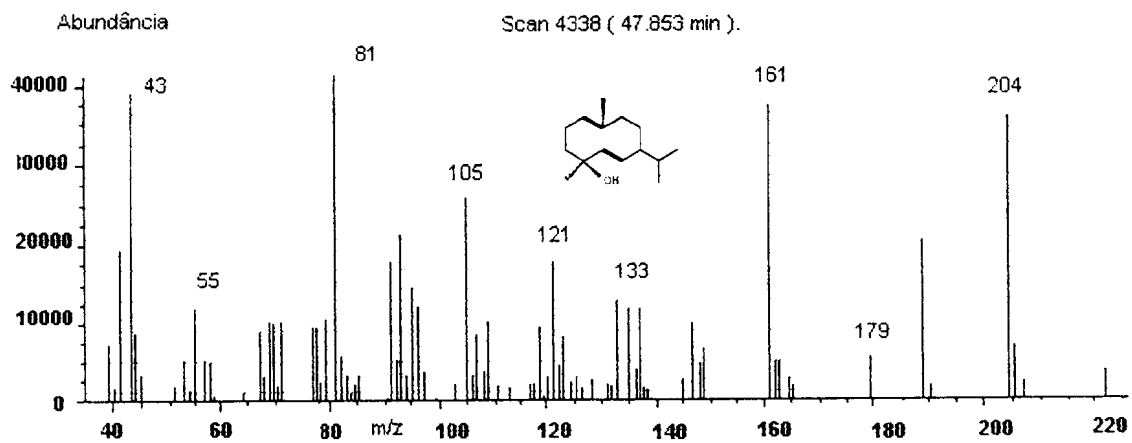


Figura 48 - Espectro de massas do 4 $\beta$ -hidroxygermacrena 1 (10) , 5- diene.

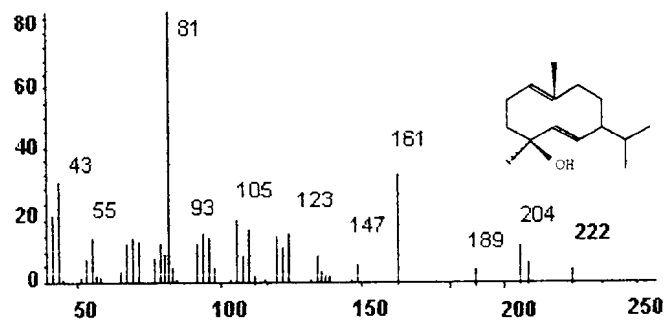
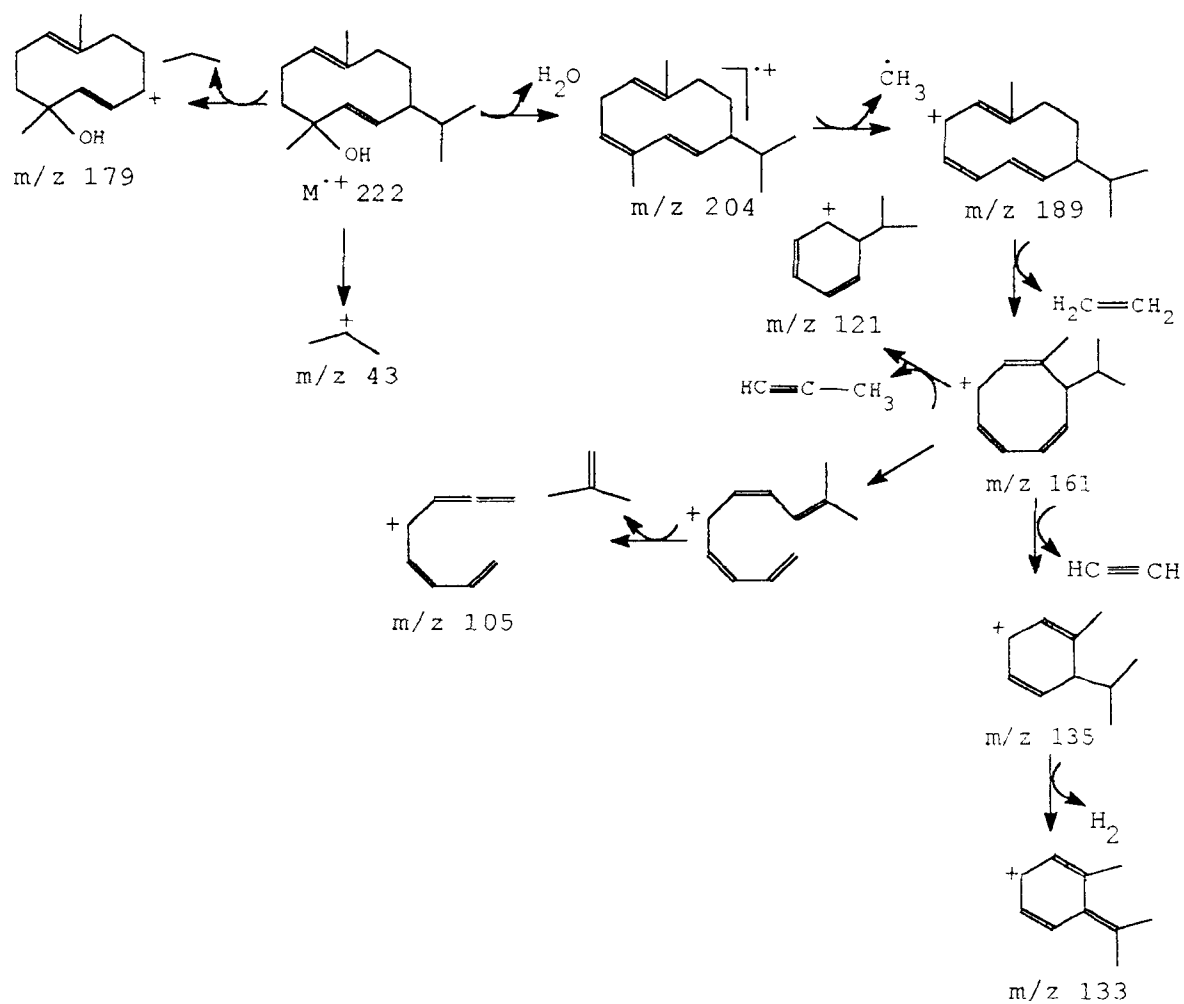


Figura 47 - Espectro de massas do 4  $\beta$ -hidroxygermacrena 1 (10) , 5-diene.<sup>(43)</sup>



**Esquema 42-** Principais íons de fragmentação de massas do 4-β -hidroxygermacrena 1 ( 10 ) 5 - diene.

## **PARTE 3**

**PROPOSTA BIOSINTÉTICA DOS SESQUITERPENOS.**



### 3. PROPOSTA BIOSSINTÉTICA DOS SESQUITERPENOS

A diversidade e predominância de esqueletos sesquiterpênicos presentes no óleo essencial da *E. ovalifolia* Camb. nos levaram a busca das correlações biossintéticas existentes entre estes compostos.

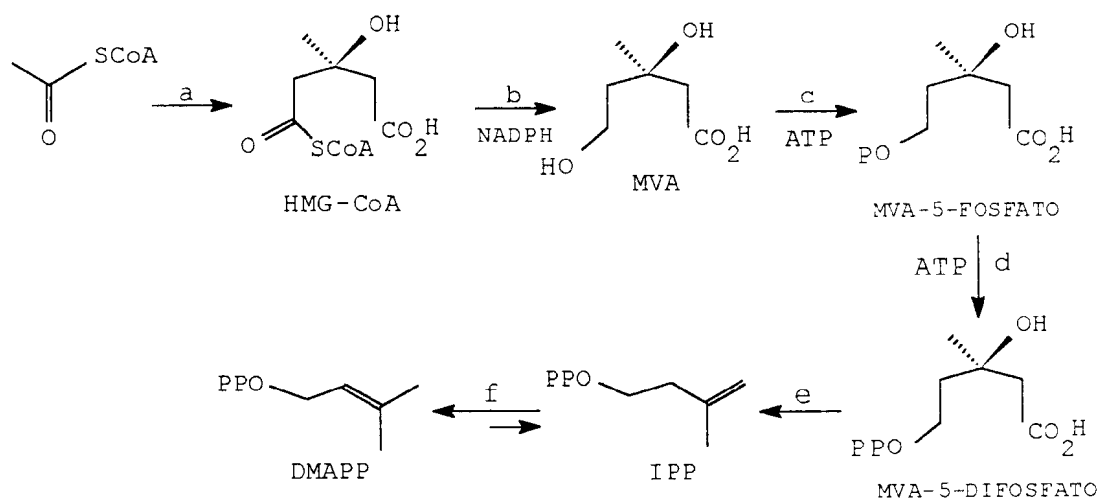
Algumas revisões tratam da biossíntese de compostos terpênicos C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub><sup>(45,46,47)</sup> e mais especificamente sobre sesquiterpenos<sup>(48)</sup>. As rotas biossintéticas de um grande número de sesquiterpenos foram bem estabelecidas nos últimos anos, graças principalmente a trabalhos desenvolvidos envolvendo o isolamento das enzimas que catalizam determinadas reações, e com o estabelecimento dos mecanismos definidos através de experimentos com prováveis precursores marcados isotopicamente.

O precursor original (esquema 43) na biossíntese dos terpenos é o mevalonato, através da reação de condensação do acetil CoA e do acetoacetil CoA levando a 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) que é catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA sintase, na seqüência de reação que leva ao ácido mevalônico a participação da enzima hidroxi-metil-glutaril CoA redutase catalisa a redução do 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA a ácido mevalônico na presença de NADPH.

A enzima mevalonato quinase na presença de ATP catalisa a fosforilação do mevalonato para mevalonato-5-fosfato, esta reação leva inicialmente ao isopentenil

difosfato (IPP) e finalmente isopentenildifosfato: dimetilalildifosfato isomerase (IPP isomerase) catalisa a reação de rearranjo 1,3-alfílico que converte IPP em dimetilalilpirofosfato (DMAPP) via um mecanismo base catiônico postulado no (esquema 44) resultando na observação de uma transposição antarafacial de hidrogênio.

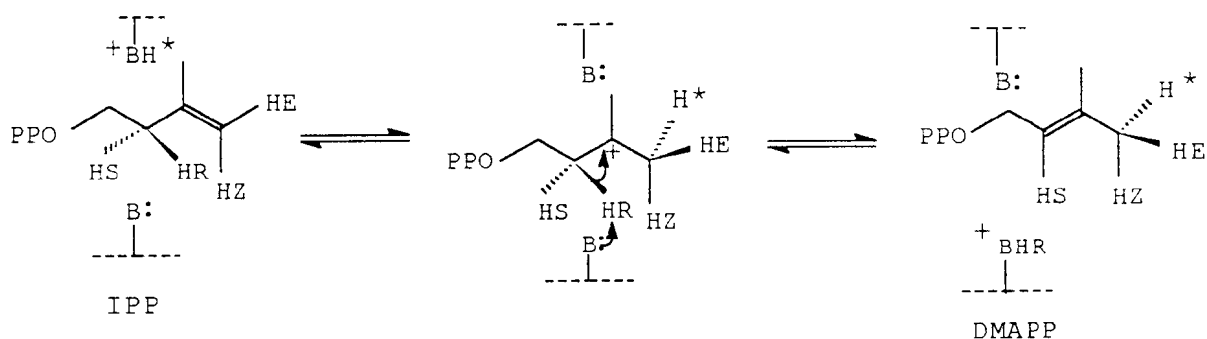
Esquema 43



a - HMG CoA sintase.  
b - HMG CoA redutase.  
c - mevalonato quinase

d - fosfomevanolato quinase.  
e - mevalonato 5-difosfato descarboxilase.  
f - IPP isomerase

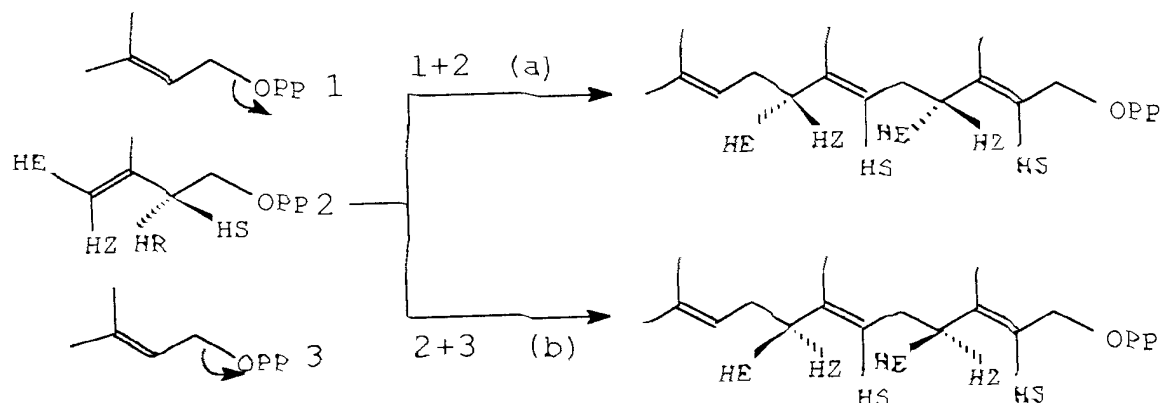
## Esquema 44



Farnesildifosfato é formado pela condensação sequencial cabeça-cauda de dimetilalildifosfato com duas unidades de isopentenildifosfato na presença de enzimas preniltransferases que não são específicas, contudo para o alongamento da cadeia uma enzima específica tem sido encontrada nas folhas de *Pelargonium roseum*, geranildifosfato sintase (GPP sintase) e mostra uma grande distinção com farnesildifosfato sintase (FPP sintase) também presentes em plantas.

Experimentos com marcação isotópica usando enzimas de *Pelargonium roseum* tem confirmado a normal estereoespecificidade do acoplamento, no qual DMAPP é adicionado na fase *si-si* da dupla ligação do IPP, com estereoespecificidade de perda do hidrogênio *pro-2R* do ipp<sup>(49)</sup>. Por outro lado tem sido demonstrado que em *Pisum sativum*<sup>(50)</sup>, o acoplamento ocorre de uma forma anômala no qual o resíduo alílico adicionado a face *re-re*, mas com a usual perda do hidrogênio *pro-2R* da unidade IPP mostrados no esquema 45.

Esquema 45

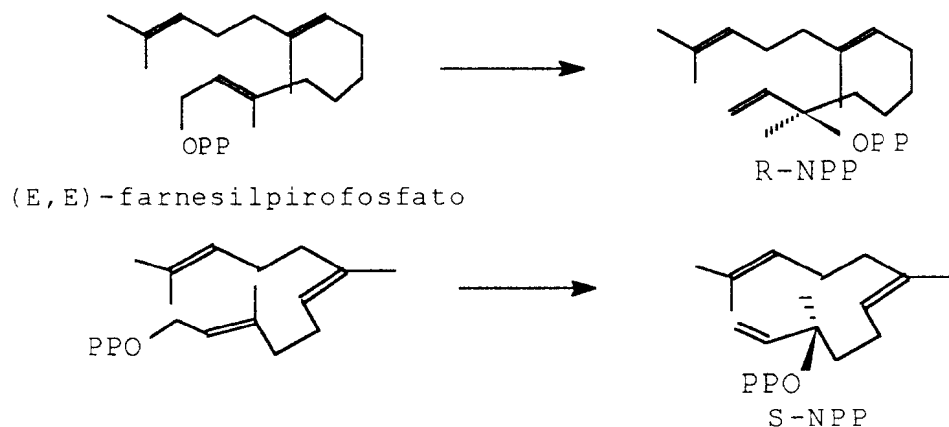


a = *re-re* (anômalo)

b = *si-si* (normal)

Em geral os precursores dos sesquiterpenos são o (E,E)-farnesildifosfato e (Z,E)-farnesildifosfato, no entanto, outras propostas biossintéticas sugerem R-nerolidilpirofosfato (R-NPP) ou S-nerolidilpirofosfato (S-NPP) por um rearranjo *syn.* alílico do (E,E) farnesildifosfato com o precursor dos sesquiterpenos (esquema 46).

Esquema 46



Nerolidilpirofosfato sofre ciclização sobre a dupla ligação  $\Delta^6$ , ou  $\Delta^{10}$  sobre o C-1 com eliminação antiálica do pirofosfato e a conformação dos enantiômeros dos nerolidilpirofosfato que sofre a ciclização, determina a estereoquímica dos produtos.

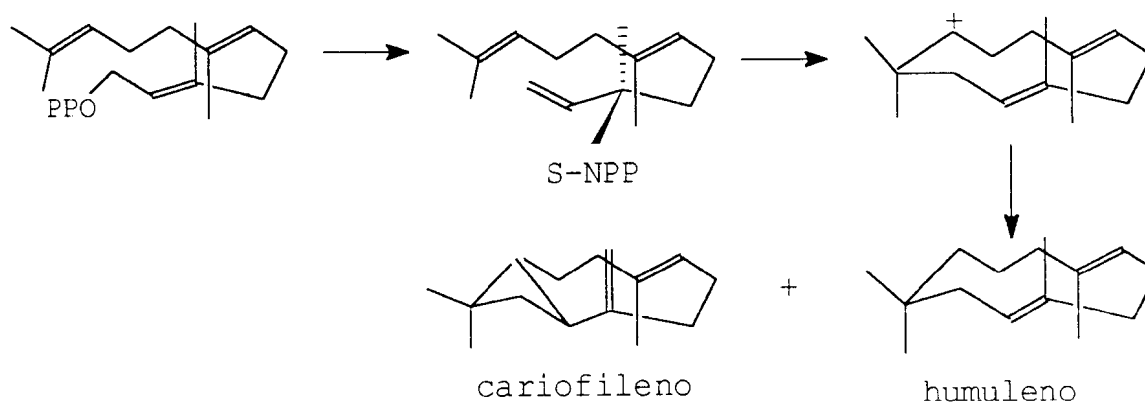
Andersen e col.<sup>(51)</sup> sugerem que nerolidilpirofosfato (NPP) seja o substrato imediato para a ciclização enzimática, e elimina o mecanismo que distingue entre os derivados (E,E) e (Z,E)-farnesilpirofosfato<sup>(52)</sup>. Foi atribuído por Arigoni o conceito de que a conformação de ciclização do substrato é que determina a estereoquímica do produto.

Humuleno e cariofileno são dois sesquiterpenos que ocorrem comumente em muitas plantas. Na biossíntese do humuleno e cariofileno que está sugerida no

(esquema 47), o mesmo sistema de enzimas catalisa as seguintes reações: rearranjo *syn-alílico* e deslocamento antialílico, mas utiliza o S-NPP como substrato de partida.

A conformação do S-NPP leva diretamente a biossíntese de humuleno e cariofileno nas suas conformações mais estáveis<sup>(53,54)</sup>. O ataque nucleofílico do C<sub>2</sub> sobre o C<sub>10</sub> como mostra o (esquema 48), ocorre em três etapas na conversão *in vitro* de humuleno para cariofileno<sup>(56)</sup>.

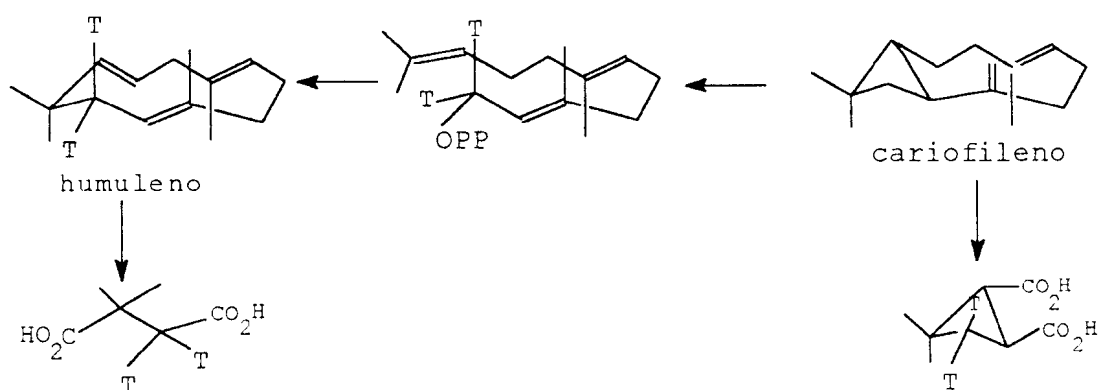
Esquema 47



Croteau (57) tem relatado que uma enzima obtida das folhas de *Salvia officinalis* converteu [1-<sup>3</sup>H] FPP em uma mistura 2:1 de humuleno e cariofileno respectivamente.

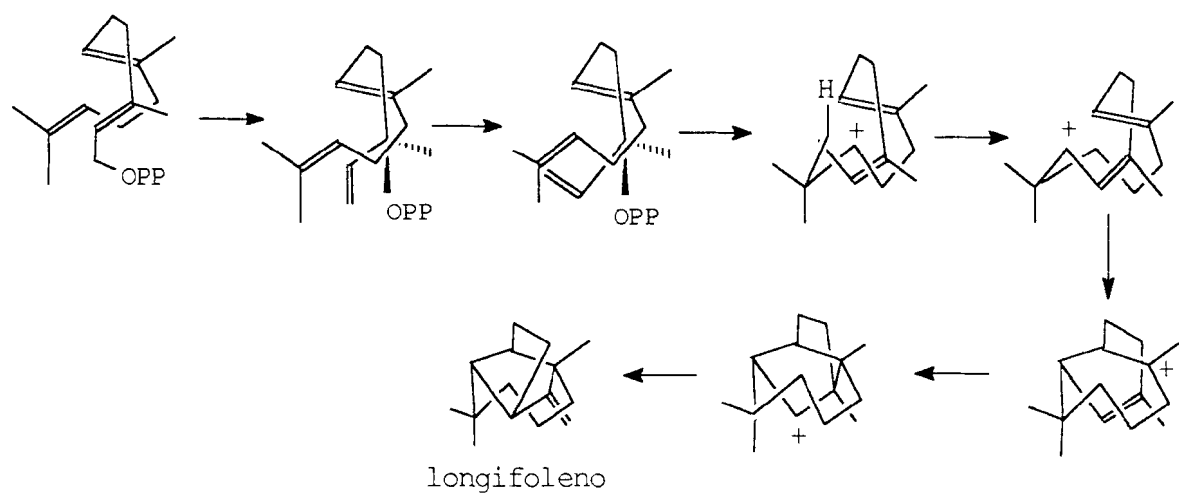
A especificidade da marcação isotópica foi confirmada pela degradação oxidativa dos sesquiterpenos obtidos enzimaticamente para ácido 2,2-dimetilsuccênico e ácido *trans*-norcariofilênico como mostra o (esquema 48).

Esquema 48



A rota biossintética para obtenção de longifoleno, que está suportada na proposta sugerida por Arigoni<sup>(41)</sup>, concluída por estudos detalhados de marcação isotópica mostrada no (esquema 41), revela as implicações conformacionais e estereoquímicas, onde a etapa inicial de ciclização é mostrada como um deslocamento antialílico do pirofosfato do R-nerolidilpirofosfato (R-NPP). Esta é uma reação biossintética conhecida e elimina o segundo rearranjo alílico inicialmente proposto<sup>(58)</sup>.

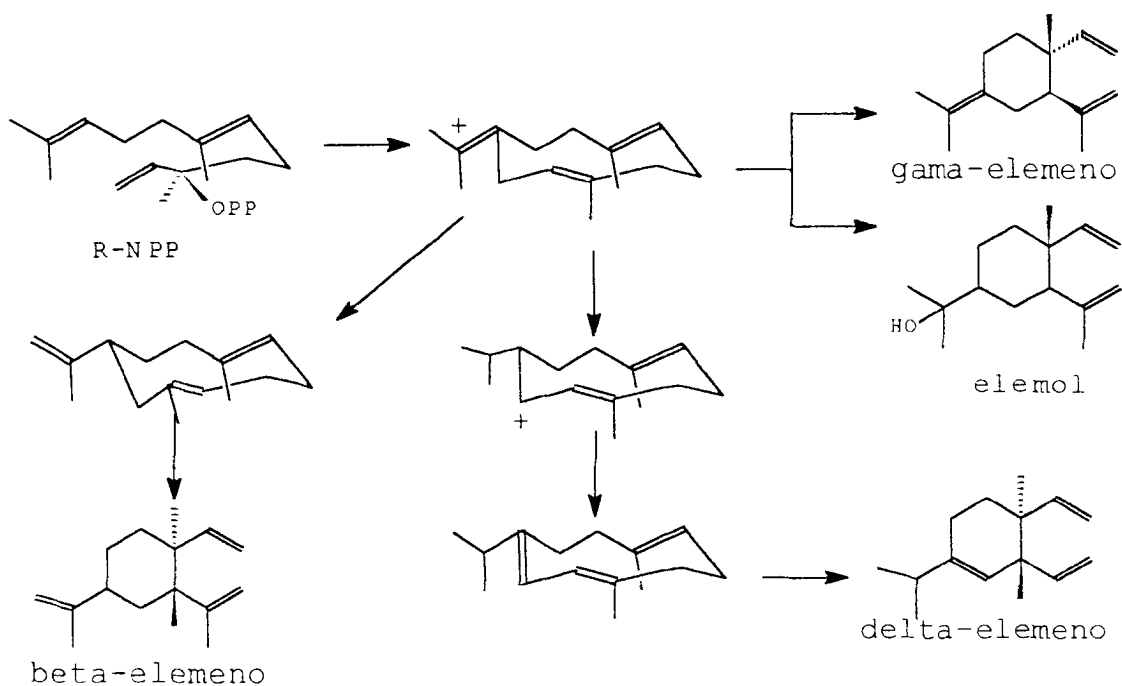
## Esquema 49



Dentro da mesma proposta de ciclização do R-NPP hipóteses foram propostas para a biossíntese de elemenos<sup>(59)</sup> sugeridos no ( esquema 50 ).

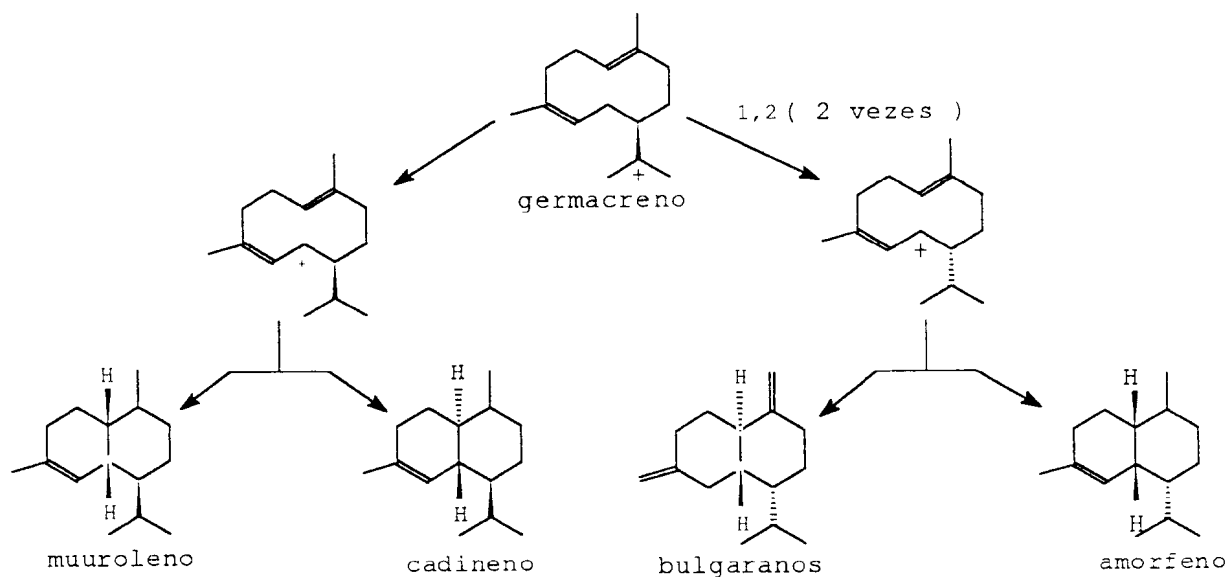


## Esquema 50



A formação de 4 classes de cadinenos tem sido racionalizada assumindo-se um processo de ciclização envolvendo um rearranjo 1,3 de hidreto para um carbocátion em C-12 do germacreno, para o grupo dos muurolenos e cadinenos e por dois rearranjos 1,2 de hidretos para formação do grupo dos amorfenos e bulgaranos<sup>(60,61)</sup>.

Esquema 51

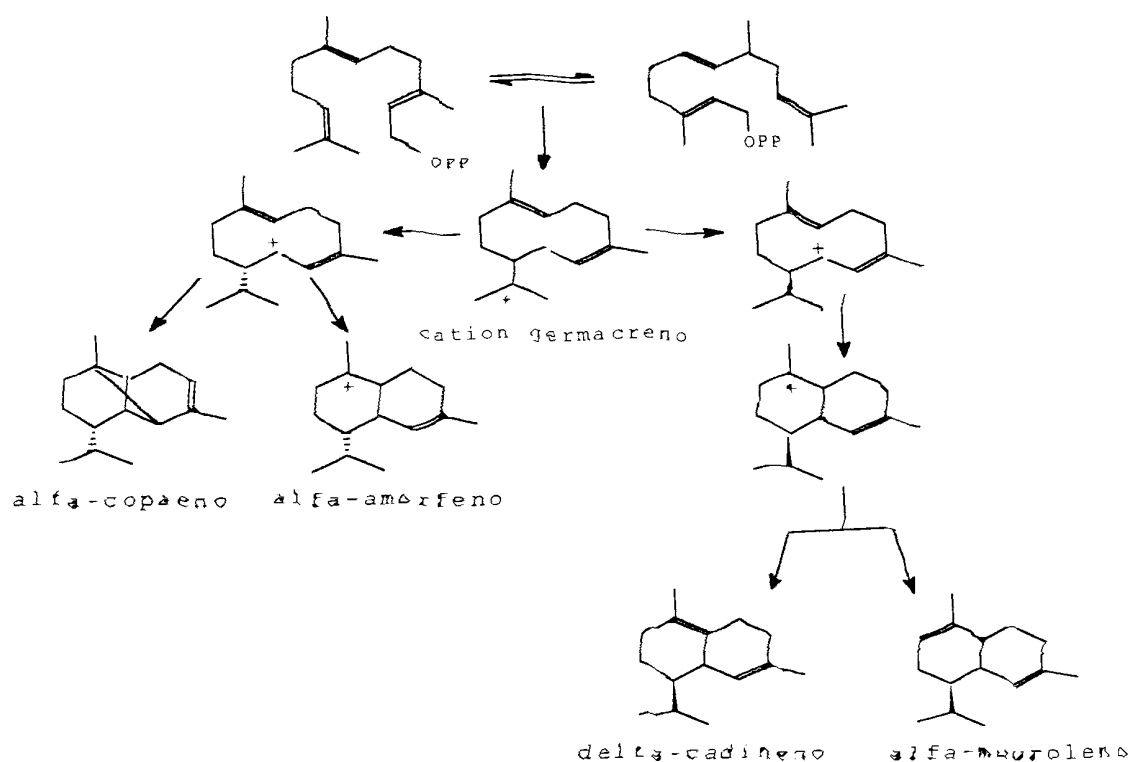


A ciclização enzimática de (E,E)-FPP para (+)- $\delta$ -cadineno tem sido detectada em experimentos com administração de (E,E)-[1- $^3$ H] farnesilpirofosfato em *Gossypium hirsutum*<sup>(62)</sup> catalisada pela enzima (+)- $\delta$ -cadineno sintase posteriormente purificada de cotiledons infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *malvecearum* (Smith)<sup>(63)</sup>.

Duas possíveis soluções envolvendo a ciclização de farnesilpirofosfato para cadinenos foram propostas por Arigoni<sup>(41)</sup>, a primeira que envolve a ciclização de farnesilpirofosfato para formar um anel de dez membros, seguida pela desprotonação levando a um intermediário, germacreno-D, que pode sofrer uma troca conformacional

para configuração *cisoid* dos carbonos 2 e 3 e posterior protonação e ciclização para  $\delta$ -cadineno. Rearranjos de hidretos para o cátion germacreno possibilitaria a formação de esqueletos muuroleno e amorfeno mostrado no (esquema 52).

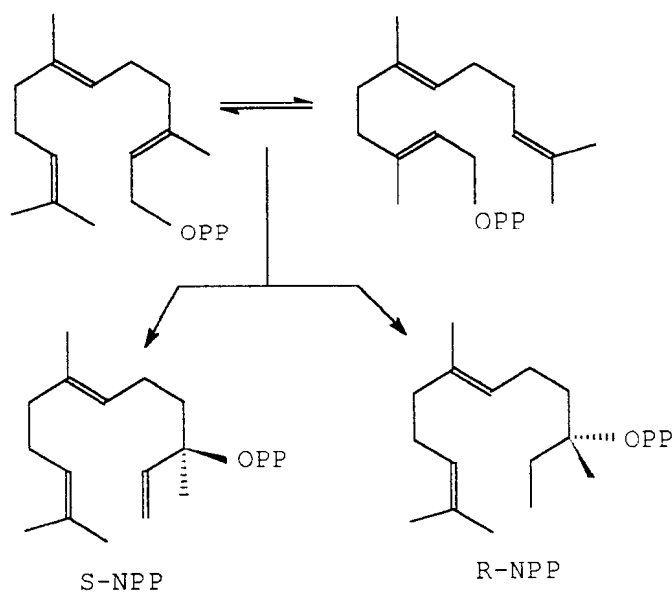
Esquema 52



A segunda solução para o problema geométrico da dupla ligação 2,3-*trans* envolve a inicial isomerização de farnesilpirofosfato para nerolidilpirofosfato (NPP), seguida pela rotação da ligação 2,3 e este leva ao cátion germacreno

(esquema 53) que através de rearranjos de hidretos mencionados anteriormente dá origem aos diversos cadinenos.

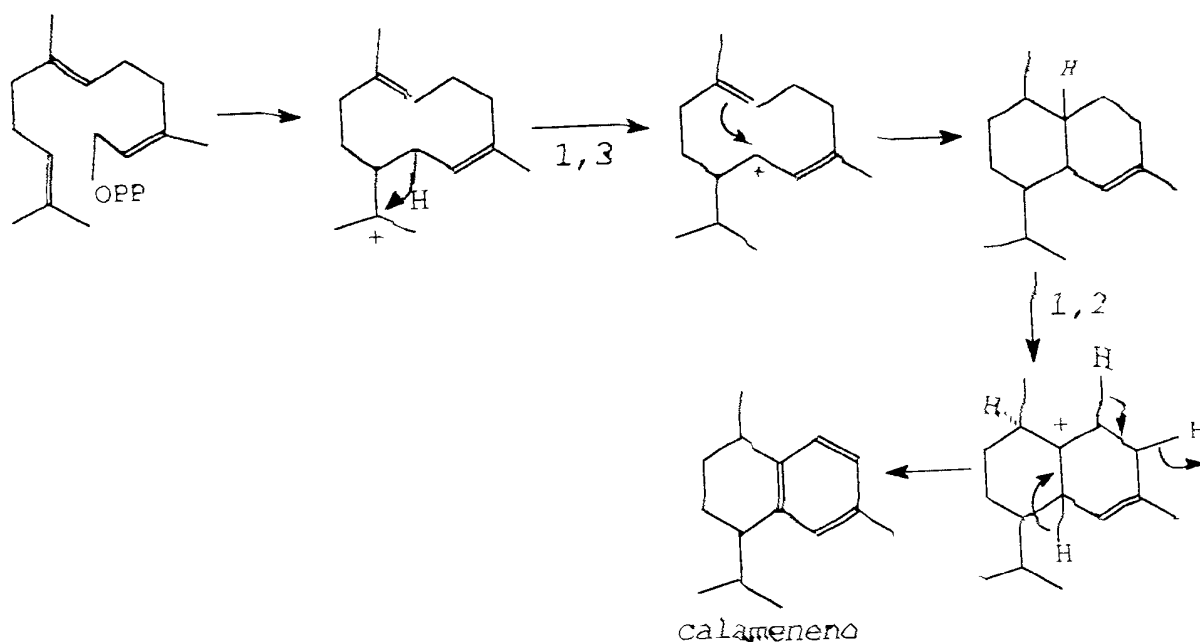
Esquema 53



Em trabalho desenvolvido por Okuyama e Col.<sup>(64)</sup> com diferentes mevalonatos deuterado foi mostrado a eficiente incorporação em calameneno através da determinação por espectrometria de massas. A distribuição da marcação isotópica pode ser racionalizada pela seqüência ilustrada no (esquema 54). Inicial ciclização de FPP para o cátion germacradienil com rearranjo 1,3 de hidreto dando origem a formação do bicíclico com um novo rearranjo 1,2 de hidreto do C-<sub>8a</sub> para C-<sub>1</sub> com

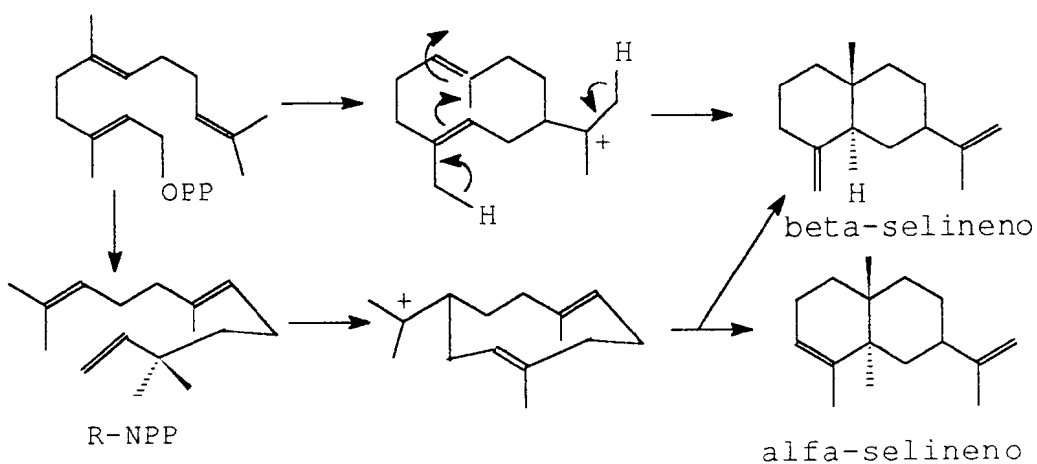
subseqüente eliminação de H<sup>+</sup> para a junção do anel, de H-5 para C-8 e H-2 para C-7 dando calameneno.

Esquema 54



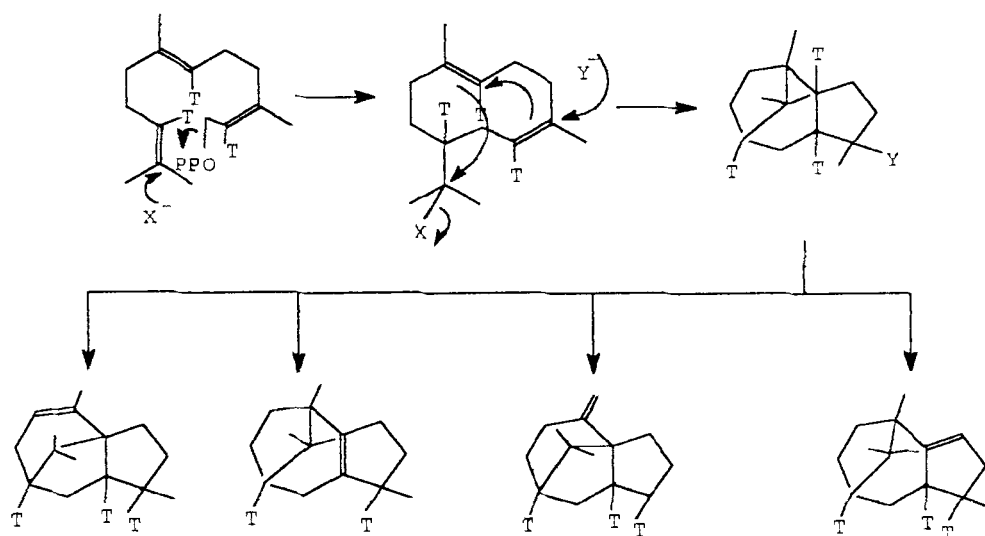
(E,E)-farnesilpirofosfato também atua como precursor na biossíntese de  $\beta$ -selineno. A parcial purificação da enzima  $\beta$ -selineno ciclase dos frutos de *Citrofortunella mitis*<sup>(65)</sup> dando resultados comuns a outros sesquiterpenos ciclases que requer um metal divalente como cofator revelado no caso da enzima  $\beta$ -selineno ciclase, onde Mg<sup>++</sup> tem atuação mais efetiva do que Mn<sup>++</sup>. A proposta da seqüência biossintética está ilustrada no (esquema 55).

## Esquema 55



Estudos feitos por Thakur e col.<sup>(66)</sup> mostraram rearranjos 1,2 de hidrogênio durante a biossíntese de patchoulenos em *Pogostemon cablin* Benth.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -patchoulenos envolvendo provavelmente *cis*-farnesilpirofosfato, que sofre ciclização e subsequente rearranjos 1,2 de hidreto ilustrado na seqüência do (esquema 56), que indica um intermediário comum para estes patchoulenos.

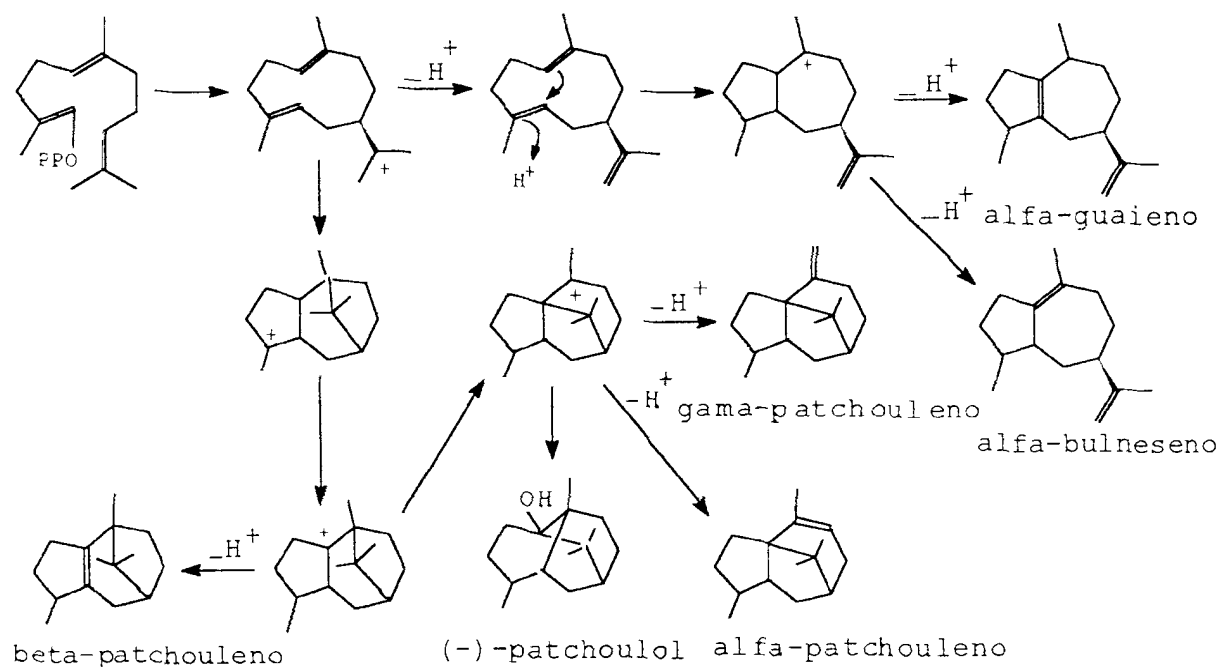
## Esquema 56



alfa-patchouleno    beta-patchouleno    gama-patchouleno    delta-patchouleno

Considerações mecanísticas finais foram estabelecidas por Croteau e col. (67,68) partir de experimentos que demonstraram a seqüência biossintética de produção de patchoulol à partir de  $[12,13-^{14}\text{C}; 1-^3\text{H}]$  farnesilpirofosfato mediadas pela enzima patchoulol sintase, que também requer especificamente  $\text{Mg}^{++}$  com o cofator. O resumo destes resultados sugeriu que olefinas cíclicas estruturalmente relacionadas são sintetizadas como co-produtos de patchoulol sintase e que este processo pode ser racionalizado assumindo que as olefinas surgem de um intermediário carbocatiônico na rota para patchoulol pela desprotonação, ou rearranjo de hidreto seguida de desprotonação mostrado no (esquema 57).

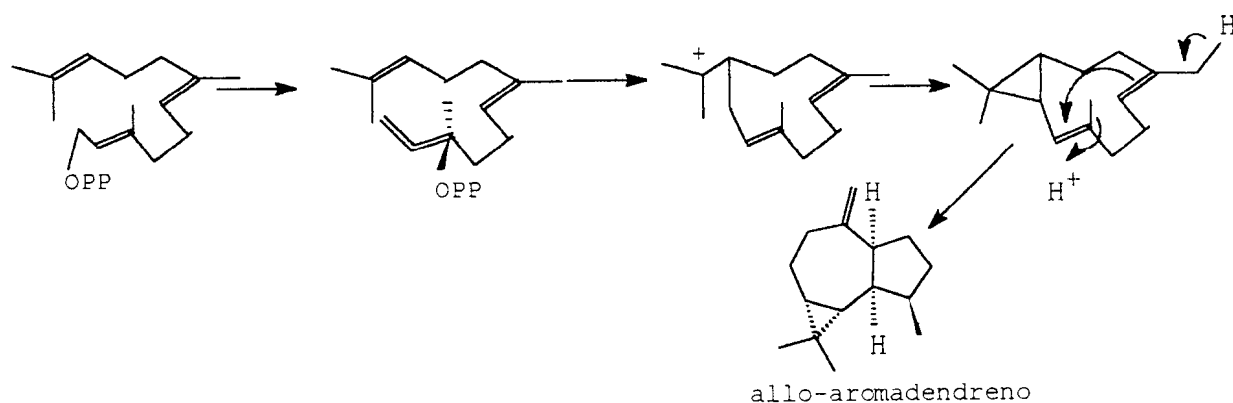
## Esquema 57



Proposta biossintética para obtenção de allo-aromadendreno segue a hipótese de ciclização do S-NPP citada na literatura como ilustra o ( esquema 58 ).

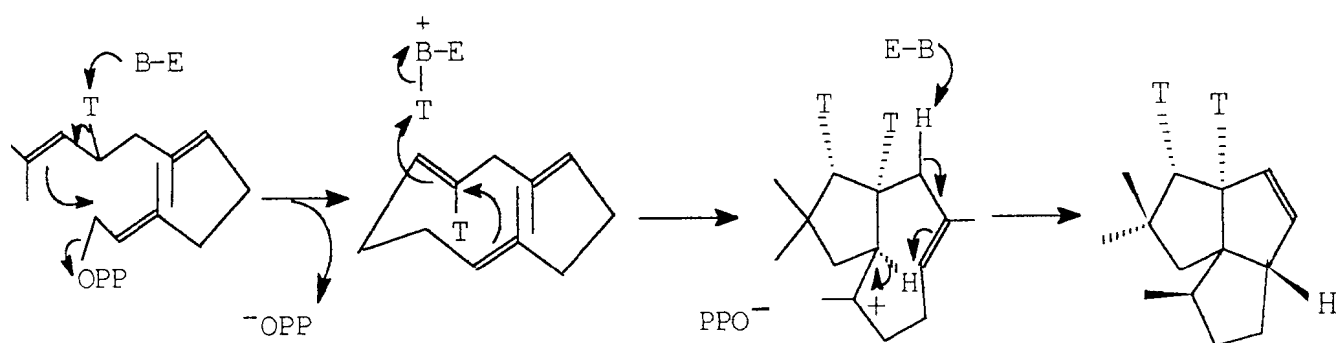


Esquema 58



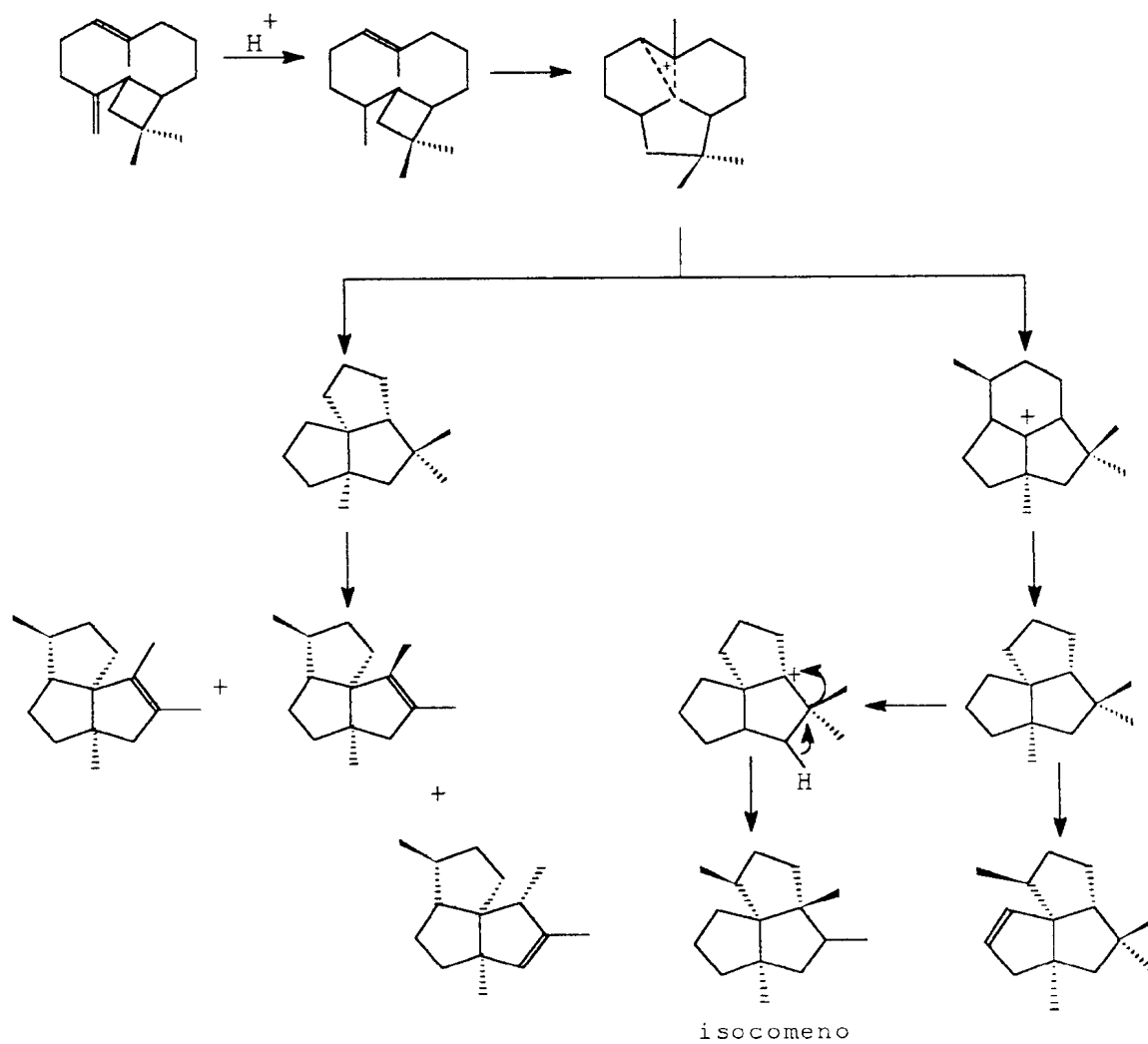
Cane e col.<sup>(69,70)</sup> têm estudado o mecanismo que envolve a obtenção de pentaleneno através da conversão de FPP isotópicamente marcado, e relatado o isolamento e purificação de pentaleneno sintase de uma espécie de *Streptomyces* que catalisa a ciclização de *trans-trans*-farnesilpirofosfato para pentaleneno. O mecanismo no qual a ionização inicial, e ciclização do FPP gera humuleno pelo ataque eletrofílico sobre a face *Sí* do C-<sub>11</sub> e a perda de um próton de C-<sub>9</sub>, está ilustrado no (esquema 59). Reprotonação do intermediário humuleno para C-10 e ataque intramolecular sobre C-<sub>6</sub>, pela dupla ligação  $\Delta^7$  gera o cátion, que pode sofrer migração de hidreto seguida de ciclização com perda de um dos prótons H-<sub>8</sub> do precursor FPP para produzir pentaleneno.

Esquema 59



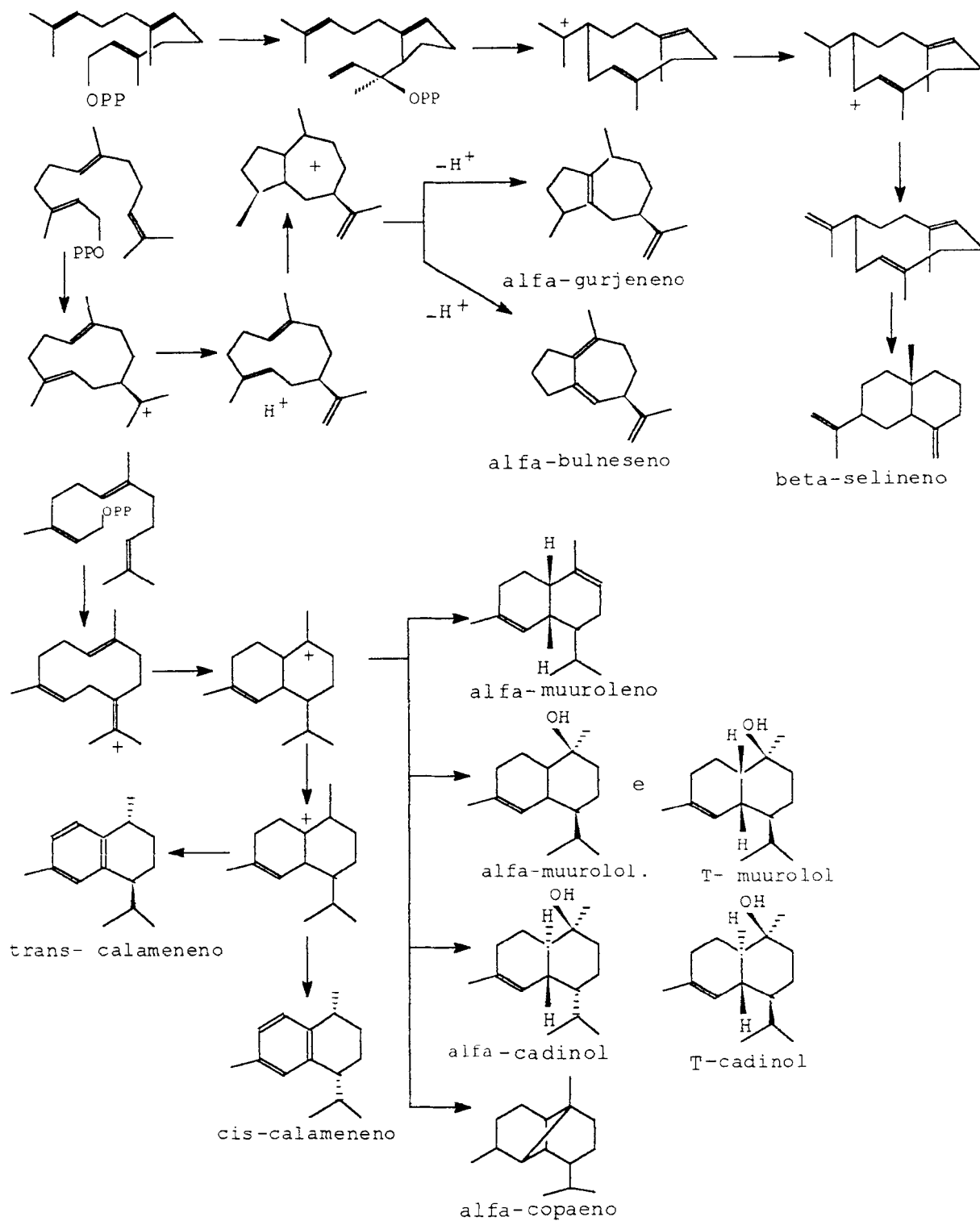
Por outro lado a biossíntese de isocomeno e outros esqueletos afins parecem ter como precursor cariofileno tendo como intermediário dois carbocátions que foram propostos por Zalkow e Col.<sup>(71,72)</sup> e por Bohlmann<sup>(73)</sup> que podem ser visualizado no (esquema 60).

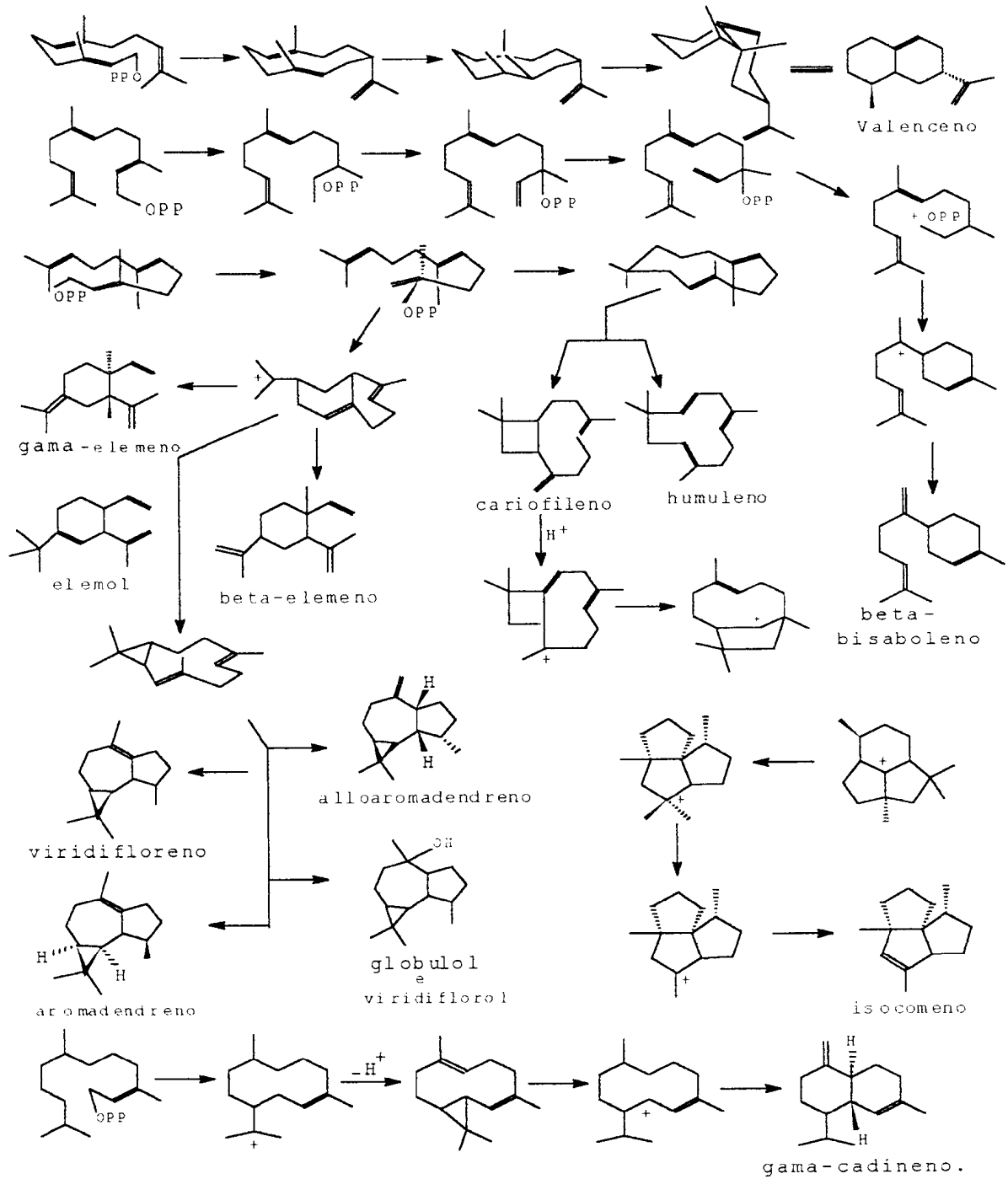
Esquema 60



### **3.1- CORRELAÇÃO BIOSSÍNTETICA ENTRE OS COMPONENTES IDENTIFICADOS EM *Eugenia ovalifolia* Camb.**

A partir das propostas biossintéticas descritas na literatura para os sesquiterpenos foi possível correlacionar os compostos identificados que têm como precursores a ciclização 2,3 *cis*-farnesilpirofosfato ( pág. 98 ) e do 2,3 *trans*-farnesilpirofosfato ( pág.99 ).

Ciclização 2,3 *cis*-farnesilpirofosfato.

Ciclização 2,3 *trans*-farnesilpirofosfato

## **PARTE 4**

### **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

*Eugenia ovalifolia* Camb. é conhecida como muro, murinho, esta espécie foi coletada na estrada Rio/Santos, Avenida das Américas, entre a Barra e o Recreio dos Bandeirantes no período de outubro de 1995. A identificação botânica da espécie estudada foi realizada pela Dr<sup>a</sup> Graziela M. Barroso pesquisadora aposentada do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, classificou o vegetal como uma Myrtaceae do gênero *Eugenia ovalifolia* Camb.

### 4.2. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial da *Eugenia ovalifolia* Camb. foi extraído das folhas, pelo método de arraste de vapor com coação em aparelho de Clevenger, logo após a coleta, durante 4 horas. Foi usado 849 g das folhas frescas obtendo 0,50 g do óleo com rendimento de 0,070%.



#### 4.3. PARTE INSTRUMENTAL

A análise do óleo essencial foi feita em duas colunas cromatográficas, como também os padrões de hidrocarbonetos lineares para o cálculo do índice de Kováts para comparação e identificação dos constituintes do óleo essencial da *E. ovalifolia* Camb. O método cromatográfico utilizado foi Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) no cromatógrafo HP 5890 série II, acoplado a Espectrometria de Massas-Computadorizada CGAR-EM-C modelo HP 5890, MSP 5970 com 7958B e 70 eV.

O gás de arraste foi o hidrogênio na vazão 1 ml/min, com taxa de divisão de fluxo 1/100. A temperatura do injetor foi 280°C e a do detector 300°C. Para melhor identificação dos componentes deste óleo foram utilizadas duas colunas cromatográficas uma polar e a outra apolar, a primeira (polar) de sílica fundida (30 m x 0,32 mm x 0,50 mm) fase estacionária polietileno-glicol (Innowax) e a apolar também de sílica fundida (25 m x 0,20 mm x 0,33 mm), fase estacionária - 5% difenil e 95% dimetil polisiloxane (Ultra-2). As programações de temperatura foram: 60-200°C, taxa de aquecimento de 4°C/min., programada a 60°C por 1 minuto permanecendo na temperatura final por 4 minutos.

As condições de análise no CGAR-EM-C foram: a temperatura do injetor 250°C a do analisador de quadrupolo foi 300°C. A coluna utilizada (25 m x 0,2 mm x 0,33 mm) com fase estacionária polietileno-glicol (FFAP). A programação da

temperatura 70°C-280°C, taxa de aquecimento de 2°C/min., programada a 70°C por 1 minuto elevando a temperatura final e permanecendo por 3 min.

Os padrões de hidrocarbonetos lineares foram analisados no cromatógrafo a gás Hewlett Packard -modelo 5890 série II- nas seguintes condições: o gás de arraste foi o hidrogênio na vazão 1 ml/min, injeção com divisão de fluxo (1/100) com colunas capilares já descritas anteriormente. A programação foi de 60° C a 200°C com taxa de aquecimento de 4°C/min.

#### 4.4. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

##### 4.4.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO

O aparelho utilizado para medir o índice de refração foi o Schimadru Brusch e Lomb, [o solvente utilizado foi o tolueno]. O índice de refração do óleo essencial da *Eugenia ovalifolia* Camb. foi de 1,5024.

##### 4.4.2. ROTAÇÃO ÓPTICA

Foi utilizado um polarímetro Perkin-Elmer modelo n° 341, temperatura do banho de 20°C, a célula polarimétrica foi de 10 mm com desvio a 0°C.

O valor obtido do óleo essencial da *Eugenia ovalifolia* Camb. foi  $[\alpha]_D^{20}$   
= -0,70°.

#### 4.4.3. CÁLCULO DA UMIDADE

Para o cálculo da umidade utilizou-se um "Dean starke", empregou-se 10 g do material vegetal e 75 ml de tolueno como solvente; após o período de 4 horas foi possível o cálculo do teor de umidade que teve como resultado para a *Eugenia ovalifolia* Camb. 45% de umidade.

#### 4.5. PADRÕES UTILIZADOS

Os padrões de hidrocarbonetos lineares utilizados nas duas colunas foram de C<sub>9</sub> a C<sub>30</sub> para a coluna de fase estacionária polietileno-glicol (Innowax) e de C<sub>7</sub> a C<sub>26</sub> para coluna de fase estacionária 5% difenil e 95% dimetil polisiloxane (Ultra-2). Estes padrões foram fornecidos pela Aldrich.

## **PARTE 5**

### **CONCLUSÃO**

## 5. CONCLUSÃO

O uso da CGAR, CGAR-EM-C associado as análises dos IK e comparação com as espectrootecas NIST e Wiley, possibilitou a identificação de 53 substâncias no óleo essencial da *Eugenia ovalifolia* Camb.

A coluna capilar polar polietileno-glicol (Innowax), mostrou maior eficiência na separação das substâncias, o mesmo não ocorrendo com a coluna capilar apolar 5% fenil 95% dimetil polisiloxano (Ultra-2).

Os componentes de maiores abundâncias na coluna capilar polar foram o globulol (12,8 %) e o viridiflorol (11,3 %). Na coluna capilar apolar o de maior abundância foi o globulol com (19,8 %).

Propostas biossintéticas para sesquiterpenos indicam que os sesquiterpenos identificados de *Eugenia ovalifolia* Camb. têm origem na ciclização de 2,3 - *cis* ou 2,3 *trans* farnesilpirofosfato.

O uso da CGAR-EM com espectrootecas cada vez mais completas, tem-se revelado a cada dia um poderoso método de análise para óleos essenciais, que não requer custos elevados e demasiado tempo.

## **PARTE 6**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Igarashi, R. (1985) 1<sup>o</sup> *Simpósio de Óleos Essenciais*, Fundação Cargill, 27-28/03/86, Campinas. **73**.
2. Collins, C.H. e Braga, G.L. ( 1988 ) *Introdução a Métodos Cromatográficos* , **14**. Editora da Unicamp, 3<sup>a</sup> Edição.
3. Braga,F.W.(1994) *Caracterização Química dos Constituintes do Óleo Extraído de Copaifera cearenses*.Tese de Mestrado,UFRJ.
4. Inouye, H., Uobe, k . and Hirai,M., Masada,Y. and Hashimoto,K . (1976) *J. Chromatogr.***118**,201.
5. Blechsmidt, S., Castel, V.,Hedden,G.,Graebe,J.E.,Macmillan,J. and Gaspin, P. (1984) *Phytochemistry*. **23** ( 3 ),553.
6. Radosevich, B.M., Delfin, N.E. and England. R .(1985) *Phytochemistry*. **24**( 9 ) , 2063.
7. Pinto, C. A ., Simoni , M.L.P.S.C., Cunha,C.M.P.S. e Lago , R.C.A. ( 1994 ) *Química Nova* , **17** ( 4 ), 333.
8. Patitucci , M . L ., Veiga . V.F ., Pinto , A . C ., Zoghbi , M . G . B . e Silva , J . R . A . ( 1995 ) *Química Nova* , **18** ( 3 ) , 262 .
9. Attygalle , A. B., Vostrowsky , O.M.H . and Bestmann ,H.J. ( 1987 ) *J. Chem. Eco.* , **13** ( 5 ) , 1298 .
10. Bestmann , H . J ., Attygalle , A . B ., Schwany , J ., Garbe , w ., Vostrowsky . O and Tomida , I . ( 1989 ) *T. Letters* , **30** ( 22 ) , 2911.

11. Greenaway, W. and Whatley, F.R. (1990) *Phytochemistry*. **29** (8) ,2551.
12. Greenaway, W., Gumudere, J. and Whatley, F.R. (1991) *Phytochemistry*. **30** (6), 1883.
13. Greenaway, W. and Whatley, F.R. (1990) *Phytochemistry* .**30** (6),1887.
14. Haffner , T. and Tressl, R. ( 1996 ) *J.Agric.Food.Chem.***44**,1218.
15. Schottler , M . and Boland ,W. (1996 ) *Helv. Chim. Acta* . **79**,1488.
16. Legrand, D.C. e Klem, R.M. (1977) *Flora Illustrada Catarinense.*, Itajaí, SC.
17. Cronquist, A. (1988) *The evolution and classification of flowering plants*. 2<sup>a</sup> ed. The New York Botanical Garden, New York.
18. Corrêa, M.P. (1926) *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.
19. Barroso, M.G. e Peron, M.V. (1994) *Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares*. Vol. **1**,126.
20. Fontenelle, G.B., Costa ,G.G., and Machado, R.D (1994 ) *Bot.J. Linnean Soc.*. **115**,111.
21. Adehajo, A.C., Aladesanmi, A.J. e Oloke, K.J. (1989) *Fitoterapia*. **60** (5), 451.
22. Weyerstahl, P., Marschall,W.H., Christransen, C., Oguntimein, B.O. and Odeoye A.O (1988) *Planta medica*,546.
23. Morais,S.M., Craveiro,A.A., Machado,M.J.L., Alencar,J. W. e Matos, F.J.A.(1996) *J .Essent .Oil Res*. 8,449.
24. Guimarães,F.A., Holanda,L.F.F., Maia,G.A. and Moura,F.J.A.(1982)



- Cienc. Tecnol. Aliment* **2** (2),208.
25. Suksamrarn, A. and Brophy, J.J. (1987) *Flavour and Fragrance Journal*. **2**,37.
26. Mitscher, L.A., Wu, W.N. and Beal, J.L. (1973) *Lloydia*, 422.
27. Bello, A., Rodriguez, M.L., Rosado, A. and Pino, J.A. (1995) *J. Essent. Oil Res.* **6**, 697.
28. Lee, P.E., Swords, G. and Hunter, G.L.K. (1975) *J. Food Sci.* **40**, 421.
29. Iwamuro, H., Takenokuchi, H., Matsubara, Y. and Lizuka, Y. (1983) *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2099.
30. Painuly, P. and Tanson, J.S. (1982) *Phytochemistry*. **22**, 243.
31. Dan, A.M.M.S. e Braz, F.R. (1983) *Resumo da SBQ-QPN-57-D.2.5*, 540.
32. Henriques, A.T., Sobral, M.E., Cauduro, A.D., Schapoval, E.E.S., Bassani, V.L., Lamaty, G., Menut, C. and Bessiere, J.M. (1993) *J. Essent. Oil Res.* **5**, 451.
33. Gottlieb, O.R. and Leão, M.S., Maia, J.G.S. (1972) *Phytochemistry*. **11**, 1185.
34. Craveiro, A.A., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W. and Machado, M.J.L. (1983) *J. Nat. Prod.* **46**, 591.
35. Vera, R.R., Laurent, S.J. and Fraisse, D.J. (1994) *J. Essent. Oil Res.* **6**, 155.
36. Kováts, E. (1958) *Helv. Chim. Acta*. **41**, 1915.
37. Erdey, L., Takács, J. and Szalanczy, E. (1969) *J. Chromatogr.* **46**, 29.
38. Sanchez, E.F., Dominguez, J.A.G., Menéndez, V. and Santiuste, J.M. (1990) *J. Chromatogr.* **498**, 1.
39. Ramaswani, S.K., Gargiullo, J. and Von Geldern, T. (1986) *Flavour and Fragrance*. **9**, 52.

40. Adams, R.P. (1995) *Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/mass Spectroscopy*. Selured Publishing Corporation, Illinois, USA.
41. Davies, N.W. (1990) *J. Chromatogr.* **503**,1.
42. Weyerstahl, P., Marschall, H., Score, R.W. and Maischall, H. (1993) *Flavour and Fragrance*. **8**,201.
43. Nagahama, S., Tazaki, M. and Kobayashi, H. (1995) *J. Essent. Oil Res.* **7**,571.
44. Banthorpe, D.V. and Branch, S.A. (1985) *Nat. Prod. Rep.* **2**,158.
45. Beale, M.H. (1991) *Nat. Prod. Rep.* **8**,441.
46. Dewick, P.M. (1995) *Nat. Prod. Rep.* **8**,507.
47. Cane, D.E. (1990) *Chem. Rev.* **90**.1089.
48. Endo, T. and Suga, T. (1992) *Phytochemistry*. **31**(5),1565.
49. Yoshioka, T., Zheng, R.Y., Otha, S. and Suga, T. (1990) *Phytochemistry*. **29** ( 11 ),3467.
50. Berry, K.M., Nigel, B.P. and Weavers, R. T.(1985) *Phytochemistry*. **24** (12 ),2893.
51. Parker, W., Roberts, J.S. and Ramage, R. (1987) *Quart.Rev.* **21**,331.
52. Arigoni, D. (1975) *Pure Appl. Chem.* **41**,219.
53. Shirahama, H., Ōsawa, E. and Matsumoto, T. (1980) *J. Am Chem Soc.* **23**,3208.
54. Shirahama, H., Ōsawa, E., Chlabra, B.R., Shimakawa, T., Yokono, T., Kanaiwa, T., Smiya, T. and Matsumoto, T. (1981) *T. Letters*. **22** (16),1527.
55. Greenwood, J.M., Solomon, M.D., Sutherland, J.K. and Torre, A. (1968) *J. Chem. Soc. C*. 3004.

56. Croteau, R. and Gundy, A. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **233**,838.
57. Cane, D.E. (1990) *T. Letters.***36**,1109.
58. Ohta, Y. and Hirose, Y. (1969) *T. Letters.* **20**,1601.
59. Ohta, Y., Ohara, K. and Hirose, Y. (1968) *T. Letters.* **39**,4181.
60. Davis,G.D. and Essenberg,M .(1995) *Phytochemistry* **39** (3),553.
61. Davis, E.M., Tsuji, J., Davis, G.D., Pierce, M.L. and Essenberg, M. (1996)  
*Phytochemistry.* **41**( 4),1047.
62. Nabeta, K., Mototani, Y., Tazaki, H. and Okuyama, H.(1994) *Phytochemistry.* **35**  
(4 ), 915.
63. Belingheri, L., Cartayrade, A., Pauly, G. and Gleizes, M. (1992)  
*Phytochemistry.***84**,129.
64. Akhila, A.; Pradeep, K.S. and Raghunath, S.T. (1987) *Phytochemistry.* **26** (10),  
2705.
65. Croteau,R. and Purkett, P.T .( 1989 ) *Arch.Biochem.Biophys.* **271**,524.
66. Croteau, R., Munck, S.L., Akoh, C.C., Fisk, H.J. and Satterwhite, M. (1987) *Arch*  
*. Biochem. Biophys.* **256**, 56.
67. Cane, D.E. and Tillman, A.M. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**,122.
68. Cane, D.E .and Pargellis, C. (1987) *Arch. Bioch. Biophys..* **254** ,(2), 421.
- 69 Harrison, P .H .M. Oliver, J.S. and Cane, D.E. (1988) *J. Am .Chem .Soc,*  
**110**, 5922.
70. Cane, D.F., Oliver, J.S., Harrison, P.H.M., Abell, C., Hubbard, B.R., Kane,  
C.T.and Lattman, R. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**,4513.

71. Zalkow, L.H., Harris, R.N. and Derveer, D.V. (1978) *J.C.S. Chem. Comm.* 420.
72. Zalkow, L.H., Harris, R.N. and Burke, N.I. (1979) *Nat. Prod. J.* **42**, 96.
73. Bohlmann, F. and Jakupovic, J. (1980) *Phytochemistry.* **19**, 259.