

**DIOGO MONTES VIDAL**

**Novos compostos bioativos relacionados às espécies *Homalinotus depressus*  
(Coleptera: Curculionidae), *Pseudomonas veronii* (Pseudomonadales:  
Pseudomonadaceae) e *Micromonospora echinospora* (Actinomycetales:  
Micromonosporaceae)**

**CURITIBA**

**2016**



**DIOGO MONTES VIDAL**

**Novos compostos bioativos relacionados às espécies *Homalinotus depressus*  
(Coleptera: Curculionidae), *Pseudomonas veronii* (Pseudomonadales:  
Pseudomonadaceae) e *Micromonospora echinospora* (Actinomycetales:  
Micromonosporaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Química, Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

CURITIBA

2016



Vidal, Diogo Montes

Novos compostos bioativos relacionados às espécies *Homalinotus depressus* (Coleoptera: Curculionidae), *Pseudomonas Veronii* (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae), *Micromonospora echinospora* (Actinomycetales: Micromonosporaceae) / Diogo Montes Vidal. – Curitiba, 2016.

244 f. : il.; tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

Bibliografia: p.151-166

1. Coleoptera. 2. Pseudomonas. 3. Compostos bioativos.  
I. Zarbin, Paulo Henrique Gorgatti. II. Título.

CDD 660.28449

TERMO DE APROVAÇÃO

**NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS RELACIONADOS ÀS ESPÉCIES  
HOMALINOTUS DEPRESSUS (COLEPTERA: CURCULIONIDAE),  
PSEUDOMONAS VERONII (PSEUDOMONADALES:  
PSEUDOMONADACEAE) E MICROMONOSPORA ECHINOSPORA  
(ACTINOMYCETALES: MICROMONOSPORACEAE)**

por

DIOGO MONTES VIDAL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



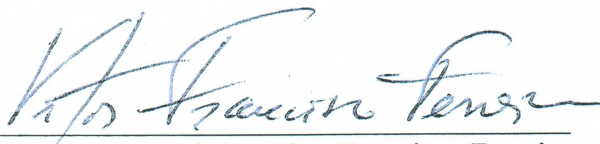
Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin  
Orientador  
Dep. de Química – UFPR



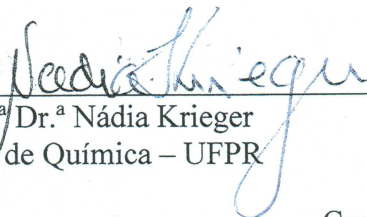
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Tallarico Pupo  
Ciências Farmacêuticas – FCFRP - USP



Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke  
Institut für Organische Chemie - Universität Hamburg



Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira  
Instituto de Química – UFF



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia Krieger  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 19 de fevereiro de 2016.

**Dedico este trabalho**

à minha mãe, Ariadne, que nunca mediu esforços para que eu sempre tivesse o melhor, sempre me apoiou e amou incondicionalmente.

à minha amada esposa, Daiane, por todo o amor, compreensão e inspiração durante toda essa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Zarbin por todas as oportunidades, conselhos, ensinamentos e, principalmente, pela amizade e confiança durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Stefan Schulz por ter prontamente nos acolhido em seu grupo de pesquisa na TU Braunschweig, assim como por todos os valiosos ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. Nádia Krieger pela participação em minha formação, através da avaliação do projeto de doutorado, relatórios e exames de qualificação e de defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Wittko Francke, por todas as discussões e conselhos dados durante meu doutorado e por ter gentilmente aceitado participar da avaliação deste trabalho.

À Profa. Dra. Mônica T. Pupo e ao Prof. Dr. Vitor F. Fereira por terem prontamente se disponibilizado a participar da avaliação deste trabalho e por suas valiosas contribuições.

Aos Profs. Drs. Alfredo R.M de Oliveira e Luiz P. Ramos pelas contribuições durante a avaliação de meu exame de qualificação.

À Sococo e ao Dr. Marcos A. B. Moreira pela parceria na realização do trabalho com *Homalinotus depressus*.

À Dra. Ulrike Groenhagen pela colaboração na realização do trabalho com *Pseudomonas veronii* e por ter me instruído nas metodologias básicas para o manejo das culturas de bactérias.

A todos os estudantes e pesquisadores que fizeram parte do Laboratório de Semioquímicos da UFPR durante estes anos, pela amizade, incentivo e descontração, que sempre tornaram o ambiente mais agradável.

Aos colegas do grupo do Prof. Stefan por terem nos acolhido como parte do grupo, em especial ao Florian Mann, à Lisa Ziesche e à Jana Casper por toda a ajuda e convivência agradável.

A todos que contribuíram para este trabalho direta ou indiretamente, incluindo todos os colegas, professores, servidores técnico-administrativos da UFPR e do departamento de química.

Aos meus amigos e a toda a minha família, por todo o amor e carinho e por tornarem tudo mais leve e agradável.

## RESUMO

Este trabalho descreve aspectos relacionados à ecologia química de três espécies distintas (uma espécie de inseto e duas de bactérias), abordando desde a criação dos organismos em condições de laboratório com o objetivo de realizar a extração de voláteis e posterior identificação estrutural, síntese, estudos biossintéticos e de determinação de bioatividade. Desta maneira, o trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo discute de aspectos relacionados à identificação e síntese do feromônio de agregação do besouro *Homalinotus depressus* (Coleoptera: Curculionidae), cuja população tem crescido constantemente na região norte do Brasil, levando a perdas financeiras de grandes proporções na produção de coco. Devido a aspectos biológicos da espécie, acredita-se que o uso de feromônios no controle da praga é promissor. Respostas comportamentais de *H. depressus* a extratos de aeração de coespecíficos sugerem a presença de um feromônio de agregação produzido pelos machos. As análises destes extratos em GC revelaram a presença de quatro compostos macho-específicos. O conjunto de dados analíticos sugeriu que o componente minoritário da mistura estaria relacionado à estrutura da isoforona, que foi confirmada através da co-injeção com um padrão analítico. Algumas reações foram propostas a partir da isoforona, com o objetivo de identificar os demais componentes da mistura. A reação de epoxidação resultou na epóxi-isoforona, a qual coeluiu com um dos compostos macho-específicos. Através das análises em GC-FTIR e GC-MS e da redução da epóxi-isoforona com NaBH<sub>4</sub>, o composto majoritário foi identificado como 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (homalinol). A preparação diastereoseletiva dos estereoisômeros *syn* e *anti* do homalinol e a comparação de seus respectivos perfis cromatográficos permitiu a determinação da configuração relativa do composto majoritário como *syn*. Ambos os enantiômeros do *syn*-homalinol foram obtidos em bons excessos enantioméricos via biocatálise e a configuração absoluta do homalinol natural foi determinada como (1*R*,2*R*,6*S*). Bioensaios em olfátometro-Y e em campo demonstraram que o componente majoritário sintético puro ou em mistura com os demais compostos macho-específicos é atrativo para *H. depressus*.

A segunda parte do trabalho relata a identificação, síntese e biossíntese de nitrilas voláteis emitidas por culturas das bactérias *Pseudomonas veronii* e *Micromonospora echinospora*. Os voláteis produzidos por culturas de *P. veronii* R02 e *M. echinospora* DSM 43816 foram coletados por aparato de trapeamento em circuito



fechado (CLSA) e analisados por GC-MS. Análises prévias à realização deste trabalho permitiram a identificação de diversos compostos presentes nos extratos de ambas as espécies, assim como a detecção de nitrilas de cadeia longa, não identificadas. Foram detectados seis compostos nos extratos de *P. veronii* R02 e onze compostos nos extratos de *M. echinospora* DSM43816 contendo a função nitrila. Através da análise dos respectivos índices de retenção, espectros de massas e dados oriundos de derivatização com disulfeto de dimetila (DMDS) foram elaboradas propostas estruturais para as nitrilas presentes nos extratos de ambas as espécies. As propostas foram confirmadas através da síntese de padrões. Em *P. veronii* R02 foram identificadas as seguintes estruturas: (*Z*)-tetradec-7-enonitrila, tetradecanonitrila, pentadecanonitrila, (*Z*)-hexadec-9-enonitrila, hexadecanonitrila e (*Z*)-octadec-11-enonitrila. Em *M. echinospora* DSM43816 foram identificadas as seguintes estruturas: (*Z*)-12-metiltridec-3-enonitrila, (*E*)-12-metiltridec-3-enonitrila, (*Z*)-tetradec-3-enonitrila, (*E*)-tetradec-3-enonitrila, (*Z*)-13-metiltetradec-3-enonitrila, (*Z*)-12-metiltetradec-3-enonitrila, (*E*)-13-metiltetradec-3-enonitrila, 13-metiltetradecanonitrila, (*Z*)-pentadec-3-enonitrila, (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila e (*Z*)-hexadec-3-enonitrila. Através da síntese e aplicação de compostos isotopicamente marcados às culturas foi possível elaborar propostas biossintéticas para a obtenção das nitrilas naturais em ambas as espécies. Estudos de atividade antimicrobiana preliminares demonstraram que a *E/Z*-pentadec-3-enonitrila é capaz de inibir o crescimento de culturas de *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

This project describes aspects related to the chemical ecology of three different species (one insect and two bacteria species), approaching since the organism rearing in laboratory conditions, aiming the extraction of volatiles followed by structural elucidation, synthesis, biosynthetic studies, and bioactivity determination. In this way this thesis is divided in two distinct chapters. The first chapter describes aspects related to the identification and synthesis of the aggregation pheromone produced by the beetle *Homalinotus depressus* (Coleoptera: Curculionidae), whose population has constantly increased on the Brazilian Northern region, leading to heavy financial losses on coconut production. Due to biological aspects of the species, the use of pheromones in pest management programs is promising. The behavioral responses of *H. depressus* to conspecifics aeration extracts suggested the presence of a male-produced aggregation pheromone. GC analyses of these extracts revealed the presence of four male-specific compounds. Analytical dataset suggested the identity of the minor component as isophorone which was confirmed by co-injection with an analytical standard. Several reactions were proposed starting from isophorone in order to identify the remaining components. The epoxydation reaction resulted in epoxyisophorone, which co-eluted with one of the male-specific compounds. By GC-FTIR and GC-MS analyses and NaBH<sub>4</sub> reduction of epoxyisophorone the major compound was identified as 4,4,6-trimethyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]heptan-2-ol (homalinol). Diastereoselective preparation of *syn* and *anti* stereoisomers of homalinol and the comparison of their respective chromatographic profiles allowed the determination of the relative configuration of the major compound as *syn*. Both enantiomers of *syn*-homalinol were obtained in high enantiomeric excesses by biocatalysis and the absolute configuration on natural homalinol was determined as (1*R*,2*R*,6*S*). Y-tube olfactometer and field bioassays demonstrated that the synthetic major compound pure or as a mixture of all the male specific compounds is attractive to *H. depressus*.

The second chapter describes the identification, synthesis and biosynthesis of volatile nitriles released by bacterial cultures of *Pseudomonas veronii* and *Micromonospora echinospora*. Volatiles produced by *P. veronii* R02 and *M. echinospora* DSM 43816 cultures were collected by closed loop stripping apparatus (CLSA) and analyzed by GC-MS. Previous analyses allowed the identification of

several compounds in extracts from both species and the detection of unidentified long chain nitriles. Six nitriles were detected on extracts from *P. veronii* R02 and eleven from *M. echinospora* DSM43816. Structural proposals for the nitriles contained on extracts from both species we performed through the analysis of the respective retention indexes, mass spectra and dimethyl disulfide (DMDS) derivatisations data. The proposed structures were confirmed by synthesizing standards. The following structures were identified on *P. veronii* R02: (*Z*)-tetradec-7-enenitrile, tetradecanenitrile, pentadecanenitrile, (*Z*)-hexadec-9-enenitrile, hexadecanenitrile e (*Z*)-octadec-11-enenitrile. The following structures were identified on *M. echinospora* DSM43816: (*Z*)-12-methyltridec-3-enenitrile, (*E*)-12-methyltridec-3-enenitrile, (*Z*)-tetradec-3-enenitrile, (*E*)-tetradec-3-enenitrile, (*Z*)-13-methyltetradec-3-enenitrile, (*Z*)-12-methyltetradec-3-enenitrile, (*E*)-13-methyltetradec-3-enenitrile, 13-methyltetradecanenitrile, (*Z*)-pentadec-3-enenitrile, (*Z*)-14-methylpentadec-3-enenitrile and (*Z*)-hexadec-3-enenitrile. It was possible to propose biosynthetic routes to the natural nitriles through synthesis and application of isotopically labeled compounds to the cultures. Preliminary antimicrobial activity studies showed that pentadec-3-enenitrile is active against growth of *Staphylococcus aureus* cultures.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Compostos identificados como componentes feromonais em diferentes espécies da família Curculionidae. ....	6
Figura 2: A: <i>Homalinotus depressus</i> em suas diferentes fases de desenvolvimento e danos causados por <i>Homalinotus depressus</i> na cultura de coco .....	7
Figura 3: Danos ocasionados por infestação de <i>Homalinotus depressus</i> em cultivo de coco, ocasionando quebra e queda do cacho. ....	8
Figura 4: Sequência metodológica empregada na identificação do feromônio de agregação de <i>H. depressus</i> .....	11
Figura 5: Confeção das armadilhas.....	26
Figura 6: Aplicação dos testes de campo.....	27
Figura 7: Perfil cromatográfico dos compostos macho-específicos presentes em extratos de <i>Homalinotus depressus</i> . ....	28
Figura 8: Respostas olfativas de machos e fêmeas de <i>Homalinotus depressus</i> frente ao extrato de aeração de machos x solvente (controle) e de fêmeas x solvente (controle) em condições de olfatômetro tipo Y. ....	29
Figura 9: Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto <b>2</b> . ....	31
Figura 10: Comparação entre perfil cromatográfico e espectro de massas da 3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (isoforona) sintética com os apresentados pelo composto natural <b>2</b> . ....	32
Figura 11: Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto <b>1</b> . ....	34
Figura 12: Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto <b>3</b> . ....	36
Figura 13: A - Comparação entre o cromatograma do homalinol ( <b>3</b> ) sintético e do extrato natural de <i>H. depressus</i> . B – Comparação dos espectros de massas dos dois produtos sintéticos (a e b) e do produto natural <b>4</b> (c). ....	37
Figura 14: Estereoisômeros do homalinol ( <b>3</b> ). ....	38
Figura 15: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, referente ao composto <i>anti-3</i> .....	39
Figura 16: Transferência de hidreto proposta para a estereoseletividade da redução da epóxi-isoforona <b>1</b> com borohidreto de zinco. ....	40
Figura 17 Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, referente ao composto <i>syn-3</i> .....	42
Figura 18: Projeções dos compostos <i>anti-3</i> e <i>syn-3</i> e ângulo diedral entre os hidrogênios H <sub>1</sub> e H <sub>2</sub> . ....	42

Figura 19: Mecanismo proposto para a reação de epoxidação do composto <b>5</b> com MPPA. ....	43
Figura 20: Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros do homalinol ( <b>3</b> ) e sua comparação com o componente majoritário do feromônio de agregação de <i>H. depressus</i> .....	44
Figura 21: Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros do homalinol- <b>3</b> e sua comparação com o componente majoritário do feromônio de agregação de <i>H. depressus</i> .....	49
Figura 22: Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros da epóxi-isoforona- <b>1</b> e sua comparação com o componente natural do feromônio de agregação de <i>H. depressus</i> .....	50
Figura 23: Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto <b>4</b> . ....	51
Figura 24: Média de insetos capturados por armadilha nos diferentes tratamentos. ....	54
Figura 25: Compostos macho-específicos liberados por <i>Homalinotus depressus</i> . ....	57
Figura 26: Diversidade estrutural de nitrilas de ocorrência natural.....	62
Figura 27: Voláteis previamente identificados em <i>Pseudomonas veronii</i> R02.....	65
Figura 28: Voláteis majoritários produzidos por <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816. ....	66
Figura 29: Sequência metodológica empregada na identificação, síntese e biossíntese dos voláteis produzidos por <i>Pseudomonas veronii</i> e <i>Micromonospora echinospora</i> .....	69
Figura 30: Aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA).....	72
Figura 31: Cromatograma referente aos compostos nitrílicos voláteis produzidos por <i>Pseudomonas veronii</i> R02 ( <b>7-12</b> ). ....	101
Figura 32: Espectro de massas referente ao composto natural <b>9</b> . ....	102
Figura 33: Estruturas identificadas para os compostos <b>8, 9</b> e <b>11</b> .....	103
Figura 34: Espectro de massas referente ao composto <b>10</b> . ....	104
Figura 35: Espectro de massas referente ao produto obtido ( <b>13</b> ) pela reação do composto natural <b>7</b> com DMDS. ....	105
Figura 36: Espectro de massas referente ao produto obtido ( <b>14</b> ) pela reação do composto natural <b>10</b> com DMDS. ....	106
Figura 37: Espectro de massas referente ao produto obtido ( <b>15</b> ) pela reação do composto natural <b>12</b> com DMDS. ....	106

Figura 38: Estrutura identificada para o composto natural <b>10</b> . .....	107
Figura 39: Nitrilas detectadas por GC-MS em extratos de voláteis de <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816.....	109
Figura 40: Espectro de massas obtido para o composto <b>23</b> .....	109
Figura 41: Cromatograma referente aos compostos naturais <b>19-29</b> . .....	111
Figura 42: Propostas estruturais iniciais para os compostos <b>19, 20, 23, 25 e 28</b> .....	112
Figura 43: Espectro de massas referente ao composto <b>21</b> . .....	112
Figura 44: Propostas estruturais iniciais para os compostos <b>21, 22, 24, 27 e 29</b> .....	113
Figura 45: Espectro de massas referente ao composto <b>26</b> . .....	114
Figura 46: Estrutura proposta para o composto natural <b>26</b> .....	114
Figura 47: Cromatograma referente aos produtos obtidos pela derivatização do extrato de voláteis de <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816 com DMDS.....	115
Figura 48: Espectro de massas referente aos derivativos obtidos pela derivatização do extrato de <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816 com DMDS.....	116
Figura 49: Estruturas propostas para os compostos <b>19-29</b> , produzidos por <i>M. echinospora</i> (DSM43816). .....	117
Figura 50: Ampliação da região dos sinais dos átomos de hidrogênio olefínicos do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>36</b> . .....	119
Figura 51: Ampliação da região dos sinais dos átomos de hidrogênio olefínicos do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>38</b> . .....	120
Figura 52: Comparação entre os espectros de massas e índices de retenção do composto natural <b>21</b> e do composto sintético <b>50</b> .....	126
Figura 53: Espectro de massas referente à nitrila formada após alimentação de <i>P. veronii</i> R02 com ácido palmítico D <sub>31</sub> . .....	129
Figura 54: Espectro de massas referente ao composto <b>63</b> obtido pela análise dos produtos obtidos na reação do extrato de <i>P. veronii</i> R02 com DMDS. ....	130
Figura 55: Obtenção do éster-SNAC <b>67</b> , a partir do ácido decanóico-D <sub>19</sub> ( <b>66</b> ). .....	131
Figura 56: Estrutura, espectro de massas e estrutura referente ao pico base para o composto <b>10</b> , produzido por <i>Pseudomonas veronii</i> R02 após alimentação com o éster SNAC <b>67</b> . .....	132
Figura 57: Espectro de massas referente à nitrila produzida após alimentação de <i>M. echinospora</i> DSM43816 com ácido palmítico-D <sub>31</sub> ( <b>61</b> ). .....	133

Figura 58: Espectro de massas referente ao composto <b>70</b> , obtido após derivatização do extrato obtido de <i>M. echinospora</i> DSM43816 após alimentação com ácido palmítico- <i>d</i> <sub>31</sub> ( <b>61</b> ) com DMDS. ....	134
Figura 59: Rota sintética para a obtenção dos precursores deuterados <b>76</b> , <b>77</b> e <b>78</b> ....	135
Figura 60: Comparação entre os espectros de massas apresentados pelos compostos <b>26</b> e <b>76</b> . ....	137
Figura 61: Espectro de massas referente ao ácido carboxílico <b>77</b> e mecanismo de formação do fragmento com <i>m/z</i> 63. ....	138
Figura 62: Cromatograma referente ao extrato obtido após alimentação de <i>M. echinospora</i> DSM43816 com o ácido carboxílico <b>77</b> e espectros de massas referentes às nitrilas <b>79</b> e <b>76</b> , respectivamente. ....	139
Figura 63: Resumo das estruturas identificadas nos extratos de voláteis obtidos a partir de culturas de <i>P. veronii</i> R02. ....	147
Figura 64: Resumo das estruturas identificadas nos extratos de voláteis obtidos a partir de culturas de <i>M. echinospora</i> DSM43816. ....	148

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Epoxidação da isoforona (2) com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
Esquema 2: Preparação do homalinol (3).....	36
Esquema 3: Síntese diastereoseletiva do <i>anti</i> -homalinol (3).....	39
Esquema 4: Síntese diastereoseletiva do <i>syn</i> -homalinol (3).....	41
Esquema 5: Resolução cinética enzimática do racemato <i>syn</i> -3 empregando-se diferentes lipases, solventes e tempos de reação. ....	45
Esquema 6: Síntese enantioseletiva do homalinol (3) e do respectivo acetato (6), em escala preparativa. ....	48
Esquema 7: Preparação dos compostos (1 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-1 e (1 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-1. ....	49
Esquema 8: Preparação do diosfenol 4.....	52
Esquema 9: Rotas biossintéticas descritas para obtenção de nitrilas.....	63
Esquema 10: Derivatização de alcenos com DMDS e formação dos fragmentos característicos. ....	104
Esquema 11: Obtenção da ( <i>Z</i> )-tetradec-7-enonitrila (7).....	107
Esquema 12: Obtenção da ( <i>Z</i> )-octadec-11-enonitrila (12). ....	108
Esquema 13: Obtenção das nitrilas 38 e 28.....	118
Esquema 14: Síntese das nitrilas 23 e 25.....	121
Esquema 15: Obtenção dos compostos 19 e 20.....	122
Esquema 16: Síntese das nitrilas 46 e 47.....	123
Esquema 17: Obtenção dos compostos 49 e 50.....	124
Esquema 18: Obtenção das nitrilas 55 e 24.....	125
Esquema 19: Obtenção das nitrilas 21, 22, 27 e 29.....	127
Esquema 20: Síntese do composto 26. ....	128
Esquema 21: Estrutura da nitrila esperada (62) como resultado para o experimento de alimentação de <i>Pseudomonas veronii</i> R02 com o ácido palmítico- <i>d</i> <sub>31</sub> (61).....	128
Esquema 22: Obtenção do éster-SNAC derivado do ácido palmítico- <i>d</i> <sub>31</sub> , 65.....	131
Esquema 23: β-oxidação de ácidos graxos saturados proposta para <i>Pseudomonas</i> <i>veronii</i> R02. ....	140
Esquema 24: Proposta biossintética para obtenção das nitrilas produzidas por <i>Pseudomonas veronii</i> R02. ....	142
Esquema 25: Proposta biossintética para obtenção das nitrilas produzidas por <i>M.</i> <i>echinospora</i> DSM43816.....	143



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos empregados nos bioensaios de captura em campo. ....	26
Tabela 2: Distribuição as armadilhas do bioensaio. ....	27
Tabela 3: Índices de Retenção dos compostos <b>1-4</b> em colunas RTX-5 e EC-WAX....	30
Tabela 4: Resolução cinética do álcool <i>syn-3</i> empregando "Amano"SD ou AK "Amano" 20 e diferentes solventes orgânicos e tempos de reação.....	46
Tabela 5: Número de fêmeas e machos de <i>Homalinotus depressus</i> atraídos para diferentes fontes de odor, em olfatômetro em Y. ....	53
Tabela 6: Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana e de citotoxicidade das nitrilas sintéticas .....	146

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxv
APRESENTAÇÃO.....	xxvi
CAPÍTULO I .....	2
1.1 INTRODUÇÃO .....	3
1.1.1 Compostos orgânicos voláteis e comunicação química.....	3
1.1.2 Feromônios de agregação em curculeonídeos (Coleoptera: Curculionidae) ....	4
1.1.3 <i>Homalinotus depressus</i> e a cultura de coqueiros no Brasil .....	6
1.2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	9
1.2.1 Objetivo Geral.....	9
1.2.2 Objetivos específicos .....	9
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
1.3.1 Criação dos insetos, extração de voláteis e bioensaios comportamentais .....	12
1.3.1.1 Criação de <i>Homalinotus depressus</i> .....	12
1.3.1.2 Extração de voláteis produzidos por <i>H. depressus</i> .....	12
1.3.1.3 Bioensaios comportamentais .....	12
1.3.2 Análises Estatísticas.....	13
1.3.3 Métodos de Análise .....	13
1.3.3.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) .....	13
1.3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia no infravermelho .....	13

1.3.3.3 Determinação dos índices de retenção.....	14
1.3.3.4 Análises em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral.....	14
1.3.4 Síntese dos compostos de referência.....	15
1.3.4.1 Preparação da 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ona ( <b>1</b> ).....	15
1.3.4.2 Preparação do 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol ( <b>3</b> ).....	16
1.3.4.3 Preparação do borohidreto de zinco.....	16
1.3.4.4 Preparação do <i>anti</i> -4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol ( <i>anti</i> - <b>3</b> )	17
1.3.4.5 Preparação do 3,5,5-trimethylcyclohex-2-enol ( <b>5</b> ) (Isoforol).....	17
1.3.4.6 Preparação do <i>syn</i> -4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol ( <i>syn</i> - <b>3</b> )..	18
1.3.4.6.1 Preparação do ácido 2-carboxiperoxibenzóico.....	18
1.3.4.6.2 Epoxidação empregando-se MPPA.....	19
1.3.4.7 Resolução cinética enzimática – Escala Analítica.....	19
1.3.4.8 Resolução cinética enzimática – Escala Preparativa.....	21
1.3.4.9 Resolução cinética enzimática – Escala Preparativa.....	21
1.3.4.10 Síntese do Acetato de (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )- <b>6</b> .....	22
1.3.4.11 Síntese do (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )- <b>3</b> .....	23
1.3.4.12 Síntese da 2-hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona ( <b>4</b> ).....	23
1.3.4.13 Síntese do (1 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )- <b>1</b> .....	24
1.3.4.14 Síntese do (1 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )- <b>1</b> .....	25
1.3.5 Experimento de captura de <i>Homalinotus depressus</i> em campo.....	25
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
1.4.1 Extração de voláteis de <i>Homalinotus depressus</i> e análises iniciais.....	28
1.4.2 Identificação estrutural do composto ( <b>2</b> ).....	30
1.4.3 Identificação estrutural do componente ( <b>1</b> ).....	33
1.4.4 Identificação estrutural do componente majoritário ( <b>3</b> ).....	35
1.4.5 Determinação da configuração relativa do componente natural ( <b>3</b> ).....	38
1.4.6 Determinação da configuração absoluta do componente natural ( <b>3</b> ).....	44

1.4.7 Determinação da configuração absoluta da epóxi-isoforona.....	49
1.4.8 Identificação estrutural do componente natural (4).....	50
1.4.9 Bioensaios em laboratório .....	52
1.4.10 Bioensaios de captura em campo.....	53
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
CAPÍTULO II.....	58
2.1 INTRODUÇÃO .....	59
2.1.1 Compostos voláteis liberados por bactérias.....	59
2.1.2 Ocorrência natural de nitrilas.....	61
2.1.3 Biossíntese de nitrilas .....	63
2.1.4 Estudos prévios envolvendo voláteis de <i>Pseudomonas veronii</i> .....	64
2.1.5 Estudos prévios envolvendo voláteis de <i>Micromonospora echinospora</i> .....	65
2.2 OBJETIVOS .....	67
2.2.1 Objetivo Geral.....	67
2.2.2 Objetivos Específicos .....	67
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	68
2.3.1 Preparo dos meios de cultura.....	70
2.3.1.1 Luria-Bertami (LB).....	70
2.3.1.2 GPHF .....	70
2.3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultura .....	70
2.3.2.1 <i>Pseudomonas veronii</i> .....	70
2.3.2.2 <i>Micromonospora echinospora</i> .....	71
2.3.3 Extração de voláteis por CLSA .....	71
2.3.4 Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	72
2.3.5 Determinação dos índices de retenção.....	73
2.3.6 Derivatizações com DMDS .....	73

2.3.7 Síntese dos compostos de referência .....	73
2.3.7.1 Procedimentos Gerais .....	74
2.3.7.1.1 A - Preparação de nitrilas a partir de ácidos carboxílicos.....	74
2.3.7.1.2 B- Preparação de tosilatos.....	74
2.3.7.1.3 C- Reações de Grignard entre tosilatos e haletos de alquila.....	74
2.3.7.1.4 D- Reação de acoplamento cruzado por metátese de olefinas.....	75
2.3.7.1.5 E - Preparação de ésteres SNAC.....	75
2.3.7.2 Preparação do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (17) .....	76
2.3.7.3 Preparação da (Z)-tetradec-7-enonitrila (7) .....	77
2.3.7.4 Preparação da (Z)-octadec-11-enonitrila (12).....	77
2.3.7.5 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (34).....	78
2.3.7.6 Preparação do 12-metiltridec-1-eno (36).....	78
2.3.7.7 Preparação das nitrilas 38 e 28 .....	79
2.3.7.8 Preparação do 11-metildodec-1-eno (40) .....	80
2.3.7.9 Preparação das nitrilas 25 e 23 .....	80
2.3.7.10 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de oct-7-en-1-ila (42) .....	81
2.3.7.11 Preparação do 10-metilundec-1-eno (43) .....	82
2.3.7.12 Preparação das nitrilas 19 e 20.....	82
2.3.7.13 Preparação do 11-metiltridec-1-eno (45).....	83
2.3.7.14 Preparação das nitrilas 46 e 47 .....	84
2.3.7.15 Preparação do 9-metilundec-1-eno (48) .....	85
2.3.7.16 Preparação das nitrilas 49 e 50.....	85
2.3.7.17 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de 2-metilbut-1-ila (52) .....	86
2.3.7.18 Preparação do 8-bromooct-1-eno (53).....	87
2.3.7.19 Preparação do 10-metildodec-1-eno (54) .....	87
2.3.7.20 Preparação das nitrilas 24 e 55 .....	88
2.3.7.21 Preparação das nitrilas 21 e 22 .....	89

2.3.7.22	Preparação das nitrilas <b>27</b> e <b>58</b> .....	90
2.3.7.23	Preparação das nitrilas <b>29</b> e <b>60</b> .....	91
2.3.7.24	Preparação da 13-metiltetradecanonitrila ( <b>26</b> ) .....	92
2.3.7.25	Preparação do hexadecanotioato- $d_{31}$ de S-(2-acetamidoetila) ( <b>65</b> ).....	92
2.3.7.26	Preparação do decanotioato- $d_{19}$ de S-(2-acetamidoetila) ( <b>67</b> ).....	93
2.3.7.27	Preparação do ácido 11-metildodecanóico ( <b>71</b> ).....	94
2.3.7.28	Preparação do 11-metildodecanoato de metila ( <b>72</b> ) .....	94
2.3.7.29	Preparação do (1,1,2,2- $^2\text{H}_4$ )-11-metildodecan-1-ol ( <b>73</b> ).....	95
2.3.7.30	Preparação do (1,1,2,2- $^2\text{H}_4$ )-1-iodo-11-metildodecano ( <b>75</b> ) .....	96
2.3.7.31	Preparação da (3,3,4,4- $^2\text{H}_4$ )-13-metiltetradecanonitrila ( <b>76</b> ).....	97
2.3.7.32	Preparação do ácido (2,2,3,3,4,4- $^2\text{H}_6$ )-13-metiltetradecanóico ( <b>77</b> ).....	98
2.3.7.33	Preparação da (2,2,3,3,4,4- $^2\text{H}_6$ )-13-metiltetradecanamida ( <b>78</b> ).....	99
2.4	RESULTADOS .....	101
2.4.1	Voláteis produzidos por <i>Pseudomonas veronii</i> R02.....	101
2.4.1.1	Identificação dos compostos <b>8</b> , <b>9</b> e <b>11</b> .....	101
2.4.1.2	Identificação dos compostos <b>7</b> , <b>10</b> e <b>12</b> .....	103
2.4.2	Voláteis produzidos por <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816.....	108
2.4.2.1	Propostas estruturais iniciais.....	109
2.4.2.2	Determinação da posição das ligações duplas nos compostos insaturados	114
2.4.2.3	Síntese dos compostos <b>19</b> , <b>20</b> , <b>23</b> , <b>25</b> e <b>28</b> .....	117
2.4.2.4	Síntese dos compostos <b>21</b> , <b>22</b> , <b>24</b> , <b>27</b> e <b>29</b> .....	123
2.2.3	Biossíntese das nitrilas produzidas por <i>Pseudomonas veronii</i> R02 e <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816.....	128
2.4.3.1	Ensaio com <i>Pseudomonas veronii</i> R02.....	128
2.4.3.2	Ensaio com <i>Micromonospora echinospora</i> DSM43816.....	132
2.4.3.3	Implicações e possibilidades biossintéticas a partir dos resultados obtidos com os experimentos com compostos isotopicamente marcados.....	139

2.4.4 Determinação de atividade antimicrobiana.....	144
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	147
3 CONCLUSÃO GERAL.....	149
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	151
ESPECTROS - CAPÍTULO I.....	167
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 1 .....	167
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 1 .....	167
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO <i>anti-3</i> .....	168
ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO <i>anti-3</i> .....	168
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO <i>syn-3</i> .....	169
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO <i>syn-3</i> .....	169
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 4.....	170
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 4.....	170
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 5.....	171
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 5.....	171
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 5.....	172
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-6.....	172
ESPECTROS - CAPÍTULO II .....	173
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 7 .....	173
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 8 .....	173
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 9 .....	174
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 10 .....	174
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 11 .....	175
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 12 .....	175
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 19 .....	176

ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 20 .....	176
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 21 .....	177
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 22 .....	177
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 23 .....	178
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 24 .....	178
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 25 .....	179
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 26 .....	179
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 27 .....	180
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 28 .....	180
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 29 .....	181
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 17.....	182
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 17.....	182
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 17.....	183
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 17.....	183
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 7.....	184
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 7.....	184
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 7.....	185
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 7.....	185
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 12.....	186
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 12.....	186
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 12.....	187
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 12.....	187
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 34.....	188
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 34.....	188
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 34.....	189
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 34.....	189
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 36.....	190



ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 36.....	190
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 36.....	191
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 36.....	191
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 38.....	192
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 38.....	192
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 38.....	193
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 38.....	193
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 28.....	193
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 40.....	194
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 40.....	194
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 40.....	195
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 40.....	195
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 25.....	196
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 25.....	196
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 25.....	197
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 25.....	197
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 23.....	197
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 42.....	198
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 42.....	198
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 42.....	199
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 42.....	199
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 43.....	200
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 43.....	200
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 43.....	201
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 43.....	201
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 20.....	202
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 20.....	202

ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 20.....	203
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 20.....	203
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 19.....	203
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 45.....	204
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 45.....	204
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 45.....	205
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 45.....	205
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 46.....	206
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 46.....	206
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 46.....	207
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 46.....	207
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 47.....	207
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 48.....	208
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 48.....	208
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 48.....	209
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 48.....	209
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 49.....	210
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 49.....	210
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 49.....	211
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 49.....	211
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 50.....	211
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 52.....	212
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 52.....	212
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 52.....	213
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 52.....	213
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 53.....	214
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 53.....	214

ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 53.....	215
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 53.....	215
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 54.....	216
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 54.....	216
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 54.....	217
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 54.....	217
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 55.....	218
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 55.....	218
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 55.....	219
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 55.....	219
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 24.....	219
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 22.....	220
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 22.....	220
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 22.....	221
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 22.....	221
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 21.....	221
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 58.....	222
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 58.....	222
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 58.....	223
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 58.....	223
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 27.....	223
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 60.....	224
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 60.....	224
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 60.....	225
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 60.....	225
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 29.....	225
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 26.....	226

ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 26.....	226
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 26.....	227
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 26.....	227
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 65.....	228
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 65.....	228
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 65.....	229
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 67.....	229
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 67.....	230
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 67.....	230
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 71.....	231
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 71.....	231
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 71.....	232
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 72.....	233
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 72.....	233
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 72.....	234
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 72.....	234
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 74.....	235
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 74.....	235
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 73.....	236
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 74.....	236
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 74.....	236
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 75.....	237
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 75.....	237
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 75.....	238
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 75.....	238
ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 76.....	239
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 76.....	239

ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 76.....	240
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 76.....	240
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 77.....	241
ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 77.....	241
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 77.....	242
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 77.....	242
ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 78.....	243
ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 78.....	243
ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 78.....	244
ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 78.....	244

## LISTA DE ABREVIATURAS

AK “Amano” 20	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
AY “Amano” 30	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLSA	Aparato de trapeamento em circuito fechado (do inglês, <i>closed-loop stripping apparatus</i> )
CSI	Isocianato de clorosulfonila
DMAP	Dimetilaminopiridina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
GC	Cromatografia gasosa ou cromatógrafo gasoso (do inglês, <i>gas chromatography</i> )
GC-EAD	Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (do inglês, <i>gas chromatography – electroantennography detection</i> )
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>gas chromatography – mass spectrometry</i> )
GC-FTIR	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria no infravermelho (do inglês, <i>gas chromatography – Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
DCM	Diclorometano
DMDS	Disulfeto de dimetila
FID	Detector de ionização de chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i> )
IR	Índice de retenção
LTEB 11	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperóxibenzóico
MPPA	Ácido mono-perftálico
MS	Espectrometria de massas
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butillítio
PCC	Clorocromato de piridínio
PPL	Lipase de pâncreas suíno
PS “Amano” SD	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNAC	Tioester de N-acetilcisteamina (do inglês, <i>N-acetylcysteamine thioesters</i> )
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	Éter <i>t</i> -butil metílico
TEA	triethylamina
THF	Tetrahidrofurano
TsCl	Cloreto de tosila
δ	Deslocamento químico
<i>v</i>	Número de onda

## APRESENTAÇÃO

A presente tese está dividida em dois capítulos:

**Capítulo I – Identificação e síntese do feromônio de agregação de *Homalinotus depressus* (Coleoptera: Curculionidae).**

**Capítulo II - Identificação, síntese e biosíntese de nitrilas voláteis produzidas por cepas das bactérias *Pseudomonas veronii* e *Micromonospora echinospora*.**

## **CAPÍTULO I**

**Identificação e síntese e do feromônio de agregação de *Homalinotus depressus* (Coleoptera: Curculionidae)**



## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Compostos orgânicos voláteis e comunicação química

Os compostos orgânicos voláteis naturais encontrados na atmosfera são produzidos durante as fases de crescimento, manutenção e decaimento de plantas, animais e micro-organismos. Tais compostos são produzidos para emprego como hormônios, ou para fins de comunicação e defesa ou ainda como simples subprodutos biossintéticos<sup>[1]</sup>.

A emissão de compostos voláteis em plantas é responsável por modular a resistência a estresses causados por calor, poluentes e água, assim como está diretamente relacionada às interações planta-planta e planta-inseto<sup>[2]</sup>.

Os animais comunicam-se através do uso de sinais visuais, acústicos, táteis e químicos. Entre os insetos, por exemplo, observa-se o uso de todos esses sinais no que se refere à comunicação; entretanto, cada espécie difere sensivelmente quanto à importância que cada um destes assume. O fator que determina qual é o principal sinal utilizado por determinada espécie está intimamente ligado com a natureza de seu habitat, seu comportamento e a interação desta espécie com seu meio ambiente<sup>[3]</sup>. Cada um destes sinais tem sua importância para determinada espécie, entretanto os sinais químicos, de modo geral, destacam-se como os grandes responsáveis pela comunicação entre insetos e seu meio ambiente<sup>[4]</sup>, sendo responsáveis pelo comportamento reprodutivo, de defesa, localização e seleção do hospedeiro, do habitat e, no caso de insetos sociais, da organização da colônia. Substâncias químicas liberadas por determinado organismo que provoquem uma mudança fisiológica ou comportamental em outro organismo são denominadas infoquímicos. Estas substâncias podem ter ação intra-específica (feromônios) ou interespecífica (aleloquímicos)<sup>[5]</sup>.

Feromônios e aleloquímicos são classificados de acordo com o tipo de comportamento que provocam<sup>[5]</sup>. Feromônios podem atuar como atraentes sexuais, marcadores de trilhas, ou propiciar comportamentos de agregação, alarme, dispersão, entre outros enquanto que os aleloquímicos diferenciam-se de acordo com o tipo de organismo que está sendo beneficiado na comunicação. Dentre os aleloquímicos, os caïromônios são sinais químicos que quando liberados, beneficiam somente o agente

receptor. Por outro lado, alomônios são sinais químicos que somente favorecem o emissor. Já os sinomônios favorecem tanto o agente emissor como o receptor do sinal.

O termo feromônio (*pherein* = transferir, *hormon* = excitar) foi introduzido pelos estudos de por Karlson e Lüscher (1959)<sup>[6]</sup> sendo que dentre os semioquímicos, os feromônios são os mais amplamente estudados. Vários comportamentos de insetos, por exemplo, são regulados por feromônios, entretanto, os feromônios relacionados com atração sexual e de agregação são os que apresentam maior potencial de utilização em um programa de controle de pragas agrícolas.

Além dos estudos relacionados a insetos e aracnídeos, avanços recentes têm evidenciado comportamentos mediados por feromônios também em vertebrados. Alguns anfíbios e répteis, por exemplo, utilizam uma classe de feromônios não-voláteis em sua comunicação<sup>[7]</sup>. É o caso da esplendiferina, um polipeptídeo com uma sequência de 25 aminoácidos que é liberada na água por sapos machos da espécie *Litoria splendida*, com o intuito de atrair fêmeas<sup>[7]</sup>. Este mesmo tipo de comunicação química via peptídeo-feromônios é também encontrada em diferentes espécies de tritões, sapos e salamandras<sup>[7]</sup>. Além desta classe de feromônios não voláteis, diversas estruturas de macrolídeos e alcoóis voláteis extraídos de glândulas femorais são associadas a mecanismos de comunicação em sapos de diferentes espécies<sup>[8-10]</sup>.

Exemplos relacionados à comunicação química mediada por voláteis liberados por diferentes espécies de micro-organismos têm sido descritos nos anos recentes<sup>[11-12]</sup>. Bactérias, por exemplo, são capazes de produzir combinações de voláteis com uma grande diversidade estrutural, dependendo de sua identidade taxonômica e seu estágio de crescimento, assim como do meio de cultura em que crescem. Tais sinais químicos são capazes de estabelecer conexões entre organismos de mesma espécie, espécies diferentes e até mesmo reinos diferentes.

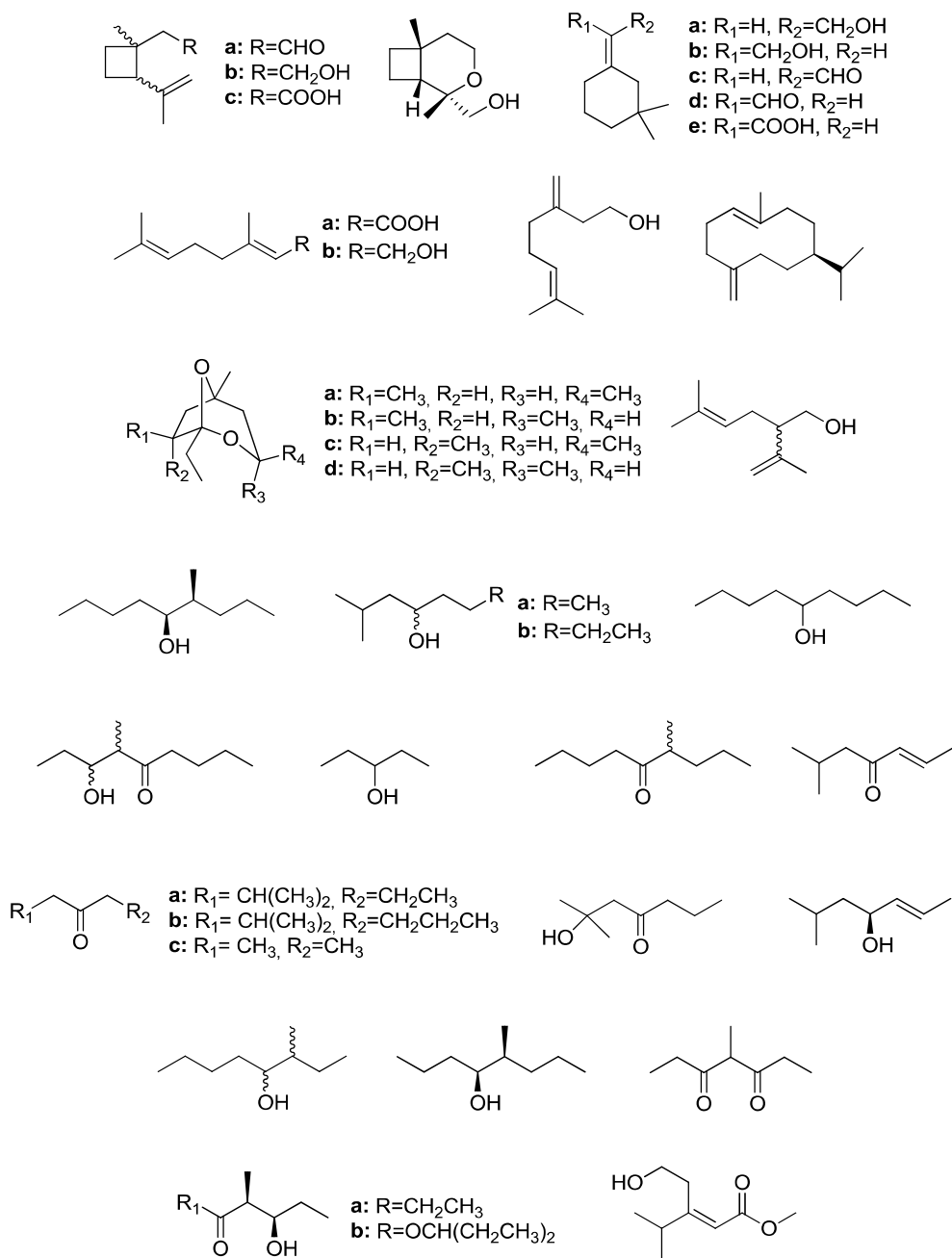
### **1.1.2 Feromônios de agregação em curculeonídeos (Coleoptera: Curculionidae)**

Feromônios de agregação são compostos sexo-específicos, que resultam na atratividade de ambos os sexos, com a finalidade de auxiliar na seleção de parceiro sexual, defesa contra predadores e supressão de sistema de defesa do hospedeiro por ataque em massa. Exemplos de feromônios de agregação têm sido encontrados em diversas famílias de insetos, como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Dictyoptera e Orthoptera<sup>[13]</sup>.

Diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando na identificação e síntese de compostos feromoniais de insetos da família Curculionidae nos últimos anos<sup>[14]</sup>. Este interesse no estudo destas espécies se deve à grande presença destas como pragas em culturas de grande valor econômico e à necessidade de medidas de controle com menores impactos ambientais.

Os diversos estudos realizados com curculionídeos revelaram a presença de compostos produzidos por machos como mediadores do comportamento da espécie, sendo atrativos para ambos os sexos e por isto denominados feromônios de agregação. Até o momento (janeiro/2016) foram identificados componentes feromoniais de 38 espécies dentre as cerca de 60.000 espécies descritas na família<sup>[14-21]</sup>, sendo que o maior número de espécies com estrutura feromonal identificada pertence ao Gênero *Rhynchophorus*. Nenhuma espécie do gênero *Homalinotus* possui estudos relacionados à comunicação mediada por feromônios.

A estrutura química dos compostos descritos como feromônios de espécies da família Curculionidae (Figura 1) divide-se basicamente em duas classes. A primeira trata-se de monoterpênóides majoritariamente cíclicos. A segunda classe de compostos apresenta álcoois, cetonas, e ésteres de cadeia curta, contendo ramificações metílicas, com número variável de carbonos na cadeia principal.



**Figura 1:** Compostos identificados como componentes feromonais em diferentes espécies da família Curculionidae (adaptado de Ambrogio *et al.*, 2009<sup>[14]</sup>).

### 1.1.3 *Homalinotus depressus* e a cultura de coqueiros no Brasil

Entre os principais cultivos brasileiros de frutíferas, destaca-se a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*, *Arecaceae*), com importância econômica e social, pois deste fruto obtém-se diversos produtos, como água e leite de coco, madeira, fibras, combustível, ração animal, óleos e outros derivados para o processamento

agroindustrial. Além disso, o cultivo pode ser consorciado com outras espécies vegetais anuais como a mandioca (*Manihot esculenta*) ou perenes como o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), propiciando uma fonte de renda extra, principalmente, para o pequeno produtor<sup>[22]</sup>

A produção brasileira de coco é de aproximadamente, 2.8 milhões de toneladas em uma área de cerca de 300.000 ha, desde o Pará até o Rio de Janeiro<sup>[23]</sup>. Essa cultura apresenta grande potencial de expansão na região norte do Brasil, especialmente no estado do Pará, o segundo maior produtor brasileiro<sup>[24]</sup>, concentrando quase a totalidade da produção na região, com 24.000 ha plantados e produção de 243 milhões de frutos ao ano, o que representa 12 % da produção brasileira. No cenário global, o Brasil aparece como o 4º maior produtor (4 % da produção mundial), atrás de Indonésia, Filipinas e Índia<sup>[25]</sup>.

Insetos-praga estão entre os principais fatores responsáveis pelos baixos índices de rendimento dos coqueirais brasileiros por provocarem prejuízos severos às plantas<sup>[26]</sup>. Os surtos de pragas são favorecidos por fatores intrínsecos da planta, como produção contínua de folhas e inflorescências, ou extrínsecos, como temperatura, umidade, tratos culturais mal conduzidos e utilização inadequada de pesticidas<sup>[27]</sup>.

A ocorrência de *Homalinotus depressus* (Figura 2) tem sido registrada nas Antilhas, no Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso, Goiás e Rio de Janeiro), Colômbia, Guiana Francesa, Guiana e Suriname<sup>[28]</sup>.



**Figura 2:** A: *Homalinotus depressus* em suas diferentes fases de desenvolvimento; B e C: Danos causados por *Homalinotus depressus* na cultura de coco (Fotos: Marcos A. B. Moreira).

Os danos provocados por *H. depressus* são causados especialmente por suas larvas, que constroem galerias no pedúnculo floral e estipes do coqueiro, interrompendo o fluxo de seiva e promovendo a queda de flores e frutos (Figura 3), sendo que o inseto foi identificado pela primeira vez como infestação em coqueirais no

ano de 2008, no município de Mojú-PA<sup>[29]</sup>. Similarmente ao observado, para *Homalinotus coriaceus*<sup>[26]</sup>, ataques de adultos dessa broca podem ocorrer em diferentes estágios de desenvolvimento do coqueiro, e ao se alimentarem, danificam flores e frutos novos, secando-os e provocando a queda destes. Além disso, a abertura de orifícios nas inflorescências por *H. depressus* pode facilitar a penetração de fungos e bactérias antes mesmo da abertura da espata floral, diminuindo a frutificação do coqueiro e a produção das plantas, como também observado em ataques de *H. coriaceus*<sup>[26]</sup>.



**Figura 3:** Danos ocasionados por infestação de *Homalinotus depressus* em cultivo de coco, ocasionando quebra e queda do cacho (Fotos: Diogo M. Vidal).

## **1.2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Realizar a identificação estrutural e síntese dos componentes do feromônio de agregação de *Homalinotus depressus*.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

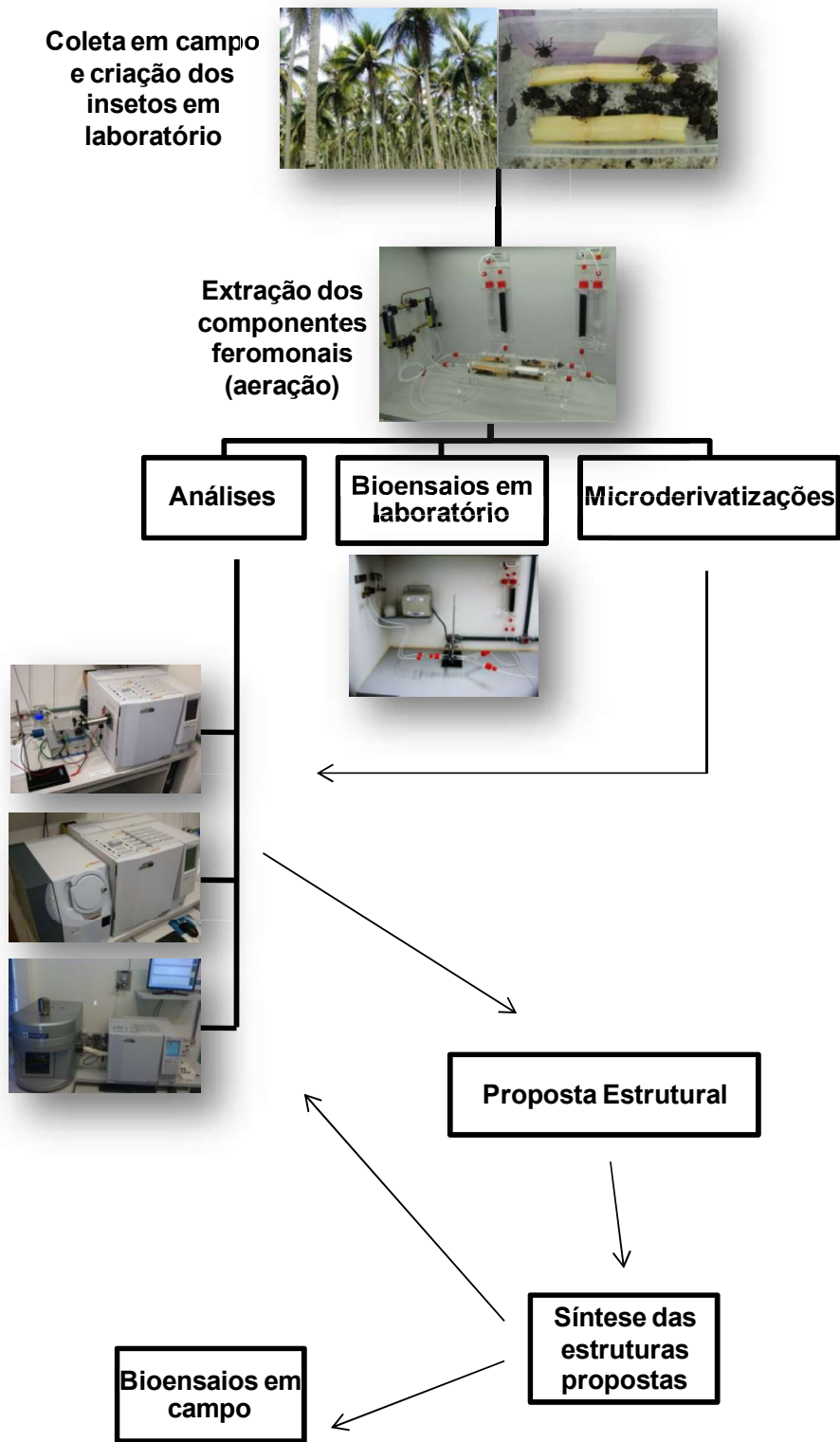
1. Identificar estruturalmente as substâncias que tenham possibilidade de estar relacionadas à comunicação química da espécie, através do uso de técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas;
2. Estabelecer uma rota sintética eficiente para a obtenção dos componentes feromonais previamente identificados;
3. Avaliar a eficiência do feromônio sintético na atratividade de *Homalinotus depressus* em laboratório e em condições de campo.

### **1.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Um resumo ilustrado da metodologia utilizada na criação dos insetos, isolamento, identificação estrutural e síntese dos componentes feromonais e bioensaios utilizados pode ser observado na Figura 4. Os experimentos foram iniciados com a coleta de indivíduos em campo e estabelecimento de uma criação em laboratório, visando a extração de componentes feromonais e a realização de bioensaios. Os extratos obtidos foram utilizados em bioensaios em laboratório, evidenciando a presença de voláteis envolvidos na comunicação química da espécie.

As análises químicas foram iniciadas pela determinação de quais componentes dos extratos são produzidos por somente um dos sexos, através de análises em cromatografia gasosa. A estrutura destes compostos foi posteriormente proposta através de análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e à espectroscopia no infravermelho, assim como pela realização de microderivatizações. Através da síntese das estruturas inicialmente propostas foi possível confirmá-las pela comparação de perfis cromatográficos, atividade biológica e espectros de massas e infravermelho. A síntese das estruturas propostas permitiu também a obtenção destes compostos em maior escala, para a realização de bioensaios no campo para determinar sua eficiência na atratividade dos insetos.





**Figura 4:** Sequência metodológica empregada na identificação do feromônio de agregação de *H. depressus* (Fotos: Diogo M. Vidal) (Adaptado de Vidal, 2012<sup>[30]</sup>).

### **1.3.1 Criação dos insetos, extração de voláteis e bioensaios comportamentais**

#### **1.3.1.1 Criação de *Homalinotus depressus***

Para o início da colônia de insetos foram efetuadas coletas de câmaras pupais e adultos em área comercial de coco pertencente à empresa Socôco, localizada no município de Mojú-PA, por funcionários da empresa. As coletas foram efetuadas em áreas tradicionais de infestações de *Homalinotus depressus*, as quais periodicamente são monitoradas pela empresa. Os insetos foram removidos das plantas e acondicionados em caixas plásticas (20 cm x 12 cm x 15 cm) com ventilação nas faces laterais. O material coletado foi conduzido ao Laboratório de Semioquímicos da UFPR.

Os insetos adultos foram sexados e mantidos em laboratório sob temperatura (28 °C), fotoperíodo (12 horas-luz: 12 horas-escuro) e umidade (UR 85 %) controlados. Os insetos foram alimentados com cana-de-açúcar, substituída a cada 72 horas.

#### **1.3.1.2 Extração de voláteis produzidos por *H. depressus***

Os voláteis produzidos por *H. depressus* foram coletados através do método de aeração<sup>[31]</sup>. Dez insetos machos e dez fêmeas foram acondicionados separadamente no interior de câmaras cilíndricas de 30 cm de comprimento por 12 cm de diâmetro interno, juntamente com a dieta natural. Um fluxo controlado (1 L.min<sup>-1</sup>) de ar comprimido filtrado em carvão ativo e umidificado foi aplicado no interior da câmara no sentido ascendente.

Os voláteis liberados no interior da câmara foram adsorvidos no topo desta por filtros contendo 10mg de HayeSep D® (polidivinilbenzeno, 795 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, 80-100 mesh). A cada intervalo de 24 horas os filtros foram lavados com hexano (200 µL), para dessorção dos voláteis e preparação dos extratos.

#### **1.3.1.3 Bioensaios comportamentais**

A resposta comportamental aos extratos naturais e aos padrões sintéticos foi observada utilizando-se um olfatômetro tipo Y, operando com um fluxo de ar de 2,5 L.min<sup>-1</sup> previamente umidificado e filtrado por carvão ativo. O olfatômetro consiste de um tubo de vidro com 4 cm de diâmetro em formato Y com o tubo principal medindo

40 cm de comprimento e os dois braços menores com 20 cm de comprimento cada. No final de cada braço do olfatômetro, foi colocada a fonte de odor. Um inseto adulto foi introduzido na base do olfatômetro e seu comportamento foi observado durante no máximo 10 minutos. Foi considerada uma resposta quando o inseto caminhou mais de 5 cm dentro do braço escolhido e permaneceu neste durante mais de 2 minutos. Foi considerada como “não resposta” quando o inseto não saiu do braço principal do olfatômetro. Cada inseto testado foi considerado como uma repetição e cada inseto foi testado apenas uma vez, durante a 4ª e 6ª horas da escotofase<sup>[32-33]</sup>.

### **1.3.2 Análises Estatísticas**

Os dados de respostas olfatométricas foram analisados utilizando a técnica de qui-quadrado no *software* BioEstat<sup>[34]</sup>. Os insetos que não escolheram nenhum dos braços do olfatômetro foram excluídos das análises estatísticas.

### **1.3.3 Métodos de Análise**

#### **1.3.3.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

As análises em GC-MS foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu QP2010 Plus, operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), acoplado a um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010. As amostras foram eluídas em uma coluna capilar RTX-5 (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; Restek Chromatography Products, EUA), sob um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por 1 minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 5 minutos.

#### **1.3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia no infravermelho (GC-FTIR)**

As análises em GC-FTIR foram realizadas em um sistema formado por um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de detecção DiscovIR-GC (Spectra Analysis). A temperatura do forno do GC foi mantida a 100 °C por 1 minuto, aumentada para 270 °C em uma velocidade de 10 °C.min<sup>-1</sup>, sendo mantida nesta temperatura por 10 minutos. Hélio foi empregado como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram eluídas em uma coluna capilar RTX-5 (30 m

X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; Restek Chromatography Products, EUA).

### 1.3.3.3 Determinação dos índices de retenção

Uma solução estoque contendo os hidrocarbonetos lineares de C<sub>10</sub> a C<sub>26</sub> foi preparada com concentração próxima a 10 ppm. Foram preparadas soluções com concentração aproximada de 100 ppm dos padrões a serem analisados. Aliquotas contendo 1 µL da solução de hidrocarbonetos e 1 µL da solução do composto desejado ou do extrato natural foram analisadas por GC. A rampa de temperatura do GC foi programada para iniciar em 50 °C, com acréscimos constantes de 3 °C.min<sup>-1</sup> até 270 °C, mantendo-se esta temperatura por 10 minutos adicionais. As análises foram realizadas em duas fases estacionárias distintas, RTX-5 (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; (5 %) difenil- (95 %) dimetilpolisiloxano; Restek Chromatography Products, EUA). e EC-WAX (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; polietilenoglicol; GRACE, EUA)..Os índices de retenção foram calculados com base no método proposto por van den Dool & Kratz<sup>[35]</sup>, pela seguinte equação<sup>[36]</sup>:

$$I^T = 100 \cdot n \cdot (t_{RTx} - t_{RTz}) / (t_{RT(z+n)} - t_{RTz}) + 100z$$

Onde:  $n$  = diferença do número de átomos de carbono dos n-alcenos que eluem antes e depois do analito;  $t_{RTx}$  = tempo de retenção do composto de interesse ( $x$ );  $t_{RTz}$  e  $t_{RT(z+n)}$  = tempo de retenção dos n-alcenos que eluem antes e depois do analito, contendo  $z$  e  $z+n$  átomos de carbono.

### 1.3.3.4 Análises em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral

As análises em CG de fase estacionária quiral foram realizadas em um cromatógrafo Varian 3800, equipado com uma coluna capilar β-Dex 325 (Supelco; 25 % 2,3-di-O-metil-6-O-TBDMS-β-ciclodextrina; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) e detecção por FID. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por um minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 3 °C/min até alcançar 130 °C, mantendo-se nesse valor por 1 minuto. A temperatura foi então elevada para

230 °C sob uma taxa de 7 °C.min<sup>-1</sup>, mantendo-se na temperatura final durante 5 minutos.

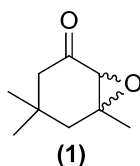
### 1.3.4 Síntese dos compostos de referência

Os compostos de referência sintetizados foram analisados por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho. As análises por RMN foram realizadas em um espectrômetro Bruker ARX-200<sup>®</sup> (DQ-UFPR) a 200 (<sup>1</sup>H) e 50 MHz (<sup>13</sup>C), utilizando clorofórmio deuterado como solvente, tendo tetrametilsilano (TMS) como referência. As análises em GC-MS e GC-FTIR foram realizadas conforme descrito em detalhes anteriormente.

Os reagentes e solventes nas reações foram tratados, quando necessário, seguindo métodos descritos na literatura<sup>[37]</sup>. Os solventes utilizados nas reações foram evaporados em um evaporador rotatório IKA Basic 10, operando sob pressão reduzida. As reações foram monitoradas via análise cromatográfica em camada delgada. Nas placas de vidro (2 cm x 5 cm) utilizadas para CCD, utilizou-se sílica gel 60G (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Revelou-se as placas cromatográficas em iodo molecular em recipientes de vidro e em uma solução preparada com 1 % vanilina, 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em etanol. Nas separações feitas por cromatografia em coluna, utilizou-se sílica gel 230-400 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

#### 1.3.4.1 Preparação da 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ona (1) (Epóxi-isoforona)

A uma solução contendo isoforona (2) (20 g; 144.7 mmol) em etanol (250 mL), foi adicionada sob constante agitação e temperatura ambiente, uma solução aquosa de NaOH (620 mg em 20,5 mL). Adicionou-se então 20,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %) durante 20 minutos. A temperatura foi então mantida entre 30 e 35 °C durante o período de 1 hora. A mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com 170 mL de água e o produto extraído com DCM (3x150 mL). A fase aquosa foi lavada com água, seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente evaporado sob vácuo. O resíduo foi purificado em coluna *flash* (Hexano/Acetato de Etila: 9/1), resultando na epóxi-isoforona (1) em 89 % de rendimento (19.85 g, 128.8 mmol)<sup>[38]</sup>.



**RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 0,82 (s, 3H); 0,96 (s, 3H); 1,34 (s, 3H); 1,56-1,66 (m, 1H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,93-2,06 (m, 1H); 2,44-2,59 (m, 1H); 2,96 (s, 1H) (Página 167).

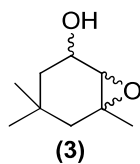
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 24,0; 27,8; 30,8; 36,2; 42,7; 47,9; 61,3; 64,3, 208,1 (Página 167).

**EM:  $m/z$  (%)**: 154 ( $\text{M}^+$ , 8); 139 (25); 126 (16); 111 (10); 98 (6); 97 (23); 84 (6); 83 (100); 82 (8); 81 (6); 79 (6); 70 (5); 69 (55); 67 (8); 58 (12); 57 (6); 56 (18); 55 (44); 53 (7); 43 (29); 42 (7); 41 (41) (Página 34).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ )**: 913, 1255, 1347, 1400, 1469, 1707, 1722, 2874, 2961, 2969, 3006 (Página 34).

#### 1.3.4.2 Preparação do 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (3)

Uma mistura contendo epóxi-isoforona (1) (100 mg; 0,65 mmol),  $\text{NaBH}_4$  (9 mg; 0,225 mmol) e ácido bórico (55 mg; 0,225 mmol) foi macerada em almofariz durante 45 minutos. A reação foi finalizada pela adição de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e filtrada. A solução resultante foi extraída com DCM (3x15 mL) e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash com hexano/acetato de etila: 2/1, resultando no produto puro em 85 % de rendimento<sup>[39]</sup>.



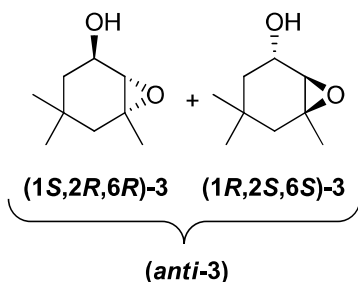
#### 1.3.4.3 Preparação do borohidreto de zinco

Um balão de fundo redondo, com capacidade para 250 mL, equipado com agitação magnética e condensador de refluxo, foi tratado com calor ( $\sim 200^\circ\text{C}$ ) sob fluxo de argônio. A este sistema foram adicionados 4,180 g (29,0 mmol) de  $\text{ZnCl}_2$  (previamente fundido sob calor e vácuo<sup>[37]</sup>) e 2,540 g (67,8 mmol) de  $\text{NaBH}_4$ . Em seguida adicionou-se 58 mL de THF e agitou-se sob temperatura ambiente por um

período de 72 horas. O sobrenadante é utilizado para as reações de redução, e sua concentração estimada é de 4.4mol de hidreto por litro de solução<sup>[40]</sup>.

#### 1.3.4.4 Preparação do *anti*-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (*anti*-3)

Preparou-se uma solução contendo 5,00 g (32,4 mmol) da epóxi-isoforona (**1**) em 200 mL de THF, sob temperatura de 0 °C. À mistura foram adicionados 22,5 mL da solução 4.4 mol.L<sup>-1</sup> de Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, sob constante agitação. Após um período de 45 minutos sob temperatura de 0 °C, 100 mL de água destilada foi adicionado e a solução foi mantida sob agitação durante 30 minutos adicionais. Secou-se a solução com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o precipitado foi filtrado. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, resultando no composto *anti*-3, o qual foi purificado em coluna cromatográfica *flash* (hexano/acetato de etila: 2:1), em 85 % de rendimento (4,29 g, 27,5 mmol)<sup>[41]</sup>.



**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 0,91 (s, 3H); 0,97 (s, 3H); 1,17 (dd, J<sub>1</sub>=13,37Hz, J<sub>2</sub>=7,42Hz, 1H); 1,34 (s, 3H); 1,52 (d, J=15,03Hz, 1H); 1,64 (dd, J<sub>1</sub>=13,35Hz, J<sub>2</sub>=5,75Hz, 1H), 1,71 (d, 15,03Hz, 1H); 2,33 (s, 1H); 2,96 (s, 1H); 4,15 (dd, J<sub>1</sub>=7,4Hz, J<sub>2</sub>=5.8Hz, 1H) (Página 168).

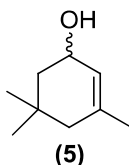
**RMN de <sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 24,05; 28,48; 28,84; 31,62; 42,42; 42,54; 59,47; 62,96; 65,75(Página 168).

**EM: m/z (%):** 141 (M<sup>+</sup>-15, 4); 123 (7); 112 (7); 107 (7); 100 (8); 99 (41); 98 (92); 97 (21); 95 (27); 85 (65); 83 (36); 81 (12); 79 (12); 72 (10); 71 (32); 69 (30); 67 (21); 60 (18); 57 (24); 56 (12); 55 (33); 53 (11); 44 (4); 43 (100); 42 (6); 41 (45) (Página 37).

#### 1.3.4.5 Preparação do 3,5,5-trimethylcyclohex-2-enol (**5**) (Isoforol)

Em um balão de fundo redondo, contendo uma suspensão de LiAlH<sub>4</sub> (15,4 mg, 400 mmol) em THF anidro (600 mL), mantida a 0 °C, sob atmosfera de argônio e

aitação magnética, foi adicionada a isoforona (**2**) (20 g; 142 mmol) lentamente. Após 5 horas de agitação à temperatura ambiente, o excesso de hidreto foi destruído adicionando-se H<sub>2</sub>O gelada (200 mL) lentamente, solução de NaOH 15 % (100 mL) e novamente H<sub>2</sub>O gelada (200 mL). A suspensão foi então filtrada sob vácuo, a fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila: 8/2), resultando no isoforol (**5**), com 92 % de rendimento (131,4 mmol, 18,39 g) <sup>[39, 42]</sup>.



**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,88 (s, 3H); 0,99 (s, 3H); 1,16-1,29 (m, 1H); 1,54-1,92 (m, 6H); 4,14-4,30 (m, 1H); 5,38-5,46 (m, 1H) (Página 171).

**RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 23,5; 26,2; 31,0; 31,2; 44,1; 45,2; 66,7; 123,7, 135,8 (Página 168).

**EM: m/z (%):** 140 (M<sup>+</sup>, 14); 126 (9); 125 (100); 122 (10); 107 (42); 105 (8); 93 (6); 91 (23); 84 (50); 83 (33); 82 (11); 81 (7); 79 (17); 77 (9); 69 (50); 67 (7); 65 (6); 57 (5); 56 (13); 55 (27); 53 (7); 43 (22); 41 (20) (Página 172).

#### 1.3.4.6 Preparação do *syn*-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (*syn*-3)

##### 1.3.4.6.1 Preparação do ácido 2-carboperoxibenzóico (MPPA, ácido monoperftálico)

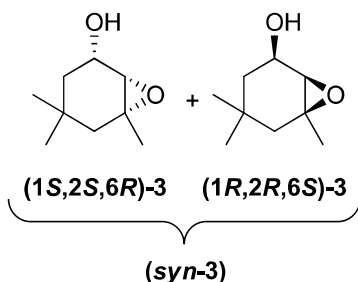
Adicionou-se à solução aquosa (68 mL) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16,74 g; 134 mmol), sob agitação constante à -5 °C, 18,6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mantendo-se a temperatura entre 0 e -5 °C, adicionou-se 20 g (134 mmol) de anidrido ftálico. A mistura foi então transferida para um funil de separação contendo 90 mL de éter etílico e então acidificada pela adição cuidadosa de uma solução aquosa gelada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8 mL de ácido em 40 mL de água). Extraíu-se a fase aquosa com éter (2x) e lavou-se a fase orgânica com sulfato de amônio (40 %<sub>m/v</sub>). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 12 horas, sob refrigeração (-18 °C) <sup>[43]</sup>.

A concentração de perácido foi determinada pela adição de 30 mL de uma solução de KI (20 % em água) à 2 mL da solução de MPPA. Após 10 minutos, titulou-se o iodo liberado com uma solução 0,1 N de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> <sup>[43]</sup>.



### 1.3.4.6.2 Epoxidação empregando-se MPPA

Adicionou-se 10g (71 mmol) de isoforol (**5**) à uma mistura contendo uma solução etérea de MPPA (85 mmol; 153 mL) em 200 mL de solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. A mistura resultante foi saturada com NaCl e extraída com DCM (4x100 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila: 2/1), resultando em 84 % de rendimento (59,64 mmol, 9,30 g) [44].



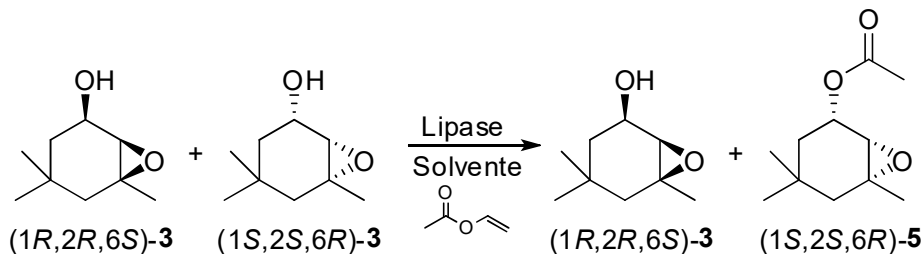
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,86 (s, 3H); 0,89 (s, 3H); 1,10-1,27 (m, 1H); 1,35 (s, 3H); 1,36-1,70 (m, 3H); 2,43 (s, 1H); 3,12-3,20 (m, 1H) ; 4,07 (ddd, J<sub>1</sub>=10,92Hz, J<sub>2</sub>=6,05Hz, J<sub>3</sub>=2,24Hz,1H) (Página 169).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 24,75; 26,46; 31,21; 31,30; 40,06; 42,28; 61,06; 62,24; 66,61 (Página 169).

**EM: m/z (%):** 141 (M<sup>+</sup>-15, 4); 123 (5); 112 (4); 107 (5); 100 (7); 99 (40); 98 (88); 97 (13); 95 (19); 85 (50); 83 (25); 81 (9); 79 (9); 72 (8); 71 (30); 69 (22); 67 (16); 60 (16); 57 (21); 56 (9); 55 (25); 53 (8); 44 (6); 43 (100); 42 (6); 41 (42) (Página 36).

**IV (ν Max, cm<sup>-1</sup>):** 912, 1025, 1367, 1421, 1454, 2870, 2930, 2956, 3300 (Página 36).

### 1.3.4.7 Resolução cinética enzimática do *syn*-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (*syn*-4) empregando-se diferentes lipases – Escala Analítica



As resoluções enzimáticas em escala analítica foram realizadas com cinco enzimas comerciais e uma enzima desenvolvida no departamento de química da UFPR:

- CAL-B: Lipase de *Cândida Antarctica* B (Novozymes, USA)
- AY “Amano” 30: Lipase de *Cândida rugosa* (Amano, Japão)
- AK “Amano” 20: Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano, Japão)
- PS “Amano” SD: Lipase de *Burkholderia cepacia* (Amano, Japão)
- PPL: Lipase de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich, USA)
- LTEB 11: Lipase de *Burkholderia cepacia* (Baron, *et al.*, 2011<sup>[45]</sup>)

Foram adicionados a uma ampola com capacidade para 2mL: 1mL do solvente orgânico apropriado (hexano, THF ou TBME), 30 µL do álcool **4** (0,17 mmol), 60µL de acetato de vinila (0,65 mmol) e 40 mg da lipase apropriada. A mistura foi agitada em um termo-shaker a 37 °C e 200 rpm, durante o período de tempo determinado para cada lipase. Os ensaios com CAL-B, AK “Amano” 20 e PS “Amano” SD tiveram duração de 24 horas, enquanto que os com AY “Amano” 30, PPL e LTEB 11 foram realizados em 24, 72 (3 dias), 144 (6 dias) e 216 horas (9 dias). Após o período pré-determinado, as amostras foram filtradas para remoção da enzima<sup>[42]</sup>.

A análise dos produtos das reações foi realizada em cromatógrafo a gás equipado com fase estacionária quiral e, através das áreas dos picos referentes aos reagentes de partida e dos ésteres formados foi possível calcular os respectivos excessos enantioméricos, as taxas de conversão das reações, assim como a razão enantiomérica da reação (*E*). A razão enantiomérica (*E*), também chamada de fator de seletividade (*s*), é um parâmetro adimensional que descreve a seletividade de determinada resolução, determinado pelo “ambiente químico” do sistema e permanecendo constante durante toda a reação<sup>[46]</sup>. Valores de *E* abaixo de 15 são considerados impraticáveis para aplicações sintéticas, enquanto valores na faixa de 15-30 são considerados bons e acima deste, excelentes<sup>[46]</sup>. Valores de *E* acima de 200 não podem ser determinados com precisão, devido aos limites de quantificação dos equipamentos empregados para determinação do excesso enantiomérico, pois pequenas variações destes causam mudanças significativas no valor de *E*<sup>[46]</sup>. A razão enantiomérica *E* foi calculada através da utilização da Equação 1<sup>[47]</sup>, a seguir:

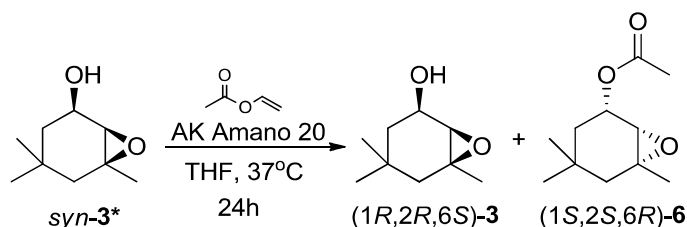
$$E = \left\{ \ln \left[ \frac{ee_p \times (1 - ee_s)}{ee_p + ee_s} \right] / \ln \left[ \frac{ee_p \times (1 + ee_s)}{ee_p + ee_s} \right] \right\}$$

Onde,

$ee_p$  = excesso enantiomérico éster formado

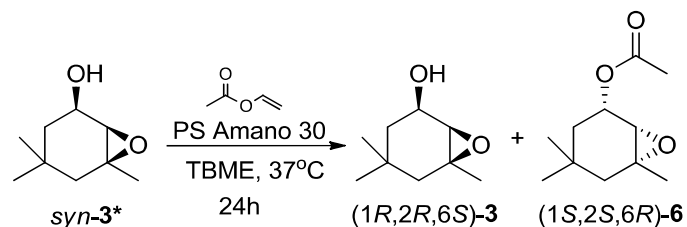
$ee_s$  = excesso enantiomérico álcool remanescente

#### 1.3.4.8 Resolução cinética enzimática do *syn*-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (*syn*-3) empregando-se Lipase AK "Amano" – Escala Preparativa



A um Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, contendo 32 mL de THF, 1920  $\mu$ L (20,8mmol) de acetato de vinila e 1,280 g da Lipase AK "AMANO", foi adicionado o álcool *syn*-3 (1000 mg, 6,4 mmol). A mistura foi agitada em shaker rotativo (37 °C, 150 rpm) durante 24 horas. Após este período, a lipase foi filtrada e o solvente evaporado. Os produtos foram purificados em coluna flash empregando-se hexano:acetato de etila - 2:1 como eluente, resultando no enantiômero remanescente (**1R,2R,6S-3**; 459 mg; 2,94 mmol; 46 %) e no produto acetilado (**1S,2S,6R-6**; 562 mg; 2,84 mmol; 44,5 %). **1R,2R,6S-3** - $[\alpha]_D = +35,0$  ( $c=0,86$ ;  $\text{CHCl}_3$ ; 24 °C) -  $ee=98,8$  % e **1S,2S,6R-6** - $[\alpha]_D = -58,9$  ( $c=0,86$ ;  $\text{CHCl}_3$ ; 24 °C) -  $ee=75,7$  %<sup>[42]</sup>.

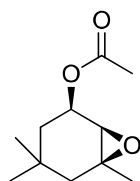
#### 1.3.4.9 Resolução cinética enzimática do *syn*-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (*syn*-3) empregando-se Lipase PS "Amano" SD – Escala Preparativa



A um Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, contendo 32 mL de éter *t*-butilmetílico (TBME), 1920  $\mu$ L (20,8 mmol) de acetato de vinila e 1280 mg da Lipase PS “Amano” SD, foi adicionado o álcool syn-**3** (1000 mg, 6,4 mmol). A mistura foi agitada em shaker rotativo (37 °C, 150 rpm) durante 24 horas. Após este período, a lipase foi filtrada e o solvente evaporado. Os produtos foram purificados em coluna flash empregando-se hexano:acetato de etila - 2:1 como eluente, resultando no enantiômero remanescente (**1R,2R,6S-3**; 464 mg; 2,98 mmol; 46,6 %) e no produto acetilado (**1S,2S,6R-6**; 566 mg; 2.86 mmol; 44,8 %). **1R,2R,6S-3**  $-\alpha_D = + 20,54$  ( $c=0,86$ ;  $\text{CHCl}_3$ ; 24 °C) -  $ee=64,2$  % e **1S,2S,6R-6**  $-\alpha_D = - 70,23$  ( $c=0,86$ ;  $\text{CHCl}_3$ ; 24 °C) -  $ee=97,6$  %.

#### 1.3.4.10 Síntese do Acetato de (**1R,2R,6S**)-4,4,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ila ((**1R,2R,6S**)-**6**)

A um balão de fundo redondo, sob agitação magnética, contendo uma solução de piridina (60  $\mu$ L) e do álcool (**1R,2R,6S**)-**3** (20 mg, 0,128 mmol), em diclorometano (2 mL), adicionou-se anidrido acetico (60  $\mu$ L, 0,65 mmol). A mistura resultante foi agitada por um periodo de 12 horas a temperatura ambiente. A reação foi então diluída em diclorometano (5 mL) e a fase orgânica lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , HCl 10 % e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila: 4/1), resultando no acetato (**1R,2R,6S**)-**6** em 85 % de rendimento (22 mg; 0,110 mmol). **1R,2R,6S-6**  $-\alpha_D = + 74,9$  ( $c=0,86$ ;  $\text{CHCl}_3$ ; 24 °C) -  $ee=98,5$  %.



(**1R,2R,6S**)-**6**

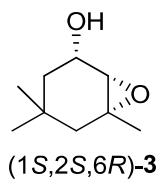
**RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,87 (m, 3H); 0,97-1,70 (m, 7H); 2,03-2,07 (m, 3H); 2,19 (s, 3H); 3,09-3,16 (m, 1H); 3,97-3,26 (m, 1H) (Página 172).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,0; 24,5; 26,4; 31,0; 31,1; 35,6; 42,2; 58,9; 59,8; 69,9; 166,4(Página 172).

**EM:  $m/z$  (%):** 156 (1); 140 (19); 138 (4); 123 (13); 109 (5); 107 (13); 100 (6); 99 (14); 98 (100); 97 (7); 95 (23); 93 (6); 91 (8); 85 (15); 83 (15); 82 (5); 81 (13); 79 (11); 77 (5); 71 (7); 69 (11); 67 (11); 57 (7); 55 (11); 53 (5); 43 (82); 41 (17) (Página 172).

#### 1.3.4.11 Síntese do (1*S*,2*S*,6*R*)-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol ((1*S*,2*S*,6*R*)-3)

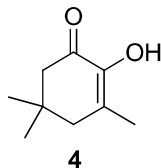
Uma solução contendo 200 mg (1,01 mmol) do acetato (1*S*,2*S*,6*R*)-6 em 10 mL de metanol foi resfriada a 5 °C e tratada com uma solução NaOH (48 mg em 5 mL de metanol), com velocidade de adição suficiente para que a temperatura da solução não ultrapassasse 15 °C. A mistura resultante foi agitada magnéticamente durante 3 horas, sob temperatura de 5 °C e durante 12 horas adicionais a 25 °C. Após este período, a mistura foi agitada na presença de HCl 5 % (10 mL) durante 10 minutos. O metanol foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e a fase aquosa resultante foi extraída com diclorometano (3x 10 mL). A fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila: 2/1), resultando no álcool (1*S*,2*S*,6*R*)-3 em 92 % de rendimento (145 mg; 0,93 mmol). (1*S*,2*S*,6*R*)-3 - $[\alpha]_D = -34,5$  ( $c=0,86$ ; CHCl<sub>3</sub>; 24 °C) -  $ee=97,5$  %.



#### 1.3.4.12 Síntese da 2-hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (4)

Em um balão de fundo redondo foi preparada uma mistura contendo a epóxi-isoforona (0,5 g; 3,25 mmol), ácido sulfúrico (0,33 mL), ácido acético (0,66 mL) e sílica gel (4,00 g) em THF (25 mL). O solvente da solução resultante foi evaporado em evaporador rotativo à 60 °C. Após a completa remoção do solvente, a reação é mantida sob a mesma condição durante 5 minutos. Após este período, o sólido resultante foi lavado com diclorometano e a fase orgânica lavada com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e *brine* e seca com sulfato de sódio anidro. O produto bruto foi purificado em coluna

cromatográfica (hexano/acetato de etila: 2/1), resultando no composto **4** em 60 % de rendimento (300 mg; 1,25 mmol)<sup>[48]</sup>.



**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 1,07 (s, 6H); 1,89 (s, 3H); 2,26 (s, 2H); 2,36 (s, 2H); 6,05 (s, 1H) (Página 170).

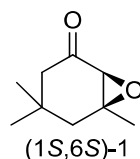
**RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 17,05; 28,31; 33,41; 44,62; 49,28; 127,78; 143,00; 194,01(Página 170).

**EM: m/z (%):** 154 (M<sup>+</sup>, 70); 139 (29); 126 (10); 125 (13); 121 (9); 112 (23); 111 (25); 108 (6); 99 (5); 98 (46); 97 (8); 95 (4); 94 (5); 93 (10); 91 (5); 85 (8); 83 (25); 79 (4); 77 (6); 71 (10); 70 (100); 69 (19); 67 (7); 57 (17); 56 (5); 55 (38); 53 (7); 43 (25); 42 (9); 41 (28) (Página 51).

**IV (v Max, cm<sup>-1</sup>):** 1128, 1188, 1345, 1402, 1443, 1648, 1677, 2871, 2894, 2962, 3419(Página 51).

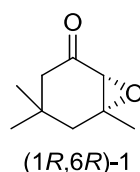
#### 1.3.4.13 Síntese do (1*S*,6*S*)-4,4,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona ((1*S*,6*S*)-**1**)

Uma solução do álcool (**1*R*,2*R*,6*S*)-3**) (0,64 mmol) em 5 mL de diclorometano, foram adicionados em uma suspensão em agitação de clorocromato de piridínio (PCC) (1,56 mmol, 0,33 g), acetato de sódio (0,32 mmol, 26 mg) e 347 mg de celite em 2 mL de diclorometano. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 3 horas, adicionou-se 10 mL de éter etílico seco e a mistura escura foi filtrada em um uma mistura de celite e sílica sob vácuo e lavado com porções de 5 mL de éter etílico. O produto foi concentrado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica com fase móvel de hexano - acetato de etila – 8:2. O rendimento da reação foi de 82 % (0,52 mmol, 81 mg, *ee*=87,5 %) <sup>[49]</sup>.



#### 1.3.4.14 Síntese do (1R,6R)-4,4,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona ((1R,6R)-1)

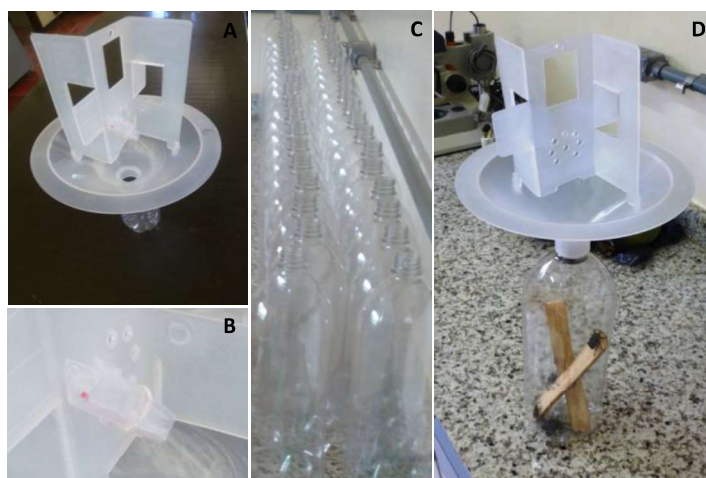
A preparação do composto (1R,6R)-1 foi realizada seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o composto (1S,6S)-1, partindo-se de 100 mg (0,64 mmol). O rendimento da reação foi de 84 % (0,54 mmol, 83 mg, *ee*=89,3 %).



#### 1.3.5 Experimento de captura de *Homalinotus depressus* em campo

Os ensaios de atratividade e captura em campo foram realizados no município de Mojú-PA. O tipo de armadilha utilizado pode ser determinante no sucesso de um ensaio de campo e a armadilha escolhida para o primeiro teste em campo realizado com *H. depressus* foi a Pitfall<sup>®</sup>, produzida pela empresa brasileira Biocontrole (Figura 5-A). No topo da armadilha foram instalados os sachês contendo os compostos atrativos (isca), como ilustrado na Figura 5-B. Abaixo do topo da armadilha foram fixadas garrafas tipo PET (Figura 5-C), que servem de suporte para a dieta natural, oferecida como atrativo por possuir atividade sinérgica com os compostos feromonais, assim como para armazenar os possíveis insetos capturados (Figura 5-D).

Foram planejados nove tratamentos diferentes, com cinco repetições cada. Os tratamentos utilizados estão ilustrados na Tabela 1



**Figura 5:** Confeção das armadilhas; **A-** topo da armadilha, pitfall®; **B-** iscas contendo o feromônio; **C-** garrafas tipo pet 2 L, utilizadas na base; **D-** visão da marmadilha pronta para instalação.

**Tabela 1:** Tratamentos empregados nos bioensaios de captura em campo.

Tratamento	Isca
A	<i>syn-3</i> (100 mg) + Dieta
B	<i>anti-3</i> (100 mg) + Dieta
C	Controle <sup>1</sup> + Dieta
D	<i>syn-3</i> (100 mg) + <i>anti-3</i> (100 mg) + Dieta
E	<i>R,R,S-3</i> (50 mg) + Dieta
F	<i>syn-3</i> (100 mg) (septo <sup>2</sup> ) + Dieta
G	<i>syn-3</i> (100 mg) + 1 (10mg) + 2 (10mg) + 4 (10 mg)
H	1 (200 mg)
I	2 (200 mg)

<sup>1</sup> O tratamento indicado como controle utilizou como isca apenas o sachê plástico, sem a presença de componentes feromonais. <sup>2</sup> Foi realizado um teste em que o sachê liberador foi substituído por um septo de borracha.

A área selecionada para a realização do experimento foi o lote em que foi observada maior presença de *H. depresso* no mês anterior, respeitando uma distância de cinco plantas entre as linhas e colunas, sendo que a distância entre plantas nas linhas e nas colunas é de aproximadamente 6 metros. As armadilhas foram



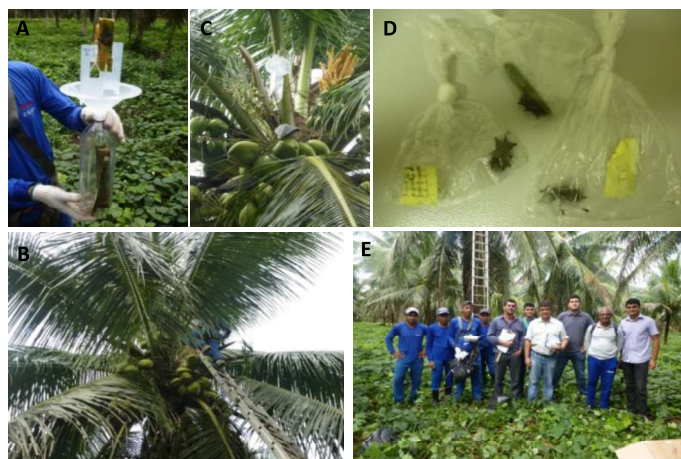
distribuídas nas plantas através de um modelo de delineamento de blocos ao acaso, conforme mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Distribuição as armadilhas do bioensaio.

Planta <sup>1</sup>	10	15	20	25	30	35	40	45
05	I <sup>2</sup> A <sup>3</sup>	I B	I C	I D	I E	I F	I G	I I
10	II F	II E	II A	II C	II D	II G	II B	I H
15	III D	III B	III G	III F	III A	III C	III E	II
20	IV G	IV C	IV A	IV E	IV D	IV F	IV B	I H
25	V B	V F	V D	V A	V C	V G	V E	-

<sup>1</sup>Os Números na linha e na coluna principal indicam a posição hipotética do coqueiro no qual foi instalada cada armadilha no lote. <sup>2</sup>Os algarismos romanos (I-V) representam a repetição de cada tratamento. <sup>3</sup>As letras indicam os diferentes tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

Após preparo das armadilhas e mapeamento da área de aplicação, estas foram transportadas para a área do teste (Figura 6 –A) e instaladas no topo dos coqueiros, local de maior incidência da praga (Figura 6 –B e C). Os insetos capturados foram armazenados em sacos plásticos para posterior contagem e verificação em laboratório (Figura 6 – D). A partir da instalação das armadilhas, foi realizada a contagem do número de insetos e manutenção a cada 48 horas, por um período de 10 dias.



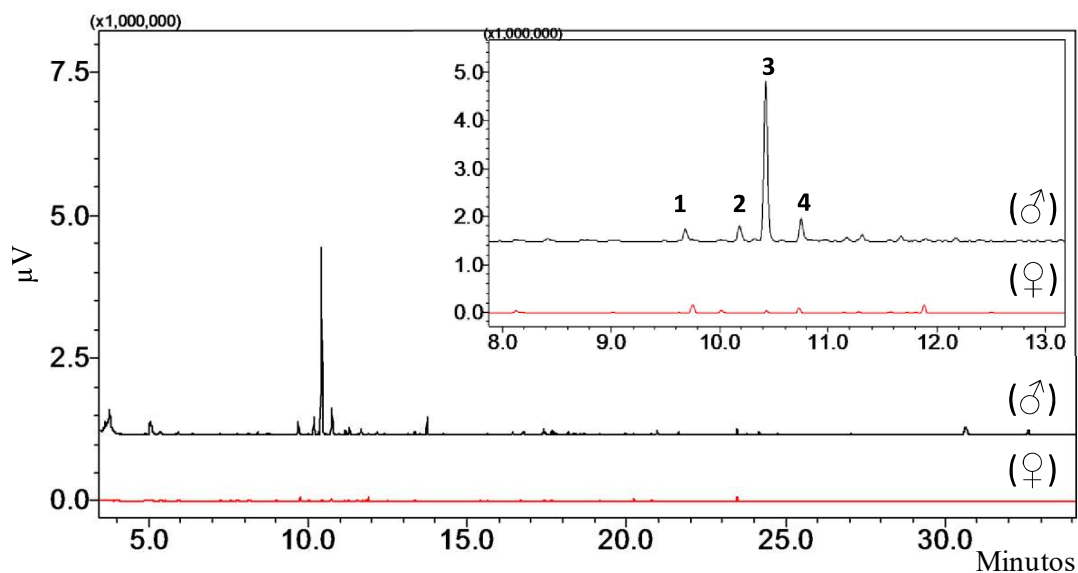
**Figura 6:** Aplicação dos testes de campo – A- Armadilha pronta para instalação; B- Instalação das armadilhas no topo dos coqueiros; C- Armadilha instalada; D- Insetos capturados pelo uso das armadilhas E- Equipe de instalação e acompanhamento dos ensaios de campo.

## 1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.4.1 Extração de voláteis de *Homalinotus depressus* e análises iniciais – a evidência de comportamento mediado por feromônios

Machos e fêmeas de *Homalinotus depressus* coletados no campo (Mojú-PA), foram encaminhados ao Laboratório de Semioquímicos da UFPR, onde foram alimentados com cana-de-açúcar e mantidos em ambiente controlado (28 °C, 85 % UR, 12 h luz: 12 h escuro). Machos e fêmeas foram submetidos paralelamente ao sistema de coleta de voláteis (aeração), a fim de obter extratos para a realização de análises químicas e bioensaios comportamentais.

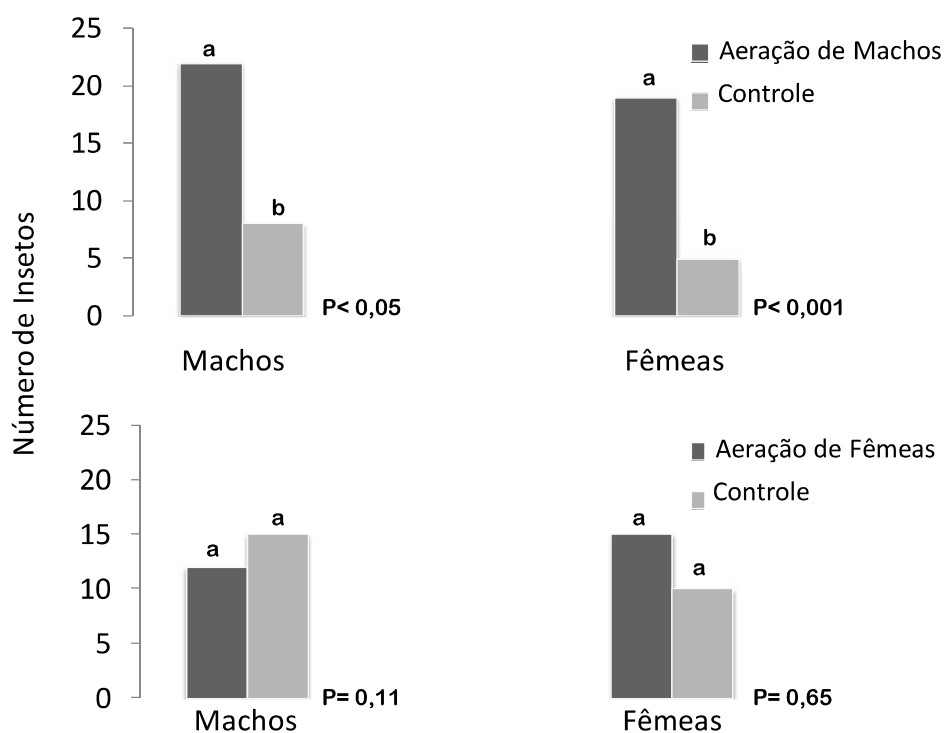
Através da comparação dos cromatogramas de extratos de voláteis de machos e fêmeas em cromatografia em fase gasosa (GC), revelou-se a presença de quatro compostos macho-específicos. Para fins práticos, estes compostos foram numerados de 1 a 4, seguindo a ordem de eluição apresentada em GC (coluna RTX-5) (Figura 7).



**Figura 7:** Perfil cromatográfico dos compostos macho-específicos presentes em extratos de *Homalinotus depressus*.

Bioensaios de olfatométrie revelaram que voláteis obtidos de machos são atrativos para ambos os sexos, enquanto os oriundos de fêmeas não apresentam atratividade significativa para co-específicos (Figura 8), fornecendo assim uma evidência comportamental de que um ou mais compostos dentre os macho-específicos,

detectados por GC, são responsáveis pela atratividade apresentada pelos extratos obtidos dos machos de *H. depressus*.



**Figura 8:** Respostas olfativas de machos e fêmeas de *Homalinotus depressus* frente ao extrato de aeração de machos x solvente (controle) e de fêmeas x solvente (controle) em condições de olfatômetro tipo Y. Barras indicadas por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste distribuição binominal ( $p < 0,05$ ).

Os índices de retenção dos produtos naturais foram calculados em duas colunas cromatográficas capilares distintas (RTX-5- apolar e EC-Wax – polar). Através destes dados, foi possível calcular a diferença entre os valores obtidos nas fases estacionárias distintas, fornecendo informações quanto à polaridade destes compostos, devido a diferenças nas interações entre fase estacionária e analito nas diferentes colunas cromatográficas (Tabela 3). Maiores valores de  $\Delta IR$  indicam maior interação com a fase estacionária polar (EC-WAX), indicando maior polaridade na estrutura do analito.

**Tabela 3:** Índices de Retenção dos compostos 1-4 em colunas RTX-5 e EC-WAX.

Composto	IR <sup>1</sup> RTX-5 <sup>2</sup>	IR EC-WAX <sup>3</sup>	Δ IR
1	1096	1540	444
2	1119	1584	465
3	1127	1789	656
4	1158	1660	501

<sup>1</sup>IR: Índice de retenção. <sup>2</sup>RTX-5: Coluna cromatográfica capilar - (5 %) difenil- (95 %) dimetilpolisiloxano. <sup>3</sup>EC-WAX: Coluna cromatográfica capilar – polietilenoglicol.

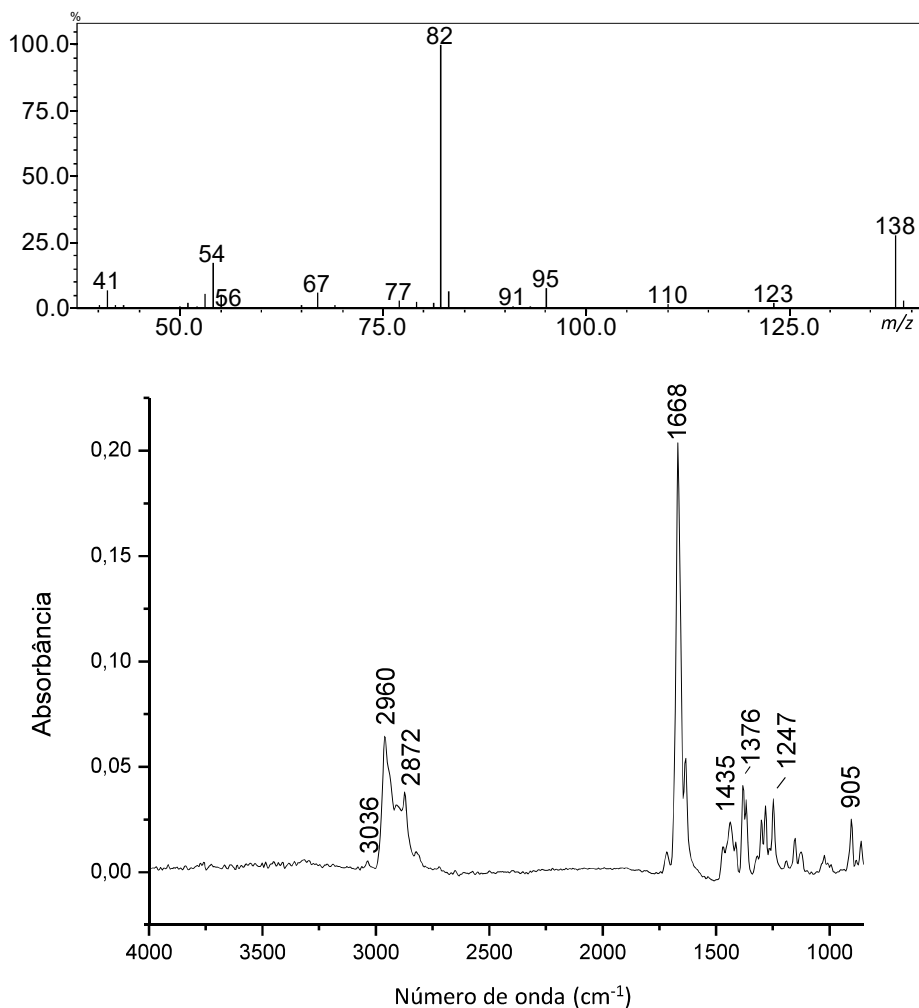
Foram então realizadas análises em GC-MS e GC-FTIR para a obtenção de informações espectroscópicas e espectrométricas dos compostos naturais, uma vez que a análise tradicional e muito usual na identificação de compostos orgânicos, a ressonância magnética nuclear (RMN), não é possível devido à baixa concentração produzida por inseto por dia e à alta complexidade da mistura presente nas amostras. Os dados referentes a estas análises serão discutidos detalhadamente nas próximas seções, que irão tratar da identificação estrutural destes compostos.

#### 1.4.2 Identificação estrutural do composto (2)

O espectro de massas referente ao composto **2** apresentou pico base em  $m/z$  82 e um possível pico do íon molecular em  $m/z$  138 (Figura 9), com grande semelhança ao espectro apresentado pelo composto comercial 3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (isoforona). Outra semelhança encontrada entre a isoforona e o composto **2** foi o índice de retenção em coluna capilar do tipo 5 (5 % difenil/95 % dimetil siloxano) na qual o valor 1117 é descrito para a isoforona<sup>[50]</sup> e 1119 foi encontrado experimentalmente para o produto natural **2**.

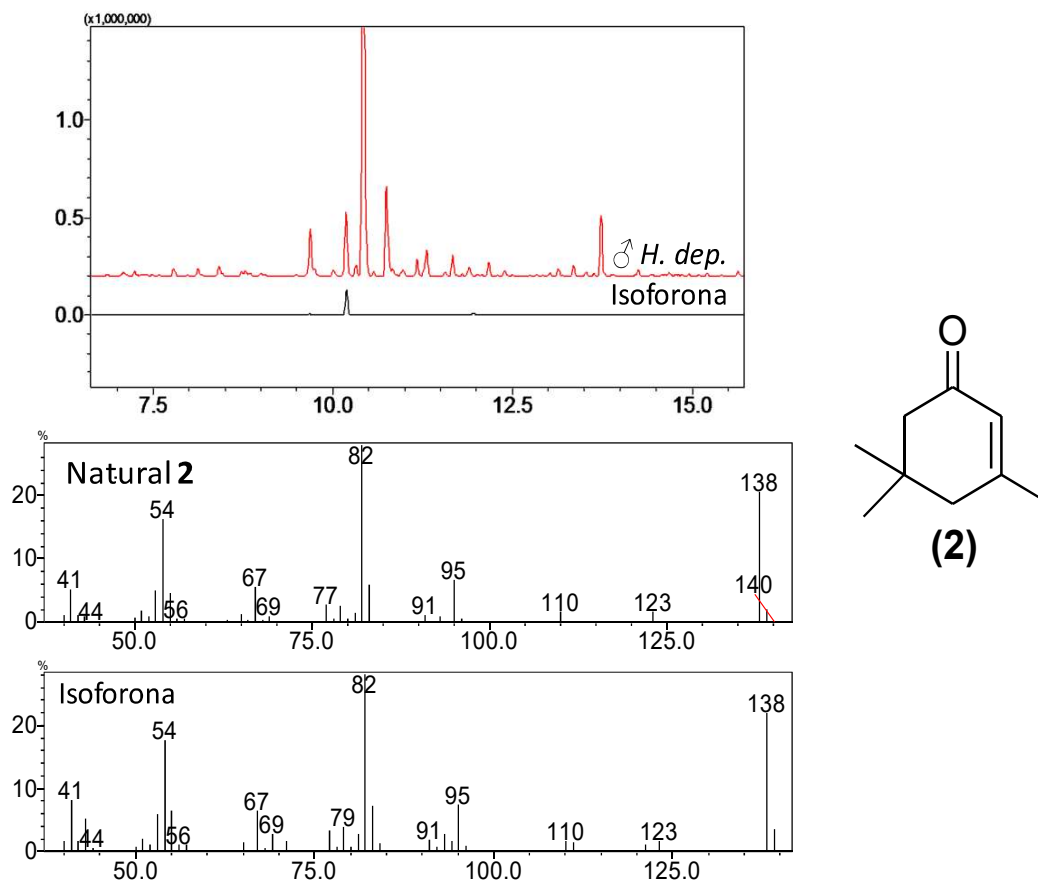
O espectro no infravermelho referente ao composto **2** (Figura 9) sugere uma estrutura contendo uma ligação dupla C-C trissubstituída, através da presença banda de estiramento da ligação C=C em  $1640\text{ cm}^{-1}$  e do número de onda da banda relativa ao estiramento da ligação C-H em alcenos em  $3036\text{ cm}^{-1}$ . Em  $2959$  e  $2941\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas de estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H em  $\text{CH}_3$ ,

respectivamente, com grande intensidade relativa, sugerindo uma estrutura ramificada. A banda intensa em  $1668\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento da ligação C=O de uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.



**Figura 9:** Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto **2** (natural).

Através da comparação dos dados obtidos nas análises do produto natural com os do padrão da isoforona, foi possível identificar o composto **2** como 3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (**2**), conforme observado na Figura 10.



**Figura 10:** Comparação entre perfil cromatográfico e espectro de massas da 3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (isoforona) sintética com os apresentados pelo composto natural **2**.

A isoforona (**2**) foi identificada previamente como um dos compostos liberados por salmão (família Salmonidae) na água, agindo como atrativo para parasitas (*Leophtheirus salmonis*, piolho do mar), sendo neste caso classificada como caïromônio<sup>[51]</sup>. A isoforona foi também descrita como feromônio liberado pelo *hairpencil* de machos da espécie de borboleta *Amauris echeria*<sup>[52]</sup>. No reino vegetal, a isoforona foi identificada como componente dos extratos de flores *Primula farinosa* (pímula do olho do pássaro)<sup>[53]</sup> e *Rosa hybrida* (rosa)<sup>[54]</sup>.

Uma vez que uma das estruturas naturais minoritárias foi identificada, a estratégia adotada foi a realização de diferentes microreações de derivatização na estrutura da isoforona (**2**), uma vez que os espectros de massa dos demais compostos indicaram que as estruturas poderiam possuir cadeias carbônicas análogas. Inicialmente, foi realizada a hidrogenação catalítica da ligação dupla C-C da isoforona,

com subsequente redução da carbonila com borohidreto de sódio. Outra microreação realizada foi a redução da carbonila da isoforona (**2**) com borohidreto de sódio, obtendo-se o isoforol. Entretanto, nenhum dos três produtos formados apresentou espectros e índices de retenção semelhantes aos encontrados nos produtos naturais.

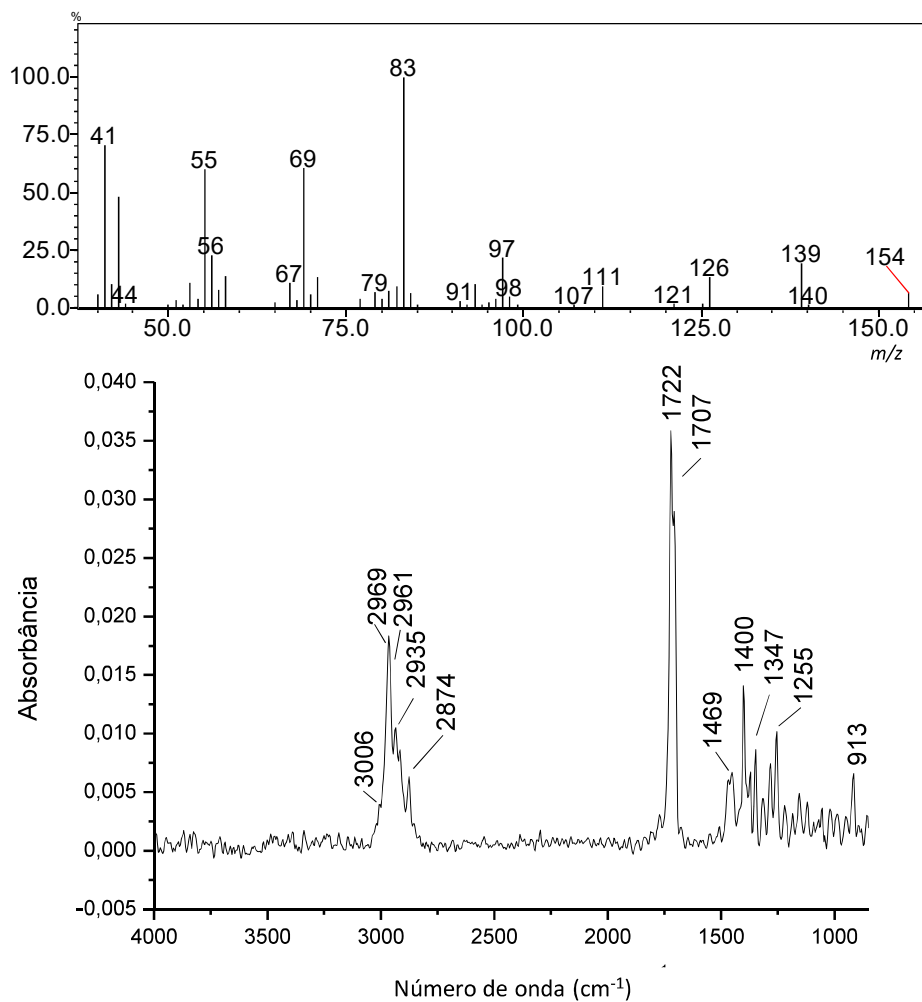
#### 1.4.3 Identificação estrutural do componente (1)

O espectro de massas referente ao composto **1** (Figura 9) apresenta pico base com  $m/z$  83 e um provável pico do íon molecular com  $m/z$  154, o que sugere a fórmula molecular  $C_9H_{14}O_2$ . O padrão de fragmentação apresentado pelo composto **1** é similar ao da isoforona (**2**), contendo apenas um átomo de oxigênio adicional em sua fórmula molecular, indicando estruturas químicas correlatas.

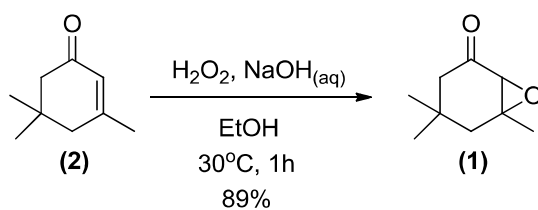
No espectro no infravermelho (Figura 11) observa-se novamente a evidência da presença de ramificações metílicas através das bandas de estiramento simétrico e assimétrico de  $CH_3$  em 2961 e 2969  $cm^{-1}$ , além da banda em 1722  $cm^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação  $C=O$  de cetona. A banda em 3006  $cm^{-1}$  (estiramento da ligação  $C-H$  em epóxido), em conjunto com as bandas em 913 e 1255  $cm^{-1}$  (estiramento assimétrico e simétrico em anel de epóxido)<sup>[55]</sup>, indica a presença da funcionalidade epóxido na estrutura do composto.

Com base nos dados apresentados, a estrutura química do composto **1** foi proposta como 4,4,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona (epóxi-isoforona), a qual foi sintetizada inicialmente em microescala pela reação de Prilezhaev a partir da isoforona (**2**), empregando-se *m*-CPBA como agente oxidante. Entretanto, o rendimento da reação manteve-se abaixo de 5 % (GC) em diferentes condições reacionais. Desta maneira optou-se por utilizar peróxido de hidrogênio na oxidação, conforme ilustra o Esquema 1, resultando em 89 % de rendimento para o composto **1**.

A formação da epóxi-isoforona **1** pôde ser evidenciada através da análise de seus espectros RMN de  $^1H$ , de  $^{13}C$  e DEPT 135. Pode-se destacar a presença de um simpleto em  $\delta$  2,96 integrando para 1 hidrogênio no espectro de  $^1H$ , referente ao hidrogênio ligado ao anel do epóxido. Nos espectros de  $^{13}C$  e DEPT 135 é possível observar o sinal referente aos carbonos do anel epóxido em  $\delta$  64,32 (quaternário) e 61,35 (CH) além do sinal em  $\delta$  208,05, referente ao carbono da cetona, assim como os demais sinais característicos da estrutura.



**Figura 11:** Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto **1** (natural).



**Esquema 1:** Epoxidação da isoforona (**2**) com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O espectro de massas obtido para o composto natural **1** mostrou-se semelhante ao da epóxi-isoforona sintética, assim como seu espectro no infravermelho. A coinjeção dos compostos em GC confirmou a identificação do componente **1** como epóxi-isoforona (**1**).

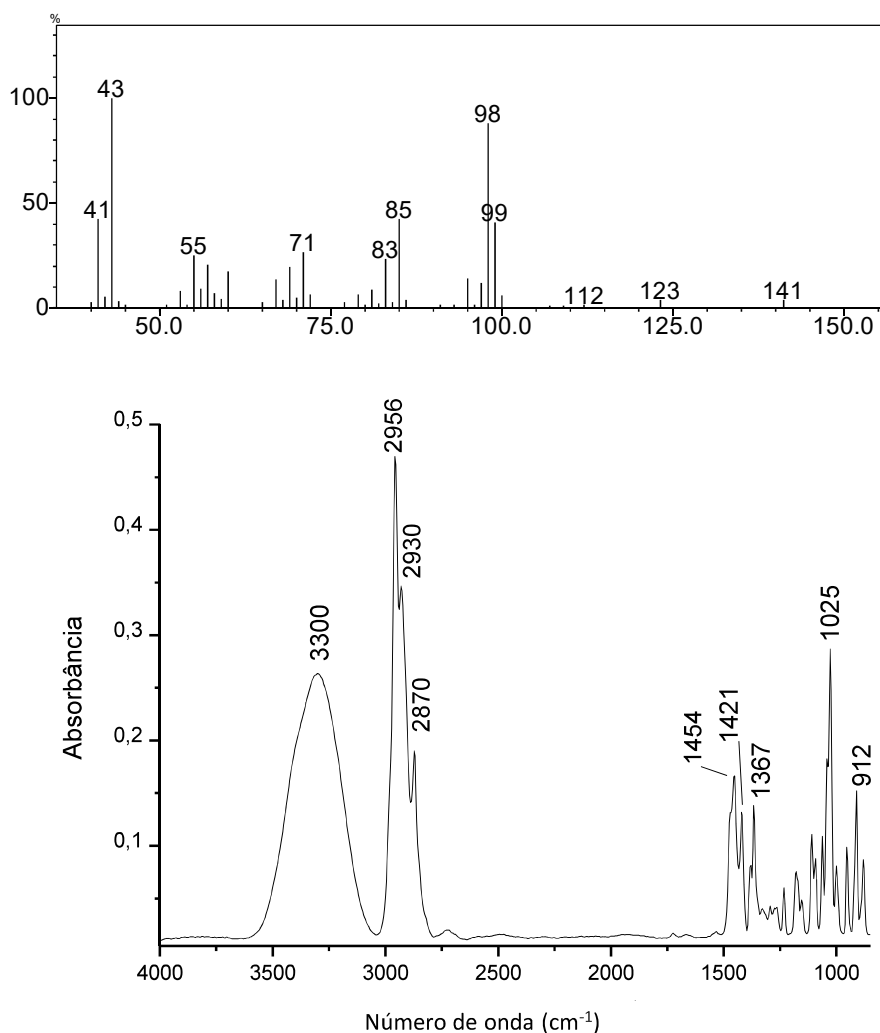


#### 1.4.4 Identificação estrutural do componente majoritário (3)

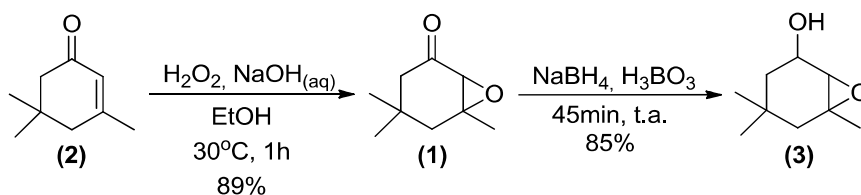
O espectro no infravermelho referente ao componente majoritário 3 (Figura 12) apresenta uma banda de deformação axial de ligação O-H de alcoóis em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , assim como a banda em  $1025\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial da ligação C-O, indicando a presença de uma hidroxila na estrutura. O índice de retenção calculado para o composto 3 em coluna RTX-5 foi 1133 e em coluna EC-WAX foi 1562 (Tabela 3). A diferença entre os valores encontrados para estes dois tipos de fase estacionária fornece informações importantes quanto aos grupamentos presentes nas moléculas do analito<sup>[36]</sup>, devido às diferentes interações entre o analito e às diferentes fases estacionárias. A diferença esperada para a presença de uma hidroxila de álcool na estrutura seria de aproximadamente 500 unidades. A diferença encontrada para o composto 3 foi de 656 unidades, sendo que 500 unidades são atribuídas à presença da hidroxila e cerca de 150 unidades atribuídas à contribuição da presença de um grupo funcional polar adicional na estrutura química do composto natural 3.

No espectro de massas obtido para o composto 3 (Figura 12) observa-se o pico base em  $m/z$  43, assim como o fragmento detectável de maior  $m/z$  em 141, observando-se a perda de uma molécula de água, que resulta no fragmento em  $m/z$  123. Supondo que o fragmento  $m/z$  141 seja gerado pela perda de uma metila do íon molecular, pode-se supor que o componente 3 teria  $156\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$ .

Com base no conjunto de dados obtidos, foi possível propor a estrutura química do composto (3) como 4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol (homalinol). Após otimização da sequencia experimental, o homalinol (3) foi sintetizado com 76 % de rendimento em duas etapas (Esquema 2), realizando-se primeiramente a epoxidação da isoforona, seguida da redução da carbonila da epóxi-isoforona com borohidreto de sódio e ácido bórico, usando metodologia livre de solvente<sup>[48]</sup>.



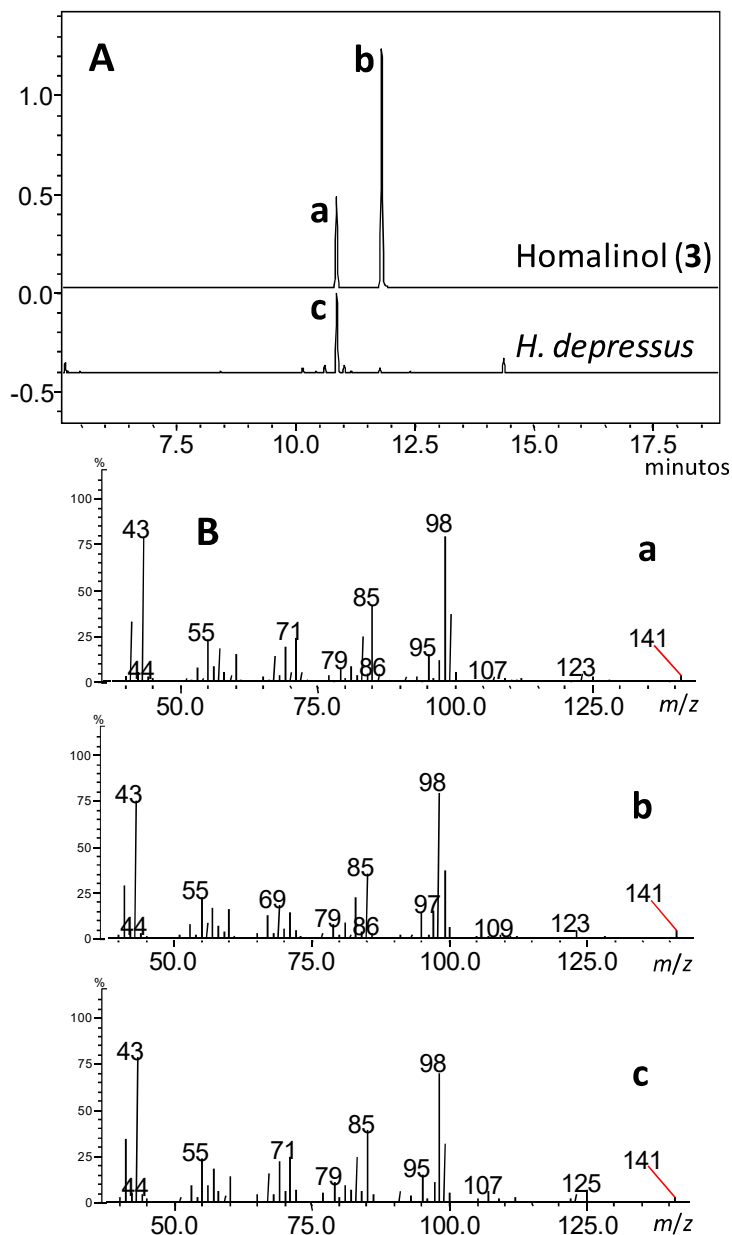
**Figura 12:** Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto **3** (natural).



**Esquema 2:** Preparação do homalinol (**3**).

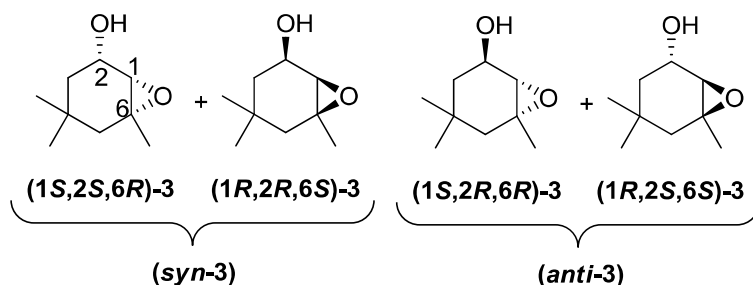
O cromatograma referente ao produto formado na síntese do composto **3** (Figura 13) apresenta dois picos, com diferença de cerca de 1 minuto do tempo de eluição em coluna RTX-5, na proporção 1:3 e espectros de massas com grande semelhança. Ao comparar o cromatograma dos produtos obtidos na síntese com o do extrato natural de *H. depressus*, observa-se coeluição do composto natural majoritário

**3** com o menos retido dos compostos sintéticos (Figura 13A). O espectro de massas apresentado pelo composto natural mostrou-se muito semelhante aos dos produtos sintéticos (Figura 13B). Não há registros quanto à ocorrência natural de nenhum dos estereoisômeros do composto **3**, sendo este o primeiro caso a ser descrito. Desta maneira, o composto **3** será tratado neste documento como homalinol, nome derivado de *Homalinotus depressus*.



**Figura 13:** A - Comparação entre o cromatograma do homalinol (**3**) sintético e do extrato natural de *H. depressus*. B – Comparação dos espectros de massas dos dois produtos sintéticos (a e b) e do produto natural **4** (c).

A estrutura do homalinol (Figura 14) possui 3 centros estereogênicos, o que levaria a 8 possíveis estereoisômeros. Entretanto, devido à presença do anel epóxido, este número diminui para 4 possibilidades: **(1R,2R,6S)-3**, **(1S,2S,6R)-3**, **(1S,2R,6R)-3** e **(1R,2S,6S)-3** (Figura 14).



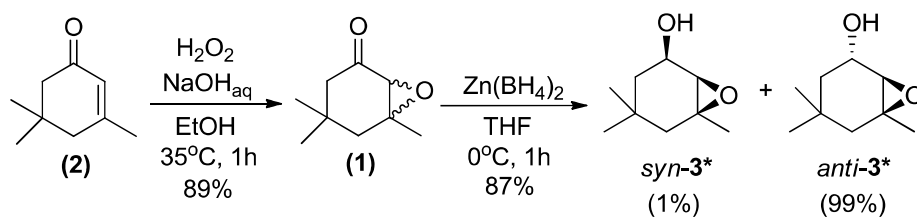
**Figura 14:** Estereoisômeros do homalinol (**3**).

Ambas as reações realizadas na preparação do homalinol (**3**) descritas anteriormente (Esquema 2), não são estereoseletivas, fazendo com que na primeira reação fosse formado um racemato da epóxi-isoforona (**1**) e na redução da carbonila, formada uma mistura dos estereoisômeros do homalinol (**3**). Entretanto, devido à natureza não quiral da fase estacionária empregada nas análises em GC-MS, não é possível visualizar a separação cromatográfica de todos os produtos formados, apenas do par de diastereoisômeros conforme ilustrado na Figura 13A.

#### 1.4.5 Determinação da configuração relativa do componente natural (**3**)

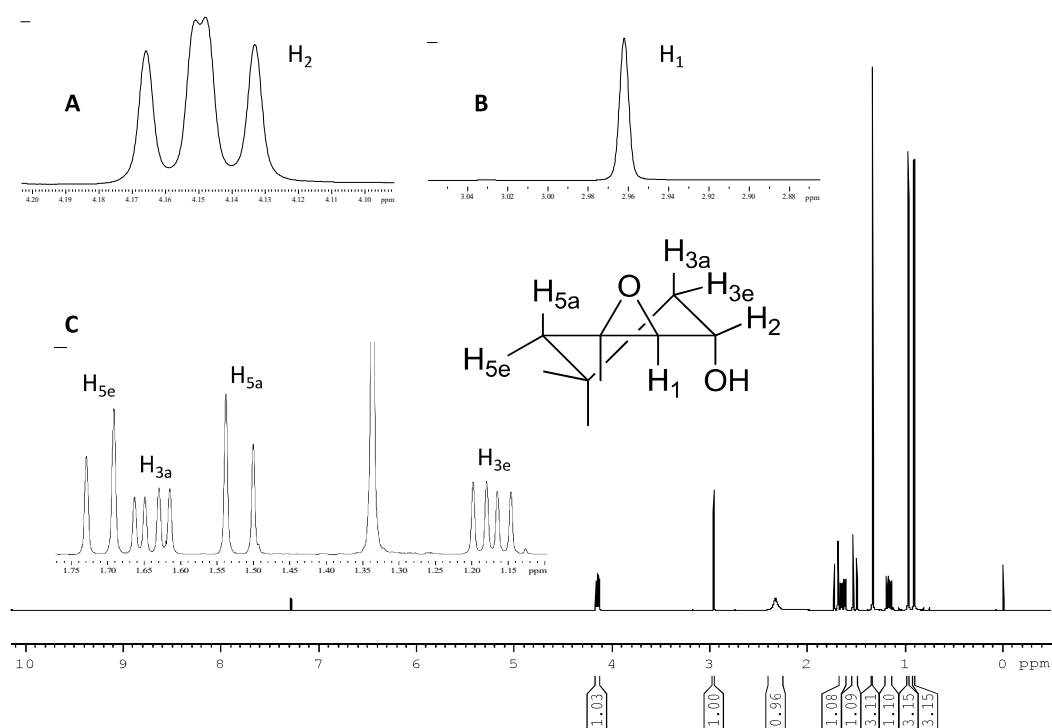
A importância do efeito desencadeado pela presença de diferentes estereoisômeros feromônios, frente ao comportamento dos insetos têm sido discutida ao longo das últimas cinco décadas<sup>[56]</sup>. Um fato que vêm sendo observado no desenvolvimento de diversos estudos é a diversidade existente nas formas de reconhecimento da quiralidade pelos diferentes organismos, o que demonstra a importância do conhecimento quanto à estereoquímica dos produtos naturais.

Desta maneira, para a determinação da configuração relativa do homalinol (**3**) natural, foi realizada primeiramente a reação de epoxidação da isoforona (**2**), empregando-se peróxido de hidrogênio em meio básico, com 89 % de rendimento. O produto formado, a epóxi-isoforona (**1**), foi reduzido com boro-hidreto de zinco com formação do *anti*-homalinol (*anti-3*) em 87 % de rendimento e 98 % de excesso diastereoisomérico (Esquema 3).



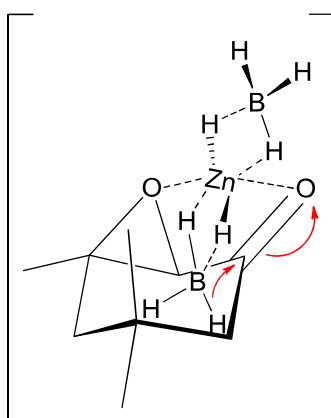
**Esquema 3:** Síntese diastereoseletiva do *anti*-homalinol (**3**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *anti*-**3** (Figura 15), destaca-se um duplo duplete integrando para 1H em  $\delta$  4,15 de constantes de acoplamento  $J_1=7,4$  e  $J_2=5,8$  Hz, referentes ao acoplamento do hidrogênio  $\text{H}_2$  com os hidrogênios  $\text{H}_{3a}$  e  $\text{H}_{3e}$ . O hidrogênio  $\text{H}_{3e}$  é responsável pelo duplo duplete em  $\delta$  1,17 ( $J_1=13,4$  e  $J_2=7,4$  Hz) enquanto que o hidrogênio  $\text{H}_{3a}$  refere-se ao duplo duplete em  $\delta$  1,64 ( $J_1=13,4$  e  $J_2=5,8$  Hz). O sinal referente ao hidrogênio  $\text{H}_1$  ocorre como um simpleto em  $\delta$  2,96. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é possível observar a presença sinal referente ao carbono quaternário e ao CH do epóxido em  $\delta$  59,5 e 63,0 respectivamente, assim como o sinal em  $\delta$  65,8 referente ao carbono carbinólico.



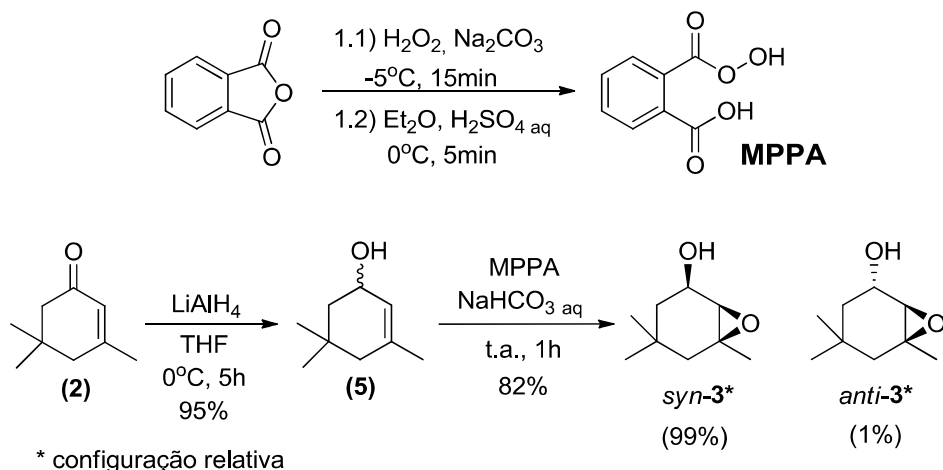
**Figura 15:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , referente ao composto *anti*-**3**.

Reduções diastereoseletivas de  $\alpha$  e  $\beta$ -hidróxi cetonas e  $\alpha,\beta$ -epóxi cetonas com borohidreto de zinco são amplamente aplicadas devido ao poder quelante do cátion  $Zn^{2+}$  ser muito superior ao de outros cátions comumente utilizados em borohidretos metálicos<sup>[40]</sup>. Esta habilidade de coordenação confere ao borohidreto de zinco uma seletividade ímpar nas reações de transferência de hidreto, que pode ser explicada no caso da síntese do *anti*-**3** por um estado de transição cíclico, no qual os átomos de oxigênio do epóxido e da carbonila do composto **1** encontram-se coordenados ao átomo de zinco, com a aproximação e transferência de hidreto ocorrendo pela face superior da cetona ilustrada na Figura 16<sup>[41]</sup>.



**Figura 16:** Transferência de hidreto proposta para a estereoseletividade da redução da epóxi-isoforona **1** com borohidreto de zinco.

A síntese diastereoseletiva do racemato *syn*-**3** foi realizada partindo-se da redução da cetona da isoforona (**2**), com hidreto de lítio e alumínio, seguido da epoxidação da ligação dupla C-C com ácido mono-perftálico (MPPA) em 78 % de rendimento global e 98 % de excesso diastereoisomérico (Esquema 4). O MPPA utilizado na epoxidação foi preparado através da reação entre o anidrido ftálico com peróxido de hidrogênio, seguido do tratamento com ácido sulfúrico e a respectiva concentração determinada por titulação.



**Esquema 4:** Síntese diastereoseletiva do *syn*-homalinol (3).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do *syn*-3 (Figura 17), apresenta um duplo-duplo-duplete integrando para 1H em δ 4,07 de constantes de acoplamento  $J_1=10,92$ ,  $J_2=6,05$  e  $J_3=2,24$  Hz, referentes ao acoplamento do hidrogênio H<sub>2</sub> com os hidrogênios H<sub>1</sub>, H<sub>3a</sub> e H<sub>3c</sub>. Os hidrogênios H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub> geram dois multipletos em δ 1,10-1,27 e 1,36-1,70. O sinal referente ao hidrogênio H<sub>1</sub> ocorre como um duplete em δ 3,12 com constante de acoplamento  $J=2,24$  Hz. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C é possível observar a presença sinal referente ao carbono quaternário e ao CH do epóxido em δ 61,1 e 62,2 respectivamente, assim como o sinal em δ 66,7 referente ao carbono carbinólico.

Conforme observado nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H ilustrados na Figura 15 e na Figura 17, o acoplamento entre os hidrogênios vicinais H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> dos estereoisômeros *anti*-3 e *syn*-3 ocorre com constantes de acoplamento  $J \approx 0$  Hz e  $J=2,24$  Hz, respectivamente. Esta constante de acoplamento muito próxima a 0 se deve ao ângulo diedral entre os átomos de hidrogênio ser muito próximo a 90° no composto *anti*-3. O ângulo diedral entre H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> é próximo a 0° no *syn*-3, permitindo a visualização do duplo duplo duplete em seu respectivo espectro, com  $J_3=2,24$  Hz.

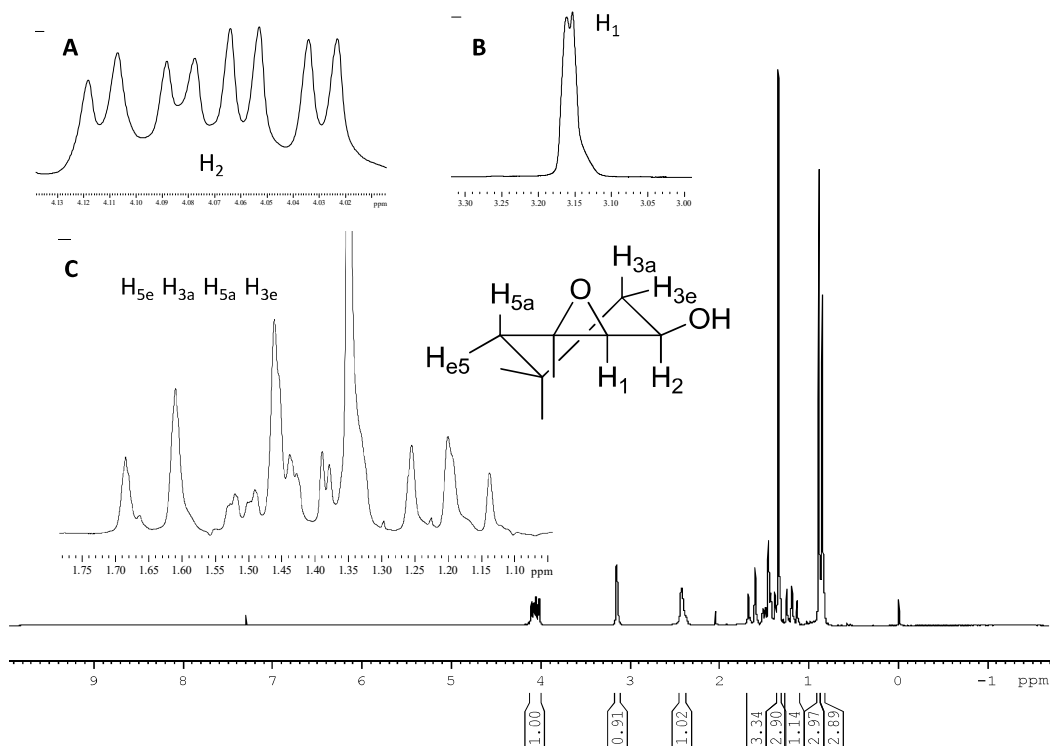


Figura 17 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , referente ao composto *syn-3*.

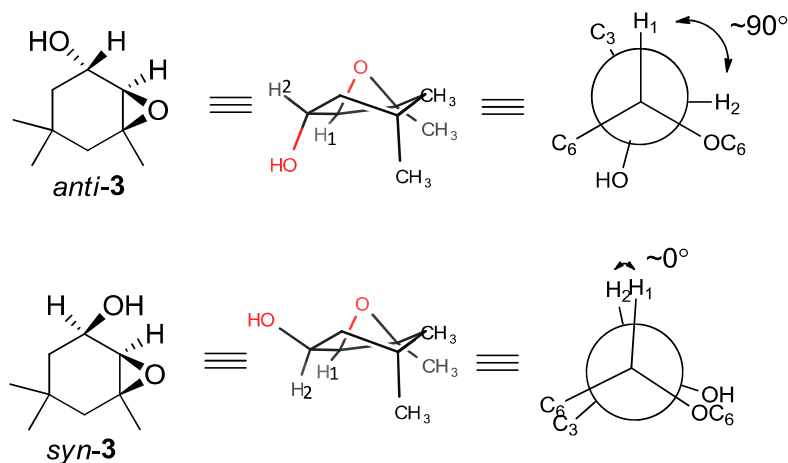
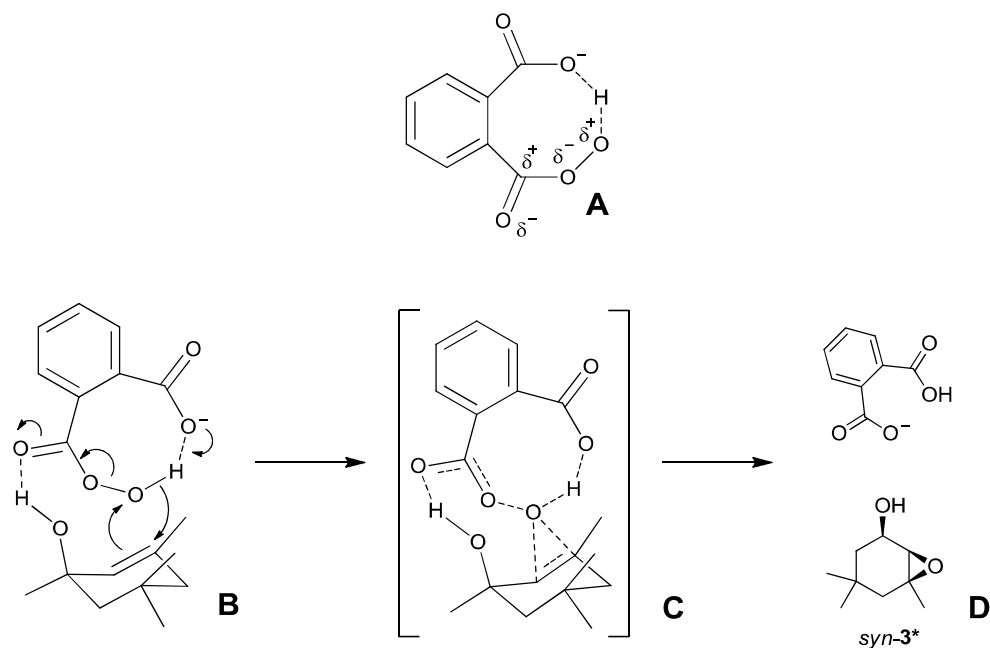


Figura 18: Projeções dos compostos *anti-3* e *syn-3* e ângulo diedral entre os hidrogênios  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ .

A diastereoseletividade da reação com preferência para formação da configuração relativa *syn* é explicada através do mecanismo ilustrado na Figura 19, proposto pela adaptação do mecanismo da reação de Prilezhaev<sup>[57]</sup>. Inicialmente, através da preparação da solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  e MPPA, ocorre desprotonação



do ácido carboxílico do MPPA, gerando um ânion carboxilato (Figura 19, A). O alto grau de polarização do perácido torna um dos átomos de oxigênio da estrutura suscetível ao ataque nucleofílico do par de elétrons da ligação C=C do isoforol (5), ao mesmo tempo em que forma-se uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carboxila do perácido com o hidrogênio da hidroxila do isoforol (5). O ataque nucleofílico do par de elétrons da ligação C=C do isoforol e clivagem heterolítica da ligação O-H do perácido para formação do anel epóxido, assim como a formação de uma nova ligação O-H, clivagem da ligação O-O e migração do par de elétrons da C=O para o átomo de oxigênio ocorrem de maneira concertada, como demonstrado na Figura 19-B, para gerar o ânion ftalato e o *syn*-3 (Figura 19-D), através do intermediário ilustrado na Figura 19-C.

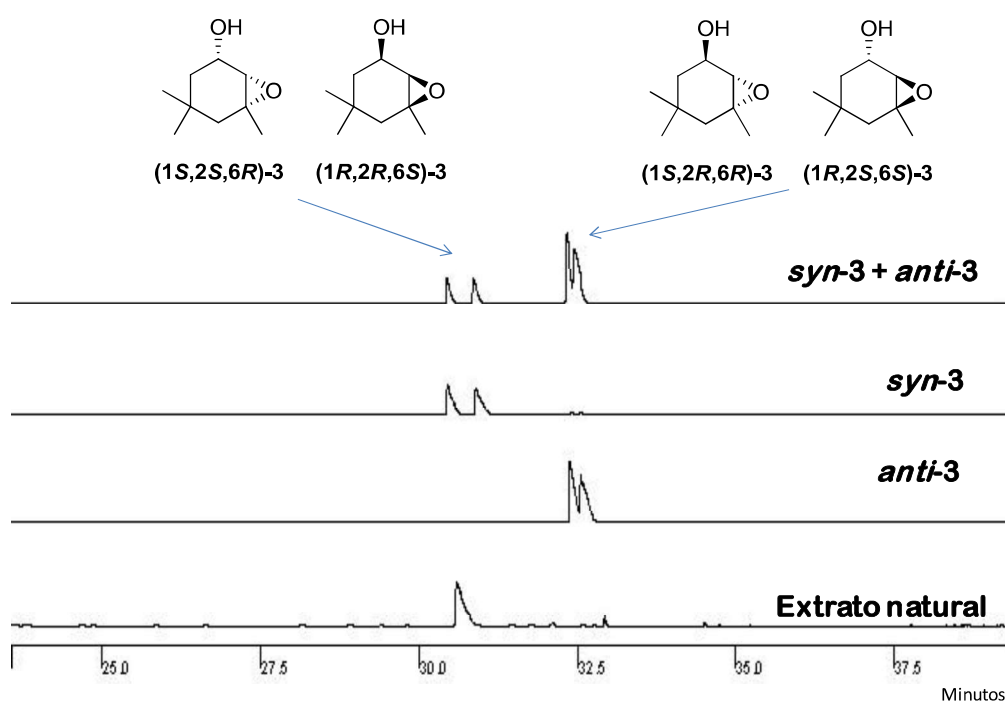


**Figura 19:** Mecanismo proposto para a reação de epoxidação do composto 5 com MPPA. **A:** MPPA em solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub>; **B:** Movimentação eletrônica para formação do intermediário C; **D:** Produtos formados. \*Configuração relativa.

Foram realizadas tentativas de separação dos estereoisômeros do composto 3 em cromatografia líquida de alta eficiência utilizando duas fases estacionárias distintas (Chirex PGLY- DNB/Phenomenex e Celulose/Phenomenex) e diferentes proporções hexano/isopropanol (variando entre hexano 100 % e hexano 80 %). Entretanto, as

condições de fase móvel e estacionárias utilizadas não foram eficientes na separação dos estereoisômeros do homalinol (**3**).

Após o desenvolvimento de uma metodologia analítica em GC com fase estacionária quiral ( $\beta$ -DEX 325/Supelco), foi possível observar a separação cromatográfica dos quatro estereoisômeros do homalinol sintético, assim como verificar que o produto natural ocorre em apenas uma forma estereoisomérica, sendo que este é eluído no mesmo tempo de retenção do estereoisômero menos retido, um dos enantiômeros do *syn*-homalinol (**3**) ( $(1R,2R,6S)$ -**3** ou  $(1S,2S,6R)$ -**3**), conforme ilustrado na Figura 20.

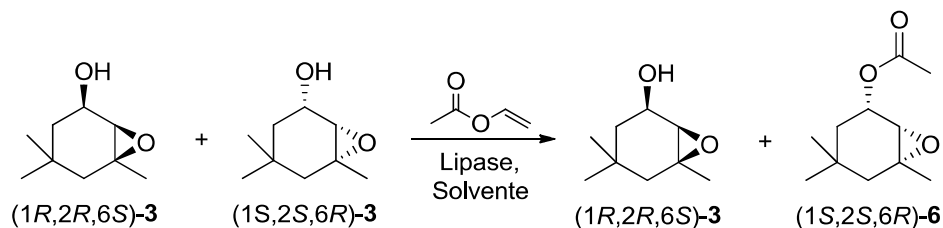


**Figura 20:** Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros do homalinol (**3**) e sua comparação com o componente majoritário do feromônio de agregação de *H. depressus*.

#### 1.4.6 Determinação da configuração absoluta do componente natural (**3**)

Os estudos visando à síntese enantioselectiva dos alcoóis  $(1R,2R,6S)$ -**3** e  $(1S,2S,6R)$ -**3** foram realizados através de ensaios de resolução cinética enzimática, empregando-se as lipases CAL-B (*Candida antarctica* B), AY “Amano” 30 (*C. rugosa*), AK “Amano” 20 (*Pseudomonas fluorescens*), PS “Amano” SD (*Burkholderia cepacia*), PPL (pâncreas de porco) e LTEB 11 (*B. cepacia*). Acetato de vinila foi

utilizado como fonte de acetato em três solventes orgânicos diferentes (TBME, hexano e THF) (Esquema 5).



**Esquema 5:** Resolução cinética enzimática do racemato *syn*-3 empregando-se diferentes lipases, solventes e tempos de reação.

Os resultados obtidos com CAL-B não foram satisfatórios, uma vez que apresentaram baixa enantioseletividade, sendo que o melhor resultado foi obtido na resolução de 24 horas em THF, na qual foi encontrado 43,6 % de excesso enantiomérico para o álcool remanescente e 60,8 % para o acetato formado. As resoluções empregando AY “Amano” 30, PPL e LTEB 11 apresentaram taxas de conversão abaixo de 5 % em ambos os solventes, em tempos de reação de até nove dias.

Os ensaios em que foi utilizada a lipase PS “Amano” SD (Tabela 4) resultaram em excelentes excessos enantioméricos do acetato formado (até 99 %), e conseqüentemente em valores de *E* igualmente satisfatórios. Cabe salientar a resolução em que foi utilizado éter *t*-butilmetílico como solvente, na qual o produto acetilado foi obtido em 98,6 % de excesso enantiomérico (*ee*), com taxa de conversão *c* = 39,9 % e *E* > 200. Nos ensaios realizados com AK “Amano” 20 foram observados excelentes excessos enantioméricos para o álcool remanescente (até 99 %), assim como excelentes valores de *E*.

**Tabela 4:** Resolução cinética do álcool *syn-3* empregando "Amano"SD ou AK "Amano" 20 e diferentes solventes orgânicos e tempos de reação.

Lipase	Solvente	Tempo (h)	$ee_s^a$ (%)	$ee_p^a$ (%)	$c^b$ (%)	$E^c$
<b>PS "Amano" SD</b>	<b>Hexano</b>	<b>24</b>	24,6	98,8	19,9	>200
<i>Burkholderia cepacia</i>	<b>THF</b>	<b>24</b>	51,9	95,2	35,3	68
(Amano, Japão)	<b>TBME</b>	<b>24</b>	65,4	98,6	39,9	>200
	<b>Ac. de vinila</b>	<b>24</b>	12,5	94,0	11,7	37
<b>AK "Amano" 20</b>	<b>Hexano</b>	<b>24</b>	44,0	95,7	31,5	71
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>THF</b>	<b>24</b>	99,9	80,0	55,5	65
(Amano, Japão)	<b>TBME</b>	<b>24</b>	99,9	66,8	59,9	36
	<b>Ac. de vinila</b>	<b>24</b>	99,9	82,5	54,8	82

Condições: 37 °C, 200 rpm, álcool *syn-3* (30 µL, 0,17 mmol), solvente orgânico (1 mL), acetato de vinila (60 µL, 0,65 mmol), enzima (40 mg);

<sup>a</sup>  $ee =$  excesso enantiomérico ( $s$ =substrato,  $p$ =produto) – calculado através da comparação das áreas dos respectivos enantiômeros no cromatograma obtido por GC através da seguinte fórmula:  $ee_x = 100 \times (A_M - A_m) / (A_M + A_m)$ , onde  $A_M =$  área do enantiômero majoritário e  $A_m =$  área do enantiômero minoritário

<sup>b</sup>  $c$  (conversão) =  $[ee_s / (ee_s + ee_p)] \times 100$

<sup>c</sup>  $E = \{ \ln[ee_p \times (1 - ee_s) / (ee_p + ee_s)] / \ln[ee_p \times (1 + ee_s) / (ee_p + ee_s)] \}$

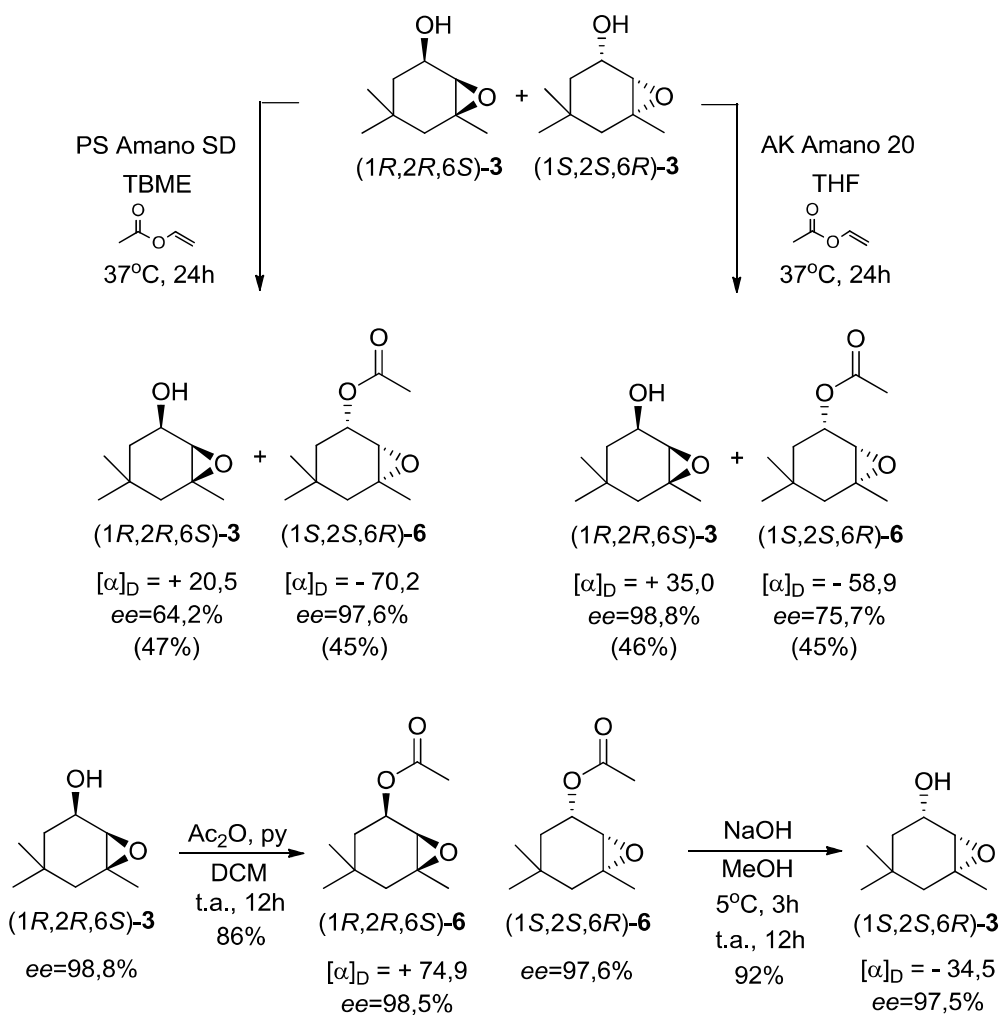
Os compostos **(1R,2R,6S)-3** e **(1S,2S,6R)-3** já foram descritos na literatura como produtos de testes de reatividade do isoforol (**5**) ou da epóxi-isoforona (**1**) frente a diversos catalisadores ou auxiliares quirais. Entretanto, o único estereoisômero que possui dados referentes à sua rotação ótica é o **(1S,2S,6R)-3**, com  $[\alpha]_D^{24} = -18.8$  ( $c = 0,86$ ;  $CHCl_3$ ,  $ee = 38\%$ ), com configuração absoluta determinada a partir de análises em RMN do respectivo derivativo de Mosher<sup>[58]</sup>. Os acetatos **(1R,2R,6S)-5** e **(1S,2S,6R)-6** são inéditos em sua forma enantiopura e, portanto, ainda não há dados na literatura referentes aos respectivos desvios óticos. Desta maneira, foram desenvolvidas metodologias para obtenção de amostras com elevados valores de  $ee$  dos compostos **(1R,2R,6S)-3**, **(1S,2S,6R)-3**, **(1R,2R,6S)-6** e **(1S,2S,6R)-6**.

Primeiramente foram realizadas medidas de  $[\alpha]_D$  dos produtos oriundos das resoluções enzimáticas em escala preparativa, após purificação em coluna flash. Para o

álcool remanescente na resolução foi encontrado um  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +35,0$  (*ee* 98,8 %), revelando que o álcool remanescente em ambas as resoluções enzimáticas (PS "Amano"SD em TBME e AK "Amano"20 em THF) refere-se ao enantiômero do composto que possui valor de desvio ótico descrito anteriormente por Lattanzi e colaboradores<sup>[58]</sup>. Desta forma pode se concluir que o álcool remanescente nestas reações é o **(1R,2R,6S)-3**.

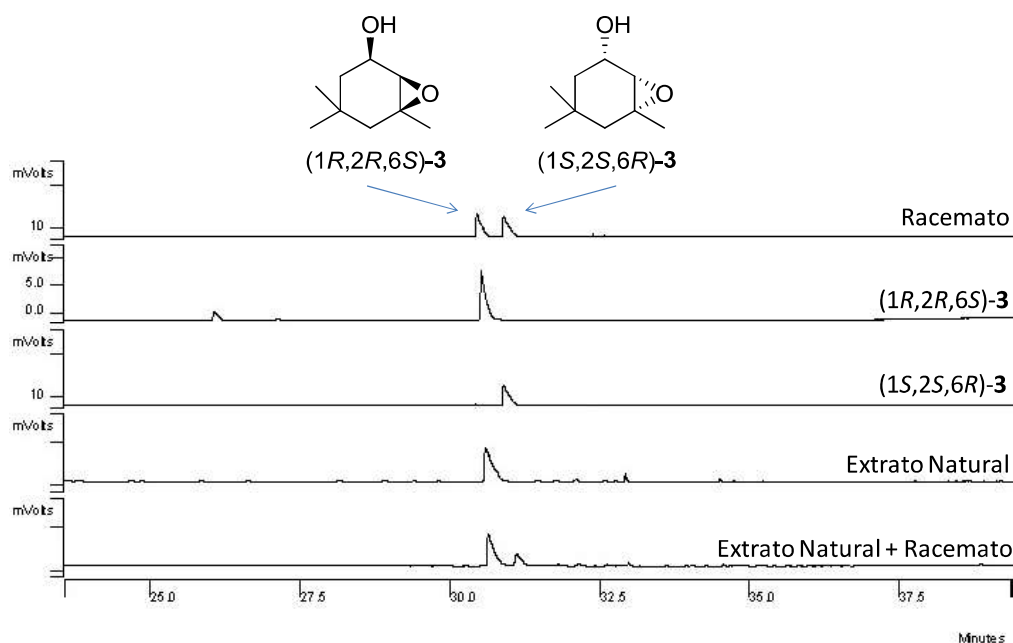
As análises de desvio ótico do acetato formado nas resoluções enzimáticas (**(1S,2S,6R)-6**) demonstraram que este possui  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -70,2$  (*ee* 97,6 %, *c*=0,86). A partir da acetilação do álcool **(1R,2R,6S)-3** (remanescente na resolução enzimática com AK "Amano"20) com anidrido acético e piridina<sup>[42, 59]</sup>, foi obtido o acetato **(1R,2R,6S)-6** em 86 % de rendimento e 98,5 % de *ee* (Esquema 6). Após purificação em coluna *flash*, o **(1R,2R,6S)-6** apresentou um  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +74,9$  (*ee* 98,5 %, *c*=0,86).

O álcool **(1S,2S,6R)-3** foi sintetizado a partir do acetato **(1S,2S,6R)-6**, obtido pela resolução do álcool *syn-3* com PS "Amano" SD em TBME. Desta maneira, foi realizada uma hidrólise básica do acetato **(1S,2S,6R)-6**, utilizando NaOH e MeOH, com 92 % de rendimento (Esquema 6). Após purificação em coluna *flash*, o **(1S,2S,6R)-3** apresentou um  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -34,5$  (*ee* 97,5 %, *c*=0,86).



**Esquema 6:** Síntese enantioselectiva do homalinol (**3**) e do respectivo acetato (**6**), em escala preparativa.

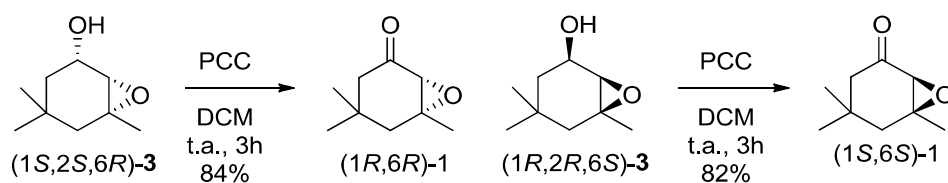
A Figura 21 mostra cromatogramas obtidos em GC operando com fase estacionária quiral. Pode-se observar no cromatogramas a diferença no tempo de retenção dos enantiômeros (1*R*,2*R*,6*S*)-**3** e (1*S*,2*S*,6*R*)-**3**, sendo o primeiro diretamente obtido via resolução enzimática e o último através da hidrólise do acetato gerado na resolução. Ainda observando a Figura 21, percebe-se que o feromônio natural ocorre na forma de um único enantiômero da estrutura do *syn*-**3** e que dentre os dois enantiômeros, o composto natural coelui com o (1*R*,2*R*,6*S*)-**3**. A partir destas observações, é possível concluir que o componente majoritário do feromônio de agregação produzido pelos machos da espécie *H. depressus* é o (1*R*,2*R*,6*S*)-4,4,6-trimetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-ol ((1*R*,2*R*,6*S*)-**3**).



**Figura 21:** Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros do homalinol-3 e sua comparação com o componente majoritário do feromônio de agregação de *H. depressus*.

#### 1.4.7 Determinação da configuração absoluta da epóxi-isoforona – Componente Natural (1)

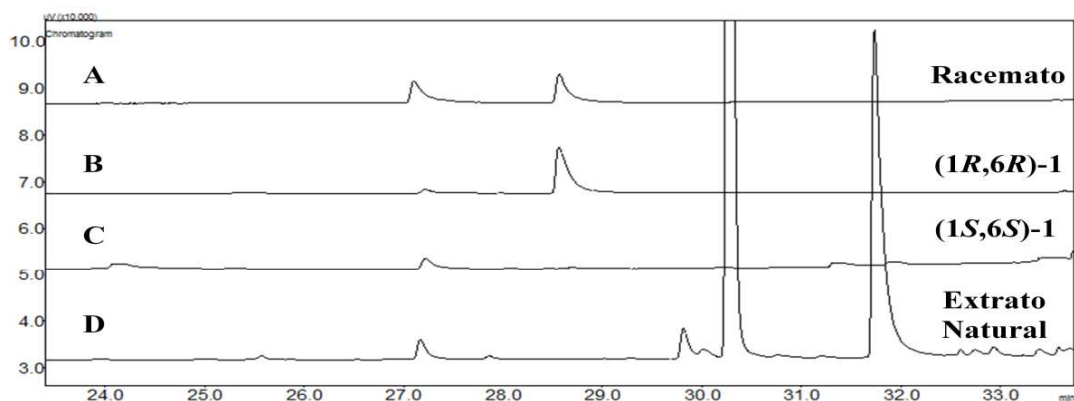
O estudo da configuração absoluta da epóxi-isoforona (**1**) produzida por *H. depressus* foi iniciado através da oxidação da hidroxila dos alcoóis (**1S,2S,6R**)-3 e (**1R,2R,6S**)-3 previamente preparados, empregando clorocromato de piridínio em diclorometano. Os compostos (**1R,6R**)-1 e (**1S,6S**)-1 foram obtidos em 84 e 82 % de rendimento respectivamente, conforme ilustra o Esquema 7.



**Esquema 7:** Preparação dos compostos (**1R,6R**)-1 e (**1S,6S**)-1.

Através do desenvolvimento de um método cromatográfico em GC com fase estacionária quiral ( $\beta$ -DEX), foi possível realizar a resolução dos enantiômeros

obtidos, e desta forma comparar os respectivos tempos de retenção com o do enantiômero natural e com o respectivo racemato (Figura 22).



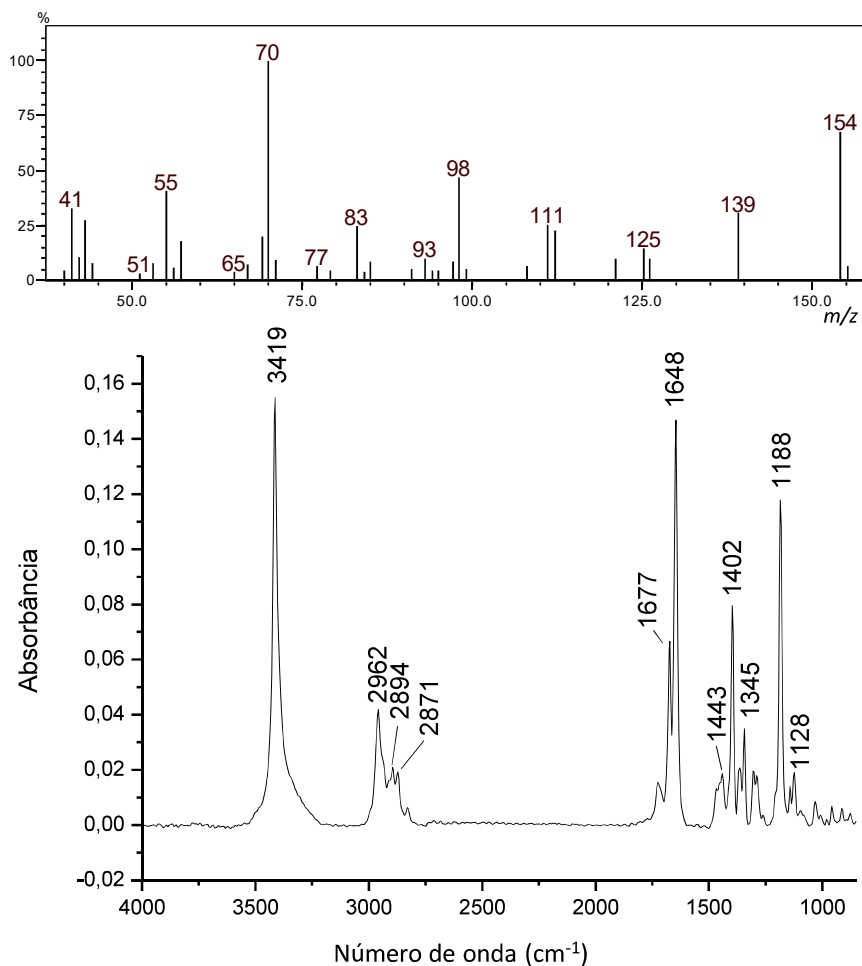
**Figura 22:** Comparação dos tempos de retenção em GC quiral dos estereoisômeros da epóxi-isoforona-**1** e sua comparação com o componente natural do feromônio de agregação de *H. depressus*. **A:** separação cromatográfica do racemato da epóxi-isoforona (**1**); **B:** (**1R,6R**)-**1**, obtido pela resolução oxidação do álcool (**1S,2S,6R**)-**3**; **C:** (**1S,6S**)-**1**, obtido pela resolução oxidação do álcool (**1R,2R,6S**)-**3**; **D:** Extrato de aeração de machos de *H. depressus*.

A análise dos resultados apresentados nos cromatogramas da Figura 22 permite concluir que o componente **1** é produzido por *H. depressus* com a configuração (**1S,6S**), com o grupamento epóxi, tendo a mesma orientação do grupamento epóxi do componente majoritário (**1R,2R,6S**)-**3**, conforme esperado devido à grande probabilidade de ambos os compostos possuírem o mesmo caminho biossintético.

#### 1.4.8 Identificação estrutural do componente natural (**4**)

O espectro de infravermelho referente ao composto natural **4** (Figura 23) apresenta uma banda intensa em  $3415\text{ cm}^{-1}$  referente à presença de uma hidroxila, cujo hidrogênio encontra-se ligado em ponte (intramolecular) ou impedido estericamente de realizar troca. Observa-se também uma banda em  $1645\text{ cm}^{-1}$ , referente à presença de uma cetona. Em  $1674\text{ cm}^{-1}$  aparece uma banda de estiramento da ligação C=C. Entretanto, não é observada a presença de bandas referentes à hidrogênios ligados a carbonos  $sp^2$ , sugerindo uma ligação dupla tetrasubstituída.

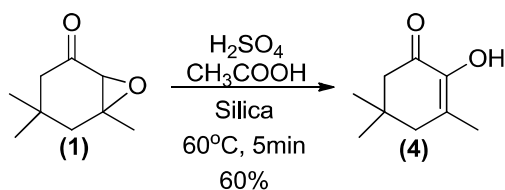




**Figura 23:** Espectro de massas e no infravermelho referentes ao composto **4** (natural).

O espectro de massas obtido para o composto **4** apresenta um possível pico do íon molecular em  $m/z$  154 e pico base em  $m/z$  70, com demais fragmentos indicando similaridade à estrutura dos demais compostos identificados (Figura 23). Os dados obtidos mostraram-se muito semelhantes ao descrito para 2-hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona.

Desta maneira, conforme ilustra o Esquema 8, o diosfenol **4** foi sintetizado a partir da epóxi-isoforona (**1**), em 60 % de rendimento<sup>[48]</sup>. O composto sintético apresentou o mesmo índice de retenção, e espectros de massas e no infravermelho muito próximos dos encontrados para o composto natural, confirmando a estrutura deste como sendo 2-hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona (**4**).



**Esquema 8:** Preparação do diosfenol **4**.

A estrutura do composto **4** foi descrita anteriormente como constituinte de açafrão (obtido de *Crocus sativus*)<sup>[60]</sup> e diversos tipos de mel<sup>[61-64]</sup>. Entretanto, esta é a primeira descrição como produto natural produzido por insetos.

#### 1.4.9 Bioensaios em laboratório envolvendo amostras sintéticas do feromônio de *Homaliothus depressus*

Com o objetivo determinar o efeito da presença do componente feromonal majoritário sintético nas respostas comportamentais de machos e fêmeas de *H. depressus*, foram realizados bioensaios em olfatômetro tipo Y, em que os insetos foram submetidos à mistura de todos os estereoisômeros do homalinol **3**, assim como ao racemato dos compostos *syn-3* e *anti-3*.

A mistura de todos os estereoisômeros do componente majoritário (**3**) (Tabela 5, F), assim como os racematos *anti-3* e *syn-3* (Tabela 5, D e E) mostraram-se atrativos para machos. Por outro lado, fêmeas apresentaram atratividade frente ao racemato *syn-3* (Tabela 5, A).

Os resultados obtidos nestes ensaios demonstram que ambos estereoisômeros do componente majoritário do feromônio produzido por *H. depressus* mostraram-se atrativos para machos enquanto apenas os estereoisômeros *syn* foram atrativos para fêmeas da espécie. Entretanto, futuros bioensaios fazem-se necessários, com o intuito de verificar o comportamento dos insetos frente aos demais componentes feromonais, em suas formas enantiomericamente puras ou como racematos. Futuros ensaios poderão também verificar um possível efeito sinérgico entre os componentes feromonais e os voláteis presentes na dieta natural, como observado em outros exemplos de espécies da família Curculionidae<sup>[65-67]</sup>.

**Tabela 5:** Número de fêmeas e machos de *Homalinotus depressus* atraídos para diferentes fontes de odor, em olfatômetro em Y.

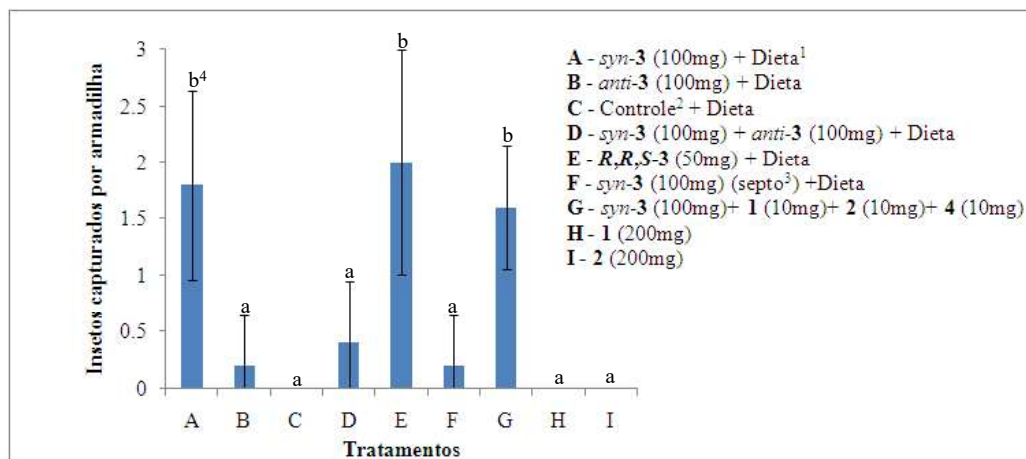
Ensaio	Sexo	Estímulos	N total <sup>1</sup>	N resposta <sup>2</sup>	Controle <sup>3</sup>	Tratamento <sup>4</sup>
A	Fêmeas	<i>syn-3</i> x hexano	39	30	9 (30 %) b <sup>5</sup>	21 (70 %) a
B	Fêmeas	<i>anti-3</i> x hexano	39	30	16 (53 %) a	14 (47 %) a
C	Fêmeas	<i>syn + anti-3</i> x hexano	36	30	14 (47 %) a	16 (53 %) a
D	Machos	<i>syn-3</i> x hexano	37	30	7 (23 %) b	23 (77 %) a
E	Machos	<i>anti-3</i> x hexano	38	30	8 (27 %) b	22 (73 %) a
F	Machos	<i>syn + anti-3</i> x hexano	31	30	10 (33 %) b	20 (67 %) a

<sup>1</sup> Número total de insetos utilizados no bioensaio. <sup>2</sup> Número de insetos que responderam ao bioensaio, dentre o total utilizado. <sup>3</sup> Hexano foi utilizado como controle. <sup>4</sup> Soluções preparadas com os compostos de interesse em hexano. <sup>5</sup> Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente (Qui-quadrado, p<0,05).

#### 1.4.10 Bioensaios de captura em campo

O gráfico ilustrado na Figura 24 contém os resultados referentes à média do número de insetos capturados por armadilha em cada um dos tratamentos testados. Os tratamentos C, H e I não capturaram insetos em nenhum momento do teste, enquanto que os ensaios B, D e F capturaram insetos, mas sem diferir estatisticamente dos tratamentos em que não houve captura. Os tratamentos A, E e G não diferiram estatisticamente entre si, sendo estatisticamente mais atrativos quando comparados aos demais tratamentos.

Estes resultados mostram que o tanto o racemato do composto majoritário (*syn-3*) (A) quanto o enantiômero puro (*R,R,S*)-**3** (E) ou a mistura contendo os quatro compostos macho específicos (G), foram capazes de atrair *H. depressus* em campo. Entretanto, o número total de insetos capturados em cada tratamento não foi satisfatório para uma possível aplicação do feromônio como controle, fazendo-se necessários novos experimentos.



**Figura 24:** Média de insetos capturados por armadilha nos diferentes tratamentos. <sup>1</sup> Foi utilizado um pedaço de cana-de-açúcar de aproximadamente 10cm no interior de cada armadilha. <sup>2</sup> O tratamento indicado como controle utilizou como isca apenas o sachê plástico, sem a presença de componentes feromonais. <sup>3</sup> Foi realizado um teste em que o sachê foi substituído por um septo de borracha. <sup>4</sup> letras diferentes indicam diferença estatística, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey ( $p < 0,01$ , exceto para A-D, B-G e F-G nos quais  $p < 0,05$ ).

Três observações importantes devem ser destacadas. A primeira é o fato de que em algumas armadilhas, no momento da troca da dieta natural, foi observado que a cana-de-açúcar que estava dentro da garrafa continha sinais de alimentação de *H. depressus*, mesmo não havendo insetos dentro da armadilha, indicando que o tipo de armadilha deve sofrer adaptações buscando evitar fuga de insetos capturados.

A segunda observação é que os insetos que foram capturados no teste caíram nas armadilhas apenas nas primeiras 48 horas. Este fato pode indicar dois problemas diferentes que necessitam ser evitados em testes futuros. Um possível problema seria a baixa quantidade de feromônio no interior dos sachês, fazendo com que após o segundo dia, com alta taxa de evaporação devido às altas temperaturas na região de

Mojú, todo o feromônio tenha evaporado; ou ainda que o sol e/ou o calor pode ter acelerado o processo de degradação dos componentes do feromônio, tornando-o ineficiente na atratividade ou até mesmo repelente aos insetos.

A terceira observação refere-se à população de insetos presente na área da realização do teste. A equipe técnica da fazenda realiza mensalmente uma contagem populacional de *H. depressus* por amostragem. No mês de realização do teste, foram encontrados 5 insetos em 20 plantas avaliadas em todo o lote, podendo ser este um dos motivos pela baixa captura, uma vez que em períodos de forte infestação este número chega a ser quatro vezes maior.

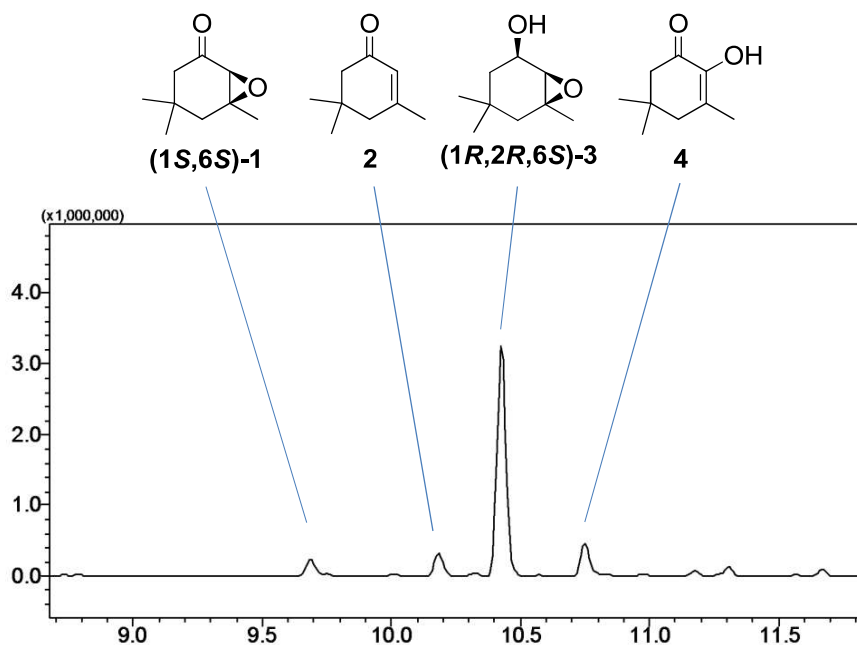
## 1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível estabelecer uma metodologia de extração e análise dos voláteis liberados por *Homalinotus depressus* por GC-MS e GC-FTIR, que possibilitou os estudos do perfil cromatográfico dos compostos naturais, assim como a obtenção dos respectivos espectros de massas e no infravermelho de quatro componentes macho-específicos. De posse destes resultados, foi possível determinar a estrutura química dos compostos: **1**- epóxi-isoforona; **2**- isoforona; **3**- homalinol e **4**- 2-hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona

Foram também desenvolvidas metodologias sintéticas eficientes para a obtenção dos estereoisômeros do componente majoritário do feromônio de agregação de *H. depressus* (**3**) de forma diastereoseletiva e enantioseletiva. Nas sínteses diastereoseletivas foi possível obter amostras com alto excesso diastereoisomérico dos compostos *syn*-**3** e *anti*-**3**. Através da abordagem biocatalítica, pelo uso de diferentes lipases foi possível determinar maneiras eficientes em termos de rendimento químico e pureza enantiomérica para a obtenção dos dois possíveis estereoisômeros do composto *syn*-**3** ((**1R,2R,6S**)-**3** e (**1S,2S,6R**)-**3**). Como resultado imediato, a síntese dos compostos (**1R,2R,6S**)-**3** e (**1S,2S,6R**)-**3** permitiu a determinação da configuração absoluta do componente majoritário do feromônio de agregação de *Homalinotus depressus* como sendo (**1R,2R,6S**)-**3**.

Através da oxidação dos alcoóis (**1R,2R,6S**)-**3** e (**1S,2S,6R**)-**3**, seguido de análises em GC em fase estacionária quiral, foi possível determinar também a estereoquímica do componente natural **1**, como (**1S,6S**)-**1**. Desta forma, pode-se observar na Figura 25 um resumo das estruturas identificadas como feromônio de agregação em *Homalinotus depressus*.

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios de laboratório e em campo, pode-se concluir que o componente majoritário em sua forma racêmica ou enantiomericamente enriquecida, sozinho ou acompanhado dos demais componentes, é ativo para captura de *H. depressus*. Entretanto, devido à baixa captura e detecção de possíveis problemas técnicos, será necessário realizar novos testes de campo, com modificações na formulação das iscas, quantidade de feromônio nas mesmas e tipo de armadilha empregada.



**Figura 25:** Compostos macho-específicos liberados por *Homalinotus depressus*.

Uma perspectiva futura é a realização de estudos relacionados à biossíntese dos compostos **1-4**, inicialmente com o objetivo de verificar se os compostos **1**, **3** e **4** são biossintetizados a partir da isoformona (**2**), através da aplicação de isoformona-2,4,4,6,6- $d_5$  na alimentação de machos de *H. depressus* e em regiões específicas do corpo do inseto.

## **CAPÍTULO II**

**Identificação, síntese e biossíntese de nitrilas voláteis produzidas por cepas das bactérias *Pseudomonas veronii* e *Micromonospora echinospora***



## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 Compostos voláteis liberados por bactérias

Compostos voláteis desempenham um papel fundamental na organização das diversas formas de vida e suas respectivas interações inter e intraespecíficas em nosso planeta. As funções desempenhadas por estes voláteis são diversas, assim como suas fontes, incluindo plantas, humanos, animais e bactérias, entre outros. A espécie humana explora a produção natural de voláteis em seu favor há muitos anos, como na produção de queijos e vinhos.

Ainda que aromas e odores produzidos por bactérias relacionados à produção de alimentos têm sido extensivamente estudados, a capacidade de produção de voláteis por micro-organismos em geral não é explorada extensivamente<sup>[68-69]</sup>. Entretanto, a pesquisa na área apresenta crescimento nos últimos 20 anos<sup>[70]</sup>. Bactérias são capazes de produzir combinações de voláteis com uma grande diversidade estrutural, dependendo de sua identidade taxonômica e seu estágio de crescimento, assim como do meio de cultura em que crescem. Em Streptomicetos, por exemplo, existem espécies em que foram detectados mais de 80 compostos voláteis em seu *bouquet*<sup>[71]</sup>.

Voláteis de diversas bactérias possuem a propriedade de inibir o crescimento de fungos entomopatogênicos e micorrízicos, induzir deformações em fungos fitopatogênicos e de importância médica, assim como servir de sinais químicos para diversos animais, além de induzir resistência a patógenos bacterianos em plantas<sup>[72-79]</sup>. A variedade estrutural de voláteis liberados por bactérias já descritos é bastante diversa e inclui derivados de ácidos graxos, compostos aromáticos, nitrogenados, sulfurados, terpenóides e, ainda que minoritariamente, compostos halogenados, compostos contendo selênio e telúrio além de compostos orgânicos ligados a metais e semimetais. Estes voláteis contribuem para a diversidade de odores e aromas encontrados no meio ambiente, sendo que, recentemente evidências de que estes compostos também induzem uma grande variedade de mudanças fisiológicas em outros organismos, como plantas e micro-organismos, têm crescido<sup>[80-82]</sup>.

Voláteis de bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Bacillus*, por exemplo, são capazes de inibir o crescimento de várias espécies de fungos e da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, enquanto que voláteis oriundos de bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem o mesmo efeito, porém em menor proporção. Por outro lado,

algumas espécies mostram-se resistentes a estes efeitos, como o fungo *Aspergillus niger* e espécies do gênero *Fusarium*. Outro efeito observado é indução de crescimento, como ocorre com fungo entomopatogênico *Rhizoctonia solani* e com *A. thaliana*, quanto expostos a voláteis de *Burkholderia cepacia* e *Staphylococcus epidermidis*. Esta variedade de efeitos demonstra que voláteis oriundos de bactérias fornecem uma nova fonte de compostos com efeitos antibióticos e de promoção de crescimento<sup>[80]</sup>.

Algumas moléculas têm sido sugeridas como contribuintes para os efeitos no crescimento de plantas, como 2,3-butanodiol<sup>[79, 83]</sup>, dimetilhexadecilamina<sup>[84]</sup>, 2-pentilfurano<sup>[85]</sup>, ou indol<sup>[86]</sup>, enquanto amônia, disulfeto de dimetila<sup>[82]</sup> e cianeto de hidrogênio<sup>[87]</sup> parecem contribuir parcialmente à morte de plantas mediada por voláteis.

Avanços recentes têm demonstrado que o uso de infoquímicos na comunicação entre diferentes indivíduos ocorre não apenas na atmosfera, mas também no interior do solo. Desde a descoberta de que organismos e partes de plantas que crescem no interior do solo são capazes de sintetizar, excretar e perceber voláteis, observou-se grande aumento no interesse em estudá-los<sup>[81]</sup>. Voláteis oriundos de raízes de plantas têm demonstrado interagir com diferentes organismos no interior do solo, como na mediação de interações entre plantas e na comunicação com micróbios, artrópodes e nematóides. De maneira semelhante, voláteis liberados por fungos podem ter importância no reconhecimento inter e intraespecífico, ou em processos de defesa. Uma vasta fonte de voláteis tem sido igualmente descoberta em bactérias presentes na rizosfera, sendo que grande parte destas substâncias são inéditas e com seus respectivos papéis biológicos ainda desconhecidos<sup>[81]</sup>.

O volátil oriundo de bactérias do solo mais amplamente conhecido é a geosmina, que é responsável pelo “cheiro de terra molhada”, que ocorre tipicamente após chuvas sobre o solo seco em dias muito quentes e também por odores desagradáveis (*off-flavors*) em comida, vinho e água contaminados. A geosmina é majoritariamente produzida por Streptomicetos e também por cianobactérias, mixobactérias, plantas Hepáticas e fungos aquáticos, de solo ou aéreos.

Espécies do filo Actinobacteria, conhecidas como actinobactérias ou actinomicetos, são uma fonte de metabólitos secundários, incluindo compostos que possuem atividade biofarmacêutica comprovada.<sup>[88]</sup> Uma característica importante da

pesquisa em micro-organismos é o fato de diferentes linhagens pertencentes a uma mesma espécie produzirem diferentes metabólitos secundários, enquanto que linhagens pertencentes a diferentes espécies podem produzir os mesmos compostos<sup>[89-90]</sup>.

Dentre os metabólitos secundários identificados em actinobactérias, a grande maioria é oriunda de espécies do gênero *Streptomyces*. Recentemente, voláteis de uma linhagem de *Streptomyces sp.* (FORM5) foram estudados, com o objetivo de avaliar a presença de precursores voláteis utilizados na produção de metabólitos secundários nestas bactérias<sup>[91]</sup>. Como resultado, foram identificados mais de 40 compostos diferentes liberados pela cultura bacteriana, sendo que dentre estes, quatro componentes possuem estruturas químicas inéditas e contendo anéis piridínicos, muito raros até o momento em bactérias, recebendo o nome de Streptopiridinas<sup>[91]</sup>.

Diversas espécies de bactérias possuem a capacidade de realizar comunicação intra-específica comprovada. Esta comunicação célula-célula ocorre através de um mecanismo conhecido como *quorum sensing*, pelo qual a densidade populacional é controlada através de uma concentração limite de moléculas chamadas autoindutoras ou moléculas de *quorum sensing*. Diversas espécies Gram-negativas utilizam N-acil-L-homoserinalactonas como autoindutoras, sendo que a especificidade ocorre na natureza da cadeia N-acil. Bactérias Gram-positivas por sua vez utilizam peptídeos consistindo tipicamente de 5-17 aminoácidos, algumas vezes com modificações na cadeia lateral como autoindutores<sup>[11]</sup>.

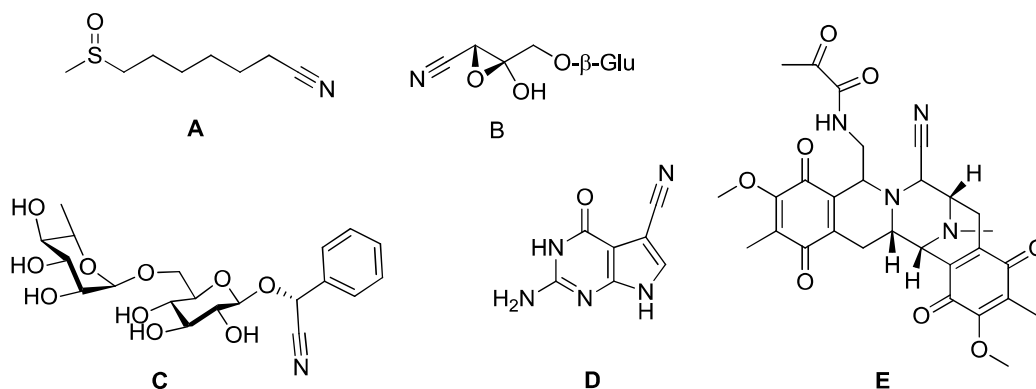
### **2.1.2 Ocorrência natural de nitrilas**

Nitrilas ocorrem com grande variedade estrutural, oriundas diferentes fontes naturais, como plantas, artrópodes e micro-organismos<sup>[92]</sup>. As estruturas identificadas variam desde alcanonitrilas simples até estruturas mais complexas como glucosídeos cianogênicos.

Em extratos de conteúdo de plantas de *Diphthocarpus strictus*, por exemplo, foi identificada a estrutura da nitrila representada na Figura 26-A, que apresenta atividade de inibição de hipoxia<sup>[93]</sup>. Outro exemplo da variedade estrutural de nitrilas naturais pode ser encontrado em *Exochorda serratifolia*, planta pertencente à família Rosaceae, espécie na qual foi identificado o composto cianogênico representado na

Figura 26-B<sup>[94]</sup>. A propriedade cianogênica deste composto é resultado da hidrólise do epóxido com subsequente liberação de cianeto.

Glucosídeos cianogênicos são a classe de nitrilas naturais mais comuns, identificados em mais de mil espécies dentre fungos, bactérias, plantas e animais. Estas moléculas são  $\beta$ -glucosídeos derivados de 2-hidróxi nitrilas cuja hidrólise química ou enzimática é capaz de liberar cianeto de hidrogênio. A função destes compostos é majoritariamente apontada como mecanismo de defesa em diversos organismos e como mecanismo de estocagem de nitrogênio<sup>[92]</sup>. A ampla ocorrência destas estruturas não implica em uma variedade estrutural muito grande, sendo todas as estruturas conhecidas derivadas de algum glucosídeo e somente seis diferentes aminoácidos: fenilalanina, tirosina, valina, isoleucina, ciclopent-2-enilglicina e ácido nicotínico. Um exemplo de glucosídeo cianogênico é o derivado da (*R*)-mandelonitrila (Figura 26-C), identificado como componente de frutos de maracujá (*Passiflora edulis*)<sup>[95]</sup>.

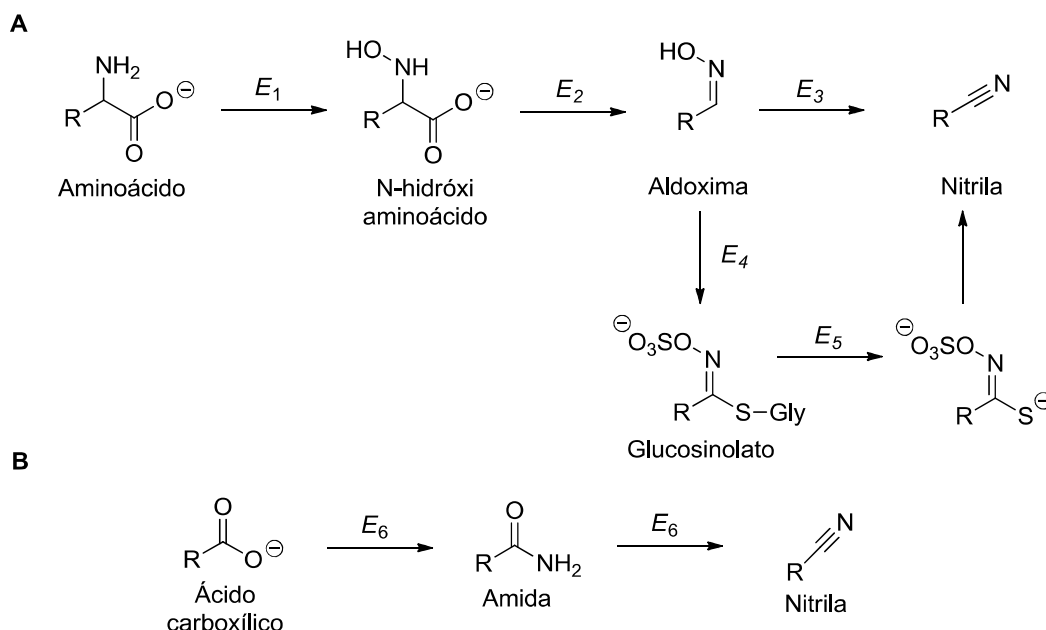


**Figura 26:** Diversidade estrutural de nitrilas de ocorrência natural.

Outra substância que demonstra a diversidade estrutural de nitrilas oriundas de fontes naturais é a nitrila  $\alpha,\beta$ -insaturada 7-ciano-7-deazaguanina (Figura 26-D), produzida por uma cepa de *Streptomyces rimosus*, que é um precursor biossintético para diferentes moléculas bioativas<sup>[96]</sup>. Outra classe de nitrilas naturais são as  $\alpha$ -amino nitrilas, cujo primeiro exemplo identificado está ilustrado na Figura 26-E, a saframicina A, que possui atividade antibiótica e antitumoral, extraída de *Streptomyces lavendulae*<sup>[97]</sup>.

### 2.1.3 Biossíntese de nitrilas

Apenas três rotas biossintéticas são propostas detalhadamente para a obtenção de nitrilas<sup>[98-99]</sup>. A primeira, proposta para diferentes micro-organismos, envolve o uso de uma molécula de aminoácido como substrato, para formação de um *N*-hidroxiaminoácido catalizada por uma hidroxilase (Esquema 9-A). A seguir, o *N*-hidroxiaminoácido é convertido em um aldoxima, através da descarboxilação catalisada por uma *N*-hidroxidescarboxilase. A nitrila é então obtida pela desidratação da aldoxima, catalisada por uma aldoxima desidratase<sup>[98]</sup>. A partir da aldoxima, seria também possível obter um glucosinolato como intermediário para a formação da nitrila pela ação de uma tioglucosídeo glucohidrolase, em uma complexa dependência de pH, co-fatores e natureza do substituinte<sup>[100]</sup>.



$E_1$ : Hidroxilase,  $E_2$ : N-Hidroxidescarboxilase,  $E_3$ :Aldoxima Desidratase,  $E_4$ : tioglucosídeo glucohidrolase,  $E_5$ : amida sintetase / nitrila sintetase

**Esquema 9:** Rotas biossintéticas descritas para obtenção de nitrilas.

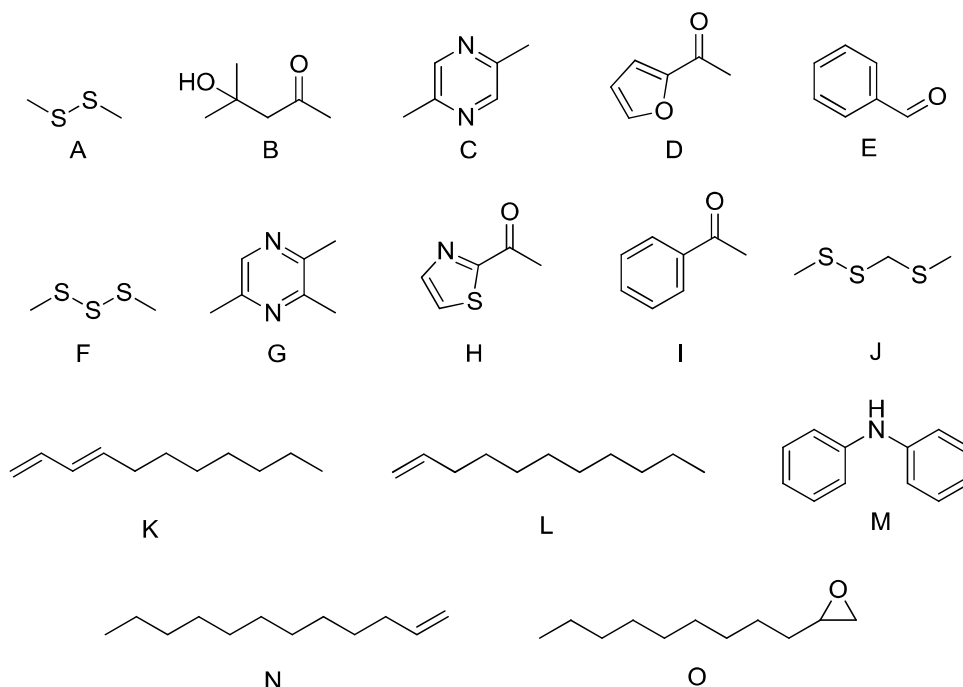
O terceiro caminho biossintético foi descrito recentemente, no estudo biossintético de 7-ciano-7-deazaguanina (Figura 26-D)<sup>[99]</sup>. O estudo demonstrou que em *Streptomyces rimosus* uma única enzima é capaz de atuar como amida sintetase, assim como nitrila sintetase, transformando um ácido carboxílico em nitrila, tendo uma amida como intermediário (Esquema 9-B).

#### 2.1.4 Estudos prévios envolvendo voláteis de *Pseudomonas veronii* R02

*Pseudomonas veronii* é uma Proteobacteria pertencente à ordem Pseudomonadales e à família Pseudomonadaceae. A espécie foi originalmente descrita em fontes de água mineral francesas<sup>[101]</sup>. Recentemente, uma coleção de 92 cepas de diferentes espécies de bactérias foi isolada da rizosfera e filosfera de plantas de batata oriundas de campo infectadas com *Phytophthora infestans* (fungo causador de requeima)<sup>[102]</sup>. Os efeitos da exposição de *P. infestans*, e outras quatro espécies de fungos e bactérias aos voláteis emitidos pelas diferentes cepas de bactérias isoladas foram avaliados.

Os voláteis de cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram os que desencadearam maior inibição no desenvolvimento de *P. infestans*. Dentre as oito cepas que causaram maior inibição, sete foram classificadas como emissoras de HCN, que é um conhecido inibidor de crescimento de fungos fitopatogênicos<sup>[103]</sup>. Por outro lado, os voláteis oriundos de *P. veronii* R02 causaram um efeito antagonístico moderado em *P. infestans*, mesmo esta espécie não emitindo HCN e amônia, sugerindo a presença de outros voláteis bioativos<sup>[102]</sup>.

Dentre as 92 cepas avaliadas inicialmente, oito foram submetidas à extração de voláteis e análises por GC-MS. Um dos compostos responsáveis pela inibição do crescimento de *P. infestans* foi caracterizado como 1-undeceno, causando inibição dose-dependente em ensaios com o composto sintético. As análises de voláteis de *P. veronii* R02 permitiram a identificação de diversos compostos já conhecidos para outras espécies de bactérias, ilustrados na Figura 27, além de um grupo de voláteis nitrogenados não identificados, mas presentes nos extratos em concentração elevada. A identificação estrutural, síntese e biossíntese destes compostos estão descritas neste trabalho e serão discutidas nos tópicos a seguir.



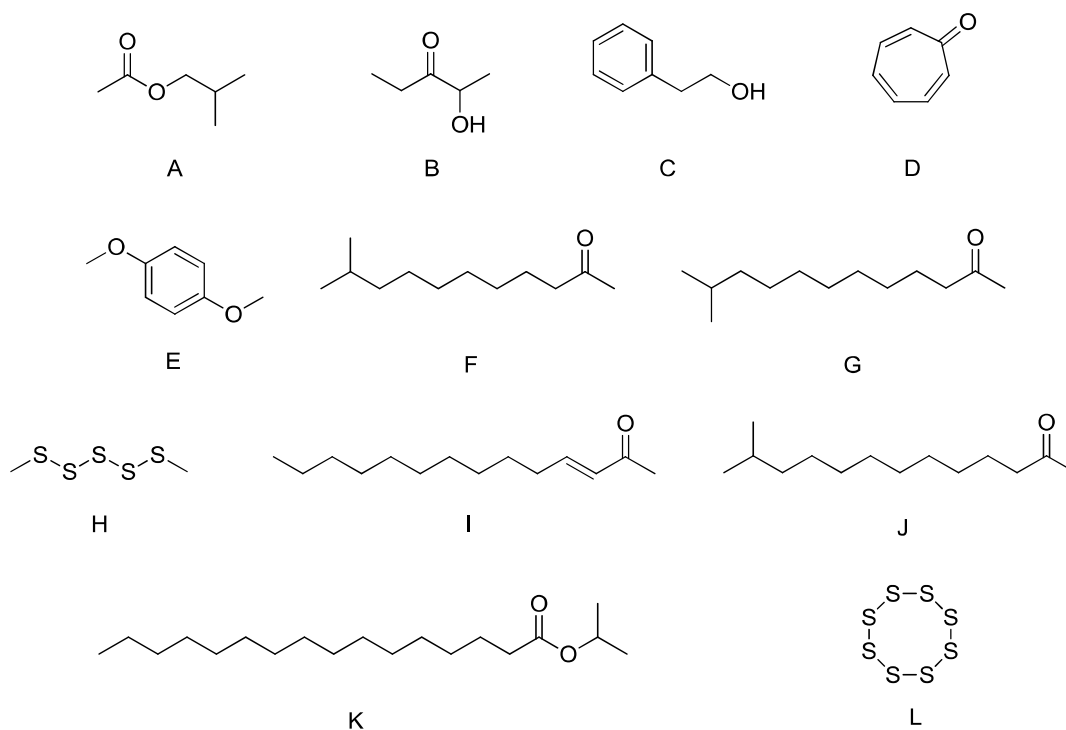
**Figura 27:** Voláteis previamente identificados em *Pseudomonas veronii* R02. **A-** disulfeto de dimetila; **B-** 4-hidróxi-4-metil-2-pentanona; **C-** 2,5-dimetilpirazina; **D-** 2-acetilfuranó; **E-** benzaldeído; **F-** trissulfeto de dimetila; **G-** trimetilpirazina; **H-** 2-acetiltiazol; **I-** acetofenona; **J-** disulfeto de metila e (metiltio)metila; **K-** 1,2-undecadiene; **L-** 1-undeceno; **M-** difenilamina; **N-** 1-dodeceno; **O-** 1,2-epóxiundecano.

### 2.1.5 Estudos prévios envolvendo voláteis de *Micromonospora echinospora* DSM43816

*Micromonospora echinospora* é uma Actinobacteria pertencente à família Micromonosporaceae, isolada do solo<sup>[104]</sup>, conhecida por produzir uma classe de antibióticos muito potentes, as calicheamicinas. A calicheamicina  $\gamma$ 1 em especial é um dos agentes antitumorais mais potentes já descritos, com grande aplicação no tratamento de leucemia<sup>[105]</sup>.

Um estudo ainda não publicado, iniciado no grupo de pesquisa do Professor Stefan Schulz na Universidade Tecnológica de Brunswick, na Alemanha, resultou na extração e detecção de mais de uma centena de compostos voláteis liberados por culturas de *M. echinospora* DSM43816. Dentre os compostos detectados, alguns se destacam por estarem presentes nos extratos em concentrações mais elevadas: acetato de isobutila, 2-hidroxipentan-3-ona, álcool fenilético, tropona, 1,4-dimetóxi-benzeno, 10-metilundecan-2-ona, 11-metil-2-dodecanona, pentasulfeto de dimetila, tetradecen-

2-ona, 12-metil-2-tridecanona, palmitato de isopropila e octatiocano (Figura 28), além de 11 compostos não identificados cujos espectros de massas sugerem a presença de nitrogênio. A identificação estrutural, síntese e biossíntese destes compostos estão descritas neste trabalho e serão discutidas nos tópicos a seguir.



**Figura 28:** Voláteis majoritários produzidos por *Micromonospora echinospora* DSM43816. **A**-acetato de isobutila; **B**- 2-hidróxi-pentan-3-ona; **C**- 2-feniletanol; **D**- tropona; **E**- 1,4-dimetóxi-benzeno; **F**- 10-metilundecan-2-ona; **G**- 11-metildodecan-2-ona; **H**- pentasulfeto de dimetila; **I**- (*E*)-tetradec-3-em-2-ona; **J**- 12-metiltridecan-2-ona; **K**- palmitato de isopropila; **L**- octatiocano.



## **2.2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

### **2.2.1 Objetivo Geral**

Identificar, sintetizar e avaliar a biossíntese de nitrilas voláteis produzidas pelas bactérias *Pseudomonas veronii* R02 e *Micromonospora echinospora* DSM43816.

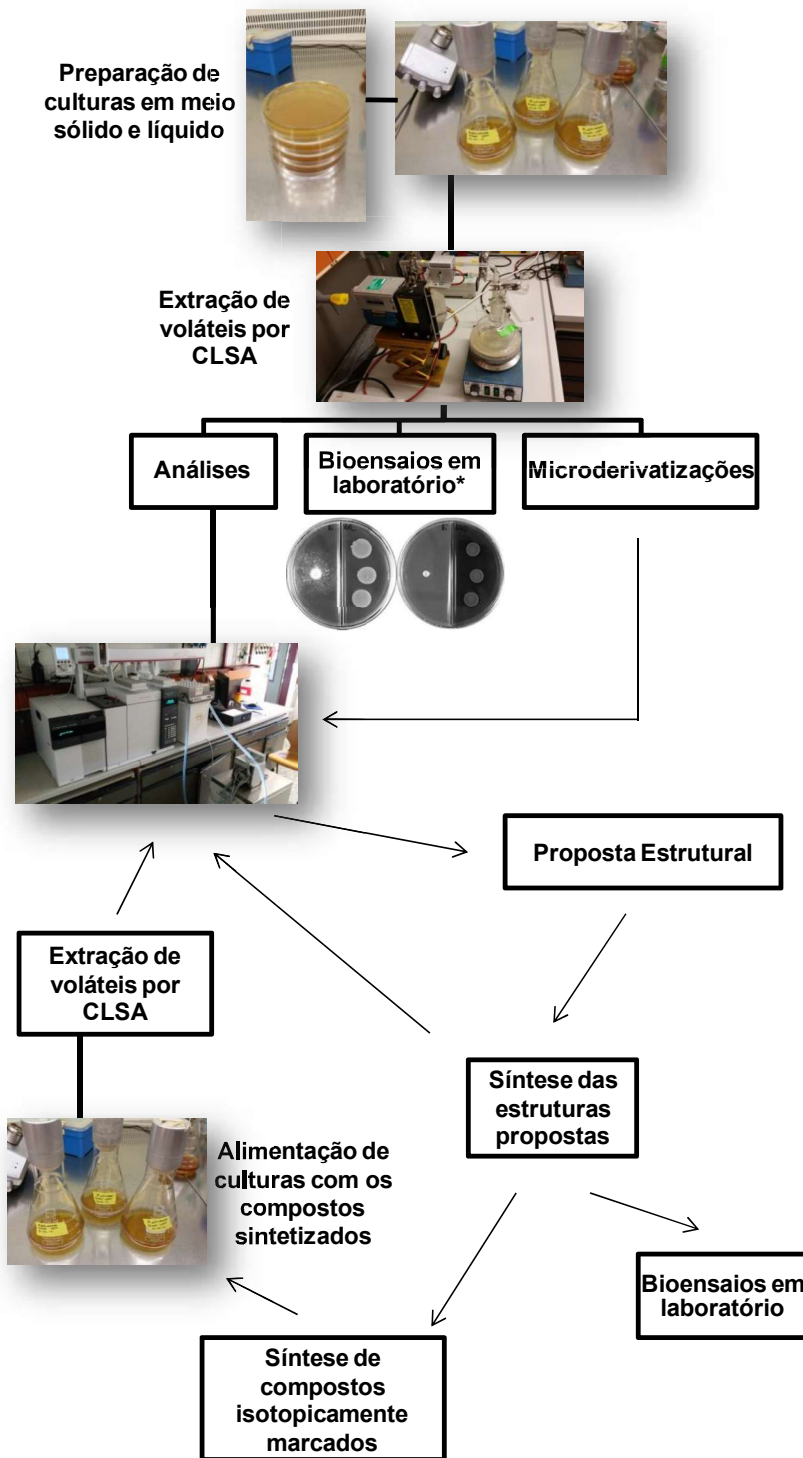
### **2.2.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer uma cultura das bactérias *Pseudomonas veronii* R02 e *Micromonospora echinospora* DSM43816.
- Realizar a extração dos voláteis emitidos pelas bactérias *Pseudomonas veronii* R02 e *Micromonospora echinospora* DSM43816.
- Analisar os extratos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Realizar eventuais análises complementares para elaborar uma proposta estrutural para os novos voláteis encontrados, através de microderivatizações.
- Confirmar as estruturas inicialmente propostas através da síntese dos compostos.
- Avaliar a produção biossintética dos voláteis de interesse, através da síntese, aplicação e extração de precursores marcados isotopicamente.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Um resumo ilustrado da metodologia utilizada no cultivo das bactérias, extração de voláteis, identificação estrutural e síntese dos compostos de interesse e bioensaios utilizados pode ser observado na Figura 29. Os experimentos foram iniciados com o estabelecimento de culturas das bactérias alvo do estudo, visando a extração de voláteis. Os extratos obtidos foram utilizados em bioensaios em laboratório, evidenciando a presença de voláteis bioativos frente à outros organismos.

As análises químicas foram iniciadas através de análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, assim como pela realização de microderivatizações. Através da síntese das estruturas inicialmente propostas foi possível confirmá-las pela comparação de perfis cromatográficos e espectros de massas. A síntese das estruturas propostas permitiu também a obtenção destes compostos em maior escala, para a realização de bioensaios em laboratório para determinar a bioatividade dos padrões sintéticos frente à diferentes organismos, individualmente. O estudo da origem biossintética dos compostos de interesse foi realizado através da síntese de possíveis precursores, aplicação às culturas, extração de voláteis e análise cromatográfica.



**Figura 29:** Sequência metodológica empregada na identificação, síntese e biossíntese dos voláteis produzidos por *Pseudomonas veronii* e *Micromonospora echinospora* (Fotos: Diogo M. Vidal) (\* Trabalho realizado previamente<sup>[102]</sup>; Adaptado de Vidal, 2012<sup>[30]</sup>).

## **2.3.1 Preparo dos meios de cultura**

### **2.3.1.1 Luria-Bertami (LB)**

O meio de cultura LB líquido foi preparado pela mistura de triptona (3,00 g), extrato de levedura (1,50 g) e NaCl (3,00 g) em água (300 mL). O pH da mistura foi ajustado para 7, utilizando NaOH (10 %) e HCl (10 %). O meio de cultura sólido foi preparado a partir da mesma receita, acrescentando ágar (4,50 g).

### **2.3.1.2 GPHF**

O meio de cultura GPHF foi preparado pela mistura de glucose (4,00 g), extrato de peptona de Caseína (2,00 g), extrato de levedura (2,00 g), extrato de carne (2,00 g) e CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (296 mg) e água destilada (400 mL). O pH da mistura foi ajustado para 7,2, utilizando Ca(OH)<sub>2</sub> (10 %) e HCl (10 %). O meio de cultura sólido foi preparado a partir da mesma receita, acrescentando ágar (6,00 g).

## **2.3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultura**

### **2.3.2.1 *Pseudomonas veronii***

Uma pré-cultura líquida foi preparada a partir de uma cultura estoque de *P. veronii* R02 (25 % glicerol, armazenada a -80 °C, isolada previamente da rizosfera de plantas de batata<sup>[102]</sup>), utilizando 30 µL da cultura estoque e 6 mL do meio de cultura LB. A solução resultante foi incubada durante 24 horas a 28 °C. Após este período, 1 mL da pré-cultura foi transferido para um Erlenmeyer juntamente com 50mL do meio de cultura LB. A cultura foi incubada durante 24 horas a 28 °C, e transferida para o sistema de extração CLSA (ver seção 2.3.3, página 71). As culturas em meio sólido foram preparadas em placas de Petri contendo o meio de cultura LB sólido, a partir de 300 µL da pré-cultura.

Nos experimentos de alimentação das bactérias com possíveis precursores deuterados, a adição destes foi realizada no momento do preparo das culturas. Os padrões deuterados foram dissolvidos em acetato de etila (500 µL) e a solução resultante filtrada em filtros de PTFE (0,22 µm). Nestes experimentos foram utilizados

separadamente: ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) (10mg), hexadecanotioato- $d_{31}$  de S-(2-acetamidoetila) (**65**) (10mg) e decanotioato- $d_{19}$  de S-(2-acetamidoetila) (**67**) (10mg).

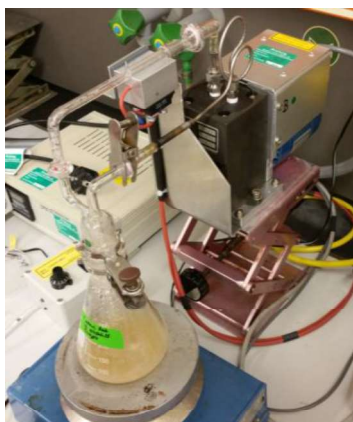
### **2.3.2.2 *Micromonospora echinospora***

Uma pré-cultura líquida foi preparada a partir de uma cultura estoque comercial de *M. echinospora* DSM43816 (25 % glicerol, armazenada a -80 °C, DSMZ, Alemanha), utilizando 50 µL da cultura estoque e 5 mL do meio de cultura GPHF. A solução resultante foi incubada durante 48 horas a 28 °C. Após este período, 1 mL da pré-cultura foi transferido para um Erlenmeyer juntamente com 50mL do meio de cultura GPHF. A cultura foi incubada durante 120 horas a 28 °C, e transferida para o aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA) (Figura 30). As culturas em meio sólido foram preparadas em placas de Petri contendo o meio de cultura GPHF sólido, a partir de 300 µL da pré-cultura.

Nos experimentos de alimentação das bactérias com possíveis precursores deuterados, a adição destes foi realizada imediatamente após o preparo das culturas. Os padrões deuterados foram dissolvidos em acetato de etila (500 µL) e a solução resultante filtrada em filtros de PTFE (0,22 µm). Nestes experimentos foram utilizados separadamente: ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) (10 mg), 13-metiltetradecanamida- $d_6$  (**78**) (5 mg), ácido 13-metiltetradecanóico- $d_6$  (**77**) (5 mg) e 13-metiltetradecanonitrila- $d_4$  (**76**) (5 mg).

### **2.3.3 Extração de voláteis por CLSA**

Os meios de cultura líquidos ou sólidos foram instalados ao aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA) (Figura 30), sob temperatura ambiente. Neste sistema, o ar é continuamente circulado durante 24 horas através uma bomba (MB-21E, Senior Flextronics, EUA), em um sistema fechado que contém a cultura líquida ou sólida e um filtro com 5 mg de carvão ativado (Precision Charcoal Filter, Chromtech GmbH, Alemanha). O filtro é lavado com diclorometano (HPLC, Merck, Alemanha) e os extratos resultantes analisados por GC-MS. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, exceto os de alimentação com precursores deuterados, que foram repetidos duas vezes.



**Figura 30:** Aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA).

### **2.3.4 Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

As análises em GC-MS dos extratos naturais foram realizadas em um espectrômetro Agilent Technologies 5977A, operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), acoplado à um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890B equipado com um sistema de injeção Gerstel MPS. As amostras foram eluídas em uma coluna capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme; Agilent Technologies, EUA), sob um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por 1 minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 5 °C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 10 minutos.

As análises em GC-MS das reações de derivatização com DMDS foram realizadas em um espectrômetro Agilent Technologies 5975, operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), acoplado à um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890A. As amostras foram eluídas em uma coluna capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme; Agilent Technologies, EUA), sob um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da coluna foi de 70 °C, mantida por 1 minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 10 °C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 15 minutos.

As análises em GC-MS dos produtos sintéticos foram realizadas em um espectrômetro HP 5973, operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70eV), acoplado à um cromatógrafo a gás HP 6890. As amostras foram eluídas em uma coluna capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme; Agilent Technologies, EUA), sob um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da

coluna foi de 50 °C, mantida por 1 minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 10 °C.min<sup>-1</sup> até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 10 minutos.

### **2.3.5 Determinação dos índices de retenção**

Os índices de retenção foram calculados de maneira análoga ao método utilizado no Capítulo I (Página 14), utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; Agilent Technologies, EUA).

### **2.3.6 Derivatizações de metilação com disulfeto de dimetila**

Preparou-se uma solução estoque de iodo em dissulfeto de carbono (2 mL; 5 %<sub>m/m</sub>). Em vial adicionou-se 10 µL de DMDS, 10 µL da solução de iodo em CS<sub>2</sub> e 10 µL do extrato natural a ser derivatizado. A mistura foi agitada sob temperatura ambiente durante 14 horas. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se solução 10 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> até que a coloração característica de iodo desaparecesse. A solução resultante foi filtrada em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e analisada por GC-MS.

### **2.3.7 Síntese dos compostos de referência**

Materiais de partida e solventes disponíveis comercialmente foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha) e utilizados sem prévia purificação. Solventes disponíveis em grau técnico foram tratados e destilados conforme descrito na literatura<sup>[37]</sup>. As reações sensíveis à umidade foram realizadas em equipamento previamente seco, sob atmosfera de nitrogênio.

As reações foram monitoradas via análise cromatográfica em camada delgada, utilizando placas cromatográficas Polygram® SIL G/UV254 (Macherey-Nagel). Revelou-se as placas cromatográficas em UV (254 nm) ou por imersão em solução aquosa de permanganato de potássio (5 %), seguido de aquecimento com pistola de ar quente. Nas separações feitas por cromatografia em coluna, utilizou-se sílica gel M60 (0.04-0.063 mm, 230- 400 mesh ASTM, Macherey-Nagel).

Os compostos de referência sintetizados foram analisados por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho. As análises por RMN foram realizadas em um espectrômetro Bruker DPX-300® (Institut für

Organische Chemie, TU Braunschweig) a 300 ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente, tendo como referencia o tetrametilsilano (TMS). As análises em GC-MS foram realizadas conforme descrito em detalhes anteriormente. As análises no infravermelho foram realizadas em um espectrômetro Bruker Tensor 27 (Diamante-ATR).

### 2.3.7.1 Procedimentos Gerais

#### 2.3.7.1.1 A - Preparação de nitrilas a partir de ácidos carboxílicos

À uma solução agitada magneticamente, contendo o ácido carboxílico (0,50 mmol), e 2,3  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  em 1,5 mL de acetonitrila, são adicionados lentamente 48  $\mu\text{L}$  de isocianato de clorosulfonila (CSI) a 0 °C. A mistura foi agitada sob t.a. durante 3 horas. Após este período, 70  $\mu\text{L}$  de trietilamina (TEA) em 0,6 mL de acetonitrila foram adicionados lentamente e a mistura foi agitada por um período adicional de 2 horas. O solvente foi evaporado sob vácuo e a mistura resultante diluída em diclorometano (20 mL), e lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  gelada (0 °C, 3x10 mL). A fase aquosa foi extraída com diclorometano (3x10 mL) e a fase orgânica combinada lavada com *brine* e seca sob  $\text{MgSO}_4$  e concentrada sob vácuo<sup>[106]</sup>.

#### 2.3.7.1.2 B - Preparação de tosilatos

Uma solução contendo piridina (1,56 mL) e o álcool correspondente (10,0 mmol) em 39 mL de clorofórmio foi agitada magneticamente em um balão de fundo redondo. A mistura foi levada a 0 °C e cloreto de tosila (12,0 mmol) foi adicionado em pequenas porções. A solução resultante foi agitada sob t.a., durante 14 horas. O meio reacional foi lavado com uma solução saturada de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e *brine*. A fase orgânica foi seca sob sulfato de magnésio e o solvente evaporado sob pressão reduzida<sup>[107]</sup>.

#### 2.3.7.1.3 C - Reações de Grignard entre tosilatos e haletos de alquila

Preparação dos reagentes de Grignard não comerciais: o reagente de Grignard foi preparado pela adição lenta do haleto (10 mmol) a uma suspensão de Mg (11 mmol; 0,270 g), previamente seco e ativado com iodo, em THF anidro (15 mL), sob t.a. e atmosfera inerte e subsequente agitação por 1 hora<sup>[107]</sup>. Nos casos em que os



reagentes de Grignard estavam disponíveis comercialmente, estes foram utilizados diretamente nas reações.

Procedimento da reação de Grignard: Uma solução contendo o tosilato (1 mmol) em THF (2 mL) anidro foi preparada e mantida a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob atmosfera inerte e agitação constante durante 20 minutos. Após este período, uma solução de  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$  em THF (0,5 mL; 3 %;  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi adicionada à mistura. Após 10 minutos de agitação a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  o reagente de Grignard previamente preparado (ou comercial) foi adicionado. A temperatura reacional foi aumentada durante um período de 2 horas até t.a. e a mistura foi agitada durante 12 horas adicionais. A reação foi finalizada pela adição lenta de solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3x20 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com brine e seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida<sup>[107]</sup>. O hidrocarboneto resultante foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash e pentano como eluente.

#### **2.3.7.1.4 D - Reação de acoplamento cruzado por metátese de olefinas**

À uma mistura contendo o hidrocarboneto correspondente (0,50mmol) e but-3-enonitrila (**37**) (1 mmol; 80,2 mg) em diclorometano (10 mL), sob atmosfera de nitrogênio e t.a., foi adicionado  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$  (0,10 mmol; 29 mg). A mistura resultante foi agitada sob t.a. durante 1 hora, seguida da adição do catalisador de Grubbs de segunda geração ((1,3-Bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(fenilmetileno)(triclohexilfosfina)rutenio, 0,04 mmol; 8 %; 34,3 mg). A reação foi mantida em refluxo durante 12 horas e finalizada pela adição de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . A fase orgânica foi separada e a fase aquosa extraída com diclorometano. A fase orgânica combinada foi lavada com *brine* e seca sob sulfato de magnésio. O solvente foi evaporado e o produto bruto purificado por cromatografia em coluna com pentano/acetato de etila 9:1 como eluente.

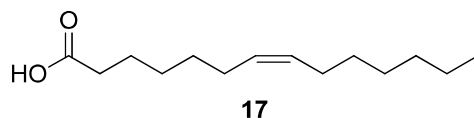
#### **2.3.7.1.5 E - Preparação de tioésteres de N-acetilcisteamina (SNAC)**

Uma solução contendo 0,05 mmol do ácido carboxílico em diclorometano (192  $\mu\text{L}$ ) foi resfriada a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. À esta solução, foram adicionados dimetilaminopiridina (DMAP; 0,010 mmol; 1,25 mg), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC; 0,06 mmol; 9,3 mg; 11,2  $\mu\text{L}$ ) e N-

acetilcisteamina (0,06 mmol; 7,21 mg; 6,4  $\mu$ L) e a mistura agitada durante 14 horas sob t.a.. A reação foi finalizada pela adição de solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mL) e extraída com diclorometano (3x5 mL). A fase orgânica combinada foi seca em sulfato de magnésio<sup>[108]</sup>.

### 2.3.7.2 Preparação do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (17)

A um balão de fundo redondo com capacidade para 10 mL, sob agitação magnética e t.a. foram adicionados o ácido tetradec-7-inóico<sup>[109]</sup> (16) (500 mg, 2,23 mmol), 20 mg (5 %<sub>m/m</sub>) de Pd em  $\text{CaCO}_3$  e 2 gotas de quinolina em 5 mL de metanol. O frasco foi submetido à atmosfera de hidrogênio (pressão atmosférica) sob t.a. durante 4 horas. A atmosfera foi substituída por nitrogênio e a solução resultante evaporada sob pressão reduzida. Acetato de etila (20 mL) foi adicionado e a mistura resultante lavada com solução aquosa de HCl (1 mol.L<sup>-1</sup>). A fase orgânica foi seca sob sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado, resultando no do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (17) em 93 % de rendimento (490 mg, 2,07 mmol)<sup>[110]</sup>.



**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 0,85-0,93 (m, 3H); 1,23-1,40 (m, 12H); 1,59-1,71 (m, 2H); 1,97-2,07 (m, 4H); 2,35 (t, 2H, J=7,6Hz); 5,28-5,42 (m, 2H) (Página 182).

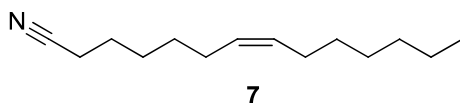
**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 14,2; 22,6; 24,6; 26,7; 27,2; 28,7; 29,0; 29,3; 29,7; 31,8; 34,0; 129,4; 130,2; 179,8 (Página 182).

**EM: *m/z* (%):** 226 ( $\text{M}^+$ , 4); 208 (14); 190 (3); 179 (3); 166 (11); 151 (7); 137 (11); 124 (18); 123 (16); 114 (13); 111 (18); 110 (21); 109 (15); 101 (12); 98 (33); 97 (41); 96 (37); 95 (31); 84 (41); 83 (50); 82 (28); 81 (31); 79 (15); 73 (20); 71 (15); 70 (27); 69 (73); 68 (26); 67 (39); 57 (18); 56 (30); 55 (100); 54 (26); 53 (12); 43 (42); 42 (14); 41 (65) (Página 183).

**IV (*v* Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 542, 726, 935, 1226, 1278, 1412, 1461, 1708, 2854, 2924, 3008 (Página 183).

### 2.3.7.3 Preparação da (Z)-tetradec-7-enonitrila (7)

A preparação da (Z)-tetradec-7-enonitrila (7) foi realizada seguindo o procedimento geral A. Quantidades utilizadas: 0,44 mmol (100 mg) do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (17), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  em 1,2 mL de acetonitrila, 43  $\mu\text{L}$  de isocianato de clorosulfonila (CSI), 62  $\mu\text{L}$  de trietilamina (TEA) em 0,5  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Rendimento: 91 %.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,89 (t, 3H, 6,89Hz); 1,25-1,52 (m, 12H); 1,61-1,73 (m, 2H); 1,96-2,10 (m, 4H); 2,34 (t, 2H, 7,09Hz); 5,20-5,50 (m, 2H) (Página 184).

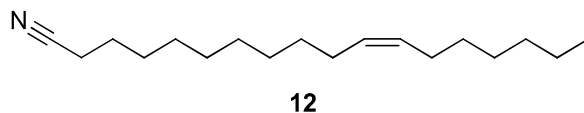
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 17,1; 22,6; 25,3; 26,8; 27,2; 28,3; 28,9; 29,00; 29,8; 31,8; 119,8; 128,9; 130,6 (Página 184).

**EM:  $m/z$  (%):** 207 ( $\text{M}^+$ , 4); 192 (5); 178 (28); 164 (32); 150 (27); 136 (76); 122 (100); 108 (19); 98 (7); 97 (20); 96 (16); 95 (12); 94 (24); 83 (21); 82 (19); 81 (19); 80 (17); 79 (13); 77 (6); 70 (16); 69 (41); 67 (26); 57 (11); 56 (23); 55 (70); 54 (23); 43 (23); 42 (12); 41 (56) (Página 185).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 720, 1457, 2245, 2855, 2925, 2953, 3007 (Página 185).

### 2.3.7.4 Preparação da (Z)-octadec-11-enonitrila (12)

A preparação da (Z)-octadec-11-enonitrila (12) foi realizada seguindo o procedimento geral A. Quantidades utilizadas: 0,53 mmol (150 mg) do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (18), 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  em 1,45 mL de acetonitrila, 51  $\mu\text{L}$  de CSI, 74  $\mu\text{L}$  de TEA em 0,6  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Rendimento: 92 %.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,89 (m, 3H); 1,20-1,52 (m, 20H); 1,59-1,73 (m, 2H); 1,96-2,07 (m, 4H); 2,33 (t, 2H, 7,06Hz); 5,23-5,44 (m, 2H) (Página 186).

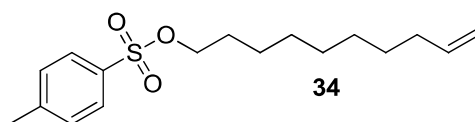
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 17,1; 22,7; 25,4; 27,2; 27,2; 28,7; 28,8; 29,0; 29,2; 29,3; 29,4; 29,7; 29,8; 31,8; 119,9; 129,8; 130,0 (Página 186).

**EM:  $m/z$  (%):** 263 ( $M^+$ , 14); 248 (3); 234 (18); 220 (26); 206 (19); 192 (18); 178 (18); 164 (22); 150 (32); 136 (70); 122 (87); 110 (22); 108 (16); 97 (41); 96 (26); 94 (14); 83 (52); 70 (36); 69 (74); 67 (30); 55 (100); 43 (34); 41 (64) (Página 187).

**IV (v Max,  $cm^{-1}$ ):** 720, 1034, 1457, 2247, 2856, 2924, 2953, 3007 (Página 187).

### 2.3.7.5 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (34)

A preparação do 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (**34**) foi realizada seguindo o procedimento geral **B**. Quantidades utilizadas: 12,82 mmol (2,0 g) do dec-9-en-1-ol (33) em 50 mL de clorofórmio, 2 mL de piridina e 2,93 g (15,38 mmol) de cloreto de tosila. Rendimento: 60 %.



**RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 1,14-1,41 (m, 10H); 1,57-1,69 (m, 2H); 1,98-2,07 (m, 2H); 2,45 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, 6,56Hz); 4,89-5,03 (m, 2H); 5,80 (ddt, 1H,  $J_1=16,91$ ;  $J_2=10,13$ ;  $J_3=6,70$ ); 7,31-7,37 (m, 2H); 7,76-7,82 (m, 2H) (Página 188).

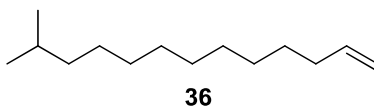
**RMN de  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 21,6; 25,3; 28,8; 28,8; 28,8; 28,9; 29,2; 33,7; 70,6; 114,2; 127,9; 129,8; 133,3; 139,1; 144,6 (Página 188).

**EM:  $m/z$  (%):** 185 (1); 173 (38); 155 (37); 138 (50); 110 (24); 109 (31); 96 (53); 95 (36); 92 (15); 91 (100); 82 (53); 81 (46); 69 (16); 68 (59); 67 (50); 65 (28); 55 (45); 54 (30); 41 (30) (Página 189).

**IV (v Max,  $cm^{-1}$ ):** 666, 915, 951, 1173, 1353, 2848, 2919, 2979, 3070 (Página 189).

### 2.3.7.6 Preparação do 12-metiltridec-1-eno (36)

A preparação do 12-metiltridec-1-eno (**36**) foi realizada seguindo o procedimento geral **C**. Quantidades utilizadas: 30mmol (4,11 g) de 1-bromo-2-metilpropano em 45 mL de THF, 0,810 g (33 mmol) de Mg, 3,00 mmol (930 mg) de 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (34) em 6 mL de THF e 1,5 mL de  $Li_2CuCl_4$  ( $0,1mol.l^{-1}$ ). Rendimento: 92 %.



**RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H, 6,60Hz); 1,11-1,40 (m, 16H); 1,44-1,59 (m, 1H); 1,99-2,10 (m, 2H); 4,92 (ddt, 1H,  $J_1=10,20Hz$ ;  $J_2=2,20$ ;  $J_3=1,29$ ); 4,99

(ddt, 1H,  $J_1=17,08\text{Hz}$ ;  $J_2=2,20$ ;  $J_3=1,52$ ); 5,81 (ddt, 1H,  $J_1=17,10\text{Hz}$ ;  $J_2=10,20$ ;  $J_3=6,66$ ) (Página 190).

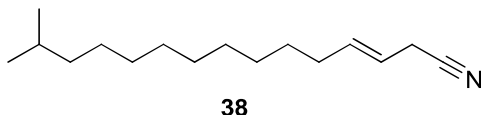
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,7; 27,4; 28,0; 29,0; 29,3; 29,5; 29,7; 29,7, 30,0; 33,8; 39,1; 114,1; 139,3 (Página 190).

**EM:  $m/z$  (%):** 196 ( $\text{M}^+$ , 6); 168 (11); 140 (13); 112 (12); 111 (31); 98 (17); 97 (58); 85 (14); 84 (33); 83 (69); 82 (16); 71 (25); 70 (46); 69 (95); 68 (16); 67 (21); 57 (86); 56 (100); 55 (86); 54 (14); 43 (72); 42 (15); 41 (19) (Página 191).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 634, 721, 908, 992, 1464, 1640, 2853, 2922, 2953, 3080 (Página 191).

### 2.3.7.7 Preparação da (*E*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (38) e (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (28)

A preparação da (*E*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (38) e (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (28) foi realizada seguindo o procedimento geral D. Quantidades utilizadas: 0,51 mmol (0,100 g) de 12-metiltridec-1-eno (36) em 10 mL de diclorometano, 1,02 mmol (80,4 mg) de but-3-enonitrila (37), 0,102 mmol (29 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,041 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (34, 6mg). Rendimento: 35 % para a mistura contendo 84 % de (*E*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (38) e 16 % de (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (28).

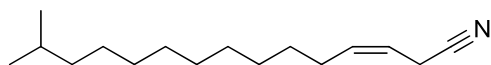


**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,67$ ); 1,10 (m, 2H); 1,23-1,30 (m, 14H); 1,33-1,41 (m, 2H); 1,44-1,58 (m, 1H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,04-3,07 (m, 2H); 5,33 (dtt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=5,55$ ;  $J_3=1,54$ ); 5,82 (dtt, 1H,  $J_1=15,28\text{Hz}$ ;  $J_2=6,80$ ;  $J_3=1,66$ ) (Página 192).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 20,4; 22,7; 27,4; 28,0; 28,8; 29,1; 29,2; 29,4; 29,6; 29,7; 29,9; 32,2; 39,0; 116,9; 117,9; 136,5 (Página 192).

**EM:  $m/z$  (%):** 235 ( $\text{M}^+$ , 2); 220 (21); 206 (13); 192 (44); 178 (28); 164 (36); 150 (40); 136 (51); 122 (52); 110 (20); 108 (22); 97 (31); 96 (21); 95 (40); 94 (26); 83 (40); 81 (49); 69 (65); 67 (45); 57 (90); 56 (61); 55 (64); 43 (100); 41 (88) (Página 193).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 720, 970, 1466, 2250, 2853, 2923, 2956, 3033 (Página 193).

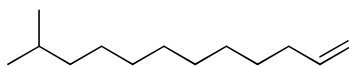


28

**EM:  $m/z$  (%):** 235 ( $M^+$ , 1); 220 (15); 206 (7); 192 (32); 178 (21); 164 (29); 150 (35); 136 (43); 122 (43); 110 (17); 108 (26); 97 (21); 96 (18); 95 (39); 94 (24); 83 (30); 81 (48); 69 (54); 67 (40); 57 (85); 56 (56); 55 (61); 43 (100); 41 (86) (Página 193).

### 2.3.7.8 Preparação do 11-metildodec-1-eno (40)

A preparação do 11-metildodec-1-eno (40) foi realizada seguindo o procedimento geral C. Quantidades utilizadas: 26,9 mmol (13,45 mL; 2 mol.L<sup>-1</sup>) de cloreto de isopropilmagnésio (39), 1,93 mmol (600 mg) de 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (34) em 15 mL de THF e 1,35 mL de Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub> (0,1 mol.L<sup>-1</sup>). Rendimento: 74 %.



40

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H, 6,65Hz); 1,09-1,19 (m, 2H); 1,21-1,32 (m, 12H); 1,32-1,44 (m, 2H); 1,44-1,59 (m, 1H); 1,99-2,08 (m, 2H); 4,92 (ddt, 1H,  $J_1=10,17$ Hz;  $J_2=2,20$ ;  $J_3=1,23$ ); 4,99 (ddt, 1H,  $J_1=17,16$ Hz;  $J_2=2,20$ ;  $J_3=1,58$ ); 5,81 (ddt, 1H,  $J_1=17,16$ Hz;  $J_2=10,17$ ;  $J_3=6,64$ ) (Página 194).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 22,7; 27,4; 28,0; 28,9; 29,2; 29,5; 29,7; 29,9; 33,9; 39,1; 114,1; 139,3 (Página 194).

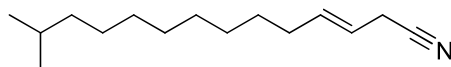
**EM:  $m/z$  (%):** 182 ( $M^+$ , 1); 168 (1); 154 (1); 138 (1); 126 (2); 111 (4); 98 (3); 97 (12); 85 (4); 84 (10); 83 (21); 82 (5); 71 (8); 70 (23); 69 (50); 68 (10); 67 (10); 57 (68); 56 (100); 55 (72); 54 (13) (Página 195).

**IV ( $\nu$  Max, cm<sup>-1</sup>):** 633, 721, 908, 992, 1089, 1463, 1640, 2853, 2924, 2953, 3078 (Página 195).

### 2.3.7.9 Preparação da (E)-13-metiltetradec-3-enonitrila (25) e (Z)-13-metiltetradec-3-enonitrila (23)

A preparação da (E)-13-metiltetradec-3-enonitrila (25) e (Z)-13-metiltetradec-3-enonitrila (23) foi realizada seguindo o procedimento geral D. Quantidades utilizadas: 0,55 mmol (0,100 g) de 11-metildodec-1-eno (40) em 10 mL de diclorometano, 1,1 mmol (86,0 mg) de but-3-enonitrila (37), 0,109 mmol (31,2 mg) de

tetraisopropóxido de titânio e 0,044 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (37,2 mg). Rendimento: 40 % para a mistura contendo 89 % de (*E*)-13-metiltetradec-3-enonitrila (**25**) e 11 % de (*Z*)-13-metiltetradec-3-enonitrila (**23**).



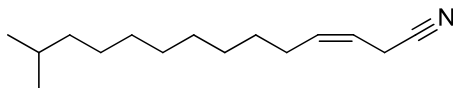
**25**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,62$ ); 1,10-1,19 (m, 2H); 1,22-1,31 (m, 14H); 1,33-1,43 (m, 2H); 1,44-1,59 (m, 1H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,04-3,07 (m, 2H); 5,33 (dt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=5,60$ ;  $J_3=1,52$ ); 5,81 (dt, 1H,  $J_1=15,32\text{Hz}$ ;  $J_2=6,80$ ;  $J_3=1,69$ ) (Página 196).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 20,4; 22,7; 27,4; 28,0; 28,9; 29,1; 29,5; 29,6; 29,9; 32,2; 39,1; 117,00; 117,9; 136,5 (Página 196).

**EM:  $m/z$  (%):** 221 ( $\text{M}^+$ , 1); 220 (3); 206 (14); 192 (10); 178 (37); 164 (24); 150 (28); 136 (36); 122 (39); 110 (14); 108 (16); 97 (23); 96 (16); 95 (30); 94 (22); 83 (33); 81 (45); 69 (64); 67 (40); 57 (82); 56 (69); 55 (57); 43 (100); 41 (83) (Página 197).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 720, 969, 1466, 2251, 2852, 2923, 2952, 3040 (Página 197).

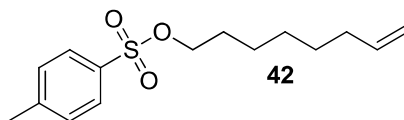


**23**

**EM:  $m/z$  (%):** 221 ( $\text{M}^+$ , 2); 220 (1); 206 (18); 192 (10); 178 (36); 164 (22); 150 (30); 136 (37); 122 (38); 110 (20); 108 (25); 97 (19); 96 (13); 95 (29); 94 (40); 83 (36); 81 (54); 69 (52); 67 (35); 57 (91); 56 (57); 55 (63); 43 (100); 41 (94) (Página 197).

### 2.3.7.10 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de oct-7-en-1-ila (**42**)

A preparação do 4-metilbenzenosulfonato de oct-7-en-1-ila (**42**) foi realizada seguindo o procedimento geral **B**. Quantidades utilizadas: 15,29 mmol (2,0 g) do oct-7-en-1-ol (**41**) em 60 mL de diclorometano, 2,5 mL de piridina e 3,57 g (18,76 mmol) de cloreto de tosila. Rendimento: 78 %.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 1,17-1,40 (m, 6H); 1,57-1,69 (m, 2H); 1,94-2,04 (m, 2H); 2,45 (s, 3H); 4,01 (t, 2H,  $6,53\text{Hz}$ ); 4,90-5,01 (m, 2H); 5,77 (ddt, 1H,  $J_1=16,93$ ;  $J_2=10,16$ ;  $J_3=6,65$ ); 7,32-7,37 (m, 2H); 7,76-7,81 (m, 2H) (Página 198).

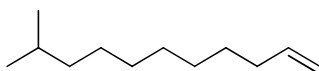
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 21,6; 25,2; 28,4; 28,6; 28,8; 33,6; 70,6; 114,4; 127,9; 129,8; 133,3; 138,8; 144,6 (Página 198).

**EM:  $m/z$  (%):** 173 (26); 155 (34); 139 (4); 110 (59); 95 (24); 92 (15); 91 (100); 82 (40); 81 (52); 69 (19); 68 (51); 67 (61); 65 (31); 55 (26); 54 (38); 41 (27) (Página 199).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 661, 811, 954, 1174, 1357, 2857, 2927, 2976, 3072 (Página 199).

### 2.3.7.11 Preparação do 10-metilundec-1-eno (**43**)

A preparação do 10-metilundec-1-eno (**43**) foi realizada seguindo o procedimento geral C. Quantidades utilizadas: 26.9 mmol (3,68 g) de 1-bromo-2-metilpropano em 40 mL de THF, 0,723 g (29,5 mmol) de Mg, 2,12 mmol (600 mg) de 4-metilbenzenosulfonato de oct-7-en-1-ila (**42**) em 6 mL de THF e 1,48 mL de  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$  (0,1 mol.L $^{-1}$ ). Rendimento: 83 %.



**43**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H, 6,63Hz); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,22-1,32 (m, 8H); 1,32-1,43 (m, 2H); 1,44-1,60 (m, 1H); 1,99-2,09 (m, 2H); 4,92 (ddt, 1H,  $J_1=10,18\text{Hz}$ ;  $J_2=2,20$ ;  $J_3=1,25$ ); 4,99 (ddt, 1H,  $J_1=17,06\text{Hz}$ ;  $J_2=2,19$ ;  $J_3=1,58$ ); 5,81 (ddt, 1H,  $J_1=17,04\text{Hz}$ ;  $J_2=10,18$ ;  $J_3=6,72$ ) (Página 200).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,7; 27,4; 28,0; 29,0; 29,2; 29,6; 29,9; 33,9; 39,1; 114,1; 139,3 (Página 200).

**EM:  $m/z$  (%):** 168 ( $\text{M}^+$ , 5); 153 (5); 140 (15); 125 (8); 112 (21); 111 (21); 98 (11); 97 (36); 85 (11); 84 (32); 83 (55); 82 (12); 71 (18); 70 (43); 69 (93); 68 (15); 67 (21); 57 (67); 56 (100); 55 (79); 54 (15); 43 (67); 42 (15); 41 (78) (Página 201).

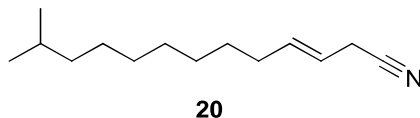
**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 633, 722, 908, 993, 1465, 1641, 2854, 2923, 2955, 3078 (Página 201).

### 2.3.7.12 Preparação da (*E*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**20**) e (*Z*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**19**)

A preparação da (*E*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**20**) e (*Z*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**19**) foi realizada seguindo o procedimento geral D. Quantidades utilizadas: 0,59 mmol (0,100 g) de 10-metilundec-1-eno (**43**) em 10 mL de diclorometano, 1,18



mmol (92,4 mg) de but-3-enonitrila (**37**), 0,107mmol (33,5 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,047 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (39,9 mg). Rendimento: 48 % para a mistura contendo 87 % de (*E*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**20**) e 13 % de (*Z*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**19**).

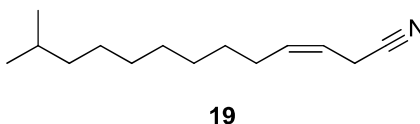


**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,86 (d, 6H, J=6,63); 1,10-1,19 (m, 2H); 1,22-1,31 (m, 14H); 1,31-1,41 (m, 2H); 1,44-1,58 (m, 1H); 1,99-2,09 (m, 2H); 3,04-3,08 (m, 2H); 5,33 (dt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,36Hz; J<sub>2</sub>=5,53; J<sub>3</sub>=1,54); 5,82 (dt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,36Hz; J<sub>2</sub>=6,80; J<sub>3</sub>=1,65) (Página 202).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 20,4; 22,7; 27,4; 28,0; 28,9; 29,1; 29,5; 29,8; 32,2; 39,0; 117,0; 117,9; 136,5 (Página 202).

**EM: m/z (%):** 207 (M<sup>+</sup>, 1) 206 (4); 192 (25); 178 (18); 164 (57); 150 (35); 136 (50); 122 (57); 110 (18); 108 (27); 97 (26); 96 (20); 95 (43); 94 (33); 83 (36); 82 (34); 81 (58); 69 (74); 67 (52); 57 (73); 56 (73); 55 (63); 43 (100); 41 (98) (Página 203).

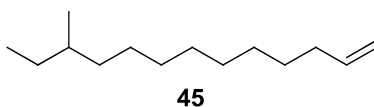
**IV (ν Max, cm<sup>-1</sup>):** 723, 966, 1466, 2250, 2852, 2923, 2952, 3038 (Página 203).



**EM: m/z (%):** 207 (M<sup>+</sup>, 3) 206 (5); 192 (14); 178 (10); 164 (27); 150 (21); 136 (30); 122 (35); 110 (9); 108 (22); 97 (17); 96 (19); 95 (33); 94 (29); 83 (17); 82 (21); 81 (40); 69 (48); 67 (48); 57 (58); 56 (50); 55 (51); 43 (90); 41 (100) (Página 203).

### 2.3.7.13 Preparação do 11-metiltridec-1-eno (**45**)

A preparação do 11-metiltridec-1-eno (**45**) foi realizada seguindo o procedimento geral C. Quantidades utilizadas: 26.9 mmol (3,68 g) de 2-bromobutano em 40 mL de THF, 0,723 g (29,5 mmol) de Mg, 1,93 mmol (600 mg) de 4-metilbenzenosulfonato de dec-9-en-1-ila (**34**) em 5 mL de THF e 1,35 mL de Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub> (0,1 mol.L<sup>-1</sup>). Rendimento: 75 %.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,81-0,91 (m, 6H); 1,03-1,17 (m, 2H); 1,19-1,43 (m, 15H); 1,99-2,08 (m, 2H); 4,92 (ddt, 1H,  $J_1=10,14\text{Hz}$ ;  $J_2=2,23$ ;  $J_3=1,25$ ); 4,99 (ddt, 1H,  $J_1=17,18\text{Hz}$ ;  $J_2=2,23$ ;  $J_3=1,53$ ); 5,81 (ddt, 1H,  $J_1=17,11\text{Hz}$ ;  $J_2=10,19$ ;  $J_3=6,61$ ) (Página 204).

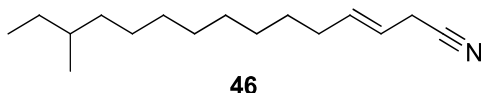
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 11,4; 19,2; 27,1; 29,0; 29,2; 29,5; 29,6; 29,7; 30,1; 33,9; 34,4; 36,7; 114,1; 139,3 (Página 204).

**EM:  $m/z$  (%):** 196 ( $\text{M}^+$ , 1); 167 (7); 139 (3); 125 (15); 111 (33); 98 (13); 97 (61); 85 (13); 84 (21); 83 (75); 82 (11); 71 (45); 70 (100); 69 (61); 68 (8); 67 (15); 57 (58); 56 (32); 55 (70); 54 (11); 43 (31); 42 (11); 41 (58) (Página 205).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 632, 720, 907, 992, 1461, 1642, 2853, 2924, 2962, 3078 (Página 205).

#### 2.3.7.14 Preparação da (*E*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (46) e (*Z*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (47)

A preparação da (*E*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (46) e (*Z*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (47) foi realizada seguindo o procedimento geral D. Quantidades utilizadas: 0,51 mmol (0,100 g) de 11-metiltridec-1-eno (45) em 10 mL de diclorometano, 1,02 mmol (80,4 mg) de but-3-enonitrila (37), 0,102 mmol (29,0 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,041 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (34,6 mg). Rendimento: 37 % para a mistura contendo 89 % de (*E*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (46) e 11 % de (*Z*)-13-metilpentadec-3-enonitrila (47).

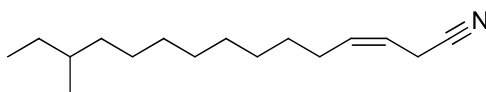


**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,80-0,90 (m, 6H); 1,02-1,19 (m, 2H); 1,22-1,44 (m, 15H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,03-3,07 (m, 2H); 5,33 (dtt, 1H,  $J_1=15,32\text{Hz}$ ;  $J_2=5,59$ ;  $J_3=1,50$ ); 5,81 (dtt, 1H,  $J_1=15,30\text{Hz}$ ;  $J_2=6,78$ ;  $J_3=1,70$ ) (Página 206).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 11,4; 19,2; 20,4; 27,1; 28,8; 29,1; 29,4; 29,5; 29,6; 30,0; 32,2; 34,6; 36,6; 116,9; 118,0; 136,4 (Página 206).

**EM:  $m/z$  (%):** 235 ( $\text{M}^+$ , 2); 220 (12); 206 (58); 192 (15); 178 (32); 164 (29); 150 (31); 136 (41); 122 (42); 110 (12); 108 (21); 97 (28); 96 (19); 95 (51); 94 (27); 83 (44); 81 (63); 69 (51); 67 (49); 57 (100); 56 (42); 55 (72); 43 (68); 41 (98) (Página 207).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 722, 967, 1462, 2250, 2851, 2923, 2959, 3036 (Página 207).

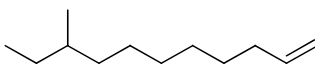


47

**EM:  $m/z$  (%):** 234 ( $M^+ - 1$ , 1); 220 (7); 206 (33); 192 (8); 178 (22); 164 (23); 150 (27); 136 (28); 122 (38); 110 (11); 108 (22); 97 (22); 96 (20); 95 (38); 94 (35); 83 (35); 81 (55); 69 (45); 67 (45); 57 (100); 56 (39); 55 (73); 43 (74); 41 (95) (Página 207).

### 2.3.7.15 Preparação do 9-metilundec-1-eno (48)

A preparação do 9-metilundec-1-eno (**48**) foi realizada seguindo o procedimento geral C. Quantidades utilizadas: 26.9 mmol (3,68 g) de 2-bromobutano em 40 mL de THF, 0,723 g (29,5 mmol) de Mg, 2,12 mmol (600 mg) de 4-metilbenzenosulfonato de oct-7-en-1-ila (**42**) em 6 mL de THF e 1,48 mL de  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$  ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Rendimento: 86 %.



48

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,82-0,89 (m, 6H); 1,03-1,19 (m, 2H); 1,20-1,42 (m, 11H); 2,00-2,08 (m, 2H); 4,93 (ddt, 1H,  $J_1 = 10,15\text{Hz}$ ;  $J_2 = 2,21$ ;  $J_3 = 1,27$ ); 4,99 (ddt, 1H,  $J_1 = 17,21\text{Hz}$ ;  $J_2 = 2,25$ ;  $J_3 = 1,54$ ); 5,81 (ddt, 1H,  $J_1 = 17,21\text{Hz}$ ;  $J_2 = 10,21$ ;  $J_3 = 6,62$ ) (Página 208).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 11,4; 19,2; 27,1; 29,0; 29,2; 29,5; 29,9; 33,9; 34,4; 36,7; 114,1; 139,3 (Página 208).

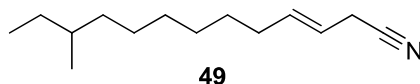
**EM:  $m/z$  (%):** 168 ( $M^+$ , 1); 140 (7); 139 (20); 125 (1); 112 (6); 111 (12); 98 (15); 97 (63); 85 (6); 84 (23); 83 (84); 82 (9); 71 (38); 70 (100); 69 (63); 68 (9); 67 (17); 57 (59); 56 (38); 55 (85); 54 (12); 43 (32); 42 (14); 41 (73) (Página 209).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 633, 723, 908, 992, 1377, 1461, 1641, 2854, 2923, 2960, 3079 (Página 209).

### 2.3.7.16 Preparação da (*E*)-11-metiltridec-3-enonitrila (49) e (*Z*)-11-metiltridec-3-enonitrila (50)

A preparação da (*E*)-11-metiltridec-3-enonitrila (**49**) e (*Z*)-11-metiltridec-3-enonitrila (**50**) foi realizada seguindo o procedimento geral D. Quantidades utilizadas: 0,59 mmol (0,100 g) de 9-metilundec-1-eno (**48**) em 10 mL de diclorometano, 1,18 mmol (92,4 mg) de but-3-enonitrila (**37**), 0,107 mmol (33,5 mg) de

tetraisopropóxido de titânio e 0,047 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (39,9 mg). Rendimento: 47 % para a mistura contendo 86 % de (*E*)-11-metiltridec-3-enonitrila (**49**) e 14 % de (*Z*)-11-metiltridec-3-enonitrila (**50**).

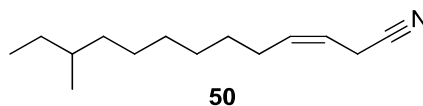


**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,80-0,89 (m, 6H); 1,02-1,18 (m, 2H); 1,21-1,42 (m, 11H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,02-3,08 (m, 2H); 5,33 (dtt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,32Hz; J<sub>2</sub>=5,56; J<sub>3</sub>=1,50); 5,82 (dtt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,32Hz; J<sub>2</sub>=6,79; J<sub>3</sub>=1,70) (Página 210).

**RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 11,4; 19,2; 20,4; 30,0; 28,8; 29,1; 29,4; 29,7; 32,1; 34,4; 36,6; 116,9; 117,9; 136,4 (Página 210).

**EM: m/z (%):** 207 (M<sup>+</sup>, 1) 206 (2); 192 (10); 178 (49); 164 (19); 150 (26); 136 (30); 122 (43); 110 (10); 108 (25); 97 (30); 96 (20); 95 (51); 94 (30); 83 (31); 82 (27); 81 (76); 69 (50); 67 (52); 57 (77); 56 (38); 55 (68); 43 (61); 41 (100) (Página 211).

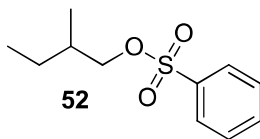
**IV (ν Max, cm<sup>-1</sup>):** 724, 967, 1461, 2251, 2854, 2925, 2959, 3038 (Página 211).



**EM: m/z (%):** 206 (M<sup>+</sup>-1, 2); 192 (9); 178 (37); 164 (13); 150 (24); 136 (25); 122 (37); 110 (9); 108 (23); 97 (19); 96 (15); 95 (44); 94 (36); 83 (29); 82 (20); 81 (58); 69 (42); 67 (48); 57 (70); 56 (34); 55 (62); 43 (61); 41 (100) (Página 211).

### 2.3.7.17 Preparação do 4-metilbenzenosulfonato de 2-metilbut-1-ila (**52**)

A preparação do 4-metilbenzenosulfonato de 2-metilbut-1-ila (**52**) foi realizada seguindo o procedimento geral **B**. Quantidades utilizadas: 17,0 mmol (1,5 g) do 2-metilbutan-1-ol (**51**) em 67 mL de diclorometano, 2,8 mL de piridina e 3,97 g (20,9 mmol) de cloreto de toсила. Rendimento: 69 %.



**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,83 (t, 3H, 7,46Hz); 0,88 (d, 3H, 6,78Hz); 1,07-1,22 (m, 1H); 1,28-1,47 (m, 1H); 1,62-1,79 (m, 1H); 2,46 (s, 3H); 3,81 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=9,30Hz, J<sub>2</sub>=6,31Hz); 3,88 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=9,30Hz, J<sub>2</sub>=5,91Hz); 7,32-7,37 (m, 2H); 7,76-7,81 (m, 2H) (Página 212).

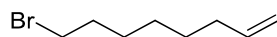
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 10,8; 15,8; 21,5; 25,3; 34,2; 74,7; 127,7; 129,7; 133,1; 144,5 (Página 212).

**EM:  $m/z$  (%):** 242 ( $\text{M}^+$ , 1); 173 (35); 155 (88); 139 (7); 108 (10); 107 (13); 93 (5); 92 (48); 91 (100); 89 (15); 77 (8); 70 (75); 65 (46); 63 (12); 57 (8); 55 (27); 41 (25) (Página 213).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 661, 812, 959, 1174, 1354, 2879, 2932, 2965, 3069 (Página 213).

### 2.3.7.18 Preparação do 8-bromooct-1-eno (**53**)

Em um balão de fundo redondo equipado com agitação magnética em banho de gelo, foi preparada uma solução contendo diclorometano (60 mL), oct-7-en-1-ol (**41**) (2,567 g; 20,02 mmol) e  $\text{CBr}_4$  (8,020 g; 24,07 mmol). Uma solução de  $\text{PPh}_3$  (7,855 g; 30,04 mmol) em diclorometano (20 mL) foi adicionada à mistura previamente preparada e o meio reacional resultante foi agitado em banho de gelo durante 1 hora. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto foi diretamente purificado por cromatografia flash com pentano como eluente, resultando no 8-bromooct-1-eno (**53**) em 99 % de rendimento<sup>[111]</sup>.



**53**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 1,27-1,50 (m, 6H); 1,80-1,92 (m, 2H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,40 (t, 2H,  $J=6,80$ ); 4,91-5,04 (m, 2H); 5,80 (ddt, 1H,  $J_1=17,03$ ,  $J_2=10,26$ ,  $J_3=6,61$ ) (Página 214).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 28,0; 28,2; 28,7; 32,7; 33,6; 33,9; 114,4; 138,8 (Página 214).

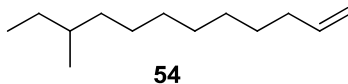
**EM:  $m/z$  (%):** 150 (22); 148 (24); 137 (3); 135 (3); 109 (6); 107 (6); 95 (4); 93 (3); 83 (11); 81 (9); 69 (100); 67 (35); 55 (97) (Página 215).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 644, 725, 909, 993, 1256, 1462, 1640, 2854, 2927, 3076 (Página 215).

### 2.3.7.19 Preparação do 10-metildodec-1-eno (**54**)

A preparação do 10-metildodec-1-eno (**54**) foi realizada seguindo o procedimento geral C. Quantidades utilizadas: 10,0 mmol (1,900 g) de 8-bromooct-1-eno (**53**) em 19 mL de THF, 0,341 g (13,9 mmol) de Mg, 1,00 mmol (0,242 g) de 4-

metilbenzenosulfonato de 2-metilbut-1-ila (**52**) em 3,4 mL de THF e 0,70 mL de  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$  (0,1 mol.L<sup>-1</sup>). Rendimento: 75 % (GC).



**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,82-0,89 (m, 4,0H); 1,03-1,18 (m, 0,29H); 1,24-1,41 (m, 10,6H); 2,00-2,09 (m, 2,1H); 4,88-5,04 (m, 2,0H); 5,71-5,88 (m, 1H) (Página 216).

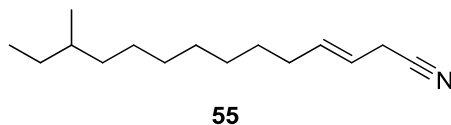
**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 11,4; 19,2; 22,7; 27,2; 28,5; 28,7; 28,9; 28,9; 29,0; 29,0; 29,2; 29,6; 29,6; 29,6; 29,7; 29,7; 30,0; 31,8; 33,7; 33,8; 33,9; 34,5; 36,7; 114,1; 114,2; 114,3; 138,9; 139,1; 139,2 (Página 216).

**EM: m/z (%):** 182 (2); 153 (15); 125 (7); 111 (35); 98 (11); 97 (64); 85 (9); 84 (20); 83 (74); 82 (11); 71 (42); 70 (100); 69 (62); 68 (9); 67 (18); 57 (57); 56 (34); 55 (77); 54 (13); 43 (32); 42 (12); 41 (68) (Página 217).

**IV (ν Max, cm<sup>-1</sup>):** 634, 721, 908, 922, 1463, 1641, 2852, 2922, 2958, 3078 (Página 217).

### 2.3.7.20 Preparação da (*E*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**55**) e (*Z*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**24**)

A preparação da (*E*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**55**) e (*Z*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**24**) foi realizada seguindo o procedimento geral **D**. Quantidades utilizadas: 1,10 mmol (0,200 g) de 11-metildodec-1-eno (**54**) em 20 mL de diclorometano, 2,20 mmol (172,0 mg) de but-3-enonitrila (**37**), 0,218 mmol (62,4 mg) de tetrakispropóxido de titânio e 0,088 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (74,4 mg). Rendimento: 65 % para a mistura contendo 27 % de (*E*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**55**) e 4 % de (*Z*)-12-metiltetradec-3-enonitrila (**24**) e 69 % de compostos nitrílicos de mesmo R<sub>f</sub>, oriundos do acoplamento cruzado entre o subproduto não isolado da reação de Grignard anterior.

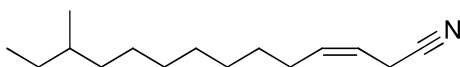


**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,80-0,94(m, 2,6H); 1,02-1,18 (m, 0,42H); 1,20-1,45 (m, 10,8H); 2,00-2,10 (m, 2,4H); 3,02-3,08 (m, 1,76H); 4,89-5,04 (m, 0,46H); 5,27-5,42 (m, 0,92); 5,74-5,88 (m, 1H) (Página 218).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 11,4; 15,5; 19,2; 20,4; 27,4; 27,3; 28,7; 28,7; 28,8; 28,8; 28,9; 29,1; 29,1; 29,4; 29,5; 29,6; 29,9; 31,6; 32,2; 33,8; 36,6; 114,1; 116,7; 117,0; 117,9; 136,2; 136,5; 139,2 (Página 218).

**EM:  $m/z$  (%):** 221 ( $\text{M}^+$ , 1); 220 (2); 206 (10); 192 (58); 178 (19); 164 (31); 150 (26); 136 (40); 122 (43); 110 (14); 109 (26); 108 (21); 97 (22); 96 (16); 95 (53); 94 (27); 83 (39); 82 (27); 81 (66); 70 (100); 69 (52); 67 (48); 57 (79); 56 (39); 55 (53); 43 (57); 41 (64) (Página 219).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 724, 909, 965, 1460, 2250, 2853, 2925, 2955, 3038, 3077 (Página 219).

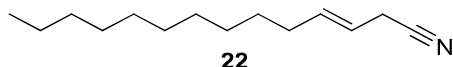


**24**

**EM:  $m/z$  (%):** 221 ( $\text{M}^+$ , 2); 220 (2); 206 (18); 192 (72); 178 (22); 164 (40); 150 (36); 136 (50); 122 (58); 110 (15); 109 (40); 108 (35); 97 (20); 96 (24); 95 (58); 94 (47); 83 (43); 82 (27); 81 (68); 70 (98); 69 (52); 67 (40); 57 (100); 56 (42); 55 (62); 43 (75); 41 (80) (Página 219).

### 2.3.7.21 Preparação da (*E*)-tetradec-3-enonitrila (**22**) e (*Z*)-tetradec-3-enonitrila (**21**)

A preparação da (*E*)-tetradec-3-enonitrila (**22**) e (*Z*)-tetradec-3-enonitrila (**21**) foi realizada seguindo o procedimento geral **D**. Quantidades utilizadas: 0,59 mmol (0,100 g) de 1-dodeceno (**56**) em 10 mL de diclorometano, 1,18 mmol (92,0 mg) de but-3-enonitrila (**37**), 0,107 mmol (33,5 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,047 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (39,9 mg). Rendimento: 39 % para a mistura contendo 87 % de (*E*)-tetradec-3-enonitrila (**22**) e 13 % de (*Z*)-tetradec-3-enonitrila (**21**).



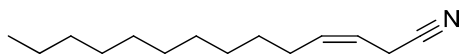
**22**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,84-0,92 (m, 3H); 1,23-1,42 (m, 16H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,03-3,08 (m, 2H); 5,33 (dt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=5,49$ ;  $J_3=1,51$ ); 5,81 (dt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=6,78$ ;  $J_3=1,70$ ) (Página 220).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 20,4; 22,7; 28,8; 29,1; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 31,9; 32,1; 116,9; 117,9; 136,4 (Página 220).

**EM:  $m/z$  (%):** 207 ( $\text{M}^+$ , 1); 206 (3); 192 (4); 178 (24); 164 (32); 150 (29); 136 (42); 122 (48); 110 (9); 109 (10); 108 (15); 97 (31); 96 (17); 95 (22); 94 (26); 83 (35); 82 (32); 81 (47); 70 (47); 69 (53); 68 (28); 67 (42); 57 (59); 56 (51); 55 (67); 43 (100); 41 (99) (Página 221).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 722, 966, 1462, 2251, 2853, 2922, 2954, 3040 (Página 221).

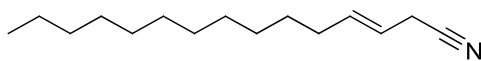


**21**

**EM:  $m/z$  (%):** 207 ( $\text{M}^+$ , 4); 206 (2); 192 (5); 178 (27); 164 (35); 150 (36); 136 (50); 122 (48); 110 (7); 109 (19); 108 (24); 97 (36); 96 (21); 95 (27); 94 (39); 83 (21); 82 (30); 81 (70); 70 (48); 69 (45); 68 (38); 67 (57); 57 (65); 56 (55); 55 (68); 43 (100); 41 (97) (Página 221).

### 2.3.7.22 Preparação da (*E*)-pentadec-3-enonitrila (**58**) e (*Z*)-pentadec-3-enonitrila (**27**)

A preparação da (*E*)-pentadec-3-enonitrila (**58**) e (*Z*)-pentadec-3-enonitrila (**27**) foi realizada seguindo o procedimento geral **D**. Quantidades utilizadas: 0,55 mmol (0,100 g) de 1-trideceno (**57**) em 10 mL de diclorometano, 1,09 mmol (85,2 mg) de but-3-enonitrila (**37**), 0,100 mmol (31,5 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,044 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (37,0 mg). Rendimento: 36 % para a mistura contendo 87 % de (*E*)-pentadec-3-enonitrila (**58**) e 13 % de (*Z*)-pentadec-3-enonitrila (**27**).



**58**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,84-0,91 (m, 3H); 1,23-1,41(m, 18H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,03-3,08 (m, 2H); 5,33 (dt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=5,54$ ;  $J_3=1,50$ ); 5,81 (dt, 1H,  $J_1=15,31\text{Hz}$ ;  $J_2=6,79$ ;  $J_3=1,70$ ) (Página 222).

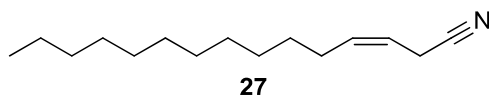
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 20,4; 22,7; 28,8; 29,1; 29,3; 29,4; 29,6; 29,6; 29,6; 31,9; 32,2; 116,9; 117,9; 136,5 (Página 222).

**EM:  $m/z$  (%):** 221 ( $\text{M}^+$ , 1); 220 (4); 206 (6); 192 (22); 178 (39); 164 (35); 150 (33); 136 (49); 122 (52); 110 (12); 109 (12); 108 (18); 97 (35); 96 (18); 95 (25); 94 (26); 83



(40); 82 (32); 81 (47); 70 (48); 69 (56); 68 (28); 67 (43); 57 (75); 56 (45); 55 (68); 43 (100); 41 (96) (Página 223).

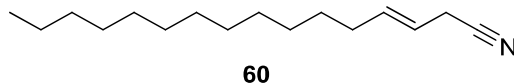
**IV (v Max, cm<sup>-1</sup>):** 722, 966, 1463, 2251, 2852, 2922, 2954, 3038 (Página 223).



**EM: m/z (%):** 221 (M<sup>+</sup>, 1); 220 (3); 206 (5); 192 (18); 178 (32); 164 (31); 150 (29); 136 (42); 122 (46); 110 (13); 109 (19); 108 (22); 97 (27); 96 (17); 95 (30); 94 (35); 83 (35); 82 (27); 81 (52); 70 (39); 69 (49); 68 (27); 67 (42); 57 (77); 56 (37); 55 (64); 43 (100); 41 (98) (Página 223).

### 2.3.7.23 Preparação da (*E*)-hexadec-3-enitrila (**60**) e (*Z*)-hexadec-3-enitrila (**29**)

A preparação da (*E*)-hexadec-3-enitrila (**60**) e (*Z*)-hexadec-3-enitrila (**29**) foi realizada seguindo o procedimento geral **D**. Quantidades utilizadas: 0,51 mmol (0,100 g) de 1-tetradeceno (**59**) em 10 mL de diclorometano, 1,02 mmol (80,4 mg) de but-3-enitrila (**37**), 0,102 mmol (29,0 mg) de tetraisopropóxido de titânio e 0,041 mmol do catalisador de Grubbs de segunda geração (34,6 mg). Rendimento: 31 % para a mistura contendo 87 % de (*E*)-hexadec-3-enitrila (**60**) e 13 % de (*Z*)-hexadec-3-enitrila (**29**).

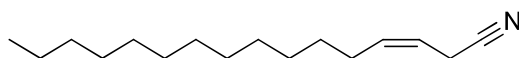


**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,82-0,91 (m, 3H); 1,23-1,42(m, 20H); 2,00-2,10 (m, 2H); 3,03-3,08 (m, 2H); 5,33 (dt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,32Hz; J<sub>2</sub>=5,54; J<sub>3</sub>=1,52); 5,82 (dt, 1H, J<sub>1</sub>= 15,32Hz; J<sub>2</sub>=6,82; J<sub>3</sub>=1,71) (Página 224).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 14,1; 20,4; 22,7; 28,8; 29,1; 29,3; 29,4; 29,6; 29,6; 29,63; 29,7; 31,9; 32,2; 116,9; 117,9; 136,5 (Página 224).

**EM: m/z (%):** 235 (M<sup>+</sup>, 1); 234 (4); 220 (5); 206 (20); 192 (31); 178 (29); 164 (30); 150 (32); 136 (46); 122 (47); 110 (13); 109 (12); 108 (17); 97 (37); 96 (19); 95 (27); 94 (24); 83 (43); 82 (31); 81 (46); 70 (46); 69 (56); 68 (27); 67 (43); 57 (82); 56 (43); 55 (70); 43 (100); 41 (94) (Página 225).

**IV (v Max, cm<sup>-1</sup>):** 721, 968, 1377, 1417, 1464, 2251, 2853, 2922 (Página 225).

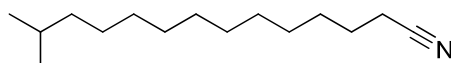


29

**EM:  $m/z$  (%):** 235 ( $M^+$ , 1); 234 (4); 220 (6); 206 (20); 192 (29); 178 (28); 164 (32); 150 (33); 136 (44); 122 (43); 110 (13); 109 (18); 108 (23); 97 (33); 96 (20); 95 (30); 94 (32); 83 (36); 82 (27); 81 (53); 70 (39); 69 (51); 68 (26); 67 (43); 57 (87); 56 (38); 55 (67); 43 (100); 41 (97) (Página 225).

### 2.3.7.24 Preparação da 13-metiltetradecanitrila (26)

A um balão de fundo redondo, sob agitação magnética e t.a. foram adicionados a 13-metiltetradec-3-enitrila (**21+22**) (30 mg, 0,135 mmol), 5 mg (10 %) de Pd/C em 2 mL de acetato de etila. O frasco foi submetido à atmosfera de hidrogênio (pressão atmosférica) sob t.a. durante 4 horas. A atmosfera foi substituída por nitrogênio e a solução resultante evaporada sob pressão reduzida. O meio reacional foi diluído em 20 mL de acetato de etila e filtrado em celite e o solvente evaporado, resultando na 13-metiltetradecanitrila (**26**) em 96 % de rendimento (28,9 mg, 0,129 mmol)<sup>[112]</sup>.



26

**RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,68Hz$ ); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,22-1,34(m, 13H); 1,37-1,58 (m, 4H); 1,59-1,71 (m, 2H); 2,33 (t, 2H,  $J= 7,13Hz$ ) (Página 226).

**RMN de  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 17,1; 22,7; 25,4; 27,4; 28,0; 28,7; 28,8; 29,3; 29,5; 29,6; 29,7; 29,9; 39,1; 119,8 (Página 226).

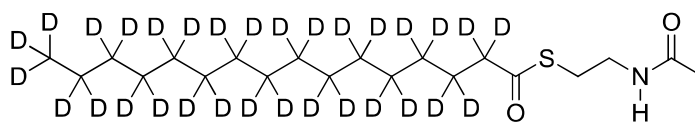
**EM:  $m/z$  (%):** 223 ( $M^+$ , 1); 222 (4); 208 (60); 194 (9); 180 (62); 166 (41); 152 (47); 138 (58); 124 (82); 111 (48); 110 (100); 97 (97); 96 (80); 85 (42); 83 (48); 82 (54); 70 (38); 69 (47); 57 (62); 55 (69); 43 (87); 41 (93) (Página 227).

**IV (v Max,  $cm^{-1}$ ):** 722, 1464, 2246, 2852, 2922, 2953 (Página 227).

### 2.3.7.25 Preparação do hexadecanotioato- $d_{31}$ de S-(2-acetamidoetila) (65)

A preparação do hexadecanotioato- $d_{31}$  de S-(2-acetamidoetila) [(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16- $^2H_{31}$ )hexadeca-notioato de S-(2-acetamidoetila)] (**65**) foi realizada seguindo o

procedimento geral E. Quantidades utilizadas: 15 mg (0,052 mmol) de ácido palmítico- $d_{31}$  [ácido (2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16- $^2\text{H}_{31}$ )palmítico] em 200  $\mu\text{L}$  de diclorometano, 1,3 mg (0,011 mmol) de DMAP, 11,6  $\mu\text{L}$  (0,0624mmol) de EDC e 6,7  $\mu\text{L}$  (0,0624 mmol) de N-acetilcisteamina  
 Rendimento: 82 %.



65

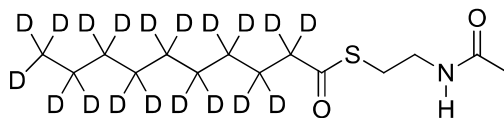
**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 1,05-1,35 (m, 1H); 1,97 (s, 3H); 2,26-2,51 (m, 2H); 2,99-3,07 (m, 2H); 3,39-3,49 (m, 2H); 5,86 (s, 1H) (Página 227).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 23,2; 28,4; 39,8; 170,2 (Página 227).

**EM:  $m/z$  (%):** 388 ( $\text{M}^+$ , 1); 329 (4); 270 (16); 269 (7); 122 (20); 120 (100); 118 (19); 102 (9); 98 (8); 86 (10); 82 (13); 78 (8); 66 (21); 62 (12); 61 (17); 50 (17); 46 (10); 43 (7) (Página 227).

### 2.3.7.26 Preparação do decanotioato- $d_{19}$ de S-(2-acetamidoetila) (67)

A preparação do decanotioato- $d_{19}$  de S-(2-acetamidoetila) [(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10- $^2\text{H}_{19}$ )decanotioato de S-(2-acetamidoetila)] (67) foi realizada seguindo o procedimento geral E. Quantidades utilizadas: 30 mg (0,157 mmol) de ácido decanoico [ácido (2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10- $^2\text{H}_{19}$ )decanoico] em 600  $\mu\text{L}$  de diclorometano, 3,92 mg (0,033 mmol) de DMAP, 35  $\mu\text{L}$  (0,188mmol) de EDC e 20,1  $\mu\text{L}$  (0,188 mmol) de N-acetilcisteamina Rendimento: 84 %.



67

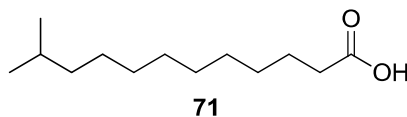
**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 1,05-1,41 (m, 1H); 1,97 (s, 3H); 2,23-2,43 (m, 1H); 2,97-3,05 (m, 2H); 3,37-3,49 (m, 2H); 6,02 (s, 1H) (Página 229).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 23,1; 28,3; 39,7; 170,3; 200,3 (Página 230).

**EM: *m/z* (%):**292 ( $M^+$ , 2); 233 (10); 205 (3); 191 (6); 174 (27); 120 (100); 118 (22); 102 (8); 98 (15); 86 (5); 82 (19); 78 (5); 66 (14); 62 (8); 61 (20); 50 (17); 46 (19); 43 (14) (Página 230).

### 2.3.7.27 Preparação do ácido 11-metildodecanóico (71)

Foi preparada uma mistura contendo 4,5 mL de tetracloreto de carbono, 4,5 mL de acetonitrila, 6,7 mL de água destilada, 440 mg (2,24 mmol) de 12-metiltridec-1-eno (36) e 1,964 g (4,1 equivalentes) de  $\text{NaIO}_4$  em um balão reacional submetido à agitação magnética vigorosa e t.a.. À esta mistura, foi adicionado  $\text{RuCl}_3$  hidratado e a mistura foi agitada durante 2 horas. Após este período, foi adicionado 20 mL de diclorometano e a fase aquosa separada e extraída com diclorometano (3X15 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com *brine* e seca com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi evaporado e o produto bruto foi purificado em coluna *flash* (pentano/acetato de etila:1/1), resultando no ácido 11-metildodecanóico (71) em 63 % de rendimento<sup>[113]</sup>.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d,  $J=6,65\text{Hz}$ , 6H); 1,09-1,19 (m, 2H); 1,22-1,37 (m, 12H); 1,44-1,56 (m, 1H); 1,57-1,70 (m, 2H); 2,35 (t,  $J=7,62\text{Hz}$ , 2H); 10,33 (s, 1H) (Página 231).

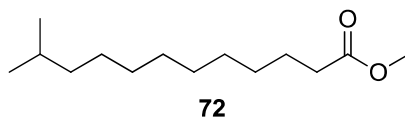
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,6; 24,7; 27,4; 27,9; 29,0; 29,2; 29,4; 29,6; 29,9; 34,1; 39,0; 180,2 (Página 231).

**EM: *m/z* (%):** 214 ( $M^+$ , 1); 199 (7); 185 (5); 171 (69); 163 (5); 157 (10); 143 (13); 129 (73); 115 (24); 111 (12); 99 (17); 98 (16); 97 (26); 96 (8); 87 (21); 85 (33); 83 (33); 73 (100); 71 (39); 69 (48); 60 (73); 57 (63); 55 (69); 43 (87); 41 (84) (Página 232).

### 2.3.7.28 Preparação do 11-metildodecanoato de metila (72)

Uma mistura contendo 300 mg (1,40 mmol) do ácido 11-metildodecanóico (71) e metanol (10 mL) foi preparada em um balão reacional equipado com agitação magnética, atmosfera de nitrogênio e a  $0^\circ\text{C}$ . A esta solução, foi adicionado  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

(1,82 mmol; 258 mg; 225  $\mu$ L). A mistura reacional resultante foi agitada por um período de 14 horas sob t.a. e a reação foi extinta pela adição de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . A fase aquosa foi então extraída com  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x15 mL) e a fase orgânica combinada foi seca com sulfato de magnésio e o solvente evaporado, resultando no 11-metildodecanoato de metila (**72**) em 91 % de rendimento. O produto foi utilizado na próxima etapa sem prévia purificação<sup>[114]</sup>.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d,  $J=6,59\text{Hz}$ , 6H); 1,10-1,19 (m, 2H); 1,22-1,35 (m, 12H); 1,43-1,56 (m, 1H); 1,57-1,69 (m, 2H); 2,30 (t,  $J=7,55\text{Hz}$ , 2H); 3,66 (s, 1H) (Página 233).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,6; 24,9; 27,4; 27,9; 29,1; 29,2; 29,4; 29,6; 29,9; 34,1; 39,0; 51,4; 174,3 (Página 233).

**EM:  $m/z$  (%):** 228 ( $\text{M}^+$ , 16); 213 (4); 199 (6); 197 (13); 185 (48); 171 (7); 157 (7); 143 (43); 129 (18); 115 (5); 111 (7); 101 (15); 98 (8); 97 (21); 95 (5); 87 (88); 85 (6); 83 (23); 75 (31); 74 (100); 69 (33); 59 (23); 57 (29); 55 (51); 43 (61); 41 (53) (Página 234).

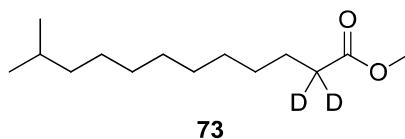
**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 722, 1169, 1365, 1436, 1464, 1741, 2853, 2924, 2951 (Página 234).

### 2.3.7.29 Preparação do (1,1,2,2- $^2\text{H}_4$ )-11-metildodecan-1-ol (**73**) (11-metildodecan-1-ol- $d_4$ )

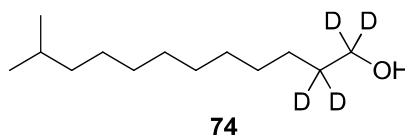
Sódio metálico (0,463 g; 20,15 mmol) finamente dividido foi dissolvido em metanol- $d_1$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ; 19 mL) em um frasco reacional, sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. 11-metildodecanoato de metila (**72**) (0,292 g; 1,28 mmol) foi adicionado à mistura e o sistema foi aquecido até a temperatura de refluxo. O meio reacional foi agitado durante um período de 6 horas, seguido pela diluição da mistura, sob t.a., com  $\text{Et}_2\text{O}$  e adição de solução de  $\text{HCl}$  (10 mL; 2  $\text{mol.L}^{-1}$ ). A fase orgânica foi subsequentemente extraída com  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x15 mL) e seca com  $\text{MgSO}_4$ . O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, resultando no 11-metildodecanoato- $d_2$  de metila (**73**). O produto foi utilizado na próxima etapa sem prévia purificação.

Na sequência, uma suspensão de  $\text{LiAlD}_4$  (0,235 g; 5,60 mmol) em  $\text{Et}_2\text{O}$  (7,5 mL) foi preparada em um balão de fundo redondo, sob atmosfera de nitrogênio, a  $0^\circ\text{C}$

e sob agitação magnética. Em seguida, 11-metildodecanoato- $d_2$  de metila (**73**) (0,288 g; 1,25 mmol) em 1 mL de Et<sub>2</sub>O foi adicionado. A reação foi gradualmente levada à t.a. e acompanhada por CCD até que foi observado o consumo do material de partida (4 horas). A seguir, HCl (15 mL; 2 mol.L<sup>-1</sup>) foi adicionado à mistura e a fase aquosa foi separada e extraída com Et<sub>2</sub>O (3x15 mL) e a fase orgânica combinada foi lavada com *brine* e seca com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente, observou-se a formação do 11-metildodecanol- $d_4$  (**74**) em 84 % de rendimento em duas etapas, o qual foi utilizado na próxima etapa sem prévia purificação<sup>[115]</sup>.



**EM:  $m/z$  (%):** 230 (M<sup>+</sup>, 11); 215 (2); 199 (11); 187 (23); 159 (2); 145 (24); 131 (8); 99 (10); 97 (6); 88 (48); 87 (44); 85 (11); 83 (8); 77 (20); 76 (100); 71 (15); 69 (15); 59 (20) (Página 236).



**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H, J=6,59); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,21-1,36 (m, 14H); 1,44-1,60 (m, 1H); 2,07 (s, 1H) (Página 235).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 26,4; 29,3; 31,2; 31,7; 33,2; 33,4; 33,4; 33,4; 33,7; 35,5; 42,8; 65,8 (Página 235).

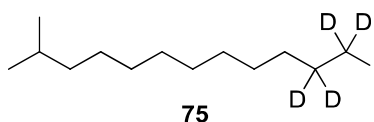
**EM:  $m/z$  (%):** 186 (M<sup>+</sup>-18, 3); 171 (2); 158 (6); 143 (4); 130 (9); 111 (13); 98 (17); 97 (18); 87 (25); 86 (22); 85 (22); 84 (30); 83 (29); 73 (23); 72 (24); 71 (33); 70 (46); 69 (63); 59 (21); 58 (25); 57 (83); 56 (100); 55 (50); 43 (71); 42 (25); 41 (56) (Página 236).

**IV (v Max, cm<sup>-1</sup>):** 722, 970, 1121, 1375, 1464, 2090, 2201, 2852, 2921, 2953, 3328 (Página 236).

### 2.3.7.30 Preparação do (1,1,2,2-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-1-iodo-11-metildodecano (**75**) (1-iodo-11-metildodecano- $d_4$ )

Em um balão de fundo redondo equipado com agitação magnética e atmosfera de nitrogênio e resfriado a 0 °C foi preparada uma mistura contendo acetonitrila anidra (1,25 mL), Et<sub>2</sub>O anidro (3,75 mL), PPh<sub>3</sub> (0,334 g; 1,28 mmol) e imidazol (0,087 g; 1,28

mmol). A esta mistura foi adicionado iodo (0,329 g; 1,28 mmol) em pequenas porções e a mistura resultante foi agitada sob temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de resfriamento a 0°C novamente. 11-metildodecanol-*d*<sub>4</sub> (**74**) (0,131 g; 0,64 mmol) em 0,5 mL de Et<sub>2</sub>O foi então adicionado e a mistura foi gradualmente aquecida até temperatura ambiente. Após o período de agitação de 14 horas, 15 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> foi adicionado e as fases separadas. A fase aquosa foi extraída com Et<sub>2</sub>O (3x15 mL) e a fase orgânica combinada foi seca com MgSO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi evaporado sob vácuo e o produto bruto purificado em coluna flash com pentano como fase móvel, resultando no 1-iodo-11-metildodecano-*d*<sub>4</sub> (**75**) em 94 % de rendimento (0,225 g; 0,60 mmol).



**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 0,86 (d, 6H, J=6,61); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,21-1,32 (m, 12H); 1,33-1,41 (m, 2H); 1,44-1,60 (m, 1H) (Página 237).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 22,7; 27,4; 28,0; 28,5; 29,4; 29,6; 29,7; 29,9; 30,3; 39,0 (Página 237).

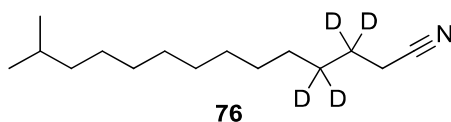
**EM: *m/z* (%):** 314 (M<sup>+</sup>, 1); 189 (20); 159 (7); 145 (3); 131 (6); 117 (6); 102 (9); 89 (19); 88 (23); 87 (18); 86 (21); 85 (29); 75 (19); 74 (33); 73 (30); 72 (34); 71 (53); 69 (19); 61 (16); 60 (35); 59 (38); 58 (45); 57 (100); 56 (27); 55 (33); 45 (18); 44 (25); 43 (97); 42 (21); 41 (63) (Página 238).

**IV (ν Max, cm<sup>-1</sup>):** 721, 967, 1365, 1463, 2116, 2193, 2852, 2921, 2952 (Página 238).

### 2.3.7.31 Preparação da (3,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-13-metiltetradecanonitrila (**76**) (13-metiltetradecanonitrila-*d*<sub>4</sub>)

Em um balão de fundo redondo equipado com agitação magnética, atmosfera de nitrogênio e sob temperatura de -78 °C foi preparada uma solução contendo acetonitrila anidra (85 mg; 108 μL; 2,07 mmol) em THF anidro (1,5 mL). A esta solução foi adicionada uma mistura contendo *n*-BuLi (1,29 mL; 1,6 mol.L<sup>-1</sup>; 2,07 mmol) em THF anidro (1 mL) e a solução resultante foi agitada durante 1 hora a -78 °C. A solução resultante foi transferida lentamente para outro frasco reacional, contendo o 1-iodo-11-metildodecano-*d*<sub>4</sub> (**74**) (225 mg; 0,72 mmol) em THF anidro (1,5 mL), a -78 °C. A mistura reacional foi agitada sob temperatura constante por um

período adicional de 15 minutos e a reação foi finalizada pela adição de água (20 mL). A fase aquosa foi extraída com éter etílico (3x10 mL) e a fase orgânica lavada com *brine* e seca com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando pentano/acetato de etila: 9/1 como eluente. 13-metiltetradecanonitrila- $d_4$  (**76**) pura foi isolada com 65 % de rendimento.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,64\text{Hz}$ ); 1,09-1,20 (m, 2H); 1,22-1,32(m, 14H); 1,44-1,60 (m, 1H); 2,31 (s, 1H) (Página 239).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 16,9; 22,7; 27,4; 28,0; 28,5; 29,2; 29,5; 29,7; 29,9; 39,0; 119,9 (Página 239).

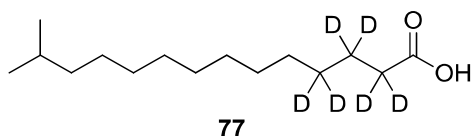
**EM:  $m/z$  (%):** 227 ( $\text{M}^+$ , 2); 226 (3); 212 (48); 198 (5); 184 (43); 170 (30); 156 (39); 142 (45); 128 (62); 115 (41); 114 (69); 101 (73); 100 (60); 99 (37); 98 (17); 87 (28); 86 (51); 85 (40); 84 (25); 72 (25); 71 (38); 70 (21); 69 (25); 59 (22); 58 (49); 57 (52); 56 (36); 55 (41); 43 (100); 41 (89) (Página 240).

**IV ( $\nu$  Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 722, 1366, 1465, 2111, 2210, 2244, 2852, 2922, 2953 (Página 240).

### 2.3.7.32 Preparação do ácido (2,2,3,3,4,4- $^2\text{H}_6$ )-13-metiltetradecanóico (**77**) (ácido 13-metiltetradecanóico- $d_6$ )

Uma solução contendo (3,3,4,4- $^2\text{H}_4$ )-13-metiltetradecanonitrila (**76**) (40 mg; 0,176 mmol), 1,5 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  e 1,5 mL de EtOD (etanol- $d_1$ ) foi preparada em um balão de fundo redondo equipado com agitação magnética e sob temperatura ambiente. Deuteróxido de sódio (NaOD; 138 mg; 3,52 mmol) foi adicionado à mistura e a solução resultante foi mantida sob refluxo durante 24 horas. Após este período, água (5 mL) e  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ . (0.5 mL) foram adicionados e a fase aquosa extraída com  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x10 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com *brine* (3x10 mL) e seca com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi evaporado sob vácuo, resultando no ácido 13-metiltetradecanóico- $d_6$  (**77**) em 89 % de rendimento. O produto bruto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação prévia.





**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,62\text{Hz}$ ); 1,10-1,21 (m, 2H); 1,22-1,34(m, 14H); 1,42-1,61 (m, 1H) (Página 241).

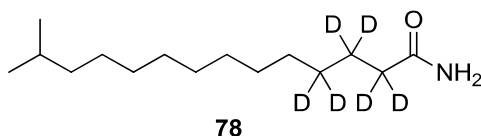
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 22,3; 22,7; 27,4; 28,0; 29,0; 29,4; 29,6; 29,6; 29,7; 29,9; 39,1 (Página 241).

**EM:  $m/z$  (%):** 248 ( $M^+$ , 53); 205 (19); 201 (17); 200 (25); 191 (23); 177 (16); 143 (15); 135 (37); 134 (15); 88 (16); 87 (19); 76 (32); 75 (23); 71 (17); 63 (49); 62 (16); 57 (39); 56 (21); 55 (31); 45 (20); 44 (20); 43 (100); 42 (24); 41 (75) (Página 242).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 722, 950, 1313, 1467, 1691, 2099, 2178, 2216, 2850, 2914, 2954.(Página 242).

### 2.3.7.33 Preparação da (2,2,3,3,4,4- $^2\text{H}_6$ )-13-metiltetradecanamida (78) (13-metiltetradecanamida- $d_6$ )

Uma solução contendo ácido 13-metiltetradecanoico- $d_6$  (**77**) (10 mg; 0,040 mmol) em diclorometano (1 mL) foi preparada em um balão de fundo redondo, sob agitação constante e 0 °C. A esta solução foram adicionados dimetilformamida (0,3  $\mu\text{L}$ , 0,0040 mmol) e cloreto de oxalila (0,045 mmol; 5,7 mg). A reação foi agitada durante 1,5 horas com gradual aumento de temperatura até temperatura ambiente. O sistema foi novamente resfriado a 0 °C e  $\text{NH}_3$  foi borbulhada na solução com posterior agitação durante 20 minutos sob a mesma temperatura. A reação foi aquecida até temperatura ambiente e diluída com acetato de etila (10 mL). A mistura foi então lavada sucessivamente com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , água e *brine*. As diferentes soluções aquosas foram combinadas e extraídas com acetato de etila (3x10 mL) e a fase orgânica combinada foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi purificado pela adição de pentano à mistura, com subsequente remoção e descarte do sobrenadante, resultando na 13-metiltetradecanamida- $d_6$  (**78**) com 65 % de rendimento.



**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,86 (d, 6H,  $J=6,66\text{Hz}$ ); 1,10-1,21 (m, 2H); 1,22-1,34(m, 14H); 1,43-1,60 (m, 1H); 5,39 (s, 2H) (Página 243).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 22,7; 27,4; 28,0; 28,1; 29,4; 29,6; 29,7; 29,7; 29,9; 39,1; 175,6 (Página 243).

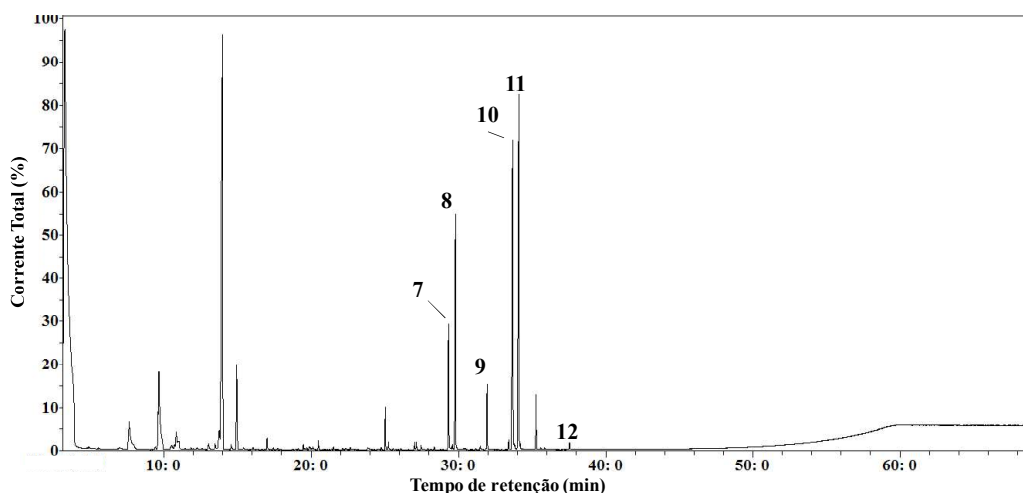
**EM:  $m/z$  (%):** 247 ( $\text{M}^+$ , 9); 232 (4); 215 (5); 204 (6); 199 (10); 190 (4); 176 (6); 162 (2); 134 (13); 120 (13); 103 (6); 92 (6); 88 (4); 87 (4); 86 (3); 77 (8); 76 (9); 75 (37); 74 (34); 73 (7); 72 (4); 71 (4); 69 (7); 63 (12); 62 (100); 57 (15); 56 (9); 55 (15); 45 (7); 44 (45); 43 (65); 42 (14); 41 (45) (Página 244).

**IV (v Max,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 625, 692, 809, 1058, 1152, 1400, 1467, 1633, 1657, 2094, 2173, 2211, 2848, 2916, 2962, 3184, 3360 (Página 244).

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Voláteis produzidos por *Pseudomonas veronii* R02

Culturas de *Pseudomonas veronii* R02 foram preparadas em meio líquido e em ágar, a partir das culturas estoque, utilizando meio de cultura LB<sup>[102]</sup>. As culturas foram incubadas durante 24 horas sob 28 °C. Após este período, as culturas foram submetidas ao aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA) durante 24 horas<sup>[102]</sup>. Os filtros de carvão ativo foram extraídos com diclorometano e os extratos analisados por GC-MS e armazenados. As análises em GC-MS revelaram a presença de 6 compostos com espectros de massas referentes à nitrilas, numerados de 7 à 12 (Figura 31). As culturas em meio líquido e em ágar apresentaram perfil de voláteis semelhantes, com relação ao número de compostos e concentração relativa.



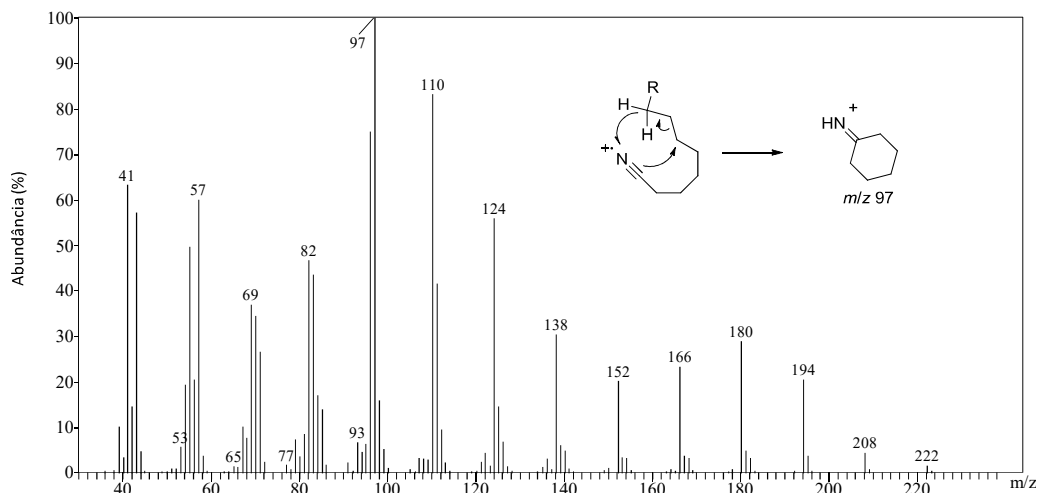
**Figura 31:** Cromatograma referente aos compostos nitrílicos voláteis produzidos por *Pseudomonas veronii* R02 (7-12).

Os índices de retenção referentes aos compostos 7-12 foram calculados em coluna HP-5MS: 1675 (7), 1696 (8), 1796 (9), 1881 (10), 1902 (11), 2085 (12).

#### 2.4.1.1 Identificação dos compostos 8, 9 e 11

Os espectros de massas e os índices de retenção obtidos para os compostos 7 a 12 indicaram que três (8, 9 e 11) estariam relacionados a estruturas saturadas, contendo a funcionalidade nitrila e cadeia carbônica longa, como pode ser observado no espectro referente ao composto 9 (Figura 32). Os índices de retenção referentes aos

compostos **8**, **9** e **11** apresentam diferença de aproximadamente 100 unidades entre si, sugerindo o aumento de um átomo de carbono na cadeia do composto **9**, e dois na cadeia do composto **11**, com relação ao composto **8** (Espectros de massas referentes aos compostos naturais **8**, **9** e **11** podem ser encontrados nas páginas 173, 174 e 175, respectivamente).

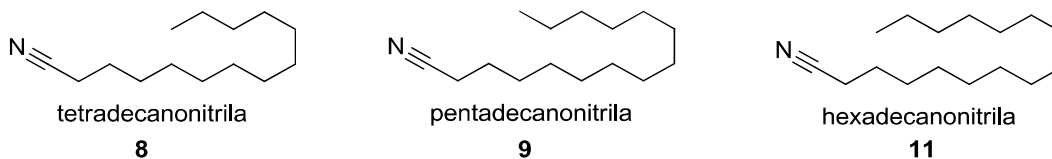


**Figura 32:** Espectro de massas referente ao composto natural **9**.

O espectro obtido para o composto natural **9** apresenta o íon com maior  $m/z$  em 222 e pico base com  $m/z$  97. O pico base com  $m/z$  97, ocorre devido à migração de um átomo de hidrogênio ligado ao carbono 8 da cadeia ao átomo de nitrogênio, e ciclização para formação do anel de seis membros, conforme ilustrado na Figura 32, fragmento característico de nitrilas com cadeia carbônica com número de átomos de carbono maior ou igual a 8, saturada<sup>[116]</sup>. O fragmento com  $m/z$  222 poderia estar relacionado ao  $M^+-1$ , sugerindo uma massa molecular 223  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , fato também comum em nitrilas contendo cadeia carbônica saturada<sup>[116]</sup>.

No espectro de massas ilustrado na Figura 32, é possível observar um perfil de fragmentação semelhante ao encontrado para os compostos **8** e **11**. No caso do composto **8**, o íon com maior  $m/z$  aparece em 208 ( $209 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e pico base com  $m/z$  97 (espectro na página 173). No espectro referente ao composto **11** observa-se o íon com maior  $m/z$  em 236 ( $237 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e pico base com  $m/z$  97 (espectro na página 175).

Desta maneira, as estruturas dos compostos **8**, **9** e **11** foram propostas respectivamente como tetratecanitrila, pentadecanitrila e hexadecanitrila (Figura 33). As estruturas propostas foram confirmadas através da comparação com os respectivos padrões sintéticos comerciais.



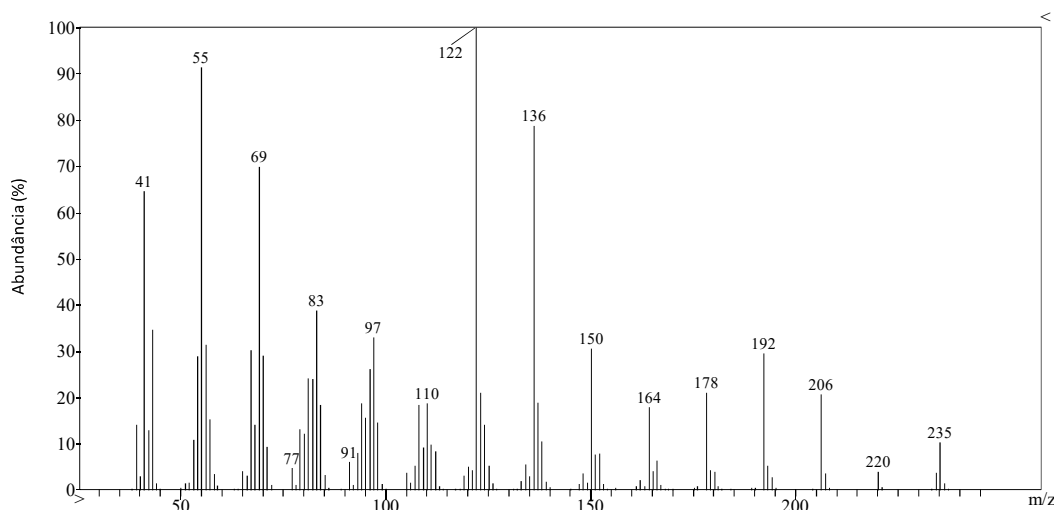
**Figura 33:** Estruturas identificadas para os compostos **8**, **9** e **11**.

A tetradecanonitrila (**8**) já foi descrita como constituinte químico da planta cubana *Zanthoxylum elephantiasis*<sup>[117]</sup> e também como um dos voláteis emitidos por carne bovina comercial<sup>[118]</sup>. Pentadecanonitrila (**9**) ocorre como subproduto da pirólise de lamas de esgoto urbano<sup>[119]</sup>, assim como a hexadecanonitrila (**11**) que também foi descrita em aerossóis atmosféricos urbanos<sup>[120]</sup> e como componente de bio óleo obtido da microalga *Spirulina*<sup>[121]</sup>.

#### 2.4.1.2 Identificação dos compostos **7**, **10** e **12**

Os índices de retenção observados para os compostos **7** e **10** possuem 21 unidades a menos do que os compostos **8** e **11**, respectivamente. Esta diferença indica que os pares de compostos **7-8** e **10-11** podem possuir cadeias carbônicas iguais, diferindo apenas pela presença de uma ligação dupla C-C nos compostos **7** e **10**<sup>[122]</sup>. Os índices de retenção referentes aos compostos **7**, **10** e **12** diferem entre si em cerca de 200 unidades. Assim, o composto **12** pode também estar relacionado à uma estrutura insaturada, com dois átomos de carbono adicionais aos do composto **10**.

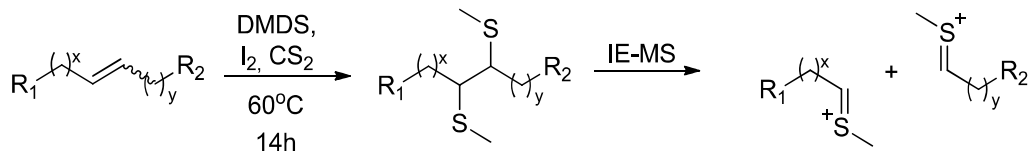
Os espectros de massas obtidos para os compostos **7**, **10** e **12** são semelhantes entre si, corroborando com as informações obtidas pelos índices de retenção. No espectro referente ao composto **10**, por exemplo (Figura 34) é possível observar o perfil de fragmentação característico dos compostos **7**, **10** e **12**. O espectro referente ao composto **10** apresenta um possível pico do íon molecular com  $m/z$  235 e pico base com  $m/z$  122, além dos fragmentos com  $m/z$  41, 55, 69 e 136 com grande intensidade relativa.



**Figura 34:** Espectro de massas referente ao composto **10**.

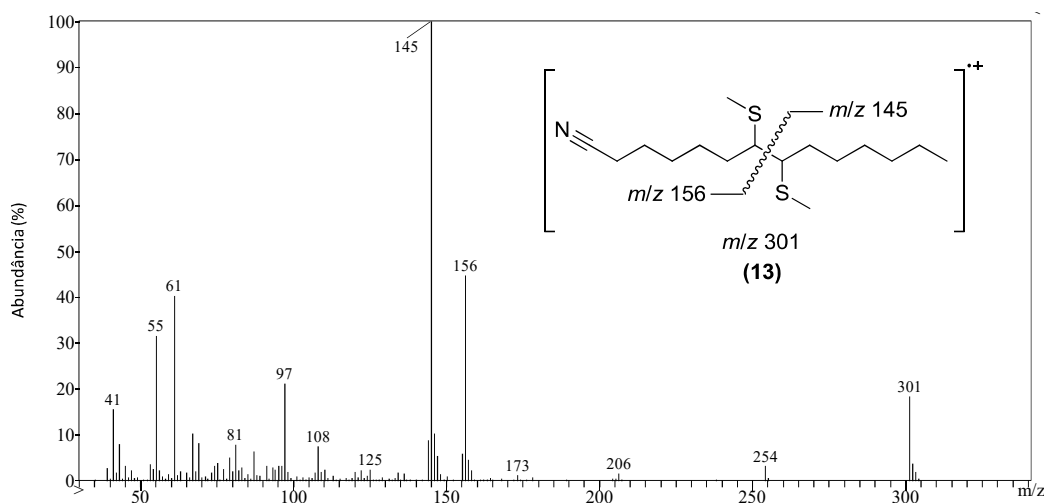
No caso do composto **7**, o possível  $M^+$  ocorre em  $m/z$  207 e pico base com  $m/z$  122 (espectro na página 173). No espectro referente ao composto **12** (espectro na página 175) observa-se o possível íon molecular com  $m/z$  235 e pico base com  $m/z$  55, porém com os fragmentos com  $m/z$  122 e 136 com grande intensidade (espectro na página 175). Desta maneira, as estruturas dos compostos **7**, **10** e **12** foram propostas respectivamente como tetratecenonitrila, pentadecenonitrila e octadecenonitrila, com a posição das ligações duplas C-C a ser determinada.

Para determinar a posição das ligações duplas C-C nos compostos **7**, **10** e **12**, realizou-se uma reação de microderivatização do extrato natural com DMDS (Esquema 10)<sup>[32]</sup>. A derivatização com DMDS é o método mais recomendado para determinação da posição de ligações duplas C-C, especialmente em compostos monoinsaturados<sup>[123]</sup>. A análise do produto da reação em GC-MS produz fragmentos que caracterizam a posição da ligação dupla no alceno parental, através da clivagem da ligação C-C entre os dois tioéteres (Esquema 10).



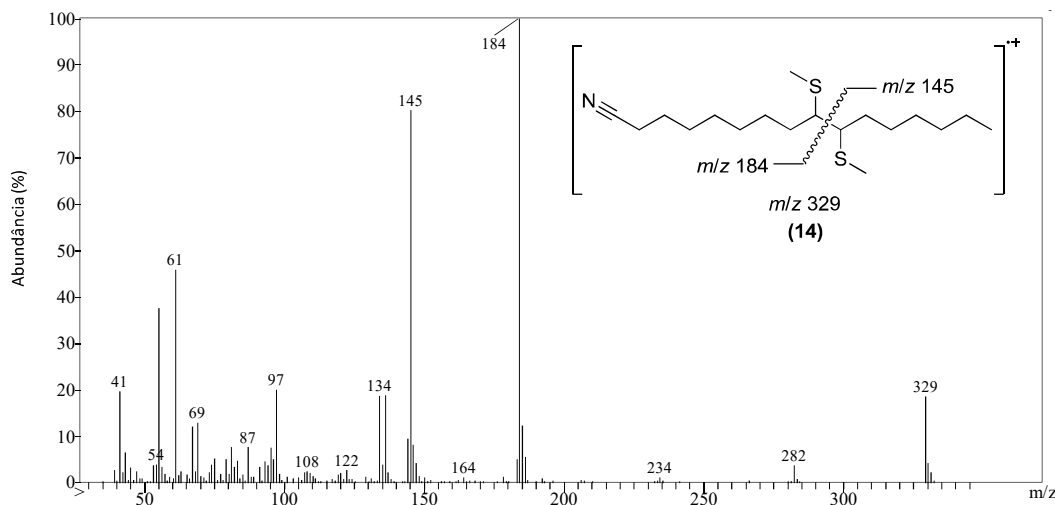
**Esquema 10:** Derivatização de alcenos com DMDS e formação dos fragmentos característicos.

As análises em GC-MS do produto resultante na derivatização em GC-MS demonstraram a formação de 3 adutos, oriundos dos três compostos insaturados. Os espectros de massas dos adutos apresentaram fragmentos com grande intensidade relativa, característicos da clivagem sigma da ligação C-C nas posições em que estão localizados os metiltioéteres. No espectro de massas ilustrado na Figura 35, referente ao produto de reação (**13**), obtido pela derivatização do composto **7**, é possível observar a presença do pico do íon molecular com  $m/z$  301, assim como os fragmentos que indicam a posição da ligação dupla no alceno parental no carbono 7 com  $m/z$  145 e 156.



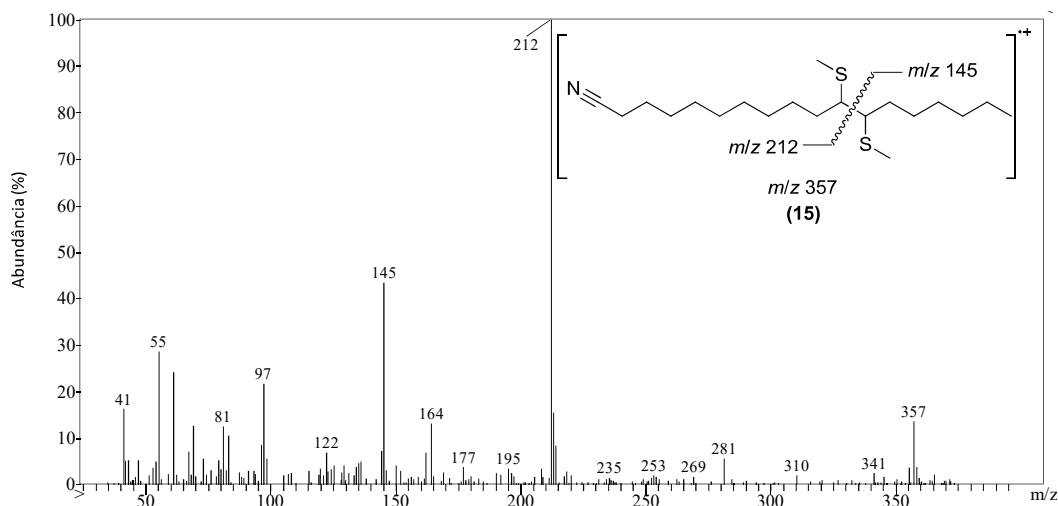
**Figura 35:** Espectro de massas referente ao produto obtido (**13**) pela reação do composto natural **7** com DMDS.

A análise do produto de reação **14** obtido a partir do composto **10** demonstrou que o produto natural estaria relacionado à hexadec-9-enonitrila, devido à presença dos fragmentos com  $m/z$  184 e 145 no espectro de massas, além do pico do íon molecular com  $m/z$  329 (Figura 36).



**Figura 36:** Espectro de massas referente ao produto obtido (**14**) pela reação do composto natural **10** com DMDS.

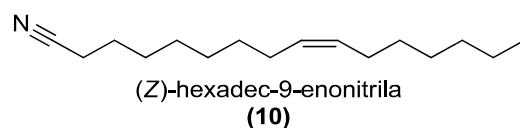
A análise do produto de reação **15** obtido a partir do composto **12** demonstrou que o produto natural estaria relacionado à octadec-11-enonitrila, devido à presença dos fragmentos com  $m/z$  212 e 145 no espectro de massas (Figura 37).



**Figura 37:** Espectro de massas referente ao produto obtido (**15**) pela reação do composto natural **12** com DMDS.

A comparação do índice de retenção e do espectro de massas do produto natural **10** com um padrão sintético, confirmou a estrutura deste composto como (*Z*)-hexadec-9-enonitrila (Figura 38). Os índices de retenção mostraram-se muito semelhantes (1880 natural; 1881 sintética), assim como os respectivos espectros de massas.





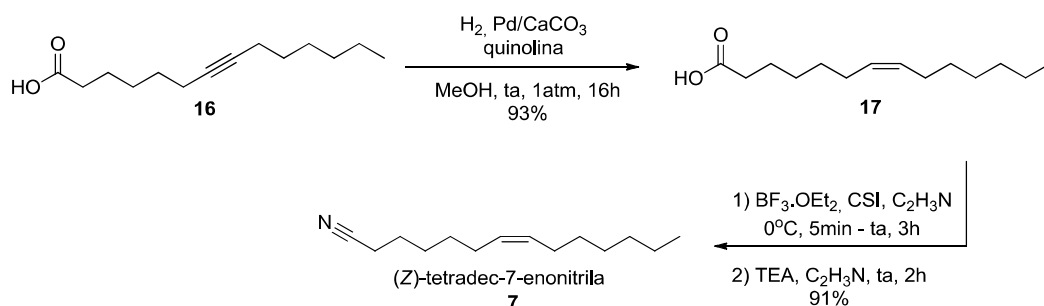
**Figura 38:** Estrutura identificada para o composto natural **10**.

Uma vez que o composto **10** foi identificado como (Z)-hexadec-9-enonitrila, decidiu-se realizar a síntese da (Z)-tetradec-7-enonitrila e da (Z)-octadec-11-enonitrila como possíveis estruturas referentes aos compostos **7** e **12**, respectivamente.

A síntese da (Z)-tetradec-7-enonitrila foi iniciada partindo da hidrogenação catalítica do ácido tetradec-7-inóico (**16**)<sup>[112]</sup>, para obtenção do ácido (Z)-tetradec-7-enóico (**17**) em 93 % de rendimento, utilizando catalizador de Lindlar sob atmosfera de hidrogênio (Esquema 11). A obtenção da (Z)-tetradec-7-enonitrila foi realizada em 91 % de rendimento<sup>[106]</sup>, através da reação do ácido **17** com isocianato de clorosulfonila (CSI), para formação de uma N-clorosulfonilamida que através do tratamento com trietilamina leva à nitrila.

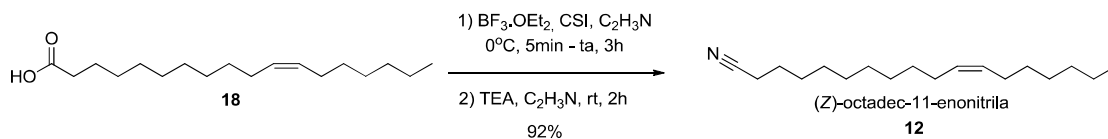
No espectro no infravermelho obtido para o composto sintético é possível verificar a presença da ligação dupla de configuração Z pela banda em 3014 cm<sup>-1</sup> relativa à deformação axial da ligação =C-H. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H destaca-se o multiplete em  $\delta$  5,20-5,50, relativo aos átomos de hidrogênio da ligação dupla C-C, assim como o tripleto em 2,34 relativo aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono  $\alpha$ -nitrila. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C é possível observar o sinal referente ao carbono quaternário da nitrila em  $\delta$  119,76 e os sinais referentes aos carbonos da ligação dupla em  $\delta$  128,92 e 130,62.

Através da comparação do espectro de massas e do índice de retenção da nitrila sintética com a natural **7**, de maneira análoga à realizada anteriormente, foi confirmada a estrutura do composto natural como (Z)-tetradec-7-enonitrila.



**Esquema 11:** Obtenção da (Z)-tetradec-7-enonitrila (**7**).

De maneira análoga ao método utilizado na síntese da nitrila **7**, a (*Z*)-octadec-11-enonitrila foi obtida a partir do ácido (*Z*)-octadec-11-enóico (**18**), em 92 % de rendimento<sup>[106]</sup> e sua estrutura foi confirmada como referente ao composto natural **12**, através de análises realizadas de maneira similar às anteriores (Esquema 12).

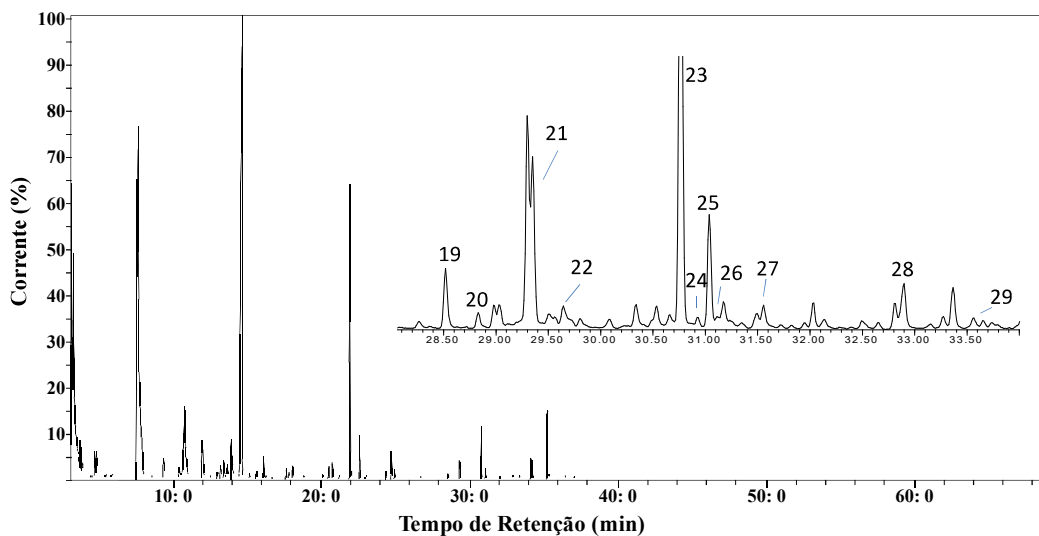


**Esquema 12:** Obtenção da (*Z*)-octadec-11-enonitrila (**12**).

#### 2.4.2 Voláteis produzidos por *Micromonospora echinospora* DSM43816

As culturas de *M. echinospora* foram preparadas em meio líquido e sólido a partir das culturas estoque (25 % glicerol), utilizando meio de cultura GPHF. As culturas foram incubadas durante 120 horas a 28 °C. Após este período, as culturas foram submetidas ao aparato de trapeamento em circuito fechado (CLSA) durante 24 horas<sup>[102]</sup>. Os filtros de carvão ativo foram extraídos com diclorometano e os extratos analisados por GC-MS.

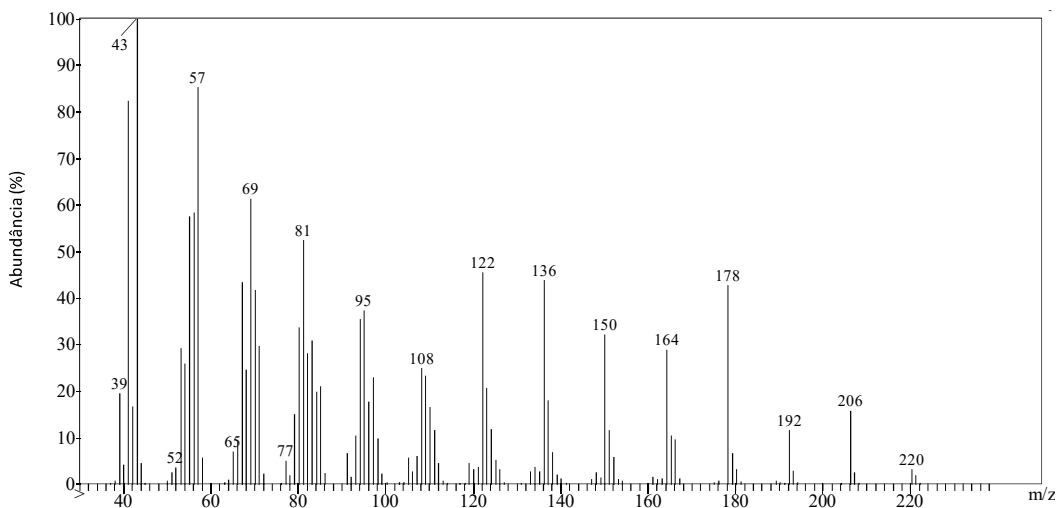
As análises em GC-MS revelaram a presença de onze compostos contendo espectros de massas referentes à compostos nitrílicos, numerados de **19** à **29** (Figura 39) (Os espectros de massas referentes aos compostos naturais 19-29 podem ser encontrados nas páginas 176-181). Os extratos de culturas em meio líquido apresentaram perfil de voláteis com maior quantidade de compostos e em concentração mais alta, com relação ao observado nas culturas oriundas de meio sólido.



**Figura 39:** Nitrilas detectadas por GC-MS em extratos de voláteis de *Micromonospora echinospora* DSM43816.

#### 2.4.2.1 Propostas estruturais iniciais

O espectro de massas referente ao composto majoritário da mistura (**23**) (Figura 40), apresenta um possível  $M^+$  com  $m/z$  221, o íon  $M^+-1$  relativamente intenso com  $m/z$  220 e pico base com  $m/z$  43, sugerindo uma fórmula molecular  $C_{15}H_{27}N$ , com grau de insaturação igual a 3. No espectro também aparecem os fragmentos intensos com  $m/z$  122, 136, 150, 160, 178, 192 e 206, assim como ocorre nas nitrilas monoinsaturadas identificadas em *P. veronii* R02.



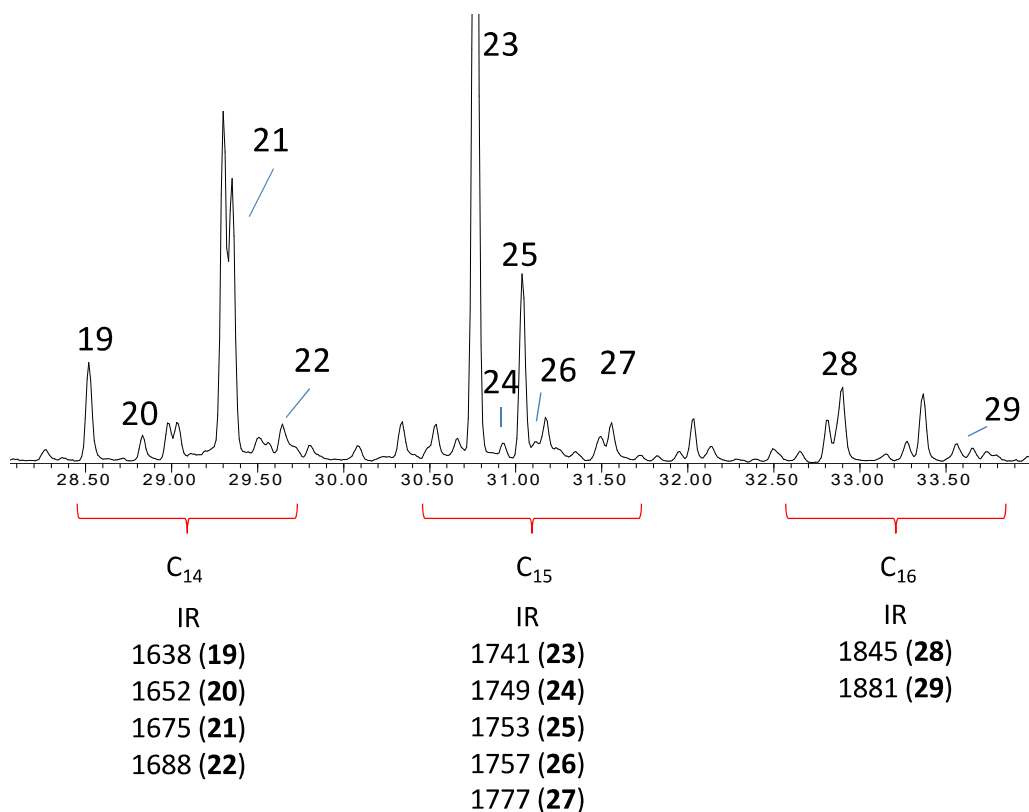
**Figura 40:** Espectro de massas obtido para o composto **23**.

Os espectros de massas obtidos para outros nove compostos (**19**, **20**, **21**, **22**, **24**, **25**, **27**, **28** e **29**) indicaram que estes também estariam relacionados à estruturas monoinsaturadas, contendo a funcionalidade nitrila e cadeias carbônicas de 14 (**19**, **20**, **21** e **22**), 15 (**24**, **25**, **27**) e 16 (**28** e **29**) átomos de carbono (Espectros nas páginas 176-181) .

Os índices de retenção referentes aos compostos **19-29** foram calculados em coluna HP-5MS<sup>[36]</sup>: 1638 (**19**), 1652 (**20**), 1675 (**21**), 1688 (**22**), 1741 (**23**), 1749 (**24**), 1753 (**25**), 1757 (**26**), 1777 (**27**), 1845 (**28**), 1881 (**29**) (Figura 41).

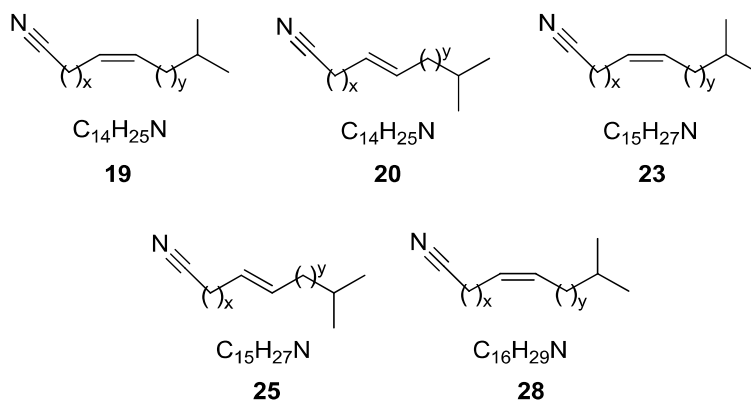
O valor do índice de retenção calculado para o composto majoritário (**23**) (1741) é 40 unidades menor, quando comparado ao valor encontrado para o composto linear **10** no estudo com *Pseudomonas veronii* R02 (1881). Esta diferença no índice de retenção sugere a presença de ramificações metílicas na estrutura do composto **23**, uma vez que uma variação muito menor (até cerca de 20 unidades) seria esperada para um composto linear apenas com a monoinsaturação em outras posições na cadeia carbônica<sup>[36]</sup>.

Em uma interpretação mais minuciosa do espectro de massas mostrado no exemplo da Figura 40, é possível observar um aumento na intensidade relativa do fragmento com  $m/z$  206, quando comparado ao 220 e ao 192, sugerindo que a ramificação metílica poderia estar localizada na posição  $\omega-1$ , justificando este aumento na intensidade relativa do pico 206 ( $M^+-15$ ). O mesmo tipo de comportamento foi observado nos espectros referentes aos compostos **19**, **20**, **25** e **28**, sugerindo a posição da ramificação também na posição  $\omega-1$  (Espectros nas páginas 176-180).



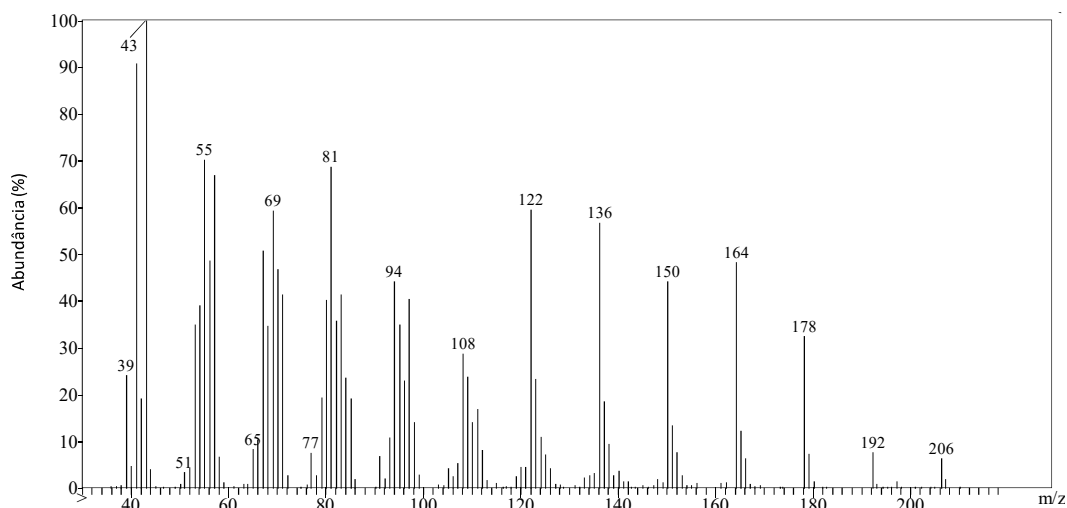
**Figura 41:** Cromatograma referente aos compostos naturais **19-29**, contendo os respectivos índices de retenção e número de átomos de carbono de cada estrutura.

A diferença observada entre os índices de retenção dos pares de compostos **19-20** e **23-25** (~13 unidades), aliado à grande semelhança entre os respectivos espectros de massas sugere que estes pares referem-se à pares de estereoisômeros *E* e *Z*. Desta maneira, seria esperado que os compostos **19** e **23** estivessem relacionados à estereoquímica *Z*, enquanto que os compostos **20** e **25** seriam *E*. A diferença entre os valores observados para os compostos **19** (*Z*-C<sub>14</sub>, 13-Metil) e **23** (*Z*-C<sub>15</sub>, 14-Metil) é de 103 unidades, entre os compostos **20** (*E*-C<sub>14</sub>, 13-Metil) e **25** (*E*-C<sub>15</sub>, 14-Metil), 101 unidades e uma diferença de 12 unidades entre ambos os pares de estereoisômeros. Com base nestas diferenças, pode-se supor que o composto **28** estaria relacionado com a estereoquímica *Z* (*Z*-C<sub>16</sub>, 15-Metil), uma vez que seu índice de retenção é 104 unidades maior, comparado ao apresentado pelo composto **23**. A Figura 42 ilustra as propostas estruturais elaboradas a partir do conjunto apresentados para os compostos **19, 20, 23, 25** e **28**.



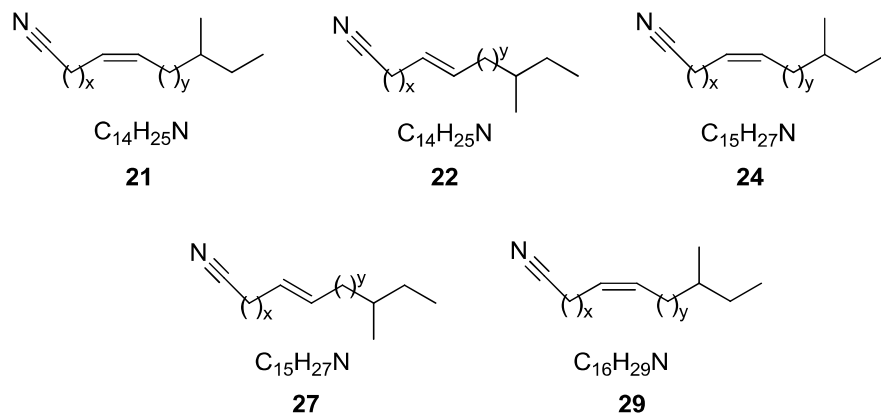
**Figura 42:** Propostas estruturais iniciais para os compostos **19**, **20**, **23**, **25** e **28** (x e y representam o número de carbonos, que variam de acordo com a posição da ligação dupla na cadeia).

Os compostos **21**, **22**, **24**, **27** e **29** apresentaram perfis de fragmentação semelhantes entre si, com variações significativas observadas apenas pelo aumento da massa molecular (Espectros nas páginas 177-181). No exemplo ilustrado na Figura 43, observa-se o espectro de massas referente ao composto **21**, no qual observa-se o pico  $M^+ - 1$  com  $m/z$  206 e pico base com  $m/z$  43. O fragmento  $M^+ - 29$  ( $m/z$  178) mostrou-se relativamente intenso (comparado ao  $M^+ - 15$ ,  $m/z$  192) em ambos os compostos e os índices de retenção destes mostraram-se maiores do que os observados para os compostos com ramificações supostamente na posição  $\omega - 1$ . A partir destes dois fatos, os compostos **21**, **22**, **24**, **27** e **29** foram propostos como contendo ramificações metílicas na posição  $\omega - 2$ .



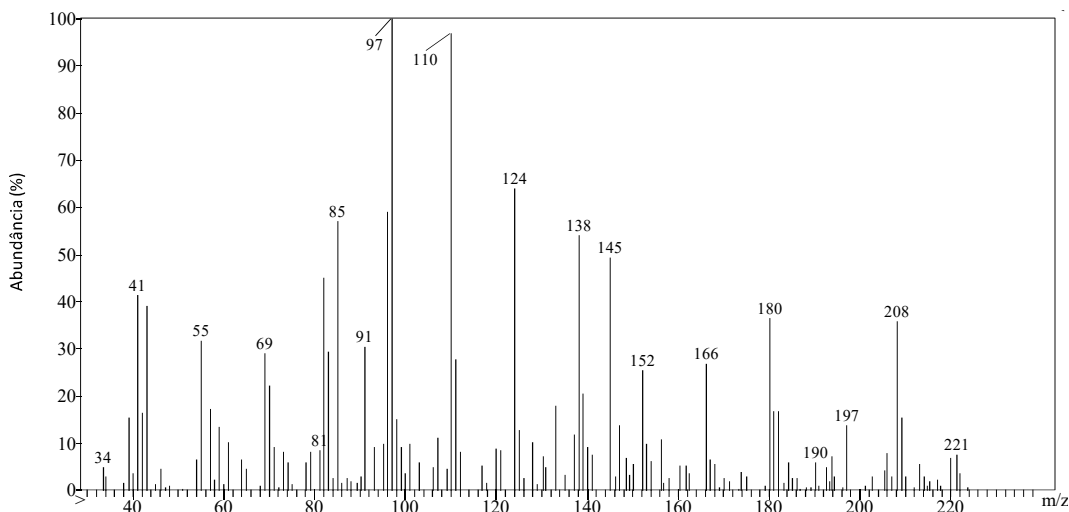
**Figura 43:** Espectro de massas referente ao composto **21**.

Os dados obtidos pela análise dos espectros de massas, aliado a comparação dos índices de retenção apresentados pelos compostos **21**, **22**, **24**, **27** e **29**, de maneira análoga à realizada anteriormente, resultou em propostas iniciais quanto à estrutura destes compostos (Figura 44).



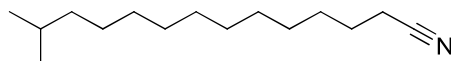
**Figura 44:** Propostas estruturais iniciais para os compostos **21**, **22**, **24**, **27** e **29** (x e y representam o número de átomos de carbono, que variam de acordo com a posição da ligação dupla na cadeia).

O espectro referente ao composto **26** apresenta o íon  $M^+-1$ , com  $m/z$  222 (possível fórmula molecular,  $C_{15}H_{29}N$ ) e pico base com  $m/z$  97 (Figura 45). O pico base ocorre com  $m/z$  97, devido à migração de um átomo de hidrogênio ligado ao carbono 8 da cadeia ao átomo de nitrogênio, e ciclização para formação do anel de seis membros, fragmento característico de nitrilas com cadeia carbônica com mais de oito átomos de carbono, saturada.



**Figura 45:** Espectro de massas referente ao composto **26**.

O índice de retenção calculado para o composto **26** (1757), é 39 unidades menor do que o composto linear pentadecanonitrila (**9**) (IR, 1796), sugerindo uma cadeia carbônica também ramificada para o composto natural **26**. No espectro de massas (Figura 45) o fragmento 208 ( $M^+ - 15$ ) ocorre com intensidade relativa elevada, sugerindo a posição da ramificação metílica na posição  $\omega - 1$ . Desta maneira, a estrutura proposta para o composto **26** seria a 13-metiltetradecanonitrila, conforme ilustra a Figura 46.



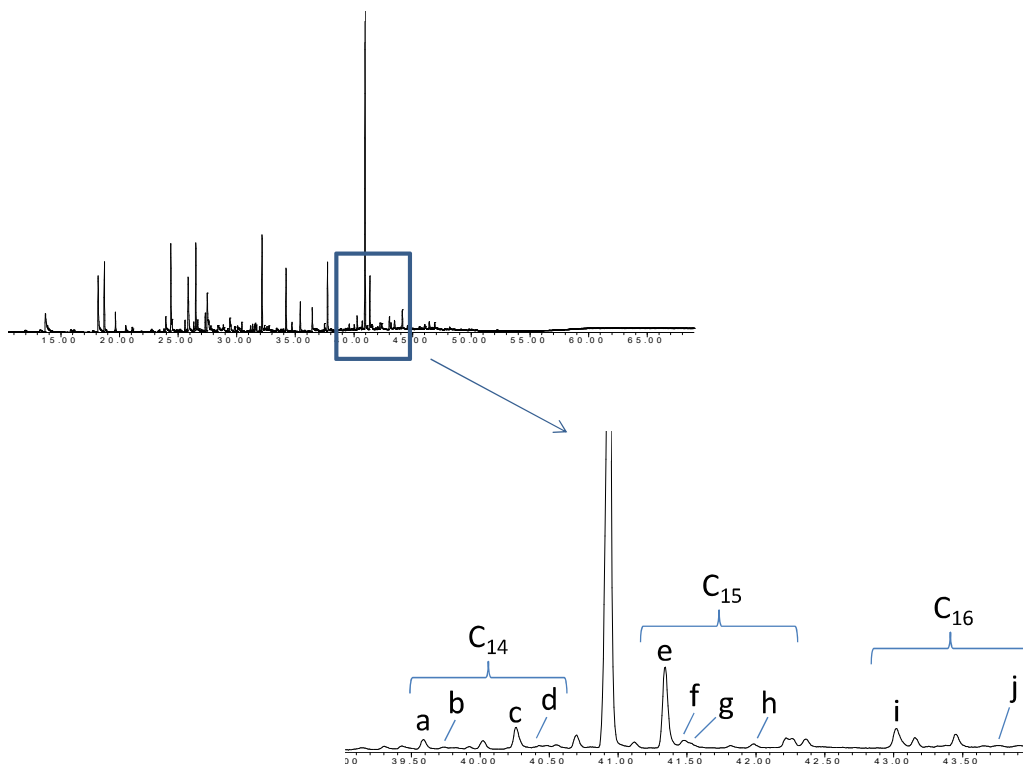
**26**

**Figura 46:** 13-metiltetradecanonitrila, estrutura proposta para o composto natural **26**.

#### 2.4.2.2 Determinação da posição das ligações duplas nos compostos insaturados

A determinação da posição das ligações duplas nos compostos naturais insaturados foi realizada através da derivatização do extrato com DMDS<sup>[32]</sup>, e análise dos produtos por GC-MS. Após a reação, observou-se a formação de 10 derivados, que estão indicados no cromatograma da Figura 47 (picos **a-j**).



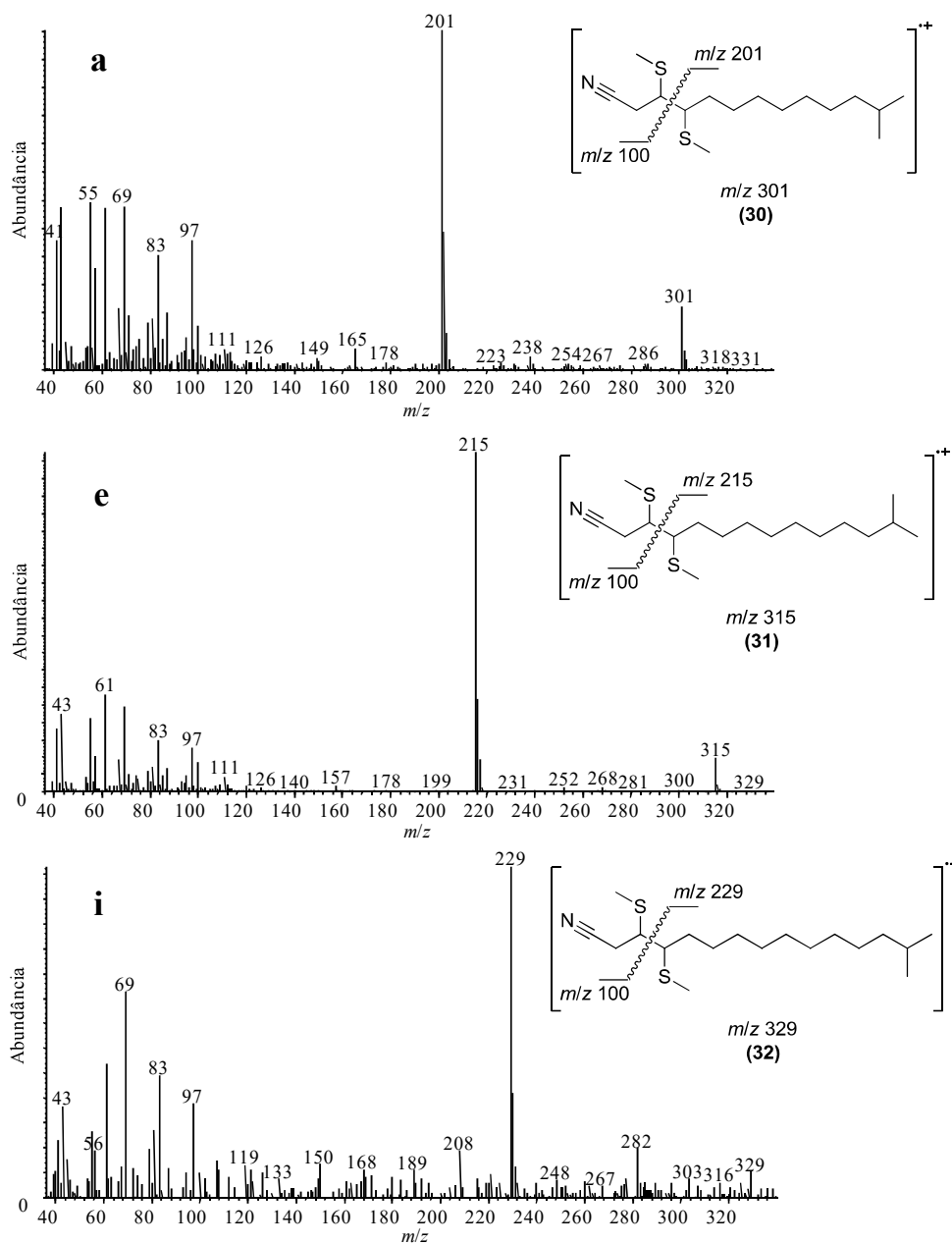


**Figura 47:** Cromatograma referente aos produtos obtidos pela derivatização do extrato de voláteis de *Micromonospora echinospora* DSM43816 com DMDS.

Dentre os picos cromatográficos destacados na Figura 47, através dos respectivos espectros de massas, é possível diferenciar os compostos que estão relacionados aos alcenos parentais com 14 (**a-d**), 15 (**e-h**) e 16 (**i, j**) átomos de carbono. Exemplos de espectros de massas apresentados pelos derivativos formados a partir de um alceno C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> e C<sub>16</sub>, podem ser observados na Figura 48.

No espectro de massas **a** da Figura 48 observa-se a formação do composto **30**, oriundo do composto natural **19**. Neste espectro é possível observar o pico do íon molecular referente ao derivativo **30** ( $m/z$  301), assim como o pico base com  $m/z$  201, indicando que a posição da ligação dupla no composto parental **19** estaria localizada na posição 3 da cadeia carbônica. O espectro de massas **e** apresenta o íon  $M^+$  com  $m/z$  315 e pico base com  $m/z$  215, indicando que neste caso a ligação dupla também estaria localizada no carbono 3. A mesma situação é encontrada no caso do espectro de massas **i**, no qual se observa o pico base com  $m/z$  229 e  $M^+$  com  $m/z$  329. Em ambos os espectros apresentados o fragmento com  $m/z$  100 também caracteriza a posição da ligação dupla, ainda que ocorrendo em menor intensidade relativa. Os espectros de massas de todos os 7 compostos restantes mostraram que a posição das ligações duplas

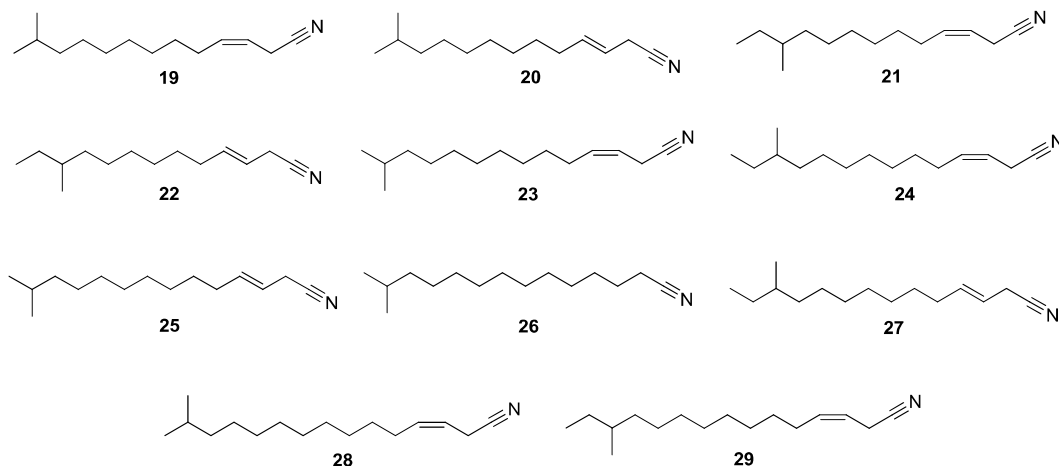
nos alcenos parentais estava localizada no carbono 3, assim como nos exemplos ilustrados na Figura 48.



**Figura 48:** Espectro de massas referente aos derivados 'a', 'e' e 'i' obtidos pela derivatização do extrato de *Micromonospora echinospora* DSM43816 com DMDS.

A partir da determinação da posição das ligações duplas nos compostos insaturados e do conjunto de dados apresentados, foi realizada a proposta estrutural para as onze nitrilas liberadas por *M. echinospora* (DSM43816), conforme ilustra a

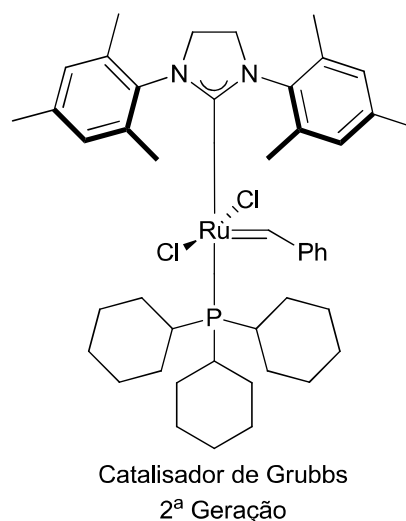
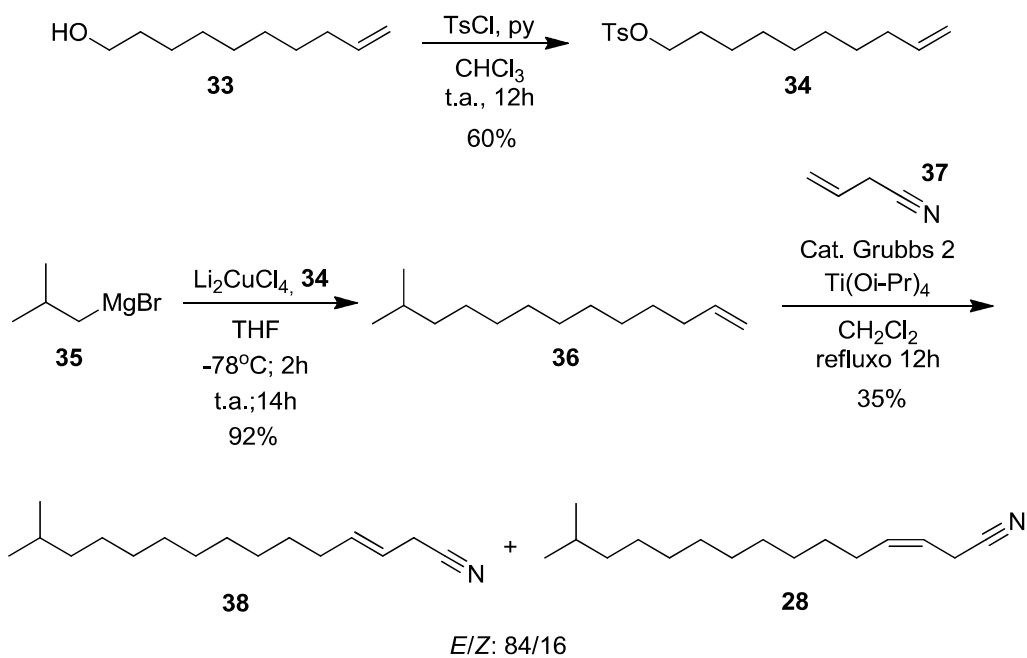
Figura 49. Foram então elaboradas sínteses de padrões destas estruturas, para comprovar as propostas realizadas.



**Figura 49:** Estruturas propostas para os compostos **19-29**, produzidos por *M. echinospora* (DSM43816).

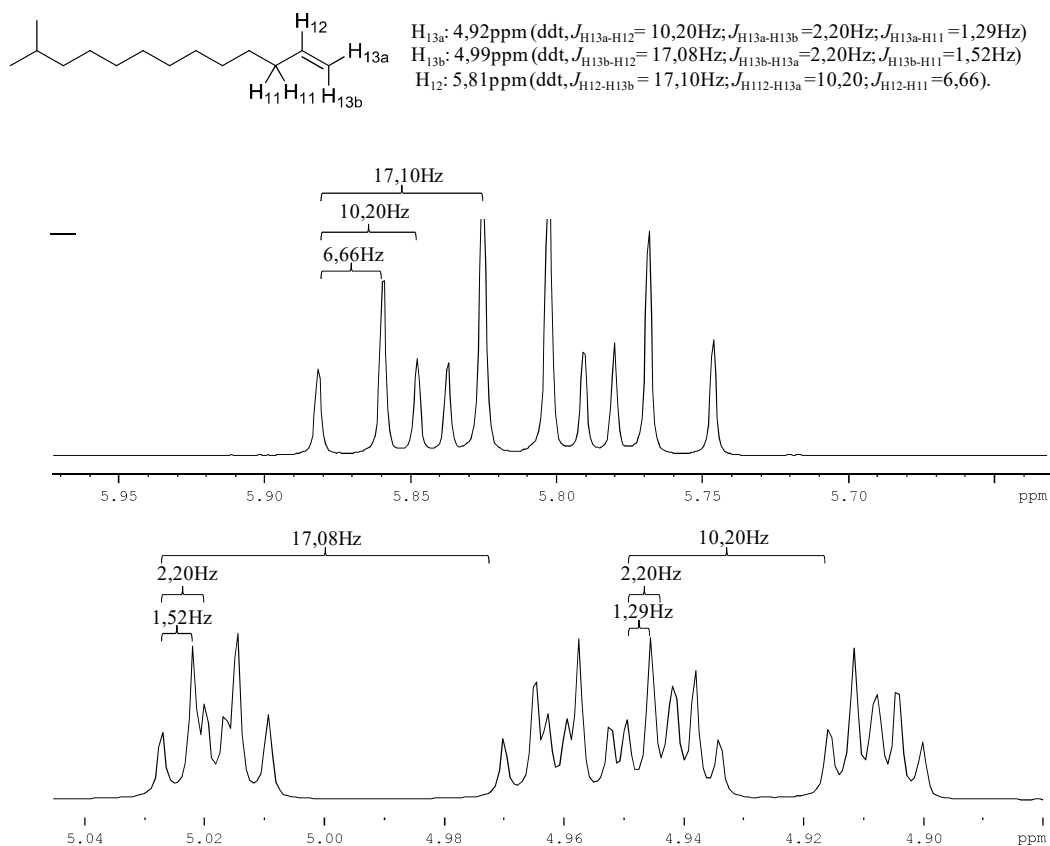
#### 2.4.2.3 Síntese dos compostos **19, 20, 23, 25 e 28**

Inicialmente foi realizada a obtenção do tosilato **A** em 60 % de rendimento, através da reação do álcool **33** com cloreto de tosilato<sup>[124]</sup>. A reação de Grignard entre o composto **34** e o tosilato **35** forneceu o alceno terminal **36** em 92 % de rendimento<sup>[125]</sup>. A reação de metátese entre o alceno **36** e a but-3-enonitrila (**37**) catalisada pelo catalisador de Grubbs de segunda geração forneceu os compostos (*E*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (**38**) e (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila (**28**) em uma razão de 84:16 e rendimento de 35 % (Esquema 13)<sup>[126-127]</sup>. O composto (*Z*)-14-metilpentadec-3-enonitrila foi confirmado por GC-MS como correspondente ao composto natural **28**, enquanto que o composto **38** não corresponde a nenhum dos compostos naturais.



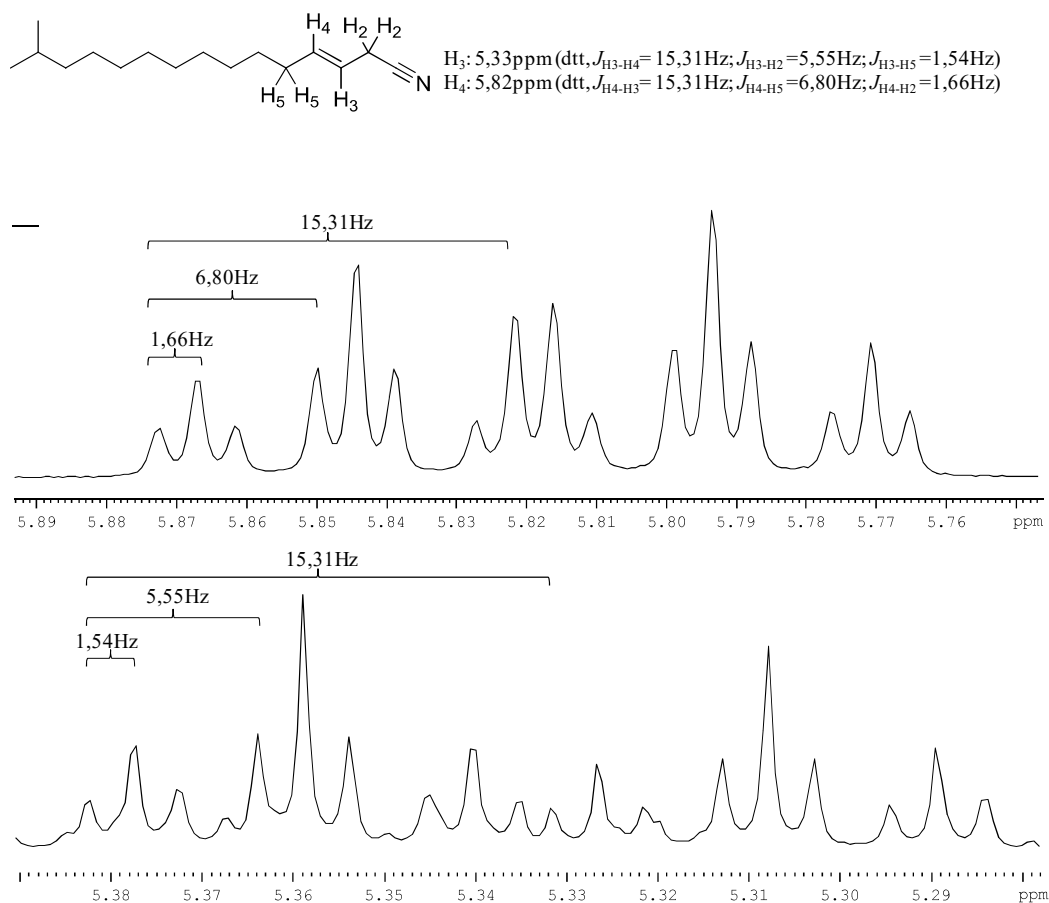
**Esquema 13:** Obtenção das nitrilas **38** e **28**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  referente ao alceno **36** apresentou os sinais característicos para a estrutura, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios olefinicos (Figura 50). Os sinais referentes aos hidrogênios  $\text{H}_{13\text{a}}$ ,  $\text{H}_{13\text{b}}$  e  $\text{H}_{12}$  ocorrem como duplo duplo tripleto em  $\delta$  4,92, 4,99 e 5,81, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destaca-se a presença dos sinais em  $\delta$  114,08 e 139,27, referentes aos carbonos  $sp^2$ . No respectivo espectro de massas é possível observar a presença do íon  $\text{M}^+$  com  $m/z$  196.



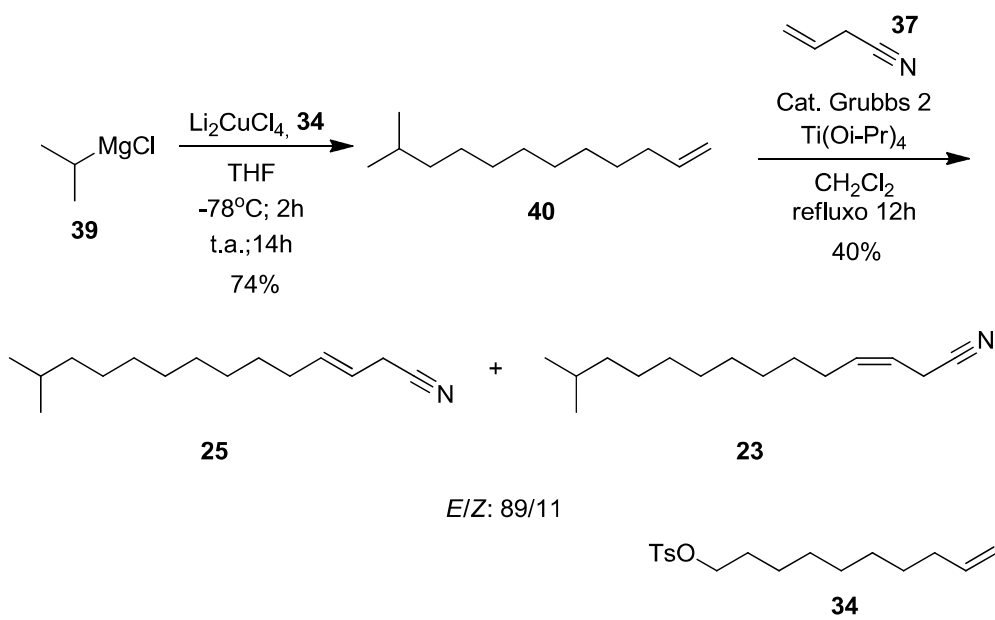
**Figura 50:** Ampliação da região dos sinais dos átomos de hidrogênio olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **36**.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  referente à nitrila **38** observam-se os sinais característicos para a estrutura, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos (Figura 50). Os sinais referentes aos hidrogênios  $H_3$  e  $H_4$  ocorrem ambos como duplo triplo tripletos em  $\delta$  5,33 e 5,82, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destaca-se a presença dos sinais em  $\delta$  116,94 e 136,48, referentes aos átomos de carbono da ligação dupla e em  $\delta$  117,90 referente ao carbono quaternário da nitrila. No respectivo espectro de massas é possível observar a presença do o íon  $M^+$  com  $m/z$  235, além dos demais fragmentos referentes à molécula.



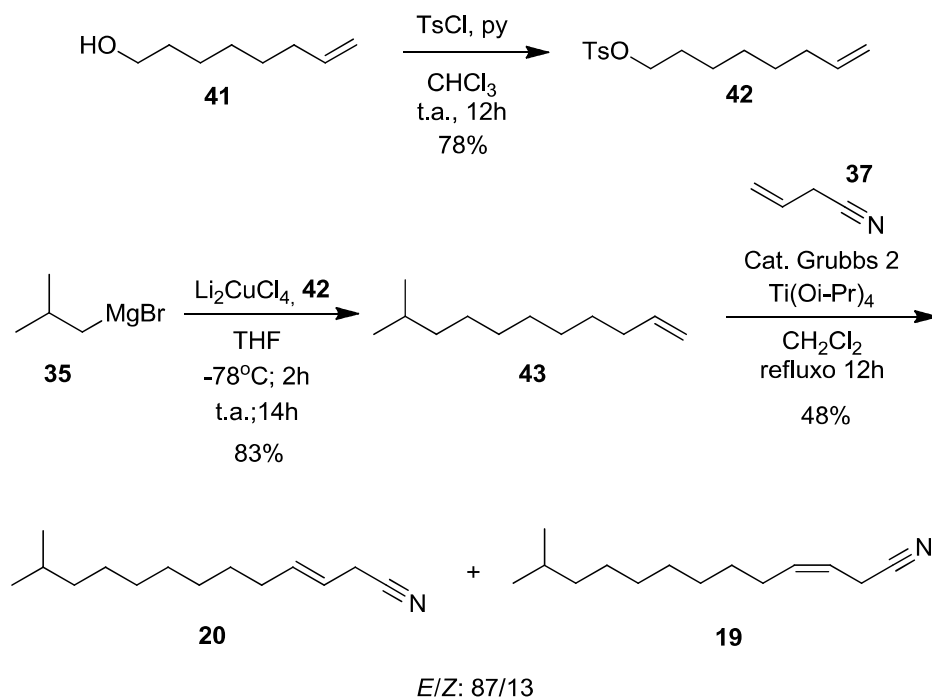
**Figura 51:** Ampliação da região dos sinais dos átomos de hidrogênio olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **38**.

A reação de Grignard entre o reagente **39** e o tosilato **34** (Esquema 14) resultou no alceno **40** em 74 % de rendimento<sup>[125]</sup>. Posteriormente, a reação de acoplamento cruzado do alceno **40** com a nitrila **37** gerou uma mistura das nitrilas **25** e **23** em 40 % de rendimento em uma razão *E:Z* de 84:16<sup>[126-127]</sup>. As nitrilas (*Z*)-13-metiltetradec-3-enonitrila e (*E*)-13-metiltetradec-3-enonitrila foram confirmadas como componentes dos extratos naturais de *M. echinospora* DSM43816 (**23** e **25**, respectivamente), com índices de retenção e espectros de massas idênticos aos naturais.



**Esquema 14:** Síntese das nitrilas **23** e **25**.

O tosilato **42** foi sintetizado através da reação do álcool **41** com cloreto de tosilato em 78 % de rendimento (Esquema 15)<sup>[124]</sup>. O tosilato **42** foi empregado na reação de Grignard com o composto **35**, gerando o alceno **43** em 83 % de rendimento<sup>[125]</sup>. O composto **43** foi submetido à reação de metátese com o alceno **37**, gerando uma mistura, com relação 87:13, dos compostos **20** e **19** em 48 % de rendimento<sup>[126, 128]</sup>. Os compostos (*Z*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**19**) e (*E*)-12-metiltridec-3-enonitrila (**20**) foram confirmados como componentes do extrato de voláteis de *M. echinospora* DSM43816, através da comparação dos respectivos índices de retenção e espectros de massas.

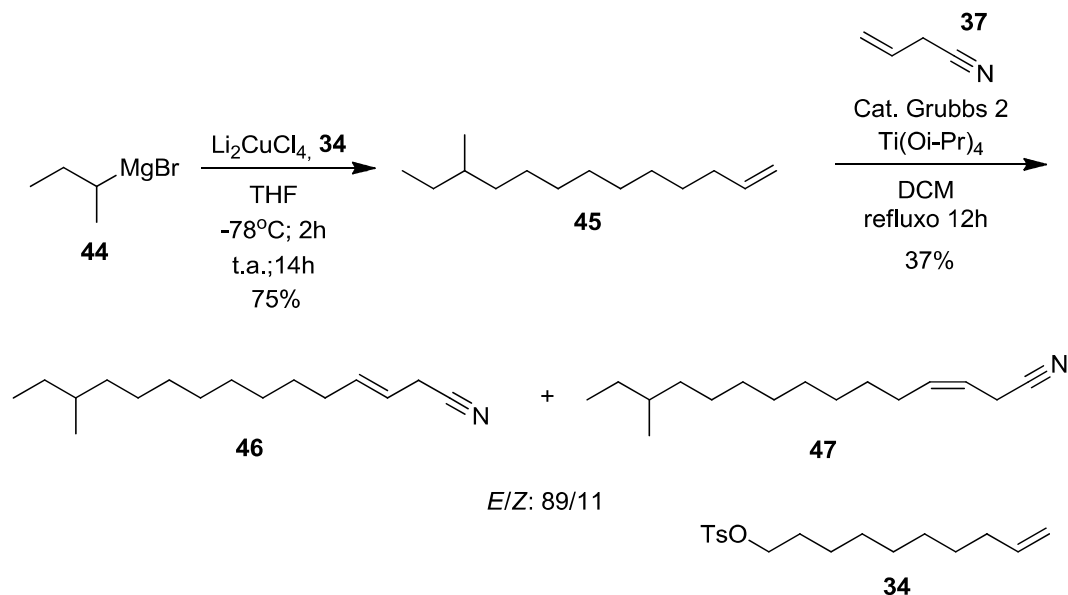


**Esquema 15:** Obtenção dos compostos **19** e **20**.



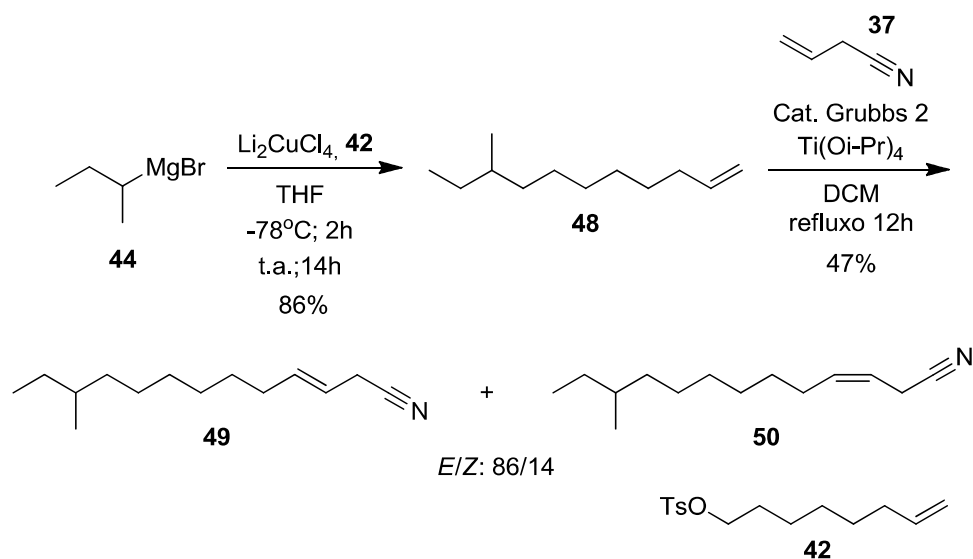
#### 2.4.2.4 Síntese dos compostos 21, 22, 24, 27 e 29

A reação de acoplamento do composto **44** com o tosilato **34** resultou no alceno **45** em 75 % de rendimento<sup>[125]</sup>. O composto **45** foi empregado na reação de metátese com o alceno **37**, resultando na mistura dos compostos **46** e **47** em uma razão de 89:11, em 37 % de rendimento<sup>[127]</sup>. Os compostos **46** e **47** não foram caracterizados como presentes nos extratos naturais de *M. echinospora*.



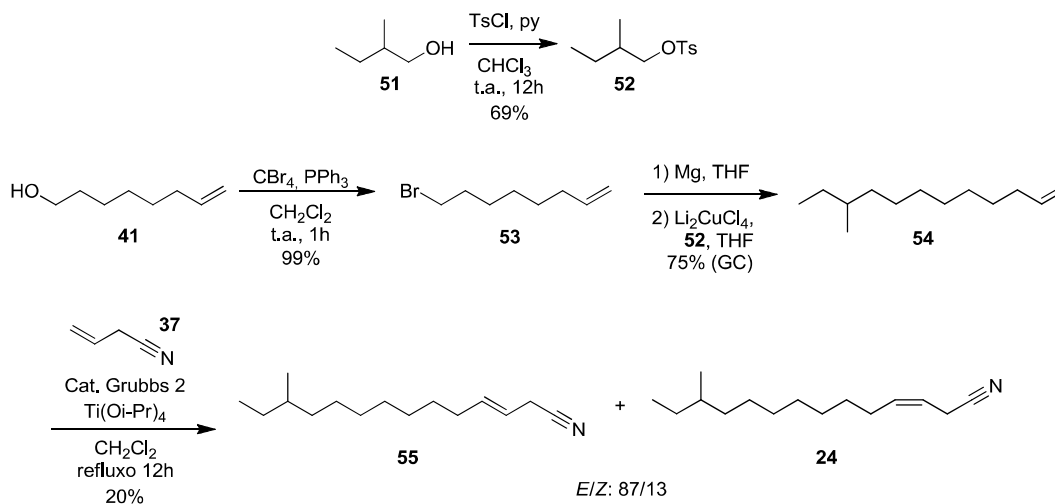
**Esquema 16:** Síntese das nitrilas **46** e **47**.

A reação de Grignard entre o composto **44** e o tosilato **42** gerou o composto **48** em 86 % de rendimento<sup>[125]</sup>. A reação de acoplamento cruzado entre a nitrila **37** e o alceno terminal **48** gerou uma mistura dos compostos **49** e **50** em uma razão de 86/14 em 47 % de rendimento<sup>[126-127]</sup>. Os compostos **49** e **50** não foram caracterizados como constituintes dos extratos de voláteis de *M. echinospora*.



**Esquema 17:** Obtenção dos compostos **49** e **50**.

A reação entre cloreto de toсила e o álcool **51** gerou o tosilato **52** em 69 % de rendimento<sup>[124]</sup>. O brometo **53** foi gerado a partir do álcool **41** através da reação de Appel, com tetrabrometo de carbono e trifenílfosfina em 99 % de rendimento<sup>[111]</sup>. A reação do reagente de Grignard gerado a partir do brometo **53** com o tosilato **52** resultou no alceno terminal **54** em 75 % de rendimento<sup>[125]</sup>. O alceno **54** foi submetido à reação de metátese com a nitrila **37**, para gerar uma mistura entre os compostos **55** e **24** em 20 % de rendimento<sup>[126-127]</sup>. A 12-metiltetradec-3-enonitrila foi confirmada como composto **24**, presentes nos extratos de *M. echinospora* DSM43816, enquanto que a nitrila **55** não foi detectada nos extratos naturais.



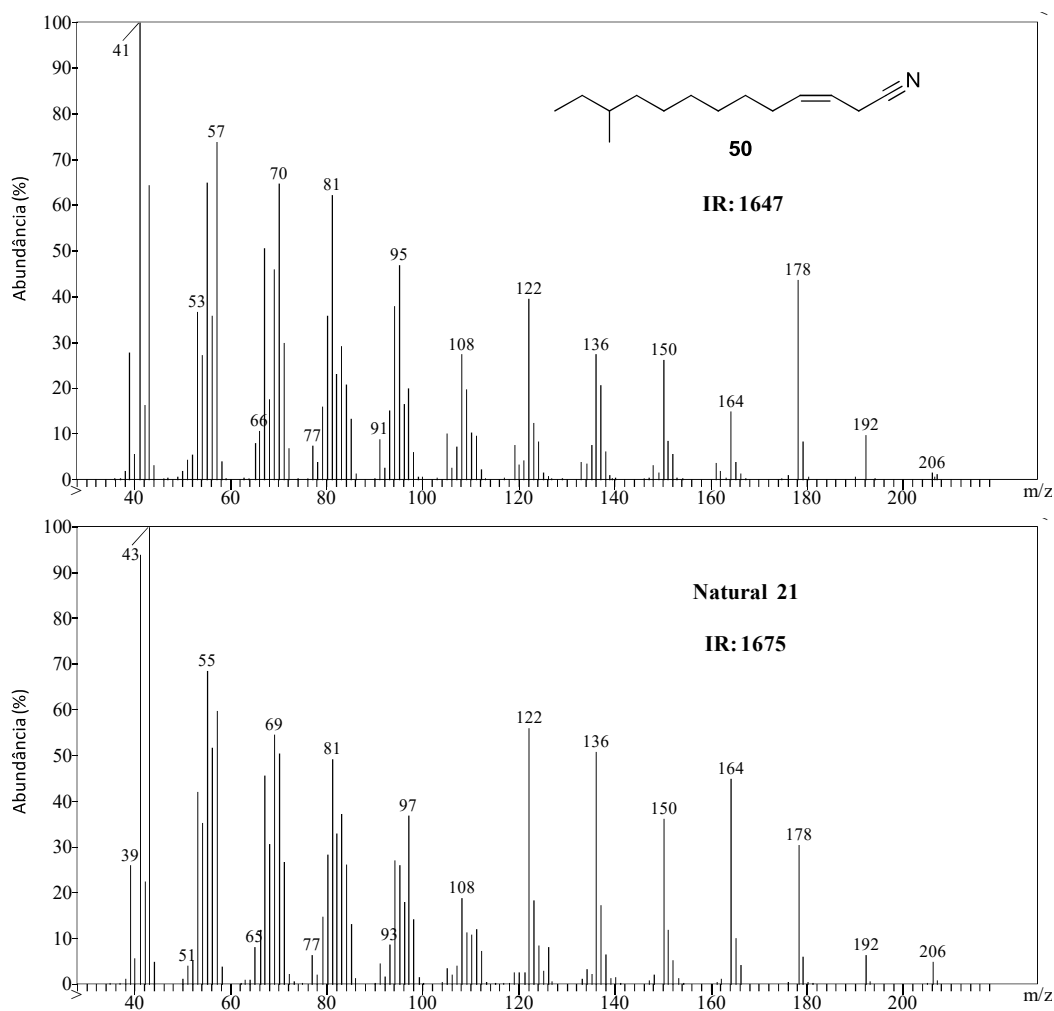
**Esquema 18:** Obtenção das nitrilas **55** e **24**.

Após a obtenção dos padrões sintéticos descritos, os compostos **19**, **20**, **23**, **24**, **25** e **28** foram identificados. Entretanto, as estruturas propostas aos compostos **21**, **22**, **27** e **29**, inicialmente propostas como contendo ramificações metílicas nas posições  $\omega$ -2, não estavam relacionadas aos padrões obtidos.

A Figura 52 mostra como exemplo a comparação entre os espectros de massas e índices de retenção dos compostos **21** (natural) e **50**. No espectro de massas do composto **50**, pode-se observar que o pico referente ao íon  $M^+ - 29$  ( $m/z$  178) possui uma intensidade relativa muito maior do que a apresentada no espectro referente ao composto natural (**21**). Entretanto, a intensidade do fragmento com  $m/z$  164 ( $M^+ - 43$ ) no espectro do composto **21** é maior quando comparada ao composto **50**, sugerindo que o composto **21** poderia estar relacionado à uma estrutura contendo uma ramificação metílica na posição  $\omega$ -3. Esta possibilidade foi descartada, uma vez que o índice de retenção do composto natural é maior do que o calculado para o composto **50**, que contém a ramificação metílica na posição  $\omega$ -2. Ramificações metílicas na posição  $\omega$ -2 apresentam os índices de retenção mais elevados quando comparados à qualquer outra posição de ramificação na estrutura<sup>[129]</sup>. Desta maneira, outra possibilidade seria uma estrutura contendo a ramificação metílica na posição  $\omega$ -2 e a ligação dupla no carbono 2 da cadeia. Esta possibilidade também foi descartada, pois seria esperada uma diferença de cerca de 60 unidades no índice de retenção do composto **21**, comparado ao **50**, enquanto que a diferença observada foi de apenas 28

unidades, além dos resultados obtidos nas derivatizações com DMDS<sup>[36]</sup>. As mesmas observações podem ser extrapoladas para os compostos **22**, **27** e **29**.

Através das comparações entre os índices de retenção e espectros de massas relatadas, a estrutura dos compostos **21**, **22**, **27** e **29** foi proposta como linear, contendo a insaturação no carbono 3.

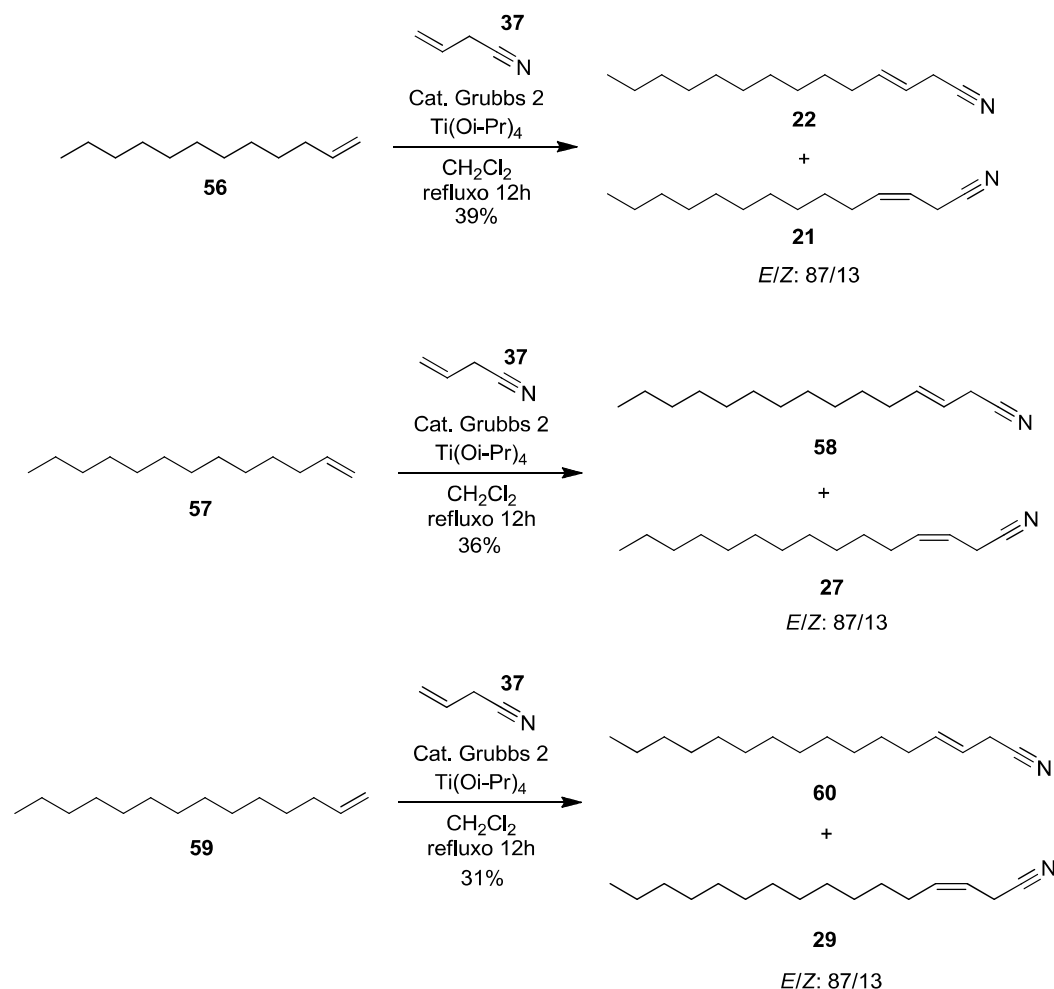


**Figura 52:** Comparação entre os espectros de massas e índices de retenção do composto natural **21** e do composto sintético **50**.

Uma misura dos compostos **21** e **22** foi obtida em 39 % de rendimento através da reação de metátese entre o 1-dodeceno (**56**) e a nitrila **37** (Esquema 19)<sup>[126-127]</sup>. A reação de metátese entre o 1-trideceno (**57**) e a nitrila **37** gerou em 36 % de rendimento uma mistura entre os compostos **58** e **27** (Esquema 19)<sup>[126-127]</sup>. Utilizando-se 1-tetradeceno (**59**) e a nitrila **37**, uma mistura entre as nitrilas **60** e **29** foi obtida em uma razão de 87:13 e 31 % de rendimento (Esquema 19)<sup>[126-127]</sup>. Através da síntese

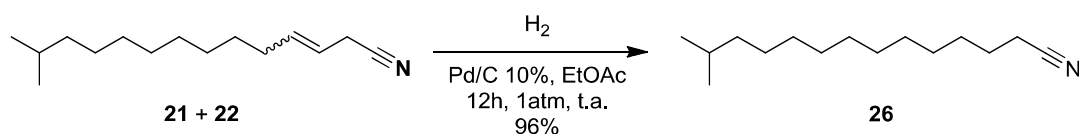
dos padrões e comparação dos respectivos espectros de massas e índices de retenção, a estrutura dos compostos naturais foi confirmada como (*Z*)-tetradec-3-enonitrila (**21**), (*E*)-tetradec-3-enonitrila (**22**), (*Z*)-pentadec-3-enonitrila (**27**) e (*Z*)-hexadec-3-enonitrila (**29**).

A (*Z*)-tetradec-3-enonitrila (**21**) já foi descrita como produto de estudo de síntese estereosseletiva de nitrilas (*Z*)- $\beta,\gamma$ -insaturadas<sup>[130]</sup> e a (*Z*)-hexadec-3-enonitrila (**29**) descrita como aditivo para baterias de lítio<sup>[131]</sup>.



**Esquema 19:** Obtenção das nitrilas **21**, **22**, **27** e **29**.

O último componente identificado, a nitrila saturada **26**, foi obtido em 96 % de rendimento através da hidrogenação catalítica da mistura dos compostos **23** e **25**, resultando na 13-metiltetradecanonitrila (**26**), a qual foi confirmada como parte do extrato de *M. echinospora* DSM43816 (Esquema 20).



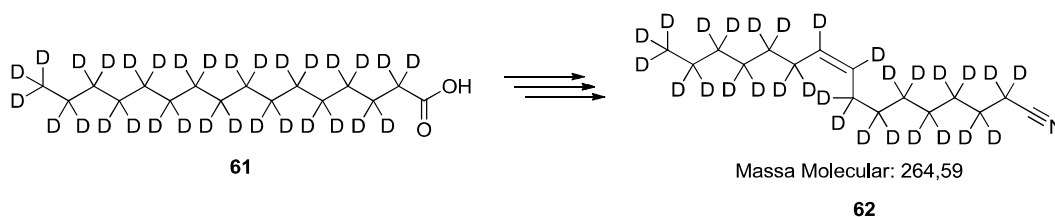
**Esquema 20:** Síntese do composto **26**.

### 2.2.3 Estudo biossintético das nitrilas produzidas por *Pseudomonas veronii* R02 e *Micromonospora echinospora* DSM43816

#### 2.4.3.1 Ensaaios com *Pseudomonas veronii* R02

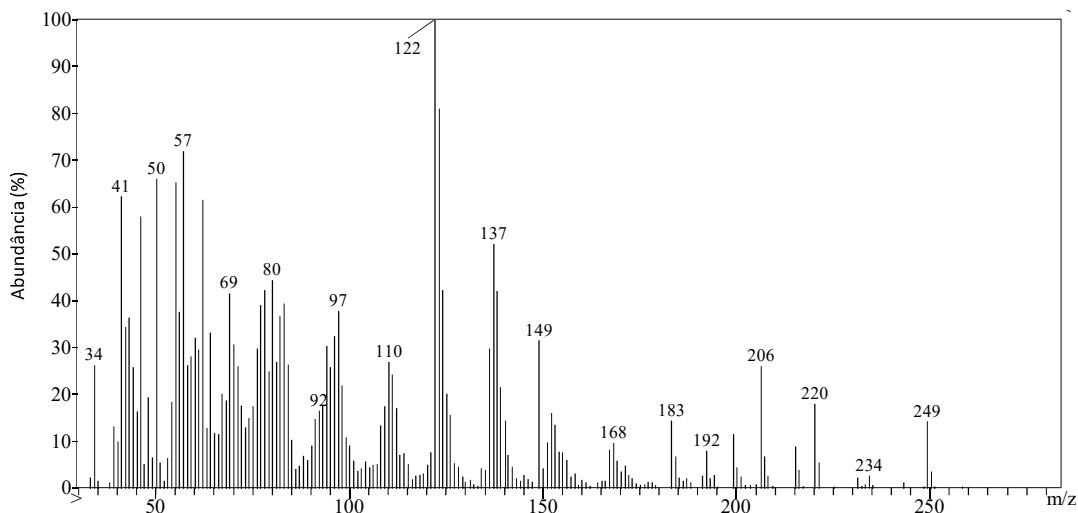
A estrutura química das nitrilas identificadas é aparentemente relacionada com a estrutura de ácidos graxos. Desta forma, seria plausível que estas estruturas sejam derivadas de ácidos graxos e por consequência, sejam biossintetizadas pelo caminho do acetato. A primeira hipótese levantada para a via biossintética dos compostos naturais foi o sequestro de ácidos graxos do meio de cultura, insaturação ou utilização de ácidos graxos insaturados, encurtamento da cadeia ( $\beta$ -oxidação) e formação das nitrilas. A estratégia escolhida para os estudos biossintéticos foi a de alimentação dos meios de cultura com os supostos precursores marcados isotopicamente e posterior extração dos voláteis e análise dos compostos formados (GC-MS), no intuito de detectar a presença de produtos finais também marcados isotopicamente.

Para verificar a hipótese de que ácidos graxos presentes no meio de cultura são utilizados na via biossintética, foi realizado um experimento de alimentação de *P. veronii* R02 com ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**). Neste experimento seria esperada a produção da nitrila **62**, no caso de que a hipótese postulada fosse verdadeira (Esquema 21).



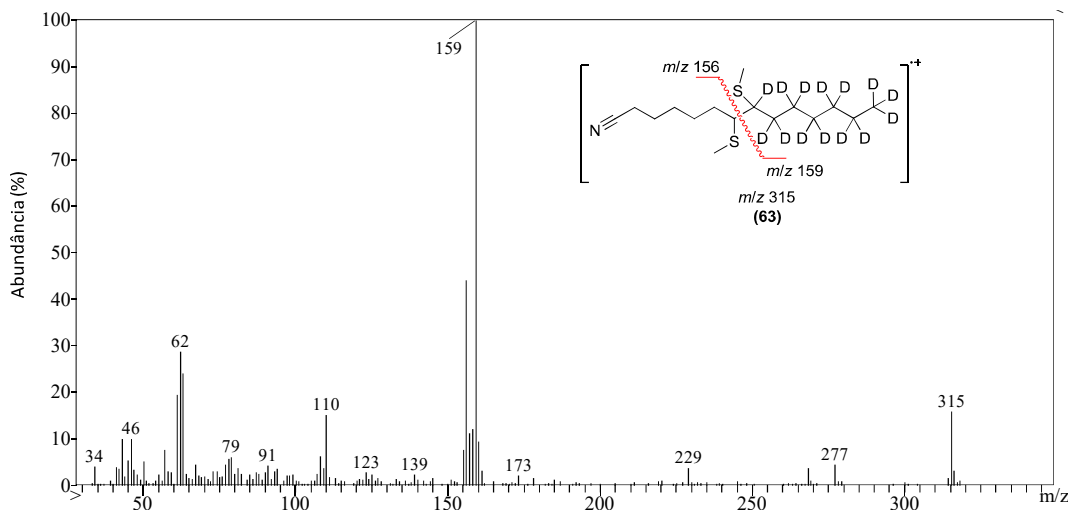
**Esquema 21:** Estrutura da nitrila esperada (**62**) como resultado para o experimento de alimentação de *Pseudomonas veronii* R02 com o ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**).

Após aplicação de ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) ao meio de cultura de *P. veronii* R02, incubação e extração dos voláteis por CLSA, observou-se a formação de nitrilas marcadas isotopicamente. O pico do íon molecular esperado em GC-MS para a nitrila **62**, por exemplo, seria  $m/z$  264. Entretanto, o produto produzido biossinteticamente por *P. veronii* R02 apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  249, indicando que 15 átomos de deutério foram de alguma forma substituídos durante o processo biossintético (Figura 53).



**Figura 53:** Espectro de massas referente à nitrila formada após alimentação de *P. veronii* R02 com ácido palmítico  $D_{31}$ .

Alguns fragmentos que contêm átomos de deutério aparecem com  $m/z$  249 ( $M^+$ ), 231 ( $M^+ - CD_3$ ), 215 ( $M^+ - CD_2CD_3$ ), 199 ( $M^+ - (CD_2)_2CD_3$ ), 183 ( $M^+ - (M^+ - (CD_2)_3CD_3)$ ), 167 ( $M^+ - (CD_2)_4CD_3$ ), 151 ( $M^+ - (CD_2)_5CD_3$ ), 137 ( $M^+ - CD(CD_2)_5CD_3$ ). Estes fragmentos indicam que os átomos de deutério da molécula estariam localizados nos 7 átomos de carbono da porção final da cadeia. Para realizar a confirmação estrutural do composto formado, foi realizada uma microderivatização do extrato obtido no experimento com ácido palmítico- $d_{31}$  com DMDS. Como resultado, observou-se a formação de um composto (**63**) cujo espectro de massas apresenta os fragmentos com  $m/z$  156 e 159, os quais confirmam o posicionamento dos átomos de deutério nas posições inicialmente propostas, conforme observado na Figura 54. Observa-se ainda a presença do pico do íon molecular com  $m/z$  315.



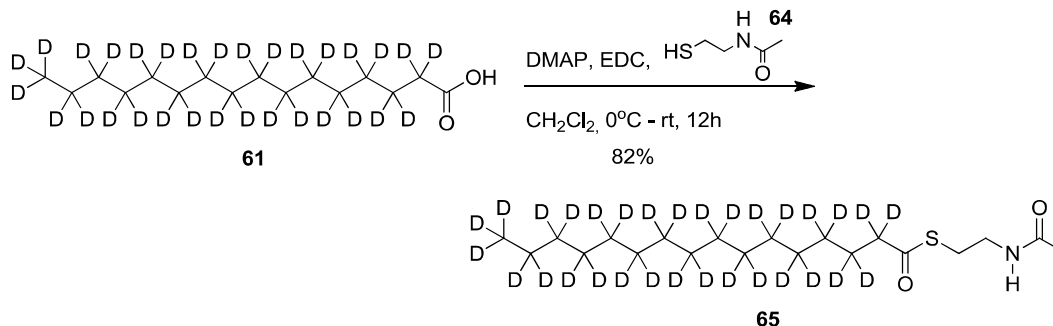
**Figura 54:** Espectro de massas referente ao composto **63** obtido pela análise dos produtos obtidos na reação do extrato de *P. veronii* R02 com DMDS.

O resultado do experimento de alimentação sugere que *P. veronii* R02 metaboliza ácidos graxos superiores, encurtando suas cadeias carbônicas até oito átomos de carbono, para então alongar novamente a cadeia até o tamanho das observadas como produtos naturais nos compostos **7-12**. Esta observação pode estar relacionada ao sistema de regulação de produção de ácidos graxos, com a presença de enzimas específicas para a formação da insaturação, como observado na biossíntese de ácidos graxos em *Escherichia coli*, por exemplo<sup>[132]</sup>. *E. coli* possui uma 3-hidróxiacil-ACP desidratase (FadA) que é especificamente requerida para a biossíntese de ácidos graxos insaturados e é ativa restritamente em substratos contendo 10 átomos de carbono, catalisando a desidratação do 3-hidróxidecanoil-ACP e a isomerização da ligação dupla do composto resultante (*trans*-2-enoil-ACP) para a posição 3, com estereoquímica *cis*<sup>[132]</sup>.

Para verificar a possibilidade de que o complexo palmitato-enzima carreadora seria metabolizado pela bactéria e utilizado na diretamente na biossíntese dos compostos nitrílicos, sem encurtamento da cadeia carbônica, foi realizada a síntese do éster-SNAC derivado do ácido palmítico-*d*<sub>31</sub> (Esquema 22)<sup>[108]</sup>, com o intuito de mimetizar a estrutura do complexo acil-enzima que é utilizado na rota metabólica. Os chamados ésteres SNAC (ésteres da N-acetilcisteamina) são amplamente utilizados em estudos biossintéticos, uma vez que a porção referente à N-acetilcisteamina é idêntica à porção final da fosfopanteteína. Fosfopanteteína por sua vez, é um grupo essencial na interação da proteína carreadora de acila (ACP), nas proteínas carreadoras de



peptidila (PCPs) e nas proteínas carreadoras de arila (PCPs), ambas derivadas da CoA<sup>[108, 133-134]</sup>. O tioéster **65** foi obtido em 82 % de rendimento, a partir da reação do ácido **61** com a N-acetilcisteamina (**64**), promovida por EDC e DMAP em diclorometano.

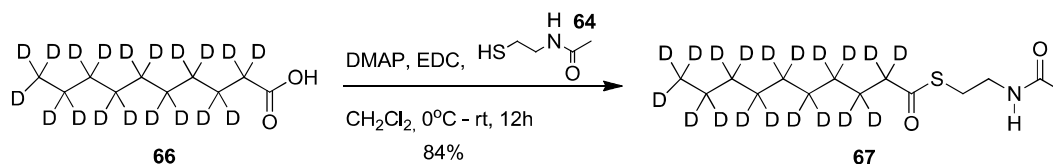


**Esquema 22:** Obtenção do éster-SNAC derivado do ácido palmítico-*d*<sub>31</sub>, **65**.

A partir do tioéster **65**, foi realizado um novo experimento de alimentação da cultura de bactérias. A análise dos extratos obtidos através deste experimento mostrou que não houve a produção de nitrilas marcadas isotopicamente. Este resultado pode indicar que nesta etapa do caminho biossintético, a porção acil do complexo acil-enzima não se encontra mais na forma saturada, não sendo assim o composto **65** reconhecido e utilizado na produção das nitrilas.

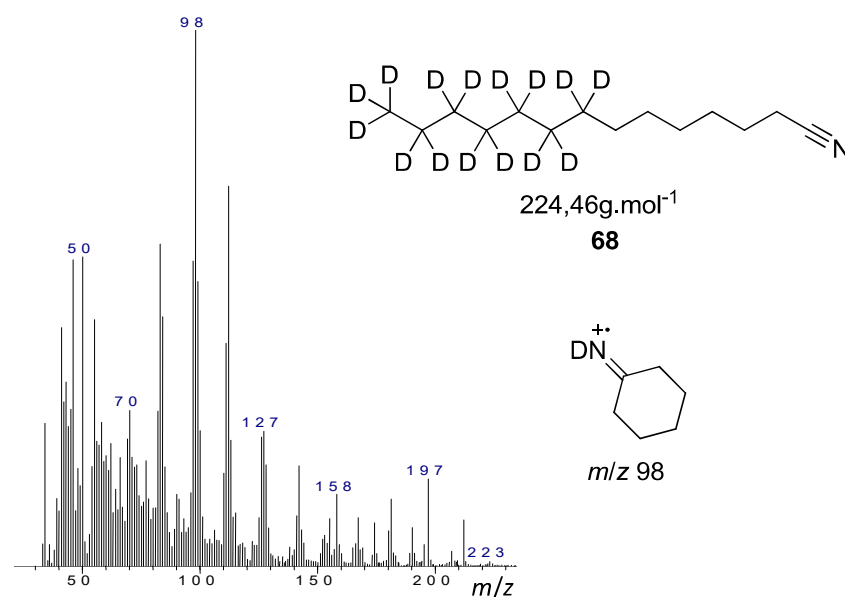
Foi elaborado um experimento de alimentação da bactéria com um éster-SNAC de comprimento de cadeia intermediário entre o das nitrilas naturais e o C<sub>8</sub>, que a bactéria produziu no experimento com ácido palmítico-*d*<sub>31</sub>. O objetivo deste experimento foi verificar se o éster-SNAC **67**, obtido a partir do ácido decanóico-*d*<sub>19</sub> (**66**) seria incorporado no caminho biossintético e sua cadeia alongada diretamente para a produção das nitrilas, ou se sua cadeia seria encurtada até C<sub>8</sub>, assim como ocorre com o ácido palmítico-*d*<sub>31</sub>.

De maneira análoga à síntese do composto **65**, o éster **67** foi obtido em 84 % de rendimento, a partir do ácido decanóico-D<sub>19</sub> (**66**)<sup>[108]</sup> (Figura 55).



**Figura 55:** Obtenção do éster-SNAC **67**, a partir do ácido decanóico-D<sub>19</sub> (**66**).

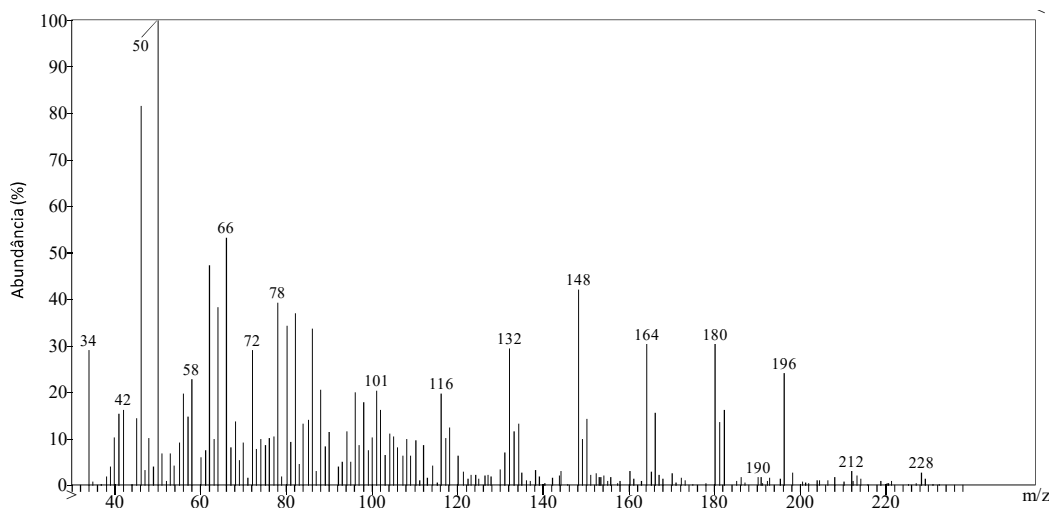
A análise em GC-MS dos extratos obtidos através deste experimento revelou a formação de nitrilas contendo somente 15 unidades de deutério quando saturadas, como por exemplo a estrutura **68** (Figura 56) e 14 quando insaturadas. Este resultado demonstra que a cadeia do éster-SNAC com 10 átomos de carbono é também encurtada para 8 átomos, para então sintetizar as nitrilas com cadeia mais longa.



**Figura 56:** Estrutura, espectro de massas e estrutura referente ao pico base para o composto **10**, produzido por *Pseudomonas veronii* R02 após alimentação com o éster SNAC **67**.

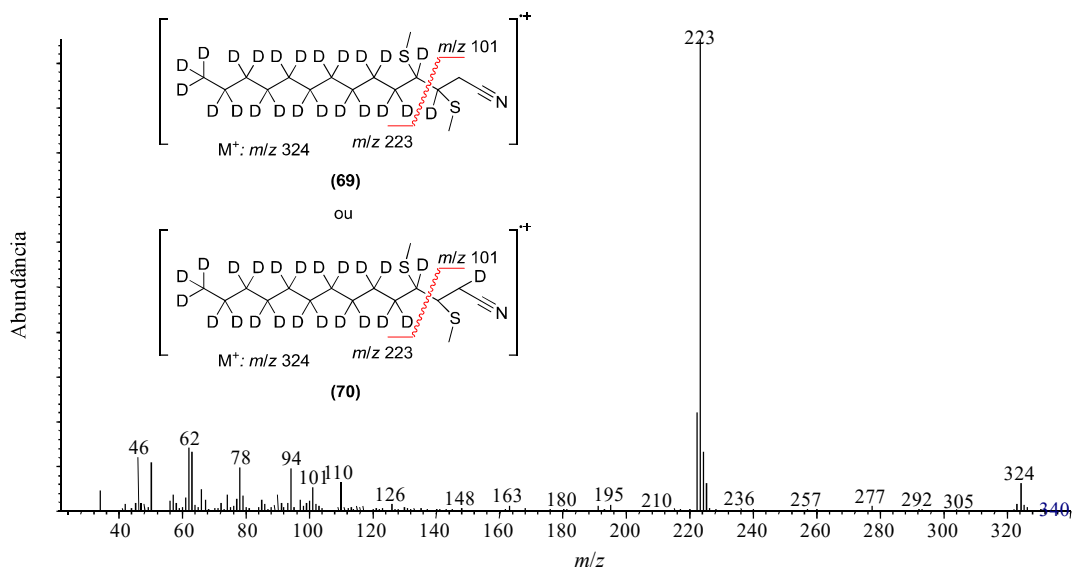
#### 2.4.3.2 Ensaio com *Micromonospora echinospora* DSM43816

Os estudos biossintéticos dos compostos produzidos por *M. echinospora* iniciaram através da aplicação de ácido palmítico-*d*<sub>31</sub> (**61**) ao meio de cultura, para posterior coleta de voláteis e avaliação de incorporação e produção de compostos marcados. A análise dos extratos obtidos, em GC-MS, revelou a presença de nitrilas marcadas isotopicamente, como no exemplo ilustrado na Figura 57. O espectro de massas na Figura 57 mostra que a nitrila biossintetizada por *M. echinospora* possui deutérios em toda a extensão da molécula, com excessão de dois átomos, como pode ser percebido através do fragmento M<sup>+</sup>-2 (D) que ocorre com m/z 228.



**Figura 57:** Espectro de massas referente à nitrila produzida após alimentação de *M. echinospora* DSM43816 com ácido palmítico-D<sub>31</sub> (**61**).

Com o objetivo de verificar a porção da molécula na qual os átomos de hidrogênio foram inseridos, foi realizada uma derivatização do extrato com DMDS<sup>[32]</sup>. O espectro de massas do derivativo obtido está ilustrado na Figura 58, no qual é observada a presença do pico do íon molecular com  $m/z$  324 e dos picos com  $m/z$  101 e 223, que caracterizaram a presença dos dois átomos de hidrogênio da cadeia principal molécula na posição 2 (**69**) ou nas posições 2 e 3 (**70**). A determinação exata da posição dos átomos de hidrogênio nesta estrutura é dificultada pelo fato de clivagens  $\alpha$  e  $\beta$  serem insignificantes em nitrilas<sup>[135]</sup>.



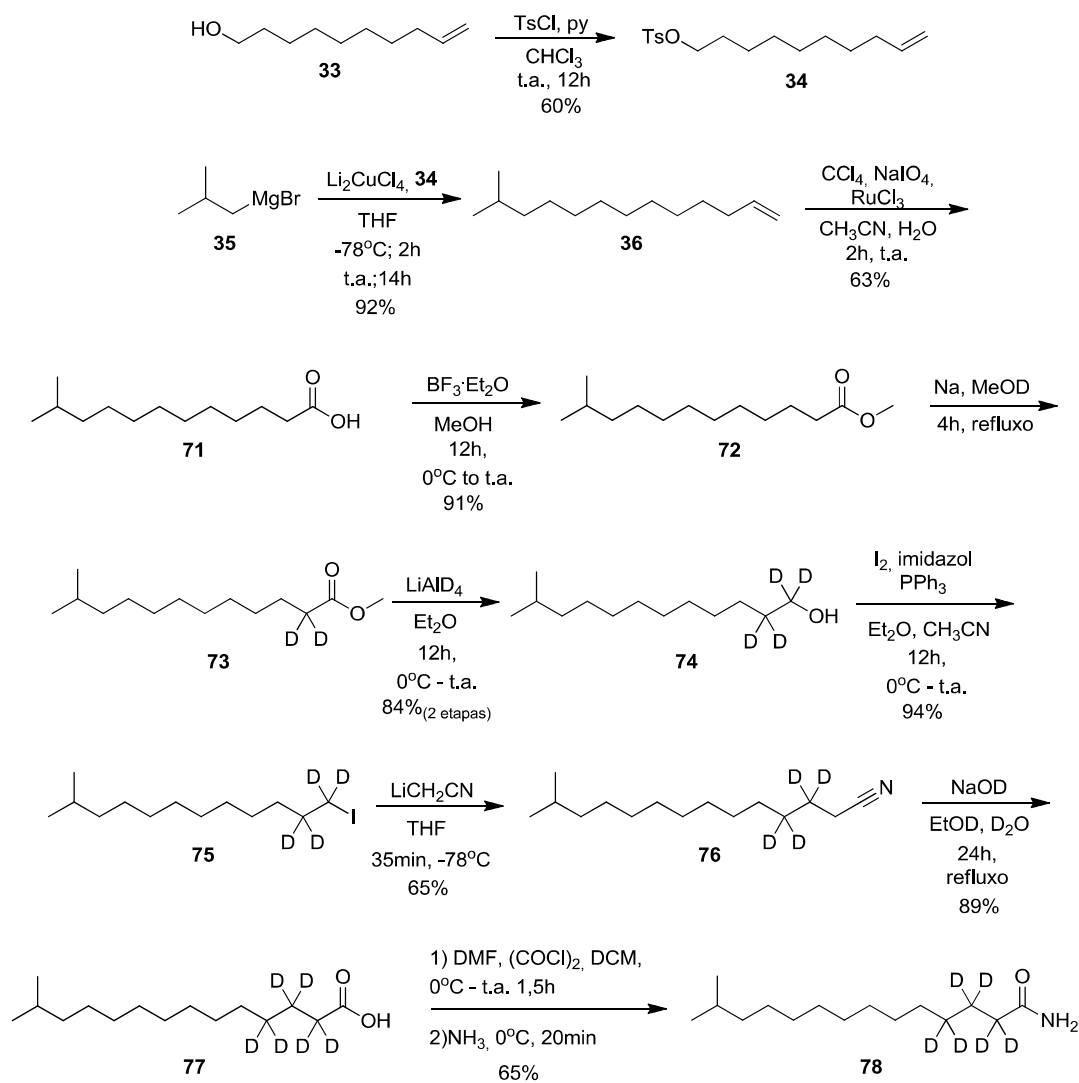
**Figura 58:** Espectro de massas referente ao composto **70**, obtido após derivatização do extrato obtido de *M. echinospora* DSM43816 após alimentação com ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) com DMDS.

Uma vez que houve incorporação e produção de nitrilas a partir do ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) que é linear, houve o interesse em estudar a incorporação de precursores deuterados da estrutura do composto majoritário presente nos extratos naturais (**23**), assim como avaliar se a biossíntese destas nitrilas ocorre pela utilização dos respectivos ácido carboxílico e amida como precursores. Esta possibilidade foi reforçada pelo resultado obtido pois, caso o mecanismo de formação das nitrilas envolvesse a formação de uma aldoxima por descarboxilação, seria esperada redução no número de átomos de carbono da cadeia, além de este processo envolver um maior número de enzimas necessárias, conforme demonstrado anteriormente.

A síntese da nitrila **44**, do ácido carboxílico **45** e da amida **46** foi proposta, conforme ilustrado no Esquema 11 para utilização em novos experimentos de alimentação das bactérias.

A síntese foi iniciada através da obtenção do tosilato **34**, a partir do álcool **33** em 60 % de rendimento<sup>[124]</sup>. O tosilato **34** foi empregado em uma reação de Grignard com o composto **35**, resultando no alceno terminal **36** em 92 % de rendimento<sup>[125]</sup>. A oxidação da ligação dupla do composto **36**, com cloreto de rutênio III, perclorato de sódio e tetracloreto de carbono resultou no ácido carboxílico **71** em 63 % de rendimento<sup>[113]</sup>. No espectro de massas referente ao composto **71** observa-se o pico  $M^+$

com  $m/z$  214, além do pico base com  $m/z$  73 e de um pico proeminente com  $m/z$  60, característico para ácidos carboxílicos.



**Figura 59:** Rota sintética para a obtenção dos precursores deuterados **76**, **77** e **78**.

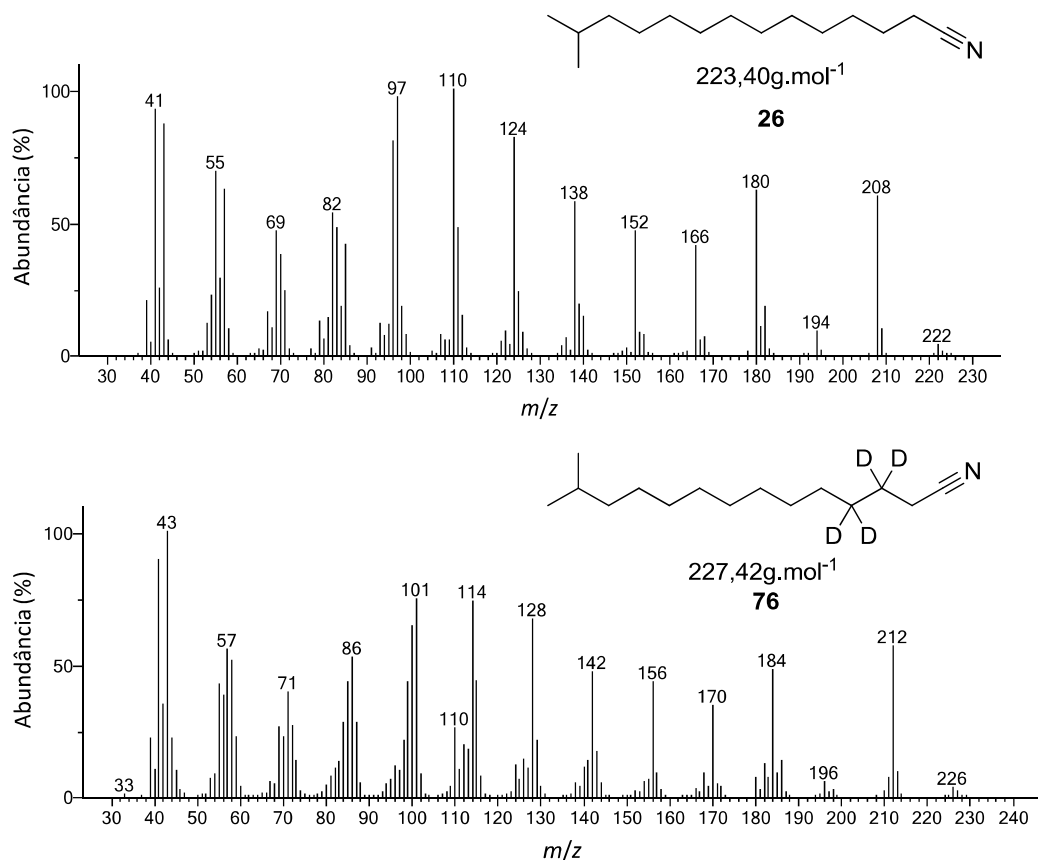
O éster **72** foi obtido posteriormente em 91 % de rendimento através da reação do ácido **71** com  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  e metanol<sup>[115]</sup>. A formação do éster metílico é evidenciada pela presença de um simpleto integrando para 3 átomos de hidrogênio em  $\delta$  3,66 e de um tripleto referente à dois átomos de hidrogênio em  $\delta$  2,30 em seu respectivo espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , referentes aos hidrogênios ligados à metoxila e ao carbono  $\alpha$  carboxila, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  são observados os sinais

referentes ao CH<sub>3</sub> da metoxila em  $\delta$  51,36 e ao carbono quaternário do éster em  $\delta$  174,27. O espectro de massas apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  228, além de fragmentos que caracterizam a formação do éster metílico **72**, por exemplo:  $m/z$  197 ( $M^+ - 31$ , -OCH<sub>3</sub>) e  $m/z$  74 (pico base, rearranjo de McLafferty).

A etapa seguinte envolveu a inserção dos dois primeiros átomos de deutério na estrutura, através da troca hidrogênio/deutério na posição 2 do éster **72**, pela reação com sódio e metanol-*d*<sub>1</sub>, resultando no composto **73**<sup>[115]</sup>, o qual foi submetido à redução com deutereto de lítio e alumínio em éter etílico para a obtenção do álcool **74** (84 % de rendimento para duas etapas), que possui dois átomos de deutério adicionais ligados ao carbono 1 da cadeia<sup>[115]</sup>. No espectro de massas referente ao composto deuterado **73** é possível verificar o aumento de duas unidades no pico do íon molecular ( $m/z$  230), no pico base ( $m/z$  76) e em outros fragmentos, em comparação com os dados obtidos para o éster **72**. O espectro no infravermelho referente ao álcool **74** apresenta uma banda larga em 3328cm<sup>-1</sup>, referente à deformação axial da ligação O-H na hidroxila, e duas bandas em 2090 e 2201cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-D.

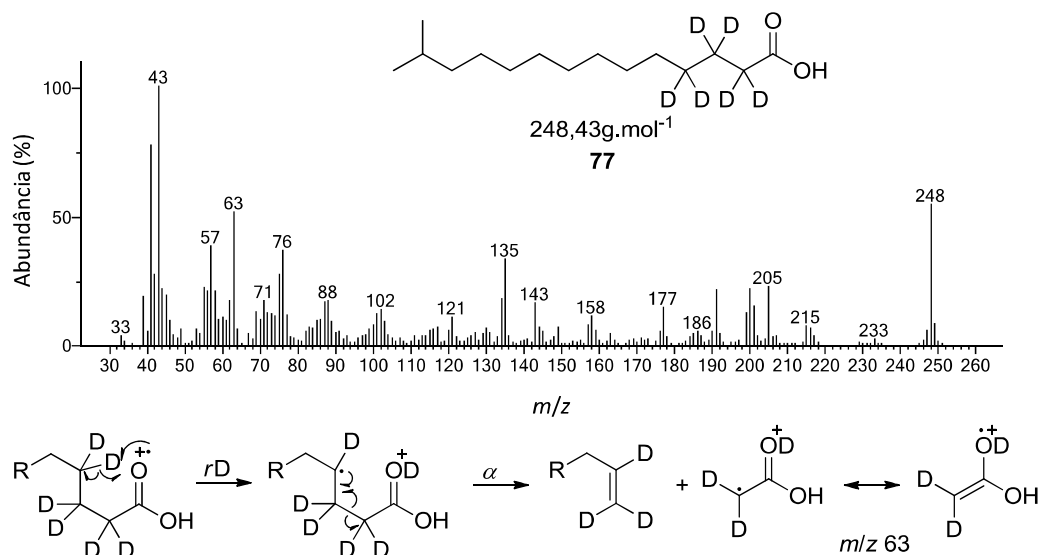
Partindo do álcool **74**, através da reação com iodo, imidazol e trifetilfosfina, o iodeto **75** foi sintetizado em 94 % de rendimento<sup>[115]</sup>. O composto **75** pode ser caracterizado através de seu espectro de massas, no qual é observado o pico do íon molecular com  $m/z$  314, e destaca-se o fragmento com  $m/z$  187, referente à perda do átomo de iodo.

O iodeto **75** foi submetido à reação com o ânion de lítio da acetonitrila, obtido a partir da reação entre acetonitrila e *n*-BuLi, resultando na nitrila **76** em 65 % de rendimento<sup>[136]</sup>. Nas análises realizadas para o composto **26**, destaca-se o seu espectro de massas, no qual é possível observar a presença dos quatro átomos de deutério em diversos fragmentos, incluindo o pico do íon molecular ( $m/z$  227) e o fragmento com  $m/z$  101, que seria o equivalente ao fragmento com  $m/z$  97 presente na análise do composto **26** (Figura 60).



**Figura 60:** Comparação entre os espectros de massas apresentados pelos compostos **26** e **76**.

A hidrólise da nitrila **76** em deutério de sódio, etanol- $d_1$  e água deuterada resultou no ácido carboxílico **77**, em 89 % de rendimento<sup>[115]</sup>, com inserção do terceiro par de átomos de deutério ligados ao carbono 2 da cadeia. No espectro de massas referente ao composto **76** destacam-se o pico  $M^+$  com  $m/z$  248, além do pico base com  $m/z$  43 e do pico com  $m/z$  63, formado através do rearranjo de McLafferty<sup>[135]</sup>, conforme ilustrado na Figura 61.

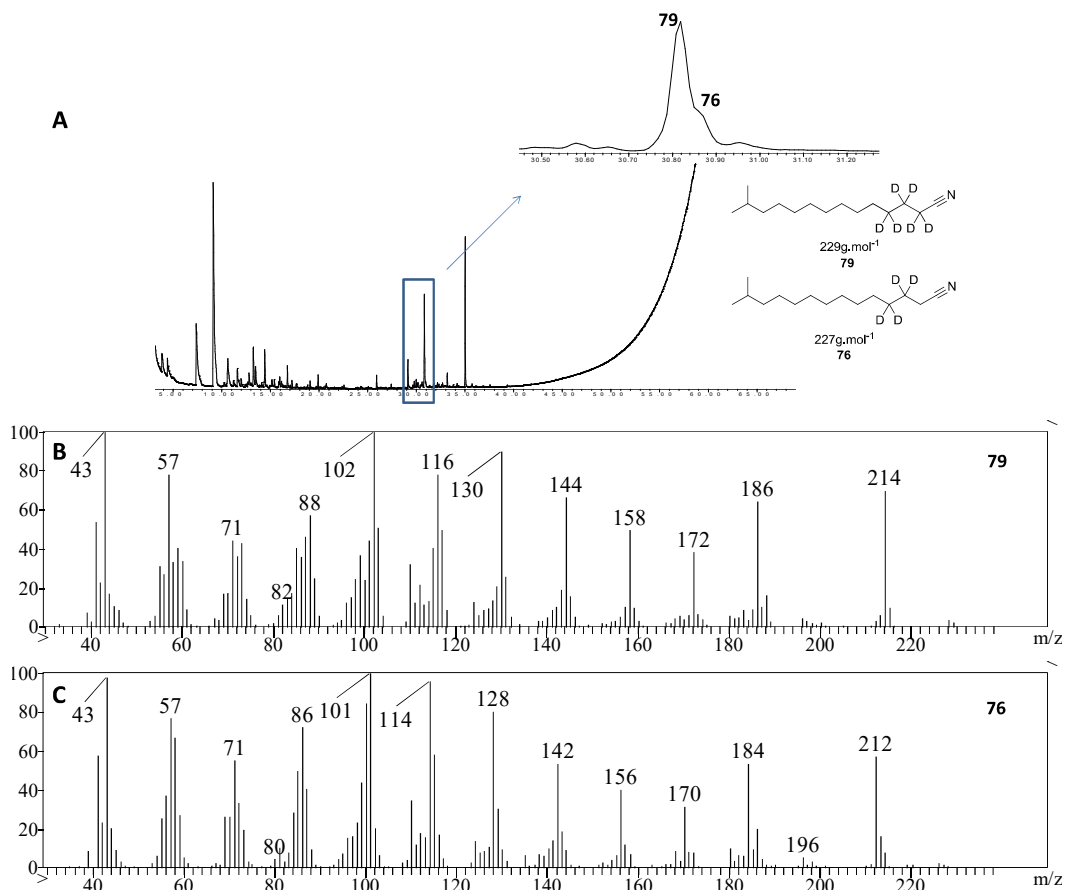


**Figura 61:** Espectro de massas referente ao ácido carboxílico **77** e mecanismo de formação do fragmento com  $m/z$  63.

A amida **78** foi obtida através da formação do cloreto de ácido *in situ* a partir do composto **77**, seguida da reação com amônia, em 65 % de rendimento. O espectro de massas obtido para o composto **78** apresentou o pico do íon molecular com  $m/z$  247 e pico base com  $m/z$  62, formado também pelo rearranjo de McLafferty. O espectro de massas do composto mostrou-se muito semelhante ao espectro apresentado pelo composto **77**, entretanto com a maioria dos fragmentos de maior abundância contendo uma unidade de massa a menos.

A partir da obtenção dos possíveis precursores biossintéticos **76**, **77** e **78**, foram realizados novos experimentos de alimentação de *M. echinospora*. O primeiro deles, realizado com o ácido carboxílico **77** resultou na produção de uma mistura contendo duas nitrilas isotopicamente marcadas, conforme ilustrado na Figura 62. O espectro de massas referente aos compostos obtidos nos extratos após alimentação com o composto **77** demonstrou que estes se referem a nitrilas similares à nitrila natural saturada produzida por *M. echinospora*, **26**, uma contendo átomos de deutério ligados aos carbonos 2 e 3 (**76**) e outra contendo átomos de deutério ligados aos carbonos 2, 3 e 4 (**79**), como observado na Figura 62.





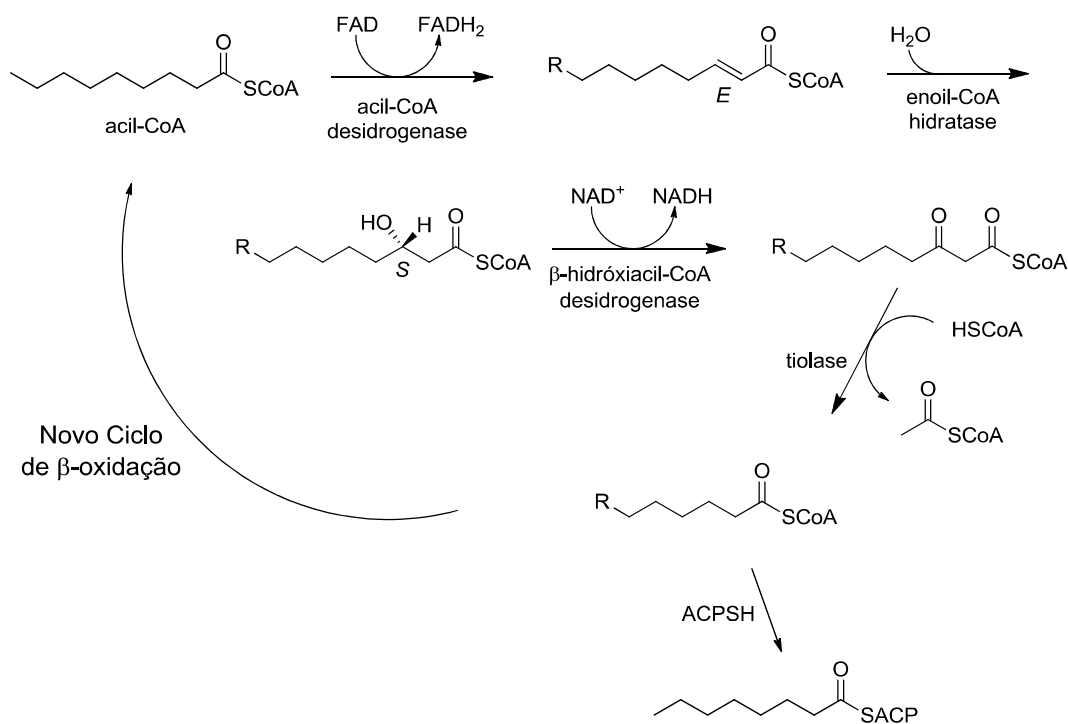
**Figura 62:** **A:** Cromatograma referente ao extrato obtido após alimentação de *M. echinospora* DSM43816 com o ácido carboxílico **77**. Em destaque a ampliação dos picos referentes às nitrilas **76** e **79**. **B e C:** Espectros de massas referentes às nitrilas **79** e **76**, respectivamente.

O experimento de alimentação da cultura de *M. echinospora* com a amida **78** resultou na produção da nitrila contendo 6 átomos de deutério (**79**). Entretanto, o experimento de alimentação de *M. echinospora* com a nitrila **76** não resultou em nenhuma modificação estrutural indicando que não há modificação na estrutura no processo biossintético após a obtenção da nitrila.

### 2.4.3.3 Implicações e possibilidades biossintéticas a partir dos resultados obtidos com os experimentos com compostos isotopicamente marcados

Através da análise dos dados obtidos pode-se sugerir que a biossíntese das nitrilas em *P. veronii* R02 ocorre inicialmente com um ácido graxo sofrendo

sucessivos ciclos de  $\beta$ -oxidação, até que a cadeia atinja o comprimento de oito átomos de carbono, conforme ilustrado no Esquema 23. Esta observação vem do fato de os ensaios de alimentação com ácido palmítico- $d_{31}$  (**61**) e com o éster SNAC derivado do ácido decanóico- $d_{19}$  (**67**) terem produzido nitrilas deuteradas nos sete átomos de carbono da porção final da estrutura.



**Esquema 23:**  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos saturados proposta para *Pseudomonas veronii* R02.

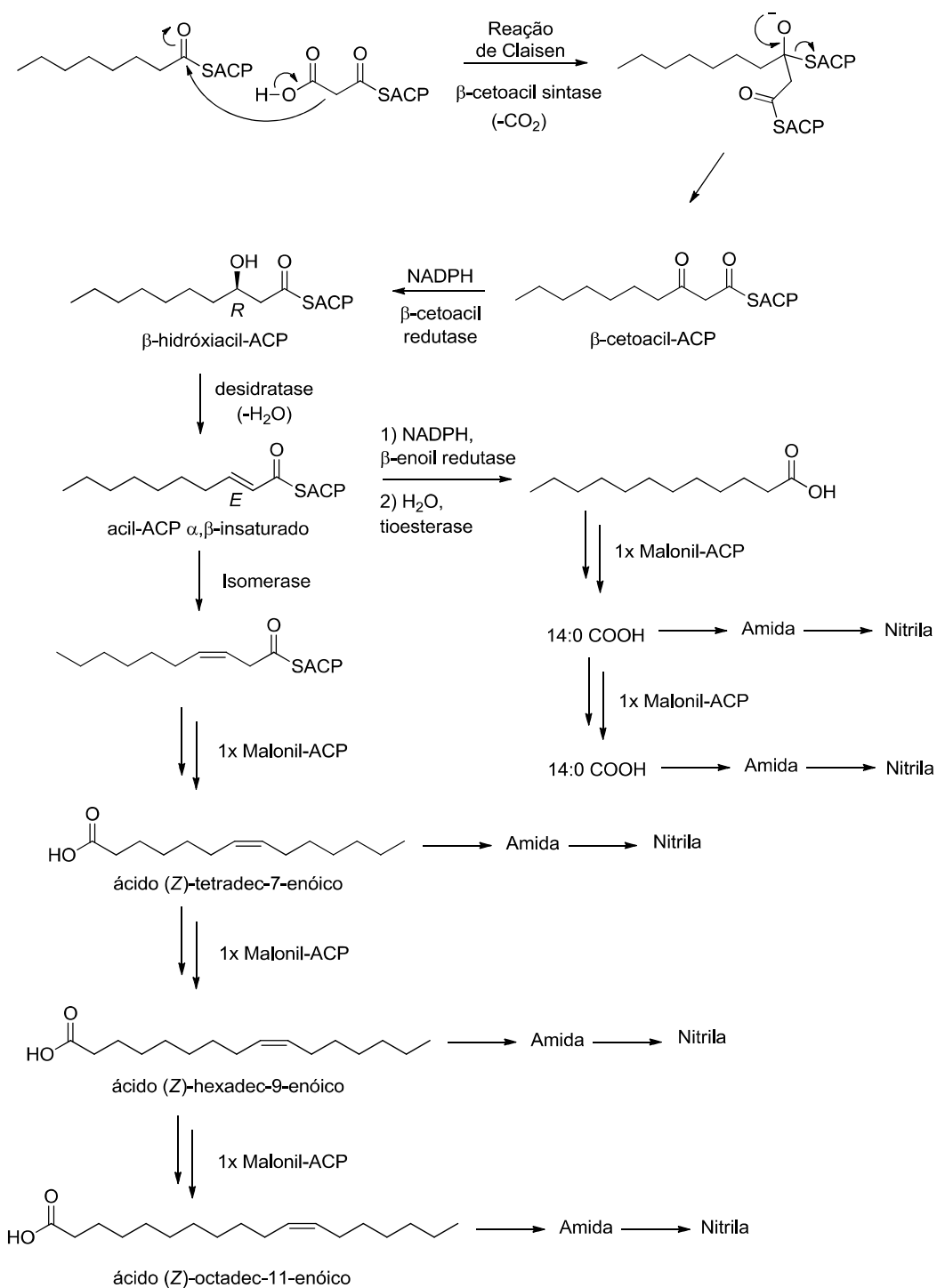
Uma possibilidade para o fato de *P. veronii* R02 catabolizar ácidos graxos superiores até a cadeia contendo oito átomos de carbono, seria para realizar a inserção das insaturações nas posições específicas encontradas nas nitrilas **7**, **10** e **12** (Esquema 24). Desta forma, o complexo octil-ACP formado através de  $n$  ciclos de  $\beta$ -oxidação sofreria adição de uma unidade de malonil-ACP, para obtenção de um  $\beta$ -cetoacil-ACP. Através da redução estereoespecífica da carbonila do  $\beta$ -cetoacil-ACP seguida da perda de uma molécula de água, seria obtido um acil-ACP  $\alpha,\beta$ -insaturado. A partir desta etapa, seriam possíveis dois caminhos biossintéticos. O primeiro seria a ação de uma  $\beta$ -enoil redutase e de uma tioesterase, para a obtenção de um ácido saturado, empregado para a síntese das nitrilas saturadas com 14 e 16 átomos de carbono. O

segundo caminho levaria à formação das nitrilas insaturadas, através da ação de uma isomerase seguida de  $n$  ciclos de adição de malonil-CoA e posterior formação das nitrilas. A formação das nitrilas a partir dos respectivos ácidos carboxílicos é proposta através da formação da amida, como intermediário. Esta possibilidade será discutida nos próximos parágrafos, com o caso apresentado para *M. echinospora* DSM43816.

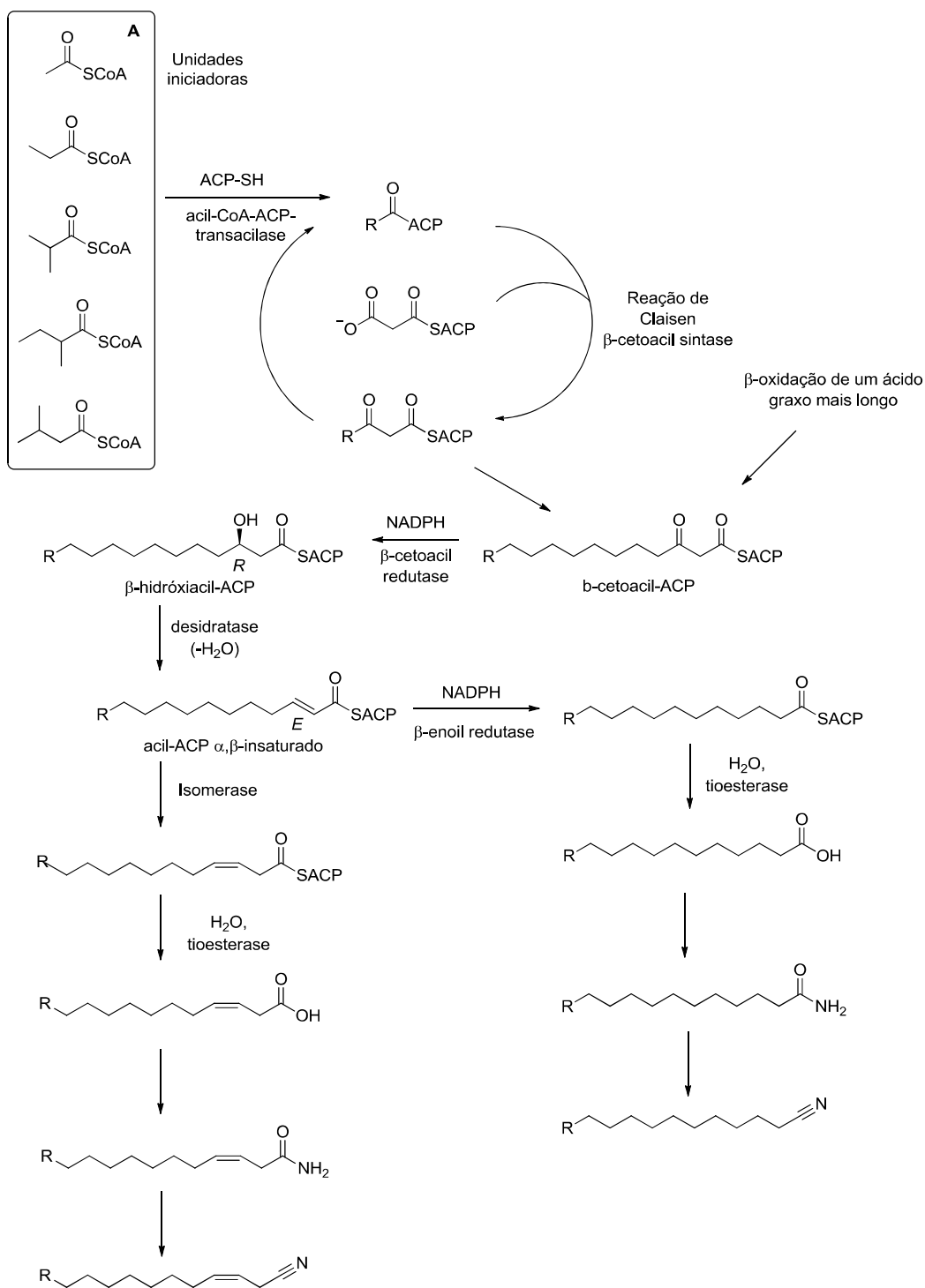
Através do conjunto de dados obtidos em todos os experimentos de alimentação com precursores deuterados, foi possível propor um caminho biossintético também para a produção das nitrilas encontradas em voláteis de *M. echinospora* DSM43816 (Esquema 25). Inicialmente ocorreria a formação de um  $\beta$ -cetoacil-ACP através de sucessivos ciclos de adição de malonil-ACP à uma das diferentes unidades iniciadoras representadas no quadro A do Esquema 25 ou via ciclos de  $\beta$ -oxidação em ácidos graxos de cadeia mais longa. A seguir ocorreria a formação do  $\beta$ -hidróxiacil-ACP e do acil-ACP  $\alpha,\beta$ -insaturado de maneira estereoespecífica. A partir do acil-ACP  $\alpha,\beta$ -insaturado seria possível a redução da ligação dupla seguido de hidrólise, gerando o ácido graxo saturado ou através da ação de uma isomerase seria gerada a ligação dupla na posição 3 que geraria o ácido graxo insaturado.

A proposta de formação das nitrilas a partir dos respectivos ácidos carboxílicos com uma amida como intermediário, foi reforçada através dos resultados obtidos nos experimentos de alimentação com o ácido **45** e com a amida **46**, nos quais em ambos os experimentos foi observada a formação da nitrila saturada correspondente.

Neste momento, estão em desenvolvimento sínteses de possíveis intermediários biossintéticos deuterados, no grupo do professor Stefan Schulz, na TU Braunschwig. Por exemplo, o ácido 15-metilhexadecanóico e o ácido 11-metildodecanóico com o objetivo de verificar se as nitrilas são produzidas via rota do acetato ou através da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia mais longa. A síntese do ácido 13-metiltetradec-2-enóico, permitirá verificar a proposta elaborada para a insaturação das diferentes nitrilas em *M. echinospora*, assim como a síntese do ácido dec-2-enóico para *P. veronii*.



**Esquema 24:** Proposta biossintética para obtenção das nitrilas produzidas por *Pseudomonas veronii* R02.



**Esquema 25:** Proposta biossintética para obtenção das nitrilas produzidas por *M. echinospora* DSM43816.

#### 2.4.4 Determinação de atividade antimicrobiana

Os compostos sintéticos **7-12** e **19-29** foram encaminhados para bioensaios para a determinação de atividade antimicrobiana e citotoxicidade no grupo de pesquisa do Dr. Rolf Müller, no Instituto Helmholtz em Bonn, na Alemanha.

A atividade antimicrobiana dos compostos sintéticos foi testada frente a diferentes micro-organismos: *Chromobacterium violaceum* DSM-30191, *Escherichia coli* DSM-1116, *E. coli* (ToIC-deficiente), *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Bacillus subtilis* DSM-10, *Micrococcus luteus* DSM-1790, *Staphylococcus aureus* Newman, *Mycobacterium smegmatis* mc2155, *Mucor hiemalis* DSM-2656, *Pichia anomala* DSM-6766 e *Candida albicans* DSM-1665. Os resultados dos bioensaios estão dispostos na Tabela 6. De maneira geral, os compostos apresentaram baixa atividade antimicrobiana, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) elevados. A 12-metiltridec-3-enonitrila (**20,21**) demonstrou moderada atividade frente ao fungo *Mucor hiemalis* DSM-2656, com CIM=8-16µg.ml<sup>-1</sup>. A pentadec-3-enonitrila (**27,58**) apresentou CIM=4-8µg.ml<sup>-1</sup> frente à *Staphylococcus aureus* Newman e citotoxicidade frente à células de carcinoma humano com IC<sub>50</sub> > 67.

*S. aureus* é uma bactéria de interesse médico, que é frequentemente relacionada à diversas infecções em seres humanos. A bactéria pode ser comumente encontrada em ambientes de circulação humana, sendo o próprio homem seu principal reservatório. Em humanos, *S. aureus* pode ser encontrada, por exemplo, em fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Infecções por *S. aureus* podem causar desde infecções simples como espinhas e furúnculos ou graves como pneumonia, endocardite e septicemia, entre outras. Cepas de *S. aureus* têm desenvolvido resistência ao tratamento com diversos antibióticos no decorrer dos anos. O tratamento de infecções com sulfanilamida, descoberta em 1932, encontrou cepas resistentes já a partir do final da década de 1930, Penicilina, amoxicilina e ampicilina em 1959 já alcançavam a taxa de 80 % de resistência de *S. aureus*. Na década de 1970 foram observadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (denominadas MRSA), descoberta em 1960. Em 1997, foi identificada a primeira cepa resistente à vancomicina (VRSA), que vinha sendo utilizada como alternativa à resistência desenvolvida à meticilina. Nos anos 2000, surgiu uma cepa de *S. aureus* resistente à associação meticilina/oxacilina. Estes dados demonstram a constante necessidade por

alternativas aos tratamentos existentes para infecção com *S. aureus* e quaisquer outros agentes infecciosos<sup>[137]</sup>.

A atividade da pentadec-3-enonitrila frente a *S. aureus* é interessante, pois abre a perspectiva de possuir atividade antimicrobiana frente à cepas multiresistentes desta bactéria de importância médica. A atividade antimicrobiana da (*Z*)-pentadec-3-enonitrila (**27**) e da (*E*)-pentadec-3-enonitrila (**58**) será testada novamente, em separado, no grupo do Professor Müller, frente à cepas de *S. aureus* multirresistentes.

**Tabela 6:** Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana e de citotoxicidade das nitrilas sintéticas

**Atividade antimicrobiana (CIM)**

	7 <sup>1</sup>	12	19 + 20	24 + 25	28 + 38	21 + 22	27 + 58	26
<i>Chromobacterium violaceum</i> DSM-30191 <sup>2</sup>	> 128 <sup>3</sup>	> 128	32-64	> 128	128	128	32-64	128
<i>Escherichia coli</i> DSM-1116	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>E. coli</i> (ToIC-deficiente)	16-32	> 128	64-128	128	> 128	128	64-128	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Bacillus subtilis</i> DSM-10	64-128	128	32	> 128	> 128	> 128	8	> 128
<i>Micrococcus luteus</i> DSM-1790	128	64	64	> 128	> 128	128	16-32	128
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	32-64	128	16-32	32-64	128	64-128	4-8	128
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	32-64	> 128	64	64-128	64	32-64	32-64	32-64
<i>Mucor hiemalis</i> DSM-2656	64-128	> 128	8-16	32-64	32-64	32-64	16-32	64
<i>Pichia anomala</i> DSM-6766	> 128	> 128	32	128	> 128	128	32	128
<i>Candida albicans</i> DSM-1665	128	64	64-128	128	64	64	64-128	64-128

**Citotoxicidade (IC<sub>50</sub>)**

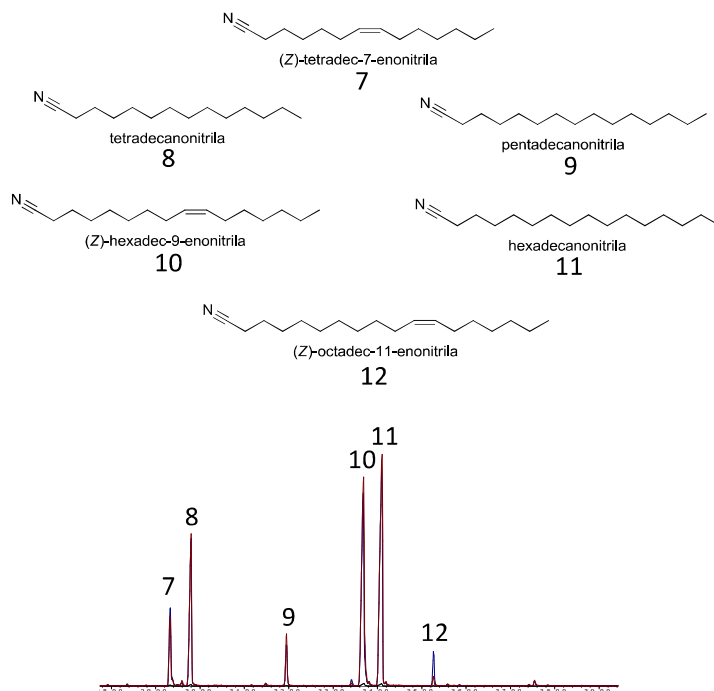
	7	12	19 + 20	24 + 25	28 + 38	21 + 22	27 + 58	26
HCT-116 (carcinoma de cólon humano)	> 67 <sup>4</sup>	> 67	> 67	> 67	> 67	> 67	> 67	> 67

<sup>1</sup>Os números na linha em negrito indicam o(s) composto(s) testado(s) (soluções em THF). Os compostos não mostrados na tabela apresentaram CIM > 128 µg.ml<sup>-1</sup> para todos os micro-organismos testados <sup>2</sup>Na coluna à esquerda estão dispostas as espécies de micro-organismos que foram utilizadas. <sup>3</sup> Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) estão dispostos em µg.ml<sup>-1</sup>. <sup>4</sup> Os valores de IC<sub>50</sub> (50 % da concentração inibitória máxima) estão expressos em µg.ml<sup>-1</sup>.

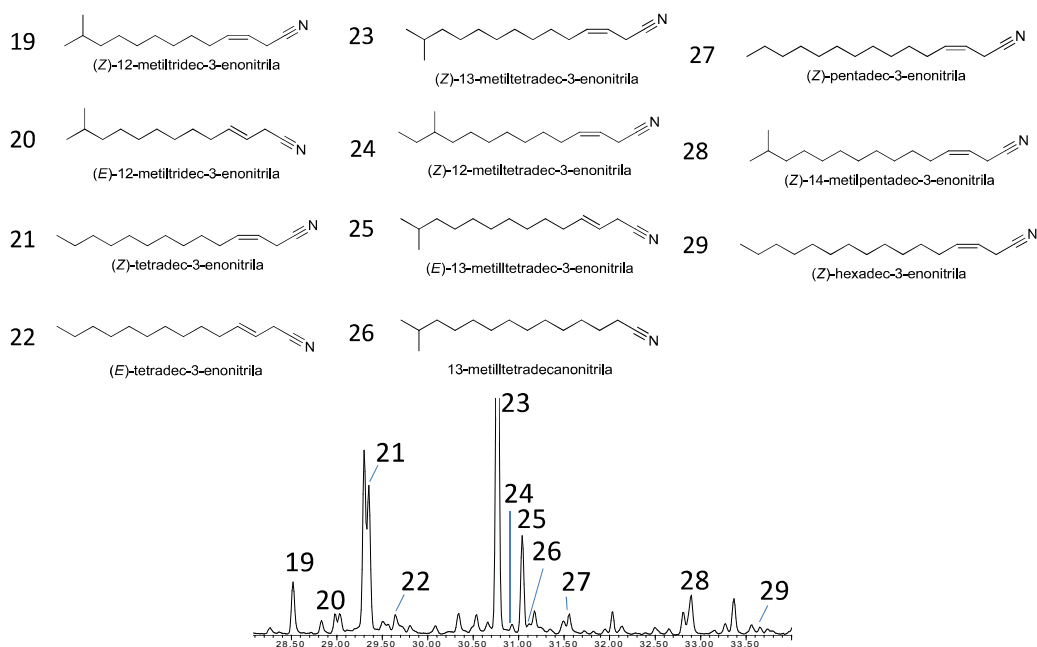


## 2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste projeto foi possível realizar a identificação e síntese de diferentes nitrilas em duas espécies de bactérias: *Pseudomonas veronii* R02 e *Micromonospora echinospora* DSM43816. Nos voláteis de *P. veronii* R02 foram identificados seis diferentes compostos (7-12) e nos de *M. echinospora* DSM43816, onze compostos (19-29, Figura 64 ). Todos os compostos naturais identificados foram confirmados através de comparação com padrões sintéticos.



**Figura 63:** Resumo das estruturas identificadas nos extratos de voláteis obtidos a partir de culturas de *P. veronii* R02.



**Figura 64:** Resumo das estruturas identificadas nos extratos de voláteis obtidos a partir de culturas de *M. echinospora* DSM43816.

Dentre as nitrilas produzidas por *P. veronii* R02, (Z)-tetradec-7-enonitrila (**7**) e (Z)-octadec-11-enonitrila (**12**) são inéditas na literatura, enquanto que pentadecanonitrila (**9**) e (Z)-hexadec-9-enonitrila (**10**) são descritas como primeiro caso de ocorrência natural. Dentre os compostos liberados por *M. echinospora* DSM43816, apenas (Z)-hexadec-3-enonitrila (**22**) e (Z)-tetradec-3-enonitrila (**29**) foram descritos anteriormente. Entretanto, para todos os onze compostos naturais, esta é a primeira descrição de ocorrência natural. Estas moléculas representam uma nova classe de nitrilas de ocorrência natural, sendo nitrilas de cadeias longa, derivadas de ácidos graxos.

Foi possível também realizar uma proposta biossintética dos compostos produzidos pelos dois micro-organismos, através da síntese e aplicação de compostos precursores marcados isotopicamente e análise dos voláteis produzidos pelas bactérias, fazendo-se necessária a síntese de novos precursores biossintéticos.

A pentadec-3-enonitrila (**27,58**) demonstrou atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, e a atividade de seus estereoisômeros será avaliada frente à cepas de *S. aureus* multirresistentes em trabalhos futuros.

### 3 CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento deste trabalho foi baseado em diferentes vertentes e técnicas das áreas de química de produtos naturais, ecologia química e síntese orgânica. Apesar de os organismos estudados nas duas partes do trabalho possuírem origem taxonômica bastante distinta, os capítulos se conectam devido à semelhança e complementação dos objetivos, técnicas e etapas utilizadas em seu desenvolvimento.

Em ambos os capítulos foram utilizadas técnicas de extração e isolamento de compostos voláteis produzidos por diferentes organismos, como as técnicas de aeração no caso de *H. depressus*, e CLSA utilizada para *P. veronii* e *M. echinospora*. A bioatividade dos extratos foi testada via ensaios de olfatométrica no caso do besouro, evidenciando a presença de um feromônio modulando o respectivo comportamento de agregação. No caso das bactérias a bioatividade foi avaliada previamente por colaboradores, indicando atividade antimicrobiana frente aos extratos produzidos por *P. veronii*, que apresentou componentes estruturalmente semelhantes aos produzidos por *M. echinospora*, motivando sua respectiva elucidação estrutural.

A elucidação estrutural dos compostos de interesse produzidos em ambos os casos foi realizada através da aplicação de diferentes técnicas de cromatografia gasosa como GC-MS, utilizada em ambas as partes e a GC-FTIR, utilizada no primeiro capítulo. Diferentes reações em microescala foram utilizadas para auxiliar nas propostas estruturais, seguida da obtenção dos respectivos padrões sintéticos em escala preparativa com o objetivo de confirmar as propostas iniciais e obter material suficiente para novos ensaios de bioatividade.

Em ambas as frentes de trabalho foi possível verificar a bioatividade dos compostos sintéticos, como compostos relacionados à comunicação intraespecífica de *H. depressus* no capítulo um e como compostos antimicrobianos frente à diferentes organismos no capítulo dois.

Uma particularidade referente ao primeiro capítulo foi a realização da determinação da configuração absoluta dos compostos macho específicos produzidos por *H. depressus*, através de técnicas de cromatografia gasosa com fase estacionária quiral e síntese estereosseletiva.

Por outro lado, no segundo capítulo foi possível estudar a biossíntese das nitrilas produzidas por ambas as espécies de bactérias, através da síntese e aplicação

de possíveis precursores isotopicamente marcados às culturas, seguida de extração de voláteis e análise por GC-MS dos produtos formados.

Desta maneira, pode-se concluir que os objetivos propostos inicialmente para ambas as frentes de trabalho foram cumpridos com êxito, assim como observar que a diversidade taxonômica dos organismos de interesse acabou permitindo o uso e desenvolvimento de diferentes técnicas complementares e bastante relacionadas, tanto na criação dos organismos, como na extração dos produtos naturais, avaliação de bioatividade, elucidação estrutural, síntese e biossíntese.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GOLDSTEIN, A. H., GALBALLY, I. E., Known and unexplored organic constituents in the earth's atmosphere. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p.1514-1521, 2007.
- [2] NIINEMETS, U., LORETO, F., REICHSTEIN, M., Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. **Trends in Plant Science**, v. 9, p.180-186, 2004.
- [3] PAYNE, T. L. 1974. Pheromone perception. Pág. 35-61 em Birch, M. (ed.). *Pheromones*. American Elsevier, New York.
- [4] TASIN, M., ANFORA, G., IORIATTI, C., CARLIN, S., DE CRISTOFARO, A., SCHMIDT, S., BENGTSSON, M., VERSINI, G., WITZGALL, P., Antennal and behavioral responses of grapevine moth *Lobesia botrana* females to volatiles from grapevine. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p.77-87, 2005.
- [5] DICKE, M., SABELIS, M. W., Infochemical terminology: should it be base on coast-benefit analisys rather than origin of compounds? **Functional Ecology**, v. 2, p.131-139, 1988.
- [6] KARLSON, P., LUSCHER, M., Pheromones - New term for a class of biologically active substances. **Nature**, v. 183, p.55-56, 1959.
- [7] HOUCK, L. D. 2009. Pheromone communication in amphibians and reptiles. Pp. 161-176. *Annual Review of Physiology*.
- [8] POTH, D., PERAM, P. S., VENCES, M., SCHULZ, S., Macrolides and alcohols as scent gland constituents of the madagascan frog *Mantidactylus femoralis* and their intraspecific diversity. **Journal of Natural Products**, v. 76, p.1548-1558, 2013.
- [9] POTH, D., WOLLENBERG, K. C., VENCES, M., SCHULZ, S., Volatile amphibian pheromones: macrolides from mantellid frogs from Madagascar. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 51, p.2187-2190, 2012.

- [10] HOETLING, S., HABERLAG, B., TAMM, M., COLLATZ, J., MACK, P., STEIDLE, J. L. M., VENCES, M., SCHULZ, S., Identification and synthesis of macrolide pheromones of the grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* and the frog *Spinomantis Aglavei*. **Chemistry-a European Journal**, v. 20, p.3183-3191, 2014.
- [11] DICKSCHAT, J. S., Quorum sensing and bacterial biofilms. **Natural Product Reports**, v. 27, p.343-369, 2010.
- [12] BANDARA, H., LAM, O. L. T., JIN, L. J., SAMARANAYAKE, L., Microbial chemical signaling: a current perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, p.217-249, 2012.
- [13] LANDOLT, P. J., Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. **American Entomologist**, v. 43, p.12-22, 1997.
- [14] AMBROGI, B. G., VIDAL, D. M., ZARBIN, P. H. G., ROSADO-NETO, G. H., Feromônios de agregação em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, v. 32, p.2151-2158, 2009.
- [15] SZENDREI, Z., AVERILL, A., ALBORN, H., RODRIGUEZ-SAONA, C., Identification and field evaluation of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p.387-397, 2011.
- [16] LAPOINTE, S. L., ALESSANDRO, R. T., ROBBINS, P. S., KHRIMIAN, A., SVATOS, A., DICKENS, J. C., OTALORA-LUNA, F., KAPLAN, F., ALBORN, H. T., TEAL, P. E., Identification and synthesis of a male-produced pheromone for the neotropical root weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p.408-417, 2012.
- [17] ZARBIN, P. H. G., MOREIRA, M. A. B., HAFTMANN, J., TROEGER, A., FRANKE, S., KOPF, J., MORI, K., FRANCKE, W., (1*R*,2*S*,6*R*)-2-Hydroxymethyl-2,6-dimethyl-3-oxabicyclo [4.2.0] octane, a new volatile released by males of the papaya borer *Pseudopiazurus obesus* (Col.: Curculionidae). **Organic Letters**, v. 12, p.2447-2449, 2010.
- [18] UNELIUS, C. R., PARK, K. C., MCNEILL, M., WEE, S. L., BOHMAN, B., SUCKLING, D. M., Identification and electrophysiological studies of (4*S*,5*S*)-5-

hydroxy-4-methyl-3-heptanone and 4-methyl-3,5-heptanedione in male lucerne weevils. **Naturwissenschaften**, v. 100, p.135-143, 2013.

[19] AMBROGI, B. G., PALACIO CORTES, A. M., ZARBIN, P. H. G., Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Sternechus subsignatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p.272-277, 2012.

[20] MARQUES, F. A., ZALESKI, S. R. M., LAZZARI, S. M. N., FRENSCH, G., SENHORINI, G. A., MAIA, B. H. L. N. S., TROEGER, A., FRANCKE, W., IEDE, E. T., MORI, K., Identification of (1R,2S)-grandisal and (1R,2S)-grandisol in *Pissodes castaneus* male-produced volatiles: evidence of a sex pheromone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p.1050-1055, 2011.

[21] PALACIO-CORTES, A. M., VALENTE, F., SAAD, E. B., TROEGER, A., FRANCKE, W., ZARBIN, P. H. G., (1R,2S,6R)-Papayanol, aggregation pheromone of the guava weevil, *Conotrachelus psidii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p.784-789, 2015.

[22] LINS, R. P. 2002. Principais pragas e doenças do estado do Pará. Pág. 192-220 em Poltronieri, L. S. & Trindade, D. R. (eds.). *Manejo integrado das principais pragas e doenças de cultivos amazônicos*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém.

[23] PINTO, A. S., NAVA, D. E., ROSSI, M. M., SOUZA, D. T. M., **Controle biológico de pragas na prática**, ESALQ, Piracicaba, 2006.

[24] CUENCA, M. A. G. 1998. Importância econômica do coqueiro. Pág. 17-56 em Ferreira, J. M. S., Warwick, D. R. N. & Siqueira, L. A. (eds.). *A cultura do coqueiro no Brasil*. Embrapa-SPI, Embrapa-CPATC, Brasília, Aracaju.

[25] Food and agriculture organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/> (acesso em Setembro/2015).

[26] FERREIRA, J. M. S. 1998. Pragas do coqueiro. Pág. 81-118 em Braga, S. R., Cardoso, J. E. & Freire, F. C. O. (eds.). *Pragas de Fruteiras tropicais de importância agroindustrial*. Embrapa-SPI, Embrapa-CNPAT, Brasília, Fortaleza.

- [27] LINS, P. M. P., FERREIRA, J. M. S. 2005. Produção integrada de coco: práticas fitossanitárias. Pág. 336-371 em Poltronieri, L. S., Trindade, D. R. & Santos, I. P. (eds.). *Pragas e doenças de cultivos amazônicos*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém.
- [28] VAURIE, P., The weevil genera *Homalinotus* and *Ozopherus* of the Neotropical Cholinae (Coleoptera, Curculionidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 152, p.1-49, 1973.
- [29] RIBEIRO, R. C., LEMOS, W. D. P., PONTES LINS, P. M., VALENTE, R. D. M., MUELLER, A. A., LUNZ, A. M., ZANUNCIO, J. C., Damage by *Homalinotus depressus* in commercial coconut palm crops in the Amazonian region of Brazil. **Phytoparasitica**, v. 40, p.239-241, 2012.
- [30] VIDAL, D. M., Identificação e síntese dos componentes do feromônio sexual de *Condylorrhiza vestigialis* (Lep.: Crambidae) e *Edessa meditabunda* (Hem.: Pentatomidae), **Mestrado**, Química, Universidade Federal do Paraná, 2012.
- [31] ZARBIN, P. H. G., FERREIRA, J. T. B., LEAL, W. S., Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, p.263-268, 1999.
- [32] ZARBIN, P. H. G., LORINI, L. M., AMBROGI, B. G., VIDAL, D. M., LIMA, E. R., Sex pheromone of *Lonomia obliqua*: Daily rhythm of production, identification, and synthesis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p.555-565, 2007.
- [33] PARRA-PEDRAZZOLI, A. L., COSSE, A., MURATA, Y., BENTO, J. M. S., VILELA, E. F., LEAL, W. S., Towards the identification and synthesis of the sex pheromone of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* stainton (Lepidoptera : gracillariidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p.12-18, 2006.
- [34] AYRES, M., AYRES, M. J., AYRES, D. L., SANTOS, A. S., **BioEstat3.0, Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**, Sociedade Civil Mamirauá,, Belém, Brasil, 2003.
- [35] VANDENDOOL, H., KRATZ, P. D., A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463-&, 1963.



- [36] MARQUES, F. D., MCELFRISH, J. S., MILLAR, J. G., Kovats retention indexes of monounsaturated C-12, C-14, and C-16 alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p.592-599, 2000.
- [37] ARMAREGO, W. L. F., CHAI, C. L. L., **Purification of Laboratory Chemicals**, Elsevier, Canberra, 2009.
- [38] RISSAFI, B., RACHIQUI, N., EL LOUZI, A., LOUPY, A., PETIT, A., FKIHTETOUANI, S., Epoxyisophorone ring-opening: an efficient route for the introduction of functional groups at position 2 of isophorone. **Tetrahedron**, v. 57, p.2761-2768, 2001.
- [39] CHO, B. T., KANG, S. K., KIM, M. S., RYU, S. R., AN, D. K., Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, p.8164-8168, 2006.
- [40] NARASIMHAN, S., BALAKUMAR, R., Synthetic applications of zinc borohydride. **Aldrichimica Acta**, v. 31, 1998.
- [41] NAKATA, T., TANAKA, T., OISHI, T., Highly stereoselective synthesis of erythro- $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxy alcohols by reduction of  $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxy ketones with zinc borohydride. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p.4723, 1981.
- [42] VIDAL, D. M., FONSECA, M. G., ZARBIN, P. H. G., Enantioselective synthesis and absolute configuration of the sex pheromone of *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae). **Tetrahedron Letters**, v. 51, p.6704-6706, 2010.
- [43] PAYNE, J. B., Monoperphthalic acid. **Organic Syntheses**, v. 5, p.805, 1973.
- [44] YE, D. Y., FRINGUELLI, F., PIERMATTI, O., PIZZO, F., Highly diastereoselective epoxidation of cycloalkenols with monoperoxyphthalic acid in water. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p.3748-3750, 1997.
- [45] BARON, A. M., ZAGO, E. C., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21, p.6, 2011.

- [46] FABER, K., **Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook**, Springer, Graz, AU, 2011.
- [47] CHEN, C. S., SIH, C. J., General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: The use of lipases [new synthetic methods (76)]. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 28, p.695-707, 1989.
- [48] ZHU, R., XING, L., WANG, X., CHENG, C., LIU, B., HU, Y., Practical preparation of diosphenols by ring opening of alpha,beta-epoxyketones catalyzed by silica gel supported acids. **Synlett**, v., p.2267-2271, 2007.
- [49] CARRUTHERS, W., COLDHAM, I., **Modern Methods of Organic Synthesis**, Cambridge, 2004.
- [50] TELLEZ, M. R., SCHRADER, K. K., KOBASISY, M., Volatile components of the cyanobacterium *Oscillatoria perornata* (Skuja). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.5989-5992, 2001.
- [51] INGVARSDOTTIR, A., BIRKETT, M. A., DUCE, I., GENNA, R. L., MORDUE, W., PICKETT, J. A., WADHAMS, L. J., MORDUE, A. J., Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. **Pest Management Science**, v. 58, p.537-545, 2002.
- [52] SCHULZ, S., BOPPRE, M., VANEWRIGHT, R. I., Specific mixtures of secretions from male scent organs of african milkweed butterflies (Danainae). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 342, p.161-181, 1993.
- [53] ANDERSSON, S., NILSSON, L. A., GROTH, I., BERGSTROM, G., Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p.129-153, 2002.
- [54] KIM, H. J., KIM, K., KIM, N. S., LEE, D. S., Determination of floral fragrances of *Rosa hybrida* using solid-phase trapping-solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p.389-404, 2000.

- [55] HENBEST, H. B., MEAKINS, G. D., NICHOLLS, B., TAYLOR, K. J., Detection of the epoxide group by infrared spectroscopy. **Journal of the Chemical Society**, v., p.1459-1462, 1957.
- [56] MORI, K., Significance of chirality in pheromone science. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.7505-7523, 2007.
- [57] LI, J. J., **Name Reactions: A Collection of Detailed Reaction Mechanisms**, Springer, Berlin, 2006.
- [58] LATTANZI, A., IANNECE, P., VICINANZA, A., SCETTRI, A., Renewable camphor-derived hydroperoxide: synthesis and use in the asymmetric epoxidation of allylic alcohols. **Chemical Communications**, v., p.1440-1441, 2003.
- [59] FONSECA, M. G., VIDAL, D. M., ZARBIN, P. H. G., Male-produced sex pheromone of the Cerambycid beetle *Hedypathes betulinus*: Chemical Identification and Biological Activity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p.1132-1139, 2010.
- [60] D'AURIA, M., MAURIELLO, G., RANA, G. L., Volatile organic compounds from saffron. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p.17-23, 2004.
- [61] BIANCHI, F., MANGIA, A., MATTAROZZI, M., MUSCI, M., Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, p.1030-1036, 2011.
- [62] KUS, P. M., JERKOVIC, I., TUBEROSO, C. I. G., SAROLIC, M., The volatile profiles of a rare apple (*Malus domestica* Borkh.) honey: Shikimic acid-pathway derivatives, terpenes, and others. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p.1638-1652, 2013.
- [63] JERKOVIC, I., TUBEROSO, C. I. G., MARIJANOVIC, Z., KRANJAC, M., MALENICA-STAVER, M., Antioxidant capacity and chemical profiles of *Satureja montana* L. honey: Hotrienol and *Syringyl* derivatives as biomarkers. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p.1047-1056, 2015.
- [64] JERKOVIC, I., TUBEROSO, C. I. G., BARANOVIC, G., MARIJANOVIC, Z., KRANJAC, M., SVECNJAK, L., KUS, P. M., Characterization of summer savory

(*Satureja hortensis* L.) honey by physico-chemical parameters and chromatographic/spectroscopic techniques (GC-FID/MS, HPLC-DAD, UV/VIS and FTIR-ATR). **Croatica Chemica Acta**, v. 88, p.15-22, 2015.

[65] SAID, I., HASNI, N., ABDALLAH, Z., COUZI, P., OUHICHI, M., RENOU, M., ROCHAT, D., Identification of the aggregation pheromone of the date palm root borer *Oryctes agamemnon*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p.446-457, 2015.

[66] WIBE, A., BORG-KARLSON, A.-K., CROSS, J., BICHAO, H., FOUNTAIN, M., LIBLIKAS, I., SIGSGAARD, L., Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry *Fragaria vesca*, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* improves attraction. **Crop Protection**, v. 64, p.122-128, 2014.

[67] ROCHAT, D., NAGNAN-LE MEILLOUR, P., ESTEBAN-DURAN, J. R., MALOSSE, C., PERTHUIS, B., MORIN, J. P., DESCOINS, C., Identification of pheromone synergists in American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p.155-187, 2000.

[68] PATIL, S. R., MORALES, R., CATES, S., ANDERSON, D., KENDALL, D., An application of meta-analysis in food safety consumer research to evaluate consumer behaviors and practices. **Journal of Food Protection**, v. 67, p.2587-2595, 2004.

[69] LIU, S. Q., HOLLAND, R., CROW, V. L., Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 14, p.923-945, 2004.

[70] RIZZI, G. P. 2002. Biosynthesis of aroma compounds containing nitrogen. Pág. 140-157 em Reineccius, G. A. & Reineccius, T. A. (eds.). *Heteroatomic Aroma Compounds*.

[71] DICKSCHAT, J. S., MARTENS, T., BRINKHOFF, T., SIMON, M., SCHULZ, S., Volatiles released by a *Streptomyces* species isolated from the North Sea. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p.837-865, 2005.

[72] CHAURASIA, B., PANDEY, A., PALNI, L. M. S., TRIVEDI, P., KUMAR, B., COLVIN, N., Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v. 160, p.75-81, 2005.

[73] BARBIERI, E., GIOACCHINI, A. M., ZAMBONELLI, A., BERTINI, L., STOCCHI, V., Determination of microbial volatile organic compounds from *Staphylococcus pasteurii* against *Tuber borchii* using solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p.3411-3415, 2005.

[74] TOSI, L., SOLA, C., ROLE OF GEOSMIN, A typical inland water odor, in guiding glass eel *anguilla-anguilla* (l) migration. **Ethology**, v. 95, p.177-185, 1993.

[75] ROBACKER, D. C., BARTELT, R. J., Chemicals attractive to Mexican fruit fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii* cultures sampled by solid-phase microextraction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p.2897-2915, 1997.

[76] ROBACKER, D. C., FLATH, R. A., Attractants from *Staphylococcus aureus* cultures for Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p.1861-1874, 1995.

[77] LEE, C. J., DEMILO, A. B., MORENO, D. S., MARTINEZ, A. J., Analysis of the volatile components of a bacterial fermentation that is attractive to the mexican fruit-fly, *Anastrepha ludens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p.1348-1351, 1995.

[78] RYU, C. M., FARAG, M. A., HU, C. H., REDDY, M. S., KLOPPER, J. W., PARE, P. W., Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p.1017-1026, 2004.

[79] RYU, C. M., FARAG, M. A., HU, C. H., REDDY, M. S., WEI, H. X., PARE, P. W., KLOPPER, J. W., Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p.4927-4932, 2003.

- [80] VESPERMANN, A., KAI, M., PIECHULLA, B., Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p.5639-5641, 2007.
- [81] WENKE, K., KAI, M., PIECHULLA, B., Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. **Planta**, v. 231, p.499-506, 2010.
- [82] GROENHAGEN, U., BAUMGARTNER, R., BAILLY, A., GARDINER, A., EBERL, L., SCHULZ, S., WEISSKOPF, L., Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p.892-906, 2013.
- [83] HAN, S. H., LEE, S. J., MOON, J. H., PARK, K. H., YANG, K. Y., CHO, B. H., KIM, K. Y., KIM, Y. W., LEE, M. C., ANDERSON, A. J., KIM, Y. C., GacS-dependent production of 2R,3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p.924-930, 2006.
- [84] VELAZQUEZ-BECERRA, C., IVETH MACIAS-RODRIGUEZ, L., LOPEZ-BUCIO, J., ALTAMIRANO-HERNANDEZ, J., FLORES-CORTEZ, I., VALENCIA-CANTERO, E., A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. **Plant and Soil**, v. 339, p.329-340, 2011.
- [85] ZOU, C., LI, Z., YU, D., *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. **Journal of Microbiology**, v. 48, p.460-466, 2010.
- [86] BLOM, D., FABBRI, C., CONNOR, E. C., SCHIESTL, F. P., KLAUSER, D. R., BOLLER, T., EBERL, L., WEISSKOPF, L., Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. **Environmental Microbiology**, v. 13, p.3047-3058, 2011.

- [87] BLOM, D., FABBRI, C., EBERL, L., WEISSKOPF, L., Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p.1000-1008, 2011.
- [88] BERDY, J., Bioactive microbial metabolites - A personal view. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p.1-26, 2005.
- [89] LARSEN, T. O., SMEDSGAARD, J., NIELSEN, K. F., HANSEN, M. E., FRISVAD, J. C., Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 22, p.672-695, 2005.
- [90] WAKSMAN, S. A., Strain specificity and production of antibiotic substances. Characterization and classification of species within the *Streptomyces-Griseus* group. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 45, p.1043-1047, 1959.
- [91] GROENHAGEN, U., MACZKA, M., DICKSCHAT, J. S., SCHULZ, S., Streptopyridines, volatile pyridine alkaloids produced by *Streptomyces* sp FORM5. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p.1421-1432, 2014.
- [92] FLEMING, F. F., Nitrile-containing natural products. **Natural Product Reports**, v. 16, p.597-606, 1999.
- [93] TOLSTIKOV, A. G., BIKTIMIROVA, L. A., TOLSTIKOVA, O. V., SHMAKOV, V. S., ARIPOVA, S. F., ODINOKOV, V. N., TOLSTIKOV, G. A., Synthesis of the racemic alkaloid diptocarpilidine. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 27, p.225-226, 1991.
- [94] LECHTENBERG, M., NAHRSTEDT, A., FRONCZEK, F. R., Leucine-derived nitrile glucosides in the rosaceae and their systematic significance. **Phytochemistry**, v. 41, p.779-785, 1996.
- [95] CHASSAGNE, D., CROUZET, J., A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. **Phytochemistry**, v. 49, p.757-759, 1998.

- [96] MCCARTY, R. M., BANDARIAN, V., Deciphering deazapurine biosynthesis: pathway for pyrrolopyrimidine nucleosides Toyocamycin and Sangivamycin. **Chemistry & Biology**, v. 15, p.790-798, 2008.
- [97] ARAI, T., TAKAHASHI, K., NAKAHARA, S., KUBO, A., The structure of a novel antitumor antibiotic, Saframycin A. **Experientia**, v. 36, p.1025-1027, 1980.
- [98] KATO, Y., TSUDA, T., ASANO, Y., Purification and partial characterization of N-hydroxy-l-phenylalanine decarboxylase/oxidase from *Bacillus* sp. strain OxB-1, an enzyme involved in aldoxime biosynthesis in the “aldoxime–nitrile pathway”. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1774, p.856-865, 2007.
- [99] NELP, M. T., BANDARIAN, V., A single enzyme transforms a carboxylic acid into a nitrile through an amide intermediate. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 54, p.10627-10629, 2015.
- [100] GIL, V., MACLEOD, A. J., The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. **Phytochemistry**, v. 19, p.2547-2551, 1980.
- [101] ELOMARI, M., COROLER, L., HOSTE, B., GILLIS, M., IZARD, D., LECLERC, H., DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p.1138-1144, 1996.
- [102] HUNZIKER, L., BOENISCH, D., GROENHAGEN, U., BAILLY, A., SCHULZ, S., WEISSKOPF, L., *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p.821-830, 2015.
- [103] VOISARD, C., KEEL, C., HAAS, D., DÉFAGO, G., Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, v. 8, p.351, 1989.
- [104] WEINSTEIN, M. J., ROSSELET, J. P., HERZOG, H. L., BLACK, J., LUEDEMANN, G. M., WAGMAN, G. H., CHARNEY, W., MARQUEZ, J. A.,



CONIGLIO, C. T., ODEN, E. M., Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, p.463-&, 1963.

[105] MAIESE, W. M., LECHEVALIER, M. P., LECHEVALIER, H. A., KORSHALLA, J., KUCK, N., FANTINI, A., WILDEY, M. J., THOMAS, J., GREENSTEIN, M., Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics - Taxonomy, fermentation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 42, p.558-563, 1989.

[106] VORBRUGGEN, H., KROLIKIEWICZ, K., The introduction of nitrile-groups into heterocycles and conversion of carboxylic groups into their corresponding nitriles with chlorosulfonylisocyanate and triethylamine. **Tetrahedron**, v. 50, p.6549-6558, 1994.

[107] NAKAMURA, Y., MORI, K., Pheromone synthesis, CCI - Synthesis of (3*S*,7*S*)- and (3*S*,7*S*,15*S*)- stereoisomers of 3,7-dimethyl-2-heptacosanone and 3,7,15-trimethyl-2-heptacosanone, the ketones identified from the locust *Schistocerca gregaria*. **European Journal of Organic Chemistry**, v., p.1307-1312, 2000.

[108] JENNER, M., FRANK, S., KAMPA, A., KOHLHAAS, C., POEPLAU, P., BRIGGS, G. S., PIEL, J., OLDHAM, N. J., Substrate specificity in ketosynthase domains from trans-AT polyketide synthases. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 52, p.1143-1147, 2013.

[109] WAGNER-DOBLER, I., THIEL, V., EBERL, L., ALLGAIER, M., BODOR, A., MEYER, S., EBNER, S., HENNIG, A., PUKALL, R., SCHULZ, S., Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. **Chembiochem**, v. 6, p.2195-2206, 2005.

[110] OVERMAN, L. E., BROWN, M. J., MCCANN, S. F., (Z)-4-(trimethylsilyl)-3-buten-1-ol. **Organic Syntheses**, v. 68, 1990.

[111] BAUGHMAN, T. W., SWOREN, J. C., WAGENER, K. B., The facile preparation of alkenyl metathesis synthons. **Tetrahedron**, v. 60, p.10943-10948, 2004.

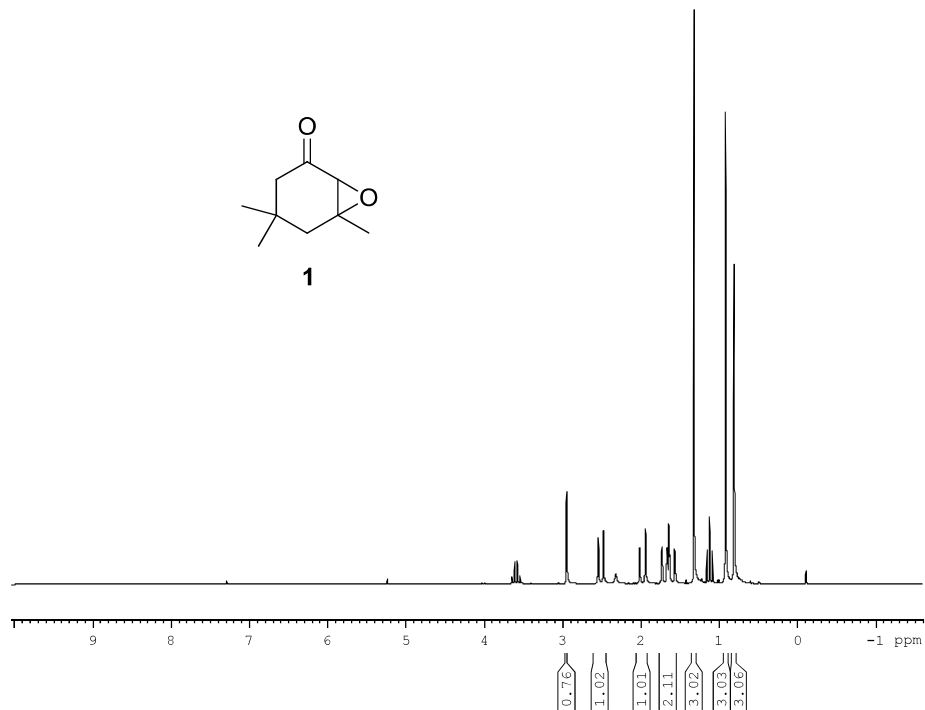
- [112] ZARBIN, P. H. G., FAVARO, C. F., VIDAL, D. M., RODRIGUES, M. A. C. M., Male-produced sex pheromone of the stink bug *Edessa meditabunda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p.825-835, 2012.
- [113] CARLSEN, P. H. J., KATSUKI, T., MARTIN, V. S., SHARPLESS, K. B., A greatly improved procedure for ruthenium tetraoxide catalyzed oxidations of organic compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 46, p.3936-3938, 1981.
- [114] LEAL, W. S., KUWAHARA, S., SHI, X., HIGUCHI, H., MARINO, C. E. B., ONO, M., MEINWALD, J., Male-released sex pheromone of the stink bug *Piezodorus hybneri*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p.1817-1829, 1998.
- [115] CHINTA, S. P., Identification and synthesis of semiochemicals from arthropods, **Tese de Doutorado**, Química, Technische Universität Braunschweig, 2010.
- [116] DASH, D. C. 2011. Analytical Chemistry. PHI Learning, Nova Deli.
- [117] MARQUEZ, L., AGUERO, J., HERNANDEZ, I., GARRIDO, G., MARTINEZ, I., DIEGUEZ, R., PRIETO, S., RIVAS, Y., MOLINA-TORRES, J., CURINI, M., DELGADO, R., Anti-inflammatory evaluation and phytochemical characterization of some plants of the *Zanthoxylum* genus. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p.325-330, 2005.
- [118] MACHIELS, D., VAN RUTH, S. M., POSTHUMUS, M. A., ISTASSE, L., Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. **Talanta**, v. 60, p.755-764, 2003.
- [119] FAN, H., ZHOU, H., WANG, J., Pyrolysis of municipal sewage sludges in a slowly heating and gas sweeping fixed-bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p.1151-1158, 2014.
- [120] OEZEL, M. Z., HAMILTON, J. F., LEWIS, A. C., New sensitive and quantitative analysis method for organic nitrogen compounds in urban aerosol samples. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p.1497-1505, 2011.

- [121] YUAN, X., WANG, J., ZENG, G., HUANG, H., PEI, X., LIU, Z., CONG, M., Comparative studies of thermochemical liquefaction characteristics of microalgae using different organic solvents. **Energy**, v. 36, p.6406-6412, 2011.
- [122] ADAMS, R. P., **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 1995.
- [123] ATTYGALLE, A. B. 1998. Microchemical Techniques. Pág. 390 em Millar, J. G. H., Kenneth (ed.). *Methods in Chemical Ecology*. Chapman & Hall.
- [124] ZARBIN, P. H. G., CRUZ, W. D., FERREIRA, J. T. B., Stereospecific synthesis of two isomers of (4,8)-dimethyldecanal: The aggregation pheromone of *Tribolium spp.* **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.511-513, 1998.
- [125] MOREIRA, J. A., CORREA, A. G., Enantioselective synthesis of three stereoisomers of 5,9-dimethylpentadecane, sex pheromone component of *Leucoptera coffeella*, from (-)-isopulegol. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 14, p.3787-3795, 2003.
- [126] BAI, C. X., LU, X. B., HE, R., ZHANG, W. Z., FENG, X. J., Lewis-acid assisted cross metathesis of acrylonitrile with functionalized olefins catalyzed by phosphine-free ruthenium carbene complex. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, p.4139-4142, 2005.
- [127] TAKADA, A., HASHIMOTO, Y., TAKIKAWA, H., HIKITA, K., SUZUKI, K., Total synthesis and absolute stereochemistry of Seragakinone A. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, p.2297-2301, 2011.
- [128] MILLER, D. R., BORDEN, J. H., SLESSOR, K. N., Enantiospecific pheromone production and response profiles for populations of pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae), in British Columbia. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p.2157-2172, 1996.
- [129] CARLSON, D. A., BERNIER, U. R., SUTTON, B. D., Elution patterns from capillary GC for methyl-branched alkanes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p.1845-1865, 1998.

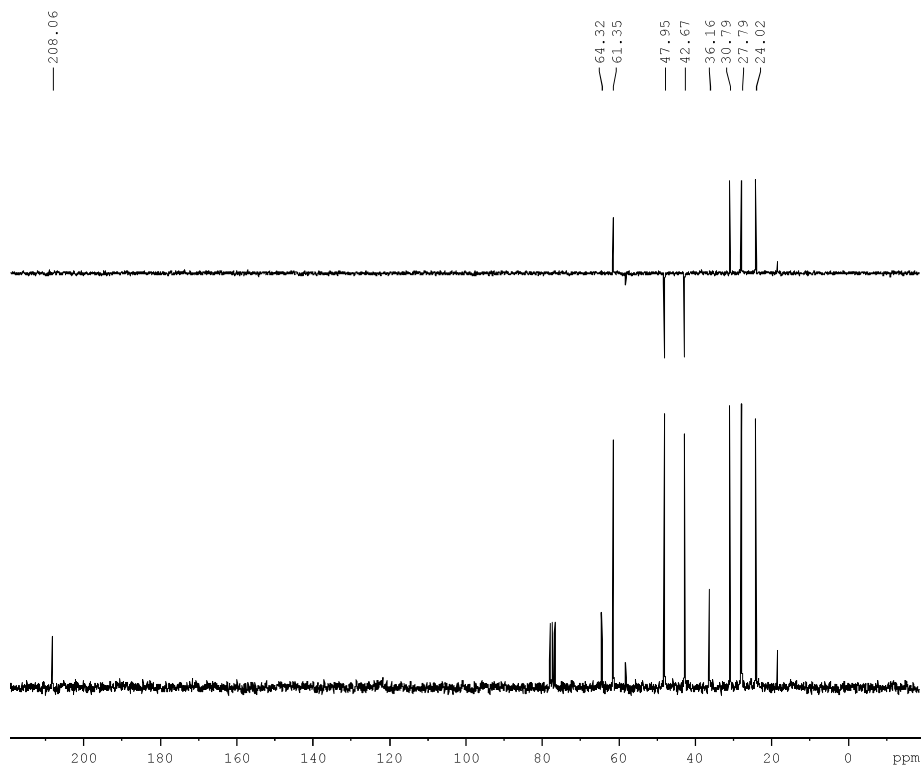
- [130] CONCELLON, J. M., RODRIGUEZ-SOLLA, H., SIMAL, C., SANTOS, D., PAZ, N. R., General, stereoselective synthesis of (Z)- $\beta,\gamma$ -unsaturated nitriles promoted by samarium diiodide. **Organic Letters**, v. 10, p.4549-4552, 2008.
- [131] KIM, J., PARK, N., LIM, J., HAN, S., OH, J. Electrolyte and lithium ion secondary battery comprising the same. Patente: EP 2124286 A1, 2009.
- [132] FUJITA, Y., MATSUOKA, H., HIROOKA, K., Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. **Molecular microbiology**, v. 66, p.829-839, 2007.
- [133] CANE, D. E., KUDO, F., KINOSHITA, K., KHOSLA, C., Precursor-directed biosynthesis: Biochemical basis of the remarkable selectivity of the Erythromycin Polyketide Synthase toward unsaturated triketides. **Chemistry & Biology**, v. 9, p.131-142, 2002.
- [134] DEWICK, P. M., **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, Wiley, Chichester, UK, 2009.
- [135] MCLAFFERTY, F. W., TURECEK, F., **Interpretation of Mass Spectra**, University Science Books, Sausalito, CA, 1993.
- [136] GOLDRING, W. P. D., Application of ring-closing metathesis to the synthesis of unsaturated 14-membered lactams and marine alkaloids motuporamines A-C, **Tese de Doutorado**, Química, The University of British Columbia, 2000.
- [137] DOS SANTOS, A., SANTOS, D. O., DE FREITAS, C. C., FERREIRA, B. L. A., AFONSO, I. F., RODRIGUES, C. R., CASTRO, H. C., Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, p.413-423, 2007.

# ESPECTROS - CAPÍTULO I

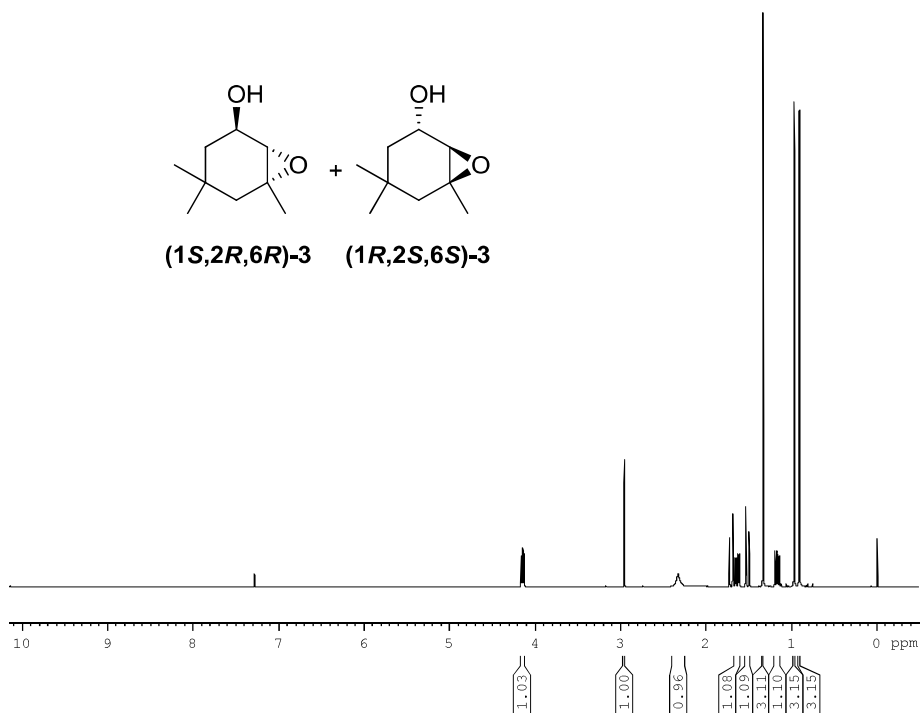
## ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 1



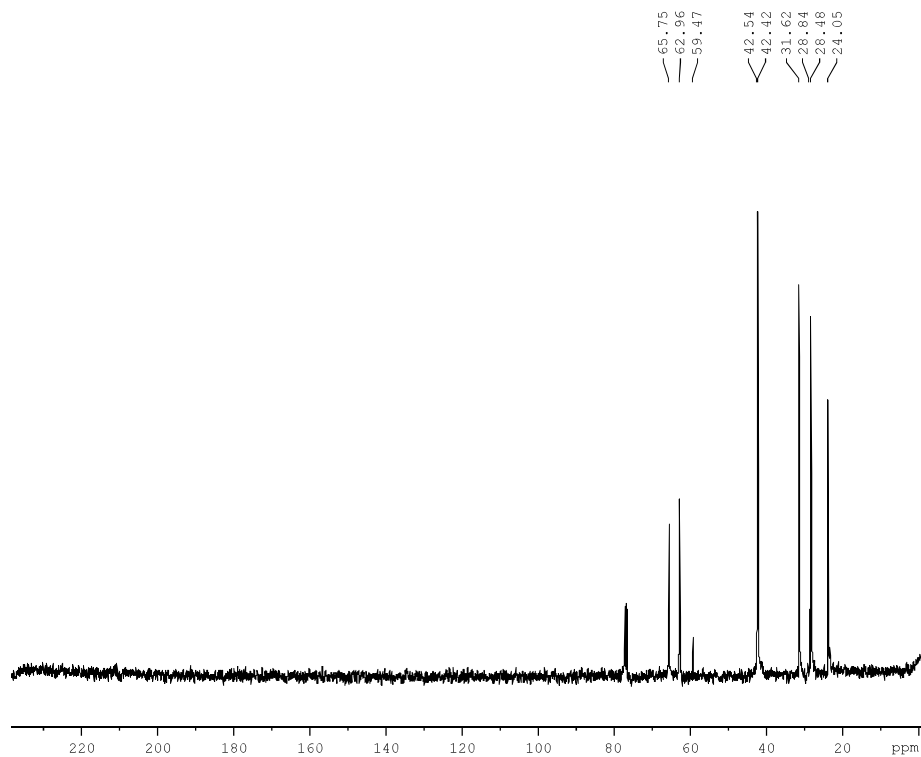
## ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 1



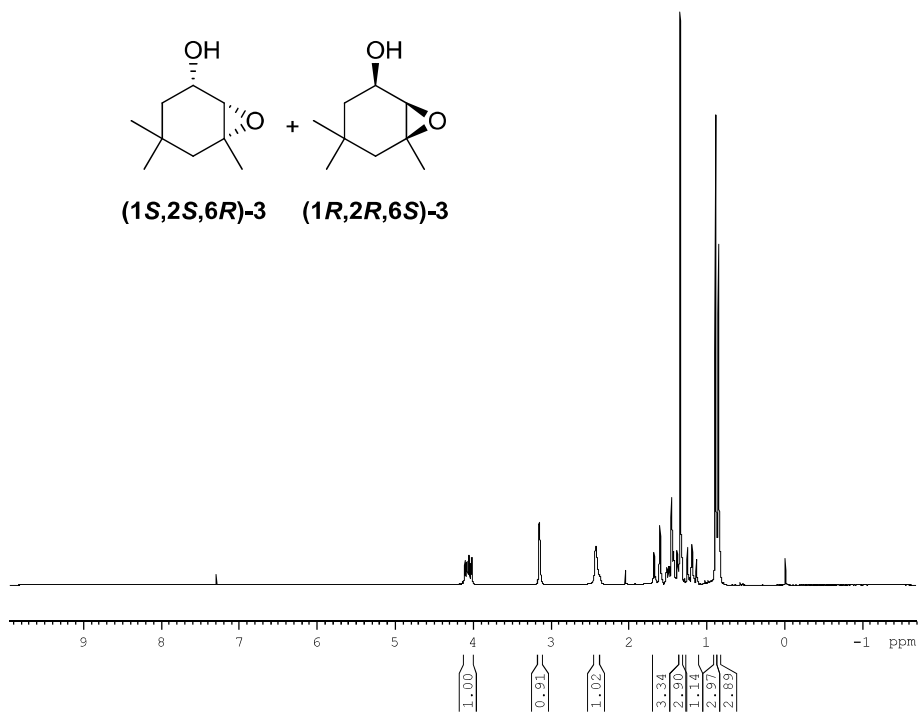
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO *anti*-3



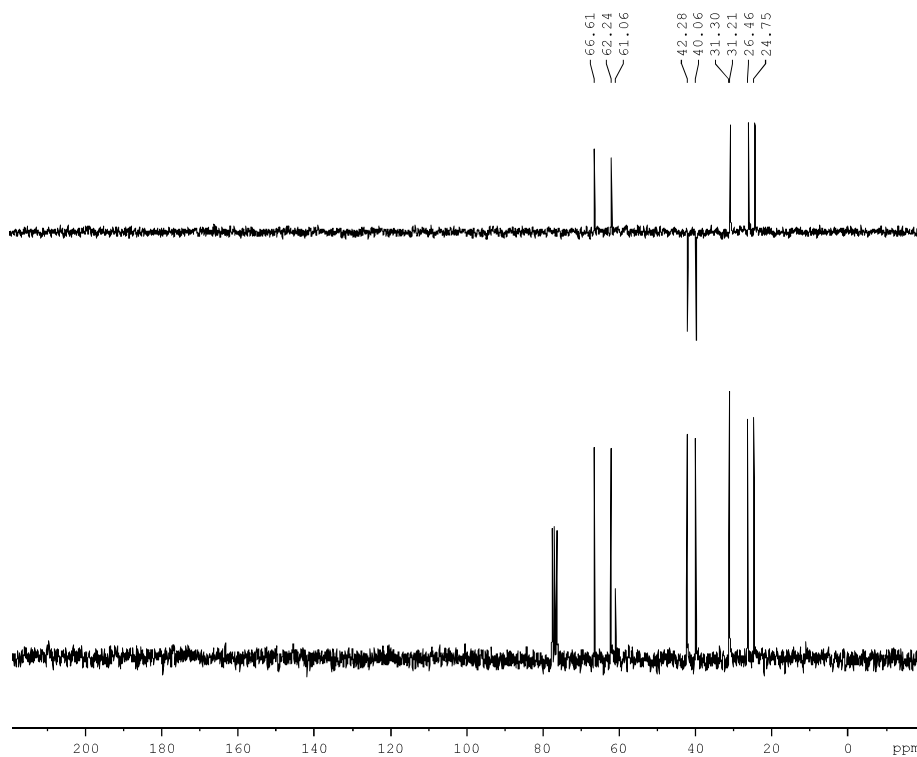
### ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO *anti*-3



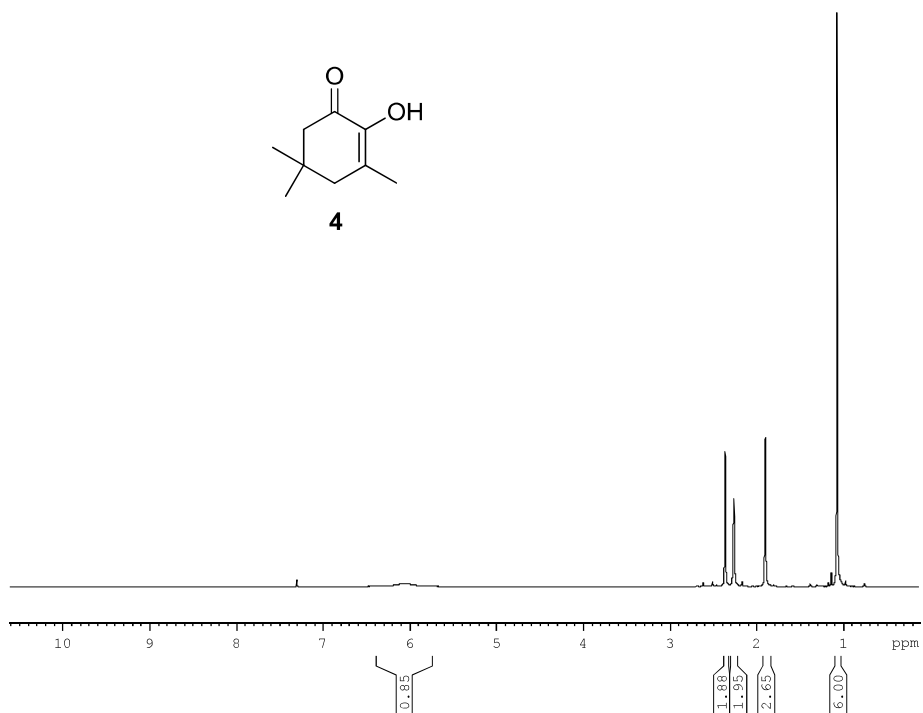
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO *syn-3*



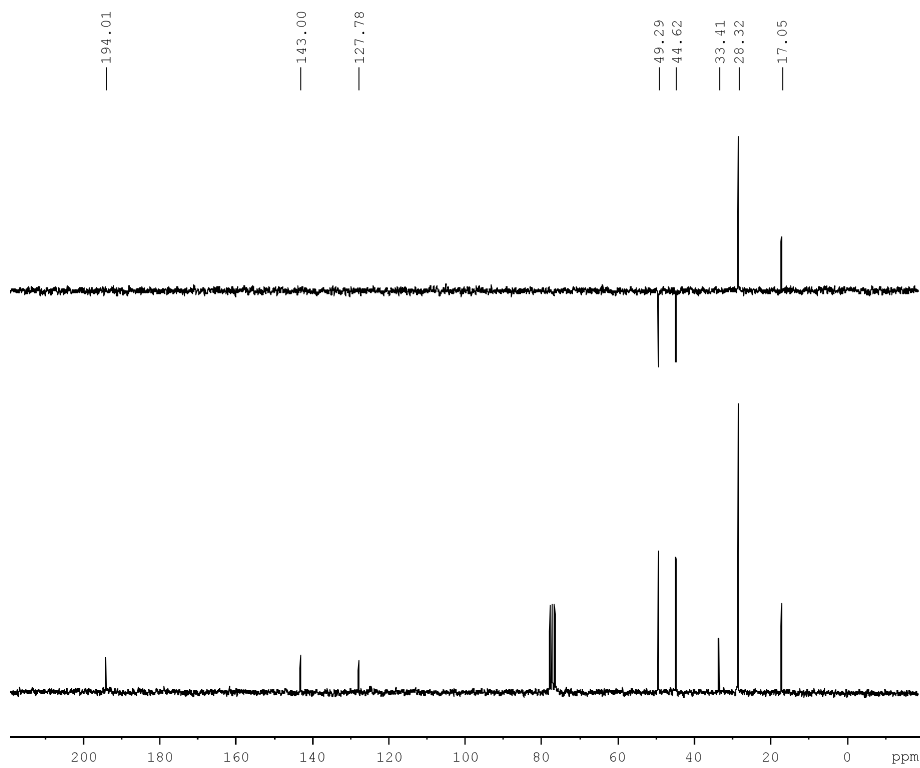
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO *syn-3*



# ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 4

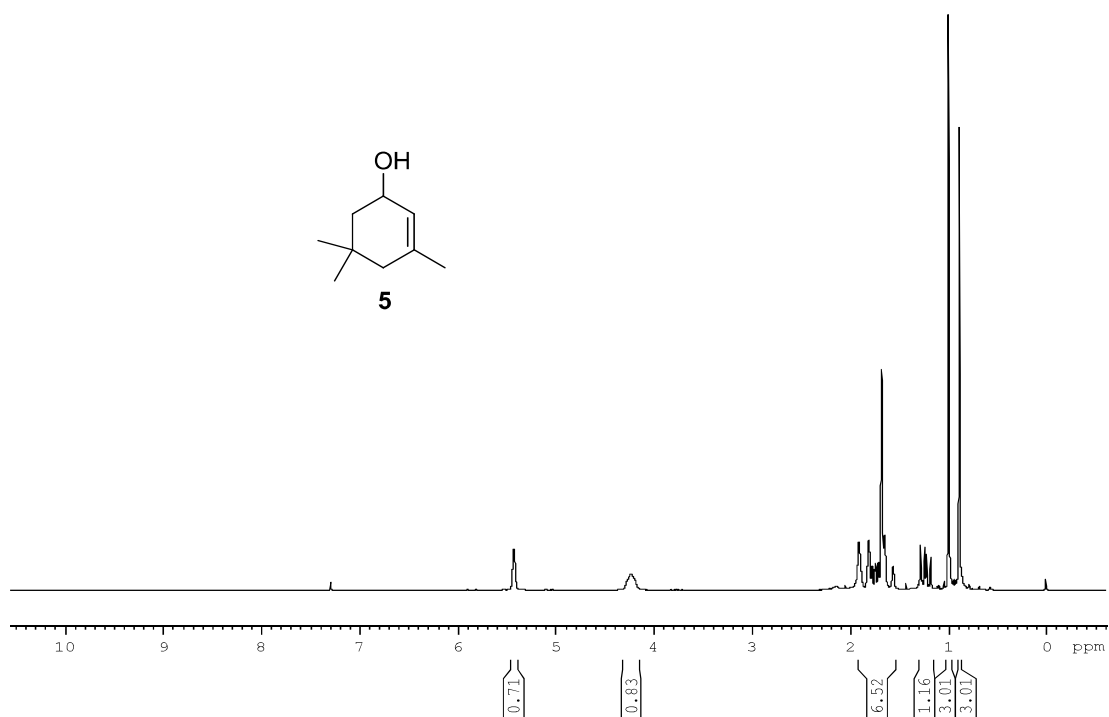


# ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 4

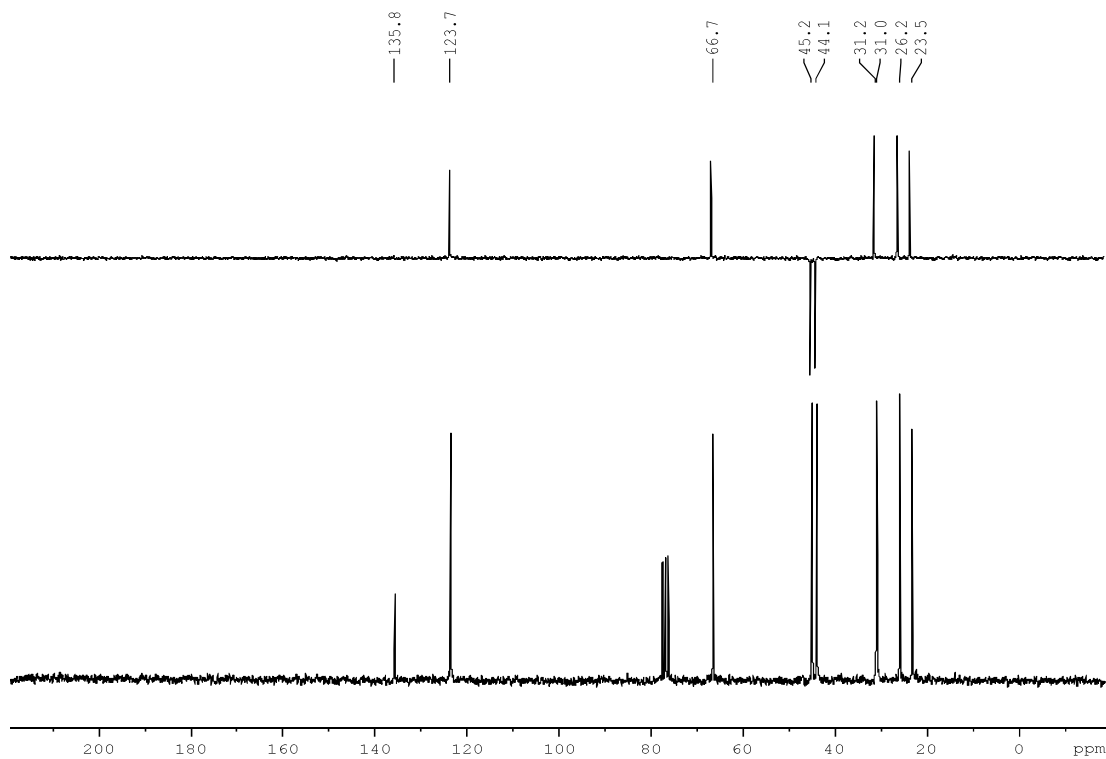




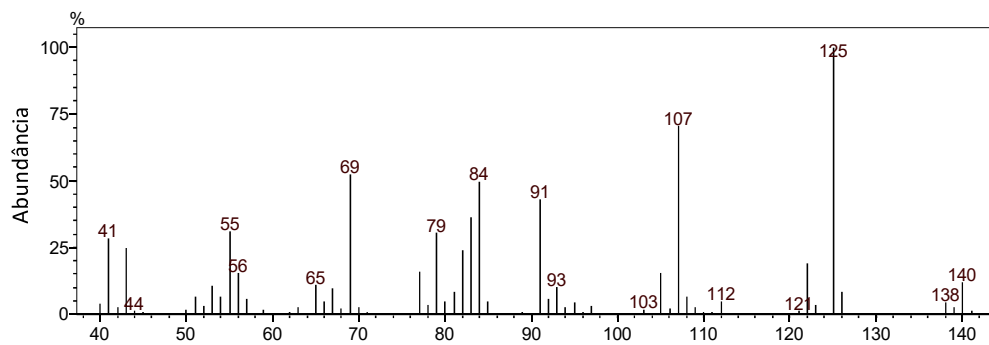
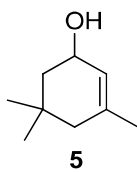
# ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 5



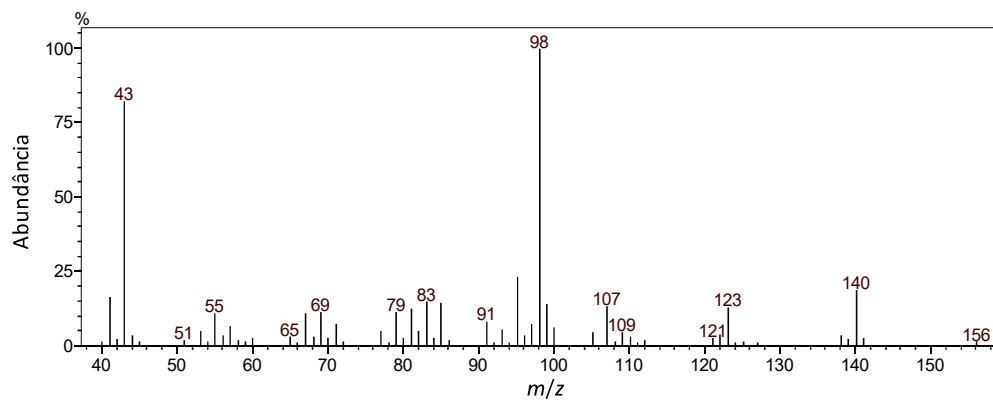
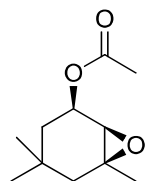
# ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 5



## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 5

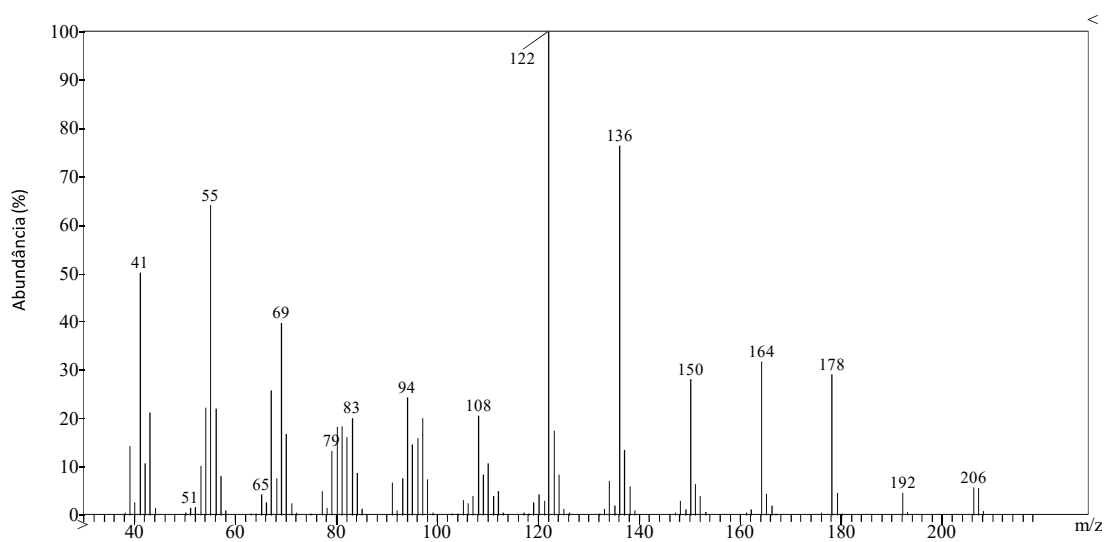


## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO (1R,2R,6S)-6

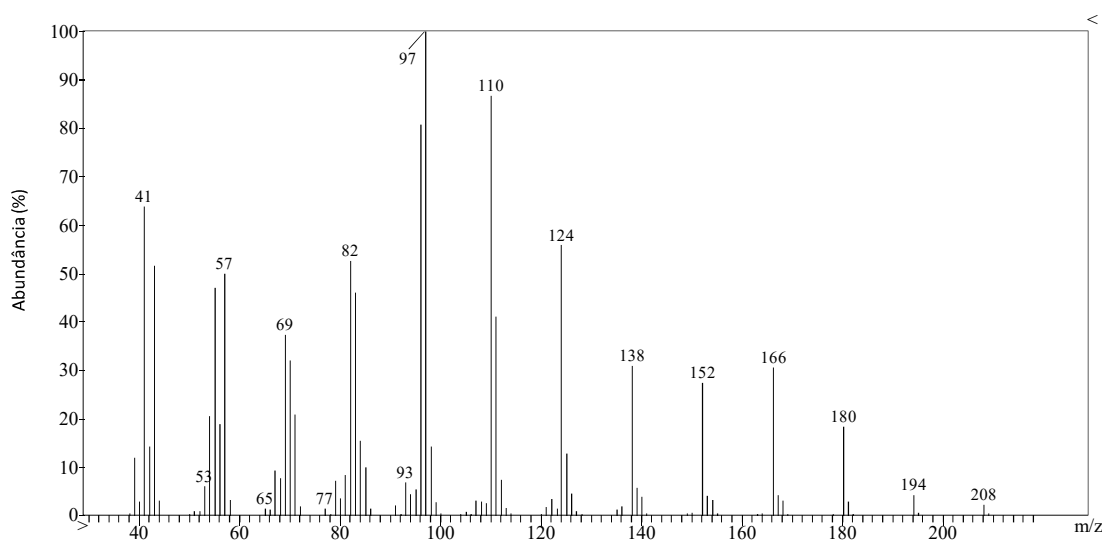


## ESPECTROS - CAPÍTULO II

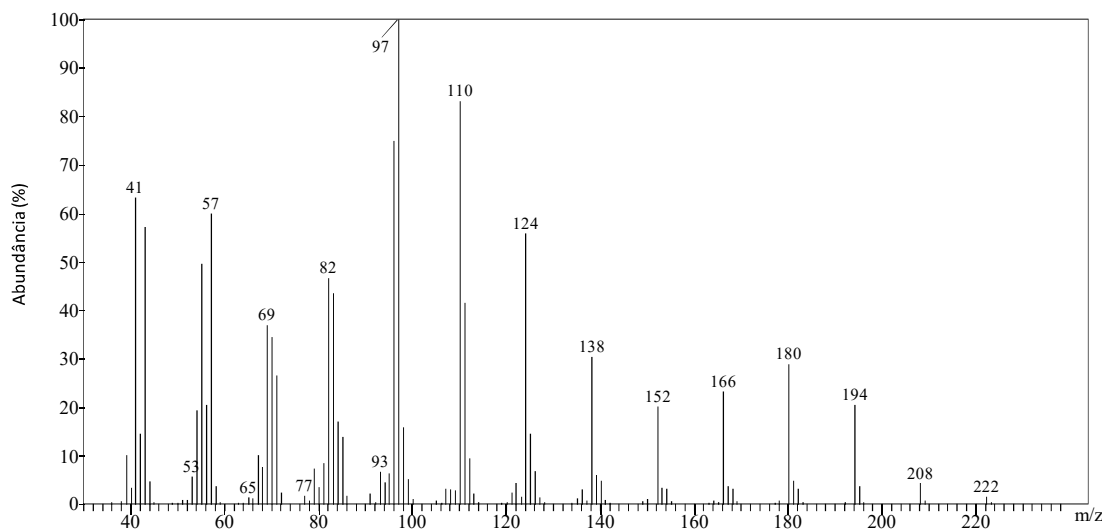
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 7



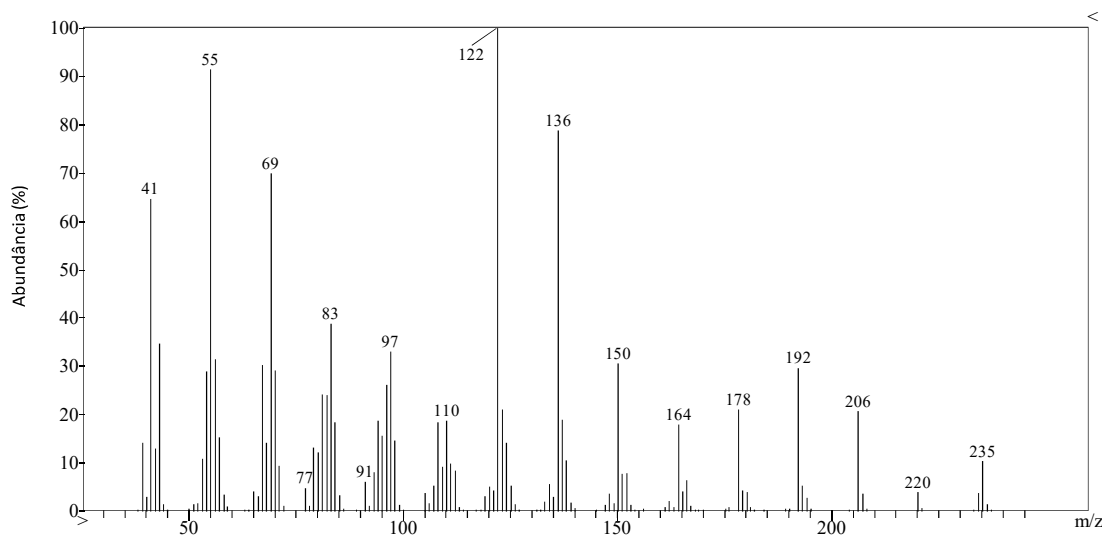
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 8



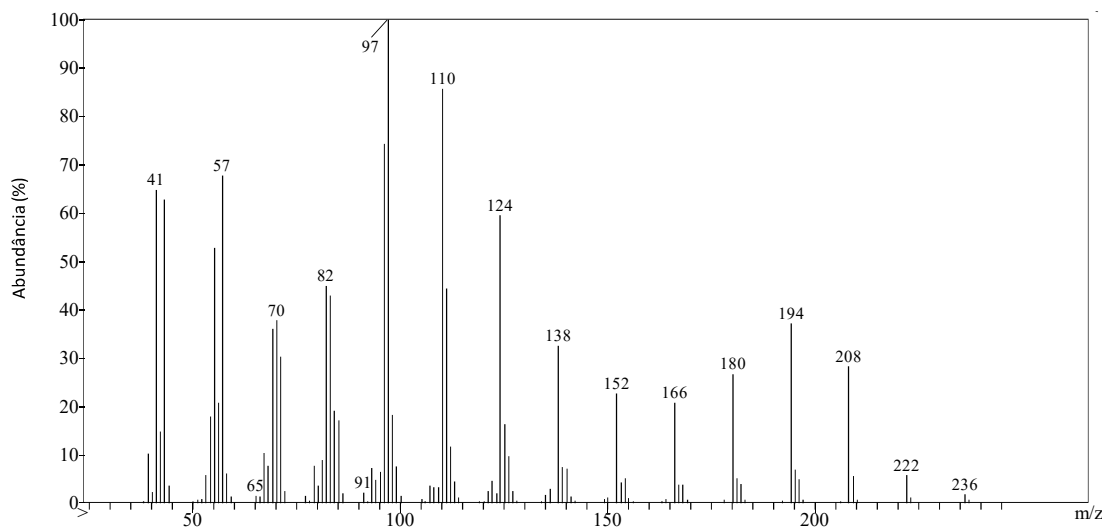
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 9



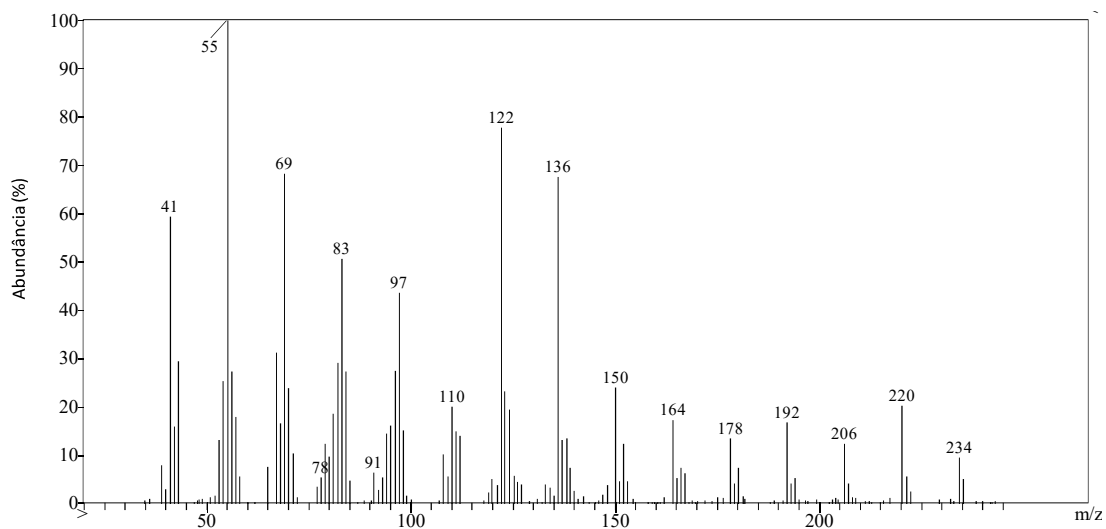
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 10



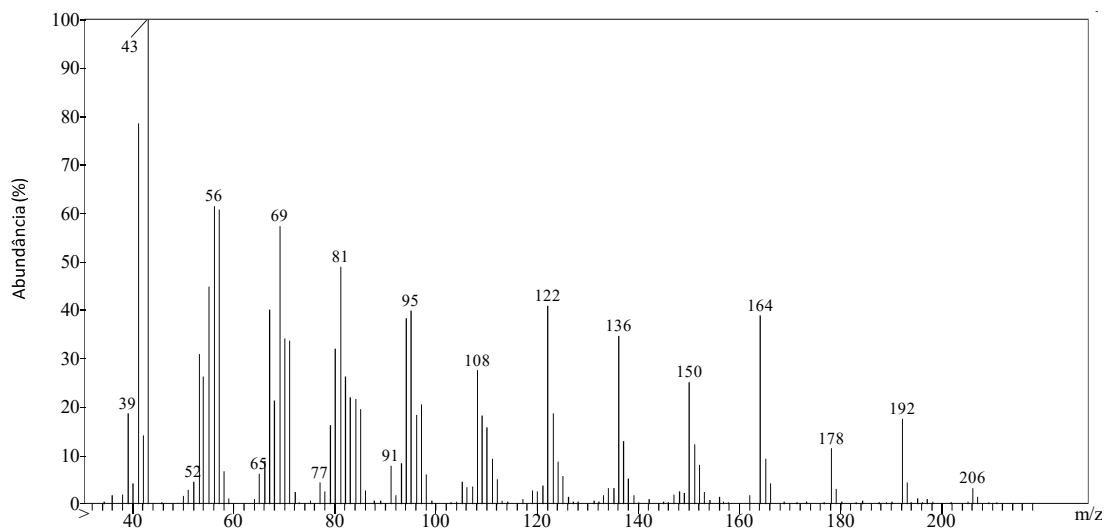
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 11



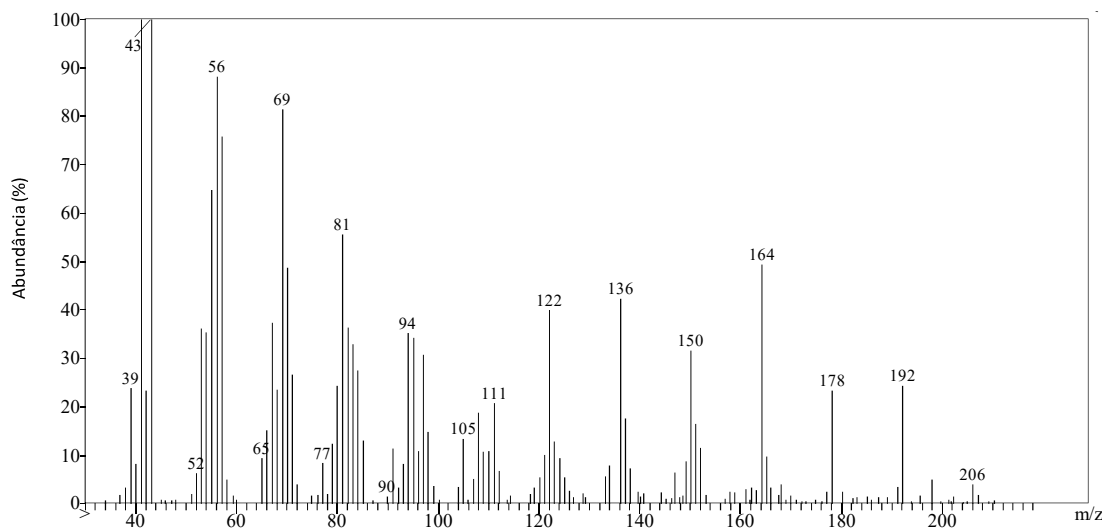
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 12



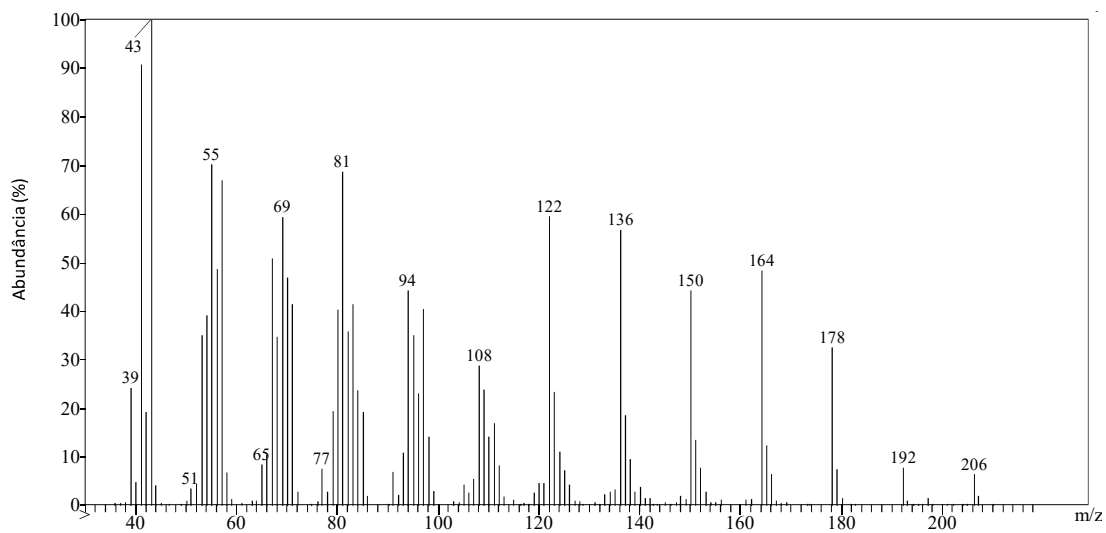
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 19



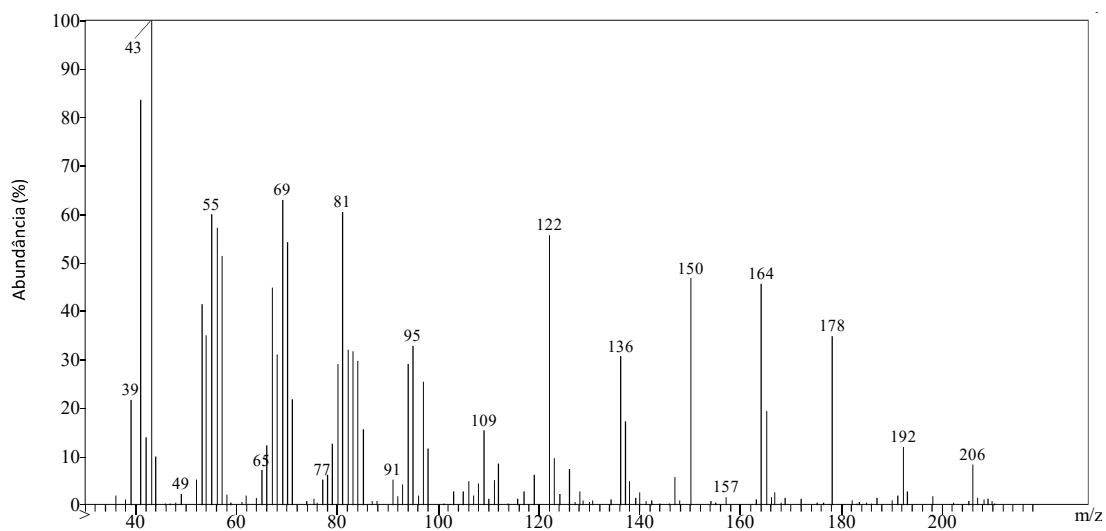
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 20



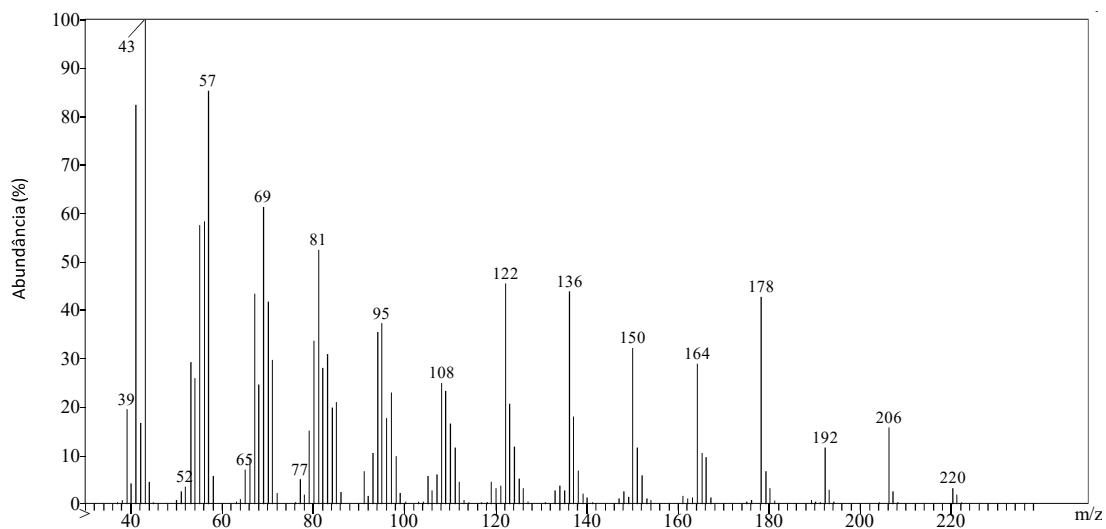
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 21



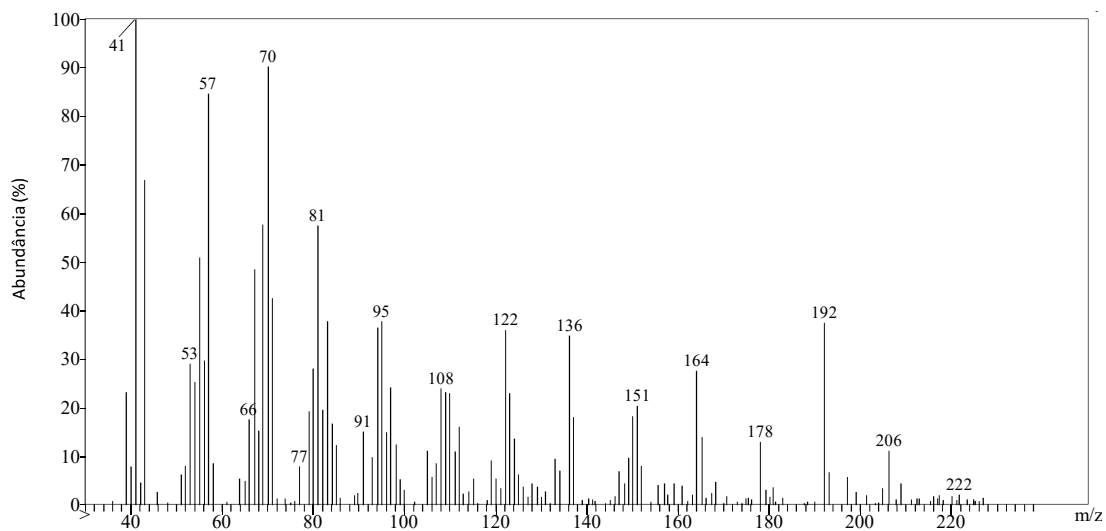
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 22



### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 23

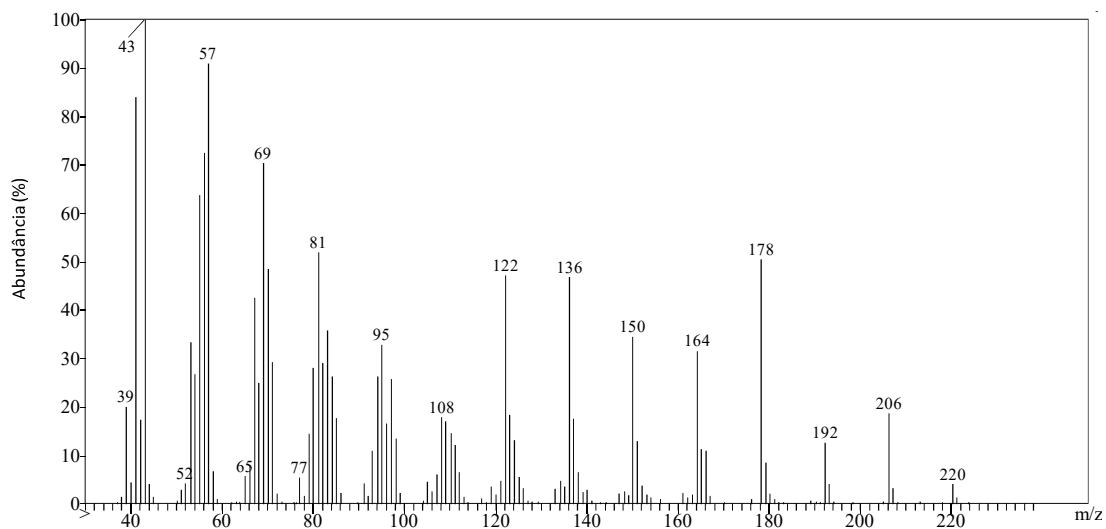


### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 24

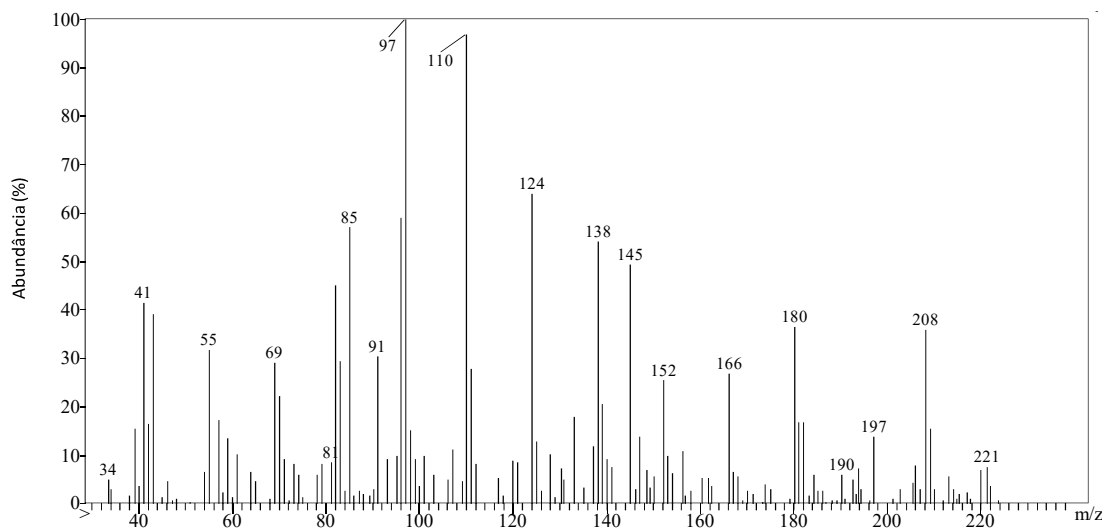




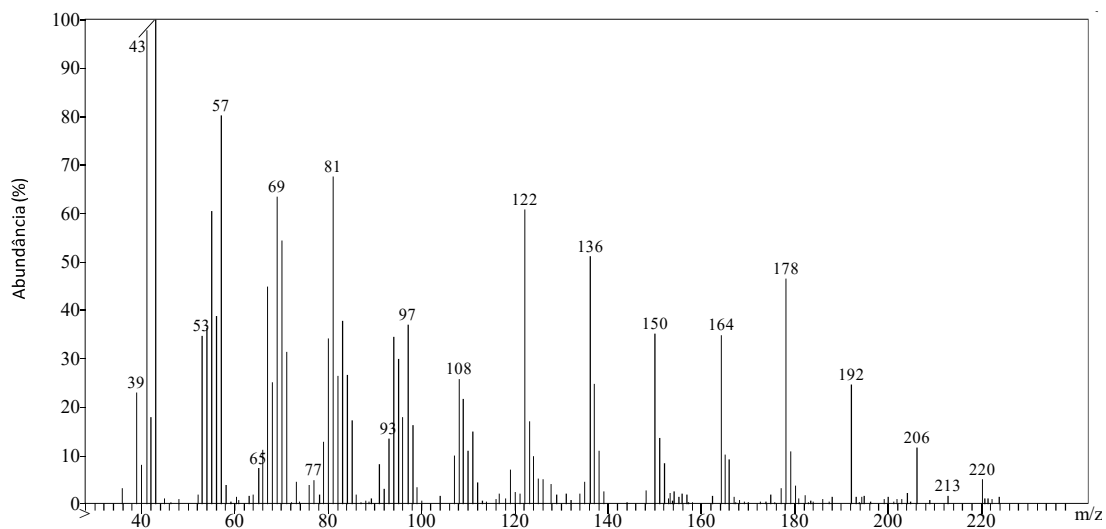
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 25



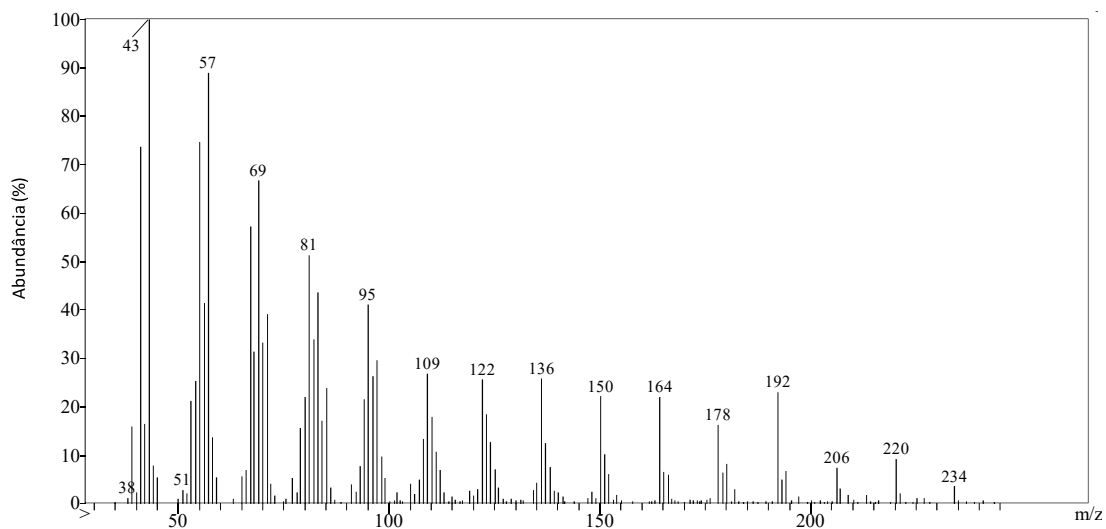
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 26



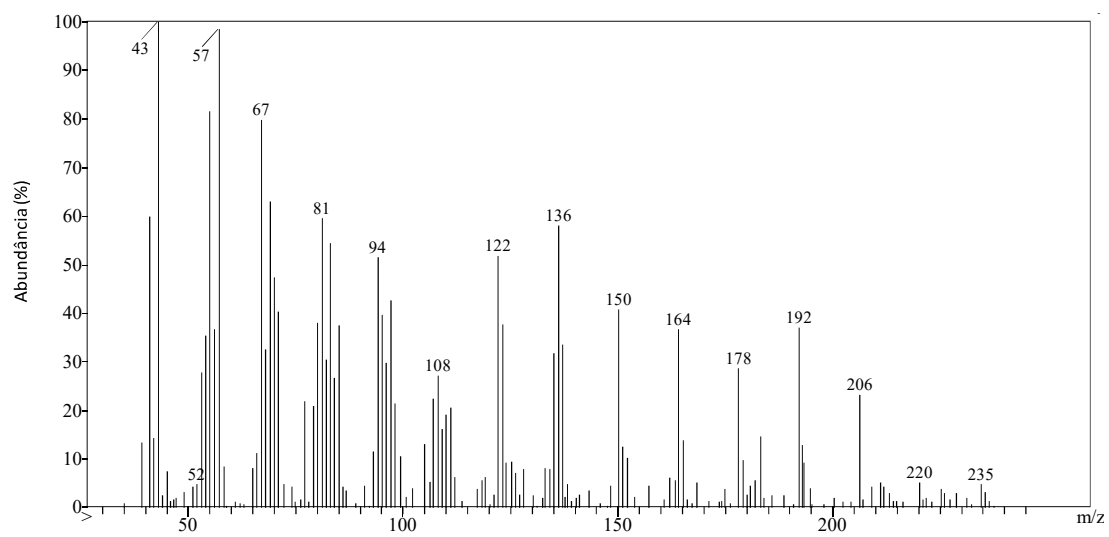
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 27



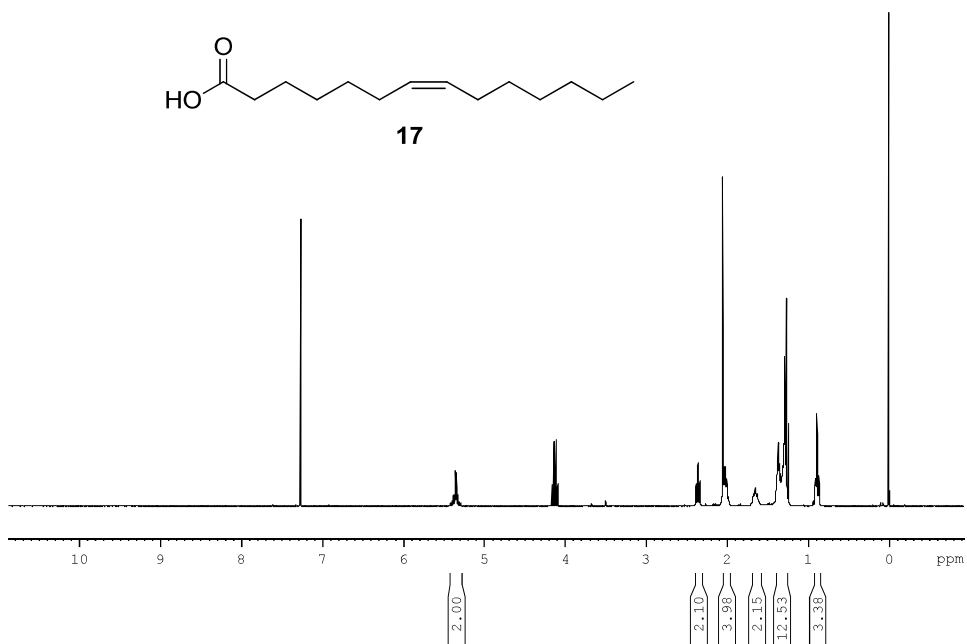
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 28



## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO NATURAL 29

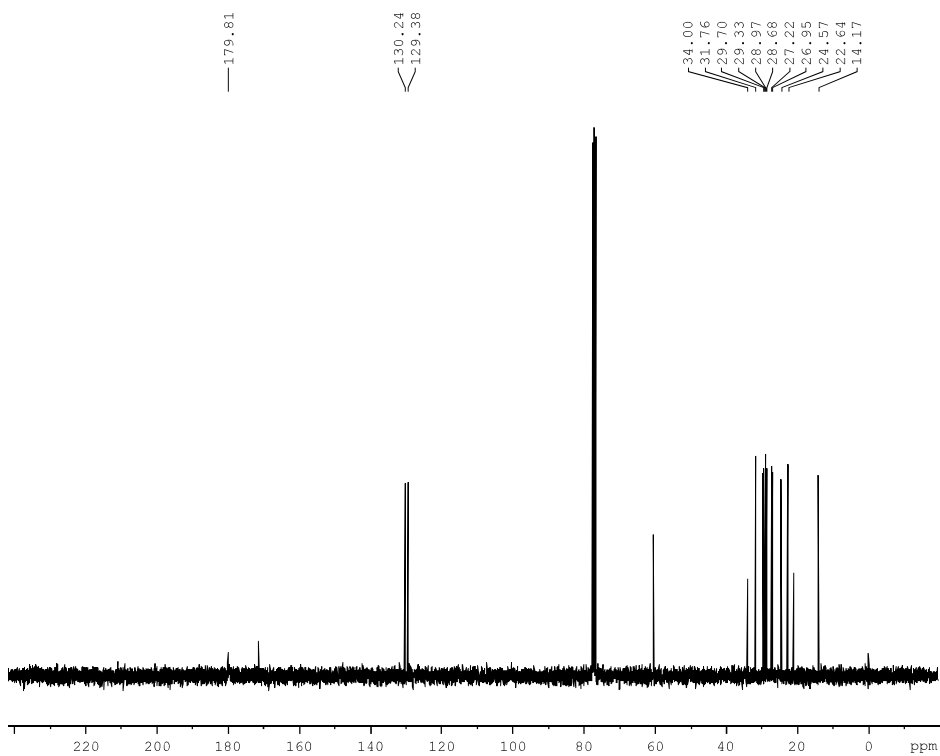


### ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DO COMPOSTO 17



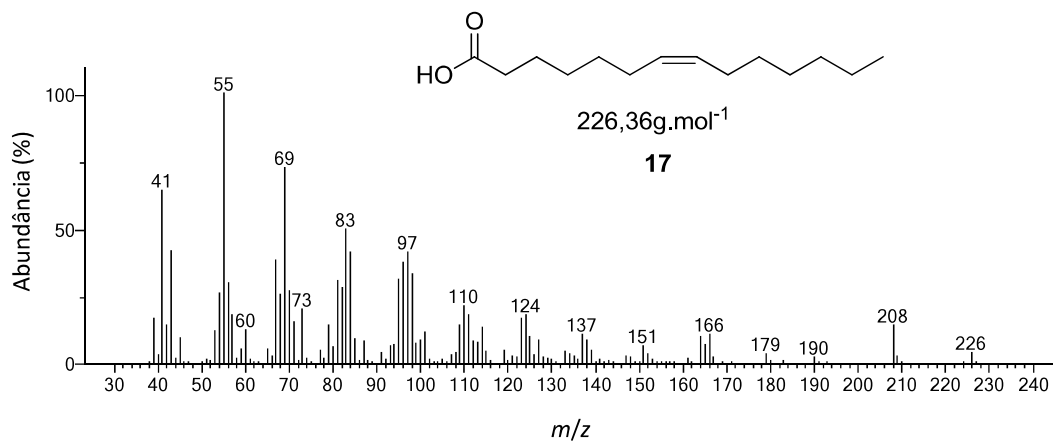
Cont. acetato de etila: 1,26 (t,3H, J=7,16Hz); 2,05 (s, 3H); 4,12 (q, 2H, J=7,16Hz).

### ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DO COMPOSTO 17

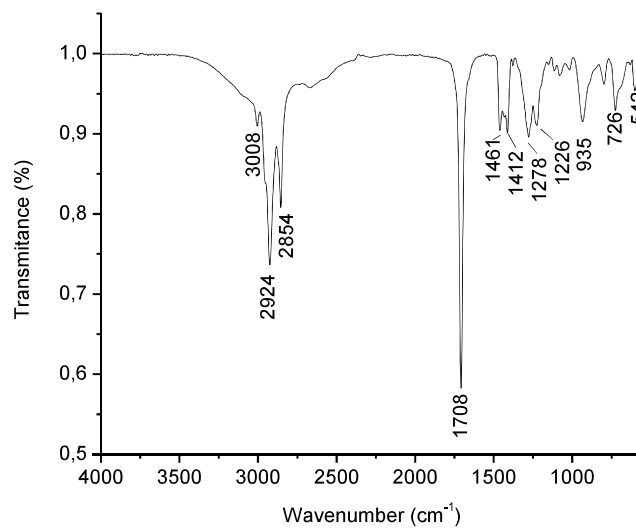


Cont. acetato de etila: 14,10; 21,03; 61,41; 171,22).

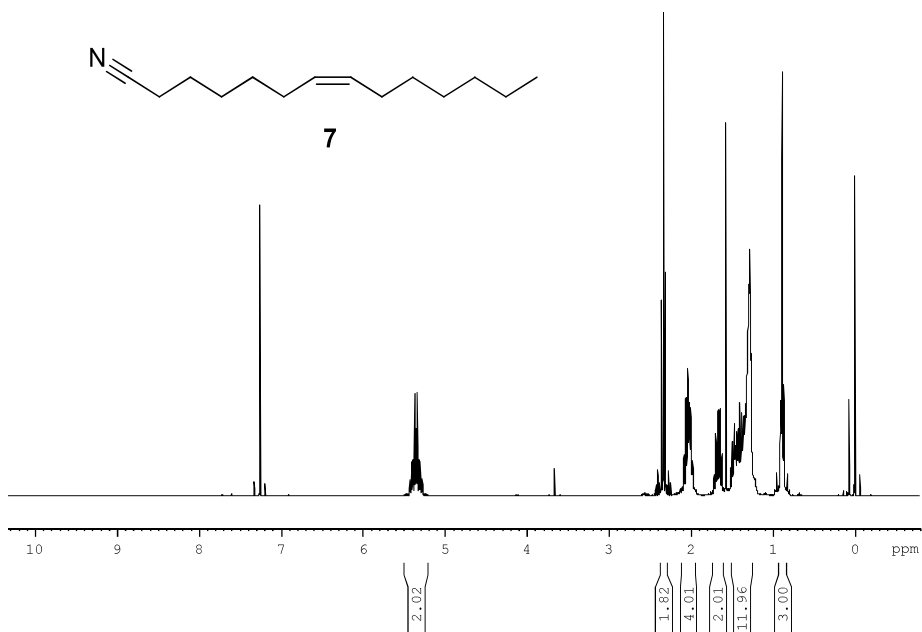
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 17



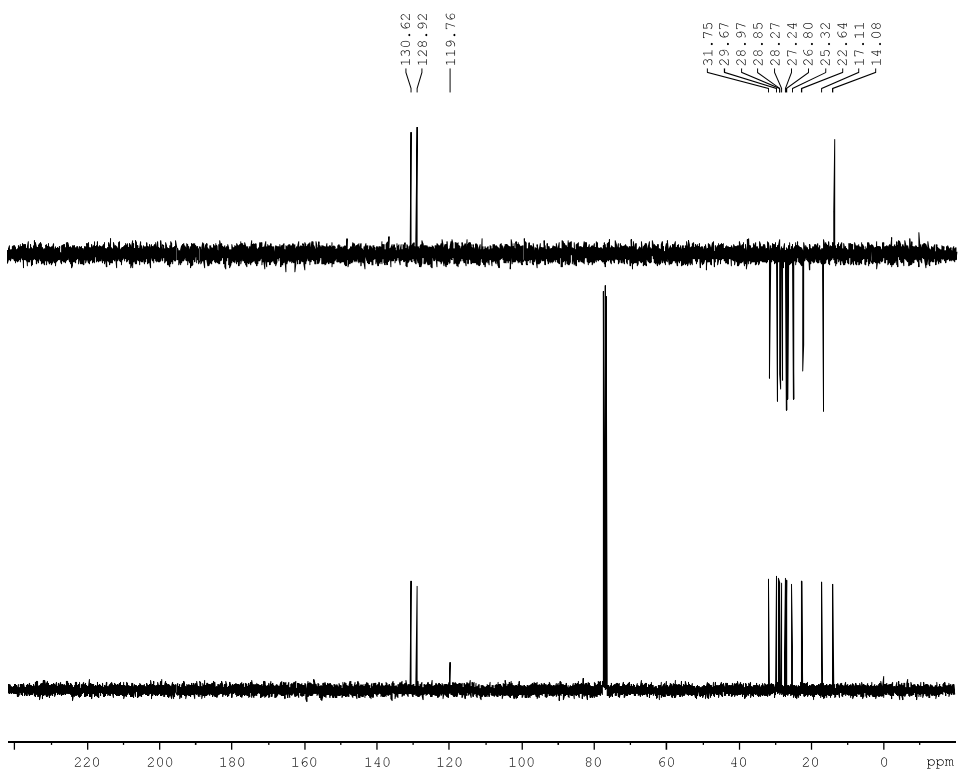
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 17



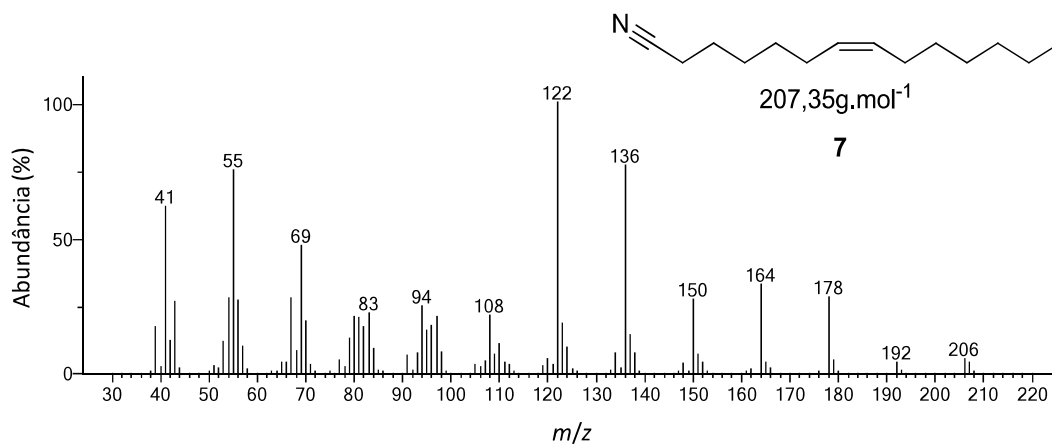
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 7



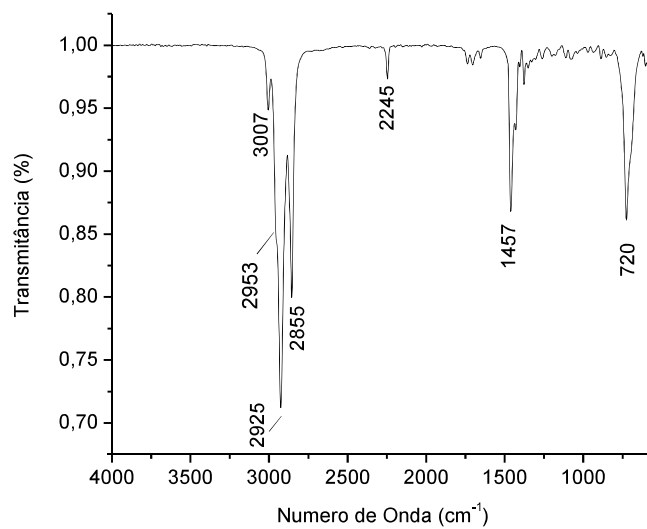
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 7



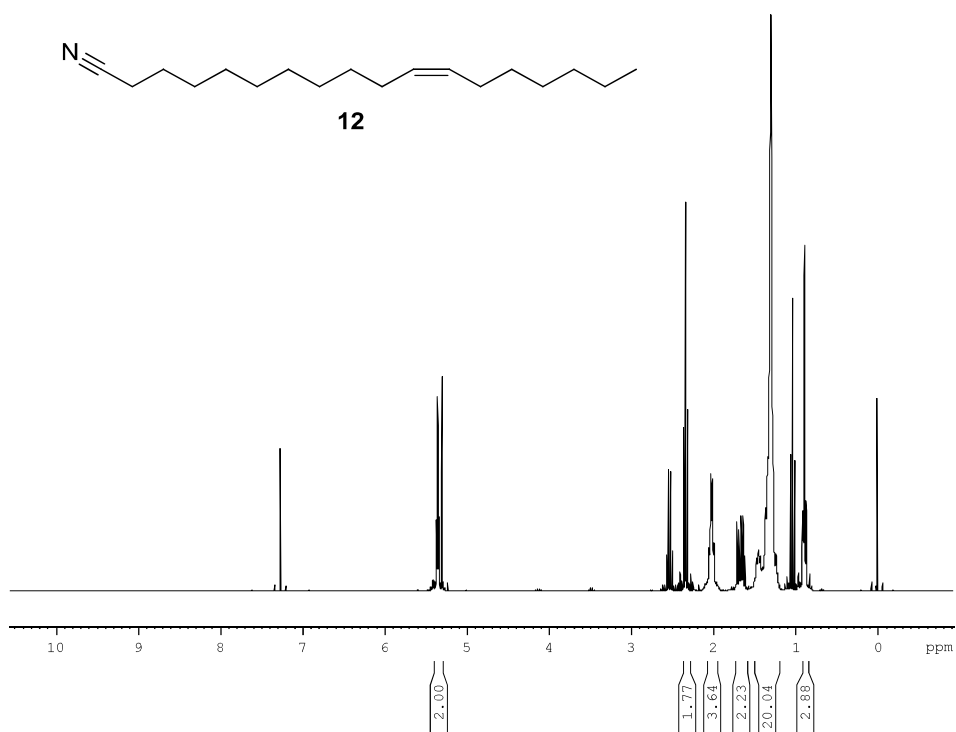
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 7



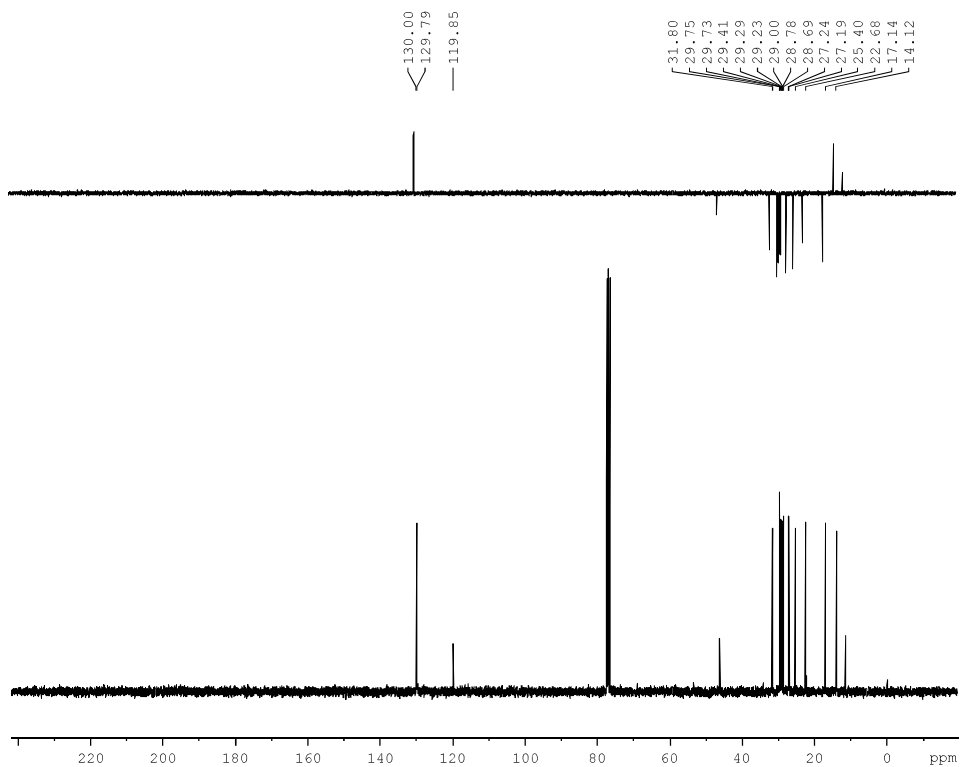
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 7



**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 12**

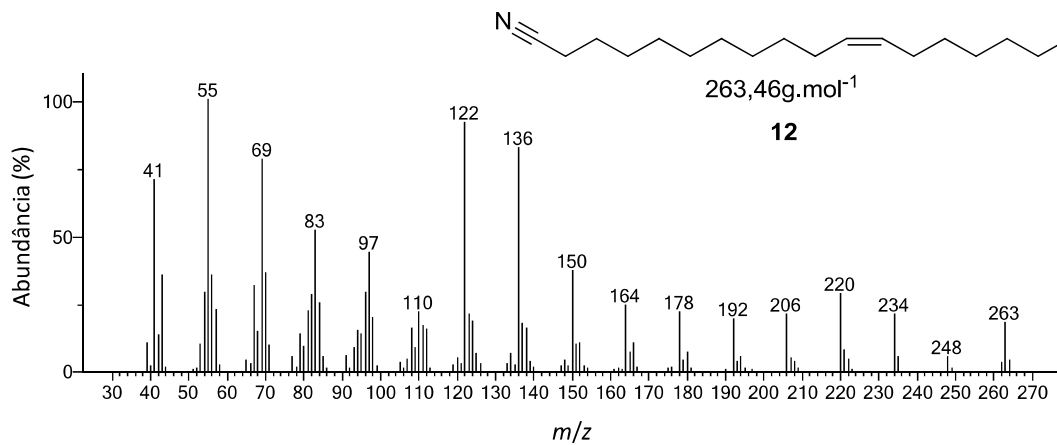


**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 12**

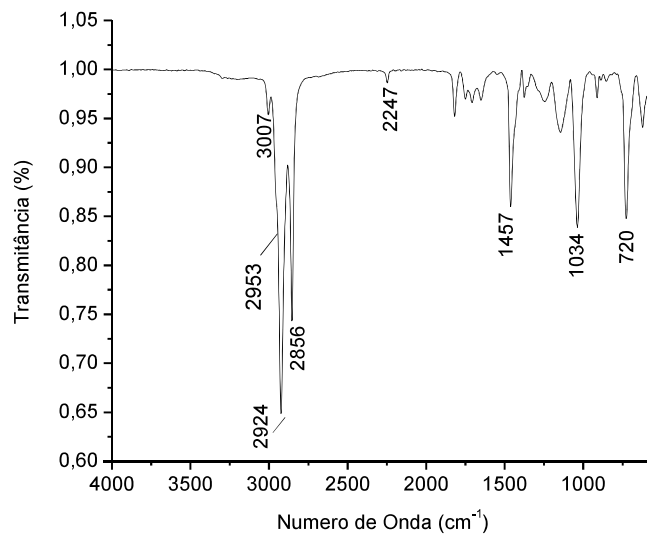




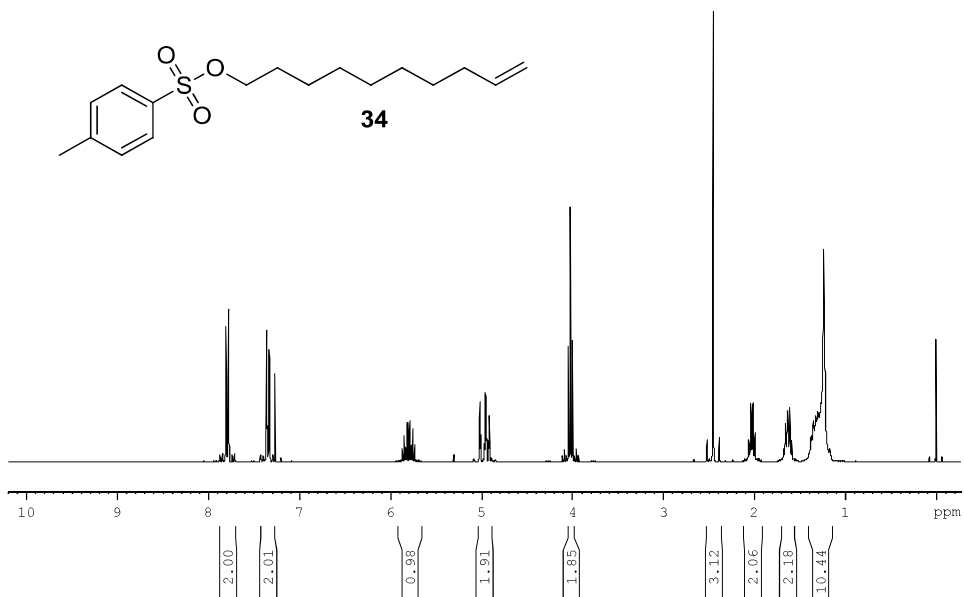
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 12



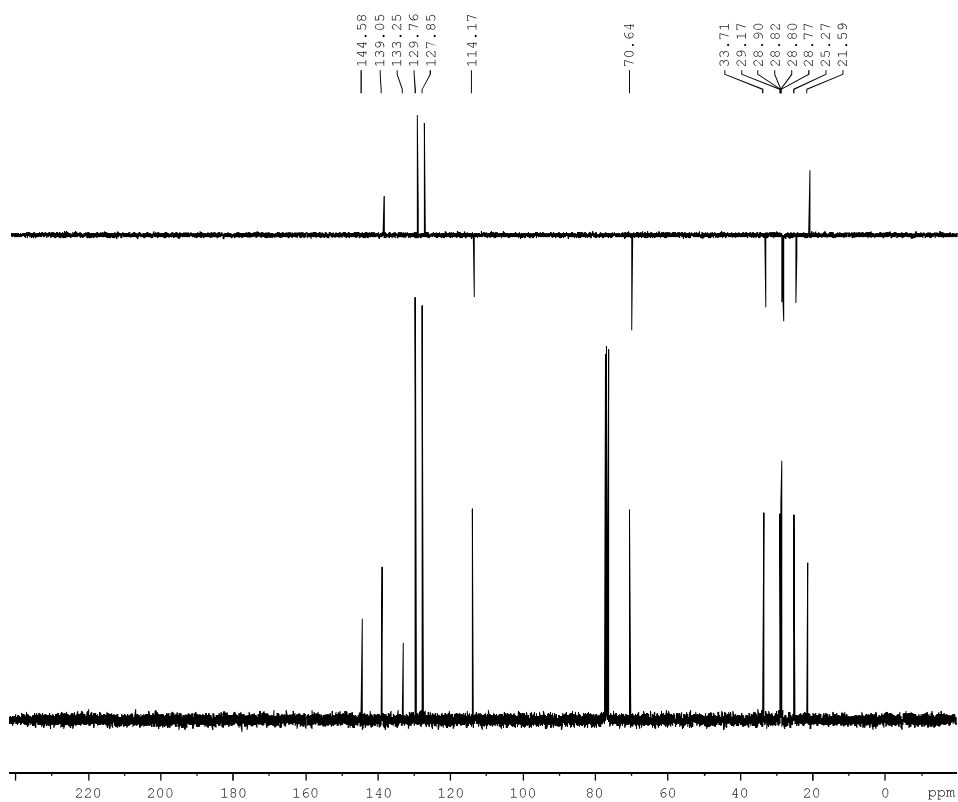
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 12



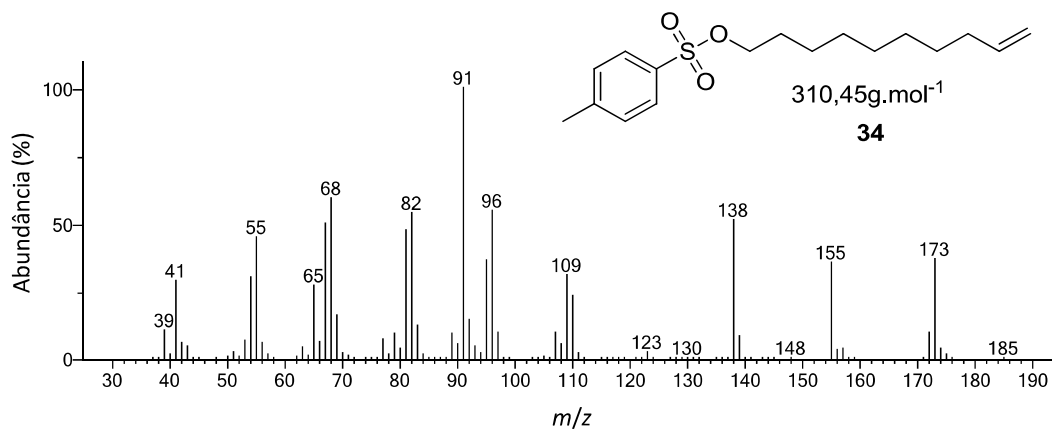
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 34**



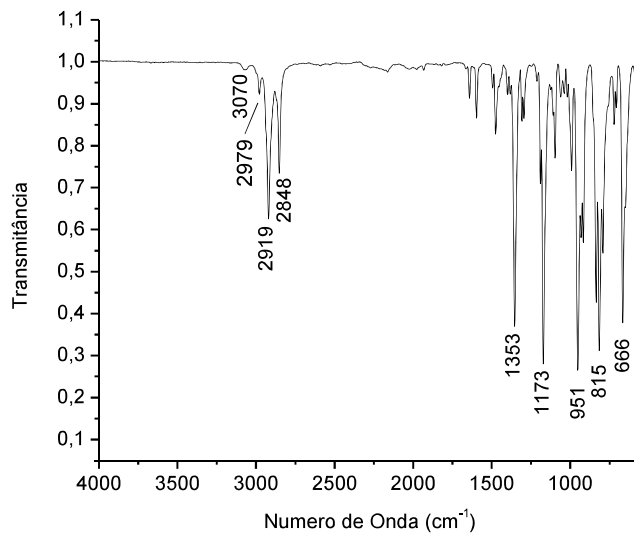
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 34**



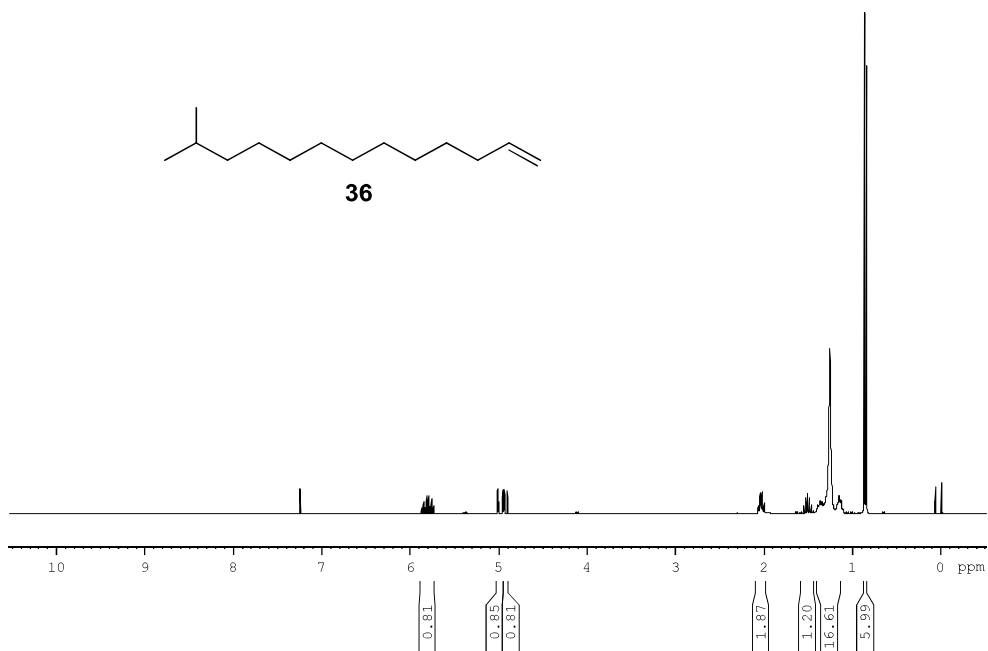
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 34



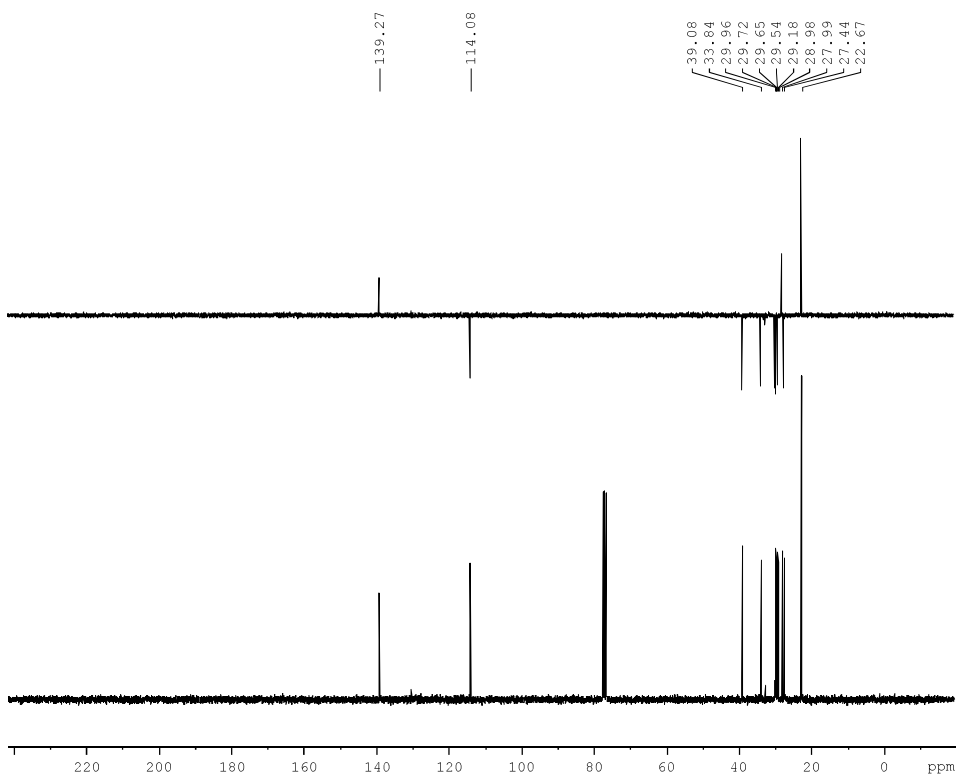
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 34



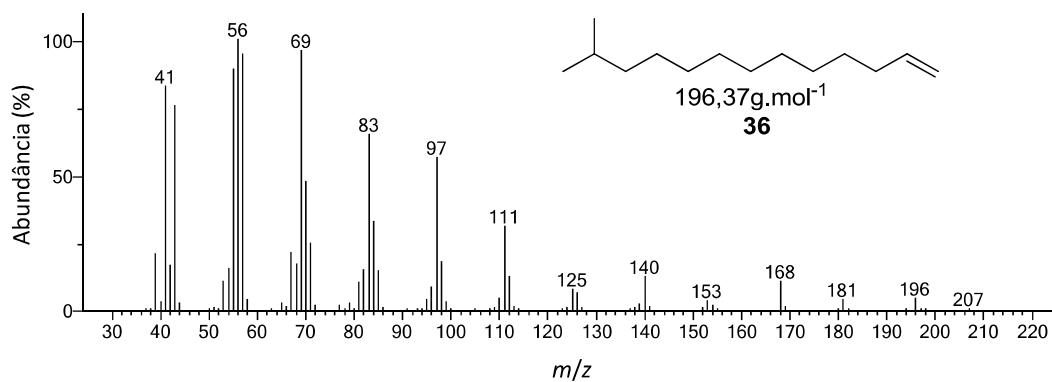
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 36



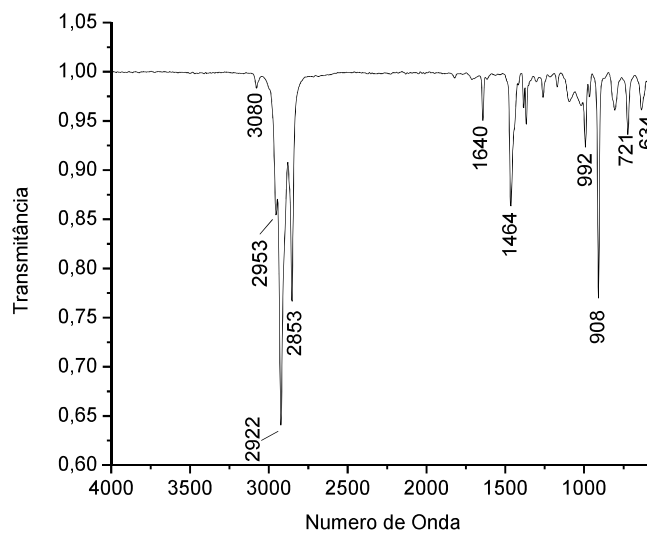
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 36



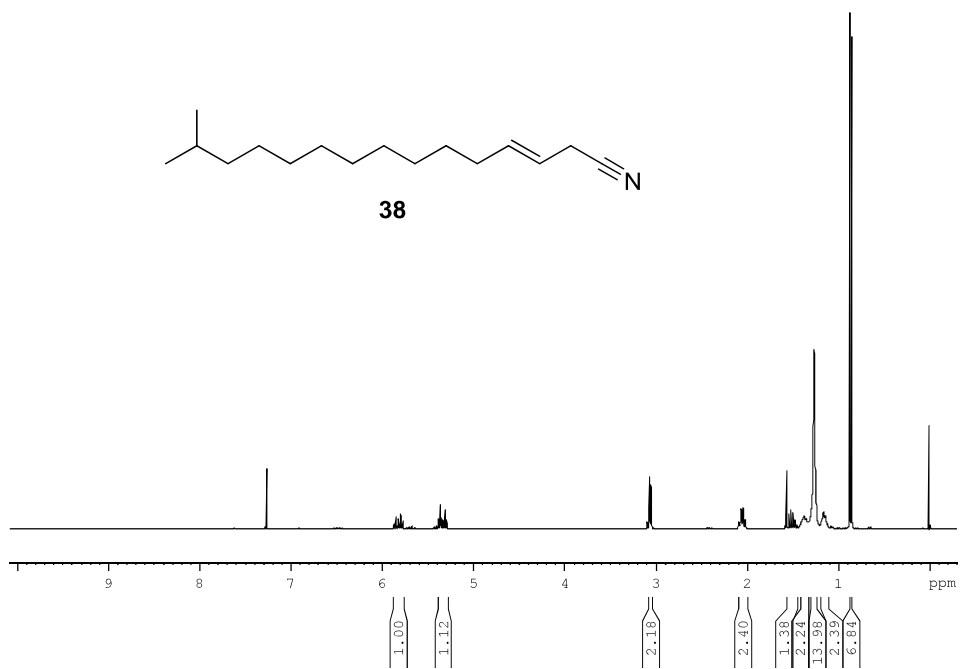
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 36



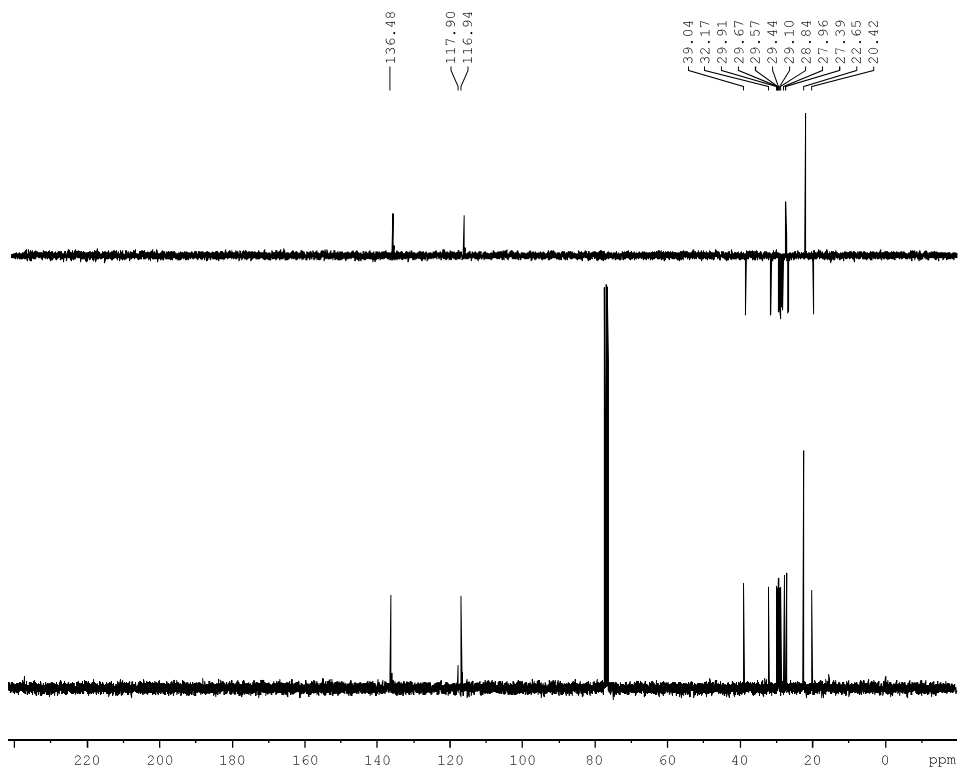
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 36



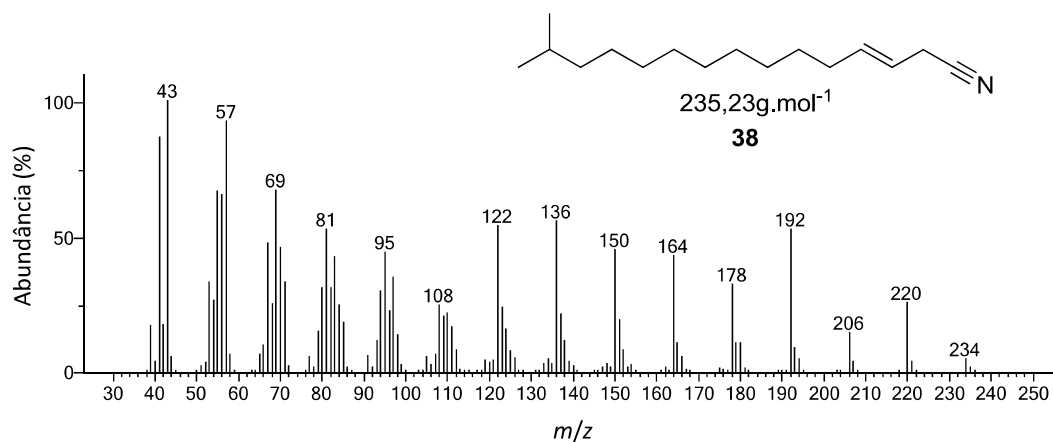
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 38



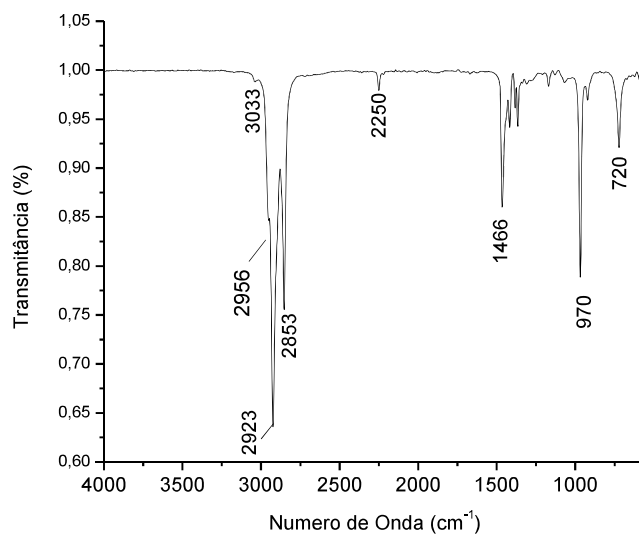
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 38



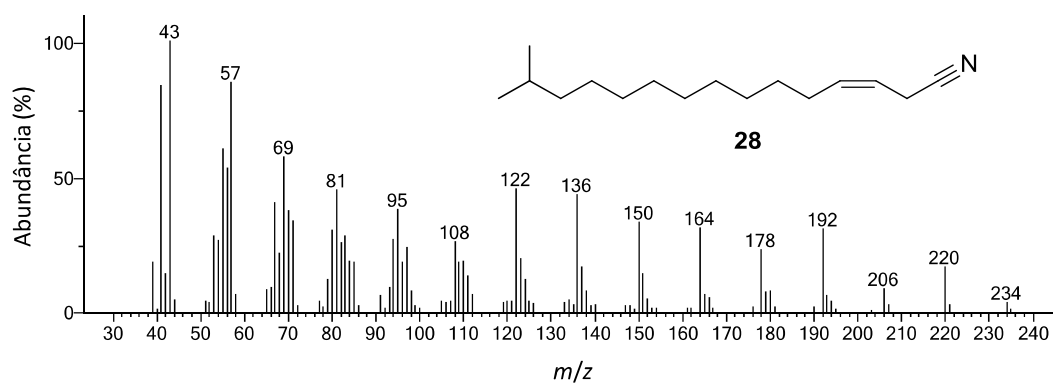
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 38



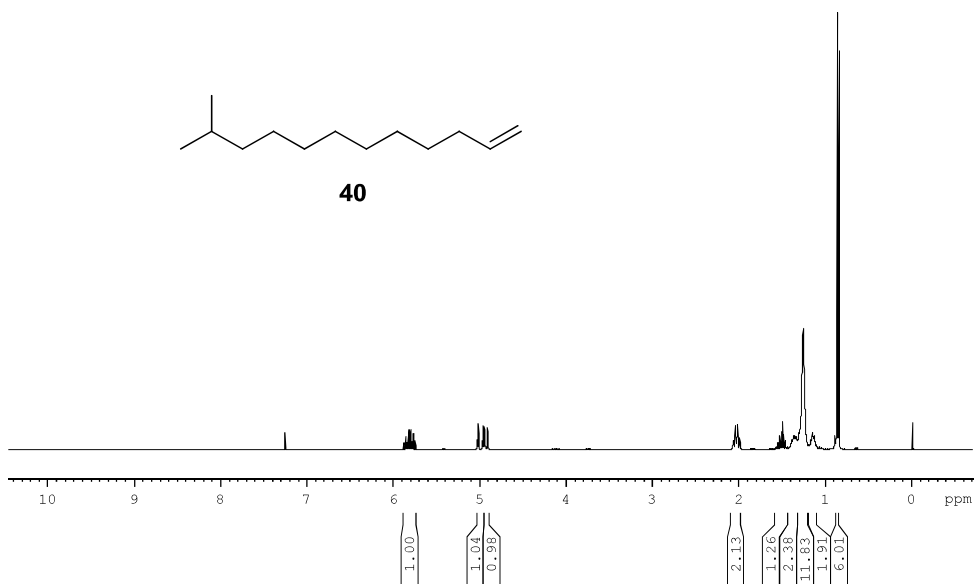
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 38



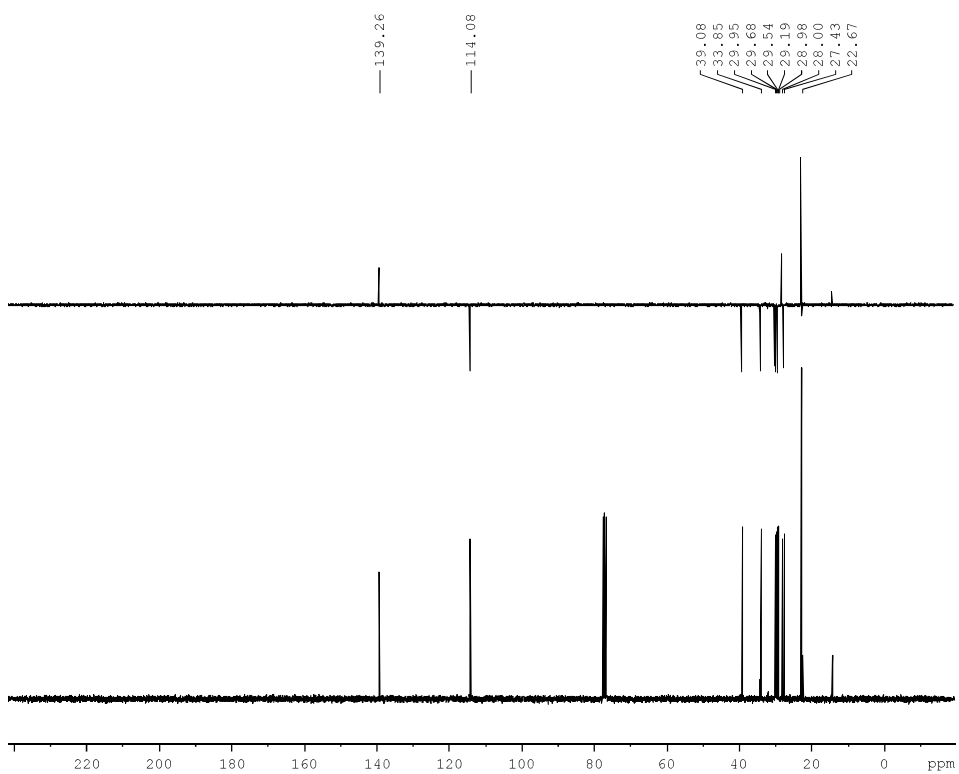
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 28



### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 40



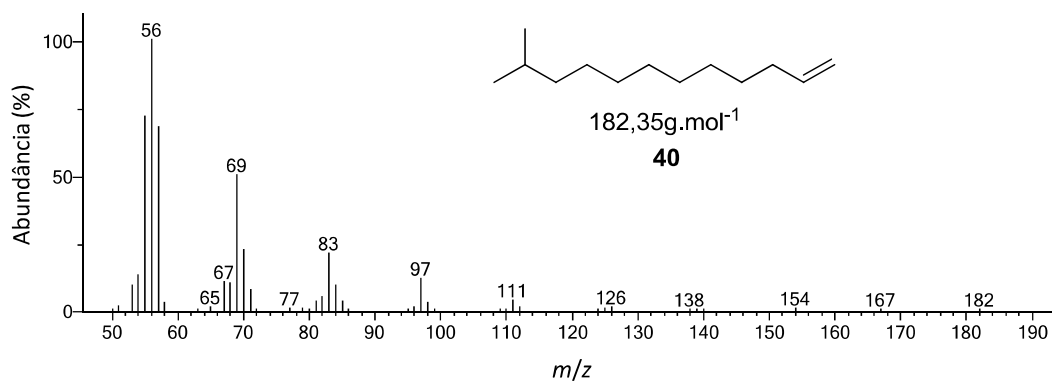
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 40



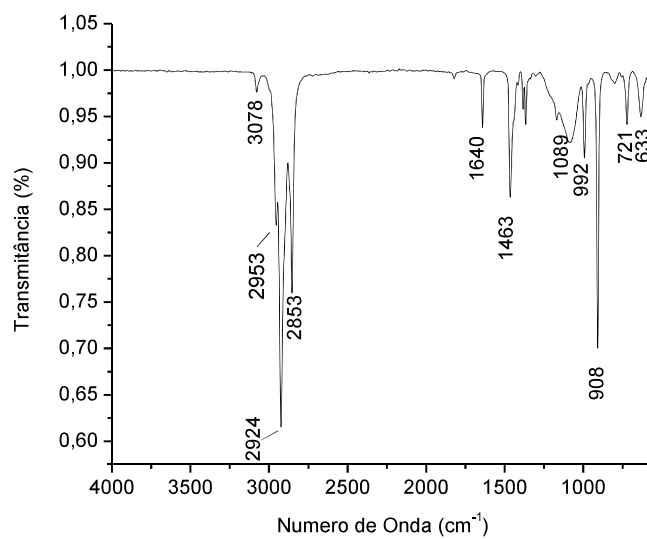
Cont. pentano: 14,1; 22,4; 32,0.



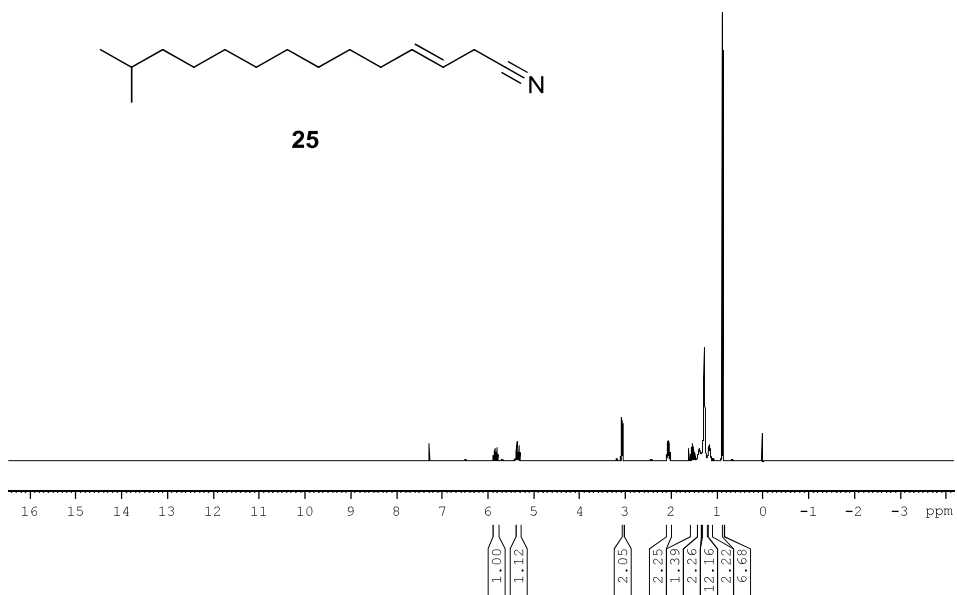
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 40



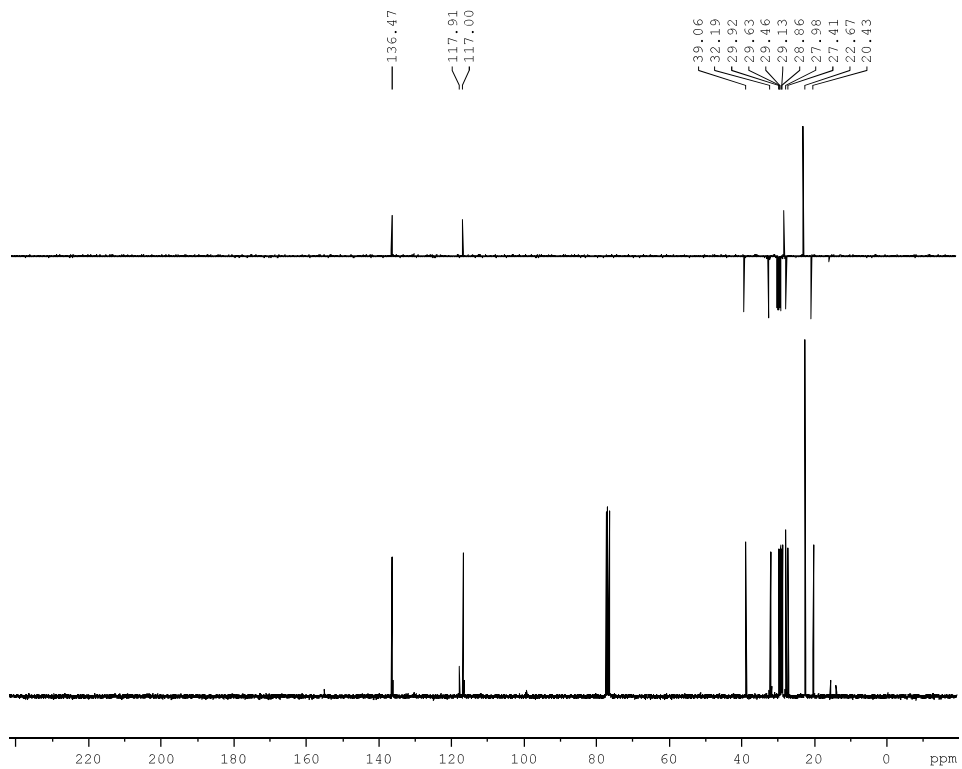
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 40



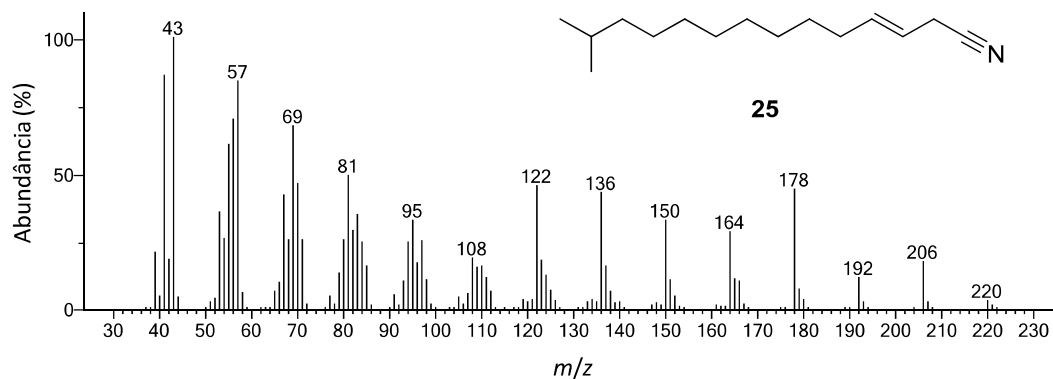
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 25**



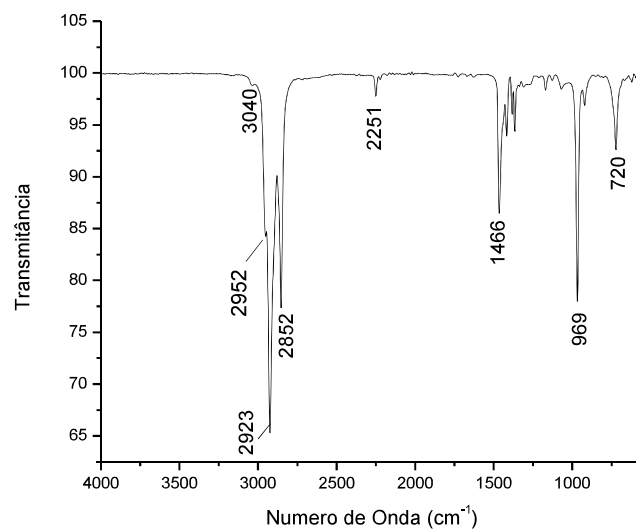
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 25**



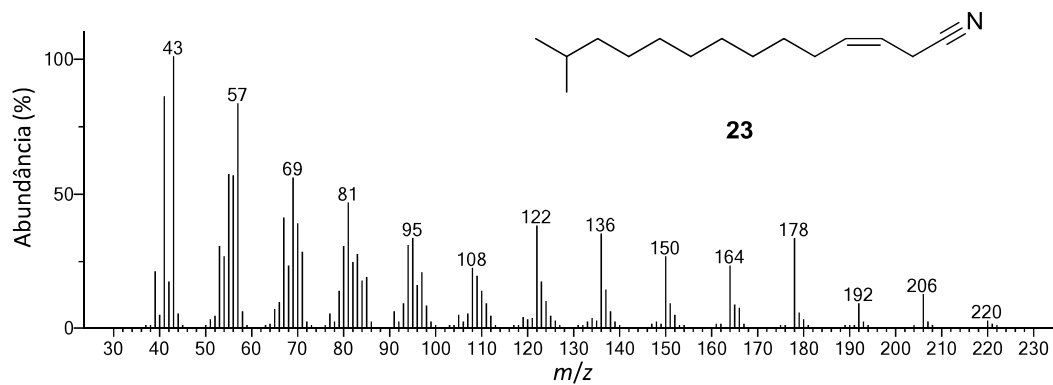
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 25



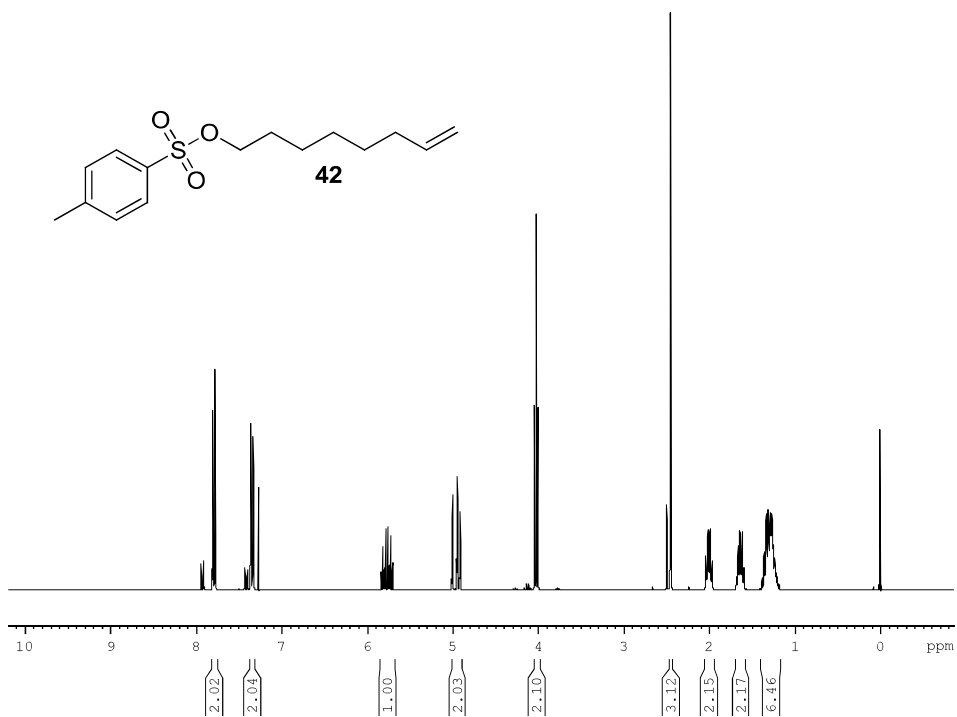
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 25



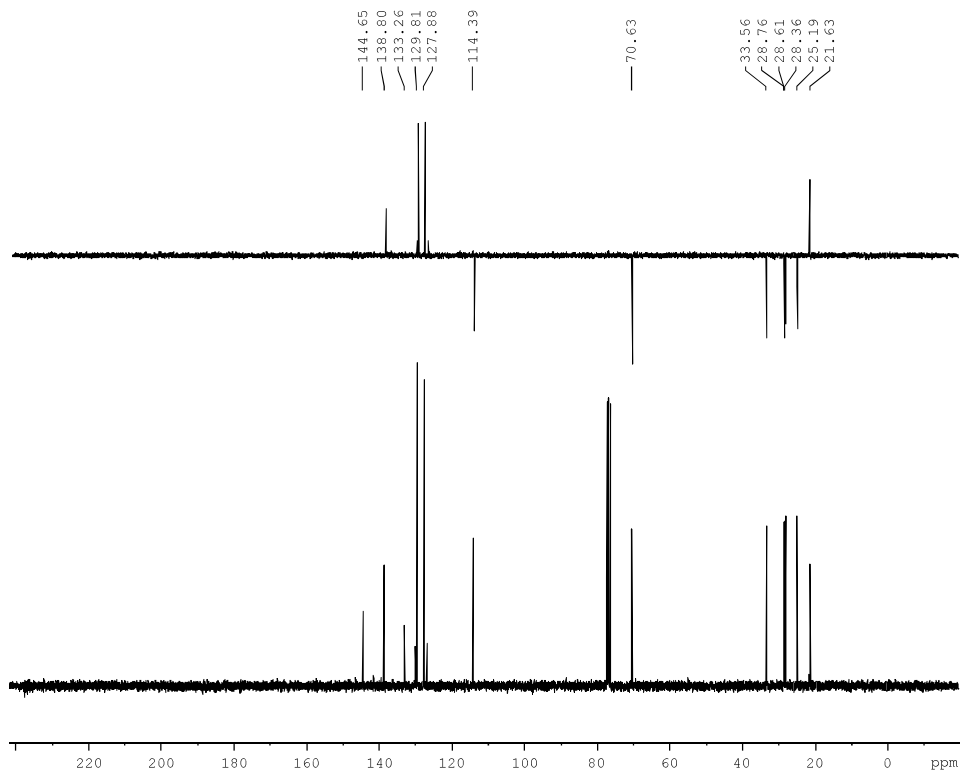
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 23



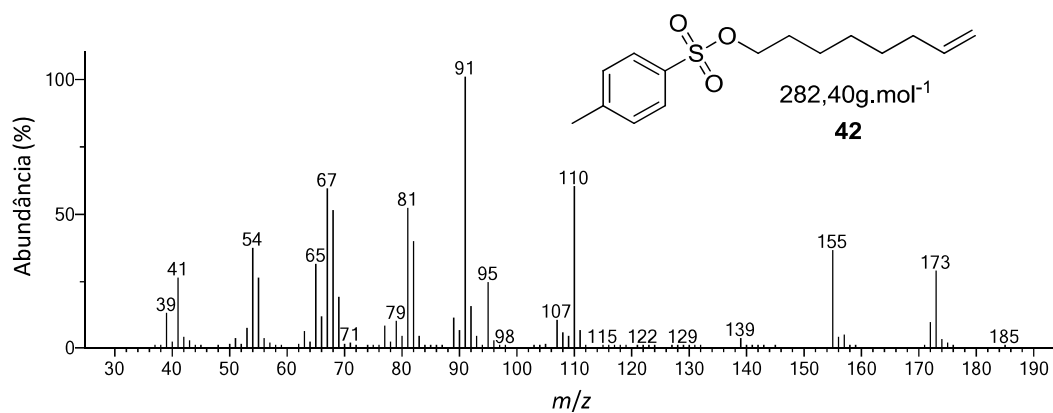
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 42**



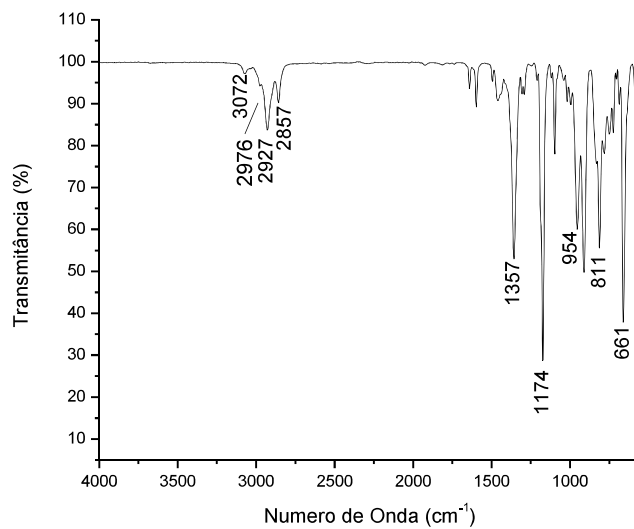
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 42**



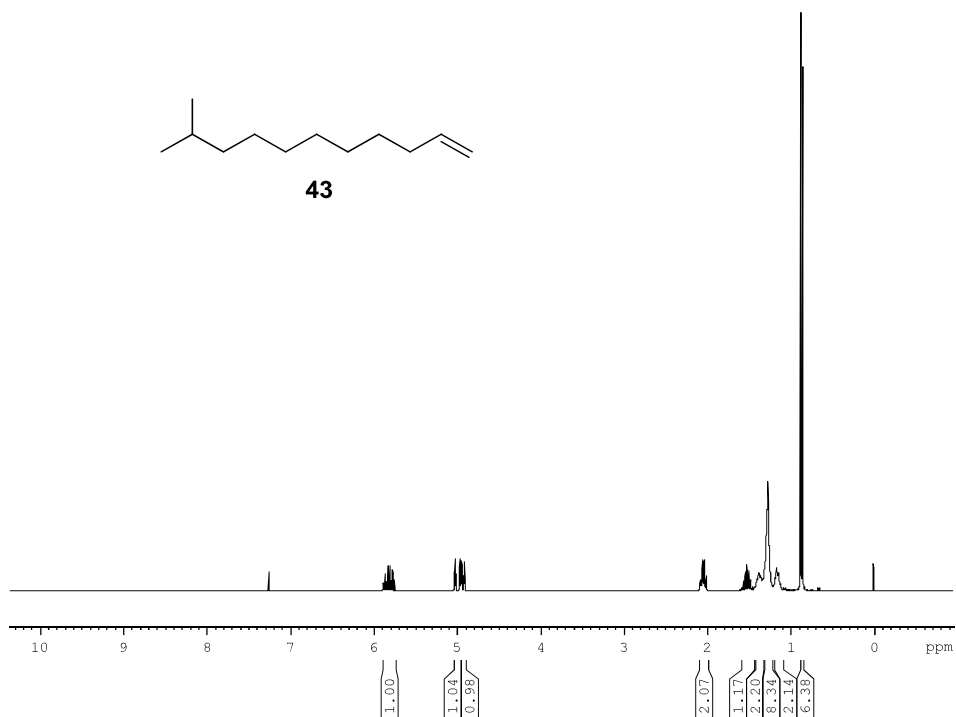
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 42



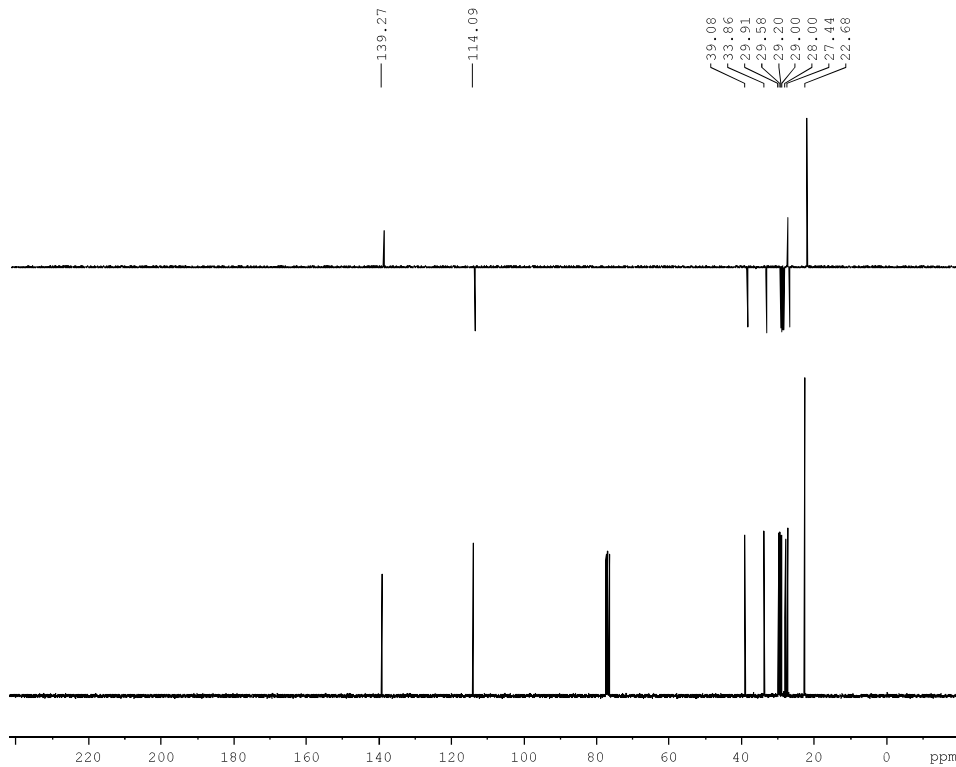
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 42



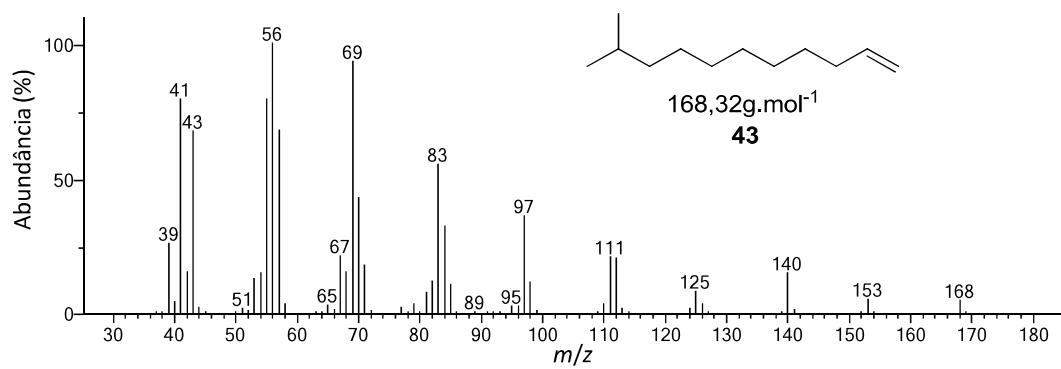
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 43**



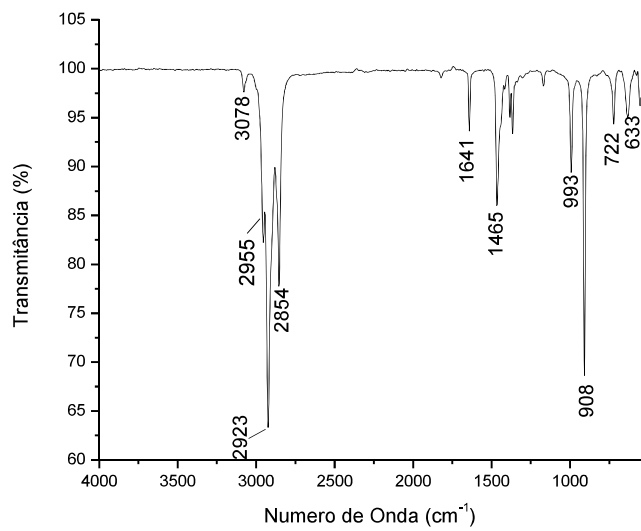
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 43**



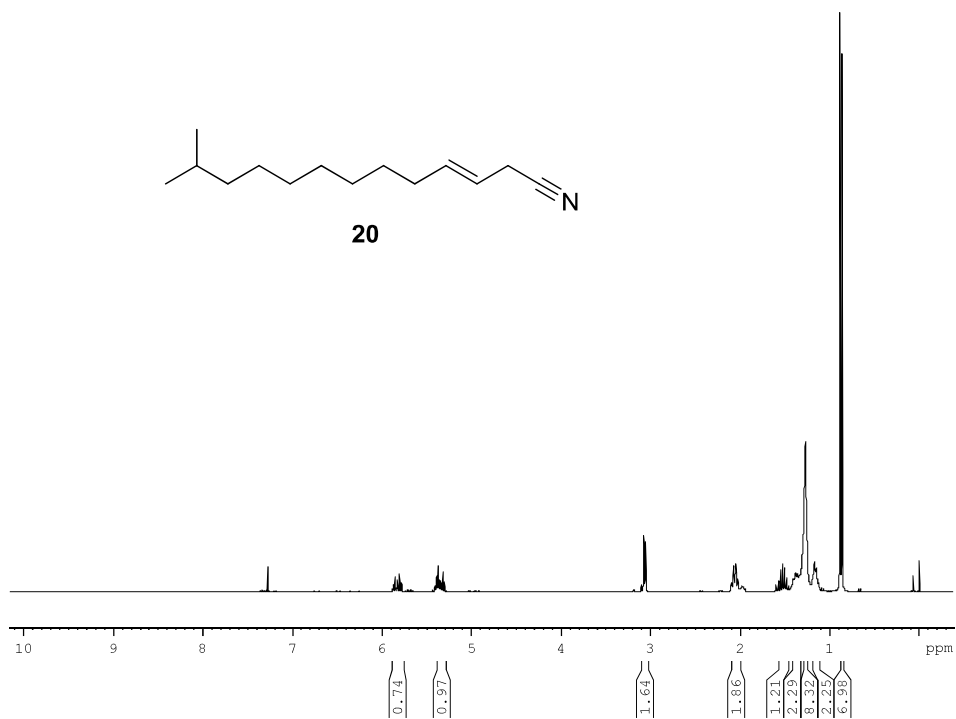
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 43



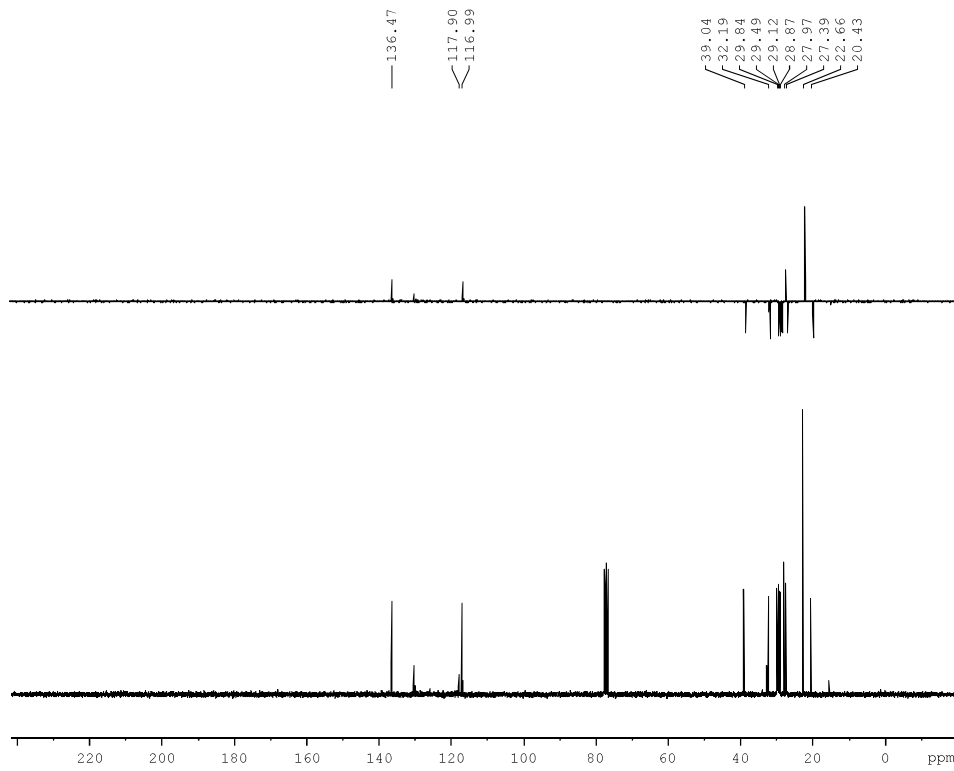
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 43



**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 20**

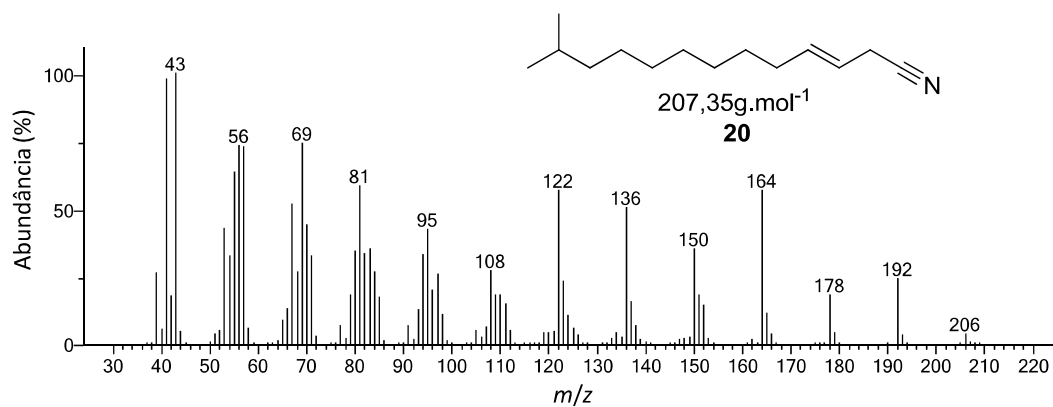


**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 20**

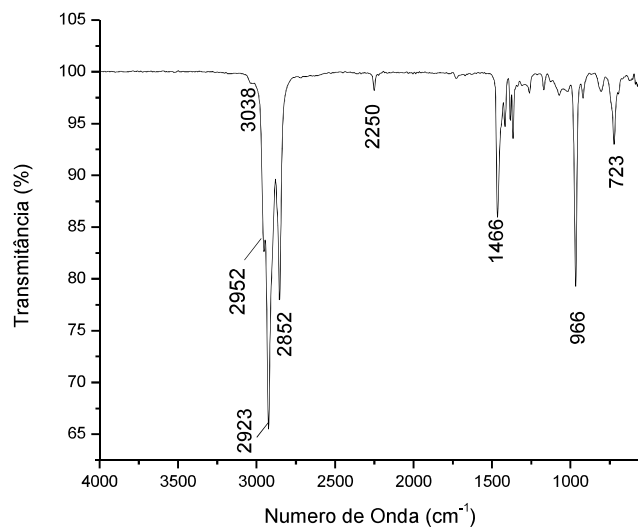




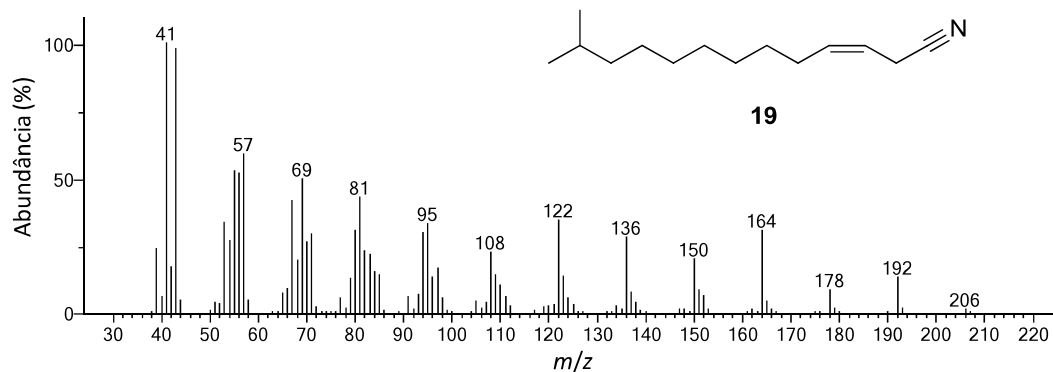
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 20



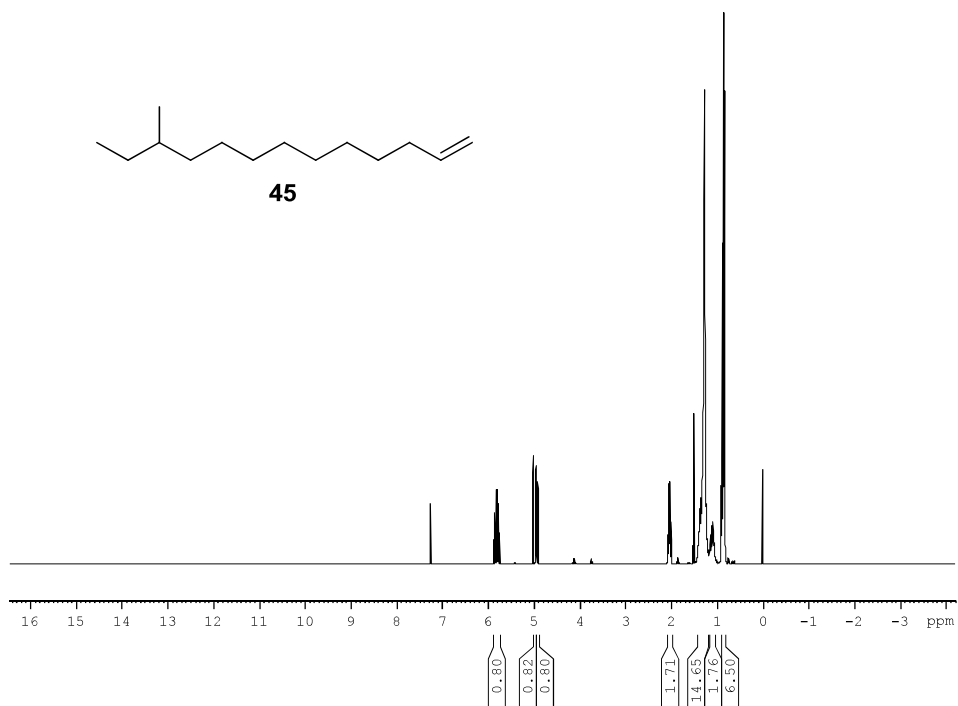
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 20



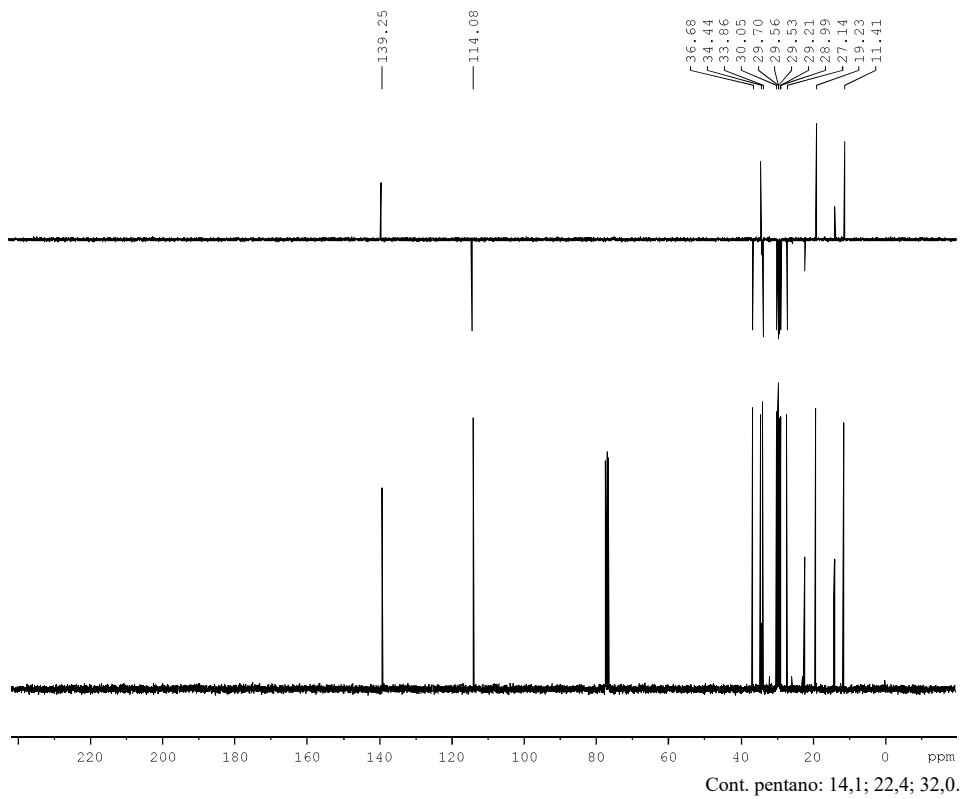
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 19



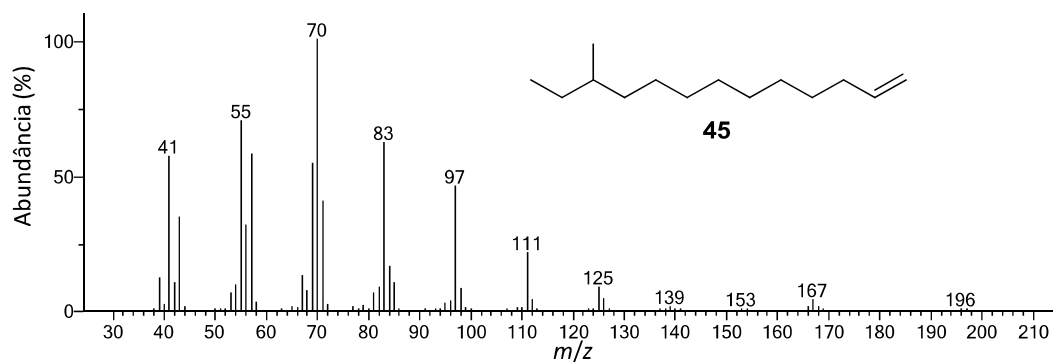
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 45



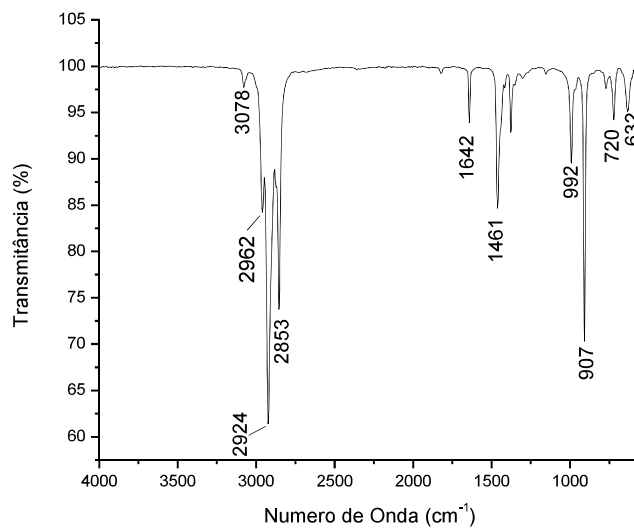
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 45



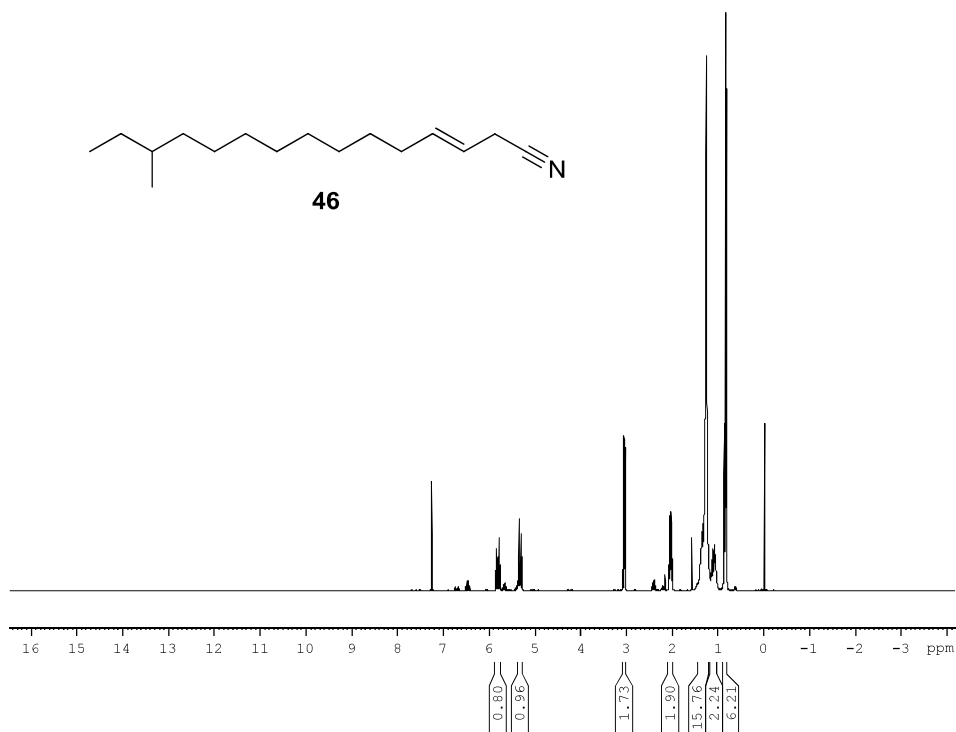
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 45



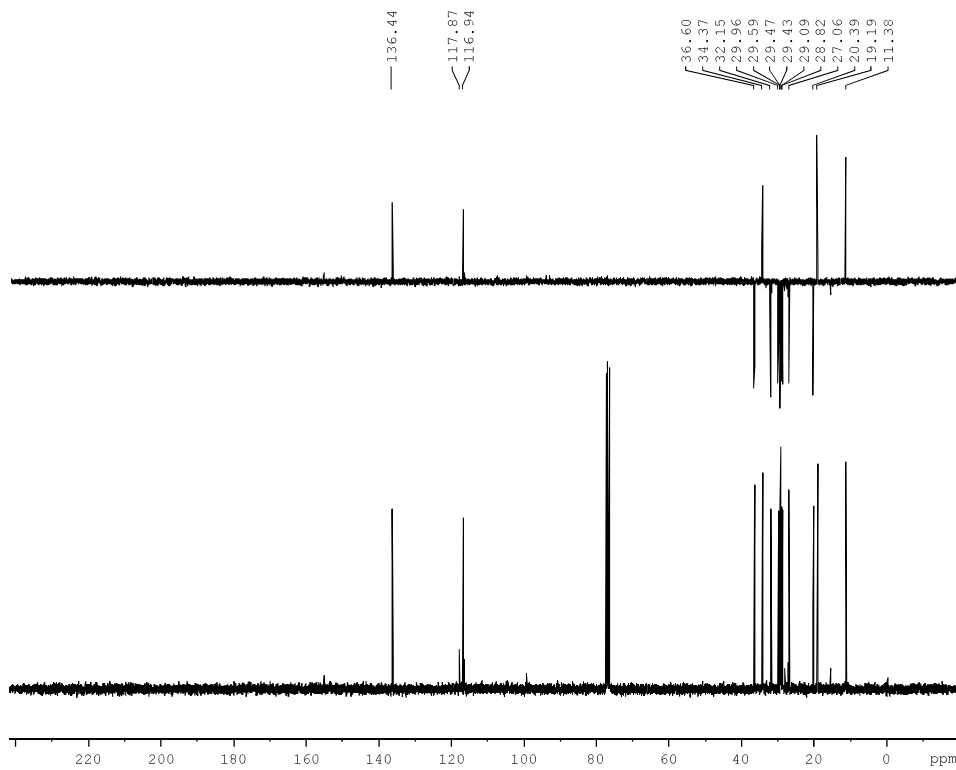
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 45



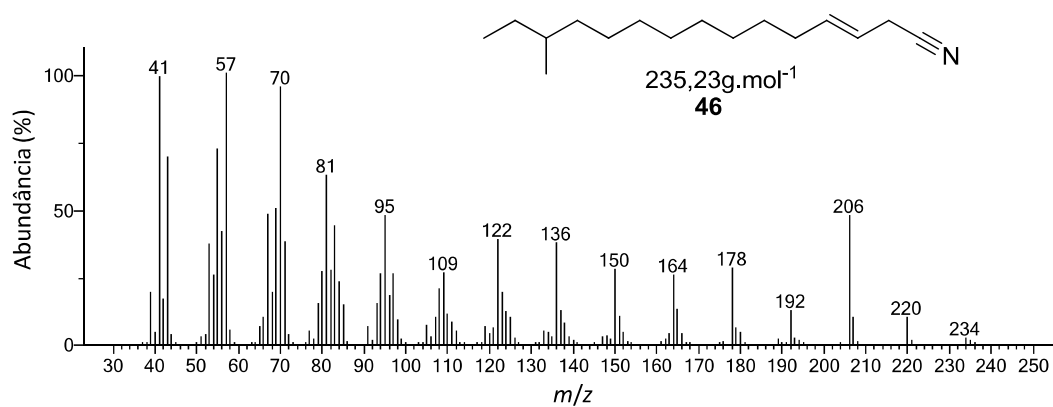
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 46



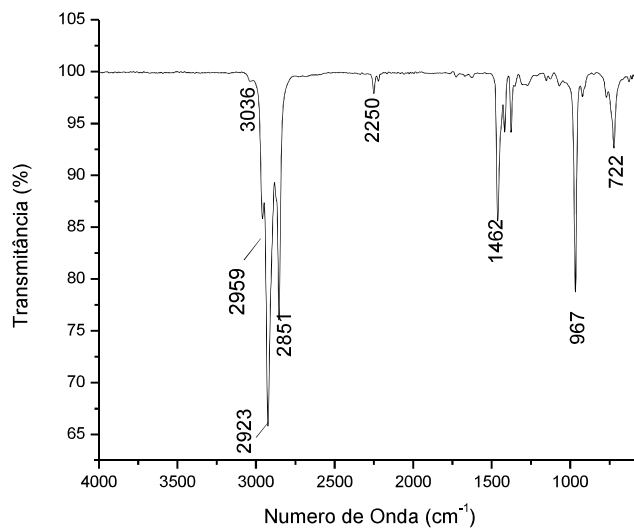
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 46



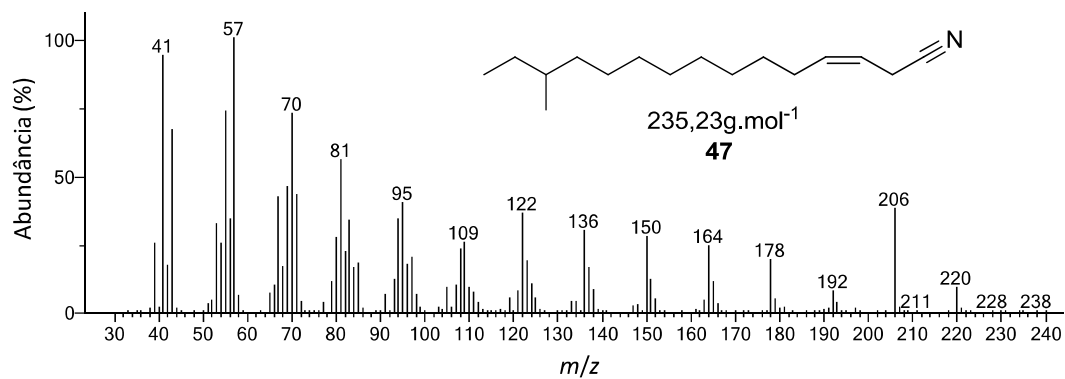
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 46



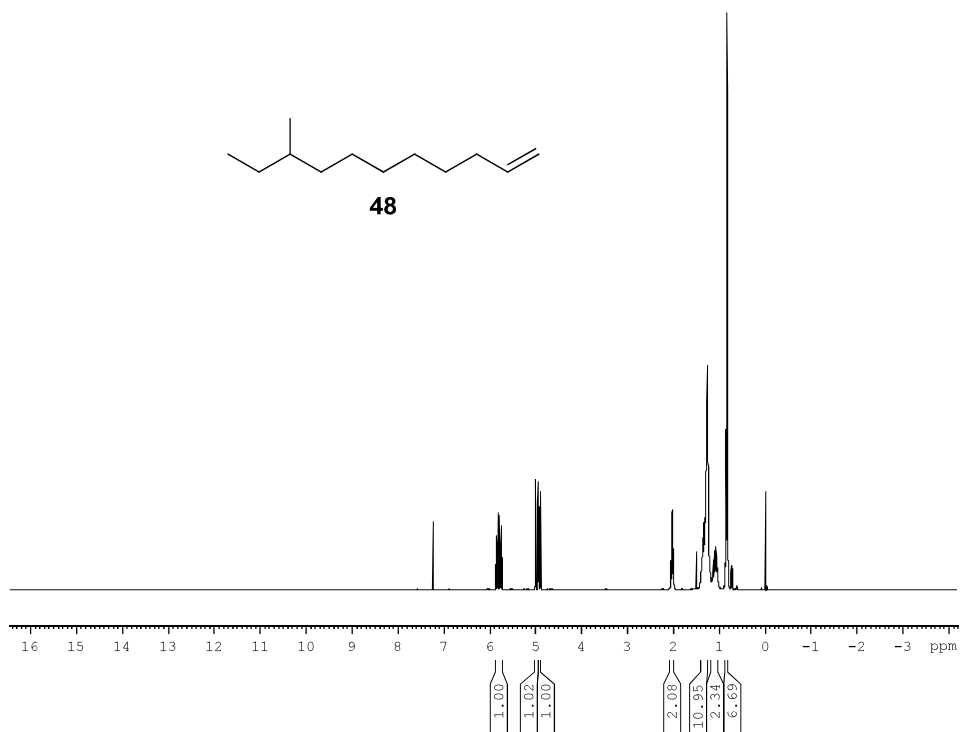
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 46



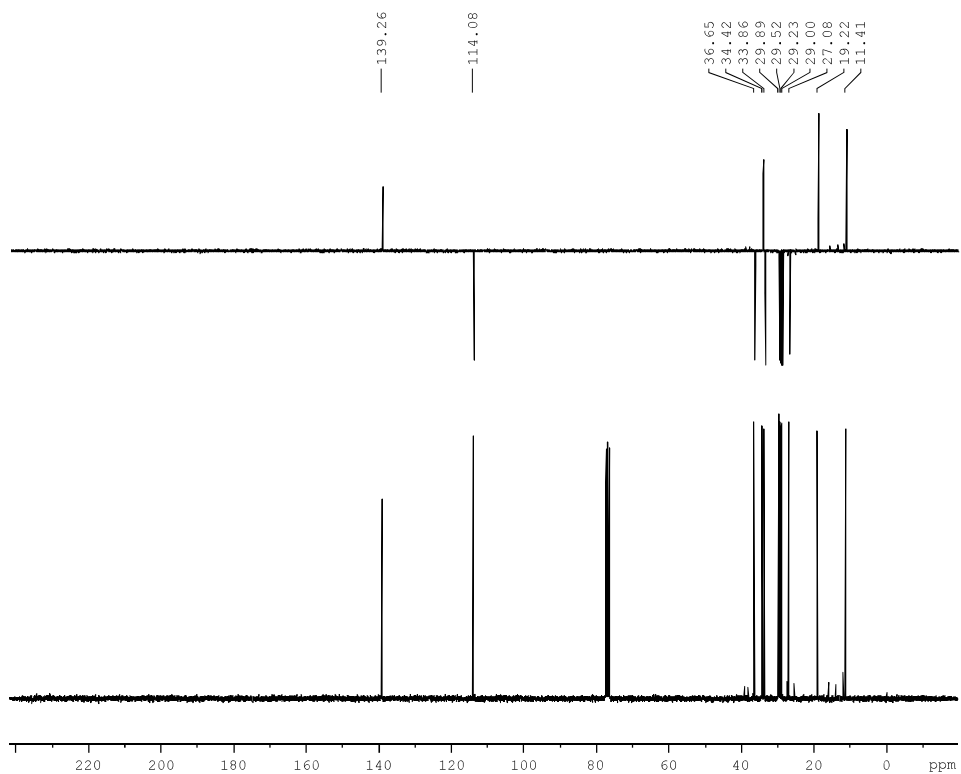
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 47



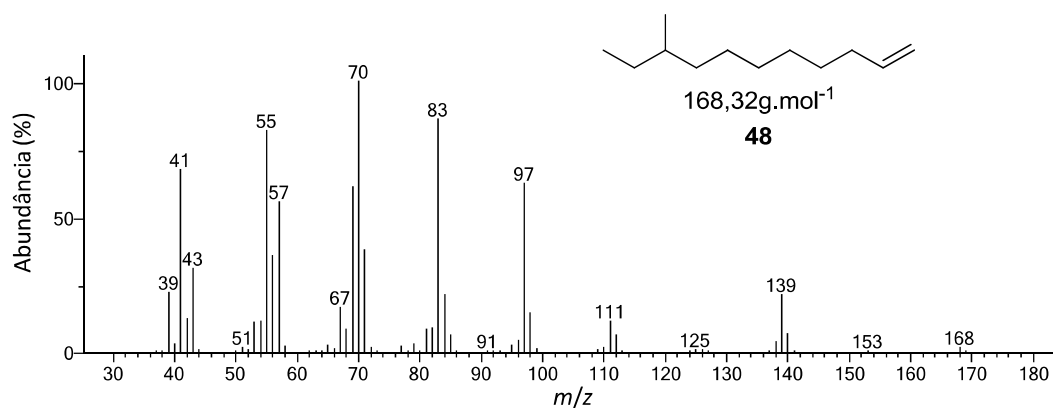
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 48**



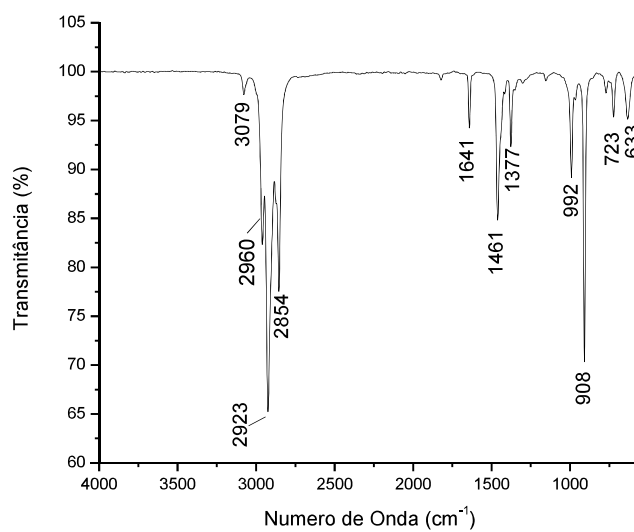
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 48**



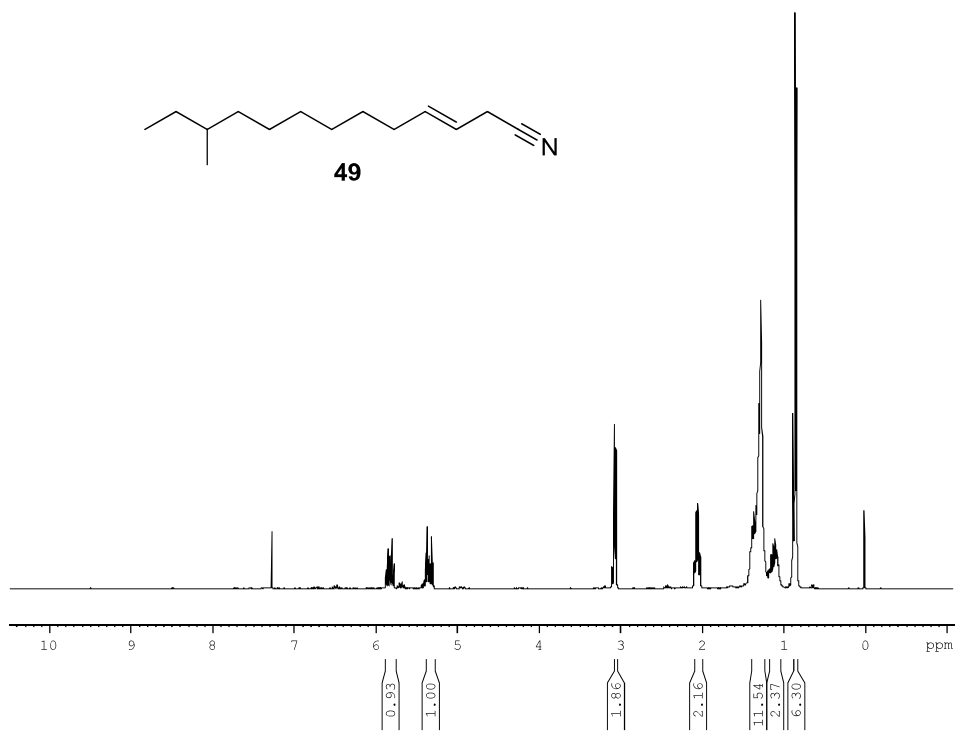
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 48



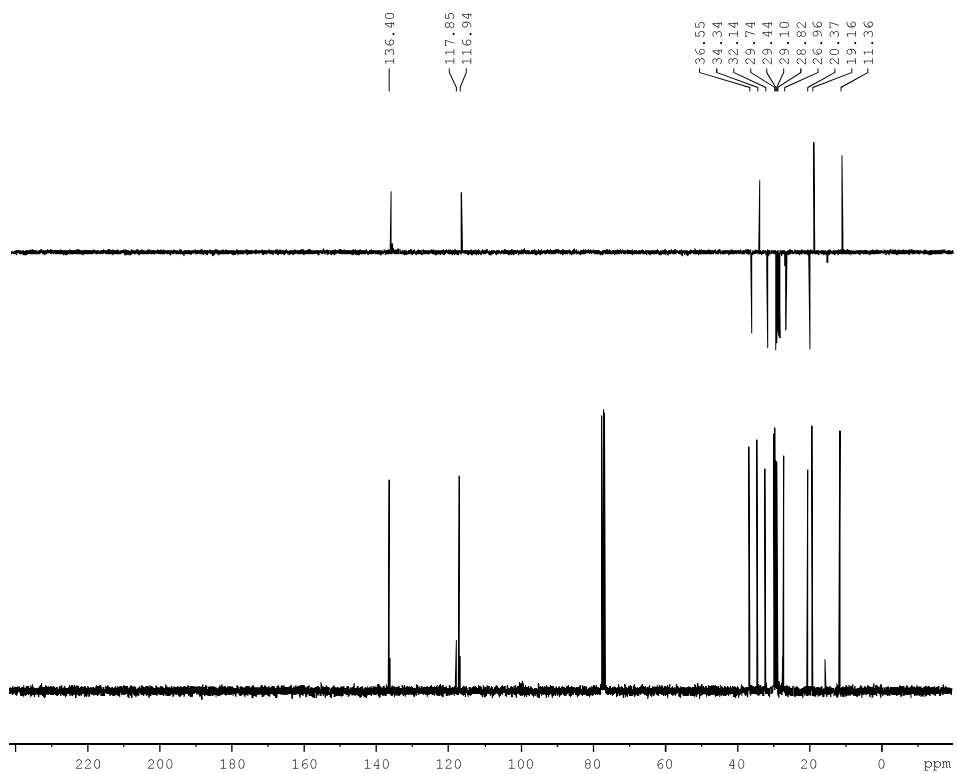
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 48



ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 49

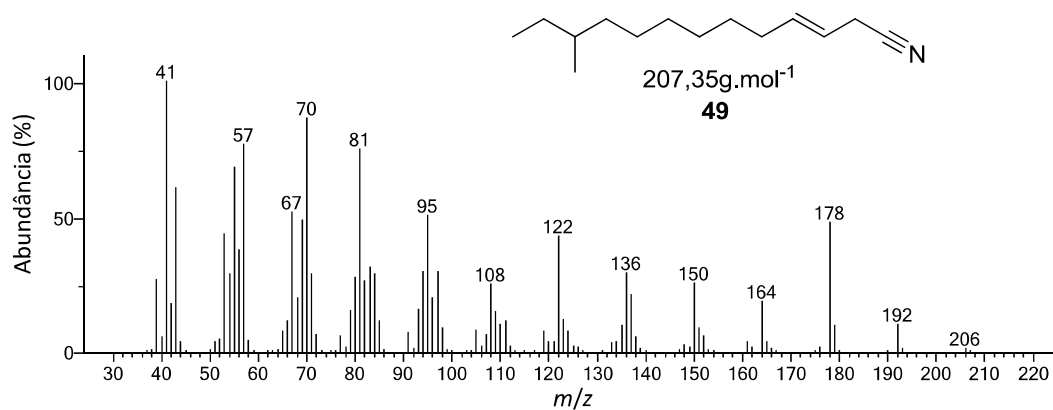


ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 49

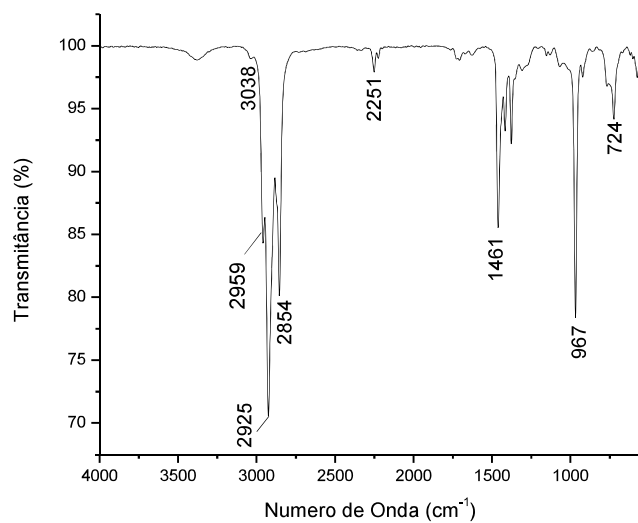




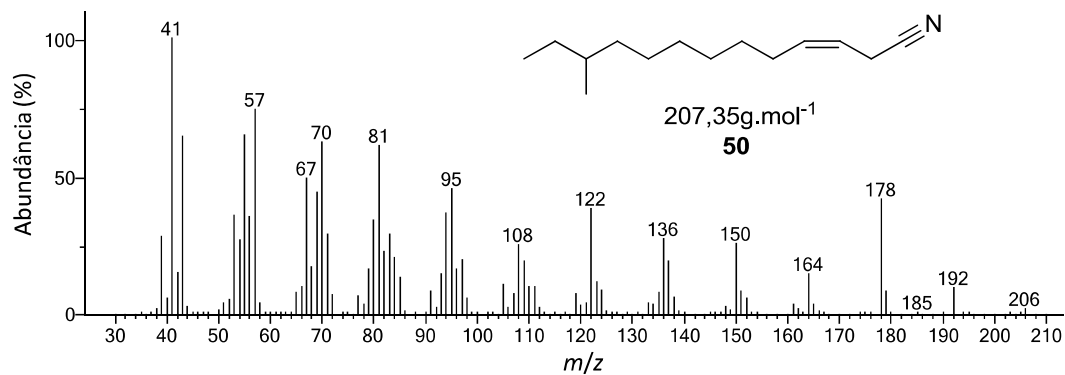
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 49



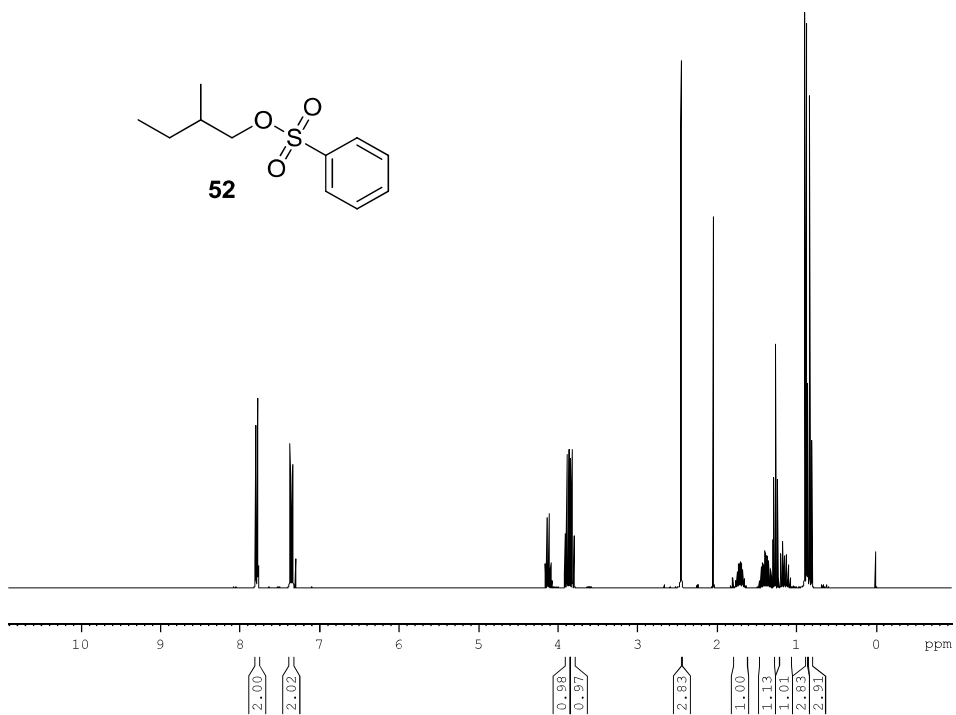
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 49



### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 50

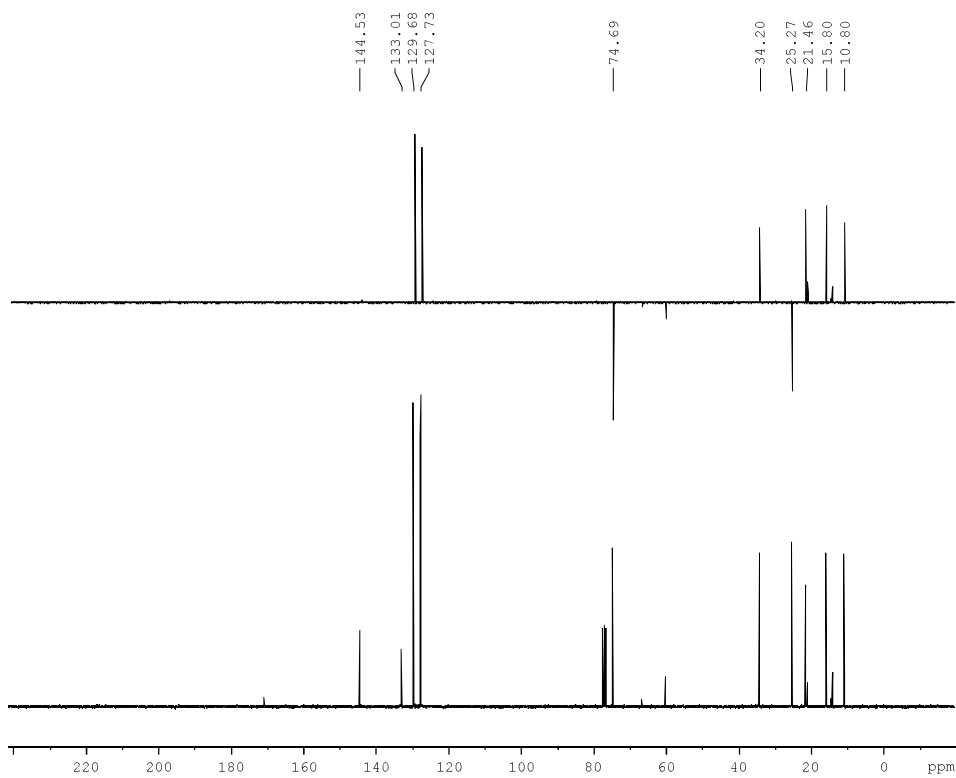


## ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 52



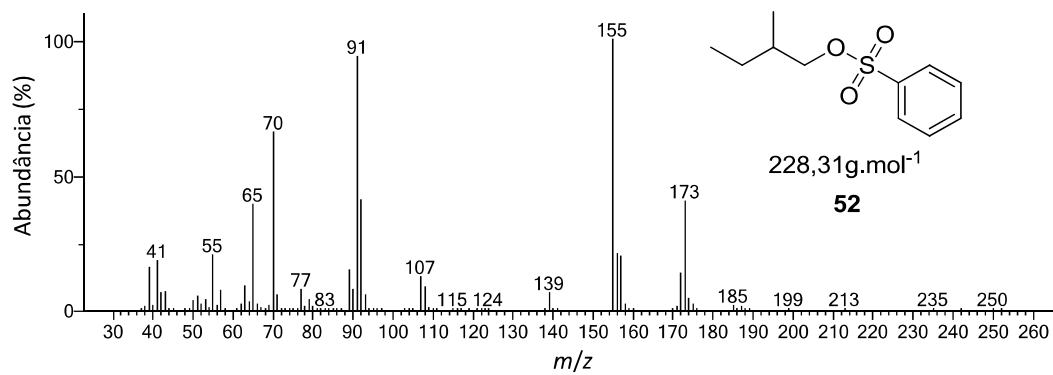
Cont. acetato de etila: 1,25 (t, 3H, 7,21Hz); 2,04 (s, 1H); 4,12 (q, 2H, 7,21Hz).

## ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 52

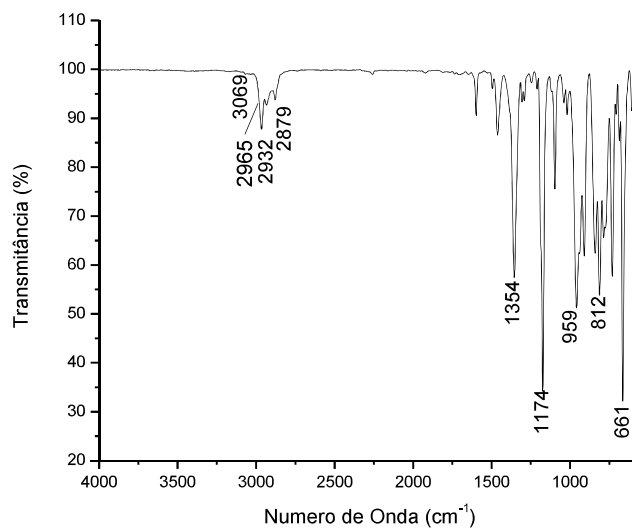


Cont. acetato de etila: 14,05; 20,88; 60,10; 171,00.

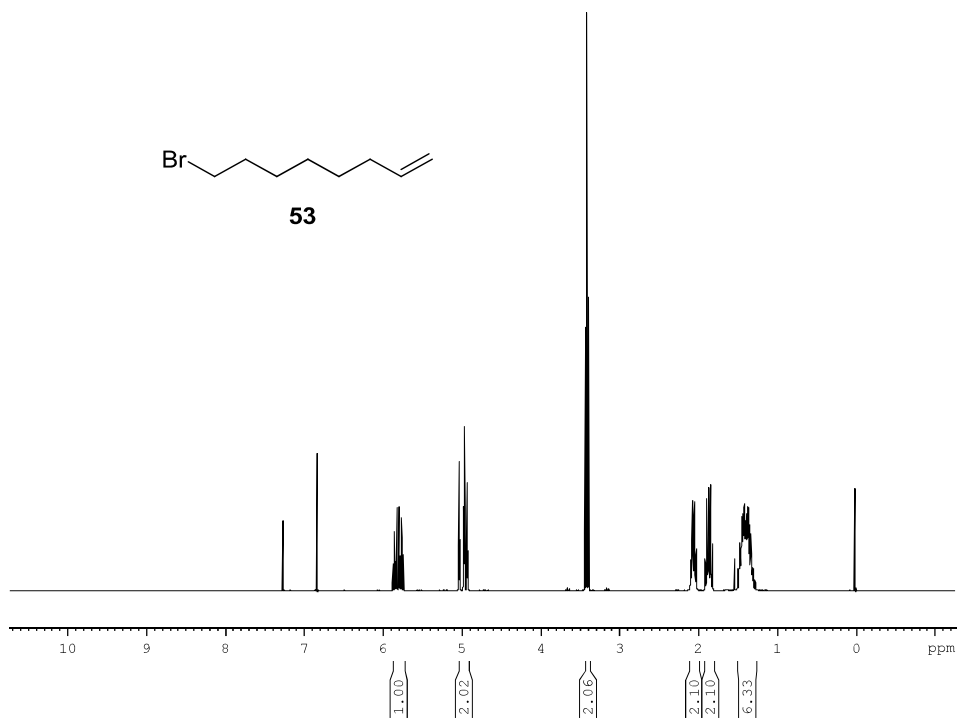
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 52



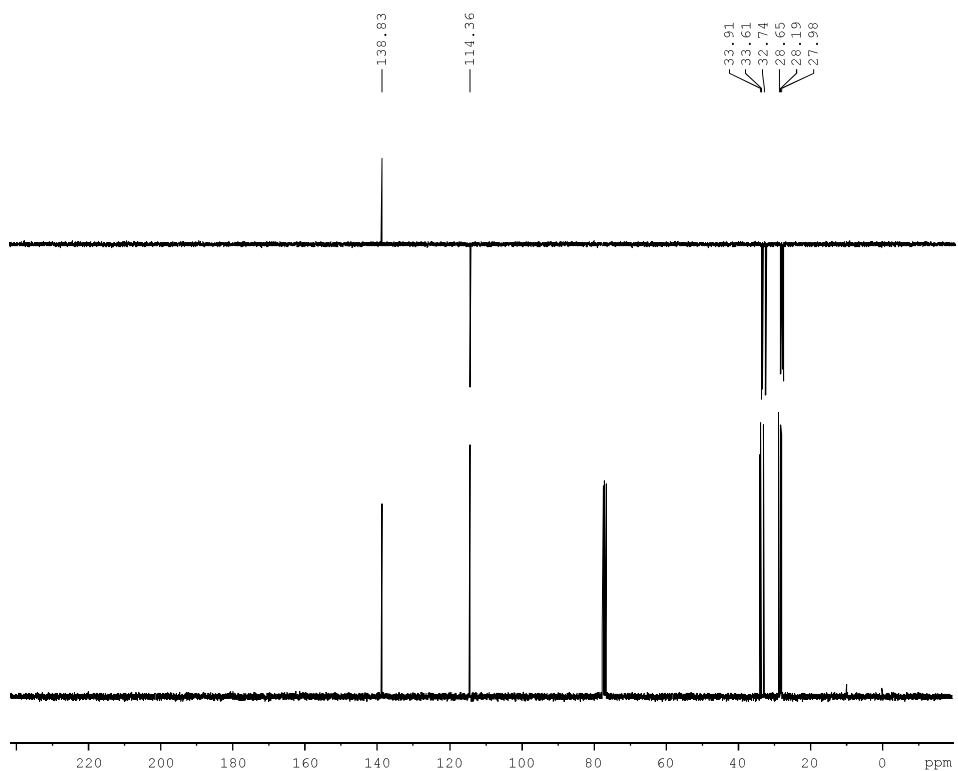
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 52



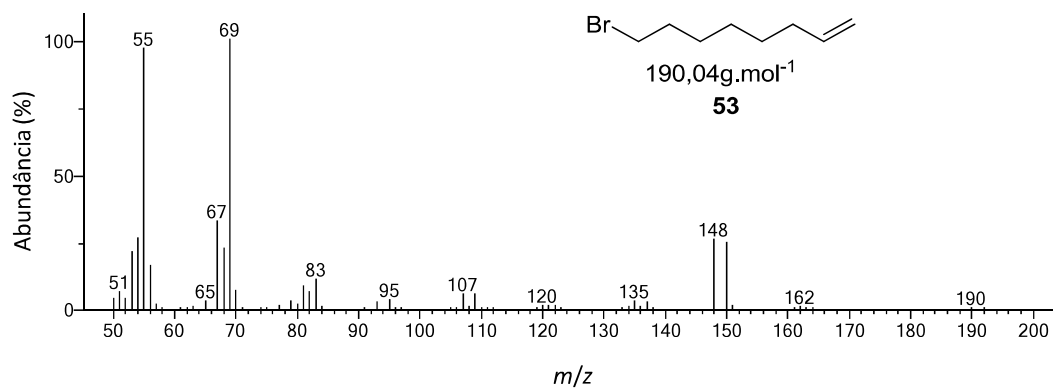
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 53



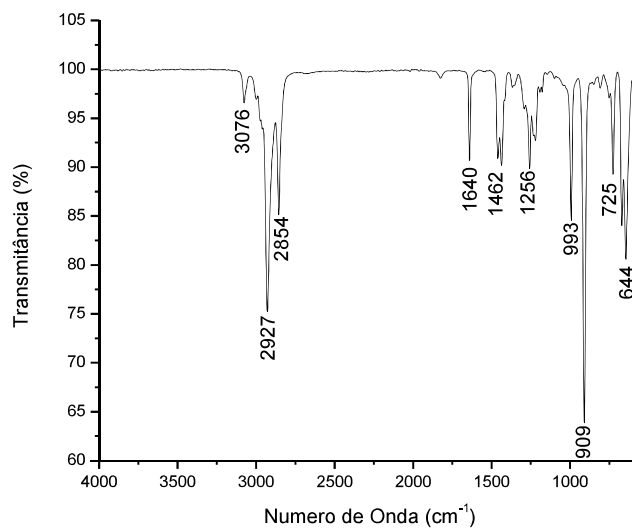
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 53



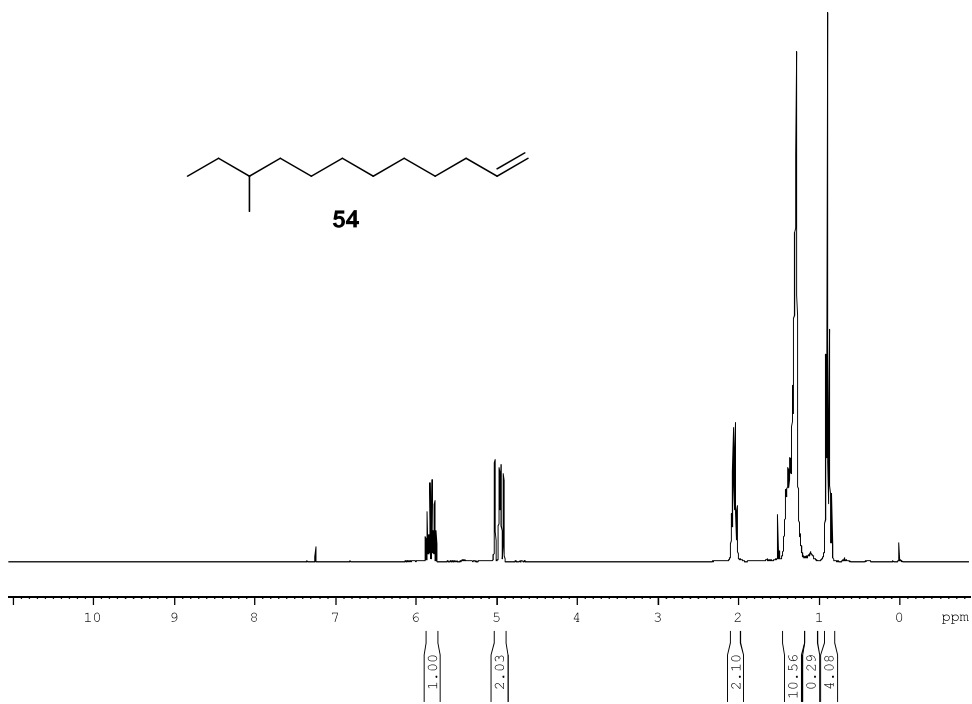
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 53



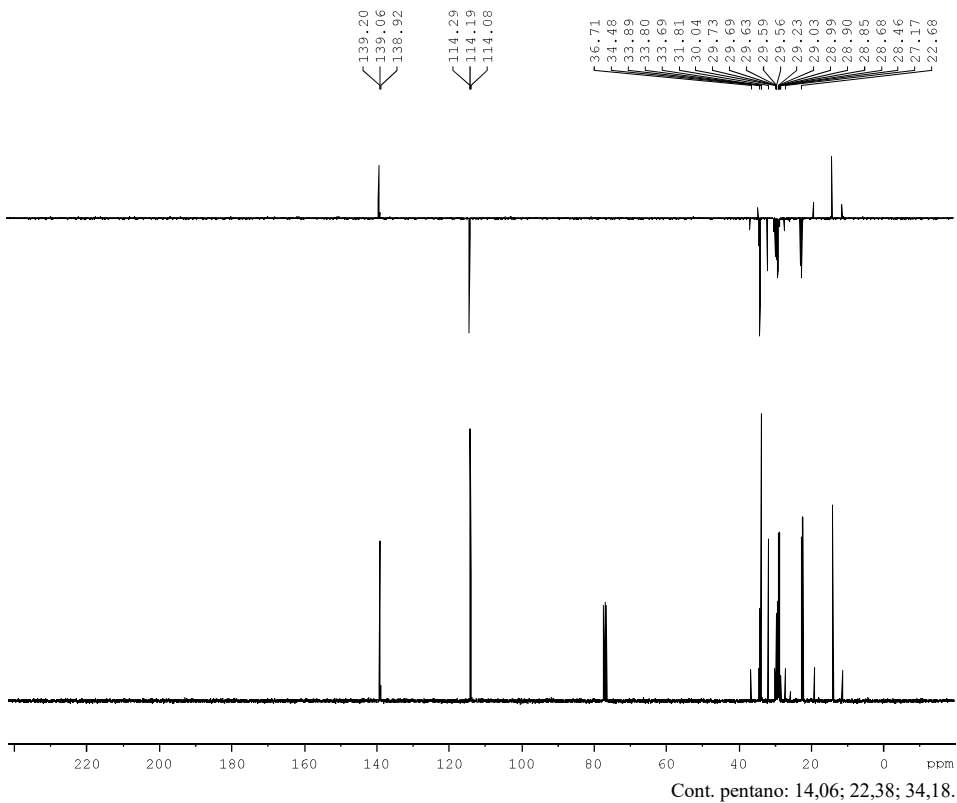
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 53



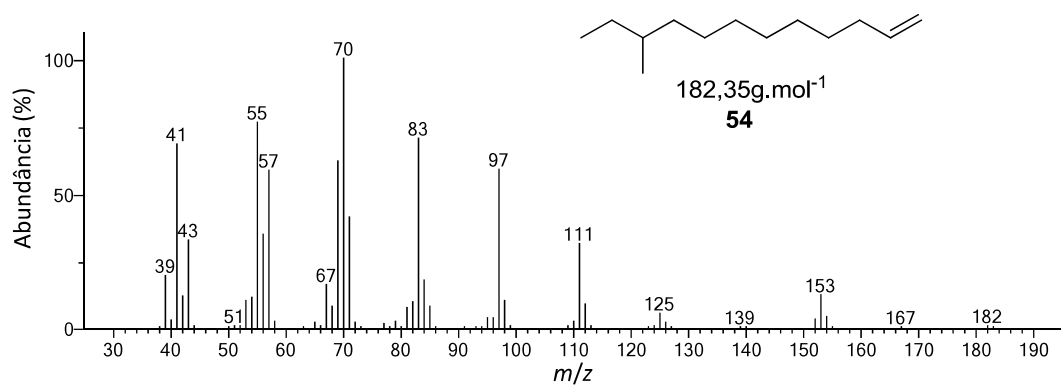
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 54**



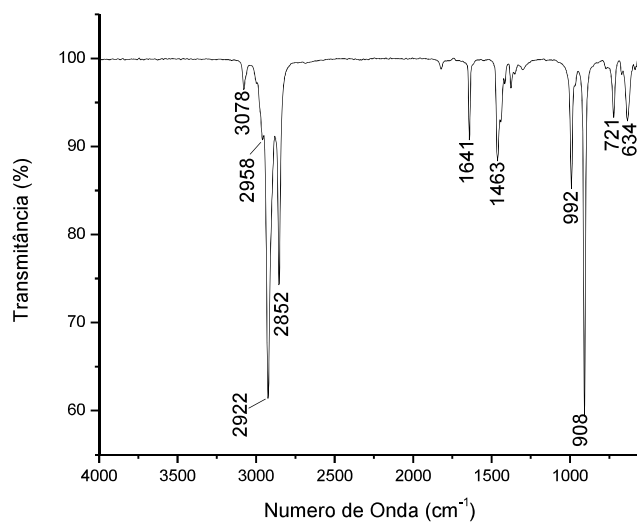
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 54**



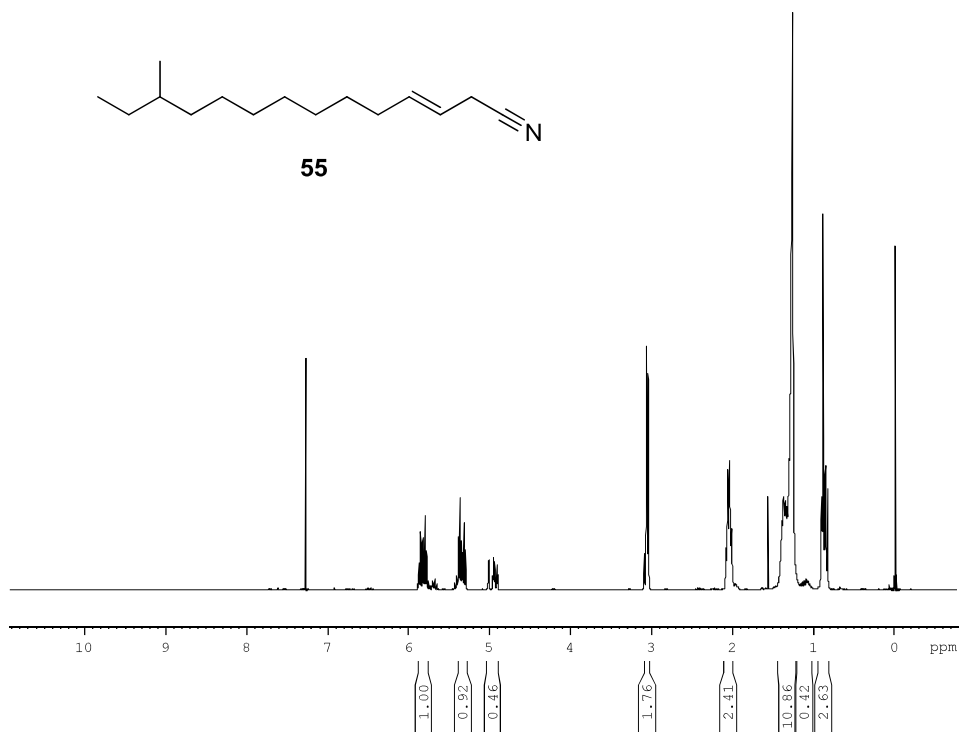
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 54



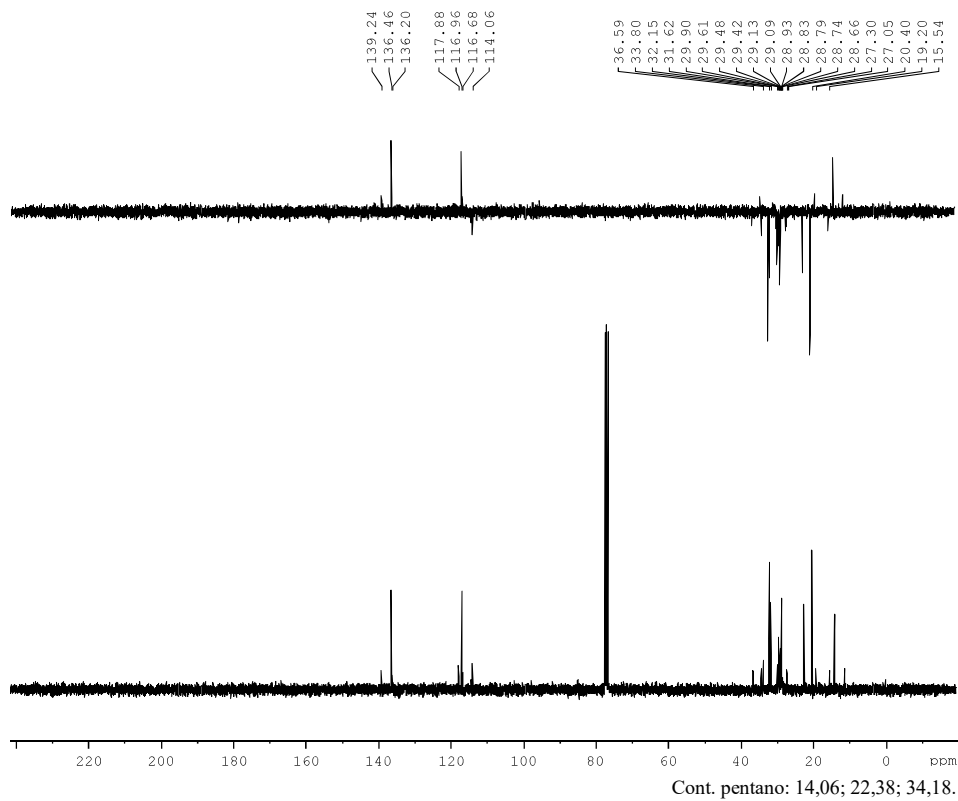
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 54



**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 55**

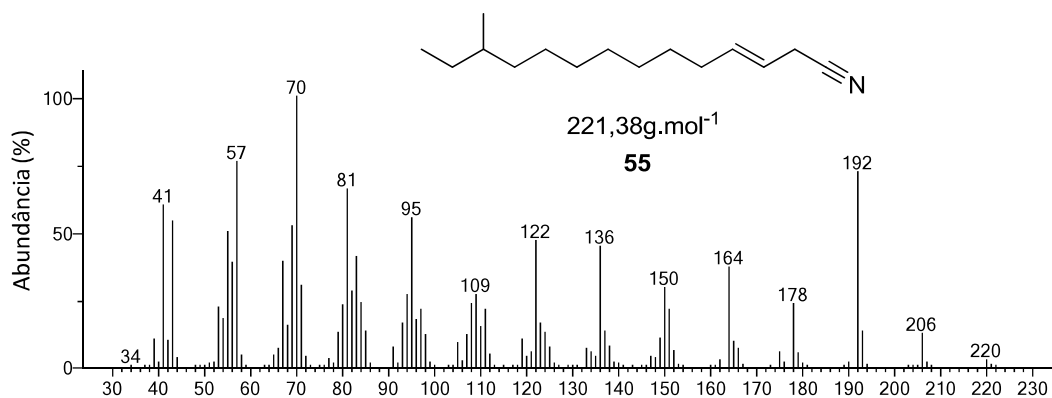


**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 55**

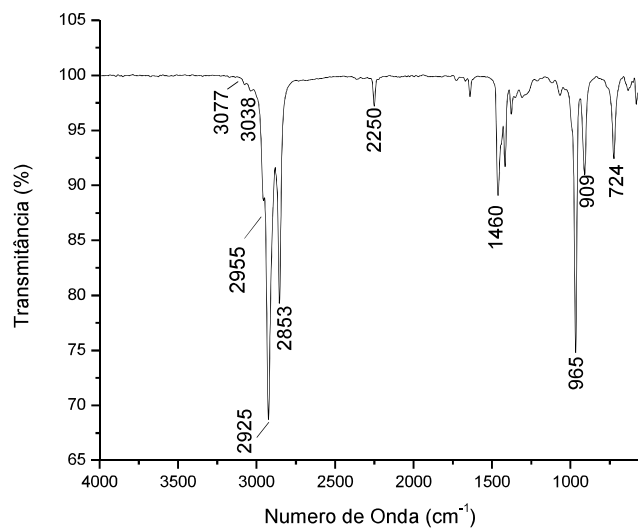




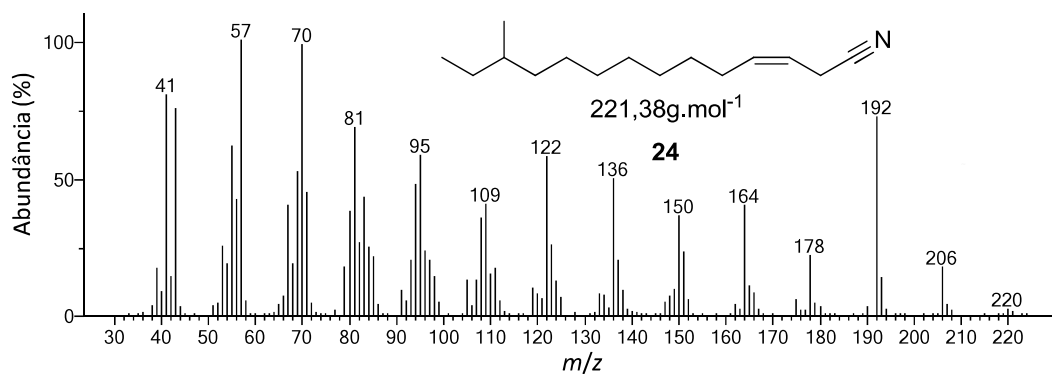
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 55



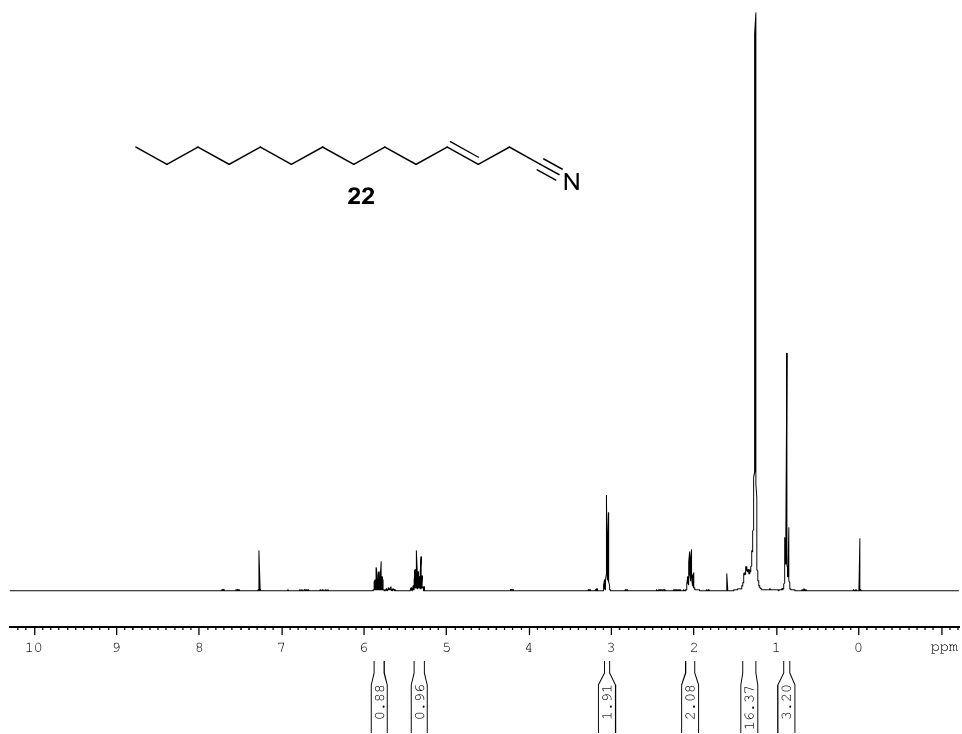
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 55



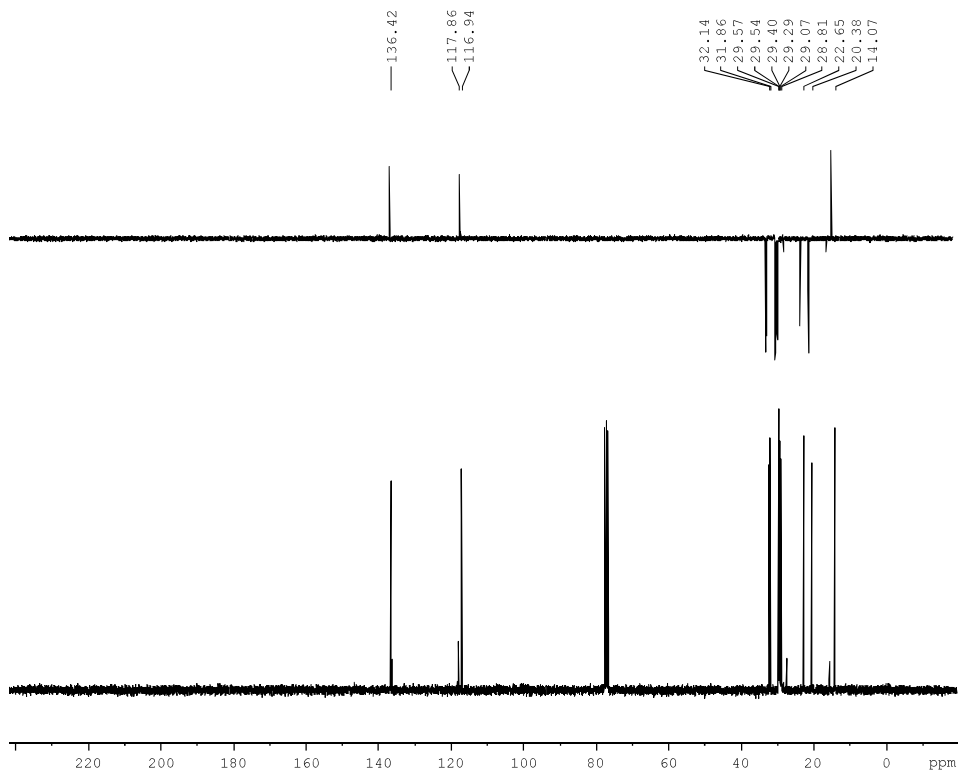
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 24



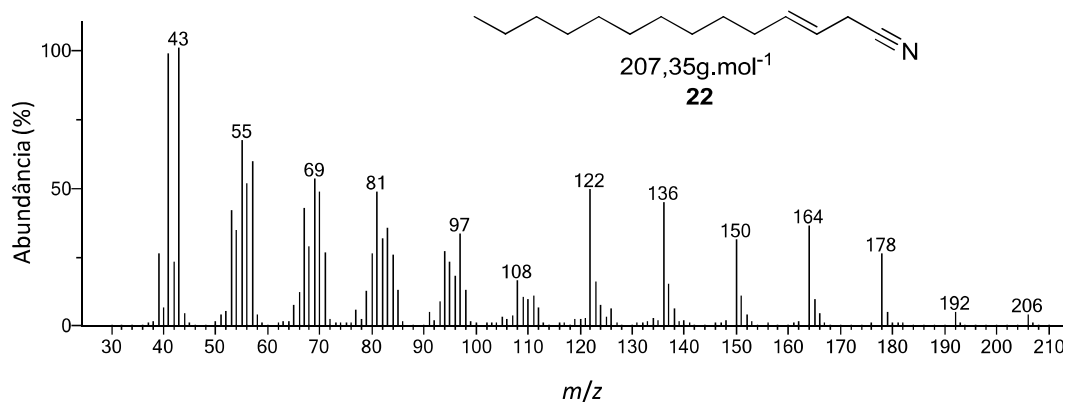
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 22**



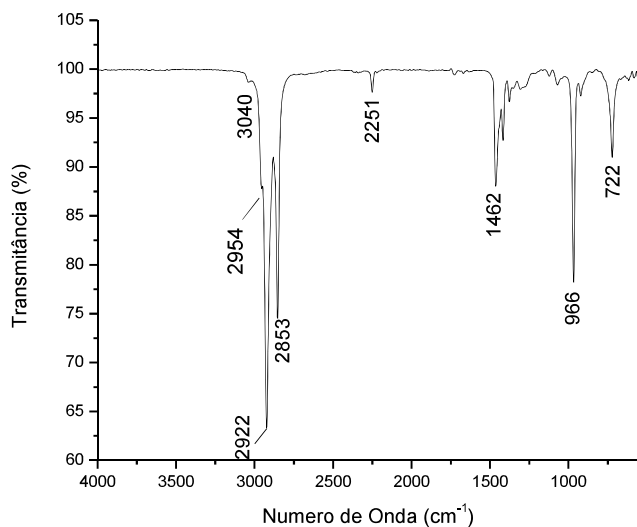
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 22**



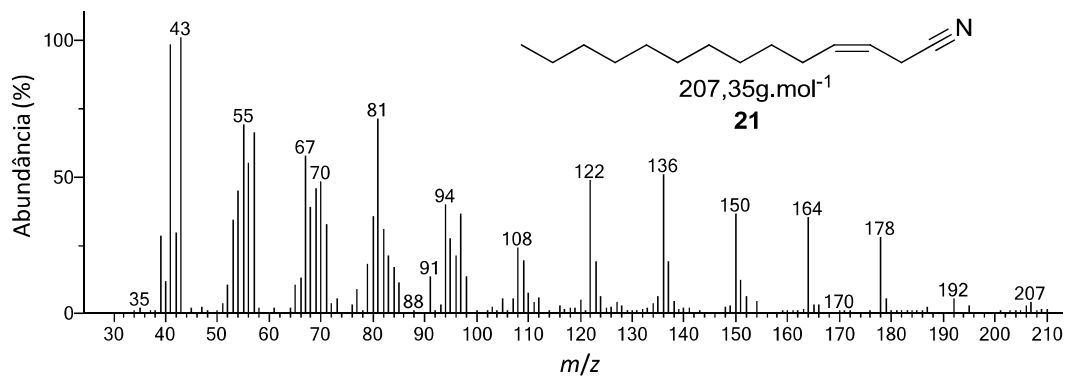
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 22



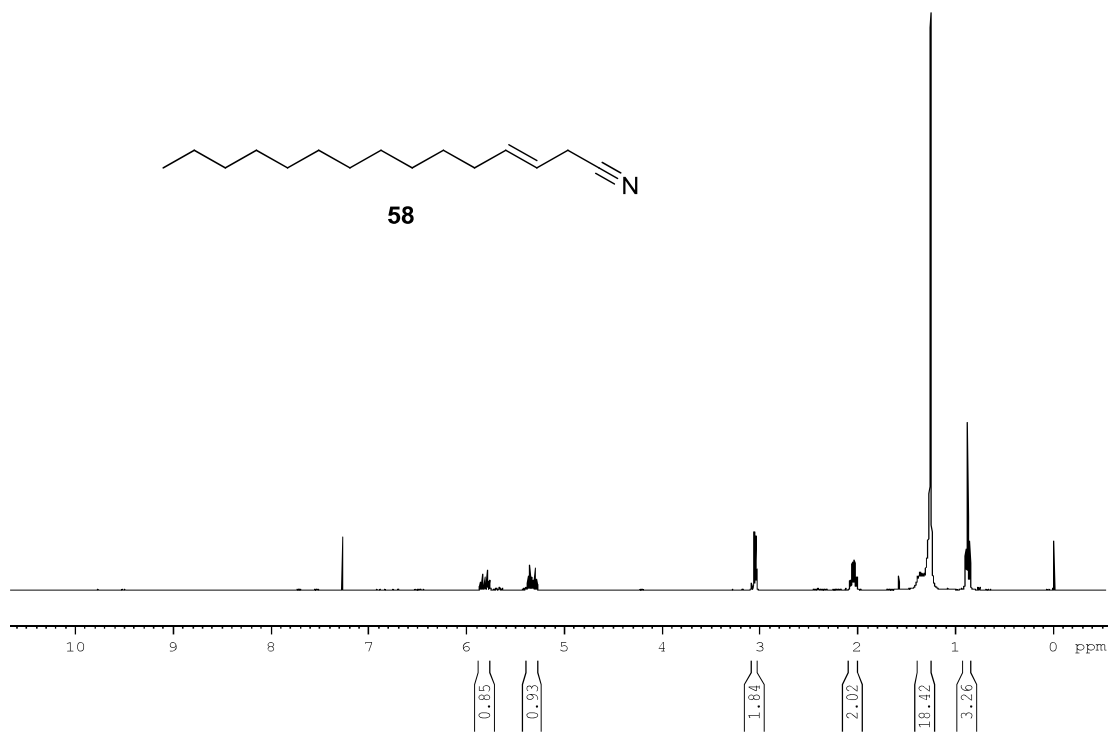
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 22



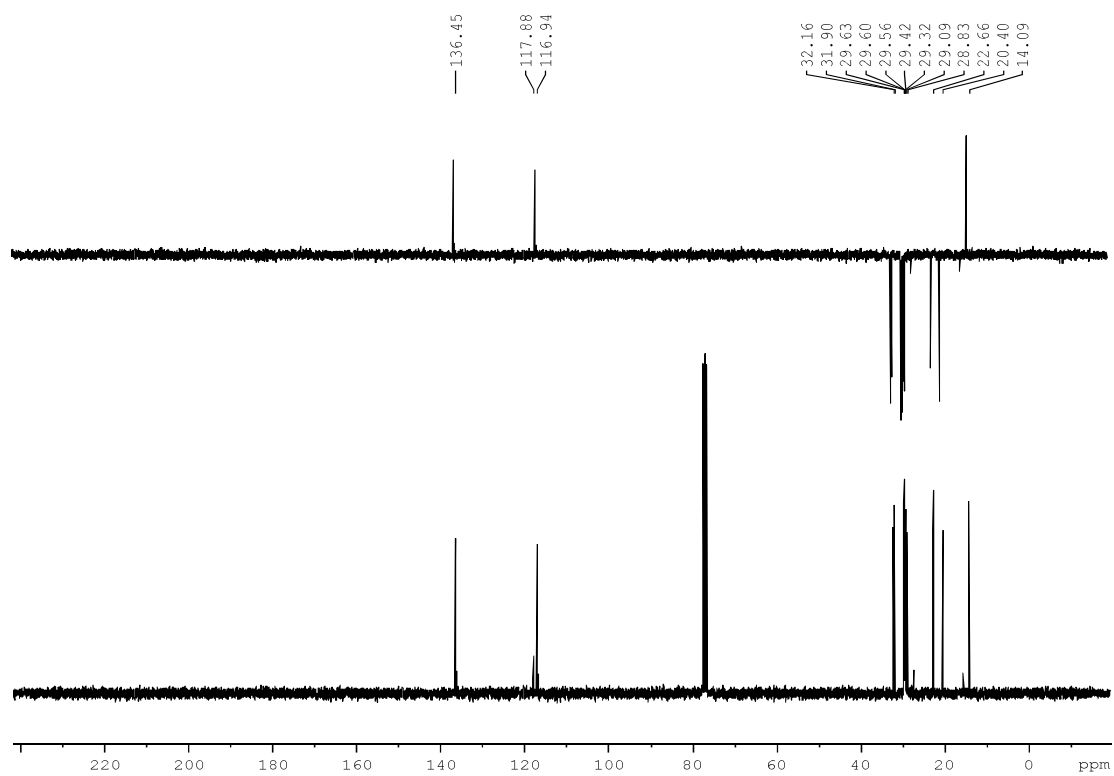
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 21



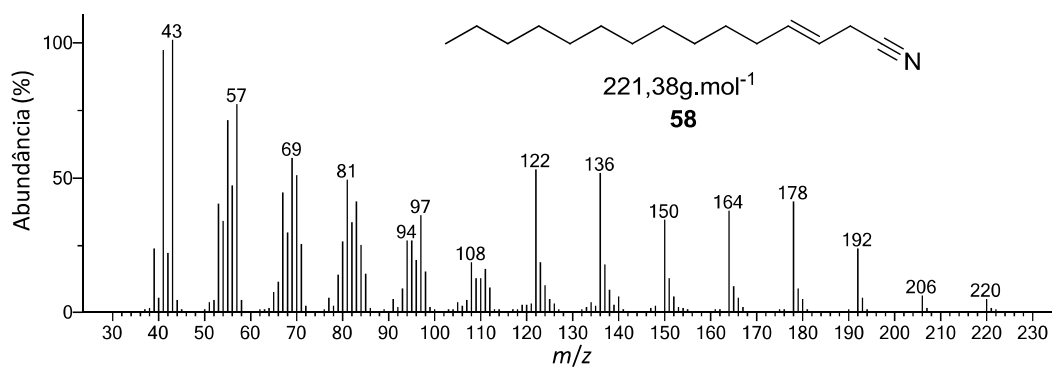
# ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 58



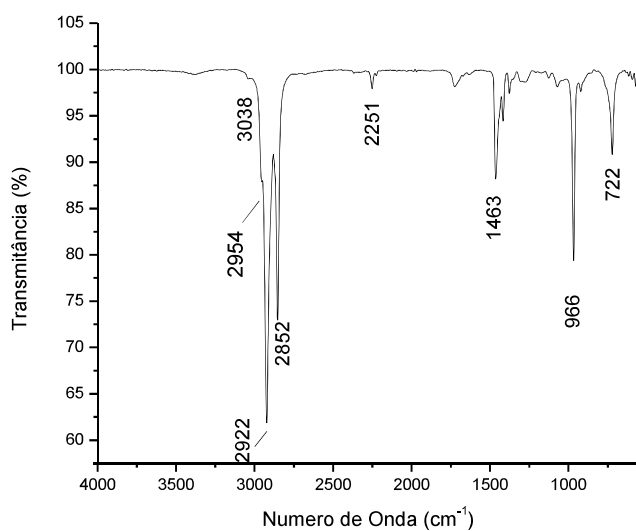
# ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 58



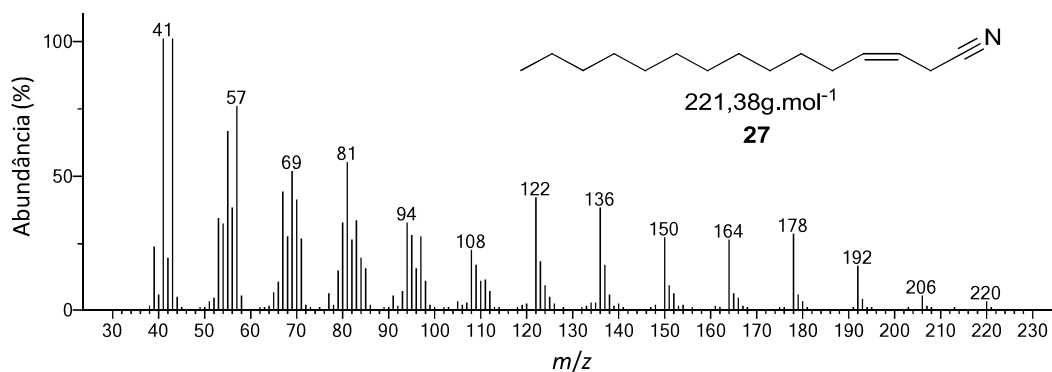
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 58



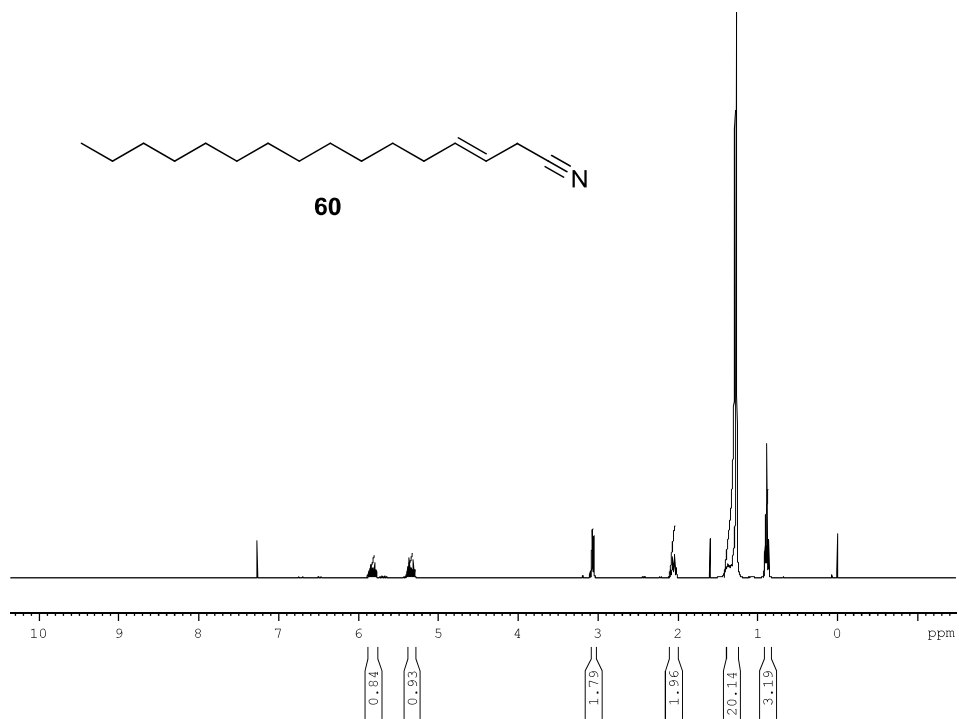
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 58



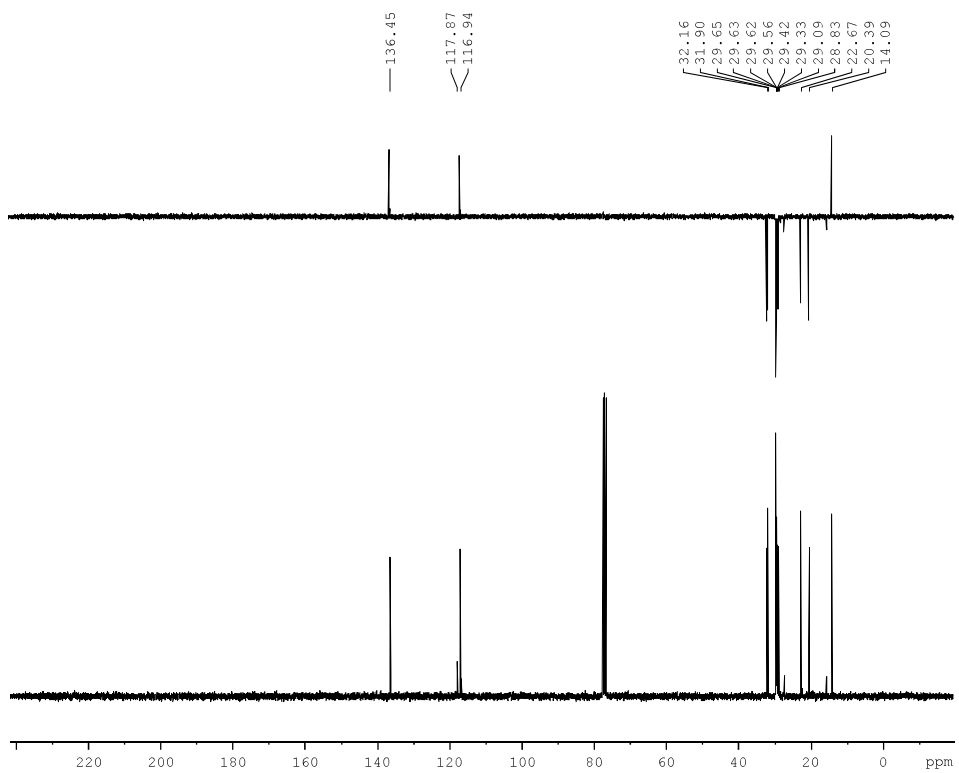
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 27



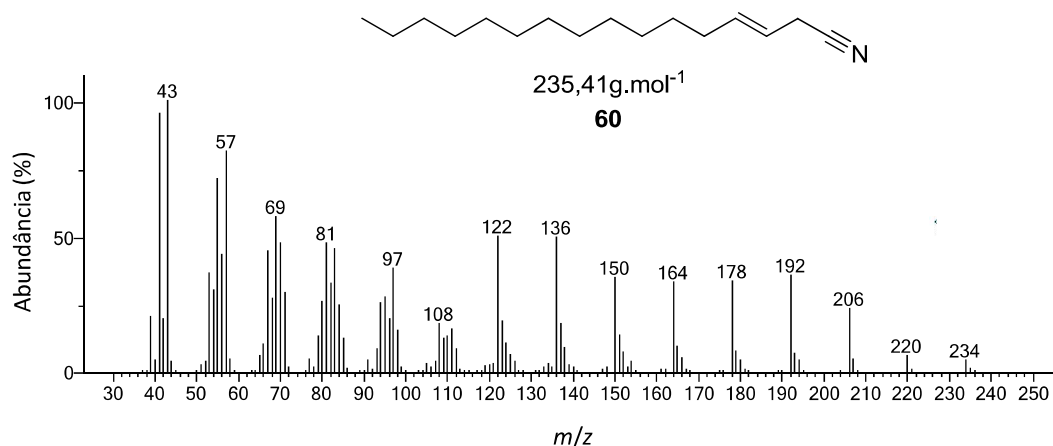
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 60**



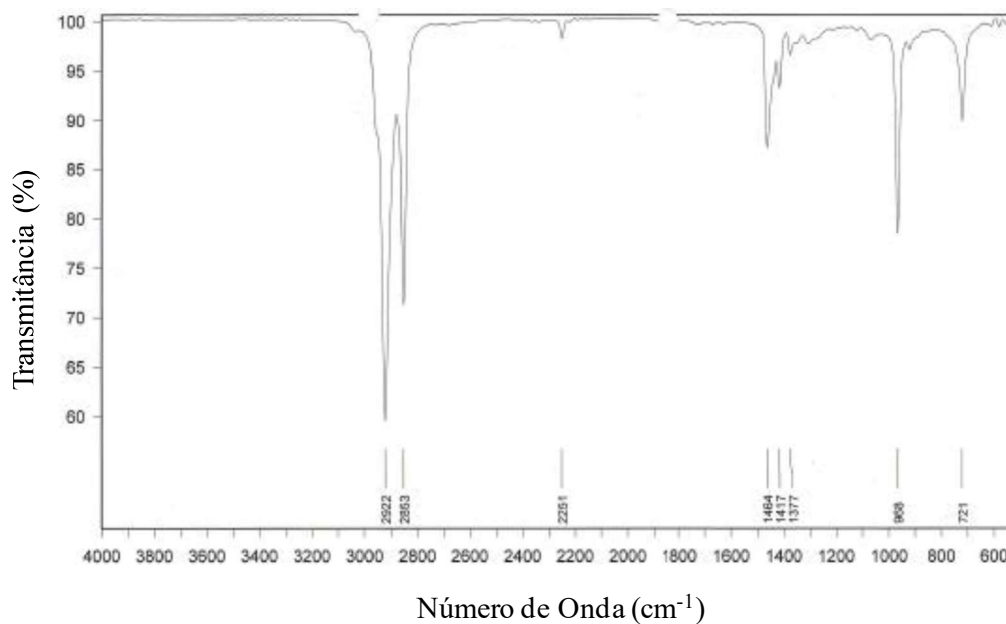
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 60**



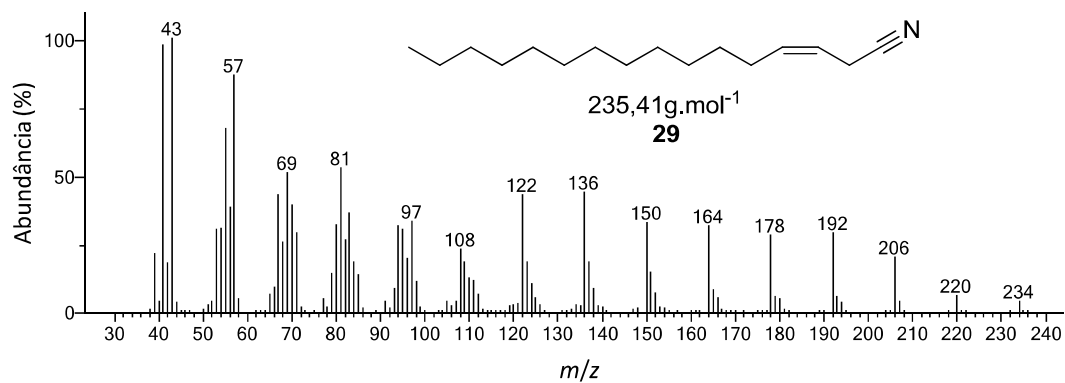
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 60



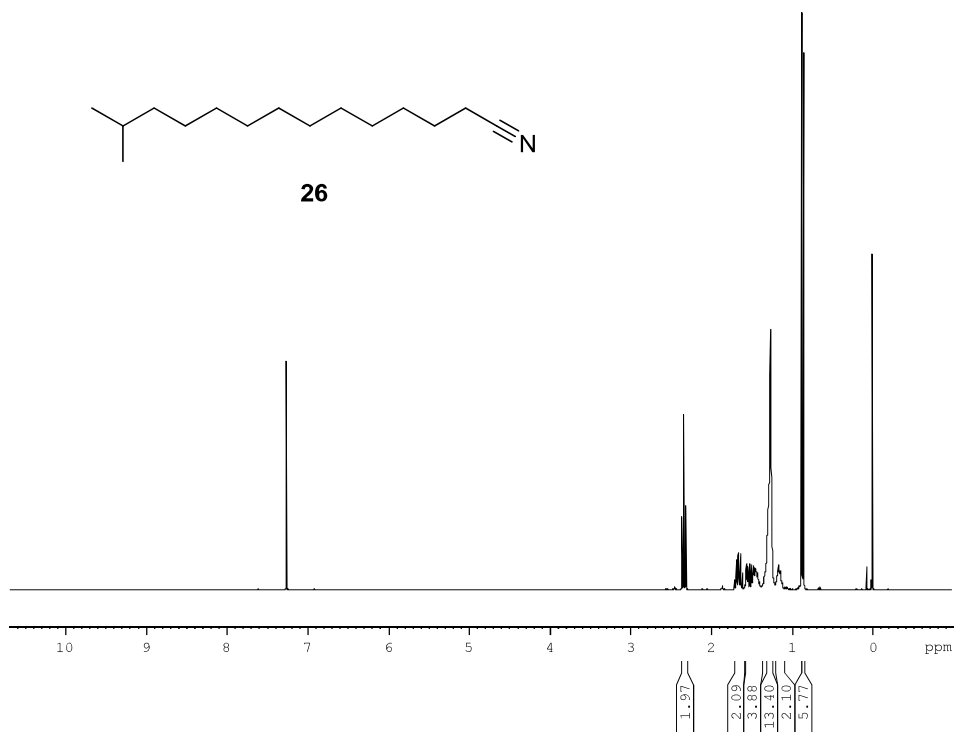
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 60



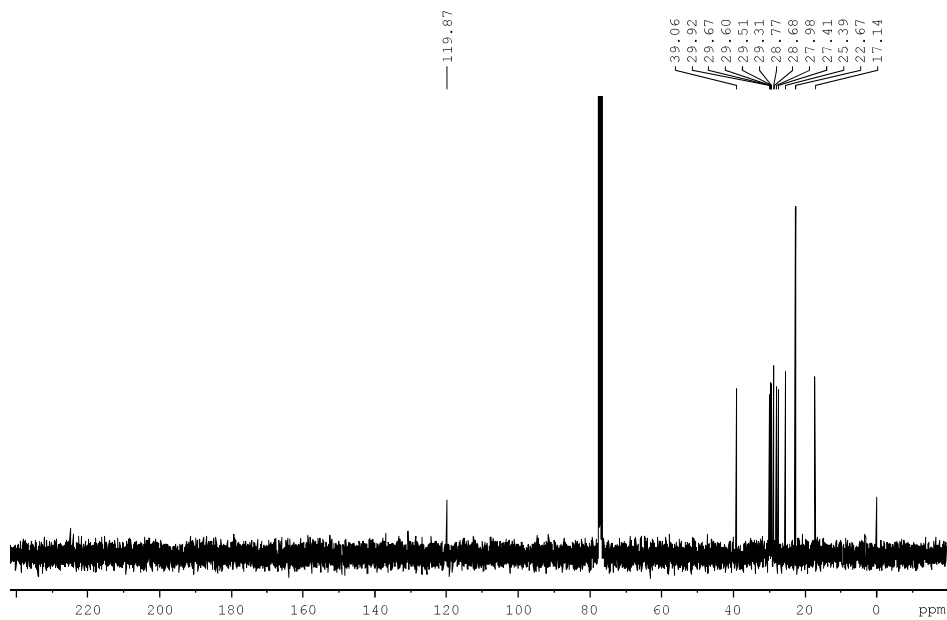
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 29



### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 26

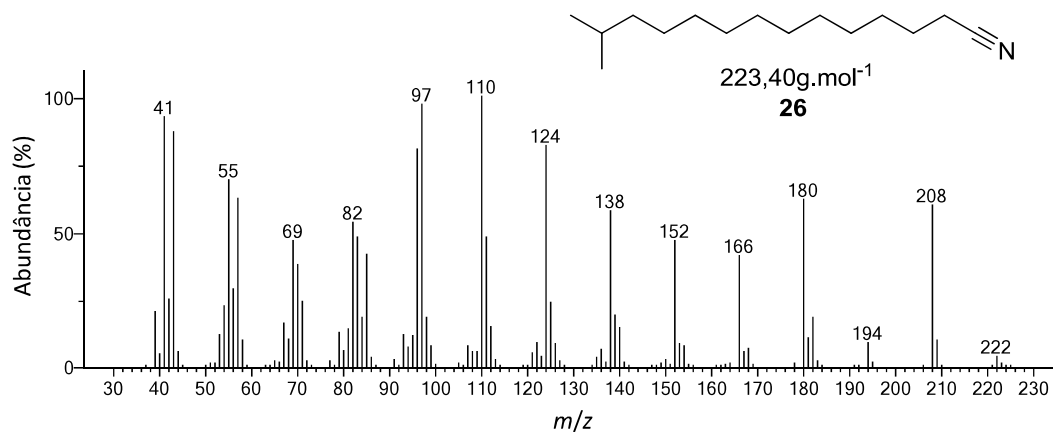


### ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 26

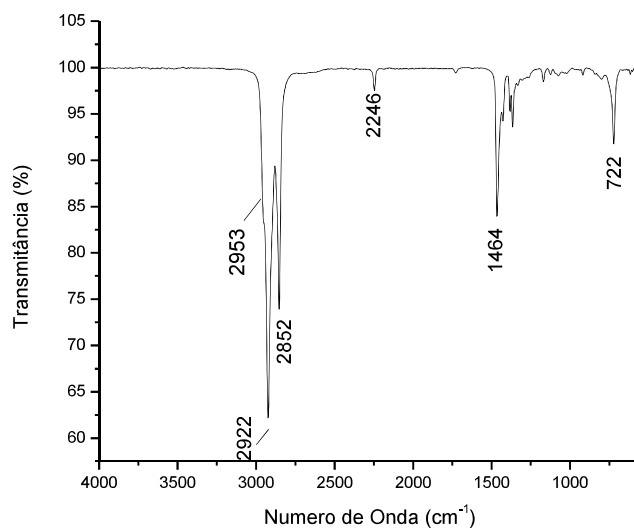




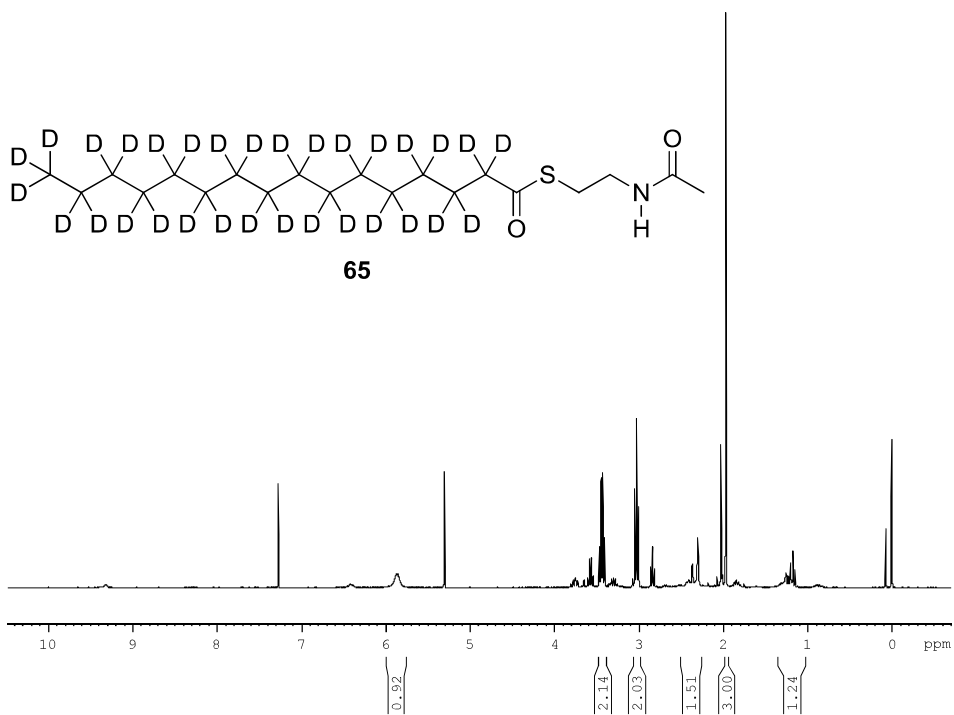
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 26



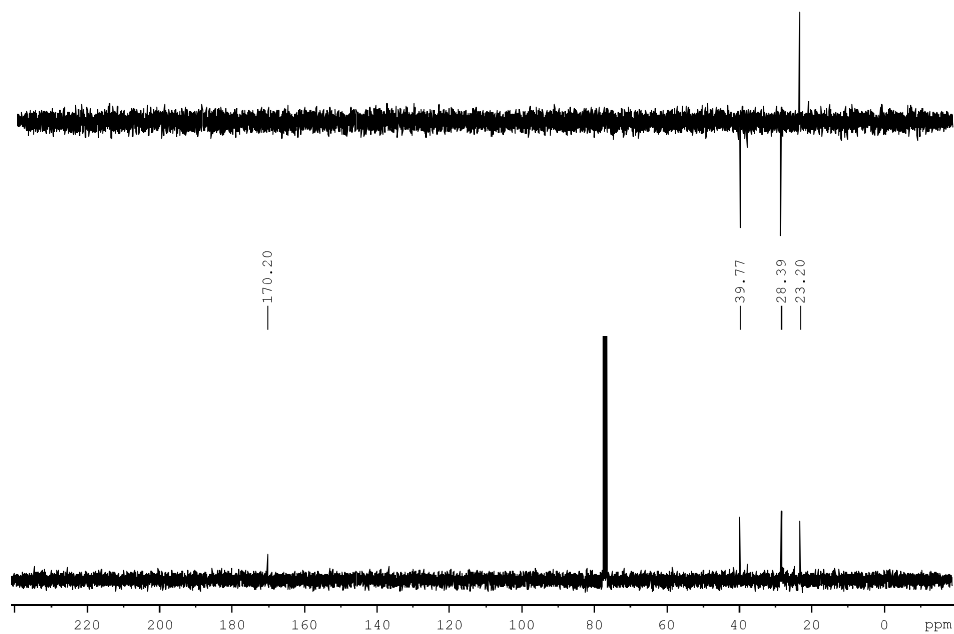
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 26



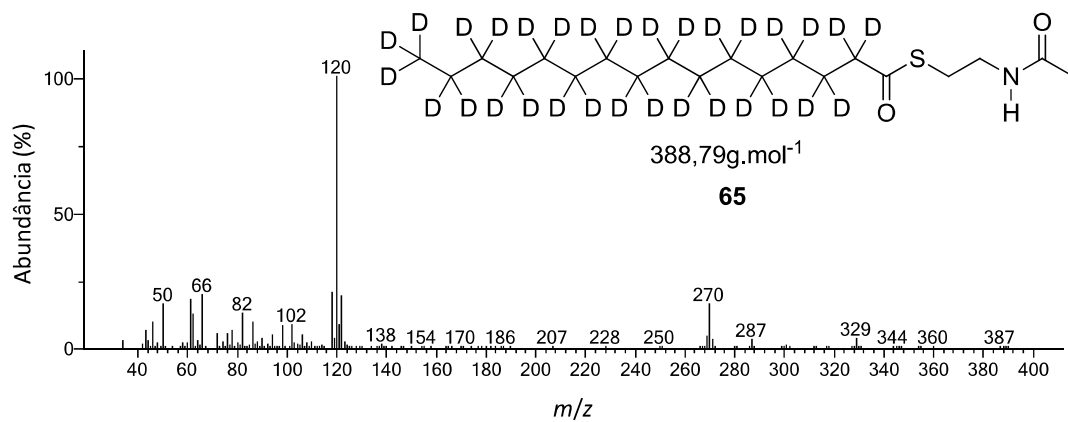
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 65



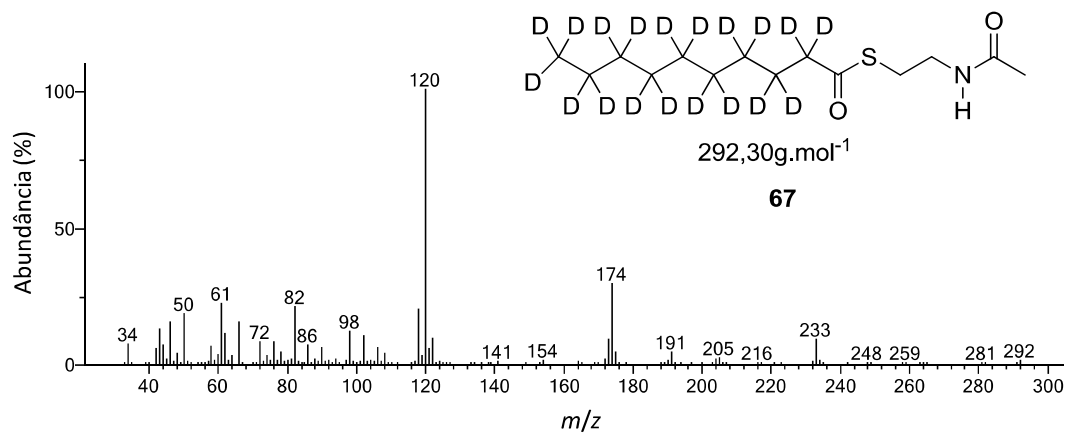
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 65



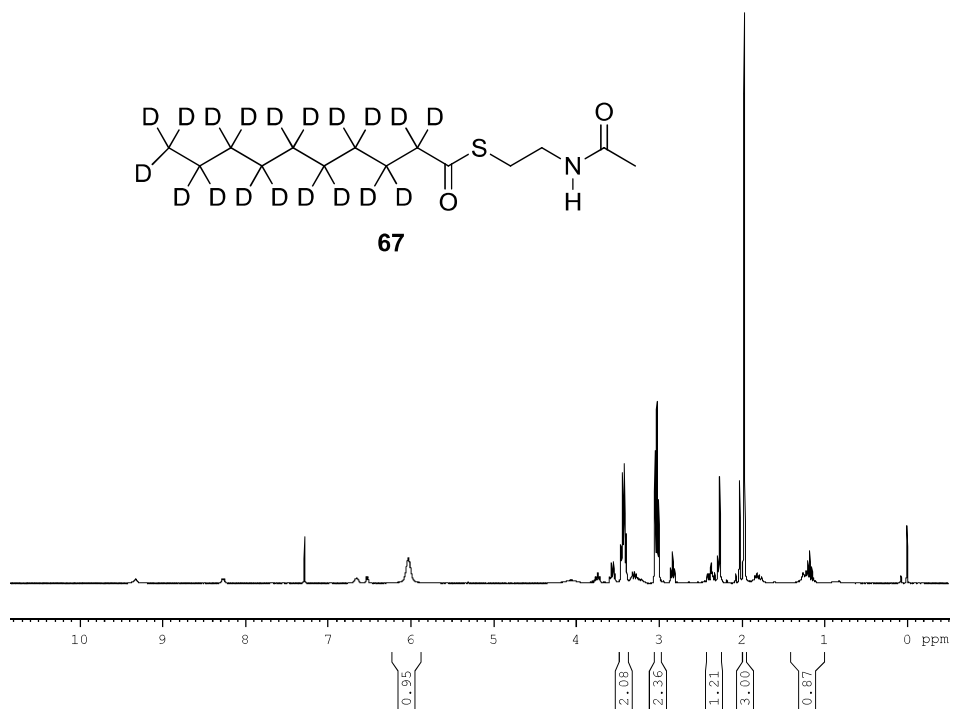
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 65



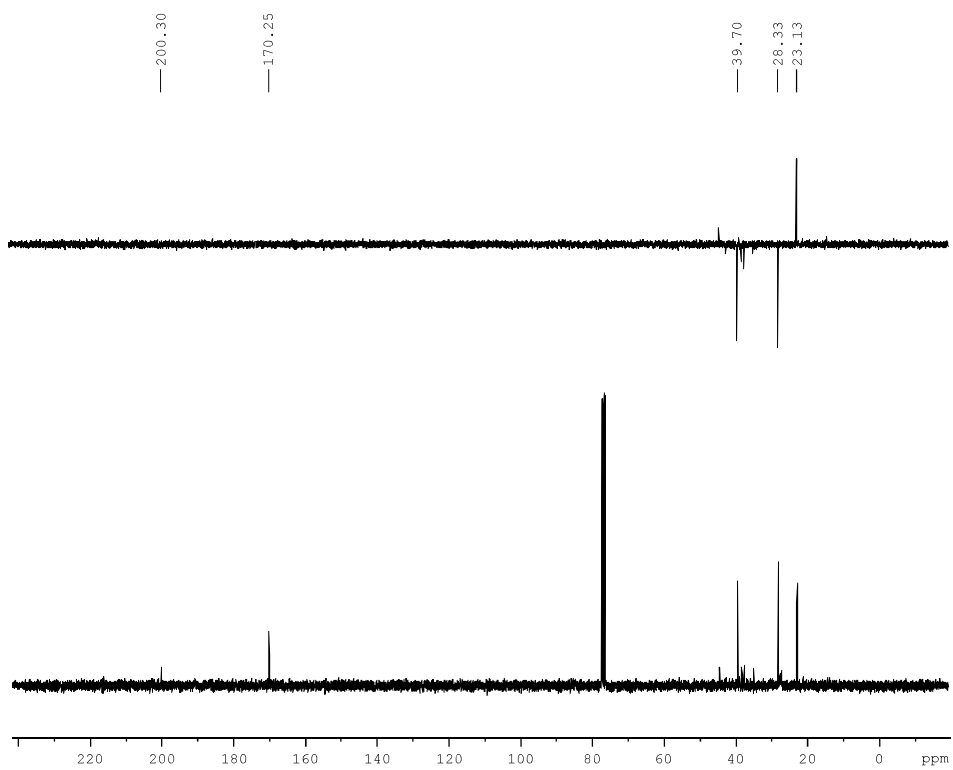
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 67



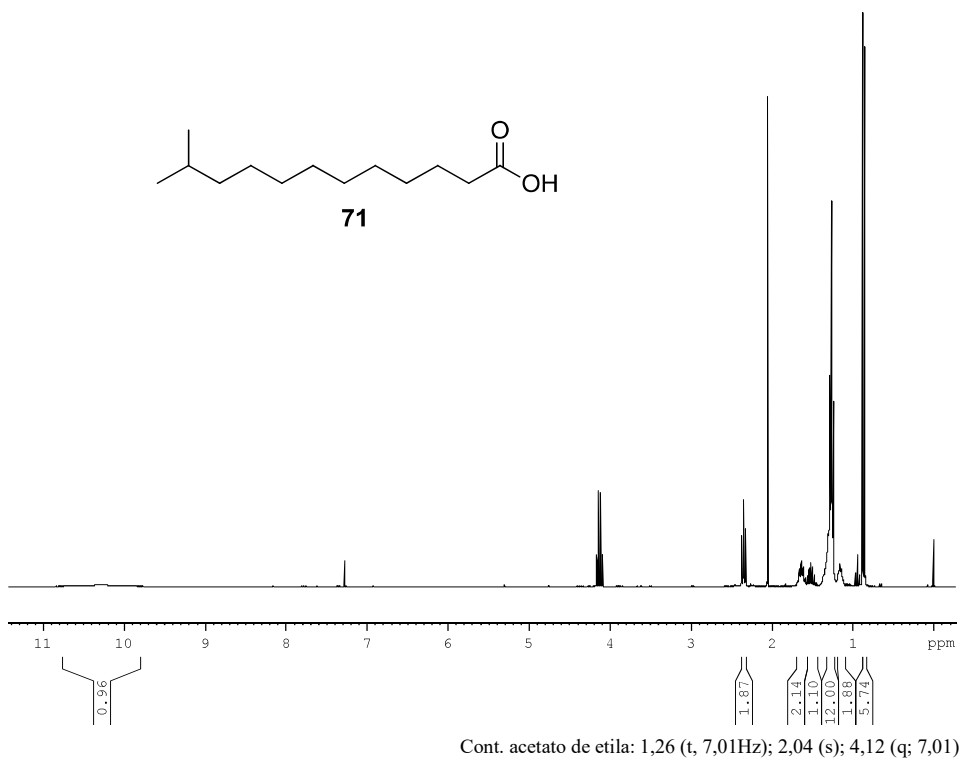
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 67



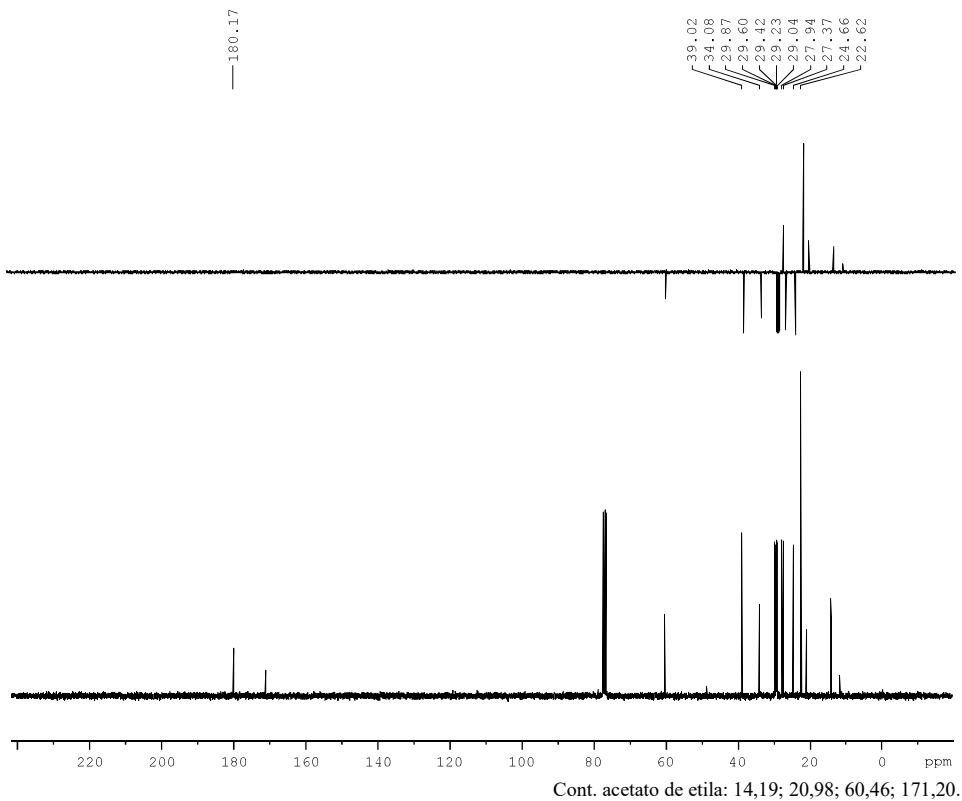
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 67



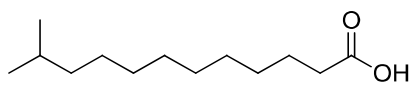
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 71**



**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 71**

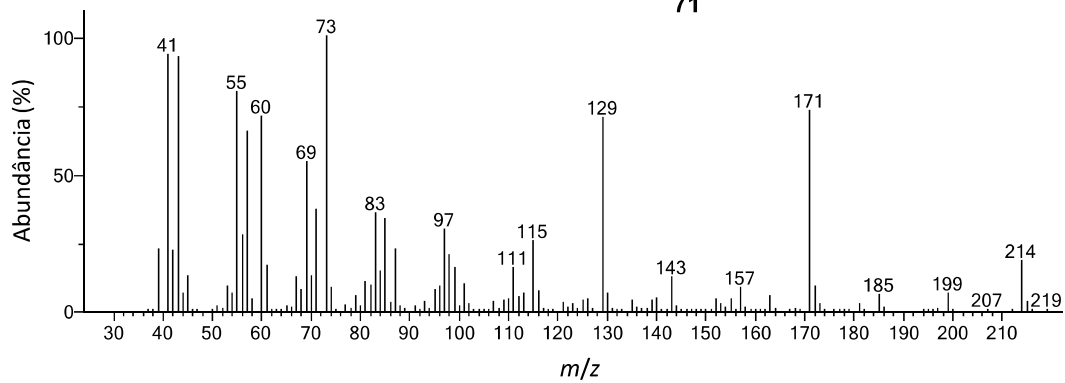


# ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 71

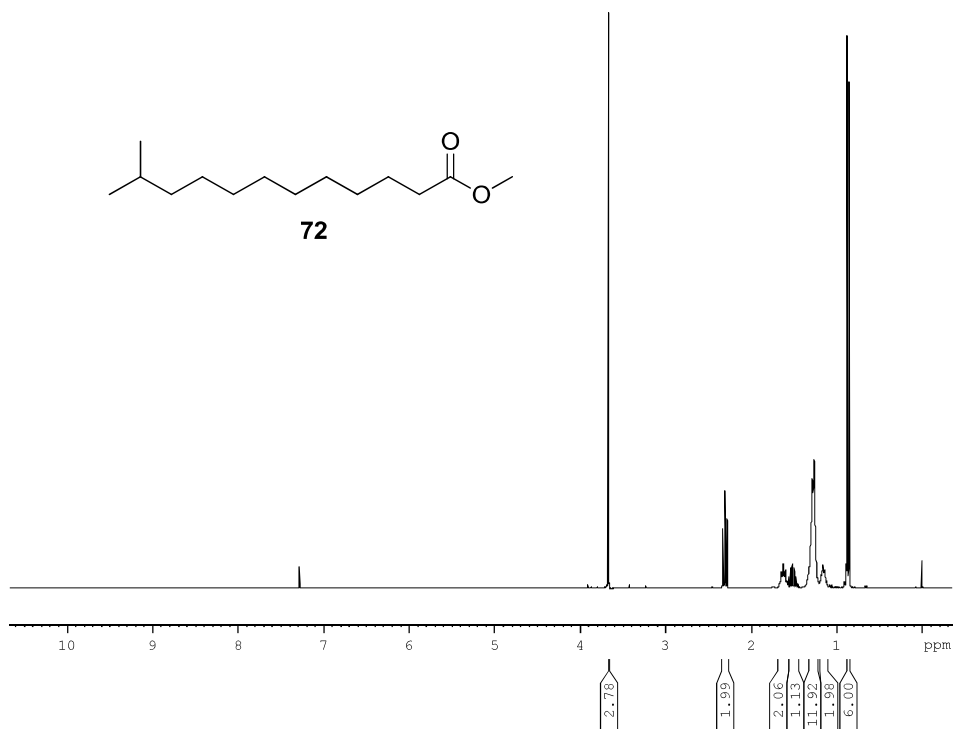


214,34g.mol<sup>-1</sup>

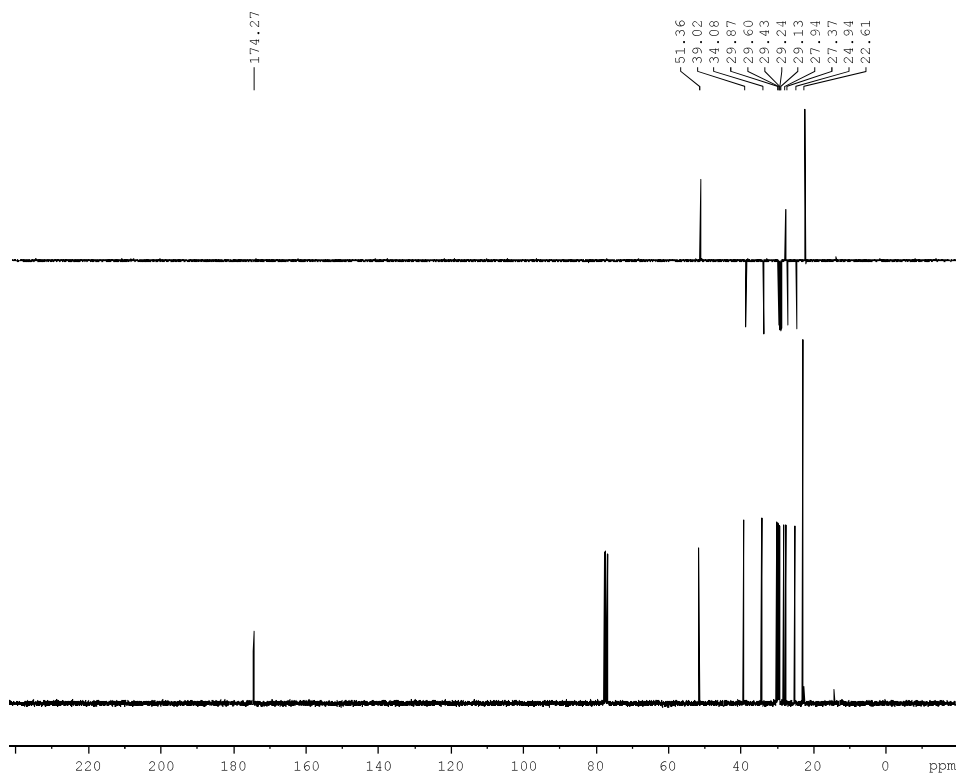
71



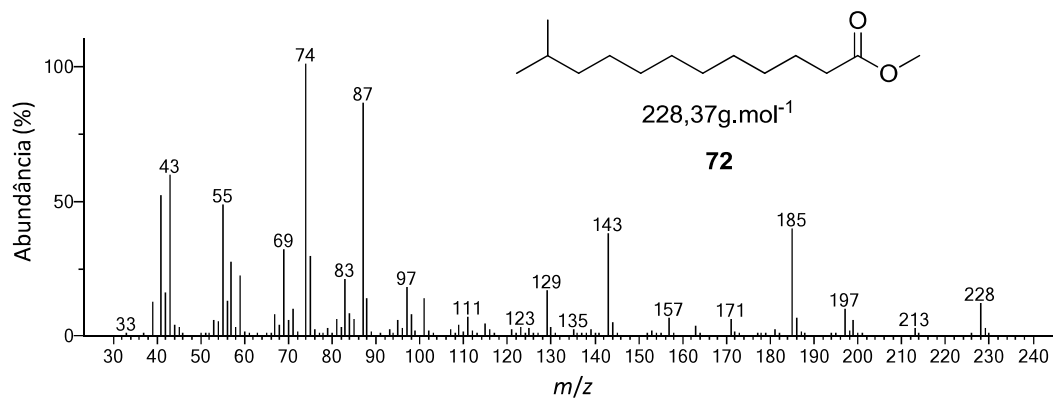
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 72



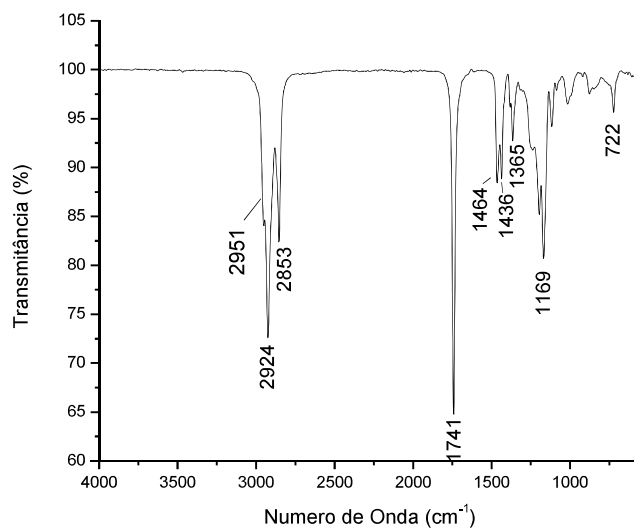
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 72



## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 72

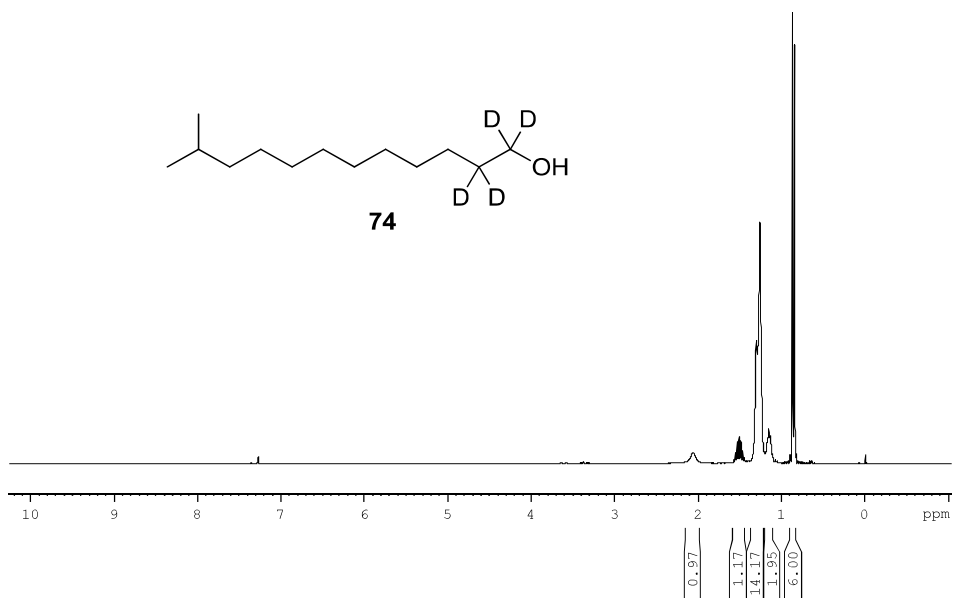


## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 72

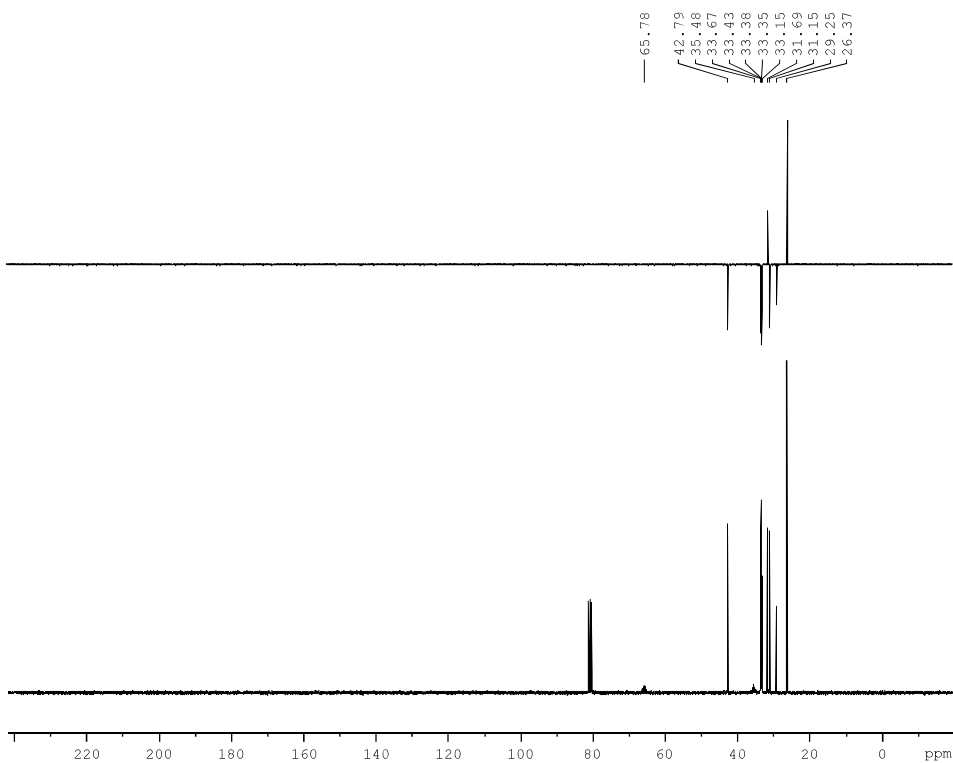




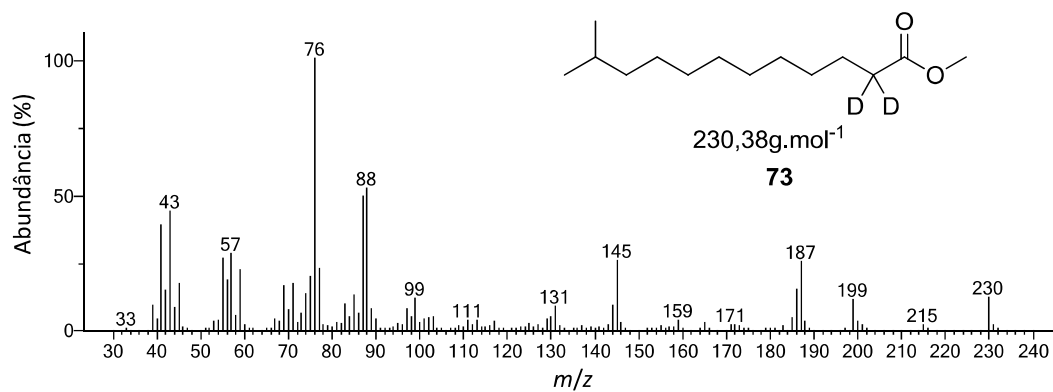
### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO 74



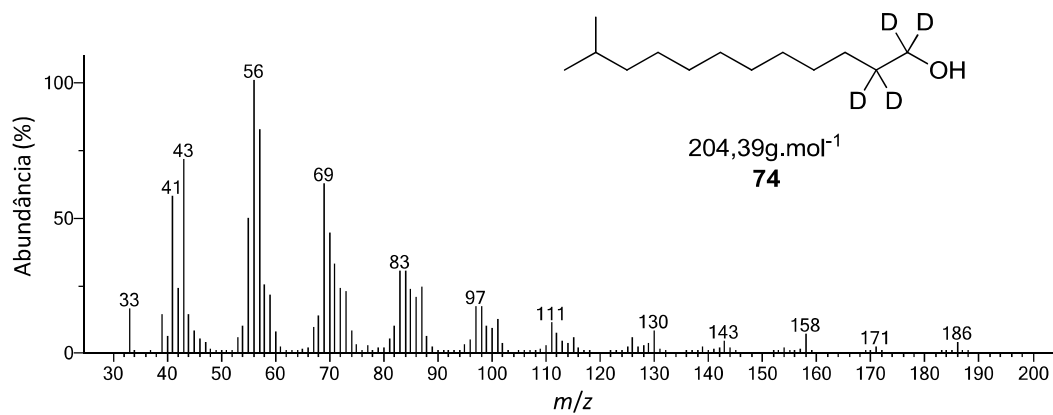
### ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO 74



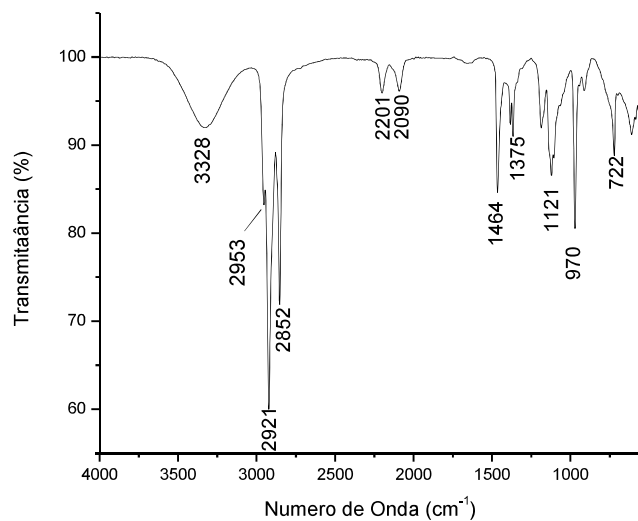
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 73



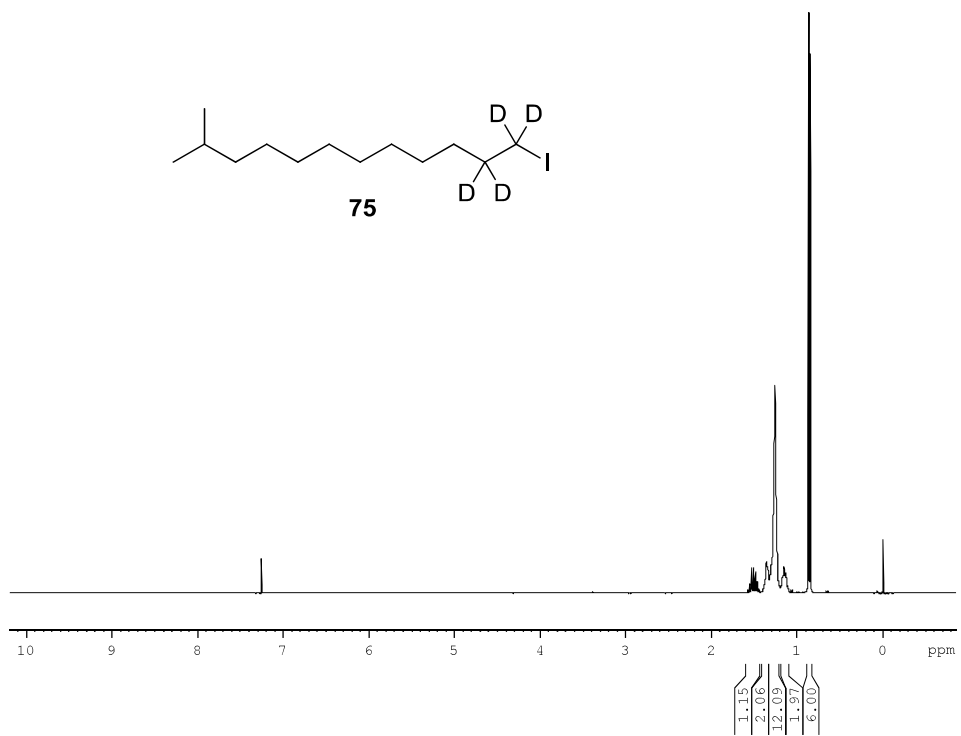
### ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 74



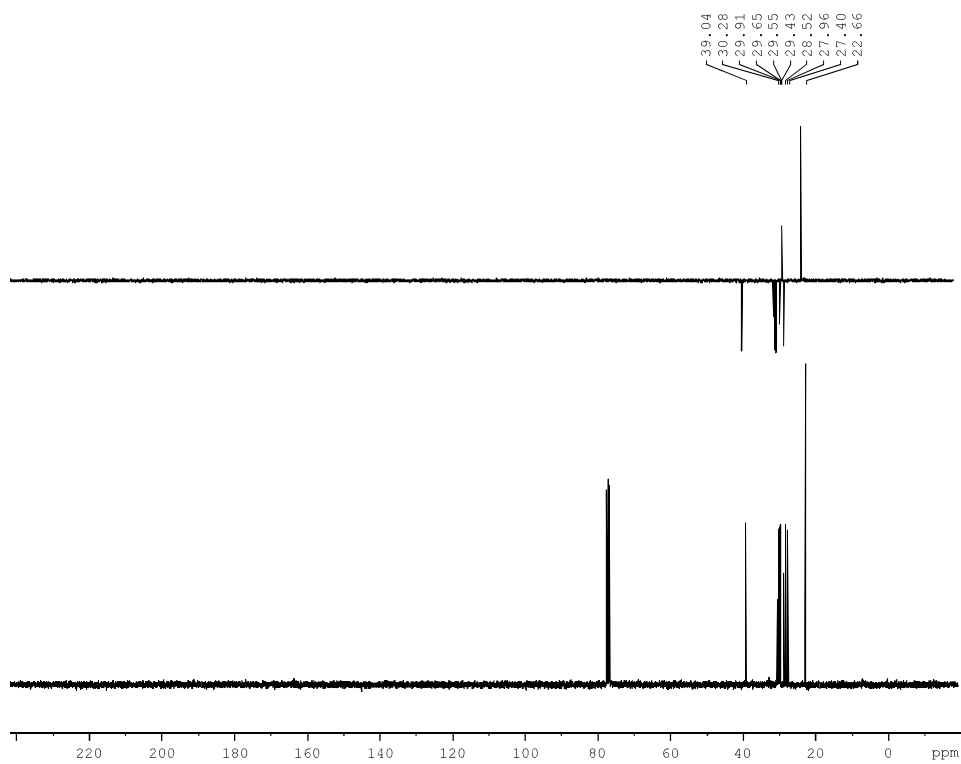
### ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 74



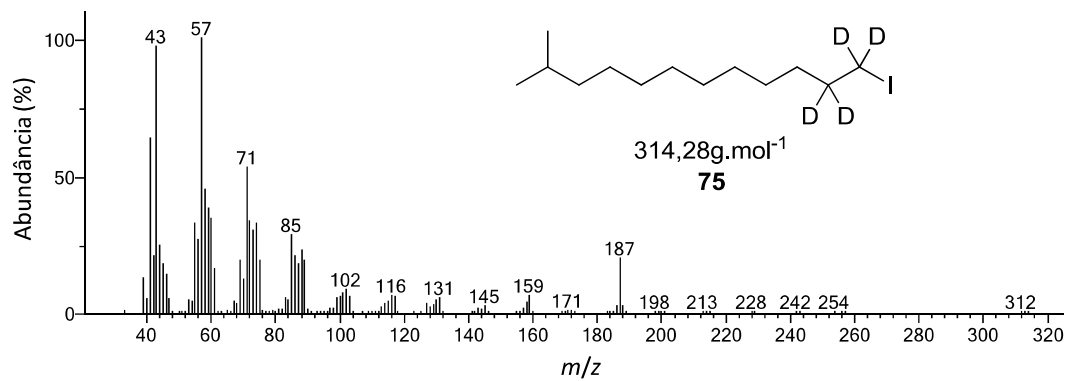
**ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 75**



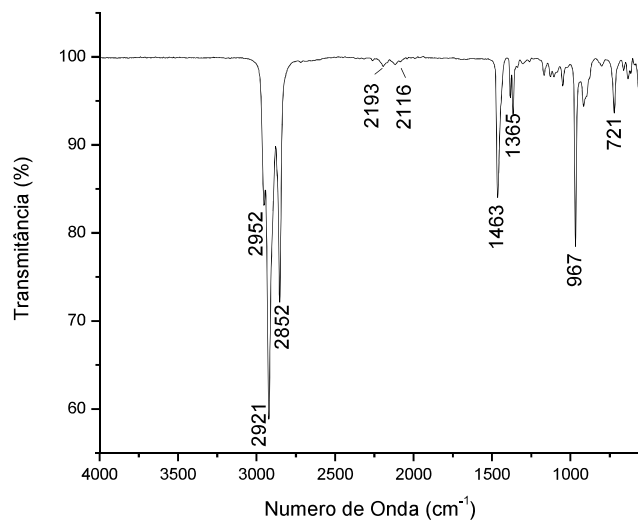
**ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 75**



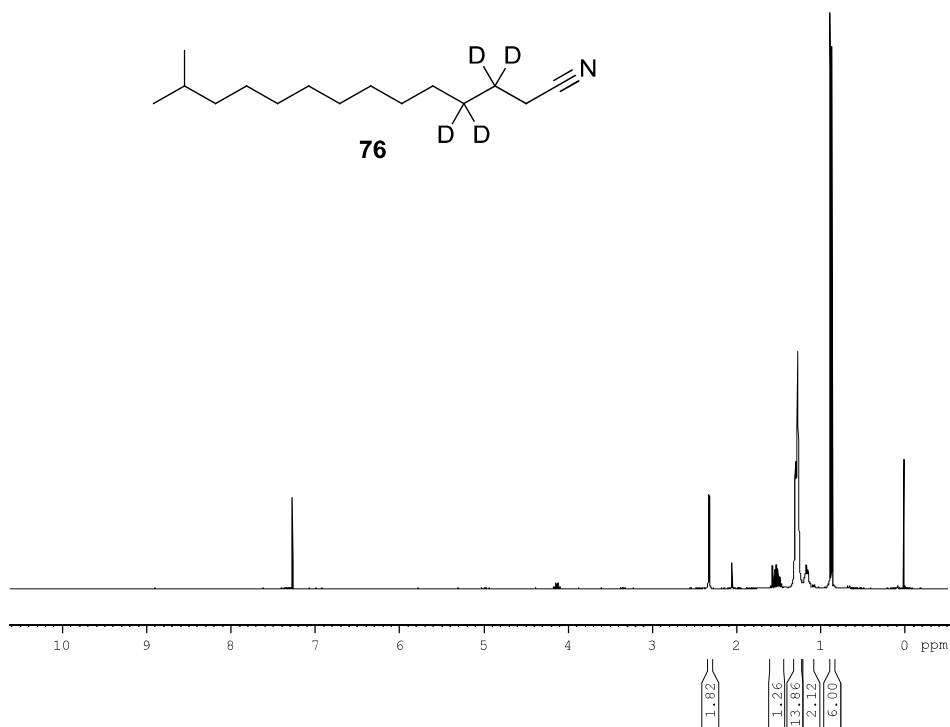
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 75



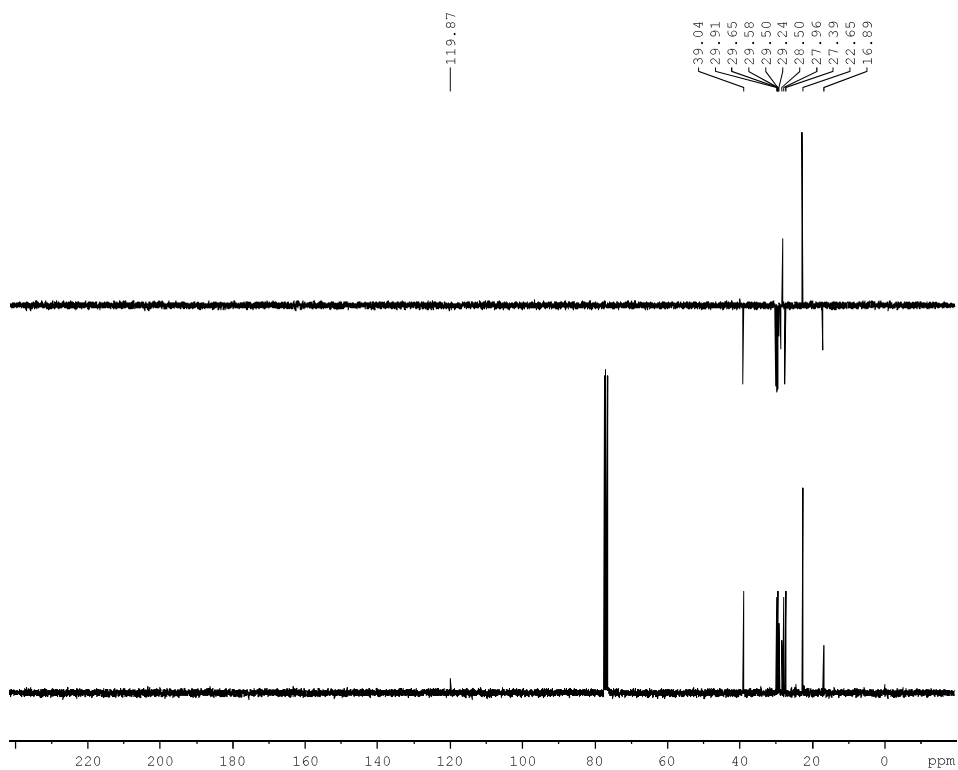
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 75



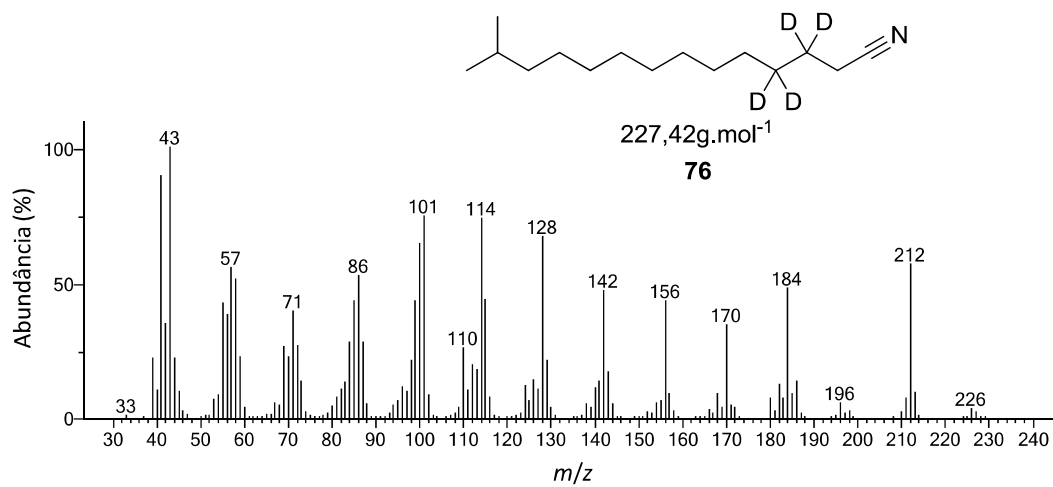
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 76



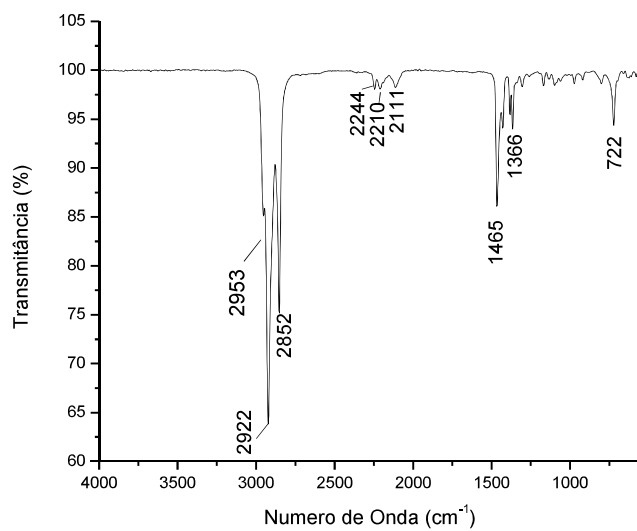
ESPECTROS DE RMN DEPT 135 E DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 76



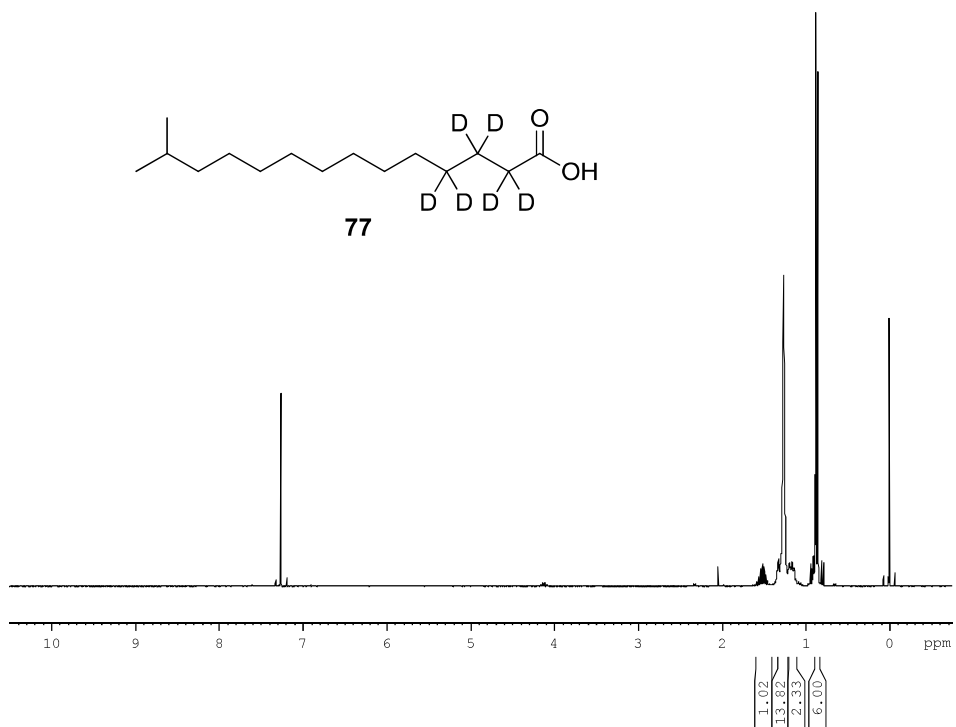
## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 76



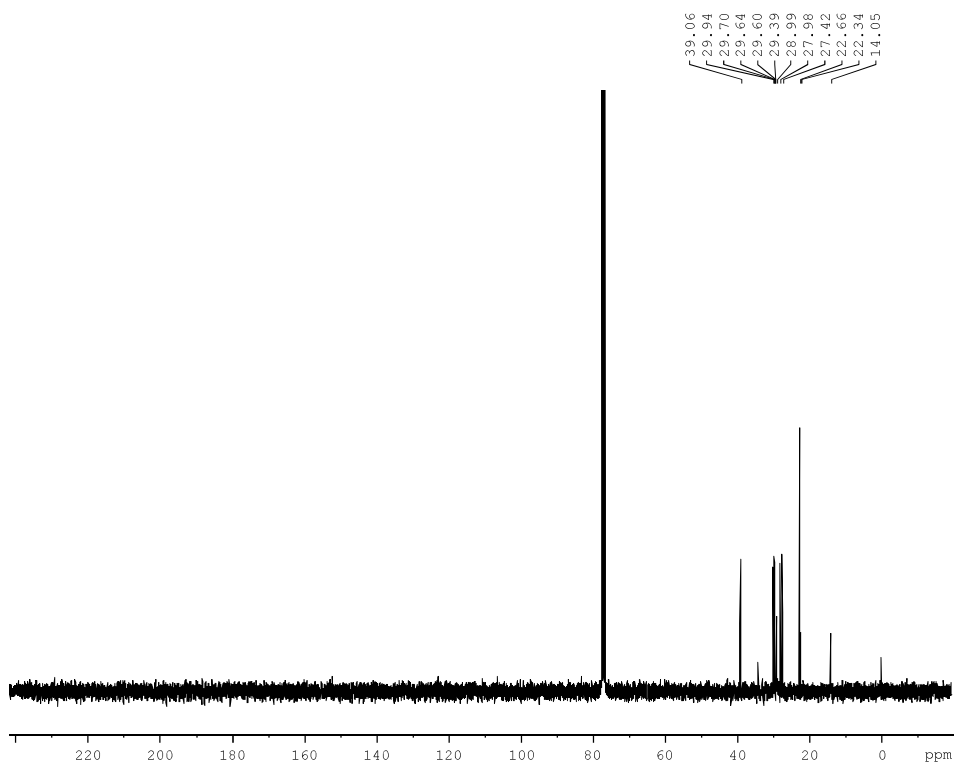
## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 76



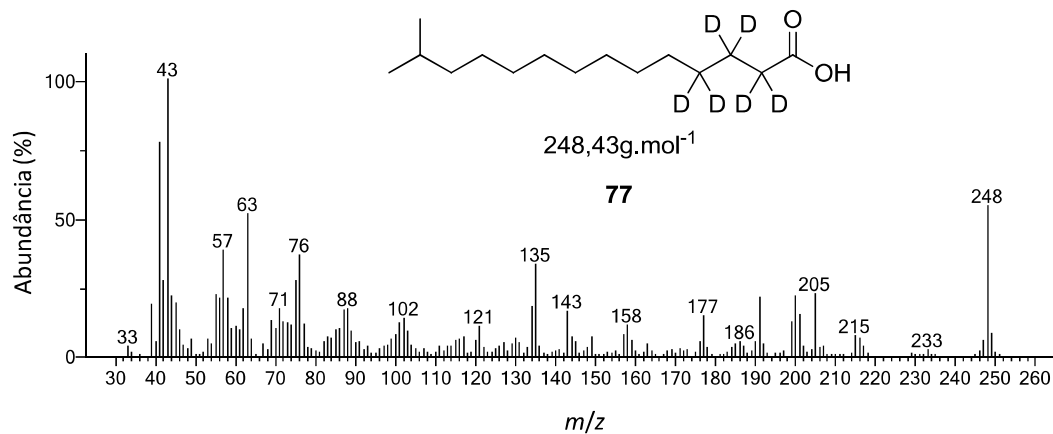
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 77



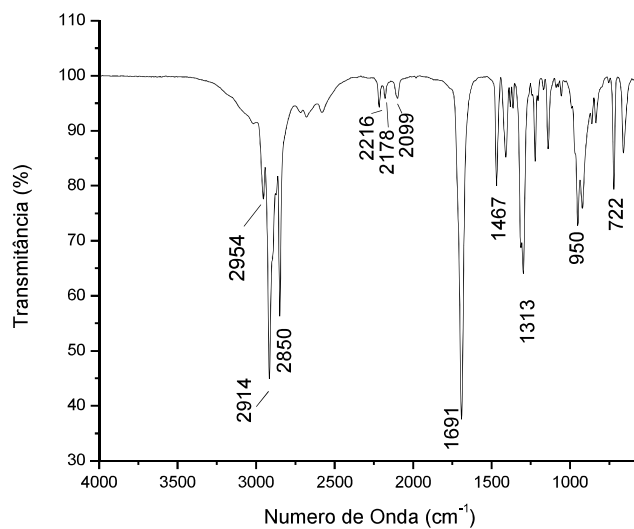
ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 77



## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 77



## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 77

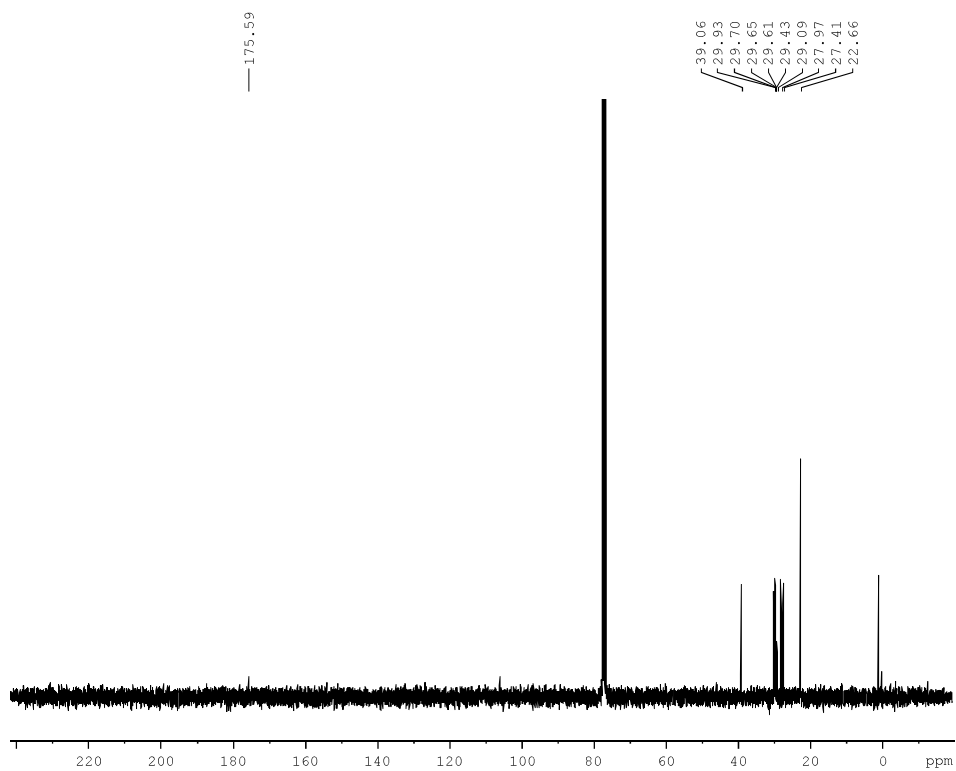




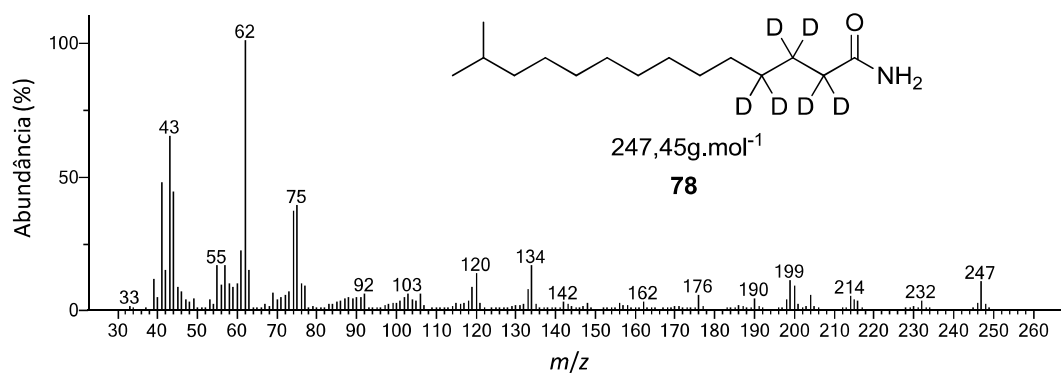
ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO 78



ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 78



## ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 78



## ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 78

