



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

**IVNA RIBEIRO SALMITO MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA  
VIBRACIONAL DO TRITERPENO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO**

**CRATO – CE**

**2013**

**IVNA RIBEIRO SALMITO MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA  
VIBRACIONAL DO TRITERPENO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues  
Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. João Hermínio da Silva  
Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos

**CRATO – CE**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

- 
- M528a      Melo, Ivna Ribeiro Salmito.  
Avaliação da atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional do triterpeno ácido acetil  
aleuritólico / Ivna Ribeiro Salmito Melo. – 2013.  
102f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Cariri, Mestrado em Bioprospecção Molecular,  
Área de concentração: Bioprospecção de produtos naturais.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira.  
Co-orientação: Prof. Dr. João Hermínio da Silva  
Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
1. Ácido acetil aleuritólico. 2. Antimicrobiano. I. Título.

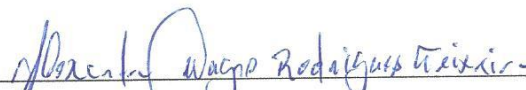
**IVNA RIBEIRO SALMITO MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESPECTROSCOPIA  
VIBRACIONAL DO TRITERPENÓ ACIDO ACETIL ALEURITÓLICO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

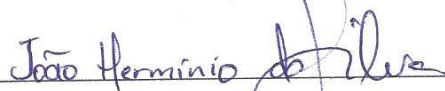
Aprovada em: 4/07/2013

**BANCA EXAMINADORA**



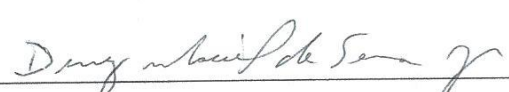
Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira (Orientador)

Universidade Regional do Cariri (URCA)



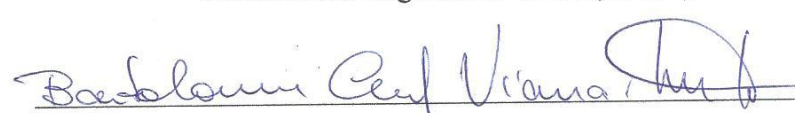
Prof. Dr. João Herminio da Silva (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



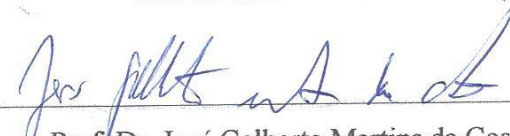
Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior

Universidade Regional do Cariri (URCA)



Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto

Universidade Federal do Piauí (UFPI)



Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Suplente)

Universidade Regional do Cariri (URCA)

Aos meus Pais Esliam e Graça;

Aos Professores:

Alexandre Magno Rodrigues Teixeira,

Diniz Maciel de Sena Junior,

Hécio Silva dos Santos e

João Hermínio da Silva.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS pela força espiritual para concretização deste trabalho e por todas as bênçãos alcançadas.

Aos meus pais, Esliriam Melo e Graça Salmito, que são os pilares da minha vida, obrigada por todo incentivo, amor incondicional, conselhos e carinho que foram essenciais para a minha qualificação acadêmica e formação pessoal.

Ao meu Orientador Alexandre Magno Rodrigues Teixeira por ter me acolhido como orientanda, por toda paciência, pela confiança, pelos ensinamentos e por ser extremamente tranquilo, otimista e incentivador o que tornou agradabilíssima a realização deste trabalho.

Ao meu Co-orientador João Hermínio da Silva pela credibilidade e por todas as palavras de incentivo, durante os momentos de dificuldades, fazendo-me sorrir e acreditar que tudo iria dar certo.

Ao Dr. Hécio Silva dos Santos pela co-orientação e concessão da amostra utilizada nesta dissertação.

Ao Professor Diniz Maciel de Sena Junior por todos os valiosos ensinamentos que foram essenciais para a conclusão deste trabalho e pela imensa paciência.

Ao Dr. Ricardo Rodrigues de França Bento e Dr. Jorge Luiz Brito de Faria, da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pela realização dos Cálculos Computacionais.

Ao Professor Henrique Douglas Melo Coutinho, da Universidade Regional do Cariri (URCA), pelo fornecimento da estrutura necessária para realização das atividades biológicas.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), da Universidade Regional do Cariri (URCA), em especial à Jacqueline Andrade pelo auxílio na realização dos ensaios microbiológicos e por todo apoio.

Ao Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire, da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela disponibilização dos equipamentos para realização das medidas de espectroscopia Infravermelho e espalhamento Raman. Em especial à Marília pelo auxílio na realização destas medidas.

Aos membros da banca pelas valiosas contribuições para melhoria deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ pela concessão das linhagens de bactérias e fungos.

Aos colegas, Gildivan, Gillena Sampaio, Jacielly de Matos e Tatiana Oliveira, do Laboratório de Bioinformática avançada da Universidade Regional do Cariri (URCA), por todos os momentos de aprendizagem e descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA) pela valiosa contribuição na minha formação científica.

Às Secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira por toda prestatividade.

Aos meus colegas de trabalho da Universidade Federal do Ceará (UFC), Carlos Azevedo, Diana Rodrigues, Edson Ferreira, Eduardo Batista, Felipe Cavalcante, Francisco de Assis, João Paulo Saraiva, Karyne Martins, Lainara Lima, Pedro Lopes, Raul Azevedo e Simone Teixeira pelo incentivo e por todos os sorrisos proporcionados que aliviaram meu estresse.

Aos meus amigos Edenia Barros e Rodrigo Lemos por me incentivarem a fazer a seleção de mestrado, por todos os conselhos, apoio psicológico e amizade.

Ao meu amigo Flávio Batista por ter revisado e verificado a formatação do trabalho, pela amizade e por todos os momentos filosóficos sobre vida de TB.

À Lucimara Bandeira por ser uma companheira de morada adorável, preocupa-se com o meu bem-estar e entender meus momentos de estresse.

Ao meu amor Solon Odisio, pelas palavras de incentivo, pelo carinho e por todo apoio emocional.

Aos meus colegas de mestrado (Delmacia Gonçalves, Mayara Maurício, Ronaldo Vieira, Sarah Ribeiro, Simoni de Oliveira) por todos os momentos de estudo e aprendizagem. Em especial a Alison Honório, Ana Luiza Siebra e Damiana Gonçalves que fizeram parte da minha equipe na maioria dos seminários; e a Danielle Oliveira, Eidla Maciel, Heverton Mendes, Laura Inocência, Olga Alcântara e Thiago Almeida (meus companheiros de tequila) por todos os momentos felizes que tornaram o mestrado espetacular e inesquecível.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

“Jesus nunca prometeu um caminho fácil, mas realmente prometeu um que levaria a esquecer as dificuldades da caminhada”.

*William Barclay*



## RESUMO

*Croton* é um gênero de Euphorbiaceae com cerca de 1.300 espécies, amplamente distribuídas no Nordeste do Brasil. Várias espécies têm aplicações na medicina popular no tratamento de uma variedade de doenças. Neste trabalho, apresentamos um estudo por espectroscopias Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) e Infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (FTIR-ATR), cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT), e atividade antimicrobiana do triterpeno ácido acetil aleuritólico ( $C_{32}H_{50}O_4$ ) que foi isolado do caule de *Croton zehntneri*. Os espectros FTIR-ATR e FT-Raman da amostra policristalina do ácido acetil aleuritólico (AAA) foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de  $600\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$  e de  $40\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Adicionalmente, cálculos DFT foram realizados com o propósito de obter informações sobre as propriedades estruturais e vibracionais deste composto orgânico. Os valores das frequências calculadas, ajustadas com fator de escala de 0,9517, apresentaram boa concordância com as frequências experimentais. O teste de atividade biológica foi realizado por um ensaio de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do AAA frente as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e os fungos *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*; e um ensaio de modulação da atividade dos aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e neomicina, e dos antifúngicos anfotericina B, benzoilmetronidazol, mebendazol e nistatina frente as bactérias multirresistentes *E. coli* 27, *S. aureus* 358 e *P. aeruginosa* 03, e as mesmas cepas fúngicas. A CIM do AAA foi de  $128\text{ }\mu\text{g/mL}$  para bactérias e fungos, exceto *C. tropicalis* ( $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), mas esse valor foi semelhante ao do solvente dimetilsulfóxido, e o composto não modificou a atividade dos aminoglicosídeos e antifúngicos. Portanto, o triterpeno AAA não foi promissor como antimicrobiano para as cepas testadas.

**Palavras-chave:** ácido acetil aleuritólico, triterpeno, antimicrobiano, Raman, Infravermelho, Teoria do funcional da densidade.

## ABSTRACT

*Croton* is a genus of Euphorbiaceae comprising around 1300 species, widespread in northeastern Brazil. Several species have applications in popular medicine to treat a variety of diseases. In this work we present a study by attenuated total reflectance Fourier Transform infrared (FTIR-ATR) and Fourier Transform Raman (FT-Raman) spectroscopies, Density Functional Theory (DFT) calculations, and antimicrobial activity of triterpene acetyl aleuritolic acid ( $C_{32}H_{50}O_4$ ), isolated from the stems of *Croton zehntneri*. The FTIR-ATR and FT-Raman spectra of polycrystalline sample of acetyl aleuritolic acid (AAA) were recorded at room temperature in the regions  $600\text{ cm}^{-1}$  to  $4000\text{ cm}^{-1}$  and  $40\text{ cm}^{-1}$  to  $4000\text{ cm}^{-1}$ , respectively. In addition, DFT calculations were performed in order to obtain information about structural and vibrational properties of this organic compound. Calculated frequency values with a scaling factor of 0.9517 were observed to reproduce the experimental values with good agreement. In biological activity tests the minimal inhibitory concentration (MIC) of AAA was determined in a microdilution assay against bacterial *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and fungal *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* and the aminoglycoside modifying activity amikacin, gentamicin and neomycin and antifungal amphotericin B, benzoilmetronidazol, mebendazole, nystatin against multiresistant bacterial *E. coli* 27, *S. aureus* 358 e *P. aeruginosa* 03 and the same fungal. The MIC of AAA was  $128\text{ }\mu\text{g/mL}$  against bacterial and fungal, except *C. tropicalis* ( $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), but the MIC of compound was same the MIC of dimethylsulfoxide solvent and the compound no modifying antibiotic and antifungal activity. However, the triterpene AAA was not efficient as antimicrobial for the strains tested.

**Key words:** acetyl aleuritolic acid, triterpenoid, antimicrobial, Raman, infrared, density functional theory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estruturas químicas dos principais componentes do óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i> , coletada no Nordeste.....	22
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do ácido acetil aleuritólico (C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub> ) .....	25
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do <i>p</i> -bromobenzil 3-acetilmapronoato (C <sub>39</sub> H <sub>55</sub> BrO <sub>4</sub> ) .....	26
<b>Figura 4</b> - Tipos de vibrações moleculares. A - vibrações de estiramento (A1 - simétrico, A2 - assimétrico); B - vibrações de deformação angular (B1 - <i>rocking</i> , B2 - <i>scissoring</i> , B3 - <i>wagging</i> , B4 - <i>twisting</i> ) .....	37
<b>Figura 5</b> - Interferômetro de Michelson .....	38
<b>Figura 6</b> - Reflectância Total Atenuada (ATR).....	39
<b>Figura 7</b> - Mecanismo de espalhamento <i>Rayleigh</i> e Raman.....	41
<b>Figura 8</b> - Planta <i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoffm. ....	46
<b>Figura 9</b> - Espectrômetro utilizado para realizar medidas de FT-IR (A) e FT-Raman (B).....	48
<b>Figura 10</b> - Porta-amostra para realizar medidas utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) na região do Infravermelho.....	48
<b>Figura 11</b> - Microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima. AAA: amostra ácido acetil aleuritólico, DMSO: o solvente dimetilsulfóxido nas concentrações 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL. Os fungos utilizados foram <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>C. krusei</i> (Ck), <i>C. tropicalis</i> (Ct) e as bactérias : <i>Escherichia coli</i> (Ec), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) e <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) .....	53
<b>Figura 12</b> - Microplaca utilizada para ensaio de modulação dos antibióticos (amicacina-A, gentamicina-G e neomicina-N) e dos antifúngicos (anfotericina B-A, benzoilmetronidazol-B, mebendazol-M e nistatina-N). AAA representa a amostra ácido acetil aleuritólico e DMSO o solvente dimetilsulfóxido. Os fungos utilizados foram <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>C. krusei</i> (Ck), <i>C. tropicalis</i> (Ct) e as bactérias: <i>Escherichia coli</i> 27 (Ec), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03 (Pa) e <i>Staphylococcus aureus</i> 358 (Sa) .....	55
<b>Figura 13</b> - Fragmento 1 da molécula ácido acetil aleuritólico .....	58
<b>Figura 14</b> - Fragmento 2 da molécula ácido acetil aleuritólico .....	59
<b>Figura 15</b> - Fragmento 3 da molécula ácido acetil aleuritólico .....	59

<b>Figura 16-</b> Estrutura química otimizada do ácido acetil aleuritólico com a identificação dos átomos de acordo com o elemento químico (carbono, oxigênio e hidrogênio).....	60
<b>Figura 17-</b> Espectro FT-Raman da molécula ácido acetil aleuritólico à temperatura ambiente na região espectral de $3.500\text{ cm}^{-1}$ a $250\text{ cm}^{-1}$ .....	62
<b>Figura 18-</b> Espectro FTIR-ATR da molécula ácido acetil aleuritólico à temperatura ambiente na região espectral de $3.500\text{ cm}^{-1}$ a $500\text{ cm}^{-1}$ .....	62
<b>Figura 19-</b> Distribuição das intensidades das bandas Raman (FT-Raman ) do ácido acetil aleuritólico .....	71
<b>Figura 20-</b> Distribuição das intensidades das bandas Infravermelho (FTIR-ATR) do ácido acetil aleuritólico.....	72

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1-</b> Perfil de Resistência das bactérias aos antibióticos .....	52
<b>Tabela 1-</b> Tipos de graus de liberdade e quantidade de transições de acordo com a geometria molecular .....	33
<b>Tabela 2-</b> Regiões espectrais do Infravermelho.....	35
<b>Tabela 3-</b> Parâmetros da amplitude normalizada utilizados para classificação da intensidade das bandas de FT-IR ( $\omega_{FT-IR}$ ) e FT-Raman ( $\omega_{FT-Raman}$ ) obtidas experimentalmente.....	51
<b>Tabela 4-</b> Número de onda calculado ( $\omega_{calc}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{esc}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{FT-Raman}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{FT-IR}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de $cm^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $C_{32}H_{50}O_4$ ).....	64
<b>Tabela 5-</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acetil aleuritólico (AAA) e dimetilsulfóxido (DMSO) frente às cepas bacterianas .....	74
<b>Tabela 6-</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acetil aleuritólico (AAA) e dimetilsulfóxido (DMSO) frente às cepas fúngicas .....	75
<b>Tabela 7-</b> Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ( $\mu g/mL$ ) na presença de 16 $\mu g/mL$ do ácido acetil aleuritólico (AAA) ou DMSO frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> 27 (EC27), <i>Staphylococcus aureus</i> 358 (SA358) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03 (PA03) .....	76
<b>Tabela 8-</b> Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos ( $\mu g/mL$ ) na presença de 16 $\mu g/mL$ do ácido acetil aleuritólico (AAA) ou DMSO frente aos fungos <i>Candida albicans</i> 40006, <i>C. krusei</i> 6258 e <i>C. tropicalis</i> 13803 .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAA</b>	ácido acetil aleurítico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATR</b>	reflexão total atenuada ( <i>attenuated total reflectance</i> )
<b>B3LYP</b>	funcional de troca de 3 parâmetros de Becke (B3), funcional de correlação Lee-Yang-Parr (LYP)
<b>BHI</b>	infusão de cérebro e coração ( <i>brain heart infusion</i> )
<b>CCD</b>	cromatografia de camada delgada
<b>CGAR</b>	cromatografia gasosa de alta resolução
<b>CI</b>	concentração inibitória média
<b>CIM</b>	concentração inibitória mínima
<b>CLAE</b>	cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CZ-EtOH</b>	extrato etanólico de <i>Croton zehntneri</i>
<b>DCTN</b>	trans-desidrocotina
<b>DEPT 135</b>	incremento sem distorção por transferência de polarização ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> )
<b>DFT</b>	teoria do funcional da densidade ( <i>density functional theory</i> )
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EM</b>	espectrometria de massas
<b>FTIR</b>	infravermelho com transformada de Fourier ( <i>Fourier transform infrared</i> )
<b>FT-Raman</b>	espalhamento Raman com transformada de Fourier ( <i>Fourier transform Raman</i> )
<b>HIA</b>	ágar Infusão de coração ( <i>heart infusion agar</i> )
<b>HMBC</b>	correlação heteronuclear de múltiplas ligações ( <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i> )
<b>HSQC</b>	correlação heteronuclear de quantum-simples ( <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i> )
<b>IDH</b>	índice de deficiência de hidrogênio
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>IR</b>	infravermelho
<b>LDA</b>	aproximação da densidade local ( <i>local density approximation</i> )
<b>RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C</b>	ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13

<b>RNA</b>	ácido ribonucléico ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>SFE</b>	extração com fluido supercrítico ( <i>supercritical fluid extraction</i> )
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colônia
<b>UV-Vis</b>	ultravioleta–visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\theta$	ângulo de incidência
$\eta_1$	índice de refração do cristal
$\eta_2$	índice de refração da amostra
$\omega_i^{\text{exp}}$	frequência experimental
$\omega_i^{\text{teórico}}$	frequência calculada ou teórica
$d_p$	profundidade da penetração efetiva
$E_{\text{Eletrônica}}$	energia eletrônica
$E_{\text{Rotacional}}$	energia rotacional
$E_{\text{Total}}$	energia total
$E_{\text{Vibracional}}$	energia vibracional
$N$	número de modos vibracionais com correspondência entre as frequências calculadas e as experimentais
$\text{rms}_{\text{tot}}$	erro quadrático total ( <i>overall root mean square error</i> )
$\Delta_{\text{min}}$	resíduos minimizados
$\nu_0$	frequência da luz incidente
$\nu_m$	frequência vibracional da molécula
$\omega_{\text{calc}}$	número de onda calculado
$\omega_{\text{esc}}$	número de onda escalonado
$\omega_{\text{FT-IR}}$	número de onda experimental na região do infravermelho
$\omega_{\text{FT-Raman}}$	número de onda experimental na região do Raman
$\lambda$	fator de escala



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Considerações sobre o gênero <i>Croton</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Componentes químicos do gênero <i>Croton</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Atividades biológicas de <i>Croton zehntneri</i></b> .....	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Considerações sobre o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Tratamentos para infecções bacterianas e fúngicas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Resistência a antimicrobianos</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Espectroscopia molecular</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Espectroscopia no Infravermelho</b> .....	<b>35</b>
<b>3.9.1</b>	<b><i>Regiões espectrais no Infravermelho</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.9.2</b>	<b><i>Modos normais de vibração</i></b> .....	<b>36</b>
<b>3.9.3</b>	<b><i>Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3.9.4</b>	<b><i>Reflectância total atenuada (ATR)</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.10</b>	<b>Espectroscopia Raman</b> .....	<b>40</b>
<b>3.10.1</b>	<b><i>Espalhamento Rayleigh e Espalhamento Raman</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.10.2</b>	<b><i>Espalhamento Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)</i></b> .....	<b>42</b>
<b>3.11</b>	<b>Cálculos computacionais de primeiros princípios</b> .....	<b>43</b>
<b>3.11.1</b>	<b><i>Teoria do Funcional da Densidade (DFT)</i></b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Extração e isolamento</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Espectroscopia</b> .....	<b>47</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>Medidas FT-Raman e FT-Infravermelho</i></b> .....	<b>47</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>Métodos computacionais</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>51</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Preparação da amostra</i></b> .....	<b>51</b>
<b>4.4.2</b>	<b><i>Cepas bacterianas e fúngicas</i></b> .....	<b>51</b>

4.4.3	<i>Obtenção do inóculo</i> .....	52
4.4.4	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i> .....	53
4.4.5	<i>Modulação da atividade de aminoglicosídeos e antifúngicos</i> .....	54
4.4.6	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana</i> .....	56
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
5.1	<b>Determinação estrutural do ácido acetil aleurítico</b> .....	57
5.2	<b>Análise estrutural</b> .....	59
5.2.1	<i>Estrutura química do ácido acetil aleurítico (AAA)</i> .....	59
5.2.2	<i>Parâmetros geométricos do ácido acetil aleurítico</i> .....	61
5.3	<b>Espectroscopia vibracional</b> .....	61
5.3.1	<i>Dados experimentais de FT-Raman e FTIR-ATR do AAA</i> .....	61
5.3.2	<i>Comparação entre dados experimentais e calculados e classificação dos modos vibracionais</i> .....	63
5.4	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	73
5.4.1	<i>Concentração inibitória mínima do ácido acetil aleurítico</i> .....	73
5.4.2	<i>Atividade moduladora de aminoglicosídeos e antifúngicos</i> .....	76
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
	<b>APÊNDICES</b> .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Croton* e seus fitoquímicos estão entre os temas mais investigados nas áreas de química dos produtos naturais, farmacologia e etnofarmacologia, e novos dados são divulgados no meio científico rapidamente. Diversas partes da planta de *Croton* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de vários problemas de saúde (bronquite, câncer, diabetes, distúrbios gastrointestinais e hepáticos, dor, hipertensão, inflamação, leucemia, malária, reumatismo e úlceras). Os cientistas tentam relacionar o uso da planta medicinal com o efeito observado em ensaios farmacológicos dos extratos e substâncias isoladas. Apesar do amplo interesse da comunidade científica, considerando-se a diversidade do gênero, a lista de espécies estudadas ainda é demasiadamente escassa. A espécie *Croton zehntneri* Pax. et Hoffm. tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas, sendo indicada como uma planta de grande potencial econômico na região nordeste do Brasil (SALATINO *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

O metabólito secundário, diterpeno, e os constituintes do óleo essencial, monoterpenos e sesquiterpenos, são os mais estudados no gênero *Croton*. Já o grupo dos terpenoides é tão complexo e diverso que vários compostos não tiveram suas atividades elucidadas (DEWICK, 2009; FELIU, 2011). O ácido acetil aleuritólico (AAA) é um terpenoide que é pouco relatado na literatura em relação a caracterização da estrutura molecular e propriedades espectroscópicas, atividade antimicrobiana, como antifúngica e moduladora de drogas, e atividade farmacológica.

Antes de ser explorada tecnologicamente, é fundamental que a substância seja caracterizada para se descobrir as principais características químicas, físicas, biológicas e, eventualmente, farmacológicas, medicinais, entre outras. O conhecimento dos parâmetros físico-químicos de uma molécula é de extrema importância na indústria farmacêutica, visto que é possível a partir disso: comparar a estrutura das moléculas, gerando um índice de similaridade e correlacionar com a atividade farmacológica, como também modificar a molécula a fim de se alterar a solubilidade para melhorar a biodisponibilidade em ensaios *in vivo* e *in vitro*, além de aumentar a potência e segurança, garantindo assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (RODRIGUES, 2001; SANTOS *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2008; GUIMARÃES, 2011).

Os métodos computacionais, utilizando cálculos de primeiros princípios ou *ab initio* para caracterização de uma molécula estão se tornando cada vez mais importantes em várias áreas da física e da química. A partir dessa técnica é possível analisar as ligações químicas, calcular a energia de ionização, afinidades eletrônicas, a polarizabilidade, estudar os modos normais de vibração, os espectros de absorção e de emissão, susceptibilidades e propriedades de ressonância magnética (RMN) de moléculas com potencial tecnológico (MARQUES; BOTTI, 2006).

Na literatura existem alguns trabalhos relatando as atividades biológicas para o AAA isolado a partir de espécies de *Croton*, como antibacteriana, antiespasmódica, anti-inflamatória e antinoceptiva (PERES *et al.*, 1997; MACIEL *et al.*, 1998; 2000; PERAZZO *et al.*, 2007). Contudo, não foi relatada a influência do AAA na atividade antifúngica e como modificador da atividade de antifúngicos e antibióticos. Esta dissertação irá abordar esse tema, visto que a síntese de novas substâncias antimicrobianas com efeito indireto ou direto sobre o micro-organismo é importante, tendo em vista o aumento da resistência as drogas, e consequentemente, o aumento da morbidade e mortalidade causada pelas infecções. Também não há nenhuma publicação com a identificação das propriedades vibracionais e estruturais, utilizando-se espectroscopias de Infravermelho e Raman. Existe apenas a caracterização do AAA por espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) (MCLEAN *et al.*, 1987; BARRETO *et al.*, 2013). Uma melhor elucidação da estrutura do AAA será de extrema relevância para subsidiar trabalhos futuros que abordem a modelagem molecular. Além disso, o AAA apresenta uma baixa solubilidade em água o que prejudica sua biodisponibilidade, então o conhecimento das propriedades estruturais da molécula poderá contribuir com a modificação molecular sem prejuízo da atividade biológica (GIL *et al.*, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização do composto ácido acetil aleuritólico (AAA) por meio de técnicas espectroscópicas de Infravermelho e Raman, identificar os modos vibracionais e as propriedades estruturais da molécula por meio de cálculos computacionais de primeiros princípios, além de avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica deste composto e a modulação de antibióticos e antifúngicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar medidas de Infravermelho e Raman no composto ácido acetil aleuritólico (AAA);
- Fazer cálculos computacionais, usando a Teoria do Funcional da Densidade, para otimização da geometria da molécula e obtenção das frequências teóricas;
- Comparar as frequências experimentais obtidas por espalhamento Raman e espectroscopia Infravermelho com aquelas obtidas por cálculos computacionais;
- Classificar os modos normais de vibração da molécula AAA com base na visualização dos estiramentos e deformações angulares;
- Verificar a atividade antimicrobiana do AAA frente a bactérias (Gram negativas e Gram positivas) e fungos, determinando a concentração inibitória mínima do composto;
- Avaliar o efeito exercido pelo AAA como modificador da atividade de aminoglicosídeos frente a linhagens bacterianas multirresistentes e modulador de antifúngicos frente a fungos patogênicos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Considerações sobre o gênero *Croton*

*Croton* L. representa o segundo maior e mais diverso gênero da família Euphorbiaceae e possui em torno de 1.300 espécies com porte arbóreo, arbustivo ou herbáceo, sendo amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (GOVAERTS *et al.*, 2000; SALATINO *et al.*, 2007). As espécies desse gênero ocorrem predominantemente nas Américas, embora algumas espécies atinjam a África, Ásia e Oceania. Os principais centros de diversidade do gênero encontram-se na América do Sul, Antilhas e México (BURGER; HUFT, 1995). No Brasil, existem em torno de 354 espécies de *Croton* (BERRY, 2002).

As plantas do gênero *Croton* têm sido foco de grande interesse para as pesquisas científicas, visto que é muito utilizada pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Salatino *et al.* (2007) relatam em seu trabalho várias plantas do gênero *Croton* nativas da América do Sul, América do Norte e Central, África e Ásia, que possuem uso tradicional como planta medicinal e que tiveram os seus efeitos farmacológicos comprovados cientificamente. Dentre as diversas espécies presentes na América do Sul que têm sido ressaltadas em pesquisas de prospecção fitoquímica das propriedades medicinais estão: *Croton betulaster* Müll. Arg., *C. brasiliensis* Müll. Arg., *C. cajucara* Benth., *C. celtidifolius* Baill., *C. dracanooides* Müll. Arg., *C. eluteria* Bennett., *C. lechleri* L., *C. lobatus* L., *C. luetzelburgii* Pax. et Hoffm., *C. malambo* Karst., *C. moritibensis* Baill., *C. muscicarpa* Müll. Arg., *C. nepetaefolius* Baill., *C. palanostigma* Klotzsch., *C. salutaris* Casar., *C. schiedeanus* Schlecht., *C. sellowii* Baill., *C. sonderianus* Müll. Arg., *C. urucurana* Baill., e *C. zehntneri* Pax. et Hoffm. Algumas espécies não têm recebido suporte científico suficiente e não tiveram seu uso popular como planta medicinal comprovados em ensaios farmacológicos, como é o caso de *C. eluteria* (bronquite, febre, malária), *C. palanostigma* (feridas e problemas digestivos), *C. urucurana* (dor) e *C. zehntneri* (anorexia).

### 3.2 Componentes químicos do gênero *Croton*

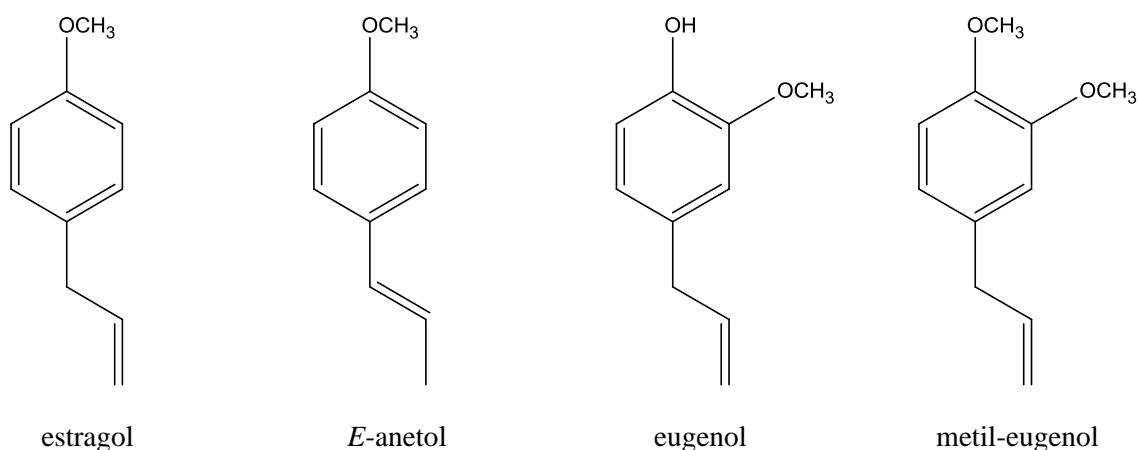
A composição química das plantas do gênero *Croton* é bem diversa e parece existir uma afinidade química entre as espécies relacionada com a distribuição geográfica (SALATINO *et al.*, 2007). Entre os metabólitos secundários constituintes do *Croton*, o terpenoide é o predominante, principalmente, a classe dos diterpenos que possuem os seguintes tipos de esqueleto: cembranoides, clerodanos, neoclerodanos, halimanos, isopimaranos, cauranos, sarcopetalanos, labdanos, ésteres do forbol e traquilobanos (BLOCK *et al.*, 2004). Várias espécies do gênero são aromáticas, indicando a presença de óleos voláteis que podem conter mono e sesquiterpenoides e, às vezes, compostos derivados do chiquimato (OLIVEIRA *et al.*, 2001a; LOPES *et al.*, 2003; SALATINO *et al.*, 2007). As plantas do gênero *Croton* também são fontes de diferentes classes de alcaloides, sendo que esse metabólito não é tão comum em plantas da família Euphorbiaceae (AMARAL; BARNES, 1998; MILANOWSKI *et al.*, 2002). Já o látex é uma substância característica de Euphorbiaceae e geralmente está associado a propriedades medicinais. Várias espécies de *Croton* contêm esse composto que pode ser de cor vermelha e conter pró-antocianidinas e/ou alcaloides (SANDOVAL *et al.*, 2002; RISCO *et al.*, 2003). Outros metabólitos frequentemente relatados são os triterpenos e compostos fenólicos, como flavonoides, lignoides e pró-antocianidinas (SALATINO *et al.*, 2007; BARRETO *et al.*, 2013).

Segundo COSTA *et al.* (2008) existe uma variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos óleos essenciais. O óleo volátil obtido a partir de brotos de *C. zehntneri* é composto principalmente por fenilpropanoides, como anetol, metileugenol e estragol (BATATINHA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2001a).

No trabalho de Moraes *et al.* (2006a) foi observado que existe uma diferença na composição química dos óleos essenciais dependendo da localidade em que a planta é coletada. Foram encontrados para a espécie de *C. zehntneri*, coletadas no Nordeste, quatro tipos químicos: anetol, para os exemplares coletados em Fortaleza - CE e Viçosa - CE, eugenol- para os coletados em Areia Branca - RN e Quixadá - CE, metil-eugenol - para os coletados em Ipu - CE e Oeiras - PI, estragol - para os exemplares coletados em Tianguá - CE e Granja - CE. As estruturas químicas dos compostos presentes no óleo essencial dos quatro tipos químicos de *C. zehntneri* estão representadas na Figura 1. Esse mesmo autor também observou uma diferença na composição química entre os óleos essenciais obtidos a partir de

*C. zehntneri*, coletado em Viçosa em diferentes horários (6 h e 13 h). O componente majoritário foi o *E*-anetol, independente da hora de coleta. Na planta de *C. zehntneri* coletada pela manhã (6 h), o *E*-anetol (47,34 %) apresenta-se em maior percentual que o somatório do *para*-anisalaldeído com o formiato de anisila (30,81 %), que são considerados seus produtos de oxidação. Já na planta coletada pela tarde (13h), esses produtos juntos (43,84 %) representam um maior percentual que o *E*-anetol (30,97 %). Verificou-se também que alguns metabólitos ocorrem somente em uma das amostras. Apenas no óleo coletado pela manhã foi encontrado estragol,  $\alpha$ -guaieno e  $\beta$ -selineno, já no óleo coletado pela tarde foi encontrado  $\alpha$ -pineno, canfeno e *E*-metil-iso Eugenol que não estavam presentes no outro óleo.

**Figura 1-** Estruturas químicas dos principais componentes do óleo essencial de *Croton zehntneri*, coletada no Nordeste



Fonte: Morais *et al.* (2006a).

Em outro estudo, realizado por SOUSA *et al.* (2005), foi observado que os componentes químicos também podem variar de acordo com o método de extração. Foram comparados os três métodos seguintes: extração com fluido supercrítico (SFE), utilizando-se dióxido de carbono como meio de extração; destilação a vapor e extração com etanol. O componente majoritário para os três métodos foi o mesmo, o *E*-anetol. No óleo obtido a partir da destilação a vapor não foi encontrado o beta-bisabolol e na extração por etanol foram obtidos menos metabólitos, não sendo observado nem o estragol que é relatado como componente majoritário de *C. zehntneri* por outros autores (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; COELHO DE SOUSA *et al.*, 1997).



Dentre os compostos presentes em *C. zehntneri* os que são mais estudados são os diterpenos e óleos essenciais. Já os terpenoides são o grupo mais complexo e diversificado dos metabólitos secundários, sendo a diversidade tão grande que vários compostos não tiveram suas atividades elucidadas (DEWICK, 2009; FELIU, 2011). O ácido acetil aleuritólico (AAA) é um terpenoide que é pouco relatado na literatura em relação a caracterização da estrutura química e propriedades espectroscópicas, bem como quanto a avaliação da atividade antimicrobiana, como antifúngica e moduladora de drogas, além da atividade farmacológica.

### 3.3 Atividades biológicas de *Croton zehntneri*

Dentre as espécies de *Croton* relatadas na literatura que tiveram as propriedades farmacológicas e antimicrobianas do extrato, do óleo essencial ou de substâncias isoladas investigadas e comparadas com o uso popular está a espécie *Croton zehntneri*.

A espécie *C. zehntneri* é uma planta indígena que se desenvolve na vegetação da Caatinga (SOUSA *et al.*, 2005), sendo popularmente conhecida como canela-de-cunhã, canelinha ou canela-brava. Essa planta possui hábito arbustivo, apresenta ramos finos de cor castanho escuro, pequenas folhas caducifólias com formato oval e que possuem tricomas estrelados, além disso, apresenta um forte aroma de anis, lembrando uma mistura de erva doce e cravo da índia (CRAVEIRO *et al.*, 1981; COSTA *et al.*, 2008). *C. zehntneri* é uma espécie endêmica do Brasil e está distribuída somente na região Nordeste, abrangendo os estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (CORDEIRO *et al.*, 2013).

A infusão das folhas de *C. zehntneri* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios nervosos e gástricos, tais como insônia (ação sedativa), anorexia (estimulador de apetite), má digestão e distúrbios gastrointestinais (ação antiespasmódica da musculatura do intestino). Essa planta também é empregada na área alimentícia, suas folhas, galhos e cascas são utilizados em alimentos e bebidas como adoçante, bem como podem ser usados durante o cozimento de alimentos para temperar. Dentre as atividades farmacológicas citadas a única que não foi investigada pela comunidade científica foi o efeito do *C. zehntneri* no tratamento de anorexia (SOUSA *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008).

Em relação ao efeito exercido pelo óleo volátil de *C. zehntneri* foram observadas as atividades antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006a), antibacteriana (COSTA *et al.*, 2008), moduladora do aminoglicosídeo gentamicina (RODRIGUES *et al.*, 2009), antifúngica (FONTENELLE *et al.*, 2008), larvicida para *Aedes aegypti* (MORAIS *et al.*, 2006b) e antihelmíntica para a eclosão de ovos e desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus in vitro*, bem como em testes *in vivo* para *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*, que são nematoides parasitas de camundongos (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007). Foi observado também o efeito do óleo na cicatrização de feridas (CAVALCANTI *et al.*, 2012), o efeito relaxante do músculo liso, que justifica seu uso na medicina tradicional como antiespasmódico gastrointestinal (COELHO DE SOUSA *et al.*, 1997; 1998), o efeito antinocepcivo, geralmente associado com a atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2001a) e o efeito cardiovascular na hipotensão (SIQUEIRA *et al.*, 2006). Além disso, foi verificado que o óleo essencial obtido a partir da casca e de folhas de *C. zehntneri* provoca depressão no sistema nervoso central em ratos (LAZARINI *et al.*, 2000).

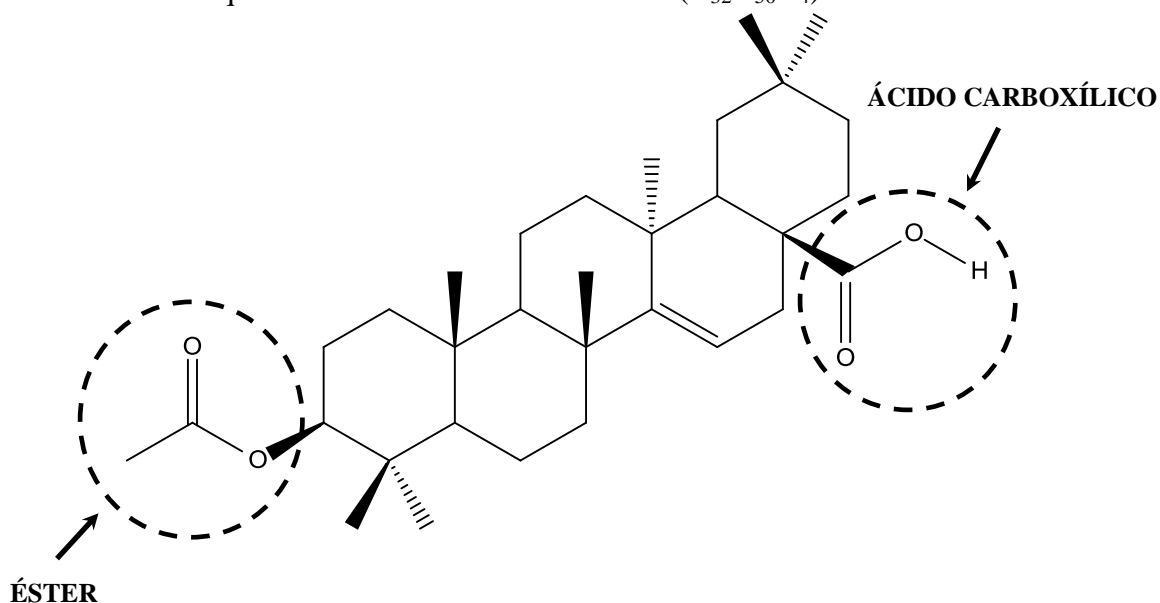
Em relação a atividade farmacológica de compostos isolados de *C. zehntneri*, foi observado que o anetol (fenilpropanóide) possui efeito anticarcinogênico (CHAINY *et al.*, 2000), que o anetol e o estragol (componentes majoritários) são efetivos no relaxamento de músculos esqueléticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995) e que o metileugenol possui efeito antidepressivo em ratos (NORTE *et al.*, 2005). Enquanto que o óleo essencial de *C. zehntneri* provocou depressão em ratos, o metileugenol, que é o componente majoritário, teve efeito antidepressivo, utilizando-se um modelo experimental semelhante. Portanto, estudar o efeito de substâncias isoladas é de extrema importância para se verificar a qual componente de um determinado óleo essencial é atribuída a atividade farmacológica, a fim de se produzir a formulação química dos medicamentos. O trabalho de Norte *et al.* (2005) demonstra que o componente majoritário metileugenol não é o responsável pelo efeito depressivo, visto que ao ser analisado seu efeito isolado foi observada uma atividade oposta (antidepressiva).

### **3.4 Considerações sobre o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA)**

Os terpenoides são constituídos por unidades isoprênicas pentacarbonadas que são classificados quanto ao número de unidades de isoprenos em sua estrutura, podendo ser monoterpenos (2 unidades, 10 carbonos), sesquiterpenos (3 unidades, 15 carbonos), diterpenos (4 unidades, 20 carbonos), triterpenos (6 unidades, 30 carbonos), carotenoides

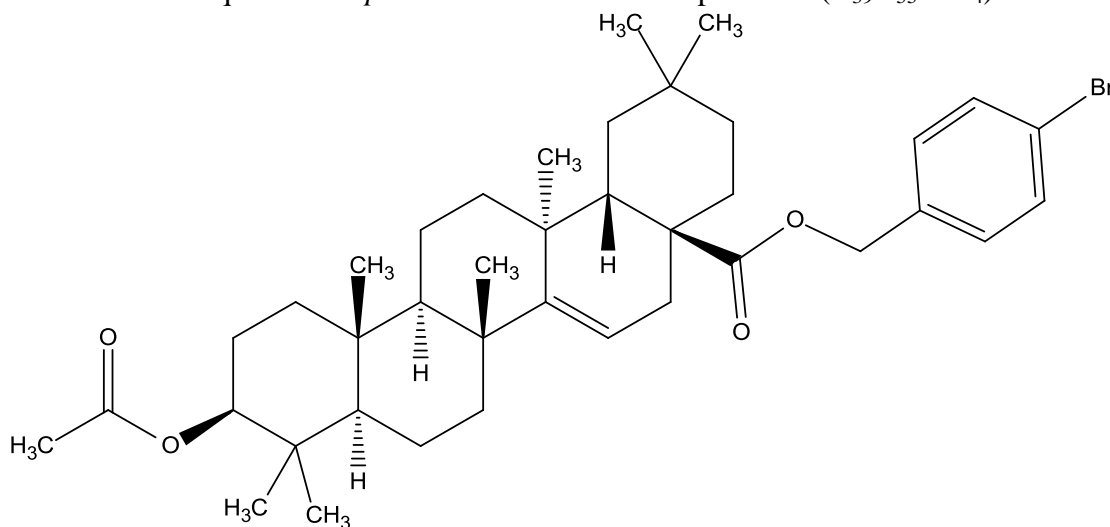
(8 unidades, 40 carbonos) e esteroides, que são sintetizados a partir do triterpeno (DEWICK, 2009). O ácido acetil aleuritólico (AAA) é classificado como um triterpeno e possui 2 grupos funcionais: um éster e um ácido carboxílico. A estrutura química do AAA pode ser observada na Figura 2.

**Figura 2**– Estrutura química do ácido acetil aleuritólico ( $C_{32}H_{50}O_4$ )



O ácido acetil aleuritólico foi isolado pela primeira vez a partir da casca de *Aleurites montana* em 1970 (MISRA, KHASTGIR, 1970). Em 1987, a estrutura do AAA foi caracterizada por espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN), empregando técnicas 1D e 2D (MCLEAN *et al.*, 1987). Em 1989, a determinação da estrutura tridimensional da molécula AAA foi feita indiretamente por meio da análise cristalográfica da molécula *p*-bromobenzil 3-acetilmapronoato ( $C_{39}H_{55}BrO_4$ ), utilizando a técnica de difração de Raios-X (MCPHAIL *et al.*, 1989). A molécula  $C_{39}H_{55}BrO_4$  (Figura 3) é derivada do ácido maprounico, um produto natural isolado de *Maprounea africana*, sendo que esse composto possui estrutura esquelética semelhante aquela do AAA ( $C_{32}H_{50}O_4$ ). As estruturas químicas destas moléculas estão disponíveis no Banco de Dados Estrutural de Cambridge (Cambridge Structural Database - CSD) (GIL *et al.*, 2008). McPhail *et al.* (1989) justificaram que a determinação da estrutura tridimensional do AAA teve que ser feita com o derivado *p*-bromobenzil, pois não foi possível a obtenção de cristais de ácido acetil aleuritólico de forma isolada.

**Figura 3-** Estrutura química do *p*-bromobenzil 3-acetilmapronoato (C<sub>39</sub>H<sub>55</sub>BrO<sub>4</sub>)



O triterpeno ácido acetil aleuritólico tem sido relatado como constituinte de várias espécies de Euphorbiaceae, tendo sido isolado de algumas espécies de *Croton* nativas do Brasil. Esse composto foi obtido a partir da casca do caule de *C. urucurana* (PERES *et al.*, 1997), a partir da raiz, casca do caule e folha de *C. cajucara* (MACIEL *et al.*, 1998; 2000), a partir da casca do caule de *C. pseudopulchellus* (LANGAT *et al.*, 2012) e a partir dos galhos sem as folhas e inflorescências de *C. muscicarpa* (BARRETO *et al.*, 2013). Esse composto também já foi isolado de plantas de outros gêneros: a partir do rizoma de *Jatropha isabelli* (PERTINO *et al.*, 2007), da casca do caule de *Spirostachys africana* (MATHABE *et al.*, 2008) e de folha e raiz de *Alchornea cordifolia* (MAVAR-MANGA *et al.*, 2008).

Na literatura foram relatadas algumas atividades biológicas do AAA isolado de espécies de Euphorbiaceae. Verificou-se a partir do AAA extraído de *C. urucurana* a atividade antibacteriana frente as cepas *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (PERES *et al.*, 1997); a partir do AAA isolado de *Spirostachys africana* o efeito antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Shigella dysentery*, *Shigella flexnerii* e *Shigella boydii* (MATHABE *et al.*, 2008); a partir do AAA isolado de *C. Cajucara*, observou-se a ação antiespasmódica, pois houve redução da motilidade gastrointestinal; ação anti-inflamatória por meio da redução do edema de pata (induzido por carragenina, dextrina e histamina); antinoceptiva (constricção abdominal induzida pelo ácido acético). O AAA não foi efetivo na redução do dano da mucosa (úlceras), atividade antinoceptiva (utilizando o método da placa quente) e antitumoral (MACIEL *et al.*, 1998; 2000; PERAZZO *et al.*, 2007).

Quanto a presença do AAA nas diversas partes da planta, foi observado que os componentes majoritários da casca do caule são: o ácido acetil aleurítico (AAA) e o *trans*-desidrocotina (DCTN), tendo uma diferença na quantidade de composto presente na casca de acordo com a idade da planta. O AAA foi encontrado como componente majoritário na casca do caule em plantas jovens com 18 meses de idade, enquanto que o DCTN não foi detectado. Já em plantas com 3-6 anos de idade, o triterpeno AAA foi encontrado em pequenas quantidades, enquanto que o diterpeno DCTN foi o componente majoritário da casca do caule. O triterpeno também foi encontrado nas raízes de plantas com 18 meses de idade, mas estava ausente em galhos, caule e folhas de plantas velhas (MACIEL *et al.*, 2000).

### 3.5 Doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos

As bactérias que mais provocam mortes no mundo são *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, visto que são resistentes a múltiplas drogas. Os processos infecciosos causados por esses micro-organismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA *et al.*, 2011). As infecções humanas que tem como alvo a pele e mucosa constituem um problema sério, principalmente nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. Os patógenos mais frequentes em doenças infecciosas são os dermatófitos (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*) e os fungos do gênero *Candida* spp (GURGEL *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2009).

*Escherichia coli* possui formato bacilar, é aeróbio e anaeróbio facultativo, pertence ao grupo de bactérias Gram negativas, da família Enterobacteriaceae e produz enteroxinas que podem estar envolvidas nas doenças diarreicas (MURRAY, 2004; MATIAS *et al.*, 2011). Essa bactéria está presente na microbiota normal do trato intra-intestinal dos animais (incluindo o homem). Entretanto, dentre as cepas de *E. coli*, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (SILVA *et al.*, 2003). Linhagens patogênicas de *E. coli* têm sido evidenciadas como causa primária de infecções no trato urinário, meningite neonatal, septicemia nosocomial e enterites em seres humanos. (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram positivos, é aeróbio e anaeróbio facultativo. Este micro-organismo é facilmente encontrado na

pele e nas mucosas dos seres humanos e aves. Essa bactéria é comumente o agente etiológico que causa infecções purulentas em diversos tecidos e órgãos, podendo provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, miocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa e ubíqua ambiental. Nos seres humanos, é responsável pelas infecções crônicas pulmonares eventuais e muitas vezes fatais em pacientes imunocomprometidos ou portadores de fibrose cística (LYCZAK *et al.*, 2000; ROWE *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* é a terceira causa principal de infecções hospitalares (BONOMO; SZABO, 2006). Por ter preferência por locais úmidos, é encontrada com maior facilidade em áreas do corpo humano como orofaringe, axilas, períneo e mucosa nasal, sendo o trato gastrointestinal sua principal área de colonização (FERREIRA, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram negativa, com formato bacilar e pertence a família Enterobacteriaceae sendo conhecida como patógeno causador da pneumonia adquirida na comunidade. Ao longo dos anos a incidência de pneumonia adquirida atribuída a *K. pneumoniae* vem diminuindo, no entanto é extremamente comum a associação desse patógeno com infecções do trato urinário, corrente sanguínea, intra-abdominal e pneumonia (CHANG *et al.*, 2005; KEYNA; RUBINSTEIN, 2007).

Espécies de *Candida* são reconhecidas como as leveduras mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *Candida albicans* seu agente etiológico mais frequente. Ainda, outras espécies inseridas no gênero *Candida* (por exemplo: *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LIMA *et al.*, 2006).

### **3.6 Tratamentos para infecções bacterianas e fúngicas**

A incidência de infecções causadas tanto por fungos como bactérias vem aumentando consideravelmente devido a indução de resistência das bactérias aos antibióticos e ao desenvolvimento de toxicidade, após o tratamento prolongado com muitos antifúngicos (GIORDANI *et al.*, 2001). O tratamento convencional para doenças causadas por fungos é

limitado em comparação com a terapia para infecções bacterianas, visto que o fungo é eucarionte, portanto torna-se difícil o desenvolvimento de uma droga que seja seletivamente tóxica para fungo e não para as células do hospedeiro (HARRIS, 2002). Vários compostos químicos, sintéticos ou semi-sintéticos e produtos naturais, estão sendo elucidados por causa de suas propriedades antimicrobianas. O uso de extratos de plantas e fitoquímicos com propriedades antifúngicas e antibacterianas têm importância significativa para o tratamento terapêutico (FONTENELLE *et al.*, 2007; MATIAS *et al.*, 2011; MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013). Os compostos que potencializam a atividade de uma droga ou que revertem a resistência ao antibiótico são classificados como modificadores da atividade da droga ou moduladores (COUTINHO *et al.*, 2010; MATIAS *et al.*, 2011). A pesquisa por novos produtos com atividade antimicrobiana direta, bem como agente modificador da resistência a antibióticos e antifúngicos é de extrema importância para reduzir a morbidade e mortalidade como consequência de infecções. Assim, são incentivados os estudos para descobrir alternativas que sejam mais eficiente, barata e menos tóxica do que a terapia tradicional (CAVALEIRO *et al.*, 2006).

Das drogas existentes para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, a quantidade de fármacos antifúngicos em uso é limitada se comparada com os antibióticos e, na maioria das vezes, possuem alguma limitação na eficácia ou na toxicidade terapêutica (RUIZ-HERRERA; SAN-BLAS, 2003).

Uma das classes de antibióticos amplamente utilizados são os aminoglicosídeos. Esse fármaco contém um anel aminociclitol que pode ser uma estreptidina ou uma 2-desoxiestreptamina que são conectados a dois ou mais açúcares por ligações glicosídicas. São caracterizados também como compostos polares, carregados positivamente (catiônicos). A maioria dos aminoglicosídeos são produzidos naturalmente por Actinomicetos do gênero *Streptomyces* ou *Micromonospora*. São derivados semi-sintéticos de *Streptomyces*: a amicacina, netilmicina, dibecacina, isepamicina e arbecacina, enquanto que os provenientes de *Micromonospora* são: neomicina, gentamicina, tobramicina e paramomicina (GIAMERLLOU, 1986). As vantagens dessa classe de antibiótico são: possuir um amplo espectro antimicrobiano, rápida ação bactericida e capacidade de agir sinergicamente com outras drogas o que pode ocasionar uma superação da resistência bacteriana e ser bastante útil no tratamento de graves infecções hospitalares. Além de possuir um custo relativamente baixo, estabilidade química e não provocar reações alérgicas. Em relação às desvantagens,

esse antibiótico é inativo contra bactérias anaeróbias, não é absorvido oralmente (devido a natureza catiônica), tendo que ser administrado por via parenteral, intramuscular ou intravenosa, bem como possui limitações terapêuticas devido sua toxicidade (nos sistemas coclear e/ou vestibular e nos rins) (JANA; DEB, 2006).

Os aminoglicosídeos possuem efeito, principalmente, sobre bactérias aeróbias do grupo bacilos Gram negativas e sobre bactérias do grupo cocos Gram positivas. A ação do aminoglicosídeo ocorre principalmente na inibição da síntese proteica em que as moléculas do antibiótico se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a tradução e ocasionando a morte celular (KOTRA *et al.*, 2000). Outros efeitos no metabolismo da bactéria que podem ser considerados como efeitos secundários do antibiótico são: danos na membrana celular (alterando a composição e permeabilidade da membrana), alteração das concentrações iônicas celulares e modificações na síntese do DNA e RNA (FOURMY *et al.*, 1996). Os aminoglicosídeos podem ser utilizados como agentes profiláticos e como agente antimicrobiano para o tratamento de diversas enfermidades. A gentamicina e amicacina são utilizadas para o tratamento das mesmas doenças (meningite, pneumonia e sepse), já a neomicina é utilizada em queimaduras, feridas, úlceras e dermatites (RYBAK; WHITWORTH, 2005). A gentamicina é escolhida, na maioria das vezes, por causa de seu baixo custo e por ser eficaz na inibição de bactérias aeróbias Gram negativas (ROUGIER *et al.*, 2004). Já a amicacina é eficiente, quando aplicada em bactérias que são resistentes a outros aminoglicosídeos, pois a sua estrutura química é menos suscetível a inativação pelas enzimas bacterianas (JANA; DEB, 2006).

Os antifúngicos são divididos em quatro classes baseado no seu mecanismo de ação: classe pirimidina (interfere na síntese de DNA e RNA); classe polienos (interagem com o ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana); classe azóis, representado pelo imidazol e triazol; alilaminas; morfolina e tiocarbamato (interferem na biossíntese do ergosterol, produzindo esteróis tóxicos que afetam a estrutura da membrana e suas funções, como transporte de nutrientes e síntese de quitina) e a quarta classe, representada pela griseofulvina (atua na mitose). A maioria dos antifúngicos na indústria de fármacos atua interferindo na biossíntese de ergosterol, principal esterol da membrana do fungo (BOSSCHE, 1997; MANFRINI, 2007).

Os polienos são fungicidas de amplo espectro de ação, sendo a anfotericina B, usado clinicamente como antifúngico sistêmico e a nistatina em uso tópico. O mecanismo de



ação é a ligação não covalente com o ergosterol, formando poros na membrana plasmática do fungo que provocam o extravasamento dos componentes plasmáticos e a morte celular (BEHR, 2003), como também podem provocar dano oxidativo. Esses fármacos apresentam maior afinidade para o ergosterol fúngico do que para o colesterol de mamíferos, sendo menos tóxicos para as células de mamíferos (VICENTE *et al.*, 2003; MANFRINI, 2007). Apesar disso, a anfotericina B provoca lesão renal grave, podendo levar ao óbito (GEORGOPAPADAKOU, 1998). As drogas mebendazol e benzoilmetronidazol possuem anéis azóis que possuem ação antifúngica.

### 3.7 Resistência a antimicrobianos

O uso excessivo e inadequado de algumas drogas para o tratamento de doenças patogênicas em humanos tem ocasionado o aumento da incidência de resistência microbiana, principalmente quando é utilizada apenas uma classe de antimicrobiano durante um longo período (ZEMBOWER *et al.*, 1998; FLUIT; SCHMITZ, 1999). Os mecanismos de resistência dos micro-organismos aos antifúngicos e antibióticos ainda são pouco elucidados.

A pressão seletiva pelo uso de aminoglicosídeos pode provocar mutações nos genes que por sua vez alteram a expressão das enzimas, resultando na capacidade de modificar/inativar os aminoglicosídeos. As bactérias podem adquirir o DNA exógeno (gene com a mutação) por meio de mecanismos de transdução, transformação e conjugação, ocorrendo a transferência do gene em plasmídeos ou transposons (AHMED; SHIMAMOTO, 2004). Existem três mecanismos gerais de resistência aos aminoglicosídeos: redução da concentração intracelular do antibiótico nas células bacterianas, geralmente por um bombeamento da droga para fora da célula por uma bomba de efluxo ou pela alteração da permeabilidade; alteração do alvo molecular do antibiótico, geralmente resultante de uma mutação espontânea no gene que codifica o alvo ou substituição do gene alvo por um gene exógeno; inativação enzimática do aminoglicosídeo. Existem outros mecanismos de resistência que não se enquadram nesses três tipos, além disso, pode ocorrer mais de um mecanismo (na mesma estirpe e ao mesmo tempo) no caso de algumas classes de drogas (WALSH, 2000; AZUCENA; MOBASHERY, 2001; WALMSLEY, 2001; JANA; DEB, 2006).

A resistência aos antifúngicos pode ser definida como uma estável herança genética por um fungo, resultando em uma sensibilidade menor do que o normal para o antifúngico. A expressão do nível de resistência pode ser definida pela seguinte equação:  $CI_{50}$  linhagens resistentes (após o tratamento) /  $CI_{50}$  fungos selvagens (antes do tratamento). A  $CI_{50}$  significa a concentração inibitória média em que há inibição de 50 % das células fúngicas. Existem dois tipos de resistência: a cruzada positiva que ocorre quando um mesmo fator genético media a resistência a dois ou mais antifúngicos e a cruzada negativa que é quando um fator genético media a resistência a um agente antifúngico e ao mesmo tempo aumenta a sensibilidade para um segundo antifúngico (DEKKER, 1995; BOSSCHE, 1997). Os recentes estudos sobre os mecanismos de resistência aos antifúngicos indicam que pode ocorrer uma deficiência na absorção e uma superexpressão de bombas de efluxo da droga que mantém a concentração intracelular do fármaco muito baixa. A resistência também pode ser proveniente da alteração do alvo, e conseqüente amplificação desse gene que codifica a enzima alvo ou ainda pela alteração do nível de ergosterol, a partir de uma diferença na acumulação natural de esteróis ou a partir de uma redução na ativação de agentes antifúngicos (BOSSCHE, 1997).

### 3.8 Espectroscopia molecular

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, tendo como finalidade a determinação da configuração dos níveis de energia (rotacional, vibracional e eletrônica) de átomos ou moléculas. A partir da utilização dessa técnica, pode-se obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas. Quando a radiação eletromagnética incide sobre a matéria, pode ocorrer uma transição entre estados energéticos. Nas moléculas, a região espectral onde as transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (SALA, 2008). A energia total de uma molécula é a soma de todas essas energias, como pode ser observado na Equação 1:

$$E_{Total} = E_{Eletrônica} + E_{Vibracional} + E_{Rotacional} \quad (1)$$

Nas transições eletrônicas praticamente não há mudança da posição dos núcleos da molécula, este tipo de transição é caracterizado pela passagem de um elétron de um estado de menor energia para um de maior energia, após a absorção da radiação. Nos outros tipos de

transições ocorre a mudança da posição relativa dos átomos na molécula, nas vibracionais os núcleos dos átomos mudam de posição constantemente devido a mudanças nas distâncias de ligação ou nos ângulos de ligação, nas rotacionais os átomos da molécula mudam de posição devido a rotações sobre eixos definidos (centro de gravidade) e nas translacionais ocorre devido a movimentos de translação da molécula como um todo (OLIVEIRA, 2001b).

Sob influência da radiação eletromagnética, os átomos de uma molécula podem se movimentar nas três direções dos eixos cartesianos (x, y e z). A quantidade e a qualidade de movimentos que podem ser efetuados pelos átomos que compõem a molécula são definidos como graus de liberdade. Uma molécula com N átomos pode se movimentar em 3 direções, o que implica em 3N modos distintos de movimentos associados aos três tipos possíveis de transições. Quando uma molécula é linear, ou seja, os átomos estão dispostos sobre um dos eixos do sistema de coordenadas, haverá 3 modos translacionais e apenas 2 movimentos rotacionais, pois não pode haver rotação sobre o eixo em que a molécula está definida. Os movimentos vibracionais são calculados pelo total de graus de liberdade (3N) menos a quantidade de movimentos translacionais e rotacionais presentes na molécula e são denominados de modos normais de vibração. Logo, uma molécula linear terá  $3N - 5$  vibrações moleculares. Já em uma molécula que não é linear ocorrem todos os modos translacionais e rotacionais, portanto o número de modos vibracionais é definido por  $3N - 6$ . Para cada modo normal de vibração, há uma relação de energia potencial que pode ser expressa de acordo com os níveis discretizados (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002). Os tipos de graus de liberdade e a quantidade de transições possíveis de acordo com a geometria da molécula, classificada em linear e não linear estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1**– Tipos de graus de liberdade e quantidade de transições de acordo com a geometria molecular

<b>Tipo de grau de liberdade</b>	<b>Linear</b>	<b>Não linear</b>
Translação	3	3
Rotacional	2	3
Vibracional	$3N - 5$	$3N - 6$
Total	3N	3N

Fonte: OLIVEIRA (2001b).

Os métodos espectroscópicos: espectroscopia na região do Infravermelho (IR), espalhamento Raman, ultravioleta–visível (UV-VIS), espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) constituem, atualmente, os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas, sendo de extrema importância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. O uso dos referidos métodos físicos de análise traz uma série de vantagens, destacando-se a redução no tempo de análise, diminuição substancial nas quantidades de amostra, ampliação da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, não destruição da amostra (exceto em EM) e a possibilidade de acoplamento com métodos modernos de separação, como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A espectroscopia na região do infravermelho tem sido também, amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES; FASCIO, 2004).

A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais no Infravermelho e no Raman. A manipulação da amostra para medidas em espectroscopia Raman é mais simples do que em espectroscopia IR, visto que o vidro comum pode ser utilizado em janelas, lentes e outros componentes ópticos do espectrômetro, no lugar de cristais de haletos, que são mais frágeis e menos estáveis na atmosfera. Além disso, a fonte de radiação *laser* do Raman é facilmente focalizada em uma área pequena da amostra e a radiação emitida é eficientemente focalizada na abertura ou fenda de entrada de um espectrômetro. Como resultado, amostras muito pequenas podem ser investigadas (HOLLER *et al.*, 2009). Contudo, como os efeitos físicos envolvidos nas duas técnicas são distintos, os modos vibracionais ativos também serão diferentes, ou seja, alguns modos normais da molécula aparecem somente no Infravermelho ou somente no Raman. Portanto, essas técnicas são consideradas complementares e para se obter uma análise completa da estrutura vibracional de um sistema químico pode ser necessário avaliar os dois espectros (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

### 3.9 Espectroscopia no Infravermelho

#### 3.9.1 Regiões espectrais no Infravermelho

A região espectral do infravermelho (IR) abrange uma radiação com número de onda de 12.800 a 10  $\text{cm}^{-1}$  que é comumente dividida de acordo com as aplicações e instrumentação em três regiões: radiação no infravermelho próximo, médio e distante (SKOOG *et al.*, 2002). Os detalhes relativos a radiação para cada região espectral estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Regiões espectrais do Infravermelho

Região	Intervalo de Comprimento de Ondas ( $\lambda$ ), $\mu\text{m}$	Região de Número de Onda ( $\bar{\nu}$ ), $\text{cm}^{-1}$	Região de Frequência ( $\nu$ ), Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
Mais usada	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Fonte: SKOOG *et al.* (2002).

Para que uma molécula possa absorver a radiação infravermelha, esta tem que sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento rotacional ou vibracional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e pela distância entre dois centros de carga. Somente nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos. Para moléculas diatômicas homonucleares, tais como  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  ou  $\text{Cl}_2$  nenhuma variação efetiva no momento de dipolo é observada durante a vibração ou rotação, impedindo que estas moléculas absorvam radiação no infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002; HOLLER *et al.*, 2009). Portanto, os modos vibracionais esperados para uma molécula não linear ( $3N - 6$ ) ou linear ( $3N - 5$ ) não são todos ativos no espectro de infravermelho, pois alguns modos terão momento de dipolo, ou sua variação, igual a zero (OLIVEIRA, 2001b). Existem quatro fatores que ocasionam uma visualização experimental de um número menor de bandas (modos normais de vibração) do que o teoricamente esperado: a simetria da molécula é muito alta que não ocorre variação no dipolo a partir de uma vibração particular;

as energias de duas ou mais vibrações são idênticas ou semelhantes (degenerescência); a intensidade de absorção é tão baixa que não é detectada pelos meios comuns; e a energia vibracional está em uma região de comprimento de onda além da faixa do instrumento (SKOOG *et al.*, 2002).

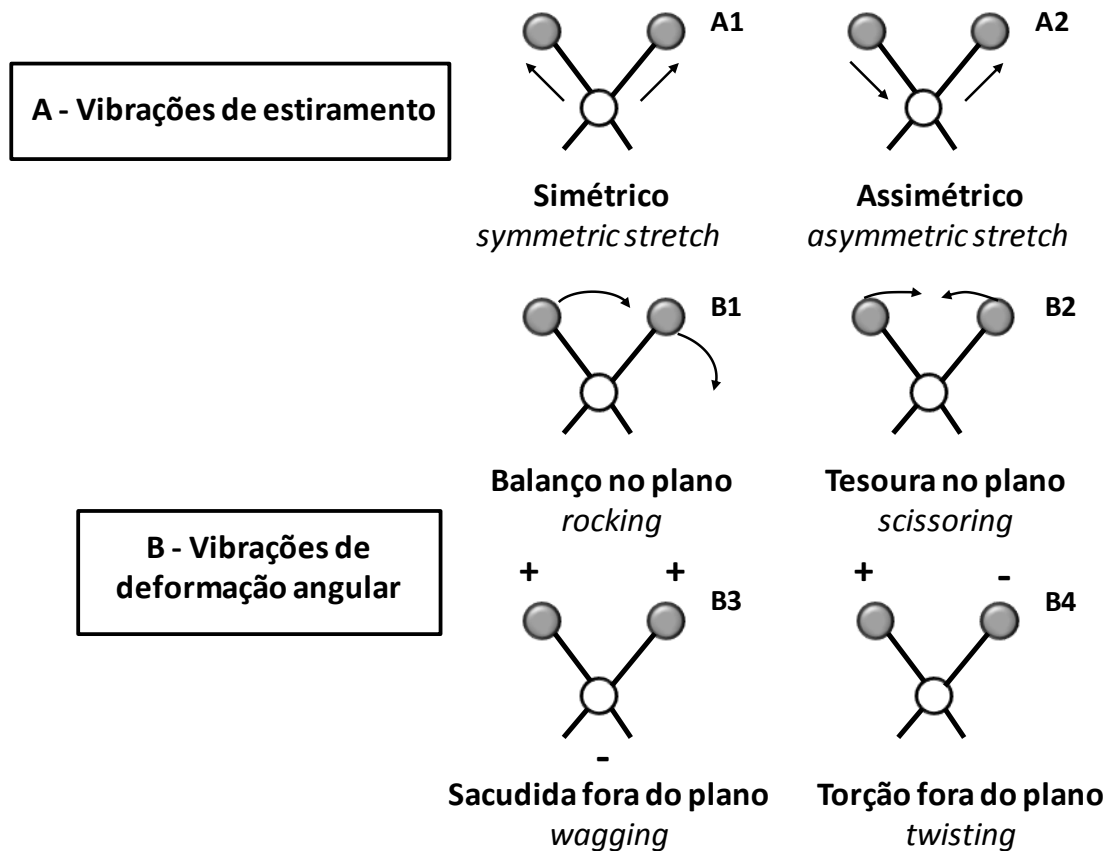
Cada molécula possui suas próprias frequências naturais de vibração, absorvendo ondas eletromagnéticas de frequências específicas e gerando um espectro de absorção característico, justamente quando ocorre a ressonância entre a frequência da radiação infravermelha incidente e as frequências naturais de vibração do material (LEITE; PRADO, 2012).

O espectro no infravermelho médio apresenta vibrações fundamentais, onde as bandas são intensas e bem definidas. O espectro infravermelho médio pode ser subdividido em duas regiões, sendo a região de 3.600 a 1.200  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a bandas de absorção da maioria dos grupos funcionais. Já a região de 1.200 a 600  $\text{cm}^{-1}$  é conhecida como região de impressão digital (*fingerprint region*), onde cada substância apresenta um padrão específico de bandas de absorção (SKOOG *et al.*, 2002).

### 3.9.2 Modos normais de vibração

As vibrações moleculares podem ser classificadas em: vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento são caracterizadas por uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, e as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações. Os estiramentos são classificados em: simétricos (*symetric*) e assimétricos (*asymetric*). Já as vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: simétrica no plano (*rocking*, balanço ou oscilação), assimétrica no plano (*scissoring* ou tesoura), simétrica fora do plano (*wagging*, sacudida ou balanço em fase) e assimétrica fora do plano (*twisting*, torção ou balanço fora de fase) (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2009). Os tipos de vibrações moleculares estão representados na Figura 4.

**Figura 4-** Tipos de vibrações moleculares. A - vibrações de estiramento (A1 - simétrico, A2 - assimétrico); B - vibrações de deformação angular (B1 - *rocking*, B2 - *scissoring*, B3 - *wagging*, B4 - *twisting*)



Nota: (+) indica movimento para fora da página e (-) indica movimento para dentro da página.  
 Fonte: adaptado de SKOOG *et al.* (2002); PAVIA *et al.* (2009).

### 3.9.3 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

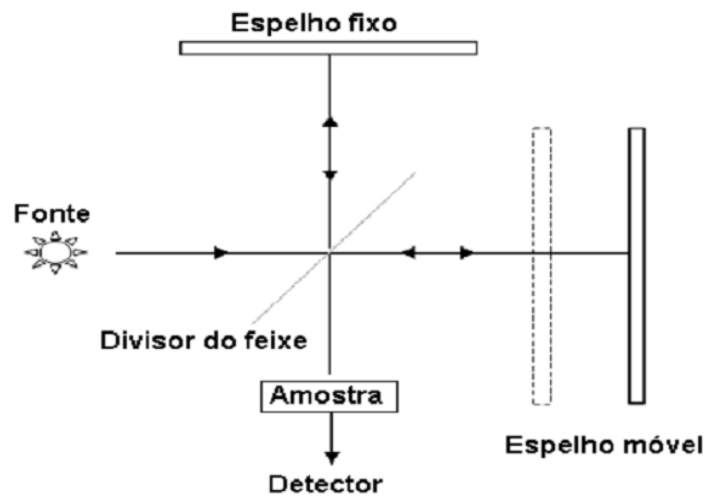
Os instrumentos com transformada de Fourier apresentam uma série de vantagens: possuem uma relação sinal-ruído melhor em mais de uma ordem de magnitude que as de instrumentos dispersivos de boa qualidade, podendo, em muitos casos, fazer varreduras rápidas e obter bons espectros em um tempo curto. Os instrumentos interferométricos são também caracterizados por resoluções maiores ( $<0,1 \text{ cm}^{-1}$ ) e determinações de frequências altamente exatas e reproduzíveis. Além disso, a óptica deste tipo de aparelho fornece um transporte de energia muito maior (uma ou duas ordens de magnitude) que os instrumentos dispersivos. Assim, o interferômetro está livre de radiação espúria, pois cada frequência no infravermelho é modulada em uma frequência diferente (SKOOG *et al.*, 2002).

Esse instrumento emprega o interferômetro de Michelson de dois feixes (Figura 5) e explora o processo matemático da transformada de Fourier. O equipamento é composto por

dois espelhos planos perpendiculares entre si, um espelho fixo e um espelho móvel. Contém também um espelho semi-refletor (parte do feixe passa e parte é refletida) que é o divisor de feixe, cortando os planos dos dois espelhos.

No infravermelho com transformada de Fourier (FTIR: *Fourier transform infrared*) a radiação emitida pela fonte, depois de colimada por um espelho, é introduzida em um interferômetro e separada em dois feixes pelo divisor de feixes. Um dos feixes percorre uma distância fixa e o outro, uma distância variável (espelho móvel). No divisor de feixe, os dois raios são combinados opticamente, podendo gerar uma interferência construtiva (se estiverem em fase) ou destrutiva (se estiverem fora de fase), gerando um interferograma. Quando este feixe combinado de luz atravessa a amostra, é absorvido seletivamente e, dependendo das absorções apresentadas pela amostra, gera um novo interferograma. Este interferograma é tratado por meio de um processo matemático, denominado Transformada de Fourier, originando um espectro no infravermelho que pode ser tanto de transmitância quanto de absorbância (WARTEWIG *et al.*, 2005).

**Figura 5-** Interferômetro de Michelson



Fonte: WARTEWIG *et al.* (2005)

### 3.9.4 Reflectância total atenuada (ATR)

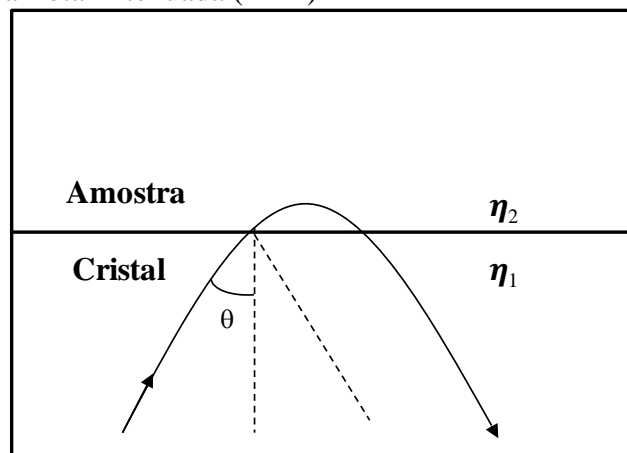
Uma das maiores vantagens da espectroscopia de Infravermelho do tipo reflexão total atenuada com transformada de Fourier (FTIR-ATR: *Fourier Transform infrared attenuated total reflectance*) é ser um método não destrutivo que requer um mínimo preparo



da amostra, facilitando e agilizando a obtenção dos espectros. Esse método também é escolhido quando a amostra possui limitações na manipulação, pois abrange uma ampla variedade de tipos de amostra. Podem-se analisar substâncias que são pouco solúveis, linhas, fios, tecidos, pós, pastas, filmes de polímeros e fibras, alimentos, borrachas, adesivos entre outros, pressionando-se a amostra contra um cristal denso. Soluções aquosas também podem ser analisadas, desde que o cristal utilizado no equipamento não seja solúvel em água (SKOOG *et al.*, 2002; HOLLER *et al.*, 2009).

A técnica de ATR em espectroscopia é caracterizada pela reflexão que ocorre quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um meio menos denso. Embora ocorra completa reflexão interna na interface cristal/amostra, a radiação penetra uma pequena distância dentro da amostra. Esta penetração chama-se onda evanescente. A amostra interage com a onda evanescente, resultando na absorção da radiação pela amostra, que corresponde ao espectro de transmissão dessa mesma amostra, conforme representação esquemática mostrada na Figura 6 (WARTEWIG *et al.*, 2005; HOLLER *et al.*, 2009).

**Figura 6**– Reflectância Total Atenuada (ATR)



Fonte: WARTEWIG *et al.* (2005)

A obtenção do espectro depende de diversos parâmetros, incluindo ângulo de incidência da radiação na amostra, comprimento de onda da radiação, índices de refração da amostra e do cristal do equipamento (cristais de ZnSe, BaF<sub>2</sub>, CaF<sub>2</sub>, KBr, KCl). A profundidade da penetração efetiva ( $d_p$ ) depende do comprimento de onda do feixe, dos índices de refração do cristal e da amostra, e do ângulo do feixe (WARTEWIG *et al.*, 2005). O cálculo da profundidade de penetração está descrito na Equação 2:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\eta_1 \sqrt{\sin^2\theta - \left(\frac{\eta_2}{\eta_1}\right)^2}} \quad (2)$$

onde:

$\lambda$  = comprimento de onda da radiação incidente

$\eta_1$  = índice de refração do cristal

$\eta_2$  = índice de refração da amostra

$\theta$  = ângulo de incidência

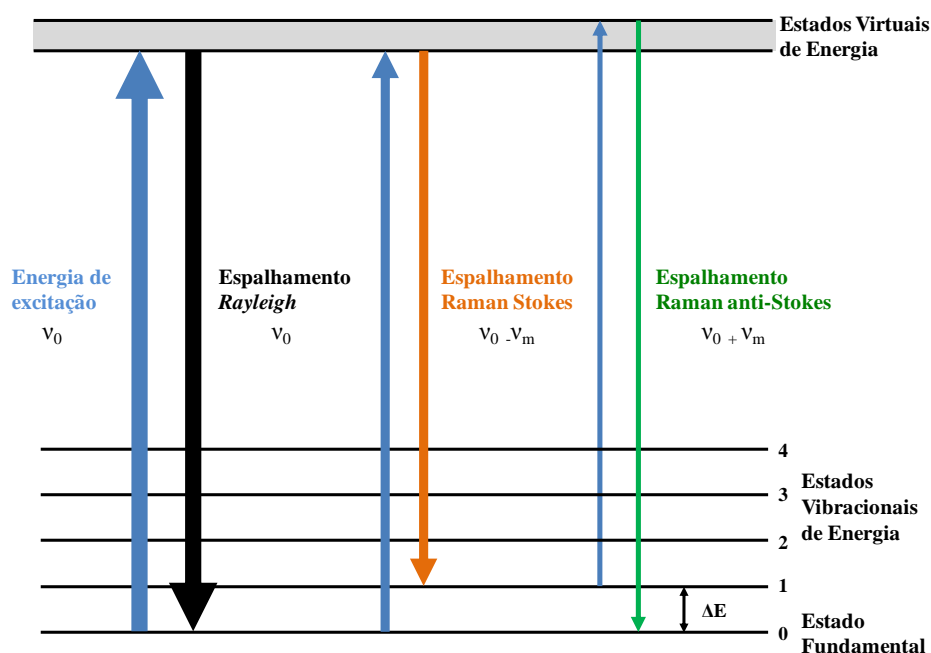
### 3.10 Espectroscopia Raman

#### 3.10.1 Espalhamento Rayleigh e Espalhamento Raman

Os espectros Raman são obtidos ao irradiar uma amostra com uma fonte *laser* de radiação monocromática no visível ou no infravermelho próximo. Quando a radiação atravessa um meio transparente, as espécies presentes espalham uma fração do feixe em todas as direções. Se essa radiação for espalhada com o mesmo valor de comprimento de onda, ou seja, a energia for a mesma antes e depois da interação com a matéria, será um espalhamento elástico. Se a radiação depois de interagir com a matéria, tiver um comprimento de onda diferente da radiação incidente (fonte de excitação) será um espalhamento inelástico da luz (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002). O espalhamento elástico também denominado de espalhamento *Rayleigh* é aquele em que a luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente ( $\nu_0$ ). Já o espalhamento inelástico ou Raman ocorre quando a luz espalhada tem frequência igual a da luz incidente mais ou menos a frequência vibracional da molécula ( $\nu_m$ ) (RICCI, 2008). Um diagrama ilustrando os espalhamentos *Rayleigh* e Raman é mostrado na Figura 7.

No espalhamento *Rayleigh*, as moléculas estão no estado fundamental (estado no qual as moléculas estão em um menor nível de energia). Quando essas moléculas sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente), passam do estado fundamental para um estado virtual e voltam em seguida para o estado fundamental e o fóton espalhado conserva a energia.

**Figura 7** - Mecanismo de espalhamento *Rayleigh* e Raman



Nota:  $\nu_0$  = frequência da luz incidente,  $\nu_m$  = frequência vibracional da molécula.  
 Fonte: adaptado de RICCI (2008); SKOOG *et al.* (2002).

O espalhamento Raman envolve uma distorção momentânea da nuvem eletrônica dos elétrons em torno de um átomo ou de uma molécula, seguida por reemissão da radiação enquanto a nuvem eletrônica volta ao estado normal. Na sua forma distorcida, a molécula fica temporariamente polarizada. A grandeza física que está associada à capacidade de deformação da nuvem eletrônica de um determinado átomo ou molécula frente ao efeito de um campo elétrico externo é denominada de polarizabilidade. Portanto, a atividade Raman está ligada à polarizabilidade da molécula devido a interação do campo elétrico externo da radiação com a amostra, gerando um momento dipolo induzido. De acordo com a mecânica quântica uma vibração somente é ativa no espectro Raman, quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade (OLIVEIRA, 2001b; SKOOG *et al.*, 2002).

O espalhamento Raman pode ser de dois tipos: *Stokes* e *Anti-Stokes*. Quando a radiação espalhada é de menor frequência do que a radiação incidente, ela é chamada de espalhamento *Stokes*, já quando a radiação espalhada possui frequência maior do que a radiação da fonte é chamada espalhamento *Anti-Stokes* (HOLLER *et al.*, 2009).

No espalhamento Raman *Stokes*, as moléculas sofrem colisão com o fóton passando do estado fundamental para o estado virtual, e em seguida, decai para um estado vibracional excitado de energia, então esse fóton espalhado terá energia menor que a radiação

incidente. No espalhamento Raman *anti-Stokes*, o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e leva a molécula a uma energia bem mais alta. Quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental, assim o fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente.

O espalhamento *Rayleigh* tem probabilidade de ocorrência muito maior que o Raman, bem como o espalhamento Raman *Stokes* ocorre com mais frequência que o *Anti-Stokes*, devido à contribuição do fator de Boltzmann, ou seja, o número de moléculas que estão no estado fundamental é muito maior que o de moléculas em estado excitado (SKOOG *et al.*, 2002).

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de picos ou bandas, cada um correspondendo a uma frequência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula tem o seu próprio espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma impressão digital ou *fingerprint* de uma substância da qual a sua estrutura molecular pode ser determinada (LORINCZ *et al.*, 2004).

### **3.10.2 Espalhamento Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)**

O instrumento Raman com transformada de Fourier (FT-Raman: *Fourier transform Raman*) emprega um interferômetro de Michelson semelhante ao utilizado em espectrômetros FTIR. Ao conjugar-se a excitação no infravermelho próximo (de baixa energia) com a técnica de interferometria e de transformada de Fourier, um interferômetro produz um sinal (o interferograma) no qual são codificadas todas as frequências do espectro Raman. Depois que o sinal é acumulado em um detector, será decodificado por um programa computacional em que as frequências de todas as bandas Raman serão encontradas por intermédio de uma transformada de Fourier. Utilizando-se como fonte de radiação um *laser* Nd-YAG de onda contínua, que excita a amostra na linha 1064 nm (1,064  $\mu\text{m}$ ), praticamente elimina-se a fluorescência/luminescência e a fotodecomposição das amostras, contudo a intensidade do sinal Raman é bastante reduzida. Ao empregar a técnica da transformada de Fourier, pode-se interpretar o sinal fraco espalhado pela amostra. Assim, o instrumento FT-Raman proporciona uma melhor precisão da frequência em relação aos instrumentos convencionais (HOLLER *et al.*, 2009; GUIMARÃES, 2011).

### 3.11 Cálculos computacionais de primeiros princípios

Na mecânica quântica emprega-se a equação de Schrödinger para calcular as propriedades físicas de átomos e moléculas, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos (BARREIRO; RODRIGUES, 1997). Os cálculos de mecânica quântica não são exatos, pois são feitas algumas aproximações baseadas em dados empíricos. Uma aproximação utilizada para solucionar a equação de Schrödinger é a de Born-Oppenheimer. Nessa aproximação o movimento dos elétrons é considerado mais rápido e independente do núcleo e, uma vez que os elétrons giram em torno do núcleo, é possível descrever o movimento eletrônico separadamente do movimento nuclear. Supõe-se que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer alteração na configuração geométrica dos núcleos, assumindo que os núcleos possuem movimento livre e que todas as interações nucleares são aditivas. A superfície de Born-Oppenheimer, conhecida como superfície de energia potencial, é caracterizada como multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares. Esta superfície possui mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis e, em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial (TOSTES, 1998; COELHO *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2003). Os métodos de cálculos de primeiros princípios também denominados de *ab initio*, descrevem de maneira rigorosa a natureza quântica dos elétrons.

#### 3.11.1 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

A Teoria do funcional da densidade (DFT: Density Functional Theory) emergiu como uma alternativa para os métodos tradicionais (*ab initio* e semi-empíricos) no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Entre as vantagens do método DFT estão o ganho em velocidade computacional e espaço em memória. Além disso, nas derivações das equações do funcional da densidade, nenhum parâmetro, em princípio, necessita ser ajustado ou determinado empiricamente. Esse método é bastante útil no estudo de uma ampla variedade de materiais, tais como moléculas grandes, descrevendo-se realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semicondutores (MORGON; CUSTODIO, 1995). Contudo, não se pode aplicar em sistemas magnéticos, supercondutores e

condensados de Bose-Einstein, pois esse método não é muito preciso. Então, considera-se que os limites desse método são as aproximações existentes para o potencial de troca e correlação (MARQUES; BOTTI, 2006; GUIMARÃES, 2011).

O método DFT foi estudado por Walter Kohn, Pierre Hohenberg e Lu Sham em 1964. Esses cientistas reformularam a mecânica quântica, baseada na função de onda quântica de um sistema e apresentaram o modelo da densidade eletrônica, baseado na equação de Kohn-Sham (Equação 3).

$$v_{KS}[\rho](\vec{r}) = v_{ext}(\vec{r}) + v_{Hartree}[\rho](\vec{r}) + v_{xc}[\rho](\vec{r}) \quad (3)$$

onde:

$v_{KS}[\rho](\vec{r})$  = potencial de Kohn-Sham

$v_{ext}(\vec{r})$  = potencial externo

$v_{Hartree}[\rho](\vec{r})$  = potencial de Hartree

$v_{xc}[\rho](\vec{r})$  = potencial de troca e correlação

A Teoria do funcional da densidade (DFT) simplifica a resolução da equação de Schrödinger para sistemas complexos com uma precisão notável. Atualmente, esse método é empregado em programas de computador como *Gaussian*, *Gamess*, *Vasp*, *Abinit* e *Pwscf*, sendo o *Gaussian*, criado por John Pople, o programa de computador mais utilizado para realizar esses cálculos em moléculas. Por meio do DFT pode-se analisar as ligações químicas, calcular energia de ionização, afinidades eletrônicas, a polarizabilidade, estudar os modos normais de vibração, os espectros de absorção e de emissão, susceptibilidades e propriedades eletrônicas e magnéticas de moléculas com potencial tecnológico (MARQUES; BOTTI, 2006).

No desenvolvimento da DFT, o primeiro funcional de troca utilizado foi o LDA (aproximação da densidade local, *Local Density Approximation*), baseado no estado fundamental do gás homogêneo de elétrons, um sistema idealizado em que os núcleos atômicos são substituídos por uma carga positiva contínua e constante. Posteriormente, surgiram os métodos híbridos que permitem uma conformação de mais baixa energia, ao relacionar o método HF (Hartree-Fock) e DFT. Atualmente, o mais utilizado é o B3LYP, esta sigla significa aplicação do funcional de troca-correlação de Becke, utilizando-se três

parâmetros empíricos para compor o funcional (B3), no qual está incluso o funcional de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr (LEE *et al.*, 1988; PARR *et al.*, 1989; BECKE *et al.*, 1993; MARQUES; BOTTI, 2006). É através das funções de base, que são construídos os orbitais moleculares e é feita a predição da energia de ligação na molécula, assim, a escolha correta do conjunto de funções de base é essencial para um bom resultado. Para simplificar a matemática usada no algoritmo do programa, são utilizadas funções Gaussianas. A notação da base 6-31G significa que cada orbital interno é uma combinação de seis Gaussianas primitivas, com expansão ou contração dos orbitais atômicos, sem polarização (correção da distorção na forma dos orbitais atômicos que ocorre com a formação de espécies poliatômicas/perda de simetria) e os orbitais atômicos de valência são representados por uma combinação de 3 + 1 Gaussianas. As funções de polarização são fundamentais para a correção dos ângulos de ligação. As funções de polarização são descritas por uma letra entre parênteses ou por asteriscos. Por exemplo: 6-31G(d,p) ou 6-31G\*\*, indica o uso da base 6-31G, com a inclusão de funções do tipo *p* no hidrogênio e funções do tipo *d* nos demais átomos (GUIMARÃES, 2011; ZHAO; TRUHLAR, 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta da planta *Croton zehntneri*, bem como a extração e isolamento do ácido acetil aleuritólico (AAA) foram realizados pelos colaboradores do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) em Sobral-CE, Brasil.

### 4.1 Material vegetal

Amostras do caule da espécie *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (Figura 8) foram coletadas em abril de 2008, em Tianguá na Serra da Ibiapaba, Ceará, Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Edson Paula Nunes do Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia na Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará, Brasil, sendo a exsicata depositada neste herbário sob registro de nº 42.389.

**Figura 8** - Planta *Croton zehntneri* Pax et Hoffm.



Fonte: SANTOS, H. S.

### 4.2 Extração e isolamento

Amostras do caule de *C. zehntneri* (1,5 kg) foram pulverizadas e imersas em 10 L de etanol a temperatura ambiente, durante 4 semanas, sendo realizadas 3 trocas. Após esse período, o solvente foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico de *C. zehntneri* (CZ-EtOH). Obteve-se um rendimento de 13,87%. Para o isolamento do composto ácido acetil aleuritólico (AAA) foram utilizadas técnicas cromatográficas. O extrato de CZ-EtOH (208 g) foi fracionado em uma coluna de



sílica gel e eluído com hexano (frações 1-10), clorofórmio -  $\text{CHCl}_3$  (frações 11-18), acetato de etila -  $\text{AcOEt}$  (frações 19-27) e etanol-  $\text{EtOH}$  (frações 28-40), obtendo-se um total de 40 frações com 100 mL cada. A fração de  $\text{CHCl}_3$  (4,8 g) foi refracionada em uma coluna de sílica gel utilizando como eluente o hexano (F'1-60) e uma mistura binária dos solventes hexano/ $\text{AcOEt}$  com gradiente de polaridade nas seguintes proporções 9:1 (F' 61-95); 8:2 (F' 96-102); 7:3 (F' 103-105); 6:4 (F' 106-120); 1:1 (F' 121-125); 4:6 (F' 126-130); 3:7 (F' 131-135); 2:8 (F' 136-140); 1:9 (F' 141-145), além dos eluentes  $\text{AcOEt}$  (F' 146-150) e  $\text{EtOH}$  (F' 151), fornecendo um total de 151 frações de 50 mL cada. As frações obtidas foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico semelhante, avaliado por cromatografia de camada delgada (CCD). A partir das frações (F' 82-83) eluídas com hexano / $\text{AcOEt}$  (9:1), obteve-se o composto utilizado neste estudo: o ácido acetil aleuritólico (30 mg). O AAA foi identificado por meio da análise dos dados obtidos de espectros de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), espectro de massa (EM) e comparação com os dados da literatura.

### 4.3 Espectroscopia

A caracterização do ácido acetil aleuritólico (AAA), utilizando técnicas espectroscópicas de Infravermelho e Raman, foi realizada no Laboratório de Espalhamento Raman do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brasil.

#### 4.3.1 Medidas FT-Raman e FT-Infravermelho

O espectro de espalhamento Raman com transformada de Fourier (FT-Raman: *Fourier transform Raman*) do ácido acetil aleuritólico (AAA) foi obtido em um espectrômetro Bruker, modelo Vertex 70, módulo Ram II (Figura 9), com detector D418-T, tendo como fonte o *laser* Nd: YAG que excita a amostra na linha 1.064 nm, com 150 mW de potência de saída. A resolução espectral foi ajustada em  $4\text{ cm}^{-1}$ , e a relação sinal/ruído foi otimizada fazendo-se 60 varreduras na faixa de número de onda de  $40\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ .

As medidas da amostra AAA por espectroscopia de Infravermelho foram do tipo reflexão total atenuada com transformada de Fourier (ATR - FTIR: *attenuated total reflection*

*Fourier transform infrared*). O espectro ATR - FTIR foi obtido em um espectrômetro Bruker, modelo Vertex 70 (Figura 9), utilizando resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e realizando 128 varreduras na região de número de onda de  $600\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ . O acessório para medidas utilizando a técnica ATR está representado na Figura 10.

**Figura 9-** Espectrômetro utilizado para realizar medidas de FT-IR (A) e FT-Raman (B)



Fonte: MELO, I. R. S.

**Figura 10 -** Porta-amostra para realizar medidas utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) na região do Infravermelho



Fonte: MELO, I. R. S.

### 4.3.2 Métodos computacionais

Os cálculos computacionais de primeiros princípios ou *ab initio* para obtenção das frequências de vibração da molécula do ácido acetil aleuritólico (AAA) foram realizados pelo método da Teoria do funcional da densidade (DFT) no programa *Gaussian 03* (FRISCH *et al.*, 2003). A estrutura do AAA utilizada como arquivo de entrada para o *Gaussian* foi desenhada no programa *ChemSketch* por meio dos dados obtidos a partir da espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A geometria da molécula foi otimizada para um mínimo de energia e as frequências foram calculadas pelo método DFT (PARR *et al.*, 1989), utilizando o funcional de troca de 3 parâmetros de Becke (B3) em conjunto com o funcional de correlação Lee-Yang-Parr (LYP) e empregando a base 6-31 G (d, p) (BECKE *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1988). Após a realização dos cálculos computacionais no *Gaussian*, é gerado um arquivo de saída que contém a estrutura otimizada e as frequências vibracionais da molécula AAA.

Utilizando-se o programa *Chemcraft* 1.6 foi possível a análise dos parâmetros geométricos que são: os comprimentos, ângulos e diedros das ligações entre os átomos e também analisar as atribuições dos tipos de modos vibracionais presentes na molécula do AAA.

Os números de onda obtidos teoricamente (calculados pelo método DFT) foram ajustados às bandas experimentais de FT-Raman por um fator de escala ( $\lambda$ ) apropriado, obtido por meio do procedimento de ajuste dos mínimos quadrados, que consiste em minimizar os resíduos ( $\Delta$ ) de acordo com a Equação 4 (SCOTT; RADOM, 1996):

$$\Delta = \sum_i^N \left( \lambda \omega_i^{\text{teórico}} - \omega_i^{\text{exp}} \right)^2 \quad (4)$$

Onde  $i$  são os  $i$ -ésimos números de onda (em  $\text{cm}^{-1}$ ), sendo  $\omega_i^{\text{teórico}}$  o número de onda calculado e  $\omega_i^{\text{exp}}$  o experimental e o  $N$  corresponde ao número de modos vibracionais que possui correspondência entre os números de onda calculados e os experimentais.

O fator de escala foi calculado segundo a Equação 5:

$$\lambda = \frac{\sum_i^N \omega_i^{\text{teórico}} - \omega_i^{\text{exp}}}{\sum_i^N (\omega_i^{\text{teórico}})^2} \quad (5)$$

Após o ajuste entre os números de onda calculados e os experimentais, realiza-se o cálculo dos resíduos minimizados ( $\Delta_{\min}$ ) para cada modo de acordo com a Equação 6:

$$\Delta_{\min} = (\lambda \omega_i^{\text{teórico}} - \omega_i^{\text{exp}})^2 \quad (6)$$

Em seguida calcula-se o erro quadrático total ( $rms_{\text{tot}}$ ) que é obtido pela Equação 7:

$$rms_{\text{tot}} = \sqrt{\frac{\sum_i^N \Delta_{\min}}{N}} \quad (7)$$

O cálculo do erro é feito pelo reajuste da combinação dos números de onda calculados e experimentais, repetidamente, até que o erro seja mínimo.

Após a obtenção do fator de escala correspondente ao menor erro, é feita a classificação das vibrações moleculares e da intensidade quanto a força das bandas Raman e Infravermelho. As vibrações foram classificadas nas seguintes categorias: em estiramento ( $\nu$ ), estiramento simétrico ( $\nu_s$ ), estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ), deformação angular ( $\delta$ ), deformações do tipo: sacudida (*wag - wagging*), tesoura (*sc - scissoring*), balanço (*r - rocking*), torção ( $\tau$ -*twisting*), deformação em um dos anéis ( $\delta(R1)$ ,  $\delta(R2)$ ,  $\delta(R3)$ ,  $\delta(R4)$  ou  $\delta(R5)$ ) e deformações de todos os anéis  $\delta(R_s)$ . A classificação quanto a intensidade das bandas em: muito forte ( $\nu_s$ ), forte ( $s$ ), média ( $m$ ), fraca ( $w$ ) e muito fraca ( $\nu_w$ ) foi feita por meio de um teste lógico no programa Excel. Após a normalização da amplitude, construiu-se um gráfico no Excel com esses valores para analisar o perfil do espectro, e em seguida, definiu-se a intensidade da banda de acordo com um intervalo da amplitude normalizada. Os parâmetros considerados para classificação das intensidades das bandas estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3**– Parâmetros da amplitude normalizada utilizados para classificação da intensidade das bandas de FT-IR ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) e FT-Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) obtidas experimentalmente

Intensidade	Amplitude normalizada (x)
Muito forte (vs)	$50 < x < 100$
Forte (s)	$30 < x < 50$
Média (m)	$20 < x < 30$
Fraca (w)	$15 < x < 20$
Muito fraca (vw)	$x < 15$

#### 4.4 Atividade antimicrobiana

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE, Brasil.

##### 4.4.1 Preparação da amostra

O composto ácido acetil aleuritólico (0,01 g) foi dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração inicial de  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Em seguida, diluiu-se essa solução inicial até um volume de 5 mL para ser utilizada nos testes microbiológicos. A solução foi preparada da seguinte maneira: foi retirada uma alíquota da solução inicial e dissolveu-se em DMSO até uma concentração final de  $1.024 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Testou-se a solubilização em água destilada estéril, mas o composto não foi solúvel. Então, utilizou-se como solvente o DMSO.

##### 4.4.2 Cepas bacterianas e fúngicas

As cepas microbianas utilizadas nos testes são provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) obtidas por meio do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas as cepas bacterianas Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; as cepas

fúngicas: *Candida albicans* 40006, *C. krusei* 6258 e *C. tropicalis* 13803. Para avaliar o efeito do ácido acetil aleurítico como modificador da atividade dos antibióticos foram utilizadas as cepas bacterianas multirresistentes: *P. aeruginosa* 03, *S. aureus* 358 e *E. coli* 27; já para avaliar a atividade moduladora de antifúngicos foram utilizadas as mesmas cepas fúngicas do ensaio de CIM. O perfil das linhagens multirresistentes de bactérias está descrito no Quadro 1.

**Quadro 1-** Perfil de Resistência das bactérias aos antibióticos

Bactéria	Fonte	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida Cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Chlo, Im, Kan, Szt, Tet, Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Cultura de urina	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

Fonte: MORAIS-BRAGA *et al.* (2013)

Ast: aztreonam; Ax: amoxicilina; Amp: ampicilina; Ami: amicacina; Amox: amoxicilina; Ca: cefadroxil; Cfc: cefaclor; Cf: cefalotina; Caz: ceftazidima; Cip: ciprofloxacina; Chlo: chloranphenicol; Im: imipenem; Kan: canamicina; Szt: sulfametrim; Tet: tetraciclina; Tob: tobramicina; Oxa: oxacilina; Gen: gentamicina; Neo: neomicina; Para: paramomicina; But: butirosina; Sis: sisomicina; Net: netilmicina; Com: Cefepime; Ctz: ceftazidima; Ptz: piperacilina-tazobactam; Lev: levofloxacina; Mer: meropenem.

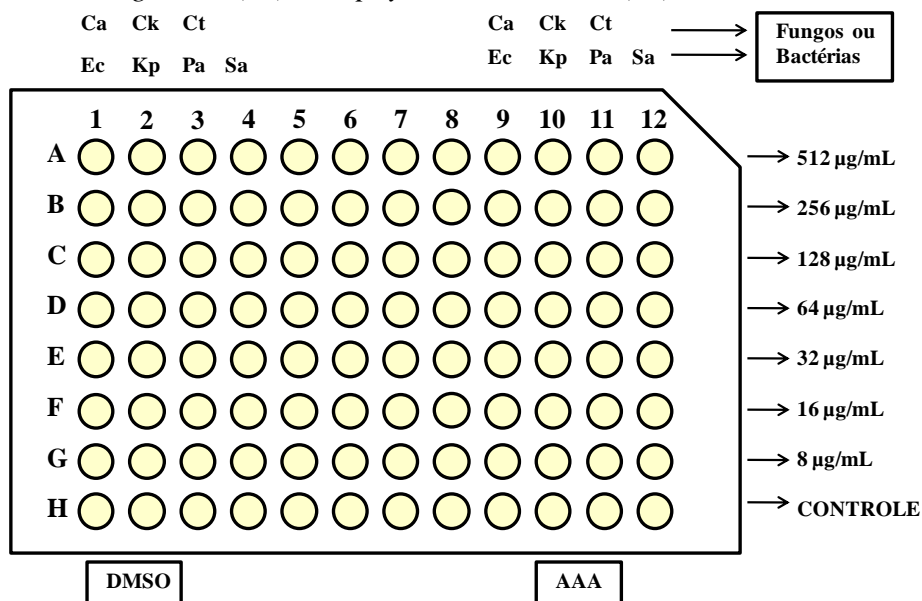
#### 4.4.3 Obtenção do inóculo

As cepas microbianas foram mantidas em placas de Petri, contendo o meio Ágar Infusão de coração (*Heart Infusion Agar*- HIA; Difco Laboratories Ltd.) a 4 °C, a fim de se conservarem todas as suas características bioquímicas e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Antes da realização dos ensaios de CIM e modulação, as cepas bacterianas e fúngicas foram retiradas com uma alça de drigalski da cultura estoque e cultivadas em 5 mL de Caldo de Infusão de cérebro e coração (*Brain heart infusion broth*- BHI; HIMEDIA – Índia), sendo incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. Para preparação do inóculo dos testes foram utilizadas as suspensões bacterianas ou fúngicas em meio BHI descritas anteriormente, retirou-se 100 µL dessa suspensão e inoculou em 900 µL de caldo BHI 10% (proporção 1:10) para se obter uma concentração final de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônia/mL) (NCCLS, 2000).

#### 4.4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM do ácido acetil aleuritólico foi realizado um ensaio de microdiluição (JAVADPOUR *et al.*, 1996) em microplacas contendo 96 poços de fundo redondo de acordo com a Norma M7-A6 (CLSI, 2003). O ensaio procedeu-se da seguinte maneira: em cada poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo o inóculo de bactéria ou fungo de cada cepa ( $10^5 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e o meio BHI 10%. As cepas bacterianas ou fúngicas foram distribuídas no sentido numérico das placas, sendo cada coluna numérica representada por uma cepa diferente (Figura 11). Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do composto ácido acetil aleuritólico foi colocado no primeiro poço e realizaram-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca, obtendo-se as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do composto. O último poço da microplaca é constituído apenas pelo inóculo e o meio BHI 10%, representando o controle para verificação da viabilidade das cepas. Foi realizada também uma microdiluição, utilizando-se o DMSO em vez do composto para a verificação da influência do solvente na atividade antimicrobiana. Após o procedimento experimental, as placas foram incubadas a  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h.

**Figura 11-** Microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima. AAA: amostra ácido acetil aleuritólico e DMSO: o solvente dimetilsulfóxido nas concentrações 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os fungos utilizados foram *Candida albicans* (Ca), *C. krusei* (Ck), *C. tropicalis* (Ct) e as bactérias : *Escherichia coli* (Ec), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) e *Staphylococcus aureus* (Sa)



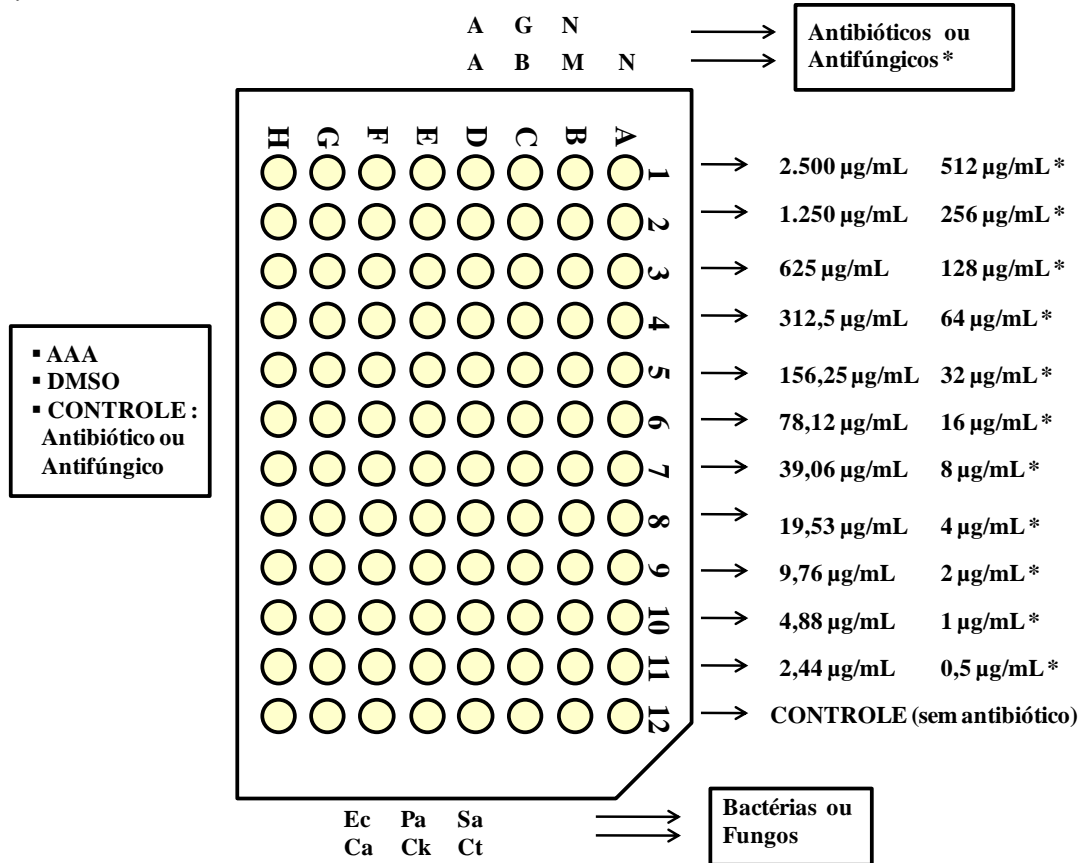
Fonte: autora, baseado em JAVADPOUR *et al.* (1996).

#### 4.4.5 Modulação da atividade de aminoglicosídeos e antifúngicos

Para avaliar o efeito do composto ácido acetil aleuritólico como modificador da atividade dos antibióticos/antifúngicos foram utilizados os aminoglicosídeos: amicacina, gentamicina e neomicina (Sigma-USA), com concentração de  $5.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e os antifúngicos: anfotericina B, benzoilmetronidazol, mebendazol e nistatina (Sigma-USA), com concentração de  $1.024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A modulação foi determinada por um ensaio de microdiluição em microplacas com 96 poços (COUTINHO *et al.*, 2008), seguindo o sentido alfabético em que cada coluna (letra) representa um antibiótico ou antifúngico diferente (Figura 12). Após a obtenção da CIM no teste antimicrobiano, esse valor foi reduzido 8 vezes ( $^{CIM/8}$ ), resultando na concentração subinibitória do composto e do DMSO para ser utilizado no ensaio de modulação. Em cada poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo: 150  $\mu\text{L}$  do inóculo ( $10^5 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de fungo ou bactéria de cada cepa, o composto ou DMSO (controle) na concentração subinibitória de  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $^{128/8}$ ) e o meio BHI 10% q.s.p 1.500  $\mu\text{L}$ . Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do antibiótico ou antifúngico foi colocado no primeiro poço e realizou-se diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço da microplaca. As concentrações dos antibióticos foram 2.500; 1.250; 625; 312,50; 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; 2,44  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Já as concentrações dos antifúngicos foram 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O último poço da microplaca não contém o antibiótico ou antifúngico, a fim de se verificar a viabilidade das cepas. No grupo controle não foi adicionado o composto, apenas o inóculo, o meio BHI 10 % e o antibiótico ou antifúngico. Portanto, há 2 controles: o do solvente em que foi substituído o composto pelo DMSO e o do antibiótico ou antifúngico em que não foi colocado nem o composto nem o DMSO. Após a realização dos procedimentos, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h.



**Figura 12** - Microplaca utilizada para ensaio de modulação dos antibióticos (amicacina-A, gentamicina-G e neomicina-N) e dos antifúngicos (anfotericina B-A, benzoilmetronidazol-B, mebendazol-M e nistatina-N). AAA representa a amostra ácido acetil aleuritólico e DMSO o solvente dimetilsulfóxido. Os fungos utilizados foram *Candida albicans* (Ca), *C. krusei* (Ck), *C. tropicalis* (Ct) e as bactérias: *Escherichia coli* 27 (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* 03 (Pa) e *Staphylococcus aureus* 358 (Sa)



Fonte: autora, baseado em COUTINHO *et al.* (2008).

#### **4.4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana**

Nos ensaios de CIM e modulação a verificação do crescimento microbiano foi realizada de maneira semelhante. Para determinar se houve crescimento bacteriano foi realizado um ensaio colorimétrico, utilizando-se o corante resazurina 0,01% (p/v). Após o período de 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL do corante em cada poço da microplaca, e depois de 1 h em temperatura ambiente foi feita a leitura. A mudança da coloração de azul pra rosa indica que houve crescimento bacteriano e ocorre devido à redução da resazurina, já a coloração azul inalterada indica ausência de crescimento (PALOMINO *et al.*, 2002). A CIM será determinada pela menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para determinar se houve crescimento fúngico foi realizado um ensaio de turbidez. A CIM é a menor concentração do composto em que houve 100 % da inibição do crescimento do fungo, visualizado através da ausência de turbidez do meio.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação estrutural do ácido acetil aleuritólico

O composto identificado como ácido acetil aleuritólico apresentou-se como cristais em forma de agulhas, com ponto de fusão na faixa de 284,3-286,1 °C. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do AAA (Apêndice A) revelou seis sinais simples na faixa de  $\delta$  0,85 a 0,98 que foram relacionados a sete grupamentos metilas ligados a carbonos saturados  $\delta$  0,86 (H-23); 0,89 (H-24); 0,96 (H-25); 0,96 (H-26); 0,93 (H-27); 0,95 (H-29); 0,92 (H-30), além do sinal em  $\delta$  2,0 (s, H-32) relativo a uma metila de um grupamento acetila. Além disso, foram ainda visualizados sinais característicos de hidrogênio ligado a carbonos olefínico em  $\delta$  5,53 (dd,  $J = 3,2; 7,8$  Hz, H-15), e um hidrogênio ligado a carbono oxigenado em  $\delta$  4,47 (dd,  $J = 5,7; 10,6$  Hz, H-3).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do AAA apresentou trinta e duas linhas espectrais (Apêndice B). Dentre os sinais observados foram identificados dois carbonos insaturados, um não-hidrogenado e outro mono-hidrogenado em  $\delta$  160,79 e 117,09, respectivamente, além de um carbono oximetínico em  $\delta$  81,13 e sinais referentes a duas carbonilas, uma de ácido carboxílico em  $\delta$  184,46 e outra de éster em  $\delta$  171,24. A análise comparativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ - DEPT 135 (Melhoramento sem Distorção por Transferência de Polarização, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) permitiu identificar a presença de oito carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e nove carbonos não-hidrogenados (Apêndice C e D).

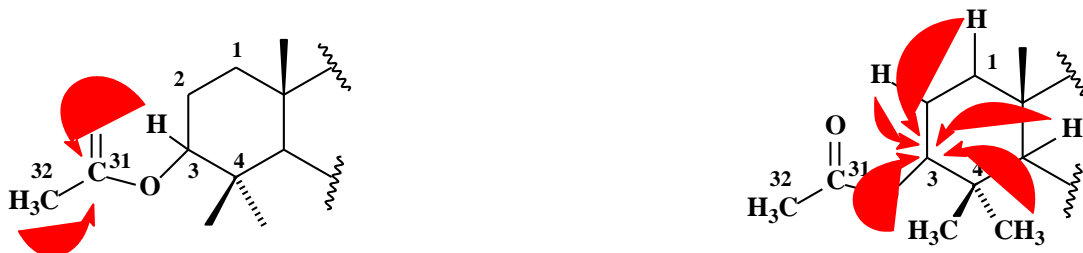
A partir dos dados obtidos, foi proposta a fórmula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ , com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito, em acordo com o sinal do íon molecular observado no espectro de massa em  $m/z$  498 (Apêndice E). Após análise dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , pode-se justificar as três insaturações presentes na molécula, sendo duas associadas à carbonila (ácido e éster) e uma dupla ligação. Uma comparação com os dados da literatura para classes de triterpenos pode-se sugerir para o AAA uma estrutura de triterpenopentacíclico do tipo oleanano.

Analisando a correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio HSQC (Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples, *Heteronuclear*

*Single-Quantum Correlation*), pode-se associar todos os sinais dos hidrogênios a seus respectivos carbonos, de modo inequívoco (Apêndice F).

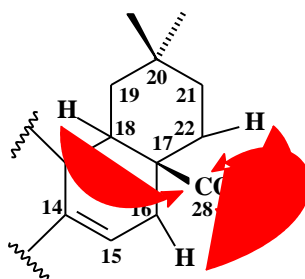
Por meio do espectro de HMBC (Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações, *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) (Apêndice G) foram observados os acoplamentos à longa distância entre hidrogênios e carbonos (acoplamentos  $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ). Desta forma, a exata posição do grupamento éster metílico foi determinada, através da concomitante correlação dos sinais do hidrogênio ligado a carbono oxigenado em  $\delta$  4,47 (1H-3), e da metila do grupo acetil em  $\delta$  2,04 (3H-32) com o sinal do carbono carbonílico em  $\delta$  171,20. Outras importantes correlações foram observadas entre o hidrogênio metínico em  $\delta$  0,86 (1H-5), dos grupos metilas em  $\delta$  0,86 (3H-23) e 0,89 (3H-24), e dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  1,60 (2H-1) e  $\delta$  1,63 (2H-2) com o carbono oxigenado em  $\delta$  81,13 (C-3), o que confirmou a posição do grupo éster ligado a C-3 do esqueleto oleanano no fragmento 1 (Figura 13).

**Figura 13** – Fragmento 1 da molécula ácido acetil aleuritólico



As correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,44 (2H-22), 2,26 (1H-18) e 2,38 (2H-16) com a carbonila em  $\delta$  184,46 (C-28) possibilitaram identificar a localização da carbonila do ácido carboxílico ligado ao carbono C-17 no fragmento 2 (Figura 14). A posição da dupla ligação trissubstituída foi determinada através da correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,53 (H-15) com os carbonos em  $\delta$  41,65(C-18), 31,56(C-16) e dos hidrogênios  $\delta$  2,26 (H-18), 1,63 (H-12), 1,63 (H-11) e 1,41 (H-9) com o carbono  $\delta$  160,79 (C-14) no fragmento 3 (Figura 15).

**Figura 14** - Fragmento 2 da molécula ácido acetil aleuritólico



**Figura 15** - Fragmento 3 da molécula ácido acetil aleuritólico



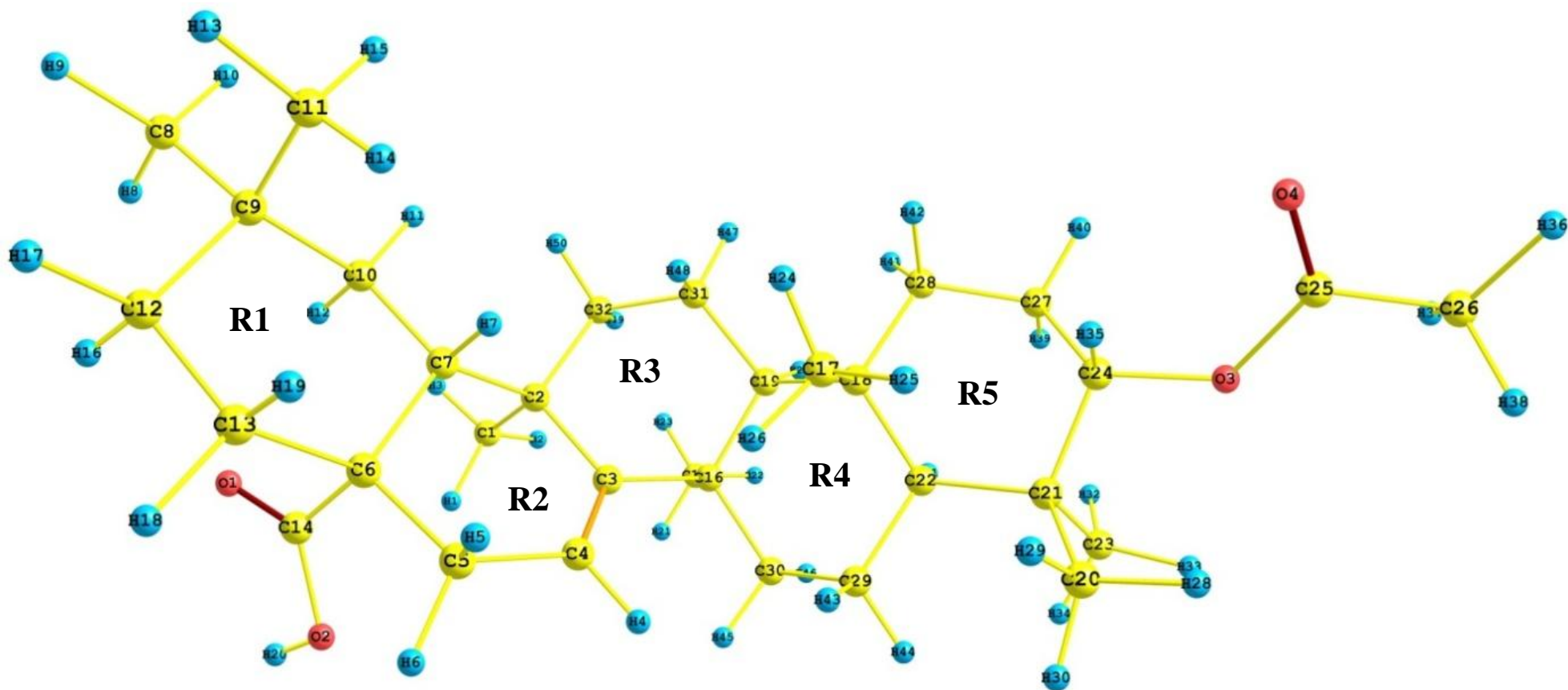
Analisando todos os dados espectroscópicos obtidos (Apêndice H) e por comparação com dados descritos na literatura para triterpenosoleananos foi possível identificar o composto, como sendo o ácido 3-acetil-olean-14-en-28-oico, também denominado de ácido acetil aleuritólico.

## 5.2 Análise estrutural

### 5.2.1 Estrutura química do ácido acetil aleuritólico (AAA)

O ácido acetil aleuritólico possui fórmula molecular  $C_{32}H_{50}O_4$ , sendo constituído por 86 átomos distribuídos em 5 anéis (R1, R2, R3, R4 e R5). A estrutura molecular otimizada do AAA com os átomos identificados e numerados de acordo com o elemento químico (carbono, oxigênio e hidrogênio) está representada na Figura 16. Nesta figura os traços representados pela cor laranja e vermelha são ligações duplas, enquanto os com cores amarela são ligações simples.

**Figura 16** - Estrutura química otimizada do ácido acetil aleuritólico com a identificação dos átomos de acordo com o elemento químico (carbono, oxigênio e hidrogênio)



### 5.2.2 Parâmetros geométricos do ácido acetil aleuritólico

Os resultados dos parâmetros geométricos relacionados ao comprimento das ligações, ângulos das ligações e diedros das ligações entre os átomos do ácido acetil aleuritólico podem ser observados nos Apêndice I, Apêndice J e Apêndice L, respectivamente.

## 5.3 Espectroscopia vibracional

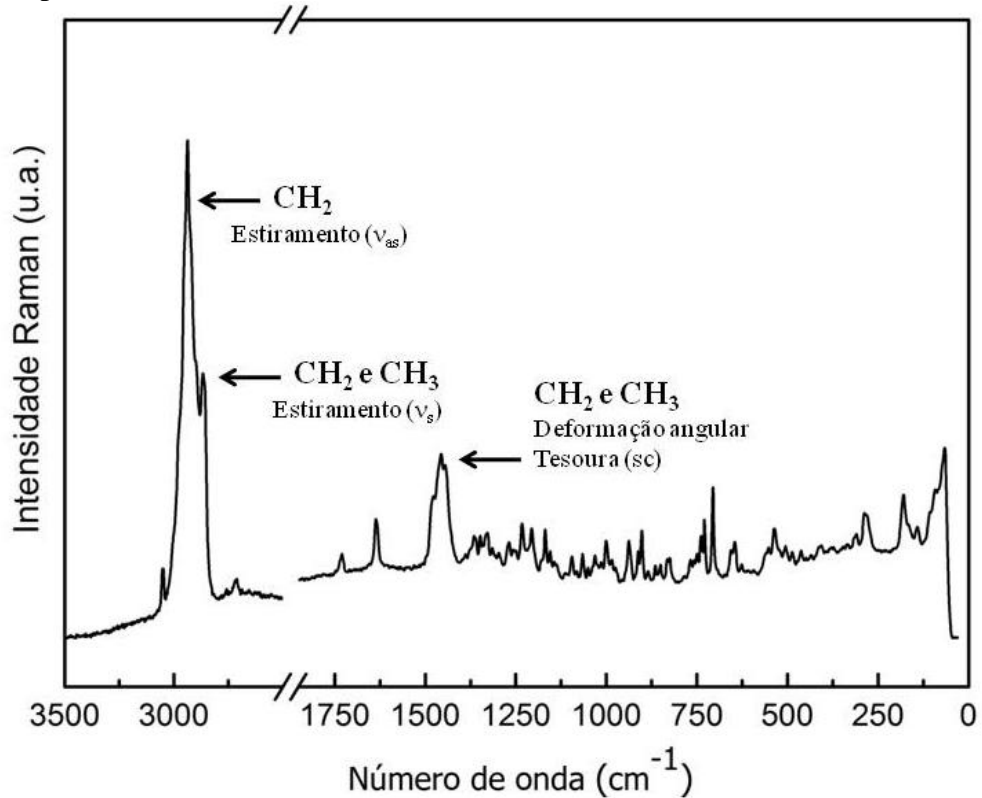
### 5.3.1 Dados experimentais de FT-Raman e FTIR-ATR do AAA

Os espectros FT-Raman e FTIR-ATR da amostra policristalina do AAA foram medidos à temperatura ambiente na região espectral de  $40\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ , e de  $600\text{ cm}^{-1}$  a  $4.000\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

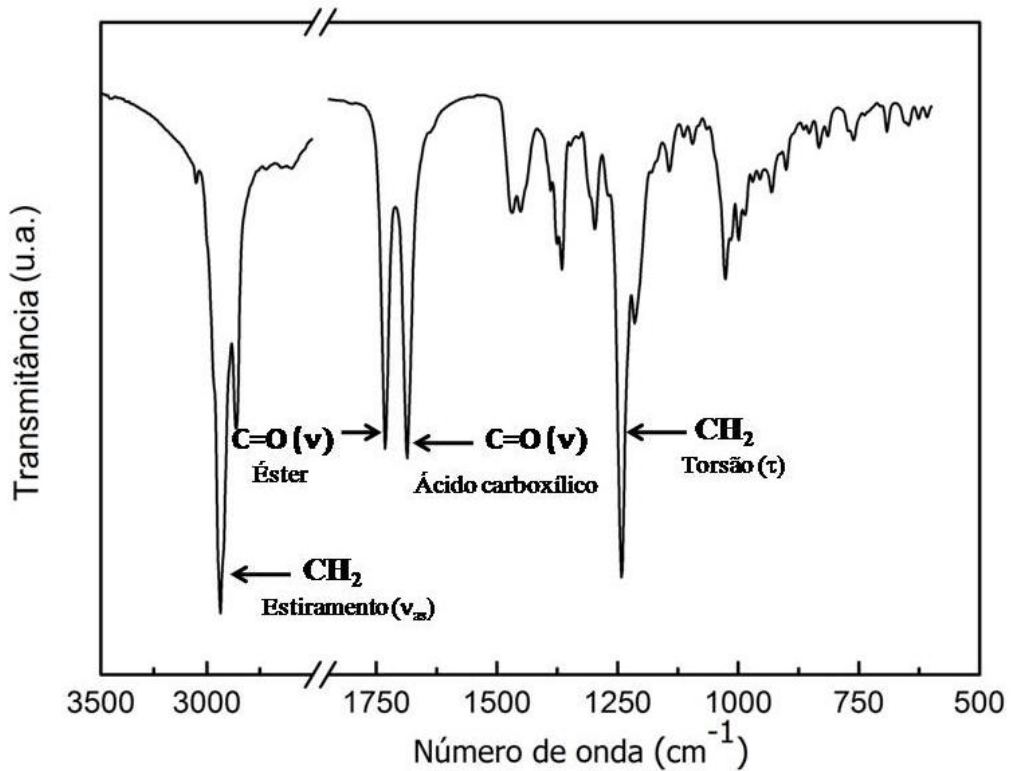
No espectro Raman (Figura 17) foram observadas bandas muito fortes com número de onda de  $2.936\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a um estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) dos grupos  $\text{C}(29)\text{H}_2$  e  $\text{C}(30)\text{H}_2$  e número de onda de  $2.898\text{ cm}^{-1}$  que resulta de um estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) de  $\text{C}(15)\text{H}_3$ ,  $\text{C}(29)\text{H}_2$  e  $\text{C}(30)\text{H}_2$ ; já o número de onda de  $1.456\text{ cm}^{-1}$ , classificado como forte é característico de uma deformação angular do AAA do tipo tesoura ( $\nu$ ) nos grupos  $\text{C}(1)\text{H}_3$ ,  $\text{C}(15)\text{H}_3$  e  $\text{C}(32)\text{H}_2$ .

A banda mais intensa observada no espectro de Infravermelho (Figura 18) foi a de  $2.936\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a um estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) do  $\text{C}(29)\text{H}_2$  e  $\text{C}(30)\text{H}_2$ . Outras bandas muito fortes foram as com números de onda de  $1.730$  e  $1.686\text{ cm}^{-1}$ , que são características do estiramento do grupo  $\text{C}=\text{O}$ , a primeira banda corresponde a carbonila presente no grupo funcional éster e a segunda ao ácido carboxílico. Outro número de onda destacado no gráfico foi o de  $1.241\text{ cm}^{-1}$ , resultante da deformação angular do tipo torção ( $\tau$ ) nos grupos  $\text{C}(29)\text{H}_2$ ,  $\text{C}(30)\text{H}_2$ ,  $\text{C}(31)\text{H}_2$  e  $\text{C}(32)\text{H}_2$ . Comparando-se o espectro Raman com o infravermelho, pode-se observar que a vibração dos grupos  $\text{C}(29)\text{H}_2$  e  $\text{C}(30)\text{H}_2$  ocorreram em ambos os espectros com número de onda idêntico de  $2.936\text{ cm}^{-1}$  e caracteriza um estiramento assimétrico.

**Figura 17** - Espectro FT-Raman da molécula ácido acetil aleuritólico à temperatura ambiente na região espectral de  $3.500\text{ cm}^{-1}$  a  $250\text{ cm}^{-1}$



**Figura 18** - Espectro FTIR-ATR da molécula ácido acetil aleuritólico à temperatura ambiente na região espectral de  $3.500\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$





O estiramento O-H de ácido carboxílico apresenta-se como uma banda larga no espectro infravermelho, entre  $3.500\text{ cm}^{-1}$  e  $2.400\text{ cm}^{-1}$ , mas não no espectro Raman. No caso do AAA, no espectro de FTIR-ATR podemos observá-la pela variação na curvatura do espectro antes e depois de  $3.000\text{ cm}^{-1}$ , sobreposta pelas bandas de estiramento C-H, de maior intensidade (Figura 18) (LAMPMAN *et al.*, 2010).

### 5.3.2 Comparação entre dados experimentais e calculados e classificação dos modos vibracionais

A molécula  $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$  possui 86 átomos, portanto existem 258 graus de liberdade ( $3N$ ), excluindo-se os três modos rotacionais e os três movimentos translacionais ( $3N - 6$ ) são esperados 252 modos vibracionais para o AAA.

O fator de escala ( $\lambda$ ) obtido foi de 0,9517 com o erro quadrático total ( $\text{rms}_{\text{tot}}$ ) correspondente igual a  $14,9\text{ cm}^{-1}$ . Quanto mais próximo de 1 for o valor do fator de escala, significa que mais próximo foram as frequências teóricas das experimentais. Os valores obtidos para o AAA foram menores que os valores obtidos por outros autores, quando se utiliza o método DFT, o funcional B3LYP e a base 6-31 G. Wong (1996) em seu trabalho obteve  $\lambda = 0,9613$  e  $\text{rms} = 34\text{ cm}^{-1}$ ; Scott e Radom (1996) obtiveram  $\lambda = 0,9614$  e  $\text{rms} = 34\text{ cm}^{-1}$ ; Bytheway e Wong (1998) observaram um  $\lambda = 0,9929$  e  $\text{rms} = 32\text{ cm}^{-1}$ . Portanto, o valor do fator escala para a molécula AAA foi menor que os valores apresentados para esses trabalhos e o erro calculado para verificar a concordância entre as frequências experimentais e calculadas pelo método DFT foi em torno de 46,56% menor do que os observados por Wong (1996) e Scott e Radom (1996).

Os números de onda calculados são comparados com as posições da banda Raman e Infravermelho, sendo realizadas as atribuições para cada modo de vibração correspondente. Uma boa concordância foi observada quando os números de onda calculados são ajustados pelo fator de escala 0,9517. Na Tabela 4 há uma descrição detalhada dos números de onda atribuídos a cada modo vibracional do AAA à temperatura ambiente. Na 1ª coluna estão os valores dos números de onda calculados pelo método DFT ( $\omega_{\text{calc}}$ ), na 2ª coluna os números de onda escalonados ( $\omega_{\text{esc}}$ ) e na 3ª e 4ª coluna os valores experimentais para AAA, em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), obtidos por espectroscopia Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e por Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ), respectivamente, já na 5ª coluna está representada a classificação dos modos vibracionais.

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
10	10			$\tau$ ( $\text{R}_s$ )
25	24			$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{R2}$ )
42	40			$\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
49	47			$\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
52	49			$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C24O3C2526}$ )
58	55			$\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
60	57	67 s		$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C26H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{O1C14O2H}$ )
73	69	72 s		$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{C26H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{O1C14O2H}$ )
82	78			$\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
95	90	93 m		$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
109	104	107 m		$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C26H}_3$ )
135	128			$\tau$ ( $\text{R4}$ ) + $\tau$ ( $\text{R5}$ )
142	135			$\tau$ ( $\text{R3}$ ) + $\tau$ ( $\text{R4}$ ) + $\tau$ ( $\text{R5}$ )
149	142	142 m		$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ )
165	157			$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{R3}$ ) + $\tau$ ( $\text{C18C9C11}$ )
175	167	165 m		$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{R3}$ ) + $\tau$ ( $\text{C18C9C11}$ )
195	186	180 m		$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
210	200			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C17H}_3$ )
215	205			$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{C11H}_3$ + $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
224	213			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C11H}_3$ + $\text{C15H}_3$ )
227	216			$\tau$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ )
230	219			$\tau$ ( $\text{R4}$ ) + $\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C17H}_3$ + $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{C27H}_2$ + $\text{C28H}_2$ )
237	226			$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C17H}_3$ )
239	227			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
255	243			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ )
259	246			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C20H}_3$ )
264	251			$\tau$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{R3}$ ) + $\tau$ ( $\text{R4}$ ) + $\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C20H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C4H}$ )
269	256			$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
275	262			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C15H}_3$ + $\text{C20H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
278	265			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ + $\text{C15H}_3$ )
281	267	279 m		$\delta$ ( $\text{R1}$ ) + $\tau$ ( $\text{C23H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{C13H}_2$ )
296	282			$\delta$ ( $\text{R1}$ ) + $\delta$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C15H}_3$ + $\text{C23H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{C13H}_2$ )
297	283	288 m		$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C15H}_3$ + $\text{C23H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{C13H}_2$ )
307	292			$\tau$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C15H}_3$ + $\text{C23H}_3$ + $\text{C26H}_3$ )
311	296			$\tau$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ + $\text{C15H}_3$ + $\text{C17H}_3$ )
317	302	310 m		$\delta$ ( $\text{R1}$ ) + $\delta$ ( $\text{R2}$ ) + $\tau$ ( $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ ) + $\tau$ ( $\text{C12H}_2$ )
336	320	318 m		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\delta$ ( $\text{C1C2C3}$ ) + $\delta$ ( $\text{C28H}_2$ + $\text{C29H}_2$ )
347	330	332 w		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C15H}_3$ + $\text{C17H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C29H}_2$ )
352	335	337 w		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C1H}_3$ + $\text{C8H}_3$ + $\text{C11H}_3$ + $\text{C17H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C10H}_2$ + $\text{C12H}_2$ + $\text{C29H}_2$ + $\text{C30H}_2$ )
357	340	347 w		$\delta$ ( $\text{R3}$ ) + $\delta$ ( $\text{R4}$ ) + $\delta$ ( $\text{R5}$ ) + $\tau$ ( $\text{C15H}_3$ + $\text{C17H}_3$ + $\text{C23H}_3$ )
365	347			$\delta$ ( $\text{R3}$ ) + $\delta$ ( $\text{R4}$ ) + $\tau$ ( $\text{C17H}_3$ + $\text{C20H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C30H}_2$ )
370	352	353 w		$\delta$ ( $\text{R1}$ ) + $\delta$ ( $\text{R2}$ ) + $\delta$ ( $\text{R3}$ ) + $\delta$ ( $\text{C5H}_2$ + $32\text{H}_2$ )
378	360	360 w		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C15H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C30H}_2$ )
384	365	373 w		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C26H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C32H}_2$ ) + $\delta$ ( $\text{O1C14O2H}$ )
393	374	378 w		$\delta$ ( $\text{R}_s$ ) + $\tau$ ( $\text{C20H}_3$ + $\text{C26H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{C12H}_2$ + $32\text{H}_2$ )
399	380	383 w		$\delta$ ( $\text{R1}$ ) + $\delta$ ( $\text{R2}$ ) + $\delta$ ( $\text{R3}$ ) + $\delta$ ( $\text{C8C9C11}$ ) + $\delta$ ( $\text{C5H}_2$ + $\text{C12H}_2$ )

Continua

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
412	392	392 w		$\delta$ (R1) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> )
424	404	407 w		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> )
433	412	414 w		$\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C17H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C28H <sub>2</sub> )
443	422	423 w		$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
453	431	434 w		$\delta$ (R1) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
469	446	437 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
476	453	449 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
492	468	462 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
502	478	473 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
509	484	487 w		$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\delta$ (C20C21C23) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> )
522	497			$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
531	505	505 w		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H + C7H)
544	518	522 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\delta$ (O3C25C26) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )
554	527			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (O1C14O2H) + $\delta$ (C7H)
564	537	536m		$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
573	545	552 w		$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) +
591	562	559 w		$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
602	573			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\tau$ (C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (O3C25O4)
606	577	593 vw		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (O3C25O4)
639	608	610 vw	609 vw	$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (O1C14O2H)
658	626	626 vw	626 vw	$\delta$ (R5) + $\nu$ (C25C6) + $\delta$ (O3C25O4) + $\delta$ (C24H)
663	631	646 w	647 vw	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (O1C14O2H)
684	651	657 w	655 vw	$\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
699	665			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\delta$ (O1C14O2H) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
707	673	674 vw		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (O1C14O2H)
727	692		692 vw	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (O1C14O2H) + $\nu_s$ (C8C9C11) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
730	695			$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\nu_s$ (C17C18C28) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
742	706	706 s		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\nu_s$ (C8C9C11) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (O1C14O2H)
773	736	729 m	739 vw	$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\nu_s$ (C20C21C23) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (O1C14O2H)
781	743	750 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (O1C14O2H)
787	749	759 w	750vw	$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\delta$ (C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
810	771	768 w	771 vw	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
818	778	785 vw		$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
830	790			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
845	804	805 vw	815 vw	$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C15H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
858	817	826 w		$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )
873	831	832 w	832 vw	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (C4H)
898	855	851 vw		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )

Continuação

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
902	858	856 vw	853 vw	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
913	869			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
919	875			$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\nu_s$ (C20C21C23) + $\nu$ (C25C26) + $\delta$ (O3C25O4)
922	877			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
932	887	885 vw	888 vw	$\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C29H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C22H)
938	893			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
942	897			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> )
946	900	903 m	901 w	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> )
952	906			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> )
959	913	913 w		$\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C30H <sub>2</sub> )
975	928			$\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C22H <sub>2</sub> )
977	930			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
984	937	938 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H + C24H)
985	937			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C12H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
989	941			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H)
1005	956	957 vw	956 w	$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
1007	958			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C32H <sub>2</sub> )
1012	963			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C12H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
1013	964	975 vw	970 w	$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H + C24H)
1025	975	984 w	986 m	$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H + C24H)
1032	982			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\tau$ (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H)
1034	984			$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C24H)
1040	990			$\delta$ (R4) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )
1047	996	1000 w		$\delta$ (R <sub>s</sub> ) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1053	1002			$\delta$ (R2) + $\delta$ (R5) + $\tau$ (C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )
1056	1005	1014 w	1015 m	$\delta$ (R2) + $\delta$ (C24O3C25C26)
1062	1011			$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\tau$ (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H)
1065	1014			r (C26H <sub>3</sub> )
1071	1019			$\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + r (C15H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H + C19H + C24H)
1079	1027	1026 w	1027 s	$\delta$ (R1) + $\delta$ (R2) + $\delta$ (R3) + $\delta$ (R4) + r (C1H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C19H)

Continuação

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
1087	1034	1032 w		$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C20H}_3) + \delta (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C7H} + \text{C19H} + \text{C24H})$
1090	1037	1038 vw		$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C8H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C20H}_3) + \delta (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C4H} + \text{C7H})$
1098	1045	1050 vw	1047 vw	$\delta (\text{R1}) + \delta (\text{R2}) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C8H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3) + \delta (\text{C5H}_2 + \text{C28H}_2)$
1114	1060			$\delta (\text{R4}) + \delta (\text{R5}) + \delta (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C29H}_2) + \delta (\text{C22H})$
1120	1066	1066 w	1066 vw	$\delta (\text{R}_s) + \delta (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C31H}_2)$
1129	1074			$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2) + \delta (\text{C22H} + \text{C24H})$
1136	1081	1082 vw		$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C8H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2) + \delta (\text{C7H} + \text{C19H} + \text{C22H}) + \delta (\text{C14O2H})$
1141	1086			$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2) + \delta (\text{C22H}) + \delta (\text{C14O2H})$
1153	1097	1096 w	1095 vw	$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C8H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C4H} + \text{C7H} + \text{C19H} + \text{C22H}) + \delta (\text{C14O2H})$
1164	1108			$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3) + \tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C7H} + \text{C22H} + \text{C24H})$
1175	1118	1113 vw	1112 vw	$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C14O2H})$
1181	1124	1117 vw		$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C11H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1185	1128			$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C1H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C13H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1195	1137	1138 vw		$\delta (\text{R}_s) + \tau (\text{C11H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2) + \delta (\text{C14O2H})$
1198	1140			$\tau (\text{C8H}_3 + \text{C15H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2) + \delta (\text{C14O2H})$
1203	1145	1144 w	1143 w	$\tau (\text{C8H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2) + \delta (\text{C4H} + \text{C7H})$
1212	1153			$\tau (\text{C8H}_3 + \text{C11H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2)$
1215	1156	1156 w		$\tau (\text{C1H}_3 + \text{C8H}_3 + \text{C11H}_3 + \text{C15H}_3 + \text{C17H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1227	1168	1169 m	1168 vw	$\tau (\text{C17H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2)$
1241	1181	1179 w	1178 vw	$\tau (\text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1245	1185			$\tau (\text{C27H}_2 + \text{C28H}_2)$
1251	1191			$\tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2)$
1252	1192			$\tau (\text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + \tau (\text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1263	1202	1206 m		$\tau (\text{C15H}_3) + \tau (\text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1277	1215		1214 s	$\text{wag} (\text{C26H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{O3C25O4})$
1281	1219			$\text{wag} (\text{C26H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C4H} + \text{C7H} + \text{C24H}) + \delta (\text{O3C25O4})$
1290	1228			$\tau (\text{C8H}_3 + \text{C11H}_3) + \tau (\text{C5H}_2 + \text{C10H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C27H}_2 + \text{C28H}_2) + \delta (\text{C7H} + \text{C24H}) + \delta (\text{C14O2H})$
1296	1233	1233 m		$\text{wag} (\text{C27H}_2) + \tau (\text{C28H}_2 + \text{C29H}_2 + \text{C32H}_2) + \delta (\text{C19H})$
1304	1241		1241 vs	$\tau (\text{C29H}_2 + \text{C30H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
1310	1247	1250 w		$\tau (\text{C5H}_2 + \text{C12H}_2 + \text{C13H}_2) + \delta (\text{C14O2H})$

Continuação

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
1326	1262	1257 w		wag (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C19H)
1330	1266			wag (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C19H) + $\delta$ (C14O2H)
1333	1269	1270 w	1270 m	wag (C10H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C19H) + $\delta$ (C14O2H)
1344	1279			wag (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H) + $\delta$ (C14O2H)
1351	1286			wag (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C22H + C24H)
1358	1292			wag (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C24H)
1362	1296	1297 w	1297 m	wag (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C19H + C22H)
1368	1302			wag (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C7H + C22H)
1371	1305			wag (C29H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C19H+ C22H)
1377	1310			wag (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C7H + C19H+ C24H)
1379	1312	1316 w	1310 m	wag (C27H <sub>2</sub> +C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H + C22H+ C24H)
1383	1316			wag (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H + C24H)
1388	1321			wag (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> +C13H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H)
1390	1323			wag (C17H <sub>3</sub> ) + wag (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> +C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C7H + C19H+ C22H)
1393	1326	1331 m	1330 vw	wag (C17H <sub>3</sub> ) + wag (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C7H + C19H+ C22H+ C24H)
1400	1332			wag (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C4H+ C7H + C19H+ C22H)
1404	1336			wag (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H + C19H+ C22H)
1406	1338			wag (C26H <sub>3</sub> ) + wag (C29H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C22H + C24H)
1408	1340			wag (C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> + C26H <sub>3</sub> ) + wag (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H + C22H)
1410	1342			wag (C15H <sub>3</sub> ) + wag (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C22H)
1412	1344			wag (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> )
1415	1347	1348 m	1347 vw	wag (C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + $\delta$ (C22H + C24H)
1416	1348			wag (C1H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + wag (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C7H)
1426	1357			wag (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + wag (C27H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C24H)
1427	1358			wag (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + wag (C27H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C24H)
1429	1360	1364 m	1365 s	wag (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + wag (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H+ C24H)
1435	1366			wag (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + wag (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H+ C22H + C24H)
1439	1369			wag (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + wag (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C19H+ C22H + C24H)
1443	1373	1376 w	1376 m	wag (C17H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + wag (C28H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> ) + $\delta$ (C22H+ C24H)
1484	1412	1390 w		wag (C26H <sub>3</sub> )
1489	1417			sc (C15H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1490,3	1418			sc (C26H <sub>3</sub> )

Continuação

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
1490,5	1418			sc (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> +C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1494	1422			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
1496	1424			sc (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
1496	1424			sc (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
1499	1427			sc (C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
1501	1429			sc (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> )
1502	1429			sc (C1H <sub>3</sub> + C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> + C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
1504	1431			sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
1505	1432			sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> +C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1508	1435			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> +C15H <sub>3</sub> +C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C5H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
1509	1436			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1513	1440			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> +C15H <sub>3</sub> +C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> + C31H <sub>2</sub> + C32H <sub>2</sub> )
1515	1442			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> +C15H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> + C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
1517	1444	1445 s		sc (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> + C29H <sub>2</sub> )
1520	1447			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + sc (C10H <sub>2</sub> + C12H <sub>2</sub> )
1522	1448			sc (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )
1526	1452			sc (C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> + C23H <sub>3</sub> ) + sc (C27H <sub>2</sub> )
1527	1453			sc (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> )
1528	1454	1456 s	1451 m	sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C32H <sub>2</sub> )
1532	1458			sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> )
1534	1460			sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> + C17H <sub>3</sub> + C20H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
1541	1467		1468 m	sc (C1H <sub>3</sub> + C15H <sub>3</sub> ) + sc (C32H <sub>2</sub> )
1543	1468	1477 m		sc (C17H <sub>3</sub> ) + sc (C29H <sub>2</sub> )
1723	1640	1635 m	1636 vw	v (C3C4)
1806	1719	1730 w	1686 vs	v (O1C14)
1822	1734	1736 w	1730 vs	v (O4C25)
2991	2847	2714 vw	2716 w	v (C22H)
2998	2853	2866 vs	2862 vs	v (C5H <sub>2</sub> )
3009	2864			v (C19H)
3018	2872			v (C7H)
3027	2881			v <sub>s</sub> (C8H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
3030	2884			v <sub>s</sub> (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
3035	2888			v <sub>s</sub> (C11H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C12H <sub>2</sub> + C13H <sub>2</sub> )
3036	2889	2898 vs		v <sub>s</sub> (C15H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C29H <sub>2</sub> + C30H <sub>2</sub> )
3041	2894			v <sub>s</sub> (C8H <sub>3</sub> + C11H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C13H <sub>2</sub> )
3046	2899			v <sub>s</sub> (C23H <sub>3</sub> ) + v <sub>s</sub> (C27H <sub>2</sub> + C28H <sub>2</sub> )

Continuação

**Tabela 4-** Número de onda calculado ( $\omega_{\text{calc}}$ ), número de onda escalonado ( $\omega_{\text{esc}}$ ) pelo fator de escala 0,9517, números de onda experimentais observados no Raman ( $\omega_{\text{FT-Raman}}$ ) e Infravermelho ( $\omega_{\text{FT-IR}}$ ) à temperatura ambiente (em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ) e classificação para os modos vibracionais do composto ácido acetil aleuritólico ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ )

$\omega_{\text{calc}}$	$\omega_{\text{esc}}$	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais
3047	2900			$v_s(\text{C15H}_3 + \text{C23H}_3)$
3047	2900			$v_s(\text{C15H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + v_s(\text{C29H}_2)$
3051	2904			$v_s(\text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + v_s(\text{C29H}_2 + \text{C30H}_2)$
3052	2905			$v_s(\text{C20H}_3 + \text{C23H}_3) + v_s(\text{C27H}_2 + \text{C12H}_2)$
3056	2908			$v_s(\text{C10H} + \text{C32H}_2)$
3057	2909			$v_s(\text{C17H}_3 + \text{C20H}_3 + \text{C23H}_3)$
3059	2911			$v_s(\text{C10H}_2 + \text{C31H}_2)$
3066	2918			$v_s(\text{C26H}_3)$
3068	2920	2924 vs	2923 vs	$v_{\text{as}}(\text{C13H}_2 + \text{C12H}_2)$
3074	2926			$v_s(\text{C1H}_3 + \text{C32H}_2)$
3077	2928	2936 vs	2936 vs	$v_{\text{as}}(\text{C30H}_2 + \text{C29H}_2)$
3077	2928			$v_s(\text{C17H}_3 + \text{C1H}_3 + \text{C32H}_2)$
3080	2931			$v_s(\text{C17H}_3) + v_s(\text{C1H}_3)$
3086	2937			$v_{\text{as}}(\text{C28H}_2) + v_{\text{as}}(\text{C27H}_2)$
3092	2943			$v(\text{C24H}) + v_{\text{as}}(\text{C5H}_2)$
3092	2943			$v_{\text{as}}(\text{C5H}_2)$
3095	2946	2951 vs		$v_{\text{as}}(\text{C8H}_3)$
3099	2949			$v_{\text{as}}(\text{C36H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C22H})$
3103	2953			$v_{\text{as}}(\text{C8H}_3)$
3105	2955			$v_{\text{as}}(\text{C8H}_3 + \text{C11H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C12H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
3105	2955			$v_{\text{as}}(\text{C8H}_3 + \text{C15H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C12H}_2 + \text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
3107	2957			$v_{\text{as}}(\text{C15H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C27H}_2)$
3109	2959			$v_{\text{as}}(\text{C23H}_2) + v_{\text{as}}(\text{C27H}_3) + v(\text{C4H})$
3110	2960			$v_{\text{as}}(\text{C8H}_3 + \text{C11H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C12H}_2)$
3112	2962			$v_{\text{as}}(\text{C23H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C27H}_2)$
3113	2963			$v_{\text{as}}(\text{C11H}_3)$
3116	2965			$v_{\text{as}}(\text{C31H}_2 + \text{C32H}_2)$
3120	2969	2977 s	2971 vs	$v_{\text{as}}(\text{C20H}_3)$
3124	2973			$v_{\text{as}}(\text{C10H}_2)$
3132	2981			$v_{\text{as}}(\text{C26H}_3)$
3133	2982			$v_{\text{as}}(\text{C17H}_3 + \text{C20H}_3)$
3140	2988			$v_{\text{as}}(\text{C23H}_3)$
3142	2990			$v_{\text{as}}(\text{C17H}_3) + v_{\text{as}}(\text{C20H}_3)$
3149	2997	3003 w	2999 m	$v_{\text{as}}(\text{C1H}_3)$
3160	3007			$v_{\text{as}}(\text{C17H}_3)$
3166	3013			$v_{\text{as}}(\text{C1H}_3)$
3180	3026			$v_{\text{as}}(\text{C26H}_3)$
3186	3032			$v_{\text{as}}(\text{C15H}_3) + v(\text{C4H})$
3187	3033	3050 vw	3050 w	$v_{\text{as}}(\text{C15H}_3) + v(\text{C4H})$
3742	3561			$v(\text{O2H})$

Conclusão

**Nomenclatura:**

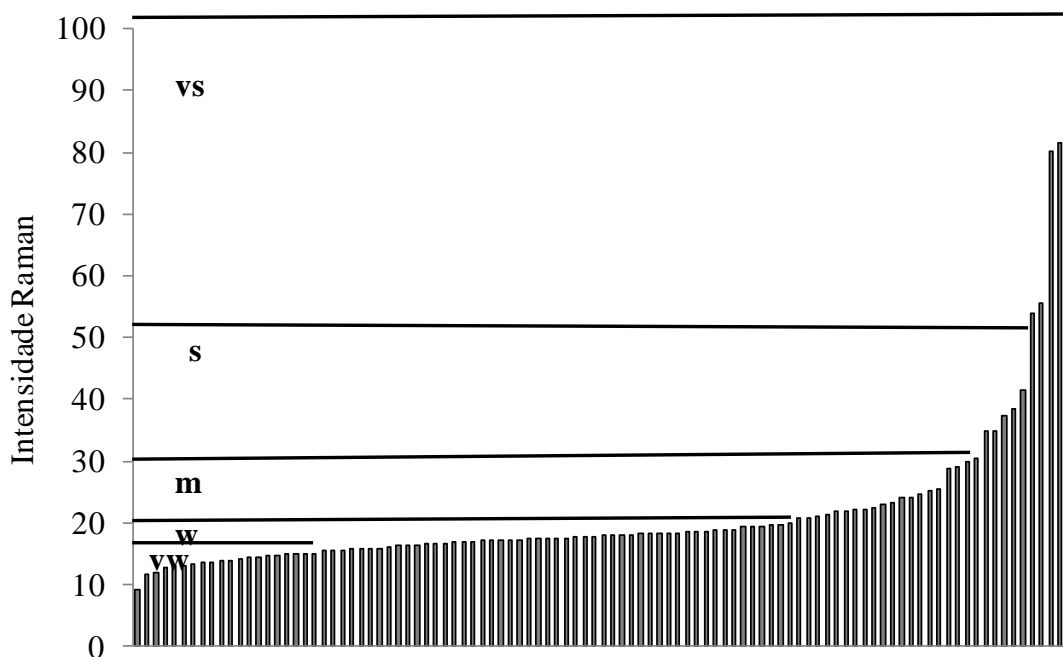
R = anel (*ring* R1, R2, R3, R4, R5);  $R_s$  = todos os anéis;  $\tau$  = torção (*twisting*);  $\delta$  = deformação (*bending*); r = balanço (*rocking*); wag = sacudida (*wagging*); sc = tesoura; (*scissoring*); v = estiramento (*stretching*);  $v_s$  = estiramento simétrico (*symetric stretch*);  $v_{\text{as}}$  = estiramento assimétrico (*asymetric stretch*); vs = muito forte (*very strong*); s = forte (*strong*); m = média (*medium*); w = fraca (*weak*); vw = muito fraca (*very weak*).



A atribuição para policristais de ácido acetil aleurítico mostra que a maioria das bandas no FT-Raman e FT-IR correspondem a misturas de modos de vibração. Na região entre  $10 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{cal}} \leq 1.098 \text{ cm}^{-1}$  podem ser observadas as deformações dos anéis, vibrações tipo torção dos anéis da estrutura, bem como dos grupos funcionais  $\text{CH}_2$ , e  $\text{CH}_3$ . Pode-se também observar uma localização acentuada dos modos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ : vibração do tipo *rocking* ( $r$  = balanço) são observadas na região entre  $1.065 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{cal}} \leq 1.290 \text{ cm}^{-1}$ , vibrações *wagging* ( $wag$  = sacudida) surgem na região entre  $1.277 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{cal}} \leq 1484 \text{ cm}^{-1}$  e vibrações tipo *scissoring* ( $sc$  = tesoura) aparecem na região entre  $1.489 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{cal}} \leq 1.543 \text{ cm}^{-1}$ . Para cristais orgânicos, a região entre  $2800 \text{ cm}^{-1}$  a  $3200 \text{ cm}^{-1}$  contém as bandas originadas a partir de estiramento dos grupos funcionais  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , e  $\text{OH}$ .

A distribuição das intensidades das bandas Raman é apresentada na Figura 19. No total foram identificadas 101 frequências Raman.

**Figura 19** - Distribuição das intensidades das bandas Raman (FT-Raman) do ácido acetil aleurítico



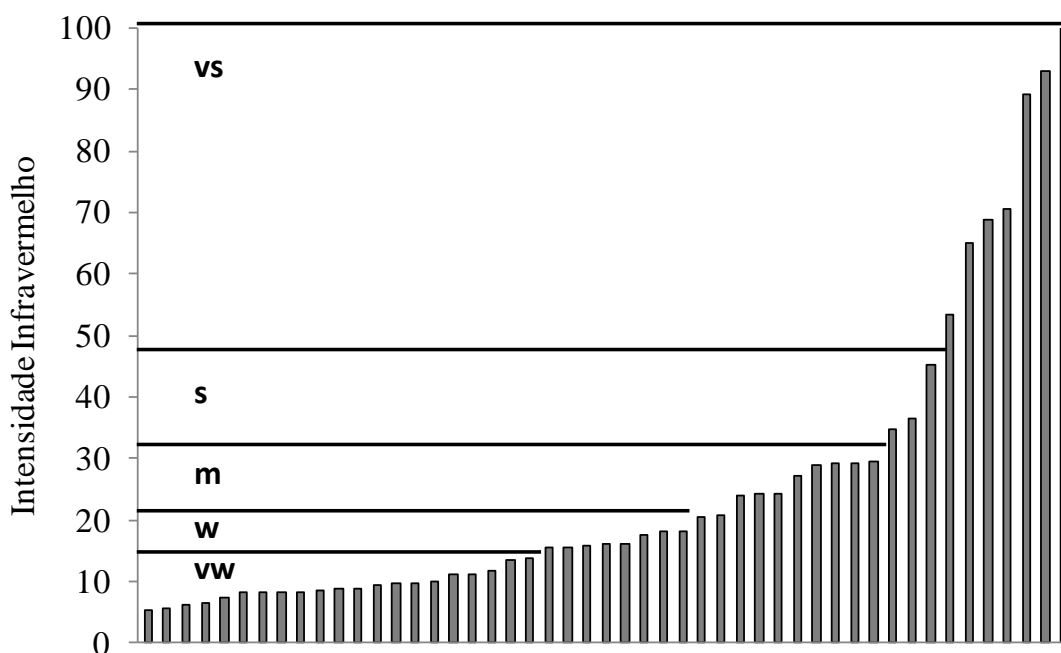
Nota: vs= muito forte (*very strong*); s = forte (*strong*); m = média (*medium*); w = fraca (*weak*); vw =muito fraca (*very weak*).

No espectro FT-Raman foram observadas 71 bandas que apresentaram intensidade abaixo de 20, ou seja, a maioria das bandas possui baixa (w) e muito baixa (vw) intensidade e a maioria delas encontra-se na região das vibrações características do AAA (região de *fingerprint* ou impressão digital). Pode-se observar, por exemplo, uma banda

Raman de baixa intensidade em  $1.376\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.443\text{ cm}^{-1}$ ) que foi identificada como sendo associada as vibrações:  $\text{wag}(\text{C}17\text{H}_3 + \text{C}23\text{H}_3) + \text{wag}(\text{C}28\text{H}_2 + \text{C}31\text{H}_2) + \delta(\text{C}22\text{H} + \text{C}24\text{H})$ . No entanto, nesta região também existem algumas bandas Raman de média (m) e de forte (s) intensidade. Destaca-se uma banda Raman de média intensidade em  $1.169\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.227\text{ cm}^{-1}$ ) identificada como vibrações do tipo *rocking*:  $r(\text{C}17\text{H}_3 + \text{C}20\text{H}_3 + \text{C}23\text{H}_3) + r(\text{C}27\text{H}_2 + \text{C}28\text{H}_2)$ . Uma banda Raman de forte intensidade é observada em  $1.456\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.528\text{ cm}^{-1}$ ) atribuída como sendo associada a vibrações do tipo *scissoring*:  $\text{sc}(\text{C}1\text{H}_3 + \text{C}15\text{H}_3) + \text{sc}(\text{C}32\text{H}_2)$ . Na região de estiramento dos grupos funcionais CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, observa-se quatro bandas Raman muito forte (vs) e uma forte (s), são elas observadas em:  $2.866, 2.898, 2.924, 2.936$  e  $2.977\text{ cm}^{-1}$ .

A distribuição das intensidades das bandas Infravermelho pode ser observada na Figura 20. No total foram identificadas 49 frequências IR.

**Figura 20** - Distribuição das intensidades das bandas Infravermelho (FTIR-ATR) do ácido acetil aleuritólico



Nota: vs= muito forte (*very strong*); s = forte (*strong*); m = média (*medium*); w = fraca (*weak*); vw =muito fraca (*very weak*).

No espectro FTIR-ATR foram observadas 29 bandas que apresentam intensidade abaixo de 20, ou seja, mais da metade das bandas IR possuem baixa e muito baixa intensidade e a maioria delas encontram-se na região abaixo de  $1.000\text{ cm}^{-1}$ . Uma banda IR de muito baixa intensidade é observada em  $692\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 727\text{ cm}^{-1}$ ) atribuídas como sendo associadas as

vibrações do tipo deformações dos anéis e dos CH<sub>2</sub> e COO:  $\delta$  (R1) +  $\delta$  (R2) +  $\delta$  (R3) +  $\delta$  (O1C14O2H) +  $\nu_s$  (C8C9C11) +  $\delta$  (C12H<sub>2</sub> + C13H<sub>2</sub>). Na região de impressão digital entre  $1.000 \text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{ATR-FTIR}} \leq 1.730 \text{ cm}^{-1}$  observa-se 10 bandas com baixa e muito baixa intensidade. Pode-se observar uma banda IR de baixa intensidade em  $1.143 \text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.203 \text{ cm}^{-1}$ ) que foi identificada como sendo associada as vibrações do tipo *rocking e twisting* (torsão):  $r$  (C8H<sub>3</sub>) +  $\tau$  (C5H<sub>2</sub> + C10H<sub>2</sub> + C12H<sub>2</sub> + C13H<sub>2</sub>) +  $\delta$  (C4H+ C7H). No entanto, nesta região também são encontradas 9 bandas IR de média, 3 bandas de forte e 3 bandas de muito forte intensidade. Destaca-se uma banda IR de média intensidade em  $1.297 \text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.362 \text{ cm}^{-1}$ ) identificada como vibrações do tipo *wagging*:  $wag$  (C5H<sub>2</sub> + C12H<sub>2</sub> + C13H<sub>2</sub> + C27H<sub>2</sub> + C28H<sub>2</sub> + C31H<sub>2</sub> + C32H<sub>2</sub>) +  $\delta$  (C4H+ C19H + C22H). Uma banda IR de forte intensidade é observada em  $1.365 \text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{cal}} = 1.429 \text{ cm}^{-1}$ ) atribuída como sendo associada a vibrações do tipo *wagging*:  $wag$  (C1H<sub>3</sub> + C15H<sub>3</sub>) +  $wag$  (C29H<sub>2</sub> + C30H<sub>2</sub>) +  $\delta$  (C19H+ C24H). Na região de estiramento dos grupos funcionais CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, observa-se 4 bandas IR muito forte nesta região, são elas observadas em: 2.862, 2.923, 2.936 e  $2.971 \text{ cm}^{-1}$ .

## 5.4 Atividade antimicrobiana

### 5.4.1 Concentração inibitória mínima do ácido acetil aleuritólico

A concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acetil aleuritólico (AAA) foi de  $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para todas as cepas bacterianas testadas (Tabela 5), portanto não houve diferença na sensibilidade ao composto entre as cepas Gram positivas e Gram negativas. O solvente dimetilsulfóxido (DMSO), que foi utilizado para solubilizar a amostra, também foi testado, a fim de se verificar se o efeito antimicrobiano seria somente da ação do composto ou teria influência do DMSO. Foi observado que a CIM do DMSO ( $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi semelhante a do AAA. Logo, não se pode afirmar que o AAA possui efeito inibidor do crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Tabela 5-** Concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acetil aleuritólico (AAA) e dimetilsulfóxido (DMSO) frente as cepas bacterianas

Bactérias	CIM ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ )	
	DMSO	AAA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	128	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4362	128	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	128	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128	128

Uma menor eficácia da atividade antibacteriana exercida por alguns produtos naturais, como o AAA, pode estar relacionada com a baixa solubilidade do composto nos solventes DMSO e água o que pode ocasionar uma baixa biodisponibilidade do composto em ensaios *in vivo* e *in vitro* (GIL *et al.*, 2008). Alguns testes de solubilidade de produtos naturais foram relatados, em que são utilizados sistemas de microemulsões para aumentar a biodisponibilidade. Então, foram testados tween 80 : span 20 (3:1) como surfactante, etanol como agente tensoativo, miristato de isopropila como óleo e água bidestilada em diferentes porcentagens. Esses métodos foram eficazes para solubilizar os clerodanos *trans*-desidrocotina (DCTN) e *trans*-crotonina (CTN), mas foram ineficazes na solubilização do ácido acetil aleuritólico (AAA). Portanto, uma abordagem alternativa para melhorar a disponibilidade em ensaios farmacológicos é o encapsulamento do AAA em nanopartículas de lipídio sólido ou ciclodextrina. A elucidação das propriedades da molécula AAA é de extrema importância, pois contribui para o êxito no encapsulamento do fármaco e, conseqüentemente, para o incremento da biodisponibilidade (PANYAM *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2008)

Mathabe *et al.* (2008) isolaram o ácido acetil aleuritólico a partir da casca do caule de *Spirostachys africana* Sond. e testaram seu efeito antibacteriano em microorganismos causadores de doença diarreica. Eles observaram que foi necessária uma concentração de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AAA para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 0232, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Shigella dysentery*, já para as bactérias *S. flexnerii* e *S. boydii* a CIM foi de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AAA. A concentração para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) relatada por Mathabe *et al.* (2008) foi menor do que a observada nesse trabalho para o AAA extraído de *C. zehntneri* ( $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Esses autores não informaram como foi

feita a preparação da amostra para utilização nos testes de CIM, se o AAA foi solubilizado em algum solvente que poderia interferir na atividade antimicrobiana. Peres *et al.* (1997) também testaram a atividade antibacteriana de AAA. O composto foi extraído da casca do caule de *Croton urucurana* Baillon e verificou-se o efeito frente as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (AS) ITAL SFCO 001 e *Salmonella typhi* (FTPTAT 1035), obtendo-se uma CIM de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Em outros estudos em que a avaliação da atividade antibacteriana utiliza o óleo essencial de *C. zehntneri* (variedade estragol), extraído de folhas secas, demonstrou-se que é necessária uma concentração de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do óleo para inibir o crescimento da bactéria *Shigella flexneri* ATCC 12022 (COSTA *et al.*, 2008).

Os valores de CIM para atividade antifúngica exercido pelo AAA estão representados na Tabela 6. Para a inibição do crescimento dos fungos *Candida albicans* 40006 e *C. krusei* 6258 a concentração necessária de DMSO foi a mesma que a do AAA (CIM de  $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), logo é muito provável que a atividade antifúngica esteja associada ao efeito do solvente e não propriamente a ação do composto testado. A CIM do DMSO frente a *C. tropicalis* 13803 foi de  $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , enquanto que para o composto AAA foi de  $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Contudo, quando o valor de concentração do Controle (DMSO) e da substância testada (AAA) para inibir o crescimento do micro-organismo difere em apenas 1 poço, não se considera a diferença significativa.

**Tabela 6-** Concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acetil aleuritólico (AAA) e dimetilsulfóxido (DMSO) frente as cepas fúngicas

Fungos	CIM ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	DMSO	AAA
<i>Candida albicans</i> 40006	128	128
<i>Candida krusei</i> 6258	128	128
<i>Candida tropicalis</i> 13803	128	64

Não existem estudos na literatura para a atividade antifúngica do AAA isolado e também há poucos relatos para a atividade exercida por óleo essencial de espécies de *C. zehntneri*. Fontenelle *et al.* (2008) observaram que a CIM do óleo essencial de *C. zehntneri*, extraído de folhas, para inibir o crescimento das cepas *Candida tropicalis* foi  $2.500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , para *C. albicans* foi  $\geq 5.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e *Microsporium canis* variou de 620 a  $1.250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 5.4.2 Atividade moduladora de aminoglicosídeos e antifúngicos

Avaliando-se o efeito exercido pelo composto AAA como modulador da atividade dos aminoglicosídeos, verifica-se que não houve diferença significativa entre os valores obtidos de CIM para o controle (antibióticos), o DMSO e o AAA, pois a diferença de inibição foi de apenas 1 poço (Tabela 7). Então, o AAA não modificou a atividade da amicacina, gentamicina e neomicina frente as bactérias multirresistentes *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 358 e *Pseudomonas aeruginosa* 03.

**Tabela 7-** Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) na presença de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do ácido acetil aleurítico (AAA) ou DMSO frente às bactérias *Escherichia coli* 27 (EC27), *Staphylococcus aureus* 358 (SA358) e *Pseudomonas aeruginosa* 03 (PA03)

Antibióticos	EC 27			SA358			PA03		
	Controle	AAA	DMSO	Controle	AAA	DMSO	Controle	AAA	DMSO
Amicacina	19,53	19,53	9,76	156,25	78,13	78,13	78,13	156,25	78,13
Gentamicina	4,88	4,88	2,44	9,76	19,53	4,88	39,06	39,06	19,53
Neomicina	78,13	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	312,50

O ácido acetil aleurítico combinado com os antifúngicos anfotericina B, benzoilmetronidazol, mebendazol e nistatina não interferiu na inibição do crescimento dos fungos *Candida albicans* 40006, *C. krusei* 6258 e *C. tropicalis* 13803. Portanto, a associação do composto com os antifúngicos não aumentou (sinergismo) e nem diminuiu (antagonismo) a inibição do crescimento dos fungos, sendo observado uma CIM maior ou igual a  $1.024\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para todos os tratamentos frente as cepas testadas (Tabela 8).

**Tabela 8-** Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) na presença de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do ácido acetil aleurítico (AAA) ou DMSO frente aos fungos *Candida albicans* 40006, *C. krusei* 6258 e *C. tropicalis* 13803

Antifúngicos	CA	CT	CK
	Controle	AAA	DMSO
Anfotericina B	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$
Benzoilmetronidazol	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$
Mebendazol	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$
Nistatina	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$

Não existem relatos na literatura utilizando-se o AAA isolado para avaliação do efeito modificador da atividade de antibióticos ou antifúngicos. Já para avaliação do efeito do óleo de *C. zehntneri*, Rodrigues *et al.* (2009) verificaram a ação deste como modulador da gentamicina e tetraciclina na inibição de *P. aeruginosa* ATCC 15442. Foi observado que o óleo aumentou a inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, quando combinado com a gentamicina e que não influenciou na atividade da tetraciclina.

## 6 CONCLUSÃO

- Foram obtidas 101 e 49 frequências experimentais para os espectros Raman e Infravermelho, respectivamente, e as bandas mais intensas foram identificadas, correspondendo às frequências de estiramentos e deformações angulares dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , bem como ao estiramento do grupo  $\text{C}=\text{O}$  associado as funções orgânicas éster e ácido carboxílico presentes no ácido acetil aleuritólico;
- A geometria estável da molécula (com conformação de mais baixa energia) foi obtida, os comprimentos, ângulos e diedros de ligação foram definidos e os 252 modos normais de vibração foram classificados;
- Os números de onda calculados foram bem correlacionados com os números de onda experimentais de FT-Raman e FTIR-ATR, pois o fator de escala e erro quadrático total obtidos estão de acordo com os valores previstos para o método DFT na literatura;
- O ácido acetil aleuritólico (AAA) não foi promissor como composto antimicrobiano, visto que a concentração inibitória mínima do AAA foi semelhante ao do solvente dimetilsulfóxido utilizado nos testes;
- O composto AAA não modificou a atividade dos antibióticos amicacina, gentamicina e neomicina e nem dos antifúngicos anfotericina B, benzoilmetronidazol, mebendazol e nistatina frente as cepas avaliadas.



## PERSPECTIVAS

Para dar continuidade ao estudo das propriedades biológicas, estruturais e vibracionais do triterpeno ácido acetil aleuritólico, enumeramos as seguintes perspectivas:

- Os dados obtidos neste trabalho poderão subsidiar futuros trabalhos de docagem molecular;
- Realização de medidas experimentais de espectroscopia Raman com variação de pressão e/ou temperatura para verificar se ocorre alguma transição de fase e/ou possíveis modificações das propriedades biológicas do composto;
- Verificar o encapsulamento do composto em nanopartículas de lipídio sólido ou ciclodextrina para avaliar se há uma diferença na inibição frente as mesmas cepas utilizadas neste trabalho, como também podem ser testados outros micro-organismos.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. A plasmid-encoded class I integron carrying *sat*, a putative phosphoserine phosphatase gene and *aadA2* from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 isolated in Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 243–248, 2004.
- ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L.; CARDOSO, J. H. Leal Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, n.1, p. 41–49, 1995.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE; MEDEIROS, P. M. DE A.; ALMEIDA, L. S. DE; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO E. M. DE F.; MELO, J. G. DE. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- AMARAL, A. C. F.; R. A. BARNES. A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1445-1447, 1998.
- AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resist Updates**, v. 4, p.106–117, 2001.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, vol. 20, p. 1-11, 1997.
- BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B. DE; PINTO, F. DAS C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.xy, n. 00, 200\_ . Publicado na web 2013.
- BATATINHA, M. J. M.; DE SOUZA- SPINOZA, H.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri*—Possible central-nervous system effects of the essential oil in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 53–57, 1995.
- BECKE, A. D. Density-Functional Thermo chemistry: The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p.5648-5652, 1993.
- BEHR, J. B. Chitin synthase as an antifungal target: recent advances. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents**, v. 2, n. 2, p. 1-17, 2003.
- BERRY, P.E. **Croton ResearchNetwork**. University of Wisconsin-Madison. 2002. Disponível em:<<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/brazil.html>>. Acesso em: 8 abr. 2013.
- BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; LLABRES, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1165-71, 2004.

- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. SS49–SS56, 2006.
- BYTHEWAY, I.; WONG, M. W. The prediction of vibrational frequencies of inorganic molecules using density functional theory. **Chemical Physics Letters**, v. 282, p. 219-226, 1998.
- BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, p. 44-49, 1997.
- BURGER, W.; HUFT, M. Family 113 – Euphorbiaceae. **Fieldiana**, new series, v. 36, p. 1-169, 1995.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288–294, 2007.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, vol. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
- CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; ALVES, K.; ROCHA, M. V. A. DE P.; LIMA, C. C.; CECATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 240–247, 2012
- CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1333–1338, 2006.
- CHAINY, G. B. N.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis, **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2943-2950, 2000.
- CHANG, C. M.; LU, F. H.; GUO, H. R.; KO, W. C. *Klebsiella pneumoniae* fascial space infections of the head and neck in Taiwan: emphasis on diabetic patients and repetitive infections. **Journal of Infection**, v. 50, p. 34–40, 2005.
- CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne- PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.
- COELHO DE SOUSA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C.C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on the intestinal smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v.11, n. 4, p. 299–304, 1997.

COELHO DE SOUSA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations on the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 189–194, 1998.

COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; HERRERA, J. O. M.; MACHADO, S. P. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química nova**, v. 22, n. 3, p.396-404, 1999.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARNEIRO-TORRES, D. S.; LIMA, L. R. DE; CARUZO, M. B. R.; BERRY, P.; RIINA, R. G.; SILVA, O. L. M.; SILVA, M. J. DA; SODRÉ, R. C. **Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013 Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 8 abr. 2013.

COSTA, J. G. M. DA; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K.; SOUZA, E. O. DE; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A. MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. DOS. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 583-586, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCAO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. P. J. R.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L.in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 467–471, 2010.

CRAVEIRO, A.; FERNANDES, A.; ANDRADE, C. H.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza-Ceará: UFC (Universidade Federal do Ceará), 1981. 209 p.

DEKKER J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: Lyr H. **Modern selective fungicides - Properties, applications, mechanisms of action**. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1995. p. 23-28.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Product- A biosynthetic approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley e Sons Ltd, 2009. 546p.

FELIU, D. A. DE. **Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Botânica)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2011.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana Infectologia**, v. 12, p. 44-50, 2010.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.18, p.761–770, 1999.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1383–1390, 2008.

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A-site of *E. coli*. 16 S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p.1367–1371, 1996.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR., T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C. OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLER, J. A. **Gaussian 03**, Revision B.02, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 547-557, 1998.

GIAMERLLOU, H. Aminoglycosides plus beta-lactams against Gram-negative organisms. **American Journal of Medicine**, v. 80, p. 126–137, 1986.

GIL, R. A. DA S. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B. DE; PINTO, A. DA C.; GOMES, F. DO E. S.; DANTAS, T. N. DE C.; MACIEL, M. A. M. Solid-state <sup>13</sup>C NMR and molecular modeling studies of acetyl aleuritic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. **Journal of Molecular Structure**, v. 885, p. 82–88, 2008.

GIORDANI, R.; TREBAUX, J.; MASI, M.; REGLI, P. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 1–5. 2001.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. Croton. In: **World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. 2 ed. London: Royal Botanic Gardens Kew, 2000. p. 417-536.

GUIMARÃES, C. **Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona**. 2011. Dissertação (Mestrado em Física)- Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, 2011.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL- FILHO, V.; RAO, V. S. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 409–412, 2005.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, p. 83–91, 2002.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre-RS: Bookman, 2009. 1055 p.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 140–50, 2006.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107–3113, 1996.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 385–389, 2007.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3249–3256, 2000.

LAMPMAN, G. M.; PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. 1. ed. Belmont - CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2010. 716 p.

LANGAT, M. K.; CROUCH, N. R.; POHJALA, L.; TAMMELA, P.; SMITH, P. J.; MULHOLLAND, D. A. Ent-kauren-19-oic acid derivatives from the stem bark of *Croton pseudopulchellus* Pax. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 414–418, 2012.

LAZARINI, C. A.; UEMA, A. H.; BRANDÃO, G. M. S.; GUIMARÃES, A. P. C.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, v. 7, n. 6, p. 477–481, 2000.

LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy formula into a Functional of the Electron-Density. **Physical Review Letters**, v. 37, p. 785-789, 1988.

LEITE, D. O.; PRADO R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, p. 2504-1 a 9, 2012.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 197-201, 2006.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SOBRINHO, A. F. S.; PEREIRA, M. V. G. Essential oil from leaves of *Croton sacaquinha* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 48-49, 2003.

LOPES, W. A.; FASCIO M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; NAIK, V.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; AUNER, G.; RABAH, R., LANGENBURG, S.E.; KLEIN, M.D. Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: a pilot study. **Journal of Pediatric Surgery**, v.39, n.6, p. 953-956, 2004.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1051-1060, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823-828, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 70, p. 41-55, 2000.

MANFRINI, R. M. **Síntese de derivados de N-acetilglicosamina e investigação de sua atividade antimicrobiana**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências-Química)- Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.

MARQUES, M. A. L.; BOTTI, S. O que é e para que serve a teoria dos funcionais da densidade? **Gazeta de física**, v. 29, n. 4, p. 10-15, 2006.

MATHABE, M. C.; HUSSEIN, A. A.; NIKOLOVA, R. V.; BASSON, A. E.; MEYER, J. J. M.; LALL, N. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys Africana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 194-197, 2008.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Phytochemical Prospecction and Modulation of Aminoglycoside Antibiotic Activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**, v. 57, p. 305-309, 2011.

- MAVAR-MANGA, H.; HADDADA, M.; PIETERS, L.; BACCELLI, C. PENGE, A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 25–29, 2008.
- MCLEAN, S.; PERPICK-DUMONT, M.; REYNOLDS, W. F.; JACOBS, H.; LACHMANSING, S. S. Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of 2 triterpenoids of *Maprounea guianensis* by 2 dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 65, p. 2519–2525, 1987.
- MCPHAIL, A. T.; MCPHAIL, D. R.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; NICHOLAS, A. W. "Plant Antitumor Agents. Part 29. Identity of Maprounic Acid with Aleuritolic Acid. Revision of the Structure of Maprounic Acid: X-Ray Crystal Structure of  $\rho$ -Bromobenzyl Acetylmaprounate". **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 212-216, 1989.
- MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L. Dermatofitos- Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano VII, n.12, 2009.
- MILANOWSKI, D. J.; WINTER, R. E. K.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 6, p. 814-819, 2002.
- MISRA, D. R.; KHASTGIR, H. N. Terpenoids and related compounds-XI' chemical investigation of *Aleurites montana* and the structure of aleuritólico acid-a new triterpeno acid. **Tetrahedron**, v. 26, p. 3017-3021, 1970.
- MORAIS, S. M. DE; CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. DA.; MARTINS-NETO, J. S. RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil, **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006a.
- MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 161–164. 2006b.
- MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A. SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n.1, p. 38 – 43, 2013.
- MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Teoria do funcional de densidade. **Química nova**, v. 18, n. 1, p. 44-55, 1995.
- MURRAY, PATRICK R. **Microbiologia Médica**. 4 ed. [S.l.]: Elsevier, 2004.



NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 5 ed. Villanova- PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

NORTE, M. C. B.; COSENTINO, R. M.; LAZARINI, C. A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. **Phytomedicine**, v. 12, p. 294–298, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 34, n.11, p. 1471–1474, 2001a.

OLIVEIRA, L. F. C., Espectroscopia Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n, 4, p. 24-30, 2001b.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PARR, R.G.; YANG, W. **Density Functional Theory of Atoms and Molecules**. New York: Oxford University Press, 1989.

PANYAM, J.; WILLIAMS, D.; DASH, A.; LESLIE-PELECKY, D.; LABHASETWAR, V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n. 7, p. 1804-1814, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4. ed. Belmont - CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009. 744 p.

PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; RODRIGUES, M.; MORAIS, E. K. L.; MACIEL, M. A. M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p 521-528, 2007.

PERES, M. T. L.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 223-226, 1997.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 209-211, 1998.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 553–559, 2007.

- RICCI, E. G. **Aplicação do método de análise dos componentes principais e espectroscopia Raman para a avaliação da mistura de etanol-metanol**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de França. França, 2008.
- RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ÁLVAREZ, E.; CAÑIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Med**, v. 69, n. 9, p. 785-794, 2003.
- ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.
- RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 03, p. 43-49, 2001.
- RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1052–1055, 2009.
- ROUGIER, F.; CLAUDE, D.; MAURIN, M.; MAIRE, P. Aminoglycoside nephrotoxicity. **Current Drug Targets**, v. 4, p. 153–162, 2004.
- ROWE, S. M.; MILLER, S.; SORSCHER, E. J. Cystic fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1992–2001, 2005.
- RUIZ-HERRERA, J.; SAN-BLAS, G. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v. 3, p. 77-91, 2003.
- RYBAK, L. P.; WHITWORTH, C. A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1313–1321, 2005.
- SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2 ed. São Paulo: Unesp, 2008. 276p.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 121-129, 2002.
- SANTOS, J. L.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M. C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n.2, p. 235-240, 2007.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de água superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 11-17, 2009.

SCOTT, A. P.; RANDOM, L. Harmonic vibrational frequencies: an evaluation of Hartree-Fock, Moller-Plesset, Quadratis configuration interaction, density functional theory, and semiempirical scale factors. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, p. 16502-16513, 1996.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SIQUEIRA, R. J. B. DE.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sciences**, v.78, p. 2365 – 2372, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre-RS: Bookman, 2002. 836 p.

SOUSA, E. M. B. D.; MARTÍNEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P. T. V. DOMINGOS, T.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with pressurized CO<sub>2</sub>: solubility, composition and kinetics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 325–333, 2005.

TOSTES, J. G. Estrutura molecular: o conceito fundamental da química. **Química nova na escola**, n. 7, p 17-20, 1998.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 1, p. 15-32, 2003.

WALMSLEY, M. The structure and function of drug pumps. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 71–79, 2001.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775–781, 2000.

WARTEWIG, S.; NAUBERT, R. H. H. Pharmaceutical Applications of Mid-IR and Raman Spectroscopy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1144-1170, 2005.

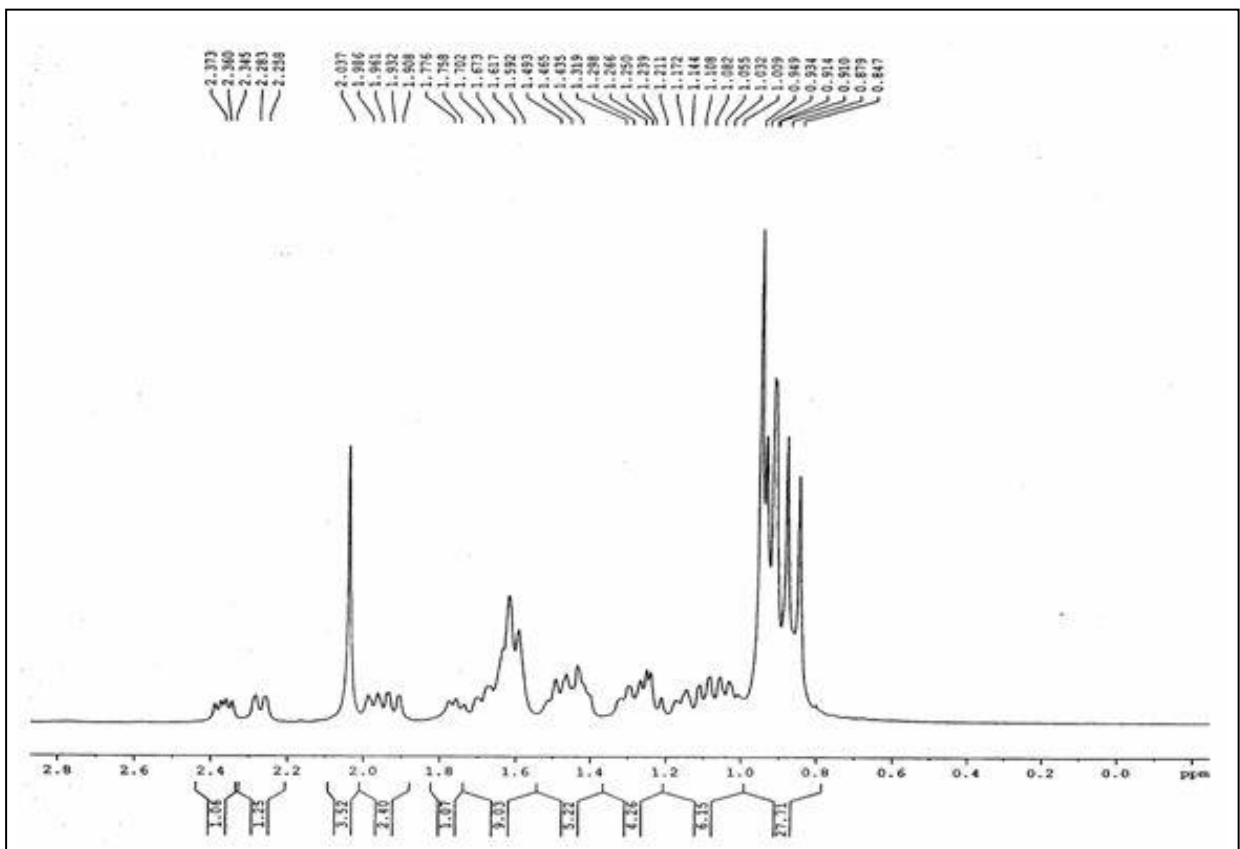
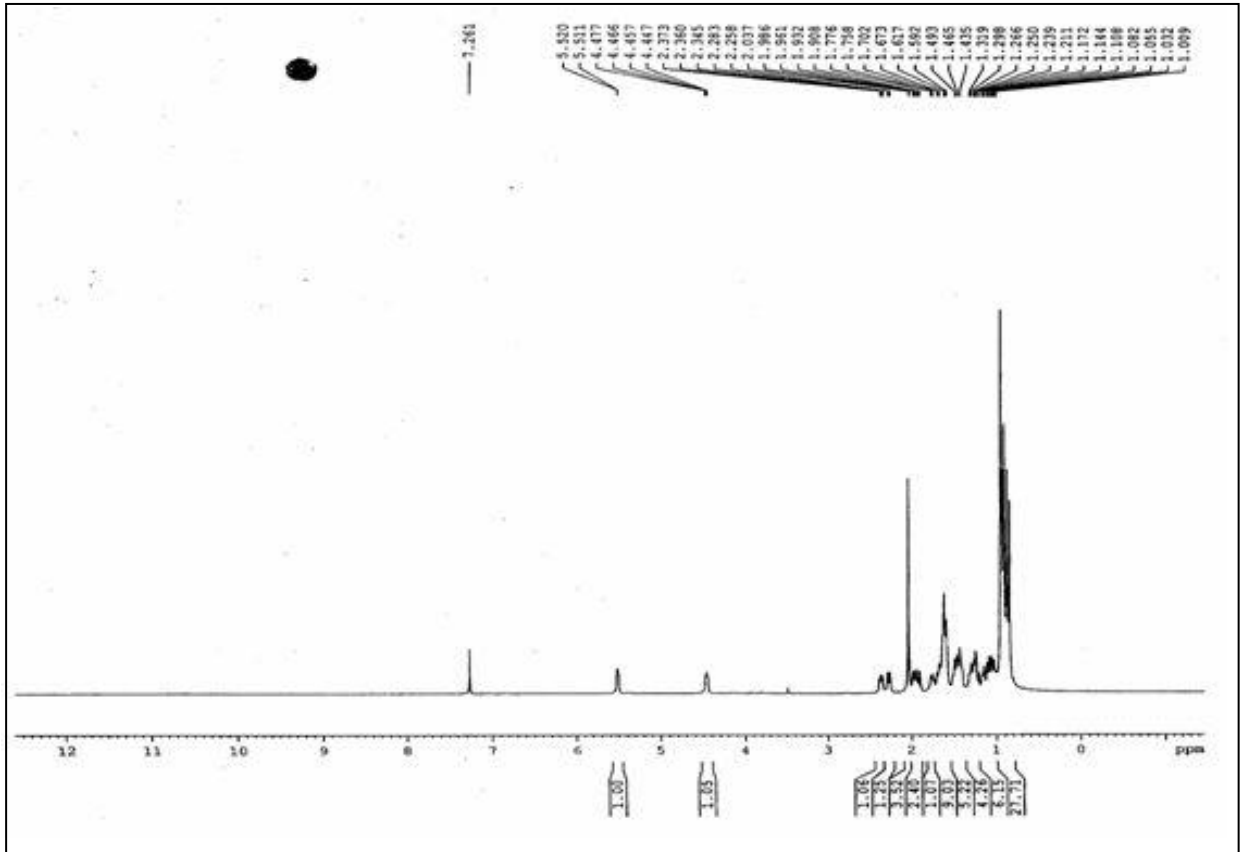
WONG, M. W. Vibrational frequency prediction using density functional theory. **Chemical Physics Letters**, v. 256, p. 391-399, 1996.

ZEMBOWER, T. R.; NOSKIN, G. A.; POSTELNICK, M. J.; NGUYEN, C.; PETERSON, L. R. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.10, p. 95–105, 1998.

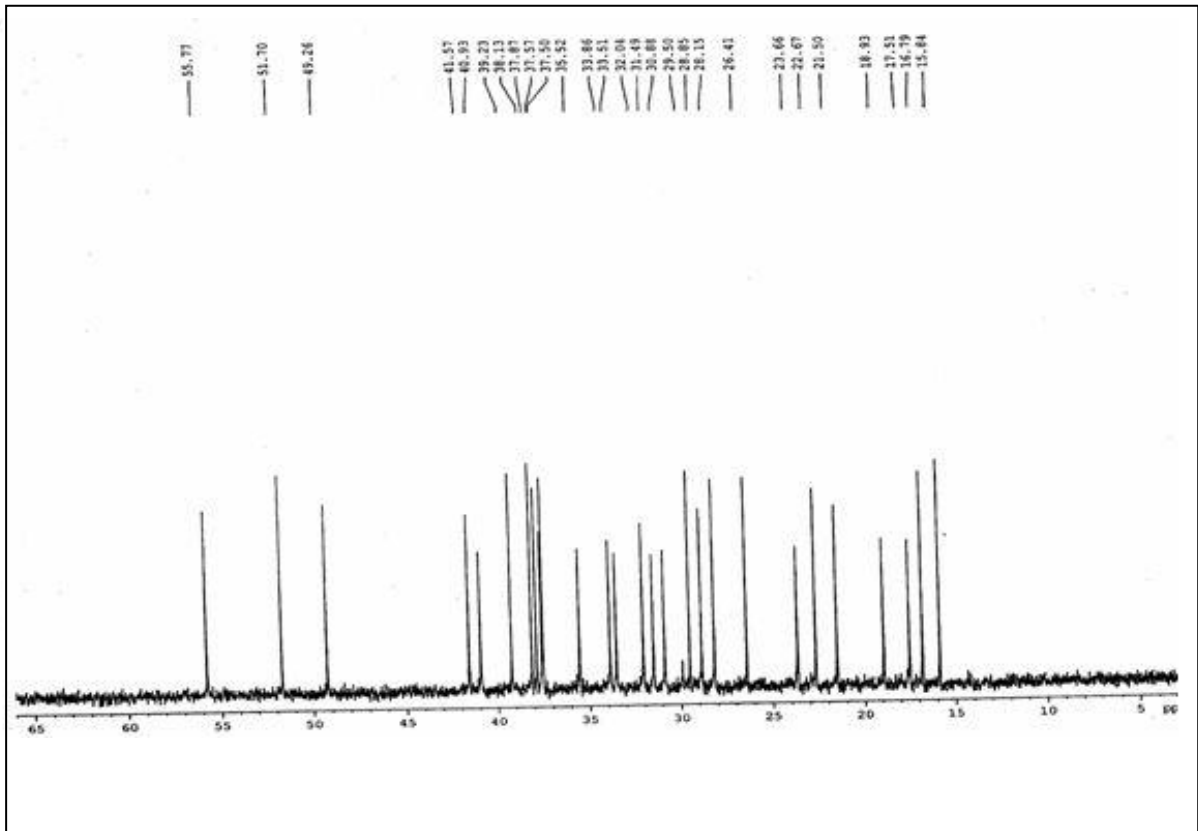
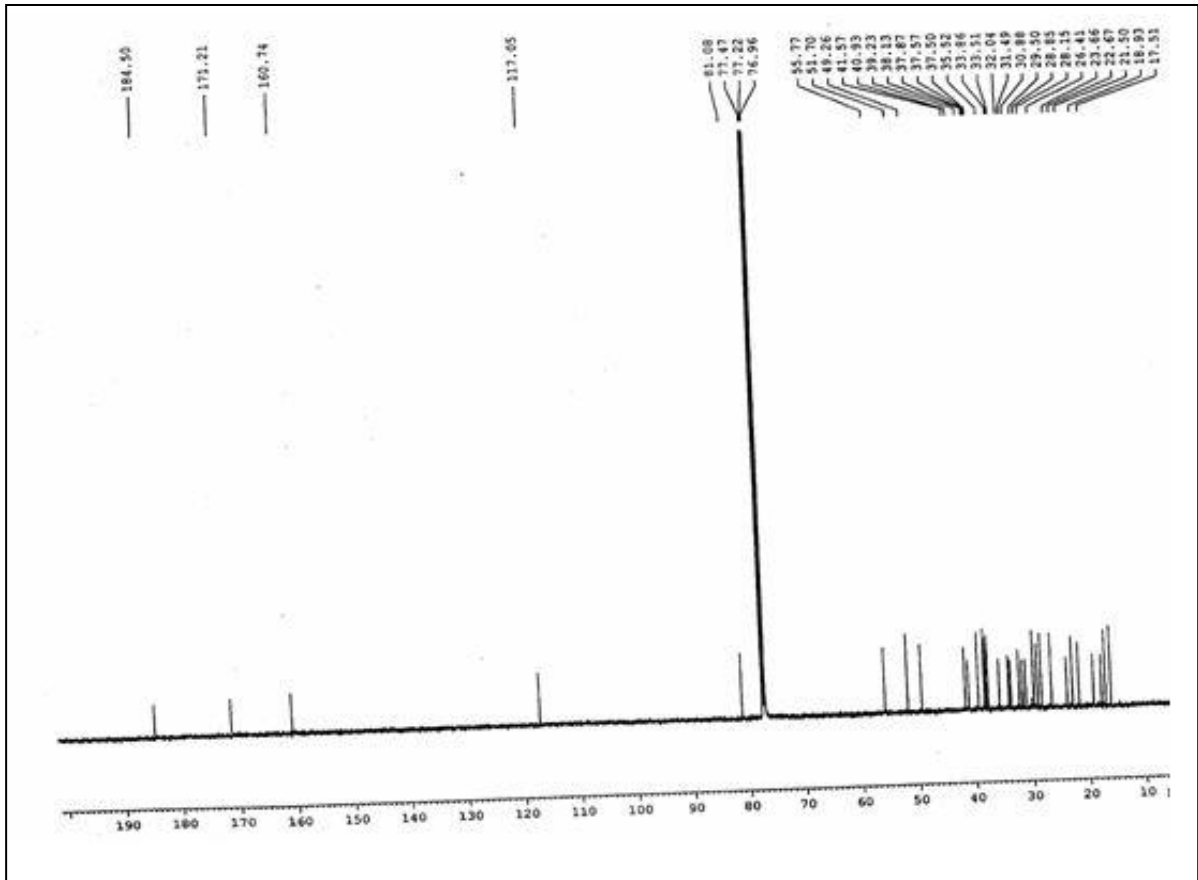
ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. **Accounts of chemical research**. Disponível em: [www.pubs.acs.org/acr](http://www.pubs.acs.org/acr). Acesso em: 27 mai. 2013.

APÊNDICES

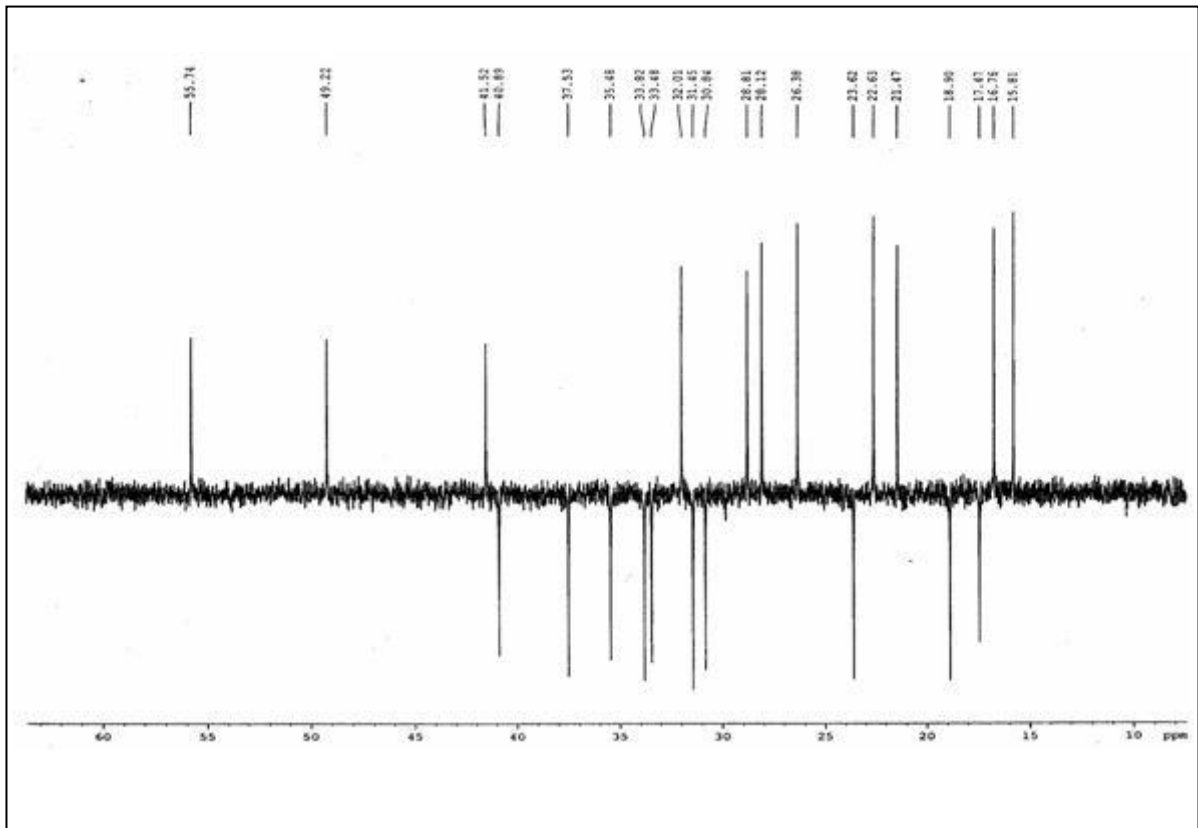
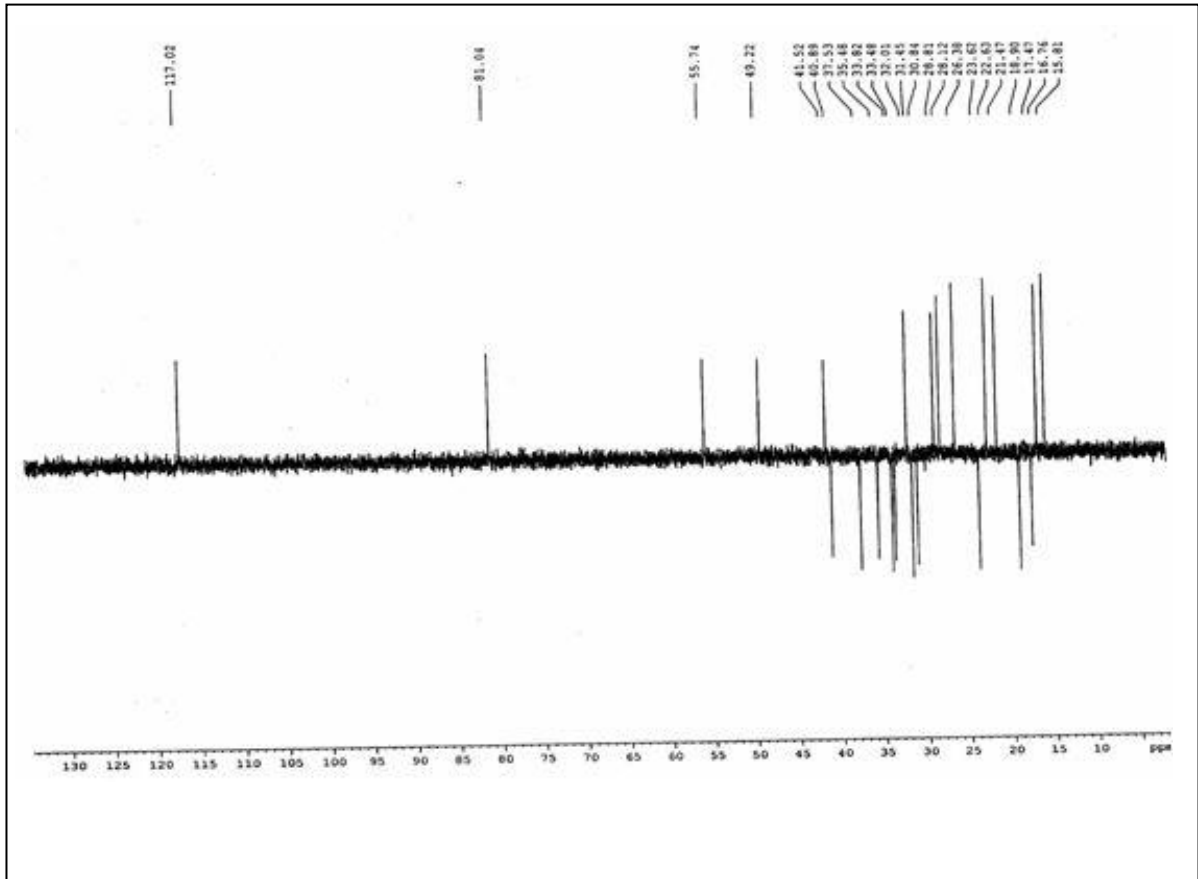
APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO



APÊNDICE B - ESPECTRO DE RMN<sup>13</sup> C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO



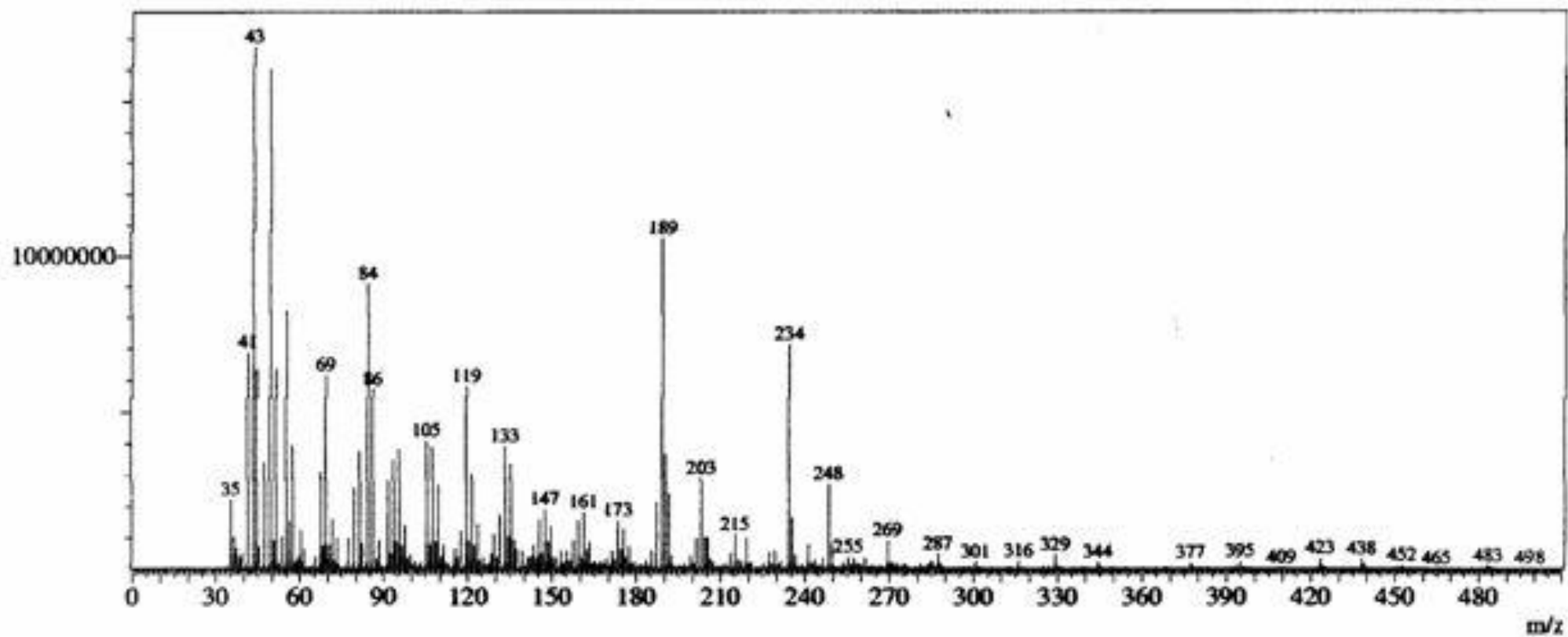
APÊNDICE C - ESPECTRO DE RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135° (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) DO  
ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO



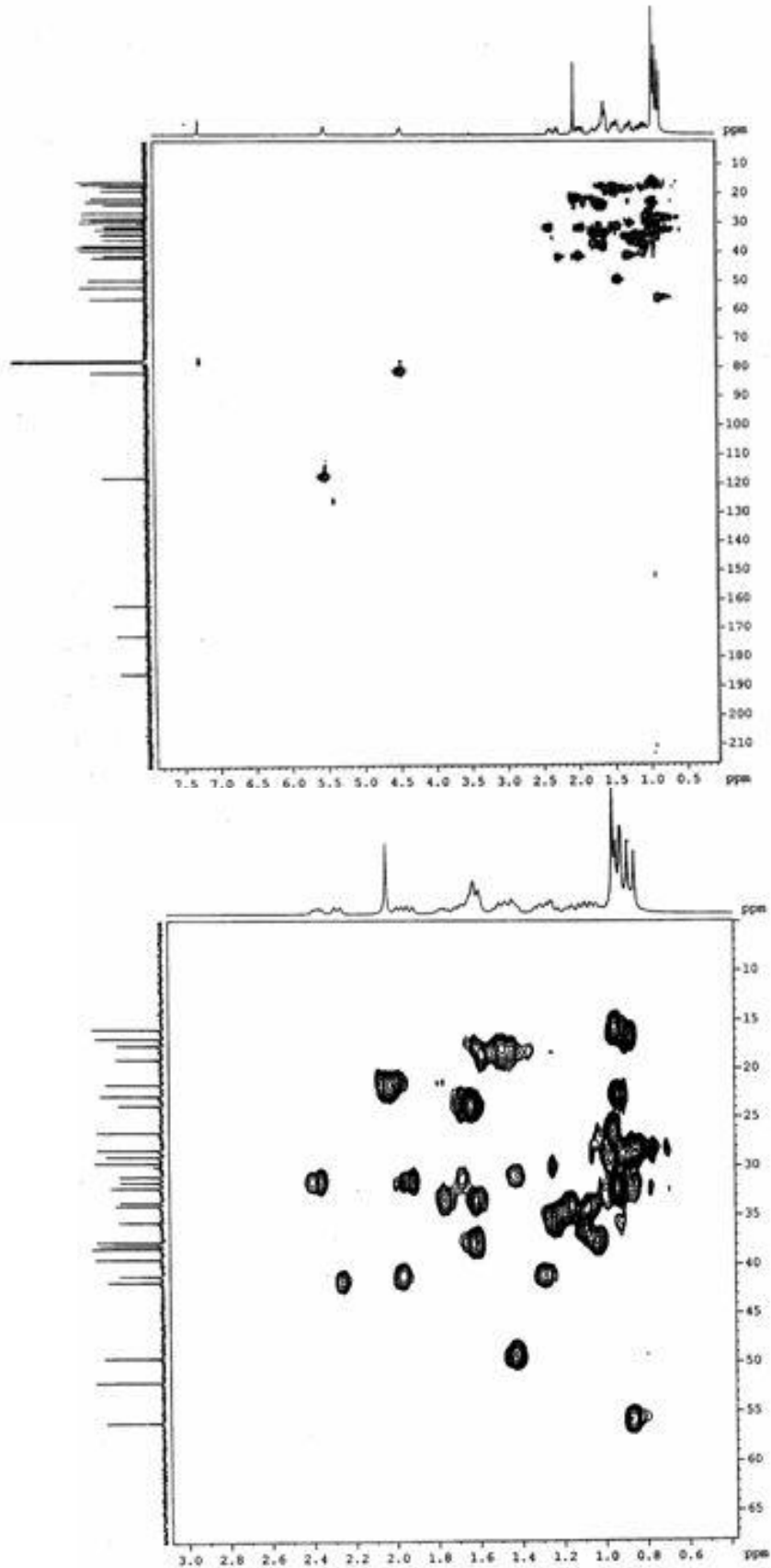
**APÊNDICE D - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup>C DO ÁCIDO ACETIL  
ALEURITÓLICO POR PADRÃO DE HIDROGENAÇÃO**

<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH</b>	<b>C</b>	<b>Total</b>
32,10	41,01	117,09 (C=C)	184,46 (COOH)	
28,88	37,64	81,13 (C-O)	171,20 (C=O)	
28,19	35,59	55,85	160,79 (C=C)	
26,43	33,92	49,33	51,73	
22,70	33,57	41,65	39,27	
21,50	31,56		38,19	
16,82	30,97		37,92	
15,87	27,70		37,56	
	18,98		29,53	
	17,55			
<b>C<sub>8</sub>H<sub>24</sub></b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub></b>	<b>C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O</b>	<b>C<sub>9</sub>HO<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub></b>

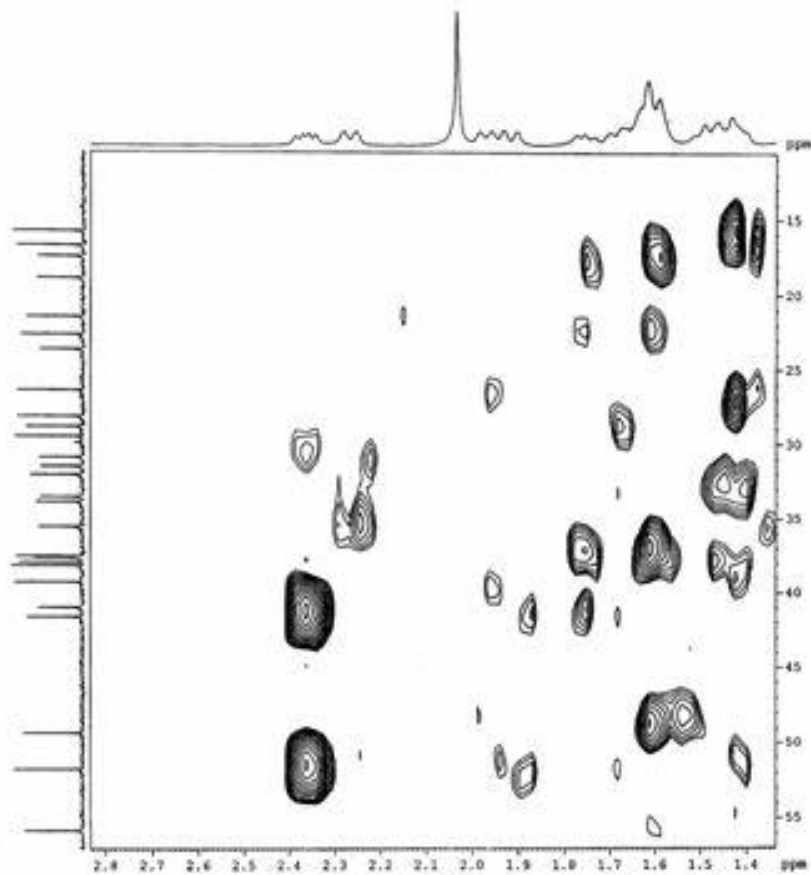
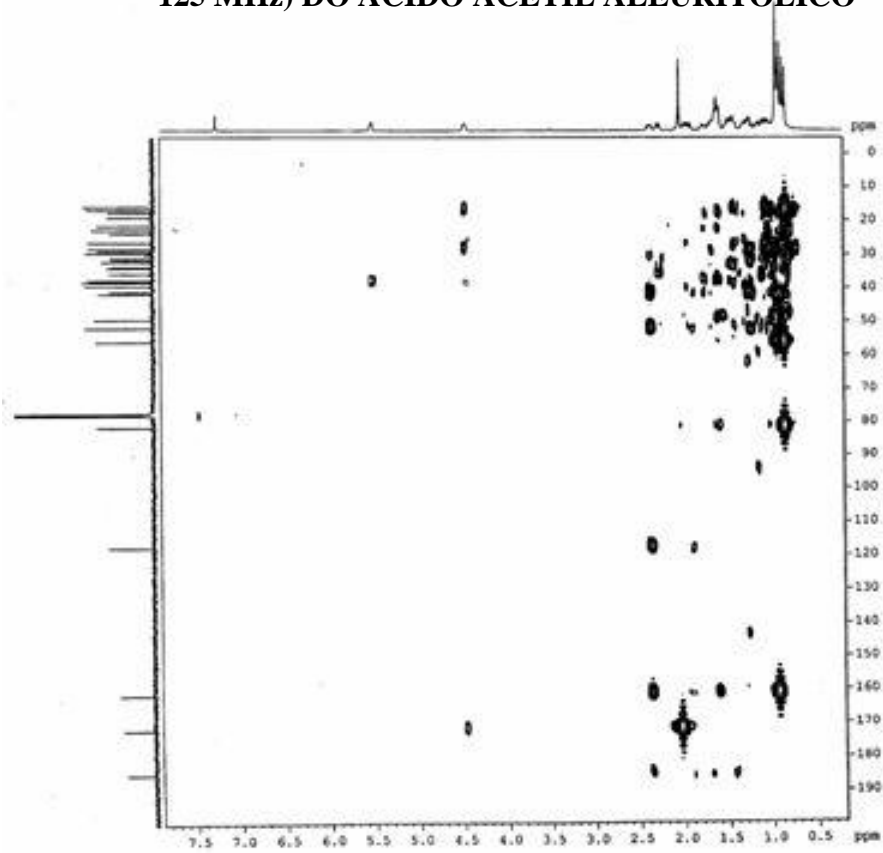


APÊNDICE E - ESPECTRO DE MASSAS  $^{13}\text{C}$  DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO

APÊNDICE F – MAPA DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR - HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO



**APÊNDICE G – MAPA DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR – HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO**



**APÊNDICE H – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C DO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO  
DISPOSTOS SEGUNDO AS CORRELAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DE  
ESPECTROS HMQC E HMBC**

C	HSQC*		HMBC	
	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	<sup>2</sup> J <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> J <sub>CH</sub>
1	37,64	1,60 (t; 2H)		
2	23,71	1,63 (t; 2H)	2H-1	1H-3
3	81,13	4,47 (dd; 1H)	2H-2	1Hb-6, 2H-1, 3H-5, 3H-24
4	37,56	-	H-3, 3H-24, 3H-23	1H-6B, 3H-25
5	55,85	0,86(s; 1H)	Hb-6, Ha-6	1H-3, 3H-24, 3H-23
6	18,98	1,65 (m; 1Ha); 1,50 (m; 1Hb)	H-5	-
7	41,01	1,96 (d; 1Ha); 1,30 (m; 1Hb)	Ha-6	1H-15, 2H-11, H-9, 1H-5
8	39,28	-	Ha-7, 3H-26	1Hb-12, 3H-25,
9	49,33	1,41(d; 1H)	Ha-11, Hb-11	2H-12, Ha-6, 2H-2, 2H-1
10	37,64	-	H-5	2H-2, 2H-12, 2H-1
11	17,55	1,63 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	1Ha e b-12, 1H-9	3H-25, 3H-26, 1H-5
12	33,57	1,78 (d; 1Ha); 1,63 (m; 1Hb)	Hb-11	1H-18, 1Ha-19, H-9, 3H-29
13	38,19	-	1H-18, 1Hb-12, 3H-27	1H-15, 1Ha-11, 1H-9, 3H-26
14	160,79	-	-	1H-18, 1Ha-11, 1Hb-12, 1H-9
15	117,09	5,53 (m; 1H)	1Hb-16	1H-18
16	31,56	2,38 (m; 1Hb); 1,92 (m; 1Ha)	1H-15	1Hb-22, 2H-19, 2H-21
17	51,73	-	1Hb-16, 1Hb-22	1Ha-19
18	41,65	2,26(d; 1H)	1Hb-19, 1Ha-19	2H-16, Ha-22, 3H-29, 3H-30
19	35,59	1,25 (t; 1Ha), 1,14 (m; 1Hb)	1H-18	1Ha-21, 3H-29, 3H-30
20	29,53	-	Ha e b-19, 1Ha-21	1H-18, Ha-22
21	33,92	1,18 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	1Ha e b-22	1Ha-19, 3H-29, 3H-30
22	30,95	1,69 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	Ha e b-21	2H-16, 2H-19, 3H-29, 3H-30
23	28,19	0,86 (s; 3H)	3H-24, 1H-5	1H-3
24	16,82	0,89 (s; 3H)	3H-23, 1H-5	1H-3, 2H-2
25	15,87	0,96 (s; 3H)	-	1H-9, 1H-5
26	26,43	0,96 (s; 3H)	-	1Ha-7, 1Ha-11, 1H-9
27	22,70	0,93 (s; 3H)	-	1H-18, 1Ha-12, 1Hb-19
28	184,46	-	-	1Ha-16, 1H-18, 1Hb-22
29	32,10	0,95 (s; 3H)	3H-30	1Hb-22, 1Hb-19, 2H-21
30	28,88	0,92 (s; 3H)	3H-29	1H-18, 2H-22, Hb-19, Hb-21
31	171,20	-	3H-32	1H-3
32	21,50	2,04 (s; 3H)	-	-

**APÊNDICE I – COMPRIMENTO DAS LIGAÇÕES ENTRE OS ÁTOMOS DA  
MOLÉCULA ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO (C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>) OBTIDOS A PARTIR  
DE CÁLCULOS DFT**

<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Comprimento das ligações <i>Calc.</i> (Å)</b>	<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Comprimento das ligações <i>Calc.</i> (Å)</b>
C1-C2	1,55	C16-C19	1,59
C2-C3	1,55	C16-C30	1,56
C2-C7	1,58	C17-C18	1,55
C2-C32	1,57	C18-C19	1,59
C3-C4	1,34	C18-C22	1,56
C3-C16	1,55	C18-C28	1,57
C4-C5	1,50	C19-C31	1,56
C5-C6	1,54	C20-C21	1,54
C6-C7	1,57	C21-C22	1,59
C6-C13	1,56	C21-C23	1,55
C6-C14	1,54	C21-C24	1,55
C7-C10	1,54	C22-C29	1,53
C8-C9	1,54	C24-O3	1,46
C9-C10	1,55	C24-C27	1,52
C9-C11	1,54	O3-C25	1,35
C9-C12	1,55	C25-C26	1,51
C12-C13	1,53	C25-O4	1,21
C14-O1	1,22	C27-C28	1,54
C14-O2	1,36	C29-C30	1,53
C15-C16	1,56	C31-C32	1,53

**APÊNDICE J – ÂNGULO DAS LIGAÇÕES ENTRE OS ÁTOMOS DA MOLÉCULA  
ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO (C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>) OBTIDOS A PARTIR DE CÁLCULOS  
DFT**

<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Ângulo das ligações Calc. (Å)</b>	<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Ângulo das ligações Calc. (Å)</b>
C1-C2-C3	110,53	C15-C16-C19	108,16
C1-C2-C7	110,49	C15-C16-C30	102,95
C1-C2-C32	108,81	C19-C16-C30	112,40
C3-C2-C7	109,16	C17-C18-C19	112,50
C3-C2-C32	108,25	C17-C18-C22	110,45
C7-C2-C32	109,57	C17-C18-C28	108,68
C2-C3-C4	120,75	C19-C18-C22	108,63
C2-C3-C16	117,74	C19-C18-C28	106,89
C4-C3-C16	121,23	C22-C18-C28	109,60
C3-C4-C5	126,91	C16-C19-C18	118,45
C4-C5-C6	115,21	C16-C19-C31	111,25
C5-C6-C7	108,72	C18-C19-C31	110,44
C5-C6-C13	108,66	C20-C21-C22	114,52
C5-C6-C14	111,83	C20-C21-C23	107,46
C7-C6-C13	108,34	C20-C21-C24	108,43
C7-C6-C14	112,66	C22-C21-C23	106,86
C13-C6-C14	106,48	C22-C21-C24	109,18
C2-C7-C6	113,98	C23-C21-C24	110,35
C2-C7-C10	115,18	C18-C22-C21	117,47
C6-C7-C10	111,05	C18-C22-C29	110,04
C8-C9-C10	108,47	C21-C22-C29	112,75
C8-C9-C11	108,13	C21-C24-O3	108,10
C8-C9-C12	108,93	C21-C24-C27	112,29
C10-C9-C11	111,25	O3-C24-C27	110,89
C10-C9-C12	109,01	C24-O3-C25	117,21
C11-C9-C12	110,98	O3-C25-C26	110,59
C7-C10-C9	114,54	O3-C25-O4	124,31
C9-C12-C13	113,35	C26-C25-O4	125,10
C6-C13-C12	115,23	C24-C27-C28	109,82
C6-C14-O1	125,77	C18-C28-C27	115,04
C6-C14-O2	114,17	C22-C29-C30	110,34
O1-C14-O2	120,01	C16-C30-C29	118,01
C3-C16-C15	111,77	C19-C31-C32	115,94
C3-C16-C19	107,63	C2-C32-C31	113,00
C3-C16-C30	113,82		

**APÊNDICE L – DIEDROS DAS LIGAÇÕES ENTRE OS ÁTOMOS DA MOLÉCULA  
ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO (C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>) OBTIDOS A PARTIR DE CÁLCULOS  
DFT**

<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Diedros das ligações Calc. (Å)</b>	<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Diedros das ligações Calc. (Å)</b>
C1-C2-C3-C4	-97,74	C11-C9-C10-C7	68,57
C1-C2-C3-C16	88,26	C12-C9-C10-C7	-54,14
C7-C2-C3-C4	23,98	C8-C9-C12-C13	168,56
C7-C2-C3-C16	-150,02	C10-C9-C12-C13	50,37
C32-C2-C3-C4	143,18	C11-C9-C12-C13	-72,50
C32-C2-C3-C16	-30,82	C9-C12-C13-C6	-52,85
C1-C2-C7-C6	71,53	C3-C16-C19-C18	96,32
C1-C2-C7-C10	-58,52	C3-C16-C19-C31	-33,23
C3-C2-C7-C6	-50,22	C15-C16-C19-C18	-142,77
C3-C2-C7-C10	179,73	C15-C16-C19-C31	87,69
C32-C2-C7-C6	-168,60	C30-C16-C19-C18	-29,79
C32-C2-C7-C10	61,35	C30-C16-C19-C31	-159,34
C1-C2-C32-C31	-149,90	C3-C16-C30-C29	-90,17
C3-C2-C32-C31	-29,74	C15-C16-C30-C29	148,67
C7-C2-C32-C31	89,20	C19-C16-C30-C29	32,52
C2-C3-C4-C5	-5,91	C17-C18-C19-C16	-78,50
C16-C3-C4-C5	167,88	C17-C18-C19-C31	51,42
C2-C3-C16-C15	-53,83	C22-C18-C19-C16	44,09
C2-C3-C16-C19	64,79	C22-C18-C19-C31	174,01
C2-C3-C16-C30	-169,94	C28-C18-C19-C16	162,28
C4-C3-C16-C15	132,20	C28-C18-C19-C31	-67,80
C4-C3-C16-C19	-109,18	C17-C18-C22-C21	-67,57
C4-C3-C16-C30	16,09	C17-C18-C22-C29	63,23
C3-C4-C5-C6	12,30	C19-C18-C22-C21	168,60
C4-C5-C6-C7	-35,89	C19-C18-C22-C29	-60,60
C4-C5-C6-C13	-153,61	C28-C18-C22-C21	52,14
C4-C5-C6-C14	89,14	C28-C18-C22-C29	-177,06
C5-C6-C7-C2	56,80	C17-C18-C28-C27	103,80
C5-C6-C7-C10	-171,12	C19-C18-C28-C27	-134,54
C13-C6-C7-C2	174,73	C22-C18-C28-C27	-16,99
C13-C6-C7-C10	-53,20	C16-C19-C31-C32	-23,43
C14-C6-C7-C2	-67,73	C18-C19-C31-C32	-157,09
C14-C6-C7-C10	64,34	C20-C21-C22-C18	95,80
C5-C6-C13-C12	170,49	C20-C21-C22-C29	-33,75

<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Diedros das ligações Calc. (Å)</b>	<b>Identificação dos átomos</b>	<b>Diedros das ligações Calc. (Å)</b>
C7-C6-C13-C12	52,53	C23-C21-C22-C18	-145,33
C14-C6-C13-C12	-68,90	C23-C21-C22-C29	85,12
C5-C6-C14-O1	179,16	C24-C21-C22-C18	-25,98
C5-C6-C14-O2	1,80	C24-C21-C22-C29	-155,52
C7-C6-C14-O1	-58,03	C20-C21-C24-O3	77,75
C7-C6-C14-O2	124,61	C20-C21-C24-C27	-159,61
C13-C6-C14-O1	60,60	C22-C21-C24-O3	-156,87
C13-C6-C14-O2	-116,75	C22-C21-C24-C27	-34,22
C2-C7-C10-C9	-171,09	C23-C21-C24-O3	-39,70
C6-C7-C10-C9	57,45	C23-C21-C24-C27	82,95
C8-C9-C10-C7	-172,62	C18-C22-C29-C30	64,80
C21-C22-C29-C30	-161,94	C24-O3-C25-C26	179,84
C21-C24-O3-C25	-151,66	C24-O3-C25-O4	-0,12
C27-C24-O3-C25	84,84	C24-C27-C28-C18	-39,64
C21-C24-C27-C28	68,96	C22-C29-C30-C16	-50,71
O3-C24-C27-C28	-169,98	C19-C31-C32-C2	59,32