

MARCELO HENRIQUE DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE *Rheedia gardneriana* (PL. E TR.)  
E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS SEUS CONSTITUINTES

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Agroquímica,  
para obtenção do título de “*Magister  
Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
OUTUBRO - 1996

MARCELO HENRIQUE DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE *Rheedia gardneriana* (PL. E TR.) E  
APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS SEUS CONSTITUINTES

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Agroquímica,  
para obtenção do título de “*Magister  
Scientiae*”.

APROVADA: 28 de fevereiro de 1996.

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Conselheira)

---

Prof. Luiz C. Guedes de Miranda  
(Conselheiro)

---

Prof. José Rogério de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup> Rosângela D'Arc de L. Oliveira

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Orientador)

A Deus,  
pela saúde e pelos amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pela amizade e pela orientação deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de estudo.

Aos professores Luíz Carlos Guedes de Miranda, Tânia Toledo de Oliveira, Maria Eliana L.R.de Queiroz, Antônio Augusto Neves, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Antônio Jacinto Demuner, Gulab Newandram Jham e Valdir Peres, pelas sugestões e pela amizade.

Aos amigos de curso Márcia, Doriguetto, Cíntia, Mauro, Eliana, Cristiana, Alessandro, Reinaldo, Luís Carlos, Vanderlúcia, Sayuri, Gelson, Marisa, Leonardo, Róbson, Paulo, Fernando, Adilson, Cláudia, Ana Lúcia e José Maurício, pelo incentivo.

Aos alunos de iniciação científica Daniela, Kelly, Ulisses, Marisi, Édson e Lourdes, pela convivência.

Ao técnico Jorge Luíz Martins de Rezende, pela ajuda e pela amizade.

Aos funcionários José Luís, Lucinha, Onezina, Solange e Eduardo Rezende, Elói e Sueli, Leacir, José Mauro e Jacó, pela colaboração.



À Marilda Conceição da Silva, pela orientação nos trabalhos de isolamento dos constituintes químicos, e ao Departamento de Química da UFMG, pelos trabalhos realizados em CG/EM.

Ao professor Júlio S.L.T. Militão (UFCE), pela ajuda nas análises de triterpenóides.

Ao professor Eduardo E. Borges de Lima, pela orientação no teste de germinação de sementes e cromatografia.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela ajuda com testes em enterobactérias.

Ao professor José Rogério de Oliveira e à mestranda Dulandula (Dula), pela ajuda nos testes com fitobactérias.

À professora Rosângela D'Árc de Lima Oliveira e ao mestrando José Mauro Cunha e Castro, pela ajuda nos testes com fitonematóides.

Ao NPPN (UFRJ), pelos espectros de massas e de ressonância magnética nuclear.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para o engrandecimento deste trabalho e de minha formação profissional.

## **BIOGRAFIA**

Marcelo Henrique dos Santos, filho de Carlos Alberto dos Santos e Regina de Oliveira Duque Santos, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 2 de março de 1971.

Cursou as primeiras séries do primeiro grau na Escola Estadual Coronel Antônio da Silva Bernardes. Da quinta à oitava série, estudou na Escola Estadual Dr. Raimundo Alves Torres. Fez o segundo grau no Colégio Universitário (COLUNI).

Em 1989 iniciou o curso de Química na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o bacharelado e a licenciatura em agosto de 1993. No mesmo ano, matriculou-se no curso de mestrado em Agroquímica, na UFV, concluindo-o em outubro de 1996.

## CONTEÚDO

|                                                                                            | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE QUADROS .....                                                                     | x      |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                     | xiii   |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                                                | xvi    |
| EXTRATO .....                                                                              | xviii  |
| ABSTRACT .....                                                                             | xx     |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                        | 1      |
| 1.1. Características gerais da família Guttiferae .....                                    | 2      |
| 1.2. O Gênero <i>Rheedia</i> .....                                                         | 2      |
| 1.2.1. Descrição botânica e caracterização de <i>Rheedia gardneriana</i><br>Pl. e Tr. .... | 6      |
| 1.2.2. Utilização de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                                      | 8      |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                           | 9      |
| ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE <i>Rheedia gardneriana</i> .....                              | 9      |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                        | 9      |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                | 11     |
| 2.1. Equipamentos e condições analíticas .....                                             | 11     |
| 2.2. Isolamento dos constituintes dos frutos de <i>Rheedia gardneriana</i> ..              | 12     |
| 2.2.1. Coleta e separação do material .....                                                | 12     |

|                                                                                                                              | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.2.2. Análise de ésteres de ácidos graxos em extratos etéreos da casca, polpa e semente de <i>Rheedia gardneriana</i> ..... | 12     |
| 2.2.2.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos .....            | 13     |
| 2.2.3. Estudo do polpa .....                                                                                                 | 14     |
| 2.2.3.1. Obtenção dos extratos da polpa .....                                                                                | 14     |
| 2.2.3.2. Elaboração do extrato hexânico da polpa .....                                                                       | 15     |
| 2.2.3.3. Elaboração do extrato etanólico da polpa .....                                                                      | 16     |
| 2.2.4. Estudo da casca .....                                                                                                 | 17     |
| 2.2.4.1. Obtenção dos extratos da casca .....                                                                                | 17     |
| 2.2.4.2. Elaboração do extrato hexânico da casca .....                                                                       | 17     |
| 2.2.4.3. Elaboração do extrato diclorometânico da casca (RCD) ...                                                            | 20     |
| 2.2.4.4. Elaboração do precipitado do extrato diclorometânico da casca .....                                                 | 22     |
| 2.2.4.5. Elaboração do extrato etanólico da casca .....                                                                      | 23     |
| 2.2.5. Estudo da semente .....                                                                                               | 25     |
| 2.2.5.1. Obtenção dos extratos da semente .....                                                                              | 25     |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                              | 27     |
| 3.1. Caracterização e identificação dos constituintes do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                           | 27     |
| 3.1.1. Ésteres de ácidos graxos dos extratos etéreos da casca, polpa e semente do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> .....  | 27     |
| 3.1.2. Constituintes obtidos a partir dos extratos da polpa .....                                                            | 30     |
| 3.1.2.1. Extrato hexânico .....                                                                                              | 30     |
| 3.1.3. Constituintes obtidos a partir dos extratos da casca .....                                                            | 39     |
| 3.1.3.1. Extrato hexânico .....                                                                                              | 39     |
| 3.1.3.2. Extrato etanólico .....                                                                                             | 40     |
| 3.1.3.3. Extrato diclorometânico .....                                                                                       | 60     |
| 3.1.3.4. Extrato etanólico .....                                                                                             | 77     |

|                                                                                                                                              | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                             | 80     |
| EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA CASCA DO FRUTO DE <i>Rheedia gardneriana</i> SOBRE <i>Meloidogyne incognita</i> , RAÇA 3 ..... | 80     |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                          | 80     |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                  | 83     |
| 2.1. Efeito de RCD8, RCH5B e RCH1B sobre a eclosão de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3 .....                                 | 83     |
| 2.1.1. Obtenção das massas de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3 .....                                                            | 83     |
| 2.1.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade de RCD8, RCH5B e RCH1B sobre <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3 .....                       | 83     |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                              | 85     |
| 4. CONCLUSÃO .....                                                                                                                           | 90     |
| CAPÍTULO 3 .....                                                                                                                             | 91     |
| EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA CASCA DO FRUTO DE <i>Rheedia gardneriana</i> SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS .....                 | 91     |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                          | 91     |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                  | 94     |
| 2.1. Origem e cultivo dos microrganismos .....                                                                                               | 94     |
| 2.2. Sensibilidade <i>in vitro</i> de diferentes fitobactérias a RCH1B, RCH5B e RCD8 .....                                                   | 94     |
| 2.2.1. Sensibilidade de <i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>Michiganense</i> a diferentes concentrações de RCH5B .....                 | 95     |
| 2.3. Sensibilidade <i>in vitro</i> de diferentes enterobactérias a RCH1B, RCH5B e RCD8 .....                                                 | 95     |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                              | 96     |
| 4. CONCLUSÃO .....                                                                                                                           | 99     |

|                                                                                                                                                                 | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CAPÍTULO 4 .....                                                                                                                                                | 100    |
| EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA<br>CASCA DO FRUTO DE <i>Rheedia gardneriana</i> SOBRE A<br>GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Sorghum bicolor</i> ..... | 100    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                             | 100    |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                     | 103    |
| 2.1. Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade de sementes de <i>Sorghum</i><br><i>bicolor</i> a RCH1B, RCH5B e RCD8 .....                                     | 103    |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                 | 104    |
| 4. CONCLUSÃO .....                                                                                                                                              | 106    |
| RESUMO E CONCLUSÕES .....                                                                                                                                       | 107    |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                | 109    |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                      | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Lista de gêneros e espécies conhecidas que produzem xantonas da família Guttiferae .....                          | 3      |
| 2. Substâncias isoladas de plantas do gênero <i>Rheedia</i> .....                                                    | 4      |
| 3. Algumas substâncias isoladas do caule e da raiz de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                               | 5      |
| 4. Classificação de <i>Rheedia gardneriana</i> Pl. e Tr. ....                                                        | 6      |
| CAPÍTULO 1                                                                                                           |        |
| 1. Ordem de eluição do extrato hexânico da polpa por cromatografia em coluna com as respectivas frações .....        | 15     |
| 2. Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato hexânico da polpa .....                          | 16     |
| 3. Ordem de eluição do extrato hexânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações .....        | 18     |
| 4. Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato hexânico da casca .....                          | 19     |
| 5. Ordem de eluição do extrato diclorometânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações ..... | 21     |
| 6. Reunião das frações em grupos da cromatografia em coluna do extrato diclorometânico da casca .....                | 21     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 7. Ordem de eluição de precipitado do extrato diclorometânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações .....                                                                                                                                                                                             | 23     |
| 8. Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna de precipitado do extrato diclorometânico da casca .....                                                                                                                                                                                                               | 23     |
| 9. Ordem de eluição do extrato etanólico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações .....                                                                                                                                                                                                                  | 24     |
| 10. Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato etanólico da casca .....                                                                                                                                                                                                                                   | 25     |
| 11. Tempos de retenção dos padrões e amostras co-injetadas dos produtos metilados dos extratos etéreos das partes do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                                                                                                                                                                  | 29     |
| 12. Proporção relativa dos constituintes dos extratos etéreos das partes dos frutos de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                                                                                                                                                                                                         | 30     |
| 13. Dados de RMN <sup>13</sup> C e APT (50,2 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de RPH1 (β-sitosterol e estigmasterol) e comparação com valores da literatura .....                                                                                                                                                                       | 38     |
| 14. Fatores de retenção para padrões de açúcares e amostra do extrato etanólico da polpa em cromatografia em papel descendente, ao final de seis horas .....                                                                                                                                                                    | 39     |
| 15. Deslocamentos de RMN <sup>1</sup> H (100 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) e <sup>13</sup> C (50,2 MHz) para RCH5B .....                                                                                                                                                                                                 | 59     |
| 16. Deslocamento químico (δ, CDCl <sub>3</sub> , 60 MHz) dos grupos metila nas séries olean-12-eno (TURSH et al., 1967), urs-12-eno (CHEUNG e WILLANSON, 1969) e lupano [40] (CHEUNG e WILLANSON, 1969), tomando como valor básico o esqueleto olean-12-en [45] e lupan-28-oato de metila [43] (CHEUNG e WILLANSON, 1969) ..... | 71     |
| 17. Deslocamentos de RMN <sup>13</sup> C (δ) de olean-12-enos .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 76     |
| CAPÍTULO 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |        |
| 1. Somatório das médias de J <sub>2</sub> de <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3, eclodidos na presença de diversas doses de RCD8 até 240 horas e 336 horas .....                                                                                                                                                             | 87     |



### CAPÍTULO 3

1. Avaliação do crescimento bacteriano após 24 horas de incubação, a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em meio de cultura contendo RCH1B, RCH5B e RCD8 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ..... 96
2. Avaliação do crescimento bacteriano após 30 horas de incubação, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em meio de cultura contendo RCH1B, RCH5B e RCD8, a  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ..... 97

### CAPÍTULO 4

1. Porcentagem de germinação e médias dos comprimentos das radículas das sementes de *Sorghum bicolor* tratadas com os constituintes químicos RCH1B, RCH5B e RCD8 ..... 104

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                   | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Ilustração da parte aérea de <i>Rheedia gardneriana</i> Pl. e Tr.; fruto (F):<br>casca (C), polpa (P) e semente (S) .....                                                                      | 7      |
| <br>CAPÍTULO 1                                                                                                                                                                                    |        |
| 1. Fluxograma da separação do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> em<br>partes, com as respectivas massas secas .....                                                                             | 13     |
| 2. Fluxograma da obtenção dos extratos da polpa do fruto de <i>Rheedia<br/>gardneriana</i> com as respectivas massas sem solvente (não se obteve<br>extrato quando foi usado diclorometano) ..... | 14     |
| 3. Fluxograma da obtenção dos extratos da casca do fruto de <i>Rheedia<br/>gardneriana</i> com as respectivas massas, após evaporação do<br>solvente .....                                        | 18     |
| 4. Fluxograma da obtenção dos extratos da semente do fruto de<br><i>Rheedia gardneriana</i> com as respectivas massas sem solvente .....                                                          | 26     |
| 5. Cromatograma dos ésteres metílicos presentes nos extratos etéreos<br>da casca, polpa e semente do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> .....                                                    | 28     |
| 6. Espectro no infravermelho (KBr) do extrato etéreo da casca de<br><i>Rheedia gardneriana</i> .....                                                                                              | 29     |
| 7. Espectro no infravermelho (KBr) de RPH3 .....                                                                                                                                                  | 31     |
| 8. Espectro no infravermelho (KBr) de RPH1 .....                                                                                                                                                  | 32     |
|                                                                                                                                                                                                   | Página |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RPH1, compreendendo a região de $\delta$ 0,5 a 5,5 .....                        | 33 |
| 10. Espectro de massas de RPH1 .....                                                                                                           | 34 |
| 11. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,2 MHz) de RPH1 .....                                                                                   | 36 |
| 12. Espectro de APT (50,2 MHz) de RPH1 .....                                                                                                   | 37 |
| 13. Espectro no infravermelho (puro) de RCH1B .....                                                                                            | 41 |
| 14. Cromatograma de RCH1B obtido por cromatografia gasosa .....                                                                                | 41 |
| 15. Espectro de massas do pico em 11,38 min .....                                                                                              | 42 |
| 16. Espectro de massas do pico em 13,90 min .....                                                                                              | 43 |
| 17. Espectro de massas do pico em 14,03 min .....                                                                                              | 44 |
| 18. Espectro de massas do pico em 14,87 min .....                                                                                              | 45 |
| 19. Espectro no infravermelho (KBr) de RCH5A .....                                                                                             | 47 |
| 20. Espectro no infravermelho (KBr) de RCH5B .....                                                                                             | 47 |
| 21. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (60 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RCH5B, compreendendo a região de $\delta$ 1,0 a 19,0 .....                      | 49 |
| 22. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (60 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) de RCH5B, compreendendo a região de $\delta$ 1,0 a 19,0 ..... | 50 |
| 23. Espectros de UV de RCH5B, em diferentes médios .....                                                                                       | 51 |
| 24. Espectro de massas de RCH5B .....                                                                                                          | 52 |
| 25. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,2 MHz) de RCH5B .....                                                                                  | 54 |
| 26. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (100 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de RCH5B, compreendendo a região de $\delta$ 0,0 a 7,7 .....               | 55 |
| 27. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (100 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de RCH5B, compreendendo a região de $\delta$ 4,5 a 7,7 .....               | 56 |
| 28. Espectro de DEPT 135 (50,2 MHz) e RCH5B .....                                                                                              | 58 |

|                                                                                                                           | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 29. Espectro de infravermelho (KBr) de RCD8 .....                                                                         | 61     |
| 30. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de $\delta$ 0,5 a 8,0 .....  | 62     |
| 31. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de $\delta$ 0,5 a 2,4 .....  | 63     |
| 32. Espectro de massas de RCD8 .....                                                                                      | 64     |
| 33. Espectro de infravermelho (KBr) de RCD8A .....                                                                        | 65     |
| 34. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8A, compreendendo a região de $\delta$ 0,5 a 5,5 ..... | 68     |
| 35. Espectro de COSY HH (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de $\delta$ 0,0 a 5,5 .....           | 69     |
| 36. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,2 MHz) de RCD8 .....                                                              | 74     |
| 37. Espectro de DEPT 135 (50,2 MHz) de RCD8 .....                                                                         | 75     |
| 38. Espectro de infravermelho (KBr) de RCE6 .....                                                                         | 78     |
| 39. Espectro de infravermelho (KBr) de RCE7 .....                                                                         | 78     |

## CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Efeito de constituintes químicos extraídos da casca do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> sobre a eclosão <i>in vitro</i> de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3, avaliados a cada 48 horas ..... | 85 |
| 2. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> sobre <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ao final de 240 horas .....                            | 86 |
| 3. Curva de regressão da concentração (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de RCD8 versus a eclosão de juvenis <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 3, ao final de 240 horas em relação à água .....                                            | 88 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                     |                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| CC                  | Cromatografia em coluna                                          |
| CCD                 | Cromatografia em camada delgada                                  |
| CP                  | Cromatografia em papel                                           |
| CL                  | Cromatografia em fase líquida                                    |
| CG                  | Cromatografia em fase gasosa                                     |
| CG/EM               | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa          |
| PF                  | Ponto de fusão                                                   |
| IV                  | Infravermelho                                                    |
| UV                  | Ultravioleta                                                     |
| EM                  | Espectro de massa                                                |
| m/z                 | Razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga elétrica |
| RMN <sup>1</sup> H  | Ressonância magnética nuclear protônica de hidrogênio            |
| RMN <sup>13</sup> C | Ressonância magnética nuclear de carbono 13                      |
| COSY                | Correlated spectroscopy                                          |
| DEPT                | Distortionless enhancement by polarization transfer              |
| APT                 | Attached proton test                                             |
| s                   | Simpleto                                                         |
| d                   | Dupleto                                                          |
| dd                  | Duplo dupleto                                                    |
| t                   | Tripleto                                                         |

|                |                                                                                        |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| tt             | Triplo tripleto                                                                        |
| m              | Multiplete                                                                             |
| J              | Constante de acoplamento                                                               |
| Hz             | Hertz                                                                                  |
| R <sub>f</sub> | Fator de retenção em cromatografia de camada delgada                                   |
| p/v            | Peso por volume                                                                        |
| v/v            | Volume por volume                                                                      |
| t <sub>R</sub> | Tempo de retenção                                                                      |
| δ              | Deslocamento químico                                                                   |
| δ <sub>s</sub> | Deformação angular                                                                     |
| υ              | Deformação axial (estiramento)                                                         |
| RCH            | Extrato hexânico da casca do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                       |
| RCH1B          | mistura de sesquiterpenos obtido de RCH                                                |
| RCH1A          | mistura de hidrocarbonetos (não identificados) obtidos do grupo 1                      |
| RCH5B          | clusianona [36]                                                                        |
| RCH5A          | mistura de hidrocarbonetos (não identificados) obtidos do grupo 5                      |
| RCD            | Extrato diclorometânico da casca do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                |
| RCD*           | Precipitado do extrato diclorometânico da casca do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i> |
| RCD8           | ácido oleanólico [39]                                                                  |
| RCD8A          | acetato do ácido oleanólico [40]                                                       |
| RCD*4          | ácido oleanólico [39]                                                                  |
| RCE            | Extrato etanólico da casca do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                      |
| RCE6           | mistura de álcoois alifáticos do grupo 6                                               |
| RCE7           | mistura de álcoois aromáticos do grupo 7                                               |
| RPH            | Extrato hexânico da polpa do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                       |
| RPH3           | mistura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa do grupo 3                         |
| RPH6           | mistura de β-sitosterol e esatigmasterol, do grupo 6                                   |
| RPH7           | mistura de β-sitosterol e esatigmasterol, do grupo 7                                   |
| RPE            | Extrato etanólico da polpa do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                      |
| RSH            | Extrato hexânico da semente do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                     |
| RSD            | Extrato diclorometânico da semente do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>              |
| RSE            | Extrato etanólico da semente do fruto de <i>Rheedia gardneriana</i>                    |

## EXTRATO

SANTOS, Marcelo Henrique dos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 1996. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* (Pl. e Tr.) e aplicações biológicas dos constituintes.** Professor Orientador: Tanus Jorge Nagem. Professores Conselheiros: Tânia Toledo de Oliveira e Luiz Carlos Guedes de Miranda.

*Rheedia gardneriana*, conhecida popularmente como “bacuparí”, “bacuparí miúdo” e “bacoparé”, é uma planta da família Guttiferae, nativa da região Amazônica, e se encontra espalhada por todo o território brasileiro em menor proporção. O estudo químico do fruto (casca e polpa) conduziu à identificação dos seguintes constituintes: sesquiterpenos (mistura de compostos  $C_{15}H_{24}$ , contendo, dentre outros:  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -muuroleno e cadineno), ésteres de ácidos graxos (palmitato, estearato, oleato, linoleato e linolenato), açúcares (glicose, sacarose e frutose), triterpenóide pentacíclico (ácido oleanólico), benzofenona prenilada (clusianona) e esteróides (estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol). Além destes compostos, foram isolados outros que não tiveram suas estruturas até o momento elucidadas, por constituírem misturas de hidrocarbonetos e álcoois. Os constituintes RCH1B, RCH5B e RCD8, extraídos da casca do fruto, foram avaliados quanto ao seu potencial biológico em testes realizados *in vitro*. RCH5B

e RCD8 mostraram atividade inibitória do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Já RCH5B demonstrou atividade sobre o crescimento da fitobactéria *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*. No teste sobre a eclosão de juvenis do fitonematóide *Meloidogyne incognita*, raça 3, a substância RCD8 mostrou-se mais eficiente na redução de eclosão deste patógeno. Quanto ao potencial alelopático, somente RCH5B demonstrou atividade sobre *Sorghum bicolor*.



## ABSTRACT

SANTOS, Marcelo Henrique dos, M.S., Federal University of Viçosa, october 1996. **Chemical study of the fruits of *Rheedia gardneriana* (Pl. and Tr.) and biological applications of the constituents.** Advisor: Tanus Jorge Nagem. Committee Members: Tânia Toledo de Oliveira e Luiz Carlos Guedes de Miranda.

*Rheedia gadneriana* is knowed as “bacuparí”, “bacuparí miúdo” and “bacoparé”. It is a plant of Guttiferae family, is native of the amazonic region and is finded in all brazilian territory. This work carried for a identification of the fruit constituents: sesquiterpenes mixture ( $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -muurolene, cadinene) ester of fatty acids (palmitate, estearate, oleate, linoleate, linolenate), sugars (glucose, sucrose, fructose), triterpene (oleanolic acid), benzofenone (clusianone) and sterols (stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol). Other constituents couldn't be identified: mixture of the hidrocarbons, alcohol and esters of long chain. The chemical constituents isolated from the bark were tested in biological activity *in vitro*, by using patogenic bacter and nematode *Meloidogyne incognita*, 3 race. It was also demonstrated that it chemical constituents didn't show hebicidal activity expressive on *Sorghum bicolor* seeds germination.

## 1. INTRODUÇÃO

A medicina alopática utiliza universalmente 119 drogas, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. A existência de cerca de 250.000 espécies de plantas superiores permite deduzir que muitas substâncias com atividade medicinal podem ser isoladas destes organismos vegetais e caracterizadas estruturalmente (BRAZ-FILHO, 1994).

A busca de novos medicamentos em plantas tropicais é, hoje, a esperança mais concreta para os pacientes que possuem doenças graves, como o câncer e a Aids, e o caminho mais curto para os pesquisadores. A indústria farmacêutica simplesmente não tem mais tempo nem dinheiro para pesquisar novas drogas a partir do zero - há casos de remédios que custam 250 milhões de dólares e dez anos de trabalho. Para o tratamento de câncer, por exemplo, já foram testadas mais de 1 milhão de formulações produzidas em laboratório e, dessas, apenas 15 agiram eficazmente contra a doença. É uma relação de 100 mil tentativas para apenas uma bem-sucedida. A alternativa mais rápida e barata, portanto, são as plantas que produzem, como se fossem uma indústria, substâncias químicas que podem ser usadas como remédios. Partindo dos vegetais, as chances de acerto são de uma para cinco mil tentativas. Com 30% das florestas tropicais do planeta, o Brasil tem justamente uma natureza privilegiada. Estima-se que existam entre 55

mil e 80 mil espécies vegetais só na Amazônia brasileira e menos de 2% delas foram estudadas pelos cientistas.

O presente trabalho consistiu do estudo dos frutos de *Rheedia gardneriana*, uma planta pertencente à família Guttiferae, bem como da realização de testes biológicos com seus constituintes purificados e identificados.

### **1.1. Características gerais da família Guttiferae**

A família Guttiferae compreende novecentas (900) espécies, distribuídas em vinte e um (21) gêneros (Quadro 1) e tem sido objeto de estudo principalmente pela ocorrência de xantonas. As xantonas têm despertado grande interesse dos pesquisadores, principalmente na área de saúde, pela comprovação de variadas atividades farmacológicas, como: antialérgico, antiasmático, antiinflamatório, antileucêmico, antipirético, anti-reumático, antidepressor, anti-helmíntico, antitumoral, anti-secretor, antiulcerogênico, agente contra filariose, analgésico, analéptico, bactericida, bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, depressor e estimulante do sistema nervoso central, imuno-supressor, músculo-relaxante, agente antiparkinsonismo, schistosomicida, ação contra urticária e inibidor da monoaminoxidase. Apresentaram também atividades inseticida, fungicida, repelente de cupins e nematicida e atuaram na proteção de plantas contra danos causados por ozônio, sendo utilizadas na indústria de polímeros, na química analítica, como catalisador em fotorreações e como marcadores quimiossistemáticos; a literatura registra mais de 200 referências (OLIVEIRA, 1976).

### **1.2. O Gênero *Rheedia***

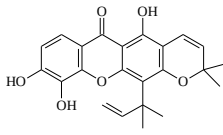
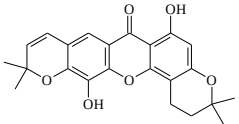
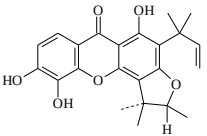
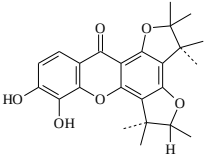
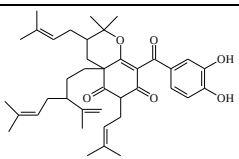
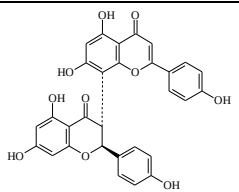
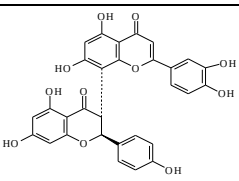
Estudos químicos anteriores de plantas do gênero *Rheedia* (Quadro 2) e de *Rheedia gardnerina* (Quadro 3) conduziram ao isolamento de diversos constituintes.

Quadro 1 - Lista de gêneros e espécies conhecidas que produzem xantonas da família Guttiferae

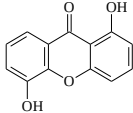
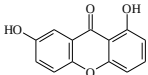
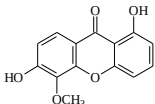
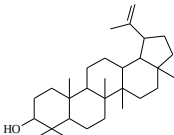
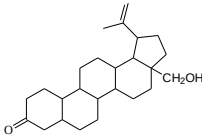
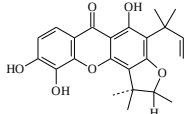
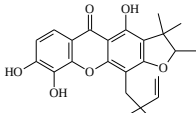
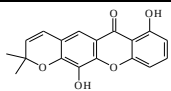
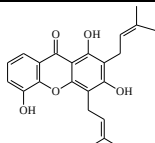
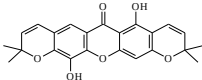
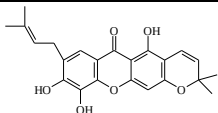
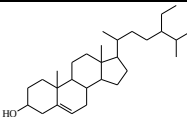
| Gênero               | Espécies                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Allonblackia</i>  | <i>A. floribunda</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Archytaea</i>     | <i>A. multiflora</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Bonnetia</i>      | <i>B. dinizii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <i>Calophyllum</i>   | <i>C. bracteatum</i> ; <i>C. brasiliense</i> ; <i>C. calaba</i> ; <i>C. canum</i> ; <i>C. cuneifolium</i> ; <i>C. fragans</i> ; <i>C. inophyllum</i> ; <i>C. neoebudicum</i> ; <i>C. ramiflorum</i> ; <i>C. sclerophyllum</i> ; <i>C. scriblitifolium</i> ; <i>C. thwaitesii</i> ; <i>C. tomentosum</i> ; <i>C. trapezifolium</i> ; <i>C. walkeri</i> ; <i>C. zeylanicum</i>                                                                                                                |
| <i>Caraipa</i>       | <i>C. densiflora</i> ; <i>C. grandifolia</i> ; <i>C. psidifolia</i> ; <i>C. valioi</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Cratoxylon</i>    | <i>C. celebicum</i> ; <i>C. cochinchinense</i> ; <i>C. pruniflorum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Garcinia</i>      | <i>G. buehneri</i> ; <i>G. cowa</i> ; <i>G. densivenia</i> ; <i>G. dulcis</i> ; <i>G. echinocarpa</i> ; <i>G. eugenifolia</i> ; <i>G. forbesii</i> ; <i>G. hanburyi</i> ; <i>G. mangostana</i> ; <i>G. morella</i> ; <i>G. multiflora</i> ; <i>G. nervosa</i> ; <i>G. opaca</i> ; <i>G. ovalifolia</i> ; <i>G. pedunculata</i> ; <i>G. polyantha</i> ; <i>G. pyrifera</i> ; <i>G. morella</i> ; <i>G. staudtii</i> ; <i>G. subelliptica</i> ; <i>G. terpnophylla</i> ; <i>G. thwaitesii</i> |
| <i>Hapocladia</i>    | <i>H. leiantha</i> ; <i>H. paniculata</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>Kayea</i>         | <i>K. stylosa</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <i>Kielmeyera</i>    | <i>K. candidissima</i> ; <i>K. corymbosa</i> ; <i>K. coriacea</i> ; <i>K. densiflora</i> ; <i>K. excelsa</i> ; <i>K. ferruginea</i> ; <i>K. grandifolia</i> ; <i>K. petiolares</i> ; <i>K. rubriflora</i> ; <i>K. rupestris</i> ; <i>K. speciosa</i> ;                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Lorostemon</i>    | <i>L. coelhoi</i> ; <i>L. negrensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>Mammea</i>        | <i>M. acuminata</i> ; <i>M. africana</i> ; <i>M. americana</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <i>Mesua</i>         | <i>M. ferrea</i> ; <i>M. thwaitesii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>Ochrocarpus</i>   | <i>O. odoratus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Pentadesma</i>    | <i>P. butyracea</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <i>Pentaplangium</i> | <i>P. solomonense</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <i>Psorospermum</i>  | <i>P. febrifugum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Rheedia</i>       | <i>R. benthamiana</i> ; <i>R. brasiliensis</i> ; <i>R. gardneriana</i> ; <i>R. madruno</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Symphonia</i>     | <i>S. globulifera</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <i>Tovomitia</i>     | <i>T. brasiliensis</i> ; <i>T. choisyana</i> ; <i>T. excelsa</i> ; <i>T. macrophylla</i> ; <i>T. mangle</i> ; <i>T. pyrifolium</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Vismia</i>        | <i>V. guaramirangae</i> ; <i>V. guineensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

BOTTA et al. (1984); MANDAL (1992).

Quadro 2 - Substâncias isoladas de plantas do gênero *Rheedia*

| Nome                    | Fórmula                                                                             | Espécie                                         | Referência                  |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|
| macluraxantona<br>[1]   |    | <i>R. benthamiana</i>                           | DELLE MONACHE et al. (1984) |
| rheediaxantona A<br>[2] |    | <i>R. benthamiana</i>                           | DELLE MONACHE et al. (1984) |
| rheediaxantona B<br>[3] |    | <i>R. benthamiana</i><br><i>R. brasiliensis</i> | DELLE MONACHE et al. (1984) |
| rheediaxantona C<br>[4] |   | <i>R. benthamiana</i>                           | DELLE MONACHE et al. (1984) |
| xantochimol<br>[5]      |  | <i>R. madruno</i>                               | BOTTA et al. (1984)         |
| volkensiflavona<br>[6]  |  | <i>R. madruno</i>                               | BOTTA et al. (1984)         |
| fukugentina<br>[7]      |  | <i>R. madruno</i>                               | BOTTA et al. (1984)         |

Quadro 3 - Algumas substâncias isoladas do caule e da raiz de *Rheedia gardneriana*

| SUBSTÂNCIA                           | FÓRMULA                                                                               |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1,5-diidroxixantona<br>[8]           |    |
| 1,7-diidroxixantona<br>[9]           |    |
| 1,6-diidroxi-5-metoxixantona<br>[10] |    |
| lupeol<br>[11]                       |    |
| betulina<br>[12]                     |   |
| rheediaxantona B<br>[13]             |  |
| isorheediaxantona B<br>[14]          |  |
| rheediacromenoxantona<br>[15]        |  |
| 8-deoxigartanina<br>[16]             |  |
| piranojacareubina<br>[17]            |  |
| 7-preniljacareubina<br>[18]          |  |
| $\beta$ -sitosterol<br>[19]          |  |

BRAZ-FILHO et al. (1970), DELLE MONACHE et al. (1983, 1984).

### 1.2.1. Descrição botânica e caracterização de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr.

A espécie *Rheedia gardneriana* foi classificada, de acordo com o Quadro 4, tendo como sinonímia: *Lamprophyllum gardnerianum* Miers.

Quadro 4 - Classificação de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr.

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| Reino     | Vegetal                    |
| Classe    | Dicotiledônea              |
| Subclasse | Archichlamydeae            |
| Ordem     | Guttiferales               |
| Subordem  | Theineae                   |
| Família   | Guttiferae                 |
| Tribo     | Clusioidae                 |
| Espécie   | <i>Rheedia gardneriana</i> |

BRAZ-FILHO (1994).

É uma árvore pequena, copa piramidal com até 5 m de altura, folhas opostas, pecioladas e coriáceas. Entrenós com 4 a 6 cm de comprimento e 3 a 5 mm de diâmetro. Pecíolo com cerca de 1 cm; limbo com 7 a 12 cm de comprimento, 2 a 4 cm de largura; nervuras laterais formando ângulos de 70 a 80° com a nervura principal, distantes entre si 3 a 4 mm. Pedicelo com cerca de 1 cm de comprimento.

Possui botões florais com 3 mm de diâmetro. Sépalas com cerca de 1,5 mm de comprimento e largura. Pétalas com 2,5 mm de comprimento. Disco nectarífero levemente sulcado longitudinalmente. Ovário levemente oval, com estigma de 1,5 mm de diâmetro e possuindo parede de 0,5 mm de grossura.

Possui fruto (baga amarela) com comprimento variando de 1,5 a 2,5 cm, 1,5 a 2,0 cm de largura, contendo polpa branca, mucilagínosa, adocicada e comestível, envolvendo a semente (Figura 1). São conhecidas as variedades *glaziovii* e *parvifolia*.

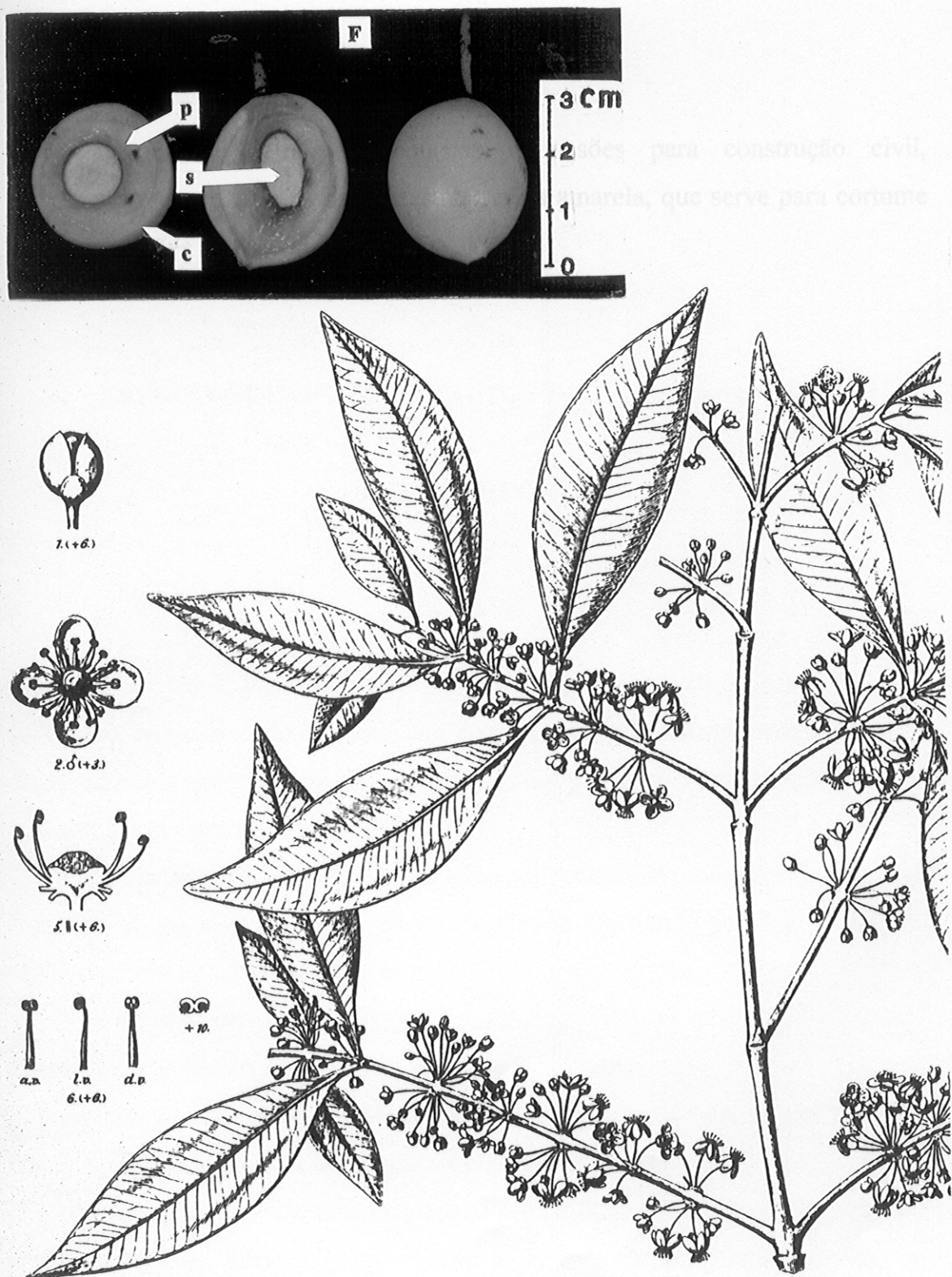


Figura 1 - Ilustração da parte aérea de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr.; fruto (F): casca (C), polpa (P) e semente (S).



É cultivada nas regiões do Ceará até o Rio Grande do Sul e Minas Gerais (CORRÊA, 1978; FLORA, 1967).

#### **1.2.2. Utilização de *Rheedia gardneriana***

Fornece madeira de pequenas dimensões para construção civil, marcenaria e carpintaria. A casca exsuda resina amarela, que serve para cortume e tem aplicações medicinais (CORRÊA, 1978).

## **CAPÍTULO 1**

### **ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE *Rheedia gardneriana***

#### **1. INTRODUÇÃO**

A crescente busca de novos produtos naturais com atividades biológicas, sobretudo originários do metabolismo secundário, para sanarem os problemas causados pelos sintéticos existentes, tem sido um grande estímulo para a pesquisa química em plantas.

Mais especificamente, este trabalho concentrou-se no estudo químico dos frutos de *R. gardneriana*, uma planta da família Guttiferae sobre a qual já há registro de estudos do caule e da raiz.

Foram objetivos específicos deste estudo:

- a) contribuição para o conhecimento da flora brasileira;
- b) contribuição para o melhor conhecimento da taxonomia vegetal, por meio do isolamento e da identificação dos constituintes de *R. gardneriana*;
- c) formação de recursos humanos altamente qualificados na área de química de produtos naturais, principalmente quanto ao uso de técnicas mais refinadas de separação de compostos presentes em misturas complexas (CLAE, CG/EM, etc.),

bem como utilização de métodos espectroscópicos de identificação: RMN, IV, UV e EM;

d) obtenção de matérias-primas que possam ser testadas quanto ao potencial biológico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Equipamentos e condições analíticas**

Nas separações cromatográficas em coluna, foi utilizada sílica gel 60 (70 a 230 Mesh-ASTM, Merck).

Nas separações cromatográficas em camada delgada, utilizaram-se placas de vidro (10 cm x 10 cm e 2,5 cm x 10 cm) com 0,25 mm de sílica gel GF<sub>254</sub> 60 Merck com indicador de fluorescência UV<sub>254</sub>.

Foram utilizados como reveladores radiação ultravioleta, iodo, soluções de ácido fosfomolibídico e sulfato cérico.

Todas as frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório.

Os pontos de fusão foram determinados em bloco de Kofler R. Winkel Sottingen, modelo 17717, e com aparelho para determinação de ponto de fusão QUIMIS, modelo 340D-23, com as devidas correções.

Os cromatogramas em fase gasosa foram obtidos em Cromatógrafo a Gás Shimadzu CG 14-A, equipado com detector de ionização de chama acoplado a um registrador e integrador C-R6A CHROMATOPAC. A coluna utilizada foi uma capilar Carbowax 20 M (Supelco) de 25 m x 0,2 mm, de sílica fundida, com espessura do filme de 0,25 µm.

A cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foi realizada em cromatógrafo a gás da UFMG, modelo HP5890, série II, acoplado a espectrômetro de massa 5989 A da HP, 70 eV, sendo a coluna de metilsilicone, de sílica fundida (30 m x 0,2 mm); o gás de arraste foi hélio.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Mattson Instruments FTIR, no Departamento de Química - ICEx - UFMG, Belo Horizonte.

Os espectros de ressonância magnética nuclear a 200 MHz foram obtidos em espectrômetro Gemini 200 - Varian, no NPPN - CCS - UFRJ - Rio de Janeiro.

Os espectros de massa foram registrados em um espectrômetro VG Auto Spec Q, no NPPN - CCS - UFRJ - Rio de Janeiro.

Os espectros de ultravioleta foram obtidos de espectrofotômetro uv-visível HITACHI modelo U-2000 de feixe duplo, do Departamento de Química da UFV - Viçosa.

## **2.2. Isolamento dos constituintes dos frutos de *Rheedia gardneriana***

### **2.2.1. Coleta e separação do material**

Os frutos maduros de *R. gardneriana* foram coletados no setor do Horto Botânico, Universidade Federal de Viçosa, em 19 de janeiro de 1994. O fruto foi separado em três partes: casca, polpa e semente (Figura 1), sendo secos em estufa a 58°C, moídos e acondicionados em sacos de papel em lugar arejado até o momento da extração.

### **2.2.2. Análise de ésteres de ácidos graxos em extratos etéreos da casca, polpa e semente de *Rheedia gardneriana***

Os extratos etéreos foram obtidos em escala menor, extraindo-se das partes do fruto (casca, polpa e semente) os constituintes lipofílicos com éter de

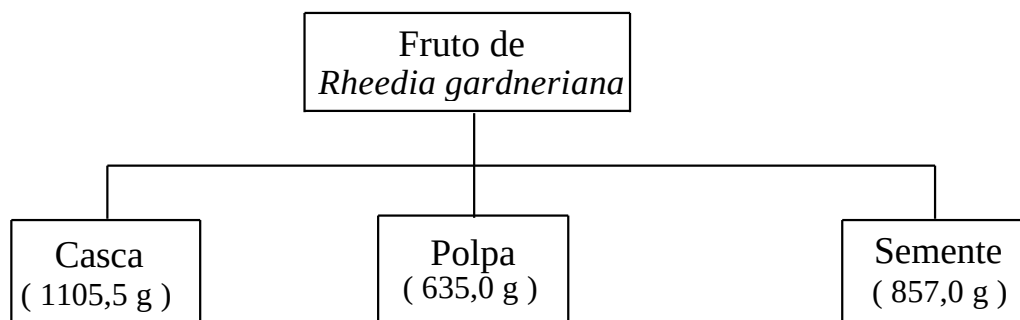


Figura 1 - Fluxograma da separação do fruto de *Rheedia gardneriana* em partes, com as respectivas massas secas.

petróleo em aparelho de Soxhlet por 24 horas, concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida. A presença de ésteres foi confirmada pela análise de IV.

#### **2.2.2.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos**

As amostras constituídas de mistura de ésteres de ácidos graxos, caracterizadas pelos espectros de IV, foram submetidas a um processo de transesterificação para obtenção de seus ésteres metílicos, de acordo com o seguinte procedimento: a amostra (20 mg) foi dissolvida em 0,5 mL de tetrahydrofurano (THF) em um tubo de ensaio (10 mL). Adicionou-se 1,0 mL de solução de metóxido de sódio a 0,5 M, preparada utilizando-se sódio metálico e álcool metílico. Aqueceu-se o tubo a 50 °C por 10 minutos em banho termostaticado. Em seguida, foram adicionados 50,0 µL de ácido acético glacial e, posteriormente, 5,0 mL de água destilada. Os produtos transesterificados foram extraídos com 5,0 mL de n-hexano por três vezes. Utilizou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro contendo 10% de KHCO<sub>3</sub> sólido, para eliminar água da fase orgânica, filtrando-se em seguida. Eliminou-se o solvente em evaporador rotatório à pressão reduzida.

O resíduo foi redissolvido em 1,0 mL de n-hexano e injetado em cromatógrafo a gás (coluna Carbowax 20M de sílica fundida contendo 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro). As condições de análise foram: temperatura do injetor (200°C); fluxo de gases N<sub>2</sub> (7,5 Kg/cm<sup>2</sup>), ar (300mL/cm<sup>2</sup>) e H<sub>2</sub> (28mL/cm<sup>2</sup>); temperatura do detector (200°C); e programação de temperatura da coluna: inicial (150°C) por 1 minuto e 5°C/minuto até (215°C), mantendo a 215°C até o final. Também foram co-injetados padrões de ésteres metílicos.

### 2.2.3. Estudo da polpa

#### 2.2.3.1. Obtenção dos extratos da polpa

A polpa moída foi submetida a extrações sucessivas com n-hexano, diclorometano e etanol, por agitação mecânica à temperatura ambiente, sendo os extratos, em seguida, filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Figura 2).

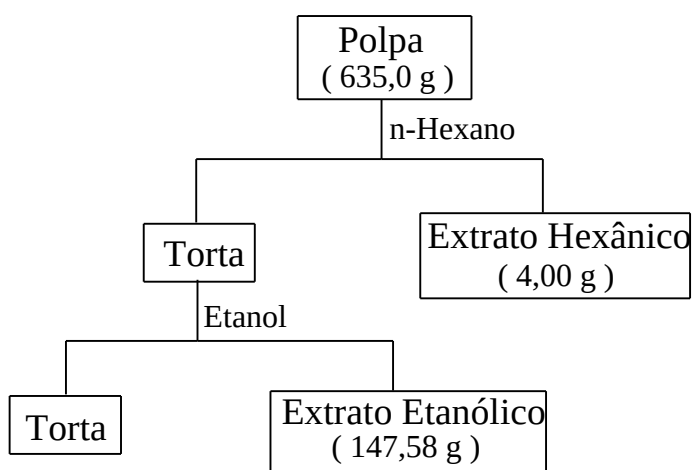


Figura 2 - Fluxograma da obtenção dos extratos da polpa do fruto de *Rheedea gardneriana* com as respectivas massas sem solvente (não se obteve extrato quando foi usado diclorometano).

### 2.2.3.2. Elaboração do extrato hexânico da polpa

O extrato hexânico da polpa (4,0 g) de *R. gardneriana* foi submetido a uma análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de otimizar a separação de seus componentes por CC.

Após a escolha dos sistemas de solventes, o extrato foi eluído em coluna (200,0:2,0 cm) contendo sílica gel (80,0 g), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Ordem de eluição do extrato hexânico da polpa por cromatografia em coluna com as respectivas frações

| Solvente                 | Frações |
|--------------------------|---------|
| n-Hexano                 | 1-26    |
| n-Hexano/Clorofórmio 1%  | 27-29   |
| n-Hexano/Clorofórmio 10% | 30-90   |
| n-Hexano/Clorofórmio 30% | 91-126  |
| n-Hexano/Clorofórmio 50% | 127-137 |
| Clorofórmio              | 138-147 |
| Clorofórmio/Etanol 1%    | 148-157 |
| Clorofórmio/Etanol 3%    | 158-169 |
| Clorofórmio/Etanol 5%    | 170-177 |
| Clorofórmio/Etanol 10%   | 178-182 |
| Clorofórmio/Etanol 30%   | 183-187 |
| Clorofórmio/Etanol 50%   | 188-200 |
| Etanol                   | 200-208 |

As frações coletadas (100 mL) foram posteriormente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e reunidas em grupos de acordo com os valores de  $R_f$ , por comparação em CCD, fornecendo 11 grupos, conforme mostrado no Quadro 2.

O **grupo 3**, constituído de material ceroso ligeiramente amarelado, foi submetido a CC em coluna (64,0:1,3 cm) contendo sílicagel (10,84 g), utilizando



Quadro 2 - Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato hexânico da polpa

| Grupo | Frações Reunidas | Massas (g) |
|-------|------------------|------------|
| 1     | 1-5              | 0,10       |
| 2     | 6-32             | 0,06       |
| 3     | 33-46            | 0,18       |
| 4     | 47-60            | 0,04       |
| 5     | 61-91            | 0,07       |
| 6     | 92-125           | 0,83       |
| 7     | 126-129          | 0,88       |
| 8     | 130-132          | 0,08       |
| 9     | 133-155          | 1,06       |
| 10    | 156-174          | 0,18       |
| 11    | 175-208          | 0,35       |

como eluente uma mistura de n-hexano/diclorometano (45%, v/v). Foram coletadas 30 frações de 10,0 mL cada, as quais foram, posteriormente, reunidas em quatro grupos, dos quais o que englobava as frações 10-18 foi denominado RPH3 e caracterizado como mistura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa.

Os **grupos 6 e 7**, por meio de recristalização com acetona, conduziram ao isolamento de RPH6 e RPH7, que, por análise em TLC, IV e PF, confirmaram ser as mesmas substâncias, totalizando 0,110 g de sólido cristalino.

Os demais grupos não sofreram processos de separação, por estarem em misturas muito complexas, de difícil separação em CCD.

### 2.2.3.3. Elaboração do extrato etanólico da polpa

Este extrato apresentou-se como uma mistura muito complexa, quando analisado por CCD, sendo muito solúvel em água e com sabor adocicado, parecendo ser constituído na sua maioria por açúcares. Por isso não sofreu fracionamento por CC, sendo somente submetido à análise por cromatografia em papel descendente.

#### **a. Identificação qualitativa de açúcares por cromatografia em papel**

Para as determinações qualitativas dos açúcares presentes foi usada cromatografia em papel descendente, utilizando papel-filtro Watman N<sup>o</sup> 1 (14 x 18 cm). Os pontos de aplicação foram 4 cm da borda superior, separados por 1 cm de distância. O sistema solvente foi n-butanol:ácido acético:água (8:2:1). O tempo de corrida foi de seis horas em cuba saturada. Após a corrida, os papéis foram secos em estufa a 70°C por 30 minutos, borrifados com revelador (1 mL de anilina e 1 g de difenilamina, diluídos em 100 mL de acetona) e posteriormente levados à estufa a 70°C por 30 min. As amostras foram comparadas com os fatores de retenção e coloração dos cromatogramas dos padrões dos açúcares, bem como a confirmação foi feita por meio de misturas da amostra com os padrões mais prováveis.

#### **2.2.4. Estudo da casca**

##### **2.2.4.1. Obtenção dos extratos da casca**

O pó moído da casca foi submetido a extrações sucessivas com n-hexano, diclorometano e etanol, por agitação mecânica à temperatura ambiente, sendo os extratos filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até que todo material fosse extraído. Ao se concentrar o extrato diclorometânico houve precipitação de sólido amarelado, que foi separado por filtração e seco ao ar (Figura 3).

##### **2.2.4.2. Elaboração do extrato hexânico da casca**

Parte do extrato hexânico da casca (66,0 g) de *R. gardneriana* foi submetida à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de otimizar a separação de seus componentes em cromatografia em coluna; o restante (6,28 g) foi conservado em frasco de vidro sob refrigeração.

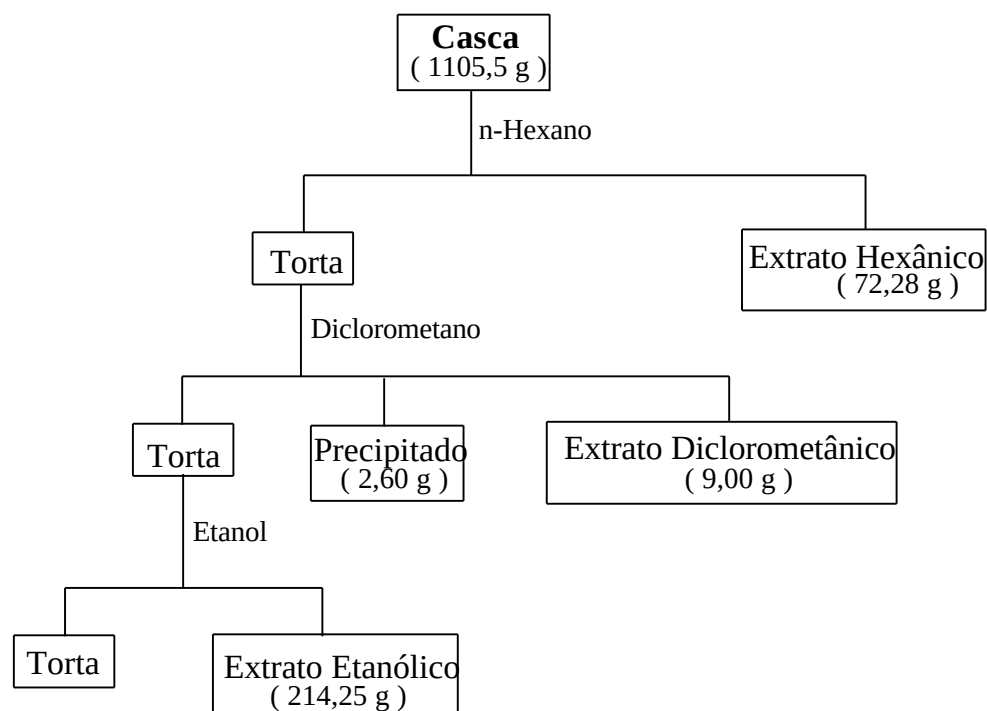


Figura 3 - Fluxograma da obtenção dos extratos da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* com as respectivas massas, após evaporação do solvente.

Após escolha dos sistemas de solventes, o extrato foi eluído em coluna (149,0:5,3 cm) contendo sílica gel (714,0 g), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, como mostrado no Quadro 3.

Quadro 3 - Ordem de eluição do extrato hexânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações

| Solvente                 | Frações |
|--------------------------|---------|
| n-Hexano                 | 1-13    |
| n-Hexano/Clorofórmio 10% | 14-71   |
| n-Hexano/Clorofórmio 30% | 72-99   |
| n-Hexano/Clorofórmio 80% | 100-103 |
| Clorofórmio              | 104-106 |
| Clorofórmio/Etanol 3%    | 107-110 |
| Clorofórmio/Etanol 50%   | 111-113 |
| Clorofórmio/Etanol 80%   | 114-116 |
| Etanol                   | 117-121 |

As frações coletadas (200 mL) foram posteriormente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e reunidas em grupos, de acordo com os valores de  $R_f$ , por comparação em CCD, fornecendo 13 grupos, conforme mostrado no Quadro 4.

Quadro 4 - Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato hexânico da casca

| Grupos | Frações Reunidas | Massa (g) |
|--------|------------------|-----------|
| 1      | 1-11             | 6,86      |
| 2      | 12-15            | 0,09      |
| 3      | 16-18            | 0,13      |
| 4      | 19-59            | 6,37      |
| 5      | 60-74            | 4,14      |
| 6      | 75-83            | 7,43      |
| 7      | 84-89            | 26,78     |
| 8      | 90-93            | 0,74      |
| 9      | 94-103           | 0,16      |
| 10     | 109-110          | 0,67      |
| 11     | 111-113          | 0,11      |
| 12     | 114-118          | 0,04      |
| 13     | 119-121          | 0,07      |

Foram caracterizados os grupos que se apresentaram mais promissores, com base em seus espectros de IV, possibilidade de separação quando analisado em CCD e quantidade de amostra.

O **grupo 1**, constituído de óleo viscoso ligeiramente amarelado com cheiro agradável, quando da adição de metanol, mostrou precipitação de sólido branco, que foi separado por filtração e rotulado como RCH1A. O sobrenadante, solúvel em metanol, foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e rotulado como RCH1B. Foi verificado, por análise no IV, que RCH1B tratava-se de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis; esta mistura foi dissolvida em n-hexano (0,0032 g/mL) e injetada (1,0  $\mu$ L) em cromatógrafo a gás modelo HP5890, série II, acoplado a espectrômetro de massa 5989 A, sendo a coluna de

metilsilicone de sílica fundida (30 m x 0,2 mm). As condições de análise foram: temperatura inicial da coluna (120°C) e final (200°C); fluxo de gases N<sub>2</sub> (7,5 kg/cm<sup>2</sup>), ar (0,3 kg/cm<sup>2</sup>) e He (1 mL/min); e programação de temperatura de 4°C/minuto.

Os **grupos 4, 5 e 6**, constituídos de material oleoso com cristais amarelos, apesar de parecerem iguais visualmente, foram trabalhados individualmente, uma vez que as análises em CCD mostravam pequenas diferenças em suas composições químicas. Estes grupos receberam o mesmo tratamento: adicionou-se acetona a frio, havendo precipitação de sólido branco amorfo, que foi lavado com acetona e filtrado, originando as substâncias RCH4A, RCH5A e RCH6A, dos **grupos 4, 5 e 6**, respectivamente, as quais foram analisadas por IV e RMN <sup>1</sup>H. O sobrenadante, após evaporação da acetona, foi recristalizado com metanol por várias vezes, sempre acompanhado por CCD, com o objetivo de verificar a pureza da amostra. Desta recristalização, obteve-se material cristalino amarelo denominado RCH4B, RCH5B e RCH6B, dos **grupos 4, 5 e 6**, respectivamente, os quais foram analisados por UV, IV e RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além de um material oleoso que não foi analisado.

O **grupo 8**, constituído de material pastoso escuro, foi lavado com acetona a frio, havendo precipitação de um sólido branco amorfo denominado RCH8 (0,20 g), que se mostrou idêntico a RCH5A por IV, CCD e RMN <sup>1</sup>H, e sobrenadante escuro composto de mistura muito complexa, não sendo verificada boa separação em CCD; portanto, foi caracterizado apenas por IV.

#### **2.2.4.3. Elaboração do extrato diclorometânico da casca (RCD)**

O extrato diclorometânico da casca (9,0 g) de *R. gardneriana* foi submetido a uma análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de otimizar a separação de seus componentes por CC.

Após a escolha dos sistemas de solventes, o extrato foi eluído em coluna (149,0:5,3 cm) contendo sílica gel (220,0 g), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, como mostrado no Quadro 5.

Quadro 5 - Ordem de eluição do extrato diclorometânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações

| <b>Solvente</b>      | <b>Frações</b> |
|----------------------|----------------|
| n-Hexano             | 1-4            |
| n-Hexano/ Etanol 1%  | 5-8            |
| n-Hexano/ Etanol 5%  | 9-43           |
| n-Hexano/ Etanol 20% | 44-68          |
| n-Hexano/ Etanol 50% | 69-78          |
| n-Hexano/ Etanol 80% | 79-88          |
| Etanol               | 89-95          |

As frações coletadas (100 mL) foram posteriormente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e reunidas em grupos, de acordo com os valores de  $R_f$ , por comparação em CCD, fornecendo 12 grupos, conforme Quadro 6.

Quadro 6 - Reunião das frações em grupos da cromatografia em coluna do extrato diclorometânico da casca

| <b>Grupo</b> | <b>Frações Reunidas</b> | <b>Massas (g)</b> |
|--------------|-------------------------|-------------------|
| 1            | 1-3                     | 0,01              |
| 2            | 4-6                     | 0,04              |
| 3            | 7-14                    | 0,04              |
| 4            | 15-16                   | 0,14              |
| 5            | 17-18                   | 0,75              |
| 6            | 19-22                   | 2,08              |
| 7            | 23-28                   | 0,27              |
| 8            | 29-45                   | 0,15              |
| 9            | 46-56                   | 1,42              |
| 10           | 57-67                   | 0,41              |
| 11           | 68-75                   | 0,28              |
| 12           | 76-112                  | 0,35              |

Dos grupos obtidos, somente o **grupo 8** conduziu ao isolamento de material cristalino, por meio de recristalização com metanol e acompanhamento por TLC, para verificar pureza. A substância purificada foi rotulada de RCD8, determinando-se o PF, IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Verificado que se tratava de um ácido carboxílico, preparou-se o derivado acetilado pelo seguinte procedimento: 0,05 g de RCD8 foi dissolvido em 2,0 mL de piridina, adicionando-se 2,0 mL de anidrido acético. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por duas horas. Logo após foi transferida para funil de separação, onde foram adicionados 60,0 mL de éter etílico. Em seguida foram feitas extrações sucessivas, para eliminar o excesso de anidrido acético e piridina, com as seguintes soluções: água (3X 20,0 mL), HCl 2 M (10X 10,0 mL),  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2X 10,0 mL) e NaCl saturado (2X 10,0 mL). A fase orgânica foi tratada com  $\text{MgSO}_4$ , para eliminar resíduos de água, e concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida. O resíduo foi submetido à CC, e a coluna (50,0:0,5 cm) contendo 7,3 g de sílica foi eluída com mistura n-hexano/etanol (0, 1, 3, 5, 7, 10, 30, 50, 100%); o produto principal foi recristalizado com metanol, sempre acompanhado por TLC, originando a substância RCD8A, da qual foram determinados PF, IV e RMN  $^1\text{H}$ .

#### **2.2.4.4. Elaboração do precipitado do extrato diclorometânico da casca**

O precipitado do extrato diclorometânico da casca (2,6 g) de *R. gardneriana* foi submetido a uma análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de otimizar a separação de seus componentes por CC.

Após a escolha dos sistemas de solventes, o extrato foi eluído em coluna (149,0:5,3 cm) contendo sílica gel (107,13 g), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, conforme mostrado no Quadro 7.

As frações coletadas (100 mL) foram posteriormente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e reunidas em grupos, de acordo com os valores de  $R_f$ , por comparação em CCD, fornecendo nove grupos, como mostrado no Quadro 8.

Quadro 7 - Ordem de eluição de precipitado do extrato diclorometânico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações

| Solvente               | Frações |
|------------------------|---------|
| Clorofórmio            | 1-3     |
| Clorofórmio/Etanol 1%  | 4-20    |
| Clorofórmio/Etanol 1%  | 21-28   |
| Clorofórmio/Etanol 10% | 29-32   |
| Clorofórmio/Etanol 80% | 33-34   |
| Etanol                 | 35-37   |

Quadro 8 - Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna de precipitado do extrato diclorometânico da casca

| Grupo | Frações Reunidas | Massas (g) |
|-------|------------------|------------|
| 1     | 1-5              | 0,17       |
| 2     | 6-7              | 0,08       |
| 3     | 8-13             | 0,08       |
| 4     | 14-19            | 0,85       |
| 5     | 20-22            | 0,21       |
| 6     | 23               | 0,20       |
| 7     | 24-26            | 0,38       |
| 8     | 27-31            | 0,13       |
| 9     | 32-36            | 0,25       |

O **grupo 4**, por meio de recristalização com metanol, levou à purificação de uma substância branca cristalina rotulada de RCD\*4, que se apresentou como idêntica à RCD8, quando comparados os espectros de IV,  $R_f$  em TLC e PF.

As demais frações não conduziram ao isolamento de material cristalino.

#### 2.2.4.5. Elaboração do extrato etanólico da casca

Parte do extrato etanólico da casca (108,04 g) de *R. gardneriana* foi submetida a uma análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de otimizar a separação de seus componentes por CC.



Após a escolha dos sistemas de solventes, o extrato foi eluído em coluna (128,0:7,5 cm) contendo sílica gel (1008,0 g), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, conforme mostrado no Quadro 9.

Quadro 9 - Ordem de eluição do extrato etanólico da casca por cromatografia em coluna com as respectivas frações

| <b>Solvente</b>          | <b>Frações</b> |
|--------------------------|----------------|
| n-Hexano                 | 1-7            |
| n-Hexano/Clorofórmio 5%  | 8-16           |
| n-Hexano/Clorofórmio 10% | 17-20          |
| n-Hexano/Clorofórmio 30% | 21-40          |
| n-Hexano/Clorofórmio 50% | 41-51          |
| Clorofórmio              | 52-64          |
| Clorofórmio/Etanol 3%    | 65-77          |
| Clorofórmio/Etanol 5%    | 78-81          |
| Clorofórmio/Etanol 10%   | 82-90          |
| Clorofórmio/Etanol 20%   | 91-104         |
| Clorofórmio/Etanol 30%   | 105-127        |
| Clorofórmio/Etanol 40%   | 128-188        |
| Clorofórmio/Etanol 50%   | 189-219        |
| Clorofórmio/Etanol 60%   | 220-238        |
| Clorofórmio/Etanol 70%   | 239-246        |
| Clorofórmio/Etanol 80%   | 247-259        |
| Etanol                   | 260-266        |

As frações coletadas (200 mL) foram posteriormente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e reunidas em grupos, de acordo com os valores de  $R_f$ , por comparação em CCD, fornecendo nove grupos, conforme Quadro 10.

O **grupo 6**, constituído de material sólido que precipitou durante a concentração no evaporador rotatório, foi submetido à purificação com metanol, originando a substância amorfa RCE6 e um sobrenadante escuro de alta complexidade, quando analisado por TLC.

Quadro 10 - Frações reunidas em grupos da cromatografia em coluna do extrato etanólico da casca

| Grupo | Frações Reunidas | Massas (g) |
|-------|------------------|------------|
| 1     | 1-13             | 0,04       |
| 2     | 14-17            | 0,24       |
| 3     | 18-52            | 0,50       |
| 4     | 53-83            | 1,14       |
| 5     | 84-96            | 0,63       |
| 6     | 97               | 9,31       |
| 7     | 98-99            | 8,56       |
| 8     | 100-116          | 5,85       |
| 9     | 117-266          | 65,12      |

O **grupo 7**, constituído de material sólido insolúvel em clorofórmio, foi recristalizado em metanol, no qual houve precipitação de um sólido amarelo denominado RCE7.

O **grupo 9**, constituindo quase a totalidade do extrato, apresentou-se como um material escuro, com sabor adocicado e alta complexidade química por TLC, e foi submetido à análise de açúcares, de acordo com o procedimento verificado em **2.2.3.3.a**.

Os demais grupos, sobretudo os **grupos 4 e 8**, apesar de possuírem grande massa, não apresentaram boa separação em CCD, não sendo, portanto, submetidos aos métodos usuais de cromatografia.

## **2.2.5. Estudo da semente**

### **2.2.5.1. Obtenção dos extratos da semente**

A semente moída foi submetida a extrações sucessivas com n-hexano, diclorometano e etanol, por agitação mecânica à temperatura ambiente, sendo os extratos, em seguida, filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Figura 4). Porém, estes extratos não foram purificados neste trabalho.

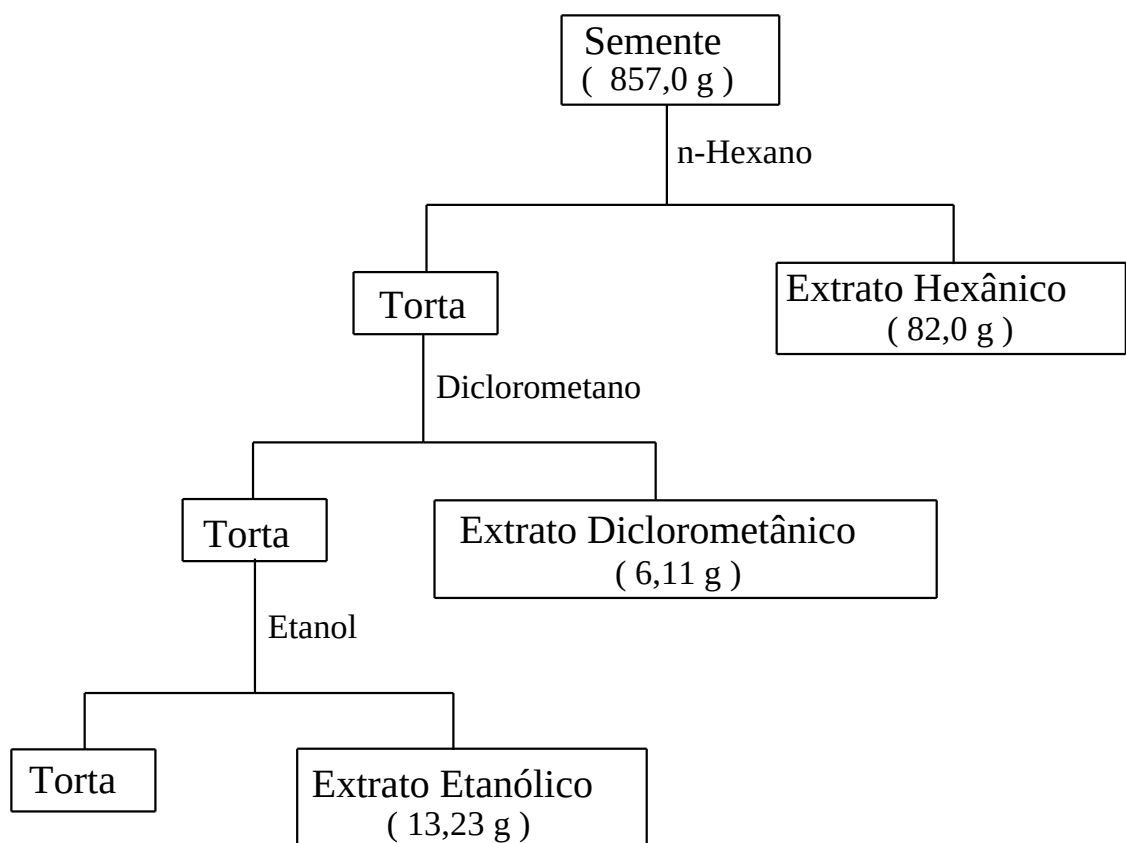


Figura 4 - Fluxograma da obtenção dos extratos da semente do fruto de *Rheedia gardneriana* com as respectivas massas sem solvente.

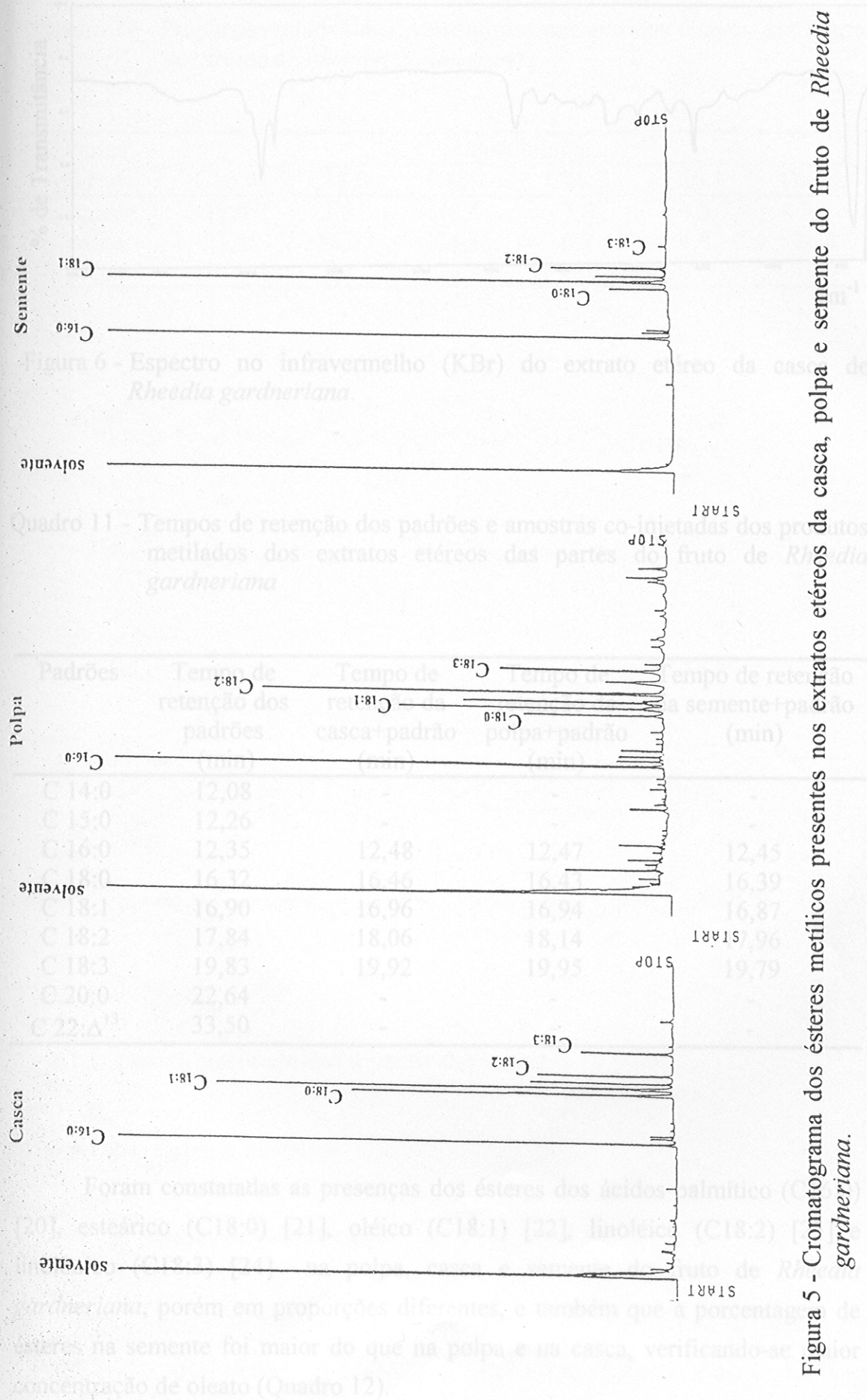
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Caracterização e identificação dos constituintes do fruto de *Rheedia gardneriana***

##### **3.1.1. Ésteres de ácidos graxos dos extratos etéreos da casca, polpa e semente do fruto de *Rheedia gardneriana***

Os extratos etéreos das partes do fruto de *Rheedia gardneriana*, com as seguintes percentagens sobre o peso da amostra seca: 14,5% (semente), 4,7% (casca) e 2,5% (polpa), foram transesterificados e submetidos a CG, originando os cromatogramas da Figura 5, uma vez que em análise por infravermelho (Figura 6) caracterizou-se a presença de ésteres graxos nas misturas pelas absorções em 3.010 ( $\nu_{C=C-H}$ ), 2.910 e 2.850 ( $\nu_{C-H}$ ) e 1.740 ( $\nu_{C=O}$  éster).

Os tempos de retenção das amostras foram comparados com os dos padrões, entretanto, a confirmação da presença dos ésteres metilados foi obtida através de co-injeção da amostra com cada padrão. Somente a comparação dos tempos de retenção não seria suficiente, uma vez que era notada uma pequena variação nestes valores, ainda que mantendo as mesmas condições de funcionamento do cromatógrafo (Quadro 11).



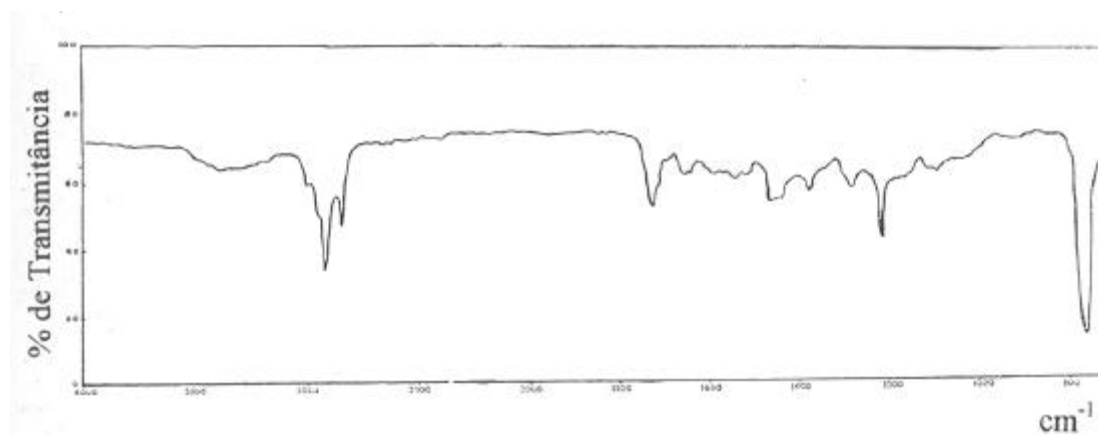


Figura 6 - Espectro no infravermelho (KBr) do extrato etéreo da casca de *Rheedia gardneriana*.

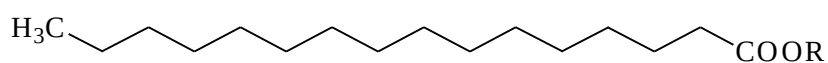
Quadro 11 - Tempos de retenção dos padrões e amostras co-injetadas dos produtos metilados dos extratos etéreos das partes do fruto de *Rheedia gardneriana*

| Padrões              | Tempo de retenção dos padrões (min) | Tempo de retenção da casca+padrão (min) | Tempo de retenção da polpa+padrão (min) | Tempo de retenção da semente+padrão (min) |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| C 14:0               | 12,08                               | -                                       | -                                       | -                                         |
| C 15:0               | 12,26                               | -                                       | -                                       | -                                         |
| C 16:0               | 12,35                               | 12,48                                   | 12,47                                   | 12,45                                     |
| C 18:0               | 16,32                               | 16,46                                   | 16,43                                   | 16,39                                     |
| C 18:1               | 16,90                               | 16,96                                   | 16,94                                   | 16,87                                     |
| C 18:2               | 17,84                               | 18,06                                   | 18,14                                   | 17,96                                     |
| C 18:3               | 19,83                               | 19,92                                   | 19,95                                   | 19,79                                     |
| C 20:0               | 22,64                               | -                                       | -                                       | -                                         |
| C 22:Δ <sup>13</sup> | 33,50                               | -                                       | -                                       | -                                         |

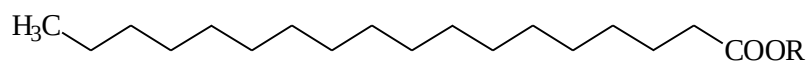
Foram constatadas as presenças dos ésteres dos ácidos palmítico (C16:0) [20], esteárico (C18:0) [21], oléico (C18:1) [22], linoléico (C18:2) [23] e linolênico (C18:3) [24] na polpa, casca e semente do fruto de *Rheedia gardneriana*, porém em proporções diferentes, e também que a porcentagem de ésteres na semente foi maior do que na polpa e na casca, verificando-se maior concentração de oleato (Quadro 12).

Quadro 12 - Proporção relativa dos constituintes dos extratos etéreos das partes dos frutos de *Rheedia gardneriana*

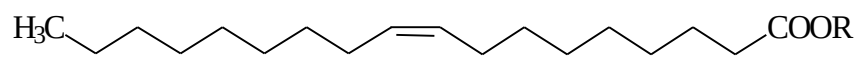
| Partes do fruto | Constituintes |       |       |       |       |        |
|-----------------|---------------|-------|-------|-------|-------|--------|
|                 | C16:0         | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | Outros |
| semente         | 37,0          | 3,5   | 46,5  | 7,0   | 0,5   | 5,5    |
| casca           | 21,4          | 16,5  | 24,3  | 6,2   | 4,8   | 26,8   |
| polpa           | 16,0          | 5,3   | 10,4  | 19,0  | 6,7   | 42,6   |



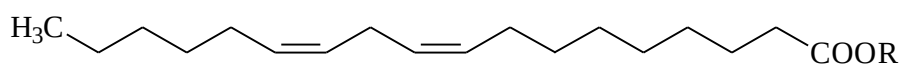
[20]



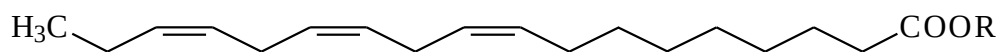
[21]



[22]



[23]



[24]

### 3.1.2. Constituintes obtidos a partir dos extratos da polpa

#### 3.1.2.1. Extrato hexânico

##### a. Ésteres de cadeia longa

O espectro de IV da fração RPH3 (Figura 7) apresentou absorções em 3.010 ( $\nu\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ), 2.965 e 2.855 ( $\nu\text{C}-\text{H}$ ), 1.740 ( $\nu\text{C}=\text{O}$  éster), 1.470 e

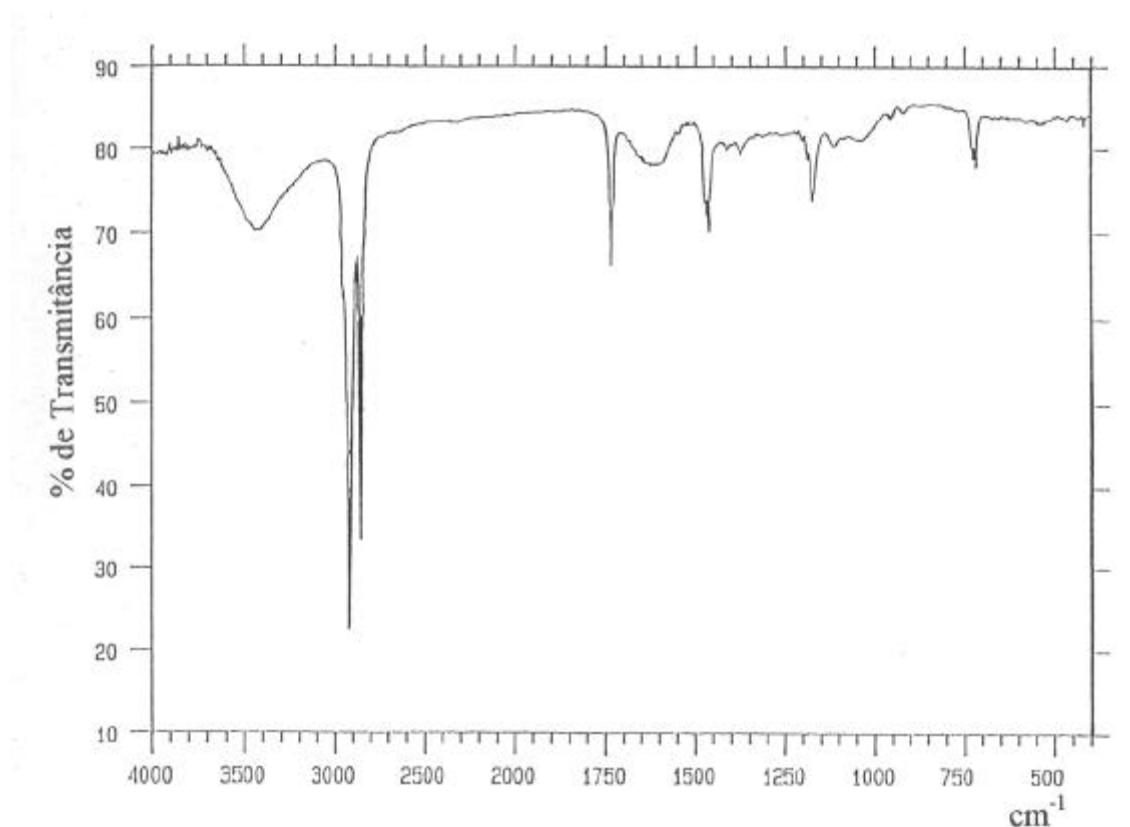


Figura 7 - Espectro no infravermelho (KBr) de RPH3.

1.385 ( $\delta_s$  C-H), 1.170 (C-O éster) e 720  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_s$   $(\text{CH}_2)_n$ ;  $n > 4$ ), caracterizando uma mistura de ésteres graxos, possivelmente os mesmos detectados em 3.1.1.

#### **b. Esteróides: estigmasterol [25] e b-sitosterol [19]**

A substância RPH1, sólido branco cristalino, com ponto de fusão 136-137 °C, apresentou espectro de IV (Figura 8) com absorções em 2980, 2930 e 2870 ( $\nu$  C-H), 1.470 e 1.390  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_s$  C-H), que caracterizam a natureza alifática desta substância. As absorções em 3.420 ( $\nu$  O-H) e 1.070  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-O) foram indicativos da presença de hidroxila alcoólica, e as bandas de absorção em 1.640 ( $\nu$  C=C) e 800  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_s$  C=C-H) indicam a presença de ligação dupla.

Aliado ao teste de Lieberman-Burchard para triterpenóides pentacíclicos e esteróides (MATOS, 1988) e com base na comparação visual do espectro de



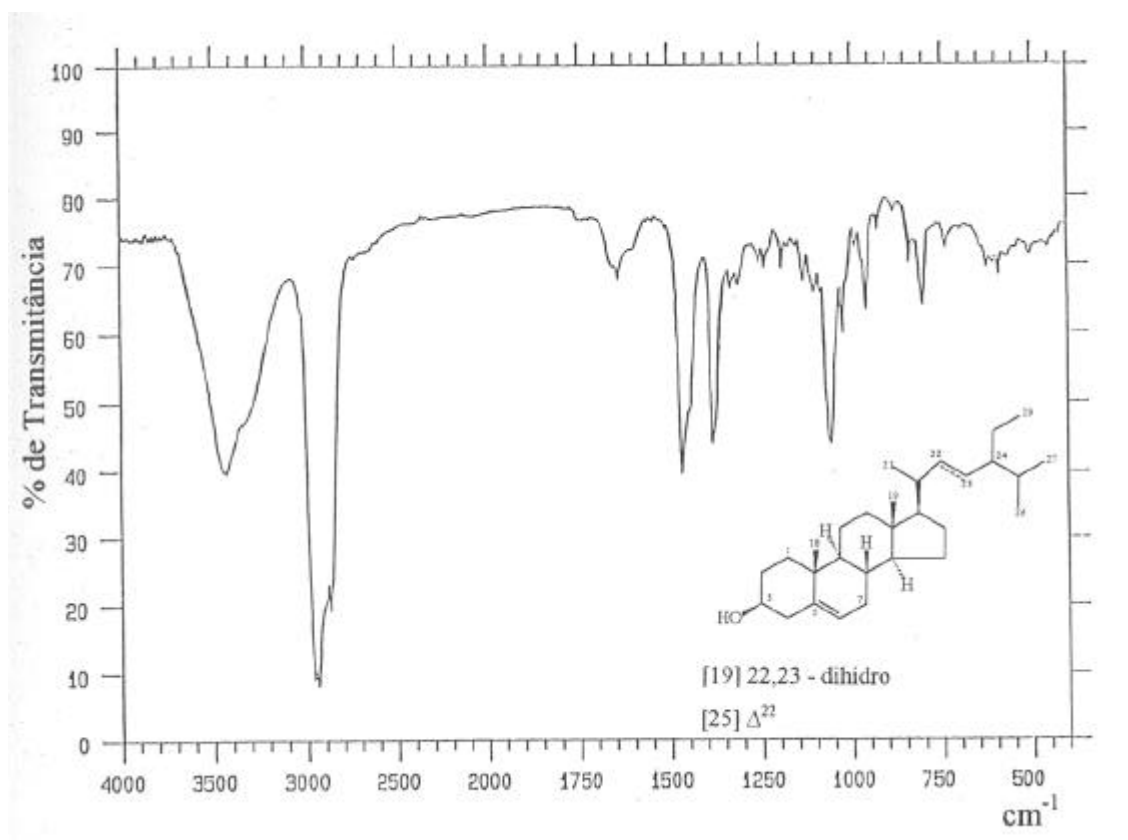


Figura 8 - Espectro no infravermelho (KBr) de RPH1.

RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9) com os existentes na literatura (POUCHERT, 1981), foi observado que se tratava de um esteróide. Substâncias de origem isoprenóide (terpenóides e esteróides) são amplamente difundidas em plantas e também em animais marinhos, apresentando grande diversidade estrutural. Entretanto, existe uma grande dificuldade no isolamento destes esteróides em forma pura, utilizando-se CC e TLC, por exemplo em razão da grande semelhança química e física (PINTO et al., 1994).

O espectro de massas (Figura 10) apresentou o pico íon molecular em  $m/z$  414 compatível com a fórmula  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  do sitosterol [19], além do pico-base em  $m/z$  296 formado pela perda de água (fragmento 1a) e vários outros, tais como aqueles em  $m/z$  255, 145, 107, 95, 81, 55, 43, etc. A presença do estigmasterol [25] como mistura com  $\beta$ -sitosterol [19] foi indicada pela presença de fragmentos característicos em  $m/z$  394 (1b), 396 (1a), 397 (2a) e 412 ( $\text{M}^+$  do estigmasterol).

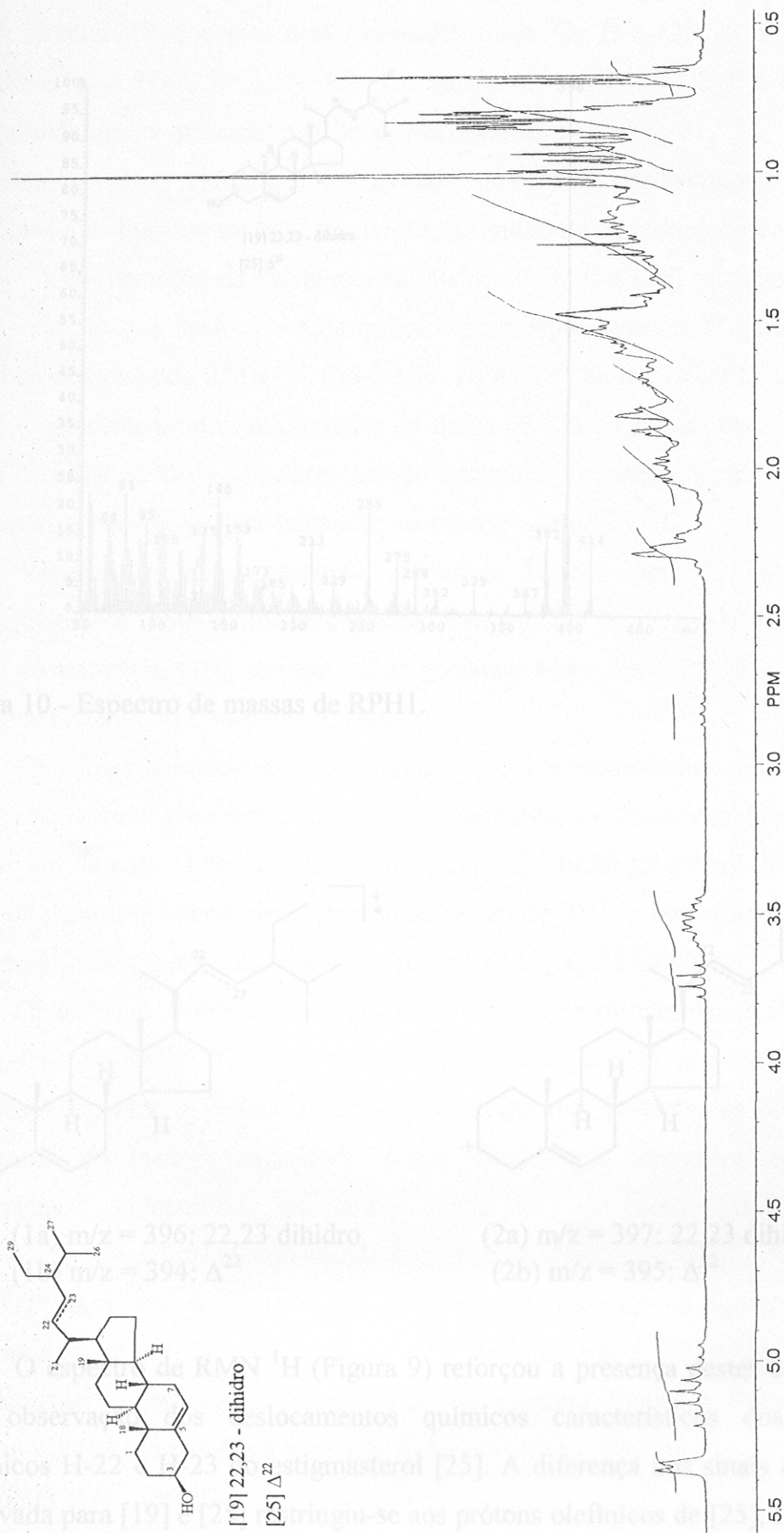


Figura 9 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RPH1, compreendendo a região de  $\delta$  0,5 a 5,5.

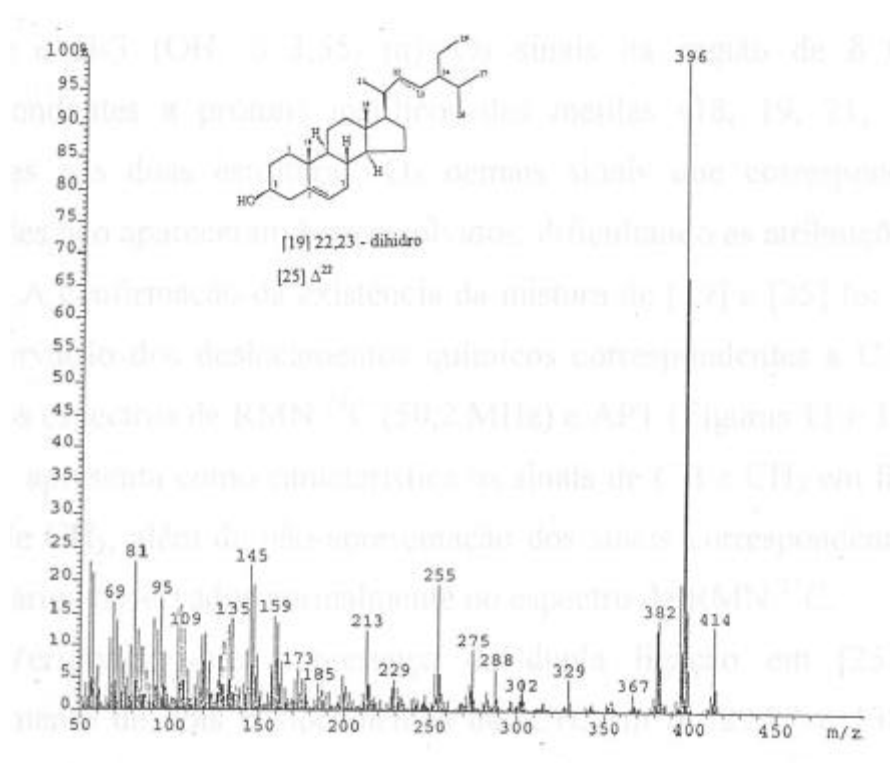
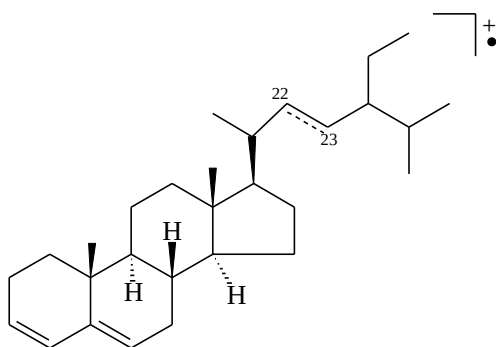
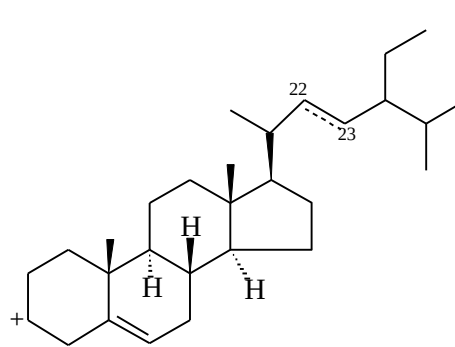


Figura 10 - Espectro de massas de RPH1.



(1a) m/z = 396: 22,23 dihidro

(1b) m/z = 394:  $\Delta^{22}$



(2a) m/z = 397: 22,23 dihidro

(2b) m/z = 395:  $\Delta^{22}$

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9) reforçou a presença destes esteróides, pela observação dos deslocamentos químicos característicos dos prótons olefínicos H-22 e H-23 do estigmasterol [25]. A diferença nos sinais de próton observada para [19] e [25] restringiu-se aos prótons olefínicos de [25], H-22 (1H,  $\delta$  5,14, dd,  $J = 8,6/15,2$  Hz) e H-23 (1H,  $\delta$  5,00, dd,  $J = 8,7/15,2$  Hz). Outros

sinais característicos destes dois esteróides foram de H-6 (2H,  $\delta$  5,33, d,  $J$  = 5,3 Hz) e H-3 (OH,  $\delta$  3,55, m). Os sinais na região de  $\delta$  0,6-1,0 foram correspondentes a prótons metílicos das metilas (18, 19, 21, 26, 27 e 29) presentes nas duas estruturas. Os demais sinais que correspondem aos dois esteróides não apareceram bem resolvidos, dificultando as atribuições.

A confirmação da existência da mistura de [19] e [25] foi feita por meio da observação dos deslocamentos químicos correspondentes a C-22 e C-23 de [25], nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,2 MHz) e APT (Figuras 11 e 12). O espectro de APT apresenta como característica os sinais de CH e  $\text{CH}_3$  em fase oposta aos sinais de  $\text{CH}_2$ , além da não-apresentação dos sinais correspondentes a carbonos quaternários observados normalmente no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

Verifica-se que a presença da dupla ligação em [25] promove o aparecimento de dois deslocamentos de -CH, em  $\delta$  129,27 e 138,40, o que o difere do sitosterol [19], em que estas posições estão em  $\delta$  26,10 e 34,0, dos carbonos C-23 e C-22, respectivamente.

Os sinais apresentados no Quadro 13, correspondentes aos carbonos olefínicos, foram caracterizados por apresentarem-se mais desblindados em relação aos demais. O deslocamento químico em  $\delta$  140,80 foi atribuído a C-5, em razão do desaparecimento deste sinal no espectro de APT, e também por aparecer mais desblindado que os carbonos olefínicos de [25], C-22 e C-23.

Os carbonos olefínicos de [25], C-22 e C-23, foram facilmente observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e confirmados como sinais de CH, por meio de APT, por aparecerem numa região do espectro característica de carbonos olefínicos e por causa da menor intensidade destes sinais, que aparecem apenas no estigmasterol, comparados aos outros sinais de CH, como C-6, que estão presentes tanto em [25] quanto em [19].

O sinal em  $\delta$  121,60 foi atribuído ao carbono olefínico restante, confirmado que era CH por meio de APT. O sinal em  $\delta$  71,70, por aparecer isoladamente numa região característica de carbono ligado à hidroxila, foi atribuído a C-3, único deste tipo nas duas estruturas (BEZERRA et al., 1994; ARAGÃO et al., 1990).

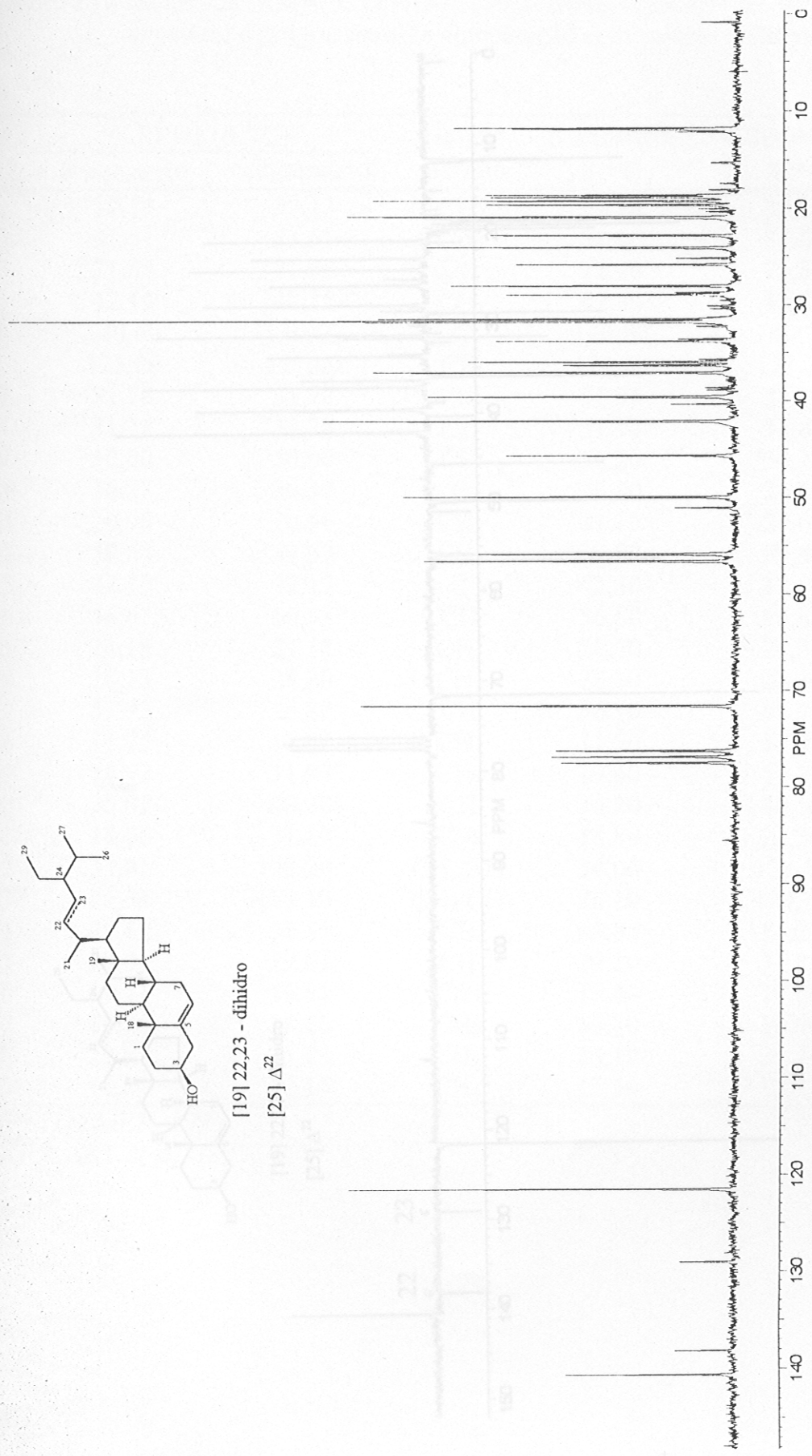


Figura 11 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,2 MHz) de RPH1.

Quadro 13 - Dados de RMN<sup>13</sup>C e APT (50,2 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de RPH1 (β-sitosterol e estigmasterol) e comparação com valores da literatura

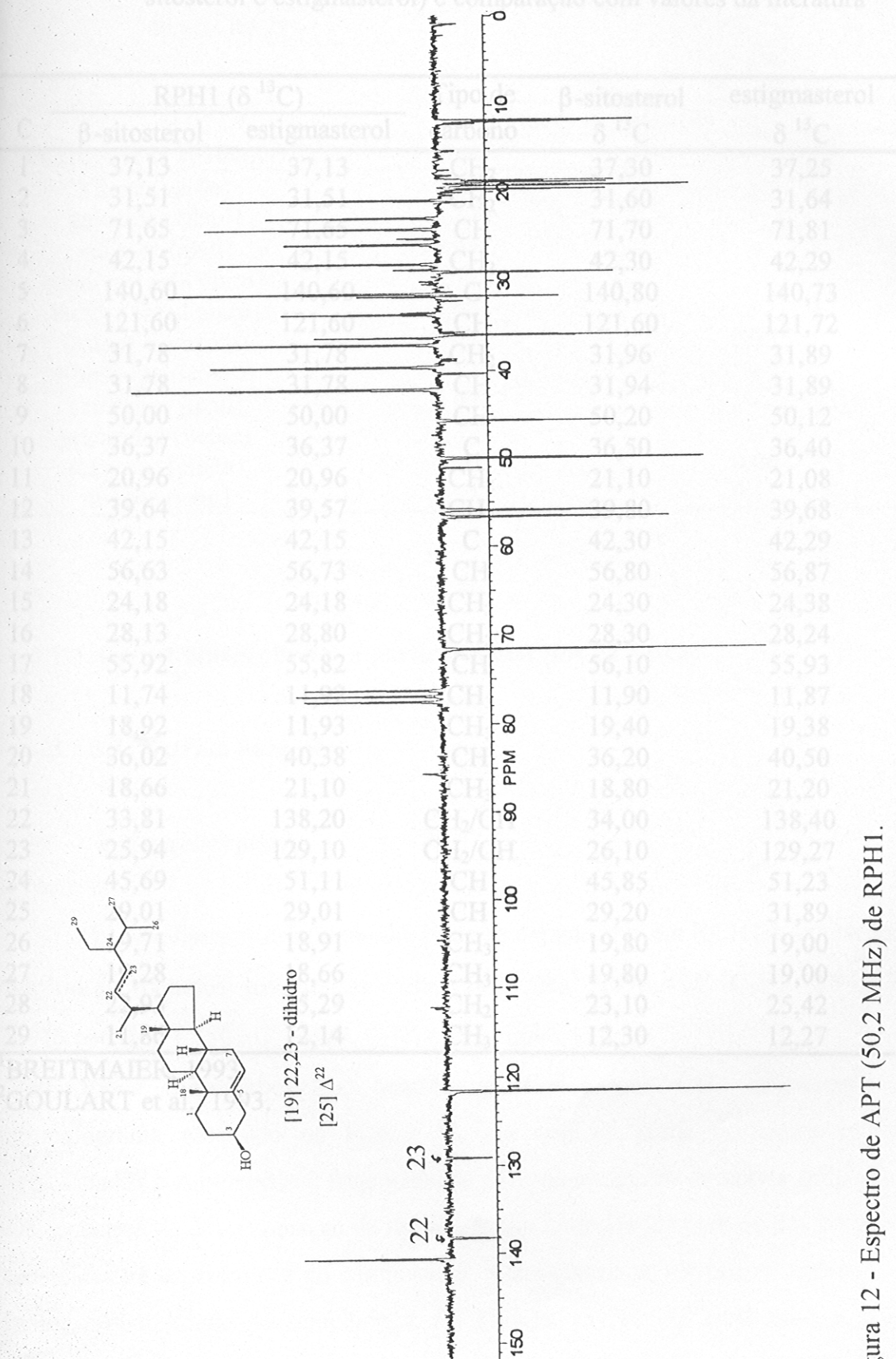


Figura 12 - Espectro de APT (50,2 MHz) de RPH1.

Quadro 13 - Dados de RMN<sup>13</sup>C e APT (50,2 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de RPH1 ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol) e comparação com valores da literatura

| C  | RPH1 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) |               | Tipo de carbono     | $\beta$ -sitosterol   | estigmasterol         |
|----|--------------------------------|---------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
|    | $\beta$ -sitosterol            | estigmasterol |                     | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 1  | 37,13                          | 37,13         | CH <sub>2</sub>     | 37,30                 | 37,25                 |
| 2  | 31,51                          | 31,51         | CH <sub>2</sub>     | 31,60                 | 31,64                 |
| 3  | 71,65                          | 71,65         | CH                  | 71,70                 | 71,81                 |
| 4  | 42,15                          | 42,15         | CH <sub>2</sub>     | 42,30                 | 42,29                 |
| 5  | 140,60                         | 140,60        | C                   | 140,80                | 140,73                |
| 6  | 121,60                         | 121,60        | CH                  | 121,60                | 121,72                |
| 7  | 31,78                          | 31,78         | CH <sub>2</sub>     | 31,96                 | 31,89                 |
| 8  | 31,78                          | 31,78         | CH                  | 31,94                 | 31,89                 |
| 9  | 50,00                          | 50,00         | CH                  | 50,20                 | 50,12                 |
| 10 | 36,37                          | 36,37         | C                   | 36,50                 | 36,40                 |
| 11 | 20,96                          | 20,96         | CH <sub>2</sub>     | 21,10                 | 21,08                 |
| 12 | 39,64                          | 39,57         | CH <sub>2</sub>     | 39,80                 | 39,68                 |
| 13 | 42,15                          | 42,15         | C                   | 42,30                 | 42,29                 |
| 14 | 56,63                          | 56,73         | CH                  | 56,80                 | 56,87                 |
| 15 | 24,18                          | 24,18         | CH <sub>2</sub>     | 24,30                 | 24,38                 |
| 16 | 28,13                          | 28,80         | CH <sub>2</sub>     | 28,30                 | 28,24                 |
| 17 | 55,92                          | 55,82         | CH                  | 56,10                 | 55,93                 |
| 18 | 11,74                          | 11,92         | CH <sub>3</sub>     | 11,90                 | 11,87                 |
| 19 | 18,92                          | 11,93         | CH <sub>3</sub>     | 19,40                 | 19,38                 |
| 20 | 36,02                          | 40,38         | CH                  | 36,20                 | 40,50                 |
| 21 | 18,66                          | 21,10         | CH <sub>3</sub>     | 18,80                 | 21,20                 |
| 22 | 33,81                          | 138,20        | CH <sub>2</sub> /CH | 34,00                 | 138,40                |
| 23 | 25,94                          | 129,10        | CH <sub>2</sub> /CH | 26,10                 | 129,27                |
| 24 | 45,69                          | 51,11         | CH                  | 45,85                 | 51,23                 |
| 25 | 29,01                          | 29,01         | CH                  | 29,20                 | 31,89                 |
| 26 | 19,71                          | 18,91         | CH <sub>3</sub>     | 19,80                 | 19,00                 |
| 27 | 19,28                          | 18,66         | CH <sub>3</sub>     | 19,80                 | 19,00                 |
| 28 | 22,93                          | 25,29         | CH <sub>2</sub>     | 23,10                 | 25,42                 |
| 29 | 11,86                          | 12,14         | CH <sub>3</sub>     | 12,30                 | 12,27                 |

<sup>1</sup>BREITMAIER, 1993.

<sup>2</sup>GOULART et al., 1993.

Quadro 14 - Fatores de retenção para padrões de açúcares e amostra do extrato etanólico da polpa em cromatografia em papel descendente, ao final de seis horas

| <b>Padrões (cor revelada)</b> | <b>Fatores de retenção</b> |                |
|-------------------------------|----------------------------|----------------|
|                               | <b>Padrões</b>             | <b>Amostra</b> |
| xilose (verde)                | 0,35                       | -              |
| galactose (azul)              | 0,19                       | -              |
| maltose (azul)                | 0,04                       | -              |
| manose (azul claro)           | 0,12                       | -              |
| lactose (azul claro)          | 0,03                       | -              |
| frutose (marrom)              | 0,28                       | 0,28           |
| ribose (azul claro)           | 0,53                       | -              |
| celobiose (azul)              | 0,03                       | -              |
| arabinose (verde)             | 0,38                       | -              |
| sacarose (cinza)              | 0,06                       | 0,06           |
| glicose (azul)                | 0,15                       | 0,15           |

### 3.1.3. Constituintes obtidos a partir dos extratos da casca

#### 3.1.3.1. Extrato hexânico

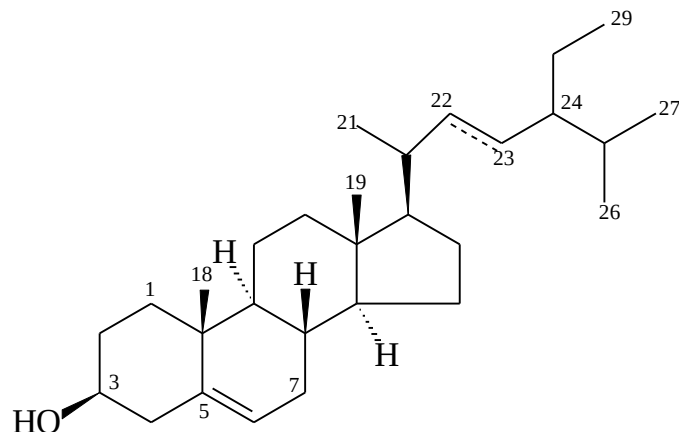
##### a- Sesquiterpenos

Pela análise por infravermelho pôde-se caracterizar em RCH1B a presença de hidrocarbonetos insaturados pelas absorções 3.050 ( $\nu$ C=C-H), 2.940 e 2.910 ( $\nu$ C-H), 1.450 e 1.390 ( $\delta_s$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 13).

Esses hidrocarbonetos, quando analisados por CG, originaram o cromatograma mostrado na Figura 14, em que os picos principais foram selecionados e submetidos à fragmentação em espectrômetro de massa acoplado. Os espectros de decomposição de massas foram comparados com os dos padrões existentes na espectroteca do computador, relacionando as estruturas mediante a maior probabilidade de semelhança. As Figuras 15, 16, 17 e 18 mostram os espectros de massas, sendo a seguir mostrados os principais fragmentos de massa.



De acordo com as atribuições, conclui-se que RPH1 tratava-se de uma mistura composta pelos esteróides estigmasterol [25] e  $\beta$ -sitosterol [19].



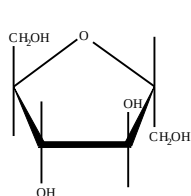
[19] 22,23 - dihidro

[25]  $\Delta^{22}$

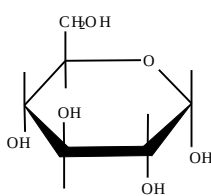
### 3.1.2.2. Extrato etanólico

#### a. Açúcares

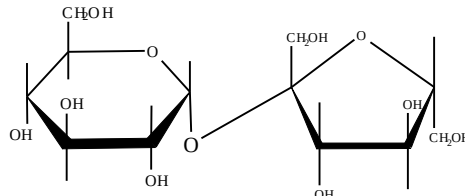
O extrato etanólico, após submetido à cromatografia em papel, revelou a presença dos possíveis açúcares: frutose [26], glicose [27] e sacarose [28]. A identificação foi obtida por meio da comparação dos fatores de retenção ( $R_f$ ) e coloração dos padrões com os da amostra (Quadro 14).



[26]



[27]



[28]

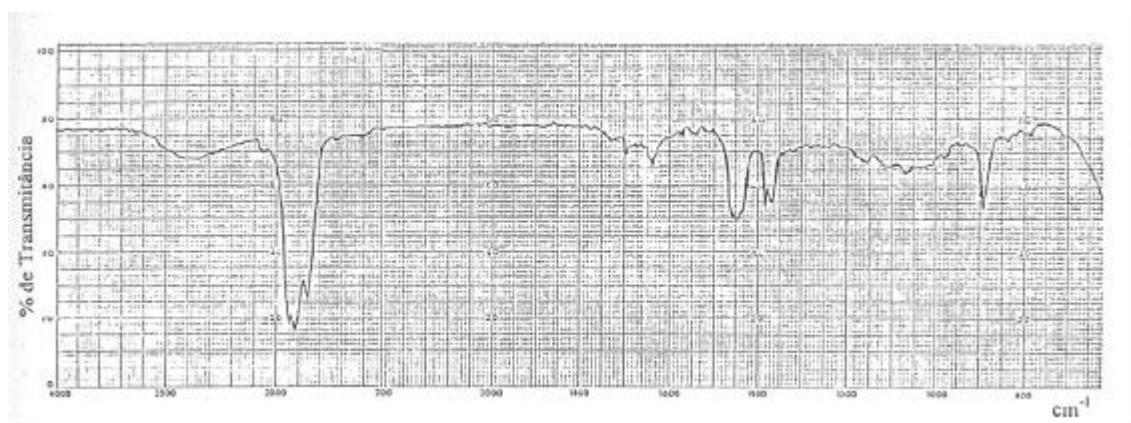


Figura 13 - Espectro no infravermelho (puro) de RCH1B.

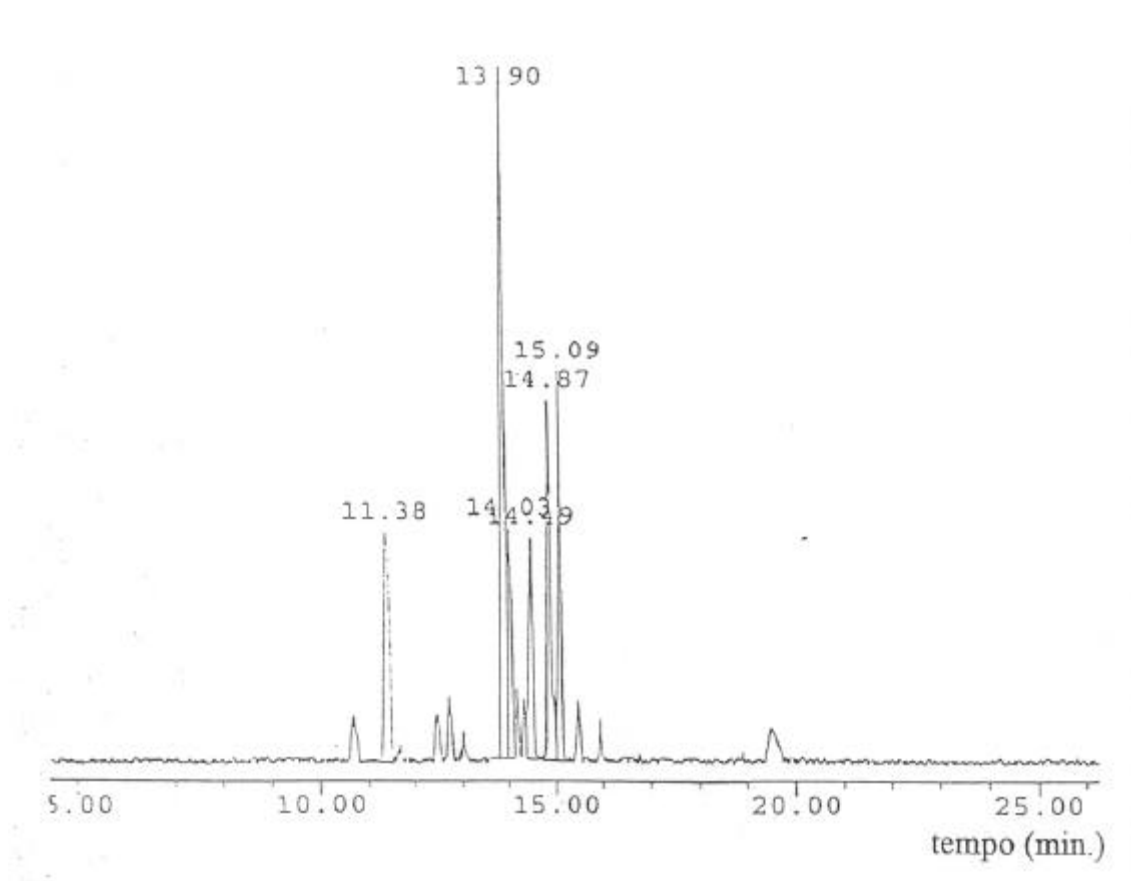


Figura 14 - Cromatograma de RCH1B obtido por cromatografia gasosa.

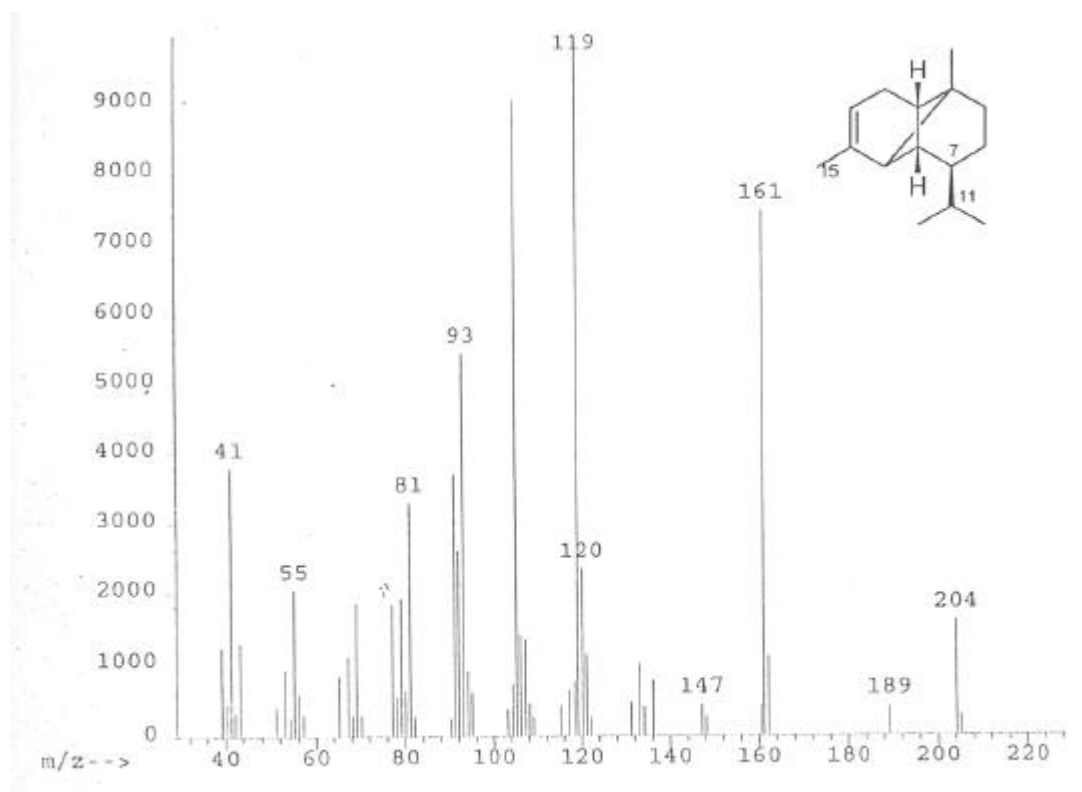
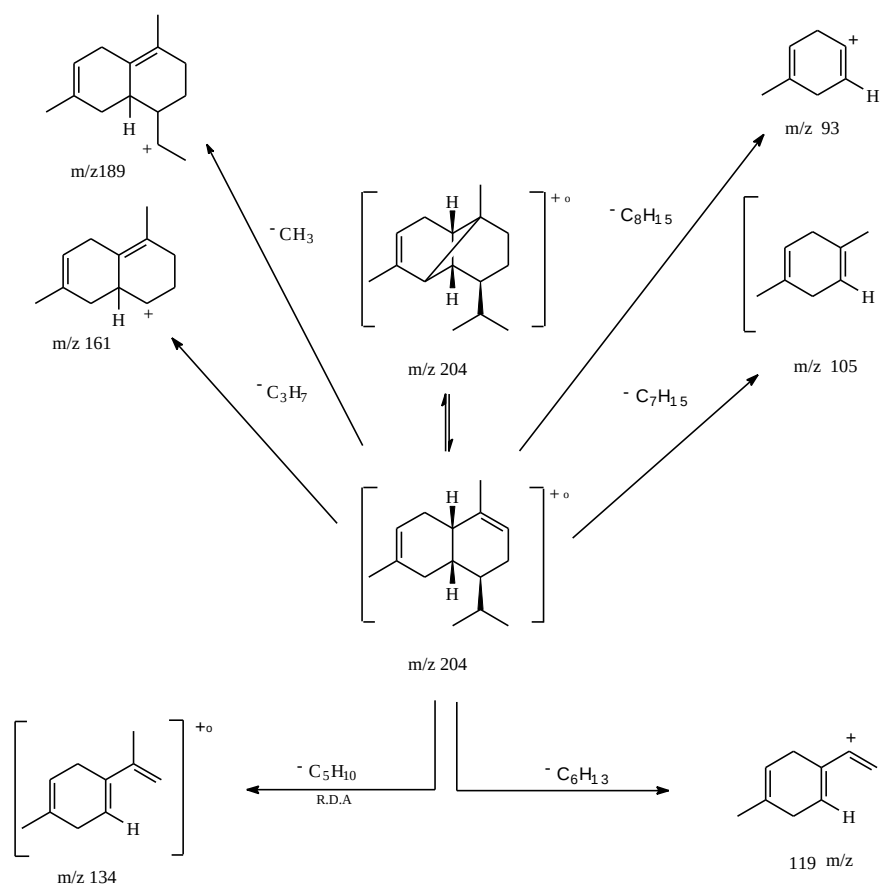


Figura 15 - Espectro de massas do pico em 11,38 min.

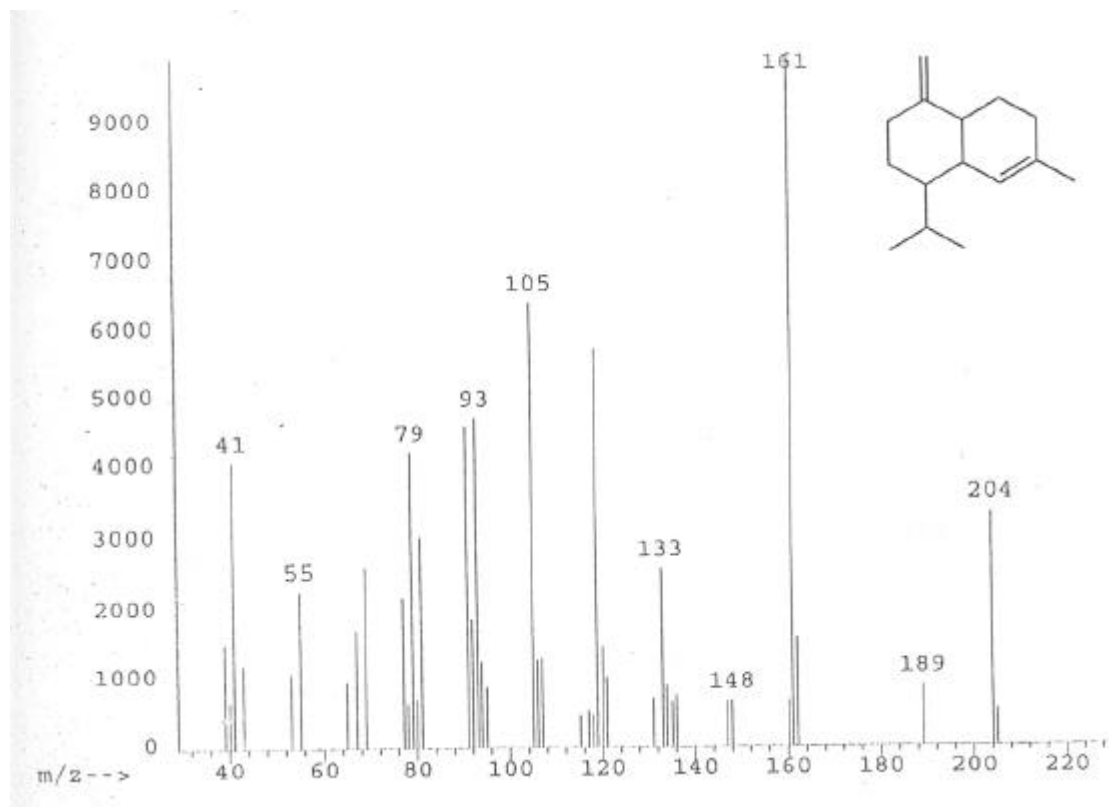
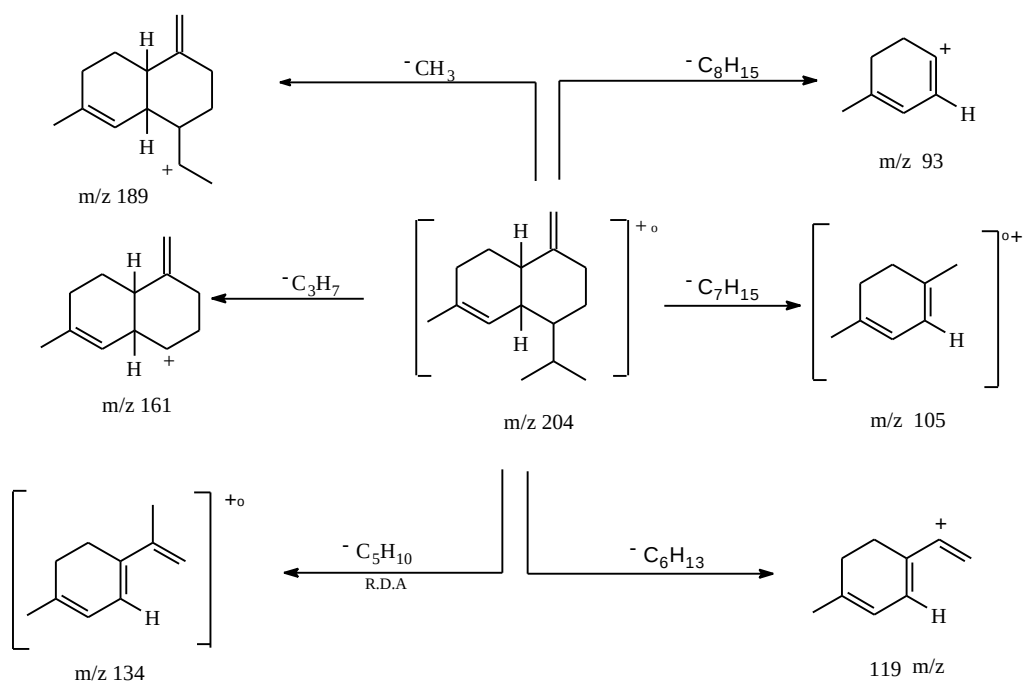


Figura 16 - Espectro de massas do pico em 13,90 min.

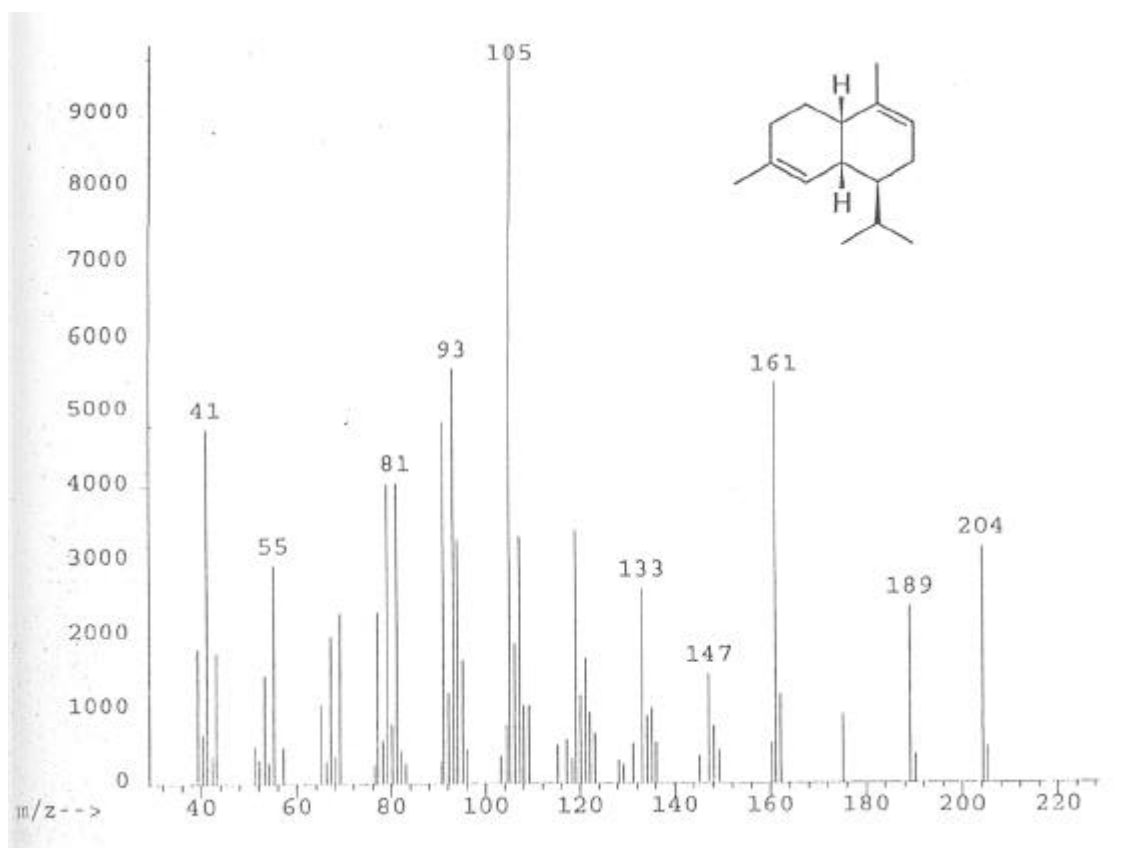
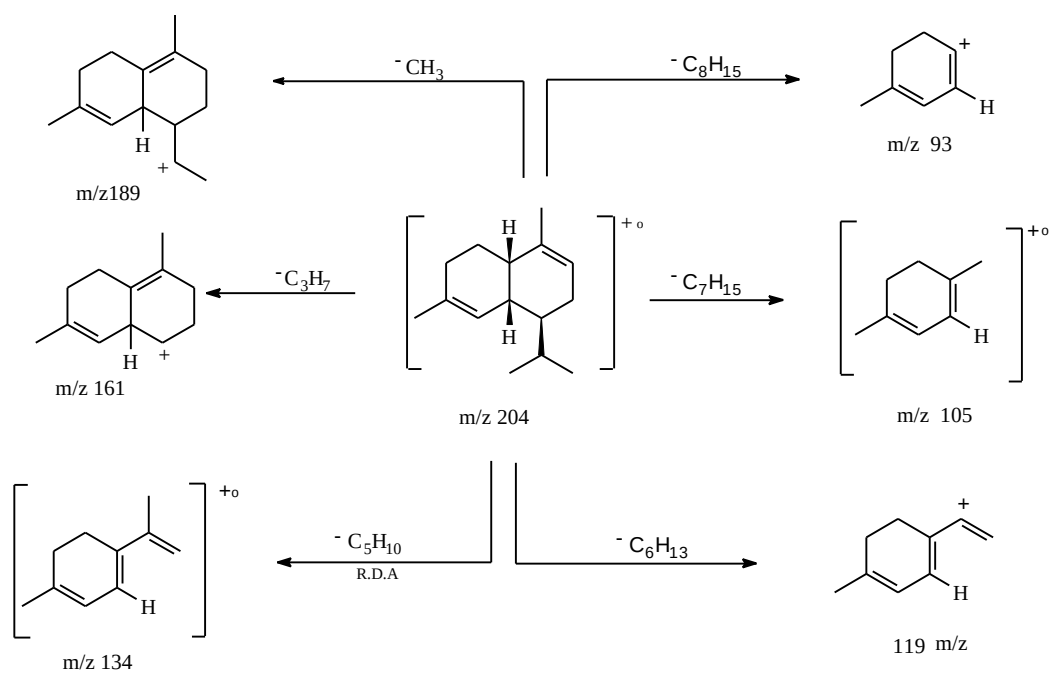


Figura 17 - Espectro de massas do pico em 14,03 min.

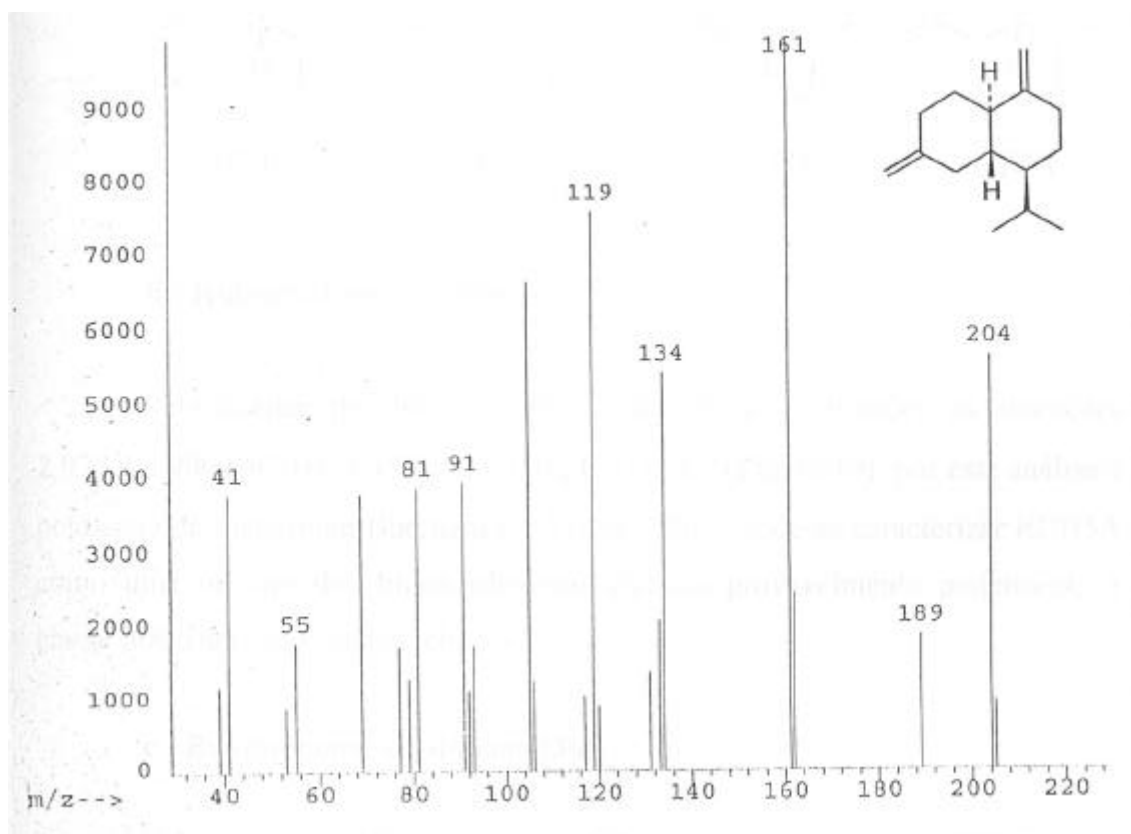
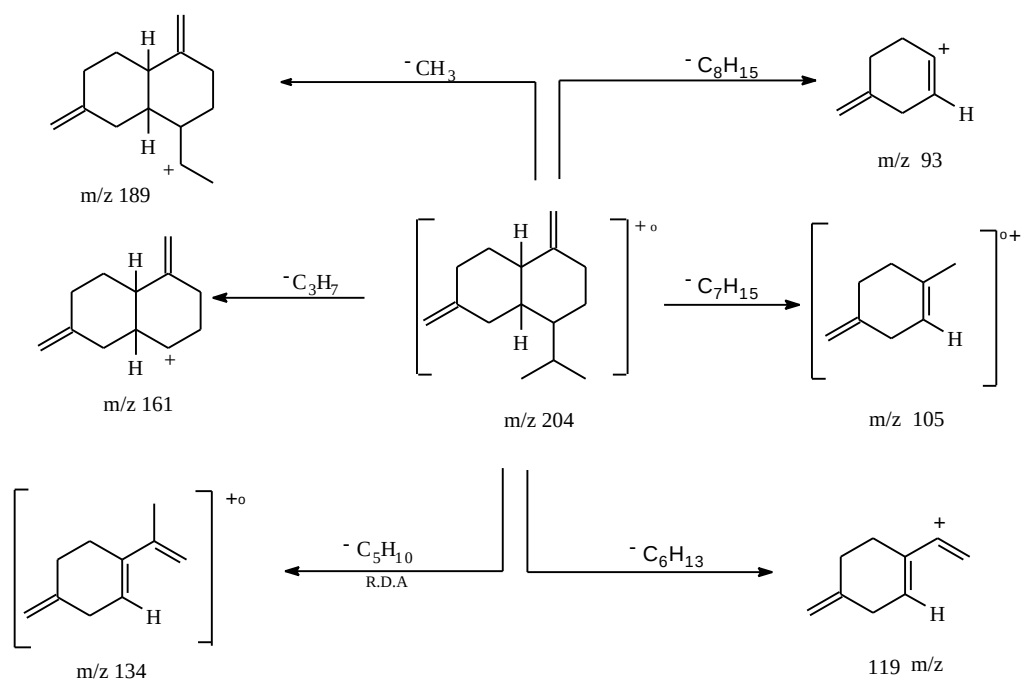
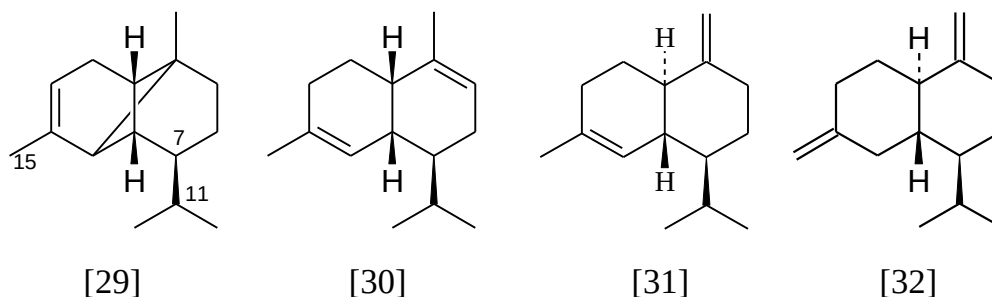


Figura 18 - Espectro de massas do pico em 14,87 min.

Os compostos  $\alpha$ -copaeno [29],  $\alpha$ -muuroleno [30], naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-, (1. $\alpha$ , 4a. $\alpha$ ., 8a. $\alpha$ ) [31] e cadineno [32] mostraram padrões de desintegração com maior semelhança, comparados aos padrões dos picos da amostra. LOYAZA et al. (1995) atentam para a dificuldade encontrada na análise de óleos essenciais no que se refere à falta de padrões puros e ao fato de um mesmo componente ser caracterizado como duas substâncias diferentes, quando se compara com bancos de dados diferentes para mesmo tipo de coluna cromatográfica. Assim, para confirmação precisa da estrutura destes componentes presentes na mistura de sesquiterpenos, dever-se-á proceder ao isolamento e uso de técnicas espectroscópicas convencionais. Todavia, a técnica de CG/EM pode revelar uma grande probabilidade de estes compostos estarem presentes em RCH1B.



### **b - Hidrocarbonetos alifáticos**

Pela análise por infravermelho foram feitas atribuições às absorções 2.970 e 2.900 ( $\nu$ C-H), 1.450 e 1.370 ( $\delta_s$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 19); por esta análise e pelo teste de Lieberman-Burchard (MATOS, 1988), pôde-se caracterizar RCH5A como uma mistura de hidrocarbonetos cíclicos provavelmente pertencente à classe dos triterpenos pentacíclicos.

### **c - Benzofenona: clusianona [36]**

O composto RCH5B, sólido cristalino de cor amarelo-clara, apresentou PF 92-93°C. Quando analisado por IV (Figura 20), mostrou absorções em

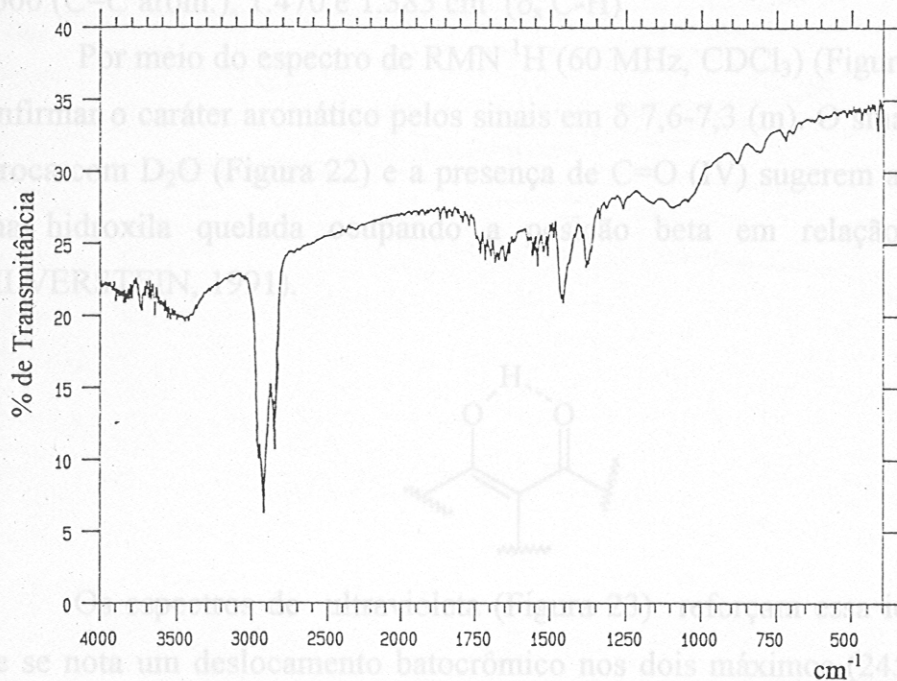


Figura 19 - Espectro no infravermelho (KBr) de RCH5A.

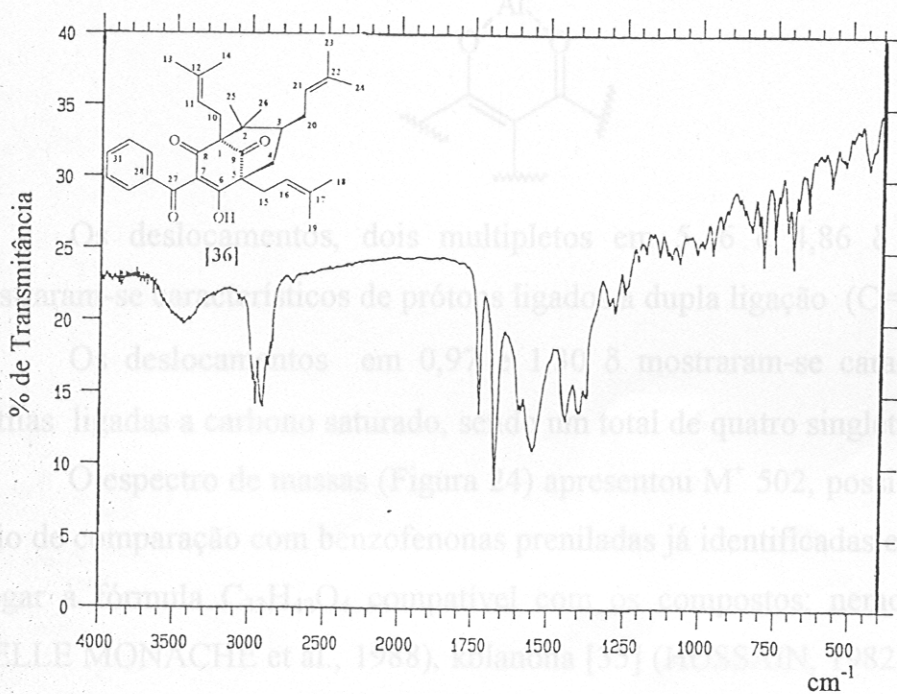
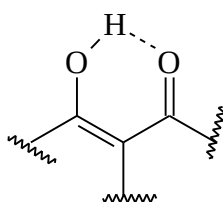


Figura 20 - Espectro no infravermelho (KBr) de RCH5B.

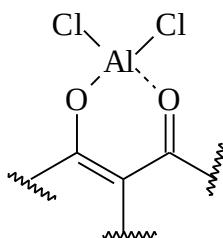


3.080 ( $\nu$ C=C-H), 2.970, 2.900 e 2.860 ( $\nu$ C-H), 1.725, 1.670 ( $\nu$ C=O), 1.600 (C=C arom.), 1.470 e 1.385  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_s$  C-H).

Por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 21), pôde-se confirmar o caráter aromático pelos sinais em  $\delta$  7,6-7,3 (m). O sinal em  $\delta$  17,73, a troca com  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 22) e a presença de C=O (IV) sugerem a atribuição de uma hidroxila quelada ocupando a posição beta em relação à carbonila (SILVERSTEIN, 1991).



Os espectros de ultravioleta (Figura 23) reforçam essa idéia, uma vez que se nota um deslocamento batocrômico nos dois máximos (245  $\Rightarrow$  253 nm; 295  $\Rightarrow$  327 nm), pela formação de um quelato, com o alumínio trivalente, estável em meio ácido, típico desse sistema (MABRY et al., 1970), além de deslocamentos hipsocrômicos com NaOH e NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  (295  $\Rightarrow$  280 nm).



Os deslocamentos, dois multipletos em 5,16 e 4,86  $\delta$  (Figura 21), mostraram-se característicos de prótons ligados à dupla ligação (C=C-H).

Os deslocamentos em 0,97 e 1,30  $\delta$  mostraram-se característicos de metilas ligadas a carbono saturado, sendo um total de quatro singletos.

O espectro de massas (Figura 24) apresentou  $\text{M}^+$  502, possibilitando, por meio de comparação com benzofenonas preniladas já identificadas em Guttiferae, chegar à fórmula  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_4$  compatível com os compostos: nemorosonol [34] (DELLE MONACHE et al., 1988), kolanona [35] (HUSSAIN, 1982), clusianona A [36] e clusianona B [37] (DELLE MONACHE et al., 1991), além de camboginol [33] (RAMA RAO, 1980) e xantochimol [5] (DREYER, 1974).

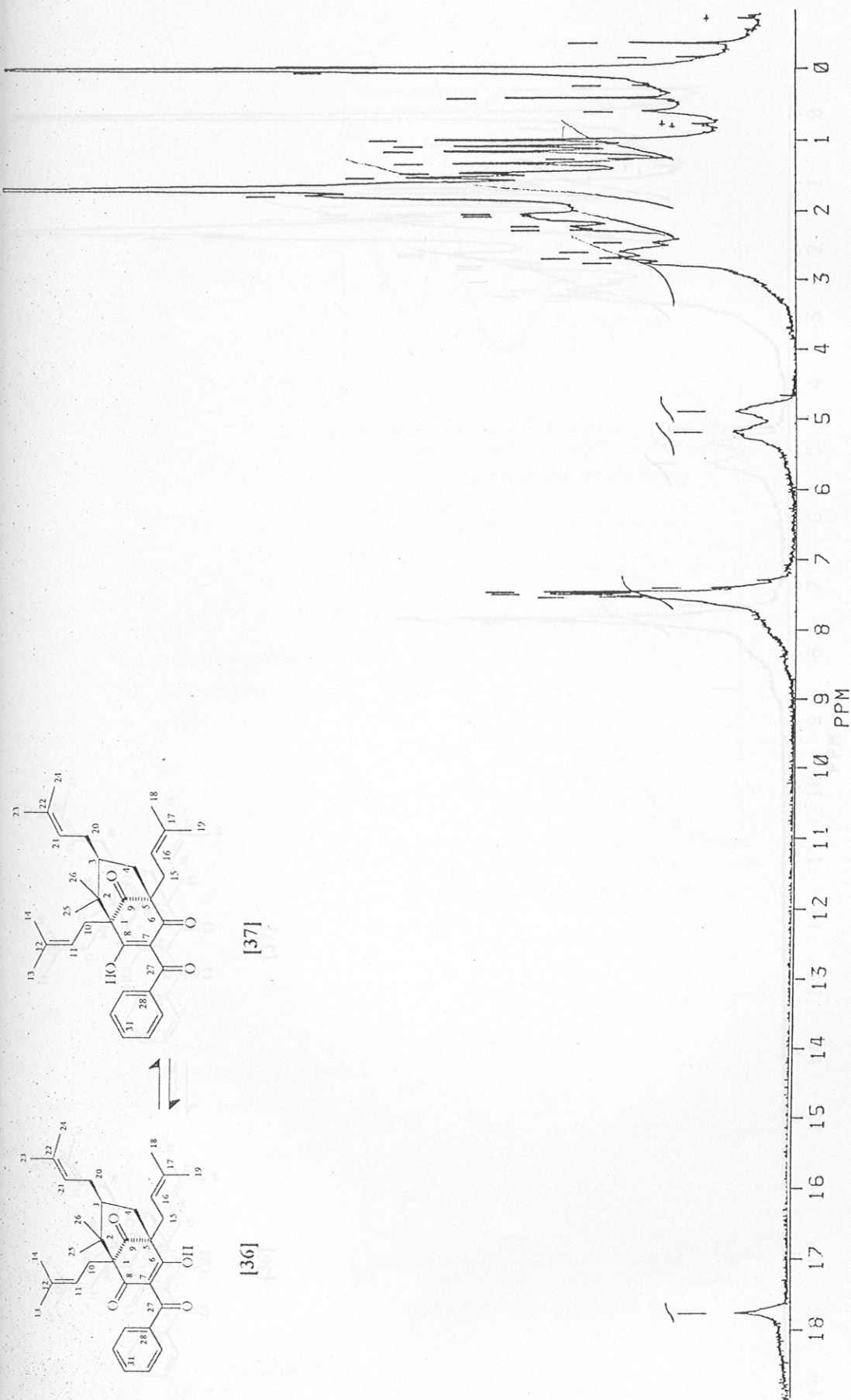


Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RCH5B, compreendendo a região de  $\delta$  1,0 a 19,0.

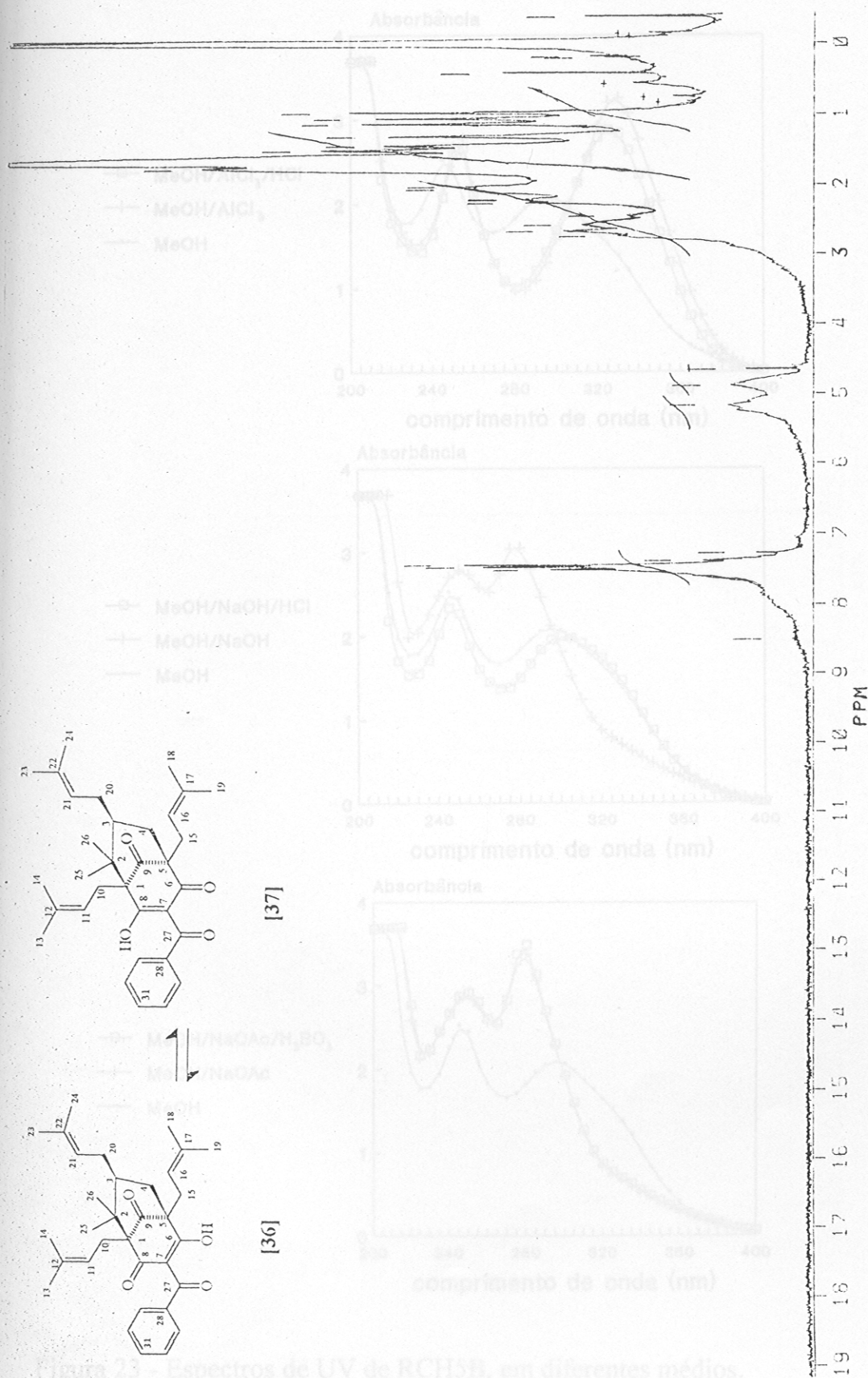


Figura 22 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) de RCH5B, compreendendo a região de  $\delta$  1,0 a 19,0.

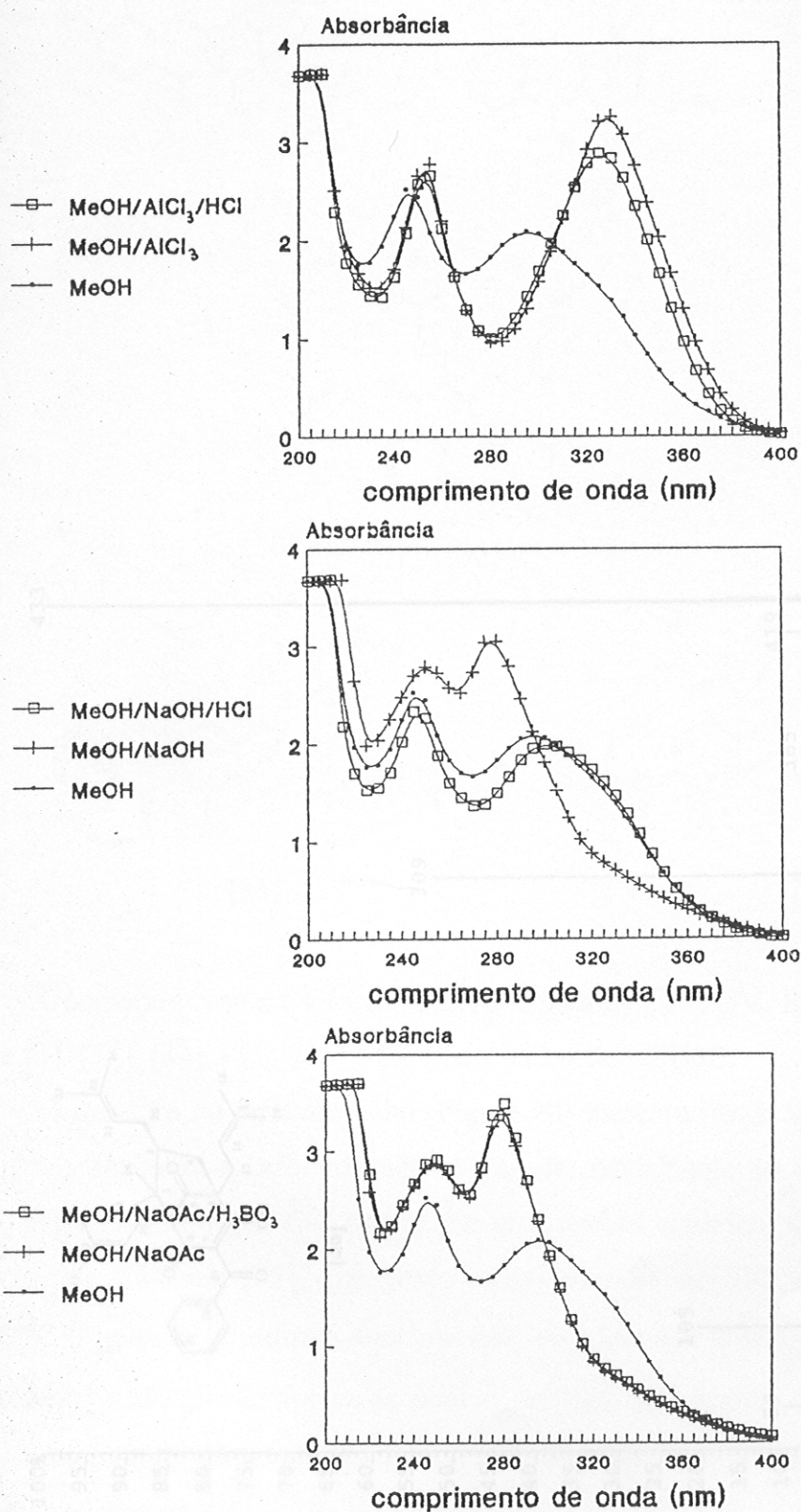


Figura 23 - Espectros de UV de RCH5B, em diferentes médios.

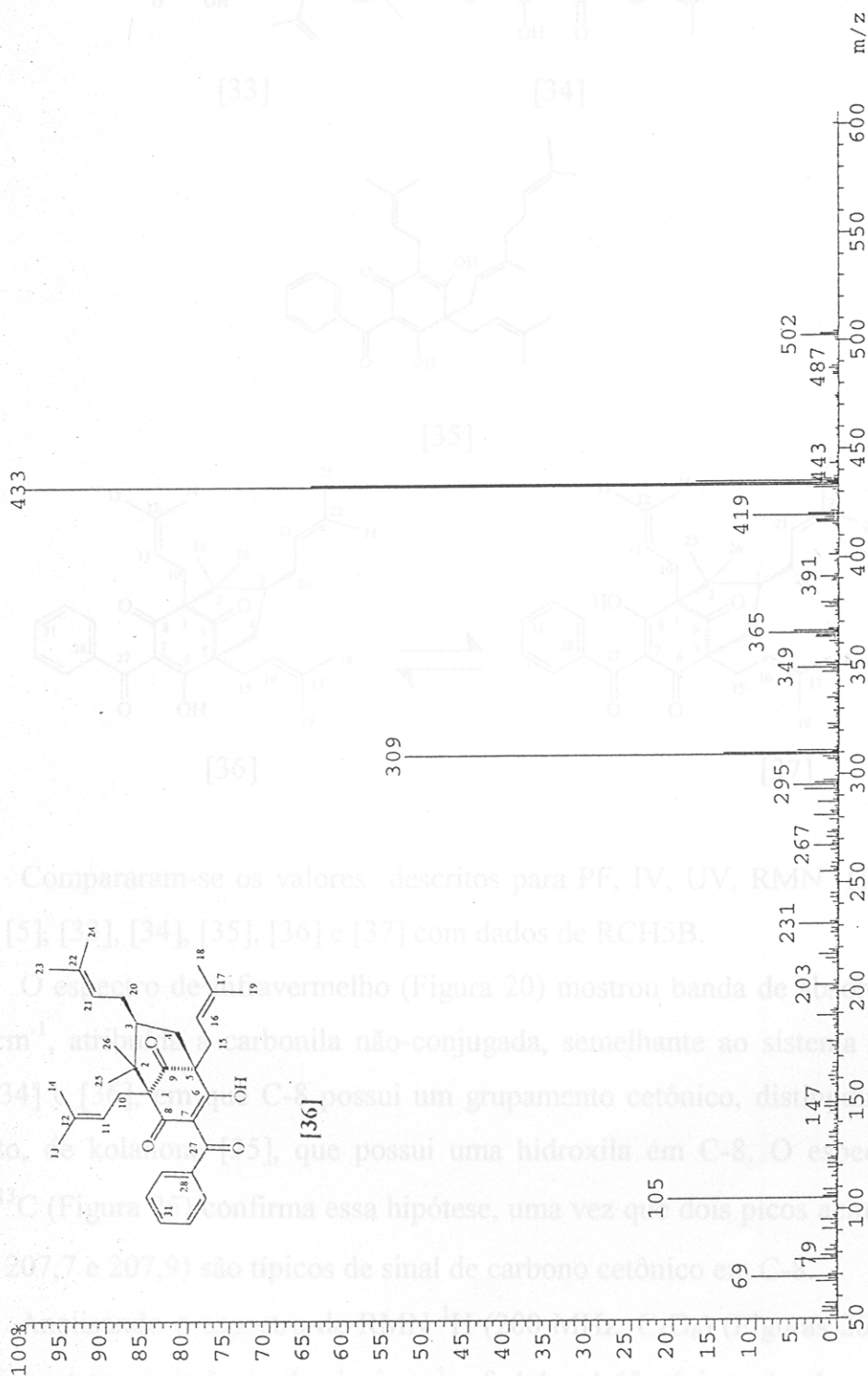
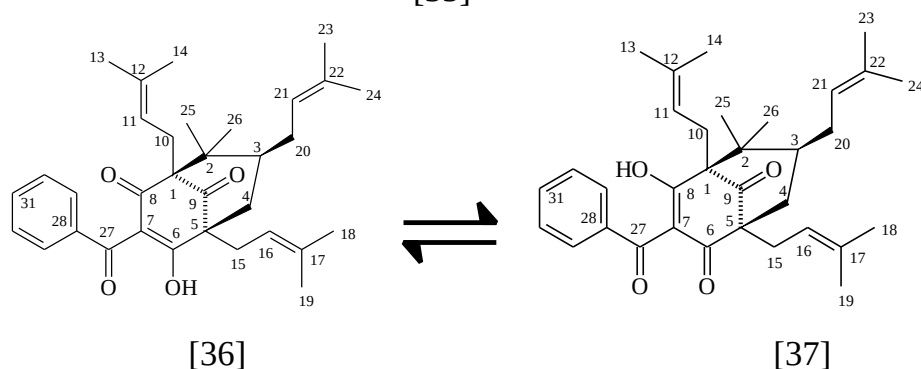
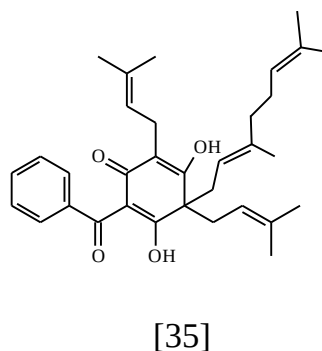
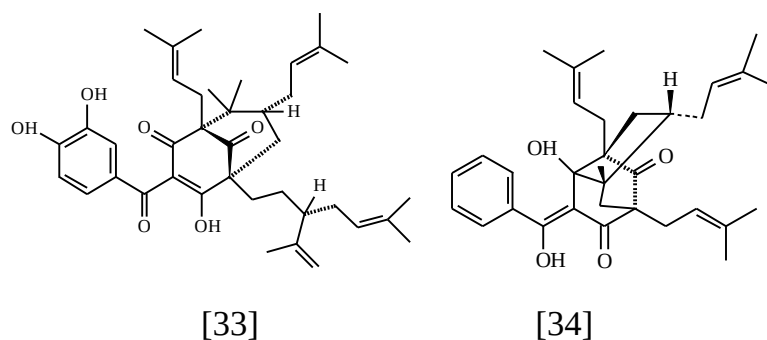


Figura 24 - Espectro de massas de RCH5B.





Compararam-se os valores descritos para PF, IV, UV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  de [5], [33], [34], [35], [36] e [37] com dados de RCH5B.

O espectro de infravermelho (Figura 20) mostrou banda de absorção em  $1725\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à carbonila não-conjugada, semelhante ao sistema de [5], [33], [34] e [36], em que C-8 possui um grupamento cetônico, distinguindo-se, portanto, de kolanona [35], que possui uma hidroxila em C-8. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 25) confirma essa hipótese, uma vez que dois picos acima de  $\delta$  200 ( $\delta$  207,7 e 207,9) são típicos de sinal de carbono cetônico em C-8.

Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) (Figuras 26 e 27), não se constatou existência de sinais entre  $\delta$  4,4 e 4,65, típicos de absorção de próton metilênico ( $-\text{C}(\text{Me})=\text{CH}_2$ ), podendo-se distinguir a amostra de [5], [33] e

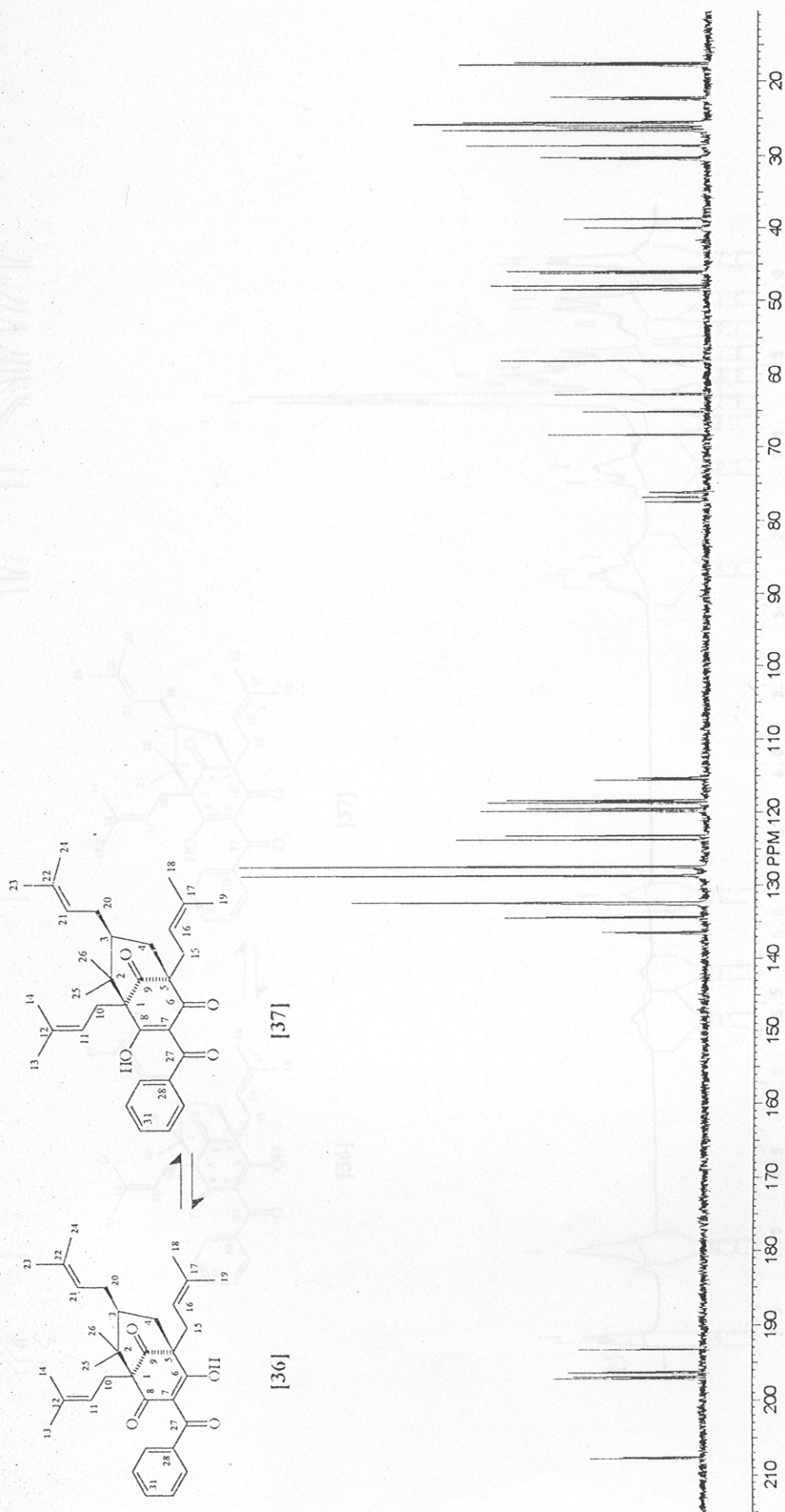


Figura 25 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,2 MHz) de RCH5B. 36B, compreendendo a região de  $\delta$  0,0 a 7,7.

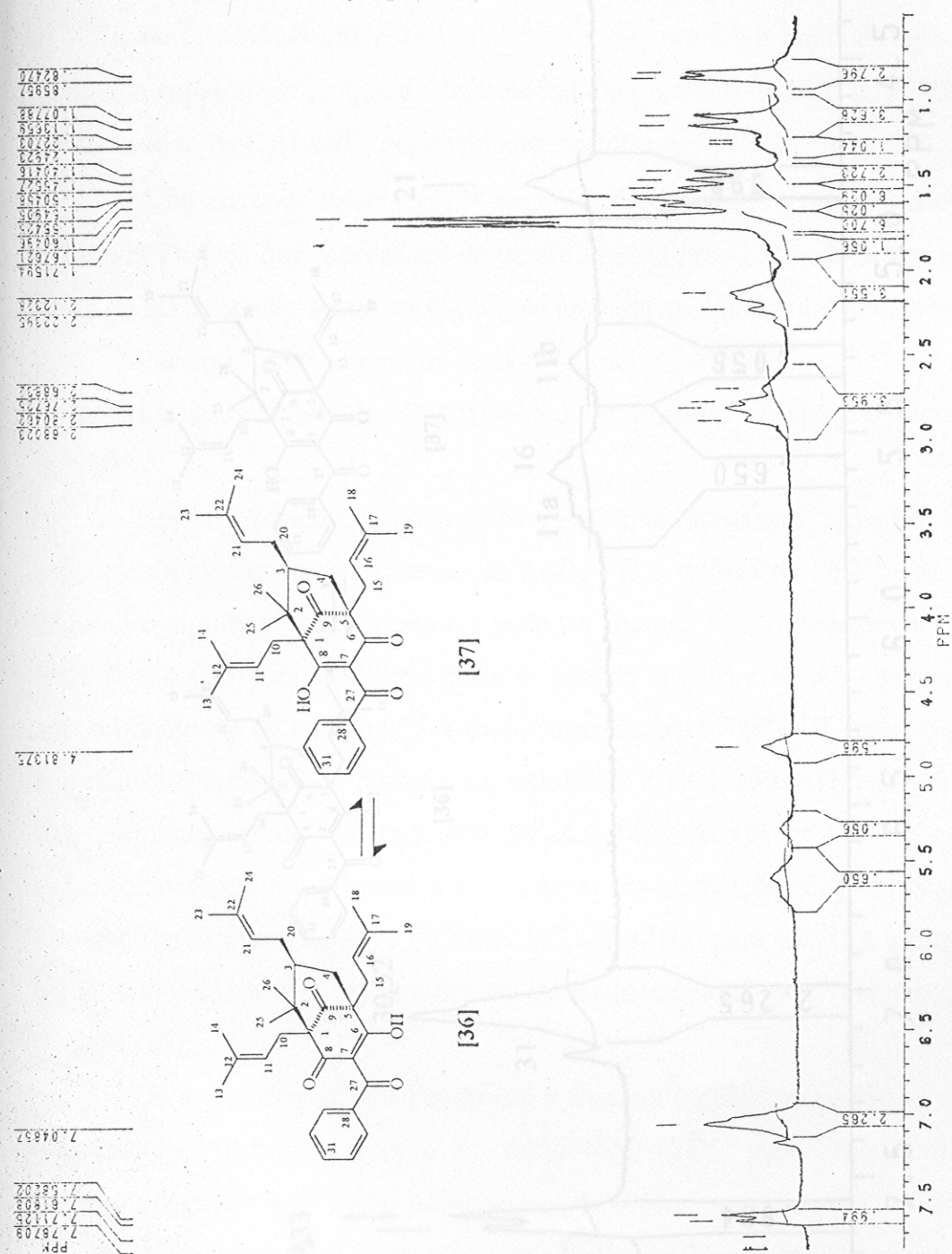


Figura 26 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de RCH5B, compreendendo a região de  $\delta$  0,0 a 7,7.



[35], além de não haver qualquer absorção, no RMN  $^{13}\text{C}$ , em torno de  $\delta$  148, que seria devida ao carbono metilênico ( $-\text{C}(\text{Me})=\text{CH}_2$ ).

RCH5B pode ser claramente distinguido de [5] e [33] pela ausência de deslocamentos, no RMN  $^{13}\text{C}$ , para carbonos aromáticos ligados a hidroxila ( $\text{C}-\text{OH}$ ) na faixa de  $\delta$  143 e 150. Verifica-se que o núcleo aromático não possui nenhuma substituição, o que é confirmado pela presença do pico em  $\delta$  105 (21%), característico de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ , observado no espectro de massas (Figura 26).

A ausência de sinais em  $\delta$  174 exclui definitivamente a possibilidade de clusianona [36], já que a presença de uma hidroxila em C-8 destrói o sinal cerca de 30 ppm não verificado na ausência qualquer sinal nessa região.

Por fim, não se pode excluir nem a forma [34] (Figura 25) quando observado o espectro de composição elementar, em que o cálculo baseado no  $m/z$  105.

Restou somente a clusianona [36] que apresenta espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muito similares, como pode ser visto no quadro 15. A configuração existente entre C-6 e C-8 gera um equilíbrio entre as formas A [36] e B [37], justificando o aparecimento de dois carbonos. Os deslocamentos para RMN  $^1\text{H}$  foram similares.

Entretanto, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  amostra foi obtido em  $\text{CDCl}_3$  (60 MHz) (Figura 27), enquanto o realizado por DELLEMONACHE et al. (1991) foi em  $\text{C}_6\text{D}_6$ , o que causava dificuldades nas atribuições dos deslocamentos.

Por isso fez-se outro espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz) para RCH5B usando  $\text{CDCl}_3$  como solvente, a fim de confirmar os deslocamentos da clusianona [36] (Quadro 15).

Os dados disponíveis conduzem à fórmula de clusianona [36], e existem discrepâncias quanto ao ponto de fusão ( $130$ - $152^\circ\text{C}$  para [36] e [37], enquanto a nossa era de  $92$ - $93^\circ\text{C}$ ) e ao não aparecimento de uma banda de absorção no infravermelho (extinção da hidroxila). Sugere-se que essas diferenças possam ser do processo de recristalização utilizado ou da predominância da forma [36] sobre a forma B [37].

Figura 27 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de RCH5B, compreendendo a região de  $\delta$  4,5 a 7,7.

[35], além de não haver qualquer absorção, no RMN  $^{13}\text{C}$ , em torno de  $\delta$  148, que seria devida ao carbono metilênico ( $-\underline{\text{C}}(\text{Me})=\text{CH}_2$ ).

RCH5B pode ser claramente distinguido de [5] e [33] pela ausência de deslocamentos, no RMN  $^{13}\text{C}$ , para carbonos aromáticos ligados a hidroxila ( $\underline{\text{C}}\text{-OH}$ ) na faixa de  $\delta$  143 e 150. Verifica-se que o núcleo aromático não possui nenhuma substituição, o que é confirmado pela presença do pico  $m/z$  105 (21%), característico de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ , observado no espectro de massas (Figura 24).

A ausência de sinais a  $\delta$  174 exclui definitivamente a possibilidade de ser kolanona [35], já que a presença de uma hidroxila em C-8 desblinda o sinal em cerca de 30 ppm, não sendo verificado na amostra qualquer sinal nessa região.

Por fim, pode-se excluir nemorosonol [34] e kolanona [35] quando são observados os padrões de decomposição de massas, em que o pico-base é  $m/z$  105.

Restou somente a clusianona [36], que apresenta espectro de UV, espectro de massas, deslocamentos de RMN  $^{13}\text{C}$  e valores de DEPT 135 (Figura 28) muito similares, como pode ser visto no Quadro 15. A conjugação existente entre C-6 e C-8 gera equilíbrio entre as formas A [36] e B [37], justificando o aparecimento de 60 carbonos. Os deslocamentos para RMN  $^1\text{H}$  foram similares, entretanto, o espectro da amostra foi obtido em  $\text{CDCl}_3$  (60 MHz) (Figuras 21 e 22), enquanto estudo realizado por DELLE MONACHE et al. (1991) exibiu espectro em  $\text{C}_6\text{D}_6$ , o que causava dificuldades nas atribuições dos deslocamentos. Por isso fez-se outro espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz) para RCH5B usando  $\text{C}_6\text{D}_6$  como solvente, a fim de confirmar os deslocamentos para clusianona [36] (Quadro 15).

Os dados disponíveis conduzem à fórmula de clusianona [36], e existem discrepâncias quanto ao ponto de fusão ( $150\text{-}152^\circ\text{C}$  para [36], enquanto a amostra era de  $92\text{-}93^\circ\text{C}$ ) e ao não-aparecimento de absorção acima de  $3100\text{ cm}^{-1}$  no infravermelho (em razão da hidroxila). Sugere-se que essas diferenças possam advir do processo de recristalização utilizado ou da predominância da forma A [36] sobre a forma B [37].

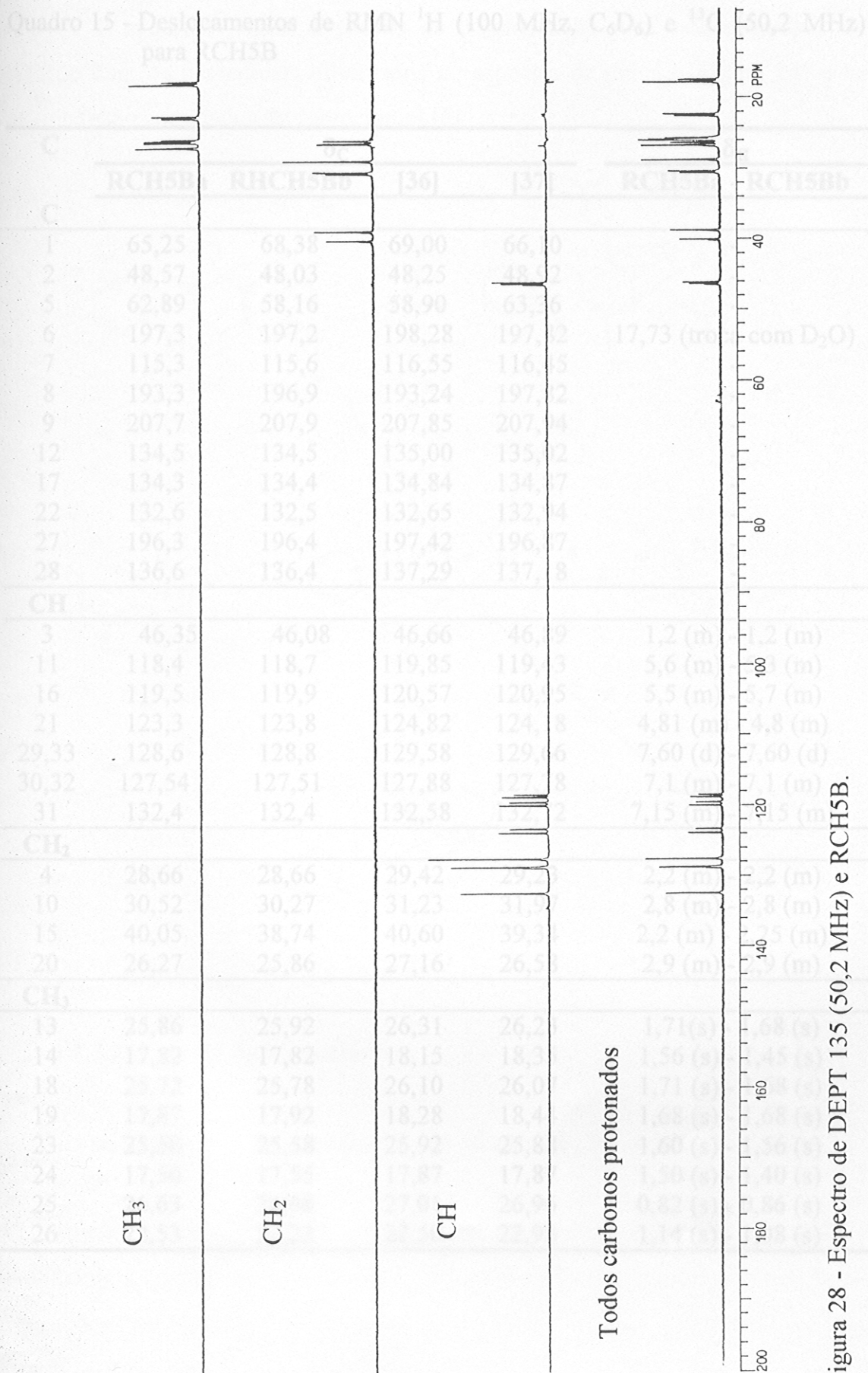
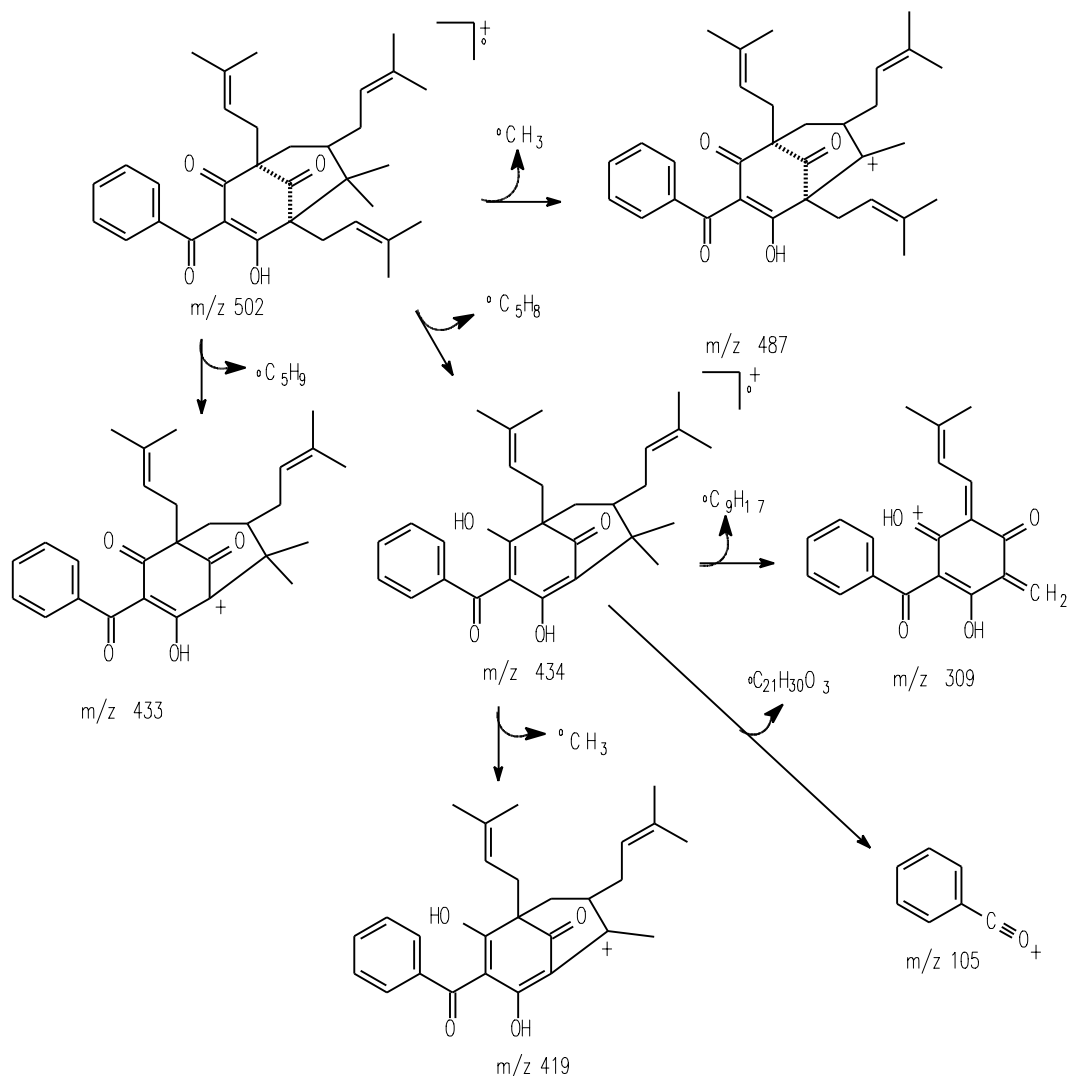


Figura 28 - Espectro de DEPT 135 (50,2 MHz) e RCH5B.

Quadro 15 - Deslocamentos de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50,2 MHz) para RCH5B

| C                     | $d_{\text{C}}$ |         |        |        | $d_{\text{H}}$                          |
|-----------------------|----------------|---------|--------|--------|-----------------------------------------|
|                       | RCH5Ba         | RHCH5Bb | [36]   | [37]   | RCH5Ba - RCH5Bb                         |
| <b>C</b>              |                |         |        |        |                                         |
| 1                     | 65,25          | 68,38   | 69,00  | 66,10  | -                                       |
| 2                     | 48,57          | 48,03   | 48,25  | 48,92  | -                                       |
| 5                     | 62,89          | 58,16   | 58,90  | 63,36  | -                                       |
| 6                     | 197,3          | 197,2   | 198,28 | 197,82 | 17,73 (troca com $\text{D}_2\text{O}$ ) |
| 7                     | 115,3          | 115,6   | 116,55 | 116,45 | -                                       |
| 8                     | 193,3          | 196,9   | 193,24 | 197,82 | -                                       |
| 9                     | 207,7          | 207,9   | 207,85 | 207,94 | -                                       |
| 12                    | 134,5          | 134,5   | 135,00 | 135,02 | -                                       |
| 17                    | 134,3          | 134,4   | 134,84 | 134,87 | -                                       |
| 22                    | 132,6          | 132,5   | 132,65 | 132,94 | -                                       |
| 27                    | 196,3          | 196,4   | 197,42 | 196,87 | -                                       |
| 28                    | 136,6          | 136,4   | 137,29 | 137,18 | -                                       |
| <b>CH</b>             |                |         |        |        |                                         |
| 3                     | 46,35          | 46,08   | 46,66  | 46,89  | 1,2 (m) - 1,2 (m)                       |
| 11                    | 118,4          | 118,7   | 119,85 | 119,43 | 5,6 (m) - 5,3 (m)                       |
| 16                    | 119,5          | 119,9   | 120,57 | 120,95 | 5,5 (m) - 5,7 (m)                       |
| 21                    | 123,3          | 123,8   | 124,82 | 124,18 | 4,81 (m) - 4,8 (m)                      |
| 29,33                 | 128,6          | 128,8   | 129,58 | 129,66 | 7,60 (d) - 7,60 (d)                     |
| 30,32                 | 127,54         | 127,51  | 127,88 | 127,78 | 7,1 (m) - 7,1 (m)                       |
| 31                    | 132,4          | 132,4   | 132,58 | 132,72 | 7,15 (m) - 7,15 (m)                     |
| <b>CH<sub>2</sub></b> |                |         |        |        |                                         |
| 4                     | 28,66          | 28,66   | 29,42  | 29,23  | 2,2 (m) - 2,2 (m)                       |
| 10                    | 30,52          | 30,27   | 31,23  | 31,97  | 2,8 (m) - 2,8 (m)                       |
| 15                    | 40,05          | 38,74   | 40,60  | 39,34  | 2,2 (m) - 2,25 (m)                      |
| 20                    | 26,27          | 25,86   | 27,16  | 26,58  | 2,9 (m) - 2,9 (m)                       |
| <b>CH<sub>3</sub></b> |                |         |        |        |                                         |
| 13                    | 25,86          | 25,92   | 26,31  | 26,23  | 1,71(s) - 1,68 (s)                      |
| 14                    | 17,82          | 17,82   | 18,15  | 18,35  | 1,56 (s) - 1,45 (s)                     |
| 18                    | 25,72          | 25,78   | 26,10  | 26,07  | 1,71 (s) - 1,68 (s)                     |
| 19                    | 17,87          | 17,92   | 18,28  | 18,44  | 1,68 (s) - 1,68 (s)                     |
| 23                    | 25,50          | 25,58   | 25,92  | 25,88  | 1,60 (s) - 1,56 (s)                     |
| 24                    | 17,50          | 17,55   | 17,87  | 17,87  | 1,50 (s) - 1,40 (s)                     |
| 25                    | 26,63          | 26,68   | 27,01  | 26,96  | 0,82 (s) - 0,86 (s)                     |
| 26                    | 22,53          | 22,23   | 22,50  | 22,98  | 1,14 (s) - 1,08 (s)                     |



### 3.1.3.2. Extrato diclorometânico

**a. Triterpeno pentacíclico: ácido oleanólico [39]**

A substância RCD8, sólido branco cristalino de PF 295-298°C, submetida à análise no IV (Figura 29), demonstrou caráter ácido e alifático pelas absorções características: banda larga em  $3.350\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{OH}$ ),  $2.900\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-H}$ )  $1.690\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C=O}$ ).

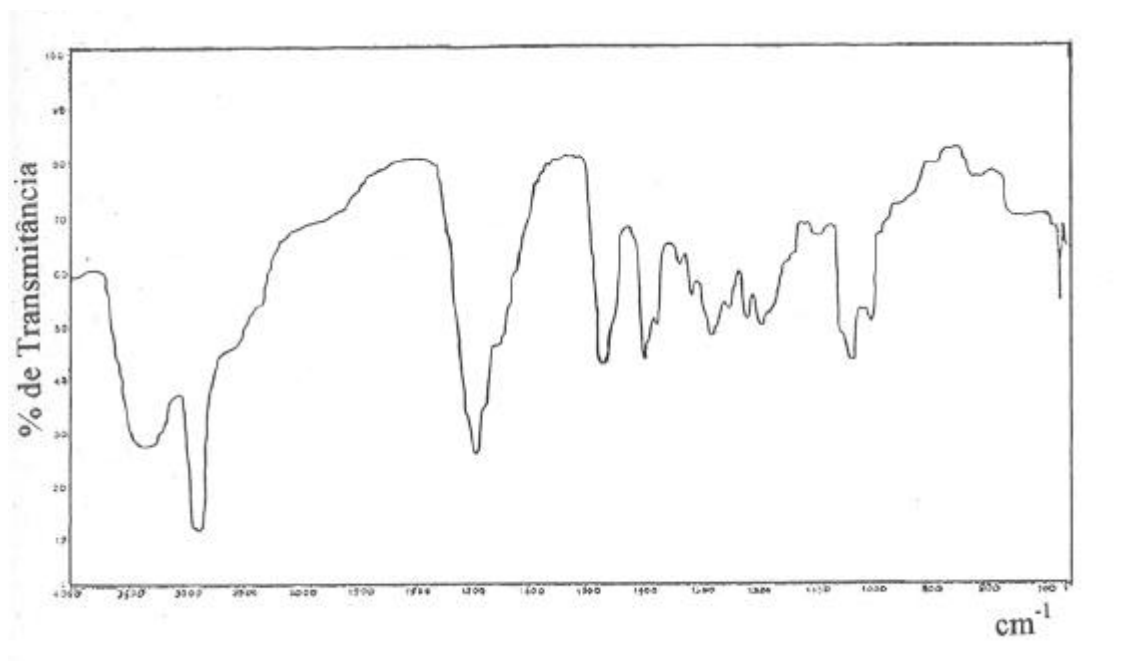


Figura 29 - Espectro de infravermelho (KBr) de RCD8.

Aliado ao teste de Lieberman-Burchard para triterpenóides pentacíclicos e esteróides (MATOS, 1988) e com base na comparação visual do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 30 e 31) com os existentes na literatura (POUCHERT, 1981), foi observado que se tratava de um triterpenóide pentacíclico.

O espectro de massas (Figura 32) apresentou o pico íon-molecular ( $\text{M}^+$ ) em  $m/z$  456 (3%) compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ . O padrão de fragmentação apresentou como pico-base  $m/z$  248 (100%), resultante de uma reação retro-Diels-Aldier, característica dos triterpenos pentacíclicos  $\Delta^{12}$ -insaturados das séries olean-12-eno e urs-12-eno, além dos fragmentos  $m/z$  203 (62%),  $m/z$  189 (11%).

Para melhor elucidar a estrutura de RCD8, foi analisado seu derivado acetilado (RCD8A), o qual consistiu de sólido branco cristalino, com ponto de fusão 263-265°C, e mostrou infravermelho (Figura 33) com banda larga de absorção em 3.300-3.150  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{OH}$  de ácido), 2.900  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-H}$ ), 1.725 e 1.700  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C=O}$  ácido e éster), 1.640 e 1.250  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-O}$ ).

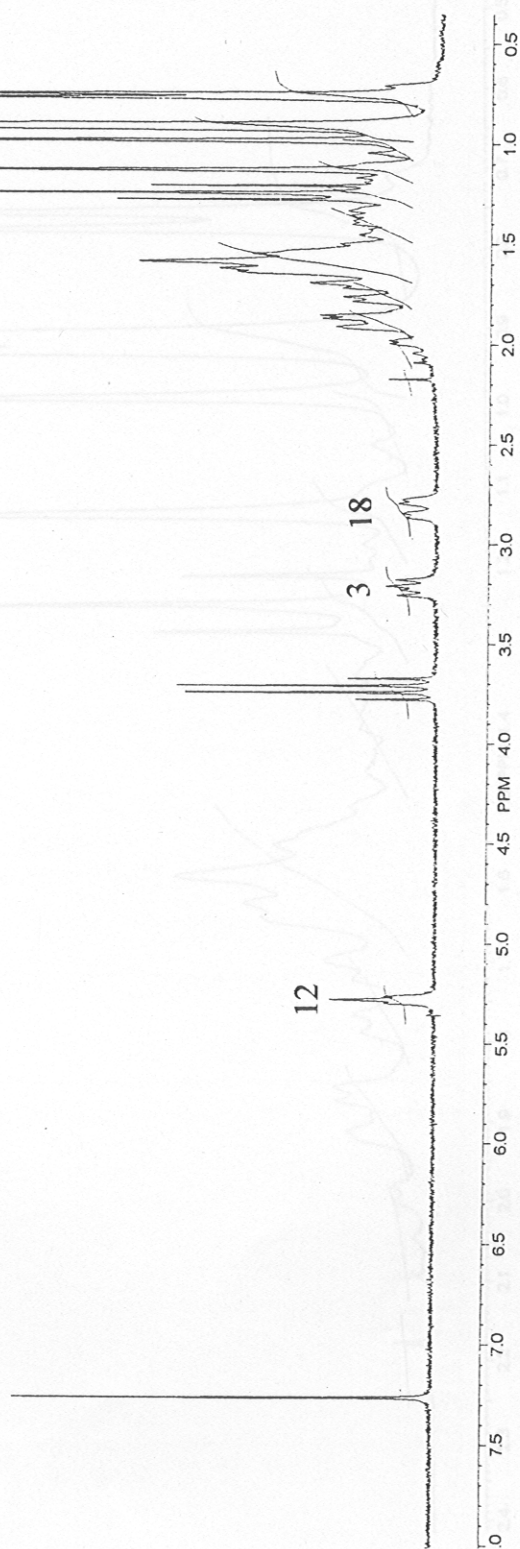
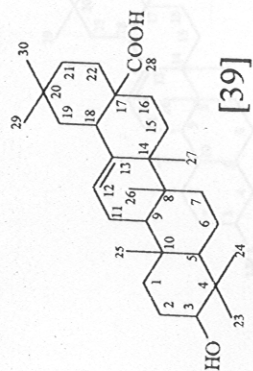


Figura 30 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de  $\delta$  0,5 a 8,0.



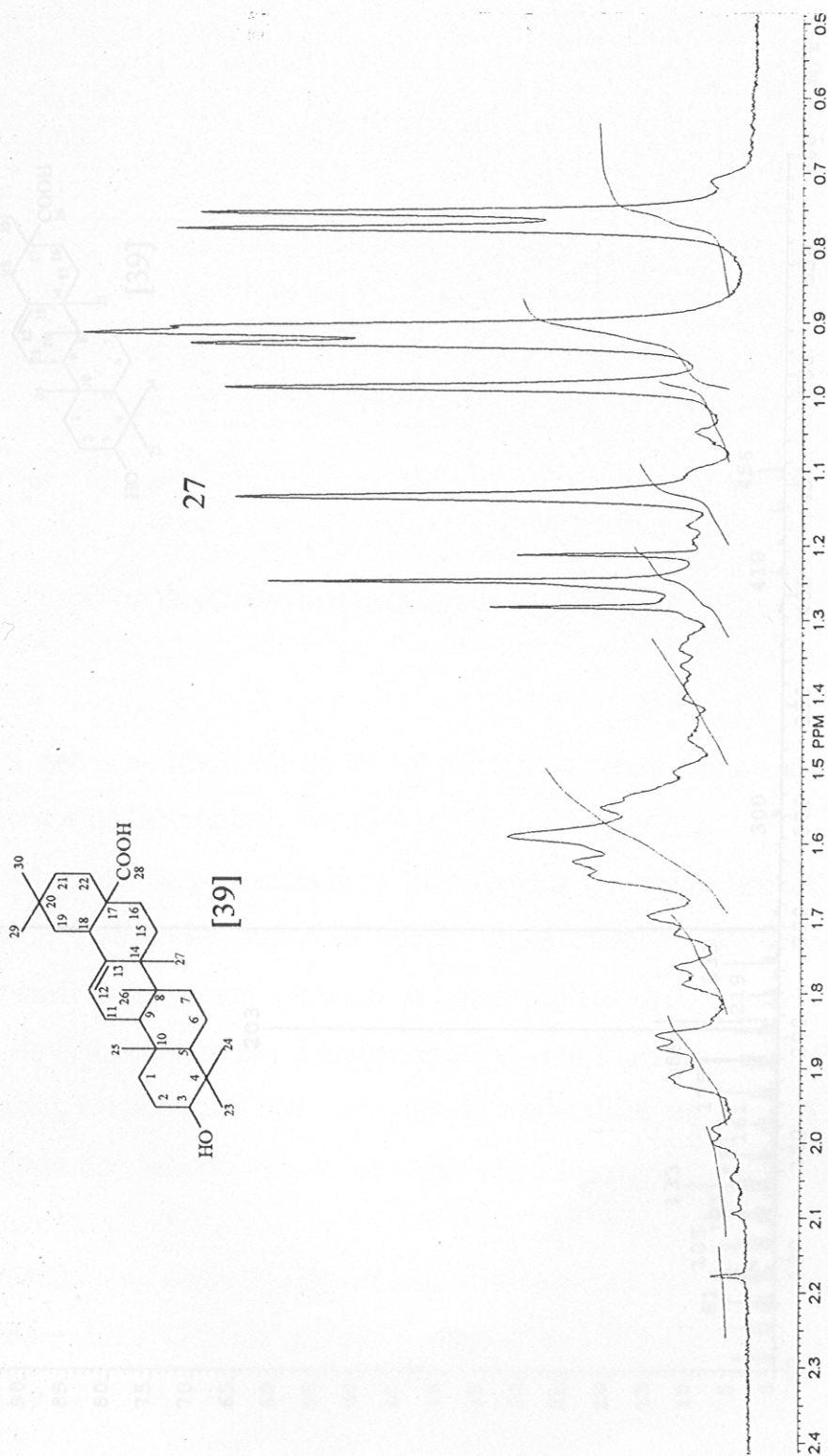


Figura 31 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de  $\delta$  0,5 a 2,4.



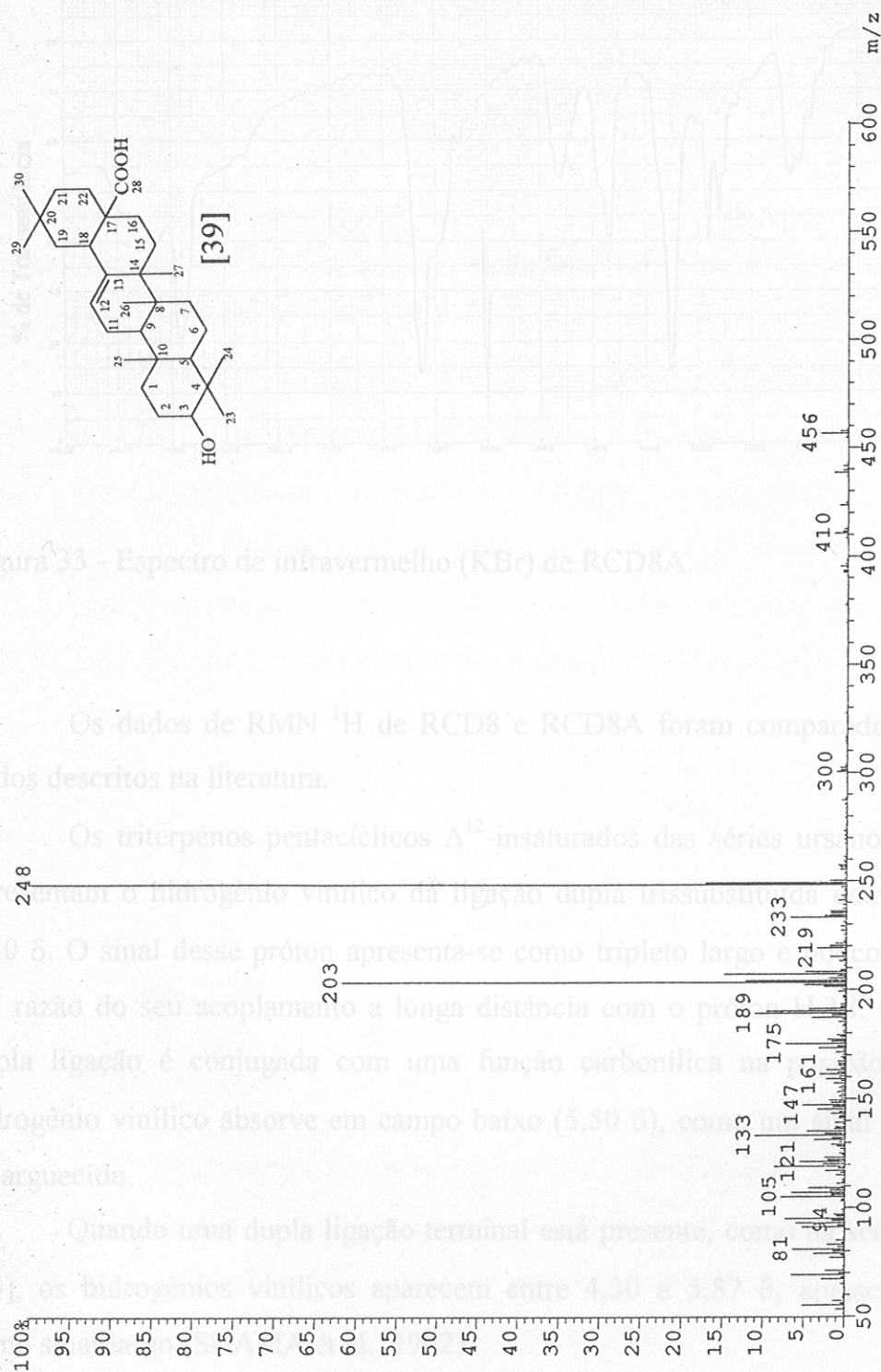


Figura 32 - Espectro de massas de RCD8.

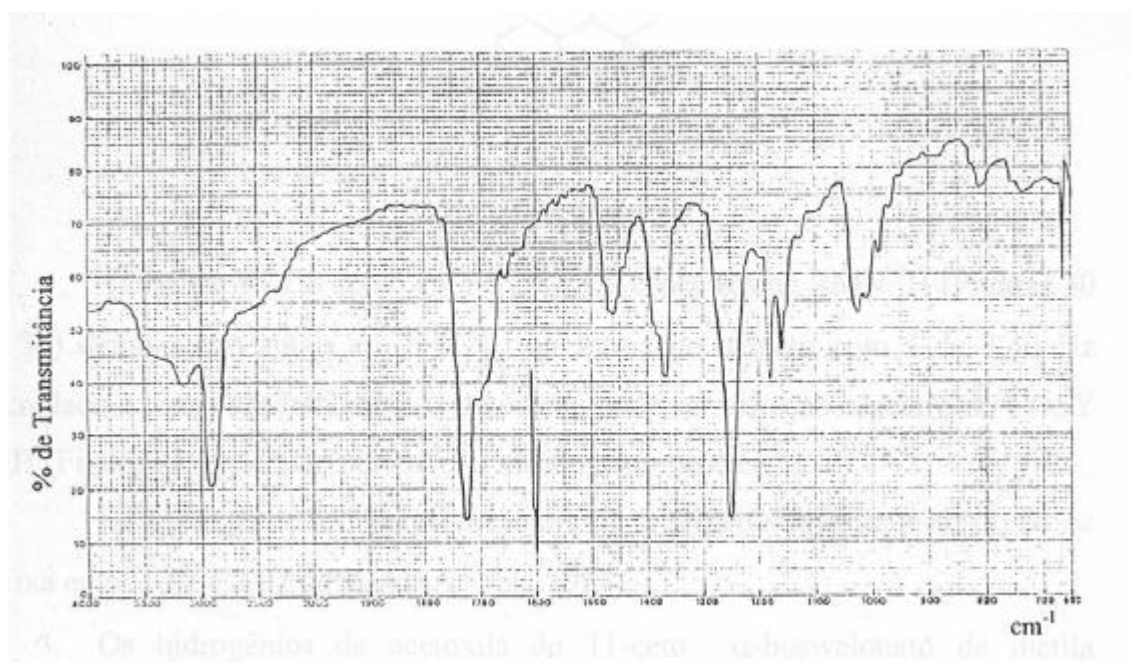
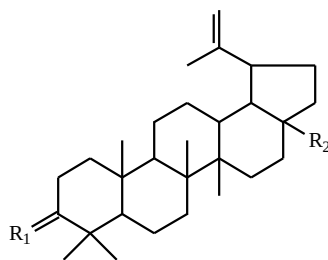


Figura 33 - Espectro de infravermelho (KBr) de RCD8A.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  de RCD8 e RCD8A foram comparados com os dados descritos na literatura.

Os triterpenos pentacíclicos  $\Delta^{12}$ -insaturados das séries ursano e oleano apresentam o hidrogênio vinílico da ligação dupla trissubstituída entre 4,93 e 5,50  $\delta$ . O sinal desse próton apresenta-se como tripleto largo e pouco definido, em razão do seu acoplamento a longa distância com o próton H-18. Quando a dupla ligação é conjugada com uma função carbonílica na posição C-11, o hidrogênio vinílico absorve em campo baixo (5,50  $\delta$ ), como um sinal simples e enlarguecido.

Quando uma dupla ligação terminal está presente, como na série lupano [40], os hidrogênios vinílicos aparecem entre 4,30 e 5,87  $\delta$ , apresentando-se como sinal largo (SHAMA et al., 1962).

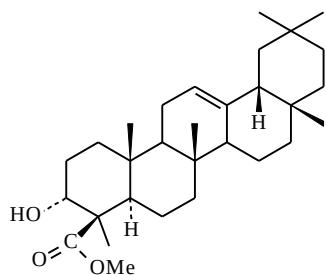


[40]

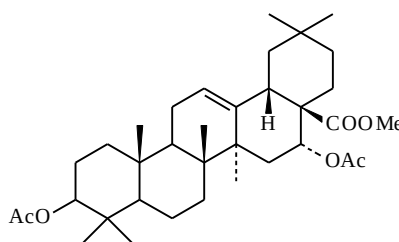
Tanto em RCD8 como em RCD8A, os espectros de RMN <sup>1</sup>H (Figuras 30 e 34) demonstram sinais em  $\delta$  5,28 na forma de tripleto com J de 3,40 Hz acoplado a longa distância com H-18, o que pode ser visto no espectro de COSY HH (Figura 35), podendo pertencer à série ursano ou oleano.

Os hidrogênios do grupo acetoxila de triterpenos mostram absorção na faixa entre 1,82 e 2,07  $\delta$  (SHAMA et al., 1962).

Os hidrogênios da acetoxila do 11-ceto  $\alpha$ -boswelonato de metila acetilado [41] e do echinocistato de metila diacetilado [42] absorvem em 1,99 e 2,07  $\delta$ , respectivamente (SHAMA et al., 1962). A forte absorção em 2,05  $\delta$  (s) para RCD8A (Figura 34) foi atribuída aos hidrogênios da acetoxila.



[41]



[42]

RCD8A apresentou absorção em 4,50  $\delta$  (t) com J de 8,70 Hz.

Os hidrogênios alfa a grupos acetoxila podem se apresentar na configuração axial-equatorial. Os hidrogênios equatoriais apresentam banda estreita em razão da menor constante de acoplamento, podendo ser axial-equatorial (a-e) ou equatorial-equatorial (e-e). Os hidrogênios axiais podem revelar acoplamento a-a e a-e (SHAMA et al., 1962).

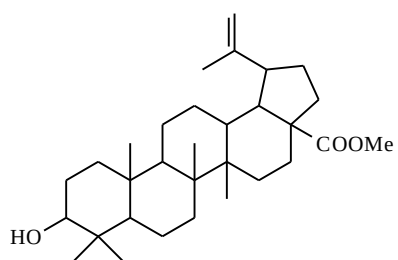
O próton H-3 axial em compostos acetilados absorve entre 4,0 e 4,75, enquanto H-3 equatorial, como no  $\alpha$ -boswelato de metila acetilado e seu 11-ceto derivado [41], absorve entre 5,20 e 5,48  $\delta$  (SHAMA et al., 1962).

Sugeriu-se que o tripleto em 4,50  $\delta$  e J (6,52 Hz) para RCD8A (Figura 34) deve-se à absorção do H-3 axial, mostrando-se como um quarteto em 3,22  $\delta$  para RCD8 (Figura 30), estando alfa à hidroxila, acoplando com H-2 (Figura 35).

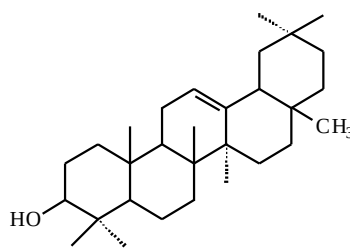
Os sinais das metilas angulares no espectro de RMN  $^1\text{H}$  localizam-se numa faixa relativamente muito estreita do espectro, entre 0,65-1,50  $\delta$ , o que dificulta a interpretação, especialmente em espectro realizado em 60 MHz, enquanto os espectros registrados a 100 MHz permitem melhor observação, tornando possível reconhecer inclusive os sinais das metilas secundárias presentes na série ursano (ITÔ et al., 1960).

Nos compostos olean-12-enos, os sinais das metilas no espectro de RMN  $^1\text{H}$  não são amplamente usados para estudos estruturais, mas sua correlação com estruturas estabelecidas assume importância significativa para elucidação de compostos desconhecidos. Modificações estruturais causam mudanças sistemáticas nos deslocamentos químicos dos grupos metila localizados na vizinhança (ITÔ et al., 1960).

A introdução de um grupo hidroxila em várias posições do esqueleto olean-12-eno [45] responde por alterações nos deslocamentos químicos das metilas vizinhas ao centro substituído. A análise demonstrada pelos autores tomou como padrão  $\beta$ -amirina [44], em virtude da presença do grupo OH na posição beta de C-3 dos olean-12-enos. Verifica-se que a acetilação deste grupo provoca mudança nos deslocamentos químicos das metilas. O efeito do grupo acetoxila é menor do que o grupo hidroxila (ITÔ et al., 1960).



[43]



[44]

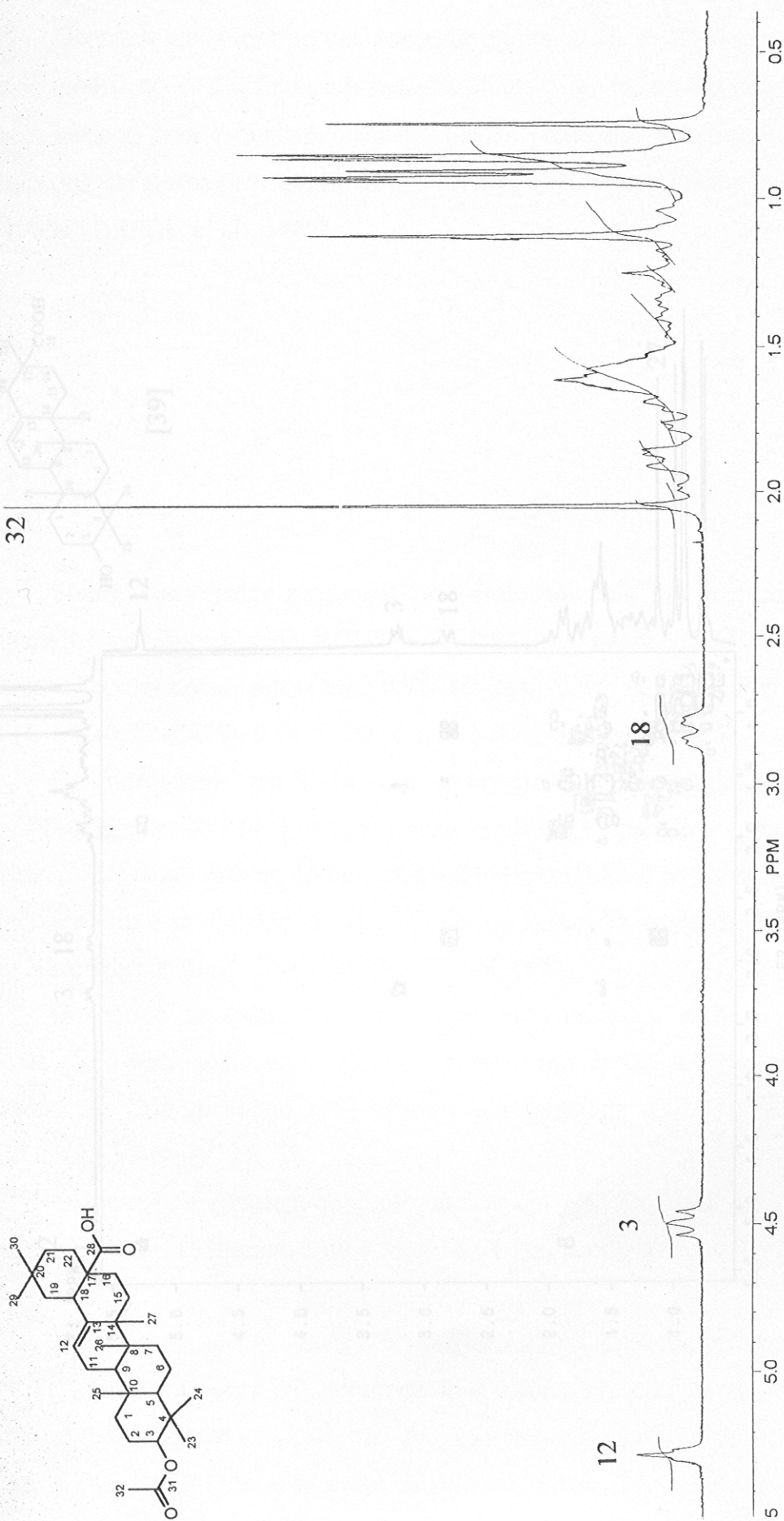


Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8A, compreendendo a região de  $\delta$  0,5 a 5,5.

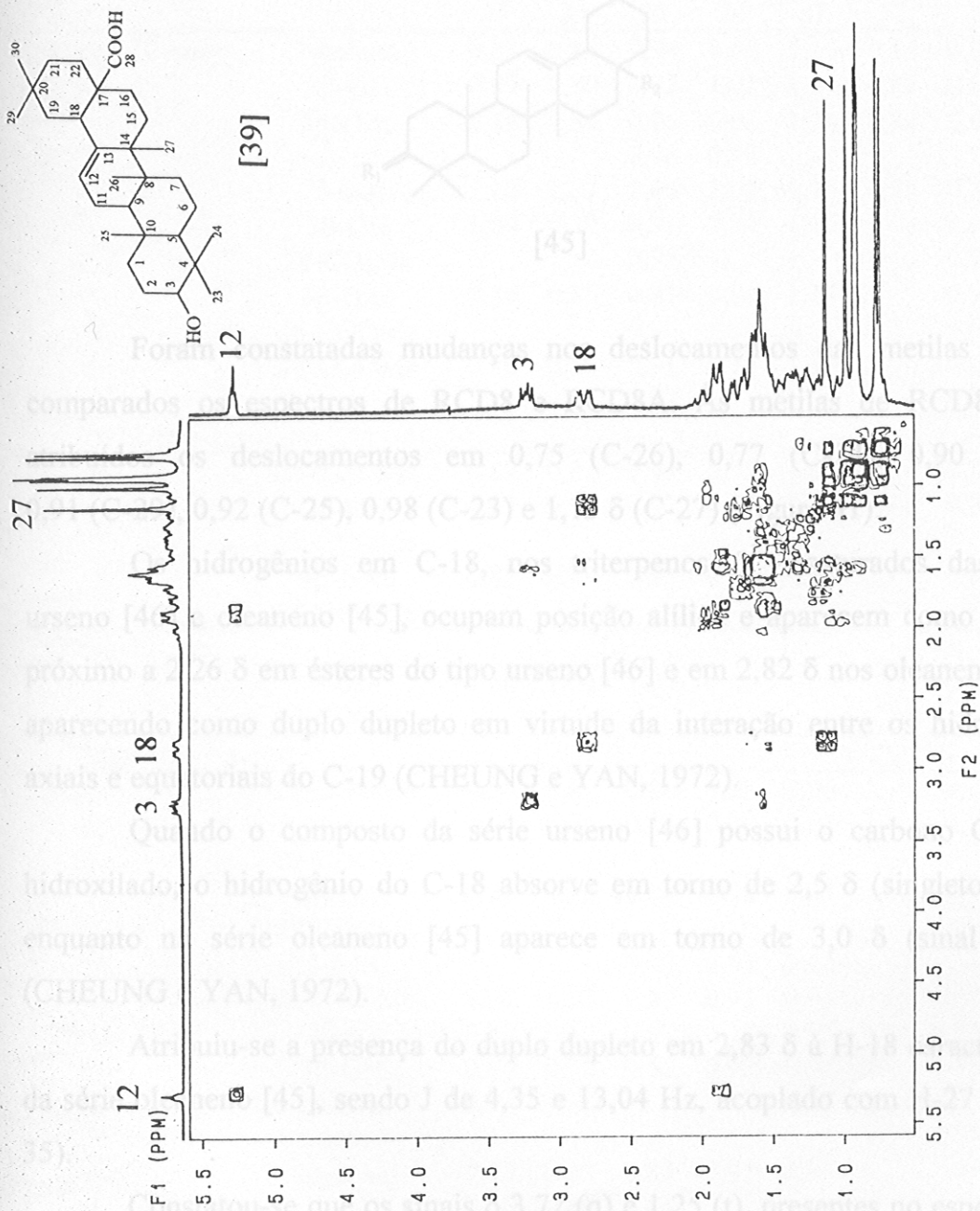
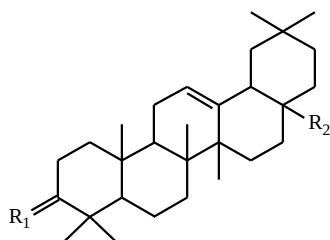


Figura 35 - Espectro de COSY HH (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de RCD8, compreendendo a região de  $\delta$  0,0 a 5,5.



Ocorrem mudanças no deslocamento químico das metilas de triterpenos quando modificações são feitas nas suas estruturas. Com base nisto, utilizaram-se valores básicos para esqueleto oleaneno [45] e efeito dos substituintes para o cálculo dos deslocamentos químicos das metilas angulares (Quadro 16) (ITÔ et al., 1960; TURSCH et al., 1967).



[45]

Foram constatadas mudanças nos deslocamentos das metilas quando comparados os espectros de RCD8 e RCD8A. Às metilas de RCD8 foram atribuídos os deslocamentos em 0,75 (C-26), 0,77 (C-24), 0,90 (C-30), 0,91 (C-29), 0,92 (C-25), 0,98 (C-23) e 1,13  $\delta$  (C-27) (Figura 31).

Os hidrogênios em C-18, nos triterpenos  $\Delta^{12}$ -insaturados das séries urseno [46] e oleaneno [45], ocupam posição alílica e aparecem como duplete próximo a 2,26  $\delta$  em ésteres do tipo urseno [46] e em 2,82  $\delta$  nos oleanenos [45], aparecendo como duplo duplete em virtude da interação entre os hidrogênios axiais e equatoriais do C-19 (CHEUNG e YAN, 1972).

Quando o composto da série urseno [46] possui o carbono C-19  $\alpha$ -hidroxilado, o hidrogênio do C-18 absorve em torno de 2,5  $\delta$  (singlete largo), enquanto na série oleaneno [45] aparece em torno de 3,0  $\delta$  (sinal duplo) (CHEUNG e YAN, 1972).

Atribuiu-se a presença do duplo duplete em 2,83  $\delta$  à H-18 característico da série oleaneno [45], sendo J de 4,35 e 13,04 Hz, acoplado com H-27 (Figura 35).

Constatou-se que os sinais  $\delta$  3,72 (q) e 1,25 (t), presentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de RCD8 (Figura 28), foram devidos à contaminação por etanol, usado durante a recristalização, o que não se verificou no espectro de COSY HH (Figura 35) quando foi utilizada a mesma amostra, porém isenta deste solvente.

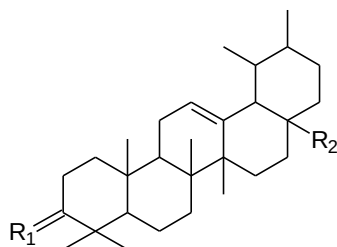
Quadro 16 - Deslocamento químico ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) dos grupos metila nas séries olean-12-eno (TURSH et al., 1967), urs-12-eno (CHEUNG e WILLANSON, 1969) e lupano [40] (CHEUNG e WILLANSON, 1969), tomando como valor básico o esqueleto olean-12-en [45] e lupan-28-oato de metila [43] (CHEUNG e WILLANSON, 1969)

| Tipo         | Substituintes         | CH <sub>3</sub> |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|-----------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|
|              |                       | 23              | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30   |
| Olean-12-eno | Nenhum                | 0,88            | 0,84 | 0,94 | 0,98 | 1,15 | 0,84 | 0,88 | 0,88 |
|              | 3 $\beta$ -OH         | 0,99            | 0,80 | 0,95 | 1,01 | 1,15 | 0,85 | 0,88 | 0,88 |
|              | 3 $\beta$ -OAc        | 0,88            | 0,88 | 0,95 | 0,95 | 1,14 | 0,84 | 0,88 | 0,88 |
|              |                       |                 |      | 0,98 | 0,98 |      |      |      |      |
|              | 3-oxo                 | 1,10            | 1,03 | 1,06 | 1,08 | 1,15 | 0,85 | 0,88 | 0,88 |
|              | 3 $\beta$ -OH         | 1,00            | 0,79 | 0,91 | 0,74 | 1,15 | -    | 0,91 | 0,91 |
|              | 28-CO <sub>2</sub> Me |                 |      | 0,95 |      |      |      | 0,95 | 0,95 |
|              | 3 $\beta$ -OAc        | 0,86            | 0,86 | 0,91 | 0,74 | 1,14 | -    | 0,91 | 0,91 |
|              | 28-COOMe              |                 |      | 0,96 |      |      |      | 0,96 | 0,96 |
|              | 28-COOMe              | 0,86            | 0,86 | 0,91 | 0,73 | 1,14 | -    | 0,91 | 0,91 |
|              |                       |                 |      | 0,93 |      |      |      | 0,96 | 0,96 |
| Urs-12-eno   |                       |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 28-COOMe              | 0,87            | 0,82 | 0,93 | 0,75 | 1,08 | -    | 0,80 | 0,95 |
|              | 3 $\beta$ -OH         | 0,97            | 0,79 | 0,92 | 0,76 | 1,07 | -    | 0,80 | 0,95 |
|              | 28-COOMe              |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 3 $\beta$ -OAc        | 0,87            | 0,87 | 0,95 | 0,75 | 1,08 | -    | 0,81 | 0,96 |
|              | 28-COOMe              |                 |      |      |      |      |      |      |      |
| Olean-12-eno |                       |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 3-oxo                 | 1,08            | 1,04 | 1,07 | 0,81 | 1,09 | -    | 0,80 | 0,95 |
|              | 28-COOMe              |                 |      |      |      |      |      |      |      |
| Lupano       |                       |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 28-COOMe              | 0,84            | 0,81 | 0,86 | 0,93 | 0,96 | -    | 0,75 | 0,85 |
|              | 3 $\beta$ -OH         | 0,96            | 0,76 | 0,83 | 0,90 | 0,95 | -    | 0,74 | 0,85 |
|              | 28-COOMe              |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 3 $\beta$ -OAc        | 0,86            | 0,86 | 0,84 | 0,92 | 0,95 | -    | 0,75 | 0,85 |
|              | 28-COOMe              |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 3-oxo,                |                 |      | 0,93 | 0,93 | 0,93 |      |      |      |
|              | 28-COOMe              | 1,07            | 1,03 | 0,95 | 0,95 | 0,95 | -    | 0,75 | 0,86 |
|              | 20-ene                | 0,83            | 0,80 | 0,87 | 0,92 | 0,95 | *    | **   | 1,73 |
|              | 3 $\beta$ -OH,        | 0,95            | 0,76 | 0,82 | 0,92 | 0,95 | -    | **   | 1,70 |
|              | 20-29-ene, 28-        | 0,97            |      |      |      | 0,97 |      |      |      |
|              | oato                  |                 |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 3 $\beta$ -OAc,       | 0,83            | 0,83 | 0,83 | 0,92 | 0,95 | -    | **   | 1,70 |
|              |                       | 0,86            | 0,86 | 0,86 |      |      |      |      |      |
|              | 3-oxo,                | 1,06            | 1,00 | 0,95 | 0,92 | 0,95 | -    | **   | 1,66 |
|              | 20-29-ene, 28-        |                 |      | 0,97 |      | 0,97 |      |      |      |
|              | oato                  |                 |      |      |      |      |      |      |      |

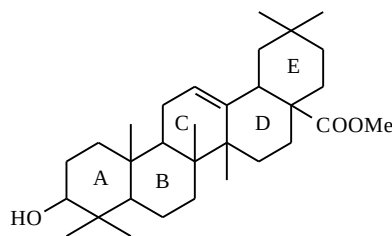
\* Falta dado na literatura; \*\* Grupo =CH<sub>2</sub> terminal.



Com os dados de RMN  $^1\text{H}$  pôde-se classificar o composto RCD8 na série olean-12-en [45], possuindo seis grupamentos  $\text{CH}_3$ , uma dupla ( $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ), um grupamento carboxílico e uma hidroxila equatorial.



[46]



[47]

Analisando o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para RCD8 (Figura 7), pôde-se constatar com maior exatidão a diferença entre triterpenos das séries olean-12-eno e urs-12-eno.

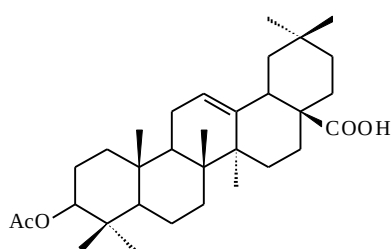
Na série olean-12-eno existem seis carbonos quaternários, e a série urs-12-eno possui apenas cinco (SEO et al., 1975).

A distinção entre as séries pode ser feita pelo deslocamento químico dos carbonos olefínicos C-12 e C-13. De acordo com observações feitas por SEO (1975), o carbono C-12 absorve na faixa de 124,0 a 125,0  $\delta$  na série urs-12-eno, sendo desprotegido em 2  $\delta$  em relação à série olean-12-eno, que mostra o carbono C-12 absorvendo entre 121,0 e 123,8  $\delta$ . O carbono C-13 é protegido em cerca de 5  $\delta$  na série urs-12-eno; essa absorção ocorre na faixa de 140 a 145  $\delta$  (SEO et al., 1975).

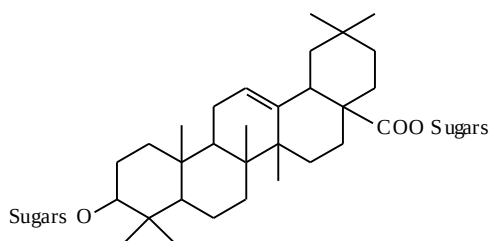
Podem-se observar ainda diferenças significativas nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel E [47]. Estas diferenças aproximadas de 12  $\delta$  (C-18), 7,5  $\delta$  (C-19), 8,5  $\delta$  (C-20) e 2,7  $\delta$  para C-27 são observadas na comparação envolvendo a série urs-12-eno, em relação à série olean-12-eno (SEO, 1975).

Na série lupano [40], C-12 e C-13 absorvem em 25,09  $\delta$  e 38,60  $\delta$ , respectivamente, indicando a ausência da dupla ( $\text{C}=\text{C}$ ) entre esses carbonos. C-20 e C-29 absorvem em 150,60  $\delta$  e 109,54  $\delta$ , respectivamente, sendo 150,60  $\delta$  referente a C-20 e 109,54  $\delta$  a C-29, grupo metileno terminal comum nessa série (PATRA et al., 1981).

RCD8 apresentou espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 36) e DEPT (Figura 37). Pelos dados de DEPT (8 C, 5 CH, 10  $\text{CH}_2$  e 7  $\text{CH}_3$ ), descartou-se a possibilidade de ele pertencer à série urs-12-eno que possui 7 C, 7 CH, 9  $\text{CH}_2$  e 7  $\text{CH}_3$ . Pela comparação com a literatura, utilizando programas de computador que comparam dados de triterpenos presentes no banco de dados com a amostra, chegou-se a três substâncias mais prováveis, com as respectivas atribuições dos carbonos de acordo com esqueleto de triterpenóides olean-12-enos [45] (Quadro 17).

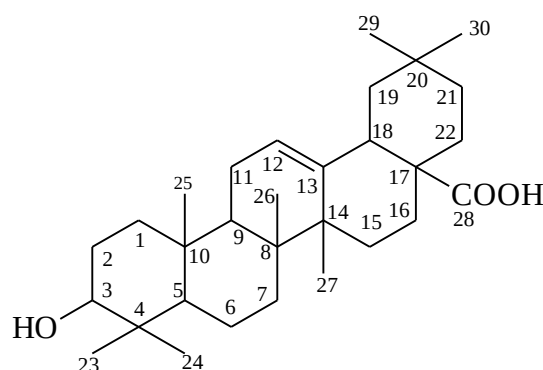


[48]



[49]

Os resultados conduziram à identificação de RCD8 como sendo ácido oleanólico [39], confirmando as fragmentações de massas exibidas pela Figura 32 e a comparação com dados de literatura:



[39]

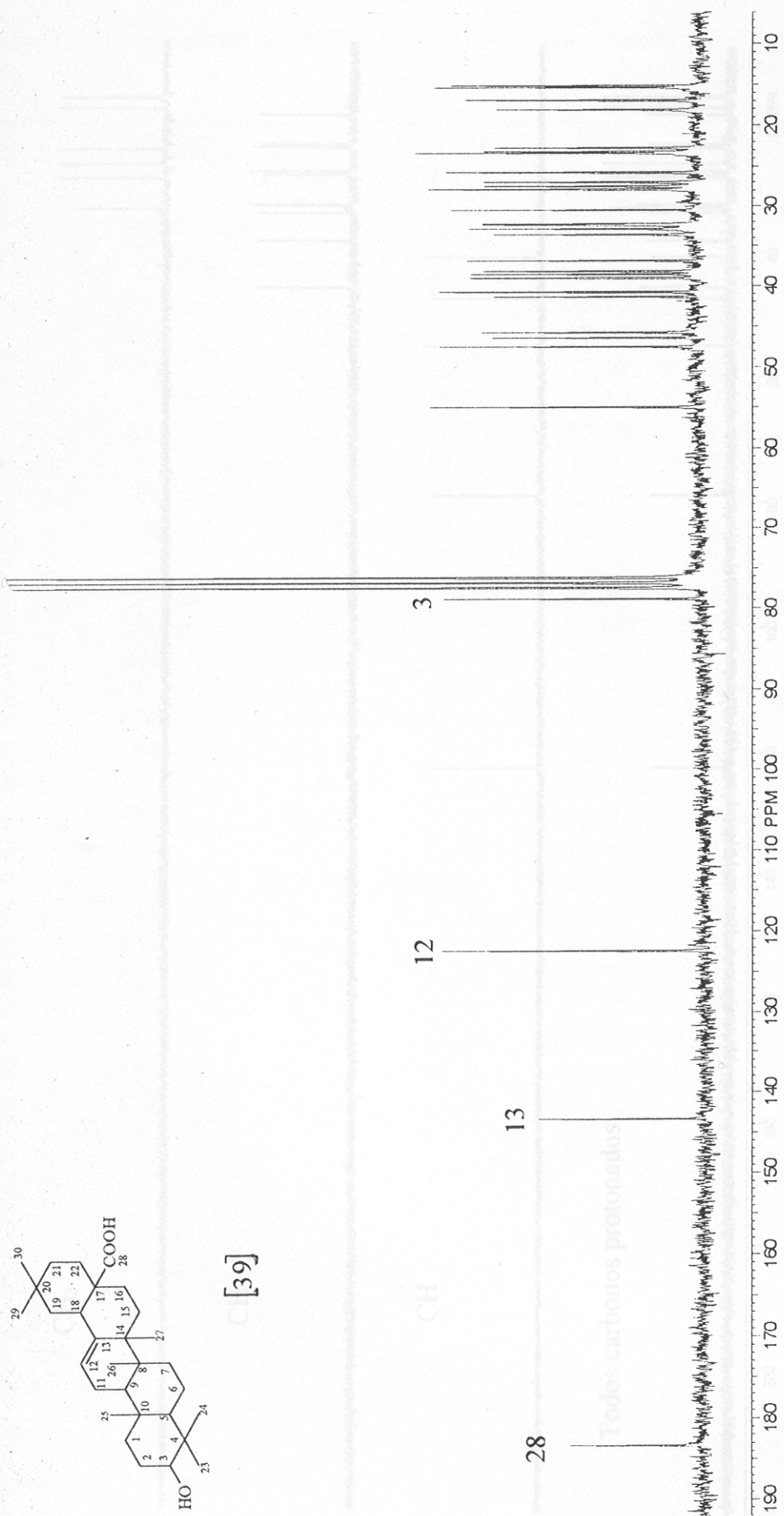


Figura 36 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,2 MHz) de RCD8.

Quadro 17 - Deslocamentos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) de olean-12-enos

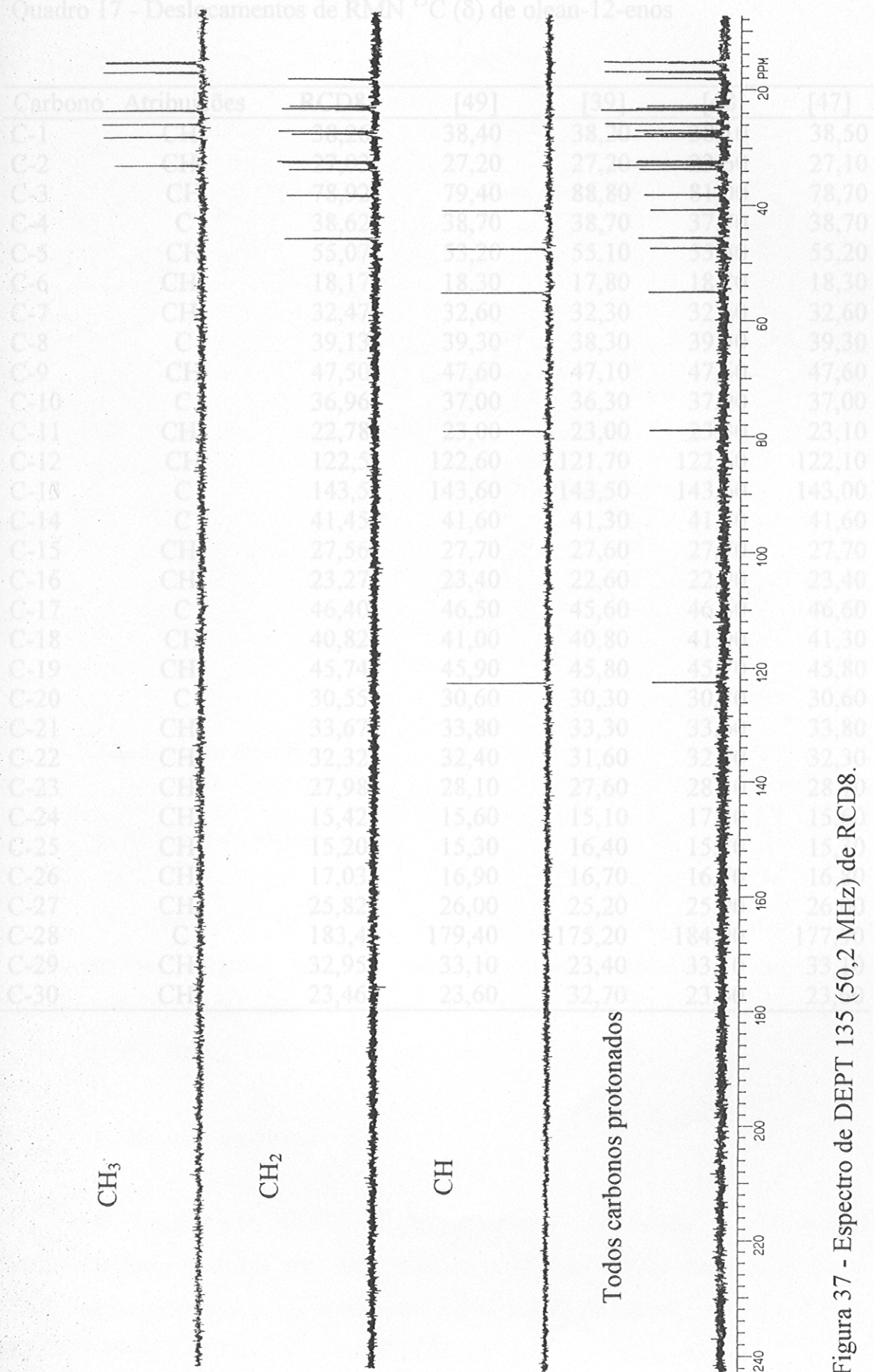
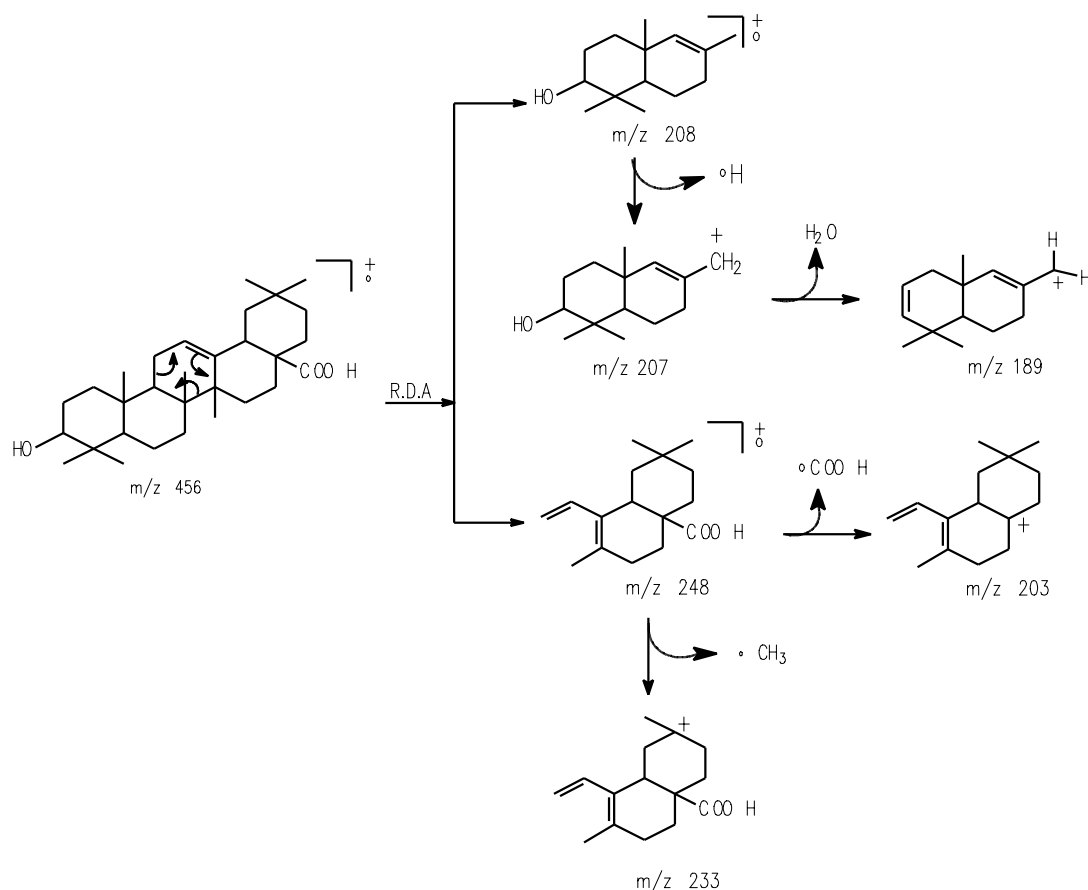


Figura 37 - Espectro de DEPT 135 (50,2 MHz) de RCD8.

Quadro 17 - Deslocamentos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) de olean-12-enos

| Carbono | Atribuições     | RCD8  | [49]   | [39]   | [48]   | [47]   |
|---------|-----------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| C-1     | CH <sub>2</sub> | 38,26 | 38,40  | 38,20  | 38,10  | 38,50  |
| C-2     | CH <sub>2</sub> | 27,03 | 27,20  | 27,20  | 23,60  | 27,10  |
| C-3     | CH              | 78,92 | 79,40  | 88,80  | 81,00  | 78,70  |
| C-4     | C               | 38,62 | 38,70  | 38,70  | 37,70  | 38,70  |
| C-5     | CH              | 55,07 | 53,20  | 55,10  | 55,40  | 55,20  |
| C-6     | CH <sub>2</sub> | 18,17 | 18,30  | 17,80  | 18,20  | 18,30  |
| C-7     | CH <sub>2</sub> | 32,47 | 32,60  | 32,30  | 32,60  | 32,60  |
| C-8     | C               | 39,13 | 39,30  | 38,30  | 39,40  | 39,30  |
| C-9     | CH              | 47,50 | 47,60  | 47,10  | 47,60  | 47,60  |
| C-10    | C               | 36,96 | 37,00  | 36,30  | 37,00  | 37,00  |
| C-11    | CH <sub>2</sub> | 22,78 | 23,00  | 23,00  | 23,40  | 23,10  |
| C-12    | CH              | 122,5 | 122,60 | 121,70 | 122,60 | 122,10 |
| C-13    | C               | 143,5 | 143,60 | 143,50 | 143,60 | 143,00 |
| C-14    | C               | 41,45 | 41,60  | 41,30  | 41,60  | 41,60  |
| C-15    | CH <sub>2</sub> | 27,56 | 27,70  | 27,60  | 27,70  | 27,70  |
| C-16    | CH <sub>2</sub> | 23,27 | 23,40  | 22,60  | 22,90  | 23,40  |
| C-17    | C               | 46,40 | 46,50  | 45,60  | 46,60  | 46,60  |
| C-18    | CH              | 40,82 | 41,00  | 40,80  | 41,00  | 41,30  |
| C-19    | CH <sub>2</sub> | 45,74 | 45,90  | 45,80  | 45,70  | 45,80  |
| C-20    | C               | 30,55 | 30,60  | 30,30  | 30,70  | 30,60  |
| C-21    | CH <sub>2</sub> | 33,67 | 33,80  | 33,30  | 33,60  | 33,80  |
| C-22    | CH <sub>2</sub> | 32,32 | 32,40  | 31,60  | 32,50  | 32,30  |
| C-23    | CH <sub>3</sub> | 27,98 | 28,10  | 27,60  | 28,40  | 28,10  |
| C-24    | CH <sub>3</sub> | 15,42 | 15,60  | 15,10  | 17,20  | 15,60  |
| C-25    | CH <sub>3</sub> | 15,20 | 15,30  | 16,40  | 15,20  | 15,30  |
| C-26    | CH <sub>3</sub> | 17,03 | 16,90  | 16,70  | 16,70  | 16,80  |
| C-27    | CH <sub>3</sub> | 25,82 | 26,00  | 25,20  | 25,90  | 26,00  |
| C-28    | C               | 183,4 | 179,40 | 175,20 | 184,00 | 177,90 |
| C-29    | CH <sub>3</sub> | 32,95 | 33,10  | 23,40  | 33,10  | 33,10  |
| C-30    | CH <sub>3</sub> | 23,46 | 23,60  | 32,70  | 23,60  | 23,60  |



### 3.1.3.3. Extrato etanólico

#### a. Mistura de álcoois -1

O constituinte RCE6, PF largo, quando submetido à análise por infravermelho, mostrou ser uma mistura contendo álcool alifático como componente principal pelas absorções: 3.300 ( $\nu\text{OH}$  de álcool), 2.870 ( $\nu\text{CH}$ ), 1.640 ( $\nu\text{C=O}$ , fraco), 1.025 e 1.070  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-O}$ ) (Figura 38).

#### b. Mistura de álcoois -2

O constituinte RCE7, PF largo, quando submetido à análise por infravermelho, mostrou ser uma mistura contendo álcool aromático como componente principal pelas absorções: 3.300 ( $\nu\text{OH}$  de álcool), 1.640 ( $\nu\text{C=O}$ ), 1.595, 1.499 e 1.470 ( $\nu\text{C=C}$  arom.), 1.050  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-O}$ ) (Figura 39).

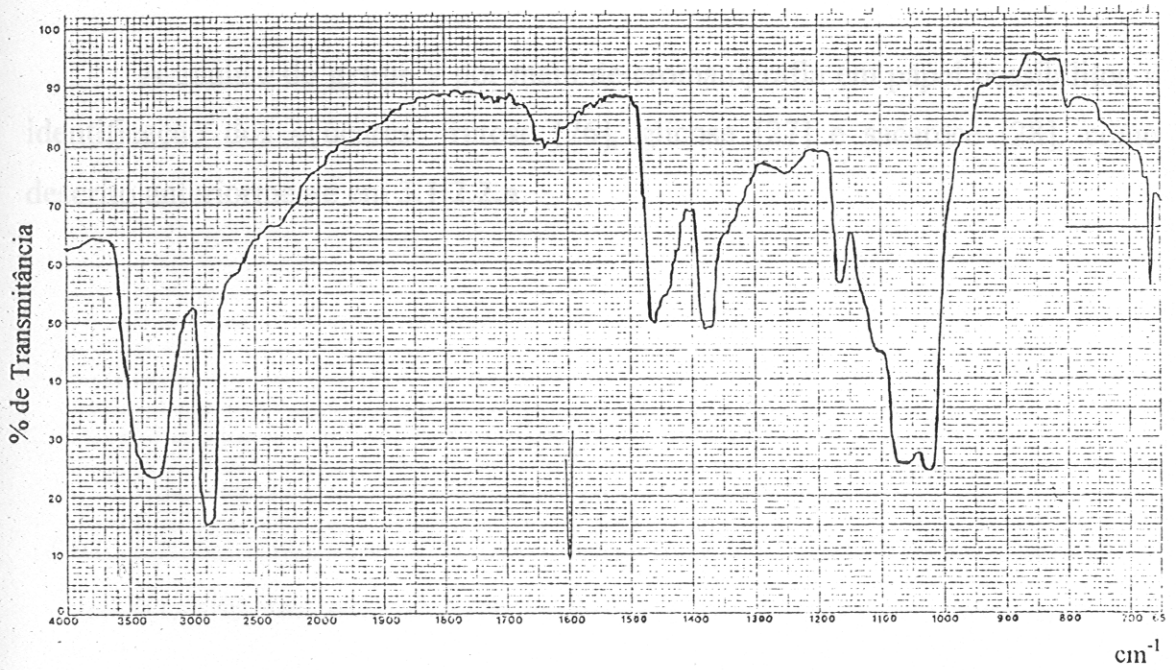


Figura 38 - Espectro de infravermelho (KBr) de RCE6.

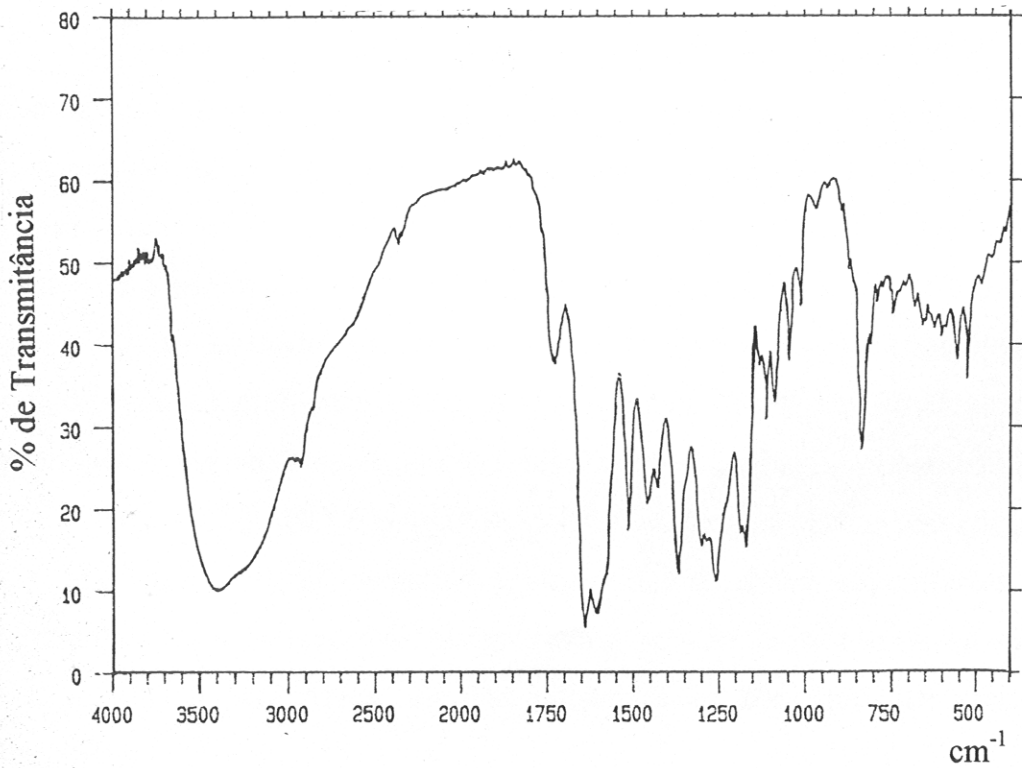


Figura 39 - Espectro de infravermelho (KBr) de RCE7.

### **c. Açúcares**

A análise do **grupo 9** por meio de cromatografia em papel possibilitou a identificação dos açúcares: frutose [26], glicose [27] e sacarose [28], como descrito anteriormente em **3.1.2.2.a**.



## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA CASCA DO FRUTO DE *Rheedia gardneriana* SOBRE *Meloidogyne incognita*, RAÇA 3**

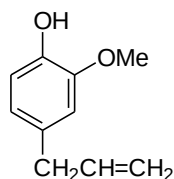
#### **1. INTRODUÇÃO**

Fitonematóides são parasitas que atacam as mais diversas culturas economicamente rentáveis, causando transtorno pela enorme perda todos os anos. Os danos advêm, na maioria das vezes, da penetração desses parasitas na raiz das plantas, onde eles competem pela absorção de nutrientes, diminuindo a resistência e facilitando o ataque por fungos e bactérias (SASSER, 1989).

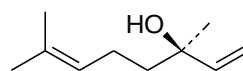
Em se tratando do controle desse patógeno, produtos sintéticos têm trazido inúmeros problemas em razão do acúmulo de resíduos tóxicos, que são carcinogênicos e persistentes no meio, resultando em poluição ambiental (SINGH et al., 1990; RIGITANO e BARBOSA, 1992). Diversas plantas são conhecidas pela capacidade de atrair nematóides, ou por agir de forma a neutralizar a ação atrativa de plantas hospedeiras, por prevenir a eclosão de juvenis ou impedir que estes atinjam a maturidade, ou por afetar-lhes os hormônios de reprodução (SASSER e CARTER, 1985).

Uma das respostas da planta à infecção por organismos fitopatogênicos é o acúmulo de produtos secundários do metabolismo, como alcalóides, terpenos,

fenóis, glicosídeos cianogênicos, thienil derivados, benzofuranos, ácidos carboxílicos, alcalóides, diterpenos e fenóis ditioacilenos extraídos de diversas plantas, tais como: *Tagetes* spp., *Helenium* sp., *Asparagus* sp., *Solanum tuberosum*, *Dahpne* sp., *Eragrostis* sp., *Ambrosia* sp. (BIRCH et al., 1993); eugenol [50] e linalol [51] isolados de folha de *Ocimun sanctum* e *O. basiculum* mostraram atividade nematicida (CHATTERJEE et al., 1982; SUKUL, 1993). Entretanto, os compostos fenólicos são os mais freqüentemente produzidos nas plantas enfermas, e sua produção está relacionada com a resistência de certas plantas a determinadas espécies de nematóides fitopatogênicos (FERRAZ et al., 1984). Este mesmo autor verificou que havia variações nos teores de fenóis totais em *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) infestada por *Meloidogyne incognita* e que os níveis altos destes compostos nem sempre estavam associados à maior resistência da planta.



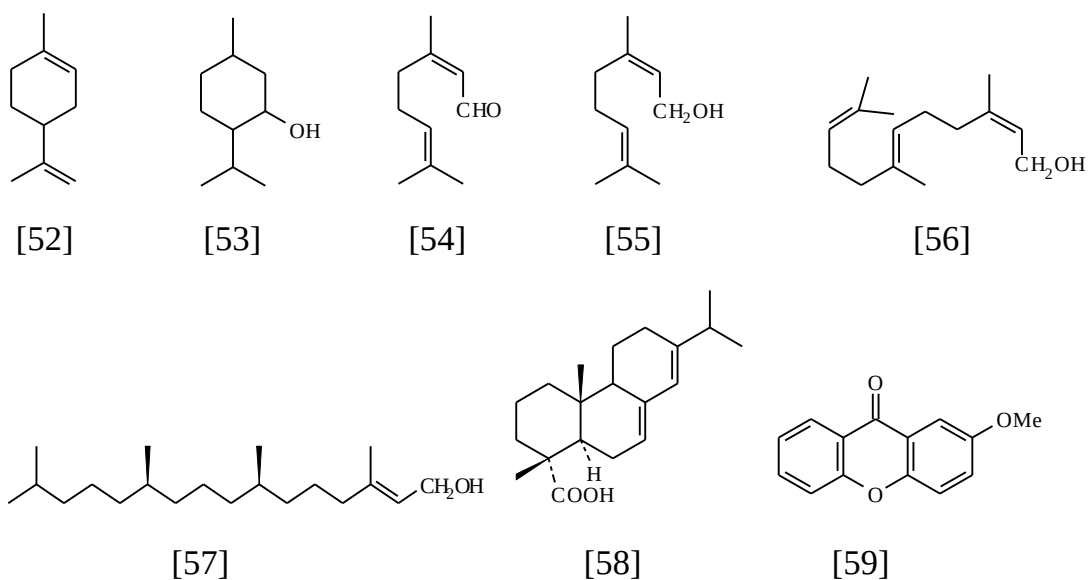
[50]



[51]

O uso de plantas chamadas antagonistas é um método eficiente de controle de nematóides e não oferece riscos ao meio ambiente. Por outro lado, a aplicação de extratos de plantas, ou incorporação de folhas ao solo, não é viável na maioria dos casos, pois a quantidade requerida para se obter uma alta eficiência é muito grande. Alguns extratos e óleos vegetais, entretanto, são eficientes quando empregados em tratamento de sementes ou imersão de raízes, o que torna viável o seu uso direto, principalmente em pequenas propriedades. Torna-se necessária a busca de compostos nematicidas que podem servir de base para o desenvolvimento de novos produtos, menos danosos ao homem e ao meio ambiente (FERRAZ e VALLE, 1995). Neste sentido, são testados extratos que podem conduzir ao isolamento de princípios ativos.

BABU e SUKUL (1990) testaram extratos aquosos e óleos essenciais contendo limoneno [52] e mentol [53] de folhas de *Hyptis suaveolens* sobre *Meloidogyne incognita* e verificaram sua ação nematicida. Resultados também foram positivos para citral [54], geraniol [55], farnesol [56], fitol [57], ácido abiético [58] e 2-metoxixantona [59]; este último é um dos componentes principais de *Mesua ferra* Linn. (Guttiferae) (SINGH et al., 1990).



SCRAMIN et al. (1987) avaliaram extratos (a 1%) de diferentes espécies e partes vegetais obtidos por extração com solventes orgânicos [hexano(H), clorofórmio(C) e etanol(E)], *in vitro*, quanto à atividade nematicida ou nematostática contra juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, raça 1. Dentre os 62 extratos de plantas avaliados, somente os extratos a seguir mostraram atividade potencial: *Tagetes minuta* (folha-H e caule-H), *Tagetes patula* (caule-C), *Cassia occidentalis* (fruto-E), *Ageratum conyzoides* (folha-C), *Vernonia condensata* (caule-H,C) e *Alomia fastigiata* (flor-H).

Neste ensaio buscou-se determinar, por meio de testes *in vitro*, a potencialidade dos constituintes, RCH1B, RCD8 e RCH5B, extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* para o controle de *Meloidogyne incognita*, raça 3.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Efeito de RCD8, RCH5B e RCH1B sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita*, raça 3**

#### **2.1.1. Obtenção das massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, raça 3**

As massas de ovos foram obtidas a partir de culturas puras de *Meloidogyne incognita*, raça 3, mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV, em tomateiro cv. Santa Cruz. As plantas foram removidas dos vasos, e os sistemas radiculares foram lavados delicadamente, para não perder as massas de ovos. Por meio de um microscópio estereoscópico e com a ajuda de uma pinça e um estilete, as massas de ovos foram retiradas individualmente e transferidas para câmaras de eclosão.

#### **2.1.2. Avaliação *in vitro* da atividade de RCD8, RCH5B e RCH1B sobre *Meloidogyne incognita*, raça 3**

Foram testadas as substâncias RCD8, RCH5B e RCH1B, usando-se suspensões na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Esses constituintes foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% em água destilada, utilizando

aparelho de ultra-som. Adicionaram-se 3,0 mL de cada suspensão à câmara de eclosão constituída de placa de Petri (5,0 cm de diâmetro), contendo tela de nylon com malha de 1 mm forrada com lenço de papel (tipo Kleenex). Nesse conjunto foram depositadas 10 massas de ovos, num total de cinco placas (repetições) por tratamento. Duas testemunhas foram utilizadas: uma onde se empregou somente água destilada (3,0 mL) e outra, a solução de DMSO a 1% (3,0 mL). As câmaras de eclosão foram mantidas à temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  na ausência de luz. As avaliações consistiram da contagem dos juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) às 48, 96, 144, 192 e 240 horas após exposição das massas de ovos aos extratos testados. Foram removidas as suspensões a cada avaliação, e outros 3,0 mL foram novamente adicionados às câmaras de eclosão. As contagens dos  $J_2$  foram efetuadas sob microscópio estereoscópico, usando câmara de contagem de Peters.

Posteriormente, escolheu-se RCD8, a qual apresentou a maior atividade de inibição da eclosão dos juvenis para estudar o efeito de dosagem sobre a eclosão de *M. incognita*, raça 3. Utilizaram-se as suspensões de RCD8 nas concentrações de 800, 400, 200, 100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em DMSO a 1%, repetindo-se o procedimento anterior.

Ao final das 240 horas retiraram-se as suspensões contendo RCD8, substituindo-as por água destilada, avaliando-se o número de  $J_2$  eclodidos em 288 horas e 336 horas, visando avaliar o caráter nematicida ou nematostático desta substância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de solvente água/DMSO a 1% para preparo das emulsões não influenciou significativamente a eclosão dos juvenis, quando comparado com a eclosão em água pura (Figura 1).

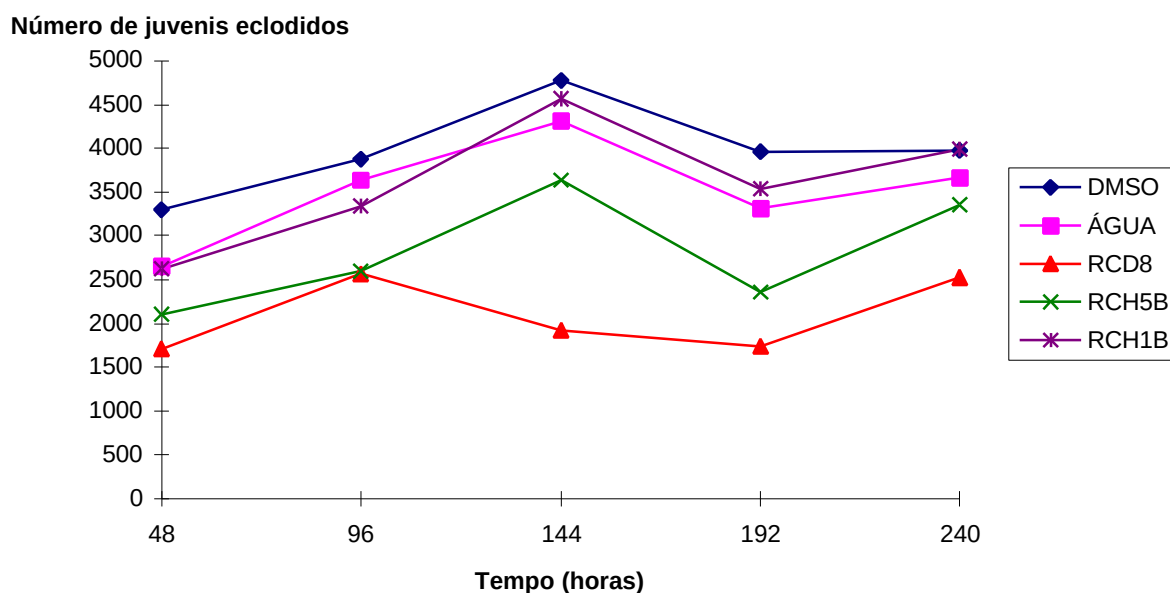
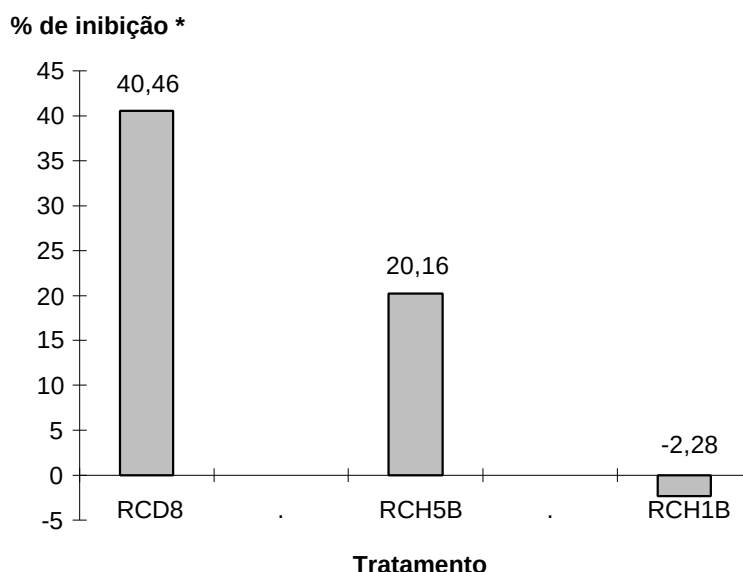


Figura 1 - Efeito de constituintes químicos extraídos da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a eclosão *in vitro* de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, raça 3, avaliados a cada 48 horas.

A Figura 2 mostra o efeito das suspensões das substâncias RCD8, RCH5B e RCH1B a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ao longo do tempo, em cinco avaliações a cada 48 horas após a montagem das câmaras de eclosão.



(\*A porcentagem é dada em relação ao número total de juvenis eclodidos na água).

Figura 2 - Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre *Meloidogyne incognita*, raça 3, na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ao final de 240 horas

Das três substâncias avaliadas, RCD8 apresentou maior porcentagem de inibição de eclosão dos juvenis de *M. incognita*, raça 3 (Figura 2). Esta substância é o ácido oleanólico, pertencente à classe dos triterpenóides pentacíclicos, e não foi encontrado na literatura relato algum sobre compostos desta natureza com atividade sobre fitonematóides.

O valor negativo referente a RCH1B (Figura 2) indicou ligeiro estímulo à eclosão dos juvenis. Esta substância é uma mistura de hidrocarbonetos insaturados cíclicos (sesquiterpenóides). Dos compostos similares descritos na literatura, somente os possuidores de oxigênio (cital [54], limoneno [52], etc.) demonstraram ação sobre fitonematóides (BABU e SUKUL, 1990; CHATTERJEE et al., 1982).

Já RCH5B demonstrou valor de inibição intermediário (Figura 2). É um composto pertencente à classe das benzofenonas preniladas, possuindo uma carbonila ligada ao núcleo aromático. Compostos aromáticos foram citados por FERRAZ et al. (1984) como fatores de resistência de plantas a fitonematóides.

Quando se avaliou o total de juvenis de *M. incognita* eclodidos até as 336 horas, tanto para o tratamento em que foi usada RCD8 e posterior troca por água destilada, como para o controle, notou-se que a taxa de eclosão de J<sub>2</sub> demonstrava tendência de crescimento, ou seja, a presença desta substância só estava causando retardamento da eclosão, não sendo verificada morte das larvas (Quadro 1), caracterizando-se, portanto, um efeito nematostático.

Quadro 1 - Somatório das médias de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*, raça 3, eclodidos na presença de diversas doses de RCD8 até 240 horas e 336 horas

| Tratamento              | Somatório das médias de J <sub>2</sub> eclodidos |       |                |
|-------------------------|--------------------------------------------------|-------|----------------|
|                         | até 240 horas                                    |       | até 336 horas  |
|                         | % de inibição                                    |       |                |
| 800 µg.mL <sup>-1</sup> | 1347,6 (164,3) <sup>a</sup>                      | 63,55 | 2393,6 (304,7) |
| 400 µg.mL <sup>-1</sup> | 1837,2 (304,0)                                   | 50,31 | 2806,8 (430,7) |
| 200 µg.mL <sup>-1</sup> | 2331,2 (319,8)                                   | 36,95 | 3648,0 (560,9) |
| 100 µg.mL <sup>-1</sup> | 2479,6 (376,4)                                   | 32,93 | 3564,8 (611,8) |
| 50 µg.mL <sup>-1</sup>  | 2994,8 (515,3)                                   | 19,00 | 3685,2 (688,2) |
| Controle                | 3737,2 (312,0)                                   | 0,00  | 4276,0 (328,1) |

<sup>a</sup>desvio-padrão.

Verificou-se que os valores de inibição da eclosão de J<sub>2</sub> (Quadro 1) mostraram comportamento logarítmico explicado pela curva  $Y = 21,671\ln(X) + 3,3369$  com um  $R^2 = 0,9809$  a 5% de significância (Figura 3). À medida que a concentração da substância aumentava, o percentual de inibição teve acréscimo rápido no início e tendência à estabilização a partir de 400 µg.mL<sup>-1</sup>, havendo acréscimo de somente 13,2% quando se passou para 800 µg.mL<sup>-1</sup>.



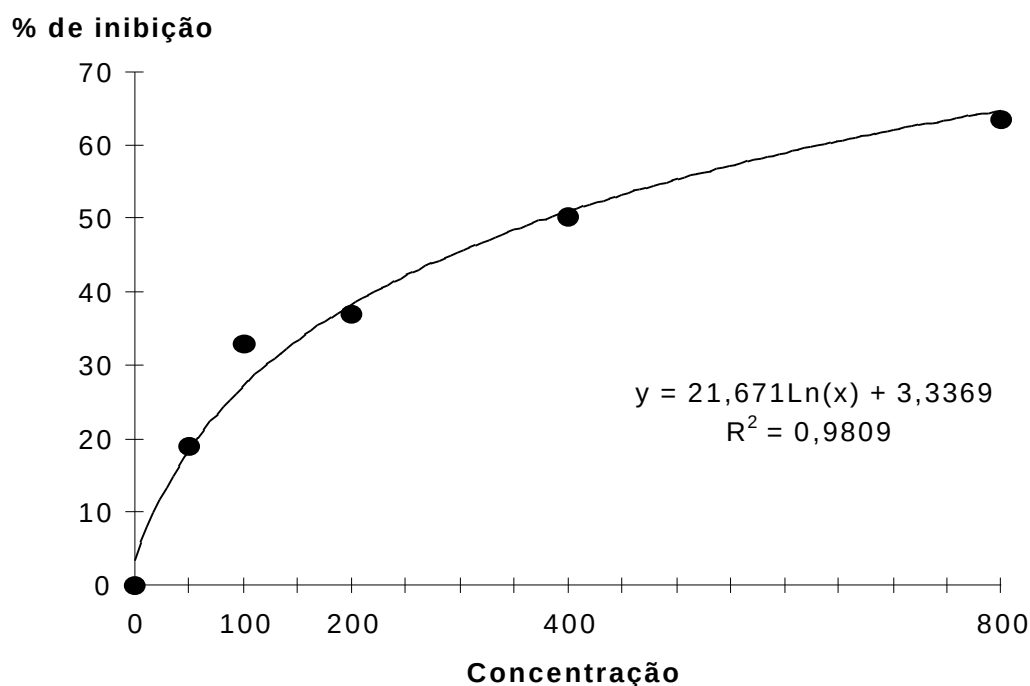


Figura 3 - Curva de regressão da concentração (em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de RCD8 versus a eclosão de juvenis *Meloidogyne incognita*, raça 3, ao final de 240 horas em relação à água.

Os valores de inibição, *in vitro*, obtidos com RCD8, não foram altos, quando comparados com compostos nematicidas conhecidos, por exemplo 2-metoxixantona [59], um dos componentes principais de *Mesua ferrea* Linn. (Guttiferae). Essa substância exibiu potencial nematicida sobre *Meloidogyne incognita*, com 72,4% de mortalidade a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e 54,6% a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  após 48 horas (SINGH et al., 1990).

Outros estudos, envolvendo esse constituinte, devem ser efetuados, porque todo tratamento visando ao controle de fitonematóides não é erradicante, e estas medidas objetivam sempre reduzir populações. Testes *in vivo*, em casa de vegetação, além de estudos da interação desse composto com a planta hospedeira, talvez possam promover melhor controle desses patógenos.

Comparando as classes dos compostos testados com os descritos na literatura (ZUCKERMAN et al., 1971), observou-se que a presença de grupamentos oxigenados (álcoois, ácidos, fenóis, etc.) está relacionada com o potencial nematicida ou nematostático.

Outro aspecto a ser considerado seria provocar modificações na sua estrutura química, com retirada ou introdução de grupamentos químicos, hidrogenação, etc., visando melhorar a atividade de RCD8 no controle de fitonematóides.

#### 4. CONCLUSÃO

Dos constituintes de *Rheedia gardneriana* testados, RCH1B, RCH5B e RCD8, no controle *in vitro* do fitonematóide *Meloidogyne incognita*, raça 3, RCD8 foi o que apresentou melhor resultado. Esse composto, um triterpeno pentacíclico, foi capaz de reduzir a população em 63,5% em 240 horas, na concentração de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mostrando um efeito nematostático. RCH5B (benzofenona) apresentou baixa atividade de inibição de eclosão (20,16%) e RCH1B, constituído de mistura de sesquiterpenos ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ ), não demonstrou atividade inibitória, ambos a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## CAPÍTULO 3

### EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA CASCA DO FRUTO DE *Rheedia gardneriana* SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

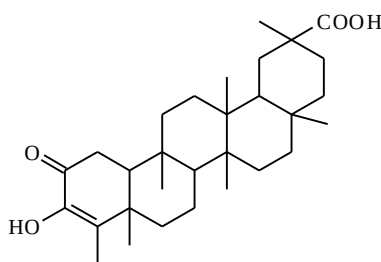
#### 1. INTRODUÇÃO

Diversas substâncias sintetizadas por plantas apresentam atividade antimicrobiana e estão envolvidas na resistência a doenças. Destacam-se as fitoalexinas, que são biossintetizadas em resposta a fatores bióticos e abióticos, participam das reações de defesa da planta e possuem estruturas diferentes dos produtos antimicrobianos conhecidos, além de estarem presentes em plantas comestíveis (MISAGHI, 1982; SATO et al., 1995; IZZO et al., 1995).

A literatura registra não só o uso de substâncias puras, como de extratos de plantas, no controle de enterobactérias patogênicas e fitobactérias.

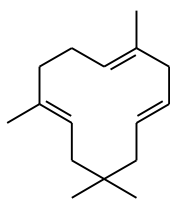
KAI et al. (1990) testaram os efeitos antimicrobianos de extratos de casca de *Tsuga heterophila* e verificaram que os extratos metanólico e acetônico, em solução de NaOH e aquoso, inibiram o crescimento de *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces scabies* e *Gibberella zeae*.

Já SOUZA et al. (1990) isolaram triterpenos pentacíclicos da casca de raiz de *Austroplenckia polpunea*, e o ácido 3-hidroxi-2-oxofriedelan-3-en-20 $\alpha$ -carboxílico [60] mostrou atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. typhimurium*. Extratos aquosos de chá e café mostraram, em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação, potencial para controle das fitobactérias *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (raças 1 e 2) e *P. s.* pv. *phaseolicola* (raça 1) (ALSTRÖM, 1992).

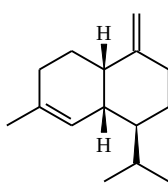


[60]

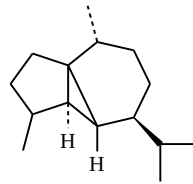
FOURNIER et al. (1994) determinaram a composição do óleo essencial de três espécies de *Xilopia*, utilizando CG/EM, constatando a presença dos terpenos:  $\alpha$ -humuleno [61],  $\alpha$ -copaeno [29],  $\gamma$ -muuroleno [62],  $\alpha$ -cubebeno [63], valenceno [64] e limoneno [52], além de compostos oxigenados como elemol [65] e cubenol [66], que exibiram moderadas atividades bacteriostática e fungistática.



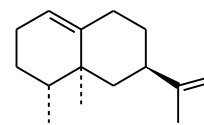
[61]



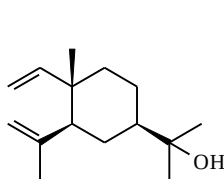
[62]



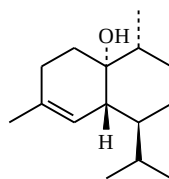
[63]



[64]



[65]

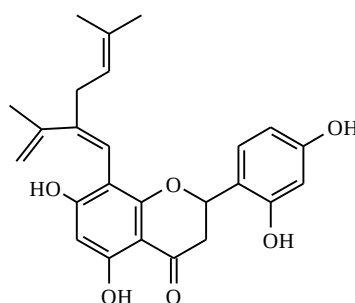


[66]

VILLASEÑOR et al. (1995) verificaram a ação de extratos de frutos, folhas e flores de *Cucurbita maxima* sobre *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. O

extrato etanólico do fruto inibiu completamente o crescimento de *B. subtilis* e parcialmente o de *E. coli*.

SATO et al. (1995) verificaram que a 5,7,2',4'-tetrahidroxi-8-lavandulil-flavanona [67] exibiu efeito sobre *Staphylococcus aureus* em concentrações que variaram de 3,13 a 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; estes autores também avaliaram o sinergismo desta substância com outros agentes antimicrobianos e observaram em alguns casos maior eficiência na inibição de crescimento bacteriano.



[67]

Outro composto possuindo grupamento cetônico ligado ao núcleo aromático (benzofenona prenilada), kolanona [35], também mostrou grande atividade, a 10000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sobre crescimento de enterobactérias patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*), com halos de inibição médios de 14 mm, enquanto no controle eles eram de 1,5 mm.

Neste ensaio procurou-se avaliar a sensibilidade *in vitro* de fitobactérias e enterobactérias patogênicas, quando cultivadas em meios contendo constituintes químicos extraídos da casca do fruto de *Rheedia gardneriana*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Origem e cultivo dos microrganismos**

Os microrganismos fitopatogênicos empregados neste trabalho foram procedentes da bacterioteca do Departamento de Fitopatologia da UFV. Foram utilizadas as seguintes bactérias: *Agrobacterium tumefaciens* (galha de coroa em rosáceas), *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (cancro bacteriano do tomateiro), isolado mas não identificado (em milho), *Pseudomonas solanacearum* (murcha bacteriana das solanáceas) e *Erwinia* sp. (podridão-mole). Dentre os microrganismos enteropatogênicos do Departamento de Microbiologia da UFV, foram utilizadas as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os isolados foram cultivados em meio 523, de KADO e HESKETT (1970), e preservados sob óleo mineral a 4°C.

### **2.2. Sensibilidade *in vitro* de diferentes fitobactérias a RCH1B, RCH5B e RCD8**

A sensibilidade *in vitro* das bactérias fitopatogênicas estudadas a RCH1B, RCH5B e RCD8 foi determinada pela observação de seus efeitos no crescimento de colônias. Para este estudo, foram empregados o meio 523 e

suspensões (tindalizadas) a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de RCH1B, RCH5B e RCD8 em água destilada com dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%.

Ao meio 523, com concentração final de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos constituintes em estudo, adicionou-se 0,1 mL de cada suspensão bacteriana, com pipeta automática, espalhando com alça de Drigalsky, em câmara asséptica de fluxo laminar. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas, e observados os crescimentos bacterianos em relação ao controle (somente meio 523 e suspensão bacteriana). Para cada bactéria foram realizadas quatro repetições.

### **2.2.1. Sensibilidade de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* a diferentes concentrações de RCH5B**

O procedimento para esta avaliação foi o mesmo descrito em 2.2, sendo utilizado o meio 523 contendo RCH5B nas concentrações de 2, 4, 8, 16 e  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram realizadas quatro repetições para cada concentração, bem como para o controle.

### **2.3. Sensibilidade *in vitro* de diferentes enterobactérias a RCH1B, RCH5B e RCD8**

A sensibilidade *in vitro* das bactérias enteropatogênicas estudadas a RCH1B, RCH5B e RCD8 foi determinada pela observação de seus efeitos no crescimento de colônias. Para este estudo, foram empregados o meio 523 e suspensões (autoclavadas a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos) a  $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de RCH1B, RCH5B e RCD8 em água destilada com dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%.

Ao meio contendo concentração final de  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos constituintes em estudo adicionou-se 0,1 mL de cada suspensão bacteriana, com pipeta automática, espalhando com alça de Drigalsky, em câmara asséptica de fluxo laminar. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , por 30 horas, e observados os crescimentos bacterianos em relação ao controle (somente meio 523 e suspensão bacteriana). Para cada bactéria foram realizadas quatro repetições.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de DMSO a 1% em água como agente dispersante dos constituintes testados foi apropriada, uma vez que em testes preliminares não foi verificada qualquer atividade deste produto sobre o crescimento bacteriano, quando comparado ao controle (sem DMSO).

Já no teste qualitativo, somente RCH5B demonstrou atividade sobre as fitobactérias *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* e o isolado do milho (não identificado) (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação do crescimento bacteriano após 24 horas de incubação, a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em meio de cultura contendo RCH1B, RCH5B e RCD8 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$

| FITOBACTÉRIA                                               | RCH1B | RCH5B | RCD8 |
|------------------------------------------------------------|-------|-------|------|
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                           | +     | +     | +    |
| <i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i> | +     | -     | +    |
| isolado do milho (não identificado)                        | +     | -     | +    |
| <i>Pseudomonas solancearum</i>                             | +     | +     | +    |
| <i>Erwinia</i> sp.                                         | +     | +     | +    |

(+) crescimento; (-) ausência de crescimento.

Em seguida, no teste quantitativo, avaliou-se o comportamento de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* na presença de RCH5B em diferentes concentrações. Observou-se que não houve crescimento bacteriano nos meios contendo concentrações de 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Na concentração de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  o crescimento foi comparável ao ocorrido no controle.

Em relação às enterobactérias, este teste *in vitro* permitiu constatar que RCD8 e RCH5B, na concentração de 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , promoveram inibição de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Quadro 2). Nos meios contendo RCD8 notou-se ainda algum crescimento, quando comparado ao controle, denotando que na concentração de 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não houve completa inibição do crescimento bacteriano. Já para RCH5B nenhum crescimento bacteriano foi verificado, mesmo em observações após 48 horas de incubação.

Quadro 2 - Avaliação do crescimento bacteriano após 30 horas de incubação, a 37°C, em meio de cultura contendo RCH1B, RCH5B e RCD8, a 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

| ENTEROBACTÉRIA                | RCH1B | RCH5B | RCD8     |
|-------------------------------|-------|-------|----------|
| <i>Escherichia coli</i>       | +     | +     | +        |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | +     | -     | <u>±</u> |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | +     | +     | +        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | +     | -     | <u>±</u> |

(+) crescimento; (±) crescimento parcial; (-) ausência de crescimento.

As substâncias RCH5B (benzofenona) e RCD8 (triterpenóide) mostraram-se promissoras no controle de algumas bactérias, e os compostos com natureza química semelhante [35] e [60], com oxigênio na estrutura, já haviam mostrado atividade antibacteriana (SOUZA et al., 1990; HUSSAIN et al., 1982; SATO et al., 1995). Já a não-atividade de RCH1B pode estar associada à ausência de grupamentos oxigenados, uma vez que estruturas semelhantes, porém possuindo oxigênio na estrutura (FOURNIER et al., 1994), inibiram o crescimento de bactérias. Estes estudos são importantes e servem de base para

outras investigações mais detalhadas que podem auxiliar no entendimento do mecanismo de ação das substâncias, além de possibilitar o uso das estruturas químicas como modelo para síntese de novos compostos antibacterianos.

#### 4. CONCLUSÃO

Dos constituintes testados, RCH5B inibiu totalmente o crescimento, *in vitro*, da fitobactéria isolada do milho (não identificada), a  $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* a  $4\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ , além das enterobactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* a  $80\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já RCD8 apresentou inibição parcial a  $80\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  das enterobactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

## **CAPÍTULO 4**

### **EFEITO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EXTRAÍDOS DA CASCA DO FRUTO DE *Rheedia gardneriana* SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Sorghum bicolor***

#### **1. INTRODUÇÃO**

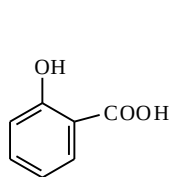
A intoxicação do solo e da água por resíduos de herbicidas e pesticidas, utilizados na agricultura, mostram reflexos sobre a fauna silvestre, tanto terrestre quanto aquática, e vêm levando os governos de diferentes países a estabelecerem leis cada vez mais rigorosas contra o uso indiscriminado de agrotóxicos (RICE, 1984).

Busca-se, portanto, o controle das pragas por métodos alternativos menos agressivos ao meio ambiente. Neste contexto surge a alelopatia, uma forma de competição em que o controle de uma espécie sobre a outra se faz por meio de substâncias químicas, liberadas para o meio pelas diferentes espécies. Da mesma forma que outros compostos de grande uso farmacológico foram descobertos em plantas, moléculas com efeitos alelopáticos têm também sido detectadas em plantas de diferentes famílias vegetais (RICE, 1984).

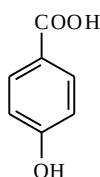
Torna-se necessário, entretanto, o conhecimento das fontes naturais desses produtos, quais são eles e como atuam na inibição e no crescimento de

outras espécies vegetais (RICE, 1984). Neste sentido, verifica-se que pesquisas envolvendo testes alelopáticos vêm sendo efetuadas com substâncias naturais de diversas classes químicas.

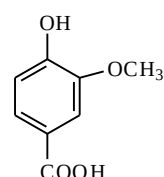
TRIPATHI et al. (1981) relatam os efeitos alelopáticos de *Eupatorium adenophorum* e sua interferência no crescimento de outras espécies vegetais, o mesmo sendo verificado por EINHELLIG e RASMUNSEN (1978) em relação aos ácidos salicílico [68], p-OH-benzóico [69], vanílico [70], 0-coumárico [71], p-OH-cinâmico [72] e ferúlico [73]. HALLIGAN (1975) relata o isolamento dos terpenos com efeito alelopático extraídos de *Salvia leucophylla*: 1,8 cineole [74], canfora [75],  $\alpha$ -pineno [76],  $\beta$ -pineno [77], canfeno [78] e thyjona [79]; e MULLER (1970) relata o uso de terpenos isolados de arbustos. O papel destes terpenos está relacionado com sua presença em folhas; eles são voláteis, formando nuvens de vapor ao redor de outras plantas, estão presentes nos solos rodeando as plantas, agem sobre os microrganismos do solo e têm um efeito significativo na germinação de sementes. Outros terpenóides com efeitos alelopáticos foram extraídos de *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Artemisia absinthium* e *Ambrosia psilostachya* (MULLER, 1970; GANT e CLEBSH, 1975; NEIL e RICE, 1971).



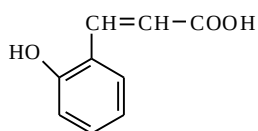
[68]



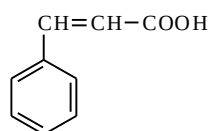
[69]



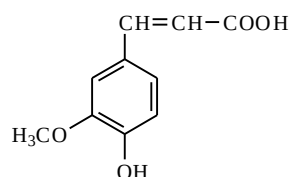
[70]



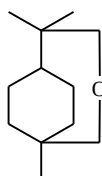
[71]



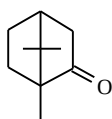
[72]



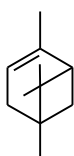
[73]



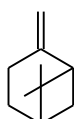
[74]



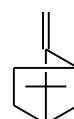
[75]



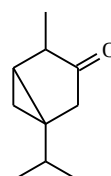
[76]



[77]



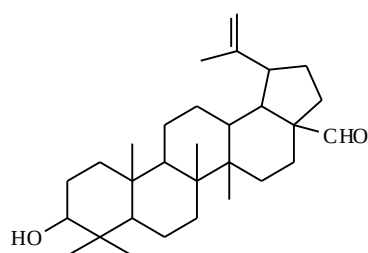
[78]



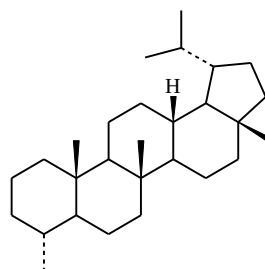
[79]

Sesquiterpenóides contendo o esqueleto básico de cadineno [28] são produzidos por uma grande variedade de plantas com ação alelopática (TALWAR et al., 1992). Dessa forma, BARUAH et al. (1994) estudaram o efeito de cadinenos isolados de *Eupatorium adenophorum* e verificaram seus efeitos inibitórios na germinação de sementes de *Allium cepa*, *Raphanus sativus* e *Cucumis sativus*.

Assim como os mono e sesquiterpenóides, os triterpenóides têm sido testados como aleloquímicos. MACIAS et al. (1994) isolaram os triterpenóides lupeol [11], betulina [12], aldeído betulínico [80] e norlupano [81] de frações de *Melilotus mesanesis* que foram testadas sobre sementes de *Cucumis sativus*, mostrando baixo efeito de redução de crescimento de radícula.



[80]



[81]

Neste capítulo avaliou-se o potencial herbicida de constituintes extraídos da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre sementes de *Sorghum bicolor*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de sementes de *Sorghum bicolor* a RCH1B, RCH5B e RCD8

Este ensaio foi feito com o objetivo de avaliar o potencial herbicida de RCH1B, RCH5B e RCD8 sobre o crescimento de radícula das sementes de *Sorghum bicolor* (sorgo), seguindo-se a técnica de EINHELLING e RASMUNSEN (1983). Estes constituintes químicos foram dissolvidos em clorofórmio (pesados de forma a dar a concentração final desejada) e transferidos para recipientes com tampas rosqueadas de 8,0 cm de diâmetro por 5,0 cm de altura, contendo dois discos de papel Watman N<sup>o</sup> 1 no fundo, como absorventes. Deixou-se evaporar todo o solvente por 24 horas à temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 2,0 mL de água destilada, de forma que as concentrações finais, para os diferentes pesos, fossem 50, 100, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram colocadas, em cada recipiente, 20 sementes selecionadas de *Sorghum bicolor*, incubando em germinador a 25°C por 72 horas, quando se mediu o tamanho das radículas. Foram realizadas quatro repetições e utilizou-se uma testemunha que continha somente água destilada.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico (teste de Tukey a 5% de erro).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação foi maior que 93% nos tratamentos, demonstrando a boa qualidade das sementes utilizadas, como pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 - Porcentagem de germinação e médias dos comprimentos das radículas das sementes de *Sorghum bicolor* tratadas com os constituintes químicos RCH1B, RCH5B e RCD8

| Tratamento | Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |           |           |           | % de germinação <sup>b</sup> |
|------------|----------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------------|
|            | 1000                                   | 500       | 100       | 10        |                              |
| RCH1B      | 1,8(0,48) <sup>a</sup>                 | 1,7(0,55) | 2,1(0,10) | 2,2(0,24) | 93,4                         |
| RCH5B      | 1,4(0,23)                              | 1,5(0,38) | 1,7(0,40) | 1,6(0,13) | 93,1                         |
| RCD8       | 2,0(0,64)                              | 2,1(0,30) | 2,1(0,15) | 2,0(0,33) | 95,6                         |
| Testemunha | 1,8(0,28)                              | 1,8(0,28) | 1,8(0,28) | 1,8(0,28) | 93,8                         |

<sup>a</sup> o valor entre parênteses é o desvio-padrão para as médias relacionadas.

<sup>b</sup> foram consideradas como germinadas as sementes com radículas maiores que 0,1 cm.

Os tratamentos utilizando RCH5B a 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  mostraram diferença significativa quando comparados ao testemunha; e os valores de comprimentos de radícula, 1,5 e 1,4 cm, mostraram que houve 16,7 e 22,2%,

respectivamente, de inibição de crescimento da radícula. Essa substância é uma benzofenona prenilada (clusianona [36]), possuindo caráter aromático, o que talvez possa justificar essa atividade, uma vez que compostos aromáticos estão associados à resistência de plantas, como já verificado por EINHELLIG e RASMUNSEN (1978). Os demais constituintes testados não exibiram qualquer atividade sobre a germinação de sementes de *Sorghum bicolor*.

#### **4. CONCLUSÃO**

Dos constituintes avaliados (RCH1B, RCH5B e RCD8), somente RCH5B apresentou potencial efeito alelopático, e os demais não apresentaram atividade *in vitro*, nas concentrações testadas, para inibição de crescimento de radícula de sementes de *Sorghum bicolor*.

## RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo químico do fruto de *Rheedia gardneriana* (casca e polpa) possibilitou o isolamento e a identificação dos seguintes constituintes: RCH1B (sesquiterpenos -  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -muuroleno, cadineno), ésteres de ácidos graxos (palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato), açúcares (glicose, sacarose, frutose), RPH1 (esteróides - estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol), RCD8 (triterpenóide pentacíclico - ácido oleanólico) e RCH5B (benzofenona - clusianona). Dentre os constituintes não identificados, estão: RCH1A (mistura de hidrocarbonetos), RCH5A (mistura de hidrocarbonetos insaturados), RCE6 e RCE7 (mistura de álcoois) e RPH2 (mistura de ésteres graxos de cadeia longa).

A identificação dos sesquiterpenos e do ácido oleanólico é fato inédito nessa planta e no gênero *Rheedia*, assim como os ensaios biológicos *in vitro*.

O constituinte químico RCH5B, na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , causou 20,16% de inibição de eclosão do fitonematóide *Meloidogyne incognita*, raça 3, além de inibir, a  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o crescimento das enterobactérias *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, ao lado da fitobactéria *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganenese* na concentração mínima de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Quanto ao potencial alelopático, RCH5B promoveu inibição de 16,7 e 22,2% na germinação de sementes de *Sorghum bicolor* (sorgo) nas concentrações de 500 e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, e nas concentrações de 100 e  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  não houve efeito de inibição.

Dos constituintes testados, o RCD8 demonstrou maior potencial para controle do fitonematóide *Meloidogyne incognita*, raça 3, além de causar inibição moderada no crescimento das enterobactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* a  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

RCH1B não apresentou potencial para controle dos patógenos testados, nem inibição de germinação de sementes de *Sorghum bicolor*.

Serão feitos mais estudos, visando dar continuidade a este trabalho, tanto na purificação e identificação das substâncias com estruturas não-elucidadas, como em testes específicos com as substâncias RCD8 e RCH5B em bactérias patogênicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSTRÖM, S. Antimicrobial activity of tea and coffee wastes against some plant pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. **J. of Phytopathology**, v.136, n.6, p.329-334, 1992.
- ARAGÃO, P.C., TOLEDO, J.B., MORAIS, A.A., BRAZ-FILHO, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química Nova**, v.13, n.3, p.254-259, 1990,.
- BABU, S.P., SUKUL, N.C. Essential oils as nematocidal principles. **Environmental & Ecology**, v.8, n.4, p.1118- 1120, 1990.
- BARUAH, N.C., SARMA, J.C., SARMA, S. et al. Seed germination and growth inhibitory cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **J. of Chem. Ecology**, v.20, n.8, p.1885-1892, 1994.
- BEZERRA, M.Z.B, CAMPELO, P.A., MACHADO, M.I.L. et al. Constituintes químicos isolados de três espécies do gênero *Sclerolobium*. **Química Nova**, v.17, n. , p.205-209,1994,.
- BIRCH, A.N.E., ROBERTSON, W.M., FELLOWS, L.E. Plant products to control plant parasitic nematodes. **Pestic. Sci.**, v.31, p.141-145, 1993.
- BOTTA, B., MARQUINA MAC-QUHAE, M., DELLE MONACHE, G. et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, V. Biflavonoids and xanthochimol. **J. Nat. Prod.**, v.47, n.3, p.1053, 1984.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v.17, n.5, p.405-445, 1994.

- BRAZ-FILHO, R., CAVALCANTE DE MAGALHÃES, G., GOTTLIEB, O.R.  
Xanthones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.9, n.3, p.673,1970.
- BREITMAIER, E. **Structure elucidation by nmr in organic chemistry: a practical guide**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. 265 p.
- BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D.H. **Mass espectrometry of organic compounds**. San Francisco: Holden-Day, 1967. 690 p.
- CHATTERJEE, A., SUKUL, N.C., LASKAR, S. et al. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. **Journal Of Nematology**, v.14, n.1, p.118-120, 1982.
- CHEUNG, T. H., YAN, T. C. Constituents of Diptereocarpaceae resins. **Aust. J. Chem.**, v.25, p.2003-2012, 1972.
- CHEUNG, T.H., WILLANSON, D. G. Nmr signals of methly groups of triterpenes with oxygen functions at positions 2, 3 & 23. **Tetrahedron**, v.25, n.1, p.119-128, 1969.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. v.1, p.232-234.
- DELLE MONACHE, F., DELLE MONACHE, G., GACS-BAITZ, E. Prenylated benzophenones from *Clusia sadiensis* **Phytochemistry**, v.30, n.6, p.2003-2005, 1991.
- DELLE MONACHE, F., DELLE MONACHE, G., PINHEIRO, R.M. et al. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0<sup>3,7</sup>]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v.27, n.7, p.2305-2308, 1988.
- DELLE MONACHE, G., BOTTA, B., DE MELLO, J.F. et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, VI. Three new xanthonas from *Rheedia Brasiliensis*. **J. Nat. Prod.**, v.47, n.4, p.620-625, 1984.
- DELLE MONACHE, G., DELLE MONACHE, F., BETTOLO, G.B.M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, II. Prenylated xanthones from *Rheedia Gardneriana*. **J. Nat. Prod.**, v.46, n.5 , p.655-659, 1983.
- DELLE MONACHE, G., DELLE MONACHE, F., WATERMAN, P.G. et al. Minor xanthones from from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.23, n.8, p.1757-1759, 1984.
- DREYER, D. Xantochimol from *Clusia Rosea* (Guttiferae). **Phytochemistry**, v.13, n.12, p.2883-2884, 1974.

- EINHELLIG, F.A, RASMUSSEN, J.A., Synergistic inhibitory effects of vanillic and *p*-hidroxybenzoic acids on radich and grain sorghum. **J. Chem. Ecol.**, v.4, n.3, p. 425-436, 1978.
- EINHELLING, M.K.S., RASMUSSEN, J.A. **Plant growth regulators**. London: John Wiley & Sons, 1983. v.1, 251 p.
- FERRAZ, E.C.A., ORCHARD, J.E., LOPEZ, A.S. Resposta da pimenta-do-reino à infestação por *Meloidogyne incognita* em relação ao teor de fenóis totais. **Revista Theobroma**, v.14, n.3, p.217-227, 1984.
- FERRAZ, S., VALLE, L.A.C. do, Utilização de plantas antagonistas no controle de fitonematóides. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL, 1995, Rio Quente. **Resumos...** Rio Quente: Sociedade Brasileira de Nematologia/Organização dos Nematologistas da América Tropical, 1995, p.257-276.
- FLORA Brasiliensis**. New York: Verlag von J. Cramer, v.12, pte.1, p.462-463, 1967.
- FOURNIER, G., HADJIAKHOONDI, A., LEBOEUF, M. et al. Volatile constituents of *Xylopi frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, v.8, n.3, p.166-169, 1994.
- GANT, R.E, CLEBSH, E.E.C. The allelopathic influences of *Sassafras albidum* old field succession in Tennessee. **Ecology**, v.56, n.3, p.604-615, 1975.
- GOULART, M.O.F., SANTANA, A.E.G, LIMA, R.A. et al. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolonas a e b. **Química Nova**, v.16, n.2, p.95-100, 1993.
- HALLIGAN, J.P. Toxic terpenes from *Artemisia californica*. **Ecology**, v.56, n.4, p.999-1003, 1975.
- HUSSAIN, R.A., OWEGBY, A.G., PARIMOO, P. et al. Kolanone, a novel polyisoprenilated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia Kola*. **Planta Medica**, v.44, p.78-81, 1982.
- ITÔ, S., MITSUAKI, K., MAKOTO, S. et al. Substituents effects on the methy signals in the nmr spectra of olean-12-en-28-ol of the hidroxyl and acetoxyl groups. **Tetrahedron Letters**, v.25, n.34, p.2905, 1960.



- IZZO, A.A., DI CARLO, G., BISCARDI, D. et al. Biological screening of italian medicinal plants for antibacterial activity. **Phytotherapy Research**, v.9, n.4, p.281-286, 1995.
- KADO, C.I., HESKETT, M. G. Selective medium for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969-979, 1970.
- KAI, H., UEDA, T., SAKAGUCHI, M. Antimicrobial activity of bark-compost extrats. **Soil Biol. Biochem**, v.22, n.7, p.983-986, 1990.
- LOYAZA, I., ABUJDER, D., ARANHA, R. et al. Essential oils of *Baccharis salicifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v.38, n.2, p.381-389, 1995.
- MABRY, T.J, MARKHAM, K.R., THOMS, M.B. **The sistematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 690 p.
- MACIAS, F.A, SIMONET, A.M., ESTEBAN, M.D. Potencial allelopathic lupane triterpenes from bioative fratinos of *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, v.36, n.6, p.1369-1379, 1994.
- MANDAL, S., PRABHASH, C das, JOSHI, P.C. Naturally occurring xanthones from terrestrial flora. **J. Indian Chem. Soc.**, V.69, p. 611-636, 1992.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Ed. UFC, 1988. 126p.
- MISAGHI, J.I. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. New York: Plenum Press, 1982. 287p.
- MULLER, K. O. Hipersensitivity. In: HORSFALL, J.G., DIMOND, A.E. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 1970. v.1, p.469-519.
- NEIL, R.L., RICE, E.L. Possible role of *Ambrosia psilostachya* on patterning and succession in old-fields. **Am Midl. Natr.**, v.86, p.344-357, 1971.
- OLIVEIRA, W.G. **Estudos químicos de *Tovomita macrophylla* walp.** Belo Horizonte: UFMG, 1976. 143p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1976.
- PATRA, A., MUKHUPADHYAY, L., ALOK, K. et al. <sup>13</sup>C-nmr assigments of some friedelanes and taraxasteranes. **Organic Magnetic Ressonance**, v.17, n.3, p.166-168, 1981.

- PINTO, A.C., SIMONI, M.L.P.S.C., SOCORRO, M.P., et al. Misturas naturais de esteróides, uma alternativa para aplicação de padrões em análises por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.17, n.4, p.333-335, 1994.
- POUCHERT, C.J. **The Aldrich library of nmr spectra**. Wisconsin: Aldrich Chemical Company, 1981. v.2, 1220p.
- RAMA RAO, A.V., VENKATSWAMY, G., PENDSE, A.D. Camboginol and Cambogin. **Tetrahedron Letters**, v.21, n.20, p.1975-1978, 1980.
- RICE, E.L., **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. 424 p.
- RIGITANO, R.L.O., BARBOSA, T.M.L. A degradação do inseticida-nematicida Aldicarbe em quatro diferentes solos. - In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, 1992, Lavras. **Resumos...** Lavras: ESAL, 1992. p.21.
- SASSER, J.N., CARTER, C.G. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. v.1, p.11-17.
- SASSER, J.N. **Plant - parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy**. Raleigh: North Carolina State University/Consortium for International Crop Protection., 1989. 115 p.
- SATO, M., TSUCHIYA, H., TAKASE, I. et al. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. **Phytotherapy Research**, v.9, n.7, p.509-512, 1995.
- SCRAMIN, S., SILVA, H.P., FERNANDES, L.M.S. et al. Avaliação biológica de extratos de 14 espécies vegetais sobre Meloidogyne incognita raça 1. **Nematologia Brasileira**, v.11, p.89-102, 1987.
- SEO, S., TOMITA, Y., TORI, K.  $^{13}\text{C}$ -nmr spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara, tissue cultures. **Tetrahedron Letters**, v.31, n.1, p.7-10, 1975.
- SHAMA, M., GLICK, E.R., MUMMA, R. The nuclear resonance spectra of triterpenes pentacyclic. **J. Org. Chem.**, v.27, p.4512-4517, 1962.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSELER, G.C., MORRILL, T.C. **Spectrometryc identification of organic compounds**. 5a ed. Melon Park: John Wiley & Sons, 1991. 419 p.

- SINGH, R.P., TOMAR, S.S., DEVAKUMAR, C. et al. Plant products - a versatile source of agro-chemicals. **Pesticide Research Journal**, v.2, n.2, p.61-68, 1990.
- SOUZA, J.R., SILVA, G.D.F., PEDERSOLI, J.L. Triterpenos pentacíclicos e quinanometídeos de *Austroplenckia populnea*. **Química Nova**, v.13, n.4, p.252-253, 1990.
- SUKUL, N.C. Plants antagonistic to plant parasitic nematodes. **Indian Rev. Life Sci.**, v.12, p.23-52, 1993.
- TALWAR, K.K., SINGH, I.P., KALSI, P.S. A sesquiterpenoid with plant growth regulating activity from *Saussuria lappa*. **Phytochemistry**, v.31, n.1, p.336-338, 1992.
- TRIPATHI, R.S., SINGH, R.S., RAI, J.P.N. Allelopathic potencial of *Eupatorium adenophorum*, a dominant ruderal weed of Meghaya. **Proc. Indian Nat. Sci. Acad.**, v.47, p.458-465, 1981.
- TURSCH, B., SAVOIR, R., OTTINGER, R. et al. Nmr spectra of triterpenes. effect of substitution of the chemical shifts of methyl groups in the  $\Delta^{12}$  oleanene serie. **Tetrahedron Letters**, v.15, n.7, p.539-543, 1967.
- VILLASEÑOR, I.M., BARTOLOME, A.L. O., DACLAN, L.C. et al. Microbiological and pharmacological studies on extracts of *Cucurbita maxima*. **Phytotherapy Research**, v.9, n.5, p.376-378, 1995.
- ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F., ROHDE, R.A. **Plant parasit nematodes**. New York: Academic Press, 1971. v.1, p.235-253.