



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química Orgânica

JOSÉ CLÁUDIO DIAS AGUIAR

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Hymenaea courbaril* L.

FORTALEZA

2009

JOSÉ CLÁUDIO DIAS AGUIAR

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Hymenaea courbaril* L.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago

FORTALEZA
2009

A229e **Aguiar, José Cláudio Dias**
Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L. / José Cláudio Dias Aguiar , 2009.
139 f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Área de concentração: Química Orgânica
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2009.

1. *Hymenaea courbaril* 2. Óleos essenciais 3. Isolamento de substâncias 4. Atividades biológicas I. Santiago, Gilvandete Maria Pinheiro (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica e Inorgânica III. Título

CDD 547

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À minha mãe, Inês de Maria Dias Aguiar, que sempre tem colaborado e orientado meus projetos de vida;

À minha noiva, Patrícia Vasconcelos Freitas, pelo carinho, paciência e companheirismo, em todos os momentos;

Aos colegas de turma: Érica, Natália, Luciana, Isabel e Honório, pela amizade e estímulo;

Aos companheiros de Laboratório: Eduardo, Diego, Patrícia Luz, Patrícia Lavor, Tathilene, Wagner, e, em especial, Helenicy Veras, Yana, Jackson, Jefferson e Michele Asley, pela grande ajuda na rotina laboratorial, sendo, os dois últimos, grandes colaboradores no estudo das técnicas experimentais e das determinações estruturais;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química, pelos bons ensinamentos e, principalmente, pelos bons exemplos e experiências de vida;

À Biblioteca Central da Universidade Federal do Ceará, pela iniciativa em elaborar um Guia de Normalização de Trabalhos Acadêmicos, útil e prático, facilitando consultas às regras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT);

Aos Professores Raimundo Braz Filho e Péricles Barreto Alves, que, mesmo distantes geograficamente, contribuíram nas determinações estruturais e no estudo dos constituintes dos óleos essenciais, respectivamente, ambos estando próximos cientificamente desta pesquisa;

À Professora Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, pela forma de orientação, respeito e atenção;

Aos órgãos colaboradores CAPES e, principalmente, FUNCAP e CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O estudo fitoquímico de *Hymenaea courbaril* L., conhecida popularmente como “jatobá”, foi realizado com as cascas dos frutos desta espécie, a qual tem aplicações em processos inflamatórios e em distúrbios intestinais. Das cascas dos frutos maduros, foi extraído o óleo essencial, do qual 76,17% dos constituintes foram identificados, sendo α -copaeno, o majoritário. A composição deste óleo foi comparada com a do óleo essencial obtido a partir dos frutos verdes, do qual 93,34% dos constituintes foram identificados, sendo germacreno-D, o majoritário. Em ambos os óleos, foi verificada a presença somente de sesquiterpenos. O estudo dos constituintes fixos possibilitou o isolamento dos diterpenos *ent*-labdânicos, ácido zanzibárico e ácido isoóxico, e do sesquiterpeno caryolano-1,9 β -diol, sendo, a última substância, inédita no gênero *Hymenaea*. O estudo biológico revelou bons agentes larvicidas sobre *Aedes aegypti*, para os óleos essenciais de frutos maduros e verdes, com valores de CL₅₀ iguais a $14,85 \pm 0,44$ ppm e $28,44 \pm 0,27$ ppm, respectivamente. Também, foi verificada uma satisfatória atividade antioxidante sobre o radical livre DPPH, com o extrato em metanol, com valor de CI₅₀ igual a 0,04 mg/mL. O extrato em acetato de etila apresentou uma considerável atividade alelopática sobre *Lactuca sativa* L., com inibição do crescimento de hipocótilos em 44,68%, na concentração 0,4 mg/mL, e com inibição do crescimento de radículas em 31,47%, na concentração 0,8 mg/mL.

Palavras-chave: *Hymenaea courbaril*. Óleos essenciais. Isolamento de substâncias. Atividades biológicas.

ABSTRACT

The phytochemical study of *Hymenaea courbaril* L., named “jatobá”, was executed by fruit's bark of this vegetal, that is applied in inflammatory and intestinal diseases. Essential oil was extracted from mature fruit and 76,17% of the constituents were identified. The major constituent was α -copaene. The composition of this oil was compared with the composition of the oil obtained on immature fruit, whose 93,34% of the constituents were identified. The major constituent of immature fruit was germacrene-D. Sesquiterpenes were present into both oils. The study of the fixe constituents permitted to isolate two *ent*-labdanic diterpenes, zanzibaric acid and isoozic acid, and the sesquiterpene caryolane-1,9 β -diol, that was a inedited substance in *Hymenaea* species. The biological study revealed that essential oils of mature fruit and immature fruit were satisfactory larvicidal agentes about *Aedes aegypti* and their LC₅₀ 14,85 \pm 0,44 ppm and 28,44 \pm 0,27 ppm, respective. A satisfactory antioxidant activity about DPPH free radicals was verified for extract in methanol whose IC₅₀ 0,04 mg/mL. The extract in ethyl acetate showed notable allelopathic effect on *Lactuca sativa* L., and hypocotyls growth was reduced in 44,68% (in concentration 0,4 mg/mL) and radicules growth was reduced in 31,47% (in concentration 0,8 mg/mL).

Keywords: *Hymenaea courbaril*. Essential oils. Isolation of substances. Biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Substâncias isoladas dos frutos de <i>Hymenaea courbaril</i>	03
Figura 02 – (-)-Zanzibarato de metila isolado de <i>Hymenaea courbaril</i>	04
Figura 03 – Frutos imaturos de <i>Hymenaea courbaril</i>	07
Figura 04 – Folhas de <i>Hymenaea courbaril</i>	07
Figura 05 – Frutos de <i>Hymenaea courbaril</i>	08
Figura 06 – Cromatograma (CG/EM) de OEHC.....	16
Figura 07 – Cromatograma (CG/DIC) de OEHC.....	17
Figura 08 – Espectro de massa do α -cubebeno.....	19
Figura 09 – Espectro de massa do α -ylangeno.....	19
Figura 10 – Espectro de massa do α -copaeno.....	19
Figura 11 – Espectro de massa do β -elemeno.....	20
Figura 12 – Espectro de massa do β -cariofileno.....	20
Figura 13 – Espectro de massa do β -copaeno.....	20
Figura 14 – Espectro de massa do aromadendreno.....	20
Figura 15 – Espectro de massa do α -humuleno.....	21
Figura 16 – Espectro de massa do allo-aromadendreno.....	21
Figura 17 – Espectro de massa do γ -muuroleno.....	21
Figura 18 – Espectro de massa do amorfa-4,7(11)-dieno.....	21
Figura 19 – Espectro de massa do β -selineno.....	22
Figura 20 – Espectro de massa do δ -selineno.....	22
Figura 21 – Espectro de massa do γ -cadineno.....	22
Figura 22 – Espectro de massa do δ -amorfenno.....	22
Figura 23 – Espectro de massa do <i>trans</i> -calameneno.....	23

Figura 24 – Espectro de massa do α -calacoreno.....	23
Figura 25 – Espectro de massa do germacreno B.....	23
Figura 26 – Espectro de massa do espatulenol.....	23
Figura 27 – Espectro de massa do óxido de cariofileno.....	24
Figura 28 – Espectro de massa do selin-11-en-4 α -ol.....	24
Figura 29 – Cromatograma (CG/EM) de OEHCV.....	25
Figura 30 – Cromatograma (CG/DIC) de OEHCV.....	25
Figura 31 – Espectro de massa do δ -elemeno.....	27
Figura 32 – Espectro de massa do α -cubebeno.....	27
Figura 33 – Espectro de massa do α -ylangeno.....	27
Figura 34 – Espectro de massa do α -copaeno.....	27
Figura 35 – Espectro de massa do 7- <i>epi</i> -sesquitujeno.....	28
Figura 36 – Espectro de massa do cipereno.....	28
Figura 37 – Espectro de massa do β -cariofileno.....	28
Figura 38 – Espectro de massa do β -copaeno.....	28
Figura 39 – Espectro de massa do α - <i>trans</i> -bergamoteno.....	29
Figura 40 – Espectro de massa do (Z)- β -farneseno.....	29
Figura 41 – Espectro de massa do <i>cis</i> -muurola-3,5-dieno.....	29
Figura 42 – Espectro de massa do α -humuleno.....	29
Figura 43 – Espectro de massa do allo-aromadendreno.....	30
Figura 44 – Espectro de massa do <i>trans</i> -cadin-1(6),4-dieno.....	30
Figura 45 – Espectro de massa do germacreno-D.....	30
Figura 46 – Espectro de massa do β -selineno.....	30
Figura 47 – Espectro de massa do <i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno.....	31

Figura 48 – Espectro de massa do biciclogermacreno.....	31
Figura 49 – Espectro de massa do δ -amorfenol.....	31
Figura 50 – Espectro de massa do γ -cadineno.....	31
Figura 51 – Espectro de massa do δ -cadineno.....	32
Figura 52 – Espectro de massa do <i>trans</i> -cadin-1,4-dieno.....	32
Figura 53 – Espectro de massa do α -cadineno.....	32
Figura 54 – Espectro de massa do germacreno B.....	32
Figura 55 – Espectro de massa do espatulenol.....	33
Figura 56 – Espectro de massa do óxido de cariofileno.....	33
Figura 57 – Espectro de massa do globulol.....	33
Figura 58 – Espectro de massa do epóxido de humuleno II.....	33
Figura 59 – Espectro de massa do 1- <i>epi</i> -cubenol.....	34
Figura 60 – Espectro de massa do α -cadinol.....	34
Figura 61 – Espectro de massa do levomenol.....	34
Figura 62 – Estrutura do ácido zanzibárico.....	40
Figura 63 – Espectro de massa (70 eV) de HC-1.....	42
Figura 64 – Espectro de absorção na região do IV de HC-1 (em brometo de potássio)....	42
Figura 65 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1.....	43
Figura 66 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1.....	43
Figura 67 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1.....	44
Figura 68 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-1.....	44
Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de HC-1.....	45
Figura 70 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC de HC-1.....	45
Figura 71 – Expansão do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC de HC-1.....	46

Figura 72 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HC-1.....	46
Figura 73 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-1.....	47
Figura 74 – Expansão do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-1.....	47
Figura 75 – Estrutura proposta para HC-2.....	53
Figura 76 – Estereoisômeros da estrutura proposta para HC-2.....	55
Figura 77 – Estrutura do caryolano-1,9 β -diol.....	61
Figura 78 – Fragmentos propostos para os principais picos observados no espectro de massa de HC-2.....	62
Figura 79 – Espectro de massa (70 eV) de HC-2.....	63
Figura 80 – Espectro de absorção na região do IV de HC-2 (em brometo de potássio)....	63
Figura 81 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HC-2.....	64
Figura 82 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HC-2.....	64
Figura 83 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-2.....	65
Figura 84 – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-2.....	65
Figura 85 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de HC-2.....	66
Figura 86 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-2.....	66
Figura 87 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2.....	67
Figura 88 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2.....	67
Figura 89 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2.....	68
Figura 90 – Expansão 3 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2.....	68
Figura 91 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HC-2.....	69

Figura 92 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	69
Figura 93 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	70
Figura 94 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	70
Figura 95 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	71
Figura 96 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	71
Figura 97 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (CD_3COCD_3) de HC-2.....	72
Figura 98 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	72
Figura 99 – Expansão do Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.....	73
Figura 100 – Estrutura do ácido isoóxico.....	81
Figura 101 – Espectro de massa (i.e. 70 eV) de HC-3.....	83
Figura 102 – Espectro de absorção na região do IV de HC-3 (em brometo de potássio).....	83
Figura 103 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3.....	84
Figura 104 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3.....	84
Figura 105 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3.....	85
Figura 106 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-3.....	85
Figura 107 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de HC-3.....	86
Figura 108 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3.....	86
Figura 109 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3.....	87
Figura 110 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3.....	87
Figura 111 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3.....	88

Figura 112 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de HC-3.....	88
Figura 113 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de HC-3.....	89
Figura 114 – Expansão 3 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de HC-3.....	89
Figura 115 – Expansão 4 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de HC-3.....	90
Figura 116 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY de HC-3.....	90

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 – Método de extração do óleo essencial de <i>H. courbaril</i>	96
Fluxograma 02 – Tratamentos cromatográficos relativos ao EHC.....	109
Fluxograma 03 – Tratamentos cromatográficos relativos ao EAHC.....	110

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

BB – Broad Band

CENAUREMN – Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG – Cromatografia Gasosa

COSY – Correlation Spectroscopy

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

EM – Espectrometria de Massa

EAHC – Extrato em Acetato de etila de *Hymenaea courbaril*

EHHC – Extrato em Hexano de *Hymenaea courbaril*

EMHC – Extrato em Metanol de *Hymenaea courbaril*

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Connectivity

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

L – Comprimento

OEHC – Óleo Essencial das cascas dos frutos maduros de *Hymenaea courbaril*

OEHCV – Óleo Essencial das cascas dos frutos verdes de *Hymenaea courbaril*

ppm – partes por milhão

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

Φ - Diâmetro

δ - Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Hymenaea</i>	09
Tabela 02 – Estruturas das substâncias isoladas de espécies de <i>Hymenaea</i> sp.....	12
Tabela 03 – Constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de <i>H. courbaril</i>	18
Tabela 04 – Constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de <i>H. courbaril</i>	26
Tabela 05 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos átomos de carbono não hidrogenados (C), metilênicos (CH ₂), metínicos (CH) e metílicos (CH ₃), obtidos por comparação entre espectros de RMN ¹³ C – BB e de RMN ¹³ C – DEPT 135°.....	36
Tabela 06 – Dados espectroscópicos de HC-1 comparados com dados da literatura.....	41
Tabela 07 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos carbonos não hidrogenados (C), metilênicos (CH ₂), metínicos e metílicos (CH e CH ₃), obtidos por comparação entre espectros de RMN ¹³ C – BB e de RMN ¹³ C – DEPT 135°.....	49
Tabela 08 – Dados espectroscópicos de HC-2 em CDCl ₃	54
Tabela 09 – Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (CDCl ₃) de HC-2 e das estruturas propostas (I, II e III).....	56
Tabela 10 – Comparação de dados obtidos em espectros de RMN de HC-2, em CD ₃ COCD ₃ e em CDCl ₃	58
Tabela 11 – Dados espectroscópicos de HC-2 comparados com dados da literatura.....	60
Tabela 12 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos carbonos não hidrogenados (C), metilênicos (CH ₂), metínicos e metílicos (CH e CH ₃), obtidos por comparação entre espectros de RMN ¹³ C – BB e de RMN ¹³ C – DEPT 135°.....	75
Tabela 13 – Dados espectroscópicos de HC-3 comparados com dados da literatura.....	82
Tabela 14 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHHC.....	98
Tabela 15 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHHHC.....	98
Tabela 16 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHHC(26-28).....	99
Tabela 17 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHHHC(26-28).....	100

Tabela 18 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHc(31-39).....	100
Tabela 19 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHHc(31-39).....	101
Tabela 20 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHc(31-39) (243-329).....	102
Tabela 21 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHHc(31-39) (243-329).....	102
Tabela 22 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHc(31-39)(243-329)(16-56).....	103
Tabela 23 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC.....	103
Tabela 24 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EAHC.....	104
Tabela 25 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26).....	104
Tabela 26 – Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26).....	105
Tabela 27 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)....	106
Tabela 28 – Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11).....	106
Tabela 29 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(3-7).....	107
Tabela 30 – Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11)(3-7).....	107
Tabela 31 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(8-34).....	108
Tabela 32 – Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11)(8-34).....	108
Tabela 33 – Resultado dos testes de atividade antioxidante sobre DPPH.....	112

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	05
2.1 Considerações botânicas sobre a família Fabaceae.....	05
2.2 Considerações botânicas sobre o gênero <i>Hymenaea</i>	05
2.3 Considerações botânicas sobre <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	06
CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	09
CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	16
4.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	16
4.2 Identificação dos constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	24
4.3 Determinação estrutural dos constituintes fixos de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	35
4.3.1 Determinação estrutural de HC – 1	35
4.3.2 Determinação estrutural de HC – 2	48
4.3.3 Determinação estrutural de HC – 3	74
CAPÍTULO 5 – PARTE EXPERIMENTAL.....	91
5.1 Material vegetal.....	91
5.2 Métodos analíticos.....	91
5.2.1 Métodos cromatográficos.....	91

5.2.2 Métodos físicos de análise orgânica.....	92
5.2.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	93
5.2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	93
5.2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	93
5.2.2.4 Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (DIC).....	94
5.2.2.5 Ponto de fusão.....	95
5.2.2.6 Índice de refração.....	95
5.2.2.7 Rotação óptica.....	95
5.3 Estudo dos constituintes voláteis de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	95
5.3.1 Obtenção do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de <i>Hymenaea courbaril</i>	95
5.3.2 Obtenção do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de <i>Hymenaea courbaril</i>	96
5.4 Estudo dos constituintes fixos de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	97
5.4.1 Obtenção dos extratos em hexano, em acetato de etila e em metanol das cascas dos frutos de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	97
5.4.2 Fracionamento cromatográfico de EHC.....	97
5.4.2.1 Tratamento cromatográfico de EHC(26-28) e isolamento de HC-1.....	99
5.4.2.2 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39).....	100
5.4.2.3 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39)(243-329).....	101
5.4.2.4 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39)(243-329)(16-56) e isolamento de HC-2.....	102
5.4.3 Fracionamento cromatográfico de EAHC.....	103
5.4.3.1 Tratamento cromatográfico de EAHC.(19-26).....	104
5.4.3.2 Tratamento cromatográfico de EAHC.(19-26)(11).....	105
5.4.3.3 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(3-7) e isolamento de HC-3.....	106
5.4.3.4 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(8-34) e isolamento de HC-3....	107

CAPÍTULO 6 – ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	111
6.1 Atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> L.....	111
6.2 Atividade antioxidante sobre DPPH.....	112
6.3 Atividade alelopática sobre <i>Lactuca sativa</i> L.....	113
CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
CAPÍTULO 8 – CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS.....	115
REFERÊNCIAS.....	118

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira pode constituir importante fonte de riqueza, ao ser mais bem estudada e compreendida, o que possibilitaria melhorias no bem-estar e na saúde da população. Para tanto, verifica-se a importância da aplicação da fitoquímica como ferramenta no desenvolvimento de pesquisas sobre os diversos metabólitos vegetais presentes nessa biodiversidade e, até mesmo, sobre os diversos mecanismos metabólicos (GOTTLIEB; BORIN; PAGOTTO, 1998).

Sabe-se que essa biodiversidade apresenta um potencial para o desenvolvimento de medicamentos a base de produtos vegetais, os quais implicam em uma janela de oportunidades na indústria de medicamentos, o que pode gerar um mercado poderoso na busca de novas moléculas para assegurar a competitividade na produção de novos medicamentos patenteados. Dessa forma, o estudo sobre a variada flora brasileira possibilita no desenvolvimento de um mercado promissor e competitivo, promovendo um grande salto tecnológico na produção de novos medicamentos (VILLAS BOAS; GADELHA, 2007).

A utilização de medicamentos de origem vegetal é bastante expressiva em populações que têm dificuldade de acesso a outros tipos de terapias. Estes medicamentos podem ser aplicados tanto em medidas profiláticas como em curativas (MICHELIN *et al.*, 2005).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (BRASIL, 2006).

Como exemplo de uso profilático de recursos vegetais, pode-se citar a procura crescente de produtos naturais que sejam eficazes no controle de mosquitos adultos e à exterminação das larvas do *Aedes aegypti*, agente vetor da dengue, que é uma doença viral infecciosa aguda de curta duração podendo assumir formas graves e letais que vem preocupando as autoridades médico-sanitárias de todo o mundo (COSTA *et al.*, 2005).

O controle das infecções pelo vírus da dengue vem tendo insucessos em quase todo o mundo em função da não disponibilidade de vacinas e da inexistência de drogas antivirais capazes de influenciar na redução da viremia. Dessa forma, as intervenções estão muito direcionadas para a eliminação do vetor desta enfermidade, o *Aedes aegypti* (TEIXEIRA; BARRETO; COSTA, 2002).

As pesquisas envolvendo produtos naturais, de origem vegetal, que apresentem atividade antioxidante, também, têm ganhado espaços no meio científico, pois esta atividade está relacionada com o seqüestro dos radicais livres, principalmente as espécies reativas de oxigênio, implicados na ocorrência de muitas patologias, tais como envelhecimento precoce, inflamação crônica, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese. Logo, caracteriza-se, nesse caso, uma finalidade profilática, também, para as substâncias de origem vegetal (ANDRADE *et al.*, 2007).

Os estudos das propriedades antioxidantes das substâncias ativas vêm despertando muito interesse de pesquisadores, considerando o aumento da expectativa de tempo de vida observado nas últimas décadas e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento. Muitas substâncias já foram relacionadas com esta atividade. ácido ascórbico e muitos flavonóides são exemplos destas (SCOTTI *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante pode ser testada em extratos vegetais pelo método do seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil - DPPH[•], utilizando espectrofotometria. Assim, quanto maior for o consumo de DPPH por uma amostra de extrato vegetal, maior será a atividade antioxidante desta amostra. Sabendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀) ou concentração inibitória (CI₅₀), conclui-se que quanto menor for o valor da CE₅₀, maior será a atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Sabe-se que a atividade biológica de substâncias de origem vegetal pode se manifestar por meio de propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas ou farmacológicas, de um modo geral. Neste contexto, também pode ser enquadrada a atividade alelopática testada em muitos extratos vegetais. Este tipo de atividade biológica está relacionado com a capacidade de um ser vivo, neste caso, vegetal, liberar substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, que atuem de forma benéfica ou nociva sobre outro ser vivo. Tal liberação ocorre pelas diversas partes da planta ou por intermédio da decomposição de folhas e caules e exsudação direta no solo pelas raízes (TERRONES *et al.*, 2007b).

A liberação de aleloquímicos que atuem de forma nociva sobre outro ser vivo pode ser relacionada com um mecanismo de defesa do organismo liberador e, se o alvo atingido for um vegetal, tais substâncias são denominadas de herbicidas naturais (TERRONES *et al.*, 2007b).

O estudo sobre a atividade alelopática vem se tornando uma linha de pesquisa de grande interesse, na expectativa de descobrir novos herbicidas naturais, visando diminuir o

impacto ambiental provocado pelos herbicidas sintéticos usados na agricultura (TERRONES *et al.*, 2007a).

Vegetais do gênero *Hymenaea*, o qual pertence à subfamília Caesalpinioideae da família Fabaceae, estão bem distribuídos pelo Brasil, principalmente na zona tropical, e têm sido relacionados em muitos estudos de natureza fitoquímica. Entre as 14 espécies, deste gênero, encontra-se a *Hymenaea courbaril* L., conhecida comumente como jatobá. As espécies de *Hymenaea* são conhecidas por apresentarem, principalmente, diterpenos do tipo *ent*-labdânicos na constituição química da resina e cascas do tronco (NAKANO; DJERASSI, 1961; CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1973; MARSAIOLI; FILHO; CAMPELLO, 1975; IMAMURA *et al.*, 1977) e diterpenos *ent*-halimanos na resina do epicarpo (KHOO; OEHLSCHLAGER; OURISSON, 1973).

Esta espécie vem sendo foco de muitos estudos, principalmente agrônômicos e fitoquímicos, pois além de possuir madeira resistente, frutos comestíveis e casca rica em taninos, também apresenta variados usos na medicina popular no tratamento de úlceras, bronquites e distúrbios intestinais (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Terpenóides, como crotomaclina (1), ácido labdanólico (2) e ácido (13*E*)-labda-7,13-dien-15-óico (3), isolados dos frutos de *Hymenaea courbaril*, cujas estruturas estão mostradas na Figura 01, apresentaram considerável atividade anti-inflamatória através da inibição das enzimas ciclooxigenases (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

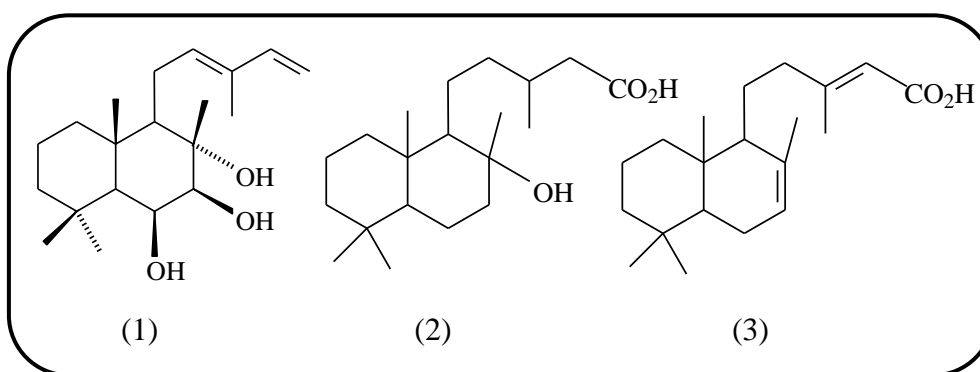


Figura 01 – Substâncias isoladas dos frutos de *Hymenaea courbaril*

O éster (-)-zanzibarato de metila, cuja estrutura está mostrada na Figura 02, é um dos metabólitos secundários isolado do epicarpo de *Hymenaea courbaril*. (IMAMURA; MIRANDA; GIACOMINI, 2004).

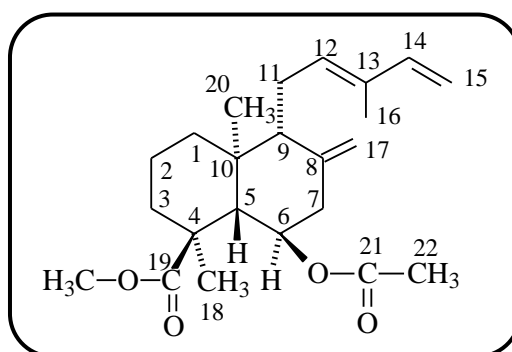


Figura 02 - (-)-Zanzibarato de metila isolado de *Hymenaea courbaril*

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo químico dos constituintes fixos e voláteis, o qual compreende o isolamento, a purificação e determinação da estrutura molecular dos metabólitos secundários da casca do fruto da espécie *Hymenaea courbaril*, utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas; e o estudo biológico dos extratos, através da utilização dos testes de atividades larvívora sobre *Aedes aegypti*, antioxidante em relação ao radical livre DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e alelopática sobre *Lactuca sativa* L.

Este trabalho encontra-se dividido em oito capítulos: Introdução (Capítulo 1), Considerações botânicas (Capítulo 2), Levantamento bibliográfico (Capítulo 3), Determinação estrutural (Capítulo 4), Parte experimental (Capítulo 5), Ensaios de atividade biológica (Capítulo 6), Considerações finais (Capítulo 7) e Constantes físicas e dados espectroscópicos (Capítulo 8).

Capítulo 2

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Considerações botânicas sobre a família Fabaceae

A família Fabaceae compreende aproximadamente 650 gêneros e 18.000 espécies, as quais encontram-se distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae (OLIVEIRA, 2001).

A subfamília Caesalpinioideae compreende 150 gêneros e 2.700 espécies, com ampla distribuição (BIONDO; MIOTTO; WITTMANN, 2005a). A maioria dos gêneros encontra-se nos trópicos, na África, América e sudeste da Ásia, sendo bem representados no Brasil (BIONDO; MIOTTO; WITTMANN, 2005b). Dentre eles, estão os gêneros: *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Peltophorum*, *Cassia*, *Senna*, *Copaifera* e *Hymenaea* (CONEGLIAN; OLIVEIRA, 2006).

Estudos mostram que esta família é uma das mais abundantes na Chapada do Araripe, em Crato – Ceará (ALENCAR; SILVA; BARROS, 2007). O cerrado da chapada do Araripe, que é um enclave no domínio semi-árido da caatinga cearense, apresenta, principalmente espécies pertencentes às famílias: Fabaceae, Myrtaceae, Poaceae, Euphorbiaceae e Malpighiaceae (COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004).

2.2 Considerações botânicas sobre o gênero *Hymenaea*

Este gênero abrange 14 espécies, das quais nove são encontradas no Brasil, ocorrendo em quase todas as regiões, com distribuição uniforme na Amazônia, onde é encontrado nas matas de terra firme de solo argiloso e, algumas vezes, nas várzeas altas. A maioria das espécies desse gênero possui algum valor econômico, fornecendo madeira de ótima qualidade, valiosas resinas, frutos comestíveis e casca rica em tanino, além de possuir variados usos na medicina popular (MELO; MENDONÇA; MENDES, 2004).

Este gênero tem origem na África e foi trazido para a América, onde adaptou-se muito bem, na zona tropical. Com árvores de porte superior aos 20 metros, tronco reto e cilíndrico, apresenta frutos de aspecto lenhoso, formato ovóide, de cor marrom, quando

maduros ou verdes, quando imaturos. O nome foi adotado por Linnaeus, em 1737, sendo uma homenagem a Himeneu, o deus grego do casamento, pois as pequenas folhas destas plantas aproximam-se durante a noite (COSTA, 2004).

2.3 Considerações botânicas sobre *Hymenaea courbaril* L

Comumente encontrada na região tropical do Brasil, desenvolve-se em mata de terra firme, sobre solo argiloso e, também, nas proximidades de rios ou lagos (Figura 03, p. 07). Raramente, ocorre em zonas campestres (CAMPOS; UCHIDA, 2002).

Geralmente, mede aproximadamente entre 10 a 15 metros de altura, sendo pouco exigente em fertilidade e umidade do solo (FILHO *et al.*, 2003), sendo encontradas espécimens com 40 metros de altura (LIMA *et al.*, 2007).

Apresenta tronco cilíndrico e reto com, aproximadamente, 2m de diâmetro, com a copa espalhada; casca lisa, dura e cinzenta; folhas alternadas, ou seja, uma folha por nó, pecioladas, portanto, com a haste de sustentação ao caule e bifoliadas, com dois folíolos na extremidade do pecíolo (Figura 04, p. 07), flores em panículas, que são ramificações piramidais terminais e frutos indeiscentes, os quais não liberam as sementes quando maduros.

Os frutos maduros (Figura 05, p. 08) possuem uma polpa farinácea que fornece farinha com valor alimentício muito procurada por várias espécies da fauna, que dispersam suas sementes. Comumente, é conhecida como jatobá (DUBOC *et al.*, 1996). Têm comprimento aproximadamente entre 10 e 20 cm, com diâmetro variando entre 4 e 6 cm (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).



Figura 03 – Frutos imaturos de *Hymenaea courbaril*
Créditos: www.biologo.com.br/plantas/fichas/jatoba.html



Figura 04 – Folhas de *Hymenaea courbaril*
Créditos: www.rain-tree.com/jatoba.htm



Figura 05 – Frutos de *Hymenaea courbaril*

Créditos: www.biologo.com.br/plantas/fichas/jatoba.html

Capítulo 3

LEVANTAMIENTO BIBLIOGRÁFICO

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Através do levantamento bibliográfico realizado, tendo Science Direct e Sci Finder Scholar, como ferramentas de busca, foram encontrados estudos fitoquímicos para as seguintes espécies do gênero *Hymenaea*: *H. courbaril*, *H. martiana*, *H. oblongifolia*, *H. palustris*, *H. parvifolia*, *H. stigonocarpa* e *H. verrucosa*. Dentre essas, *H. courbaril* foi foco da maior parte das publicações.

Foi verificado que, em certas substâncias isoladas de algumas das espécies citadas, também foram realizados estudos sobre as seguintes atividades biológicas: imunossupressão (MIYAKE *et al.*, 2006), antineoplásica (ABDEL-KADER *et al.*, 2002), anti-inflamatória (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007) e antimicrobiana (PETTIT *et al.*, 2003).

Os nomes das substâncias isoladas de espécies do gênero *Hymenaea* encontram-se na Tabela 01 (p. 09) e as suas respectivas estruturas químicas são mostradas na Tabela 02 (p. 12).

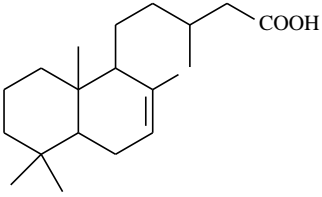
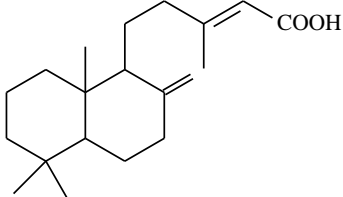
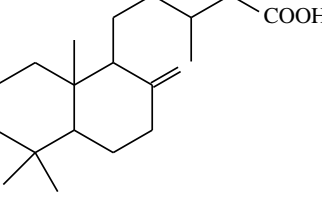
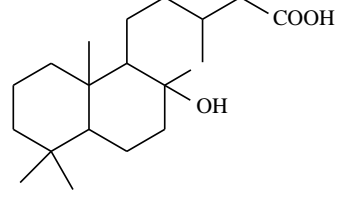
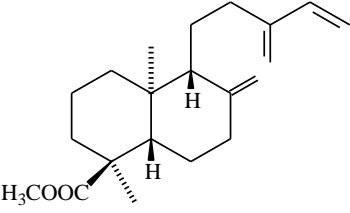
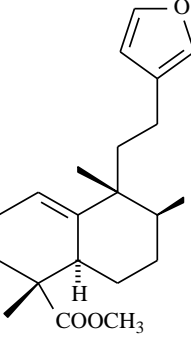
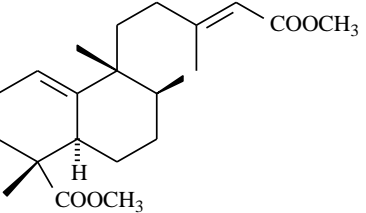
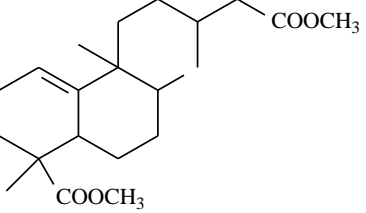
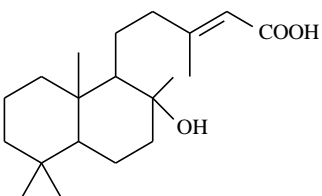
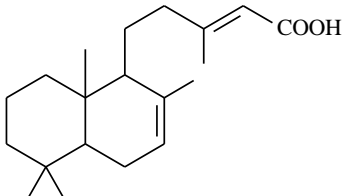
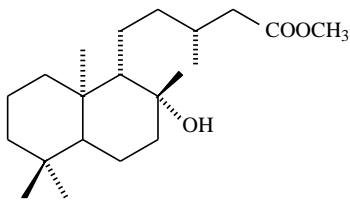
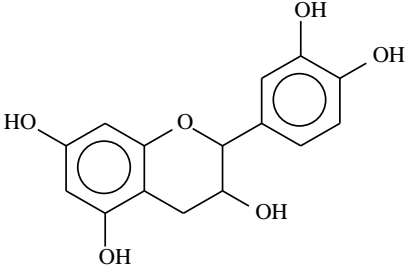
Tabela 01 – Substâncias isoladas de espécies do gênero *Hymenaea*.

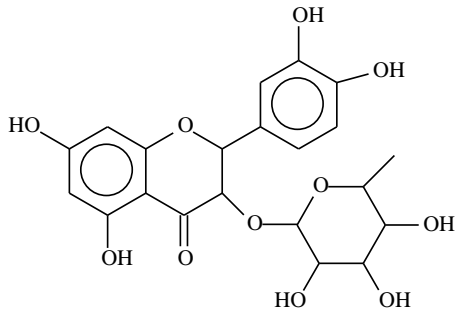
ESPÉCIE	SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
<i>H. courbaril</i>	ácido catívico	1	NAKANO; DJERASSI, 1961
	ácido copálico (ácido labd-8(17),13E-dien-15-óico)	2	NAKANO; DJERASSI, 1961
	ácido eperúico	3	NAKANO; DJERASSI, 1961
	ácido labdanólico (ácido <i>enantio</i> -13-epilabdanólico)	4	NAKANO; DJERASSI, 1961
	(-)-isoozato de metila	5	KHOO; OEHLSCHLAGER; OURISSON, 1973
	éster metílico do ácido 5-[2-(3-furanil)etil]-1,2,3,5,6,7,8,8a-octaidro-1,5,6-trimetil-1-naftalenocarboxílico	6	KHOO; OEHLSCHLAGER; OURISSON, 1973
	éster metílico do ácido 1,2,3,5,6,7,8,8a-octaidro-5-(5-metoxi-3-metil-5-oxo-3-pentenil)-1,5,6-trimetil-1-naftalenocarboxílico	7	KHOO; OEHLSCHLAGER; OURISSON, 1973

éster metílico do ácido 1,2,3,4,4a,5,6,7-octaidro-5-(metoxicarbonil)- β -1,2,5-tetrametil-1-naftalenopentanóico	8	KHOO; OEHLISCHLAGER; OURISSON, 1973
ácido labd-13-en-8-ol-15-óico	9	CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1974
ácido eperua-7,13-dien-15-óico (ácido (13 <i>E</i>)-labd-7,13-dien-15-óico)	10	MARSAIOLI; FILHO; CAMPELLO, 1975
ácido labdan-8 β -ol-15-óico (ácido labdanóico)	4	MARSAIOLI; FILHO; CAMPELLO, 1975
<i>ent</i> -labdan-8 β -ol-15-oato de metila	11	IMAMURA <i>et al.</i> , 1977
(-)-epicatequina	12	ARTAVIA; BARRIOS; CASTRO, 1995
taxifolin-3- <i>O</i> -ramnosídeo	13	ARTAVIA; BARRIOS; CASTRO, 1995
(-)-kovalenato de metila	14	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001
(-)-ozato de metila	15	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001
ácido (-)-(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-cleroda-3,13 <i>E</i> -dien-15-óico	16	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001
ácido (-)-(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-cleroda-3,13 <i>E</i> -dien-15-óico	17	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001
(-)-(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-clerod-3-en-15-oato de metila	18	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002
ácido (13 <i>R</i>)-13-hidróxi-1(10),14- <i>ent</i> -halimadien-18-óico	19	ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 2002
ácido (2 <i>S</i> ,13 <i>R</i>)-2,13-diidróxi-1(10),14- <i>ent</i> -halimadien-18-óico	20	ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 2002
ácido (13 <i>R</i>)-2-oxo-13-hidróxi-1(10),14- <i>ent</i> -halimadien-18-óico	21	ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 2002
(-)-zanzibarato de metila	22	IMAMURA; MIRANDA; GIACOMINI, 2004
(-)-epicatequina-3- <i>O</i> -galato	23	MIYAKE <i>et al.</i> , 2006
crotomaclina	24	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007
ácido (13 <i>E</i>)-labd-7,13-dien-15-óico (ácido eperua-7,13-dien-15-óico)	10	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007
ácido labd-8(17),13 <i>E</i> -dien-15-óico (ácido copálico)	2	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007
espatulenol	25	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007

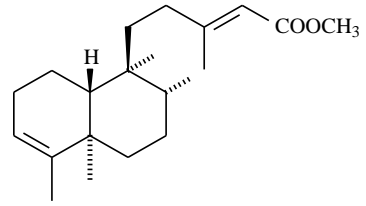
	Polissacarídeo constituído por galactose, glicose, xilose e arabinose	-	OMAIRA <i>et al.</i> , 2007
<i>H. martiana</i>	astilbina	26	CARNEIRO <i>et al.</i> , 1993
	engelitina	27	CARNEIRO <i>et al.</i> , 1993
	eucrifina	28	CARNEIRO <i>et al.</i> , 1993
<i>H. oblongifolia</i>	ácido guamáico	29	CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1973
	ácido <i>enantio</i> -pinifólico	30	CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1973
	quesnoina	31	JOSSANG <i>et al.</i> , 2008
<i>H. palustris</i>	crisoeriol	32	PETTIT <i>et al.</i> , 2003
	hidnocarpina D	33	PETTIT <i>et al.</i> , 2003
	luteolina	34	PETTIT <i>et al.</i> , 2003
	palstatina	35	PETTIT <i>et al.</i> , 2003
	tricina	36	PETTIT <i>et al.</i> , 2003
<i>H. parvifolia</i>	ácido <i>enantio</i> -13-epilabda-nólico (ácido labdanólico)	4	CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1973
<i>H. stigonocarpa</i>	<i>ent</i> -labdan-8 β -ol-15-oato de metila	11	IMAMURA <i>et al.</i> , 1977
	ácido linolênico	37	MATUDA; NETTO <i>et al.</i> , 2005
	ácido oléico	38	MATUDA; NETTO <i>et al.</i> , 2005
<i>H. verrucosa</i>	ácido <i>enantio</i> -8(17),13(16),14-labdatrien-18-óico	39	MARTIN; LANGENHEIM, 1974
	ácido zanzibárico	40	CUNNINGHAM <i>et al.</i> , 1983
	ácido (4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-decaidro-4,10-dimetil-8-metileno-9-(3-metil-2,4-pentadienil)-6-ol-4-naftalenocarboxílico	41	CUNNINGHAM <i>et al.</i> , 1983

Tabela 02 – Estruturas das substâncias isoladas de espécies de *Hymenaea* sp.

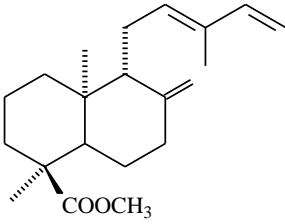
 <p>(1)</p>	 <p>(2)</p>
 <p>(3)</p>	 <p>(4)</p>
 <p>(5)</p>	 <p>(6)</p>
 <p>(7)</p>	 <p>(8)</p>
 <p>(9)</p>	 <p>(10)</p>
 <p>(11)</p>	 <p>(12)</p>



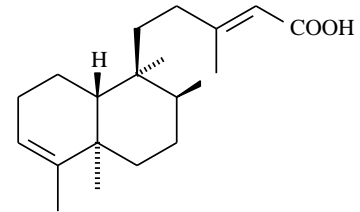
(13)



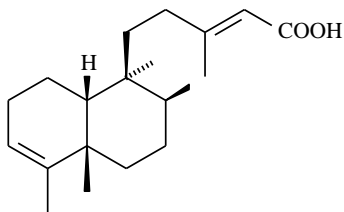
(14)



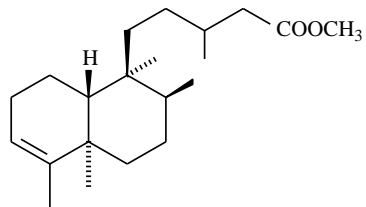
(15)



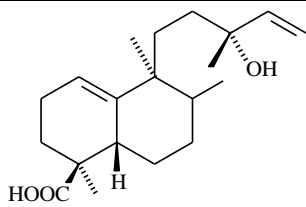
(16)



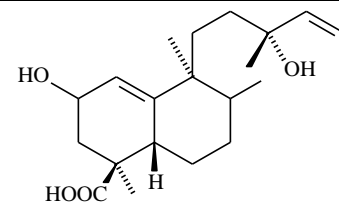
(17)



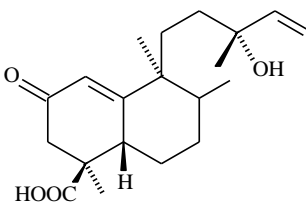
(18)



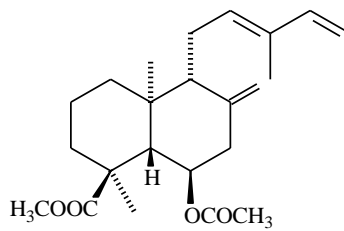
(19)



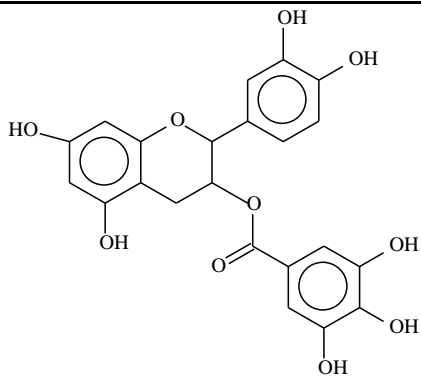
(20)



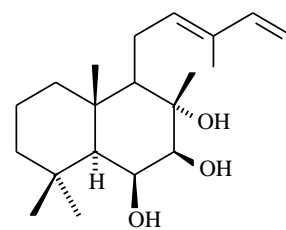
(21)



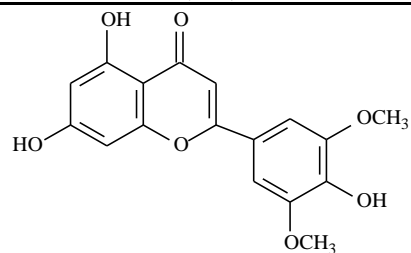
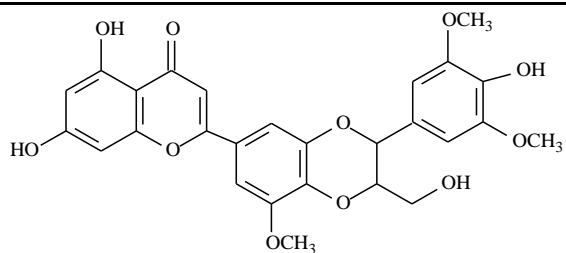
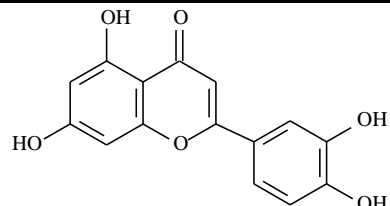
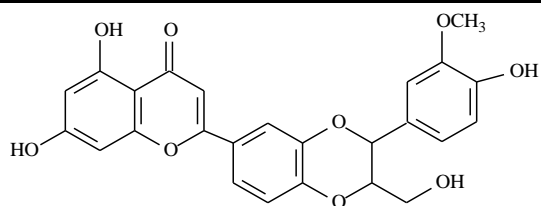
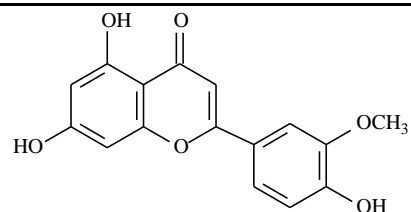
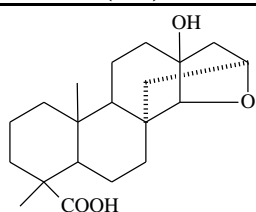
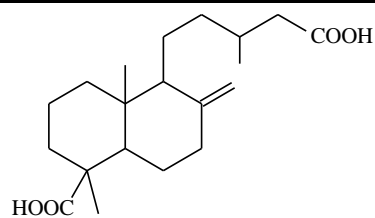
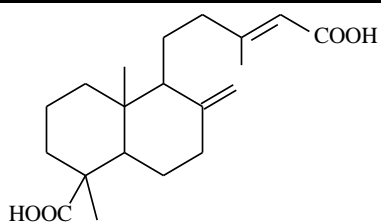
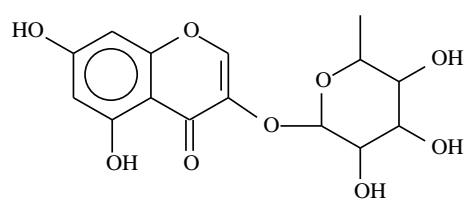
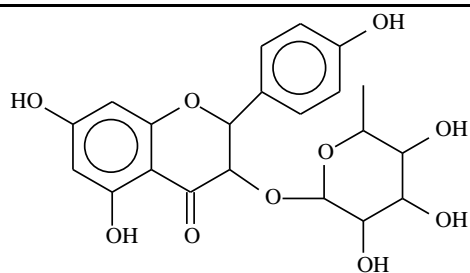
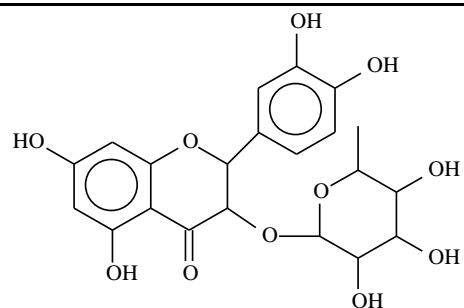
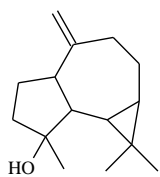
(22)

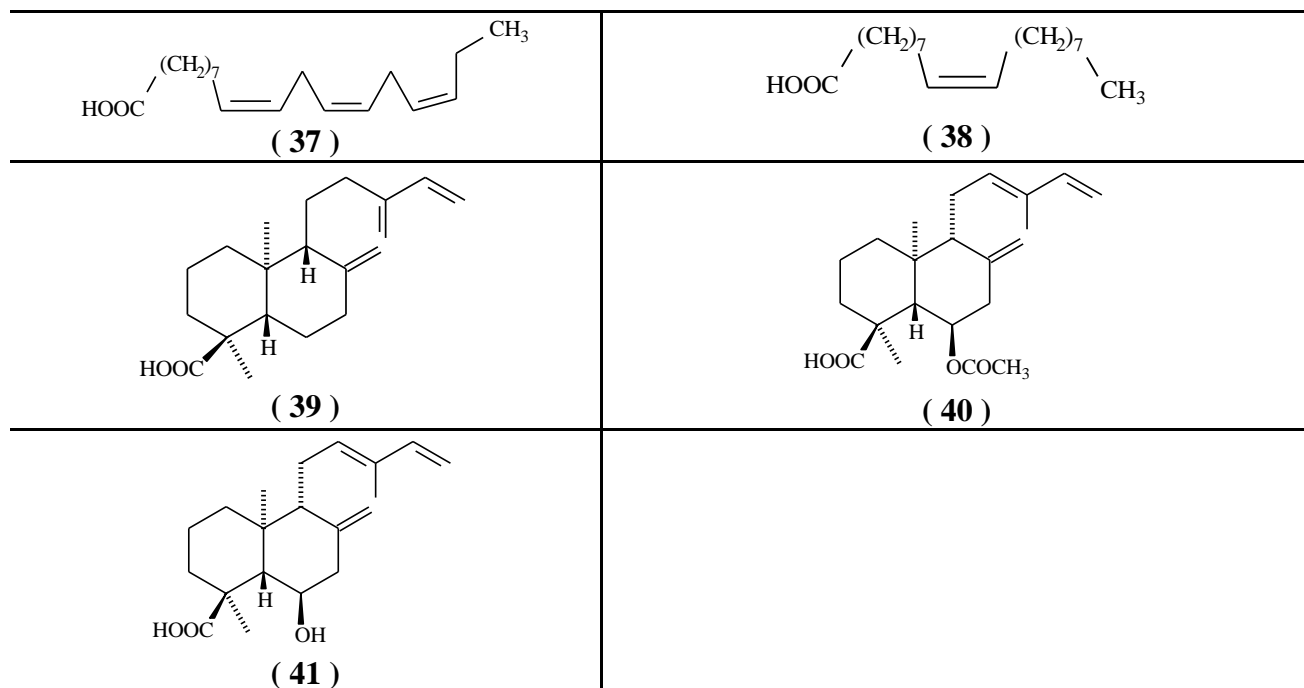


(23)



(24)





Capítulo 4

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *Hymenaea courbaril* L.

O estudo da composição química do óleo essencial das cascas dos frutos maduros (OEHC) foi realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) na análise qualitativa e por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG/DIC) na análise quantitativa. Os cromatogramas obtidos por ambas as técnicas são mostrados nas Figuras 06 e 07, respectivamente.

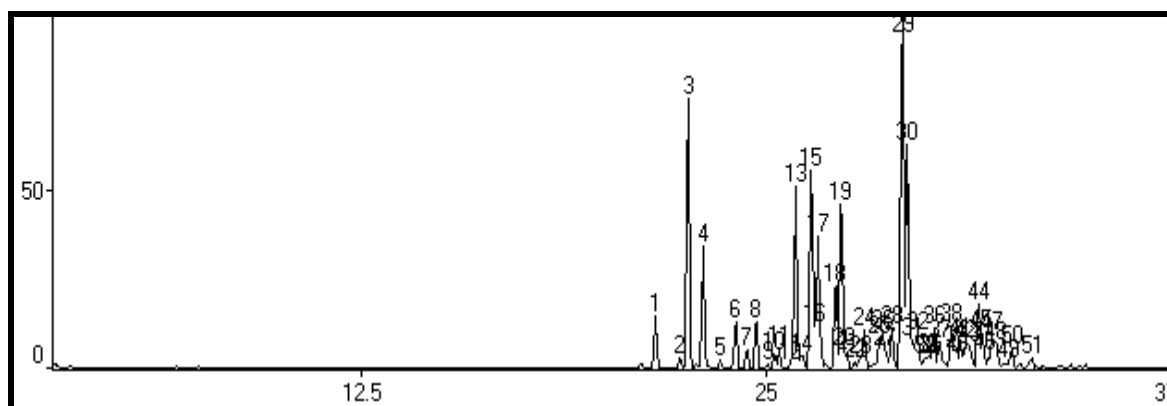


Figura 06 - Cromatograma (CG/EM) de OEHC

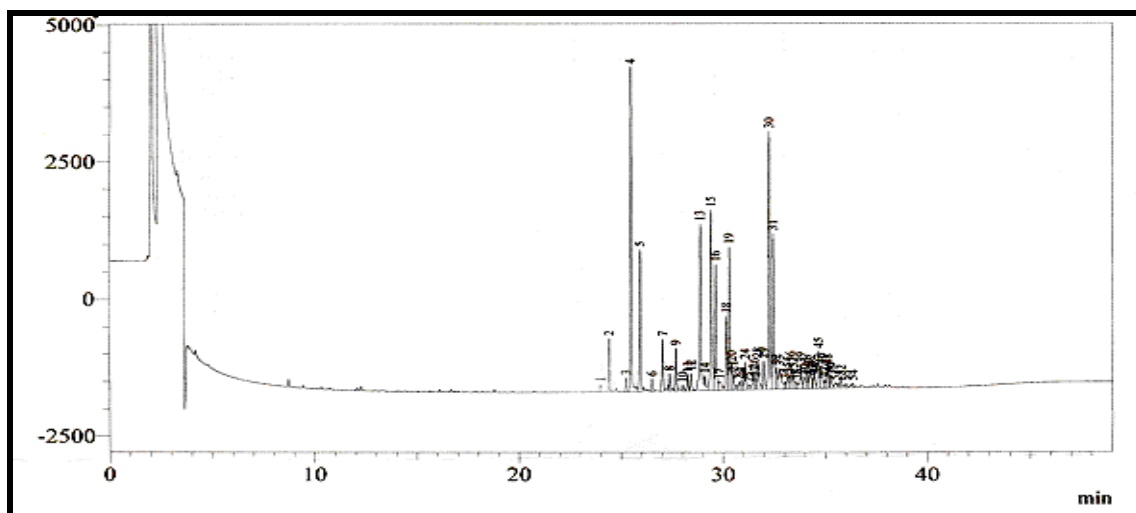


Figura 07 - Cromatograma (CG/DIC) de OEHC

Os componentes do óleo (OEHC) foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (Figuras 08 a 28) com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros do banco de dados (NIST21 e NIST107) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homologa de *n*-alcanos (C₈-C₁₈) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Desta forma foi possível, a identificação de 76,17 % dos constituintes deste óleo, como mostra a Tabela 03. O índice de refração obtido foi 1,6608°, a rotação óptica medida foi + 0,020° e a rotação específica + 0,13°.

Tabela 03 – Constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *H. courbaril*.

PICO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO	% (CG/DIC)	IK _{experimental}
1	21,58	α -cubebeno	1,73	1342
2	22,35	α -ylangeno	0,52	1364
3	22,58	α -copaeno	11,14	1371
4	23,06	β -elemeno	4,99	1384
6	24,06	β -cariofileno	2,02	1414
7	24,40	β -copaeno	0,63	1424
8	24,68	aromadendreno	1,56	1432
10	25,25	α -humuleno	0,28	1450
11	25,39	allo-aromadendreno	0,60	1454
13	25,91	γ -muuroleno	7,85	1469
14	26,10	amorfa-4,7(11)-dieno	0,27	1475
15	26,38	β -selineno	8,21	1484
17	26,59	δ -selineno	5,73	1490
18	27,13	γ -cadineno	2,69	1507
19	27,29	δ -amorfenno	5,25	1512
20	27,40	<i>trans</i> -calameneno	1,09	1515
24	28,02	α -calacoreno	1,10	1535
26	28,58	germacreno B	1,75	1553
29	29,18	espatulenol	10,14	1572
30	29,34	óxido de cariofileno	6,86	1577
44	31,52	selin-11-en-4 α -ol	1,76	1649
TOTAL			76,17	

As Figuras 08 a 28 mostram os espectros de massas de cada constituinte identificado, obtidos em espectrômetro de massa através da técnica de impacto eletrônico de 70 eV.

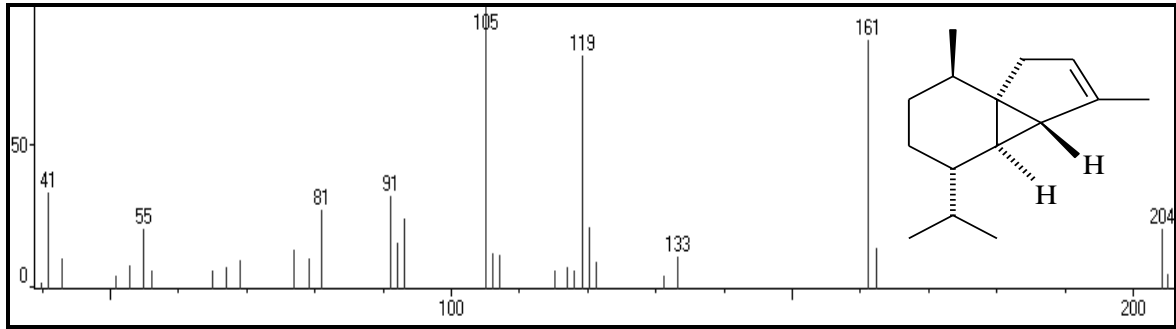


Figura 08 – Espectro de massa do α -cubebeno

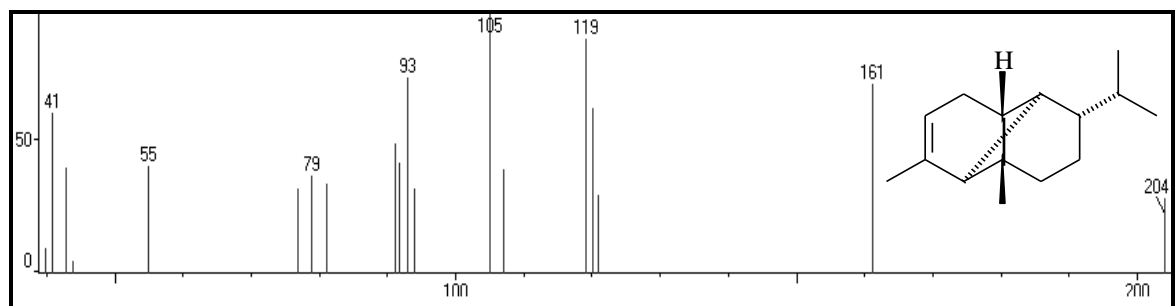


Figura 09 – Espectro de massa do α -ylangeno

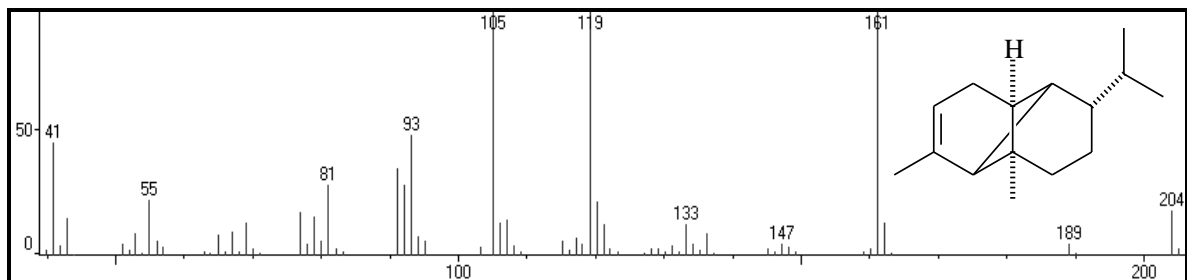


Figura 10 – Espectro de massa do α -copaeno

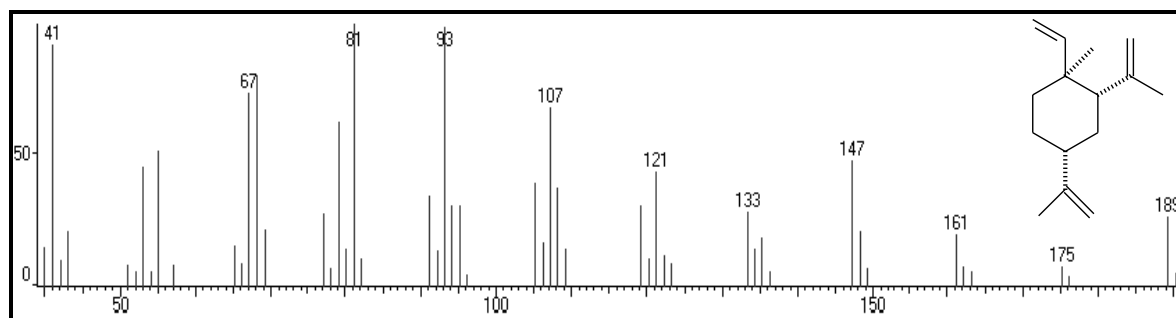


Figura 11 – Espectro de massa do β -elemeno

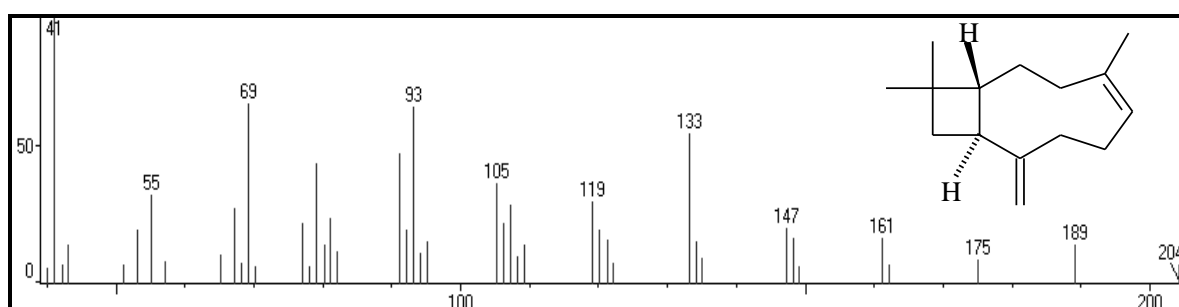


Figura 12 – Espectro de massa do β -cariofileno

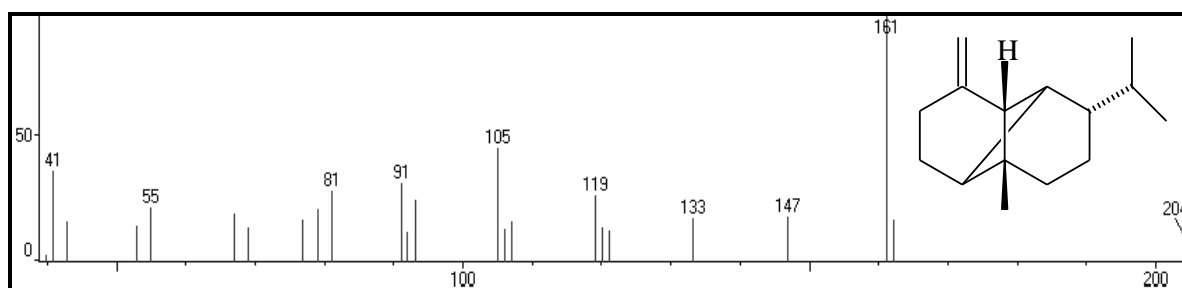


Figura 13 – Espectro de massa do β -copaeno

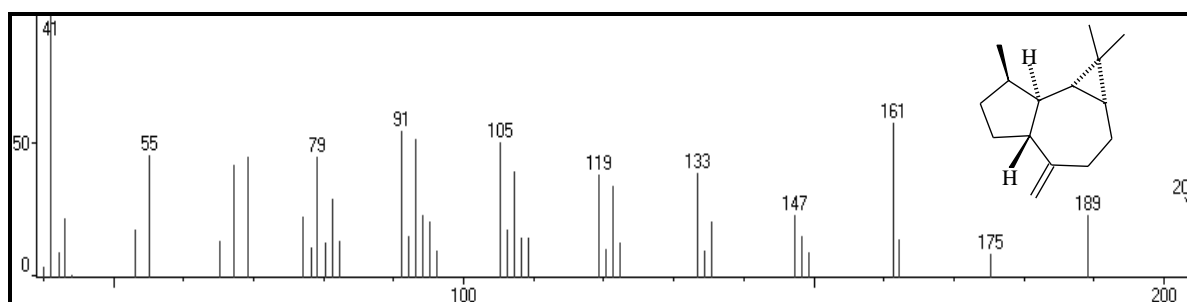


Figura 14 – Espectro de massa do aromadendreno

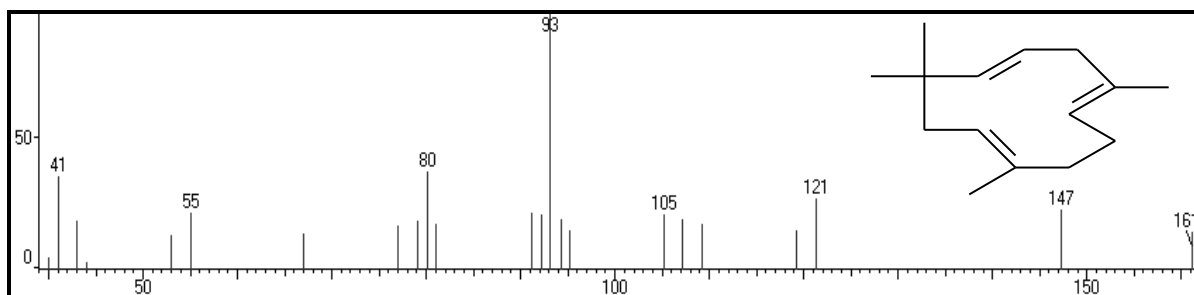


Figura 15 – Espectro de massa do α -humuleno

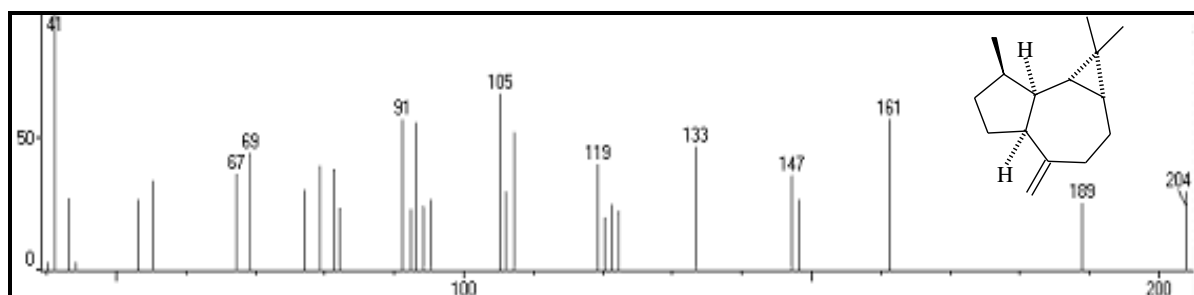


Figura 16 – Espectro de massa do allo-aromadendreno

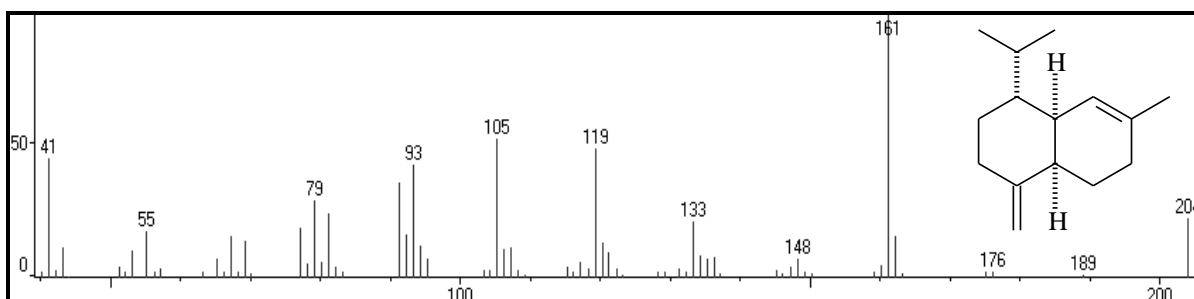


Figura 17 – Espectro de massa do γ -muuroleno

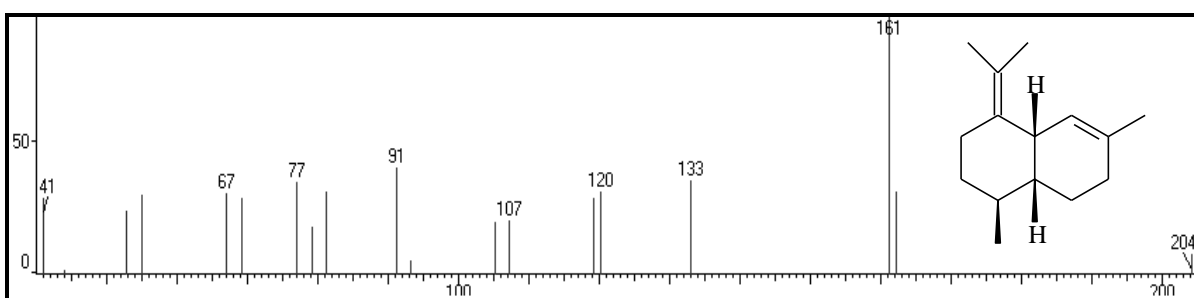


Figura 18 – Espectro de massa do amofa-4,7(11)-dieno

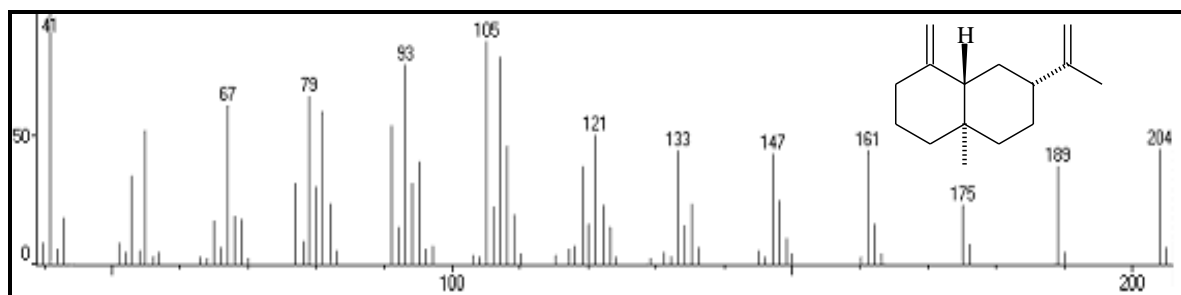


Figura 19 – Espectro de massa do β -selineno

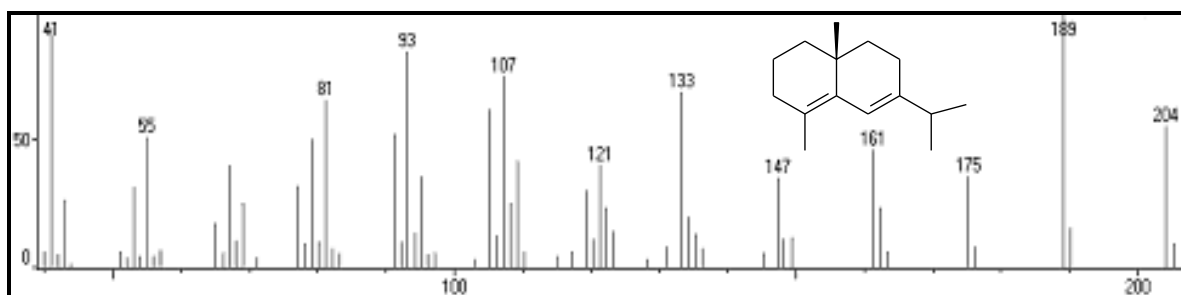


Figura 20 – Espectro de massa do δ -selineno

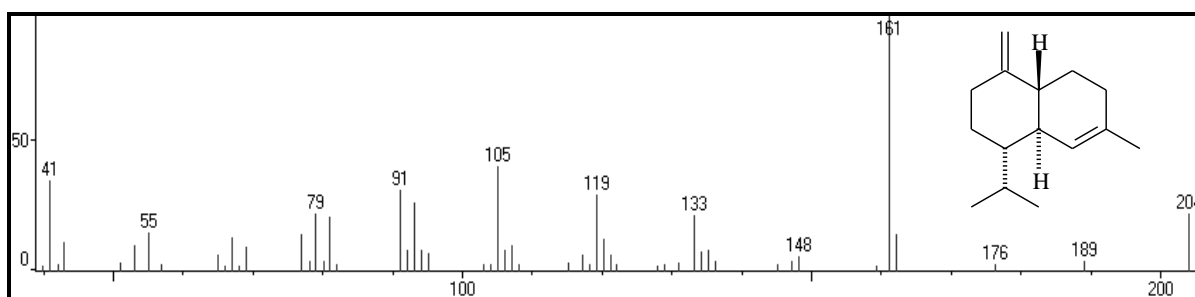


Figura 21 – Espectro de massa do γ -cadineno

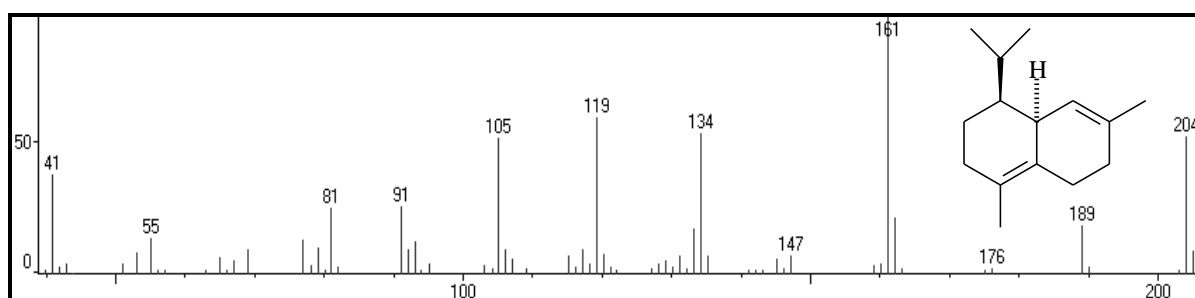


Figura 22 – Espectro de massa do δ -amorfenno

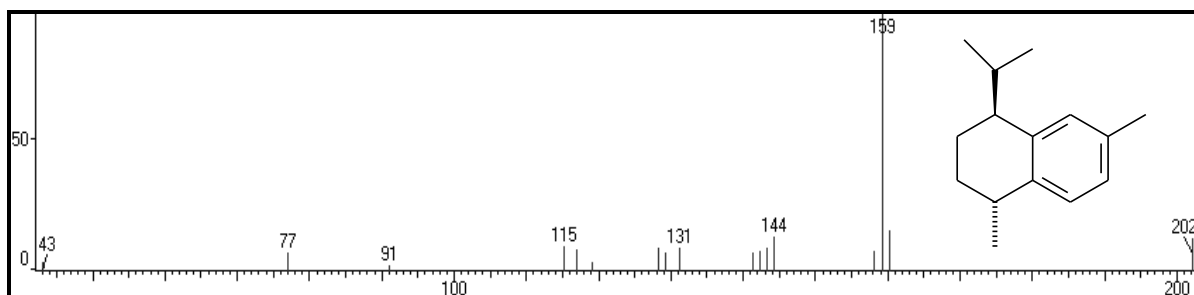


Figura 23 – Espectro de massa do *trans*-calameneno

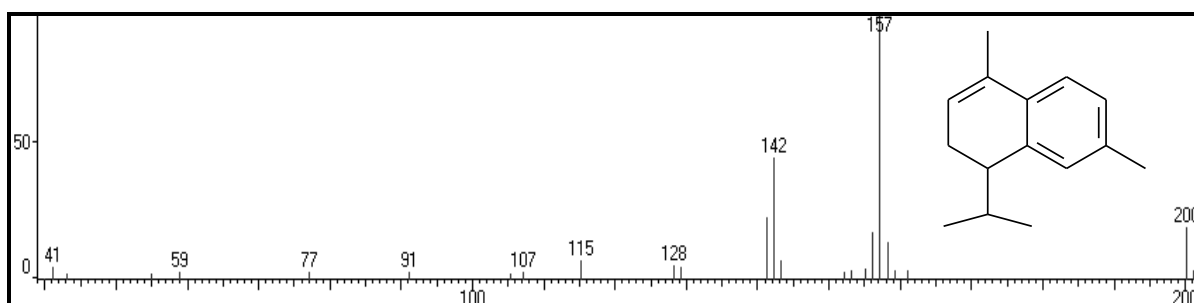


Figura 24 – Espectro de massa do α -calacoreno

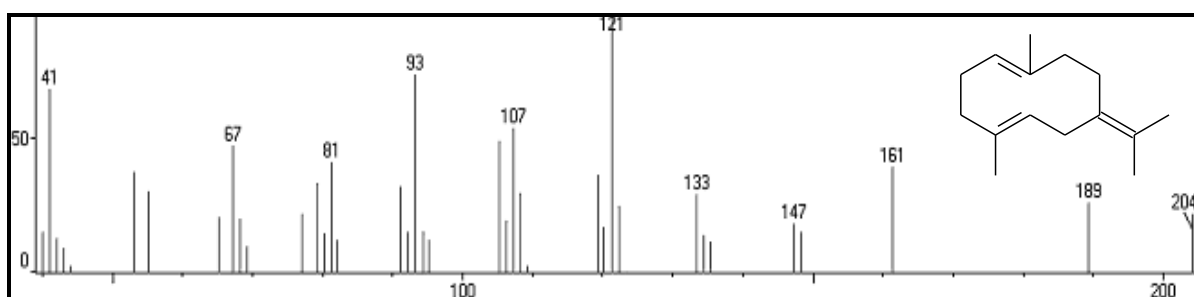


Figura 25 – Espectro de massa do germacreno B

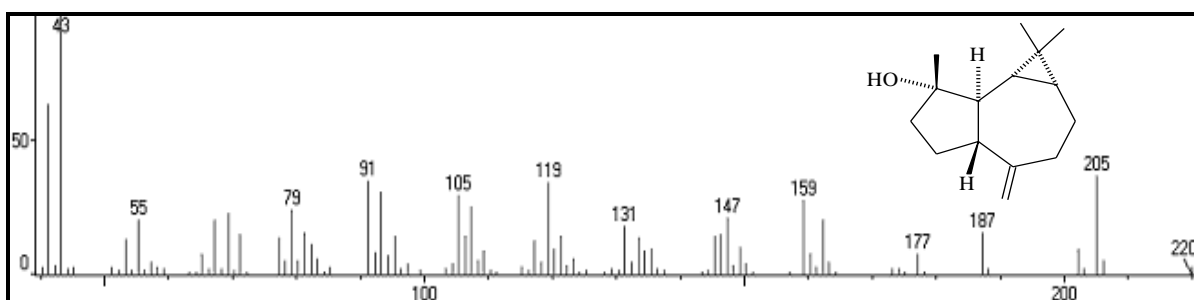


Figura 26 – Espectro de massa do spatulenol

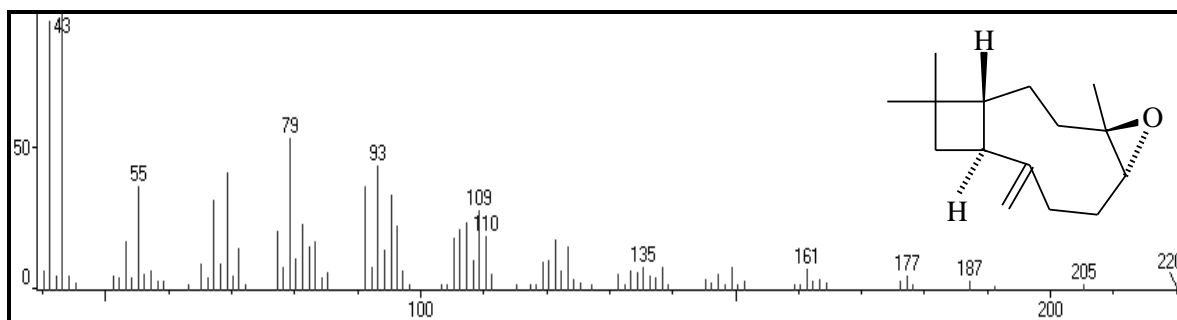


Figura 27 – Espectro de massa do óxido de cariofileno

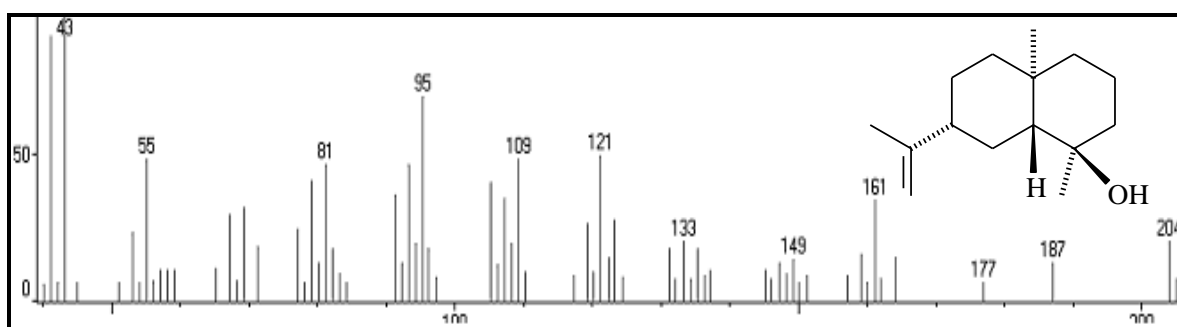


Figura 28 – Espectro de massa do selin-11-en-4 α -ol

A ausência de monoterpenos no óleo essencial dos frutos maduros de *H. courbaril*, levou a se pensar que, no processo de amadurecimento destes, estes compostos poderiam ser volatilizados e daí resolveu-se extrair e identificar os constituintes químicos do óleo essencial dos frutos verdes da espécie.

4.2 Identificação dos constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de *Hymenaea courbaril* L.

De forma semelhante ao óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *H. courbaril* (OEHC), o estudo da composição química do óleo essencial das cascas dos frutos verdes (OEHCV) foi realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) na análise qualitativa e por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG/DIC) na análise quantitativa. Os cromatogramas obtidos por ambas as técnicas são mostrados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

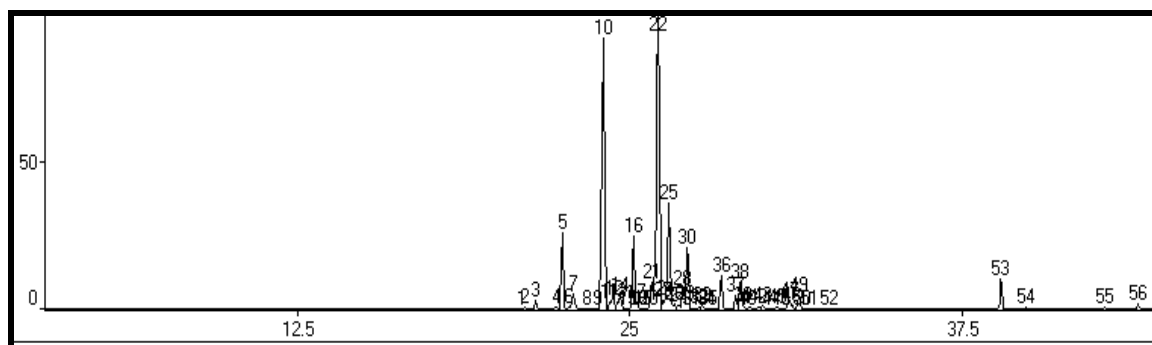


Figura 29 - Cromatograma (CG/EM) de OEHCV

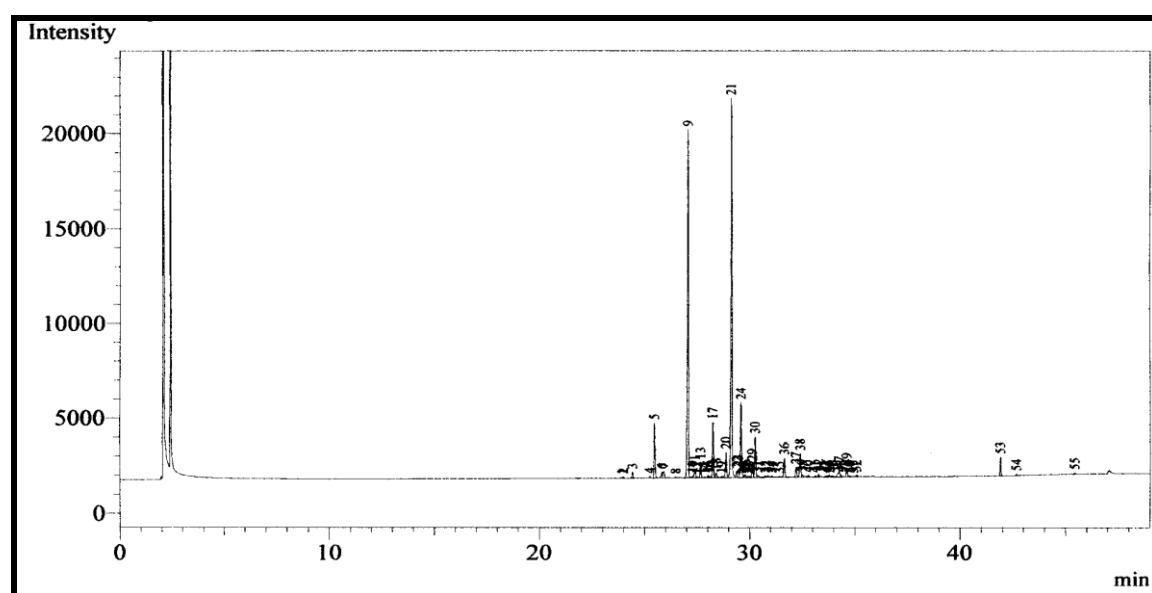


Figura 30 - Cromatograma (CG/DIC) de OEHCV

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de *H. courbaril* (OEHCV) foi efetuada de forma semelhante à utilizada para a identificação e quantificação do óleo essencial das cascas dos frutos maduros (OEHC), sendo possível, a identificação de 93,34% dos constituintes deste óleo, como mostra a Tabela 04. O índice de refração obtido foi 1,6703°, a rotação óptica medida foi + 0,028° e a rotação específica + 0,10°.

Tabela 04 – Constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de *H. courbaril*.

PICO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO	% (CG/DIC)	IK _{experimental}
2	21,07	δ -elemeno	0,09	1333
3	21,48	α -cubebeno	0,44	1345
4	22,24	α -ylangeno	0,14	1367
5	22,48	α -copaeno	4,16	1374
7	22,89	7- <i>epi</i> -sesquitujeno	0,75	1386
8	23,40	cipereno	0,08	1401
10	24,02	β -cariofileno	27,10	1419
11	24,29	β -copaeno	0,14	1428
12	24,40	α - <i>trans</i> -bergamoteno	0,87	1431
14	24,67	(Z)- β -farneseno	1,21	1439
15	24,93	<i>cis</i> -muurola-3,5-dieno	0,09	1447
16	25,16	α -humuleno	4,24	1454
17	25,28	allo-aromadendreno	0,51	1458
21	25,84	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	2,31	1475
22	26,07	germacreno-D	31,93	1482
23	26,28	β -selineno	0,58	1488
24	26,38	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	0,76	1491
25	26,49	biciclogermacreno	6,48	1494
26	26,69	δ -amorfenol	0,29	1501
28	27,02	γ -cadineno	1,11	1511
30	27,18	δ -cadineno	3,33	1516
32	27,62	<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	0,20	1530
33	27,75	α -cadineno	0,23	1534
36	28,45	germacreno B	1,71	1557
37	29,00	espatulenol	0,89	1575
38	29,18	óxido de cariofileno	2,11	1580
39	29,28	globulol	0,21	1583
43	30,02	epóxido de humuleno II	0,27	1607
45	30,55	1- <i>epi</i> -cubenol	0,18	1625
49	31,38	α -cadinol	0,79	1653
54	39,92	levomenol	0,14	1887
TOTAL			93,34	

As Figuras 31 a 61 mostram os espectros de massas de cada constituinte identificado, obtidos em espectrômetro de massa através da técnica de impacto eletrônico de 70 eV.

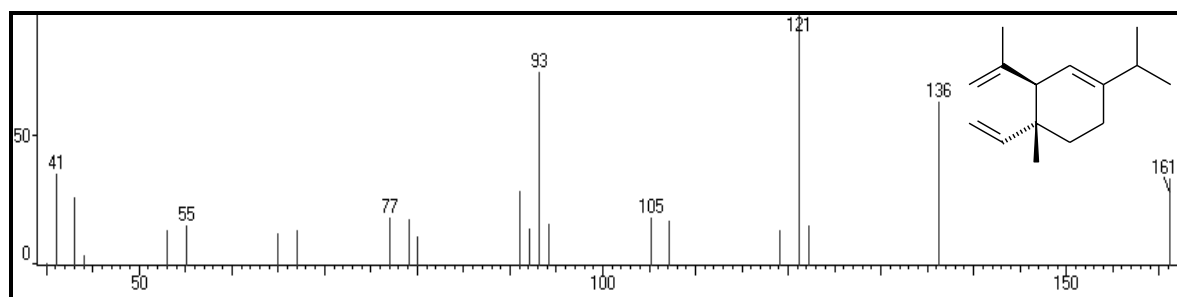


Figura 31 – Espectro de massa do δ -elemeno

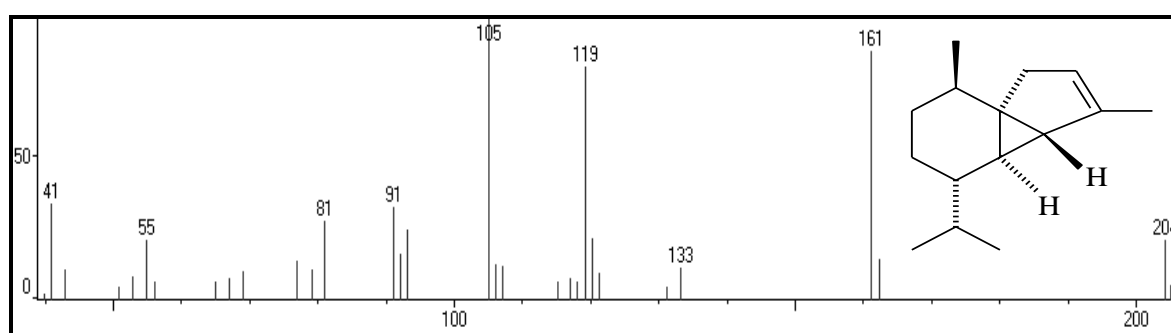


Figura 32 – Espectro de massa do α -cubebeno

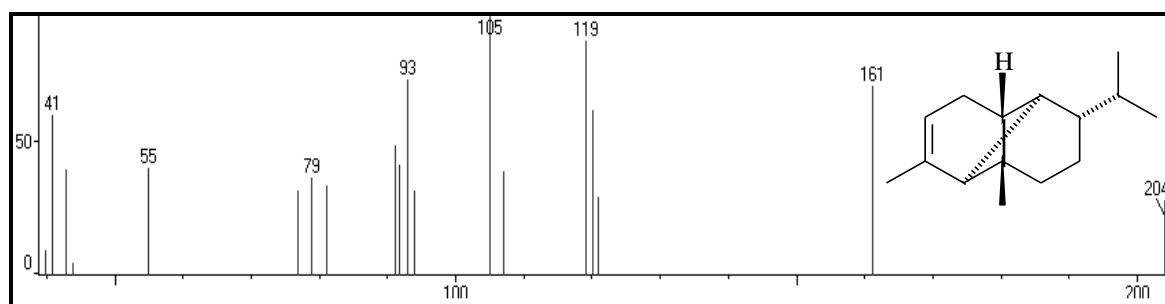


Figura 33 – Espectro de massa do α -ylangeno

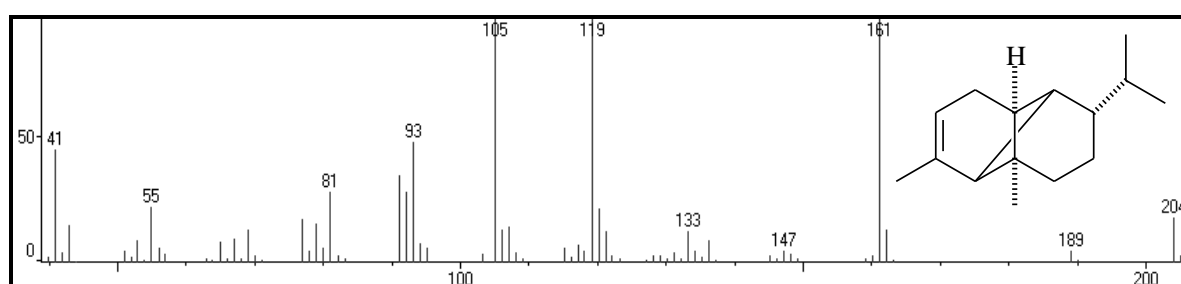


Figura 34 – Espectro de massa do α -copaeno

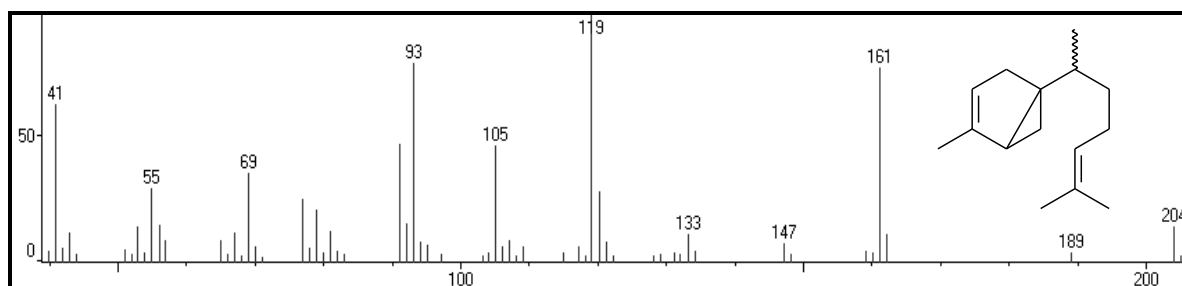


Figura 35 – Espectro de massa do 7-*epi*-sesquitujeno

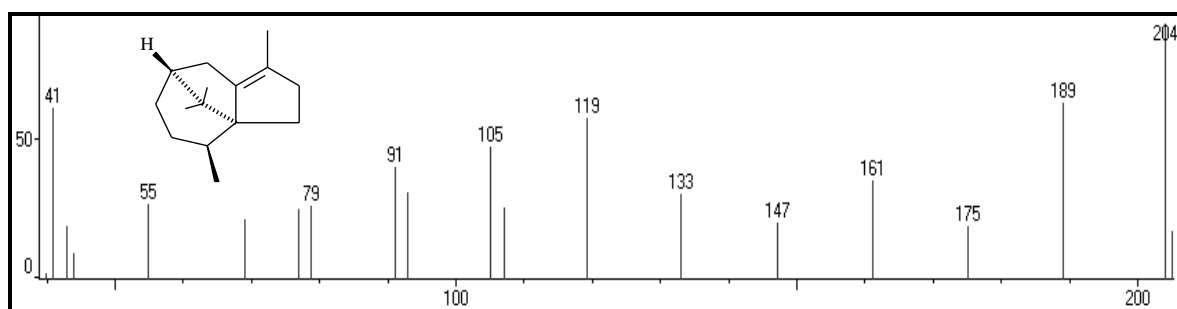


Figura 36 – Espectro de massa do cipereno

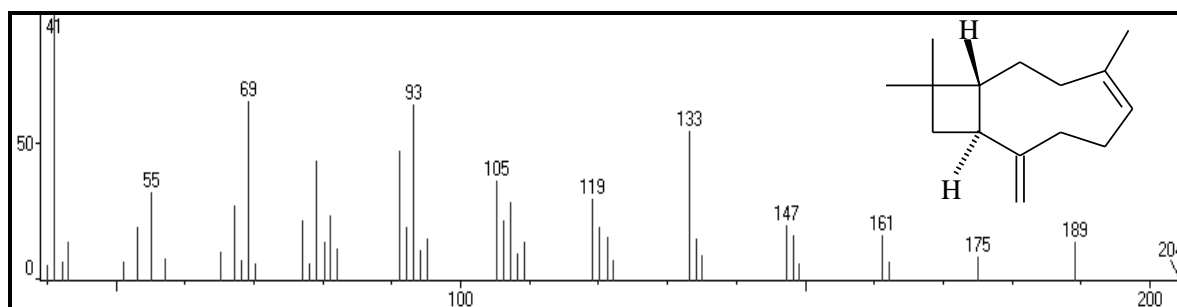


Figura 37 – Espectro de massa do β -cariofileno

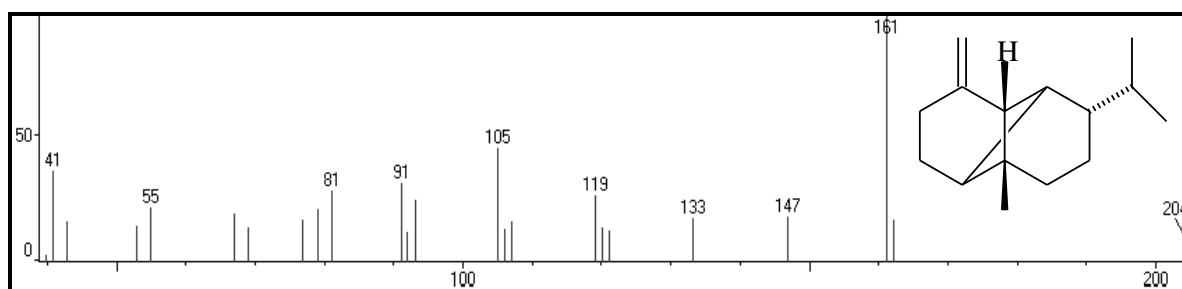


Figura 38 – Espectro de massa do β -copaeno

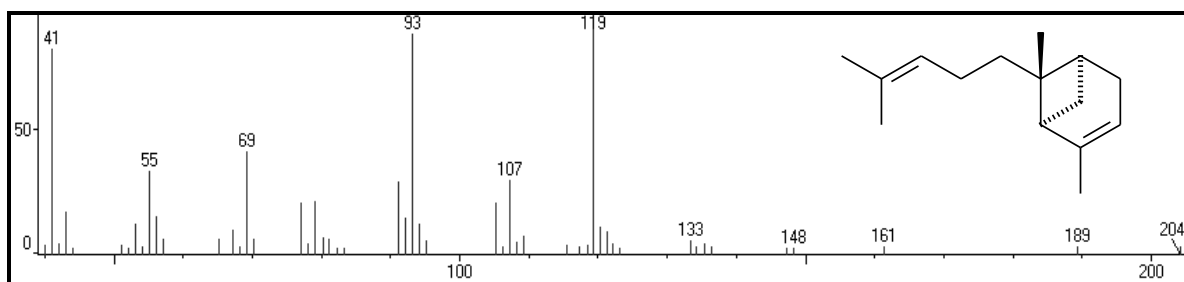


Figura 39 – Espectro de massa do α -*trans*-bergamoteno

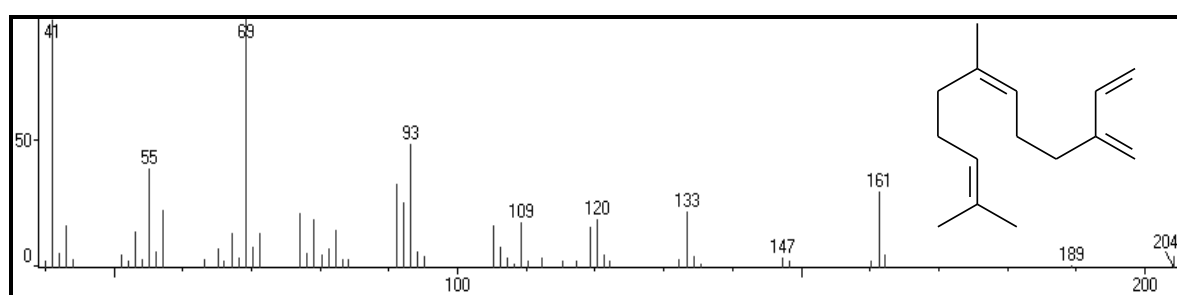


Figura 40 – Espectro de massa do (*Z*)- β -farneseno

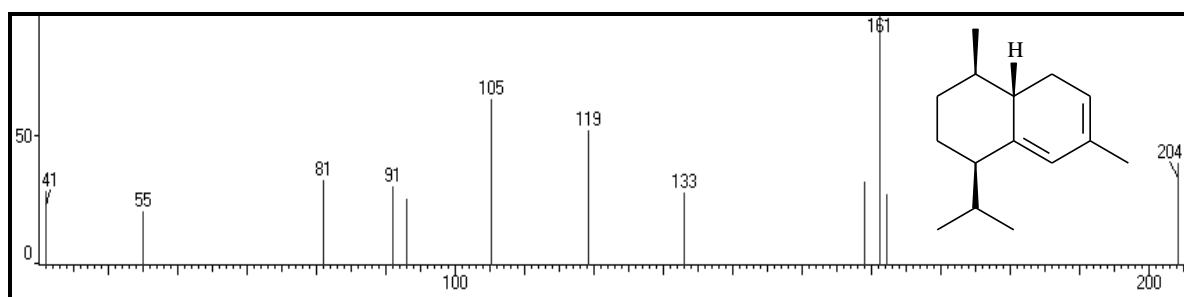


Figura 41 – Espectro de massa do *cis*-muurolo-3,5-dieno

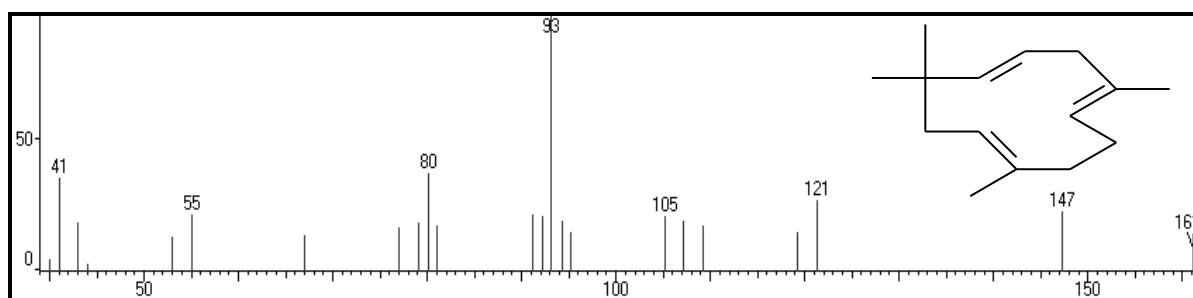


Figura 42 – Espectro de massa do α -humuleno

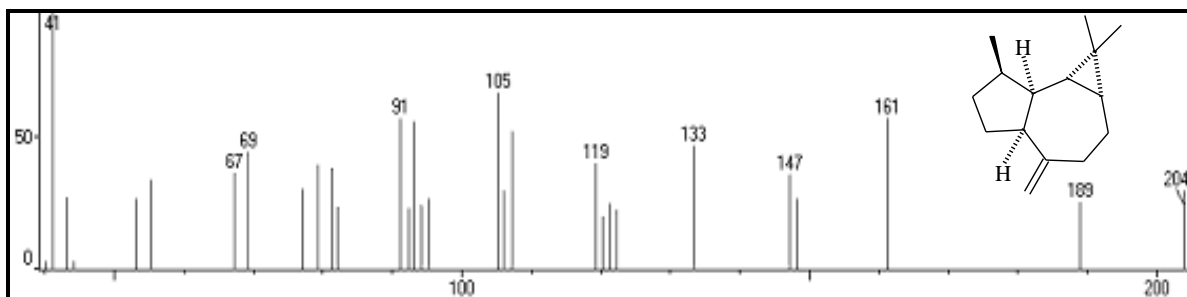


Figura 43 – Espectro de massa do allo-aromadendreno

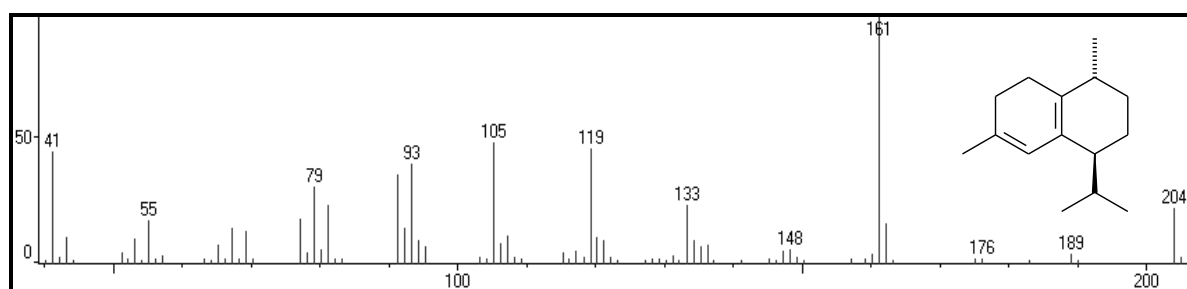


Figura 44 – Espectro de massa do *trans*-cadina-1(6),4-dieno

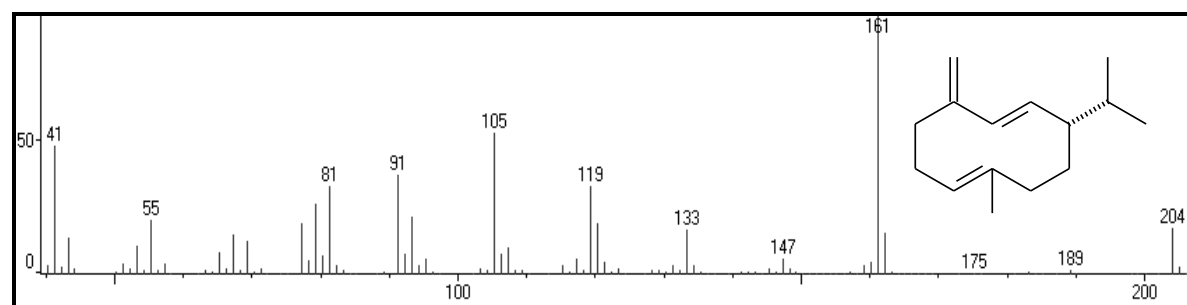


Figura 45 – Espectro de massa do germacreno-D

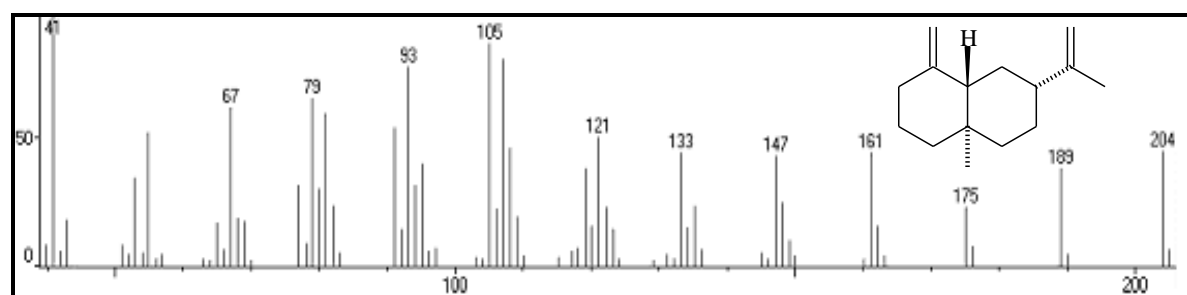


Figura 46 – Espectro de massa do β -selineno

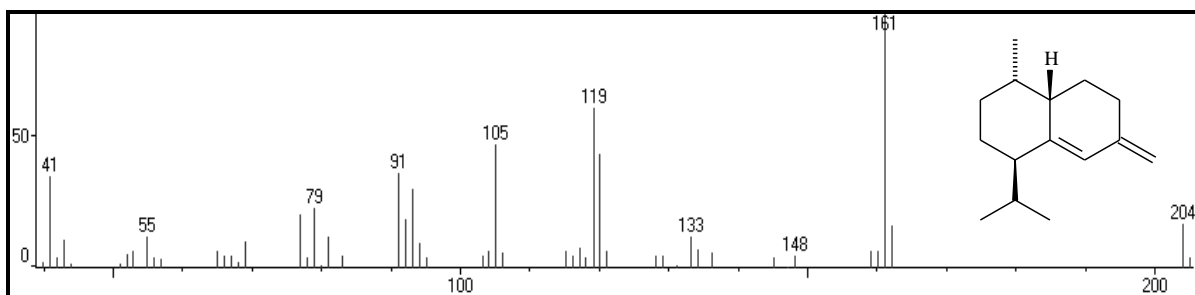


Figura 47 – Espectro de massa do *trans*-muurola-4(14),5-dieno

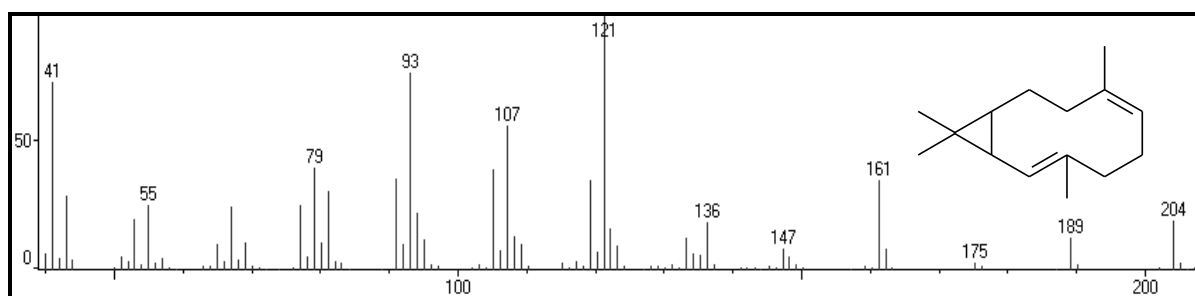


Figura 48 – Espectro de massa do bicylogermacreno

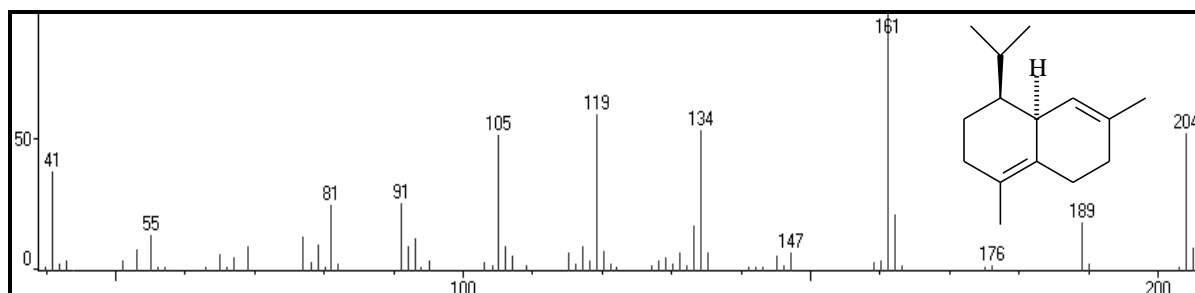


Figura 49 – Espectro de massa do δ -amorfen

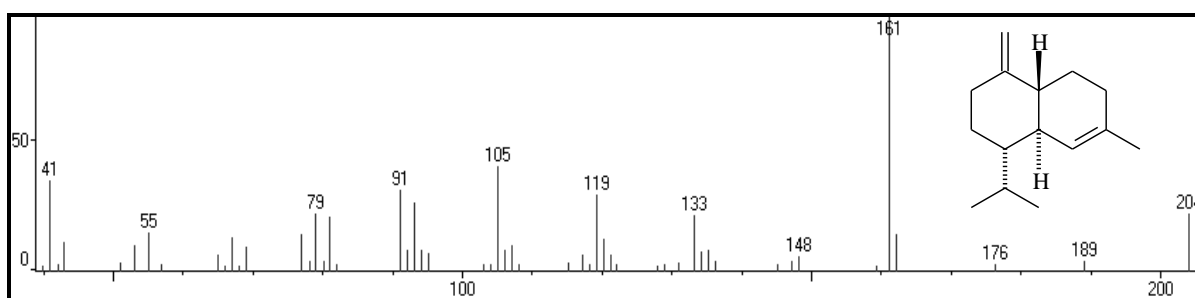


Figura 50 – Espectro de massa do γ -cadineno

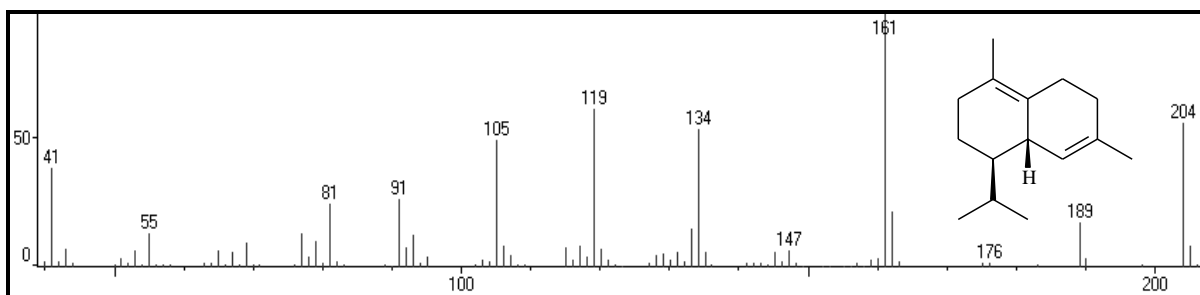


Figura 51 – Espectro de massa do δ -cadineno

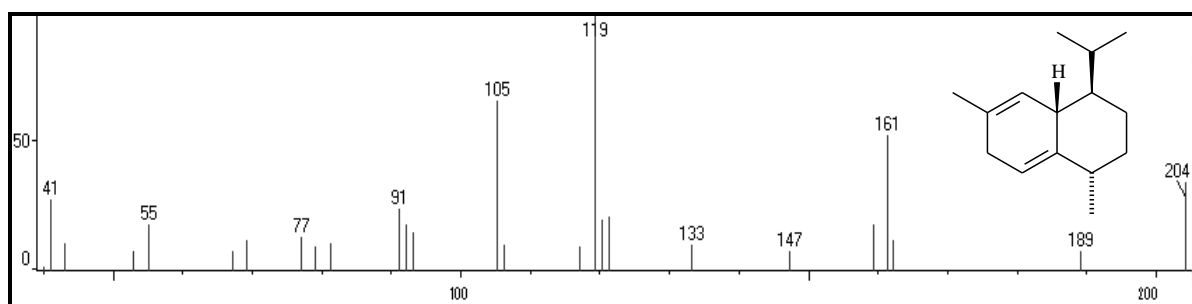


Figura 52 – Espectro de massa do *trans*-cadina-1,4-dieno

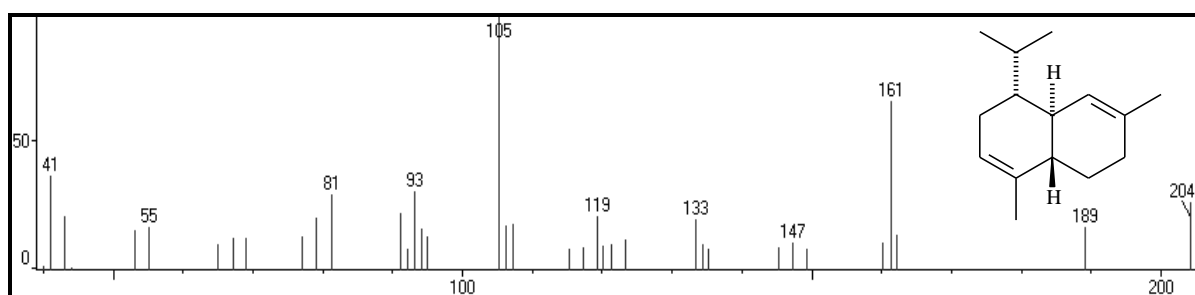


Figura 53 – Espectro de massa do α -cadineno

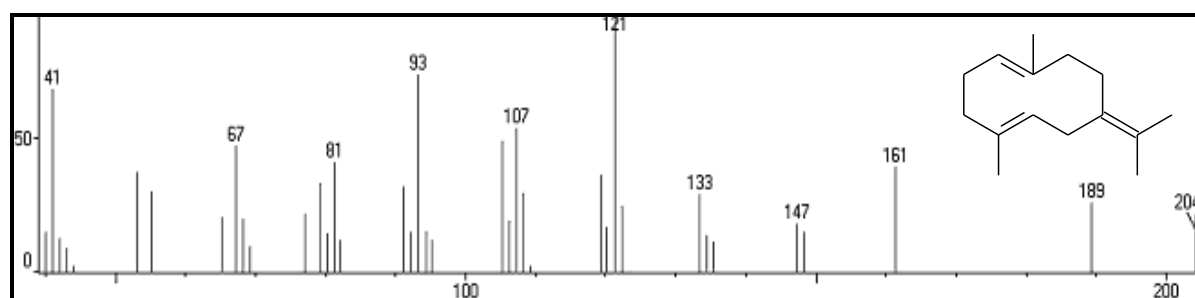


Figura 54 – Espectro de massa do germacreno B

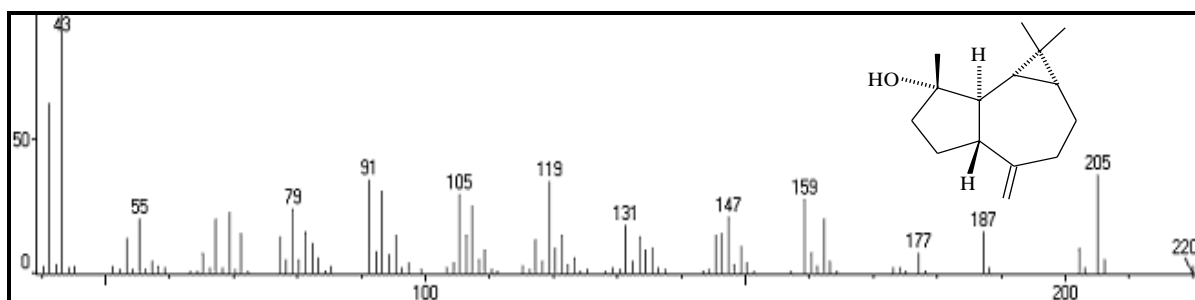


Figura 55 – Espectro de massa do spatulenol

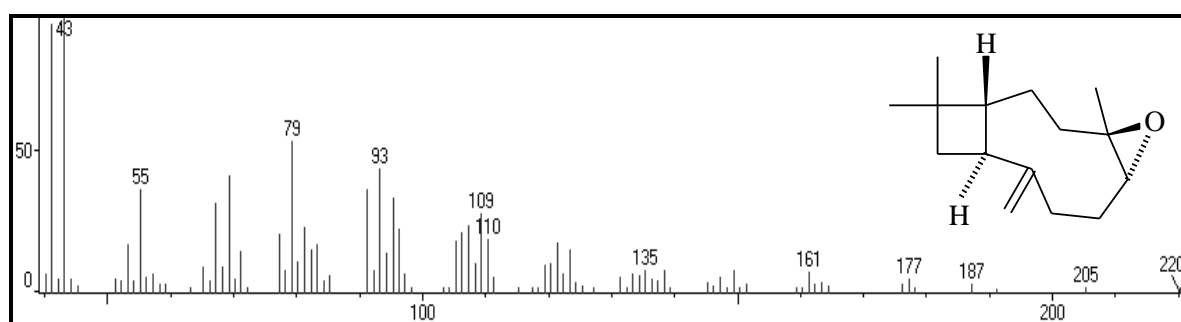


Figura 56 – Espectro de massa do óxido de cariofileno

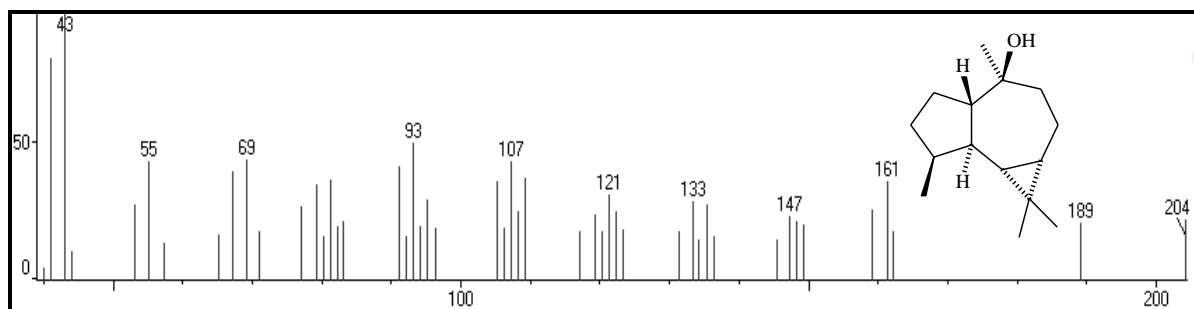


Figura 57 – Espectro de massa do globulol

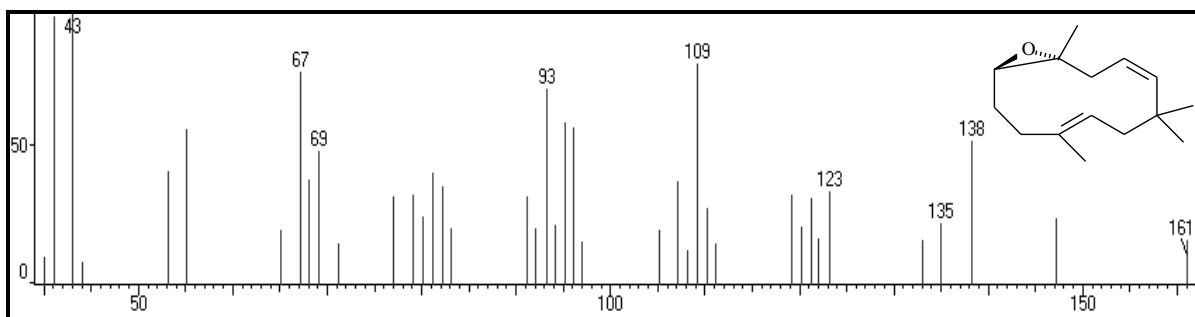


Figura 58 – Espectro de massa do epóxido de humuleno II

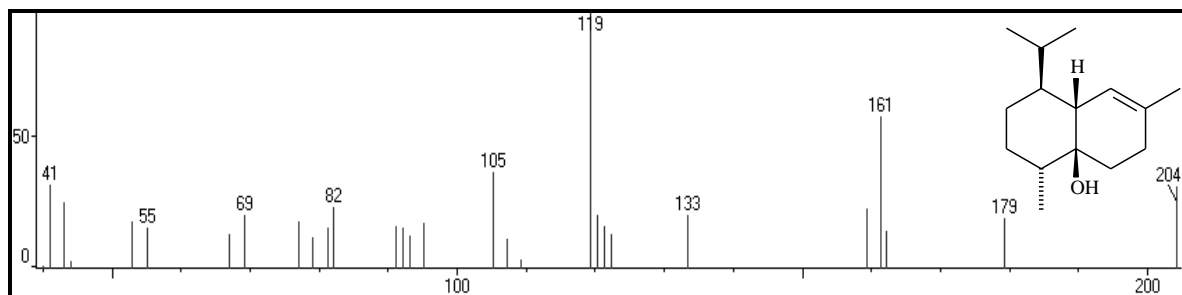


Figura 59 – Espectro de massa do 1-*epi*-cubenol

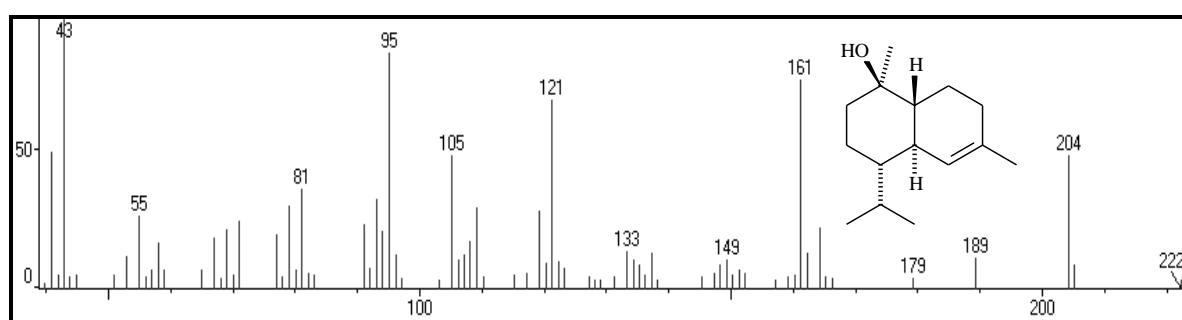


Figura 60 – Espectro de massa do α -cadinol

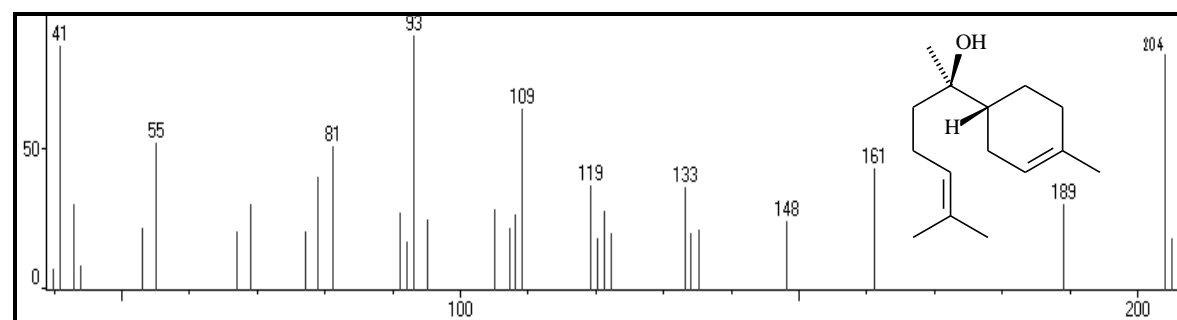


Figura 61 – Espectro de massa do levomenol

4.3 Determinação estrutural dos constituintes fixos de *Hymenaea courbaril* L.

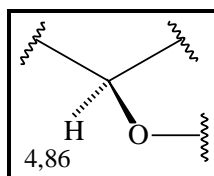
4.3.1 Determinação estrutural de HC-1

Sucessivos fracionamentos cromatográficos de EHHC levaram à obtenção de EHHC (26-28), (item 5.4.2.1, p. 99), permitindo o isolamento de 121,6 mg de um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio, que foi denominado HC-1, cujo espectro de massa (Figura 63, p. 42) apresentou o pico íon molecular m/z igual a 360 Daltons.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV), mostrado na Figura 64 (p. 42), mostrou uma banda em frequência 3414 cm^{-1} indicativa da deformação axial da ligação O – H de grupo hidroxila. As bandas em 1716 e 1735 cm^{-1} indicaram deformação axial da ligação dupla no grupo carbonila de ácido carboxílico e de éster, respectivamente. Observaram-se bandas em 1239 , 1155 e 1124 cm^{-1} relativas a vibrações de deformação axial de C – O. Os valores em 2938 e 2852 cm^{-1} corresponderam à deformação axial da ligação de carbonos sp^3 com hidrogênios, em CH_3 e CH_2 , respectivamente. Este espectro mostrou bandas em 1638 cm^{-1} , correspondente à deformação axial de ligação C = C em sistema conjugado; e em 1684 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de ligação C = C em sistema não conjugado. As frequências 1443 e 1463 cm^{-1} foram relacionadas às deformações angulares de CH_3 e de CH_2 , respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), mostrado na Figura 65 (p. 43), apresentou sinais com deslocamentos químicos (δ) entre 4,64 e 6,33, característicos de absorção de átomos de hidrogênio ligados a carbonos olefínicos. Na expansão 1 deste espectro (Figura 66, p. 43), foram verificados quatro singletos em δ 0,86; 1,14; 1,76 e 1,95, referentes a sinais de átomos de hidrogênio em grupos metila ligados a carbonos não hidrogenados.

Na expansão 2 do espectro de RMN ^1H (Figura 67, p. 44), os sinais em δ 4,64, 4,98, 4,91, 5,07, 5,40 e 6,33 indicaram presença de átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono olefínicos. O sinal em δ 4,86 mostrou um dubleto de tripleto ($J = 11,2$ e $4,9\text{ Hz}$) referente a hidrogênio ligado a carbono de hibridação sp^3 oxigenado:



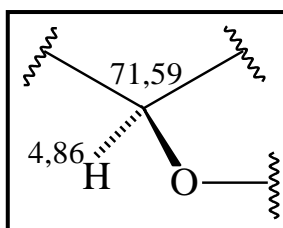
Na Figura 68, correspondente ao espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3), foram observadas 22 linhas espectrais e, através da comparação com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 69. p. 45), foi possível caracterizar o padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono e distinguir aqueles não hidrogenados dos demais por subtração espectral. Dessa forma, foi constatada a presença de sete átomos de carbono metilênicos (CH_2) e de seis não hidrogenados (C). Os outros nove sinais podem ser atribuídos à presença de grupos metínicos (CH) e metílicos (CH_3). Assim, estes dados podem ser conferidos na Tabela 05.

Tabela 05 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos átomos de carbono não hidrogenados (C), metilênicos (CH_2), metínicos (CH) e metílicos (CH_3), obtidos por comparação entre espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°

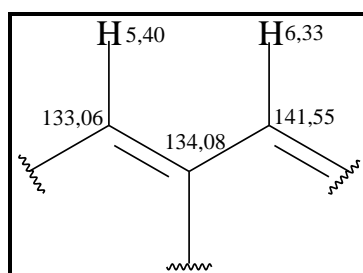
C	CH_2	CH, CH_3
38,57	18,27	12,10
44,72	23,18	15,70
134,08	38,00	16,44
143,62	38,32	21,09
170,50	43,42	52,54
186,35	110,54	71,59
-	111,96	56,39
-	-	133,06
-	-	141,55

Os sinais em δ 170,50 e 186,35 sugeriram a presença de grupos carbonila de éster e de ácido carboxílico, respectivamente; confirmando a sugestão fornecida através dos dados obtidos no espectro na região do infravermelho. Os sinais em δ 110,54; 111,96; 133,06; 134,08; 141,55 e 143,62 são correspondentes a sinais de absorção de carbonos olefínicos.

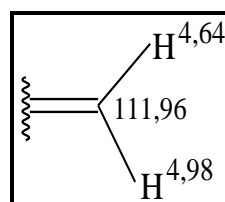
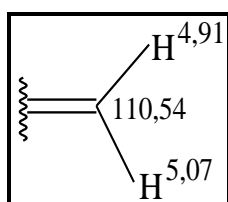
A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 70, p. 45), indicou que os átomos de carbono com absorções em δ 12,10, 16,44, 15,70 e 21,09 pertenciam a grupos metila (CH_3), enquanto o sinal em δ 71,59 sugeriu átomo de carbono oxigenado, e, de acordo com o espectro HSQC, notou-se a sua correlação com o sinal de hidrogênio em δ 4,86:



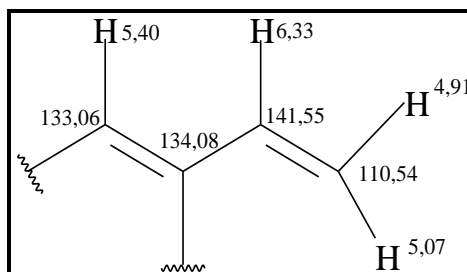
Ainda, em relação ao espectro HSQC, notou-se que o sinal em δ 133,06 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio δ 5,40 (t, $J = 6,2$ Hz), mostrando tratar-se de um carbono metínico (CH). O mesmo foi verificado com o sinal em δ 141,55, o qual correlaciona-se com o sinal em δ 6,33 (dd, $J = 17,4$ e $10,8$ Hz), indicando, também, tratar-se de um carbono metínico (CH). Com o conhecimento de que o sinal em δ 134,08 indica carbono olefínico não hydrogenado, foi possível sugerir a sub-estrutura:



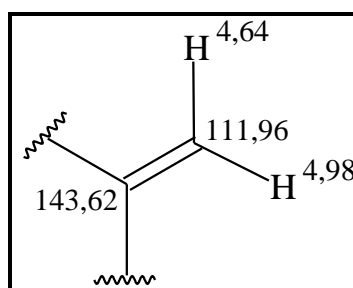
Na expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 71, p. 46), notou-se a correlação entre o sinal de carbono olefínico em δ 110,54 e os sinais de hidrogênio em δ 5,07 e 4,91, indicando tratar-se de um grupo metileno terminal. O mesmo fato foi verificado com o sinal de carbono olefínico em δ 111,96, o qual apresentou correlação com os átomos de hidrogênio em δ 4,64 e 4,98. Estes dados levaram à indicação de dois grupos metileno terminais na molécula:



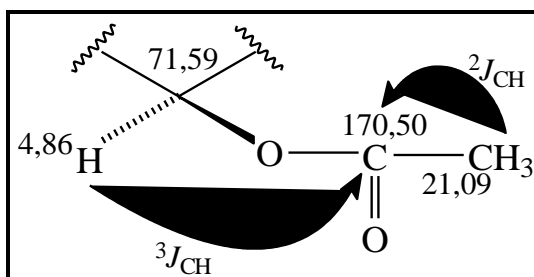
Através da análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Figura 72, p. 46) notou-se a correlação entre os sinais de átomos de hidrogênio em δ 4,91 e 5,07 com o hidrogênio em δ 6,33, o que levou a proposição da sub-estrutura:



Foi verificado que os átomos de hidrogênio com sinais em δ 4,64 e 4,98 não apresentaram correlação alguma no espectro COSY, podendo-se concluir que estes sinais correspondem a átomos de hidrogênio de grupo metileno terminal, cujo carbono apresenta sinal em δ 111,96, está ligado a um átomo de hidrogênio não hydrogenado, o qual, pela análise dos valores de deslocamentos químicos da Tabela 05, é identificado como sendo o carbono em δ 143,62.



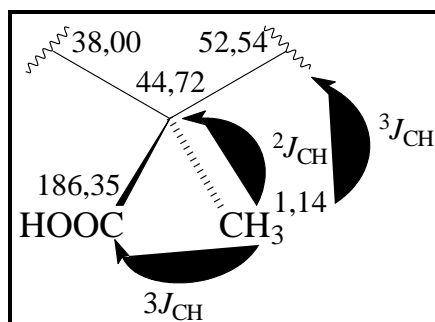
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 73, p 47) e sua expansão (Figura 74, p 47) mostraram a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o carbono em δ 170,50, atribuído a um carbono do grupo carbonila de éster, e o átomo de hidrogênio em δ 4,86. Também, indicou a correlação a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre o carbono em δ 170,50 e os hidrogênios em δ 1,95, os quais encontram-se ligados ao carbono metílico em δ 21,09, mostrado no espectro de HSQC. Dessa forma, pôde-se elaborar a seguinte sub-estrutura:



No espectro HMBC, também foi verificado que o átomo de carbono em δ 71,59 apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) com os átomos de hidrogênio em δ 2,04 e 2,74, os quais, pela análise do HSQC, encontravam-se ligados ao átomo de carbono metilênico em δ 43,42 e no espectro COSY, foi verificada a correlação entre os hidrogênios em δ 4,86 e δ 2,74. Logo, pôde-se concluir que o carbono em δ 71,59 está ligado ao carbono em δ 43,42. Com a correlação verificada do carbono em δ 43,42 a três ligações ($^3J_{CH}$) com os dois átomos de hidrogênio δ 4,64 e 4,98, justifica-se a sub-estrutura:



O sinal de átomo de carbono em δ 186,35, referente ao carbono do grupo carboxila, apresentou correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) com os átomos de hidrogênio em δ 2,42 e 1,14. Do mesmo modo, os átomos de carbono em δ 38,00 e em δ 52,54 apresentaram correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) com os hidrogênios em δ 1,14. Já o átomo de carbono sp^3 não hidrogenado em δ 44,72 apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) com os átomos de hidrogênio em δ 2,42 e em δ 1,14. Então, tornou-se possível a localização do grupo carboxila na molécula:



Baseados nos dados espectrais apresentados, no conhecimento das classes de substâncias presentes nesta espécie e na comparação com os dados descritos na literatura para o (-)-zanzibarato de metila (IMAMURA; MIRANDA; GIACOMINI, 2004), foi possível concluir que HC-1 tratava-se do diterpeno *ent*-labdânico, ácido zanzibárico (Figura 62), substância já isolada da espécie na forma de éster metílico. A Tabela 06 mostra os dados espectroscópicos de HC-1 comparados com dados da literatura descritos para (-)-zanzibarato de metila.

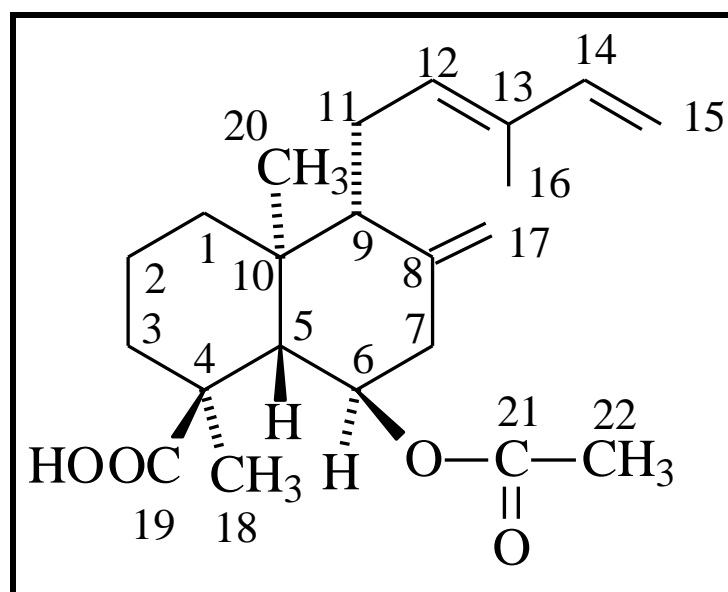


Figura 62 – Estrutura do ácido zanzibárico

Nome químico: ácido decaidro-6-acetiloxi-4,10-dimetil-8-metileno-9-(3-metil-2,4-pentadienil)-4-naftalenocarboxílico.

Tabela 06 – Dados espectroscópicos de HC-1 comparados com dados da literatura (IMAMURA; MIRANDA; GIACOMINI, 2004).

C	RMN ¹ H		RMN ¹³ C		HMBC	
	(-)-zanzibarato de metila (IMAMURA <i>et al</i> , 2004)	HC-1	(-)-zanzibarato de metila (IMAMURA <i>et al</i> , 2004)	HC-1	² J _{CH}	³ J _{CH}
C						
4	-	-	44,5	44,72	H-5; H-18	
8	-	-	143,7	143,62	2H-7; H-9	H-11
10	-	-	38,4	38,57	H-5; H-20	-
13	-	-	133,9	134,08	H-16	2H-15
19	-	-	179,5	186,35	-	H-5;H-18
21	-	-	170,5	170,50	H-22	H-6
CH						
5	2,44 (d; 11,0)	2,42 (d; 11,6)	52,1	52,54	-	H-7; H-18; H-20
6	4,85 (dt; 11,0; 5,1)	4,86 (dt; 11,2; 4,8)	71,3	71,59	2H-7; H-6	-
9	1,92 (d; 12,9)	1,91	56,2	56,39	H-11	H-5; H-7;H-12;2H-17;H-20
12	5,40 (t; 6,4)	5,40 (t; 6,2)	133,1	133,06	-	H-14
14	6,33 (dd; 10,6; 17,2)	6,33 (dd; 17,4; 10,8)	141,5	141,55	H-15	H-12; H-16
CH₂						
1	1,18-1,30 (m) e 1,80-1,86 (m)	1,25-1,30 (m)	38,1	38,32	-	H-3
2	1,54-1,62 (m)	1,57-1,63 (m)	18,0	18,27	-	-
3	1,54-1,62 (m) e 1,69-1,74 (m)	1,57-1,63 (m) e 1,81-1,86 (m)	37,5	38,00	-	H-18
7	2,06 (t; 11,0) e 2,72 (dd; 11,0; 5,1)	2,04 (t; 11,4) e 2,74 (dd; 12,1; 4,8)	43,1	43,42	-	2H-17
11	2,12-2,21 (m) e 2,36-2,42 (m)	2,14-2,17 (m) e 2,38-2,39 (m)	22,9	23,18	H-12	-
15	4,90 (d; 10,6) e 5,06 (d; 17,2)	4,91 (d; 15,4) e 5,07 (d; 17,4)	110,3	110,54	-	-
17	4,62 (s)	4,64 (s) e 4,98 (s)	111,5	111,96	-	2H-7
CH₃						
16	-	1,76 (s)	-	12,10	-	H-12; H-14
18	-	1,14 (s)	-	16,44	-	H-3
20	-	0,86 (s)	-	15,70	-	-
22	-	1,95 (s)	-	21,09	-	-

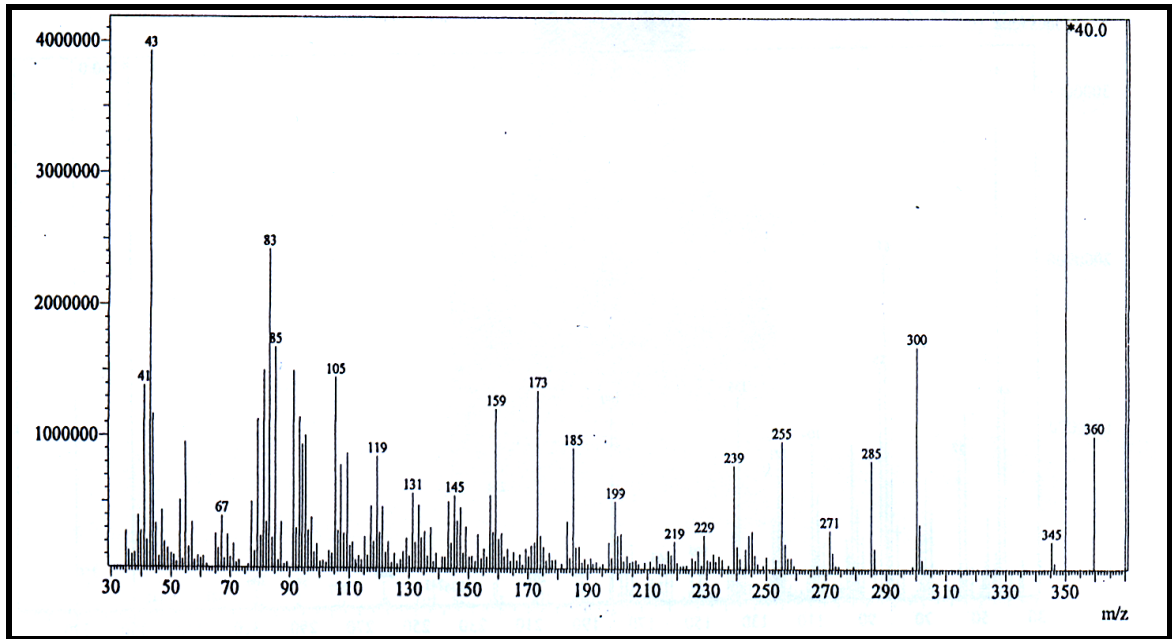


Figura 63 – Espectro de massa (70 eV) de HC-1

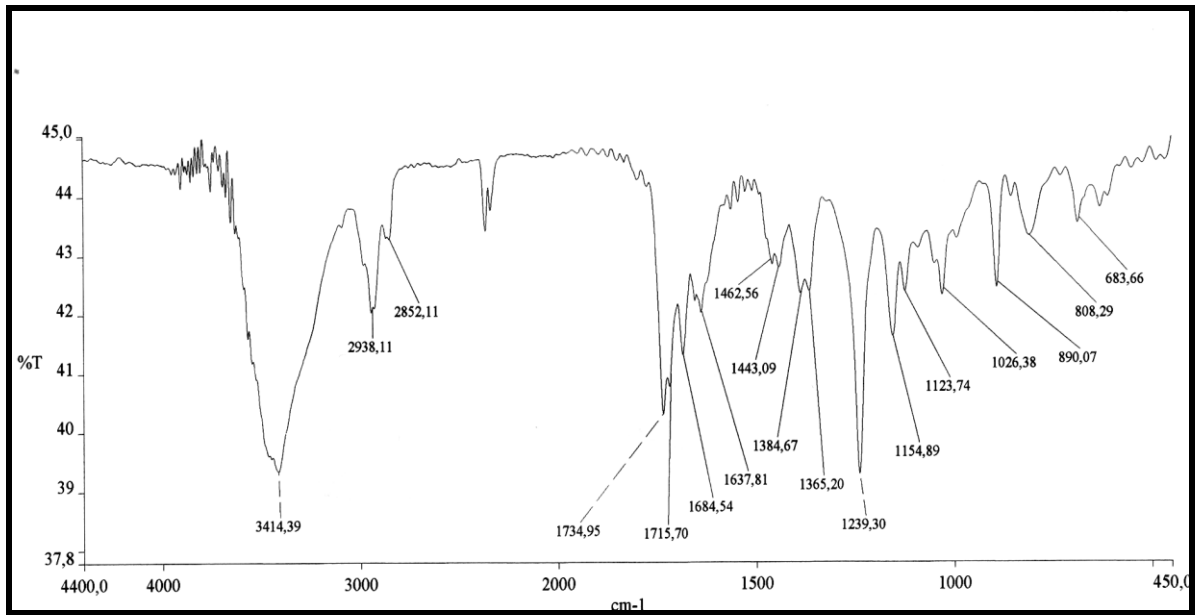


Figura 64 – Espectro de absorção na região do IV de HC-1 (em brometo de potássio)

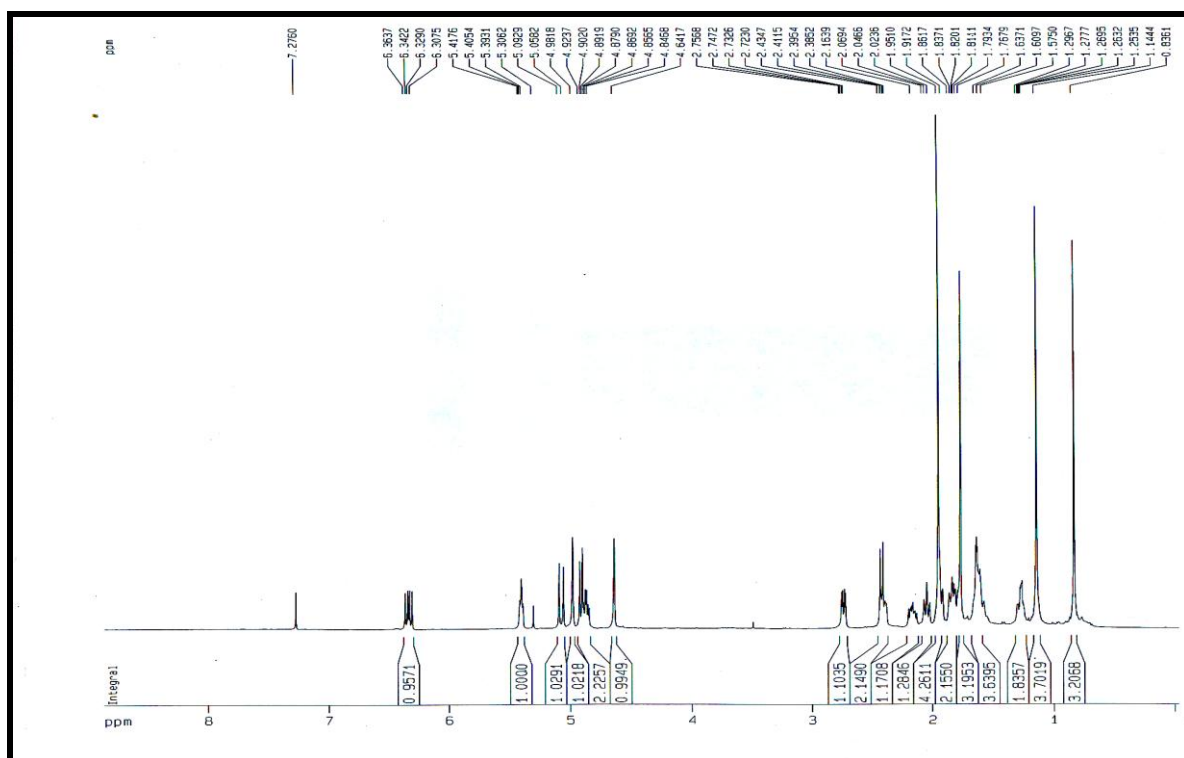


Figura 65 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1

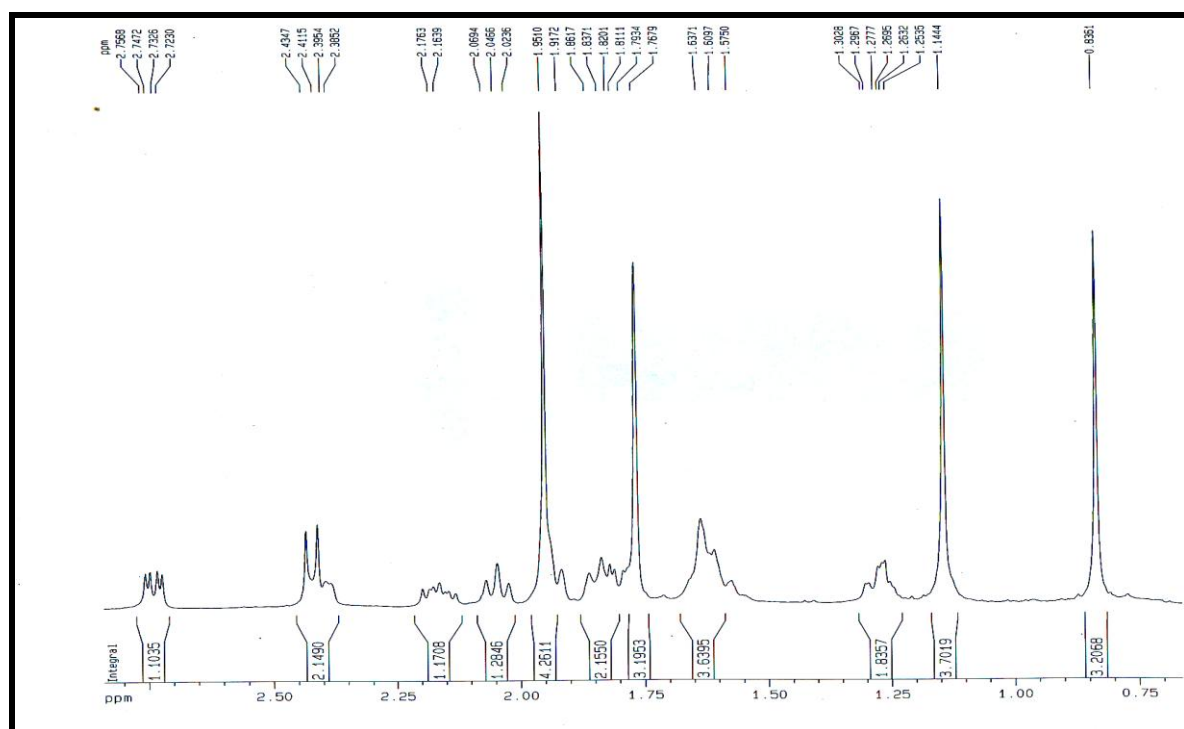


Figura 66 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1

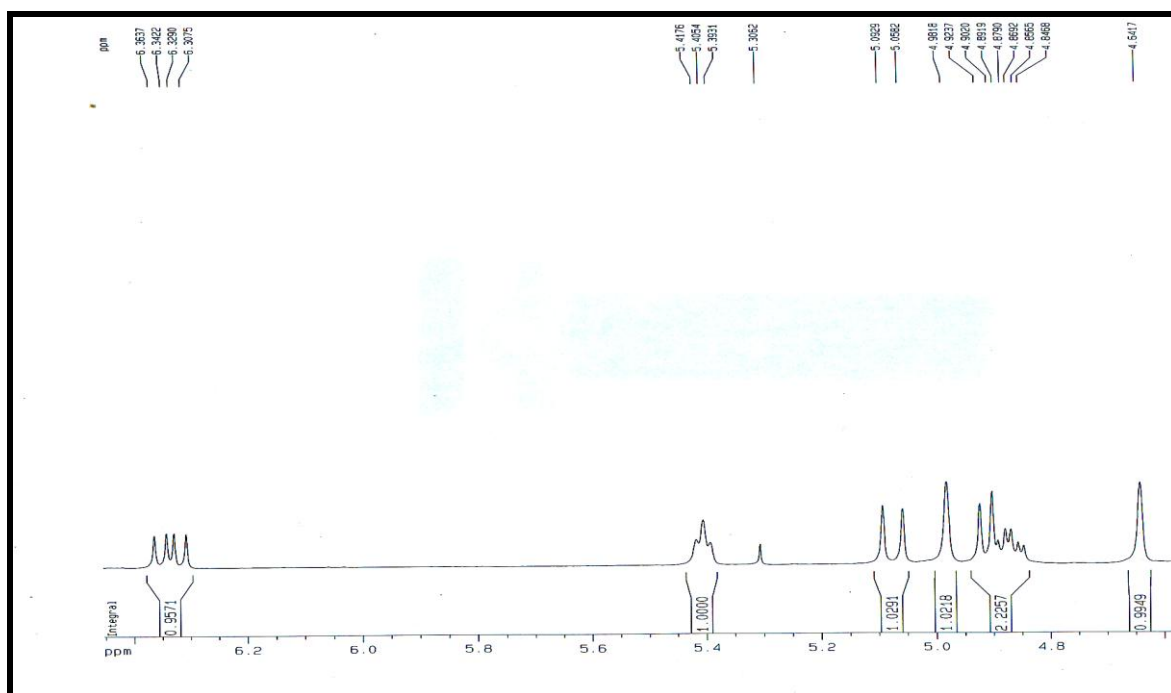


Figura 67 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-1

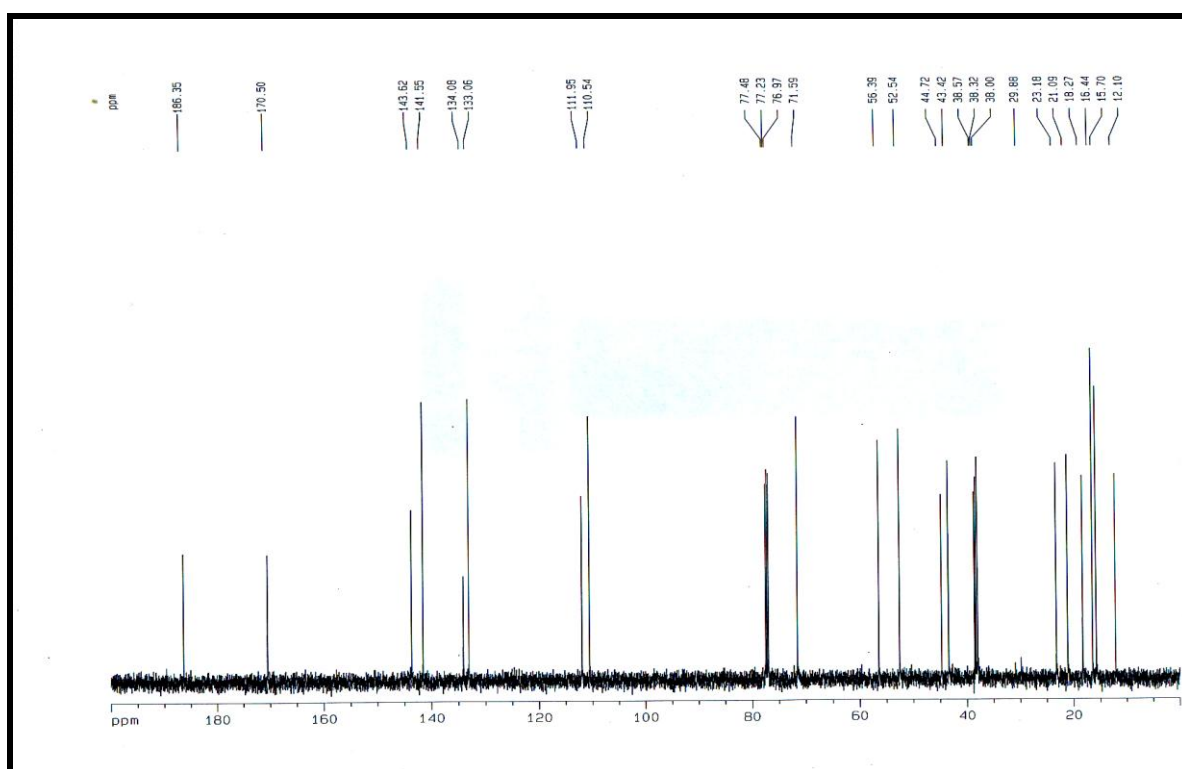


Figura 68 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-1.

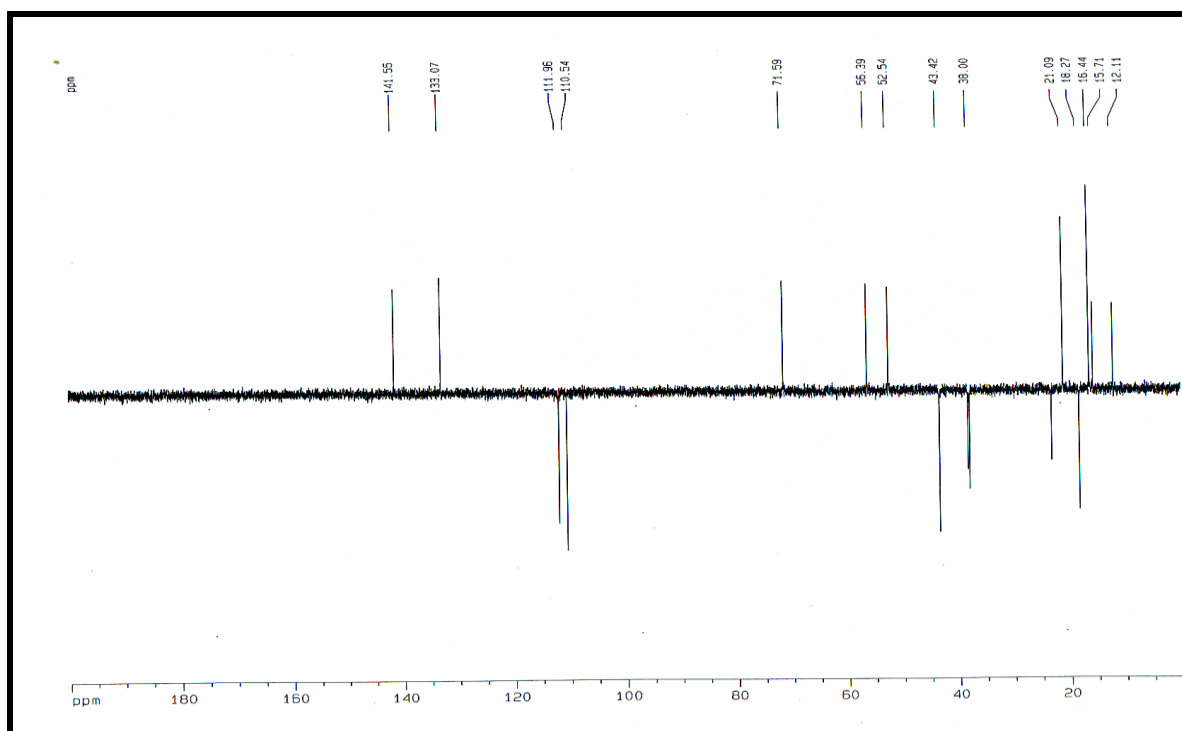


Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de HC-1

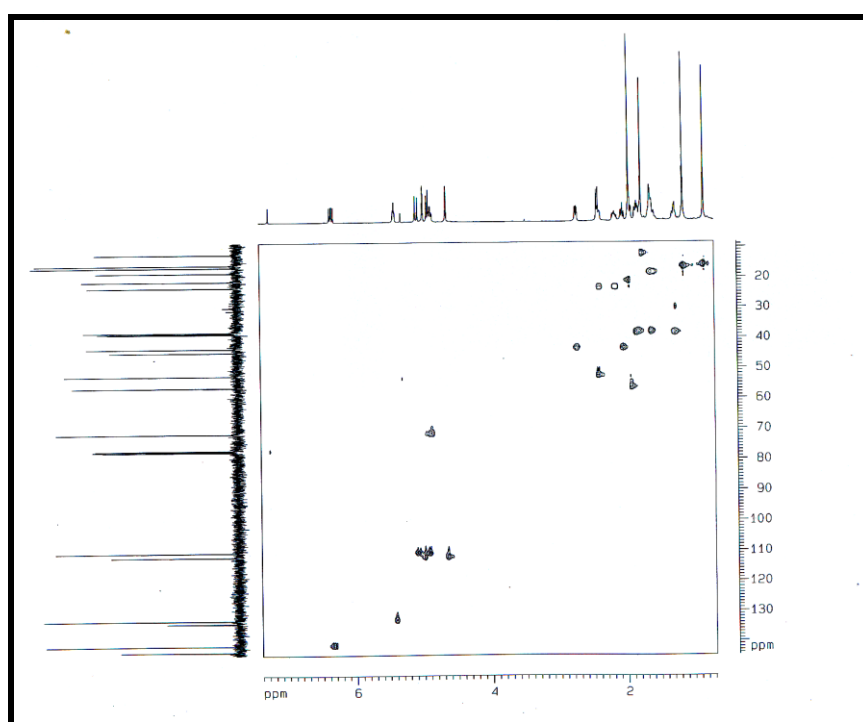


Figura 70 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-1

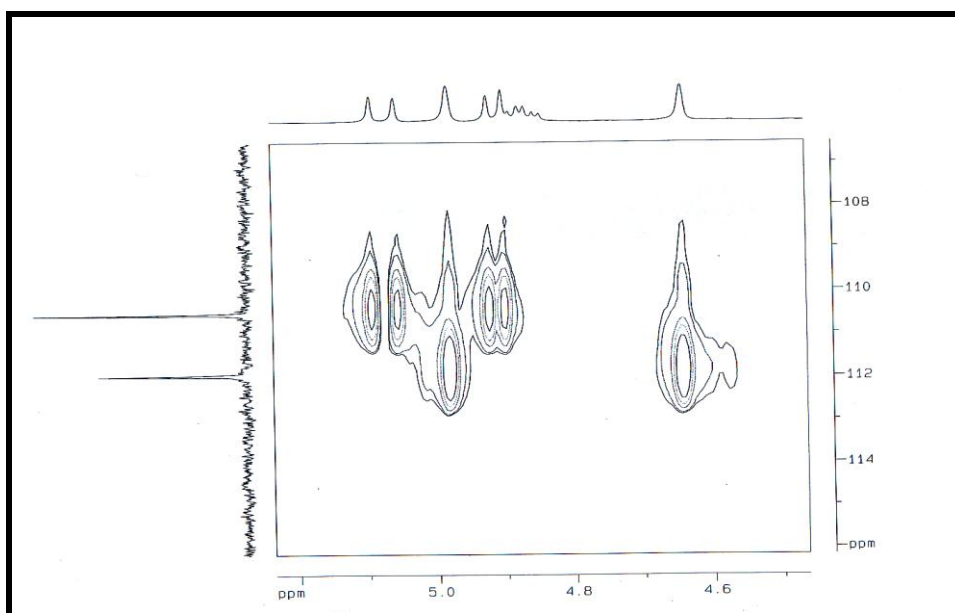


Figura 71 - Expansão do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-1

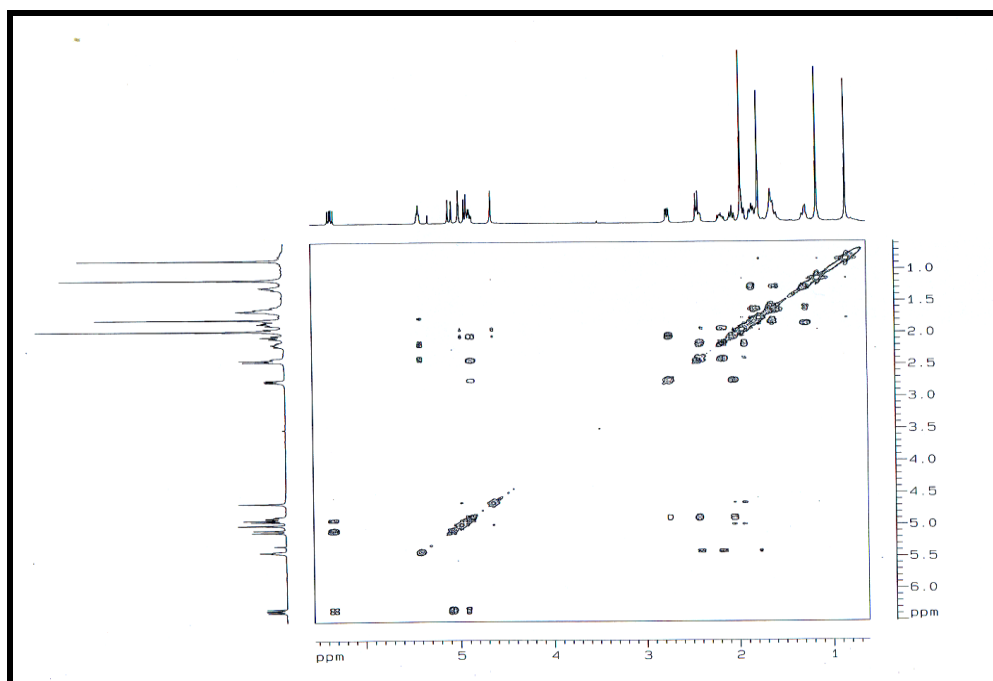


Figura 72 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HC-1

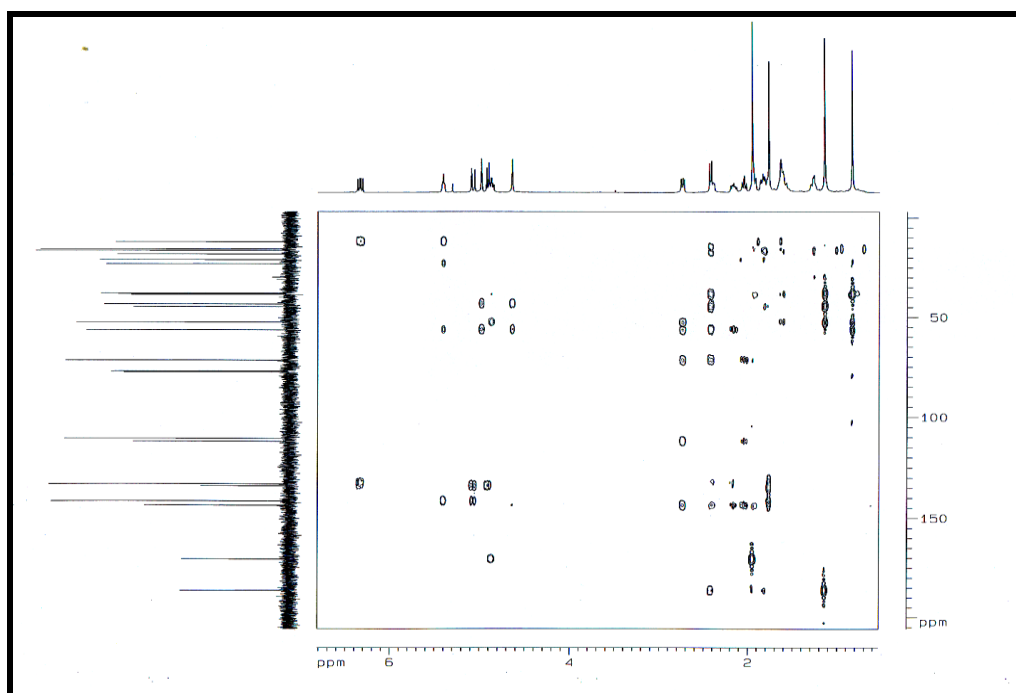


Figura 73 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-1

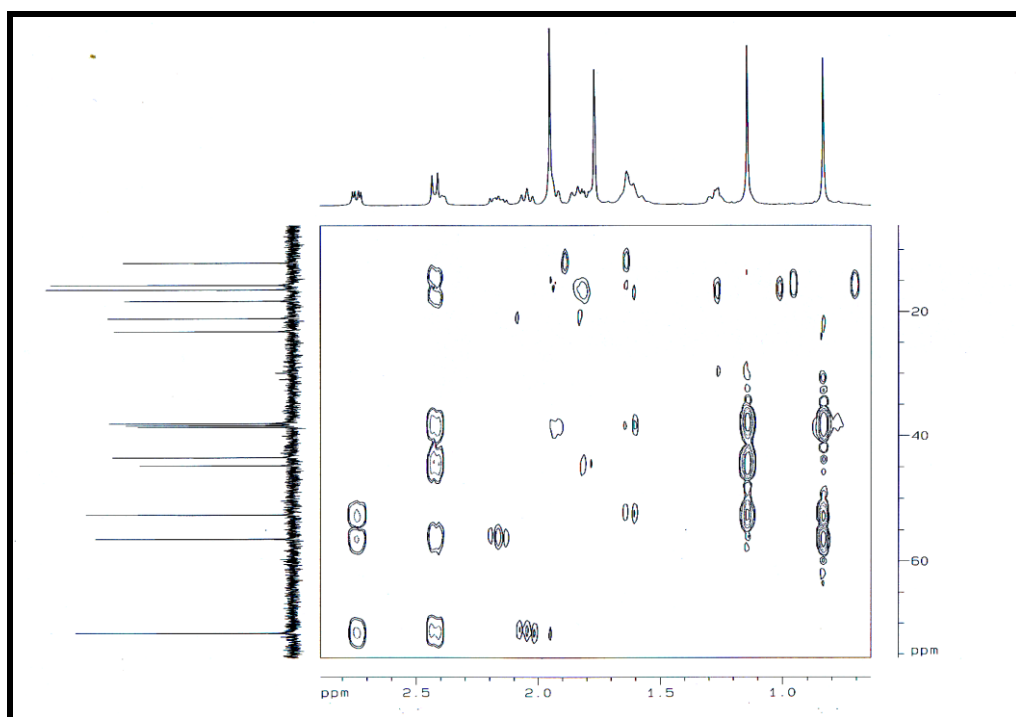


Figura 74 – Expansão do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-1

4.3.2 Determinação estrutural de HC-2

A partir de tratamentos cromatográficos, em gel de sílica de EHHC, obteve-se a fração EHHC(31-39)(243-329)(16-56), (item 5.4.2.4, p.102), da qual foram isolados 6,7 mg de um sólido esverdeado de aspecto cristalino, solúvel em clorofórmio, que foi denominado de HC-2, cujo espectro de massa (Figura 79, p. 63) apresentou pico de íon molecular m/z 220 Daltons.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV), mostrado na Figura 80, p. 63, mostrou uma banda forte em frequência 3403 cm^{-1} indicativa de deformação axial da ligação simples de grupo hidroxila (OH). Os sinais em 2931 e 2860 cm^{-1} foram relacionados com a deformação axial da ligação de carbonos sp^3 com hidrogênios, em CH_3 e CH_2 , respectivamente. A banda mostrada em frequência 1065 cm^{-1} foi relativa às vibrações de deformação axial da ligação C – O. Os valores em 1400 e 1460 cm^{-1} corresponderam às deformações angulares de ligações nos grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), mostrado na Figura 81 (p. 64), apresentou sinais de deslocamentos químicos (δ) entre 0,86 e 3,36 ppm, referentes a átomos de hidrogênio em grupos alquilas. O multiplete em δ 3,35 pode ser atribuído a hidrogênio ligado a átomo de carbono sp^3 oxigenado. Na expansão deste espectro (Figura 82, p. 64), são observados singletos em δ 0,85; 0,94 e 0,96, indicando presença de hidrogênios de grupos metila ligados a átomos de carbono não hidrogenados.

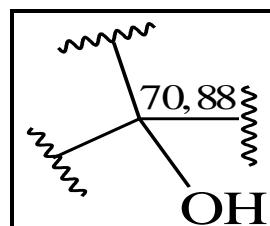
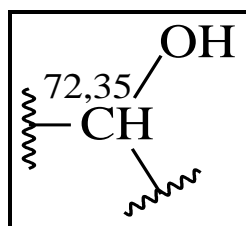
Na Figura 83 (p. 65), correspondente ao espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3), foram observadas 15 linhas espectrais e, através da comparação com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 85, p. 66), foi possível caracterizar o padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono e distinguir aqueles não hidrogenados dos demais, por subtração espectral. Assim, pôde-se verificar a presença de seis grupos metilênicos (CH_2) e três átomos de carbono não hidrogenados. Os demais seis sinais estão relacionados à presença de átomos de carbono em grupos metínicos (CH) e metílicos (CH_3). Com esta análise, os dados de deslocamentos químicos podem ser conferidos na Tabela 07.

Tabela 07 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos carbonos não hidrogenados (C), metilênicos (CH_2), metínicos e metílicos (CH e CH_3), obtidos por comparação entre espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°

C	CH_2	CH, CH_3
35,11	20,49	38,11
39,42	28,14	44,03
70,88	33,14	72,35
-	34,18	20,88
-	35,58	26,79
-	42,30	30,24

A expansão do espectro de RMN ^{13}C – BB (Figura 84, p. 65) mostrou sinais de deslocamento químico (δ) em 70,88 e 72,35, referentes a átomos de carbono de hibridação sp^3 ligados a átomos de oxigênio. Por tanto, pôde-se sugerir que o átomo de carbono em δ 72,35 tratava-se de um carbono mono-hidrogenado. Os demais sinais compreendidos entre δ 20,49 e 44,03 são relativos a átomos de carbono de grupos alquilas não oxigenados.

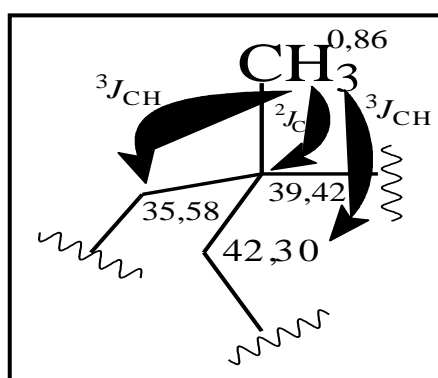
Então, também pôde ser percebida a presença dos grupos:



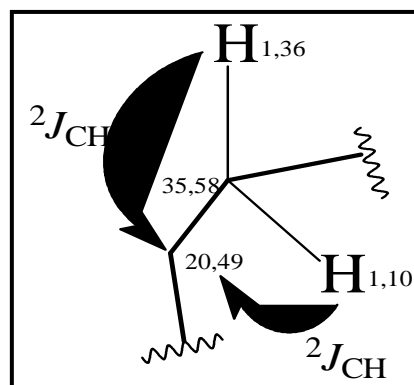
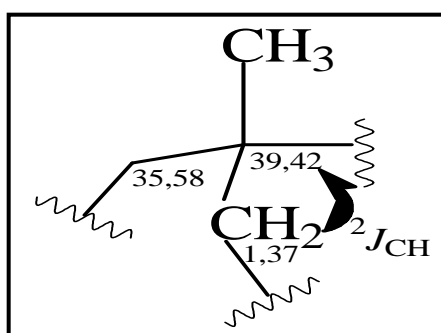
Observando o espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 86, p. 66), foi verificado que os átomos de carbono com sinais em δ 20,88; 26,79 e 30,24 apresentaram correlações com sinais singletos de hidrogênios em δ 0,96; 0,86 e 0,94, respectivamente, indicando tratar-se de hidrogênios de três grupos metila (CH_3). Assim, pôde-se concluir que os átomos de carbono com sinais em δ 38,11; 44,03 e 72,35 são mono-hidrogenados.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 87, p. 67), pôde-se identificar as correlações a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre átomos de carbono e de hidrogênio alquílicos compreendidos entre δ 0,86 e 3,36.

Na expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 88, p. 67), foram verificadas as correlações a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) do átomo de carbono em δ 39,42 com os três átomos de hidrogênio em δ 0,86; a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) do átomo de carbono em δ 35,58 com, também, os três átomos de hidrogênio em δ 0,86; e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) do átomo de carbono em δ 42,30 com os já citados átomos de hidrogênio:

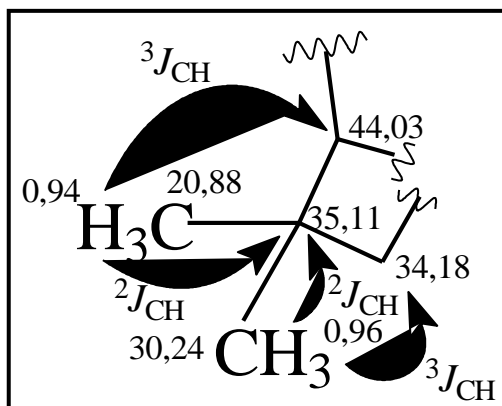


Foram verificadas correlações a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) do átomo de carbono em δ 39,42 com os dois átomos de hidrogênio em δ 1,37; e do átomo de carbono em δ 20,49 com os hidrogênios em δ 1,10 e 1,36:

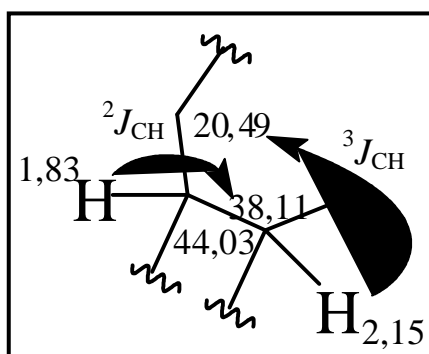


O átomo de carbono em δ 35,11 apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os três átomos de hidrogênio em δ 0,94 e 0,96. Foram também observadas correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) foram observadas do átomo de carbono em δ 34,18 com os três

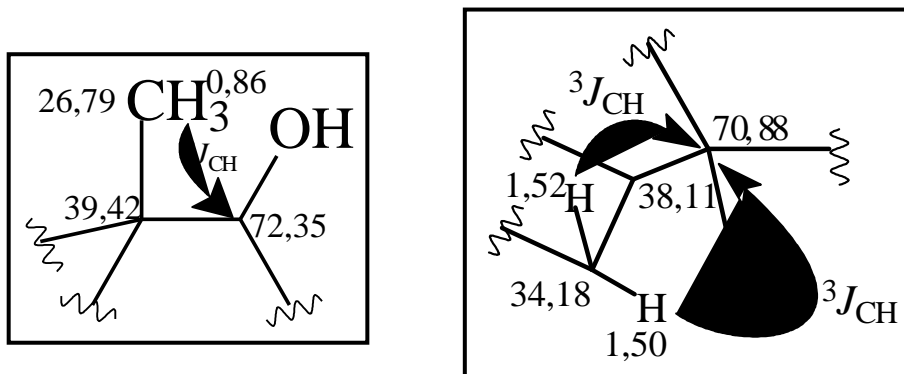
hidrogênios em δ 0,96 e em δ 0,94 e do carbono em δ 44,03 com os três átomos de hidrogênio em δ 0,94 e em δ 0,96:



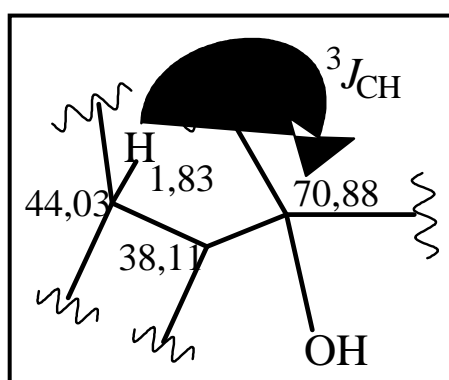
A análise da expansão 2 do espectro bidimensional HMBC (Figura 89, p. 68), mostrou correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) do átomo de carbono em δ 38,11 com o átomo de hidrogênio em δ 1,83 e correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) do carbono em δ 20,49 com o hidrogênio em δ 2,15:



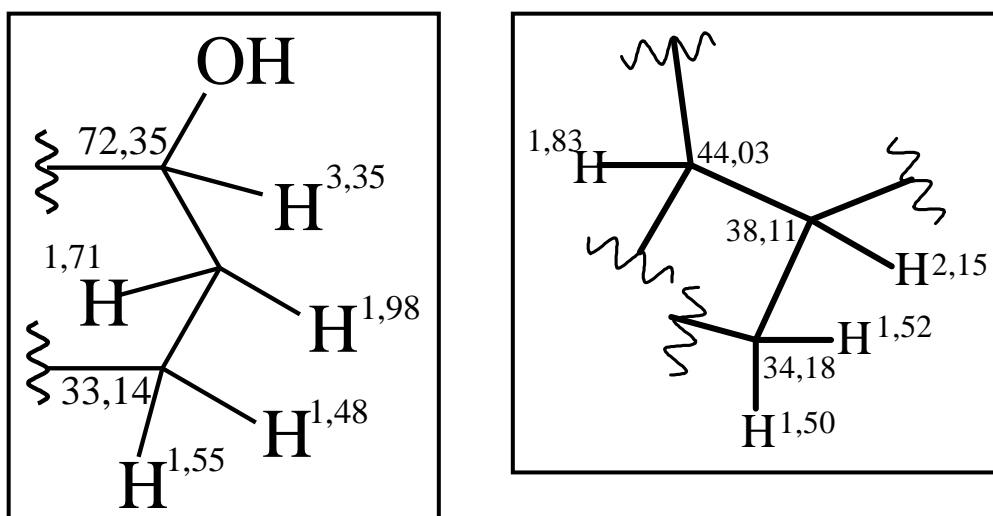
Na expansão 3 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ – HMBC (Figura 90, p. 68), foram verificadas correlações a três ligações ($^3J_{CH}$) do átomo de carbono em δ 72,35 com os três átomos de hidrogênio em δ 0,86, o que permitiu localizar a posição de um dos grupos hidroxila, o qual encontra-se ligado ao átomo de carbono citado. Da mesma forma, também foram observadas correlações a três ligações ($^3J_{CH}$) do átomo de carbono em δ 70,88 com os dois átomos de hidrogênio em δ 1,50 e 1,52, sendo possível a localização do outro grupo hidroxila.



Também, pôde ser verificada correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) do átomo de carbono em δ 70,88 com o átomo de hidrogênio em δ 1,83:



O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1H \times ^1H - COSY$ (Figura 91, p. 69) mostrou correlações do sinal de hidrogênio em δ 3,35 com os sinais em δ 1,71 e 1,98; e destes com os hidrogênios em δ 1,48 e 1,55. Também, foi possível identificar correlações do hidrogênio em δ 1,83 com o hidrogênio em δ 2,15; e deste último, com os hidrogênios em δ 1,50 e 1,52:



A análise dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C (uni e bidimensionais) dispostos na Tabela 08 e as informações adicionais obtidas pela interpretação dos espectros de massas (Figura 79, p.63), permitiram concluir que HC-2 trata-se do sesquiterpeno, cuja estrutura é ilustrada na Figura 75.

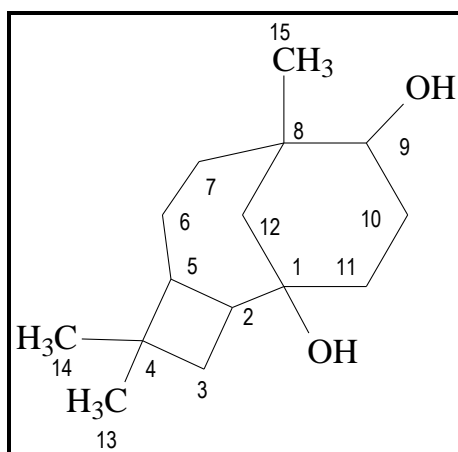


Figura 75 – Estrutura proposta para HC-2

Tabela 08 – Dados espectroscópicos de HC-2 em CDCl₃.

C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	
			² J _{CH}	³ J _{CH}
C				
8	-	39,42	3H-15; 2H-12	
1	-	70,88		H-5; 2H-3
4	-	35,11	H-5; 3H-13; 3H-14	2H-6
CH				
5	1,83 (m)	44,03	H-2	H-3a; 3H-13; 3H-14
9	3,35 (m)	72,35		3H-15; 2H-12
2	2,15 (m)	38,11	H-5	2H-11; 2H-12
CH₂				
6	1,50 (m) e 1,35 (m)	20,49	2H-7	H-2
7	1,36 (m) e 1,10 (m)	35,58	2H-6	3H-15
10	1,98 (m) e 1,71 (m)	28,14	H-11a	
11	1,55 (dt) e 1,48 (m)	33,14		
3	1,52 (m) e 1,50 (m)	34,18	H-2	3H-13; 3H-14
12	1,37 (m)	42,30		H-7b; 3H-15
CH₃				
13	0,94 (s)	20,88		H-5; H-3b; 3H-14
14	0,96 (s)	30,24		H-5; H-3b; 3H-13
15	0,85 (s)	26,79		H-7a

Através de pesquisa bibliográfica observou-se a existência de três estereoisômeros da estrutura proposta para HC-2 (Figura 76).

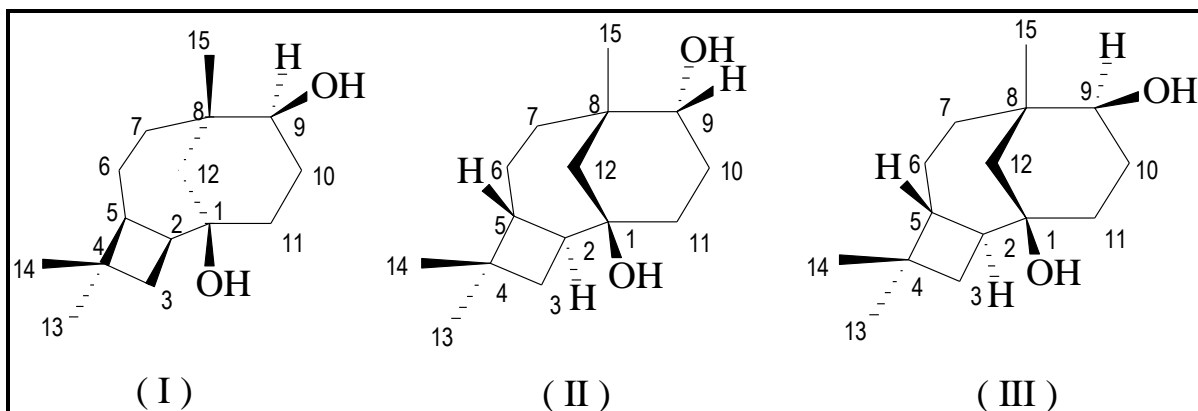


Figura 76 – Estereoisômeros da estrutura proposta para HC-2

ESTRUTURA	REFERÊNCIA
I	BOHLMANN; ZIESCHE, 1981
II	HEYMANN <i>et al.</i> , 1994
III	HEYMANN <i>et al.</i> , 1994

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos três estereoisômeros e os observados para HC-2, foram comparados, como mostrado na Tabela 09.

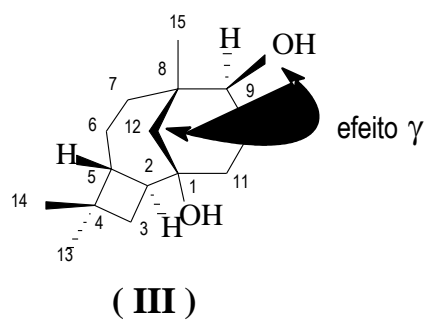
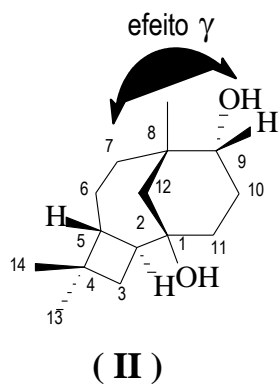
Tabela 09: Valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (CDCl_3) de HC-2 e das estruturas propostas (I, II e III).

	HC-2	I	II	III
C				
1	70,88	72,60	70,40	70,70
4	35,11	34,00	35,30	35,00
8	39,42	37,60	38,80	39,30
CH				
2	38,11	49,10	37,40	38,00
5	44,03	41,70	43,80	43,80
9	72,35	74,20	78,20	72,10
CH₂				
3	34,18	38,50	34,00	34,00
6	20,49	22,10	20,00	20,30
7	35,58	34,50	29,45	35,30
10	28,14	35,80	29,52	28,10
11	33,14	27,20	38,00	33,30
12	42,30	36,50	47,50	42,40
CH₃				
13	20,88	24,50	20,70	20,80
14	30,24	30,10	30,60	30,50
15	26,79	27,20	28,70	31,20

A comparação dos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono de HC-2 com os correspondentes valores das estruturas I, II e III, permitiu a exclusão da estrutura I, uma vez que os referidos valores para os átomos de carbono de I apresentaram-se bem diferentes daqueles observados para HC-2; e estando esta estrutura excluída, a escolha para esta representação passou a ser estudada nas estruturas epiméricas II e III, as quais diferem, entre si, pela configuração do átomo de carbono 9.

Comparando o valor de δ igual a 29,45, referente ao átomo de carbono 7 da estrutura II, e δ igual a 35,30, do mesmo átomo de carbono na estrutura III, foi verificado que essa diferença ocorreu em razão do efeito γ protetor da hidroxila sobre C-7, devido à disposição espacial deste grupo em C-9, na estrutura II. O mesmo efeito foi identificado na estrutura III, na qual a disposição espacial do grupo hidroxila de C-9 foi responsável pelo valor de δ do átomo de carbono 12 igual a 42,40, inferior ao valor de δ de C-12 igual a 47,50, apresentado na estrutura III. Como o valor de δ 42,40 foi próximo ao valor de δ igual a 42,30 do átomo de carbono 12 de HC-2, pôde-se supor que a estrutura III poderia representar

melhor, a estereoquímica de HC-2, indicando haver efeito γ protetor do grupo hidroxila de C-9 sobre o átomo de carbono 12, por este ser coplanar ao grupo hidroxila em questão.



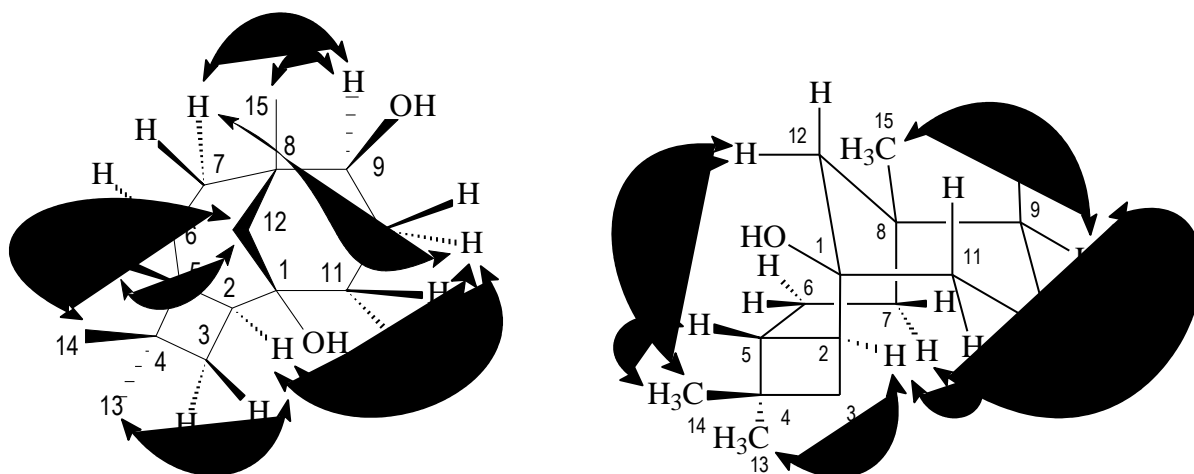
Também foram feitos os espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H de HC-2, em CD_3COCD_3 e estes dados estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Comparação de dados obtidos em espectros de RMN de HC-2, em CD_3COCD_3 e em CDCl_3 .

C	HC-2 em CD_3COCD_3		HC-2 em CDCl_3	
	HSQC		HSQC	
	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H
C				
1	70,46	-	70,88	-
4	35,41	-	35,11	-
8	40,02	-	39,42	-
CH				
2	39,38	2,25 (m)	38,11	2,15 (m)
5	44,68	1,92 (m)	44,03	1,83 (m)
9	72,13	3,36 (m)	72,35	3,35 (m)
CH₂				
3	35,94	1,61 (t, 9,5); 1,42	34,18	1,52 (m), 1,50 (m)
6	21,36	1,49; 1,34	20,49	1,50 (m), 1,35 (m)
7	36,56	1,50 (m), 1,10	35,58	1,36 (m), 1,10 (m)
10	29,29	2,05 (m), 1,91 (m)	28,14	1,98 (m), 1,71 (m)
11	34,38	1,69, 1,42	33,14	1,55 (dt), 1,48 (m)
12	43,85	1,52 (d, 12,9), 1,34 (d, 12,9)	42,30	1,37 (m)
CH₃				
13	21,33	0,99 (s)	20,88	0,96 (s)
14	30,93	0,98 (s)	30,24	0,94 (s)
15	27,61	0,88 (s)	26,79	0,85 (s)

O estudo do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY, em CD_3COCD_3 , e sua expansão, (Figuras 98 e 99, p. 72 e 73), mostrou correlação entre o átomo de hidrogênio em δ 3,36, que está diretamente ligado ao átomo de carbono 9, e os átomos de hidrogênio em δ 0,88, ligados ao carbono 15, assim como, o hidrogênio em δ

1,50 de C-7. Como não foi verificada correlação entre o hidrogênio em δ 3,36, ligado a C-9, e os hidrogênios em δ 1,34 e 1,52, ligados ao carbono 12, pôde-se concluir que o átomo de hidrogênio do carbono 9 encontra-se em um plano oposto ao átomo de carbono, cabeça de ponte, 12. Logo, o grupo hidroxila ligado ao carbono 9 apresentou-se coplanar à ponte possuidora do carbono 12, o que foi coerente com a estrutura III proposta.



A Tabela 11 mostra os dados de RMN ¹H e RMN ¹³C (uni e bidimensionais) de HC-2, assim como os descritos na literatura para o caryolano-1,9 β -diol (HEYMANN *et al.*, 1994).

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de HC-2 comparados com dados da literatura (HEYMANN *et al.*, 1994).

C	RMN ¹ H		RMN ¹³ C		HMBC de HC-2	
	caryolano-1,9β-diol (HEYMANN <i>et al.</i> , 1994)	HC-2	caryolano-1,9β-diol (HEYMANN <i>et al.</i> , 1994)	HC-2	² J _{CH}	³ J _{CH}
C						
8	-	-	39,30	39,42	3H-15; 2H-12	
1	-	-	70,70	70,88		H-5;2H-3
4	-	-	35,00	35,11	H-5;3H-13;3H-14	2H-6
CH						
5	1,89 (m)	1,83 (m)	43,80	44,03	H-2	H-3a;3H-13;3H-14
9	3,44 (t)	3,35 (m)	72,10	72,35		3H-15;2H-12
2	2,22 (m)	2,15 (m)	38,00	38,11	H-5	2H-11;2H-12
CH₂						
6	1,53 (m) e 1,39 (m)	1,50 (m) e 1,35 (m)	20,30	20,49	2H-7	H-2
7	1,42 (m) e 1,15 (m)	1,36 (m) e 1,10 (m)	35,30	35,58	2H-6	3H-15
10	2,04 (m) e 1,77 (m)	1,98 (m) e 1,71 (m)	28,10	28,14	H-11a	
11	1,64 (dt) e 1,51 (m)	1,55 (dt) e 1,48 (m)	33,30	33,14		
3	1,54 (t) e 1,49 (dd)	1,52 (m) e 1,50 (m)	34,00	34,18	H-2	3H-13;3H-14
12	1,42 (d) e 1,47 (d)	1,37 (m)	42,40	42,30		H-7b;3H-15
CH₃						
13	1,00 (s)	0,94 (s)	20,80	20,88		H-5;H-3b;3H-14
14	1,02 (s)	0,96 (s)	30,50	30,24		H-5;H-3b;3H-13
15	0,93 (s)	0,85 (s)	26,70	26,79		H-7a

De acordo com os dados discutidos, principalmente de RMN (uni e bidimensionais), nos dados de espectrometria de massa, no conhecimento das classes de substâncias presentes nesta espécie e na comparação com os dados descritos na literatura para o caryolano-1,9 β -diol (HEYMANN *et al.*, 1994), foi possível concluir que HC-2 tratava-se do sesquiterpeno, caryolano-1,9 β -diol (Figura 77), que no melhor dos nossos conhecimentos está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Hymenaea*.

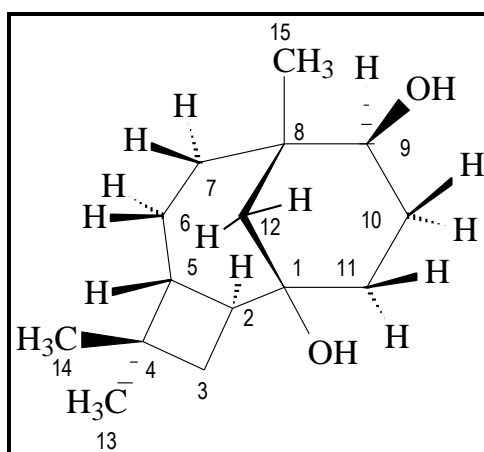


Figura 77 – Estrutura do caryolano-1,9 β -diol

Nome químico: (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*,9*S*)-4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0]dodecano-1,9-diol

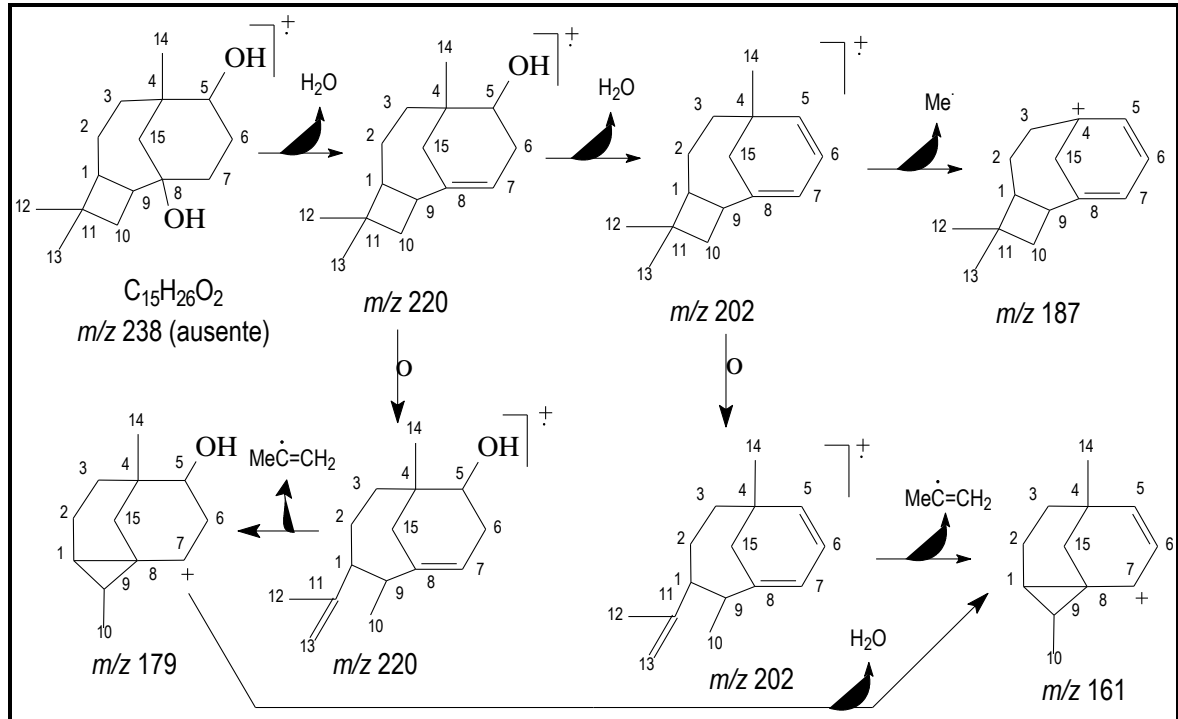


Figura 78 – Fragmentos propostos para os principais picos observados no espectro de massa de HC-2

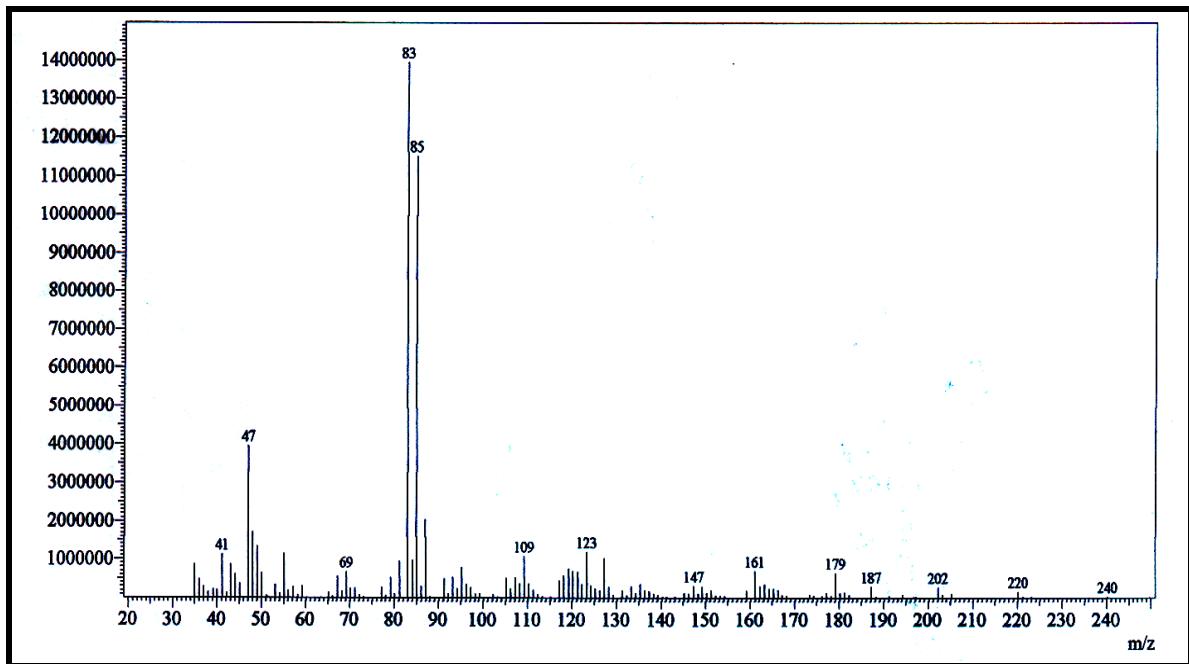


Figura 79 – Espectro de massa (70 eV) de HC-2

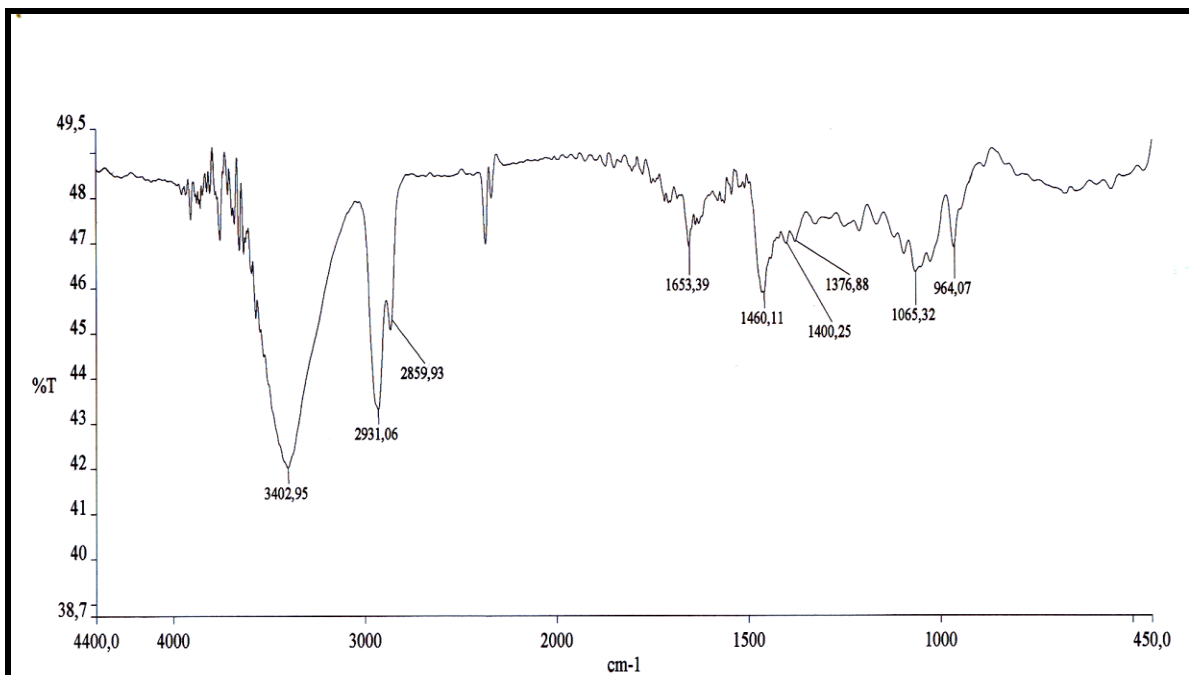


Figura 80 – Espectro de absorção na região do IV de HC-2 (em brometo de potássio)

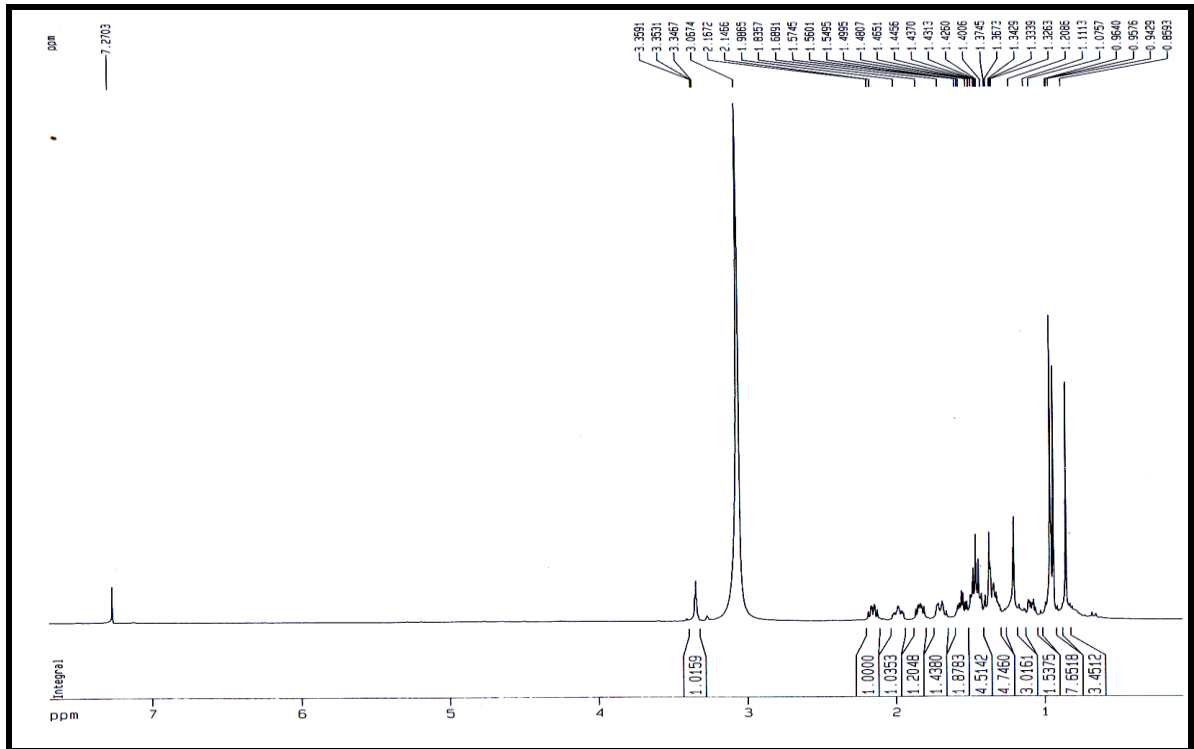


Figura 81 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HC-2

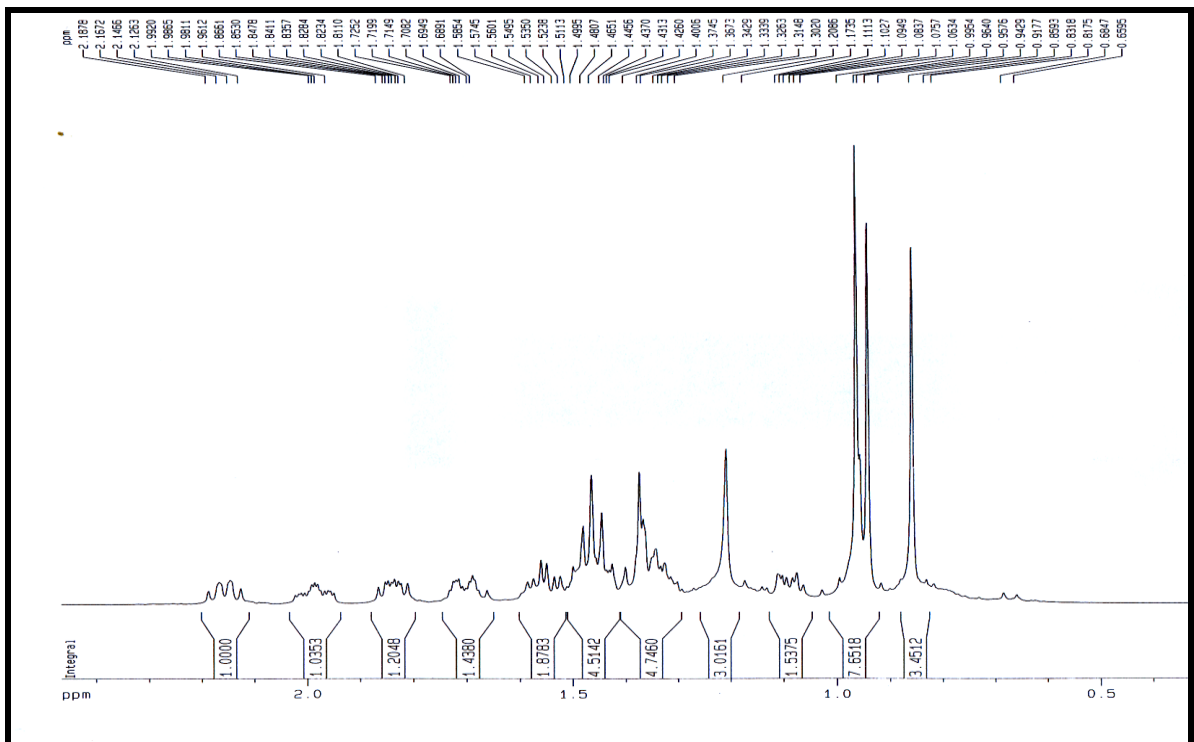


Figura 82 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HC-2

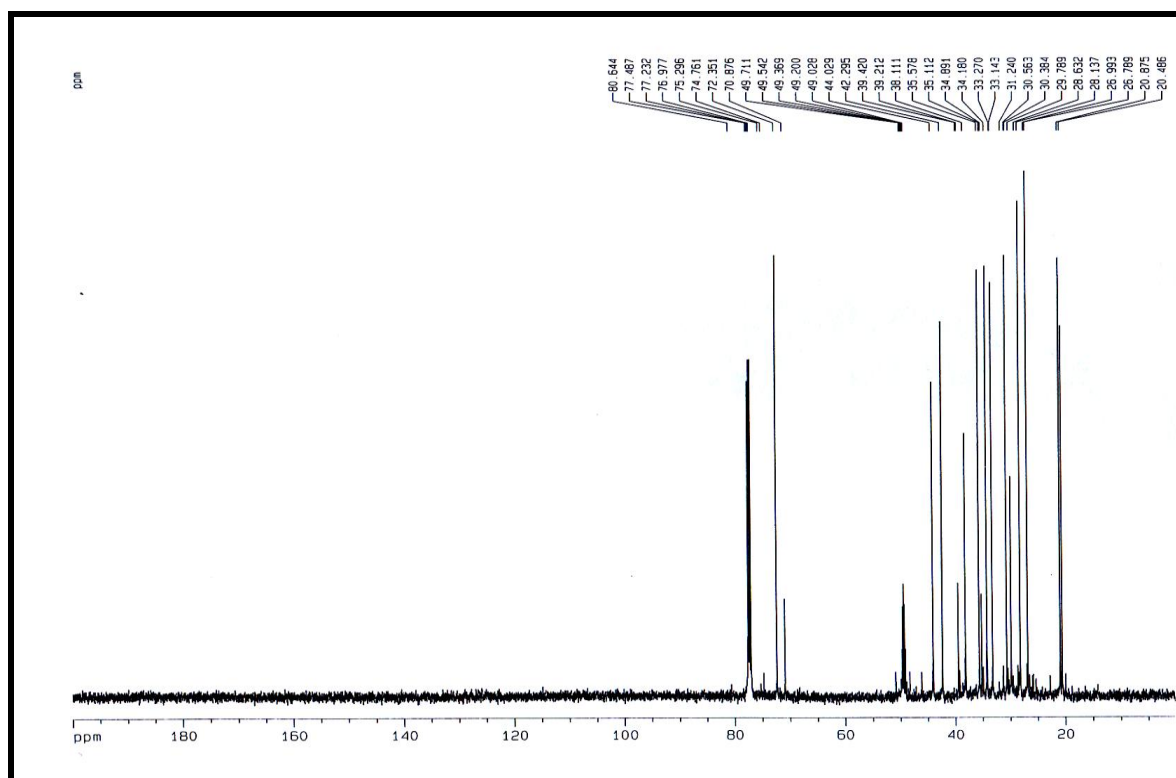


Figura 83 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-2

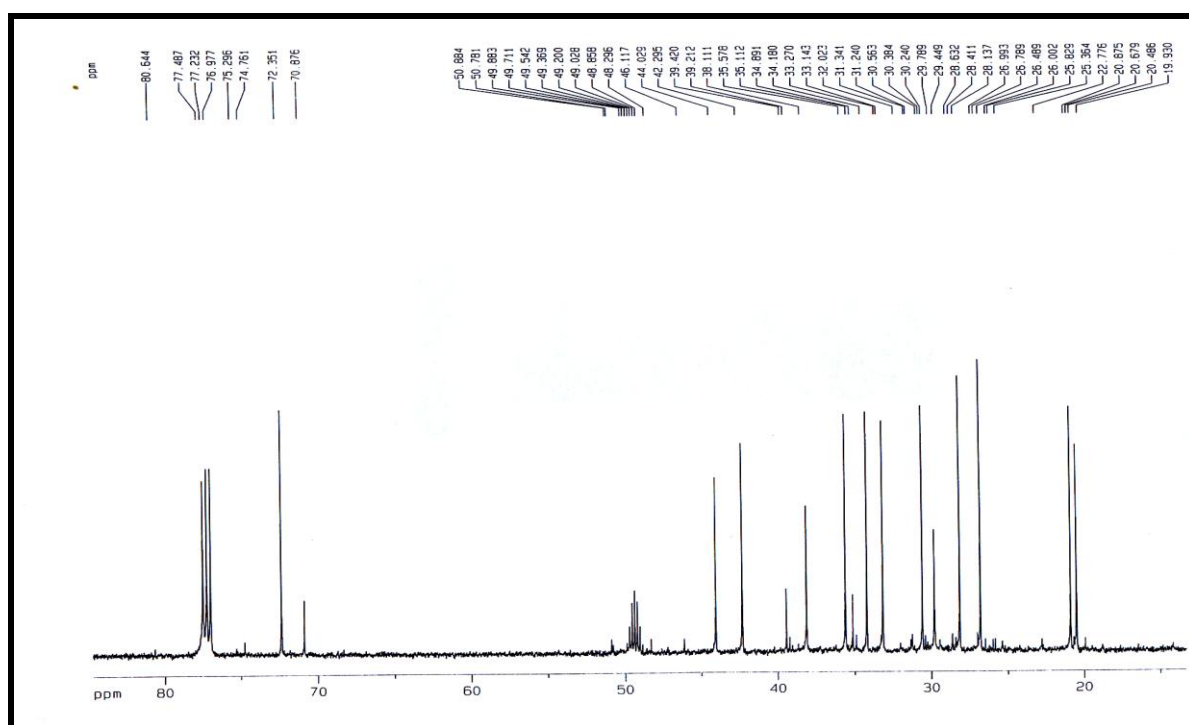


Figura 84 – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-2

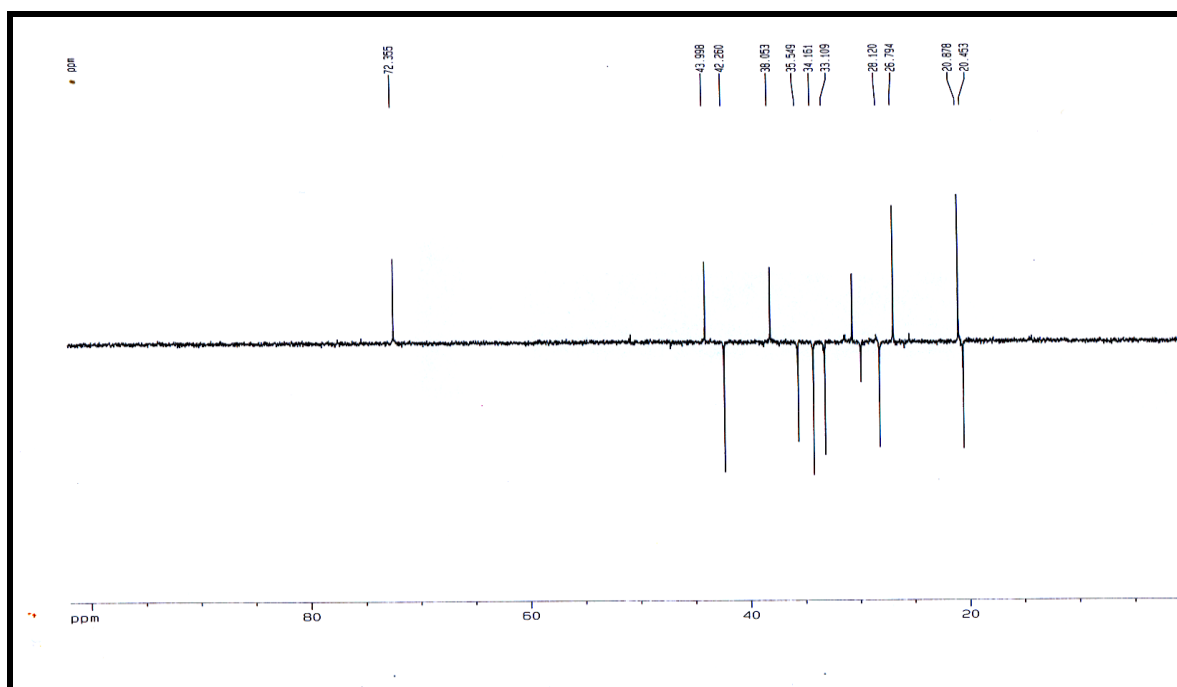


Figura 85 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de HC-2

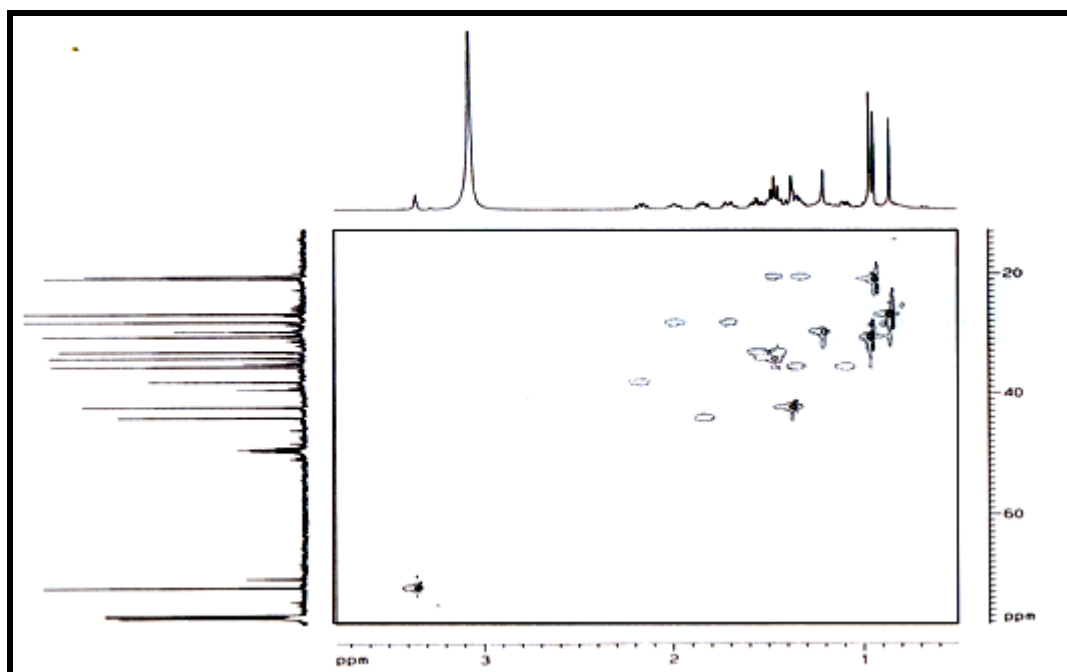


Figura 86 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-2

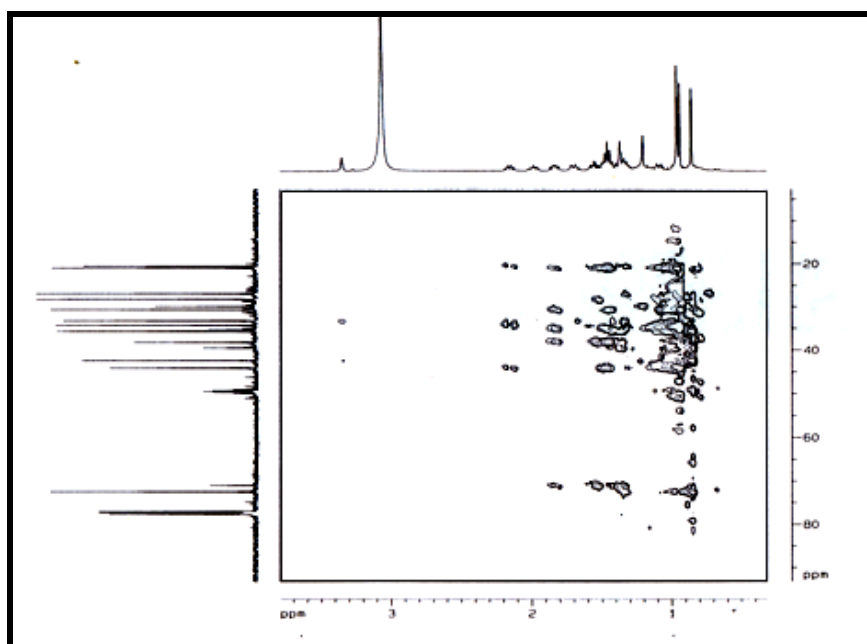


Figura 87 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2

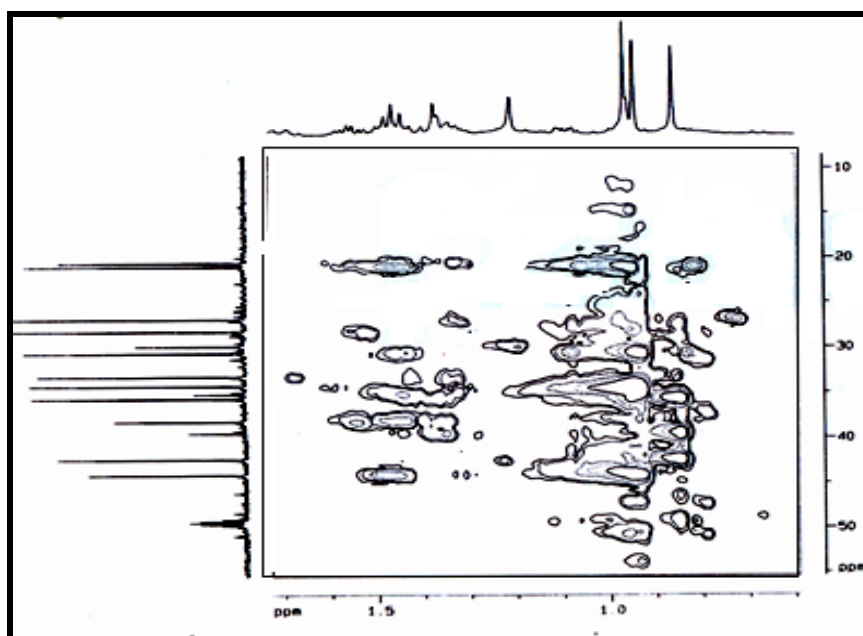


Figura 88 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2

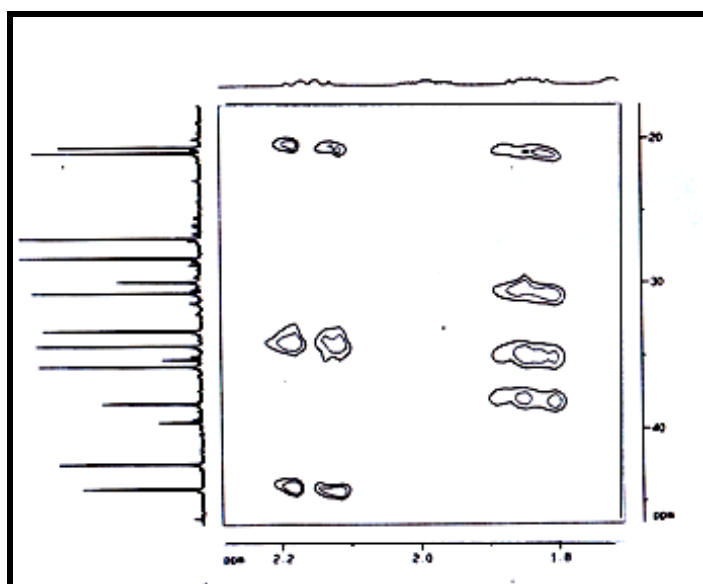


Figura 89 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2

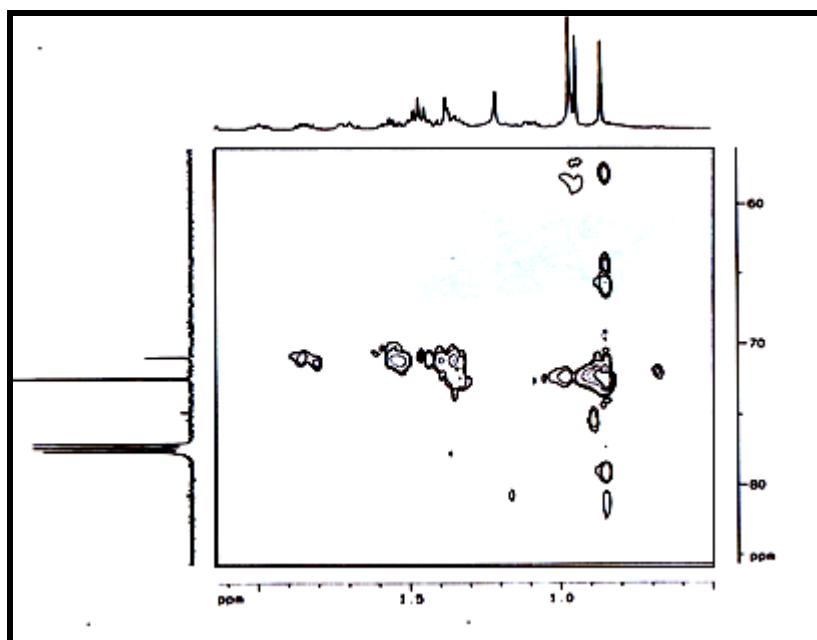


Figura 90 – Expansão 3 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-2

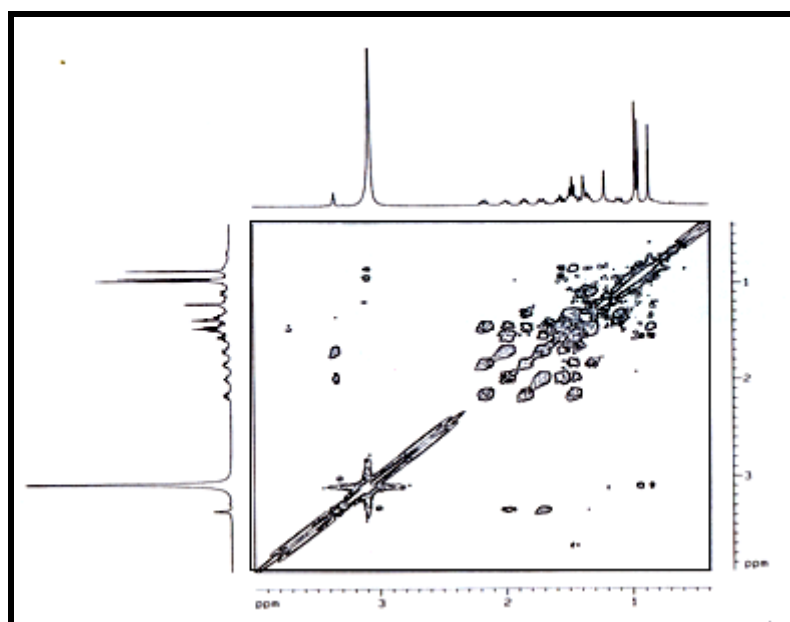


Figura 91 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HC-2

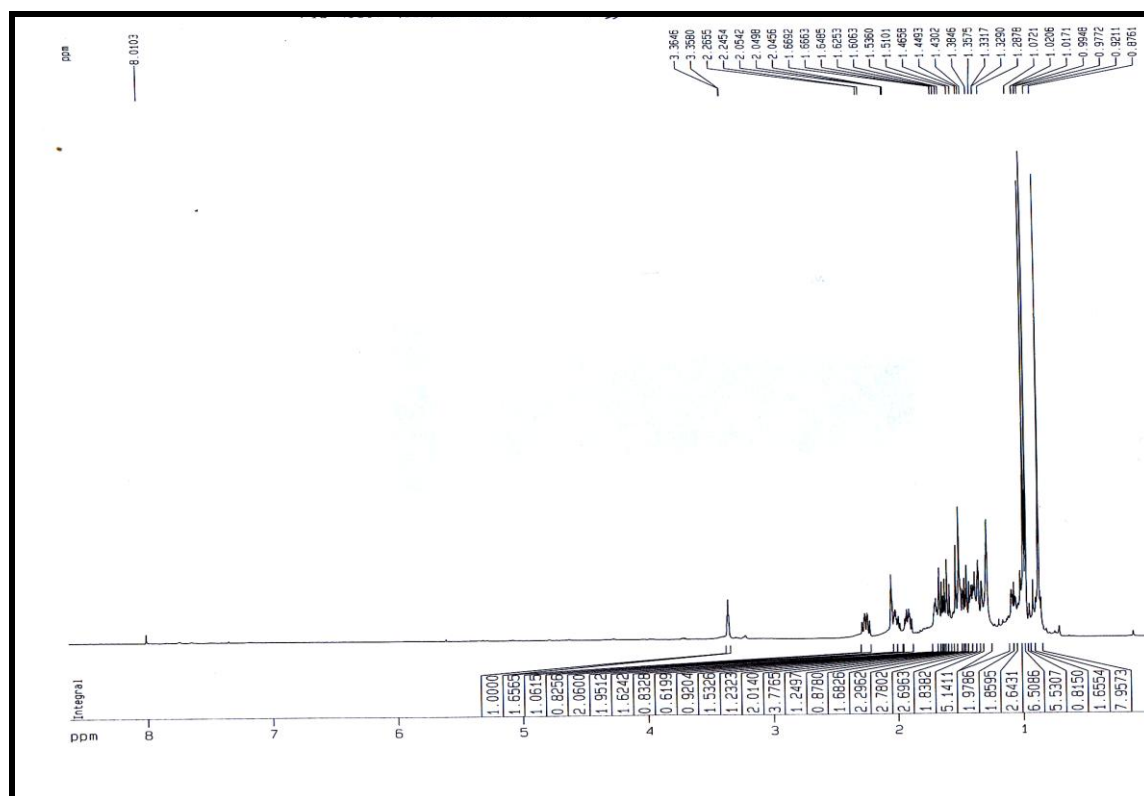


Figura 92 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2

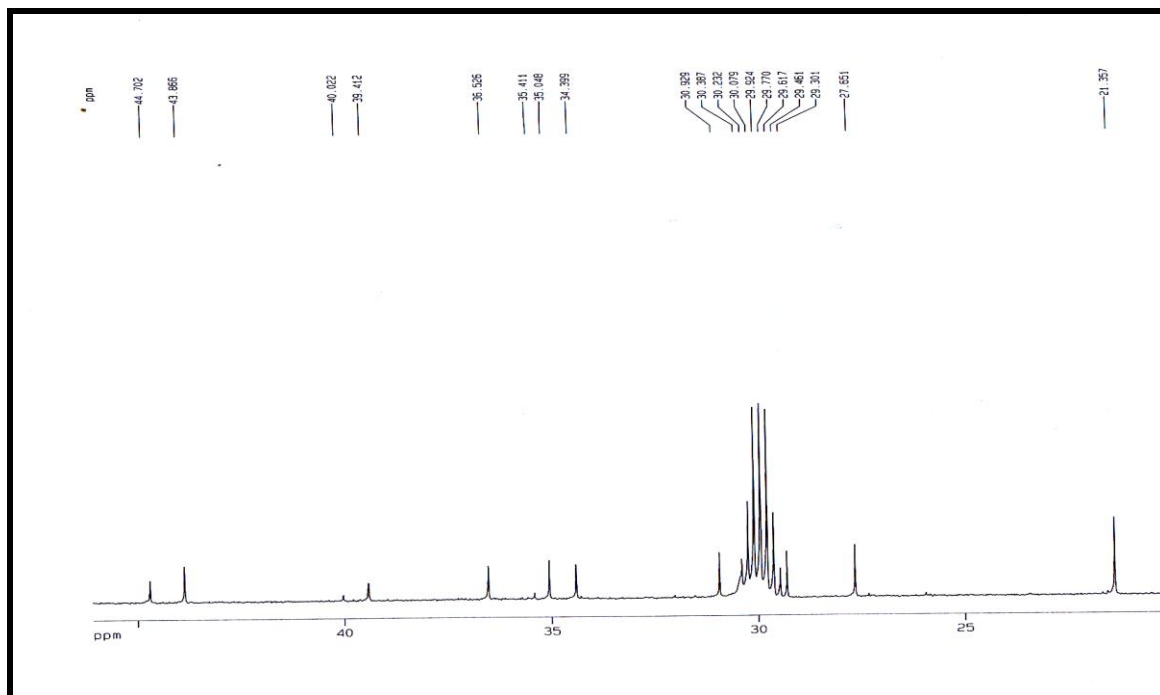


Figura 95 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2

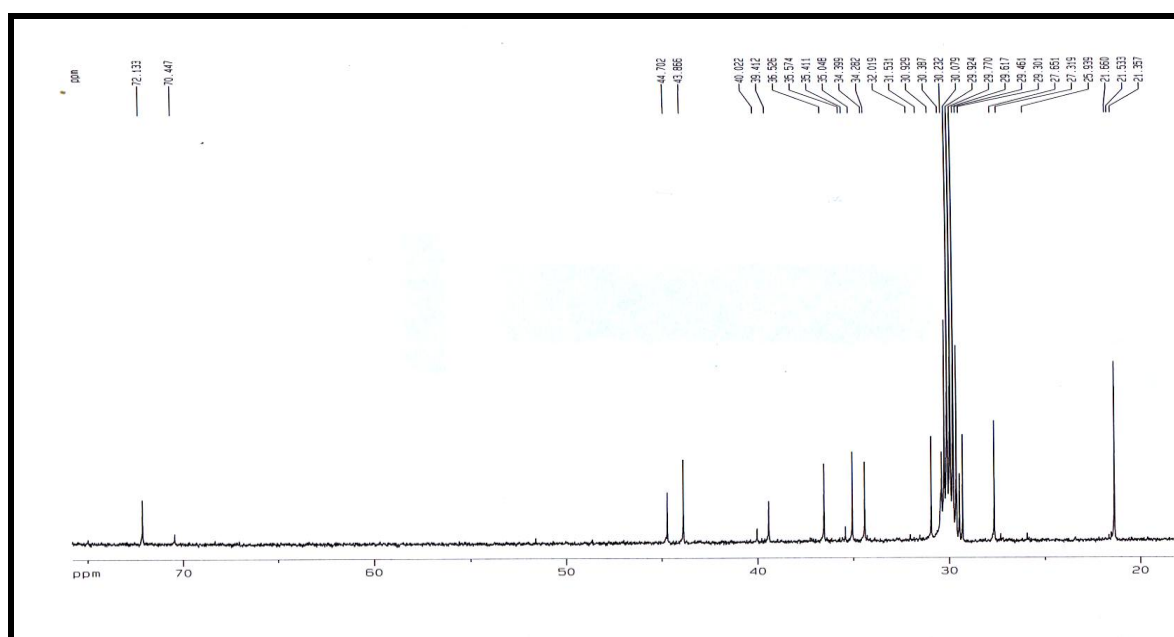


Figura 96 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2

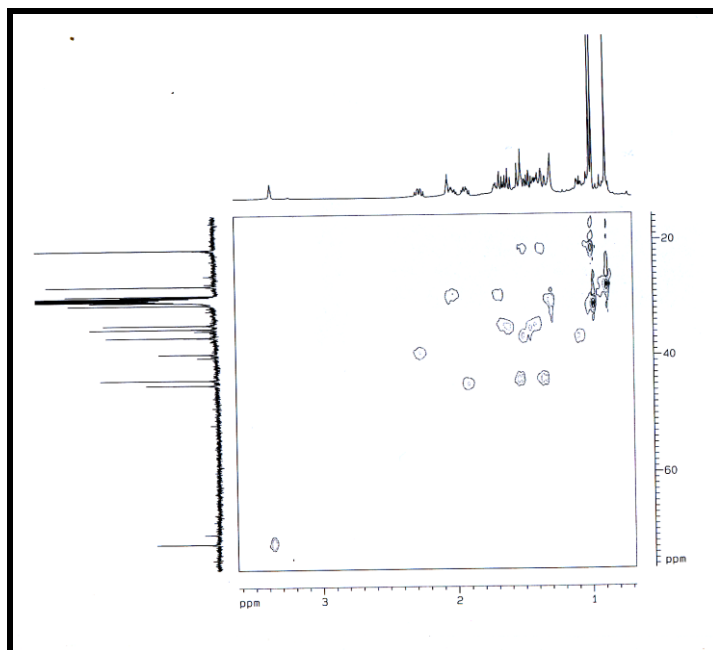


Figura 97 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (CD_3COCD_3) de HC-2.

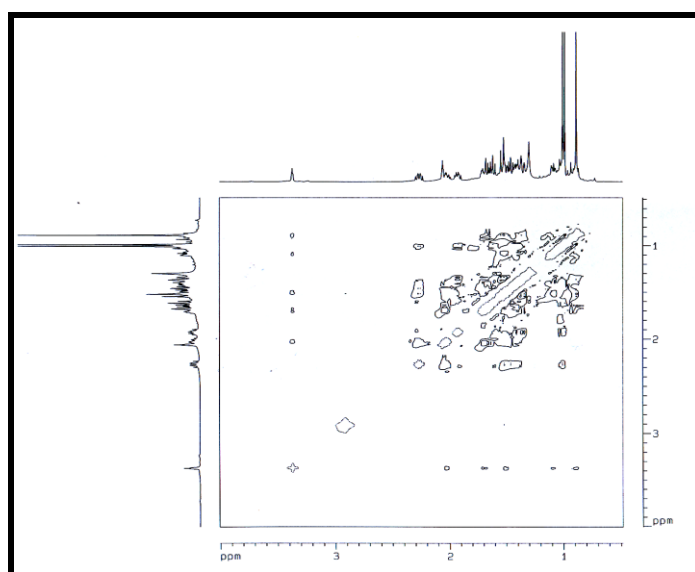


Figura 98 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.

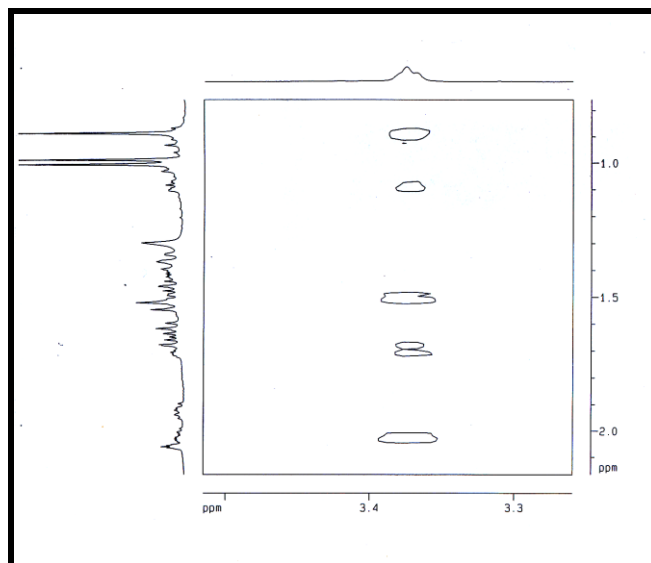


Figura 99 – Expansão do Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz, CD_3COCD_3) de HC-2.

4.3.3 Determinação estrutural de HC-3

O fracionamento cromatográfico, em gel de sílica, de EAHC permitiu a obtenção das frações denominadas EAHC(19-26)(11)(3-7) e EAHC(19-26)(11)(8-34), (itens 5.4.3.3 e 5.4.3.4, pp. 106 e 107), das quais foram obtidos 20,5 mg de um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio, que foi denominado HC-3, cujo espectro de massa (Figura 101, p. 83) apresentou o pico íon molecular m/z igual a 302 Daltons.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV), mostrado na Figura 102 (p. 83), mostrou uma banda em frequência 3020 cm^{-1} relacionada à deformação axial da ligação O – H de grupo hidroxila. A banda em 1693 cm^{-1} indicou deformação axial da ligação C = O. Foi verificada uma absorção forte em 1216 cm^{-1} característica de vibrações de deformação axial da ligação C – O. Os valores em 2931 e 2855 cm^{-1} corresponderam à deformação axial da ligação de carbonos sp^3 com átomos de hidrogênio, em grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente. Foram observadas bandas em 1642 cm^{-1} , relativa à deformação axial de ligação C = C de sistema conjugado, e em 1693 cm^{-1} , relacionada à deformação axial de ligação C = C de sistema não conjugado. A banda em 1445 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de CH_3 .

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), mostrado na Figura 103 (p. 84), apresentou sinais com deslocamentos químicos (δ) entre 4,60 e 6,38, característicos de átomos de hidrogênio ligados a carbonos olefínicos. Na expansão 1 deste espectro (Figura 104, p. 84), os sinais compreendidos entre δ 0,73 e 2,39 caracterizaram átomos de hidrogênio ligados a carbonos sp^3 . Os singletos em δ 0,73 e 1,13 indicaram átomos de hidrogênio ligados a carbonos de grupos metila. Foi verificado um duplete de duplete em δ 1,98 ($J = 2,7$ e $12,4$ Hz), o que levou a supor a presença de átomo de hidrogênio com acoplamento axial-equatorial e axial-axial, respectivamente.

Na expansão 2 do espectro de RMN ^1H (Figura 105, p. 85) observou-se quatro singletos largos em δ 4,60, 4,88, 4,99 e 5,02 e dois dubletos em δ 5,07 (1H, $J = 10,8$ Hz) e em δ 5,23 (1H, $J = 17,6$ Hz) correspondentes a sinais de hidrogênios olefínicos. Foi verificado também neste espectro um duplete de duplete em δ 6,38 (1H, $J = 10,8$ e $17,6$ Hz), indicando que este átomo de hidrogênio estava acoplado com os hidrogênios com sinais de absorção em δ 5,07 e 5,23 .

Na Figura 106 (p. 85), correspondente ao espectro de RMN ^{13}C – BB, foram verificadas 20 linhas espectrais e, por comparação com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 107, p. 86), tornou-se possível a caracterização do padrão de hidrogenação relativo aos átomos de carbono e distinguir aqueles não hidrogenados dos demais, por meio de subtração espectral. Assim, constatou-se a presença de cinco átomos de carbono não hidrogenados. Os outros quinze sinais foram atribuídos a carbonos hidrogenados, dos quais dez eram metilênicos (CH_2) e cinco envolviam carbonos mono-hidrogenados (CH) e metílicos (CH_3). Dessa forma, pôde-se elaborar a Tabela 12.

Tabela 12 – Dados de deslocamentos químicos (δ) dos carbonos não hidrogenados (C), metilênicos (CH_2), metínicos e metílicos (CH e CH_3), obtidos por comparação entre espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135° .

C	CH_2	CH, CH_3
39,09	18,64	14,99
47,71	22,37	16,58
147,23	27,09	49,81
148,10	30,37	56,71
184,20	37,32	139,26
-	38,08	-
-	38,14	-
	107,21	-
-	113,43	-
-	115,81	-

Os sinais compreendidos entre δ 14,99 e 56,71 foram atribuídos a átomos de carbono alquílicos (sp^3), enquanto os sinais entre δ 107,21 e 148,10 indicaram carbonos olefínicos (sp^2). Já o sinal em δ 184,20 foi relativo a carbono carboxílico.

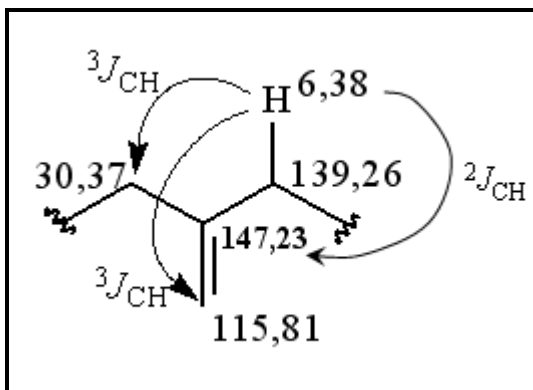
Como os sinais em δ 107,21; 113,43 e 115,81 foram atribuídos a carbonos metilênicos e olefínicos e desta forma, pôde-se concluir que estes se tratavam de átomos de carbono pertencentes a grupos metilenos terminais.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 108, p. 86), foi identificada correlação entre o átomo de carbono sp^3 em δ 56,71 e o átomo de hidrogênio em δ 1,78 e correlação entre o átomo de carbono sp^2 em δ 139,26 e o átomo de hidrogênio em δ 6,38 (dd, $J = 10,8$ e $17,6$ Hz), caracterizando, dessa forma, dois dos grupos metínicos (CH) da molécula.

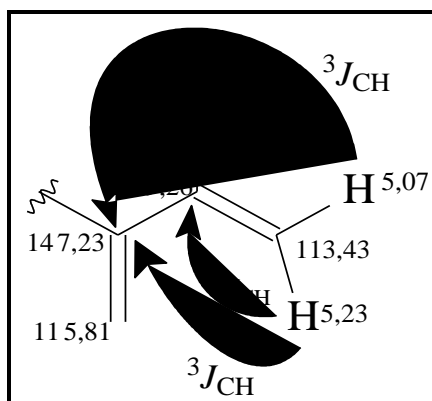
Na expansão 1 do espectro HSQC (Figura 109, p. 87), foi verificada correlação entre o átomo de carbono em δ 49,81 e o hidrogênio em δ 1,98, caracterizando, portanto, mais de um átomo de carbono mono-hidrogenado de HC–3. Também, foram identificadas correlações entre o átomo de carbono em δ 14,99 e os de hidrogênio em δ 0,73 e entre o carbono em δ 16,58 e os três hidrogênios em δ 1,13, indicando, dessa forma, a presença de dois grupos metila. Dentre os grupos metílicos presentes na substância estudada, foi possível a identificação de seis destes grupos, através das correlações verificadas entre: o átomo de carbono em δ 18,64 e os átomos de hidrogênio em δ 1,63; o átomo de carbono em δ 22,37 e os átomos de hidrogênio em δ 1,54 e 1,70; o átomo de carbono em δ 27,09 e os átomos de hidrogênio em δ 1,39; o átomo de carbono em δ 37,32 e os átomos de hidrogênio em δ 1,67; o átomo de carbono em δ 38,08 e os átomos de hidrogênio em δ 1,78 e o átomo de carbono em δ 38,14 e os átomos de hidrogênio em δ 2,39.

A análise da expansão 2 do espectro HSQC (Figura 110, p. 87) mostrou as correlações envolvendo os três grupos metílicos terminais, as quais ocorreram entre o átomo de carbono em δ 107,21 e os hidrogênios em δ 4,60 e 4,88, entre o carbono em δ 113,43 e os hidrogênios em δ 5,07 (d, $J = 10,8$ Hz) e 5,23 (d, $J = 17,6$ Hz) e entre o átomo de carbono em δ 115,81 e os hidrogênios em δ 4,99 e 5,02.

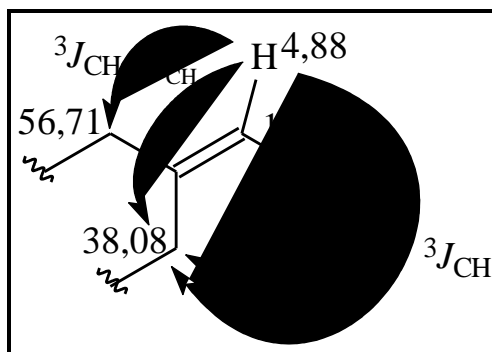
No espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 111, p. 88), foi verificado que os átomos de carbono em δ 30,37 e 115,81 apresentaram correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com o átomo de hidrogênio em δ 6,38 (dd, $J = 10,8$ e $17,6$ Hz) e que o átomo de carbono em δ 147,23 apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com o referido átomo de hidrogênio.



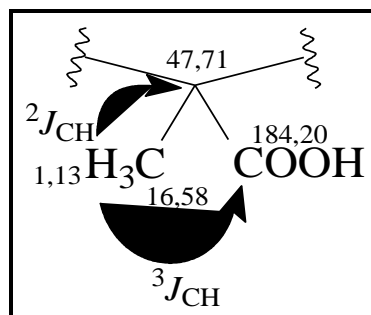
O átomo de carbono em δ 147,23 apresentou correlações a três ligações ($^3J_{CH}$) com os átomos de hidrogênio em δ 5,07 (d, $J = 10,8$ Hz) e 5,23 (d, $J = 17,6$ Hz). Já o carbono em δ 139,26 apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) com o átomo de hidrogênio em δ 5,23.



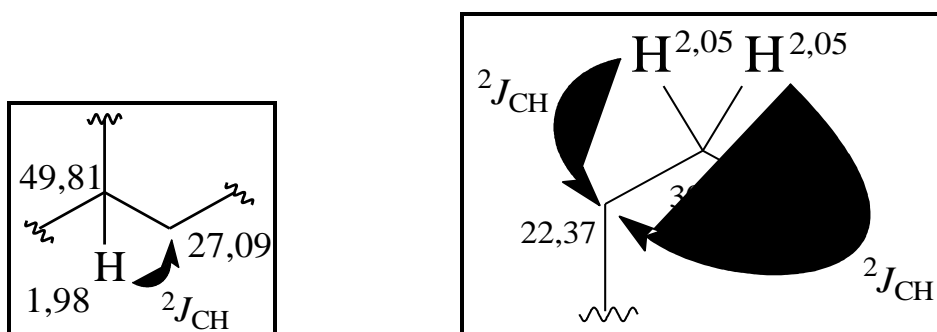
Também, os átomos de carbono em δ 38,08 e 56,71 apresentaram correlações a três ligações ($^3J_{CH}$) com os átomos de hidrogênio em δ 4,60 e 4,88.



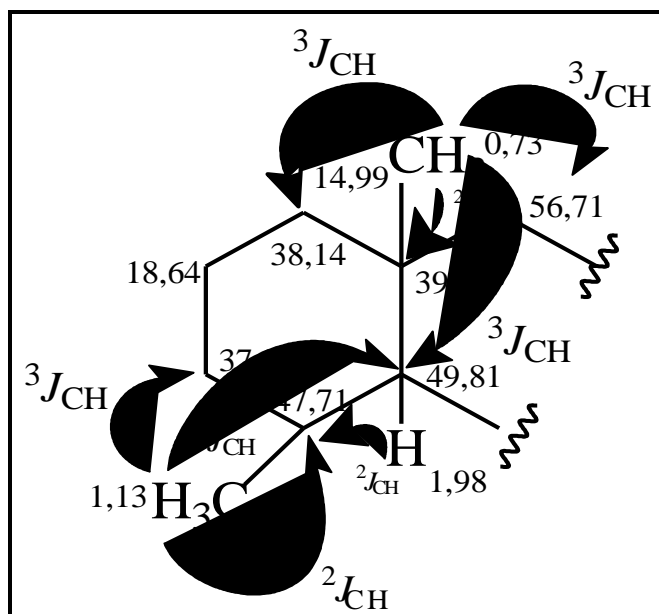
O grupo carboxila da molécula pôde ser posicionado com a observação da correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 47,71 e os hidrogênios em δ 1,13 e da correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 184,20 e os hidrogênios em δ 1,13.



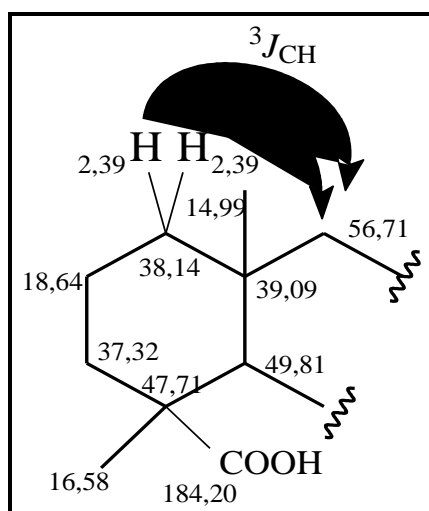
Com a análise da expansão 1 do espectro HMBC (Figura 112, p. 88), foram verificadas a correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 27,09 e o átomo de hidrogênio em δ 1,98 (dd, $J = 2,7$ e $12,4$ Hz) e a correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 22,37 e os átomos de hidrogênio em δ 2,05.



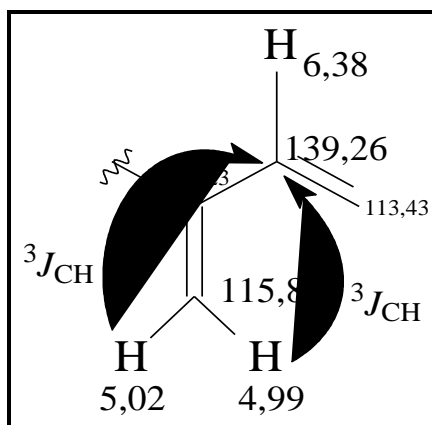
A expansão 2 do espectro HMBC (Figura 113, p. 89) mostrou correlações a três ligações entre o átomo de carbono em δ 37,32 e os átomos de hidrogênio em δ 1,13, entre o átomo de carbono em δ 38,14 e os hidrogênios em δ 0,73, entre o carbono em δ 49,81 e os átomos de hidrogênio em δ 0,73 e 1,13 e entre o carbono em δ 56,71 e os hidrogênios em δ 0,73. Correlações a duas ligações ($^2J_{CH}$) foram verificadas entre o átomo de carbono em δ 39,09 e os átomos de hidrogênio em δ 0,73 e entre o átomo de carbono em δ 47,71 e os hidrogênios em δ 1,13 e 1,98 (dd, $J = 2,7$ e $12,4$ Hz).



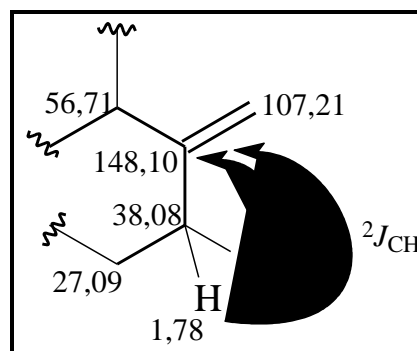
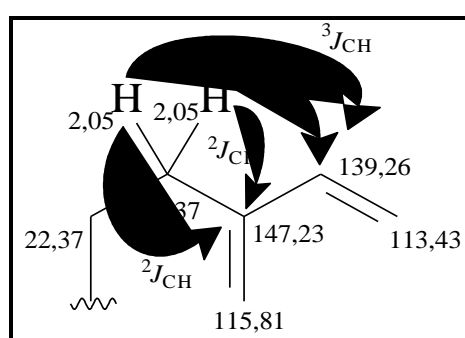
Analisando, novamente, o espectro HMBC (Figura 111, p. 88), identificou-se a correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 56,71 e os átomos de hidrogênio em δ 2,39, a qual, com os dados obtidos na observação da expansão 2, deste espectro, pôde ser localizada:



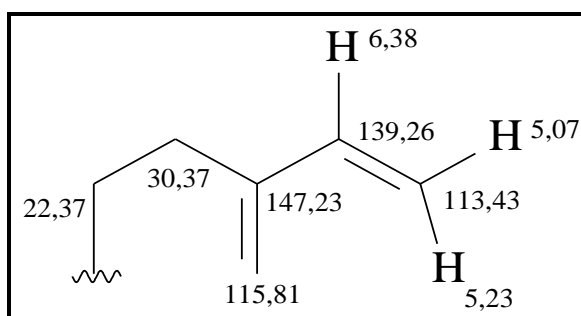
Na expansão 3 do espectro HMBC (Figura 114, p. 89), foi observada correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 139,26 e os átomos de hidrogênio em δ 4,99 e 5,02, o que possibilitou a localização de mais um dos grupos metílenos terminais.



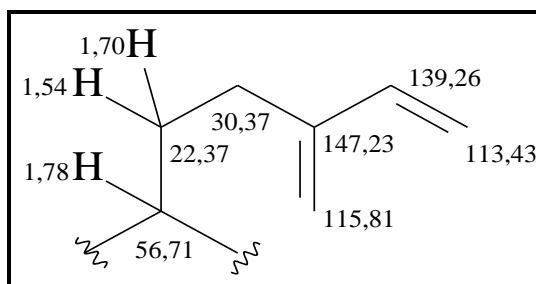
A expansão 4 do espectro HMBC (Figura 115, p. 90) mostrou correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 147,23 e os átomos de hidrogênio em δ 2,05 e correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 139,26 e os átomos de hidrogênio em δ 2,05. Também, foi observada a correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o átomo de carbono em δ 148,10 e os átomos de hidrogênio em δ 1,78.



O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1H \times ^1H - COSY$ (Figura 116, p. 90) mostrou correlação entre o átomo de hidrogênio em δ 6,38 (dd, $J = 10,8$ e $17,6$ Hz) e os hidrogênios em 5,07 (d, $J = 10,8$ Hz) e 5,23 (d, $J = 17,6$ Hz).



Também, foram verificadas correlações entre os átomos de hidrogênio em δ 1,54 e 1,70 e em δ 1,54 e 1,78.



Através da comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C (uni e bidimensionais) de HC-3 (Tabela. 13 p. 82) com dados descritos na literatura (MARTINS *et al.*, 1999) e no conhecimento das classes de substâncias presentes na espécie estudada, foi possível concluir que HC-3 tratava-se do diterpeno *ent*-labdânico, ácido isoóxico (Figura 100), substância isolada na forma de éster metílico de *H. courbaril* (KHOO; OEHLISCHLANGER; OURISSON, 1973 e NOGUEIRA *et al.*, 2001).

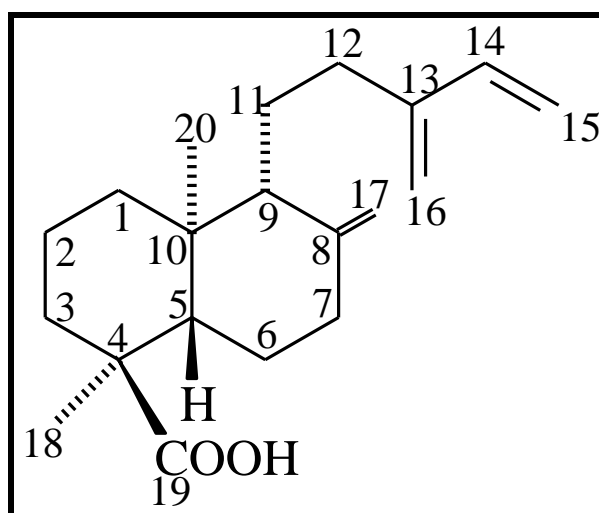


Figura 100 – Estrutura do ácido isoóxico

Nome químico: ácido decaidro-4,10-dimetil-8-metileno-9-(3-metileno-4-pentenil)-4-naftalenocarboxílico.

Tabela 13 – Dados espectroscópicos de HC-3 comparados com dados da literatura (MARTINS *et al.*, 1999).

C	RMN ¹ H		RMN ¹³ C		HMBC	
	Ácido isoóxico (MARTINS <i>et al.</i> , 1999)	HC-3	Ácido isoóxico (MARTINS <i>et al.</i> , 1999)	HC-3	² J _{CH}	³ J _{CH}
C						
4	-	-	47,5	47,71	3H-18; H-5	
8	-	-	147,8	148,10	2H-7	
10	-	-	38,8	39,09	3H-20	
13	-	-	146,9	147,23	H-14; 2H-12	H-15 _E ; H-15 _Z
19	-	-	185,3	184,20		3H-18
CH						
5		1,98 (1H, dd, 12,4 e 2,7)	49,5	49,81		3H-20; 3H-18
9		1,78 (1H, m)	56,4	56,71		2H-17; 2H-1; 3H-20
14	6,35 (1H, dd, 17,6 e 10,8)	6,38 (1H, dd, 17,6 e 10,8)	139,0	139,26	H-15 _E	2H-16; 2H-12
CH₂						
1		2,39 (2H, m)	37,8	38,14		3H-20
2		1,63 (2H, m)	18,4	18,64		
3		1,67 (2H, m)	37,1	37,32		3H-18
6		1,39 (2H, m)	26,8	27,09	H-5	
7		1,78 (2H, m)	37,8	38,08		2H-17
11		1,54 (1H, m) e 1,70 (1H, m)	22,1	22,37	H-12	
12		2,05	30,1	30,37		H-14
15	5,03 (1H, d, 10,8) e 5,19 (1H, d, 17,6)	5,07 (1H, d, 10,8) e 5,23 (1H, d, 17,6)	113,2	113,43		
16	4,96 (1H, sl) e 4,98 (1H, sl)	4,99 (1H, sl) e 5,02 (1H, sl)	115,6	115,81		H-14
17	4,56 (1H, sl) e 4,84 (1H, sl)	4,60 (1H, sl) e 4,88 (1H, sl)	107,0	107,21		
CH₃						
18	1,13 (3H, s)	1,13 (3H, s)	16,3	16,58		
20	0,70 (3H, s)	0,73 (3H, s)	14,7	14,99		

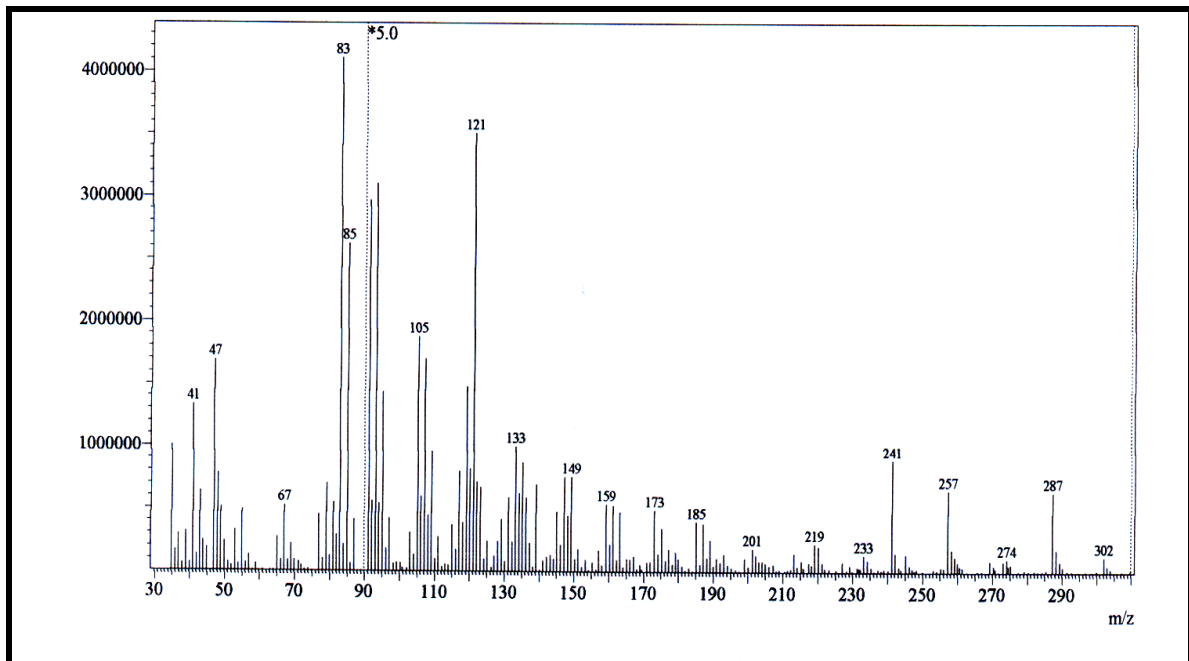


Figura 101 – Espectro de massa (i.e. 70 eV) de HC-3

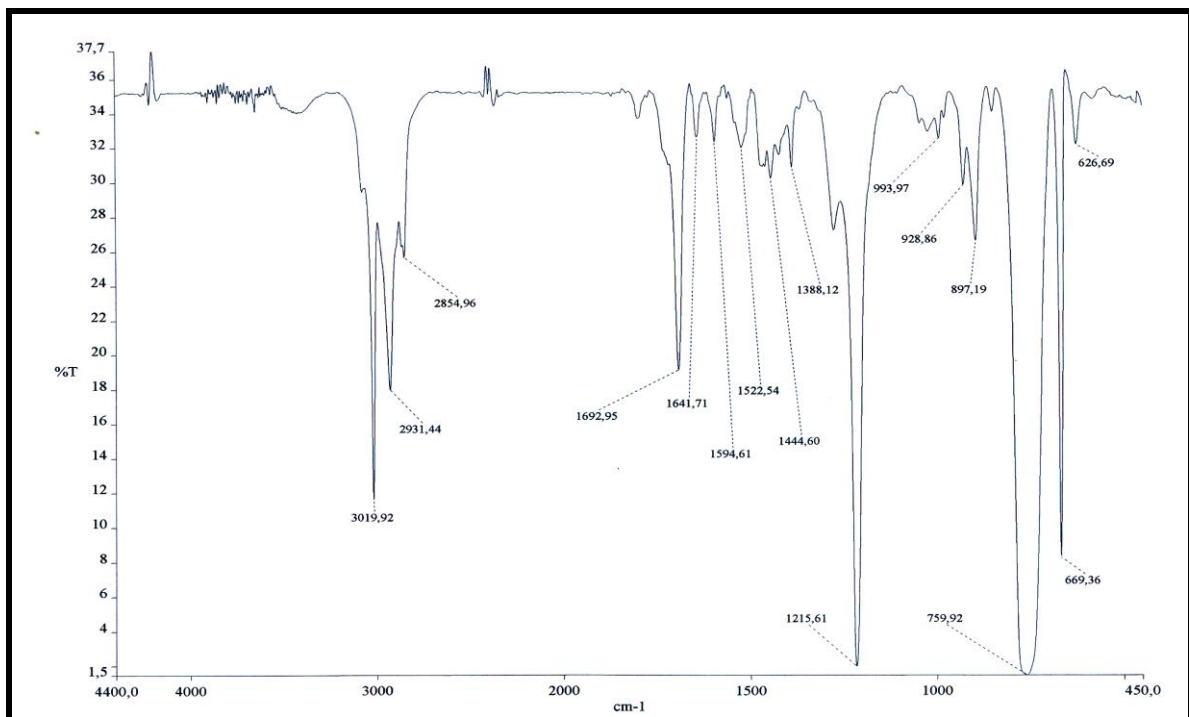


Figura 102 – Espectro de absorção na região do IV de HC-3 (em brometo de potássio)

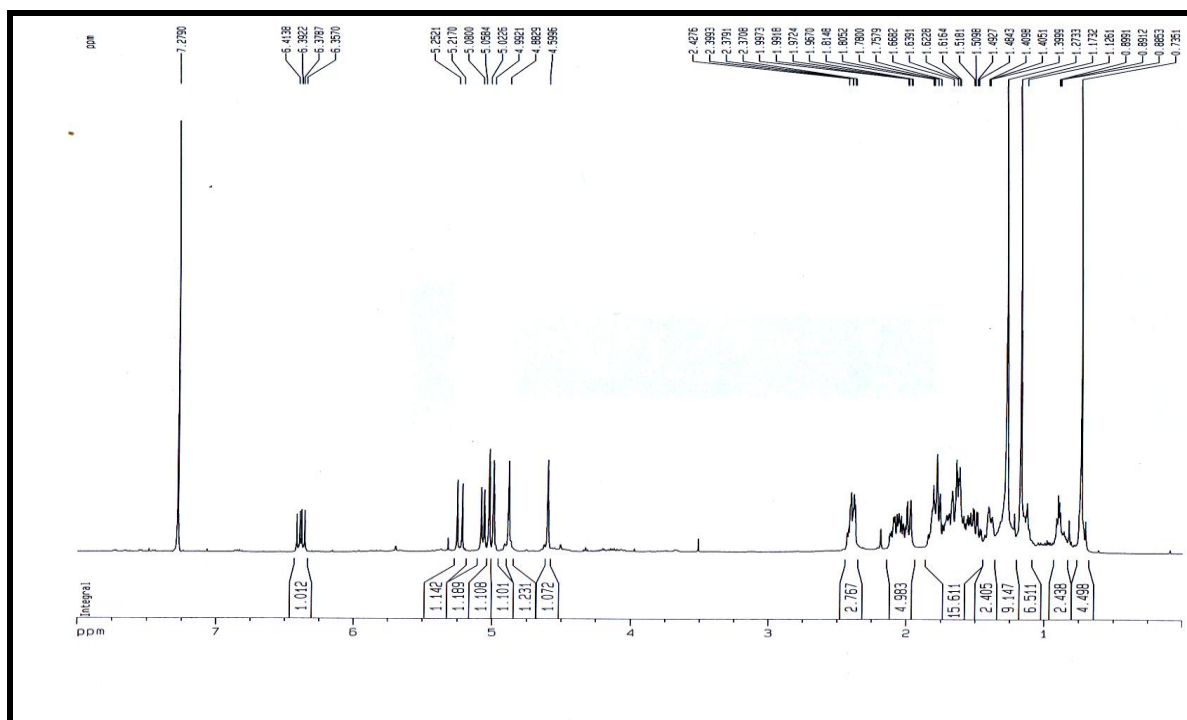


Figura 103 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3

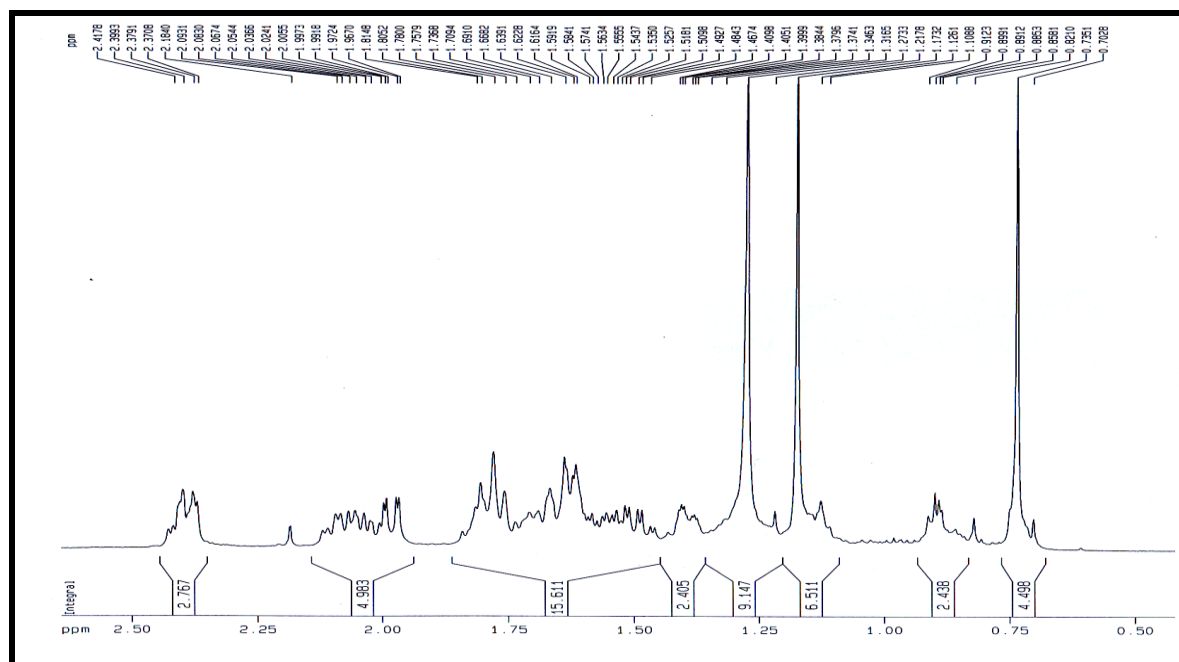


Figura 104 – Expansão 1 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3

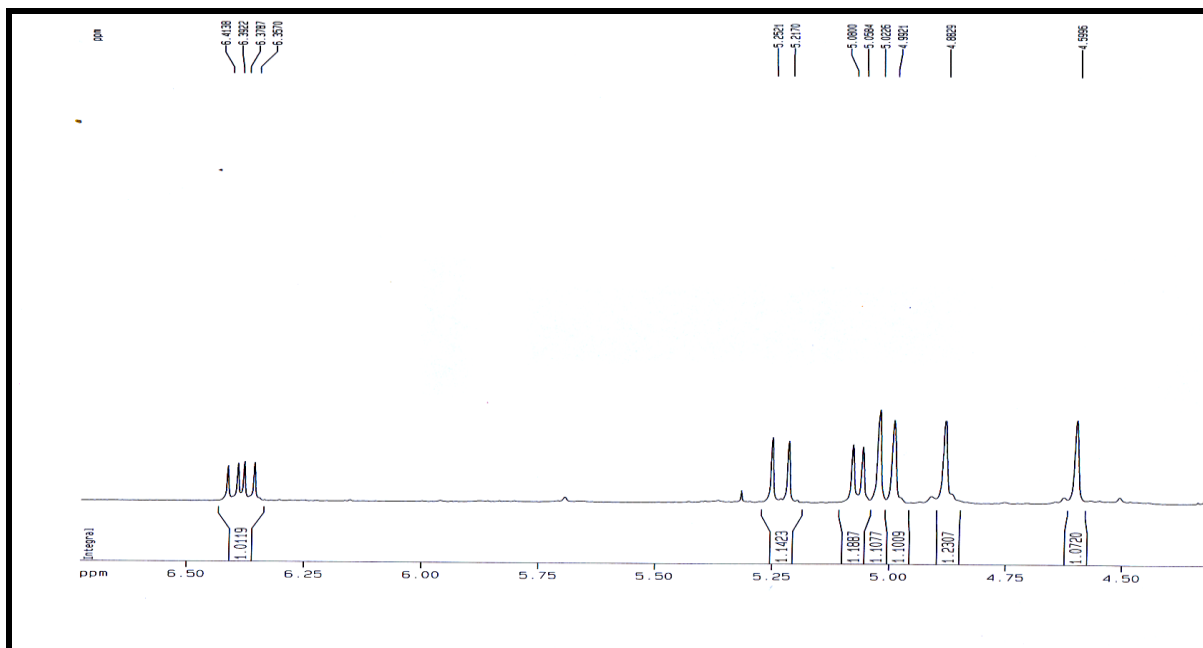


Figura 105 – Expansão 2 do Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HC-3

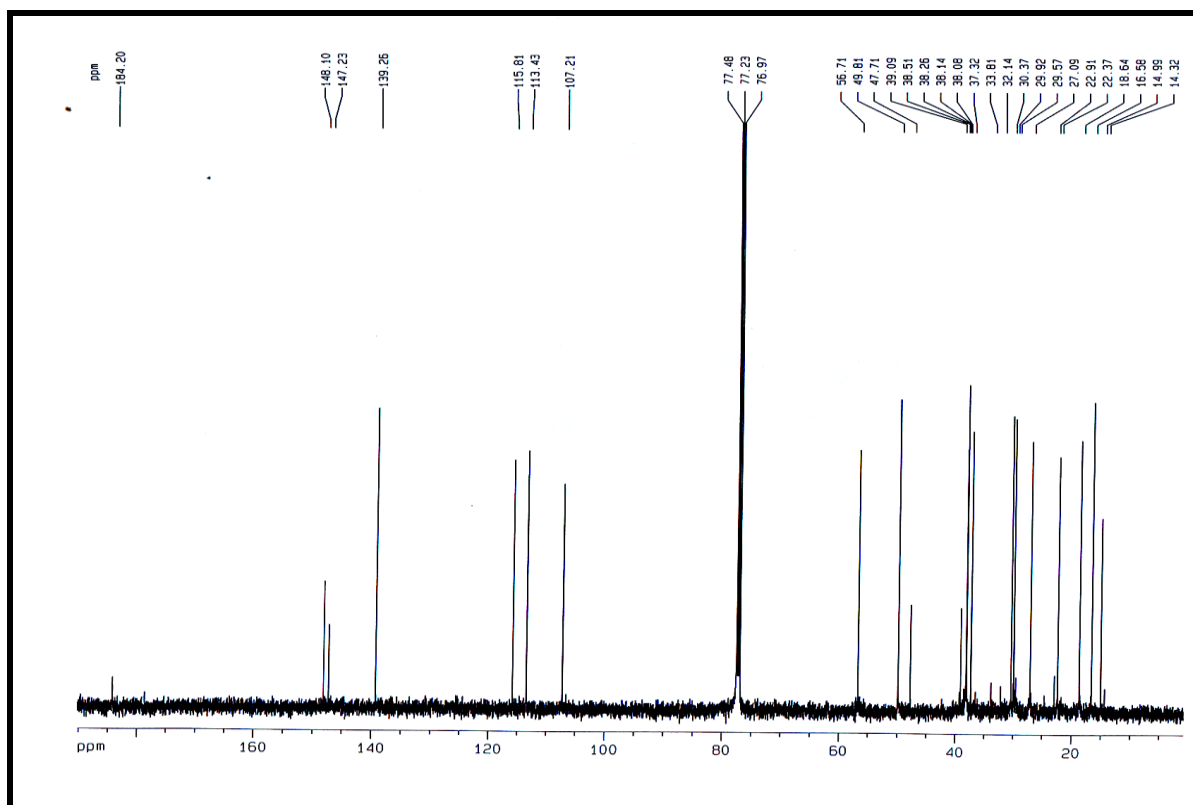


Figura 106 – Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de HC-3

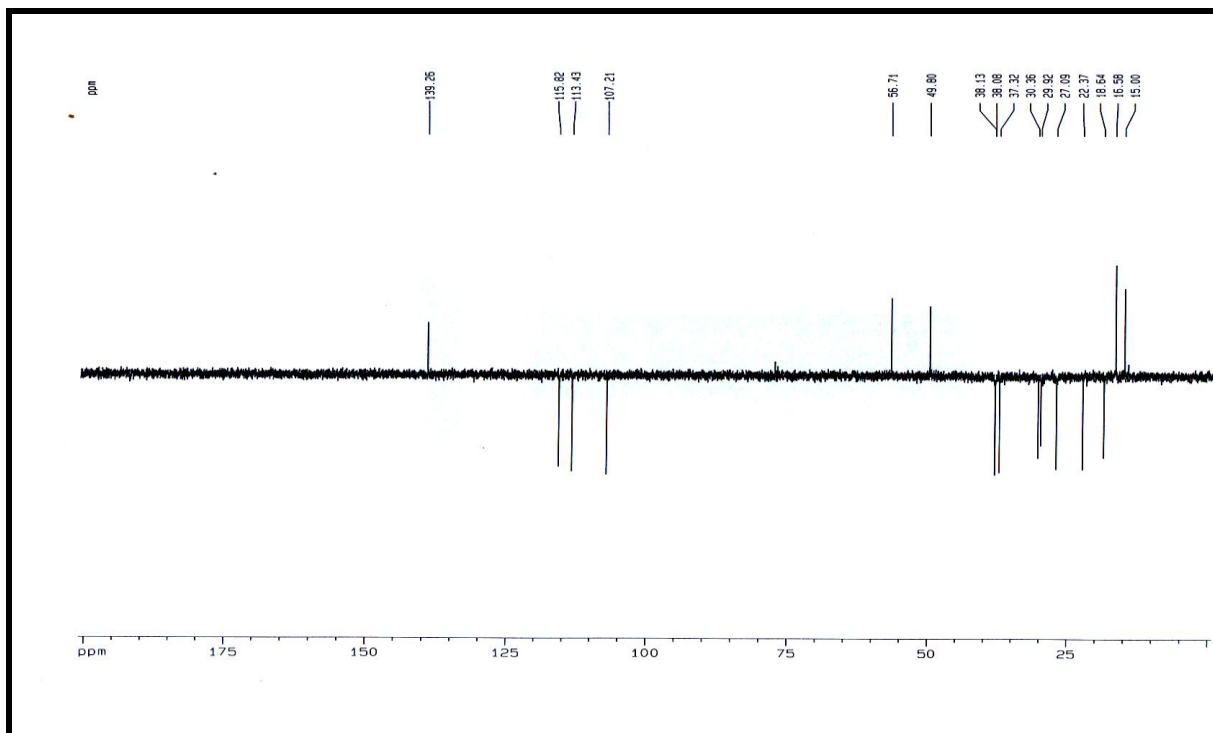


Figura 107 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de HC-3

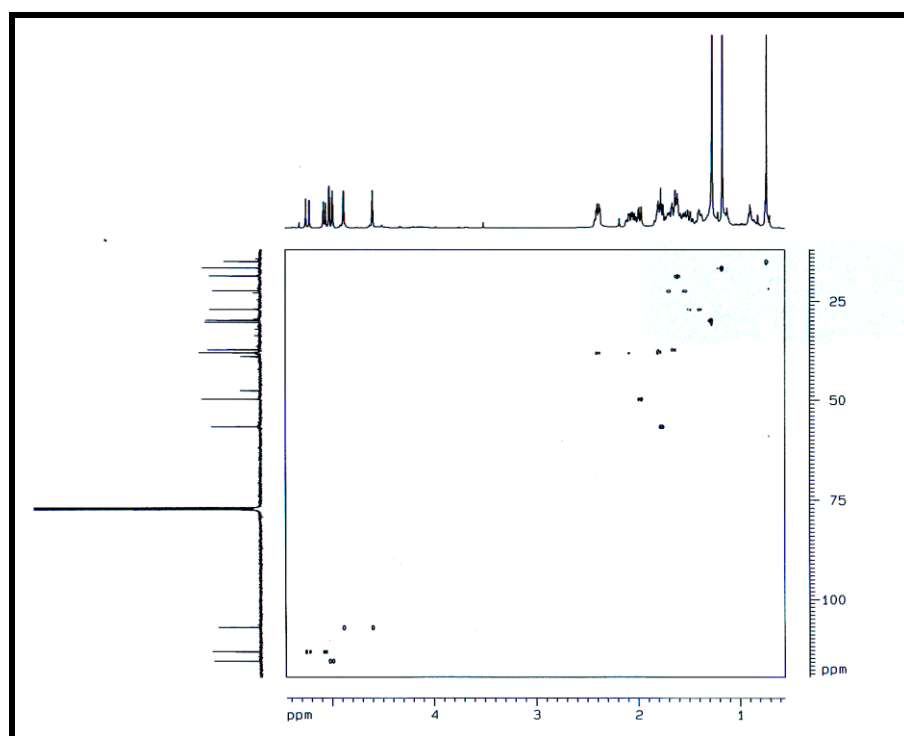


Figura 108– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3

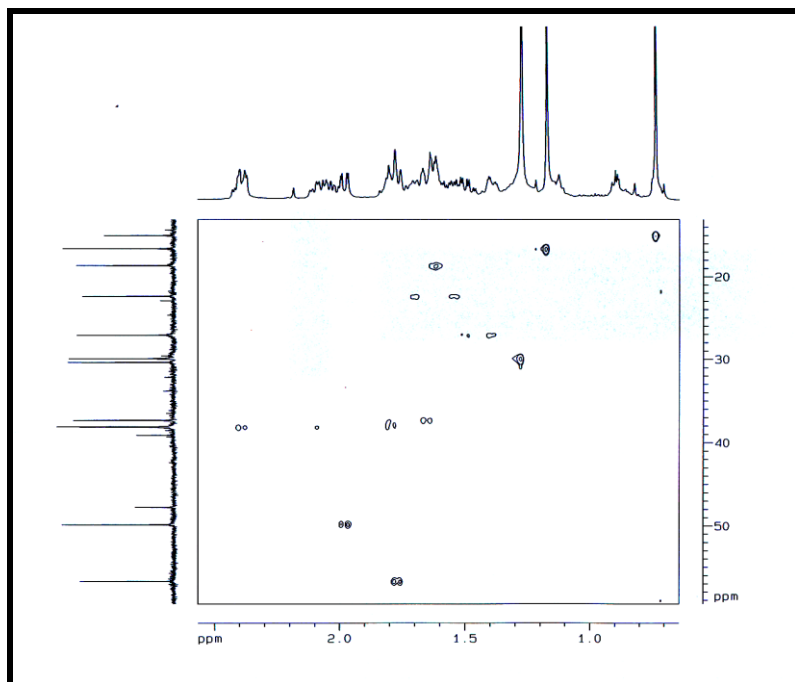


Figura 109 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3

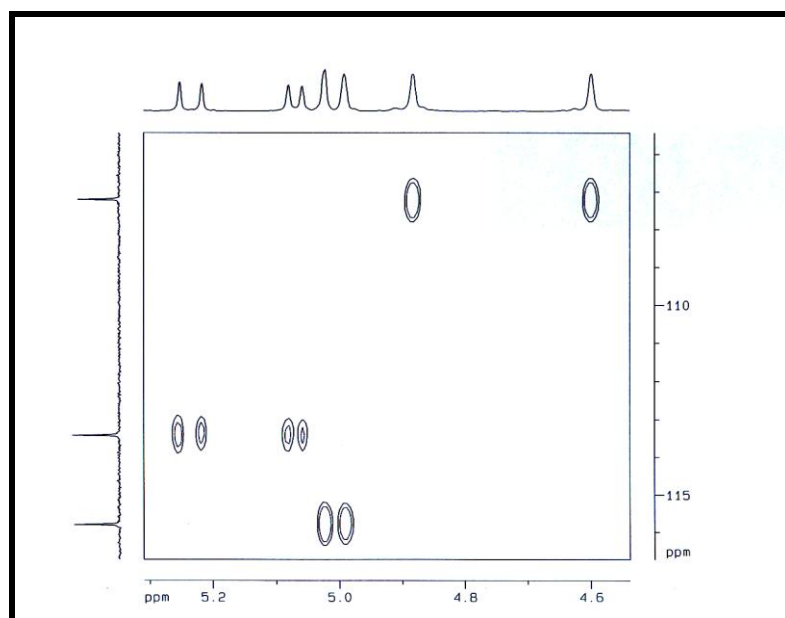


Figura 110 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HC-3

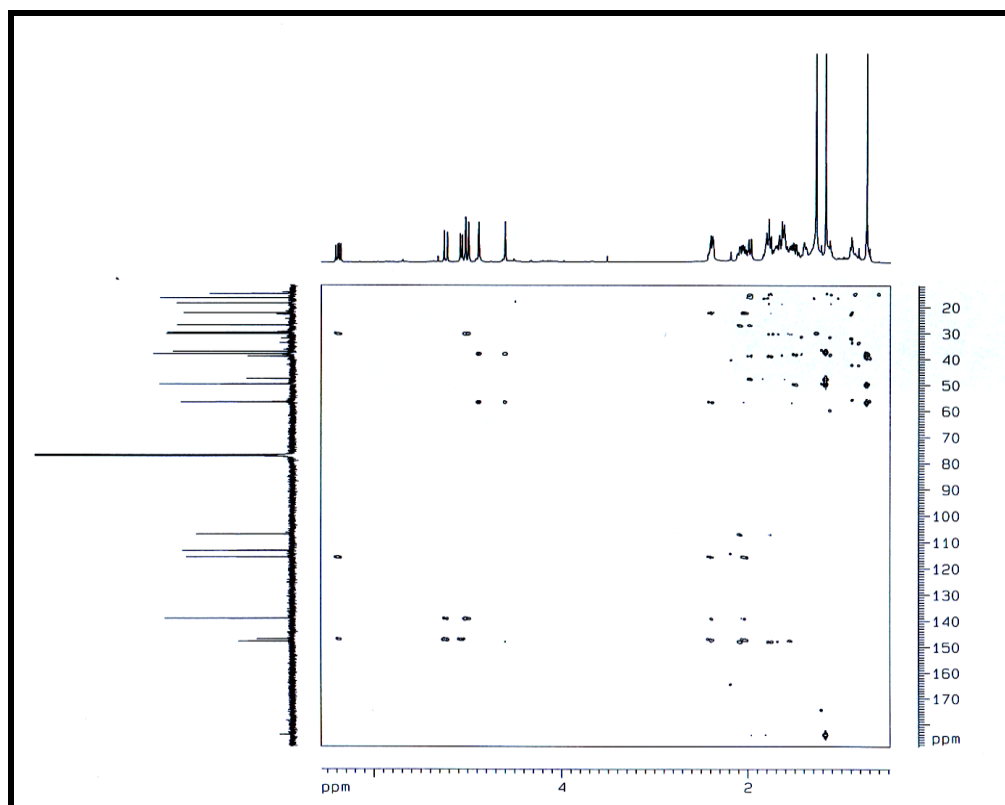


Figura 111 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3

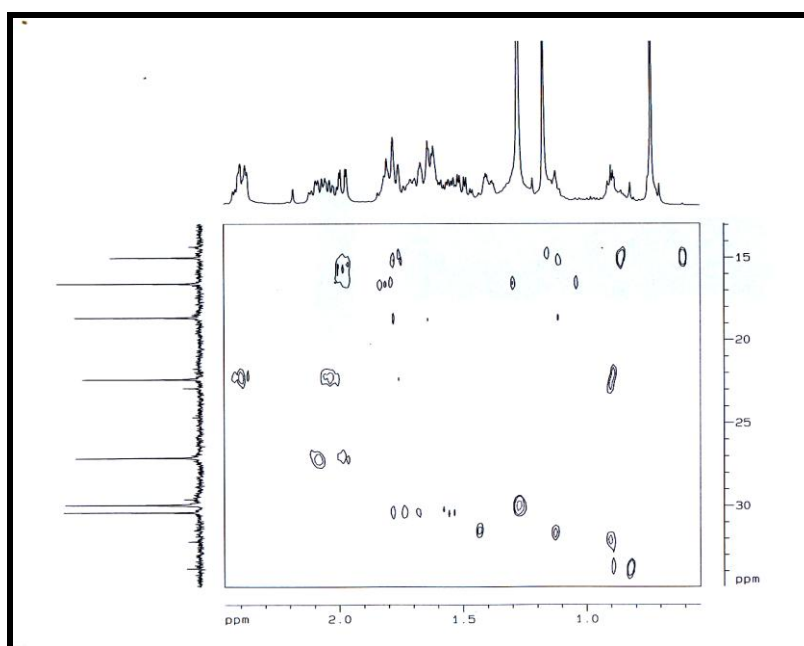


Figura 112 – Expansão 1 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3

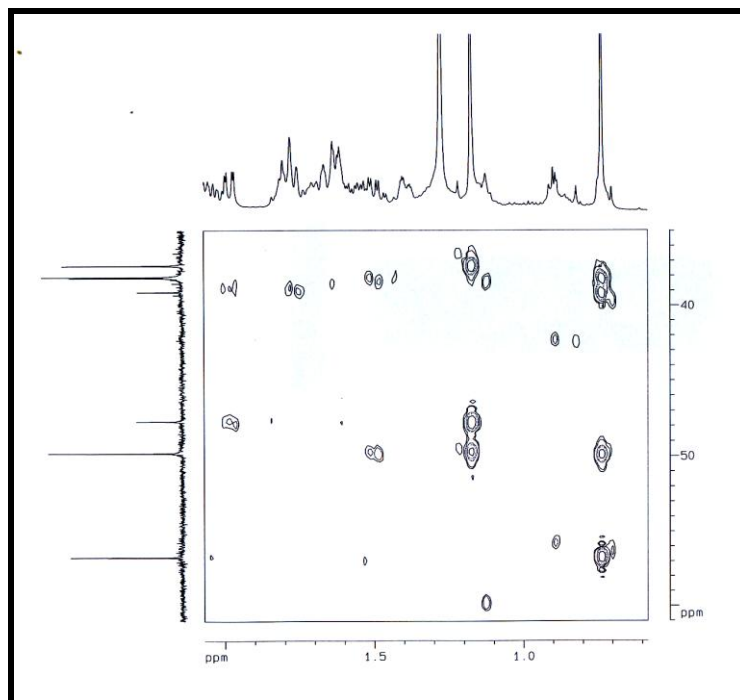


Figura 113 – Expansão 2 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3

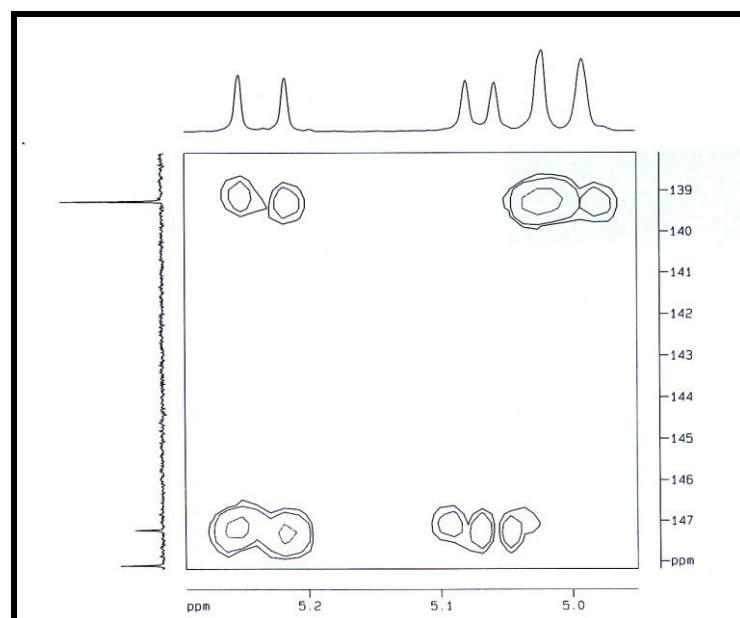


Figura 114 – Expansão 3 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3

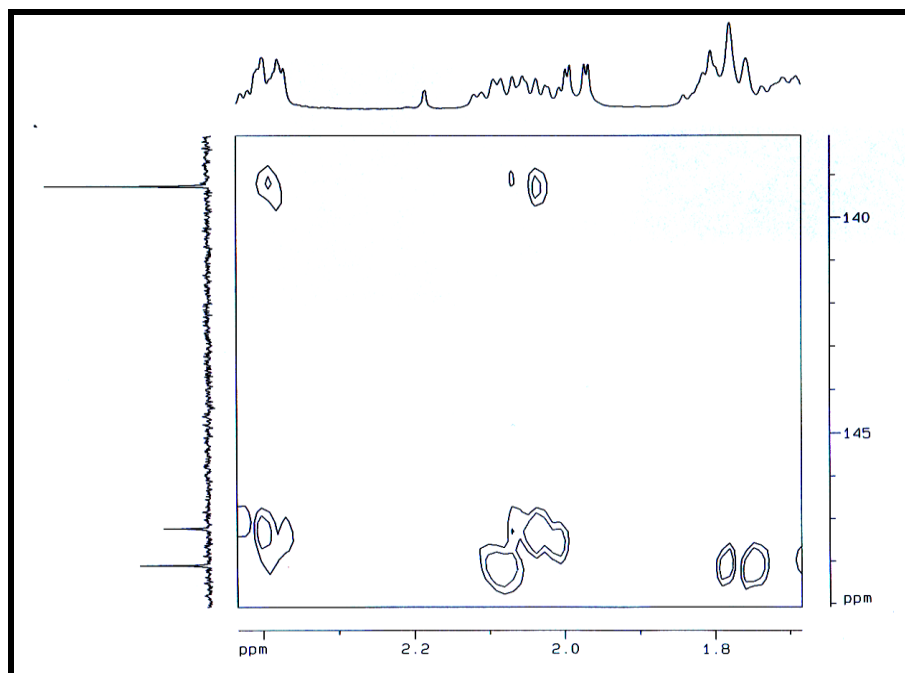


Figura 115 – Expansão 4 do Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HC-3

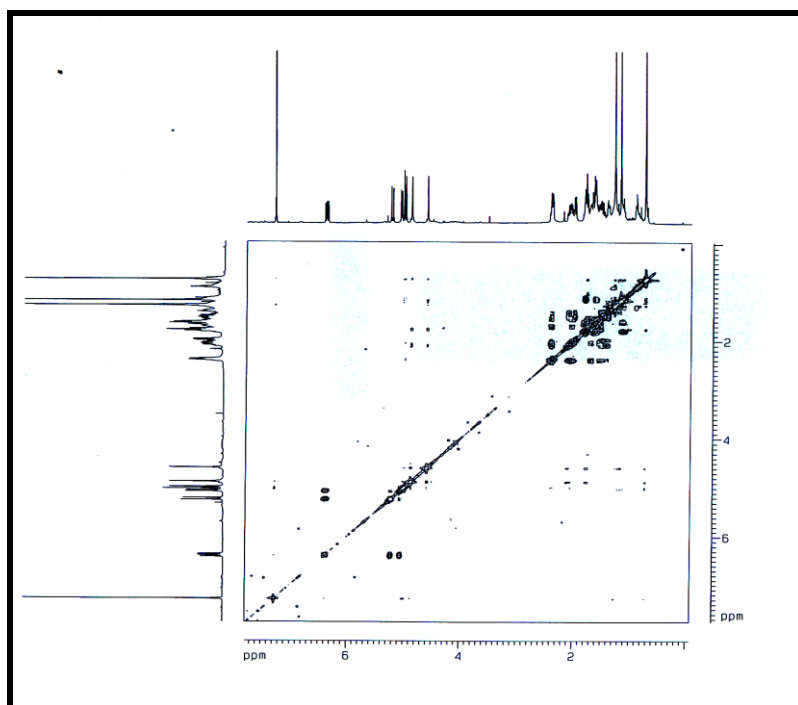


Figura 116 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HC-3

Capítulo 5

PARTE EXPERIMENTAL

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

Os frutos maduros de *Hymenaea courbaril* L., conhecida popularmente como jatobá, foram coletados no distrito de Arajara, município de Crato – Ceará, em 29 de julho de 2007, às sete horas da manhã por Helenicy Nogueira Holanda Veras, acadêmica de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. Os frutos verdes desta espécie foram coletados no município de Sobral – Ceará, em 12 de julho de 2008.

A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número 41026.

5.2 Métodos analíticos

5.2.1 Métodos cromatográficos

Para as cromatografias de adsorção em coluna foram utilizadas gel de sílica 60 (0,063 a 0,200) da VETEC®. As dimensões das colunas (comprimento e diâmetro) variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas.

As análises cromatográficas em camada delgada foram efetuadas em gel de sílica G60 da VETEC® sobre suporte de vidro e em gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre poliéster T-6145 da Merck®.

As revelações das substâncias nas cromatoplaças analíticas foram realizadas através da exposição à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4.LC da Vilber Lourmat e/ou por imersão em solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) 5g / 100 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) 0,75M / 100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico HL-500, da Steinel à aproximadamente 150 °C, por alguns segundos.

Foram empregados solventes de qualidade PA (Synth) tais como hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol, isocráticos ou em misturas, em ordem crescente de gradiente de polaridade.

A remoção dos solventes de extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório BÜCHI “Waterbath” Modelo B-480 e R-114, sob pressão reduzida.

5.2.2 Métodos físicos de análise orgânica

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas nos equipamentos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os dados de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, em relação às substâncias isoladas, foram obtidos nos equipamentos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Enquanto que os referentes aos óleos essenciais foram obtidos em experimentos de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e a detector por ionização de chama, no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) das substâncias isoladas foram obtidos em aparelhos pertencentes ao CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.2.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Estes espectros foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de brometo de potássio para análise das amostras.

5.2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500, operando na frequência de 125 MHz e 500 MHz para carbono-13 e hidrogênio, respectivamente.

Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio e metanol deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: singlete (s), dubleto (d), dubleto de dubleto (dd), dubleto de tripleto (dt), tripleto (t) e multipletto (m).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais espectrais observados no espectro BB (Broad Band).

5.2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais obtidos foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM Shimadzu, modelo QP5050A), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e provido de uma coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) com

30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme 0,25 μm , tendo o hélio como gás de arraste e com fluxo de 1,2 mL/min.

A temperatura foi programada mantendo 50 °C por 1,5 min, seguido de um aumento de 4 °C/min até atingir 200 °C, depois a 10 °C até atingir 280 °C mantendo constante esta temperatura por 5 min. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura do detector (ou interface) foi 280 °C. Foi injetado um volume de 0,5 μL de acetato de etila, com taxa de partição do volume injetado de 1:83 e pressão na coluna de 64.20 kPa.

Foi utilizado espectrômetro de massa com detector de captura iônica operando por impacto eletrônico, com energia de impacto de 70 eV, velocidade de varredura 1.000, intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

Os espectros de massa das substâncias isoladas foram obtidos em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo CG/EM QP5050A, provido de uma coluna capilar da marca OHIO VALLEY, OV-5, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme 0,25 μm acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu. As condições de operação da análise cromatográfica das referidas substâncias foram as seguintes: programação de aquecimento do forno cromatográfico 4,0°C/min de 40 até 180°C e 20°C/min de 180 até 280°C, durante 7,0 min, com o injetor a temperatura de 250°C e 280°C. O gás de arraste utilizado na coluna foi hélio e os espectros de massa foram obtidos através da técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

5.2.2.4 Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (DIC)

A análise quantitativa da composição química dos óleos essenciais obtidos foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização por chama (DIC), usando um equipamento Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de filme, usando as mesmas condições do CG/EM. A quantificação dos constituintes foi realizada pela normatização da área (%). As concentrações dos compostos foram calculadas pela área e colocados na ordem de eluição do CG.

5.2.2.5 Ponto de fusão

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram obtidos em aparelho digital MQAPF-302 da Microquímica equipamentos, em uma velocidade média de aquecimento 5 °C/mim.

5.2.2.6 Índice de Refração

Estas medidas foram determinadas em refratômetro WYA-15 ABBE QUIMIS.

5.2.2.7 Rotação óptica

Verificada em polarímetro Perkin Elmer 341.

5.3 Estudo dos constituintes voláteis de *Hymenaea courbaril* L.

O estudo da composição volátil de *Hymenaea courbaril* L. foi realizado com o óleo essencial das cascas dos frutos verdes e maduros desta espécie.

Um sistema de hidrodestilação tipo Clevenger modificado por Gottlieb (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960) foram empregados na obtenção dos óleos essenciais.

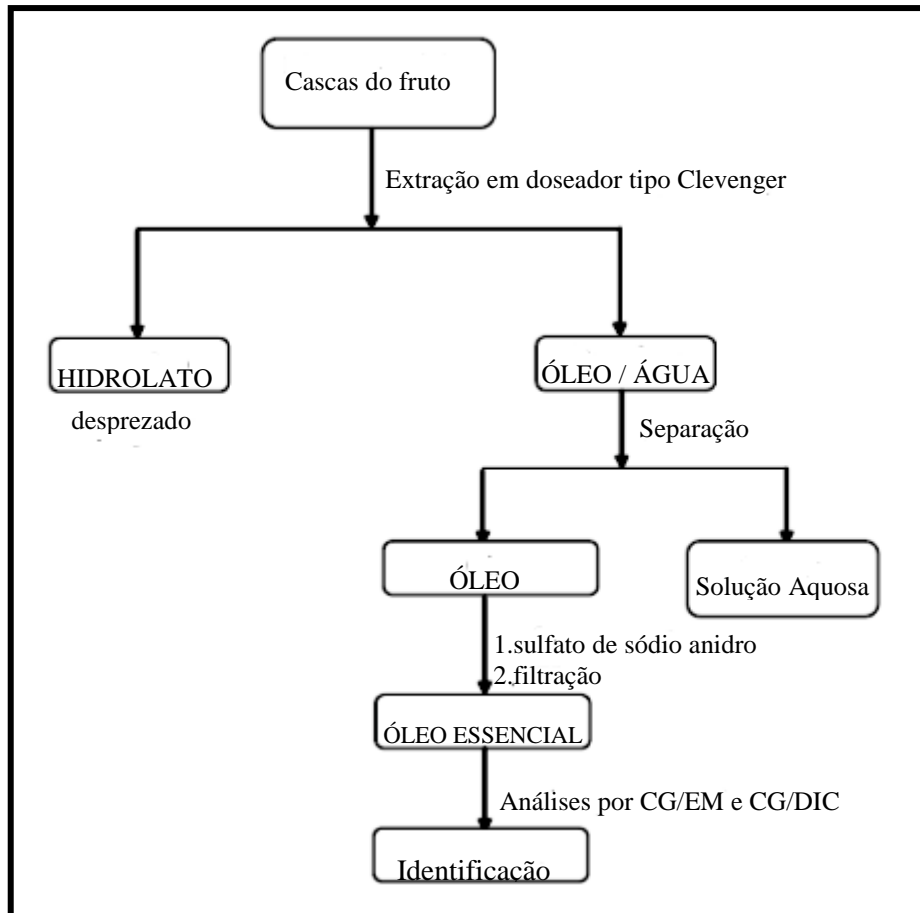
5.3.1 Obtenção do óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *Hymenaea courbaril*.

As cascas secas e trituradas dos frutos maduros de *H. courbaril* (636 g) foram adicionadas em um balão de 5 L de capacidade. Em seguida, foram adicionados 2500 mL de água destilada. Após duas horas sob refluxo, separou-se a mistura óleo/água no doseador. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada, resultando em 266,8 mg de um óleo de coloração verde clara; obtendo-se, portanto, um rendimento de 0,042%. (Fluxograma 01, p. 96). A Tabela 03, p. 18 mostra o resultado da identificação e quantificação relativa dos componentes químicos deste óleo.

5.3.2 Obtenção do óleo essencial das cascas dos frutos verdes de *Hymenaea courbaril*.

As cascas trituradas dos frutos verdes de *H. courbaril* (940 g) foram adicionadas em um balão de 5 L de capacidade. Em seguida, foram adicionados 2500 mL de água destilada. Após duas horas sob refluxo, separou-se a mistura óleo/água no doseador. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada, resultando em 668,6 mg de um óleo de coloração amarela clara; obtendo-se, portanto, um rendimento de 0,071%.

(Fluxograma 01, p. 96). A Tabela 04, p. 26 mostra o resultado da identificação e quantificação relativa dos componentes químicos deste óleo.



Fluxograma 01 – Método de extração do óleo essencial de *H. courbaril*

5.4 Estudo dos constituintes fixos de *Hymenaea courbaril* L.

5.4.1 Obtenção dos extratos em hexano, em acetato de etila e em metanol das cascas dos frutos de *Hymenaea courbaril* L.

As cascas dos frutos, após secagem e trituração, (1000 g) foram submetidas à extração, à temperatura ambiente, com hexano, seguida com acetato de etila e com metanol e, após sucessivas extrações com os já citados solventes, os extratos obtidos foram concentrados por destilação sob pressão reduzida, resultando na obtenção de 54,23 g de extrato em hexano de *H. courbaril* (**EHHC**), 60,00 g do extrato em acetato de etila de *H. courbaril* (**EAHC**) e 47,00 g de extrato em metanol de *H. courbaril* (**EMHC**).

Os referidos extratos foram submetidos a testes de atividade alelopática sobre *Lactuca sativa* L., antioxidante sobre DPPH e larvicida sobre *Aedes aegypti*.

5.4.2 Fracionamento cromatográfico de EHHC

O extrato EHHC (53,23 g) foi submetido a uma coluna filtrante, utilizando 180 g de gel de sílica, em uma coluna (L = 39 cm e Φ 4,5 cm,). Foram utilizados hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, como eluentes. As frações obtidas tiveram seus solventes evaporados sob pressão reduzida, resultando nas frações mostradas na Tabela 14.

Tabela 14 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHC

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 7	hexano
8 a 15	hexano : clorofórmio (50:50)
16 a 28	clorofórmio
29 a 36	clorofórmio : acetato de etila (50:50)
37 a 44	acetato de etila
45 a 52	acetato de etila : metanol (50:50)
53 a 91	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações que apresentaram semelhantes perfis cromatográficos foram reunidas, de acordo com a Tabela 15.

Observou-se que as frações 44 a 91 não foram solúveis em solventes orgânicos, tais como: hexano, diclorometano, acetona, metanol, e, portanto, foram guardadas, isoladamente, em local fresco e ao abrigo da luz.

Tabela 15 - Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHHC

FRAÇÃO	MASSA (g)	FRAÇÃO	MASSA (g)
1	0,4	17 a 18	3,6
2	1,4	19 a 21	3,4
3	0,4	22 a 24	1,8
4 a 7	0,2	25	0,7
8	0,0039	26 a 28	2,5
9	0,0208	29	0,4
10 a 12	3,8	30	2,9
13	1,1	31 a 39	1
14	1,2	40 a 41	0,0646
15 a 16	1,5	42 a 43	0,1

5.4.2.1 Tratamento cromatográfico de EHC(26-28) e isolamento de HC-1

A fração obtida EHC(26-28) (2,5 g) descrita no item 5.4.2 (Tabela 15), de aspecto sólido esbranquiçado foi, inicialmente, lavada com hexano, à temperatura ambiente e o material resultante desta lavagem (608,5 mg) foi, posteriormente, submetido a uma coluna cromatográfica de gel de sílica ($L = 59$ cm e $\Phi = 1,5$ cm) eluída com clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade de acordo com os dados descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHC(26-28)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 34	clorofórmio : acetato de etila (98:2)
35 a 52	clorofórmio : acetato de etila (97:3)
53 a 80	clorofórmio : acetato de etila (95:5)
81 a 97	clorofórmio : acetato de etila (90:10)
98 a 113	clorofórmio : acetato de etila (85:15)
114 a 129	clorofórmio : acetato de etila (80:20)
130 a 137	clorofórmio : acetato de etila (70:30)
138 a 141	clorofórmio : acetato de etila (50:50)
142 a 145	acetato de etila
146	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuni-las, conforme mostrado na Tabela 17. As frações 1, 2 e 3 foram descartadas por ausência de material, assim como, as frações 71 a 146.

A fração 38-56 que continha 121,6 mg de um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio, apresentou faixa de fusão entre 158,8 °C e 160,3 °C, sendo denominada HC-1.

Tabela 17 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHC(26-28)

FRAÇÃO	MASSA (g)
4 a 30	0,0087
31 a 37	0,0140
38 a 56	0,1216
57 a 70	0,0064

5.4.2.2 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39)

Visando dar continuidade ao tratamento cromatográfico das frações obtidas na coluna filtrante descrita no item 5.4.2, realizou-se o tratamento cromatográfico de EHC(31-39) (Tabela 15). O material (999,2 mg) foi misturado a uma pequena quantidade de gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana e então, submetido a uma coluna cromatográfica (L = 23 cm e Φ = 2,3 cm) em gel de sílica. As frações obtidas, assim como os solventes utilizados no fracionamento cromatográfico encontram-se mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHC(31-39).

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 103	clorofórmio : acetato de etila : metanol (98:1,5:0,5)
104 a 322	clorofórmio : acetato de etila : metanol (95:4,5:0,5)
323 a 355	clorofórmio : acetato de etila : metanol (90:9,5:0,5)
356 a 370	clorofórmio : acetato de etila : metanol (80:19,5:0,5)
371 a 386	clorofórmio : acetato de etila : metanol (75:24,5:0,5)
387 a 405	clorofórmio : acetato de etila : metanol (70:29,5:0,5)
406 a 419	clorofórmio : acetato de etila : metanol (50:49,5:0,5)
420 a 430	acetato de etila : metanol (99,5:0,5)
431 a 441	acetato de etila
442 a 450	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e desta forma, reunir as semelhantes. As frações

reunidas encontram-se apresentadas na Tabela 19. As frações 1 a 62 foram descartadas por ausência de material e as frações 432 a 450 apresentaram-se insolúveis em solventes orgânicos testados, tais como: hexano, diclorometano, acetona e metanol.

Tabela 19 - Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHC(31-39)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
63 a 70	2,1	192 a 242	45,4
71 a 98	9,9	243 a 329	35,7
99 a 110	7,8	330 a 344	9,5
111 a 124	8	345 a 364	11,1
125 a 158	22,2	365 a 389	35
159 a 175	15	390 a 431	552,1
176 a 191	19,6	-	-

5.4.2.3 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39)(243-329)

A fração EHC (31-39) (243-329) (35,7 mg) descrita no item 5.4.2.2 (Tabela 19), foi submetida a uma coluna cromatográfica de gel de sílica ($L = 17$ cm e $\Phi = 1,5$ cm) eluída com hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade de acordo com os dados descritos na Tabela 20.

Tabela 20 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHC(31-39) (243-329)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 11	clorofórmio : acetato de etila (95:5)
12 a 20	clorofórmio : acetato de etila (90:10)
21 a 47	clorofórmio : acetato de etila (85:15)
48 a 74	clorofórmio : acetato de etila (80:20)
75 a 86	clorofórmio : acetato de etila (75:25)
87 a 95	clorofórmio : acetato de etila (65:35)
96 a 103	clorofórmio : acetato de etila (50:50)
104 a 113	acetato de etila

A posterior análise por cromatografia em camada delgada (CCD) permitiu verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuní-las, conforme descrito na Tabela 21.

Tabela 21 - Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHC(31-39) (243-329)

FRAÇÃO	MASSA (mg)
1 a 15	2,2
16 a 56	10,4
57 a 113	6,3

5.4.2.4 Tratamento cromatográfico de EHC(31-39)(243-329)(16-56) e isolamento de HC-2

A fração EHC(31-39)(243-239)(16-56) (10,4 mg), descrita no item 5.4.2.3 (Tabela 21), foi submetida à cromatografia em coluna ($L = 16$ cm e $\Phi = 1$ cm), utilizando gel de sílica como adsorvente; clorofórmio e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade como eluentes. Este tratamento cromatográfico levou à obtenção de 78 frações conforme descrito na Tabela 22. Destas, as frações 1 a 18 foram descartadas por ausência de material, enquanto as frações 42 a 78 apresentaram-se insolúveis nos solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol.

Tabela 22 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHHC(31-39)(243-239)

(16-56)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 15	clorofórmio : acetato de etila (90:10)
16 a 25	clorofórmio : acetato de etila (85:15)
26 a 46	clorofórmio : acetato de etila (80:20)
47 a 64	clorofórmio : acetato de etila (75:25)
65 a 74	clorofórmio : acetato de etila (70:30)
75 a 78	acetato de etila

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), foi possível reunir as frações 19 a 41 obtidas que apresentaram 6,7 mg de um sólido esverdeado de aspecto cristalino, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão entre 47,9 °C e 49,2° C, sendo denominada HC-2.

5.4.3 Fracionamento cromatográfico de EAHC

O extrato EAHC (60 g) foi submetido a uma coluna filtrante (L = 12 cm e Φ 10 cm,). Foram utilizados hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, como eluentes. As frações obtidas tiveram seus solventes evaporados sob pressão reduzida, resultando nas frações mostradas na Tabela 23.

Tabela 23 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 9	Hexano
10 a 17	hexano : acetato de etila (50:50)
18 a 26	acetato de etila
27	acetato de etila : metanol (50:50)
28	metanol

A posterior análise por cromatografia em camada delgada (CCD) permitiu verificar o perfil cromatográfico das frações e as semelhantes foram reunidas, conforme descrito na Tabela 24. A fração 27 apresentou-se insolúvel nos solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol.

Tabela 24 - Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EAHC

FRAÇÃO	MASSA (g)
1 a 10	0,0551
11 a 18	6,1
19 a 26	11,1
28	22,7

5.4.3.1 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)

A fração EAHC(19-26) (10 g), descrita no item 5.4.3 (Tabela 24) foi submetida a uma coluna cromatográfica de gel de sílica ($L = 20$ cm e $\Phi = 4$ cm) eluída com hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade de acordo com os dados descritos na Tabela 25.

Tabela 25 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 5	hexano : acetato de etila (95:5)
6 a 9	hexano : acetato de etila (90:10)
10 a 14	hexano : acetato de etila (80:20)
15 a 17	hexano : acetato de etila (70:30)
18 a 21	hexano : acetato de etila (60:40)
22 a 24	hexano : acetato de etila (50:50)
25 a 27	hexano : acetato de etila (40:60)
28 a 30	hexano : acetato de etila (30:70)
31 a 33	hexano : acetato de etila (20:80)
34 a 36	hexano : acetato de etila (10:90)
37	acetato de etila
38	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuni-las, na forma como descreve a Tabela 26.

Tabela 26 - Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
1 a 3	20,1	15 a 17	373,2
4 a 6	22,8	18	149,9
7	5	19 a 20	450,8
8	6,1	21 a 23	754,8
9	4,8	24 a 28	1397,4
10	12,1	29 a 36	824,7
11	59,9	37	100,7
12	74,5	38	614,9
13 a 14	81	-	-

5.4.3.2 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)

A fração EAHC(19-26)(11) (59,9 mg), descrita no item 4.4.3.1 (Tabela 26) foi cromatografada em de gel de sílica coluna ($L = 7,5$ cm e $\Phi = 1,5$ cm) eluída com clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade como mostrado na Tabela 27.

Tabela 27 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 24	clorofórmio : acetato de etila (98:2)
25 a 47	clorofórmio: acetato de etila (97:3)
48 a 89	clorofórmio: acetato de etila (95:5)
90 a 111	clorofórmio: acetato de etila (90:10)
112 a 135	clorofórmio: acetato de etila (85:15)
136 a 156	clorofórmio: acetato de etila (80:20)
157 a 179	clorofórmio : acetato de etila (70:30)
180 a 197	clorofórmio : acetato de etila (50:50)
198 a 208	acetato de etila
209	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuni-las, na forma como descreve a Tabela 28. As frações 1 e 2 foram descartadas por ausência de material.

Tabela 28 - Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11)

FRAÇÃO	MASSA (mg)
3 a 7	33
8 a 34	21
35 a 194	7,5
195 a 208	3
209	52,8

5.4.3.3 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(3-7) e isolamento de HC-3

A fração EAHC(19-26)(11)(3-7) (33 mg), descrita no item 5.4.3.2 (Tabela 28) foi misturada a uma pequena quantidade de gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana e então, submetida a uma coluna cromatográfica (L = 15 cm e Φ = 1,5 cm) em gel de sílica.

Neste tratamento, foram coletadas 102 frações de aproximadamente 10 mL, utilizando os eluentes descritos na Tabela 29.

Tabela 29 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(3-7)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 18	diclorometano : hexano (90:10)
19 a 36	diclorometano : hexano (95:5)
37 a 47	diclorometano
48 a 58	diclorometano : acetato de etila (99:1)
59 a 69	diclorometano : acetato de etila (98:2)
70 a 80	diclorometano : acetato de etila (95:5)
81 a 90	acetato de etila
91 a 102	metanol

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações obtidas e reuni-las, na forma como descreve a Tabela 30.

Tabela 30 - Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11)(3-7)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
1 a 8	1,5	19 a 46	13,5
9 a 10	0,9	47 a 90	5,2
11	3,1	91 a 102	1,6
12 a 18	5,8	-	-

A fração 19-46 (13,5 mg) mostrou-se pura quando analisada por cromatografia em camada delgada, como um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão entre 195 e 197 °C, sendo denominada HC-3.

5.4.3.4 Tratamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(8-34) e isolamento de HC-3

Visando a continuidade do fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11) item 5.4.3.2 (Tabela 28) realizou-se o tratamento da fração EAHC(19-26)(11)(8-34). A

referida fração (20,6 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ($L = 10$ cm e $\Phi = 1$ cm), utilizando os eluentes descritos na Tabela 31.

Tabela 31 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EAHC(19-26)(11)(8-34)

FRAÇÕES	ELUENTE
1 a 19	diclorometano : hexano (90:10)
20 a 38	diclorometano : hexano (95:5)
39 a 47	diclorometano
48 a 58	diclorometano : acetato de etila (99:1)
59 a 66	diclorometano : acetato de etila (97:3)
67 a 75	diclorometano : acetato de etila (95:5)
76 a 85	acetato de etila
86	metanol

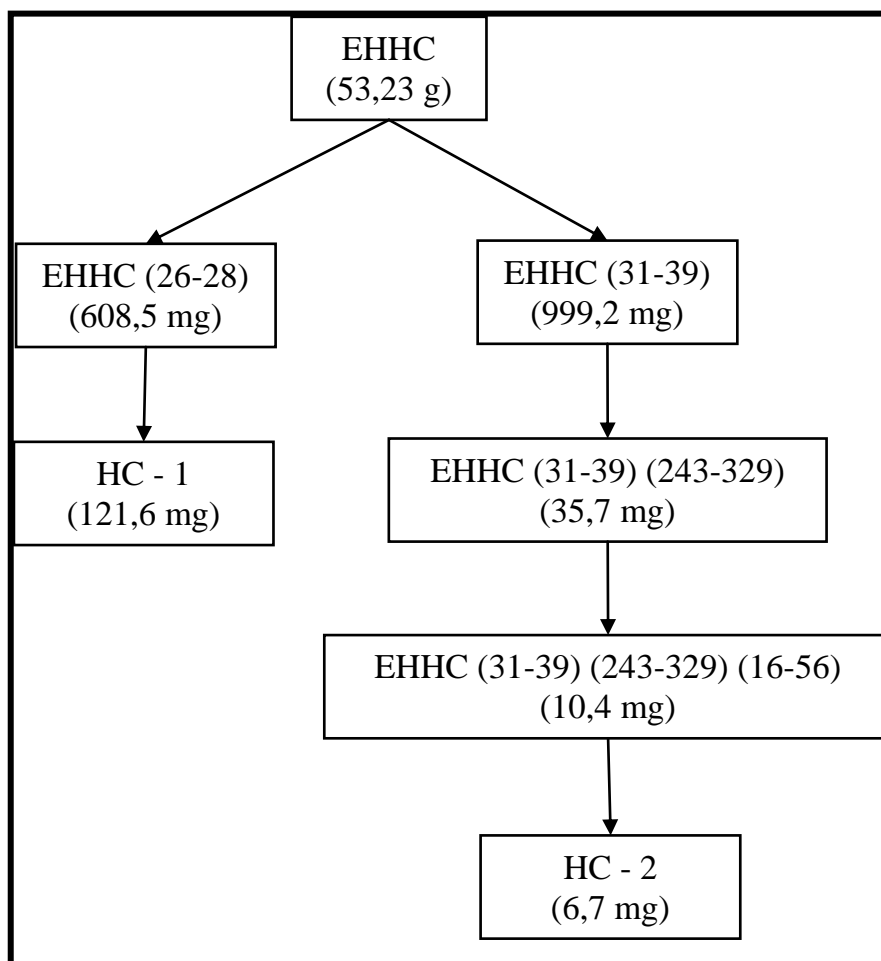
A comparação das frações obtidas por cromatografia em camada delgada (CCD), permitiu a reunião das semelhantes, conforme descrito na Tabela 32.

Tabela 32 - Dados referentes às frações obtidas de EAHC(19-26)(11)(8-34)

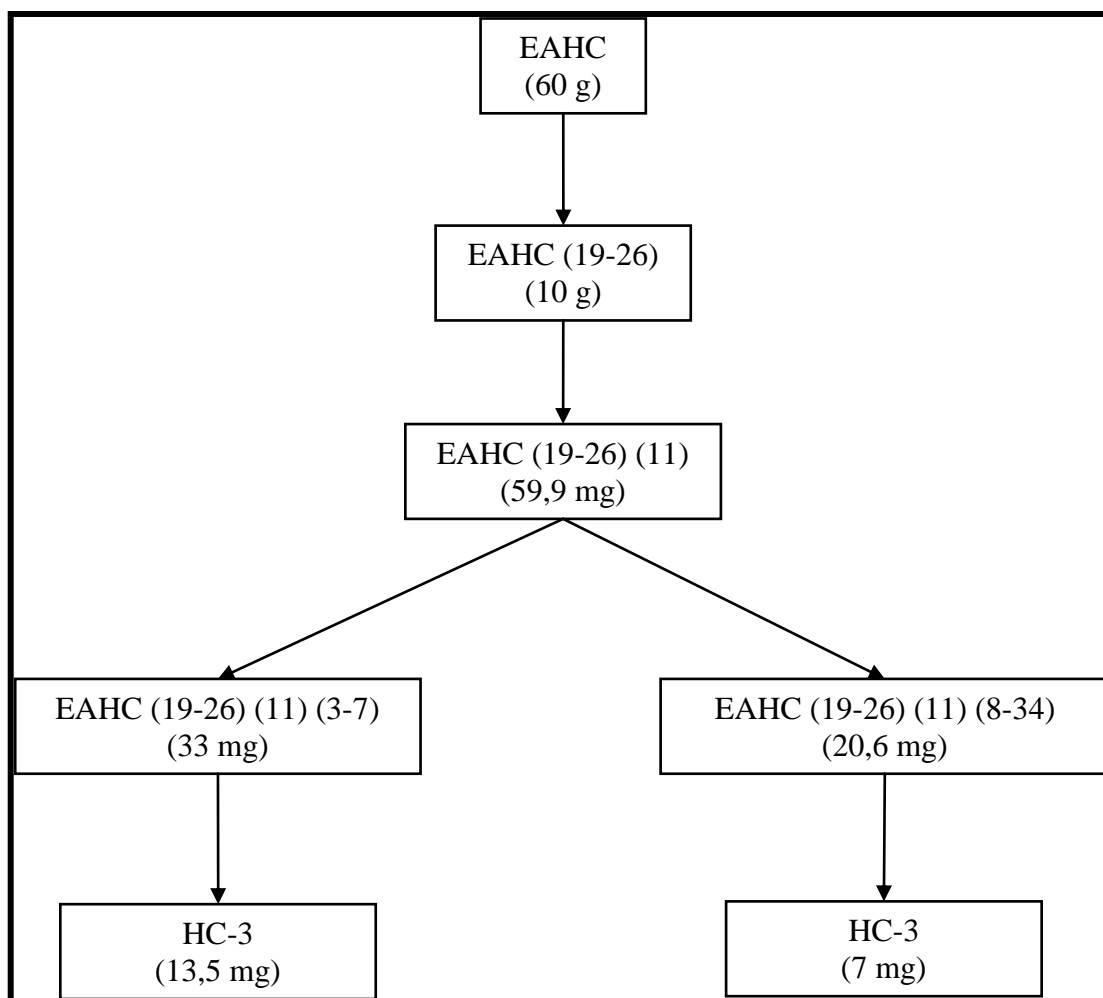
FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
1 a 2	2,6	34 a 74	3,3
3 a 4	3	75 a 76	1,3
5 a 10	7	77 a 85	3
11 a 16	3,3	86	1,2
17 a 33	2,1	-	-

A fração 5-10 (7 mg), após análise por cromatografia em camada delgada, mostrou-se semelhante à fração 19-46, descrita no item 5.4.3.3, sendo, também denominada HC-3.

Os Fluxogramas 02 e 03 mostram os tratamentos cromatográficos relativos ao EHHC e EAHC, respectivamente.



Fluxograma 02 – Tratamentos cromatográficos relativos ao EHC



Fluxograma 03 – Tratamentos cromatográficos relativos ao EAHC

Capítulo 6

ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

6 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

6.1 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L.

Os testes de atividade larvicida foram realizados em parceria com o Laboratório de Entomologia do Núcleo de Endemias da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – NUEND/SESA-CE, em convênio com a Universidade Federal do Ceará, sob orientação da Professora Doutora Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

Alíquotas de 1 mg, 2 mg, 5 mg e 10 mg, em triplicata, dos extratos em hexano (EHHC), em acetato de etila (EAHC), em metanol (EMHC), do óleo essencial das cascas dos frutos maduros (OEHC) e do óleo essencial das cascas dos frutos verdes (OEHCV) de *Hymenaea courbaril* foram, inicialmente, dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido e transferidas para um béquer de 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas de terceiro estágio (GADELHA; TODA, 1985) juntamente com 19,7 mL de água. Paralelamente, foram feitos testes em branco, utilizando-se água e DMSO a 1,5 %. Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas exterminadas e calculada a CL₅₀ (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Os resultados destes bioensaios mostraram que os extratos em hexano (EHHC), em acetato de etila (EAHC) e em metanol (EMHC) não apresentaram nenhuma atividade e que o óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *Hymenaea courbaril* (OEHC) e o óleo essencial das cascas dos frutos verdes (OEHCV) apresentaram resultados satisfatórios, com valores de CL₅₀ igual a $14,85 \pm 0,44$ ppm e $28,44 \pm 0,27$ ppm, respectivamente. Estes resultados obtidos com os óleos essenciais podem ser considerados bons, uma vez que, de acordo com a literatura, amostras apresentando valores de CL₅₀ menores que 100 ppm podem ser consideradas ativas e constituem bons agentes larvicidas (CHENG *et al.*, 2003). Estes bioensaios tiveram Temephos®, um inseticida organofosforado, como controle positivo que apresentou valor de CL₅₀ igual a $1,4 \pm 0,20$ ppm.

6.2 Atividade antioxidante sobre DPPH

Os testes de atividade antioxidante foram realizados com amostras do extrato em hexano (EHHC), em acetato de etila (EAHC) e em metanol (EMHC) das cascas dos frutos de *Hymenaea courbaril*.

A metodologia utilizada, neste teste, foi baseada na captura de radicais livres, descrita por HEGAZI e HADY (2002), na qual o radical utilizado foi DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) na concentração de 60 mM (HEGAZI; HADY, 2002).

Em uma cubeta de 3 mL, ocorreu adição de 1000 µL de DPPH e 1000 µL de etanol P.A., sendo, em seguida, realizada uma leitura da absorbância em espectrofotometria a 520 nm, para obtenção de um teste em branco.

Foram preparadas quatro concentrações de cada amostra (1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 µg / µL). A 1000 µL de cada uma destas foram adicionados 1000 µL do DPPH, na cubeta, e levadas para leitura em espectrofotometria.

O declínio da concentração de DPPH é indicado com a diminuição na absorbância em 520 nm, por um período de 30 minutos. Após a leitura, em espectrofotômetro, a inibição de DPPH radical livre em porcentagem foi calculada. Este teste teve trolox (ácido 3,4-diidro-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-Benzopiran-2-carboxílico) e o BHT (2,6-diterc-butil-4-metilfenol), como controles positivos.

Os resultados, mostrados na Tabela 33 (p. 112), foram interpretados com base na concentração inibitória (CI₅₀), em mg/mL. Quanto menor for CI₅₀, maior será a atividade antioxidante da referida amostra.

Tabela 33 – Resultado dos testes de atividade antioxidante sobre DPPH

AMOSTRA	CI ₅₀ em mg/mL
EHHC	>1,00
EAHC	0,81
EMHC	0,04
Trolox	0,001
BHT	0,007

Ao analisar a Tabela 33, verifica-se que o extrato em metanol (EMHC) apresentou melhor atividade antioxidante, em relação aos demais extratos (EHHC e EAHC), com o menor valor de CI_{50} , 0,04 mg/mL, o qual, também, foi o mais próximo da CI_{50} dos controles positivos trolox e BHT.

6.3 Atividade alelopática sobre *Lactuca sativa* L.

Nestes ensaios, foram utilizadas amostras, (1 mg, 2 mg, 4 mg e 8 mg) dos extratos em acetato de etila e em metanol das cascas dos frutos de *Hymenaea courbaril*. Estas alíquotas foram dissolvidas, separadamente, em 10 mL de etanol P.A., resultando em concentrações finais de 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,8 mg/mL, respectivamente. Em seguida, ocorreu a distribuição dessas soluções em placas de Petri contendo uma folha de papel filtro. O sistema ficou exposto para evaporação do solvente, em temperatura ambiente, por 24 horas.

Foram adicionados, em cada placa, 3 mL de água destilada, seguida pela adição de 25 sementes de alface (*L. sativa*) distribuídas por toda a placa.

O desenvolvimento das sementes é analisado, durante cinco dias, sempre no mesmo horário. Tal análise é baseada na contagem de sementes germinadas, nas medidas das radículas e dos hipocótilos, sendo, o paquímetro, o instrumento de medida. Paralelamente, foi realizado um teste em branco, que utiliza apenas 10 mL de etanol.

Com as medidas obtidas, foram calculadas as médias, as quais são comparadas com o teste em branco e assim observou-se a atividade alelopática dos extratos em análise.

A atividade alelopática do extrato obtido com acetato de etila foi verificada com inibição dos hipocótilos em 44,68 %, na concentração 0,4 mg/mL, e com inibição do crescimento radicular em 31,47 %, na concentração 0,8 mg/mL. O extrato obtido com metanol não apresentou a referida atividade.

Capítulo 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comparação entre a composição química do óleo essencial dos frutos maduros e verdes de *H. courbaril* revelou a presença de somente sesquiterpenos em ambos os óleos, sendo o α -copaeno e o espatulenol, os dois constituintes majoritários do óleo extraído dos frutos maduros, enquanto, o germacreno-D e o β -cariofileno, foram os dois constituintes majoritários do óleo obtido a partir de frutos verdes.

Os diterpenos ácido zanzibárico e ácido isoóxico, assim como o sesquiterpeno caryolano-1,9 β -diol, isolados das cascas dos frutos de *H. courbaril*, confirmaram a composição, em terpenos, encontrada no levantamento bibliográfico sobre a espécie estudada, sendo, a última substância, inédita no gênero *Hymenaea*.

A atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* foi verificada para o óleo essencial das cascas dos frutos maduros de *Hymenaea courbaril* (OEHC) e o óleo essencial das cascas dos frutos verdes (OEHCV), apresentando resultados satisfatórios, com valores de CL₅₀ igual a $14,85 \pm 0,44$ ppm e $28,44 \pm 0,27$ ppm, respectivamente, os quais foram considerados bons, uma vez que, de acordo com a literatura, amostras apresentando valores de CL₅₀ menores que 100 ppm podem ser consideradas ativas e constituem bons agentes larvicidas.

Em relação à atividade antioxidante, concluiu-se que o extrato em metanol apresentou melhor atividade, comparado com os demais extratos (EHC e EAHC), com valor de CI₅₀ igual a 0,04 mg/mL, o qual, também, foi o mais próximo da CI₅₀ dos controles positivos Trolox e BHT.

Por fim, quanto à atividade alelopática sobre *Lactuca sativa* L., o extrato obtido com acetato de etila resultou na inibição do crescimento de hipocótilos em 44,68% e de radículas em 31,47%, o que revelou a presença de bons agentes aleloquímicos na espécie.

Capítulo 8

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

8 CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

HC – 1: ácido zanzibárico

Fórmula molecular: C₂₂H₃₂O₄

Massa molar: 360 g/mol

Aspecto físico: sólido cristalino incolor

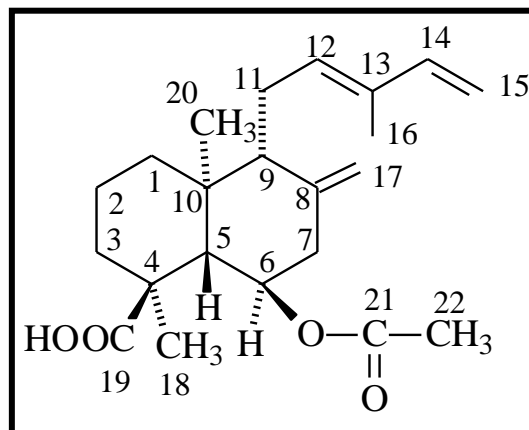
Solubilidade: solúvel em clorofórmio

Faixa de fusão: entre 158,8 °C e 160,3 °C

Espectroscopia de absorção na região do IV (KBr, cm⁻¹) – 3414, 2938, 2852, 1735, 1716, 1684, 1638, 1463, 1443, 1239, 1155, 1124.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ_H (**multiplicidade; constante de acoplamento**) – 2,42 (1H; d; *J* = 11,6 Hz), 4,86 (1H; dt; *J* = 11,2 e 4,8 Hz), 1,91 (1H), 5,40 (1H; t; *J* = 6,2 Hz), 6,33 (1H; dd; *J* = 17,4 e 10,8 Hz), 1,25-1,30 (2H; m), 1,57-1,63 (2H; m), 1,57-1,63 (1H; m), 1,81-1,86 (1H; m), 2,04 (1H; t; *J* = 11,4 Hz), 2,74 (1H; dd; *J* = 12,1 e 4,8 Hz), 2,14-2,17 (1H; m), 2,38-2,39 (1H; m), 4,91 (1H; d; *J* = 15,4 Hz), 5,07 (1H; d; *J* = 17,4 Hz), 4,64 (1H; s), 4,98 (1H; s), 1,76 (3H; s), 1,14 (3H; s), 0,86 (3H; s), 1,95 (3H; s).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ_C (**padrão de hidrogenação, correlação estrutural**) – 38,32 (CH₂, C1), 18,27 (CH₂, C2), 38,00 (CH₂, C3), 44,72 (C, C4), 52,54 (CH, C5), 71,59 (CH, C6), 43,42 (CH₂, C7), 143,62 (C, C8), 56,39 (CH, C9), 38,57 (C,C10), 23,18 (CH₂, C11), 133,06 (CH, C12), 134,08 (C,C13), 141,55 (CH, C14), 110,54 (CH₂, C15), 12,10 (CH₃, C16), 111,96 (CH₂, C17), 16,44 (CH₃, C18), 186,35 (C,C19), 15,70 (CH₃, C20), 170,50 (C,C21), 21,09 (CH₃, C22).

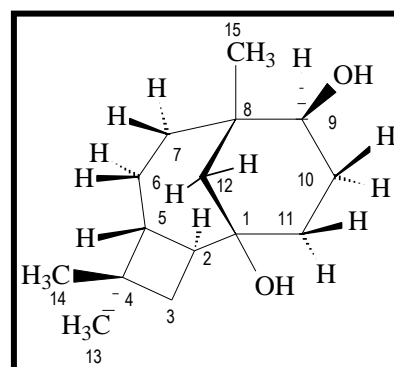


HC – 2: caryolano-1,9 β -diol

Fórmula molecular: C₁₅H₂₆O₂

Massa molar: 238 g/mol

Aspecto físico: sólido esverdeado de aspecto cristalino



Solubilidade: solúvel em clorofórmio

Faixa de fusão: entre 47,9 °C e 49,2° C

Espectroscopia de absorção na região do IV (KBr, cm⁻¹) – 3403, 2931, 2860, 1460, 1400, 1065.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ_H (multiplicidade) – 1,83 (1H; m), 3,35 (1H; m), 2,15 (1H; m), 1,50 (1H; m), 1,35 (1H; m), 1,36 (1H; m), 1,10 (1H; m), 1,98 (1H; m), 1,71 (1H, m), 1,55 (1H; dt), 1,48 (1H; m), 1,52 (1H; m), 1,50 (1H; m), 1,37 (2H; m), 0,94 (3H; s), 0,96 (3H; s), 0,85 (3H; s).

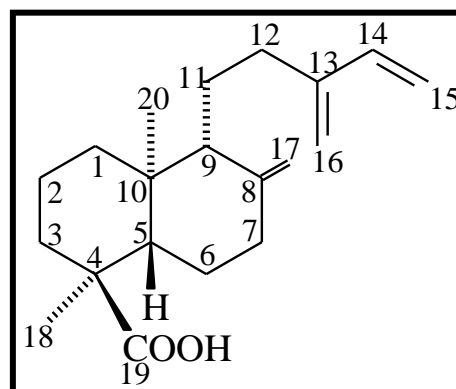
Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ_C (padrão de hidrogenação, correlação estrutural) – 70,88 (C, C1), 38,11 (CH, C2), 34,18 (CH₂, C3), 35,11 (C, C4), 44,03 (CH, C5), 20,49 (CH₂, C6), 35,58 (CH₂, C7), 39,42 (C, C8), 72,35 (CH, C9), 28,14 (CH₂, C10), 33,14 (CH₂, C11), 42,30 (CH₂, C12), 20,88 (CH₃, C13), 30,24 (CH₃, C14), 26,79 (CH₃, C15).

HC – 3: ácido isoóxico

Fórmula molecular: C₂₀H₃₀O₂

Massa molar: 302 g/mol

Aspecto físico: sólido cristalino incolor



Solubilidade: solúvel em clorofórmio

Faixa de fusão: entre 195 e 197 °C

Espectroscopia de absorção na região do IV (KBr, cm⁻¹) – 3020, 2931, 2855, 1693, 1642, 1445, 1216.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ_H (**multiplicidade, constante de acoplamento**) – 1,98 (1H; dd; *J* = 12,4 e 2,7 Hz), 1,78 (1H; m), 6,38 (1H; dd; *J* = 17,6 e 10,8 Hz), 2,39 (2H; m), 1,63 (2H; m), 1,67 (2H; m), 1,39 (2H; m), 1,78 (2H; m), 1,54 (1H; m), 1,70 (1H; m), 2,05 (2H; m), 5,07 (1H; d; *J* = 10,8 Hz), 5,23 (1H; d; *J* = 17,6 Hz), 4,99 (1H; sl), 5,02 (1H; sl), 4,60 (1H; sl), 4,88 (1H; sl), 1,13 (3H; s), 0,73 (3H; s).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ_C (**padrão de hidrogenação, correlação estrutural**) – 38,14 (CH₂, C1), 18,64 (CH₂, C2), 37,32 (CH₂, C3), 47,71 (C, C4), 49,81 (CH, C5), 27,09 (CH₂, C6), 38,08 (CH₂, C7), 148,10 (C, C8), 56,71 (CH, C9), 39,09 (C, C10), 22,37 (CH₂, C11), 30,37 (CH₂, C12), 147,23 (C, C13), 139,26 (CH, C14), 113,43 (CH₂, C15), 115,81 (CH₂, C16), 107, 21 (CH₂, C17), 16,58 (CH₃, C18), 184,20 (C, C19), 14,99 (CH₃, C20).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINSTON, D.G.I. Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 1, p. 11-15, 2002.

ADAMS, R.P., **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 4. ed., 2007.

ALENCAR, A.L.; SILVA, M.A.P.; BARROS, L.M. Florística e fitossociologia de uma área de cerrado na Chapada do Araripe – Crato – CE. **Rev. Bras. Biociênc.**, v. 5, supl. 2, p. 18-20, 2007.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ARTAVIA, D.; BARRIOS, M.; CASTRO, O. A flavanonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 91-92, 1995.

BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; WITTMANN, M.T.S. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae-Leguminosae do Sul do Brasil. **Ciênc. Florest.**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 2005.

BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; WITTMANN, M.T.S. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região Sul do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v. 28, n. 4, p. 797-808, 2005.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. Sesquiterpenes from three *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 3, p. 469-472, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**, p.10, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf> Acesso em: 15 Maio 2008.

CAMPOS, M.A.A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, n. 3, p. 281-288, 2002.

CARNEIRO, E.; CALIXTO, J.B.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. Isolation, chemical identification, and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin, and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Int. J. Pharmacogn.**, v. 31, n. 1, p. 38-46, 1993.

CHENG, S.S.; CHANG, H.T.; CHANG, S.T.; TSAI, K.H.; CHEN, W.J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technol.**, v. 89, p. 99-102, 2003.

CONEGLIAN, I.R.M.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 29, n. 2, p. 193-207, 2006.

COSTA, G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTA, I.R.; ARAÚJO, F.S.; LIMA-VERDE, L.W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 4, p. 759-770, 2004.

COSTA, P.M.F., **Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas de *Hymenaea courbaril* L.** 2004. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Disponível em: <<http://4ccr.pgr.mpf.gov.br/documentos-e-publicacoes/trabalhos-cientificos/Costa,%20Paula%20Moreira%20Felix%20.PDF>>. Acesso em 12 de Maio de 2008.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Resin acids from two amazon species of *Hymenaea*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 633-635, 1973.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 1, p. 294-295, 1974.

CUNNINGHAM, A.; GAY, I.D.; OEHLISCHLAGER, A.C.; LANGENHEIM, J.H. ¹³C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 965-968, 1983.

DUBOC, E.; VENTORIM, N.; VALE, F.R.; DAVIDE, A.C. Nutrição do jatobá. **Rev. Cerne**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 1996.

FILHO, J.S.C.; BLANK, M.F.A.; BLANK, A.F.; RANGEL, M.S.A. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Rev. Cerne**, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2003.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B.; PAGOTTO, C.L.A. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. Modified distillation trap. **Chem. Analyst**, v. 49, p. 114, 1960.

HEGAZI, A. G.; HADY, F.K.A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Z. Naturforsch.**, v. 57, p. 395-402, 2002.

HEYMANN, H.; TEZUKA, YASUHIRO; KIKUCHI, TOHRU; SUPRIYATNA, SUTARDJO. Constituents of *Sindora sumatrana* Miq. I. Isolation and NMR spectral analysis of sesquiterpenes from the dried pods. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 42, n. 1, p. 138-146, 1994.

IMAMURA, P.M.; MARSAIOLI, A.J.; BARATA, L.E.S.; RÚVEDA, E.A. ¹³C NMR spectral analysis of eperuane diterpenes. **Phytochemistry**, v. 16, n. 11, p. 1842-1844, 1977.

IMAMURA, P.M.; MIRANDA, P.C.M.L.; GIACOMINI, R.A. A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for the diterpene methyl (-)-zanzibarate by 2D spectroscopy and NOE experiments. **Magn. Reson. Chem.**, v. 42, n. 6, p. 561-563, 2004.

JAYAPRAKASAM, B.; LINDO, R.L.A.; WITT, D.L.; NAIR, M.G. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chem.**, v. 105, n. 2, p. 485-490, 2007.

JOSSANG, J.; KASSAOUI, H.B.; JOSSANG, A.; SEULEIMAN, M.; NEL, A. Quesnoin, a novel pentacyclic *ent*-diterpene from 55 million years old Oise amber. **J. Org. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 412-417, 2008.

KHOO, S.F.; OEHLISCHLAGER, A.C.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (caesalpinioideae) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29, n. 21, p. 3379-3388, 1973.

LIMA, A.F.; AZEVEDO, K.S.; CAMPOS, C.A.S.; TAVEIRA, U.S.; ROCHA, A.A. Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na reserva extrativista Chico Mendes, Acre. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007. p.1-3.

MARSAIOLI, A.J.; FILHO, H.F.L.; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1882-1883, 1975.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. *Enantio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oic acid* from trunk resin of Kenyan *Hymenaea verrucosa*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 2, p. 523-525, 1974.

MARTINS, D.; HAMERSKI, L.; ALVARENGA, S.A.V.; ROQUE, N.F. Labdane dimers from *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 813-817, 1999.

MATUDA, T.G.; NETTO, F.M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005.

MELO, M.G.G.; MENDONCA, M.S.; MENDES, A.M.S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amaz.**, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MIYAKE, M.; SASAKI, K.; IDE, K.; MATSUKURA, Y.; SHIJIMA, K.; FUJIWARA, D. Highly oligomeric procyanidins ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis via suppression of Th1 immunity. **J. Immunol.**, v. 176, n. 10, p. 5797-5804, 2006.

NAKANO, T.; DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **J. Org. Chem.**, v. 26, p. 167-173, 1961.

NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE JR, A.; MARSAIOLI, A.J.; IMAMURA, P.M. Clerodane-type diterpenes from seed pood of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.

NOGUEIRA, R.T.; GIACOMINI, R.A.; SHEPHERD, G.J.; IMAMURA, P.M. A new *ent*-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 3, p. 389-391, 2002.

OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosea*. **Rev. Bras. Bot.**, v. 24, n. 1, p. 85-97, 2001.

OLIVEIRA, M.F.; LEMOS, T.L.G.; MATTOS, M.C.; SEGUNDO, T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; BRAZ-FILHO, R. New enamines derivatives of lapachol and biological activity. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 74, n. 2, p. 211-221, 2002.

OMAIRA, A.; GLADYS, L.P.; MARITZA, M.; OMAIRA, G.; LILIAN, S. Structural features of a xylogalactan isolated from *Hymenaea courbaril* gum. **Food Hydrocolloid.**, v. 21, n. 8, p. 1302-1309, 2007.

PETTIT, G.R.; MENG, Y.S.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. Isolation and structure of palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 2, p. 259-262, 2003.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I.C.; BOLZANI, V.S.; VELASCOL, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 7.ed. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos Editora, 2006.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; COSTA, M.C.N. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 5, n. 1. p. 108-115, 2002.

TERRONES, M.G.H.; MORAIS, S.A.L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D.Q.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Estudo fitoquímico e alelopático do extrato de caule de sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 755-762, 2007.

TERRONES, M.G.H.; MORAIS, S.A.L.; LONDE, G.B.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colônia (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 763-769, 2007.

VAN DEN DOLL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.