



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

EUCALYPTUS SPP E *TRIGONA SPINIPES* FABRICIUS: FITOQUÍMICA E
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DA INTERAÇÃO
INSETO/PLANTA

Marinalva Oliveira Freitas

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Química Orgânica, como
requisito parcial, para a obtenção de Título de Doutor.

FORTALEZA-CEARÁ

2005

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Marinalva Oliveira Freitas

TESE DE DOUTORADO APROVADA EM: 07/10/2005

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Gilvandete Maria P. Santiago 2
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

Prof. Dra. Lúcia Maria Conserva
Universidade Federal de Alagoas- UFAL

A Deus.
A meus pais
Marina (*in memoriam*) e Edmundo.
A meu esposo
Carlos Iberê
e aos meus filhos
Eduardo e Gabriel.

“Para um só êxito é necessário uma
constelação de eventos”.

Rilke, R. M.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e coragem para fazer de cada dia comum um momento de aprendizagem, treino de paciência e iluminação. Por não me deixar desistir perante os obstáculos os quais julguei intransponíveis. Por me manter firme e persistente a cada recomeço e me fazer acreditar que eu conseguiria.

Ao Professor Edilberto Rocha Silveira, por aceitar ser meu orientador num momento tão difícil, além do exemplo de dedicação à química.

Aos Professores do Departamento de Engenharia Química pela concessão do afastamento para realização deste curso.

Ao Professor Francisco José de Abreu Matos, pelos valiosos conselhos acadêmicos e pelo exemplo de dedicação e amor ao trabalho.

Ao Professor Raimundo Braz Filho, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pelo exemplo de dedicação à laboriosa tarefa de determinação estrutural dos compostos orgânicos bem como ao ser grande em conhecimento e tão maior sua humildade e solidariedade para com todos.

À professora Mary Anne pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Aos Professores Afrânio Fernandes e Edson Nunes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, pela identificação botânica das espécies de *Eucalyptus*.

Ao Daniel Santiago Pereira, da ESAM Júnior Consultoria, pela identificação da abelha *Trigona spinipes*.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição à minha formação acadêmica.

À Alexandra Gomes Martins, a quem eu devo a minha presença aqui todos os dias, a quem eu confio a guarda dos meus filhos, e a quem serei sempre grata.

Ao meu amigo Eduardo Araújo, pela digitação de uma boa parte da Tese, e por escanear os espectros.

Às amigas Antônia Lúcia e Edinilza, por compartilharem momentos que só os amigos conseguem compreender.

Ao meu marido Carlos Iberê, por me ensinar a lutar pelos meus objetivos, por sempre acreditar no meu esforço e pelas palavras de incentivo nas horas mais difíceis. Ainda por colaborar escaneando os espectros e por ter a paciência de encontrar tantos artigos para mim, na Internet.

Aos meus filhos Carlos Eduardo e Gabriel que tornaram cada dia um “desafio bem grande” tentar ser mãe e cientista e ainda ter bom humor para compreender um pedido de “fica em casa hoje”.

Aos meus pais: Marina (*in memoriam*) e Edmundo, por sempre acreditarem que a educação é a maior herança que se pode deixar para os filhos.

Aos colegas de laboratório Arthur, Henrique, Gizelle, Érika, e principalmente ao Sávio-Flávio, meu bolsista “falador” e ao Flávio-Sávio, por ter paciência e sempre responder mesmo quando não era ele o solicitado. Ainda ao Eduardo, o “E.T.” vindo da Bioquímica, com quem eu nunca me demorava muito nas conversas, por ser este tão “calado”!

Aos funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelos serviços diversos prestados.

Ao CNPq, CAPES e FINEP, pelo apoio financeiro .

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xxiv
LISTA DE QUADROS.....	xxv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxvi
ABREVIATURAS	xxvii
RESUMO.....	xxviii
ABSTRACT.....	xxix
CAPÍTULO 1	
1	INTRODUÇÃO..... 31
CAPÍTULO 2	
2 -	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO..... 39
2.1-	Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Voláteis Isolados de <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook. 39
2.2-	Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Não-Voláteis Isolados de <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook. 54
2.3 -	Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Não-Voláteis Isolados de "Kino". 62
CAPÍTULO 3	
3-	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS..... 72
3.1 -	Generalidades. 72
3.2. -	As Abelhas sem Ferrão 73
3.2.1 -	Classificação Zoológica das Abelhas sem Ferrão Nativas do Brasil 73
3.3 -	O Gênero <i>Trigona</i> 74
3.3.1 -	3.3.1 Considerações Zoológicas sobre <i>Trigona spinipes</i> Fabricius. 74
3.3.2 -	3.3.2 Habitat e Diversidade de Plantas Visitadas. 76
3.4 -	3.4. Considerações sobre a Química dos Produtos das Abelhas. 77
CAPÍTULO 4	

4	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	84
4.1 –	Considerações Botânicas sobre a Família Myrtaceae.....	84
4.2 –	Considerações sobre <i>Eucalyptus</i>	85
4.2.1 –	Considerações Botânicas sobre <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	86
4.2.1.1 –	Mudança no Nome do <i>Eucalyptus citriodora</i>	88
4.2.2 –	Considerações Botânicas sobre <i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith.	89
	CAPÍTULO 5	
5	CONSTITUINTES VOLÁTEIS	92
5.1 –	Determinação da Composição Química de Óleos Essenciais de <i>Eucalyptus</i>	92
5.1.1 –	Estudo da Variação Química Circadiana e Sazonal dos Óleos Essenciais das Folhas de <i>E. citriodora</i> e <i>E. tereticornis</i> de um Mesmo Espécime.....	93
5.1.1.1 –	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook – Variação Química Circadiana.....	97
5.1.1.2 –	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook – Variação Química Sazonal.....	100
5.1.1.3 –	<i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith – Variação Circadiana.	103
5.1.1.4 –	<i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith – Variação Química Sazonal.....	106
5.1.2 –	Estudo da Composição Química Volátil das Folhas de <i>Eucalyptus citriodora</i> OEEC2.....	110
	CAPÍTULO 6	
6	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	122
6.1 –	Identificação Estrutural de ECK-1.	122
6.2 –	Identificação Estrutural de ECK-2.	133
6.3 –	Identificação Estrutural de ECK-3.....	148
6.4 –	Identificação Estrutural de ECK-4.....	156
6.5 –	Identificação Estrutural de ECK-5.....	163
6.6 –	Identificação Estrutural de ECK-6.....	174
6.7 –	Identificação Estrutural de ECK-7.....	184
6.8 –	Determinação Estrutural de ECK-8.....	195
6.9 –	Determinação Estrutural de ECK-9.....	208
6.10 –	Identificação Estrutural de ECK-10.....	220
6.11 –	Identificação Estrutural de ECK-11.....	224
6.12 –	Determinação Estrutural de ECK-12.....	234
6.13 –	Identificação Estrutural de TS-1.....	245

6.14 –	Identificação Estrutural de TS-2.....	254
6.15 –	Identificação Estrutural de TS-3.....	264
6.16 –	Identificação Estrutural de TS-4.....	266
6.17 –	Identificação Estrutural de TS-5.....	269
6.18 –	Identificação Estrutural de TS-6.....	277
CAPÍTULO 7		
7	PARTE EXPERIMENTAL.....	282
7.1 –	Coleta e Identificação do Material Botânico.....	282
7.1.1 –	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.....	282
7.1.2 –	<i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith.....	282
7.1.3 –	Kino.....	282
7.2 –	Coleta e Identificação do Material Zoológico.....	282
7.2.1 –	Ninho de <i>Trigona spinipes</i> Fabricius.....	282
7.3. –	Métodos Analíticos.....	283
7.3.1 –	Métodos Cromatográficos.....	283
7.3.1.1 –	Cromatografia de Adsorção.....	283
7.3.1.2. –	Cromatografia por Exclusão.....	284
7.3.2 –	Métodos Físicos de Análises.....	284
7.3.2.1 –	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	284
7.3.2.2 –	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	284
7.3.2.3 –	Espectrometria de Massas.....	285
7.3.2.4 –	Cromatografia Gás-Líquido Acoplada a Detector FID.....	286
7.3.2.5 –	Ponto de Fusão.....	286
7.4 –	Estudo dos Constituintes Voláteis de <i>E. citriodora</i> e <i>E. tereticornis</i>	287
7.4.1 –	Estudo da Variação Química Circadiana dos Óleos Essenciais das Folhas de <i>E. citriodora</i> Hook e <i>E. tereticornis</i> Smith.....	287
7.4.2 –	Estudo da Variação Química Sazonal dos Óleos Essenciais das Folhas de <i>E. citriodora</i> Hook e <i>E. tereticornis</i> Smith.....	287
7.5 –	Isolamento dos Metabólitos Secundários do “Kino” de <i>E. citriodora</i>	288
7.5.1 –	Particionamento do “Kino” do <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	288
7.5.2 –	Fracionamento cromatográfico por exclusão em Gel Sephadex LH-2- da fração ECK-PC.	289

7.5.3 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-A – Isolamento de ECK-1 e ECK-2	290
7.5.4 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-AB.....	291
7.5.5 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da ECK-PC-A'.....	291
7.5.6 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-A'C – Isolamento de ECK-4	292
7.5.7 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-A'CC.....	293
7.5.8 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-A'CF.- Isolamento de ECK-3	294
7.5.9 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-B	296
7.5.10 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-BB.....	296
7.5.11 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC- BBA.....	296
7.5.12 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC- BBA2 – Isolamento de ECK-5	297
7.5.13 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-BC.....	298
7.5.14 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-BCB.....	299
7.5.15 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" das frações ECK-PC-BCB-18- 22 + ECK-PC-2A. Isolamento de ECK-8	300
7.5.16 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-C	300
7.5.17 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-C'.....	302
7.5.18 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-C'2.....	303
7.5.19 –	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-D.....	303
7.5.20 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 das frações ECK-PC- C8 + ECK-PC-DF – Isolamento de ECK-7	304
7.5.21 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-E.....	305
7.5.22 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-EA – Isolamento de ECK-6.....	306
7.5.23 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC- EB	307
7.5.24 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC- EBD.....	308
7.5.25 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-X	308

7.5.26 -	Fracionamento cromatográfico tipo "flash" da fração ECK-PC-X2.....	309
7.5.27 -	Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-M - Isolamento de ECK-9.	309
7.5.28 -	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA.....	310
7.5.29 -	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-G (obtenção de ECK-10)	312
7.5.30 -	Fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração ECK-PA-H.....	313
7.5.31 -	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PA-HB – Isolamento de ECK-11 e ECK-12.	314
7.6 -	Isolamento dos Metabólitos Secundários de <i>Trigona spinipes</i>	315
7.6.1-	Obtenção do extrato da colméia de <i>Trigona spinipes</i>	315
7.6.2 -	Particionamento do extrato de TSCE.....	315
7.6.3 -	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH.....	316
7.6.4 -	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-A.....	317
7.6.5 -	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-AC – Isolamento de TS-1.	318
7.6.6 -	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC (filtrante).....	319
7.6.7 -	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-A – Isolamento de TS-2.....	320
7.6.8 -	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AA.- Isolamento de TS-3 e TS-4.....	321
7.6.9 -	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AF - Isolamento de TS-5	323
7.6.10 -	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AB – Isolamento de TS-6.	323
7.7 –	Obtenção de Derivado – Reação de Acetilação de ECK-2	326
	CAPÍTULO 8	
6	CONCLUSÃO.....	326
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	328

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Fotografias de: **A** – caule de um espécime de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de A. Matos, exibindo o fluxo de “kino”. **B** – ampliação do caule com o “kino” em detalhe..... 31
- Figura 1.2** – Fotografias de: **A** – Do tronco de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de A. Matos com detalhes da perfuração (círculo vermelho) e abelha arapuá coletando kino (círculo azul), **B** - arapuá com partículas de kino do *E. citriodora* Hook em suas patas. Fotos Prof. E. R. Silveira..... 32
- Figura 3.1** – Foto de um espécime de *T spinipes*. Foto: E. R. Silveira. 75
- Figura 3.2** – Foto detalhando a corbícula de *T. spinipes* Fabricius . (Fonte: www.ufv.br/dbg/bee/Trigonaspinipes.jpg acesso: 28/02/2005.)..... 75
- Figura 3.3** – Fotos do ninho de *T. spinipes*:. a) ninho construído em árvore exibindo a entrada; b) detalhe da entrada do ninho. Foto obtida na Internet, site: www.ufv.br/dbg/bee/ninhomelipon.htm acesso: 28/02/2005. 76
- Figura 4.1** – Fotos de um espécime de *Eucalyptus citriodora* Hook encontrado no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, na Universidade Federal do Ceará: **a)** Árvore completa; **b)** Detalhes de um ramo com folhas e inflorescência; **c)** Detalhes da inflorescência com flores abertas e botões florais recobertos pelo opérculo (parte marron sobre os botões). Foto Prof. E. R. Silveira 87
- Figura 4.2** – Fotos de um espécime de *Eucalyptus tereticornis* Smith encontrado no Campus do Pici - Universidade Federal do Ceará: **a)** Árvore completa; **b)** Detalhes de um ramo com folhas e inflorescência. Foto Prof. E. R. Silveira. 90
- Figura 5.1** – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook, 6:00 h..... 98
- Figura 5.2** – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook, 18:00 h. 98

Figura 5.3 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. citriodora</i> Hook, junho.....	101
Figura 5.4 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. citriodora</i> Hook, julho.	101
Figura 5.5 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith, 15:00 h.	104
Figura 5.6 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith, 18:00 h.	104
Figura 5.7 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith, fevereiro.	108
Figura 5.8 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith, julho.	108
Figura 5.9 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de OEEC2.	111
Figura 5.10 – Espectro de massa do α -tujeno (17).....	112
Figura 5.11 – Espectro de massa do α -pineno (18).....	112
Figura 5.12 - Espectro de massa do β -pineno (21).....	112
Figura 5.13 - Espectro de massa do <i>para</i> -cimeno (24).....	112
Figura 5.14 - Espectro de massa do 1,8-cineol (28).....	113
Figura 5.15 - Espectro de massa do β -ocimeno (157).....	113
Figura 5.16 – Espectro de massa do γ -terpineno (30).....	113
Figura 5.17 – Espectro de massa do α -terpinoleno (33).....	113
Figura 5.18 – Espectro de massa do óxido <i>cis</i> -rose (35).....	114
Figura 5.19 – Espectro de massa do <i>endo</i> -fenchol (151).....	114
Figura 5.20 – Espectro de massa do óxido <i>trans</i> -rose (36).....	114
Figura 5.21 – Espectro de massa do <i>trans</i> -pinocarveol (152).....	114
Figura 5.22 – Espectro de massa do isopulegol (38).....	115
Figura 5.23 – Espectro de massa do citronelal (40).....	115
Figura 5.24 – Espectro de massa do iso-isopulegol (41).....	115
Figura 5.25 – Espectro de massa do <i>endo</i> -borneol (153).....	115
Figura 5.26 – Espectro de massa do terpinen-4-ol (45).....	116
Figura 5.27 – Espectro de massa do neoiso-isopulegol (44).....	116
Figura 5.28 – Espectro de massa do <i>trans</i> -isocarveol (154).....	116
Figura 5.29 – Espectro de massa do α -terpineol (46).....	116

Figura 5.30 –	Espectro de massa do β -citronelol (47).....	117
Figura 5.31 –	Espectro de massa do <i>cis</i> -menta 1(7)-8-dien-ol (<i>para</i>) (155).....	117
Figura 5.32 –	Espectro de massa do timol (158).....	117
Figura 5.33 –	Espectro de massa do carvacrol (159).....	117
Figura 5.34 –	Espectro de massa do acetato de citronelila (56).....	118
Figura 5.35 –	Espectro de massa do <i>iso</i> -cariofileno (150).....	118
Figura 5.36 –	Espectro de massa do β -duprezianeno (160).....	118
Figura 5.37 –	Espectro de massa do (+)-aromadendreno (161).....	118
Figura 5.38 –	Espectro de massa do longifoleno (162).....	119
Figura 5.39 –	Espectro de massa do viridiflorol (163).....	119
Figura 5.40 –	Espectro de massa do globulol (73).....	119
Figura 5.41 –	Espectro de massa do germacreno B (156).....	119
Figura 5.42 –	Espectro de massa do óxido de cariofileno (157).....	120
Figura 6.1 –	Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-1.....	122
Figura 6.2 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-1 (500 MHz, CD_3OD)	123
Figura 6.3 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz)	125
Figura 6.4 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz).....	125
Figura 6.5 –	Espectro de massa de ECK-1 (IE 70 eV)	126
Figura 6.6 -	Espectro de RMN HMQC de ECK-1 (CD_3OD , 500 MHz x 125 MHz). 128	
Figura 6.7 –	Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY de ECK-1 (CD_3OD , 500 MHz).....	129
Figura 6.8 –	Espectro de RMN HMBC de ECK-1 (CD_3OD , 500 MHz x 125 MHz) 130	
Figura 6.9 –	Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-2.....	133
Figura 6.10 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-2 (CD_3OD , 500 MHz).	134
Figura 6.11 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-2 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	135
Figura 6.12 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-2 (CD_3OD , 125 MHz)	136
Figura 6.13 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-2 (CD_3OD , 125 MHz).....	136
Figura 6.14 –	Espectro de massa de ECK-2 (IE, 70 eV)	138
Figura 6.15 –	Espectro de RMN HMQC de ECK-2 (CD_3OD , 500, 125 MHz).....	140
Figura 6.16 –	Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY de ECK-2.....	142
Figura 6.17 –	Espectro de RMN HMBC de ECK-2 (CD_3OD , 500, 125 MHz)	142
Figura 6.18 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-2-Ac (CD_3OD , 500 MHz)	145
Figura 6.19 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-2-Ac (CD_3OD , 125 MHz)	146
Figura 6.20 –	Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de ECK-3.....	148

Figura 6.21 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-3 (500 MHz, CD_3OD).....	149
Figura 6.22 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-3 (CD_3OD , 125 MHz)	150
Figura 6.23 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-3 (CD_3OD , 125 MHz).....	150
Figura 6.24 –	Espectro de massa de ECK-3 (IE 70 eV).	152
Figura 6.25 –	Espectro de absorção na região do I.V. de ECK-4.....	156
Figura 6.26 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-4 (500 MHz, CD_3OD)	157
Figura 6.27 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-4 (CD_3OD , 125 MHz)	158
Figura 6.28 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-4 (CD_3OD , 125 MHz).....	158
Figura 6.29 –	Espectro de massa de ECK-4 (IE 70 eV).	159
Figura 6.30 –	Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-5	163
Figura 6.31 –	Espectro RMN ^1H de ECK-5 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	164
Figura 6.32 –	a) Espectro RMN ^{13}C -CPD de ECK-5 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) b) Expansão do espectro RMN HMBC de ECK-5 na faixa de δ 123,00 a 140,00 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).	165
Figura 6.33 –	Espectro RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-5 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	166
Figura 6.34 –	Espectro de massa de ECK-5 (IE, 70 eV)	168
Figura 6.35 –	Espectro RMN HMQC de ECK-5 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	169
Figura 6.36 –	a) Espectro RMN HMBC de ECK-5 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) b) Expansão do espectro RMN HMBC de ECK-5 na faixa de δ 115,00 a 160,00 δ 7,00 a 9,00 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).	170
Figura 6.37 –	Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de ECK-6.....	174
Figura 6.38 –	Espectro RMN ^1H de ECK-6 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	175
Figura 6.39 –	Espectro RMN ^{13}C -CPD de ECK-6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	177
Figura 6.40 –	Espectro RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	177
Figura 6.41 –	Espectro RMN HMQC de ECK-6 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	179
Figura 6.42 –	Espectro RMN HMBC de ECK-6 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	180
Figura 6.43 –	Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-7	184
Figura 6.44 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-7 (CD_3OD , 500 MHz)	185
Figura 6.45 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-7 (CD_3OD , 125 MHz)	187
Figura 6.46 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-7 (CD_3OD , 125 MHz).....	187
Figura 6.47 –	Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK- 7 (CD_3OD , 125 MHz)	189
Figura 6.48 –	Espectro de HMQC de ECK-7 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)	190

Figura 6.49 –	Espectro de HMBC de ECK-7 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz)	191
Figura 6.50 –	Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-8.....	195
Figura 6.51 –	Espectro de RMN ¹ H de ECK-8 (CD ₃ OD, 500 MHz)	196
Figura 6.52 –	a) Espectro de RMN ¹³ C-CPD de ECK-8 (CD ₃ OD, 125 MHz) b) Expansões do espectro RMN HMBC de ECK-8 relativas aos sinais dobrados em torno de δ 18,00, 74,00 e 93,00 (125 MHz, CD ₃ OD).....	198
Figura 6.53 –	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de ECK-8 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	198
Figura 6.54 –	Espectro de massa de ECK-8 (IE, 70 eV)	199
Figura 6.55 –	Espectro de RMN bidimensional de correlação ¹ H, ¹ H COSY de ECK- 8 (CD ₃ OD, 125 MHz)	202
Figura 6.56 –	Espectro de RMN HMQC de ECK-8 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz)...	203
Figura 6.57 –	Espectro de RMN HMBC de ECK-8 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz)...	204
Figura 6.58 –	Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-9..	208
Figura 6.59 –	Espectro de RMN ¹ H de ECK-9 (CD ₃ OD, 500 MHz)	209
Figura 6.60 –	Espectro de RMN ¹³ C-CPD de ECK-9 (CD ₃ OD, 125 MHz)	211
Figura 6.61 –	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de ECK-9 (CD ₃ OD, 125 MHz).	211
Figura 6.62 –	Espectro de massa de ECK-9 (IE, 70 eV)	212
Figura 6.63 –	Espectro de RMN bidimensional de correlação ¹ H, ¹ H COSY de ECK- 9 (CD ₃ OD, 125 MHz)	214
Figura 6.64 –	Espectro de RMN HMQC de ECK-9 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz)...	215
Figura 6.65 –	Espectro de RMN HMBC de ECK-9 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz)...	216
Figura 6.66 –	Espectro absorção de na região do IV, em KBr, de ECK-10.	220
Figura 6.67 –	Espectro de RMN ¹ H de ECK-10 (CD ₃ OD, 500 MHz)	221
Figura 6.68 –	Espectro de massa de ECK-10 (IE, 70 eV)	222
Figura 6.69 –	Espectro de RMN ¹³ C-CPD de ECK-10 (CD ₃ OH, 125 MHz).....	223
Figura 6.70 –	Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-11	224
Figura 6.71 –	Espectro de RMN ¹ H de ECK-11 (CD ₃ OD, 500 MHz)	225
Figura 6.72 –	Espectro de RMN ¹³ C-CPD de ECK-11 (CD ₃ OD, 125 MHz)	227
Figura 6.73 –	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de ECK-11 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	227
Figura 6.74 –	Espectro de massa de ECK-11 (IE, 70 eV)	228
Figura 6.75 –	Espectro de RMN HMQC de ECK-11 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz).	229
Figura 6.76 –	Espectro de RMN HMBC de ECK-11 (CD ₃ OD, 500 MHz, 125 MHz).	231

Figura 6.77 –	Espectro absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-12....	234
Figura 6.78 –	Espectro de RMN ^1H de ECK-12 (CD_3OD , 500 MHz)	235
Figura 6.79 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-12 (CD_3OD , 125 MHz)	237
Figura 6.80 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-12 (CD_3OD , 125 MHz).....	237
Figura 6.81 –	Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK-12 (CD_3OD , 125 MHz)	239
Figura 6.82 –	Espectro de RMN HMQC de ECK-12 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz).	240
Figura 6.83 –	a) Espectro de RMN HMBC de ECK-12 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz) e b) Expansão do espectro de RMN HMQC de ECK-12 na região de δ 155,00 a 175,00 x δ 4,40 a 7,60 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)	241
Figura 6.84 –	Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de TS-1.	245
Figura 6.85 –	Espectro de RMN ^1H de TS-1 (CDCl_3 , 300 MHz)	246
Figura 6.86 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-1 (CD_3OD , 125 MHz)	248
Figura 6.87 –	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de TS-1 (CD_3OD , 125 MHz)	248
Figura 6.88 –	Espectro de massa de TS-1 (IE, 70 eV).	249
Figura 6.89 –	Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de TS-2.....	254
Figura 6.90 –	Espectro de RMN ^1H de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz)	255
Figura 6.91 –	a) Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) b) Expansão do espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-2 na região de δ 123,00 a 151,00 (CD_3OD , 500 MHz)	257
Figura 6.92 –	Espectro de massa de TS-2 (IE, 70 eV).....	258
Figura 6.93 –	Espectro de RMN HMQC de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz, 125 MHz).....	259
Figura 6.94 –	Espectro de RMN HMBC de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz, 125 MHz).....	260
Figura 6.95 –	Espectro de RMN ^1H de TS-3 (CD_3OD , 500 MHz)	264
Figura 6.96 –	Espectro de RMN ^1H de TS-4 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz)	266
Figura 6.97 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz)	267
Figura 6.98 –	Espectro de RMN ^1H de TS-5 (CD_3OD , 500 MHz)	269
Figura 6.99 –	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-5 (CD_3OD , 125 MHz)	271
Figura 6.100 -	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de TS-5 (CD_3OD , 125 MHz)	271
Figura 6.101 -	Espectro de HMQC de TS-5 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)	272
Figura 6.102 -	Espectro de HMBC de TS-5 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)	273
Figura 6.103 -	Espectro de RMN ^1H de TS-6 (CD_3OD , 300 MHz).	277
Figura 6.104 -	Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-6 (CD_3OD , 125 MHz)	279

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –	Constituintes voláteis identificados em óleos essenciais de <i>E. citriodora</i> Hook analisados em diferentes países.	45
Tabela 2.2 –	Constituintes químicos não voláteis isolados de <i>E. citriodora</i> Hook. ..	55
Tabela 2.3 –	Constituintes não-voláteis isolados ou identificados nos “kinos” de algumas espécies de <i>Eucalyptus</i> Hook.....	66
Tabela 3.1 –	Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas...	78
Tabela 5.1 –	Dados da extração dos óleos essenciais das folhas de <i>E. citriodora</i> Hook e <i>E. tereticornis</i> Smith para o estudo da variação química circadiana.	93
Tabela 5.2 –	Dados da extração dos óleos essenciais das folhas de <i>E. citriodora</i> Hook e <i>E. tereticornis</i> Smith para o estudo da variação química sazonal.	95
Tabela 5.3 –	Composição química circadiana do óleo essencial de <i>E. citriodora</i>	97
Tabela 5.4 –	Composição química sazonal do óleo essencial de <i>E. citriodora</i> Hook.	100
Tabela 5.5 –	Comparação da composição química do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes horas do dia.	103
Tabela 5.6 –	Comparação da composição química do óleo essencial das folhas de <i>E. tereticornis</i> Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano.	107
Tabela 5.7 –	Constituintes voláteis do óleo essencial das raízes de <i>E. citriodora</i> Hook coletado em 2005. (OEEC2).	111
Tabela 6.1 –	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de ECK-1 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-CPD e DEPT -135°, δ, CD ₃ OD, 75 MHz)....	124
Tabela 6.2 –	Dados de RMN ¹ H, RMN ¹³ C e correlações ¹ H, ¹³ C-HMQC - ¹ J _{CH} e HMBC - ⁿ J _{CH} (n=2 e n=3) de ECK-1.....	131
Tabela 6.3 –	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C obtidos na literatura para ECK-1.	132
Tabela 6.4 –	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de ECK-2 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C -CPD e DEPT -135°, δ, CD ₃ OD, 125 MHz)	137

Tabela 6.5 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^1H -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-2.....	143
Tabela 6.6 –	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos na literatura para ECK-2.	144
Tabela 6.7 –	Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de ECK-2 (δ , CD_3OD , 125 MHz) com os dados de ECK-2-Ac (δ , CDCl_3 , 75 MHz).....	147
Tabela 6.8 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-3 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT -135°, δ CD_3OD , 75 MHz)	151
Tabela 6.9 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-3 (CD_3OD , 125 MHz) com os de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz) e com os da literatura [Almeida, Lemos <i>et al.</i> , 2005].....	155
Tabela 6.10 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-4 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , (CD_3OD , 125 MHz)	159
Tabela 6.11 –	Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de ECK-4 (δ , CD_3OD , 125 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 125 MHz) e com os de aromadendrina (4) [Almeida, Lemos, <i>et al.</i> , 2005].....	162
Tabela 6.12 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-5 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT-135°, δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz).....	166
Tabela 6.13 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-5.	172
Tabela 6.14 –	Comparação com dados de RMN ^{13}C obtidos na literatura para ECK-5.....	173
Tabela 6.15 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-6 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT-135°, δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz).....	176
Tabela 6.16 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-6.....	182
Tabela 6.17 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-6 com os encontrados na literatura para 7-metil-aromadendrina-4'-O-(6''- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroila)- β -D-glicopiranosídeo em CD_3OD [Rashwan; 2002].....	183

Tabela 6.18 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-7 com padrão de hidrogenação.(RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)	186
Tabela 6.19 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-7.....	193
Tabela 6.20 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-7 com os encontrados na literatura para (7) [Rashwan; 2002]	194
Tabela 6.21 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-8 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135°, δ , CD_3OD , 125 MHz).	197
Tabela 6.22 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-8.....	206
Tabela 6.23 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-8 (CD_3OD , 125 MHz) com os de gericundranina C [Lee, Kim <i>et al.</i> , 1996]	207
Tabela 6.24 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-9 com padrão de hidrogenação.(RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)	210
Tabela 6.25 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-9.....	218
Tabela 6.26 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C entre ECK-8, ECK-9 (CD_3OD , 125 MHz) e gericundranina C [Lee, Kim <i>et al.</i> , 1996].....	219
Tabela 6.27 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-10 (CD_3OD , 125 MHz) com os dados do ácido gálico (CD_3OD , 75 MHz) [Almeida, Lemos <i>et al.</i> , 2005]	222
Tabela 6.28 –	Valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-11A e ECK-11B com padrão de hidrogenação.(RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OH , 125 MHz).....	228
Tabela 6.29a-	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-11A.....	232
Tabela 6.29b-	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-11B.....	232
Tabela 6.30 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-11 com os valores de 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]- D -glucopiranosose [Huang; Liao <i>et al.</i> , 2004]	233

Tabela 6.31 –	Valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-12 com padrão de hidrogenação.(RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OH , 125 MHz)	236
Tabela 6.32 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-12.	243
Tabela 6.33 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-12 com os valores de <i>para</i> -cinamoila, galoila e β -glicopiranosídeo (ver as estruturas ECK-7 e ECK-10).....	244
Tabela 6.34 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-1A com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135°, δ , CDCl_3 , 75 MHz).....	247
Tabela 6.35 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-1B com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135°, δ , CDCl_3 , 75 MHz).....	247
Tabela 6.36 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-1A (CDCl_3 , 125 MHz) com os do ácido magniferólico [Sy <i>et al.</i> ,1997] e de TS-1B com os do 3 β -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico [Anjaneyulu <i>et al.</i> ,1985].....	253
Tabela 6.37 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-2 com padrão de hidrogenação RMN ^{13}C -CPD e HMQC, ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz).....	256
Tabela 6.38 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de TS-2.....	262
Tabela 6.39 –	Comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-2 (CD_3OD , 125 MHz) com os dados da 3'-metil-quercetina (14) (CD_3OD , 75 MHz) [Agrawal, 1989].....	263
Tabela 6.40 –	Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-3 (δ , CD_3OD , 500 MHz) com os dados de ECK-1 (δ , CDCl_3 , 300 MHz).	265
Tabela 6.41 –	Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-4 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) com os dados de ECK-5 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz).	267
Tabela 6.42 –	Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) com os dados de ECK-5 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz).	268
Tabela 6.43 –	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-5 com padrão de hidrogenação.(RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)	270

Tabela 6.44 –	Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de TS-5.	275
Tabela 6.45 –	Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 (δ , CD_3OD , 500 MHz) com os dados de ECK-5 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz).	276
Tabela 6.46 –	Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-6 (δ , CD_3OD , 300 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 300 MHz).	278
Tabela 6.47 –	Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de TS-6 (δ , CD_3OD , 75 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 75 MHz).	280
Tabela 7.1 –	Frações obtidas por meio do particionamento do “kino” de <i>E. citriodora</i>	289
Tabela 7.2 –	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 de ECK-PC.....	289
Tabela 7.2a.	Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico de ECK-PC.	289
Tabela 7.3 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-A.....	290
Tabela 7.3a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A.	290
Tabela 7.4 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A’.....	292
Tabela 7.5 –	Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-A’C	292
Tabela 7.5a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A’C	293
Tabela 7.6 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-ACF .	294
Tabela 7.6a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A’CF.....	294
Tabela 7.7 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-B.....	296
Tabela 7.8 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BBA.....	297
Tabela 7.9 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-BC.....	298
Tabela 7.9a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BC.....	299
Tabela 7.10 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BCB.....	299
Tabela 7.11 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-BCB-18-22 + ECK-PC-2A.....	300
Tabela 7.12 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-C.....	301
Tabela 7.12a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-C	301
Tabela 7.13 –	Fracionamento cromatográfico tipo “flash” da fração ECK-PC-C’.....	302
Tabela 7.13a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-C’	302
Tabela 7.14 –	Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-D.....	303

Tabela 7.14a-	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-D.....	304
Tabela 7.15 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-E.....	305
Tabela 7.16 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-EA.....	306
Tabela 7.17 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-EB.....	308
Tabela 7.18 –	Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-M.	309
Tabela 7.19 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA.....	311
Tabela 7.19a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA.....	311
Tabela 7.20 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-G.....	312
Tabela 7.20a –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-G.....	312
Tabela 7.21 –	Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-H.....	313
Tabela 7.21a-	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-H.....	313
Tabela 7.22 –	Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-HB.....	314
Tabela 7.23 –	Fracionamento cromatográfico (filtrante) da fração TSCE-PH.....	316
Tabela 7.23a-	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH.....	317
Tabela 7.24 –	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-A.....	317
Tabela 7.24a –	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH-A.....	318
Tabela 7.25 –	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-AC.....	318
Tabela 7.25a-	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH-AC.....	319
Tabela 7.26 –	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC.....	319
Tabela 7.27 –	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-A.....	320
Tabela 7.27a-	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-A.....	320
Tabela 7.28 –	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AA.....	322
Tabela 7.29 –	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AF.	323
Tabela 7.30 –	Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-AB.....	324
Tabela 7.30a –	Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AB.....	324
Tabela 7.31 –	Dados resultantes do tratamento cromatográfico de ECK-2Ac.....	326

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 7.1 - Método de extração do óleo essencial das folhas de <i>Eucalyptus</i> .	288
Fluxograma 7.2 - Esquema de obtenção de ECK-1, ECK-2, ECK-3 e ECK-4.....	295
Fluxograma 7.3 - Esquema de obtenção de ECK-5.....	298
Fluxograma 7.4 - Esquema de obtenção de ECK-7.....	305
Fluxograma 7.5 - Esquema de obtenção de ECK-6.....	307
Fluxograma 7.6 - Esquema da obtenção de ECK-9.	310
Fluxograma 7.7 - Esquema de obtenção de ECK-10, ECK-11 e ECK-12.....	315
Fluxograma 7.8 - Esquema da obtenção de TS-2.	321
Fluxograma 7.9 - Esquema da obtenção de TS-3 e TS-4.	322
Fluxograma 7.10 - Esquema da obtenção de TS-5 e TS-6.	325

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Constituintes químicos não-voláteis isolados do “kino” de <i>E. citriodora</i> Hook.	35
Quadro 1.2	Constituintes químicos não-voláteis isolados do extrato etanólico de <i>Trigona spinipes</i> Fabricius.	36
Quadro 2.1	– Estruturas dos constituintes voláteis identificados no óleo essencial de <i>E. citriodora</i> Hook..	49
Quadro 2.2	– Constituintes químicos não voláteis isolados de <i>E. citriodora</i> Hook.	57
Quadro 2.3	– Constituintes químicos isolados do “kino” de espécies de <i>Eucalyptus</i> Hook.	68
Quadro 3.1	– Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas.....	80
Quadro 6.1	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-1 (1)	127
Quadro 6.2	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-2 (2)	139
Quadro 6.3	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-3 (3)	154
Quadro 6.4	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-4 (4)	160
Quadro 6.5	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-8 (8).	200
Quadro 6.6	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-9 (9).	213
Quadro 6.7	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para TS-1A (13a)	250
Quadro 6.8	– Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para TS-1B (13b)	251

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1** – Representação da variação dos teores de óleo essencial obtidos ao longo do dia para as espécies *E. citriodora* Hook. e *E. tereticornis* Smith. 94
- Gráfico 5.2** – Monitoramento da variação sazonal de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith observados no período de janeiro a julho de 2003..... 96
- Gráfico 5.3** – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook. coletadas de um mesmo espécime em diferentes horários do dia. 99
- Gráfico 5.4** – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano. 102
- Gráfico 5.5** – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E.tereticornis* Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes horários do dia. 105
- Gráfico 5.6** – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. tereticornis* Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano. 109

ABREVIATURAS

ϕ	Diâmetro externo
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CGL/EM	Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa
CPD	Composte Pulse Decoupling
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ECK	Kino de <i>Eucalyptus citriodora</i>
Fig.	Figura
Flux.	Fluxograma
h	altura
Hex.	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
I. D. H.	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IK	Índice Kovat
I. V.	Infravermelho
IE	Impacto Eletrônico
J	Constante de acoplamento
OEEC	Óleo essencial de <i>E. citriodora</i>
OEEC2	Óleo essencial de <i>Euclyptus citriodora</i> coletado no Lula's Buffet
OEET	Óleo essencial de <i>E. tereticornis</i>
p.	Página
pf	Ponto de fusão
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
Tab.	Tabela
TSEC	Extrato etanólico da colméia de <i>Trigona spinipes</i>

RESUMO

Este trabalho relata o estudo da composição química volátil das folhas de duas espécies de *Eucalyptus*: *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith, coletadas no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, na Universidade Federal do Ceará para os quais foram avaliadas a variação química circadiana e sazonal. Citronelal e 1,8-cineol foram os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith, respectivamente.

Na tentativa de estabelecer o elo ecológico entre as abelhas *Trigona spinipes* Fabricius (arapuá) e as árvores por elas visitadas, especificamente o *E. citriodora* Hook, foi realizado o estudo cromatográfico do “kino” (uma exudação dos caules de várias espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae), originários da Austrália) e do extrato etanólico obtido a partir do ninho das abelhas.

Por meio de técnicas cromatográficas adequadas aplicadas às frações provenientes do fracionamento do “kino” solubilizado, obtiveram-se da fração clorofórmica, os flavonóides sakuranetina, naringenina, 7-metil éter aromadendrina, aromadendrina, e 7-metil éter kampferol, dois novos flavonóides: 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,4'-diidroxil-7-metoxil-flavanonol e 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,7,4'-triidroxil-flavanonol; além do 7-metil aromadendrina-4'-O-(6"-*trans-p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo e 1-O-cinamoil-6-O-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo. Da fração acetato de etila, foram isolados o ácido gálico, 6-O-(*p*-cumaroil)-D-glicopiranosose, nas configurações β e α , e um novo tanino: 1,2-digaloil-6-O-*trans-p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo.

Do extrato etanólico do ninho de *Trigona spinipes* Fabricius, foi possível isolar a mistura de triterpenos: ácido magniferólico e ácido 3 β -hidróxi-24-metilenocicloartan-26-óico e cinco flavonóides: 3'-metil-quercetina, sakuranetina, 7-metil éter kampferol, tricetina e 7-metil éter aromadendrina.

Para a identificação dos constituintes voláteis, utilizou-se CGL/EM, além da comparação dos índices de Kovats e espectros de massa em espectroteca, bem como a comparação visual com dados da literatura. Para a elucidação estrutural dos constituintes fixos e do derivado reacional foram utilizados métodos espectroscópicos tais como infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais, tais como COSY, HMQC e HMBC, assim como também a técnica espectrométrica EM por impacto eletrônico.

ABSTRACT

This work reports the study on the volatile chemical constituents of leaves of two *Eucalyptus* species (Myrtaceae): *Eucalyptus citriodora* Hook and *Eucalyptus tereticornis* Smith, collected from the Medicinal Plants Garden Francisco José de Abreu Matos, of the Universidade Federal do Ceará. The circadian and seasonal chemical variation was determined for both plants specimens. Citronelal and 1,8-cineol were major constituents for *E. citriodora* and *E. tereticornis*, respectively.

Attempting to establish the ecological link between *Trigona spinipes* Fabricius (“arapuá”) and the trees visited by them, particularly *E. citriodora* Hook, a chromatographic study was performed with the kino (the exudate resin from several *Eucalyptus* species originary from Australia) and the ethanol extract from the bees' colony.

Thought adequate chromatographic techniques applied to the fractions obtained from the solubilized kino the flavonols: sakuranetin, naringenin, aromadendrin 7-methyl ether, aromadendrin, kaempferol 7-methyl ether, and two news flavonols 6-[1-(*p*-hydroxyphenyl)-ethyl]-3,5,4'-trihydroxy-7-methoxy-flavanone and the 6-[1-(*p*-hydroxyfenil)-ethyl]-3,5,7,4'-tetrahydroxy-flavanone and the heterosides 1-*O*-cinnamoyl-6-*O*-(*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside and 7-methylaromadendrin-4'-*O*-(6''-*trans-p*-coumaroil)- β -D-glucopyranoside were obtained from the CHCl₃ fraction. From the ethyl acetate fraction were isolated the gallic acid, 6-*O*-(*p*-coumaroyl)-D-glucopyranose and the tannin 1,0-2,0-digaloyl-6-*O*-(*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside.

From the ethanol extract of the *T. spinipes* Fabricius colony a mixture of the triterpenes magniferolic acid and 3 β -hydroxi-24 methylencyclopropan-26-oic, and five flavonoids 3'-methyl-quercetin, sakuranetin, kaempferol 7-methyl ether, tricetin e aromadendrin 7-methyl ether.

The volatile components were identified by GC/MS analysis and comparison of the Kovats Indices and mass spectra from a computer library, as well as by visual comparison to literature date. The non-volatile constituents were characterized by spectroscopic and derivatives techniques such IR, MS, ¹H and ¹³C NMR, including 2D NMR COSY, HMQC and HMBC.

Capítulo 1:

Introdução

1 – INTRODUÇÃO:

A observação foi e será o marco para as grandes descobertas, resultando em transformações profundas na maneira de ser e de viver dos seres humanos, estendendo os aspectos positivos e negativos para todos os seres vivos. Assim, dentre os benefícios, pode-se citar o progresso da ciência, que ora a passos lentos, ora com uma rapidez surpreendente, já proporcionou, e sem dúvidas continuará com sua benéfica tarefa de minimizar o sofrer, facilitar a vida, aumentar a longevidade.

Dentre o ramo de pesquisas realizadas, o estudo dos produtos naturais caracteriza bem os anseios da humanidade, haja vista ser o ponto de partida para a descoberta de medicamentos, ora sendo utilizado na sua forma natural, ora servindo como modelo de sínteses de novos fármacos, ou ainda como suporte para os semi-sintéticos.

Com o intuito de contribuir para a ciência dos produtos naturais, foram realizados estudos com duas espécies de *Eucalyptus*, o *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith e com uma espécie de abelha, a *Trigona spinipes* Fabricius, conhecida popularmente como arapuá.

Observou-se no Horto de Plantas Medicinais, Francisco José de Abreu Matos, UFC, que abelhas arapuá perfuravam os troncos de árvores de *Eucalyptus*, e que destas exsudavam líquidos viscosos, cuja denominação na literatura é “kino”, [COSTELLO, www.mouget.com/mlinks/lemonweb.pdf acesso: 02/2003] estes endureciam após exposição ao sol e ao ar formando bolhas de um material quebradiço de cor marrom (Fig. 1.1).



Figura 1.1. Fotografias de: **A** – caule de um espécime de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de A. Matos, exibindo o fluxo de “kino”. **B** – ampliação destacando as gotas de “kino” endurecidas.

O “kino” era recolhido pelas abelhas *Trigona spinipes* Fabricius (arapuá) como mostra a Figura 1.2. Partindo destas observações, decidiu-se averiguar se o destino deste exsudato seria a utilização no ninho das abelhas.

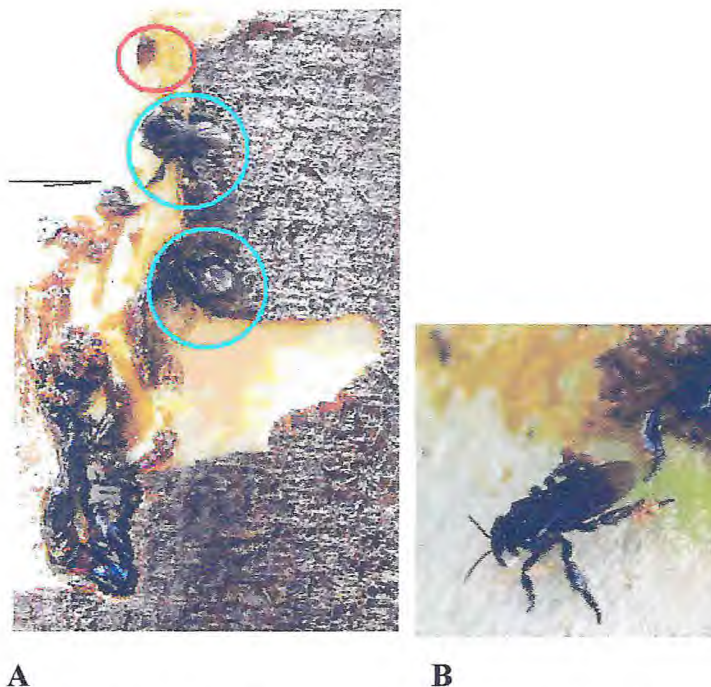


Figura 1.2 – Fotografias de: **A** – Do tronco de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de A. Matos com detalhes da perfuração (círculo vermelho) e abelha arapuá coletando kino (círculo azul), **B** - arapuá com partículas de kino do *E. citriodora* Hook em suas patas. Fotos Prof. E. R. Silveira.

Segundo Park, Alencar *et al.* (2002), num estudo sobre as evidências fitoquímicas da origem vegetal de própolis, o melhor indicador da origem botânica da mesma é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal.

Bastos (2003), em estudos realizados com a própolis verde produzida em Minas Gerais, conseguiu apontar a família da planta que servia de base à sua produção. Para tanto, foram realizadas pesquisas de campo, para avaliar quais espécies eram visitadas pelas abelhas; estudos da composição química das resinas do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), seguidos da realização de testes histoquímicos, ou seja, a análise dos tecidos das plantas.

O objetivo deste trabalho consiste na identificação dos constituintes químicos voláteis dos óleos essenciais das duas espécies de *Eucalyptus*, dos constituintes não-voláteis

do “kino” do *E. citriodora* Hook e dos constituintes presentes no ninho de *T. spinipes* Fabricius. Então, através da comparação entre os constituintes identificados, visa-se estabelecer a importância ecológica que há entre as abelhas e as árvores por elas visitadas, mais especificamente que a diversidade da composição do “kino” é necessária para manter a integridade do ninho das abelhas.

Pertencente a família Myrtaceae, o gênero *Eucalyptus* desde muito tempo é utilizado na medicina popular. Originário da Austrália, mas disseminado por todos os continentes, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais [Mondello, Verzera *et al.*, 1998], é grande a utilização de suas espécies, destacando-se entre elas o *E. citriodora* e o *E. tereticornis*, pelo valor comercial de seus óleos, pois o primeiro é rico em citronelal [Betts, 2000], cujo uso é muito difundido nas indústrias de fabricação de sabões, perfumes e produtos de toaletes [Cimanga, Kambu *et al.*, 2002], enquanto o segundo é rico em 1,8-cineol [Panda e Panda, 1987], ao qual são atribuídas as propriedades diaforética, desinfetante, expectorante e anti-malárica [Siddiqui, Sultana *et al.*, 2000]. Ambos já foram amplamente estudados nos países onde foram adaptados [Cimanga, Kambu *et al.*, 2002]. O “kino” de eucalipto há muito tempo é utilizado na Austrália como antidiarréico, em hemorragias por suas propriedades adstringentes [Siddiqui, Sultana *et al.*, 2000] e como cicatrizante, em problemas de pele, graças ao elevado teor de taninos e compostos fenólicos presentes em sua composição.

O estudo realizado com *Eucalyptus* foi dividido em duas partes: a análise dos óleos essenciais das duas espécies mencionadas e o estudo do “kino” de *E. citriodora*. Com as folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith, foram realizados o acompanhamento circadiano e sazonal dos constituintes químicos dos óleos essenciais para a determinação dos seus constituintes voláteis.

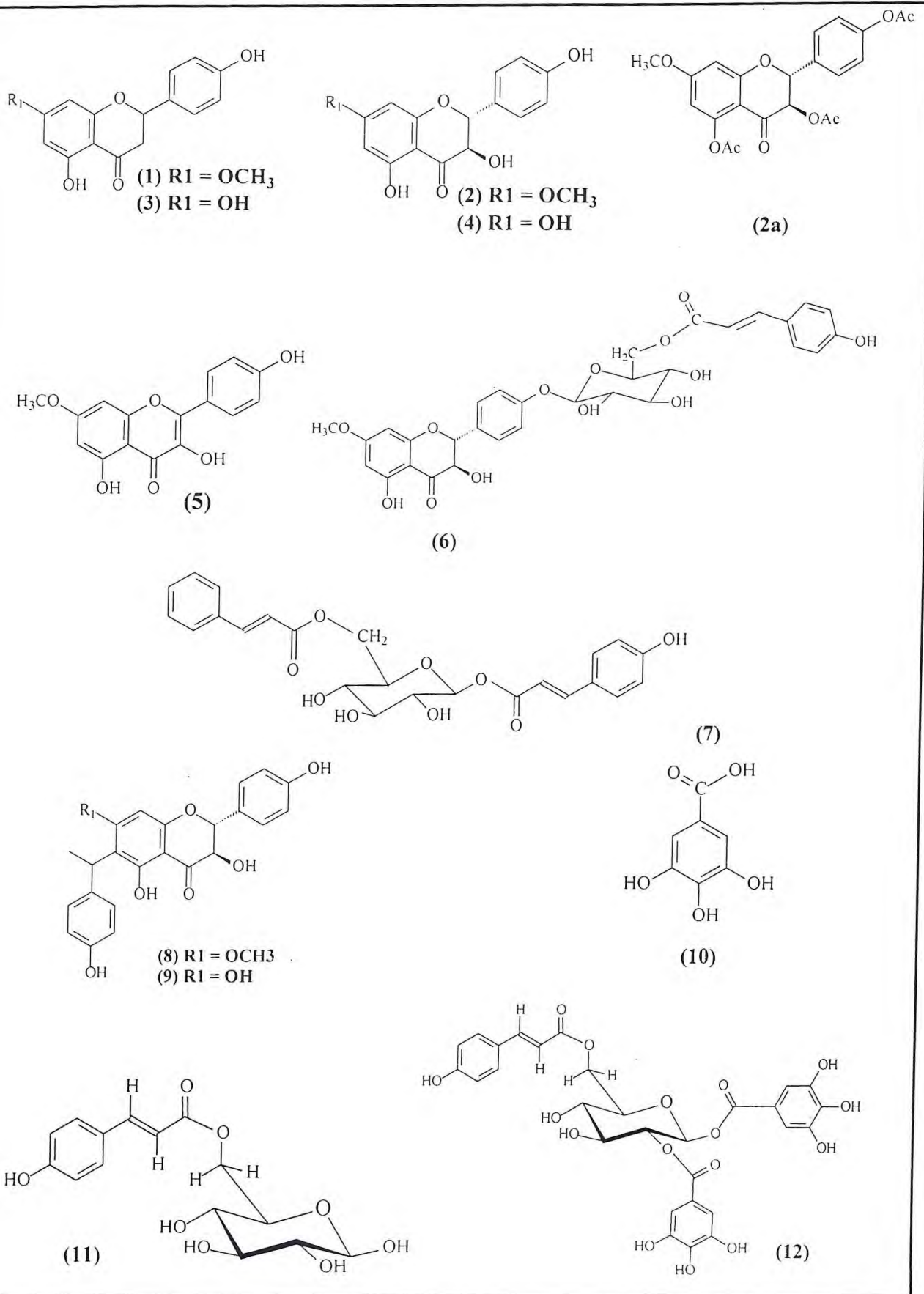
Por meio do particionamento realizado com o “kino” solubilizado em EtOH/H₂O 1:1 de *E. citriodora* Hook, e sucessivos tratamentos cromatográficos realizados com as frações clorofórmica e acetato de etila, foram isolados sete flavonóides, dentre os quais dois inéditos, três heterosídeos conhecidos, um composto fenólico, um tanino inédito. Para a obtenção do derivado de um dos flavonóides, foi realizada a reação de acetilação (Quadro 1.1, p. 35).

Em paralelo foi realizado o estudo dos constituintes químicos do ninho de abelhas de *T. spinipes* Fabricius, uma abelha indígena sem ferrão, conhecida popularmente como arapuá e cuja distribuição geográfica no Brasil é ampla [Chiaradia, Da Croce *et al.*, 2003].

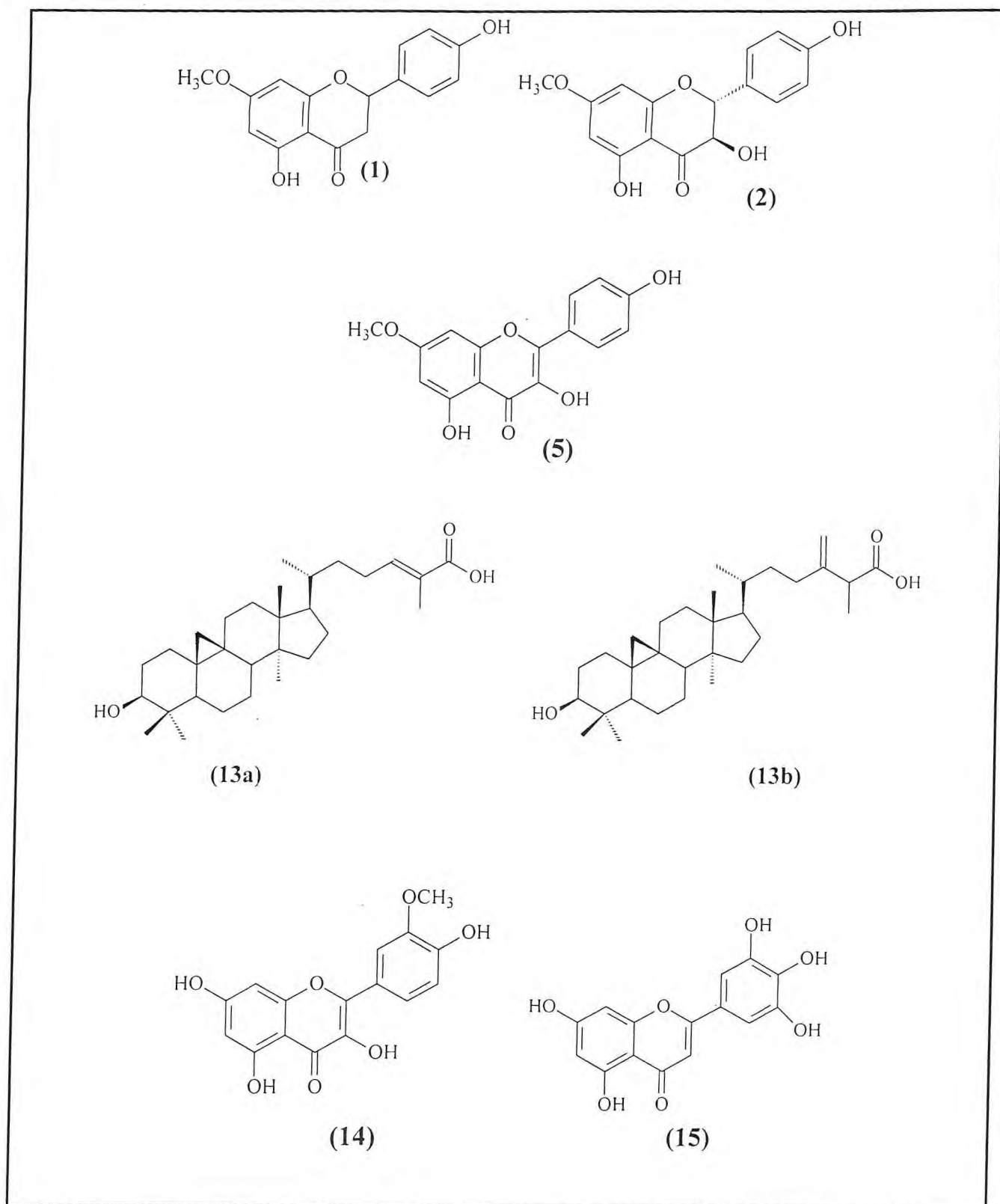
Ao mel das abelhas arapuás são atribuídas propriedades medicinais, o que torna este muito procurado [Chiaradia, Da Croce *et al.*, 2003]. Além do mel, as abelhas podem fornecer a geléia real, o pólen, a própolis e a apitoxina [Freitas, 1999], cuja elucidação dos constituintes químicos está sendo alvo de muitas pesquisas. Entretanto, para o gênero *Trigona*, há ausência de informações, sendo mais um motivo para realizar pesquisa neste âmbito.

A partir do extrato etanólico do ninho de *T. spinipes* Fabricius foi isolada uma mistura de triterpenos do tipo cicloartano e cinco flavonóides, dentre os quais três coincidentes com os isolados do “kino” de *E. citriodora* Hook. Todos os compostos são inéditos para a espécie (Quadro 1.2, p. 36).

Quadro 1.1 – Constituintes químicos não-voláteis isolados do “kino” de *E. citriodora* Hook



Quadro 1.2 – Constituintes químicos não-voláteis isolados do extrato etanólico de *Trigona spinipes* Fabricius.



Este trabalho está dividido em oito capítulos. Além desta Introdução, os demais abordam os seguintes assuntos:

- Capítulo 2 - Levantamento Bibliográfico: traz o levantamento bibliográfico dos constituintes químicos voláteis e não voláteis de *E. citriodora* Hook e dos constituintes químicos do “kino” já identificados para esta espécie, bem como para algumas outras relatadas na literatura.
- Capítulo 3 - Considerações Gerais sobre as Abelhas: traz um breve relato sobre abelhas, algumas características que identificam as *Trigonas* e fotos evidenciando algumas das características citadas. Ainda apresenta considerações sobre a química dos produtos das abelhas: pólen, mel e própolis.
- Capítulo 4 - Considerações Botânicas: apresenta a descrição do *E. citriodora* e do *E. tereticornis* exibindo fotos de exemplares dos mesmos.
- Capítulo 5 - Constituintes Voláteis: apresenta a identificação dos constituintes químicos obtidos dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. tereticornis* por meio de monitoramento circadiano e sazonal.
- Capítulo 6 - Elucidação Estrutural: apresenta a identificação dos constituintes químicos do “kino” de *E. citriodora* e do extrato etanólico do ninho de *Trigona spinipes*.
- Capítulo 7 - Parte Experimental: descrevem-se os dados de coleta, especificações de aparelhos, reagentes e solventes, métodos utilizados na obtenção dos óleos essenciais e procedimentos usados para o isolamento neste trabalho.
- Capítulo 8 - Conclusões

Referências Bibliográficas

Capítulo 2:

Levantamento Bibliográfico

2.0 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

O gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, conta com mais de 600 espécies. Recentemente algumas destas foram reclassificadas em um novo gênero denominado *Corymbia* ao qual agora pertence, entre outras, o *Eucalyptus citriodora* Hook e que oficialmente é *Corymbia citriodora* [Pengelly, www.nhoa.org.au/forum/text/ahg97.html, acesso: 1/02/2003], mas que neste estudo ainda será reportado com o nome original.

O levantamento bibliográfico realizado no *Chemical Abstract* e na Internet, permitiram compilar dados acerca da composição química do *E. citriodora* Hook. De acordo com as informações obtidas foi possível dividir o levantamento bibliográfico em duas partes: 1) constituintes voláteis oriundos dos óleos essenciais (Tab. 2.1, pp. 45-48) e 2) constituintes não-voláteis obtidos dos extratos de folhas e caule (Tab. 2.2, pp. 55-56).

O “kino” do *E. citriodora* Hook também foi pesquisado visando estabelecer a sua composição e o resultado levou a descrição de uma relação com várias espécies estudadas (Tab. 2.3, pp. 66-67)

2.1. Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Voláteis Isolados de *Eucalyptus citriodora* Hook

O óleo essencial de *E. citriodora* Hook foi estudado em vários países e a composição do mesmo apresentou alterações dependentes da origem, da técnica utilizada e do período do ano no qual foi realizada a coleta.

A única parte estudada da planta, com exceção do trabalho realizado por Rao e Sood (1961), que relata a composição dos botões florais de *E. citriodora* Hook, foram as folhas. O componente majoritário foi o citronelal (40), com teores variando entre 40 a 90 %. Os constituintes encontram-se listados na Tabela 2.1, pp. 45-48, numerados de acordo com a ordem crescente dos IK [Adams, 2001], sendo também, relativa aos países nos quais foram realizadas as análises, estes citados em ordem alfabética. O Quadro 2.1, pp. 49-53 traz a representação das estruturas dos constituintes citados.

Chiris (1925) citou a presença de pineno, traços de cineol, citronelal (**40**) (50 %), isopulegol (**38**) (1-2 %) , citronelol (**47**) (15-20 %), geraniol (**51**) (~ 5%), além de sesquiterpenos, butirato de citronelila e citronelato de citronelila.

O óleo essencial obtido por meio de destilação dos botões frescos das flores de *E. citriodora* Hook foi analisado por Rao e Sood (1961). Estes citaram a presença de citronelal (**40**) (28,8 %), α -felandreno (**23**), citronelol (**47**), citral (**52**), geraniol (**53**) e ésteres de ácidos acético e isovalérico.

Sharma e Handa (1963) realizaram a extração do óleo das folhas frescas de óleo de *E. citriodora* Hook, cultivado em Jammu, que por meio de análise possibilitou a identificação de seis constituintes pineno (**18 ou 22**), citronelal (**40**) (50%), citronelol (**47**), geraniol (**51**), acetato de citronelila (**56**) e acetato de geraniol (**60**). O citronelal foi isolado por meio de NaHSO₃.

Elkeiy, Darwish *et al.* (1964), em estudos com espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Egito, citaram para o óleo essencial obtido das folhas jovens e velhas de *E. citriodora* Hook, a presença de dez constituintes, observados por meio de CCD, empregando EtOAc e benzeno como eluente. O teor de citronelal (**40**) foi de 60,47%.

Num estudo em escala de planta piloto. Cristini, Baruffaldi *et al.* (1966), realizaram a verificação da influência do processamento das folhas de *E. citriodora* Hook cultivados em São Paulo, **Brasil**, com relação ao rendimento em essência, sua composição e qualidade. Foram realizadas extrações por meio de dois processos: arraste de vapor e hidrodestilação. As folhas eram frescas, ou secas em estufa; inteiras, laminadas ou trituradas finamente e grosseiramente. Então conseguiram chegar as seguintes conclusões: das folhas frescas se obtinham melhores resultados, visto que a secagem parcial das mesmas acarretava perdas de óleo e do citronelal presente; o melhor rendimento em citronelal foi obtido para as folhas finamente trituradas, por meio dos dois métodos de extração. Para as folhas frescas ou secas em estufa, inteiras, laminadas ou trituradas grosseiramente, a melhor extração correspondeu a hidrodestilação, enquanto para as folhas frescas ou secas finamente trituradas, o melhor processo de extração correspondeu ao arraste a vapor. Assim foi estabelecido que o processo mais indicado para a obtenção do óleo essencial de *E. citriodora* seria: folhas frescas finamente trituradas e destiladas em corrente de vapor.

Ainda estabeleceram, por meio de CCD, a composição do óleo, no qual foram detectados: felandreno (26), cineol (28), citronelol (47), geraniol (51) e dois componentes não foram identificados.

O óleo essencial proveniente do *E. citriodora* Hook da **Angola** foi analisado por Proença da Cunha e Neves (1969), sendo identificados doze constituintes (ver Tab.2.1, pp. 45-48).

Barua, Gupta *et al.* (1972) analisaram a composição do óleo essencial de *E. citriodora* Hook cultivado em Jorhat, Assam, na **Índia**. O teor de citronelal foi de 77,9%. Além dos compostos listados na Tabela 2.1, pp. 45-48, sete compostos não foram identificados, totalizando dezesseis compostos presentes.

Argiro e Retamar (1973), citaram como os compostos majoritários do óleo essencial obtido das folhas de *E. citriodora* Hook obtidas na província de Tucuman, **Argentina**(Tab. 2.1, pp. 45-48): citronelal (40) (54, 4%), α -pineno (18), β -pineno (21), limoneno (25), cineol (28), isopulegol (38), carvona (50), β -hidroxicitronelal (54) e eugenol (57) e eudesmol (isômero não definido).

Em estudos realizados por Miranda e Zayas (1985), avaliando o melhor tempo de colheita das folhas de *E. citriodora* Hook, crescidos em Havana, para obtenção de óleo essencial, observaram que havia pequenas variações durante o ano, mas que os meses mais favoráveis para a coleta seriam fevereiro e novembro.

Mwangi, Kosti *et al.* (1985) citaram por meio de análises realizadas com os óleo obtidos das folhas de espécimes de *E. citriodora* Hook, colhidas no **Kenya**, a existência de dois quimiotipos (variedade normal e citronelol, este variando de 32,1-51,8%) cujos valores dos componentes majoritários foram: citronelal (40) (65 e 88%), citronelol (47) (2 e 25 %) e isopulegol (38) (2 e 19%).

Visando comparar a constituição química do óleo essencial de folhas jovens e velhas de *E. citriodora* Hook, Sood, Rier *et al.* (1987) realizaram a análise destes óleos e citaram que houve uma significativa diferença, sendo esta maior com relação aos teores do citronelal (40)

(32,0 e 66,6 %) e do citrionelol (**47**) (51,7 e 23,1 %), respectivamente para o óleo das folhas jovens e velhas.

Panda e Panda (1987) realizaram estudos com espécies de *Eucalyptus* e do óleo essencial do *E. citriodora* Hook da **Índia**. Citaram vinte e nove constituintes identificados. Os constituintes majoritários foram o citrionelal (**40**) (72,8 %) e o citrionelol (**47**) (14,5 %). Vinte e seis compostos estão relacionados na Tab. 2.1, pp. 45-48 . Os outros são: isopropil-ciclohexano, 1,8 terpenidrato, e metil-*cis*-9-octade-ceneato.

A atividade repelente de mosquito de dois constituintes encontrados no óleo de *E. citriodora* Hook, o *cis*-para-mentano-3,8-diol (**81**) e o *trans*-para-mentano-3,8-diol (**82**), foi avaliada por Nishimura (1989).

Zrira, Benjilali *et al.* (1992), avaliaram a composição química do óleo essencial de vinte e sete espécies de *Eucalyptus* de Marrocos, dentre eles o *E. citriodora* Hook , cujo teor de citrionelal (**40**) registrado foi de 56 %.

Chaudhry, Akbar *et al.* (1994) analisaram a composição química do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook do **Paquistão**, coletadas no mês de setembro. O óleo revelou a presença de trinta e três constituintes, dos quais vinte foram identificados. Os principais constituintes foram o citrionelal (**40**) (79,0 %), citrionelol (**47**) (12,0 %) e isopulegol (**38**) (2,7 %).

Em 1996, Sohounhloue, Dangou *et al.*, avaliaram a constituição química de três espécies de *Eucalyptus* de **Benim**, dentre os quais o *E. citriodora* Hook apresentou um teor de citrionelal (**40**) de 65,5 %. Entre as outras substâncias presentes foram citadas: α -pineno (**18**) (0,1 %), β -pineno (**22**) (0,4%), 1,8-cineol (**28**) (0,5 %), isopulegol (**38**) (10,3 %), citrionelol (**47**) (13,1 %), acetato de citrionelila (**56**) (2,1 %), β -cariofileno (**65**) (0,5 %) *E,E*-farnesol (**80**) (0,9 %), num total de nove constituintes identificados, (Tab. 2.1, p. 45-48).

Em um estudo realizado sobre a variação química sazonal com as folhas de *E. citriodora* Hook, do **Paquistão**, Rafique e Chaudhary (1996), citaram os componentes majoritários identificados do óleo essencial obtido desta espécie e a variação dos teores

destes: citronelal **(40)** (25,6-36,3 %), isocitronelal (21,5-31,9 %), hidroxicitronelal **(54)** (7,9-14,5 %), eugenol **(57)** (1,1-4,5 %), citronelol **(47)** (1,7-7,3 %), acetato de citronelila **(56)** (0,5-2,5 %), 1,8- cineol **(28)** (0,1-1,8 %), felandreno **(26)** (0,3-0,6 %) e *para*-cimeno **(24)** (0,1-0,9 %). Indicaram os meses de fevereiro e julho como os mais adequados aos padrões do mercado internacional.

Kaul, Bhattacharya *et al.* (1997) avaliaram o efeito da estocagem, pelo período de um ano, do óleo de *E. citriodora* Hook, coletado na região sul da **Índia**. Foi possível observar que o teor de citronelal **(40)** sofreu uma redução de 79,77 % para 50,42 %, ao passo que outros compostos aumentaram seus teores, tais como o isopulegol **(38)** e o borneol **(43)** (4,75 para 16,16 %), o citronelol **(47)** (5,43 para 17,32 %), geraniol **(51)** (0,57 para 2,00 %), acetato de citronelila **(56)** (0,72 para 1,08 %) e o β -cariofileno **(65)** (1,79 para 5,47%).

Mondello, Verzera *et al.* (1998), citaram como componentes majoritários para o óleo essencial das folhas (2,2 %) de *E. citriodora* Hook de **Bangladesh** (Tab. 2.1, pp. 45-48) itronelal **(40)** (77,0 %), neo-isopulegol **(37)** (7,3%), citronelol **(47)** (5,9 %) e o iso-isopulegol **(41)** (4,1 %). Trinta e cinco componentes foram identificados.

Em um estudo sobre os fatores que influenciam no produto e na qualidade do óleo essencial obtido das folhas de *E. citriodora* Hook cultivados em **Creta**, (Grécia) (Tab. 2.1, p. 45-48), Mejdoub, Katsiotis *et al.* (1998), conseguiram detectar por meio de análises em CG e CG/EM, mais de oitenta constituintes, dos quais trinta e seis representantes de 96,53 % do total, foram identificados. O teor de citronelal **(40)** variou de 68,9 a 81,2%. Entre outros os seguintes foram os majoritários: isopulegol (3,8 – 9,3 %) **(38)**, β -citronelol (6,5 -12,8 %) **(47)**, acetato de citronelila (0,4 – 3,7%) **(56)** e β -cariofileno (0,1 – 2,81 %) **(65)**.

Moudachirou, Gbênou *et al.* (1999), avaliaram vários fatores que poderiam afetar a composição dos óleos essenciais de *E. citriodora* Hook e *E. camaldulensis* cultivados em **Benim** (Tab. 2.1, p. 45) tais quais as seguintes influências: do local e tempo de colheita na produção e na composição química dos óleos; do método de extração e do tempo de destilação. Para o *E. citriodora* Hook concluíram que o melhor tempo de extração foi de uma hora, assim como o melhor tempo de estocagem do material da planta seria de duas semanas.

As folhas de espécies de *Eucalyptus* da **Etiópia**, dentre eles o *E. citriodora* Hook, tiveram seus óleos analisados no trabalho de Dagme, Bisrat *et al.* (2000), no qual citaram para o *E. citriodora* Hook os constituintes majoritários como sendo o citronelal (**40**) (73,3 %) e o citronelol (**47**) (11,9 %).

Betts (2000) realizou um estudo da variação química sazonal de três espécies de *Eucalyptus* empregando a técnica de microextração em fase sólida (Solid-Phase Microextraction - SPME), obtendo óleo essencial de cinco folhas de cada espécime. Para o *E. citriodora* Hook, o teor de citronelal (**40**) registrado variou de 72,9-80,5%, o citronelol (**47**) de 3,5-5,4 %, o acetato de citronelila (**56**) de 1,0-3,8 %, o cariofileno (**65**) de 9,2-11,8% e o biciclogermacreno (**70**) de 1,4-1,7%.

Cimanga, Kambu *et al.* (2002), analisaram a composição química de quinze espécies de plantas medicinais crescidas na **República Democrática do Congo**, dentre eles, *E. citriodora* Hook e correlacionaram a com a atividade antimicrobiana. O óleo do *E. citriodora* Hook apresentou dezesseis constituintes (Tab. 2.1, pp. 45-48), dentre eles os majoritários foram α -pineno (2,3 %) (**18**), citronelal (72,7 %) (**40**), citronelol (6,3 %) (**47**), acetato de citronelila (2,3 %) (**56**) e eugenol (3,5 %) (**57**).

Ramezani, Singh *et al.* (2002), testaram o óleo essencial de *E. citriodora* Hook (1,73 %) contra fungos fitopatogênicos. Este apresentou maior atividade inibitória do crescimento radial do que o controle Mancozeb, principalmente para os fungos *Rhizoctonia solani* e *Alternaria triticina*, o que os levou a sugerir a utilização deste óleo como um agroquímico a ser utilizado em doenças de plantas.

Em experimentos realizados com os óleos essenciais de três espécies de *Eucalyptus* dentre eles *E. citriodora*, Silva, Abebe *et al.* (2003), avaliaram os efeitos antiinflamatório e analgésico destes e de acordo com os resultados positivos apresentados foi sugerida a possibilidade de serem utilizados como nova classe de analgésicos e antiinflamatórios.

Batish, Setia *et al.* (2004), testaram o óleo essencial de *E. citriodora* Hook como inibidor de crescimento de algumas espécies de plantas, este apresentou forte fitotoxicidade e habilidade de suprimir a germinação de ervas daninhas, sugerindo-se poder ser utilizado como bioerbicida.

Tabela 2.1 – Constituintes voláteis identificados em óleos essenciais de *E. citriodora* Hook analisados em diferentes países.

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	Relação de Países que Analisaram a Composição dos Óleos Essenciais de <i>E. citriodora</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
triciclono (16)				X								
α -tujeno (17)									X	X		
α -pineno (18)	X	X	X	X	X		X		X	X		
canfeno (19)	X						X					
sabineno (20)				X					X			
β -pineno (22)	X	X	X	X	X		X		X	X		
mirreno (22)	X		X	X	X		X		X			
α -felandreno (23)						X			X			
<i>para</i> -cimeno (24)	X			X					X	X		X
limoneno (25)		X		X	X				X	X		
β -felandreno (26)						X						X
Δ_3 -careno (27)									X			
1,8-cineol (28)	X	X	X		X		X		X	X		X
bergamal (29)				X						X		
γ -terpineno (30)				X			X		X	X		
<i>p</i> -menta-3,8-dieno (31)				X						X		
óxido de <i>cis</i> -linalol (32)							X		X			
α -terpinoleno (33)			X	X*					X	X		
linalol (34)			X	X	X		X		X	X		
óxido <i>cis</i> -rose (35)				X					X	X		
óxido <i>trans</i> -rose (36)				X								

1 – Angola (1969)

2 – Argentina (Tucuman) (1973)

3 – Austrália (2000)

4- Bangladesh (1998)

5 – Benin (1996 e 1999)

6 – Brasil (São Paulo) (1966)

7 – Democrática República do Congo (2002)

8 Etiópia (2000)

9 – Grécia (1998)

10 – Índia (1972, 1987 e 1997)

11 - Kenya (1985)

12 - Paquistão (1994 e 1996)

Tabela 2.1 – Constituintes voláteis identificados em óleos essenciais de *E. citriodora* Hook analisados em diferentes países.

SUBSTÂNCIAS	Relação de Países que Analisaram a Composição dos Óleos Essenciais de <i>E. citriodora</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
neo-isopulegol (37)			X	X								
isopulegol (38)	X	X	X		X				X	X	X	X
mentona (39)												
citronelal (40)	X	54,4	80,5	76,9	89,9	X	72,7	73,3	81,2	79,7	88,0	79,0
iso-isopulegol (41)				X								
δ-terpineol (42)				X								
borneol (43)										X		
neoiso-isopulegol (44)				X								
terpinen-4-ol (45)				X								
α-terpineol (46)				X			X		X	X		
β-citronelol (47)	X		X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
nerol (48)				X					X	X		
neral (49)				X								
carvona (50)		X										
geraniol (51)	X			X		X				X		
citral (52)	X											
geranial (53)				X								
hidroxicitronelal (54)												X
acetato de terpenila (55)							X					
acetato de citronelila (56)	X		X	X	X		X		X	X		X
eugenol (57)		X					X					

1 – Angola (1969)

2 – Argentina (Tucuman) (1973)

3 – Austrália (2000)

4- Bangladesh (1998)

5 – Benin (1996 e 1999)

6 – Brasil (São Paulo) (1966)

7 – Democrática República do Congo (2002)

8 Etiópia (2000)

9 – Grécia (1998)

10 – Índia (1972, 1987 e 1997)

11 - Kenya (1985)

12 - Paquistão (1994 e 1996)

Tabela 2.1 – Constituintes voláteis identificados em óleos essenciais de *E. citriodora* Hook analisados em diferentes países.

SUBSTÂNCIAS	Relação de Países que Analisaram a Composição dos Óleos Essenciais de <i>E. citriodora</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
acetato de nerila (58)									X			
β-patchouleno (59)									X			
acetato de geranila (60)									X	X		
β-cubebeno (61)										X		
β-elemeno (62)				X								
cis-jasmona (63)				X					X			
metileugenol (64)							X					
β-cariofileno (65)			X	X	X		X				X	
γ-elemeno (66)									X	X		
α-humuleno (67)			X	X					X	X		
allo-aromadendreno (68)									X			
germacreno-D (69)				X								
biciclogermacreno (70)			X									
espatulenol (71)				X					X	X		
óxido de cariofileno (72)				X								
globulol (73)									X			
β-asarono (74)				X								
β-eudesmol (75)		X*							X			
α-eudesmol (76)		X*										
cis-p-ment-2-en-8-ol (77)					X							

- 1 – Angola (1969) 2 – Argentina (Tucuman) (1973) 3 – Austrália (2000) 4- Bangladesh (1998)
5 – Benin (1996 e 1999) 6 – Brasil (São Paulo) (1966) 7 – Democrática República do Congo (2002) 8 Etiópia (2000)
9 – Grécia (1998) 10 – Índia (1972, 1987 e 1997) 11 - Kenya (1985) 12 - Paquistão (1994 e 1996)

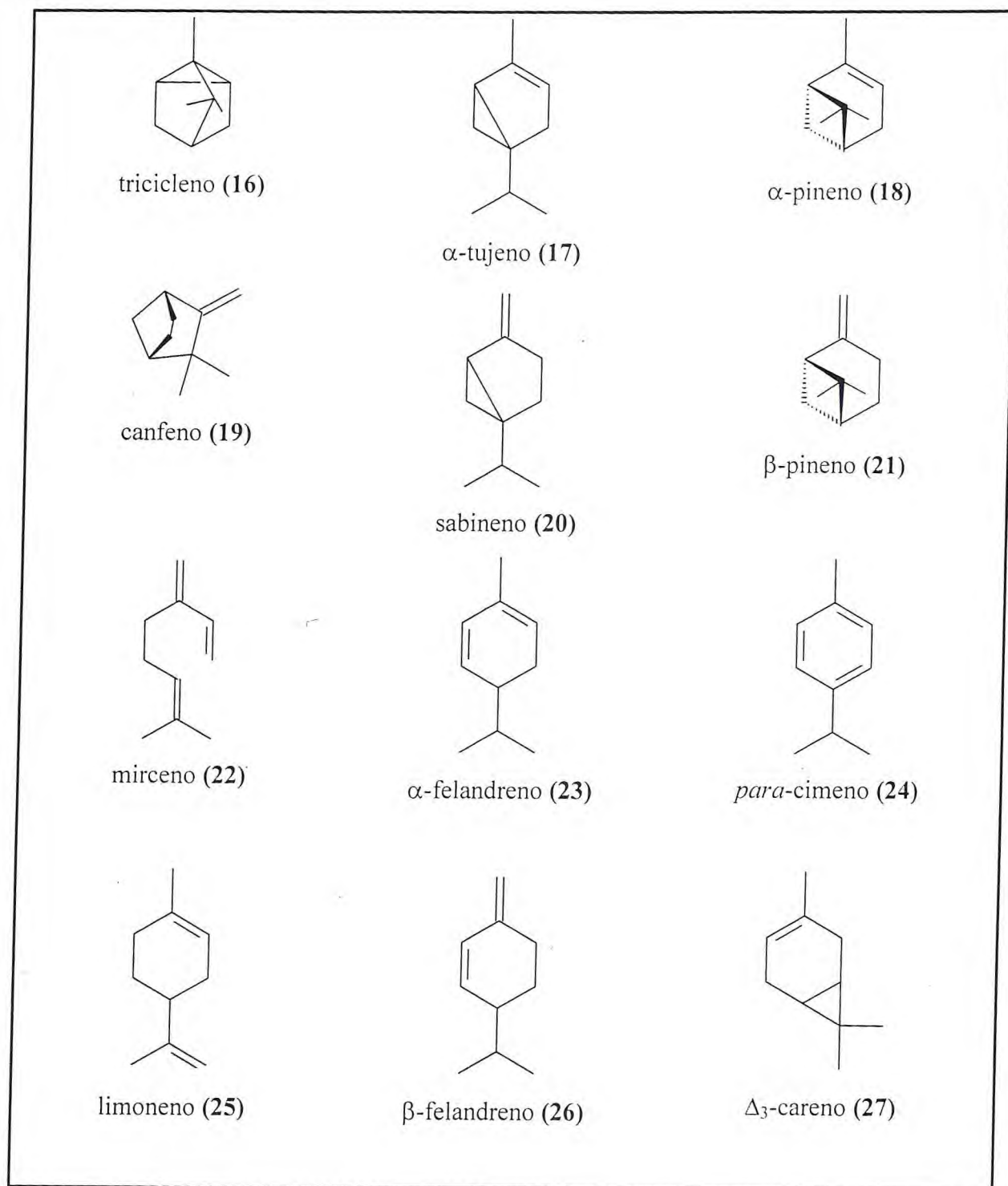
Tabela 2.1 – Constituintes voláteis identificados em óleos essenciais de *E. citriodora* Hook analisados em diferentes países.

SUBSTÂNCIAS	Relação de Países que Analisaram a Composição dos Óleos Essenciais de <i>E. citriodora</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>trans-p</i> -ment-2-en-8-ol (78)					X							
<i>trans,trans</i> -farnesol (79)					X							
juniper cânfora (80)									X			
<i>cis-p</i> -mentan-3,8-diol (81) *												
<i>trans-p</i> -mentan-3,8-diol (82) *												

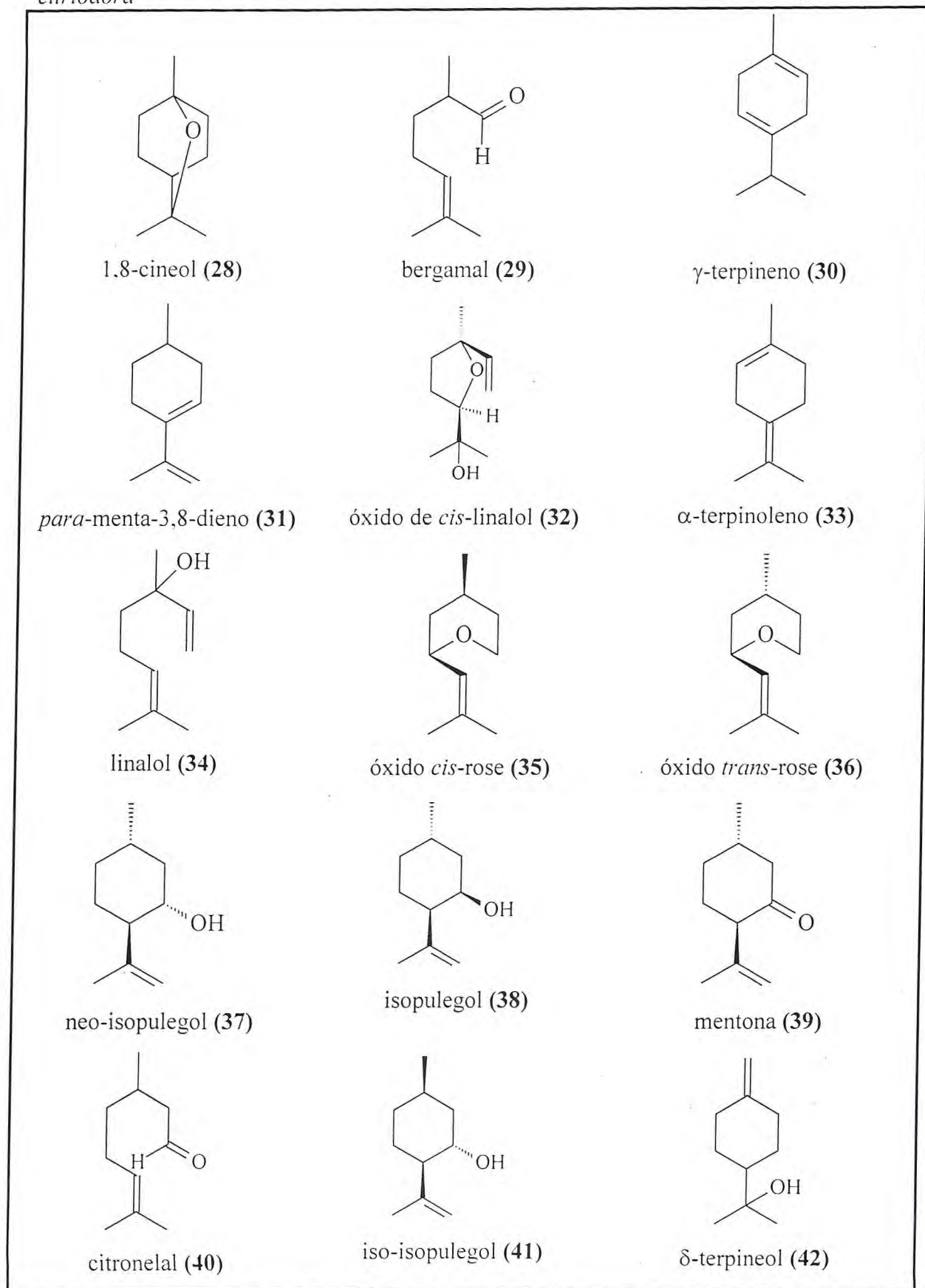
* Substâncias citadas no levantamento, porém não relacionada aos países citados nesta Tabela.

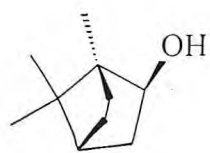
- 1 – Angola (1969) 2 – Argentina (Tucuman) (1973) 3 – Austrália (2000) 4- Bangladesh (1998)
5 – Benin (1996 e 1999) 6 – Brasil (São Paulo) (1966) 7 – Democrática República do Congo (2002) 8 Etiópia (2000)
9 – Grécia (1998) 10 – Índia (1972, 1987 e 1997) 11 - Kenya (1985) 12 - Paquistão (1994 e 1996)

Quadro 2.1– Estruturas dos constituintes voláteis identificados no óleo essencial de *E. citriodora* Hook.

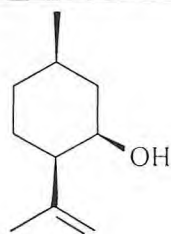


Quadro 2.1– Estruturas dos constituintes voláteis identificados no óleo essencial de *E. citriodora*

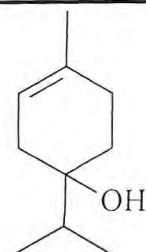




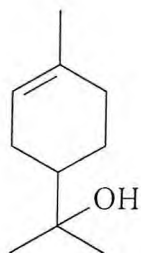
borneol (43)



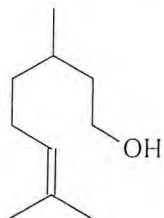
neo iso isopulegol (44)



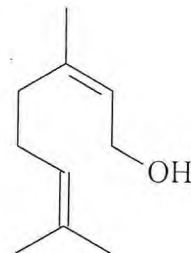
terpinen-4-ol (45)



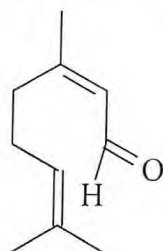
α -terpineol (46)



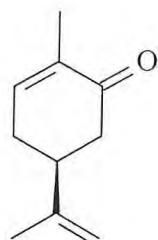
β -citronelol (47)



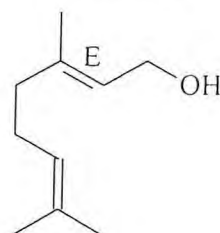
nerol (48)



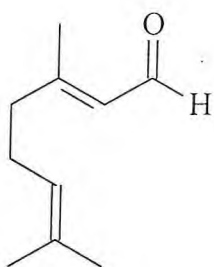
neral (49)



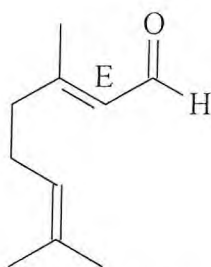
carvona (50)



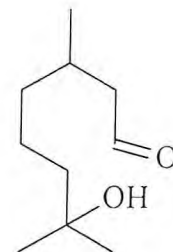
geraniol (51)



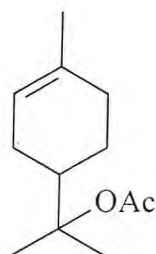
citral (52)



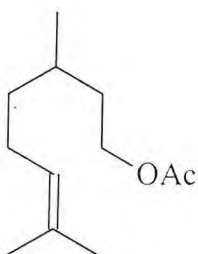
geranial (53)



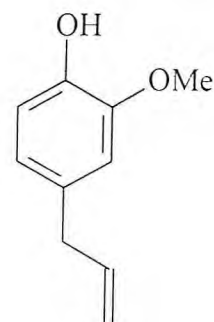
hidroxicitronelal (54)



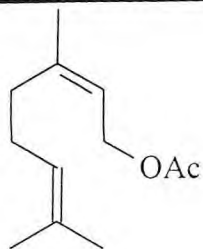
acetato de terpenila (55)



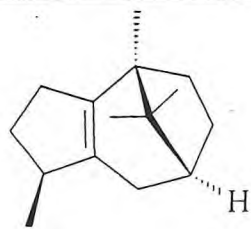
acetato de citronelila (56)



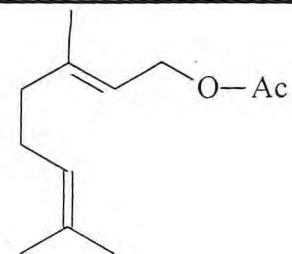
eugenol (57)



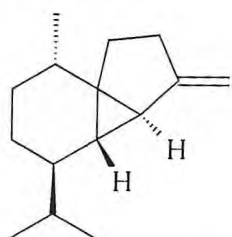
acetato de nerila (58)



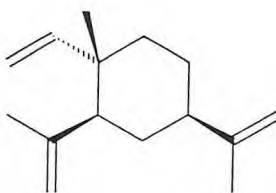
β -patchouleno (59)



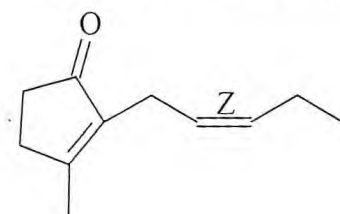
acetato de geranila (60)



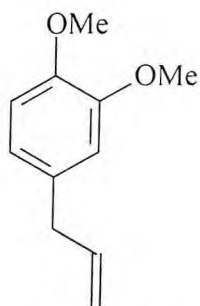
β -cubebeno (61) β



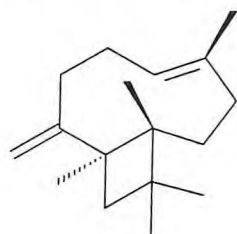
β -elemeno (62)



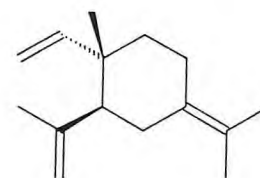
cis-jasmona (63)



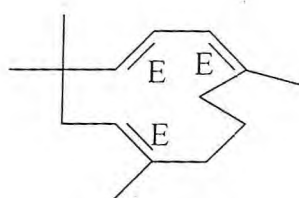
metileugenol (64)



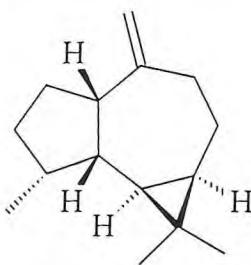
β -cariofileno (65)



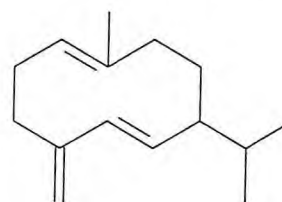
γ -elemeno (66)



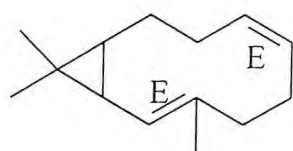
α -humuleno (67)



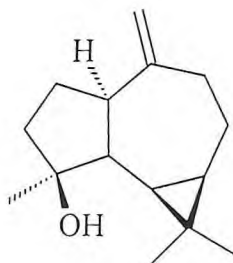
allo-aromadendreno (68)



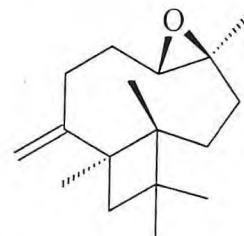
germacreno D (69)



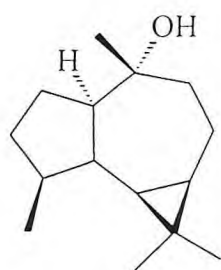
biciclogermacreno (70)



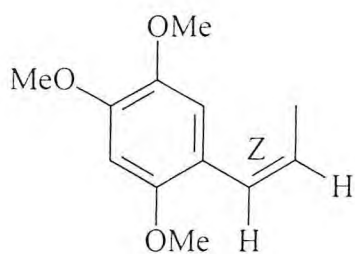
espatulenol (71)



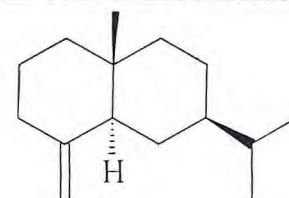
óxido de cariofileno (72)



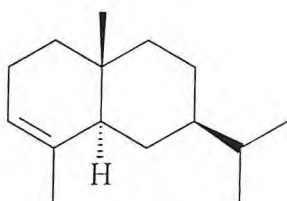
globulol (73)



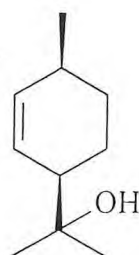
β -asareno (74)



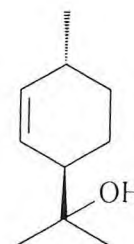
β -eudesmol (75)



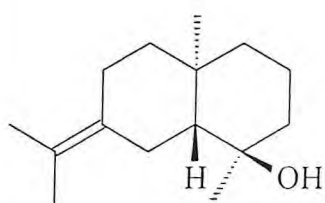
α -eudesmol (76)



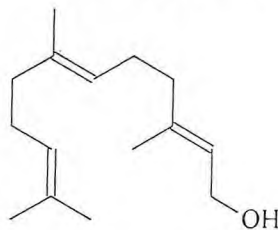
cis-p-ment-2-en-8-ol (77)



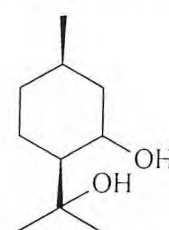
trans-p-ment-2-en-8-ol (78)



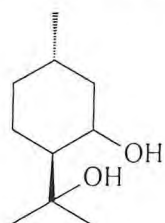
juniper canfora (79)



trans,trans-farnesol (80)



cis-p-mentan-3,8-diol (81)



trans-p-mentan-3,8-diol
(82)

2.2. Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Não-Voláteis Isolados de *Eucalyptus citriodora* Hook.

Apesar do grande número de trabalhos realizados com o óleo de *E. citriodora*, poucos estudos foram realizados avaliando a constituição química não-volátil desta espécie. Levantamento bibliográfico no *Chemical Abstract* e na Internet forneceram dados que possibilitaram formular a Tabela 2.2, pp. 55-56, listando os compostos isolados. As estruturas para os mesmos encontram-se no Quadro 2.2, pp. 57-61. Dentre os trabalhos publicados somente um foi sobre os compostos isolados do cerne do caule, enquanto os demais relatam os constituintes isolados das folhas.

Utilizando resinas de troca aniônica, Anet, Birch *et al.* (1957), conseguiram extrair das folhas de *E. citriodora* Hook os seguintes ácidos fenólicos: chiquímico (84), quínico (85), glutárico (86), succínico (87), málico (88) e cítrico (89).

Elkeiy, Darwish *et al.* (1964b) estudando as folhas de espécimes de *E. citriodora* Hook e *E. globulus*, isolaram de ambos uma flavona denominada eucaliptina (93).

Nishimura, Nakamura *et al.* (1984), cita a presença do *p*-mentano-*cis*-3,8-diol (81) e *p*-mentano-*trans*-3,8-diol (82) num estudo sobre o efeito alelopático destes em *E. citriodora*.

Shen e Yu (1986) obtiveram das folhas de *E. citriodora* Hook, por meio de sucessivas cromatografias em colunas de sílica e Sephadex LH-20, o isolamento de quatro compostos: eucaliptina (93), ácido ferúlico (90), *p*-mentano-*cis*-3,8-diol (81) e *p*-mentano-*trans*-3,8-diol (82).

Shen, Yu *et al.* (1987), isolaram das folhas de *E. citriodora* Hook, um novo composto denominado citriodorina (116).

Shen e Xu (1987), ainda das folhas desta espécie, obtiveram flavonóides e seus heterosídeos: quercetina (94), miricetina (95), 3-*O*-glicopiranosil-quercetina (96), 3-*O*-glicopiranosil-miricetina (97) e 3-*O*-rhamnopiranosil-miricetina (98).

Shen e Yu (1990), isolaram das folhas de *E. citriodora* Hook os ácidos elágico (91) e gálico (10) e a castalagina (115), um elagitanino, sendo o primeiro isolado de espécies de *Eucalyptus*.

Lee e Chang (2000) estudando o cerne do caule de *E. citriodora* Hook, obtiveram da fração clorofórmica, oriunda do particionamento do extrato acetônico, o isolamento de dezenove constituintes, pertencentes a diversas classes, tais como: terpenos, ácidos fenólicos, triterpenos, dentre eles um novo na literatura, o vernolitato de cicloeucalenila (109), um aldeído fenólico, o siringaldeído (83) e as lignanas iangambina (113) e sesamina (114).

Tabela 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.

Classes de Substâncias	Referências
Compostos Fenólicos	
siringaldeído (83)	[Lee; Chang, 2000]
Ácidos	
ácido gálico (10)	[Shen e Yu, 1990]
ácido chiquímico (84)	[Anet; Birch <i>et al.</i> , 1957]
ácido quínico (85)	" "
ácido glutárico (86)	" "
ácido succínico (87)	" "
ácido málico (88)	" "
ácido cítrico (89)	" "
ácido ferúlico (90)	[Shen; Yu, 1986]
ácido elágico (91)	[Shen e Yu, 1990]
ácido siríngico (92)	[Lee; Chang, 2000]
Flavonóides	
eucaliptina (93)	1964, [Shen; Yu, 1986]
quercetina (94)	[Shen; Xu, 1987]
miricetina (95)	" "
Heterosídeos	
3- <i>O</i> -glicopiranosil-quercetina (96)	[Shen; Xu, 1987]
3- <i>O</i> -glicopiranosil-miricetina (97)	" "
3- <i>O</i> -rhamnopiranosil-miricetina (98)	" "

Terpenos

<i>p</i> -mentano- <i>cis</i> -3,8-diol (81)	[Shen; Yu, 1986]
<i>p</i> -mentano- <i>trans</i> -3,8-diol (82)	" "
<i>trans</i> -calameneno (99)	[Lee; Chang, 2000]
T-muurulol (100)	" "
α -cadinol (101)	" "
2 β -hidroxi- α -cadinol (102)	" "
ácido linoleico (103)	" "

Triterpenos

esqualeno (104)	[Lee; Chang, 2000]
eritrodiol (105)	" "
ácido morólico (106)	" "
ácido betulínico (107)	" "
cicloeucaleenol (108)	" "
vernolitato de cicloeucaleenila (109)	" "
β -sitosterol (110)	" "
β -sitosteril-3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo	" "
tetraacetato (111)	" "
β -sitostenona (112)	" "

Lignanas

iangambina (113)	[Lee; Chang, 2000]
sesamina (114)	" "

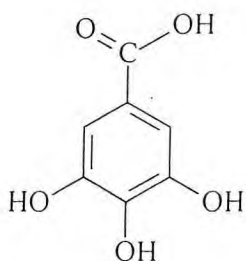
Tanino

castalagin (115)	[Shen e Yu, 1990]
------------------	-------------------

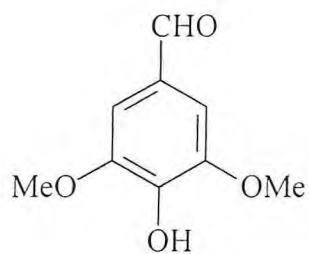
Outros

citriodorina (116)	[Shen; Yu; <i>et al.</i> , 1987]
α -tocoferol (117)	[Lee; Chang, 2000]

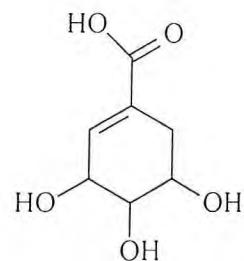
Quadro 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.



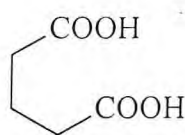
ácido gálico (10)



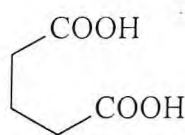
siringaldeído (83)



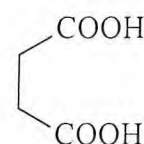
ácido chiquímico (84)



ácido quínico (85)

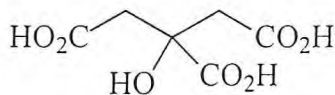


ácido glutárico (86)

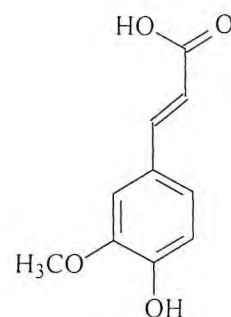


ácido succínico (87)

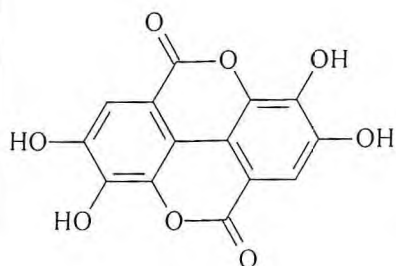
ácido málico (88)



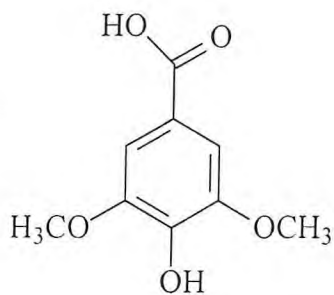
ácido cítrico (89)



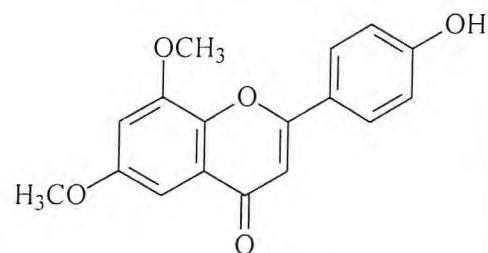
ácido ferúlico (90)



ácido elágico (91)

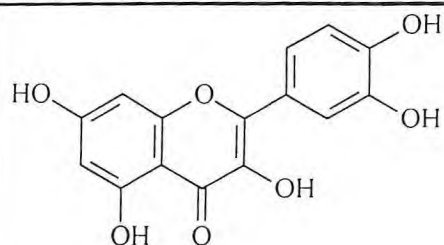


ácido siringico (92)

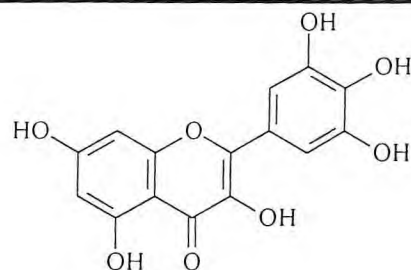


eucaliptina (93)

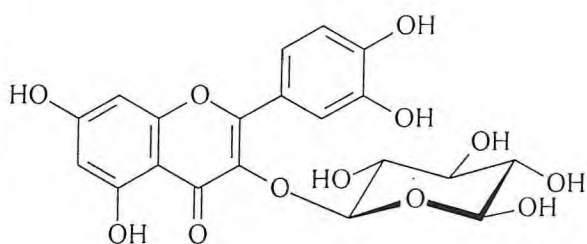
Quadro 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.



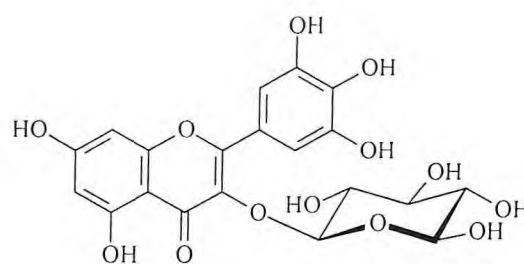
quercetina (94)



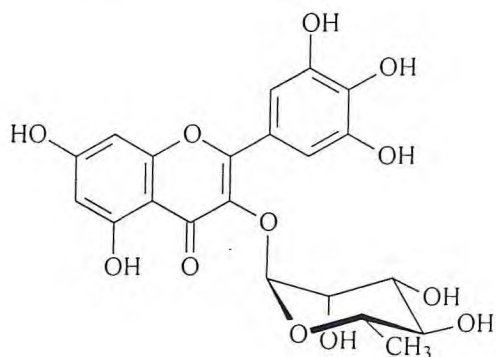
miricetina (95)



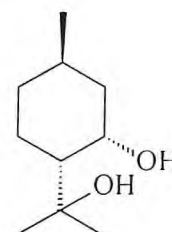
3-*O*-glicopiranosil-quercetina (96)



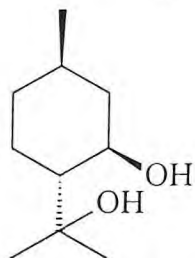
3-*O*-glicopiranosil-miricetina (97)



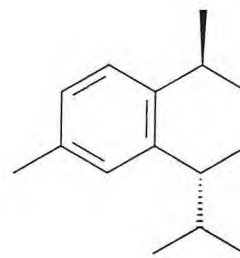
3-*O*-rhamnopiranosil-miricetina (98)



p-mentano-*cis*-3,8-diol (81)

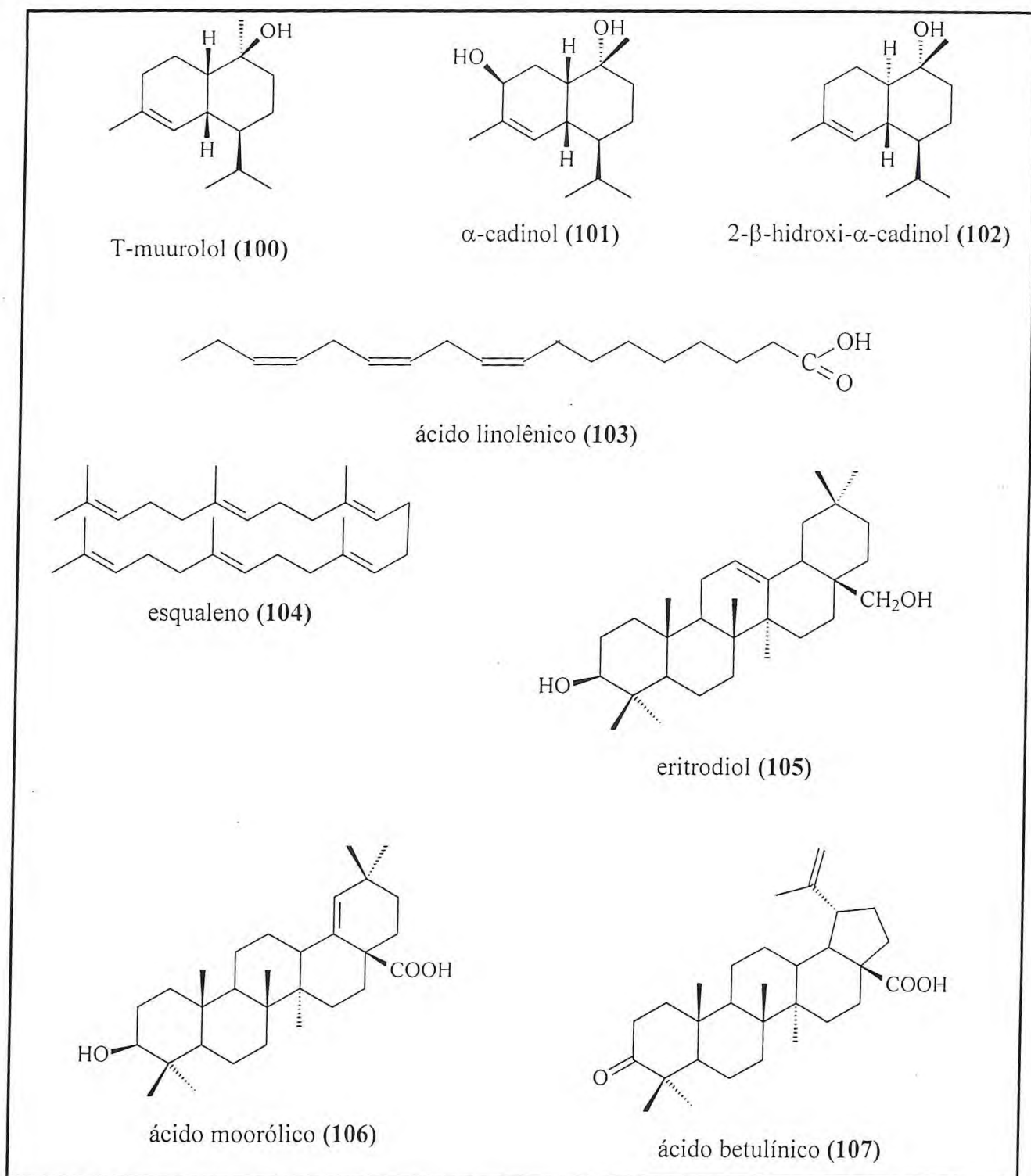


p-mentano-*trans*-3,8-diol (82)

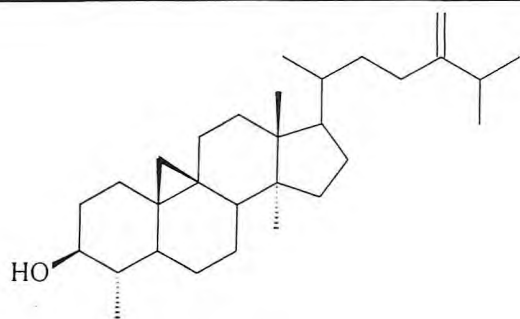


trans-calameneno (99)

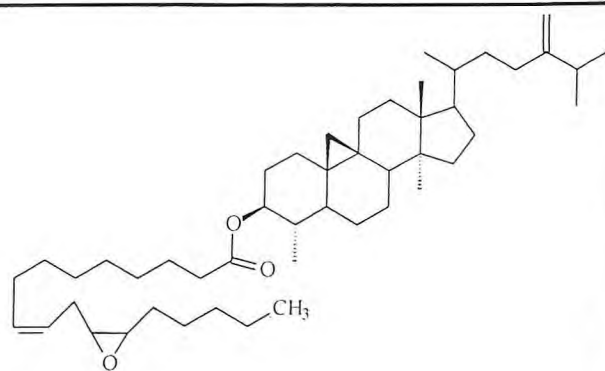
Quadro 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.



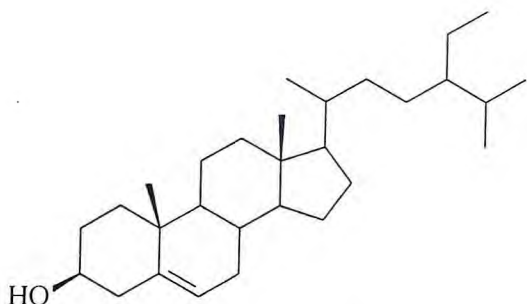
Quadro 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.



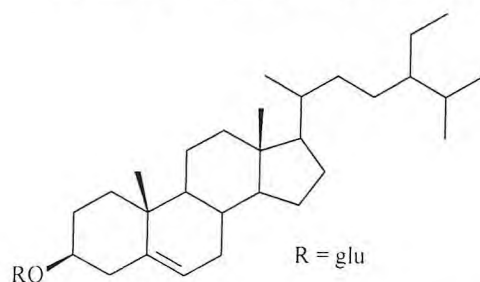
cicloeucaleol (108)



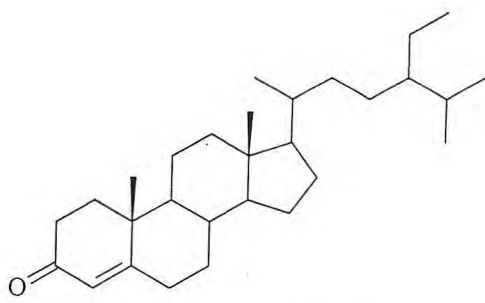
vernolitato de cicloeucalenola (109)



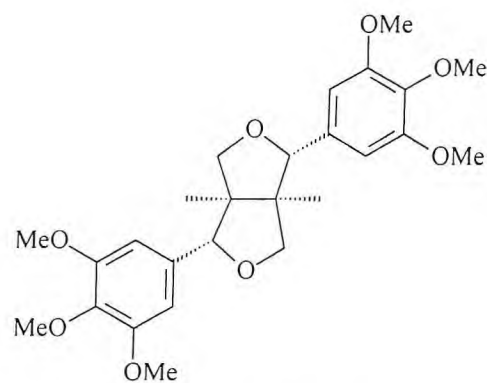
β -sitosterol (110)



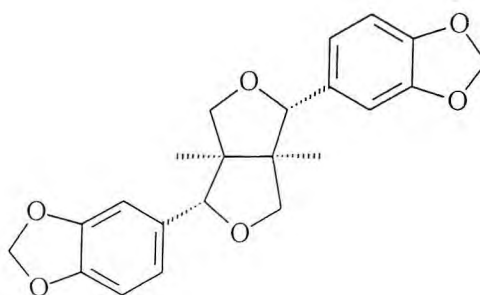
β -sitosterol- β -D-glicopiranosídeo (111)



β -sitostenona (112)

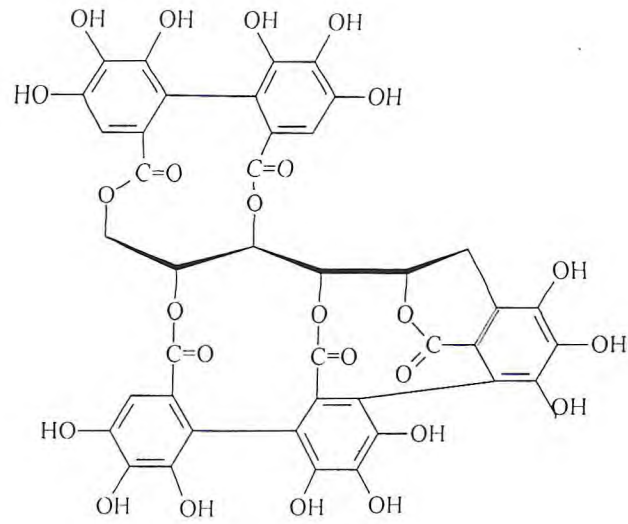


iangambina (113)

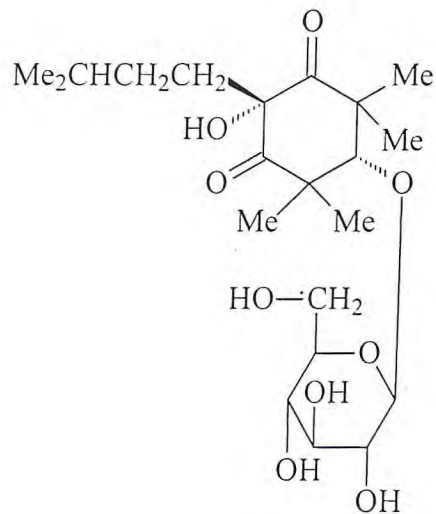


sesamina (114)

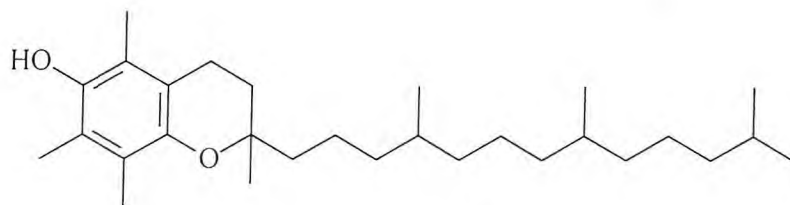
Quadro 2.2 – Constituintes químicos não voláteis isolados de *E. citriodora* Hook.



castalagina (115)



citriodorina (116)



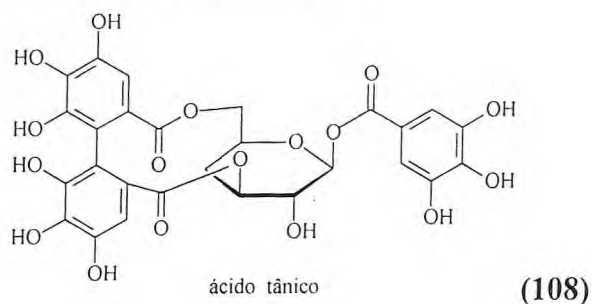
α -tocoferol (117)

2.3. Levantamento Bibliográfico dos Constituintes Químicos Não-Voláteis Isolados de “Kino”

“Kino” do eucalipto é uma exsudação dos caules de várias espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae), originários da Austrália. O exsudato é encontrado, algumas vezes, nas cavidades do tronco da árvore, onde esta se acumula, ou entre a madeira e a casca. O “kino” pode ser obtido por meio de incisões nos troncos que exsudam um líquido espesso que resseca ao sol. O “kino” do eucalipto ocorre como pedaços irregulares, vermelho escuro, frágil, quebradiço e com superfície brilhante.

Os veios de kino são formados pela quebra ou dissolução (lise) de bandas de células do parênquima no xilema ou floema, ocorrendo em resposta a injúrias tais como causadas por insetos, fungos e fogo. Este é um mecanismo de defesa contra as infecções patogênicas [Costello, www.mouget.com/mlinks/lemonweb.pdf acesso em 06/02/2003].

A composição do “kino” do eucalipto parece variar consideravelmente de acordo com as espécies das quais são obtidos. O “kino” apropriado para uso medicinal pode consistir de ácido tânico (118) não gelatinisável, que resulta numa coloração verde com cloreto férrico. Outros constituintes que podem estar presentes são: resina e compostos cristalisáveis como eudesmina (119), taninos glucosídicos, pirocatequina (catecol) (120), catequina (129) e o aromadendrina (4) [Rashwan, 2002].



O interesse pelo kino data de antes de 1800, na Austrália. Dados na literatura indicam que era usado em produtos farmacêuticos (tais como tinturas) e como fonte de tanino [Costello, www.mouget.com/mlinks/lemonweb.pdf acesso em 06/02/2003].

Embora todas as espécies de *Eucalyptus* produzam kino, estas variam na localização do veio e na sensibilidade para nervação. A maioria das espécies forma veios no xilema

(exemplo: *E. ficifolia*, *E. camaldulensis*, *E. nicholli*, *E. globulus*, e *E. viminalis*). Espécies que os formam no floema incluem *E. lehmanii*, *E. clodacalyx*, *E. polyanthemos*, *E. sideratylon* e *E. leucoxyton*. Estes devem ser perdidos quando a casca é retirada. Algumas espécies possuem veios largos e produzem copiosas quantidades de kino (exemplo: *E. ficifolia* e *E. citriodora*).

O “kino” de *Eucalyptus* também é conhecido como “**botany bay kino**” ou “**Australian kino**”, descrito pela primeira vez por Smith, em 1790, era tido como o sumo adstringente da goma marrom da árvore de New Holland (o *E. resinifera*), uma árvore fina e alta pertencente à *Myrtaceae*. Quase todas as espécies de *Eucalyptus* produzem “kino” entretanto, somente uma espécie é de valor comercial, *E. rostrata*, Schlecht., que cresce em grande quantidade ao longo do Rio Murray, na Austrália; esta produz a “Murray red-gum” ou “red-gum kino”.

Há muitos outros exsudatos conhecidos no comércio como “kino”, que são provenientes de plantas ou pertencentes a ordens diferentes. Entre as mais importantes estão:

Kino Africano (*African kino*),

Gambia kino, proveniente de *Pterecorpus erinaceus*, dela obtêm-se o kino genuíno, introduzido na medicina pelo Dr. Fothergill. (1,75% de cinza e 52% de tanino);

Dhak-Tree kino, Butea kino, Bengal kino, Butea gum, Palas kino, Pilas kino, Gum of the Palas (Dhak-tree), produzido pela *Butea frondosa*, Roxburgh.. Contém de 73 a 90% de ácido tânico (108).

East India Kino (ou **Malabar**) kino do oeste da Índia. É obtido da “sea-side grape” (*Coccoloba uvifera*, Linné), uma árvore pertencente a *Polygonaceae*.

South America, Columbia, ou **Caracas kino**, provavelmente fornecido pela mesma árvore do west indian, sendo provavelmente derivado da *Coccoloba uvifera*, Linné. O que difere é que é mais livre de substâncias tanácias.

Myristica kino (Kât jadikai) é um extrato que parece o kino oficial, obtido como exsudato depois de incisões na casca da *Myristica malabarica*, Lamar, uma árvore que cresce para o sul da Índia. O que o distingue do kino oficial é a presença de cristais de tartarato de cálcio.

O “kino” de várias espécies de *Eucalyptus* foi estudado para estabelecer sua composição química. Levantamento bibliográfico no *Chemical Abstract* e na Internet forneceram dados acerca das substâncias isoladas ou identificadas por cromatografia em papel, ou ainda aquelas isoladas por meio de reações realizadas com frações do “kino”, ou com as substâncias isoladas. De posse das informações obtidas na pesquisa bibliográfica foi possível elaborar a Tabela 2.3 (p. 66-67) na qual podem ser observadas as espécies estudadas com seus respectivos constituintes não-voláteis identificados. O Quadro 2.3 (p. 68-70) apresenta as estruturas de todas as substâncias relatadas neste tópico.

Reações realizadas com o kino de *Eucalyptus* possibilitaram determinar fragmentos de moléculas pertencentes a estruturas presentes neste, além de derivados dos constituintes isolados. Mcgooken e Heilbron (1926) obtiveram por meios reacionais com o “kino” de *E. calophylla* o catecol (**120**), o ácido verátrico (**123**) e o ácido pirocatéuico (**124**).

Hillis (1951) realizou estudos cromatográficos com sete espécies de *Eucalyptus*, detectando para os seguintes números de constituintes: *E. calophylla* 12, *E. gonicalyx* 11, *E. corymbosa* 13, *E. radiata* 5, *E. regnans* 4, *E. obliqua* 3 e *E. sideroxylon* 3. Entretanto, somente do *E. calophylla* foram isolados o aromadendrina (**4**) e o kampferol (**126**).

Hillis (1952) em estudos com *E. calophylla* e *E. corymbosa*, conseguiu isolar aromadendrina (**4**), kampferol (**126**), e ácido elágico (**89**). Por meio de aquecimento do aromadendrina, obteve o floroglucinol (**122**), enquanto por meios reacionais, obteve o 7-metilkampferol (**5**).

Satwalekar, Gupta *et al.* (1957), isolaram do “kino” de *E. citriodora* aromadendrina 7-metil éter (**2**), 7-monometil éter kampferol (**5**), ácido elágico (**89**) e dimetil éter aromadendrina e citriodoral (**127**).

Gell, Pinhey *et al.* (1958), isolaram do “kino” de *E. maculata*, 7-metileter aromadendrina (2), narigenina (3), ácido elágico (89), ácido *p*-hidroxicinâmico (125), e. Ainda obtiveram por meio reacional, realizado com um dos compostos isolados, o 7-metileter kampferol (5).

Hillis e Carle (1960), ainda trabalhando com *E. calophylla*, conseguiram, por meio de cromatografia em papel em duas dimensões, detectar 21 constituintes e identificar a (-)-epicatequina (128), (+)-catequina (129), e galocatequina (130). Ainda isolou o pirogalol (121) e a afzelequina (131).

Hillis e Carle (1963) [*in* Hillis e Yazaki, 1974] isolaram a engelitina (133) do “kino” de *E. moluccana* Roxb..

Hillis e Yazaki (1974) identificaram por meio de cromatografia a engelitina (133) em três espécies: *E. astringens*, *E. lehmannii* e *E. platypus*. Ao realizarem reações de degradação ácidas, obtiveram produtos que não eram encontrados em outras partes destas plantas, e identificaram o ácido gálico (10), o ácido elágico (89) e o floroglucinol (122).

Echeverri, Torres *et al.* (1992), isolaram o 7-metileter aromadendrina (2) e testaram a atividade larvicida contra larvas de *Culex* sp.

Abdel-Sattar *et al.* (2000), relatou o isolamento de sakuranetina (1) e 7-metilaromadendrina (2), do “kino” de *E. maculata*. Ainda da mesma espécie, Rashwan (2002), isolou o 7-metilaromadendrina-4'-*O*-(6''-*trans*-*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (6), 1-*O*-cinamoil-6-*O*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo (7), o ácido *p*-hidroxicinâmico (125) e 1,6-*O*-dicinamoil- α -D-glicopiranosídeo (132).

Tabela 2.3 – Constituintes não-voláteis isolados ou identificados nos “kinos” de algumas espécies de *Eucalyptus*.

I = *E. astringens*

II = *E. corymbosa*

III = *E. citriodora*

IV = *E. corymbosa*

V = *E. lehmannii*

VI = *E. maculata*

VII = *E. moluccana* Roxb.

VIII = *E. platypus*

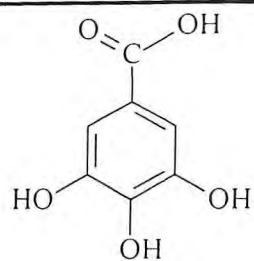
IX = *E. tereticornis*

Substâncias	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
<i>Compostos fenólicos</i>									
catecol (120)		X							
pirogalol (121)		X							
floroglucinol (122)	X				X			X	
<i>Ácidos fenólicos</i>									
ácido gálico (10)	X				X			X	
ácido elágico (89)	X	X	X	X	X	X		X	
ácido verátrico (123)		X							
ácido protocatéquico (124)		X							
ácido <i>para</i> -hidroxicinâmico (125)						X			
<i>Flavonóides</i>									
sakuranetina (1)						X			
7-metiléter aromadendrina (2)			X			X			X
narigenina (3)						X			
aromadendrina (4)		X		X					
7-metiléter kampferol (5)			X						
kampferol (126)		X							
citriodoral (127)			X						
(-)-epictequina (128)		X							
(+)-catequina (129)		X							
galocatequina (130)		X							
afzelequina (131)		X							

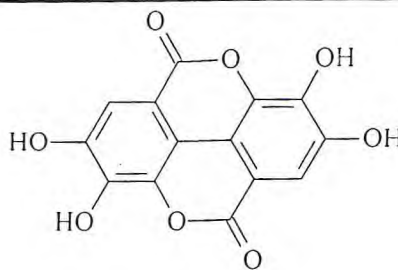
Heterosídeos

4'- <i>O</i> -(6''- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroil)- β-D-glicopiranosídeo-7- metilaromadendrina (6)					X
1- <i>O</i> -cinamoil 6- <i>O</i> -cumaroil- β-D-glicopiranosídeo (7)					X
1,6- <i>O</i> -dicinamoil-α-D- glicopiranosídeo (132)					X
engeletina (133)	X		X	X	X

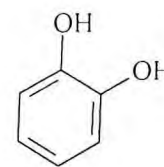
Quadro 2.3 – Constituintes químicos isolados do “kino” de espécies de *Eucalyptus*.



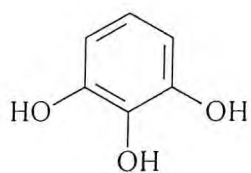
ácido gálico (10)



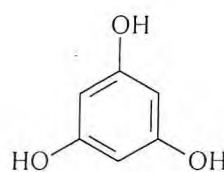
ácido elágico (89)



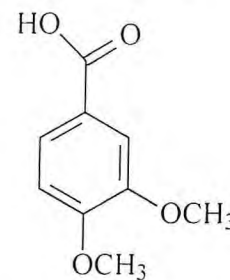
catecol (120)



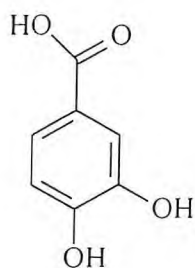
pirogalol (121)



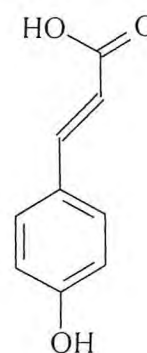
floroglucinol (122)



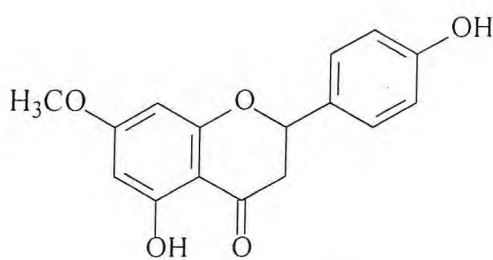
ácido verátrico (123)



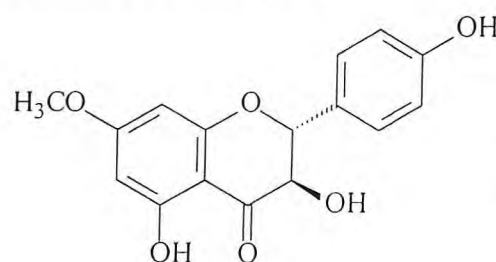
ácido protocatéquico (124)



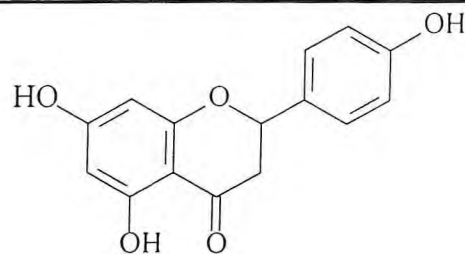
ácido para-hidroxicinâmico (125)



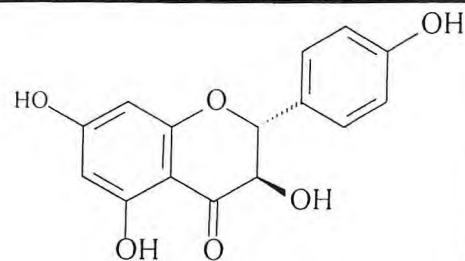
sakuranetina (1)



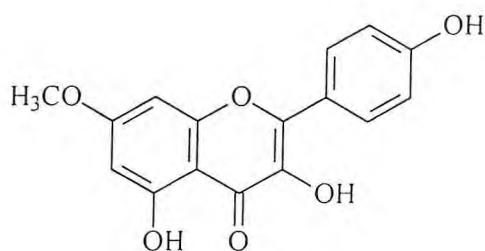
7-metileter aromadendrina (2)

Quadro 2.3 – Constituintes químicos isolados do “kino” de espécies de *Eucalyptus*.

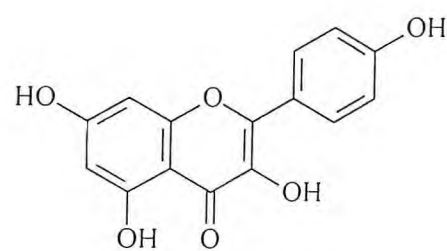
narigenina (3)



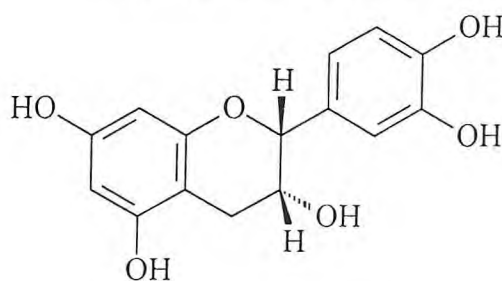
aromadendrina (4)



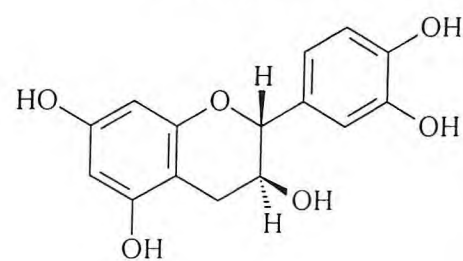
7-metiléter kampferol (5)



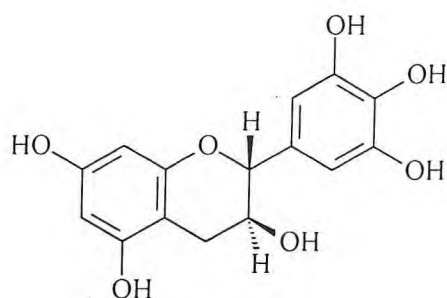
kampferol (126)



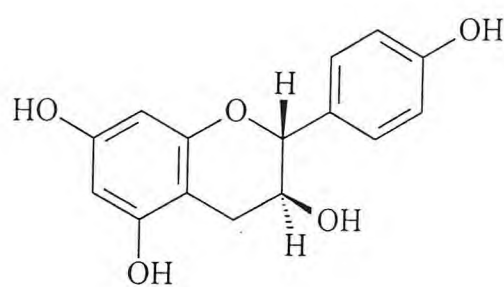
(-)-epicatequina (128)



(+) -catequina (129)

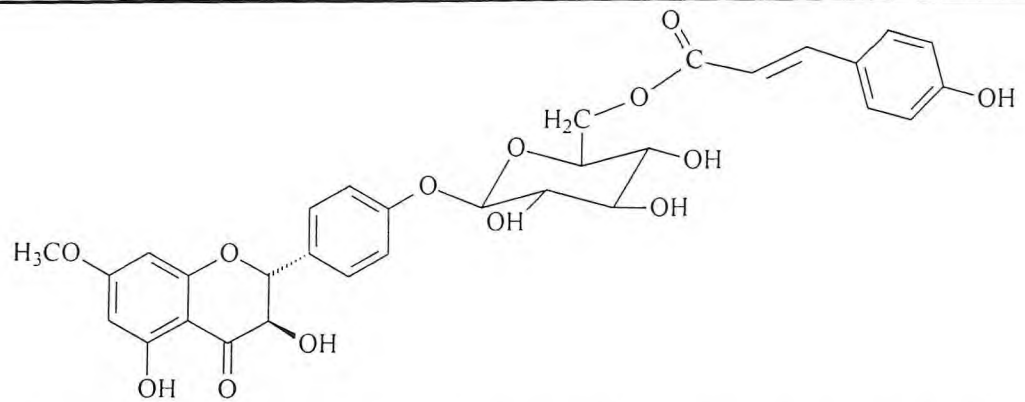


galocatequina (130)

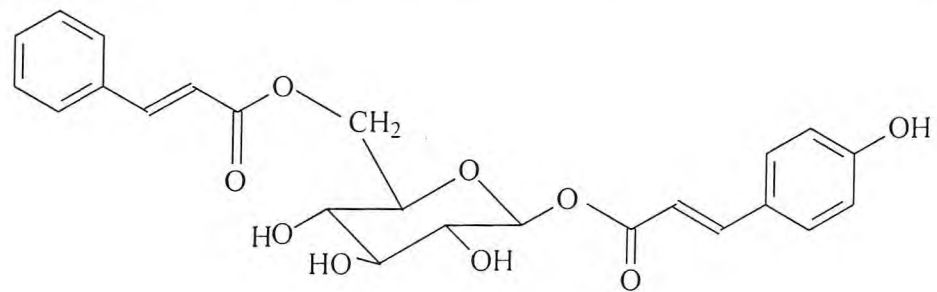


afzelequina (131)

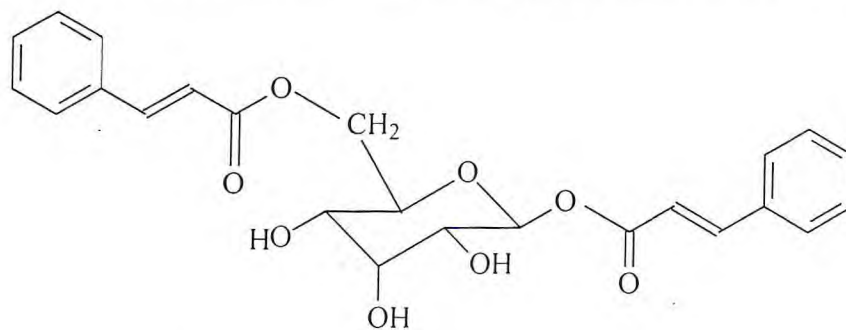
Quadro 2.3 – Constituintes químicos isolados do “kino” de espécies de *Eucalyptus*.



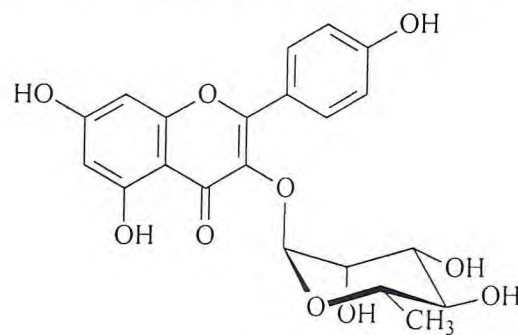
4'-O-(6''-*trans-p*-coumaroil)β-D-glicopiranosídeo)-7-metilaromadendrina (6)



6-O-cinamoil-1-O-cumaroil-β-D-glicopiranosídeo (7)



1,6-O-dicinamoil-α-D-glicopiranosídeo (132)



engeletina (133)

Capítulo 3:

Considerações Gerais sobre as Abelhas

3 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS

3.1 – Generalidades

As abelhas pertencem ao reino ANIMAL, classe dos INSETOS e à ordem HYMENOPTERA. A data exata do aparecimento das primeiras abelhas não é conhecida, mas sabe-se que foi no Cretáceo, já que não existiam flores antes dessa época (140 milhões de anos atrás). Considerando que as primeiras devem ter sido solitárias, tais quais as vespas que as originaram, e a evolução para a vida em sociedade levaria milhões de anos, é de se esperar que tenham surgido por volta de 130 a 120 milhões de anos atrás. O fóssil mais velho de abelha que se conhece possui pelo menos 74 milhões de anos; tratava-se de uma operária da espécie denominada *Trigona prisca*, hoje extinta [Campos, 1983].

Na época do surgimento das abelhas, os continentes atuais do nosso planeta apenas tinham começado a se separar uns dos outros, possibilitando que as abelhas primitivas de então se espalhassem por todos eles. Isso explica porque atualmente encontramos espécies de abelhas nativas em toda a superfície terrestre onde haja flores. Assim sendo, as abelhas são encontradas desde as florestas e matas tropicais, aos locais mais inóspitos como o Ártico, os Andes e Himalaia, regiões semi-áridas (a Caatinga do Nordeste, por exemplo) e desertos como o do Arizona (EUA) e de Israel [Campos, 1983].

A vida em locais tão diversos em climas, vegetações, luminosidades, temperatura, pluviosidade, predadores, opções para nidificação, propiciou o surgimento da diversidade de espécies de abelhas que hoje habitam o planeta, contabilizando mais de 20.000 espécies conhecidas ao redor do mundo. Essas espécies são divididas em famílias de acordo com características semelhantes e maior ou menor proximidade evolutiva [Campos, 1983].

As muitas espécies de abelhas também evoluíram distintamente no que diz respeito à sociabilidade. Enquanto algumas continuaram solitárias, com cada fêmea construindo o seu próprio ninho e criando sozinha alguns poucos filhotes (Stenotritidae, Oxaeidae, Melittidae, Ctenoplectridae e Fideliidae), outras desenvolveram vários níveis de sociabilidade que vão desde o compartilhamento de áreas de nidificação até a formação de colônias permanentes com milhares de indivíduos (Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Anthophoridae e

Megachilidae). A família Apidae é a única que consiste primariamente de abelhas sociais [Campos, 1983].

Na América, quando da chegada dos descobridores, não havia *A. melífera* Linnaeus, a abelha atualmente mais utilizada para produção de mel. Havia, entretanto, muitas espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas por abelhas indígenas sem ferrão, pois possuem o ferrão atrofiado, não sendo capaz de picar, a exceção do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente por Mamangavas, as únicas abelhas sociais nativas do Brasil que possuem ferrão desenvolvido [Campos, 1983].

Os grupos de abelhas que têm desencadeado mais estudos a seu respeito, tornando-se mais conhecidos, são as melíferas do gênero *Apis*, com destaque para *Apis mellifera* (abelhas italianas, africanas e africanizadas), os meliponíneos (sem ferrão), as mamangavas sociais (gênero *Bombus*), as mamangavas "solitárias" (gênero *Xylocopa*) e algumas espécies de abelhas solitárias.

3.2 As Abelhas sem Ferrão

As abelhas brasileiras sem ferrão adquirem grande importância ecológica, pois são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40 a 90% da polinização das árvores nativas. O interesse pela criação de abelhas sem ferrão é justificado na maioria dos casos pelo uso nutricional e terapêutico do mel e pelo fato da sua comercialização promover um aumento da renda familiar, além da atividade servir como fonte de lazer. [Kerr *et. al.*, 1996].

3.2.1 Classificação Zoológica das Abelhas sem Ferrão Nativas do Brasil

Para Kerr e colaboradores (1996), as abelhas sem ferrão nativas do Brasil pertencem à superfamília Apoidea que é subdividida em 8 famílias: Colletidae, Andrenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae. Os Apidae se subdividem em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Os Meliponinae, por sua vez, se dividem em duas tribos: Meliponini e Trigonini.

A tribo Meliponini (abelhas sem ferrão) tem uma distribuição pantropical, a mais diversificada nos Neotrópicos, com 52 gêneros e mais de 500 espécies encontradas nas Américas [Sakagami, 1982; Velthuis, 1997], sendo que aproximadamente 75% destas são espécies restritas à região Neotropical. Esta tribo pode ser facilmente distinguida de outras da subfamília Apinae pela reduzida venação das asas, presença de um penicílio (uma escova de cerdas longas no exterior, superfície apical traseira da tibia), e um ferrão vestigial [Wille, 1979; Wille, 1983; Michener, 1990; Michener, 2000], dentre muitas outras características. A ausência de uma aurícula na traseira basitarsus é uma das maiores características que separa a Meliponini das outras tribos. As espécies incluídas na tribo mostram considerável variedade no tamanho, locais e arquitetura de ninhos [Michener, 1974; Sakagami, 1982]. As castas de fêmeas, rainha e operárias, diferem estritamente na morfologia [Michener, 1974; Wille, 1979].

3.3 O Gênero *Trigona*

Abelhas do gênero *Trigona* com pelo menos 31 espécies, popularmente conhecidas como *xupé*, *mombuca* e *sanharão*, mostram uma variedade de comportamentos defensivos e de habitats para seus ninhos. Este grupo de abelhas é distribuído largamente nos Neotrópicos, do México a Argentina, na Ásia, da Índia e Sri-Lanka a Coreia, na região do Pacífico, Ilhas Carolina e Solomon, do sul da Indonésia e Nova Guiné, e algumas regiões da Austrália [Michener, 2000].

3.3.1 Considerações Zoológicas sobre *Trigona spinipes* Fabricius

A espécie selecionada para este estudo, *Trigona spinipes* Fabricius, é uma das abelhas sem ferrão e tem ampla distribuição geográfica no país.

Reino: Animália

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Hymenoptera

Subordem: Aprocrita

Superfamília Apoidea**Família** Apidae**Subfamília** Meliponinae**Tribos** Meliponini e Trigonini**Gênero** *Trigona***Espécie** *spinipes* Fabricius**Nome popular:** sanharó, irapuá, arapuá, abelha cachorro

Os adultos da abelha “arapuá” (Fig. 3.1) (Fonte: www.ufv.br/dbg/bee/Trigonaspinipes.jpg, acesso: 28/02/2005.), são de coloração preta, têm asas transparentes e medem entre 6 e 8 mm de comprimento por 2,5 mm largura [Chiaradia, 2003].



Figura 3.1- Foto de um espécime de *T.spinipes*.
Fotógrafo. E.R. Silveira.

As abelhas podem transportar pólen de quatro maneiras diferentes, dependendo da Subfamília ou Família a que pertencem. As abelhas *T. spinipes* Fabricius colocam o pólen em uma parte chata ou côncava da tíbia das pernas posteriores cujas margens são contornadas por pêlos rígidos e eretos chamados corbícula (Fig. 3.2). Na parte central da corbícula há um único pêlo longo e meio curvo ao redor do qual o pólen é arrumado [Freitas, 1999].



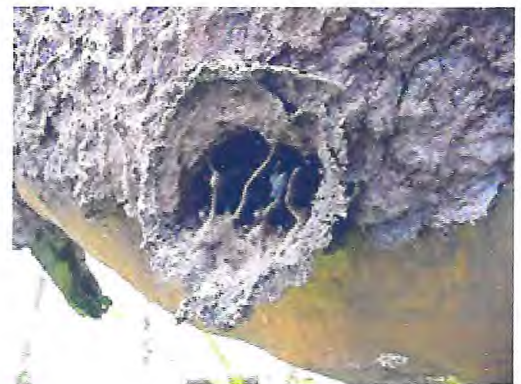
Figura 3.2 – Foto detalhando a corbícula de *T. spinipes* Fabricius . (Fonte: www.ufv.br/dbg/bee/Trigonaspinipes.jpg, acesso: 28/02/2005.).

Uma das formas de diferenciação das espécies é baseada nas características do ninho. No caso do *T. spinipes* Fabricius, seu ninho apresenta as seguintes características: no interior deste se destaca, além da presença de resinas e barro, uma consistente massa composta de materiais diversos, tais como: restos de casulos, abelhas mortas, folhas maceradas e excrementos [Campos, 1983].

O tamanho do ninho entre as espécies é também bastante variado. A *Trigona spinipes* Fabricius constrói ninhos aéreos, de formatos ovais, apoiados em forquilhas de árvores (Fig. 3.3a, p. 73) que chegam a ter mais de 100.000 abelhas [Campos, 1983]. Em geral, para o ninho das abelhas indígenas, existe uma entrada típica situada no centro, ampla e oval, com lamelas internas de cerume das raías convergentes de barro (Fig. 3.3b) que dá passagem só a uma abelha de cada vez. Os favos de cria são horizontais. Não apresentam células reais. Têm invólucro de cerume envolvendo os favos de cria que na espécie *T. spinipes* Fabricius pode conter até três agrupamentos de cria grandes no mesmo ninho. O batume contém muito barro e pouca própolis, não sendo constituído de geoprópolis (mistura de resina com barro) (Nogueira-Neto, 1970).



a



b

Figura 3.3 - Fotos do ninho de *T. spinipes*:. a) ninho construído em árvore exibindo a entrada; b) detalhe da entrada do ninho. Foto obtida na Internet, site: www.ufv.br/dbg/bee/ninhomelipon.htm acesso: 28/02/2005.

3.3.2 Habitat e Diversidade de Plantas Visitadas

Para Silveira e Campos (1995) é bem distinto o conjunto de plantas visitadas pelas abelhas nos diferentes tipos vegetacionais, mesmo quando se consideram as áreas de uma mesma vegetação. Estes autores revelaram que a caatinga foi o domínio mais isolado, comparativamente ao do cerrado, dos Planaltos da Araucária e Mata Atlântica. Viana (1999) atribuiu à caatinga baixa similaridade entre localidades, ao verificar variação expressiva da fauna de abelhas.

Algumas espécies vegetais são freqüentemente visitadas por estas abelhas, da quais se destacam os citros (*Citrus* spp.) e as bananeiras (*Musa* spp.), culturas nas quais a presença destes insetos é indesejável. Acácias (*Acacia* spp.), “pinheiro-brasileiro” (*Araucaria angustifolia*), figueiras (*Ficus* spp.), roseira (*Rosa* spp.), são outras plantas muito procuradas para coleta de resinas [Chiaradia, 2003].

Recentemente foi constatado o ataque deste himenóptero em plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, em reflorestamentos situados na região de Oeste Catarinense. [Chiaradia, 2003].

3.4. Considerações sobre a Química dos Produtos das Abelhas

Dentre os produtos que as abelhas podem oferecer, destacam-se o mel, a cera, a própolis, a geléia real, o pólen e apitoxina (veneno) que podem ser explorados comercialmente, além da ação polinizante [Freitas, 1999].

Estudos já foram realizados sobre a composição do pólen, mel e principalmente da própolis. Estes possibilitaram a identificação de diversas classes de compostos, tais como hidrocarbonetos [Negri, Marcucci *et al.*, 2000], compostos fenólicos [Usia, Banskota *et al.*, 2002], triterpenos [Ito, Chang *et al.*, 2001] e uma grande variedade de flavonóides [Siess, Le Bon *et al.*, 1996; Lins, Silva *et al.*, 2003]. A Tabela 3.1 (pp. 78-79) apresenta uma lista de compostos isolados destes produtos das abelhas com as estruturas apresentadas no Quadro 3.1 (pp. 80-82).

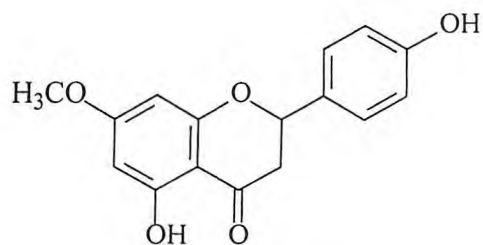
Tabela 3.1 – Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas.

Substâncias	Mel	Pólen	Própolis	Referências
<i>Flavonóides</i>				
sakuranetina (1)			X	Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Park, Koo <i>et al.</i> , 1997
naringenina (3)		X		
isorhamnetina (14)		X		Lins, Silva <i>et al.</i> , 2003
trictina (15)		X		Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Seixas, Silva <i>et al.</i> , 2003
quercetina (92)	X	X	X	Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Lins, Silva <i>et al.</i> , 2003; Park, Koo <i>et al.</i> , 1997
miricetina (93)	X	X		Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Lins, Silva <i>et al.</i> , 2003
pinocembrina (134)	X		X	Siess, Le Bon <i>et al.</i> , 1996
pinobanksina (135)	X		X	"
galangina (136)	X		X	Siess, Le Bon <i>et al.</i> , 1996; Park, Koo <i>et al.</i> , 1997
crisina (137)	X		X	"
tectocrisina (138)			X	"
apigenina (139)			X	Park, Koo <i>et al.</i> , 1997
kampferol (126)	X		X	Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Park, Koo <i>et al.</i> , 1997
rhamnetina (140)			X	"
3,7,4'5'-tetrametiléter	X		X	Isabel, Moncef <i>et al.</i> , 1997
miricetina (141)				
luteolina (142)	X			Martos, Ferreres <i>et al.</i> , 2000; Seixas, Silva <i>et al.</i> , 2003
selagenina (143)		X		Seixas, Silva <i>et al.</i> , 2003
8-metóxi-kampferol (144)		X		"
diidromiricetina (145)		X		Lins, Silva <i>et al.</i> , 2003

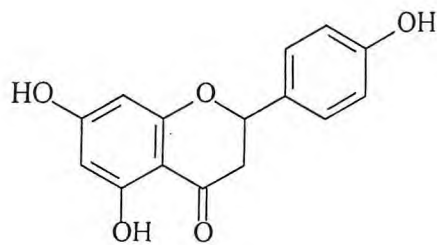
Triterpenos

meliferona (146)	X	Ito, Chang <i>et al.</i> , 2001
ácido morônico (147)	X	"
ácido betulínico (148)	X	"
ácido anwuweizonico (149)	X	"

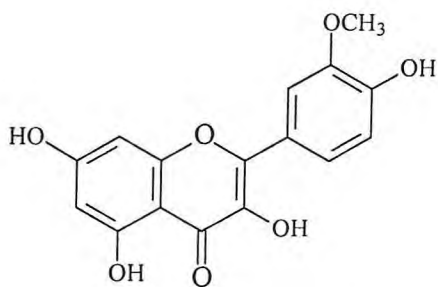
Quadro 3.1- Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas.



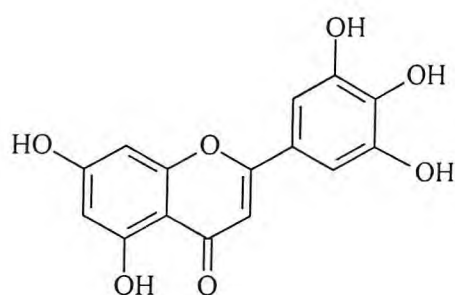
sakuranetina (1)



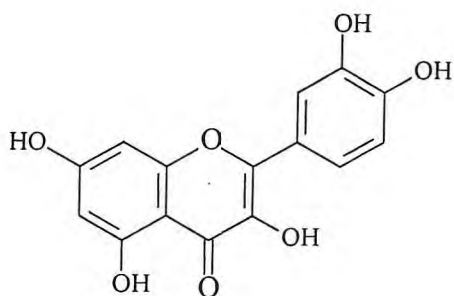
naringenina (3)



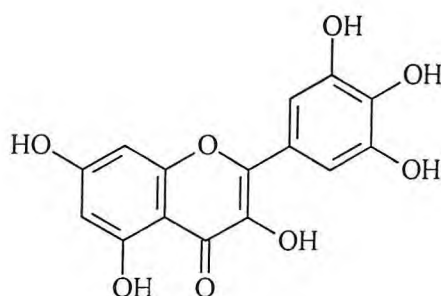
isorhamnetina (14)



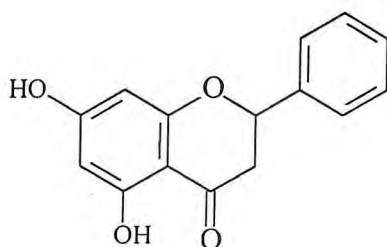
tricetina (15)



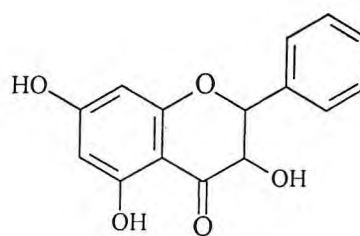
quercetina (92)



miricetina (93)

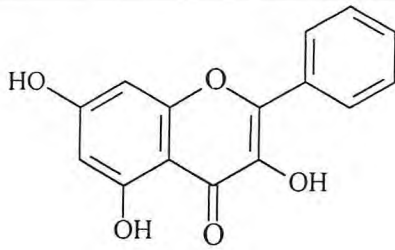


pinocembrina (134)

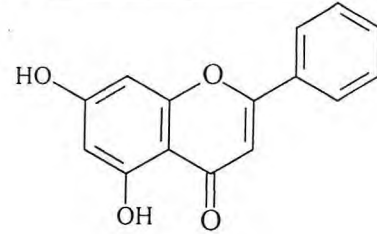


pinobankisina (135)

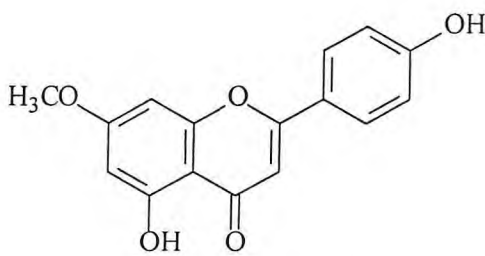
Quadro 3.1- Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas. (Cont.)



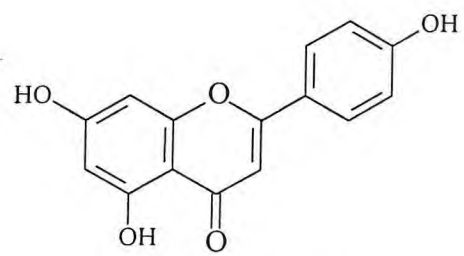
galangina (136)



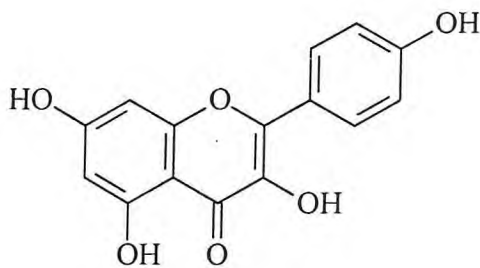
crisina (137)



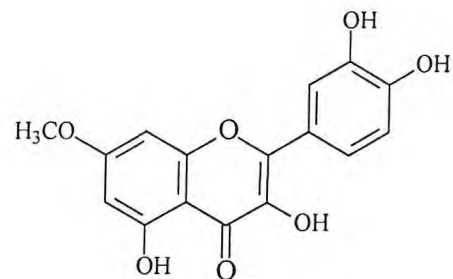
tectocrisina (138)



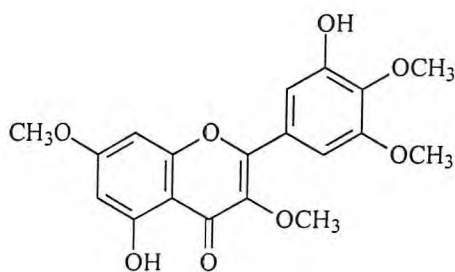
apigenina (139)



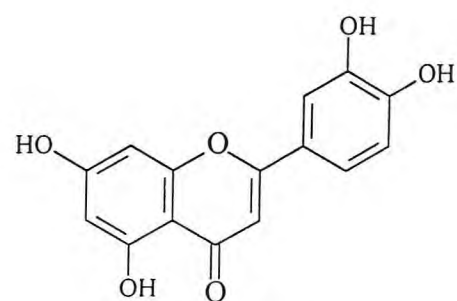
kampferol (126)



rhamnetina (140)

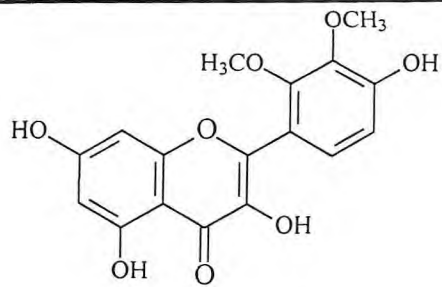


3,7,4',5'-tetrametileter miricetina (141)

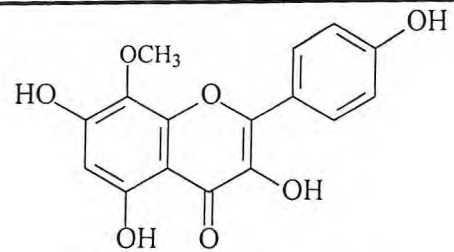


luteolina (142)

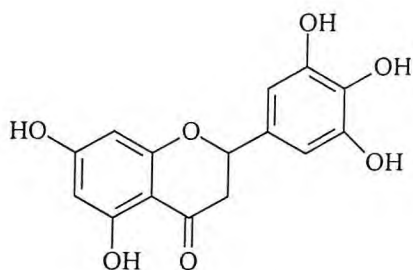
Quadro 3.1- Constituintes químicos isolados de mel, pólen e própolis de abelhas. (Cont.)



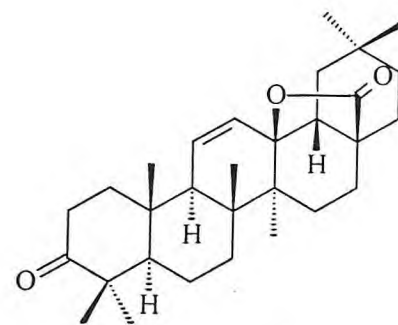
selagenina (143)



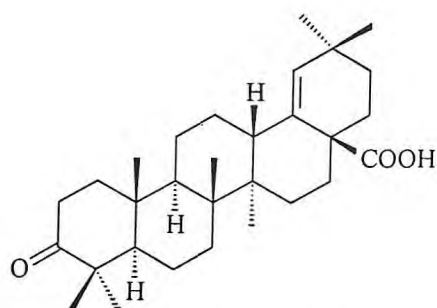
8-metoxi-kampferol (144)



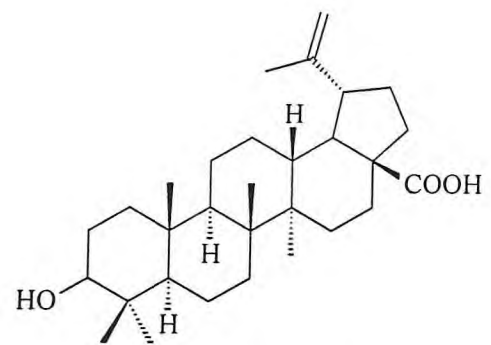
diidromiricetina (145)



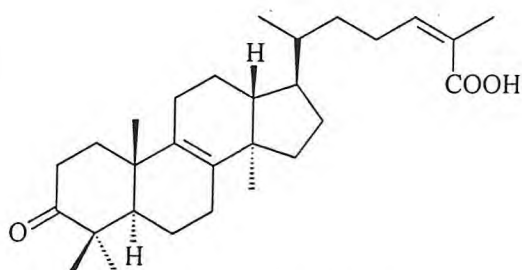
meliferona (146)



ácido morônico (147)



ácido betulínico (148)



ácido anwuweizônico (149)

Capítulo 4:

Considerações Botânicas

4 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

4.1 Considerações Botânicas sobre a Família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende cerca de 3.500 espécies, subordinadas a aproximadamente 100 gêneros, cujos dois principais centros de desenvolvimento são: a América tropical e a Austrália, havendo alguns registros nas regiões temperadas.

O aspecto da maioria dos caracteres desta família é muito semelhante, o que torna difícil o trabalho de identificação e classificação das espécies, por isso a sistemática dessa família exige um levantamento cuidadoso das espécies, aliados a estudos de biosistemática [Barroso, 1986].

A família Myrtaceae é constituída por plantas lenhosas em forma de arbustos e árvores altas; folhas simples, inteiras, opostas, sem estípulas; as nervuras laterais se anastomosam entre si na sua extremidade por meio de uma nervura marginal ou formando arcos. O limbo apresenta pontos glandulosos translúcidos, cheios de essências aromáticas, muito características para os diversos gêneros [Legrand, Klein, 1978].

Muitas vezes pode-se reconhecer a família, e em alguns casos até os gêneros, observando as características acima citadas e friccionando as folhas a fim de sentir um aroma característico, como no caso da pitangueira, da goiabeira, da guabirobeira e do eucalipto [Legrand, Klein, 1978].

4.2 Considerações sobre *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* foi nomeado por L'Héritier em 1788, sendo a palavra de origem grega *eu* “bem” e *kalypto* “cubro”, em alusão aos opérculos que recobrem os estames até estarem bem desenvolvidos [Guenther, 1972].

Eucalyptus pertence à família Myrtaceae e é um gênero de árvores aromáticas que compreende mais de 500 espécies nativas da Austrália, Tasmânia e ilhas vizinhas. Várias espécies são cultivadas, particularmente em regiões de clima sub-tropical e regiões temperadas devido a seu valor medicinal e econômico. As folhas de algumas espécies são usadas para a produção de óleo essencial. [Siddiqui, Sultana *et al.*, 2000].

Além das espécies existentes ainda há a ocorrência de vários quimiotipos, um exemplo a ser citado é o do *E. citriodora* Hook para o qual há o registro de quatro quimiotipos [Penfold and Willis, 1953].

O eucalipto foi introduzido no Brasil em 1868, no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro. Até o início do século, as espécies de *Eucalyptus* eram utilizadas apenas para a arborização de ruas ou como quebra ventos. A cultura em larga escala foi iniciada em 1903, no estado de São Paulo com o objetivo de produzir madeira para lenha. Porém, atualmente, a madeira de eucalipto é utilizada na construção civil, construções rurais e é crescente o uso na indústria moveleira [www.remade.com.br/revista/matéria.php?edicao=75&id=400, acesso em 16/05/2005].

Pio Corrêa descreveu as características de algumas espécies de *Eucalyptus*, dentre elas o *E. citriodora* e o *E. tereticornis*, ambos objeto de estudo nesta tese. Segundo ele, as folhas de quase todas as espécies deste gênero têm formas variáveis conforme a idade, sendo as inferiores em geral opostas e as superiores quase sempre alternadas. Nas descrições que se seguem sobre as espécies estudadas, as árvores são consideradas adultas e conseqüentemente, as folhas apresentam sua forma definitiva [Corrêa, 1984].

4.2.1 Considerações Botânicas sobre *Eucalyptus citriodora* Hook.

A literatura relata a ocorrência de quatro quimiotipos para o *E. citriodora* Hook [Penfold and Willis, 1953].

Moudachirou *et al.* (1999), descreveram as variedades como sendo:

- Um tipo dominante, variedade rica em citronelal, com teor acima de 65%.
- Variedade A, contendo citronelol, acetato de citronelila e citronelal, variando de 1 a 14%.
- Uma "forma intermediária" caracterizada pela presença de quantidades de citronelal entre 20 e 50% e guaiacol.
- Uma "forma hidrocarbonada" contendo uma pequena porcentagem de citronelal (<10%) juntamente com hidrocarbonetos.

De acordo com Corrêa, 1984, *E. citriodora* Hook (Fig. 4.1, p. 87), é descrita como segue:

“Árvore grande, vistosa, elegante, até 32 m de altura, caule reto e liso; casca quase branca desprendendo-se em lâminas finas; folhas variáveis, compridas, estreitas, nervadas, glabras, de cor igual e vernicosas nas duas páginas; flores numerosas dispostas em racimos compostos e curto-pendunculados; fruto cápsula ovóide ou globosa, truncada, comprida nos bordos; opérculo hemisférico. Fornece madeira amarela, castanha ou acinzentada, flexível, rija, forte e de grande durabilidade, própria para construção naval e civil...”

“...Espécie de alto valor pela sua madeira e pelo seu rápido crescimento, sendo uma das mais indicadas para secar terrenos brejosos, graças a grande extensão de suas raízes e a sua notável força de absorção de água...”

“...As folhas têm aroma idêntico ao da erva cidreira e delas se extrai óleo essencial altamente volátil, constituído em parte por citronelal e em parte por geranial; as flores são valiosíssimas para a apicultura. Sinônimos: *E. limão*. Lemon-scented, Gum tree.” [Corrêa, 1984].

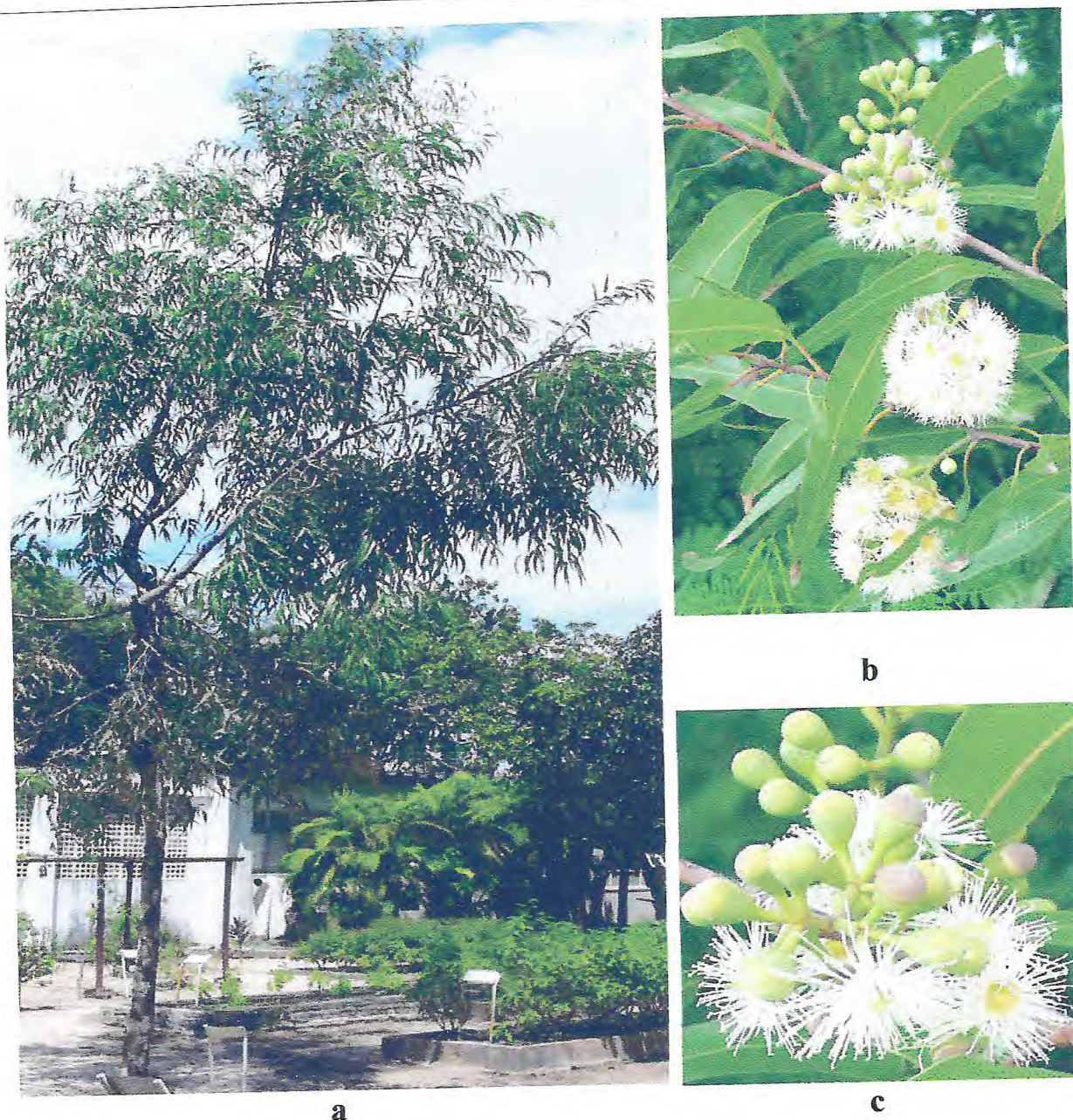


Figura 4.1 – Fotos de um espécime de *Eucalyptus citriodora* Hook encontrado no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, na Universidade Federal do Ceará: **a)** Árvore completa; **b)** Detalhes de um ramo com folhas e inflorescência; **c)** Detalhes da inflorescência com flores abertas e botões florais recobertos pelo opérculo (parte marron sobre os botões). Foto Prof. E. R. Silveira.

4.2.1.1 Mudança no Nome do *Eucalyptus citriodora*

Existem dois grupos de plantas que podem ser chamadas de eucalipto. Um deles é o gênero *Eucalyptus*, que é o maior, e o outro é *Angophora*, o menor. Este gênero é composto de sete espécies que ocorrem naturalmente no New South Wales e Queensland. *Angophora* difere do *Eucalyptus* em vários aspectos, porém, o mais conhecido é que suas flores têm pétalas [Barrow, www.farrer.riv.csu.edu/ASGAP/APOL19/sep00.3.html, acesso em 06/02/2003].

Eucalyptus era dividido em cerca de sete ou mais grupos, denominados sub-gêneros. Um dos sub-gêneros eram os “bloodwoods”, conhecidos como *Corymbia*. Dentro desta classificação podem ser citadas árvores como *E. calophylla*, *E. ficifolia*, *E. citriodora* (“lemon scented gum”) e o *E. maculata* (“spotted gum”). Um outro sub-gênero era o “ghost gum” que conta como representante o *E. tessellareis*. Este sub-gênero era denominado *Blakella*. Na tentativa de simplificar estas divisões, Hill e Johnson (1995) publicaram um artigo no qual argumentaram que seria lógico promover os sub-gêneros combinados “bloodwoods” e “ghost gums” ao gênero *Corymbia*. O fato foi reforçado pelos estudos que um grupo de Melbourne realizaram com DNA cujas conclusões foram semelhantes [Barrow, www.farrer.riv.csu.edu/ASGAP/APOL19/sep00.3.html, acesso em 06/02/2003].

O ATSC (The Australian Tree Seed Centre) agora reconhece estes subgêneros como um gênero distinto. Então, espécies comumente conhecidas como “bloodwoods”, tais como *E. maculata* (Spotted Gum) e *E. citriodora* (Lemon Scented Gum) possuem um novo nome genérico e serão conhecidas como *Corymbia maculata* e *Corymbia citriodora*, respectivamente [www.ffp.csiro.au/tigr/atscmain/taxonomy/cory.html]

4.2.2 Considerações Botânicas sobre *Eucalyptus tereticornis* Smith.

De acordo com Corrêa (1984), *E. tereticornis* Smith (Fig. 4.2, p. 90), é descrita como segue:

“Árvore de caule reto e porte piramidal, acinzentado-brancacenta, lisa, caduca; folhas pêndulas, lanceoladas ou ovado-oblongas, agudas, direitas ou arqueadas, até 15 cm de comprimento, coriáceas, da mesma tonalidade verde nas duas páginas; flores brancas, grandes, 7-9, raramente mais, reunidas em umbelas axilares pendunculadas; fruto cápsula pequena, em forma de pião, quase esférica, valvas muito exsertas; opérculo abruptamente agudo, freqüentemente obtuso, brancacento, 3-4 vezes mais comprido que o cálice. – Fornece madeira avermelhada, dura, resistente, pesada e bastante conhecida no comércio, própria para obras do chão, construção civil, dormentes, fabricação de papel, peso específico 0,793.

... Tem a vantagem de crescer rapidamente, melhor em terrenos arenosos, secos ou úmidos, preferindo os últimos, suportando condições mais desfavoráveis e resistindo a temperaturas altas ou baixas. Cresce até 15 m em quatro anos. A casca encerra de 4 a 4,9% de tanino. Como uma das mais belas do gênero, foi introduzida na arborização de Belo Horizonte. Sinônimos: Flooded Gum, Red Forest Gum, Red Gum Tree e Slaty Gum Tree.”



Figura 4.2 – Fotos de um espécime de *Eucalyptus tereticornis* Smith encontrado no Campus do Pici - Universidade Federal do Ceará: **a)** Árvore completa; **b)** Detalhes de um ramo com folhas e inflorescência. Foto Prof. E. R. Silveira.

Capítulo 5:

Constituintes Voláteis

5.0 CONSTITUENTES VOLÁTEIS

5.1 Determinação da Composição Química de Óleos Essenciais de *Eucalyptus*.

O estudo dos componentes químicos voláteis dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. tereticornis*, foi realizado a partir de amostras das folhas de um mesmo espécime para cada, coletadas no ano de 2003, em horários diferentes no decorrer de um dia, como também numa única hora em diferentes meses do ano.

As folhas de *Eucalyptus* coletadas foram submetidas ao processo de hidrodestilação, em aparelho doseador do tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb [Gottlieb e Magalhães, 1960]. Os procedimentos referentes à coleta e a obtenção dos óleos essenciais estão descritos nos itens 7.1 (p. 282) e 7.4 (p. 287), respectivamente. A análise dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se CGL/EM. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por meio da comparação com espectros de massas do banco de dados (espectroteca) [Alencar *et al.*, 1984], combinada com a determinação dos índices de Kovats simulados [Alencar *et al.*, 1990], e também por comparação com dados da literatura [Adams, 2001].

Os cromatogramas correspondentes a cada óleo essencial analisado registraram a presença de vários componentes e os espectros de massa dos componentes identificados podem ser observados nas Figuras de 5.10 a 5.42 (p. 112 - 120).

5.1.1 Estudo da Variação Química Circadiana e Sazonal dos Óleos Essenciais das Folhas de *E. citriodora* e *E. tereticornis*.

Estudos indicam que os óleos essenciais sofrem, em maior ou menor magnitude, variações na sua composição química, de acordo com o método de extração [Betts, 2000], estágio de vida da planta [Elkeiy, Darwish *et al.*, 1964] e horário da coleta [Moudachirou, Gbên ou *et al.*, 1999].

Neste trabalho relataram-se os resultados obtidos com o monitoramento da composição química dos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* e de *E. tereticornis*, obtidos no decorrer de um mesmo dia e de amostras coletadas em diferentes meses do ano, visando avaliar a variação circadiana e sazonal, respectivamente.

Foram realizadas cinco coletas das folhas de um mesmo espécime, para cada espécie, no mês de janeiro, nos horários de 6:00h, 9:00h, 12:00h, 15:00h e 18:00 destinadas à análise circadiana. Os dados referentes ao procedimento encontram-se dispostos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Dados da extração dos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith para o estudo da variação química circadiana.

	Horário da Coleta	Peso das Folhas (g)	Volume do Óleo (mL)	Teor (%)
<i>E. citriodora</i>				
	6:00 h	260,0	6,7	2,6
	9:00 h	142,0	4,8	3,4
	12:00 h	125,0	3,3	2,6
	15:00 h	141,8	4,0	2,8
	18:00 h	148,8	3,3	2,2
<i>E. tereticornis</i>				
	6:00 h	261,5	3,0	1,1
	9:00 h	159,5	1,8	1,1
	12:00 h	128,4	1,4	1,1
	15:00 h	148,4	1,8	1,2
	18:00 h	182,6	1,0	0,5

O Gráfico 5.1 representa a variação dos teores (percentuais) de óleos obtidos nas extrações realizadas, podendo-se observar que no horário de 9:00 h, para o *E. citriodora*, houve uma maior produção de óleo, enquanto às 18:00 h foi registrado um declínio. Já para o *E. tereticornis*, a produção de óleo manteve-se constante ao longo do dia, declinando, também, às 18:00 h.

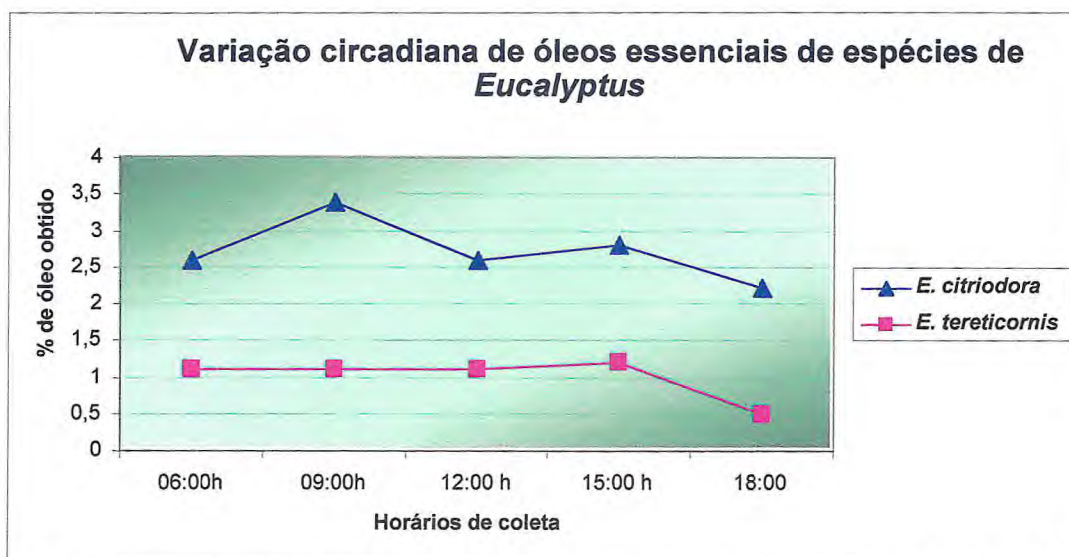


Gráfico 5.1 – Representação da variação dos teores de óleo essenciais obtidos ao longo do dia para as espécies *E. citriodora* e *E. tereticornis*.

Foram realizadas seis coletas das folhas de um mesmo espécime, para cada espécie, nos meses de janeiro (a amostra de 9:00h da coleta já mencionada) a julho (excetuando abril), sempre no horário de 9:00h, destinadas à avaliação sazonal. Os dados referentes a cada espécie encontram-se dispostos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Dados da extração dos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith para o estudo da variação química sazonal.

	Mês do Ano	Peso das Folhas (g)	Volume do Óleo (mL)	Teor (%)
<i>E. citriodora</i>				
	Janeiro	142,0	4,8	3,4
	Fevereiro	145,7	5,3	3,6
	Março	148,0	3,9	2,6
	Maio	97,4	3,0	3,1
	Junho	129,1	4,3	3,3
	Julho	131,1	3,5	2,7
<i>E. tereticornis</i>				
	Janeiro	159,5	1,8	1,1
	Fevereiro	144,2	0,7	0,5
	Março	152,8	1,7	1,1
	Maio	147,3	1,3	0,9
	Junho	182,2	2,0	1,1
	Julho	145,0	*	-

* Processo interrompido por problemas técnicos.

O Gráfico 5.2 representa a variação dos teores (percentuais) de óleos obtidos nas extrações realizadas nos meses citados, podendo-se observar que fevereiro representou o mês de maior produção de óleo para o *E. citriodora*, porém sendo o de menor produção para o *E. tereticornis*. Não obstante, enquanto nos demais meses houve variação na produção oleífera para o *E. citriodora*, para o *E. tereticornis*, permaneceu praticamente constante.

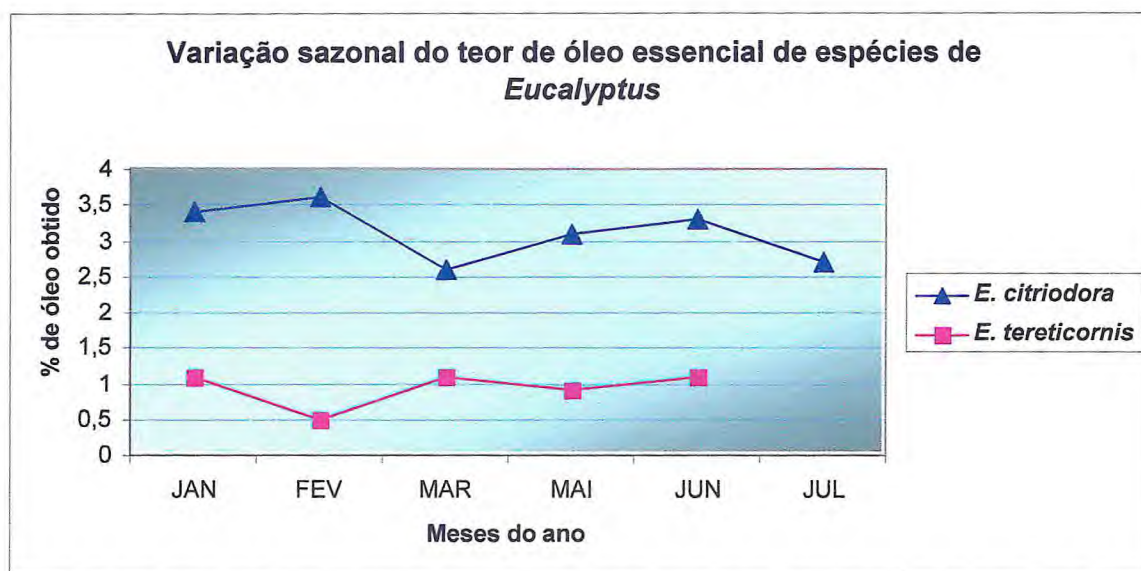


Gráfico 5.2 – Monitoramento da variação sazonal de *E. citriodora* e *E. tereticornis* observados no período de janeiro a julho de 2003

As coletas foram todas realizadas em Fortaleza, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. As amostras coletadas foram imediatamente submetidas à hidrodestilação e os óleos obtidos, analisados por CGL/EM.

A determinação dos constituintes de cada espécie foi realizada separadamente, sendo elaboradas Tabelas (5.3, p. 97 e 5.5, p. 103) referentes à variação da composição química circadiana e Tabelas (5.4, p. 100 e 5.6, p. 107) comparando a variação da composição química sazonal destes.

Ainda para o *E. citriodora*, foram coletadas folhas da localidade do Lulas' Buffet, em Fortaleza, e o resultado da análise dos constituintes do óleo encontram-se descritas na Tabela 5.7 (p. 111).

5.1.1.1 *Eucalyptus citriodora* – Variação Química Circadiana

Os cromatogramas selecionados para este procedimento de análise dos óleos essenciais foram os obtidos no mês de janeiro, nos horários de coleta de 6:00 h (Fig. 5.1, p. 93), por apresentar somente três constituintes e o de 18:00 h (Fig. 5.2, p. 93), por apresentar oito constituintes, porém, somente quatro foram identificados.

A Tabela 5.3, apresenta o percentual (teor %) dos principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *E. citriodora*. A análise dos óleos essenciais obtidos aponta o citronelal (40) como constituinte majoritário, com um teor variando de 60,6 a 90,3 %, seguido pelo β -citronelol (47), variando de 6,2 a 21,8%. O isopulegol (38) foi identificado como constituinte minoritário, cujo teor variou de 2,9 a 6,0%.

Tabela 5.3 – Composição química circadiana do óleo essencial de *E. citriodora* Hook

Compostos	Percentual				
	6:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h
Isopulegol (38)	3,5	6,0	4,3	2,9	5,7
Citronelal (40)	90,3	60,6	63,1	64,1	67,9
β -citronelol (47)	6,2	21,5	21,8	21,5	14,5
acetato de citronelila (56)	-	10,5	9,8	10,2	8,4
TOTAL	100,0	98,6	99,0	98,7	96,5

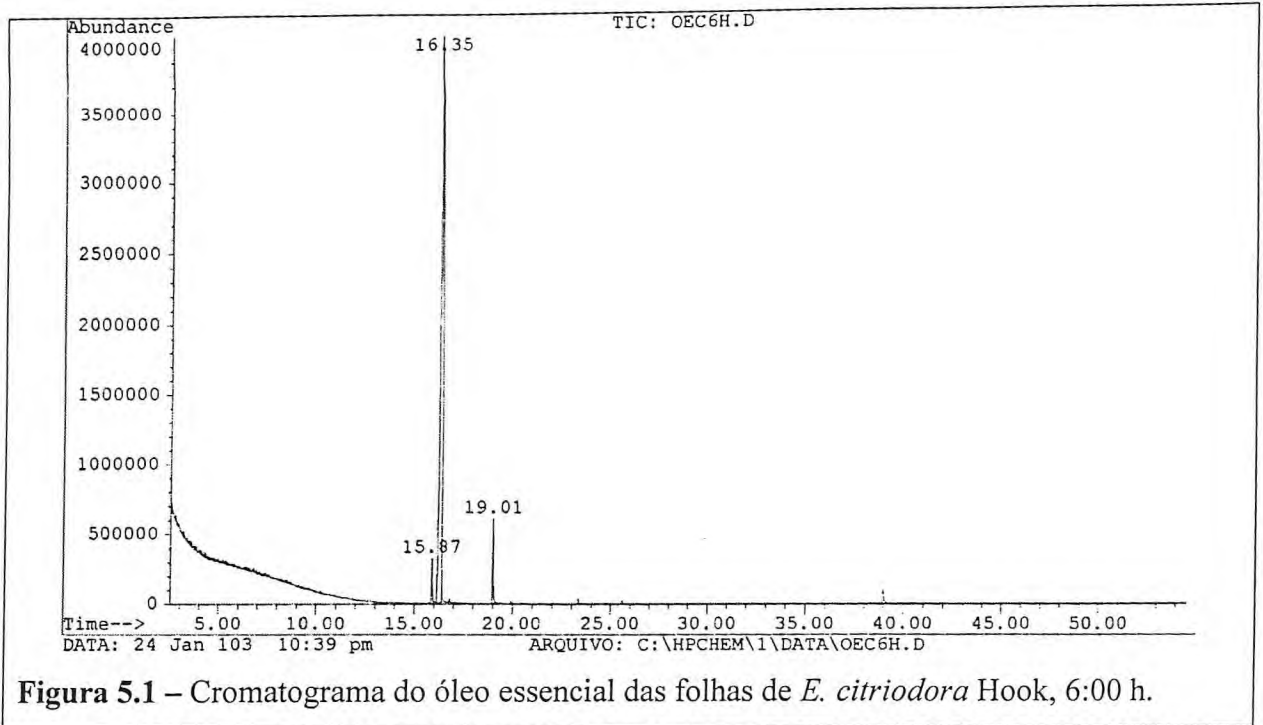


Figura 5.1 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook, 6:00 h.

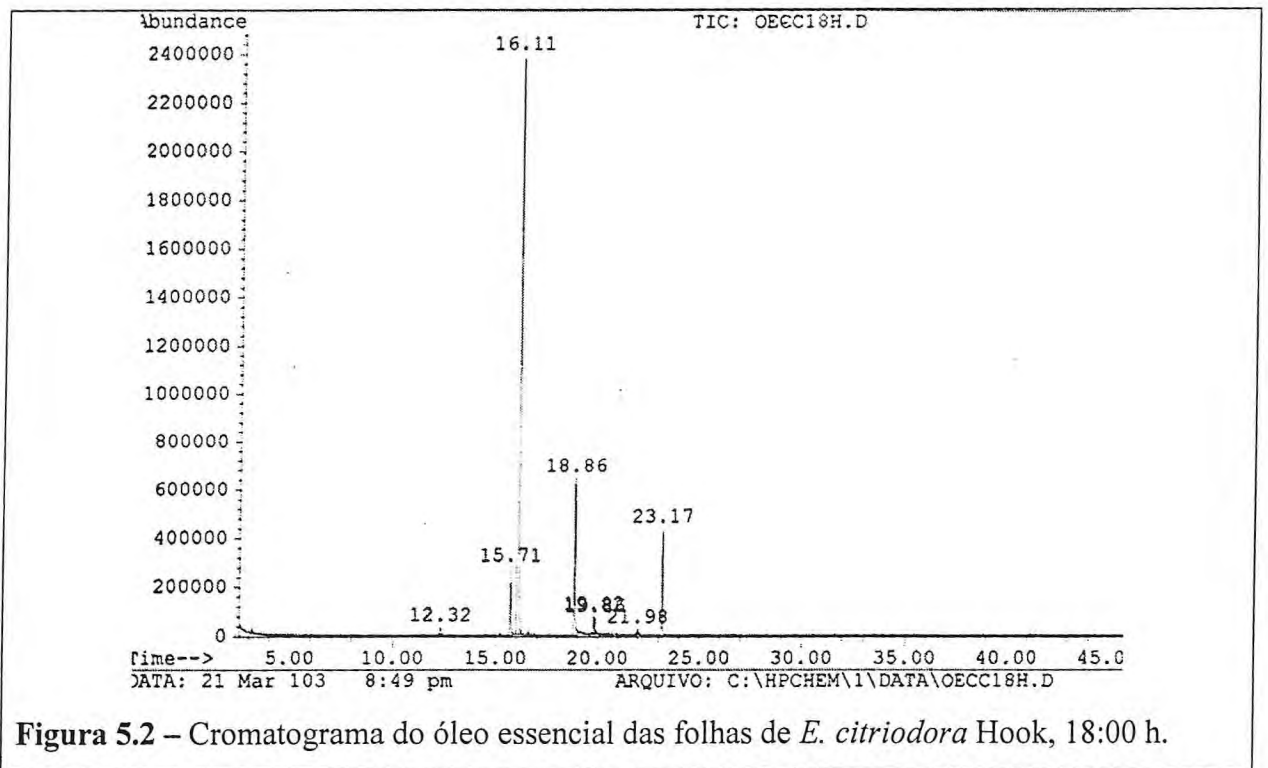


Figura 5.2 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* Hook, 18:00 h.

Observando-se o Gráfico 5.3, foi possível perceber que a variação mais significativa do teor (%) dos constituintes do óleo essencial do *E. citriodora* ocorreu no horário de 6:00 h, para o qual foi registrada a maior produção do componente citronelal (40) (90,3 %) e a ausência do acetato de citronelila (56). Nos demais horários a composição não apresentou grandes alterações

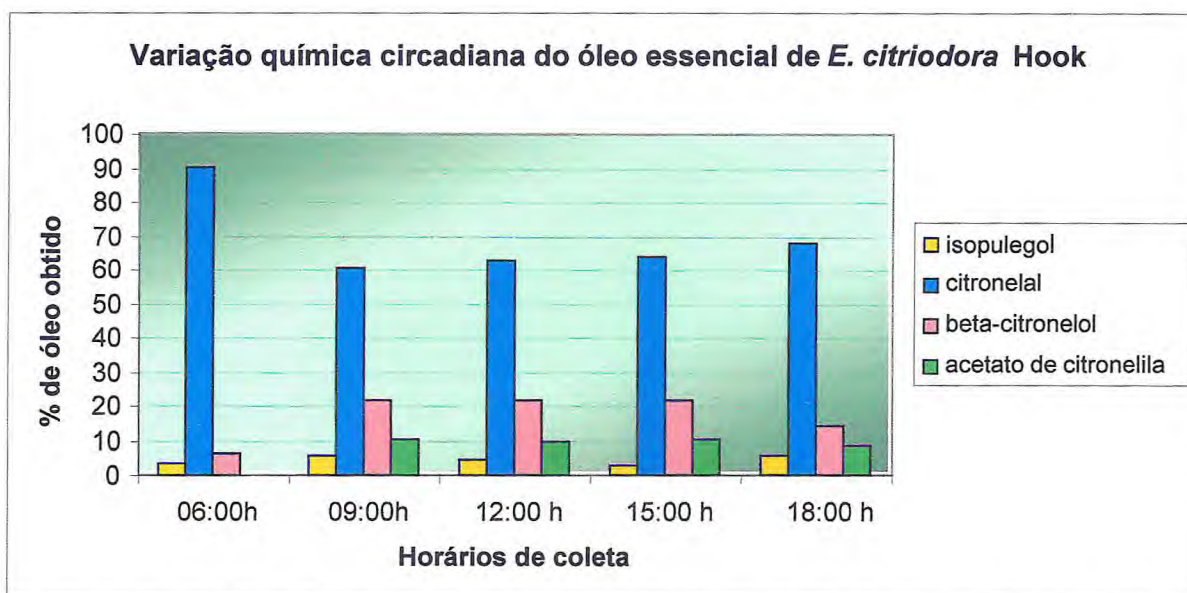


Gráfico 5.3 – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* coletadas de um mesmo espécime em diferentes horários do dia.

5.1.1.2 *Eucalyptus citriodora* – Variação Química Sazonal

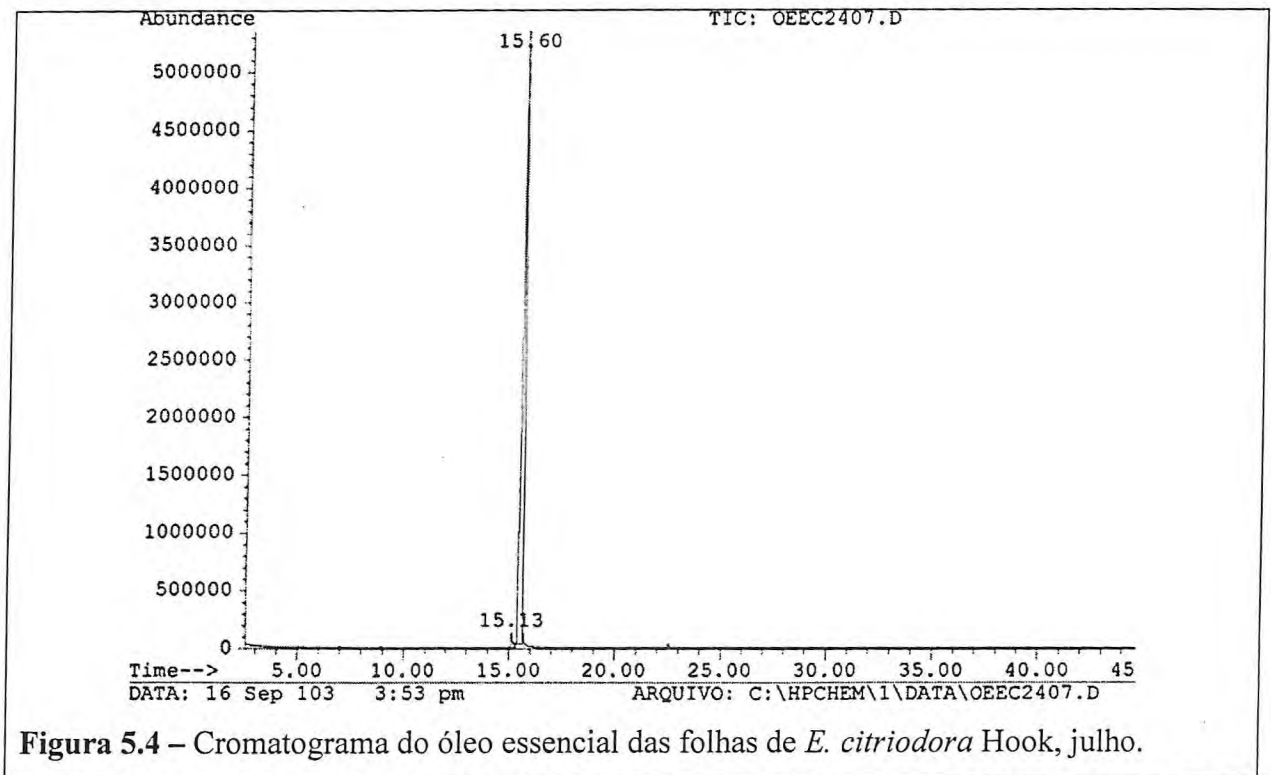
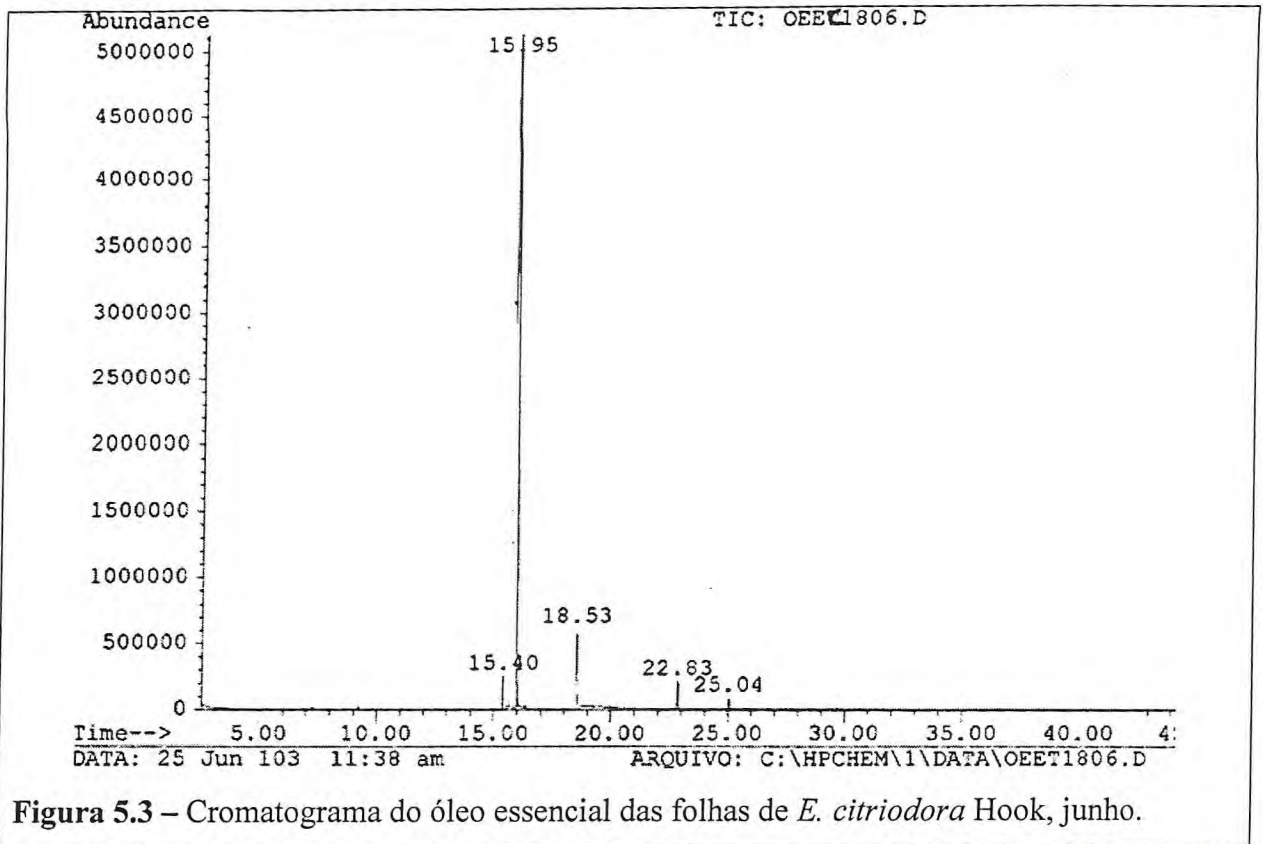
Os cromatogramas selecionados para este procedimento de análise dos óleos essenciais foram os obtidos nos meses de coleta de junho (Fig. 5.3, p. 96), por apresentar cinco constituintes e o de julho (Fig. 5.4, p. 96), por apresentar somente dois constituintes.

A Tabela 5.4 apresenta o percentual (teor %) dos principais constituintes identificados dos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* coletados em diferentes meses do ano. A análise dos óleos essenciais obtidos aponta como constituintes majoritários: citronelal (40), com um teor variando de 60,6 a 98,0 % e o β -citronelol (47), variando de 3,1 a 21,5%. O isopulegol (38) foi identificado como constituinte minoritário, cujo teor variou de 0,9 a 10,5 %.

Tabela 5.4 – Composição química sazonal do óleo essencial de *E. citrodora* Hook.

Compostos	Percentual					
	JAN*	FEV	MAR	MAIO	JUN	JUL
Isopulegol (38)	6,0	2,8	2,3	2,5	2,1	2,0
Citronelal (40)	60,6	88,9	93,4	93,5	92,2	98,0
β -citronelol (47)	21,5	7,4	3,1	3,1	3,9	-
Acetato de citronelila (56)	10,5	0,9	1,2	1,0	1,3	-
<i>iso</i> - cariofileno (150)	-	-	-	-	0,5	-
TOTAL		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* Valores referentes ao horário de coleta das 9:00 h (Tab. 5.3, p. 97).



Observando-se o Gráfico 5.4, foi possível perceber que no mês de janeiro obteve-se o mais baixo teor (%) de citronelal (**40**) (60,6 %), porém o percentual dos demais constituintes foi maior, enquanto no mês de julho, o citronelal (98 %) atingiu o maior teor e a diversidade de constituintes foi a menor: apenas dois compostos. Nos outros meses a composição permaneceu mais equilibrada.

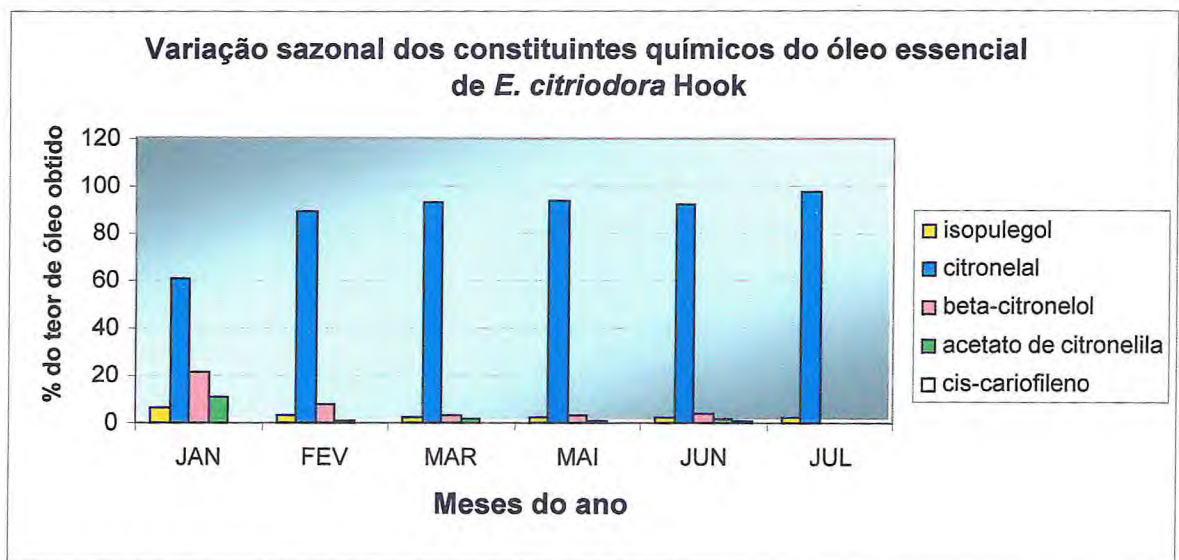


Gráfico 5.4 - Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano.

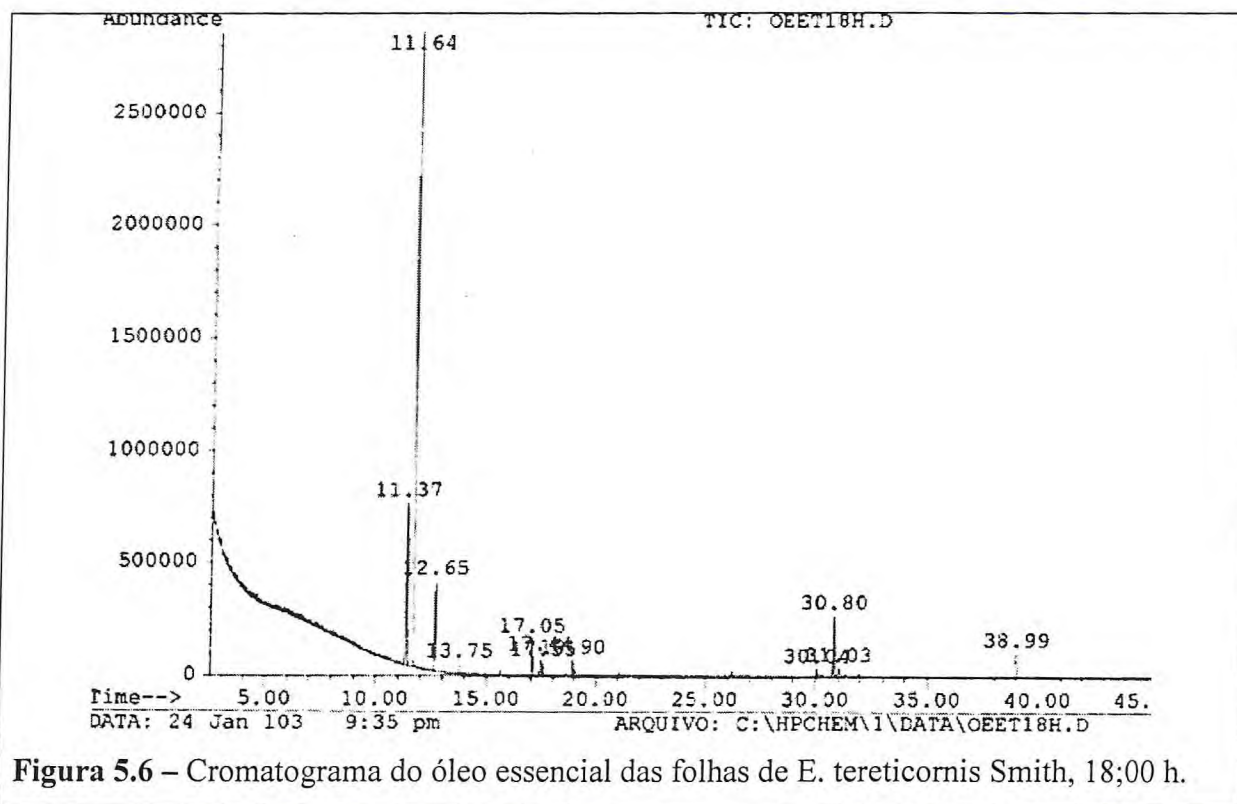
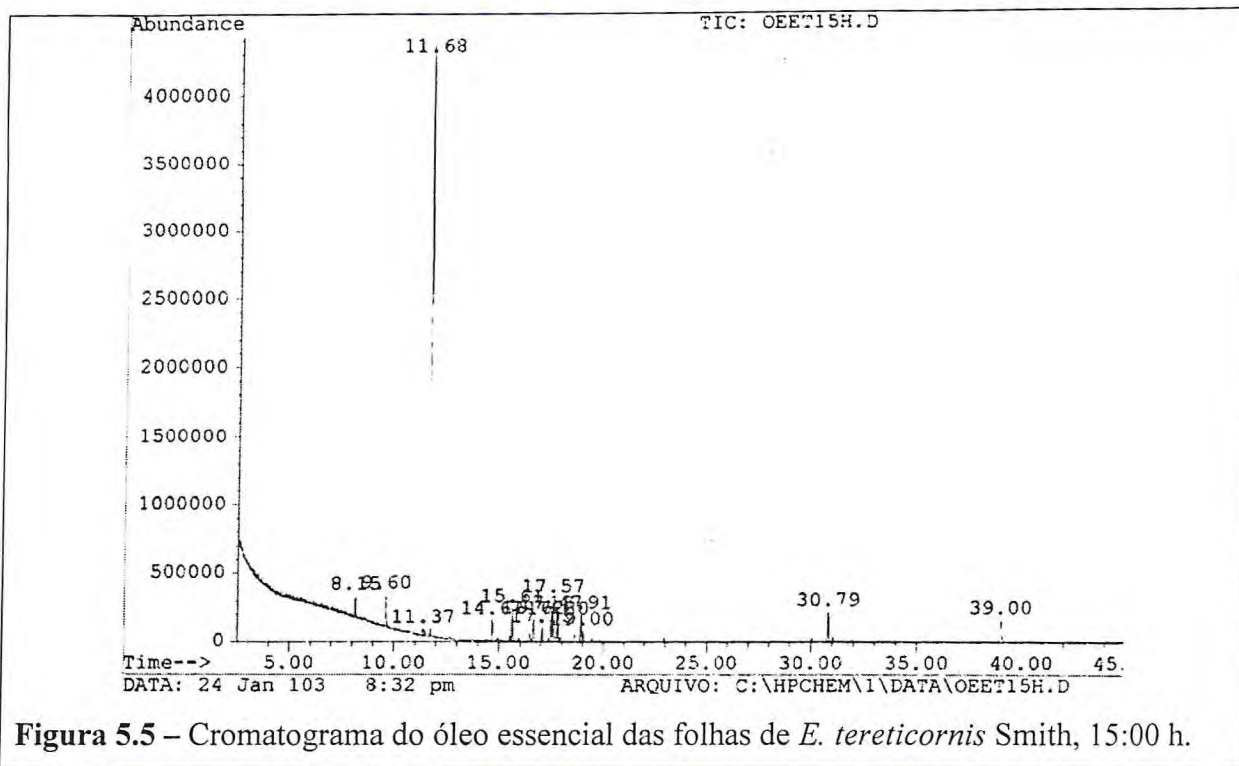
5.1.1.3 *Eucalyptus tereticornis* – Variação Circadiana

Os cromatogramas selecionados para este procedimento de análise dos óleos essenciais foram os obtidos no mês de janeiro, nos horários de coleta de 15:00 h (Fig. 5.5, p. 104), por apresentar quinze constituintes, dos quais dez foram identificados e o de 18:00 h (Fig. 5.6, p. 104), por apresentar doze constituintes, porém, somente seis foram identificados, mas que juntos apresentam o total de compostos identificados..

A Tabela 5.5, apresenta o percentual (teor %) dos principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *E. tereticornis*. A análise dos óleos essenciais obtidos aponta o 1,8-cineol (**28**) como constituinte majoritário, com um teor variando de 62,6 a 80,0 %, seguido pelo *para*-cimeno (**24**) (0,0 – 14,2 %), β -pineno (**21**) (2,1 – 6,3 %) e o α -terpineol (**46**), variando de 3,3 a 4,1 %. Foram identificados como constituintes minoritários: *endo*-fenchol (**151**) (0,8 – 1,5 %), *endo*-borneol (**153**) (0,9 – 1,7 %), α -terpinoleno (**33**) (0,9 – 1,1 %) e terpinen-4-ol (**45**) (1,0 – 2,8 %).

Tabela 5.5 – Comparação da composição química do óleo essencial das folhas de *E. tereticornis* Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes horas do dia.

Compostos	Percentual				
	6:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h
β -pineno (21)	6,3	3,4	4,8	2,1	-
<i>para</i> -cimeno (24)					14,2
1,8-cineol (28)	80,0	82,4	79,6	74,3	62,6
γ -terpineno (30)					6,3
α -terpinoleno (33)	1,0	1,1	0,9	-	0,8
<i>endo</i> -fenchol (151)			0,8	1,5	
<i>trans</i> -pinocarveol (152)				2,4	
<i>endo</i> -borneol (153)			0,9	1,7	
terpinen-4-ol (45)	1,9	1,8	1,6	1,0	2,8
<i>trans</i> -isocarveol (154)				2,2	
α -terpineol (46)	3,9	4,1	4,1	3,3	-
menta-1(7),8-dien-ol(<i>cis-para</i>) (155)				2,1	
Germacreno B (156)		2,2	2,1	2,6	5,3
TOTAL	93,1	95,0	94,8	93,2	92,0



O Gráfico 5.5 permitiu observar que a variação mais significativa do teor (%) dos constituintes majoritários do óleo essencial de *E. tereticornis* foi no horário de 18:00 h, para o qual foi registrada a menor produção do componente 1,8-cineol (**28**) (62,6 %), a ausência do β -pineno (**21**) e α -terpineol (**46**), além da presença do *para*-cimeno e do germacreno-B (**156**). Nos demais horários a composição não apresentou alterações significativas.

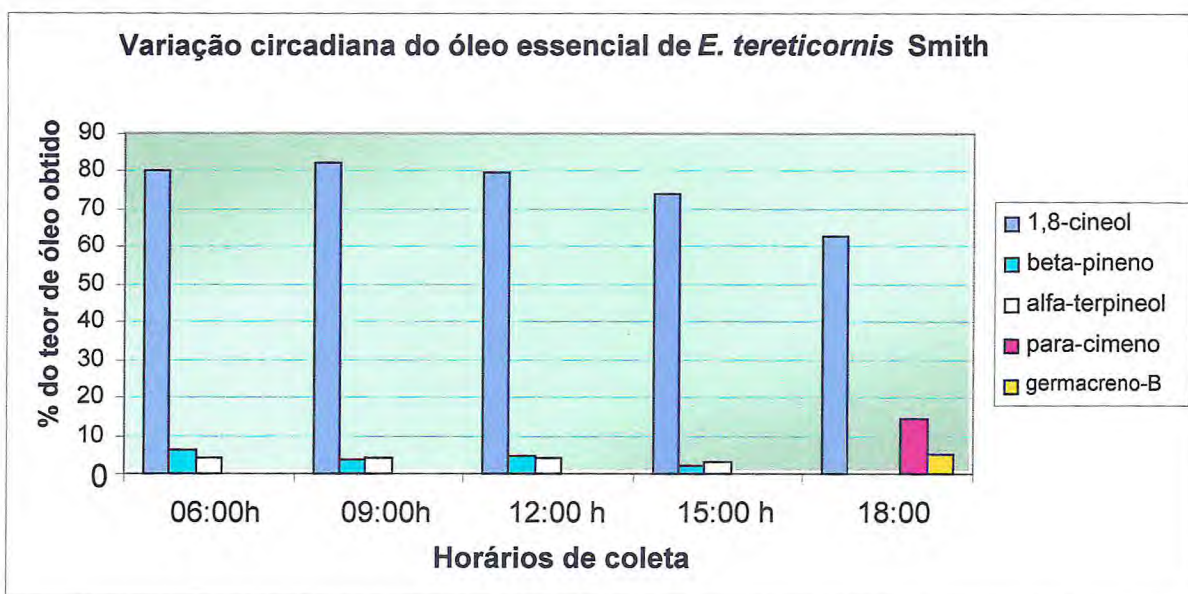


Gráfico 5.5 – Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E.tereticornis* coletadas de um mesmo espécime em diferentes horários do dia.

5.1.1.4 *Eucalyptus tereticornis* – Variação Química Sazonal

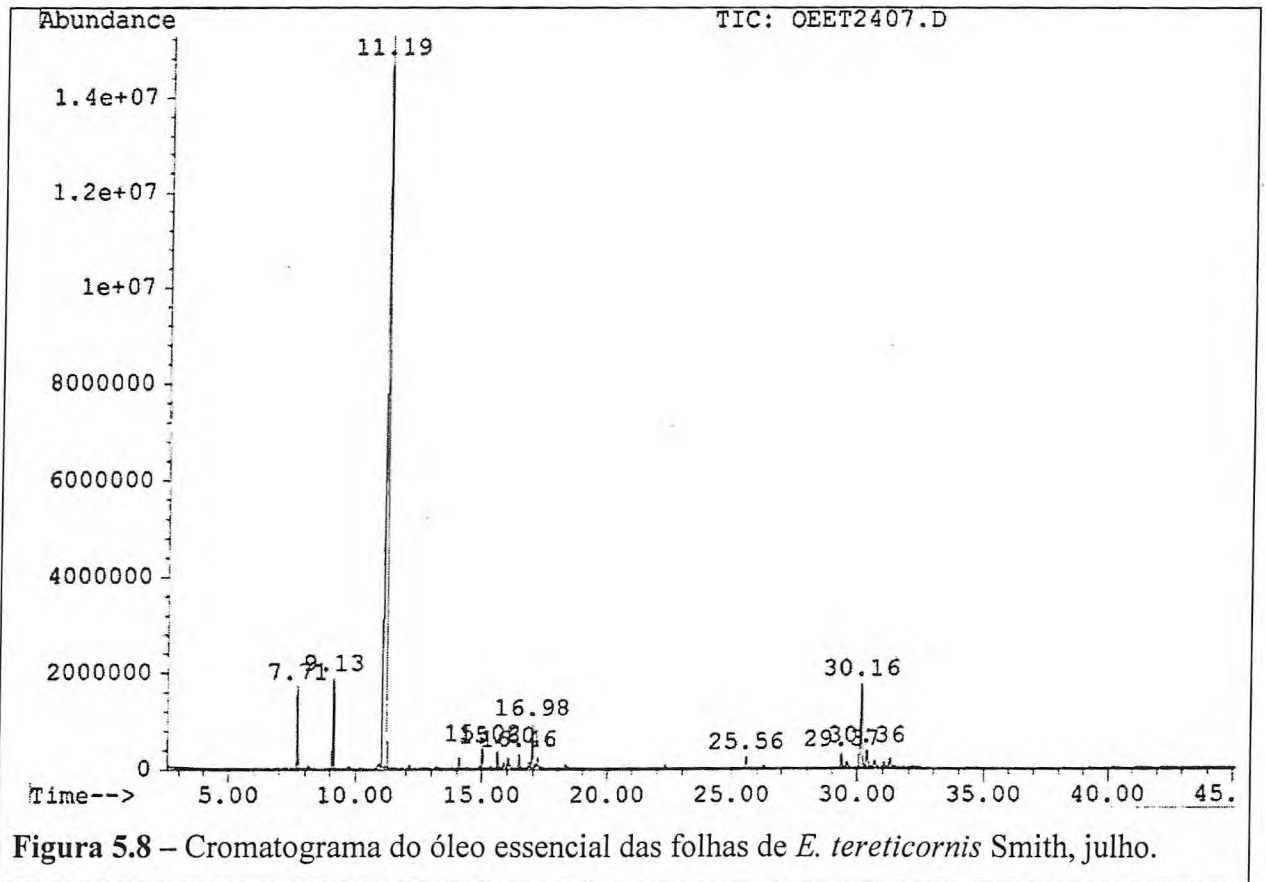
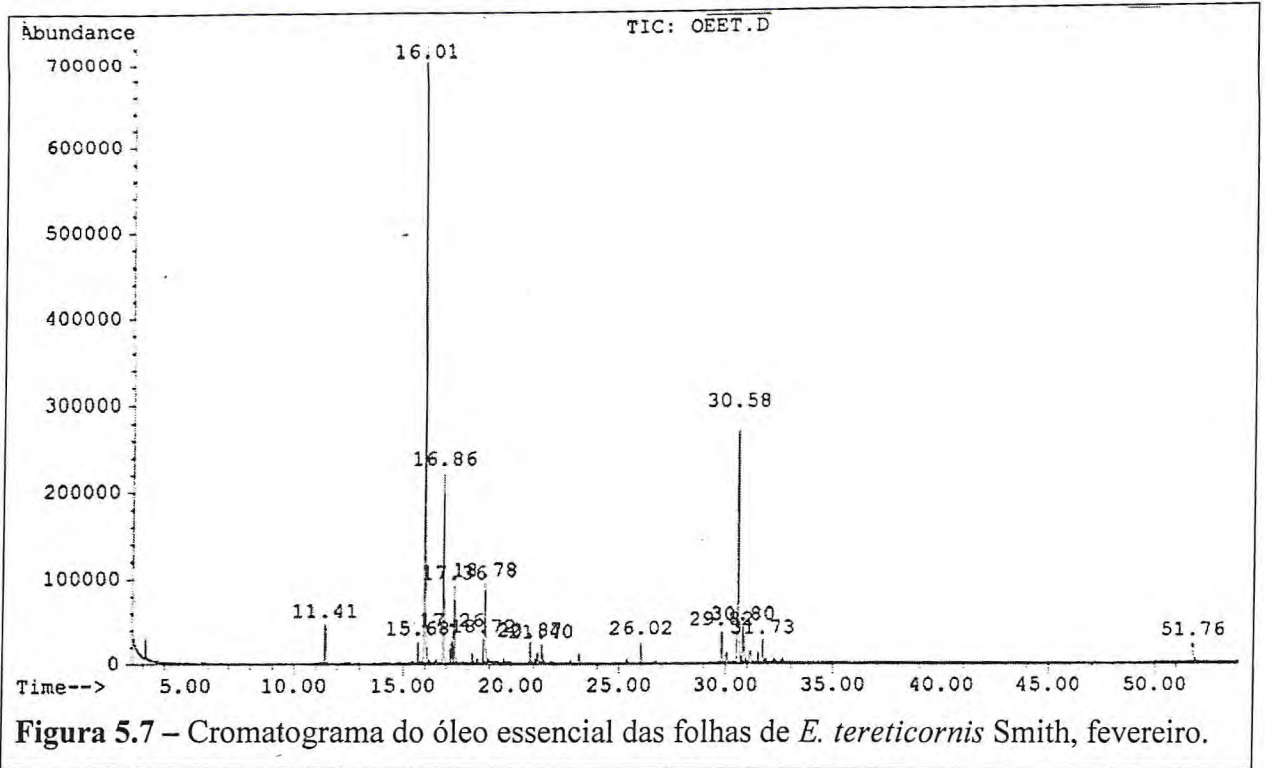
Os cromatogramas selecionados para este procedimento de análise dos óleos essenciais foram os obtidos nos meses de coleta de fevereiro (Fig. 5.7, p. 108), por apresentar dezesseis constituintes, dos quais treze foram identificados, equivalendo ao menor percentual (93 %) e o do mês de julho (Fig. 5.8, p. 108), por apresentar onze constituintes e todos identificados (100 %).

A Tabela 5.6, p. 107, apresenta o percentual (teor %) dos principais constituintes identificados dos óleos essenciais das folhas de *E. tereticornis* coletados em diferentes meses do ano. A análise dos óleos essenciais obtidos aponta como constituintes majoritários: 1,8-cineol (**28**), com um teor variando de 2,2 a 87,3 %, seguido pelo globulol (**73**) (6,6 – 19,2 %) e α -terpineol (**46**) (1,5 – 11,5 %), variando de 3,1 a 21,5%. Como constituintes minoritários foram identificados: γ -terpineno (**30**) (0,5 %), β -ocimeno (**157**) (0,6%), α -pineno (**18**) (0,8 – 2,5 %), longifoleno (**162**) (1,0 %) e α -terpinoleno (**33**) (1,1 – 1,8 %).

Tabela 5.6 – Comparação da composição química do óleo essencial das folhas de *E. tereticornis* Smith coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano.

Compostos	Percentual					
	JAN*	FEV	MAR	MAIO	JUN	JUL
α -tujeno (17)						3,6
α -pineno (18)			0,8		2,5	
β -pineno (21)	3,4		2,2			4,4
<i>para</i> -cimeno (24)					0,9	
1,8-cineol (28)	82,4	2,2	59,9	62,1	87,3	76,2
β -ocimeno (157)			0,6			
γ -terpineno (30)					0,5	
α -terpinoleno (33)	1,1		1,8			
<i>trans</i> -pinocarveol (152)				3,3		1,2
isopulegol (38)		1,4				
citronelal (40)		38,6				1,1
terpinen-4-ol (45)	1,8	11,7	6,3	3,5	1,1	0,8
<i>trans</i> -isocarveol ()		1,7		3,8		
α -terpineol (46)	4,1	4,9	11,5	10,8	1,5	2,7
citronelol (47)		5,7				
mentha-1(7),8-dien-ol(<i>cis</i> - <i>para</i>) (155)		1,5		2,0		
timol (158)		1,4				
carvacrol (159)		1,4				
β -duprezianeno (160)		1,5			2,7	0,8
(+)-aromadendreno (161)		2,2	1,8		0,6	
longifoleno (162)						1,0
viridiflorol (163)						1,6 ?
globulol (73)		19,2	13,1	11,6		6,6
Germacreno B (156)	2,2					
TOTAL	95,0	93,4	98,0	97,1	97,1	100,0

* Valores referentes ao horário de coleta das 9:00 h (Tab. 5.5, p. 103).



Observando-se o Gráfico 5.6, foi possível notar que os meses que apresentaram o maior percentual do constituinte 1,8-cineol (**28**) foram janeiro (82,4 %) e junho (87,3 %). O globulol (**73**) foi o segundo constituinte majoritário, porém não mantendo este patamar em todos os meses, sendo que nos meses de janeiro e junho não esteve presente na composição do óleo. Para o α -terpineol (**46**) a variação observada foi similar, onde em março (11,5 %) e maio (10,8 %) atingiu os maiores teores, enquanto nos demais, foi notório o decréscimo na composição do óleo. No mês de fevereiro a presença do citronelal (**40**) (38,6 %) foi uma surpresa, principalmente por ter sido acompanhado pelo menor registro do teor do 1,8-cineol (2,2 %).

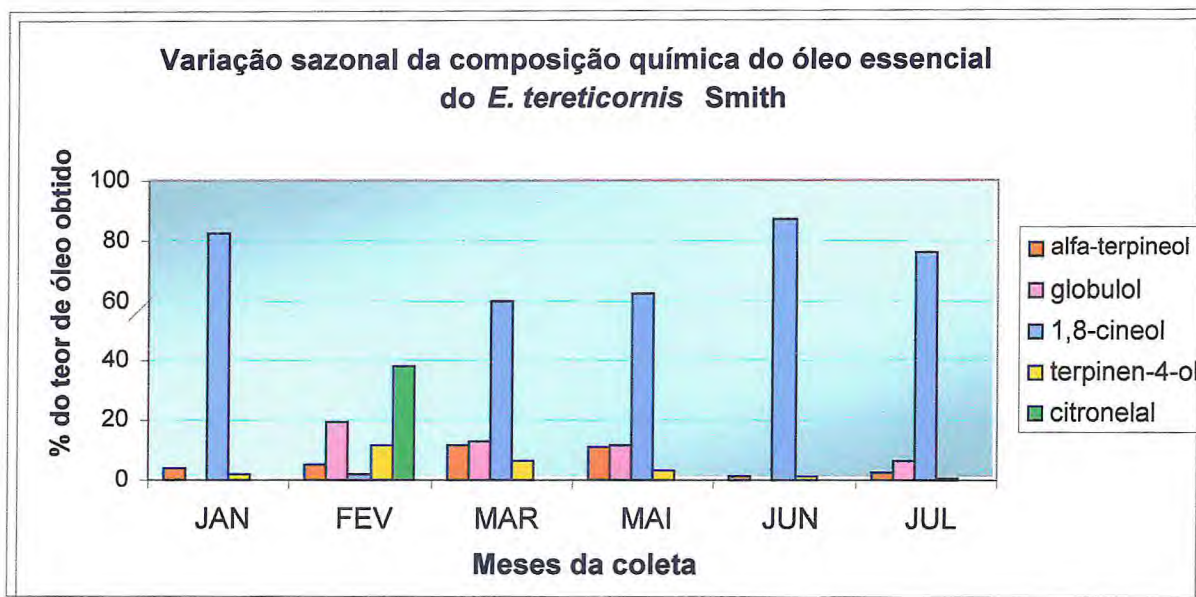


Gráfico 5.6 - Comparação dos teores (%) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *E. tereticornis* coletadas de um mesmo espécime em diferentes meses do ano.

5.1.2 Estudo da Composição Química Volátil das Folhas de *Eucalyptus citriodora* OEEC2

Foi realizada uma coleta das folhas de um espécime de *Eucalyptus citriodora* Hook, em janeiro de 2005, às 10:00 h, em um Buffet denominado Lula's Buffet, localizado em Fortaleza. O óleo essencial obtido foi denominado OEEC2. A análise por CGL/MS forneceu o cromatograma mostrado na Fig 5.9, p. 111. Deste foram selecionados quinze picos, dos quais nove constituintes químicos foram identificados. A caracterização foi efetuada através de determinação e correção dos índices de Kovats simulados e comparação com espectros de massa de substâncias sugeridas pelo banco de dados (espectroteca) [Alencar, 1990] e dados da literatura [Adams, 2001]. A correção dos índices de Kovats foi efetuada através de regressão linear do gráfico constituído por tempos de retenção e índices Kovats tabelados de quatro picos obtidos do cromatograma de OEEC2. A equação da reta da regressão linear obtida no procedimento, utilizando o programa para elaboração de gráficos do Excel, foi: $IK = 28,985t + 634,5$; o fator de correção foi $R^2 = 0,9998$.

O resultado da análise do óleo das folhas (Tab. 5.7, p.111) mostrou o citronelal (**40**) (45,7 %) como constituinte majoritário. Os outros constituintes identificados foram o óxido *cis*-rose (**35**) (0,8 %), isopulegol (16,9 %) (**38**), iso-isopulegol (**41**) (9,1 %), neoiso-isopulegol (**44**) (0,8 %) β -citronelol (**47**) (12,3 %), acetato de citronelila (**56**) (2,3 %) e óxido de cariofileno (**72**) (2,5 %).

O estudo do óleo essencial deste espécime contribuiu para a comprovação da existência de outros quimiotipos de *E. citriodora* Hook, já mencionados na literatura que citam a existência de quatro tipos relacionados aos teores de citronelal apresentados (p. 86) [Moudachirou, Gbênou *et al.*, 1999].

Tabela 5.7 – Constituintes voláteis do óleo essencial das raízes de *E. citriodora* Hook coletado em 2005. (OEEC2).

Constituintes Químicos	*IK	IK	(%)
óxido <i>cis</i> -rose (35)	1107	1108	0,8
óxido <i>trans</i> -rose (36)	1124	1126	0,9
isopulegol (38)	1145	1145	16,9
citronelal (40)	1150	1153	45,7
iso-isopulegol (41)	1156	1160	9,1
neo-iso-isopulegol (44)	1168	1171	0,8
β -citronelol (47)	1231	1228	12,3
acetato de citronelila (56)	1359	1354	2,3
óxido de cariofileno (72)	1582	1583	2,5
TOTAL			91,3

*IK = Índices Kovats simulados

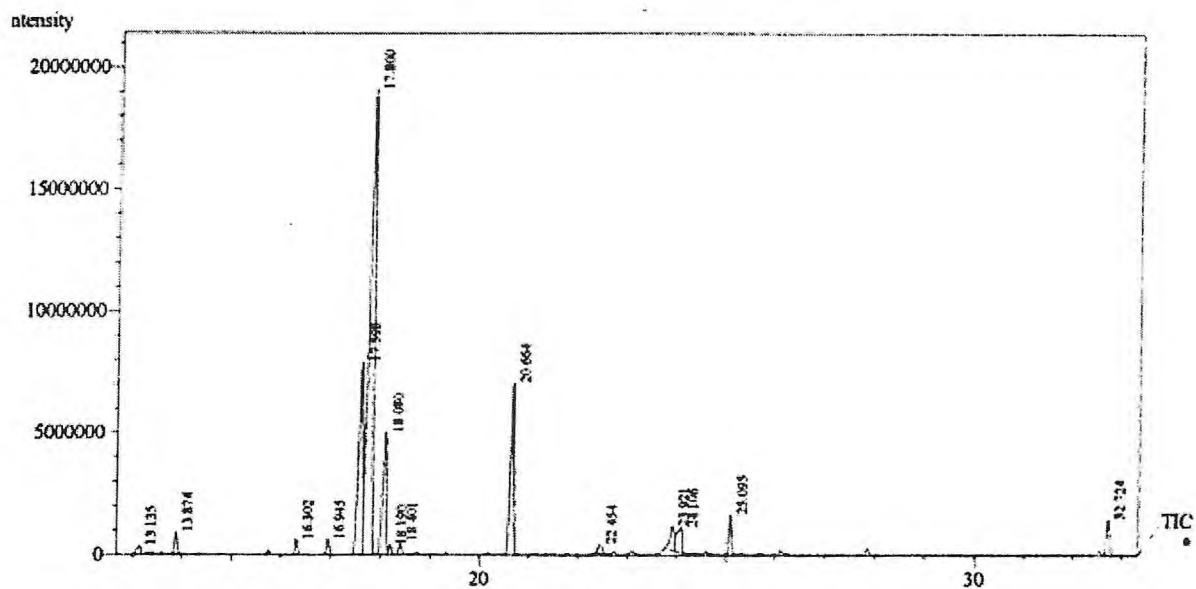
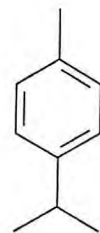
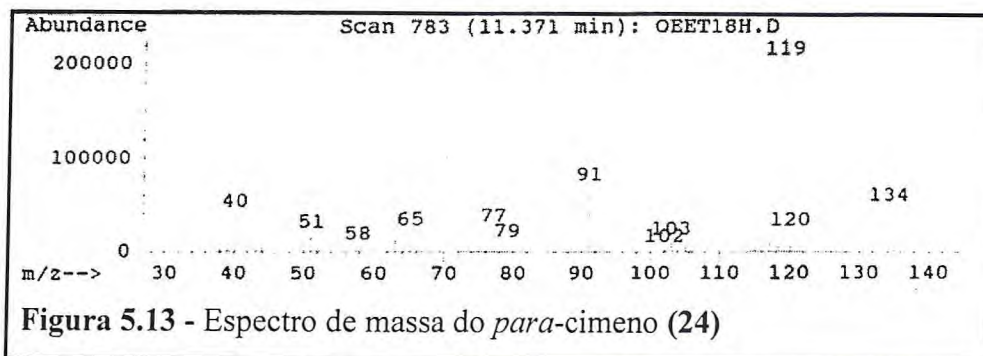
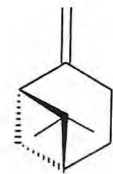
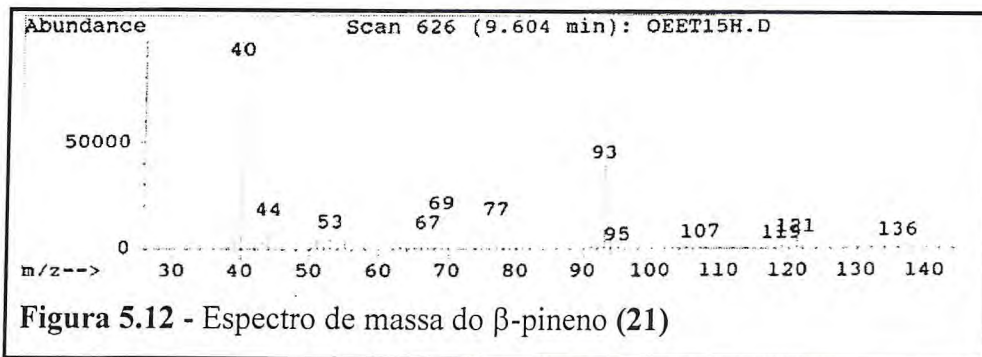
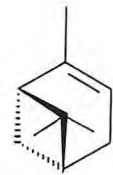
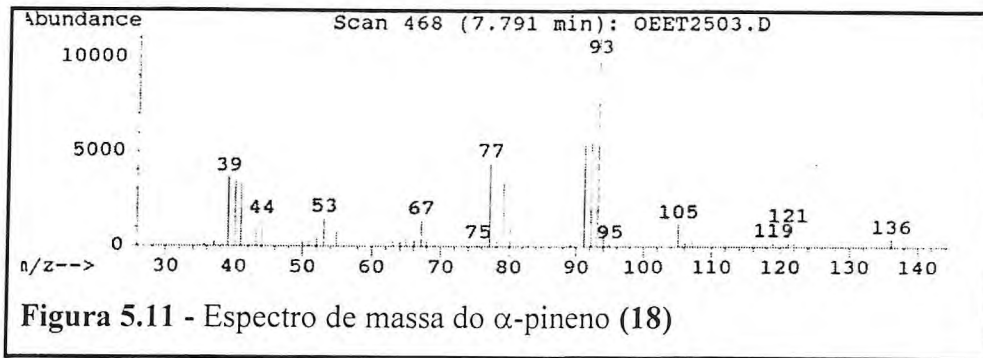
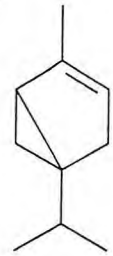
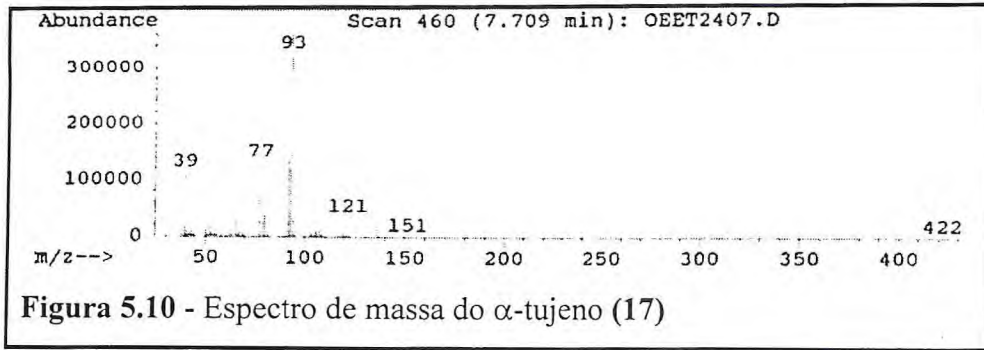
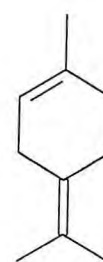
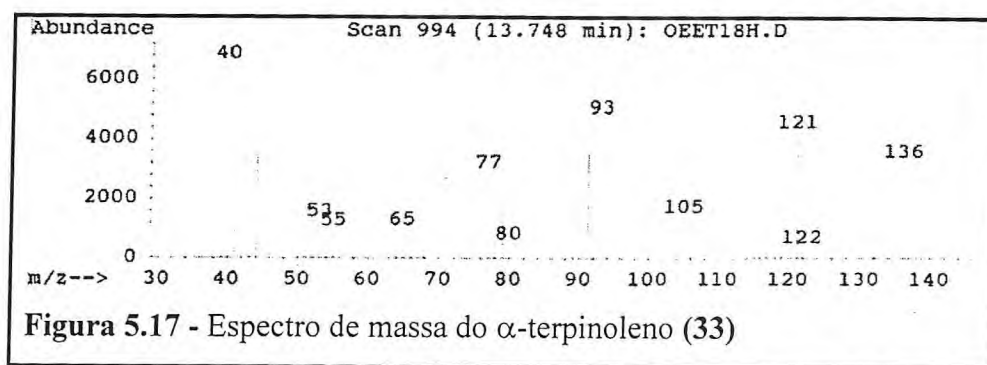
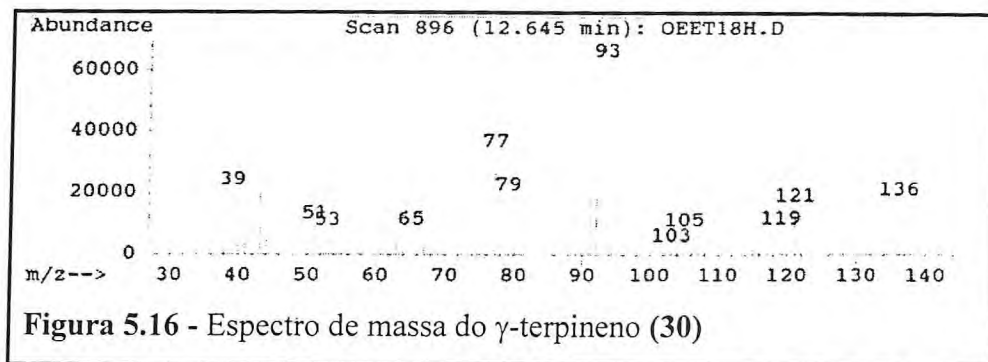
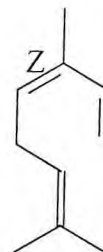
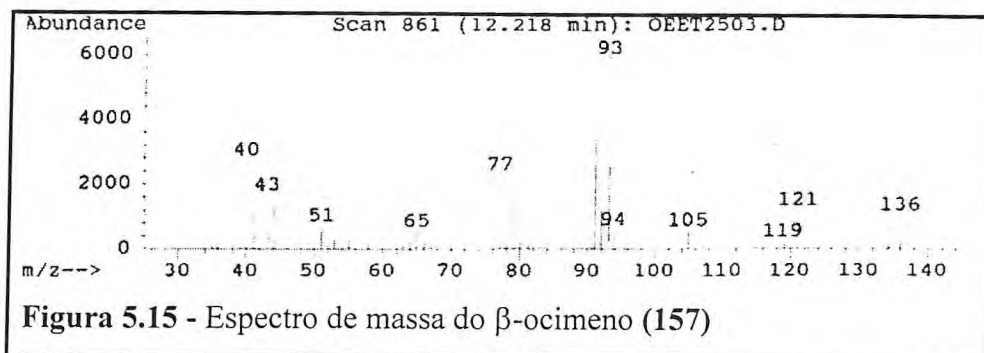
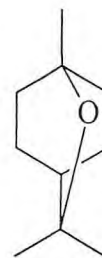
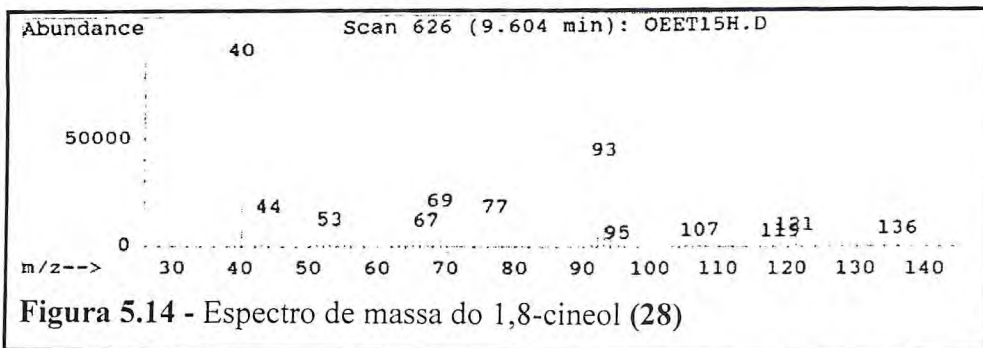
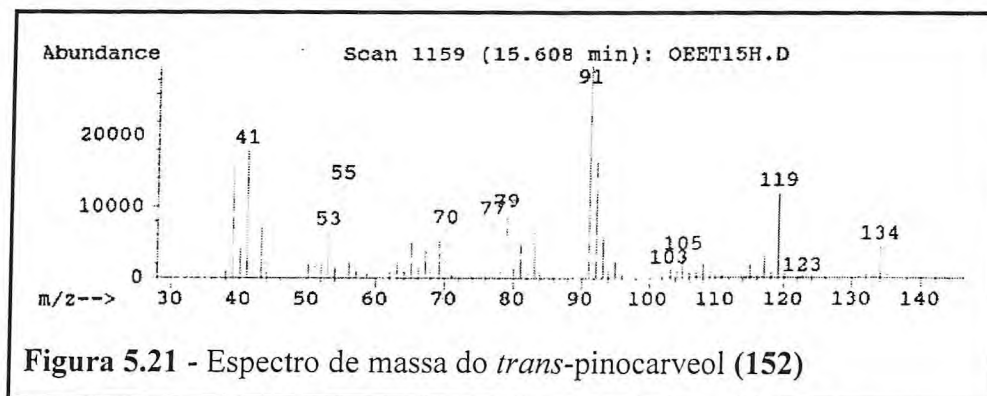
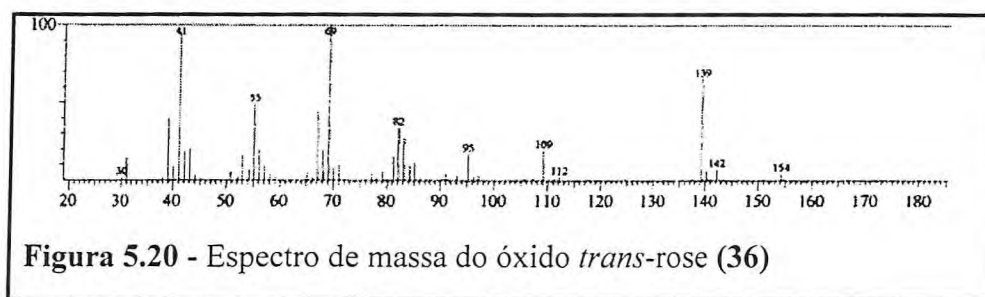
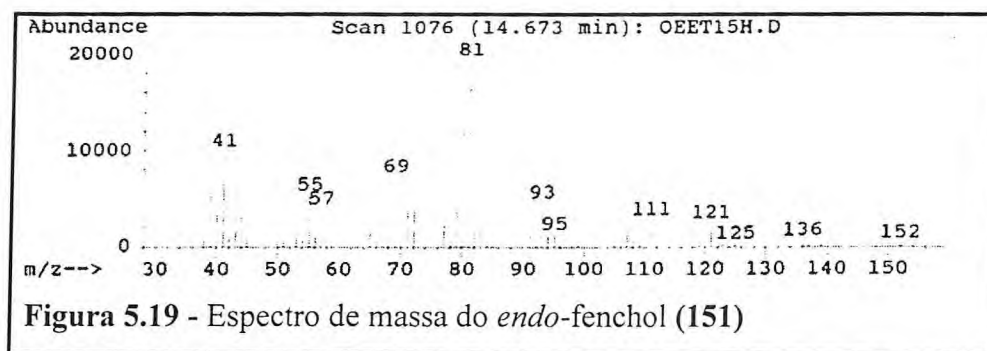
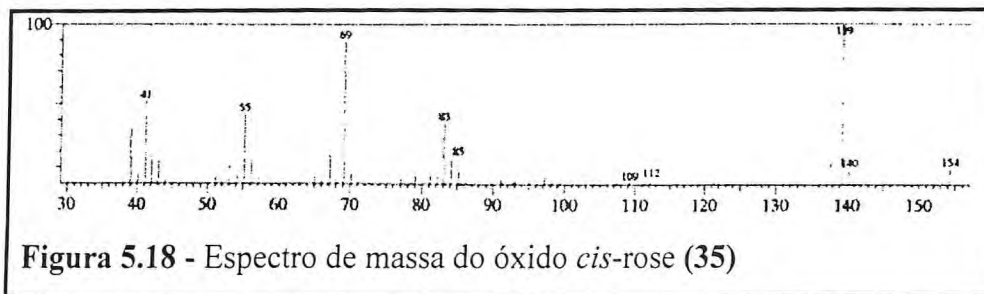
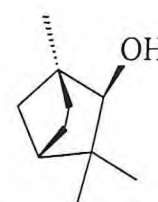
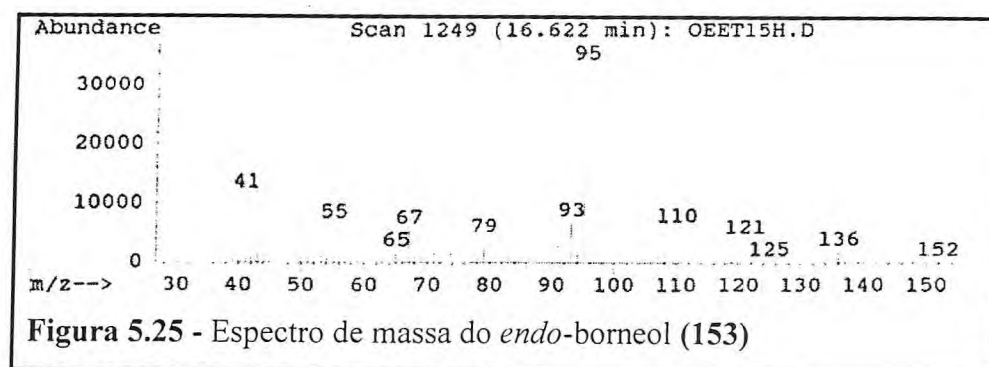
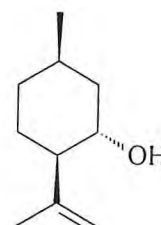
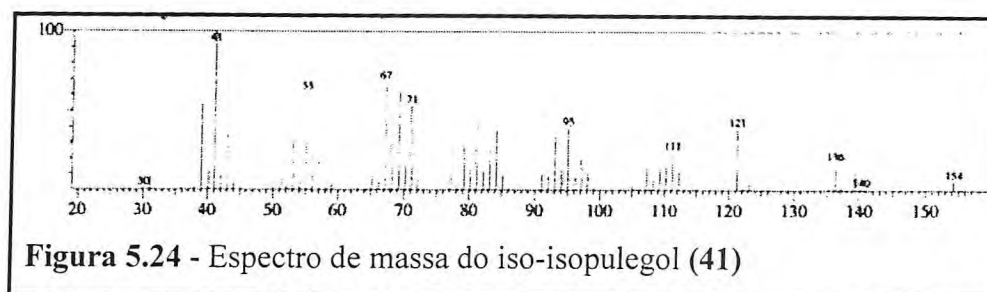
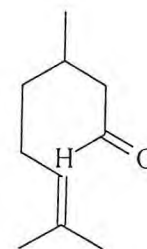
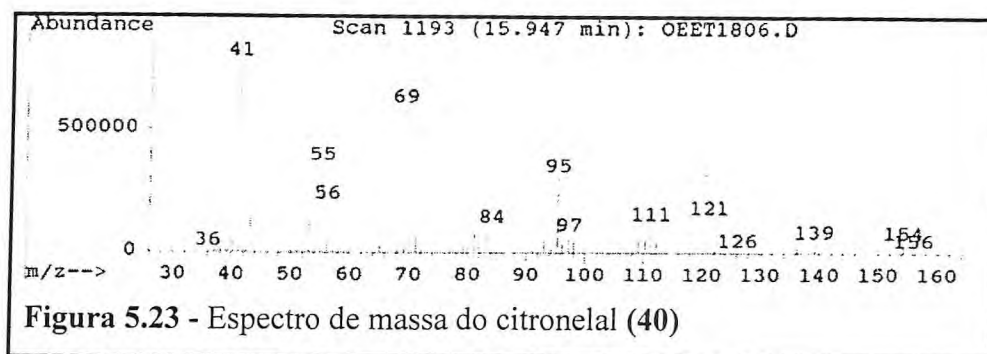
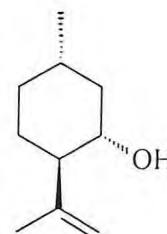
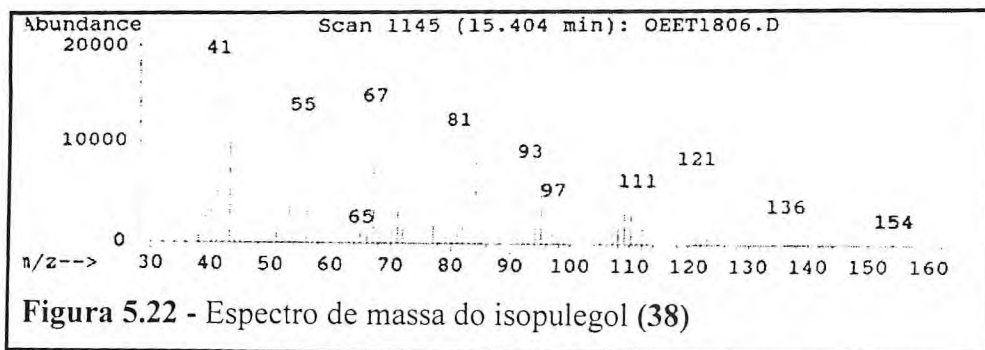


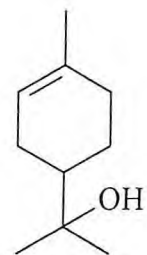
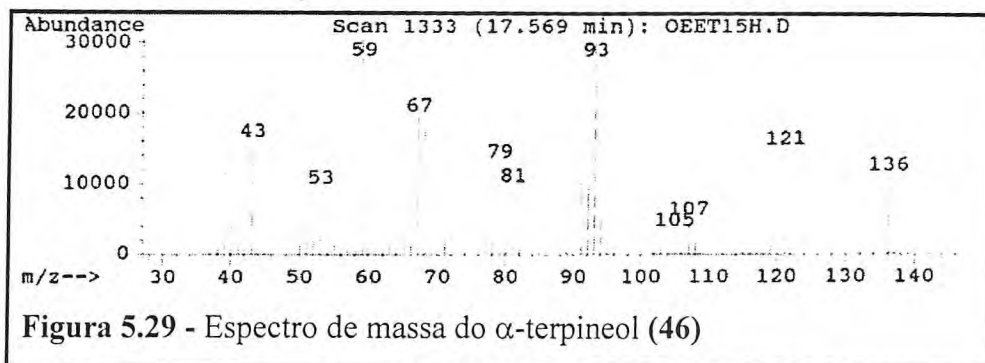
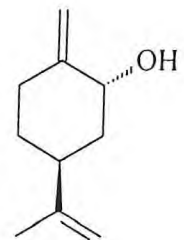
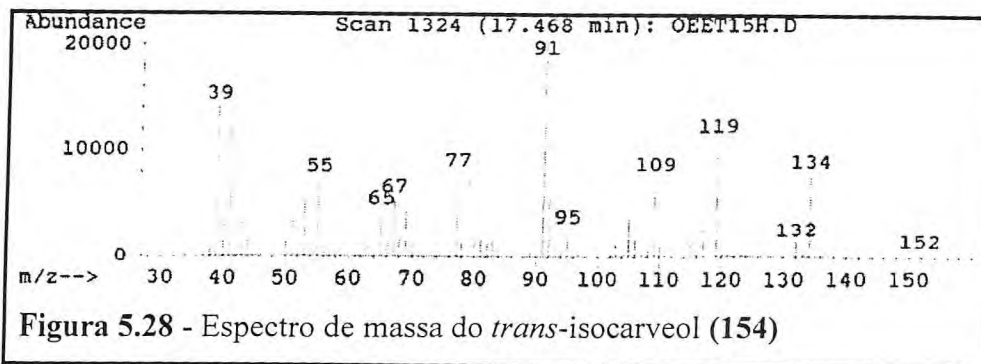
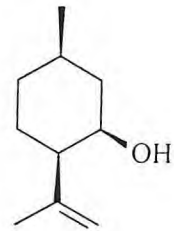
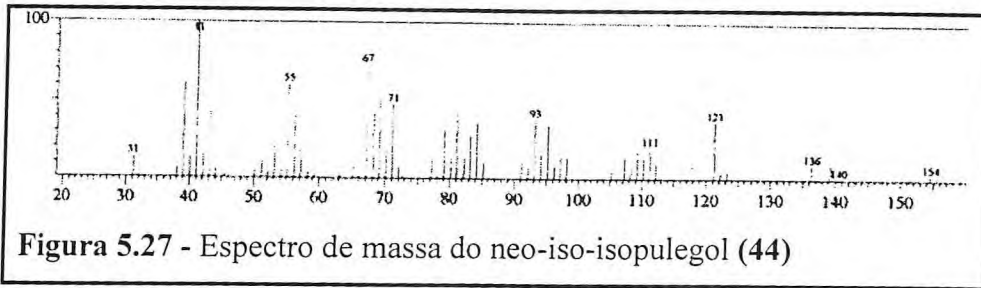
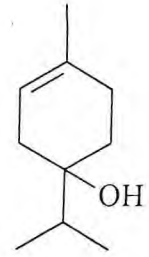
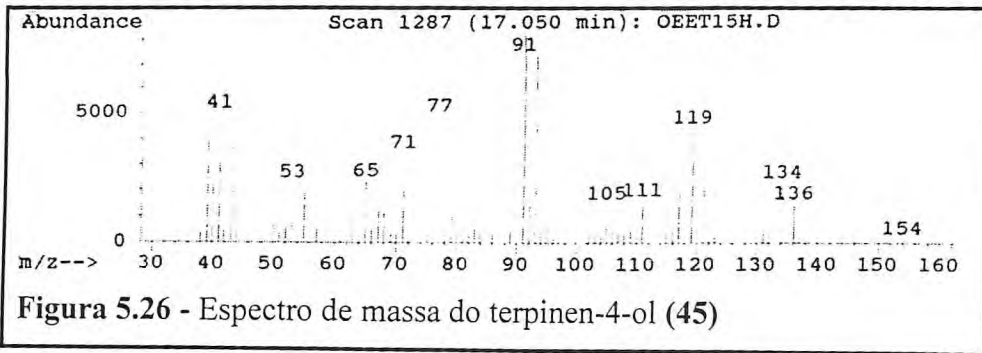
Figura 5.9 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de OEEC2.

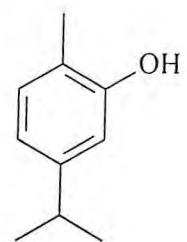
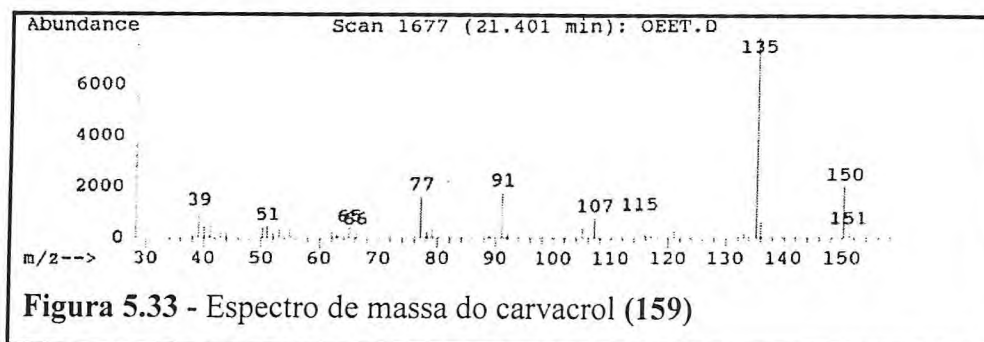
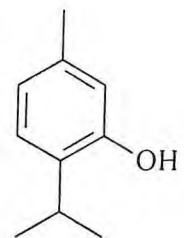
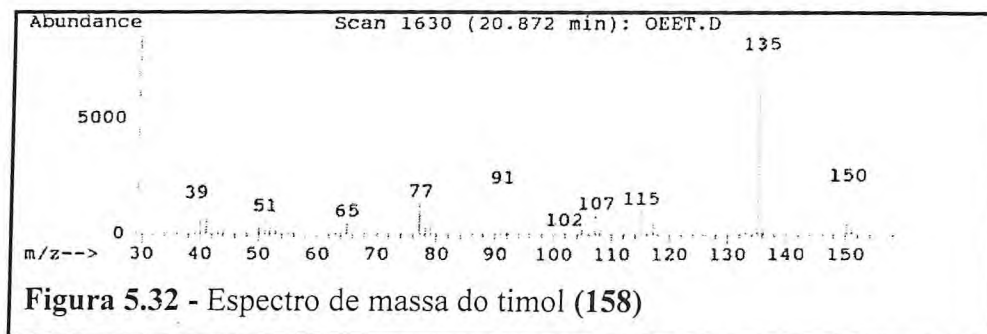
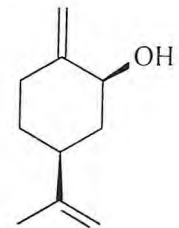
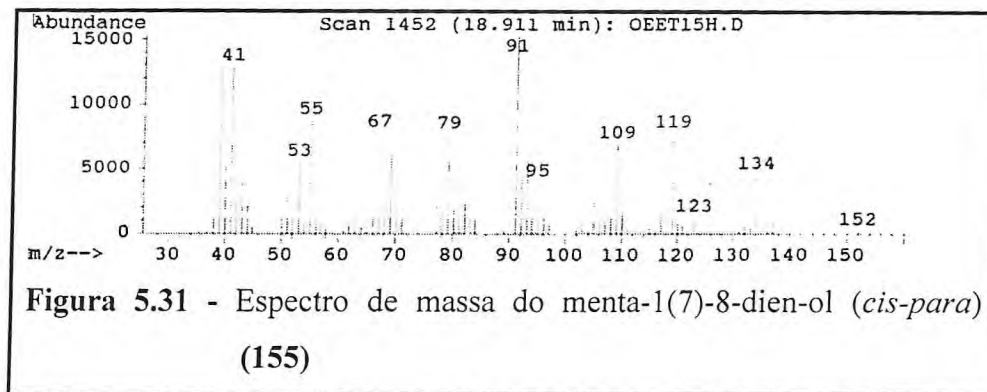
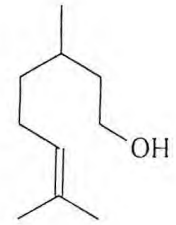
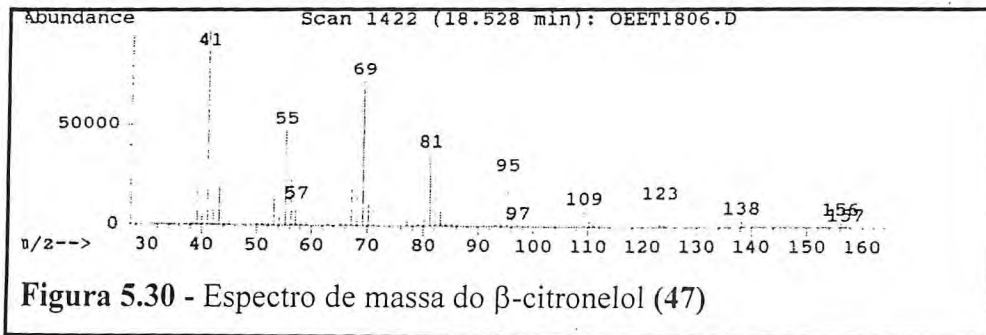


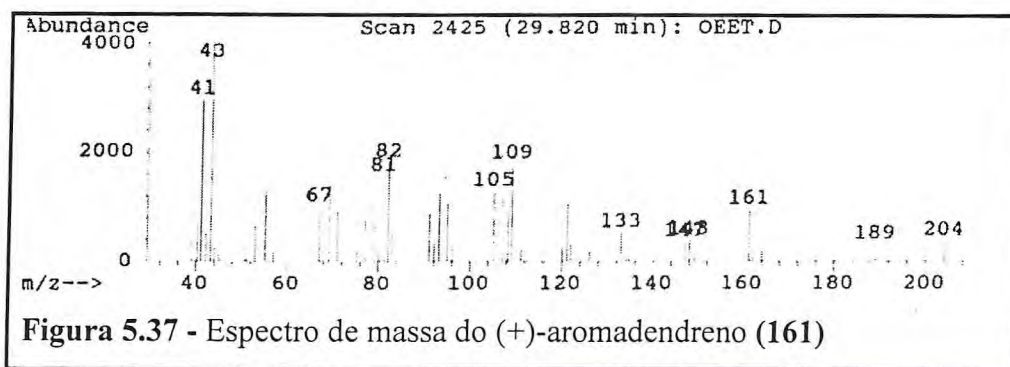
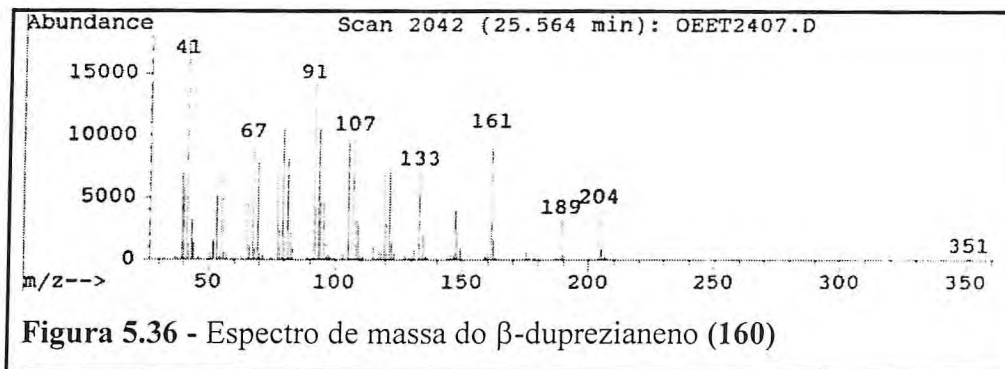
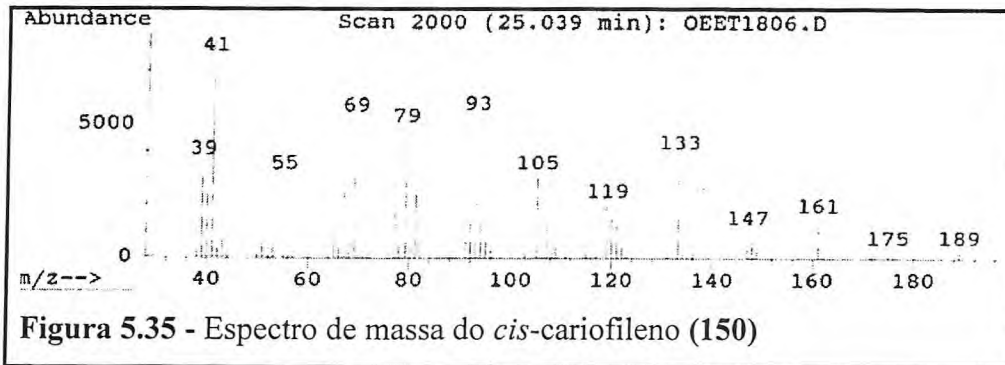
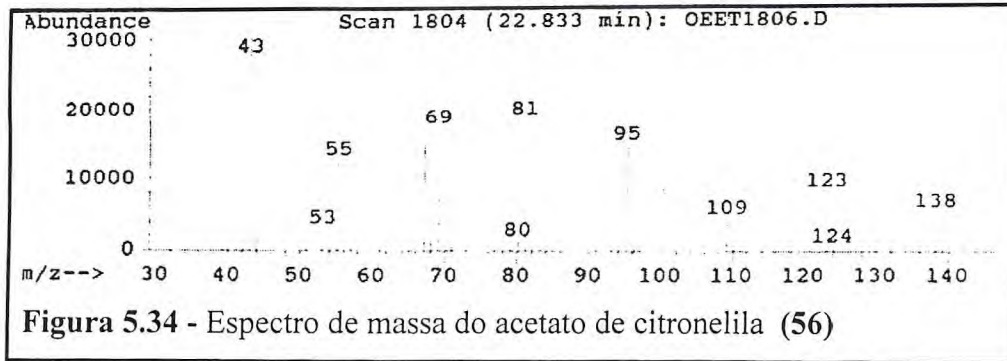


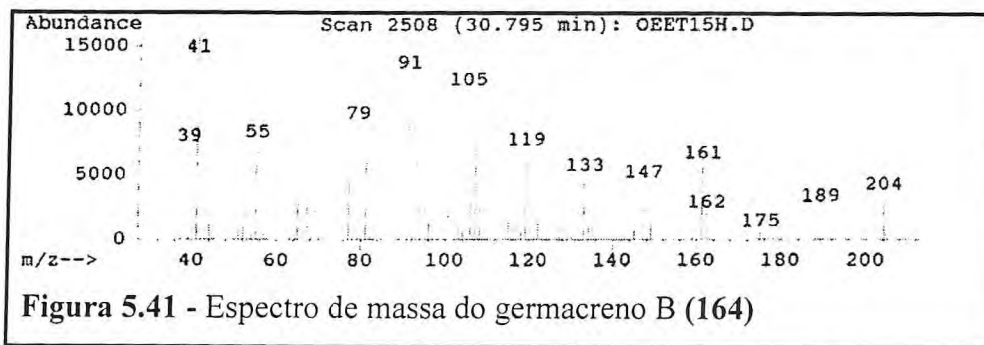
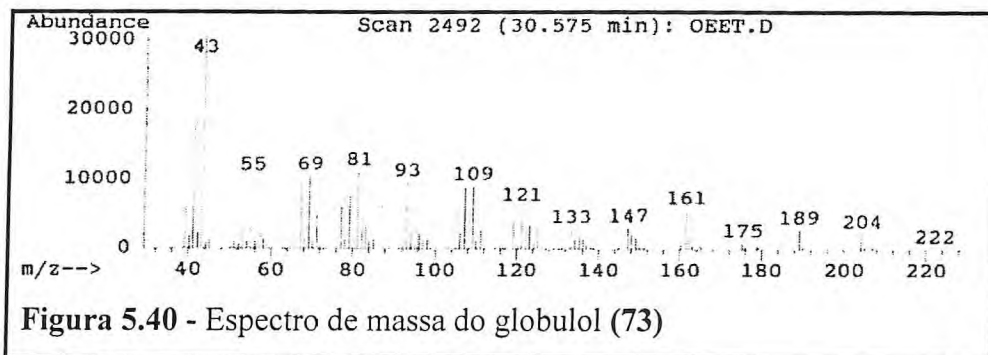
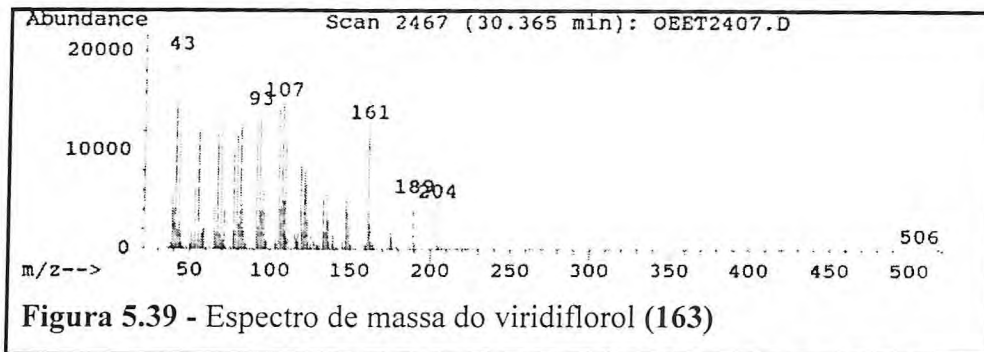
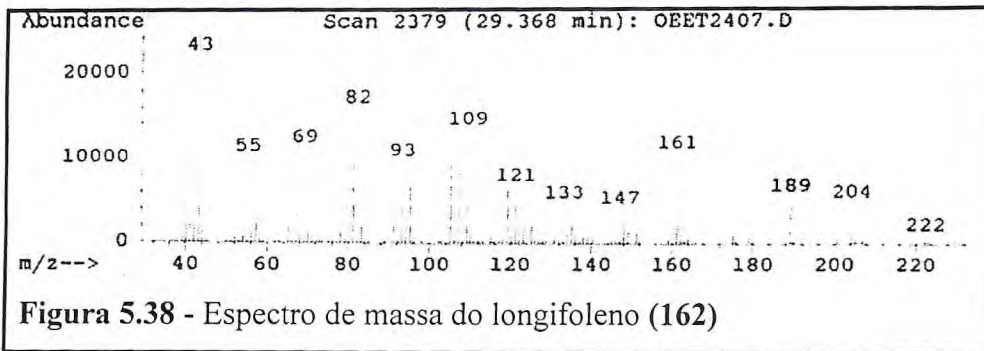


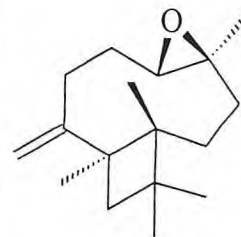
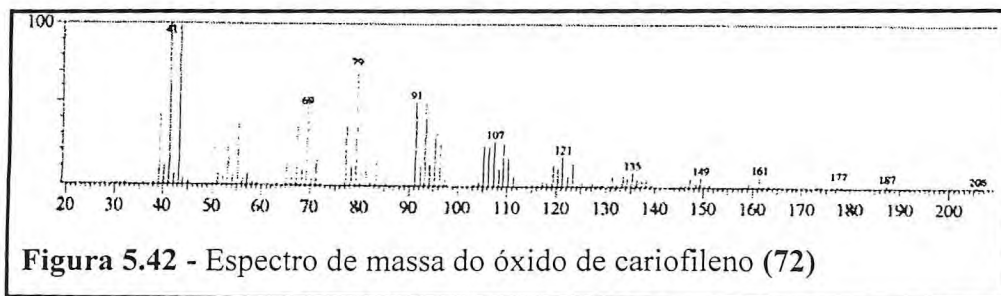












Capítulo 6:

Elucidación Estructural

6 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

6.1 – Substâncias Isoladas do “Kino” de *E. citriodora*

6.1.1 – Identificação Estrutural de ECK-1

O fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-A (p. 280), (Flux. 7.2, p. 295) obtida do particionamento do “kino” do *E. citriodora*, permitiu o isolamento de um sólido amarelo, p.f. = 74,9-76,1°C, denominado ECK-1.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 6.1) de ECK-1 permitiu observar uma banda larga em 3423.30 cm^{-1} referente a estiramento OH, possivelmente quelada; bandas em 2937 e 2844 cm^{-1} relativas à deformação axial assimétrica de ligação $C_{sp^3}\text{-H}$, indicativas de grupamentos CH_2 e CH_3 respectivamente. A absorção em 1643 cm^{-1} foi relacionada à deformação axial da ligação C=O , característica de carbonila em sistema conjugado e com ligação intramolecular. As bandas esqueléticas entre 1618 e 1444 cm^{-1} foram relacionadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático, e as bandas compreendidas entre 887 a 739 cm^{-1} foram associadas à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromáticos.

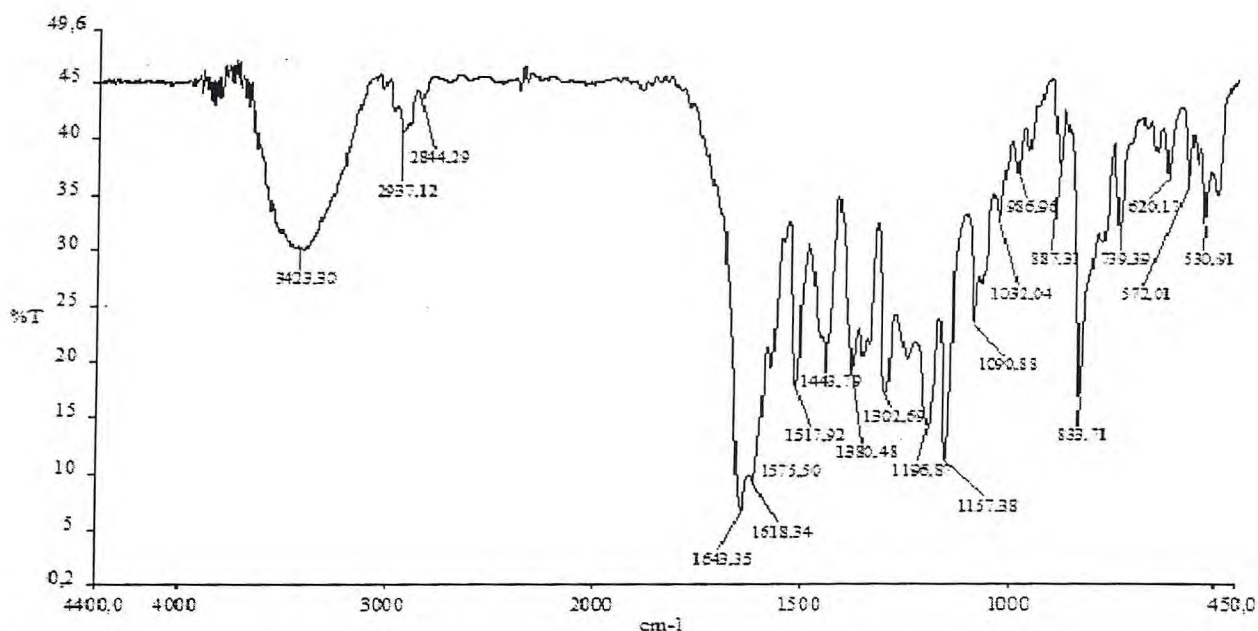


Figura 6.1 – Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-1.

Foram observados no espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-1 (Fig. 6.2), sinais característicos de sistemas aromáticos, através dos sinais em δ 6,03 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) 6,02 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) atribuídos a prótons com acoplamento *meta*, bem como dois dubletos em δ 7,30 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) e 6,82 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) característicos de grupos fenila *para*-substituídos. Observou-se um sinal em δ 5,34 (1H, dd, $J = 12,9$ e 2,85 Hz) sugestivo de hidrogênio ligado a carbono oxigenado, e sinais em δ 3,11 (1H, dd, $J = 17,2$ e 12,9 Hz) e δ 2,71 (1H, dd, $J = 17,2$ e 3 Hz), de hidrogênios diastereotópicos. Ainda um sinal em δ 3,79 (3H, s) atribuídos a prótons de metoxila.

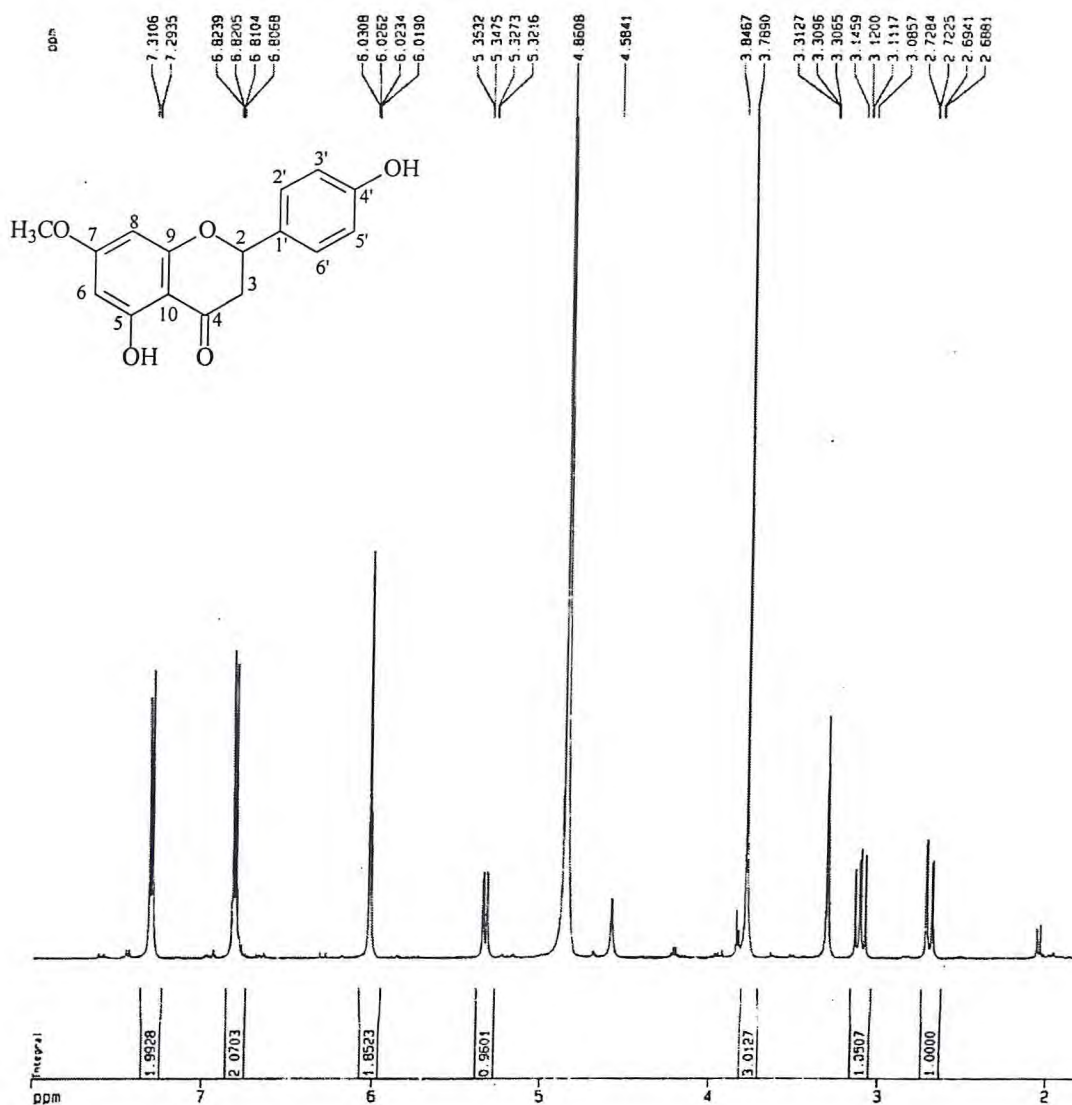


Figura 6.2 – Espectro de RMN ^1H de ECK-1 (500 MHz, CD_3OD)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz) (Fig. 6.3, p. 125) apresentou catorze sinais correspondente a dezesseis átomos, tendo em vista a presença de um anel benzênico *para*-substituído, onde se têm dois grupos de carbonos magneticamente equivalentes.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 125 MHz) (Fig. 6.4, p. 125), possibilitou estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos (Tab 6.1). A partir desta análise pôde-se observar que sete eram metínicos (CH), um metilênico (CH_2), um metílico (CH_3) e sete não-hidrogenados (C).

Tabela 6.1 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-1 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135° , δ , CD_3OD , 75 MHz).

δ C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
198,38	129,23 (x 2)	44,16	56,42	
169,66	116,51 (x 2)			
165,36	95,91			
164,84	95,11			
159,21	80,73			
131,08				
104,20				
C ₄	C ₆ H ₆	CH ₂	OCH ₃	
(C-OH) ₂	HC-O			
C=O				C ₁₆ H ₁₄ O ₅

Segundo a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein *et al.*, 1994] o sinal em δ 198,38 pôde ser atribuído a uma carbonila de cetona conjugada (também sugerida no espectro IV). Os sinais em δ 169,66, 165,36, 164,84, 159,21 e 80,73 sugeriram a presença de carbonos oxigenados, sendo o último um carbono sp^3 e os demais sp^2 . Os sinais em δ 129,23 (x2), 116,51 (x2), 95,90 e 95,10 foram atribuídos a carbonos metínicos sp^2 . Para o sinal em δ 56,42, atribui-se à absorção de carbono metílico sp^3 oxigenado, sugerindo uma metoxila que foi confirmada pela análise do espectro de RMN ^1H através do sinal em δ 3,79 (3H, s). Ainda pôde-se atribuir ao sinal em δ 44,16, um carbono metilênico sp^3 . Os demais sinais em δ , 131,08 e 104,20 sugeriram tratar-se de carbonos insaturados não-hidrogenados.

De posse destes dados, pôde-se atribuir a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$, com um Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a dez. Estas informações juntamente com as características espectrais apontaram para uma estrutura flavonoídica. A ausência de hidrogênio olefínico e a existência dos grupos metilênicos e oximetínicos indicaram tratar-se de uma flavanona.

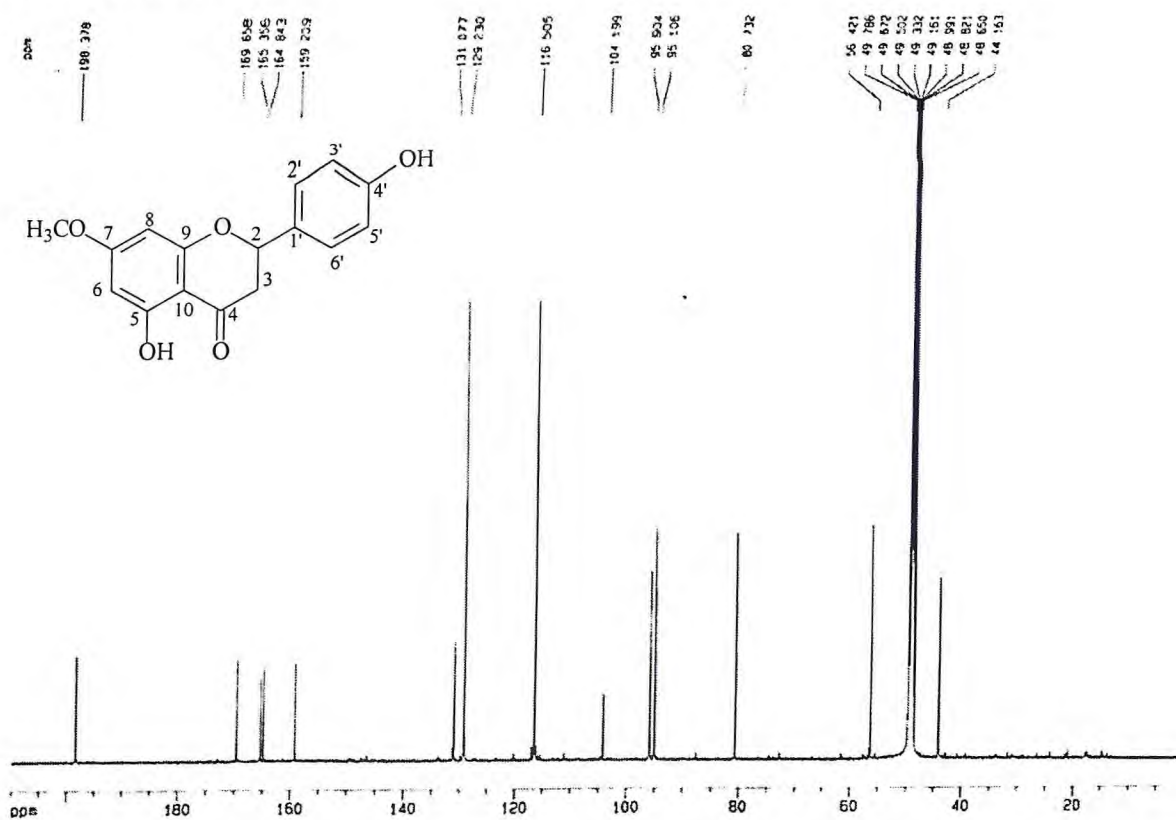


Figura 6.3 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz)

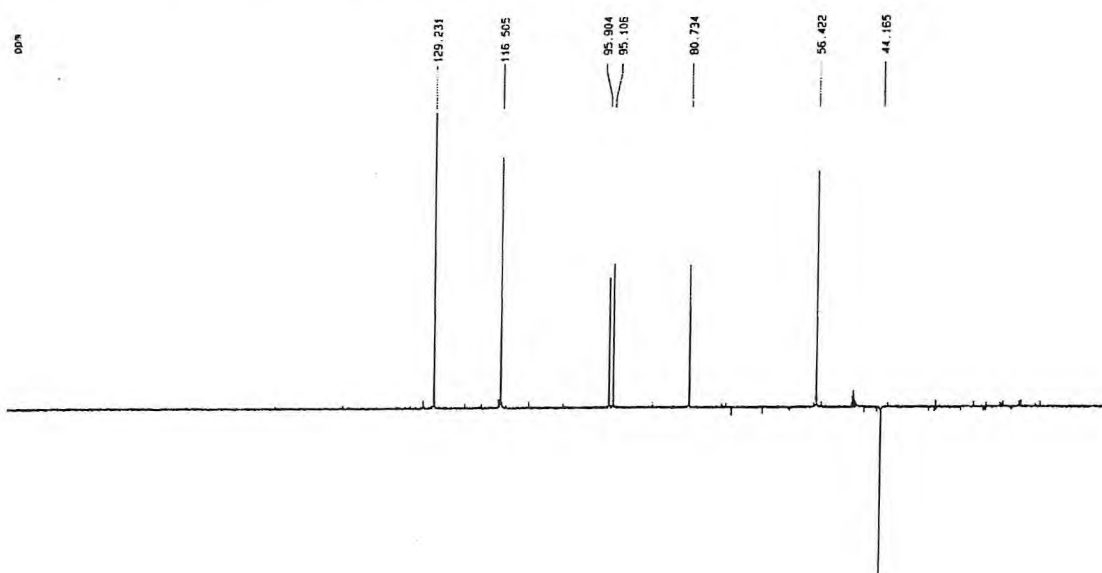


Figura 6.4 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz)

O espectro de massa (Fig. 6.5) apresentou o pico do íon molecular em m/z 286, concordante com a fórmula molecular proposta. O pico base observado em m/z 167 é resultante de um mecanismo de fragmentação comum em flavonóides via uma reação Retro-Diels-Alder. O Quadro 6.1, p. 127, ilustra este mecanismo, dentre outros.

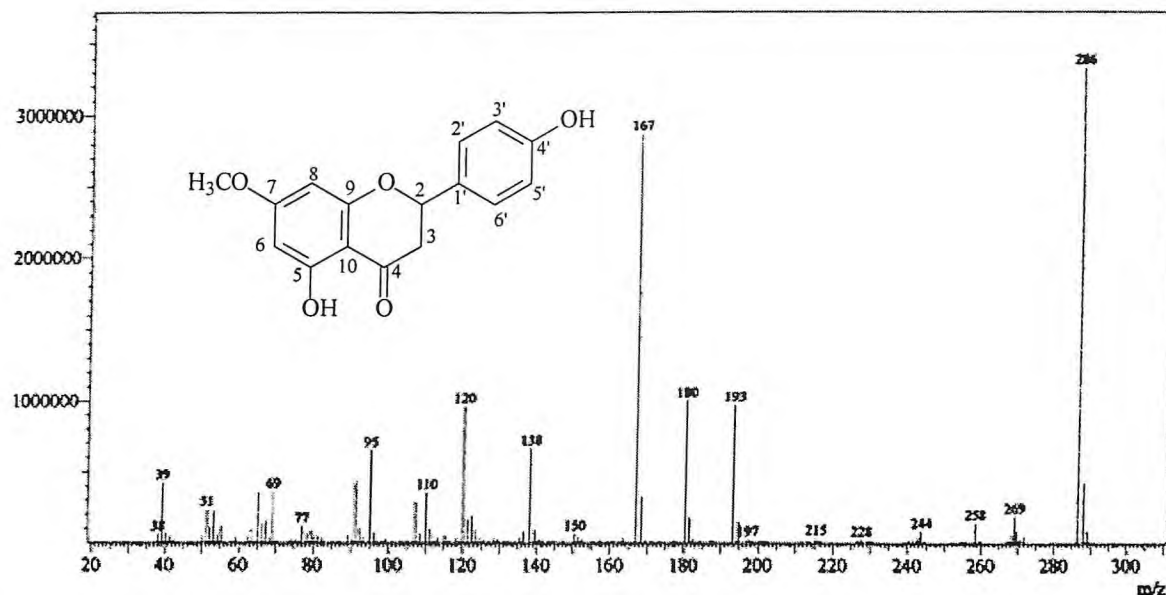
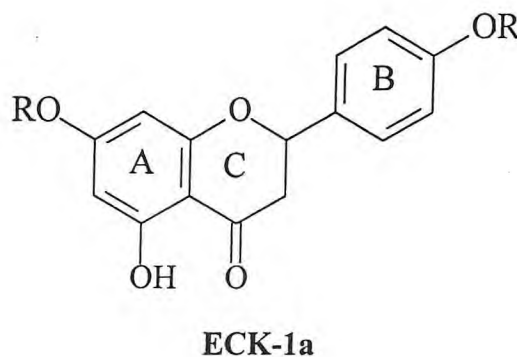
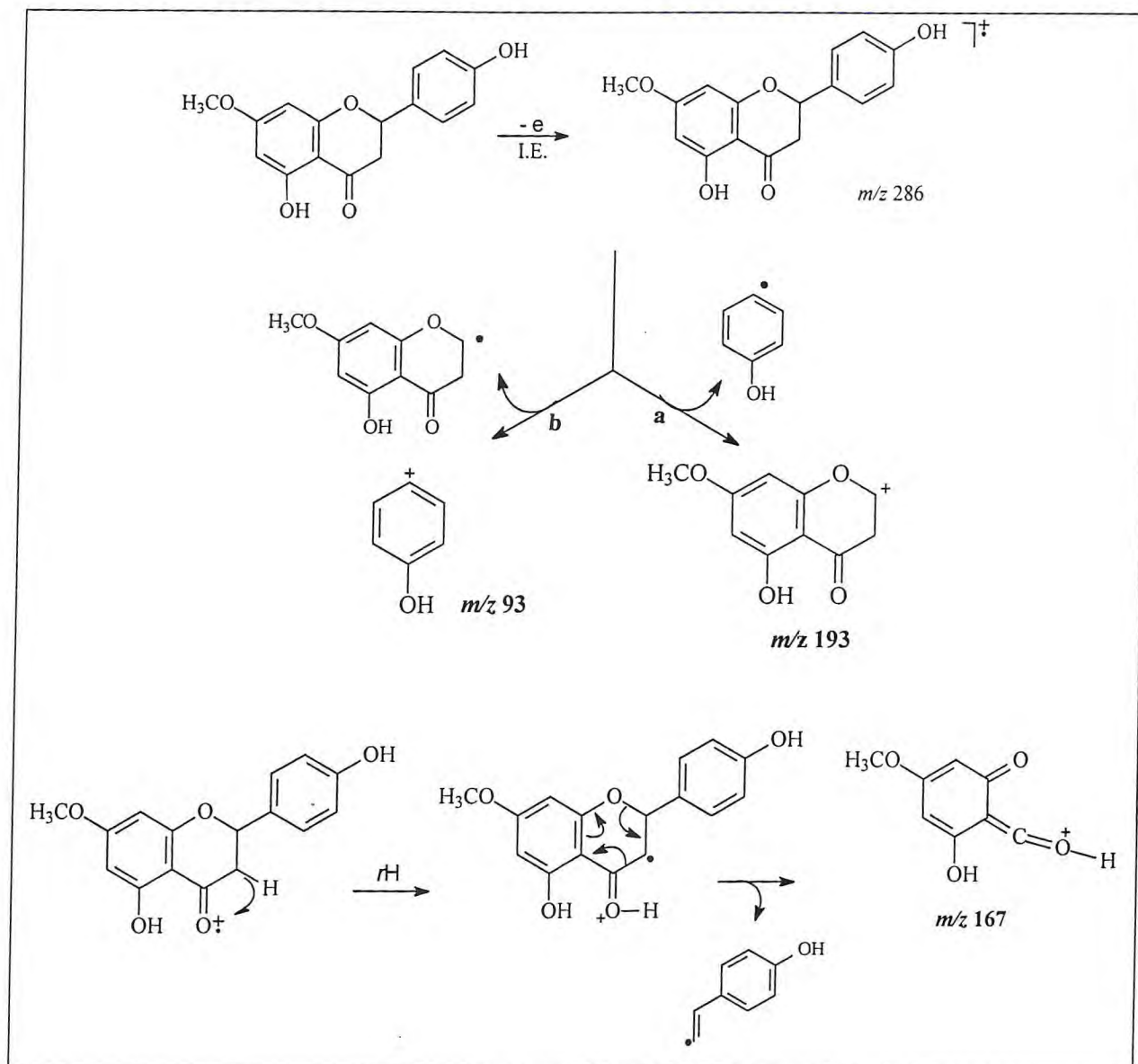


Figura 6.5 – Espectro de massa de ECK-1 (IE 70 eV)

De acordo com o padrão de multiplicidade observado no espectro de RMN ^1H de ECK-1, foi possível propor que os prótons na faixa de δ 7,30 e 6,82 ocupariam as posições 2',6' e 3',5', respectivamente, enquanto os outros prótons aromáticos estariam ligados a C-6 e C-8, visto que a maioria dos flavonóides descritos na literatura (Agrawal, 1989) são oxigenados nas posições C-5 e C-7. O esqueleto básico de ECK-1 está representado na estrutura ECK-1a.



Quadro 6.1 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-1
(1)



rH = rearranjo de hidrogênio.

Para confirmação da estrutura, recorreu-se à análise dos espectros bidimensionais. Assim, a análise do espectro de HMQC de ECK-1 (Fig.6.6) possibilitou correlacionar inequivocamente as absorções dos prótios aos seus respectivos carbonos (Tab. 6.2, p. 131).

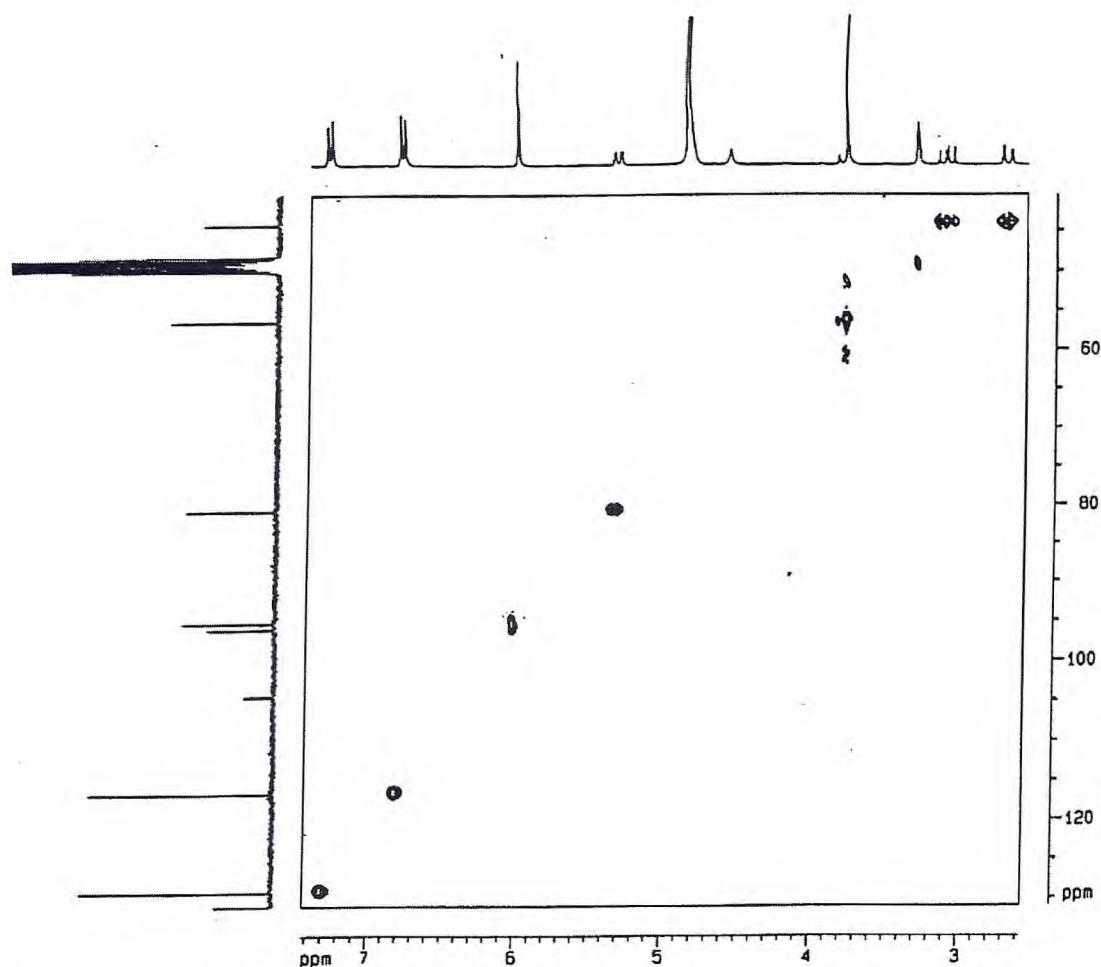


Figura 6.6 – Espectro de RMN HMQC de ECK-1 (CD₃OD, 500 MHz x 125 MHz)

A análise do espectro de RMN ¹H,¹H-COSY (Fig.6.7, p. 129) revelou os acoplamentos vicinais entre os prótios em δ 7,30 (H-2') com 6,82 (H-3') e em 5,34 (H-2) com 3,11 (H-3 β) e 2,71 (H-3 α), além do acoplamento vicinal entre os dois últimos.

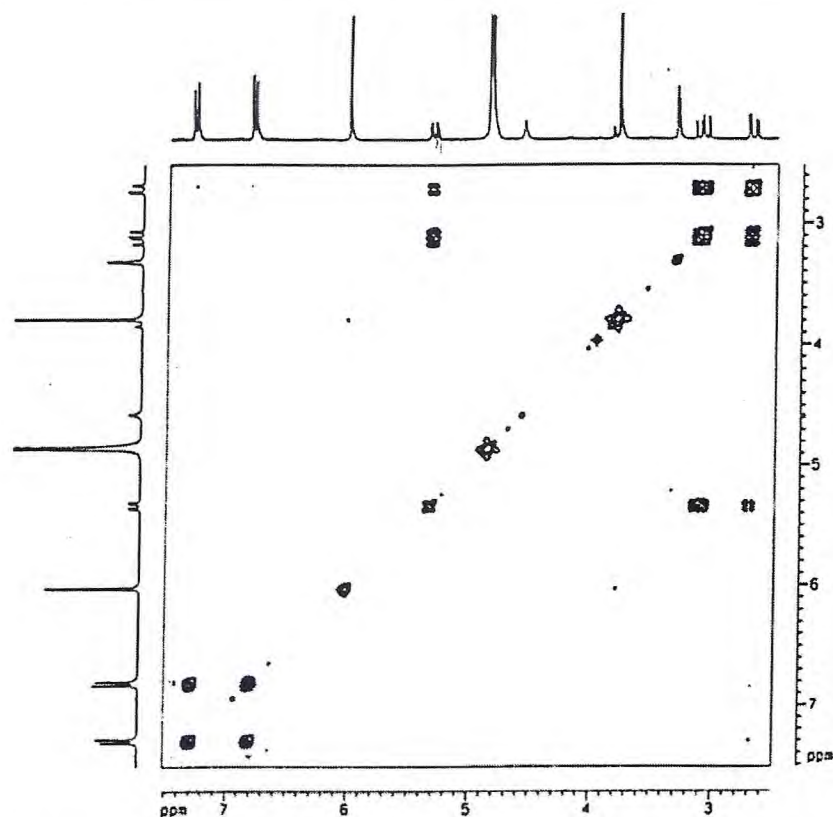
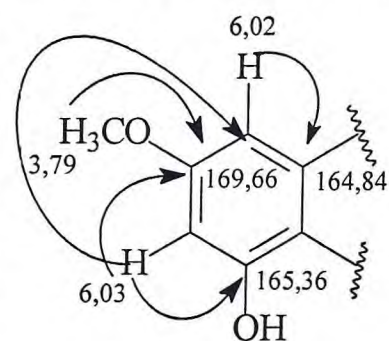


Figura 6.7 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY de ECK-1 (CD_3OD , 500 MHz)

A análise do espectro de HMBC (Fig. 6.8, p. 130) possibilitou confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos por meio dos acoplamentos à longa distância (Tab 6.2, p. 131). Dentre os acoplamentos observados, a correlação dos prótios em: δ 3,79 (OCH_3) com o carbono em δ 169,66 (C-7); δ 6,03 (H-6) com os carbonos em δ 169,66 (C-7), 165,36 (C-5) e 104,20 (C-10) e δ 6,02 (H-8) com os carbonos em δ 169,66 (C-7), 164,84 (C-9) e 104,20 (C-10), permitiram indicar a posição da metoxila em C-7, como demonstrado na subestrutura - ECK-1b.



Subestrutura ECK-1b

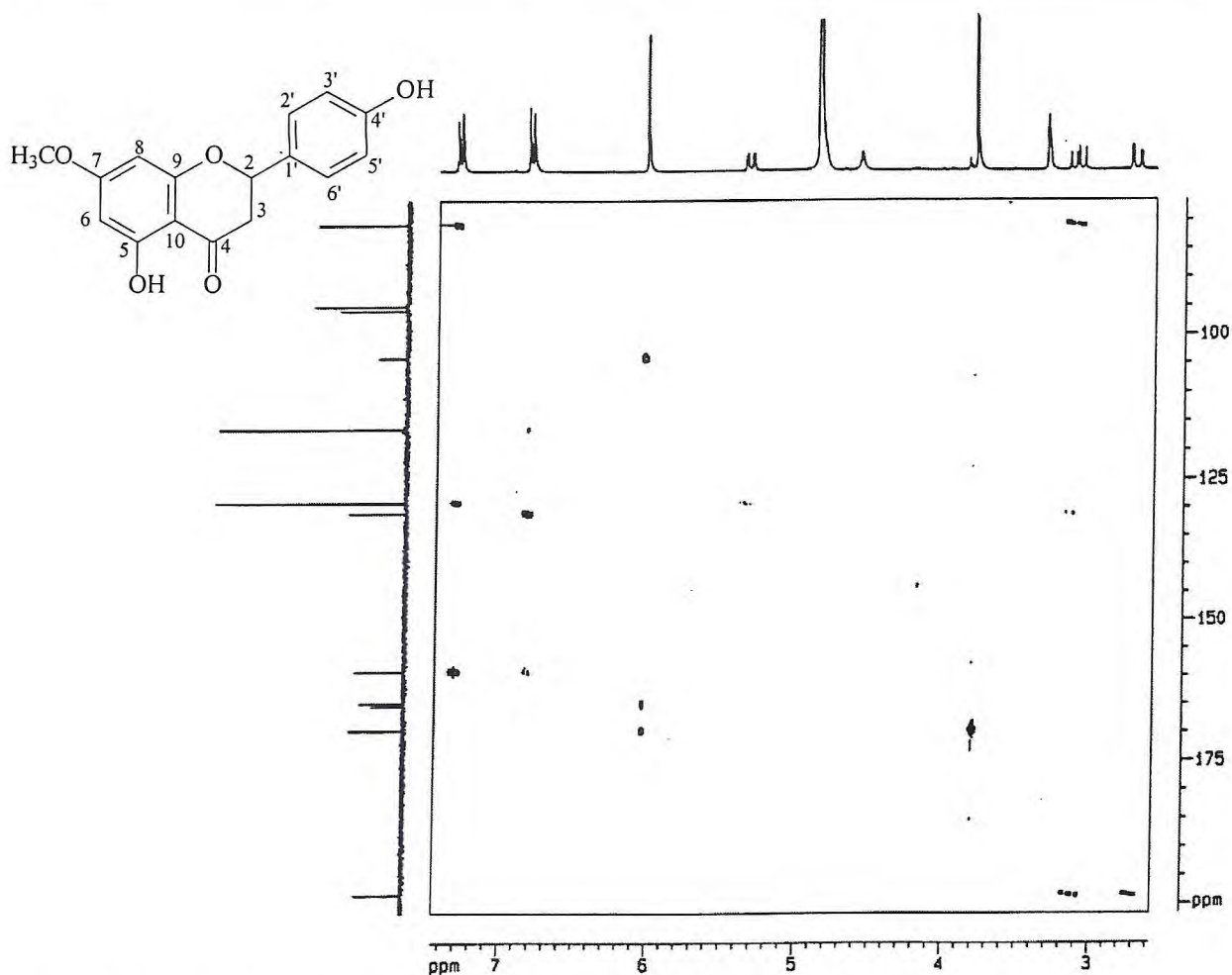
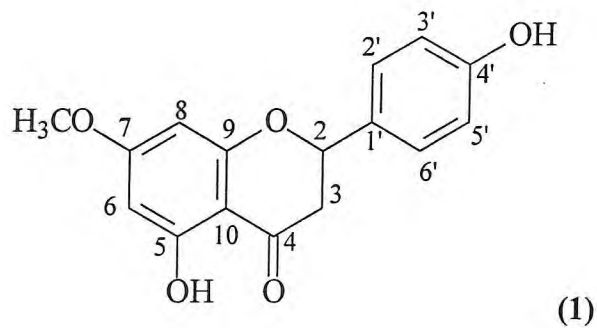


Figura 6.8 – Espectro de RMN HMBC de ECK-1 (CD₃OD, 500 MHz x 125 MHz)

As comparações entre os dados observados com os valores obtidos na literatura (Tab. 6.3, p. 132), possibilitaram sugerir para ECK-1 uma estrutura, condizente com a 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona (sakuranetina) (1), isolada do “kino” de *E. maculata* [Abdel-Sattar *et al*, 2000, *in* Rashwan, 2002], porém descrita pela primeira vez dentre os compostos isolados do “kino” de *E. citriodora*.



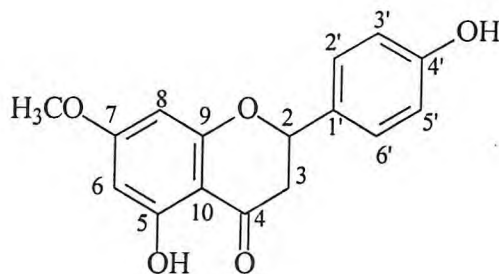
ECK-1: 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona

Tabela 6.2 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$) de ECK-1.

Carbono	δ C	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)	
		δ H	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2	80,73	5,34 (dd, $J = 12,9$ e 3 Hz)		1H-2'; 1H-6'	
3	44,16	3,11 (dd, $17,2$ e $12,9$ Hz) 2,71 (dd, $17,2$ e $3,0$ Hz)			
4	198,36		1H-3		
5	165,36				
6	95,10	6,03 (d, $J = 2,0$ Hz)		1H-8	
7	169,66		1H-6, 1H-8		
8	95,90	6,02 (d, $J = 2,0$ Hz)		1H-6	
9	164,84		1H-8		
10	104,20			1H-6, 1H-8	
1'	131,08			1H-3', 1H-5'	
2'	129,23	7,30 (d, $J = 8,6$ Hz)			
3'	116,51	6,82 (d, $J = 8,6$ Hz)			
4'	159,21		1H-3', 1H-5'	1H-2', 1H-6'	
5'	116,51	6,82 (d, $J = 8,6$ Hz)			
6'	129,23	7,30 (d, $J = 8,6$ Hz)			
OCH ₃	56,42	3,79 (s)			

Tabela 6.3 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos na literatura [Agrawal, 1989] para ECK-1.

C	ECK-1	Sakuranetina, CD_3OD
2	80,73	80,2
3	44,16	43,8
4	198,36	197,9
5	165,36	164,9
6	95,10	95,7
7	169,66	169,1
8	95,90	95,0
9	164,84	164,3
10	104,20	103,8
1'	131,08	130,7
2'	129,23	128,9
3'	116,51	116,3
4'	159,21	158,7
5'	116,51	116,3
6'	129,23	128,9
OCH_3	56,42	



ECK-1: 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona (1)

6.1.2 Identificação Estrutural de ECK-2

O tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-A (Flux. 7.2, p. 295) obtida da fração clorofórmica proveniente do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*, resultou no isolamento de cristais brancos, p.f. = 182,8-183,9 °C, denominada **ECK-2**.

No espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-2 (Fig. 6.9) foram observadas bandas características de deformação axial da ligação O-H de hidroxila: uma banda fina em 3461 cm^{-1} , relativa à hidroxila livre e em 3376 cm^{-1} , atribuída à hidroxila quelada; em 3102 cm^{-1} uma banda de deformação axial característica da ligação C-H insaturado; as absorções em 2921 e 2860 cm^{-1} foram relacionadas à deformação axial assimétrica de ligação C_{sp^3} - H, e a absorção registrada em 1627 cm^{-1} é relativa à deformação axial da ligação C=O, sugerindo a presença de cetona com ligação intramolecular, conjugada e duplamente quelada. Em 1576, 1519, 1462 e 1438 cm^{-1} , foram registradas absorções indicativas de vibrações esqueléticas referentes à deformação axial das ligações C = C de anel aromático, enquanto os valores observados em 1260, 1208, 1188, 1153, 1134 e 1088 cm^{-1} , envolvem as deformações axiais de C-O. Ainda foram observadas absorções referentes à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromático em 836 e 760 cm^{-1} .

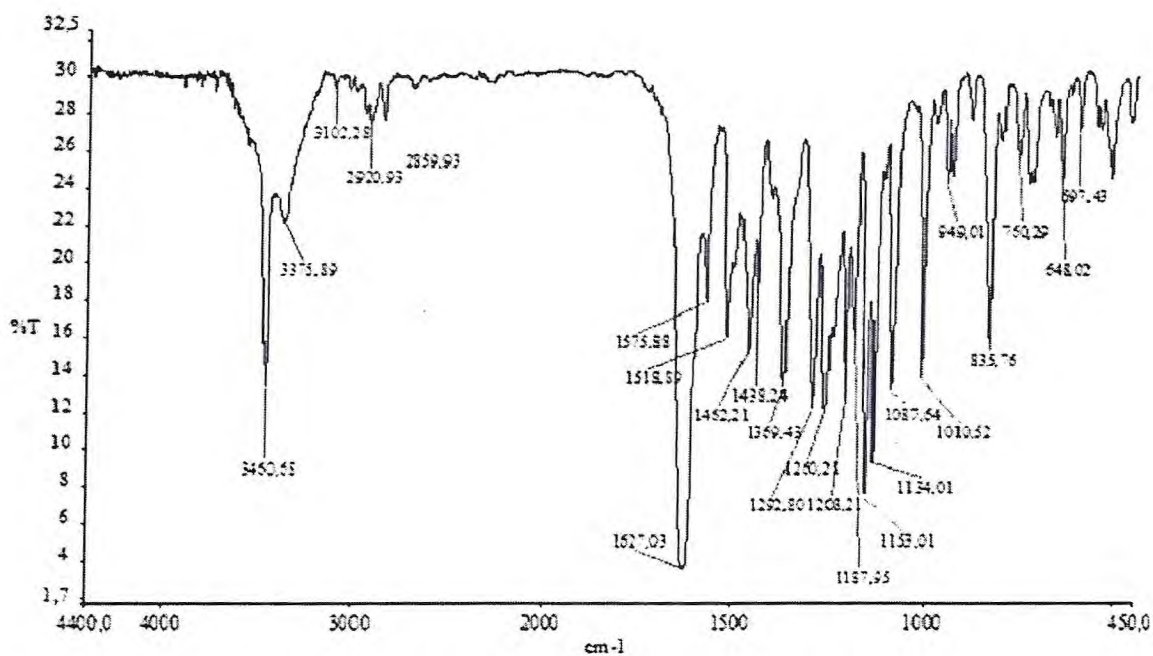


Figura 6.9 – Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-2.

A análise do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-2 (Fig. 6.10) permitiu observar sinais na região de hidrogênios aromáticos, dos quais dois deles foram atribuídos a sistemas aromáticos *para*-substituídos através dos sinais de dois hidrogênios em δ 7,37 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), magneticamente equivalentes. As absorções em δ 6,09 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e 6,04 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), sugeriram a existência de outro sistema aromático com acoplamento *meta*. As absorções em δ 5,02 (1H, d, $J = 11,5$ Hz) e 4,58 (1H, d, $J = 11,5$ Hz) foram atribuídas a prótons ligados a carbonos oxigenados característicos de um esqueleto diidroflavanol com estereoquímica *trans*.

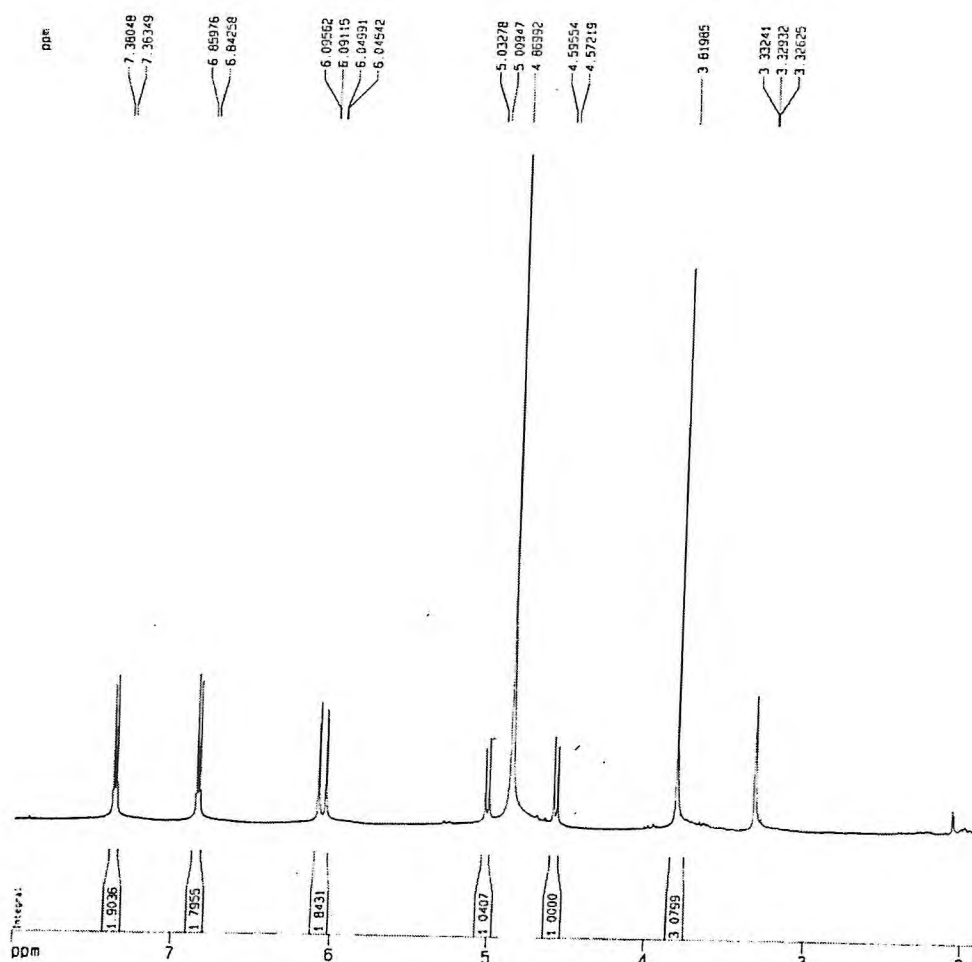


Figura 6.10 – Espectro de RMN ^1H de ECK-2 (CD_3OD , 500 MHz).

O espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz), apresentou sinais adicionais antes não observados com CD_3OD . O sinal em δ 11,87 (1H, s) foi atribuído a uma hidroxila quelada e em δ 9,58 (1H, s) foi atribuído a outra hidroxila fenólica. Ainda se pôde assinalar o sinal em 4,64 (1H, m) a hidrogênio de hidroxila ligada a carbono sp^3 . (Fig. 6.11, p. 135).

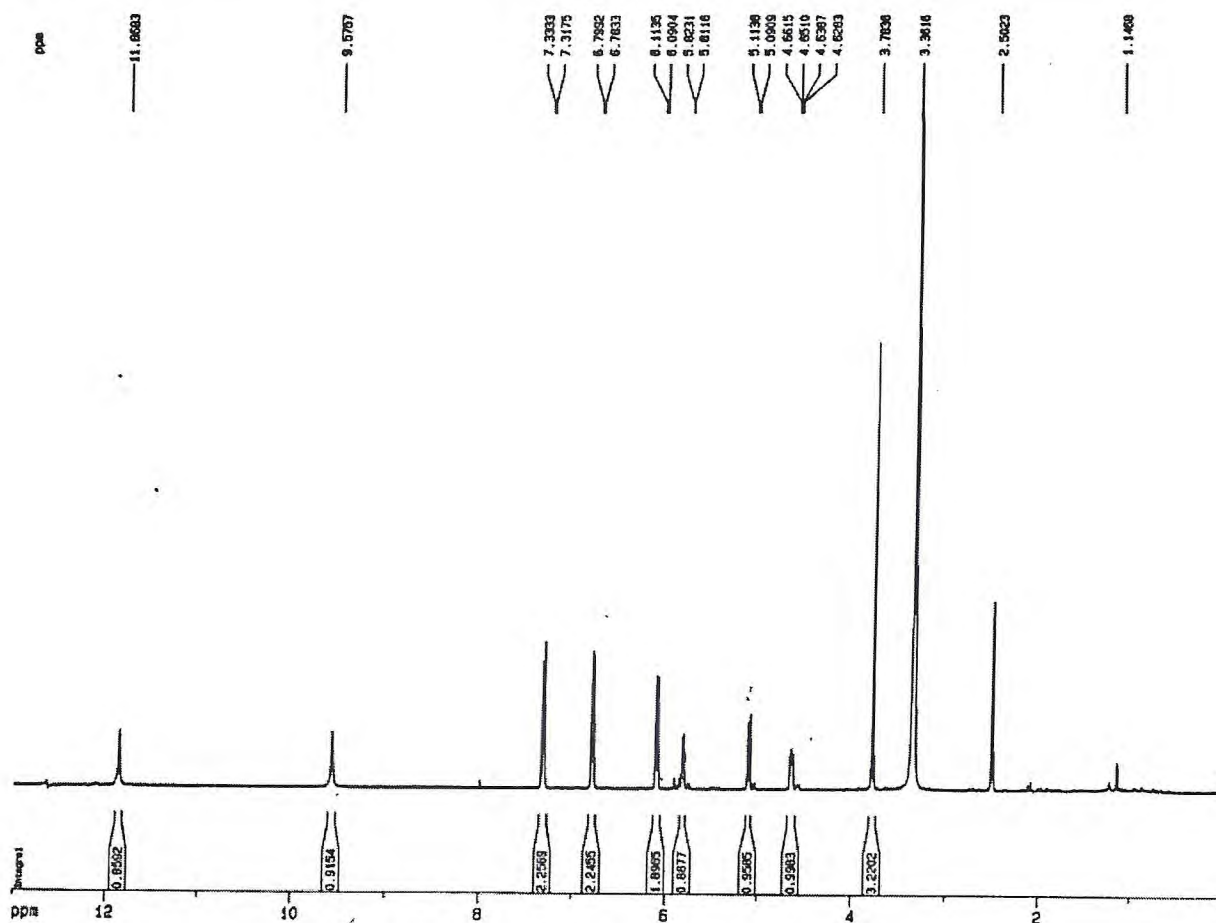


Figura 6.11 – Espectro de RMN ^1H de ECK-2 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Analisando-se o espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 6.12, p. 136) de ECK-2 (CD_3OD , 125 MHz), puderam-se observar catorze sinais referentes a dezesseis carbonos, posto que os sinais em δ 129,39 e 115,16 foram atribuídos a dois carbonos magneticamente equivalentes.

Para atribuir o padrão de hidrogenação dos carbonos, fez-se a comparação entre espectros de RMN ^{13}C -CPD e o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 125 MHz) (Fig. 6.13, p. 136), o que possibilitou estabelecer que sete carbonos eram não-hidrogenados (C), oito metínicos (CH) e um metílico (CH_3) (Tab 6.4, p. 137).

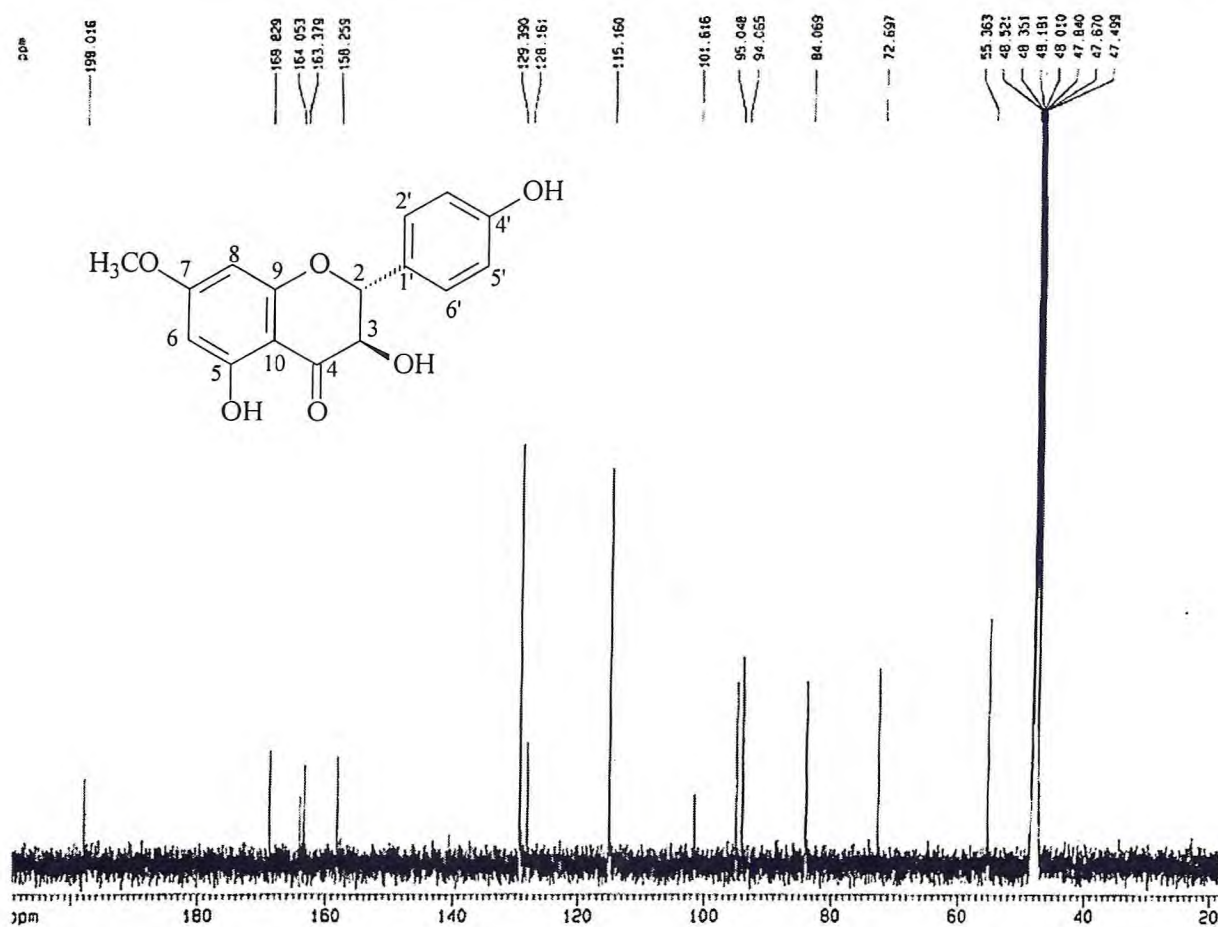


Figura 6.12 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de ECK-2 (CD₃OD, 125 MHz)

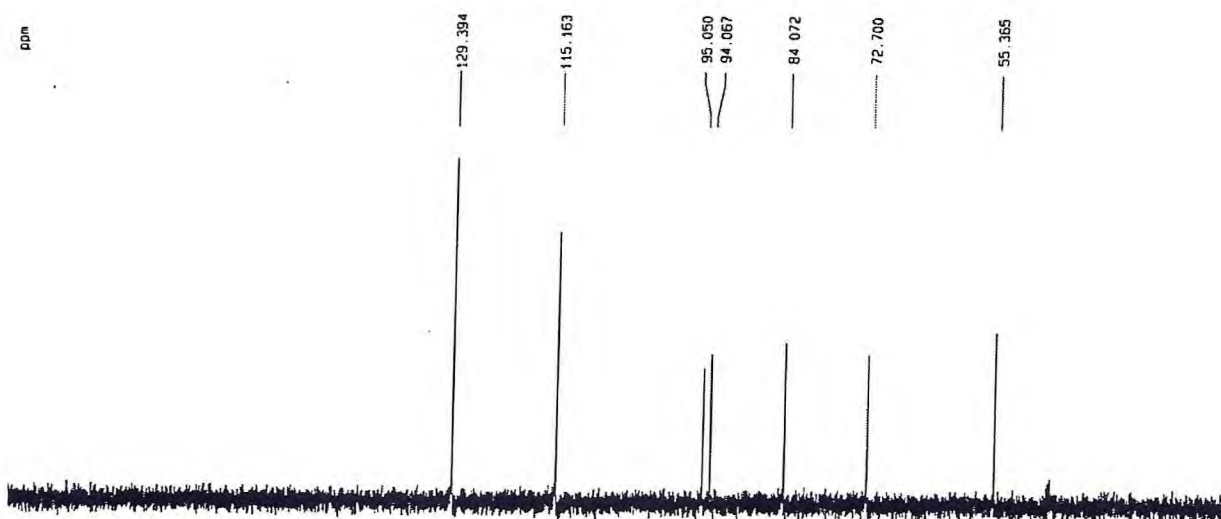


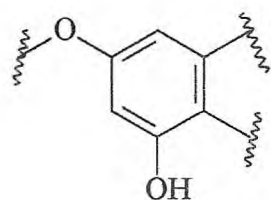
Figura 6.13 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-2 (CD₃OD, 125 MHz)

Tabela 6.4 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-2 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135° , δ , CD_3OD , 125 MHz)

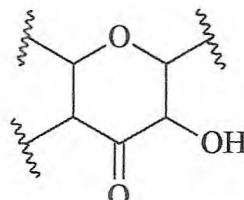
δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
198,02	129,39 (x2)		55,37	
168,83	115,16 (x2)			
164,05	95,05			
163,38	94,07			
158,26	84,07			
128,16	72,70			
101,62				
C ₃	C ₆ H ₆		O-CH ₃	
(C-OH) ₂	HC-OH			
C-O	HC-O			
C=O				C ₁₆ H ₁₄ O ₆

A utilização da teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] possibilitou sugerir valores aos carbonos. O sinal em δ 198,02 foi atribuído a carbonila de cetona conjugada. Os sinais entre δ 168,83 e 158,26 foram atribuídos a carbonos oxigenados sp^2 , enquanto o sinal em δ 84,07, também oxigenado, porém sp^3 . Os sinais observados em δ 129,39, 115,16, 95,05 e 94,07 foram atribuídos a carbonos metínicos sp^2 , enquanto para o sinal em δ 55,37, a absorção de carbono metílico sp^3 oxigenado, característica de metoxila. Os sinais em δ 84,07 e 72,07 sugeriram ser carbonos oxigenados do tipo sp^3 . Os demais, em δ 128,16 e 101,62, foram caracterizados como carbonos não-hidrogenados de aromáticos.

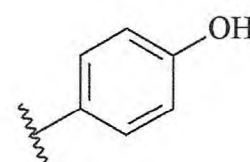
De acordo com os dados observados foi possível propor para ECK-2 a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$, com dez índices de deficiência de hidrogênio (IDH), os quais oito deles foram atribuídos a dois anéis aromáticos, um ao grupo carbonila e o último a mais um anel, correspondendo a um provável esqueleto flavonoídico com a incorporação das possíveis estruturas parciais.



ECK-2a



ECK-2b



ECK-2c

Subestruturas propostas para ECK-2

O espectro de massa de ECK-2 (Fig. 6.14) apresentou o pico do íon molecular em m/z 302, condizente com a fórmula molecular sugerida. O pico base observado em m/z 167 é característico de flavonóides gerado pelo mecanismo de Retro-Diels-Alder a representação do mecanismo desta fragmentação está no Quadro 6.2, p. 139.

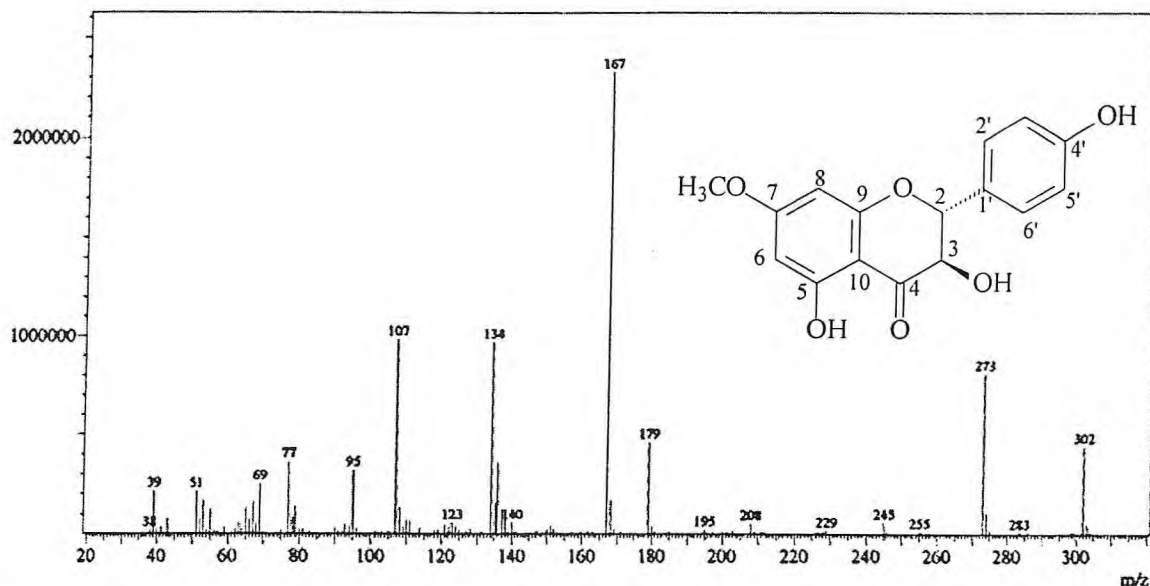
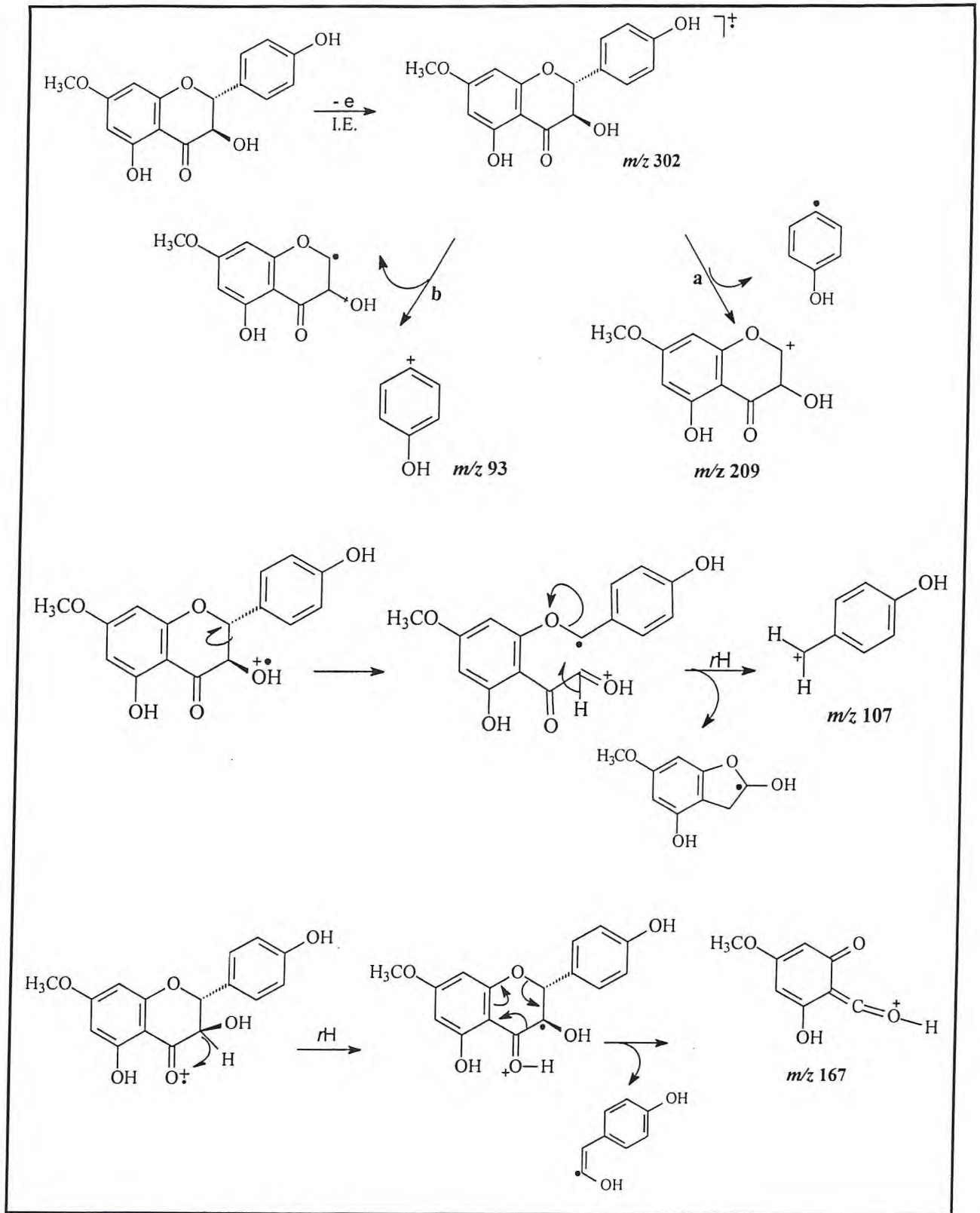


Figura 6.14 – Espectro de massa de ECK-2 (IE, 70 eV)

Quadro 6.2 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-2 (2)



rH = rearranjo de hidrogênio.

A análise do espectro RMN HMQC de ECK-2 (Fig. 6.15) possibilitou observar o acoplamento C-H a uma ligação e relacionar todos os prótios aos seus respectivos carbonos inequivocamente. Este espectro mostrou o acoplamento $^1J_{CH}$ entre o prótio oximetínico em δ 5,02 com o carbono em δ 84,07 (C-2) e do prótio metínico em δ 4,58 com o carbono em 72,70 (C-3); dos prótios metínicos em δ 7,37 e 6,85 com os carbonos em δ 129,39 (C-2' e C-6') e 115,16 (C-3' e C-5'), respectivamente. Os demais se encontram relacionados na Tabela 6.5 (p. 143).

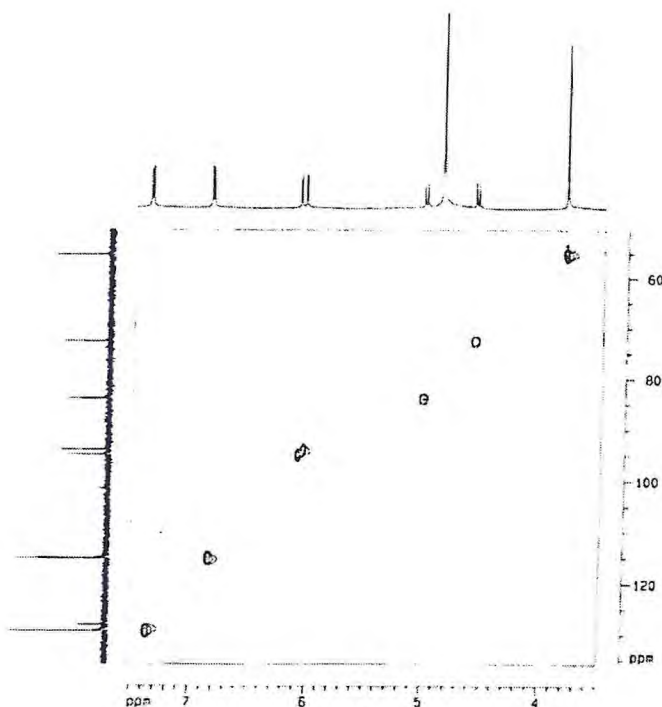
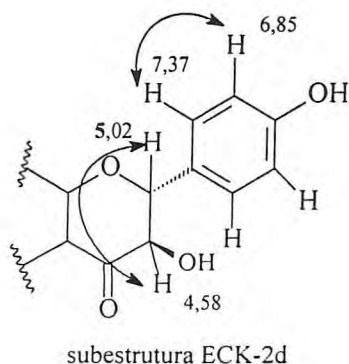


Figura 6.15 – Espectro de RMN HMQC de ECK-2 (CD₃OD, 500, 125 MHz)

Estes acoplamentos citados, em particular, puderam ser confirmados pelo resultado da análise do espectro de RMN 2D de correlação homonuclear ($^1H, ^1H$ -COSY) (Fig. 6.16, p. 141), revelou os acoplamentos vicinais entre os prótios em δ 7,37 (H-2' e H-6') com 6,85 (H-3' e H-5') e em δ 5,02 (H-2) com 4,58 (H-3), justificando a subestrutura ECK-2d atribuída para o flavanonol.



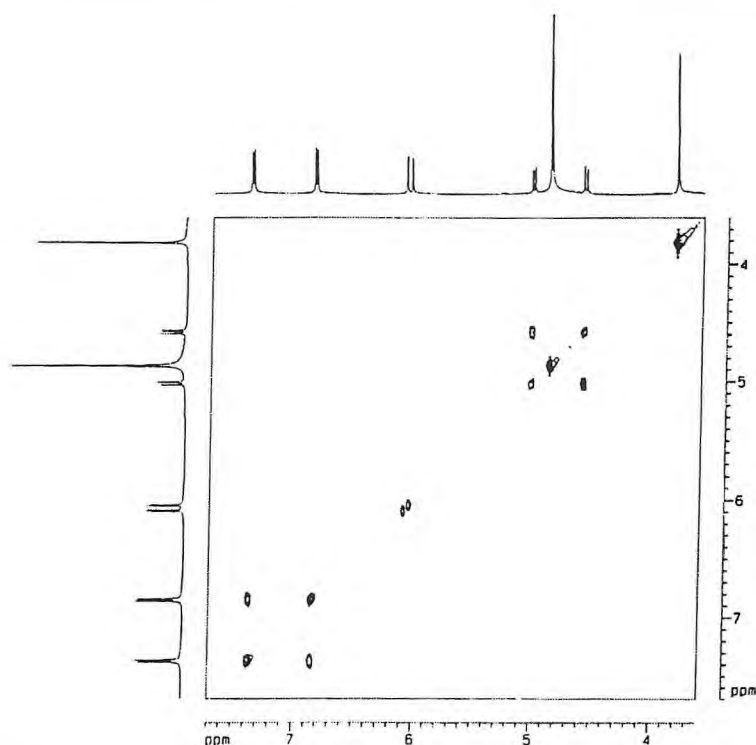
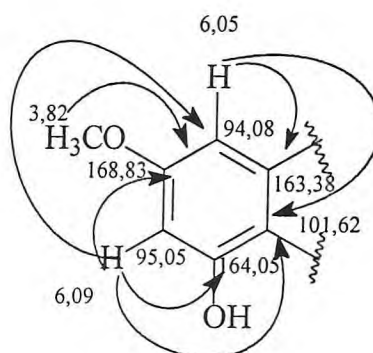


Figura 6.16. Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY de ECK-2

A análise do espectro RMN HMBC (Fig. 6.17, p. 142), permitiu mostrar os acoplamentos a longa distância ($^2\text{J}_{\text{CH}}$, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre prótios e carbonos (Tab. 6.5, p. 143). Desta forma, ficou inequívoca a localização da metoxila em δ 168,83 (C-7), através das correlações dos prótios da metoxila em δ 3,82 e dos prótios em δ 6,09 (H-6) e 6,05 (H-8) com este carbono. Puderam-se observar também, acoplamentos $^2\text{J}_{\text{CH}}$, entre os prótios com os carbonos em: δ 6,09 (H-6) com 164,05 (C-5) e 6,05 (H-8) com 163,38 (C-9). A representação destes acoplamentos encontra-se na subestrutura ECK-2e.



Subestrutura ECK-2e

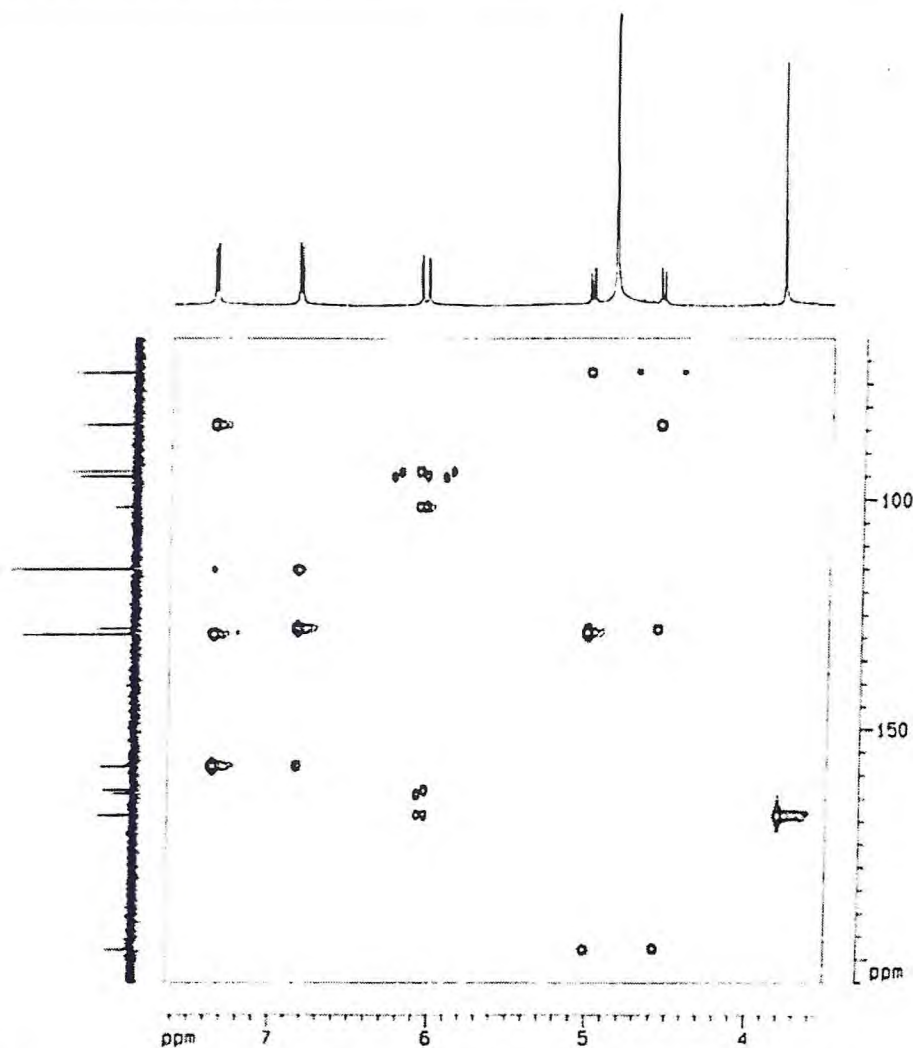
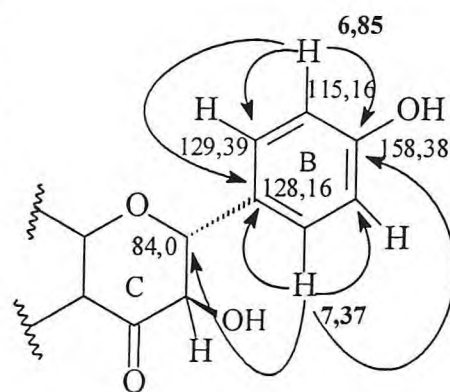


Figura 6.17 – Espectro de RMN HMBC de ECK-2 (CD_3OD , 500, 125 MHz)

As correlações observadas no anel B, obtidas por meio de observações no espectro RMN HMBC, do prótio em δ 7,37 (H-2' e H-6') com os carbonos em δ 128,16 (C-1'), 158,38 (C-4'), 115,16 (C-3' e C-5') e 84,07 (C-2), assim como do prótio em 6,85 (H-3' e H-5') com os carbonos em δ 158,38 (C-4'), 129,39 (C-2' e C-6') e 128,16 (C-1'), confirmou a posição de OH no carbono C-4'. A subestrutura ECK-2f traz a representação destes acoplamentos.

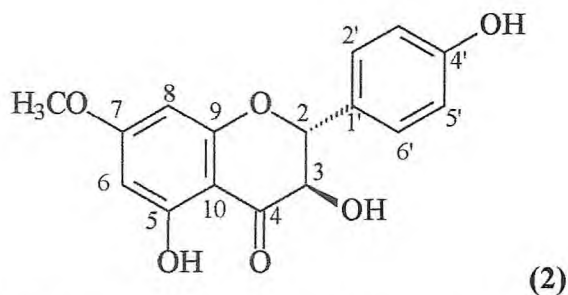


Subestrutura ECK-2f

Tabela 6.5 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-2

Carbono	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	84,07	5,02 (d, $J=11,5$ Hz)	1H-3	1H-2';1H-6'
3	72,70	4,58 (d, $J=11,5$ Hz)	1H-2	
4	198,02			
5	164,05		1H-6	
6	95,05	6,09 (d, $J=2$ Hz)		1H-8
7	168,83		1H-6, 1H-8	3H(OCH ₃)
8	94,07	6,04 (d, $J=2$ Hz)		1H-6
9	163,38		1H-8	
10	101,62			1H-6, 1H-8
1'	128,16		1H-2, 1H-2', 1H-6'	1H-3, 1H-3'; 5'
2'	129,39	7,37 (d, $J=8,5$ Hz)	1H-3'	1H-2
3'	115,16	6,85 (d, $J=8,5$ Hz)	1H-2'	
4'	158,39		1H-3', 1H-5'	1H-2', 1H-6'
5'	115,16	6,85 (d, $J=8,5$ Hz)	1H-6'	
6'	129,39	7,37 (d, $J=8,5$ Hz)	1H-5'	1H-2
OCH ₃	55,37	3,82 (s)		

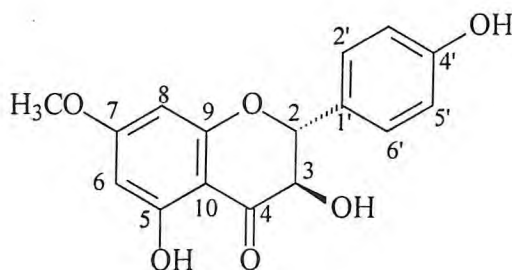
A análise dos dados espectroscópicos obtidos para ECK-2, e a posterior comparação com dados registrados na literatura (Tab. 6.6, p. 144) confirmaram que ECK-2 tratava-se da 5,4'-diidróxi-7-metóxi-flavanonol (aromadendrina-7-metil éter) (2) [Agrawal, 1989] anteriormente isolada e já descrita para o "kino" de *E. citriodora* [Satwalekar, Gupta *et al.*, 1957].



ECK-2: 5,4'-diidróxi-7-metóxi-flavanonol (aromadendrina-7-metil éter).

Tabela 6.6 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de ECK-2 com os da literatura para aromadendrina-7-metil éter [Agrawal, 1989].

C	ECK-2	Aromadendrina-7-metil éter, CD_3OD
2	84,07	83,8
3	72,70	72,3
4	198,02	197,7
5	164,05	163,6
6	95,05	95,0
7	168,83	168,4
8	94,07	93,7
9	163,38	163,0
10	101,62	101,2
1'	128,16	127,8
2'	129,39	129,1
3'	115,16	114,8
4'	158,39	158,1
5'	115,16	114,8
6'	129,39	129,1
$\text{CH}_3\text{O}-$	55,37	



6.1.2.1 Reação de Acetilação de ECK-2 – Obtenção de ECK-2-Ac

A reação de acetilação de ECK-2 com anidrido acético e piridina (Item 7.7, p. 326), foi realizada para a obtenção de um derivado de ECK-2. Obteve-se um sólido branco, translúcido, com p.f. 119,7 -123,3 °C, sendo denominado **ECK-2-Ac**.

A comparação dos dados dos espectros de RMN ^1H de ECK-2 e de ECK-2-Ac (Fig. 6.18) revelou a incorporação de grupamentos acetila pelo surgimento de três sinais simples e intensos em δ 2,38 (3H, s), 2,31 (3H, s) e 2,01 (3H, s), indicando que todas as hidroxilas, inclusive a quelada, foram acetiladas.

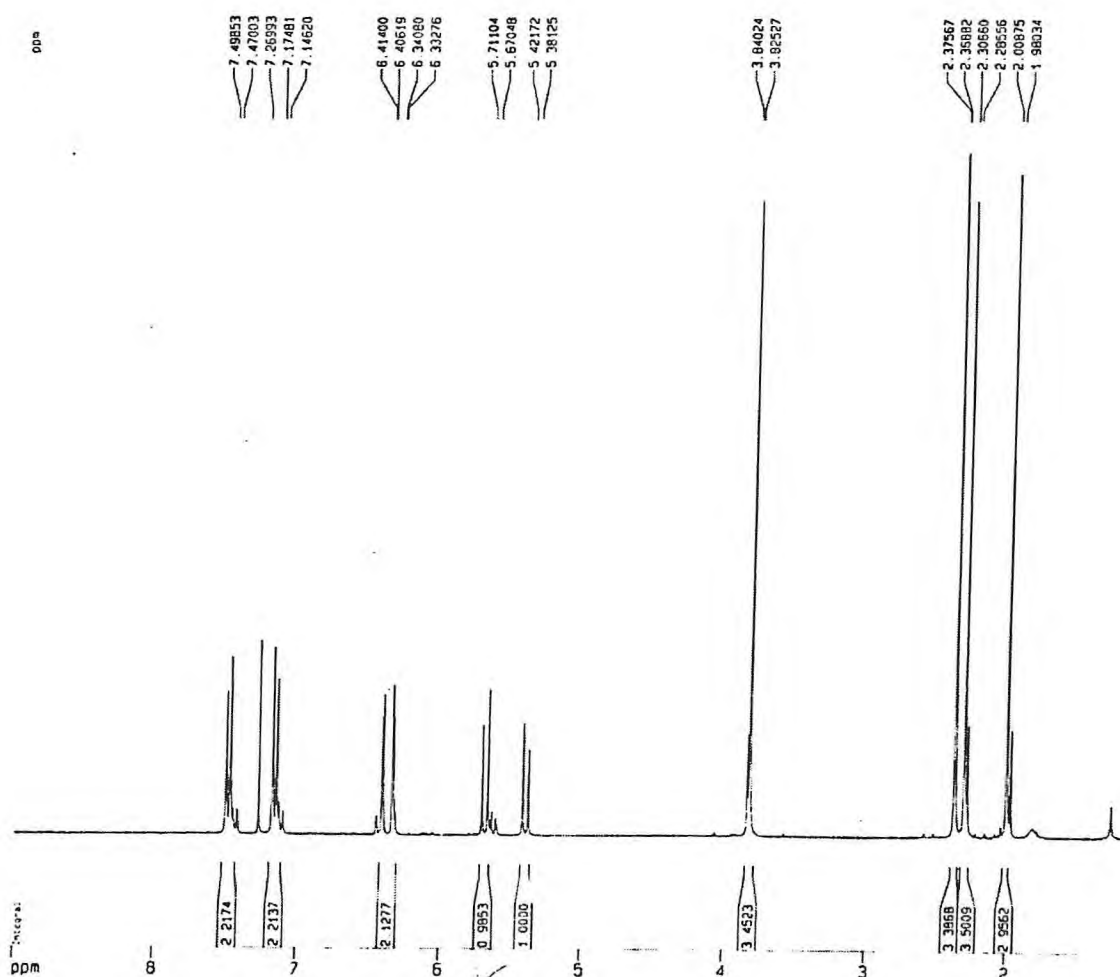


Figura 6.18 – Espectro de RMN ^1H de ECK-2-Ac (CDCl_3 , 500 MHz).

Estes dados foram confirmados por meio do espectro RMN ^{13}C -CPD (Fig. 6.19) no qual foram observadas linhas espectrais adicionais em δ 169,48, 169,40 e 169,30 relacionados aos três carbonos carbonílicos e em δ 21,26, 21,16 e 20,51, relativos a três grupamentos metila. Ao comparar os espectros de RMN ^{13}C -CPD de ECK-2 com o do ECK-2-Ac (Fig. 6.19) foram observadas diferenças nos valores de deslocamentos químicos, principalmente dos carbonos aromáticos oxigenados de ECK-2-Ac, os quais apresentaram menores valores de δ devido ao efeito protetor dos grupos acetila. Observaram-se, também, alterações nos valores de δ dos carbonos vizinhos a estes, os quais foram deslocados para região de desproteção.

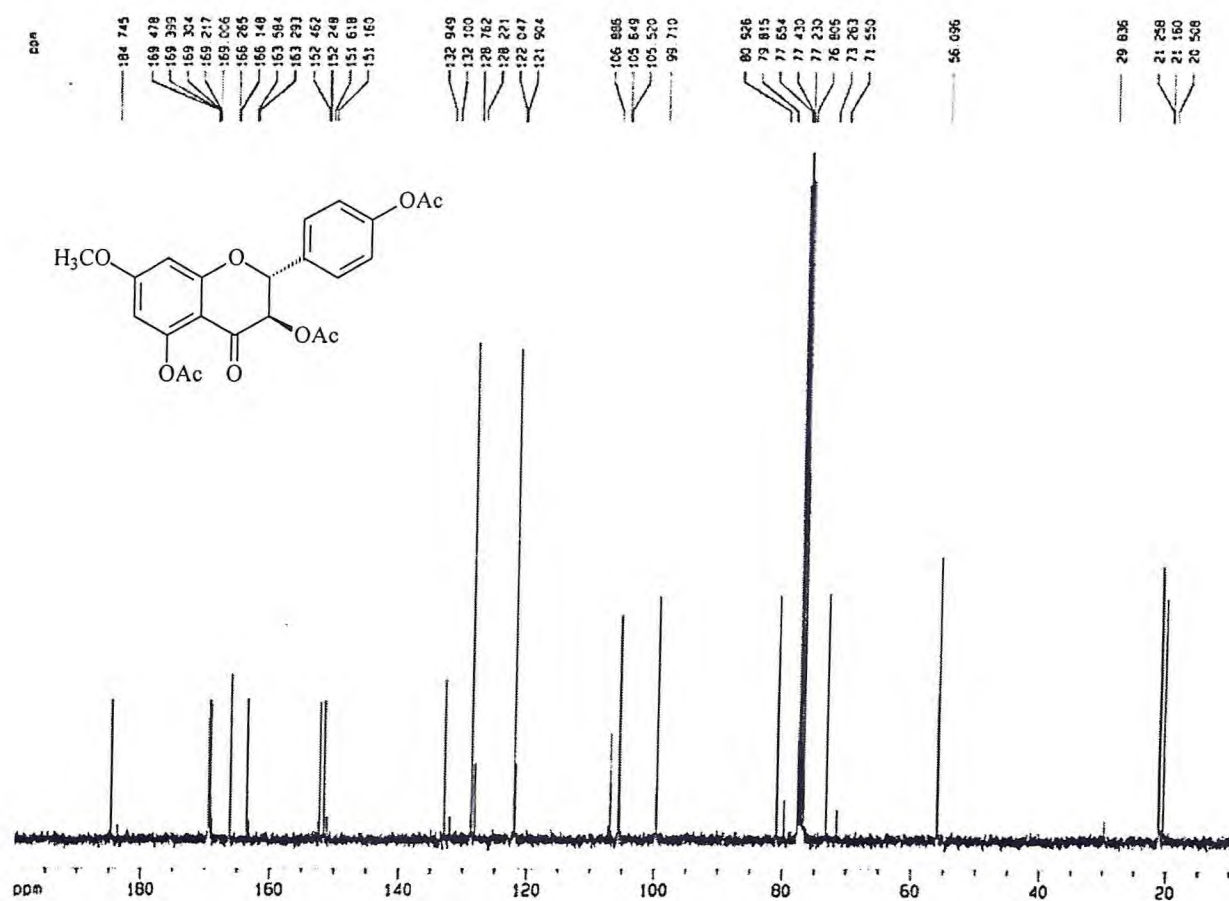
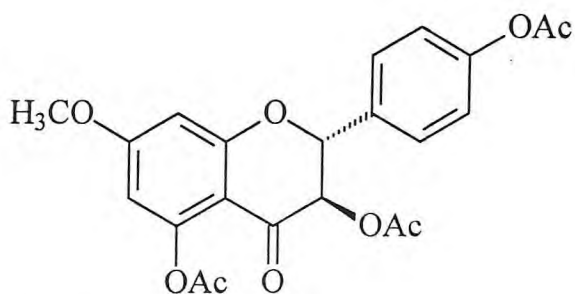


Figura 6.19 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-2-Ac (CDCl_3 , 125 MHz)

Após análise dos dados espectrais obtidos, chegou-se à fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_9$, condizente com os acréscimos dos grupamentos acetila, permitindo atribuir a ECK-2 a estrutura de 3,5,4'-triacetoxi-7-metileter aromadendrina. Os dados de RMN ^{13}C -CPD de ECK-2 e ECK-2-Ac encontram-se dispostos na Tabela 6.7, p.147.

Tabela 6.7 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de ECK-2 (δ , CD_3OD , 125 MHz) com os dados de ECK-2-Ac (δ , CDCl_3 , 125 MHz)

Carbono	ECK-2	ECK-2-Ac
2	84,07	80,93
3	72,70	73,26
4	198,02	184,75
5	164,05	152,25
6	95,05	105,65
7	168,83	169,01
8	94,07	99,71
9	163,38	169,03
10	101,62	106,89
1'	128,16	132,95
2'	129,39	128,76
3'	115,16	121,05
4'	158,38	151,62
5'	115,16	121,05
6'	129,39	128,76
CH_3O	55,36	56,10
$\text{C}=\text{O}$ (Ac)		169,49
"		169,40
"		169,30
CH_3 (Ac)		21,26
"		21,16
"		20,51



ECK-2Ac: 3,5,4'-triacetoxy-7-metileter aromadendrina.

6.1.3 Identificação estrutural de ECK-3

O tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-A'CF (Flux. 7.2, p. 295), obtida da fração clorofórmica oriunda do particionamento do kino de *Eucalyptus citriodora*, resultou em um sólido cristalino, translúcido, p.f. = 227,8-229,9 °C, denominado **ECK-3**.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-3 (Fig.6.20) permitiu observar bandas características de grupos funcionais específicos tais como: uma banda larga em 3134 cm^{-1} , atribuída à deformação axial da ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila quelada, bandas em 2919 e 2831 cm^{-1} relacionadas à deformação axial assimétrica de ligação $C_{sp^3}\text{-H}$, sugestivas de grupamentos CH_2 e CH_3 , respectivamente; banda em 1630 cm^{-1} relativas à deformação axial da ligação C=O de cetona conjugada; absorções visualizadas em 1499 e 1464 cm^{-1} , indicativas de vibrações de esqueleto envolvendo a deformação axial das ligações C=C de anel aromático. As absorções em 1251 , 1179 , 1159 e 1086 foram atribuídas a deformações axiais C-O, enquanto aquelas em 889 , 832 e 736 cm^{-1} foram caracterizadas como deformações angulares fora do plano de ligação C-H de anel aromático.

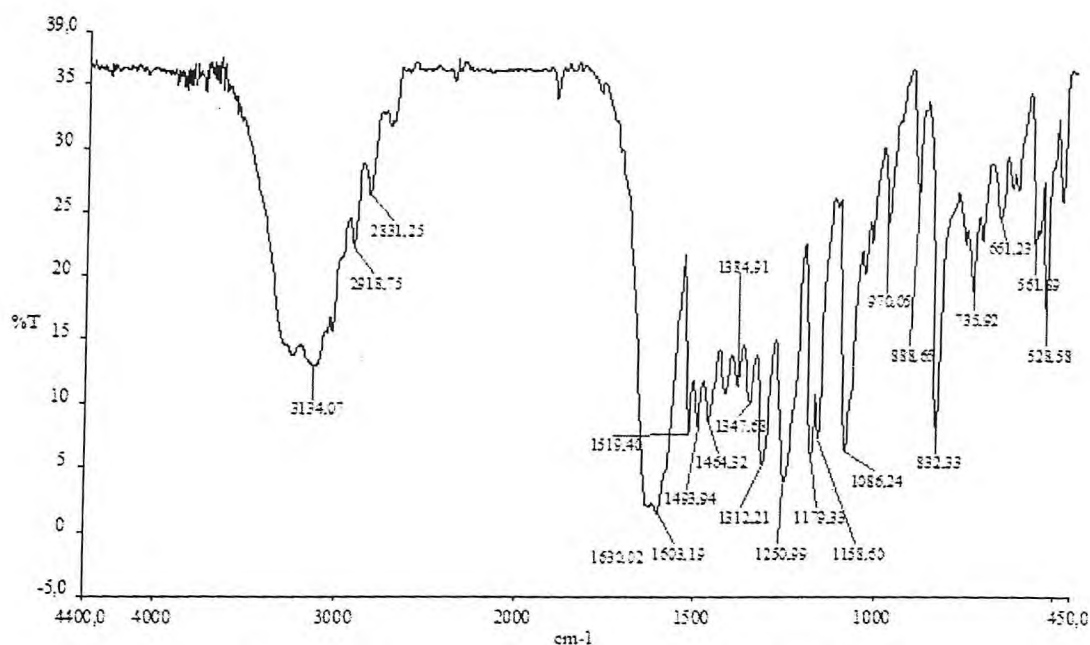


Figura 6.20 – Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de ECK-3

A análise do espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de ECK-3 (Fig. 6.21, p. 149) permitiu observar sinais na região de prótios aromáticos, dentre eles dois foram caracterizados

como um sistema *para*-substituído através das absorções em δ 7,31 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e δ 6,81 (2H, d, $J = 8,5$ Hz). O sinal em δ 5,30 (1H, dd, $J = 2,8$ e 12,9 Hz) foi atribuído a prótio ligado a carbono oxigenado, enquanto os sinais em δ 3,08 (1H, dd, $J = 17,1$ e 12,9 Hz) e em δ 2,67 (1H, dd, $J = 17,1$ e 2,9 Hz), a prótios ligados a carbonos sp^3 .

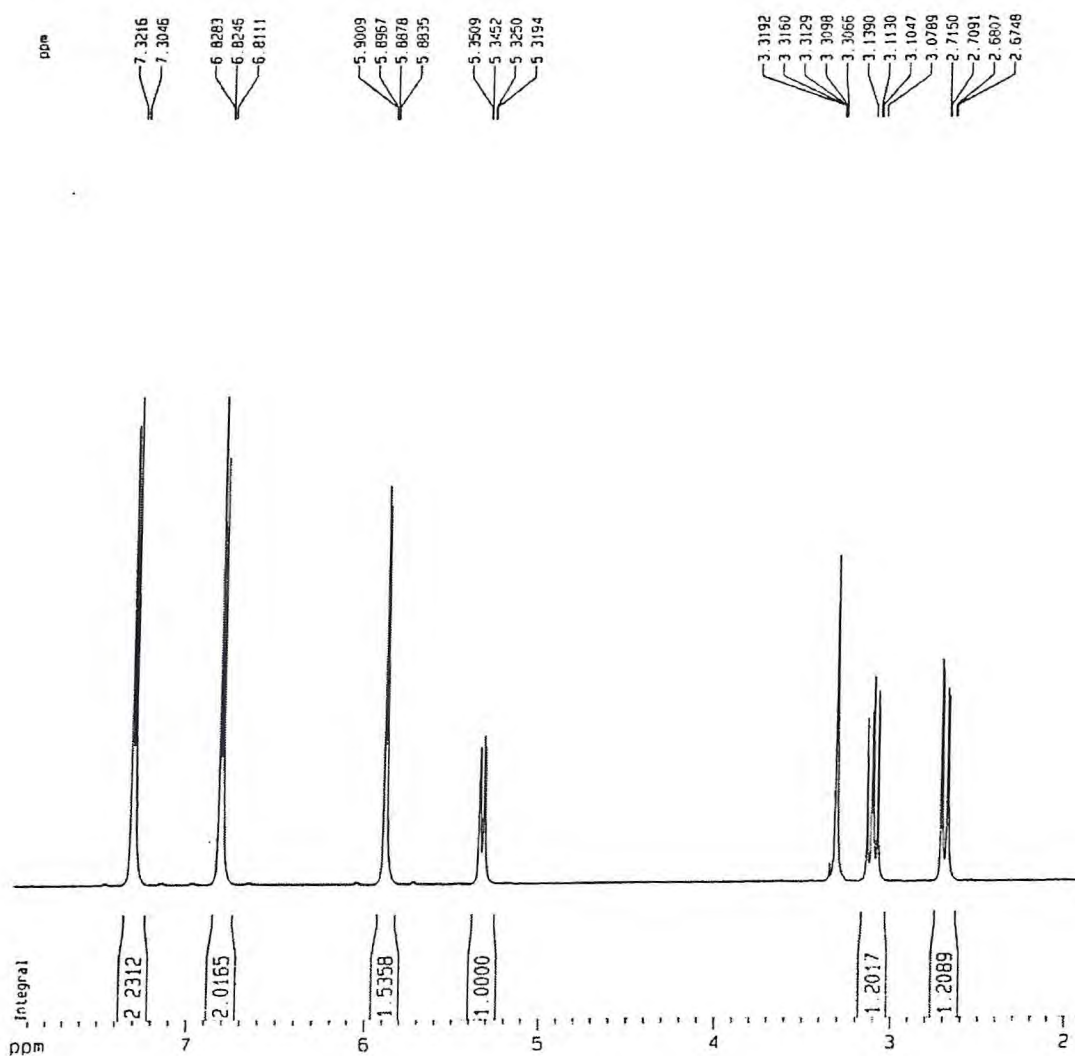


Figura 6.21 – Espectro de RMN ^1H de ECK-3 (500 MHz, CD_3OD)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-3 (Fig. 6.22, p. 150) apresentou treze sinais atribuídos a quinze átomos de carbonos, levando em consideração a equivalência química dos carbonos do sistema *p*-substituído.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135 (Fig. 6.23, p. 150) permitiu estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos e elaborar a Tabela

6.8 (p. 151), ficando evidente a presença de sete carbonos não-hidrogenados (C), sete metínicos (CH) e um metilênico (CH₂).

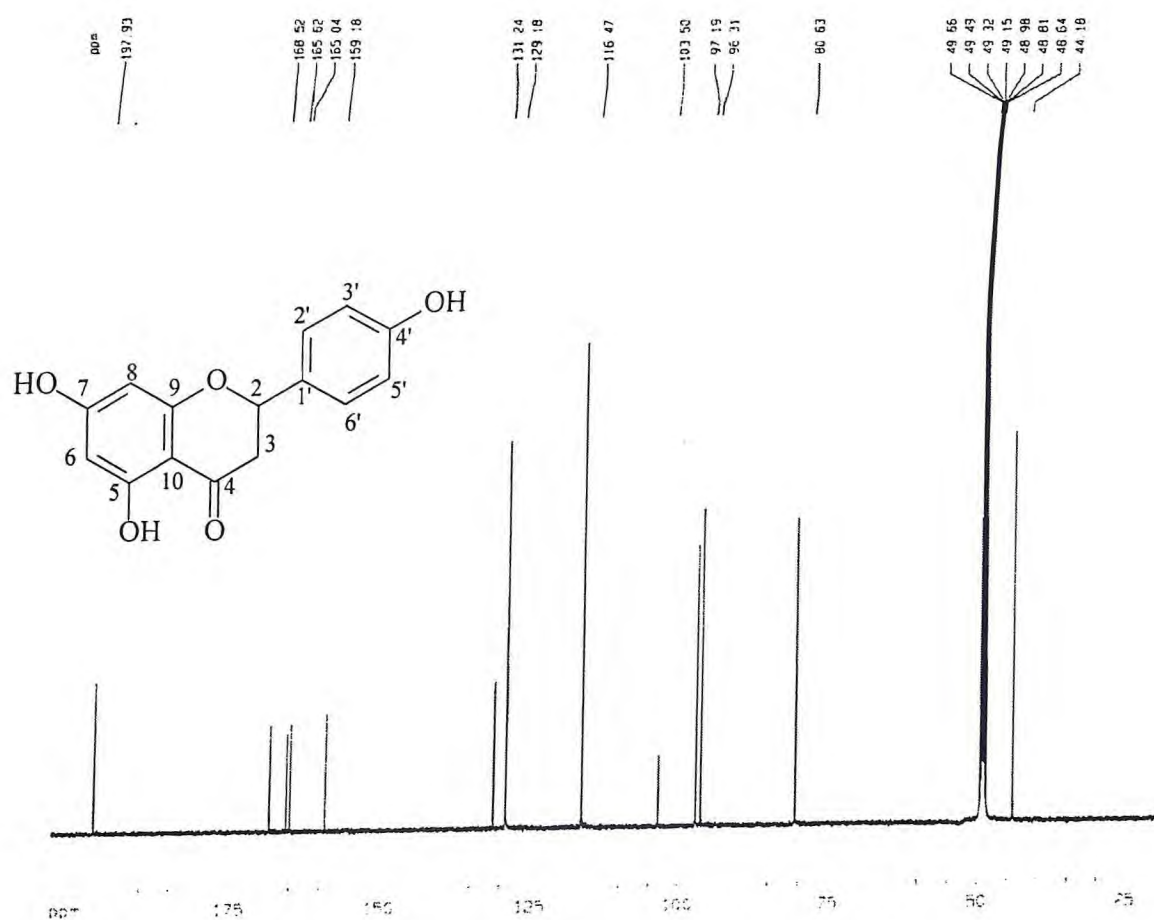


Figura 6.22 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de ECK-3 (CD₃OD, 125 MHz)

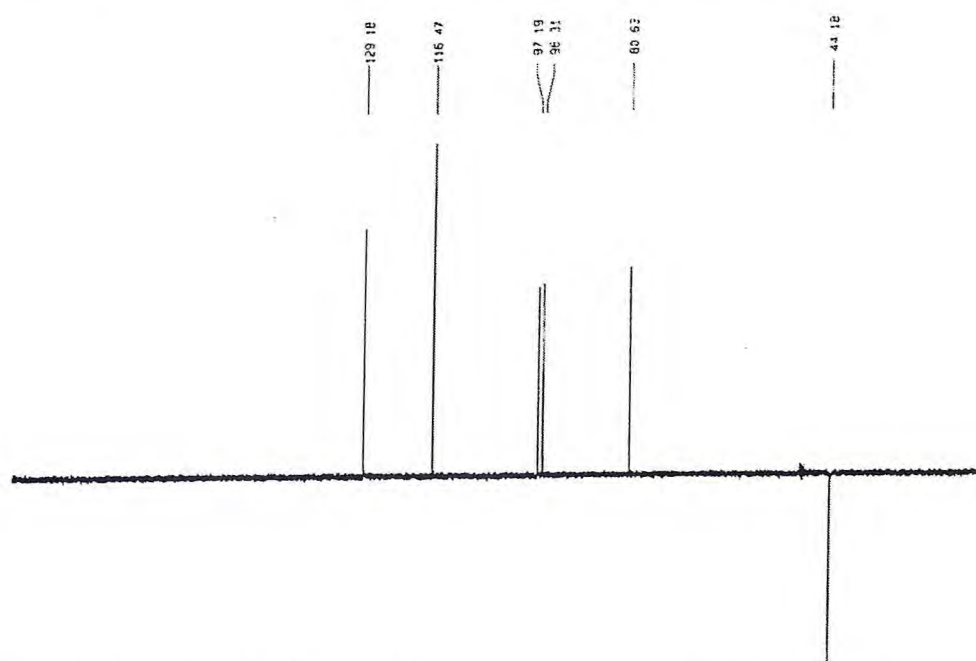


Figura 6.23 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-3 (CD₃OD, 125 MHz)

Tabela 6.8 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-3 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT -135° , δ CD_3OD , 125 MHz)

δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
197,93	129,18 (x2)	44,13		
168,48	116,47 (x2)			
165,57	97,19			
165,00	96,31			
159,18	80,63			
131,24				
103,46				
C ₂	C ₆ H ₆	CH ₂		
(C-OH) ₃	HC-O			
C-O				
C=O				C ₁₅ H ₁₂ O ₅

Segundo a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994], a atribuição dos sinais foi realizada da seguinte maneira: o sinal em δ 197,90 foi relacionado a carbonila de cetona conjugada, os sinais com as absorções registradas em δ 168,48, 165,57, 165,00, 159,12 e 80,58 foram indicativos de carbonos oxigenados, onde o último C_{sp^3} e os demais C_{sp^2} . As absorções em δ 129,18 (x2) e 116,45 (x2), 97,18 e 96,31, foram atribuídas a carbonos metínicos sp^2 e a absorção em δ 44,13, a um carbono metilênico sp^3 . Os demais sinais foram característicos de carbonos insaturados não-hidrogenados com absorções registradas em δ 131,20 e 103,46.

De posse destes dados, pôde-se atribuir à estrutura de ECK-3, a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a dez.

A análise do espectro de massa (Fig. 6.24) apresentou o pico do íon molecular em m/z 272, confirmando a sugestão feita para a fórmula molecular de ECK-3. O pico base registrado em m/z 153 sugeriu ser formado pelo processo de fragmentação via mecanismo Retro-Diels-Alder (Quadro 6.3, p. 153).

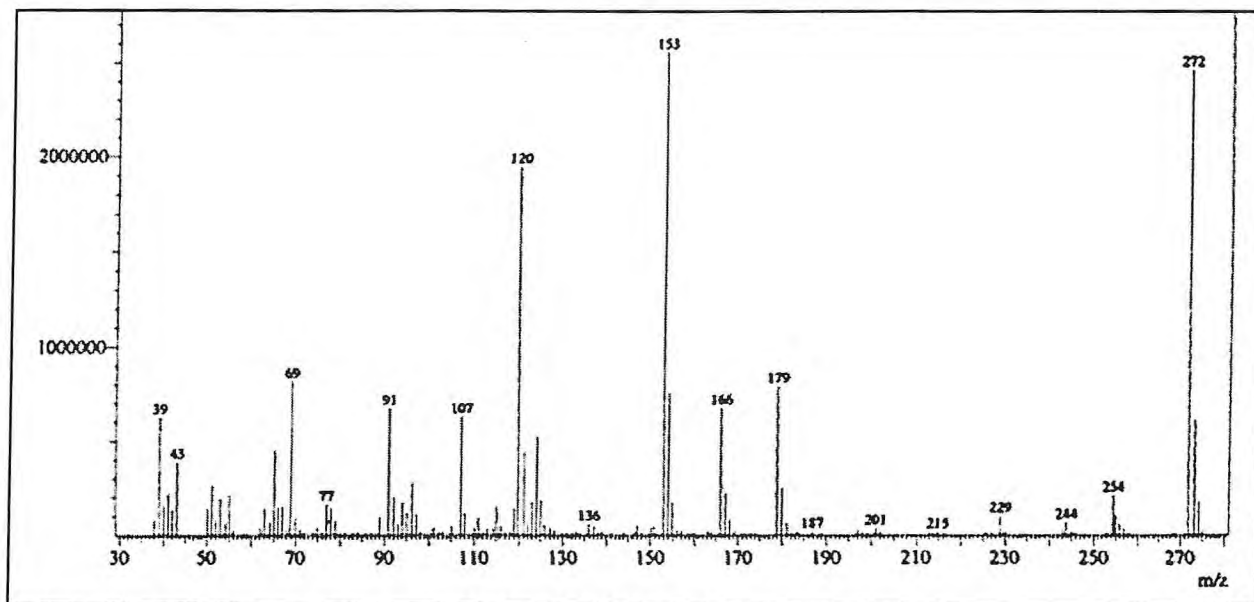
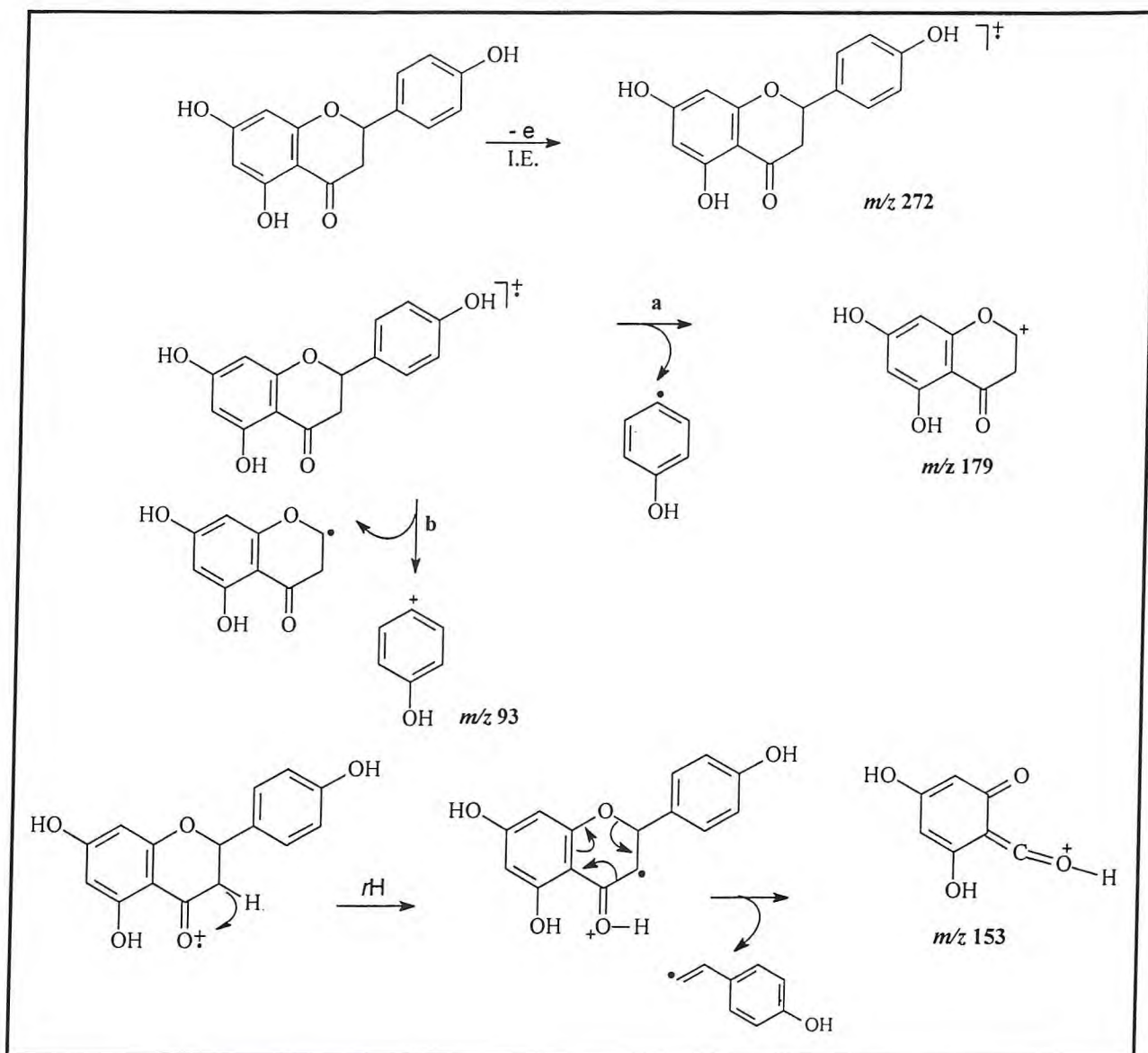


Figura 6.24 – Espectro de massa de ECK-3 (IE 70 eV).

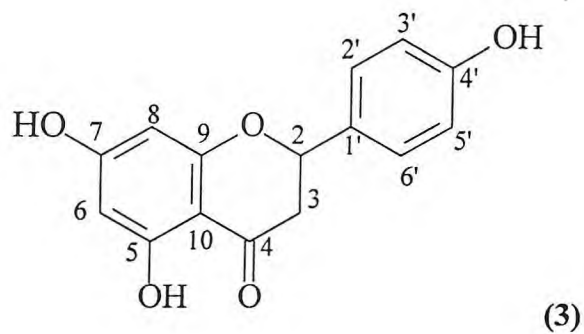
As informações obtidas pela análise dos espectros disponíveis sugeriram uma estrutura flavonoídica, que pela ausência de hidrogênio olefínico indicou ser uma flavanona. Contudo, os dados obtidos no espectro de RMN ^1H foram similares aos de ECK-1. Então, procedeu-se uma comparação dos valores de deslocamentos químicos tanto dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C quanto de ^1H , conduzindo à elaboração da Tabela 6.9 (p. 155).

As mudanças observadas no espectro de RMN ^{13}C de ECK-3 com relação ao do espectro de RMN ^{13}C de ECK-1 foram as seguintes: desaparecimento do sinal referente a OCH_3 em δ 56,42; no C-7, agora ligado a hidroxila, alteração no δ em 1,18 ppm para região de proteção; em C-10 uma diferença de δ 0,74, também para esta região, enquanto os carbonos C-6 e C-8 tiveram os valores de δ modificados em 1,21 e 1,28 ppm, respectivamente, para região de desproteção. No mais, os valores de δ permaneceram praticamente inalterados.

Quadro 6.3 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-3
(3)



Comparação adicional com dados da literatura (Tab. 6.9, p. 155) [Almeida, Lemos *et al.*, 2005] permitiu sugerir que ECK-3 tratava-se da 5,7,4'-triidroxi-flavanona, conhecida como naringenina (**3**) isolada anteriormente do “kino” de *E. maculata* [Gell, Pinhey *et al.*, 1958], entretanto, a ocorrência desta substância ainda não foi descrita na composição química do “kino” de *E. citriodora*.



Estrutura proposta para ECK-3: 5,7,4'-triidroxi-flavanona (naringenina)

Tabela 6.9 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-3 (CD_3OD , 125 MHz) com os de ECK-1 (CD_3OD , 125 MHz) e com os da literatura [Almeida, Lemos *et al.*, 2005].

$\delta \text{ C}$	ECK-3		C	ECK-1		[Almeida, Lemos <i>et al.</i> , 2005]
	C	H		H	H	
2	80,63	5,30 (dd, $J=12,9$ e $2,8$ Hz)	80,73	5,34 (dd, $J=12,9$ e 3 Hz)	80,0	
3	44,18	3,08 (dd, $J=17,1$ e $12,9$ Hz)	44,16	3,11 (dd, $17,2$ e $12,9$ Hz)	43,5	
		2,67 (dd, $J=17,1$ e $2,8$ Hz)		2,71 (dd, $17,2$ e $3,0$ Hz)		
4	197,93		198,36		197,3	
5	165,57		165,36		165,3	
6	96,31	5,88 (s)	95,10	6,02 (s)	96,9	
7	168,48		169,66		167,4	
8	97,19	5,88 (s)	95,90	6,02 (s)	95,9	
9	165,00		164,84		164,4	
10	103,46		104,20		103,3	
1'	131,24		131,08		130,8	
2'	129,18	7,31 ($J=8,5$ Hz)	129,23	7,30 (d, $J=8,6$ Hz)	129,0	
3'	116,47	6,81 ($J=8,5$ Hz)	116,51	6,82 (d, $J=8,6$ Hz)	116,2	
4'	159,18		159,21		158,7	
5'	116,47	6,81 ($J=8,5$ Hz)	116,51	6,82 (d, $J=8,6$ Hz)	116,2	
6'	129,18	7,31 ($J=8,5$ Hz)	129,23	7,30 (d, $J=8,6$ Hz)	129,0	
OCH_3			56,42	3,79 (s)		

6.1.4 Identificação Estrutural de ECK-4

O tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-A'C (Flux. 7.2, p. 295), obtida da fração clorofórmica proveniente do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*, resultou no isolamento de cristais brancos e p.f. = 222,8 – 225,5°C, denominada ECK-4.

No espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-4 (Fig. 6.25) foram observadas bandas em 3548 e 3416 cm^{-1} atribuídas à deformação axial da ligação O-H de hidroxila, sendo a primeira de hidroxila livre e a segunda quelada; absorção em 3087 cm^{-1} referente a deformação axial de ligação C-H de aromático; em 1621 cm^{-1} foi registrada a absorção relativa à deformação axial da ligação C=O característica de cetona duplamente caonjugada. Foram observadas, em 1518 e 1468, absorções de vibrações esqueléticas relacionadas à deformação axial das ligações C=C de anel aromático, enquanto em 1283, 1164, 1139 e 1078 cm^{-1} , houve o registro de sinais atribuídos às deformações axiais de C-O. As absorções referentes à deformações angulares fora do plano de C-H de anel aromático foram observadas em 831 e 729 cm^{-1} .

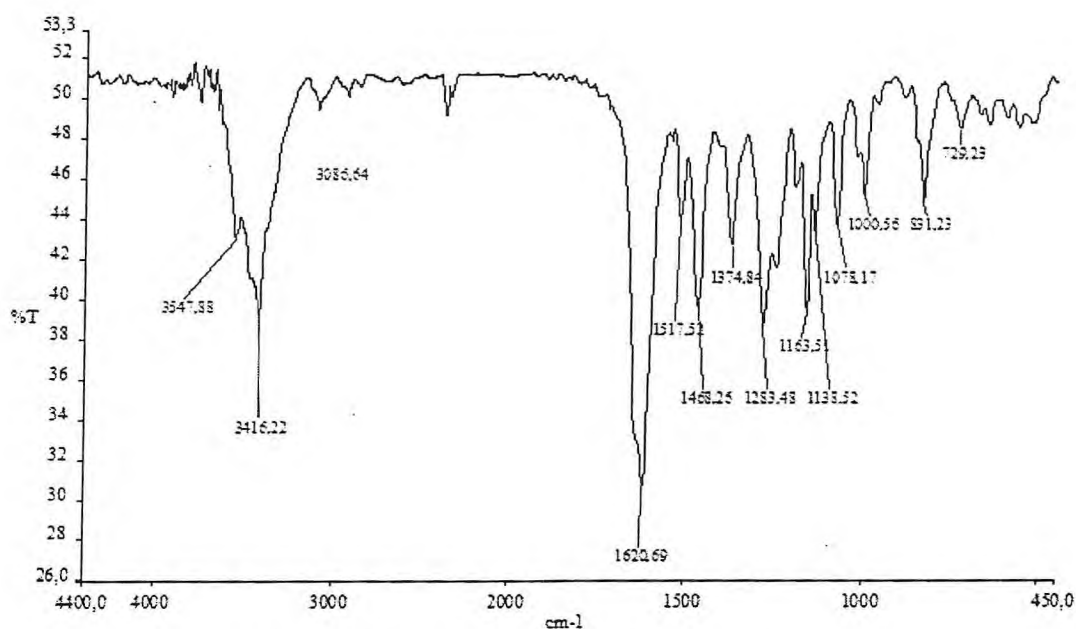


Figura 6.25 – Espectro de absorção na região do I.V. de ECK-4.

A análise do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-4 (Fig. 6. 26, p. 157) permitiu a observação de quatro sinais na região de prótios de aromáticos, sendo dois deles, δ 7,35 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,83 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), característicos de um sistema *para*-

substituído. Em adição, foram observados hidrogênios em δ 5,92 (1H, d, $J=2$ Hz) e 5,88 (1H, d, $J=2$ Hz), característicos de acoplamento *meta* de um outro sistema aromático. Os sinais em δ 4,97 (1H, d, $J=11,6$ Hz) e 4,53 (1H, d, $J=11,6$ Hz) foram condizentes com um esqueleto diidroflavanol com estereoquímica *trans*.

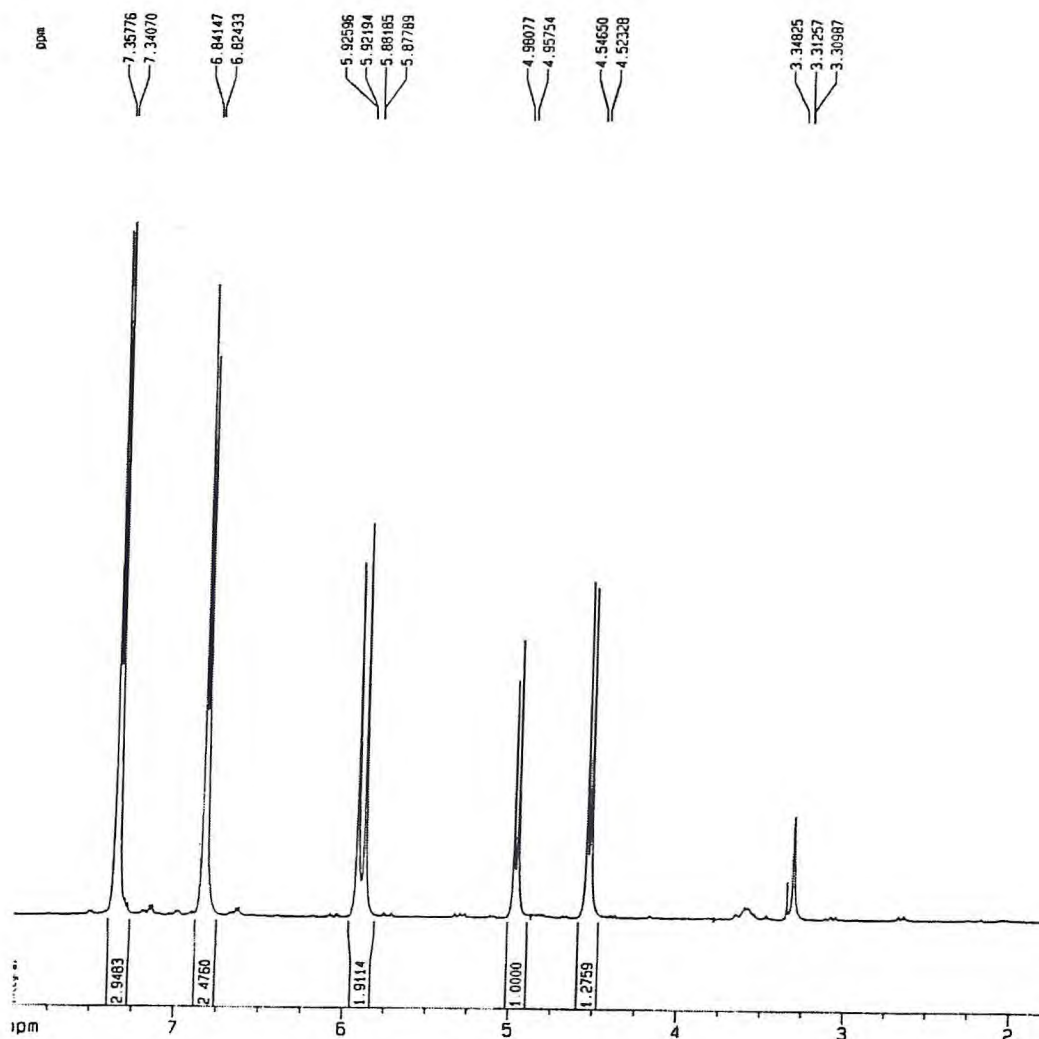


Figura 6.26 – Espectro de RMN ^1H de ECK-4 (500 MHz, CD_3OD)

A análise do espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-4 (Fig. 6. 27, p. 158) forneceu valores relativos a treze sinais, referentes a quinze carbonos, visto que os sinais em δ 130,51 e 116,29 representam, cada, dois carbonos magneticamente equivalentes.

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e de RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 125 MHz) (Fig. 6.28, p. 158), forneceu o padrão de hidrogenação dos carbonos, sendo possível estabelecer a presença de sete carbonos não-hidrogenados (C) e oito metínicos (CH) (Tab 6.10, p. 159).

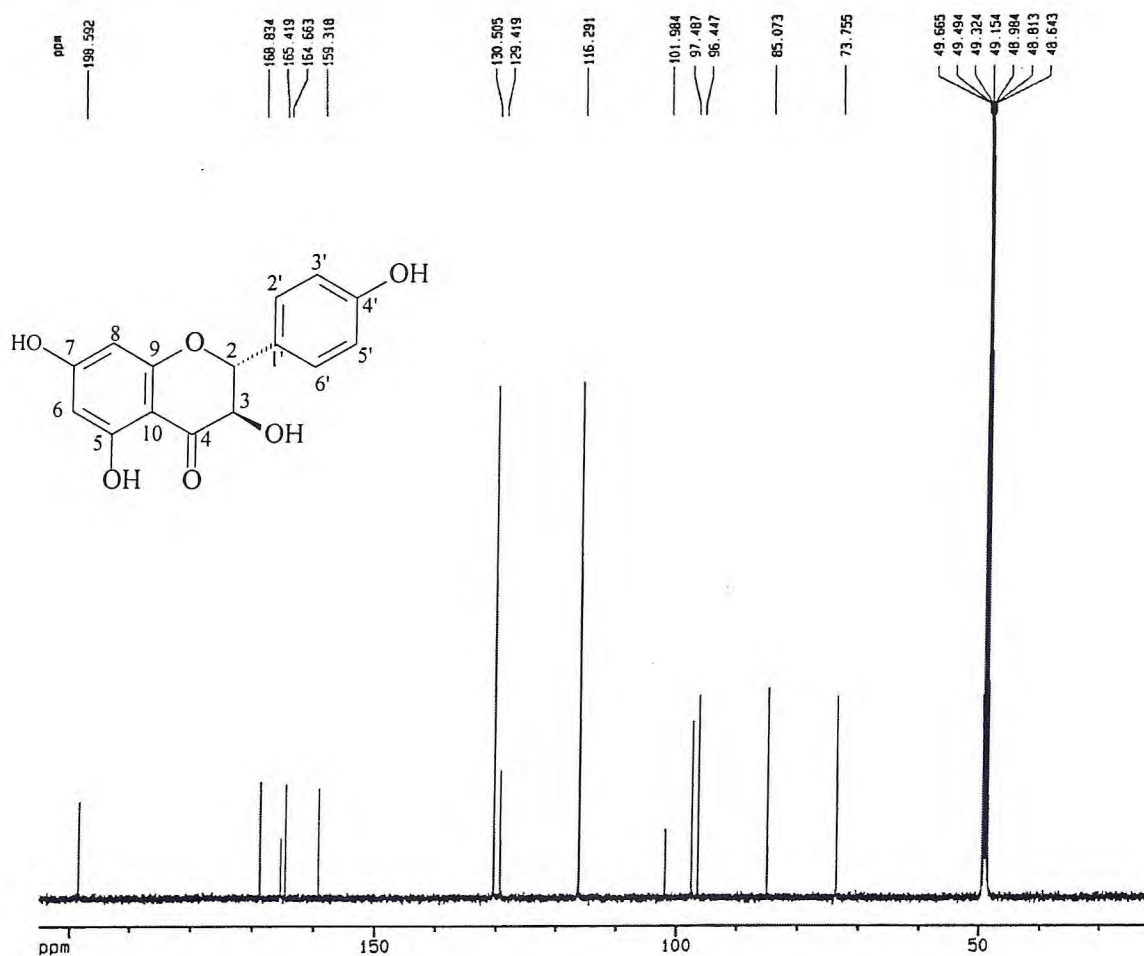


Figura 6.27 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-4 (CD_3OD , 125 MHz)

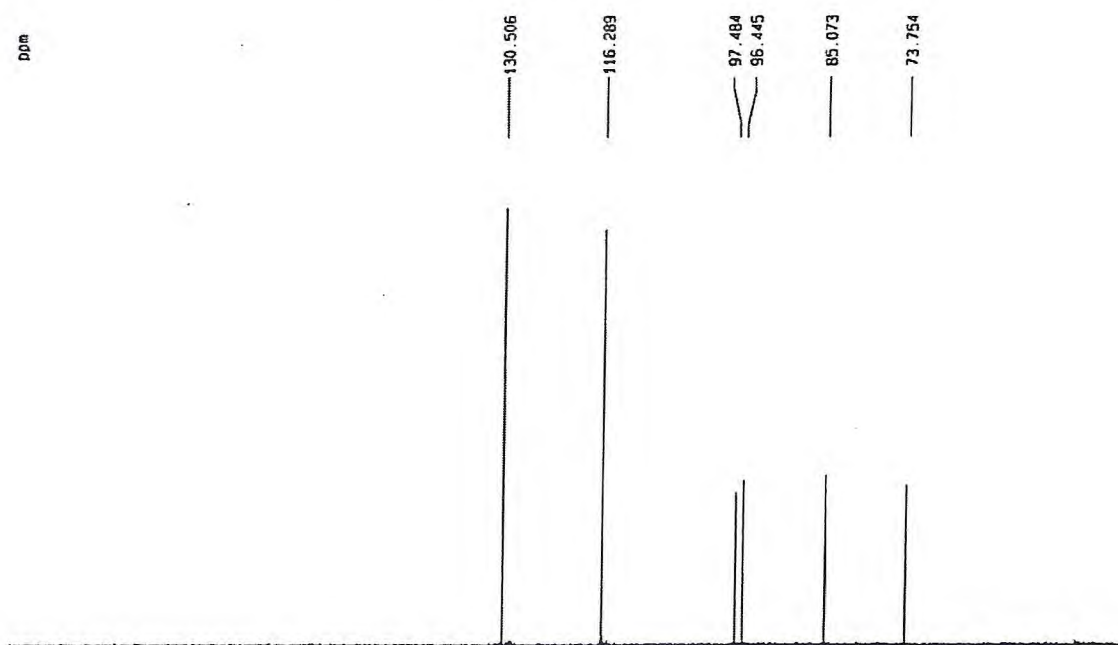


Figura 6.28 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-4 (CD_3OD , 125 MHz)

Tabela 6.10 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-4 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)

δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
198,59	130,51 (x2)			
168,83	116,29 (x2)			
165,42	97,49			
164,66	96,45			
159,32	85,07			
129,42	73,76			
101,98				
C ₂	C ₆ H ₆			
(C-OH) ₃	HC-OH			
C-O	HC-O			
C=O				C ₁₅ H ₁₂ O ₆

De acordo com os dados dos espectros de RMN, foi possível propor para ECK-4 a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$, com dez índices de deficiência de hidrogênio (IDH). Oito insaturações foram relacionadas a dois anéis aromáticos, a um grupo carbonila e a um ciclo.

O espectro de massa obtido para ECK-4 (Fig. 6.29) apresentou um pico intenso em m/z 288, condizente com a fórmula molecular proposta. O pico base em m/z 153 é característico de flavonóide. O pico em m/z 107 é favorecido pelo rearranjo do H- α a hidroxila da posição 3, indicando que o composto trata-se de um flavononol.

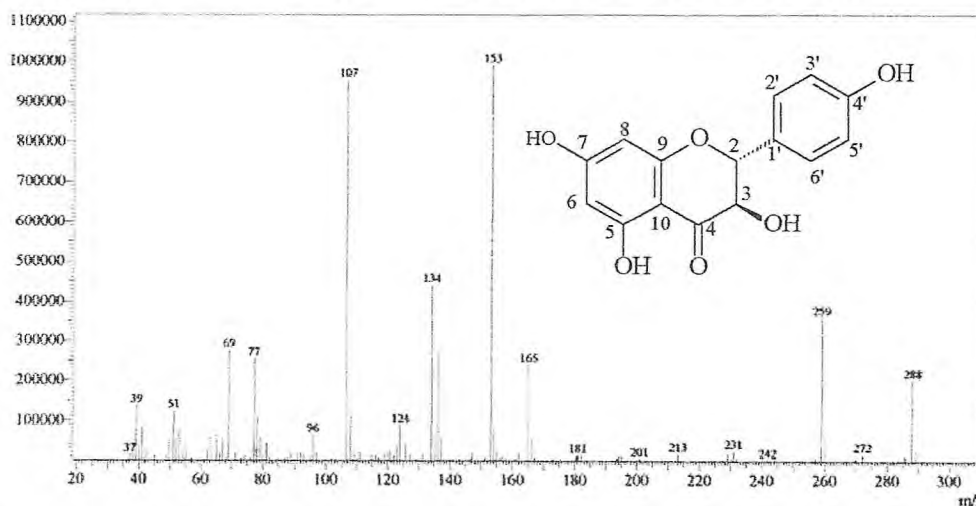
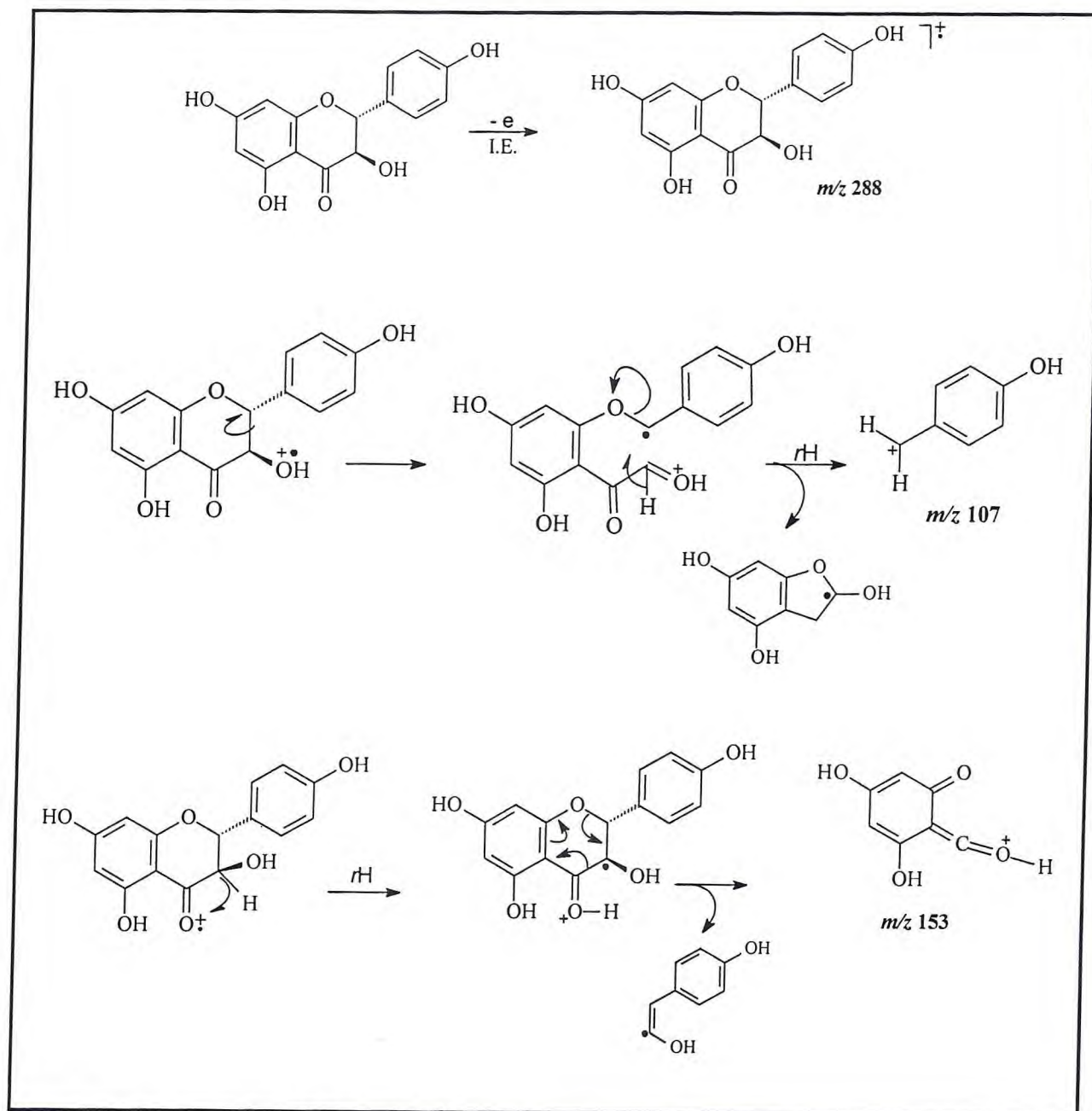


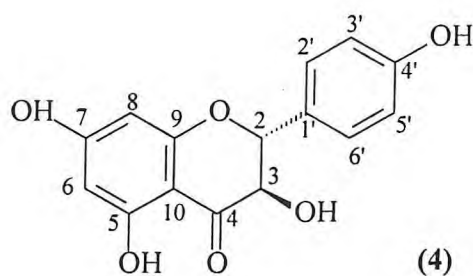
Figura 6.29 – Espectro de massa de ECK-4 (IE 70 eV).

Quadro 6.4 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-4
(4)



rH = rearranjo de hidrogênio.

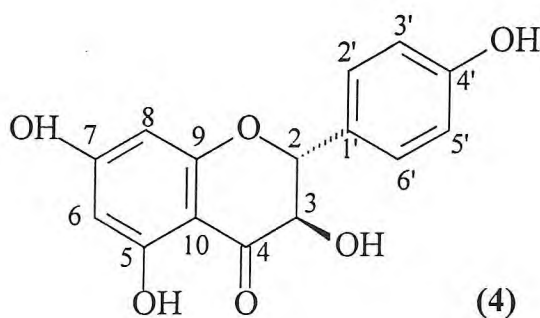
Os dados dos espectros citados revelaram grande semelhança com a estrutura ECK-2, (ver identificação estrutural de ECK-2, p. 133). A comparação dos valores de RMN ^{13}C -CPD das duas substâncias revelou a ausência de um sinal referente à metoxila, confirmado pelo espectro de RMN ^1H . Então, recorreu-se à literatura [Almeida, Lemos *et al.*, 2005] para confirmar que ECK-4 tratava-se do flavonóide 5,7,4'-triidroxi-flavanonol (aromadendrina) (4) (Tab. 6.11, p. 162), já isolado do “kino” de *E. callophyla* [Hillis, 1951], porém, este é o primeiro relato para *E. citriodora*.



Estrutura proposta para ECK-4: 5,7,4'-triidroxi-flavanonol (aromadendrina).

Tabela 6.11 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de ECK-4 (δ , CD_3OD , 125 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 125 MHz) e com os de aromadendrina (4) [Almeida, Lemos *et al.*, 2005]

Carbono	ECK-4	ECK-2	(4) [Almeida, Lemos <i>et al.</i> , 2005]
2	85,07	84,07	85,3
3	73,76	72,70	74,0
4	198,59	198,02	198,8
5	165,41	164,05	165,6
6	97,49	95,05	97,7
7	168,83	168,83	169,1
8	96,45	94,07	96,7
9	164,66	163,38	164,9
10	101,98	101,62	102,2
1'	129,42	128,16	129,6
2'	130,51	129,39	130,7
3'	116,29	115,16	116,5
4'	159,32	158,38	159,5
5'	116,29	115,6	116,5
6'	130,51	129,39	130,7
CH_3O		55,36	



6.1.5 Identificação Estrutural de ECK-5

A partir do tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-BB (Flux. 7.3, p. 298), proveniente da fração clorofórmica, resultante do particionamento do “kino” de *E. citriodora*, obteve-se **ECK-5**, cujo aspecto era de um pó amarelo e p.f = 215,2 – 218,5°C.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-5 (Fig. 6.30) mostrou uma banda larga em 3484 cm^{-1} , correspondente à deformação axial da ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila quelada; banda em 2919 e 2852 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H; em 1657 cm^{-1} relativa à deformação axial C=O de uma carbonila conjugada, em ligação intramolecular; bandas esqueléticas em 1609 , 1587 , 1507 1420 cm^{-1} , atribuídas a deformações axiais das ligações C=C de anel aromático; bandas em 1225 , 1164 e 1093 cm^{-1} relacionadas às deformações axiais de C-O e ainda, absorções em 882 e 819 cm^{-1} , características de deformações angulares fora do plano das ligações C-H de anel aromático.

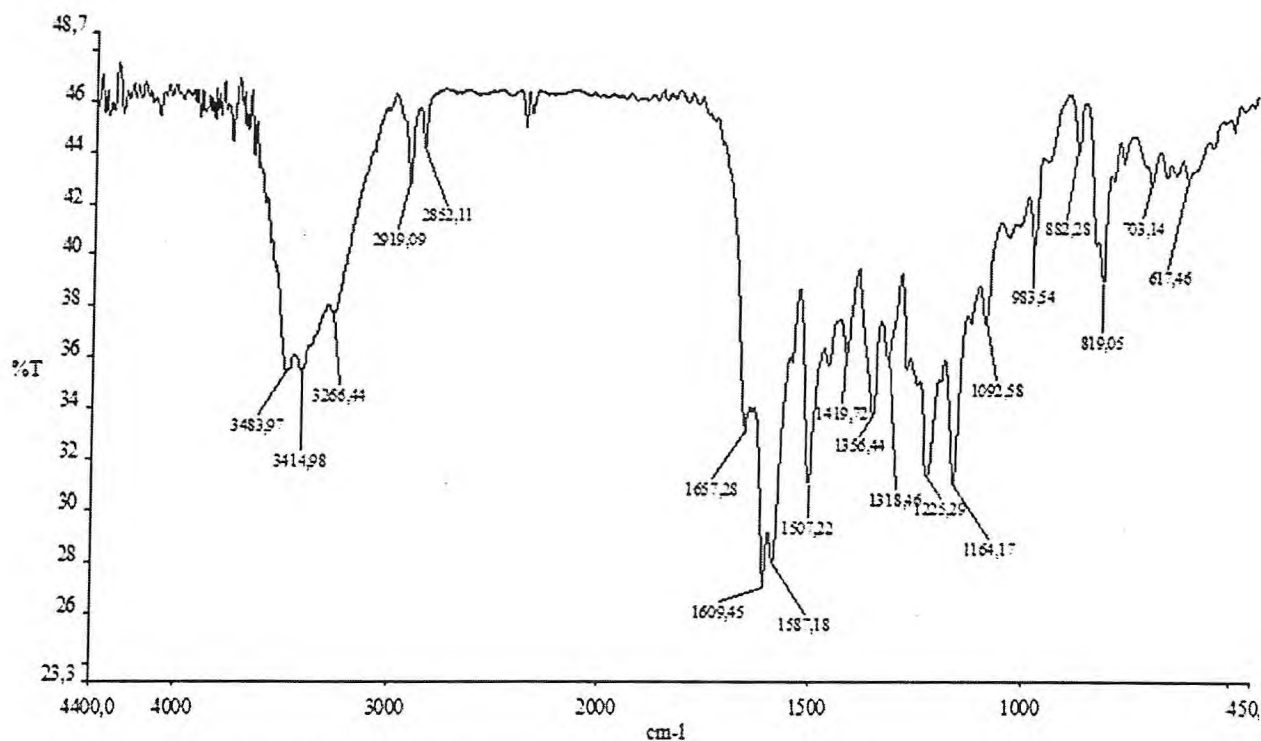


Figura 6.30 – Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-5

O espectro de RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) de ECK-5 (Fig. 6.31, p. 164), revelou sinais característicos de esqueleto aromático com sistema *para*-substituído, através da

observação dos sinais em δ 8,57 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 7,37 (2H, d, $J = 8,5$ Hz). Os sinais em δ 6,73 (1H, s) e 6,62 (1H, s) foram atribuídos a prótios com acoplamento *meta*. Os sinais observados em 13,25 (1H, s) e 3,79 (3H, s) foram relacionados a um prótio de hidroxila quelada e a um grupamento metoxila, respectivamente.

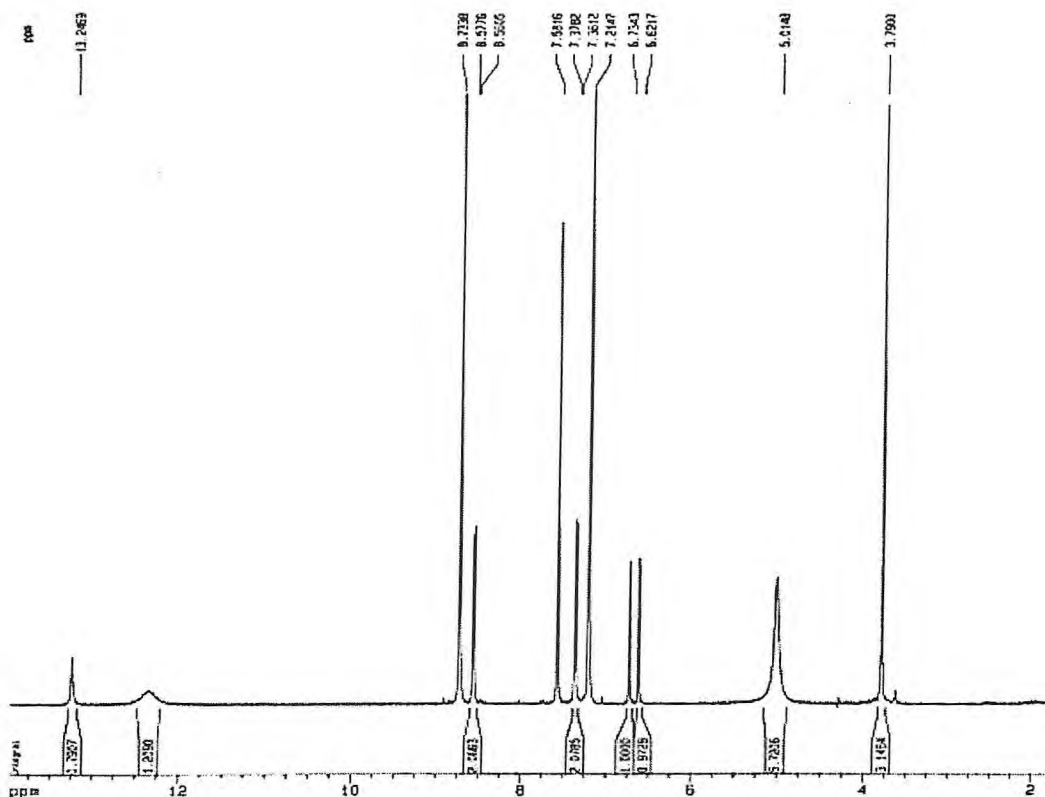


Figura 6.31 - Espectro RMN ^1H de ECK-5 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 6.32a, p. 165) de ECK-5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) exibiu catorze linhas espectrais referentes a dezesseis carbonos, visto que os sinais em δ 130,98 e 116,80 foram atribuídos a dois carbonos cada, magneticamente equivalentes. O sinal em δ 123,54 somente pôde ser observado por meio da expansão do espectro (Fig. 6.32.b, p. 165), pois foi sobreposto pelo sinal do solvente.

Para estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos, recorreu-se a comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e ^{13}C -DEPT 135° ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) (Fig. 6.33, p. 166), cujos valores estão dispostos na Tabela 6.12 (p. 166). Constataram-se a presença de seis carbonos sp^2 mono-hidrogenados (CH), um metílico (CH_3) e nove não hidrogenados (C).

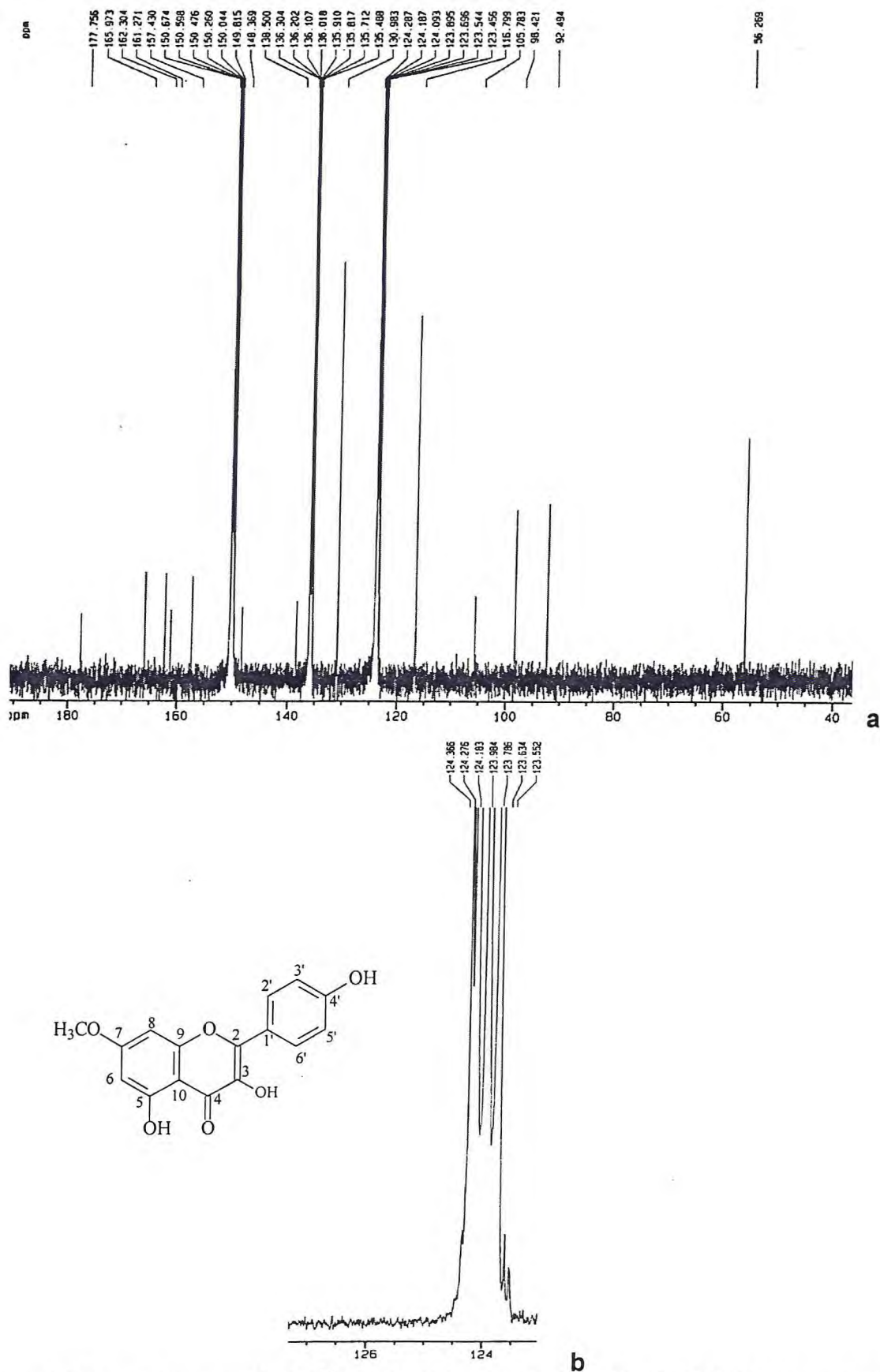


Figura 6.32 – a) Espectro RMN ^{13}C -CPD de ECK-5 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) b) Expansão do espectro RMN HMBC de ECK-5 na faixa de δ 123,00 a 140,00 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

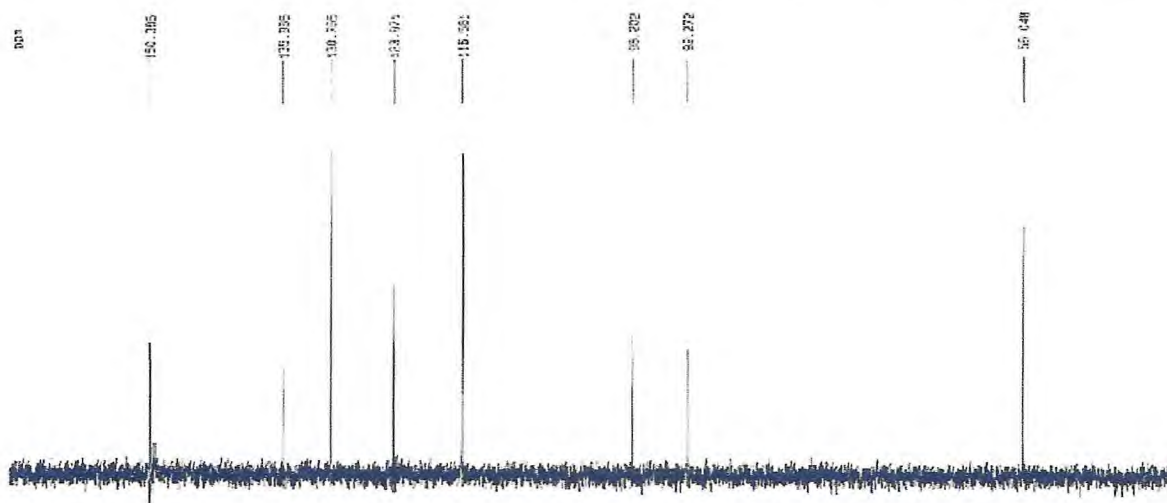


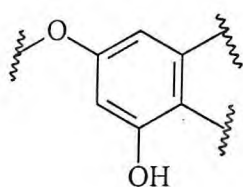
Figura 6.33 - Espectro RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-5 (125 MHz, C₅D₅N)

Tabela 6.12 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³C de ECK-5 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³C-CPD e DEPT-135°, δ, C₅H₅N, 125 MHz).

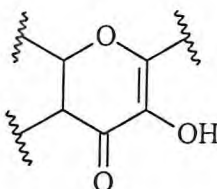
δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
177,76	130,98 (x2)		56,04	
165,97	116,80 (x2)			
162,30	98,20			
161,27	92,27			
157,43				
148,37				
138,50				
123,54				
105,78				
C ₃	C ₆ H ₆		O-CH ₃	
(C-OH) ₃				
(C-O) ₂				
C=O				C ₁₆ H ₁₂ O ₆

Segundo a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994], pôde-se sugerir que o sinal em δ 177,76 referia-se a uma carbonila inserida num anel 4-pirânico de cetona completamente conjugada. Para os sinais de carbonos não hidrogenados, sugeriu-se que as absorções em δ 165,97; 162,30; 161,27; 157,43; 148,37 e 138,50 eram carbonos sp^2 oxigenados, enquanto as absorções em δ 123,54 e 105,78 eram carbonos sp^2 não oxigenados. Os sinais observados em δ 130,98; 116,78; 98,20 e 92,49 foram atribuídos a carbonos sp^2 mono-hidrogenados e finalmente, para a absorção em δ 56,27, sugeriu-se uma metoxila.

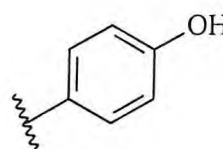
Com os dados obtidos nos espectros relacionados, pôde-se propor a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$, com IDH igual a onze, dos quais oito insaturações foram atribuídas a dois anéis aromáticos, uma relacionada a uma carbonila de cetona e as duas remanescentes foram justificadas pela presença de mais um anel com dupla ligação. Estas características descritas levaram a sugerir uma provável estrutura de flavonol, permitindo a incorporação das seguintes subestruturas ECK-5a, ECK-5b e ECK-5c:



ECK-5a



ECK-5b



ECK-5c

Subestruturas propostas para ECK-5

O espectro de massa obtido para ECK-5 (Fig. 6.34) apresentou o pico do íon molecular e o pico base em m/z 300, condizente com a fórmula molecular sugerida.

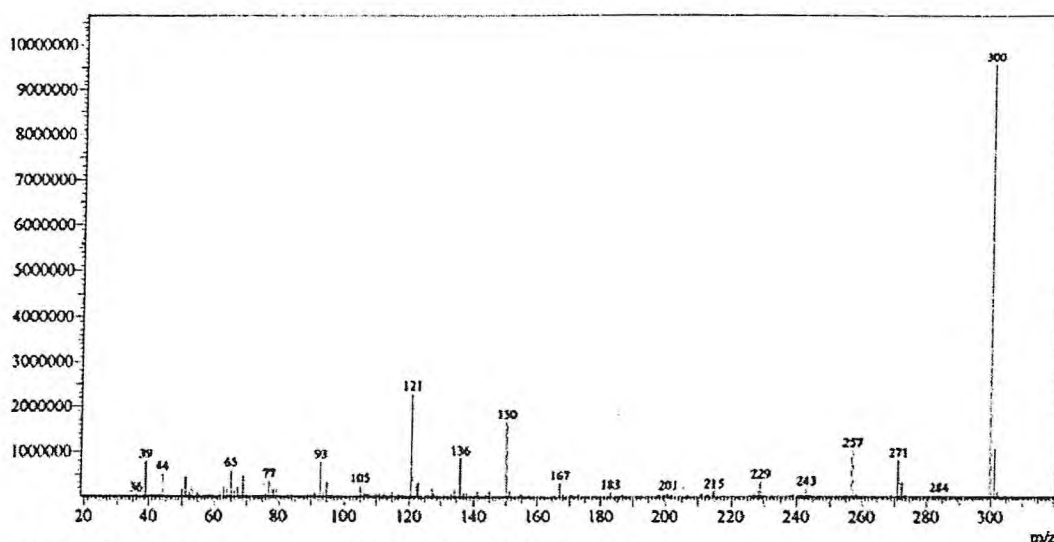


Figura 6.34 - Espectro de massa de ECK-5 (IE, 70 eV)

A análise do espectro de RMN HMQC de ECK-5 (Fig. 6.35, p. 169) possibilitou observar o acoplamento C-H a uma ligação e relacionar os hidrogênios observados no espectro de prótios aos seus respectivos carbonos de forma inequívoca. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 6.13 (p. 172).

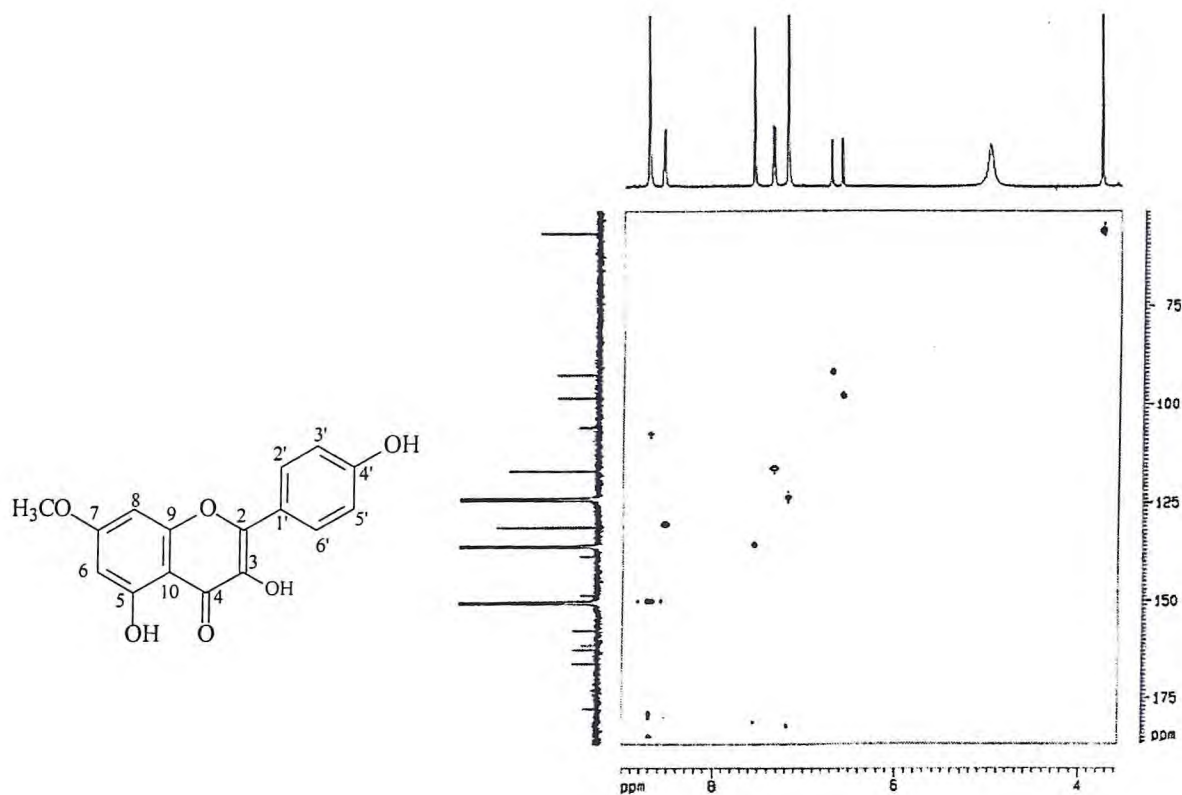
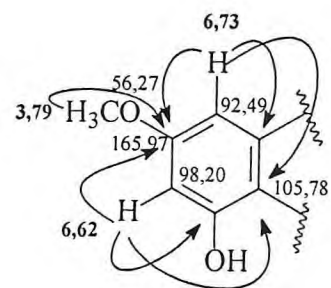


Figura 6.35 - Espectro RMN HMQC de ECK-5 (500 MHz, 125 MHz, C₅D₅N)

Para atribuir os demais valores de δ aos carbonos, recorreu-se à análise do espectro de RMN HMBC (Fig. 6.36, p. 170). Este permitiu mostrar os acoplamentos a mais de uma ligação entre os prótons e os carbonos (Tab. 6.13, p. 172). Por meio deste, o padrão de substituição do anel A foi claramente determinado através da correlação do sinal do próton em δ 6,62 (H-6) com o carbono em δ 92,49 (C-8); do sinal do próton em δ 6,73 (H-8) com o carbono em 98,20 (C-6) e da correlação de ambos os prótons com o carbono em 105,78 (C-10), sugerindo um anel aromático tetra-substituído. A posição da metoxila foi determinada observando-se a correlação do sinal dos prótons em δ 3,79 (3H, OCH₃) com o carbono em δ 165,97 (C-7), revelando ser esta a localização da mesma. A subestrutura ECK-5a mostra as correlações observadas.

Subestrutura ECK-5a com representação de acoplamentos vistos no espectro de RMN HMBC.



Subestrutura ECK-5a

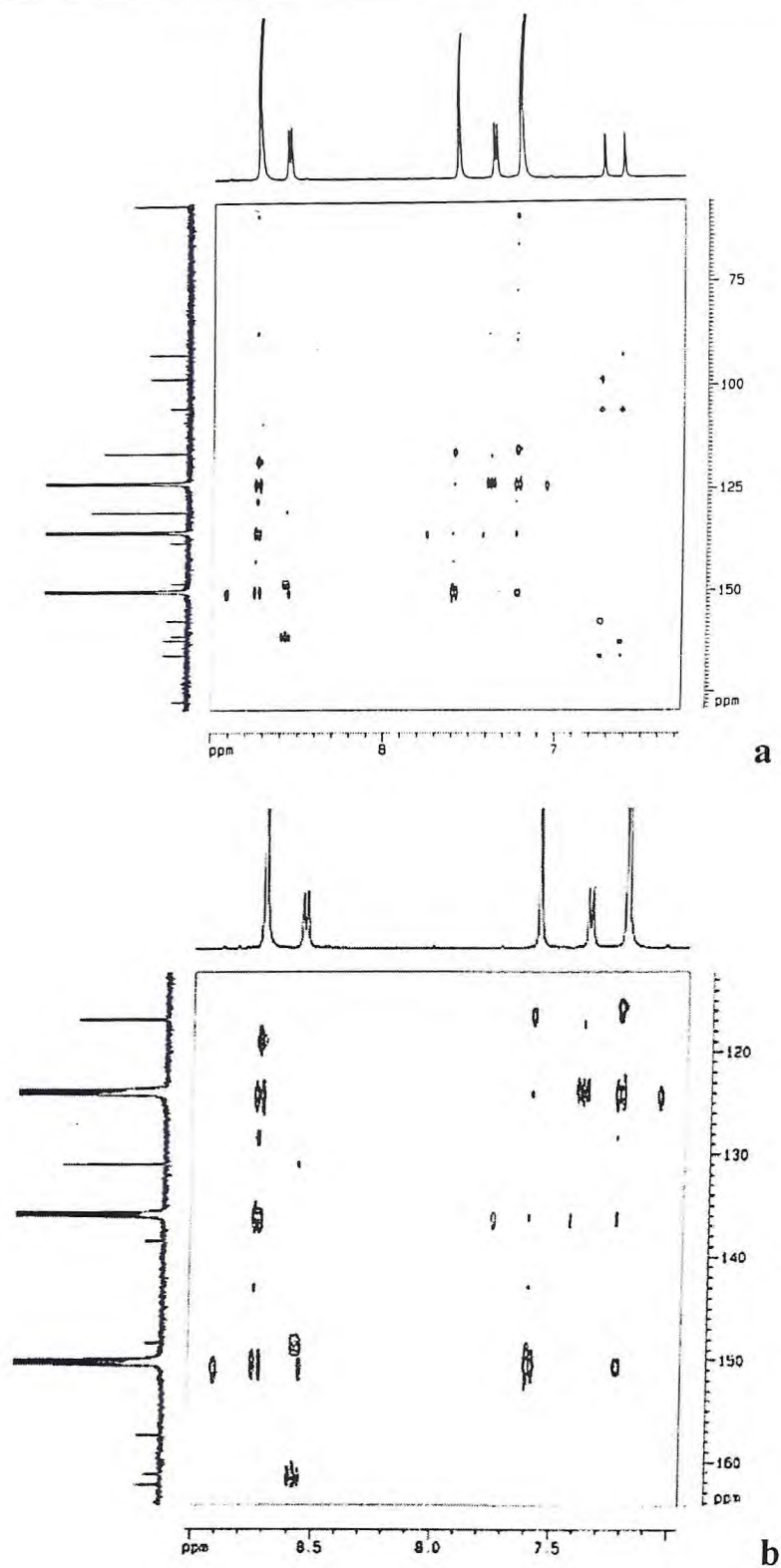
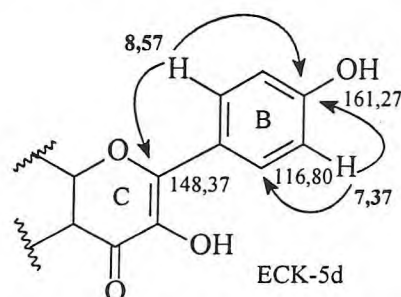


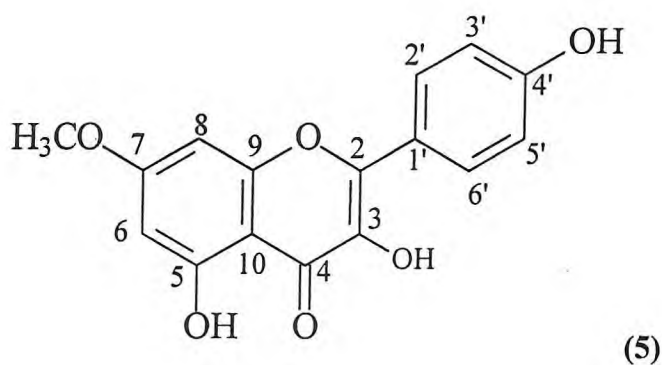
Figura 6.36 - a) Espectro RMN HMBC de ECK-5 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) b) Expansão do espectro RMN HMBC de ECK-5 na faixa de δ 115,00 a 160,00 δ 7,00 a 9,00 (500 MHz, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Apesar dos hidrogênios do anel B estarem em posição *orto* entre si, não foi observado o acoplamento a duas ligações do prótio H-2' com o carbono C-3', porém tornou-se inequívoca a posição do C-4' em δ 161,27, posto que puderam ser observados os acoplamentos entre os prótios em 8,57 (H-2' e H-6') e 7,37 (H-3' e H-5'), 3J e 2J , respectivamente, com o carbono em δ 161,27, como pode ser visto na subestrutura ECK-5d. Observou-se ainda, o acoplamento entre os prótios H-2' e H-6' com o carbono em δ 148,37 (C-2) a três ligações indicando o sítio da ligação entre o anel B e o anel C do flavonol.



Subestrutura ECK-5d com representação de acoplamentos observados no HMBC .

A comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-5 com aqueles descritos na literatura para flavonóis (Tab. 6.14, p. 173) indicou que a mesma tratava-se da 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavonol (kampferol-7-metil éter) (5), obtida por meio reacional dos “kinos” de *E. maculata* [Gell, Pinhey *et al.*, 1958], *E. calophylla* e *E. corymbosa* [Hillis 1952], além de ser isolada do “kino” de *E. citriodora* [Satwalekar, Gupta *et al.*, 1957].



Estrutura de ECK-5: 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavonol (5)

Tabela 6.13 – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-5.

Carbono	$\delta \text{ C}$	^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
		^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$	^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)
2	148,37		1H-2' e 6'
3	138,50		
4	177,76		
5	162,30	13,25	1H-6
6	98,20	6,62 (s)	1H-8
7	165,97		
8	92,43	6,73 (s)	1H-6
9	157,43		1H-8
10	105,78		1H-8 e 1H-6
1'	123,54		1H-3' e 5'
2'	130,98	8,57 (d, $J = 8,5$ Hz)	
3'	116,80	7,37 (d, $J = 8,5$ Hz)	1H-2'
4'	161,27		1H-2' e 6'
5'	116,80	7,37 (d, $J = 8,5$ Hz)	
6'	130,98	8,57 (d, $J = 8,5$ Hz)	
CH ₃ O	56,27	3,79 (s)	H-7

Tabela 6.14 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos na literatura para ECK-5 [Agrawal, 1989].

C	ECK-5	Kampferol-7-metil éter
2	148,37	147,2
3	138,50	135,9
4	177,76	176,0
5	162,30	160,3
6	98,20	97,4
7	165,97	164,9
8	92,43	92,1
9	157,43	156,1
10	105,78	104,0
1'	123,54	121,6
2'	130,98	129,4
3'	116,80	115,4
4'	161,27	159,3
5'	116,80	115,4
6'	130,98	129,4
OCH ₃	56,27	*

* A fonte da literatura utilizada não forneceu este valor.

6.1.6 Identificação Estrutural de ECK-6

A substância denominada ECK-6, foi obtida do tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-EA (Flux. 7.5, p. 307), proveniente de sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração clorofórmica oriunda do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*. ECK-6 apresentou o aspecto de um sólido amorfo branco, p.f= 194,9 – 196,1 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-6 (Fig. 6.37) permitiu observar bandas em 3403 cm^{-1} , relativa à deformação axial da ligação O-H de hidroxila; em 2922 cm^{-1} , característica de deformação axial assimétrica de ligação C-H sp^3 ; e em 1688 e 1638 cm^{-1} , relativas à deformações axiais da ligação C=O de carbonila, sugerindo a última, pertencer a cetona conjugada, com dupla quelação. A absorção em 1075 é sugestiva de deformação axial de C-H do carbono anomérico (C1) de unidades osídicas. Em 832 cm^{-1} , observou-se absorção relativa à deformações angulares fora do plano, das ligações C-H de anel aromático.

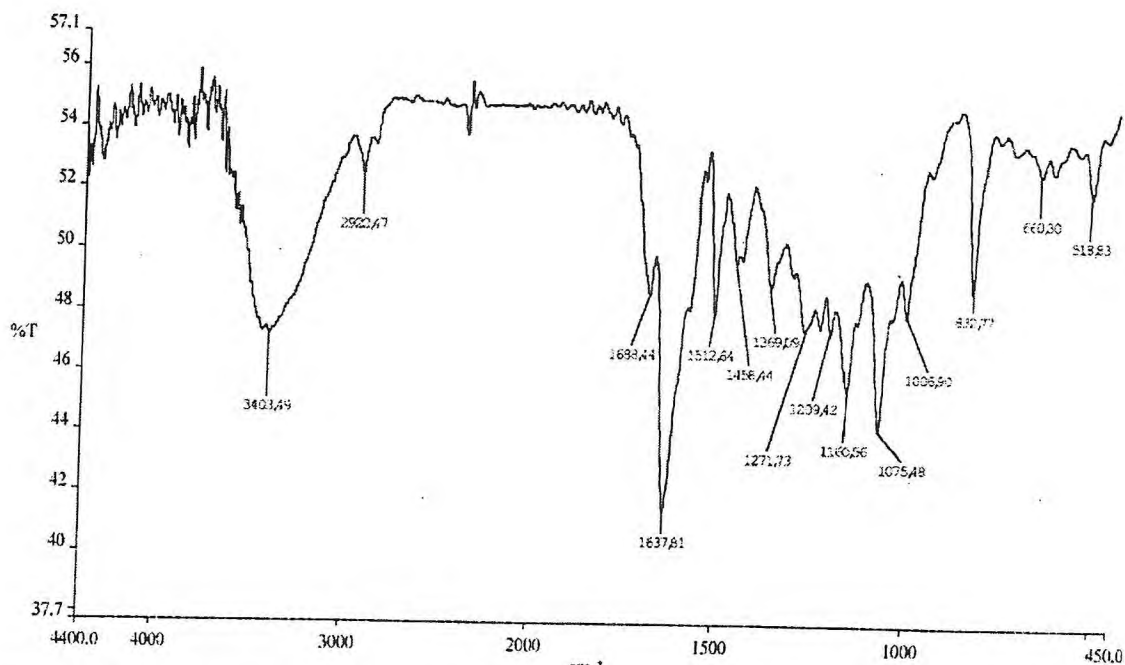


Figura 6.37 – Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-6

No espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de ECK-6 (Fig. 6.38, p. 175) foram observados sinais na região dos aromáticos atribuídos a dois sistemas *para*-substituídos em δ 7,74 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 7,46 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); 7,54 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) e 7,09 (2H, d, $J = 8,4$ Hz), assim como sinais característicos de um esqueleto diidroflavonol em δ 5,37 (1H, d, J

= 11,6 Hz) e 4,77 (1H, d, $J = 11,6$ Hz), cujos valores de constante de acoplamento (J), sugeriram uma estereoquímica *trans*. Os sinais em δ 6,35 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e 6,25 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) foram atribuídos a dois prótons de anel aromático *meta*-substituído.

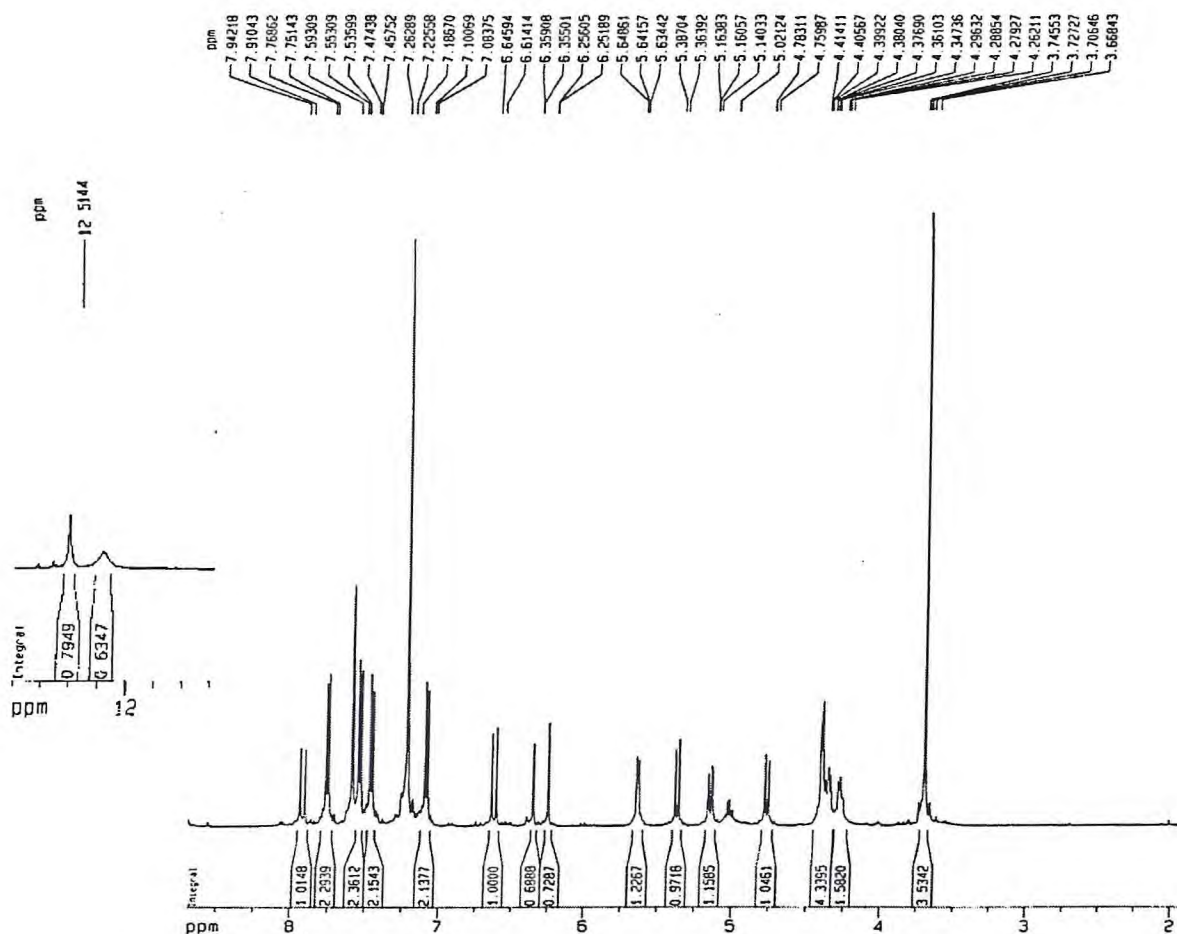


Figura 6.38 - Espectro RMN ^1H de ECK-6 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Os sinais observados em δ 7,92 (1H, d, $J = 15,7$ Hz) e 6,63 (1H, d, $J = 15,7$ Hz) sugeriram a presença de prótons olefinicos em dupla conjugada, com estereoquímica *trans*. Enquanto os sinais dos prótons observados entre δ 5,64 - 4,28, característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, foram sugestivos da presença de uma unidade de açúcar, que pela constante de acoplamento observada para o carbono anomérico em δ 5,64 (H-1", d, $J = 7,0$ Hz), pôde-se sugerir a configuração β . O sinal observado em δ 3,70 (3H, s) foi atribuído aos prótons de metoxila e um sinal em δ 12,51 (1H, s) foi relacionado ao próton de hidroxila quelada.

De acordo com a análise do espectro de RMN ^{13}C -CPD ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) de ECK-6 (Fig. 6.39, p. 177), foram observadas vinte e sete linhas espectrais correspondentes a

trinta e um átomos de carbono. As absorções em δ 132,16, 130,29 117,47 e 117,27 foram atribuídas a dois carbonos, cada, pertencentes a anéis aromáticos *para*-substituídos, o que foi confirmado pelo espectro de RMN ^1H , discutido anteriormente.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) (Fig. 6.40, p. 177) permitiu a elaboração da Tabela 6.15, da qual foi possível observar o padrão de hidrogenação dos carbonos, a saber: dez carbonos não-hidrogenados (C), dezenove metínicos (CH), um metilênico (CH_2) e um metílico (CH_3).

Tabela 6.15 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-6 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT-135°, δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz).

C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
199,37	143,84	64,93	56,30	
168,90	131,16(x2)			
167,85	130,29(x2)			
165,00	117,47(x2)			
163,84	117,27(x2)			
161,99	115,53			
159,43	102,82			
132,41	96,29			
126,45	94,93			
102,95	84,70			
	78,91			
	76,06			
	75,33			
	73,78			
	72,03			
C_5	$\text{C}_{13} \text{H}_{13}$	CH_2	OCH_3	
$(\text{C-OH})_2$	$(\text{CH-OH})_4$			
CO	$(\text{HC-O})_2$			
C=O				
COO				$\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$

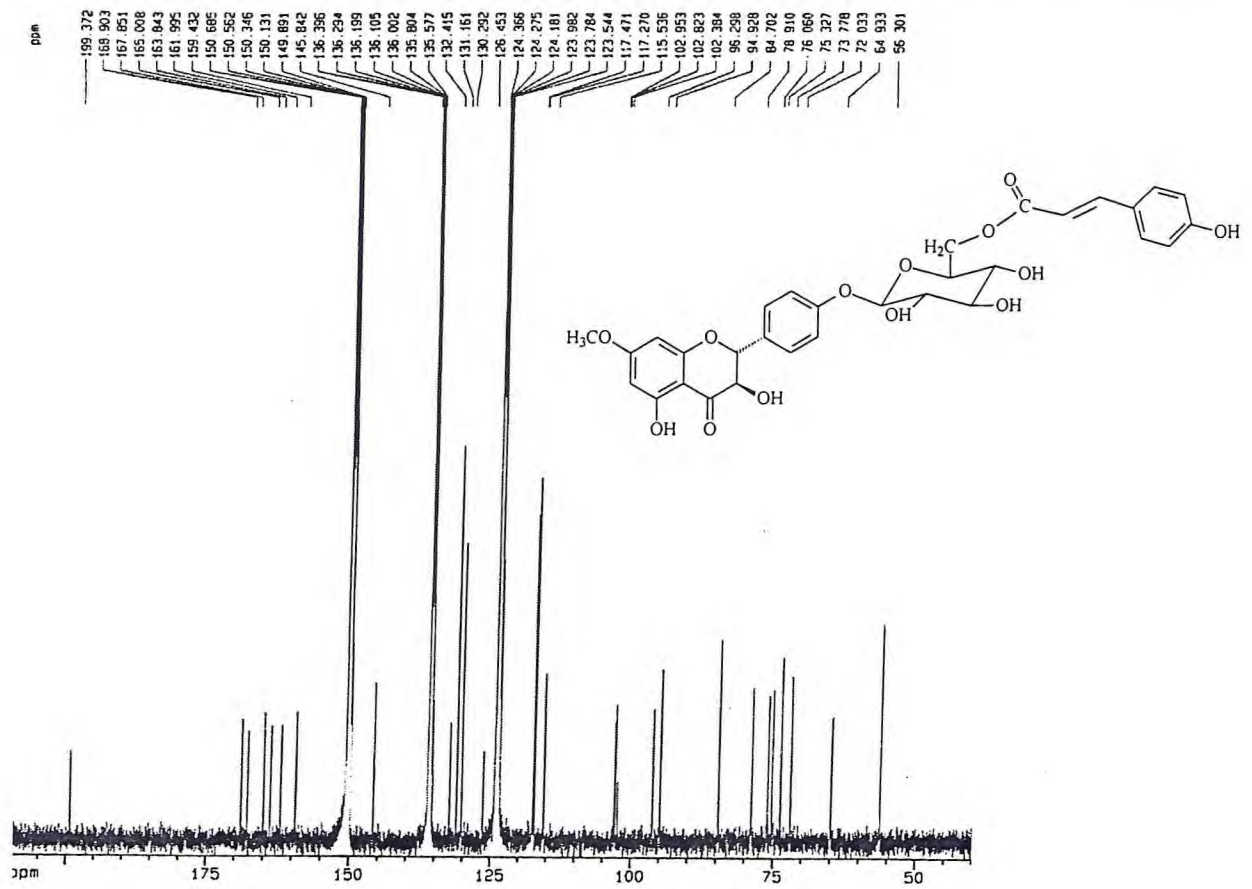


Figura 6.39 -Espectro RMN ¹³C-CPD de ECK-6 (125 MHz, C₅D₅N)

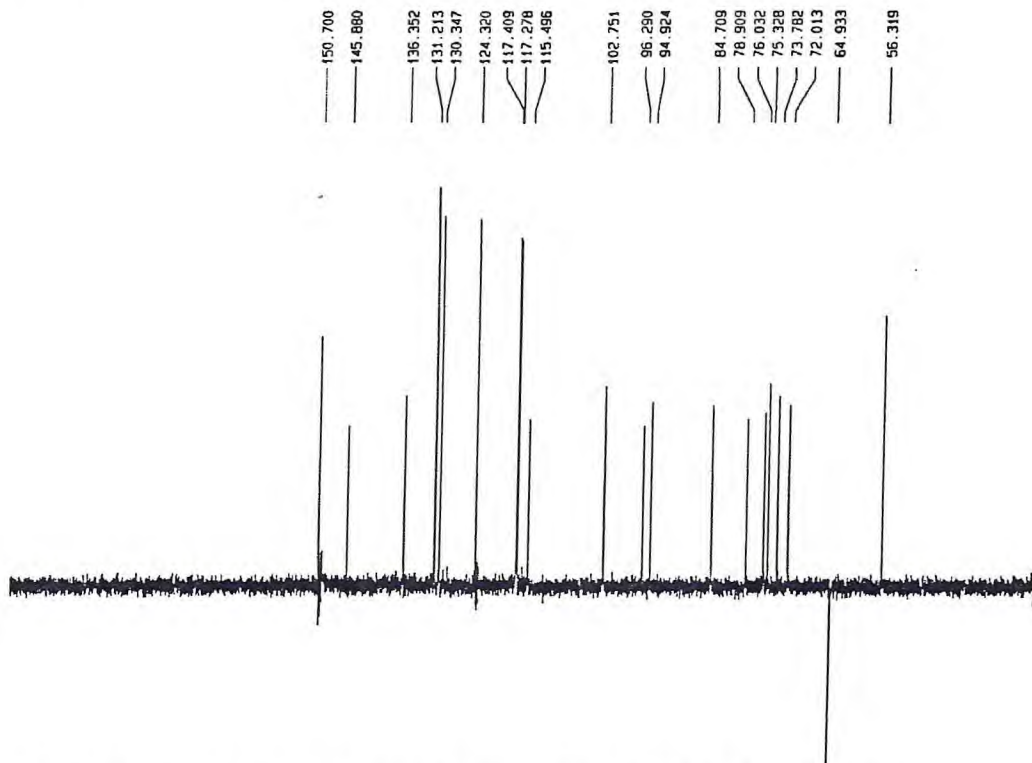
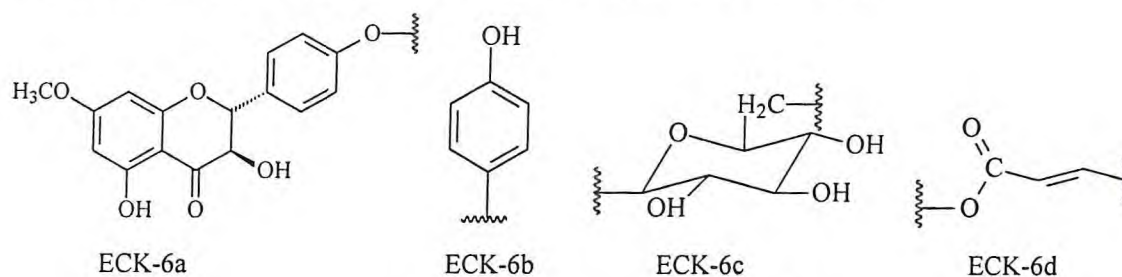


Figura 6.40 - Espectro RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-6 (125 MHz, C₅D₅N)

De acordo com a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] foi possível estabelecer que o sinal em δ 199,37 era de uma carbonila de cetona conjugada. A presença dos sinais na faixa de δ 168,90 a 159,43 e o 102,95 sugeriu que estes pertenciam a carbonos oxigenados, enquanto o observado em δ 102,82 e os na faixa de δ 84,70 a 72,03, possivelmente pertencentes a carbonos metínicos sp^3 oxigenados, assim como o sinal em δ 64,93, um carbono metilênico sp^3 , também oxigenado. Receberam a atribuição de possíveis carbonos metínicos sp^2 , os sinais compreendidos na faixa de δ 145,84 a 94,93, excetuando-se os em δ 132,41 e 126,45, estes, possíveis carbonos sp^2 de aromáticos e não-hidrogenados. O sinal em δ 56,30 foi relacionado à presença de carbono metoxílico e aquele em δ 167,87, uma carbonila de éster.

A compilação dos dados, obtidos até o momento, permitiu sugerir a fórmula molecular $C_{31}H_{30}O_{13}$, com dezessete índices de deficiência de hidrogênio (IDH=17), atribuídos aos anéis aromáticos (12 IDH), ao anel da glicose (1 IDH) a uma dupla ligação (1 IDH), às carbonilas (2 IDH) e ao anel C do flavonóide.

De acordo com estas informações, as subestruturas ECK-6b, ECK-6c, e ECK-6d, puderam ser incorporadas à subestrutura ECK-6a, a qual se refere ao flavanonol 7-metil éter aromadendrina (ECK-2), também isolado e descrito neste trabalho.



Subestruturas proposta para ECK-6.

Pela análise do espectro RMN HMQC (Fig. 6.41, p. 179), pôde-se observar o acoplamento C-H, a uma ligação, possibilitando relacionar, de forma inequívoca, os hidrogênios observados no espectro de prótios aos seus respectivos carbonos (Tab 6.16, p. 182).

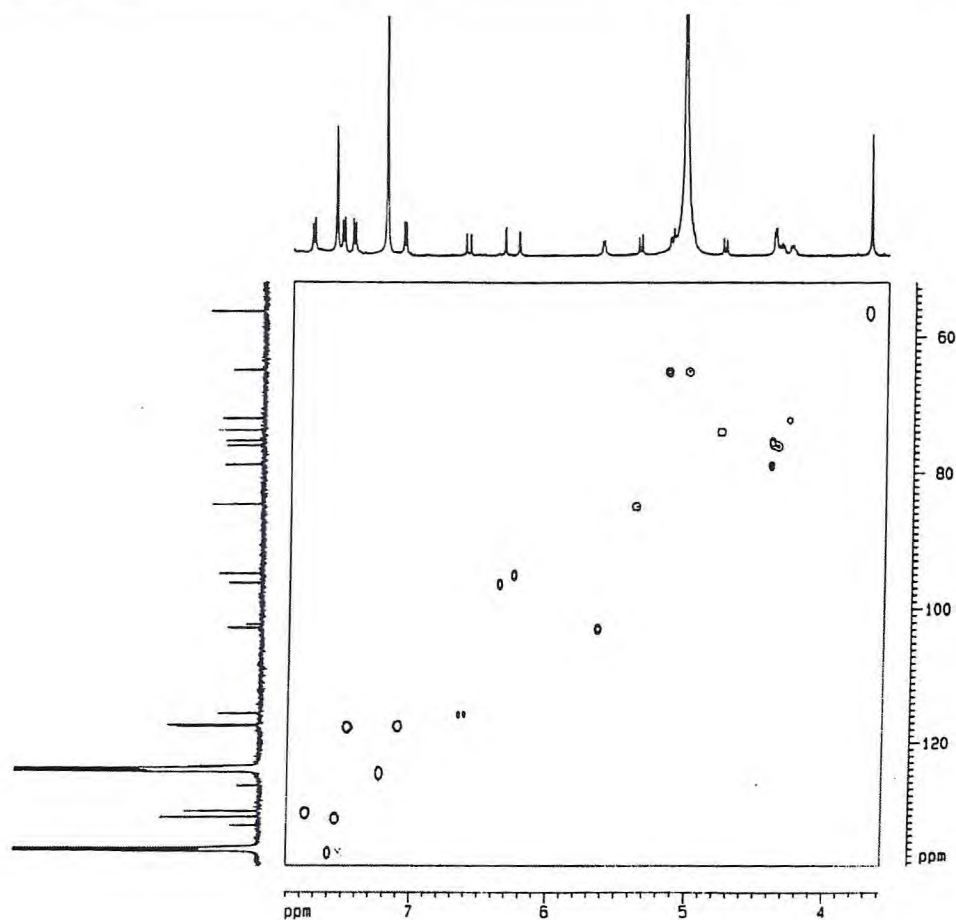
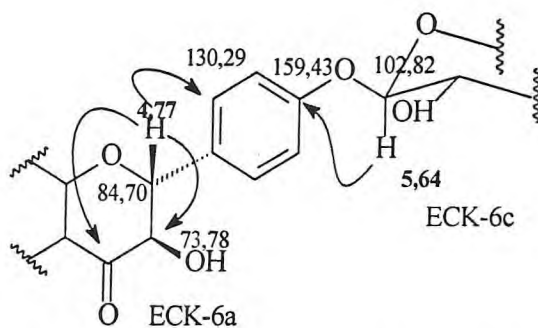


Figura 6.41 - Espectro RMN HMBC de ECK-6 (500 MHz, 125 MHz, C_5D_5N)

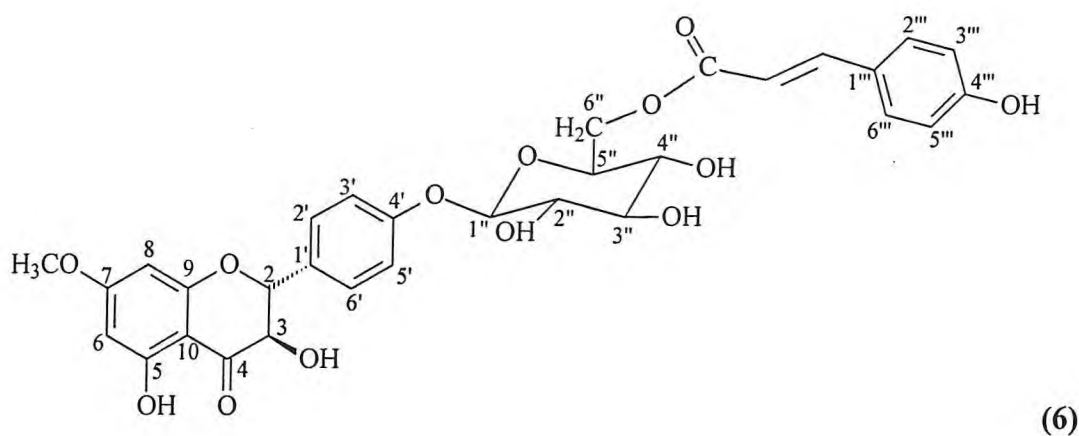
A conectividade das subestruturas mencionadas anteriormente foi determinada por meio da análise do espectro de RMN HMBC (Fig. 6.42, p.180). Desta forma pôde-se sugerir que ECK-6a estava ligada a ECK-6c, justificada pelo acoplamento verificado, a três ligações, entre o hidrogênio anomérico em δ 5,64 (H-1'') e o carbono em δ 159,43 (C-4'), valor este deslocado para região de proteção.



Representação de acoplamentos observados no HMBC entre ECK-6a e ECK-6c

A conectividade entre as subestruturas ECK-6c e ECK-6d foi estabelecida através da comparação com dados da literatura [Silverstein, 1994], onde pôde-se observar que a acilação da glicose no carbono C-6'' deslocava os valores dos carbonos C-6'' e C-5'' em $\approx (+1,4 \text{ ppm})$ e $(-1,7 \text{ ppm})$, respectivamente.

Estabelecendo as conectividades das subestruturas, chegou-se a estrutura (6), que após a comparação com os dados de RMN ^{13}C fornecidos pela literatura para 7-metil-aromadendrina-4'-O-(6''-*trans*-*p*-cumaroila)- β -D-glicopiranosídeo [Rashwan, 2002], (Tab. 6.17, p. 183), verificou-se a identidade entre as mesmas. Esta substância foi isolada pela primeira vez do "kino" de *Eucalyptus maculata*, sendo inédita para o *Eucalyptus citriodora*.



Estrutura de ECK-6: 7-metil-aromadendrina-4'-O-(6''-*trans*-*p*-cumaroila)- β -D-glicopiranosídeo

Tabela 6.16 – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$) de ECK-6.

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
2	84,70	5,37 (d, $J=10,6$ Hz)	1H-3	
3	73,78	4,77 (d, $J=10,6$ Hz)	1H-2	
4	199,37		1H-3	1H-2
5	163,84		1H-6	
6	94,93	6,25 (d, $J=2,0$ Hz)		1H-8
7	168,90		1H-6; 1H-8	3H-OCH ₃
8	96,29	6,35 (d, $J=2,0$ Hz)		1H-6
9	165,00		1H-8	
10	102,95			1H-6; 1H-8
1'	132,41		1H-2	1H-3'; 1H-5'; 1H-3
2' e 6'	130,29	7,74 (d, $J=8,5$ Hz)		1H-2
3' e 5'	117,47	7,46 (d, $J=8,5$ Hz)		
4'	159,43		1H-3'; 1H-5'	1H-2'; 1H-6'; 1H-''
OCH ₃	56,30	3,71 (s)		
β-D-glicose				
1''	102,82	5,64 (d, $J=7,0$ Hz)		
2''	75,33	4,40 (m)	1H-3''	
3''	78,91	4,40(m)	1H-2''	
4''	72,03	4,28(m)		
5''	76,06	4,36(m)		
6''	64,93	5,15 (d, $J=10,5$ Hz)		
p-cumaroila				
1'''	126,45			1H-3'''; 1H-5'''; 1H- α
2''', 6'''	131,16	7,54 (d, $J=8,4$ Hz)		1H- β
3''', 5'''	117,27	7,09 (d, $J=8,4$ Hz)		
4'''	161,99			1H-2'''; 1H-6'''
C α	115,53	6,63 (d, $J=15,7$ Hz)	1H- β	
C β	145,84	7,92 (d, $J=15,7$ Hz)		1H-2'''; 1H-6'''
C=O	167,87			1H- β

Tabela 6.17 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-6 com os encontrados na literatura para 7-metil-aromadendrina-4'-O-(6''-*trans*-*p*-cumaroila)- β -D-glicopiranosídeo em CD_3OD [Rashwan; 2002].

$\delta \text{ C}$	ECK-6	[Rashwan]
2	84,70	82,9
3	73,78	72,2
4	199,37	196,3
5	163,84	162,5
6	94,93	94,1
7	168,90	168,3
8	96,29	95,8
9	165,00	163,3
10	102,95	101,0
1'	132,41	130,4
2'	130,29	128,6
3'	117,47	116,6
4'	159,43	157,6
5'	117,47	116,6
6'	130,29	128,6
1''	102,82	100,6
2''	75,33	73,0
3''	78,91	76,3
4''	72,03	70,1
5''	76,06	74,0
6''	64,93	63,2
1'''	126,45	125,5
2'''	131,16	129,8
3'''	117,27	115,6
4'''	161,99	159,4
5'''	117,27	115,6
6'''	131,16	129,8
C=O	167,87	167,6
C α	115,53	113,7
C β	145,84	145,5
OCH $_3$	56,30	

6.1.7 Identificação Estrutural de ECK-7

O tratamento cromatográfico das frações ECK-PC-C8 + ECK-PC-DE (Flux. 7.4, p. 305), obtidas da fração clorofórmica oriunda do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*, resultou em um sólido, em forma de cristais translúcidos, p.f. = 116,9 – 119,6 °C, denominado ECK-7.

O espectro na região de absorção de infravermelho, obtido em KBr (Fig. 6.43) apresentou absorções em 3400 cm^{-1} , banda larga atribuída à deformação axial da ligação O-H de hidroxila; em 1703 cm^{-1} e em 1634 cm^{-1} , associadas à deformação axial da ligação C=O característica de ácido ou éster e de cetona conjugada com ligação intramolecular, respectivamente. Foram observadas bandas de vibrações esqueléticas envolvendo a deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1604 cm^{-1} , 1514 , e 1449 cm^{-1} , enquanto em 1069 e 1019 cm^{-1} foram relacionadas à deformação angular no plano de ligação C-H, e em 831 e 768 cm^{-1} , à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromáticos. As absorções registradas em 1281 e 1171 cm^{-1} foram relacionadas às deformações axiais de ligações C-O.

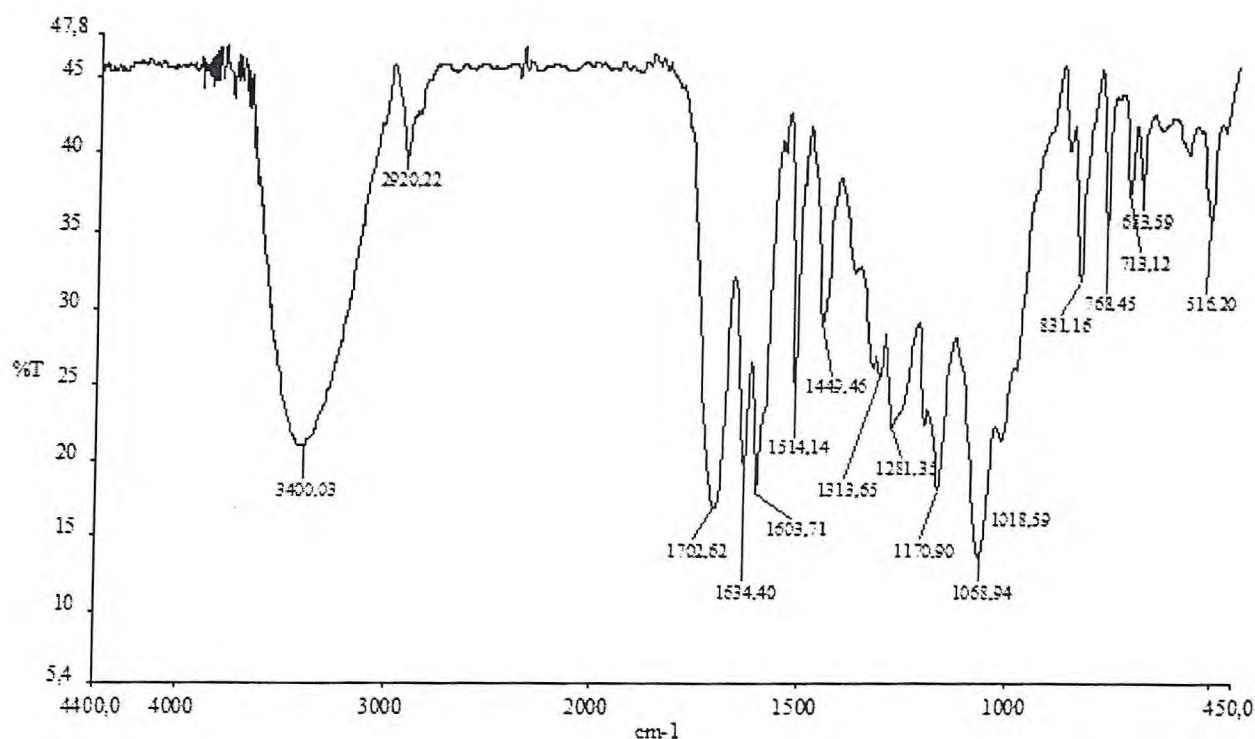


Figura 6.43 – Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-7

No espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) (Fig. 6.44) de ECK-7, pôde-se observar que os sinais estavam divididos em duas regiões: a primeira característica de hidrogênios aromáticos, δ 7,73-6,37 e a segunda de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, δ 5,59 a 3,47. Tais dados sugeriram a presença de uma unidade de açúcar, para a qual, por meio dos valor da constante de acoplamento do prótio em δ 5,59 (1H, d, $J=7,6$ Hz) ligado ao carbono anomérico (C-1'), pôde sugerir a configuração β .

A análise dos sinais na região de hidrogênios aromáticos sugeriu a presença de um sistema mono-substituído através das absorções em δ 7,60 (2H, m) e 7,39 (3H, m), além de um sistema *p*-substituído com sinais em δ 7,46 (2H, d, $J=8,5$ Hz) e 6,80 (2H, d, $J=8,5$ Hz). Os demais sinais, em δ 7,74 (1H, d, $J=16,0$ Hz) e δ 6,37 (1H, d, $J=16,0$ Hz) e δ 7,71 (1H, d, $J=16,0$ Hz) e δ 6,56 (1H, d, $J=16,0$ Hz) sugeriram ser prótios olefinicos com estereoquímica *trans*.

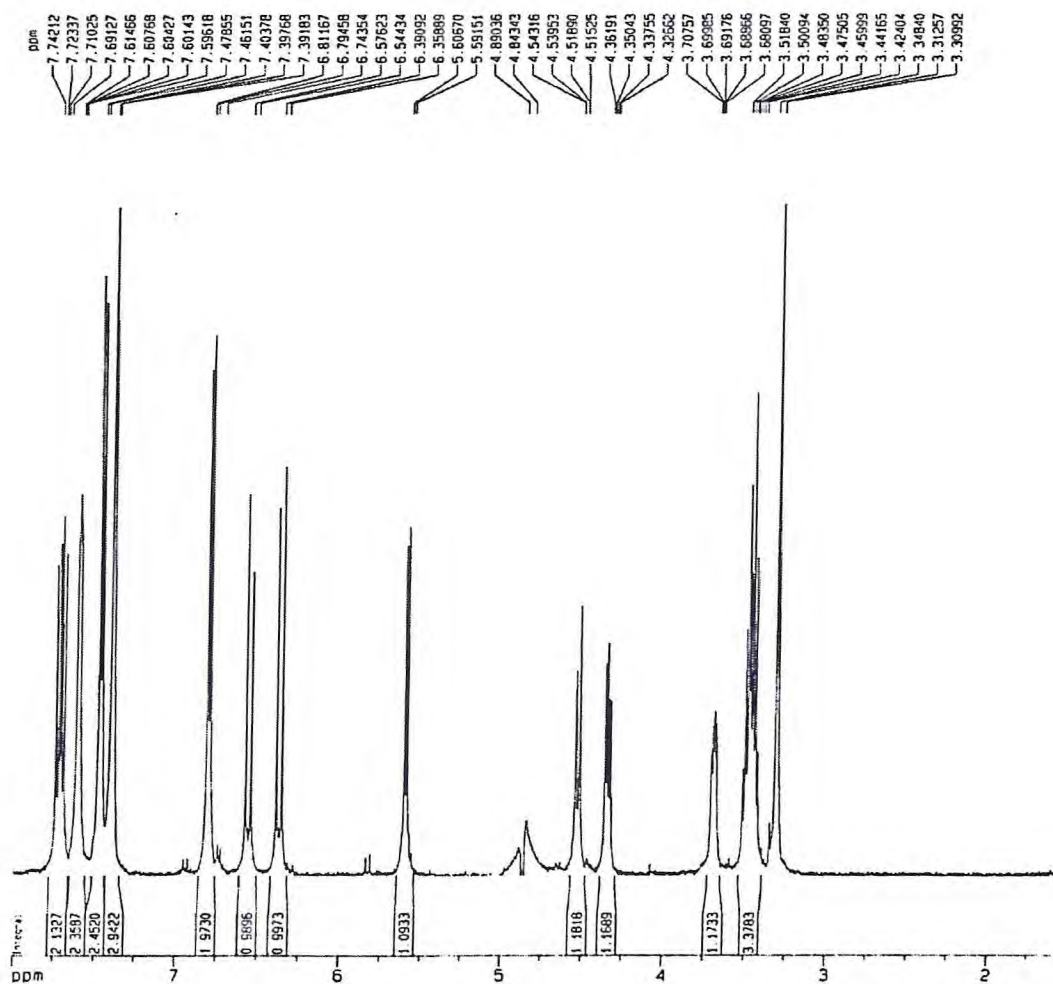


Figura 6.44 – Espectro de RMN ^1H de ECK-7 (CD_3OD , 500 MHz)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-7 (Fig. 6.45, p. 187) forneceu sinais relativos a vinte e uma linhas espectrais, referentes a vinte e quatro átomos de carbono, visto que os quatro sinais em δ 131,58; 130,17; 129,47 e 117,02 foram atribuídos a dois átomos de carbono cada, tendo em vista a presença de anéis benzênicos *para* e mono substituídos, onde se têm dois grupos de carbonos magneticamente equivalentes em cada sistema.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OH , 125 MHz) (Fig. 6.46, p. 187) desta substância possibilitou estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos e a elaboração da Tabela 6.18. Desta forma, foi sugerida a presença de cinco carbonos não-hidrogenados (C), dezoito metínicos (CH) e um metilênico (CH_2).

Tabela 6.18 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-7 com padrão de hidrogenação. (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° , δ , CD_3OD , 125 MHz).

δ	C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
168,64		148,22	64,75		
167,76		146,77			
161,74		131,69			
135,92		131,58 (x2)			
127,10		130,17 (x2)			
		129,47 (x2)			
		118,77			
		117,02 (x2)			
		114,53			
		95,90			
		78,05			
		76,42			
		74,15			
		71,50			
	C_2	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}$	CH_2		
	C-OH	(HC-OH) $_3$			
	(COO) $_2$	CH-O			$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_9$

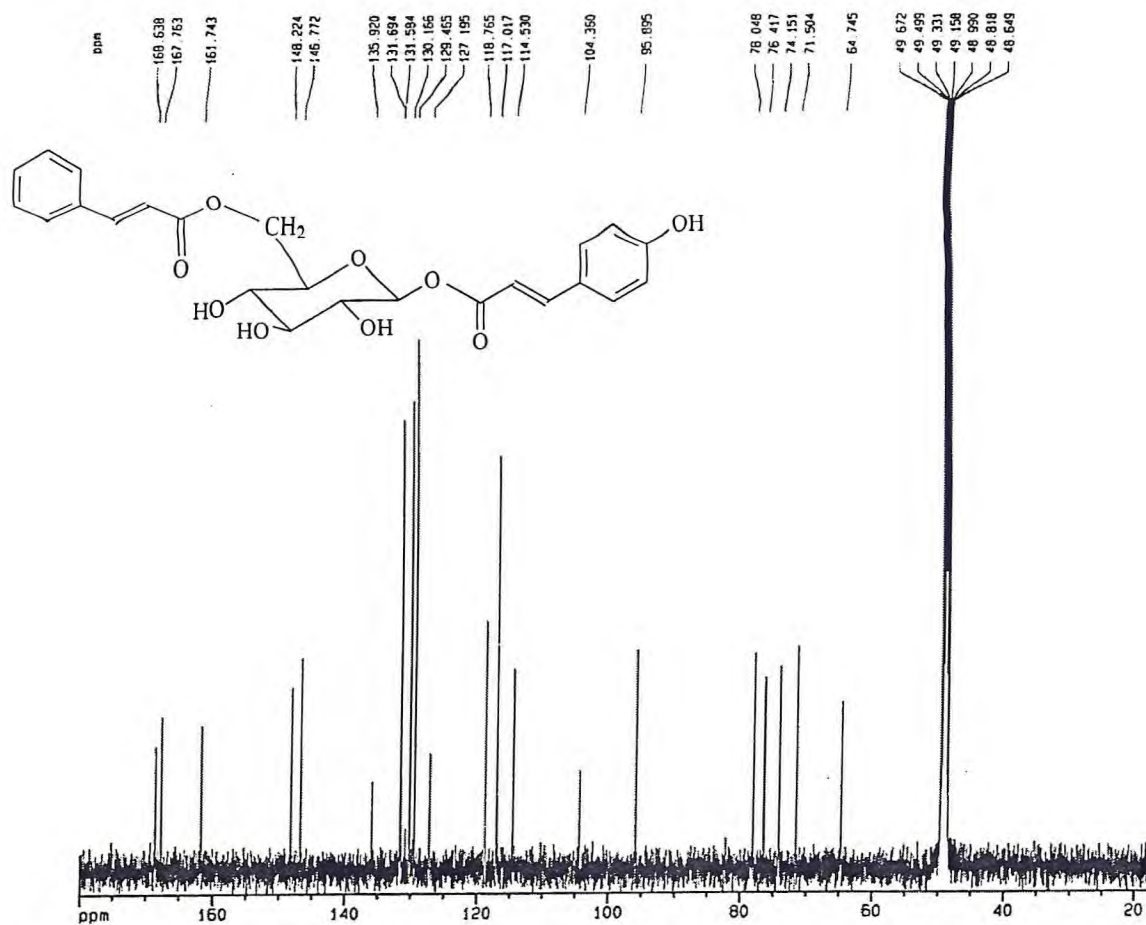


Figura 6.45 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-7 (CD_3OD , 125 MHz)

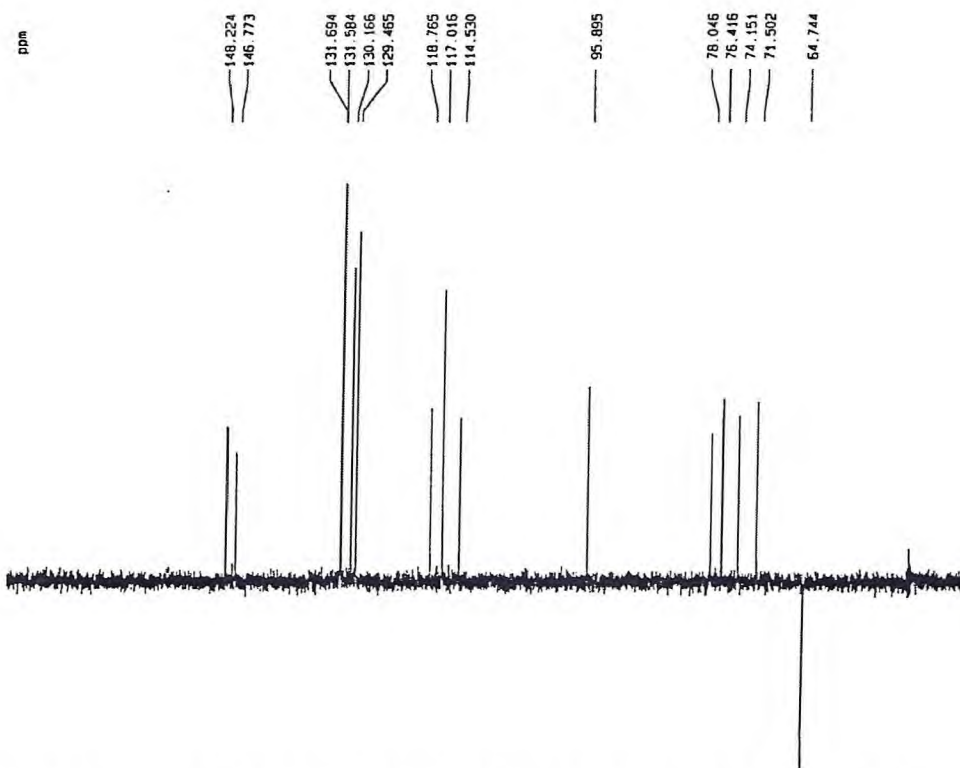
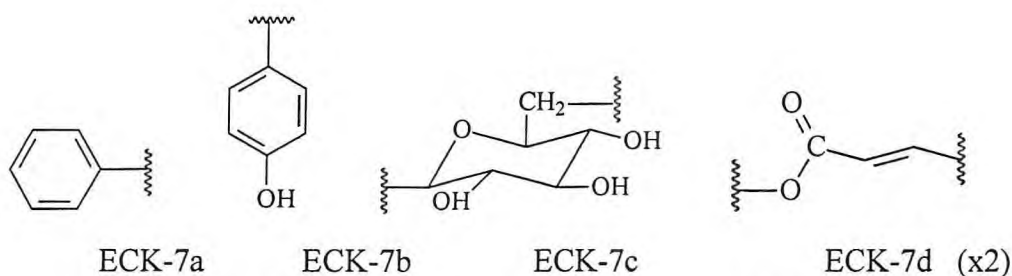


Figura 6.46 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-7 (CD_3OD , 125 MHz)

Pela teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein,1994] pôde-se sugerir que os sinais em δ 168,64, δ 167,76 e δ 161,74 seriam carbonos sp^2 oxigenados, sendo os dois primeiros pertencentes, possivelmente a carbonilas de ésteres. Já aqueles observados entre δ 148,22 e 114,53, sugeriram pertencer a carbonos sp^2 não oxigenados, enquanto os registrados entre δ 95,90 e 64,75 foram relacionados a carbonos sp^3 oxigenados.

A compilação dos dados obtidos permitiu sugerir a fórmula molecular $C_{24}H_{24}O_9$, com treze índices de deficiência de hidrogênio (IDH=13), distribuídos entre dois anéis aromáticos (IDH = 8), um para o anel do açúcar, dois para as duas carbonilas e dois para duas duplas ligações.

Com base nos dados obtidos, as subestruturas ECK-7a, ECK-7b, ECK-7c e ECK-7d foram propostas e para estabelecer a ordem da conectividade entre elas, recorreu-se a análise dos espectros de RMN bidimensionais.



Subestruturas proposta para ECK-7.

O espectro de RMN 1H , 1H -COSY (Fig. 6.47, p. 189) mostrou os acoplamentos entre os prótios adjacentes do grupamento cinamoila em δ 7,60 (H-3, H-5) com 7,39 (H-2, H-6 e H-4), bem como dos sinais em δ 7,73 (H-2", H-6") com 6,80 (H-3", H-5"). Para o grupamento β -glicopiranosídeo, observou-se o acoplamento geminal entre o prótio em δ 4,53 (H-6'A) com 4,34 (H-6'B), e os acoplamentos adjacentes entre aqueles em δ 4,34 (H-6'B) com 3,69 (H-5'), cujo acoplamento seqüencial foi observado no mesmo sinal em δ 3,47 para H-4', H-3' e H-2', onde este, finalmente completa a seqüência com o sinal em δ 5,59 (H-1'). Estes dados confirmaram a proposição das subestruturas (ECK-7a a ECK-7d).

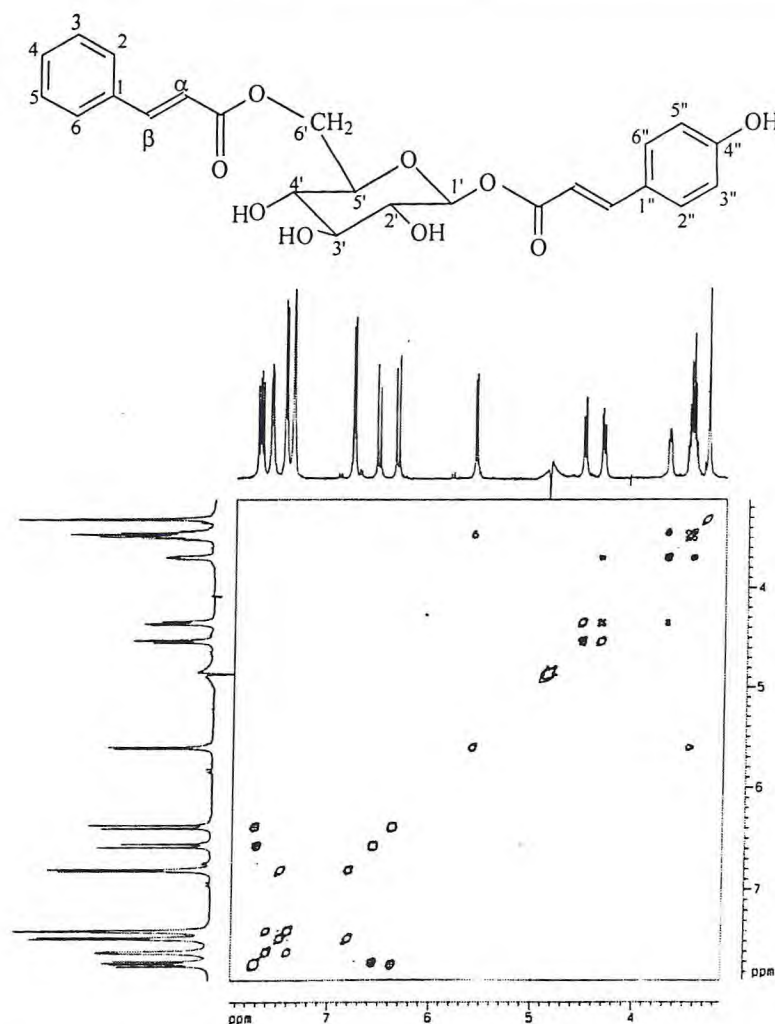


Figura 6.47 – Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK-7 (CD_3OD , 125 MHz)

Analisando o espectro de RMN HMQC (Fig. 6.48, p. 190), foi possível observar os acoplamentos C-H, ^1J e relacionar os prótios aos seus respectivos carbonos de maneira inequívoca, como visto na Tab 6.19, (p. 193). Dentre os acoplamentos observados, destacaram-se aqueles entre os carbonos em δ 78,05 (C-3'), 74,15 (C-2') e 71,50 (C-4'); todos com o mesmo prótio em δ 3,47 (3H, m), os dois sinais em δ 4,53 e 4,34 acoplando com o mesmo carbono em δ 64,75 (C-6'), e ainda os acoplamentos dos átomos quimicamente equivalentes, ou seja, entre os prótios em δ 7,60, 7,46, 7,39 e 6,80 com os respectivos carbonos em δ 129,47 (C-3 e C-5); 131,58 (C-2'' e C-6''); 130,17 (C-2 e C-6); e 117,02 (C-3'' e C-5''). O sinal em δ 7,39 também se correlacionou com o carbono em δ 131,69 (C-4).

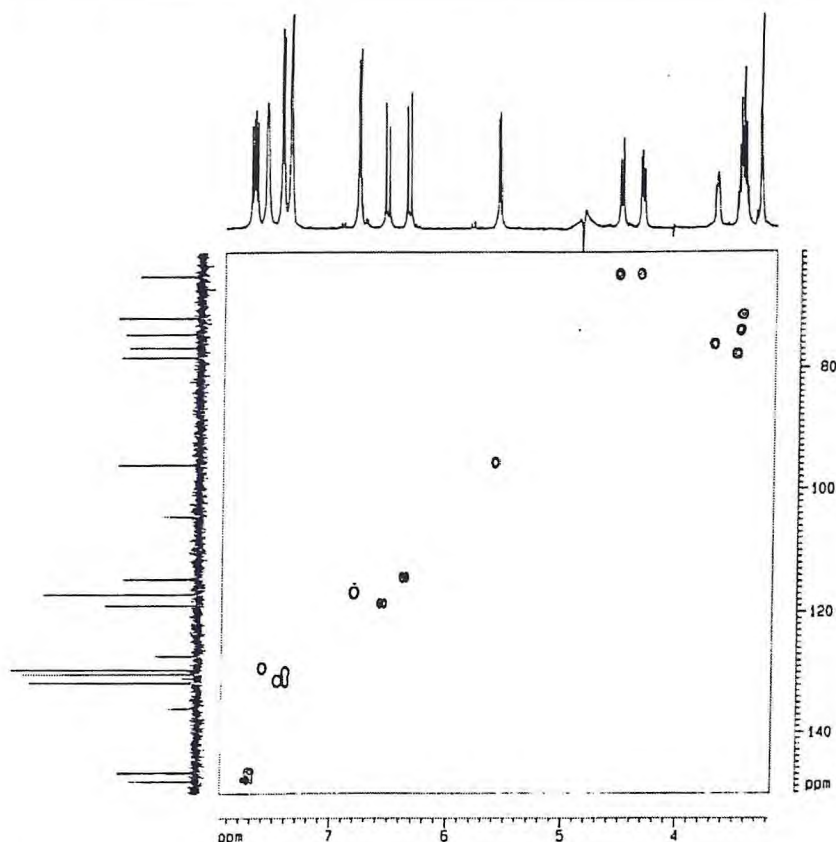
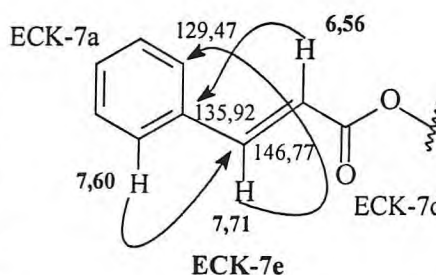
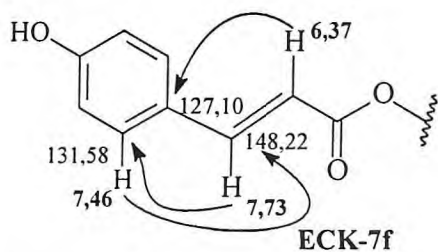


Figura 6.48 – Espectro de HMQC de ECK-7 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

A análise do espectro de RMN HMBC (Fig. 6.49, p. 191) permitiu estabelecer a ordem de conectividade entre as subestruturas mencionadas. Assim por meio da existência de acoplamento (³J) entre os prótio em δ 7,71 (H-β), 7,60 (H-2, H-6) e 6,56 (H-α) com os respectivos carbonos em δ 129,47 (C-2 e C-6), 146,77 (C-β) e em δ 135,92 (C-1), foi possível sugerir que ECK-7a e ECK-7d estariam ligadas, formando o grupamento cinamoila, representado na subestrutura ECK-7e.



Representação de acoplamentos entre ECK-7a e ECK-7d observados no HMBC para ECK-7e.



Representação de acoplamentos entre ECK-7b e ECK-7d observados no HMBC para ECK-7f.

Da mesma forma, para construção da subestrutura ECK-7f, recorreu-se a observação dos acoplamentos, (³J), existente entre os prótios em δ 7,73 (H-β''), 7,46 (H-2'', H-6'') e 6,37 (H-α') com os respectivos carbonos em δ 131,58 (C-2'' e C-6''), 148,22 (C-β') e 127,10

(C-1''), sugerindo o grupamento *para*-cumaroila, resultante da ligação entre ECK-7b e uma outra unidade de ECK-7d.

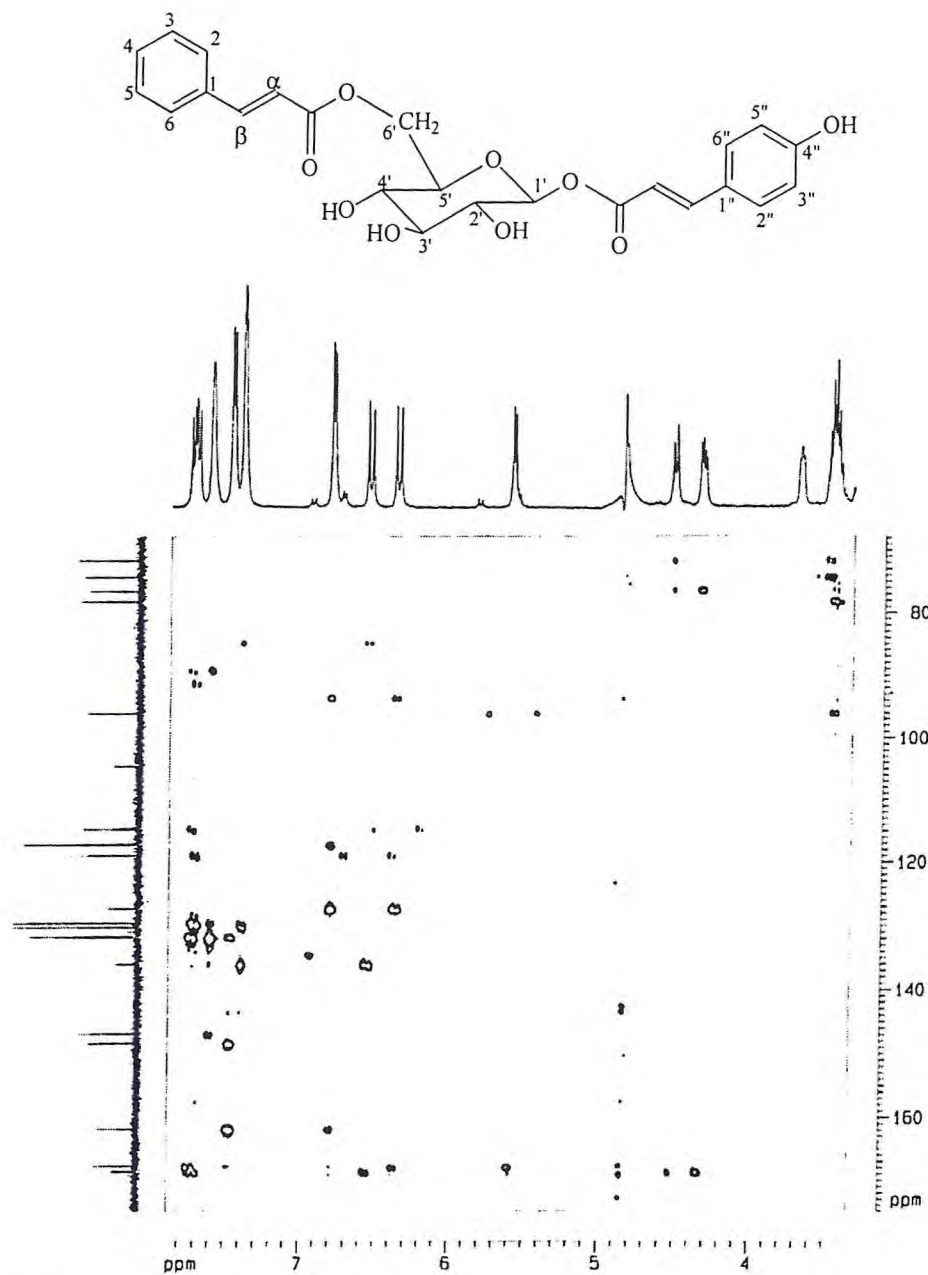
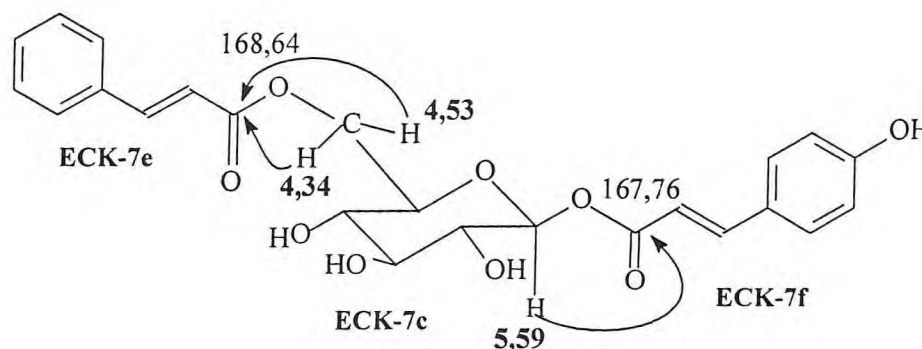


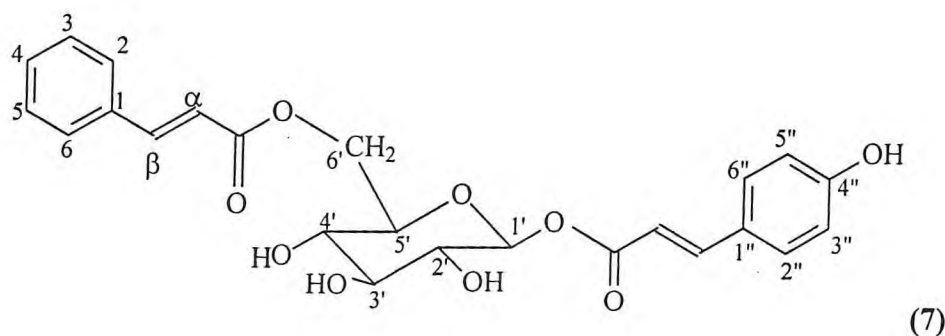
Figura 6.49 – Espectro de HMBC de ECK-7 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

O acoplamento observado entre o prótio δ 5,59 (H-1') e o carbono carbonílico em δ 167,76, representado em ECK-7f, aponta a conectividade entre esta e ECK-7c, assim como a ligação entre a subestrutura ECK-7e e a unidade osídica foi determinada por meio do acoplamento observado entre os prótios em δ 4,53 (H-6A) e 4,34 (H-6B) com o carbono carbonílico em δ 168,64.



Representação dos acoplamento entre as subestruturas ECK-7c, ECK-7e e ECK-7g observados no HMBC para a estrutura ECK-7.

Os grupamentos cinamoila e *p*-cumaroila foram então localizados nas posições C-6' e C-1' da unidade de glicose. Após comparação com os dados de RMN ^{13}C obtidos na literatura para 1-*O*-cinamoil-6-*O*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo (7) (Tab. 6.20, p. 194) verificou-se a identidade entre ambas. Esta substância já fora isolado de *Eucalyptus maculata* [Rashwan, 2002], mas descrita para *Eucalyptus citriodora* pela primeira vez.



Estrutura proposta para ECK-7: 1-*O*-cinamoil-6-*O*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo (7)

Tabela 6.19 – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-7

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
cinamoila			H-2; H-6	H- α
1	135,92			
2	129,47	7,60 (m)		H- β
3	130,17	7,39 (m)		
4	131,69	7,39 (m)	H-3; H-5	
5	130,17	7,39 (m)		
6	129,47	7,60 (m)		H- β
α	118,77	6,56 (d, $J=16,0$ Hz)	H- β	
β	146,77	7,71(d, $J=16,0$ Hz)		H-5(^4J)
C=O	168,64		H- α	H- β ; H-6A e H-6B
β-D-glicose				
1'	95,90	5,59(d, $J=7,6$ Hz)		
2'	74,15	3,47 (m)	H-3'	H-4'
3'	78,05	3,47 (m)	H-2'	
4'	71,50	3,47 (m)	H-3'	H-2'
5'	76,42	3,69	2H-6'; H-4'	H-3'
6'	64,75	A 4,53 (d, $J=12,0$ Hz) B 4,34 (d, $J=12,0$ Hz)		
<i>p</i>-cumaroila				
1''	127,10			H-3''; H-5''; H- α ''
2''	131,58	7,46 (d, $J=8,5$ Hz)		H- β
3''	117,02	6,80 (d, $J=8,5$ Hz)	H-3''; H-5''	H-2''; H-6''
4''	161,74			
5''	117,02	6,80 (d, $J=8,5$ Hz)		
6''	131,58	7,46 (d, $J=8,5$ Hz)		H- β ''
α ''	114,53	6,37 (d, $J=16,0$ Hz)	H- β ''	
β ''	148,22	7,73 (d, $J=16,0$ Hz)		H-2''; H-6''
C=O	167,76		H- α ''	H- β ''; H-1'

Tabela 6.20 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-7 com os encontrados na literatura para 1-*O*-cinamoil-6-*O*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo 7) [Rashwan; 2002]

δ C	ECK-7	[Rashwan, 2002], CD_3OD
cinamoila		
1	135,92	135,2
2	130,17	129,7
3	129,47	129,1
4	131,69	129,7
5	129,47	129,1
6	130,17	129,7
α	118,77	118,6
β	146,77	145,6
C=O	168,64	167,0
β-D-glicose		
1'	95,90	95,1
2'	74,15	73,8
3'	78,05	77,6
4'	71,50	70,8
5'	76,42	75,7
6'	64,75	64,2
<i>para</i>-cumaroila		
1"	127,10	126,7
2"	131,58	131,1
3"	117,02	116,6
4"	161,74	160,8
5"	117,02	116,6
6"	131,58	131,1
α "	114,53	114,7
β "	148,22	146,8
C=O	167,76	166,0

6.1.8 Determinação Estrutural de ECK-8

Da fração ECK-PC-BCB (p. 299), obtida do tratamento cromatográfico da fração clorofórmica proveniente do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*, foi isolada uma substância sólida, de coloração amarela translúcida, p.f = 115,4 - 119,1 °C e $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$ (c = 0,04, metanol), denominada **ECK-8**.

O espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr (Fig. 6.50) de ECK-8 mostrou bandas intensas e largas em 3423 cm^{-1} , referente a deformação axial de OH, outra em 2932 cm^{-1} , atribuída à deformação axial assimétrica de $C_{sp^3}\text{-H}$, indicativa da presença de grupamentos metílicos e metilênicos; banda intensa em 1633 cm^{-1} , relacionada a deformação axial da ligação C=O de carbonila conjugada, com uma ou mais ligações intramoleculares; As absorções referentes a bandas esqueléticas correspondentes a deformação axial da ligação C=C de anel aromático foram registradas entre 1572 a 1352 cm^{-1} . As bandas compreendidas entre 1263 a 1098 cm^{-1} foram atribuídas à deformação axial da ligação C-O e as observadas em 954 a 834 cm^{-1} , à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromático.

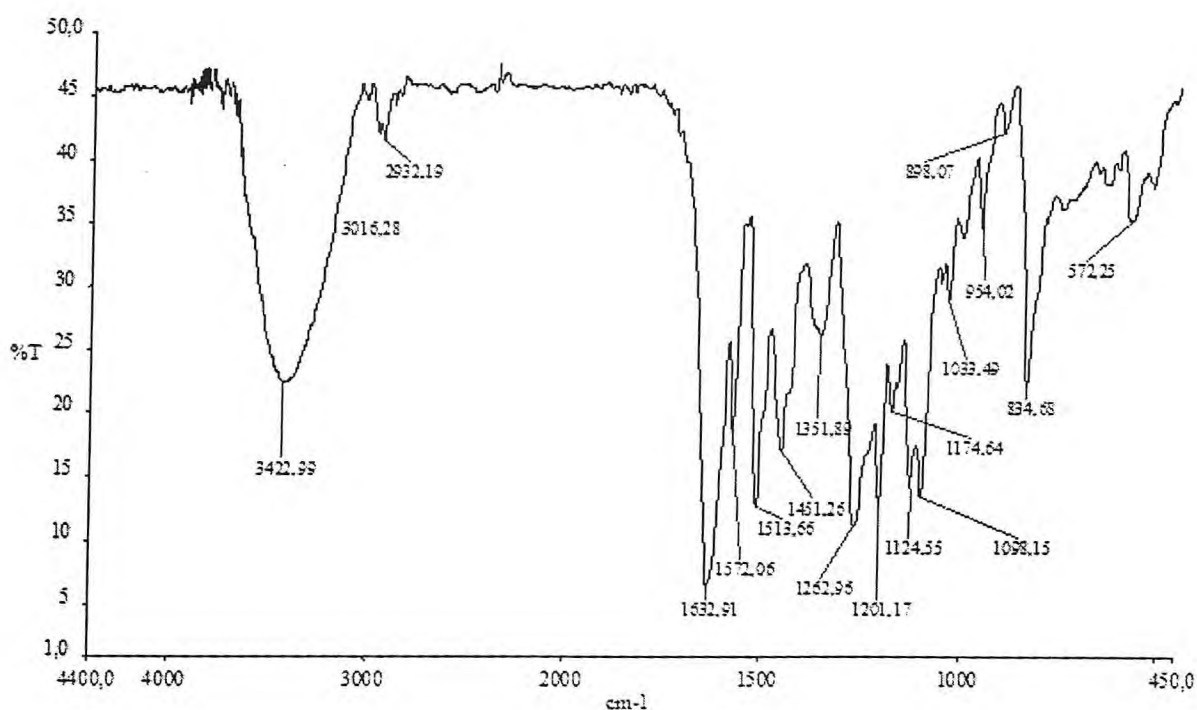


Figura 6.50 – Espectro de absorção na região do IV (KBr) de ECK-8.

A análise do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-8 (Fig. 6.51) permitiu observar cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos, dos quais quatro deles foram atribuídos a dois grupos de sistemas aromáticos *para*-substituídos em δ 7,36 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,12 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) e 6,65 (2H, d, $J = 8,4$ Hz). A presença do singlete em δ 6,08 (1H, s), sugere que um dos anéis aromáticos encontra-se penta-substituído. Sinais em δ 4,99 (1H, d, $J = 11,8$ Hz) e 4,57 (1H, d, $J = 11,8$ Hz), foram atribuídos a hidrogênios característicos de um esqueleto diidroflavonol, cujos valores das constantes de acoplamentos indicaram estereoquímica *trans*. Ainda foram observados sinais em δ 3,70 (3H, s) e 1,62 (3H, d, $J = 7,2$ Hz), sendo o primeiro sugestivo de uma metoxila e o segundo de uma metila. Por fim, um sinal em δ 4,63 (1H, q, $J = 7,2$ Hz).

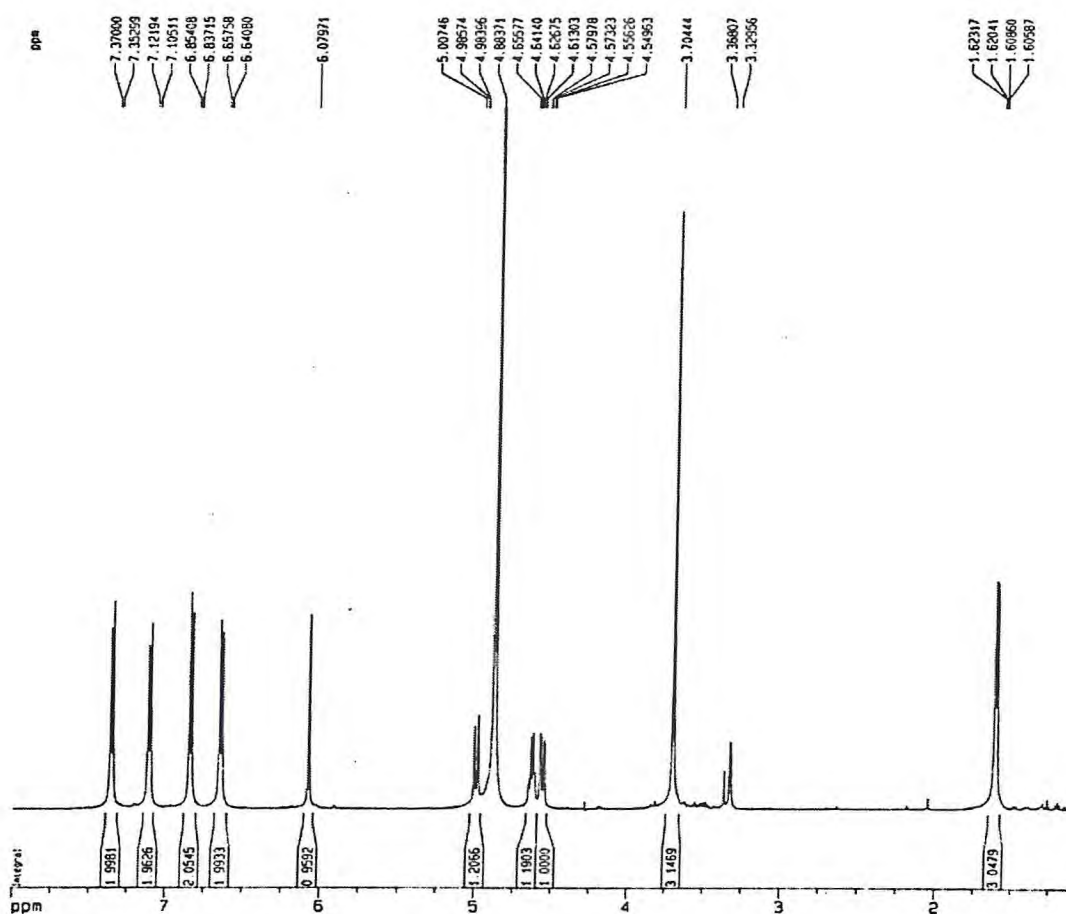


Figura 6.51 – Espectro de RMN ^1H de ECK-8 (CD_3OD , 500 MHz)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-8 (Fig. 6.52, p. 198), apresentou dezenove linhas espectrais, correspondentes a vinte e quatro átomos de carbono dadas a existência de carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes. Os sinais em δ

130,53, 116,27 e 115,52 foram atribuídos a dois carbonos cada, enquanto o sinal em δ 129,35, a três (explicações adicionais na análise do espectro RMN HMBC).

A comparação entre os dados do espectro de RMN ^{13}C -CPD com os dados do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 6.53, p. 199) permitiu verificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono. Por este procedimento foi possível elaborar a Tabela 6.21 e constatar a presença de dez carbonos não-hidrogenados (C), doze carbonos metínicos (CH) e dois carbonos metílicos (CH_3).

Tabela 6.21 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-8 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135° , δ , CD_3OD , 125 MHz).

Δ C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
199,42	130,53 (x2)		56,39	
167,75	129,35(x2)		18,14	
163,25	116,27(x2)			
161,41	115,52(x2)			
159,33	92,77			
155,95	85,17			
137,96	73,84			
129,35	33,21			
116,06				
102,48				
C_5	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}$		CH_3	
$(\text{C}-\text{OH})_3$	$\text{HC}-\text{OH}$		$\text{O}-\text{CH}_3$	
$\text{C}-\text{O}$	$\text{HC}-\text{O}$			
$\text{C}=\text{O}$				$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_7$

De acordo com a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] pôde-se atribuir o sinal observado em δ 199,42 a uma carbonila de cetona conjugada. Os sinais em δ 167,75; 163,25; 161,41; 159,33 e 155,95 sugeriram ser carbonos sp^2 oxigenados, enquanto os sinais em δ 130,53 (x2), 129,35 (x2); 116,27 (x2), 115,52 (x2) e 92,77 foram atribuídos a carbonos metínicos insaturados, ao passo que em δ 85,17 e 33,21, correspondiam a carbonos sp^3 , sendo o primeiro oxigenado. Sinais correspondentes a carbonos insaturados não-hidrogenados foram observados em δ 163,25; 137,96; 129,35; 116,06 e 102,48.

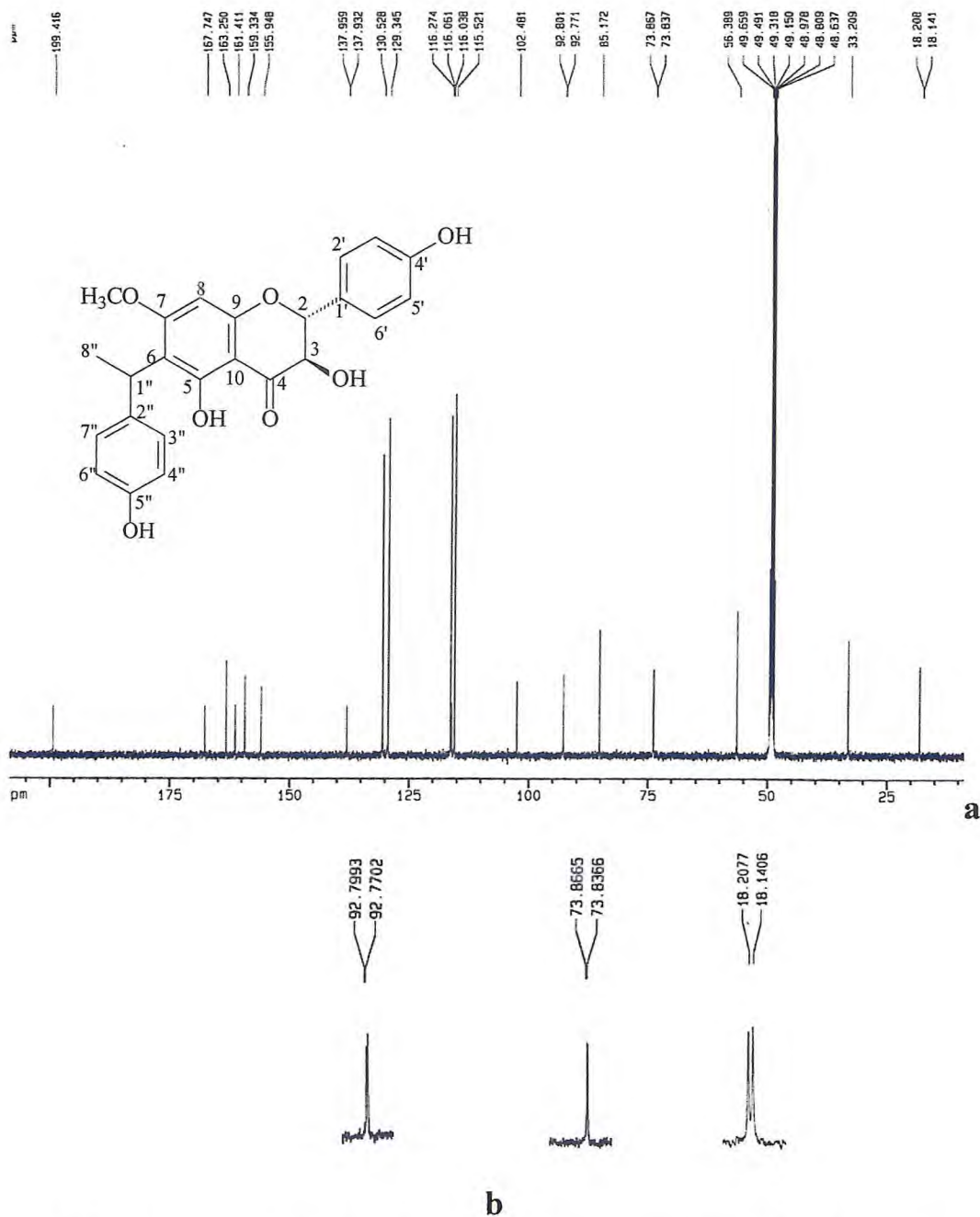


Figura 6.52 – a) Espectro de RMN ¹³C-CPD de ECK-8 (CD₃OD, 125 MHz) b) Expansões do espectro RMN HMBC de ECK-8 relativas aos sinais dobrados em torno de δ 18,00, 74,00 e 93,00 (125 MHz, CD₃OD).

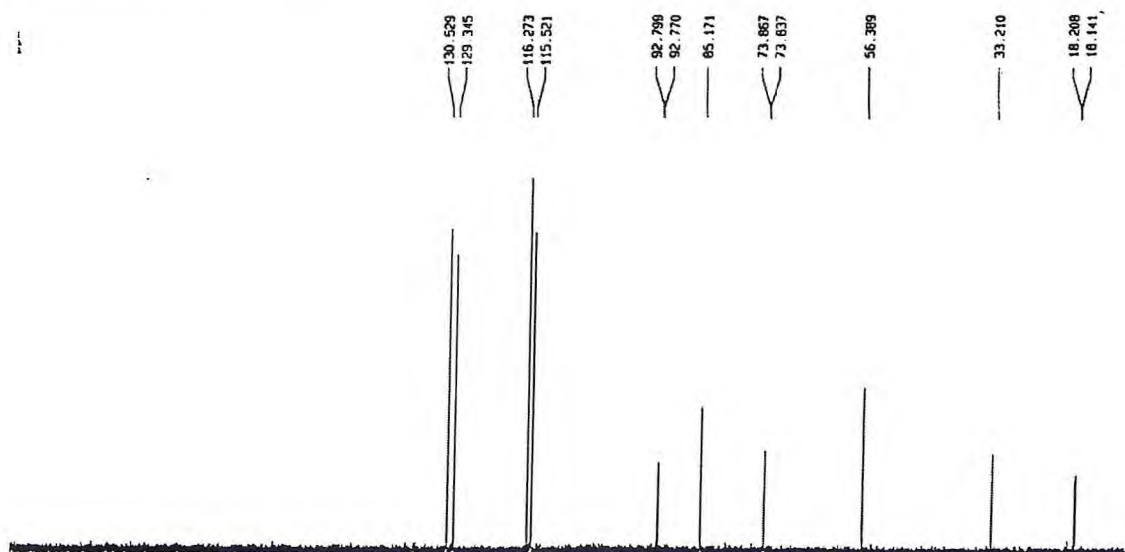


Figura 6.53 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-8 (CD_3OD , 125 MHz)

De acordo com os dados dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , foi possível propor para ECK-8 a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_7$, corroborada pelo espectro de massa (Fig. 6.54), no qual há o registro do pico íon molecular em m/z 422.

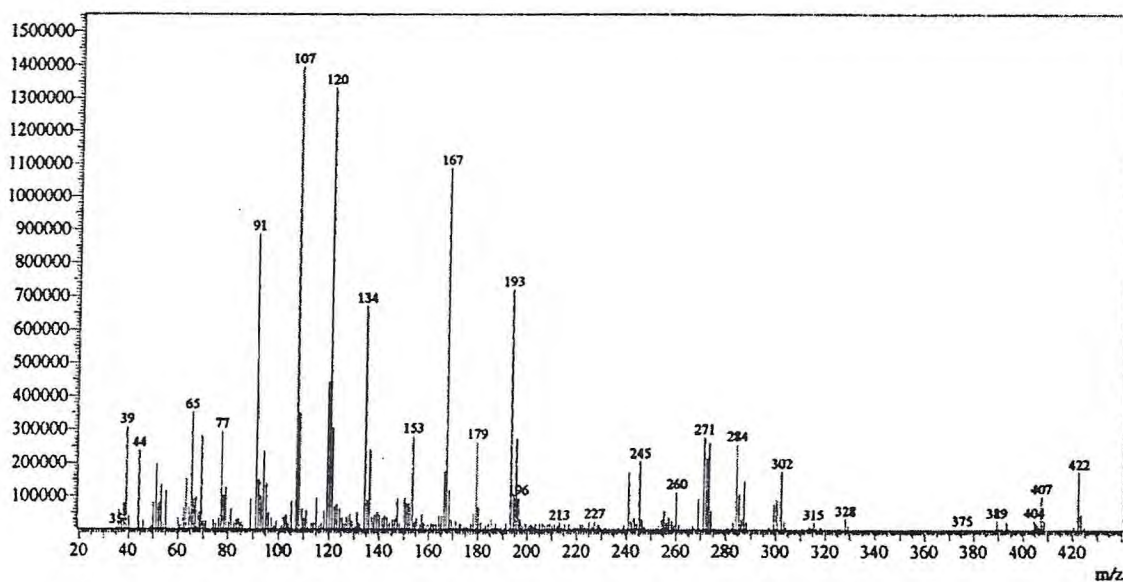
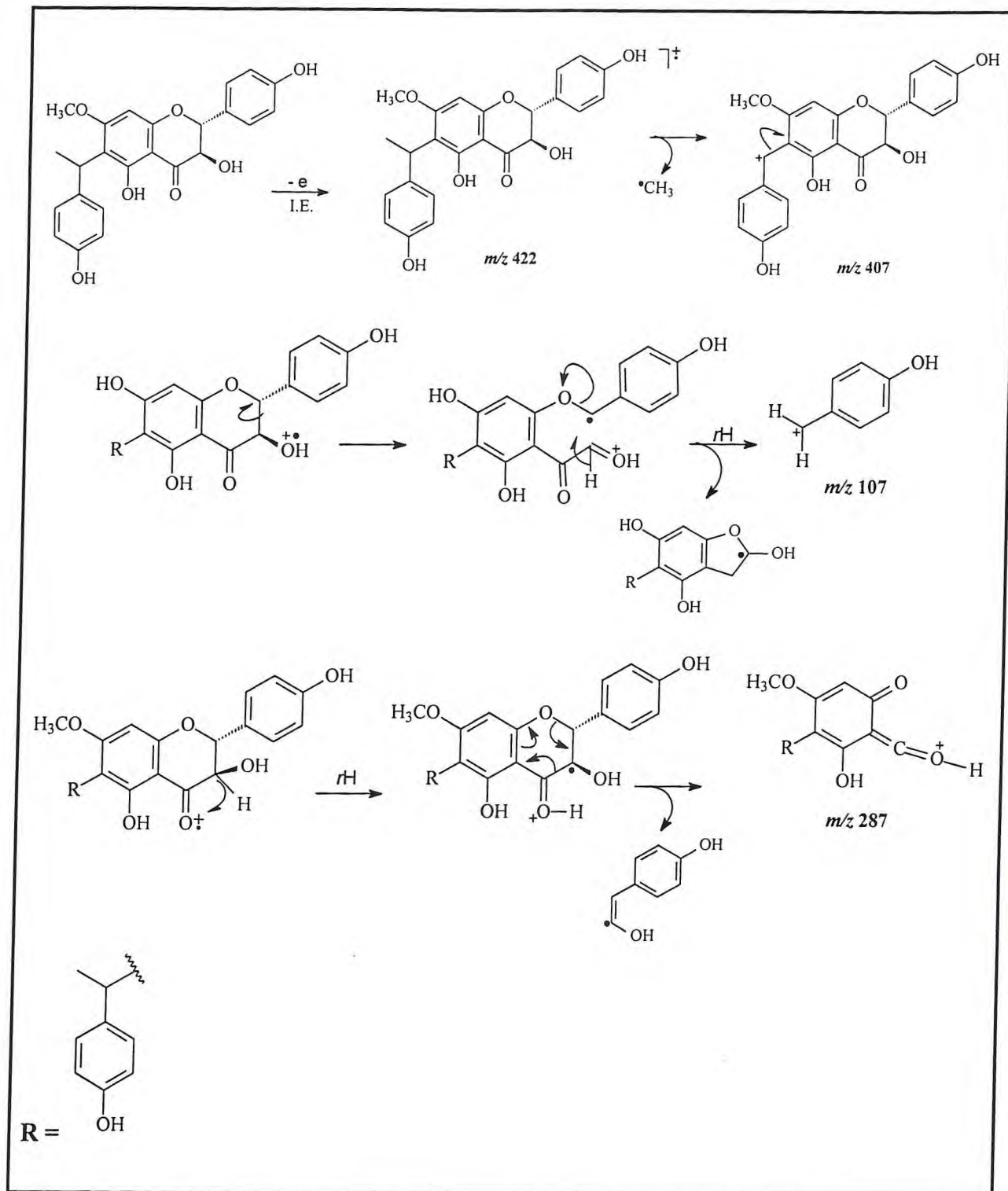
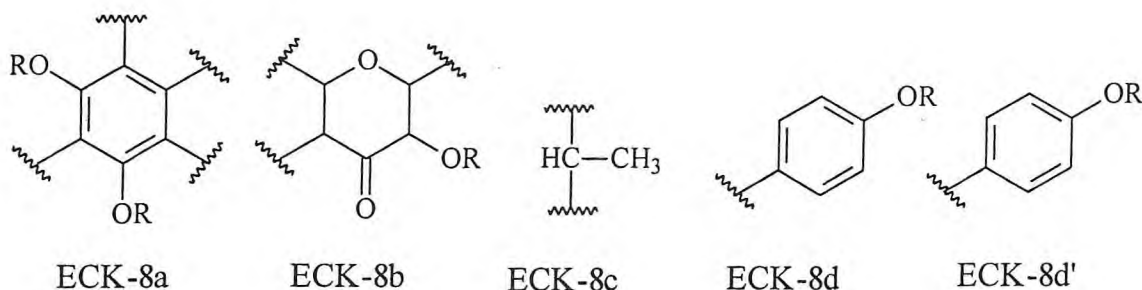


Figura 6.54 – Espectro de massa de ECK-8 (IE, 70 eV)

Quadro 6.5 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-8 (8)



O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) calculado foi igual a catorze, os quais foram atribuídos a três anéis aromáticos (12 IDH) e a um grupo carbonila de um anel pirânico. Com base nas informações disponíveis, foi possível idealizar as subestruturas abaixo, que além das unidades aromáticas e da cíclica, ainda pôde-se propor a porção alifática:



Subestruturas propostas para ECK-8

As informações obtidas sugeriram um esqueleto flavonoídico, entretanto restou a incorporação dos grupamentos ECK-8c e ECK-8d'. Por conseguinte, recorreu-se à interpretação dos espectros 2D.

No espectro de RMN 2D de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig. 6.55, p. 202), puderam-se observar os acoplamentos vicinais entre os prótios aromáticos em δ 7,36 (H-2' e H-6') e 6,85 (H-3'' e H-7'') e entre δ 7,12 (H-4'' e H-6'') e 6,65 (H-2'' e H-6''); entre os prótios ligados a carbonos oxigenados em δ 4,99 (H-2) e 4,52 (H-3) e ainda entre o prótio metínico em δ 4,63 (H-1'') e os prótios metílicos em δ 1,62 (H-8'').

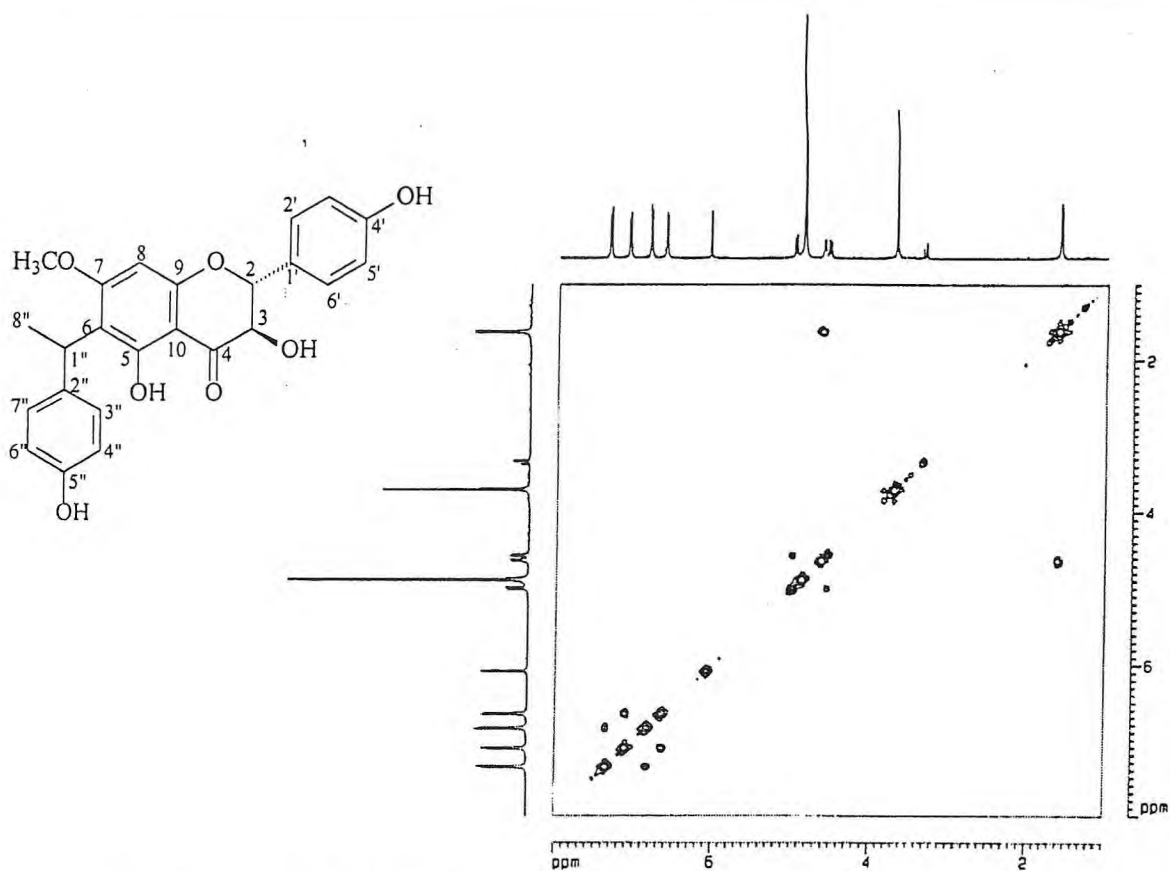


Figura 6.55 – Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK-8 (CD_3OD , 125 MHz)

Por meio da análise do espectro RMN HMQC (Fig. 6.56, p. 203) de ECK-8, foi possível associar inequivocamente os sinais de todos os prótons aos seus respectivos carbonos, como pode ser visto na Tab 6.22, (p. 206).

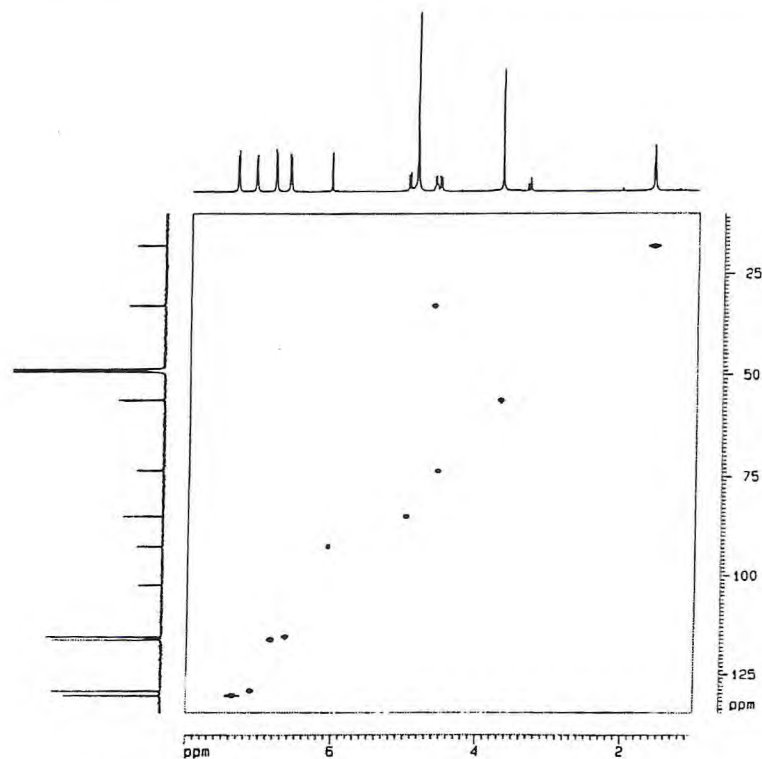
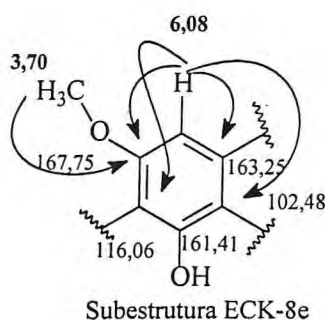


Figura 6.56 – Espectro de RMN HMQC de ECK-8 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)

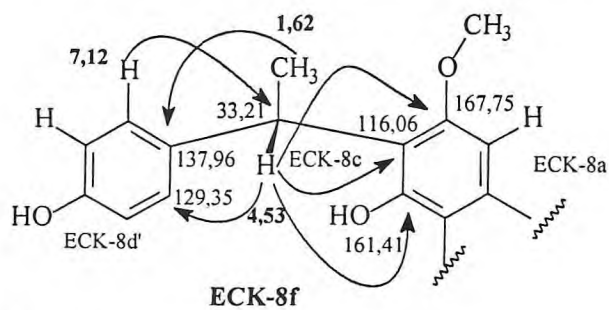
Para determinar a posição do grupo metoxila, recorreu-se a análise do espectro RMN



Subestrutura ECK-8e, representando acoplamentos do HMBC.

HMBC (Fig. 6.57, p. 204) de onde foi possível estabelecer os acoplamentos, à longa distância, entre os prótios em δ 3,70 com o carbono δ em 167,75 (C-7), e ainda os acoplamentos do prótio em δ 6,08 (H-8) com os carbonos a duas ligações em δ 167,75 (C-7) e 163,25 (C-9); e a três ligações em δ 102,48 (C-10) e 116,06 (C-6).

Ainda por meio da análise deste espectro foi possível estabelecer as conectividades entre as subestruturas ECK-8a, ECK-8c e ECK-8d', identificadas pelos acoplamentos $^2J_{\text{CH}}$ entre o prótio em δ 4,63 com os carbonos em δ 116,06 (C-6), 137,96 (C-2'') e 18,14 (C-8'') e $^3J_{\text{CH}}$ em δ 167,75 (C-7), 161,04 (C-5), 129,35 (C-3'' e C-7''), conduzindo a proposição da subestrutura ECK-8f (p. 204).



Subestrutura ECK-8f e a representação dos acoplamentos do HMBC.

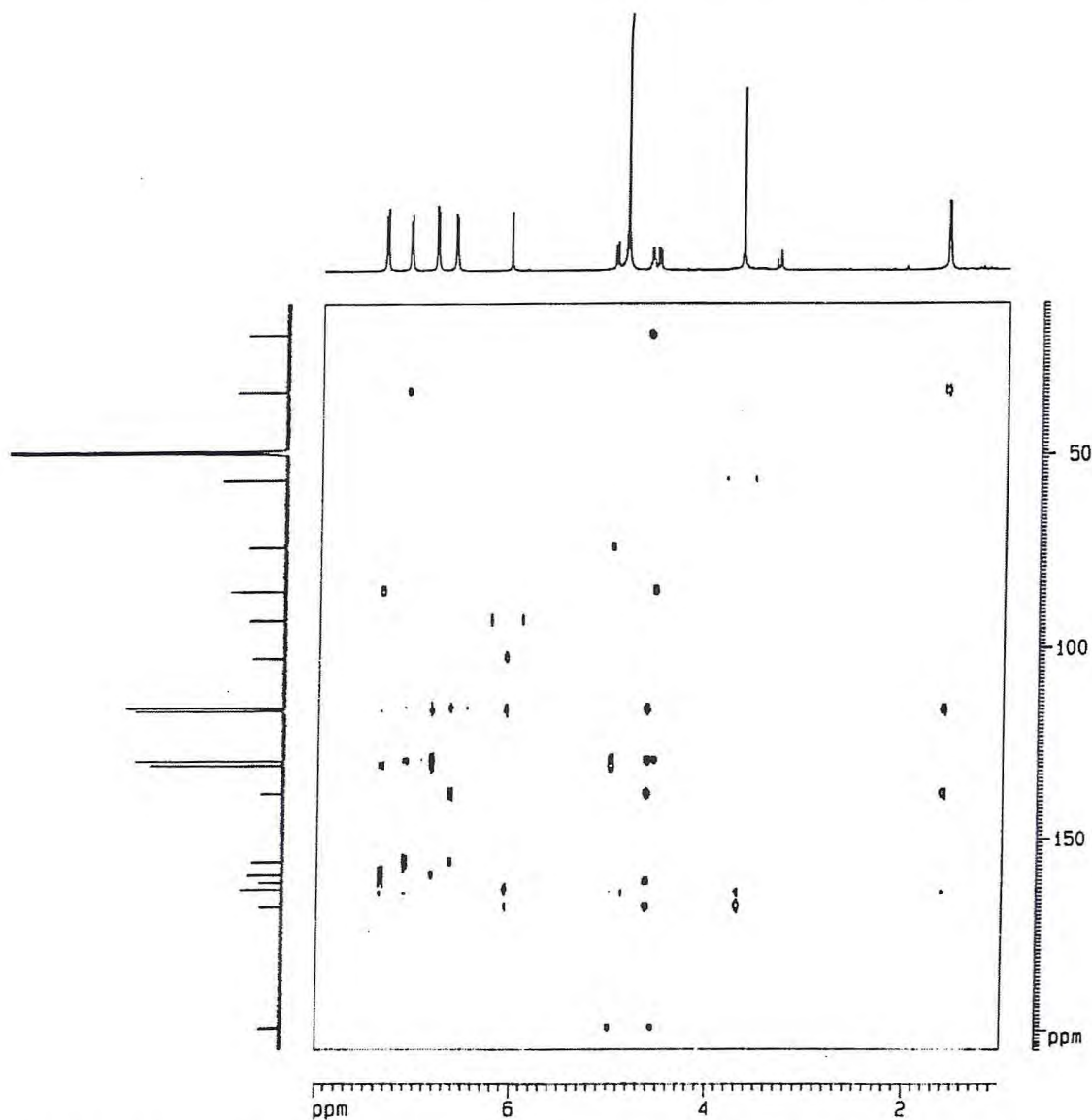
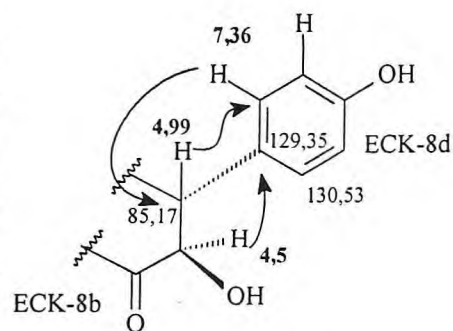


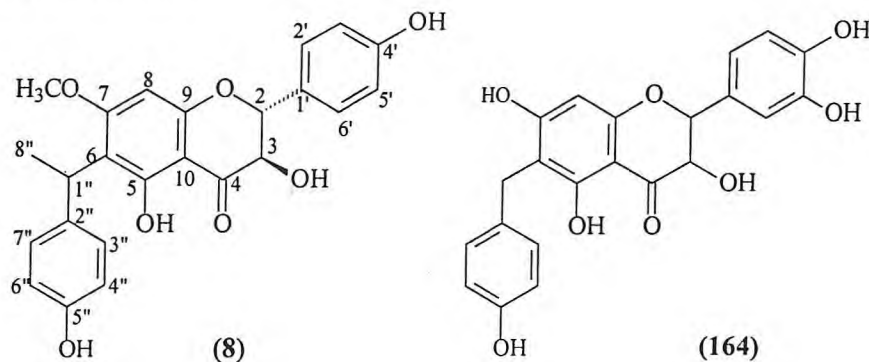
Figura 6.57 – Espectro de RMN HMBC de ECK-8 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

O registro de outros acoplamentos importantes permitiram estabelecer a posição da conectividade da subestrutura ECK-8b e ECK-8d, podendo-se assinalar os acoplamentos ($^3J_{CH}$) entre os seguintes prótios em: δ 7,36 (H-2' e H-6') com carbono em δ 85,17 (C-2); 4,99 (H-2) com os carbonos em δ 130,53 δ (C-2' e C-6') e 4,57 (H-3) com aquele em δ 129,35 (C-1'). Este último confirma a atribuição deste sinal para três átomos de carbono.



Subestrutura de ECK-8g representando os acoplamentos do HMBC.

A reunião das subestruturas, obedecendo à ordem dos acoplamentos observados em ECK-8f e ECK-8g, conduziu a proposição para a estrutura ECK-8, um tipo raro de flavonóide com substituinte benzílico na posição (C-6). A comparação dos dados de RMN ^{13}C desta com os de gericudranina C (**164**) obtidos na literatura [Lee, Kim *et al.*, 1996] apontou semelhança entre as estruturas (Tab. 6.23, p. 207). De acordo com a pesquisa realizada no *Chemical Abstract* (on line), esta substância, denominada 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,4'-diidroxiflavanonol, está sendo descrita pela primeira vez na literatura.



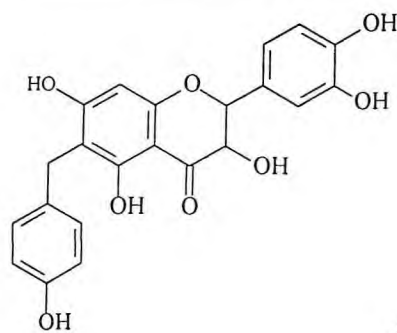
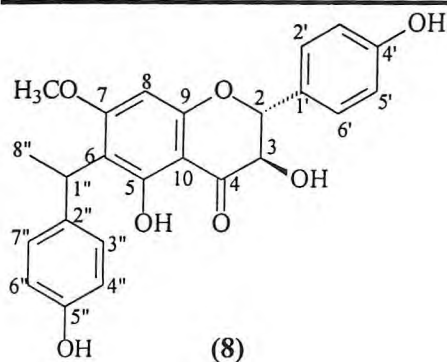
Estrutura de ECK-8 (**8**): 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,4'-diidroxiflavanonol

Tabela 6.22 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^3H -HMQC - $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC - $^nJ_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-8.

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1J_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^nJ_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
2	85,17	4,99 (d, $J=11,8$ Hz)	1H-3	1H-2' e 1H-6'
3	73,84	4,5 (d, $J=11,8$ Hz)	1H-2	-
4	199,42	-	1H-3	1H-2
5	161,41	-	-	1H-1"
6	116,06	-	-	3H-8" 3H-8
7	167,75	-	1H-8	1H-1"; 1H-OCH ₃
8	92,77	6,08 (s)	-	-
9	163,25	-	1H-8	-
10	102,48	-	-	1H-8
1'	129,35	-	-	1H-3; 1H-3'; 1H-5'
2'	130,53	7,36 (d, $J=8,5$ Hz)	-	1H-2
3'	116,27	6,85 (d, $J=8,5$ Hz)	-	-
4'	159,33	-	1H-3'; 1H-5'	1H-2' e 1H-6'
5'	116,27	6,85 (d, $J=8,5$ Hz)	-	-
6'	130,53	7,36 (d, $J=8,5$ Hz)	-	-
1"	33,21	4,63(q, $J=7,2$ Hz)	3H-8"	1H-3"; 1H-7"
2"	137,96	-	1H-1"	1H-8"; 1H-4"; 1H-6"
3"	129,35	7,12 (d, $J=8,4$ Hz)	-	1H-1"
4"	115,52	6,65 (d, $J=8,4$ Hz)	-	-
5"	155,95	-	1H-4"; 1H-6"	1H-3"; 1H-7"
6"	115,52	6,65 (d, $J=8,4$ Hz)	-	-
7"	129,35	7,12 (d, $J=8,4$ Hz)	-	1H-1"
8"	18,14	1,62 (d, $J=7,2$ Hz)	1H-1"	-
OCH ₃	59,39	3,70 (s)	-	-

Tabela 6.23 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-8 (CD_3OD , 125 MHz) com os de gericudranina C (164) [Lee, Kim *et al.*, 1996].

C	ECK-8	[Lee, Kim <i>et al.</i> , 1996]
2	85,17	85,10
3	73,84	73,75
4	199,42	198,47
5	163,25	162,39
6	116,06	110,54
7	167,75	166,52
8	92,77	95,63
9	161,41	162,42
10	102,48	101,62
1'	129,35	129,99
2'	130,53	115,8
3'	116,27	146,28
4'	159,33	147,08
5'	116,27	116,05
6'	130,53	120,91
1''	33,21	27,54
2''	137,96	133,74
3''	129,35	130,50
4''	115,52	115,66
5''	155,95	156,04
6''	115,52	115,66
7''	129,35	130,50
8''	18,14	-
OCH_3	56,39	-



6.9 Determinação Estrutural de ECK-9

O isolamento de ECK-9 foi realizado por meio de tratamento cromatográfico da fração ECK-PC-M (Fluxograma 7.6, p. 310), obtida após sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração clorofórmica proveniente do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*. O aspecto era de um sólido, de coloração amarela translúcida, p.f. = 125,9 - 130,5 °C e $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$ (c = 0,04 MeOH).

No espectro de absorção na região do infravermelho de ECK-9 (Fig. 6.58), deu-se destaque para as absorções em 3399 cm^{-1} , uma banda larga, atribuída à deformação axial da ligação O-H de hidroxila e a absorção em 1633 cm^{-1} , associada à deformação axial da ligação C=O, característica de cetona conjugada. Outras bandas presentes muito se assemelham com as já descritas para ECK-8 (em estudo, p. 195).

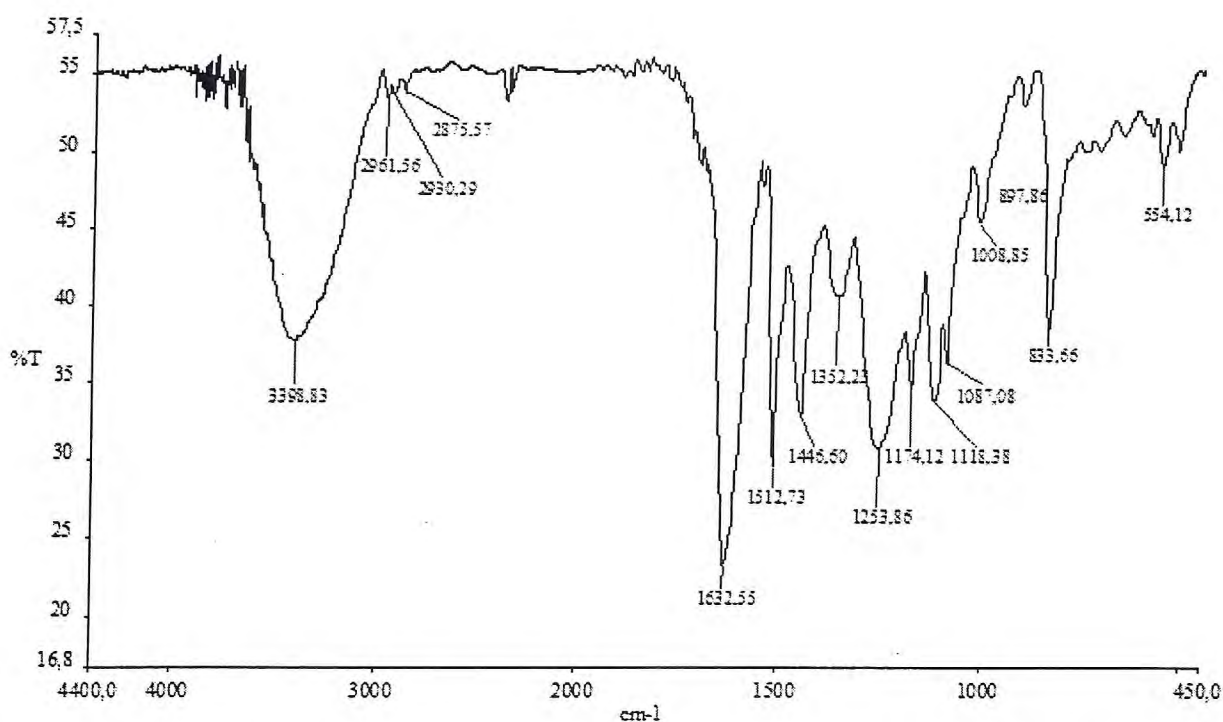


Figura 6.58 – Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-9

No espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de ECK-9 (Fig. 6.59, p. 209) verificaram-se absorções características de dois sistemas aromáticos *para*-substituídos, em δ 7,34 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,82 (2H, d, $J = 8,3$ Hz) e em δ 7,15 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,63 (2H,

d, $J = 8,5$ Hz). As demais absorções se apresentaram em δ 5,90 (1H, s), em δ 4,94 (1H, d, $J = 11,7$ Hz) e 4,52 (1H, d, $J = 11,7$ Hz), características de esqueleto diidroflavonol, com estereoquímica *trans* sugerida pelos valores de J . Os sinais em δ 4,59 (1H, q, $J = 7,3$ Hz) e 1,64 (3H, d, $J = 7,3$ Hz), foram atribuídos a prótios ligados a carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH₃), respectivamente.

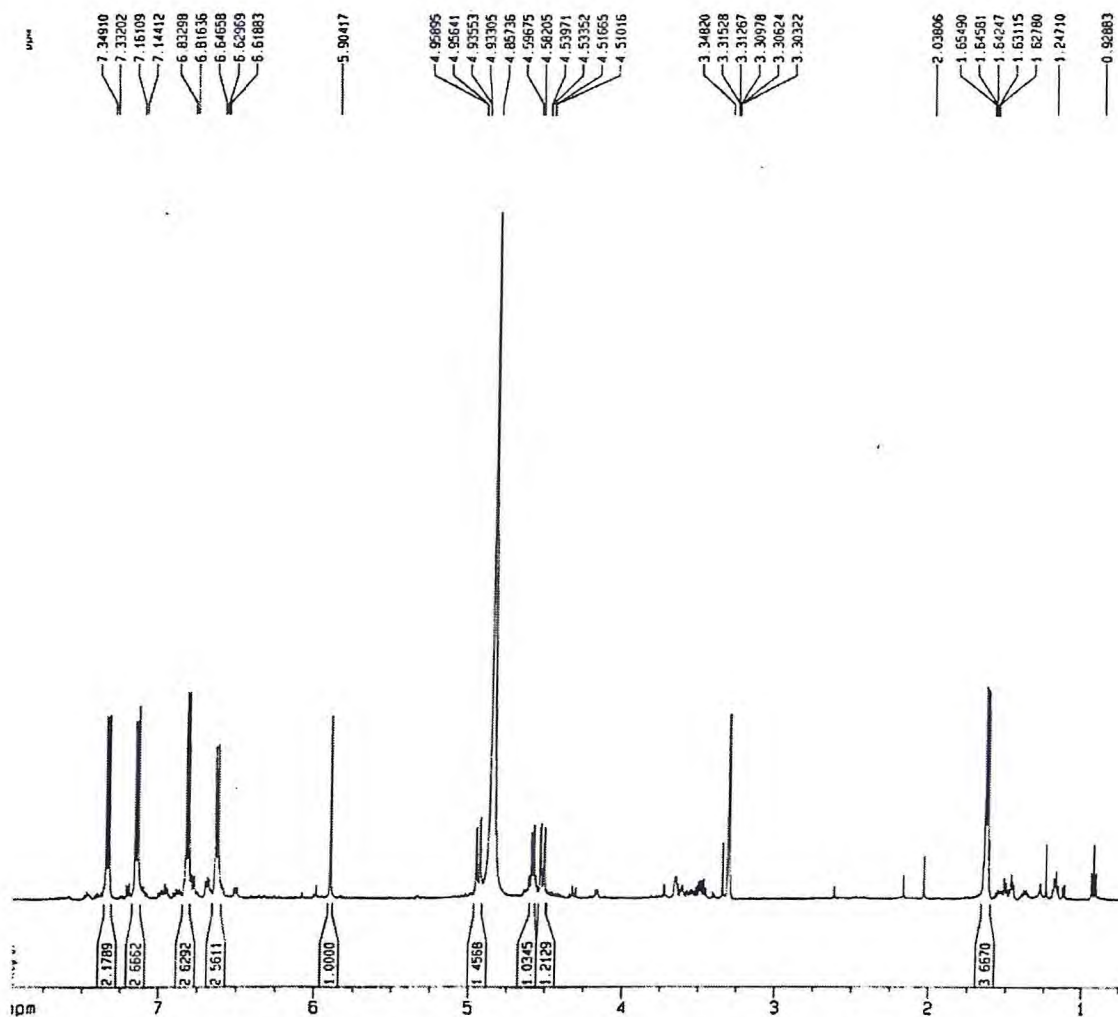


Figura 6.59 – Espectro de RMN ¹H de ECK-9 (CD₃OD, 500 MHz)

O espectro de RMN ¹³C-CPD (CD₃OD, 125 MHz) de ECK-9 (Fig. 6.60, p. 211), exibiu dezenove linhas espectrais, que foram atribuídas a vinte e três carbonos, duplicando-se as atribuições referentes aos carbonos magneticamente equivalentes em δ 130,49, 129,49, 116,27 e 115,51, atribuídos à presença de dois anéis benzênicos *para*-substituídos, onde se têm dois grupos de carbonos magneticamente equivalentes, em cada.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 125 MHz) (Fig. 6.61, p. 211) permitiu elaborar a Tabela 6.24, da qual pôde-se estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos como dez carbonos não-hidrogenados (C), doze carbonos metínicos (CH) e um carbono metílico (CH_3).

Tabela 6.24 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-9 com padrão de hidrogenação. (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)

C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
198,80	130,49 (x2)		18,29	
166,69	129,49 (x2)			
162,87	116,27 (x2)			
162,46	115,51 (x2)			
159,31	96,09			
155,94	85,01			
138,22	73,86			
129,43	33,45			
115,98				
101,88				
C_4	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}$		CH_3	
$(\text{C-OH})_4$	HC-OH			
C-O	HC-O			
C=O				$\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{O}_7$

Com base na teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] pôde-se sugerir que, dentre os carbonos não-hidrogenados (C) os localizados entre δ 166,69 a 155,94 eram oxigenados. Os sinais atribuídos a dois carbonos cada, entre δ 130,49 a 115,51 foram relacionados a carbonos metínicos sp^2 , juntamente com o sinal em δ 96,09. Aos demais sinais correspondentes a carbonos sp^3 , pôde-se sugerir que os observados em δ 85,01 e 33,21 correspondiam a carbonos metínicos saturados, em 18,14 a um carbono metílico e em δ 73,86, a um carbono oxigenado.

Ao expandir algumas regiões do espectro de RMN ^{13}C , pôde-se observar que alguns sinais encontravam-se dobrados, a saber, os seguintes pares: δ 138,22 e 138,20; 130,57 e 130,49; 129,55 e 129,48; 73,86 e 73,84 e 18,29 e 18,22. Estes dados sugeririam que ECK-9 poderia se tratar de uma mistura de epímeros.

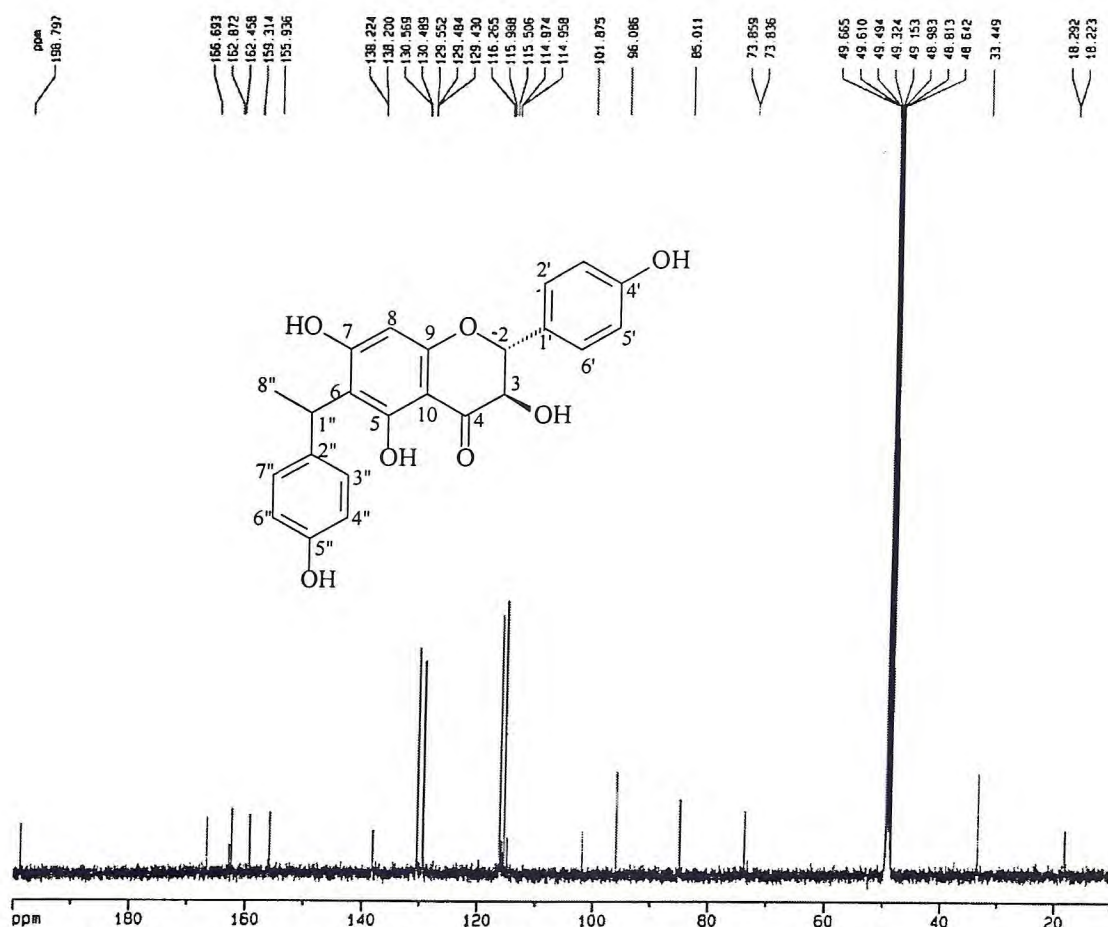


Figura 6.60 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-9 (CD_3OD , 125 MHz)

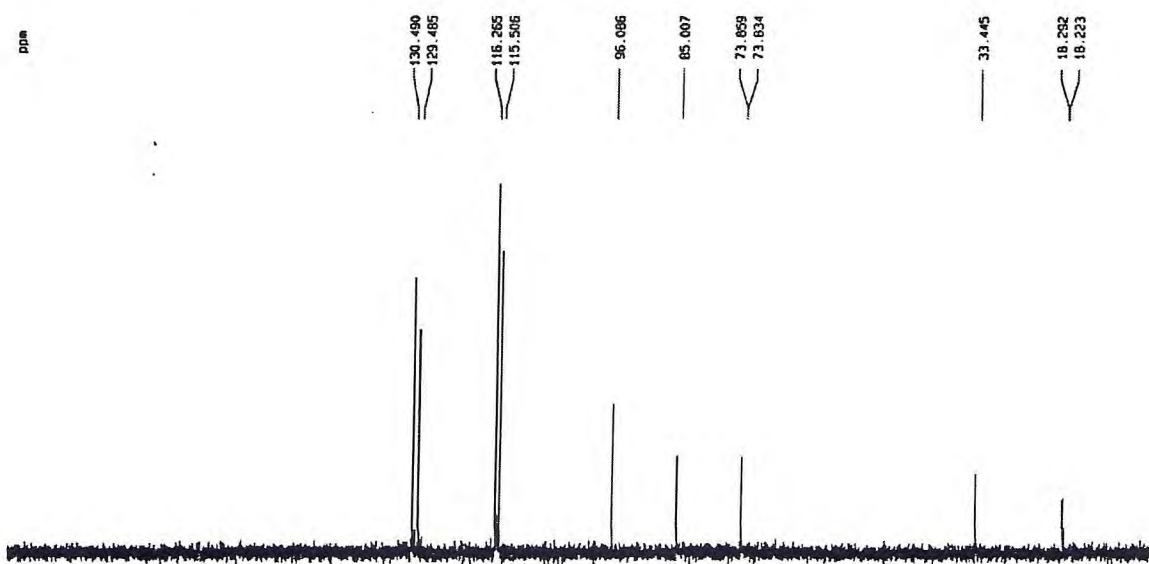


Figura 6.61 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de ECK-9 (CD_3OD , 125 MHz)

A compilação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C de ECK-9 até agora apresentados, permitiu a proposição da fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{O}_7$, com catorze lacunas de insaturação, onde doze delas relacionadas a três anéis aromáticos, uma a carbonila e uma ao anel heterocíclico.

A confirmação da fórmula molecular foi obtida pelo espectro de massa (Fig. 6.62) que apresentou o pico do íon molecular em $m/z = 408$. O pico registrado em m/z 273 sugeriu ser formado pelo processo de fragmentação via mecanismo Retro-Diels-Alder (Quadro 6.6, p. 213). Os picos m/z 288 e m/z 153 podem ser referentes à impurezas na amostra, tratando-se de ECK-4, posto que os Rfs eram muito próximos.

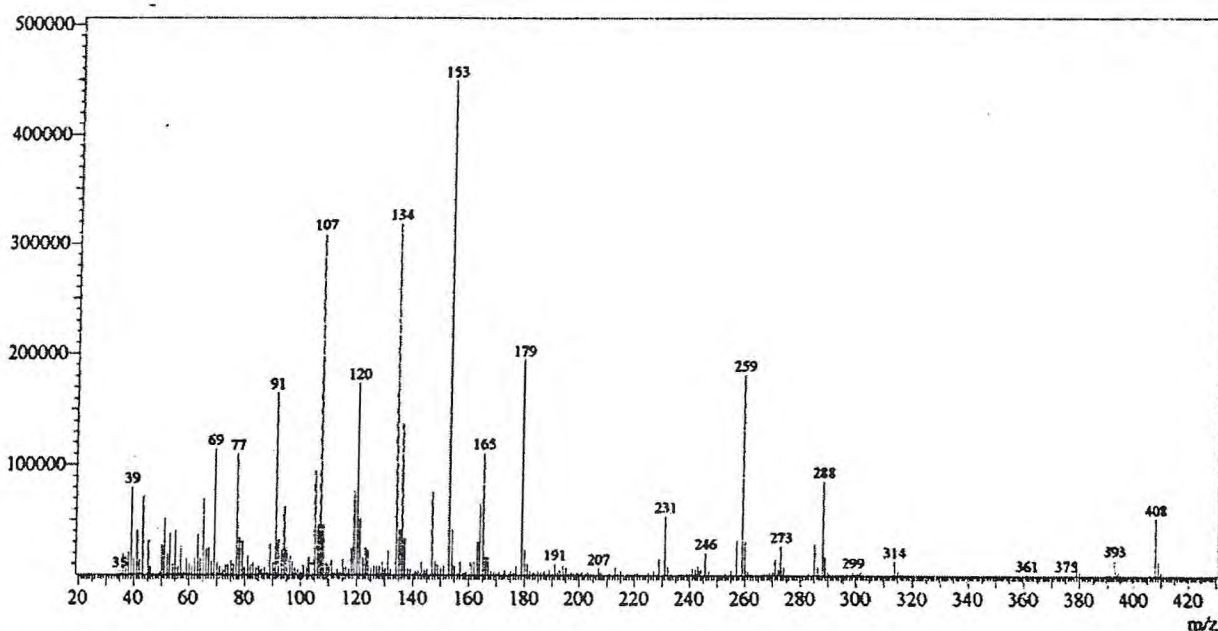
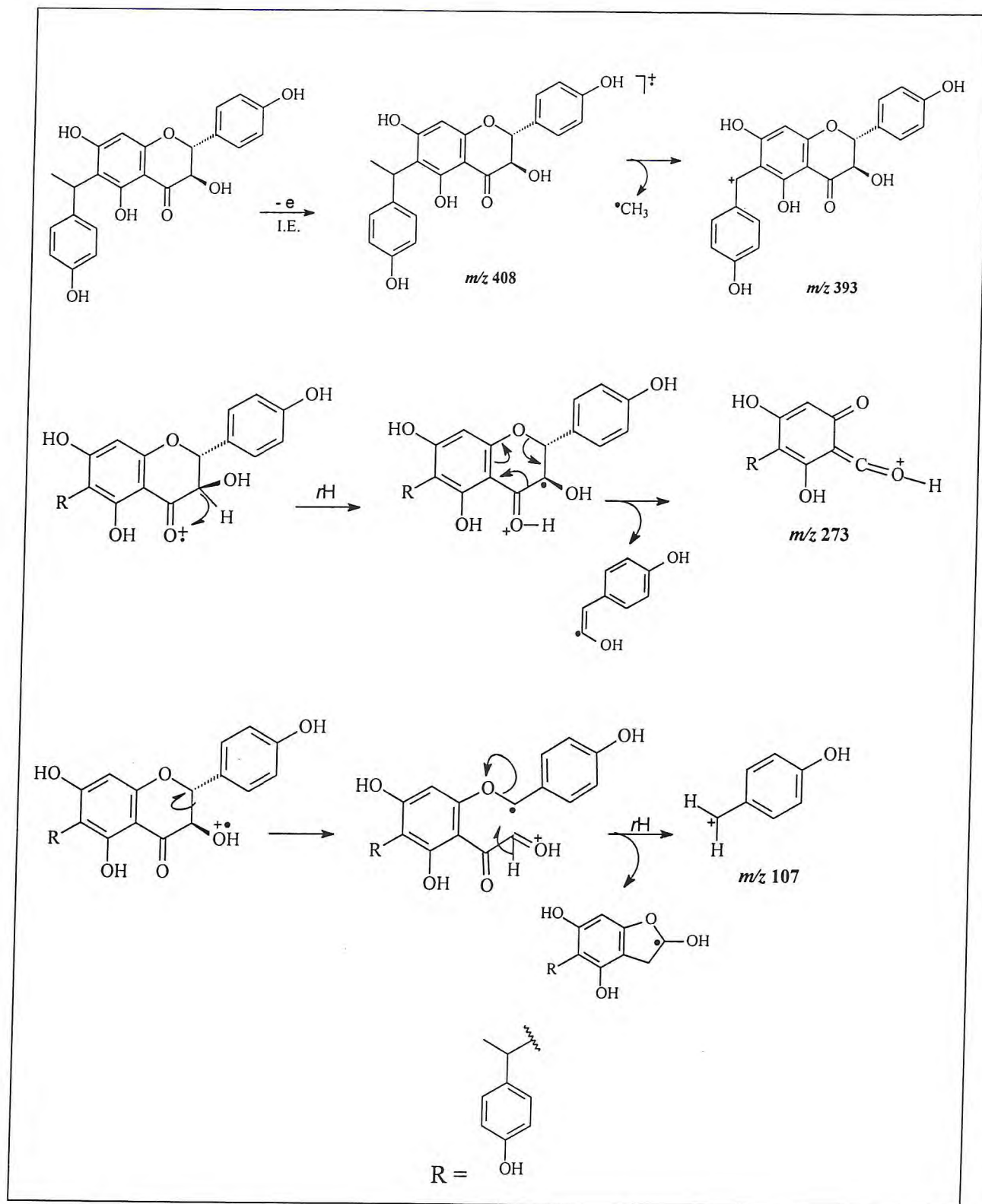


Figura 6.62 – Espectro de massa de ECK-9 (IE, 70 eV)

Quadro 6.6 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para ECK-9 (9)



rH = rearranjo de hidrogênio.

No espectro de RMN 2D de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (Fig. 6.63, p. 214), puderam-se observar os acoplamentos vicinais entre os prótons aromáticos em δ 7,34 (H-2' e H-6') e 6,82 (H-3' e H-5') e entre δ 7,15 (H-3'' e H-7'') e 6,63 (H-4'' e H-6''); entre os prótons ligados a carbonos oxigenados em δ 4,94 (H-2) e 4,52 (H-3) e ainda entre os prótons metínicos em δ 4,59 (H-1'') e os prótons metílicos em δ 1,64 (H-8'').

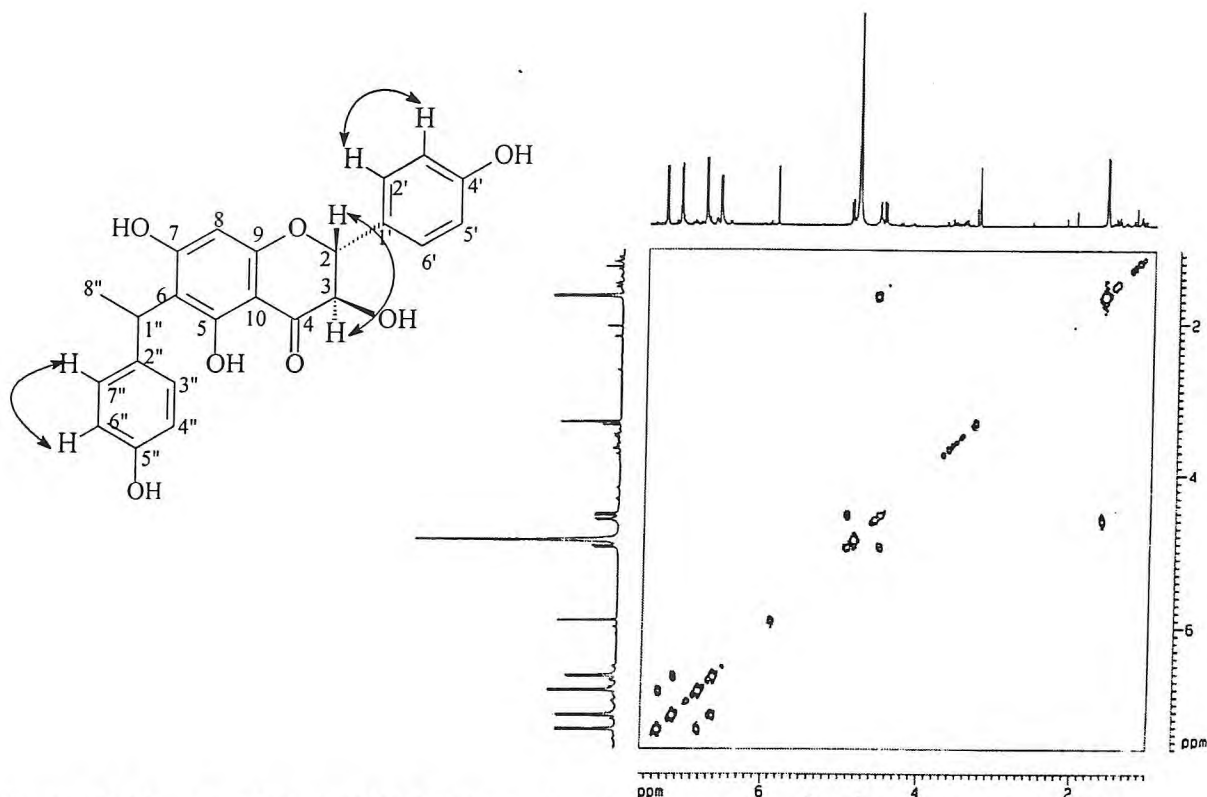
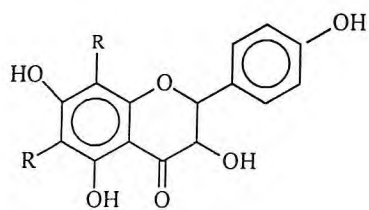
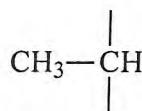


Figura 6.63 – Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK-9 (CD_3OD , 125 MHz)

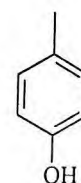
As análises realizadas até o momento apontam para uma estrutura flavonoídica, com esqueleto semelhante ao do flavononol aromadendrina, também em estudo (p. 152), diferenciado por um grupamento ligado na posição C-6 ou C-8, então as subestruturas ECK-9a, ECK-9b e ECK-9c puderam ser propostas.



ECK-9a



ECK-9b



ECK-9c

Subestruturas propostas para ECK-9

Dando continuidade às análises dos espectros de RMN 2D, obteve-se do HMQC (Fig. 6.64), as associações de todos os prótios aos seus respectivos carbonos de maneira inequívoca (Tab 6.25, p. 218).

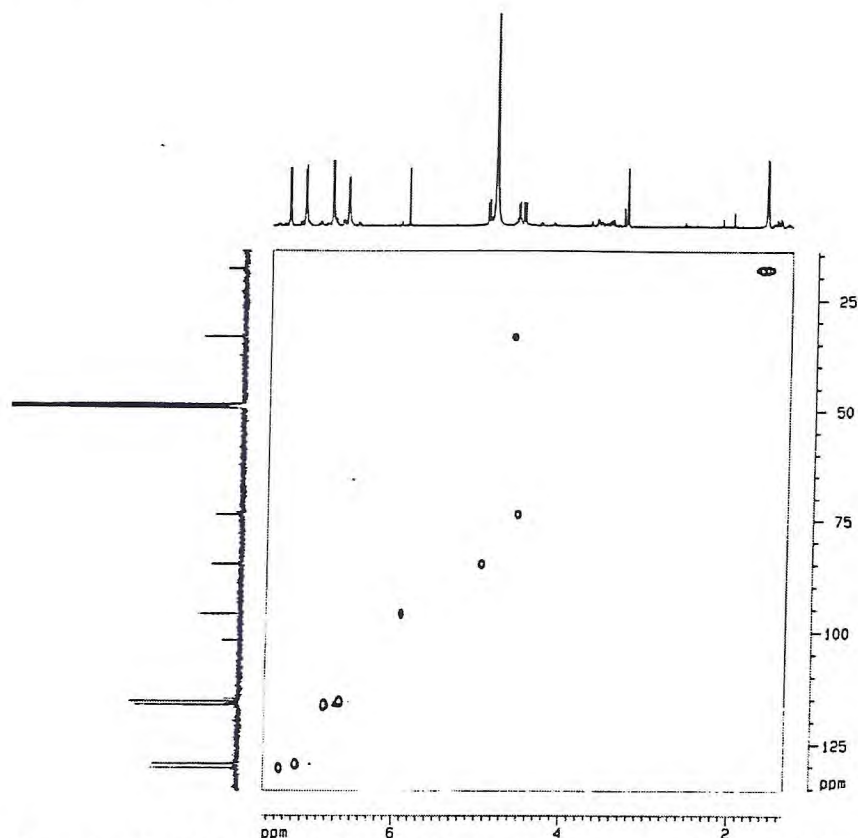
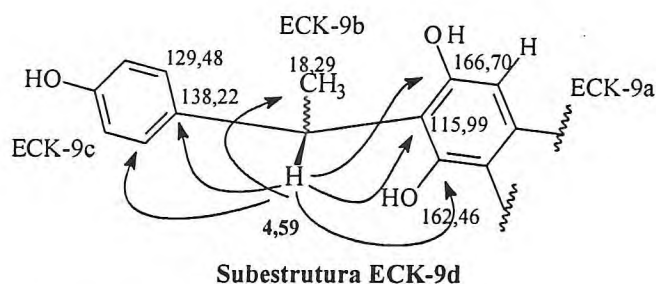


Figura 6.64 – Espectro de RMN HMQC de ECK-9 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)

O espectro de RMN HMBC (Fig. 6.65, p. 216) permitiu estabelecer as conectividades dos grupos remanescentes. Por meio desta análise, puderam ser observados os acoplamentos, $^2J_{\text{CH}}$, entre o prótio em 4,59 (H-1") e o carbono em δ 18,29 (C-8"); 138,22 (C-2") e 115,98 (C-6), e ainda a $^3J_{\text{CH}}$ em δ 166,70 (C-7), 162,46 (C-5) e 129 (C-3" e C-7"), o que levou a inferir que o sítio de ligação entre as subestruturas ECK-9a e ECK-9c seria no C-6. A subestrutura ECK-9d representa estes acoplamentos.



Representação de acoplamentos observados no HMBC demonstrando a conectividade entre as subestruturas ECK-9a, ECK-9b e ECK-9c.

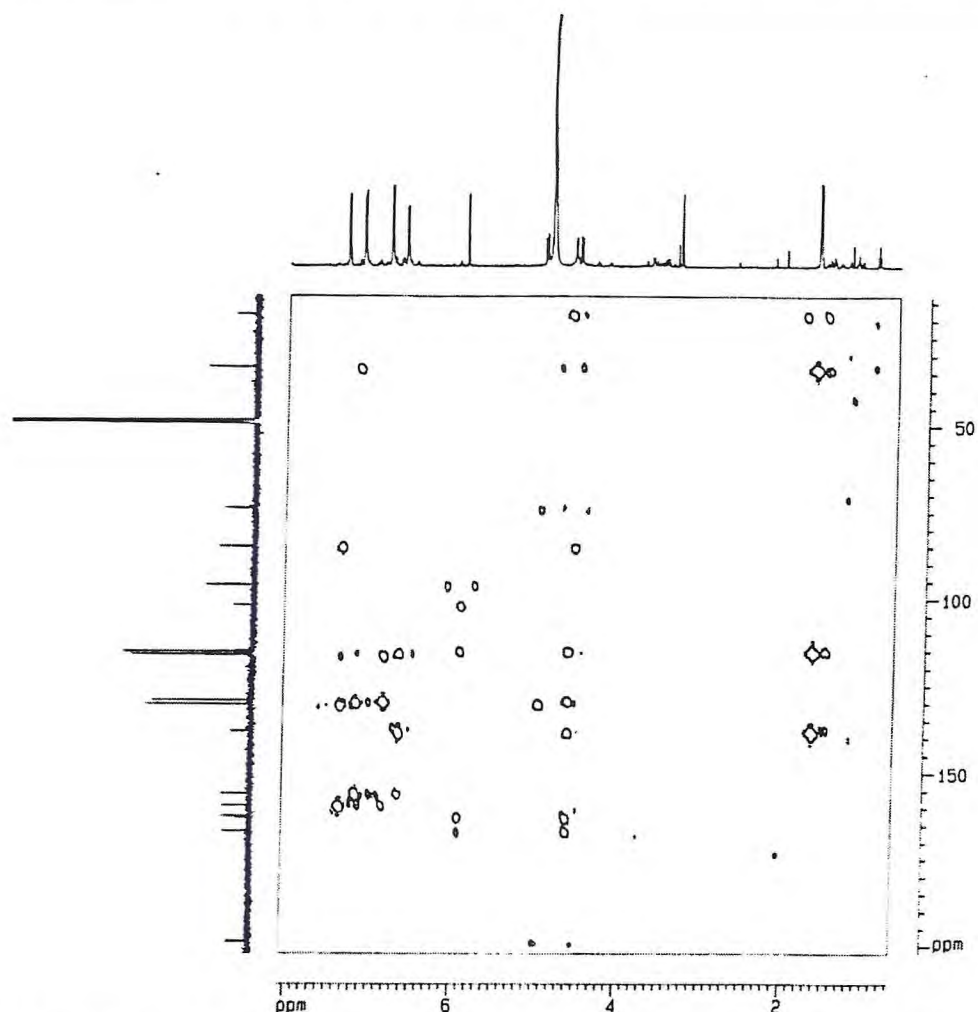
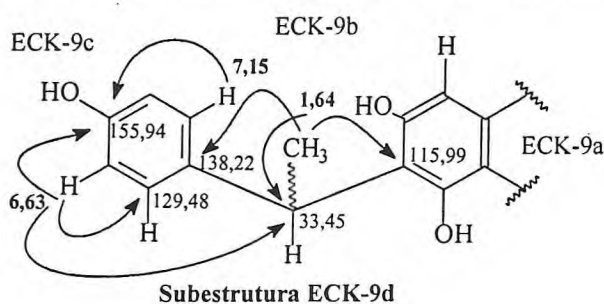


Figura 6.65 – Espectro de RMN HMBC de ECK-9 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

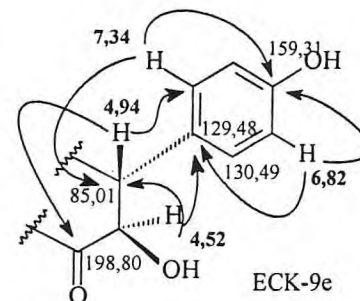
Ainda foi possível atribuir aos carbonos C-5 e C-9 os valores de deslocamentos químicos, que apesar de muito próximos, puderam ser assinalados de forma inequívoca, mediante a observação do acoplamentos, $^2J_{CH}$, entre o prótio em 5,90 (H-8) e o carbono em δ 162,87 (C-9), e a $^3J_{CH}$ entre o prótio em δ 4,59 (H-1") e o carbono em 162,46 (C-5).



Representação de acoplamentos vistos no HMBC demonstrando a conectividade entre as subestruturas ECK-9a, ECK-9b e ECK-9c

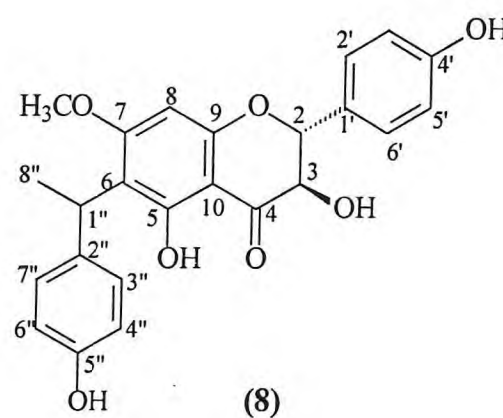
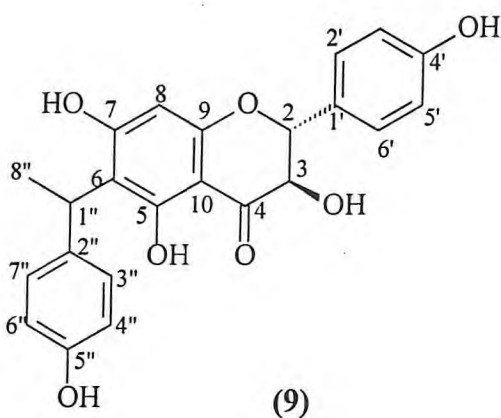
Um acoplamento raro, $^4J_{CH}$, foi observado entre o prótio em δ 6,63 (H-4" e H-6") com o carbono em 33,45, sendo possível por haver entre eles uma conformação estrutural em "W".

Foi importante ressaltar o acoplamento observado entre o prótio em δ 6,82 (H-3' e H-5') com o carbono em δ 129,48 (C-1'), posto que este sinal já fora atribuído a dois carbonos metínicos (C-3" e C-7") , o que só foi possível observando este já mencionado acoplamento, demonstrado na subestrutura ECK-9e, juntamente com os demais, os quais se encontram registrados na Tab 6.25 (p. 218).



Representação de acoplamentos observados no HMBC para a subestrutura ECK-9e.

A compilação de todos os dados relatados conduziu à proposição da estrutura (9), que por sua vez difere de ECK-8 (8) apenas pela ausência da metoxila na posição C-7. Os valores das duas foram comparados e encontram-se dispostos na Tabela 6.26 (p. 219). De acordo com a pesquisa realizada no *Chemical Abstract* (on line), esta substância, denominada 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,7,4'-triidroxi-flavanonol, está sendo descrita pela primeira vez na literatura.



Estrutura de ECK-9 (9) 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,7,4'-triidroxi-flavanonol.

Tabela 6.25 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-9

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
2	85,01	4,94 (d, $J=11,7$ Hz)	1H-3	1H-2'; 1H-6'
3	73,86	4,52 (d, $J=11,7$ Hz)	1H-2	
4	198,80			1H-2
5	162,46			1H-1"
6	115,98		1H-1"	3H-8"; 1H-8
7	166,70		1H-8	1H-1"
8	96,88	5,90 (s)		
9	162,87		1H-8	
10	101,88			1H-8
1'	129,48			1H-3'; 1H-5'
2'	130,49	7,34 (d, $J=8,5$ Hz)		1H-2
3'	116,27	6,82 (d, $J=8,5$ Hz)		
4'	159,31		1H-3'; 1H-5'	1H-2'; 1H-6'
5'	116,27	6,82 (d, $J=8,5$ Hz)		
6'	130,49	7,34 (d, $J=8,5$ Hz)		
1"	33,45	4,59 (q, $J=7,3$ Hz)	3H-8"	(n=4); 1H-4" e 6"
2"	138,22		1H-1"	3H-8"; 1H-4" e 1H-6"
3"	129,48	7,15 (d, $J=8,5$ Hz)		1H-1"
4"	115,51	6,63 (d, $J=8,5$ Hz)		
5"	155,94		1H-4"; 1H-6"	1H-3"; 1H-7"
6"	115,51	6,63 (d, $J=8,5$ Hz)		
7"	129,48	7,15 (d, $J=8,5$ Hz)	1H-4"; 1H-6"	1H-1"
8"	18,29	1,64 (d, $J=7,3$ Hz)	1H-1"	1H-1"

Tabela 6.26 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C entre ECK-9, ECK-8 (CD_3OD , 125 MHz) e gericundranina C (**164**) [Lee, Kim *et al.*, 1996].

C	ECK-9	ECK-8	[Lee, Kim <i>et al.</i> , 1996]
2	85,01	85,17	85,10
3	73,86	73,84	73,75
4	198,80	199,42	198,47
5	162,46	163,25	162,39
6	115,98	116,06	110,54
7	166,70	167,75	166,52
8	96,88	92,77	95,63
9	162,87	161,41	162,42
10	101,88	102,48	101,62
1'	129,48	129,35	129,99
2'	130,49	130,53	115,8
3'	116,27	116,27	146,28
4'	159,31	159,33	147,08
5'	116,27	116,27	116,05
6'	130,49	130,53	120,91
1''	33,45	33,21	27,54
2''	138,22	137,96	133,74
3''	129,48	129,35	130,50
4''	115,51	115,52	115,66
5''	155,94	155,95	156,04
6''	115,51	115,52	115,66
7''	129,48	129,35	130,50
8''	18,29	18,14	-
OCH ₃	-	56,39	-

6.1.10 Identificação Estrutural de ECK-10

Da fração ECK-PA-AG, proveniente de ECK-PA (Flux. 7.7, p. 315), oriunda do particionamento do "kino" de *Eucalyptus citriodora*, obteve-se um sólido em forma de agulhas incolores, p.f. = 251,6-253,8 °C, cuja denominação foi **ECK-10**.

Analisando-se o espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 6.66), observaram-se bandas que sugeriram tratar-se de um composto aromático, tais como: absorção em 3063 cm^{-1} , atribuída à deformação axial da ligação C-H de insaturados; absorções de vibrações esqueléticas em 11622 a 1451 cm^{-1} , relacionadas à deformação axial das ligações C=C de anel aromático, bem com as registradas em 868 e 766 cm^{-1} , referentes à deformação angular fora do plano da ligação C-H de aromáticos. Além destas bandas, duas outras sugeriram a presença de hidroxila, uma em 3373 cm^{-1} , larga, atribuída a deformação axial de O-H em ligação hidrogênio intermolecular e a outra em 3290 cm^{-1} , típico de deformação axial de O-H em dímeros de ácidos. A absorção em 1703 cm^{-1} foi relacionada à deformação axial de C=O.

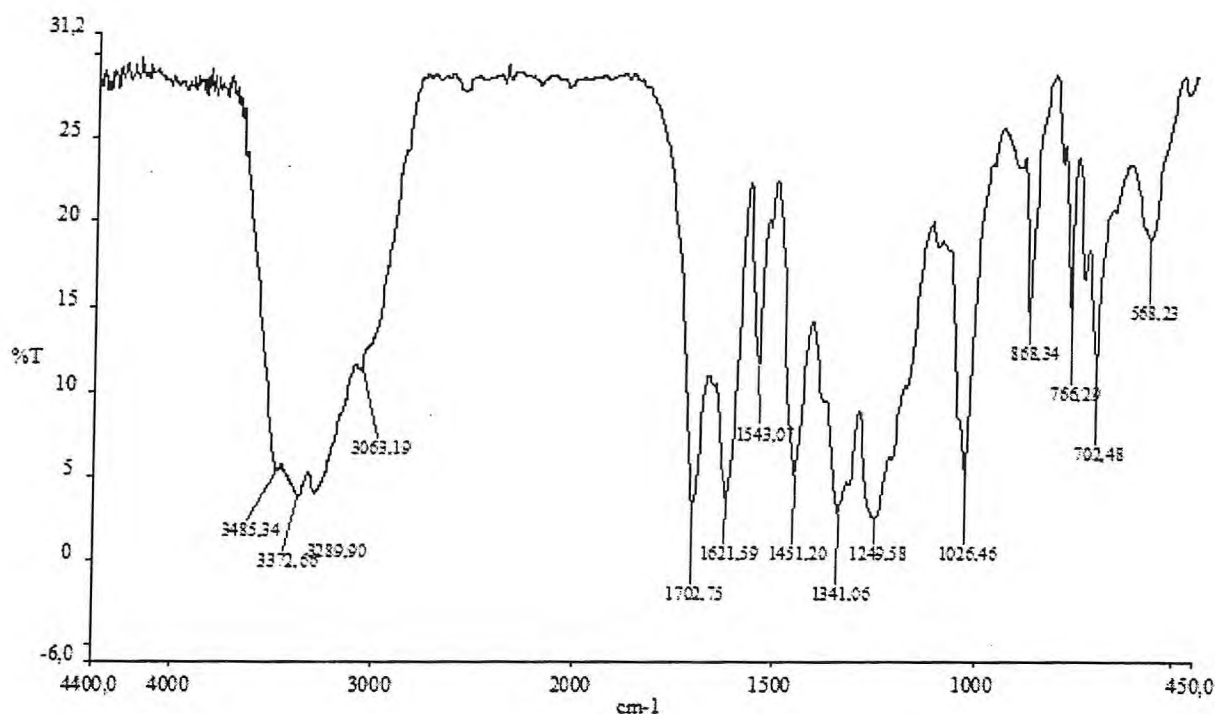


Figura 6.66 – Espectro absorção de na região do infravermelho, em KBr, de ECK-10.

O espectro de hidrogênio de ECK-10 (CD_3OD , 500 MHz) apresentou um único sinal em δ 7,06 (s), característico de compostos aromáticos (Fig. 6.67).

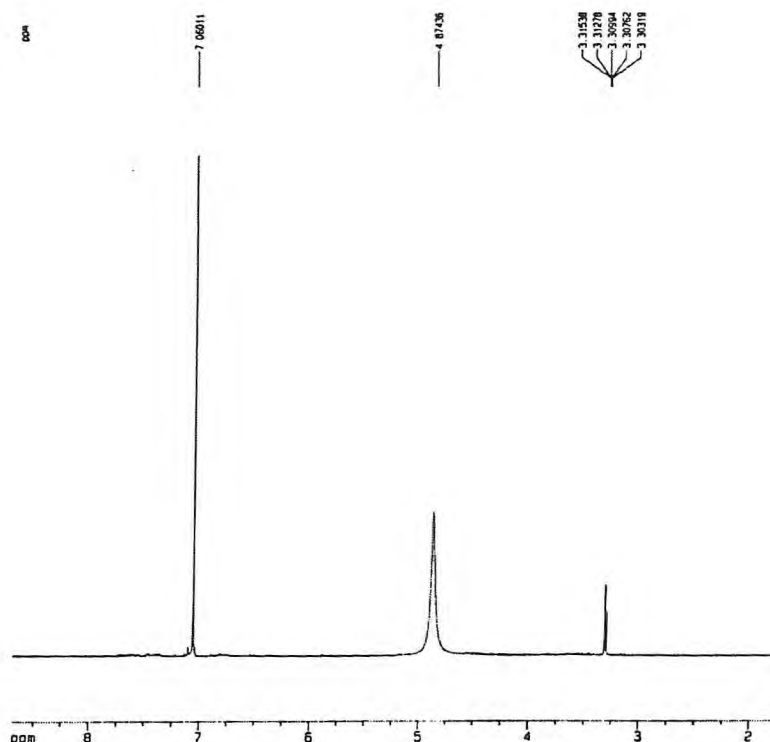


Figura 6.67 - Espectro de RMN ^1H de ECK-10 (CD_3OD , 500 MHz)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OH , 125 MHz) de ECK-10 (Fig. 6.69, p. 223) apresentou cinco linhas espectrais, atribuídas a sete átomos de carbono, inferido pela intensidade dos sinais em δ 145,39 e 109,34. A teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] permitiu sugerir que o sinal em δ 169,47 pertencia a carbonila de ácido, enquanto os sinais entre 145,39 e 121,07, seriam de carbonos sp^2 não-hidrogenados, restando o sinal em δ 109,34 que seria de carbono sp^2 hidrogenado, metínico (CH).

O espectro de massa (Fig. 6.68, p. 222) apresentou o pico do íon molecular em m/z 170 e os picos em m/z 153, relativo à perda de (OH) radicalar e em m/z 125, associado à perda de (CO). Com o auxílio deste foi possível estabelecer para ECK-10 a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, com cinco índices de deficiência de hidrogênio, atribuídos da seguinte maneira: um à carbonila e os demais ao anel aromático.

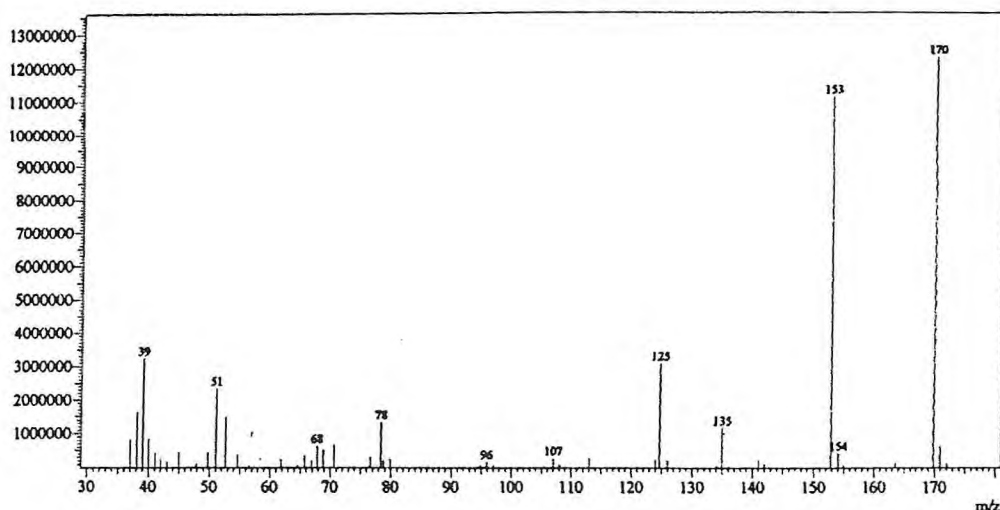
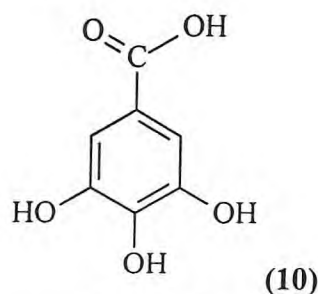


Figura 6.68 - Espectro de massa de ECK-10 (IE, 70 eV)

A análise dos espectros anteriormente citados, bem como a comparação com dados da literatura (Tab. 6.27) [Almeida, Lemos *et al.*, 2005], levaram a inferir que ECK-10 tratava-se do ácido gálico (10), já identificados dos "kinos" *E. astringens*, *E. lehmannii* e *E. platypus* [Hillis e Yazaki, 1974], porém descrita pela primeira vez para o "kino" de *E. citiodora*.

Tabela 6.27 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-10 (CD_3OD , 125 MHz) com os dados do ácido gálico (CD_3OD , 75 MHz) [Almeida, Lemos *et al.*, 2005].

C	ECK-10	[Almeida, Lemos <i>et al.</i> , 2005]
1	121,08	120,7
2	109,34	109,1
3	145,39	145,1
4	138,57	138,3
5	145,39	145,1
6	109,34	109,1
7	169,47	169,1



Estrutura proposta para ECK-10: ácido gálico (10)

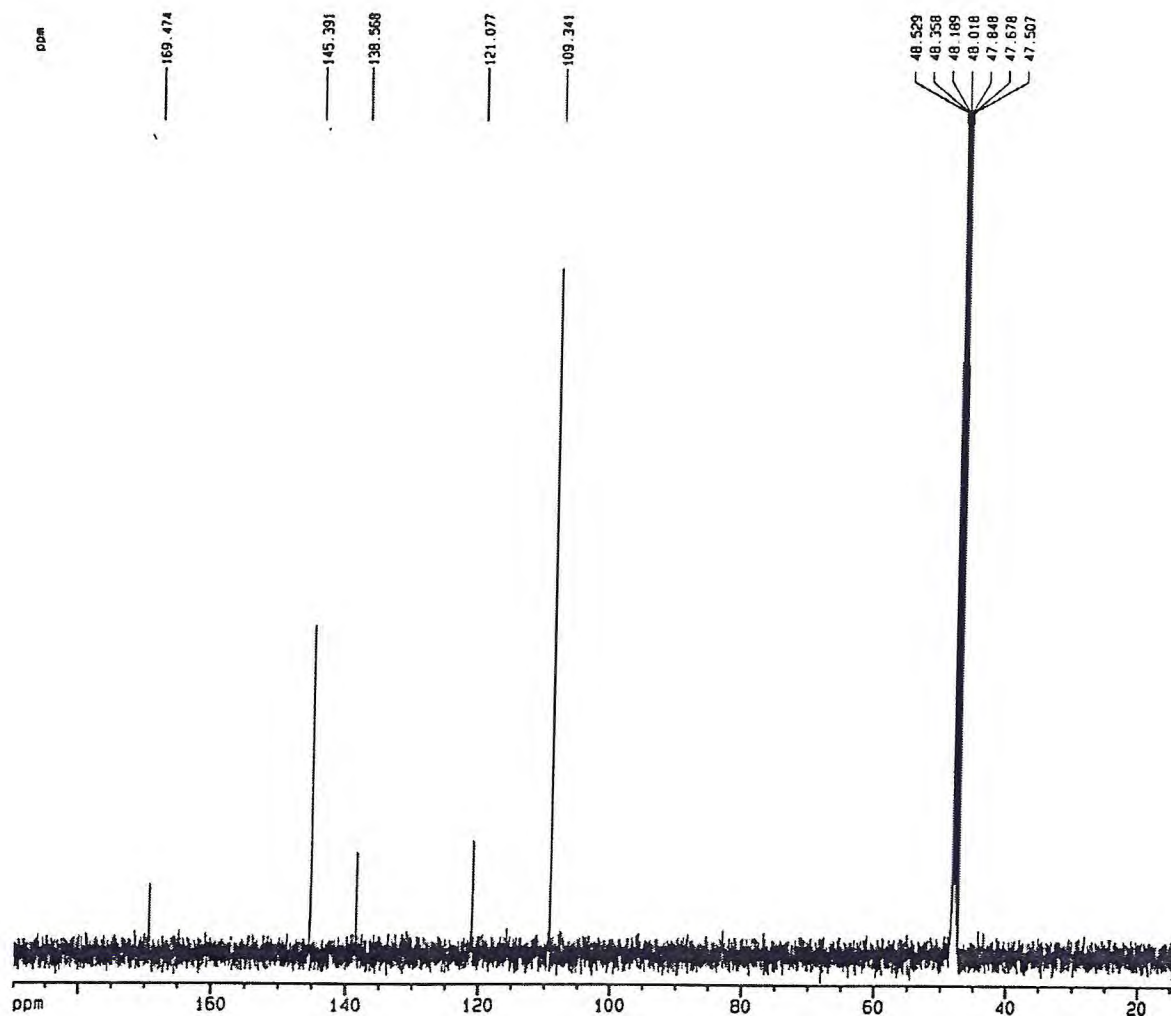
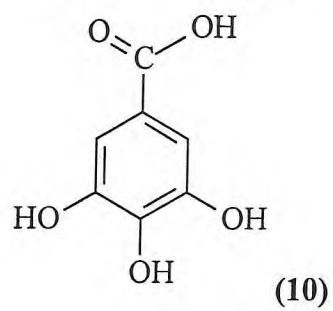


Figura 6.69 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-10 (CD_3OH , 125 MHz).



6.1.11 Identificação Estrutural de ECK-11

Da fração ECK-PA-HB, obtida do tratamento cromatográfico de ECK-PA (Flux. 7.7, p. 315), originada do particionamento do "kino" do *Eucalyptus citriodora*, obteve-se um sólido amorfo com coloração amarelo-marfim e p.f = 148,2 – 150,9 °C, denominada ECK-11.

O espectro na região de absorção de infravermelho, obtido em KBr (Fig. 6.70) apresentou absorções em 3399 cm^{-1} , banda larga atribuída à deformação axial da ligação O-H de hidroxila; em 1690 cm^{-1} associada à deformação axial da ligação C=O característica de ácido ou éster. Foram observadas bandas de vibrações esqueletais envolvendo a deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1609 cm^{-1} , 1519 e 1445 cm^{-1} , enquanto em 1077 e 1025 cm^{-1} eram relativas à deformação angular no plano de ligação C-H, e em 819 cm^{-1} , à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromáticos. As absorções registradas em 1280 e 1176 cm^{-1} foram relacionadas às deformações axiais de ligações C-O.

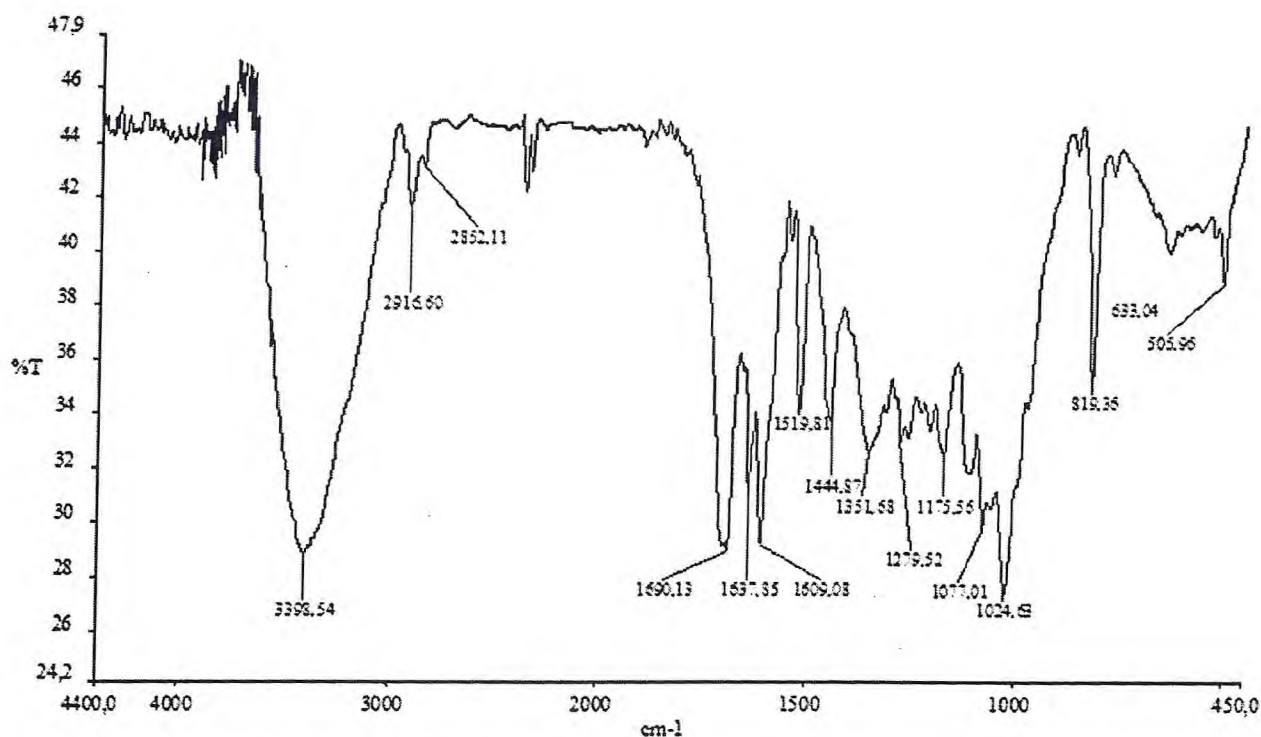


Figura 6.70 – Espectro de absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-11

A análise do espectro de prótio (CD_3OH , 500 MHz) de ECK-11 (Fig. 6.71, p. 225) permitiu observar sinais característicos de compostos aromáticos e de prótios ligados a carbonos oxigenados.

Os sinais em δ 7,45 (2H, d, $J=8,5$ Hz) e 6,81 (2H, d, $J=8,5$ Hz) sugeriram pertencer a anel aromático *para*-substituído, enquanto em δ 7,63 (1H, d, $J=15,9$ Hz) e 6,34 (1H, d, $J=15,9$ Hz), a prótios olefínicos com estereoquímica *trans*, definido pelas constantes de acoplamento. Já para os sinais em δ 4,51 (d, $J=7,4$ Hz), 4,49 (m), 4,31 (m), 3,55 (m), 3,38 (m) e 3,17 (t, $J=8,2$ Hz) foram atribuídos a uma unidade de açúcar, cuja constante de acoplamento do carbono anomérico aponta para a configuração β . Um outro grupo de sinais observados em δ 5,12 (d, $J=3,6$ Hz), 4,05 (m) e 3,70 (t) sugeriu uma outra unidade de açúcar com configuração α , levando a inferir que se tratava de uma mistura, que pelos valores de integração estavam numa proporção aproximada de 2:1.

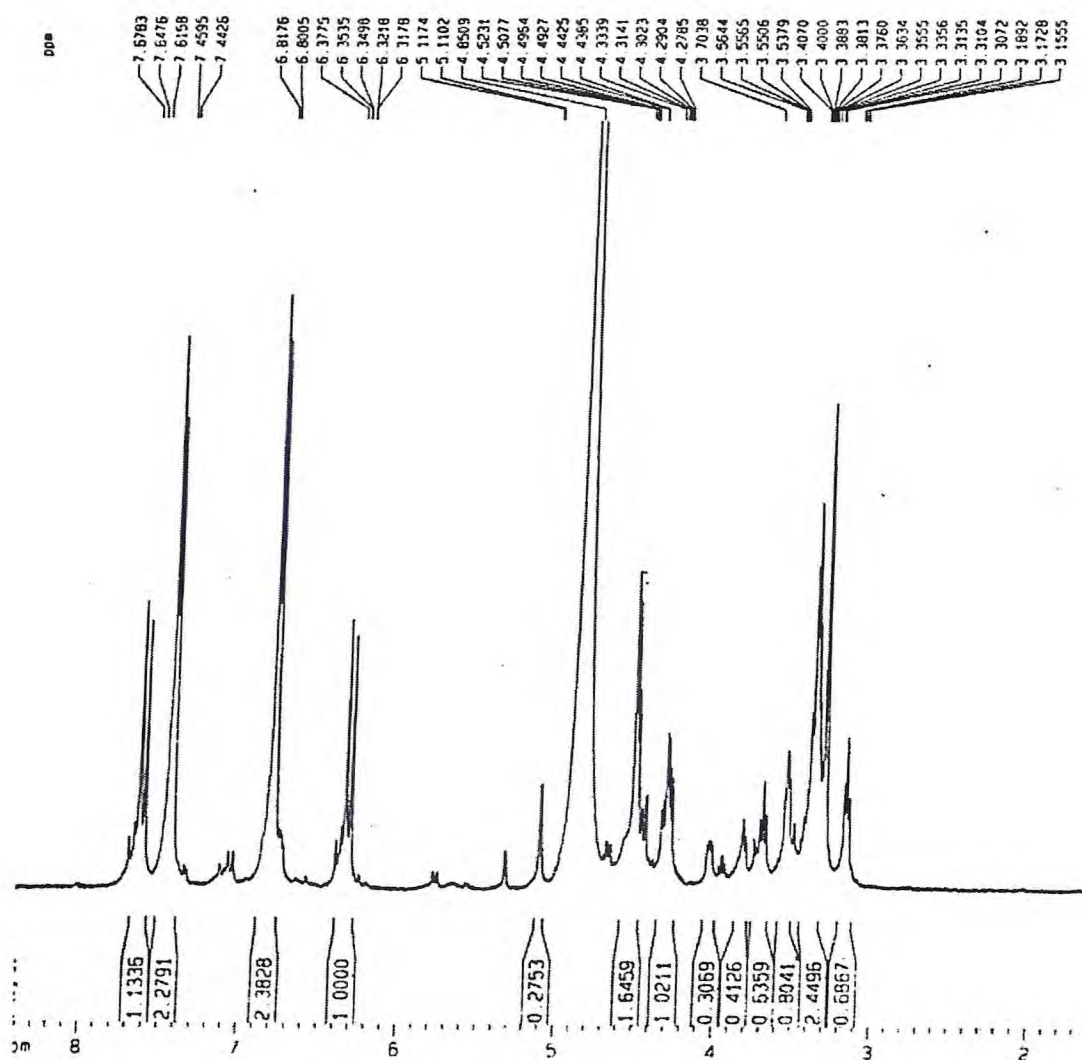


Figura 6.71 – Espectro de RMN ^1H de ECK-11 (CD_3OD , 500 MHz)

Por meio do espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-11 (Fig. 6.72, p. 227) pôde-se observar a presença de 22 linhas espectrais majoritárias atribuídas aos trinta

carbonos das duas estruturas, levando em consideração a presença de um anel benzênico *p*-substituído para as duas substâncias.

Para obter o padrão de hidrogenação dos carbonos, recorreu-se a comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 6.72, p. 227) permitindo elaborar a Tabela 6.28 da qual se destacou a presença de três carbonos não-hidrogenados (C), onze metínicos (CH) e um metilênico (CH₂).

Tabela 6.28 - Valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-11A e ECK-11B com padrão de hidrogenação. (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD₃OH, 125 MHz).

ECK-11A			ECK-11B			
δ C	CH	CH ₂	δ C	CH	CH ₂	TOTAL
169,26	146,87	64,98	169,36	146,83	65,05	
161,44	131,30 (x2)		161,44	131,30 (x2)		
127,27	116,98 (x2)		127,27	116,98 (x2)		
	115,15			115,09		
	98,40			94,15		
	78,08			74,92		
	76,36			73,93		
	75,61			72,16		
	71,91			70,94		
C	C ₆ H ₆	H ₂ C-O	C	C ₆ H ₆	H ₂ C-O	
(C-OH)	(HC-OH) ₄		(C-OH)	(HC-OH) ₄		(x2)
(C=O)	HC-O		(C=O)	HC-O		C ₁₅ H ₁₈ O ₈

De acordo com a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] pôde-se sugerir que os sinais em δ 169,26 e 169,36 seriam de carbonilas, possivelmente de ésteres. Os carbonos não-hidrogenados em δ 161,44 (oxigenado) e 127,27 seriam correspondentes a carbonos sp^2 . Para os carbonos metínicos, em δ 131,30 e 116,98, sugeriu-se serem carbonos sp^2 de aromáticos, enquanto aqueles em δ 146,87; 146,83; 115,15 e 115,09 referiram-se a carbonos olefinicos. Já os observados entre δ 98,28 a 70,94, sugeriram pertencer a carbonos sp^3 , oxigenados.

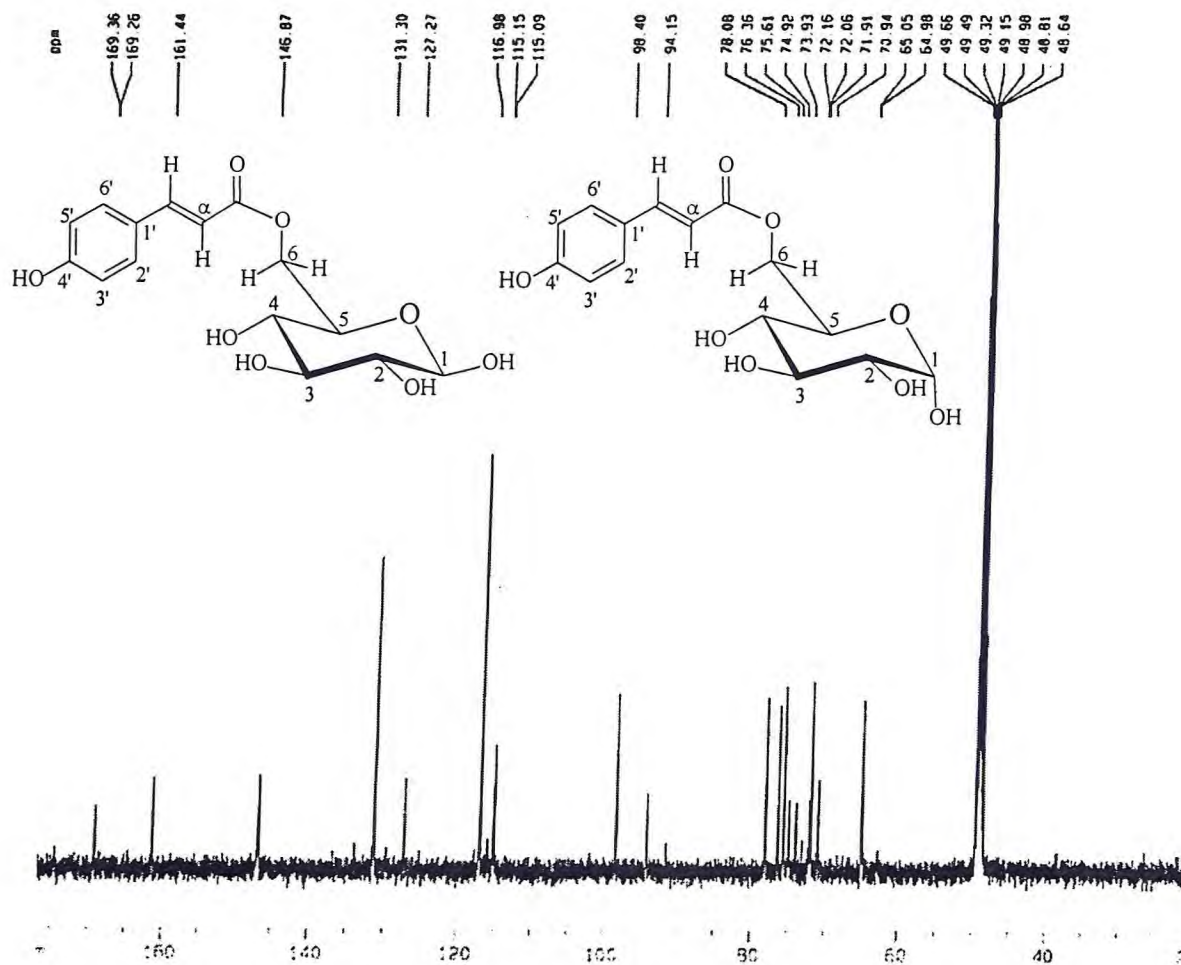


Figura 6.72 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de ECK-11 (CD₃OD, 125 MHz)

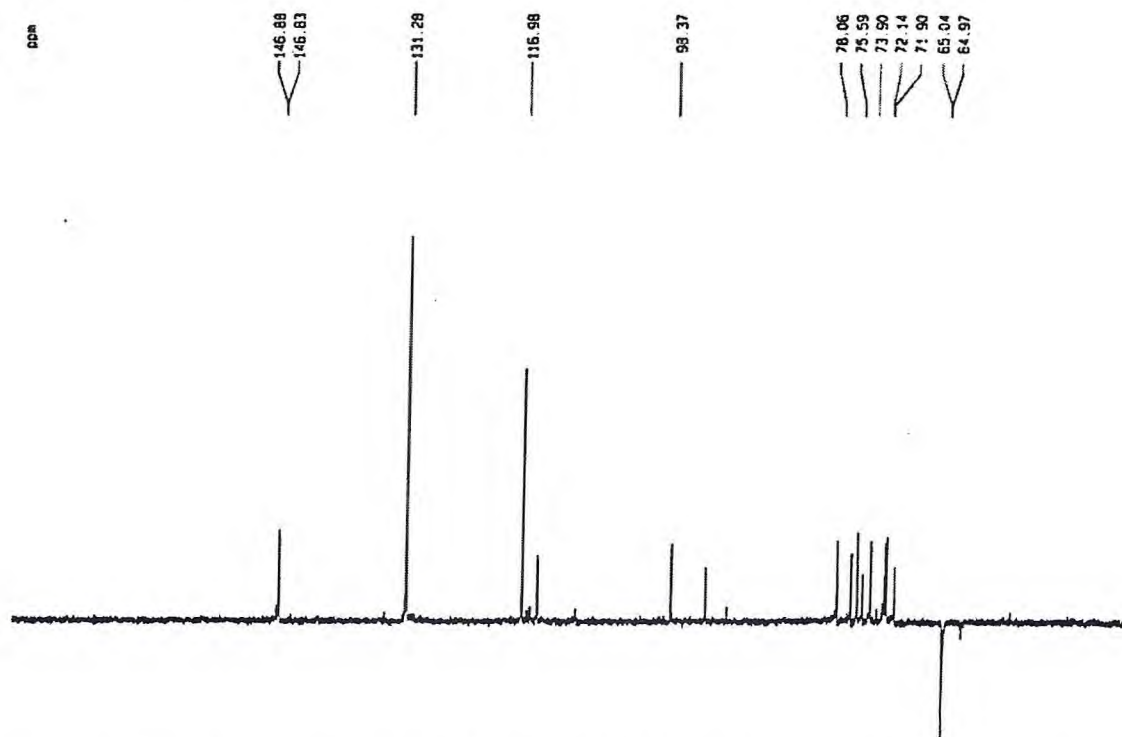


Figura 6.73 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-11 (CD₃OD, 125 MHz)

O espectro de massa (Fig. 6.74) obtido para ECK-11 não apresentou o pico do íon molecular, sugerindo uma estrutura instável ao processo. Entretanto, revelou a presença de picos cujas relações massa/carga sugerem a presença das unidades *para*-cumaroil ($m/z = 147$) e glicopiranosil ($m/z = 163$).

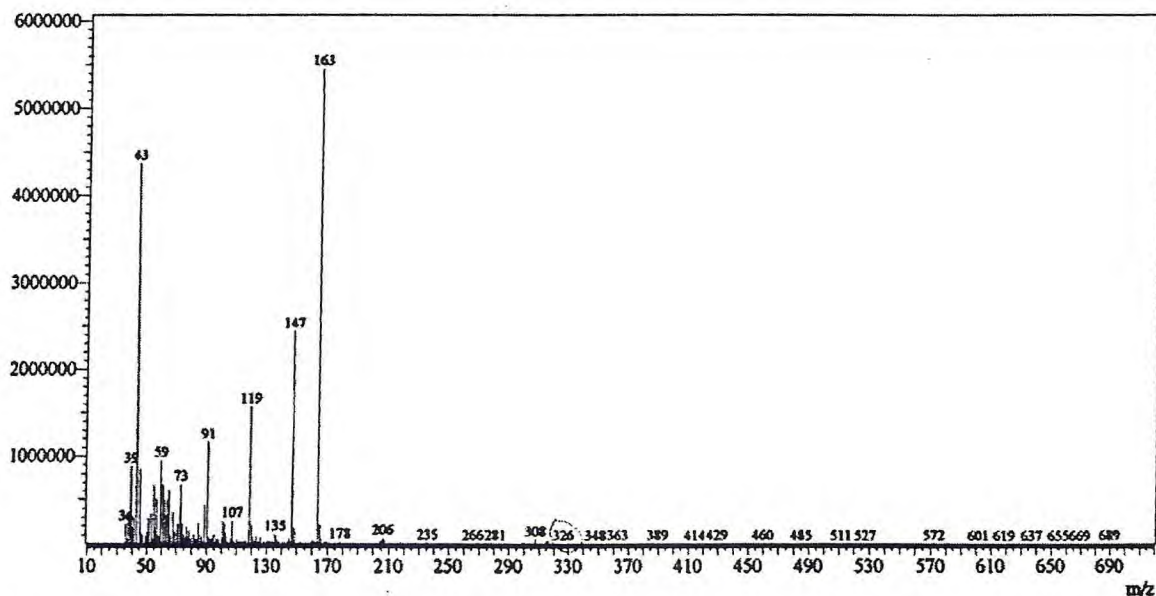
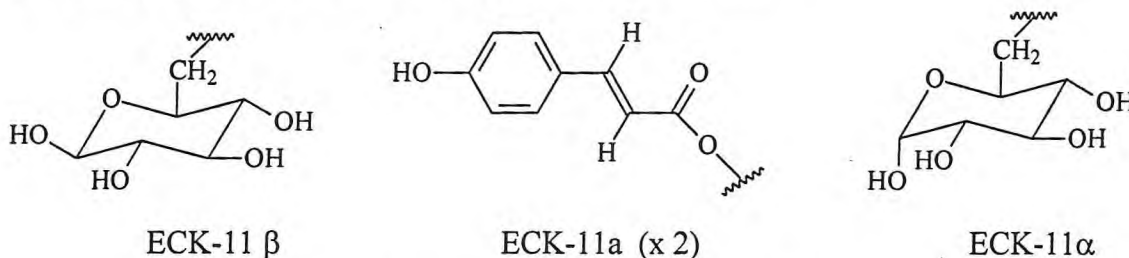


Figura 6.74 – Espectro de massa de ECK-11 (IE, 70 eV)

Com os dados disponíveis até o momento, foi possível propor para cada composto da mistura de ECK-11 a fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_8$, com sete índices de deficiência de hidrogênio (IDH=7) distribuídos entre o anel aromático (4 IDH), a carbonila, a dupla ligação e o anel da glicose (confirmada por meio de comparação com dados da literatura). As subestruturas propostas puderam ser incorporadas às estruturas.



Subestruturas propostas para ECK-11

O espectro de RMN HMQC de ECK-11 (Fig. 6.75) possibilitou atribuir, de forma inequívoca, a ligação dos carbonos aos seus respectivos prótios (Tab 6.29a, p. 232 e Tab 6.29b, p. 232). Além de permitir identificar os prótios correspondentes a cada composto de forma diferenciada.

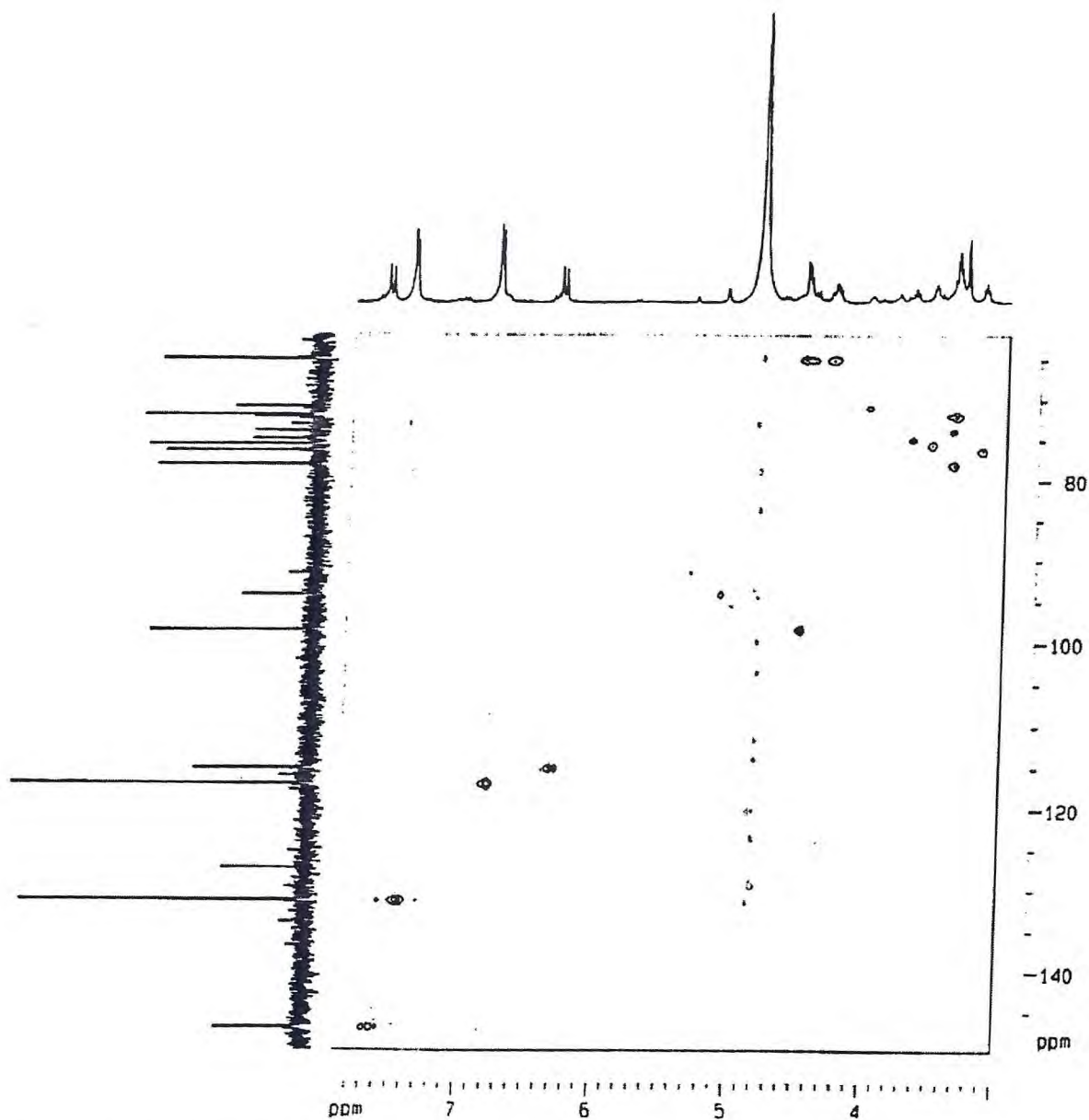
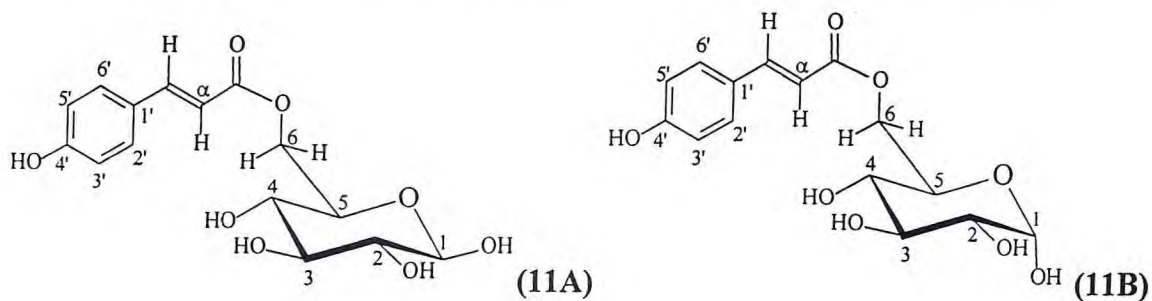
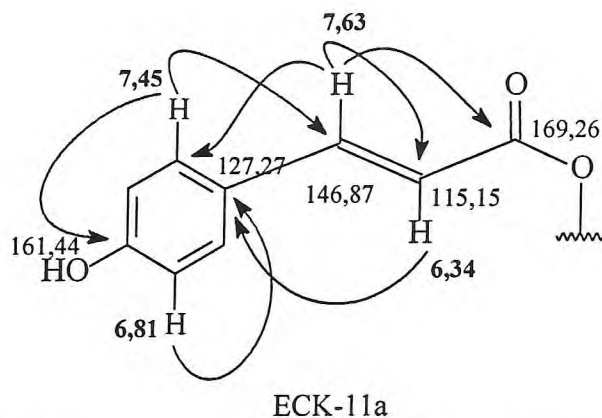


Figura 6.75 – Espectro de RMN HMQC de ECK-11 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)



De acordo com a análise do espectro de RMN HMBC (Fig. 6.76, p. 231), foi possível observar acoplamentos a mais de uma ligação entre os hidrogênios em δ 7,63 (H- β), $^2J_{CH}$, com os carbonos em δ 115,15 e 146,87 (C- α das duas formas configuracionais) e $^3J_{CH}$, com os carbonos em δ 131,30 (C-2' e -6' de A e B) e 169,26 e 169,36 (C=O de A e B), enquanto o prótio em δ 7,45 (H-2' e H-6' de A e B) acopla, $^3J_{CH}$, com os carbonos em δ 161,44 (C-4' de A e B) e 146,87 e 147,83 (C- β das duas formas de configuracionais). Estes acoplamentos justificam a proposição dos isômeros configuracionais. Os demais acoplamentos podem ser vistos nas Tabela 6.29a e 6.29b, p. 232. A representação destes acoplamentos pode ser visualizada na subestrutura ECK-11a.



Representação de acoplamentos vistos no HMBC para a subestrutura ECK-11

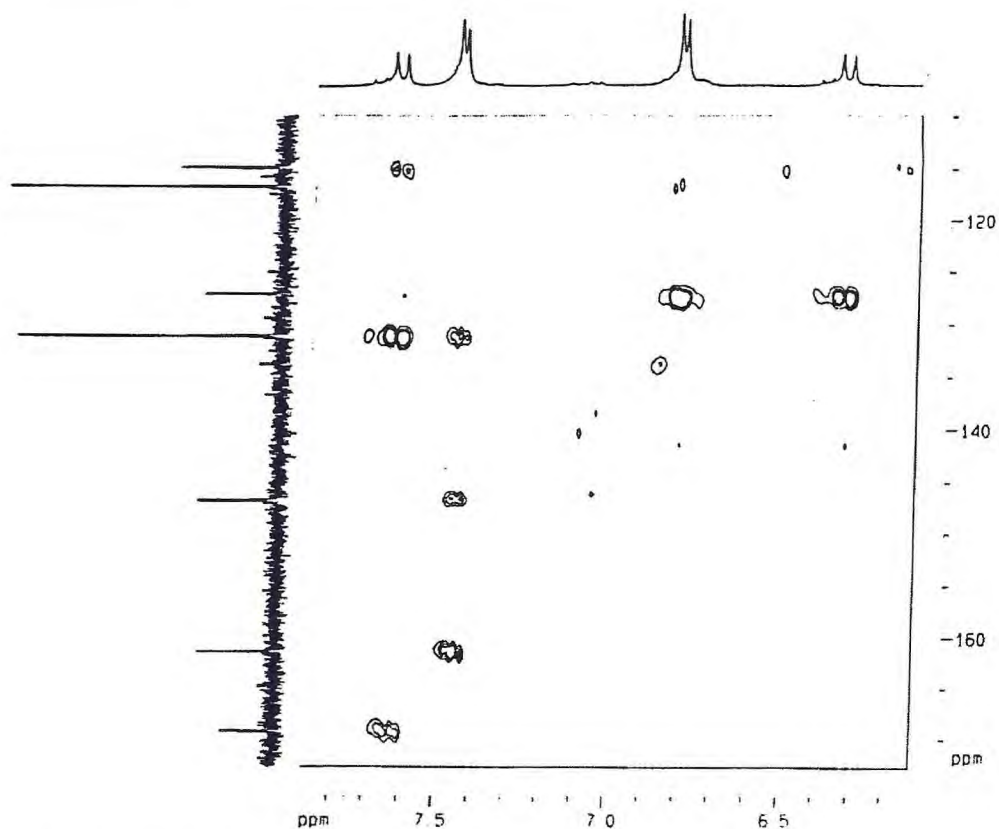
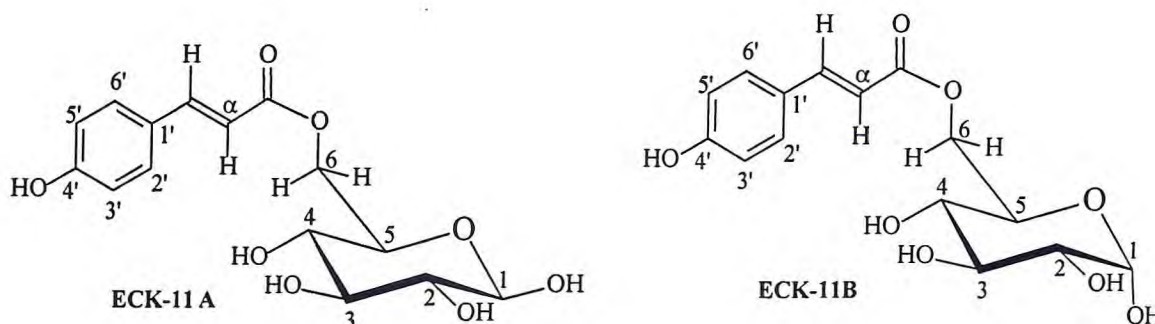


Figura 6.76 – Espectro de RMN HMBC de ECK-11 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)

De posse de todas estas informações e ainda por meio de comparação com dados da literatura (Tab. 6.30, p. 233) foi possível sugerir para ECK-11 as estruturas (11A) e (11B), cujas denominações são 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]- β -D-glicopiranosose e 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]- α -D-glicopiranosose, respectivamente. De acordo com levantamento bibliográfico realizado no *Chemical Abstract* (on line) e na Internet, esta mistura de isômeros foi isolada de *Picrorhiza scophulariiflora* [Huang, Liao, *et al.*, 2004], tratando-se, porém, do primeiro relato para o gênero *Eucalyptus*.



Estrutura proposta para ECK-11: 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-enoato]-D-glicopiranosose, nas configurações β (ECK-11A) e α (ECK-11B).

Tabela 6.29a – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-11A.

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
β -D-glicopiranosídeo				
1	98,40	4,51 (d, J = 7,7 Hz)		
2	75,61	3,55 (m)	H-3	H-4
3	78,08	3,38 (m)	H-4	H-5
4	71,91	3,38 (m)		
5	76,36	3,17 (t, J = 8,2 Hz)		
6	64,98	4,49 (m)		
		4,31 (m)		
<i>p</i> -cumaroila				
1'	127,27			H-3'; H-5'; H- α
2', 6'	131,30	7,45 (d, J = 8,5 Hz)		H- β
3', 5'	116,98	6,81 (d, J = 8,5 Hz)		H-2'; H-6'
4'	161,44			
α	115,15	6,34 (d, J = 15,9 Hz)	H- β	
β	146,87	7,63 (d, J = 15,9 Hz)		H-2'; H-6'
C=O	169,26			H- β

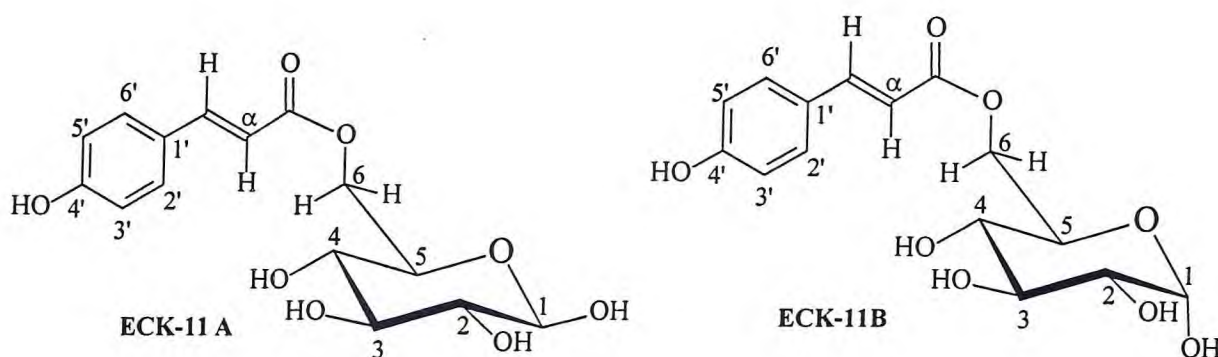
Tabela 6.29b – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-11B

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
α -D-glicopiranosídeo				
1	94,15	5,12 (d, J = 3,6 Hz)		
2	74,92	3,70 (t)		
3	73,93	3,38 (m)	H-2	
4	70,94	4,05 (m)		
5	72,15	3,17 (m)		H-3
6	65,05	4,51 (m)		
		4,31 (m)		
<i>p</i> -cumaroila				
1'	127,27			H-3'; H-5'; H- α
2', 6'	131,30	7,45 (d, J = 8,5 Hz)		H- β
3', 5'	116,98	6,81 (d, J = 8,5 Hz)		H-2'; H-6'
4'	161,44			
α	115,09	6,34 (d, J = 15,9 Hz)	H- β	
β	146,87	7,63 (d, J = 15,9 Hz)		H-2'; H-6'
C=O	169,26			H- β

Tabela 6.30 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-11 com os valores de 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]-D-glicopiranosose [Huang; Liao *et al.*, 2004]

$\delta\text{ C}$	ECK-11A	[Huang; Liao <i>et al.</i> , 2004] (DMSO)	ECK-11B	[Huang; Liao <i>et al.</i> , 2004] (DMSO)
β-D-glicose		β-D-glicose		α-D-glicose
1	98,40	97,58	94,15	92,97
2	75,61	73,56	74,92	74,25
3	78,08	77,09	73,93	72,85
4	71,91	70,88	70,94	69,56
5	76,36	75,37	72,16	71,31
6	64,98	64,63	65,05	64,69
<i>p</i>-cumaroila				
1'	127,27	125,72	127,27	125,72
2', 6'	131,30	131,05	131,30	131,05
3', 5'	116,98	116,43	116,98	116,43
4'	161,44	*	161,44	*
α	115,15	114,73	115,09	114,62
β	146,87	145,62	146,83	145,49
C=O	169,26	167,35	169,36	

* A literatura consultada não fornece esses valores.



6.1.12 Determinação Estrutural de ECK-12

Da fração ECK-PA-HB, obtida do tratamento cromatográfico de ECK-PA (Flux. 7.7, p. 315), originada do particionamento do "kino" do *Eucalyptus citriodora*, obteve-se um sólido amorfo amarelo-pálido $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$ ($c = 0.05$, metanol) e p.f = 167,9 – 170,2 °C, denominada ECK-12.

O espectro na região de absorção de infravermelho, obtido em KBr (Fig. 6.77), apresentou absorções em 3404 cm^{-1} , banda larga atribuída à deformação axial da ligação O-H de hidroxila; em 1705 cm^{-1} associada à deformação axial da ligação C=O característica de ácido ou éster. Foram observadas bandas de vibrações esqueléticas envolvendo a deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1605 cm^{-1} , 1514 , e 1451 cm^{-1} , enquanto em 1073 e 1032 cm^{-1} eram relativas à deformação angular no plano de ligação C-H, e em 868 , 829 e 764 cm^{-1} , à deformação angular fora do plano de ligação C-H de aromáticos. As absorções registradas em 1209 e 1167 cm^{-1} foram relacionadas às deformações axiais de ligações C-O.

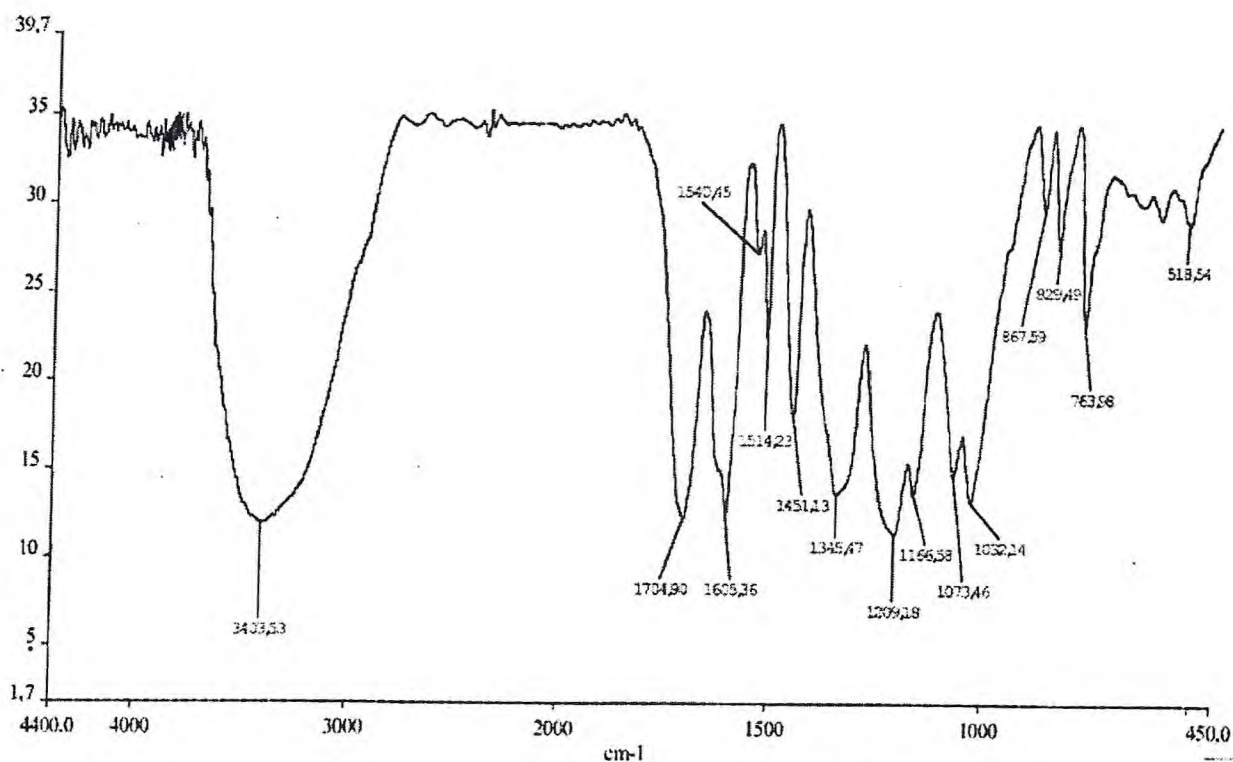


Figura 6.77 – Espectro absorção na região do infravermelho, em KBr, de ECK-12

A análise do espectro de prótio (CD_3OH , 500 MHz) de ECK-12 (Fig. 6.78) permitiu observar sinais característicos de compostos aromáticos através dos sinais em $\delta 7,40$ (2H, d, J

=8,1 Hz) e 6,77 (2H, d, $J = 8,1$ Hz) sugerindo um anel aromático *para*-substituído. Os sinais em δ 7,62 (1H, d, $J = 15,9$ Hz) e 6,30 (1H, d, $J = 15,9$ Hz), foram atribuídos a prótios olefinicos com estereoquímica *trans*, definido pelos valores das constantes de acoplamento. Os sinais em δ 7,11 (2H, s) e 7,05 (2H, s) indicaram elevado padrão de substituição de anéis aromáticos, provavelmente nas posições 1, 3, 4 e 5 de forma a tornar os prótios quimicamente equivalentes. Já para os sinais em δ 5,67 (1H, d $J = 8,4$ Hz), 5,16 (1H, dd, $J = 9,2$ e 8,6 Hz), 4,57 (1H, d, $J = 10,6$ Hz), 4,45 (1H, dd, $J = 10,6$ e 4,6 Hz), 3,82 (2H, t, $J = 9,2$ Hz) e 3,66 (1H, d, $J = 9,2$ Hz) foram atribuídos a uma unidade de glicose, cuja constante de acoplamento do carbono anomérico aponta para a configuração β .

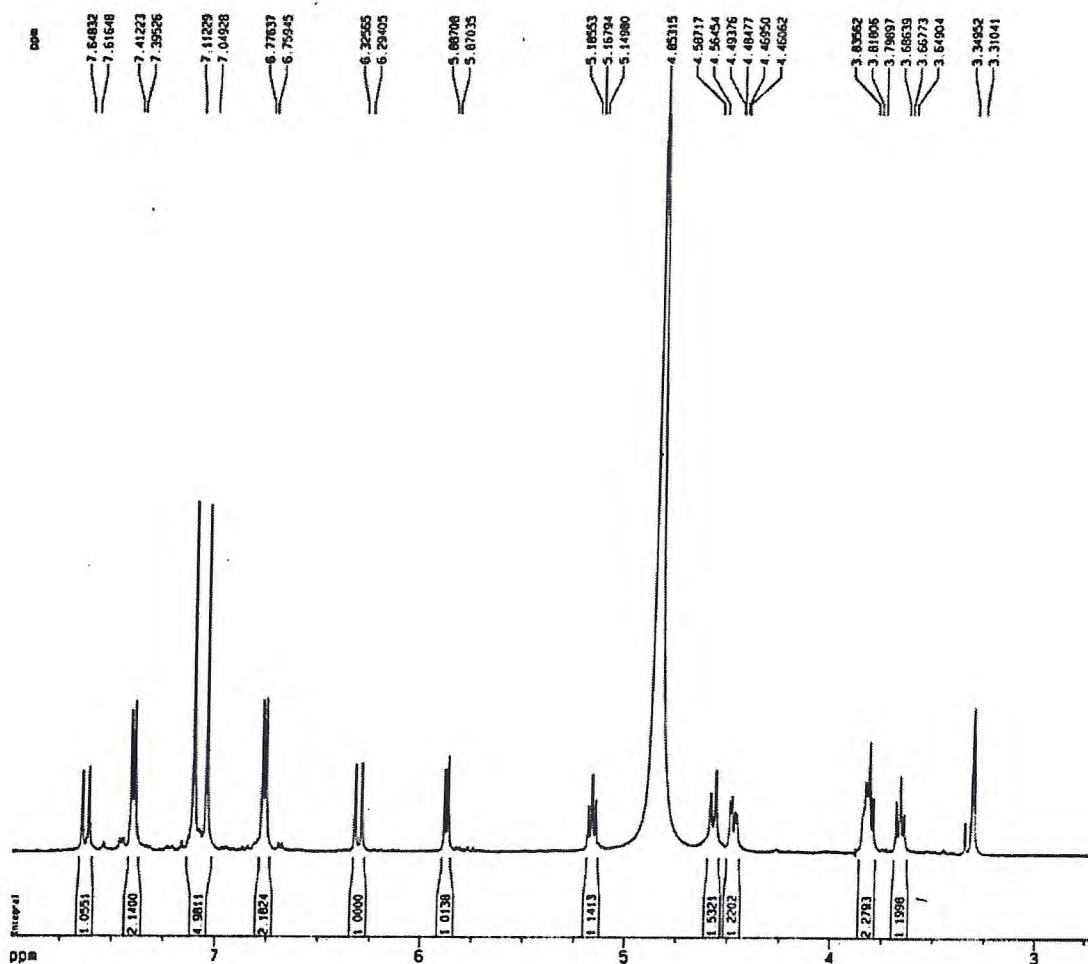


Figura 6.78 - Espectro de RMN ^1H de ECK-12 (CD_3OD , 500 MHz)

Por meio do espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ECK-12 (Fig. 6.79, p. 237) pôde-se observar a presença de vinte e três linhas espectrais atribuídas a vinte e nove carbonos. Para obter o padrão de hidrogenação dos carbonos recorreu-se à comparação entre

os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 6.80, p. 237) permitindo elaborar a Tabela 6.31 da qual se destacou a presença de treze carbonos não-hidrogenados (C), quinze metínicos (CH) e um metilênico (CH_2).

Tabela 6.31 - Valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ECK-12 com padrão de hidrogenação. (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OH , 125 MHz)

δ C	CH	CH_2	TOTAL
168,51	147,55	64,34	
168,41	131,40 (x2)		
166,68	116,92 (x2)		
161,40	114,71		
146,64 (x4)	110,74 (x2)		
140,73	110,36 (x2)		
140,02	94,28		
127,21	76,71		
121,41	75,92		
120,17	74,17		
	71,43		
C_3	$\text{C}_9 \text{H}_9$	$\text{H}_2\text{C-O}$	
$(\text{C-OH})_7$	$(\text{HC-OH})_2$		
$(\text{C=O})_3$	HC-O		
	HC-OO		$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{16}$

De acordo com a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] pôde-se sugerir que os sinais entre δ 168,51 e 166,68 seriam de carbonilas, possivelmente de ésteres. Os demais carbonos não-hidrogenados seriam correspondentes a carbonos sp^2 , dos quais os encontrados na faixa de δ 161,40 a 140,02, são oxigenados, e entre δ 127,21 a 120,17, não oxigenados. Os carbonos metínicos em δ 131,40; 116,92; 110,74 e 110,36 (atribuídos a dois carbonos, cada), foram correlacionados a carbonos sp^2 de aromáticos, enquanto aqueles em δ 147,55 e 114,71 a carbonos olefinicos. Já os observados entre 94,28 a 71,43, sugeriram pertencer a carbonos sp^3 oxigenados.

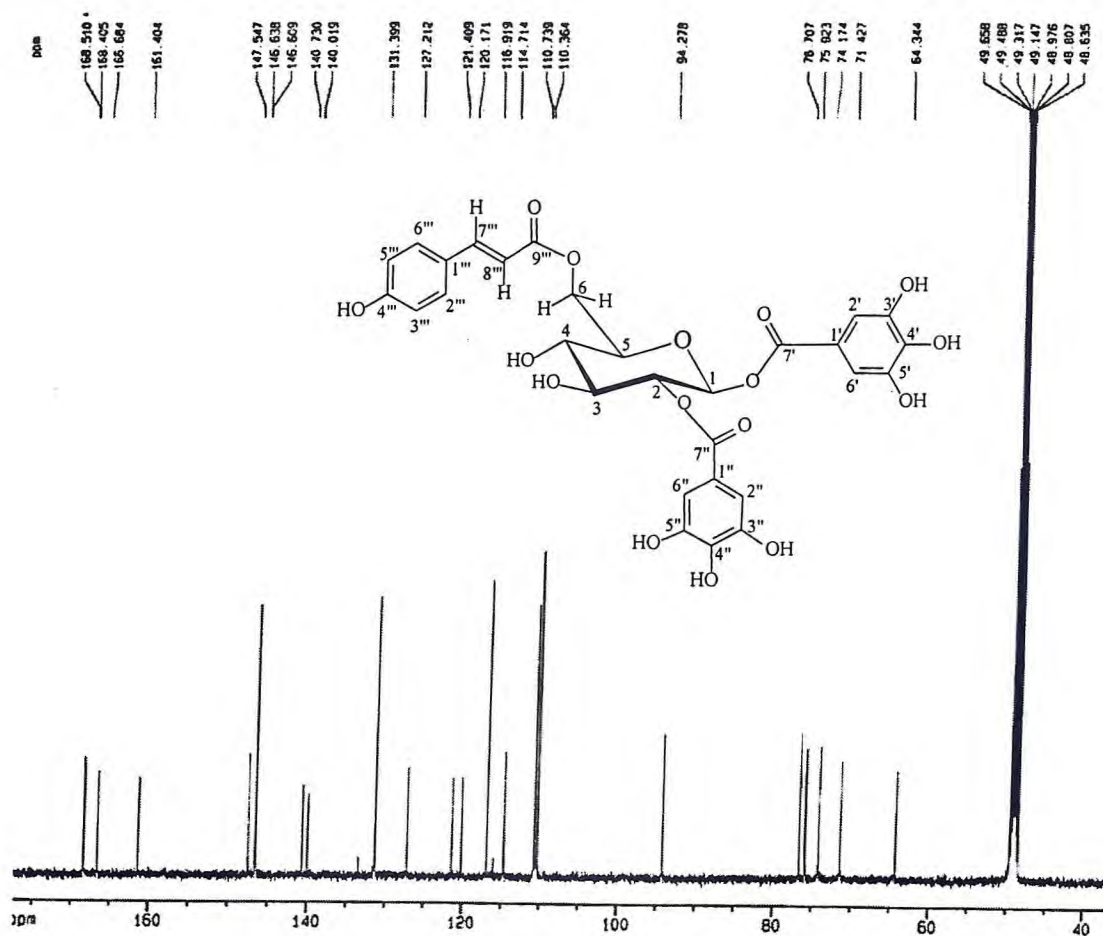


Figura 6.79 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de ECK-12 (CD₃OD, 125 MHz)

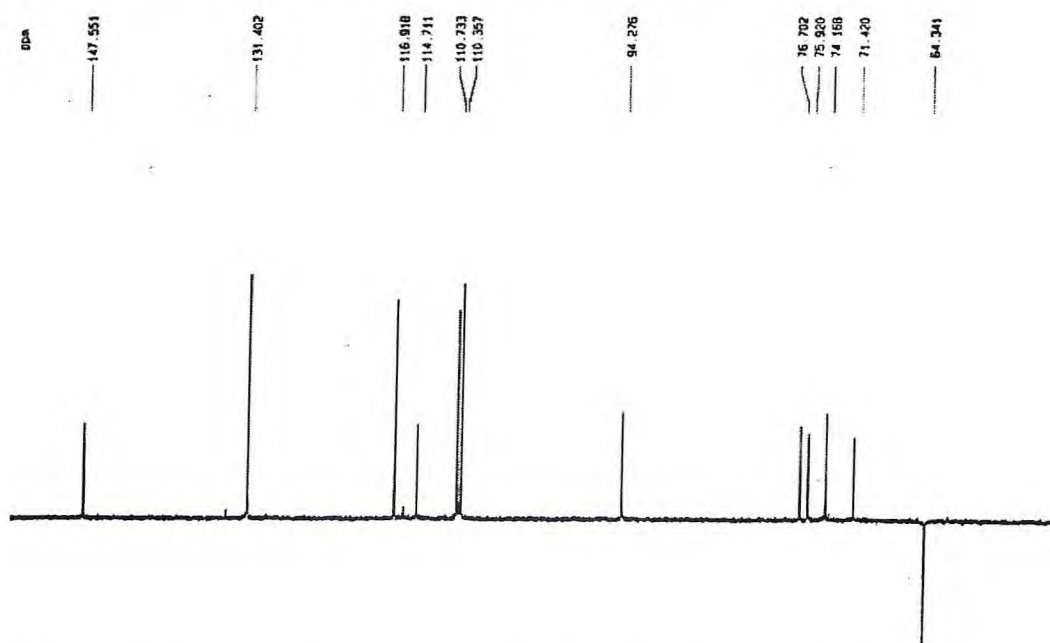
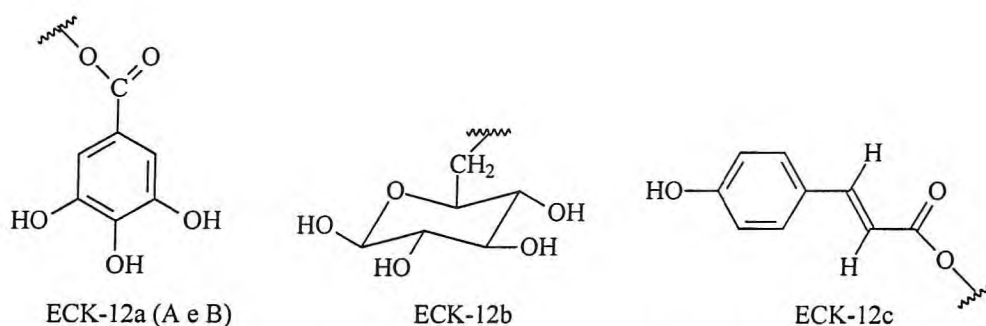


Figura 6.80 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de ECK-12 (CD₃OD, 125 MHz)

A partir dos dados disponíveis, foi possível sugerir para o composto ECK-12 a fórmula molecular $C_{29}H_{24}O_{16}$, com dezessete índices de deficiência de hidrogênio (IDH=17) distribuídos entre três anéis aromáticos (12 IDH), três carbonilas (3 IDH), uma dupla ligação (1 IDH) e o anel da glicose (1 IDH).

Comparando-se os valores de deslocamentos químicos do ácido gálico (ECK-10, p. 222), verificou-se que no espectro de RMN ^{13}C -CPD de ECK-12 (Fig. 6.79, p. 237) havia dois conjuntos de sinais semelhantes, propondo-se, por conseguinte, duas unidades da subestrutura ECK-12a. Da mesma forma, comparativamente, verificou-se que havia um conjunto de sinais cujos valores eram semelhantes ao grupamento *para*-cumaroil da subestrutura ECK-7 (p. 193). As subestruturas propostas para ECK-12 estão dispostas abaixo. Os dados utilizados para comparação estão reunidos na Tabela 6.33 (p. 244).



Subestruturas propostas para ECK-12

A análise dos espectros bidimensionais forneceu evidências que ajudaram a estabelecer a conectividade das subestruturas. No espectro de RMN 1H , 1H -COSY (Fig. 6.81, p. 239) foi possível observar o acoplamento geminal (subestrutura ECK-12b), entre os prótons em δ 4,57 (H-6a) e 4,45 (H-6b), bem como os acoplamentos vicinais entre os prótons em δ 5,67 (H-1) com 5,17 (H-2), deste com δ 3,82 (H-3) e deste com 3,68 (H-4). Outros acoplamentos vicinais que foram observados eram referentes à subestrutura ECK-12c, sendo estes em δ 7,63 (H-7''') com 6,3 (H-8''') e δ 7,40 (H-2''' e H-6''') com 6,77 (H-3''' e H-5'''), confirmando o padrão de substituição do anel aromático como sendo *para*.

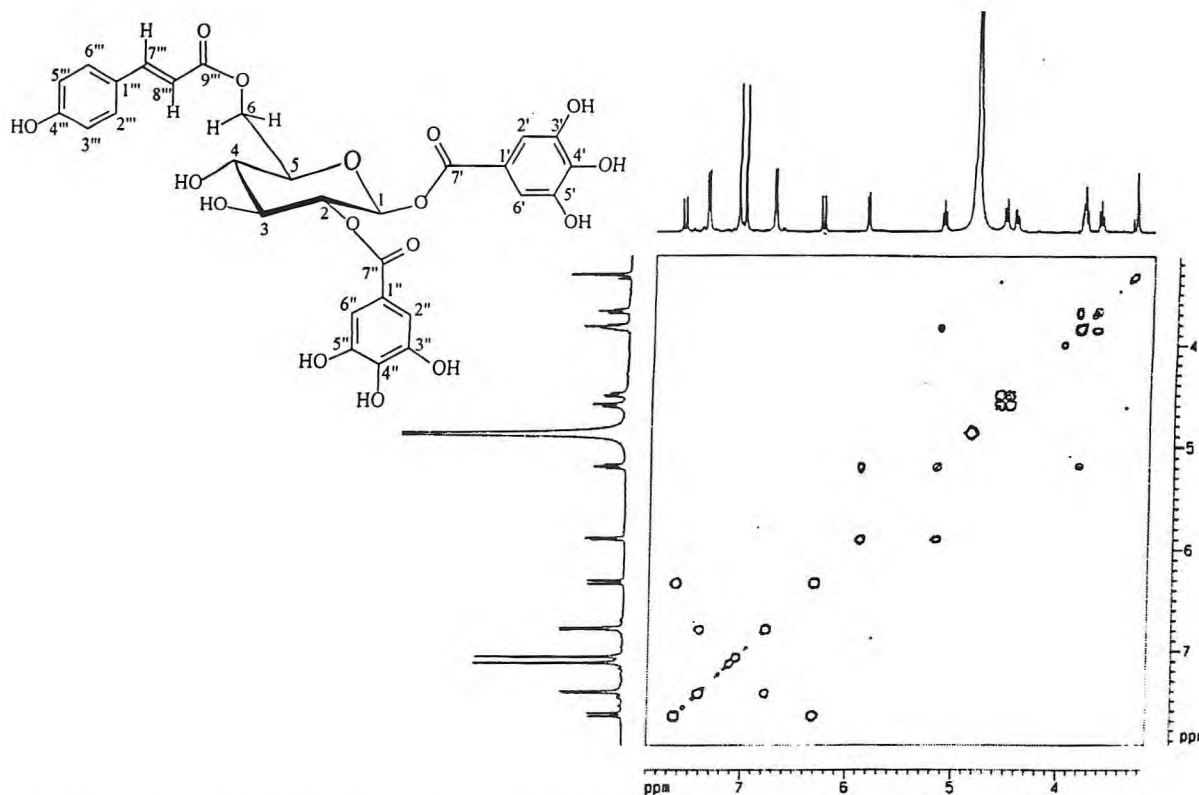
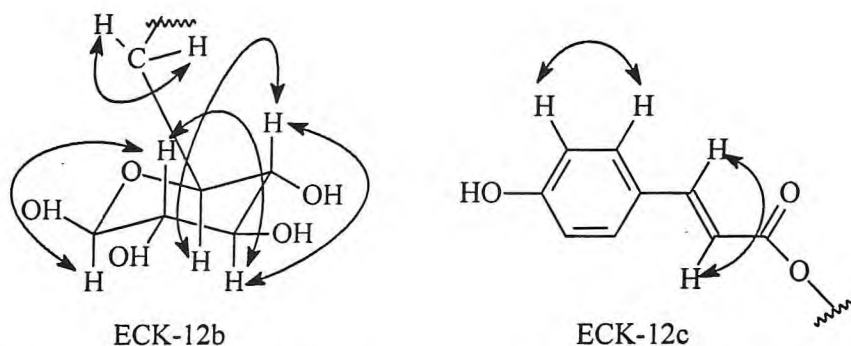


Figura 6.81 – Espectro de RMN bidimensional de correlação ^1H , ^1H COSY de ECK-12 (CD_3OD , 125 MHz)



Representação dos acoplamentos para as subestruturas ECK-12c e ECK-12b, observados no espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY.

O espectro de RMN HMQC de ECK-12 (Fig. 6.82, p. 240) possibilitou atribuir, de forma inequívoca, a ligação dos carbonos aos seus respectivos prótios (Tab 6.32, p. 243), recebendo especial atenção as correlações entre os prótios em δ 7,11 (H-2'' e H-6'') e 7,05 (H-2' e H-6') com os carbonos em δ 110,36 (C-2'' e C-6'') e 110,74 (C-2' e C-6'), respectivamente, visto serem de fundamental importância para as atribuições dos demais valores dos sinais de carbono das unidades dos substituintes galoila, cujos sinais eram muito próximos, gerando dúvidas nas atribuições, mas que aqueles seriam utilizados como sítio de

referência na posterior análise do espectro RMN HMBC. Ainda observou-se que o sinal do prótio em δ 3,82 estava correlacionado com dois carbonos em δ 75,92 (C-3) e 76,71 (C-5).

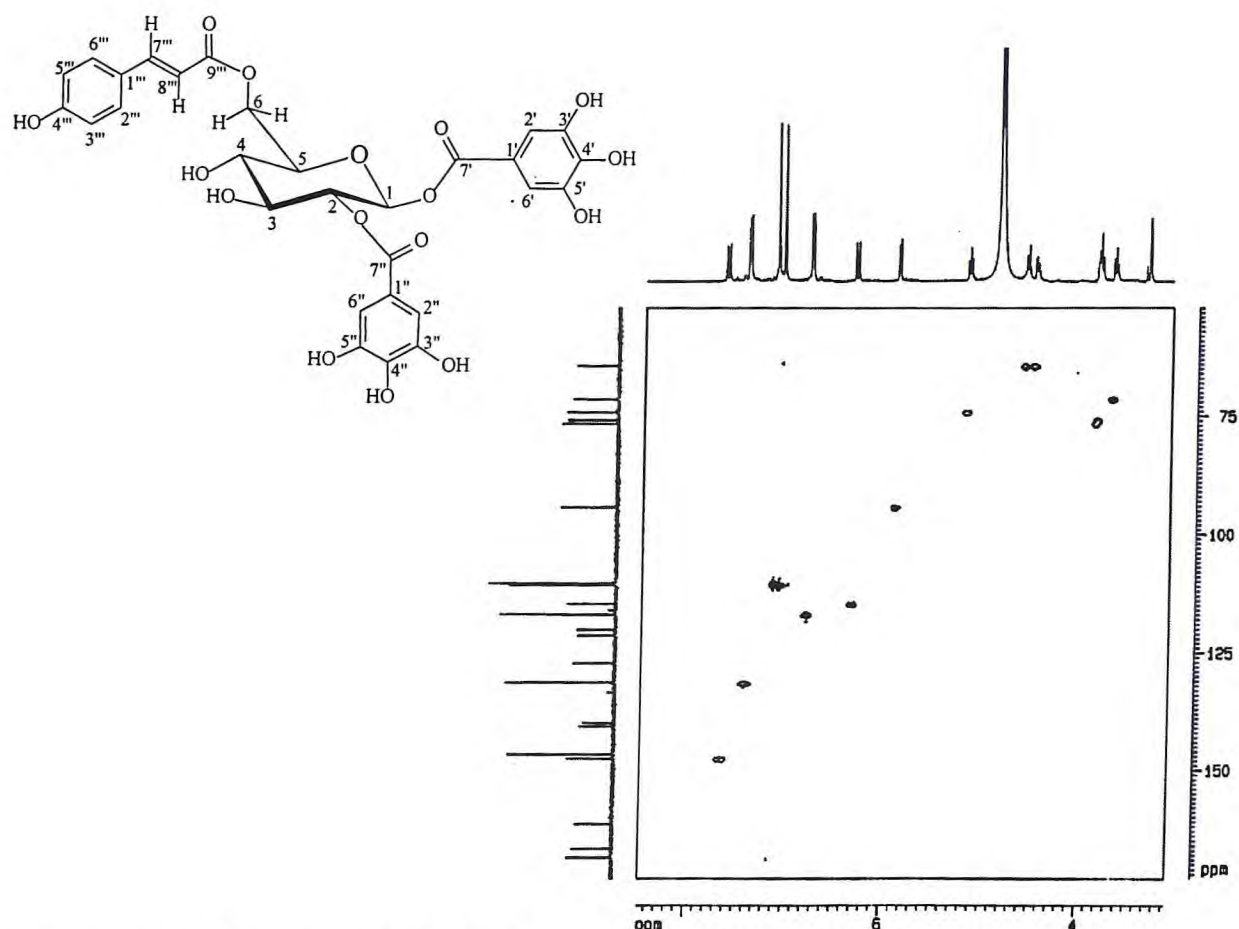
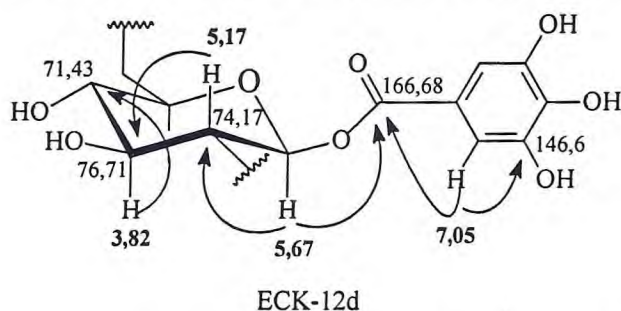


Figura 6.82 – Espectro de RMN HMQC de ECK-12 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

De acordo com a análise do espectro RMN HMBC (Fig. 6.83, p. 241), foi possível propor as conectividades das subestruturas e estabelecer uma estrutura para ECK-12. Os acoplamentos observados entre os prótios em δ 5,88 (H-1) e 5,17 (H-2) com os carbonos carbonílicos em δ 166,68 (C-7') e 168,51 (C-7''), conduziram a proposição das subestruturas ECK-12d e ECK-12e. As demais correlações encontram-se descritas na Tabela 6.32 (p. 243).



Representação de acoplamentos vistos no HMBC para a subestrutura ECK-12d, destacando a conectividade entre ECK-12a e ECK-12b.

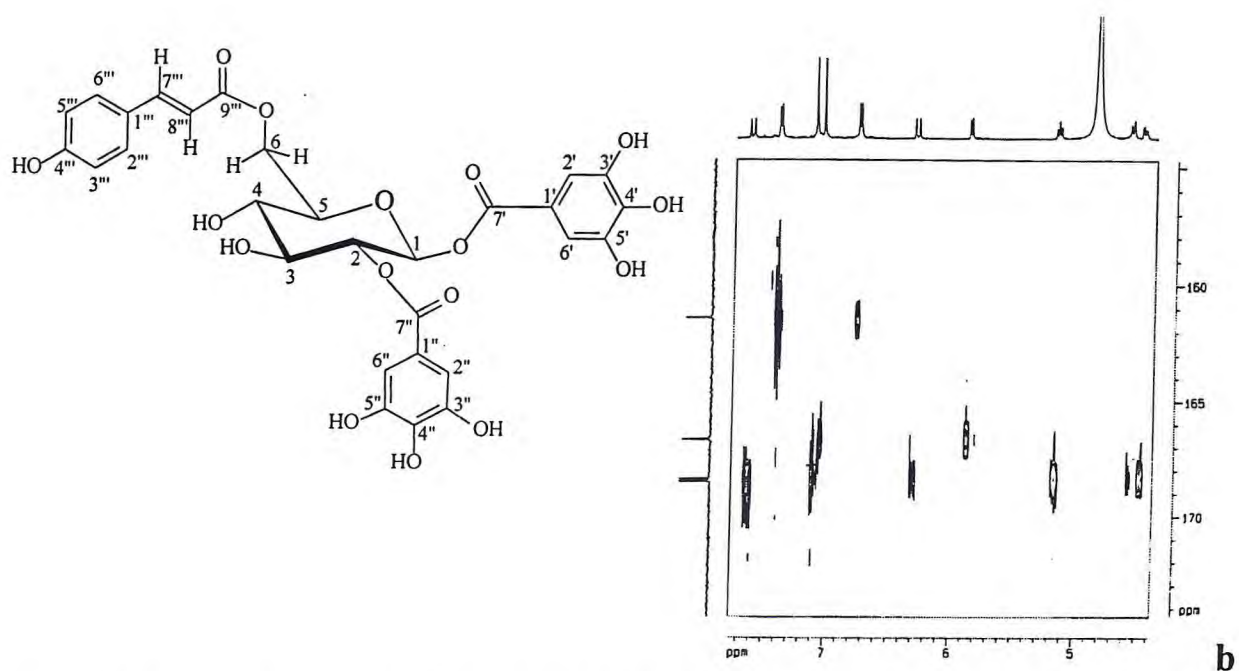
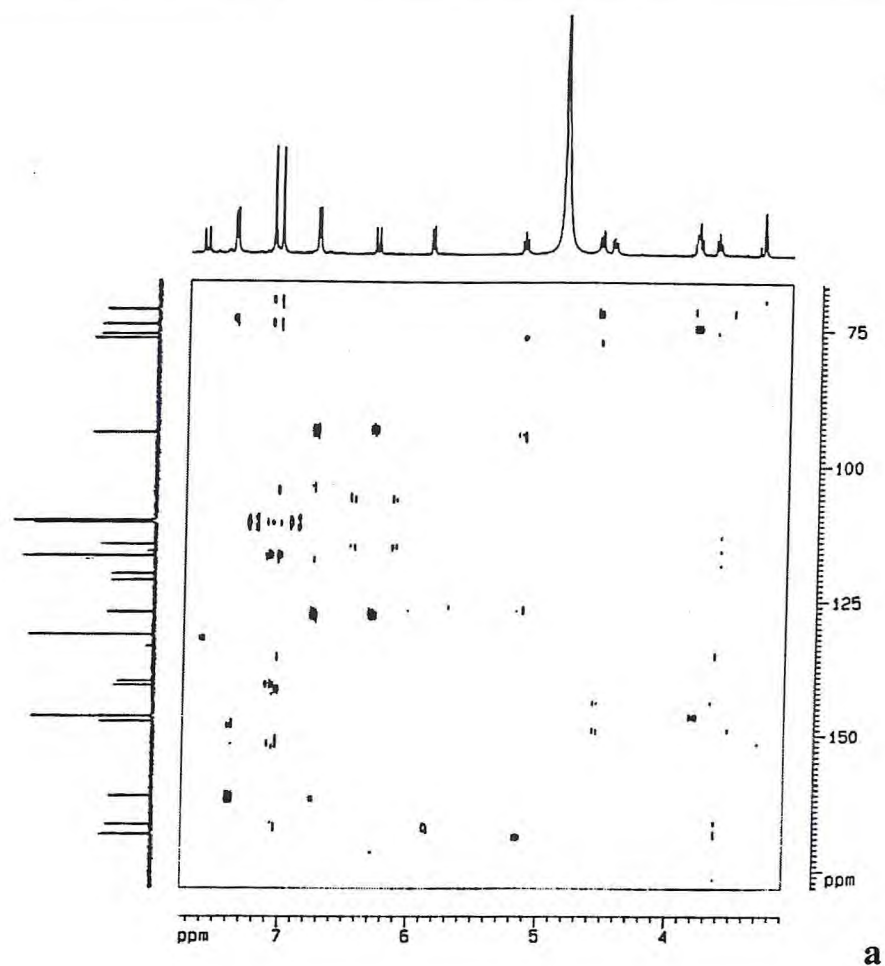
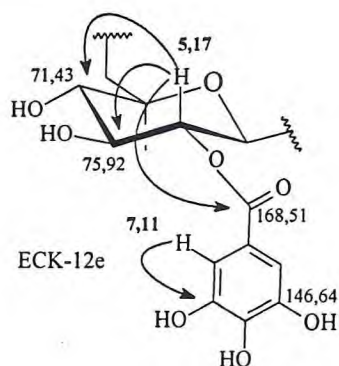


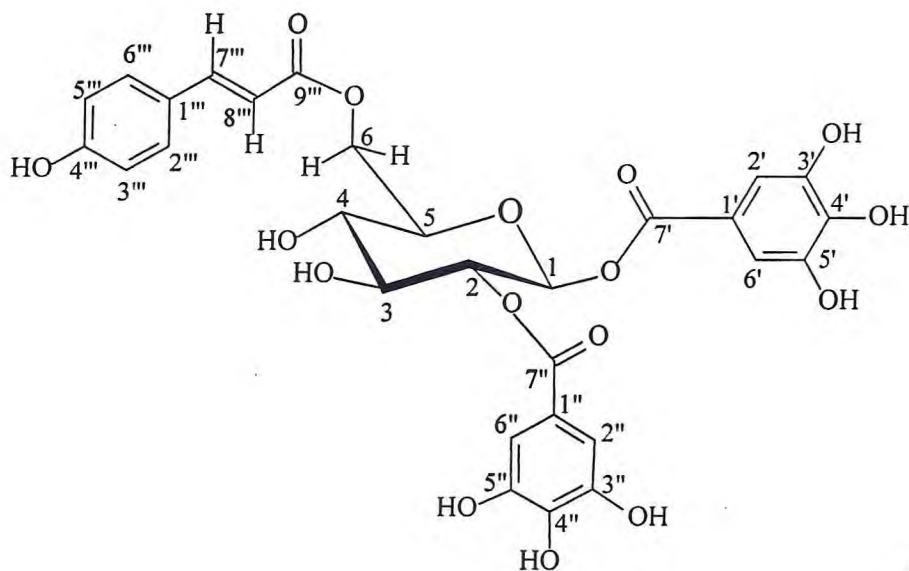
Figura 6.83 – a) Espectro de RMN HMBC de ECK-12 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz) e b) Expansão do espectro de RMN HMQC de ECK-12 na região de δ 155,00 a 175,00 x δ 4,40 a 7,60 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz).



Representação de acoplamentos vistos no HMBC para a subestrutura ECK-12e destacando a conectividade entre ECK-12aB e ECK-12b

Ainda foi possível determinar a conectividade do grupamento *p*-cumaroila com a unidade osídica por intermédio do acoplamento registrado entre os prótons em δ 4,57 (H-6a) e 4,45 (H-6b) com o carbono em δ 168,41 (C=O).

De acordo com os dados obtidos, foi possível caracterizar ECK-12 (**12**) como 1,2-*O*-digaloil-6-*O*-*trans*-*p*-cumaroila- β -D-glicopiranosídeo, um tanino pirogálico, que segundo levantamento no Chemical Abstract (on line), é o primeiro relato na literatura.



Estrutura de ECK-12: 1,2-*O*-digaloil-6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo

Tabela 6.32 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC - $^nJ_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de ECK-12.

Carbono	$\delta\text{ C}$	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1J_{\text{CH}}$ $\delta\text{ H}$	^1H , ^{13}C -HMBC - $^nJ_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
			n=2	n=3
β-D-glicopiranosídeo				
1	94,28	5,67 (d, $J=8,4$ Hz)	H-2	
2	74,17	5,17 (dd, $J=9,2$ e $8,6$ Hz)	H-3	
3	75,92	3,82 (t, $J=9,2$ Hz)	H-4; H-2	
4	71,43	3,66 (t, $J=9,2$ Hz)	H-5 e H-3	H-6a
5	76,71	3,82 (m)	H-4, 2H-6	
6	64,34	4,57 (d, $J=10,6$ Hz)a 4,45 (dd, $J=10,6$ e 4,5 Hz)b		H-4
1-O-galoila				
1'	120,17			
2'/6'	110,74	7,05 (s)		
3'/5'	146,64		H-2'/H-6'	
4'	140,73			H-2'/H-6'
4' (C=O)	166,68			H-2'/H-6'; H-1
1-O-galoila				
1''	121,41		H-2''/H-6''	
2''/6''	110,36	7,11 (s)		
3''/5''	146,64		H-2''/H-6''	
4''	140,02			H-2''/H-6''
7'' (C=O)	168,51			H-2; H-2''/H-6''
p-cumaroila				
1'''	127,21		H-7'''	H-3'''/H-5'''; H-8'''
2''', 6'''	131,40	7,40 (d, $J=8,1$ Hz)		H-7'''
3''', 5'''	116,92	6,77 (d, $J=8,1$ Hz)	H-2'''/H-6'''	
4'''	161,40		H-3'''/H-5'''	H-2'''/H-6'''
7'''	147,55	7,63 (d, $J=15,9$ Hz)		H-2'''/H-6'''
8'''	114,71	6,30 (d, $J=15,9$ Hz)	H-7'''	
9''' (C=O)	168,41		H-8'''	H-7'''; 2H-6

Tabela 6.33 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ECK-12 com os valores de *para*-cinamoila, galoila e β -glicopiranosídeo (ver as estruturas ECK-7 e ECK-10).

δ C	ECK-12	<i>p</i> -cinamoila (ECK-7)	galoila (ECK-10)	β -glicopiranosídeo (ECK-7)
β-D-glicose				
1	94,28			95,90
2	74,17			74,15
3	75,92			78,05
4	71,43			71,50
5	76,71			76,42
6	64,34			64,75
galoila A				
1'	120,17		121,08	
2', 6'	110,74		109,34	
3', 5'	146,6		145,39	
4'	140,73		138,57	
C=O	166,68		169,47	
galoila B				
1''	121,41		121,08	
2'', 6''	110,36		109,34	
3'', 5''	146,6		145,39	
4''	140,02		138,57	
-COO	168,51		169,47	
<i>p</i>-cinamoila				
1'''	127,21	127,10		
2''', 6'''	131,40	131,58		
3''', 5'''	116,92	117,02		
4'''	161,40	161,74		
α	114,71	114,53		
β	147,55	148,22		
C=O	168,41	167,76		

6.2 – Substâncias Isoladas do Ninho de *Trigona spinipes*

6.2.1 Identificação Estrutural de TS-1

O tratamento cromatográfico da fração TSCE-PH-AC (p.), oriunda do fracionamento cromatográfico da fração hexânica do extrato etanólico de *T. spinipes*, submetido a particionamento, permitiu o isolamento de uma substância de cor branca, sólida, denominada TS-1.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 6.84) TS-1 revelou a presença de grupamento hidroxila, indicada pela banda intensa em 3413 cm^{-1} referente a estiramento da ligação O-H; absorção em 2944 cm^{-1} , relacionada à presença de carbonos saturados sp^3 . A banda registrada em 1688 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de ligação C=O, enquanto em 1644 cm^{-1} , foi atribuída a estiramento da ligação C=C de alceno. As bandas em 1444 e 1375 cm^{-1} foram relacionadas à deformação angular de CH_2 e CH_3 , respectivamente.

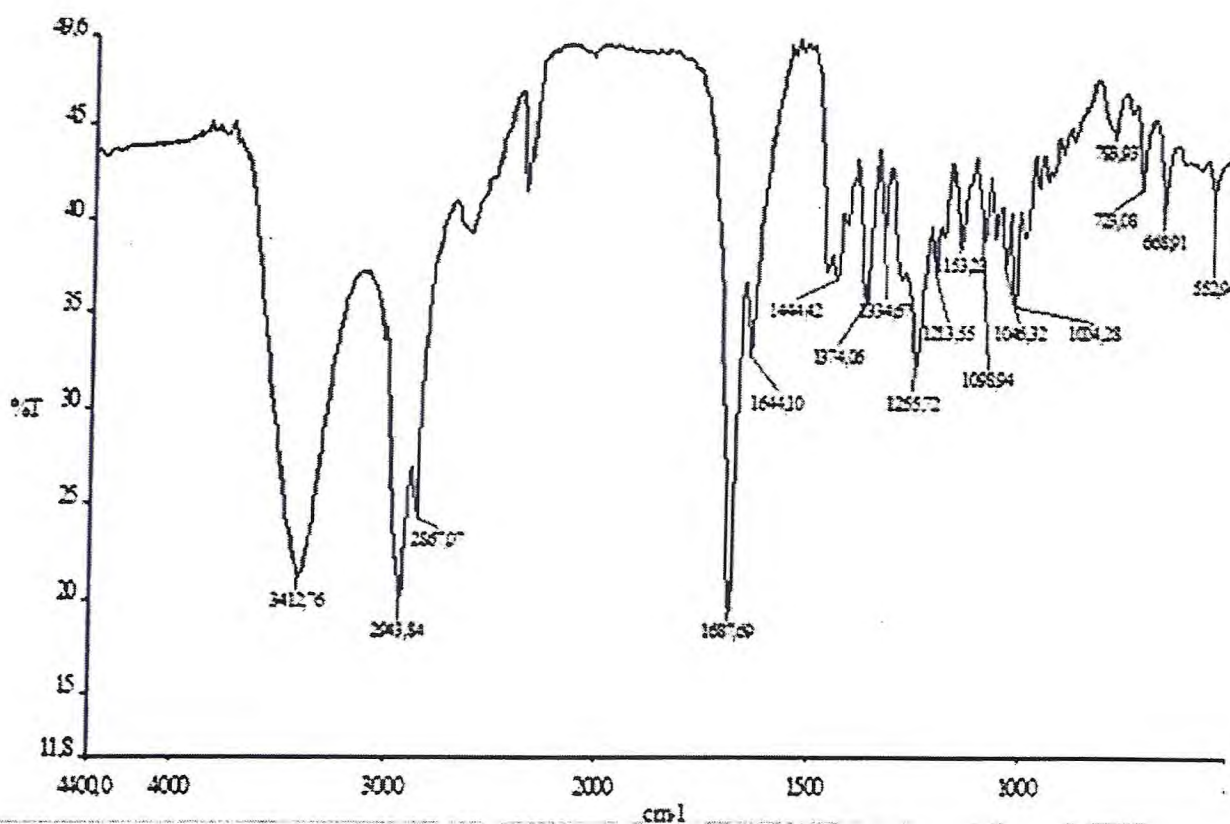


Figura 6.84 - Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de TS-1.

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de TS-1 (Fig. 6.85) apresentou absorções intensas em δ 0,89 – 1,84, características de grupos metila. Um outro ponto importante foi a presença das absorções registradas em região de proteção em δ 0,52 e 0,35, características de um grupo ciclopropila presente em triterpenóides da série cicloartano. Os sinais em δ 6,91 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 4,97 (sl) e 4,93 (sl), levam a sugerir a presença de ligações duplas, trissubstituída e dissubstituída terminal, respectivamente.

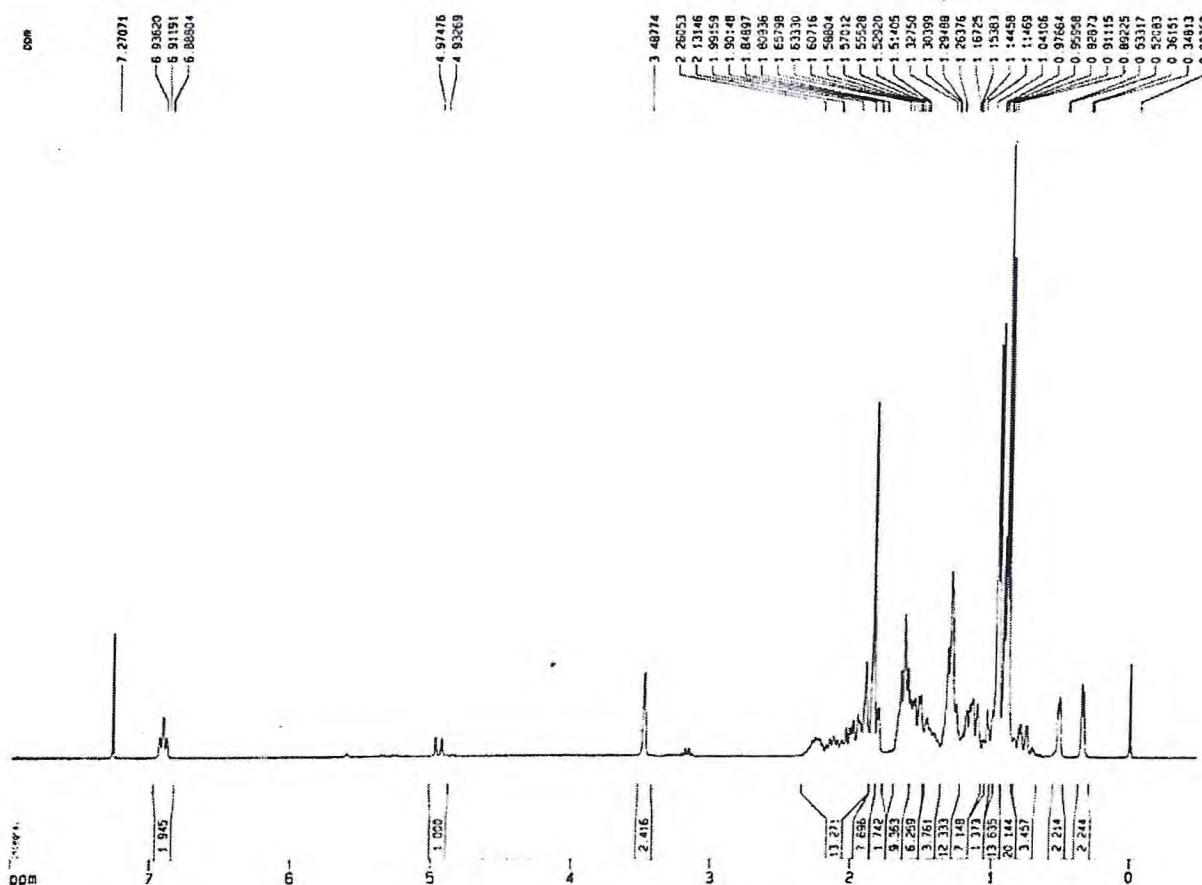


Figura 6.85 - Espectro de RMN ^1H de TS-1 (CDCl_3 , 300 MHz)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CDCl_3 , 300 MHz) de TS-1 (Fig. 6.86, p. 248), revelou, levando em consideração o elevado número de absorções registradas na faixa de carbonos saturados, que o composto TS-1 era de natureza triterpenoidal. Foram registradas trinta e seis linhas espectrais, o que sugeriu tratar-se de uma mistura de dois triterpenos.

Comparando-se os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C - DEPT-135° (Fig. 6.87, p. 248), pôde-se elaborar as Tabelas 6.34 e 6.35 para TS-1A e TS-1B (p. 234), deduzindo-se a presença dos carbonos não-hidrogenados (C), metínicos (CH), metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3).

Tabela 6.34 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-1A com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135° , δ , CDCl_3 , 75 MHz).

δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
173,23	145,97	35,71	26,06	
126,83	77,30	35,03	21,44	
49,14	52,40	33,12	19,51	
45,54	48,23	30,00	18,34	
39,77	41,30	28,79	18,24	
26,70	36,21	28,35	12,18	
20,05		27,70		
		26,50		
		26,14		
		25,88		
		21,30		
C ₆	C ₅ H ₅	C ₁₁ H ₂₄	C ₆ H ₁₈	
COOH	CH-OH			C ₃₀ H ₄₈ O ₃

Tabela 6.35 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-1B com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -CPD e DEPT -135° , δ , CDCl_3 , 75 MHz).

δ C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
180,22	77,30	111,26	26,06	
145,98	52,40	35,71	19,51	
49,14	48,23	35,03	18,51	
45,54	45,54	33,12	18,34	
39,77	41,30	31,88	18,24	
26,70	36,21	30,00	16,53	
20,05		28,79		
		28,35		
		26,50		
		26,14		
		25,88		
		21,30		
C ₆	C ₅ H ₅	C ₁₂ H ₂₄	C ₆ H ₁₈	
COOH	CH-OH			C ₃₁ H ₅₀ O ₃

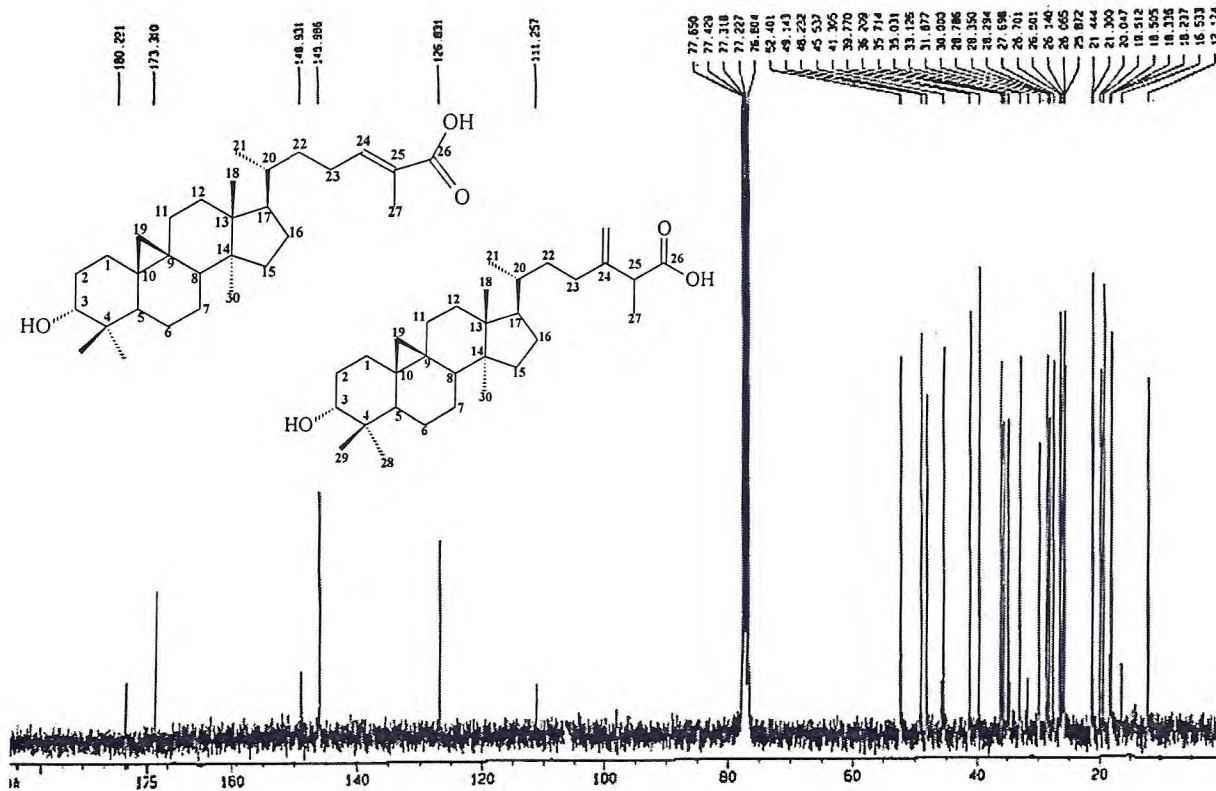


Figura 6.86 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de TS-1 (CD₃OD, 125 MHz)

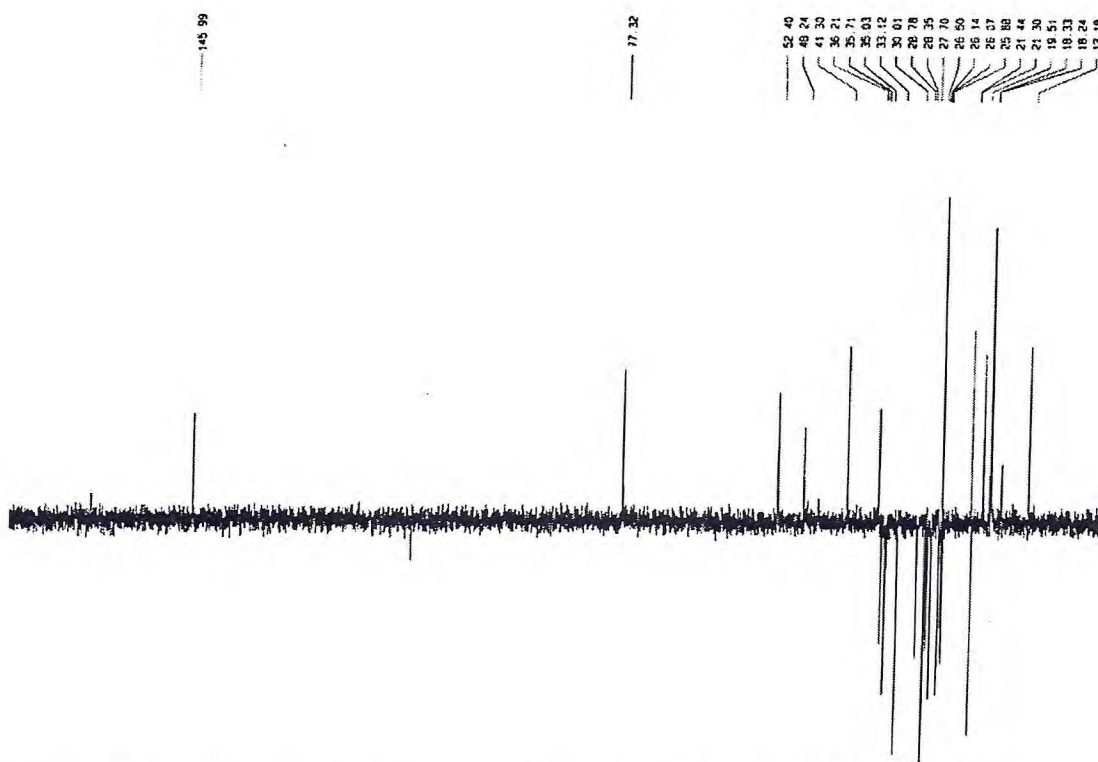


Figura 6.87 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de TS-1 (CD₃OD, 125 MHz)

Utilizando-se a teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994], pôde-se inferir a presença de duas carbonilas em δ 180,22 e 173,29, dois carbonos olefinicos em uma dupla terminal em δ 148,93 (C) e 111,28 (CH₂), e ainda dois carbonos olefinicos em dupla trissubstituída em δ 145,97 (CH) e 126,52 (C). Estas absorções corroboraram para sugerir que se tratava de uma mistura de triterpenos. Observou-se ainda um sinal em δ 77,30, sugestivo de carbono oxigenado.

O espectro de massa de TS-1 (Fig. 6.88) revelou os picos referentes aos íons moleculares de TS-1A (m/z 456) e TS-1B (m/z 470) em acordo com as estruturas propostas.

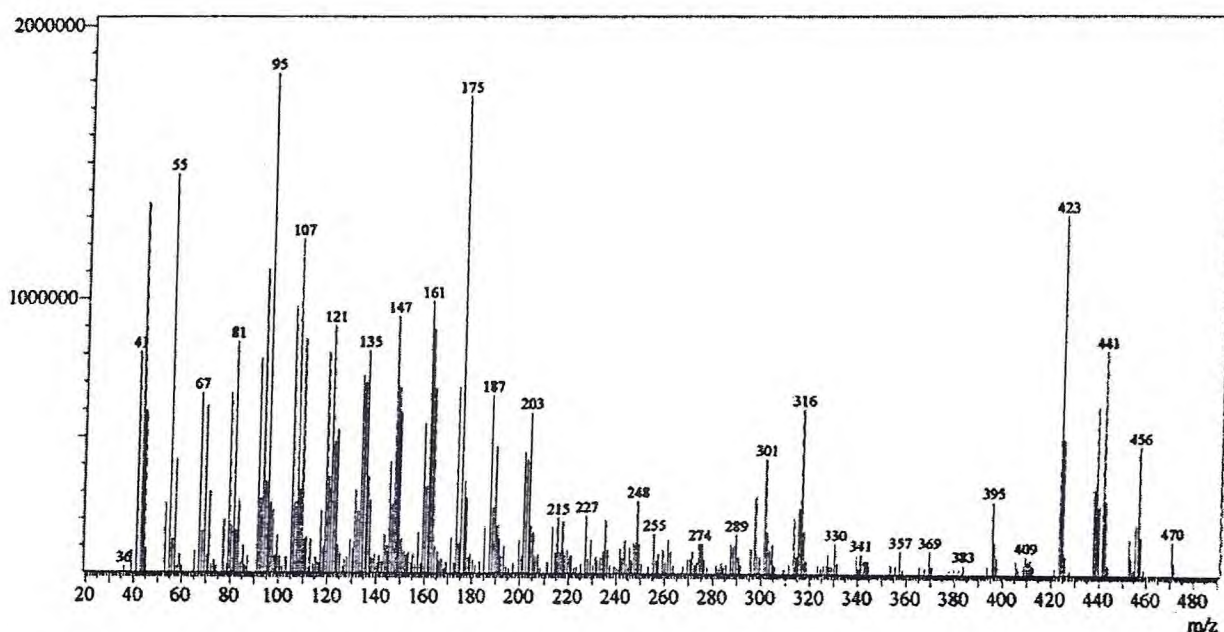
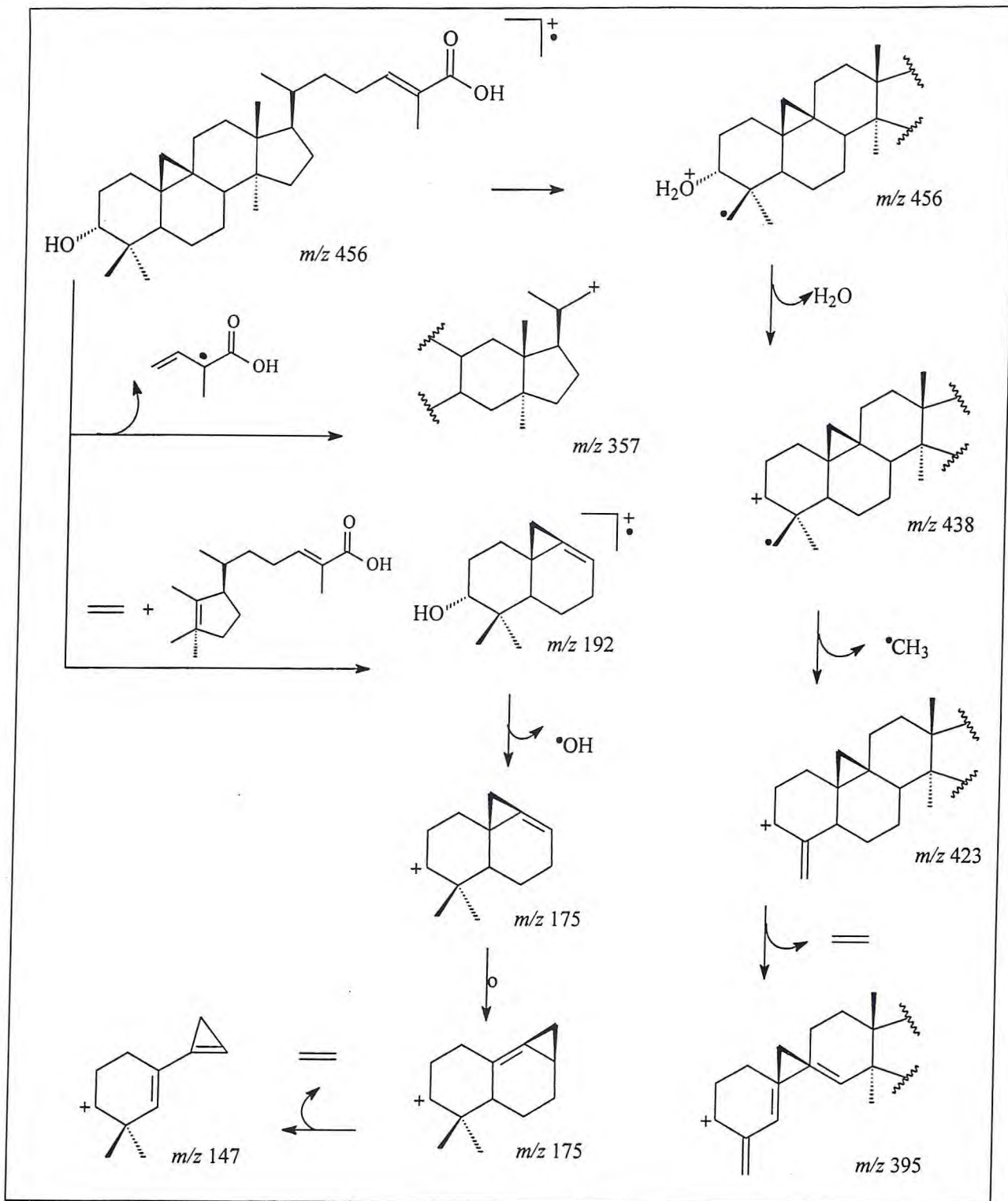
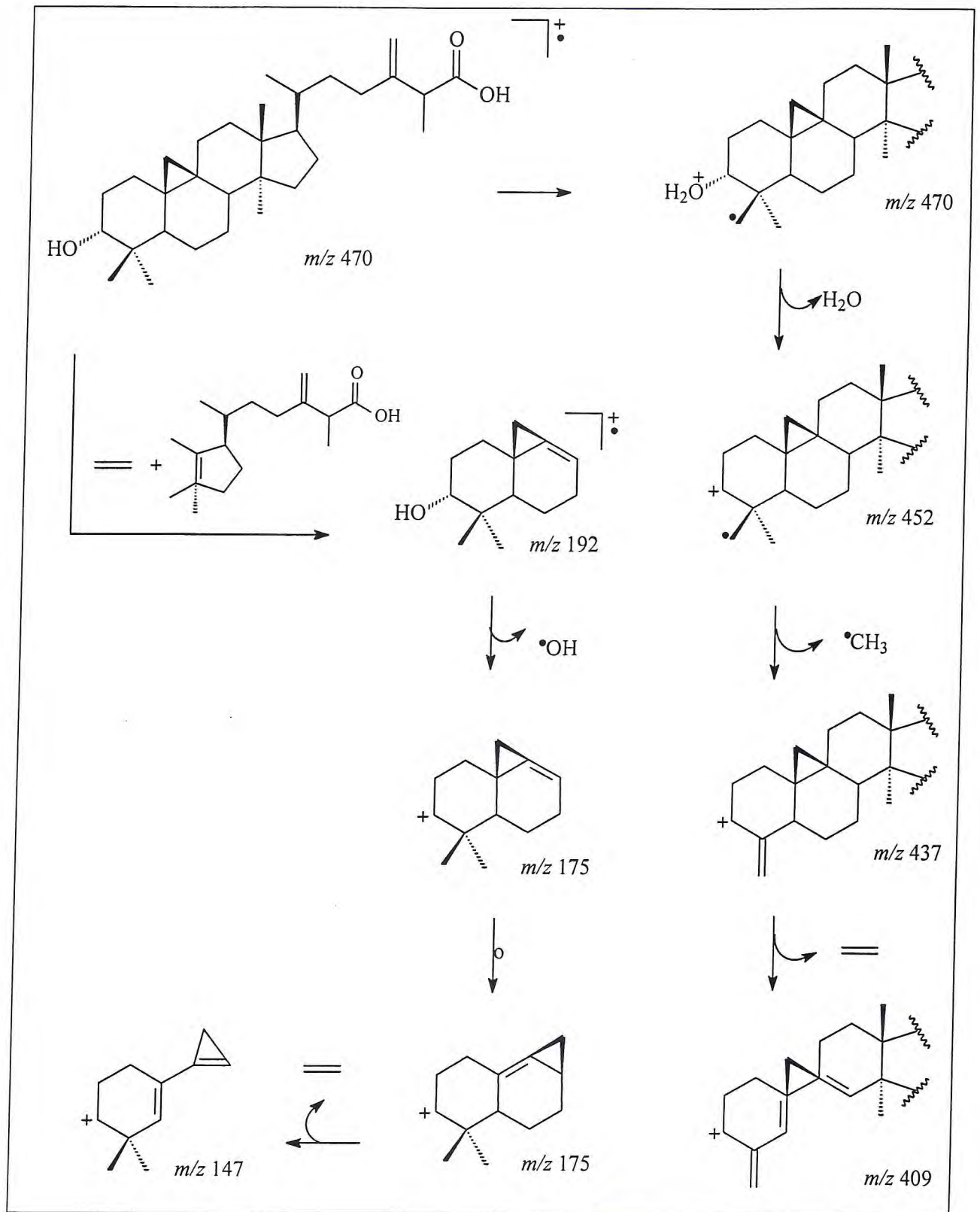


Figura 6.88 - Espectro de massa de TS-1 (IE, 70 eV).

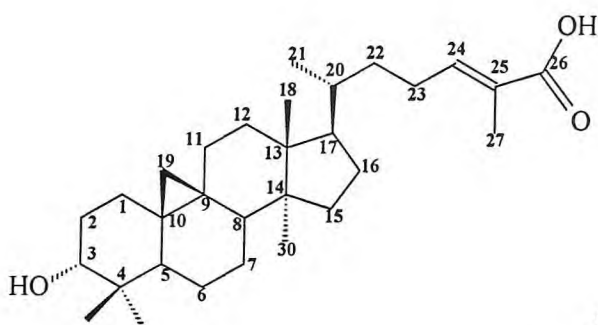
Quadro 6.7 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para TS-1A
(13a)



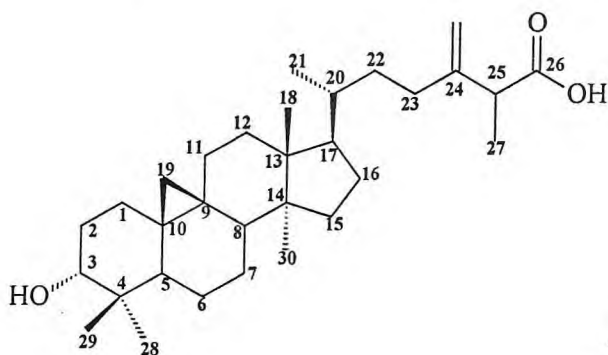
Quadro 6.8 – Propostas de fragmentações de massas de alguns picos registrados para TS-1B
(13b)



A comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-1A com TS-1B, com dados descritos na literatura [Sy, Saunders *et al.*, 1997 e Anjaneyulu, Prasad *et al.*, 1985] para triterpenos da série cicloartano (Tab. 6.36, p. 253) indicaram que os componentes da mistura eram, respectivamente, os ácidos *trans*-3 α -hidróxi-24-cicloarteno-26-óico (ácido magniferólico) e 3 α -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico, isolados de *Scaptotrigona postica* [Assunção, 2004]. Ambos estão sendo relatados pela primeira vez para *Trigona*.



TS-1A (13a)



TS-1B (13b)

Estruturas propostas para **TS-1A** ácido *trans*-3 α -hidróxi-24-cicloarteno-26-óico (ácido magniferólico) e **TS-1B** (ácido 3 α -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico)

Tabela 6.36 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-1A (CDCl_3 , 125 MHz) com os do ácido magniferólico [Sy *et al.*,1997] e de TS-1B com os do 3 β -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico [Anjaneyulu *et al.*,1985].

	TS-1A	Ácido magniferólico	TS-1B	Ácido 3 β -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico
C				
4	39,77	39,6	39,77	39,6
9	20,05	19,8	20,05	20,1
10	26,70	26,5	26,70	25,9
13	45,54	45,3	45,54	45,3
14	49,14	49,0	49,14	48,8
24	--	--	145,98	151,6
25	126,83	126,6	--	---
26	173,23	172,6	180,22	179,5
CH				
3	77,30	77,1	77,30	80,6
5	41,30	41,1	41,30	47,1
8	48,23	48,1	48,23	47,8
17	52,40	52,2	52,40	52,1
20	36,21	36,0	36,21	36,8
24	145,97	145,8	--	--
25	--	--	45,54	36,0
CH₂				
1	27,70	27,5	31,88	31,7
2	28,79	28,6	28,79	26,8
6	21,30	21,2	21,30	21,0
7	25,88	25,7	25,88	28,0
11	26,50	26,3	26,50	25,8
12	33,12	32,9	33,12	35,5*
15	35,71	35,5	35,71	32,8*
16	28,35	28,2	28,35	26,5
19	30,00	29,9	30,00	29,7
22	35,03	34,8	35,03	31,6
23	26,14	26,0	26,14	34,7
31	--	---	111,26	109,0
CH₃				
18	18,34	18,1	18,24	17,9
21	18,24	18,0	18,51	18,3
27	12,18	12,0	18,34	18,2
28	26,06	25,9	19,51	19,3
29	21,44	21,3	26,06	25,4
30	19,51	19,3	16,53	15,1

6.2.2 - Identificação Estrutural de TS-2

Do tratamento cromatográfico (cromatografia filtrante) da fração TSCE-PC-AB, (Flux. 7.8, p. 306), proveniente do particionamento do extrato etanólico de *T.spinipes*, TSCE, foi isolada uma substância de coloração amarela, em pó, p.f. = 292,6 – 295,0° C, cuja denominação foi **TS-2**

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 6.89) apresentou uma banda larga em 3234 cm^{-1} , correspondente à deformação axial da ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila com ligação intramolecular; uma absorção em 1657 cm^{-1} , relativa à deformação axial da ligação C=O, atribuída a uma carbonila α,β bi-conjugada. As bandas esqueléticas de deformações axiais das ligações C=C foram registradas em 1616, 1560 e 1510 cm^{-1} , enquanto as absorções em 1243, 1210, 1166, 1121 e 1032 cm^{-1} foram relacionadas a deformações axiais de C-O. As absorções registradas em 863, 821 e 791 cm^{-1} , foram atribuídas a deformações angulares das ligações C-H dos anéis aromáticos

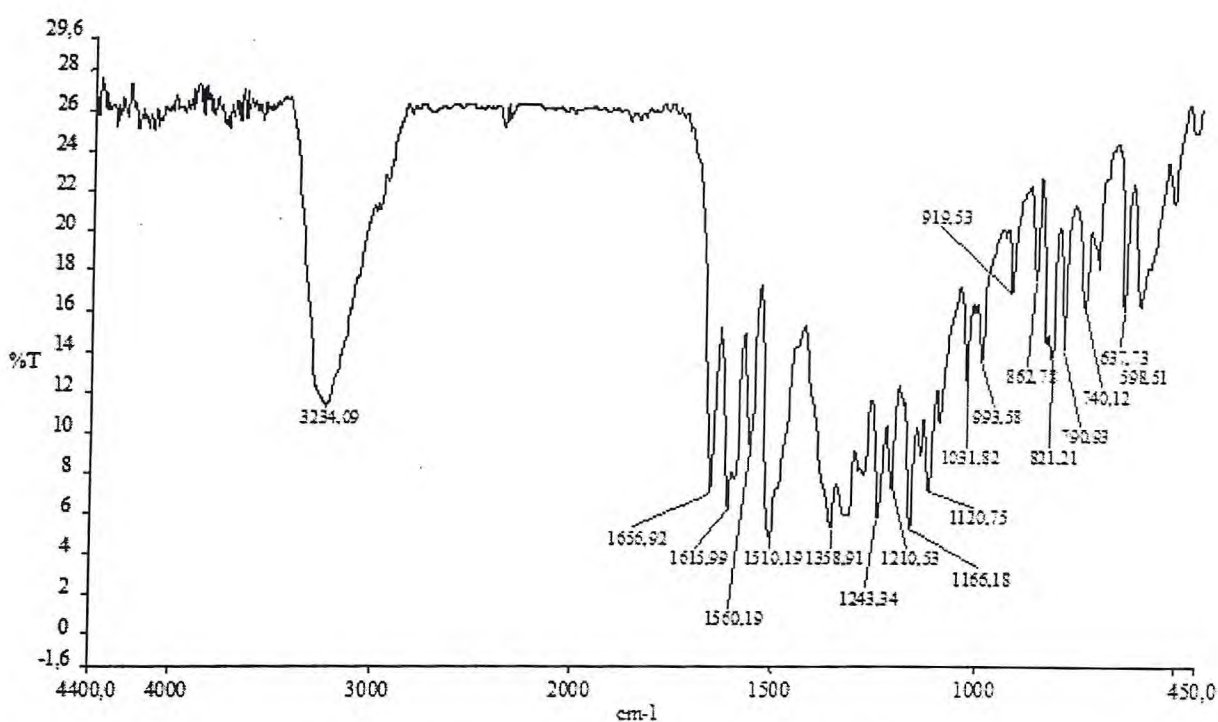


Figura 6.89 – Espectro de absorção na região do IV, em KBr, de TS-2

O espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) de TS-2 (Fig. 6.90), apresentou sinais característicos de prótios aromáticos situados em δ 8,30 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), 8,18 (1H, dd, $J = 8,3$ e 1,8 Hz), 7,36 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), possivelmente pertencentes ao mesmo anel, sugerindo a presença de substituintes nas posições 1', 3' e 4', posto que foram observados dois acoplamentos *orto*, possivelmente dos prótios vicinais em H-5' e H-6', e *meta/para*, com o prótio H-2'. Os outros sinais dos prótios em δ 6,87 (1H, d, $J = 1,4$ Hz) e 6,76 (1H, d, $J = 1,4$ Hz), cujo valor de J é característico de acoplamento *meta*, determinou o padrão de substituição do outro anel aromático, que possivelmente se encontra tetra-substituído. Os demais sinais de prótios em δ 13,34 (1H, s) e em 3,88 (3H, s), foram atribuídos a prótios de hidroxila quelada e do grupamento metoxila, respectivamente.

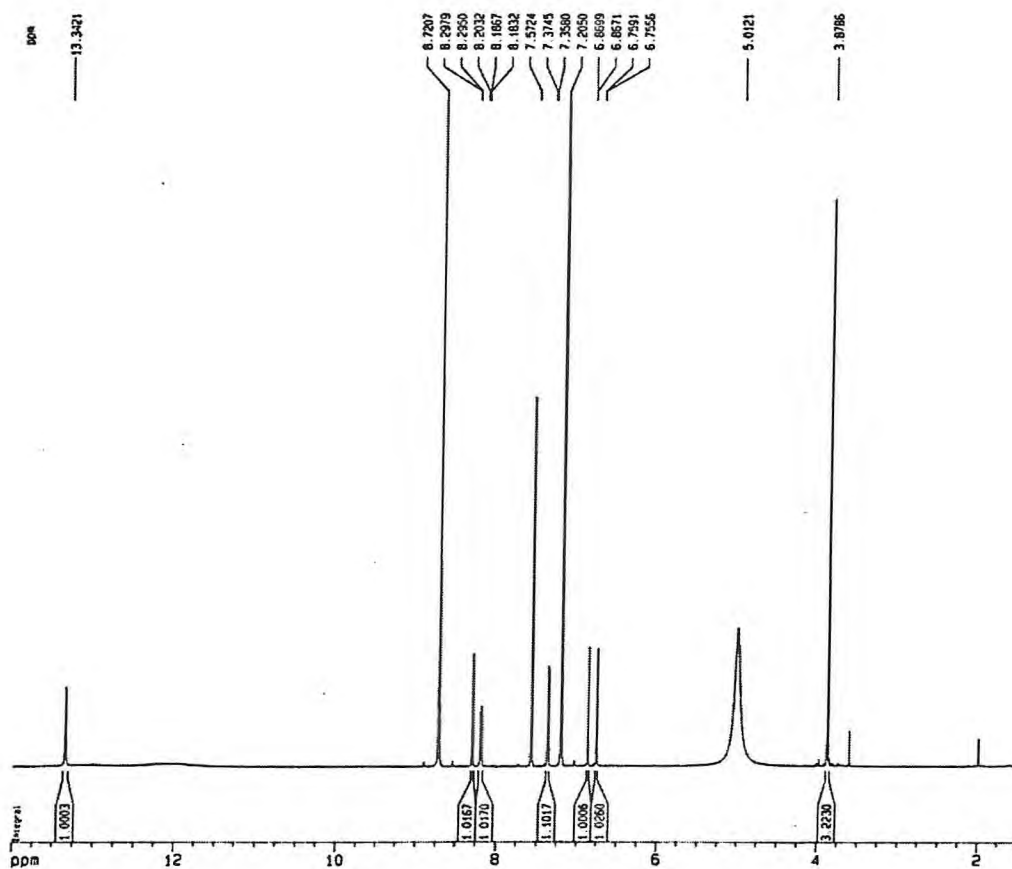


Figura 6.90 - Espectro de RMN ^1H de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz)

A análise do espectro de RMN ^{13}C -CPD ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) de TS-2 (Fig. 6.91, p. 257), possibilitou observar treze linhas espectrais e após expansão, dezesseis, correspondentes a dezesseis carbonos.

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi estabelecido comparando os espectros de RMN ^{13}C -CPD e o espectro RMN HMQC (Fig. 6.93, p. 259), possibilitando a formulação da Tabela 6.37. Dentre as linhas espectrais observadas, dez foram atribuídas a carbonos não-hidrogenados (C), cinco metínicos (CH) e um metílico (CH_3).

Tabela 6.37 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-2 com padrão de hidrogenação RMN ^{13}C -BB e HMQC, ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz)

C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
177,69	123,20		56,36	
165,96	116,99			
162,82	113,03			
157,85	99,63			
150,76	94,80			
148,81				
147,87				
138,30				
123,43				
104,83				
C_4	$\text{C}_5 \text{H}_5$		O-CH_3	
C=O				
$(\text{C-OH})_4$				
C-O				$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$

A teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] possibilitou sugerir que o sinal em δ 177,69, seria provavelmente de uma carbonila de anel pirânico, insaturada nas posições α e β . Aos sinais de carbonos não-hidrogenados, somente dois, em δ 123,43 e 104,83 eram sp^2 não oxigenados, os demais, na faixa de 165,96 a 138,30, eram carbonos sp^2 ligados a oxigênio. Aos sinais de carbonos metínicos pôde-se sugerir que todos eram sp^2 . Para o sinal em δ 56,36, sugeriu-se pertencer a uma metoxila.

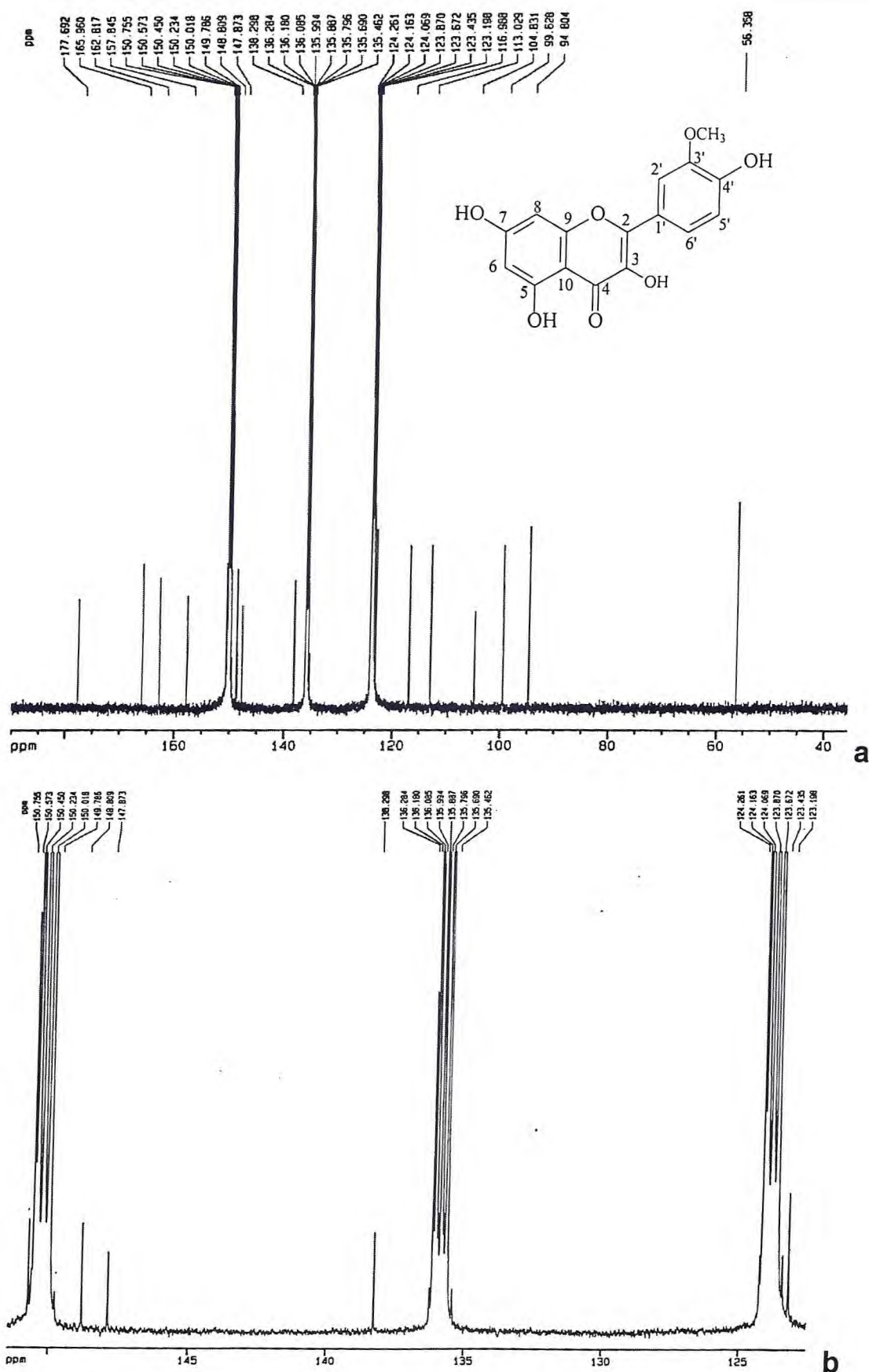
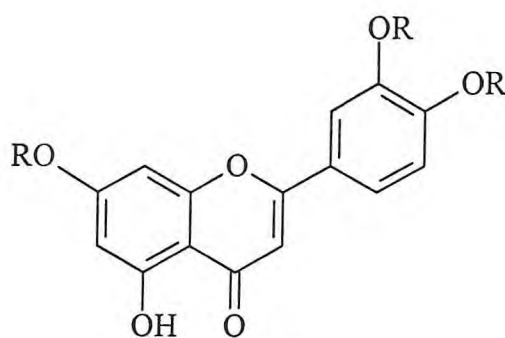


Figura 6.91 – a) Espectro de RMN ¹³C-CPD de TS-2 (C₅H₅N, 125 MHz) b) Expansão do espectro de RMN ¹³C-CPD de TS-2 na região de δ 123,00 a 151,00 (CD₃OD, 500 MHz)

A análise realizada, até o momento, levou a proposição da fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$, com 11 índices de deficiência de hidrogênio (IDH=11), sugerindo que o composto tratava-se de uma flavona, dada a ausência de carbono metilênico e a presença de mais uma dupla ligação, sugerindo-se a estrutura parcial TS-2a.



TS-2a

Estrutura parcial para TS-2

O espectro de massa (Fig. 6.92) apresentou o pico do íon molecular em m/z 316, justificando a fórmula molecular sugerida.

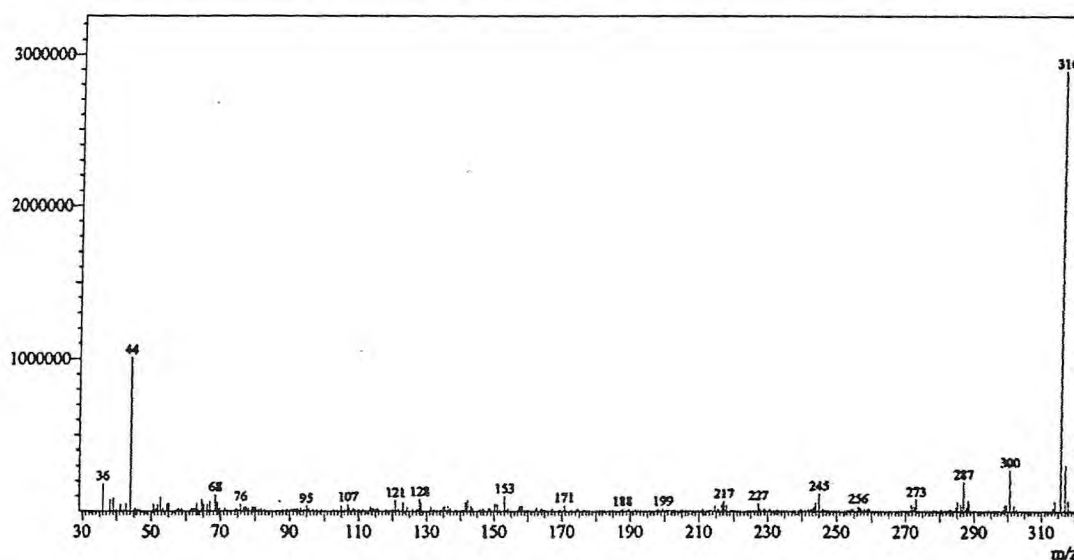


Figura 6.92 – Espectro de massa de TS-2 (IE, 70 eV)

O espectro de RMN HMQC (Fig. 6.93) de TS-2 forneceu informações sobre os acoplamentos dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos, de forma inequívoca (Tab. 6.38, p. 262).

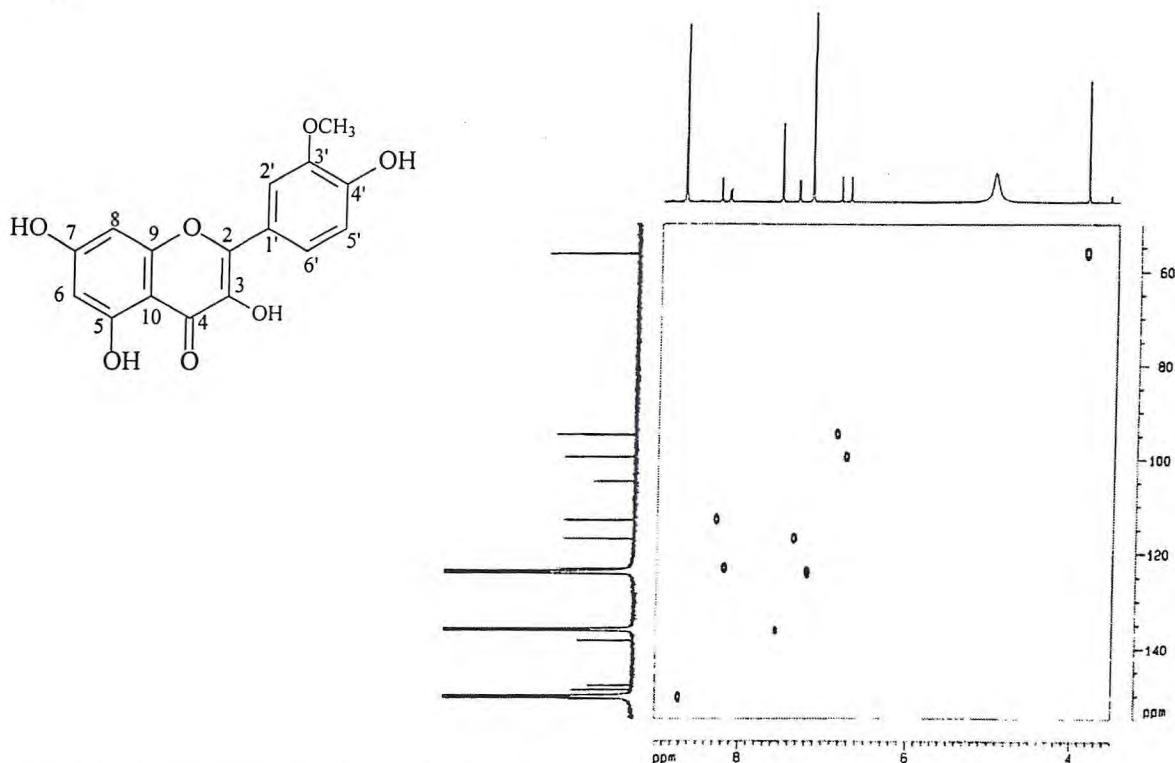
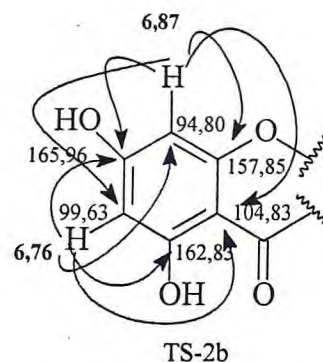


Figura 6.93 – Espectro de RMN HMQC de TS-2 (C_5H_5N , 500 MHz, 125 MHz)

A análise do espectro de RMN HMBC (Fig. 6.94, p. 260) possibilitou determinar a estrutura proposta por meio das correlações entre os sinais dos prótios e dos carbonos observadas a duas ou três ligações. Então, as posições dos hidrogênios, no anel A, foram confirmadas por meio dos acoplamentos $^2J_{CH}$ dos prótios em δ 6,87 (H-8), representados na subestrutura TS-2b, com os carbonos em δ 165,96 (C-7) e 157,85 (C-9), bem como a $^3J_{CH}$ em δ 104,8 (C-10) e 99,63 (C-6), e do prótio em δ 6,76 (H-6), com carbonos, a $^2J_{CH}$, em δ 165,96 (C-7) e 162,83 (C-5), além de $^3J_{CH}$ em δ 104,83 (C-10) e 94,80 (C-8), o que determinou a localização das duas hidroxilas em C-5 e C-7, respectivamente.



Subestrutura TS-2b com representação de acoplamentos observados no HMBC

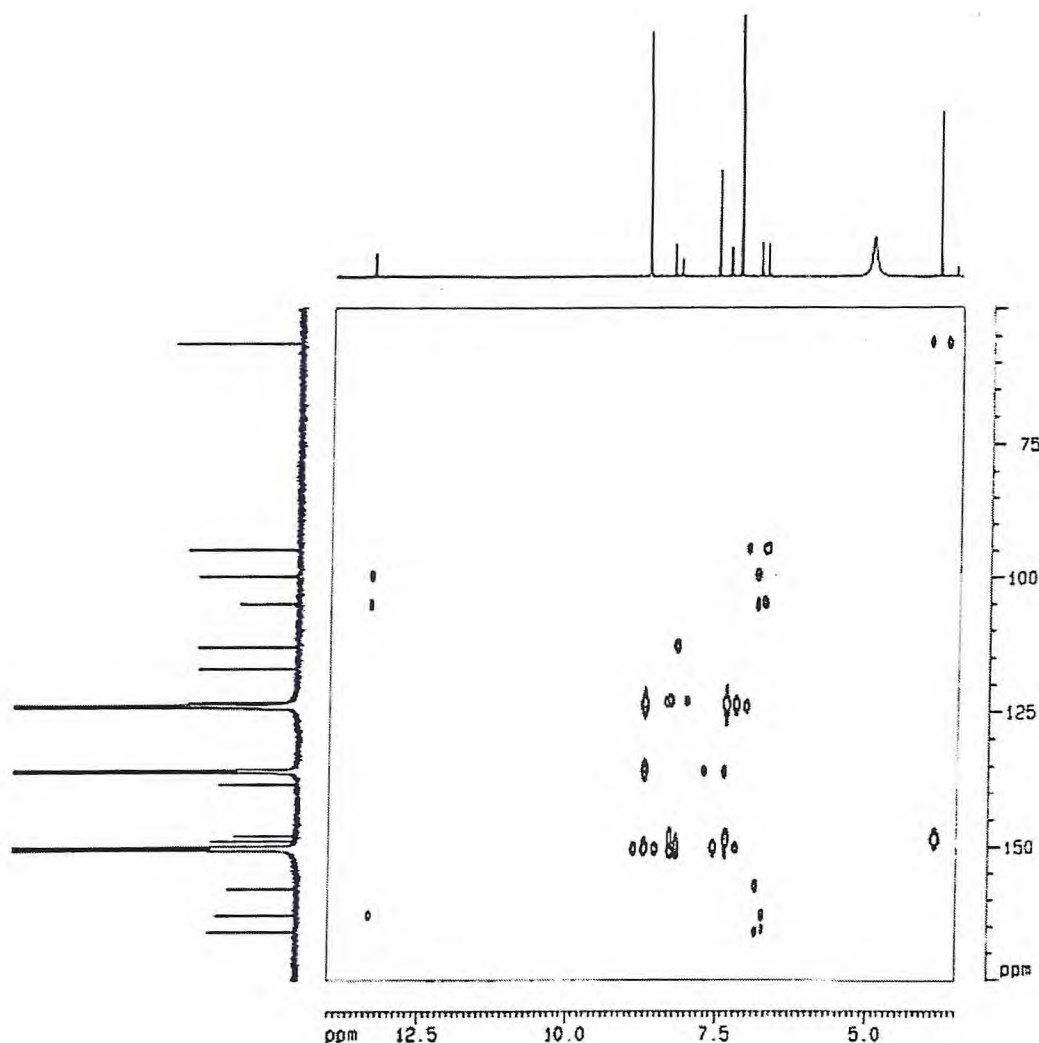
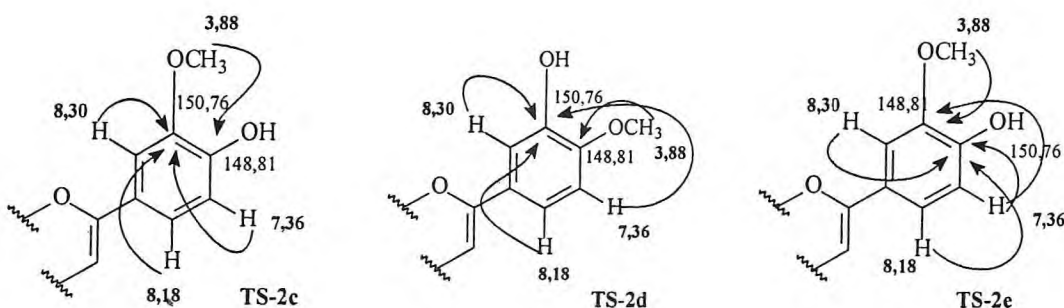


Figura 6.94 – Espectro de RMN HMBC de TS-2 (C_5H_5N , 500 MHz, 125 MHz)

A conectividade entre o anel B e o C da flavona foi justificado pela correlação observada entre o sinal do prótio em δ 8,30 (H-2') com o sinal do carbono em δ 147,87 (C-2) (Tab. 6.38, p. 262).

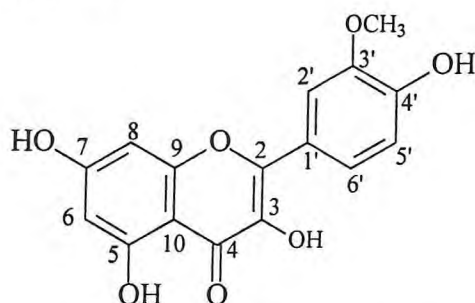
Para estabelecer a correlação inequívoca dos carbonos C-3' e C-4', foram propostas as subestruturas TS-2c, TS-2d e TS-2e. Assim, a subestrutura TS-2c, na qual a metoxila estava ligada ao C-3', foi descartada por não ser possível o acoplamento observado entre o prótio em δ 3,88 com o carbono em 148,81 (C-4). Já a subestrutura TS-2d, para a qual foi sugerida a troca da posição da metoxila para o C-4', foi rejeitada por apresentar o prótio em δ 8,18 (H-6') acoplado 4J com o carbono em 150,76 (C-3). Enquanto TS-2e, cujos valores atribuídos a C-3' e C-4' pela literatura, foram permutados, satisfizeram a correlação do sinal do prótio em

δ 3,88 (H-OCH₃) com o sinal em 148,81 (C-3'), bem como os acoplamentos dos sinais em δ 8,30 (H-2') e 8,18 (H-6') com aquele em δ 150,76 (C-4').



Subestruturas propostas para TS-2 com a representação dos acoplamentos vistos nos espectros de RMN HMBC que justificariam as posições de C-3' e C-4'.

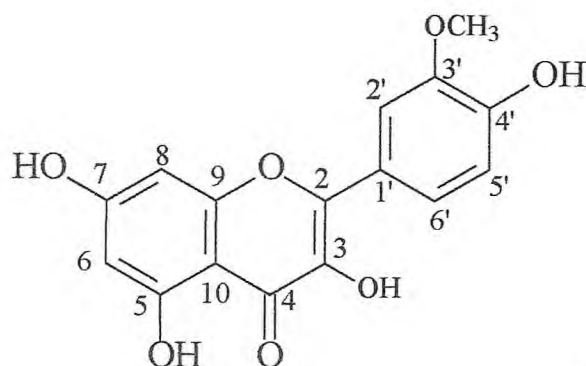
A compilação dos dados, reunidos na Tabela 6.39 (p.263), conduziu à proposição da flavonol 3'-metil-quercetina (**14**) (isorhamnetina) para TS-2, a qual já havia sido isolada anteriormente de *Scaptotrigona bipunctata* [Lins; Silva *et al.*, 2003], mas que está sendo descrita pela primeira vez para *Trigona*.



Estrutura de TS-2: 3'-metil-quercetina (**14**)

Tabela 6.38 - Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de TS-2.

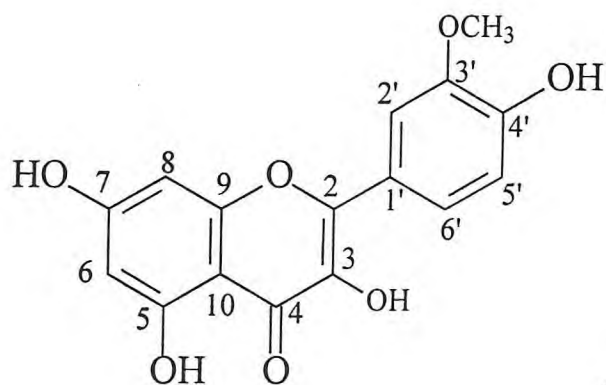
Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
2	147,87			H-2'
3	138,30			
4	177,69			
5	162,83		H-6	
6	99,63	6,76 (d, $J=1,4$ Hz)		H-8
7	165,96		H-6; H-8	
8	94,80	6,86 (d, $J=1,4$ Hz)		H-6
9	157,85		H-8	
10	104,83			H-6; H-8
1'	123,43		H-2'	H-5'
2'	113,03	8,30 (d, $J=1,5$ Hz)		H-6'
3'	148,81		H-2'	H-5'; 3H-OCH ₃
4'	150,76		H-5'	H-2'; H-6'
5'	116,99	7,36 (d, $J=8,3$ Hz)		
6'	123,20	8,18 (dd, $J=8,3$ e 1,5 Hz)	H-5'	H-2'
OCH ₃	56,36	3,88 (s)		



(14)

Tabela 6.39 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-2 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) com os dados da 3'-metil-quercetina (14) ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz) [Agrawal, 1989].

C	TS-2	3'-metil-quercetina [Agrawal, 1989]
2	147,87	147,10
3	138,30	136,1
4	177,69	176,3
5	162,83	161,2
6	99,63	98,6
7	165,96	164,4
8	94,80	93,9
9	157,85	156,8
10	104,83	103,5
1'	123,43	
2'	113,03	112,7
3'	148,81	149,4
4'	150,76	147,9
5'	116,99	116,0
6'	123,44	122,2



(14)

6.2.3 – Identificação Estrutural de TS-3 (ECK-1)

Do tratamento cromatográfico da fração TSCE-PC-AAAd (Flux. 7.9, p. 307) obtida do particionamento do extrato etanólico de *T. spinipes*, TSCE, após sucessivas cromatografias, foi isolada uma substância de coloração amarela, solúvel em metanol, solúvel em piridina, p.f. = 74,9-76,1°, cuja denominação foi TS-3.

Foram observados no espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de TS-3 (Fig. 6.95) dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos em δ 7,30 (2H, d, $J=8,6$ Hz) e 6,82 (2H, d, $J=8,6$) característicos de anéis aromáticos *para*-substituídos. Este acoplamento é referente aos hidrogênios que acoplam em posição *orto*. As absorções em δ 6,04 (2H, m), na região de aromáticos, foram atribuídas a acoplamento *meta*. Observou-se um sinal em 5,37 (1H, dd, $J=13$ e 3 Hz) sugestivo de hidrogênio ligado a carbono oxigenado, e sinais em δ 3,15 (1H, dd, $J=17$ e 13 Hz) e δ 2,73 (1H, dd, $J=17$ e 3 Hz), ambos ligados ao mesmo carbono.

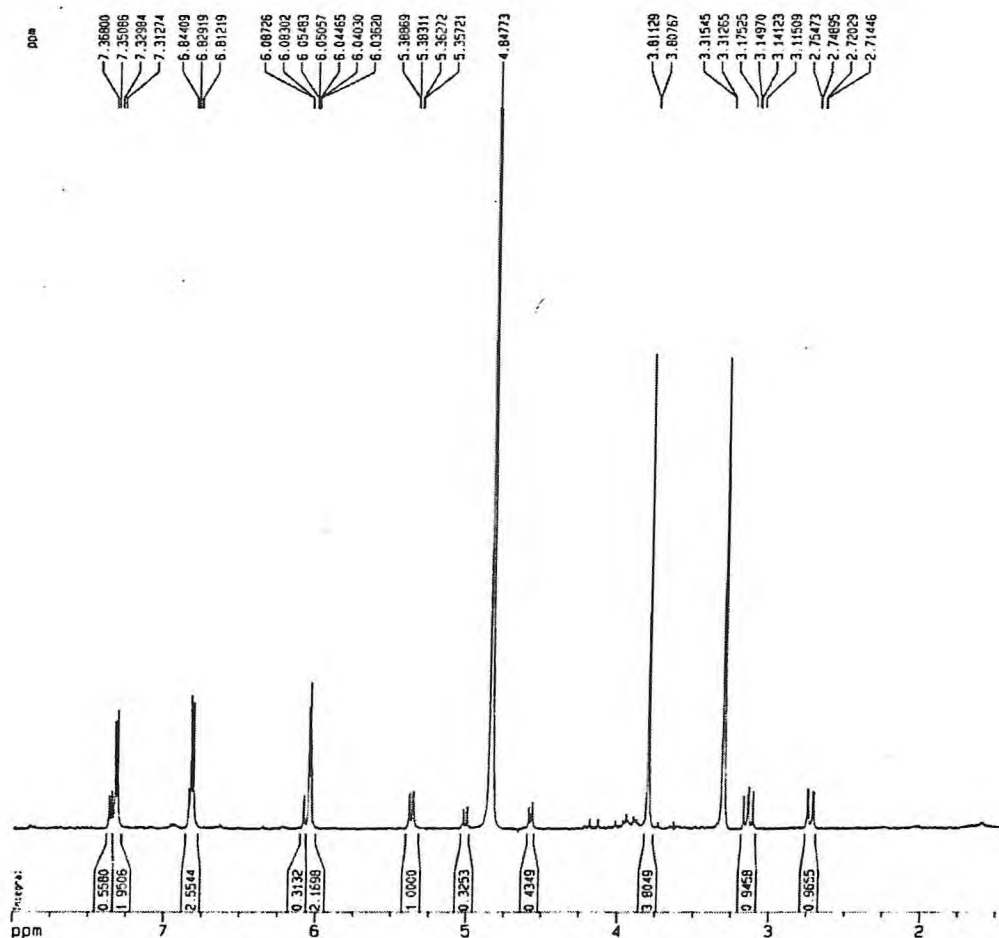
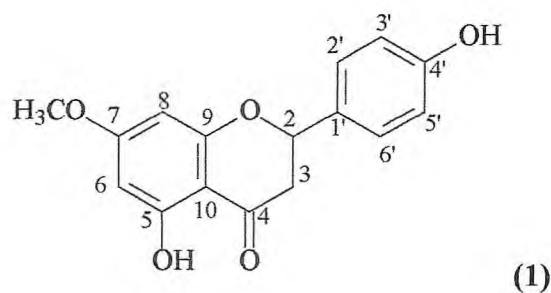


Figura 6.95 – Espectro de RMN ^1H de TS-3 (CD_3OD , 500 MHz)

Tabela 6.40 - Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-3 (δ , CD_3OD , 500 MHz) com os dados de ECK-1 (δ , CDCl_3 , 300 MHz)

Prótons	TS-3	ECK-1
2	5,37(dd, $J=13$ e 3 Hz)	5,34 (dd, $J=13$ e 3 Hz)
3	3,15 (dd, $J=17$ e 13 Hz)	3,16 (dd, $J=17$ e 13 Hz)
	2,73 (dd, $J=17$ e 3 Hz)	2,71 (dd, $J=17$ e 3 Hz)
6	6,04 (m)	6,02 (m)
8	6,04 (m)	6,02 (m)
2' e 6'	7,32 (d, $J=8,5$ Hz)	7,30 (d, $J=8,6$ Hz)
3' e 5'	6,82 (d, $J=8,5$ Hz)	6,82 (d, $J=8,6$ Hz)
C=O (Ac)	3,81 (s)	3,79 (s)

A pequena quantidade isolada desta substância permitiu que somente o espectro de prótio fosse obtido, porém foi suficiente para confirmar de que se tratava de uma das substâncias isoladas do “kino” do *E. citriodora*, em estudo (ver elucidação estrutural de ECK-1, p. 122), denominada 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona (**1**) (sakuranetina ou naringenina-7-metil éter). A literatura relata o isolamento desta substância para espécies tais como *Apis mellifera* [Park, Koo *et al*, 1997], porém é a primeira vez que se reporta ao gênero *Trigona*.



Estrutura proposta para TS-3: 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona (sakuranetina).

6.2.4 - Identificação Estrutural de TS-4 (ECK-5)

Do tratamento cromatográfico da fração TSCE-PC-AAf, (Flux. 7.9, p. 307) obtida do particionamento do extrato etanólico de *T. spinipes*, TSCE, após sucessivas cromatografias, foi isolada uma substância de coloração amarela, p.f. = 215,0 – 218,2°C, cuja denominação foi TS-4.

A análise do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) de TS-4 (Fig. 6.96), revelou sinais característicos de sistema aromático *para*-substituído, a partir das absorções em δ 8,57 (2H, d, $J = 8,6$) e 7,37 (2H, d, $J = 8,6$). Os sinais em δ 6,74 (1H, s) e 6,63 (1H, s) foram atribuídos a prótios com acoplamento *meta*. Um sinal observado em 13,25 (1H, s) foi relacionado a um prótio de hidroxila quelada, enquanto que o singlete posicionado em δ 3,80 (3H, s) foi relacionado a um grupamento metoxila. Estes dados mostraram-se muito semelhantes aos de ECK-5, também analisada neste trabalho (p. 163). A comparação dos dados de RMN de prótios entre as duas encontra-se descrita na Tabela 6.41 (p. 267).

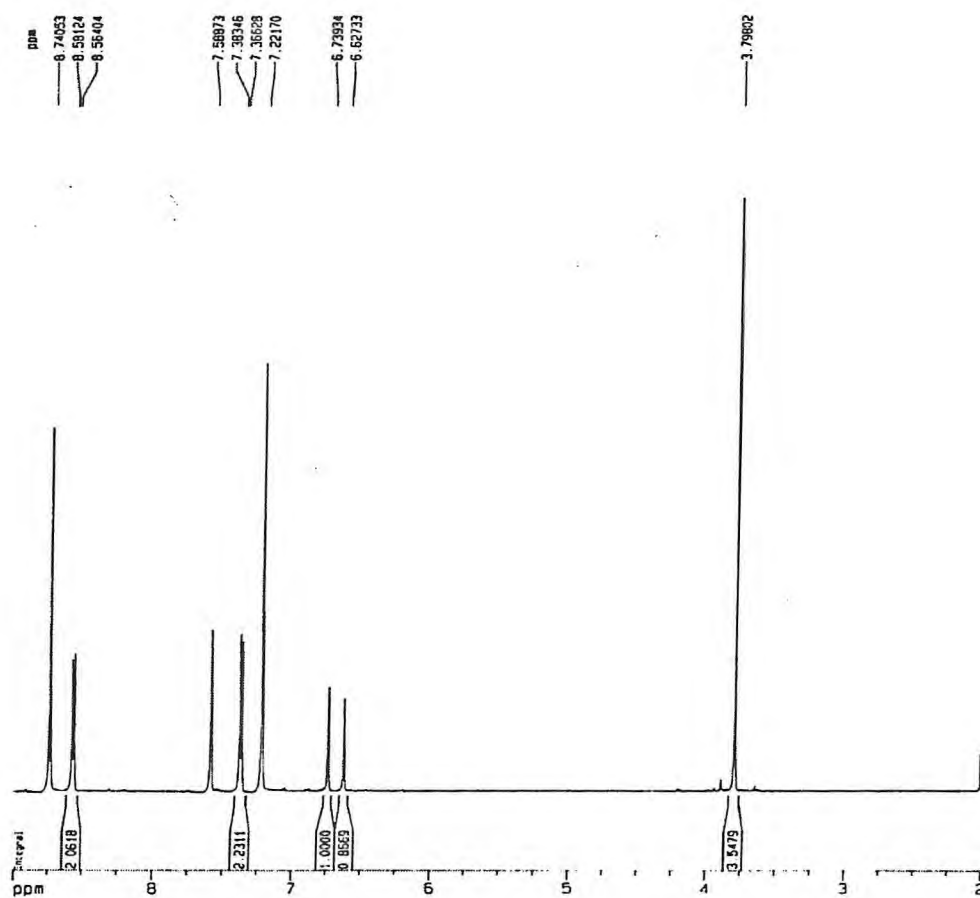


Figura 6.96 – Espectro de RMN ^1H de TS-4 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz)

Tabela 6.41 - Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-4 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) os dados de ECK-5 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz)

Prótons	TS-4	ECK-5
6	6,63 (s)	6,62 (s)
8	6,74 (s)	6,73 (s)
2' e 6'	8,57 (d, $J=8,6$ Hz)	8,57 (d, $J=8,5$ Hz)
3' e 5'	7,37 (d, $J=8,6$ Hz)	7,37 (d, $J=8,5$ Hz)
OCH_3	3,81 (s)	3,79 (s)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 6.97) de TS-4 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) exibiu catorze linhas espectrais referentes a dezesseis carbonos, visto que os sinais em δ 131,72 e 116,87 foram atribuídos a dois carbonos cada, posto que em sistemas para-substituído existem dois grupos de carbonos magneticamente equivalentes. O sinal em δ 123,55 somente pôde ser observado por meio da expansão do espectro, pois foi sobreposto pelo sinal do solvente.

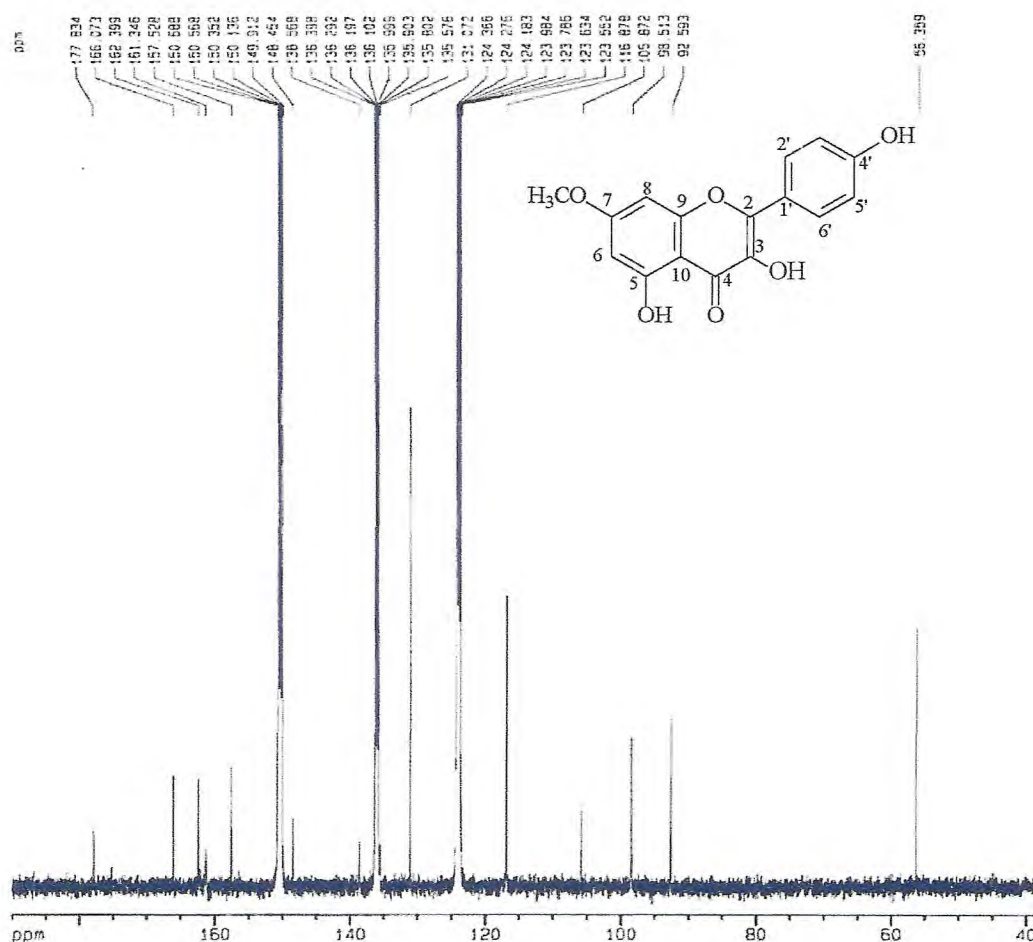
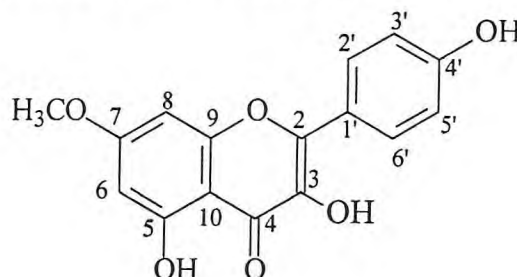


Figura 6.97 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 125 MHz)

Foi realizada a comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 (Tab. 6.42) com os valores de ECK-5 (ver determinação estrutural de ECK-5, p.) e juntamente com a comparação dos dados de RMN ^1H de TS-4 com os correspondentes dados de ECK-5, indicou a identidade entre as duas substâncias, ou seja, TS-4 trata-se da 3,5,4'-triidroxi-7-metoxiflavonol (kampferol7-metil éter), relatada pela primeira vez para *Trigona*.



Estrutura proposta para TS-4: 3,5 4'-triidroxi-7-metoxiflavonol

Tabela 6.42 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de TS-4 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz) com os dados de ECK-5 (δ , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 500 MHz).

Carbono	TS-4	ECK-5
2	148,45	148,37
3	138,56	138,50
4	177,83	177,76
5	162,40	162,30
6	98,51	98,20
7	166,07	165,97
8	92,60	92,49
9	157,53	157,43
10	105,87	105,78
1'	123,55	123,54
2'	131,07	130,98
3'	116,88	116,80
4'	161,35	161,27
5'	116,88	116,80
6'	131,07	130,98
CH_3O	56,36	56,27

6.2.5 Identificação Estrutural de TS-5

Obteve-se do tratamento cromatográfico da fração TSCE-PC-AF (Flux. 7.10, p. 310), proveniente da fração clorofórmica, originada do particionamento do extrato etanólico, TSCE, de *Trigona spinipes*, um sólido amarelo, p.f. = > 300°C, sendo denominado **TS-5**.

O espectro de RMN de prótio (CD₃OD, 500 MHz) desta substância (Fig. 6.98) apresentou quatro sinais na região de aromáticos, sendo dois singletos em δ 6,98 (2H) e 6,48 (1H) e dois dubletos em δ 6,42 (1H, d, $J = 2$ Hz) e 6,20 (1H, d, $J = 2$ Hz), estes sugeriram acoplamento *meta* entre si.

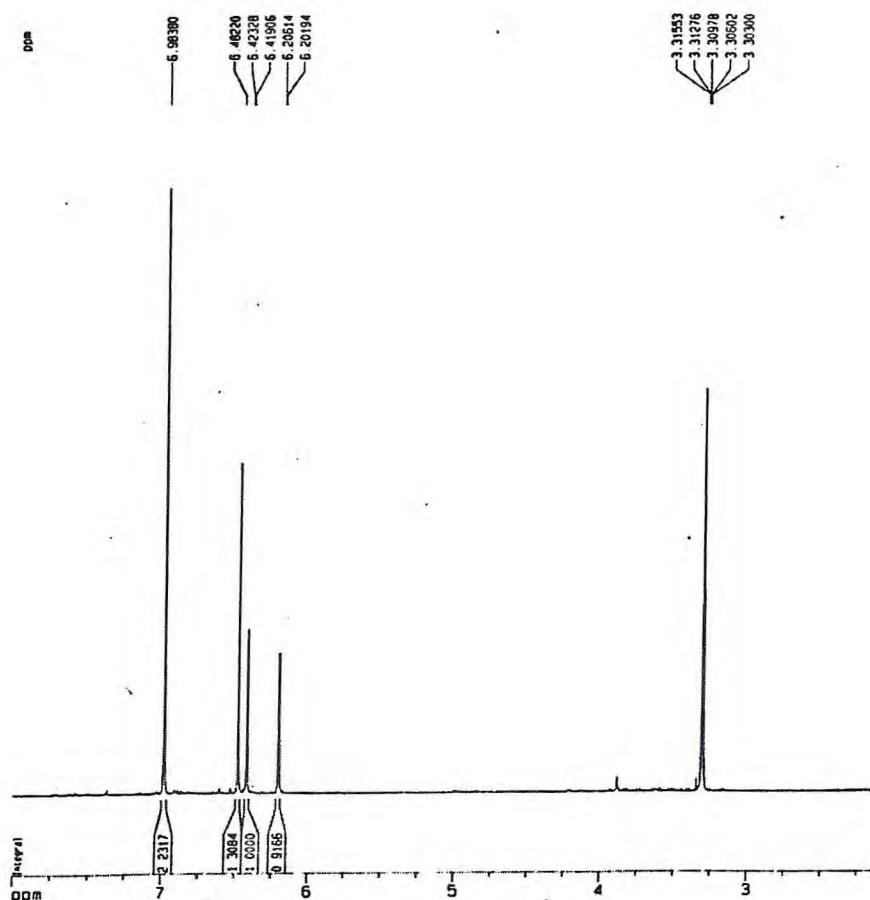


Figura 6.98 – Espectro de RMN ¹H de TS-5 (CD₃OD, 500 MHz)

A análise do espectro de RMN ¹³C-CPD (CD₃OD, 125 MHz) de TS-5 (Fig. 6.99, p. 271), revelou a presença de treze linhas espectrais atribuídos a quinze átomos de carbono, posto que os sinais em δ 147,56 e 106,91, foram relacionados a dois carbonos magneticamente equivalentes.

A comparação realizada entre os espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT

135° (Fig. 6.100, p. 271), possibilitou estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos, como também permitiu a elaboração da Tabela 6.43, na qual pôde-se observar que dentre os carbonos haviam dez não-hidrogenados (C) e cinco metínicos (CH).

Tabela 6.43 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de TS-5 com padrão de hidrogenação. (RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135°, δ , CD_3OD , 125 MHz)

δ C	CH	CH_2	CH_3	TOTAL
183,98	106,91 (X2)			
166,64	104,04			
166,23	100,27			
163,35	95,12			
159,56				
147,56 (X2)				
139,20				
122,80				
105,43				
C_3	C_5H_5			
$(\text{C-OH})_5$				
C=O				
C-O				$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$

A utilização da teoria dos deslocamentos químicos [Silverstein, 1994] permitiu sugerir que o sinal em δ 183,98 seria de uma carbonila de cetona conjugada. Aqueles localizados entre δ 166,64 e 105,43 sugeriram pertencer a carbonos sp^2 oxigenados e não-hidrogenados, excetuando-se o sinal em δ 122,79, por não ser oxigenado. Os demais sinais entre 106,91 e 95,12, seriam de carbonos sp^2 metínicos.

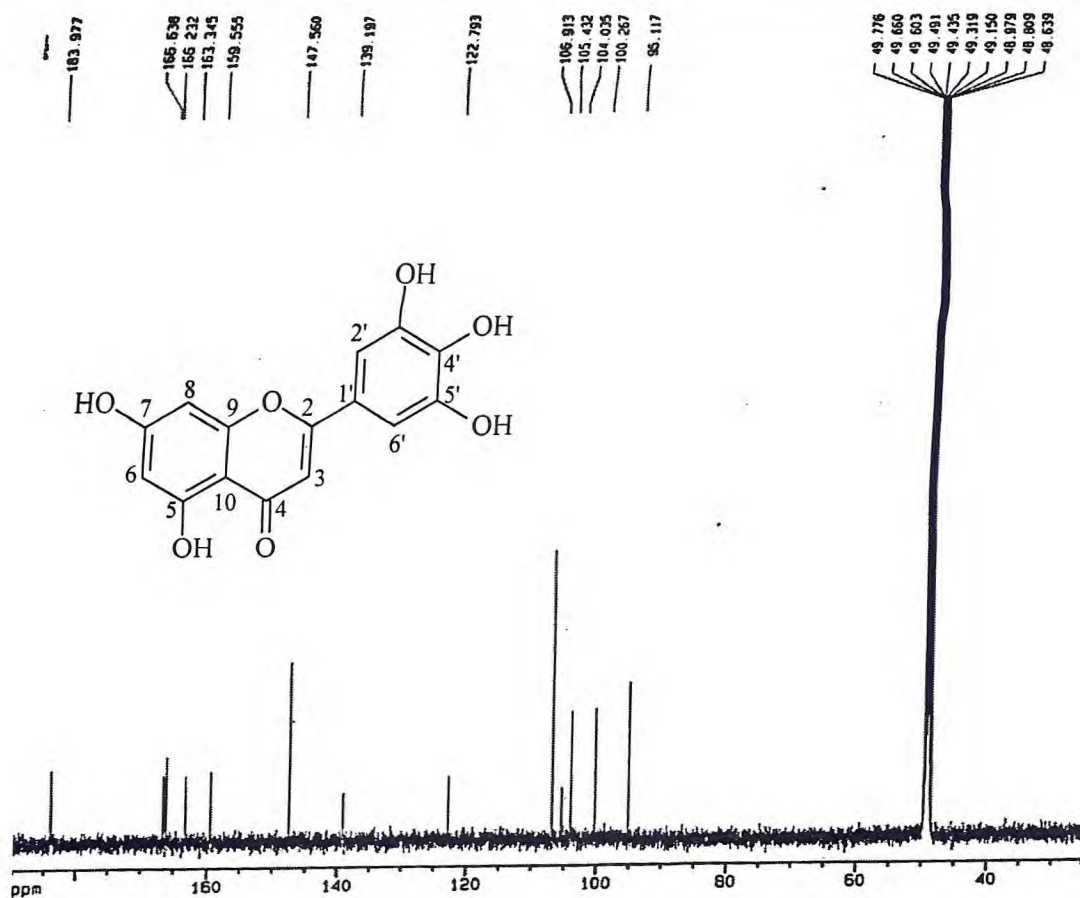


Figura 6.99 – Espectro de RMN ¹³C-CPD de TS-5 (CD₃OD, 125 MHz)

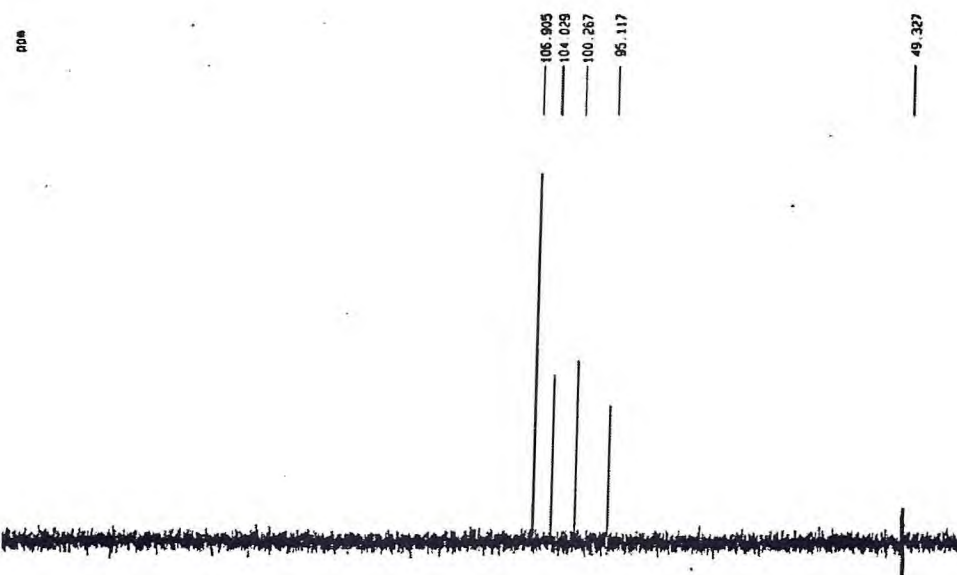


Figura 6.100 – Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de TS-5 (CD₃OD, 125 MHz)

Com base nos dados, obtidos dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , TS-5 pareceu tratar-se de uma flavona, com 11 índices de deficiência de hidrogênio (IDH=11), distribuídos entre os dois anéis aromáticos (8 IDH), uma carbonila (1 IDH), o anel C e a dupla ligação nele contida (2 IDH). O IDH foi calculado por meio da fórmula molecular sugerida, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

O espectro de RMN HMQC (Fig. 6.101), foi utilizado na correlação inequívoca entre os prótios e seus respectivos carbonos, vide Tabela 6.44 (p. 275), entretanto a ausência de acoplamentos provenientes das posições 3', 4' e 5', sugeriram a ausência de prótios nestes locais, induzindo propor que o anel B encontrava-se tetra-substituído, o que reforçou a afirmação feita anteriormente, na qual o sinal em δ 147,56 fora atribuído a dois carbonos.

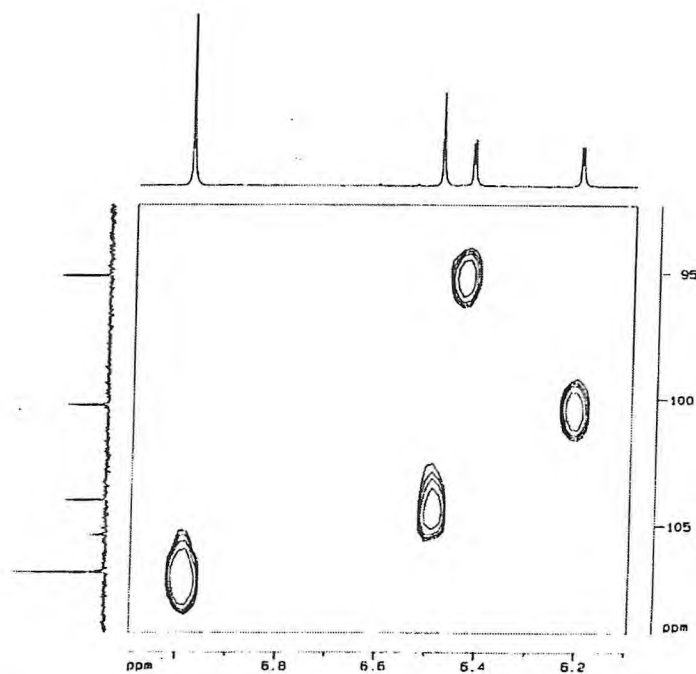
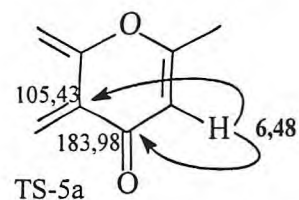


Figura 6.101 – Espectro de HMQC de TS-5 (CD_3OD , 500 MHz, 125 MHz)

Analisando o espectro de RMN HMBC (Fig. 6.102) de TS-5 foi possível comprovar a sugestão de que este composto tratava-se de uma flavona, por meio dos acoplamentos registrados entre o sinal do prótio em δ 6,48 com os sinais de carbono em δ 183,98 (C-4,) e 105,43 (C-10,), a duas e três ligações, respectivamente, representado na subestrutura TS-5a.



Subestrutura TS-5a representando acoplamentos observados no espectro de RMN HMBC

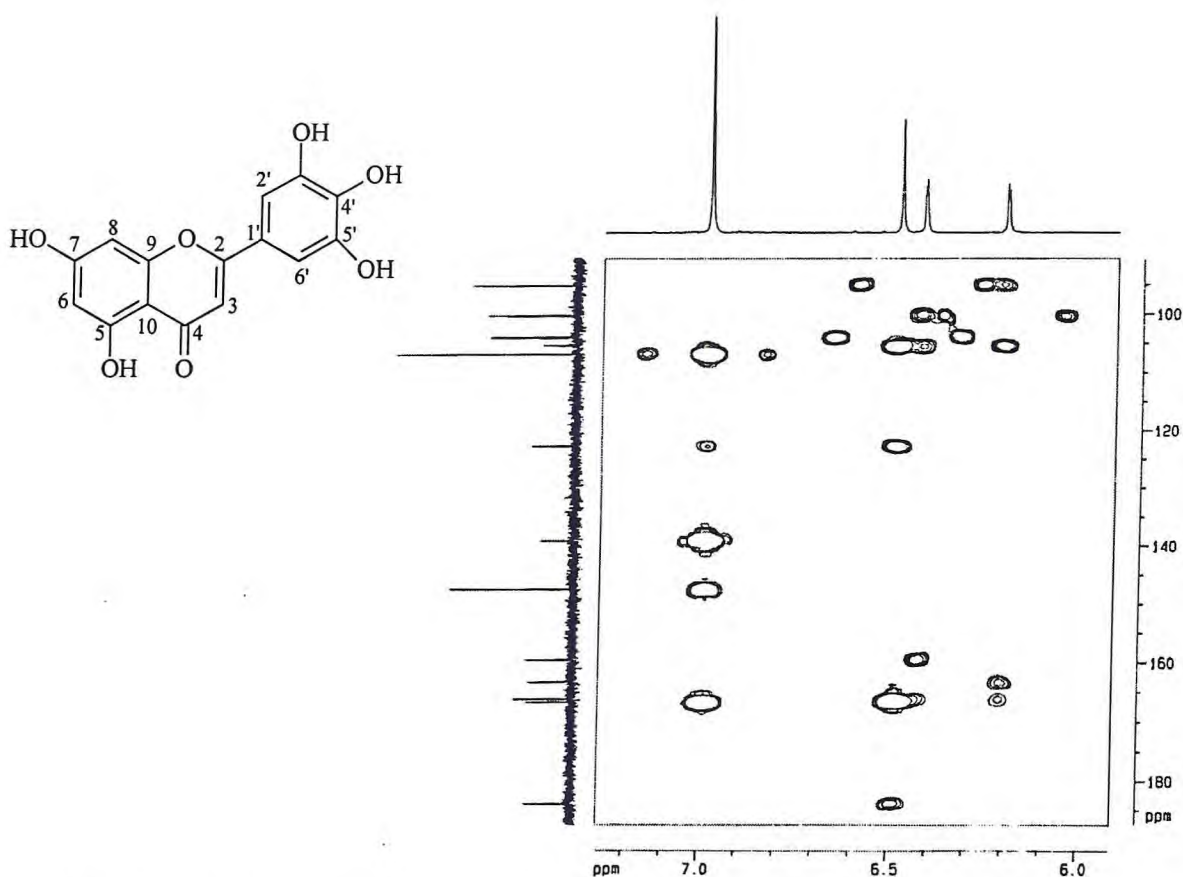
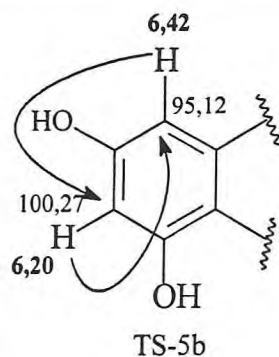
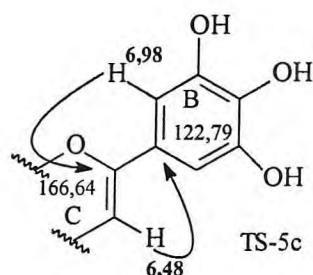


Figura 6.102 – Espectro de HMBC de TS-5 (CD₃OD, 500 MHz, 125 MHz)

As correlações observadas entre os prótios em δ 6,20 (H-6) e 6,42 (H-8), a três ligações, com os carbonos em δ 95,17 (C-8) e 100,27 (C-6), respectivamente, confirmaram estas posições para estes hidrogênios, posto que pela análise do espectro RMN ¹H, já havia sido proposto acoplamento *meta* para estes (Tab. 6.44, p. 275).



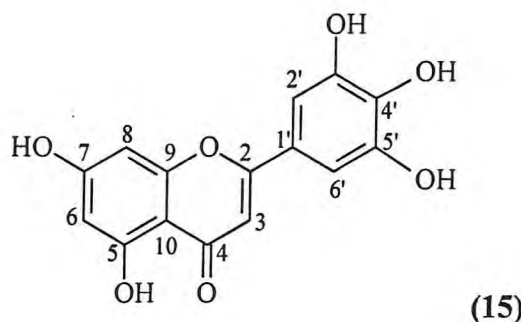
Representação de acoplamentos observados no HMBC para a subestrutura TS-5b



Subestrutura TS-5c justificando a conectividade do anel B ao anel C.

A conectividade do anel B ao anel C foi justificada por meio dos acoplamentos registrados, 3J , entre o prótio em δ 6,98 (H-2', H-6') com o carbono em δ 166,64 (C-2) e J^2 , entre o prótio em δ 6,48 (H-3) com o carbono em δ 122,79 (C-1'), vide subestrutura TS-5c.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C de TS-5 com aqueles publicados na literatura para flavonas (Tab. 6.45, p. 276), indicou que esta substância tratava-se da 5,7,3',4',5'-pentaidroxiflavona, (trictina) (15) já isolada anteriormente do pólen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* [Lins, Silva *et al.*, 2003], porém descrita pela primeira vez para *Trigona*.



Estrutura de TS-5: 5,7,3',4',5'-pentaidroxiflavona, (trictina).

Tabela 6.44 – Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações ^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3) de TS-5.

Carbono	^1H , ^{13}C -HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		^1H , ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e n=3)	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	n=2	n=3
2	166,64		H-3	H-2'; H-6'
3	104,35	6,48 (s)		
4	183,98		H-3	
5	166,23			^4J - H-3
6	100,27	6,20 (d, $J=2\text{ Hz}$)		H-8
7	163,20		H-6	
8	95,17	6,42 (d, $J=2\text{ Hz}$)		H-6
9	159,56		H-8	
10	105,43			H-3; H-6; H-8
1'	122,79		H-2'; H _G	H-3
2', 6'	106,91	6,98 (s)		
3', 5'	147,56		H-2'; H-6	
4'	139,20			H-2'; H-6'

Tabela 6.45 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de TS-5 (δ , CD_3OD , 500 MHz) com os dados de RMN ^{13}C -CPD da tricetina (**15**) (δ , DMSO, 500 MHz)

Carbono	TS-5	Tricetina [Agrawal, 1989]
2	166,64	164,2
3	104,35	103,2
4	183,98	181,6
5	166,23	161,6
6	100,27	99,0
7	163,20	164,2
8	95,17	93,9
9	159,56	157,5
10	105,43	104,0
1'	122,79	120,9
2'	106,91	106,0
3'	147,56	146,5
4'	139,20	137,9
5'	147,56	146,5
6'	106,91	106,0

6.2.6 Identificação Estrutural de TS - 6 (ECK-2)

O tratamento cromatográfico da fração TSPC-AC (Flux. 7.10, p. 310), proveniente de sucessivas cromatografias realizadas a partir do extrato etanólico do ninho de *T. spinipes*, permitiu o isolamento de um sólido branco amarelado, p.f = 182,8-183,9 °C, e foi denominado TS-6.

A análise do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de TS-6 (Fig. 6.103) permitiu observar sinais na região de aromáticos, onde dois deles são atribuídos a sistemas aromáticos *para*-substituídos que evidenciam os sinais de dois hidrogênios, magneticamente equivalentes, acoplando *orto*, em δ 7,35 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) e 6,83 (2H, d, $J = 8,5$ Hz). As absorções em δ 6,08 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e 6,03 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), sugerem pertencer a hidrogênios de anel aromático com acoplamento *meta*, enquanto as absorções em δ 5,01 (1H, d, $J = 11,6$ Hz) e 4,57 (1H, d, $J = 11,6$ Hz) foram atribuídas a prótons ligados a carbonos oxigenados, característicos de um esqueleto diidroflavanol, que pelo valor de J , sugere-se a estereoquímica *trans*.

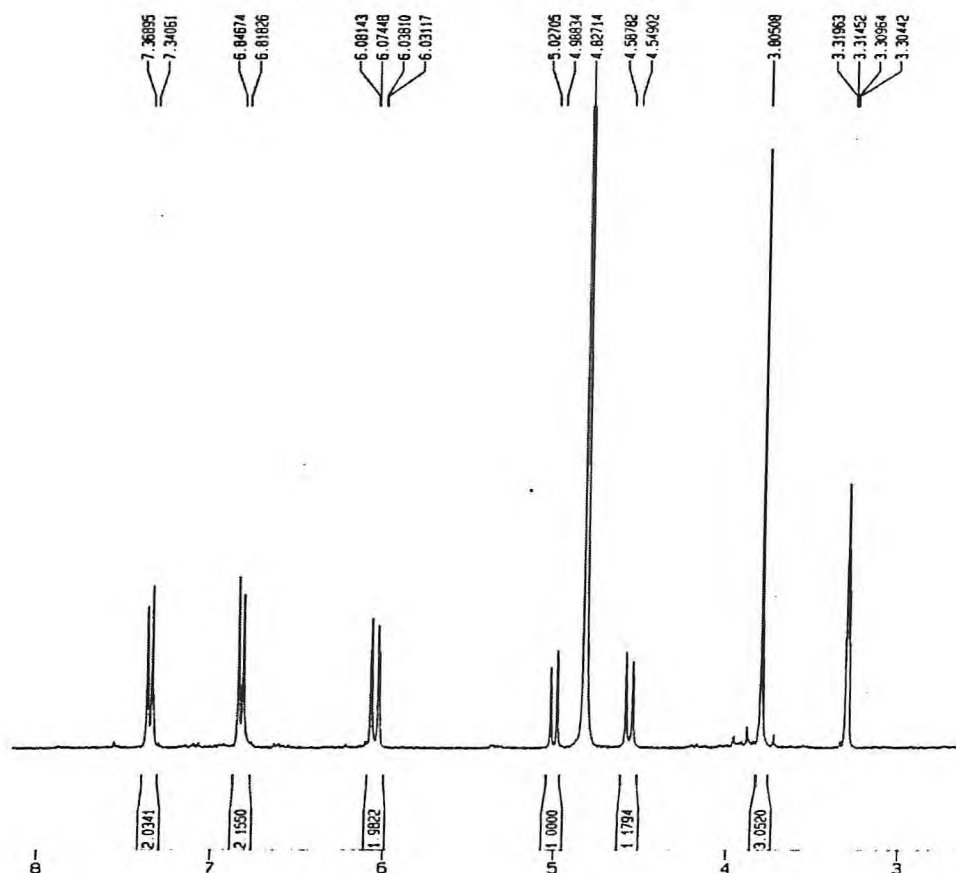


Figura 6.103 - Espectro de RMN ^1H de TS-6 (CD_3OD , 300 MHz).

A grande semelhança entre os espectros de RMN ^1H obtida para TS-6 e ECK-2, em estudo (p. 133) levou a sugerir que se tratavam da mesma substância. A Tabela 6.46 mostra a comparação entre os valores dos dados de RMN ^1H das duas.

Tabela 6.46 - Comparação entre os dados de RMN ^1H de TS-6 (δ , CD_3OD , 300 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 300 MHz)

Próton	TS-6	ECK-2
2	5,01(d, $J=11,6$ Hz)	5,02 (d, $J=11,5$ Hz)
3	4,57 (d, $J=11,6$ Hz)	4,58 (d, $J=11,5$ Hz)
6	6,08 (d, $J=2,0$ Hz)	6,09 (d, $J=2,0$ Hz)
8	6,03 (d, $J=2,0$ Hz)	6,05 (d, $J=2,0$ Hz)
2' e 6'	7,35 (d, $J=8,5$ Hz)	7,37 (d, $J=8,5$ Hz)
3' e 5'	6,83 (d, $J=8,5$ Hz)	6,85 (d, $J=8,5$ Hz)
OCH_3	3,81 (s)	3,82 (s)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de TS-6 (Fig. 6.104, p. 279) revelou catorze linhas espectrais, que foram associados a dezesseis carbonos. Estes dados foram comparados aos valores de deslocamentos químicos de ^{13}C de ECK-2 e encontram-se relacionados na Tabela 6.47 (p. 264).

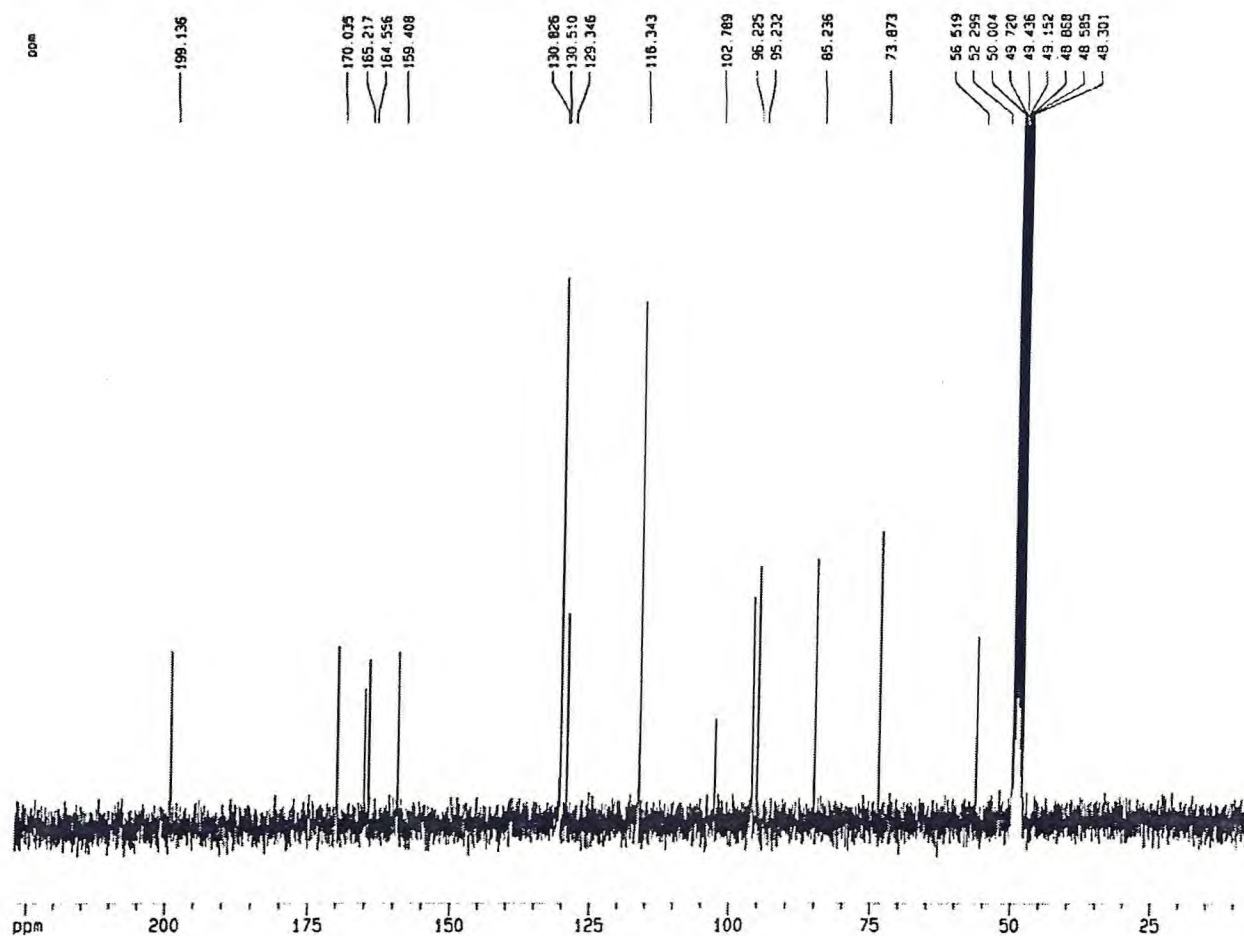
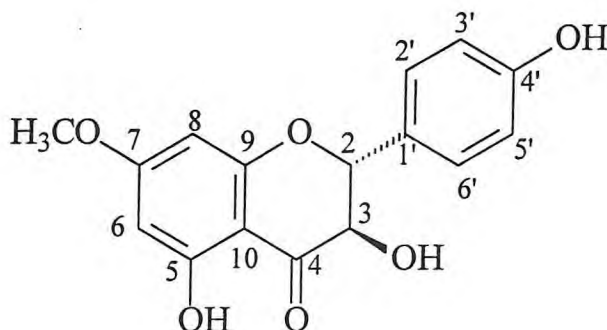


Figura 6.104 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD de TS-6 (CD_3OD , 125 MHz)

O resultado da comparação entre os dados relacionados permitiu sugerir que TS-6 e ECK-2 (Tab. 6.47, p. 280) realmente eram a mesma substância, ou seja, a 3,5,4'-triidroxi-7-metoxi-flavanonol, descrita pela primeira vez para *Trigona*.



Estrutura de TS-6: 3,5,4'-triidroxi-7-metoxi-flavanonol.

Tabela 6.47 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de TS-6 (δ , CD_3OD , 75 MHz) com os dados de ECK-2 (δ , CD_3OD , 75 MHz)

Carbono	TS-6	ECK-2
2	85,24	84,07
3	73,87	72,70
4	199,14	198,02
5	165,22	164,05
6	96,23	95,05
7	170,04	168,83
8	95,23	94,07
9	164,56	163,38
10	102,79	101,62
1'	129,35	128,16
2'	130,51	129,39
3'	116,34	115,16
4'	159,41	158,38
5'	116,34	115,16
6'	130,51	129,39
CH_3O	56,52	55,36

Capítulo 7:

Parte Experimental

7. PARTE EXPERIMENTAL.

7.1 Coleta e Identificação do Material Botânico.

7.1.1 *Eucalyptus citriodora* Hook

O espécime de *E. citriodora* Hook selecionado para o estudo dos constituintes químicos do óleo essencial foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. Sua identificação botânica foi feita pelos professores Afrânio Gomes Fernandes e Edson Nunes. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 35532.

7.1.2 *Eucalyptus tereticornis* Smith

O espécime de *E. tereticornis* Smith selecionado para o estudo dos constituintes químicos do óleo essencial foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. Sua identificação botânica foi feita pelos professores Afrânio Gomes Fernandes e Edson Nunes. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 35533.

7.1.3 Kino

O “kino” foi coletado pelo prof. Edilberto Rocha Silveira, no mês de janeiro de 2003, de um espécime de *E. citriodora* coletado no bairro Edson Queiroz, Fortaleza - Ceará.

7.2 Coleta e Identificação do Material Zoológico

7.2.1 Ninho de *Trigona spinipes* Fabricius

O ninho da abelha *Trigona spinipes* Fabricius(arapuá) foi coletado pelo Professor Edilberto Rocha Silveira, no bairro Serrinha, em Fortaleza - Ceará. A identificação do himenóptero foi feita pelo Engenheiro Agrônomo Daniel Santiago Pereira, da ESAM Júnior Consultoria, Escola Superior de Agronomia de Mossoró, Rio Grande do Norte.

7.3. Métodos Analíticos

7.3.1 Métodos Cromatográficos

7.3.1.1 Cromatografia de Adsorção

Para as cromatografias de adsorção em coluna (CC) foram utilizados gel de sílica 60 da VETEC ($\varnothing 63 - 200 \mu\text{m}$) código 1095 e para as colunas flash, utilizou-se gel de sílica 60 ($\varnothing 40-63 \mu\text{m}$) da Merk. O tamanho das colunas (comprimento e diâmetro) variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes empregados. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob pressão média (cromatografia flash) foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregado nesta técnica o uso de bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 4724059 de Ind. de Aparelhos Médicos Ltda.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizados gel de sílica 60 ($\varnothing 2-25 \mu\text{m}$) da Carlo Erba cod. 45335 e cromatoplasas de gel de sílica 60 ($\varnothing 2-25 \mu\text{m}$) sobre alumínio da Merck (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm).

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram realizadas através da exposição destas à irradiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light e/ou pela pulverização com solução de vanilina em ácido perclórico e etanol, seguido de aquecimento em estufa a aproximadamente 100°C, por aproximadamente cinco minutos, ou ainda pela exposição a vapores de iodo.

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

A remoção dos solventes do extrato e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório BUCHI, sob pressão reduzida.

7.3.1.2. Cromatografia por Exclusão

Os fracionamentos realizados por cromatografia de exclusão ou permeação foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro, ou combinado com clorofórmio ou acetona como fase móvel.

7.3.2. Métodos Físicos de Análises

As análises apresentadas neste trabalho foram realizadas nos equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

7.3.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Foi utilizado espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Para as amostras sólidas foram preparadas pastilhas com brometo de potássio (KBr).

7.3.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono-Treze (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Advance DRX-300 e/ou Advance DRX-500, pertencentes ao Centro de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAURMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e a 500,13 MHz e na frequência do carbono a 75,47 MHz e a 125,75 MHz.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD), piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e DMSO deuterado. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para RMN ^1H pelos picos de hidrogênio pertencentes às frações não deuteradas dos seguintes solventes: corofórmio (δ 7,24), metanol (δ 3,30), piridina (δ 7,22; 7,58 e 8,74) e DMSO (δ

2,50) e para RMN ^{13}C pelos picos de carbono-13 dos seguintes solventes: do clorofórmio (δ 77,23), do metanol (δ 49,0), da piridina (δ 123,87; 135,91 e 150,35) e do DMSO (δ 39,51).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto) e m (multiplete).

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) e que não apareciam no espectro DEPT e, segundo convenção, a terminologia metílico, metilênico e metínico foi aplicada para os grupos CH_3 , CH_2 e CH, respectivamente.

7.3.2.3. Espectrometria de Massas

Os espectros de massa dos óleos essenciais foram obtidos em Espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a Cromatógrafo Gás-Líquido, modelo HP-5890 A, série II (CG/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone DB-5 com 25,0 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno, pertencente ao Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará PADETEC (UFC).

Nos experimentos utilizaram-se gradientes de aumento de temperatura de $4,0^\circ\text{C}/\text{min}$ de 50 a 180°C e $20^\circ\text{C}/\text{min}$ de 180 a 280°C , com injetor a temperatura de 250°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.

Os espectros de massas dos constituintes não-voláteis fixos foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massa SHIMADZU, modelo QP 5000, DI-50, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

7.3.2.4 Cromatografia Gás-Líquido com Detecção por Ionização em Chama

Os cromatogramas com área detectada dos óleos essenciais foram obtidos através de detector FID (Flame Ionization Detection), acoplado a cromatógrafo gás-líquido SHIMADZU, modelo GC-17A (CG/DIC), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone DB-5, com 30,0 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno, no Departamento de Química Analítica e Físico-Química.

Nos experimentos foram utilizados gradientes de aumento de temperatura de 4,0 °C/min, de 50 a 180 °C e 17 °C/min de 180 a 280 °C, com a temperatura do injetor de 35 °C.

7.3.2.5 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento da Micro Química modelo MQAFP 301. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e não foram corrigidas.

7.4 Estudo dos Constituintes Voláteis de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith

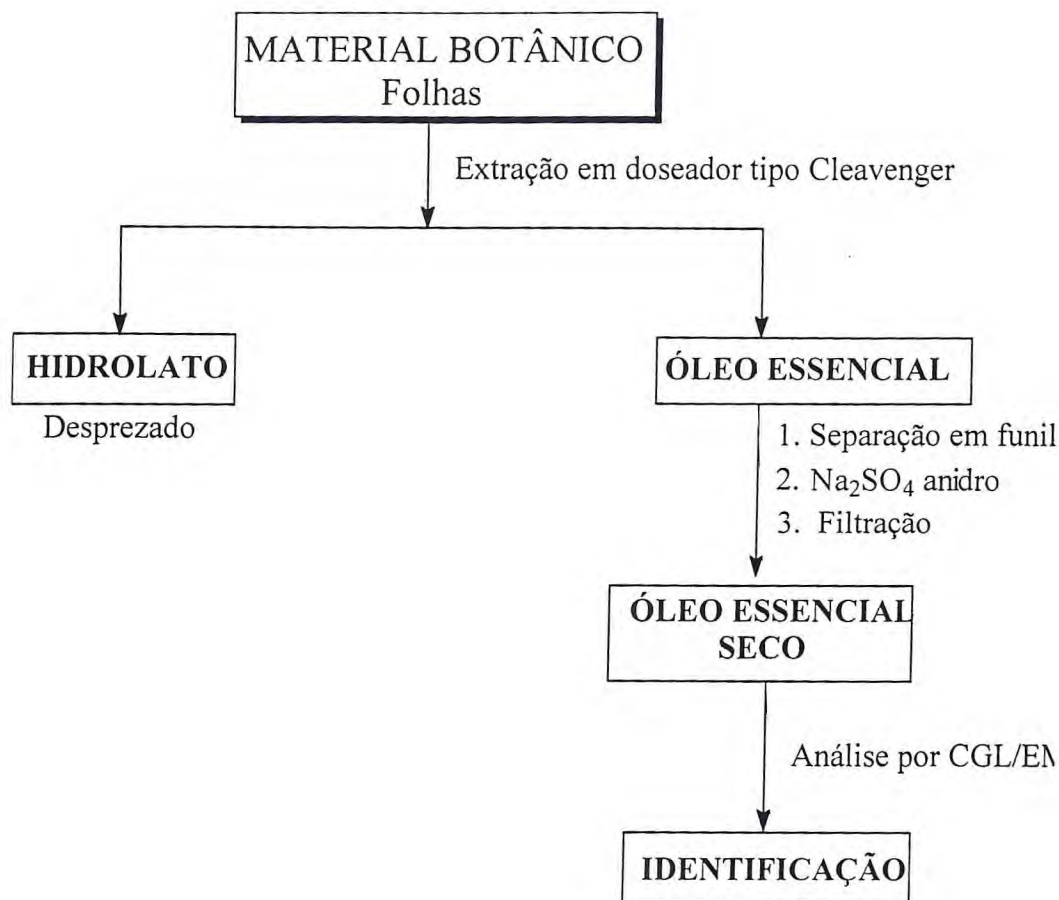
Os óleos essenciais das folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith foram extraídos por hidrodestilação e coletados em um aparelho doseador tipo Cleavenger (Fluxograma 7.1, p. 288), modificado por Gottlieb [Gottlieb e Magalhães, 1960]. Foram realizados dois tipos de estudo, um verificando a variação química circadiana e o outro, a sazonal.

7.4.1. Estudo da Variação Química Circadiana dos Óleos Essenciais das Folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith

Foram realizadas cinco coletas das folhas de um mesmo espécime para as duas espécies em estudo, iniciando-se às 6:00 horas, repetindo-se a cada três horas e finalizando-se às 18:00 horas, do dia 15 de janeiro de 2003. As amostras coletadas foram imediatamente submetidas à extração por hidrodestilação e os óleos essenciais obtidos foram analisados por CGL/EM. Os dados referentes ao procedimento encontram-se dispostos na Tabela 5.1, p. 93.

7.4.2 Estudo da Variação Química Sazonal dos Óleos Essenciais das Folhas de *E. citriodora* Hook e *E. tereticornis* Smith

As amostras das folhas de *E. citriodora* e *E. tereticornis* foram coletadas, em seis meses diferentes, às 9:00h e submetidas a extração por hidrodestilação. Os óleos essenciais obtidos das amostras foram analisados por CGL/EM. Os dados referentes à cada espécie encontram-se dispostos na Tabela 5.3, p. 97.

Fluxograma 7.1 - Método de extração do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus*.

7.5. Isolamento dos Metabólitos Secundários do “Kino” de *E. citriodora* Hook

7.5.1 - Particionamento do “Kino” do *Eucalyptus citriodora* Hook.

40,0 gramas do “kino” de *Eucalyptus citriodora* foram pulverizados em gral de porcelana e solubilizados em 200 mL de etanol. A esta mistura foram acrescentados 200 mL de água destilada.

Foi realizada partição líquido-líquido com clorofórmio (5 x 50 mL), seguido por acetato de etila (5 x 80 mL) e *n*-butanol (5 x 80 mL).

As fases orgânicas obtidas foram lavadas com água destilada (20 mL), secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas, e o solvente foi retirado por pressão reduzida. A fração aquosa foi liofilizada. Desta forma foram obtidas quatro frações (Tab. 7.1, p. 289):

Tabela 7.1 - Frações obtidas por meio do particionamento do “kino” de *E. citriodora*

FRAÇÃO	PESO (g /%)	COLORAÇÃO	DENOMINAÇÃO
Clorofórmica	6,4 (16,0)	amarela	ECK-PC
Acetato de Etila	18,1 (45,3)	marrom	ECK-PA
<i>n</i> -Butanólica	6,0 (15,0)	marrom	ECK-PB
Aquosa	7,8 (19,5)	marrom	ECK-PA
Total	38,3 (95,8)		

7.5.2 - Fracionamento cromatográfico por exclusão em Gel Sephadex LH-2- da fração ECK-PC.

6,0 g da fração ECK-PC foram divididos em cinco porções de 1,2 g. Cada porção foi submetida à cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 (30,0 g), em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,8$ cm), para fornecer 29 frações utilizando os seguintes eluentes discriminados na (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 de ECK-PC

Frações	Volume (ml)	Eluente	Coloração
1	35	CH ₂ Cl ₂ /Acetona	Incolor
2 - 14	10	CH ₂ Cl ₂ / Acetona	Amarela-pálida
15 - 20	10	Acetona/ MeOH	Amarela-pálida
21 - 29	10	Acetona/ MeOH	Amarela

Finalizado o processo cromatográfico, as frações obtidas foram submetidas à análise comparativa em CCD e agrupadas de acordo com as suas semelhanças (Tab. 7.2a).

Tabela 7.2a. Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico de ECK-PC

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
2 - 3	1,53	ECK-PC-A
4 - 10	0,83	ECK-PC-B
11 - 17	0,89	ECK-PC-C
18 - 20	0,50	ECK-PC-D
21 - 25	1,95	ECK-PC-E
TOTAL	5,70 (95%)	

7.5.3 - Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-A – Isolamento de ECK-1 e ECK-2

396,0 mg da fração ECK-PC-A foram cromatografadas em um funil cilíndrico ($\varnothing_{ext.} = 1,9$ cm) contendo 20,0 g de gel de sílica para cromatografia "flash" ($h = 22$ cm). O material foi adsorvido em 400,0 mg do mesmo tipo de gel de sílica e adicionado ao topo da coluna. A eluição foi realizada com solventes $CHCl_3$ e MeOH em misturas binárias, seguindo um gradiente de concentração, como demonstrado na Tabela 7.3.

Tabela 7.3 - Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-A

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1	30	$CHCl_3$ /MeOH 3%	Incolor
2-8	2	$CHCl_3$ /MeOH 3%	Incolor
9-25	5	$CHCl_3$ /MeOH 3%	Incolor
26-47	5	$CHCl_3$ /MeOH 5%	Incolor
48-66	5	$CHCl_3$ /MeOH 10%	Incolor
67-75	5	$CHCl_3$ /MeOH 1:1	Incolor
76	10	$CHCl_3$ /MeOH 1:1	Incolor

Análise comparativa das frações obtidas por CCD, permitiu a reunião de nove frações, como expresso na Tabela 7.3a:

Tabela 7.3a- Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
3-4	5,0	ECK-PC-AA
5-9	20,0	ECK-PC-AB
10-16	153,0	ECK-PC-AC
17	12,0	ECK-PC-AD
18	23,0	ECK-PC-AE
19-20	102,0	ECK-PC-AF
21-32	58,0	ECK-PC-AG
43-46	15,0	ECK-PC-AH
50-76	3,0	ECK-PC-AI
TOTAL	291 (73,5%)	

As frações ECK-PC-AA e a ECK-PC-AE mostraram-se homogêneas em CCD e foram enviadas para análises espectroscópicas. Os resultados sugeriram tratarem-se de duas substâncias puras as quais foram denominadas **ECK-1** e **ECK-2**, respectivamente.

ECK-1 foi isolada como um sólido em forma de pequenos cristais brancos, solúvel em acetona e metanol, p.f. = 74,9-76,1°C.

ECK-2 foi isolada em forma de finas agulhas, solúvel em acetona e metanol, p.f.= 182,8-183,9 °C.

ECK-PC-AF foi purificada em cromatografia “flash” e forneceu 74,0 mg adicionais de **ECK-2**.

7.5.4 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-AB

A fração ECK-PC-AB (20,0 mg) foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}}$ = 1,9 cm) contendo 2,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash”. A eluição foi realizada com a mistura binária $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3% com a qual foram coletadas 17 frações: 1-7 (1 mL), 8-17 (5 mL) e com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30% para as frações 18-19 (10 mL).

Análise em CCD revelou a fração F-1 como uma substância pura (5,0 mg) que se mostrou idêntica a ECK-1. As demais frações foram desprezadas.

7.5.5 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da ECK-PC-A'

O remanescente da fração ECK-PC-A, denominado ECK-PC-A' (1,13g), foi cromatografado em Sephadex LH-20, em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}}$ = 2,8 cm), contendo 30,0g de gel de sílica. A eluição foi realizada utilizando a mistura de solventes $\text{CHCl}_2/\text{Acetona}$ 1:1 (1-9; 10 mL) e Acetona/MeOH 1:1 (11-13; 25 mL).

As frações obtidas foram agrupadas conforme suas semelhanças após comparação em CCD, como descrito na Tabela 7.4 (p. 292).

Tabela 7.4- Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A'

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
1-2	3,0	ECK-PC-A'A
3-5	25,0	ECK-PC-A'B
6-9	720,0	ECK-PC-A'C
10-13	352,0	ECK-PC-A'D
30-35	9,0	ECK-PC-A'E
36-44	8,0	ECK-PC-A'F
45-60	19,0	ECK-PC-A'G
TOTAL	1,13 (100%)	

7.5.6 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-A'C – Isolamento de ECK-4

Os 720,0 mg da fração ECK-PC-A'C foram recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm) contendo 18,3 g de gel de sílica para cromatografia “flash” (h = 22 cm). O material foi adsorvido em 1,0 g de gel de sílica e acondicionado ao topo da coluna, esta previamente empacotada com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3%. A eluição foi realizada com mistura binária de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 56 frações, conforme exposto na Tabela 7.5.

Tabela 7.5 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-A'C

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-5	1	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3%	Incolor
6-26	5	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3%	Incolor
29-45	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%	Incolor
46-55	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 40%	Incolor
56	50	MeOH	Incolor

Foi realizada a análise comparativa por CCD, obtendo-se um total de oito frações, como disposto na Tabela 7.5a (p. 293).

Tabela 7.5a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A'C

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
2-4	10,0	ECK-PC-A'CA
5-9	17,0	ECK-PC-A'CB
10-13	64,0	ECK-PC-A'CC
14-16	178,0	ECK-PC-A'CD
17-23	97,0	ECK-PC-A'CE
24-42	223,0	ECK-PC-A'CF
43-49	2,0	ECK-PC-A'CG
50-52	8,0	ECK-PC-A'CH
TOTAL	599 (83,2%)	

As frações ECK-PC-A'CA (10,0 mg) e ECK-PC-A'CE (97,0 mg), mostraram-se homogêneas em CCD, sendo a primeira idêntica a **ECK-1** e a segunda, uma nova substância pura, denominada **ECK-4**, cujo aspecto era de cristais em forma de finas agulhas, branca, solúvel em acetona e metanol, p.f. = 222,8 – 225,5°C.

7.5.7 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-A'CC

A fração ECK-PC-A'CC (64 mg) foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,0$ cm), contendo 4,0 g de gel de sílica ($h = 10$ cm). Esta foi adsorvida em 300 mg de gel de sílica para cromatografia “flash” e acondicionada no topo da coluna. A eluição foi realizada inicialmente com a mistura binária $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3%, sendo coletadas as frações de 1-13 (1 mL) e 14-18 (10 mL). As demais frações 19-25 (10 mL) foram eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30%. Após análise comparativa em CCD, foi constatado que as frações 1-5 eram idênticas e se tratavam de ECK-1 (5 mg). As demais frações foram reservadas.

7.5.8 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-A'CF.- Isolamento de ECK-3

223,0 mg da fração ECK-PC-A'CF foram adsorvidos em 700 mg de gel de sílica e recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8 \text{ cm}$) contendo 21 g de gel de sílica ($h = 23 \text{ cm}$). Foram coletadas 49 frações utilizando um gradiente crescente de polaridade, descrito na Tabela 7.6

Tabela 7.6 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-ACF

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-7	2	CHCl ₃ /MeOH 3%	Incolor
8-11	5	CHCl ₃ /MeOH 3%	Incolor
12-40	5	CHCl ₃ /MeOH 4%	Incolor
41-47	10	CHCl ₃ /MeOH 15%	Incolor
48-49	10	MeOH	Incolor

A posterior comparação por CCD das frações obtidas permitiu o agrupamento das frações, como descrito na Tabela 7.6a.

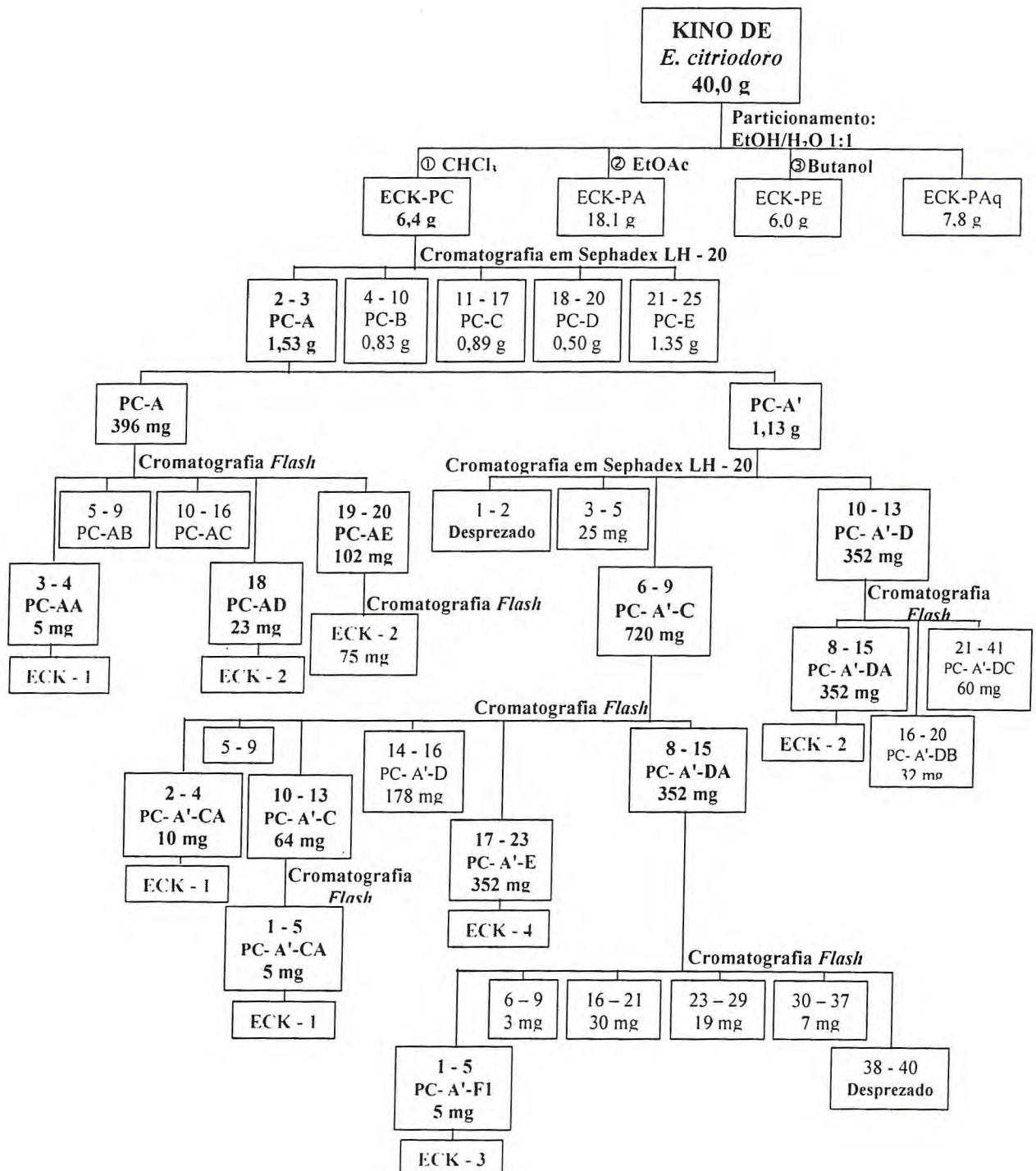
Tabela 7.6a: Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-A'CF

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-5	7,0	ECK-PC-A'CF1
6-9	32,0	ECK-PC-A'CF2
10-15	23,0	ECK-PC-A'CF3
16-21	54,0	ECK-PC-A'CF4
23-29	18,0	ECK-PC-A'CF5
30-37	31,0	ECK-PC-A'CF6
TOTAL	165 (74,0%)	

Das frações obtidas, duas apresentaram somente uma única mancha quando reveladas em CCD, sugerindo serem substâncias puras. A fração ECK-PC-A'CF1 foi denominada **ECK-3**, uma substância em forma de pequenos cristais brancos, p.f = 227,8-

229,9 °C , solúvel em acetona e metanol e a fração ECK-PC-A'CF₃, idêntica a ECK-4. (ver Flux. 7.2, p. 295)

Fluxograma 7.2 – Esquema de obtenção de ECK-1, ECK-2, ECK-3 e ECK-4



7.5.9 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-B

A fração ECK-PC-B (827,0 mg) foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,8$ cm) contendo Sephadex-LH-20 ($h = 20$ cm). Foram coletadas 9 frações de 25 mL por eluição com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetona}$ 1:1 (1-7) e $\text{Acetona}/\text{MeOH}$ 1:1, (8-9). Após análise em CCD, as frações foram agrupadas em três frações, como consta na Tabela 7.7:

Tabela 7.7 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-B

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-3	331,0	ECK-PC-BA
4	171,0	ECK-PC-BB
5-9	218,0	ECK-PC-BC
TOTAL	720,0 (87,1%)	

7.5.10 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-BB

171 mg da fração ECK-PC-BB foram recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,3$ cm) contendo 8,0 g de gel de sílica “flash” ($h=16,5$ cm). A eluição foi realizada com as misturas binárias, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7% e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10% e MeOH puro para a obtenção de 38 frações. Destas, após análise em CCD, somente 5-11, denominada **ECK-PC-BBA (145 mg)** foi reservada.

7.5.11 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-BBA

Os 145 mg da fração ECK-PC-BBA foram submetidos ao tratamento cromatográfico em Sephadex LH-20, em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm). A eluição foi realizada com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 (1-3; 10 mL e 4-10; 5 mL), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 (11-15; 10 mL) e MeOH puro (16-17; 10 mL).

O resultado da análise comparativa em CCD permitiu o agrupamento em três frações, descritas na Tabela 7.8 (p. 297).

Tabela 7.8 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BBA

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
3-4	40,0	ECK-PC-BBA1
5-7	110,0	ECK-PC-BBA2
8-10	18,0	ECK-PC-BBA3
TOTAL	168,0 (98,2%)	

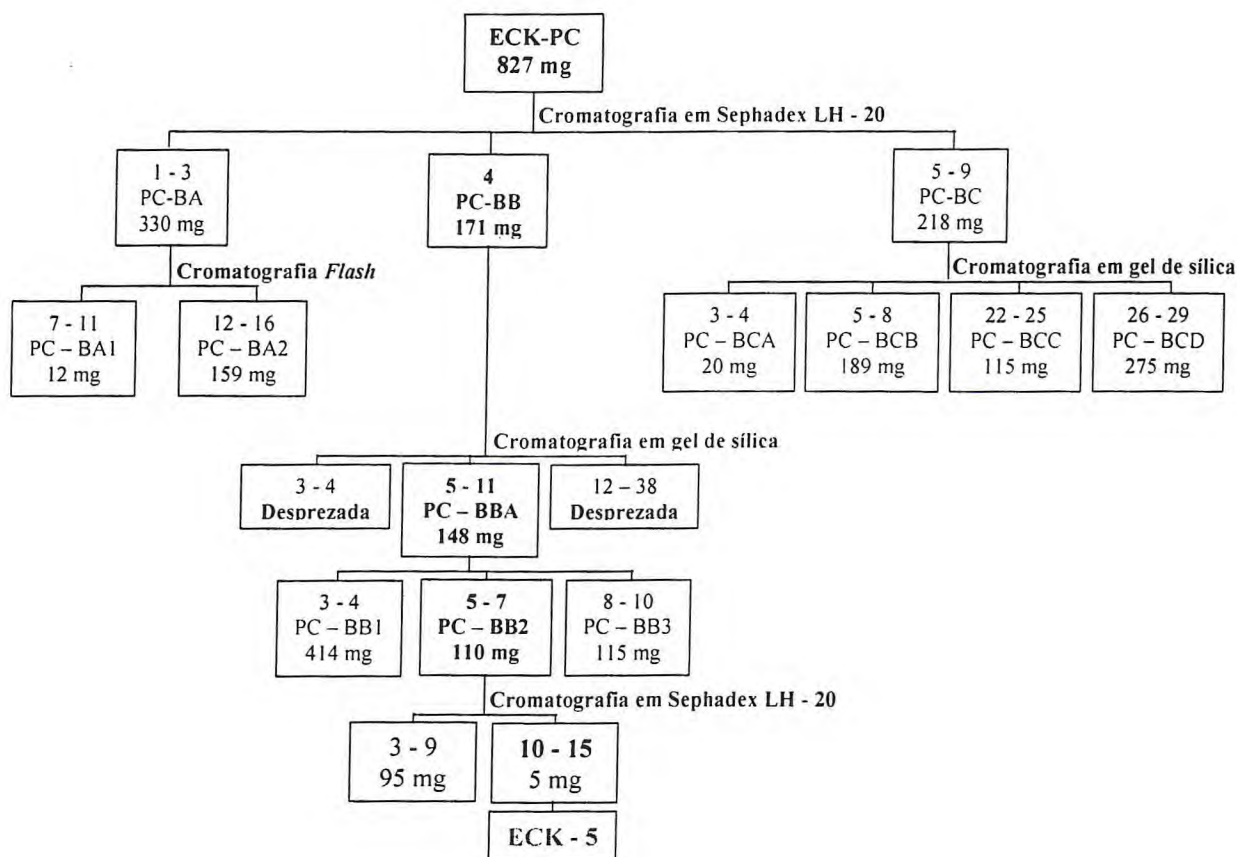
7.5.12 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-BBA2 – Isolamento de ECK-5

A fração ECK-PC-BBA2 (110 mg), foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm) contendo Sephadex LH-20. A eluição foi realizada com MeOH e foram obtidas 16 frações: 1-3 (10 mL), 4-9 (5 mL), 10-13 (5 mL,) e 14-16 (10 mL).

Após comparação em CCD, as frações 3-9 (ECK-PC-BBA2/3-9; 95 mg) e 10-15, (ECK-PC-BBA2/10-15; 5 mg) foram agrupadas.

A fração **ECK-PC-BBA2/10-15** (5,0 mg), apresentou-se homogênea em CCD, o que sugeriu tratar-se de uma substância pura e foi denominada **ECK-5**, um sólido em forma de cristais amarelos, p.f. = 215,2 – 218,5°C, parcialmente solúvel em metanol, solúvel em piridina. O Fluxograma 7.3 (p. 298) resume o processo de obtenção de ECK-5.

Fluxograma 7.3 – Esquema de obtenção de ECK-5.



7.5.13 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-BC

A fração ECK-PC-BC (218 mg), foi adsorvida em gel de sílica e recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,3 \text{ cm}$) contendo 10,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” ($h=21 \text{ cm}$). A eluição foi realizada em gradiente de polaridade crescente, resultando em 27 frações, conforme descrito na Tabela 7.9.

Tabela 7.9 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-BC

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-8	5	CHCl ₃ /MeOH 7%	Amarelada
9-12	10	CHCl ₃ /MeOH 7%	Incolor
13-17	10	Acetona/ MeOH 10%	Incolor
18-25	10	CHCl ₃ /MeOH 25%	Incolor
26-27	10	MeOH	Amarelada

Seguindo o procedimento usual de comparação por CCD das frações obtidas, foi possível agrupá-las da seguinte maneira, como exposto na Tabela 7.9a.

Tabela 7.9a: Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BC

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
3-4	20,0	ECK-PC-BCA
5-8	139,0	ECK-PC-BCB
11-13	15,0	ECK-PC-BCC
TOTAL	174 (79,8%)	

7.5.14 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-BCB

Os 139 mg da fração ECK-PC-BCB foram adsorvidos em 600 mg de gel de sílica e recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,9$ cm) contendo 15,0 g de gel de sílica ($h=18,3$ cm). A eluição foi realizada com os solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4% (1-3; 10 mL), (4-46; 2,0 mL), (47-53; ~ 6,0 mL) e MeOH (54-62; 10 mL).

A comparação das frações por meio de CCD, possibilitou agrupá-las da seguinte maneira (Tab. 7.10):

Tabela 7.10 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-BCB

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-5	-	
6-13	9,0	ECK-PC-BCB 6-13
14-17	6,0	ECK-PC-BCB 14-17
18-22	32,0	ECK-PC-BCB 18-22
24-35	36,0	ECK-PC-BCB 24-35
36-52	11,0	ECK-PC-BCB 36-52
TOTAL	94,0 (67,6 %)	

7.5.15 - Fracionamento cromatográfico “flash” das frações ECK-PC-BCB-18-22 + ECK-PC-C'2A. - Isolamento de ECK-8.

As frações ECK-PC-BCB-18-22 (32,0) + ECK-PC-C'2A (22,0 mg) foram recromatografadas, após serem dissolvidas em CHCl₃/MeOH 4% e adicionadas diretamente em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,0$ cm) contendo 8,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” (h = 20,0 cm). A eluição foi realizada utilizando mistura dos solventes CHCl₃/MeOH 4% para a obtenção das frações (1-3; 10 mL) e (4-30, 2 mL) e MeOH para obter as frações (31-32; 10 mL).

As frações foram posteriormente agrupadas, após análise comparativa em CCD (ver Tab. 7.11).

Tabela 7.11 Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-BCB-18-22 + ECK-PC-2A

FRAÇÕES	PESO (mg)
6-8	7,0
10-11	9,0
12-15	17,0
16-21	8,0
22-24	3,0
25-29	-
TOTAL	44,0 (81,4 %)

A fração 12-15 (17,0) apresentou-se como um sólido amarelo translúcido, solúvel em metanol e o ponto de fusão era de 115,4-119,1 °C, homogêneo em CCD, o que sugeriu tratar-se de uma substância pura, sendo denominada **ECK-8**.

7.5.16 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-C

292 mg da fração ECK-PC-C foram recromatografados. A amostra foi acondicionada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,9$ cm) contendo 18,0 g de gel de sílica para cromatografia

“flash” (h=19,5 cm). A eluição foi realizada utilizando a mistura binária CHCl₃/MeOH em gradiente de polaridade crescente, conforme descrito na Tabela 7.12.

Tabela 7.12 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-C

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1	10	CHCl ₃ /MeOH 5%	Incolor
2-37	4	CHCl ₃ /MeOH 5%	Incolor
38-71	5	CHCl ₃ /MeOH 5%	Incolor
72-82	10	CHCl ₃ /MeOH 10%	Incolor
83-86	10	CHCl ₃ /MeOH 15%	Incolor
87-91	10	MeOH	Incolor

A análise comparativa em CCD levou ao agrupamento das frações semelhantes, conforme descrito na Tabela 7.12a.

Tabela 7.12a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-C

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
4-6	4,0	ECK-PC-CA
8-10	10,0	ECK-PC-CB
11-20	29,0	ECK-PC-CC
21-29	58,0	ECK-PC-CD
30-35	14,0	ECK-PC-CE
36-44	18,0	ECK-PC-CF
45-60	85,0	ECK-PC-CG
TOTAL	219,0 (75%)	

Das frações obtidas, duas apresentaram somente uma única mancha quando reveladas em CCD, sugerindo serem substâncias puras. Estas se mostraram idênticas a **ECK-3** (ECK-PC-CB; 10,0 mg) e a **ECK-4** (ECK-PC-CD; 58,0 mg)

7.5.17 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-C’

O remanescente da fração ECK-PC-C, denominada ECK-PC-C’ (590,0 mg), foi recromatografado em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,9 \text{ cm}$) contendo 23,0 g de gel de sílica ($h=26 \text{ cm}$). A eluição foi realizada com misturas binárias de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e MeOH e a Tabela 7.13 descreve o perfil cromatográfico do experimento.

Tabela 7.13 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-C’

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-40	5	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%	Incolor
41-44	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%	Incolor
45-74	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8%	Incolor
74-80	10	MeOH	levemente amarelada

A análise das frações por meio de CCD conduziu ao agrupamento das frações da maneira demonstrada na Tabela 7.13a.

Tabela 7.13a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-C’

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
10-12	7,0	ECK-PC-C’1
13-19	44,0	ECK-PC-C’2
20-26	42,0	ECK-PC-C’3
27-29	125,0	ECK-PC-C’4
30-39	84,0	ECK-PC-C’5
40-44	47,0	ECK-PC-C’6
50-52	10,0	ECK-PC-C’7
53-54	51,0	ECK-PC-C’8
55-63	27,0	ECK-PC-C’9
64-79	42,0	ECK-PC-C’10
TOTAL	479,0 (81,2 %)	

A fração ECK-PC-C'1, mostrou-se por CCD, idêntica a ECK-3. As demais frações eram compostas de misturas binárias ou terciárias e foram reservadas para tratamentos cromatográficos posteriores.

7.5.18 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-C'2

Os 44,0 mg da fração ECK-PC-C'2 foram adsorvidos em 300 mg de gel de sílica e acondicionados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,0$ cm) previamente empacotado com 9,2 g de gel de sílica para cromatografia “flash”. A eluição foi realizada com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, de forma isocrática (2 mL, 1-9 e 10 mL, 10-12) e com MeOH (10 mL, 13-14). Destas frações, após comparação em CCD, somente as 9-16 (22 mg), **ECK-PC-C'2A** foi reservada, apesar de ser mistura de duas substâncias.

7.5.19 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-D

Os 490 mg da fração ECK-PC-D foram adsorvidos em 800 mg de gel de sílica e foram recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm) contendo 22 g de gel de sílica ($h=26$ cm) empacotada com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 6%. Foram coletadas 60 frações e a série eluotrópica, com gradiente em ordem crescente de polaridade, encontra-se descrita na Tabela 7.14.

Tabela 7.14 - Fracionamento cromatográfico “flash” da fração ECK-PC-D

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-9	3	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 6%	Incolor
10-40	5	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 6%	Incolor
41-56	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 12%	Incolor
57-60	10	Acetona/ MeOH 10%	Amarelada

As frações foram submetidas a análise em CCD para ser realizado o agrupamento das semelhantes, conforme descrito na Tabela 7.14a (p. 304).

Tabela 7.14a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-D

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
10	4,0	ECK-PC-DA
11-14	98,0	ECK-PC-DB
15-19	40,0	ECK-PC-DC
20-28	77,0	ECK-PC-DD
30-40	74,0	ECK-PC-DE
41-48	40,0	ECK-PC-DF
49-60	28,0	ECK-PC-DG
TOTAL	361,0 (73,7%)	

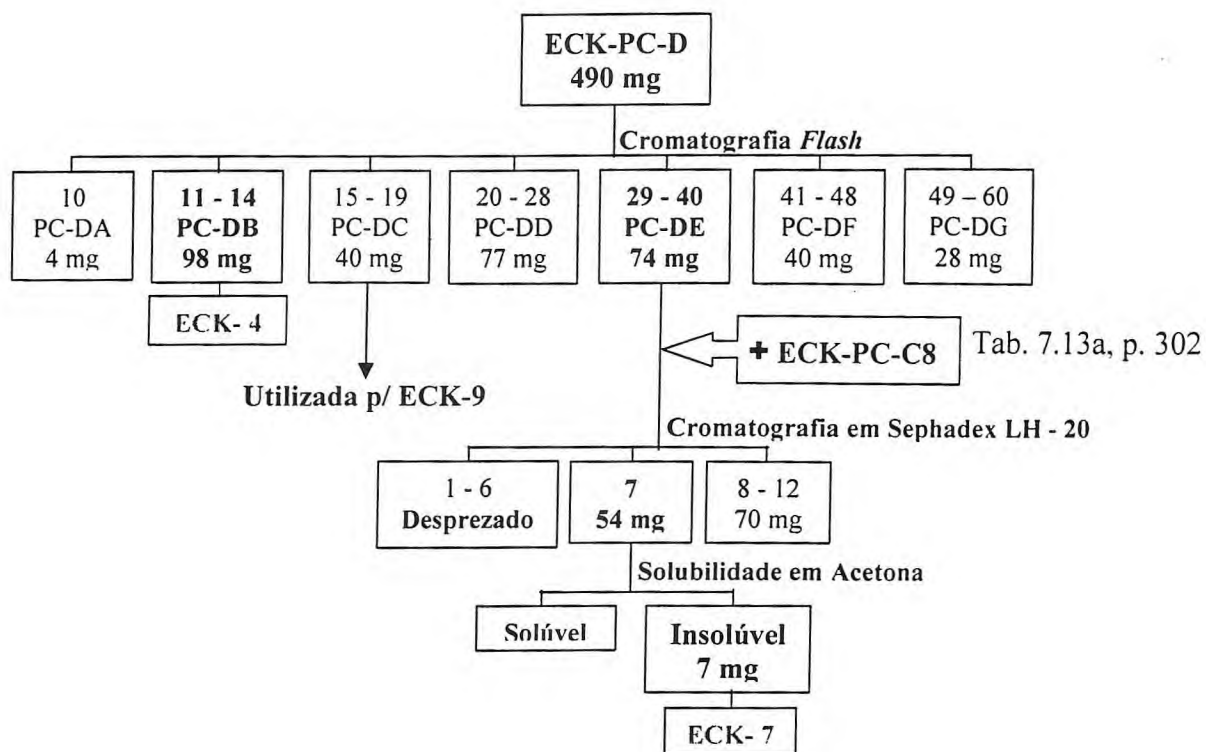
A fração ECK-PC-DB mostrou-se idêntica a ECK-4, como componente majoritário.

7.5.20 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 das frações ECK-PC-C8 + ECK-PC-DF – Isolamento de ECK-7

As frações ECK-PC-C8 + ECK-PC-DF foram recromatografadas em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm) contendo Sephadex LH-20. A amostra foi solubilizada em metanol e a eluição foi realizada utilizando o mesmo solvente. Foram coletadas 12 frações: 1-2 (10 mL), 3-7 (5 mL) e 8-12 (10 mL).

A fração 7, quando seca, foi solubilizada em acetona havendo a formação de um precipitado. O sobrenadante foi separado e a porção insolúvel mostrou-se como um sólido amorfo, branco solúvel em metanol com p.f = 116,9 – 119,6 °C e homogêneo em CCD, sendo denominado **ECK-7** (9 mg).

Fluxograma 7.4 - Esquema de obtenção de ECK-7



7.5 21- Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-E

1,95 g da fração ECK-PC-E foram recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{ext.} = 2,8$ cm). A eluição foi realizada de forma isocrática com a mistura de solventes Acetona/MeOH 60%, sendo coletadas 18 frações: 1-2 (10 mL; amarela-pálida) 3-5 (5 mL; amarela) e 16-18 (10 mL, amarela). Após a análise comparativa em CCD, as frações puderam ser agrupadas da seguinte maneira (ver Tabela 7.15)

Tabela 7.15 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-E

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
3-4	0,31	ECK-PC-E-A
5-8	1,19	ECK-PC-E-B
9-10	0,07	ECK-PC-E-C
11-12	0,01	ECK-PC-E-D
13-18	0,01	ECK-PC-E-E
Total	1,59 (81,5 %)	

7.5.22 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PC-EA – Isolamento de ECK-6

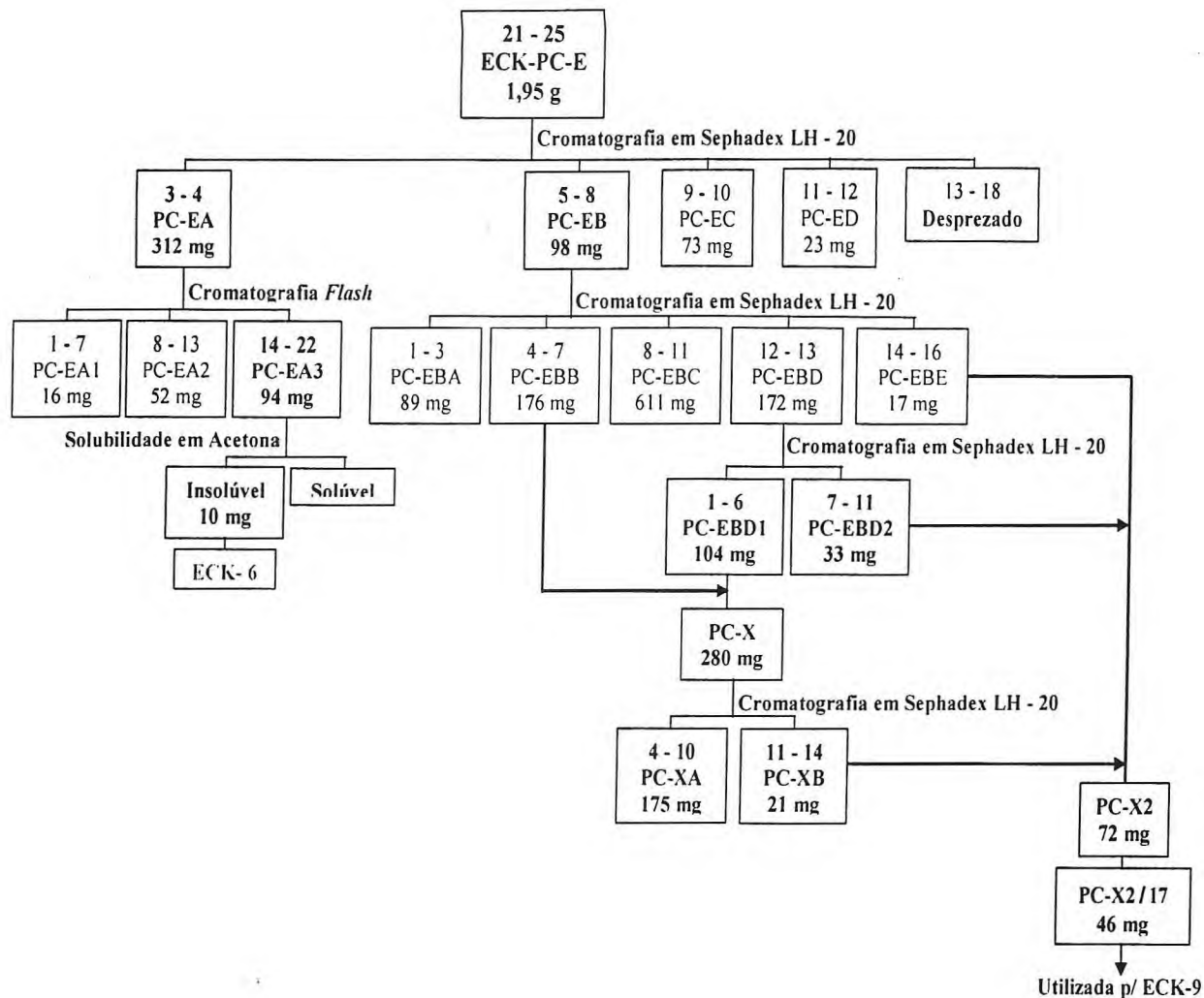
A fração ECK-PC-EA, pesando 312,0 mg foi adsorvida em gel de sílica e recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,8$ cm) contendo 13,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” (h=16 cm). A eluição foi realizada com a mistura ternária de solventes CHCl_3 35%/EtOAc 64%/MeOH 1% para as frações 1-7 (3 mL), 8-11 (6 mL) e 12-19 (10 mL) e com MeOH puro para as frações 20-27 (10 mL). Segundo o procedimento de análise comparativa em CCD, foram reunidas as seguintes frações (Tab. 7.16):

Tabela 7.16 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-EA

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-7	16,0	ECK-PC-EA1
8-13	52,0	ECK-PC-EA2
14-22	94,0	ECK-PC-EA3
TOTAL	162,0 (51,9 %)	

Depois da evaporação do solvente, a fração ECK-PC-EA3 foi solubilizada em acetona, com formação de um precipitado. A solução, que continha mistura de substâncias, foi recolhida e a porção insolúvel foi seca e pesada, obtendo-se 10 mg de um pó branco, solúvel em metanol à quente, piridina. Após verificar em CCD que se tratava de apenas uma mancha, a amostra foi enviada para análise e confirmou-se tratar de mais uma substância, denominada **ECK-6**, p.f= 194,9 – 196,1 °C.

Fluxograma 7.5 - Esquema de obtenção de ECK-6



7.5.23 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-EB

A fração ECK-PC-EB (1,1 g), foi recromatografada em Sephadex LH-20, em um funil cilíndrico ($\varnothing_{ext.} = 2,8$ cm). A eluição foi realizada de forma isocrática com Acetona/MeOH 65%, obtendo-se 16 frações: 1-9 (5 mL) e 10-16 (10 mL).

Após a comparação em CCD, as frações foram reunidas de acordo com o descrito na Tabela 7.17 (p. 293).

Tabela 7.17 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PC-EB

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-3	28,0	ECK-PC-EBA
4-7	176,0	ECK-PC-EBB
8-11	611,0	ECK-PC-EBC
12-13	177,0	ECK-PC-EBD
14-16	17,0	ECK-PC-EBE
TOTAL	1009,0 (91,7 %)	

7.5.24 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-EBD

A fração ECK-PC-EBD (177,0 mg) foi recromatografada em um funil cilíndrico (\emptyset ext. = 1,3 cm) contendo Sephadex LH-20 e eluído com Acetona/Metanol 65%. Foram obtidas onze frações: 1-8 (3 mL) e 9-11 (6 mL), que após análise em CCD foram agrupadas em duas frações: (1-6) ECK-PC-EBD1 (104,0 mg) e (7-11) ECK-PC-EBD2 (33,0 mg).

A fração ECK-PC-EBD1 (104,0 mg) mostrou-se idêntica à fração ECK-PC-EBB (176,0 mg). Desta forma as duas frações foram reunidas para serem recromatografadas e uma nova denominação lhes foi atribuída: ECK-PC-X (281,0).

7.5.25 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PC-X

Os 281 mg da fração ECK-PC-X foram recromatografados seguindo o mesmo procedimento do item anterior. Foram obtidas quinze frações que foram agrupadas em duas frações após a comparação em CCD: (4-10) (175 mg; ECK-PC-XA) e (11-14) (21 mg; ECK-PC-XB).

A fração ECK-PC-XB foi comparada às frações ECK-PC-EBE (17, mg) e ECK-PC-EBD2 (33,0 mg) por meio de análise em CCD e mostraram-se semelhantes. Então foram reunidas, recebendo a denominação ECK-PC-X2 (71,0 mg).

7.5.26 - Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-X2.

A fração ECK-PC-X2 (71,0 mg) foi adsorvida em gel de sílica e adicionada ao funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,3$ cm) contendo 5,0 g de gel de sílica para cromatografia "flash" (h=10,7 cm). A eluição foi realizada com CH_2Cl_2 30 %/EtOAc 69%/MeOH 1% (1-6; 2,0 mL) e (7-12; 5,0 mL) e (13-15; 10 mL), EtOAc/MeOH 2% (16-18; 10 mL) MeOH (19-23; 10 mL). Após a comparação em CCD, foi obtida a fração ECK-PC-X2-1-7 (46 mg). Esta fração foi reservada.

A fração ECK-PC-CF (18,0 mg) (Tab. 7.12a, p. 301) foi comparada à fração ECK-PC-X2_1-7 (46,0 mg) por meio de análise em CCD e mostraram-se semelhantes. Então foram reunidas, recebendo a denominação ECK-PC-M (64,0 mg).

7.5.27 - Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-M - Isolamento de ECK-9.

A fração ECK-PC-M (64 mg) foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 1,0$ cm) contendo 8,0 g de gel de sílica (h=20 cm). O material foi adsorvido em 400 mg de gel de sílica e eluída com a mistura binária de solvente CHCl_3 /MeOH 4% para as frações (1-6; 10 mL), (7-32; 2 mL) e (33-35; 10 mL) e CHCl_3 /MeOH 20% para as frações (36-40; 10 mL).

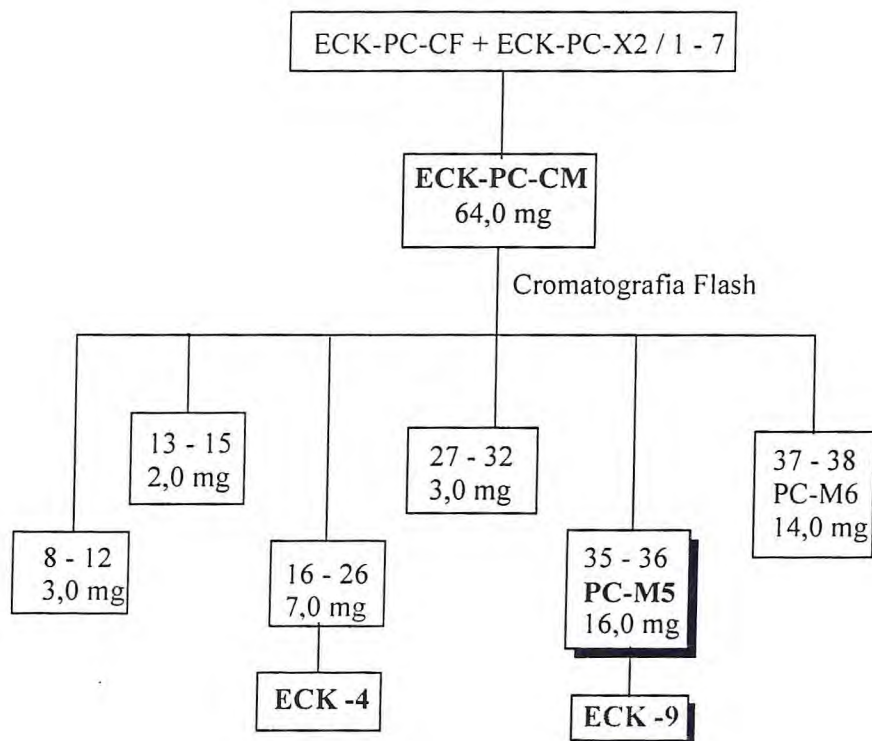
A análise comparativa em CCD permitiu o agrupamento das frações como descritas na Tab. 7.18:

Tabela 7.18 - Fracionamento cromatográfico "flash" da fração ECK-PC-M

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
8-12	3,0	ECK-PC-M1
13-15	2,0	ECK-PC-M2
16-26	7,0	ECK-PC-M3
27-32	3,0	ECK-PC-M4
35-36	16,0	ECK-PC-M5
37-38	14,0	ECK-PC-M6
TOTAL	45,0 (70,3%)	

Dentre as frações obtidas, duas apresentaram-se homogêneas em CCD. A fração ECK-PC-M3 mostrou-se idêntica ao composto ECK-4, por co-cromatografia, enquanto a fração ECK-PC-M5 (16,0 mg), correspondia a uma nova substância. Esta se apresentou como um sólido amarelo pálido translúcido e quebradiço, p.f. = 125,9-130,5 °C, solúvel em metanol denominado **ECK-9**.

Fluxograma 7.6: Esquema da obtenção de **ECK-9**.



7.5.28 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA

5,42 g da fração ECK-PA foram adsorvidos em gel de sílica e cromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 4,0$ cm) previamente empacotado com 31,0 g de gel de sílica ($h=6,3$ cm). Foram coletadas 110 frações e a série eluotrópica em gradiente crescente de polaridade encontra-se descrita na Tabela 7.19 (p. 311).

Tabela 7.19 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1	100	CHCl ₃ /MeOH 8%	Incolor
2-23	10	CHCl ₃ /MeOH 8%	Amarelada
24-44	10	CHCl ₃ /MeOH 10%	Amarelada
45-60	10	CHCl ₃ /MeOH 15%	Amarelada
61-62	10	CHCl ₃ /MeOH 20%	Amarelada
63-87	10	CHCl ₃ / Acetona 1:1	Amarelada
88-101	10	Acetona	Amarela-alaranjada
102-103	30	Acetona	Amarela-alaranjada
104-110	10	MeOH	Marrom

As frações foram analisadas por meio de CCD, o que permitiu a reunião das seguintes frações conforme Tabela 7.19a

Tabela 7.19a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
2-3	0,02	ECK-PA-A
4-11	0,08	ECK-PA-B
12-17	0,03	ECK-PA-C
18-38	0,07	ECK-PA-D
39-42	0,05	ECK-PA-E
43-50	0,19	ECK-PA-F
51-66	1,20	ECK-PA-G
67-79	1,15	ECK-PA-H
80-90	0,83	ECK-PA-I
91-101	0,81	ECK-PA-J
102-110	0,71	ECK-PA-K
TOTAL	51,4 (94%)	

7.5.29 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-G (obtenção de ECK-10)

1,20 g da fração ECK-PA-G foram adsorvidos em 2,0 g de sílica e recromatografados em um funil cilíndrico ($\varnothing_{ext.} = 2,0$ cm) contendo 8,3 g de gel de sílica ($h=8,0$ cm). Foram utilizados os solventes $CHCl_3$, MeOH e acetona para a eluição, obtendo-se 67 frações como descrito na Tabela 7.20.

Tabela 7.20 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-G

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-34	10	$CHCl_3$ /MeOH 10%	Levemente Amarelada
35-45	10	$CHCl_3$ /MeOH 15%	Incolor
46-55	10	$CHCl_3$ /MeOH 20%	Incolor
56-61	10	$CHCl_3$ /MeOH 30%	Incolor
62-66	10	Acetona	Amarelada
67	30	MeOH	Amarronzada

O processo de análise comparativa em CCD permitiu o agrupamento das seguintes frações (ver Tabela 7.20a):

Tabela 7.20a - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-G

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
5-7	26,0	ECK-PA-GA
8-9	55,0	ECK-PA-GB
10-12	115,0	ECK-PA-GC
13-21	323,0	ECK-PA-GD
22-27	166,0	ECK-PA-GE
28-40	30,0	ECK-PA-GF
41-48	73,0	ECK-PA-GG
49-67	185,0	ECK-PA-GH
TOTAL	973,0 (81%)	

A fração ECK-PA-GA (55.0 mg) foi recristalizada com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5% e se apresentou como cristais brancos em forma de agulhas, solúvel em metanol e p.f. = 251.6-253.8 °C, sendo denominados **ECK-10** (18 mg).

7.5.30 - Fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração ECK-PA-H

A fração ECK-PA-H (1.15 g), foi adsorvida em 1.3 g de gel de sílica e foi recromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,0$ cm) contendo 8.6 g de gel de sílica (h=8.3 cm). A eluição foi realizada com gradiente em ordem crescente de polaridade empregando os solventes CHCl_3 , MeOH e acetona. A Tabela 7.21 resume o procedimento.

Tabela 7.21 - Fracionamento cromatográfico da fração ECK-PA-H

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-20	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10%	Incolor
21-39	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10%	Levemente Amarelada
40-59	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 15%	Incolor
60-69	10	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20%	Incolor
70-74	10	Acetona	Amarela
75-77	50	Acetona	Amarela
78-79	50	MeOH	Amarelada

Prosseguindo com a análise das frações por meio de comparação em CCD, estas foram agrupadas da seguinte maneira (ver Tabela 7.21a):

Tabela 7.21a: Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-H

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
9-11	8.0	ECK-PA-HA
12-22	231.0	ECK-PA-HB
23-31	295.0	ECK-PA-HC
32-47	166.0	ECK-PA-HD
48-60	15.0	ECK-PA-HE
62-79	11.0	ECK-PA-HF
TOTAL	726,0 (63,1%)	

7.5.31 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração ECK-PA-HB – Isolamento de ECK-11 e ECK-12.

A fração ECK-PA-HB (231,0 mg) foi solubilizada em metanol e eluída com o mesmo solvente em uma coluna de Sephadex LH-20 (h=25 cm). Foram coletadas 19 frações contendo os seguintes volumes: (1; 10 mL), (2-14; 3 mL), e (15-19; 10 mL).

A comparação das frações em CCD permitiu o agrupamento em cinco frações, como exposto na Tabela 7.22:

Tabela 7.22 - Resultado do agrupamento das frações de ECK-PA-HB

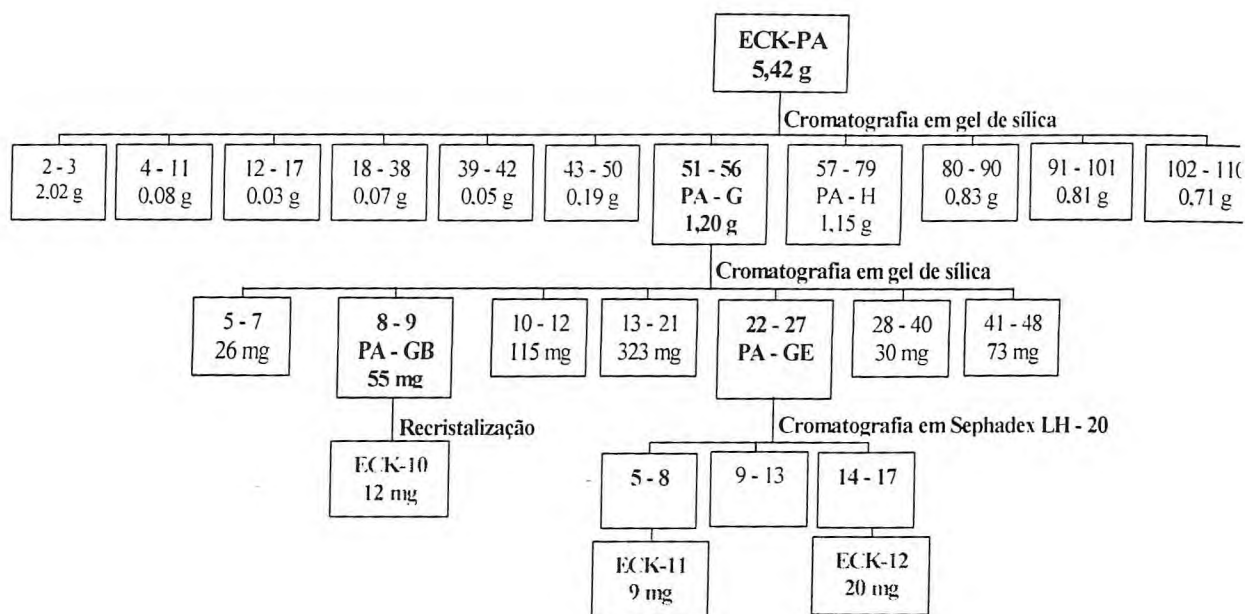
FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
3-5	24,0	ECK-PA-HB1
6	11,0	ECK-PA-HB2
7-9	113,0	ECK-PA-HB3
11-13	40,0	ECK-PA-HB4
10	13,0	ECK-PA-HB5

A fração ECK-PA-HB1 se mostrou como um sólido branco, amorfo, solúvel em metanol, p.f. = 148,2 – 150,9 °C, denominado **ECK-11**.

A fração ECK-PA-HB4 se mostrou como um sólido amarelo translúcido, solúvel em metanol, p.f. = 167,9 – 170,2 °C, denominado **ECK-12**.

Procedimento similar ao descrito neste item foi realizado com as frações ECK-PA-GE e ECK-PA-HC obtendo mais 30,0 mg de **ECK-11** e 90,0 mg de **ECK-12**.

Fluxograma 7.7 – Esquema de obtenção de ECK-10, ECK-11 e ECK-12



7.6 - Isolamento dos Metabólitos Secundários de *Trigona spinipes* Fabricius

7.6.1- Obtenção do extrato do ninho de *Trigona spinipes* Fabricius.

14,7 kg do ninho de *Trigona spinipes* foram acondicionados, em pedaços pequenos (5-7 cm) em um frasco ao qual foi adicionado etanol em quantidade suficiente para cobrir todo o material. Após a evaporação do solvente obteve-se um extrato de cor marrom, aroma adocicado, pastoso e pegajoso, denominado TSCE (2,24 kg).

7.6.2 - Particionamento do extrato de TSCE

Foram tomados 29,0 g do extrato de TSCE e dissolvidos em 180 mL de etanol/água 1:1. A mistura foi aquecida para solubilização do extrato e posteriormente foi iniciado o processo partição líquido-líquido.

A primeira extração foi realizada com hexano, empregando porções de 50 mL (x5). Após secagem com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente, obteve-se uma fração amarelada, viscosa que pesou 18.60 g (43.4%). Esta foi denominada **TSCE-PH**.

A segunda extração foi realizada com clorofórmio, utilizando porções de 50 mL (x6). Após este procedimento, obteve-se 8,17 g (28,2%) de um material alaranjado, viscoso e pegajoso denominado **TSCE-PC**.

A extração também foi realizada com acetato de etila, 5 mL (5x). A fração pastosa, de cor amarronzada, pesou 1.31 g (4,50%) e foi denominada **TSCE-PA**.

O remanescente da mistura de TSCE foi evaporado e a fase aquosa liofilizada. Esta pesou 4,92 g (17%) e foi denominado **TSCE-Aq**.

Rendimento total = 93.1%.

7.6.3 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH

8.0 g da fração TSCE-PH foram adsorvidos em 30,0 g de gel de sílica e submetidos a uma cromatografia filtrante em um funil cilíndrico contendo 60 g de gel de sílica. Foram coletadas 12 frações. Os dados encontram-se descritos na Tabela 7.23.

Tabela 7.23 - Fracionamento cromatográfico (filtrante) da fração TSCE-PH

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-4	125	Hexano	Incolor
5-8	125	Diclorometano	Amarela
9-10	125	EtOAc	Amarela-pálida
11-12	125	MeOH	Amarela-pálida

As frações coletadas foram rotoevaporadas e reunidas de acordo com os eluentes utilizados fornecendo as seguintes frações (Tab. 7.23a, p. 317):

Tabela 7.23a: Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-4	231 mg	TSCE-PH-H
5-8	3,25 g	TSCE-PH-C
9-10	2,90 g	TSCE-PH-A
11-12	115 mg	TSCE-PH-M
TOTAL	6,496 (81,2 %)	

7.6.4 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-A

A fração TSCE-PH-A (2,90 g) foi adsorvida em 10,0 g de gel de sílica e cromatografada em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 3,8$ cm) contendo 60 g de gel de sílica ($h=14,5$ cm). Foram obtidas 35 frações utilizando-se solventes puros ou misturas binárias de solvente ou estes puros. Na Tabela 7.24 encontram-se os dados referentes ao processo de eluição.

Tabela 7.24 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-A

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-4	100	Hexano/ EtOAc 10%	Incolor
5-9	100	Hexano/ EtOAc 15%	Incolor
10-15	50	Hexano/ EtOAc 20%	Amarela
16-24	50	Hexano/ EtOAc 25%	Amarela
25-29	50	Hexano/ EtOAc 30%	Amarela
30-31	100	Hexano/ EtOAc 35%	Amarela
32-33	100	EtOAc	Marrom
34-35	100	MeOH	Marrom-pálido

As frações foram comparadas por meio de CCD e agrupadas de acordo com a semelhança entre elas. A Tabela 7.26a (p. 318) reúne as informações do agrupamento das frações.

Tabela 7.24a - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH-A

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-5	vazia	-
6-8	151,0	TSCE-PH-AA
9-12	448,0	TSCE-PH-AB
13-15	458,0	TSCE-PH-AC
15 ppt	24,0	TSCE-PH-AD
16-21	619,0	TSCE-PH-AE
22-28	300,0	TSCE-PH-AF
29-32	173,0	TSCE-PH-AG
33	526,0	TSCE-PH-AH
34-35	72,0	TSCE-PH-AI
TOTAL	2771,0 (95,6%)	

A fração TSCE-PH-AC foi suspensa com hexano/EtoAc 20%. A parte insolúvel foi reservada. A porção solúvel foi recromatografada.

7.6.5 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-AC – Isolamento de TS-1.

A fração TSCE-PH-AC (458 mg) foi recromatografada, após ser adsorvida em 2,0 g de gel de sílica, em um funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,6$ cm) contendo 20 g de gel de sílica (h=11 cm). O processo de eluição foi efetuado utilizando gradiente de concentração de solvente tal como exposto na Tabela 7.25.

Tabela 7.25 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PH-AC

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1-2	100	Hexano/CHCl ₃ %	Incolor
3-4	100	Hexano/CHCl ₃ %	Incolor
5-6	50	Hexano/CHCl ₃ %	Incolor
7-10	50	CHCl ₃	Incolor
11-13	50	CHCl ₃	Amarelada
14-17	50	CHCl ₃ /EtOAc5%	Incolor
18-22	50	CHCl ₃ /EtOAc10%	Incolor
23	100	CHCl ₃ /MeOH10%	Amarelada

Após o procedimento usual de comparação em CCD, as frações foram agrupadas da seguinte maneira (Tab. 7.25a):

Tabela 7.25a - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PH-AC

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-10	-	
11-14	148,0	TSCE-PH-ACA
14 ppt	14,0	TSCE-PH-ACB
15-18	40,0	TSCE-PH-ACC
TOTAL	202,0 (44,1 %)	

Destas frações, a TSCE-PH-ACB (14,0 mg) apresentou-se como um pó branco, solúvel em clorofórmio. Após as análises preliminares no RMN, constatou-se que era uma mistura de triterpenos da série cicloartano e foi denominada **TS-1**.

7.6.6 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC (filtrante)

6,40 g da fração TSCE-PC foram adsorvidos em 20 g de gel de sílica e cromatografados sobre 90,0 g de gel de sílica em funil de Buchner. Utilizou-se a série eluotrópica em gradiente crescente com hexano (600 mL) diclorometano (700 mL), acetato de etila (1250 mL) e metanol (700 mL), resultando em quatro frações (ver Tab. 7.26):

Tabela 7.26 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC

FRAÇÕES	PESO (g)	DENOMINAÇÃO
hexano	0,01	TSCE-PC-H
diclorometano	0,33	TSCE-PC-D
acetato de etila	4,13	TSCE-PC-A
metanol	1,10	TSCE-PC-M
TOTAL	5,57 (87,0 %)	

7.6.7 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-A – Isolamento de TS-2

3,8 g da fração TSCE-PC-A, após adsorvidos em 16,0 g de gel de sílica, foram recromatografados em funil cilíndrico contendo 60,0 g de gel de sílica. A série eluotrópica empregada com gradiente crescente está descrita na Tabela 7.27.

Tabela 7.27 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-A

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1	40	CHCl ₃ /EtOAc 5%	Incolor
2-13	50	CHCl ₃ /EtOAc 5%	Amarela
14-17	50	CHCl ₃ /EtOAc 10%	Amarela
18-19	50	CHCl ₃ /EtOAc 20%	Amarela
20-25	50	Hexano/EtOAc 1:1	Amarela
26-29	50	Hexano/EtOAc 80%	Amarela
30-34	50	MeOH	Amarela

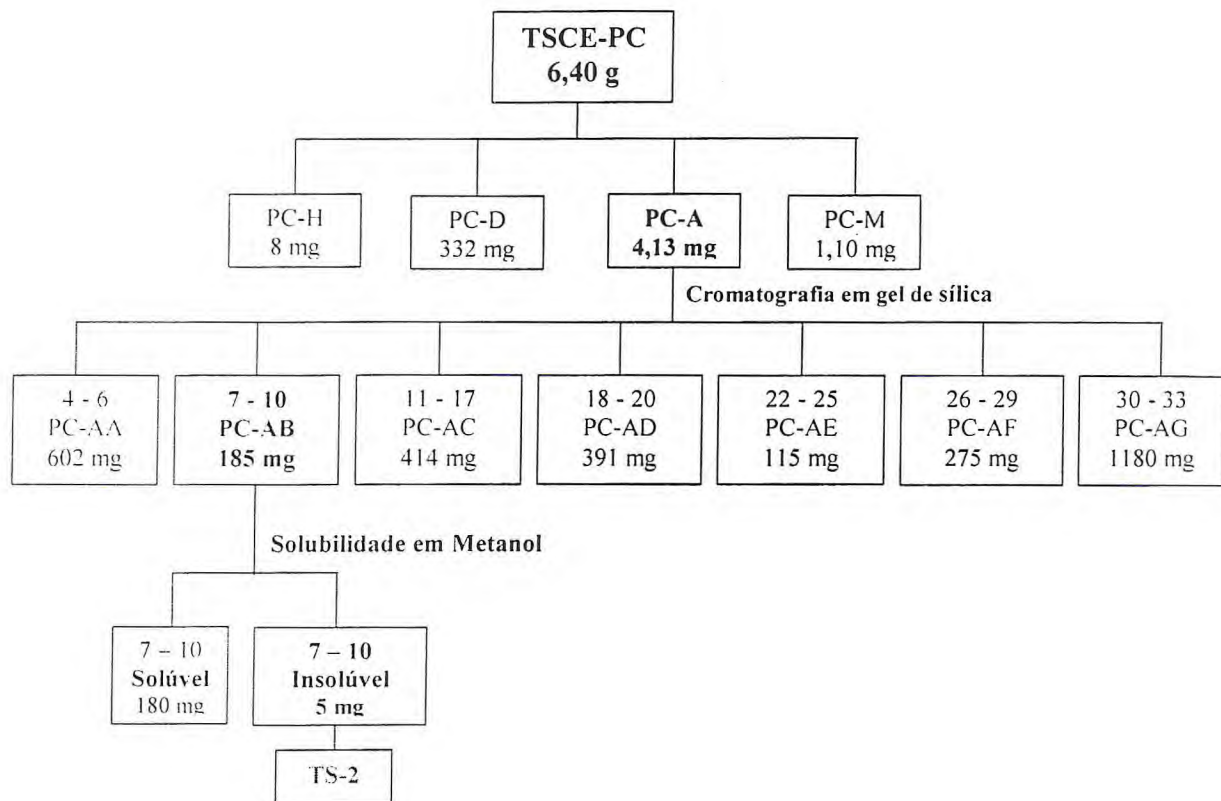
Prosseguindo com a comparação das frações em CCD foi possível agrupá-las como mostra a Tabela 7.27a.

Tabela 7.27a - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-A

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
4-6	602,0	TSCE-PC-AA
7-10	185,0	TSCE-PC-AB
11-17	414,0	TSCE-PC-AC
18-20	391,0	TSCE-PC-AD
22-25	115,0	TSCE-PC-AE
26-29	275,0	TSCE-PC-AF
30-33	1187,0	TSCE-PC-AG
TOTAL	3167,0 (83,3%)	

A fração 7-10 (TSCE-PC-AB) apresentou um anel de sólido amarelo-vivo na parede do frasco, insolúvel em metanol. Análise em CCD demonstrou que este sólido insolúvel se apresentava homogêneo, era solúvel em piridina. p.f = 292,6 – 295,0° C. Foi denominado **TS-2** (Flux. 7.8, p. 321).

Fluxograma 7.8 - Esquema da obtenção de TS-2



7.6.8 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AA.- Isolamento de TS-3 e TS-4

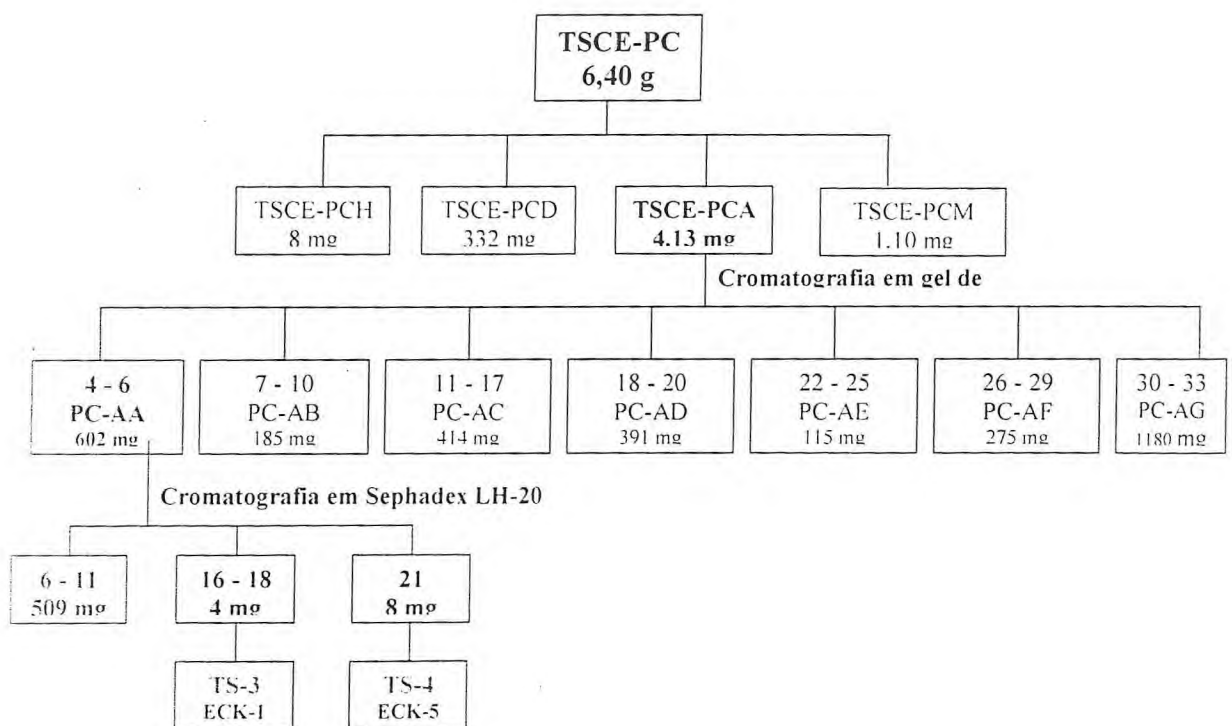
Os 602 mg da fração ACE-PC-AA foram solubilizados em metanol e recromatografados em funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,2$ cm) contendo Sephadex LH-20 ($h=24,3$ cm). A eluição isocrática foi realizada com MeOH e 25 frações foram coletadas, (1-4; 5 mL); (5-9; 3 mL) e (10-25; 5 mL). Por comparação em CCD as seguintes frações foram agrupadas (ver Tab. 7.28, p. 322).

Tabela 7.28 - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AA

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
2-5	57.0	TSCE-PC-AAa
6-11	509.0	TSCE-PC-AAb
12-15	8.0	TSCE-PC-AAc
16-18	4,0	TSCE-PC-AAd
19-20	2.0	TSCE-PC-AAe
21	8,0	TSCE-PC-AAf
22-25	5.0	TSCE-PC-AAg
TOTAL	593,0 (98,5%)	

As frações TSCE-PC-AAd (4.0 mg), denominada **TS-3** e TSCE-PC-AAf (8.0 mg) denominada **TS-4**, mostraram-se homogêneas em CCD e foram comparadas aos padrões obtidos do “kino”, mostrando-se idênticas a ECK-1 e a ECK-5, respectivamente (Flux. 7.9).

Fluxograma 7.9 - Esquema da obtenção de TS-3 e TS-4.



7.6.9 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AF- Isolamento de TS-5

A fração ACE-PC-AF (275,0 mg) foi solubilizada em MeOH, recromatografada em funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,8$ cm) contendo Sephadex LH-20 ($h=24,3$ cm) e eluída de forma isocrática com MeOH, coletando-se 31 frações: (1-2; 8 mL), (3-5; 5 mL), (6-20; 3 mL), (21-26; 5 mL), (27-31; 8 mL). As frações obtidas foram comparadas por meio de CCD, permitindo o agrupamento das frações conforme disposto na Tabela 7.29.

Tabela 7.29 - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AF.

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
1-3	34	TSCE-PCA-Fa
4-6	58	TSCE-PCA-Fb
7-11	89	TSCE-PCA-Fc
12-14	5	TSCE-PCA-Fd
15-17	4	TSCE-PCA-Fe
18-23	32	TSCE-PCA-Ff
24-27	25	TSCE-PCA-Fg
28-29	5	TSCE-PCA-Fh
30-31	18	TSCE-PCA-Fi
TOTAL	270 (98,2 %)	

Dentre as frações, TSCE-PC-AFh (5,0 mg), apresentou-se como um sólido amarelo-pálido, homogêneo em CCD, solúvel em metanol e $p.f. = > 300$ °C, recebendo a denominação de **TS-5**. O Fluxograma 7.10, p. 310, resume o processo de obtenção.

7.6.10 - Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração TSCE-PC-AB – obtenção de TS-6

180,0 mg da fração 7-10 (sobrenadante) (TSCE-PC-AB) foram recromatografados em funil cilíndrico ($\varnothing_{\text{ext.}} = 2,8$ cm) contendo Sephadex LH-20 ($h=24,3$ cm), em condições isocráticas, na qual foi utilizado metanol como eluente. Foram coletadas 20 frações e o procedimento encontra-se resumido na Tabela 7.30 (p. 324).

Tabela 7.30 - Fracionamento cromatográfico da fração TSCE-PC-AB

FRAÇÕES	VOLUME (mL)	ELUENTE	COLORAÇÃO
1	15	MeOH	Marrom
2	10	MeOH	Amarela
3-8	5	MeOH	Amarela-clara
9-12	5	MeOH	Amarela-clara
13-18	5	MeOH	Amarela-clara
19-20	10	MeOH	Amarela-clara

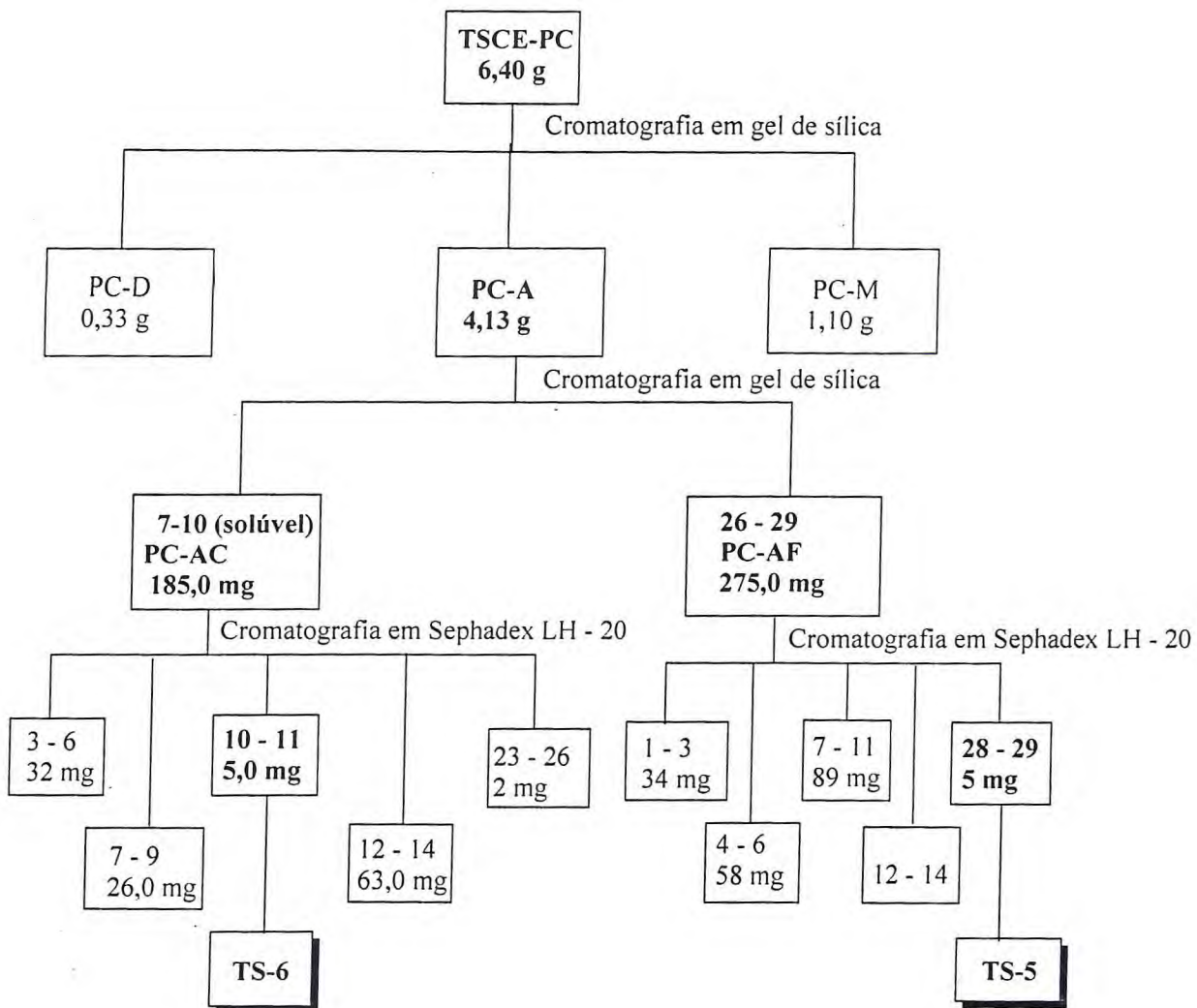
A análise comparativa em CCD permitiu o agrupamento em cinco frações, discriminadas na Tabela 7.30a.

Tabela 30a - Resultado do agrupamento das frações de TSCE-PC-AB

FRAÇÕES	PESO (mg)	DENOMINAÇÃO
3-6	32	TSCE-PC-ABA
7-9	26	TSCE-PC-ABB
10-11	5	TSCE-PC-ABC
12-14	63	TSCE-PC-ABD
15-20	39	TSCE-PC-AE
TOTAL	165 (91,7 %)	

Destas, a fração TSCE-PC-ABC (11,0 mg) denominada **TS-6**, mostrou-se homogênea em CCD e foi comparada aos padrões obtidos do “kino”, mostrando-se idêntica a ECK-2. O Fluxograma 7.10 (p. 325) resume o processo de obtenção de TS-6.

Fluxograma 7.10 – Esquema da obtenção de TS-5 e TS-6.



7.7 Obtenção de Derivado – Reação de Acetilação de ECK-2

Em um balão de 100 mL foram colocados 50 mg de ECK-2 obtida no Item 7.5, e adicionados anidrido acético (4,0 mL) e piridina (0,5 mL), segundo a técnica descrita na literatura [Matos, 1988] A mistura reacional foi posta para reagir por 24h sob agitação constante. Em seguida foi adicionado gelo picado sob agitação e após resfriamento da solução, extraiu-se o material acetilado com três porções de 10 mL de clorofórmio, em funil de separação. O excesso de piridina do extrato clorofórmico foi removido com uma solução de HCl 5 % e com sucessivas lavagens com água destilada, até pH próximo de 5. A porção clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada, fornecendo 74 mg de material acetilado impuro que foi submetido a tratamento cromatográfico.

O produto obtido foi submetido à purificação em coluna de gel de sílica “flash” onde foram coletadas 40 frações mediante eluição com Hexano 30%/CHCl₃ 70%. Após análise comparativa em CCD foi possível o agrupamento em três frações, conforme exposto na Tabela 7.31.

Tabela 7.31 - Dados resultantes do tratamento cromatográfico de ECK-2Ac.

Denominação	Fração	Peso (mg)
F1	5- 13	9
F2	15-24	54
F3	25-40	7

A fração **F1** (54 mg) apresentou-se homogênea em CCD, coloração branca opaca, p.f = 119,7 – 123,3 °C e foi denominada **ECK-2Ac**.

Capítulo 8:

Conclusão

7 CONCLUSÕES

A análise circadiana realizada com os óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook (OEEC1), no mês de janeiro, nos horários de 6:00 às 18:00h, com intervalos de três horas entre elas, apontou o horário das 9:00h como sendo o de maior produção percentual do óleo (3,4%). Com relação aos constituintes presentes, o horário que apresentou maior variação foi o de 6:00h, no qual foi detectado o maior teor de citronelal (90,3%) e a presença de três constituintes. Os demais constituintes identificados ao longo das análises foram: isopulegol, acetato de citronelila e β -citronelol. Na análise sazonal realizada com OEEC1 durante os meses de janeiro a julho (exceto o mês de abril), observou-se que em fevereiro houve a maior produção de óleo (3,6%). O mês no qual o OEEC1 apresentou o maior teor de citronelal (98,0%) foi julho, porém com menor número de constituintes presentes (apenas dois). Os demais meses apresentaram-se constantes (quatro constituintes, os mesmos da análise circadiana) variando apenas em junho, que apresentou o *cis*-cariofileno a mais, na sua composição.

Na análise realizada com o óleo essencial das folhas de *E. citriodora* de outra localidade (OEEC2) foram registrados quinze constituintes dos quais nove foram identificados: óxido *cis*-rose, óxido *trans*-rose, citronelal, iso-isopulegol, neoiso-isopulegol, acetato de citronelila, β -citronelol e óxido de cariofileno. O constituinte majoritário foi o citronelal (45 %). A diferença observada entre os teores deste composto em OEEC1 e OEEC2, corrobora com os dados da literatura que descrevem quatro quimiotipos de *E. citriodora* baseados na composição dos óleos: tipo dominante, citronelal > 65%, tipo A; citronelal variando de 1 a 14%, tipo intermediário, citronelal entre 20 a 50% e o último com citronelal < 10%.

A análise circadiana do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus tereticornis* Smith (OEET), realizada concomitante ao OEEC1, apresentou-se constante quanto à produção do óleo (1,1 %), exceto às 18:00h, horário que houve o decréscimo (0,5%). Quanto à composição química dos óleos, a mais complexa foi obtida às 15:00h, quinze constituintes, dos quais, dez foram identificados, enquanto o óleo com menor número de constituintes foi o das 18:00h, com doze constituintes, sendo seis identificados. No total foram identificados treze compostos: β -pineno, *para*-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno, α -terpinoleno, *endo*-fenchol,

trans-pinocarveol, *endo*-borneol, terpinen-4-ol, *trans*-isocarveol, α -terpineol, *cis*-ment-1(7),8-dien-ol(*para*) e germacreno B. O composto 1,8-cineol foi o majoritário em todas as amostras analisadas, com o maior teor percentual às 9:00h (82,45 %) e o menor às 18:00h (62,6%). Para a análise sazonal do OEET, também realizada no mesmo período de OEET1, a produção oleífera permaneceu praticamente constante (1,0 %), registrando decréscimo no mês de fevereiro (0,5%). Foram registrados vinte e cinco constituintes, treze a mais das análises anteriores, os quais foram: α -tujeno, α -pineno, β -ocimeno, isopulegol, citronelal, citronelol, timol, carvacrol, β -duprezianeno, aromadendreno, longifoleno, viridiflorol e globulol. Novamente o 1,8-cineol foi o composto majoritário, registrando o maior e menor teor percentual nos respectivos meses, junho (87,3%) e fevereiro (2,2%).

Os constituintes químicos não-voláteis isolados a partir do “kino” de *Eucalyptus citriodora* Hook foram caracterizados como sendo os flavonóides 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona, 5,7,4'-triidroxi-flavanona (naringina), 5,7,4'-triidroxi-flavanonol (aromadendrina), 5,4'-diidroxi-7-metóxi-flavanonol (aromadendrina-7-metil éter), 3,5,4'-triidroxi-7-metoxiflavanol, 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,4'-diidroxi-7-metoxi-flavanonol e 6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-5,7,4'-triidroxi-flavanonol; os heterosídeos: 7-metil-aromadendrina-4'-O-(6''-*trans-p*-cumaroila)- β -D-glicopiranosídeo, 1-O-cinamoila-6-O-*p*-cumaroila- β -D-glicopiranosídeo, 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]- β -D-glicopiranosose e 6[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propanoato]- α -D-glicopiranosose; o ácido gálico e o tanino 1-O,2-O-digaloil-6-O-*trans-p*-cumaroil- β -D-glicopiranosídeo. São inéditos na espécie os três primeiros flavonóides e os dois primeiros heterosídeos; a mistura de heterosídeos é inédita no gênero, enquanto os dois últimos flavonóides e o tanino são inéditos na literatura.

Os constituintes químicos não-voláteis isolados a partir do extrato etanólico do ninho de *Trigona spinipes* Fabricius foram caracterizados a mistura de triterpenos ácido *trans*-3 β -hidróxi-24-cicloarteno-26-óico (ácido magniferólico) e ácido 3 β -hidróxi-24-metilenocicloartano-26-óico, além dos cinco flavonóides: 3'-metil-quercetina, 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona (sakuranetina), 3,5,4'-triidroxi-7-metoxiflavanol (kampferol-7-metil éter), 3,5 4'-triidroxi-7-metoxiflavanol e 3,5,4'-triidroxi-7-metóxi-flavanona. Estes compostos estão sendo descritos pela primeira vez para *Trigona*.

Três compostos foram igualmente obtidos do “kino” do *Eucalyptus citriodora* Hook e do extrato etanólico do ninho de *Trigona spinipes* Fabricius (arapuá), a saber, os flavonóides 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona (sakuranetina), 3,5,4'-triidroxí-7-metoxiflavonol (kampferol-7-metil éter) e 3,5,4'-triidroxí-7-metóxi-flavanona. Esta evidência confirma a utilização do “kino” na confecção do ninho das abelhas, possivelmente como fonte germicida, propriedades estas atribuídas a alguns compostos fenólicos, posto ser o ninho bastante contaminado por materiais utilizados na sua confecção, tais como fezes secas, além de insetos mortos e presos nas colônias.

Além destas três substâncias, a comparação por CCD da fração clorofórmica do “kino” com a fração TSEC-C revelou a presença de outros compostos comuns que por estarem em pequenas quantidades ou em misturas cujos R_fs eram muito próximos ou sobrepostos, não puderam ser obtidos pelos processos disponíveis. Portanto, a utilização de outras técnicas tais como, CG/MS, HPLC ou as duas, possibilitariam a identificação ou obtenção destes constituintes presentes.

Dentre as possibilidades de dar continuidade a este trabalho seria um estudo mais detalhado da composição dos óleos essenciais das plantas estudadas durante o período de 18:00 às 6:00h e também os meses de agosto a dezembro. E com relação ao estudo do kino e do ninho de *T. spinipes*, o emprego das técnicas já citadas para o isolamento das substâncias encontradas nas misturas mais complexas e de difícil separação.

A avaliação da atividade biológica das substâncias obtidas, tais como testes relacionados com as atividades antimicrobianas e antioxidante dos flavonóides, heterosídeos e do tanino, também podem ser promissores.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SATTAR, E.; KOHIEL, M. A.; SHEHATA, I. A.; EL-ASKARY, H. **Pharmazie**, v. 55, p. 263, 2000 (in RASWAN, 2002)

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Quadupole Spectroscopy**. 3th ed., USA, 2001.

AGRAWAL, P. K.. **Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier, 1989.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; Kovats indices as a preselecion routine in mass spectra library search of volatiles. **J. Nat. Prod.**, v. 47, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; Kovats indices simulation essencial oils analysis. **Química Nova**, v.13, n. 4, p. 282-284, 1990

ALMEIDA, S. C. X.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2005.

ANET, E. F. L. J.; BIRCH, A. J.; MASSAY-WESTROPP, R. A.. The isolation of shikimic acid from *Eucalyptus citriodora*. **Australian J. Chem.**, v. 10, p. 93-94, 1957.

ANJANEYULU, V.; HARISCHANDRA PRASAD, K.; RAVI, K.; CONNOLLY, J. D.. Triterpenoids from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**, v.24, n. 10, p. 2359-2367, 1985.

ASSUNÇÃO, J. C. C. Estudo Químico de Própolis do Ceará. Dissertação de Mestrado, Depto. de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. p. 118, 2004.

- ARGIRO, A. I.; RETAMAR, J. A.. Essential oils of Tucuman province. Essence of *Eucalyptus citriodora*. **Arch. Bioquim., Quim. Farm.**, v.18, p. 29-37, 1973.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa. p.15-77, 1984
- BARROW. J., *Corymbia, Corymbia...* wherefore art thou *Corymbia*? www.farrer.riv.csu.edu/ASGAP/APOL19/sep00.3.html acesso em 06/02/2003.
- BARUA, A. K. S.; GUPTA, N. K.; BHAGAT, S. D.; MATHUR, R. K.; GOPINATH, K. W.; IYENGAR, M. S.. Chemical composition of oil of *Eucalyptus citriodora* cultivated at Jorhat, Assam. **Flavour Ind.**, v. 3, n. 8, p. 416-417, 1972.
- BASTOS, E. Estudo mostra o potencial da própolis verse de Minas Gerais. *Ciência & Tecnologia*, <http://www.radiobras.gov.br/ct/materia.phtml?materia=86595>, acesso em 07/09/2005.
- BATISH, D. R.; SETIA, N.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potencial use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v.23, p. 1209-1214, 2004.
- BETTS, T. J.. Solid phase microextraction of volatile constituents from individual fresh *Eucalyptus* leaves of three species. **Planta Medica**, v. 66, p. 193-195, 2000.
- CAMPOS, L. A. O. **Criação de abelhas: alternativa para aumento da produção agrícola**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 9, n. 106, p. 76-80, outubro 1983.
- CHAUDHRY, F. M.; AKBAR, S.; AHMAD, R.; WAHEED, A.; RASHID, M.. Chemical constituents of the essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae), grow in Pakistan. **Sci. Int. (Lahore)**, v. 6, n. 4, p. 373-375, 1994.

- CHIARADIA, L. A.; DA CROCE, D. M.; MILANEZ, J. M. Dano e controle de abelha “irapuá” em eucalipto. **Rev. Agropec. Catarinense**, v. 16, n. 1, 2003; [file://A:\Epagri%20\(trigona%20spinipes\)%20Eucalyptus.htm](file://A:\Epagri%20(trigona%20spinipes)%20Eucalyptus.htm) em 02/03/2005.
- CHIRIS, E. A.. Oil of *Eucalyptus citriodora*. **Parfums de France**, n. 25, p. 72-73, 1925.
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L; VLIETINCK, A.J.. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas Volume II**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro pp 614-616 e 627-628, 1984.
- CRISTINI, B. J. C.; BARUFFALDI, R.; AKISUE, G.. Essence of *Eucalyptus citriodora* and its composition. **Rev. Fac. Farm. Bioq. Universid. São Paulo**, v. 4, n. 1, p. 119-136, 1966.
- COSTELLO, L. R. Western arborist kino: a brief overview. www.mouget.com/mlinks/lemonweb.pdf acesso em 06/02/2003.
- DAGME, E.; BISRAT, D.; ALEMAYEHU, M.; WORKU, T.. Essential oils of twelve *Eucalyptus* species from Ethiopia. **Journal of Essential oil Reseach**, v. 12, n. 4, p. 467-470.
- ECHEVERRI, F.; TORRES, F.; CARDONA, G.; LOPEZ, J.; QUINONES, W.; GALLEGO, L. H.; PELAEZ, C. A.; ROJAS, M.; GARCIA, F.; RESTREPO, L. M.. Larvicidal activity of 7-methoxyaramadendrin agaisnt *Culex* sp. larvae. **Rev. Boliv. Quim.**, v. 11, n. 1, p. 43-45, 1992.
- ELKEIY, M. A.; DARWISH, M.; HASHIM, F. M.; KHADEGA, A.. Investigation of the volatile oil content of certain *Eucalyptus* species cultivated in Egypt. **Bull. Fac. Pharm.**, v. 3, n. 1, p. 97-108, 1964a.

ELKEIY, M. A.; DARWISH, M.; HASHIM, F. M.; KHADEGA, A..A new crystalline substance isolated from the leaves of *Eucalyptus globulus* and *E. citriodora*. **Bull. Fac. Pharm**, v. 3, n. 1, p. 109-117, 1964b.

Fotos trigona ninho www.ufv.br/dbg/bee/ninhomelipon.htm acesso 28/02/2005.

FREITAS, B. M. **A Vida das Abelhas**. Fortaleza : Craveiro & Craveiro, 1999, v.01.

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Livro em CD-Rom com 453 ilustrações

GELL, R. J.; PINHEY, J. T.; RITCHIE, E.. Constituents of the kino of *Eucalyptus maculata*. **Australian J. Chem.** v. 11, p.372-375, 1958.

GOTTILIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; Modified distillation trap. **Chemist Analyst**, v. 49, p. 114-116, 1960.

GUENTHER, E. The Essential Oils, v. IV, Robert E. Krieger Publishing Co. Huntington, New York, 1972

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. Systematic studies in the eucalyptus 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea** v. 6, p.185-504, 1995, *in* BARROW, J., www.farrer.riv.csu.edu/ASGAP/APOL19/sep00.3.html].

HILLIS, W. E.. Eucalypt kinos. II. Aromadendrin, kaempferol, and ellagic acid. **Australian J. Sci. Research** , A5, p. 379-386, 1952.

HILLIS, W. E.. The chemistry of eucalypt kinos. I Chromatografic resolution. **Australian J. Applied Sci.**, v. 2, p. 385-395, 1951.

HILLIS, W. E.; CARLE, A.. The chemistry of eucalypt kinos. III. (+) Afzelechin, pyrogallol, and (+)-catechin from *Eucalyptus calophylla*. **Australian J. Chem.** v. 13, p. 390, 1960.

- HILLIS, W. E.; CARLE, A.. **Australian J. Chem.** v. 16, p. 147, 1963. (in HILLIS, YAZAKI, 1974).
- HILLIS, W. E.; YAZAKI, Y.. Kinins of *Eucalyptus* species and their acid degradation products. **Phytochemistry**, v. 13, p. 495-498, 1974.
- HUANG, SHENG-XIONG; LIAO, X.; NIE, QUAN-JIANG; DING, LI-SHENG, PENG, SHU-LIN. Phenyl and phenylethyl glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 598-604, 2004.
- ISABEL, M.; MONCEF, C.; FREDERICO, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n.8, p. 2824-2829, 1997.
- ITO, J.; CHANG, FRANG-RONG; WANG, HUI-KANG; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, KUO-HSIUNG. Anti-AIDS agents. 48. Anti- HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from brazilian propolis. **J. Nat. Prod.** v. 64, p. 1278-1281, 2001.
- KAUL, P. N.; BHATTCHARYA, A. K.; RAJESWARA RAO, B. R.; MALLAVARAPU, G.R.; RAMESH, S.. Essential oils from *Eucalyptus citriodora*. Composition of products from India. **Parfuem. Kosmet.**, v. 78, n. 10, p. 38-40, 1997.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu : Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte-MG : Acangauá, 1996. 144 p.: il., (Coleção Manejo da vida silvestre; 2).
- LEE, CHING-KUO; CHANG, MING-HUEY. The chemical constituents from the heartwood of *Eucalyptus citriodora*. **J. Chinese Chem. Soc.**, v.47, p. 555-560, 2000.
- LEE, IN-KYOUNG; KIM, CHANG-JIM; SONG, KYUNG-SIK, KIM, HWAN-MOOK; KOSHINO, H.; URAMOTO, M.; YOO, ICK-DONG. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 213-216, 1996.

- LEGRAND, D., KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense. Mirtaceas.** Itajaí, SC: Paulino Reitz, p. 842-853, 1978.
- LINS, A. C. S.; SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A., SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M., Flavonóides isolados do pollen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* (canudo). **Rev. Bras. Farmacog.**, v.13, supl. 2, p. 40-41, 2003.
- MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Identification of flavonoid markers for botanical origin of eucalyptus honey. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 5, p. 1498-1502, 2000.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** EUFC, Fortaleza - CE, 1988. 126 p.
- MCGOOKEN, A.; HEILBRON, I. M., Tannin occurring in the kino of *Eucalyptus calophylla*. **J. Pharmacol.**, v. 26, p. 421-446, 1926.
- MEJDOUB, R.; KATSIOTIS, S. Th.. Factors influencing the yield and the quality of the obtaining essential oil from the leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook. Growing in Crete. **Sci. Pharm.**, v. 66, p. 93-105, 1998.
- MICHENER, C.D. **The Social Behavior of the Bees.** Harvard Univ. Press, Cambridge, 1974.
- MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.** v. 54, p. 75-164, 1990.
- MICHENER, C.D. **The Bees of the World.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 2000. 925 pp.
- MIRANDA, M.; ZAYAS, J. P.. Effects of harvest time on essential oil yield and chemical composition of *Eucalyptus citriodora* Hook growing in Cuba. **Rev. Cub. Farm.**, v. 19, n. 1, p. 121-127.

MONDELLO, L.; VERZERA, A.; BONACCORSI, I.; CHOWDHURY, J. U.; YUSEF, M.; BEGUM, J.. Studies in the essential oil bearing plants of Bangladesh. Part V. Composition of leaf oils of *Eucalyptus citriodora* Hook and *E. Alba* Reinw. Ex Blume. **J. Essent. Oil Res.**, v. 10, p. 185-188, 1998.

MOUDACHIROU, M.; GBÊNOU, J. D.; CHALCHAT, J. C.; CHABARD, J. L.; LARTIGUE, C.. Chemical composition of essential oils of *Eucalyptus* from Bénim: *Eucalyptus citriodora* and *E. camaldulensis*. Influence of location, harvest time, storage of plants and time of steamdistilation. **J. Essent. Oil Res.**, v. 13, n. 1, p. 109-118, 1999.

MWANGI, J. W.; GUANTAI, A. N.; MURIUKI, G.. *Eucalyptus citriodora* essential oil content and chemical varieties in Kenya. **East Afr. Agric. For. J.**, v. 46, n. 1-4, p. 89-96.

Name changes in *Eucalyptus camaldulensis*:
www.ffp.csiro.au/tigr/atscmain/taxonomy/cory.html.

NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALANTINO, A.; SALANTINO, M. L. F.. Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). **J. Bras. Chem. Soc.**, v. 11, n. 5, p. 453-457, 2000.

NISHIMURA, H.. The mosquito repellents in *Eucalyptus*. *p*-Menthane-3,8-diols, essential oils in vacuoles. **Kagaku to Seibitsu**, v. 27, n. 8, p. 486-488, 1989.

NISHIMURA, H.; NAKAMURA, T.; MIZUTANI, J.. Allelopathic effects of *p*-menthane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2777-2779, 1984.

NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão; (Meliponinae)**. 2.ed. São Paulo: Editora Tecnapis, 365 p. 1970

PANDA, R.; PANDA, H.; Studies on *Eucalyptus* oil. **Indian Forest**, v. 113, n. 6, p. 434-440, 1987.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L.. Comparasion of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 40, n. 1, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L.. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PENFOLD, A. R.; WILLIS, J. L. Physiological forms of *Eucalyptus citriodora* Hooker. **Nature**, v. 171, p. 883-884, 1953.

PENGELLY, A. www.nhoa.org.ae/forum/text/ahg97.html, acesso em 01/02/2003

PROENÇA DA CUNHA, A.; NEVES, M. T. C.. Analysis of essential oil of *Eucalyptus citriodora* from Angola. **Boletim da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Ed. Científica**, v. 29, p. 38-52, 1969.

RAFIQUI, M.; CHAUDHARY, F. M.. Seasonal variations in the composition of essential oil of *Eucalyptus citriodora* of Pakistan. **Pak. J. Sci. Ind. Res.**, v. 39, n. 1-4, p. 83-84, 1996.

RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 261-262, 2002 .

RAO, P. S.; SOOD, V. K.. Chemical examination of the flower bud oil of *Eucalyptus citriodora*. **Soap, Perfumery e Cosmetics**, v. 34, p. 1123-1124, 1961.

RASHWAN, O. A.. New phenylpropanoid glucosides from *Eucalyptus maculata*. **Molecules**, v. 7, p. 75-80, 2002.

SAKAGAMI, S.F. **Stingless bees**. In: Hermann H.R. (Ed.), **Social Insects**. Vol. III, Academic Press. New York, p. 361-423, 1982.

SATWALEKAR, S. S.; GUPTA, T. R.; NARASIMHA RAO, P. L.. Chemical and antibacterial properties of kinos from *Eucalyptus* spp. citriodora- the antibiotic principle from kino of *E. citriodora*. **J. Indian Inst. Sci.**, v. 39, p. 195-212, 1957.

SEIXAS, A. C. N.; SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.. Flavonóides e derivados obtidos do pollen coletado de abelhas sem ferrão nativas do Nordeste brasileiro. **Simp. Bras. Farmacog. – Livro de Resumos**. Salvador – BA, PN 7, 2003.

SHARMA, M. L.; HANDA, K. L.. The essential oil of *Eucalyptus citriodora* raised in Jammu. **India Oil Soap Journal**, v. 29, n. 6, p. 160-164, 1963.

SHEN, Z.; XU, G.. Chemical constituents of *Eucalyptus citriodora* leaves. Part II. Isolation and identification of flavonoid compounds. **Linchan Huaxue Yu Gongye**. v.7, n. 2, p. 28-34, 1987.

SHEN, Z.; YU, J.. Chemical constituents of *Eucalyptus citriodora* leaves. Part I. **Linchan Huaxue Yu Gongye**. v.6, n. 3, p. 28-31, 1986.

SHEN, Z.; YU, J.. Chemical constituents of *Eucalyptus citriodora* leaves. Part IV. Study on tannin constituents. **Linchan Huaxue Yu Gongye**. v.10, n. 2, p. 71-76, 1990.

SHEN, Z.; YU, Q.; WANG, Y.; LIN, G.. Chemical constituents of *Eucalyptus citriodora* leaves. Part III. Isolation and identification of citriodorin. **Linchan Huaxue Yu Gongye**. v.7, n. 2, p. 35-43, 1987.

SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, I.; BEGUM S.. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* leaves. **Phytochemistry**, v. 54, p. 861-865, 2000.

SISS, A. M.; CANIVENC LAVIER, M. C.; AMIOT, M. J.; SABATIER, S.; AUBERT, S. Y.; SUSCHETET, M.. Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n.8, p. 2297-2301, 1997.

- SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Eucalyptus*. **J. Ethnopharmac.** v. 89, p. 277-283, 2003.
- SILVEIRA, F.A. & M.J.O. CAMPOS. A melissofauna de Corumbataí (SP) e Paraopeba (MG) e uma análise da biogeografia das abelhas do cerrado brasileiro (Hymenoptera, Apoidea). **Rev. Bras. Entomol.** v. 39, p. 371-401, 1995.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5ª. Ed. Editora LTC: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro, RJ, 1994.
- SOHOUNHLOUE, D. K.; DANGOU, J.; GNOMHOSSOU, B.; GARNEAU, F. -X.; GAGNON, H.; JEAN, F. -I.. Leaf oils of three *Eucalyptus* species from Benin: *E. torrelliana* F. Muell., *E. citriodora* Hook. and *E. tereticornis* Smith. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, n. 1, p. 111-113, 1996.
- SOOD, V. K.; RIER, JOHN P. Jr.; GHOSH, R. C.. A gas-liquid chromatograph analysis of oil from young and old leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Parfuem. Kosmet.**, v. 68, n. 8, p. 495-498, 1987.
- SY, LAI-KING; SAUNDERS, R. M. K., BROWN, G. D. Phytochemistry of *Illicium dunnianum* and the systematic position of the Illiciaceae. **Phytochemistry**, v.44, p. 1099-1108, 1997.
- USIA, T.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. **J. Nat. Prod.** , v. 65, p. 673-676, 2002.
- VELTHUIS, H.H.W. **Biologia das Abelhas sem Ferrão**. USP e Universidade de Utrecht. São Paulo. 1997, 33 pp.

VIANA, B.F. A comunidade de abelhas (Hymenoptera. Apoidea) das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, p. 635 – 645, 1999.

WILLE, A. Biology of the stingless bees. **Annu. Rev. Entomol.** v. 28, p. 41–64, 1983.

WILLE, A. Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of stingless bees (Meliponinae) of the world. **Rev. Biol. Trop.** v. 27, p. 241–277, 1979.

www.remade.com.br/revista/matéria.php?edicao=75&id=400, Revista da Madeira, ano 13, n. 75, 2003. acesso: 16/05/2005.

ZRIRA, S.; BENJILALI, B. B.; FECHTAL, M. M; RICHARD, H. H.. Essential oils of twenty-seven *Eucalyptus* species grow in Morocco. **Journal of Essential oil Reseach**, v. 4, n. 3, p. 259-264, 1992.