

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS DE *Chrysophyllum gonocarpum*
(MART. & EICHLER) ENGL. ATIVAS
CONTRA O BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO**

MÍRIAN APARECIDA ISIDRO SANTOS

2009

MÍRIAN APARECIDA ISIDRO SANTOS

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE
Chrysophyllum gonocarpum (MART. & EICHLER) ENGL. ATIVAS
CONTRA O BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”

Orientador

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Mirian Aparecida Isidro.

Purificação e identificação de substâncias de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. ativas contra o bicho-mineiro do cafeeiro / Mirian Aparecida Isidro Santos. – Lavras : UFLA, 2009.

103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Chrysophyllum gonocarpum*. 2. Bicho-mineiro.
3. α -tocoferol. 4. Esqualeno. 5. Ácido *cis*-octadec-9-enóico. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.9517
– 583.6850419

MÍRIAN APARECIDA ISIDRO SANTOS

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE
Chrysophyllum gonocarpum (MART. & EICHLER) ENGL. ATIVAS
CONTRA O BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agroquímica, para a
obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Prof. Geraldo Andrade Carvalho

UFLA

Profa. Angelita Duarte Corrêa

UFLA

Prof. Denilson Ferreira de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico esta dissertação à minha avó Manoela Moreira Isidro (*in memoriam*), à minha mãe Wilma, à minha irmã Miranda e ao meu noivo João Paulo, por tudo o que eles representam em minha vida.

“Desde o minúsculo átomo até ao maior dos mundos, todas as coisas animadas e inanimadas, em sua serena beleza e perfeito gozo, declaram que Deus é amor.”

Ellen Gould White

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, todo poderoso por tudo o que Ele fez e faz por mim.

À minha mãe por todo o amor, por todos os ensinamentos, por toda a dedicação, por estar comigo sempre, por ser a minha base e a minha força em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Miranda, pela alegria, compreensão, apoio e por todos os momentos compartilhados.

Ao meu noivo João Paulo, pelo seu companheirismo e amizade, por todos os momentos, difíceis ou não, em que passamos juntos nesse período.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação.

Aos membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho (DEN) e Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa (DQI).

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFLA pela amizade e ajuda dispensada.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | i |
| RESUMO | ii |
| ABSTRACT | iii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Bicho-mineiro do cafeeiro: <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) | 3 |
| 2.2 Plantas com propriedades inseticidas | 4 |
| 2.3 A família Sapotaceae | 8 |
| 2.4 O gênero <i>Chrysophyllum</i> | 9 |
| 2.5 A espécie <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> | 9 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 3.1 Materiais e equipamentos utilizados | 11 |
| 3.2 Obtenção do material vegetal | 12 |
| 3.3 Preparo do extrato vegetal | 12 |
| 3.4 Criação do bicho-mineiro em laboratório | 12 |
| 3.5 Teste de oviposição do extrato bruto | 13 |
| 3.6 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes | 14 |
| 3.7 Fracionamento da fração solúvel em hexano (Mi-01-49-01) | 15 |
| 3.7.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel | 15 |
| 3.7.2 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-01 | 15 |
| 3.7.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-07 | 16 |

| | |
|---|----|
| 3.7.4 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-50-09..... | 17 |
| 3.7.5 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-78-03..... | 17 |
| 3.7.6 Fracionamento por CLAE da fração Mi-01-81-02 | 18 |
| 3.8 Teste de oviposição das substâncias isoladas | 19 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 20 |
| 4.1 Teste com o extrato bruto das folhas de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> | 20 |
| 4.2 Teste com as frações obtidas por extração com solventes..... | 20 |
| 4.3 Fracionamento da fração solúvel em hexano do extrato bruto de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> | 22 |
| 4.3.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-49-01 | 22 |
| 4.3.2 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-01 | 23 |
| 4.3.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-07 | 23 |
| 4.3.4 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-09 | 24 |
| 4.3.5 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-78-03..... | 25 |
| 4.3.6 Fracionamento em CLAE da fração Mi-01-81-02..... | 25 |
| 4.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas | 27 |
| 4.4.1 Substância Mi-01-76-02 | 27 |
| 4.4.2 Substância Mi-01-79-03 | 30 |
| 4.4.3 Substância Mi-02-16-03 | 34 |
| 4.5 Teste com a substâncias puras (Mi-02-16-03, Mi- 02-79-03 e Mi-01-76-02) obtidas do fracionamento de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> | 39 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 5 CONCLUSÕES | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| ANEXOS | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| CDD | cromatografia em camada delgada |
| CDCl_3 | clorofórmio deuterado |
| CLAE | cromatografia líquida de alta eficiência |
| DEPT | <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> |
| gCOSY | <i>gradient correlated spectroscopy</i> |
| gHMBC | <i>gradient heteronuclear multiple bond coherence</i> |
| gHMQC | <i>gradient heteronuclear multiple quantum coherence</i> |
| gHSQC | <i>gradient heteronuclear single quantum coherence</i> |
| RMN ^{13}C | ressonância magnética nuclear de carbono 13 |
| RMN ^1H | ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| TOCSY | <i>total correlation spectroscopy</i> |
| R_f | fator de retenção |
| δ | deslocamento químico |
| J | constante de acoplamento |
| MeOH | metanol |
| Hex | hexano |
| AcOEt | acetato de etila |
| AcOH | ácido acético |
| UR | umidade relativa |

RESUMO

SANTOS, Mírian Aparecida Isidro. **Purificação e identificação de substâncias de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. ativas contra o bicho-mineiro do cafeeiro.** 2009. 103 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O bicho-mineiro é considerado praga-chave da cultura cafeeira, pois causa desfolha nas plantas, afetando a produtividade das mesmas. Desta forma, buscou-se contribuir para o desenvolvimento de novos inseticidas de origem vegetal para emprego no controle do referido inseto. Para tanto, procedeu-se ao estudo fitoquímico das folhas de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl., cujo extrato metanólico se mostrou ativo contra o bicho mineiro. Após várias etapas de fracionamento por lavagens com solventes e processos cromatográficos, isolaram-se três substâncias do mencionado extrato que, após análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono treze, foram identificadas como esqualeno, α -tocoferol e ácido *cis*-octadec-9-enóico, sendo que este último se mostrou ativo contra o bicho mineiro em testes realizados em laboratório.

* Orientador: Prof. Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

ABSTRACT

SANTOS, Mirian Aparecida Isidro. **Purification and identification of substances from *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. active against the coffee leaf miner.** 2009. 103 p. Dissertation (Master in Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Since the coffee leaf miner causes plantation defoliation that accounts for losses in coffee production, this insect is considered a very important pest in coffee farms. Thus, the present study aimed to contribute to the development of new insecticides of plant origin to control such insect. Consequently, a phytochemical study about leaves of *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. was carried out. From the corresponding methanol extract, which presented activity against the coffee leaf miner, three substances were isolated after solvent extractions and chromatographic processes. After hydrogen and carbon thirteen nuclear magnetic resonance analyses, they were identified as squalene, α -tocopherol and *cis*-octadec-9-enoic acid, which was active against the insect in laboratory tests.

*Adviser: Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O bicho-mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottett, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), é uma praga exótica originária do continente africano (Gallo et al., 2002). Trata-se de um inseto monófago, que ataca apenas o cafeeiro (Reis & Souza, 1996), sendo o seu nome vulgar devido às galerias que as lagartas constroem entre as epidermes da folha, causando a destruição do tecido paliçádico, o qual é utilizado pelas lagartas para sua alimentação (Souza et al., 1998). As primeiras referências ao inseto como praga do cafeeiro no Brasil datam de 1860/1861, quando surtos importantes foram observados em cafezais da província do Rio de Janeiro e do município de Juiz de Fora, em Minas Gerais.

Os prejuízos causados pelo inseto ocorrem em conseqüência da redução da fotossíntese, a qual é causada pelo desenvolvimento das lesões, que provocam a queda prematura de folhas (Cibes & Perez, 1957; Magalhães, 1964; Walker & Quintana, 1969). De acordo com Nantes & Parra (1977), os prejuízos são potencializados pela incidência preferencial em folhas do terceiro e quarto internódio, nos quais a atividade fotossintética é maior. Como as metodologias atualmente disponíveis para o controle do bicho-mineiro se mostram deficientes, existe uma demanda por métodos de controle do referido inseto, sendo bastante promissora a alternativa correspondente ao emprego de produtos de origem natural, já que é notória a capacidade de produção de substâncias inseticidas por algumas espécies vegetais. Como exemplo, tem-se o trabalho de Henderson et al. (2003) que utilizaram substâncias extraídas de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash para o controle de insetos como baratas e formigas, já que tais substâncias apresentaram efeitos tóxicos e repelentes sobre os referidos insetos.

Em trabalho realizado em conjunto, no Laboratório de Produtos Naturais e no de Seletividade de Produtos Químicos a Inimigos Naturais da UFLA, extratos de diversas espécies vegetais foram submetidos a testes em laboratório, o que permitiu observar que *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. apresentava potencial para emprego no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. Buscou-se, portanto, isolar e identificar as substâncias com propriedades inseticidas produzidas por tal planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bicho-mineiro do cafeeiro: *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottett, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

O bicho-mineiro é considerado praga-chave da cultura cafeeira, apesar de seus danos serem indiretos. Clima seco e/ou manipulação ambiental que proporcione condições microclimáticas de baixa umidade relativa no cafezal, favorecem a ocorrência deste inseto-praga (Souza & Reis, 1998). Entretanto, a partir da década de 1970, em razão da ocorrência de ferrugem, que revolucionou a tecnologia de aplicação de defensivos na cultura e a abertura de novas fronteiras em áreas de cerrado para o cultivo de cafeeiros, o bicho-mineiro tem ocorrido de forma contínua, atacando também durante a época das chuvas (Reis, 1990; Reis et al., 1984).

O inseto-praga causa desfolha no cafeeiro, afetando a produtividade e a longevidade das plantas. Os sintomas são mais visíveis na parte alta da planta, na qual ocorre grande desfolhamento quando a infestação é elevada. A desfolha acentuada, próxima ao período de floração, é muito prejudicial à produção em razão do baixo vingamento e rendimento de frutos (frutos grandes com maior volume de casca). Pesquisas conduzidas na região sul de Minas Gerais demonstraram redução de mais de 50% na produção devido a 67% de desfolha ocorrida em outubro, época de floração do cafeeiro (Gallo et al., 2002; Le Pelley, 1968; Reis, 1990; Reis et al., 1984).

O método mais utilizado para o controle desta praga é o químico. Porém, os inseticidas sintéticos podem provocar desequilíbrios biológicos, favorecendo o aparecimento de pragas secundárias, o desenvolvimento de populações resistentes, a contaminação ambiental e dos aplicadores com substâncias de elevada toxicidade (Souza, 1998).

Atualmente, a integração de métodos de controle do bicho-mineiro tem sido uma prioridade devido aos efeitos colaterais desastrosos advindos do uso excessivo de agrotóxicos. Neste contexto, dá-se preferência pela conservação e aumento de fatores de mortalidade natural na regulação de populações do inseto-praga. Para exemplificar os impactos indesejáveis de inseticidas sintéticos sobre o ambiente, é possível mencionar o trabalho realizado por Picanço et al. (1998) com o bicho-mineiro e *Polybia ignobilis* (Haliday, 1836) (Hymenoptera: vespidae), um de seus inimigos naturais. Observou-se que os inseticidas carbaril e paration metílico eram mais ativos contra *P. ignobilis*. De forma análoga, Reis & Souza (1996) constataram que a deltametrina e a combinação de aldicarbe com deltametrina ou ethion acarretaram um impacto negativo sobre as populações de vespas, que são inimigos naturais do bicho-mineiro.

Além dos efeitos indesejáveis observados para os inseticidas químicos disponíveis, não se pode deixar de lembrar que a eficiência do produto pode ser reduzida em razão das condições de aplicação e, principalmente, da resistência de insetos a inseticidas. Fragoso et al. (2003), estudando a seleção e a dispersão de resistência em dez populações do bicho-mineiro do cafeeiro, provenientes de diferentes regiões produtoras de café em Minas Gerais, verificaram que o aumento da frequência de indivíduos resistentes foi correlacionado com o maior número de aplicações de organofosforados e provável dispersão de indivíduos resistentes. Desde 1939, marco da utilização de inseticidas orgânicos de origem sintética como o DDT, para o controle de vetores de malária, os insetos sempre responderam à pressão de seleção destes produtos, aumentando a população resistente dos insetos. Logo, há a necessidade da busca de novas moléculas.

2.2 Plantas com propriedades inseticidas

Algumas plantas apresentam substâncias que podem conferir resistência ou tolerância a determinadas pragas. *Melia azedarach* L. (Erva-de-santa-

barbara), por exemplo, possui propriedades repelentes e tóxicas para algumas pragas. O extrato aquoso desta planta foi testado sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. As lagartas alimentadas com folhas tratadas com o extrato, independente do genótipo, tiveram o seu desenvolvimento mais lento e apresentaram menor viabilidade larval (Vendramim et al., 1997).

Hernández & Vendramim (1997) avaliaram a bioatividade de extratos aquosos de doze espécies de plantas da família Meliaceae sobre *S. frugiperda*. Nesse estudo foi verificado que 67% destas espécies (*Azadirachta indica* A. Juss., *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Cedrela odorata* L., *Guarea macrophylla* Vahl., *Melia azedarach* L., *Swietenia macrophylla* King e *Toona ciliata* M. Roem) apresentaram em alguma parte da planta substância com atividade tóxica sobre *S. frugiperda*. *C. odorata* e *T. clausenni* apresentaram em seus caules substâncias que afetaram o desenvolvimento da praga, causando alongamento da fase imatura e/ou diminuição do peso das pupas. As sementes de *A. indica* e *C. odorata* e os frutos de *M. azedarach* foram altamente tóxicos às larvas de *S. frugiperda*, causando mortalidade acima de 80%.

Tavares & Vendramim (2005) estudando a influência do pó e do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre o comportamento e a sobrevivência do gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* (Mots. 1855) (Coleoptera: Curculionidae), observaram que, apesar de não terem efeito repelente, os pós de frutos e de outras partes da planta apresentaram atividade inseticida sobre adultos de *S. zeamais*, ao passo que os extratos aquosos dessas estruturas vegetais não afetaram a sobrevivência e a emergência de adultos do inseto.

Em estudo da atividade inseticida dos constituintes voláteis das partes aéreas de *Gallesia gorazema* (Vell.) Moq., durante o qual se fez uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, observou-se ação de

repelência à baratas, *Periplaneta americana* (L.1758) (Blattaria: Blattidae). Tal efeito foi atribuído aos diversos compostos organossulfurados voláteis identificados nas cascas da planta (Teixeira, 1996).

Em estudo buscando avaliar o efeito da variabilidade de timbós do gênero *Derris* de diferentes regiões da Amazônia sobre a ação das plantas contra *Musca domestica* (L. 1758) (Diptera: Muscidae), observou-se que a espécie *Derris elliptica* (Wallich) Benth. foi muito eficiente no controle de larvas desse inseto (Costa, 1996).

Machado et al. (1995) avaliaram o efeito de extratos de folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) na repelência e controle de baratas. Os resultados demonstraram que os extratos e algumas frações voláteis das folhas apresentaram ação repelente para ninfas e adultos de baratas. Entretanto, não se observou qualquer poder inseticida por parte dos mencionados extratos.

Os efeitos de extratos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) sobre ovos da traça-dos-cereais, *Sitotroga cerealella* (Oliv.1819) (Lepidoptera, Gelechiidae), foram avaliados por Boff & Almeida (1996). Os resultados demonstraram que para todas as concentrações estudadas ocorreu alta mortalidade no período da embriogênese. Próximo da eclosão das larvas o extrato teve sua ação reduzida.

Thomazini (1999), estudando o efeito de genótipos de *Lycopersicon* spp. e de extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), verificou que os extratos de ramos e de folhas foram prejudiciais ao desenvolvimento do inseto. O extrato da folha foi mais tóxico, afetando principalmente a fase jovem. Embora a ação ovicida não tenha sido verificada, quando a densidade populacional do inseto era elevada, as folhas tratadas foram menos preferidas para a oviposição.

T. pallida também foi empregada por Roel (1998) em estudos com *S. frugiperda*. Verificou-se que as lagartas desse inseto alimentadas com folhas de

milho tratadas com o extrato em acetato de etila de tal planta apresentavam comportamento anormal, pois o desenvolvimento e a sobrevivência do inseto foram significativamente afetados.

Quando empregaram combinações de ácido orgânico volátil como agente estabilizador e componente químico extraído de plantas para a preservação de grãos de arroz, Baek et al. (2001) conseguiram prevenir de forma eficiente a infestação de insetos quando os grãos eram mantidos em sistemas de armazenamento.

Uma das espécies mais empregadas no controle de insetos é o nim (*Azadirachta indica* A. Juss.). Composições do extrato seco de sementes de nim com sacarose e celulose se mostraram eficientes na obtenção de produtos estáveis para o controle de algumas pragas agrícolas. Segundo os estudos realizados isso se deve principalmente à presença de uma substância chamada azadiractina, que é produzida em quantidade considerável pela planta e tem forte efeito sobre os insetos (Damarla, 2002).

Além do extrato da semente, pode-se empregar também o extrato da folha ou o óleo de nim, que apresentam alto potencial para o controle de diversas pragas em vários agroecossistemas. Para exemplificar, vale mencionar que tal óleo causou a redução no consumo foliar de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) e mortalidade de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), e o extrato da folha causou mortalidade de *S. frugiperda* em milho (Martinez, 2002).

O controle alternativo do cupim de madeira seca, *Cryptotermis brevis* (L.1758)(Isoptera: Kalotermitidae), foi estudado por Sbeghen et al. (2001), que utilizaram óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais como *Cinamomum camphora* B. Navez (cinamônio) e *Cymbopogum winterianus* Jowitt (citronela), cujos óleos causaram altas taxas de mortalidade dos cupins.

Em geral, os resultados obtidos com produtos de origem vegetal têm sido tão promissores que são várias as patentes nessa área. Para exemplificar se pode citar o uso de frações de baixa polaridade de plantas do gênero *Alpina* para o controle de cupins, *Coptotermis formosanus* (Shiraki, 1909) (Isoptera: Rhinotermitidae) (Sannin, 2001). De forma análoga, é possível mencionar o emprego de extratos de *Perilla frutescens* (L.) Britt var. *acuta* Kudoa para a obtenção de produtos com propriedades inseticidas (Kang & Lee, 2001).

O uso de substâncias extraídas de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash também foi patenteado para o controle de insetos como baratas e formigas, já que tais substâncias apresentaram efeitos tóxicos e repelentes sobre os referidos insetos (Henderson et al., 2003)

Vários componentes de óleos essenciais de plantas também foram patenteados para uso no controle de besouros em sistemas de armazenamento de cereais (Bessette, 2003).

2.3 A família Sapotaceae

A família Sapotaceae é composta por 53 gêneros, com aproximadamente 600 espécies que são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais como arbustos e árvores. Algumas plantas produzem látex. As folhas são espirais arranjadas ou alternadas. Espécies desta família possuem flores de simetria radial. Em alguns gêneros dessa família são encontradas plantas produtoras de frutos comestíveis. Para exemplificar podem ser mencionados *Mimusops*, *Manilkara* e *Pouteria* (Shah et al., 2003). Dentre os vários gêneros desta família, destaca-se aqui aquele denominado *Chrysophyllum*, ao qual pertence a espécie alvo do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

2.4 O gênero *Chrysophyllum*

Após uma intensa pesquisa na literatura, constatou-se que poucas espécies do gênero *Chrysophyllum* foram investigadas quimicamente, apesar de algumas terem apresentado atividades biológicas importantes. Dentre essas, pode-se destacar a atividade anticonceptiva, antiinflamatória e antioxidante de um alcalóide isolado das sementes de *Chrysophyllum albidum* G. Don (Idowu et al., 2006).

Estudos recentes mostram que frutos e folhas desse gênero contêm flavonóides e outros polifenóis (antioxidantes naturais) que reduzem a velocidade de processos oxidativos associados a desordens neurodegenerativas, doença coronária, arteriosclerose e câncer. As atividades antioxidantes de extratos aquosos de plantas não foram estudadas extensivamente devido à presença de antioxidantes solúveis em água e açúcares, que podem mascarar a atividade de polifenóis. A polaridade e complexidade de extratos aquosos dos frutos dificultam o isolamento de componentes puros como antocianinas e taninos (Gordon, 1996; Wang et al., 1999).

2.5 A espécie *Chrysophyllum gonocarpum*

Chrysophyllum gonocarpum (Mart. & Eichl.) Engl., conhecida como aguai, peroba branca e cerejinha, entre outros, é uma espécie arbórea de 6–20 m de altura, podendo alcançar até 60 cm de diâmetro de caule (Reitz, 1968). Possui copa densa e verde-escura, com numerosos galhos finos. Por sua importância paisagística, econômica e ecológica, é indicada para a recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2002; Reitz, 1968). No Brasil, a espécie ocorre no Nordeste, no Rio de Janeiro, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul, em floresta estacional semidecidual. É frequente na depressão central do Rio Grande do Sul, rio Uruguai, sobretudo nos capões dos campos (Longhi, 1995; Lorenzi, 2002; Reitz, 1968). A planta produz anualmente grande quantidade de sementes,

sendo de uma a cinco por fruto (Kuera et al., 2002; Pennington, 1968; Reitz, 1968).

A escolha da espécie *C. gonocarpum* para este estudo se deu devido ao fato do seu extrato ter apresentado atividade contra o bicho-mineiro do cafeeiro em estudos preliminares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos utilizados

A não ser quando mencionado de outra forma no texto, em todo o trabalho realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência foi empregado metanol e acetonitrila grau UV-HPLC e água ultra-pura do tipo I, 18 mΩ (Milli-Q[®]; Millipore). Para os outros procedimentos foram empregados hexano, acetato de etila, metanol, propan-2-ol, trietilamina, ácido acético e ácido clorídrico de grau analítico (P.A.) e água destilada. Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica gel ou sílica-C18 (Merck), impregnadas com indicador de fluorescência F₂₅₄. Os reveladores empregados em tais análises foram: luz UV, vapor de iodo, e solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol. Sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck) foi empregada nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC).

As operações de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em aparelho semi-preparativo da marca Shimadzu, equipado com detector de UV-visível do tipo DAD SPD-M20A, com duas bombas LC-6AD, injetor manual do tipo Rheodyne 7725i, coluna de sílica-C18 Phenomenex Gemini[®] semi-preparativa (21,2 mm x 250 mm x 5 μm) e analítica (4,6 mm x 250 mm x 5 μm). As remoções dos solventes durante o processo de fracionamento foram feitas em evaporador rotatório e liofilizadora.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker 400, operando a 400MHz para hidrogênio (¹H) e 101 MHz para carbono treze (¹³C), na Universidade Federal do Rio de Janeiro e em espectrômetro Varian Inova 600, operando a 600 MHz para ¹H e 151 MHz para ¹³C, no Laboratório Nacional de Luz Síncroton, na cidade de Campinas-SP. Em

todos os casos, empregou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) contendo 0,03% de tetrametilsilano (TMS) para solubilizar as amostras.

3.2 Obtenção do material vegetal

Folhas da espécie *C. gonocarpum* foram coletadas no dia 23/11/2006, no município de Iguatama-MG, para serem conduzidas ao Laboratório de Produtos Naturais da UFLA, no qual teve início o processamento das mesmas. Parte das folhas da planta foi conduzida ao Departamento de Biologia da UFLA, no qual a identificação botânica da mesma foi realizada pelo professor Ary T. Oliveira Filho.

3.3 Preparo do extrato vegetal

Folhas frescas de *C. gonocarpum* foram secas em estufa de ventilação forçada por 48 horas, a 40°C. Em seguida, o material vegetal foi triturado em moinho, resultando em 335,67 g de material seco e moído. Este foi imerso em aproximadamente 500mL de metanol durante 48 horas. A mistura foi então, filtrada em algodão, resultando na obtenção de uma fase líquida que foi concentrada em evaporador rotatório. Quanto ao resíduo da filtração, foi submetido a mais extrações com o mesmo volume de metanol citado anteriormente, até que o filtrado estivesse claro. Após 19 extrações, o resíduo insolúvel em metanol foi descartado, enquanto as partes solúveis foram combinadas para a remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilizadora. Obtiveram-se 32,45 g de um pó verde escuro, que foi mantido em freezer até o momento da sua utilização.

3.4 Criação do bicho-mineiro em laboratório

Para a montagem dos testes, foi mantida em laboratório uma criação de bicho-mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guèrin-Mèneville & Perrottett,

1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), de acordo com a metodologia desenvolvida por Reis Jr. et al. (2000), com o mínimo de modificações. Para tanto, folhas de cafeeiros (*Coffea arabica* L. cv. Topázio) com minas intactas do bicho-mineiro, mantidas em casa de vegetação, em vasos com substrato constituído da mistura de terra, esterco de curral curtido e areia, na proporção de (3:2:1), foram destacadas e fixadas em placas de isopor pelos seus pecíolos. Tais placas foram colocadas no interior de caixas do tipo Gerbox, as quais possuíam o fundo recoberto com algodão, o qual permanecia úmido com água. As caixas do tipo Gerbox foram acondicionadas em câmara climática ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 14 horas). A cada dois dias averiguava-se o surgimento de pupas, que eram destacadas e colocadas em tubos de vidro, também acondicionadas em câmaras climáticas nas mesmas condições citadas anteriormente. Verificava-se, todos os dias, a emergência de adultos, os quais eram sexados com o uso de um microscópio. Aqueles adultos não utilizados na montagem dos testes eram liberados em casa de vegetação, com a finalidade de manter a infestação das mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Topázio).

3.5 Teste de oviposição do extrato bruto

Folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Topázio) sem minas do bicho-mineiro foram coletadas no campus da UFLA, lavadas com água destilada e, em seguida, limpas com algodão umedecido com água para a eliminação de possíveis ovos dessa praga. Dissolveu-se 0,0178 g do extrato vegetal em 2,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g.mL⁻¹ e pincelou-se a solução resultante nas faces superiores das folhas, tendo cada uma o seu pecíolo fixado em isopor, no qual já se encontrava fixada uma folha sem qualquer tratamento. Como suporte para o isopor era utilizada uma placa de Petri.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições, sendo Tween 80 a 0,01 g.mL⁻¹ e Lorsban[®] 480 BR a 0,002

g.mL⁻¹ (Dow Agrosiences Industrial Ltda) empregados como testemunha negativa e positiva, respectivamente. Cada parcela correspondeu a uma placa de Petri, que foi individualizada em uma gaiola (tubo de PVC de 15 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento), fechada com papel filme, na qual foram colocados dois casais de adultos de *L. coffeella* com um a três dias de idade, provenientes de criação em laboratório (Reis Júnior et al., 2000). Após 72h em câmara climática (25±1°, UR 70±10% e fotofase de 14h), contaram-se os ovos nas folhas. Converteram-se os valores em percentagem [% ovos na folha tratada = 100 x número de ovos na folha tratada/(número de ovos na folha tratada mais os da folha não tratada)] para a realização da análise de variância e comparação das médias pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5%.

3.6 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes

Parte (15,85 g) do extrato vegetal preparado conforme descrito no item 3.3, foi extraído sucessivamente com hexano (16x150 mL), acetato de etila (13x150 mL) e metanol (7x150mL). Após as remoções dos solventes, obtiveram-se quatro frações: solúvel em hexano (3,0877g; Mi-01-49-01), solúvel em acetato de etila (2,5537g; Mi-01-49-02), solúvel em metanol (9,1772g; Mi-01-49-03) e insolúvel (1,0323g; Mi-01-49-04). Com estas frações foi montado um teste conforme descrito no item 3.5. Para isto, foram dissolvidas em 2,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,01g/mL⁻¹, respectivamente, alíquotas de 0,004g, 0,003g, 0,01g e 0,001g, das frações solúveis em hexano, acetato de etila, metanol e da fração insolúvel. Os resultados desse teste se encontram na Tabela 2 do item 4.2.

3.7 Fracionamento da fração solúvel em hexano (Mi-01-49-01)

3.7.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

A fração solúvel em hexano (Mi-01-49-01), obtida do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto de *Chrysophyllum gonocarpum* (item 3.6), foi submetida a novo fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash*, com 6 x 15cm de sílica gel 60. Para tanto, 3,0659 g de Mi-01-49-01 foram dissolvidos em aproximadamente 5,0 mL de hexano/acetato de etila (20:1) e a solução resultante foi adicionada ao topo da coluna. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se hexano/acetato de etila (20:1, 500 mL; 15:1, 500 mL; 10:1, 500 mL; 7:1, 500 mL; 4:1, 500 mL; 2:1, 500 mL), acetato de etila (500 mL) e metanol (500 mL). Foram coletadas 60 frações de 50 mL que, após serem analisadas por CCD em placas com sílica gel, foram combinadas por similaridade, concentradas e liofilizadas, resultando em 20 frações (Mi-01-50-01 a Mi-01-50-20; Tabela 3 do item 4.3.1). Algumas dessas frações apresentaram baixa complexidade e massa suficiente para novos fracionamentos. Portanto, estas foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

3.7.2 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-01

Após análise por CCD em sílica gel para a otimização dos eluentes a serem empregados no fracionamento por cromatografia em coluna, Mi-01-50-01 (27,7mg) foi solubilizada em aproximadamente 2,0 mL de hexano para ser adicionada ao topo de uma coluna com 1 x 15cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se hexano (100mL), acetato de etila (100 mL) e metanol (100 mL). Foram coletadas vinte frações de 5,0 mL que, após serem analisadas por CCD em placas com sílica gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas, resultando

em quatro frações (Mi-01-76-01 a Mi-01-76-04, Tabela 4 do item 4.3.2). Como a fração Mi-01-76-02 (20,8 mg) se apresentava pura segundo análises por CCD em sílica gel, foi submetida a análises espectrométricas por RMN de ^1H e ^{13}C , através de experimentos unidimensionais e bidimensionais, para a identificação da substância. As demais frações, obtidas dessa etapa do fracionamento, foram desprezadas por apresentarem massas insuficientes para dar continuidade ao trabalho.

3.7.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-07

Da mesma forma que a amostra citada no item anterior, a fração Mi-01-50-07 foi analisada por CCD em sílica gel para a otimização dos eluentes a serem empregados no fracionamento por cromatografia em coluna. Mi-01-50-07 (115,4 mg) foi solubilizada em cerca de 5,0 mL de hexano/propan-2-ol (25:1) contendo 1% (v/v) de trietilamina, para ser adicionada ao topo de uma coluna com 2 x 15cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se hexano/propan-2-ol (25:1) contendo 1% (v/v) de trietilamina (200mL), acetato de etila (200 mL) e metanol (200 mL). Foram coletadas vinte frações de 10 mL que, após serem analisadas por CCD em placas com sílica gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas, resultando em seis frações (Mi-01-79-01 a Mi-01-76-06; Tabela 5 do item 4.3.3). Como a fração Mi-01-79-03 (37,0 mg) se apresentava pura segundo análises por CCD em sílica gel, foi submetida a análises espectrométricas por RMN de ^1H e ^{13}C , através de experimentos unidimensionais e bidimensionais, para a identificação da substância. Quanto às demais frações provenientes desta etapa do fracionamento, apresentavam alta complexidade e/ ou pouca massa e por isso foram desprezadas.

3.7.4 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-50-09

Inicialmente, fez-se a otimização dos eluentes a serem empregados na cromatografia em coluna por CCD. Em seguida, 246,7 mg de M1-01-50-09 foram dissolvidos em 5mL de hexano/acetato de etila (8:1) contendo 1% (v/v) de ácido acético, para que a solução resultante fosse adicionada ao topo de uma coluna com 3 x 15cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se hexano/acetato de etila (8:1) contendo 1% (v/v) de ácido acético (400mL), acetato de etila (200 mL) e metanol (200 mL). Foram coletadas vinte frações de 20 mL que, após serem analisadas por CCD em placas com sílica gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas, resultando em sete novas frações (M1-01-78-01 a M1-01-78-07; Tabela 6 do item 4.3.4). Como a fração M1-01-78-03 (136,7mg) apresentou apenas duas manchas na análise em CCD, foi submetida a um novo fracionamento.

3.7.5 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-78-03

Após análise por CCD em sílica gel para a otimização dos eluentes a serem empregados no fracionamento por cromatografia em coluna, 136,7mg de M1-01-78-03 foram dissolvidos em aproximadamente 5,0 mL de hexano/acetato de etila (8:1), contendo 1% (v/v) de ácido acético, para que a solução obtida pudesse ser adicionada ao topo de uma coluna com 3 x 17cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se hexano/acetato de etila (8:1), contendo 1% (v/v) de ácido acético (400mL) e metanol (200 mL). Foram coletadas vinte frações de 20 mL que, após serem analisadas por CCD em placas com sílica gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas, resultando em seis frações (M1-01-81-

01 a Mi-01-81-06, Tabela 7 do item 4.3.5). Em análise por CCD, a fração Mi-01-81-02 (68,8mg) parecia ter substâncias co-eluído. Consequentemente, foi submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência. As demais frações provenientes desse fracionamento apresentavam massa muito pequena ou não davam origem a manchas nas análises por CCD. Em decorrência, foram descartadas.

3.7.6 Fracionamento por CLAE da fração Mi-01-81-02

Cerca de 4,1mg de Mi-01-81-02 foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol UV/HPLC contendo 0,1% (v/v) de ácido acético e eluíu-se a solução através de um cartucho contendo 0,7mL de sílica C-18 (Acros Organics, 40-63µm), com 3,5 mL de MeOH espectroscópico. O líquido eluído foi concentrado em evaporador rotatório até *secura*, obtendo-se ao final deste processo um resíduo com massa de 3,3mg, o qual foi dissolvido em 1,2 mL de metanol UV-HPLC/água ultrapura (95:5) contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, resultando em uma solução de concentração aproximadamente igual a 2,75mg/mL. Esta foi filtrada em membrana de teflon de 0,22 µm e analisada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com coluna analítica. Para verificar o perfil cromatográfico da amostra, realizou-se um gradiente exploratório com metanol/água contendo 0,1% (v/v) de ácido acético. Para monitorar a análise, o detector foi utilizado na faixa de 200 a 400 nm. Com base no cromatograma obtido (Figura 1 do item 4.3.6), 64,7mg da amostra foram eluídos através de cartucho de sílica-C18 conforme procedimento descrito acima. O material eluído foi purificado em CLAE equipado com a coluna semipreparativa, empregando-se combinações de água e metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido acético como eluentes (95% a 100% de metanol em 15 min; 100% de metanol durante mais 10 min), com fluxo de 15 mL.min⁻¹. Foram coletadas três frações, sendo que aquela denominada Mi-02-16-03 (3,4mg) se mostrou pura durante a análise

cromatográfica (Figura 2 do item 4.3.6). Portanto, foi submetida às análises por RMN através de experimentos unidimensionais (^1H e Dept 135°) e bidimensionais (HSQC e HMBC), para a identificação da substância (item 4.3.6).

3.8 Teste de oviposição das substâncias isoladas

Com as substâncias isoladas (Mi-01-76-02; Mi-01-79-03 e Mi-02-16-03) foi montado um teste de oviposição conforme descrito no item 3.5. Para tanto, 0,5mg de cada substância pura foi solubilizado em 2,0 mL de Tween 80 a $0,01\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos se encontram na Tabela 12 do item 4.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste com o extrato bruto das folhas de *Chrysophyllum gonocarpum*

O rendimento de extrato em relação à massa de folhas secas e moídas ficou em torno de 9,6%, o que está de acordo com dados da literatura para o preparo de extratos a partir de outras espécies vegetais (Ferrari et al., 2004). Ao ser submetido ao teste com *L. coffeella*, o extrato bruto acarretou a obtenção de valor estatisticamente igual ao do inseticida comercial Lorsban[®] (Tabela 1), sendo este o primeiro relato de atividade contra um inseto por parte da espécie vegetal *C. gonocarpum*.

TABELA 1 Efeito do extrato de *Chrysophyllum gonocarpum*, Tween 80 e do inseticida Lorsban na oviposição de *Leucoptera coffeella*.

| Tratamentos | Ovos nas folhas tratadas (%) [*] |
|--|---|
| Extrato bruto | 0,0 ^a |
| Lorsban [®] (controle positivo) | 0,0 ^a |
| Tween (controle negativo) | 40,6 ^b |
| CV(%) | 26,9 |

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente segundo o teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de significância.

4.2 Teste com as frações obtidas por extração com solventes

Ao se submeter ao teste com *L. coffeella* as frações provenientes das lavagens do extrato bruto com solventes, observou-se que apenas a fração

insolúvel não possuía atividade contra o inseto, o que é um indício da produção de duas ou mais substâncias ativas por parte da planta (Tabela 2). Esta é uma situação comum entre as espécies vegetais, o que pode ser exemplificado pelo trabalho realizado por Pretto (2005). O autor observou que a espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess. era capaz de produzir xantonas, cumarinas, flavonóides e triterpenos, sendo todos ativos contra bactérias e fungos.

TABELA 2 Efeito das frações obtidas do fracionamento por extração com solventes do extrato de *Chrysophyllum gonocarpum*, de Tween 80 e de Lorsban[®] sobre a oviposição de *Leucoptera coffeella*.

| Tratamentos | Ovos nas folhas tratadas (%) [*] |
|--|---|
| Fração solúvel em hexano | 0,0 ^a |
| Fração solúvel em acetato de etila | 34,7 ^b |
| Fração solúvel em metanol | 37,9 ^b |
| Fração insolúvel | 57,8 ^c |
| Lorsban [®] (controle positivo) | 0,0 ^a |
| Tween 80 (controle negativo) | 50,0 ^c |
| CV(%) | 21,8 |

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente segundo o teste de Scott e Knott (1974) a 5% de significância.

Dentre as frações ativas (Tabela 2), a que mais afetou a oviposição do inseto foi a solúvel em hexano, o que parece um resultado aceitável, pois há vários relatos na literatura sobre a atividade inseticida por parte de substâncias apolares de origem vegetal (Sannin, 2001). De qualquer forma, optou-se por dar

continuidade ao trabalho apenas com a fração solúvel em hexano, ficando aquela solúvel em metanol e em acetato de etila para estudos futuros.

4.3 Fracionamento da fração solúvel em hexano do extrato bruto de *Chrysophyllum gonocarpum*

4.3.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-49-01

O fracionamento em coluna de sílica gel da fração solúvel em hexano (Mi-01-49-01, item 3.7.1) do extrato bruto de *Chrysophyllum gonocarpum* resultou em 20 frações (Tabela 3), dentre as quais as de código Mi-01-50-02 a Mi-01-50-06, Mi-01-50-08 e Mi-01-50-10 a Mi-01-50-20, apresentavam alta complexidade segundo análises por CCD (item 3.7.1) e/ou massa inferior ao desejável para dar continuidade ao processo. Em decorrência, foram descartadas.

TABELA 3 Frações obtidas durante o fracionamento da fração Mi-01-49-01 por cromatografia em coluna de sílica gel.

| Código da amostra | Massa da amostra (mg) | Código da amostra | Massa da amostra (mg) |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Mi-01-50-01 | 27,7 | Mi-01-50-11 | 11,2 |
| Mi-01-50-02 | 9,7 | Mi-01-50-12 | 203,6 |
| Mi-01-50-03 | 74,7 | Mi-01-50-13 | 266,9 |
| Mi-01-50-04 | 115,2 | Mi-01-50-14 | 16,2 |
| Mi-01-50-05 | 79,1 | Mi-01-50-15 | 29,0 |
| Mi-01-50-06 | 8,9 | Mi-01-50-16 | 57,8 |
| Mi-01-50-07 | 115,4 | Mi-01-50-17 | 47,1 |
| Mi-01-50-08 | 98,7 | Mi-01-50-18 | 106,0 |
| Mi-01-50-09 | 246,7 | Mi-01-50-19 | 48,6 |
| Mi-01-50-10 | 2,6 | Mi-01-50-20 | 59,9 |

4.3.2 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-01

A fração Mi-01-50-01 parecia ser composta por no mínimo duas substâncias que, segundo análise por CCD em placa com sílica gel, possuíam R_f (fator de retenção) próximos de 0,35 quando se empregava hexano como eluente. Ao ser submetida a novo fracionamento em coluna de sílica gel, tal amostra deu origem a quatro novas frações (Tabela 4), dentre as quais aquela denominada Mi-01-76-02 se apresentou como uma substância pura segundo análises por CCD.

TABELA 4 Frações provenientes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel da fração Mi-01-50-01.

| Código da amostra | Massa da amostra (mg) |
|-------------------|-----------------------|
| Mi-01-76-01 | 5,0 |
| Mi-01-76-02 | 20,8 |
| Mi-01-76-03 | 0,4 |
| Mi-01-76-04 | 0,1 |

4.3.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-07

Observou-se que a fração Mi-01-50-07 (item 3.7.3) apresentava uma substância majoritária com R_f (fator de retenção) igual a 0,35 quando analisada por CCD com placas de sílica gel, empregando-se solução de hexano/propan-2-ol (25:1) contendo 1% (v/v) de trietilamina como eluente. Em decorrência, foi submetida a novo fracionamento, o que resultou na obtenção de seis novas frações (Tabela 5), dentre as quais apenas a denominada Mi-01-79-03 (37,0 mg) se tratava de uma substância pura segundo análises por CCD.

TABELA 5 Frações provenientes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel de Mi-01-50-07.

| Código da amostra | Massa da amostra (mg) |
|--------------------------|------------------------------|
| Mi-01-79-01 | 2,7 |
| Mi-01-79-02 | 46,6 |
| Mi-01-79-03 | 37,0 |
| Mi-01-79-04 | 1,3 |
| Mi-01-79-05 | 1,8 |
| Mi-01-79-06 | 0,2 |

4.3.4 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de Mi-01-50-09

Quando a fração Mi-01-50-09 foi submetida à análise por CCD com hex/AcOEt (8:1) contendo 1% (v/v) de AcOH, pôde-se observar a presença de duas manchas com leve rastro, sendo que tais manchas possuíam R_f (fator de retenção) em torno de 0,37. Por isso, fez-se um novo fracionamento desta amostra, o que resultou em sete novas frações (Tabela 6), dentre as quais apenas a Mi-01-78-03 apresentou duas manchas na análise por CCD e foi submetida a novo fracionamento.

TABELA 6 Frações provenientes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel da fração Mi-01-50-09.

| Código da amostra | Massa da amostra (mg) |
|--------------------------|------------------------------|
| Mi-01-78-01 | 5,5 |
| Mi-01-78-02 | 33,9 |
| Mi-01-78-03 | 136,7 |
| Mi-01-78-04 | 51,4 |
| Mi-01-78-05 | 14,4 |
| Mi-01-78-06 | 3,3 |
| Mi-01-78-07 | 1,0 |

4.3.5 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel de M1-01-78-03

O fracionamento de Mi-01-78-03 resultou na obtenção de seis novas frações (Tabela 7), dentre as quais apenas a de código Mi-01-81-02 apresentava massa suficiente para dar continuidade ao processo de fracionamento. Por isso, foi analisada por CLAE.

TABELA 7 Frações obtidas durante o fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel de Mi-01-78-03.

| Código da amostra | Massa da amostra (mg) |
|--------------------------|------------------------------|
| Mi-01-81-01 | 5,0 |
| Mi-01-81-02 | 68,8 |
| Mi-01-81-03 | 33,1 |
| Mi-01-81-04 | 16,1 |
| Mi-01-81-05 | 11,7 |
| Mi-01-81-06 | 2,0 |

4.3.6 Fracionamento em CLAE da fração Mi-01-81-02

Ao se analisar a fração Mi-01-81-02 em CLAE, observou-se baixa complexidade para a mesma, conforme mostra o cromatograma obtido (Figura 1). Em decorrência, tal amostra foi submetida a fracionamento, resultando na obtenção de três novas frações (Tabela 8), dentre as quais apenas aquela de código Mi-02-16-03 se mostrava pura, conforme mostrado no cromatograma (Figura 2).

TABELA 8 Frações coletadas durante o fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra Mi-01-81-02.

| Frações | Código da fração | Massa da fração (mg) | Tempo de eluição (min) |
|---------|------------------|----------------------|------------------------|
| 1 | Mi-02-16-01 | 2,2mg | 7,5 até 10,0 |
| 2 | Mi-02-16-02 | 7,7mg | 7,6 até 12,2 |
| 3 | Mi-02-16-03 | 3,4mg | 12,3 até 13,5 |

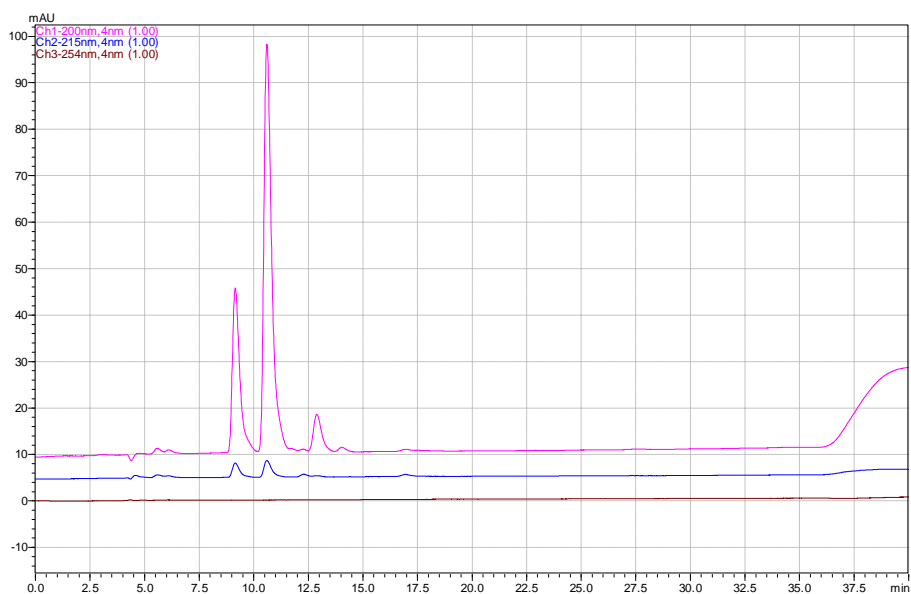


FIGURA 1 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento por CLAE de Mi-01-81-02.

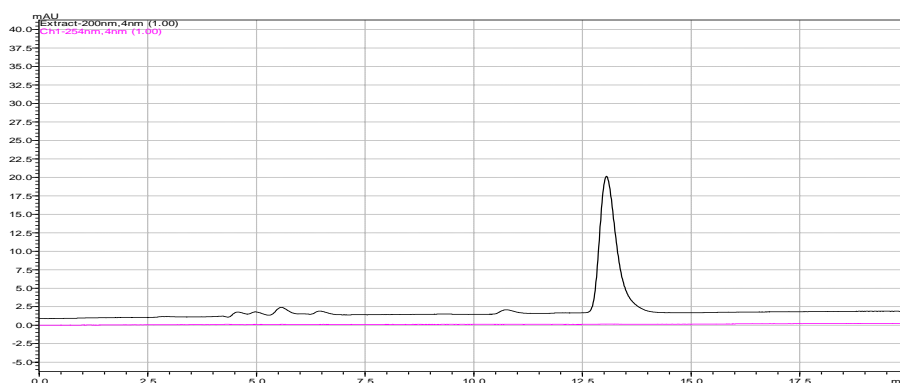


FIGURA 2 Cromatograma da substância pura (Mi-02-16-03), obtida durante o fracionamento por CLAE de Mi-01-08-02.

4.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

4.4.1 Substância Mi-01-76-02

Durante as interpretações do espectro de RMN de ^1H (Figuras 1A a 4A do anexo A) da amostra Mi-01-76-02 (Figura 3), observou-se um multiplete entre δ_{H} 5,15-5,09 (6H, m) ppm, que sugeria a presença de hidrogênios olefinicos (Silverstein & Webster, 2000). Tal resultado era compatível com a presença de seis picos entre δ_{C} 124,3 e 135,1 ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 4A a 6A do anexo A). Segundo o DEPT 135 (Figuras 7A a 9A do anexo A) três desses sinais correspondiam a átomos de carbono sem qualquer átomo de hidrogênio a eles ligados, enquanto os outros três se tratavam de grupos CH. Logo, aparentemente se tratava de uma estrutura simétrica, com 12 átomos de carbono com hibridação sp^2 , o que explicaria a presença de seis átomos de hidrogênios olefinicos na estrutura.

Observava-se no HMBC (Figuras 12A e 13A do anexo A), que os átomos de hidrogênio correspondentes aos sinais entre δ_{H} 2,10-1,95 ppm estavam quimicamente ligados aos átomos de carbono cujos picos se

encontravam entre δ_C 39,8-26,5ppm que, como podia ser observado no DEPT 135° (Figuras 7A a 9A do anexo A), tratavam-se de grupos CH₂. Como a área no espectro de hidrogênio para esses grupos correspondia a algo em torno de 20 átomos de hidrogênio, propôs-se a presença de 10 grupos CH₂ arranjados simetricamente de forma a só produzir cinco sinais no espectro de RMN de ¹³C.

Em δ_H 1,67 e 1,60 ppm eram observados dois singletos com áreas correspondentes a 6 e 18 átomos de hidrogênio, respectivamente. Como a molécula parecia bastante simétrica, acreditava-se que se tratavam de oito grupos CH₃, o que estava de acordo com os deslocamentos químicos dos átomos de carbono que, segundo o HMQC (Figuras 10A e 11A anexo A), correspondiam a δ_C 15,9, 16,0, 17,6 e 25,6 ppm.

Como os deslocamentos químicos dos hidrogênios de tais grupos CH₃ eram elevados em relação aos observados para um alcano, propôs-se que deveriam estar ligados a carbonos sp². Ademais, tais átomos de carbono não deveriam ter átomos de hidrogênio diretamente ligados a eles, pois os sinais de hidrogênio das metilas pareciam corresponder a singletos.

Somando-se os dados obtidos até então ao fato dos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos grupos CH₂ também terem indicado que tais grupos deveriam estar conectados a átomos de carbono sp², obteve-se como resultado um hidrocarboneto simétrico com fórmula molecular C₃₀H₅₀, contendo seis ligações C=C. A estrutura que melhor parecia encaixar nos dados de RMN era a do esqualeno (Figura 3), cujos espectros descritos na literatura eram coincidentes com os obtidos para a substância Mi-01-76-02 (Tabela 9).

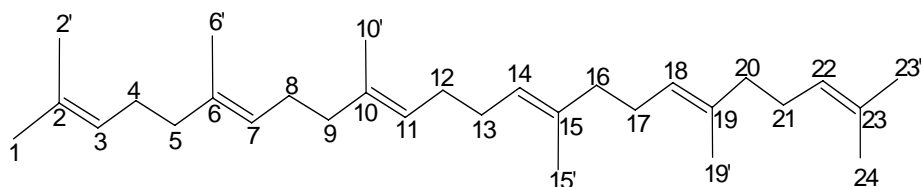


FIGURA 3 Estrutura da substância Mi-01-76-02 (esqualeno).

TABELA 9 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (*s*: singlete; *m*: multipeto), obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C), da amostra Mi-01-76-02 e dados da literatura para o esqualeno (Cerqueira, 2002)

| Posições | Esqualeno (CDCl_3) | | Mi-01-76-02 (CDCl_3) | |
|-----------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | ^{13}C (101MHz) | ^1H (400MHz) | ^{13}C (101MHz) | ^1H (400MHz) |
| 1 e 24 | 25,6 | 1,68(s) | 25,6 | 1,67(6H, s) |
| 2 e 23 | 131,2 | | 131,2 | |
| 2' e 23' | 17,6 | 1,60(s) | 17,6 | 1,60 (18H, s) |
| 3 e 22 | 124,4 ^a | 5,10-5,14(m) | 124,3 ^e | 5,15-5,09 (6H, m) |
| 4 e 21 | 26,8 ^b | 1,98-2,07(m) | 26,5 ^f | 2,10-1,95 (12H, m) |
| 5 e 20 | 39,7 ^d | 1,98-2,07(m) | 39,8 ^h | 2,10-1,95 (12H, m) |
| 6 e 19 | 134,8 | | 134,8 | |
| 6' e 19' | 16,0 ^c | 1,60(s) | 16,0 ^g | 1,60 (18H, s) |
| 7 e 18 | 124,3 ^a | 5,10-5,14(m) | 124,3 ^e | 5,15-5,09 (6H, m) |
| 8 e 17 | 26,7 ^b | 1,98-2,07(m) | 26,6 ^f | 2,10-1,95 (12H, m) |
| 9 e 16 | 39,7 ^d | 1,98-2,07(m) | 39,8 ^h | 2,11-1,94 (12H, m) |
| 10 e 15 | 135,1 | | 135,1 | |
| 10' e 15' | 15,9 ^c | 1,60(s) | 15,9 ^g | 1,60 (18H, s) |
| 11 e 14 | 124,3 ^a | 5,10-5,14(m) | 124,3 ^e | 5,15-5,09 (6H, m) |
| 12 e 13 | 28,2 | 1,98-2,07(m) | 28,2 | 2,10-1,95 (12H, m) |

^{a b c d} Estes sinais podem estar trocados

^{e f g h} Estes sinais podem estar trocados

Buscas na literatura demonstraram que tal substância já havia sido isolada anteriormente de outras plantas como, por exemplo, *Vernonia scorpioides* (Lam. Pers) (Freire et al, 2008). O esqualeno também é encontrado em menores concentrações em algumas fontes vegetais como os óleos de arroz (*Oryza sativa* L.), de milho (*Zea Mays* L.), de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), e no Amarantho (*Amaranthus caudatus* L.), uma planta originária do Peru que apresenta quantidades mais elevadas do esqualeno. No azeite de oliva, o efeito de redução ao risco de câncer é atribuído à sua presença. O esqualeno é popular em alguns países, sendo comercializado comumente em cápsulas. Atua como fortalecedor do sistema imunológico, redutor dos níveis de colesterol e pode conferir ação fotoprotetora a produtos cosméticos de uso dermatológico. (Kanehisa et al, 2007).

4.4.2 Substância Mi-01-79-03

Observou-se no espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 9B a 14B do anexo B) um pico em δ_{C} 74,5 ppm, que sugeria a presença de carbono sp^3 ligado a átomo de oxigênio. Segundo o DEPT 135° (Figuras 9B a 11B do anexo B), tratava-se de um carbono quaternário que apresentava interações de longa distância (HMBC, Figuras 12B a 16B do anexo B) com os hidrogênios cujos sinais se encontravam em δ_{H} 1,81(1H; ddd; $J^1=J^2=6,7\text{Hz}$ e $J^3=13,4\text{Hz}$) 1,74(1H; ddd; $J^1=J^2=6,7\text{Hz}$ e $J^3=13,4\text{Hz}$), 1,39(2H, m) e 1,22(3H, m) ppm. De acordo com o HSQC (Figuras 26B a 28B do anexo B), esses átomos de hidrogênio estavam respectivamente conectados aos átomos de carbono com sinais em δ_{C} 31,5, 20,7 e 23,7 ppm que, com base no DEPT 135°, tinham a ele ligados dois a três átomos de hidrogênio, respectivamente.

Analisando os espectros acima mencionados, percebia-se claramente que o CH_2 com sinais em δ_{H} 1,74 (1H; ddd; $J^1=J^2=6,7\text{Hz}$ e $J^3=13,4\text{Hz}$) e 1,81 (1H; ddd; $J^1=J^2=6,7\text{Hz}$ e $J^3=13,4\text{Hz}$) ppm e δ_{C} 31,5 ppm, e aquele CH_2 com

sinais em δ_C 21,0 ppm e δ_H 2,56 (2H, t, $J^1 = J^2 = 6,8\text{Hz}$) ppm, estavam conectados, o que era claramente comprovado pelo COSY (Figuras 20B e 21B do anexo B) e pelo TOCSY (Figura 22B do anexo B). Ademais, verificava-se que o último CH_2 mencionado estava conectado ao carbono com sinal em δ_C 117,3 ppm, que não tinha a ele ligado qualquer átomo de hidrogênio segundo o DEPT 135°.

Havia no espectro de RMN ^{13}C seis sinais entre δ_C 117 e 146 ppm, o que sugeria a presença de seis átomos de carbono sp^2 que, segundo o DEPT, não estavam conectados a qualquer átomo de hidrogênio. No HMBC era claro que estes átomos só interagiam com um dos grupos CH_2 (δ_H 2,56 (2H, t, $J^1 = J^2 = 6,8\text{Hz}$) e δ_C 21,0 ppm) acima mencionados e com os átomos de hidrogênio cujos sinais se encontravam em 2,15 (3H, s) e 2,10 (6H, s) ppm, que pareciam tratar-se de grupos metila segundo o DEPT, com sinais em δ_C 12,2, 11,7 e 11,2 ppm. Além disto, vale mencionar que os dois sinais em δ_C 145 sugeriam que dois dos carbonos sp^2 estavam diretamente ligados a heteroátomos como o oxigênio.

Em decorrência do exposto, uma possível sub-estrutura proposta se baseava no 3,4-diidro-2H-cromeno tetrasubstituído (Figura 4), cujas posições dos grupos CH_3 e OH ligados ao anel aromático ainda não estavam claras.

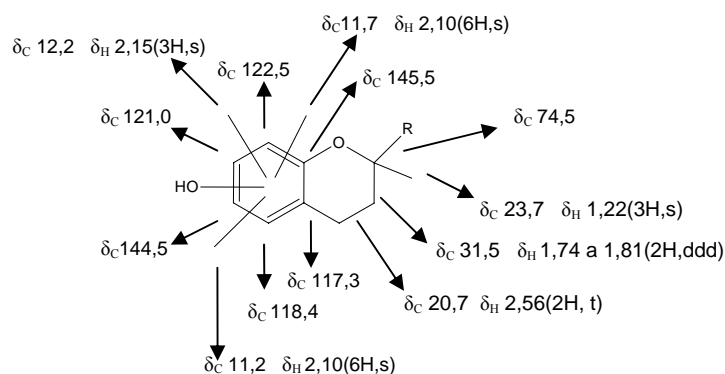


FIGURA 4 Sub-estrutura inicialmente proposta para Mi-01-79-03. Os valores correspondem aos deslocamentos químicos de carbono treze (δ_C) e hidrogênio (δ_H), em ppm.

Quanto ao grupo R (Figura 4), como só apresentava sinais de ^{13}C abaixo de 40 ppm, deveria corresponder a um grupo alquila com quatro grupos CH_3 que davam origem a quatro dupletos entre δ_H 0,83 e 0,88 ppm. Além disto, observava-se nos espectros de RMN ^{13}C e no DEPT, que tal grupo R (Figura 4) também parecia ter três grupos CH e oito grupos CH_2 .

Ao se procurar por estruturas na literatura com características próximas às relatadas até aqui, aquela cujos dados de RMN eram mais semelhantes aos da amostra Mi-01-79-03 era o α -tocoferol (Figura 5). Na verdade, como se pode observar na Tabela 10, eram perfeitamente coincidentes.

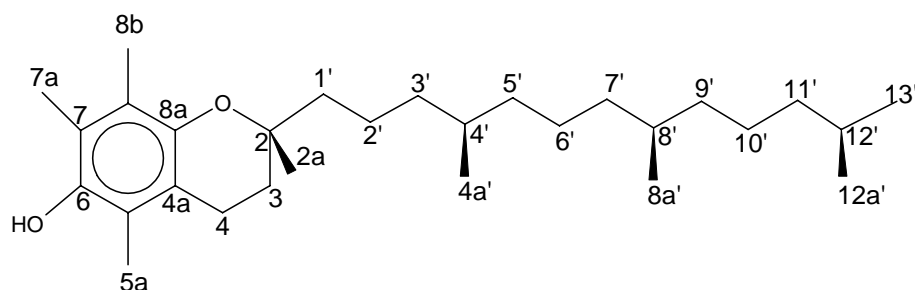


FIGURA 5 Estrutura da substância Mi-01-79-03 (α -tocoferol).

TABELA 10 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (s: singlete; d: dublete; ddd: duplo duplo dublete; m: multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hz, obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C) da amostra Mi-01-79-03 e dados da literatura para o α -tocoferol.

| Posição | α -Tocoferol (CDCl_3) | | | Mi-01-79-03 (CDCl_3) | |
|---------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|
| | ^{13}C ¹ (50MHz) | ^1H ² (200MHz) | ^1H ³ (400MHz) | ^{13}C (101MHz) | ^1H (400MHz) |
| 2 | 74,5 | | | 74,5 | |
| 3 | 31,5 | | | 31,5 | 1,74 a 1,81(2H, ddd, $J^1 \approx J^2 = 6,7$; $J_3 = 13,4$) |
| 4 | 20,7 | | 2,53 | 20,7 | 2,56(2H, t, $J^1 = J^2 = 6,8$) |
| 4a | 117,3 | | | 117,3 | |
| 5 | 118,4 | | | 118,4 | |
| 6 | 145,5 | | | 144,5 | |
| 7 | 120,9 | | | 121,0 | |
| 8 | 122,6 | | | 122,5 | |
| 8a | 145,5 | | | 145,5 | |
| 5a | 11,2 | 2,2(s) | 2,08 | 11,2 ^a | 2,10(6H, s) |
| 7a | 12,2 | | | 12,2 ^a | 2,15(3H, s) |
| 8b | 11,7 | | | 11,7 ^a | 2,10(6H, s) |
| 2a | 23,7 | 1,22(s) | | 23,7 | 1,22(3H, s) |
| 1' | 39,8 | | | 39,8 ^b | 1,47 a 1,53(2H, m) |
| 2' | 21,0 | | | 21,0 | 2,56 (2H, t, $J^1 = J^2 = 6,8$) |
| 3' | 37,3 | | | 37,4 ^c | 1,25(2H, s) |
| 4' | 32,7 | | | 32,7 | 1,36 a 1,39(2H, m) |
| 5' | 37,3 | | | 37,2 ^c | 1,13 a 1,14(2H, m) |

...continua...

TABELA 10, Cont.

| | | | | | |
|------|------|------------------|------|-------------------|---------------------------------|
| 6' | 24,4 | | 1,15 | 24,4 | 1,13 a 1,14(2H, m) |
| 7' | 37,3 | | | 37,4 | 1,13 a 1,14(2H, s) |
| 8' | 32,7 | | | 32,6 | 1,36 a 1,39(2H, m) |
| 9' | 37,3 | | | 37,4 | 1,36 a 1,39(2H, m) |
| 10' | 24,8 | | | 24,4 | 1,13 a 1,14(2H, m) |
| 11' | 39,3 | | | 39,3 ^b | 1,13 a 1,14(2H, m) |
| 12' | 27,9 | | | 27,9 | 1,36 a 1,39 (2H, m) |
| 12a' | 22,7 | | | 22,7 ^d | 0,85(3H, d, $J= 6,8\text{Hz}$) |
| 13' | 22,7 | | | 22,6 ^d | 0,85(3H, $J= 6,8\text{Hz}$) |
| 4a' | 19,6 | 0,83- 0,84(m) | | 19,7 ^e | 0,84(3H, d, $J= 6,8\text{Hz}$) |
| 8a' | 19,6 | 0,83- 0,84(m) | | 19,6 ^e | 0,84(3H, d, $J= 6,8\text{Hz}$) |

^{a b c d e} estes valores podem estar trocados

1- Witkowski et al. (1997)

2- Carvalho et al. (1998)

3- Ng et al.(2004)

O α -tocoferol é encontrado em pequenas quantidades em muitas plantas. Trata-se de uma vitamina lipossolúvel da família da vitamina E, que previne o dano celular ao inibir a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres. Melhora a circulação sanguínea, regenera tecidos e é útil no tratamento de seios fibrocísticos, tensão pré-menstrual e claudicação intermitente. É praticamente impossível obter dos alimentos as doses de vitamina E para se combater as doenças cardíacas, o câncer e aumentar a resistência imunológica (Andrighetto, 1990).

4.4.3 Substância Mi-02-16-03

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 1C a 5C do anexo C) se observava um pico intenso em δ_{H} 1,26 (22H, m) ppm que, segundo os experimentos de correlação a longa (HMBC) (Figuras 6C a 9C do anexo C) e curta (HSQC) (Figuras 7C a 13C do anexo C) distância, estavam conectados aos átomos de carbono com sinais entre δ_{C} 22,6 e 32,0 ppm. Em decorrência, propôs-se que tais

sinais de hidrogênio fossem decorrentes de grupos metilênicos de alguma cadeia hidrocarbônica. Observou-se ainda, a presença de um tripleto em δ_{H} 0,88 (3H, t, $J= 7,1\text{Hz}$) ppm, com área correspondente a três átomos de hidrogênio, que foi atribuído a um grupo metila terminal, cujo carbono correspondente se encontrava em δ_{C} 13,9 ppm. Havia também, outro tripleto em δ_{H} 2,33 (2H, t, $J= 6,6\text{Hz}$) ppm, que parecia de algum grupo metileno na posição α em relação a algum grupo como uma carboxila, e uma absorção em δ_{H} 5,34 (2H, m) ppm, que foi atribuída a hidrogênios olefínicos.

Os experimentos de HMBC e HSQC permitiram a visualização de sinais em δ_{C} 129,7 e δ_{C} 130,0 ppm, o que sugeria a presença de dois átomos de carbono sp^2 e, conseqüentemente, corroborava os sinais com maiores deslocamentos químicos no espectro de ^1H . Ademais, verificou-se também a presença de um sinal em δ_{C} 180,5 ppm, que parecia ser proveniente de uma carboxila.

Todos os dados acima mencionados sugeriam que a estrutura se tratasse de um ácido graxo com uma insaturação. Restava apenas determinar a posição e a estereoquímica da dupla ligação. Para tanto, inicialmente se levou em consideração o trabalho desenvolvido por Vlahov (1999), segundo o qual os grupos metilênicos em posição alílica de duplas com configuração *cis* deviam ter seus deslocamentos químicos cerca de δ_{C} 2,5 ppm menores que o valor normal para tais grupos em posições centrais e não perturbadas ($\sim\delta_{\text{C}}$ 29 ppm). Aparentemente, tal variação se devia a forte interação estérica entre os grupos ligados à dupla. Já na configuração *trans*, deveria ser observado um aumento de δ_{C} 5,3 ppm para os mesmos grupos metilênicos em relação ao supracitado valor de referência ($\sim\delta_{\text{C}}$ 29 ppm). Como o valor atribuído aos carbonos das posições 8 e 11 (Figura 6) foi de δ_{C} 27,0 ppm (Tabela 11) com base nos dados do HMBC, acreditou-se que a configuração da dupla em Mi-02-18-03 era *cis*.

Observou-se que os dados obtidos no COSY (Figuras 14C e 15C do anexo C) e no TOCSY (Figuras 16C e 17C do anexo C) estavam perfeitamente

de acordo com a proposta de um ácido carboxílico monoinsaturado, mas não foi possível obter qualquer informação que permitisse determinar a posição da dupla. Logo, restou apenas a realização de comparações dos valores obtidos com aqueles descritos na literatura, o que permitiu identificar a fração Mi-02-16-03 como sendo o ácido *cis*-octadec-9-enóico (Figura 6). Entretanto outros experimentos deverão ser feitos para confirmar a posição da insaturação, tais como a medição do valor de T_1 (tempo de relaxação longitudinal) de ^{13}C em ressonância magnética nuclear, pois segundo Vlahov (1999) este parâmetro pode ser correlacionado à posição da dupla ligação de triacilgliceróis e de ácidos graxos insaturados.

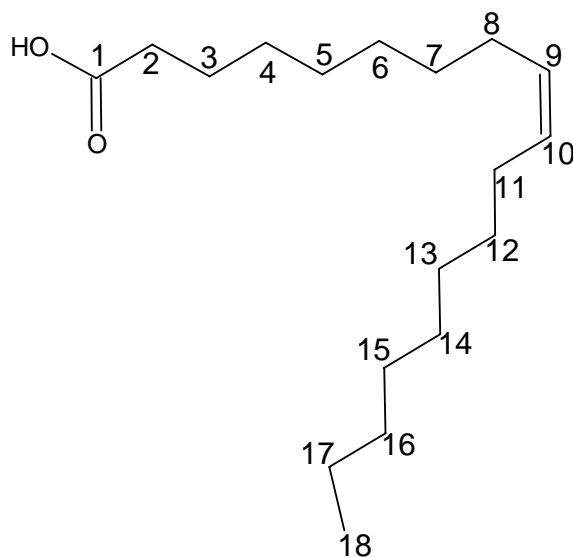


FIGURA 6 Estrutura da substância Mi-02-18-03 (ácido *cis*-octadec-9-enóico)

Os ácidos graxos podem ser encontrados em muitas plantas e sementes de vegetais (Brandão et al., 2005), sendo aqueles de configuração *cis* de grande importância na alimentação humana. As principais fontes desse ácido em óleos comestíveis são os óleos de oliva e de canola. As populações que apresentam alto consumo de ácidos monoinsaturados (como nos países do mediterrâneo, onde há uma alta ingestão de óleo de oliva) tendem a ter baixos índices de doenças coronarianas. Portanto é tentador concluir que os ácidos graxos monoinsaturados tais como o ácido *cis*-octadec-9-enóico possam proteger contra tais doenças. Além disso, já havia relatos da atividade de tal ácido contra insetos (Rahuman, 2008; Fernandes, 2002), o que sugeria que ele fosse um dos responsáveis pela atividade contra o bicho-mineiro do cafeeiro observada para o extrato bruto de *Chrysophyllum gonocarpum* no início do presente trabalho. Ademais, vale mencionar que esta é a primeira vez que se descreve a presença de tal ácido em uma espécie do gênero *Chrysophyllum*.

TABELA 11 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (s: singlete; d: dubleto; t: tripleto; m: multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hz, obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C) da amostra Mi-02-16-03 e dados da literatura para o ácido *cis*-octadec-9-enóico, quando dissolvidos em CDCl_3 .

| Posição | ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico | | Mi-02-16-03 | |
|---------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | ^{13}C (151MHz) | ^1H (600MHz) | ^{13}C (151MHz) | ^1H (600MHz) |
| 1 | 180,5 | | 178,4 | |
| 2 | 34,1 | 2,34 | 33,8 | 2,33(2H, t, $J=6,6\text{Hz}$) |
| 3 | 24,6 | 1,63 | 24,7 | 1,62 (2H, m) |
| 4 | 29,1 | 1,29-1,32 | 29,1 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 5 | 29,0 | 1,29-1,32 | 29,0 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 6 | 29,0 | 1,29-1,32 | 28,9 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 7 | 29,6 | 1,29-1,32 | 29,6 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 8 | 27,1 | 2,01 | 27,0 ^a | 2,01 (4H, m) |
| 9 | 129,7 | 5,34 | 129,7 ^a | 5,34 (2H, m) |
| 10 | 130,0 | 5,34 | 130,0 | 5,34 (2H, m) |
| 11 | 27,2 | 2,01 | 27,0 | 2,01 (4H, m) |
| 12 | 29,7 | 1,29-1,32 | 29,8 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 13 | 29,3 | 1,29-1,32 | 29,1 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 14 | 29,5 | 1,29-1,32 | 29,6 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 15 | 29,3 | 1,29-1,32 | 29,1 ^a | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 16 | 31,9* | | 32,0 | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 17 | 22,6 | 1,27 | 22,6 | 1,24-1,35 (22H, m) |
| 18 | 14,0 | 0,88 | 13,9 | 0,88 (3H, t, $J=7,1\text{Hz}$) |

^a Estes sinais podem estar trocados

* O autor não especifica qual hidrogênio está correlacionado a este carbono (Akita et al.,2004)

4.5 Teste com a substâncias puras (Mi-02-16-03, Mi- 02-79-03 e Mi-01-76-02) obtidas do fracionamento de *Chrysophyllum gonocarpum*

TABELA 12 Efeito das substâncias isoladas de *Chrysophyllum gonocarpum* sobre a oviposição de *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*).

| Tratamentos | Porcentagem de ovos (%) [*] |
|--|--------------------------------------|
| Lorsban [®] (controle positivo) | 0,0 ^a |
| Mi-02-16-03 (ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico) | 8,6 ^a |
| Mi- 02-79-03 (α -tocoferol) | 50,4 ^b |
| Mi-01-76-02(esqualeno) | 43,1 ^b |
| Tween 80 (controle negativo) | 48,7 ^b |
| CV (%) | 32,5 |

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente segundo o teste de Scott e Knott (1974) a 5% de significância.

Verificou-se que tanto o esqualeno quanto o α -tocoferol não tiveram qualquer atividade sobre o bicho-mineiro do cafeeiro (Tabela 12), o que está de acordo com dados encontrados na literatura. Goodfellow (1973), por exemplo, observou que, apesar de não sintetizar o esqualeno, *Sarcophaga bullata* (Parker 1916) (Diptera: Sarcophagidae) possuía tal substância em seu corpo, o que constata a inatividade do esqualeno frente ao inseto. O autor relata que o esqualeno encontrado pode ter sido proveniente da alimentação de *S. bullata*. Quanto ao α -tocoferol, segundo Scott (1998) é um antagonista eficaz dos piretróides, que atua nos canais de sódio protegendo *Blattella germanica* (L,

1767) (Diptera: Blattellidae) e *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) contra a ação do referido grupo de inseticidas.

Quanto ao ácido *cis*-octadec-9-enóico, verificou-se claramente que era ativo contra o bicho-mineiro do cafeeiro, pois apresentou um valor estatisticamente igual ao obtido para o inseticida comercial Lorsban® (Tabela 4 número incorreto). Apesar de não haver qualquer relato na literatura da atividade desse ácido frente ao bicho-mineiro do cafeeiro, os resultados obtidos parecem em consonância com os relatos de Rahuman (2008), que observou a atividade larvívora de *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad contra *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae), *Aedes aegypti* (L, 1967) (Diptera: Culicidae) e *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) (Diptera: Culicidae). Tal atividade foi atribuída à produção dos ácidos *cis*-octadec-9-enóico e linoleico pela planta. Há também o trabalho de Fernandes (2002), que relatou em seus estudos a atividade inseticida desses ácidos contra formiga cortadeira, *Atta sexden rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae). Logo, parece perfeitamente correto afirmar que o ácido *cis*-octadec-9-enóico é uma das substâncias ativas contra o bicho-mineiro do cafeeiro produzidas pela planta *Chrysophyllum gonocarpum*.

5 CONCLUSÕES

Quando aplicado em folhas de cafeeiros, o extrato metanólico das folhas secas e moídas de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl. reduziu a oviposição do bicho-mineiro do cafeeiro, o que confirmou o potencial da referida espécie vegetal para a produção de substâncias úteis no controle do mencionado inseto. A atividade observada pode ser devida à produção de mais de uma substância ativa contra o inseto, já que durante a lavagem com solventes do referido extrato foi observado que havia mais de uma fração que reduzia a oviposição do bicho-mineiro. O fracionamento da fração solúvel em hexano, que era a mais ativa de todas, resultou na purificação do esqualeno, do α -tocoferol e do ácido *cis*-octadec-9-enóico, que também reduziu a oviposição do inseto em folhas e cafeeiro. Logo, pode-se afirmar que tal ácido é uma das substâncias responsáveis pela atividade observada para o extrato bruto de *C. gonocarpum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKITA, C.; KAWAGUCHI, T.; KANEKO, F.; YAMAMOTO, H.; SUZUKI, M. Solid-state CNMR study on order disorder phase transition in oleic acid. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, DC, v. 75, n. 7, p. 4862-4868, July 2004.
- ANDRIGUETO, J. M. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 341 p.
- BOFF, M. I. C.; ALMEIDA, A. A. Atividade ovicida de *Piper nigrum* L. sobre *Sitotroga cerealella* Oliv. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 18, n. 2, p. 238-241, fev. 1996.
- BRANDÃO, P. A.; COSTA, F. G.; BARROS, L. R.; NASCIMENTO, G. A. J. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 26, n. 1, p. 5-14, jan. 2005.
- CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miq. (Lecythydaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 687-816, nov./dez. 1998.
- CERQUEIRA, M. D. **Estudo fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (Berg) Legrand (Myrtaceae)**. 2002. 119 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica de Produtos Naturais) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- CIBES, H. R.; PEREZ, M. Minador de la hoja disminuye en grado considerable el vigor de los cafetales. **El Café de El Salvador**, San Salvador, v. 28, p. 325-326, 1958.
- COSTA, P. C. **Efeito da variabilidade de tímpos de diferentes regiões da Amazônia em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)**. 1996. 119 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F. S.; VIEIRA, P. C. Extração de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1055-1225, nov./dez. 2002.

FERRARI, E. F.; RIBEIRO, W.; SALVADOR, M. J.; BELTRAME JUNIOR, M.; DREUX, E. C.; COGO, J. C. Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* para teste de ação anti-ofídica. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 6., 2006, Lorena. **Anais...** Lorena: Universidade do Vale do Paraíba, 2006. p. 204-207.

FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R. N. C.; LADEIRA, J. A. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 343-346, mar./abr. 2003.

FREIRE, F. M. I.; ABREU, H. S.; CRUZ, L. C. H.; FREIRE, R. B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (lam.) Pers. **Microbiology**, Reading, v. 27, n. 1, p. 1-6, Jan./Mar. 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GOODFELLOW, R. D.; LIU, G. C. Squalene metabolism in the larva of the fly, *Sarcophaga bullata*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 18, n. 1, p. 95-103, Jan. 1972.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, Cincinnati, v. 13, n. 4, p. 265-273, Dec. 1996.

HARVARD UNIVERSITY. KANG, H. H.; LEE, Y. S. **Insect repellent composition containing beefsteak plant extract**. US n. 2001062012-A, 15 July 2001. Disponível em: <www.patentstorm.us/patents>. Acesso em: 15 jan. 2009.

HERNÁNDEZ, C. R.; VENDRAMIM, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 72, n. 3, p. 305-318, maio/jun. 1997.

INOWU, T. O.; IWALEWA, E. O.; ADEROGBA, M. A.; AKINPELU, B. A.; OGUNDAINE, A. O. Antinoceptive, anti-inflammatory and antioxidant actives of eleagnine: an alkaloid isolated from *Chrysophyllum albidum* seed cotyledons. **Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, p. 1029-1034, 2006.

KANEHISA, S. L.; DIEHL, L. P.; CABRAL, F. A. Equilíbrio de fases do sistema: esqualeno-triacilgliceróis – CO₂ supercrítico. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2007. 1 CD-ROM.

KUERA, N. Y. M.; LOPEZ, J. A.; LITTLE JUNIOR, E. L.; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. **Arboles comues del Paraguay**. Asunción: Universidad Nacional de Asunción/Facultad de Ciencias Agrarias, 2002. 458 p.

LE PELLEY, R. H. **Pests of coffee**. London: Longmans, 1968. 590 p.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores**: árvores e arvoretas do Sul. Porto Alegre: L & PM, 1995. 176 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 352 p.

LOUISIANA STATE UNIVERSITY. HENDERSON, G.; HEUMANN, D. O.; LAINE, R. A.; MAISTRELLO, L.; ZHU, B. C. R.; CHEN, F. **Extracts of vetiver oil as repellent and toxicant to ants, ticks, and cockroaches**. US n. 20030073748, 30 Apr. 2003. Disponível em: <www.patent/ens.net/patent/ens/search>. Acesso em: 15 jan. 2009.

MACHADO, V. L. L.; PALMA, M. S.; COSTA, O. M. Ação repelente das frações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blattidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Rio Claro, v. 24, n. 1, p. 13-20, jun. 1995.

MAGALHÃES, A. C. N. Efeito da redução da superfície foliar sobre o desenvolvimento de cafeeiros. **Bragantia**, Campinas, v. 23, n. 11, p. 337-342, abr. 1964.

MARTÍNEZ, S. S. **O nim-*Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. DAMARLA, S. R.; SRIDHAR, S.; GOPINATHAN, M. C. **Compositions containing neem seed extracts and saccharide**. US n. 6.340.484, 30 Jan. 2002. Disponível em: <<http://www.wikipatents.com/6340484.html>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

NANTES, J. F. D.; PARRA, J. R. P. A. Avaliação de danos causados por *Perileucoptera coffeella* (Guévrin -Méneville, 1842) (Lepidoptera- Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea* spp.). **O solo**, Piracicaba, v. 699, n. 2, p. 26-29, dez. 1977.

NG, M. H.; CHOO, Y. M.; MA, A. N.; CHUAN, C. H.; HASHIM, A. Separation of vitamin E (tocopherol and tocotrienol) in palm oil. **Lipids**, Malaysia, v. 39, n. 10, p. 1031-1034, Oct. 2004.

PENNINGTON, T. D. **Sapotaceae**. New York: Organization for Flora Neotropica, 1968. 70 p. (Flora neotropica, monograph, 52).

PICANÇO, M.; RIBEIRO, L. J.; LEITE, G. L. D.; GUSMÃO, M. R. Seletividade de inseticidas a *Polybia ignobilis* (Haliday) (Hymenoptera: Vespidae) predador de *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 85-90, jan. 1998.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. 2005. 197 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

RAHUMAN, A. A.; VENKATESA, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis*. **Parasitology**, New Delhi, v. 103, n. 6, p. 1383-1390, Aug. 2008.

REIS JUNIOR, R.; LIMA, E. R.; VILELA, E. F.; BARROS, R. S. Method for maintenance of coffee leaves in vitro for mass rearing of *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera:Lyonetiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 44, p. 849-854, abr. 2000.

REIS, P. R. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. In: FERNANDES, O. A.; CORREA, A. C. B.; BORTOLI, S. A. (Ed.). **Manejo integrado de pragas e nematóides**. Jaboticabal: Funep, 1990. p. 39-57.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C. Manejo integrado do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seu reflexo na produção de café. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 77-82, jan. 1996.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C.; MELLEES, C. C. A. Pragas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 109, p. 2-57, 1984.

REITZ, P. R. **Sapotáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1968. 72 p. (Flora ilustrada catarinense. Parte I: as plantas).

ROEL, A. R. **Efeito de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swarts (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1998. 115 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SBEGHEN, A. C.; DALFOVO, V.; BARROS, N. M. Controle alternativo do cupim de madeira seca *Cryptotermis brevis* (Isoptera: Kalotermitidae) utilizando óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: SBZ, 2001. p. 129.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 3, p. 502-512, Sept. 1974.

SCOTT, J. G. Tocopherol antagonizes the toxicity of the pyrethroid insecticide permethrin in susceptible and kdr-resistant insects. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 23, n. 4, p. 399-401, Dec. 1998.

SHAH, P. J.; GANDHI, M. S.; SHAH, M. B.; GOSWAMI, S. S.; SANTANI, D. Study of *Mimusopselengi* bark in experimental gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, n. 2/3, p. 305-311, Mar./June 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O. **Bicho mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. Belo Horizonte: Epamig, 1998. 48 p.

TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 319-323, mar./abr. 2005.

TEIXEIRA, R. R. **Estudo das atividade inseticida e dos constituintes voláteis das partes areas (folhas e cascas) de *Gallesia gorazema* Moq. por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas.** 1996. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

THOMAZINI, A. P. B. W. **Efeito de genótipos de *Lycopersicon* spp. e de extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep.: Gelechiidae).** 1999. 95 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

UNIVERSITY OF CALIFÓRNIA. SANNIN, Y. G. **Separation of low-volatile component present in plants of Alpina genus, for use in insect repellent and as anti-oxidant, involves separating component by column or batch method, using ion-exchange resin.** US n. 2001226211-A, Aug. 2001. Disponível em: <www.patent/ens.net/patent/ens/search>. Acesso em: 15 jan. 2009.

UNIVERSITY OF WASHINGTON. BAEK, I. S.; HAN, S. D.; KIM, H. S.; LEE, J. G.; UHM, G. Y. **Insect repellent composition useful as preserving agent for grains, comprises volatile organic acid as stabilizing agent added to sulfur containing chemical component extracted from plant.** US n. KR275927-B; JP n. 2000086416-A, 10 Jan. 2001. Disponível em: <www.patent/ens.net/patent/ens/search>. Acesso em: 15 jan. 2009.

UNIVERSITY OF WASHINGTON. BESSETTE, S. M. **Pesticidal compositions containing plant essential oils against beetles.** US n. 20030091661, 15 May 2003. Disponível em: <www.patent/ens.net/patent/ens/search>. Acesso em: 15 jan. 2009.

VENDRAMIM, J. D.; SCAMPINI, P. J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 72, n. 2, p. 159-170, maio/ago. 1997.

VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Elmsford, v. 35, n. 4, p. 341-357, Dec. 1999.

WALKER, D. W.; QUINTANA, V. Mating and oviposition behavior of the coffee miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera - Lyonetiidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, DC, v. 71, n. 1, p. 88-90, Jan. 1969.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y. C.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 2, p. 294-296, Apr. 1999.

WITKOWSKI, S.; WALEJKO, P.; WAWER, I. C. CP MAS NMR study of 6-O-(β -D-glucopyranosyl)- and 6-O-(β -D-mannopyranosyl)-d- α -tocopherols. **Solide State Nuclear Magnetic Resonance**, New York, v. 10, n. 8, p. 123-128, Dec. 1997.

ANEXOS

| | Página | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1A | Espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 400MHz)..... | 51 |
| FIGURA 2A | Expansão do espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 400MHz)..... | 52 |
| FIGURA 3A | Expansão do espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 400MHz)..... | 53 |
| FIGURA 4A | Espectro de RMN de ^{13}C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz)..... | 54 |
| FIGURA 5A | Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz)..... | 55 |
| FIGURA 6A | Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz). | 56 |
| FIGURA 7A | Espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz)..... | 57 |
| FIGURA 8A | Expansão do espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz)..... | 58 |
| FIGURA 9A | Expansão do espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl ₃ , 101MHz)..... | 59 |
| FIGURA 10A | Mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) ^1H x ^{13}C (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl ₃ | 60 |
| FIGURA 11A | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) ^1H x ^{13}C (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl ₃ | 61 |
| FIGURA 12A | Mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa | |

| | | |
|------------|---|----|
| | distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 | 62 |
| FIGURA 13A | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 | 63 |
| FIGURA 14A | Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400 MHz)..... | 64 |
| FIGURA 15A | Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400 MHz)..... | 65 |

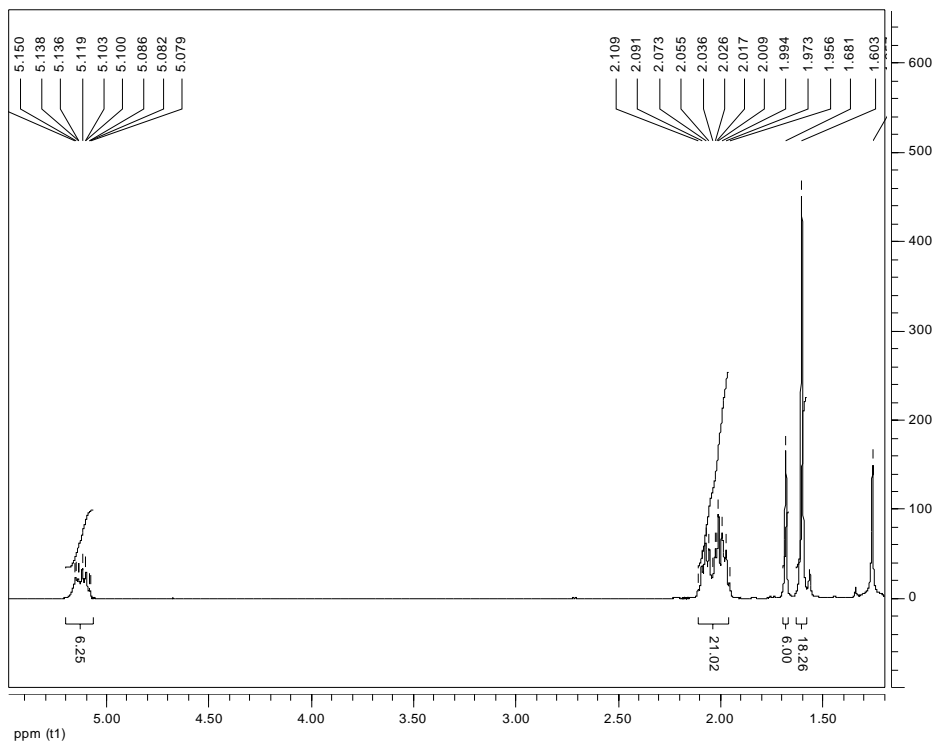


FIGURA 1A Espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400MHz).

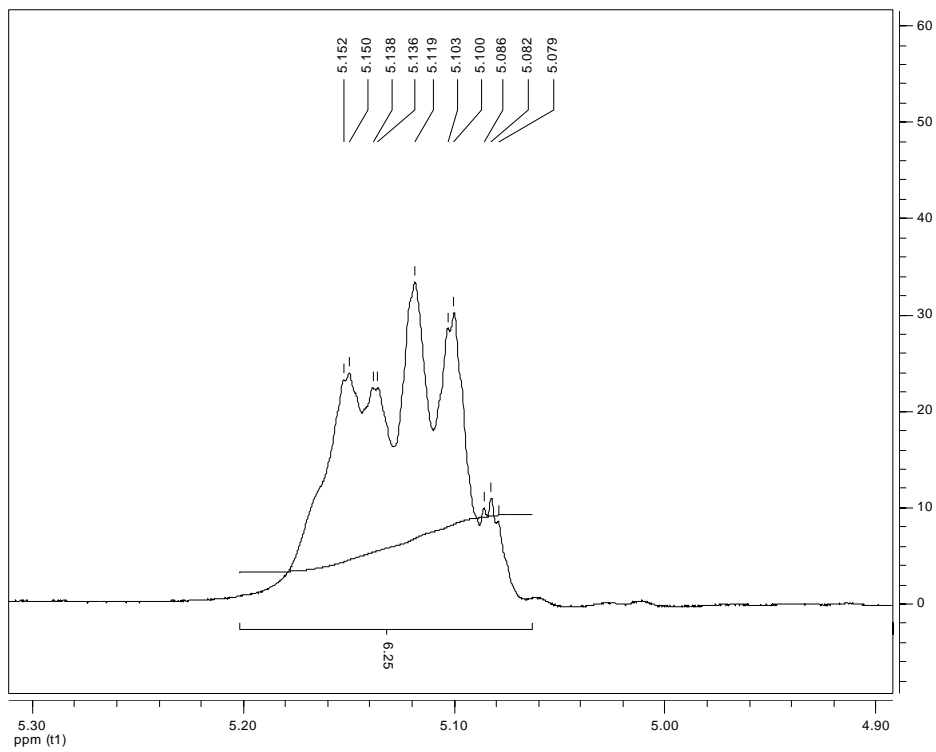


FIGURA 2A Expansão do espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400MHz).

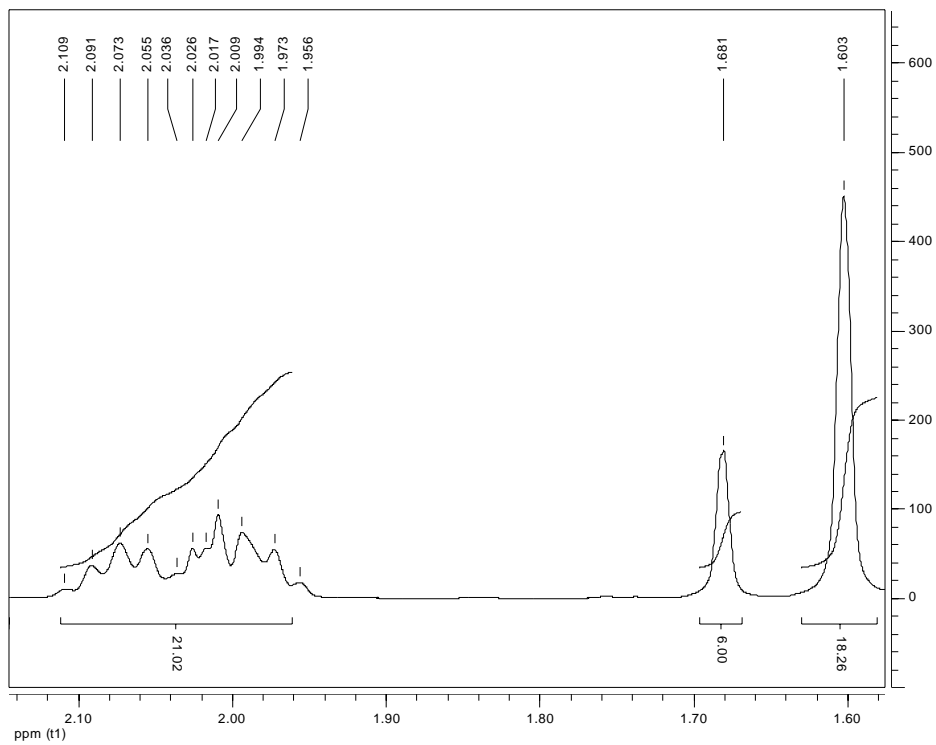


FIGURA 3A Expansão do espectro de RMN de ^1H do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400MHz).

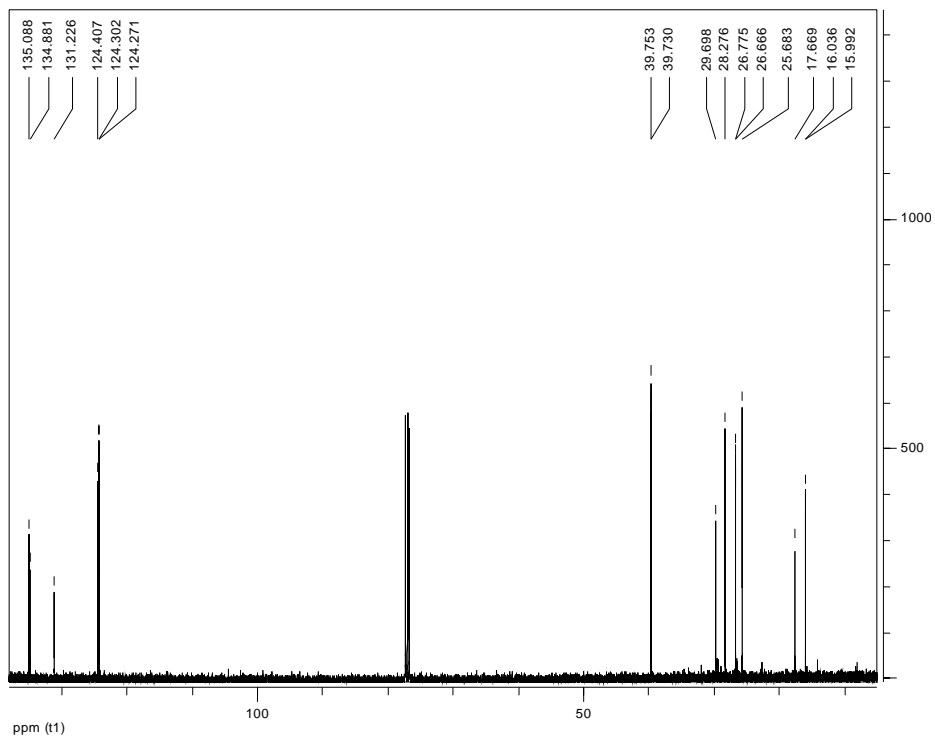


FIGURA 4A Espectro de RMN de ^{13}C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 101MHz).

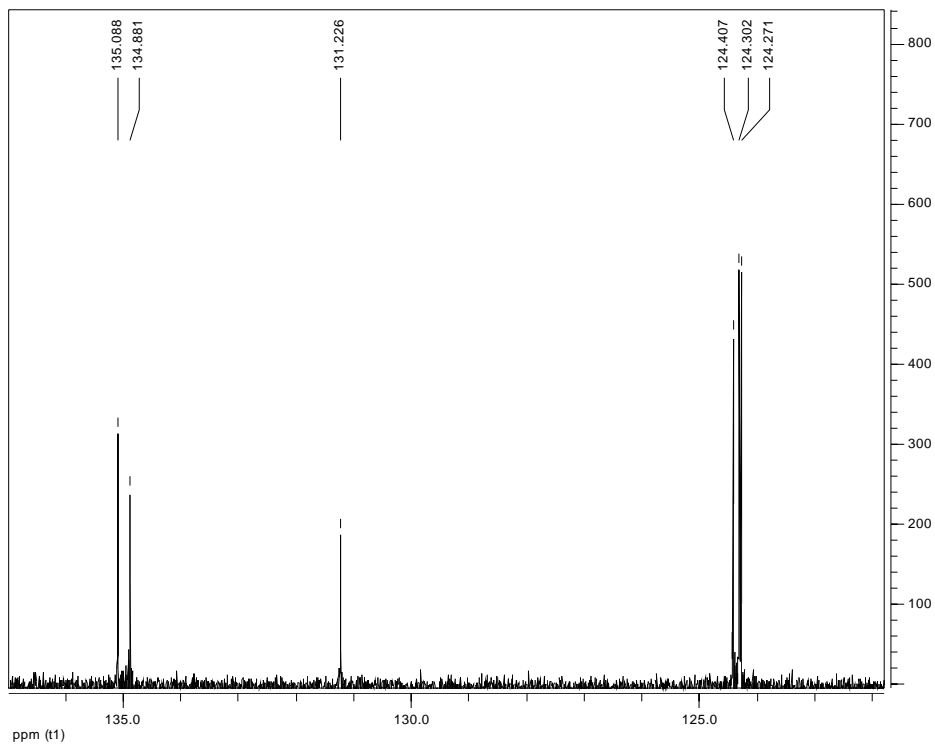


FIGURA 5A Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 101 MHz).

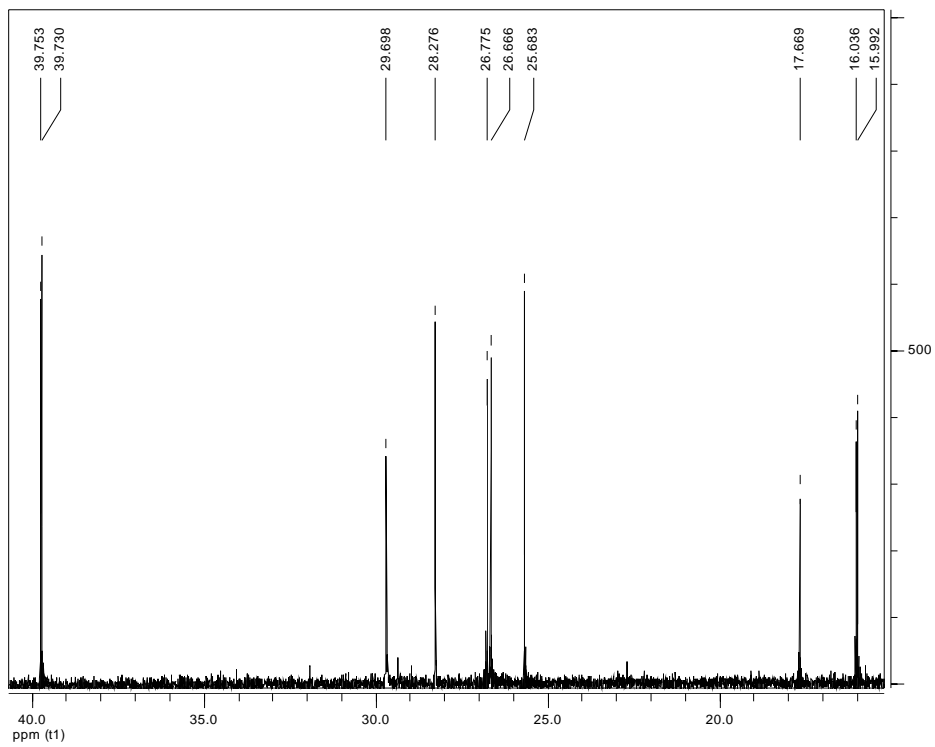


FIGURA 6A Expansão do espectro de RMN de ¹³C do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl₃, 101 MHz).

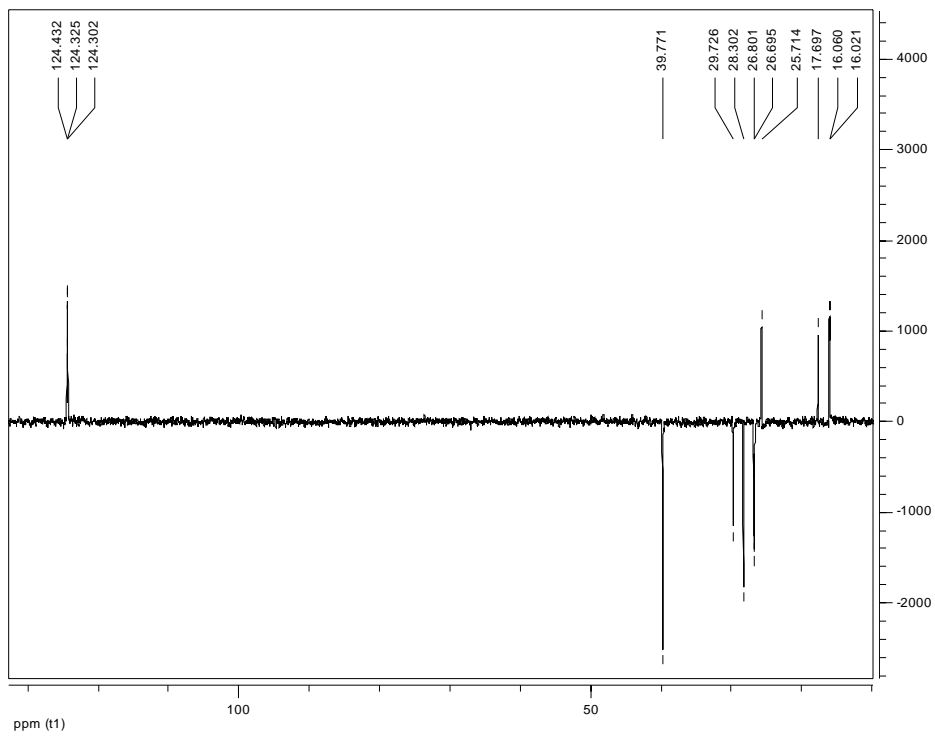


FIGURA 7A Espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl₃, 101MHz).

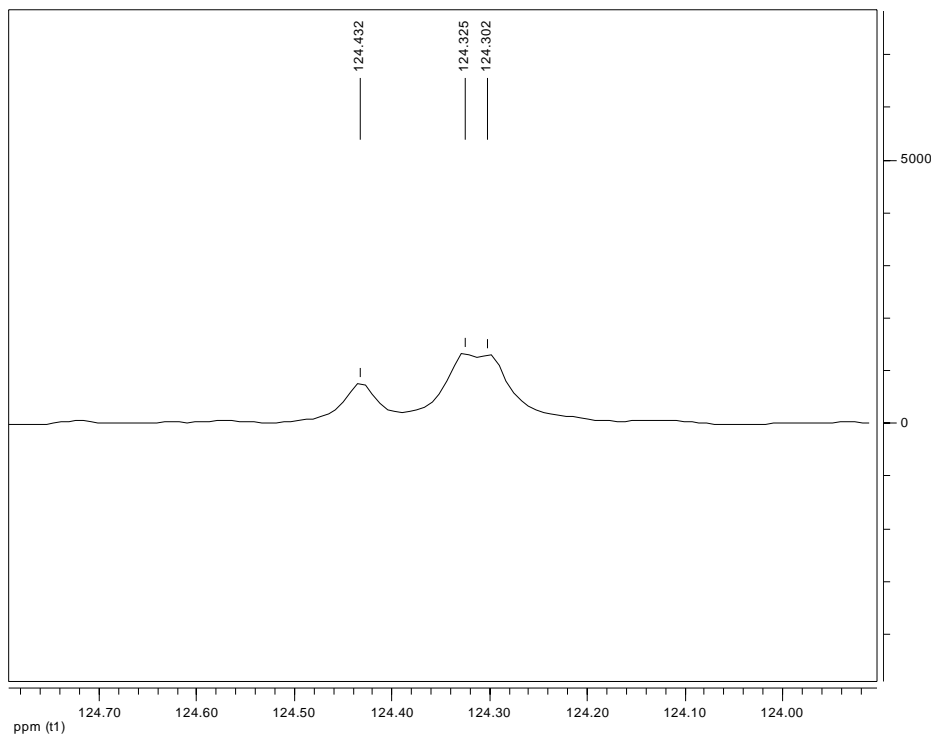


FIGURA 8A Expansão do espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl₃, 101MHz).

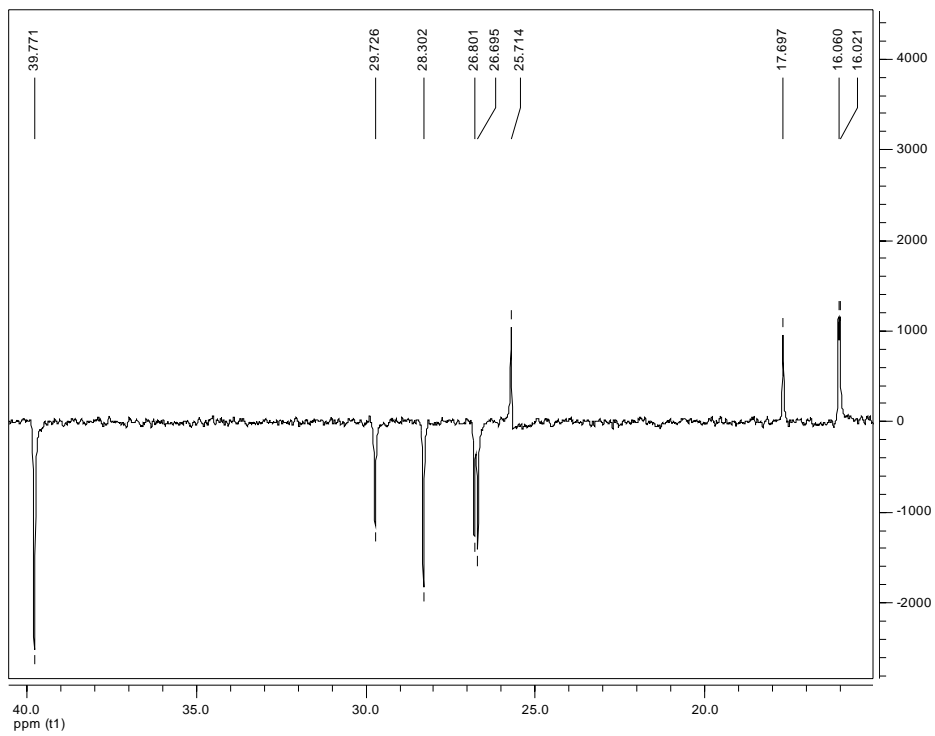


FIGURA 9A Expansão do espectro de DEPT 135° do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl₃, 101MHz).

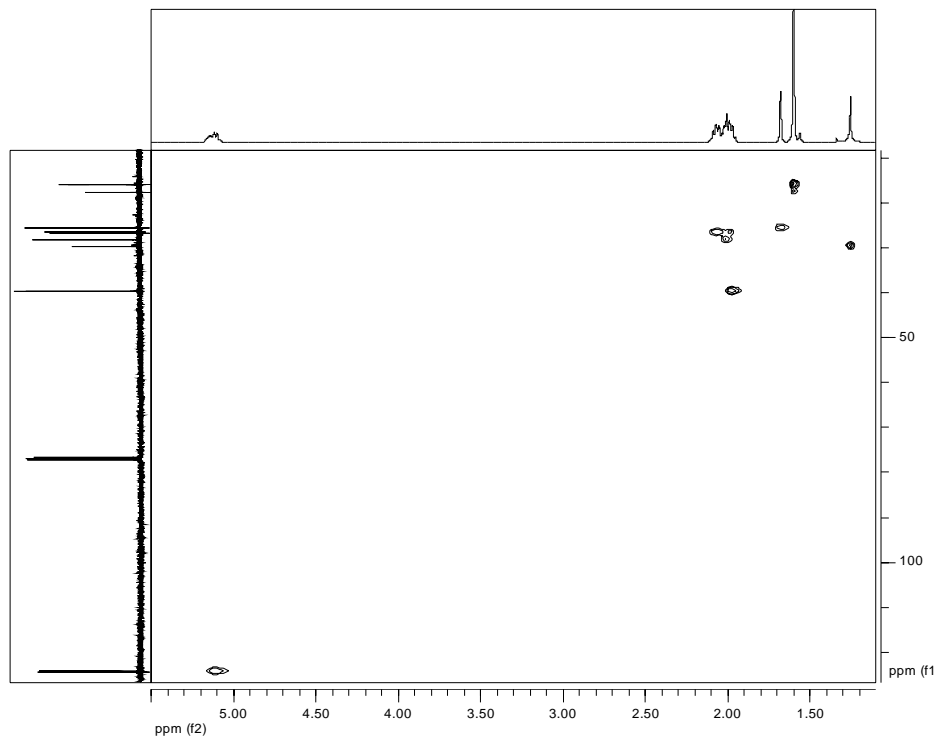


FIGURA 10 A Mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 .

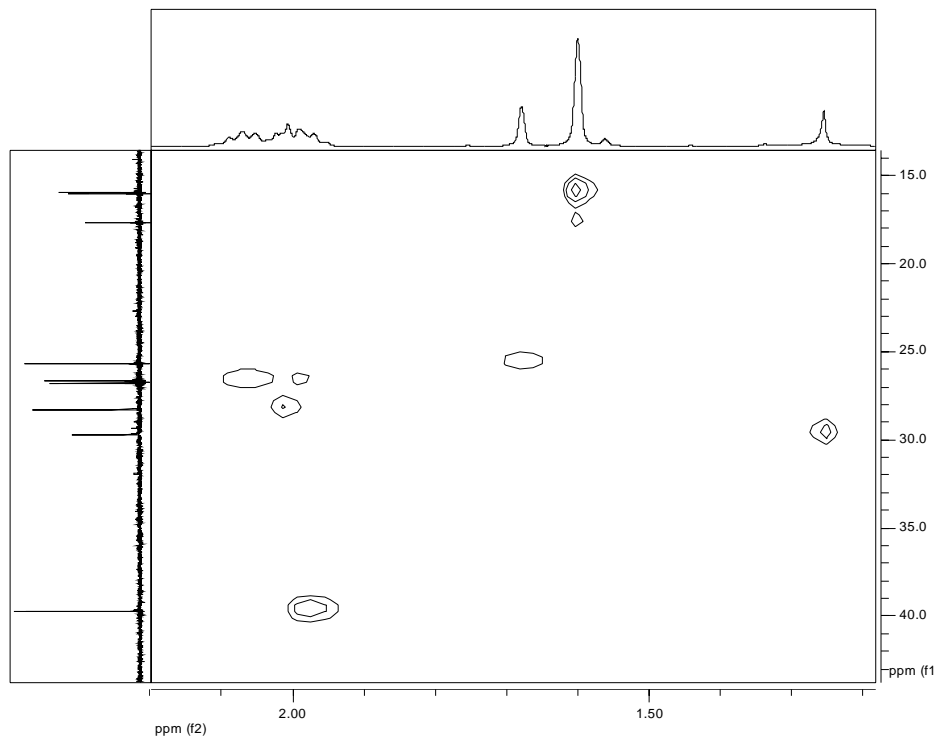


FIGURA 11 A Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 .

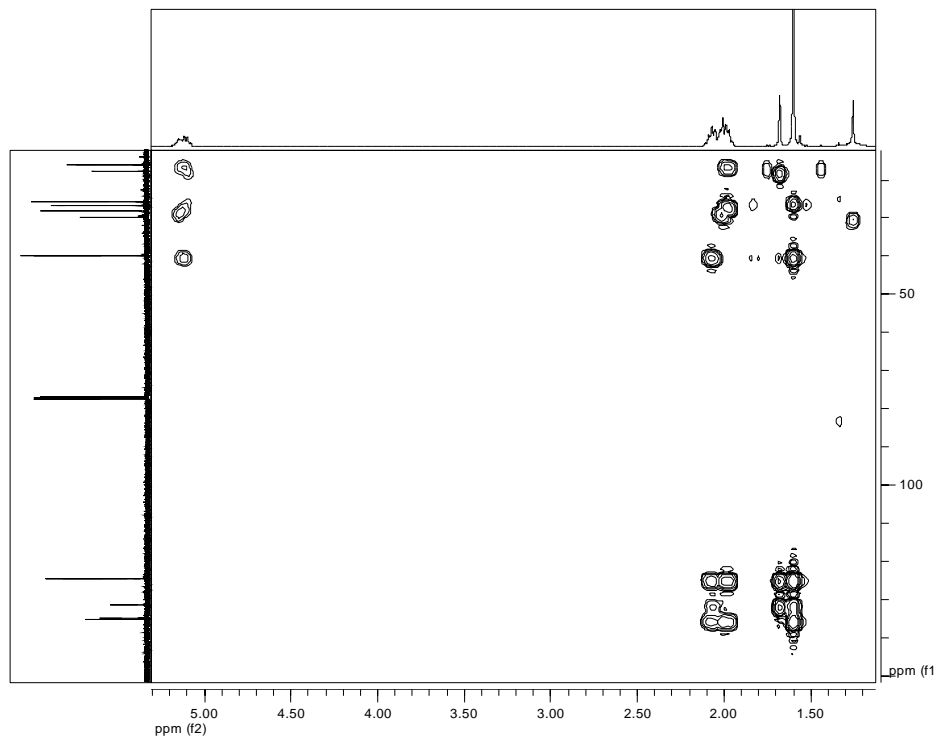


FIGURA 12A Mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 .

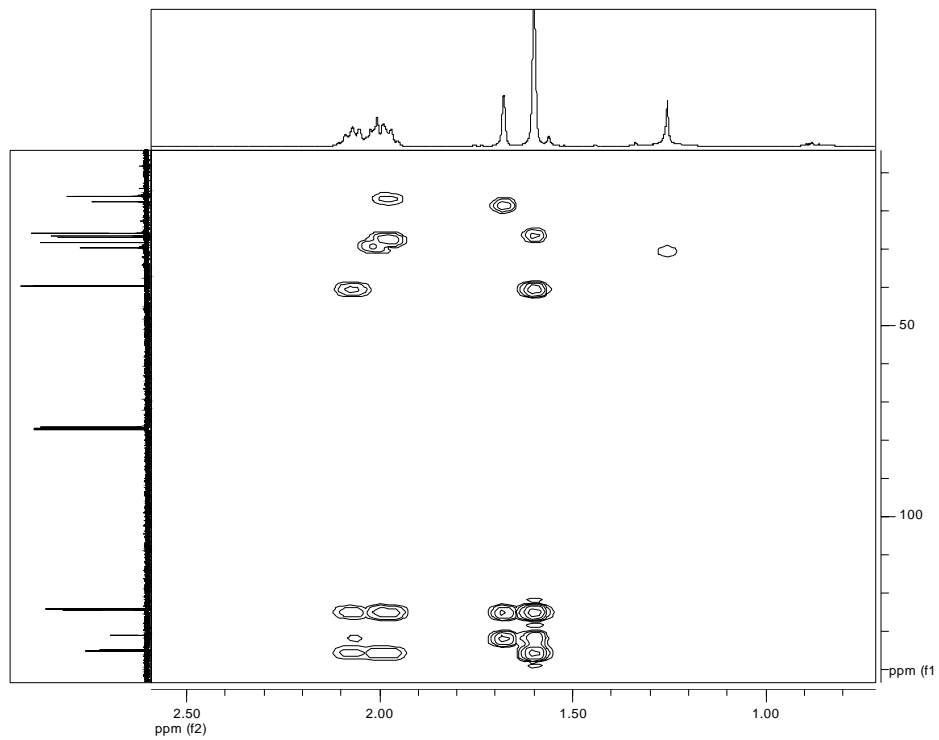


FIGURA 13A Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do esqualeno (Mi-01-76-02) em CDCl_3 .

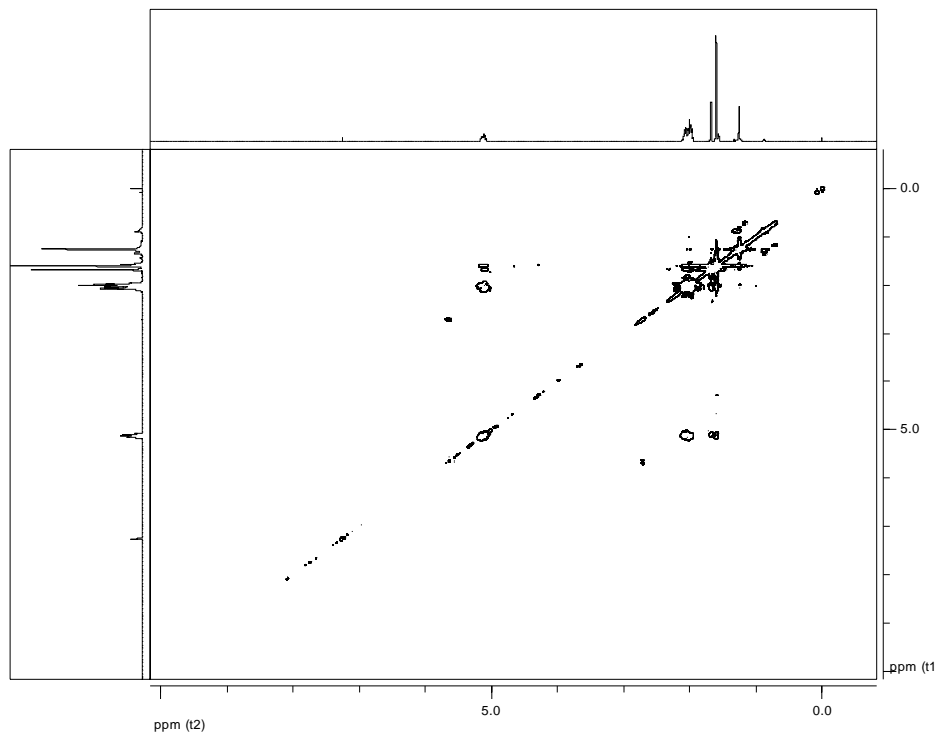


FIGURA 14 A Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400 MHz).

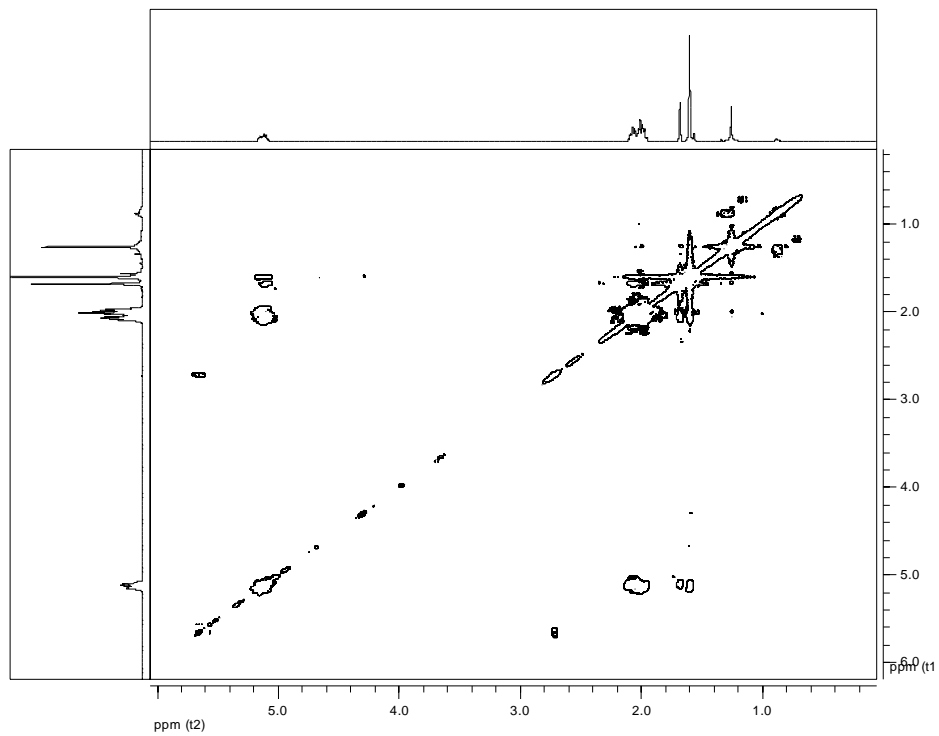


FIGURA 15A Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do esqualeno (Mi-01-76-02) (CDCl_3 , 400 MHz).

| ANEXO B | Página |
|----------------|---|
| FIGURA 1B | Espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 400MHz)..... 68 |
| FIGURA 2B | Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 400MHz)..... 69 |
| FIGURA 3B | Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 400MHz)..... 70 |
| FIGURA 4B | Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 400MHz)..... 71 |
| FIGURA 5B | Espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 72 |
| FIGURA 6B | Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 73 |
| FIGURA 7B | Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 74 |
| FIGURA 8B | Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 75 |
| FIGURA 9B | Espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 76 |
| FIGURA 10B | Expansão do espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 77 |
| FIGURA 11B | Expansão do espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl ₃ , 101MHz)..... 78 |
| FIGURA 12B | Correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl ₃ 79 |
| FIGURA 13B | Expansão da correlação heteronuclear de longa |

| | | |
|------------|--|----|
| | distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 80 |
| FIGURA 14B | Expansão da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 81 |
| FIGURA 15B | Expansão da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 82 |
| FIGURA 16B | Expansão da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 83 |
| FIGURA 17B | Correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79- 03) em CDCl_3 | 84 |
| FIGURA 18B | Expansão da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 85 |
| FIGURA 19B | Expansão da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 | 86 |
| FIGURA 20B | Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do α - tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400 MHz)..... | 87 |
| FIGURA 21B | Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400 MHz)..... | 88 |
| FIGURA 22B | TOCSY do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 400 MHz)..... | 89 |

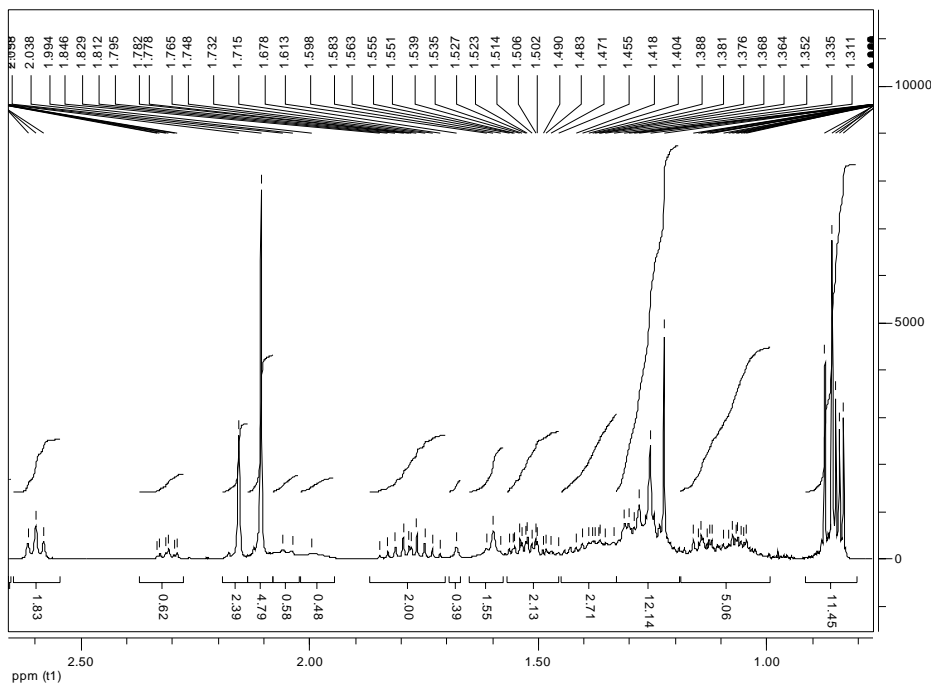


FIGURA 1B Espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400MHz).

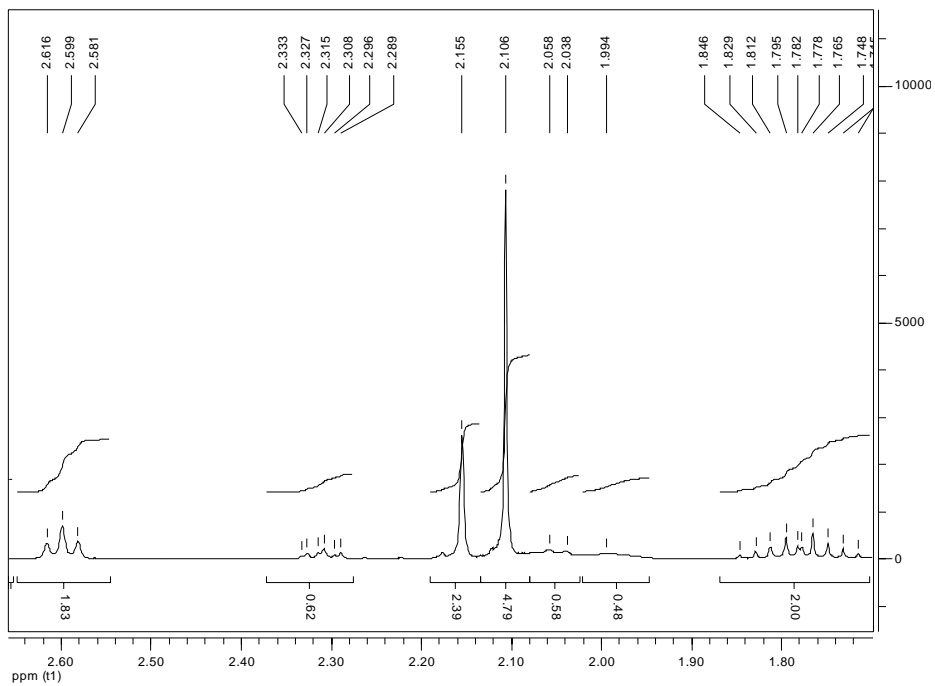


FIGURA 2B Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400MHz).

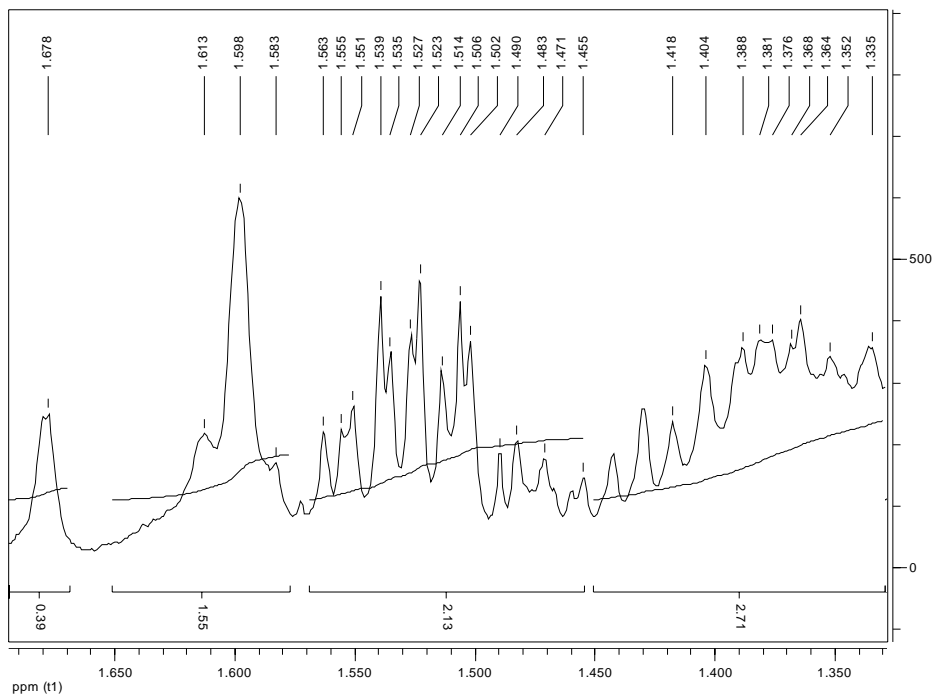


FIGURA 3B Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400MHz).

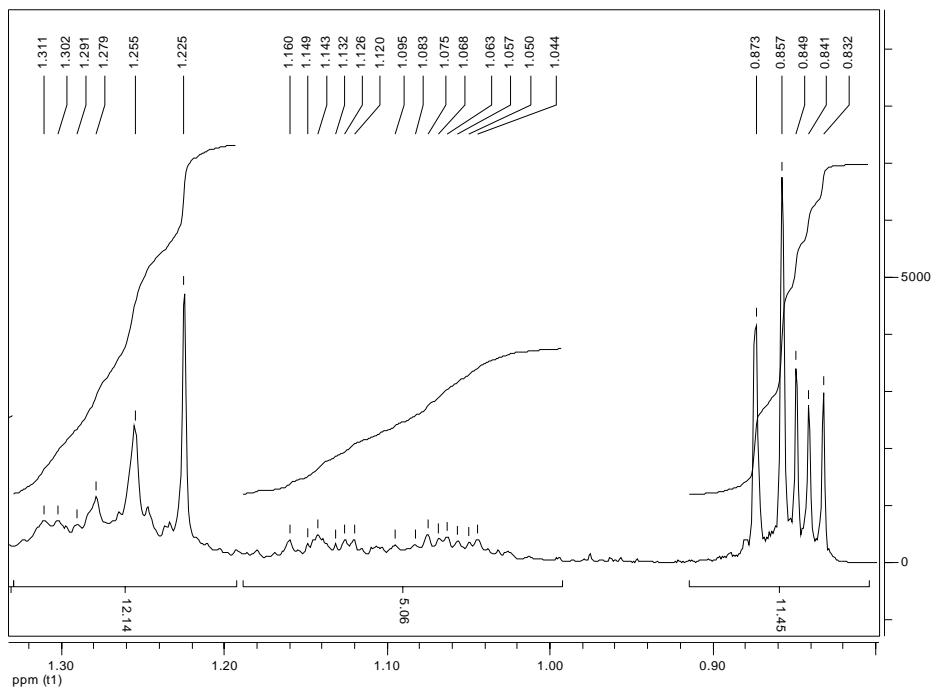


FIGURA 4B Expansão do espectro de RMN de ^1H do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400MHz).

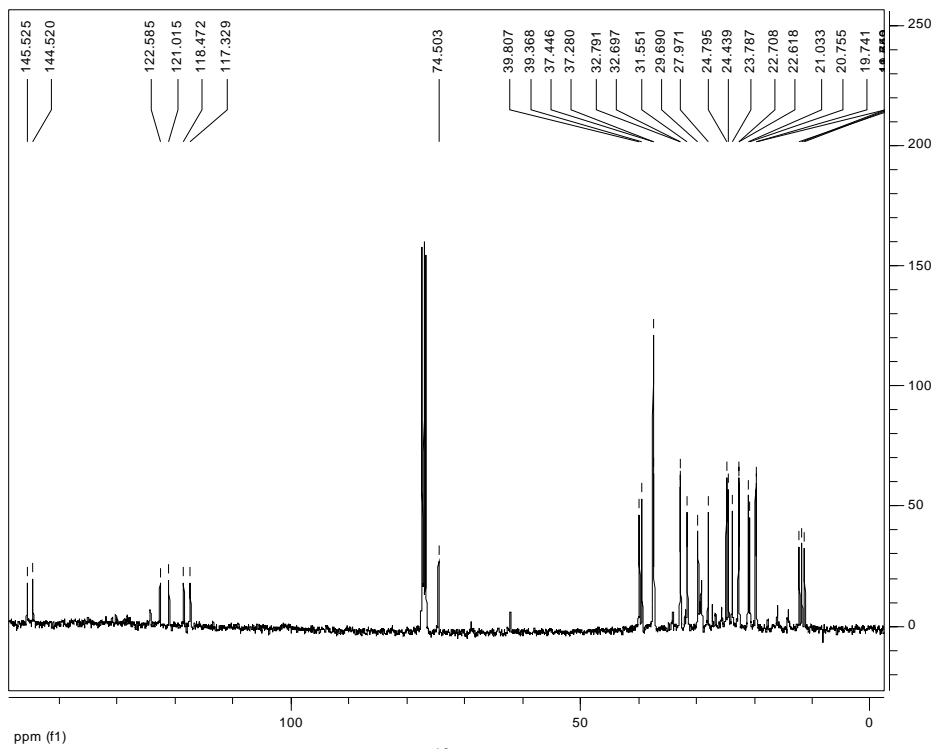


FIGURA 5B Espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 101MHz).

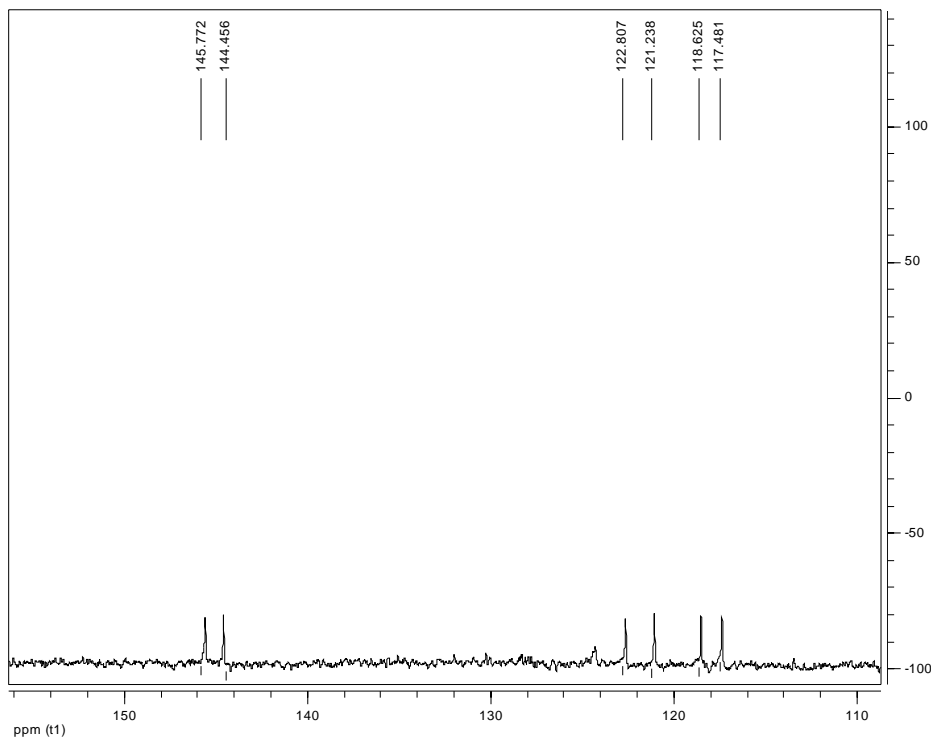


FIGURA 6B Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 101MHz).

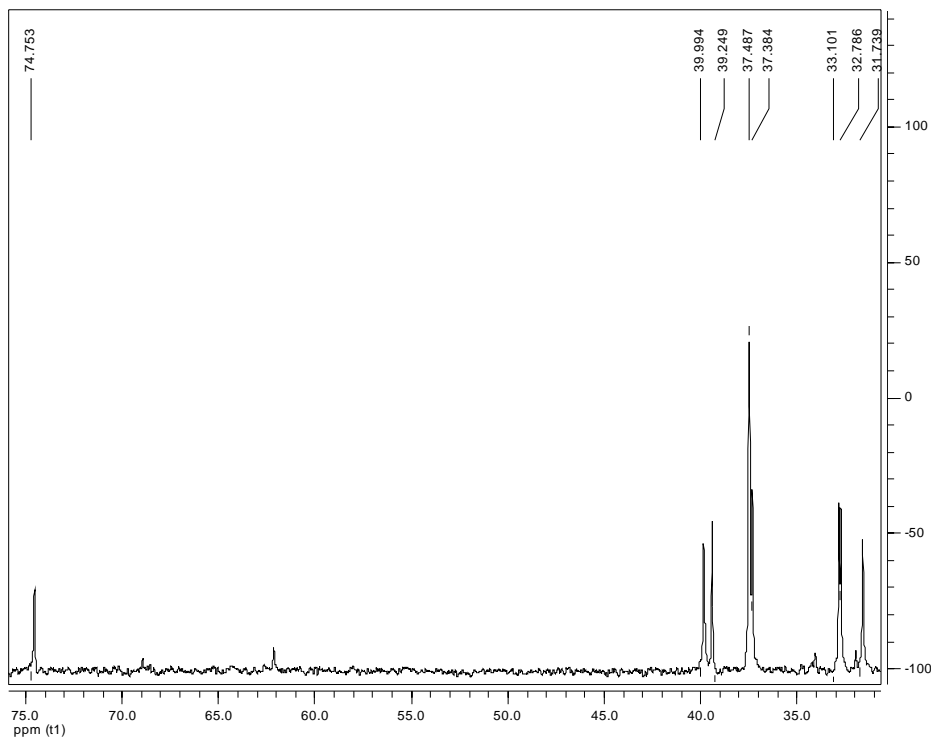


FIGURA 7B Expansão do espectro de RMN de ¹³C do α-tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl₃, 101MHz).

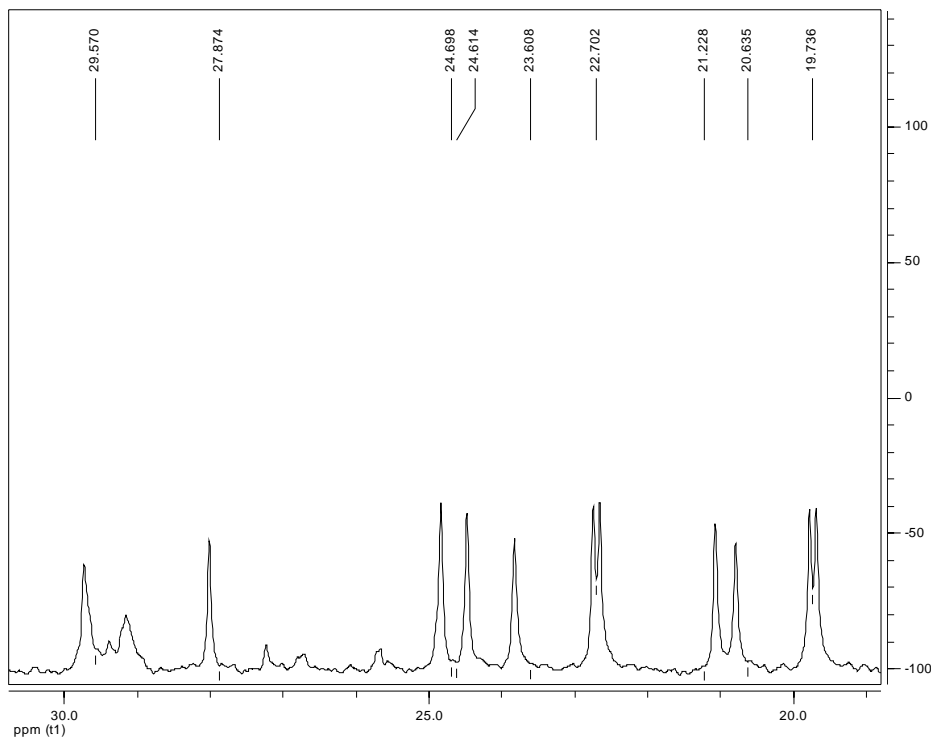


FIGURA 8B Expansão do espectro de RMN de ¹³C do α-tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl₃, 101MHz).

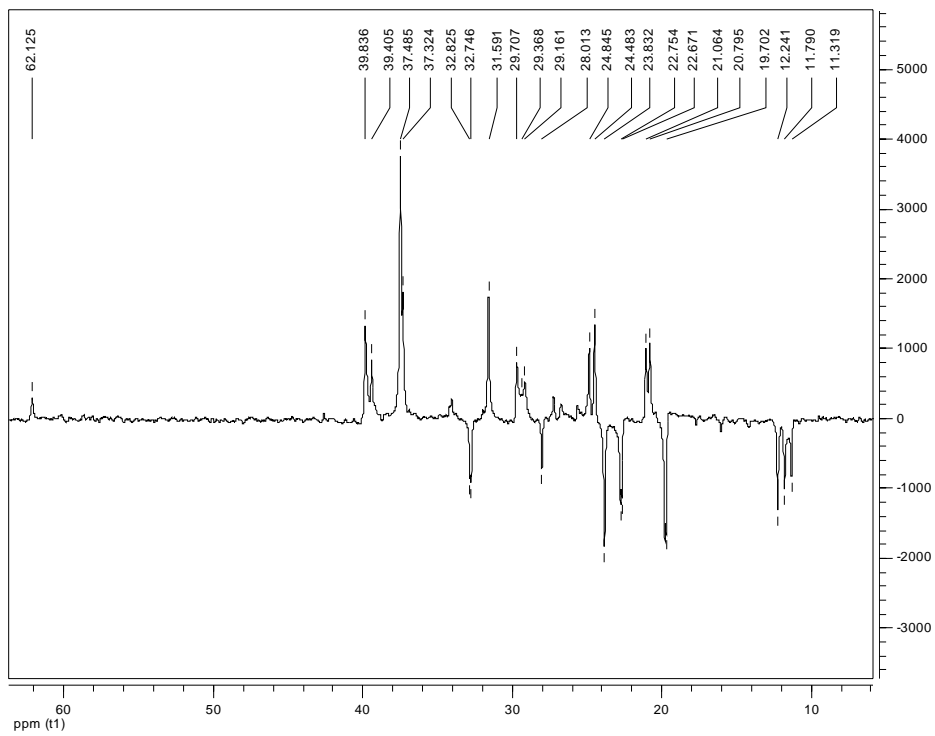


FIGURA 9B Espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 101MHz).

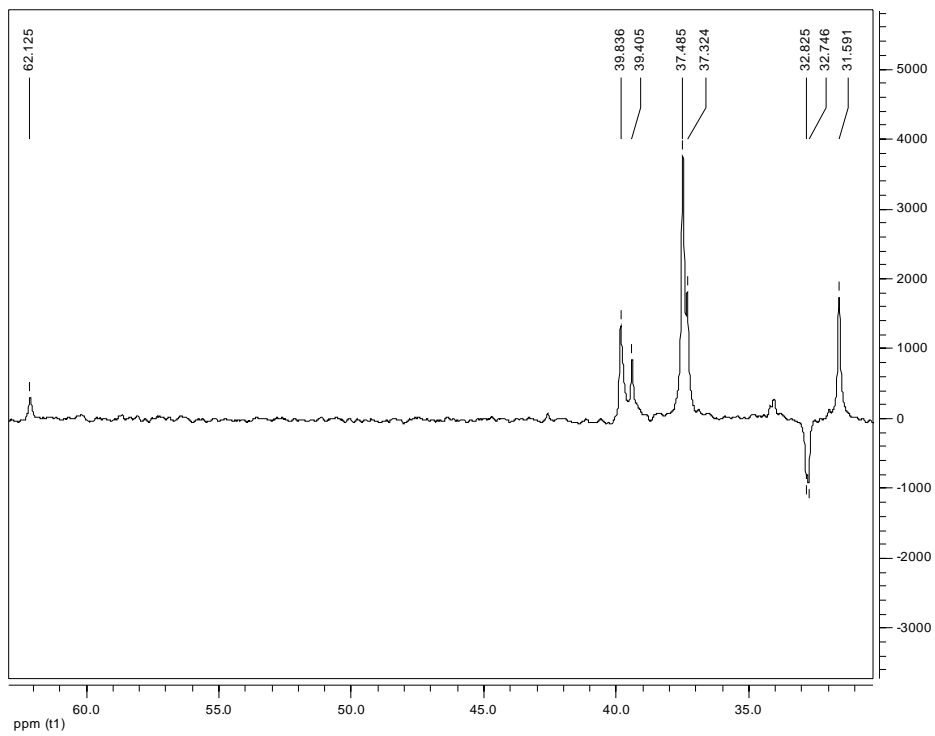


FIGURA 10B Expansão do espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 101MHz).

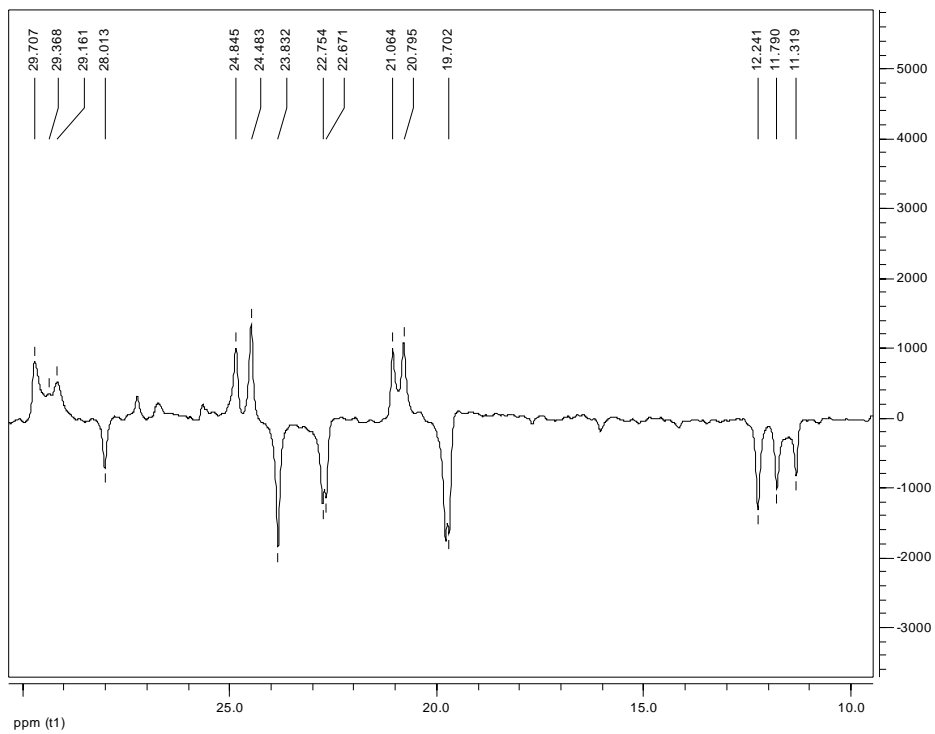


FIGURA 11B. Expansão do espectro de DEPT 135° do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl₃, 400MHz).

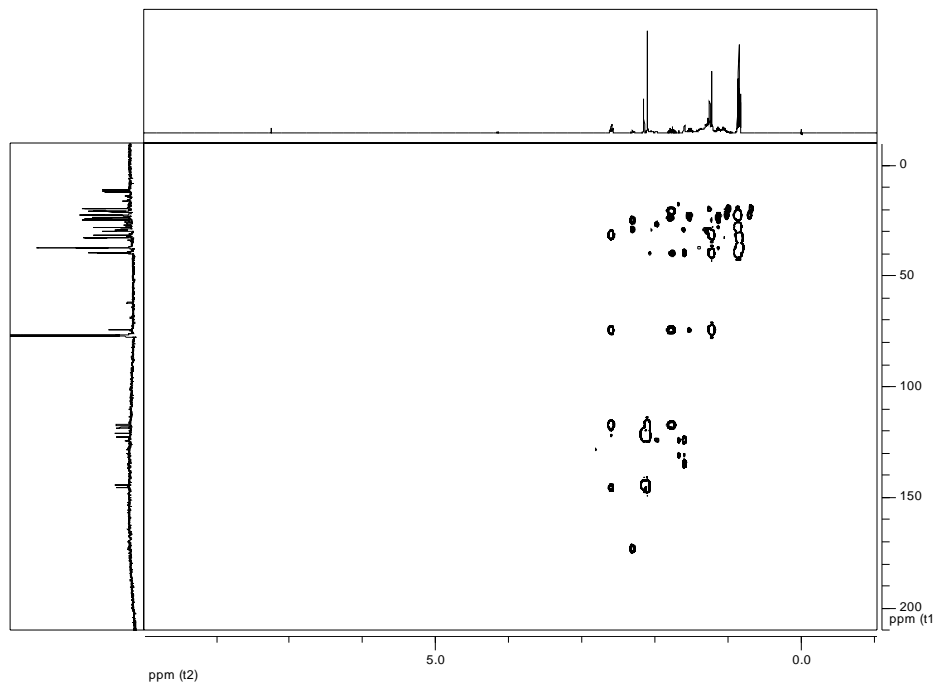


FIGURA 12B Mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

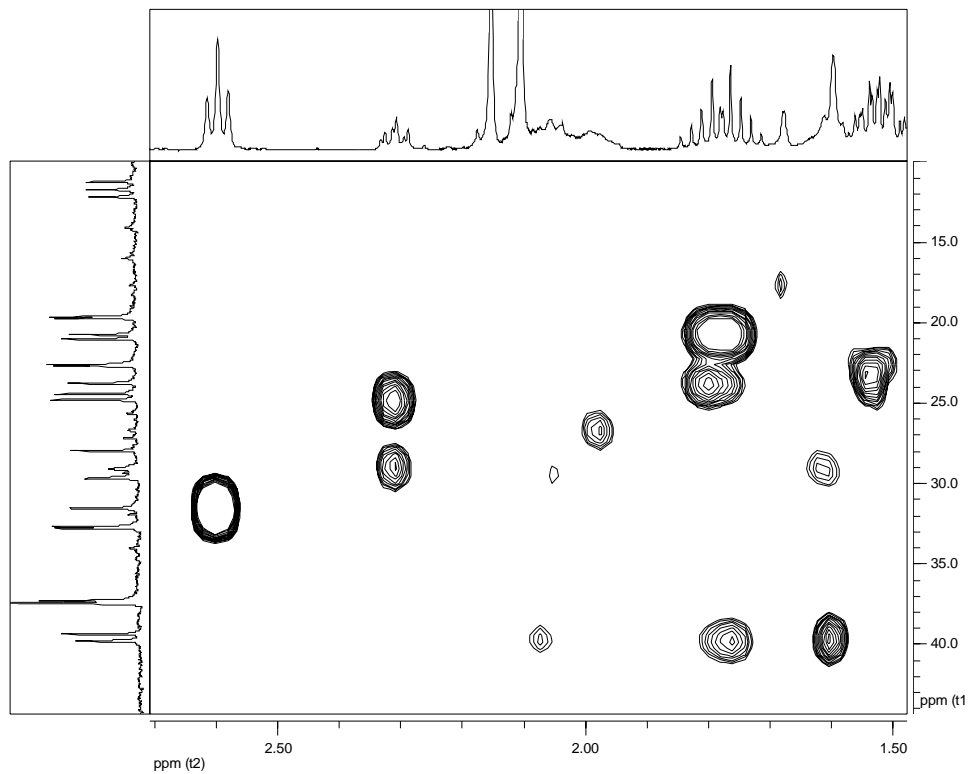


FIGURA 13B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

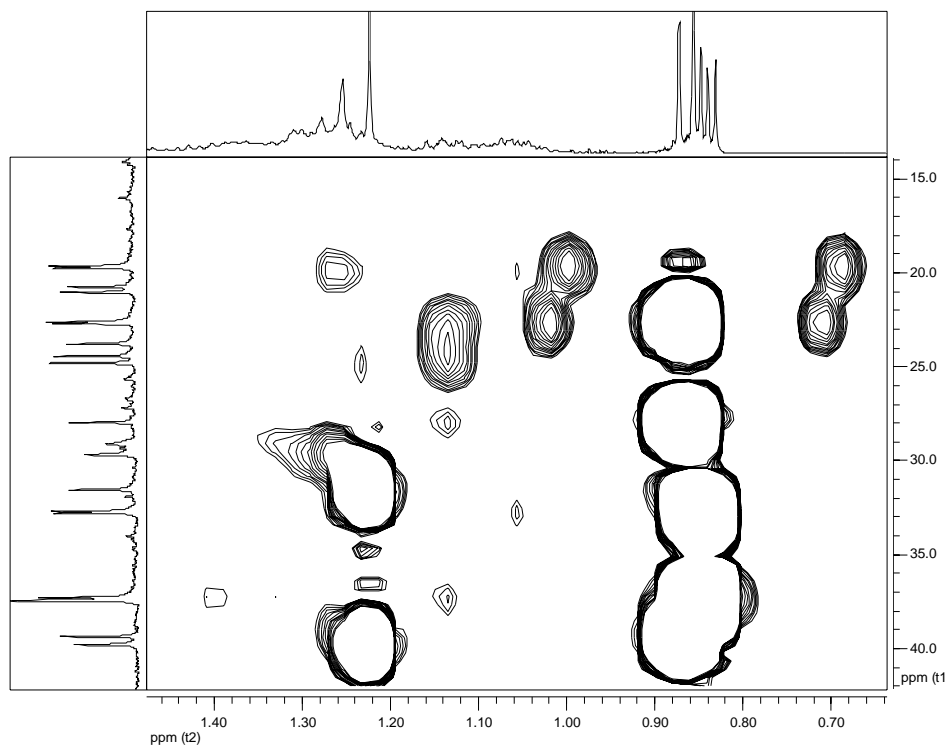


FIGURA 14B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

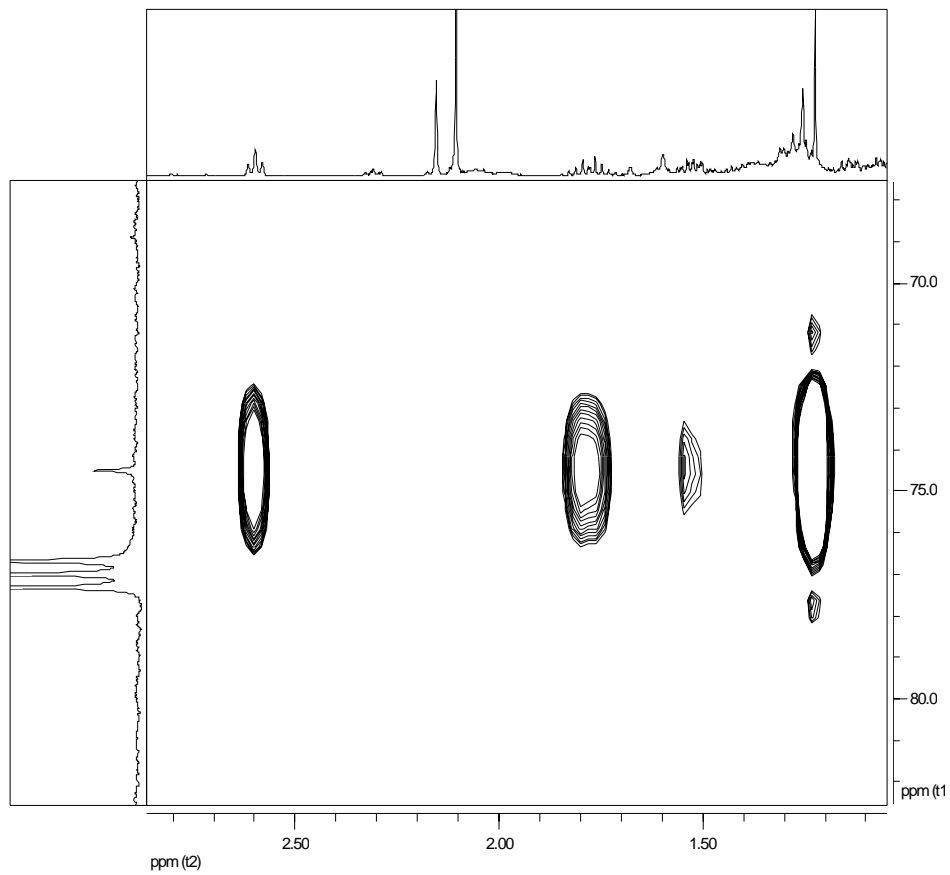


FIGURA 15B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

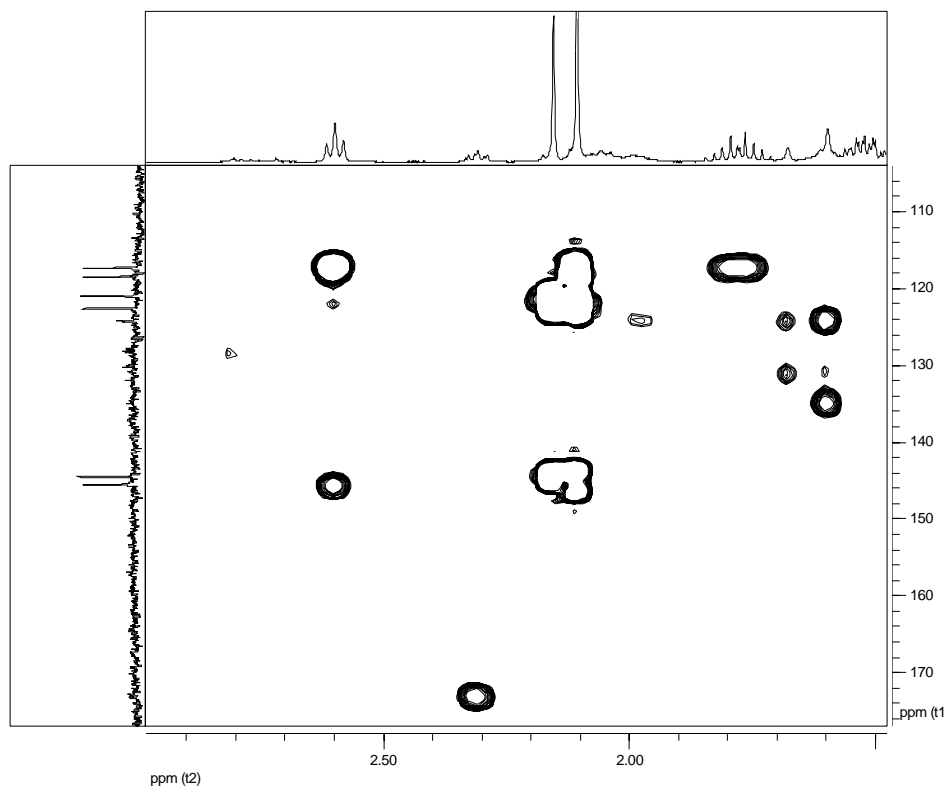


FIGURA 16B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

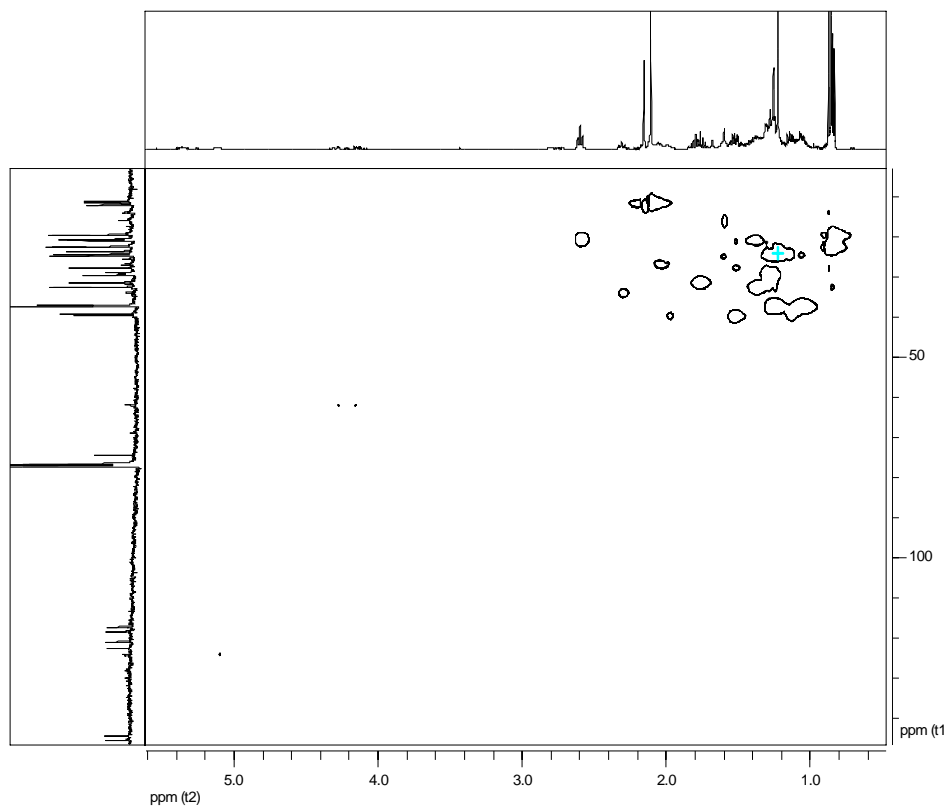


FIGURA 17B Mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

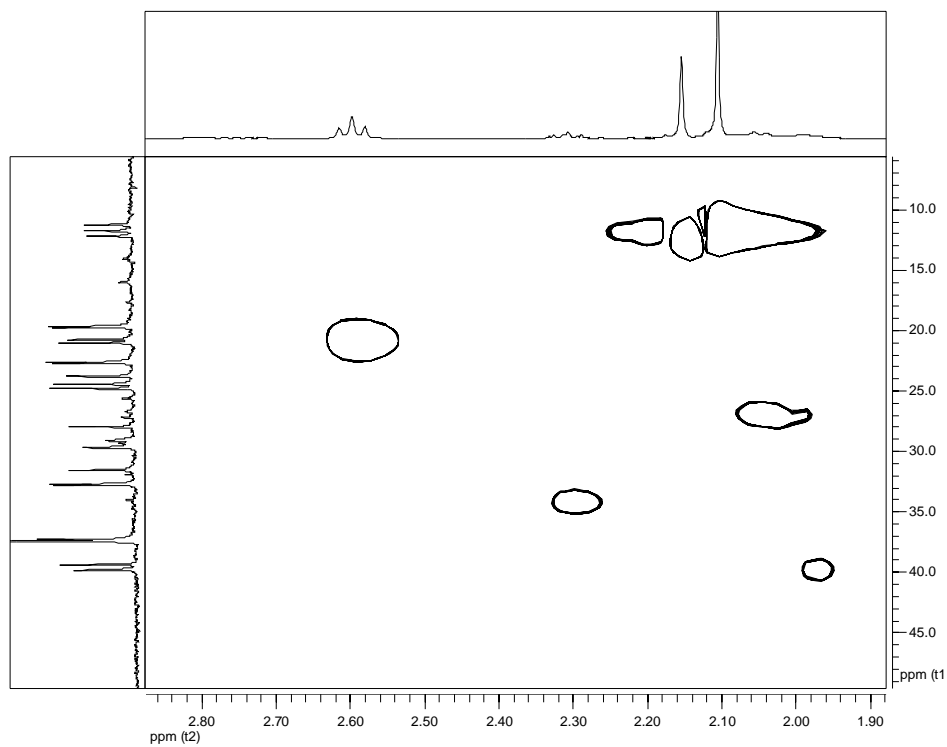


FIGURA 18B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

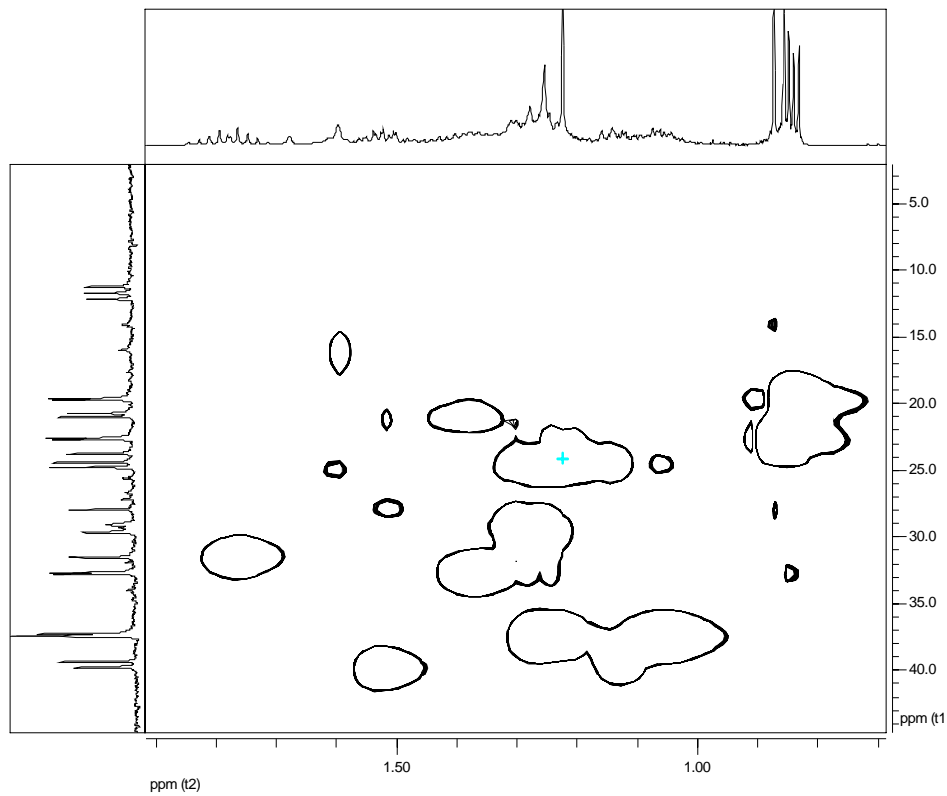


FIGURA 19B Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 101 MHz) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) em CDCl_3 .

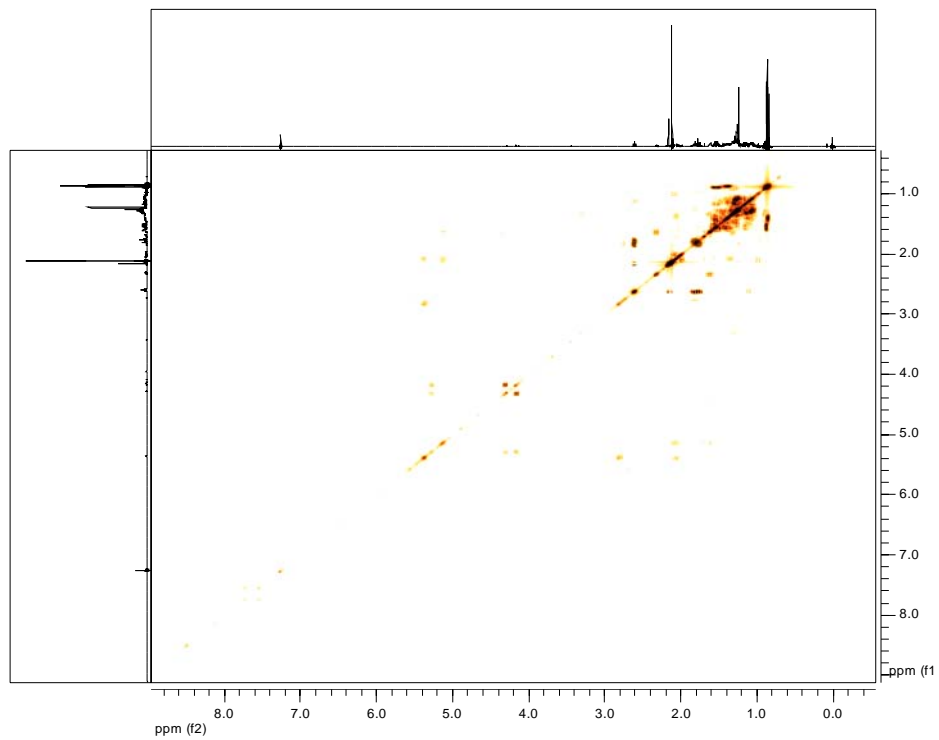


FIGURA 20B Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400 MHz).

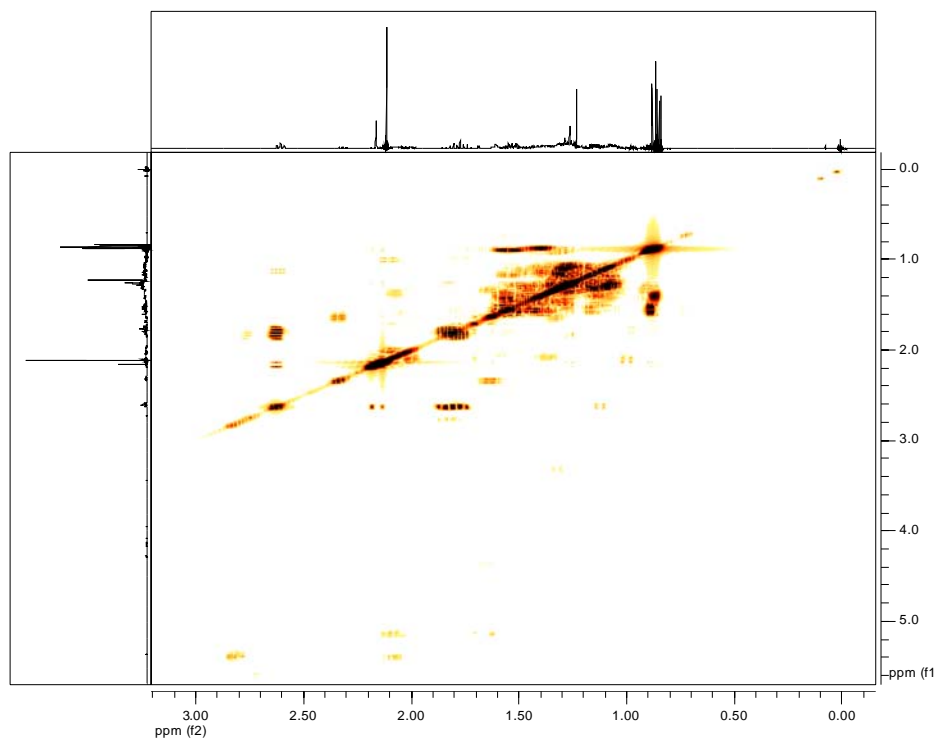


FIGURA 21B Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400 MHz).

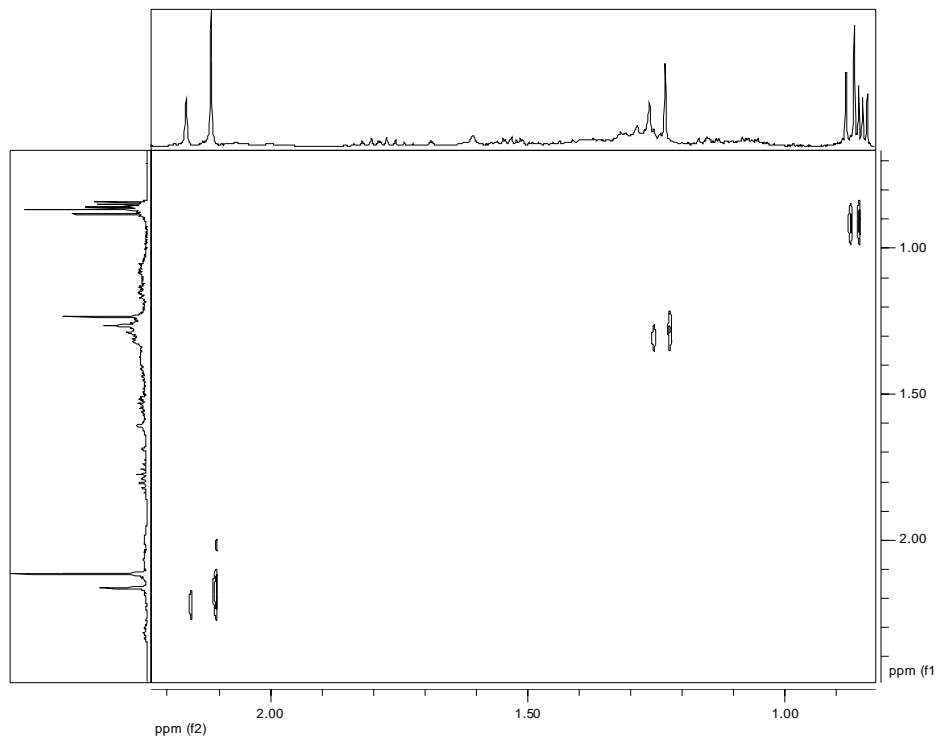


FIGURA 22B TOCSY do α -tocoferol (Mi-01-79-03) (CDCl_3 , 400 MHz).

| ANEXO C | Página |
|----------------|--|
| FIGURA 1C | Espectro de RMN de ^1H do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz)..... 92 |
| FIGURA 2C. | Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz)..... 93 |
| FIGURA 3C | Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz)..... 94 |
| FIGURA 4C | Mapa de contorno correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) 95 |
| FIGURA 5C | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) 96 |
| FIGURA 6C | Mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) 97 |
| FIGURA 7C | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) 98 |
| FIGURA 8C | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03)..... 99 |
| FIGURA 9C | Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido <i>cis</i> -octadec-9- |

| | | |
|------------|---|-----|
| | enóico (Mi-02-16-03)..... | 100 |
| FIGURA 10C | Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600 MHz)..... | 101 |
| FIGURA 11C | TOCSY do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600 MHz)..... | 102 |
| FIGURA 12C | Expansão do TOCSY do ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600 MHz)..... | 103 |

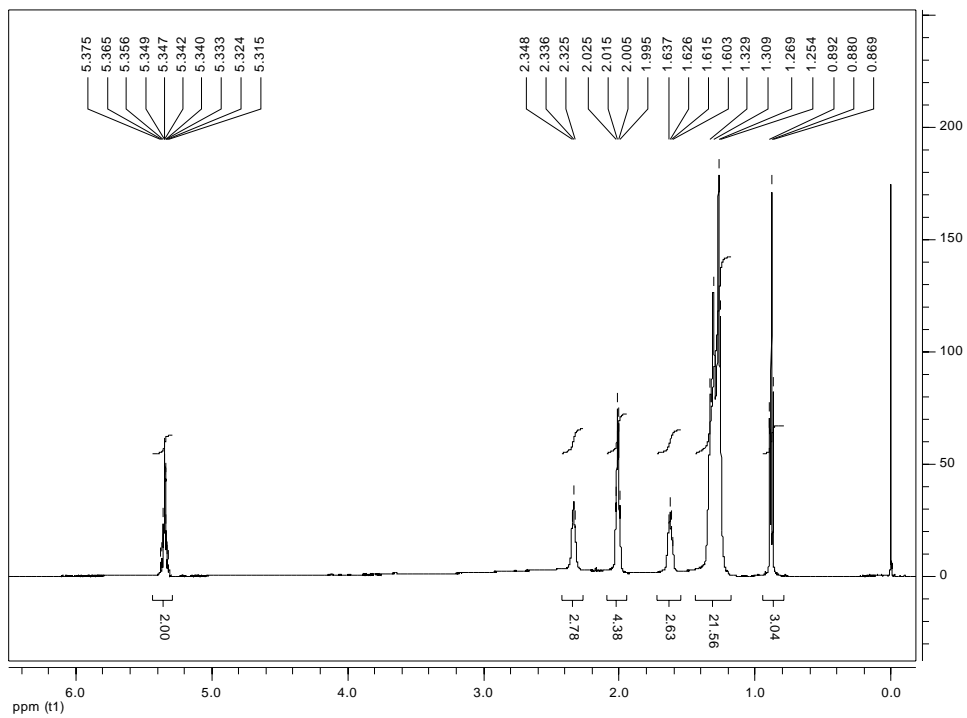


FIGURA 1 C Espectro de RMN de ^1H do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz).

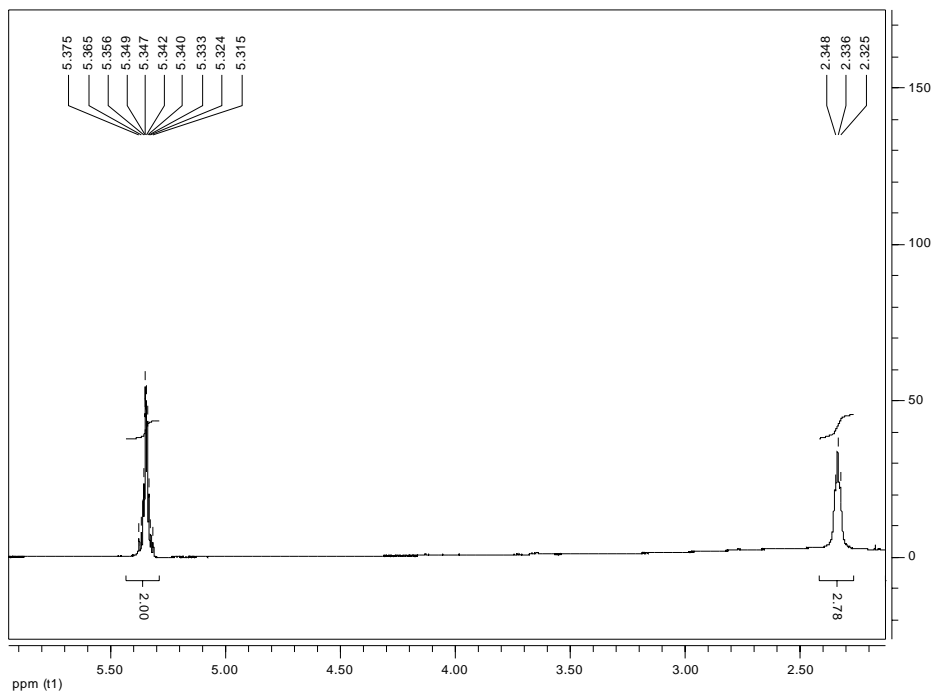


FIGURA 2C Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz).

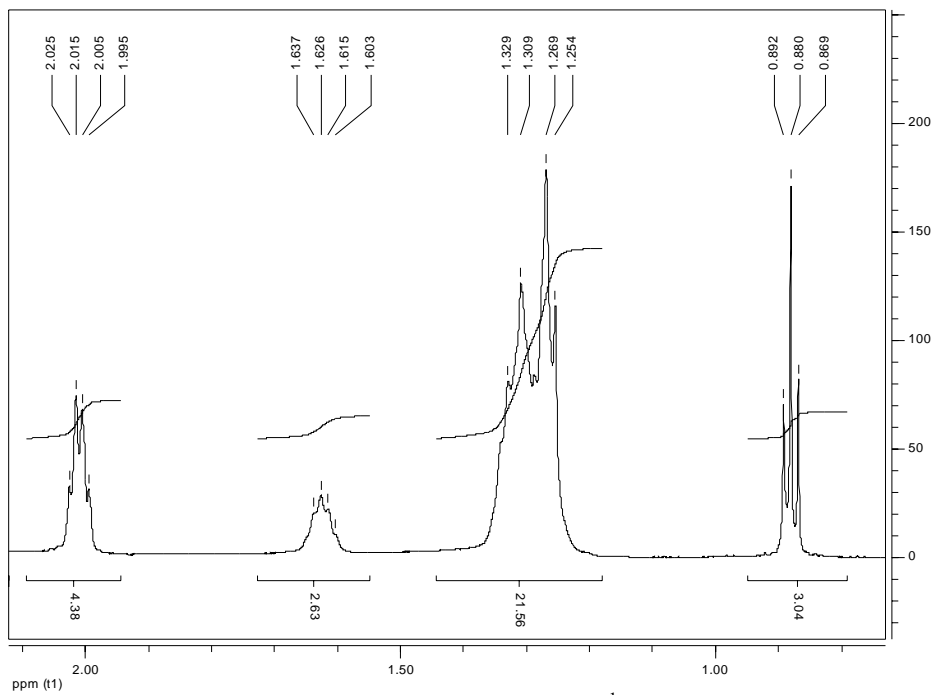


FIGURA 3C Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600MHz).

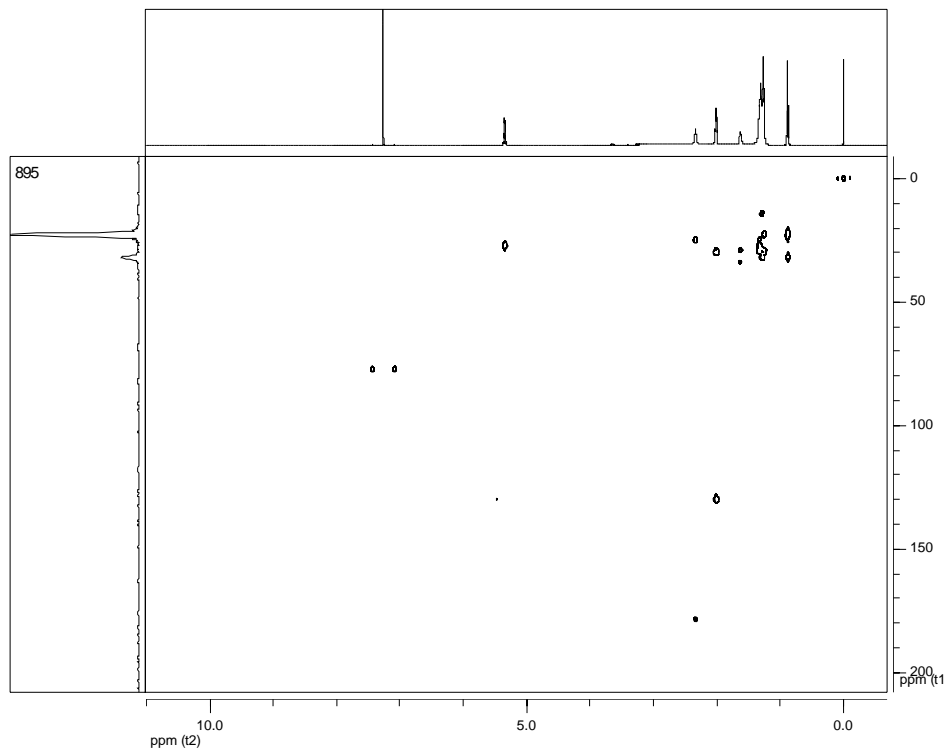


FIGURA 4C Mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

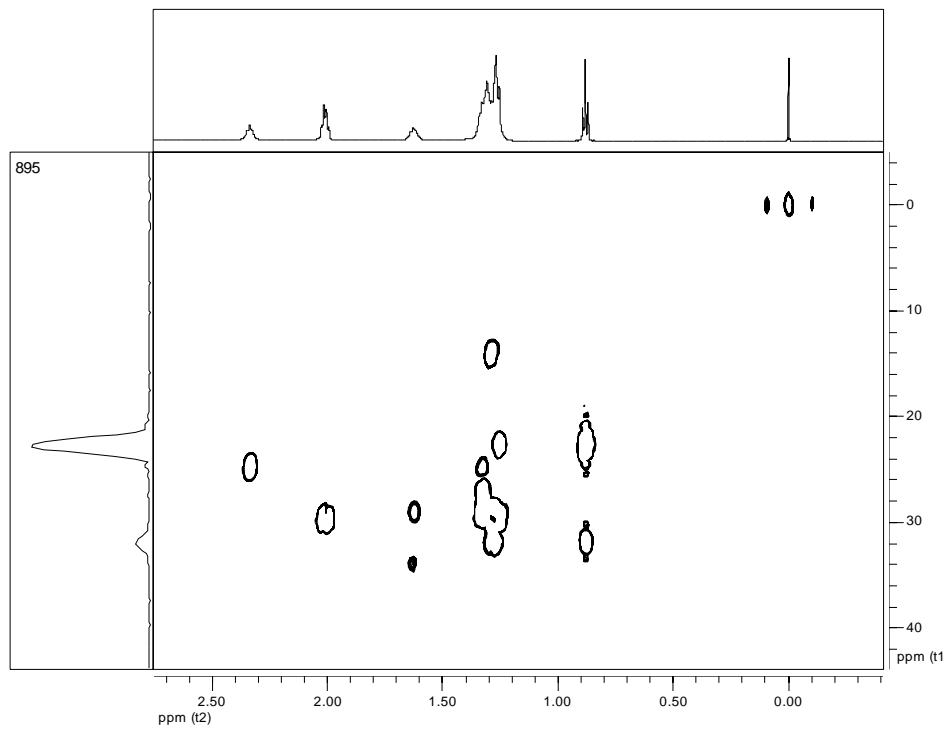


FIGURA 5C Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

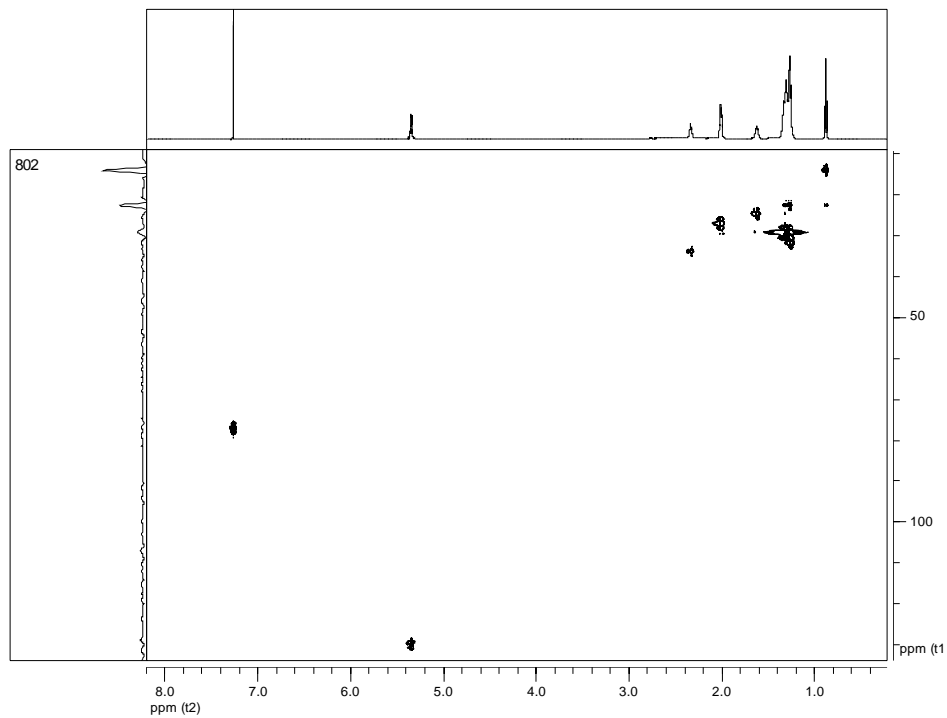


FIGURA 6C Mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

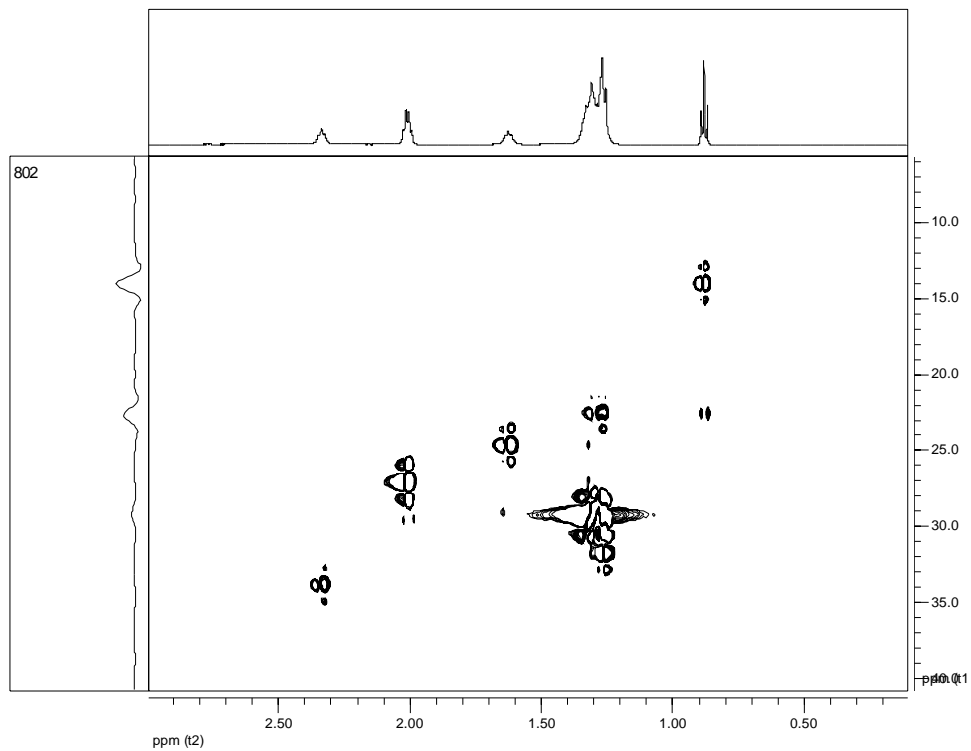


FIGURA 7C Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

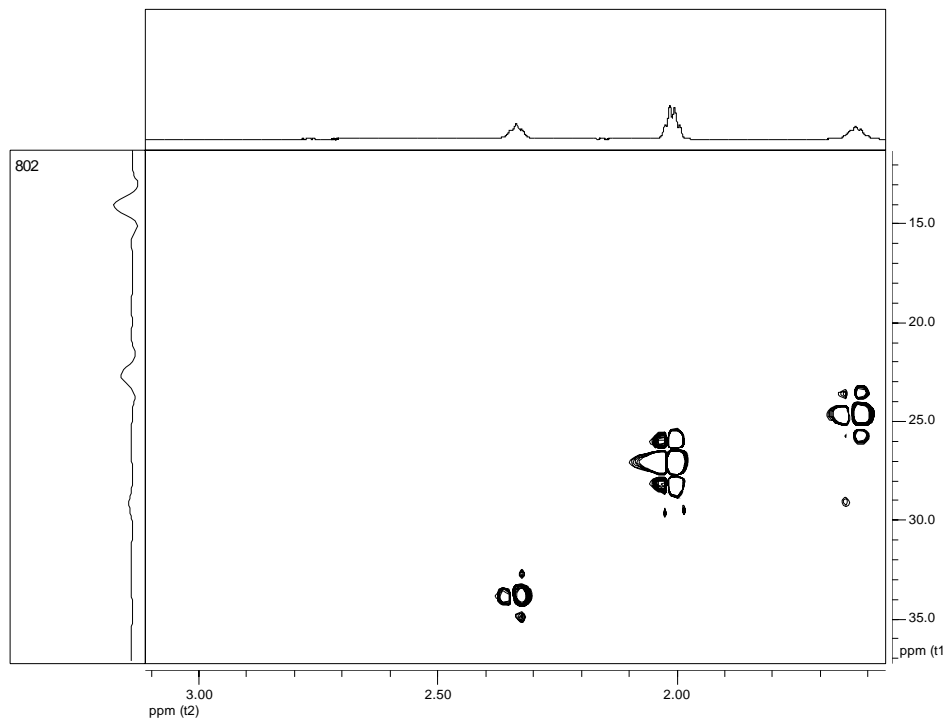


FIGURA 8C Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*- octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

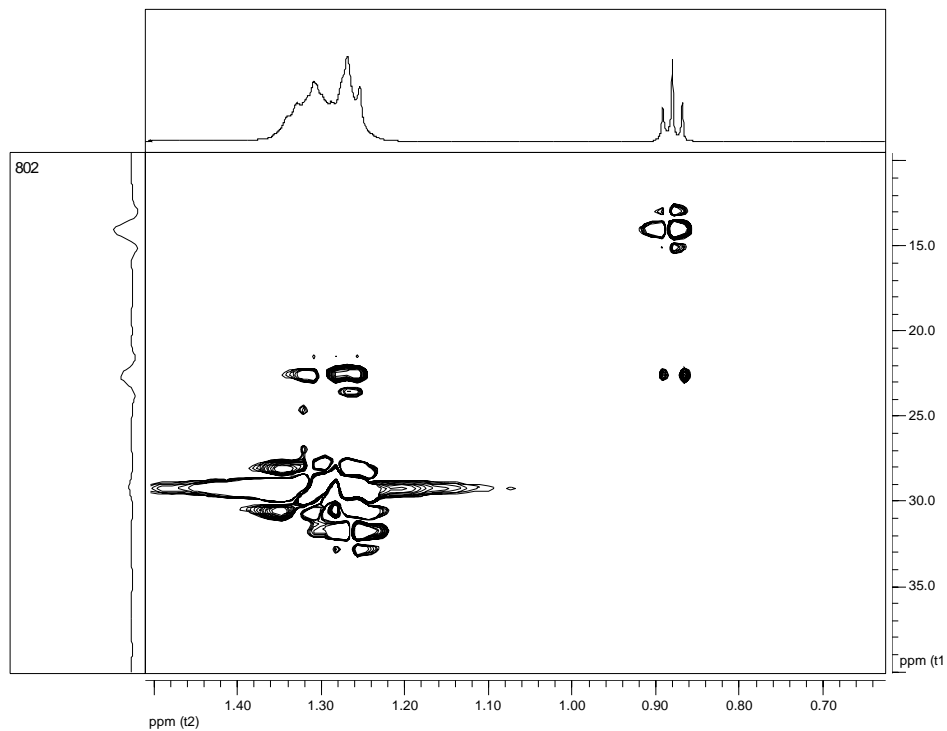


FIGURA 9C Expansão do mapa de contorno da correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) em CDCl_3 do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03).

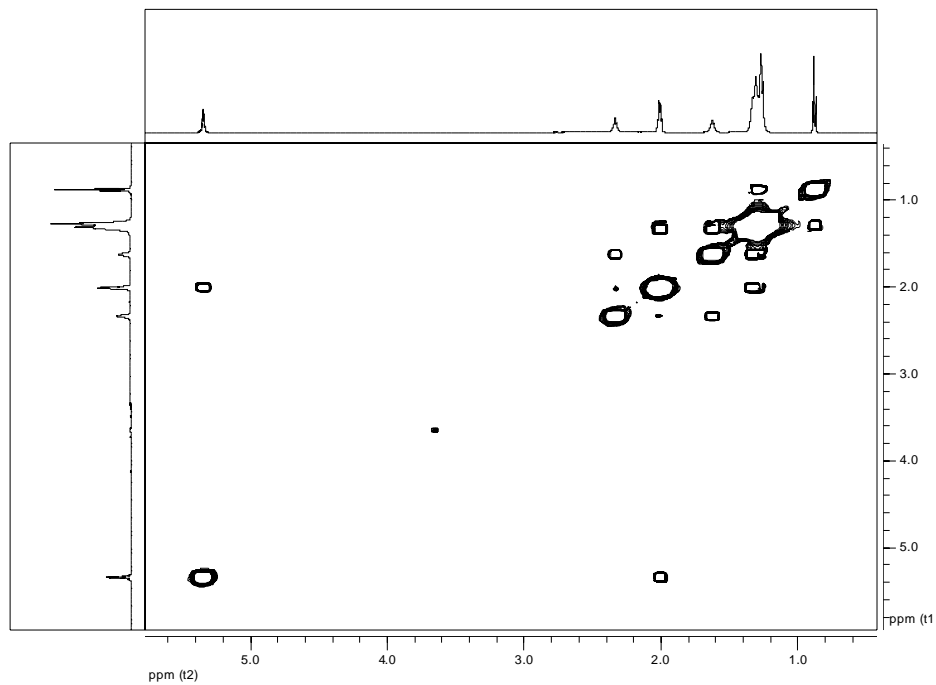


FIGURA 10C Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600 MHz).

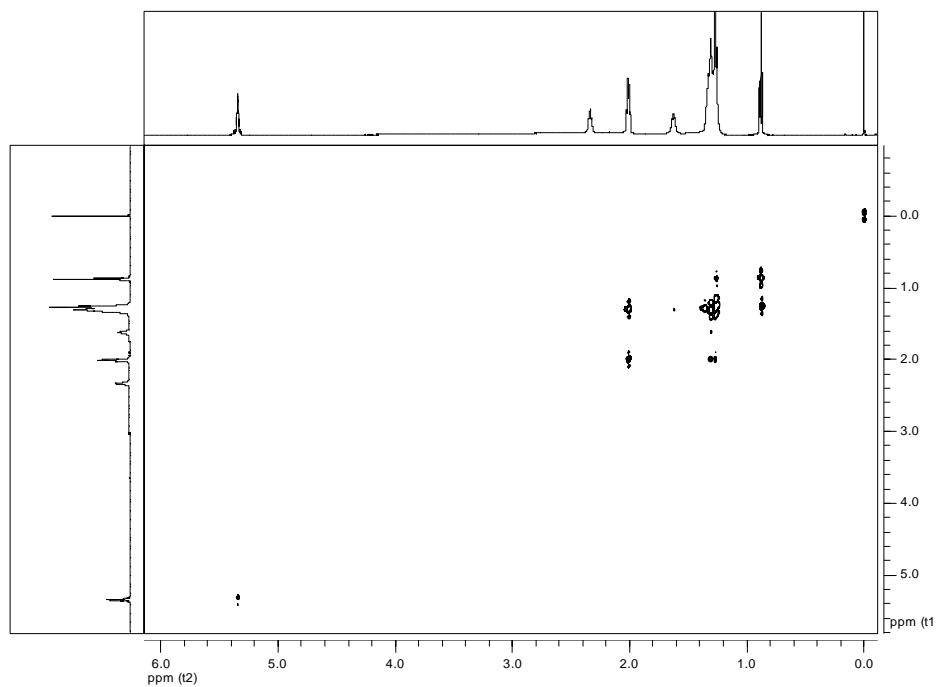


FIGURA 11C TOCSY do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl_3 , 600 MHz).

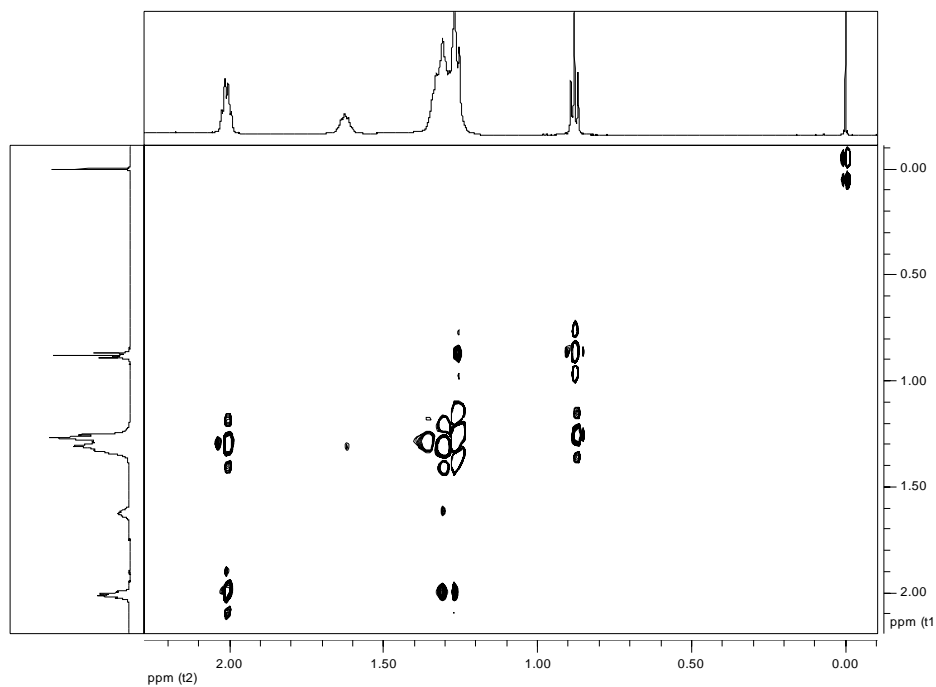


FIGURA 12C Expansão do TOCSY do ácido *cis*-octadec-9-enóico (Mi-02-16-03) (CDCl₃, 600 MHz).