



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA *Copaifera langsdorffi* DESFON E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE FUNGITÓXICA

ANA CAROLINA LOURENÇO AMORIM

2003

ANA CAROLINA LOURENÇO AMORIM

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA *Copaifera langsdorffi* DESFON E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE FUNGITÓXICA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

Amorim, Ana Carolina Lourenço

Caracterização química da *Copaifera langsdorffi* Desfon e avaliação de sua atitude fungitóxicas / Ana Carolina Lourenço Amorim. -- Lavras : UFLA, 2003.

94 p. : il.

Orientadora: Dra. Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia

1. *Copaifera*. 2. Fitoquímica. 3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.96
- 634.97332

ANA CAROLINA LOURENÇO AMORIM

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA *Copaifera langsdorffi* DESFON E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE FUNGITÓXICA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 26 de fevereiro de 2003

Prof . Dr. Mauro dos Santos Carvalho

UFLA

Prof. Dr. David Lee Nelson

UFMG

Maria das Graças Cardoso
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais de coração, Clélia e Fred,

Ao meu irmão, Mauro,

OFEREÇO

Aos meus pais, Ana e Aristeu, e a minha avó, Clélia;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo que me guia e aos espíritos protetores que iluminam meu caminho.

A minha família, meus pais de coração; esses são os laços verdadeiros de amor; ao meu "mano" Mauro, acima de tudo, meu amigo, muito obrigada por terem me escolhido para fazer parte dessa família.

Aos meus pais, pelo incentivo, carinho e amor.

A minha avó e madrinha amadas, que apoiaram-me sempre que necessário.

A minhas irmãs, Dani e Renata, e aos meus sobrinhos queridos.

A minha orientadora, Dra. Maria das Graças Cardoso, pela orientação, dedicação, parceria e amizade; você tem minha eterna gratidão!

Ao professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela co-orientação nos experimentos de controle biológico, e ao co-orientador, professor José Eduardo B. P. Pinto.

Ao professor Dr. Mário César Guerreiro, pelas análises cromatográficas e pelo convívio.

Ao professor Dr. David Lee Nelson, pelas análises de ressonância magnética e pela disposição em ajudar.

Ao professor Dr. Antônio Américo Cardoso (Universidade Federal de Viçosa), pelo inestimável auxílio e realização das análises estatísticas.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Química, que sempre me auxiliaram quando necessário.

À Miriam, secretária da pós-graduação do curso de Agroquímica e Agrobioquímica, sempre disposta a ajudar.

Ao Departamento de Fitopatologia, a Eloísa e Sheila, as quais socorreram-me sempre que possível, dispondo-se de tempo para me ensinar.

Ao CNPq, pela concessão de bolsas.

Ao Laboratório de Tecnologia da Madeira do Departamento de Ciências Florestais, em especial ao professor Dr. Paulo Fernando Trugilho, pelo empréstimo dos materiais necessários para a avaliação das atividades biológicas.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira (Embrapa Amazônia Oriental), por impulsionar-me nas pesquisas científicas e pelo incentivo.

A meus amigos Andrea (Shan) e seu esposo Juninho, pela amizade e, acima de tudo, por estarem sempre disponíveis para me ajudar e escutar; vocês serão sempre lembrados!

A minha querida amiga de longas datas e conterrânea Rairys, pela ajuda, carinho e paciência.

Aos amigos do Laboratório: Vanisse (Vanis), Wellington (Tonton), Rose (sua ajuda foi imprescindível), Tatá, Anette (quantas noites mal dormidas!), Borinho, Flávio, Fábio (Pão de Queijo) e Marcus; tenho um carinho especial por vocês.

A Grécia, Claudinha, Ana Paula, Maurício, Helga, Andréia e Norma, pela amizade, conselhos e ensinamentos que serão guardados sempre.

Aos amigos de mestrado Itânia (valeu a grande força, apoio e amizade!), Carmem, Alexandre, Adriana, pela união e companheirismo.

A Dani, Fabiana e Priscila, sempre prestativas em me auxiliar.

Aos meus amigos inesquecíveis da “Fisiologia”, pela presença constante, principalmente nos eventos sociais, e à comunidade paraense e “papachibé” aqui estabelecida, além da comunidade nordestina, é claro!

Aos meus amigos que mesmo distantes, deram-me força; Nara, Andressa, Gi, Lucy, Bruno, Edu, Fê, Sú, Serginho, Rosi e Eva.

E a todos que de alguma forma participaram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIMBOLOS.....	i
LISTA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	ii
LISTA DE REAGENTES.....	iii
RESUMO.GERAL.....	v
ABSTRACT GERAL.....	vi
CAPÍTULO 1 - Introdução geral	1
CAPÍTULO 2 - Caracterização química do óleo essencial e dos extratos hexânico e metanólico das folhas da <i>Copaifera langsdorffi</i> Desfon	3
Resumo	3
Abstract.....	5
1 Referencial Teórico	6
1.1 Fitoquímica: história e atualidade	6
1.2 O gênero <i>Copaifera</i>	11
2 Material e Métodos.....	17
2.1 Material vegetal.....	17
2.1.1 Coleta e identificação da espécie.....	17
2.2 Prospecção fitoquímica preliminar.....	17
2.2.1 Obtenção do extrato etanólico.....	17
2.2.2 Testes fitoquímicos.....	17
2.3 Fracionamento, isolamento e caracterização química	19
2.3.1 Obtenção dos extratos.....	19
2.3.2 Cromatografia de coluna.....	20
2.3.3 Faixa de temperatura de fusão.....	22
2.3.4 Cromatografia de Camada Delgada.....	22
2.3.5 Elucidação Estrutural.....	23
2.4 Óleo essencial	24
2.4.1 Obtenção do óleo essencial por meio da técnica “arraste de vapor”	24
2.4.2 Elucidação estrutural	25

3 Resultados e Discussão.....	27
3.1 Prospecção fitoquímica preliminar.....	27
3.2 Fracionamento, isolamento e caracterização química.....	29
3.2.1 Obtenção dos extratos.....	29
3.2.2 Faixa da temperatura de fusão.....	30
3.2.3 Cromatografia líquida de coluna, cromatografia de camada delgada e elucidação estrutural.....	31
3.3 Óleo essencial.....	42
3.3.1 Obtenção do óleo essencial por meio da técnica “arraste de vapor”.....	42
3.3.2 Elucidação estrutural.....	43
4 Conclusões.....	63
Referências Bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 3 - Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos hexânico e metanólico das folhas da <i>Copaifera langsdorffi</i> Desfon.....	70
Resumo.....	70
Abstract.....	71
1 Referencial Teórico.....	72
1.1 Controle biológico.....	72
1.2 Espécies fúngicas.....	74
2 Material e Métodos.....	76
2.1 Atividade fungitóxica.....	76
2.1.1 Espécie fúngica.....	76
2.1.2 Esterilização do material.....	76
2.1.3 Repicagem das colônias.....	76
2.1.4 Preparação das soluções-mãe.....	77
2.1.5 Avaliação do crescimento micelial.....	77
3 Resultados e Discussão.....	80
4 Conclusões.....	87
Referências Bibliográficas.....	88
Anexos A.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico da <i>Copaifera langsdorffi</i> Desfon.....	18
TABELA 2: Relação de eluentes utilizados na CLC.....	22
TABELA 3: Resultados da prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico da <i>C. langsdorffi</i> Desf.....	27
TABELA 4: Rendimento dos extratos brutos de copaíba obtidos por meio de extração a frio.....	30
TABELA 5: Frações orgânicas fracionadas por CLC a partir do extrato metanólico.....	31
TABELA 6: Frações orgânicas fracionadas por CLC a partir do extrato hexânico.....	32
TABELA 7: Rendimento bruto e teor em porcentagem de óleo essencial da <i>C. langsdorffi</i> Desf.....	43
TABELA 8: Compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas da <i>C. langsdorffi</i> Desf. detectadas por meio de CG/EM.....	46
TABELA 9: Resultados médios (médias de três repetições) do Índice de Crescimento e/ou Inibição Micelial, de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.....	80
TABELA 10: Resumo da análise de variância dos resultados do Índice de Crescimento e/ou Inibição Micelial, de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.....	81
TABELA 11: Resumo das análises de variância e da regressão dos resultados do Índice de Crescimento e/ou inibição Micelial, de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Estruturas químicas isoladas a partir de diversas espécies vegetais.....	8
FIGURA 02: Aspecto Geral da <i>C. langsdorffi</i> Desf.....	12
FIGURA 03: Estrutura dos compostos químicos encontrados no gênero <i>Copaifera</i>	16
FIGURA 04: Seqüência adotada para a obtenção dos extratos foliares a partir da extração a frio.....	20
FIGURA 05: Representação das colunas A e B, respectivamente.....	21
FIGURA 06: Fluxograma da metodologia aplicada aos extratos e óleo essencial para o fracionamento das amostras e elucidação estrutural.....	24
FIGURA 07: Aparelho de Clevenger modificado utilizado para a extração de óleo essencial.....	25
FIGURA 08: Rota metabólica dos terpenóides.....	29
FIGURA 09: Espectro no infravermelho da amostra A _H	33
FIGURA 10: Espectro no infravermelho da amostra B _H	33
FIGURA 11: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da amostra B _H	35
FIGURA 12: Espectro no infravermelho da amostra E _H	36
FIGURA 13: Espectro no infravermelho da amostra G _H	37
FIGURA 14: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido a partir da amostra G _H	38
FIGURA 15: Cromatografia de camada delgada realizada na amostra H.....	39
FIGURA 16: Espectro no infravermelho obtido a partir da amostra h ₁	40

FIGURA 17: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido a partir da amostra h ₁	40
FIGURA 18: Espectro no infravermelho da amostra D _M	42
FIGURA 19: Espectro no infravermelho do óleo essencial da <i>C. langsdorffi</i> Desf.....	44
FIGURA 20: Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das folhas da <i>C. langsdorffi</i> Desf.....	45
FIGURA 21: A) Espectro de massas do limoneno referente ao tempo de retenção entre 10,85 e 10,97 minutos B) Espectro de massas da biblioteca eletrônica do limoneno.....	47
FIGURA 22: Fragmentação do pico-base do limoneno.....	48
FIGURA 23: Fragmentação do limoneno (C ₇ H ₈ ⁺) levando a formação do <i>m/z</i> 93.....	48
FIGURA 24: A) Espectro de massa do β-sesquiciclogeraniol referente tempo de absorção entre 25,96 e 26,01 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do β-sesquiciclogeraniol.....	49
FIGURA 25: Fragmento do β-sesquiciclogeraniol (C ₅ H ₉ ⁺) levando a formação do <i>m/z</i> 93.....	50
FIGURA 26: A) Espectro de massa do espatulenol referente ao tempo de absorção entre 26,57 e 26,66 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do espatulenol.....	51
FIGURA 27: Fragmento do espatulenol (C ₂ H ₃ O ⁺) levando à formação do em <i>m/z</i> 43.....	52
FIGURA 28: A) Espectro de massa do β-selineno referente ao tempo de retenção entre 26,57 e 26,65 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do β-selineno.....	53
FIGURA 29: A) Espectro de massa do ledeno referente ao tempo de retenção entre 26,96 e 26,99 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica.....	54

FIGURA 30: Fragmento do ledeno equivalente ao pico em m/z 41.....	55
FIGURA 31: A) Espectro de massa do aromadendreno referente ao tempo de retenção entre 27,23 e 27,27 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do aromadendreno.....	56
FIGURA 32: A) Espectro de massa do epiglobulol referente ao tempo de absorção entre 27,22 e 27,27 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do epiglobulol.....	57
FIGURA 33: A) Espectro de massa do torreiol referente ao tempo de retenção entre 28,05 e 28,09 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do torreiol.....	58
FIGURA 34: A) Espectro de massa do α -copaeno referente ao tempo de retenção entre 27,78 e 27,82 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do α -copaeno.....	59
FIGURA 35: A) Espectro de massa do t- muurolol referente ao tempo de retenção entre 28,38 e 28,45 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do t-muurolol.....	60
FIGURA 36: A) Espectro de massa do metilfarnasato referente ao tempo de retenção entre 31,08 e 31,14 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do metilfarnasato.....	61
FIGURA 37: Raios concêntricos avaliados no crescimento micelial.....	78
FIGURA 38: Efeito das concentrações do extrato metanólico no índice de crescimento e/ou inibição micelial de das espécies fúngicas.....	83
FIGURA 39: Efeito das concentrações do extrato hexânico no índice de crescimento e/ou inibição micelial de das espécies fúngicas.....	84
FIGURA 40: A) Crescimento micelial do <i>C. gloeosporioides</i> no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato metanólico B) Crescimento micelial do <i>C. gloeosporioides</i> no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato hexânico.....	85
FIGURA 41: A) Crescimento micelial do <i>C. gloeosporioides</i> no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato metanólico B) Crescimento micelial do <i>C. gloeosporioides</i> no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato hexânico.....	86

LISTA DE SÍMBOLOS

BDA	batata, dextrose e ágar;
CCD	cromatografia de camada delgada;
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;
CLC	cromatografia líquida de coluna;
CV	coeficiente de variação;
F.V.	desvio-padrão;
G.L.	graus de liberdade;
ICM	índice de crescimento micelial;
IV	infravermelho;
PCA	potato, carrot, àgar (batata, cenoura e ágar);
Rf	fator de retenção;
Rt	tempo de retenção;
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio

LISTA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Evaporador rotatório MA-120 acoplado ao banho-maria Buchi-590;

Estufa Estufa de secagem e esterilização, Mod.320-SE/ Circulação Mecânica FANEM;

Estufa Orion 515, FANEM. Controlador modelo A-HT;

Sílica gel G 60, 70-230 Mesh - 0,063-0,200 nm (Merck);

Espectrofotômetro de Infravermelho marca Shimadzu DR 8021 utilizando 1 mg de amostra em 100 mg de KBr ou janelas de NaCl;

Aparelho para a determinação da faixa de fusão da marca Buchi 535;

Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio marca Bruker DRX 400 AVANCE, do Departamento de Química ICEX – UFMG;

Cromatógrafo HP-5890 acoplado a espectrômetro de massas com 70 eV de energia ionizante e espectros obtidos por impacto de elétrons.

LISTA DE REAGENTES

Acetato de Etila

Acetona

Ácido clorídrico concentrado

Ácido clorídrico a 1%

Ácido clorídrico a 1N

Ácido clorídrico a 5%

Ácido trifluoroacético

Água destilada

Água destilada e autoclavada

Álcool etílico

Álcool etílico 80 °GL

Álcool metílico

Benzeno

Cloridrato de hidrolamina à 10%

Clorofórmio

Diclorometano

Dimetilsulfóxido

Hexano

Hidróxido de Amônia 10%

Hidróxido de Sódio 1 N

ou Iujol?

Éter etílico

Lugol

Reativo de Pascová

Reativo de Fehling A e B

Reagente de Bouchardat, Dragendorff, Bertrand e Mayer

Cloreto férrico a 1 %

Cloridrato de hidrolamina à 10%

Peróxido de hidrogênio 30%

Solução metanólica de hidróxido de potássio 10%

Sulfato de magnésio Anidro

Vanilina a 1%

RESUMO GERAL

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Caracterização química da *Copaifera Langsdorffii* Desfon e avaliação de sua atividade fungitóxico. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/ Agroquímica e Agrobioquímica)*

Caracterizaram-se, inicialmente, os compostos químicos presentes nos extratos foliares da *Copaifera Langsdorffii* Desfon, por meio de uma prospecção fitoquímica preliminar dos constituintes químicos, seguida de cromatografia líquida de coluna e cromatografia de camada delgada. A elucidação estrutural foi realizada em 6 amostras, denominadas A_H, B_H, E_H, G_H e h₁, do extrato hexânico e D_M do metanólico, por meio da espectrometria do infravermelho e da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. A partir dos espectros, observou-se que as amostras A_H e B_H são a mesma substância, provavelmente um terpeno de cadeia carbônica curta; as amostras E_H e G_H apresentaram espectros semelhantes e as amostras h₁ e D_M, apresentaram características de um éster. A obtenção do óleo essencial foi realizada por meio do aparelho de Clevenger modificado, utilizando-se a técnica de arraste de vapor de água, sendo caracterizado por meio de IV e CG/EM. Os resultados obtidos determinaram a presença de: limoneno, β-sesquiciclogeraniol, espatulenol, β-selineno, ledeno, (+) aromadendreno, epiglobulol, torreyol, α-copaeno, t-muuroiol e metilfamasato. O rendimento da extração, utilizando-se 15 e 20 gramas de folhas frescas e secas em estufa a 40 °C, apresentou melhor resultado quando utilizaram-se folhas frescas. Avaliou-se a fungitoxicidade dos extratos hexânico e metanólico da *Copaifera langsdorffii* Desf. por meio de ensaios biológicos, contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, repicado em meio de cultura BDA e *Bipolaris sorokiniana*, repicado em PCA. Ambos foram incubados em câmara de germinação com controle de temperatura e luz. Empregaram-se cinco tratamentos (0/100/200/400/800 ppm), realizando-se três repetições e avaliando-se 4 raios, medidos em centímetros, a partir do micélio central. Os valores aferidos foram aplicados à fórmula do Índice de Crescimento Micelial (ICM) para as análises estatísticas. Observou-se que o extrato metanólico apresentou uma tendência de redução de 32%, contra o *B. sorokiniana*, ao passo que o hexânico foi eficaz para ambos os fitopatógenos, apresentando uma tendência de redução de 49% para o *B. sorokiniana* e de 18% para o *C. gloeosporioides*.

* Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-orientador), Dr. Paulo Estevão de Souza - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT GERAL

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Chemical characterization of *Copaifera Langsdorffi* Desfon and evaluation of it's fungitoxic activity. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertation – Master degree in Agronomy/ Agrochemistry and Agrobiochemistry)*

The characterization of the chemical compounds present in the extracts of the leaves of *Copaifera Langsdorffi* Desfon, began with the preliminary phytochemical prospection of the chemical constituents, followed by column liquid chromatography and thin layer chromatography. The structural elucidation was performed by infrared and hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy with six samples, denominated A_H, B_H, E_H, G_H and h₁, from the hexane extract and D_M from the methanolic extract. Based on the spectra, it was concluded that fractions A_H and B_H were composed of the same substance, probably a short chain terpene; samples E_H and G_H presented similar spectra and the spectra of h₁ and D_M were both characteristic of esters. The essential oil was obtained by steam distillation with a modified Clevenger apparatus and was characterized by infrared spectroscopy and GC/MS analysis. The results demonstrated the presence of limonene, β-sesquicyclogeraniol, epatulenol, β-selinene, ledene, (+)-aromadendreno, epiglobulol, torreyol, α-copaene, t-muurolol e methyl farnasate. The yield obtained from the extraction of 15-20 grams of fresh leaves was higher than that obtained from leaves dried in na oven at 40 °C. The fungitoxicity of hexane and methanol extracts of *Copaifera langsdorffi* Desf. were evaluated by biological tests against the phytopathogens *Colletotrichum gloeosporioides*, transplanted in BDA, and *Bipolaris sorokiniana*, in PCA. Both was incubated in a germination chamber with control of light and temperature. Five treatments (0/100/200/400/800 ppm) were used with three repetitions of each, and four mutually perpendicular radii, were measured in centimeters from the center micell. The formula for the Micelial Growth Index (MGI) was applied to the values obtained for statistical analyses. A 32% reduction in the growth of *B. sorokiniana* was observed in the presence of the methanol extract, while the hexane extract was effective against both of the phytopathogens, resulting in a 49% reduction in the growth of *B. sorokiniana* and an 18% reduction in the growth of *C. gloeospoioides*.

* Guidance Committee: Dra. Maria das Graças Cardoso (Adviser), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-Adviser), Dr. Paulo Estevão de Souza – UFLA (Co-Adviser).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A contribuição das plantas para a Medicina e Química advém desde o início da existência humana. Antigas civilizações, em diversos países, como na China e Índia, utilizavam e ainda hoje usufruem terapêuticamente dos vegetais, pesquisam suas virtudes medicinais, subsistindo durante milênios os conhecimentos adquiridos transmitidos por meio de gerações.

Após uma era na qual a utilização das plantas medicinais era puramente empírica, utilizando-se métodos de observação da utilização das espécies vegetais pelos animais e tentativas, no século XIX ocorreu a primeira caracterização de princípios ativos obtidos por meio de plantas.

A partir da Segunda Grande Guerra, houve a chamada era dos antibióticos, que destituíram os fitoterápicos (medicamentos de origem vegetal com ação terapêutica) de credibilidade. Atualmente, como grande parte da população mundial é carente de elementos básicos para a sobrevivência, tais como medicamentos, torna-se de suma importância para os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento adotarem políticas voltadas para os menos favorecidos. Dentre essas, pode-se citar o incentivo para a pesquisa e o comércio dos fitoterápicos, visto apresentarem custos inferiores, fácil aceitação e acesso.

Em razão da falta de uma fiscalização voltada inteiramente para as indústrias farmacêuticas, infelizmente, na maioria dos casos, a fitoterapia em nosso País está fundamentada na utilização popular, sem nenhuma comprovação clínica ou pré-clínica. Atualmente, bioensaios de substâncias obtidas pelo fracionamento de extratos de plantas medicinais ligados a técnicas de separação cromatográfica de metabólitos secundários são realizados com o intuito de isolar

e identificar as estruturas químicas das moléculas com atividade biológica por meio de técnicas modernas de cromatografia e espectrometria. Esses ensaios, realizados em laboratórios de fitoquímica e bioquímica, podem envolver a confirmação da bioatividade dos metabólitos com ação antibacteriana, antifúngica, antimitótica, inseticida, larvicida e moluscocida.

Entre inúmeros vegetais nativos com ação medicinal e que apresentam substâncias químicas biologicamente ativas, está o gênero *Copaifera*, compreendendo diversas espécies produtoras de um óleo-resina extraído do tronco dessas árvores. Dentre várias espécies, destaca-se a *Copaifera langsdorffi* Desf., encontrada em todo o território brasileiro, ocorrendo principalmente na região do cerrado brasileiro, sendo conhecida como angico-vermelho, ou copaíba-vermelha. Assim, objetivou-se com este trabalho identificar e caracterizar quimicamente os compostos presentes nos extratos e no óleo essencial extraído de suas folhas, além de verificar a atividade fungitóxica a partir desses em *Colletotrichum gloesporioides* e *Bipolaris sorokiniana*.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS HEXÂNICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DA *Copaifera langsdorffi* Desfon

RESUMO

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Caracterização química do óleo essencial e dos extratos hexânico e metanólico das folhas da *Copaifera Langsdorffi* Desfon. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/ Agroquímica e Agrobioquímica)*

A caracterização dos compostos químicos presentes nas folhas de *Copaifera Langsdorffi* Desfon. foi realizada inicialmente pela identificação das classes de metabólitos secundários, por meio de uma prospecção fitoquímica preliminar dos constituintes químicos e posteriormente, utilizando a cromatografia líquida de coluna seguida de cromatografia de camada delgada. Para a caracterização dos compostos químicos utilizaram-se os extratos hexânico e metanólico devido o maior rendimento obtido na extração. A elucidação estrutural foi realizada em 6 amostras, denominadas A_H, B_H, E_H, G_H e h₁ do extrato hexânico e D_M do metanólico, por meio da espectrometria do infravermelho e da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. A partir dos espectros observou-se que as amostras A_H e B_H são a mesma substância, provavelmente um terpeno de cadeia carbônica curta; a amostra E_H e G_H apresentaram espectros semelhantes e as amostras h₁ e D_M, apresentarem características de um éster. A obtenção do óleo essencial foi realizada por meio do aparelho de Clevenger modificado, utilizando-se a técnica de arraste de vapor de água, sendo caracterizado por meio de IV e CG/EM. Pelos resultados obtidos, determinou-se a presença de limoneno, β-sesquiciclogeraniol, espatulenol, β-selineno, ledeno, (+) aromadendreno, epiglobulol, torreyol, α-copaeno, t-

* Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-orientador), Dr. Paulo Estevão de Souza - UFLA (Co-orientador).

muurolol e metilfarnasato. O rendimento da extração, utilizando-se 15 e 20 gramas de folhas frescas e secas em estufa a 40 °C, apresentou melhor resultado quando utilizaram-se folhas frescas.

ABSTRACT

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Chemical characterization of essential oil and hexanic and methanolic extracts of *Copaifera Langsdorffi* Desfon leaves. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertation - Master degree in Agronomy/Agrochemistry and Agrobiochemistry) *

The characterization of the chemical compounds present in the leaves of *Copaifera Langsdorffi* Desfon, began with the identification of the classes of secondary metabolites by preliminary phytochemical prospection of the chemical constituents, followed by column liquid chromatography and thin layer chromatography. The hexane and methanol extracts were used for the characterization of the compounds because of the higher yield in the extraction. The structural elucidation was performed by infrared and hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy with six samples, denominated A_H, B_H, E_H, G_H and h₁, from the hexane extract and D_M from the methanolic extract. Based on the spectra, it was concluded that fractions A_H and B_H were composed of the same substance, probably a short chain terpene; samples E_H and G_H presented similar spectra and the spectra of h₁ and D_M were both characteristic of esters. The essential oil was obtained by steam distillation with a modified Clevenger apparatus and was characterized by infrared spectroscopy and GC/MS analysis. The results demonstrated the presence of limonene, β-sesquicyclogeraniol, epatulenol, β-selinene, ledene, (+)-aromadendreno, epiglobulol, torreyol, α-copaene, t-muurolol e methyl farnasate. The yield obtained from the extraction of 15-20 grams of fresh leaves was higher than that obtained from leaves dried in na oven at 40 °C.

* Guidance Committee: Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-Adviser), Dr. Paulo Estevão de Souza - UFLA (Co-Adviser).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Fitoquímica: história e atualidade

Desde a pré-história o homem procurou aproveitar os princípios ativos existentes nos vegetais, embora de modo totalmente empírico ou intuitivo, baseado em descobertas ao acaso. Isso pode ainda ser observado entre os povos primitivos isolados, como algumas tribos indígenas da América do Sul (Van Den Berg, 1987). É admirável que variadas civilizações em todos os continentes tenham desenvolvido a pesquisa das virtudes terapêuticas das plantas, e que esse conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando e diversificando-se, sem nunca cair totalmente no esquecimento.

Os antigos egípcios desenvolveram a cura de enfermidades com a utilização de plantas, inclusive espécies aromáticas, cujos efeitos bem conheciam, como a papoula (sonífera), a babosa, o óleo de rícino (catártico¹) e outros. Em muitos papiros descobertos por pesquisadores, foram encontrados receituários médicos que constavam plantas misturadas com outras substâncias (Matos, 1987).

Segundo Mors (1982), assim como no Egito, também na Babilônia a medicina combinava o poder curativo (ou supostamente curativo) de determinadas substâncias e de certas espécies vegetais para serem utilizadas em rituais religiosos, fenômeno ainda presente em várias seitas e cultos.

Após uma era em que a utilização das plantas medicinais era puramente empírica, através de métodos de observação da utilização das espécies vegetais pelos animais e tentativas, somente no século XIX ocorreu a primeira caracterização dos princípios ativos obtidos por meio de plantas, a quinina (Figura 01), resultando no desenvolvimento de um novo ramo da química, que

¹medicamentos que provocam efeito purgativo mais acentuado.

tem como objetivo o conhecimento dos constituintes químicos dos vegetais, sua caracterização mediante de ensaios preliminares, identificação desses com determinada atividade biológica a partir de técnicas de cromatografia e a elucidação estrutural por meio de aparelhos de espectrometria.

Pouco antes do século XIX, as plantas medicinais e seus respectivos extratos constituíam a maioria dos medicamentos, o que é constatado em farmacopéias da época. Assim, esses recursos terapêuticos começaram a ser estudados e estabeleceu-se, paulatinamente, a utilização de substâncias ativas isoladas denominadas “princípios ativos”, resquício da linguagem utilizada pelos alquimistas (Schenkel, 2001).

A partir da descoberta da quinina, houve grande interesse nas espécies nativas do novo mundo e, conseqüentemente, expedições foram realizadas com o objetivo de pesquisar novos medicamentos. Antes da segunda guerra mundial, uma série de produtos naturais isolados de plantas superiores tornaram-se agentes clínicos, os quais continuam sendo utilizados até os nossos dias. (Hostettmann, 1991; Phillipson, 2000).

A substituição da utilização dos extratos brutos das espécies medicinais pelas substâncias isoladas impuseram-se pelas inúmeras vantagens, como maior eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos. Na mesma época em que houve a caracterização das primeiras substâncias a partir de plantas, a química orgânica foi impulsionada. A idéia de que compostos orgânicos não poderiam ser sintetizados foi descartada no ano de 1807, quando realizou-se a síntese da uréia pelo químico alemão Wohler (Schenkel, 2001).

Pouco antes da Segunda Guerra Mundial, vários produtos naturais foram isolados e tornaram-se agentes clínicos, dos quais muitos ainda são aplicados, como, por exemplo, a morfina e codeína, extraídas do látex da papoula; digitoxina, um glicosídeo cardiotônico, obtido a partir da *Digitalis purpurea* e a

hiosciamina, extraída das espécies da família *Solanaceae* (Hostettmann & Hamburger, 1991) (Figura 01).

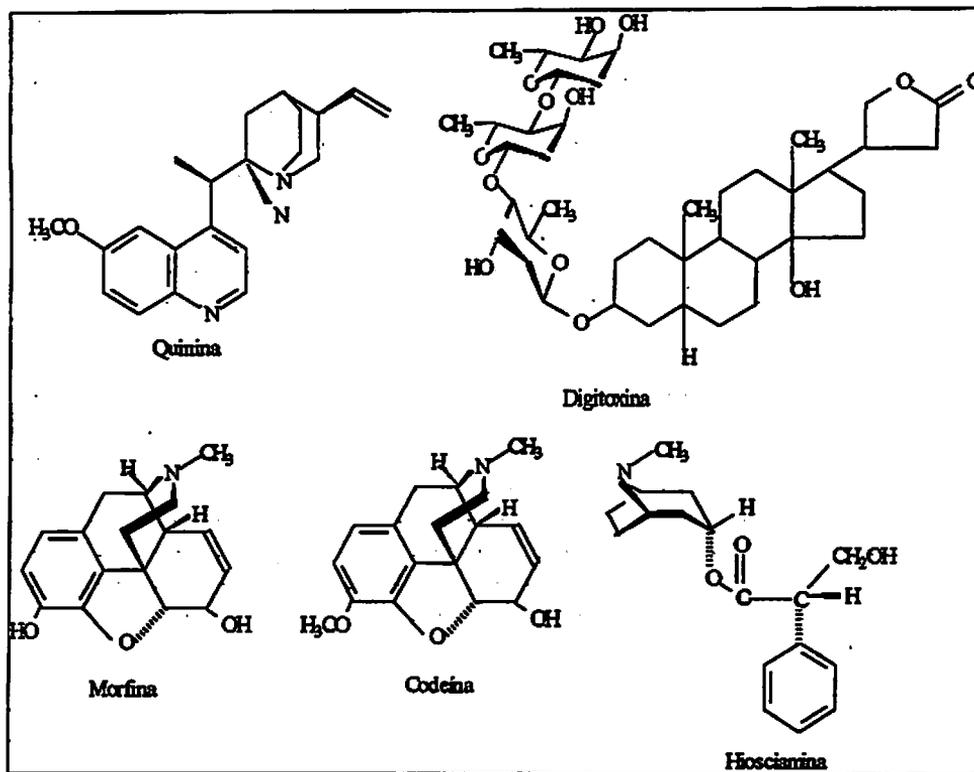


FIGURA 01: Estruturas químicas isoladas a partir de diversas espécies vegetais.

Nos anos posteriores à guerra, novas drogas foram descobertas: a reserpina, com ação tranquilizante; a vincristina, extraída da *Catharanthus roseus*, a qual promove a inibição de células cancerígenas. O impacto da fitoquímica, com a descoberta dessas e de outras substâncias, propiciou a inevitável inovação na indústria farmacêutica e, conseqüentemente, promoveu o desenvolvimento de drogas sintéticas (Phillipson, 2000). De acordo com esse

pesquisador, agentes clínicos de notável eficiência emergiram de pesquisas multidisciplinares, com a colaboração de farmacologistas e químicos.

Posteriormente à década de 60, com a síntese de drogas, houve um decréscimo no interesse da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas em investir no desenvolvimento de medicamentos a partir dos vegetais. Isso poderia estar relacionado com o lento desenvolvimento e custo oneroso para o fracionamento e identificação química dos compostos, visto que nessa época os aparelhos utilizados para os referidos estudos eram ainda obsoletos. Atualmente, técnicas modernas de separação cromatográfica, como, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) associada a métodos de identificação de compostos, tais como, espectrometria de massas ou a ressonância magnética nuclear, permitem obter rapidamente informações sobre os constituintes químicos de extratos vegetais ou óleos com conseqüente diminuição do tempo investido para a realização dos ensaios (Schenkel, 2001).

De acordo com Matos (1987), após a Segunda Guerra Mundial, com a descoberta dos antibióticos e o incremento cada vez maior de remédios à base de drogas sintéticas, houve um relativo abandono e uma certa descrença a respeito das drogas naturais. Com uma tendência ao retorno da Fitoterapia, a Organização Mundial de Saúde (OMS), no final da década de setenta, por meio de uma resolução da XXXI Assembléia Geral desse Órgão, promoveu uma reunião na qual recomendou-se o estudo e uso de plantas medicinais regionais como forma de baixar os custos dos programas de saúde pública e ampliar o número de beneficiários, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Essa recomendação contribuiu e contribui para o crescimento do uso e do comércio das plantas medicinais. Conseqüentemente, os órgãos governamentais de Saúde Pública apresentam uma nova e difícil obrigação: criar meios para preservar a população do uso de plantas ineficazes ou tóxicas que

provavelmente surgirão no mercado com o aumento da procura. É provável, portanto, que o consumo de plantas medicinais continue crescendo, impulsionado pela busca de novos modelos estruturais de moléculas naturais ativas. Entre os constituintes dos vegetais, estão os metabólitos secundários, que são de grande interesse da indústria química e farmacêutica.

Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais originam fármacos em menor tempo, com custos muitas vezes inferior e, conseqüentemente, mais acessíveis a população que, em geral, encontra-se sem quaisquer condições financeiras de arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos que possam ser utilizados como parte de atendimento das necessidades primárias de saúde. Por esses motivos, ou pela deficiência da rede pública de assistência primária de saúde, cerca de 80% da população brasileira não têm acesso aos medicamentos ditos essenciais (Furlam,1998).

O Brasil distingue-se por possuir um conteúdo inesgotável de matéria-prima fitoterápica devido a enorme variedade da flora nacional, porém nada se sabe do aspecto químico de 99% das espécies que a compõem (Gottlieb & Mors, 1980). Estima-se que existam cerca de 250.000 espécies vegetais conhecidas, mas somente 10% dessas já foram estudadas (Corrêa, 1998).

Baseado em trabalhos de Grünwald (1996), pode-se verificar o crescimento da fitoterapia. Em 1995, o mercado mundial dos medicamentos fitoterápicos estava avaliado em US\$ 12,4 bilhões de dólares e, atualmente, as formulações herbais geram em torno de 22 bilhões de dólares (Yumes, 2001).

Dados de Ferreira (1998) mostraram que em 1988 entre as vinte drogas mais vendidas no Estados Unidos, apenas sete não derivavam diretamente de espécies vegetais. Recentemente, Phillipson (2000) afirmou que, em 1996, seis das vinte mais dispensadas prescrições médicas no mundo foram medicamentos derivados de produtos naturais.



A indústria farmacêutica apresenta grande interesse em plantas e extratos vegetais para a identificação e caracterização de substâncias ativas, com intuito de desenvolver medicamentos, tanto fármacos como adjuvantes farmacêuticos. No Brasil, como forma de garantir a qualidade das formulações herbais, estabeleceu-se uma resolução (RDC- Resolução da Diretoria Colegiada nº17/2000) voltada especificamente para os fitoterápicos, determinando a obrigatoriedade da realização de estudos de comprovação da eficácia e toxicidade dos produtos (Schenkel et al., 2001). Concomitante à resolução citada, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão controlador e fiscalizador dos medicamentos, apresentando uma divisão direcionada especificamente para os produtos terapêuticos derivados exclusivamente de vegetais.

1.2 O gênero *Copaifera*

As espécies vegetais pertencentes ao gênero *Copaifera* são representantes da família Leguminosae e são encontradas principalmente na região Norte da América do Sul (Pinto, 2002) e Centro-Oeste do Brasil (Maciel, 2002). São conhecidas diversas espécies do gênero *Copaifera* distribuídas não apenas na América do Sul, como também na África Ocidental e na Malásia (Veiga, 1997, Ferreira, 2002). Segundo esses, entre as mais conhecidas espécies localizadas no Brasil, têm-se a *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. convertiflora* Bth., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. langsdorffi* Desf., das quais a última apresenta grande destaque por distribuir-se por todo território brasileiro (Pinto, 2002).

A *Copaifera langsdorffi* Desf. (Figura 02), denominada também copaíba vermelha, é uma árvore frondosa com até 13 metros de altura ou um pouco mais (apenas 2 metros quando vegeta no campo ou no cerrado), ressaltando que na Venezuela essa altura pode chegar a 50 metros. Apresenta casca vermelhao-

escura com profundas fendas longitudinais, e avermelhada interiormente. Suas folhas são pinatífidas, compostas de folíolos, alternos ou opostos, ovado-lanceolados ou elípticos, obtusos, com, no máximo, 5 centímetros de comprimento e 3 de largura, glabros. Suas flores apresentam-se brancas ou com uma tonalidade clara de amarelo, reunidas em pequenos ramos; seus frutos são do tipo vagem drupácea, pedunculada ovóide, contendo uma semente recoberta por uma cápsula alaranjada denominada de arilo (Corrêa, 1984; Nunes, 1988).

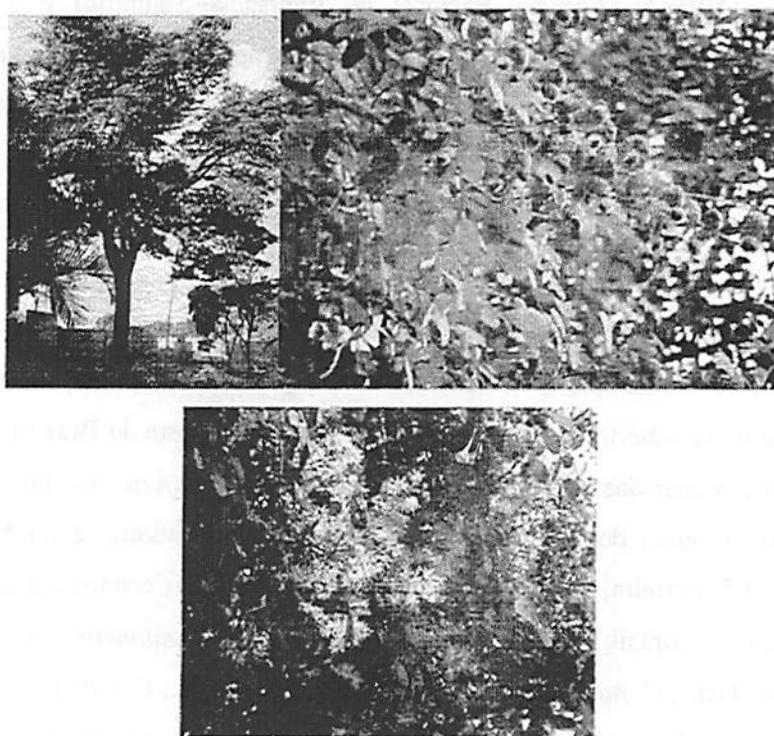


FIGURA 02: Aspecto geral da *C. langsdorffi* Desf.

As árvores “copaíba”, assim denominadas vulgarmente, são plantas pertencentes ao referido gênero, apresentando no interior do tronco um óleo-

resina ou bálsamo (Mesquita, 1989, Pinto, 1998; Pinto, 2000, Maciel 2002). Em todas as espécies, os canais secretores acham-se na região cortical dos caules, porém dispostos de modo que se prolongam até o lenho, onde existem em notável abundância, formando bolsas. Os canais de uma zona não têm comunicação com outras e, por isso, os extrativistas retiram o óleo de diversos pontos, até o centro do caule, destruindo a árvore ou tomando-a incapaz de produzir o óleo durante muitos anos (Corrêa, 1984). Pelo fato de o processo de manejo da extração do óleo-resina da copaíba ser rudimentar, podendo inutilizar a espécie, sua utilização sustentável torna-se essencial. Nesse contexto, Ferreira (2002) estimou, em um estudo de avaliação do potencial de extração e comercialização do óleo-resina da *Copaifera spp.*, o seu uso racional com geração de lucros.

Segundo Collyer (1991) e a Farmacopéia Brasileira (Silva, 1929), o óleo de copaíba apresenta-se transparente, mais ou menos denso, de cor amarelo-parda, pouco ou nada fluorescente, de cheiro forte, aromático e de sabor amargo. Existem denominações diversas para óleo de copaíba, tais como: copahyba, copaibarana, copaúba, copaibo, copal, maram, marimari e bálsamo-dos-jesuítas (Veiga, 1997).

O descobrimento das principais indicações terapêuticas do óleo ou bálsamo de copaíba deve-se aos aborígenes. No século XVI, os primeiros colonizadores das Américas relataram a utilização do bálsamo pelos índios para curar diversos ferimentos; inclusive, a referida espécie foi uma das primeiras a ser descrita pelos portugueses em cartas e publicações escritas (Veiga, 1997).

O óleo supracitado age especificamente contra numerosas enfermidades, tais como cicatrizante de feridas e úlceras, antitetânico, especialmente sobre o umbigo de recém-nascidos, além de atuar contra catarro pulmonar, bronquites rebeldes, dermatoses, como a psoríase, e de apresentar ação antisséptica das vias urinárias (Corrêa, 1984; Maciel, 2002; Rao, et. al. 2002). Apesar das suas

diversas aplicações terapêuticas, tem-se verificado uma escassez de estudos farmacológicos, toxicológicos e químicos fidedignos. Os referidos autores descreveram que, além de sua utilização medicinal, a indústria de vernizes emprega o óleo-resina como matéria-prima. Além dessas utilizações, Spanevello & Vila (1994) afirmam que os nativos da Amazônia utilizam óleo-resina como combustível, quando misturado com óleo diesel, constituindo, dessa maneira, uma alternativa de energia.

Na medicina popular nortista, o óleo de copaíba é utilizado de maneira extensa, administrado topicamente sob a forma de pomadas e cremes ou *in natura*. O bálsamo de copaíba é facilmente encontrado em mercados, ervanários, drogarias e em farmácias dessa região do Brasil (Godinho & Vasconcelos, 2002).

A respeito das pesquisas realizadas para avaliar o efeito medicinal da copaíba, a ação antiinflamatória é considerada por Pinto (2002) como a mais estudada. De acordo com esse pesquisador, foram realizados com o óleo-resina obtido da *C. cearensis* comparando-se sua ação antiinflamatória e analgésica com substâncias isoladas do óleo (ácido copálico, bisabolol e éster metílico do ácido solidago), utilizando-se como testemunha a indometacina (antiinflamatório). Considerando-se esses resultados, observou-se uma ação antiinflamatória superior do óleo-resina bruto em relação aos seus produtos isolados. Além dos referidos autores, Zanini e colaboradores (1988) pesquisaram a ação antiinflamatória do óleo de copaíba em ratos, sem a identificação botânica da espécie que o produziu. Desmarchelier (2001) verificou que o extrato etanólico de *C. reticulata* apresentava atividade anti-oxidante *in vitro*, sugerindo, portanto, que o extrato é capaz de suprimir a degradação oxidativa do DNA *in vitro*.

Utilizando camundongos como cobaias, Ohsaki e colaboradores (1994) verificaram que os diterpenos colavenol e o ácido hardwiickico (Figura 03A),

ambos extraídos da espécie *C. langsdorffi* Desf., apresentaram potente atividade antitumoral sem apresentar citotoxicidade. Paiva (1998) confirmou que a espécie em questão apresentou a capacidade de proteger a mucosa gástrica contra danos causados por úlcera gástrica.

Quanto à constituição química das espécies, observa-se em todas a presença de sesquiterpenos, como o α -humuleno, α - e β -selineno, β -bisaboleno e cariofileno (Figura 03B), sendo o óxido desse último efetivo contra fungos (Langenheim, 1988; Pinto, 2000). Em todas as análises do óleo-resina já publicados, os diterpenos encontrados nas espécies do gênero *Copaifera* apresentam um interessante padrão de esqueletos carbônicos, sendo de três tipos: caurano, labdano e clerodano (Figura 03C). Outro fato interessante é a presença em todas as resinas estudadas do ácido copálico (Figura 03D), um diterpeno ácido (Edmonds, 1983; Monti, 1996, Gilbert & Cascon, 2000; Pinto, 2000; Rao, 2002).

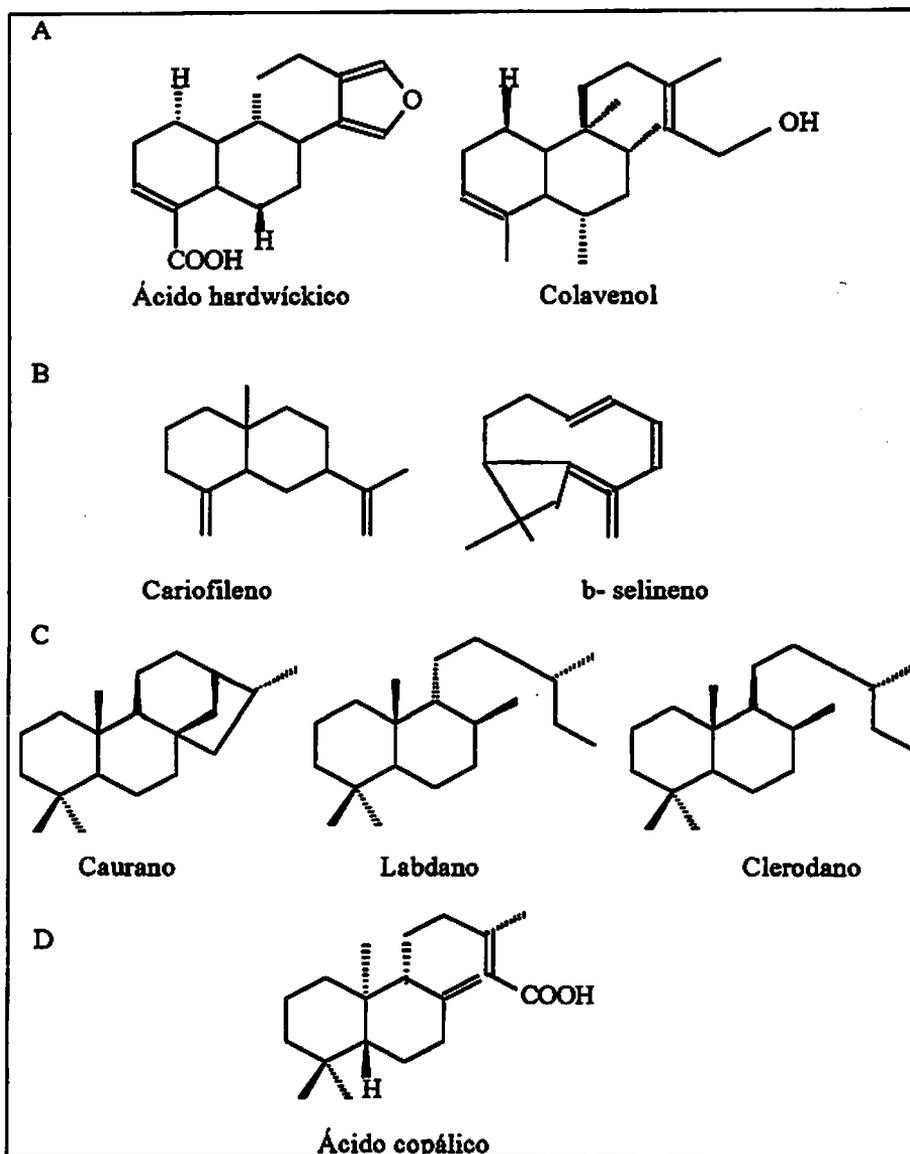


FIGURA 03: Estruturas dos compostos químicos encontrados no gênero *Copaifera*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Coleta e identificação da espécie

A espécie vegetal foi coletada no Campus da Universidade Federal de Lavras, próximo ao Departamento de Ciências Exatas. Posteriormente, o material foi identificado pela comparação com excicata, catalogado com o número 1796, presente no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Prospecção fitoquímica preliminar

2.2.1 Obtenção do extrato etanólico

Preparou-se o extrato etanólico com o intuito de realizar testes qualitativos idealizado por Matos (1988) para classificação dos grupos químicos presentes no material a ser estudado. Foram utilizados 30 gramas de folhas secas (em estufa ventilada a 40 °C) e maceradas manualmente. Posteriormente, o material foi colocado em refluxo com etanol 80 °GL durante 24 horas. Em seguida, filtrou-se em funil de Büchner e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi armazenado em estufa a 30 °C, até atingir massa constante.

2.2.2 Testes fitoquímicos

O método aplicado para a classificação dos grupos químicos foi idealizado por Matos (1988). Utilizou-se para cada análise realizada 0,5 mg do extrato etanólico e, a partir desse, adicionaram-se os reagentes específicos para a detecção de cada classe química (Tabela 01).

TABELA 01: Prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico da *C. langsdorffi* Desf. (Matos, 1988).

Grupo químico	Métodos
Ácidos Orgânicos	Sol. aquosa do extrato / reativo de Pascová
Açúcares Redutores	Sol. aquosa do extrato / reativo de Fehling A e B
Polissacarídeos	Sol. aquosa do extrato / lugol
Proteínas/aminoácidos	Reação de Molish
Taninos	Sol. aquosa do extrato / FeCl ₃ á 1%
Catequinas	Sol. metanólica do extrato / vanilina 1% / HCl _{conc.}
Flavonóides	Extrato solubilizado em metanol / HCl _{conc.} / fita de magnésio
Lactonas	Sol. metanólica do extrato / cloridrato de hidroxilamina à 10% / solução metanólica de KOH 10% / HCl 1N / FeCl ₃ à 1%
Azulenos	Extrato solubilizado em clorofórmio / reativo de Kaiser
Carotenóides	Extrato solubilizado em clorofórmio / ácido trifluoroacético
Esteróide/Triterpenóides	Teste de Lieberman-Burchard
Depsídeos/Depsidonas	Sol. etérea / FeCl ₃ a 1%
Derivados da Cumarina	Sol. etérea do extrato / NaOH 1 N
Saponina Espumídica	Sol. aquosa do extrato / etanol 80°GL
Alcalóides	Sol. HCl a 5% / reagentes de Bouchardat, Dragendorff, Bertrand e Mayer
Purinas	HCl 6 N / H ₂ O ₂ 30%
Antraquinonas	Extrato solubilizado em benzeno / NH ₄ OH 10%

2.3 Fracionamento, isolamento e caracterização química

2.3.1 Obtenção dos extratos

A técnica utilizada para a obtenção dos extratos foi a de extração a frio preconizada por Matos (1988). Em um frasco, colocaram-se 250 gramas de folhas secas e maceradas. Adicionou-se hexano, até cobrir o volume do macerado, fechou-se hermeticamente, envolveu em papel-alumínio e deixou-se em repouso por 8 dias. Em seguida, filtrou-se o material a vácuo e o líquido obtido foi evaporado em um evaporador rotatório, obtendo-se o extrato hexânico. O material vegetal desprendido de hexano, vulgarmente denominado de "torta", foi reaproveitado, levando-o à estufa ventilada até atingir massa constante, para posterior utilização em outro solvente, o clorofórmio. O mesmo processo realizado para a obtenção do extrato hexânico foi realizado para produzir os extratos clorofórmico, de acetato de etila, etanólico e metanólico (Figura 04).

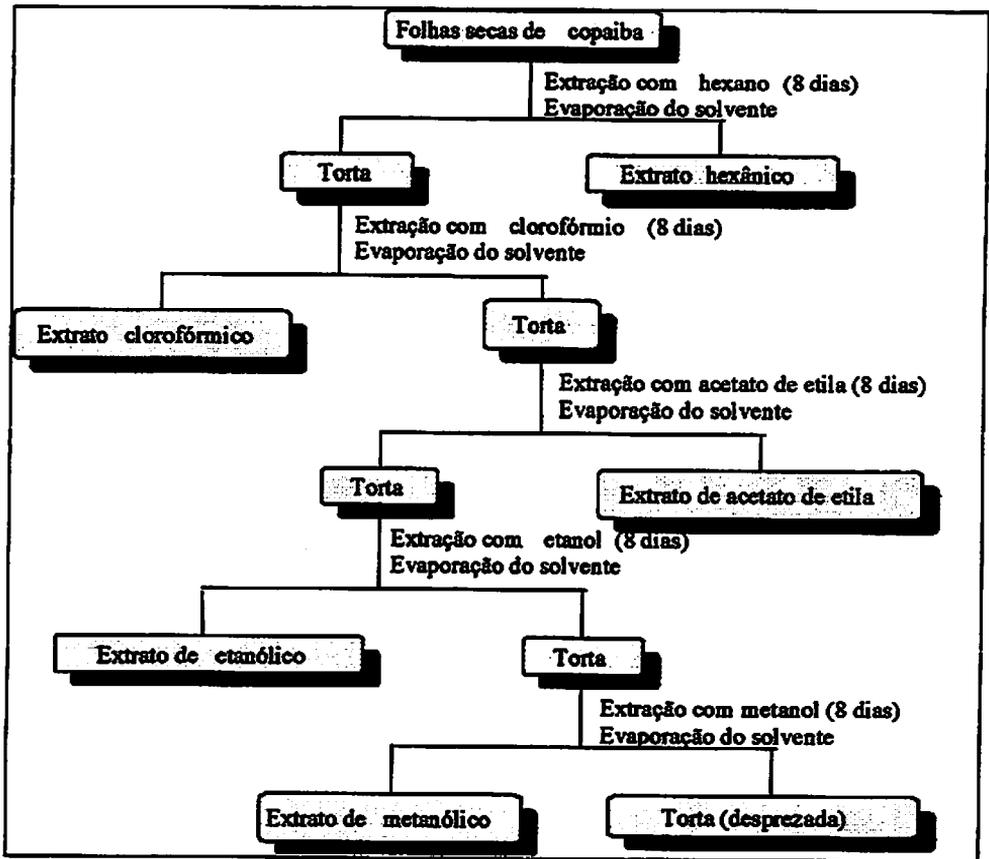


FIGURA 04: Seqüência adotada para a obtenção dos extratos foliares a partir da extração a frio.

2.3.2 Cromatografia de coluna

Foram preparadas duas colunas cromatográficas: na primeira, denominada de coluna A, foi utilizado o extrato metanólico, e na coluna B, o extrato hexânico (Figura 05). Esses extratos foram escolhidos para a caracterização química em razão de serem os que apresentaram melhores rendimentos.

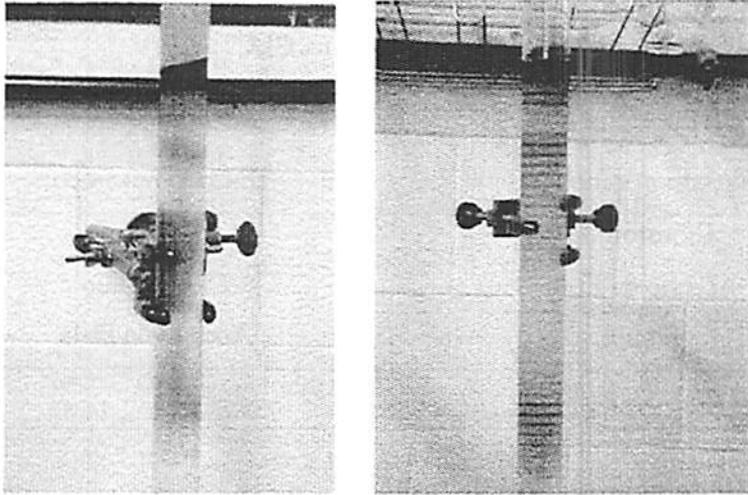


FIGURA 05: Representação das colunas A e B, respectivamente.

O adsorvente utilizado foi a sílica gel e um suporte de vidro de 50 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro.

Utilizaram-se 2 gramas de extrato bruto (hexânico e metanólico) obtidos por extração a frio, citada anteriormente. O extrato hexânico foi solubilizado em 10 mL de hexano, ao passo que o extrato metanólico, em 10 mL de clorofórmio. Os eluentes utilizados para a fase móvel foram escolhidos mediante ensaios eluotrópicos. Para a coluna A, utilizaram-se clorofórmio, acetato de etila e etanol, e para a coluna B, hexano, clorofórmio e acetato de etila (Tabela 02).

TABELA 02: Relação de eluentes utilizados na CLC.

Coluna A	Coluna B
(Extrato metanólico)	(Extrato hexânico)
Clorofórmio	Hexano
Acetato de Etila	Clorofórmio
Etanol	Acetato de Etila

2.3.3 Faixa de temperatura de fusão

A determinação da faixa de temperatura de fusão das amostras A_H e B_H foi realizada para confirmar, aliada às informações do IV, se as amostras em questão se tratavam de um mesmo composto. A elucidação da faixa de temperatura de fusão foi realizada de acordo com o proposto por Shriner (1983) e obtidos em graus Celsius. Foram realizadas três repetições de cada amostra para verificar sua variação.

2.3.4 Cromatografia de Camada Delgada

Com a fração H_H , de cor verde escura e de aspecto pastoso, realizou-se a cromatografia de camada delgada, com o intuito de melhor separação dos constituintes químicos. Para a separação das substâncias presentes na amostra H_H , inicialmente preparou-se uma solução clorofórmica do extrato a 1%. Utilizaram-se placas de vidro cromatográficas de 10 cm de comprimento por 2,5 de largura e placas de 10 cm de largura por 10 cm de comprimento, apresentando como fase estacionária sílica gel G 60 e como revelador, iodo.

A mistura binária utilizada para a separação do composto foi hexano e éter etílico (1:1). Posteriormente, a área da mancha encontrada foi destacada da

placa de vidro com auxílio de um capilar, e o composto foi solubilizado em clorofórmio e filtrado para a separação da sílica. Evaporou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se o composto purificado designado h_1 .

2.3.5 Elucidação Estrutural

As amostras obtidas a partir da cromatografia líquida de coluna, A_H , B_H , E_H e G_H , por meio do extrato hexânico, a amostra D_M do extrato metanólico e a fração h_1 obtida por cromatografia de camada delgada foram analisadas utilizando-se espectrofotômetro por Infravermelho. As amostras oleaginosas B_H e G_H e a amostra h_1 obtida por CCD foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, utilizando-se como referência o tetrametilsilano. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (g). As amostras foram solubilizadas em DMSO. Na figura seguinte, estão dispostas as análises realizadas nas amostras submetidas aos métodos de extração, fracionamento e isolamento descritas.

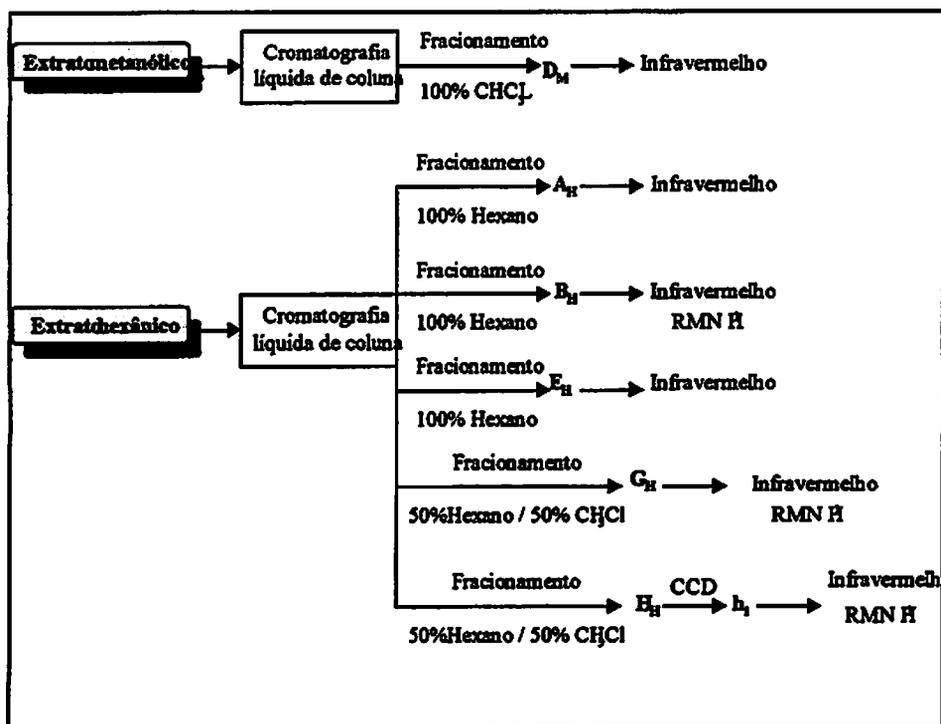


FIGURA 06: Fluxograma da metodologia aplicada aos extratos para o fracionamento das amostras e elucidação estrutural.

2.4 Óleo essencial

2.4.1 Obtenção do óleo essencial por meio da técnica “arraste de vapor”

Para a extração do óleo essencial a partir das folhas da *C. langsdorffi* Desf., utilizaram-se folhas frescas e secas em estufa ventilada a 40 °C e maceradas manualmente. A técnica empregada foi de arraste a vapor, idealizada por Craveiro (1981), utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Figura 06).

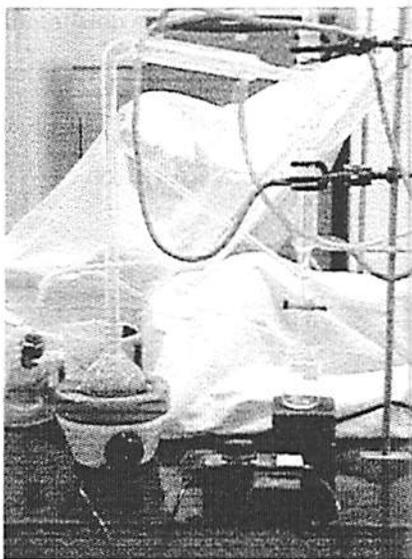


FIGURA 07: Aparelho de Clevenger Modificado utilizado para extração de óleo essencial.

O óleo essencial foi extraído de 15 e 20 gramas de folhas frescas e secas, realizando-se três repetições para cada tratamento. Em todas as extrações, utilizaram-se 250 mL de água destilada e coletaram-se cerca de 200 mL de hidrolato. Após, em um funil de separação, particionou-se com 3 frações de 65 mL de diclorometano. Reuniram-se as frações orgânicas, adicionou-se sulfato de magnésio anidro, deixando em repouso por 4 horas. Filtrou-se a vácuo e evaporou-se em evaporador rotatório, obtendo-se o óleo.

2.4.2 Elucidação estrutural

Para elucidação estrutural do óleo essencial, foram utilizados: espectrofotômetro por Infravermelho e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) com módulo de injeção com razão de divisão

(split) de 1:20. A programação da coluna foi de dois minutos a 50 °C, seguida de um aumento de 5 °C por minuto até atingir 280 °C. O óleo foi solubilizado em éter etílico e a temperatura do injetor foi de 250 °C. Os espectros das amostras analisadas foram comparadas com biblioteca eletrônica Wiley-275 PBM Format.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Prospecção fitoquímica preliminar

Os resultados obtidos dos testes fitoquímicos preliminares encontram-se descritos na tabela a seguir.

TABELA 03: Resultados da prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico da *C. langsdorffi* Desf.

Classe química	Resultado
Ácidos Orgânicos	Positivo
Açúcares Redutores	Positivo
Polissacarídeos	Positivo
Proteínas/aminoácidos	Positivo
Taninos	Positivo
Catequinas	Negativo
Flavonóides	Negativo
Lactonas	Negativo
Azulenos	Positivo
Carotenóides	Negativo
Esteróide/Triterpenóides	Positivo
Depsídeos/Depsídonas	Positivo
Derivados da Cumarina	Negativo
Saponina Espumídica	Positivo
Alcalóides	Negativo
Purinas	Negativo
Antraquinonas	Positivo

Com base nesses resultados, pode-se inferir a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, azulenos, depsídeos e depsidonas, esteróides e triterpenóides, proteínas e aminoácidos, antraquinonas, saponina espumídica e taninos.

Em estudos fitoquímicos realizados com as sementes das espécies *C. salikounda* Heck. e *C. langsdorffi* Desf., foi identificada a presença de cumarinas (Oliveira, 2000; Pinto, 2002). Os referidos autores descrevem também no óleo extraído das sementes de *Copaifera* sp. a presença do referido metabólito. Apesar de cumarinas serem encontradas nas sementes da *C. langsdorffi* Desf., não foi possível identificar, por meio da triagem fitoquímica, a presença desse grupo químico nas folhas da espécie estudada. A presença de cumarinas nas sementes e não nas folhas pode ser em decorrência dessa substância ser um metabólito secundário com ação antioxidativa, provavelmente evitando a deterioração das sementes, para garantir sua germinação (Kuster, 2001).

O teste positivo para polissacarídeos era esperado, pois pesquisas de Buckeridge (1999) relatam a presença de galactosidase presente nos cotilédones da *C. langsdorffi* Desf.

A presença de triterpenos ratifica trabalhos publicados, nos quais onde a caracterização química de sesquiterpenos, tais como α -copaeno, α -humuleno e α -cubebeno, foram isolados e identificados a partir da resina foliar de duas espécies de *Copaifera*, a *C. officinalis* L. e a *C. venezuelana* var. *Laxa* (Edmonds, 1983). Isso pode ser concluído de acordo com a rota metabólica dos terpenos (Figura 08), pois tanto os triterpenos e esteróides como os sesquiterpenos derivam de um mesmo precursor, o pirofosfato de farnesila. (Robbers, 1997; Liao, 2001; Santos, 2001).

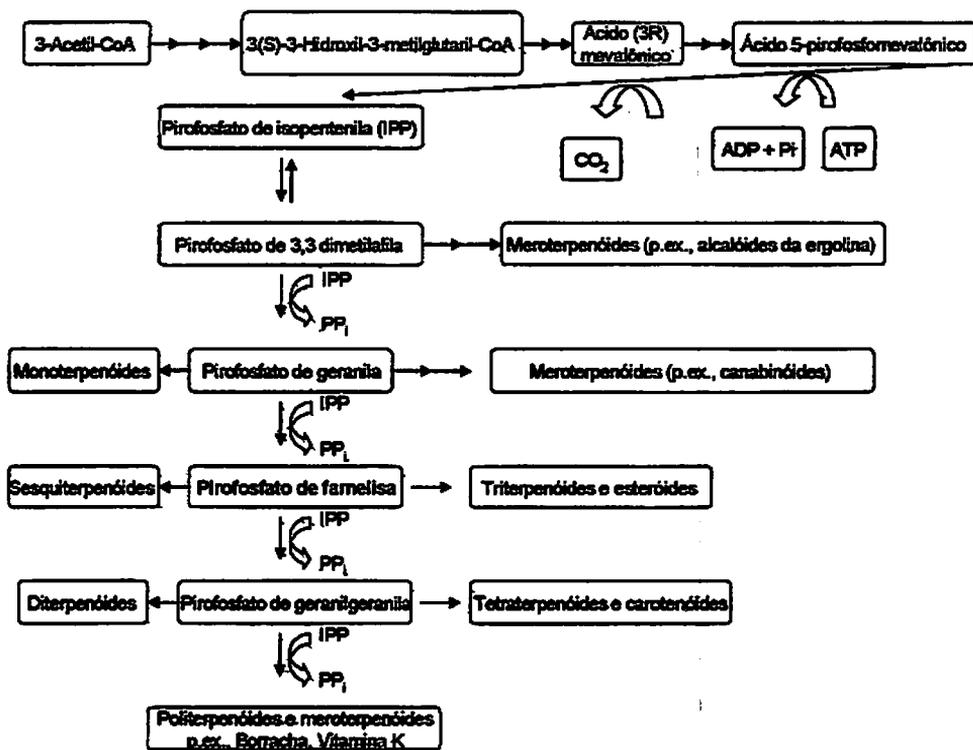


FIGURA 08: Rota metabólica dos terpenóides (Fonte: Robbers, 1997).

3.2 Fracionamento, isolamento e caracterização química

3.2.1 Obtenção dos extratos

Com a extração a frio, obtiveram-se maiores rendimentos dos extratos brutos com os solventes hexano e metanol (Tabela 04).

TABELA 04: Rendimento dos extratos brutos de copaiba obtidos por meio de extração a frio.

Solvente	Rendimento (grama)	Teor (%)
Hexano	11,28	4,51
Clorofórmio	8,56	3,42
Acetato de Etila	2,66	1,06
Etanol	11,05	4,42
Metanol	35,17	14,07

De acordo com Falkenberg (2001), o hexano extrai preferencialmente lipídeos, ceras, pigmentos e furanocumarinas, ao passo que o metanol apresenta afinidade pelos heterosídeos em geral, saponinas e taninos. A provável presença de lipídeos no extrato hexânico reafirma estudos que comprovam a presença do ácido palmítico, oléico, linoléico, araquidínico e beênico no óleo da semente de uma espécie do gênero *Copaifera* não identificado botanicamente (Pinto 2002). A provável presença de saponina e taninos no extrato etanólico obtido foi confirmada pelos testes fitoquímicos preliminares realizados no extrato foliar.

3.2.2 Faixa da temperatura de fusão

A faixa da temperatura de fusão que foi determinada para as amostras A_H e B_H foi de 60 ± 3 °C. Com base nesse resultado, pode-se inferir que por apresentarem a mesma faixa de fusão, trata-se provavelmente de compostos de cadeia carbônica curta e com poucos ou nenhum átomo que promova a formação de pontes de hidrogênio.

3.2.3 Cromatografia líquida de coluna, cromatografia de camada delgada e elucidação estrutural

A partir da coluna A, obtiveram-se 81 frações de 100 mL que, quando fracionadas por um mesmo eluente, foram reunidas e evaporadas por meio de evaporador rotatório. Ao final, obtiveram-se 10 frações orgânicas apresentadas na Tabela 03.

TABELA 05: Frações orgânicas fracionadas por CLC a partir do extrato metanólico.

Fração	Eluente	Mancha	Aspecto da fração obtida
A _M	100% CHCl ₃	1 ^a mancha	resíduo de cor verde
B _M	100% CHCl ₃	2 ^a mancha	resíduo de cor verde-escuro
C _M	100% CHCl ₃	3 ^a mancha	resíduo de cor verde
D _M	100% CHCl ₃	4 ^a mancha	resíduo de cor verde
E _M	75% CHCl ₃ 25%AcEt	5 ^a mancha	resíduo de cor verde-pálido
F _M	50% CHCl ₃ 50%AcEt	6 ^a mancha	resíduo de cor castanho
G _M	25% CHCl ₃ 75%AcEt	7 ^a mancha	resíduo de cor castanho
H _M	100% AcEt	8 ^a mancha	resíduo de cor castanho
I _M	75% AcEt 25% EtOH	9 ^a mancha	resíduo de cor castanho-escuro
J _M	50% AcEt 50% EtOH	10 ^a mancha	resíduo de cor castanho

Na coluna B, foram recolhidas 75 frações, coletadas em frascos de 30 mL, reunindo-se as pertencentes ao mesmo eluente. Ao final, obtiveram-se doze frações orgânicas apresentadas na Tabela 04.

TABELA 06: Frações orgânicas fracionadas por CLC a partir do extrato hexânico.

Fração	Eluente	Mancha	Aspecto da fração obtida
A _H	100% hexano	1ª mancha	pó, amarelo-pálido
B _H	100% hexano	2ª mancha	pó, amarelo-alaranjado
C _H	100% hexano	3ª mancha	óleo amarelo-pálido
D _H	100% hexano	4ª mancha	óleo amarelo-pálido
E _H	100% hexano	5ª mancha	óleo amarelo-pálido
F _H	75% hexano/ 50%CHCl ₃	6ª mancha	óleo amarelo-pálido
H _H	50% hexano/ 50%CHCl ₃	8ª mancha	pasta de cor verde-escura
I _H	50% hexano/ 50%CHCl ₃	9ª mancha	óleo castanho
J _H	50% hexano/ 50%CHCl ₃	10ª mancha	óleo amarelo-pálido
K _H	50% hexano/ 50%CHCl ₃	11ª mancha	óleo amarelo-pálido
L _H	50% CHCl ₃ /50%AcEt	12ª mancha	óleo amarelo-pálido

Os espectros das amostras A_H e B_H obtidas do fracionamento do extrato hexânico por cromatografia líquida de coluna submetidas à análise no infravermelho apresentam-se dispostos nas Figuras 09 e 10.

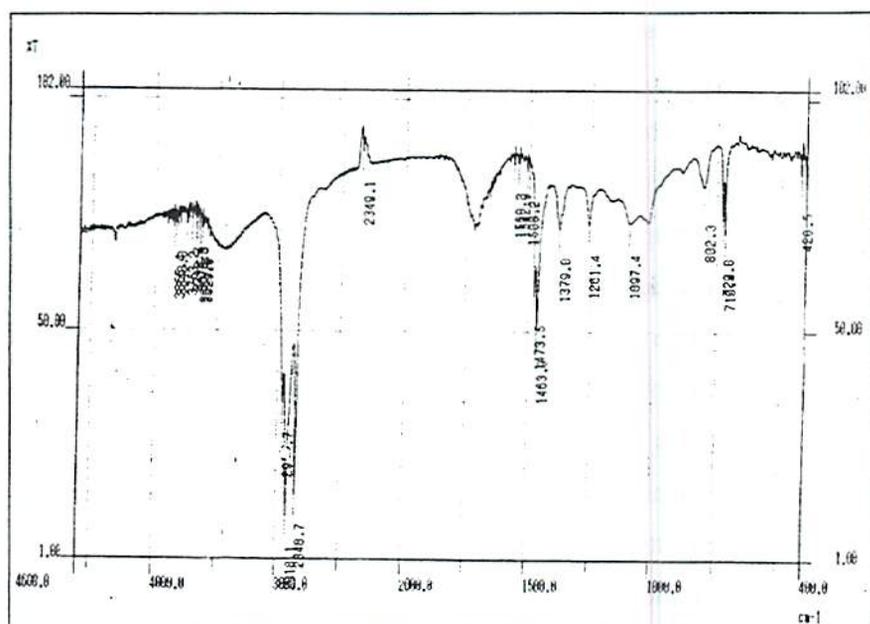


FIGURA 09: Espectro no infravermelho da amostra A_H.

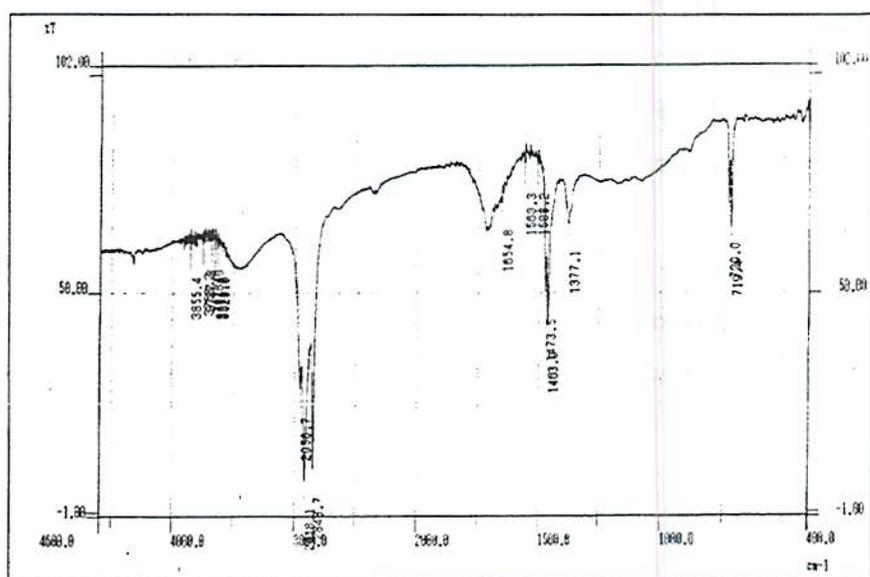


FIGURA 10: Espectro no infravermelho da amostra B_H.

Em relação a esses, notam-se bandas situadas nos intervalos em 2965 - 2848 cm^{-1} (amostra A_H) e 2859,7 - 2848,7 cm^{-1} (amostra B_H), referentes a vibrações de estiramentos de grupamentos metilas (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e metínicos (-CH); picos em 1473,5 e 1463,9 cm^{-1} equivalentes à deformação angular de C-H de grupamentos metilênicos; banda em 1377,1 cm^{-1} , em ambas amostras atribuído à deformação angular de grupos metilas. Em 1654 cm^{-1} , observa-se um sinal, o qual deve ser equivalente à deformação axial de C=C correspondente a deformações angulares fora do plano de (=CH₂), confirmado pelas bandas centradas em 729 e 719,4 cm^{-1} (Silverstein, 2000). Vale ressaltar que a ausência de bandas equivalentes à hidroxila é compatível com o baixo ponto de fusão da amostra.

Com os resultados semelhantes do ponto de fusão e dados obtidos nos espectros de infravermelho para as amostras A_H e B_H, obtidas pelo fracionamento do extrato hexânico por cromatografia líquida de coluna, conclui-se que se trata de uma mesma substância ou compostos químicos semelhantes.

De acordo com os espectros do RMN ¹H da amostra B_H, o sinal em δ -0,897 (t) e em δ -1,225 (s), cuja área corresponde proporcionalmente a 3 e a 4 hidrogênios, respectivamente, equivale possivelmente a grupamentos metilas (Figura 11).

O sinal em δ -1,645 (d), cuja área é correspondente a 4 hidrogênios, refere-se a grupamentos metilas ou metínicos. Em aproximadamente 5,0 ppm observa-se um sinal fraco que pode ser equivalente a duplas ligações.

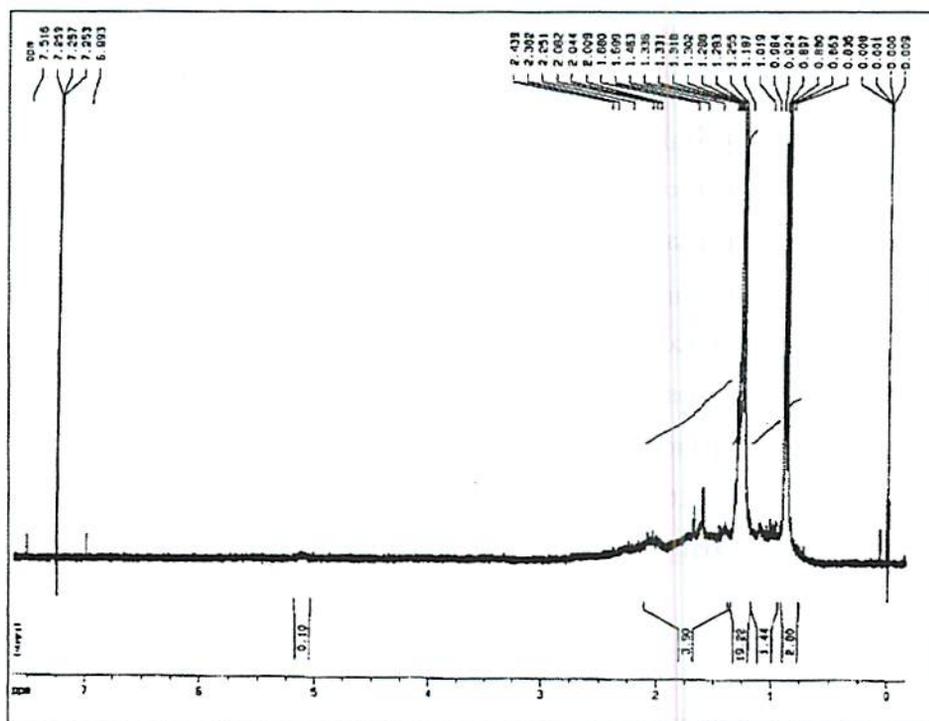


FIGURA 11: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da amostra B_H.

Com base nas informações obtidas pelo espectro do infravermelho e RMN ¹H pode-se inferir que a amostra B_H provavelmente trata-se de um terpeno (sesqui ou diterpeno) sem apresentar grupamentos carbonílicos ou hidroxila.

As amostras E_H e G_H, apresentando aspecto oleaginoso similar, apresentaram bandas similares no espectro do infravermelho. Nas Figuras 12 e 13, observa-se um sinal largo compreendido entre 3300 e 3500 cm⁻¹, o qual é atribuído à absorção de estiramentos simétricos e assimétricos de OH em associações poliméricas (Silverstein et. al., 2000). Sinais característicos de estiramento e deformações angulares de grupamentos -CH₃, -CH₂ e -CH podem ser observados aproximadamente nas regiões 2958 - 2854 cm⁻¹ (amostra E_H);

2929 - 2869 cm^{-1} (amostra G_H) e 1456 - 1375 cm^{-1} ; 1453-1379 cm^{-1} , respectivamente. A presença de um sinal presente em 1261 cm^{-1} (amostra E_H) e 1269 cm^{-1} (amostra G_H) evidencia a absorção devido ao estiramento de ligação C-O de álcool primário, secundário ou terciário (Pavia, 1996). A presença de carbonila é evidenciada pela presença de bandas fortes centradas em 1732 e 1716 cm^{-1} (amostra E_H) e em 1747 (amostra G_H). Para a amostra G_H , pode-se observar um sinal fraco próximo a 1650 cm^{-1} , característico possivelmente do estiramento de ligações duplas entre carbonos. Portanto, pode-se inferir que, possivelmente, o segundo sinal característico de carbonila presente no espectro da amostra E_H em 1716 cm^{-1} pode ser referente à interferência de sinal evidente de duplas ligações com grupamentos carbonílicos.

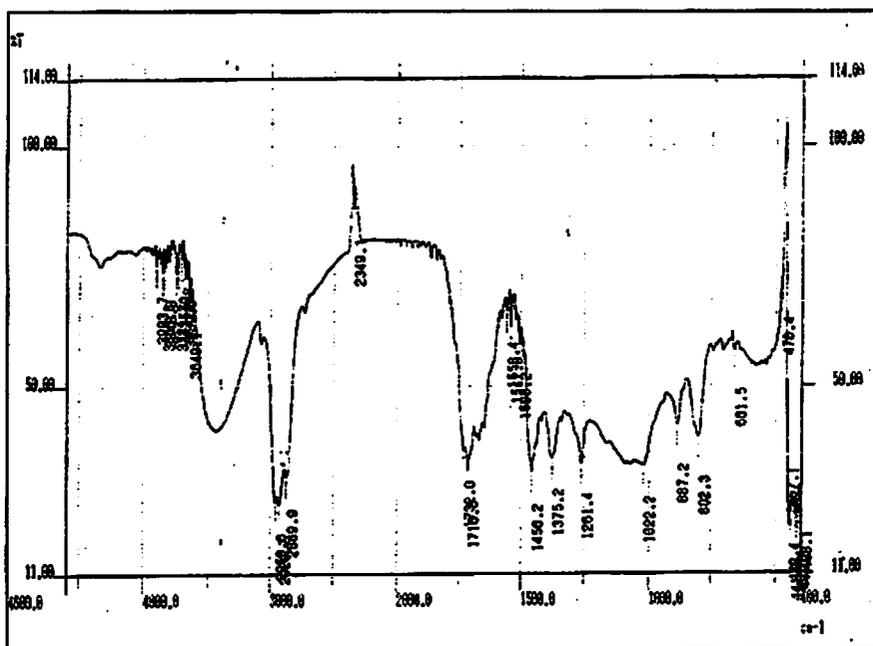


FIGURA 12: Espectro no infravermelho da amostra E_H .

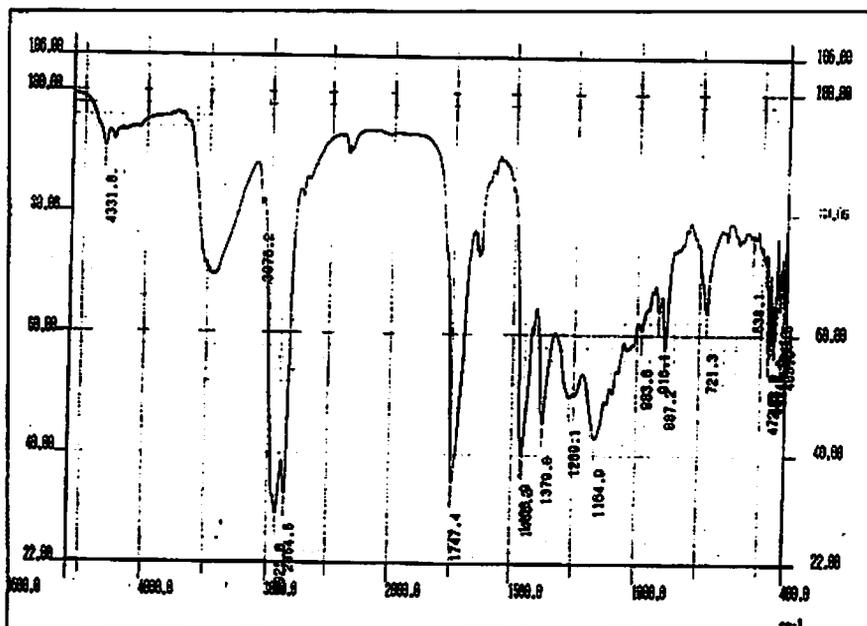


FIGURA 13: Espectro no infravermelho da amostra G_H.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio realizado na amostra GH não permitiu a obtenção de informações conclusivas, em consequência de a referida amostra não se apresentar purificada (Figura 14). Porém, pode-se observar um sinal próximo a δ 4,35 equivalente a hidrogênio característico de hidroxila, e em δ 5,341 de olefinas.

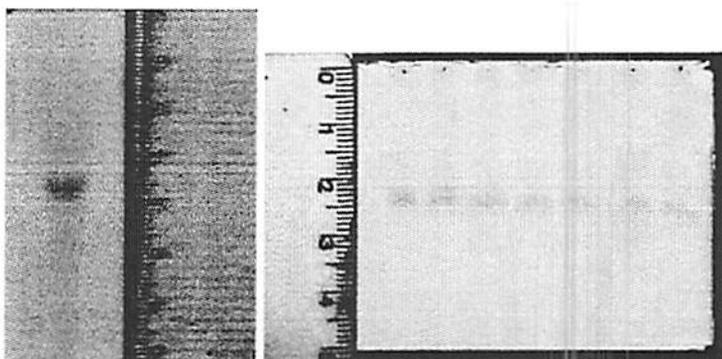


FIGURA 15: Cromatografia de camada delgada realizada na amostra H.

No espectro apresentado pela Figura 16, pode-se verificar as absorções importantes existentes nesse composto: sinais de absorção simétricas e assimétricas de estiramento das ligações $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$, ocorrendo aproximadamente na região compreendida entre $2927 - 2856 \text{ cm}^{-1}$. Observa-se um sinal de absorção forte na região compreendida entre $1747 - 1716 \text{ cm}^{-1}$, característica do grupamento carbonila, evidenciando-se, assim, a presença desse grupo na molécula. Na região compreendida entre $3490-3600$, nota-se claramente a presença de uma banda forte, característica de grupamentos hidroxílicos, confirmado pela absorção presente em 1164 , equivalente à deformação axial da ligação C-O de álcoois primários, secundários e terciários (Williams & Fleming, 1995).

O espectro de RMN ^1H apresentado na Figura 17 apresenta sinais entre $\delta-0,854$ e $0,907$ e em $\delta-1,206$ (s), com área de 6 e 16 hidrogênios respectivamente, correspondendo possivelmente a grupamentos metilas. O singlete presente em $\delta-1,545$ pode corresponder a hidrogênios de grupamentos metilênicos, com área correspondente a 10 hidrogênios, aproximadamente.

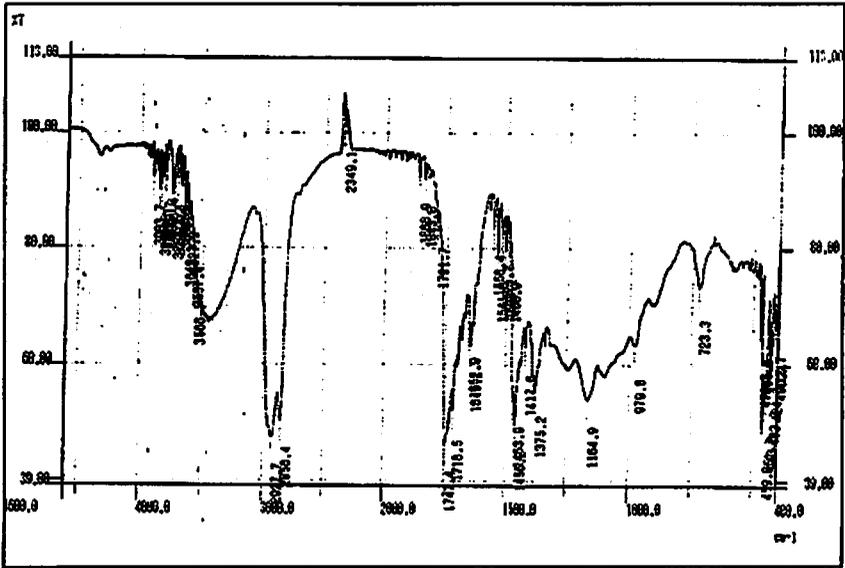


FIGURA 16: Espectro no infravermelho obtido a partir da amostra h_1 .

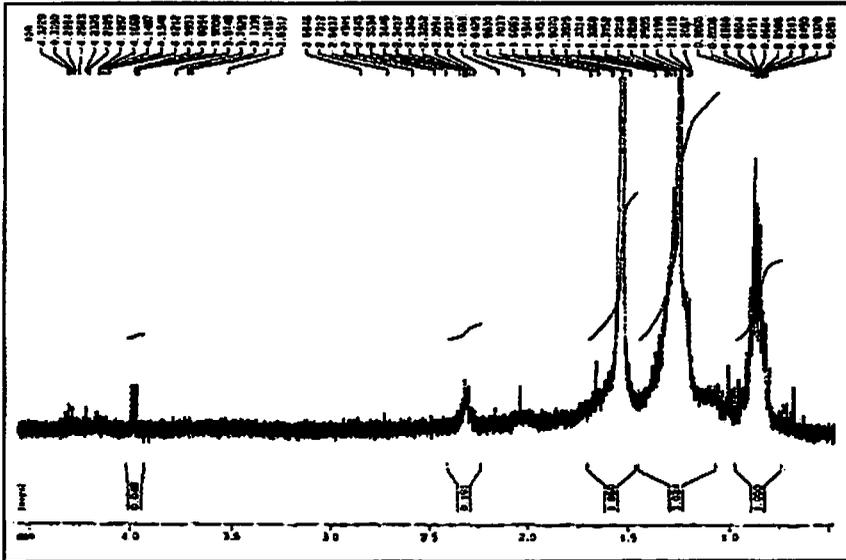


FIGURA 17: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido da amostra h_1 .

O sinal presente em δ - 2,363 corresponde, possivelmente, a hidrogênio de grupamentos metínicos próximos à carbonila, confirmando, portanto, o estiramento no espectro do infravermelho em 1747 cm^{-1} . Hidrogênios próximos a ligações duplas não são observados no espectro; porém, em situações em que o carbono apresenta-se tetrasubstituído, sinais de absorção não seriam visualizadas.

A ausência de sinal de hidrogênio correspondente à hidroxila contradiz o apresentado no espectro do infravermelho; portanto, acredita-se que a banda seja devida absorção de umidade do ar.

De acordo com as informações anteriores, pode-se inferir que a amostra h_1 , por apresentar grupamento carbonílico, com ausência de hidroxila, trata-se possivelmente de um éster.

Na Figura 18 pode ser visto o espectro no infravermelho da amostra D_M , obtida a partir do extrato metanólico. Nesse, podem-se observar absorções na região de 2958-2856 cm^{-1} , características de vibrações de estiramento das ligações C-H dos grupos metilas, metilênicos e metínicos, confirmados pelas absorções de deformação angular presentes em 1463 - 1379 cm^{-1} . Verifica-se um sinal de absorção forte em 1732 cm^{-1} característico do grupamento da carbonila, confirmando sua presença na molécula, e absorções na região compreendida entre 1271-1072 cm^{-1} devidas, possivelmente, à deformação axial de C-O.

Com base informações obtidas nos espectros do infravermelho, pode-se inferir que a amostra D_M , por evidenciar a presença de grupamentos carbonílicos e ausência de hidroxila, pode ser de um éster ou outro composto que apresente essas características descritas.

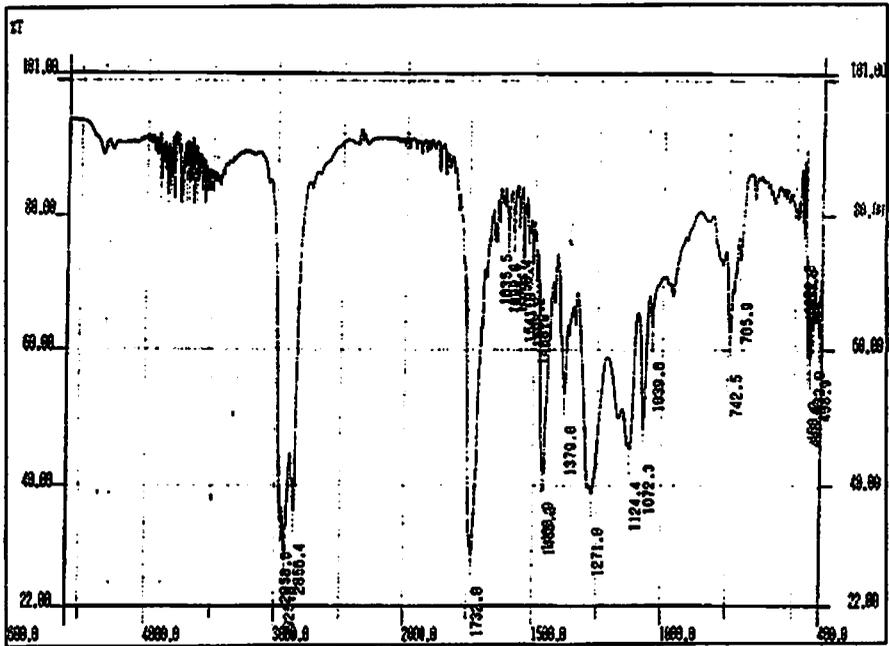


FIGURA 18: Espectro no infravermelho da amostra D_M .

3.3 Óleo essencial

3.3.1 Obtenção do óleo essencial por meio da técnica “arraste de vapor”

O rendimento do óleo essencial da *Copaifera* apresentou valores baixos, possivelmente por essa não ser uma espécie aromática. Quanto à comparação dos teores de óleo essencial entre folhas frescas e secas em estufa, pode-se verificar que a última apresentou resultados inferiores, provavelmente em consequência de o processo de secagem ser desfavorável para a extração de óleo essencial, visto que o mesmo apresenta a propriedade de ser extremamente volátil (Tabela 07).

TABELA 07: Rendimento bruto e teor em porcentagem de massa de óleo essencial da *C. langsdorffi* Desf., em grama, extraído de suas folhas frescas e secas.

Material Vegetal	Quantidade (g)	Rendimento bruto - massa (g)	Teor - massa (%)
Folha fresca	15	0,030	0,18
	20	0,008	0,04
Folha seca em estufa	15	0,010	0,06
	20	0,008	0,04

3.3.2 Elucidação estrutural

O espectro apresentado na Figura 19 apresenta uma banda larga centrada a 3490 cm^{-1} , característica de absorções de estiramentos de $-\text{OH}$; sinais de absorção forte, na região compreendida em $2954\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$, típicas de absorções simétricas e assimétricas de estiramento das ligações $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$; sinal de absorção forte característica do grupamento carbonílico em 1730 cm^{-1} . Em 1456 e 883 cm^{-1} , observa-se a presença de sinais fortes, que podem ser atribuídos à deformação axial e angular de C-H. Na região compreendida entre $1261\text{-}1020$, a presença de bandas confirmam a deformação axial de C-O.

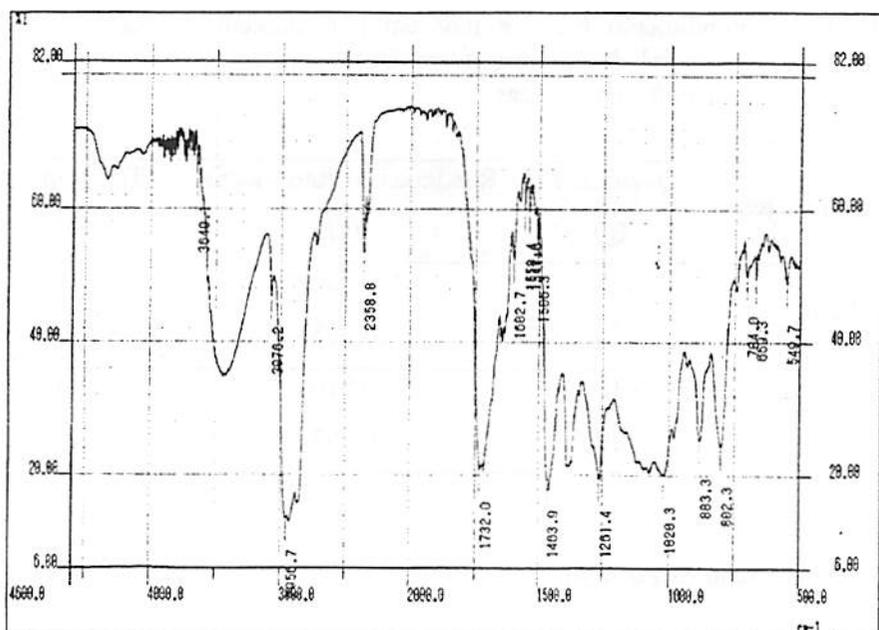


FIGURA 19: Espectro no infravermelho do óleo essencial da *C. langsdorffi* Desf.

Na Figura 20 é apresentado o cromatograma correspondente à análise realizada no óleo essencial de copaíba. De acordo com os resultados da análise do CG-EM, o óleo essencial da *C. langsdorffi* Desf. é constituído por onze moléculas majoritárias, determinadas pela da comparação entre os espectros de massa das substâncias e o banco de dados da biblioteca eletrônica. Observa-se que a composição química do óleo essencial de copaíba é constituído, na maioria, por monoterpenos, sesquiterpenos e éster, confirmando os resultados obtidos por meio do espectro no infravermelho, pelo qual evidenciavam-se grupamentos carbonílicos e hidroxila (Tabela 08).

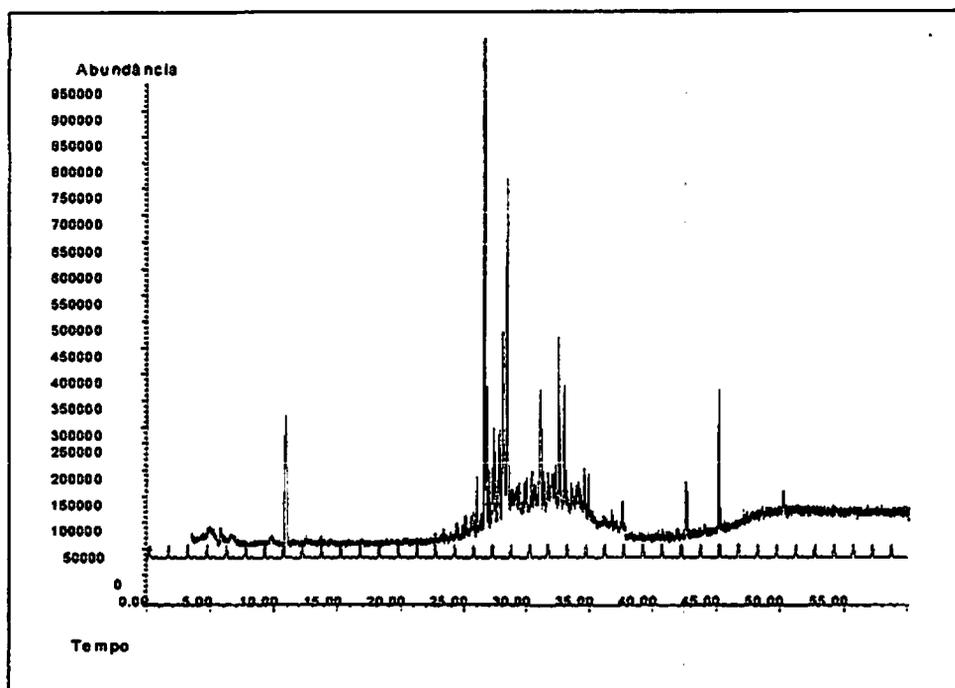


FIGURA 20: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da *C. langsdorffi* Desf.

TABELA 08: Compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas da *C. langsdorffi* Desf. detectados por meio de CG/EM.

Tempo de retenção (Rt - minutos)	Banco de dados	Probabilidade (%)	Fórmula Molecular
10,85-10,97	Limoneno	98	C ₁₀ H ₁₆
	β- sesquiciclogeraniol	93	C ₁₅ H ₂₆ O
25.96-26.01	α-trans sesquiciclogeraniol	90	C ₁₅ H ₂₆ O
	1,6,10-Dodecatrien-3-ol	89	C ₁₅ H ₂₆ O
26.57-26.66	Espatuleno	99	C ₁₅ H ₂₄ O
26.74-26.77	β-selineno	90	C ₁₅ H ₂₄
26.96-26.99	Ledeno	95	C ₁₅ H ₂₄
27.23-27.28	(+) Aromadendreno	97	C ₁₅ H ₂₄
27.22-27.27	Epiglobulol	90	C ₁₅ H ₂₆ O
28.05-28.09	Torreyol	92	C ₁₅ H ₂₆ O
28.18-28.25	α-copaeno	78	C ₁₅ H ₂₄
	T-muurolol	95	C ₁₅ H ₂₆ O
28.38-28.44	T-Cadinol	86	C ₁₅ H ₂₆ O
31.08-31.14	Metilfarnasato	93	C ₁₆ H ₂₆ O ₂

O sinal correspondente ao tempo de retenção compreendido entre 10.853-10,970 equivale, comparando-se com a biblioteca eletrônica ao limoneno, a 98% de probabilidade. Esse composto é um monoterpênóide monocíclico, que apresenta um considerável valor comercial, sendo utilizado como aromatizante de cosméticos e sabonetes, além de ser empregado na indústria de alimentos e remédios (Craveiro, 1981). Liao & Barkovic (2000) citam inclusive a possível ação desse composto como anticarcinogênico.

O espectro de massa do limoneno e da biblioteca eletrônica estão apresentados Figura 21. A Figura 22 representa o fragmento correspondente ao pico-base em m/z 68 do limoneno, e é característico da movimentação da dupla ligação no ciclohexano, com posterior quebra de ligação. De acordo com Silverstein (2000), o sinal correspondente ao íon em m/z 93 é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ (Figura 23).

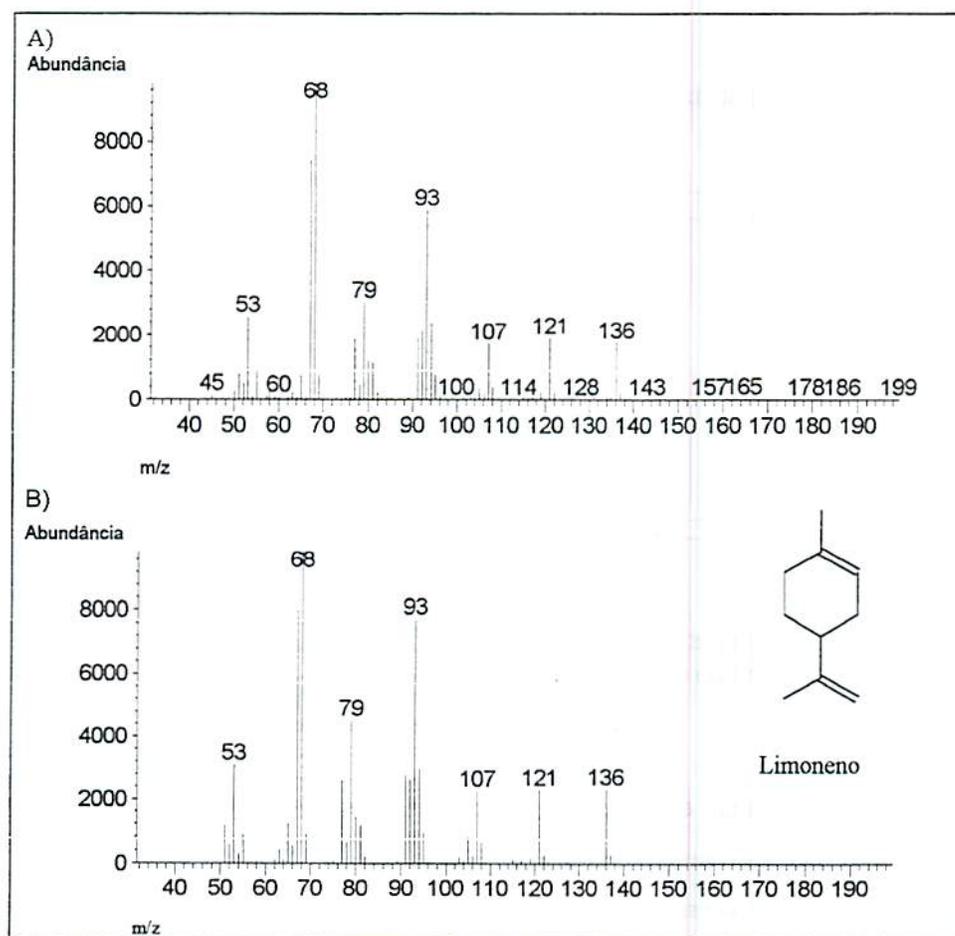


FIGURA 21: A) Espectro de massas do limoneno referente ao tempo de retenção entre 10,85 e 10,97 minutos. B) Espectro de massas da biblioteca eletrônica do limoneno.

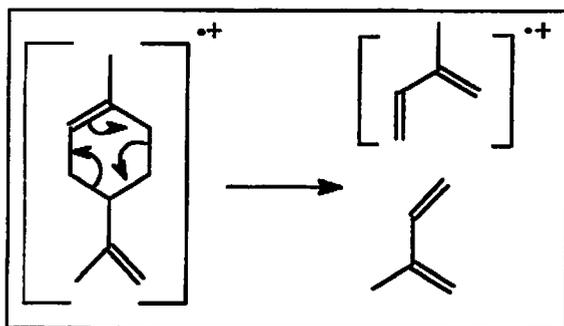


FIGURA 22: Fragmentação do pico-base do limoneno.

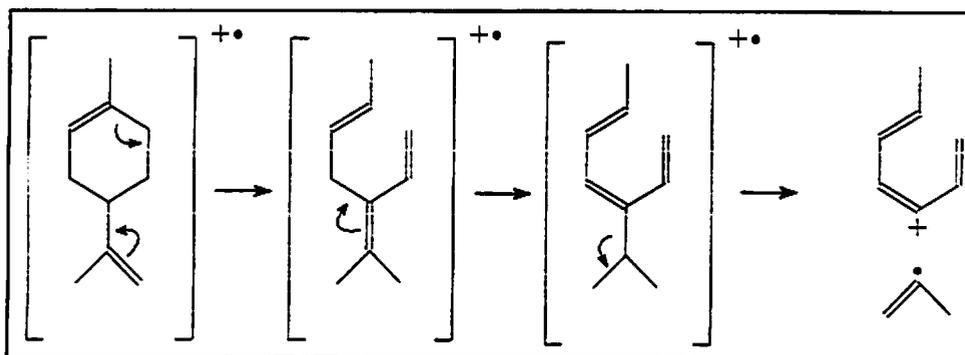


FIGURA 23: Fragmentação do limoneno ($C_7H_9^{\cdot+}$) levando à formação do fragmento em m/z 93.

Com base nos espectros de massa da biblioteca eletrônica, pode-se inferir que o pico cujo tempo de retenção ocorre entre 25,96 e 26,01 minutos do cromatograma do óleo essencial da copaíba equivale a 93% de probabilidade ao β -sesquiciclogeraniol (Figura 24). Observando o espectro de massas do possível composto, pode-se verificar que o pico-base apresenta-se em m/z 69, correspondendo provavelmente ao fragmento iônico $C_7H_9^+$ (Figura 25).

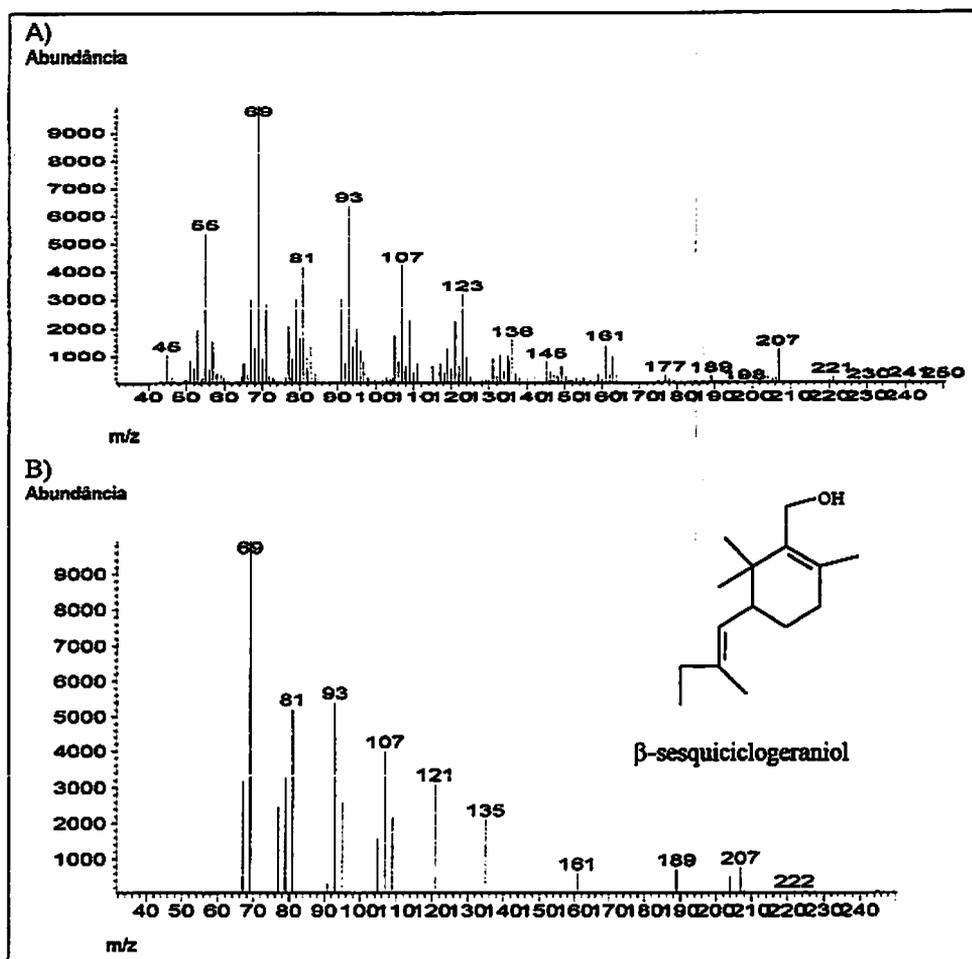


FIGURA 24: A) Espectro de massa do β -sesquiciclogeraniol referente ao tempo de retenção entre 25,957 e 26,011 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do β -sesquiciclogeraniol.

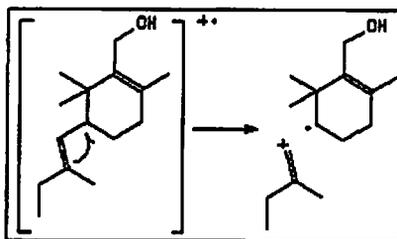


FIGURA 25: Fragmento do β -sesquiciclogeraniol ($C_{15}H_{26}^+$) levando à formação do fragmento em m/z 93.

Por meio da comparação dos espectros de massa da biblioteca eletrônica com a substância cujo tempo de retenção ocorre entre 26,57 e 26,66 minutos, determinou-se, com cerca 99% de probabilidade, que esse sinal corresponde ao espatulenol (Figura 26).

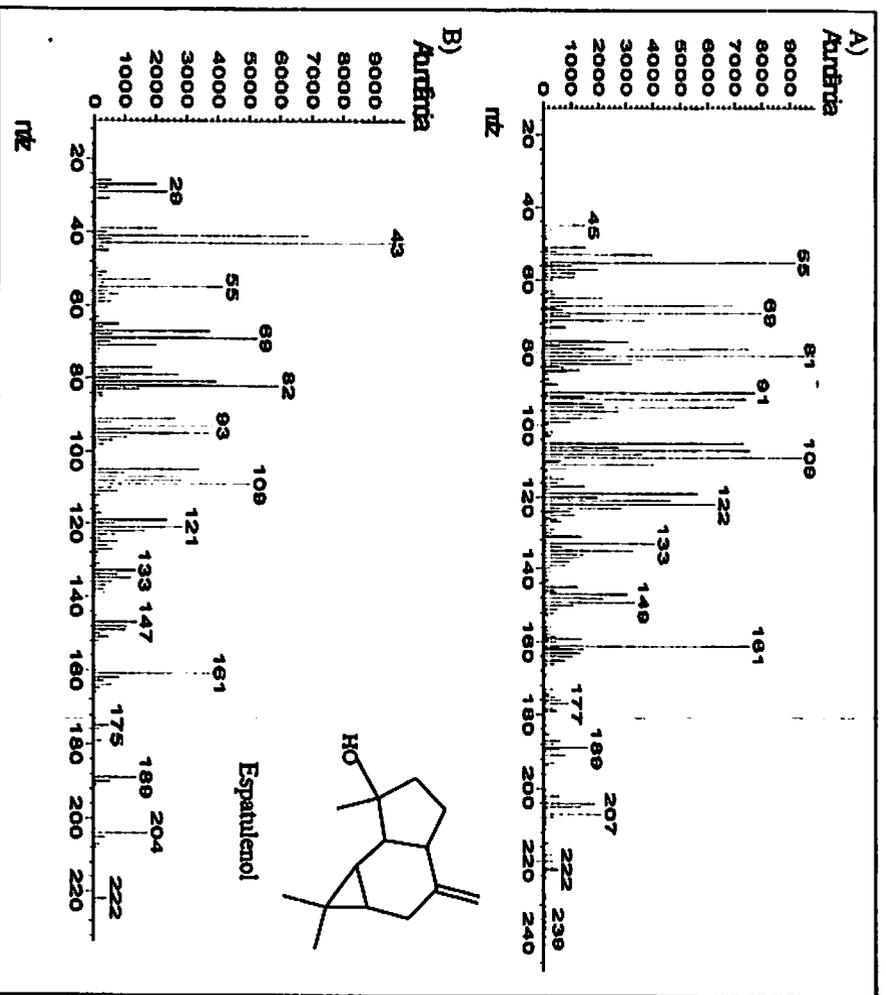


FIGURA 26: A) Espectro de massa do espatulenoil referente ao tempo de retenção entre 26,57 e 26,66 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do espatulenoil.

O espatulenoil, um sesquiterpeno, está presente na constituição química de diversos óleos essenciais de variadas espécies de plantas medicinais, como, por exemplo, de um estudo de caracterização química do óleo essencial da Carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] (Silva, 2001).

Observando-se o espectro de massa, evidencia-se o pico-base em m/z 43, indicando possivelmente a formação de fragmento iônico com fórmula molecular $C_3H_7^+$. De acordo com Silverstein (2001), tal qual a fragmentação em m/z 43, as ligações próximas a um heteroátomo quebram-se e a carga comporta-se no fragmento que contém o heteroátomo e os elétrons não ligantes estabilizam o fragmento por ressonância (Figura 27).

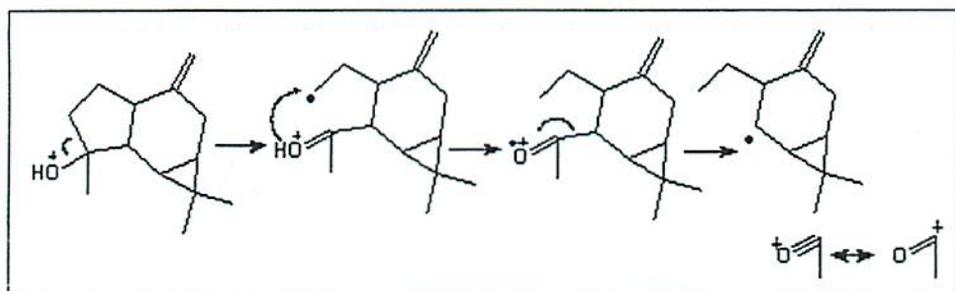


FIGURA 27: Fragmento do Espatulolol ($C_2H_3O^+$) levando à formação do fragmento em m/z 43.

Comparando-se os espectros de massa da biblioteca eletrônica, verificou-se que o pico com tempo de retenção entre 26,74 e 26,77 minutos refere-se ao β -selineno, um sesquiterpeno bicíclico também encontrado na resina foliar das espécies *C. officinalis* L. e *C. venezuelana* var. *laxa* (Langenheim, 1988). (Figura 28).

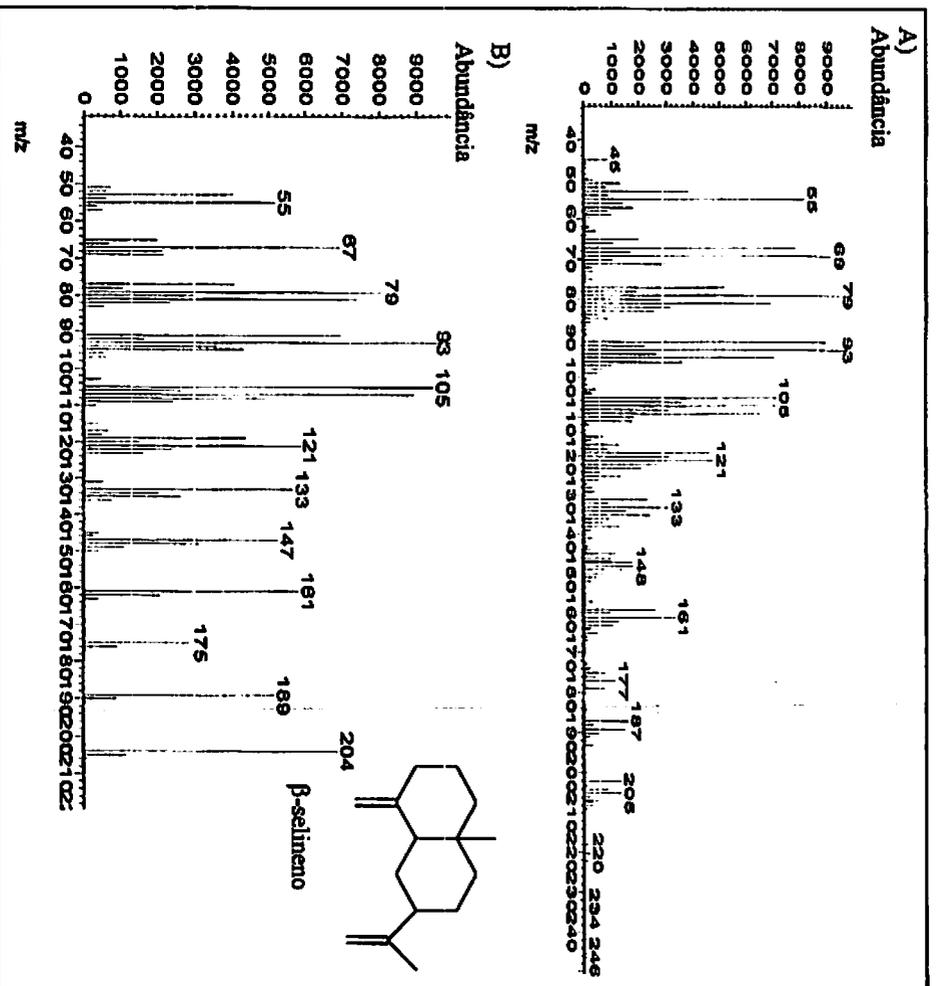


FIGURA 28: A) Espectro de massa do β-selineno referente ao tempo de retenção entre 26,57 e 26,65 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica β-selineno.

Observando-se o espectro de massa do espatulanol, pode inferir que o pico-base presente em m/z 93 corresponde possivelmente à estrutura de fórmula molecular $C_7H_9^+$, presente também na fragmentação da estrutura do limoneno (Figura 23).

Com base nos espectros de massa da biblioteca eletrônica, pode-se inferir que o pico com tempo de retenção entre 26,96 e 26,99 minutos do cromatograma do óleo essencial da copaíba equivale ao sesquiterpeno ledeno (Figura 29).

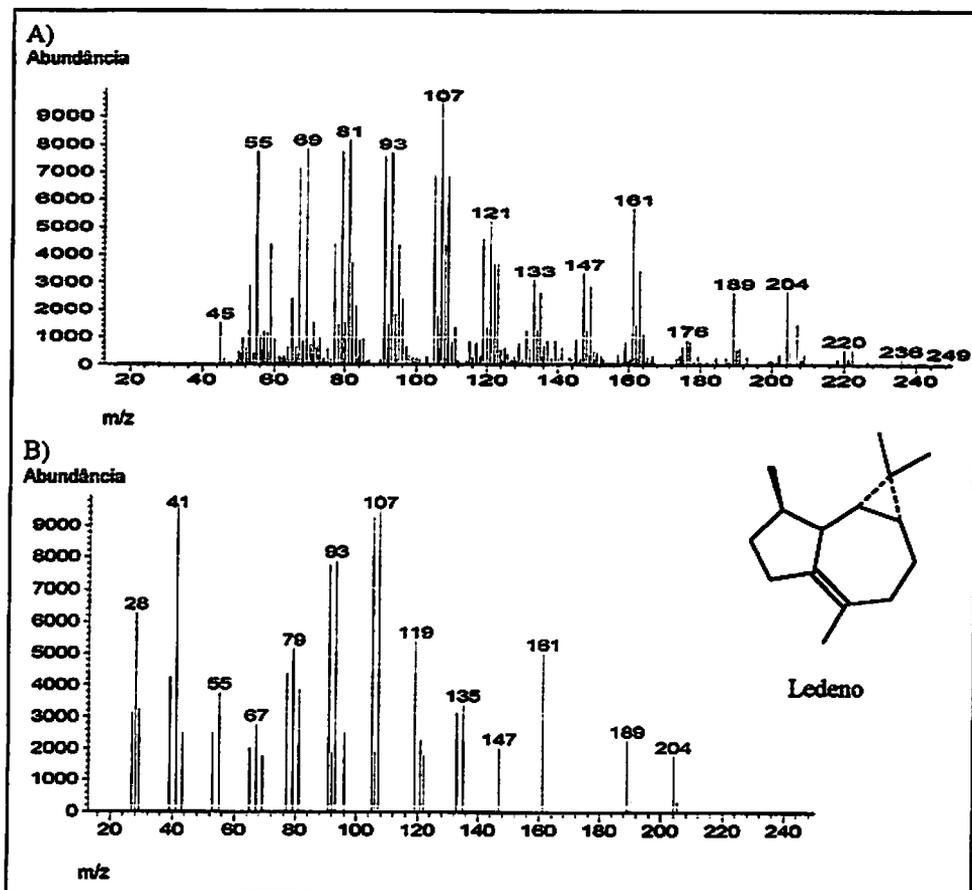


FIGURA 29: A) Espectro de massa do ledeno referente ao tempo de retenção entre 26,96 e 26,99 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do ledeno.

Pode-se verificar a partir do espectro de massas do ledeno, que o pico em m/z 93 é correspondente à fragmentação iônica característica de terpenos (Figura 24) e o pico-base em m/z 41 pode ser equivalente ao fragmento de fórmula molecular $C_3H_5^+$ (Figura 30).

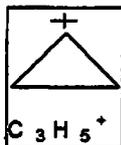


FIGURA 30: Fragmento do ledeno equivalente ao pico em m/z 41.

O sinal correspondente ao tempo de retenção compreendido entre 27,23 e 27,27 minutos apresenta 97% de probabilidade de ser equivalente ao sesquiterpeno aromadendreno (Figura 31). O pico em m/z 41 possivelmente equivale ao fragmento iônico $C_3H_5^+$ (Figura 30).

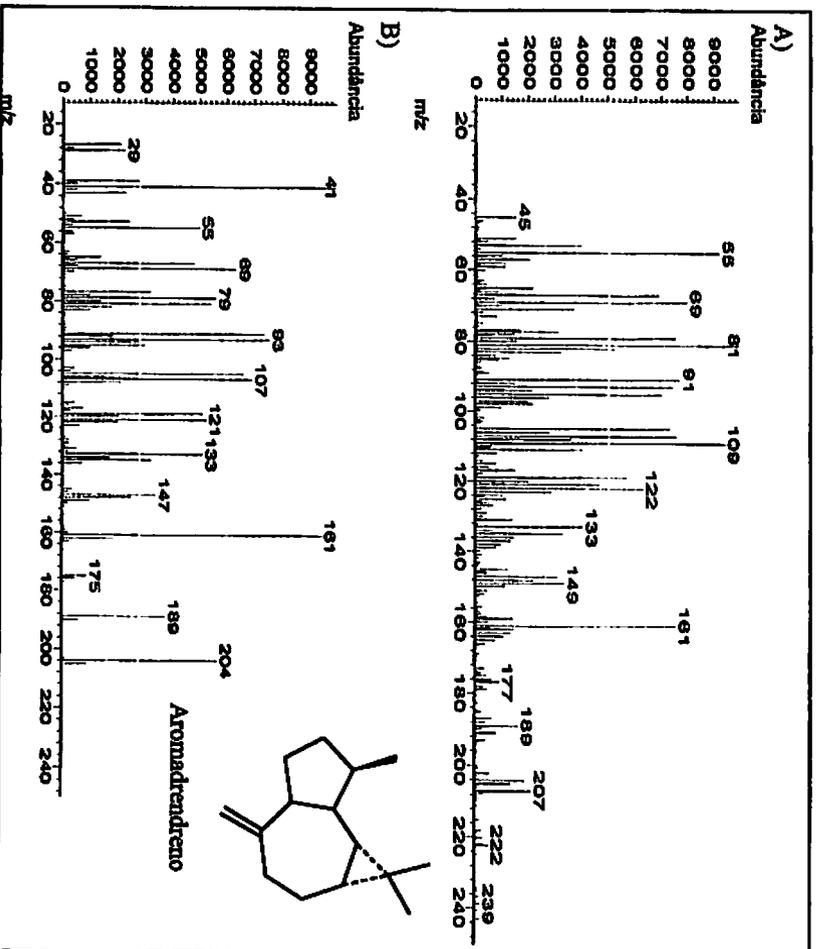


FIGURA 31: A) Espectro de massa do aromadendreno referente ao tempo de retenção entre 27,23 e 27,27 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do aromadendreno.

Em uma pesquisa recente a respeito do gênero *Copaifera*, Pinto (2002) descreve alguns sesquiterpenos encontrados no óleo-resina deste gênero, afirmando a presença do alo-aromadendreno em sua composição.

Comparando-se os espectros de massa da biblioteca eletrônica, verificou-se que o tempo de retenção entre 27,22 e 27,27 minutos refere-se ao epiglobulol, com 90% de probabilidade (Figura 32). Evidencia-se que o pico-base em m/z 43 indica a formação de fragmento iônico com fórmula molecular $C_{15}H_{21}O^+$ semelhantemente à fragmentação do espatulanol (Figura 27).

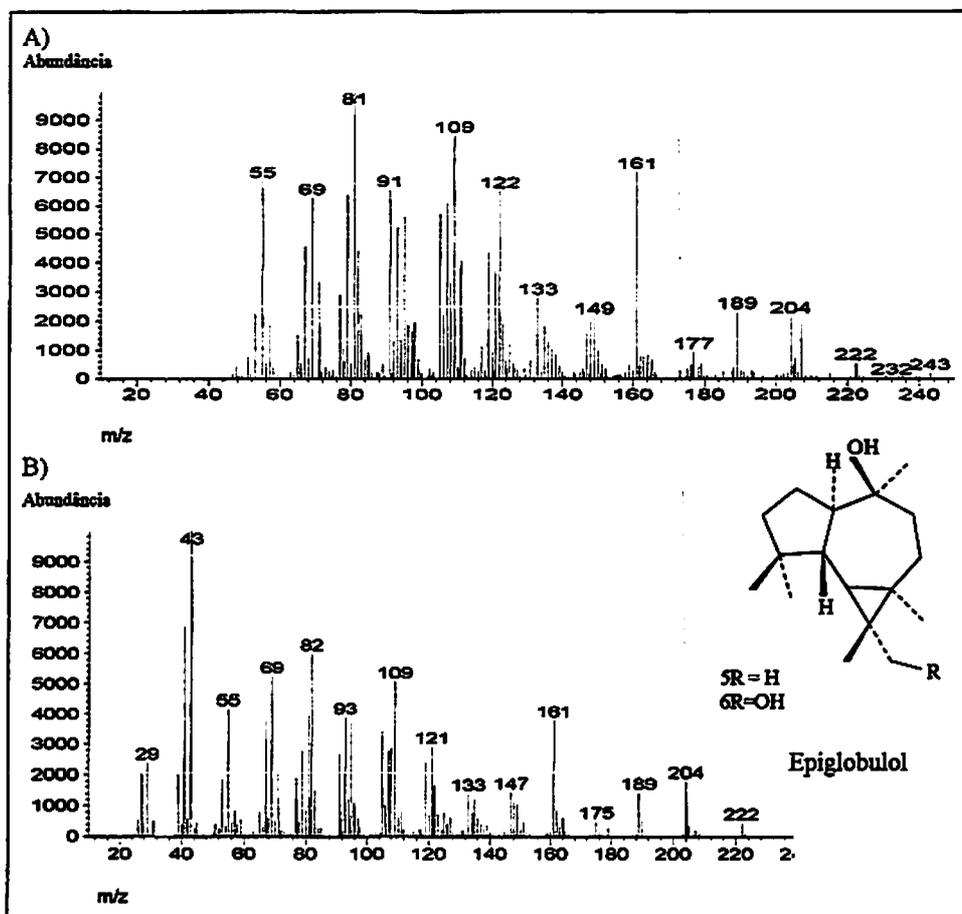


FIGURA 32: A) Espectro de massa do epiglobulol referente ao tempo de retenção entre 27,22 e 27,27 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do epiglobulol.

Salgado (2001), estudando três espécies de Eucalipto: *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e *E. calmadulensis*, e avaliando a ação fungitóxica dos óleos essenciais extraídos dessas espécies, constatou a presença desse constituinte majoritário, epiglobulol, no óleo essencial do *E. calmadulensis*.

Pesquisas realizadas com a Carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] também identificam esse terpeno como majoritário no óleo essencial (Silva, 2001).

De acordo com a comparação dos espectros de massa da biblioteca eletrônica, o sinal correspondente ao tempo de retenção de 28,05 a 28,09 minutos equivale ao torreyol, também denominado por cedreanol (Figura 33).

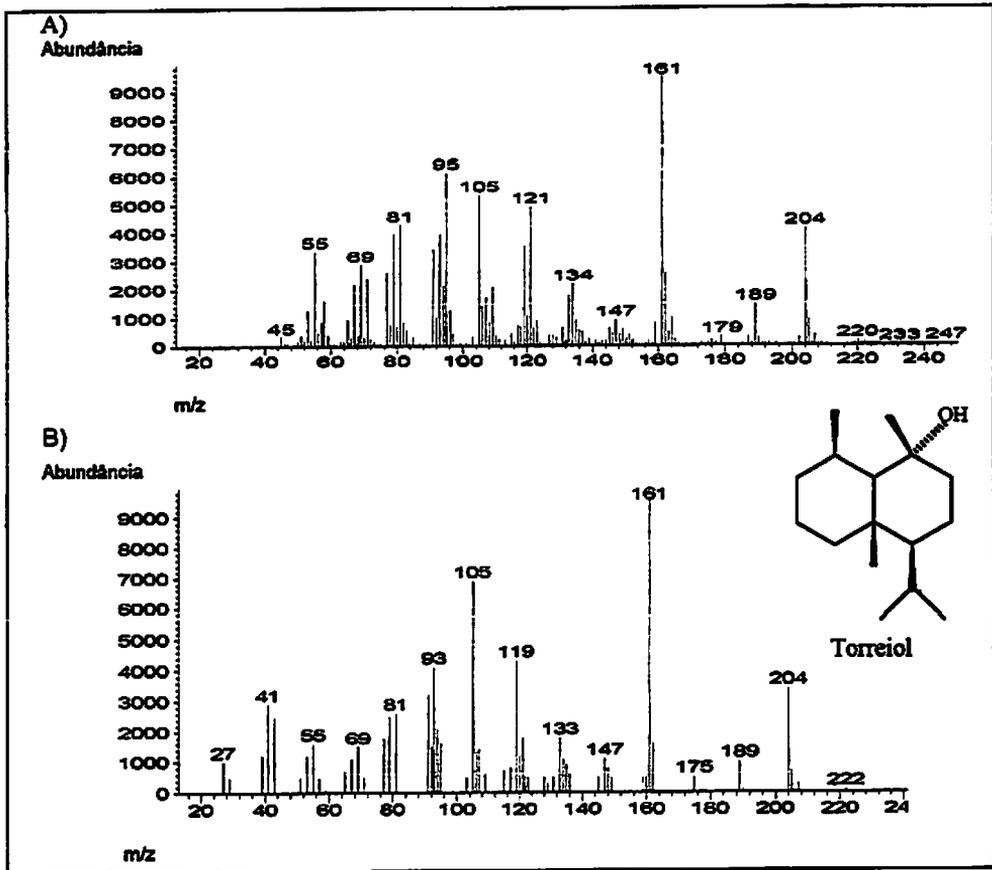


FIGURA 33: A) Espectro de massa do torreyol referente ao tempo de retenção entre 28,05 e 28,09 minutos. B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do torreyol.

Com base nos espectros de massa da biblioteca eletrônica, pode-se inferir que o tempo de retenção entre 27,78 e 27,82 minutos do cromatograma do óleo essencial da copaiba apresenta 78% de probabilidade de corresponder ao α -copaeno (Figura 34).

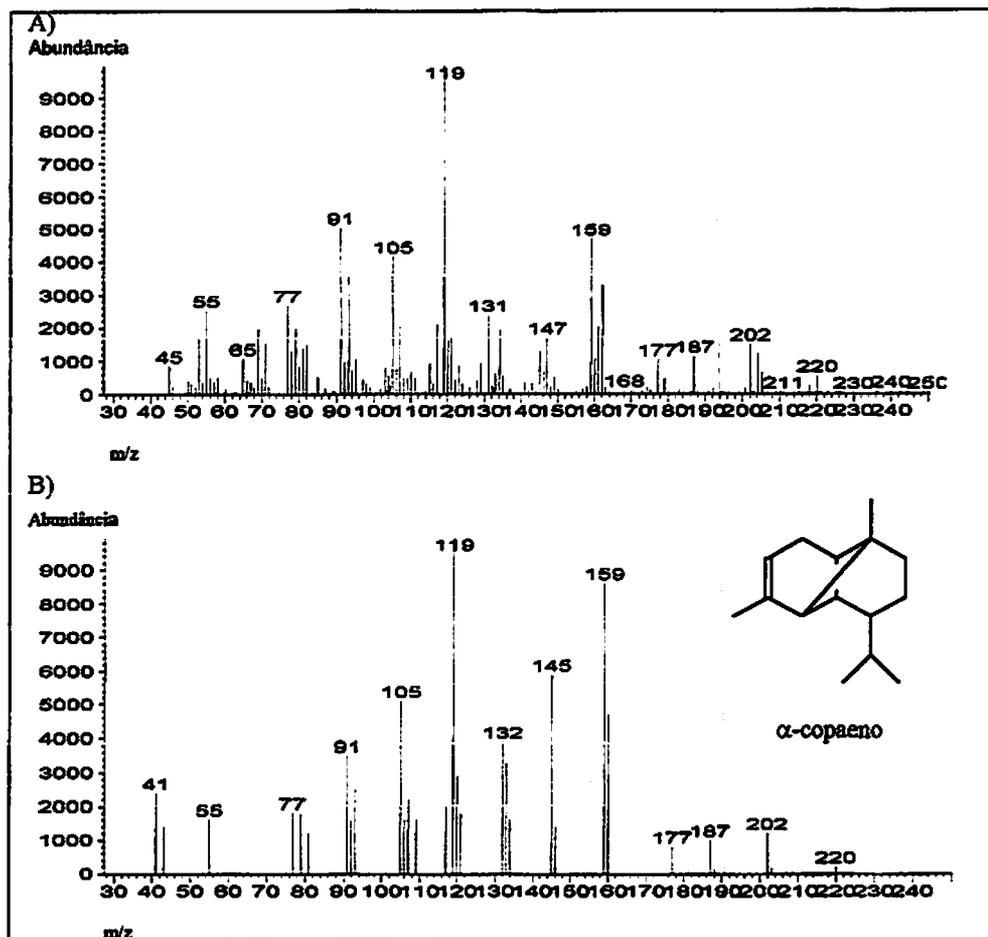


FIGURA 34: A) Espectro de massa do α -copaeno referente ao tempo de retenção entre 27,78 e 27,82 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica α -copaeno.

Com base nos espectros de massa de massa da biblioteca eletrônica, pode-se inferir que o pico cujo tempo de retenção corresponde a 28,376 até 28,448 minutos do cromatograma do óleo essencial da copaíba equivale, com 95% probabilidade, ao t-*muuroliol* (Figura 35).

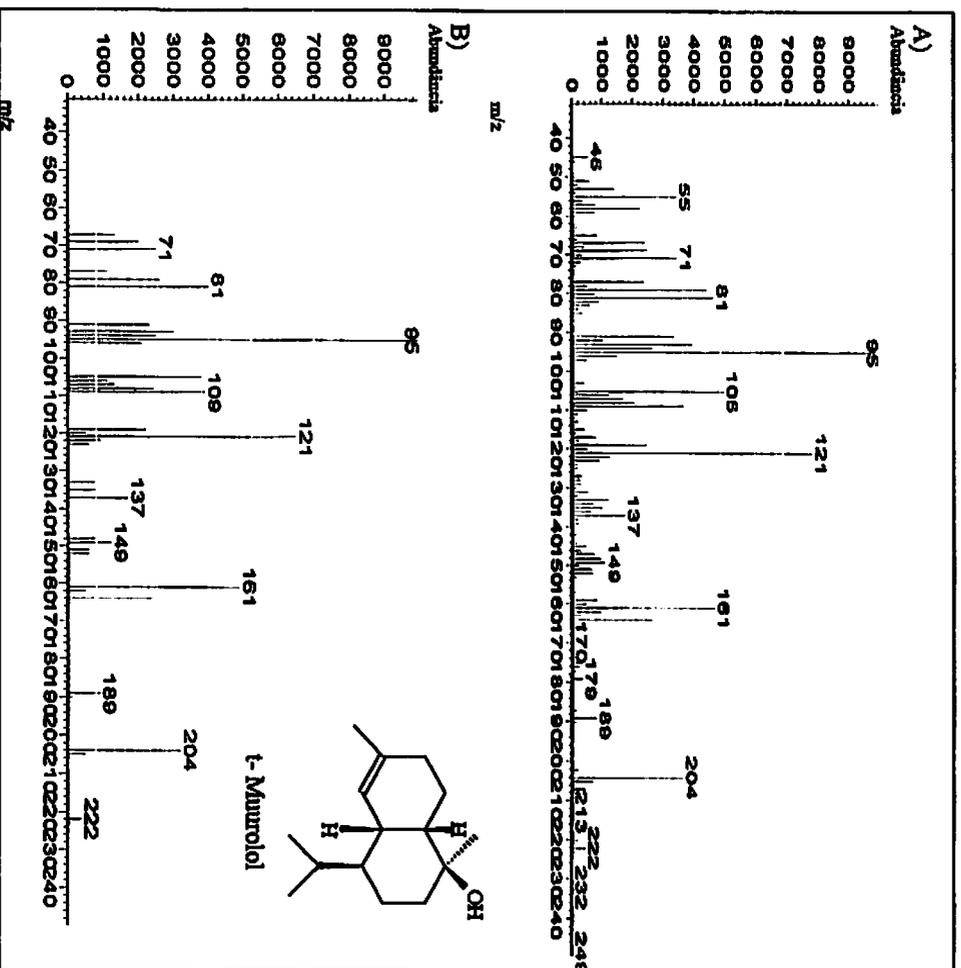


FIGURA 35: A) Espectro de massa do t-*muuroliol* referente ao pico absorvido entre 28,38 e 28,45 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do t-*muuroliol*.

De acordo com a comparação dos espectros de massa na biblioteca eletrônica, com 93% de probabilidade, o pico cujo tempo de retenção varia entre 31,082 e 31,144 minutos é equivalente ao metilfarnasato (Figura 36).

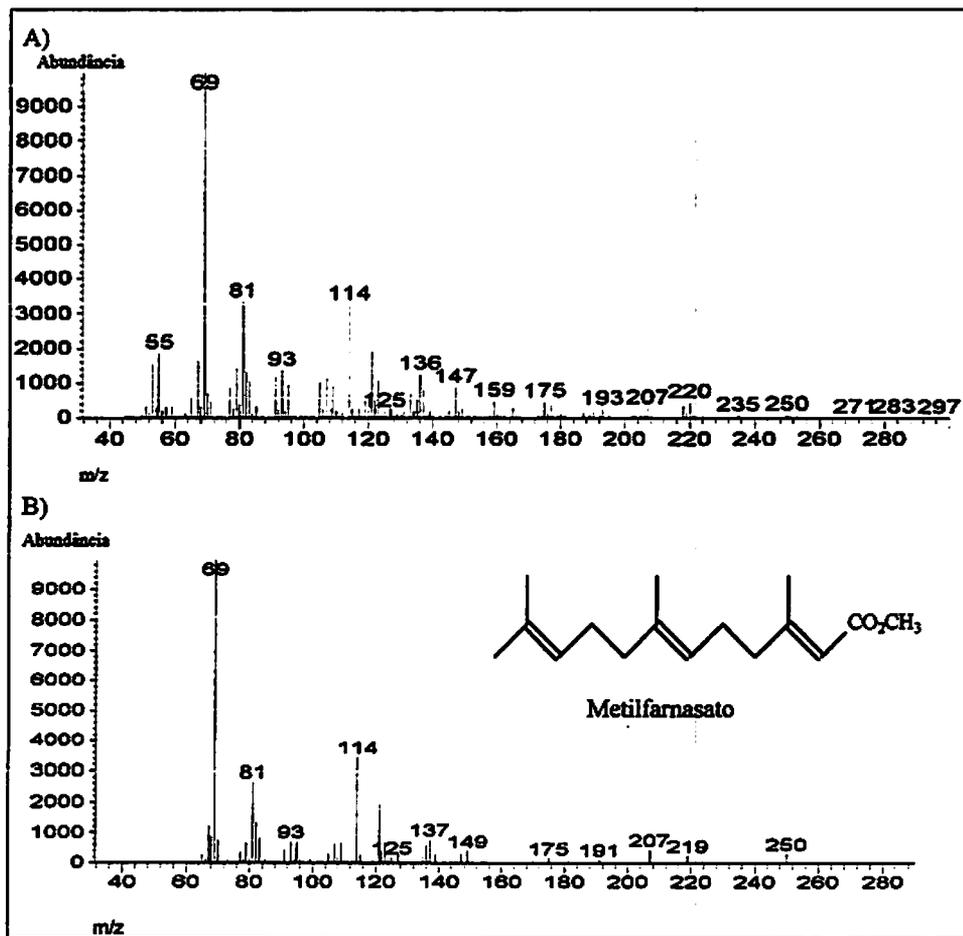


FIGURA 36: A) Espectro de massa do metilfarnasato referente ao pico absorvido entre 31,08 e 31,14 minutos B) Espectro de massa da biblioteca eletrônica do metilfarnasato.

Em publicação anterior, na qual Pinto (2002) descreve os sequiterpenos já detectados no gênero *Copaifera*, o t-muurolol foi apresentado como um dos componentes do referido gênero.

Comparando-se os resultados obtidos pela caracterização química do óleo essencial extraído das folhas da *Copaifera langsdorffi* Desf. por meio de CG/EM, com aqueles obtidos por Craveiro (1981) e mais recentemente por Pinto (2003), que pesquisaram os constituintes do óleo-resina, conclui-se que ambos, entre os compostos majoritários, apresentaram o α -copaeno. Diante de tais evidências, tal substância pode ser utilizada como biomarcador para o controle da autenticidade dos mesmos.

4 CONCLUSÕES

Para essa espécie estudada conclui-se que:

- O rendimento que apresentou melhores resultados na obtenção do óleo essencial foi o que utilizou folhas frescas.
- Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *C. langsdorffi* Desf. são: limoneno, β -sesquiciclogeraniol, espatulenol, β -selineno, ledeno, (+) aromadendreno, epiglobulol, torreyol, α -copaeno, t-muurolol e metilfamasato.
- A amostra B_H possivelmente é um terpeno de cadeia curta; a amostra h₁ um éster e a amostra G_H não apresentou informações conclusivas; no entanto, para tais afirmações, há necessidade das análises de CG/EM e elementar de C, H e N.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUCKERIDGE, M. S.; ALCÂNTARA, P. H. N.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific - galactosidase from colyledons of *Copaifera langsdorffii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 37, n. 9, p. 653-663, Sept. 1999.

COLLYER, T. A. Utilization of oils and essences of the Amazon region like alternative immersion liquids. Departamento Nacional de Produção Mineral - Ministério da Infra-Estrutura. Belém-PA, 1991. 19 p.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, 1984. v. 6, p. 612-615.

✕ CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica.** São Paulo: Vozes, 1998. 279 p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste.** Fortaleza. Edições UFC, 1981. 210 p.

DEMARCHELIER, C. J.; BUSTAMANTE, J. M.; GIL, R. R.; COUSSIO, J. D.; CICCIA, G. N.; SILVA, G. L. Profisetinidin type tannin responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*. *Pharmazie*, Eschborn, v. 57, n. 7, p. 573-577, July 2001.

EDMONDS, C. G.; ARRHENIUS, S. P.; FOSTER, C. E.; LANGENHEIM, J. H. Sesquiterpenes in leaf pocket resins of *Copaifera* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 22, n. 2, p. 471-472, Feb. 1983.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001. p. 165-181.

✕ FERREIRA, S. H. (org.) **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, L. A.; BRAZ, E. M. Avaliação do potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*). The New York

BotanicalGarden.Disponivelem:<http://www.nybg.org/bsci/acre/evaluation.htm>
>. Acesso em: maio de 2002.

X FURLAN, M. R. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 137 p. (Coleção Agroindústria ; n. 13).

GILBERT, B.; CASCON, V. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. , *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 7, p. 773-778, Dec. 2000.

GODINHO, O. E. S.; VASCONCELOS, A. F. F. de. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, nov./dez. 2002.

GOTTILIED, O. R.; MORS, W. B. Potential utilizationa of Brazilian nood extratives. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 28, n. 2, p. 196-215, Mar./Apr. 1980.

GRÜNWARD, J. The european phytoterapeutics market: figures, trends, analysis. *Drugs made in Germany*, v. 39, n. 1, p. 6-11, 1996.

/ HOSTETTMANN, K.; HAMBURGER, M. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, Oxford, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, Dec. 1991

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001. p. 461-480.

LANGENHEIM, J. H.; FEIBERT, E. B. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorfii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry*, Oxford, v. 27, n. 8, p. 2527-2532, Aug. 1988.

LIAO, J. C.; BARKOVICH, R. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metabolic Engineering*, San Diego, v. 3, n. 1, p. 27-39, Jan. 2001.

/ MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos

[REDACTED]

multidisciplinares. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, maio/jun. 2002.

MATOS, F. J. de A. **O Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC - Universidade Federal do Ceará, 1987. 113 p.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988. 128 p.

MESQUITA, J. B. **Estudos dos processos de obtenção e qualidade do óleo essencial de óleo copaiba (*Copaifera langsdorffii* Bent.)**. Monografia. 1989. (Monografia - Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. *Phytochemistry*, Oxford, v. 42, n. 6, p. 1653-1656, Aug. 1996.

MORS, W. **Plantas Medicinais**. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 14-19, nov./dez. 1982.

X NUNES, V. do A.; HARBER, L.; SILVA, S. P. da, BENTO, A.; VITA, A. de. **Enciclopédia de plantas brasileiras: a mais bela flora tropical do mundo**. São Paulo: Três, 1988. v. 2, p. 169.

X OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Oxford, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, Dec. 1994.

OLIVEIRA, A. F. de. **Estrutura genética de populações naturais de *C. langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. Dissertação de Mestrado. 2000. 114 p. Mestrado (Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. **Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats** *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 62, n. 1, p. 73-78, Aug. 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 2. ed. Washington: Harcourt Brace College Publishers, 1996. 511 p.

PHILLIPSON, J. D. **Phytochemistry and medicinal plants** *Phytochemistry*, Oxford, v. 53, n. 3, p. 237-243, Feb. 2000.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; REZENDE, C. M.; BRAGA, W. F. **Terpenoids from *Copaiba cearensis***. *Phytochemistry*, Oxford, v. 49, n. 1, p. 263-264, Jan. 1998.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA Jr., V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. **Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hidroxide impregnated silica gel**. *Journal Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 355-360, July/Auf. 2000.

PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. **O olhar dos primeiros cronistas da história do Brasil sobre a copaíba**. *Divisão de produtos naturais da sociedade brasileira de química*. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo6.htm>>. Acesso em: jan. 2003.

PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. **O gênero *Copaifera* L.** *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, mar./abr. 2002.

X RAO, V. S. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V. **The citotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin**. *Toxicon*, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, Aug. 2002.

/ ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnology**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p. 53.

↪ SALGADO, A. P. S. P. **Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus* (Dissertação de Mestrado)** 2001. *Disseertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

X SANTOS, R. I. **Dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao*

medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001. p. 333-364.

X SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001. p. 301-332.

SHRINER, R. L.; FUSON, R. C.; CURTIN, D. Y.; MORRIL, T. C. *Identificação sistemática dos compostos orgânicos: manual de laboratório*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara dois, 1983. 520 p.

SILVA, F. A. N.; MACHADO, J. da C.; LIMA, L. C. de O.; RESENDE, M. L. V. de. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, maio/jun. 2001.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, 1929. 1149 p.

/ SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 460p.

SPANEVELLO, R. A.; VILA, A. J. 7- α -acetoxylhardwickiic acid: a furanoid clerodane. *Phytochemistry*, Oxford, v. 35, n. 2, p. 537-538, Jan. 1994.

VAN DEN BERG, M. E. *Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Programa Trópico Úmido/MPEG. Museu Paraense Emílio Goeldi, 1987.

VEIGA JR, PATTUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle da autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 612-612, nov./dez. 1997.

X YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. *Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil*. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1 147-152, jan./fev. 2001.

X WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, Oxford, v. 53, n. 7, p. 747-757, Apr. 1999.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. 5. ed. London: The McGraw-Hill Companies, 1995. 329 p.

X ZANINI, A. C.; BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A.; FREITAS, P. C. D. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 22, n. 1, p. 101-109, Jan. 1988.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA DOS EXTRATOS HEXÂNICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DA *Copaifera langsdorffii* Desfon

RESUMO

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos hexânico e metanólico das folhas da *Copaifera Langsdorffii* Desfon. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/ Agroquímica e Agrobiotecnologia)*

Avaliou-se a fungitoxicidade dos extratos hexânico e metanólico da *Copaifera langsdorffii* Desf. por meio de ensaios biológicos, contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bipolaris sorokiniana*. Os referidos extratos foram escolhidos por apresentarem os melhores rendimentos na extração a frio. O material biológico foi obtido na UFLA, no Departamento de Fitopatologia, sendo repicado em meio de cultura, BDA (*C. gloeosporioides*) e PCA (*B. sorokiniana*) e incubados em câmara de germinação com controle de temperatura e luz. Empregaram-se cinco tratamentos (0/100/200/400/800 ppm), realizando-se três repetições e avaliando-se 4 raios, medidos em centímetros, a partir do micélio central. Os valores aferidos foram aplicados à fórmula do Índice de Crescimento Micelial (ICM) para as análises estatísticas. Observou-se que o extrato metanólico apresentou uma tendência à redução de 32%, contra o *B. sorokiniana*, ao passo que o hexânico foi eficaz para ambos os fitopatógenos, apresentando uma tendência à redução de 49% para o *B. sorokiniana* e 18% para o *C. gloeosporioides*.

* Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-orientador), Dr. Paulo Estevão de Souza - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

AMORIM, Ana Carolina Lourenço. Evaluation of antifungal activity of hexanic and metanolic extracts of the leaves of *Copaifera Langsdorffi* Desfon. LAVRAS: UFLA, 2003. 94p. (Dissertation – Master Degree in Agronomy/Agrochemistry and Agrobiochemistry)*

The fungitoxicity of hexane and methanol extracts of *Copaifera langsdorffi* Desf. were evaluated by biological tests against the phytopathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Bipolaris sorokiniana*. These extracts were chosen because they presented the highest yields in the extraction at room temperature. The biological material was obtained from the Department of Phytopathology of the UFLA, transplanted in BDA (*C. gloeosporioides*) and PCA (*B. sorokiniana*) culture media and incubated in a germination chamber with control of light and temperature. Five treatments (0/100/200/400/800 ppm) were used with three repetitions of each, and four mutually perpendicular radii, were measured in centimeters from the center micell. The formula for the Micelial Growth Index (MGI) was applied to the values obtained for statistical analyses. A 32% reduction in the growth of *B. sorokiniana* was observed in the presence of the methanol extract, while the hexane extract was effective against both of the phytopathogens, resulting in a 49% reduction in the growth of *B. sorokiniana* and an 18% reduction in the growth of *C. gloeosporioides*.

* Guidance Committee: Dra. Maria das Graças Cardoso (Adviser), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-Adviser), Dr. Paulo Estevão de Souza – UFLA (Co-Adviser).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Controle biológico

Com o desenvolvimento de microorganismos resistentes a substâncias químicas aplicadas indiscriminadamente em lavouras, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de buscar formas alternativas e seguras de controle agroquímico de pragas, sem causar danos ao meio ambiente e aos seres humanos, mantendo qualitativamente e quantitativamente a cultura.

→ (Considerando o aspecto econômico e a própria saúde humana, investigações a respeito da atividade biológica de extratos brutos de espécies vegetais medicinais ou do óleo essencial têm sido pesquisadas, podendo, inclusive, substituir com segurança, parcialmente ou completamente, os pesticidas, inseticidas e fungicidas.)

Zambolin & Vale (1985) consideram os fungos como os principais causadores de patologia de vegetais; portanto, também é de grande valia a realização não apenas de ensaios utilizando extratos ou óleos vegetais, mas também o conhecimento do mecanismo pelo qual o patógeno atinge a espécie.

De acordo com Cimanga e colaboradores (2002), diversas plantas medicinais têm revelado algumas atividades interessantes como, por exemplo, antibacterianas, antifúngicas e inseticidas, com diversos metabólitos secundários já isolados. Algumas classes de metabólitos secundários têm sido utilizadas para o controle biológico de fitopatógenos, como, por exemplo, os terpenóides, alcalóides, saponinas, aminas, amidas, ácidos graxos, cadeias longas de alquenos, compostos fenólicos, flavonóides, xantonas e benzoquinonas.

Vários trabalhos descrevem os sesquiterpenos, principalmente os lactônicos, extraídos de óleos essenciais, como metabólitos secundários que apresentam atividade fungitóxica reconhecida. Entre esses, cita-se a pesquisa de Harborne (1994), os quais confirmaram a ação fungitóxica dessas moléculas,

(*) Será que o termo seria esse?

demonstrando que 62% dos referidos metabólitos testados apresentam atividade inibitória parcial e que metade apresenta elevada atividade inibitória contra fungos patogênicos. Posteriormente, Wedge e colaboradores (1999) utilizaram 36 sesquiterpenos lactônicos naturais e sintéticos contra fungos fitopatogênicos, tais como o *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Phomopsis* sp., com resultados promissores.

A presença de espécies fúngicas patogênicas a vegetais de grande interesse econômico resulta em indesejável redução na qualidade e quantidade da produção vegetal. Para o combate desses agentes nocivos, utilizam-se substâncias químicas eficazes, se usadas de maneira racional, porém, quando exageradas, são prejudiciais ao homem. Conseqüentemente, como tentativa de minimizar a ação tóxica dessas substâncias, faz-se necessário encontrar maneiras alternativas para minimizar a ação desses patógenos por meio de um (controle biológico, utilizando compostos químicos extraídos de plantas.) ?

O uso racional de defensivos agrícolas apresenta em curto prazo grandes benefícios para o produtor; todavia, ao longo do tempo, além do surgimento de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas, as conseqüências para o meio ambiente e sociedade podem ser indesejáveis. Nesse contexto, atualmente tem sido desenvolvidas pesquisas voltadas para o controle alternativo de pragas, por meio de compostos químicos secundários presentes em extratos brutos ou óleo essenciais a partir de plantas medicinais nativas (Cimanga, et. al, 2001; Rizzati, 2002).

Na composição química das plantas medicinais, existem substâncias que podem atuar nas interações entre a espécie vegetal e o fitopatógeno, os metabólitos secundários, atuando como ativador do sistema defensor da planta hospedeira ou diretamente contra os patógenos fúngicos. Os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais com bioatividade contra fungos

geralmente apresentam caráter atóxico para humanos e animais, maior ação fungitóxica e menor fitotoxicidade quando comparados com os fungicidas sintéticos (Santos, 1996).

1.2 Espécies fúngicas

Entre variados patógenos fúngicos, destaca-se o gênero *Colletotrichum* sp., o segundo maior agente etiológico causador de doenças causadas por fungos na região de Lavras (Minas Gerais), com cerca de 10,5 % (Pozza, 1999). É um fitopatógeno com distribuição geográfica cosmopolita e atinge diversas famílias, principalmente fruteiras tropicais e subtropicais (Goes, 1995).

A podridão-peduncular, doença causada por variada quantidade de fungos, apresenta como principal agente causador de perdas em pós-colheita do mamão, o *C. gloeosporioides*, comprometendo a qualidade de frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) (Silva, 2001).

A espécie *C. gloeosporioides* é causador não só de podridão peduncular como também causa a antracnose nas folhas do mamoeiro e da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt), espécie de grande importância econômica para a Região Amazônica, em decorrência de ser utilizada para a produção de palmito e de produzir fruto comestível (Dickman, 1982; Veras & Yuyama, 2000).

Os sintomas provocados pela antracnose em frutos de mamoeiro causados por *C. gloeosporioides* são caracterizados inicialmente pelo aparecimento de áreas pequenas, aquosas, circulares e superficiais. Quando essas lesões estão presentes em grande número, podem reunir-se e formar extensas áreas de apodrecimento (Silva, 1988).

Além de ser causador de antracnose foliar, o *C. gloeosporioides* é causador da doença denominada de “queda do fruto jovem”, principalmente no gênero *Citrus* (Goes, 1995; Santos, 1996). O referido patógeno apresenta distribuição geográfica cosmopolita, podendo ser disseminado pelo vento e

chuva, apresentando conídios unicelulares, hialinos, ovóides a oblongos, com eventual coloração rósea ou salmão, quando massas de conídios são formadas. Apresenta como condições desfavoráveis de germinação baixa umidade, altas temperaturas e luz solar intensa (Dickman, 1982).

Outro fitopatógeno de grande importância é o *Bipolaris sorokiniana* ou *Helminthosporium sativum*, por incidir principalmente em culturas de trigo (*Triticum aestivum* L.) afetando os órgãos aéreos e radiculares e causando, conseqüentemente, a helmintosporiose ou mancha-marrom, sendo, portanto, um importante patógeno associado a sementes de trigo (Pessoa, 1993; Bach, 1997).

O *B. sorokiniana* é encontrado nas regiões tritícolas do País, tais como São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Distrito Federal (Braga, 1987, Forcelini, 1992; Pessoa, 1993). Apresenta esporos grandes, pesados, transportados pelo vento a distâncias relativamente curtas, permitindo, assim, o estabelecimento de novos focos de infecção no campo (Bergamin, 1995).

De acordo com Braga (1987), os sintomas iniciais da helmintosporiose provocados pelo *B. sorokiniana* são manchas foliares ovais de coloração castanho-escura a negra. As folhas severamente atingidas sofrem abscisão prematura, seus tecidos corticais e da bainha são afetados, resultando em uma coloração pardo-escura correspondendo os tecido necrosados, além disso, o sistema radicular é afetado, levando ao seu apodrecimento. Forcelini (1992) cita que lesões de hemintosporiose também podem ser encontradas nos nós e entrenós, causando em determinados casos o estrangulamento da área afetada, com conseqüente quebra e morte do vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Atividade fungitóxica

2.1.1 Espécie fúngica

Neste trabalho, utilizaram-se as espécies *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

2.1.2 Esterilização do material

Todo o material utilizado na repicagem, além dos meios de cultura, foi esterilizado em autoclave, durante 15 minutos, a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm, para evitar a contaminação com outros patógenos.

As placas de Petri, para sua total descontaminação, foram mantidas em um forno específico para esse material.

2.1.3 Repicagem das colônias

As espécies fúngicas utilizadas foram obtidas da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

As culturas foram repicadas a cada sete dias para obterem-se colônias novas. Para o crescimento micelial, os patógenos foram cultivados em meios de cultura específicos. Para o *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizou-se o BDA (batata, dextrose e ágar) e para o *Bipolaris sorokiniana*, o PCA (batata, cenoura e ágar). Os referidos meios de cultura foram escolhidos por promoverem a melhor produção de esporos para cada fitopatógeno.

Os patógenos foram cultivados em meio de cultura previamente fundidos, colocados em placas de Petri (processo realizado em câmara de fluxo laminar) e incubados em câmaras de germinação a uma temperatura de 20 a 22°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

2.1.4 Preparação das soluções-mãe

Os extratos brutos utilizados para a verificação da inibição fúngica foram o extrato metanólico e o hexânico, obtidos por meio da extração a frio, descrita no capítulo 1. Esses extratos foram escolhidos por apresentarem maior rendimento no processo de extração realizado. As concentrações testadas foram 100, 200, 400 e 800 ppm, comparando-se com a testemunha (0 ppm).

As soluções-mãe (soluções obtidas dos extratos e que foram aplicadas no meio de cultura) do extrato metanólico, foram solubilizadas em 10 mL de água destilada e autoclavada, ao passo que para o extrato hexânico, solubilizaram-se com 1 mL de propanona. Portanto, para a testemunha do extrato hexânico, adicionou-se ao meio de cultura a solução de propanona a 10%.

2.1.5 Avaliação do crescimento micelial

Para a montagem dos experimentos, foram inseridos discos miceliais de 4 mm de diâmetro no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura já solubilizado com a solução-mãe obtida dos extratos (hexânico e metanólico). As placas foram vedadas com auxílio de um filme plástico e incubadas em câmaras de germinação, à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas 3 repetições para cada concentração. Para a avaliação do crescimento, aferiram-se os 4 raios perpendiculares, medidos a partir do centro do halo micelial inicial, no segundo, quarto e sexto dia (Figura 37).

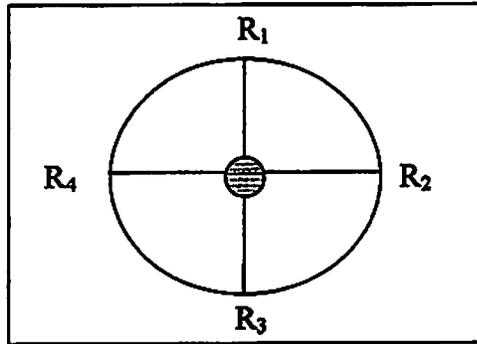


FIGURA 37: Raios concêntricos avaliados no crescimento micelial.

Os 20 tratamentos foram obtidos da combinação de dois extratos vegetais em cinco concentrações aplicadas em duas espécies de fungos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados obtidos foram transformados em Índice de Crescimento Micelial utilizando-se da fórmula modificada por Nacagava Maguire, adaptada por Oliveira (1991).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} \wedge + \frac{C_n}{N_n}$$

Em que:

ICM: Índice de Crescimento Micelial;

C₁, C₂, C_n: crescimento do micélio, no segundo, quarto e sexto dia;

N₁, N₂, N_n: número de dias.

Após transformados, os resultados foram submetidos às análises de variância e de regressão. Foram testados os efeitos linear, quadrático e cúbico do modelo polinomial [$Y = a + b x + b_1 x^2 + b_2 x^3$] e a raiz quadrada do modelo

polinomial, ou seja $[Y = a + b x^{0,5} + b_1 x + b_2 x^{1,5}]$. Foi selecionada, dentro de cada grupo de equações com o mesmo número de parâmetros estimados, aquela de efeito significativo pelo teste F a 5% de probabilidade, de significado biológico e de maior soma de quadrados, ou seja, maior R^2 , avaliando-se as médias do efeito qualitativo, espécies de fungos e tipos de extratos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios obtidos do Índice de Crescimento Micelial (I C M) das colônias das duas espécies de fungos submetidas a cinco concentrações dos extratos vegetais metanólico e hexânico encontram-se no Quadro 1.

TABELA 09: Resultados médios (médias de três repetições) do Índice de Crescimento Micelial de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.

Extratos	Conc	Fungos	ICM
Metanólico	0	<i>C. gloeosporioides</i>	1,76
Metanólico	100	<i>C. gloeosporioides</i>	1,69
Metanólico	200	<i>C. gloeosporioides</i>	1,64
Metanólico	400	<i>C. gloeosporioides</i>	1,65
Metanólico	800	<i>C. gloeosporioides</i>	1,74
Metanólico	0	<i>B. sorokiniana</i>	1,69
Metanólico	100	<i>B. sorokiniana</i>	1,63
Metanólico	200	<i>B. sorokiniana</i>	1,52
Metanólico	400	<i>B. sorokiniana</i>	1,51
Metanólico	800	<i>B. sorokiniana</i>	1,13
Hexânico	0	<i>C. gloeosporioides</i>	2,40
Hexânico	100	<i>C. gloeosporioides</i>	2,28
Hexânico	200	<i>C. gloeosporioides</i>	2,27
Hexânico	400	<i>C. gloeosporioides</i>	2,12
Hexânico	800	<i>C. gloeosporioides</i>	1,96
Hexânico	0	<i>B. sorokiniana</i>	2,13
Hexânico	100	<i>B. sorokiniana</i>	2,00
Hexânico	200	<i>B. sorokiniana</i>	1,82
Hexânico	400	<i>B. sorokiniana</i>	1,78
Hexânico	800	<i>B. sorokiniana</i>	1,12

Verifica-se na Tabela 09 que houve tendência inicial de redução e das médias do Índice de Crescimento Micelial (I C M) das colônias do fungo *C. gloesporioides* com o aumento das concentrações do extrato metanólico até a concentração de 200 ppm. Entretanto, para o fungo *B. sorokiniana*, houve a redução do ICM em todos os tratamentos. Utilizando-se o extrato hexânico, observou-se que com o aumento das concentrações, houve redução do ICM, nas duas espécies de fungos estudadas.

Os dados referentes à análise de variância dos resultados do ICM das duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos (hexânico e metanólico) apresentam-se dispostos no Anexo A.

Na Tabela 10, observa-se que não houve diferença significativa entre as médias do ICM obtidas com os extratos metanólico e hexânico na ausência de extrato (0 ppm) e nas concentrações de 100 e de 200 ppm; nas concentrações de 400 e de 800 ppm, as médias do ICM obtidas com o extrato hexânico foram significativamente inferiores às obtidas com o extrato metanólico.

TABELA 10: Resultados médios (médias de três repetições) do Índice de Crescimento Micelial para o *C. gloesporioides* submetido a quatro concentrações de dois extratos vegetais.

Extratos	Concentrações				
	0	100	200	400	800
Metanólico	1,76 a	1,69 a	1,64 a	1,65 a	1,74 a
Hexânico	1,69 a	1,63 a	1,52 a	1,51 b	1,13 b

Médias seguidas por uma mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

Observando-se a Tabela 11, pode-se inferir que as médias do ICM obtidas com o extrato metanólico foram significativamente superiores às obtidas com o extrato hexânico, para o fitopatígeno *B. sorokiniana*, nas cinco concentrações estudadas.

TABELA 11: Resultados médios (médias de três repetições) do Índice de Crescimento Micelial para o *B. sorokiniana* submetido a quatro concentrações de dois extratos vegetais.

Extratos	Concentrações				
	0	100	200	400	800
Metanólico	2,40 a	2,28 a	2,27 a	2,12 a	1,96 a
Hexânico	2,13 b	2,00 b	1,82 b	1,78 b	1,12 b

Médias seguidas por uma mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na Figura 35, observa-se que o aumento das concentrações do extrato metanólico ocasionou redução do ICM do fungo *B. sorokiniana* de 1,69 na ausência do extrato, para 1,13 na concentração de 800 ppm, ou seja, houve redução de 32% do ICM. Entretanto, para o fungo *C. gloesporioides*, o ICM passou de 1,76 na ausência do extrato, para um valor mínimo de 1,64 na concentração de 200 ppm do extrato, aumentando, em seguida, para 1,73 ICM na concentração 800 ppm do extrato metanólico. Por outro lado, o aumento das concentrações do extrato hexânico ocasionou redução do ICM nas duas espécies de fungos. Houve reduções de 18% (2,4 para 1,96) para o fungo *C. gloesporioides* e de 49% (2,13 para 1,12) para o fungo *B. sorokiniana*, quando se aumentou a concentração do extrato hexânico de zero para 800 ppm (Figura 36).

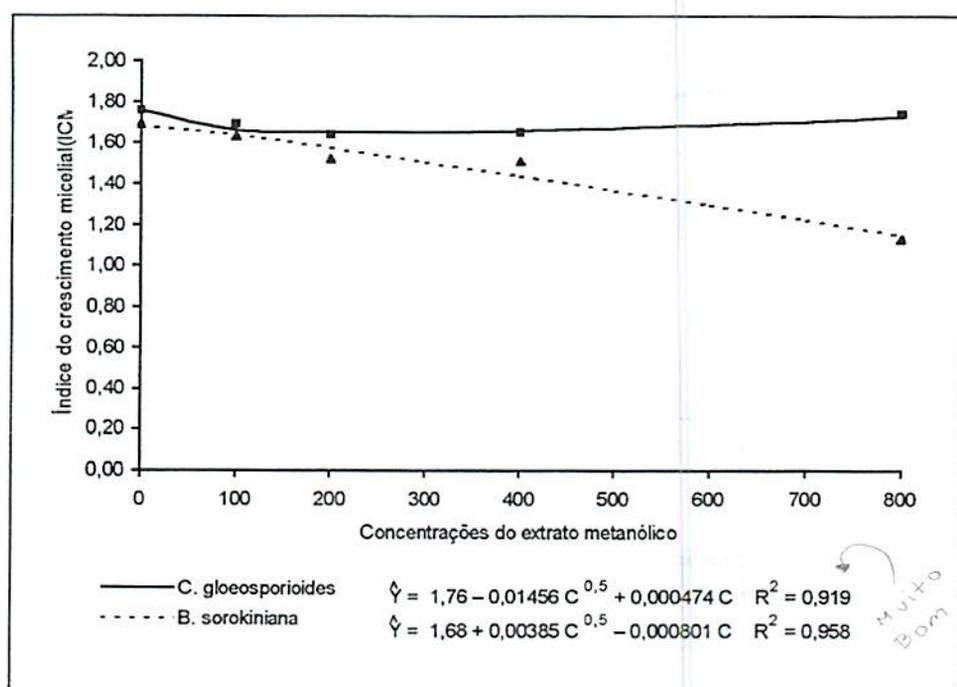


FIGURA 38: Efeito das concentrações do extrato metanólico no índice de crescimento micelial de das espécies fúngicas.

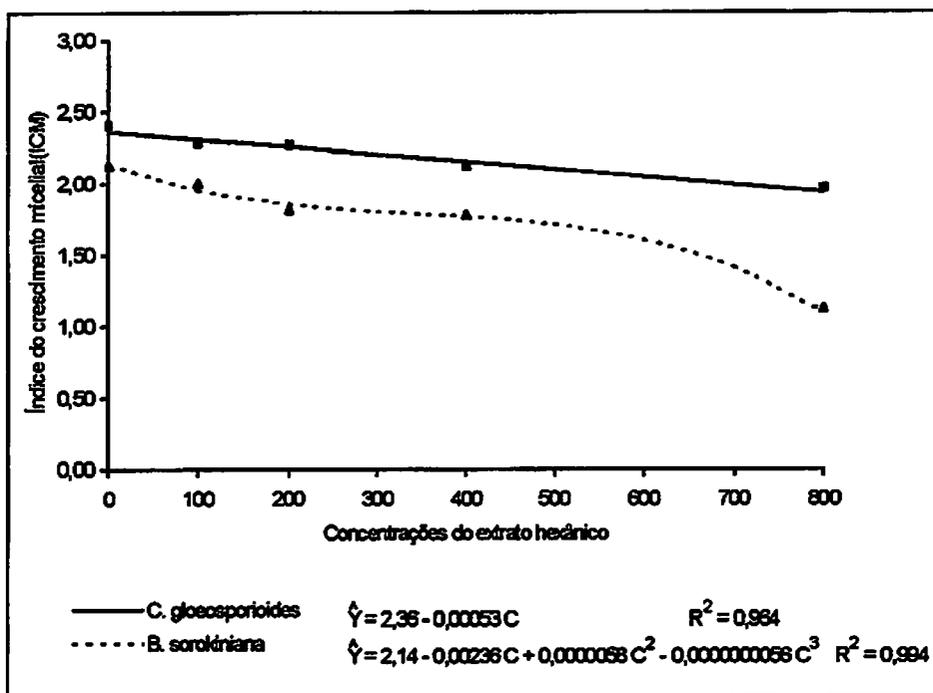


FIGURA 39: Efeito das concentrações do extrato hexânico no índice de crescimento micelial de das espécies fúngicas.

Comparando-se as figuras 35 e 36, observa-se uma inibição superior para ambos os fungos, utilizando-se o extrato hexânico. Sabe-se que o hexano extrai preferencialmente resinas, óleos e ceras; e portanto, algumas dessas classes de metabólitos podem ser responsáveis pela ação inibitória. Uma pesquisa publicada por Diniz (1996) avaliou a ação fungitóxico do bálsamo de copaíba contra os patógenos *Fusarium moniliforme* e *Alternaria* sp. confirmando uma drástica redução no desenvolvimento dos esporos desses fitopatógenos. O referido autor também verificou que o óleo de copaíba promoveu modificações na pigmentação natural dos fungos, sugerindo uma ação em seu metabolismo secundário. Assim, infere-se que o mesmo esteja ocorrendo

nos ensaios biológicos realizados com o *Bipolaris sorokiniana*. (Figura 40A e 40B) e com *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 41A e 41B).

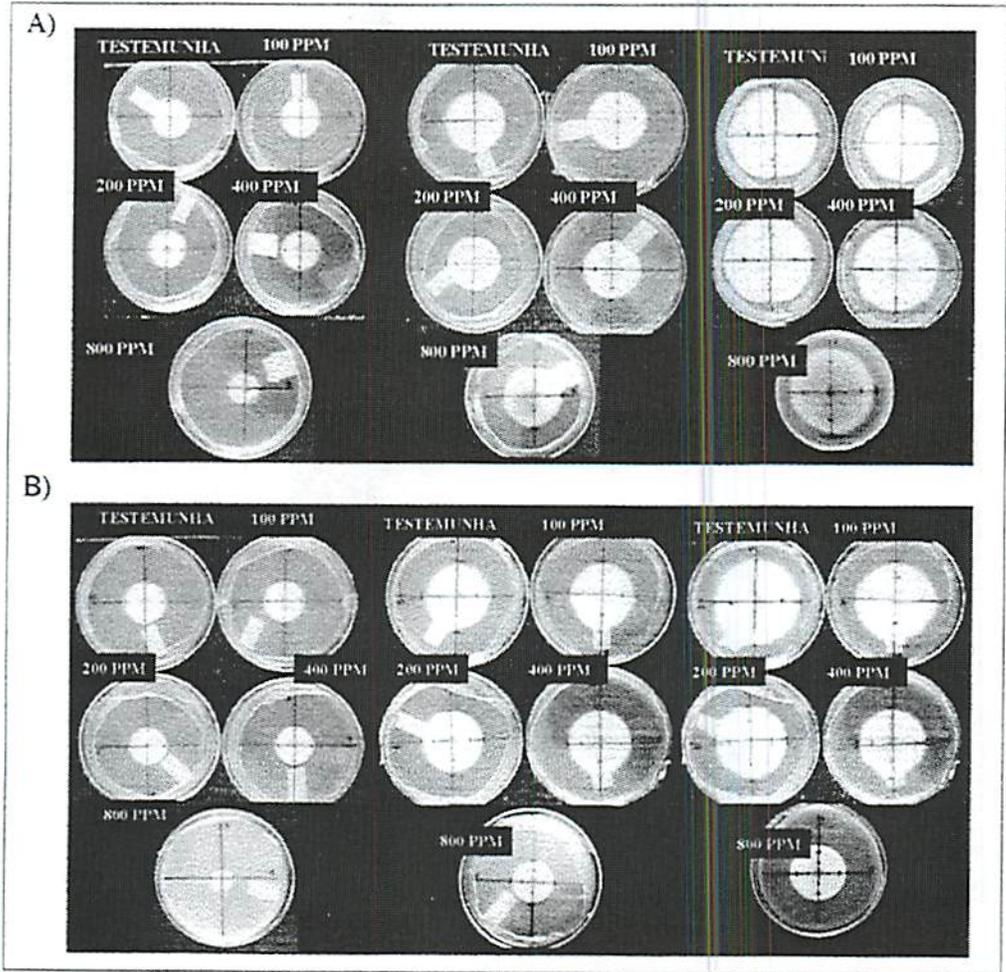


FIGURA 40: A) Crescimento micelial do *C. gloeosporioides* no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato metanólico B) Crescimento micelial do *C. gloeosporioides* no 2º, 4º e 6º, dia utilizando-se o extrato hexânico.

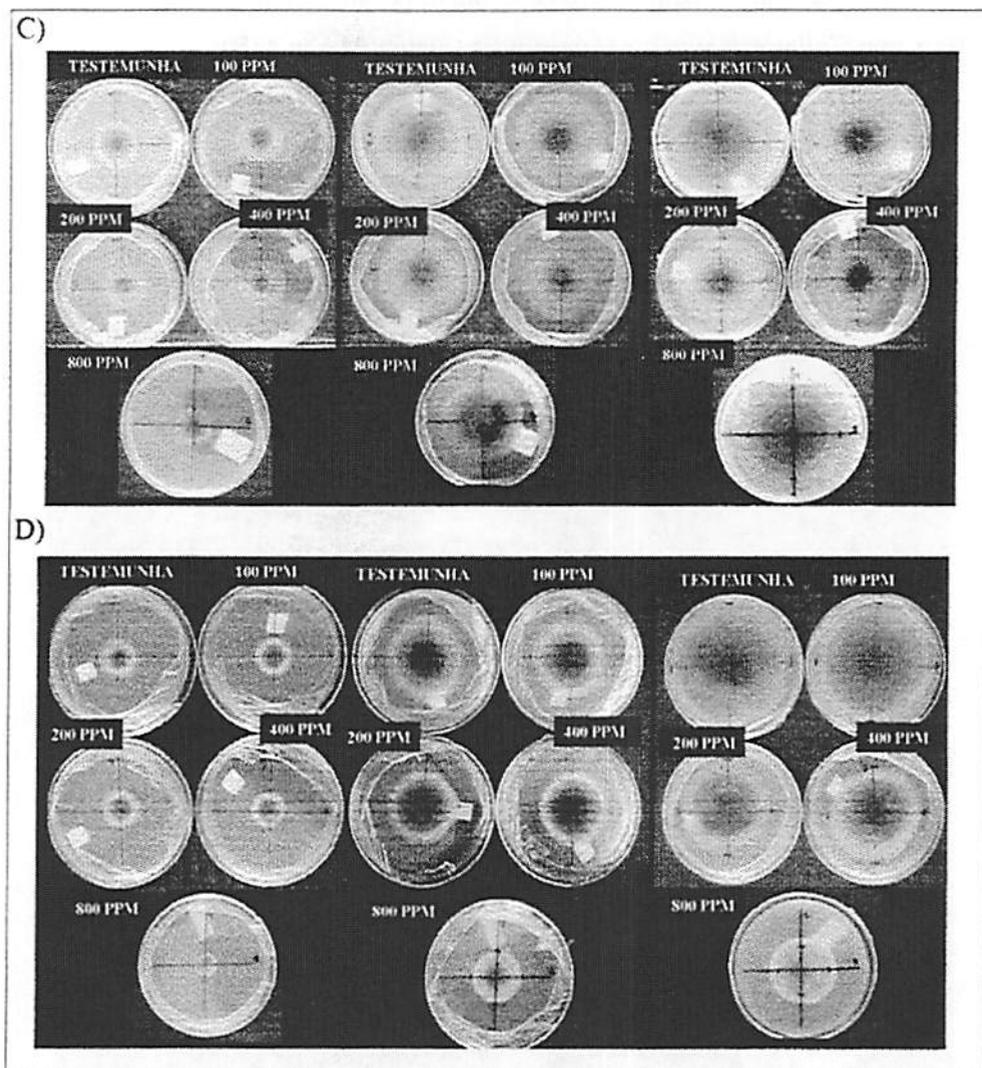


FIGURA 41: A) Crescimento micelial do *C. gloeosporioides* no 2º, 4º e 5º dia utilizando-se o extrato metanólico B) Crescimento micelial do *C. gloeosporioides* no 2º, 4º e 6º dia utilizando-se o extrato hexânico.

4 CONCLUSÕES

- O extrato hexânico, na concentração de 0 a 800 ppm, promoveu a inibição de 18% do ICM para o fungo *C. gloeosporioides* e de 49% para o *B. sorokiniana*.
- O extrato metanólico, na concentração de 0 a 800 ppm, promoveu a inibição de 32% do ICM do *B. sorokiniana*. Quanto ao *C. gloeosporioides*, houve redução do ICM de 1,76 para 1,64, de 0 a 200 ppm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACH, E. E. Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris spp.* e *Drechslera tritici-repentis* do trigo; aspectos bioquímicos das interações e indução da resistência. 1997. 150 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. v. 1, 919 p.

BRAGA, J. B. Variação de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorok.) Shoem. Associado a sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) procedentes de algumas áreas do estado de Minas Gerais. 1987. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T. De; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 79, n. 2, p. 213-220, Feb. 2001.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification, characterization, and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. *Physiological and Plant Pathology*, London, v. 20, n. 3, p. 333-347, 1982.

DINIZ, S. P. S. S.; LOZANO, V.; REZENDE, D.; TONA, N.; SOUZA, L. S. Ação do bálsamo de copaíba no controle do desenvolvimento de *Fusarium moliniforme* e *Alternaria sp.* *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21 ago, 1996. Suplemento.

FORCELINI, C. A. Incidência, transmissão e controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. 1992. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

GOES, A. de. Queda prematura dos frutos cítrico: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. [SENSU ARX, 1957], e controle da doença. 1995. 143 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HARBONE, J. B. Plant phenolics In: MANN, J.; DAVISON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBONE, J. B. (ed). Natural products: their chemistry and biological significance. Essex: Longman, 1994.

OLIVEIRA, J. A. Efeito de tratamento fungicida em sementes e no controle de tombameto de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum anannum* L.). 1991. 11 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PESSOA, M. N. G. Controle biológico de *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex Sorok. em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). 1993. 134 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E. de; CASTRO, H. A. de. Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras-MG. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1001-1005, out./dez. 1999.

RIZZATI, M. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. de S.; STANGARLIN, J. R. Efeito do extrato bruto de *Achillea millefolium* (Mil-folhas) e de *Artemisia absinthium* (Losna) em *Alternaria* spp. In: SIMPÓSIO: A BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA BRASILEIRA, PRESENTE E FUTURO, 2002, Maringá-PR.

SANTOS, M. M. F. B. dos. Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), isolado de *Citrus* sp. 1996. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SILVA, F. A. N.; MACHADO, J. da C.; LIMA, L. C. de O.; RESENDE, M. L. V. de. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, maio/jun. 2001.

SILVA, T. M. W. Tratamento térmico e radiação gama no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* [PENZ.] PENZ. Et Sacc., agente causal da Antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). 1988. 155 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

VÉRAS, S. M.; YUYAMA, K. Severidade de doenças foliares da pupunheira em diferentes períodos climáticos, níveis de adubação e espaçamentos. *Fitopatologia Brasileira*, Belém, v. 25, p. 433, ago. 2000. Suplemento.

WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, Oxford, v. 53, n. 7, p. 747-757, Apr. 1999.

ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R. do. Perdas ocasionadas pelas doenças de plantas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, n. 131, p. 56-64, nov. 1985.

ANEXOS

ANEXO A.....	92
TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM) de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.....	92
TABELA 2A - Resumo das análises de variância e da regressão dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM), de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.....	93

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM) de duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.

F.V.	G.L.	ICM
Extratos (EXT)	1	1,504167**
Concentrações (CO)	4	0,439994**
Fungos (FU)	1	2,343666**
EXT X CO	4	0,162855**
EXT X FU	1	0,210535**
CO X FU	4	0,086206**
EXT X CO X FU	4	0,002310ns
Resíduo	40	0,006141
C. V. %		2,71

** : significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

ns : não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 2A - Resumo das análises de variância e de regressão dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM) duas espécies fúngicas submetidas a cinco concentrações de dois extratos vegetais.

F.V.	G.L.	ICM	R ²
Extrato metanólico			
Concentrações/Colletotrichum gloeosporioides			
	4	0,007976	
Modelo Polinomial			
Linear	1	0,000153ns	0,005
Quadrático	1	0,029145 *	0,918
Cúbico	1	0,002506ns	0,997
Desvio	1	0,000102ns	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	0,001829ns	0,057
Linear	1	0,027493 *	0,919
Raiz quadrado cúbica	1	0,001987ns	0,981
Desvio	1	0,000596ns	
Concentrações/Bipolaris sorokiniana			
	4	0,144757	
Modelo Polinomial			
Linear	1	0,552672**	0,954
Quadrático	1	0,009262ns	0,970
Cúbico	1	0,012718ns	0,992
Desvio	1	0,004375ns	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	0,476331**	0,823
Linear	1	0,078382**	0,958
Raiz quadrado cúbica	1	0,012745ns	0,980
Desvio	1	0,011569ns	
Extrato hexânico			
Concentrações/Colletotrichum gloeosporioides			
	4	0,085905	
Modelo Polinomial			
Linear	1	0,331407**	0,964
Quadrático	1	0,005357ns	0,980
Cúbico	1	0,000060ns	0,981
Desvio	1	0,006799ns	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	0,326684**	0,951
Linear	1	0,011345ns	0,984
Raiz quadrado cúbica	1	0,000006ns	0,985
Desvio	1	0,005587ns	
Modelo Polinomial			

Continua...

Tabela 2A, Cont.

Concentrações/Bipolaris sorokiniana	4	0,452727	
Modelo Polinomial			
Linear	1	1,737513**	0,960
Quadrático	1	0,021147ns	0,971
Cúbico	1	0,042028 *	0,994
Desvio	1	0,010219ns	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	1,518643**	0,839
Linear	1	0,221690**	0,961
Raiz quadrado cúbica	1	0,039088 *	0,983
Desvio	1	0,031485 *	
Fungo Colletotrichum gloeosporioides			
Extratos / concentração 0	1	0,006528ns	
Extratos / concentração 100	1	0,004983ns	
Extratos / concentração 200	1	0,020417ns	
Extratos / concentração 400	1	0,029810 *	
Extratos / concentração 800	1	0,557642**	
Fungo Bipolaris sorokiniana			
Extratos / concentração 0	1	0,111157**	
Extratos / concentração 100	1	0,114011**	
Extratos / concentração 200	1	0,304688**	
Extratos / concentração 400	1	0,172269**	
Extratos / concentração 800	1	1,053855**	
Extrato metanólico			
Fungos / concentração 0	1	0,624306**	
Fungos / concentração 100	1	0,523872**	
Fungos / concentração 200	1	0,600348**	
Fungos / concentração 400	1	0,337449**	
Fungos / concentração 800	1	0,076407**	
Extrato hexânico			
Fungos / concentração 0	1	0,288935**	
Fungos / concentração 100	1	0,208600**	
Fungos / concentração 200	1	0,133753**	
Fungos / concentração 400	1	0,114586**	
Fungos / concentração 800	1	0,000016ns	
Resíduo	40	0,006141	

** e * significativo a 1% e a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

ns = não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.