

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Guarea
convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (VOLÁTEIS) E *G. humaitensis*
(FIXOS E VOLÁTEIS) E ATIVIDADE SOBRE *Aedes aegypti*

LYEGE AMAZONAS MACIEL MAGALHÃES

MANAUS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LYEGE AMAZONAS MACIEL MAGALHÃES

AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Guarea
convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (VOLÁTEIS) E *G. humaitensis*
(FIXOS E VOLÁTEIS) E ATIVIDADE SOBRE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração em Química Orgânica.

Orientadora: Dra. Maria da Paz Lima
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MANAUS
2009

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

M188a Magalhães, Lyege Amazonas Maciel

Avaliação dos constituintes químicos de *Guarea convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (voláteis) e *G. humaitensis* (fixos e voláteis) e atividade sobre *Aedes aegypti* / Lyege Amazonas Maciel Magalhães. - Manaus, AM : UFAM, 2010.

120 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Química. Área de concentração: Química orgânica). Universidade Federal do Amazonas. Orientadora: Profa Dra. Maria da Paz Lima.

1. Meliaceae - Composição 2. Essências e óleos essenciais 3. *Aedes aegypti* – Controle I. Lima, Maria da Paz (Orient.) II. Título

CDU (2007): 582.746.41:547.913(043.3)

LYEGE AMAZONAS MACIEL MAGALHÃES

AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Guarea
convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (VOLÁTEIS) E *G. humaitensis*
(FIXOS E VOLÁTEIS) E ATIVIDADE SOBRE *Aedes aegypti*

Aprovado em 21 de dezembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Dra Maria da Paz Lima, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dr. Pierre Alexandre dos Santos, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dedico este trabalho à razão e grande amor da minha vida,

Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

A *Jesus Cristo*, meu Amado Redentor

Aos meus pais Cleber e Marli pelo amor e apoio dedicados

À minha torcida organizada oficial: meu irmão Luciano, cunhada Jammily e sobrinha Ju, pelo amor

Ao Eduardo pelo amor e companheirismo dispensados

À minha orientadora, Dra Maria da Paz Lima, exemplo de integridade profissional, pela orientação e ensinamentos

Às minhas amigas inseparáveis Darlene e Loretta pela bela amizade durante todos esses anos

Aos amigos de laboratório William, Mauro, Aline, Elaine, Ariane, Marla e Isadora, pelo excelente convívio e pela ajuda oferecida sempre que necessário

Ao Dr Antonio Gilberto Ferreira pela obtenção dos espectros de RMN

À Dra Márcia Ortiz e Dra Roselaine Facanali pela colaboração na análise dos óleos essenciais

À Dra. Ana Cristina pelo ensaios com *Aedes aegypti*

Aos professores do Curso de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas pelos valiosos ensinamentos

À Dra Maria Lúcia Belém Pinheiro e Dr. Pierre Alexandre dos Santos, pelas orientações para a melhoria deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

Palavras-chave: limonóide mexicanolídeo, 2-desoxigrandifolídeo A, *Guarea*, óleo essencial, *Aedes aegypti*

A família Meliaceae tem ocorrência pantropical e compreende cerca de 700 espécies distribuídas em 50 gêneros. Os principais metabólitos secundários da família são limonóides, terpenóides, esteróides e flavonóides. O gênero *Guarea* compreende cerca de 50 espécies encontradas na América tropical e na África cujos estudos sobre os constituintes químicos são restritos a cerca de 10 espécies, onde foram identificados principalmente sesqui, di e triterpenos e limonóides. Este trabalho visou avaliar os constituintes químicos de *Guarea convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (voláteis) e *G. humaitensis* (voláteis e fixos) e a atividade sobre *Aedes aegypti*, principal espécie transmissora da dengue. Assim, amostras vegetais coletadas na Reserva Ducke foram submetidas a hidrodestilação para obtenção de óleos essenciais e/ou macerados para obtenção de extratos orgânicos. Os óleos essenciais obtidos mostraram a predominância de sesquiterpenos. Nos galhos de *G. convergens* os majoritários foram α -santaleno (26,26%), α -copaeno (14,61%), drima-7,9(11)-diene (6,85%) e β -santaleno (6,32%), e no óleo dos galhos de *G. humaitensis* predominaram o epóxido de cariofileno (40,91%), epóxido de humuleno II (14,43%) e β -bisaboleno (8,36%). Em folhas de *G. scabra*, os componentes majoritários foram *cis*-cariofileno (33,37%) e α -*trans*-bergamotemo (11,88%) e *G. silvatica* epóxido de cariofileno (36,54% folhas; 8,57% galhos), espatulenol (14,34% galhos e 4,17% folhas) e β -elemeno (6,20% folhas), além do diterpeno kaureno em folhas (15,61%). O estudo fitoquímico dos extratos de folhas e galhos de *G. humaitensis* conduziu a obtenção de uma mistura dos sesquiterpenos epóxido de cariofileno e epóxido de humuleno II, mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol, um novo limonóide do tipo mexicanolídeo, 2-desoxigrandifolídeo A, a cumarina escopoletina e o triterpeno cicloar-23-en-3 β ,25-diol. Dentre os óleos essenciais testados frente às larvas de *A. aegypti*, o óleo dos galhos de *G. humaitensis* apresentou a maior atividade larvicida (CL₅₀= 49,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

ABSTRACTS

Key words: limonoid mexicanolide, 2-deoxygrandifolide A, *Guarea*, essential oil, *Aedes aegypti*

The Meliaceae family has pantropical occurrence and include around 700 species distributed in 50 genus. The main secondary metabolites of the family are limonoids, terpenoids, steroids and flavonoids. The *Guarea* genus found in Tropical America and Africa contains about 50 species, of which around 10 species have chemical studies. The studies showed that sesqui-, di-, triterpenes and limonoids are the main constituents. This work aimed to evaluate the chemical constituents of *Guarea convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (volatile) and *G. humaitensis* (volatile and non-volatile) and the activity against *Aedes aegypti*, the main species transmitter of the dengue. In this manner, vegetal samples collected in the Ducke Reserve were submitted to hydrodistillation to obtain essential oil and/or macerated to obtain the organic extract. The essential oils obtained showed the predominance of sesquiterpenes. In the branches of *G. convergens* the majority components were α -santalene (26.26%), α -copaene (14.61%), drim-7,9 (11)-diene (6.85%) and β -santalene (6.32%), and in the oil of *G. humaitensis* branches predominated the caryophyllene epoxide (40.91%), humulene epoxide II (14.43%) and β -bisabolene (8.36%). In leaves of *G. scabra*, the majority components were *cis*-caryophyllene (33.37%) and α -trans-bergamotene (11.88%), and in *G. silvatica*, caryophyllene epoxide (36.54% leaves; 8.57% branches), espatulenol (14.34% branches and 4.17% leaves) and β -elemene (6.20% leaves), further the kaurene diterpene in leaves (15.61%). The phytochemical study of extracts of leaves and branches of *G. humaitensis* lead to obtaining a mixture of sesquiterpenes caryophyllene epoxide and humulene epoxide II, mixture of steroids β -sitosterol and stigmasterol, a new limonoid of the mexicanolide type, 2-deoxygrandifolide A, the coumarin scopoletin and the triterpene cycloart-23-ene-3 β ,25-diol. Among essential oils tested against the larvae of *A. aegypti*, the oil of the *G. humaitensis* branches presented the best larvicidal activity (49,0 CL₅₀= $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação morfológica da família Meliaceae segundo PENNINGTON; STYLES (1975)	17
Tabela 2. Principais constituintes dos óleos essenciais de <i>Guarea</i>	21
Tabela 3. Ocorrência de <i>Guarea convergens</i> , <i>G. humaitensis</i> , <i>G. scabra</i> e <i>G. silvatica</i>	30
Tabela 4. Rendimento (%) dos óleos essenciais de <i>G. convergens</i> , <i>G. humaitensis</i> , <i>G. scabra</i> e <i>G. silvatica</i>	58
Tabela 5. Número de constituintes identificados nos óleos de <i>G. convergens</i> , <i>G. humaitensis</i> , <i>G. scabra</i> e <i>G. silvatica</i>	58
Tabela 6. Composição química do óleo essencial dos galhos de <i>G. convergens</i>	59
Tabela 7. Composição química do óleo essencial dos galhos de <i>G. humaitensis</i>	61
Tabela 8. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>G. scabra</i>	63
Tabela 9. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>G. silvatica</i>	65
Tabela 10. Composição química do óleo essencial dos galhos de <i>G. silvatica</i>	66
Tabela 11. RMN de ^{13}C dos sesquiterpenos 1a e 1b	73
Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 3 e comparação com a literatura	80
Tabela 13. Dados de HSQC e HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) da substância 03	81
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H da substância 4 e comparação com a literatura	89
Tabela 15. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 5 e comparação com a literatura	94
Tabela 16. Dados de HSQC e HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) da substância 5	95
Tabela 17. Mortalidade (%) provocada em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da família Meliaceae	18
Figura 2. Propagação geográfica da dengue e da dengue hemorrágica	32
Figura 3. Sistema de Clevenger	40
Figura 4 . Ampolas com óleos essenciais	40
Figura 5. Galhos e folhas de <i>Guarea humaitensis</i>	42
Figura 6. Frasco Mariote	42
Figura 7. Evaporador rotativo	42
Figura 8. Incubação dos ovos de <i>Aedes aegypti</i>	54
Figura 9. Larvas de <i>Aedes aegypti</i> no 3º estágio	54
Figura 10. Ensaio larvicida dos óleos essenciais contra <i>Aedes aegypti</i>	55
Figura 11. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de <i>G. convergens</i>	60
Figura 12. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de <i>G. humaitensis</i>	62
Figura 13. Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>G. scabra</i>	64
Figura 14. Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>G. silvatica</i>	65
Figura 15. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de <i>G. silvatica</i>	67
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H de 1a e 1b (400 MHz, CDCl ₃)	74
Figura 17. Espectro de RMN ¹³ C de 1a e 1b (100 MHz, CDCl ₃)	75
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H de 2a e 2b (400 MHz, CDCl ₃)	77

Figura 19. Espectro de RMN ^1H da substância 3 (400 MHz, CDCl_3)	82
Figura 20. Expansão da região δ 3,0 a 0,7 do espectro de RMN ^1H da substância 3	83
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C da substância 3 (100 MHz, CDCl_3)	84
Figura 22. Espectro de COSY da substância 3	85
Figura 23. Espectro de HSQC da substância 3	86
Figura 24. Espectro de HMBC da substância 3	87
Figura 25. Expansão da região δ 3,0 a 0,6 do espectro de HMBC da substância 3	88
Figura 26. Espectro de RMN ^1H da substância 4 (400 MHz, CDCl_3)	90
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C da substância 4 (100 MHz, CDCl_3)	91
Figura 28. Espectro de RMN ^1H da substância 5 (400 MHz, CDCl_3)	97
Figura 29. Expansão da região δ 2,3 a 0,3 do espectro de RMN ^1H da substância 5	98
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 (100 MHz, CDCl_3)	99
Figura 31. Espectro de COSY da substância 5 (CDCl_3)	100
Figura 32. Espectro de HSQC da substância 5 (CDCl_3)	101
Figura 33. Expansão da região δ 2,3 a 0,3 do espectro de HSQC da substância 5	102
Figura 34. Espectro de HMBC da substância 5 (CDCl_3)	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sesquiterpenos isolados em <i>Guarea</i>	22
Quadro 2. Diterpenos isolados em <i>Guarea</i>	24
Quadro 3. Triterpenos isolados em <i>Guarea</i>	26
Quadro 4. Limonóides isolados em <i>Guarea</i>	27
Quadro 5. Protolimonóides isolados em <i>Guarea</i>	28
Quadro 6. Outros metabólitos isolados em <i>Guarea</i>	29
Quadro 7. Principais sesquiterpenos identificados nos óleos de <i>G. convergens</i> , <i>G. humaitensis</i> , <i>G. scabra</i> e <i>G. silvatica</i> com tipo de esqueleto e parte da planta	68

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção dos extratos brutos de <i>Guarea humaitensis</i>	43
Esquema 2. Coluna cromatográfica do extrato GHG - 2	44
Esquema 3. Coluna cromatográfica de GHG -2. 10	45
Esquema 4. Coluna cromatográfica de GHG - 2.10.11	46
Esquema 5. Coluna cromatográfica de GHG - 2.11	47
Esquema 6. Coluna cromatográfica de GHG - 2.12	48
Esquema 7. Coluna cromatográfica de GHG - 2. 18	49
Esquema 8. Coluna cromatográfica do extrato GHG - 3	50
Esquema 9. Coluna cromatográfica de GHG - 3.21	51
Esquema 10. Coluna cromatográfica do extrato GHF-1	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número anual médio de dengue e dengue hemorrágica reportado à OMS e o número anual médio de países que reportaram a dengue	32
Gráfico 2. Taxa de incidência de dengue no Brasil e em grandes regiões (1990-2008)	33
Gráfico 3. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GCG	105
Gráfico 4. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GHG	106
Gráfico 5. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GScF	106
Gráfico 6. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GSF	107
Gráfico 7. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GSG	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt:	Acetato de etila
CC:	Cromatografia em Coluna
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM:	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY:	Correlation Spectroscopy
<i>d</i> :	Dubleto
<i>dd</i> :	Duplo dubleto
eV:	Elétron volts
Fr.	Fração
h:	Altura
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC:	Heteronuclear Spectroscopy Quantum Correlation
IR:	Índice de retenção
<i>J</i> :	Constante de Acoplamento
m:	Multiplete
MeOH:	Metanol
min:	Minuto
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
°C:	Grau Celcius
RMN ¹ H:	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C:	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
s:	Singleto
sl:	Singleto largo
t:	Triplete
δ:	Deslocamento químico em parte por milhão
μL:	Microlitro
μm:	Micrômetro
Φ:	Diâmetro

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 A Família Meliaceae	17
1.2. O gênero <i>Guarea</i>	20
1.3. <i>Guarea convergens</i> , <i>G. humaitensis</i> , <i>G. scabra</i> e <i>G. silvatica</i>	30
1.4. Importância na busca constituintes químicos em espécies de Meliaceae para controle de <i>Aedes aegypti</i>	31
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3.PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
3.1. Materiais	39
3.2. Equipamentos	39
3.3. Material vegetal	39
3.3.1. Coleta e identificação	39
3.3.2. Obtenção dos óleos essenciais	40
3.3.3. Obtenção e fracionamento dos extratos de <i>Guarea humaitensis</i>	42
3.4. Ensaio larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i>	54

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Óleos essenciais	57
4.2. Identificação das substâncias isoladas dos extratos de <i>Guarea humaitensis</i>	72
4.3. Ensaio larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i>	104
5. CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1. Introdução

1.1 A Família Meliaceae

A família Meliaceae, de ocorrência pantropical (Figura 1), compreende cerca de 50 gêneros e 700 espécies. De acordo com PENNINGTON; STYLES (1975) a família está dividida nas subfamílias Melioideae, Quivisianthoideae, Cupuronianthoideae e Swietenioideae, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Classificação morfológica da família Meliaceae segundo PENNINGTON; STYLES (1975)

Subfamílias	Tribos	Gêneros
Melioideae	Turraeae	<i>Munronia, Naregamia, Turraea, Humbertiuturraea, Calodecarya, Nymania</i>
	Meliae	<i>Melia, Azadirachta</i>
	Vavaeae	<i>Vavaea</i>
	Trichilieae	<i>Trichilia, Pseudobersama, Pterorhachis, Walsura, Lepdorichilia, Malleastrum, Ekebergia, Astrotrichilia, Owenia, Cipadessa</i>
	Aglaieae	<i>Aglaia, Lansium, Aphanamixis, Reinwardtiodendron, Sphaerosacme</i>
	Guareeae	<i>Heckeldora, Cabralea, Ruagea, Turraeanthus, Guarea, Chisocheton, Megahphyllaea, Synoum, Anthocarapa, Pseudocarapa, Dysoxylum</i>
	Sandoriceae	<i>Sandoricum</i>
Swietenioideae	Cedreleae	<i>Cedrela, Toona</i>
	Swietenieae	<i>Kaya, Neobeguea, Soymida, Entandrophragma, Chukrasia, Pseudocedrela, Schumardaea, Swietenia, Loooa</i>
	Xylocarpeae	<i>Carapa, Xylocarpus</i>
Quivisianthoideae		<i>Quivisianthe</i>
Cupuronianthoideae		<i>Cupuronianthus</i>

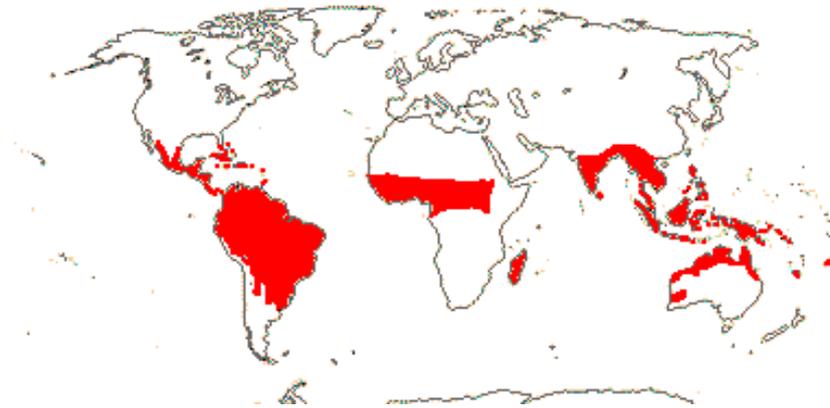


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da família Meliaceae

No Brasil ocorrem seis gêneros - *Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia* (PENNINGTON; STYLES, 1981). Na Reserva Florestal Adolfo Ducke (Km 26, AM - 010), ocorrem 23 espécies de Meliaceae, pertencentes aos gêneros *Carapa* (1 espécie), *Guarea* (12 espécies) e *Trichilia* (10 espécies), além de duas espécies que foram introduzidas, *Cedrela fissilis* e *Swietenia cf. macrophylla* (SOUZA; PENNINGTON, 1999).

O herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) registra cerca de 30 espécies do gênero *Guarea* que ocorrem no estado do Amazonas, sendo as espécies *G. silvatica*, *G. kunthiana* e *G. guidonia*, as mais encontradas.

Importância econômica e características químicas e biológicas de Meliaceae

Algumas espécies pertencentes à família Meliaceae são utilizadas na obtenção de madeiras de alta qualidade como o cedro (*Cedrela fissilis*), o mogno (*Swietenia* cf. *macrophylla*) e a andiroba (*Carapa guianensis*). A madeira de andiroba é utilizada para fabricação de móveis, construção civil, lâminas e compensado e as sementes para extração de óleo que tem sido comercializado para outras regiões do país e do mundo, principalmente para a Europa e para os Estados Unidos.

No Brasil, o óleo de andiroba e seus subprodutos, como sabonetes e velas, são geralmente encontrados em feiras livres (GONÇALVES, 2001), sendo que na Região Amazônica o óleo é utilizado como repelente de insetos e por suas atividades antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica, e as velas no combate aos mosquitos transmissores da dengue e malária (GRAHAM, 2000; PINTO, 1963; FERRAZ et al., 2002). Devido a ação antiinflamatória apresentada pelo óleo de andiroba, as indústrias farmacêuticas e cosméticas também têm mostrado um grande interesse por esse produto (PENIDO et al., 2006).

Certas espécies de *Cedrela*, *Guarea*, *Swietenia* e *Trichilia* são importantes em planos de manejo florestal uma vez que os brotos foliares e resinas exsudadas das mesmas fazem parte da dieta alimentar de *Cebuella pygmaea*, um grupo de primatas da família Callitrichidae (SOUZA; PENNINGTON, 1999).

Na família Meliaceae, os principais metabólitos secundários relatados pela literatura são limonóides, protolimonóides, terpenóides, esteróides, flavonóides e cumarinas (AMBROZIN et al., 2006; PUPO et al., 2002; CAMPOS et al., 1991; YIN et al., 2009; CHEN et al., 2009; CONOLLY, 1983; CHAMPAGNE, 1992). Entre esses metabólitos os limonóides destacam-se pela gama de atividades biológicas, principalmente como inseticida, pela ação antialimentar e reguladora do crescimento em insetos (CHAMPAGNE et al., 1992). Outras atividades reportadas são antimicrobiana (ROY et al., 2006), antimalárica (KAYSER et al.,

2003) e anticâncer (MIYAGI et al., 2000). As pesquisas realizadas com a avaliação da atividade biológica dos limonóides podem ser um grande suporte para a indústria farmacêutica e agroindústria na busca por novos princípios ativos, uma vez que a relação estrutura-atividade biológica dos limonóides pode ser estabelecida.

1.2. O gênero *Guarea*

O gênero *Guarea* compreende cerca de 50 espécies encontradas na América tropical e na África. Conforme o levantamento bibliográfico realizado, os estudos sobre os constituintes químicos (óleos essenciais e/ou extratos vegetais) são restritos a cerca de 10 espécies.

Quanto aos estudos químicos com óleos essenciais a literatura mostra a composição dos óleos de *G. guidonia*, *G. macrophylla* ssp. *tuberculata*, *G. cedrata*, *G. humaitensis* e *G. convergens*, evidenciando a predominância de sesquiterpenos (Tabela 2). No estudo eletroantagráfico realizado com o óleo essencial das folhas de *G. macrophylla* ssp. *tuberculata* para avaliar a resposta de fêmeas de *Hypsipyla grandella* (inseto que ataca espécies de Meliaceae), foi sugerido que cinco de seus componentes (ledol, 1-cubenol, guai-6-en-10 β -ol, 1-*epi*-cubenol e τ -muurolol) podem ser os responsáveis pela atração deste inseto a *G. macrophylla* ssp. *tuberculata* (LAGO et al., 2006).

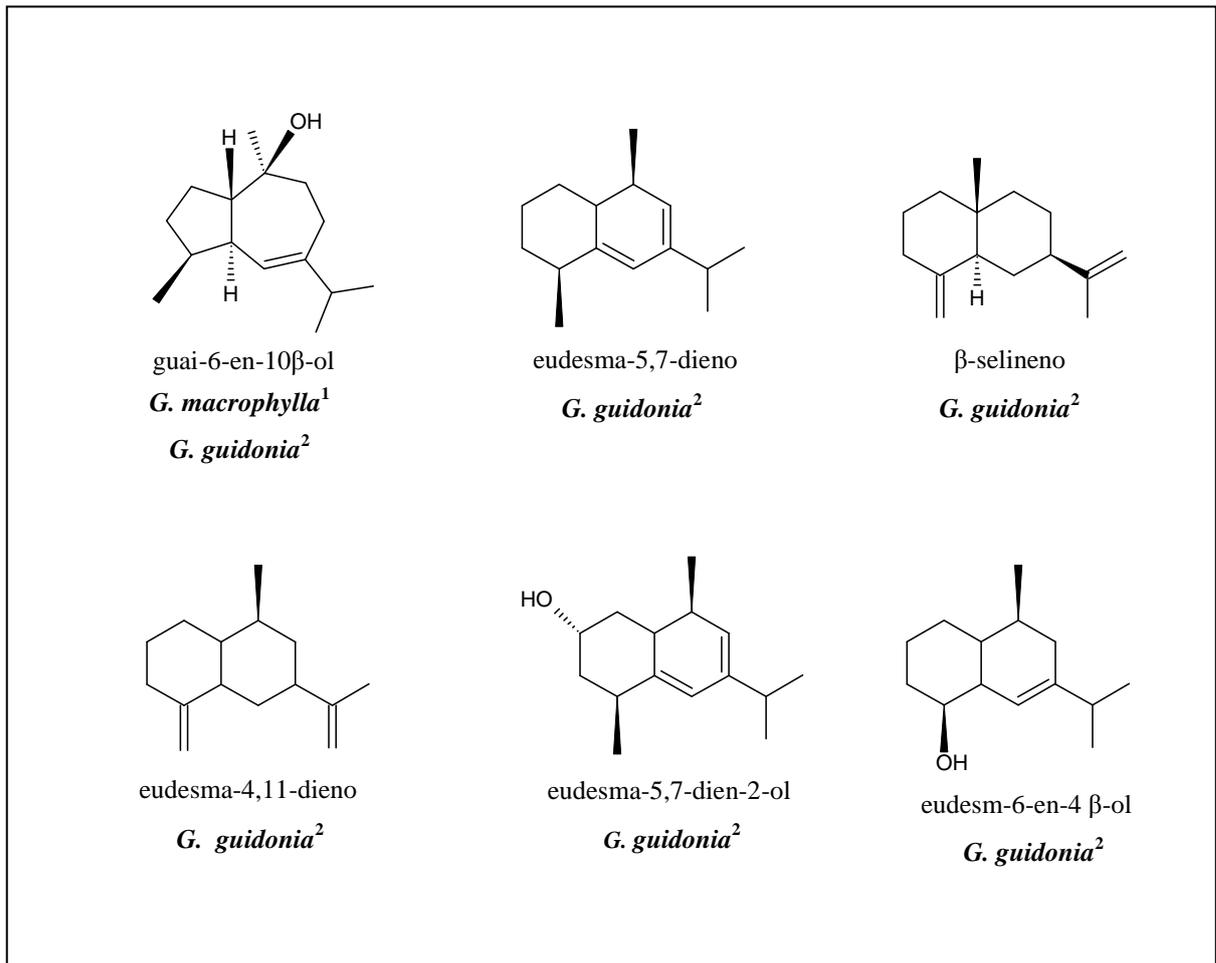
Tabela 2. Principais constituintes dos óleos essenciais de espécies de *Guarea*

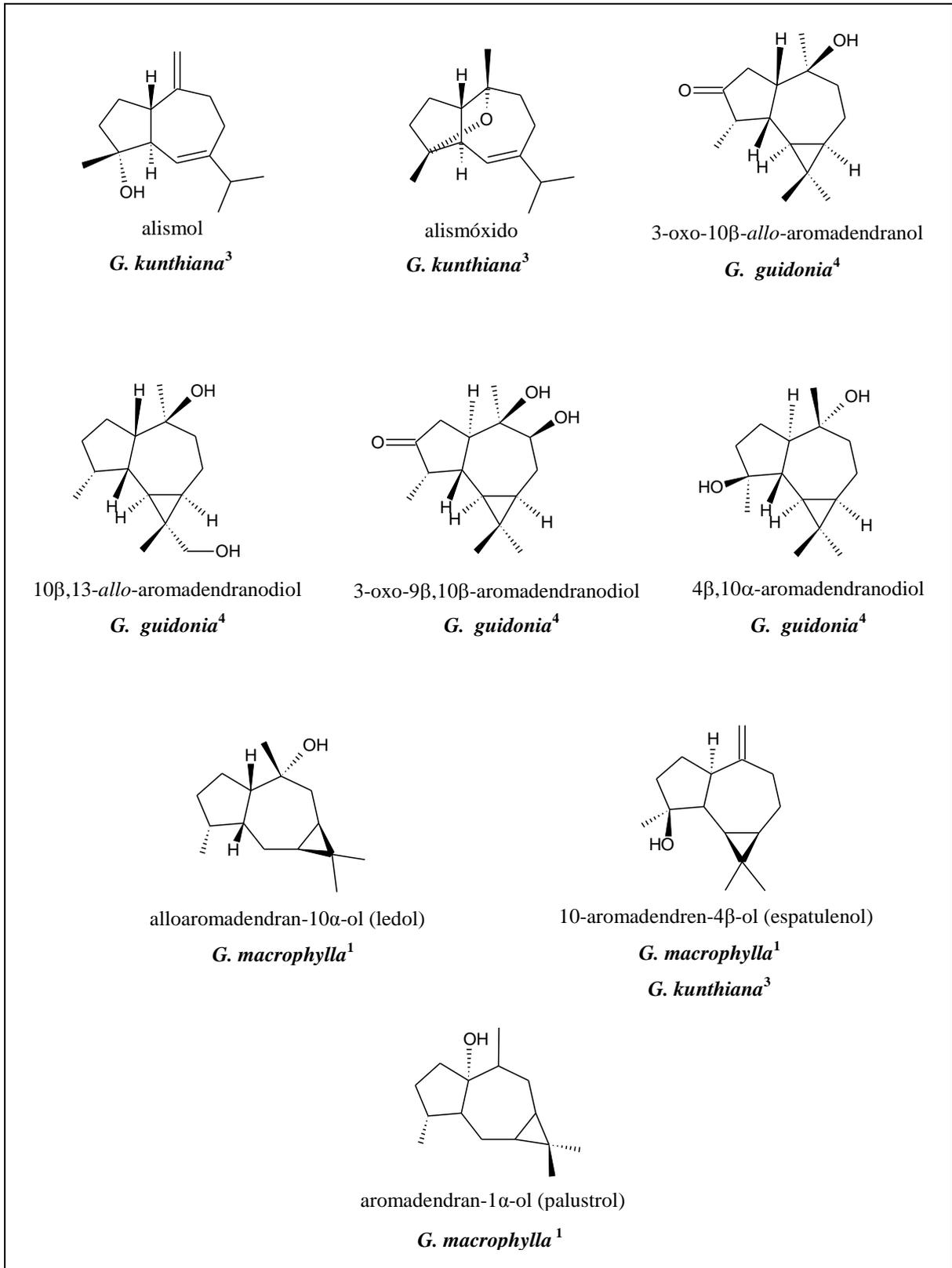
Espécie	Parte vegetativa	Principais constituintes (%)	Refer.
<i>G. guidonia</i>	Folhas	Eudesm-6-en-4 β -ol (21,0)	1, 2
		Guai-6-en-10 β -ol (21,0)	
		Eudesma-5,7-dieno (19,2)	
	Casca do caule	β -Cariofileno (25,0) Germacreno D (24,0) α -Humuleno (8,5)	3
Galhos	Germacreno D (20,9)	4	
	Epóxido de isocariofileno + Epóxido de cariofileno (12,1) α -Muurolol (9,6)		
<i>G. macrophylla ssp. tuberculata</i>	Folhas	Guai-6-en-10 β -ol (20,0 - 6,1)	5,6
		Ledol (16,7 - 5,3) γ -Cadineno (31,8 - 3,0)	
	Casca do caule	<i>cis</i> -Calamelano (11,0)	7
		δ -Cadineno (7,8) Globulol (6,5)	
Frutos	Cadina-1,4-dieno (17,5)	8	
	Viridifloreno (14,6) α -Copaeno (10,3)		
<i>G. cedrata</i>	Casca do caule	β -Cariofileno (45,1)	9
		Globulol (11,1)	
<i>G. humaitensis</i>	Folhas	β -Bisaboleno (20,23)	10
		<i>trans</i> -Cariofileno (17,99) β -Elemeno (14,61)	
<i>G. convergens</i>	Folhas	δ -Cadineno (25,79)	11
		<i>epi</i> - α -Cadinol (15,90) α -Muurolol (14,57)	

1. LAGO et al., 2002a; 2. LAGO et al., 2005a; 3. NUNEZ et al., 1999; 4. NUNEZ et al., 2005; 5. LAGO et al., 2006; 6. LAGO et al., 2007; 7. LAGO et al., 2002b; 8. LAGO et al., 2005b; 9. MENUT et al., 1995; 10. MAGALHÃES et al., 2007; 11. LIMA et al., 2007.

Nos estudos sobre os constituintes químicos dos extratos vegetais de *Guarea* foram identificados principalmente sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos do tipo cicloartano, limonóides, protolimonóides e outros constituintes como esteróides (Quadros 1-6).

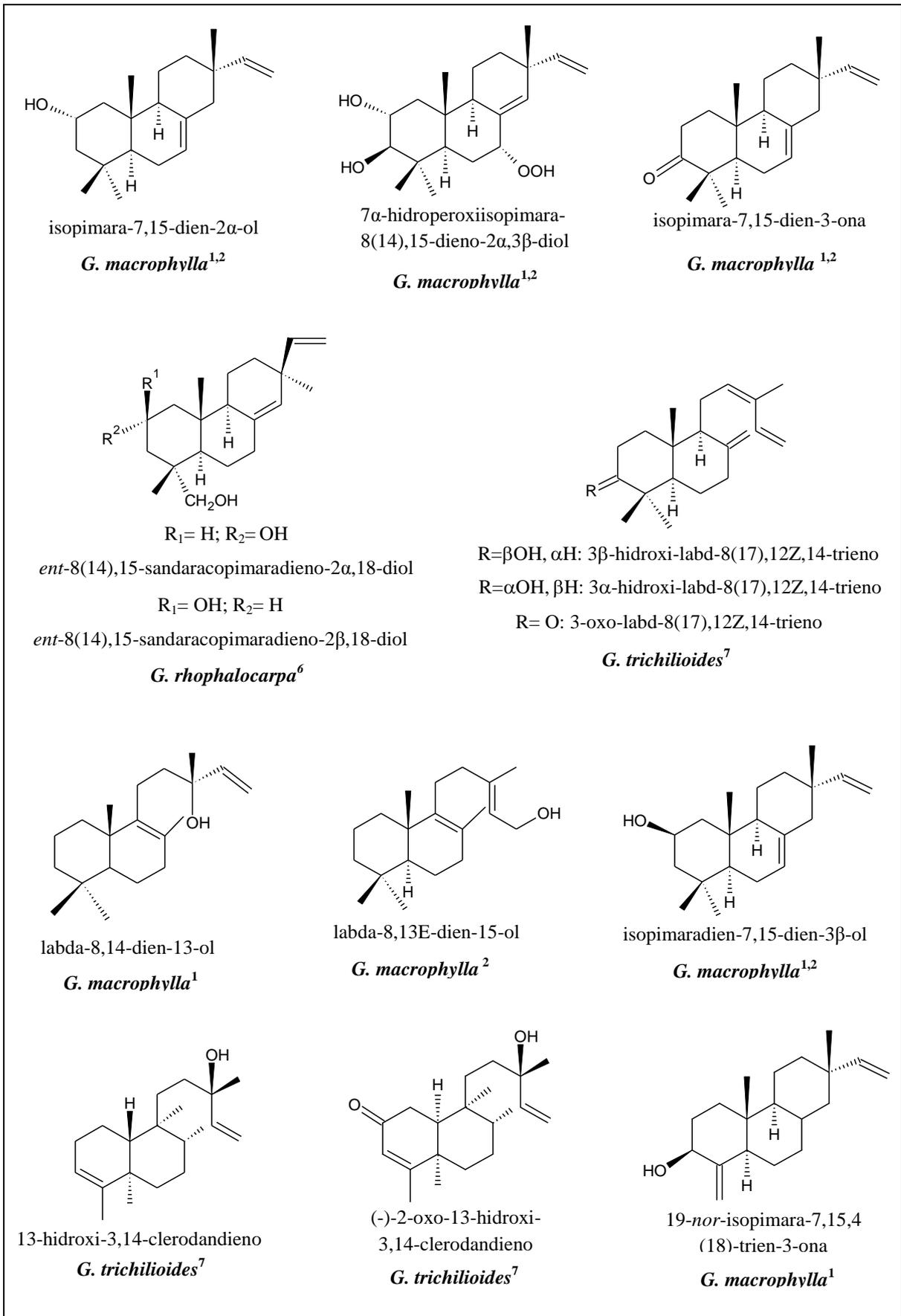
Quadro 1. Sesquiterpenos isolados em *Guarea*



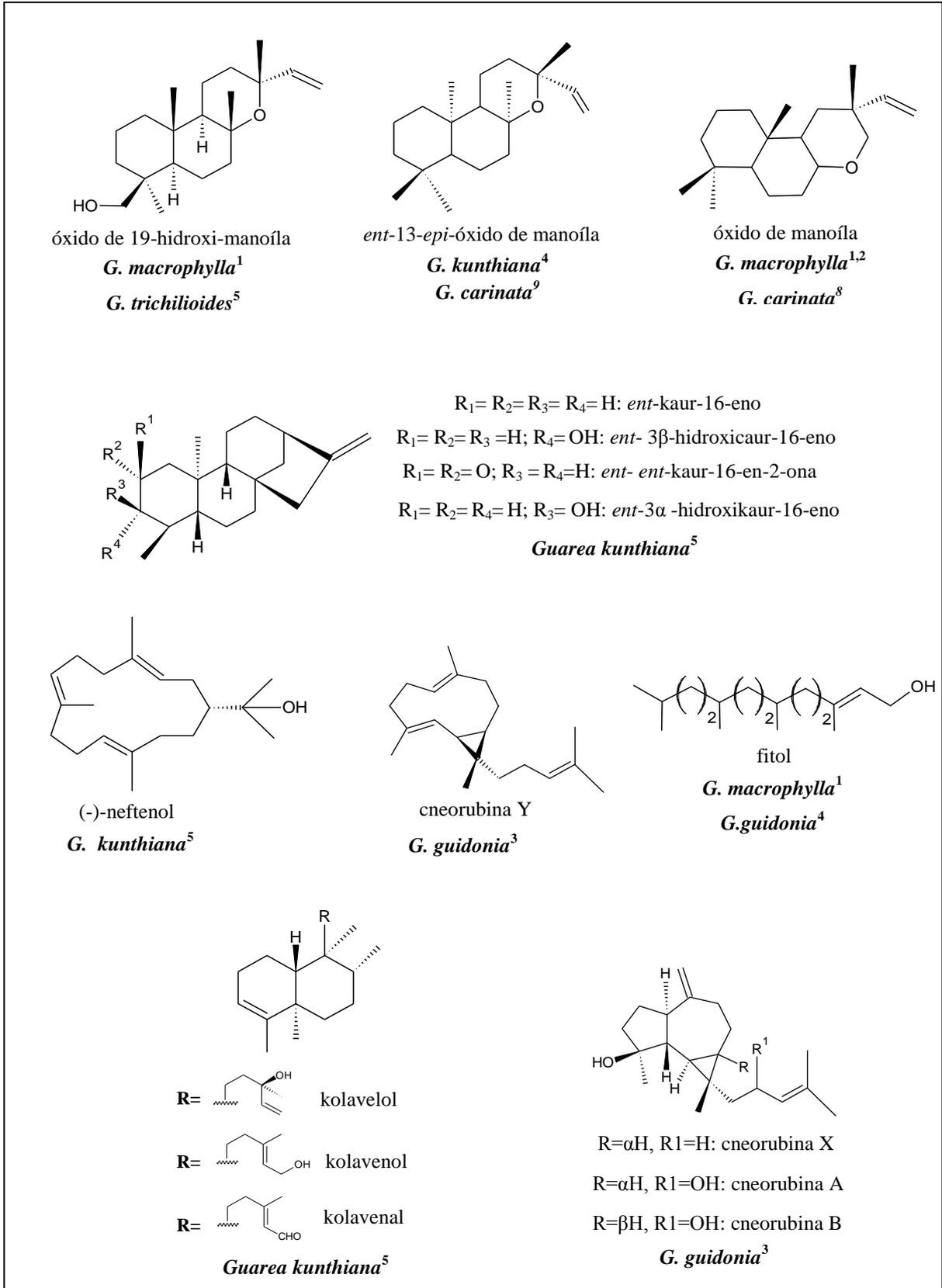
Quadro 1. Continuação

1. LAGO et al., 2000; 2. LAGO et al., 2002a; 3. GARCEZ et al., 2004; 4. RAMOS et al., 2000.

Quadro 2. Diterpenos isolados em *Guarea*

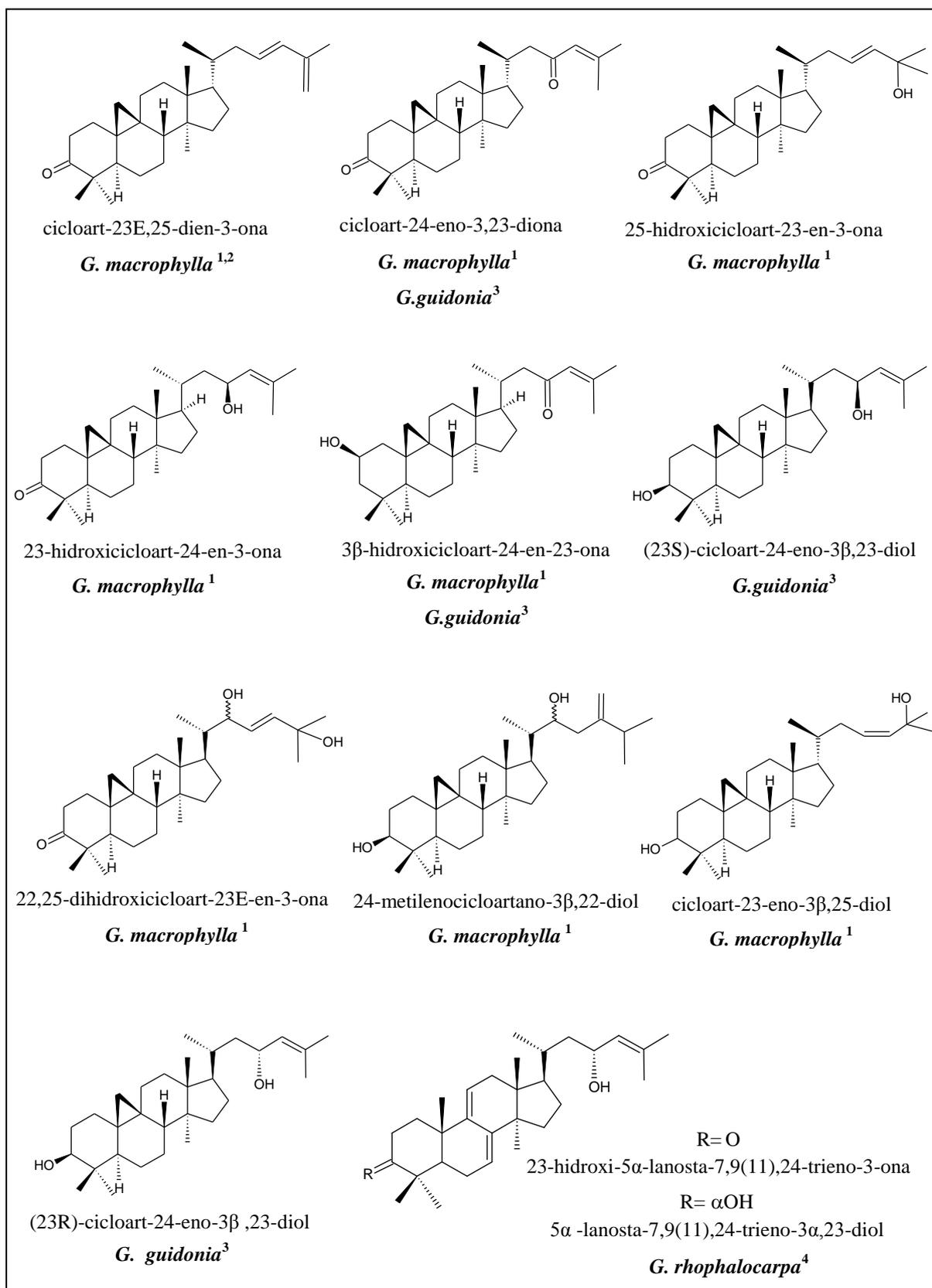


Quadro 2. Continuação



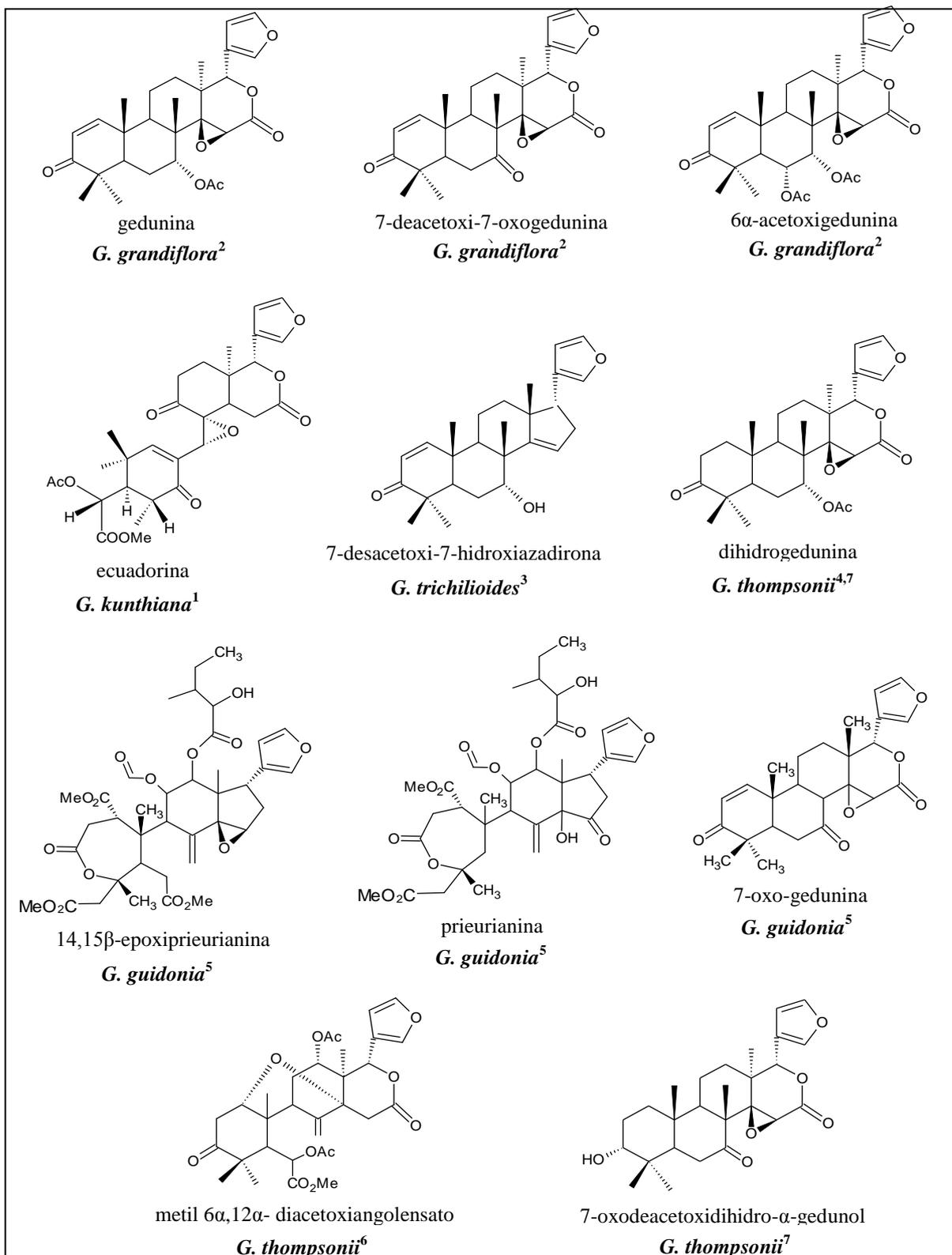
1. LAGO; ROQUE, 2005; 2. LAGO et al., 2000; 3. BROCHINI et al., 2000; 4. LAGO et al., 2002a; 5. GARCEZ et al., 2004; 6. CAMACHO et al., 2001; 7. FURLAN; LOPES, 1996; 8. PEREIRA, et al. 1990; 9. LINS et al., 1992.

Quadro 3. Triterpenos isolados em *Guarea*



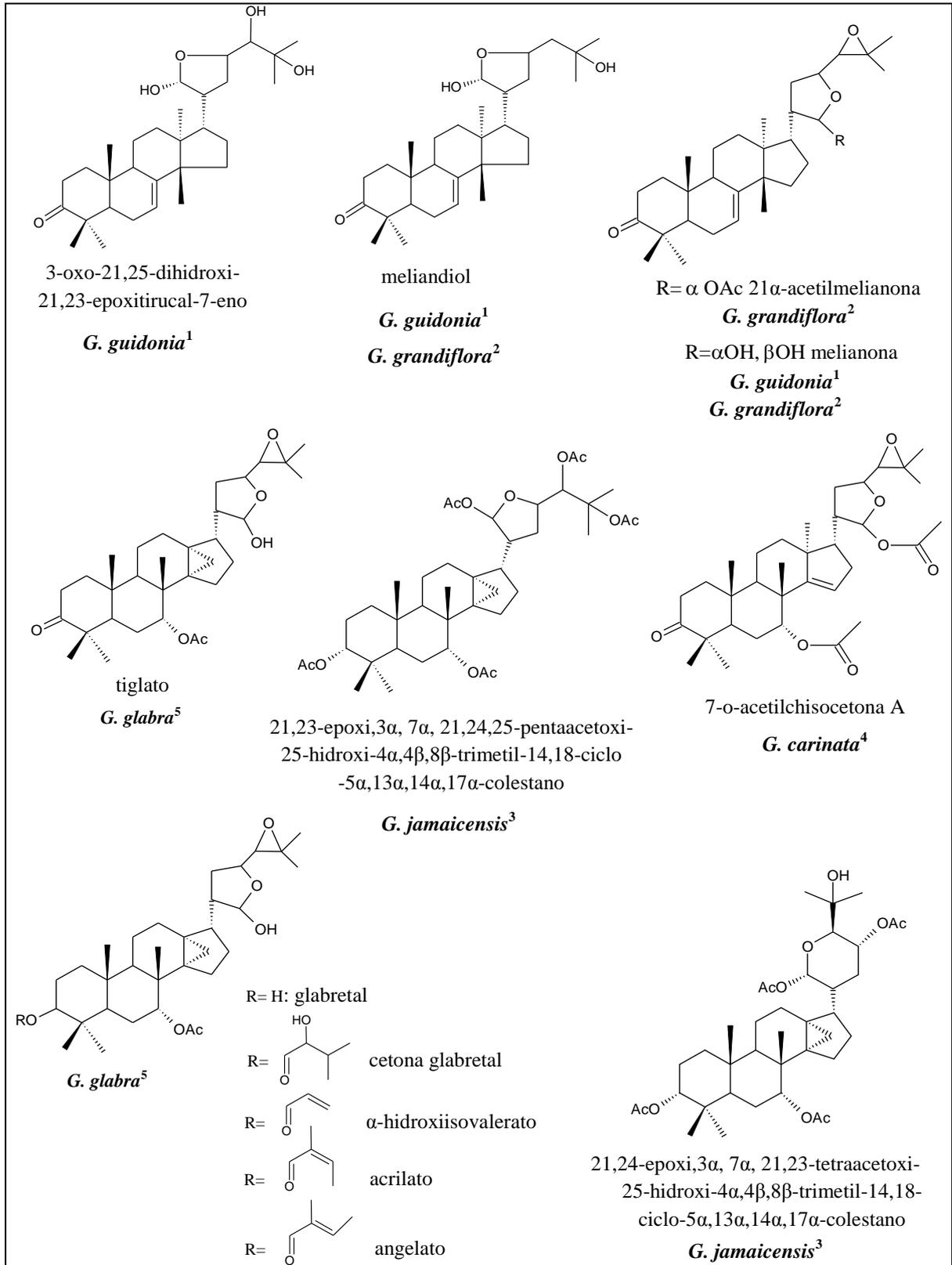
1. LAGO; ROQUE, 2002; 2. LAGO et al., 2000; 3. LAGO et al., 2002a; 4. CAMACHO et al., 2001.

Quadro 4. Limonóides isolados em *Guarea*

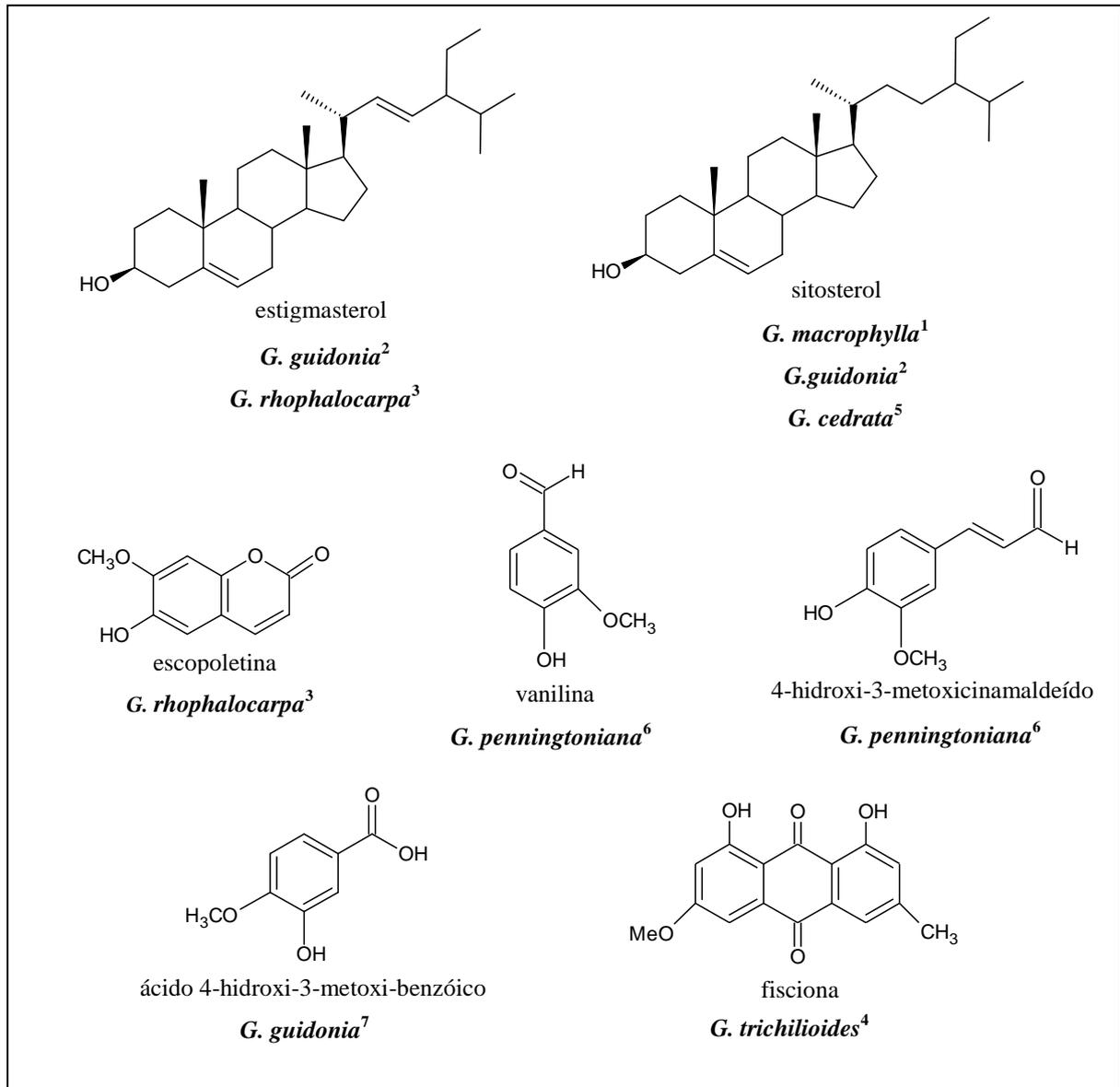


1. MOOTOO et al., 1992; 2. JIMENEZ et al., 1998; 3. WOLTER et al., 1993; 4. BEVAN et al., 1963; 5. LUKACOVA et al., 1982; 6. CONOLLY et al., 1972; 7. HOUSLEY et al., 1962.

Quadro 5. Protolimonóides isolados em *Guarea*



1. LINS et al., 1992; 2. JIMENEZ et al., 1998; 3. HARDING et al., 2001; 4. PEREIRA-JUNIOR et al., 1993; 5. FERGUSON et al., 1973.

Quadro 6. Outros metabólitos isolados em *Guarea*

1. LAGO et al., 2000; 2. LAGO et al., 2002a; 3. CAMACHO et al., 2001; 4. WOLTER et al., 1993; 5. BEVAN et al., 1963; 6. MARQUES et al., 2006; 7. RAMOS et al., 2000.

1.3. *Guarea convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*

Quatro espécies de *Guarea* foram selecionadas para este trabalho: *Guarea convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*. Apesar do registro de ocorrências em diversos países da América do Sul (tabela 3), os estudos químicos foram realizados apenas com os óleos essenciais das folhas de *G. convergens* e *G. humaitensis* (LIMA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007).

Dentre as espécies selecionadas destaca-se, pelo uso popular, *Guarea silvatica* (sin. *G. bilocularis* C. DC.; *G. duckei* C. DC.; *G. klugii* Harms; *G. apedicellata* C. DC.) que é conhecida popularmente como fruta-de-porco, jatuaúba amarela e gitó, e na região do Médio Rio Negro o chá da casca é utilizado no combate a dor de cabeça e diarreia, sugerindo que este chá possui propriedades analgésica e antibacteriana (MPEG, 2005; ALARCÓN, 2005).

Tabela 3. Ocorrência de *Guarea convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*

Espécie	Ocorrência
<i>G. convergens</i> T.D. Penn.	Colômbia, Peru e Brasil (Amazonas e Pará)
<i>G. humaitensis</i> T.D. Penn.	Equador, Guiana e Brasil (Amazonas)
<i>G. scabra</i> A. Juss.	Guiana, Peru, Suriname e Brasil (Amapá, Amazonas, Maranhão)
<i>G. silvatica</i> C. DC.	Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela e Brasil (Amazonas, Espírito Santo, Maranhão, Pará)

1.4. Importância na busca de constituintes químicos em espécies de Meliaceae para controle de *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença viral de grande impacto na saúde pública. O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae e tem sido isolado em mosquitos do gênero *Aedes*, nas espécies *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. scutellaris* e *A. polynesiensis* (WENGLER, 1991). A principal espécie transmissora é *A. aegypti*, encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta.

Os mosquitos machos são fitófagos e costumam permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento, as fêmeas realizam a hematofagia, desenvolvendo maior atividade no período entre 16 e 18h (SILVA et al., 2002). O desenvolvimento do mosquito ocorre por metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (FORATTINI; BRITO, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), fatores como o rápido crescimento populacional, infra-estrutura básica inadequada, migração para áreas urbanas e o crescente uso de materiais descartáveis têm contribuído para a expansão geográfica deste vetor. Além de transmitir a dengue o mosquito também transmite a febre amarela, que tem sido controlada por meio de vacina, no entanto, não há vacina disponível para a dengue, sendo o controle do mosquito a única forma de diminuir número de casos da doença (CICCIA et.al., 2000).

A dengue e a dengue hemorrágica estão presentes em áreas urbanas e suburbanas nas Américas, no sudeste da Ásia, no leste Mediterrâneo, no oeste Pacífico e na África (Figura 2).

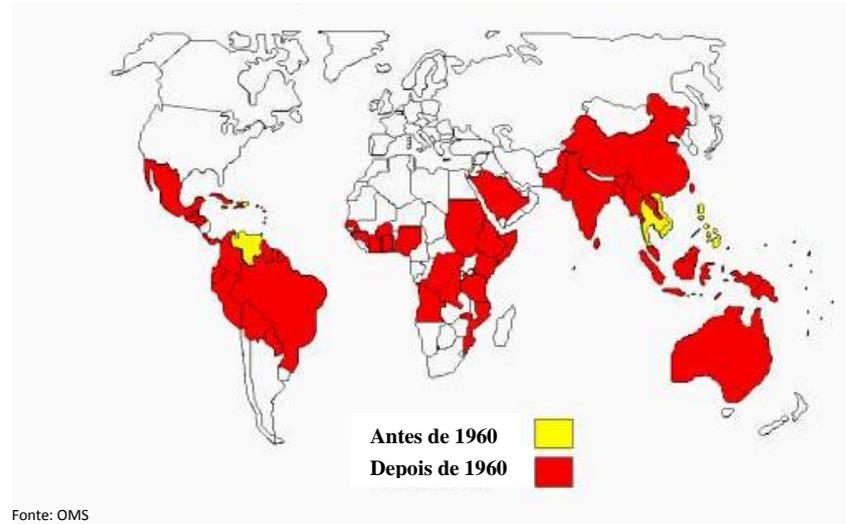


Figura 2. Propagação geográfica da dengue e da dengue hemorrágica

Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente com 500 mil casos de dengue hemorrágica e 22 mil mortes principalmente entre crianças. O número médio de infecções continua aumentando no decorrer dos anos, como mostra o gráfico 1.

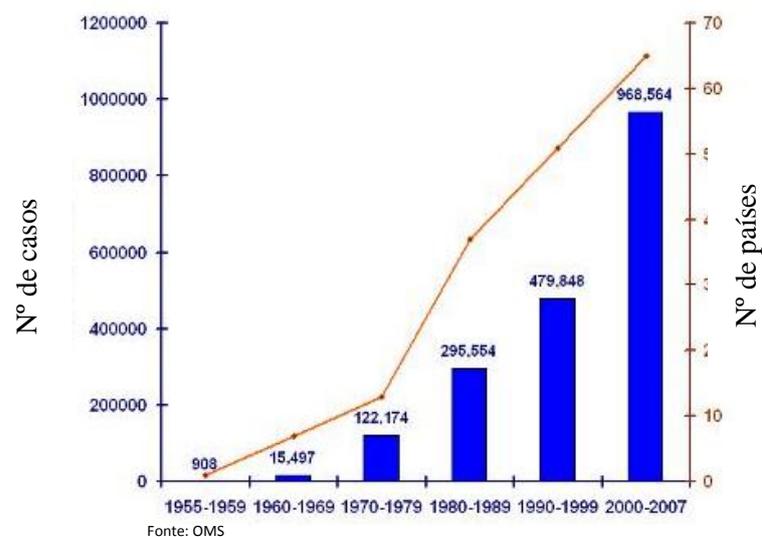
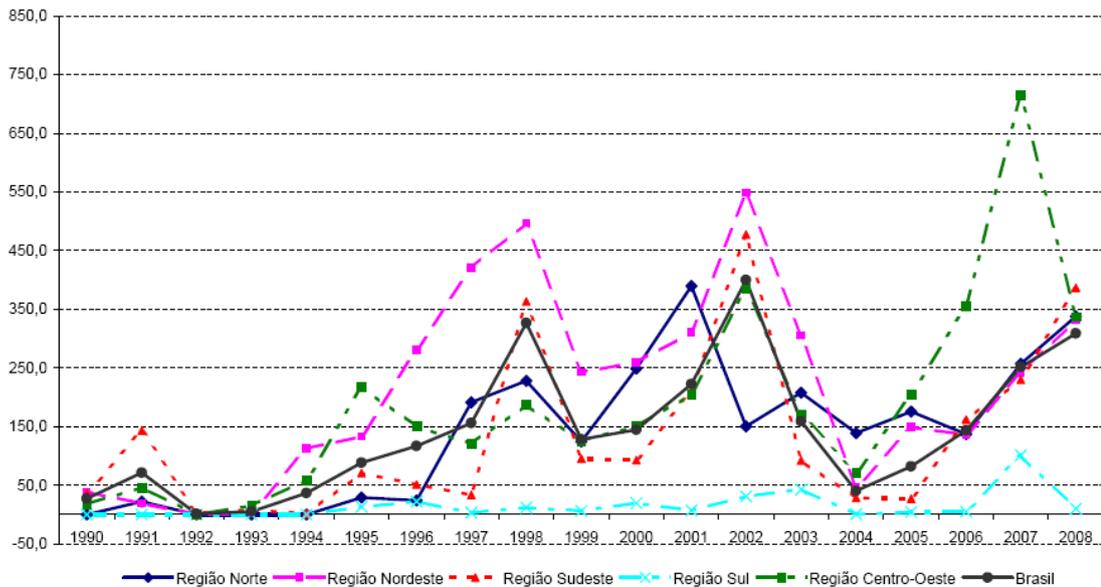


Gráfico 1. Número anual médio de dengue e dengue hemorrágica reportado à OMS e o número anual médio de países que reportaram a dengue

Segundo o Ministério da Saúde, a primeira epidemia no Brasil relatada clínica e laboratorialmente ocorreu entre 1981 e 1982 em Boa Vista, no estado de Roraima. Grandes epidemias ocorreram nos anos de 1998 e 2002, sendo que em 2007 a região Centro-Oeste alcançou números altíssimos (Gráfico 2).



Fonte: Sinam – atualizado em 27/02/2009

Gráfico 2. Taxa de incidência de dengue no Brasil e em grandes regiões (1990-2008)

O controle químico é o método mais utilizado para a eliminação do mosquito, sendo que no Brasil destacam-se os organofosforados e os piretróides. Os inseticidas organofosforados são ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico. Eles são absorvidos através da pele, pelas vias respiratórias e pelo trato gastrointestinal. Nas exposições que ocorrem durante os processos industriais de fabricação, na formulação, na aplicação agropecuária ou no controle de vetores em saúde pública, as principais vias de exposição são a respiratória e a cutânea. Após absorvidos, os organofosforados são rapidamente distribuídos por todos os tecidos. Alguns sintomas da intoxicação por organofosforados são cefaléia, perda da memória, confusão, fadiga e até a

morte Os organofosforados, juntamente com os carbamatos, são responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; NERO et al., 2007).

Os piretróides foram introduzidos no mercado na década de 1970 e surgiu de outra classe de praguicidas de origem botânica, o piretro - mistura de 6 ésteres (piretrinas I e II, cinerinas I e II, e jasmolinas I e II) extraídos das flores de crisântemo-, após modificações feitas para melhorar sua estabilidade no ambiente. Atualmente são utilizados na agricultura, na pecuária, no domicílio, nas campanhas de saúde pública. Os piretróides são rapidamente absorvidos por via oral e, em pequena quantidade, por via dérmica. Alguns dos sintomas mais comuns são sensação de queimação na pele (intoxicação por via dérmica), problemas gastrintestinais (intoxicações por via digestiva), além de sonolência, cefaléia, anorexia, fadiga e fraqueza, sendo que nos casos mais graves são observadas alterações neurológicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Estima-se que os agrotóxicos sejam responsáveis por mais de 20 mil mortes não intencionais por ano, sendo que a maioria ocorre nos países pobres, onde se estima que 25 milhões de trabalhadores agrícolas são intoxicados, de forma aguda, anualmente (ARAÚJO et al., 2000). Uma outra problemática é que os insetos são selecionados ao longo do tempo e as aplicações devem ser em quantidades maiores, causando danos ecológicos, ao homem e poluição do meio ambiente.

Considerando a alta periculosidade dos organofosforados e dos piretróides, a busca por novas moléculas capazes de combater insetos, entre eles *A. aegypti*, tem sido alvo de várias pesquisas. Entre elas, por exemplo, estão os estudos realizados com óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus*, que já são extraídos em escala comercial por mostrarem elevada ação larvicida ao *A. aegypti*. (CAVALCANTE et al., 2004). Outros estudos relatam que os óleos essenciais contendo sesquiterpenos como farnesol e nerolidol apresentaram alta

atividade larvívica ao *A. aegypti*. Mesmo havendo alguns relatos na literatura mostrando a atividade insetívica de óleos essenciais, poucos discutem a relação estrutura x atividade biológica de seus constituintes (SIMAS, 2004).

Com relação à atividade insetívica, destacam-se também os limonóides de Meliaceae. No entanto, essa atividade tem sido relatada pela literatura principalmente contra insetos da ordem Lepidoptera (CHAMPAGNE, 1992) e este fato é explicado pelo grande interesse e conseqüente investimento da agroindústria na tentativa de controlar as pragas que infestam as mais diversas plantações.

Assim, torna-se importante avaliar o potencial dos limonóides de Meliaceae, bem como dos óleos essenciais obtidos de espécies dessa família frente ao *A. aegypti* (Diptera).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os constituintes químicos de *Guarea convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (voláteis) e *G. humaitensis* (voláteis e fixos) e a atividade sobre *Aedes aegypti*

2.2. Objetivos específicos

Obter óleos essenciais de *Guarea convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*

Identificar a composição química dos óleos essenciais por CG-EM

Isolar substâncias dos extratos vegetais de *G. humaitensis* através de métodos cromatográficos

Identificar as substâncias isoladas por métodos espectroscópicos e espectrométricos

Avaliar o potencial larvicida dos óleos essenciais obtidos das espécies de *Guarea* sobre *Aedes aegypti*

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Materiais

Para as cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60 (35-70, 70-230 e 230-400 mesh, Merck), celulose microcristalina Avicel (Merck) e sephadex LH -20 (Sigma). Nas análises em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 (Merck), reveladas com luz UV e solução alcoólica de vanilina/ácido sulfúrico. Para os ensaios biológicos utilizou-se micropipetas automáticas (Eppendorf) e pipetas plásticas de Pasteur.

3.2. Equipamentos

Para a análise dos óleos essenciais utilizou-se um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), com coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.). Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro DRX-400 da Bruker, utilizando-se solventes deuterados na dissolução das amostras e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.3. Material vegetal

3.3.1. Coleta e identificação

Partes vegetativas das espécies selecionadas foram coletadas na Reserva Florestal Ducke (AM-10, Km 26) em indivíduos previamente marcados e identificados durante a execução do Projeto “Flora da Reserva Ducke”: galhos de *G. convergens* e *G. humaitensis*; folhas de *G. scabra*; e folhas e galhos de *G. silvatica*.

3.3.2. Obtenção dos óleos essenciais

Após secagem à temperatura ambiente, as amostras (galhos de *G. convergens* e *G. humaitensis*; folhas de *G. scabra*; e folhas e galhos de *G. silvatica*) foram rasuradas, pesadas e submetidas à extração por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger (Figura 3), por um período de 4 horas.

Ao término de cada extração, o volume de óleo essencial obtido foi medido para cálculo do rendimento. Os óleos essenciais foram armazenados em ampolas âmbar (Figura 4), vedadas e conservados em ambiente refrigerado.

O cálculo dos rendimentos relaciona a quantidade do material utilizado na extração com o volume de óleo obtido:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{volume de óleo obtido (mL)} \times 100}{\text{material antes da extração (g)}}$$



Figura 3. Sistema de Clevenger



Figura 4. Ampolas com óleos essenciais

Análise dos óleos essenciais

A identificação das substâncias foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70 eV.). A análise foi realizada no Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Condições de análise dos óleos essenciais

Injetor: 240 °C

Detector: 230 °C

Gás de arraste: He

Vazão: 1,0 mL/min

Diluição: 1 μ L óleo essencial/1,0 mL de acetato de etila

Volume de Injeção: 1 μ L

Split: 1/20

Programa de Temperatura: 60°C-240°C, 3°C/minuto

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.), literatura (McLAFERTY; STAUFFER, 1989) e índice de retenção (ADAMS, 1995). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção da amostra com uma série homologa de n-alcanos (C₉H₂₀ - C₂₅H₅₂, Sigma - Aldrich, 99%) no seguinte programa de temperatura: 60°C-240°C, 3°C/min (ADAMS, 1995), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

3.3.3. Obtenção e fracionamento dos extratos de *Guarea humaitensis*

Os galhos e as folhas de *G. humaitensis* (Figura 5) foram triturados, pesados e submetidos sucessivamente à maceração em hexano, diclorometano e metanol, em recipiente tipo Mariote (Figura 6) à temperatura ambiente por sete dias em cada solvente. O produto da extração foi concentrado em evaporador rotativo (Figura 7), resultando em seus respectivos extratos (Esquema 1).



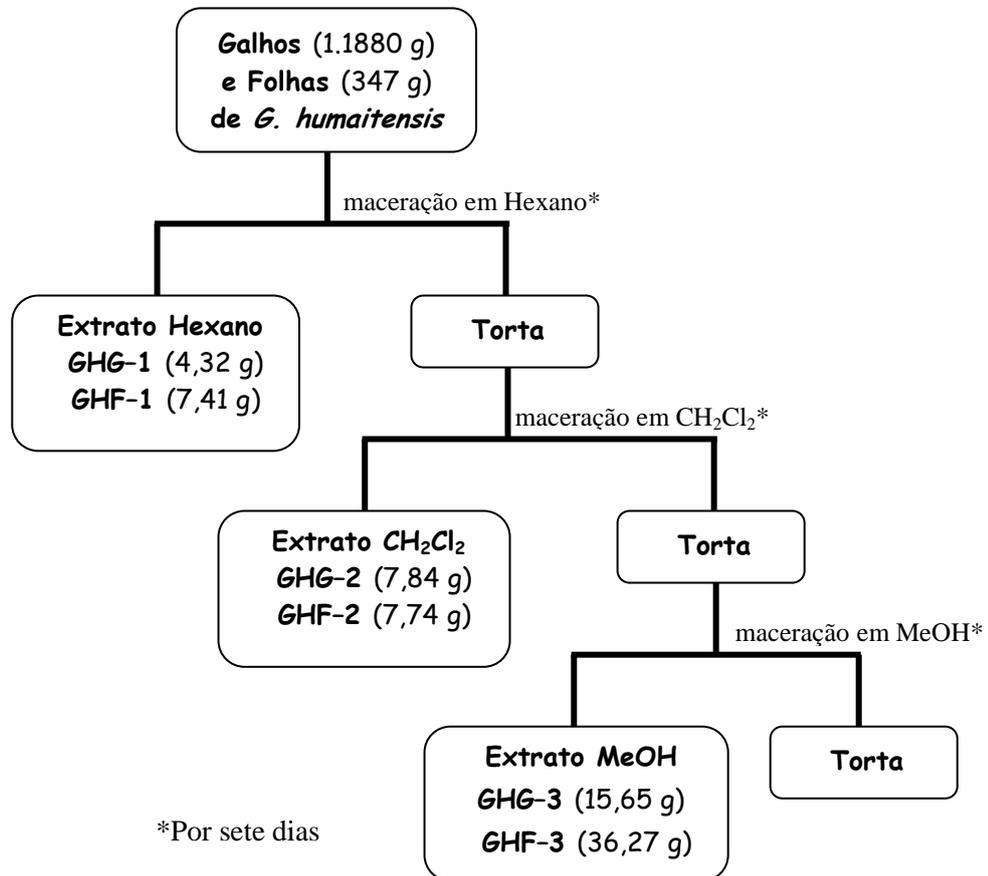
Figura 5. Galhos e folhas de *Guarea humaitensis*



Figura 6. Frasco Mariote



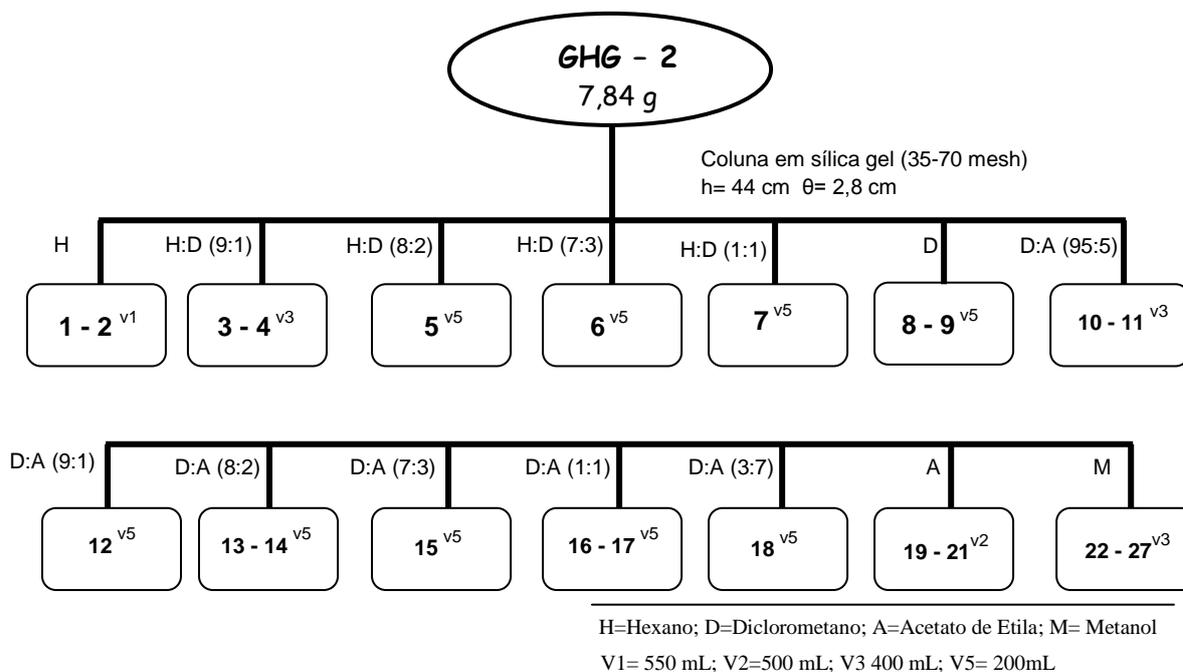
Figura 7. Evaporador rotativo



Esquema 1. Obtenção dos extratos brutos de *Guarea humaitensis*

Primeiramente, avaliou-se os extratos obtidos dos galhos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O extrato hexânico (GHG-1) mostrou-se semelhante ao diclorometânico (GHG-2), por isso o extrato diclorometânico foi selecionado para o início dos fracionamentos, por apresentar maior massa e menor quantidade de material graxo (Esquema 2).

O extrato GHG-2 foi filtrado em coluna de sílica gel, a qual foi eluída em hexano, gradientes de hexano:diclorometano, diclorometano, gradientes de diclorometano: acetato de etila, acetato de etila e metanol, fornecendo 27 frações que foram avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada.



Esquema 2. Coluna cromatográfica do extrato GHG - 2

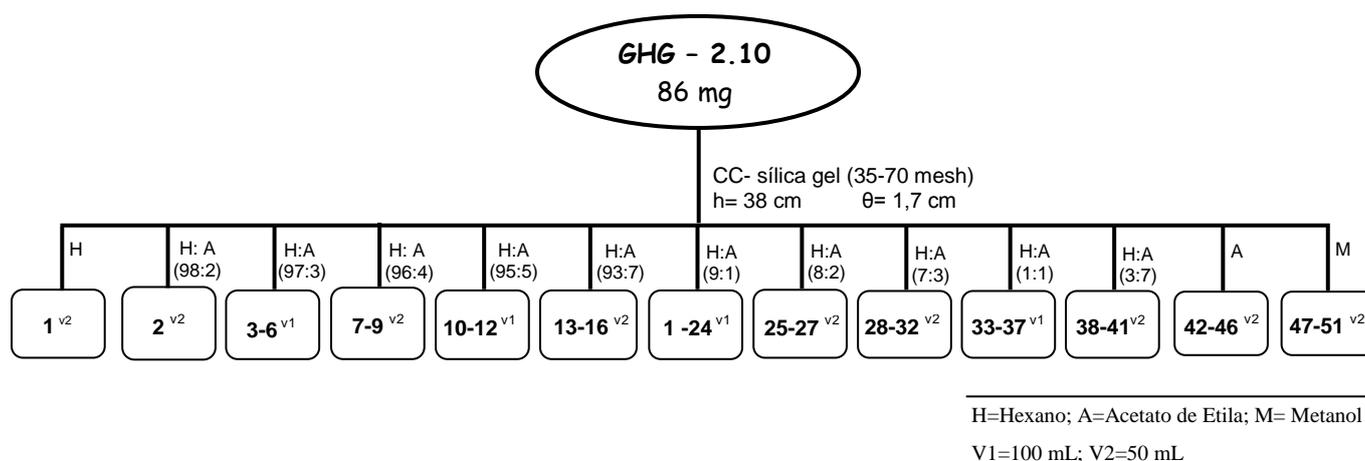
Reunião das Frações de GHG-2

Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1	GHG - 2.1	314	NT (fração muito apolar)
2	GHG - 2.2	229	NT (fração muito apolar)
3 - 5	GHG - 2.3	24	CC *
6 - 8	GHG - 2.6	90	CC*
9	GHG - 2.9	160	NT (SP em GHG - 2.6 e GHG - 2.10)
10	GHG - 2.10	86	CC (esquemas 3-4)
11	GHG - 2.11	335	CC (esquema 5)
12 - 13	GHG - 2.12	150	CC (esquema 6)
14 - 17	GHG - 2.14	1.118	NT (SP isoladas em GHG - 2.12)
18	GHG - 2.18	1.435	CC (esquema 7)
19 - 27	GHG - 2.19	1.633	-----

NT: Não trabalhada SP: Substância predominante CC: Cromatografia em coluna

* Sílica gel (230-400 mesh) - resultado não satisfatório

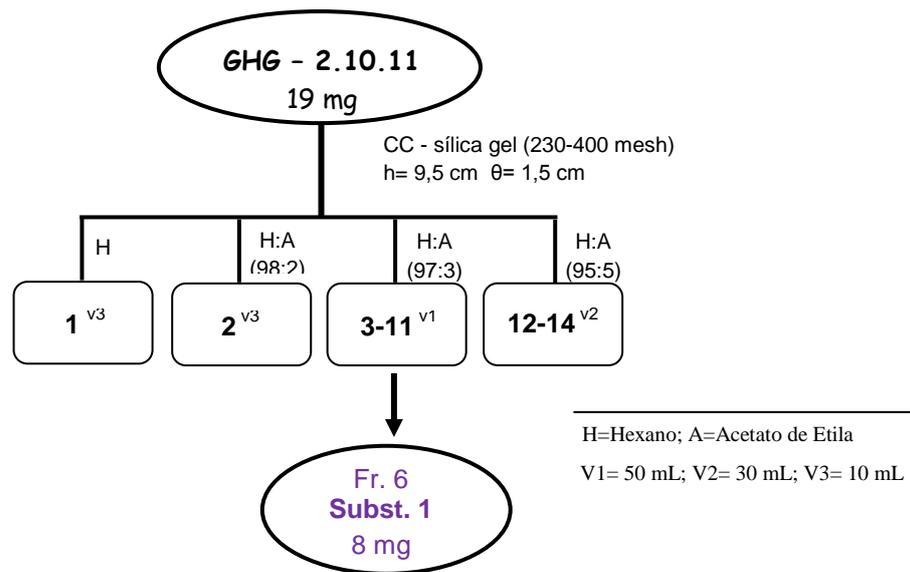
A fração GHG - 2.10, submetida à coluna de sílica gel (35-70 mesh) utilizando-se como eluentes hexano, hexano: acetato de etila (em ordem crescente de polaridade), acetato de etila e metanol, forneceu 51 frações (Esquema 3), as quais foram avaliadas em CCD. A fração GHG - 2.10.11 foi submetida a um novo fracionamento, fornecendo assim a substância GHG - 2.10.11.6 (1), como mostra o Esquema 4.



Esquema 3. Coluna cromatográfica de GHG -2. 10

Reunião de Frações de GHG - 2. 10			
Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 10	GHG - 2.10.1	31	-----
11	GHG - 2.10.11	19	CC (esquema 4)
12	GHG - 2.10.12	16	NT (SP em GHG - 2.10.11)
13 - 17	GHG - 2.10.13	20	-----
18 - 24	GHG - 2.10.18	15	-----
25 - 34	GHG - 2.10.25	31	CC*
35 - 51	GHG - 2.6.34	37	Descartado

NT: Não trabalhada SP: Substância predominante CC: Cromatografia em coluna
* Sílica gel (230-400 mesh) - resultado não satisfatório



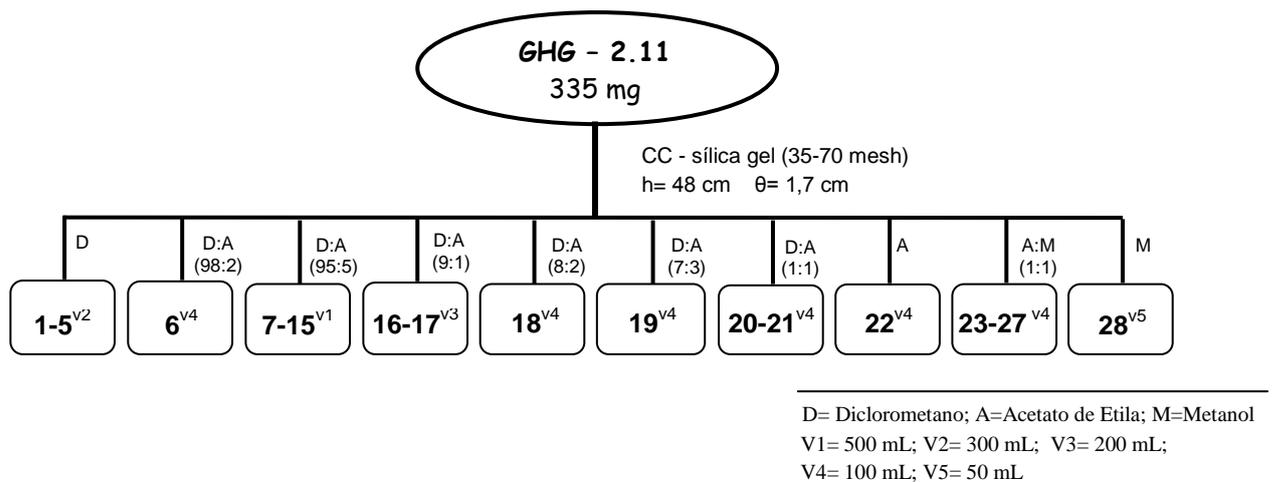
Esquema 4. Coluna cromatográfica de GHG - 2.10.11

Reunião de Frações de GHG - 2.10.11

Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 4	GHG - 2.10.11.1	1	Descartado
5	GHG - 2.10.11.5	3	NT (SP em GHG - 2.10.11.6)
6	GHG - 2.10.11.6	8	Substância 1
7-8	GHG - 2.10.11.7	2	NT (SP em GHG - 2.10.11.6)
9 - 14	GHG - 2.10.11.9	15	Descartado

NT: Não trabalhada SP: Substância predominante

A fração GHG - 2.11 foi adicionada ao topo de uma coluna cromatográfica empacotada com sílica gel eluída com diclorometano, gradiente de diclorometano e acetato de etila, acetato de etila, gradiente de acetato de etila e metanol e finalizada com metanol (Esquema 5). Coletaram-se 28 frações que após análise em CCD foram reunidas. O tratamento com metanol da fração GHG - 2.11.7 forneceu a substância GHG - 2.11.7 (2).



Esquema 5. Coluna cromatográfica de GHG - 2.11

Reunião de Frações de GHG - 2.11

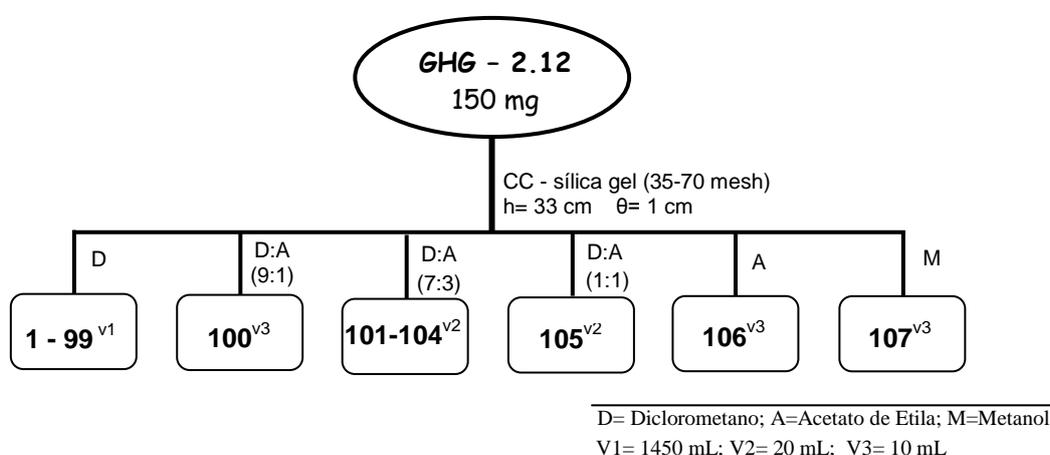
Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 3	GHG - 2.11.1	6	Descartado
4-6	GHG - 2. 11.4	95	CC*
7- 11	GHG - 2.11.7	35	Tratamento com MeOH
12-13	GHG - 2.11.12	19	Descartado
14- 18	GHG - 2.11.14	40	CC**
19	GHG - 2.11.19	2	Descartado
20 - 21	GHG - 2.11.20	17	-----
22 - 25	GHG - 2.11.22	20	CC*
26 - 27	GHG - 2.11.26	18	-----
28	GHG - 2.11.26	7	-----

Subst. 2
6 mg

NT: Não trabalhada SP: Substância predominante
CC: Cromatografia em coluna
* Sílica gel (230-400 mesh) - resultado não satisfatório
**Sephadex LH-20 - resultado não satisfatório

A fração GHG - 2.12 foi aplicada no topo de uma coluna de sílica gel que foi eluída em com diclorometano, gradiente de diclorometano e acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol (Esquema 6). Deste fracionamento resultaram 107 frações que foram reunidas após análise em CCD.

O tratamento da fração GHG - 2. 12.9 com hexano e metanol possibilitou o isolamento da substância **2**.



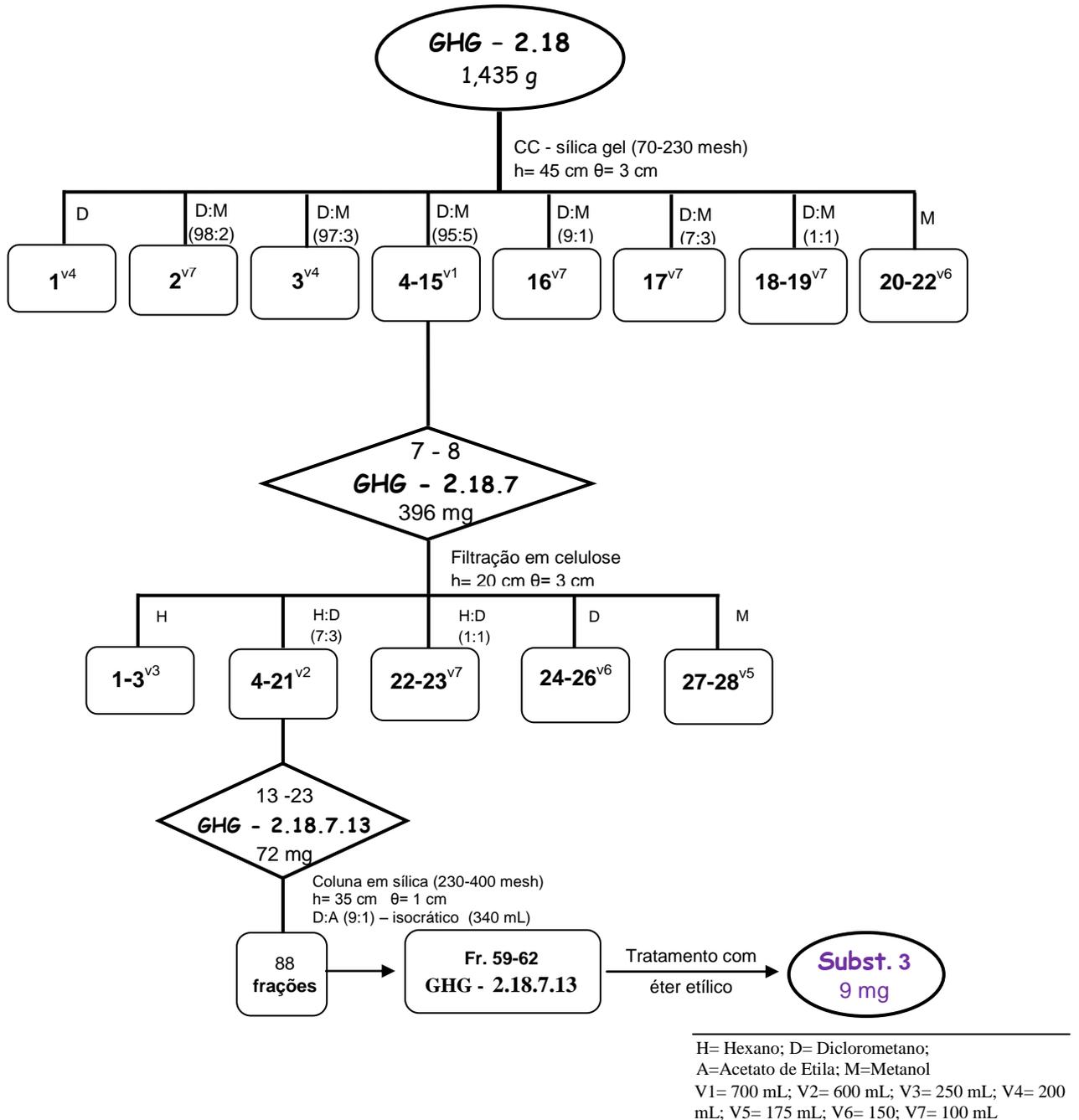
Esquema 6. Coluna cromatográfica de GHG - 2.12

Reunião de Frações de GHG - 2.12

Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 8	GHG - 2.12.1	14	Descartado
9 - 14	GHG - 2. 12.9	27	Tratamento com Hex e MeOH
15 - 25	GHG - 2.12.15	7	-----
26 - 46	GHG - 2.12.26	17	-----
47 - 51	GHG - 2.12.47	2	Descartado
52 - 101	GHG - 2.12.52	10	Guardado
102 - 107	GHG - 2.12.102	17	Descartado

Subst. 2
8 mg

À uma coluna empacotada com sílica gel foi adicionada a fração GHG- 2.18. Esta coluna foi eluída com diclorometano, gradiente de diclorometano e metanol e finalizada com metanol puro, e as 22 frações coletadas foram analisadas por CCD. A fração GHG- 2.18.7 foi filtrada em celulose para extração de pigmentos e posteriormente fracionada em coluna de sílica gel, o que resultou no isolamento da substância 3 (Esquema 7).



Esquema 7. Coluna cromatográfica de GHG - 2. 18

Reunião de Frações de GHG - 2.18

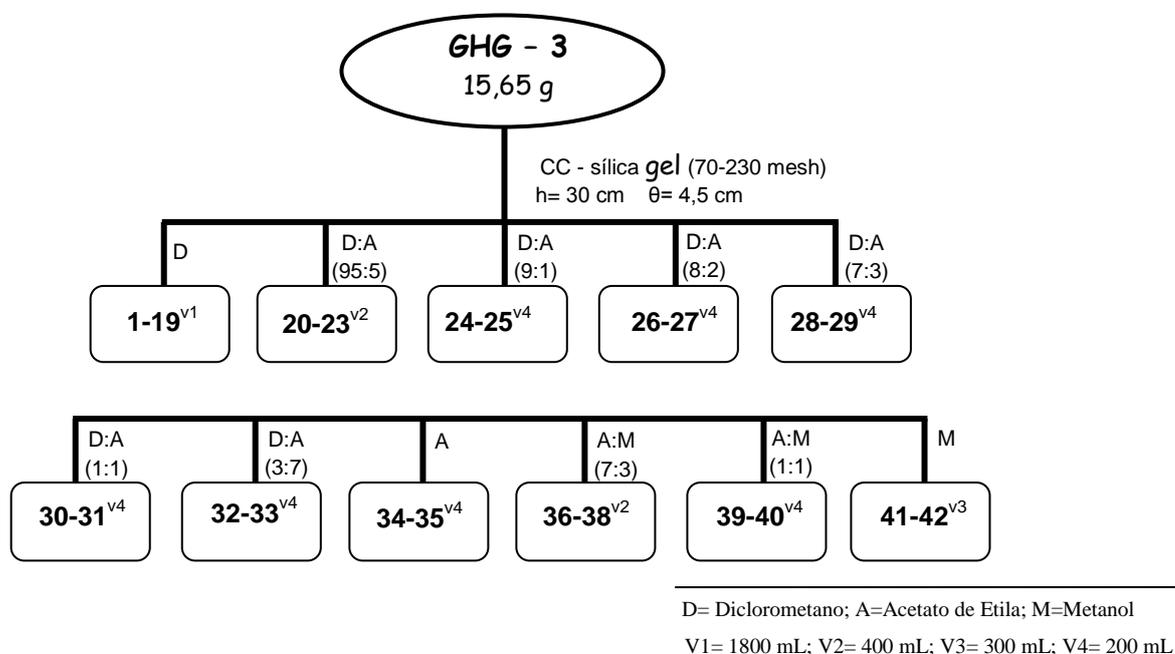
Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 5	GHG - 2.18.1	4	Descartado
6	GHG - 2. 18.6	107	NT (SP em GHG - 2.18.7)
7 - 8	GHG - 2.18.7	396	CC (esquema 7)
9 - 11	GHG - 2.18.11	463	NT (SP em GHG - 2.18.7)
12 - 15	GHG - 2.18.14	120	-----
16 - 17	GHG - 2.18.16	85	Filtração em celulose*
18 - 22	GHG - 2.18.18	82	-----

NT: Não trabalhada

SP: Substância predominante

* Resultado não satisfatório

O extrato metanólico dos galhos (GHG -3) foi filtrado em coluna de sílica gel utilizando diclorometano, gradientes de diclorometano e acetato de etila, acetato de etila, gradiente de acetato de etila e metanol e metanol 100%. Essa filtração gerou 42 frações que foram analisadas por CCD e reunidas (Esquema 8).



Esquema 8. Coluna cromatográfica do extrato GHG - 3

Reunião de Frações de GHG - 3

Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 3	GHG - 3.1	198	NT (fração muito apolar)
4	GHG - 3.4	89	NT (SP em GHG - 3.5)
5 - 6	GHG - 3.5	67	CC*
7 - 10	GHG - 3.7	90	-----
11-20	GHG - 3.11	465	Tratamento com Hex e MeOH
21-25	GHG - 3.21	112	CC (esquema 9)
26-28	GHG - 3.26	144	-----
29 - 30	GHG - 3.29	132	Filtração em celulose*
31 - 42	GHG - 3.14	1.118	-----

NT: Não trabalhada

SP: Substância predominante

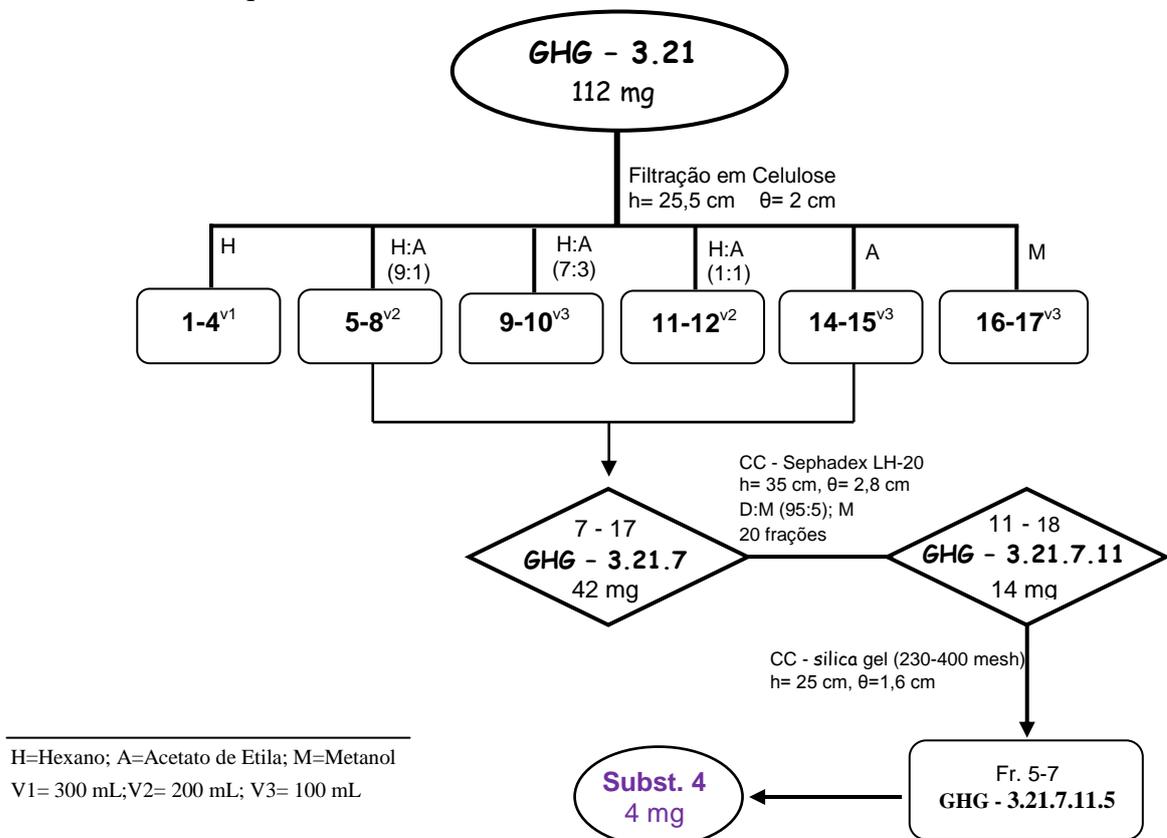
CC: Cromatografia em coluna

* Sílica gel (230-400 mesh) - resultado não satisfatório

**Resultado não satisfatório

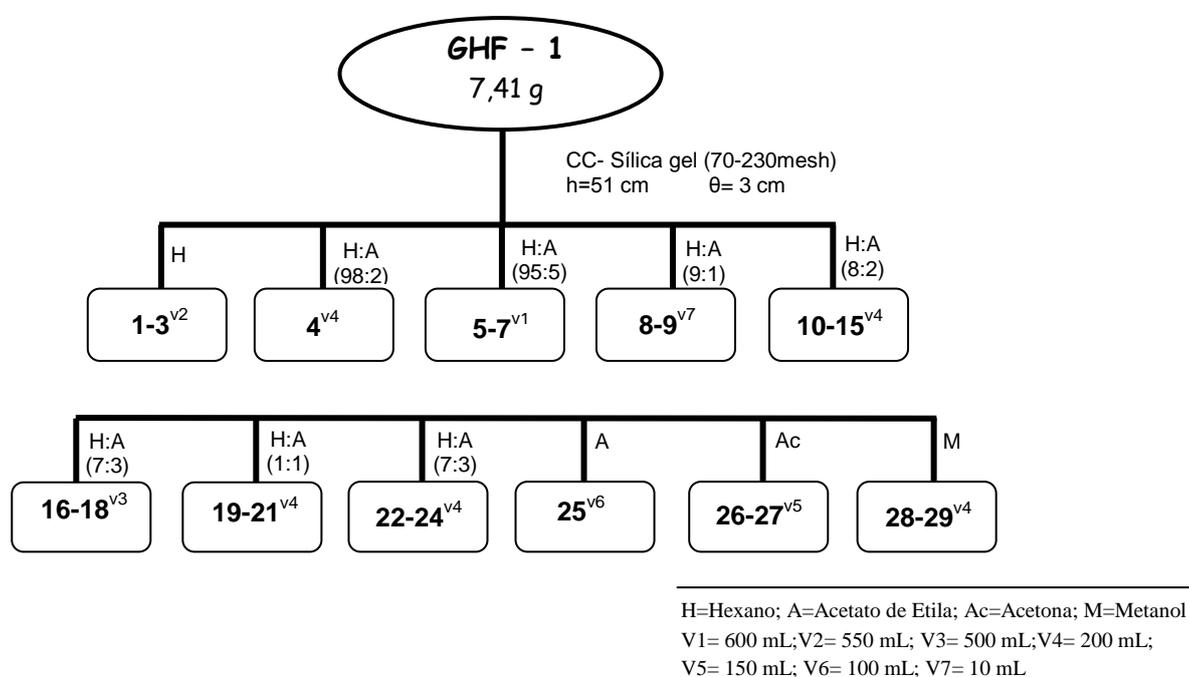
Subst. 2
10 mg

A fração GHG - 3.21 foi submetida a um novo fracionamento e forneceu a substância 4, como mostra o esquema 9.



Esquema 9. Coluna cromatográfica de GHG - 3.21

Na análise por CCD dos extratos obtidos das folhas de *Guarea humaitensis* observou-se que o extrato hexânico (GHF-1) apresentava substâncias também presentes no extrato diclorometânico (GHF-2). No entanto, o extrato hexânico (GHF-1) apresentava menor pigmentação e por isso foi fracionado primeiramente (Esquema 10). Esse fracionamento forneceu o isolamento da substância 5.



Esquema 10. Coluna cromatográfica do extrato GHF-1

Reunião de Frações de GHF - 1

Frações	Código	Massa (mg)	Observações
1 - 2	GHF - 1.1	446	NT (fração muito apolar)
3 - 9	GHF - 1.3	941	NT (SP = carotenóides)
10	GHF - 1.10	424	-----
11	GHF - 1.11	395	Filtração em celulose*, CC**
12	GHF - 1.12	511	-----
13 - 16	GHF - 1.13	1.070	-----
17 - 18	GHF - 1.17	370	Tratamento com Hex e MeOH
19 - 22	GHF - 1.19	1.220	NT (SP em GHF - 1.17)
23	GHF - 1.23	254	-----
24 - 25	GHF - 1.24	414	CC***, CC**
26 - 29	GHF - 1.26	123	-----

→ **Subst. 5**
17 mg

NT: Não trabalhada SP: Substância predominante CC: Cromatografia em coluna
 * Resultado não satisfatório ** Sílica gel (230-400 mesh) - resultado não satisfatório
 ***Sephadex LH-20 - resultado não satisfatório

3.4. Ensaio larvicida frente ao *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* foram incubados em água potável por um período de 3 a 4 dias em temperatura ambiente até alcançar o 3º estágio larval, sendo utilizado como alimento um composto de farinha de peixe, pó de fígado bovino e soja (Figuras 8 e 9). Todo o processo de desenvolvimento das larvas foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPCS-INPA).



Figura 8. Incubação dos ovos de *Aedes aegypti*



Figura 9. Larvas de *Aedes aegypti* no 3º estágio

Os óleos essenciais foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg.mL^{-1} (solução estoque). O ensaio foi realizado em copos descartáveis com larvas de 3º estágio (10 larvas / copo), onde adicionou-se alíquotas da solução estoque, água potável até o volume final de 5,0 mL e alimento para as larvas (farinha de peixe, pó de fígado bovino e soja). Os testes foram realizados em triplicata e paralelamente foi conduzido o teste em branco (DMSO e água, 100 µg.mL^{-1}), como ilustrado na figura 10.



Figura 10. Ensaio larvicida dos óleos essenciais contra *Aedes aegypti*

A mortalidade foi avaliada após 24 e 48h de exposição e indicada pela ausência de movimentos das larvas. Os dados de mortalidade foram convertidos em valores de Probit e plotados contra o log das concentrações. Após análise de regressão linear, os valores da CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança foram obtidos por interpolação gráfica.

As substâncias isoladas de *G. humaitensis* não foram avaliadas no teste larvicida por apresentarem pouca massa ou por serem insolúveis em DMSO.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Óleos essenciais

Os maiores rendimentos foram obtidos para os óleos essenciais de folhas de *G. silvatica* e galhos de *G. humaitensis* (Tabela 4). O quadro 7 mostra as estruturas dos sesquiterpenos identificados por CG/EM dos óleos essenciais.

Nos galhos de *G. convergens* foi identificada 82,04% da composição do óleo, totalizando 16 sesquiterpenos (3 oxigenados), sendo os mais abundantes os não oxigenados α -santaleno (26,26%), α -copaeno (14,61%), drima-7,9(11)-diene (6,85%) e β -santaleno (6,32%) (Figura 11 e Tabela 6). No óleo dos galhos de *G. humaitensis* identificaram-se 82,14% dos constituintes, sendo estes 13 sesquiterpenos (3 oxigenados). Os mais abundantes foram o epóxido de cariofileno (40,91%), epóxido de humuleno II (14,43%) e β -bisaboleno (8,36%) (Figura 12 e Tabela 7).

Na espécie *G. scabra* foram identificados 80,66% dos constituintes do óleo das folhas, compreendendo 17 sesquiterpenos (3 oxigenados), predominando *cis*-cariofileno (33,37%), α -*trans*-bergamotemo (11,88%) β -bourboneno (5,42%) e γ -muuroleno (5,00%) (Figura 13 e Tabela 8).

No óleo das folhas de *G. silvatica* identificaram-se 8 sesquiterpenos e 1 diterpeno, correspondendo a 69,96 % dos componentes analisados. Entre os sesquiterpenos, apenas 3 são oxigenados. No óleo essencial nos galhos deste espécimen identificou-se 55,47% da composição, sendo 18 sesquiterpenos (6 oxigenados). Os componentes majoritários foram os sesquiterpenos oxigenados, epóxido de cariofileno (36,54% em folhas; 8,57% em galhos), espatulenol (14,34% em galhos e 4,17% em folhas), e o não oxigenado β -elemeno (6,20% em folhas), além do diterpeno kaureno em folhas (15,61%) (Figuras 14 e 15 e Tabelas 9 e 10).

A tabela 5 mostra um resumo do número de constituintes voláteis dos óleos essenciais analisados bem como a quantificação dos sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados.

Tabela 4. Rendimento (%) dos óleos essenciais de *G. convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*

Espécies	Rendimento (%)	
	Galhos	Folhas
<i>G. convergens</i>	0,05	
<i>G. humaitensis</i>	0,29	
<i>G. scabra</i>		0,20
<i>G. silvatica</i>	0,05	1,26

Tabela 5. Número de constituintes identificados nos óleos de *G. convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica*

Espécies	Nº de constituintes	Sesquiterpeno		Diterpeno
		NO	O	NO
<i>G. humaitensis</i> - G	13	10	3	---
<i>G. convergens</i> - G	16	13	3	---
<i>G. scabra</i> - F	17	14	3	---
<i>G. silvatica</i> - F	9	5	3	1
<i>G. silvatica</i> - G	18	12	6	---

O: Oxigenado; NO: Não oxigenado; F: Folhas; G: Galhos

Tabela 6. Composição química do óleo essencial dos galhos de *G. convergens*

Pico	Substância	[%]	IK*	IK**
1	α -copaeno	14,61	1375	1376
2	β -elemeno	1,95	1390	1391
4	α -santaleno	26,26	1419	1420
5	α - <i>trans</i> -bergamotemo	2,32	1435	1436
6	β -santaleno	6,32	1458	1462
7	drima-7,9(11)-dieno	6,85	1467	1469
9	ar-curcumeno	2,02	1479	1483
11	β -selineno	1,88	1485	1485
12	α -selineno	2,02	1492	1494
13	α -muuroleno	1,72	1498	1499
14	β -bisaboleno	5,18	1507	1509
16	<i>cis</i> -calameneno	2,61	1519	1521
17	espatulenol	3,99	1572	1576
18	epóxido de cariofileno	1,27	1579	1581
20	1-epi-cubenol	1,77	1624	1627
23	cadaleno	1,27	1668	1674

(*) Índice de retenção experimental

(**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 1995)

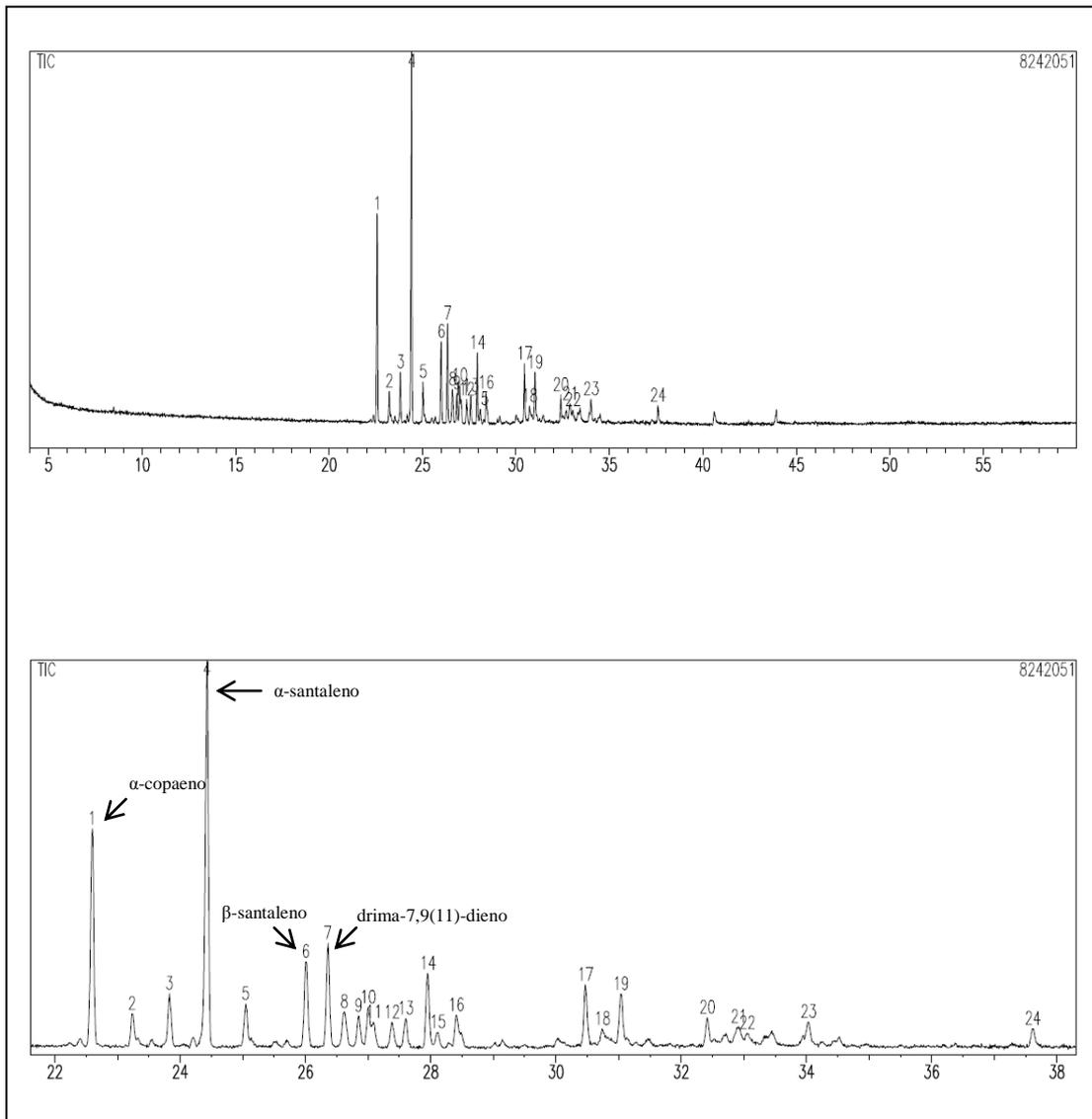


Figura 11. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de *G. convergens*

Tabela 7. Composição química do óleo essencial dos galhos de *G. humaitensis*

Pico	Substância	[%]	IK*	IK**
1	δ -elemeno	1,01	1335	1339
2	α -copaeno	1,84	1373	1376
3	β -elemeno	2,27	1389	1391
4	α - <i>trans</i> -bergamoteno	1,07	1433	1436
5	β -santaleno	0,98	1457	1462
6	γ -muuroleno	3,71	1473	1477
7	ar-curcumeno	2,05	1478	1483
9	β -bisaboleno	8,36	1505	1509
10	γ -cadineno	1,97	1509	1513
12	epóxido de cariofileno	40,91	1577	1580
14	epóxido humuleno II	14,43	1602	1606
15	1-epi-cubenol	2,60	1622	1627
21	cadaleno	0,94	1667	1674

(*) Índice de retenção experimental

(**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 1995)

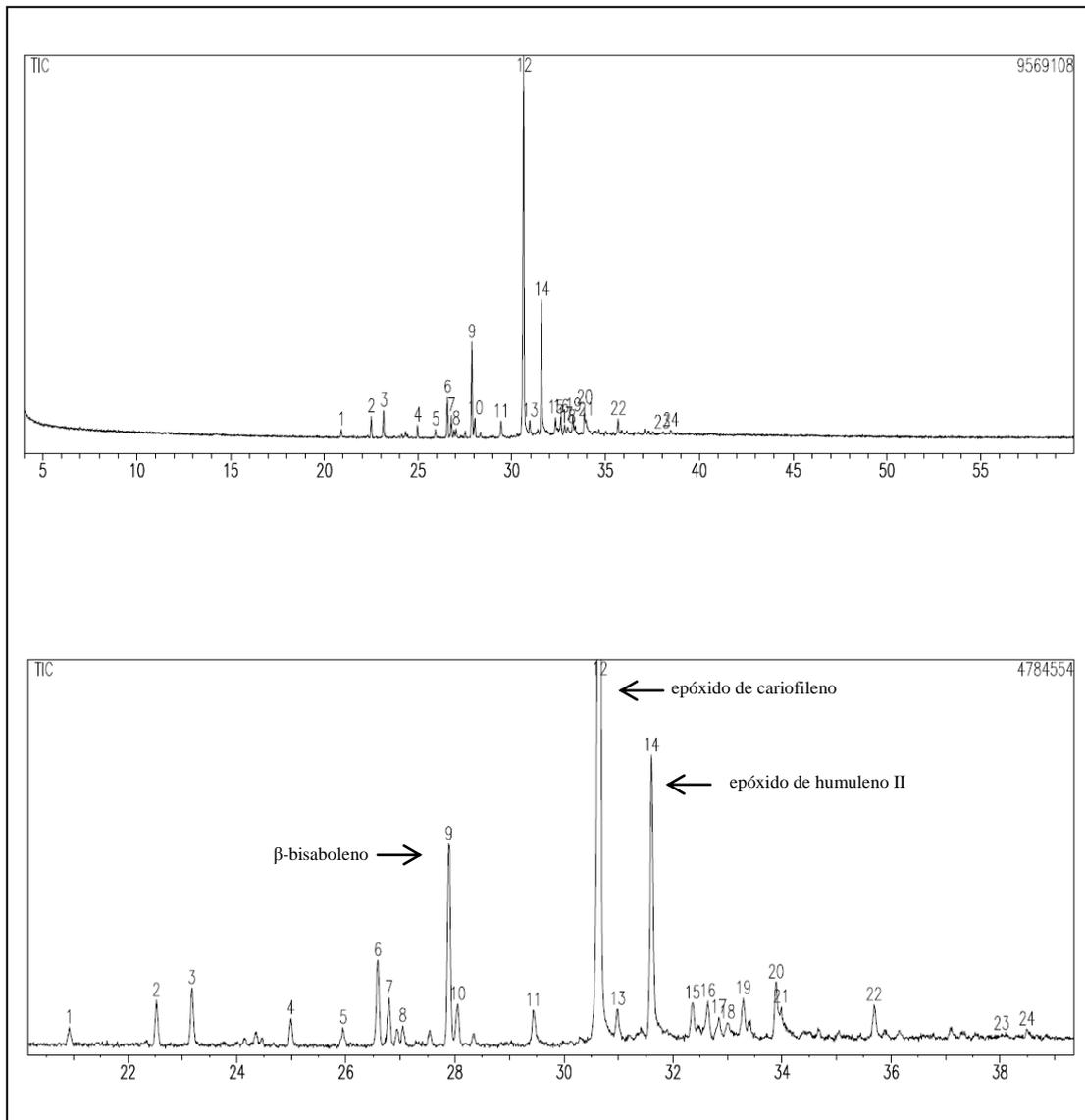


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de *G. humaitensis*

Tabela 8. Composição química do óleo essencial das folhas de *G. scabra*

Pico	Substância	[%]	IK*	IK**
1	δ -elemeno	2,60	1336	1339
2	α -ylangeno	0,71	1370	1372
3	α -copaeno	2,44	1375	1376
4	β -bourboneno	5,42	1383	1384
5	β -elemeno	0,88	1390	1391
6	<i>cis</i> -cariofileno	33,37	1405	1404
7	α - <i>cis</i> -bergamotemo	1,28	1414	1415
9	β -gurjuneno	2,08	1427	1432
10	α - <i>trans</i> -bergamotemo	11,88	1435	1436
11	α -humuleno	1,02	1450	1454
12	γ -muuroleno	5,00	1474	1477
14	ar-curcumeno	2,67	1479	1483
16	α -muuroleno	2,36	1497	1499
17	γ -cadineno	3,48	1510	1513
18	<i>trans</i> -nerolidol	1,63	1560	1564
19	epóxido de cariofileno	0,54	1577	1581
21	<i>epi</i> - α -cadinol	3,30	1637	1640

(*) Índice de retenção experimental

(**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 1995)

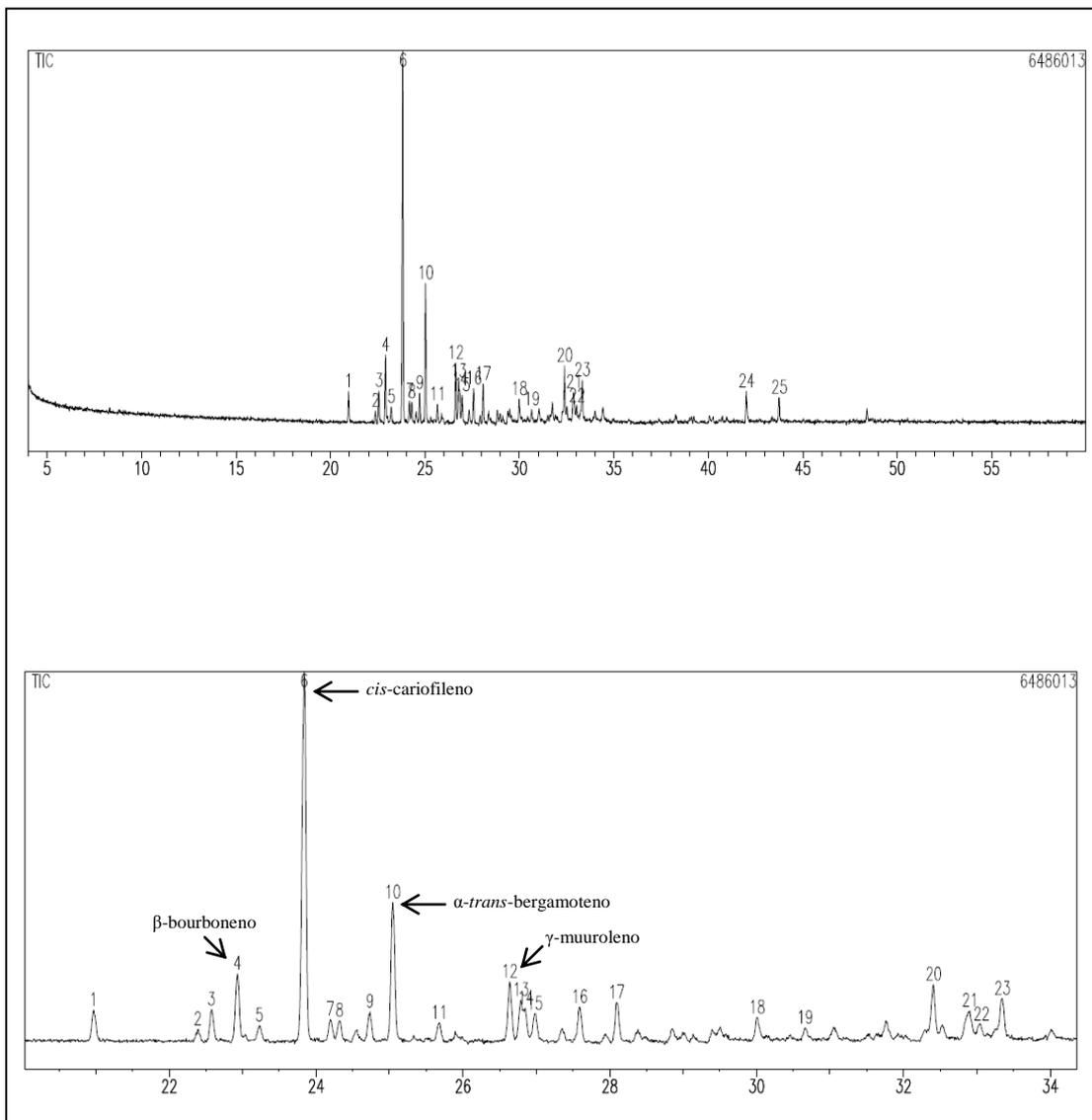


Figura 13. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *G. scabra*

Tabela 9. Composição química do óleo essencial das folhas de *G. silvatica*

Pico	Substância	[%]	IK*	IK**
3	α -copaeno	2,81	1377	1376
4	β -bourboneno	0,40	1385	1384
5	β -elemeno	6,20	1392	1391
7	γ -muuroleno	1,05	1476	1477
8	β -selineno	1,06	1485	1485
14	espatulenol	4,17	1576	1576
15	epóxido de cariofileno	36,54	1581	1581
17	epóxido humuleno II	2,12	1605	1606
32	kaureno	15,61	2034	2034

(*) Índice de retenção experimental

(**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 1995)

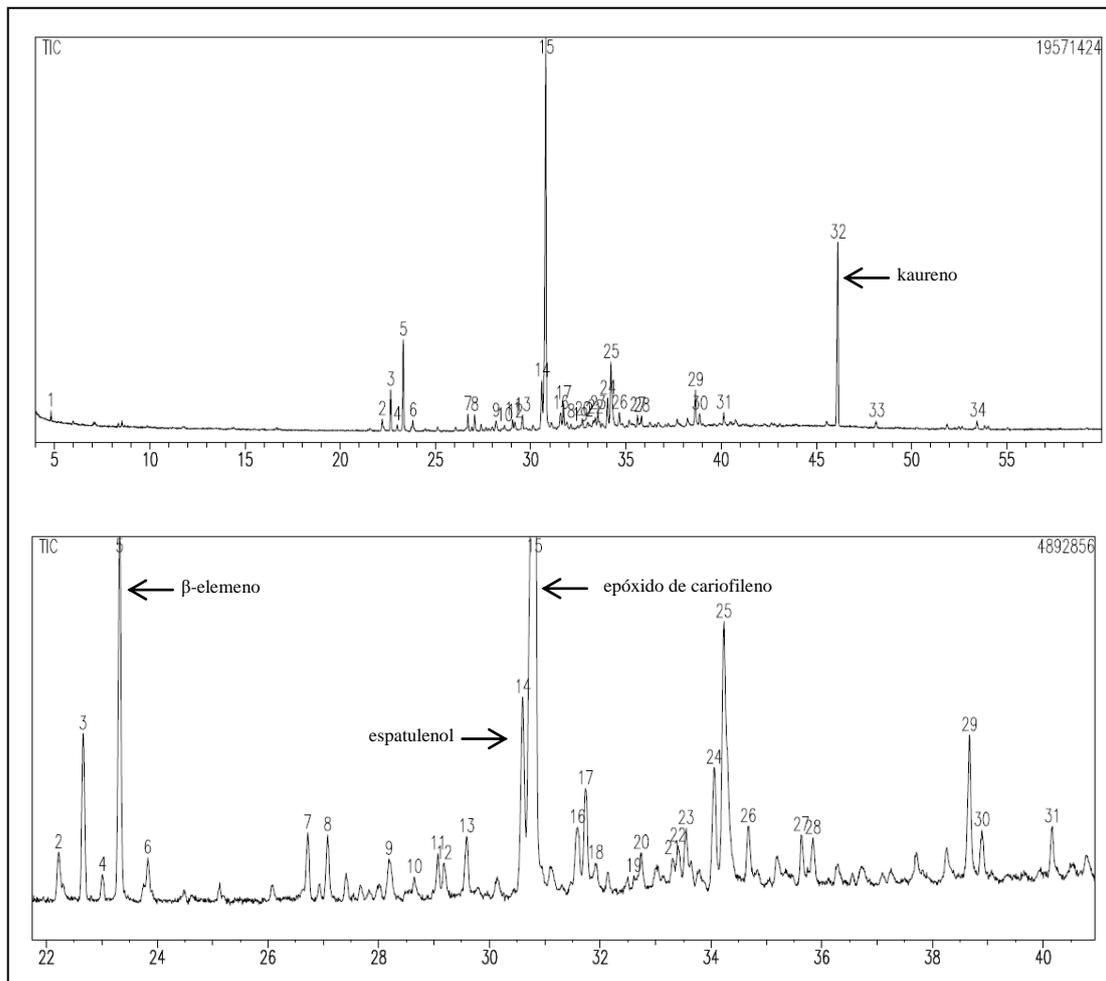
**Figura 14.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *G. silvatica*

Tabela 10. Composição química do óleo essencial dos galhos de *G. silvatica*

Pico	Substância	[%]	IK*	IK**
1	<i>α-trans</i> -bergamotemo	0,73	1436	1436
2	<i>γ</i> -muuroleno	2,91	1475	1477
3	<i>β</i> -selineno	0,69	1484	1485
4	<i>cis</i> -cadina-1,4-dieno	0,86	1493	1495
5	<i>α</i> -muuroleno	1,65	1499	1499
6	<i>β</i> -bisaboleno	2,90	1508	1509
7	<i>γ</i> -cadineno	2,15	1512	1513
8	6-metil-ionona	0,87	1517	1521
9	<i>cis</i> -calameneno	1,10	1520	1521
10	(E)-iso- <i>γ</i> -bisaboleno	2,31	1525	1529
13	espatulenol	14,34	1574	1576
14	epóxido de cariofileno	8,57	1579	1580
18	epóxido humuleno II	2,39	1605	1606
19	1- <i>epi</i> -cubenol	1,90	1625	1627
20	<i>epi-α</i> -cadinol	3,27	1639	1640
22	<i>β</i> -eudesmol	4,65	1646	1649
25	cadaleno	2,85	1670	1674
26	mustakone	1,33	1672	1677

(*) Índice de retenção experimental

(**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 1995)

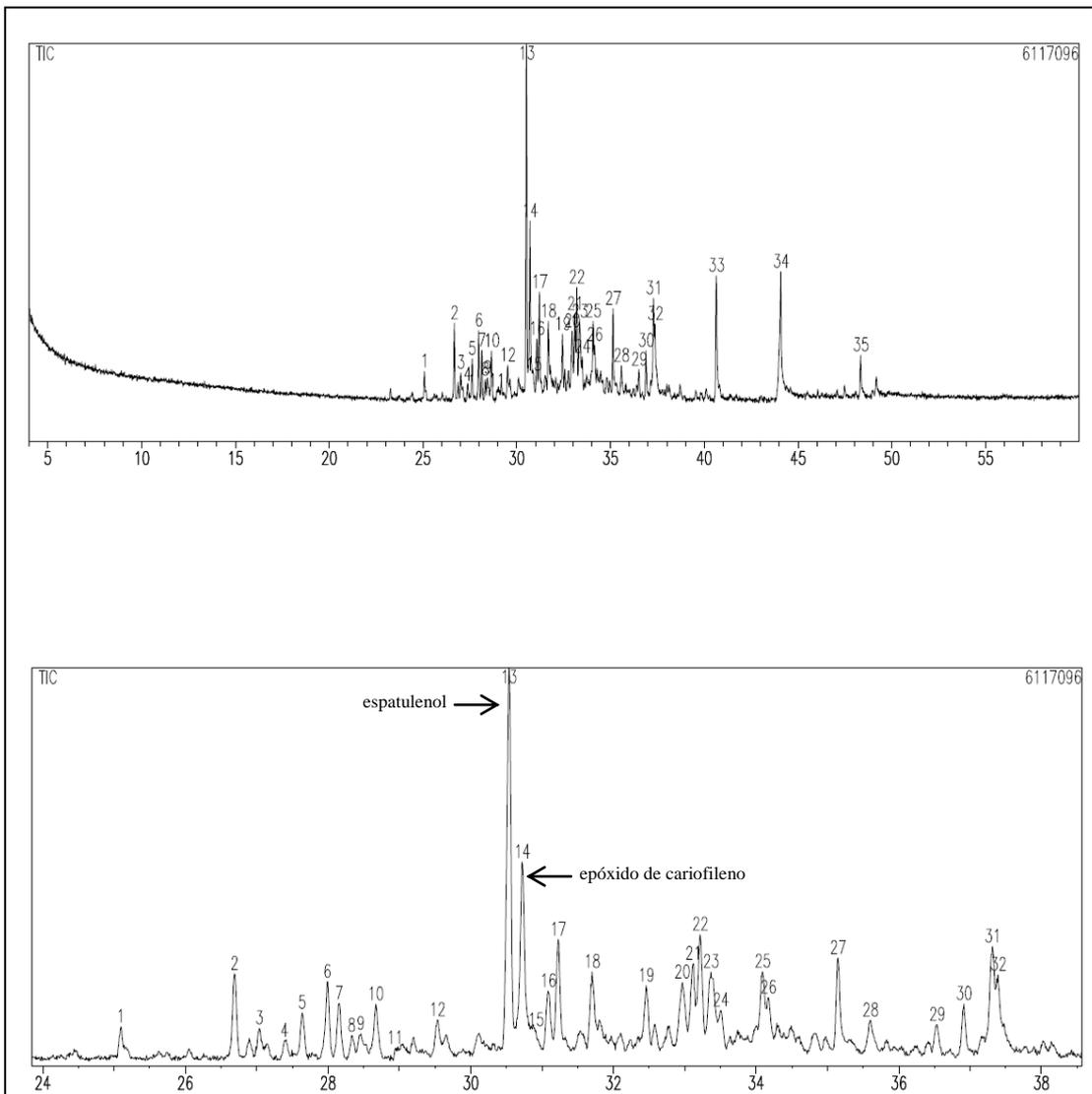
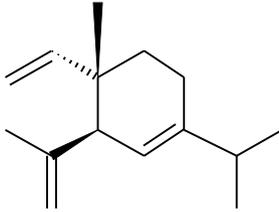
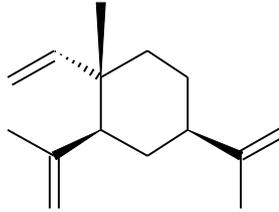
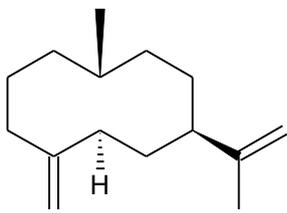
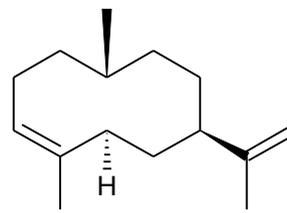
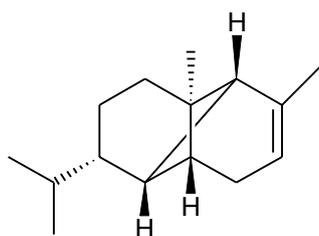
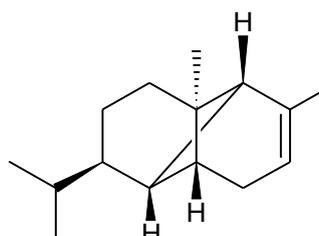


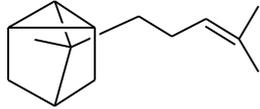
Figura 15. Cromatograma do óleo essencial dos galhos de *G. silvatica*

Quadro 7. Principais sesquiterpenos identificados nos óleos de *G. convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica* com tipo de esqueleto e parte da planta

<u>Elemeno</u>	
δ-elemeno	β-elemeno
	
<i>G. scabra</i> - F <i>G. humaitensis</i> - G	<i>G. scabra</i> - F <i>G. humaitensis</i> - G <i>G. convergens</i> - G <i>G. silvatica</i> - F
<u>Germacrano</u>	
β-selineno	α-selineno
	
<i>G. convergens</i> - G <i>G. silvatica</i> - F	<i>G. convergens</i> - G
<u>Copaano</u>	
α-ylangeno	α-copaeno
	
<i>G. scabra</i> - F	<i>G. scabra</i> - F <i>G. humaitensis</i> - G <i>G. convergens</i> - G <i>G. silvatica</i> - F

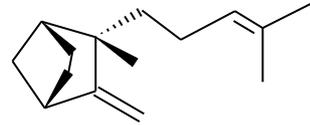
Sesquipinano e Sesquicanfano

α -santaleno



G. convergens - G

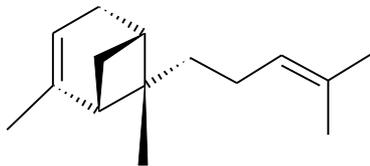
β -santaleno



G. humaitensis - G

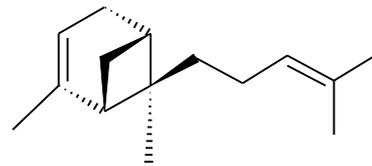
G. convergens - G

α -*cis*-bergamoteno



G. scabra - F

α -*trans*-bergamotemo



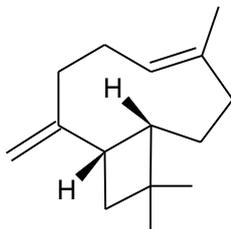
G. scabra - F

G. humaitensis - G

G. convergens - G

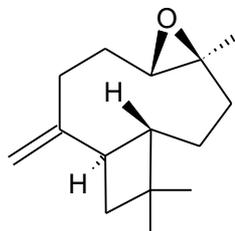
Cariofilano

***cis*-cariofileno**



G. scabra - F

epóxido de cariofileno



G. scabra - F

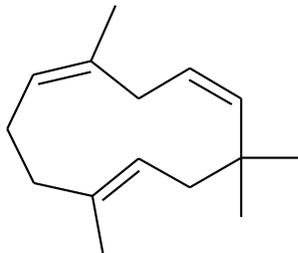
G. humaitensis - G

G. convergens - G

G. silvatica - F, G

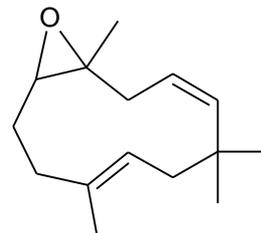
Humulano

α -humuleno



G. scabra - F

epóxido de humuleno II

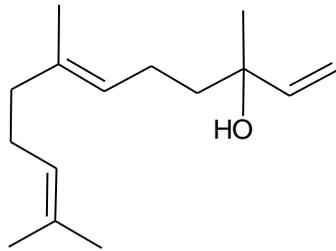


G. humaitensis - G

G. silvatica - F

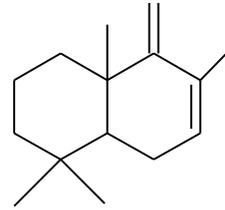
Farnesano e Biciclofarnesano

***trans*-nerolidol**



G. scabra - F

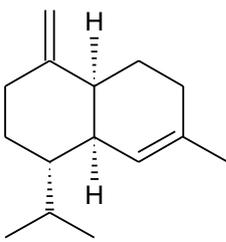
drima-7,9(11)-diene



G. convergens - G

Cadinano

γ -muuroloeno

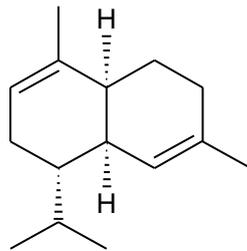


G. scabra - F

G. humaitensis - G

G. silvatica - F

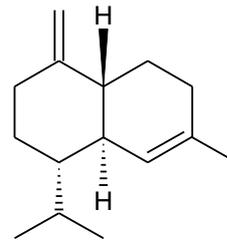
α -muuroloeno



G. scabra - F

G. convergens - G

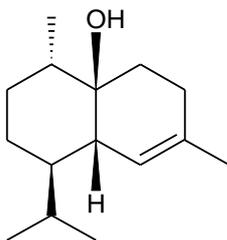
γ -cadineno



G. scabra - F

G. humaitensis - G

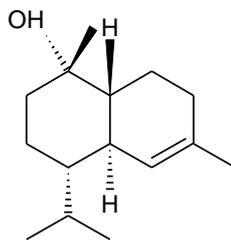
1-*epi*-cubenol



G. humaitensis - G

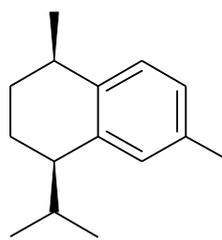
G. convergens - G

***epi*- α -cadinol**



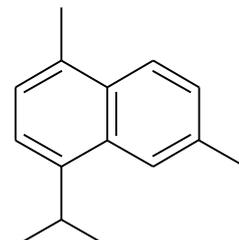
G. scabra - F

***cis*-calameneno**



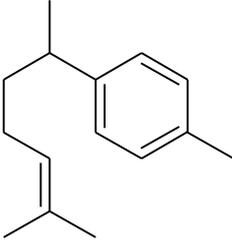
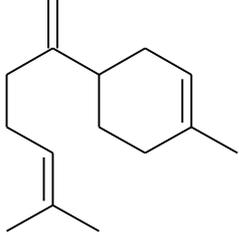
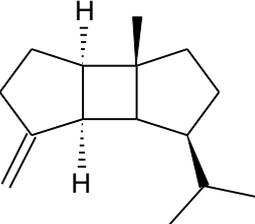
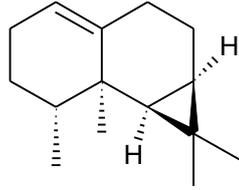
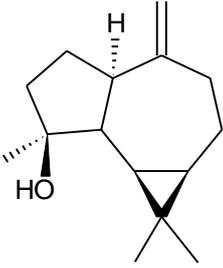
G. convergens - G

cadaleno



G. humaitensis - G

G. convergens - G

<u>Bisabolano</u>		
α-curcumeno		β-bisaboleno
		
<i>G. scabra</i> - F		<i>G. humaitensis</i> - G
<i>G. humaitensis</i> - G		<i>G. convergens</i> - G
<i>G. convergens</i> - G		
<u>Outros</u>		
β-bourboneno	β-gurjuneno	espatulenol
		
<i>G. scabra</i> - F	<i>G. scabra</i> - F	<i>G. convergens</i> - G
<i>G. silvatica</i> - F		<i>G. silvatica</i> - F, G

4.2. Identificação das substâncias isoladas dos extratos de *Guarea humaitensis*

Substância 1

Obtenção: Esquema 4 (GHG - 2.10.11.6)

Aspecto: óleo incolor

Avaliação em CCD: luz UV (254 e 365 nm) - apresenta fluorescência

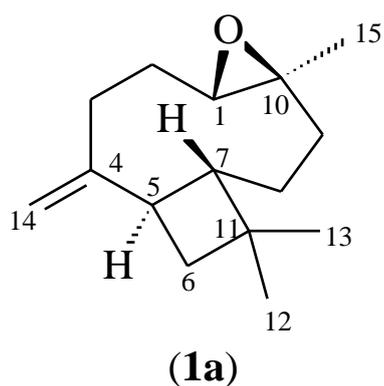
vanilina sulfúrica - coloração roxa

Rf= 0,55 [Hex: AcOEt (98:2)]

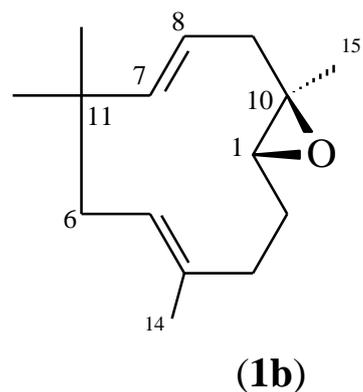
Os sinais dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C (Figuras 16 e 17) de **1** foram compatíveis com a presença de uma mistura de três sesquiterpenos: epóxido de cariofileno (**1a**), epóxido de humuleno II (**1b**) e outro sesquiterpeno não identificado.

Para o epóxido de cariofileno (**1a**) foram observados no espectro de RMN ^1H sinais em δ 4,97 (*sl*) e 4,86 (*sl*) atribuídos aos hidrogênios do metileno (H-14); δ 2,88 (*dd*; 10,4 e 4,4 Hz) de hidrogênio metínico (H-1) compatível para o grupo epóxido. Os sinais das metilas foram observados em δ 1,20 (Me-15), 1,00 (Me-12), 0,98 (Me-13). O espectro mostra também um sinal em δ 2,34 (*ddd*; 12,8; 8,4 e 4,4 Hz) referente a H-3a e um multiplete em δ 1,77 H-3b. Regiões congestionadas, de difícil interpretação da multiplicidade, aparecem entre δ 1,27 e 1,38 para H-2 e H-9b; δ 2,05 - 2,14 atribuídos a H-9a, H-5 e H-6a; e em δ 1,66 -1,65 referentes a H-7 e H6b. O epóxido de humuleno II (**1b**) foi detectado na mistura devido os sinais com menor intensidade de hidrogênios olefínicos em δ 4,97 (H-5), δ 5,13 (H-7) e 5,27 (H-8).

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 11) foram compatíveis para mistura, conforme mostra a literatura (MOREIRA et al., 2007; ECONOMIDES; ADAM, 1998).



Epóxido de Cariofileno



Epóxido de Humuleno II

Tabela 11. RMN de ^{13}C dos sesquiterpenos **1a** e **1b**

Posição	RMN ^{13}C (1a)	RMN ^{13}C (1b)
1	63,8	61,9
2	30,2	37,2
3	29,8	26,9
4	151,7	132,5
5	48,8	125,7
6	39,8	42,9
7	50,8	143,1
8	27,2	122,1
9	39,2	40,3
10	59,9	62,6
11	34,0	36,7
12	21,6	30,4
13	29,9	24,8
14	112,8	14,1
15	17,2	17,0

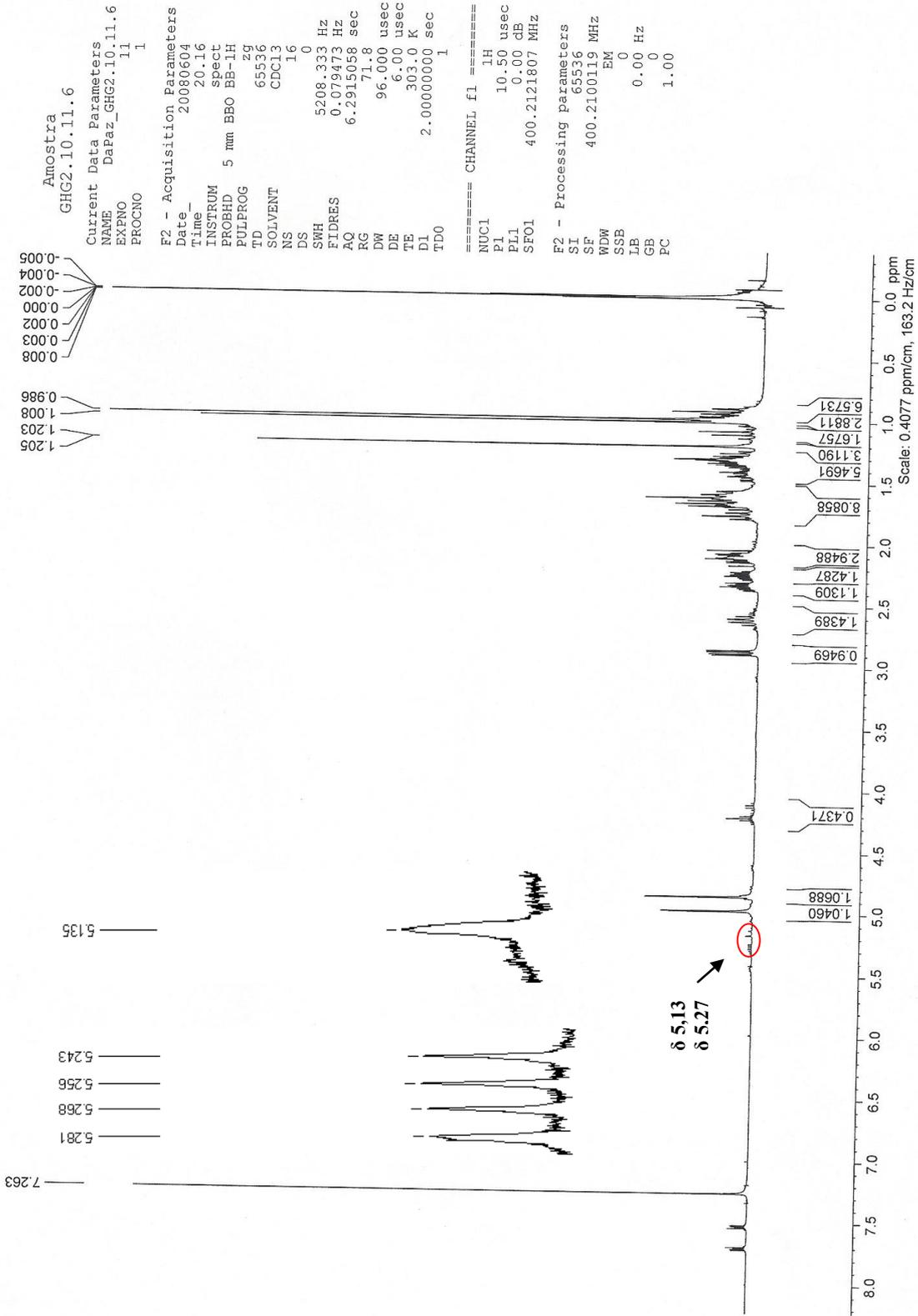


Figura 16. Espectro de RMN ¹H de **1a** e **1b** (400 MHz, CDCl₃)

```

Amostra
GHG2.10.11.6
Current Data Parameters
NAME DaPar_GHG2.10.11.6
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080604
Time 20.20
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-IH
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 49779
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 46341
DW 20.850 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 0.10100000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 0.00100000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 6.63 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 100.6429474 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waitz16
NUC2 1H
PCPD2 120.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 13.00 dB
PL13 13.00 dB
SFO2 400.2116008 MHz

F2 - Processing Parameters
SI 32768
SF 100.6328848 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 3.00 Hz
GB 0
PC 1.00
    
```

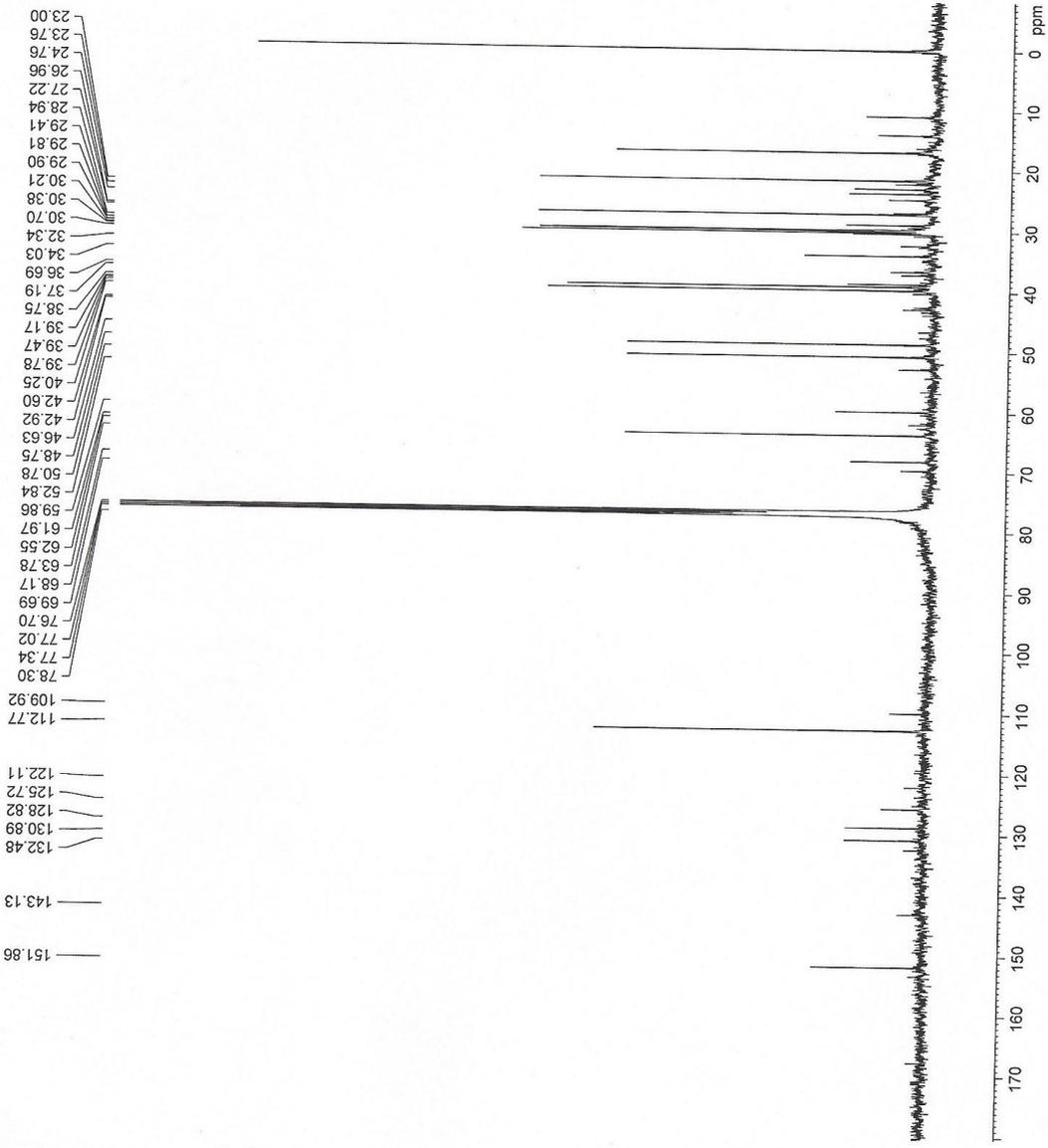


Figura 17. Espectro de RMN ¹³C de 1a e 1b (100 MHz, CDCl₃)

Substância 2

Obtenção: Esquemas 5, 6 e 8 (GHG - 2.11.7; GHG - 2. 12.9; GHG - 3.11)

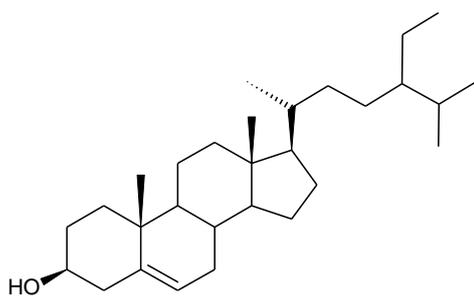
Aspecto: sólido branco cristalino

Avaliação em CCD: luz UV (254 e 365 nm) - sem fluorescência

vanilina sulfúrica - coloração roxa

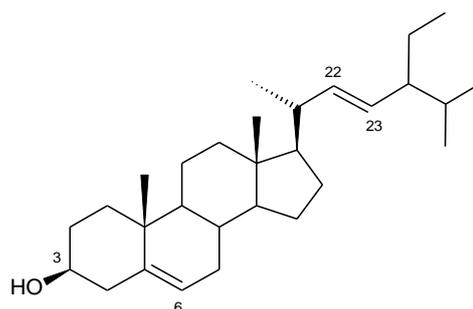
R_f = 0,47 [CH₂Cl₂: AcOEt (9:1)]

A avaliação em CCD e o aspecto sólido de **2**, foram indicativos da presença de β -sistosterol, no entanto para verificação da presença do estigmasterol, submeteu-se a amostra a análise por RMN de ¹H, cujo espectro (Figura 18) mostrou um dubleto largo em δ 5,35 ($J = 5,2$ Hz), atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e um multipletto em δ 3,53 referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (H-3). A presença do estigmasterol foi confirmada pela presença de dois duplos dubletos em δ 5,15 ($J = 15,2$ e 8,4 Hz) e em δ 5,02 ($J = 15,2$ e 8,4 Hz) atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-23 e H-22, respectivamente. Assim, a mistura foi identificada como β -sistosterol (**2a**) e estigmasterol (**2b**), cujos valores das integrais apresentadas no espectro de RMN de ¹H sugeriram a presença de **2b** em torno de 40%.



(2a)

β -Sistosterol



(2b)

Estigmasterol

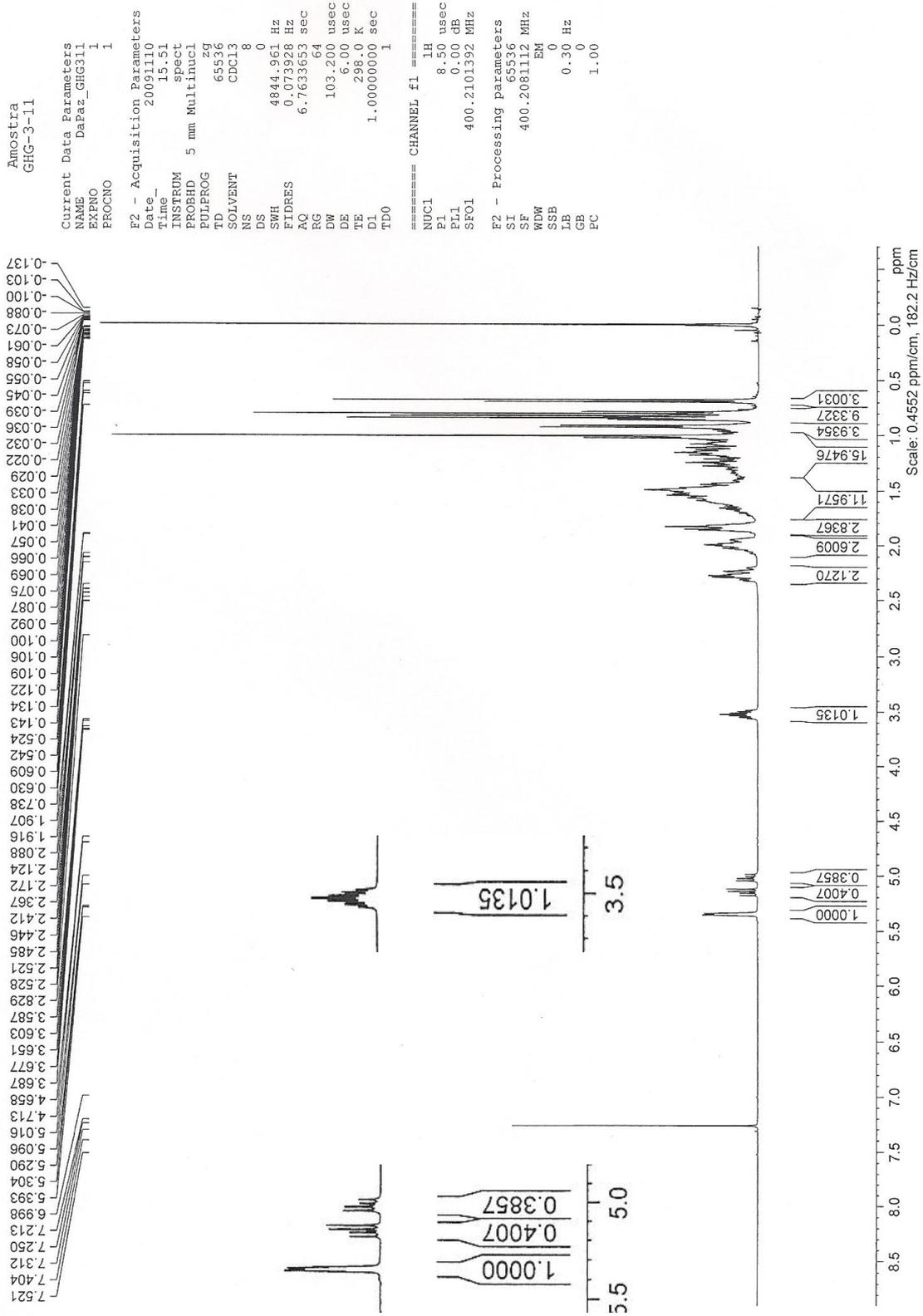


Figura 18. Espectro de RMN ¹H de 2a e 2b (400 MHz, CDCl₃)

Substância 3

Isolamento: Esquema 7 (GHG - 2.18.7.13.59)

Aspecto: sólido branco (tipo agulha)

Avaliação em CCD: luz UV (254 e 365 nm) - apresenta fluorescência

vanilina sulfúrica - coloração roxa

Rf = 0,51 [CH₂Cl₂: AcOEt (7:3)]

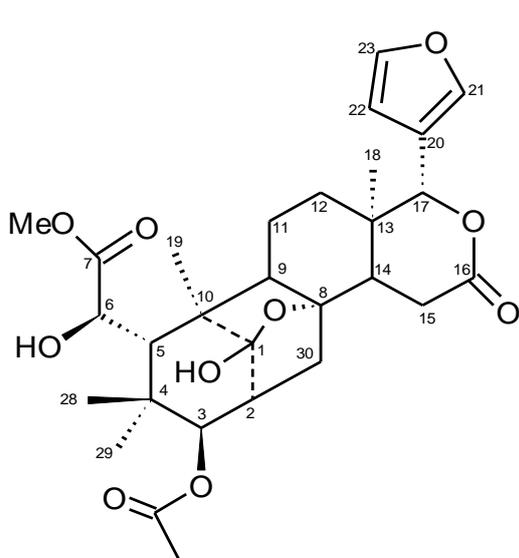
No espectro de RMN de ¹H (Tabela 12 e Figuras 19 - 20) de **3** a presença de cinco singletos referentes a metilas (δ 1,46; 1,31; 1,25; 0,99 e 0,79) e sinais característicos de anel furano (δ 7,45; 7,44 e 6,37) foram indicativos da presença de limonóide. Foram observados 3 hidrogênios oximetínicos - o sinal em δ 5,42 como singleto foi atribuído ao H-17, e os sinais em δ 4,84 (dubleto) ao H-3 e δ 4,37 (singleto largo) ao H-6. Os deslocamentos químicos verificados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C são semelhantes aos apresentados para Grandifolídeo A (Modelo I; ZHANG et al., 2008). No entanto, os acoplamentos verificados no espectro de COSY (Figura 22) entre os sinais em δ 2,75 com os sinais em δ 4,84 (H-3) e 1,70 (H-30b) indicam a presença de hidrogênio na posição 2, diferente de Grandifolídeo A (Modelo I) que não apresenta hidrogênio nesta posição.

No espectro de RMN de ¹³C (Tabela 12 e Figura 21) os deslocamentos de carbono hemiacetalico em δ 108,5 (C-1) e de outros carbonos oxigenados em 79,8 (C-8), 78,2 (C-3) e 63,7 (C-9) sugeriram o sistema triclodecano do limonóide. O modelo I apresenta uma oxigenação adicional no C-2 (δ 79,5) desse sistema, típico de mexicanolídeo. Os sinais atribuídos aos carbonos do anel furano C-23 (δ 143,1), C-22 (δ 109,8), C-21 (δ 140,6) e C-20 (δ 121,5) foram confirmados através dos mapas de contorno HSQC (Tabela 13 e Figura 23).

O mapa de contorno HMBC (Tabela 13 e Figura 24-25) mostra correlações importantes para o sistema triclodecano análogo ao do mexicanolídeo, tais como a correlação do sinal em δ 1,70 (H- 30b) a duas ligações (²J) com C-8 (δ 79,8) e a três ligações (³J) com C-9 (δ 63,7), e do sinal em δ 2,20 (H- 30a) a duas ligações (²J) com C-2 (δ 44,8)

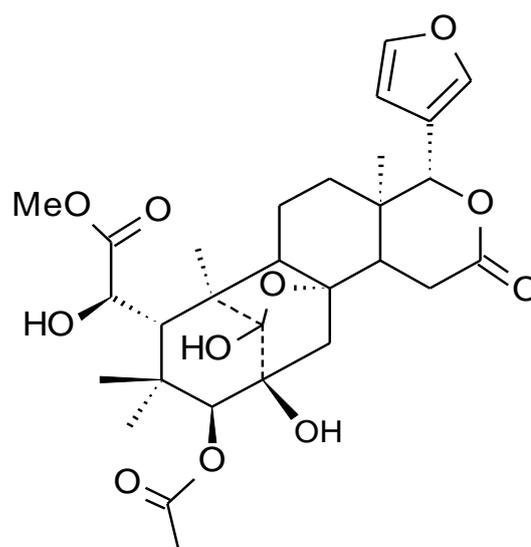
e a três ligações (3J) com C-3 (δ 78,2). A metila 19 (δ 1,31) correlacionou com δ 45,1 (C-10) a duas ligações (2J) e com δ 45,6 (C-5), 63,7 (C-9) e 108,5 (C-1) a três ligações (3J).

A ocorrência de limonóides com esqueleto do tipo mexicanolídeo tem sido relatada na família Meliaceae, sendo este o primeiro registro de isolamento de 2-desoxigrandifolídeo A (3).

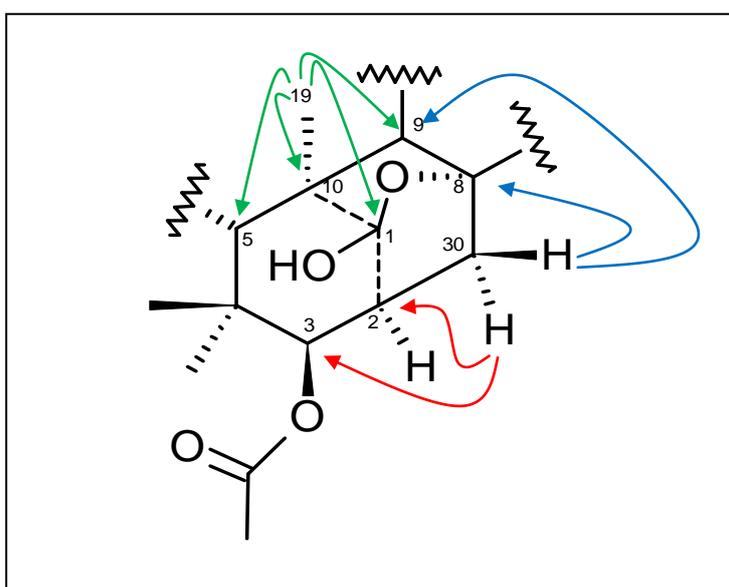


(3)

2-desoxigrandifolídeo A



Modelo I



Correlações de H-30 e Me-19 no HMBC

Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **3** e comparação com a literatura

N ^o	SUBSTÂNCIA 3		MODELO I [#]	
	RMN ^1H *	RMN ^{13}C **	RMN ^1H *	RMN ^{13}C **
1		108,5		108,3
2	2,75 (m)	44,8		79,5
3	4,84 (d; 8,8 Hz)	78,2	4,74 (s)	83,7
4		38,3		38,1
5	2,76 ^a	45,6	2,38 (d; 4,0 Hz)	49,1
6	4,37 (sl)	72,3	4,38 (sl)	71,0
7		177,2		175,6
8		79,8		78,2
9	1,60 ^b	63,7	1,61 ^b	62,9
10		45,1		44,1
11	1,81 ^c (H-11a) 1,74 ^d (H-1b)	20,0	1,88 (m); 1,59 ^d	20,4
12	1,81 ^e 1,33 ^f	35,9	1,82 (dl; 14,9 Hz); 1,33 (m)	35,4
13		35,4		35,2
14	2,15 (tl, H-12a)	45,3		44,7
15	2,83 (dl, H-12b)	28,1	2,86 ^g	27,6
16		171,8		170,4
17	5,42 (s)	78,7	5,32 (s)	78,1
18	0,99 (s)	22,2	0,98 (s)	22,5
19	1,31 (s)	21,7	1,39 (s)	22,3
20		121,5		121,2
21	7,45(m)	140,6	7,49 (sl)	140,7
22	6,37 (m)	109,8	6,40 (d; 1,2 Hz)	109,9
23	7,44 (m)	143,1	7,43 (t; 1,7 Hz)	143,0
28	0,79 (s)	23,8	0,95 (s)	24,8
29	1,46 (s)	25,1	1,30 (s)	23,9
30	2,20 ^h (H-30a) 1,70 ⁱ (H-30b)	29,0	2,53 (d; 14,3 Hz) 1,57 ⁱ	39,7
<u>OMe</u>	3,88 (s)	52,3	3,81 (s)	52,6
<u>COMe</u>		171,5		171,9
<u>COMe</u>	2,06 (s)	21,1	2,15 (s)	21,0

[#] ZHANG et al., 2008; *400 MHz, CDCl₃; **100 MHz, CDCl₃; ^{a-i} multiplicidade não definida

Tabela 13. Dados de HSQC e HMBC (400/100 MHz, CDCl₃) da substância **03**

δ (ppm)	1J	2J	3J
4,84 (H-3)	78,2	44,8 (C-2)	45,6 (C-5)
		38,3 (C-4)	25,1 (Me-29)
			29,0 (C-30)
			171,5 (COMe)
2,76 (H-5)	45,6	38,3 (C-4)	78,2 (C-3)
		72,3 (C-6)	63,7 (C-9)
		45,1 (C-10)	25,1 (Me-29)
			21,7 (Me-19)
4,37 (H-6)	72,3	45,6 (C-5)	38,3 (C-4)
		177,2 (C-7)	
2,15 (H-14)	45,3	79,8 (C-8)	171,8 (C-16)
		35,4 (C-13)	
2,83 (H-15)	28,1	45,3 (C-14)	79,8 (C-8)
		171,8 (C-16)	35,4 (C-13)
5,42 (H-17)	78,7	35,4 (C-13)	45,3 (C-14)
		121,5 (C-20)	140,6 (C-21)
			109,8 (C-22)
0,99 (Me-18)	22,2	35,4 (C-13)	45,3 (C-14)
			78,7 (C-17)
1,31 (Me-19)	21,7	45,1 (C-10)	45,6 (C-5)
			63,7 (C-9)
			108,5 (C-1)
7,45 (H-21)	140,6	121,5 (C-20)	109,8 (C-22)
6,37 (H-22)	109,8	121,5 (C-20)	140,6 (C-21)
		143,1 (C-23)	
7,44 (H-23)	143,1	109,8 (C-22)	121,5 (C-20)
0,79 (Me-28)	23,8		78,2 (C-3)
		38,3 (C-4)	45,6 (C-5)
			25,1 (Me-29)
1,46 (Me-29)	25,1		78,2 (C-3)
		38,3 (C-4)	45,6 (C-5)
			23,8 (Me-28)
2,20 (H-30a)	29,0	44,8 (C-2)	78,2 (C-3)
1,70 (H-30b)	29,0 (C-30)	79,8 (C-8)	63,7 (C-9)
3,88 (COOMe)	52,3		177,2 (C-7)
2,06 (COMe)	21,1	171,5 (-COMe)	

Obs. H-2, H-9, H-11 e H-12 correlações em regiões de sobreposição

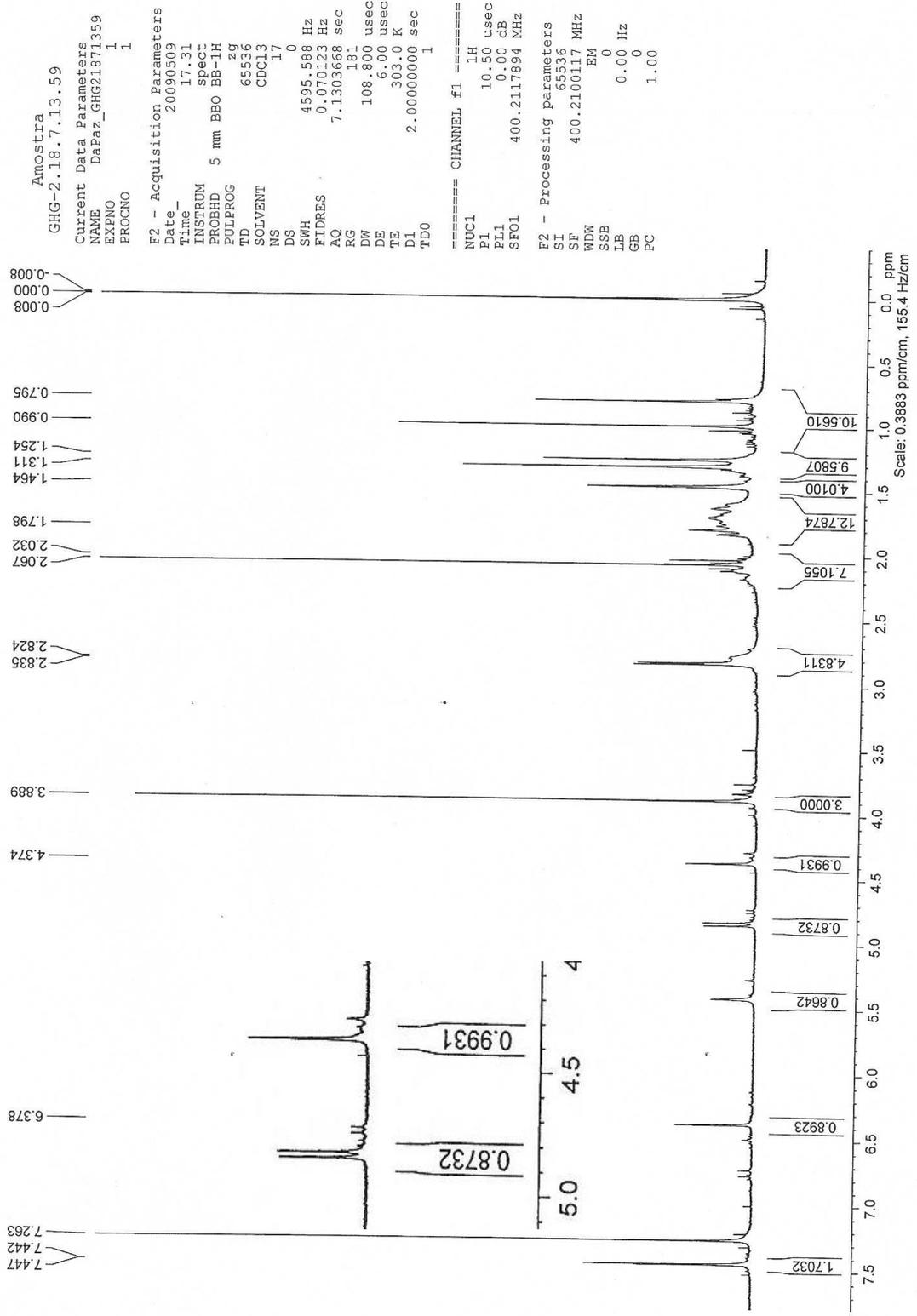


Figura 19. Espectro de RMN ¹H da substância 3 (400 MHz, CDCl₃)

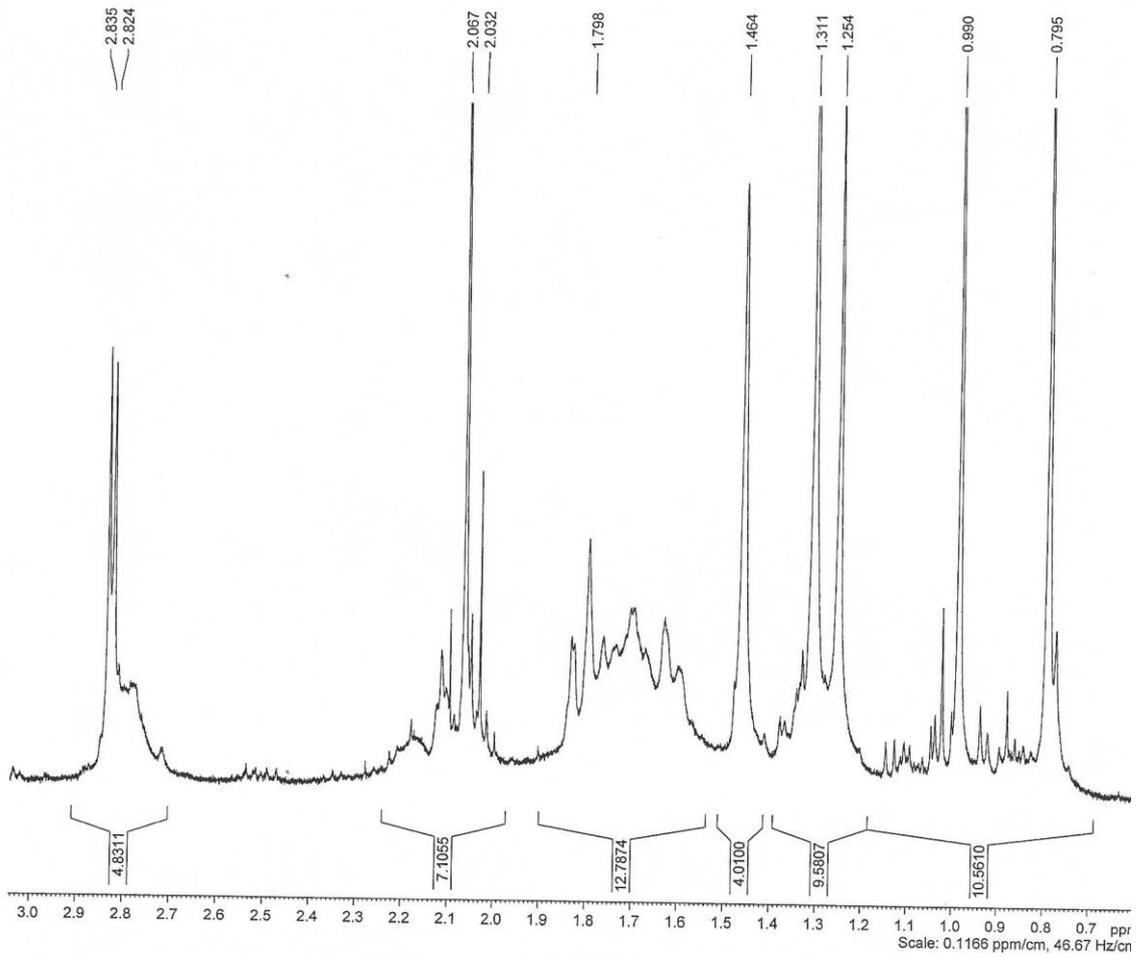


Figura 20. Expansão da região δ 3,0 a 0,7 do espectro de RMN ^1H da substância **3**

Amostra
 GHG-2.18.7.13.59

Current Data Parameters
 NAME DafaF_GHG21871359
 EXENO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20090621
 Time 17.00
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-IH
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 63705
 DS 0
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.731836 Hz
 AQ 0.6832828 sec
 RG 71.8
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.10010000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.00010000 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 6.63 usec
 PL1 -3.00 dB
 SF01 100.6429474 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 120.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 17.00 dB
 PL13 17.00 dB
 SFO2 400.2116008 MHz

F2 - Processing Parameters
 SI 32768
 SF 100.6328859 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

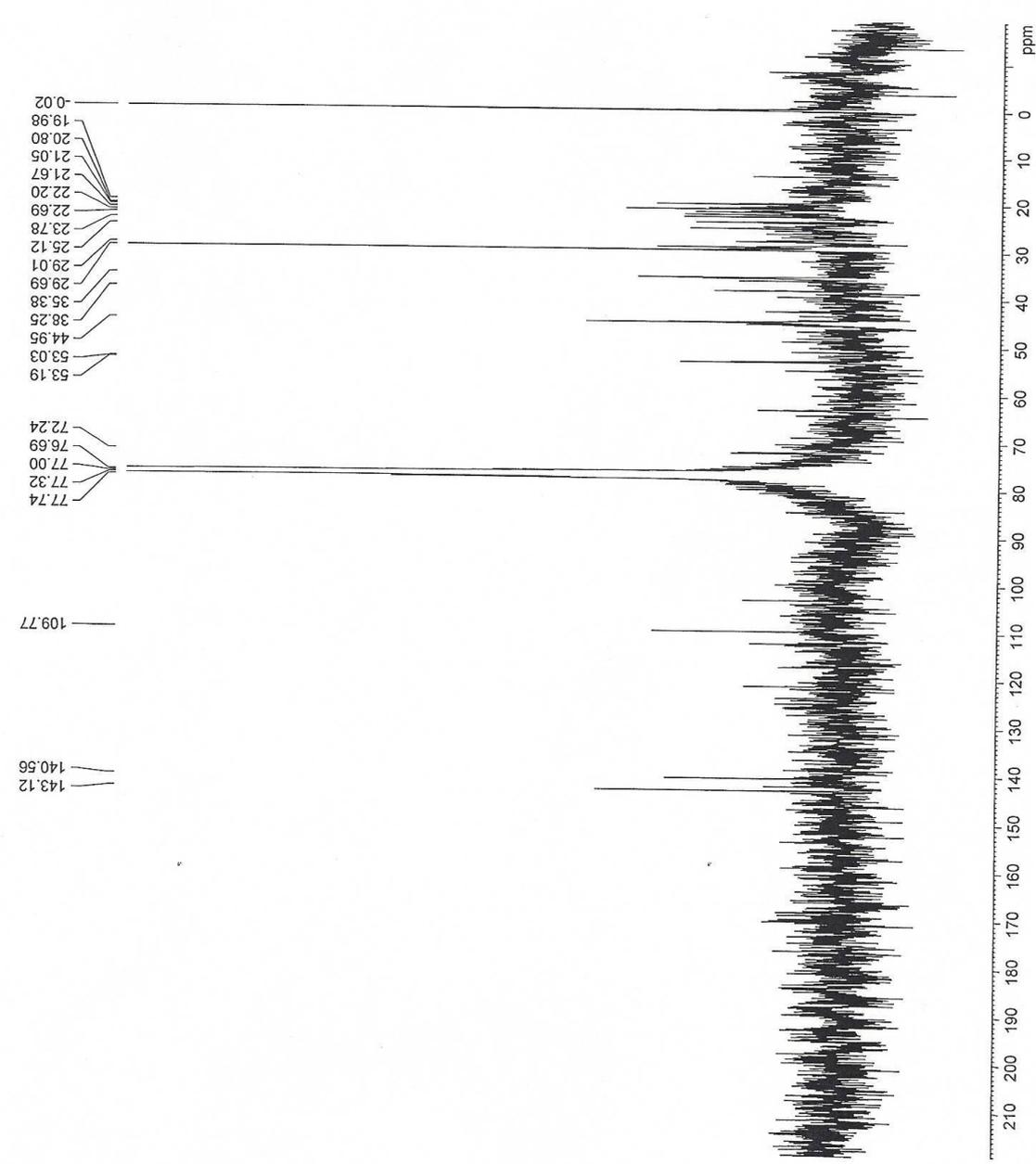


Figura 21. Espectro de RMN ¹³C da substância 3 (100 MHz, CDCl₃)

Amostra
GHG-2.18.7.13.59

Current Data Parameters
NAME DaPaz_GHG21871359
EXPNO 100
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 21/09/04
Time 16:36

INSTRUM spect
PROBHD 2.5 mm TXI 1H-
PULPROG csgygpqf
TD 4096
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 16
SWH 4432.624 Hz
FIDRES 1.027184 Hz
AQ 0.482686 sec
RG 256
DW 112.800 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
d0 0.00000300 sec
d1 1.00000000 sec
d13 0.00000400 sec
d16 0.00020000 sec
IN0 0.00022560 sec

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P0 8.00 usec
PL1 8.00 usec
PL2 6.00 dB
SFO1 400.2133955 MHz

==== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE 100
GPNAM2 SINE 100
GPZ1 10.00 %
GPZ2 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
D0 256
SFO1 400.2134 MHz
FIDRES 17.314938 Hz
SW 11.076 ppm
FRMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2115701 MHz
WDW SINE
SSB 0
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2115701 MHz
WDW SINE
SSB 0
GB 0

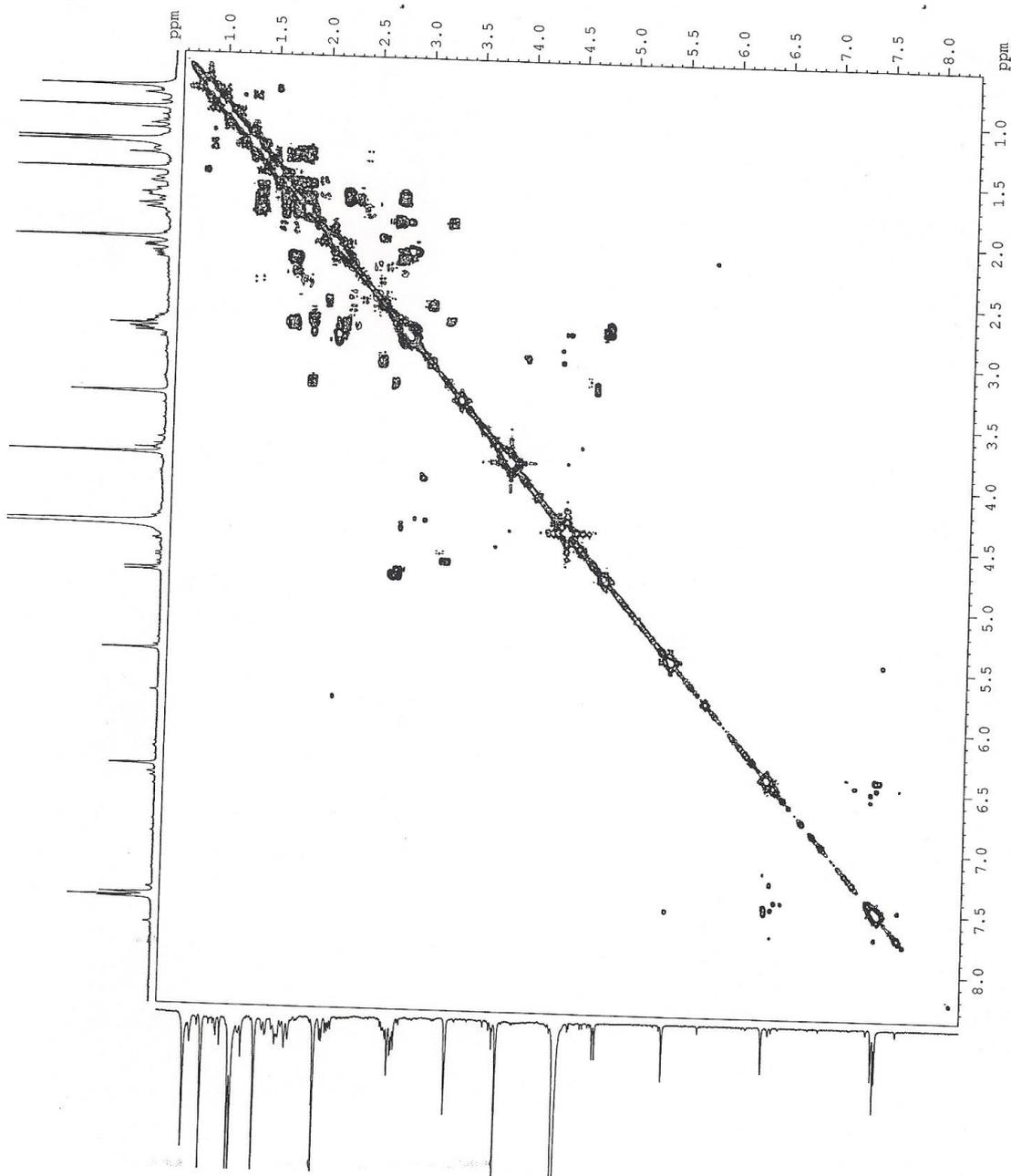


Figura 22. Espectro de COSY da substância 3

Amostra
GHG-2.18.7.13.59

Current Data Parameters
NAME DaPaz_GHG21871359
EXPNO 200
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20050904
Time 17:56:11
INSTRUM spect
PROBHD 2.5 mm TXI 1H-
TD 4096
ULPROG zgpg30
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 4
SWH 4432.624 Hz
FIDRES 1.082784 Hz
AQ 0.4620798 sec
RG 256
DVI 112.800 usec
DE 18.00 usec
TE 300.2 K
TEST2 0.00000000 sec
D1 1.00000000 sec
d11 0.00172415 sec
d12 0.00000000 sec
d13 0.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
DELTA 0.00122200 sec
INVD 0.00000000 sec
NUC1 128
ZGPGFNS

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 0.00 dB
P2 1000.00 usec
PL2 6.00 dB
SFO1 400.2133895 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 zgpg
NUC2 13C
P3 21.00 usec
PL3 0.00 dB
P4 42.00 usec
PL4 0.00 dB
P5 60.00 usec
PL5 0.00 dB
PL12 11.50 dB
SFO2 100.6403889 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPR1 20.10 %
GPR2 20.10 %
GPR3 20.10 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
NDO 256
TD 256
SFO1 100.6404 MHz
FIDRES 1.082784 Hz
SW 200.330 ppm
F1MODE Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2115668 MHz
WDW CSINE
SSB 0.00 Hz
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz
PC 1.40

F1 - Processing parameters
M2 1024
M3 echo
SF 100.6332218 MHz
WDW CSINE
SSB 0.00 Hz
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz

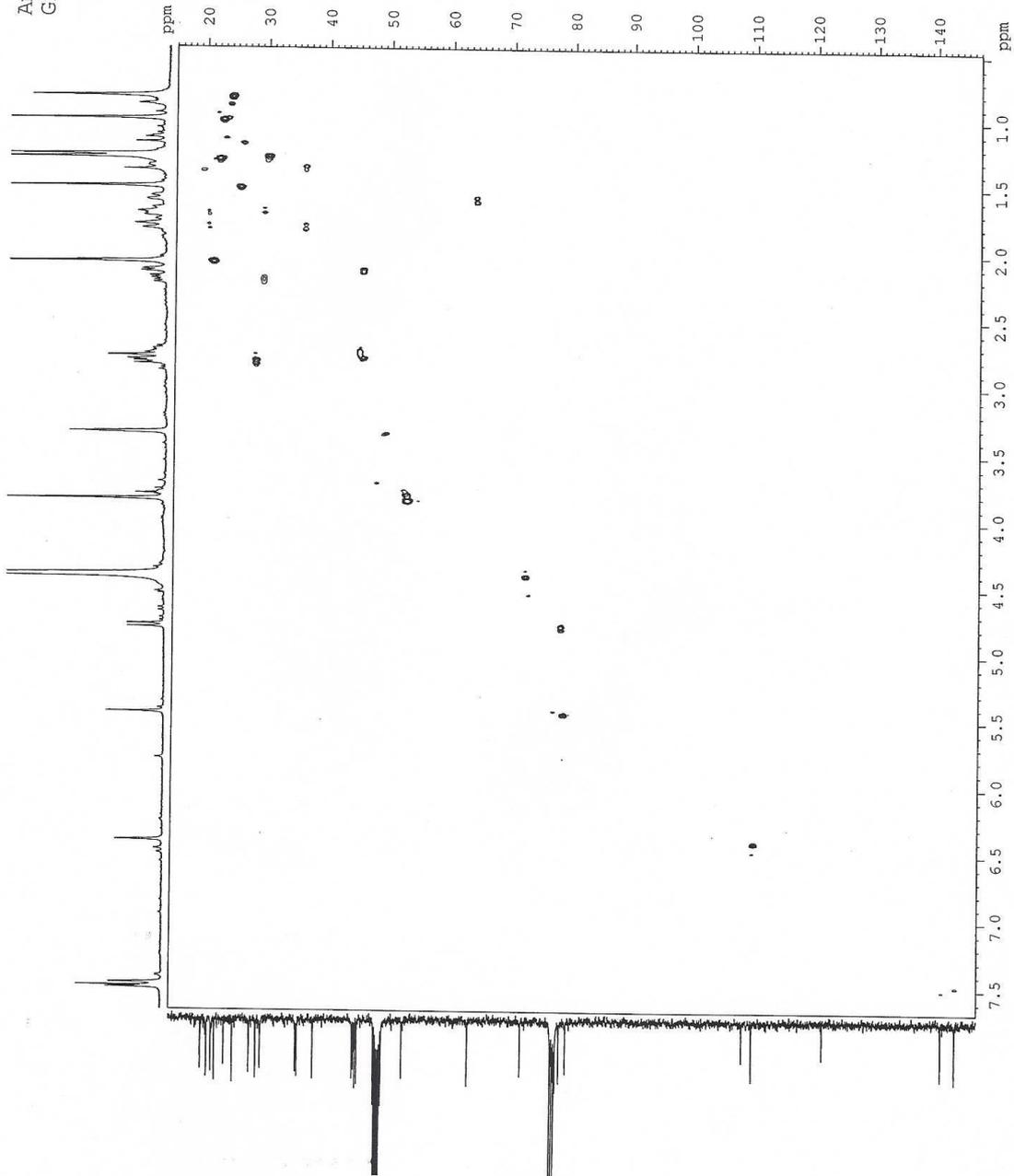


Figura 23. Espectro de HSQC da substância 3

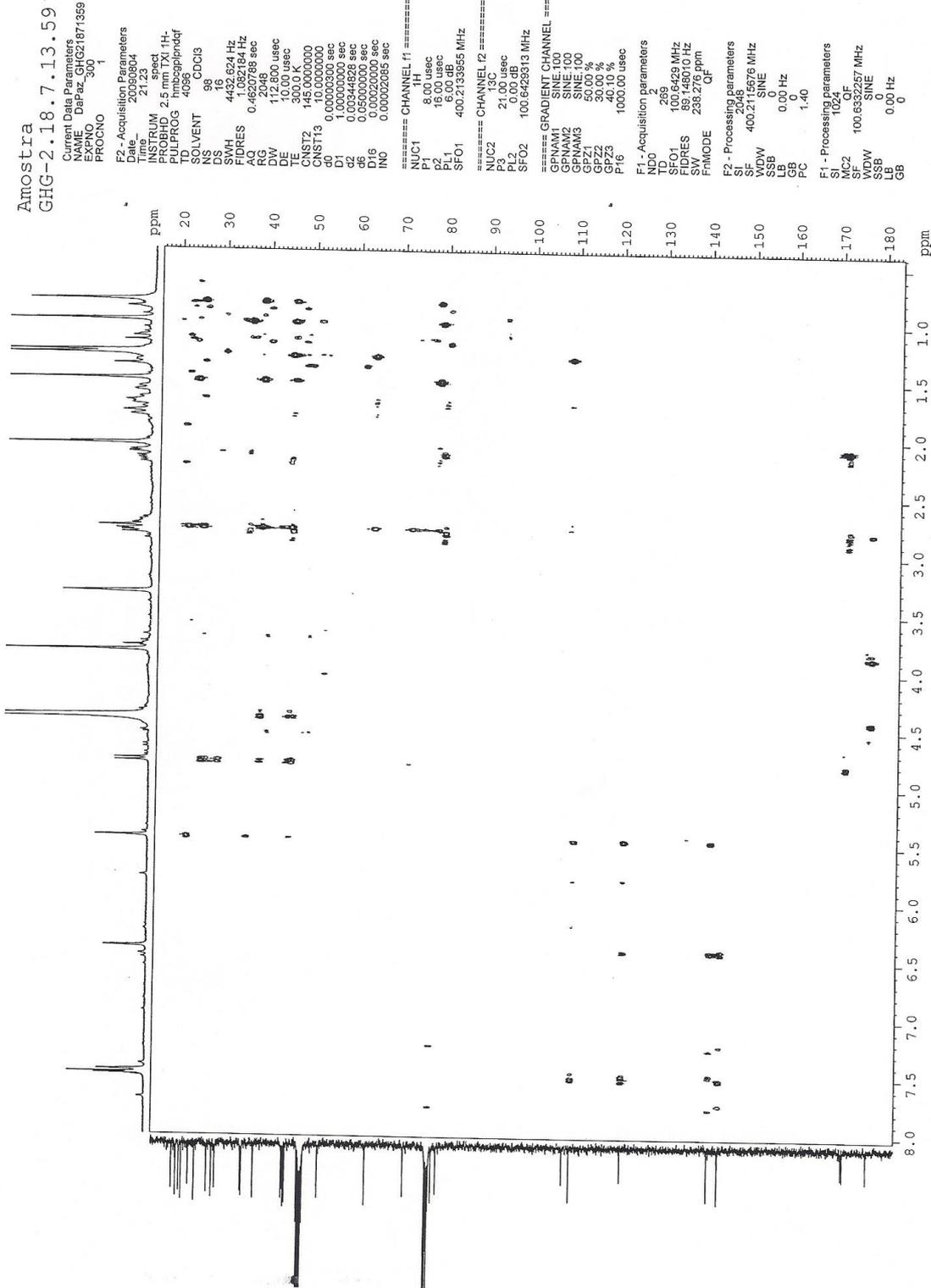


Figura 24. Espectro de HMBC da substância 3

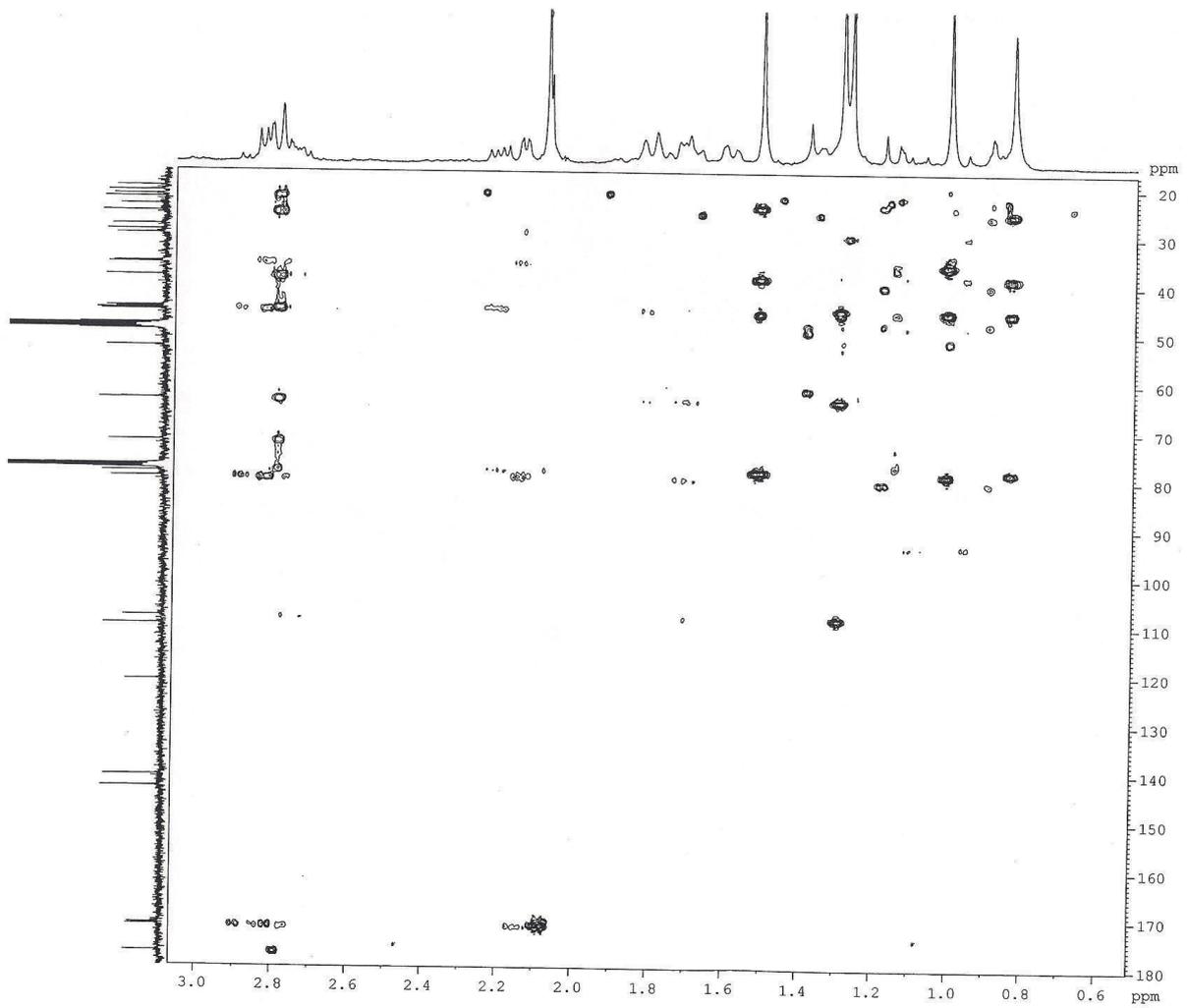


Figura 25. Expansão da região δ 3,0 a 0,6 do espectro de HMBC da substância **3**

Substância 4.

Isolamento: Esquema 9 (GHG - 3.21.7.11.5)

Aspecto: sólido amarelo (tipo agulha)

Avaliação em CCD: luz UV (254 e 365 nm) - apresenta fluorescência

vanilina sulfúrica - não revela

Rf= 0,34 [CH₂Cl₂: AcOEt (95:5)]

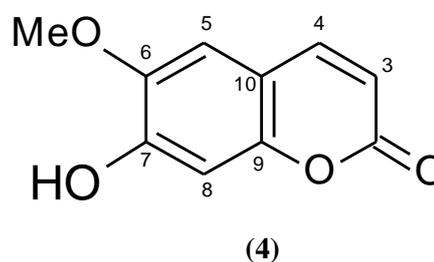
O espectro de RMN de ¹H (Figura 26) da substância **4** mostrou sinais característicos de esqueleto cumarínico devido a presença de dois dubletos em δ 7,60 e 6,27 ($J = 9,5$ Hz) característicos da insaturação α,β -lactona (H-3 e H-4). Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram verificados em δ 6,92 e 6,85 como singletos sugerindo substituição nas posições 6 e 7. Esse espectro apresentou também um sinal em δ 3,96 referente a um grupo metoxila.

No espectro de RMN ¹³C (Figura 27), os sinais dos carbonos hidrogenados foram verificados em δ 143,7 (C-4), 113,5 (C-3), δ 107,5 (C-5) e 103,2 (C-8). Esses dados são compatíveis para a cumarina escopoletina (Tabela 14). Esta cumarina foi isolada anteriormente em *Guarea rhopalocarpa* (CAMACHO et al., 2001).

Tabela 14. Dados de RMN de ¹H da substância **4** e comparação com a literatura

Nº	SUBSTÂNCIA 4	LITERATURA [#]
	RMN ¹ H*	RMN ¹ H*
3	6,27 (d; $J= 9,5$ Hz)	6,28 (d)
4	7,60 (d; $J= 9,5$ Hz)	7,60 (d)
5	6,85 (s)	6,85 (s)
8	6,92 (s)	6,92 (s)
OMe	3,96 (s)	3,95 (s)
OH	6,13 (s)	6,09 (s)

[#] RAHMAN et al., 2007; *400 MHz, CDCl₃



Escopoletina

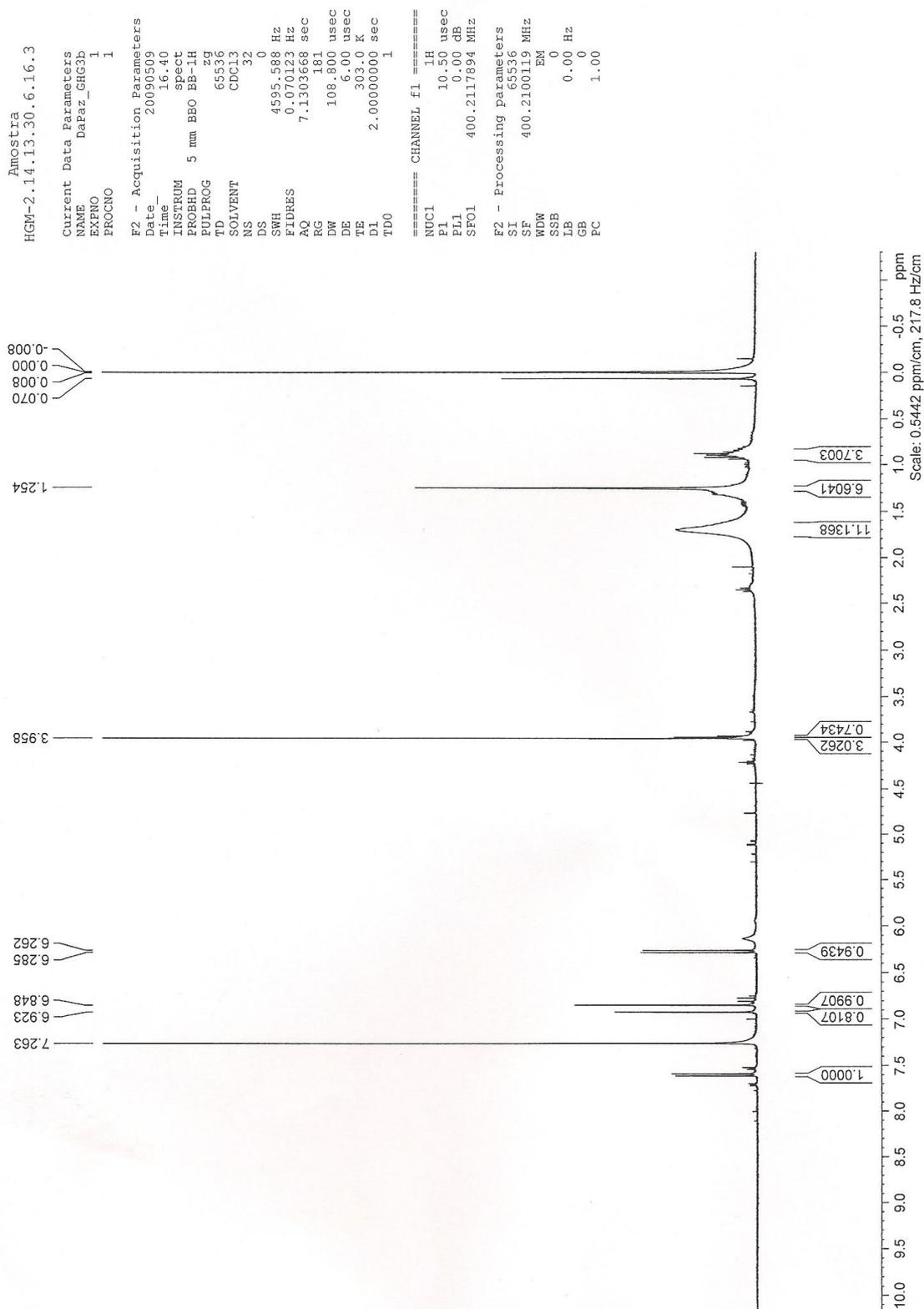


Figura 26. Espectro de RMN ^1H da substância **4** (400 MHz, CDCl_3)

Amostra
 IGM-2.14.13.30.6.16.1
 Current Data Parameters
 NAME Dapaz_GHG3b
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20090616
 time 20.11
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 48414
 DS 0
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.731836 Hz
 AQ 0.6832628 sec
 RG 16384
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.10100000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.00100000 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 6.63 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 100.6429474 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 120.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 17.00 dB
 PL13 17.00 dB
 SFO2 400.2116008 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6328842 MHz
 EM 0
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

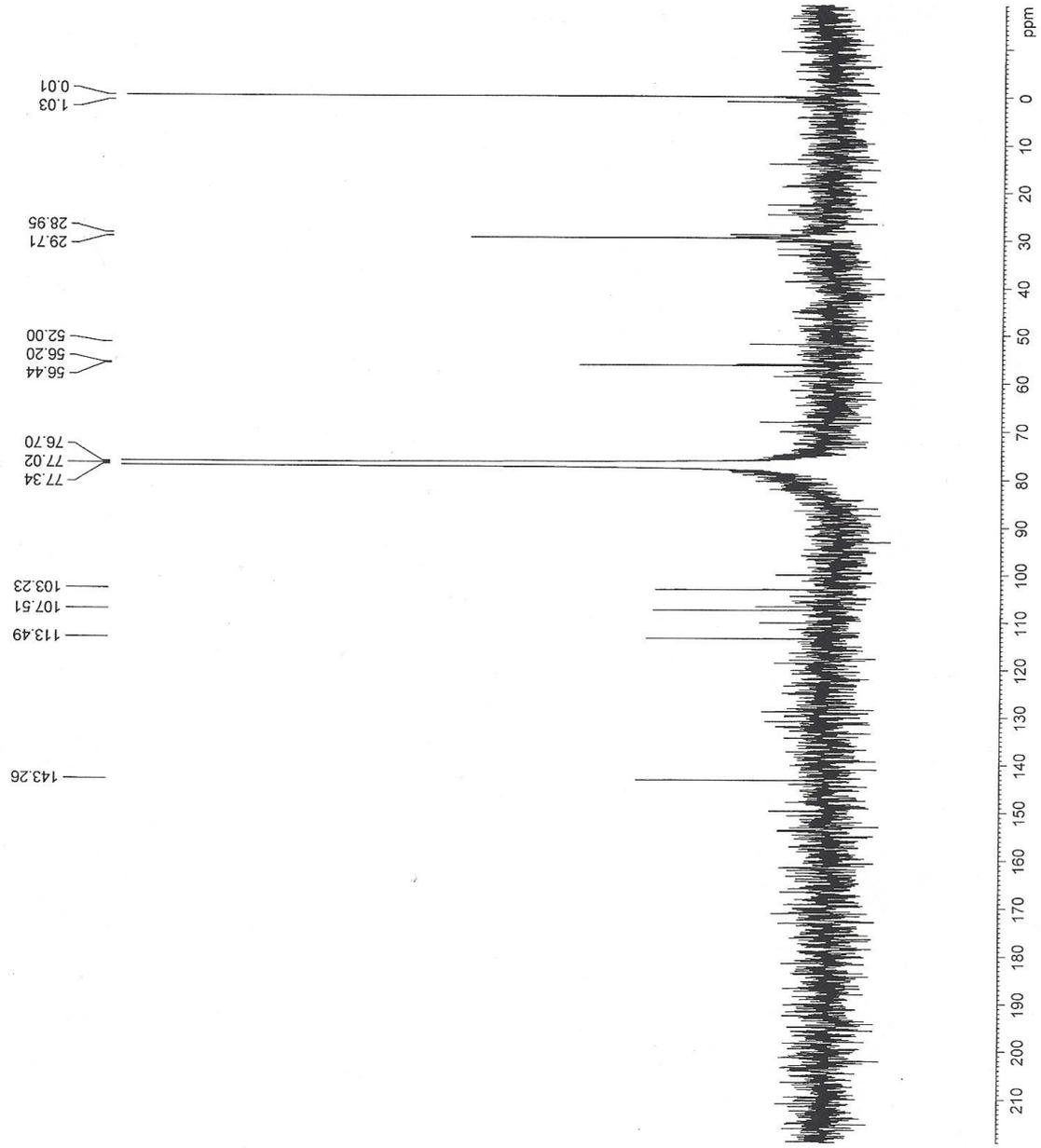


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C da substância 4 (100 MHz, CDCl₃)

Substância 5

Isolamento: Esquema 10 (GHF- 1.17)

Aspecto: sólido branco cristalino (tipo agulha)

Avaliação em CCD: luz UV (254 e 365 nm) - sem fluorescência

vanilina sulfúrica - coloração roxa

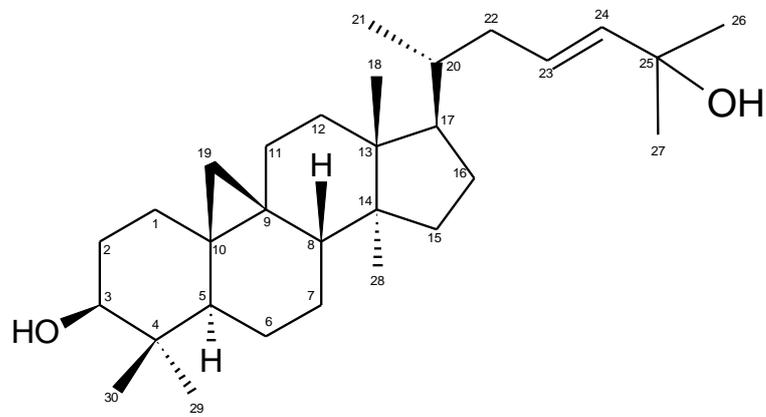
Rf= 0,47 [Hex: AcOEt (8:2)]

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 28 e 29) da substância **5** apresenta sete sinais de hidrogênios metílicos na região de δ 1,32 a 0,81 e dois dubletos em δ 0,56 ($J = 4,0$ Hz, 1H) e 0,33 ($J = 4,0$ Hz, 1H) que indicam a presença de uma ponte metilênica formando um anel ciclopropânico, cujo acoplamento é confirmado pelo espectro de COSY (Figura 32). Estes dados aliados aos sinais δ 3,28 (dd; $J = 12,2$ e 4,4 Hz, 1H) e em δ 78,9 no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 30 e 31) sugerem a estrutura de um triterpeno do tipo cicloartan-3 β -ol. A posição do grupo hidroxila foi confirmada pela correlação no mapa de contorno HMBC (Figuras 35 e 36) de δ 3,28 (H-3) com os sinais δ 40,5 (C-4), 30,4 (C-2), 25,5 (Me-30) e 14,0 (Me-29).

Os hidrogênios olefínicos da cadeia lateral foram observados como multipletos integrando para 2 hidrogênios (δ 5,60) os quais correlacionaram no espectro de HSQC (Figuras 33 e 34) com os carbonos em δ 139,4 e 125,7. No mapa de contorno estes dois hidrogênios olefínicos correlacionaram com os carbonos em δ 139,4 (C-24), 125,7 (C-23), 70,8 (C-25) e 39,1 (C-22). Outras correlações importantes da cadeia lateral foram dos hidrogênios das metilas 26 e 27 (δ 1,31) com os carbonos em δ 139,4 (C-24) e 70,8 (C-25).

Com base nos dados obtidos pela análise dos espectros RMN de ^1H e ^{13}C além dos experimentos COSY, HSQC e HMBC e pela comparação com dados da literatura (ABDELMONEM et al., 2008), concluiu-se que a substância **5** se trata do triterpeno cicloart-23-en-

3 β ,25-diol, já reportado nas espécies *Guarea macrophylla* (LAGO; ROQUE, 2002) e *Guarea trichilioides* (FURLAN et al., 1993).



(5)

Cicloart-23-en-3 β , 25-diol

Tabela 15. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **5** e comparação com a literatura

N ^o	SUBSTÂNCIA 5		LITERATURA [#]	
	RMN ^1H *	RMN ^{13}C **	RMN ^1H *	RMN ^{13}C **
1	1,56 ^a (H-1a) 1,25 ^b (H-1b)	32,0		32.1
2	1,75 ^c (H-2a) 1,57 ^d (H-2b)	30,4		30.5
3	3,28 (dd; 11,2 e 4,4 Hz)	78,9	3,24 (dd; 11,2 e 4,4 Hz)	79.0
4		40,5		40.7
5	1,29 ^e	47,2		47.3
6	1,59 ^f	21,1		21.3
7	1,05 ^g	26,0		28.2
8	1,52 ^h	47,9		48.1
9		20,1		20.2
10		26,2		26.3
11	1,98 ⁱ	26,5		26.2
12	1,61 ^j	32,9		33.0
13		45,4		45.5
14		48,9		49.0
15	1,30 ^l	35,6		35.8
16	1,90 ^f ; 1,31 ^m	28,1		26.3
17	1,58 ⁿ	52,1		52.2
Me-18	0,97 (s)	18,1	0,94 (s)	18.3
19	0,56 (d; 4,0 Hz) 0,33 (d; 4,0 Hz)	29,8	0,53 (d; 4,0 Hz) 0,31 (d; 4,0 Hz)	30.3
20	1,49 ^o	36,4		36.6
Me-21	0,86 (d; 6,4 Hz)	18,3	0,83 (s)	18.5
22	2,18 (m); 1,74 (m)	39,1		39.2
23	5,60 (m)	125,7	5,57 (m)	125.8
24	5,60 (m)	139,4	5,57 (m)	139.5
25		70,8		70.9
Me-26	1,32 (s)	30,0	1,29 (s)	29.9
Me-27	1,32 (s)	29,9	1,29 (s)	30.1
Me-28	0,89 (s)	19,3	0,86 (s)	19.5
Me-29	0,81 (s)	14,0	0,78 (s)	14.2
Me-30	0,97 (s)	25,5	0,94 (s)	25.6

[#] ABDEL-MONEM et al., 2008; *400 MHz, CDCl₃; **100 MHz, CDCl₃; ^{a-o} multiplicidade não definida

Tabela 16. Dados de HSQC e HMBC (400/100 MHz, CDCl₃) da substância **5**

δ (ppm)	1J	2J	3J
1,25 (H-1b)	32,0	30,4 (C-2) 26,2 (C-10)	78,9 (C-3) 47,2 (C-5)
1,75 (H-2a) 1,57 (H-2b)	30,4	32,0 (C-1) 78,9 (C-3)	40,5 (C-4) 26,2 (C-10)
3,28 (H-3)	78,9	30,4 (C-2) 40,5 (C-4)	14,0 (Me-29) 30,0 (Me-30)
1,29 (H-5)	47,2	40,5 (C-4) 21,1 (C-6)	26,0 (C-7) 14,0 (Me-29)
1,59 (H-6)	21,1	47,2 (C-5) 26,0 (C-7)	ND
1,05 (H-7)	26,0	21,1 (C-6) 47,9 (C-8)	20,1 (C-9)
1,52 (H-8)	47,9	26,0 (C-7) 20,1 (C-9) 48,9 (C-14)	21,1 (C-6) 35,6 (C-15) 19,3 (Me-28)
1,98 (H-11)	26,5	20,1 (C-9) 32,9 (C-12)	26,2 (C-10) 29,8 (C-19)
1,61 (H-12)	32,9	26,5 (C-11) 45,4 (C-13)	20,1 (C-9) 48,9 (C-14) 18,1 (Me-18)
1,30 (H-15)	35,6	48,9 (C-14) 28,1 (C-16)	47,9 (C-8) 45,4 (C-13)
1,90 (H-16a) 1,31(H-16b)	28,1	35,6 (C-15) 52,1 (C-17)	45,4 (C-13) 48,9 (C-14)
1,58 (H-17)	52,1	45,4 (C-13) 28,1 (C-16) 36,4 (C-20)	ND
0,97 (Me-18)	18,1	45,4 (C-13)	32,9 (C-12) 48,9 (C-14)
0,56 (H-19a) 0,33 (H-19b)	29,8	20,1 (C-9) 26,2 (C-10)	32,0 (C-1) 47,2 (C-5)
0,86 (Me-21)	18,3	36,4 (C-20)	52,1 (C-17) 39,1 (C-22)
2,18 (H-22a) 1,74 (H-22b)	39,1	36,4 (C-20) 125,7 (C-23)	52,1 (C-17) 18,3 (C-21) 139,4 (C-24)

5,60 (H23/H-24)	125,7 139,4	139,4 (C-24), 125,7 (C-23), 70,8 (C-25), 39,1 (C-22)	
1,32 (Me-26/Me-27)	30,0 29,9	70,8 (C-25), 139,4 (C-24)	
0,89 (Me-28)	19,3	48,9 (C-14)	47,9 (C-8) 45,4 (C-13) 35,6 (C-15)
0,81 (Me-29)	14,0	40,5 (C-4)	47,2 (C-5) 78,9 (C-3) 25,5 (Me-30)
0,97 (Me-30)	25,5	40,5 (C-4)	78,9 (C-3) 47,2 (C-5) 14,0 (Me-29)

ND – Não determinada (região congestionada)

Obs. H-20 correlações em regiões de sobreposição

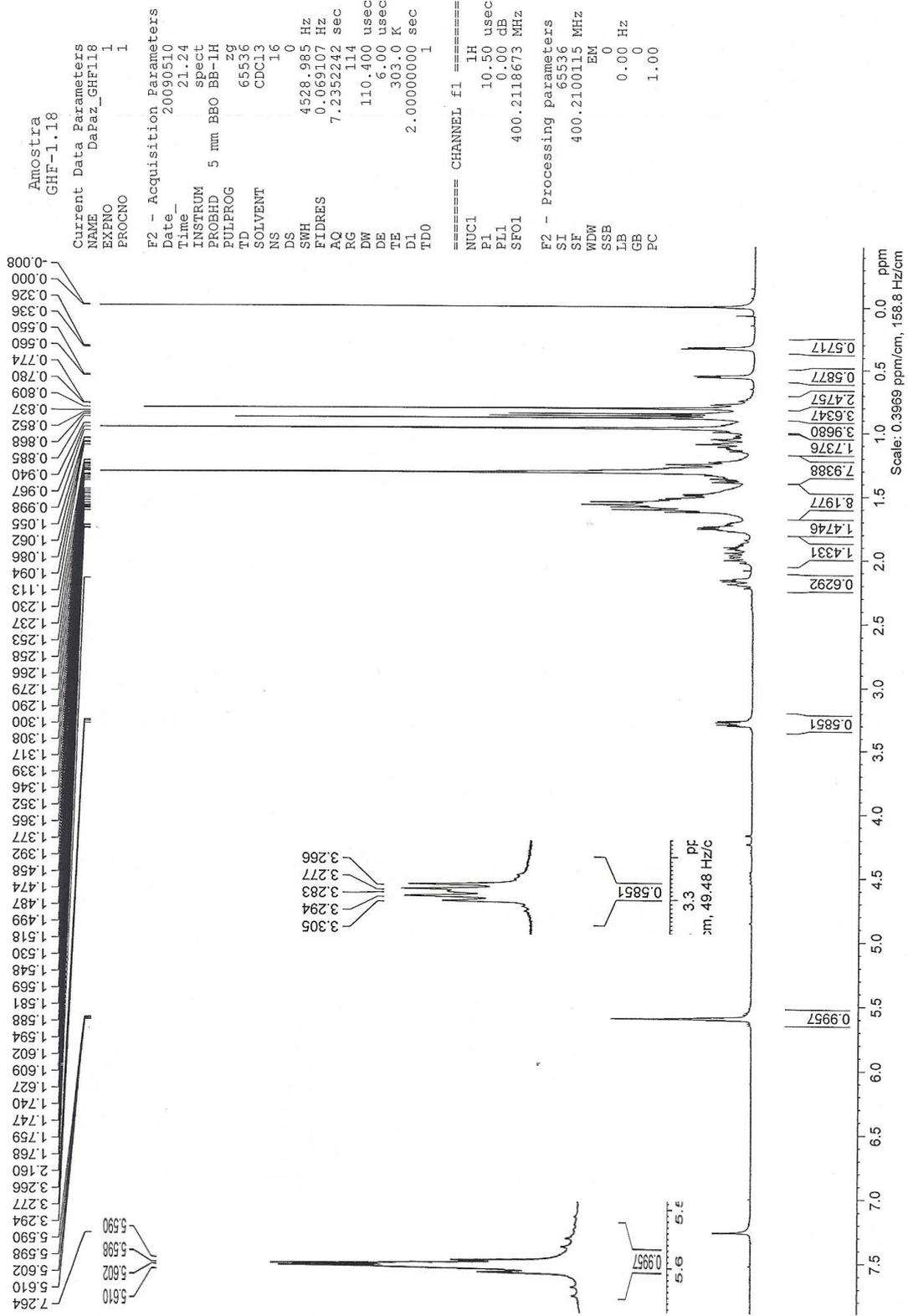


Figura 28. Espectro de RMN ¹H da substância 5 (400 MHz, CDCl₃)

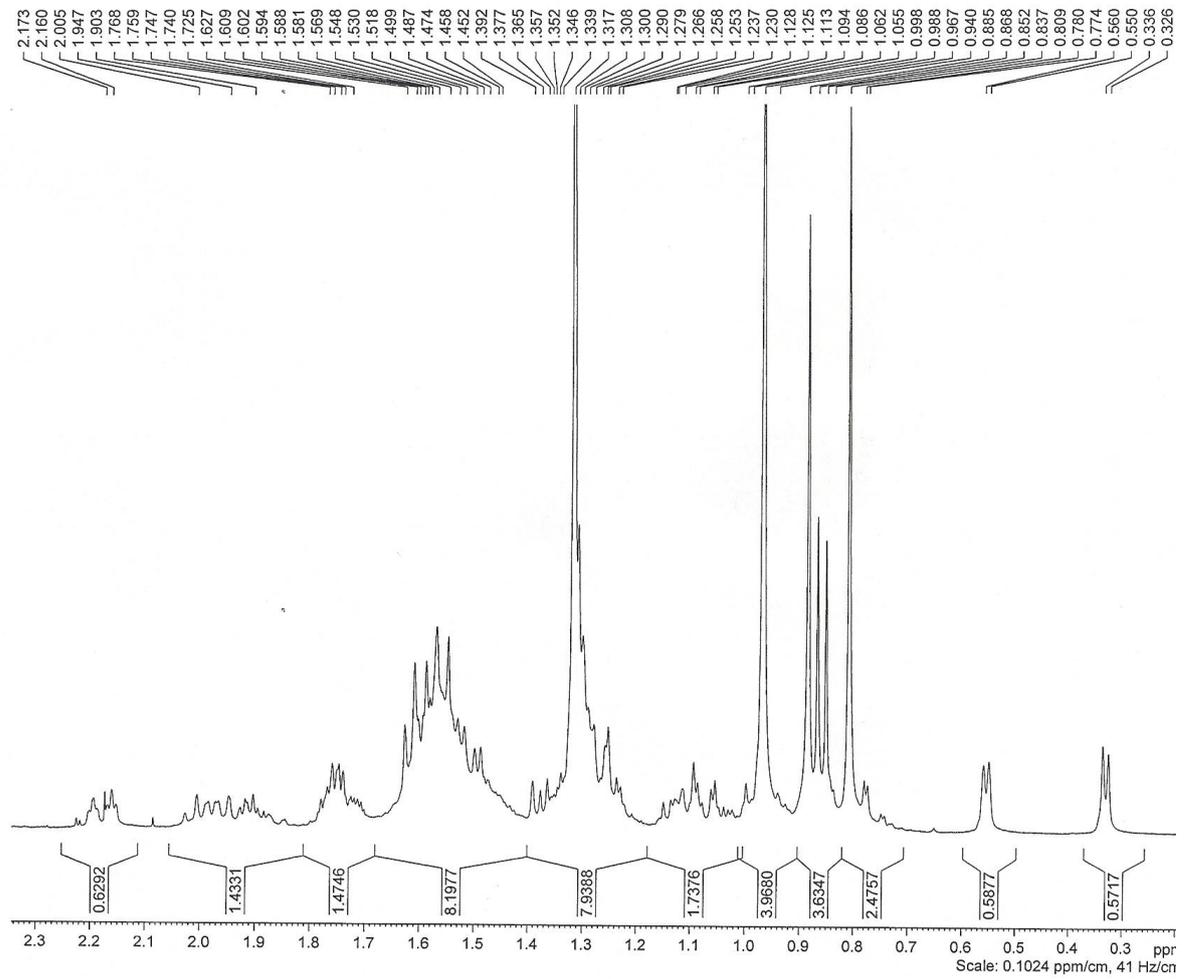


Figura 29. Expansão da região δ 2,3 a 0,3 do espectro de RMN ^1H da substância **5**

Amostra
GHF-1.18

Current Data Parameters
NAME Dafaz_GHF118
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090927
Time 15.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 72461
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 32768
DW 20.850 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 0.10010000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 0.00010000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 6.63 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 100.6429474 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 120.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 13.00 dB
PL13 13.00 dB
SFO2 400.2116008 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6328817 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

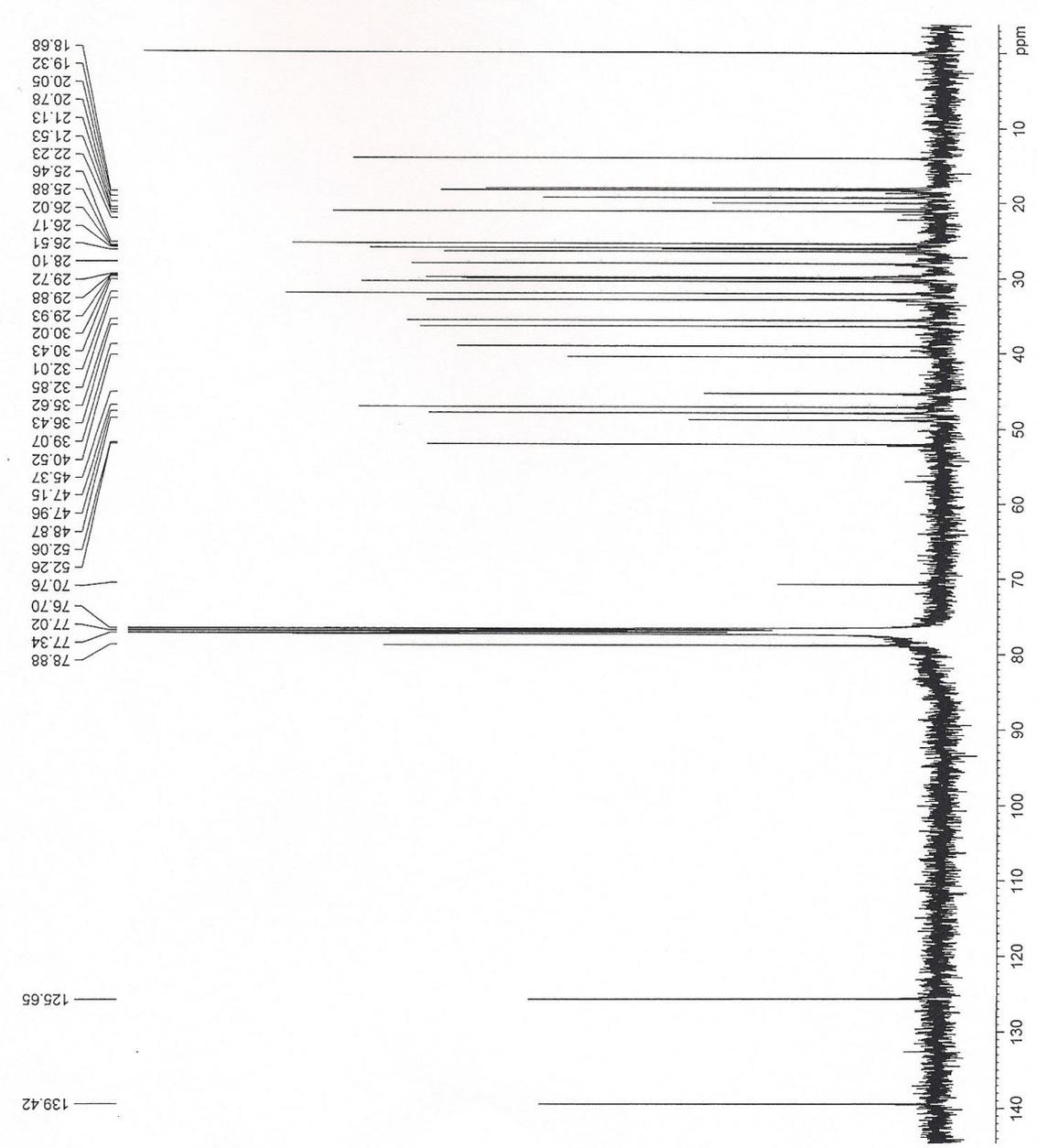


Figura 30. Espectro de RMN ¹³C da substância 5 (100 MHz, CDCl₃)

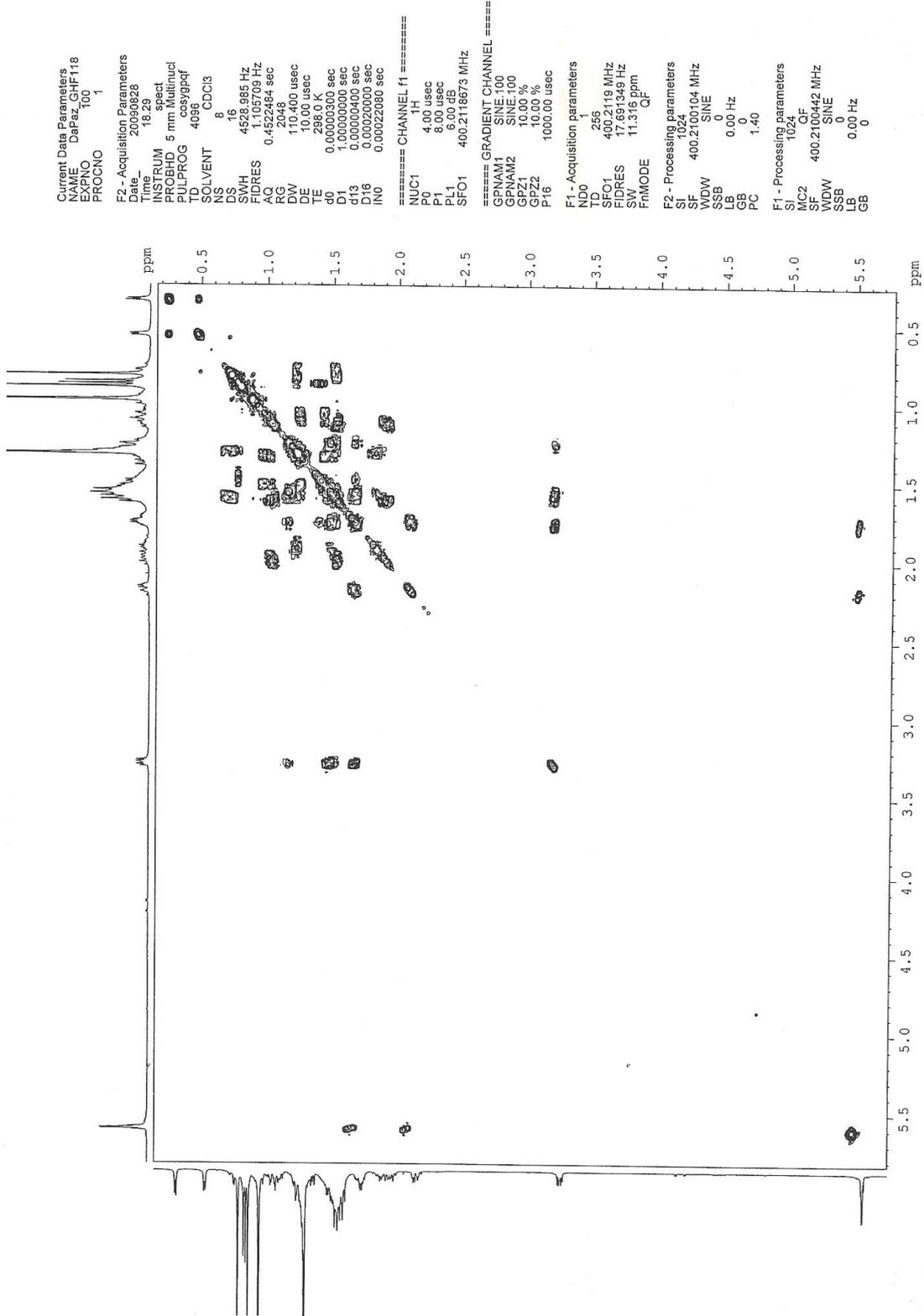


Figura 31. Espectro de COSY da substância 5 (CDCl₃)

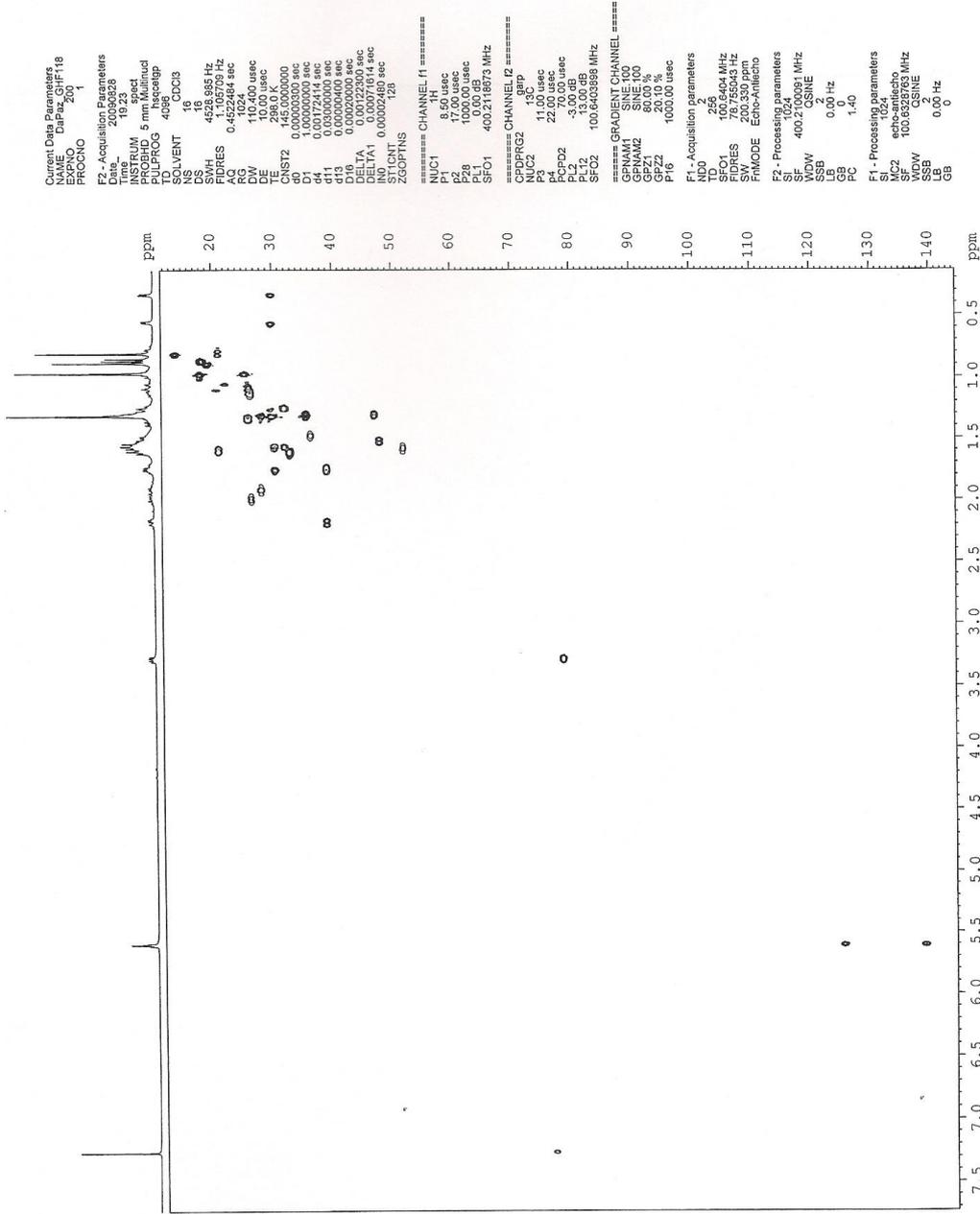


Figura 32. Espectro de HSQC da substância 5 (CDCl₃)

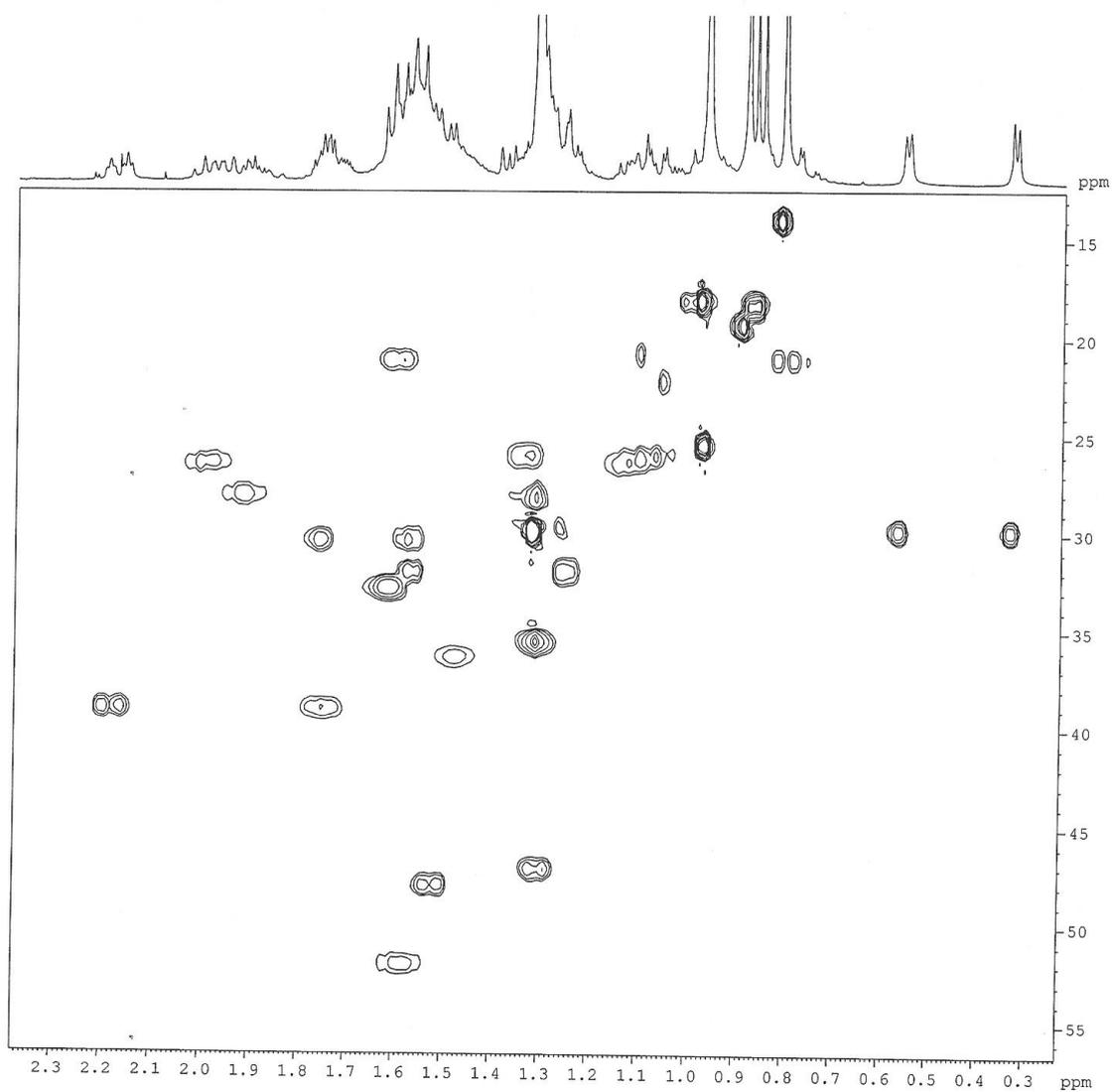


Figura 33. Expansão da região δ 2,3 a 0,3 do espectro de HSQC da substância **5**

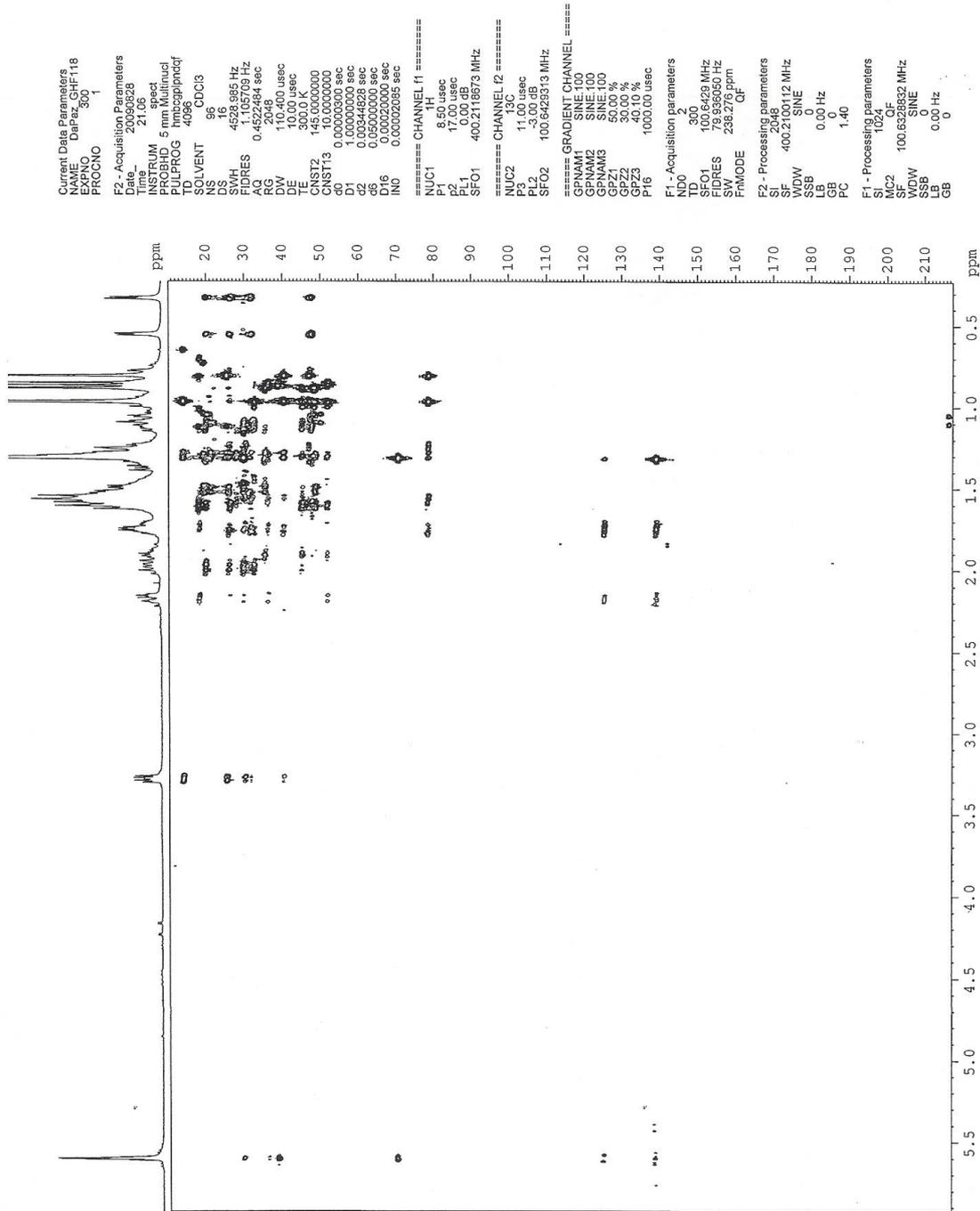


Figura 34. Espectro de HMBC da substância 5 (CDCl₃)

4.3. Ensaio larvicida frente ao *Aedes aegypti*

Dentre os óleos testados foi observada maior atividade larvicida no óleo dos galhos de *Guarea humaitensis*, GHG, ($CL_{50} = 48,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o qual apresentou 100% de mortalidade em $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, (Tabela 17 e Gráfico 4). Neste óleo os sesquiterpenos mais abundantes são o epóxido de cariofileno (40,91%), epóxido de humuleno II (14,43%) e β -bisaboleno (8,36%).

O óleo das folhas de *G. scabra* (GScF) apresentou $CL_{50} = 79,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo os principais constituintes o *cis*-cariofileno (33,37%) e o α -*trans*-bergamotemo (11,88%) (Tabela 17 e Gráfico 5). O óleo dos galhos de *G. convergens*, cujos componentes predominantes foram os sesquiterpenos não oxigenados α -santaleno (26,26%) e α -copaeno (14,61%), apresentou $CL_{50} = 124,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 17 e Gráfico 3).

Os óleos obtidos das folhas (GSF) e dos galhos (GSG) de *G. silvatica* mostraram $CL_{50} = 102,0$ e $243,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Os principais componentes nas folhas foram os sesquiterpenos epóxido de cariofileno (36,54%) e β -elemeno (6,20%), além do diterpeno kaureno (15,61%). Nos galhos os constituintes majoritários foram os oxigenados espatulenol (14,34%) e epóxido de cariofileno (8,57%) (Tabela 17 e Gráficos 6 e 7).

Os testes de atividade larvicida dos óleos essenciais avaliados nesse trabalho sugerem que os componentes com esqueleto do tipo cariofilano podem ser os responsáveis pela atividade larvicida, no entanto, é necessária a realização de mais testes para uma conclusão inequívoca.

Tabela 17. Mortalidade (%) provocada em larvas de *Aedes aegypti*

Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	GCG	GHG	GScF	GSF	GSG
500	100	100	100	100	100
250	100	100	100	100	33
100	10	100	---	50	0
50	0	40	10	17	0
25	0	7	7	0	0
CL₅₀	124,9	48,5	79,1	102,0	243,9

--- Concentração não testada

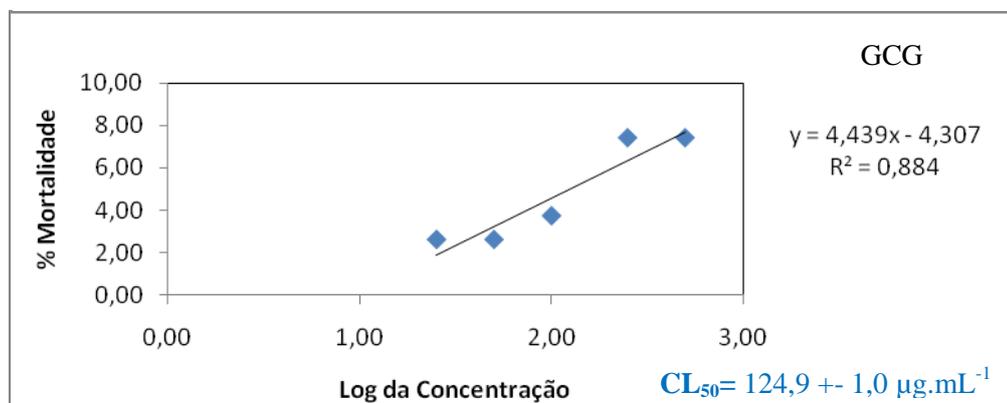
GCG- Galhos de *G. convergens*

GSF - Folhas de *G. silvatica*

GHG -Galhos de *G. humaitensis*

GSG - Galhos de *G. silvatica*

GScF - Folhas de *G. scabra*

**Gráfico 3.** Cálculo da CL₅₀ pela regressão linear das concentrações de GCG

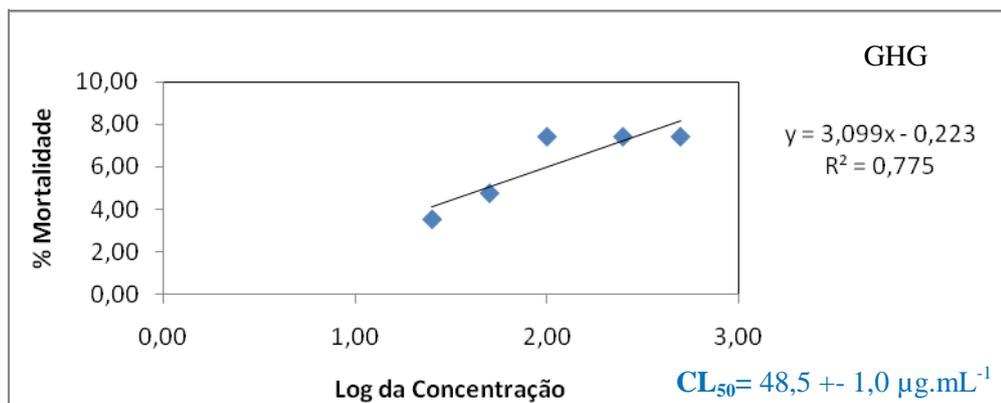


Gráfico 4. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GHG

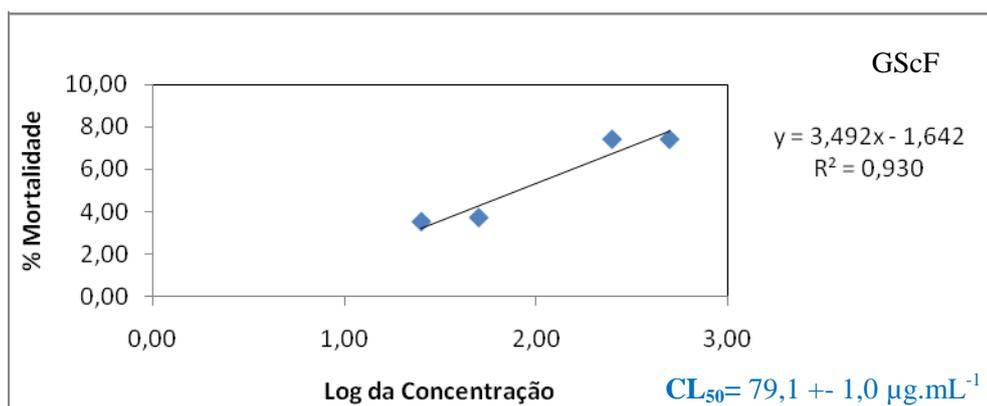


Gráfico 5. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GScF

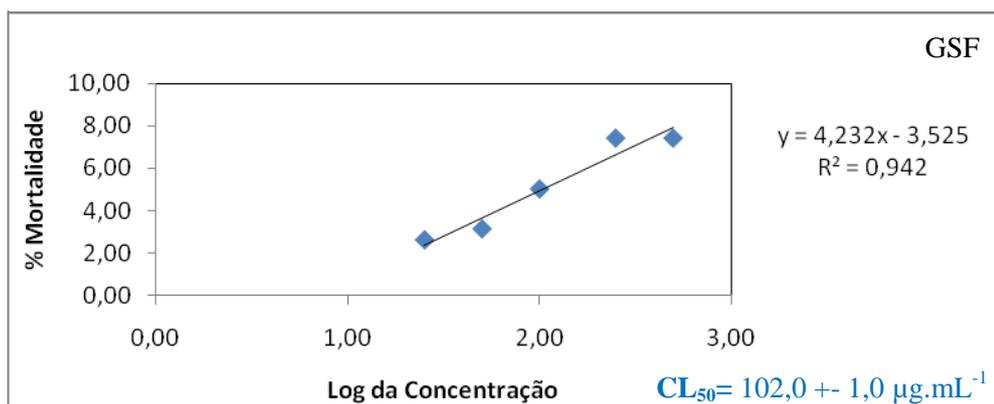


Gráfico 6. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GSF

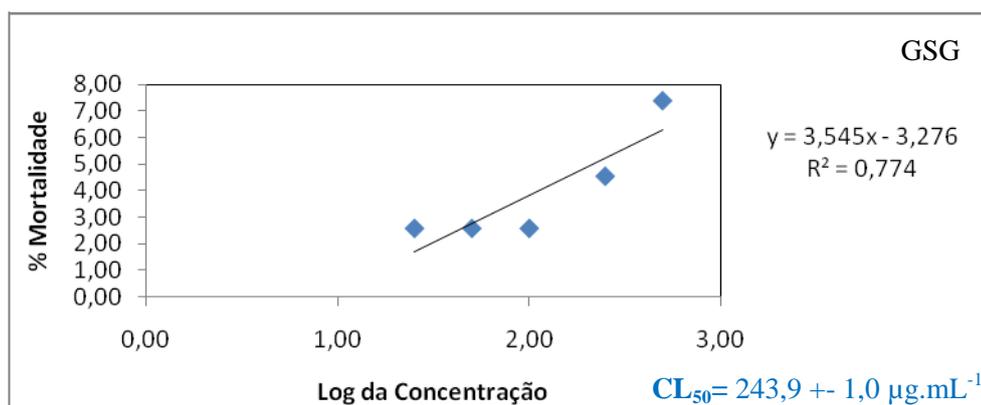


Gráfico 7. Cálculo da CL_{50} pela regressão linear das concentrações de GSG

5. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais obtidos dos galhos *G. convergens* e *G. humaitensis*, folhas de *G. scabra* e folhas e galhos de *G. silvatica* foram analisados por CG-EM e mostraram a predominância de sesquiterpenos, o que está de acordo com a literatura para espécies do gênero *Guarea*.

Além da composição química dos óleos essenciais, esse estudo permitiu a obtenção de uma mistura dos sesquiterpenos epóxido de cariofileno (**1a**) e epóxido de humuleno II (**1b**) e dos esteróides β -sistosterol (**2a**) e estigmasterol (**2b**), além do isolamento de um novo limonóide do tipo mexicanolideo, 2-desoxigrandifolídeo A (**3**), da cumarina escopoletina (**4**), e do triterpeno cicloart-23-en-3 β ,25-diol (**5**) de *G. humaitensis*.

A avaliação da atividade larvicida dos óleos essenciais sugere que os componentes com esqueleto do tipo cariofilano podem ser os responsáveis pela atividade larvicida, no entanto, será necessária a realização de mais testes para uma conclusão correta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MONEM, A. R.; ABDEL-SATTAR, E.; HARRAZ, F. M.; PETEREIT, F. 2008. Chemical Investigation of *Euphorbia schimperi* C. Presl. *Records of Natural Products*, 2(2): 39-45.
- ADAMS, R. P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publ. Corp, Carol Stream.
- ALARCÓN, J. G. S. 2005. Levantamento florístico e etnobotânico em um hectare de floresta de terra firme na região do Médio Rio Negro, Roraima, Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Escola Nacional de Botânica Tropical. Dissertação de Mestrado. 111p.
- AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; JR, M. B. 2006. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 17 (3): 542-547.
- ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. 2000. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomate. *Revista de Saúde Pública*, 34: 309-313.
- BEVAN, C. W. L.; POWELL, J. W.; TAYLOR, D. A. H. 1963. West african timbers. Part VI. Petroleum extracts from species of genera *Khaya*, *Guarea*, *Carapa*, and *Cedrela*. *Journal of Chemical Society*, 980
- BROCHINI, C. B.; ROQUE, N. F.; 2000. Two New Cneorubin Related Diterpenes from the Leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 11 (4): 361-364.
- CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. 2001. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry*, 56: 203-210.

- CAMPOS, A. M.; OLIVEIRA F. S.; MACHADO, M. I. L.; BRAZ, R. M. F. J. A. 1991. Triterpenes from *Cedrela-odorata*. *Phytochemistry*, 30 (4): 1225-1229.
- CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P. 2004. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 541-544.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, N. G. H. 1992. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31 (2): 377-394.
- CHEN, H. D.; YANG, S. P.; WU, Y.; DONG, L.; YUE, J. M. 2009. Terpenoids from *Toona ciliata*. *Journal of Natural Products*, 72: 685–689.
- CICCIA, G.; COUSSIO J.; MONGELLI, E. 2000. Insecticidal activity *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plantas. *Journal of Ethnopharmacology*: 185 - 189.
- CONNOLLY, J. D.; OKORIE, D. A.; TAYLOR, D. A. H. 1972. Limonoid Extractives from Species of *Guarea* - Unusual Shielding Effect on an Acetyl Group. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, (9-10): 1145.
- CONNOLLY, J. D. 1983. Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae. In: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Waterman, P. G.; Grundon, M. F. (Eds.) Londres, Academic Press, 175-213.
- ECONOMIDES, C.; ADAM, K. P. 1998. Lipophilic flavonoids from the fern *Woodsia scopulina*. *Phytochemistry*, 49 (3): 859 - 862.

- FERGUSON, G.; GUNN, P. A.; MARSH, W. C.; MCCRINDLR, R.; RESTIVO, R.; RESTIVO, R.; CONNOLLY, J. D.; FULKE, J. W. B.; HENDERSON, M. S. 1973. Triterpenoids from *Guarea glabra* (Meliaceae) - New Skeletal Class Identified by Chemical, Spectroscopic, and X-Ray Evidence. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (5): 159-160.
- FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. 2002. Sementes e Plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* AUBL. e *Carapa procera* D.C.): Aspectos Botânicos, Ecológicos e Tecnológicos. *Acta Amazonica*, 32 (4): 647-661.
- FORATTINI, O. P.; BRITO, M. 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 6: 67.
- FURLAN, M.; ROQUE, N. F.; WOLTER FILHO, W. 1993. Cycloartane derivatives from *Guarea trichilioides*. *Phytochemistry*, 32:1519-1611.
- FURLAN, M.; LOPES, M. N.; FERNANDES, J. B.; PIRANI, J.R. 1996. Diterpenes from *Guarea trichilioides*. *Phytochemistry*, 41 (4): 1159- 1161.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SILVA, A. F. G.; BAZZO, R. C.; RESENDE, U. M. 2004. Terpenoid Constituents from Leaves of *Guarea kunthiana*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 15(5): 767-772.
- GONÇALVES, V. A. 2001. *Levantamento de mercado de produtos florestais não-madeireiros*. Santarém: ProManejo, IBAMA, 65p.
- GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. 2000. Plants used against cancer an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 347-377.

- HARDING, W. W.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. 2001. Structural and H-1 and C-13 NMR analysis of two new glabretal triterpenoid derivatives from *Guarea jamaicensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39 (11): 719-722.
- HOUSLEY, J. R.; KING, F. E.; KING, T. J.; TAYLOR, T. R. 1962. The chemistry of Hardwood Extractives. Part XXXIV. Constituents of *Guarea* Species. 50-95.
- JIMENEZ, A.; VILLARREAL, C.; TOSCANO, R. A.; COOK, M.; ARNASON, J. T.; BYE, R.; MATA, R. 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 49 (7): 1981-1988.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT S. L. 2003. *Parasitol. Res*, 90: 55-62.
- LAGO, J. H. G.; BROCHINI, C. B.; ROQUE, N. F. 2000. Terpenes from leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 55: 727-731.
- LAGO, J. H. G.; BROCHINI, C. B.; ROQUE, N. F. 2002a. Terpenoids from *Guarea guidonia*. *Phytochemistry*, 60: 333-338.
- LAGO, J. H. G.; REIS, A. A.; ROQUE, N. F. 2002b. Chemical composition from volatile oil of the stem bark of *Guarea macrophylla* Vahl. ssp *tuberculata* Vellozo (Meliaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 17 (4): 255-257.
- LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. 2002. Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*. *Phytochemistry*, 60: 329-332.
- LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. 2005. New Diterpenoids from Leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16(3b): 643-646.

- LAGO, J. H. G.; BROCHINI, C. B.; ROQUE, N. F. 2005a. Analysis of the Essential Oil from Leaves of Three Different Specimens of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *Journal of Essential. Oil Reserch*, 17: 271-273.
- LAGO, J. H. G.; CORNELIO, M. L.; MORENO, P. R. H.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T.; ROQUE, N. F. 2005b. Sesquiterpenes from essential oil from fruits of *Guarea macrophylla* Vahl. ssp. *tuberculata* (Meliaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 17 (1): 84-85.
- LAGO, J. H. G.; SOARES, M. G.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; SILVA, M. F. G. F.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ROQUE, N. F. 2006. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: Seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry*, 67: 589–594.
- LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; PIRANI, J. R.; ROQUE, N. F. 2007. Essential Oil from of *Guarea macrophylla*Vahl var. *tuberculata* vellozo (Meliaceae) Leaves -Variation in the Chemical Component Proportions. *J. Essent. Oil Res*, 19: 338-341.
- LIMA, M. P.; MAGALHÃES L. A. M.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI R. 2007. Composição do óleo essencial das folhas de *Guarea convergens* (Meliaceae) da Reserva Florestal Adolfo Ducke – AM. *30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ*.
- LINS, A. P.; BRAGGIO, M. M.; FELICIO, J. D.; GIURIATTI, A. M.; FELICIO, J. C. 1992. Chemical and Pharmacological aspects of *Guarea guidona*. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 23(1): 30-33.
- LUKACOVA, V.; POLONSKY, J.; MORETTI, C.; PETTIT, G. R.; SCHMIDT, J. M. 1982. Isolation and structure of 14, 15 β -epoxyprieurianin from the south American tree *Guarea guidona*. *Journal of. Brazilian Chemical Society*, 45(3): 288-294.

- MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R. 2007. Composição química dos óleos essenciais das folhas de *Guarea humaitensis* e *Trichilia micrantha* (Meliaceae). IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais – IV SBOE.
- MARQUES, E. F.; SEVERINO, R. P.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Estudo Fitoquímico de *Guarea penningtoniana* - 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ.
- MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. 1989. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley Sons, New York.
- MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIERE, J. M.; SEULEIMAN, A. M.; FENDERO, P.; MAIDOU, E.; DENAMGANAI, J. 1995. Aromatic plants of tropical central Africa. XXI. Chemical composition of bark essential oil of *Guarea cedrata* (A. Chev.) Pellegr. from Central African Republic. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2): 207-9.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm.idtxt=31123. Acessado em: 29/07/2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2003. Relatório de Assessoria Técnica concedida à Coordenação Regional da Bahia (CORE- BA) no Município de Feira de Santana.
- MIYAGI, Y.; OM, A. S.; CHEE, K. M.; BENNINK, M. R. 2000. *Nutr. Cancer*, 36 (2): 224-229.
- MOOTOO, B. S.; JATIVA, C.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. 1992. Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana* - structure elucidation by 2-D NMR-spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, 70 (5): 1260-1264.

- MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. 2007. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmagnosia*, 17(1): 55-58.
- MPEG - Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. 2005. Série Ciências Naturais, Belém, 1 (1): 65-140.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. 2007. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 27(1): 201-204.
- NUNEZ, C. V.; ROQUE, N. F. 1999. Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 11(4): 439-440.
- NUNEZ, C. V.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. 2005. Variation on the Chemical Composition of the Oil from Damaged Branches of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 17: 626-627.
- OMS (Organização Mundial de Saúde). Global Alert and Response (GAR). Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>. Acessado em: 29/07/2009.
- PENIDO, C.; CONTE F. P.; CHAGAS M. S. S.; RODRIGUES C. A. B.; PEREIRA, J. F. G.; HENRIQUES, M. G. M. O. 2006. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 55: 457-464.
- PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. 1975. A generic monograph of Meliaceae. *Blumea*, 22 (3): 419-540.

- PENNINGTON, T. D. 1981. A monograph of Neotropical Meliaceae. *Flora Neotr.*, 28: 1.
- PEREIRA-JÚNIOR, O. L.; WOLTER- FILHO, W.; DA ROCHA, A. F. I.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R. 1990. Diterpenes isolated from *Guarea carinata*. *Química Nova*, 13 (4): 247-249.
- PEREIRA-JÚNIOR, O. L.; WOLTER- FILHO, W. WOLTER, E. L. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SIQUEIRA, J. B. G.; PINHEIRO, C. C. S. 1993. Atividade biológica de um novo triterpeno isolado de *Guarea carinata* (Meliaceae). *Acta Amazônica*, 23 (2-3): 173-176.
- PINTO, P. G. 1963. Características físico-químicas e outras informações sobre as principais oleaginosas do Brasil – *Boletim Técnico 18, Ministério da Agricultura, Recife/ PE, Brasil*.
- PUPO, M. T.; ADORNO, M. A. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. 2002. Terpenoids and Steroids from *Trichilia* Species. *Journal of Brazilian. Chemical. Society*. 13 (3): 382-388.
- RAHMAN, K. M.; NAHAR, K.; KHAN, M. G. U.; HASAN, C. M. 2007. Phytochemical and biological studies on *Nephelium longan*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6 (3): 68 - 72.
- RAMOS, L.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. 2000. Constituintes químicos da casca do caule de *Guarea guidonia* – Meliaceae. *23a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ*.
- ROY, A.; SARAF, S. 2006. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(2): 191-201.

- SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; GUIMARÃES, V. P.; ELIAS, C. N.; LIMA, C. G. 2002. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. *Entomology Vector*, 9: 1524.
- SIMAS, N. K.; LIMA E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LAGE, C. L. S. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, 27 (1): 46-49.
- SOUZA, M. A. D.; PENNINGTON, T. D. 1999. Meliaceae. In: *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central*. Ribeiro, J. E. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C., 816 p. INPA, DFID, Manaus.
- VAN DEN DOOL, H; KRATZ, D. J. 1963. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Cromatography*, 11: 463-467.
- WENGLER, G. Family Flaviviridae. En; FRANCKI, R.I.B., ed Classification and nomenclature of viruses; fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Ach virol*, v.2, p.230-231, 1991.
- WOLTER, E. L. A.; ROCHA, A. F. I.; WOLTER-FILHO, W.; PEREIRA-JÚNIOR, O. L.; SIQUEIRA, J. B. G.; ZOGHBI, M. G. B. 1993. Estudo químico das sementes e casca da madeira de *Guarea trichilioides* (Meliaceae). *Acta Amazônica*, 23 (2-3): 177-180.

YIN, B.; HUO, C.; SHEN, L.; WANG, C.; ZHAO, L.; WANG, Y.; SHI, Q. 2009. Protolimonoids from the seeds of *Xylocarpus granatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 218-220.

ZHANG, H.; ODEKU, O. A.; WANG, X.; YUE, J. 2008. Limonoids from the stem bark of *Khaya grandifoliola*. *Phytochemistry*, 69: 271-27.