

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Clusia – Cultura de Tecidos e Importância do Seu Látex na
Sobrevivência das Espécies

Tese apresentada pelo aluno do curso de
doutorado em química, CLAUDIO AUGUSTO
GOMES DA CAMARA, ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
“*Doctor Scientiae*”

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
Orientadora

CAMPINAS
SÃO PAULO – BRASIL
NOVEMBRO 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
CHAMADA T/UNICAMP
C14c
EX
OMBO BCI 49694
ROC 16.837/02
Dx
RECO R\$ 11,00
ATA 15/06/02
CPD

CM00167436-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

C14c

Câmara, Cláudio Augusto Gomes da
Clusia – cultura de tecidos e importância do
seu látex na sobrevivência das espécies / Cláudio
Augusto Gomes da Câmara. -- Campinas, SP:
[s.n], 2001.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Clusia. 2. Látex. 3. Cultura de tecidos.
I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Agostinho (*in memoriam*) e Helena. Aos meus irmãos: Luiz, Paulo, Jorge, Sergio, Cristina e Bruno.

A Sofia, minha “filhota”, onde à distância e o tempo foram pequenos, comparados com a nossa harmonia. A anunciação de um novo tempo, nova vida, outra filha, Amanda. A Paty por todos os momentos que juntos compartilhamos e tantos outros a compartilhar.

A Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, por permitir compartilhar o amor, amizade e sabedoria em seu grupo de pesquisa. Por sua incansável dedicação e constante preocupação na formação profissional e acadêmica de seus orientandos.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, por permitir a realização dos experimentos de cultura de tecidos. A Profa. Dra. Simone Liliane Kiszczarff Shepherd, pelo apoio recebido e orientação.

A Dulce Regina Garcia Joaquim, pelo apoio técnico e contínua predisposição em ajudar na elaboração dos fatídicos experimentos de cultura de tecidos. Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, Ana Paula, Carlos, Daniela, Emília e Márcia, pela convivência e solidariedade.

Ao Dr. Volker Bittrich pelos ensinamentos nas conversas informais, principalmente nos vários momentos que fazíamos a coleta vegetal. Pelo apoio e colaborações precisas, que tanto ajudaram na elaboração deste trabalho.

À Dona Maria Lopes pelo incansável apoio técnico, pela competência e dedicação, imprescindíveis no bom andamento dos experimentos. Quero aproveitar o ensejo e agradecer a todos os outros técnicos, principalmente do IQ, Cidão, Claudia, Daniel, Fontana, Márcia, Zelinda, Sônia e Sôzinha, pelos serviços prestados, que sem eles parte deste trabalho não seria possível.

Às técnicas Ana Paula Zibordi e Inácia Farah, pela valiosa ajuda e apoio no isolamento e caracterização de microorganismos na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello sob a supervisão do Dr. Gilson Manfio e Dra. Silva Eguchi.

A Janice Druzian pela colaboração nos estudos dos polissacarídeos. Ao Jean Patrik pelas análises de homogeneidade e dosagens de proteínas e açúcares totais dos polissacarídeos.

Aos colegas e amigos do laboratório A-5: André, Ana Lúcia, Beatriz, Bira, Catarina, Carlos, Clara, Celira, Denise, Elaine, Gelson, Giordano, Inês, Jean, Laverde, Luiz, Luiz Marcos, Lurdes, Marisa, Mariza, Míriam, Pilar, Paulo, Raquel, Regina, Renato, Ricardo, Rosana, Samísia, Sérgio, Valéria, e Veruska pelo apoio, amizade e descontração nos momentos compartilhados, dentro e fora da UNICAMP.

Aos colegas e amigos de outros laboratórios e de outras universidades: Adauto, Alexandre, Cleide, Daniela, Flávia, Joseane, Leonardo, Maurício, Valéria e Zeca pela convivência e apoio incondicional.

Aos amigos Adão e Fernando, pelos momentos de descontração e conversas filosóficas. À querida família Jair, Conceição e Guí, pelo exemplo de vida e fraternidade.

Aos professores Aderbal, Paulo e Sebastião, às técnicas da ressonância Paula e Sônia e todos os que protagonizaram os memoráveis momentos de descontração e dialética, sempre atraídos pelo aroma do café mais cobiçado do pedaço.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pelo uso das *Clusias* cultivadas na fazenda Santa Elisa. A CAPES/PICDT pela bolsa de estudo e aos colegas de trabalho do Departamento de Química da UFRPE.

Precisas, tanto quanto valiosas, foram estas e muitas outras contribuições, que passaram despercebidas e que tanto enriqueceram, de certa forma, este

trabalho. Sendo assim, quero enfatizar e manifestar meus sinceros agradecimentos a todos que tornaram possível a elaboração e realização deste trabalho...
Muitíssimo obrigado!!!

RESUMO

CLUSIA – CULTURA DE TECIDOS E IMPORTÂNCIA DO SEU LÁTEX NA SOBREVIVÊNCIA DAS ESPÉCIES

Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Palavras-chave: *Clusia*, látex, cera epicuticular, cultura de tecido e polissacarídeo.

Com o intuito de correlacionar a composição química do látex à sobrevivência das espécies foram analisadas 12 clúsias pertencentes a 4 seções taxonômicas (1- Chlamydoclusia: *C. nemorosa*, *C. rosea*, *C. grandiflora*; 2- Criuva: *C. criuva*, *C. parviflora*; 3- Phloianthera: *C. hilariana*, *C. lanceolata* 4- Cordylandra: *C. fluminensis*, *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. panapanari*, *C. spiritu-sanctensis*) e 2 híbridos (*C. paralicola* X *C. weddelliana* e *C. lanceolata* e *C. nemorosa*). Testes bioautográficos, com estes látex revelaram principalmente para as frações polares atividades bactericida e fungicida, enquanto que o látex produzido por plantas híbridas foi menos ativo contra os microorganismos testados (bactérias: *Escherichia coli* CCT 5050; *Bacillus subtilis* CCT 0089; *Rhodococcus equi* CCT 0541; *Staphylococcus aureus* CCT 4259; *Micrococcus luteus* CCT 2720; *Salmonella typhimurium* CCT 0528, e fungos: *Aspergillus fumigatus* CCT 01277; *Aspergillus niger* CCT1435; *Fusarium oxysporum* CCT 3244; *Rhizopus oryzae* CCT 4964; *Alternaria alternata* CCT 1250; *Cladosporium cladosporioides* CCT5039 e *Candida albicans* CCT 0776). A composição química dos látex foi semelhante para todas as espécies. 30% dos sólidos em suspensão no látex eram polissacarídeos constituídos por arabinose (de 29.82 a 59.15%), ramnose (de 4.81 a 9.75%), manose (de 7.44 a 12.65%), galactose (de 26.27 a 44.24 %) e ácido glucurônico (de 2.07 a 4.24 %). Análise por RMN de ¹³C revelou que a cadeia principal é β-galactose (1→3), com ramificações de β-galactose (1→6). Sesquiterpenos, triterpenos e derivados fenólicos foram os principais constituintes

da fração solúvel em metanol. Traços de benzofenonas poliisopreniladas foram detectadas no látex em *C. paralicola*, *C. parviflora* e *C. hilariana*. Análises por CG/EM e RMN de ^{13}C foram usadas para identificar os componentes das misturas de triterpenos (β -amirina, eufano, lanostano) presentes no látex. Alguns metabólitos foram isolados e caracterizados como ácido olean-12-en-3-oxo-28-oico e três derivados do tocoferol, sendo um composto inédito e dois mencionados pela primeira vez no gênero *Clusia*. Os triterpenos: β -amirina, lupeol, lupenona e fridelanona foram os constituintes majoritários caracterizados nas ceras epicuticulares de *C. lanceolata*, *C. nemorosa*, *C. paralicola*, *C. paralicola* x *C. nemorosa* e *C. lanceolata* x *C. nemorosa*, mas um tanto difícil de estabelecer, em definitivo, uma correlação entre a composição química dos híbridos e os respectivos parentais e suas resistências contra ataques de microorganismos e herbívoros. Para melhor entender os ataques de microorganismos e a composição do látex, 4 microorganismos foram isolados a partir de um espécime híbrido doente, mas nenhum deles fitopatogênico. Finalmente, composição de cultura *in vitro* de *Clusia* foi obtida por CG/EM dos calos revelando a presença dos ácidos olean-12-en-3-oxo-28-óico e olean-12-en-3-oxo-28-óico, os quais foram encontrados no látex de *C. grandiflora*.

Todas estas análises não permitem uma conclusão definitiva do papel exercido pelo látex na proteção da planta, mas certamente contribuiu para a elucidação da composição química do látex de *Clusia*, cera epicuticular e cultura de tecidos os quais não tinham sido investigados. Finalmente, o protocolo estabelecido na cultura *in vitro* de *Clusia* promoveu a formação de metabólitos encontrados *in vivo* em espécies de *Clusia*.

ABSTRACT

CLUSIA – CELL CULTURE AND LATEX ROLE TO THE SPECIES SURVIVAL

Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Adviser: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Key-words: Clusia, latex, epicuticular waxes, polysaccharide , cell culture.

Focusing on the latex importance for the *Clusia* species survival we have investigated the chemical composition of 14 *clusia* látex, belonging to 4 different taxonomic sections (1- *Chlamydoclusia*: *C. nemorosa*, *C. rosea*, *C. grandiflora*; 2- *Criuva*: *C. criuva*, *C. parviflora*; 3- *Phloioanthera*: *C. hilariana*, *C. lanceolata* 4- *Cordylandra*: *C. fluminensis*, *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. panapanari*, *C. spiritu-sanctensis*) and two hybrids (*C. paralicola* X *C. weddelliana* e *C. lanceolata* e *C. nemorosa*). Biautography tests revealed that polar components possessed antibacterial and antifungal activity while latex produced by hybrid plants were less active against microorganisms (bacteria : *Escherichia coli* CCT 5050; *Bacillus subtilis* CCT 0089; *Rhodococcus equi* CCT 0541; *Staphylococcus aureus* CCT 4259; *Micrococcus luteus* CCT 2720; *Salmonella typhimurium* CCT 0528, e fungi: *Aspergillus fumigatus* CCT 01277; *Aspergillus niger* CCT1435; *Fusarium oxysporum* CCT 3244; *Rhizopus oryzae* CCT 4964; *Alternaria alternata* CCT 1250; *Cladosporium cladosporioides* CCT5039 e *Candida albicans* CCT 0776). The chemical composition was rather similar in all investigated species: 30% of the solids in the latex suspension was composed by a polysaccharide possessing arabinose (29.82 to 59.15%), rhamnose (4.81 to 9.75%), manose (7.44 to 12.65%), galactose (26.27 to 44.24 %) and glucuronic acid (2.07 to 4.24 %). ¹³C NMR analysis revealed that the main chain is made of (1→3) β-galactose units and branching of β-galactose (1→6). Sesquiterpenes, triterpenes and phenolic derivatives were the main constituents of the methanol soluble fraction. Traces of

poliisoprenylated benzophenones were detected in *C. paralicola*, *C. parviflora* and *C. hilariana* latex. GC/MS and ^{13}C NMR analyses were used to identify the components of triterpene mixtures (β -amirine, eufane, lanostane) present in the latex. Some metabolites were isolated and fully characterized as olean-12-en-3-oxo-28-oic acid and 3 tocoferol derivatives, of these 2 tocopherol derivatives were never mentioned in the genus and one is new. The β -amirine, lupeol, lupenone, and friedelanone were major constituents of the epicuticular waxes of *C. lanceolata*, *C. nemorosa*, *C. paralicola*, *C. paralicola* x *C. nemorosa* e *C. lanceolata* x *C. nemorosa* .but it was rather difficult to establish a correlation between the chemical composition of the hybrids and natural species and their resistance to microorganism attack and herbivory.

In order to understand microorganism attack and látex composition, 4 microorganisms were isolated from sick hybrid specimen but none of them were pathogenic. Finally, composition of in vitro *Clusia* cell cultures was obtained by GC/MS of the caluses revealing the presence of olean-12-en-3-oxo-28-oic acid and olean-12-en-3-hydroxy-28-oic acid, which were also detected in the latex of *C. grandiflora*.

All the above mentioned analyses do not allow definite conclusion on the role of the latex in the plant protection but they have certainly contributed to the elucidate the chemical composition of *Clusia* latex, epicuticular waxes and cell cultures which was never performed before. Finally the *Clusia* in vitro cell culture protocol was successful and the metabolites were related to those present *in vivo*.

CURRICULUM VITAE

1-DADOS PESSOAIS

- 1.1-Nome: Cláudio Augusto Gomes da Câmara
1.2-Naturalidade: Recife-PE, Nacionalidade: Brasileira
1.3-Endereço: Rua Henrique Moser, 141/203 – Imbiribeira, Recife – PE
CEP: 51170-090, Fone: (081)34281756. E-mail: Claucamara@uol.com.br

2-FORMAÇÃO

- 2.1-Ensino Médio:
Colégio de São Bento de Olinda, Olinda-PE, 1978-1980.
2.2-Ensino Superior:
Licenciado em Ciências pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.
2.3-Pós-Graduação:
Mestre em Química pela Universidade Federal do Ceará.

3-ATIVIDADE PROFISSIONAL:

- 3.1-Professor substituto do Departamento de Química da UFRPE no período de 15/03/87 à 25/05/88.
3.2-Professor da Rede de Ensino do Estado de Pernambuco no período de 01/06/88 à 15/07/93.
3.3-Desde 16/97/93, faço parte do corpo docente do Departamento de Química da UFRPE. Atualmente, Professor Assistente IV.

4-TRABALHO EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS

- Câmara, C.A.G. & Silveira, E.R. Produtos Naturais Marinhos do Nordeste: *Echinometria lucunter*. Livro de Resumos do XXXI Congresso Brasileiro de Química –PN- 066. 21-25/10/91. Recife-PE.
- Câmara, C.A.G. & Silveira, E.R. 16-Hidroxi-Caurano de *Xylopiá sericea*. Livro de Resumos da 15ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. PN-060. 27-31/05/1992. Caxambu-MG.
- Câmara, C.A.G. & Silveira, E.R. Métodos Reacionais para Separação e Caracterização de Diterpenóides de *Xylopiá sericea*. Comunicação oral e painel, no XXXII Congresso Brasileiro de Química. 26-30/10/92. Belém-PA.
- Câmara, C.A.G. & Silveira, E.R. Constituintes Voláteis de *Xylopiá sericea*. Livro de Resumos da 17ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. PN-19. 24-27/05/1994. Caxambu-MG.

- Câmara, C.A.G.; Da Cruz, M.A.O.; Souza, O.N.; Melo, L.C.O.; Neto, M.L.P. Composição Química de Exsudatos Explorados pelo *Callithrix jacchus* e sua Relação com Marcação de Cheiro. Livro de Resumos do IV Congresso de Iniciação Científica da UFRPE. Pg. 219. 24-27/10/1994. Recife-PE.
- Câmara, C.A.G. & Oliveira, R.N. Estudo Químico da *Cecropia peltata*. Livro de Resumos do XXXV Congresso Brasileiro de Química Pg.05. 25-29/09/1995. Salvador-BA.
- Câmara, C.A.G. & Souza, O.N. Estudo Químico da *Mascagnia rígida* (Tinguí). Livro de Resumos do XXXV Congresso Brasileiro de Química.Pg. 06. 25-29/09/1995. Salvador-BA.
- Câmara, C.A.G.; Souza, O.N.; Anjos, F.B.R.; Andrade, A.S.; Neto, M.L.; Melo, L.C.O. Abordagem Fitoquímica da Casca do Caule de *Astronoiium flaxinofolium*. Livro de Resumos do V Congresso de Iniciação Científica da UFRPE. Pg. 397. 04-07/12/1995. Recife-PE.
- Souza, O.N.; Schuler, C.L.; Jimenez, G. & Câmara, C.A.G. Estudo Químico da *Mascagnia rígida* Correlacionado aos Problemas de Sanidade Animal. Livro de Resumos da 18ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. PN-133.30-02/06/1995. Caxambu-MG.
- Câmara, C.A.G. & Shepherd, S.K.L. Relação entre Aia/Kin na Cultura *in vitro* de *Clusia Paralicola* X *Clusia Weddelliana* (Guttiferae). Livro de Resumos da III Jornada Paulista de Plantas Medicinais.Pg. 017. 11-15/10/1997. Campinas-SP.
- Câmara, C.A.G.; Bittrich, V.& Marsaioli, A.J. Chemical Composition of 12 *Clusia* Latex (Fruits). Livro de Resumos da 2nd IUPAC- International Conference on Biodiversity.PN -17. 11-15/07/1999. Belo Horizonte, MG.
- Câmara, C.A.G.; Druzsian, J.I.;Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. & Scamparini, A.R.P. Partial Characterization of Polysaccharides from *Clusia* Species (Guttiferae). Livro de Resumos da 22nd Symposium on the Chemistry of Natural Products-IUPAC.BSE-16. 04-08/09/2000. São Carlos-SP.
- Câmara, C.A.G.; Marsaioli, A.J.; Shepherd, S.L.K.; Joaquim, D.R.G. Análise Química da Cultura de Tecidos do Híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana*.Livro de Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.FG-105. 17-20/10/2000. Recife-PE.
- Câmara, C.A.G.; Bittrich, V.& Marsaioli, A.J. Composição Química e Ensaio Bioautográfico do Látex de Espécies e Híbridos de *Clusia*. Livro de Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.FG-106. 17-20/10/2000. Recife-PE.
- Pereira, A.S.; Câmara, C.A.G.; Neto, R.A.; Bittrich, V. & Marsaioli, A.J. Estudo da Composição Epicuticular de Diferentes Espécies de *Clusia*. Livro de Resumos da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. PN-00-28-31/05/2001.

5- ARTIGO PUBLICADO

- Camara, C.A.G.; Silveira, E.R. Alencar, J.W.. Volatile Constituents of *Xylopia sericea* ST. HILL” J. Essent. Oil Res.1996 8, 75-78.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA TABELAS.....	xxv
LISTA DE QUADRO.....	xxix
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxxi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xxxiii
LISTA DE ESPECTROS.....	xxxv
 INTRODUÇÃO.....	 1
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	6
 CAPÍTULO I	
1- Estudo da Composição Química do Látex de <i>Clusia</i>	9
1.1- Aspectos Gerais sobre plantas Laticíferas.....	9
1.2- Revisão Bibliográfica dos Constituintes Químicos Isolados e Propriedades Medicinais no Gênero <i>Clusia</i>	12
 CAPÍTULO II	
 PARTE I – ESTUDO QUÍMICO E TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM LÁTEX DE <i>CLUSIA</i>	
1-BIOAUTOGRAFIA COM LÁTEX DE <i>CLUSIA</i> - Resultados e Discussão.....	31
1.1-Quantidade de Látex nos Ramos e Frutos.....	31
1.2-Teste Bioautográfico com o Látex dos Frutos e Ramos de <i>Clusia</i>	33
1.2.1-Resultado da Bioautografia com o Látex dos Frutos.....	33
1.2.2-Teste Bioautográfico com os látex dos Ramos.....	36

1.2.3-Teste Bioautográfico com Substâncias Isoladas da Fração Polar do Látex de <i>C. grandiflora</i>	37
1.3-Isolamento de Microorganismos a Partir do Caule e Folhas Lesionadas de Híbridos de <i>Clusia</i>	40
1.4- Conclusão Parcial.....	46
CAPÍTULO III	
ANÁLISE QUÍMICA DO LÁTEX DOS FRUTOS E RAMOS DE <i>CLUSIA</i>.	
1-Resultados e Discussão.....	49
1.1-Análise do Látex dos Frutos.....	49
1.1.1-Análise dos Sesquiterpenos.....	60
1.1.2-Characterização dos Triterpenos Através da RMN de ^{13}C	60
1.1.3- Análise da Faixa Polar do Látex dos Frutos.....	73
1.2- Análise Química do Látex dos Ramos.....	77
1.2.1-Análise da Composição Química da Cera Epicuticular de <i>Clusia</i>	85
1.3-Isolamento, Caracterização e Identificação de Produtos Naturais do Látex de <i>Clusia</i>	90
1.3.1-Isolamento dos Produtos Naturais.....	90
1.3.2-Determinação Estrutural do Composto (78).....	92
1.3.3-Determinação Estrutural do Composto (18) e (18A).....	95
1.3.4-Determinação Estrutural do Composto (79).....	97
1.3.5-Determinação Estrutural do Composto (80).....	101
1.4- Caracterização Parcial do Polissacarídeo.....	106

1.4.1-Introdução.....	106
1.4.2- Resultados e Discussão.....	107

CAPÍTULO IV

PARTE II - CULTIVO *IN VITRO* DE *CLUSIA PARALICOLA* X *CLUSIA WEDDELLIANA*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS

1-Introdução.....	116
2-Resultados e Discussão.....	118
2.1- Cultura de Explantes Foliares do Híbrido <i>Clusia Paralicola</i> X <i>Clusia Weddelliana</i>	118
2.2- Análise Química da Cultura de Tecidos do Híbrido <i>Clusia Paralicola</i> X <i>Clusia Weddelliana</i>	120
3- Conclusão Parte I e II.....	128

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL

1-Aspectos Gerais sobre os Materiais e Métodos Empregados.....	129
1.2-Material Vegetal.....	130
1.3- Microorganismos Usados nos Testes Bioautográficos.....	131
2-Equipamentos e Condições das Análises.....	131
2.1- Cromatografia em Camada Delgada e Camada Espessa Preparativa.....	131
2.2-Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	132
2.3- Cromatografia por Permeação em Gel.....	133
2.4-Ressonância Magnética Nuclear.....	134

2.5-Espectroscopia no Infravermelho.....	135
2.6- Espectroscopia no Ultravioleta.....	135
2.7-Rotação Ótica.....	135
3-EXPERIMENTAL REFERENTE À PARTE I.....	136
3.1- Obtenção do Látex dos Frutos e Ramos.....	136
3.2-Teste Bioautográfico.....	138
3.2.1-Teste Bioautográfico com Compostos Isolados da Fração Polar do Látex de <i>C. Grandiflora</i>	139
3.3-Isolamento de Fungos a partir do Caule e Folhas Lesionadas de Híbridos de <i>Clusia</i>	140
3.3.1- Teste de Campo com os Fungos Isolados.....	141
3.3.2-Teste de Difusão em Ágar com os Fungos Isolados.....	141
3.4-Metodologia Aplicada ao Látex para Caracterização de seus Constituintes Químicos.....	142
3.4.1- Análise da Fração Apolar.....	143
3.4.1.1- Isolamento das Misturas de Triterpenos.....	143
3.4.2- Análise da Fração Polar.....	143
3.4.3- Isolamento do Polissacarídeo.....	144
3.4.3.1-Análise de Homogeneidade.....	144
3.4.3.2- Metanólise.....	144
3.5-Obtenção das Ceras Epicuticulares.....	145
4-EXPERIMENTAL REFERENTE À PARTE II.....	146
4.1-Cultura de Tecido de Espécie Nativa de <i>Clusia</i> , Fonte e Preparação dos Explantes.....	146

4.2-Meio de Cultura.....	148
4.3- Teste de Viabilidade dos Explantes.....	148
4.4-Protocolo Padrão para Formação de Calo.....	148
4.5- Protocolo de Avaliação da Indução de Calos.....	149
4.6-Obtenção dos Extratos do Calo e Meio de Cultura.....	150
4.7-Metodologia para Identificação dos Constituintes Químicos do Calo e Meio de Cultura.....	152
5- DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO LÁTEX DE <i>CLUSIA</i>.....	153
5.1-Dados Espectroscópicos do Composto (78).....	153
5.2-Dados Espectroscópicos do Composto (18).....	154
5.3-Dados Espectroscópicos do Composto (18A).....	155
5.4-Dados Espectroscópicos do Composto (79).....	156
5.5-Dados Espectroscópicos do Composto (80).....	157

LISTA DE FIGURAS

	Figura
FIGURA 1	Morfologia de flores e frutos de espécies pertencentes à família Guttiferae..... 2
FIGURA 2	Na esquerda, frutos e a flor da espécie <i>C. nemorosa</i> , mostrando em vermelho a resina floral. À direita frutos de <i>C. lanceolata</i> 4
FIGURA 3-	<i>Clusia rosea</i> - Vista por baixo mostra as sépalas cor de rosa, dispostas de maneira opostas, em forma de cruz. As pétalas são geralmente rosadas e vistosas. O corte transversal no fruto, mostra a coloração, amarela intenso, do látex encontrado nesta espécie..... 5
FIGURA 4-	A) Foto obtida com auxílio de uma lupa da superfície da folha de <i>C.renggeroides</i> em que os Canais laticíferos, indicado pela seta, aparecem em branco, sob a epiderme. B) Corte transversal de um ramo de <i>C. renggeroides</i> . Os canais laticíferos aparecem como orifícios com tonalidade escura, indicados pelas setas..... 11
FIGURA 5-	Teste Bioautográfico com extratos do látex dos frutos. cloranfenicol, 2- <i>C. nemorosa</i> , 3- <i>C. rosea</i> , 4- <i>C. hilariana</i> e extrato clorofórmico da cera epicuticular de <i>C. lanceolata</i> 34
FIGURA 6-	Híbridos atacados por fungos (A e B) e Herbívoros (C)..... 36
FIGURA 7-	Teste bioautográfico com compostos isolados do látex..... 39
FIGURA 8 -	A) Halo de inibição dos fungos isolados B) Halo de crescimento dos fungos isolados.(1- <i>Cladosporiu-like</i> , CCT6420, 2- <i>Alternaria-like</i> - CCT6419, 3- <i>Alternaria-like</i> - CCT6419, 4- Micélio preto - CCT 6418)..... 44
FIGURA 9-	Cromatogramas obtidos por CG/EM das frações apolares (Rf entre 0,90-0,35, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente). Os picos estão numerados de acordo com a identificação do composto e as estruturas correspondentes se encontram nas Tabelas 11-14..... 50

FIGURA 10-	Região do cromatograma dos látex de <i>Clusia</i> , fração apolar: R_f entre 0,90-0,60, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1) onde eluem os triterpenos (tempo de retenção entre 55,00 e 65,00 min.) e os respectivos espectros de massas dos picos correspondentes.....	62
FIGURA 11-	Estrutura parcial do lupeol. Deslocamentos químicos de carbono 13 (δ) para os carbonos insaturados.....	68
FIGURA 12-	Estrutura parcial do olean-12-en-3 β -ol. Deslocamentos químicos de carbono 13 (δ) para os carbonos insaturados.....	70
FIGURA 13-	Principais modificações nos deslocamentos químicos dos carbonos na passagem de um triterpeno da série eufano para lanostano e comparação com os deslocamentos obtidos experimentalmente da mistura de triterpenos proveniente do látex de <i>C. fluminensis</i> (Entre parênteses).....	71
FIGURA 14-	Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos frutos de <i>Clusia</i>	75
FIGURA 15-	Espectro de massas obtido a partir do cromatograma da fração apolar do látex de <i>Clusia paralicola</i> (Figura 9).....	76
FIGURA 16-	Cromatogramas das frações apolares (R_f entre 0.90-0.35, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) do látex dos ramos de <i>Clusia</i>	78
FIGURA 17-	Cromatogramas das frações apolares (R_f entre 0.90-0.35, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) do látex dos ramos de híbridos e parentais de <i>Clusia</i>	79
FIGURA 18-	Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos ramos de <i>Clusia</i>	80
FIGURA 19-	Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos ramos de híbridos de <i>Clusia</i>	81

FIGURA 20-	Cromatograma dos extratos da cera epicuticular de <i>Clusia</i>	87
FIGURA 21-	Cromatograma dos extratos da cera epicuticular de híbrido de <i>Clusia</i>	88
FIGURA 22-	Cromatograma após junção das faixas de R_f (0,48 e 0,53) do látex dos frutos de <i>C. grandiflora</i>	91
FIGURA 23-	Comparação entre o deslocamento químico (δ) de C-13 do carbono metílico da α_2 -guttiferina, ácido angélico e do ácido tíglico.....	96
FIGURA 24-	Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de carbono-13 entre o sistema bicíclico do γ -Tocoferol e deslocamentos obtidos para o composto 3. (Ambos os sinais foram obtidos em $CDCl_3$ e tetrametilsilano como padrão interno).....	98
FIGURA 25-	Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de carbono-13 entre a cadeia lateral isoprênica do composto (79) e (80) (Ambos os sinais foram obtidos em $CDCl_3$ e tetrametilsilano como padrão interno).....	102
FIGURA 26-	Espectros de infravermelho dos polissacarídeos do latex dos frutos de <i>Clusia</i> pertencentes às seções: Cordylandra (<i>C. paralicola</i>); Chlamydoclusia (<i>C. rosea</i>); Criuva (<i>C. criuva</i>) e Phloyanthera (<i>C. hilariana</i>).....	110
FIGURA 27-	Cromatograma dos metilglicosídeos TMS derivados do polissacarídeo isolado de <i>Clusia rosea</i> . Identificação dos números no cromatograma estão relacionados à Tabela 33.....	110
FIGURA 28-	Resultados das análises de homogeneidade dos plissacarídeos de <i>Clusia polysaccharides</i> : A - Cordylandra; B - Chlamydoclusia; C - Criuva and D - Phloyanthera Detector "A" espalhamento de luz. Detector B: Index de refração.....	112
FIGURA 29-	Espectro de RMN ¹³ C (500MHz, D ₂ O) dos plissacarídeos de <i>Clusia</i>	113

FIGURA 30-	Esqueleto básico proposto para o PS de <i>Clusia</i> com base nas análises de CG/EM e RMN de ^{13}C	114
FIGURA 31-	Tempo de cultivo ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ na ausência de luz) e aspecto dos explantes mantidos na combinação hormonal padrão na desdiferenciação e formação de calos. A) inoculação de explantes no meio padrão B) c/ 20 dias, C) c/ 3 meses e D) c/ 8 meses.....	120
FIGURA 32-	Cromatogramas dos calos Após 28 dias de cultivo.....	121
FIGURA 33-	Cromatogramas dos calos Após 8 meses de cultivo.....	122
FIGURA 34-	Posição dos compostos na cromatoplaça em sílica gel, com suporte de alumínio, previamente cortada na dimensão 6x6 cm.....	139

LISTA TABELAS

	Página
TABELA 1- Classificação da família Guttiferae com alguns gêneros importantes.....	3
TABELA 2- Relação das espécies citadas na literatura, especificando o tipo de estudo e a parte da planta estudada.....	12
TABELA 3- Constituintes Químicos isolados de <i>Clusia</i>	18
TABELA 4- Quantidade de extrato metanólico do látex I, polissacarídeo II e triterpeno III.....	31
TABELA 5- Peso médio dos frutos (III), quantidade de extrato metanólico do látex (IV), polissacarídeo (V) e mistura de triterpeno (VI).....	32
TABELA 6- Resultados da bioautografia com os látex dos frutos de <i>Clusia</i>	35
TABELA 7- Resultados do teste bioautográfico com látex dos ramos de <i>Clusia</i>	37
TABELA 8- Comparação dos halos de inibição obtidos entre o bactericida padrão e os compostos testados.....	38
TABELA 9- Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados contra microorganismos padrões. Detecção de halo de crescimento dos fungos isolados.....	45
TABELA 10- Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados contra microorganismos padrões. Detecção de halos de inibição dos fungos isolados.....	46
TABELA 11- Composição Percentual dos látex dos frutos de <i>Clusia</i> , Seção, Cuiuva.....	53
TABELA 12- Composição Percentual do látex dos frutos de <i>Clusia</i> , Phloianthera.....	54

TABELA 13-	Composição Percentual dos látex dos frutos de <i>Clusia</i> , Seção <i>Chlamydoclusia</i>	55
TABELA 14-	Composição Percentual dos látex dos frutos de <i>Clusia</i> , Seção, <i>Cordylandra</i>	56
TABELA 15-	Percentagens relativas dos constituintes Majoritários dos Látex dos Frutos de <i>Clusia</i> , fração apolar (R_f entre 0,90-0,35, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente).....	57
TABELA 16-	Esqueletos básicos para triterpenos detectados no látex de <i>Clusia</i>	65
TABELA 17-	Deslocamento químico dos átomos de carbono na função oxigenada.....	67
TABELA 18-	Deslocamento químico de RMN de ^{13}C para os carbonos sp^2 das misturas triterpênicas.....	69
TABELA 19-	Constituintes das misturas de triterpenos nos látex dos frutos de <i>Clusia</i>	72
TABELA 20-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. paralicola</i>	195
TABELA 21-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. weddelliana</i>	196
TABELA 22-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. fluminensis</i>	197
TABELA 23-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. spirictus-sanctensis</i>	198

TABELA 24-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. rosea</i>	199
TABELA 25-	Deslocamento químico (δ) e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de <i>C. lanceolata</i>	200
TABELA 26-	Composição percentual dos constituintes da fração polar metilada dos látex dos frutos de <i>Clusia</i> , Seção: <i>Cordylandra</i> (<i>C. paralicola</i>), <i>Chlamydoclusia</i> (<i>C. grandiflora</i>), <i>Criuva</i> (<i>C. parviflora</i>) e <i>Phloianthera</i> (<i>C. hilariana</i>).....	74
TABELA 27-	Composição Percentual dos Constituintes Químicos dos Látex dos Ramos em Espécies do Gênero <i>Clusia</i>	82
TABELA 28-	Percentual de cera epicuticular em <i>Clusia</i>	86
TABELA 29-	Abundância relativa dos constituintes das ceras separados por classe química.....	86
TABELA 30-	Comparação dos Deslocamentos Químicos RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3 e Tetrametilsilano como padrão interno) entre o ácido e Olean-12-en-3-oxo-28-óico (78) e o respectivo éster metílico ...	94
TABELA 31-	Deslocamento químico de Carbono-13 de derivados do tocoferol isolados do látex de <i>Clusia grandiflora</i> , fração polar bruta e metilada ($R_f < 0,25$, sílica gel e hexano /acetato de etila como eluente).....	100
TABELA 32-	Correlações entre ^{13}C e ^1H obtidas do espectro gHMBC (E-57, pág. 190) do composto 80.....	103
TABELA 33-	Percentuais das dosagens de açúcares totais proteínas	108
TABELA 34-	Identificação dos picos numerados nos cromatogramas (Figura 28) e relação molar dos açúcares neutros e ácidos urônicos nos polissacarídeos de <i>Clusia</i> , após conversão em derivados TMS de acordo com o procedimento de HA & Thomas.....	111

TABELA 35-	Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C do PS do látex de <i>Clusia</i> com os dados da literatura.....	113
TABELA 36-	Interação dialélica para o experimento 5 entre AIA e KIN.....	119
TABELA 37-	Composição Percentual Relativa dos Constituintes Químicos dos Calos e Meios de Cultura.....	127
TABELA 38-	Partes da plante analisada (Polissacarídeo (PS), Cera Epicuticular), relacionando-as com a espécie. Origem do látex para realização dos testes bioautográficos (T.B.) e o número de identificação das exsiccatas.....	130
TABELA 39-	Partes da planta analisada, relacionando-as com a espécie. Origem do látex para realização dos testes bioautográficos (T.B.).....	131
TABELA 40-	Quantidade das substâncias utilizadas no ensaio bioautográfico	140
TABELA 41	Combinação dialélica dos fitorreguladores no cultivo dos explantes.....	149

LISTA DE QUADRO

	Página
QUADRO 1- Estruturas dos Compostos Isolados de <i>Clusia</i>	22
QUADRO 2- Compostos identificados nas frações apolares (R_f entre 0,90-0,35, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) nos látex dos frutos de <i>Clusia</i>	58
QUADRO 3- Estruturas das frações polares metiladas ($R_f < 0,25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos frutos de <i>Clusia</i>	76
QUADRO 4- Compostos identificados nas frações apolares no látex dos ramos..	83
QUADRO 5- Compostos identificados na cera epicuticular de <i>Clusia</i>	89
QUADRO 6- Estruturas isoladas do látex de <i>C. grandiflora</i>	92
QUADRO 7- Compostos identificados em calos de <i>Clusia</i>	124

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
ESQUEMA 1- Principais fragmentações de triterpenos do tipo lanostanos e eufanos.....	63
ESQUEMA 2- Principais fragmentações de triterpenos do tipo oleano e ursano.....	64
ESQUEMA 3- Principais fragmentações do ácido Olean-12-en-3-oxo-28-óico.....	95
ESQUEMA 4- Principais fragmentações para os derivados ácidos do tocoferol, isolados do látex de <i>Clusia grandiflora</i>	99
ESQUEMA 5- Principais fragmentações para o composto (80), isolado do látex de <i>C. grandiflora</i>	105
ESQUEMA 6- Reação genérica da metanólise do polissacarídeo de acordo com o procedimento de HA e Thomas.....	109
ESQUEMA 7- Procedimento de obtenção e análise do látex de <i>Clusia</i>	137
ESQUEMA 8- Etapas de esterilização e obtenção dos explantes.....	147
ESQUEMA 9- Fluxograma da obtenção dos extratos a partir dos calos de <i>Clusia Paralicola</i> X <i>Clusia Weddeliana</i>	151
ESQUEMA 10- Fluxograma da obtenção dos extratos a partir dos meios de cultura dos calos de <i>Clusia paralicola</i> X <i>Clusia weddeliana</i>	152

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indolacético
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas
CCDP	Cromatografia em Camada Preparativa
CCT	Coleção de Cultura Tropical
COSY	“Correlated Spectroscopy”
DCM	Diclorometano
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polrization Transfer”
gCOSY	“Gradient Correlated Spectroscopy”
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”
HSQC	“Heterocuclear Single Quantum Correlation”
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IV	Infravermelho
KIN	Cinetina
MA	“Malt Agar”
NBY	“Nutrient – Broth Yeast”
NOE	“Nuclear Overhauser Effect”
OA	“Oat Meal”
pH	Potencial Hidrogeniônico

PS	Polissacarídeo
Rf	“Retention Factor”
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
UV	Ultravioleta
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE ESPECTROS

	Página
E-01	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura de triterpênica do látex de <i>C.paralicola</i> 158
E-02	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.paralicola</i> 158
E-03	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.paralicola</i> 159
E-04	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.weddelliana</i> 159
E-05-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.weddelliana</i> 160
E-06-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.weddelliana</i> 160
E-07-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.fluminensis</i> 161
E-08-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.fluminensis</i> 161
E-09-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. fluminensis</i> 162
E-10-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.spiritu-sanctensis</i> 162
E-11-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.spiritu-sanctensis</i> 163
E-12-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. spiritu-sanctensis</i> 163

E-13-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.rosea</i>	164
E-14-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. rosea</i>	164
E-15-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. rosea</i>	165
E-16-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.lanceolata</i>	165
E-17-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.lanceolata</i>	166
E-18-	Espectro RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C.lanceolata</i>	166
E-19-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de <i>C.hilariana</i>	167
E-20	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. hilariana</i>	167
E-21-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de <i>C. hilariana</i>	168
E-22-	Espectro no Infravermelho (Kbr) do composto (78).....	168
E-23-	Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (78).....	169
E-24-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto (78).....	169
E-25	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (78).....	170
E-25A-	Expansão do espectro E-25 na região entre δ 10-60	170

E-26-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (78).....	171
E-27-	Espectro no Infravermelho (Kbr) do composto (18).....	171
E-28-	Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (18).....	172
E-29-	Espectro no Ultravioleta do composto (18).....	172
E-30-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto (18).....	173
E-31-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18)	173
E-31A-	Expansão do espectro E-31 na região entre δ 15,0 – 40,0.....	174
E-32-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18).....	174
E-33-	Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) HSQC - CDCl_3 do composto (18).....	175
E-33A-	Expansão do espectro E-33 na região entre δ 5,02 - 6,78 (F2).....	175
E-33B-	Expansões do espectro E-33, nas regiões entre e 1,06 – 2,82 (F2)..	176
E-34-	Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) a múltiplas ligações (gHMB -C CDCl_3) do composto (18).....	176
E-34Ae B-	Expansões do espectro E-34 nas regiões entre δ 8,0 – 84,0 e 106,0 – 176,0 (F1).....	177
E-35-	Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear ^1H , ^1H (500 MHz) gCOSY - CDCl_3) do composto (18).....	178
E-35A-	Expansão do espectro E-35 na região entre δ 0,68 – 3,08 (F1).....	178
E-36-	Espectro no Infravermelho (Kbr) do composto (18A).....	179
E-37-	Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (18A).....	179

E-38-	Espectro no Ultravioleta do composto (18A).....	180
E-39-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto (18A)...	180
E-40-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18A).....	181
E-41-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18A).....	181
E-42-	Espectro no Infravermelho (Kbr) do composto (79).....	182
E-43-	Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (79).....	182
E-44-	Espectro no Ultravioleta do composto (79).....	183
E-45-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto GRAN-3.....	183
E-46-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (79).....	184
E-46A e B	Expansões do espectro E-46 nas regiões entre δ 10,0 – 31,0 e 39,0 – 60,0.....	184
E-47-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (79).....	185
E-48-	Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H (500MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) HSQC - CDCl_3 do composto (79).....	185
E-48A-	Expansão do espectro E-48 na região entre δ 105,0 – 146,0 (F1).....	186
E-49-	Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) a longa distância (gHMBC, CDCl_3) do composto (79).....	186
E-49A-	Expansão do espectro E-49 na região entre δ 5,06 – 6,54.....	187

E-50-	Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (80)	187
E-51-	Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (80)	188
E-52-	Espectro no Ultravioleta do composto (80)	188
E-53-	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto (80)	189
E-54-	Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do Composto (80)	189
E-54A-	Expansão do espectro E-49 na região entre δ 13,0 – 31,0.....	190
E-55-	Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (80)	190
E-56-	Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz), HETCOR - CDCl_3) do composto (80) ...	191
E-56A-	Expansão do espectro E-56 na região entre δ 13,0 – 31,0.....	191
E-57-	Espectro de RMN 2D de corelação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) a múltiplas ligações (gHMBC, CDCl_3) do composto (80)	192
E-57A-	Expansão do espectro E-57 na região entre δ 4,9 – 6,4 (F2).....	192
E-57B-	Expansão do espectro E-57 na região entre 1,5 – 2,6 (F2).....	193
E-58-	Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear de ^1H , ^1H , (500 MHz), gCOSY - CDCl_3) do composto (80)	193
E-58A-	Expansão do espectro E-58 na região entre δ 0,60 – 2,73 (F1).....	194

INTRODUÇÃO

De acordo com o sistema de classificação de APG¹, a família Guttiferae, pertence à ordem Malpighiales. A família é basicamente tropical, apenas os gêneros *Hypericum* e *Triadenum* são restritos à América do Norte. Alguns dos gêneros são endêmicos a certas regiões, como é caso do gênero *Kielmeyera*, que está confinado na América do Sul (Brasil, Paraguai e Bolívia). Na região neotropical ocorrem ca. 26 gêneros com ca. 400 spp.

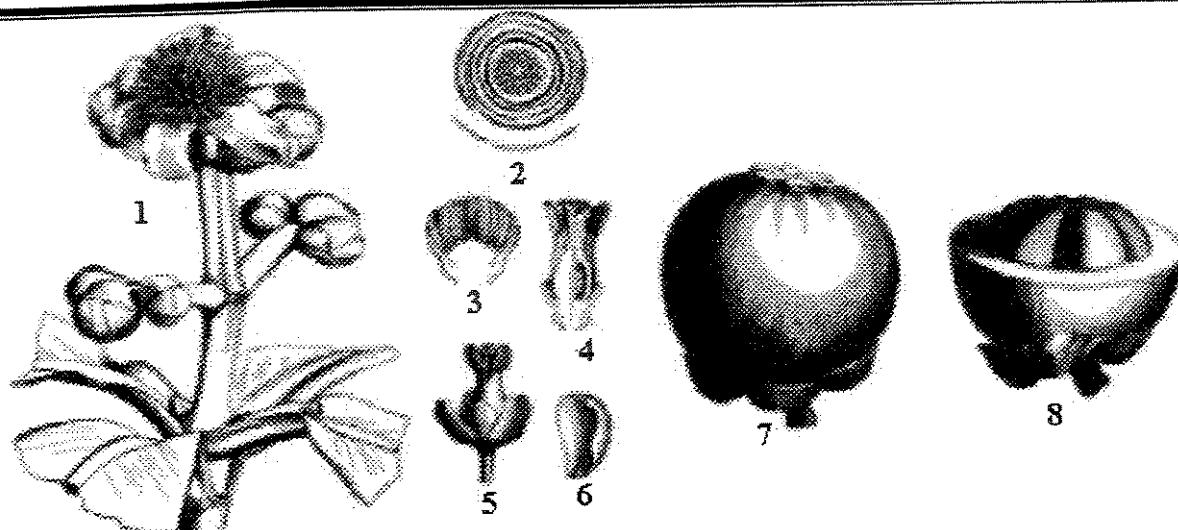
A família é caracterizada pela presença de látex, muitas vezes colorido. São árvores ou arbustos, com flores muitas vezes vistosas e a sua biologia floral bastante variável. A ocorrência de recompensas raras, como resina (*Clusia* e *Clusiella*) e óleos aromáticos (*Tovomita*), atraindo determinadas abelhas, também é notável. Enquanto, a maioria das espécies ocorre em formas de vegetação primária, certas espécies de *Clusia* e *Vismia* colonizam com sucesso, áreas de vegetação secundária e áreas degradadas.

Algumas espécies de Guttiferae são de interesse econômico como é o caso da *Platonia insignis* (bacuri), árvores nativas do Maranhão e de várias outras espécies dos gêneros *Garcinia*, e *Mammea*, que oferecem frutos comestíveis. Os látex de *Moronobea*, *Platonia* e *Symphonia* são usados por nativos para fixar as pontas de flechas, calafetar canoas, confecção de máscaras e em tochas, como fonte de luz².

Na Figura 1 (pág. 02) são mostrados detalhes morfológicos de espécies pertencentes, aos gêneros: *Clusia*, *Symphonia*; *Chrysopia*; *Garcinia* e *Kielmeyera*.

¹ The Angiosperm Phylogeny Group. 1998. "An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants" *Ann. Missouri. Bot. Gard.*, 85:531-553.

² Watson, L., and Dallwitz, M. J. . "The families of flowering plants" <http://biodiversity.uno.edu/delta/>



1- Flores ♂ de *Clusia angularis*; 2- Diagrama Floral de *Clusia*; 3-Parte do androceu de *Clusia* ♂; 4- Seção vertical do pistilo de *Symphonia*; 5- Flor sem a corola de *Symphonia*; 6- Pétalas de *Chrysopia*; 7 e 8- Fruto de *Garcinia mangostana*.



Kielmeyera rosea

1- Pistilo; 2- Seção transversal do pistilo; 3- Fruto maduro; 4-Embrião

Figura 1 Morphologia de flores e frutos de espécies pertencentes à família Guttiferae

Por serem arbustos, algumas espécies tem sua madeira aproveitada na confecção de móveis trançados. Atualmente a família Guttiferae está dividida em

cinco subfamílias: Kielmeyeroidea e Clusioideae, com duas tribos, Hypericoideae com três tribos, Calophylloideae e Symphonioideae^{3,4}. (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação da família Guttiferae com alguns gêneros importantes.

SUBFAMÍLIA	TRIBO	GÊNERO
Kielmeyeroideae	Kielmeyereae	<i>Mahurea</i>
		<i>Kielmeyera</i>
	Caraipeae	<i>Caraipa</i>
		<i>Haploclathra</i>
Calophylloideae	Calophylleae:	<i>Calophyllum</i>
		<i>Mesua</i>
		<i>Mammea</i>
Clusioideae	Clusieae	<i>Clusia</i>
		<i>Tovomita</i>
	Garcinieae	<i>Allanblackia</i>
		<i>Garcinia</i>
		<i>Pentapthalangium</i>
		<i>Rheedia</i>
Symphonioideae	Symphonieae	<i>Moronobea</i>
		<i>Pentadesma</i>
		<i>Platonia</i>
		<i>Symphonia</i>
Hypericoideae	Hypericeae	<i>Hypericum</i>
	Vismieae	<i>Harungana</i>
		<i>Psorospermum</i>
		<i>Vismia</i>

Os gêneros mais citados na literatura, relacionados à composição química, são: *Calophyllum*, *Clusia*, *Garcinia*, e *Kielmeyera*. As espécies do gênero *Clusia* se caracterizam por serem árvores ou arbustos. É um gênero neotropical, com 250-300 spp. distribuídas desde o sul da Flórida até Rio Grande do Sul (Brasil). Com poucas exceções, as espécies são dióicas*, em algumas espécies existem raças de plantas com flores bissexuadas, e em alguns casos, como a *C. scrobiculata*, sempre são

³ Dahlgren, R. M.T. *Bot. J. Linn. Soc.* 1980. 80: 2, 91.

⁴Engler, A. Guttiferae et Quimaceae in: C.F.P. von Martius: Flora Brasiliensis, Munchen, Frid. Fleisher, 1888. 12 (1), 381.

* Que tem órgãos reprodutores masculinos e femininos em indivíduos distintos, unissexuais.

hermafroditas. As flores masculinas, especialmente quando oferecem resina, mostram uma grande variação na morfologia do androceu[♦], que resultou na separação de alguns gêneros pequenos, por ex. *Decaphalangium*, (*Renggeria*). As plantas femininas por outro lado são mais difíceis de identificar, pois as flores femininas são relativamente pouco variáveis. As folhas, mais ou menos suculentas, lembram bastante as de algumas figueiras, apresentando inclusive látex, mas ao contrário delas as de *Clusia* são sempre opostas. O metabolismo tipo CAM (Metabolismo ácido de crassuláceas)[▲] foi observado em algumas espécies do gênero.

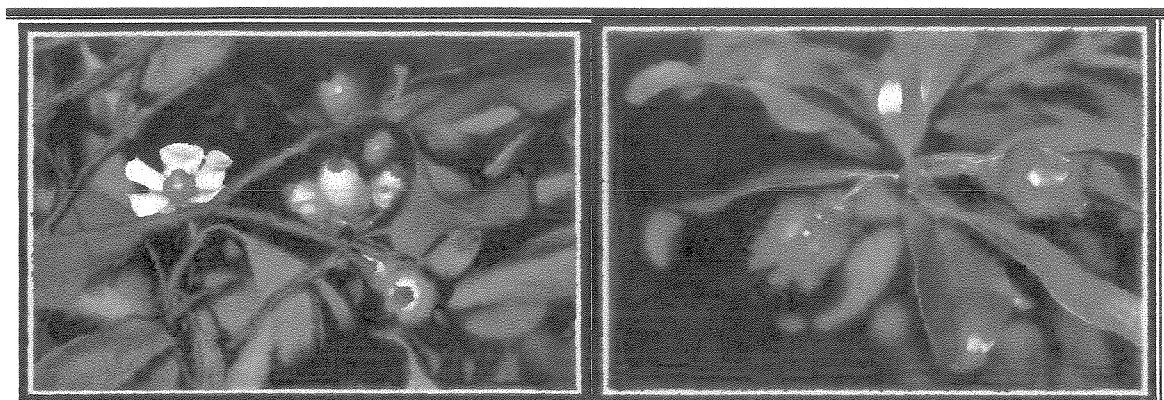


Figura 02 Na esquerda, frutos e a flor da espécie *C. nemorosa*, mostrando em vermelho a resina floral. À direita frutos de *C. lanceolata*.

Muitas espécies de *Clusia* crescem como hemiepífitas^{*} nas matas, mas como plantas terrestres em formações de vegetação aberta. A biologia floral das clúsias é muito interessante e bastante variável. Resina floral, pólen e néctar são oferecidos como recompensa para os polinizadores, que incluem abelhas de vários grupos taxonômicos e tamanhos, besouros, esfingídeos[♥], beija-flores e provavelmente

[♦] O conjunto dos órgãos masculinos, ditos estames, o qual constitui o terceiro verticilo (conjunto de peças foliáceas colocadas no mesmo nível) numa flor hermafrodita.

[▲] Mecanismo de adaptação para ambientes com escassez de água, observado em espécies de *Clusia*.

^{*} Epífitas, é o termo utilizado para os vegetais que vivem sobre um outro sem retirar os nutrientes, apenas apoiando-se nele.

[♥] Família de mariposas robustas, de grande capacidade de vôo, e cujas larvas têm postura que lembra a da esfinge.

moscas. As sementes são dispersas por vários pássaros atraídos pelos arilos* vermelhos a amarelos, oleosos e às vezes doces. Geralmente a dispersão secundária por formigas, também pode acontecer e às vezes foram encontradas plântulas* emergindo de um formigueiro.

Plantas de certas espécies, especialmente de *C. renggerioides*, podem ser encontradas perto de Manaus em áreas degradadas, e.g., ao longo de estradas, formando densas populações. O látex de *Clusia*, e mais raramente a resina floral, são usados na medicina popular/indígena para tratar ferimentos. São utilizadas como plantas ornamentais não só pela beleza e diversidade de suas flores, muitas vezes grandes e vistosas, como também pela presença de folhas sem pêlos e coriáceas*⁵ de um verde intenso e brilhante.

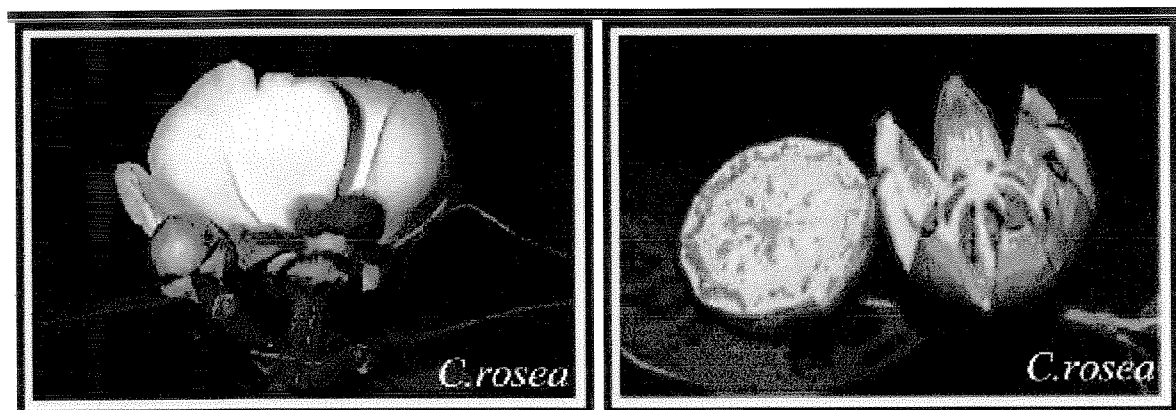


Figura 03 *Clusia rosea*, vista por baixo mostra as sépalas cor de rosa, dispostas de maneira opostas, em forma de cruz. As pétalas são geralmente rosadas e vistosas. O corte transversal no fruto, mostra a coloração, amarela intensa, do látex encontrado nesta espécie.

Representantes dos gêneros *Clusia* e *Vismia*, por serem resistentes a regiões com solo de baixa qualidade, são utilizadas como colonizadoras de ambientes degradados na Amazônia e Venezuela⁶.

* Designação comum às excrescências observadas na superfície de muitas sementes.

* Embrião em desenvolvimento, após a germinação da semente, planta recém-nascida.

* De consistência semelhante à do couro.

⁵ Bittrich, V., 1995. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 3:13-1

⁶ Saddi, N. 1989. *Rev. Brasil. Biol.*, 49,75

No Brasil, existem cerca de 22 gêneros com 200 espécies. *Clusia*, é o maior gênero de Guttiferae, com cerca de 60 espécies brasileiras⁵.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Com base no levantamento bibliográfico para espécies do gênero *Clusia*, boa parte dos artigos referem-se à identificação dos constituintes químicos e avaliação de suas atividades biológicas, sendo poucos os trabalhos voltados às interações* do tipo mutualismo, herbívoro e/ou parasitismo entre a planta e outros organismos vivos por meio desses constituintes químicos.

Elucidar a química responsável pelas diversas interações de um sistema ecológico é sempre um desafio e nem sempre, uma tarefa fácil de ser bem sucedida. O estudo do sistema *Clusia* e abelhas polinizadoras permitiram o acesso à química destas interações mutualísticas mediados por resinas florais que servem de recompensa. A composição química das resinas florais de *Clusia* foi estudada revelando que são basicamente constituídas por benzofenonas poliisopreniladas⁷.

A relação entre as resinas e a vida das abelhas, foi comprovada pela análise do ninho de *Trigona* no qual foi constatada, a existência de componentes das resinas florais de *Clusia*. Verificou-se ainda, a atração das abelhas polinizadoras pelo aroma das flores de *Clusia*, cuja composição química foi também elucidada. Portanto, cada novo questionamento, no nível molecular, sobre a ecologia química entre as clúsias e os polinizadores levou a respostas mais precisas sobre a rede infinitamente sutil que permeia a relação entre estes sistemas vivos. No momento, nossa atenção está voltada para o látex, pois como foi comentado o gênero *Clusia*, assim como na maioria das plantas da família Guttiferae existem estruturas

* mutualismo é a interação entre duas espécies, onde ambas são beneficiadas no herbivorismo e parasitismo, apenas uma das espécies envolvidas é beneficiada.

⁷ ^{a)} Oliveira, C.M.A.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Vencato, I. e Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, 1996, 37: (36), 6427-6430. ^{b)} Oliveira, C.M.A.; Porto, A.M.; Bittrich e Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, 1999, 50, 1073-1079. ^{c)} Porto, A.M.; Machado, S.M.F.; Oliveira, C.M.A.; Bittrich, V.; Amaral, M.C.E. e Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, 2000. (in press).

especializadas, que são responsáveis pela produção de látex, que ao contrário das resinas florais, é encontrado em todo o tecido vegetal e cuja importância ecológica não está explicada do ponto de vista químico. Seria, portanto, de grande relevância, desvendar os constituintes dos látex e verificar a importância dos mesmos na proteção das clúsias.

Foi observado que muitos híbridos de *Clusia* tinham baixa resistência ao ataque de microorganismos e herbívoros e *a priori*, a hipótese levantada era que os híbridos possuíam menos látex e/ou menos constituintes bioativos, já que plantas com um sistema reduzido de canais laticíferos tornam-se mais vulneráveis⁸.

De acordo com o levantamento bibliográfico, o gênero *Clusia* é rico em benzofenonas poliisopreniladas, uma classe de metabólitos secundários biologicamente ativos⁹, que estão presentes nas resinas florais e nos frutos, restringindo sua disponibilidade para o uso na medicina popular, em qualquer época do ano. Uma alternativa a este problema seria a cultura de tecidos de *Clusia* que permitiria uma fonte contínua destes metabólitos.

Conseqüentemente, o trabalho desta tese foi segmentado em duas partes principais:

- Estudo químico do látex e o seu potencial farmacológico, para estabelecer uma relação entre a composição química e a proteção das espécies contra predadores.
- Cultura de tecidos para obtenção e manutenção de calos a partir de uma espécie nativa de *Clusia*.

Levantadas estas observações e hipóteses, os principais objetivos desta tese são:

⁸ Farreall, B. D., Dussourd, D. E. & Mitter, C. 1991. *The American Naturalist*, 138: (4), 881-899.

⁹ Gustafson, K. R., Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Fuller, R. W., McKee, T. C., Cardellina, J. H. Macmhon, J. B., Cragg, G. M. & Boyd, M. R. 1992. *Tetrahedron*, 48, 46, 10093-10102.

- ❑ Avaliar o potencial da atividade antimicrobiana do látex, através da técnica bioautográfica.
- ❑ Identificar e estabelecer a importância dos constituintes químicos do látex na sobrevivência das espécies.
- ❑ Comparar os constituintes químicos do látex, provenientes dos híbridos e seus parentais.
- ❑ Elaborar um protocolo para obtenção da cultura de tecidos de *Clusia*, visando o estabelecimento da melhor combinação entre os fitorreguladores para obtenção de calos.
- ❑ Identificar os metabólitos presentes nos calos, e compara-los com os produzidos *in vivo*.

CAPÍTULO I

1-ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX DE CLUSIA

1.1-ASPECTOS GERAIS SOBRE PLANTAS LATICÍFERAS

Muitas plantas podem armazenar uma grande diversidade de fluidos, incluindo látex, resinas, mucilagens e gomas, dentro de células especializadas, canais e cavidades intercelulares. O látex pode ser definido como uma suspensão aquosa ou emulsão de vários tipos de pequenas partículas que são acumuladas em células e/ou estruturas especializadas. Estas estruturas, responsáveis pela produção de látex, são denominadas de laticíferas e a suspensão aquosa é denominada de látex a qual pode ser constituída por uma infinidade de substâncias pertencentes a vários grupos de metabólitos, inclusive constituintes inorgânicos. Entre eles destacam-se os triterpenos, esteróides, hidrocarbonetos poliisoprenóides; ácidos graxos, compostos aromáticos, fosfolipídeos, taninos, alcalóides, proteínas, etc.. As estruturas laticíferas podem ser divididas em Desarticuladas* ou Unicelulares e Articulados* ou Multicelulares^{10,11}. Ambos os grupos, não tem relação entre grupos taxonômicos, e diferentes tipos de órgãos laticíferos podem ser encontrados em diferentes espécies de uma mesma família. O látex pode também ser proveniente de células que não são laticíferas. É o caso da planta *Parthenium argentatum* (Guayule), cujo látex ocorre em células parenquimáticas^{*10,11}.

As plantas laticíferas ocorrem com maior frequência nas Dicotiledôneas. Estima-se que cerca de 40 famílias e mais de 20.000 espécies possuam algum tipo de estrutura laticífera e curiosamente, há mais famílias produtoras de látex na

* Estruturas laticíferas Desarticuladas são constituídas por células simples que crescem em conjunto e em harmonia com a planta, ocupando os espaços intercelulares.

* As articuladas são constituídas por uma fileira de células, com formato de “cadeado” onde o ponto de contato, entre as células, pode se apresentar intacta sem ramificação ou dissolvidos, confundido-se com o sistema unicelular.

¹⁰ Fahn, A. 1997. “Plant Anatomy”, 4ª ed. Vol. 10, Oxford, Butterworth Heinemann.

¹¹ Fahn, A. 1990. “Secretory Tissues in Plants”. 4ª ed. Oxford, Academic Press

* é o tecido constituído de células isodiamétricas ou paralelepipedais, que contém pontoações simples. Relaciona-se principalmente com a armazenagem e distribuição de substâncias nutritivas.

região tropical¹². As funções exercidas pelo látex na planta, ainda não estão bem esclarecidas, mas de forma geral acredita-se que tenha a função de distribuir os nutrientes às diferentes partes da planta. Outras hipóteses, fundamentadas, sugerem que as estruturas laticíferas (Figura 4, pág. 11), servem para estocar nutrientes. Resultados experimentais revelaram que em condições desfavoráveis de crescimento, a planta não viabiliza os substratos presentes no látex^{10,11}. Outras funções descritas para estes órgãos produtores de látex são o de regular o balanço de água e transporte de oxigênio nas plantas, além de proteger o vegetal contra inimigos naturais, mais especificamente, microorganismos e herbívoros. Evidências da função protetora do látex têm sido amplamente relatadas na literatura nas últimas décadas. Devido às propriedades adesivas inerentes ao látex (alta viscosidade e rápido endurecimento em contato com o ar) alguns insetos são imobilizados na tentativa de agressão à planta. A existência de metabólitos de reconhecida toxidez em látex como morfina e berberina em espécies do gênero *Euphorbia*, glicosídeos cardiotônicos em látex de espécies do gênero *Asclepias* e lactonas sesquiterpênicas em látex de espécies do gênero *Cichorium*¹², permitem atribuir ao látex, a função de proteção, a qual pode ser de forma direta ou indireta. No primeiro caso, o látex age, inicialmente como um agente selante, impermeabilizando a área lesionada da planta. No segundo caso, o látex age como um antibiótico, através dos constituintes bioativos, afastando microorganismos e herbívoros. Curiosamente, o látex de *C. insignis* Mart., são utilizados nos olhos, por algumas tribos da Amazônia, com o intuito de obter sucesso na caça subaquática^{5,13}. Há relatos na literatura, de que plantas com canais laticíferos lesionados são mais vulneráveis ao ataque dos predadores do que aquela com os canais intactos⁸. Da mesma forma, uma variedade vegetal com menor produção de látex torna-se mais vulnerável.

¹² Lewinsohn, T. M. 1991, *Chemoecology* (2), 64-68.

¹³ Uphof, J.C. 1968. "Dictionary of Economic Plant"s, second edition, New York

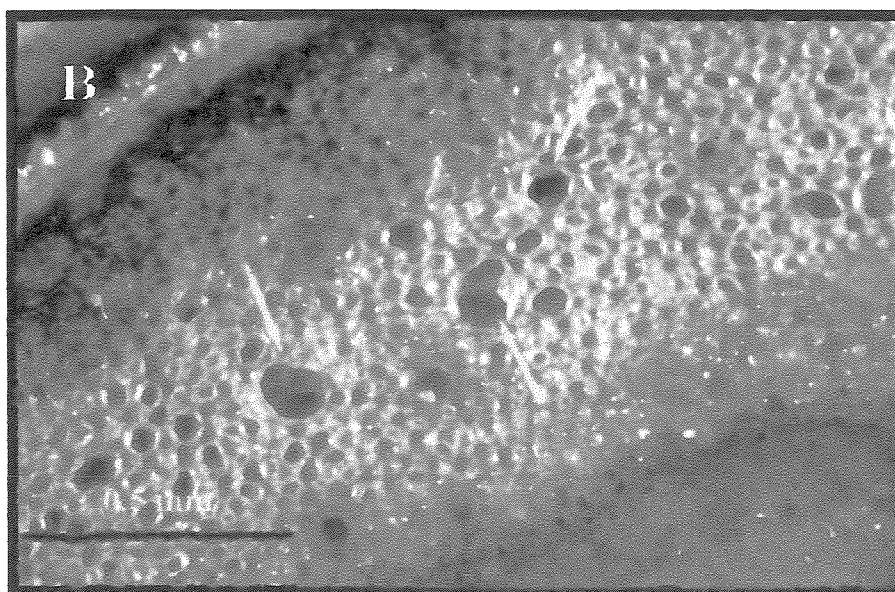
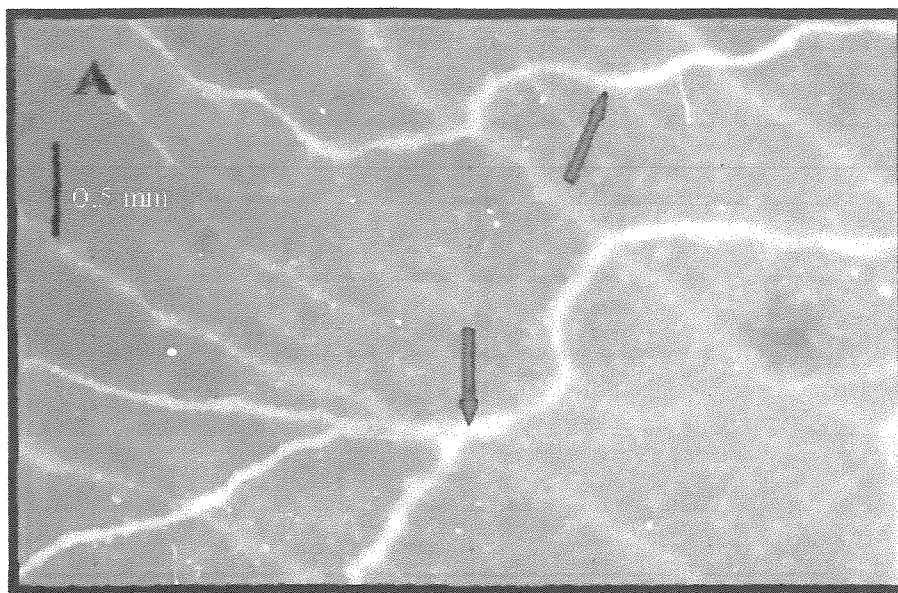


Figura 04, A) Foto obtida com auxílio de uma lupa da superfície da folha de *C.renggeroides* em que os Canais laticíferos, indicado pela seta, aparecem em branco, sob a epiderme. B) Corte transversal de um ramo de *C. renggeroides*. Os canais laticíferos aparecem como orifícios com tonalidade escura, indicados pelas setas.

1.2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS E PROPRIEDADES MEDICINAIS NO GÊNERO *CLUSIA*.

O levantamento bibliográfico foi realizado no “Chemical Abstract” e no site de busca “Web of Science” – FAPESP, abrangendo de 1940 até janeiro de 2001. Foram utilizadas, como palavras-chave, *Guttiferae*, *Clusiaceae* e *Clusia*. Das 53 espécies citadas, 36 referem-se ao estudo fitoquímico. E pouco mais de 20 espécies foram estudadas ecofisiologicamente. Por outro lado, levando em consideração o conteúdo dos artigos, aproximadamente 43,1% estão relacionados ao estudo ecofisiológico, 35,8% voltados para o interesse fitoquímico, 5,8% relata a atividade biológica de extratos e de alguns princípios ativos isolados. Os restantes, cerca de 16%, dos artigos, estão relacionados às áreas da fisiologia, ecologia, genética e botânica. Um resumo das espécies citadas na literatura, dando ênfase aos estudos fitoquímicos e farmacológicos, encontra-se descritos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 Relação das espécies citadas na literatura, especificando o tipo de investigação, Fitoquímica ou Testes Biológicos e a parte da planta estudada.

ESPÉCIES		Clusia Parte da Planta	Investigação	
			F.	T.B.
1	<i>C. arboricida</i>	Caule	X	-
2	<i>C. burchelli</i>	Resina Floral, Flor (voláteis)	X	-
3	<i>C. congetiflora</i>	Caule	X	-
4	<i>C. criuva</i>	Folha, Flor (voláteis), Fruto	X	-
5	<i>C. columnaris</i>	Folhas	X	X
6	<i>C. coclensis</i>	Folhas	-	X
7	<i>C. ellipticifolia</i>	Fruto, Folha, Caule	X	-
8	<i>C. eugenioides</i>	Frutos, Raiz	X	-
9	<i>C. flava</i>	Folhas, Flor(voláteis)	X	X
10	<i>C. fluminensis</i>	Folha, Flor (voláteis)	X	-
11	<i>C. grandiflora</i>	Frutos, Resina, Látex, Flôr	X	X
12	<i>C. guaviarensis</i>	Frutos	X	-
13	<i>C. hilariana</i>	Flor (voláteis), flor estaminal	X	-
14	<i>C. insignis</i>	Resina, flor (voláteis)	X	X
15	<i>C.havetiodes</i>	Frutos, ramo fino	X	
16	<i>C. lanceolata</i>	Flôr (voláteis), Oleo estaminal	X	-

17	<i>C. multiflora</i>	Frutos	X	-
18	<i>C. minor</i>	Frutos, Resina Floral	X	X
19	<i>C. major</i>	Resina Floral	X	X
20	<i>C. nemorosa</i>	Fruto, Folha, Caule, Resin Floral, Flor (voláteis), Óleo estaminal	X	-
21	<i>C. octopetala</i>	Frutos	X	-
22	<i>C. paralicola</i>	Raiz, Flor (voláteis)	X	X
23	<i>C. porthandiana</i>	Folhas e galhos	X	-
24	<i>C. plukenetii</i>	Frutos	X	-
25	<i>C. parviflora</i>	Flor (voláteis)	X	-
26	<i>C. palmana</i>	-	X	X
27	<i>C. pana-panari</i>	Flor (voláteis)	X	-
28	<i>C. pernambucensis</i>	Flor (voláteis)	X	-
29	<i>C. rosea</i>	Frutos, Caule, Resina Floral, Flor, Folha	X	X
30	<i>C. renggerioides</i>	Resina, Flor (voláteis), Óleo estaminal	X	-
31	<i>C. scrobiculata</i>	Resina Floral		
32	<i>C. spiritu-sanctensis</i>	Resina Floral, Flor (voláteis), Óleo estaminal	X	-
33	<i>C. sandiensis</i>	Folha, Fruto	X	-
34	<i>C. stenophylla</i>	Folha	X	X
35	<i>C. torresii</i>	-	X	X
36	<i>C. weddelliana</i>	Resina Floral, Flor (voláteis), Óleo estaminal	X	-

Desde tempos remotos, a humanidade tem usado uma infinidade de plantas com o intuito de tratar diferentes tipos de doenças. Raízes e frutos, de espécies pertencentes a vários gêneros da família Guttiferae, são usados pelos índios da Amazônia para o tratamento de eczemas, utilizados como analgésico e antipirético¹³. Plantas do gênero *Clusia* têm sido usadas na medicina popular, por meio da ingestão do látex ou na forma de chá, usando diferentes partes da planta, para o tratamento de doenças, por exemplo, reumatismo, purgativo, hanseníase ou para aliviar “dores de cabeça”¹⁴. O produto resinoso encontrado nos frutos de *C. rosea*¹⁵ é usado por nativos da Venezuela, na cauterização de ferimentos. Já a espécie, *C. insignis*, uma planta medicinal da Amazônia, conhecida popularmente

¹⁴ Salama, M. 1986, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 16: (4), 117-118.

¹⁵ Pitter, H. 1970, “*Manual de las Plantas Usales de Venezuela y su Suplemento*”, p 211. Fund. Eugenio Menzoza, Caracas.

como “apuí”, as flores frescas são usadas como purgativo^{16,16a}. Na Costa Rica, o extrato aquoso das folhas de *Clusia coclensis* é usado na medicina tradicional para o tratamento da hipertensão arterial¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹. Testes “in vivo”, de atividade biológica em ratos, com extratos polares das folhas de *C. torresii* e *C. palmana*, neutralizaram o efeito hemorrágico, induzido pelo veneno de *Bothrops asper* (serpente)²⁰.

O valor medicinal das plantas decorre da presença de uma ou várias substâncias químicas, conhecida por princípio ativo e que são capazes de produzir um efeito fisiológico.

Alguns exemplos relacionados ao isolamento e caracterização de princípios ativos, responsáveis pelas propriedades medicinais descritas, popularmente, para uma dada espécie, foram compilados da literatura e são mostrados a seguir.

Delle Monache e col²¹, Na década de 80, investigaram o potencial biológico do extrato acetônico da raiz de *C. paralicola*. O resultado dos ensaios biológicos revelou significativa atividade antimicrobiana. Análise fitoquímica do extrato possibilitou o isolamento da paralicolina A, composto 20, que é um fenantreno prenilado. Teste “in vitro” da paralicolina A, com células Kb e P388, mostrou uma forte atividade citotóxica.

No final dos anos 90, um grupo de pesquisa dos Estados Unidos, em colaboração com o do Brasil²², isolou a partir do extrato ativo da raiz de *C. paralicola*, três derivados bifenílicos, denominados de clusiaparalicolina A (59), B (60) e C (61). Estes metabólitos foram submetidos ao mesmo ensaio biológico

¹⁶ Balbach, A. 1986, “A Flora Nacional na Medicina Domestica. Edel, São Paulo, p. 466. ^{16a}Milliken, W.; Miller, R.P.; Pollard, SR.; e Wandelli, E.V. “The Ethnobotany of the Waimiri Atroari Indians of Brazil”

¹⁷ García-González, & M.º Morales. 1996, *Rev. Biol. Trop.* 44 (1) :87-91.

¹⁸ García-González, & M.º Morales. 1997, *Rev. Biol. Trop.* 45 (3) :999-1003.

¹⁹ García-González, & M.º Morales. 1998, *Rev. Biol. Trop.* 46 (3) :575-578.

²⁰ Castro, O.; Gutierrez, J.M.; Barrios, M.; Castro, I.; Romero, M.; Umana, E. 1999, *Rev. Biol. Trop.*, 47: (3), 605-615.

²¹ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Cavalcanti, J.F. 1987, *Tetrahedron Letters*, 28 (5), 563-566.

²² Seo, E.K.; Huang, L.; Wall, M.E.; Wani, M.C.; Navarro, R.M.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D. 1999, *J. Nat. Prod.* 62, 1484-1487.

daquele usado com a paralicolina A. Os três compostos revelaram atividade inibitória moderada contra células KB. Estes resultados mostram, que os metabólitos paralicolina A, clusiaparalicolina A e B são os princípios ativos do extrato da raiz da *C. paralalícola*.

As resinas florais de *C. weddelliana*^{7a}, *C. insignis*^{7a}, *C. lanceolata*^{7a}, *C. nemorosa*^{7a}, *C. renggerioides*^{7a}, *C. spirictu-sancitensis*^{7a}, e *C. grandiflora*^{7c, 23} revelaram forte atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias. Dentre as benzofenonas isoladas a partir destas resinas, podemos mencionar a clusianona (10), gutiferona (32), grandona (42), nemorosona (2), nemorosona II (57), etc.. Estas substâncias apresentaram atividade antimicrobiana contra várias bactérias de Gram positivas e negativas. Lokvam e col²⁴ isolaram três benzofenonas poliisopreniladas denominadas de chamona I (65), II (66) a partir do látex do caule e nemorosona II (57), da resina floral de *C. grandiflora*. Testes de atividade contra microorganismos patógenos às abelhas (*Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei*), utilizando a técnica de difusão em disco, revelou atividade apenas para chamona I (65) e nemorosona II (57), comprovando a atividade bactericida destas resinas florais e que as benzofenonas são os princípios ativos nas resinas florais de Clusia.

Cragg e col⁹, investigaram a atividade anti-HIV de vários extratos de diferentes espécies da família Guttiferae. O extrato metanólico das folhas de *C. rosea* foi submetido ao fracionamento monitorado com bioensaios anti-HIV. Finalmente, o extrato ativo obtido, forneceu as substâncias: xantochymol (9) e guttiferona E (32), como princípios ativos do extrato analisado. O biflavonóide, 13,II8-binaringenina (64), isolado das folhas de *C. columnaris*, apresentou ação anestésica²⁵.

²³ Lokvam, J.; Braddock, J.F. 1999. *Oecologia*, 119: (4), 534-540.

²⁴ Lokvam, J.; Braddock, J.F.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P. 2000. *Phytochemistry*, 55: (1), 29-34.

²⁵ Bittar, M.; Souza, M.M.; Yunes, R. A.; Lento R. Delle Monache, F.; Filho, V.C. 2000. *Planta Médica*. 66 (1), 84-86.

Este biflavonóide está presente em várias plantas da família Guttiferae, principalmente no gênero *Garcinia*. Em 1989, Lin e col²⁶ mostraram, *in vitro*, o potencial citotóxico anti-HIV para este biflavonóide e outros de estrutura correlata²⁷.

Fukugetina (75) e fukugesida (76) Foram isolados a partir dos frutos de *Clusia guaviarensis*²⁸. Estes compostos, foram isolados a partir das folhas de uma outra espécie da família Guttiferae, a *Rheedia gardneriana*²⁹. Estes biflavonóides, quando testados no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos foram mais eficazes do que a indometacina, que é uma droga comercial.

Até o momento, as contribuições mais relevantes, do gênero *Clusia*, para o desenvolvimento da farmacologia, foram às descobertas das propriedades analgésicas dos biflavonóide 13,II8-binaringenina (64), fukugetina (75) e fukugesida (76), que revelaram maiores atividades antinociceptiva do que algumas drogas usadas clinicamente, outras contribuições é o efeito inibitório citopático das benzofenonas poliisopreniladas, de infecções HIV observadas "*in vitro*" e o isolamento das bifenilas, clusiaparalicolinas A e B, que revelaram significativa atividade citotóxica, também "*in vitro*", para linhagens de células KB, do tipo carcinoma epidermóide oral. A contribuição ao conhecimento químico de espécies pertencentes à família Guttiferae³⁰ tem revelado uma grande diversidade de metabólitos, provenientes de várias partes da planta: folhas, raízes, caule, frutos, etc., que inclui principalmente terpenóides, flavonóides, xantonas e derivados fenólicos. O gênero *Clusia* é a principal fonte de benzofenonas poliisopreniladas e

²⁶ Lin, Y.M.; Chen, F.C.; Lee, K.H. 1989. *Planta Médica*, 55: 166-168.

²⁷ Lin, Y.M.; Anderson, H.; Flavin, M.T.; Mata-Greenwood, E.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J.M.; Schinazi, R.F.; Hughes, S.; Chen, F.C. 1997, *J. Nat. Prod.* 60: 884-888.

²⁸ Martinez, O.E.; Bárbara, M.M.; Delle-Monache, F. 1996, *Ver. Colomb. Quim.* 25: (1-2), 15-21.

²⁹ Filho, V.C. 2000. *Química Nova*, 23: (5), 680-685.

³⁰ De Araújo, H. T.; Mahajan, J. R.; Gottlieb, O. R. & Magalhães, M. T. 1966. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38: (3-4) 429.

alquilarilcetonas. Mais de 64% das substâncias isoladas pertencem à classe das benzofenonas poliisopreniladas.

Um sumário dos constituintes químicos de *Clusia* encontra-se descrito na Tabela 3. A letra sobrescrita relaciona a espécie com o local de coleta.

Ficaram fora desta listagem os constituintes provenientes das análises de voláteis³¹ e ácidos fixos de diferentes partes da planta^{32,33,34}, que foram apenas caracterizados por CG/EM.

³¹ Nogueira, P.C., Bittrich, V., Shepherd, G.J. Lopes, A.V., Marsaioli, A.J. 2000. *Phytochemistry*, 56: (5) 443-452.

³² Gonzáles, J., Martínez, E., Moreno, B., Delle Monache, F. 1993. *Rev. Colomb. Quim.*, 22: (2), 81-84.

³³ Mercedes, F.; Eduardo, M.; Delle Monache, F. 1998. *Rev. Colomb. Quim.*, 27: (2), 87-89.

³⁴ Gonzáles, J., Arias, T., Moreno, B., Arias, B. 1988. *Rev. Colomb. Quim.*, 17: (1-2), 89-91.

Tabela 3 Constituintes Químicos isolados de *Clusia*

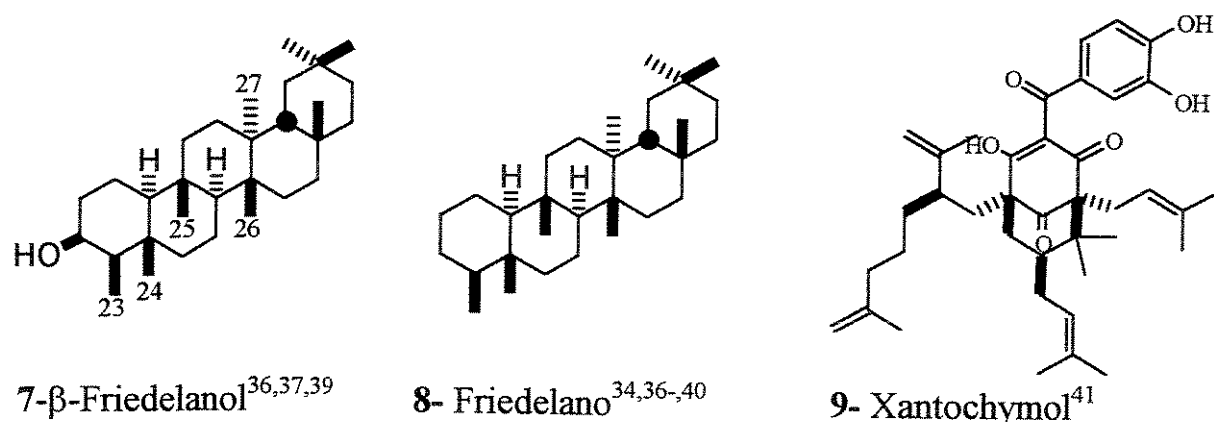
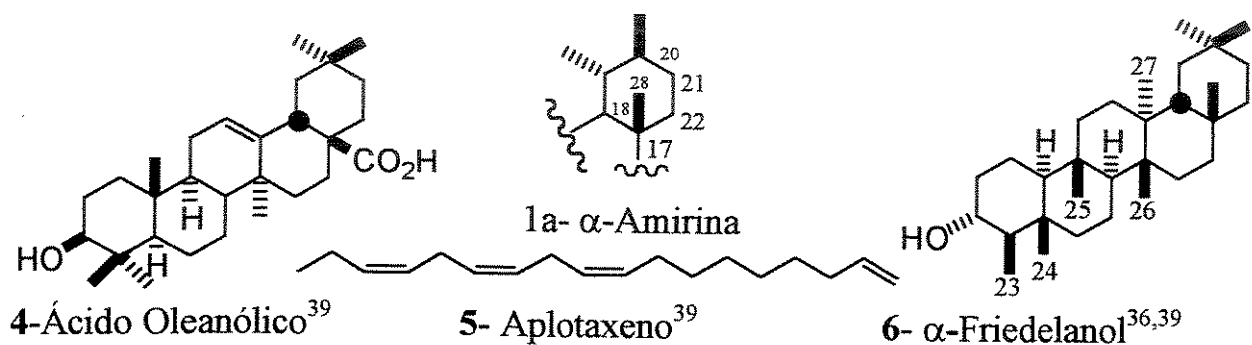
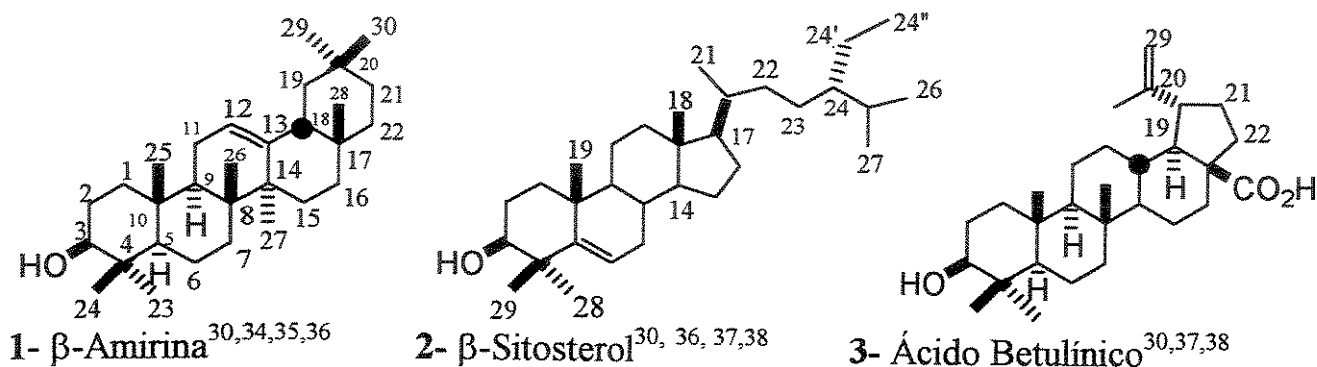
Composto	Espécie e Parte Vegetal Analisada*	Local de Coleta*
1- β -Amirina	Caule: <i>Clusia</i> ^a sp; Fruto: <i>C. grandiflora</i> ^b , <i>C. eugenioides</i> ^b e <i>C. ellipticifolia</i> ^{b'} ; Folha: <i>C. fluminensis</i> ^c , Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	- ^a Vizinho à estrada Brasília-sobradinho, Brasília- Brasil. -(b,b')Jardim Botânico de Bogotá Colômbia.
1a- α -Amirina	Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	
2- β -Sitosterol	Fruto: <i>Clusia</i> ^a sp; Folha: <i>C. fluminensis</i> ^c , <i>C. nemorosa</i> ^d , Caule: <i>C. arboricida</i> ^e ,	- ^c Rio de Janeiro-Brasil.
3-Ácido Betulínico	Fruto: <i>Clusia</i> ^a sp; Caule: <i>C. arboricida</i> ^e ; Folha: <i>C. nemorosa</i> ^d ; Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	- ^d Reserva Biológica de Murici, Alagoas- Brasil.
4-Ácido Oleanólico	Caule: <i>C. rosea</i> ^f , Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	- ^e Ouro Preto-Brasil.
5- Aplotaxeno	Caule: <i>C. rosea</i> ^f ,	
6- α -Friedelanol	Caule: <i>C. rosea</i> ^f ; Folha: <i>C. fluminensis</i> ^c .	- ^f Caripe, Venezuela.
7- β -Friedelanol	Caule: <i>C. nemorosa</i> ^d , <i>C. rosea</i> ^f ; Folha: <i>C. fluminensis</i> ^d , Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	- ^g San Antonio Del Telquendama, Bogotá-Colômbia.
8-Friedelano	Caule: <i>C. rosea</i> ^f , <i>C. arboricida</i> ^e , <i>C. nemorosa</i> ^d ; Fruto: <i>C. ellipticifolia</i> ^a , <i>C. multiflora</i> ^b , <i>C. eugenioides</i> ^b , e <i>C. grandiflora</i> ^b ; Folha: <i>C. fluminensis</i> ^c	- ^h Aupuni St. in Hilo-Hawaii.
9-Xantochymol	Fruto: <i>C. rosea</i> ^{hi}	- ⁱ Republica Dominicana.
10- Clusianona	Fruto: <i>C. congestiflora</i> ^l , <i>C. sandiensis</i> ^k , Resina Floral: <i>C. spiritu-sanctensis</i> ^l (macho), <i>C. weddelliana</i> ^l (macho), <i>C. lanceolata</i> ^l (macho), <i>C. spiritu-sanctensis</i> ^l (macho e fêmea), <i>C. burchellii</i> ^l (macho), <i>C. parapanari</i> ^l (fêmea), <i>C. paralicola</i> ^l (macho), <i>C. pernambucensis</i> ^l (fêmea), <i>C. fluminensis</i> ^l (macho).	- ^j Próximo a Fresno, Colômbia -(k,k'')Machu Pichu- Peru. - ^l IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.

11- Vismiafenona B	Frutos: <i>C. ellipticifolia</i> ^b ,	- ^b Jardim Botânico de Bogotá Colômbia.
12- Isovismiafenona B		
13- Clusiafenona A	Fruto : <i>C. ellipticifolia</i> ^b , <i>C. sandiensis</i> ^k	
14- Machuona	<i>C. sandiensis</i> ^k	- ^c Rio de Janeiro-Brasil.
15- Clusiafenona B		
16- Clusiafenona C	Fruto: <i>C. ellipticifolia</i> ^b	
17- Clusiafenona D		- ^d Reserva Biológica de Murici, Alagoas- Brasil.
18- (cis)-δ-Tocotrienólico	Fruto e látex: <i>C. grandiflora</i> ^{lm} ,	
18A-(cis)-δ-Tocotrienolato de metila		
19- (trans)-δ-Tocotrienólico	Fruto: <i>C. grandiflora</i> ^m ,	- ^e Ouro Preto-Brasil.
20- Paralicolina A	Fruto: <i>C. paralicola</i> ⁿ ,	
21- 3-oxo-Eufano	Fruto: <i>C. multiflora</i> ^b	
22- Eufol	Frutos: <i>C. multiflora</i> ^b , <i>C. grandiflora</i> ^b	- ^(k,k'') Machu Pichu- Peru.
23- Lupeol	Frutos: <i>C. grandiflora</i> ^b ; Folhas <i>C. havetiodes</i> ^j	
24- Nemorosonol	Fruto, <i>C. nemorosa</i> ^d , <i>C. multiflora</i> ^o ; Resina Floral: <i>C. minor</i> ^p , <i>C. major</i> ^q	
25- Nemorosonol B	Fruto, <i>C. nemorosa</i> ^d	- ^l IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.
26- Ácido nemorosínico A		
27- Ácido nemorosínico B	Fruto: <i>C. nemorosa</i> ^d .	
28- (-)-Epi-catequina		- ^m Jardim Botânico, Caracas-Venezuela.
29- Procianidina B2		
30- 6''-O-Acetil-2''-O-rhamnosil-vitexin	Folha: <i>C. sandiensis</i> ^{k''}	
31- 2''-O-Rhamonosil-vitexin		- ⁿ Recife- Brasil.
32- Gutiferona E	Folha: <i>C. rosea</i> ^l	
33- Lupenona	Folha: <i>C. fluminensis</i> ^c	
34- 2,6 Dimetoxi-p-benzoquinona	Caule: <i>C. arboricida</i> ^e	- ^o Parque Nacional de Purace-Colômbia.
35- Clusiacitrana A	Frutos: <i>C. multiflora</i> ^o	
36- Clusiacitrana B	Folha: <i>C. ellipticifolia</i> , Frutos: <i>C. multiflora</i> ^o	
37- Clusiacirol A		- ^p Valle de Sartenejas-Venezuela.
38- Clusiacirol B	Frutos: <i>C. multiflora</i> ^o	
39- Clusiacromeno C		
40- Xerofenona A	Galhos e Folhas: <i>C. portlandiana</i> ^f	- ^q Caracas-Venezuela.
41- Xerofenona B		
42- Grandona	Resina Floral: <i>C. grandiflora</i> ^l (macho e fêmea)	
43- Nemorosona	Resina Floral: <i>C. rosea</i> ^l (fêmea), <i>C. grandiflora</i> ^l (macho e fêmea), <i>C. insignis</i> ^s (fêmea), <i>C. nemorosa</i> ^l (hermafrodita), <i>C. hilariana</i> ^l (masculina)	- ^r Mona-Jamaica.

44- Hidroxi-nemorosona	Resina Floral: <i>C. nemorosa</i> ¹ (hermafrodita)	- ^d Reserva Biológica de Murici, Alagoas- Brasil.
45- Clusona	Flor: <i>C. insignis</i> ^t	
46-5,7-Diidroxi-2-(n-heptacosanil) cromona	Caule: <i>C. nemorosa</i> ^d	
47- Ferulato de Octacosanila	Frutos: <i>C. plukenetti</i> ^u	- ¹ IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.
48- Kaepferol		
49- Plukenetiona A		
50- Plukenetiona B		
51- Plukenetiona C		
52- Plukenetiona D		
53- Plukenetiona E		- ⁿ Recife- Brasil.
54- Plukenetiona F		
55- Plukenetiona G		
56- 7-epi-nemorosona	Resina Floral: <i>C. nemorosa</i> ¹ macho, <i>C. insignis</i> ^s macho, <i>C. reggerioides</i> ^s macho com e sem pistolídeo, <i>C. reggerioides</i> ^s fêmea	- ^s Amazonas-Brasil.
57-nemorosona II	Resina Floral: <i>C. rosed</i> ¹ fêmea, <i>C. reggerioides</i> ^s macho com e sem pistolídeo, <i>C. grandiflora</i> ^v	- ^t Belém-Brasil.
58-xantona	Resina Floral: <i>C. nemorosa</i> ¹ hermafrodita	
59- Clusiaparalicolina A	Raiz: <i>C. paralicola</i> ⁿ	- ⁿ St. Thomas-Barbados.
60- Clusiaparalicolina B		
61- Clusiaparalicolina C		
62- Vitexin	Folha: <i>C. criuva</i> ^x	
63- Isovitexin		
64-13,II8-Binaringenina	Folha: <i>C. columnaris</i> ^z	- ^y Parque Nacional Canaima-Venezuela.
65- Chamona I	Látex: <i>C. grandiflora</i> ^y	
66- Chamona II		
67- Weddellianona A	Resina Floral: <i>C. weddelliana</i> ¹ , <i>C. lanceolata</i> ¹ , <i>C. burchellii</i> ¹ , <i>C. pana-panari</i> ¹ , <i>C. Paralicola</i> ¹ , <i>C. pernambucensis</i> ¹ , <i>C. fluminensis</i> ¹ , <i>C. hilariana</i> ¹ .	- ^x Curitiba- Brasil.
68- Weddellianona B	Resina Floral: <i>C. weddelliana</i> ¹ , <i>C. pana-panari</i> ¹ , <i>C. paralicola</i> ¹ .	- ^z Rio Cataniapo-Venezuela.
69- Spiritona	Resina Floral: <i>C. spiritus-sanctensis</i> ¹ , <i>C. weddelliana</i> ¹ , <i>C. burchellii</i> ¹ , <i>C. pana-panari</i> ¹ , <i>C. pernambucensis</i> ¹ , <i>C. fluminensis</i> ¹ .	
70- Lanceolatona	Resina Floral: <i>C. lanceolata</i> ¹ , <i>C. fluminensis</i> ¹ , <i>C. pana-panari</i> ¹ , <i>C. pernambucensis</i> ¹ , <i>C. burchellii</i> ¹ , <i>C. hilariana</i> ¹ .	- ¹ IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.

71- Hilarianona	Resina Floral: <i>C. hilariana</i> ¹	- ¹ IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.
72- Insignona	Resina Floral: <i>C. insignis</i> ¹	
73- Scrobiculatona A 74- Scrobiculatona B	Resina Floral: <i>C. scrobiculata</i> ¹	
75- Fukugetina	Fruto: <i>C. guaviarensis</i>	- ^b Bogotá- Colômbia
76- Fukugisida		
77- Damara-12, 24-dien3 β -ol		
78- Ácido olean-12-en-3-oxo-28-óico	Látex de <i>C. grandiflora</i> ¹	- ¹ IAC, Fazenda Santa Eliza, Campinas-Brasil.
79- Ácido- <i>cis</i> - γ -tocotrienolato de metila		
80- 5,8-dioxo- <i>cis</i> - γ -tocotrienolato de metila		
81- 28,29-epoxyplukenetiona 82- 33-hidroxiperoxiisoplukenetiona 83-15,16-dihidro-16-hidroxiperoxiplukenetiona F	Frutos: <i>C. havetiodes</i>	- ^J Próximo a Fresno, Colômbia

*A letra sobrescrita na espécie refere-se ao local de coleta que consta no trabalho

Quadro 1 Estruturas dos Compostos Isolados de *Clusia*

³⁵ Olivares, E.M.; Gozalez, J. e Delle Monache, F. 1994, *Phytochemistry*, 36: (2), 473-475.

³⁶ Nagem, T.J.; Antonio, A.L. e Silva, R. 1993, *Fitoterapia*, 64: (4), 380.

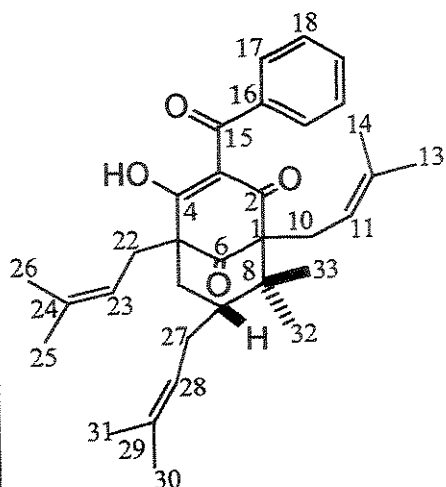
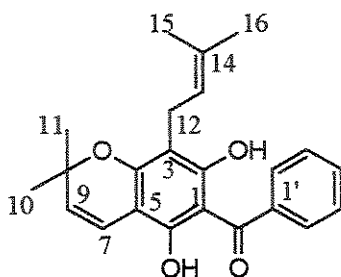
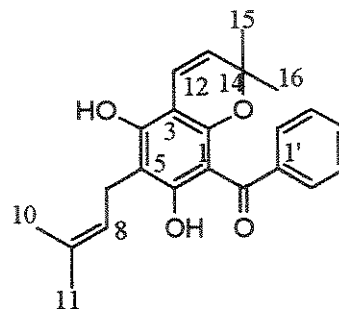
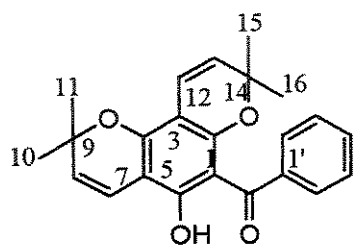
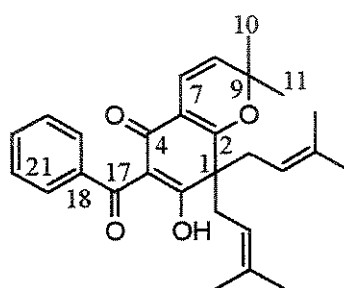
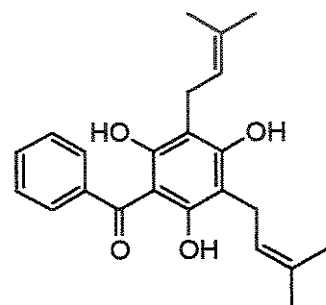
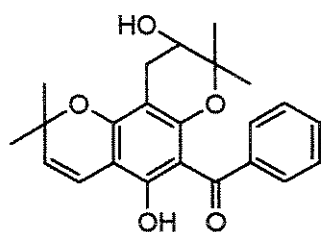
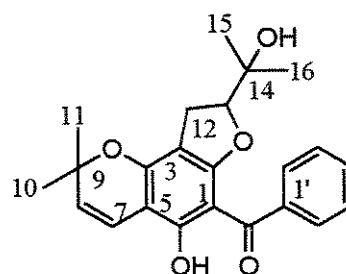
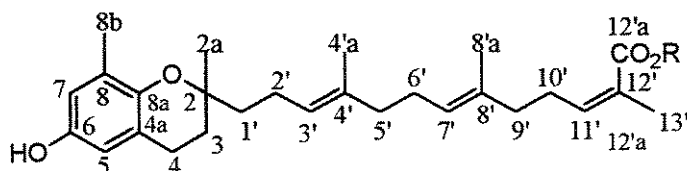
³⁷ Andrade, M.R.; Almeida, X.E. e Conserva, L.M. 1998, *Phytochemistry*, 47: (7), 1431-1433.

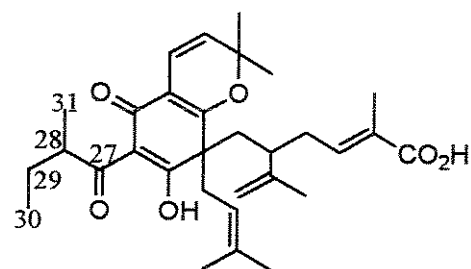
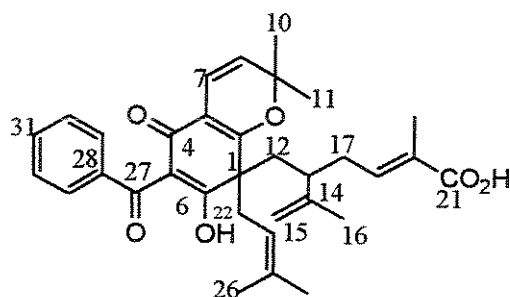
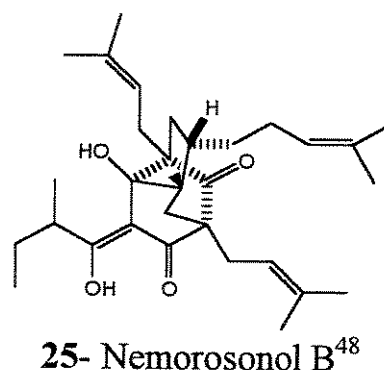
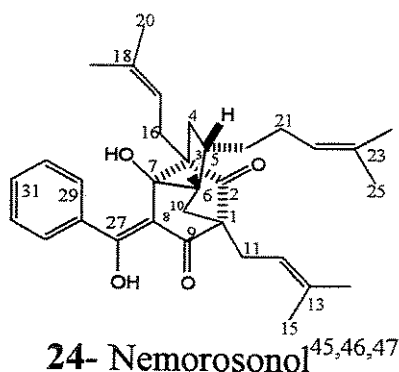
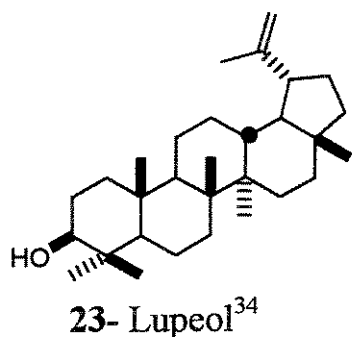
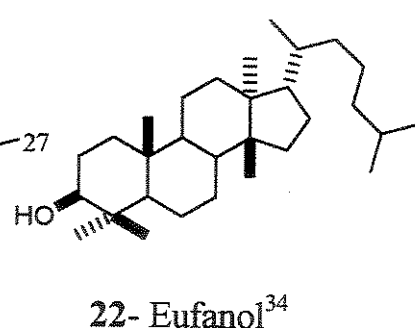
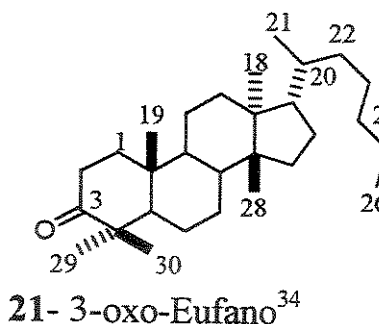
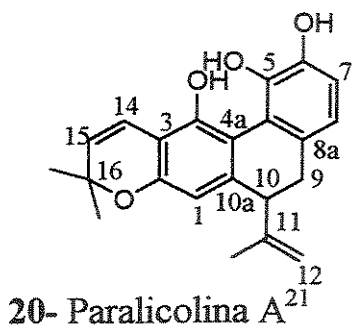
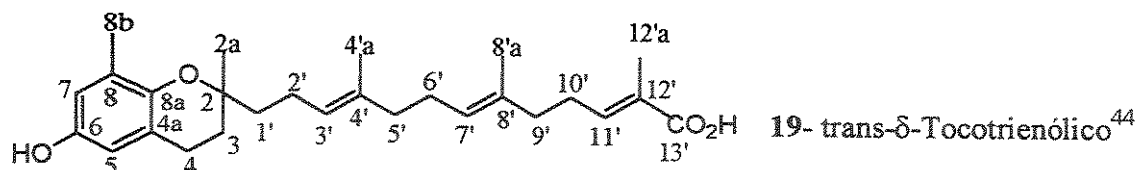
³⁸ Nagem, T.J.; Silva, M.C., Antonio, A.L., Silva, R. 1993, *Fitoterapia*, 64: (1), 87.

³⁹ Mathur, S.B. 1972, *Phytochemistry*, 11: (1513-1514).

⁴⁰ Gonzalez, J.G.; Cuellar, V. Betancourt, A. e Pinzon, M.I. 1983, *Phytochemistry*, 22: (9), 2088-2090.

⁴¹ ^{b)} Dreyer, D.L. 1974, *Phytochemistry*, 13, 2883-2884.

**10- Clusianona**^{42,43,7a-c}**11- Vismiafenona B**³⁵**12- Isovismiafenona**³⁵**13- Clusiafennona A**^{35,43}**14- Machuona**⁴³**15- Clusiafenona B**⁴³**16- Clusiafenona C**³⁵**17- Clusiafenona D**³⁵**18-R=H Ácido cis-δ-tocotrienólico**⁴⁴ **18A -R=CH₃ Ácido cis-δ-tocotrienolato de metila**⁴⁴⁴² McCandlish, B.L.; Hanson, J.C. e Stout, G. 1976, *Acta Cryst.* B32, 1793-1800.⁴³ Delle Monache, F.; Delle Monache, G. E Gács-Baitz, E. 1991, *Phytochemistry*, 30: (2), 2003-2005.



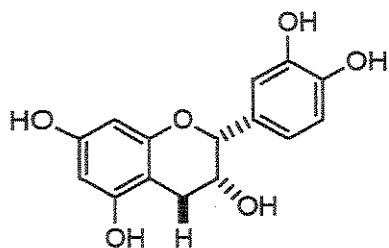
⁴⁴ Delle Monache, F.; Marta, M.; Mac-Quhae, M.M., Nicoletti, M. 1984, *Gazzetta Chimica Italiana*, 114, 135-137.

⁴⁵ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Pinheiro, R.M. e Radics, L. 1988, *Phytochemistry*, 28: (7), 2305-2308.

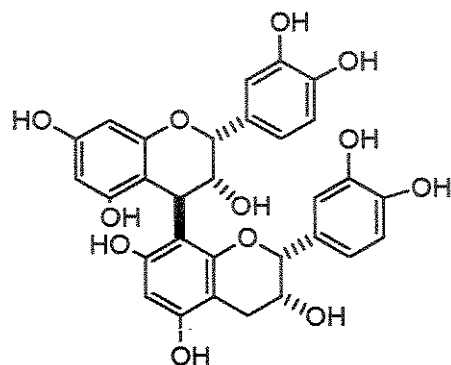
⁴⁶ Barberán, F.A.T., Viguera, C.G., Olivier, P.V., Ferreres, F., Lorente, F.T. 1993, *Phytochemistry*, 34: (1), 191-196

⁴⁷ Gonzales, J.G., Olivares, E.M., Delle Monache, F. 1995, *Phytochemistry*, 38: (2), 485-489.

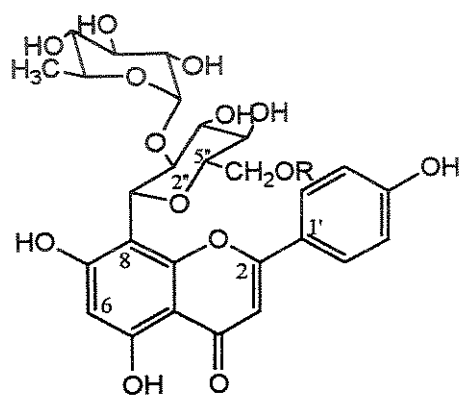
⁴⁸ Delle Monache, F.; Delle Monache, G. e Gács-Baitz, E. 1991, *Phytochemistry*, 30: (2), 703-705.



28-(-)Epi-Catequina⁵¹

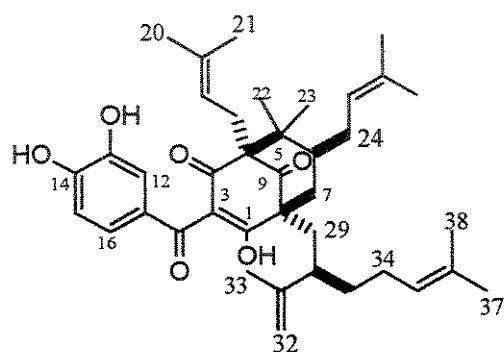


29- Procianidina B2⁵¹

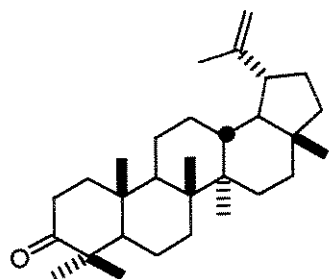


30 R= H, 6"-O-Acetil-2"-O-Rhamnosil-Vitexin⁵¹

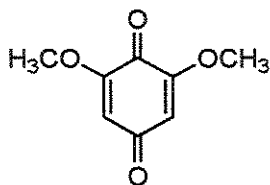
31 R=COCH₃, 2"-O-Rhamnosil-Vitexin⁵¹



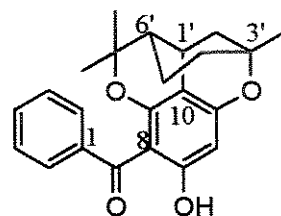
32-Gutiferona E⁹



33- Lupeonona³⁶



34- 2,6-Dimetoxi-p-benzoquinona³⁸

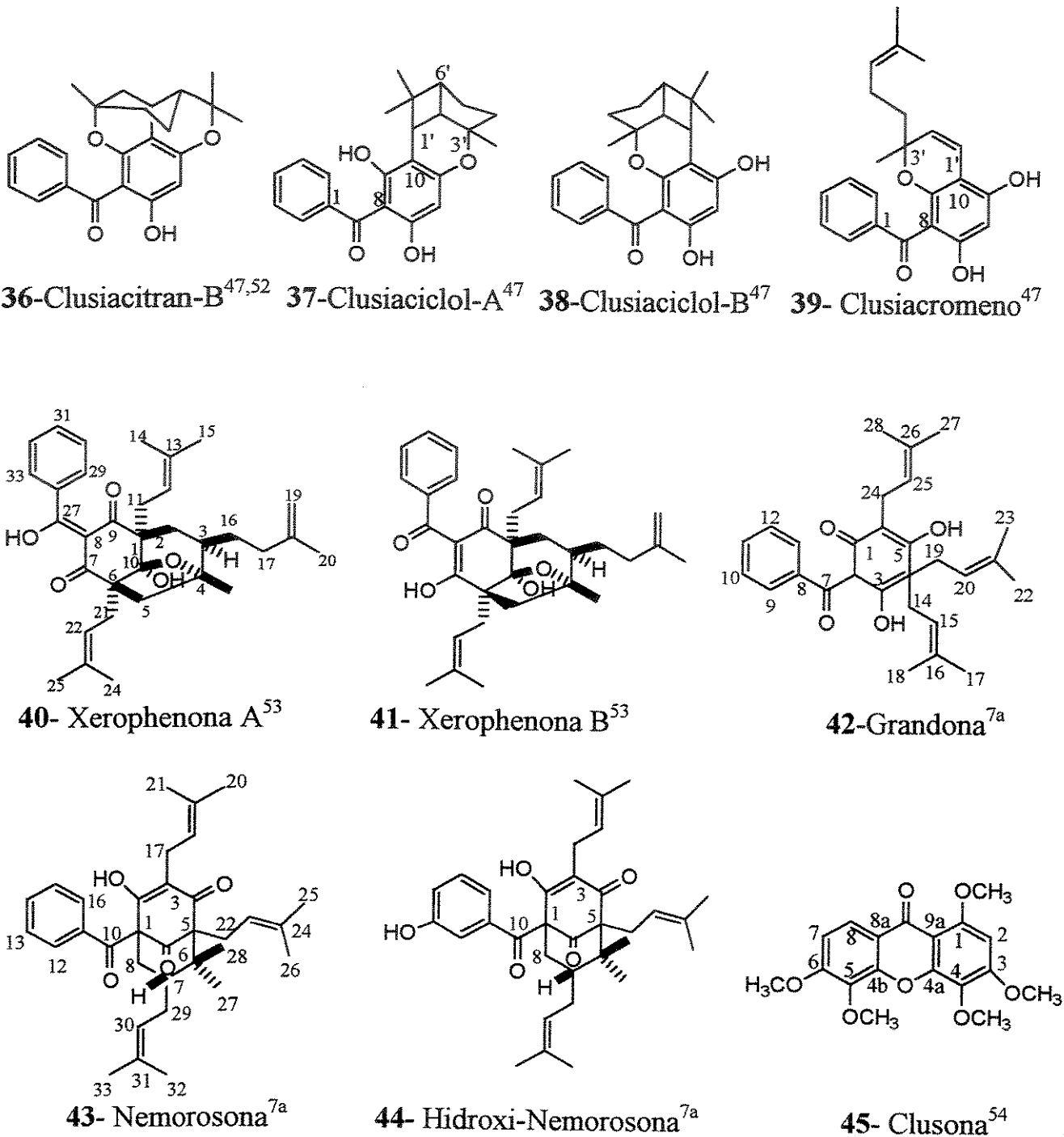


35- Clusiaditran A⁴⁷

⁴⁹ Delle Monache, F. 1990, *Bull. Chem. Soc. Ethiopia*, 4: (1), 67-69.

⁵⁰ Bax, A. 1983. *J. Magn. Reson.* 53, 517.

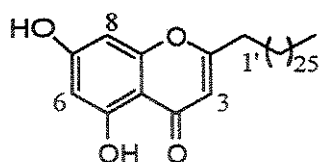
⁵¹ Delle Monache, F. Rev. 1991, *Latinoamer. Quím.*, 22: (1), 27-29.



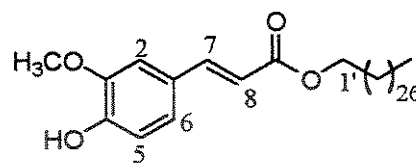
⁵² González, J.G., Martínez, E.O. 1994. Rev. Col. Quim., 23: (2), 37-41.

⁵³ Henry, G.E. e Jacobs, H. 1995, *Tetrahedron Letters*,. 36: (26), 4575-4578.

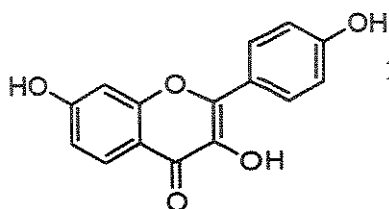
⁵⁴ Ishiguro, K.; Chaudhuri, S.K. e Kubo, I. 1998, *Phytochemistry*, 49: (8), 2531-2532.



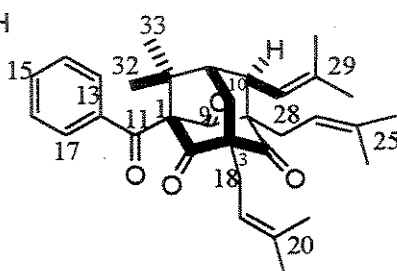
46- 5,7-diidoxi-2-(n-heptacosanil)cromona³⁷



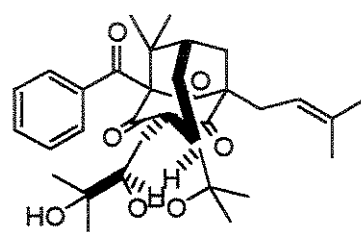
47-Ferulato de Octaxosanila³⁷



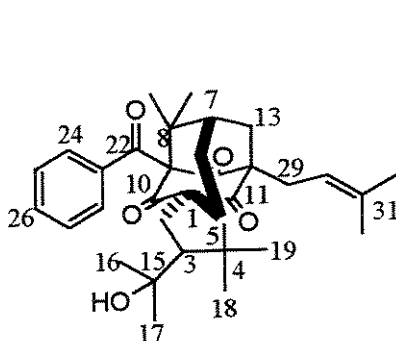
48- Kaepferol³⁷



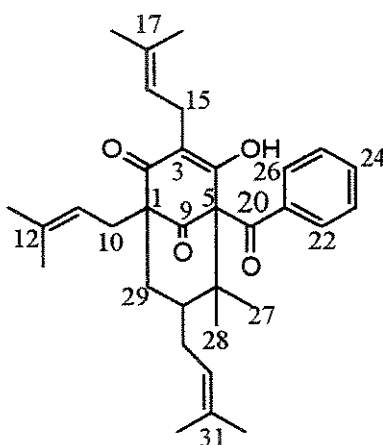
49- Plukenetiona A^{55,56}



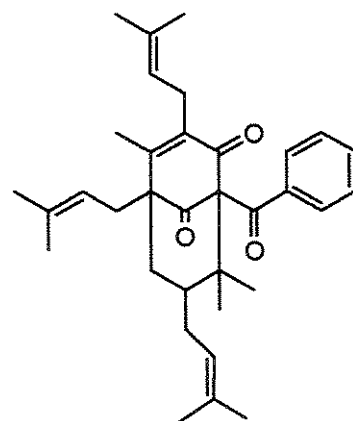
50- Plukenetiona B^{55,56}



51- Plukenetiona C^{55,56}



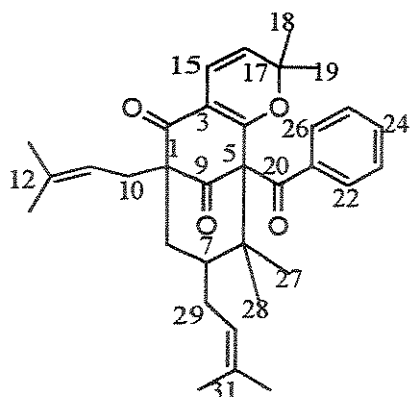
52- Plukentiona D^{55,56}



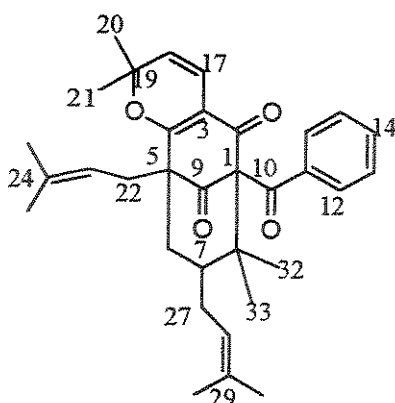
53- Plukentiona E^{5,56}

⁵⁵ Henry, G.E. e Jacobs, H.; Carrington, C.M.S.; Mclean, S. e Reynolds, W.F. 1996, *Tetrahedron letters*, 37: (48), 8663-8666.

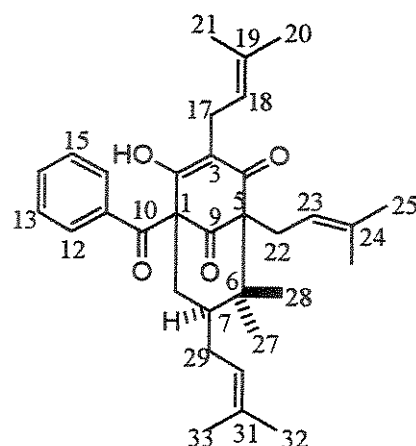
⁵⁶ Henry, G.E.; Jacobs, H.; Carrington, C.M.S.; Mclean, S. e Reynolds, W.F. 1999, *Tetrahedron*, 1581-1596.



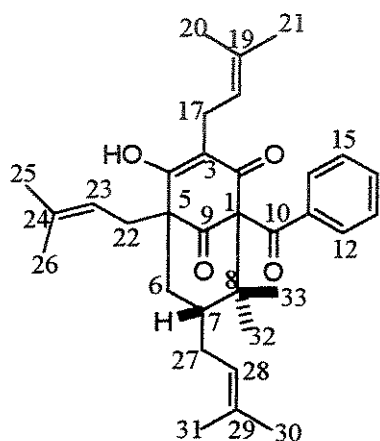
54- Plukentiona F^{55,56}



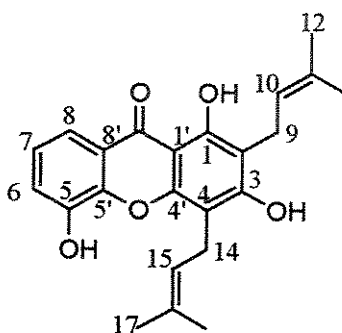
55-Plukentiona G^{55,56}



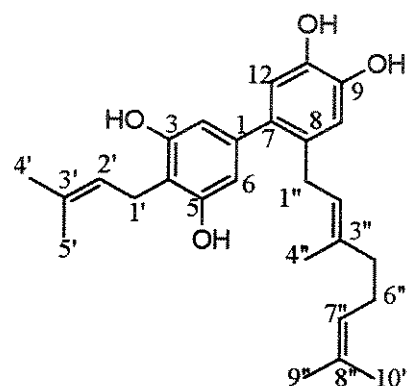
56-7-epi-Nemorosona^{55,56}



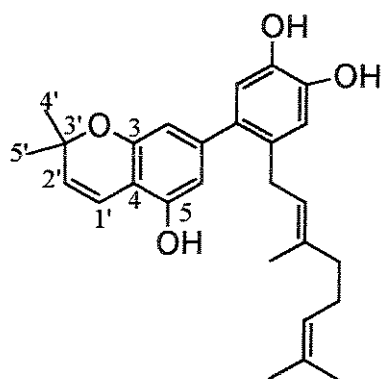
57- Nemorosona II^{55,56}



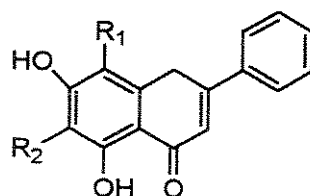
58- Xantona^{7a}



59- Clusiaparalicolina A²²



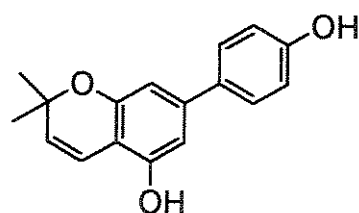
60- Clusiaparalicolina B²²



61- Clusiaparalicolina C²²

62- R₁ = Glc., R₂ = H

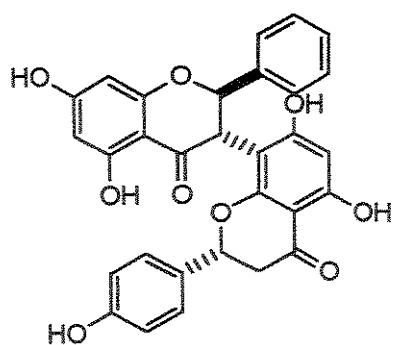
63- R₁ = H, R₂ = Glc.



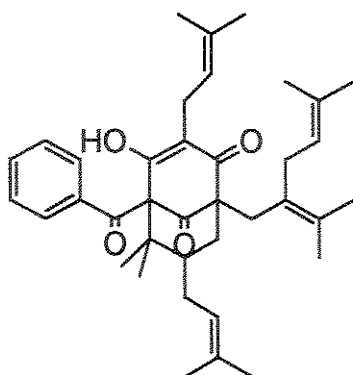
62- Vitexin⁵⁷

63- Isovetexin⁵⁷

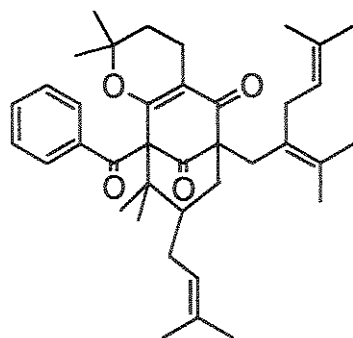
⁵⁷Chedier, L.M.; Paiva, S.R.; Costa, Figueiredo, M.R.; Kaplan, M.M.C. J. Hight Resol. Chromatogr. 1999. 22: (9), 527-530.



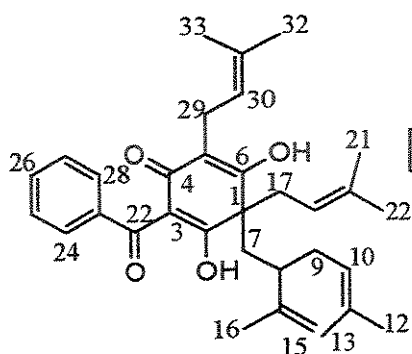
64- 13, Π8-Binaringenina²⁵



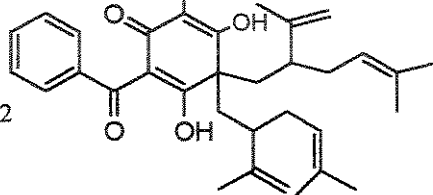
65- Chamona I²⁴



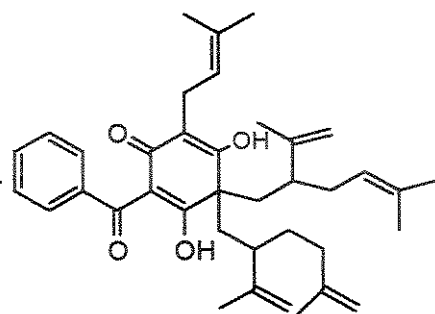
66- Chamona II²⁴



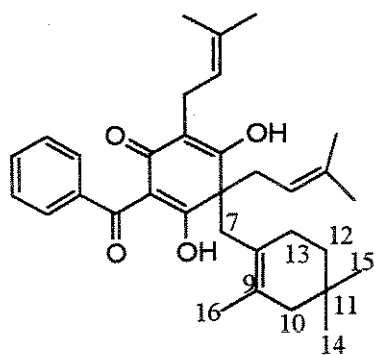
67- Weddellianona A^{7c}



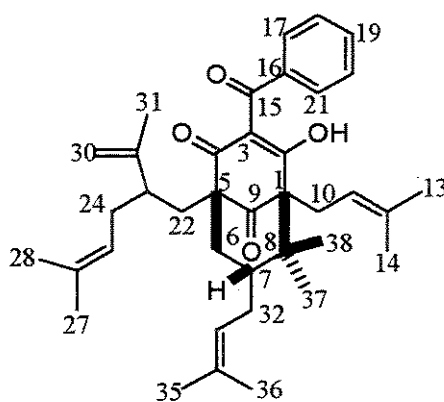
68- Weddellianona B^{7c}



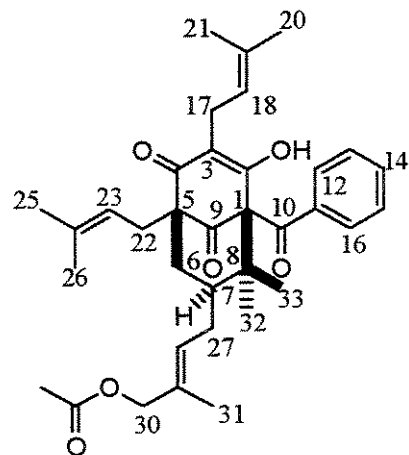
69- Lanceolatona^{7c}



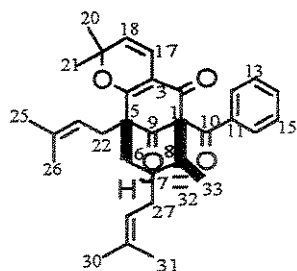
70- Hilarianona^{7c}



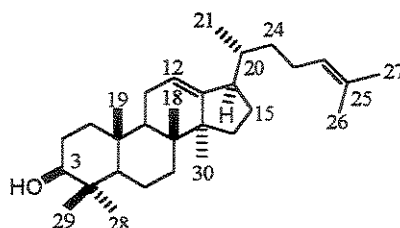
71- Spiritona^{7c}



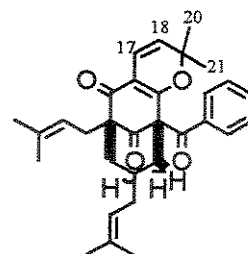
72- Insignona^{7c}



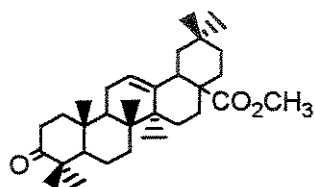
73- Scrobiculatona A^{7c}



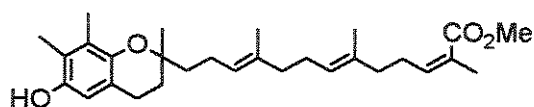
77- Damara-12,24-dien-3β-ol⁵⁸



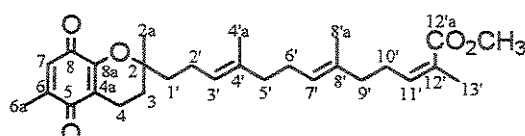
74- Scrobiculatona B^{7c}



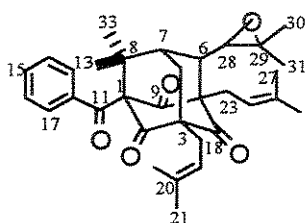
78-Olean-12-en-3-oxo-28-ato de metila



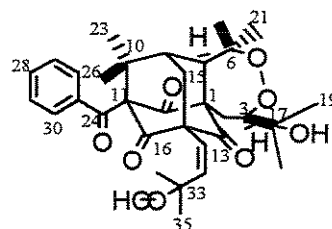
79- cis-γ-tocotrienolato de metila



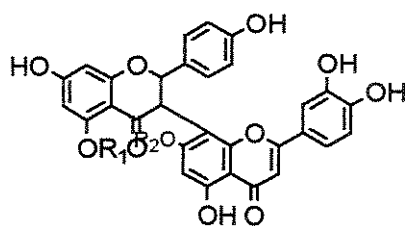
80- 5,8-dioxo-cis-γ-tocotrienolato de metila



81-28,29-epoxiplukenetione A^{59a}



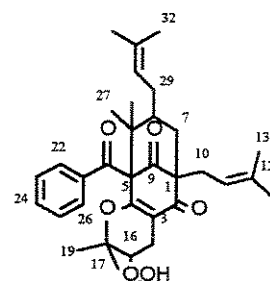
82-33-epoxiperoxisoplukenetione C^{59a}



75 = R₁=R₂=H 76 = R₁= OH, R₂= Dglc.

75- Fukugetin⁵⁹

76- Fukugisida⁴⁷



83-15,16-hidroxiperoxisoplukenetiona F^{59a}

⁵⁸Toshihiro, A.; Martinez, O.L.; Yumiko, K.; Motohiko U. Delle Monache, F. 1999. *Nihon Yukagakkaisi*, 48: (11), 1303-1306.

⁵⁹ Martinez, O.L.; Bárbara, M.M.; Delle Monache, F. 1996. *Rev. Colomb. Quim.*, 25: (1-2), 15-21.

^{59a} Christian, O.E., Henry, G.E., Jacobs, H., McLean, S. e Reynolds, W.F. 2001. *J. Nat. Prod.* 64, 23-25.

CAPÍTULO II

PARTE I - ESTUDO QUÍMICO E TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM LÁTEX DE *CLUSIA*1-BIOAUTOGRAFIA COM LÁTEX DE *CLUSIA* - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O látex encontra-se disseminado por toda a planta, e a hipótese de que ele exerce a função de proteção, contra ataques de microorganismos e herbívoros, foi investigado com 14 clúsias. Sendo assim, as principais incógnitas da primeira parte deste trabalho são: 1) Seria o látex de *Clusia* responsável pela proteção das espécies contra predadores? O quê torna os híbridos mais vulneráveis aos predadores do que as respectivas espécies parentais? 2) Quais os constituintes químicos do látex? Existe diferença entre a composição química do látex dos híbridos e dos respectivos parentais? 3) Qual a relação entre o látex, na sobrevivência e evolução das espécies?

1.1-QUANTIDADE DE LÁTEX NOS RAMOS E FRUTOS

Os extratos metanólico do látex, triterpenos e polissacarídeos (PS) das clúsias estudadas foram extraídos de acordo com o procedimento descrito no esquema 7, página 137, parte experimental. A coloração do látex variou de espécie para espécie, predominando entre o bege e o amarelado esverdeado. As Tabelas 4 e 5 (páginas 31 e 32) mostram a quantificação do extrato metanólico do látex, PS e triterpenos.

TABELA 4 Quantidade de extrato metanólico do látex I, polissacarídeo II e triterpenos III.

ESPÉCIES	DATA COLETA	COLORAÇÃO	I* (mg)	II* (mg)	III** (mg)
<i>C. nemorosa</i>	09/98	Bege	0,24	0,15	26,3
<i>C. paralicola</i>		Verde/amarelo	0,41	0,32	34,2
<i>C. lanceolata</i>		Bege	0,31	0,24	48,6
<i>C. paralicola x C. nemorosa</i>		Bege	0,51	0,40	62,3
<i>C. lanceolata x C. nemorosa</i>		Bege	0,10	0,10	54,1

*quantidades de extrato metanólico do látex e de polissacarídeo por grama de ramo. **quantidade de triterpeno por grama de extrato metanólico do látex

Apesar dos híbridos e dos respectivos parentais não possuírem a mesma idade, teve-se o cuidado de escolher, principalmente relacionados aos parentais, ramos mais jovens, por conterem mais látex. Há relatos na literatura de que híbridos possuem menor quantidade de látex do que os parentais e uma variedade vegetal com um sistema produtor reduzido de látex é mais susceptível ao ataque de predadores⁸. De acordo com os dados da Tabela 4 (pág. 31), mesmo os híbridos tendo os ramos mais jovens do que os parentais, observou-se para o híbrido de *C. lanceolata* x *C. nemorosa* uma menor quantidade de extrato metanólico e de PS do que nos seus respectivos parentais. Estes resultados poderiam reforçar a hipótese de que os híbridos que apresentam baixa sobrevivência são constituídos por uma menor quantidade de látex.

TABELA 5 Peso médio dos frutos (III), Quantidade de extrato metanólico do látex (IV), polissacarídeo (V) e mistura de triterpeno (VI).

SEÇÃO	ESPÉCIE	DATA COLETA	COLORAÇÃO	III (g)	IV* (mg)	V* (mg)	VI** (mg)
Chlamydoclusia	<i>C. nemorosa</i>	04/98	Bege	17,9	6,6	2,1	40,3
	<i>C. rosea</i>		Verde/amarelo	82,4	8,6	2,8	55,8
	<i>C. grandiflora</i>		Branca	91,9	1,0	0,2	33,3
Criuva	<i>C. parviflora</i>	09/97	Verde/amarelo	1,9	29,7	10,0	70,2
	<i>C. criuva</i>		Bege	2,2	21,4	8,91	87,1
Phloyanthera	<i>C. hilariana</i>	02/98	Branca	31,2	5,0	1,6	38,0
	<i>C. lanceolata</i>		Bege	4,4	4,5	1,5	115,4
Cordylandra	<i>C. paralicola</i>	09/97	Verde/amarelo	5,9	9,3	3,6	56,3
	<i>C. weddeliana</i>		Verde/amarelo	8,5	3,6	1,0	105,1
	<i>C. fluminensis</i>		Branca	7,2	6,9	3,7	114,5
	<i>C. panapanari</i>		Bege	1,3	5,1	1,6	26,9
	<i>C. spirictus-sanctensis</i>		Branca	12,6	4,5	1,5	84,4

*quantidades de extrato metanólico do látex e de polissacarídeo por grama de ramo.

**quantidade de triterpeno por grama de extrato metanólico do látex.

1.2- TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM O LÁTEX DOS FRUTOS E RAMOS DE *CLUSIA*

1.2.1- RESULTADO DA BIOAUTOGRAFIA COM O LÁTEX DOS FRUTOS

Os resultados dos ensaios bioautográficos foram avaliados qualitativamente, observando a existência ou não de halos de inibição. Na leitura dos resultados as placas foram pulverizadas com uma solução de MTT (cloreto de metil-tiazol-tetrazolium – 1mg/mL), com a finalidade de tornar mais visível o halo de inibição formado. Este reagente em contato com células vivas do microorganismo é reduzido, adquirindo uma coloração lilás⁶⁰, deixando uma cor rosa clara nos pontos em que o crescimento do microorganismo foi inibido (Figura 6 A-C, pág. 36). Com o intuito de se ter uma idéia da localização destes halos de inibição, Após eluição com DCM, dos extratos brutos do látex, aplicados nas cromatoplasas, a leitura foi realizada levando em consideração o " R_f " em 3 faixas principais, que foram denominadas de faixa apolar, com um intervalo de R_f entre 0,90 e 0,55; faixa intermediária, entre 0,50 e 0,45 e faixa polar com $R_f < 0,40$. Na Tabela 6, pode-se constatar que os látex provenientes dos frutos de *C. criuva* ; *C. spiritu-sanctensis* revelaram baixa atividade e o proveniente dos frutos de *C. nemorosa*, revelou-se mais ativo perante um número maior de microorganismos. Observou-se ainda, que a faixa polar foi a que mais apresentou atividade. Dos 12 látex testados, apenas os provenientes de *C. rosea* e *C. nemorosa* e *C. panapanari* mostraram-se ativos contra *Fusarium oxysporum*. Já *C. weddeliana* e *C. nemorosa* foram ativos contra o fungo *Alternaria alternata*, o qual além de ser saprófita é fitopatogênico. Estes resultados revelam o elevado potencial bactericida para o látex dos frutos de *Clusia*.

Comparação destes resultados com os obtidos, em nosso grupo⁷ e somados aos de Lokvam & Bradoch²⁴, com as resinas florais de *Clusia*, revela para estas duas fontes de metabólitos (látex e resina floral) uma ação bactericida.

⁶⁰ Altman, F.P., 1976. Tetrazolium salts and formazans. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York.

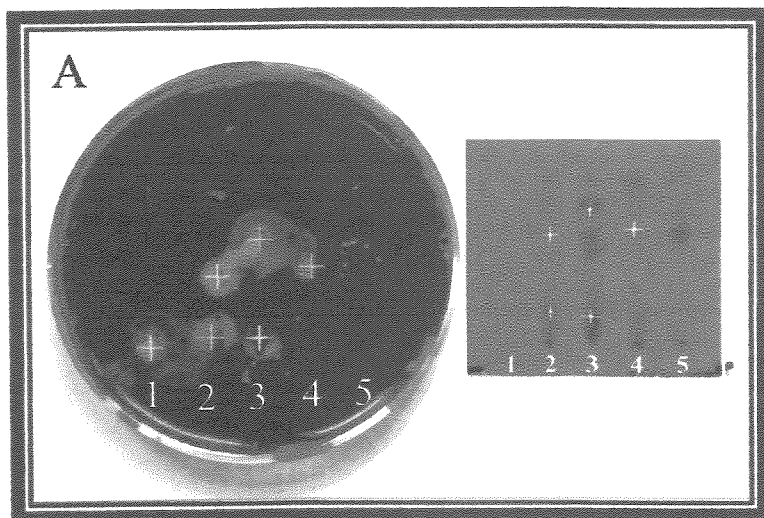


Figura A Teste Bioautográfico com extrato do látex dos frutos (100 μ g) contra *Staphylococcus aureus* CCT 4295 (suspensão de células 10^6).

Figura B Teste Bioautográfico com extrato do látex dos frutos (100 μ g) contra *Bacillus subtilis* CCT 0089 (suspensão de células 10^6).

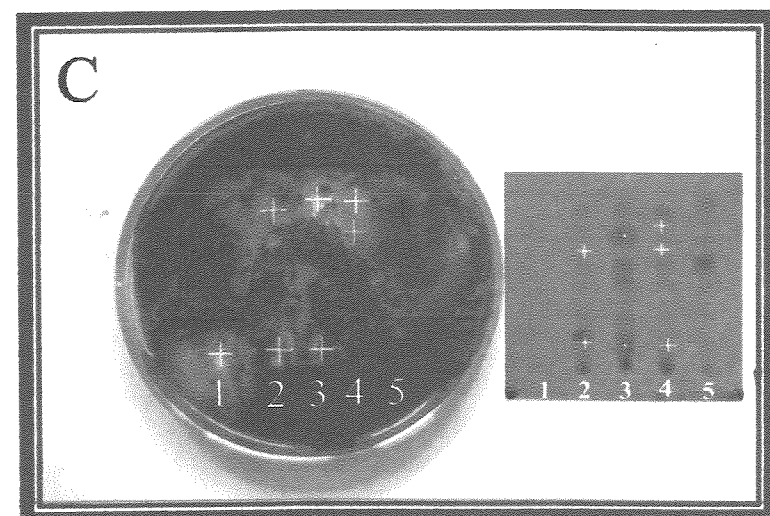
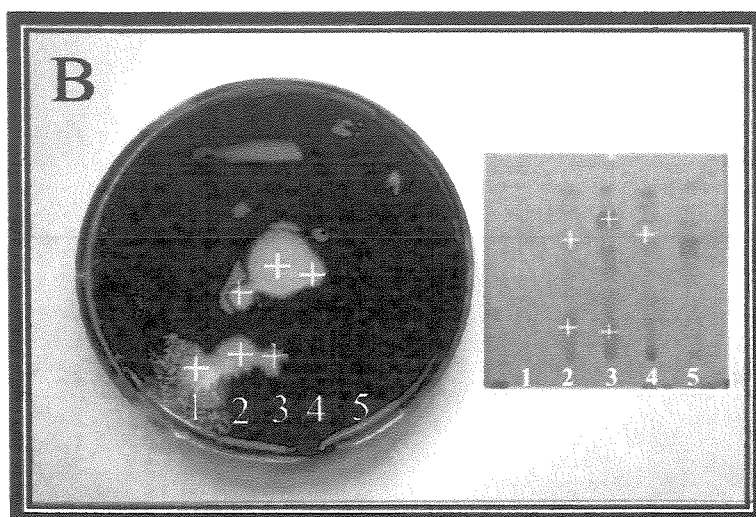


Figura C Teste Bioautográfico com extrato do látex dos frutos (100 μ g) contra *Micrococcus luteus* CCT 2720 (suspensão de células 10^6)

Figura 5 (A-C) Teste Bioautográfico com extratos do látex dos frutos. 1-cloranfenicol, 2- *C. nemorosa*, 3- *C. rosea*, 4- *C. hilariana* e 5- extrato clorofórmico da cera epicuticular de *C. lanceolata*.

TABELA 6 Resultados da bioautografia com os látex dos frutos de *Clusia*

MICROORGANISMOS		ESPÉCIES DE CLUSIA *											
GRAM	ROSEA R _f	NEMO R _f	GRAN R _f	PARV R _f	CRUIV R _f	HILA R _f	LANCE R _f	FLUM R _f	PARA R _f	WEDD R _f	PANA R _f	SPIRI R _f	
<i>E. coli</i>	-	<0,4	-	-	-	-	<0,4	-	-	-	-	-	
<i>B. subtilis</i>	+	<0,4 e 0,9-0,6	<0,4	-	-	0,9-0,6	-	-	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	
<i>R. equi</i>	+	<0,4	<0,4	<0,4	-	0,9-0,6	<0,4	-	-	-	<0,4	-	
<i>S. typhimurium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. luteus</i>	+	<0,4 e 0,9-0,6	<0,4	0,9-0,6	<0,4	0,9-0,6	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	-	
<i>S. aureus</i>	+	<0,4 e 0,9-0,6	-	-	-	0,9-0,6	-	-	<0,4	-	<0,4	-	
<i>A. ninger</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. fumigatus</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>F. oxysporum</i>		0,9-0,6	<0,4	-	-	-	-	-	-	-	<0,4	-	
<i>R. oryzae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. alternata</i>		-	<0,4	-	-	-	-	-	-	<0,4	-	-	
<i>C. albicans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. cladosporioides</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ROSEA = *C. rosea*; NEMO = *C. nemorosa*; GRAN = *C. grandiflora*; PARV = *C. Parviflora*; CRUIV = *C. Criuva*; HILA = *C. hilariana*; LANCE = *C. Lanceolata*; FLUM = *C. fluminensis*; PARA = *C. paralicola*; WEDD = *C. weddelliana*; PAN = *C. panapanari*; SPIRI = *C. spirictus-sanctensis*. R_f = Fator de Retenção < 0,4 é a fração polar, R_f entre 0,5-0,45 é a fração intermediária e R_f entre 0,9-0,55 é a fração apolar.

1.2.2- TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM O LÁTEX DOS RAMOS.

Observação de campo tem revelado que os híbridos comparados como seus parentais, são mais atacados por microorganismos (Figura 6 A e B) e raramente por herbívoros (Figura 6 C) e formigas cortadoras do gênero *Azteca*⁶¹. Estes fatos, nos motivaram a investigar o potencial biológico do látex de híbridos e comparar os resultados com os dos parentais. Como os híbridos não possuem frutos, o látex foi extraído dos ramos. O critério de seleção dos híbridos para realização dos testes bioautográficos, foi baseado nos resultados da bioautografia com látex dos frutos. A combinação entre a espécie que se revelou ativa contra um número maior de microorganismo, ou seja, *C. nemorosa*, com outra pertencente a uma seção taxonômica diferente. O teste bioautográfico foi realizado criteriosamente da mesma forma dos submetidos com os látex dos frutos, com os mesmos microorganismos. Desta forma, O látex de *C. paralicola* x *C. nemorosa* e *C. lanceolata* x *C. nemorosa* e dos respectivos parentais foram submetidos ao teste bioautográfico, cujos resultados encontram-se na Tabela 7 (pág. 37).



Figura 6 Híbridos atacados por fungos (A e B) e Herbívoros (C)

⁶¹ Onildo, J., Filho, M. 1999. Tropical Zoology, 12, 289-296.

TABELA 7 Resultados do teste bioautográfico com látex dos ramos de *Clusia*

MICROORGANISMO			ESPÉCIES DE CLUSIA				
			Pa X Ne R _f	La X Ne R _f	NEMOR R _f	PARAR R _f	LANCER R _f
Bactérias	<i>E. coli</i>	–	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	+	-	-	< 0,4	< 0,4	-
	<i>R. equi</i>	+	-	-	< 0,4	< 0,4	-
	<i>S. typhimurium</i>	+	-	-	-	< 0,4	-
	<i>M. luteus</i>	+	< 0,4	-	< 0,4	< 0,4	-
	<i>S. aureus</i>	+	< 0,4	-	-	< 0,4	-
Fungos	<i>A. niger</i>		-	-	-	-	-
	<i>A. fumigatus</i>		-	-	-	-	-
	<i>F. oxysporum</i>		-	-	-	-	-
	<i>R. oryzae</i>		-	-	-	-	-
	<i>A. alternata</i>		-	-	-	-	-
	<i>C. albicans</i>		-	-	-	-	-
	<i>C. cladosporioides</i>		-	-	-	-	-

PaxNe = *C. paralicola* x *C. nemorosa*; LaxNe = *C. lanceolata* x *C. nemorosa*; NEMOR = *C. nemorosa*; PARAR = *C. paralicola* e LANCER = *C. lanceolata*

Comparação dos resultados bioautográficos entre o látex dos híbridos e parentais, provenientes tanto dos ramos quanto dos frutos, sugere que os látex dos híbridos possuam baixa ação bactericida, observado apenas para látex de *C. paralicola* x *C. nemorosa*, que foi ativo contra *S. aureus*, curiosamente não observado para o parental *C. nemorosa*. Estes resultados, podem até explicar a vulnerabilidade dos híbridos, à ação de microorganismos, principalmente por bactérias, mas não contra insetos ou herbívoros. Entretanto, apesar dos testes bioautográficos com látex dos frutos indicam que o mesmo é pouco ativo contra fungos, foi observado, para o látex de *C. nemorosa*, uma atividade contra os fungos *A. alternata* e *F. oxysporum*, atividade esta, não observada para o látex dos ramos proveniente da mesma espécie, ou de qualquer uma outra que foi testada.

1.2.3-TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO POLAR DO LÁTEX DE *C. grandiflora*.

Com a finalidade de identificar as substâncias, possivelmente responsáveis pela ação bactericida detectadas no látex de *Clusia*, foram realizados com

compostos isolados (capítulo III, pág. 87) da fração polar do látex, os testes bioautográficos. Foram usados nestes testes os compostos: ácido *cis*- δ -tocotrienólico (**18**), *cis*- δ -tocotrienolato de metila (**18A**), *cis*- γ -tocotrienolato de metila (**79**) e ácido olean-12-en-3-oxo-28-óico (**78**). Os testes foram realizados contra os microorganismos *Bacillus subtilis* CCT 0089, *Staphylococcus aureus* CCT 4295, *Rhodococcus equi* CCT 0541 e *Micrococcus luteus* CCT 2720, cujos resultados são mostrados na Tabela 8 e Figura 7.

Tabela 8 Comparação dos halos de inibição obtidos entre o bactericida padrão e os compostos testados.

Microorganismo	Halos de inibição						
	Cloranfenicol 40µg	Composto 18		Comp. 18A	Comp. 79	Composto 78	
<i>B. subtilis</i>	30 mm	6,3 µg	5 mm	-	-	-	
		12,5 µg	7 mm				
		25 µg	9 mm				
		37 µg	9,5 mm				
<i>S. aureus</i>	25 mm	25 µg	3,5 mm	-	-	-	
<i>R. equi</i>	25 mm	37 µg	3,5 mm	-	-	20 µg	3,5 mm
						40 µg	4 mm
<i>M. luteus</i>	25 mm	-		-	-	-	

De acordo com os resultados descritos na Tabela 8, nenhum dos compostos testados mostrou-se ativo contra *M. luteus*. Os melhores resultados foram obtidos com os ácidos *cis*- δ -tocotrienólico (**18**) e olean-12-en-3-oxo-28-óico (**78**). Entretanto, comparação dos resultados obtidos para os compostos isolados com padrão bactericida, o melhor resultado foi observado para o composto **18** (25 e 37 μ g) contra *B. subtilis*, apesar do padrão ter sido três vezes mais ativo do que o composto (**18**) e cerca de sete vezes comparado com o composto **78** (20 e 40 μ g). Como também, foi usado para estes testes os compostos ácidos metilados e que na fração metanólica eles eram ácidos, é provável que a atividade pode ter sido alterada.

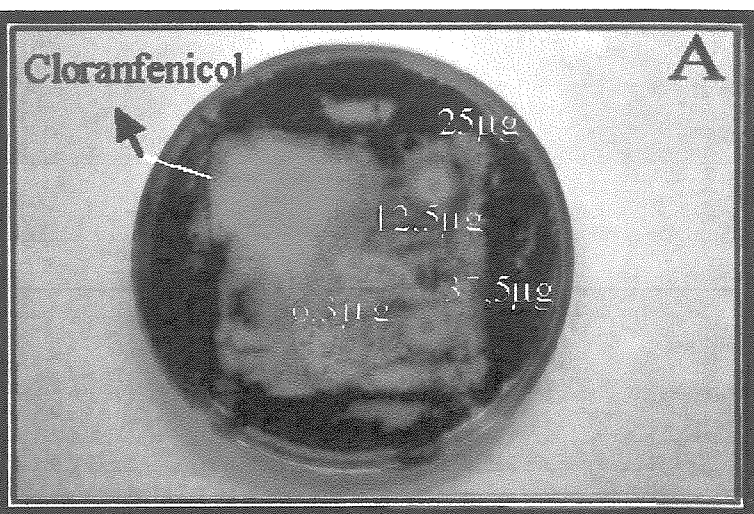


Figura 7 A Teste bioautográfico com diferentes quantidades de ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18) contra *Bacillus subtilis* CCT 0089.

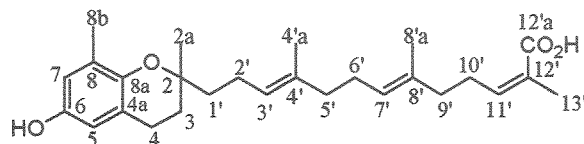


Figura 7 B Teste bioautográfico com diferentes quantidades de ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18) contra *Staphylococcus aureus* CCT 4295

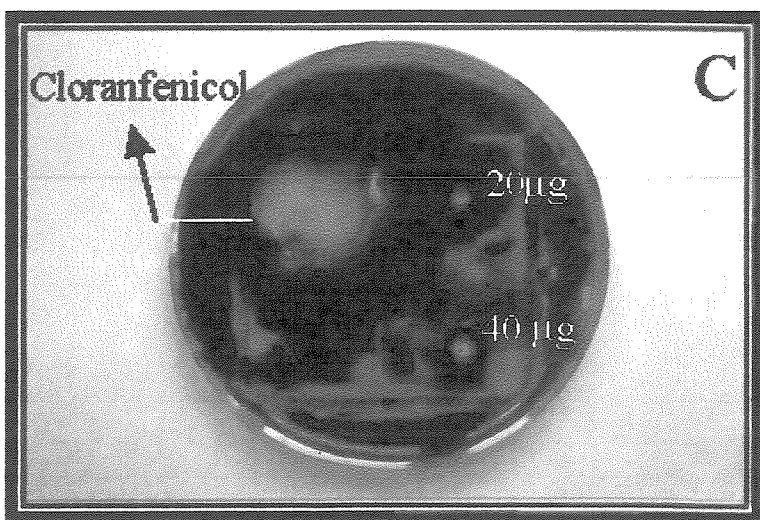
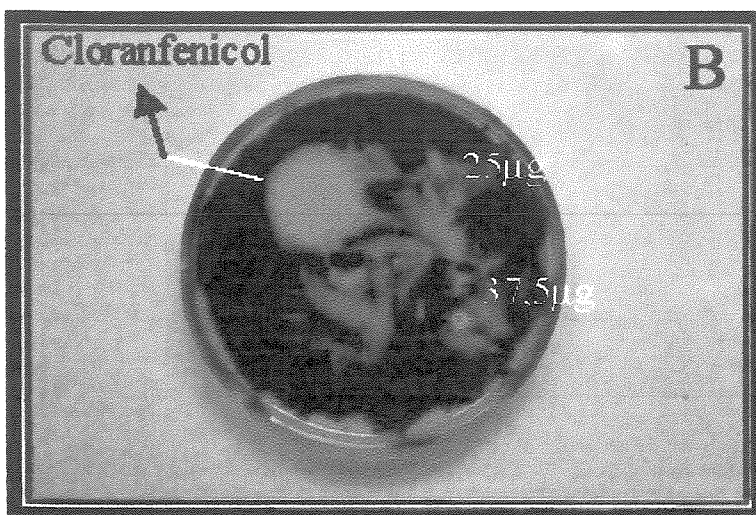
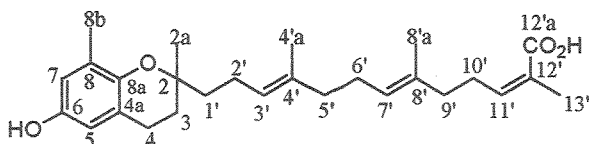
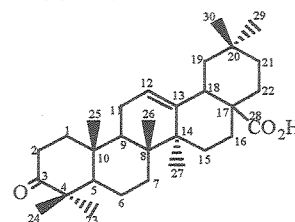


Figura 7 C Teste bioautográfico com diferentes quantidades de ácido olean-12-en-3-oxo-28-óico (78) contra *Rhodococcus equi* CCT 0541.



Estes resultados sugerem que os compostos 18 e 78, no látex de *C. grandiflora*, sejam os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana no látex de *Clusia*, uma vez que análise de CCD para ambos os compostos, apresentaram fatores de retenções (R_f) dentro da faixa observada para o extrato de látex bruto, onde revelou maior atividade bactericida, $R_f < 0,4$. Os resultados positivos, obtidos por Setzer e col⁶², contra as bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* para o isômero do composto (18), ácido trans δ -tocotrienólico (19), isolado a partir do fruto de *C. grandiflora* e do extrato bruto etanólico das folhas de *Tovomitopsis psychotriifolia* (Guttiferae), corrobora os resultados obtidos para os derivados ácidos do tocoferol encontrados nos látex de *Clusia*.

1.3-ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DO CAULE E FOLHAS LESIONADAS DE HÍBRIDOS DE CLUSIA.

O ataque de herbívoros em *Clusia*, fato raro (Figura 6C), nunca foi registrado em espécies híbridas ou não de *Clusia* cultivadas na fazenda de Santa Elisa (IAC). O mesmo não pode ser dito quanto ao ataque de microorganismos. Na fazenda Santa Elisa, são encontradas pouquíssimas clúsias nativas, apresentando lesões foliares e/ou no caule. Entretanto, a grande maioria de híbridos, cultivados *in natura* ou em casa de vegetação (Figuras 6A e B, pág. 36), possuem estes tipos de lesões. Os sintomas apresentados pelos híbridos como manchas foliares, em forma de círculo, com coloração marron, preta e/ou lesões no caule, aparentando necrose, sugerem uma infecção causada por microorganismos, especificamente por fungos.

Estigmatomicose* é uma doença encontrada nos trópicos, comum em cultura de importância econômica como café, algodão, tomate e frutas cítricas⁶³ que são

⁶² Setzer, W.N., Green, T.J., Lawton, R.º, Bates, R.R., Caldera, S., Moriarity, D.M., Haber, W.A. 1995. *Planta Medica*, 61: (3), 275-276.

* Dermatose, facilmente encontrada nos trópicos, que se caracteriza por partes ulceradas, principalmente nas folhas.

causadas pelos fungos leveduriforme *Nematospora coryli* e *Ashbya gossypii*. As manchas de alternaria, “chocolate spot” e “leaf spot” são doenças causadas pelos fungos *Alternaria solani*^{64,65}, *Botrytis fabae*⁶⁶ e *Cladosporium oxysporum*⁶⁷, encontradas nas regiões onde são cultivados o tomateiro a batata e leguminosas como o feijão.

Na luta pela sobrevivência, tanto o microorganismo quanto a planta atacada utilizam substâncias químicas e são várias as estratégias de defesa e de ataque empregadas pela planta e pelo patógeno, cujo sucesso ou fracasso das espécies envolvidas dependem destas duas estratégias. A alelopatia é a parte da química que estuda esta relação e demonstra que patógenos vegetais são capazes de produzir substâncias, *in situ* e *in vivo*, que causam sintomas semelhantes àqueles encontrados em diversas culturas. No entanto, não se pode concluir, que todo fitopatógeno, cause doenças através da liberação de toxinas e nem sempre estas substâncias estão limitadas a agirem como tal, é o caso de derivados pentanorlanostano e bicicloalternarenos isolados de *Cladosporium sp.* e *Alternaria alternata*, os quais apresentaram propriedades antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*⁶⁸ e de inibir o crescimento de folhas de uma planta aquática (*Spirodela polyrhiza*)⁶⁹, respectivamente. Em outras palavras, a alelopatia abrange todos os tipos de interações químicas entre plantas e microorganismo, podendo afetar o crescimento, e vários aspectos funcionais da espécie receptora.

Com a finalidade de investigar a maior suscetibilidade dos híbridos às lesões foliares e no caule do que os respectivos parentais e se estas lesões são realmente

⁶³ Phaff, H.J. Stariner, W. T. 1987. “Yeasts Associated With Plants, insects and Soil” Vol. 1. Ed. London, Academic press. Pag. 123-180.

⁶⁴ Nishimura, S. & Kohmoto, K. 1983. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21:, 87-116.

⁶⁵ Lawrence, C.B.; Singh, N.P.; Qiu, J.S.; Gardener, R.G.; Tuzun, S. 2000. *Physiological and Molecular plant Pathology*, 57: (5), 211-220.

⁶⁶ Jackson, A.J.; Walters, D.R.; Marshall, G. 1997. *Biological Control*, 8: (2), 97-106.

⁶⁷ Lamboy, J.S.; Dillard, H.R. 1997. *Plant Disease*, 81: (2), 228-228.

⁶⁸ Hosoe, T.; Okada, H.; Itabashi, T.; Nozawa, K.; Okada, K. Takaki, G.M.D.; Fukushima, K.; Miyaji, M.; Kawai, K. 2000. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48 (10), 1422-1426.

⁶⁹ Liebermann, B.; Nussbaum, R.P.; Gunther, W. 2000. *Phytochemistry*, 55: (8), 987-992.

Testes bioautográficos com o látex dos frutos e dos ramos contras os fungos isolados foram negativos. O fato de serem saprófitos e o teste de patogenicidade ter sido negativo, é provável que as lesões no caule e folhas nas clúsias tenham sido promovidas por bactérias e que após necrose do tecido vegetal, houve a proliferação dos fungos. Desta forma, a realização da técnica modificada de disco de difusão em ágar torna-se pertinente para avaliar o potencial antibiótico dos fungos isolados. Este método é bastante empregado para medir a sensibilidade das bactérias diante dos antibióticos⁷⁰. A atividade antibiótica dos fungos foi avaliada contra os mesmos microorganismos de referência utilizados nos testes bioautográficos para o látex.

Bons e surpreendentes resultados foram obtidos, principalmente ao se ler as placas semeadas por fungos. Ao invés de se ter uma inibição dos fungos de referência (halo de inibição, Figura 8A, pág. 44), observou-se que os fungos isolados tiveram seu crescimento favorecido, resultando em halos de crescimento (Figura 8 B, pág 44 e Tabela 9, pág. 45).

⁷⁰Allen, K.; Sammers, D. J. Diagnóstico microbiológico, Texto e Atlas Colorido, 2ª ed., Editora Médica Panamericana, São Paulo.1993.

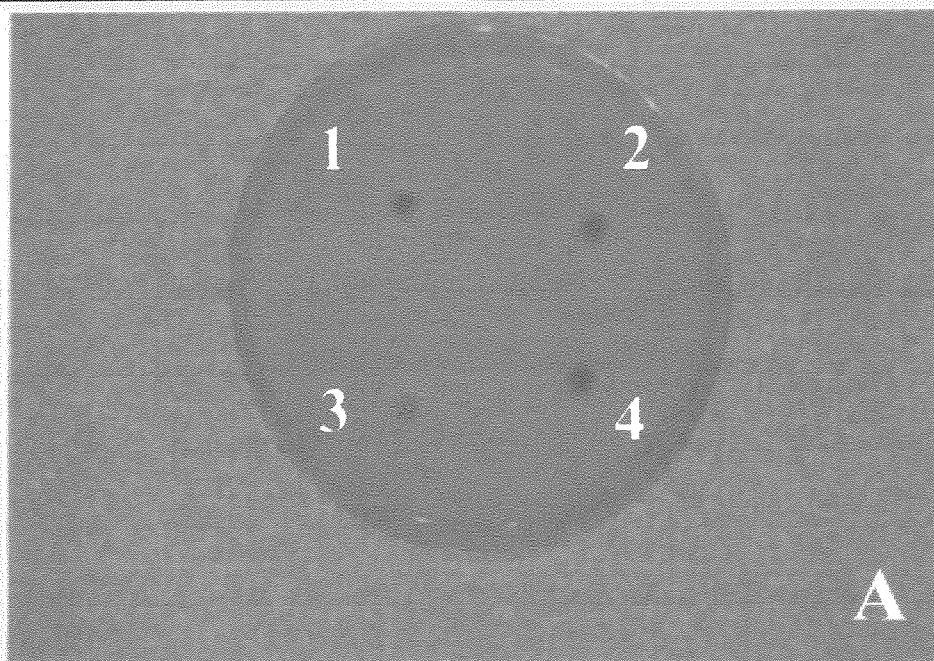


Figura 8 A) Halo de inibição dos fungos isolados (1-*Cladosporium-like*, CCT6420, 2-*Alternaria-like* - CCT6419, 3- *Alternaria-like* - CCT6419, 4- Micélio preto - CCT 6418.

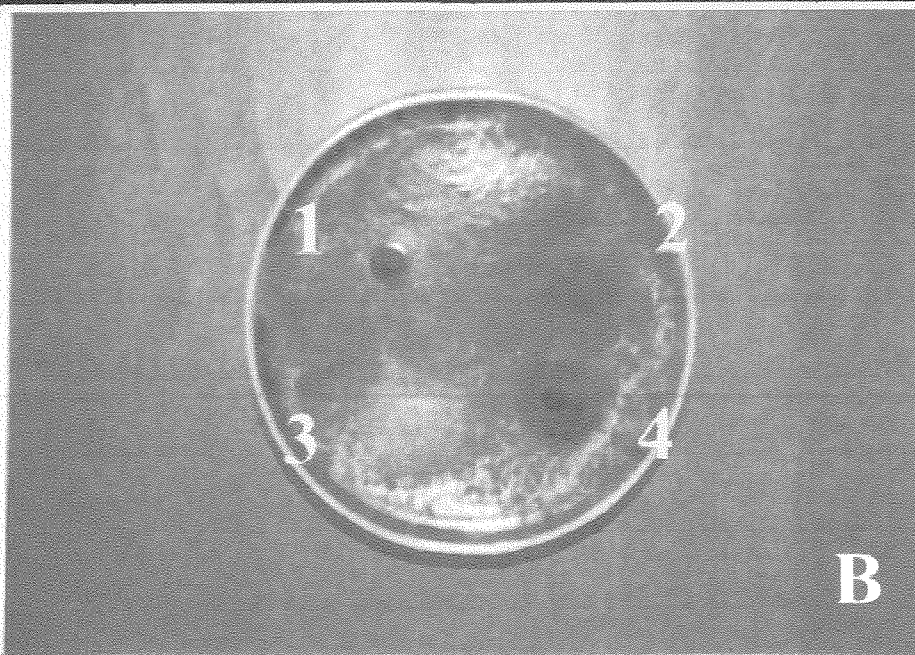


Figura 8 B) Halo de crescimento dos fungos isolados.(1-*Cladosporium-like*, CCT6420, 2-*Alternaria-like* - CCT6419, 3- *Alternaria-like* - CCT6419, 4- Micélio preto - CCT 6418.

TABELA 9 Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados contra microorganismos padrões. Detecção de halo de crescimento dos fungos isolados.

MICROORGANISMO			FUNGOS ISOLADOS			
GRAM			<i>Cladosporium</i> –like CCT 6420	<i>Alternaria</i> like CCT 6419	Micélio branco CCT 6404	Micélio preto CCT 6418
Bactérias	<i>E. coli</i>	–	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	+	-	-	-	-
	<i>R. equi</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-
	<i>M. luteus</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	+	-	-	-	-
Fungos	<i>C. albicans</i>		-	-	-	-
	<i>P. funiculosum</i>		1,0cm	2,0cm	1,5cm	-
	<i>F. oxysporum</i>		-	-	-	-
	<i>A. fumigatus</i>		-	-	-	-
	<i>R. oryzae</i>		1,0cm	3,5cm	4,0cm	2,0cm
	<i>A. alternata</i>		-	-	-	-
	<i>A. fumigatus</i>		0,5cm	-	1,5cm	-
	<i>C. cladosporioides</i>		0,9cm	2,7cm	2,0cm	1,7cm

Estes resultados sugerem que o cultivo em conjunto com outros fungos, promova o crescimento de micélio. O melhor resultado foi observado com o cultivo de Micélio branco - CCT 6404 contra *R. oryzae*, com um halo de crescimento de 4,0cm de diâmetro.

Quanto aos resultados esperados, ou seja, se algum fungo isolado inibiria o crescimento dos microorganismos testados. O fungo *Alternaria-like* - CCT6419 revelou sua atividade para os microorganismos *Salmonella typhimurium* - CCT0528, Gram (+) e *Aspergillus fumigatus*, enquanto que o *Cladosporium-like* - CCT6420 inibiu o crescimento do fungo de referência *Aternaria alternata*. Micélio preto - CCT 6418 não apresentou nenhuma atividade. Já o fungo Micélio branco - CCT 6404 foi o que apresentou o maior halo de inibição, cerca de 1,3 cm contra *Salmonella typhimurium* - CCT0528 (Tabela 10, pág. 46).

TABELA 10 Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados contra microorganismos padrões. Detecção de halos de inibição dos fungos isolados

MICROORGANISMO			FUNGOS ISOLADOS			
GRAM			<i>Cladosporiu</i> -like CCT 6420	<i>Alternaria</i> - like Cct 6419	Micélio branco CCT 6404	Micélio preto CCT 6418
Bactérias	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	+	-	-	-	-
	<i>R. equi</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-
	<i>M. luteus</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	+	-	0,7cm	1,3cm	-
Fungos	<i>C. albicans</i>		-	-	-	-
	<i>P. funiculosum</i>		-	-	-	-
	<i>F. oxysporum</i>		-	-	-	-
	<i>A. fumigatus</i>		-	-	-	-
	<i>R. oryzae</i>		-	-	-	-
	<i>A. alternata</i>		0,5cm	-	-	-
	<i>A. fumigattus</i>		-	0,7cm	-	-
	<i>C. cladosporioides</i>		-	-	-	-

1.4-CONCLUSÃO PARCIAL

As evidências obtidas através dos testes bioautográficos revelam, para os látex de *Clusia*, uma função de proteção contra microorganismos, principalmente bactérias. De acordo com as cromatoplacas analíticas, observou-se atividade para os constituintes que eluíram nas três faixas principais, sendo que aqueles que apresentaram $R_f < 0,4$ foram os mais ativos. Repetição destes testes para produtos naturais isolados a partir da faixa que apresentou maior atividade ($R_f < 0,4$) mostrou que os ácidos olean-12-en-3-oxo-28-óico e *cis*- δ -tocotrienólico são agentes biologicamente ativos.

Comparação dos testes bioautográficos realizados com os látex de híbridos e os seus respectivos parentais corrobora a hipótese de que os híbridos são realmente mais vulneráveis, por expressar sua atividade contra um menor número de microorganismos. Por outro lado, o híbrido *C. paralicola* x *C. nemorosa* ganhou uma atividade bactericida contra *S. aureus* não presente nos parentais.

microorganismos. Por outro lado, o híbrido *C. paralicola* x *C. nemorosa* ganhou uma atividade bactericida contra *S. aureus* não presente nos parentais.

Apesar do gênero *Alternaria* ser conhecido como o que mais possui espécies patogênicas e que atuam por meio da liberação de toxinas é provável que os fungos isolados tenham perdido suas patogênicidades, já que os testes de campo foram negativos. Isto normalmente ocorre quando o fungo perde a habilidade de produzir toxinas. Entretanto, o fungo pode reter sua agressividade e penetrar o tecido vegetal sem causar doenças, existindo como saprófitas não patógenos. Por outro lado, como os sintomas observados nas plantas foram semelhantes aos promovidos pelas espécies de fungos deste gênero e o resultado obtido através da técnica modificada de disco de difusão em agar para o fungo do gênero *Alternaria*, que promoveu inibição no crescimento nos microorganismos *A. fumigattus* (0,7 cm) e *S. typhimurium* (0,7 cm), é provável que o mesmo possa ser o responsável pelas lesões na planta.

Apesar destas evidências os testes de patogênicidade dos fungos isolados, principalmente os caracterizados como *Alternaria* e *Cladosporium*-like, devem ser repetidos, se possível modificando o método anteriormente utilizado e realizando testes tanto *in loco* quanto *in vitro*, não deixando dúvidas quanto a patogênicidade dos microorganismos mencionados.

CAPÍTULO III

ANÁLISE QUÍMICA DO LÁTEX DOS FRUTOS E RAMOS DE *CLUSIA*

A atividade bactericida observada para o látex de *Clusia* foi também vista para as resinas florais, que são constituídas basicamente por benzofenonas poliisopreniladas^{7a-c}. Dados preliminares sobre a composição química do látex proveniente do tronco de *C. grandiflora*²⁴, uma espécie nativa da Venezuela, indicou como agente bactericida contra dois patógenos de abelhas, as benzofenonas, clusianona (10) e chamona I (65). A presença dos compostos, derivados bioativos, na faixa polar $R_f < 0,4$, do látex do fruto de *C. grandiflora*, motivou um estudo mais detalhado da composição química do látex, cuja investigação química servirá de suporte para o entendimento de possíveis interações mutualísticas entre microorganismos-planta-herbívoros e se possível, na descoberta de novos produtos naturais de interesse biológico.

Desta forma, foram investigados os látex de 14 espécies de *Clusia*, sendo 12 provenientes dos frutos e 2 dos ramos. A análise preliminar dos látex por cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando como eluente hexano/acetato de etila (9:1). Todos os látex apresentaram comportamentos semelhantes, revelando 3 faixas distintas: polar ($R_f < 0,4$), intermediária ($R_f = 0,5$) e apolar ($R_f > 0,5$). As faixas apolar e intermediária foram reunidas, passando-se a se chamar apenas de faixa apolar. O estudo químico do látex dos frutos e ramos seguiu o seguinte roteiro: 1- Análise direta por CG/EM da faixa apolar; 2- Análise da fração polar após metilação com diazometano; 3- Análise do polissacarídeo.

Para os compostos caracterizados no látex de *Clusia*, foi adotada a numeração que se encontra nos cromatogramas da Figura 9, pag. 50, precedida pela letra "L".

1-RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1-ANÁLISES DO LÁTEX DOS FRUTOS

As faixas apolares, foram analisadas por CG/EM. Os cromatogramas obtidos encontram-se descritos na Figura 9. Os resultados das análises são mostrados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, organizados por espécies nas 4 seções taxonômicas do gênero: (*Phloyanthera*, *Criuva*, *Chlamydoclusia*, e *Cordylandra*). A identificação dos compostos, Quadro 2, foi feita com base nos índices de retenção⁷¹, por comparação dos espectros de massas obtidos com o banco de dados Wiley/NBS, composto por 270.000 espectros e com dados da literatura⁷².

Os cromatogramas obtidos pela análise de CG/EM dos látex dos frutos, podem ser divididos em duas regiões principais. Uma com tempo de retenção entre 5.00 - 40.00min. e a outra entre 42.00 e 65.00min, relacionadas aos sesquiterpenos e triterpenos, respectivamente. Discutiremos primeiro a composição sesquiterpênica, passando em seguida para análise da constituição das misturas de triterpenos.

⁷¹ Van den Dool, H., Kratz, P.D.J. 1963 Journal of Chromatography, 11, 463.

⁷² Adams, R.P. 1995. Identification of Essential Oil by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co., Illinois.

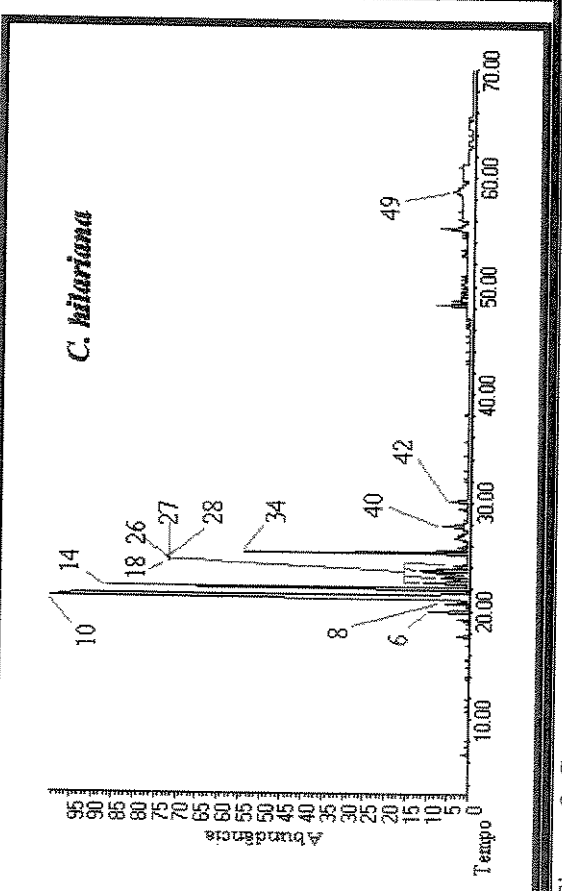
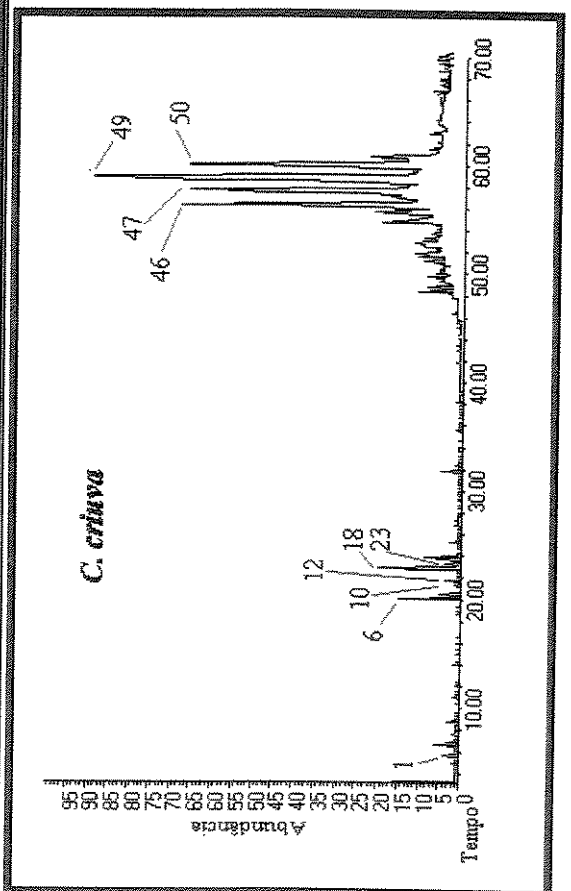
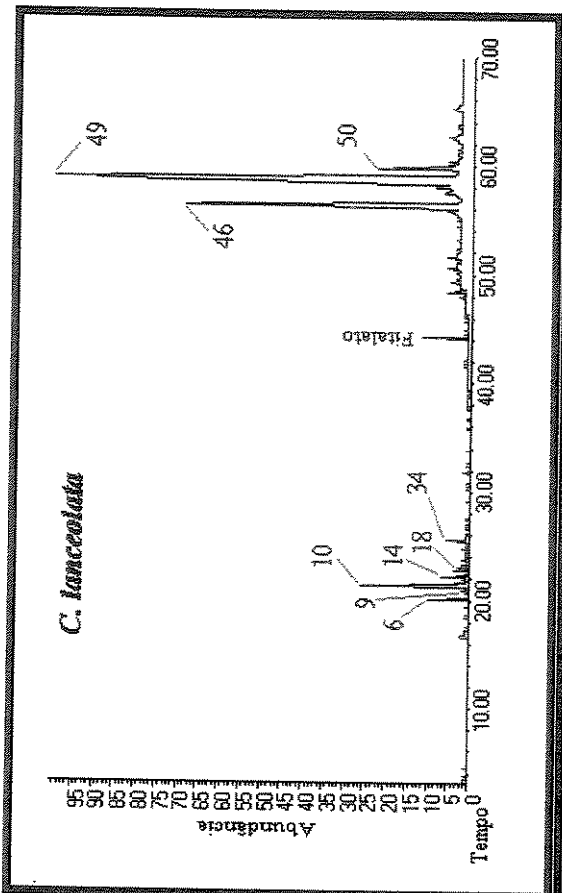
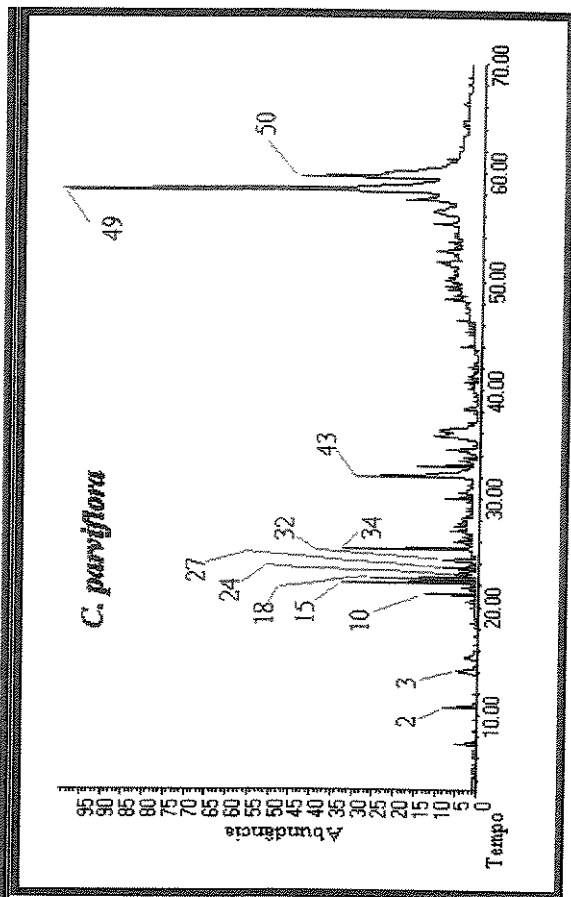


Figura 9 Cromatogramas obtidos por CG/EM das frações apolares (R_f ente 0,90-0,60, sílica gel e 9:1 de hexano/acetato de etila como eluente). Os picos estão numerados de acordo com a identificação do composto e as estruturas correspondentes que se encontram nas Tabelas 11 e 12 e no quadro 02. Seção Criuva: *C. criuva* e *C. parviflora* e Seção Phloanthera: *C. hilariana* e *C. lanceolata*.

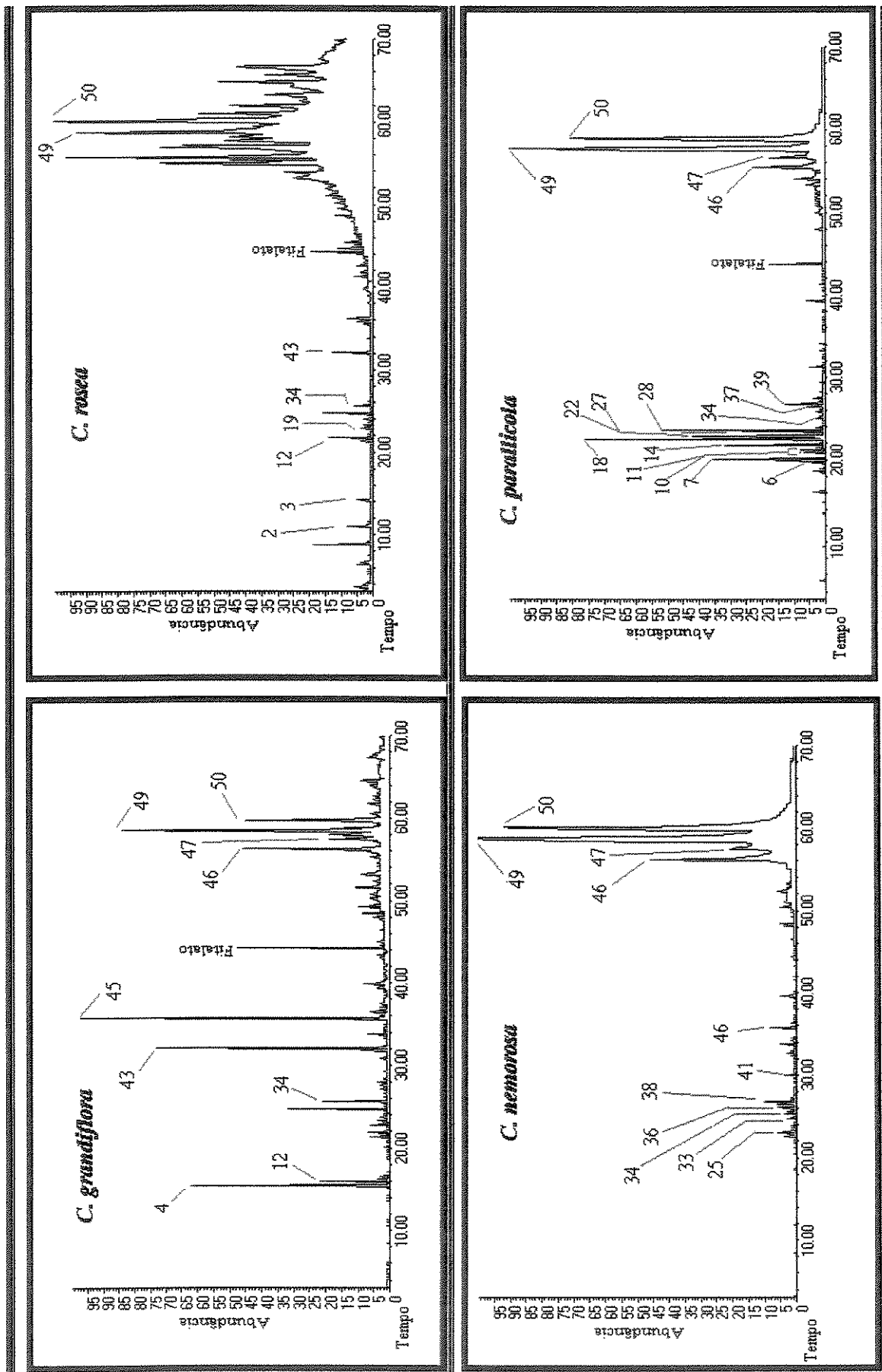


Figura 9 Cromatogramas obtidos por CG/EM das frações apolares (R_f ente 0,90-0,60, sílica gel e 9:1 de hexano/acetato de etila como eluente). Os picos estão numerados de acordo com a identificação do composto e as estruturas correspondentes que se encontram nas Tabelas 13 e 14 e no quadro 02. Seção Chlamydoclusia: *C. grandiflora*, *C. rosea* e *C. nemorosa*. Seção Cordylandra: *C. parviflora*.

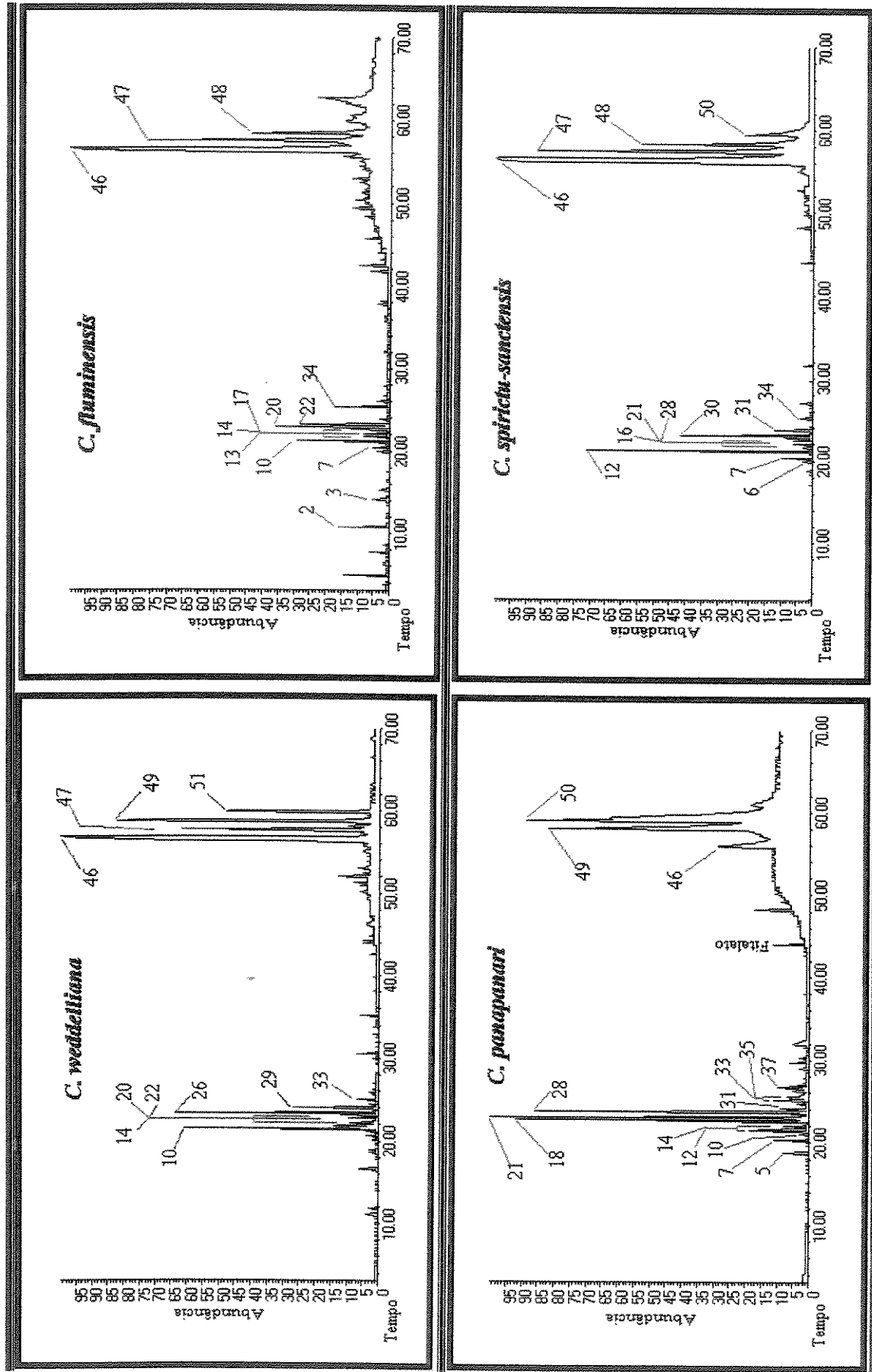


Figura 9 Cromatogramas obtidos por CG/EM das frações apolares (R_f ente 0,90-0,60, sílica gel e 9:1 de hexano/acetato de etila como eluente). Os picos estão numerados de acordo com a identificação do composto e as estruturas correspondentes que se encontram na Tabelas 14 e no quadro 02. Seção Cordylandra: *C. parvicola*..

TABELA 11 Composição percentual dos látex* dos frutos de *Clusia*,
Seção, Cuiuva

Nº do Pico	COMPOSTOS	IR _t Exp ^a .	IR _t lit ^b .	C. Cuiuva	C. parviflora
1	Acetato de metil-butila	873	880	0,49	
-	C ₁₀ H ₁₈	943		0,35	
-	C ₁₀ H ₁₈	985		0,14	
2	Acetofenona	1066	1065		1,11
3	Benzoato de metila	1170	1170		1,54
6	Copaene <alpha>	1380	1376	1,35	
10	β-Cariofileno	1425	1418	0,26	1,37
12	α-trans-Bergamoteno	1439	1436	0,38	
15	Alloaromadendreno	1468	1461		3,38
18	Germacreno D	1482	1480	2,52	2,89
23	α-Muuroleno	1499	1499	1,11	
24	n-Pentadecano	1500	1500		1,40
27	γ-Cadineno	1519	1513		0,88
32	α-Calacoreno	1550	1542		1,00
34	Oxido de Cariofileno	1592	1581		3,73
-	C ₁₅ H ₂₄ O	1708			1,06
43	hexadecanol	1886	1879		9,58
46	Triterpeno	3292		13,39	
47	Triterpeno	3340		18,70	3,37
49	Triterpeno	3381		35,71	38,22
50	Triterpeno	3424		21,30	20,01
	Não Identificados			4,23	10,34
	TOTAL			99,93	99,88

^aIR_t Exp. = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de van den Dool e Kratz⁷¹. ^bIR_t Lit. = índice de retenção da literatura⁷² * fração apolar: R_f 0,9-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1).

TABELA 12 Composição percentual do látex* dos frutos de *Clusia, Phloianthera*

Nº do Pico	COMPOSTOS	IR _t Exp. ^a	IR _t Lit. ^b	C. lanceolata	C. hilariana
6	α- Copaeno	1375	1376	1,30	1,36
8	n-Tetradecano	1400	1400		1,09
9	α- Gurjuneno	1407	1409	0,41	
10	β-Cariofileno	1425	1418	4,49	49,30
14	α- Humuleno	1461	1454	0,97	16,51
18	Germacreno D	1481	1480	0,47	1,48
-	C ₁₅ H ₂₄	1500		1,13	
26	α- Bulneseno	1503	1505		2,19
27	γ-Cadineno	1519	1513		2,01
28	δ-Cadineno	1527	1524		0,91
-	C ₁₅ H ₂₄ O	1542			0,96
34	Oxido de Cariofileno	1588	1581	1,10	9,22
40	n-Hepadecano	1700	1700		1,29
42	n-Octadecano	1800	1800		0,85
46	Triterpeno	3283		22,41	
-	C ₃₀ H ₅₀ O	3330		1,86	
49	Triterpeno	3384		59,73	2,08
50	Triterpeno	3413		5,49	
	Não Identificados			0,57	6,54
	TOTAL			99,93	99,88

^aIR_t Exp. = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de van den Dool e Kratz⁷¹. ^bIR_t Lit. = índice de retenção da literatura⁷² * fração apolar: R_f 0,9-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1).

TABELA 13 Composição percentual dos látex* dos frutos de *Clusia*, Seção *Chlamydoclusia*

Nº do Pico	COMPOSTOS	IR _t Exp. ^a	IR _t lit. ^b	<i>C. nemorosa</i>	<i>C. rosea</i>	<i>C. grandiflora</i>
-	C ₁₀ H ₁₈	910			0,21	
-	C ₁₀ H ₁₈	993			0,72	
2	Acetofenona	1065	1065		0,56	
3	Benzoato de etila	1172	1170		0,38	
4	Verbenona	1213	1204			7,57
-	C ₁₀ H ₁₄ O	1229				2,10
12	α -trans-Bergamoteno	1439	1436		0,41	
19	<Ar>Curcumeno	1486	1483		0,20	
25	β -trans-Guaieno	1500	1500	0,51		
33	trans-Nerolidol	1569	1564	0,23		
34	Oxido de Cariofileno	1592	1581	0,37	0,20	2,28
36	10-epi- γ - Eudesmol	1624	1619	0,43		
-	C ₁₅ H ₂₆ O	1640		0,72		
38	α - Muurolol	1652	1645	1,19		
-	C ₁₅ H ₂₆ O	1668		0,31		
41	n-Octadeceno	1796	1793	0,23		
43	Hexadecanol	1883	1879		0,56	9,50
-	α -Ftalato de Isobutila	1971		0,25		
44	1,11,13-Octadecatriene	2052				1,57
-	Ftalto de Diisopentila	2072		0,66		
45	Octadecanol	2086	2082		0,61	14,75
-	C ₂₀ H ₄₀ O	2284		0,53		
-	Ftalto de Bis 2-etilhexila	2550			0,57	4,32
46	Triterpeno	3292		11,38		7,14
47	Triterpeno	3342		7,32		2,85
48	Triterpeno	3387		42,62	6,95	20,67
49	Triterpeno	3435		31,11	53,28	7,73
-	Não identificados			2,05	35,27	19,45
	TOTAL			99,91	99,92	99,93

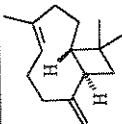
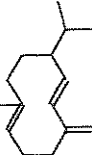
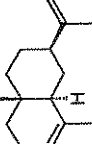
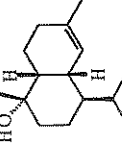
^aIR_t Exp. = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de van den Dool e Kratz⁷¹. ^bIR_t Lit. = índice de retenção da literatura⁷² * fração apolar: R_f 0,9-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1).

TABELA 14 Composição percentual dos látex* dos frutos de *Clusia*, Seção, *Cordylandra*

Nº do Pico	COMPOSTOS	IR _i Exp. ^a	IR _i Lit. ^b	PARA	WEDD	FLUM	SPIRI	PANA
-	C ₄ H ₈ O ₂	839				1,22		
-	C ₄ H ₈ O	936				0,54		
2	Acetofenona	1065	1065			1,48		
-	C ₁₀ H ₁₆ O	1251			0,76			
3	Benzoato de etila	1172	1170			1,09		
5	δ-Elemeno	1341	1339					0,69
6	α-Copaeno	1380	1376	0,64			0,43	
7	β-Elemeno	1393	1391	4,31		0,55	0,89	0,81
10	β-Cariofileno	1425	1418	0,73	4,98	2,56		0,20
11	β-Gurjuneno	1432		0,69				
12	trans-α-Bergamoteno	1437	1436				6,55	2,67
13	(+) Aromadendreno	1438	1439			0,79		
-	C ₁₅ H ₂₄	1450			1,95			
14	α-Humuleno	1454	1454	2,62	1,01	0,69		0,69
16	9-epi-trans-Cariofileno	1471	1467				0,38	
17	γ-Gurjuneno	1475	1473			1,15		
18	Germacreno D	1482	1480	7,96				8,18
20	β-Selineno	1486	1485		0,85	3,33		
21	Biciclogermacreno	1494	1494				0,52	7,98
22	α-Selineno	1496	1494	4,39	1,05	3,02		
26	α-Bulneseno	1504	1505		4,95			
27	γ-Cadineno	1513	1513	0,65				
-	C ₁₅ H ₂₄	1516					0,60	
28	δ-Cadineno	1524	1524	4,25			1,65	6,79
29	Cadina-1,4-diene	1531	1532		1,97			
30	trans-γ-Bisaboleno	1532	1533				4,20	
31	α-Cadineno	1544	1538				1,12	1,16
33	Nerolidol	1566	1564		0,59			1,59
34	Oxido de Cariofileno	1583	1581	0,86		1,60	0,59	
35	trans-β-Elemenona	1600	1600					1,55
37	epi-α-Cadinol	1648	1641	0,80				1,73
39	α-Cadinol	1660	1653	1,37				
-	Italato de etila	2547		1,44				
46	Triterpeno	3290		4,15	39,89	48,70	39,68	5,62
47	Triterpeno	3333		3,49	11,27	17,73	21,07	
49	Triterpeno	3373		34,59	16,86	9,22	13,18	22,30
51	Triterpeno	3417		2,57	8,19		8,66	34,08
	Não Identificados			1,57	5,61	6,26	0,41	3,91
	TOTAL			99,91	99,92	99,93	99,93	99,92

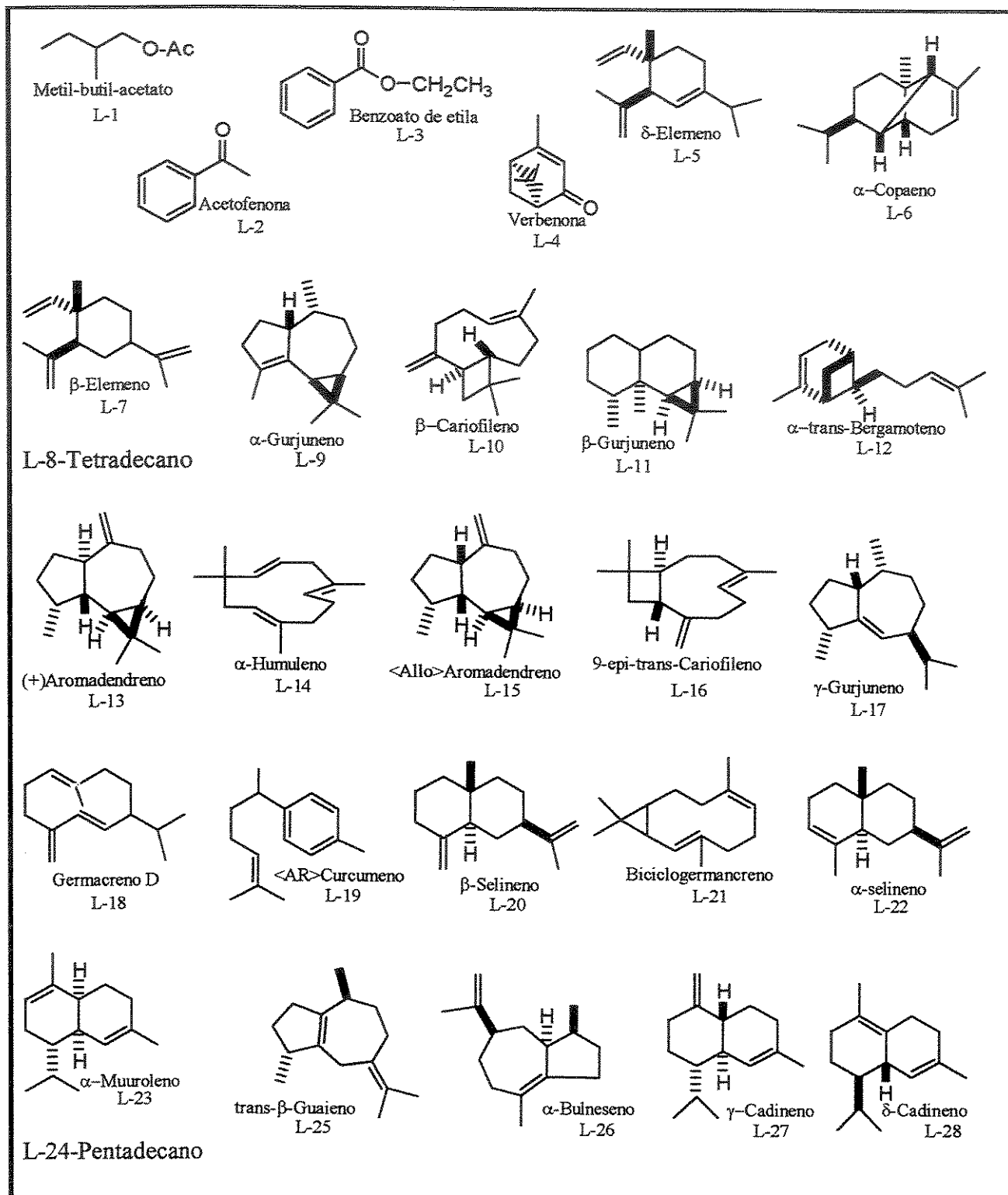
^aIR_i Exp. = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de Van den Dool e Kratz⁷¹. ^bIR_i Lit. = Índice de retenção da literatura⁷². PARA= *C. parvicola*, WEDD= *C. weddelliana*, FLUM= *C. fluminensis*, SPIRI= *C. spiritu-sanctensis*, PANA= *C. panapanari*. * fração apolar: R_f 0,9-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1).

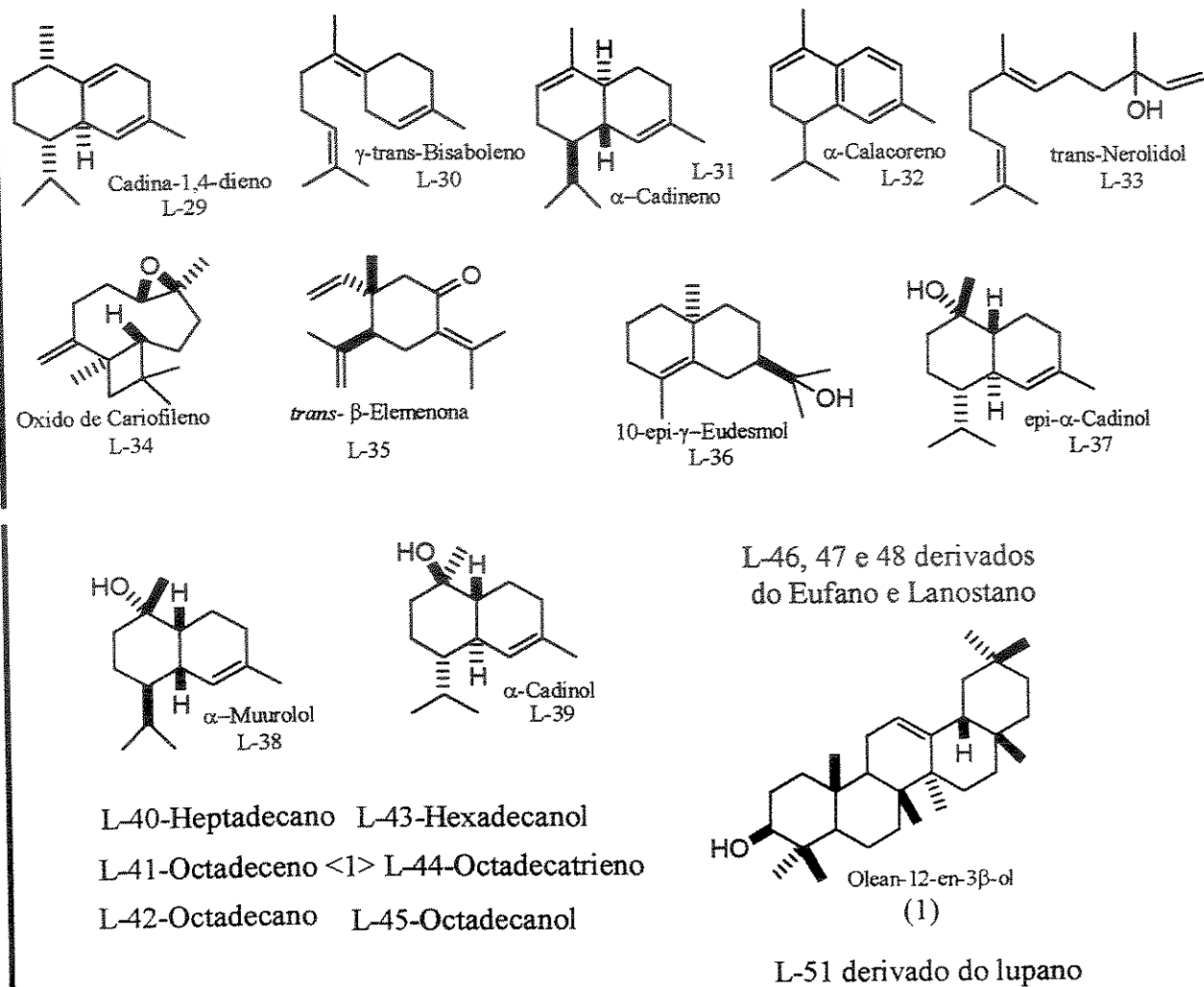
TABELA 15 Percentagens relativas dos constituintes majoritários dos látex dos frutos de *Clusia*, fração apolar (R_f 0,9-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente)

COMPOSTOS	CORDYLANDRA					CHLAMYDOCLUSIA			CRIUVA		PHLOIANTHERA	
	Para*	Wedd*	Flumi*	Spiri*	Pana*	Nemo*	Rosea*	Grand*	Criuva*	Parvi*	Lance*	Hila*
 β -Cariofileno		4,98									4,49	49,30
 α ,trans-Bergamoteno				6,55								
 Germacreno D	7,36				8,18				2,52			
 α -Selineno			3,33									
 α -Muurolol						1,19						
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{OH}$ Hexadecanol										9,58		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{OH}$ Octadecanol							0,61	14,75				

Espécies do gênero *Clusia*: *C. paralicola*; *C. weddeliana*; *C. fluminensis*; *C. spirictus-sancensis*; *C. panapanari*; *C. nemorosa*; *C. rosea*; *C. grandiflora*; *C. criuva*; *C. parviflora*; *C. lanceolata*; e *C. hilariana*.

Quadro 2 Compostos identificados nas frações apolares ($R_f \geq 0,9-0,6$ sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) nos látex dos frutos de *Clusia*





O pico 49, nos cromatogramas da Figura 9, pág. 50-52, refere-se ao composto (1), mencionado anteriormente na Tabela 3, pág. 18 e quadro 1, pág. 22.

1.1.1-ANÁLISE SESQUITERPENOS

A análise química por CG/EM da faixa apolar (R_f entre 0,9-0,6) do extrato metanólico do látex de 12 clúsias, possibilitou a caracterização de mais de 30 compostos, entre sesquiterpenos e triterpenos. Analisando os constituintes com tempo de retenção entre 5,00 e 35,00 min. nos cromatogramas da Figura 9 (pág. 50-52) e comparando os resultados contidos nas Tabelas 11-14 (pág. 53-56), constatou-se, que exceto para espécies da seção *Chlamydoclusia* e para espécie, *C. parviflora* da seção *Criuva*, as quais apresentaram constituintes oxidados como majoritários. Todas as outras espécies, incluindo a *C. criuva*, apresentaram compostos não oxigenados, mais precisamente sesquiterpenos como majoritários (Tabela 15, pág. 57). Observou-se ainda, que espécies com baixos teores de sesquiterpenos foram compensadas pelo percentual, em alguns casos, expressivo de álcoois de cadeia longa, é o caso da *C. grandiflora* e *C. criuva* que apresentaram como majoritários os álcoois octadecanol (14,75%) e hexadecanol (9,58%), respectivamente (Tabela 15, pág. 57).

1.1.2 CARACTERIZAÇÃO DOS TRITERPENOS

Os triterpenos fazem parte de uma importante classe de metabólitos naturais, que se apresentam em geral, como misturas de difícil separação, cuja identificação através da técnica CG/EM é prejudicada pela presença de fragmentos iônicos comuns aos triterpenos estruturalmente semelhantes⁷³. Em geral, os componentes destas misturas são triterpenos simples com funções químicas idênticas, podendo ser álcool, cetona, ácido carboxílico, olefina, etc., os quais se encontram localizados em pontos deferentes do esqueleto triterpênico. Com relação à região triterpênica, com tempo de retenção entre 55,00 e 65,00 min., cromatogramas da

⁷³ Ageta, H.; Kenji, S.; Arai, Y.; Masuda, K.; Takase, Y.; & Ageta, T. 1992. *Chem. Pharm. Bull.* 40: (7), 1683-1690.

Figura 9, os espectros de massas dos picos compreendidos nesta região revelaram íons moleculares de m/z 426 e 428 (Figura 10, pág. 62), sugerindo a presença de triterpenos hidroxilados com fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e $C_{30}H_{52}O$, respectivamente. Basicamente, os espectros de massas desses compostos apresentaram, principalmente dois tipos distintos de fragmentação um deles com fragmentos de triterpenos tetracíclicos insaturados do tipo lanostano de m/z 411 e m/z 393, provenientes da perda do radical metil e subsequente desidratação (Esquema 1, pág. 63). Os outros fragmentos originaram-se da ruptura da cadeia lateral entre os carbonos C-17 e C-20. O segundo tipo de fragmentação apresenta pico base de m/z 218 originados da fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, quando os anéis “C”, “D”, e “E” não são funcionalizados e caracterizam os triterpenos pentacíclicos insaturados, do tipo oleano e ursano. Dois outros fragmentos, igualmente importantes, para estas classes de triterpenos são os de m/z 203 e 189, obtidos a partir do íon de m/z 218. (Esquema 2, pág. 63).

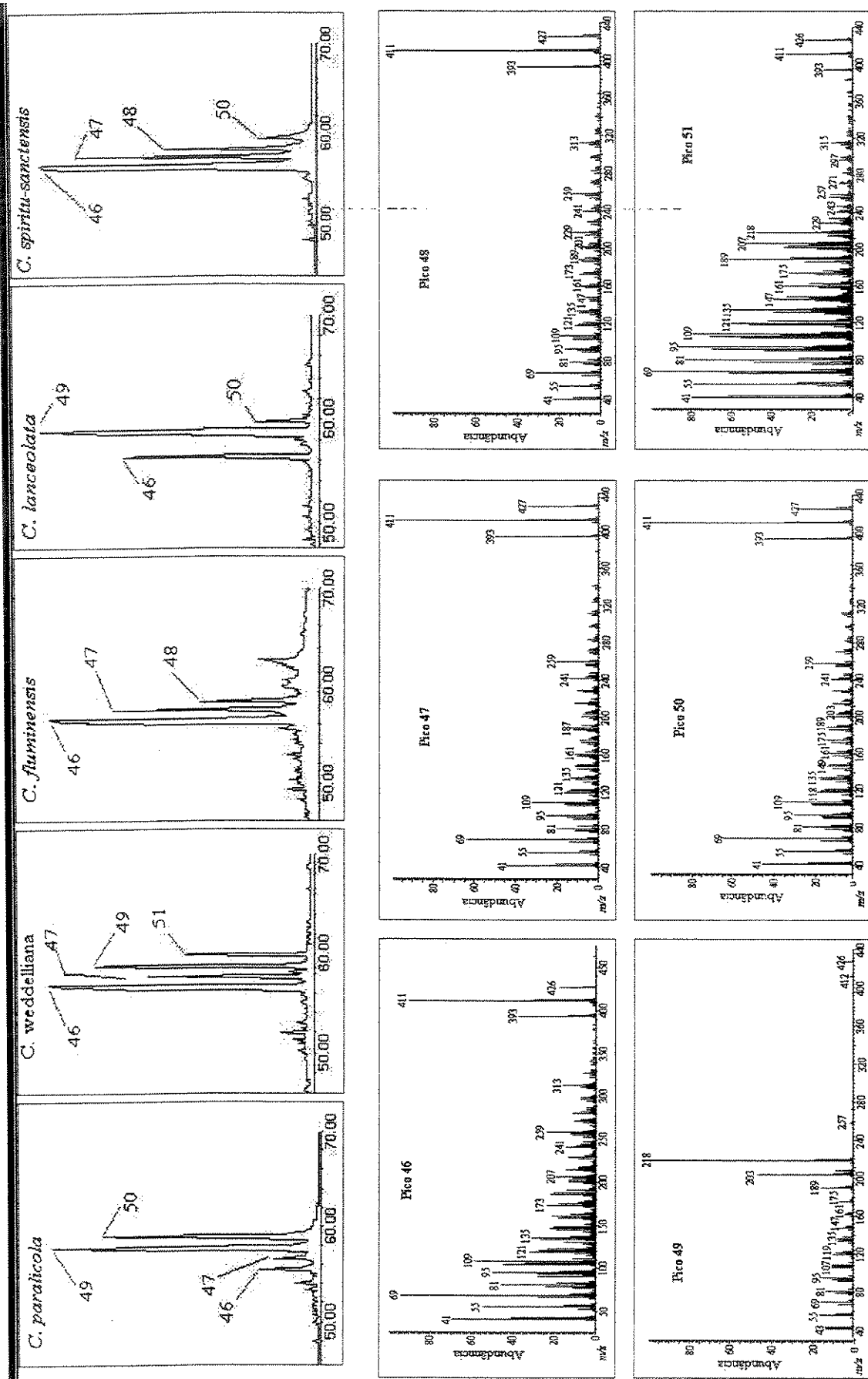
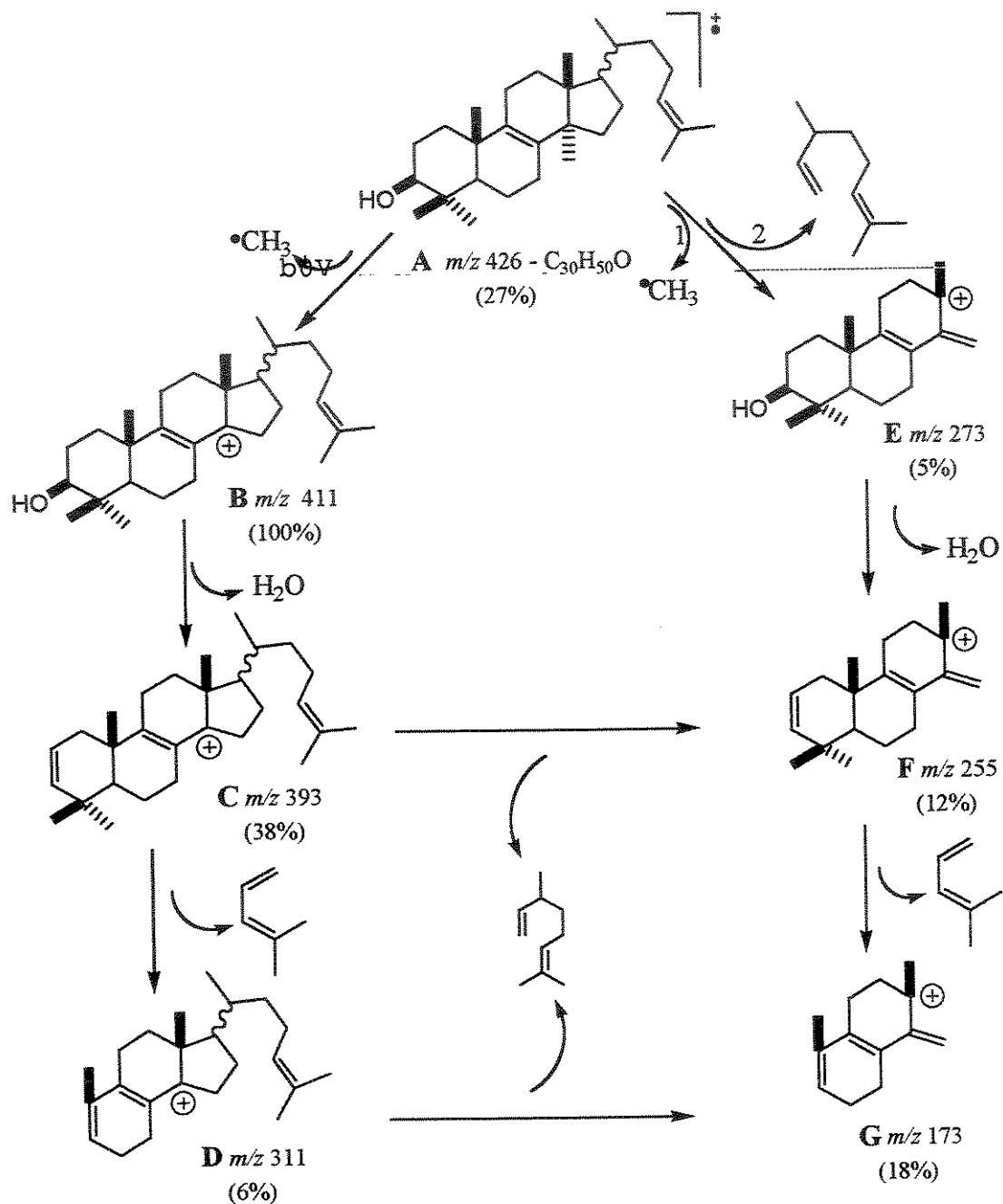


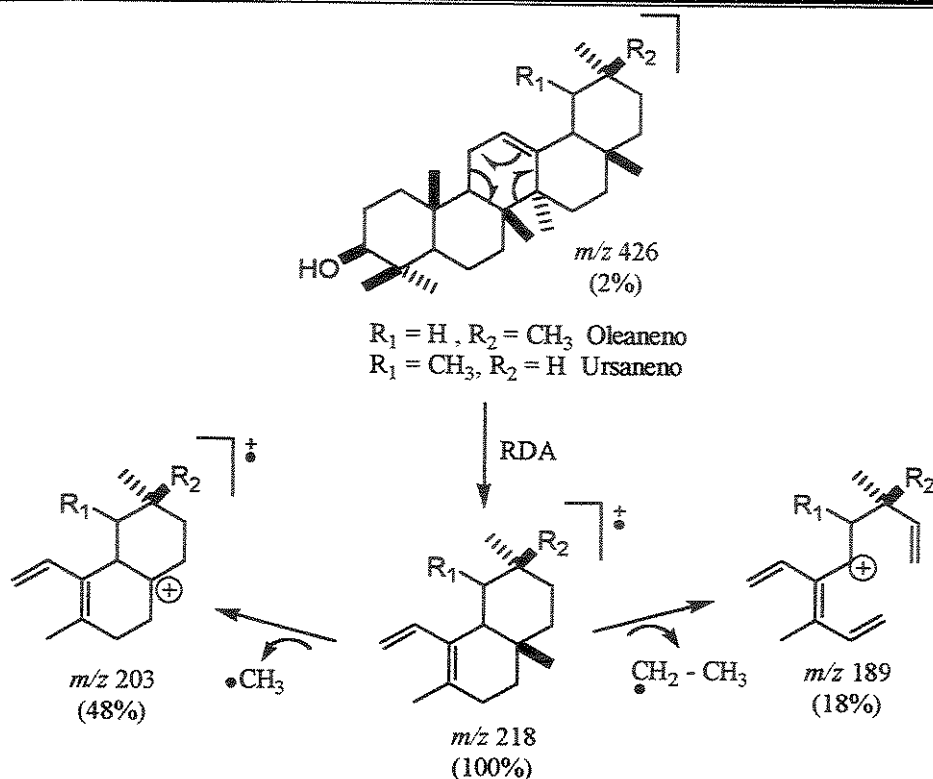
Figura 10 Região do cromatograma dos látex de *Clusia*, fração apolar: R_f entre 0,90-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente (9:1) onde eluem os triterpenos (tempo de retenção entre 55,00 e 65,00 min) e os respectivos espectros de massas dos picos correspondentes.

Esquema 1 Principais fragmentações de triterpenos do tipo lanostanos e eufanos^{74,75}

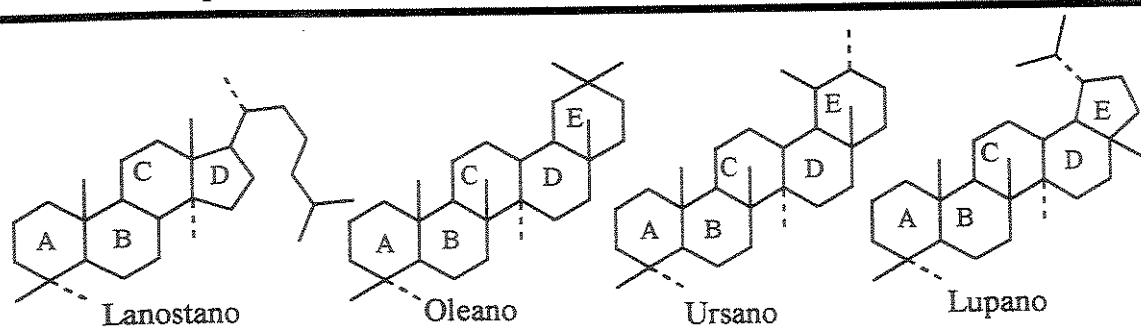
*Para o diidrolanosterol $C_{30}H_{52}O$ os fragmentos A (23%), B (30%), C (18%) e D (12%) possuem 2 unidades a mais.

⁷⁴ Audier, H. E.; Beugelmans & Das, B. C. 1966. *Tetrahedron Letters* 36, 4341-4347.

⁷⁵ Aplin, R.T. & Hornby, G.M. 1966. *J. Chem. Soc. (B)*, 1078-1079.

Esquema 2 Principais fragmentações de triterpenos do tipo oleano e ursano⁷³

Entretanto, a simples análise dos espectros de massas obtidos de cada mistura de triterpenos, sem possuir dados de índice de retenção da literatura, não é suficiente ou mesmo eficaz para caracterizar cada um dos triterpenos, já que os espectros de massas de substâncias semelhantes são parecidos, divergindo às vezes, apenas pela intensidade relativa de alguns fragmentos, causando dúvidas na sua identificação. Mesmo assim as composições das misturas de triterpenos nas diversas espécies foram inicialmente estudadas por CG/EM e apresentaram similares, exceto para a mistura obtida a partir da espécie *C. weddelliana*, que apresentou o pico de número 51, cujo espectro de massas sugere a presença de triterpeno da classe do lupano. Desta forma, as principais classes de triterpenos que constituem os látex de *Clusia*, que foram deduzidas a partir dos massas obtidos por CG/EM são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 Esqueletos básicos para triterpenos detectados no látex de *Clusia*

Em virtude da ambigüidade dos espectros de massas para os triterpenos da mesma classe, as indicações estruturais foram confirmadas através da análise das misturas por RMN de ^{13}C , desacoplados e DEPT 135° e 90°. Entretanto, ao invés de analisar por RMN de ^{13}C todas as misturas obtidas do látex de *Clusia* foram escolhidas aquelas, adquiridas em maior quantidades (veja Tabela 5). Portanto, as frações selecionadas foram obtidas a partir dos látex dos frutos das espécies *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. fluminensis*, *C. spirictu-sanctensis*, *C. rosea* e *C. lanceolata*. Os dados foram interpretados utilizando a literatura, que é bastante completa para as principais classes de triterpenos⁷⁶. A comparação dos valores de deslocamentos químicos obtidos com os descritos na literatura permite identificar componentes de uma dada mistura de triterpenos. Esta informação associada aos espectros de massas torna possível a análise de uma mistura sem uma prévia e tediosa separação dos triterpenos.

A mistura de triterpenos isenta de outras contaminações, foi obtida através da cromatografia em camada espessa preparativa (CCDP). Em seguida, foram registrados seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desacoplado e DEPT 135° e 90°.

Com o espectro de carbono-13 se tem a informação das possíveis funções orgânicas que possam vir a existir nos triterpenos que compõem cada mistura, uma vez que o carbono funcionalizado apresentará deslocamento químico característico,

⁷⁶ Olea, R. S. G. e Roque, N.F. 1990. Química Nova 13(4), 278-281.

distinguindo-se dos demais. Os principais grupos funcionais oxigenados que costumam aparecer nos triterpenos são: álcoois, acetatos, éteres metílicos, cetonas e ácidos carboxílicos, proveniente, principalmente, da oxidação quase sempre presente no Carbono-3, sendo em muitos casos, o único grupo funcional oxigenado do composto. Outra informação importante é o número aproximado, de triterpenos existentes, em cada mistura, que podem se vistos no cromatograma CG/EM apesar de alguns terem co-eluído, e confirmados por meio da análise dos carbonos insaturados e do número de duplas ligações, já que na maioria dos casos, os triterpenos tetracíclicos apresentam duas duplas ligações, enquanto que os pentacíclicos possuem apenas uma. Através das intensidades relativas de sinais análogos em moléculas distintas em espectros desacoplados de RMN de ^{13}C e da integração das áreas dos picos nos cromatogramas de CG/EM é possível inferir uma abundância relativa dos triterpenos que fazem parte da mistura. Com estas informações, o próximo passo é a atribuição dos sinais detectados.

Pela comparação dos espectros de RMN de ^{13}C , observou-se que todas as misturas de triterpenos apresentaram praticamente o mesmo perfil. Desta forma, serão discutidos os resultados obtidos apenas para as misturas de triterpenos provenientes do látex de *C. spiritu-sanctensis*, *C. weddeliana*, e *C. paralicola*.

Os espectros de RMN de ^1H das misturas de triterpenos proveniente do látex das espécies supracitadas confirmaram o caráter triterpênico insaturado destas misturas por meio de sinais relacionados aos hidrogênios olefinicos o qual foi sugerido inicialmente pela análise de CG/EM.

O próximo passo, foi caracterizar os sinais correspondentes aos átomos de carbono que fazem parte de algum grupo oxigenado ou que a ele estão ligados. Foram observados apenas deslocamentos químicos para carbonos carbinólicos. Na Tabela 17 encontram-se descritos os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C , das

misturas analisadas, referentes aos átomos de carbono que fazem parte dos grupos oxigenados.

Tabela 17 Deslocamento químico dos átomos de carbono na função oxigenada

Misturas de Triterpenos Espécies	Deslocamentos químicos (ppm)		Tipo de Carbono
	Observados	Literatura ⁷⁷	
<i>C. spiritu-sanctensis</i>	79,0	78,6 ± 0,5	C-3 (OH), β
<i>C. weddelliana</i>	78,9		
<i>C. paralicola.</i>	78,8		
<i>C. fluminensis</i>	79,1		
<i>C. rosea</i>	79,3 e 78,7		
<i>C. lanceolata</i>	79,5 e 79,3		

Estes dados, que sugerem a presença de uma função álcool para mistura de triterpenos, estão de acordo com os espectros de massas observados para os triterpenos pertencentes, principalmente à classe dos lanostano, que produzem um fragmento de m/z 393 ($M^{+*} - CH_3 - H_2O$) provenientes da perda sequencial de metil e de água⁷⁴⁻⁷⁵.

A confrontação de valores característicos para os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C , por exemplo, carbonos olefínicos e metínicos, podem levar a um rápido diagnóstico da presença ou ausência do triterpeno proposto. Foi o que aconteceu com a sugestão do espectro de massas obtido a partir do cromatograma, pico 51 em *C. weddelliana*, cuja presença de triterpenos da classe dos lupanos insaturados e saturados, nas misturas analisadas, foi descartada após comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para o lupano e lupeol⁷⁸ devido, à

⁷⁷ Breitmaier, E. & Wolfgang, V. 1990. "Carbon 13 NMR spectroscopy: High resolution methods and applications in organic and biochemistry". Weinheim, New York – VCH.

⁷⁸ Mahato, S.B. & Kundu, A. P. 1994, Phytochemistry, 37: (6), 1517-1575.

ausência principalmente dos sinais, das amostras analisadas, para o carbono quaternário em δ 150,9 e o metilênicos em δ 109,3 Figura 11.

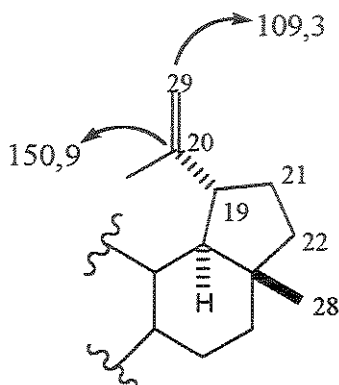


Figura 11 Estrutura parcial do lupeol. Deslocamentos químicos de carbono ^{13}C (δ) para os carbonos insaturados.

Eliminando a possibilidade, das amostras serem constituídas por triterpenos completamente saturados, que foi sugerida pelo espectro de massa obtido a partir do cromatograma de *C. weddelliana* (pico 51, Figura 10, pág. 62), o passo seguinte foi investigar os triterpenos insaturados que constituem o látex através da correlação do par de átomos de carbono que fazem parte de uma ligação dupla. No caso dos triterpenos pentacíclicos a correlação dos sinais correspondentes aos carbonos olefinicos foi feita levando em consideração as intensidades relativas dos sinais.

De acordo com a literatura, os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos átomos de carbono olefinicos, sofrem pouca variação para as classes de triterpenos que foram sugeridas inicialmente por CG/EM para as misturas analisadas (Tabela 18, pág. 69). Comparação dos deslocamentos químicos entre os carbonos olefinicos, obtidos nas misturas, com os descritos para triterpenos na literatura e somando com as informações mostradas na Tabela 17 (pág.67), que

sugere o tipo de função oxigenadas presente nos triterpenos nos levou a propor inicialmente os triterpenos pertencentes à mistura, descritos na Tabela 18.

Tabela 18 Deslocamento químico de RMN de ^{13}C para os carbonos sp^2 das misturas triterpênicas.

Mistura de Triterpeno Espécie	Sistema olefinico observado (ppm)	Triterpeno correspondente
<i>C. spiritu-sanctensis</i>	125,2 – 130,9	Lanosta-8,24-dien-3 β -ol ^{79,80,81}
	134,0 – 134,0	
	134,1 – 133,5	Eufa-8,24-dien-3 β -ol ^{80,81,82}
	130,9 – 125,2	
<i>C. weddeliana</i>	134,1 – 133,5	Eufa-8-en-3 β -ol ^{80,81,81}
	134,0 – 133,5	Eufa-8,24-dien-3 β -ol ^{80,81,82}
	130,9 – 125,2	
	145,2 – 121,7	Olean-12-en-3 β -ol ^{80,83}
<i>C. paralicola.</i>	134,0 – 133,5	Eufa-8-en-3 β -ol ^{79,80,81}
	134,0 – 133,5	Eufa-8,24-dien-3 β -ol ^{79,80,81}
	130,9 – 125,2	
	145,9 – 117,8	Lanost-7-en-3 β -ol ⁸⁴
	145,9 – 117,8	Lanosta-7,24-dien-3 β -ol ⁸⁴
	130,9 – 125,1	
	145,2 – 121,7	Olean-12-en-3 β -ol ^{80,83}

De fato, a correlação dos sinais nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° dos carbonos carbinólico, olefinicos e alguns metínicos além de serem facilmente correlacionados, servem como diagnóstico na presença ou ausência de uma dada classe de triterpeno, ou mesmo para diferenciar um do outro. Análise minuciosa dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° das amostras de *C. fluminesis* e *C. spiritu-sanctensis* mostrou que são constituídas apenas por

⁷⁹Lukacs, G.; Khuong-Huu, F.; Bennett, C.R.; Buckwater, B.L. and Wenkert, E. 1972. *Tetrahedron Letters*, 33, 3515-3518.

⁸⁰Knight, S. A. 1974. *Organic Magnetic Resonance*, 6: (11), 603.

⁸¹Harref, A. B. 1985. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 5, 965-972.

⁸²Knight, S. A. 1973. *Tetrahedron Letters*, 1, 83-86.

⁸³Seo, S.; Tomita, Y. and Tori, K. 1975. *Tetrahedron Letters*, 1, 7-10.

⁸⁴Polonsky, J.; Varon, Z. And Rabanal, R.M. 1977. *Israel Journal of Chemistry*, 16, 16-19.

triterpenos do tipo lanostano, por não apresentar no espectro de RMN de ^{13}C os sinais em δ 121,7 (CH) e δ 145,0 (C) relacionados ao sistema olefinico presente no olean-12-eno (Figura 12). Esta constatação foi confirmada pela análise dos espectros de massas obtidos a partir dos respectivos cromatogramas (região triterpênicas) dos látex de *C. fluminensis* e *C. spiritu-sanctensis* (Figura 10, pág. 62), cuja fragmentação apresentada são típicas apenas para triterpenos do tipo lanostano (Esquema 1, pág.63).

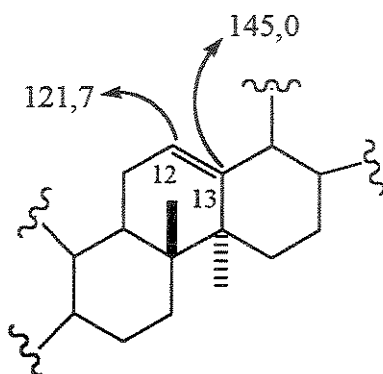


Figura 12 Estrutura parcial do olean-12-en-3 β -ol. Deslocamentos químicos de carbono 13 (δ) para os carbonos insaturados.

Por outro lado, também foi possível diferenciar os isômeros de ligação Δ^8 e $\Delta^{8,24}$ das séries do eufano e lanostano. Estes triterpenos se diferenciam através da configuração na junção da cadeia lateral entre o C-17 e C-20, e que esta inversão modifica os deslocamentos químicos dos carbonos do sistema tetracíclico exceto para os carbonos C-13 e C-14 da junção dos anéis C e D. A variação dos deslocamentos químicos entre eufano e lanostano obtidos experimentalmente para as misturas de triterpenos isoladas de *Clusia* está de acordo com aqueles publicados para os triterpenos destas séries⁸¹ Figura 13, pág. 71.

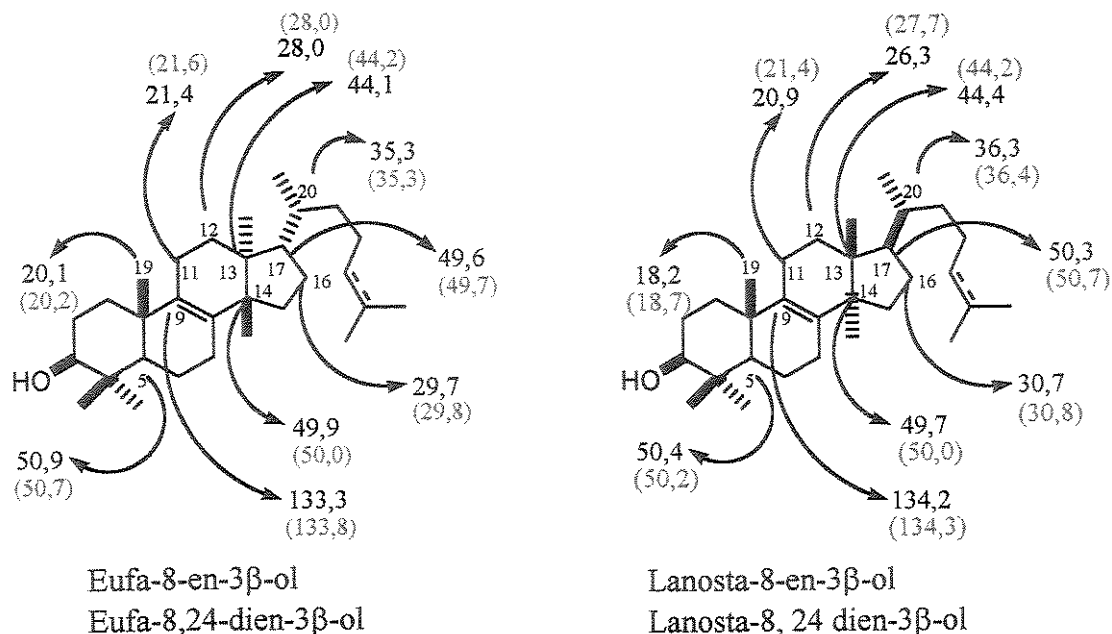


Figura 13 Principais modificações nos deslocamentos químicos dos carbonos na passagem de um triterpeno da série eufano para lanostano e comparação com os deslocamentos obtidos experimentalmente da mistura de triterpenos proveniente do látex de *C. fluminensis* (Entre parênteses).

Este estudo permitiu identificar a presença de lanost-8-en-3β-ol, lanost-8,24-dien-3β-ol, euf-8-en-3β-ol e euf-8,24-dien-3β-ol em *C. fluminensis* e apenas lanost-8,24-dien-3β-ol, e euf-8,24-dien-3β-ol em *C. spiritu-sanctensis*. Estes resultados corroboram a sugestão apresentada na Tabela 18 para composição das misturas de triterpenos isoladas do látex das clúsias mencionadas. Análise de RMN de ^{13}C de uma amostra de lanosterol, de nosso laboratório, revelou a presença de lanosteno e lanostadieno. Co-injeção, desta amostra, com a mistura de triterpeno proveniente de *C. weddelliana*, superpôs ao pico 46, não ocorrendo o mesmo com as misturas provenientes de *C. paralicola*, *C. rosea* e *C. lanceolata*, que ao invés dos sinais característicos para lanostenos Δ^8 e $\Delta^{8,24}$, revelaram sinais para carbonos olefinicos referente ao isômero $(\Delta^7)^{84}$, ressonando em 145,9 -117,8.

Os sinais para os carbonos sp^2 em δ 121,7 e δ 145,0, obtidos nas misturas triterpênicas provenientes do látex de *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. rosea* e *C.*

lanceolata permitem sugerir a presença de triterpenos do tipo oleano, confirmado através do espectro de massa (pico 49 da Figura 10, pág. 62) pela fragmentação do tipo RDA, que é peculiar a esta classe de triterpeno (Esquema 2, pág. 64).

Sendo assim, pode-se afirmar que o pico de número 49 nos cromatogramas da Figura 10 (pág. 62) está relacionado, com certeza, ao triterpeno β -amirina (1) e o 46 referem-se à mistura de lanost-8-eno e lanosta-8,24-dieno. Os outros picos, com exceção do 51 (não identificado), estão relacionados aos triterpenos tetracíclicos derivados do lanosta-7-eno, lanosta-7,24-dieno e eufano.

A investigação da composição triterpênica do látex de *Clusia* revelou que é constituída basicamente pela mistura de derivados do lanostano e eufano, e β -amirina (1). A Tabela 19 mostra os triterpenos identificados nas diferentes misturas. As análises comparativas com dados da literatura dos deslocamentos químicos obtidos a partir das misturas de triterpenos e suas respectivas correlações são mostradas nas Tabelas 20 a 25, pág. 195-200.

TABELA 19 Constituintes das misturas de triterpenos nos látex dos frutos de *Clusia*

Componentes	Misturas analisadas ^a					
	Para	Wedd	Flum	Spiri	Rosea	Lance
Lanost-7,en-3 β -ol ⁸⁴	X				X	X
Lanosta-7,24-dien-3 β -ol ⁸⁴	X				X	X
Lanost-8,en-3 β -ol ⁸⁰⁻⁸²		X	X			
Lanosta-8,24-dien-3 β -ol ⁷⁹⁻⁸¹		X	X	X		
Eufa-8-en-3 β -ol	X		X			
Eufa-8,24-dien-3 β -ol ⁸⁰⁻⁸²	X		X	X		
Olean-12-en-3 β -ol ^{80,83}	X	X			X	X

^aMisturas de triterpenos analisadas dos látex dos frutos de *Clusia*: Para = *C. paralicola*, Wedd = *C. weddelliana*, Flum = *C. fluminensis*, Spiri = *C. spiritus-sanctensis*, Rosea = *C. rosea* e Lance = *C. lanceolata*.

Resumindo, a identificação dos triterpenos das misturas analisadas, através da técnica de RMN de ¹³C em conjunto com a CG-EM permitiu uma economia de tempo e reagentes necessários à separação dos mesmos. Quanto à composição do

látex, provenientes de diferentes espécies de *Clusia*, pode-se dizer que as composições das faixas apolares são basicamente constituídas pelos mesmos sesquiterpenos e triterpenos, presentes nas espécies em proporções distintas. Não foi possível verificar uma característica comum para as seções taxonômicas.

1.1.3- ANÁLISE DA FAIXA POLAR DO LÁTEX DOS FRUTOS

Para a análise, por CG/EM, das frações polares metiladas foram escolhidas espécies pertencentes a cada uma das seções taxonômicas (seção Cordylandra : *C. paralicola*; seção Chlamydoclusia: *C. grandiflora*; seção Criuva: *C. parviflora* e seção Phloianthera: *C. hilariana*) e os resultados estão na Figura 14 (pág. 75). A numeração dos compostos caracterizados é a continuação da numeração adotada para os constituintes da faixa apolar (quadro 3, pág. 76).

Além dos álcoois (C-16 e C-18) e ácidos graxos detectados, principalmente em *C. parviflora*, foi constatada a presença do éster metílico (L-58) do ácido oleanólico (78), quadro 1 e 3 pag. 22 e 76 e o respectivo diidro o ácido olean-3-oxo-28-óico (L-59), observou-se ainda, que os picos: 54, 56 e 57 foram identificados como sendo os compostos (80), (18A) e (79), que são os ésteres metílicos dos ácidos 5,6-diidroxi-*cis*- δ -tocotrienólico; *cis*- δ -tocotrienólico e *cis*- γ -tocotrienólico. As estruturas dos constituintes caracterizados na fração polar do látex das espécies analisadas (Tabela 26, pág. 74) estão descritas no Quadro 3 (pág.76).

Comparação entre os espectros de massas de benzofenonas isoladas nas resinas florais de *Clusia*, com os obtidos, no látex da fração polar metilada de *C. paralicola* e *C. parviflora*, sugere a presença de benzofenonas no látex, do tipo aberto, ou seja, sem o esqueleto biciclo noneno [3.3.1], devido à presença dos íons de m/z 339 (100%), 105 (65%), e 323 (40%). O espectro de massas proveniente do cromatograma de *Clusia paralicola*, referente ao pico 55 (Figura 15, pág. 76) está de acordo com a fragmentação da benzofenona grandona (42) quadro 1 pag. 22,

isolada, pelo nosso grupo de pesquisa, a partir da resina floral de *Clusia grandiflora* masculina, sendo agora detectada no látex dos frutos de *C. paralicola*, *C. parviflora* e *C. hilariana*. Contrariamente aos resultados de Lokvam e col²⁴, não foi observada a presença de benzofenonas no látex de *C. grandiflora*.

TABELA 26 Composição percentual dos constituintes da fração polar metilada dos látex dos frutos de *Clusia*, Seção: Cordylandra (*C. paralicola*), Chlamydoclusia (*C. grandiflora*), Criuva (*C. parviflora*) e Phloioanthera (*C. hilariana*).

Nº do Pico	COMPOSTOS	IR _i Exp ^a	IR _i Lit ^b	<i>C. paralicola</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>C. parviflora</i>	<i>C. hilariana</i>
52	Farnesol	1699	1697	6,86		4,80	
43	Hexadecanol	1886	1879			19,42	
53	Hexadecanoato de metila	1925	1927			9,30	
54	5,6-diidroxi-cis- δ -tocotrienolato de metila	2133	-	24,21	16,27	48,61	28,92
45	Octadecanol	2095	2082			10,27	
-	Benzofenona	2882	-			7,57	
55	Grandona	3181	-	15,32		t	t
-	C ₂₉ H ₄₂ O ₄	3257	-		4,65	t	
56	δ -tocotrienolato de metila	3376	-	7,33	32,54	t	18,65
57	γ -tocotrienolato de metila	3429	-	5,40	5,62	t	t
58	Olean-12-en-3-oxo-28-ato de metila	3505	-		27,28		10,51
-	Benzofenona	3509	-	5,88			5,96
-	Benzofenona	3523	-	11,42			
59	Olean-3-oxo-28-ato de metila	3539	-		9,44		22,71
	Benzofenona	3579	-	11,58			
	Não identificados			11,96	4,17		13,23
	Total			99,96	99,97	99,97	99,98

^aIR_i Exp = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de Van den Dool e Kratz⁷¹. ^bIR_i Lit. = Índice de retenção da literatura⁷². * R_f < 0,25, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente

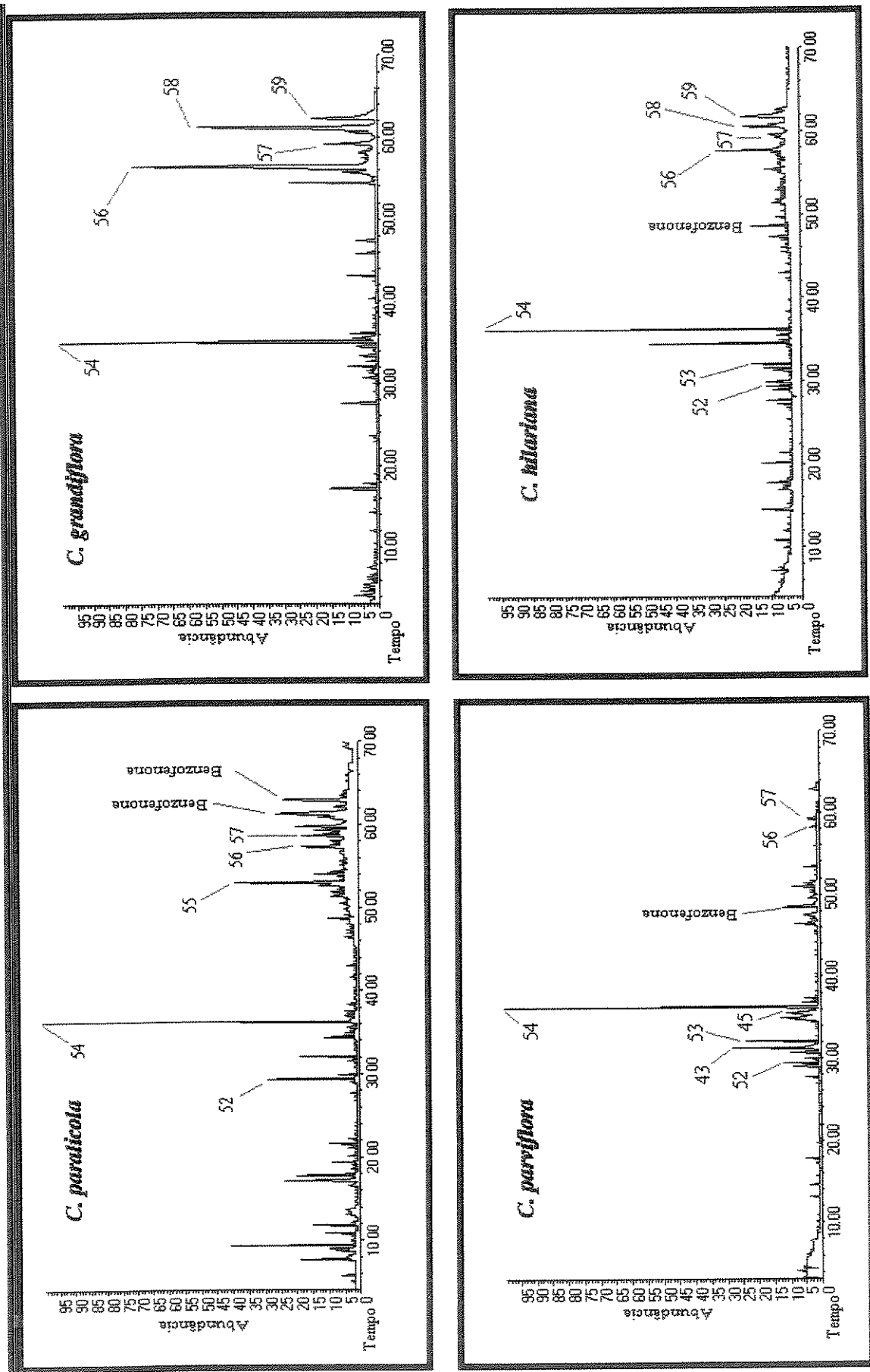


FIGURA 14 Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos frutos de *Clusia*

Quadro 3 Estruturas das frações polares metiladas ($R_f < 0,25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos frutos de *Clusia*

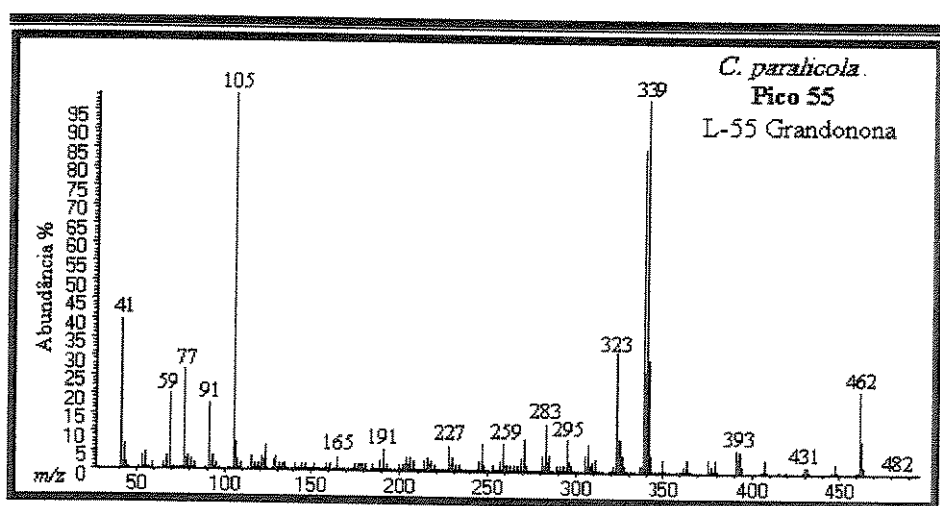
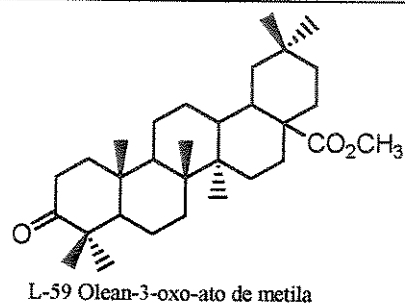
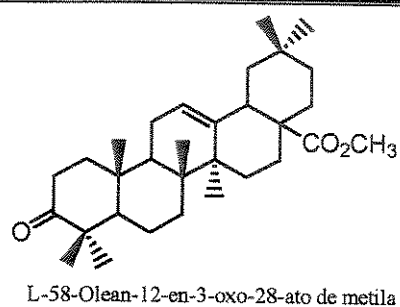
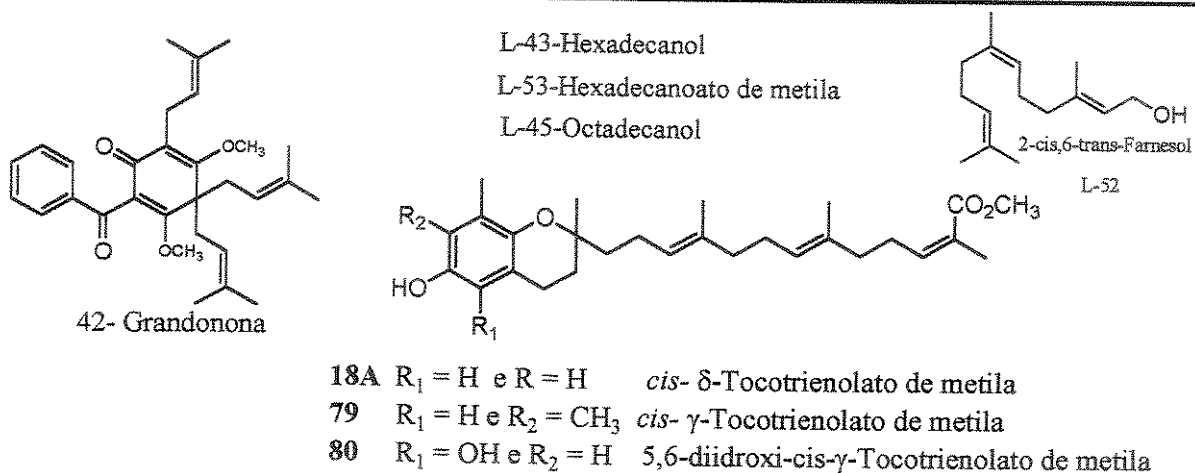


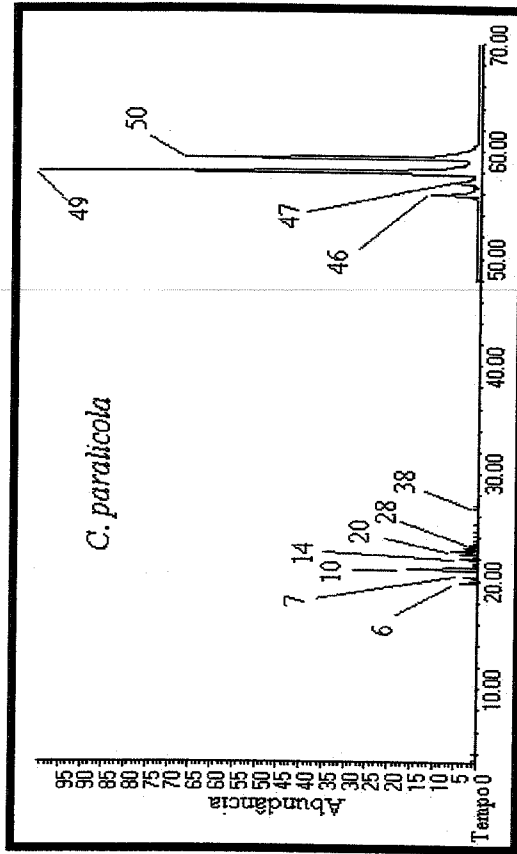
Figura 15 Espectro de massas obtido a partir do cromatograma da fração polar do látex de *Clusia parvicola* (Figura 14)

1.2-ANÁLISE QUÍMICA DO LÁTEX DOS RAMOS

O látex é produzido por estruturas especializadas, é encontrado em todo o tecido vegetal, o qual é disseminado por canais laticíferos. Esta difusão sugere que o látex encontrado nas folhas, ramos ou frutos possuam, ao menos, a mesma classe de metabólitos, variando apenas na proporção dos constituintes químicos e no nível de padrão de oxidação de algumas classes de substâncias. Mesmo assim, decidimos analisar a constituição química do látex dos ramos dos respectivos parentais dos híbridos *C. paralicola* x *C. nemorosa* e *C. nemorosa* x *C. lanceolata* e compará-la com a dos frutos. Aproveitamos ainda, os resultados desta análise química, para confrontar com os dados obtidos com o látex dos frutos, objetivando uma justificativa plausível à baixa atividade observada no teste bioautográfico para o látex dos híbridos, comparado com os látex dos parentais e maior susceptibilidade aos ataques de herbívoros para os híbridos.

A análise do látex dos ramos seguiu o mesmo protocolo estabelecido para o látex dos frutos. Os cromatogramas dos látex dos ramos (fração apolar e polar dos híbridos e dos parentais) das espécies escolhidas são mostrados nas Figura 16, 17 18 e 19 (pág. 78-81). Os resultados das análises com os percentuais relativos dos constituintes da fração apolar de cada espécie, são mostrados na Tabela 27 (pág. 82). A identificação das substâncias (Quadro 4, pág. 83) foi realizada de acordo com os critérios adotados para identificação dos constituintes químicos no látex dos frutos e a numeração dos compostos caracterizados é a continuação da numeração adotada para o látex dos frutos (quadro 2, pág. 22)

Látex dos Ramos



Látex dos Frutos

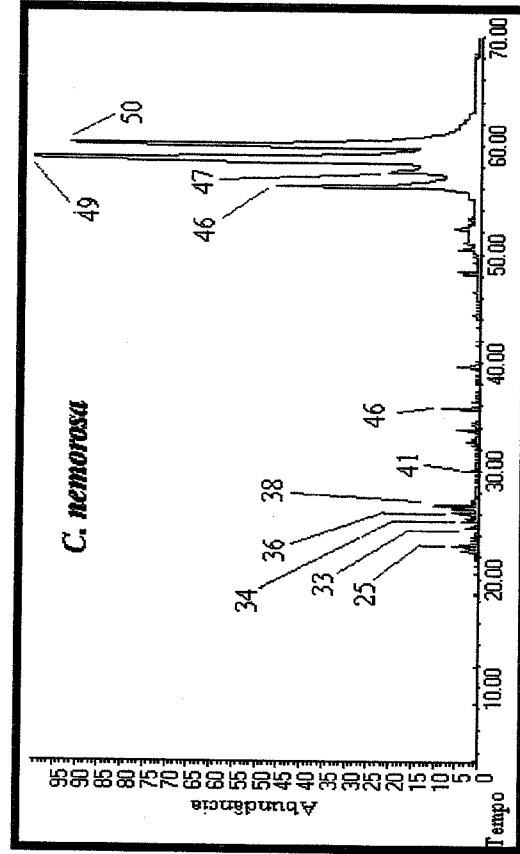
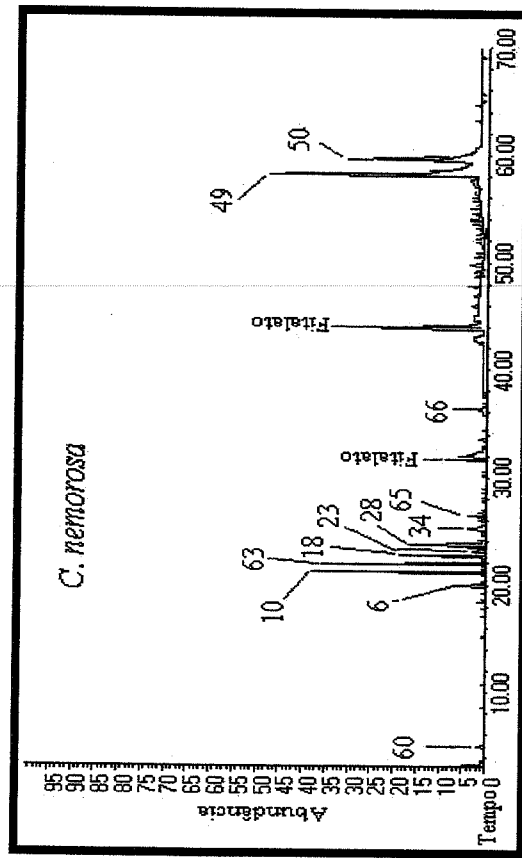
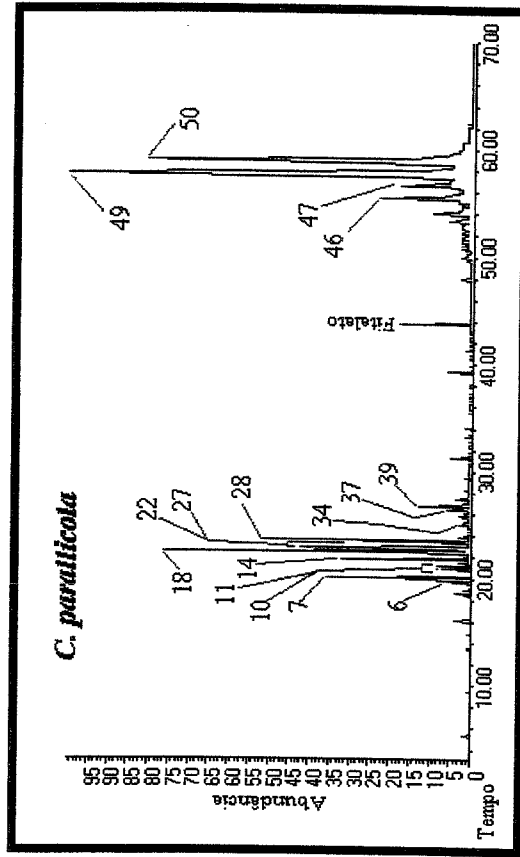
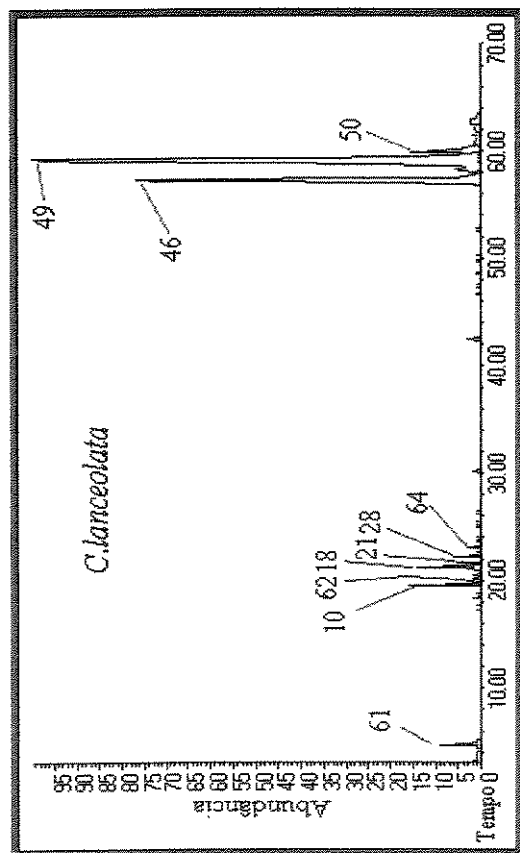
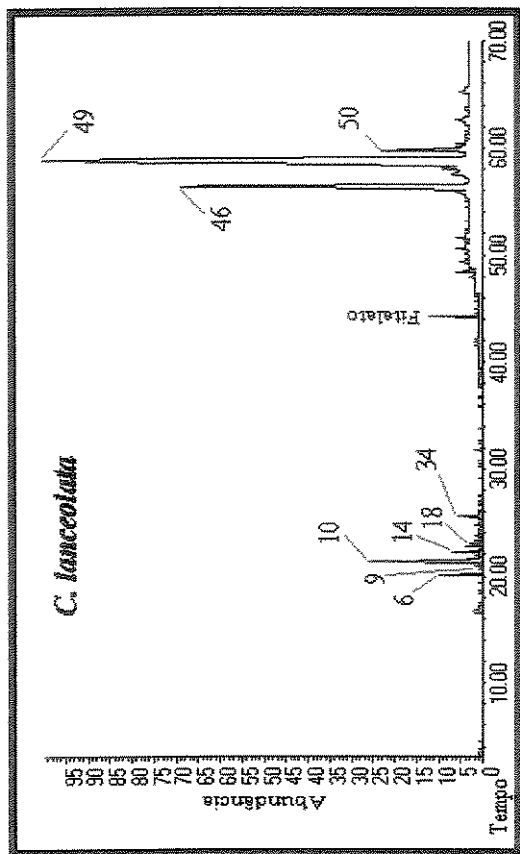


Figura 16 Cromatogramas das frações apolares (R_f entre 0.90-0,6, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) do látex dos ramos de *Clusia*.

Látex dos Ramos



Látex dos Frutos



Látex dos híbridos

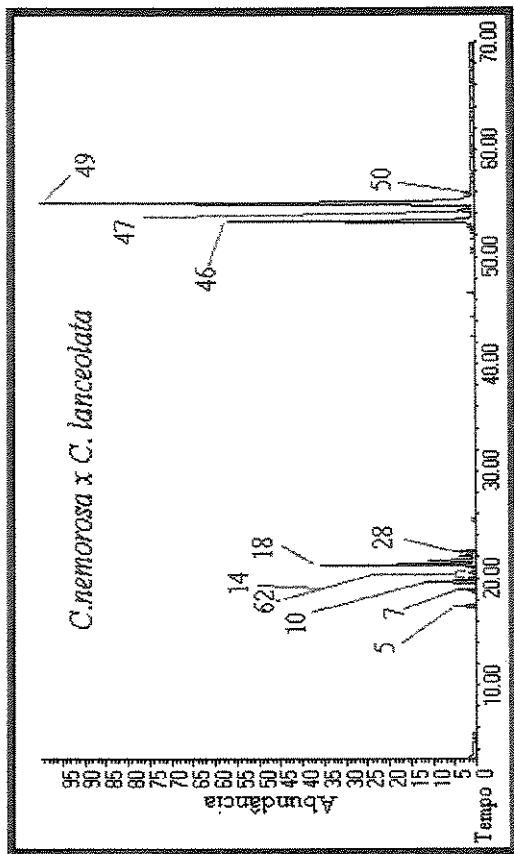
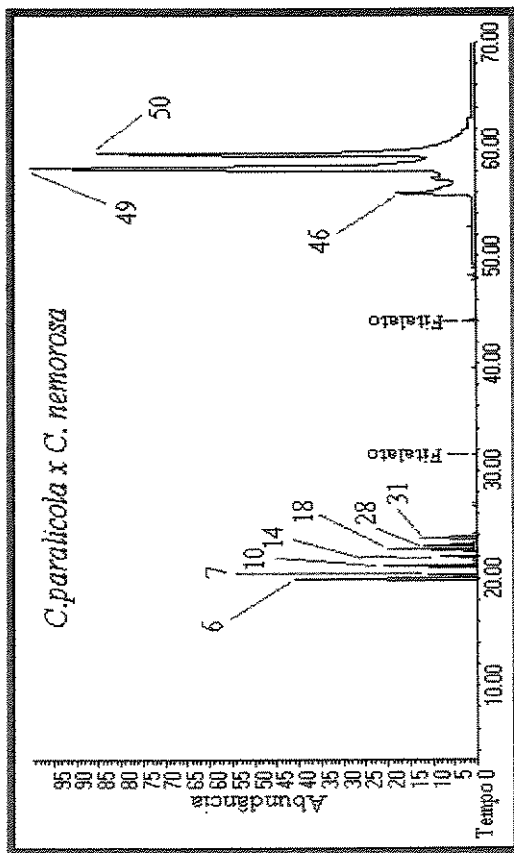


Figura 17 Cromatogramas das frações apolares (R_f entre 0,90 e 0,60, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) do látex dos ramos de híbridos e parentais de *Clusia*.

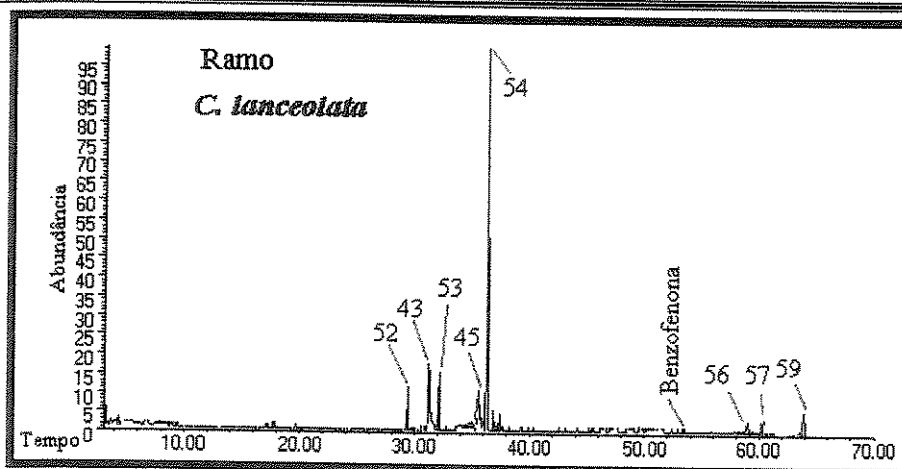
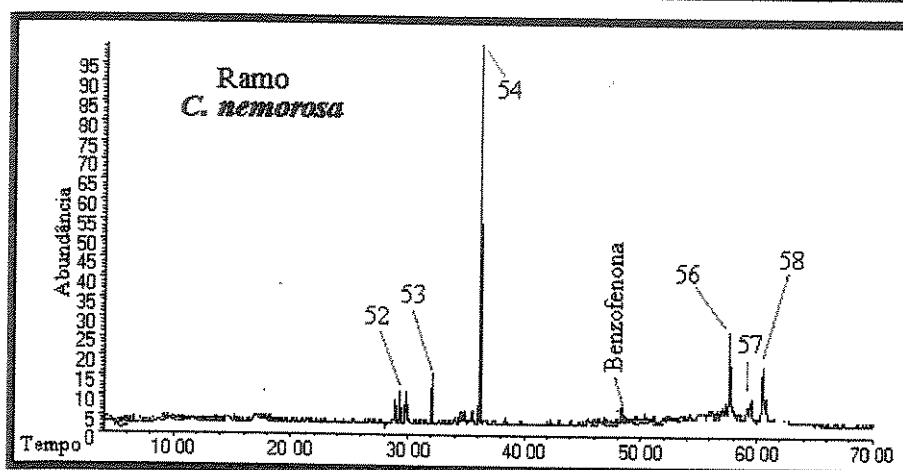
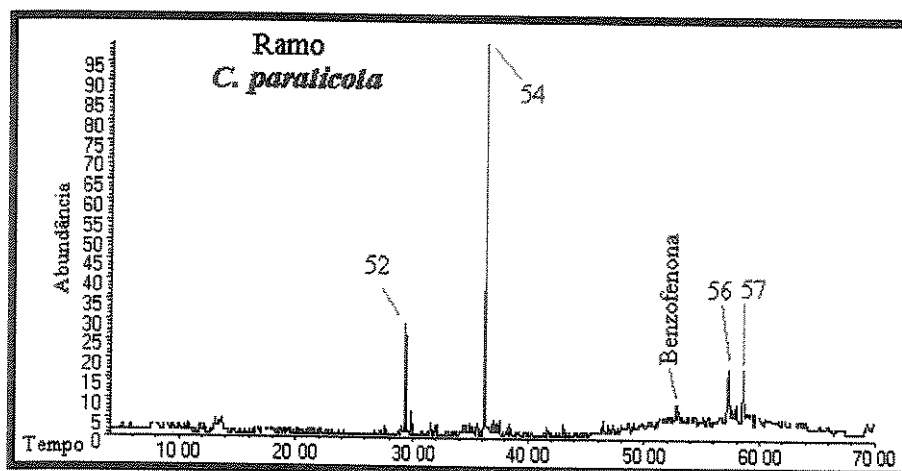


FIGURA 18 Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos ramos de espécies de *Clusia*.

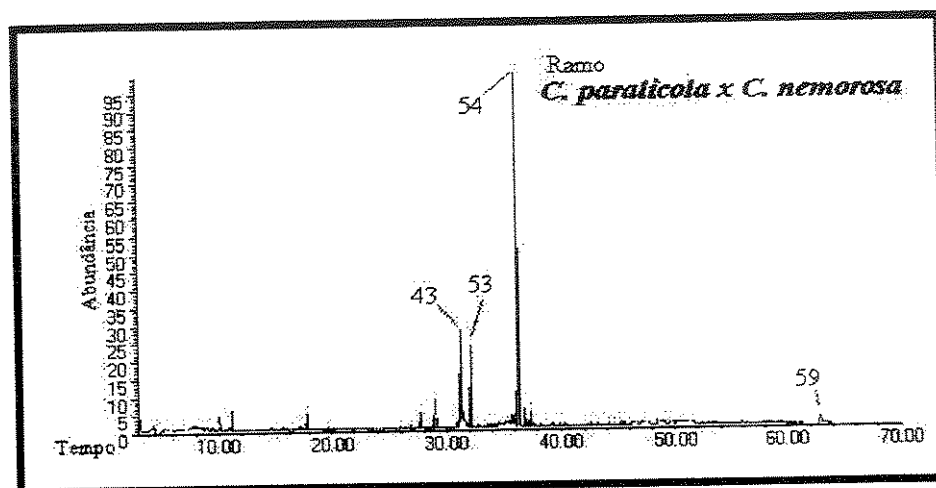
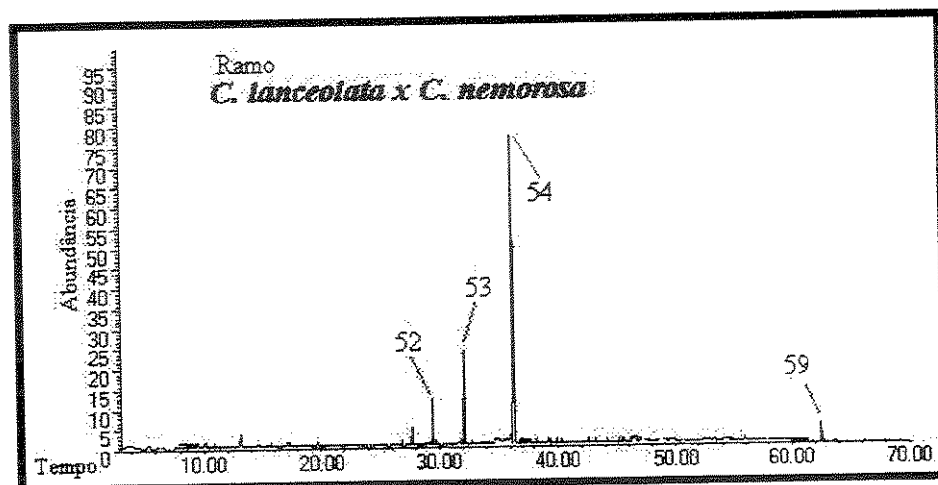


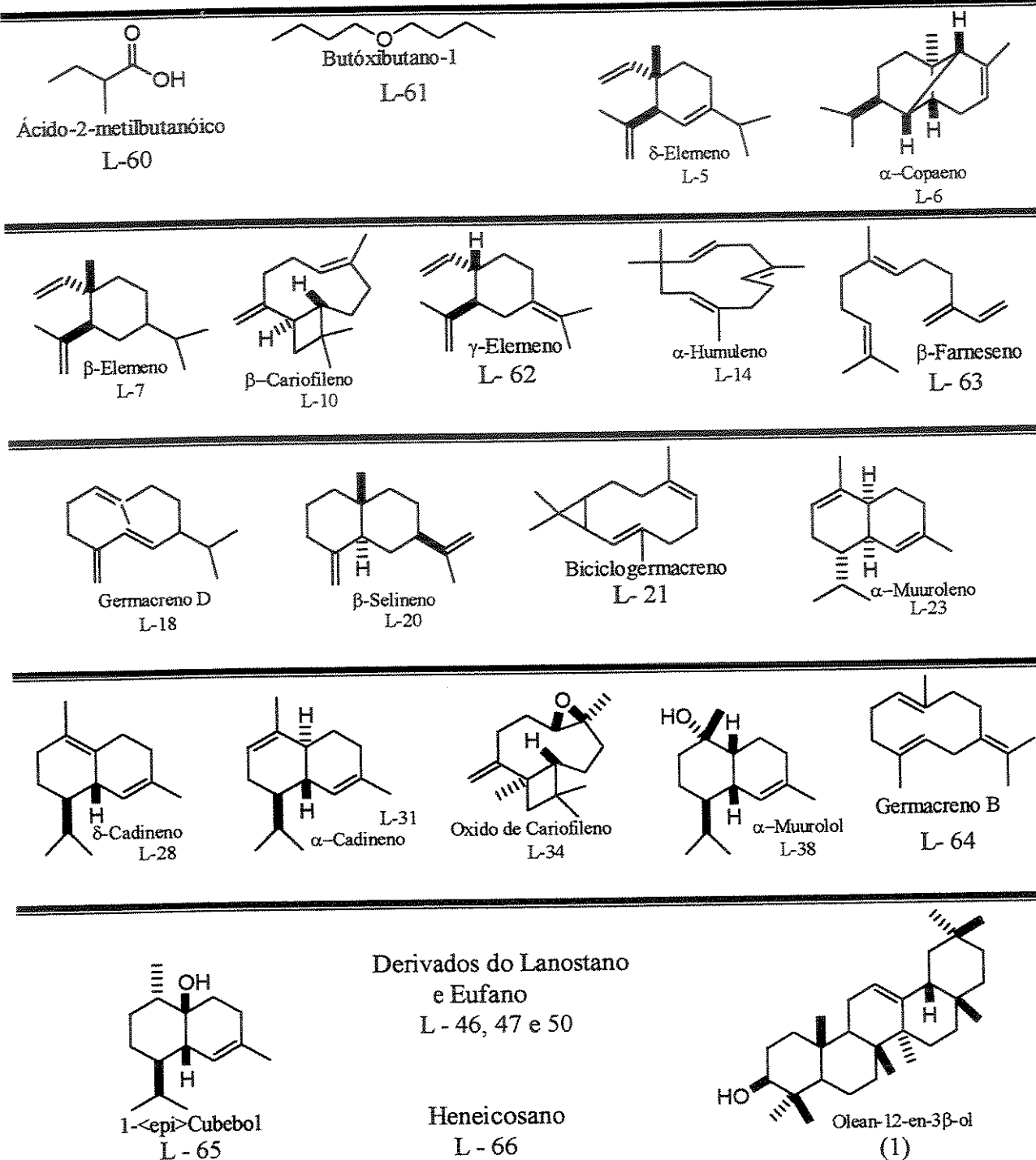
FIGURA 19 Cromatogramas das frações polares metiladas ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente) dos látex dos ramos de híbridos de *Clusia*.

Tabela 27 Composição Percentual dos Constituintes Químicos dos Látex dos Ramos em Espécies do Gênero *Clusia**

Nº PICO	Compostos	IR _e Exp ^a	IR _e Lit. ^b	PARA	NEMO	LANCE	Pa x Ne	La x Ne
60	Ácido 2-metilbutanoico	858	-		0,46			
61	Butoxibutano	906	-			1,20		
5	δ-Elemeno	1338	1339					1,25
6	α-Copaeno	1379	1376	0,84	0,92		3,88	
7	β-Elemeno	1393	1391	0,77			1,01	0,80
10	β-Cariofileno	1421	1418	3,02	7,05	1,69	2,05	2,51
62	γ-Elemeno	1436	1433			0,75		0,66
14	α-Humuleno	1454	1454	0,85			0,79	1,31
63	β-Farneseno	1457	1458		4,54			
18	Germacreno D	1482	1480		4,57	2,08	2,35	10,12
20	β-Selineno	1492	1485	2,63				
21	Biciclogermacreno	1500	1494			0,59		
23	α-Muuroleno	1504	1499		0,85			
28	δ-Cadineno	1522	1524	0,27	3,98	0,57	1,34	0,69
31	α-Cadineno	1533	1538				0,12	
64	Germacreno B	1562	1556			0,37		
34	Oxido de Cariofileno	1586	1581		2,22			
65	1-<epi> Cubenol	1633	1627		0,60			
38	α-Muurulol	1652	1645	0,17				
	Ftalato	1870	-		1,08		0,10	
66	Heneicosano	2100	-		0,74			
	Ftalato	2553	-		13,15		0,31	
46	Eufano/lanostano	3224	-	4,71		24,71	8,47	22,99
47	Eufano/lanostano	3338		2,96		T	t	1,59
49	Olean-12-en-3β-ol	3379		50,90	19,29	58,48	39,11	50,08
50	Eufano/lanostano	3421		32,13	17,28	4,26	38,75	1,59
	Não identificados			0,67	23,19	3,66	1,65	6,34
	Total			99,92	99,92	99,94	99,93	99,93

*Da esquerda para direita: *C. paralicola*, *C. nemorosa*, *C. lanceolata*, *C. paralicola* x *C. nemorosa* e *C. lanceolata* x *C. nemorosa*. ^aIR_e Exp = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de Van den Dool e Kratz⁶¹. ^bIR_e Lit. = Índice de retenção da literatura⁶². t=traço.

Quadro 4 Compostos identificados nas frações apolares no látex dos ramos



Como esperado, as composições químicas dos látex dos ramos são semelhantes às aquelas obtidas para os látex dos frutos, ou seja, as faixas apolares são constituídas basicamente por sesquiterpenos e triterpenos presentes nas diferentes espécies em abundância variáveis. Não foram detectados sesquiterpenos oxigenados no látex dos ramos dos híbridos. A principal diferença observada entre os látex provenientes dos ramos de híbridos e os respectivos parentais foi a ausência, no látex dos híbridos, de benzofenonas e derivados do tocoferol e do ácido oleanenólico.

A maior vulnerabilidade dos híbridos aos ataques de microorganismos pode ser justificada pela ausência, nestes híbridos, além das benzofenonas dos compostos derivados do tocoferol e o ácido oleanenólico, os quais mostraram-se ativos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*, respectivamente (Tabela 8, pág 38). No entanto, o que leva os herbívoros escolherem um híbrido ao invés de um parental? É provável que a resposta esteja na presença, e não na ausência, de uma classe de metabólitos ou uma dada substância que os atraiam. Comparação entre os constituintes sesquiterpenos do látex de híbridos e dos parentais, revelou uma diferença sutil, que pode ser um dos fatores que contribua para que os herbívoros tenham preferência pelos híbridos. Estou me referindo a ocorrência de sesquiterpenos de menor peso molecular nos híbridos. Ou seja, nos parentais, foram detectados sesquiterpênicos oxigenados e não oxigenados, enquanto que nos híbridos, apenas sesquiterpenos não oxigenados estão presentes, pelo menos em quantidades detectáveis. Estes sesquiterpenos, menos oxigenados, são mais facilmente volatilizados para o meio, os quais podem com seu aroma, atrair predadores, neste caso, o herbívoro que se alimentou das folhas do híbrido, mostrado na foto da Figura 5C, pág. 36. Entretanto, é aconselhável realizar novas análises químicas com um número maior de híbridos e experimentos de campo com o herbívoro.

1.2.1-ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERA EPICUTICULAR DE *CLUSIA*

O estudo da composição química de ceras epicuticulares abrange diferentes campos de pesquisas, incluindo a taxonomia, permeabilidade cuticular e interações planta-inseto. Com relação a este último, alto nível de triterpenos (β -amirina) em folhas de azaléia (*Rhododendron spp.*) está relacionado à sua resistência contra vários insetos⁸⁵. Sendo assim, decidimos analisar o extrato clorofórmico da cera epicuticular de dois híbridos e seus respectivos parentais e com base nos constituintes químicos analisados tentar correlacionar a composição química com a resistência contra herbívoros*.

De acordo com a literatura, a composição química de ceras epicuticulares é bastante diversificada, sendo constituída normalmente por ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, triterpenos, esteróis e flavonóides⁸⁶. A concentração relativa das classes de compostos entre as espécies do mesmo gênero é diferente, e às vezes, até entre as da mesma espécie, isto ocorre devido às mudanças na produção de cera de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta⁷¹. Os extratos obtidos com as folhas frescas foram extraídos em banho de ultra-som por trinta minutos em clorofórmio. Os menores percentuais de cera foram obtidos com o híbrido *C. lanceolata* x *C. nemorosa* e com o parental *C. lanceolata*. (Tabela 28, pág. 86). A numeração dos compostos caracterizados nas ceras epicuticulares é a continuação daquela adotada para o látex dos frutos e ramos (quadros 2, 3 e 4 pág 58, 76 e 83 respectivamente) , precedida pela letra “F” (quadro 5, pág. 89).

⁸⁵ Shepherd, T. Robertson, G.W. Griffiths, D.W. Birch, N.E. 1999. *Phytochemistry*, 55: 1239-1254.

* Este é o primeiro relato da composição química de ceras epicuticulares de espécies pertencentes ao gênero *Clusia*.

⁸⁶ Post-Beittenmiller, D. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1986, 47, 405.

Tabela 28 Percentual de extrato clorofórmico da cera epicuticular em *Clusia*

ESPÉCIE	% EXTRATO CHCl ₃
<i>C. lanceolata</i> x <i>C. nemorosa</i>	0,27
<i>C. paralicola</i> x <i>C. nemorosa</i>	0,38
<i>C. nemorosa</i>	0,46
<i>C. paralicola</i>	0,41
<i>C. lanceolata</i>	0,09

Os extratos foram analisados por CG/EM, possibilitando a caracterização de 31 compostos (Figuras 20 e 21, pág. 87 e 88). As principais classes de metabólitos que compõem as ceras das clúsias estudadas são sesquiterpenos, hidrocarbonetos, com número ímpar de carbono, e triterpenos. (Tabela 29).

Tabela 29 Abundância relativa dos constituintes das ceras separados por classe química.

Espécie	% das áreas dos compostos			
	A	B	C	D
<i>C. lanceolata</i>	24,6	14,8	50,8	-
<i>C. nemorosa</i>	2,2	13,4	71,0	10,3
<i>C. paralicola</i>	0,9	56,5	28,2	5,7
<i>C. paralicola</i> x <i>C. nemorosa</i>	59,9	33,2	4,3	-
<i>C. lanceolata</i> x <i>C. nemoros</i>	6,3	59,2	26,2	5,3

A-Sesquiterpenos, B-Hidrocarbonetos (>C-15), C-Triterpnos e D-Aldeídos de Cadeia longa.

Dentre os triterpenos caracterizados podemos destacar a presença, em quase todos os extratos, de β -amirina (1), lupeol (23), lupenona (33), quadro 1, pág 22 e friedelanona (F-81). Os sesquiterpenos não oxigenados são majoritários, com predominância do β -Cariofileno (L-10) quadro 2, pág. 58, exceto no extrato da espécie *C. paralicola*.

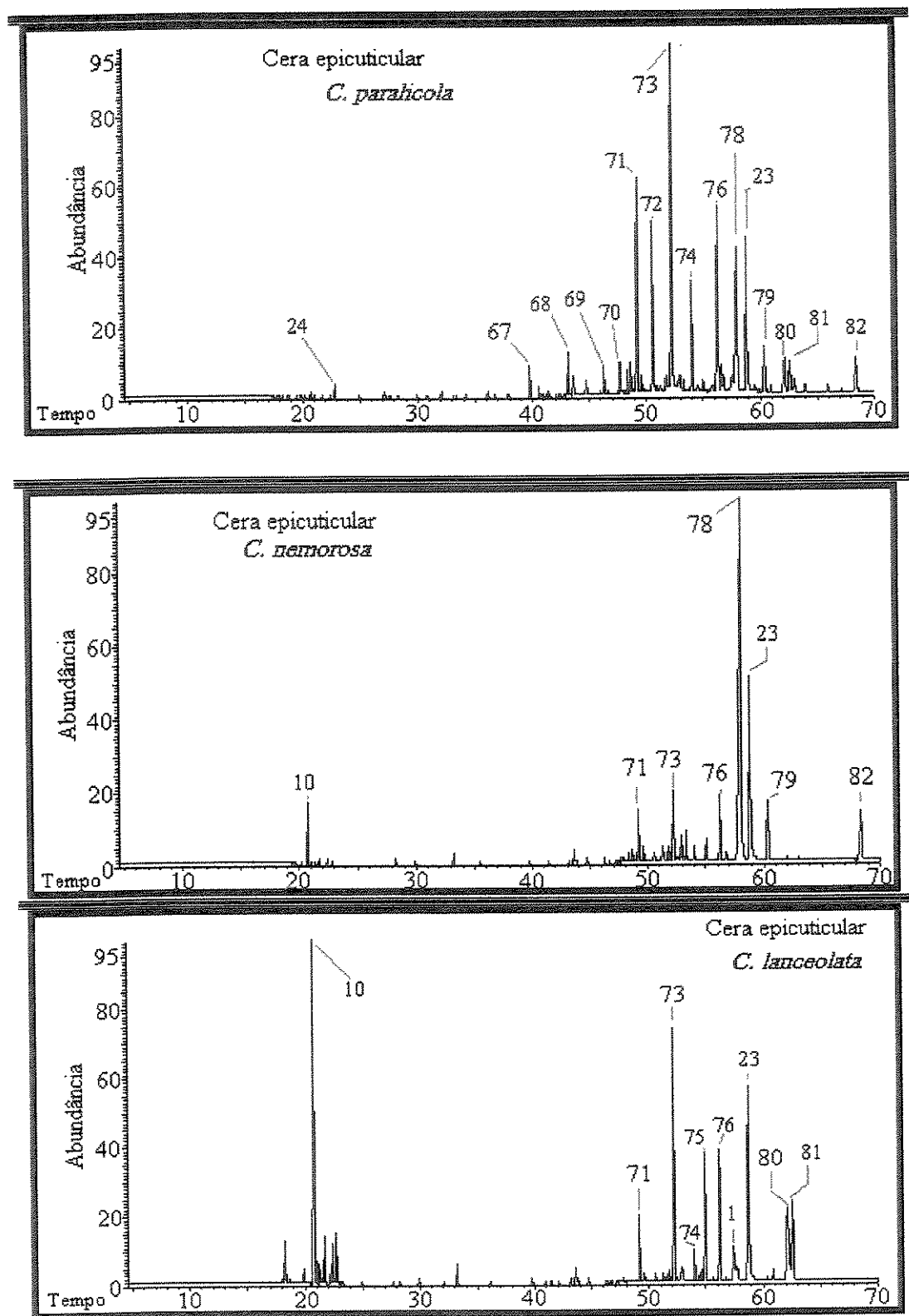


Figura 20 Cromatograma dos extratos da cera epicuticular de espécies *Clusia*.

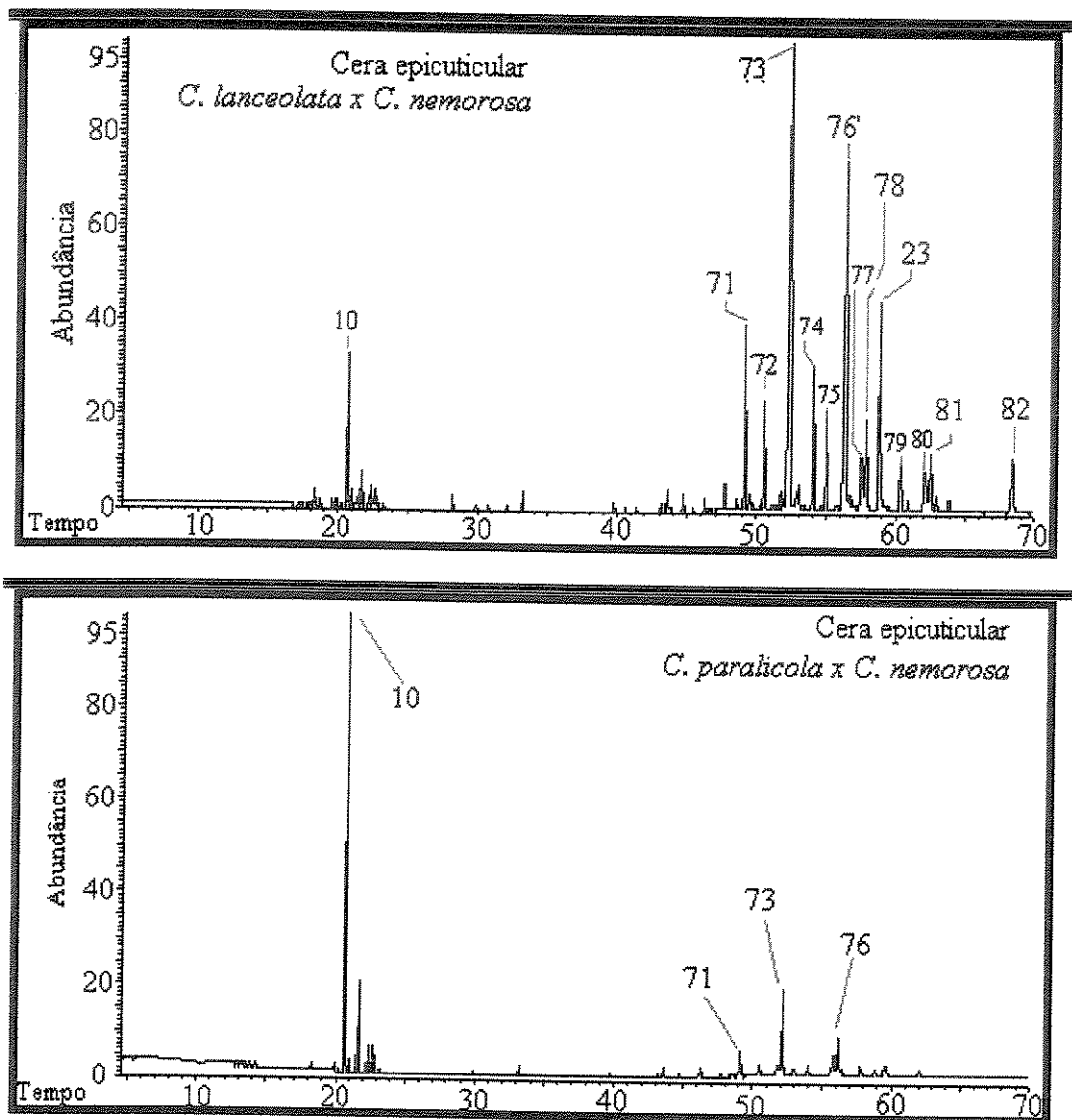
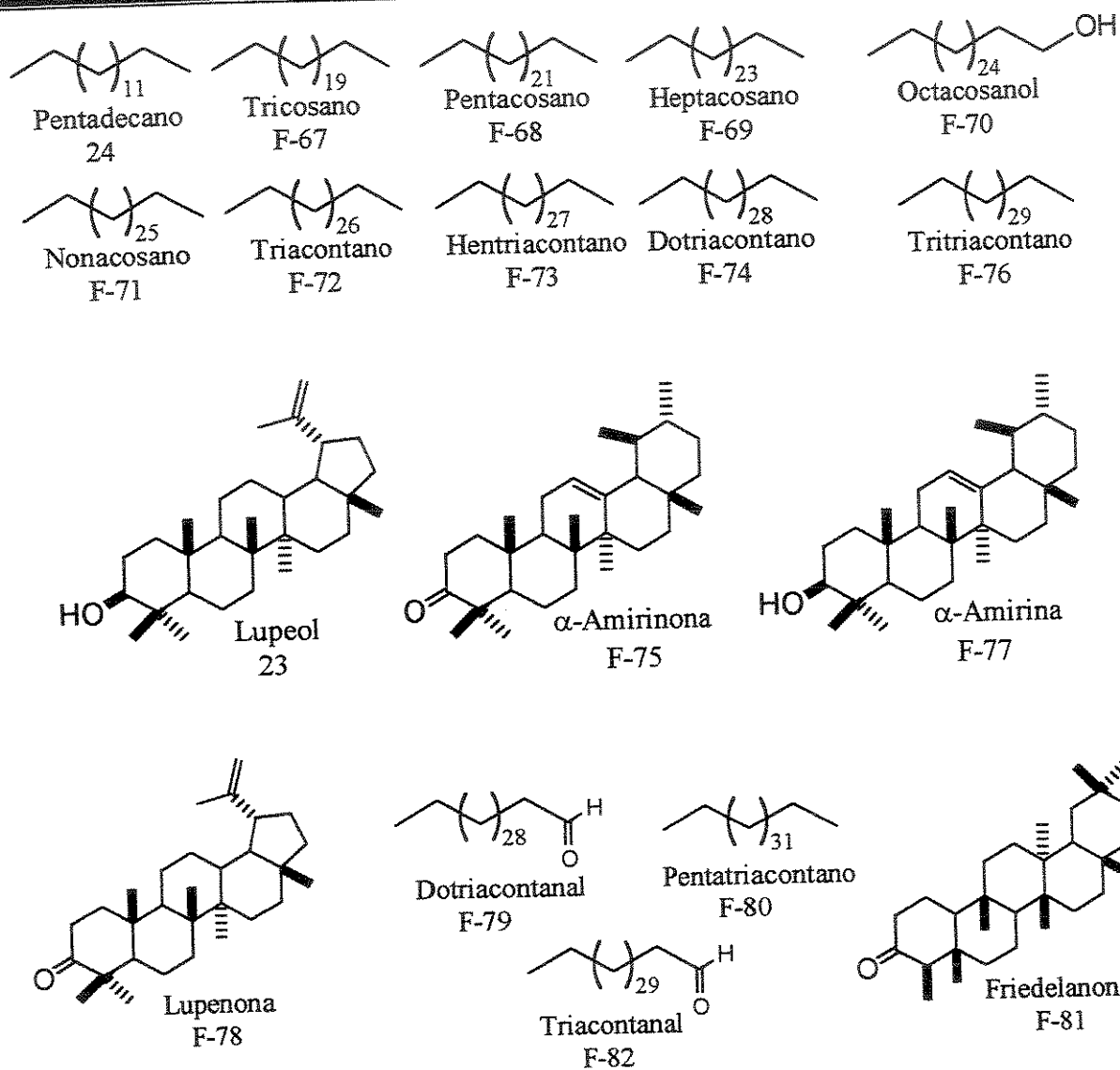


Figura 21 Cromatograma dos extratos das ceras epicuticulares de híbridos de *Clusia*.

Analisando o percentual das áreas, relacionado às classes químicas que constituem as ceras analisadas, observa-se que as ceras de ambos os híbridos são constituídas por menores quantidades de triterpenos comparado com as dos parentais, o que tornariam, os híbridos, mais vulneráveis aos ataques de predadores, já que maiores concentrações de triterpenos estejam relacionadas à sua resistência contra insetos herbívoros⁸⁵. Estes resultados somados àqueles obtidos para o látex

revelam para estas duas fontes de metabólitos, o látex e as ceras epicuticulares, uma possível relação na proteção das espécies contra ataques de insetos herbívoros.

Quadro 5 Compostos identificados na cera epicuticular de *Clusia*



1.3- ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DO LÁTEX DE *CLUSIA*.

1.3.1-ISOLAMENTO DOS PRODUTOS NATURAIS

Os compostos (78) e (18) foram obtidos a partir do látex bruto dos frutos de *C. grandiflora*. O procedimento de extração do látex encontra-se descrito no capítulo IV, parte experimental, no item 3.1, pg.136.

Uma alíquota de 90 mg do látex, foi submetida a CCDP, e eluída 3 vezes com uma mistura de solventes hexano e acetato de etila 10%. Duas das faixas de menor R_f (0,32 e 0,41) mostraram fluorescência no UV visível (254 nm e 365 nm). Com a finalidade de se ter uma idéia dos constituintes presentes no látex, a cromatoplaça, revelada no UV, teve a sílica coberta por um vidro (20x20 cm), deixando apenas 0,5 cm exposta para revelação com solução (para borrifar) de *p*-anisaldeído. As faixas de interesse foram duas, uma revelada no UV em 254 nm, e em *p*-anisaldeído, mostrando uma mancha forte de coloração marron. A outra, mostrou uma mancha azul clara, não revelada no UV. Após isolamento, ambos os compostos se revelaram puros quando submetidas a CCD. Da faixa de menor R_f (0,32) obteve-se 8,1 mg do composto (78) e de maior R_f (0,42), 5,4 mg do composto (18).

Os compostos (18A), (79) e (80) foram isolados na forma de ésteres metílicos, após tratamento com uma solução etérea saturada com CH_2N_2 a partir do látex bruto do fruto de *C. grandiflora*. Uma alíquota de 100 mg do látex foi tratada com uma solução etérea de CH_2N_2 , como descrito no item 3.1.2. e em seguida submetida CCDP. Para conseguir uma melhor separação a placa foi eluída duas vezes usando como eluente a mistura de solventes hexano/ acetato de etila 2%. Este sistema de solvente promoveu uma separação do extrato metilado em três faixas principais. O composto presente na faixa de maior R_f (0,63) revelou-se puro, quando submetido a CCD, sendo denominado de composto (80) (8,0 mg). As

outras duas faixas de menor R_f (0,53 e 0,48) foram reunidas e extraídas com uma mistura de solventes hexano e acetato de etila 10%, e analisadas por CG/EM, revelando a presença de 4 compostos (Figura 22).

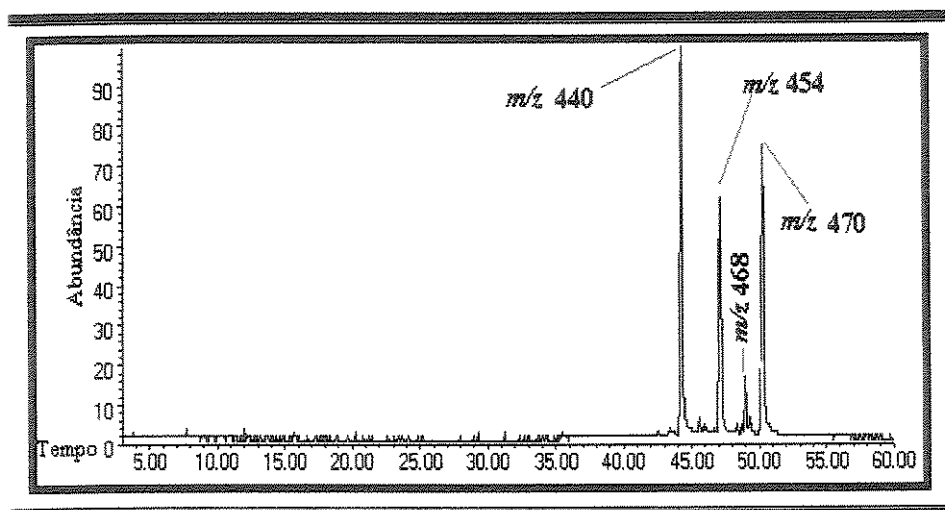


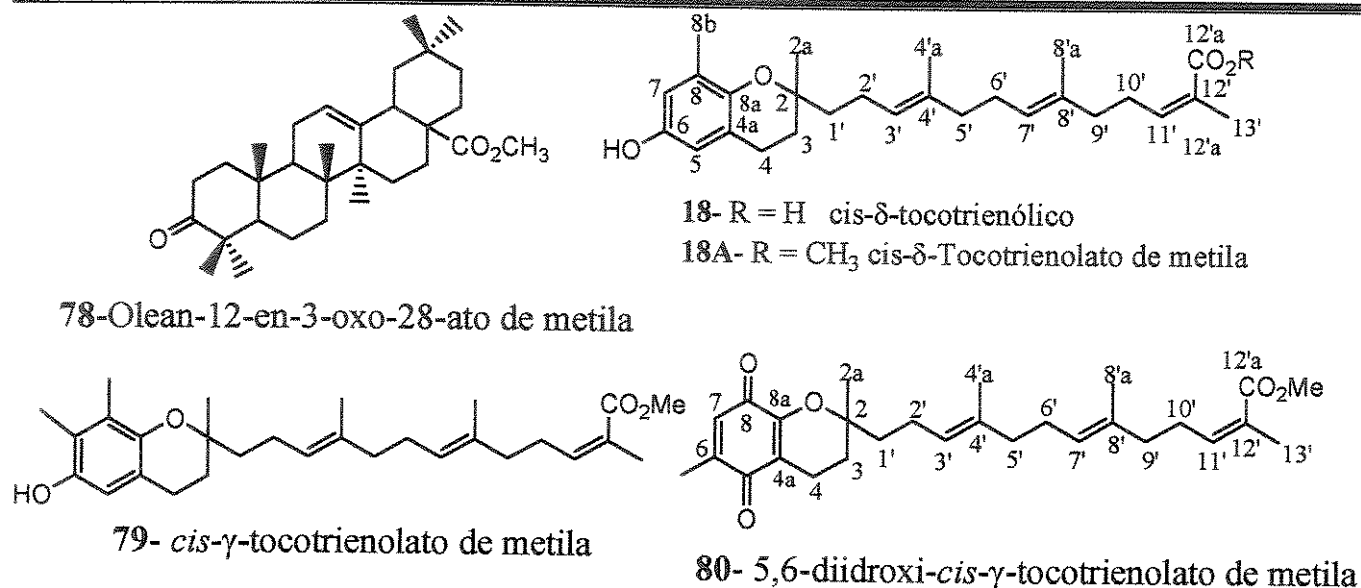
Figura 22 Cromatograma após junção das faixas de R_f (0,48 e 0,53) do látex dos frutos de *C. grandiflora*.

O primeiro o terceiro e o quarto picos, no cromatograma da figura 22, referem-se aos ésteres metílicos dos ácidos *cis*- δ -tocotrienólico⁴⁴ (18) (quadro 1, pag. 22), olean-12-en-3-oxo-28-óico (L-58) e olean-3-oxo-28-óico (L-59) (quadro 3, pag. 76) respectivamente. Estes compostos apresentam um padrão de fragmentação dos compostos (78) e (18), previamente isolados do látex bruto, acrescidos de 14 unidades para o primeiro e terceiro picos e de 2 unidades para o quarto. A mistura, após análise por CG/EM, foi recromatografada fornecendo 7,4 mg do composto (18A), o qual foi facilmente caracterizado como o éster metílico do ácido *cis*- δ -tocotrienólico⁴⁴ (18) e 5,2 mg do compostos (79).

As estruturas encontram-se descritas no quadro 6. O composto (18) tem sido isolado como principal constituinte dos frutos de *C. grandiflora*⁴⁴, já os composto (78) é isolado pela primeira vez em espécies do gênero *Clusia* e até mesmo na família Guttiferae. Os compostos (79) e (80) são inéditos. A elucidação estrutural

destes compostos foi feita usando-se as técnicas espectroscópicas, principalmente a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, uni e bidimensional, de hidrogênio e carbono (gCOSY, HSQC, gHMBC, ^1H , ^{13}C , DEPT 135° e 90°).

Quadro 6 Estruturas isoladas do látex de *C. grandiflora*



A determinação estrutural dos compostos isolados (Quadro 6) foi realizada para cada composto isoladamente por meio das análises dos dados espectrais. Os derivados do tocoferol são encontrados no látex como ácidos livres e não nas formas metiladas.

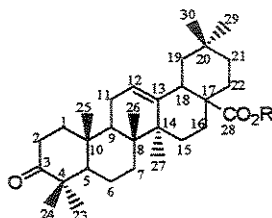
1.3.2-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (78)

O composto (78) foi obtido como um sólido branco. O espectro de massas de alta resolução forneceu o pico referente ao íon molecular em m/z 454.3445 e para o M^{+} , enquanto que a massa calculada para formula $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ é 454.3447. Os espectros desacoplado de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° exibiram a presença de 30 sinais de carbono, sendo 10 metilenos, 7 metílicos, 4 metínicos e 9 quaternários

($C_{30}H_{45}$). O RMN de 1H se caracteriza pela presença de um grande número de sinais (sete) possivelmente de grupos metílicos. Levando-se em consideração a existência de duas carbonilas, uma delas de ácido carboxílico, a fórmula molecular para o composto (78) é de fato $C_{30}H_{46}O_3$. As principais informações obtidas com o espectro de I.V. referem-se aos grupos carboxila e carbonila. É o caso de uma banda larga entre $3400-2500\text{ cm}^{-1}$, relacionada ao estiramento axial de O-H do grupo ácido. A banda do estiramento axial C-H ($2950-2856\text{ cm}^{-1}$) está superposta ao estiramento O-H. Os estiramentos de carbonila (C=O) para os ácidos carboxílicos são mais intensos do que os das cetonas. Esta informação em conjunto com dados de RMN de ^{13}C , obtidos para dois sinais de carbonos quaternários em δ 217,7 e 183,0 são característicos de carbono cetônico e de ácido carboxílico, respectivamente. Estes dados corroboram a presença destes grupos funcionais na molécula ao correlacionar as bandas de deformação axial de C=O, em 1687 cm^{-1} para um ácido carboxílico.

Análise do espectro de massas do composto (78) mostrou que os dois fragmentos iônicos de maiores intensidades (Esquema 3, pág.95), m/z 248 (100%) e 203 (95%), podem ser justificados por meio de uma clivagem característica do tipo “retro-Diels-Alder” (RDA), no anel “E”, originando o fragmento de m/z 248 (100%). Esta fragmentação é típica de triterpenos pentacíclicos, com esqueleto oleaneno e urseno Δ^{12} insaturados. O fragmento proveniente da “retro-Diels-Alder” se decompõe para originar o fragmento de m/z 203 (95%). Nestes triterpenos, um substituinte oxigenado no C-17 é eliminado mais rapidamente do que a perda de um radical metil. A natureza insaturada da molécula foi confirmada pela presença dos sinais em δ 143.6 (C_0) e δ 122.4 (CH) no espectro de carbono-13 e no de hidrogênio em δ 5,31. O espectro de RMN de 1H é consistente com a proposta estrutural, pois além do sinal de hidrogênio olefinico mostrou ainda sete singletes, para três hidrogênios cada, em δ 0,82, 0,91, 0,94, 1,04, 1,06, 1,09 e 1,15.

As correlações dos deslocamentos químicos dos carbonos foram realizadas por comparação, com valores dos átomos de carbono correspondentes, encontrados para o derivado éster metílico do ácido oleanólico^{21,83} (Tabela 30). Todas estas evidências nos levaram a designar o composto (78) como sendo o Ácido 3-oxo-Olean-12-en-28-óico.



1-R= H, Ácido Olean-12-en-3-oxo-28-óico

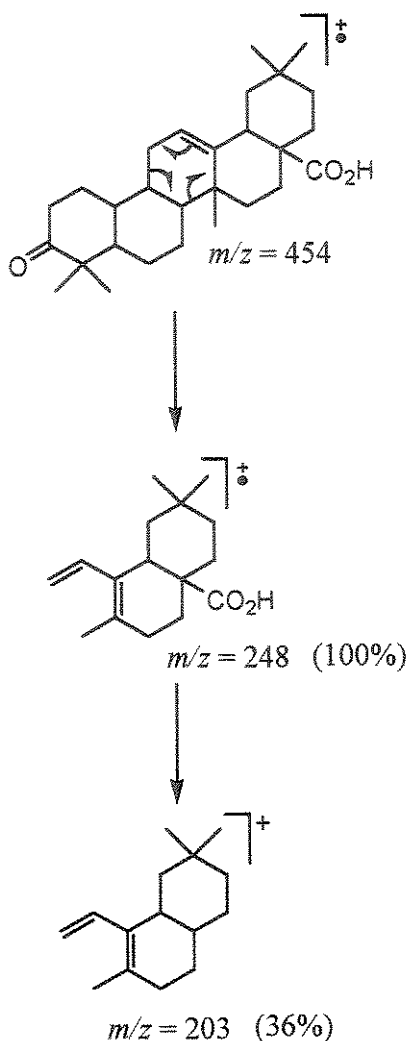
2*-R= CH₃, Olean-12-en-3-oxo-28-oato de metila

TABELA 30 Comparação dos Deslocamentos Químicos de carbono-13 (ppm, CDCl₃ e Tetrametilsilano como padrão interno) entre o Ácido 3-oxo-Olean-12-en-28-óico (78) e o respectivo éster metílico (2*).

C	78	2*	C	78	2*
1 CH ₂	39,1	39,1	16 CH ₂	23,5	23,5
2 CH ₂	34,2	34,2	17 C	46,6	46,7
3 C	217,7	216,8	18 CH	41,1	41,2
4 C	47,4	47,3	19 CH ₂	45,8	45,7
5 CH	55,3	55,2	20 C	30,7	30,5
6 CH ₂	19,6	19,5	21 CH ₂	33,8	33,7
7 CH ₂	32,2	32,1	22 CH ₂	32,4	32,1
8 C	39,3	39,1	23 CH ₃	26,4	26,4
9 CH	46,9	46,7	24 CH ₃	21,5	21,3
10 C	36,8	36,6	25 CH ₃	15,0	14,8
11 CH ₂	22,8	23,0	26 CH ₃	17,0	16,7
12 CH	122,4	121,9	27 CH ₃	25,8	25,7
13 C	143,6	143,5	28 C	183,0	177,7
14 C	41,8	41,7	29 CH ₃	33,1	33,0
15 CH ₂	27,7	27,6	30 CH ₃	23,6	23,5

^aTori, K.; Seo, S. And Tomita, Y., 1975. *Tetrahedron letters*. 1, 7-10.

Esquema 3 Principais fragmentações do ácido 3-oxo-Olean-12-en-28-óico



1.3.3-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS (18) e (18A)

No espectro na região do U.V. observou-se duas absorções em λ_{max} : 224nm e 298nm, consistente com cromóforos do tipo fenol e um grupo carboxílico α,β -insaturado, respectivamente.. Na região do I.V., o espectro revelou uma banda de absorção em 1688cm^{-1} , relacionada à vibração de deformação axial de uma carbonila, provavelmente conjugada. Observou-se, através da RMN de ^{13}C , 27 sinais com deslocamentos químicos diferentes, cujos padrões de hidrogenação foram estabelecidos pela análise do DEPT 135° e 90° , sendo observados 5 carbonos

metínicos, 8 metilênicos, 5 metílicos e por diferença 9 carbonos não hidrogenados. Análise por espectrometria de massas de alta resolução forneceu o pico íon molecular m/z 426.2775 que foi compatível com o valor 426,2770, calculado para $C_{27}H_{38}O_4$. Análise de RMN de 1H revelou dois sinais em δ 6,39 e δ 6,49 que são característicos de um sistema aromático acoplado em posição *meta* ($J_4 = 2,4\text{Hz}$) e para três hidrogênios olefinicos, provavelmente de unidades isoprenílicas, um dos quais em posição β ao grupo carboxila, estes sinais foram confirmados pela aquisição de espectros de RMN bidimensionais através das correlações homonuclear de $^1H \times ^1H$ (COSY) e heteronuclear de $^1H \times ^{13}C$ a uma ligação (HSQC), respectivamente. Com o auxílio do espectro de RMN 2D gHMBC, foi possível estabelecer as principais conectividades a longa distância (3 ligações), não restando dúvida na atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos. Os dados obtidos, e inequivocamente atribuídos para o composto (18), coincidem com os dados reportados para o Ácido *cis*- δ -tocotrienólico⁴⁴, isolado a partir dos frutos de *C. grandiflora*, como principal constituinte. A configuração “*cis*” da dupla em 11’ foi determinada através da comparação do deslocamento químico de C-13 do carbono α metílico em δ 20,7 da α_2 -guttiiferina, que também corresponde ao do ácido angélico, mas não ao do ácido tíglico (11,9)⁸⁷ (Figura 23).

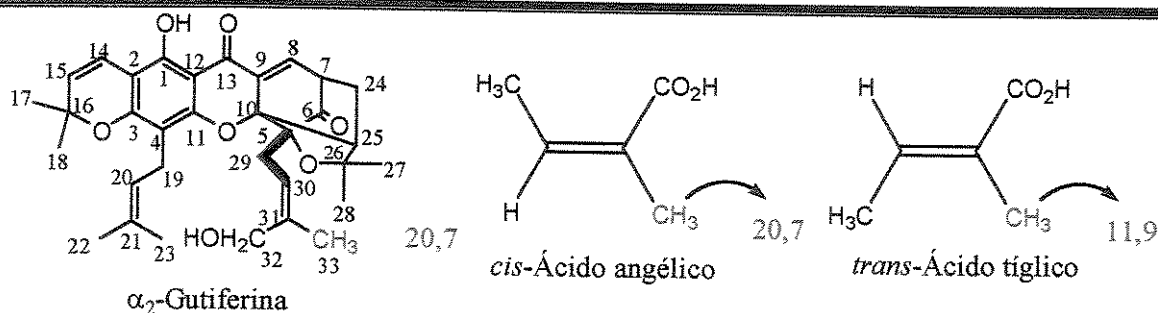


Figura 23 Comparação entre o deslocamento químico (δ) de C-13 do carbono metílico da α_2 -guttiiferina, ácido angélico e do ácido tíglico.

⁸⁷ Vogeli, U. 1975. *Org. Mag. Res.*, 7, 617.

Os espectros do composto (18A) apresentaram um perfil bastante semelhante aos do Ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18). As mesmas absorções, observadas para o composto (18), referentes aos cromóforos do tipo fenol e ácido carboxílico α,β -insaturado foram observadas, para (18A), no espectro de U.V.. O espectro de massas mostrou o pico do íon molecular com 14 unidades a mais do que o composto 18. Considerando que o composto 18A foi isolado a partir de um extrato, o qual foi previamente metilado com CH_2N_2 , considerando os sinais em δ 3,60 com integração para 3 hidrogênios, no espectro de RMN de ^1H e δ 51,2 no espectro de RMN de ^{13}C , revelado no DEPT 135° como um carbono metílico e considerando ainda, as bandas de absorções, características de ésteres de ácidos α,β -insaturados, na região do I.V. em 1716cm^{-1} e na região entre 1377cm^{-1} – 1160cm^{-1} relacionados, respectivamente às vibrações de deformações axiais de C=O e C-O, o composto (18A) é o éster metílico do ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18).

1.3.4-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (79)

O composto (79) foi obtido na forma de um óleo amarelado. O espectro de massas obtido na análise por CG/EM (Figura 22, pág. 91), mostrou como íon molecular m/z 454, que são 14 unidades a mais do que o éster metílico do ácido *cis*- δ -tocotrienólico. A análise de RMN de ^{13}C revelou 29 sinais com diferentes deslocamentos químicos, os quais, por meio do DEPT 135° e 90° foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação como sendo 7 carbonos metílicos; 8 metilênicos; 4 metínicos e 10 não hidrogenados ($\text{C}_{29}\text{H}_{41}$). Esta análise descartou a possibilidade de que o aparecimento das 14 unidades a mais para o composto (79), tenha sido proveniente da metilação do látex, já que as análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicaram a presença de apenas uma metoxila em δ 3,73 com integração para 3 hidrogênios e δ 51,2 para um carbono do tipo metílico. O espectro de massas de alta resolução forneceu o íon molecular em m/z 454.3084 e

calculado para $C_{29}H_{42}O_4$ foi 454.3083 daltons. O composto (79) apresentou o mesmo padrão de fragmentação revelado para o composto (18A), com 14 unidades a mais para os dois picos mais intensos de m/z 151 e m/z 191 para o composto (79) e m/z 137 e m/z 177, para (18A) (Esquema 4, pág. 99). Comparando os dados espectrais registrados para o composto (79) com os obtidos para (18A), ficou claro que ambos os compostos pertencem à mesma classe química, diferindo no padrão de substituição do anel aromático do sistema bicíclico. O argumento de que estes compostos pertencem à mesma classe química confirma-se através da análise de outros dados, é caso dos espectros nas regiões do U.V. e I.V., que apresentaram o mesmo perfil dos espectros obtidos para (18A). Quanto a diferença entre os dois compostos no sistema bicíclico, o espectro de RMN de 1H do composto (79) mostrou apenas um sinal atribuído para um hidrogênio pertencente ao sistema aromático em δ 6,37 e dois sinais para duas metilas aromáticas em δ 2,11 e 2,13, enquanto que para (18A) observou-se um sinal referente a uma metila aromática e um sistema de spins, H_1-H_2 , acoplados em meta. Os deslocamentos químicos dos carbonos atribuídos para o sistema bicíclico para o composto 79, mostraram-se coerentes com os dados reportados para o sistema bicíclico do γ -tocoferol⁸⁸ (Figura 24).

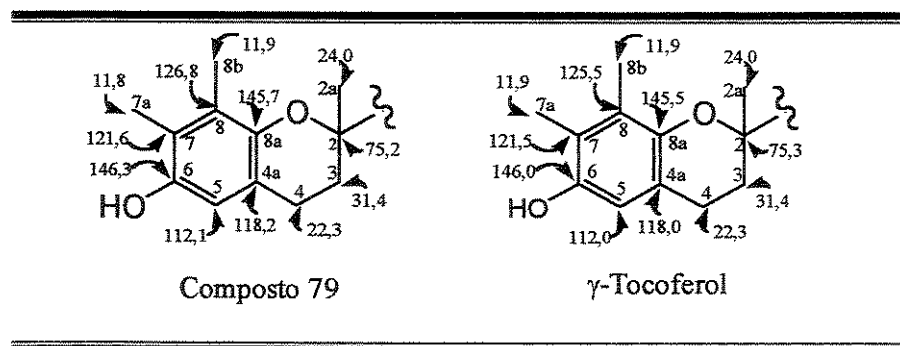


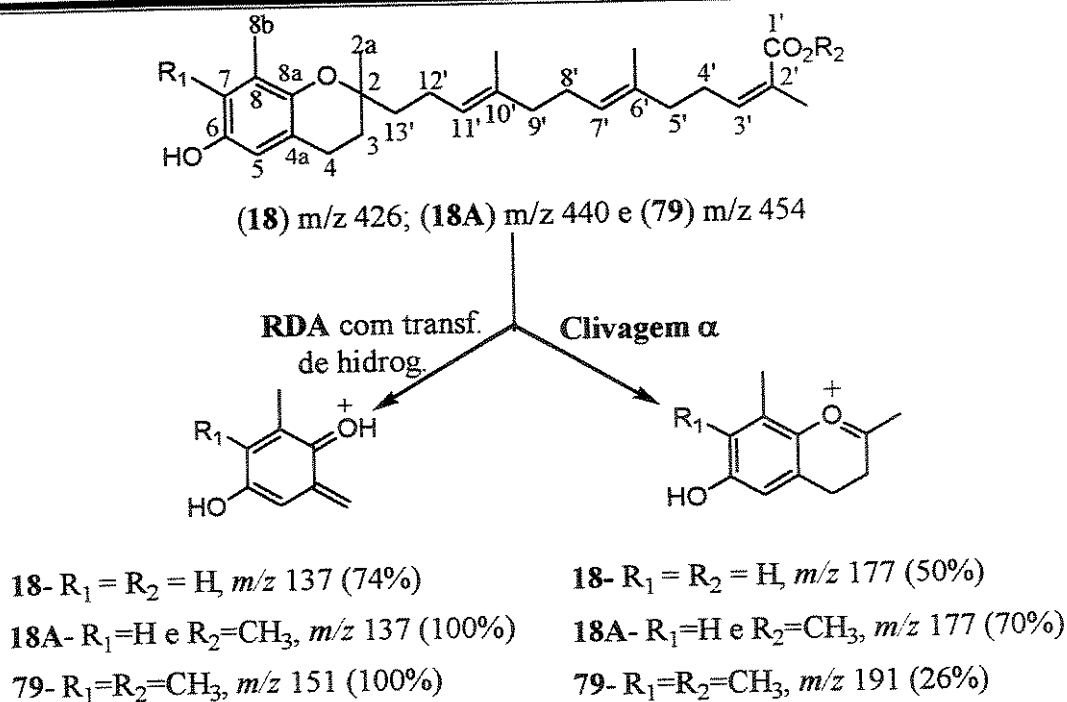
Figura 24 Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de carbono-13 entre o sistema bicíclico do γ -Tocoferol e deslocamentos obtidos para o composto (79). (Ambos os sinais foram obtidos em $CDCl_3$ e tetrametilsilano como padrão interno).

⁸⁸Matsuo, M. & urano, S.1976. *Tetrahedron*, 32, (1), 229-231.

Com base nesses dados e em conjunto com as informações deduzidas das análises dos espectros de RMN bidimensionais foi possível atribuir os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o composto (79), que apontam para a estrutura de um éster homólogo do ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18), denominado de *cis*- γ -tocotrienolato de metila.

A ocorrência, no espectro de RMN de ^{13}C , de um carbono metílico em δ 20,6, atribuído ao C-13', implica em uma configuração “*cis*” para a olefina em 11', mais uma vez, por comparação do sinal do metil (δ 20,7) do ácido angélico e da α -guttiferein (Figura 24, pág. 98). Na tabela 29 (pág. 100) estão descritos os deslocamentos químicos de carbono-13 para os constituintes majoritários do látex de *C. grandiflora*.

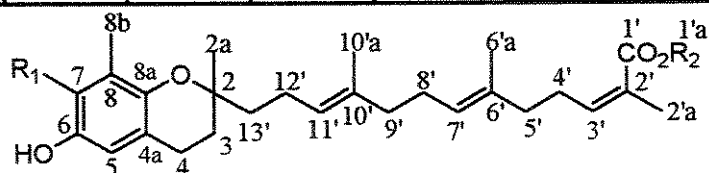
Esquema 4 Principais fragmentações para os derivados ácidos do tocoferol*, isolados do látex de *Clusia grandiflora*



(18)- Ácido *cis*- δ -tocotrienólico, (18A)- *cis*- δ -tocotrienolato de metila e (79)- γ -tocotrienolato de metila.

Tabela 31 Deslocamento químico de Carbono-13 de derivados do tocoferol isolados do látex de *Clusia grandiflora*, fração polar bruta e metilada ($R_f < 0.25$, sílica gel e hexano/acetato de etila como eluente).

C	18	18A	79	C	18	18A	79
2	75,3	75,3	75,2	10'	135,0	135,0	135,0
2a	24,1	24,0	24,0	10'a	15,9	15,9	15,8
3	31,4	31,3	31,4	9'	39,0	39,1	39,6
4	22,5	22,1	22,3	8'	26,6	26,5	26,6
4a	121,3	121,2	118,2	7'	125,0	124,9	124,9
5	112,6	112,6	112,1	6'	134,1	134,1	134,2
6	147,7	147,8	146,3	6'a	15,8	15,8	15,9
7	115,6	115,6	121,6	5'	39,0	39,5	39,1
7a	-	-	11,8	4'	28,2	28,0	28,0
8	127,4	127,3	126,8	3'	146,4	143,4	143,3
8a	146,0	145,8	145,7	2'	126,0	126,6	125,8
8b	16,1	16,1	11,9	1'	172,7	168,6	168,5
13'	39,6	39,6	39,7	1'a	-	51,2	51,2
12'	22,2	22,4	22,2	2'a	20,5	20,6	20,6
11'	124,3	124,3	124,4				



18- $R_1 = R_2 = H$ Ácido cis- δ -tocotrienólico

18A- $R_1 = H$ e $R_2 = CH_3$ cis- δ -Tocotrienolato de metila

79- $R_1 = R_2 = CH_3$ cis- γ -Tocotrienolato de metila

1.3.5-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (80)

O composto (80), obtido na forma de um óleo amarelado revelou através do espectro de massas como íon molecular m/z 456, apenas 2 unidades a mais do que o éster metílico do ácido *cis*- γ -tocotrienólico, composto (79). O espectro de RMN de ^{13}C do composto (80) revelou 27 sinais com diferentes deslocamentos químicos, onde o sinal em δ 39,6, devido a sua intensidade, foi atribuído para dois carbonos, totalizando assim 28 carbonos. Estes carbonos foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação por meio do DEPT 135° e 90° como sendo 6 carbonos metílicos; 8 metilênicos; 4 metínicos e 10 não hidrogenados ($\text{C}_{28}\text{H}_{38}$). A partir desta fórmula mínima faltam 82 unidades para se igualar ao referido íon molecular m/z 456, que podem ser justificadas pela presença de 2 hidrogênios e 5 oxigênios, ou seja, um composto com padrão de oxidação maior do que os isolados e caracterizados anteriormente. A análise por espectrometria de massas de alta resolução forneceu o pico íon molecular m/z 456,28161 que foi coerente com o valor 456,28153 daltons, calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_5$. No espectro no I.V. observou-se um estiramento em 1715cm^{-1} referente a uma carbonila conjugada e no espectro na região do U.V. observou-se absorção consistente com cromóforos do tipo fenol e carboxílicos α,β -insaturados, observado também nos compostos anteriormente caracterizados. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para as unidades isoprenílicas são coerentes com aqueles atribuídos para o composto (79) (Figura 25, pág. 102).

O composto (80) apresentou um padrão de fragmentação, comparado com os compostos (18 e 79) bastante diferente, revelando como pico base o íon em m/z 121 (Esquema 5, pág. 105). Comparação destes dados espectrais sugere que o composto (80) pertença à mesma classe química dos outros dois compostos isolados (18 e 79) diferindo apenas no padrão de substituição no sistema biciclo, apesar de revelar,

como no composto (79), um único sinal no espectro de RMN de ^1H referente a um hidrogênio aromático em δ 6,16.

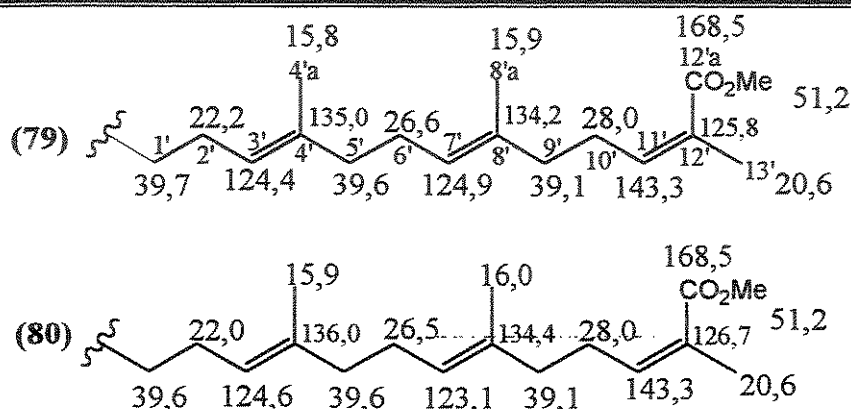
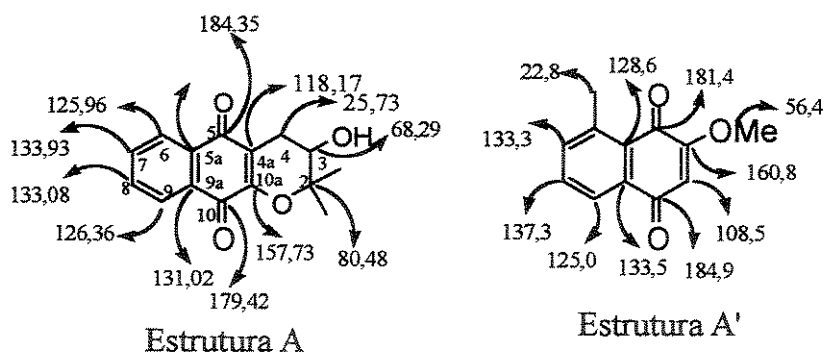


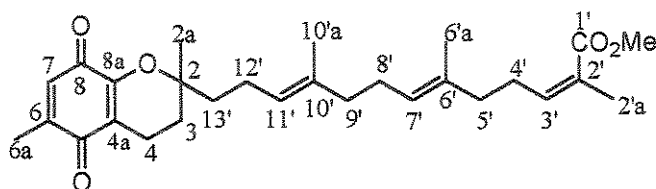
Figura 25 Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de carbono-13 entre a cadeia lateral isoprênica do composto (79) e (80) (Ambos os sinais foram obtidos em CDCl_3 e tetrametilsilano como padrão interno).

A desproteção observada para a maioria dos sinais na RMN de ^{13}C relacionados aos carbonos quaternários, que fazem parte do sistema biciclo, sugere a presença de mais de um grupo, possivelmente oxigenado, ao invés de grupos metilas, como foi atribuído ao sistema biciclo do composto (79). Entretanto, os deslocamentos químicos dos carbonos obtidos para o composto 80 não estão de acordo com os dados obtidos a partir do espectro de massas e infravermelho, e sim com anéis quinônicos, indicando a presença de grupos carbonílicos. É o caso do modelo abaixo (Estruturas A⁷⁷ e A^{77a}).



^{77a}Wu, T.S., Tien, H.J., Yef, M.Y. e Lee, K.H. 1988, *Phytochemistry*, 27:(12) 3787-3788.

Com base nesta discussão e das informações deduzidas das análises dos espectros de RMN bidimensionais a estrutura B foi sugerida para o composto (80). Análise das correlações entre ^{13}C e ^1H obtidas do espectro de gHMBC encontram-se descritas na Tabela 32.

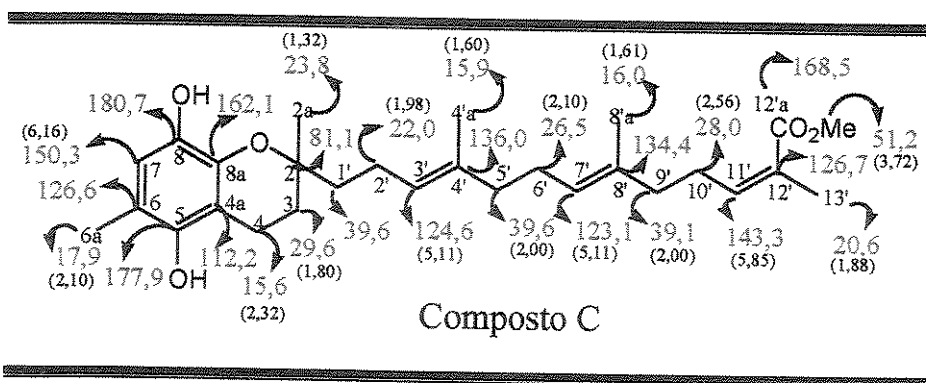


COMPOSTO B

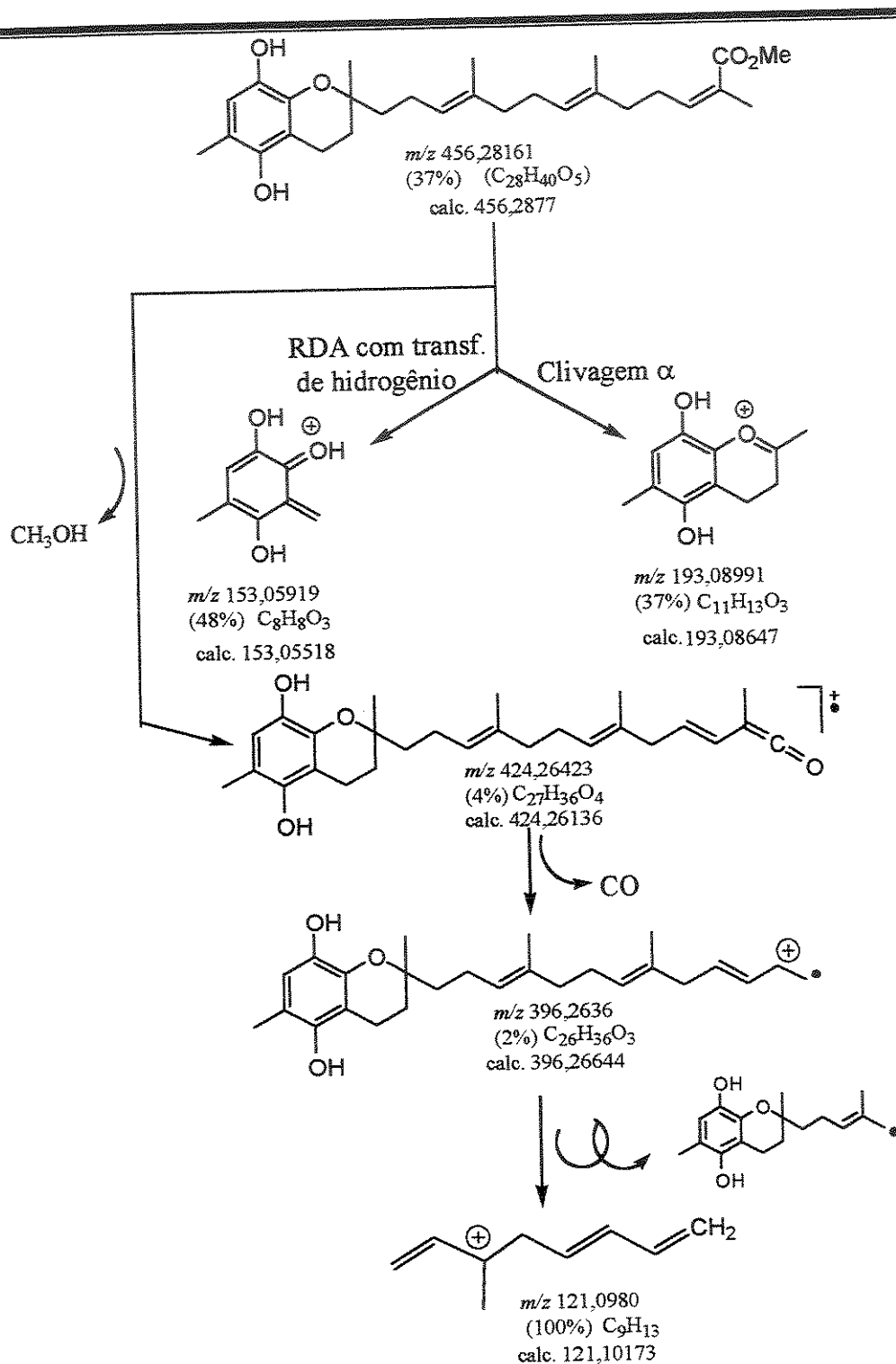
Tabela 32 Correlações entre ^{13}C e ^1H obtidas do espectro gHMBC (E-57, pág. 190) do composto 80.

Nº de C	$\delta - ^{13}\text{C}$ (ppm)/tipo de C	$\delta - ^1\text{H}$ (ppm)
1'	168,5 / C_0	5,89; 3,73 e 1,88
OMe	51,2/3,72/ CH_3	
2'	22,0/2,98/ CH_2	
2'a	20,6/1,88/ CH_3	
3'	143,3 / C_0	1,88
4'	28,0/2,56/ CH_2	
5'	39,1/2,00 / CH_2	5,88
6'	134,4 / C_0	2,54 e 2,06
6'a	16,0 / 1,61/ CH_3	2,06
7'	123,1/5,11 / CH	2,00-1,98,1,60
8'	26,5/2,10/ CH_2	
9'	39,6 / CH_2	
10'	136,0 / C_0	2,06 e 1,98
10'a	15,9/1,60 / CH_3	1,98
11'	124,6/5,11 / CH	2,06, 2,01,1,60
12'	22,0/2,98/ CH_2	
13'	39,6/2,00 / CH_2	5,11 e 1,32
2	81,1 / C_0	2,32 e 1,98
2a	23,8/1,32/ CH_3	
3	29,6/1,80 / CH_2	1,32
4	15,6/2,32/ CH_2	
4a	112,2 / CH	1,80, 2,32
6	150,3 / C_0	2,10 e 2,42
6a	17,9/2,10/ CH_3	
7	126,6/6,16 / CH	2,10
8	177,9 / C_0	2,10
8a	162,1 / C_0	6,16 e 2,42

Por outro lado, análise do espectro de infravermelho revelou bandas características de cromóforos do tipo fenol enquanto que o espectro de massas possui um íon molecular de 456 daltons, ou seja, duas unidades de massas a mais do que a massa molecular do composto B. Enquanto que os dados de ressonância estão de acordo com a estrutura B, os espectros de infravermelho e massas estão coerentes com a Estrutura C.



Estas incoerências podem ser explicadas pela oxidação do composto C na solução de clorofórmio durante a espera dos espectros de RMN, sendo o composto B um derivado inédito, porém diante desta problemática o mesmo deverá ser novamente isolado e sua estrutura confirmada.

Esquema 5 Principais fragmentações para o composto (C) isolado do látex de *Clusia grandiflora*

1.4- CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO POLISSACARÍDEO

1.4.1-INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular proveniente da condensação entre açúcares simples, podendo ser aldoses ou cetoses, que são unidos através de ligações glicosídicas. Estes polímeros possuem ampla distribuição na natureza. Sua ocorrência já foi relatada em fungos, bactérias, algas e em vegetais superiores. Apesar da pouca atenção, quanto à ocorrência em plantas inferiores, Geddes & Wilkie relataram a presença de um polissacarídeo do tipo arabinogalactano em *Eudorina californica*, uma colônia de algas verdes⁸⁹.

Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com o tipo da unidade monossacarídica que o compõe. Ou seja, são considerados homogêneos ou heterogêneos e em ambos os casos podem ser macromoléculas lineares ou ramificadas. Um polissacarídeo homogêneo é aquele resultante da condensação de moléculas do mesmo açúcar, como no amido e celulose, enquanto que o heterogêneo é aquele formado pela condensação de diferentes tipos de açúcares. Outra classificação está relacionada à solubilidade em água. Os insolúveis são celulose e algumas hemiceluloses, enquanto que os solúveis em água podem ser gomas, mucilagens e pectinas.

As GOMAS se caracterizam por apresentarem em sua estrutura ácidos urônicos. Estes ácidos são decorrentes da oxidação do grupo $-CH_2OH$, no carbono 6, a ácido carboxílico e seus nomes são baseados nos monossacarídeos que lhes deram origem. Por exemplo: Oxidação da hidroxila no carbono 6 da glicose, deriva o ácido glucorônico se fosse a galactose formaria o ácido galacturônico. Em geral as gomas são resultantes da ação de microrganismos ou lesões sofridas pela planta.

⁸⁹ Geddes, D. S. & Wilkie, K. C. B. 1971. *Carbohydr. Res.* 18: 333-35.

Em outros casos sua formação se relaciona ao processo adaptativo do vegetal principalmente às condições climáticas.

As MUCILAGENS, ao contrário das gomas, não são decorrentes de alterações patológicas da planta. Pode ocorrer em outra parte do vegetal, mas predominam nas sementes. Elas podem ser neutras ou ácidas. As ácidas possuem em sua estrutura, além dos açúcares normais, os ácidos urônicos. Fisiologicamente se caracterizam pela capacidade de retenção de água. E por isso, devem auxiliar na germinação de sementes.

As PECTINAS, Como o próprio nome revela, (do latim *pectos* = geléia) são facilmente gelificáveis devido a grande capacidade de retenção de água. São constituintes da lamela média das paredes celulares da planta. Quimicamente são polímeros do ácido galacturônico. Podem vir esterificadas por metanol, o que intensifica sua viscosidade e disperssibilidade em água.

Intensos estudos relacionados ao potencial bioativo de vários tipos de polissacarídeos de origem vegetal tem revelado para estes metabólitos atividade como: antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, anticoagulante, antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolemiantes⁹⁰.

Considerando estes estudos de atividade biológica e levando em consideração que o látex em *Clusia* é amplamente distribuído na planta e cerca de 30% em média é constituído por polissacarídeo, serviu de estímulo para iniciarmos o estudo de sua caracterização química.

1.4.2-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os PS foram isolados do látex dos frutos de *Clusia* de acordo como o procedimento descrito no capítulo V, na parte experimental. Devido a sua solubilidade em água, os polissacarídeos (PS) de *Clusia* pertencem à classe dos

⁹⁰ Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A. Petrovick, P. R. 1999. "Farmacognosia: da planta ao medicamento" Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS, Ed. da UFSC, pp. 417-431.

polissacarídeos heterogêneos. As dosagens de açúcares totais e de proteínas foram obtidas de acordo com o método de Dubois⁹¹ e Lowry⁹², respectivamente. Os resultados das dosagens de proteínas revelaram baixo teor de proteína, variando entre 3,0% (*C. paralicola*) e 0,3% (*C. criuva*). (Tabela 33).

Tabela 33 Percentuais das Dosagens de Açúcares Totais e Proteínas

Seção	Espécies	%Proteínas	%Açúcar Total
<i>Chlamydochusia</i>	<i>C. nemorosa</i>	1.2	77.5
	<i>C. rosea</i>	1.1	82.5
	<i>C. grandiflora</i>	1.2	81.3
<i>Criuva</i>	<i>C. criuva</i>	0.9	83.0
<i>Phloyanthera</i>	<i>C. hilariana</i>	1.1	93.0
	<i>C. paralicola</i>	3.0	56
	<i>C. weddeliana</i>	1.2	80
<i>Cordylandra</i>	<i>C. fluminensis</i>	1.9	65.5
	<i>C. panapanari</i>	1.6	78.2
	<i>C. spirictus-sanctensis</i>	1.0	65.2

A Figura 26, mostra os espectros na região do I.V. dos PS provenientes do látex de *Clusia*, pertencentes às 4 seções taxonômicas do gênero, revela a presença de grupo ácido carboxílico, devido às bandas de estiramentos O-H e C=O, que são características desta função orgânica. A confirmação da presença do grupo ácido carboxílico, foi confirmada pela análise cromatográfica. Os açúcares residuais foram obtidos através da metanólise do PS bruto, seguido pela formação do derivado trimetil sililado (TMS), e por meio da análise em CG/EM (Esquema 6), foram identificados por comparação com picos obtidos pela mesma análise utilizando como padrões o ácido poligalacturônico, Goma guar e goma xantana, cujos resultados foram compatíveis com os da literatura⁹³⁻⁹⁴.

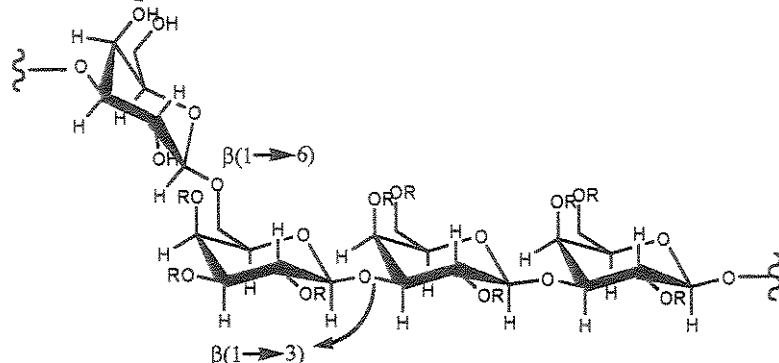
⁹¹Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. *Anal. Chem.*, Washington, Vol. 28, 350-356.

⁹²Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, K. L. 1951. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, Vol. 193, 265.

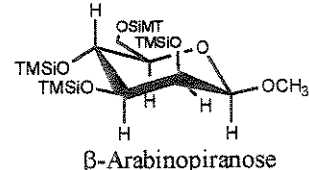
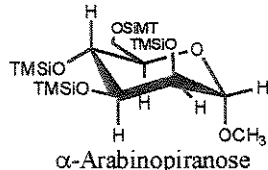
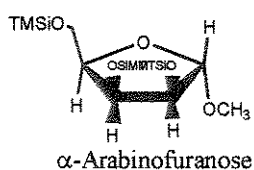
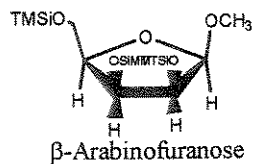
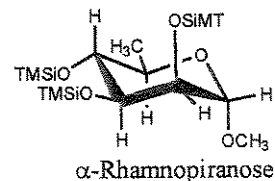
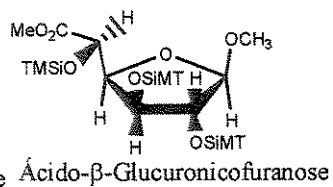
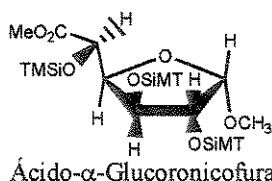
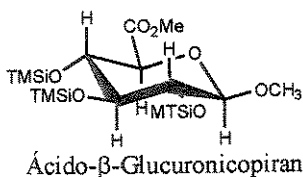
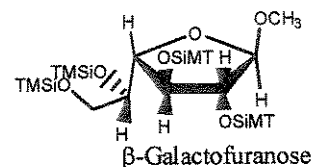
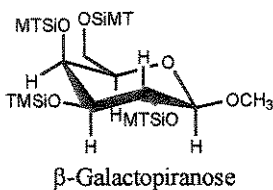
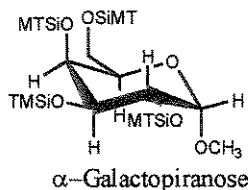
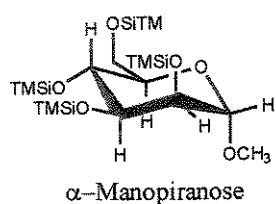
⁹³Ha, Y. W.; Thomas, R.L. Simultaneous determination of neutral sugars and uronic acids in hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 53, 2, 1988.

⁹⁴Bleton, J.; Majanelle, P.; Sansoulet, J.; Goursand, S; Tchapha, A. 1996. *Journal of chromatography A*, 720, 27-49

Esquema 6 Reação genérica da metanólise do polissacarídeo de acordo com o procedimento de HA e Thomas*



1-Metanólise
(Cloreto de acetila + MeOH anidro)
2-Sililação
(Piridina + Hexametildisilazano +
Trimetilclorosilano)



R= Arabinose, Ácido Glucurônico, Rhamnose e Manose como grupos terminais

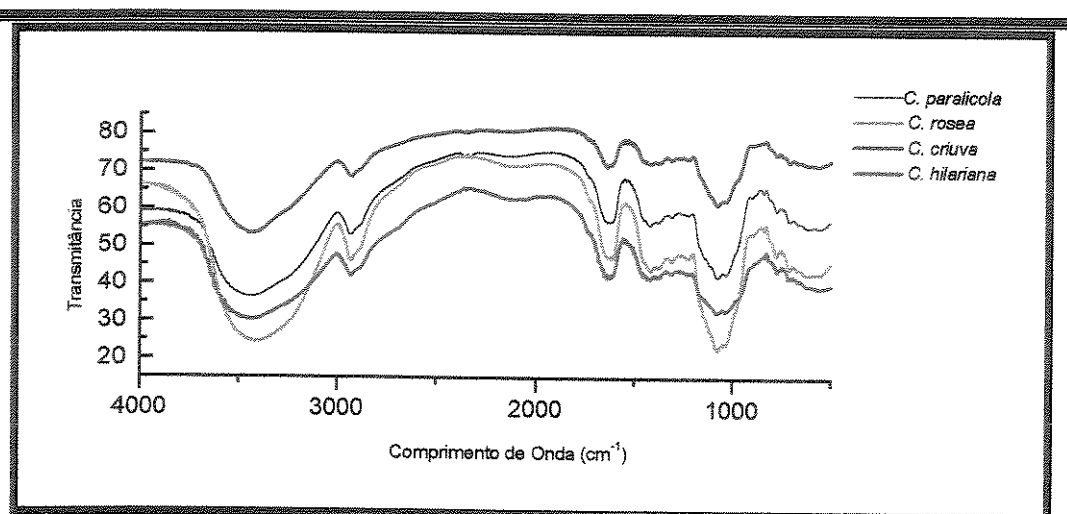


FIGURA 26 Espectros de infravermelho dos polissacarídeos do latex dos frutos de *Clusia* pertencentes às seções: Cordylandra (♦*C. paralicola*); Chlamydoclusia (♦*C. rosea*); Criuva (♦*C. criuva*) e Phloyanthera (♦*C. hilariana*)

A composição molar dos açúcares residuais foram similares entre as 12 espécies analisadas, consistindo de Arabinose (de 29.82 a 59.15%), Rhamnose (de 4.81 a 9.75%), Manose (de 7.44 a 12.65%), Galactose (de 26.27 a 44.24 %) e Acido Glucurônico (de 2.07 a 4.24 %) respectivamente (Figura 27 e Tabela 34).

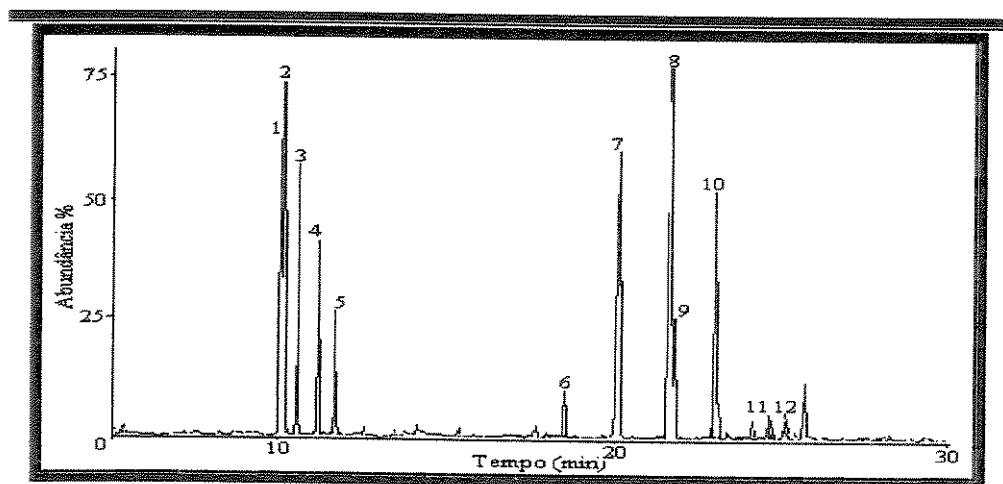


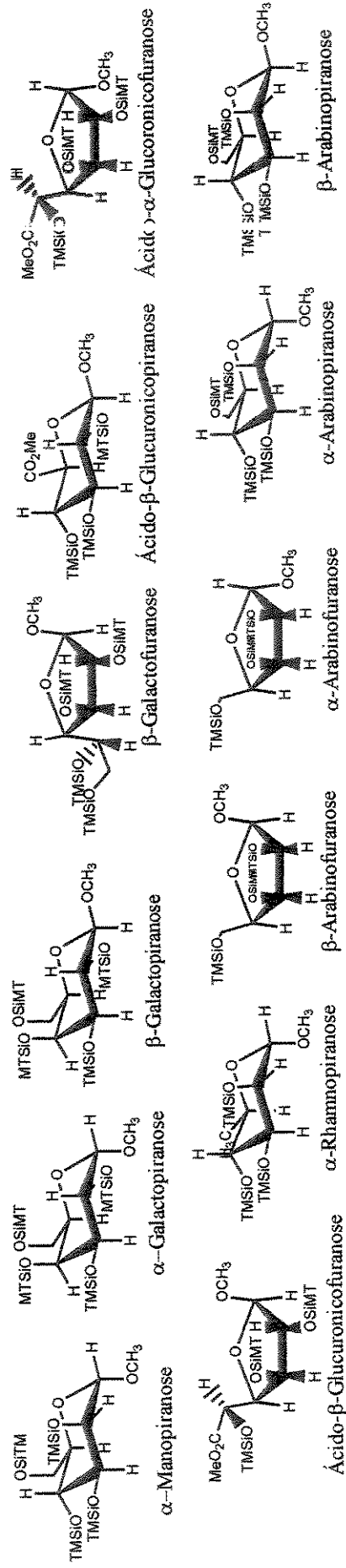
FIGURA 27 – Cromatograma dos metilglicosídeos TMS derivados do polissacarídeo isolado de *Clusia rosea*. Identificação dos números no cromatogramas estão relacionados à Tabela 34.

TABELA 34 Identificação dos picos numerados nos cromatogramas (Figura 22) e relação molar dos açúcares neutros e ácidos urônicos nos polissacarídeos de *Clusia*, após conversão em derivados TMS de acordo com o procedimento de HA & Thomas⁹³

Espécies de <i>Clusia</i>												
Açúcares	S ^a	PN ^b	Rosea	Nemo	Grand	Criuva	Hila	Para	Wedd	Flum	Padua	spuri
Arabinose	α-f	1	11.05	15.85	14.77	9.81	11.95	9.69	11.75	9.53	15.95	7.03
	β-p	2	15.45	23.04	21.30	16.24	19.71	17.08	16.90	12.93	22.17	11.47
	α-p	3	8.89	40.52	12.18	10.50	12.56	10.72	9.65	7.54	12.59	57.07
	β-f	5	5.13	6.76	6.36	5.53	6.56	5.72	5.22	4.74	6.81	4.25
Rhamnose	α-p	4	6.87	5.06	4.81	5.70	7.59	7.13	6.90	9.75	5.72	9.63
	β-f	6	1.57	0.86	0.90	0.96	1.55	1.19	1.37	1.94	1.11	1.62
Ac.glicuro nico.	β-p	11	0.78	3.20	1.39	1.76	3.35	1.26	3.04	1.17	1.18	1.12
	α-f	12	0.85	0.54	0.66	0.63	0.85	0.77	0.75	1.13	0.65	0.91
Manose	α-p	7	11.28	11.28	8.12	11.18	8.15	10.20	10.41	11.39	7.44	12.65
	α-p	8	23.21	16.03	17.43	23.54	19.30	23.37	23.01	25.36	17.07	28.27
Galactose	β-f	9	3.38	21.26	3.86	3.38	2.27	2.98	3.10	3.31	2.16	3.84
	β-p	10	11.55	6.98	8.23	10.77	8.34	9.90	10.05	11.22	7.35	12.13
	% Total		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

^a p= piranosídica e f=furanosídica. ^b Número correspondente ao pico no cromatograma na Figura 22.

Estruturas dos açúcares residuais metilglicosídeos-tetrametilsilil caracterizados por CG/EM



A análise de homogeneidade demonstrou para todos os PS, sem exceção, um alto grau de pureza (Figura 28) e o peso molecular aproximado é de 50.000 Daltons.

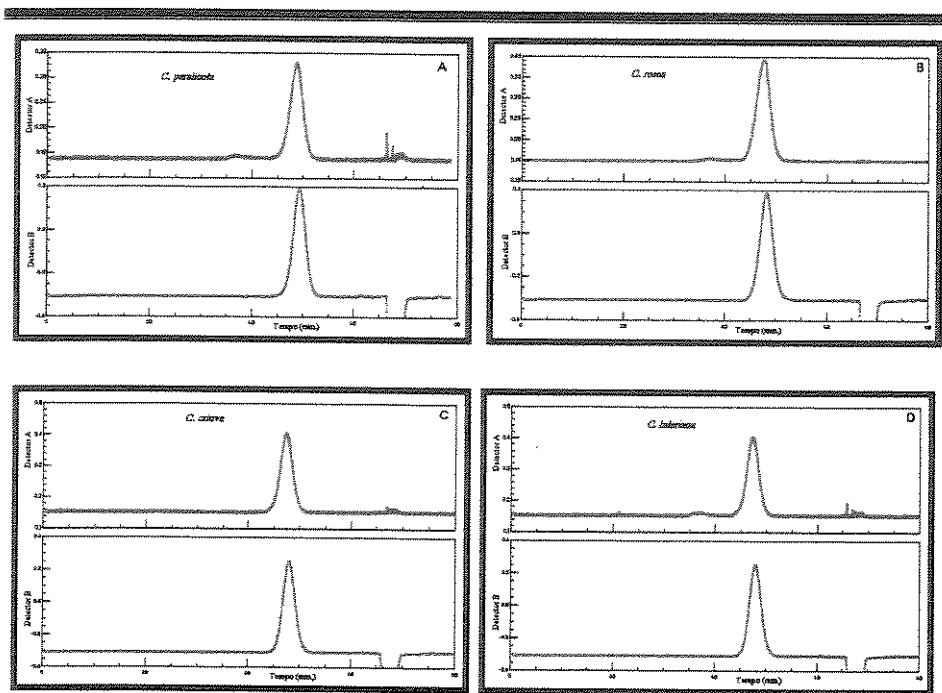


Figura 28 Resultados das análises de homogeneidade dos PS de *Chusia*: A) Seção Cordylandra, *C. parvicornis*; B) Chlamydoclusia, *C. rosea*; C) Criuva, *C. criuva* e D) Phloyanthera, *C. hilariana*. Os cromatogramas nas cores vermelha é o Detector “A”, Espalhamento de luz e azul é o Detector “B”, Índice de refração

Apesar de seu alto grau de pureza, detectados nas análises de cromatografia de permeação em gel, os espectros de RMN de ^{13}C dos PS bruto (Figura 29) mostraram-se bastante complexos, principalmente nas áreas referentes aos carbonos anoméricos (90-110ppm), carbonos primários (60-65ppm) e entre 68-85ppm, que compreende os sinais dos carbonos secundários (C-2 - C-5). Um sinal de baixa intensidade em 187,48 confirma a presença da função carboxílica de ácido observada nas análises por CG/EM e IV e outro mais intenso em 16.3 ppm, refere-se ao carbono primário (C-6) da ramnose.

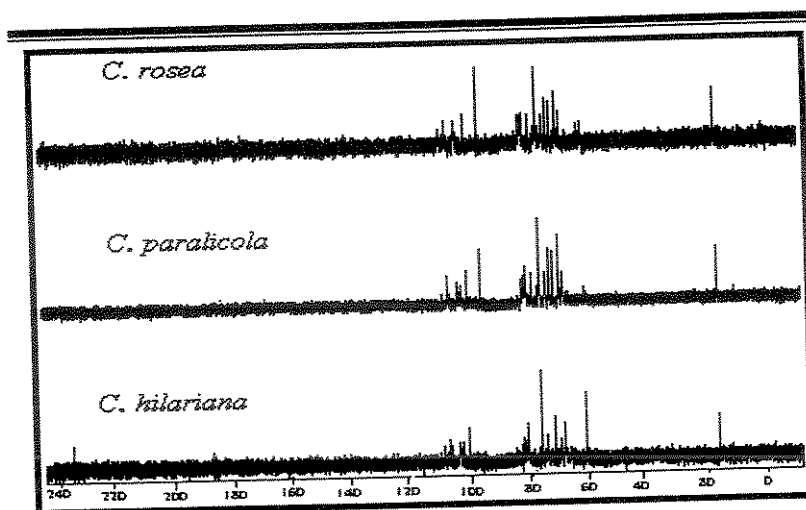


Figure 29 spectrum of ^{13}C -NMR (500MHz, D_2O) of *Clusia* polysaccharides

A atribuição dos deslocamentos químicos dos monossacarídeos que constituem os PS foi realizada por comparação com os dados da literatura^{95,96,97} (Tabela 35).

Tabela 35 Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C do PS do látex de *Clusia* com os dados da literatura⁹⁵⁻⁹⁷.

Composição	Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α furano-Arabinose Ref. 78	108.9 108.7	81.1 81.0	76.7 77.5	89.8 84.7	62.1 62.3	- -
β pirano-Galactose (1 $\rightarrow$ 6) Ref. 78	102.9 103.3	69.8 70.4	73.0 73.0	68.6 67.8	74.0 73.2	68.2 68.0
α pirano-Galactose (1 $\rightarrow$ 3) Ref. 80	103.5 104.5	71.7 71.2	82.0 82.7	70.0 69.2	76.3 75.4	62.6 62.0
α pirano-Ramnose Ref. 80	102.4 101.6	72.7 71.5	72.7 71.5	73.0 73.3	69.6 70.0	16.3 17.5
β -ÁcidoGlucorônico Ref. 79	103.5 103.7	74.2 74.3	76.3 75.7	81.8 82.4	74.4 75.1	187.4 172.0

⁹⁵ Cartier, N., Chambat, G. and Joseleau, J. P. 1987, *Carbohydrate Research*, 168, 275-283

⁹⁶ Pinto, G. L., 1991, *Carbohydrate Research*, 290, 229-242

⁹⁷ Defaye, J. e Wong, E. 1980, *Carbohydrate Research*, 150, 221-

As análises de RMN de ^{13}C confirmaram a constituição básica dos PS, obtida através de CG/EM. As atribuições dos deslocamentos químicos foram coerentes com dados para outras gomas³¹⁻³³, sugerindo para este polímero uma cadeia principal de β -galactose (1 $\rightarrow$ 3), com ramificações de β -galactose (1 $\rightarrow$ 6) enquanto que os outros monossacarídeos fazem parte da extremidade do polissacarídeo (Figura 30).

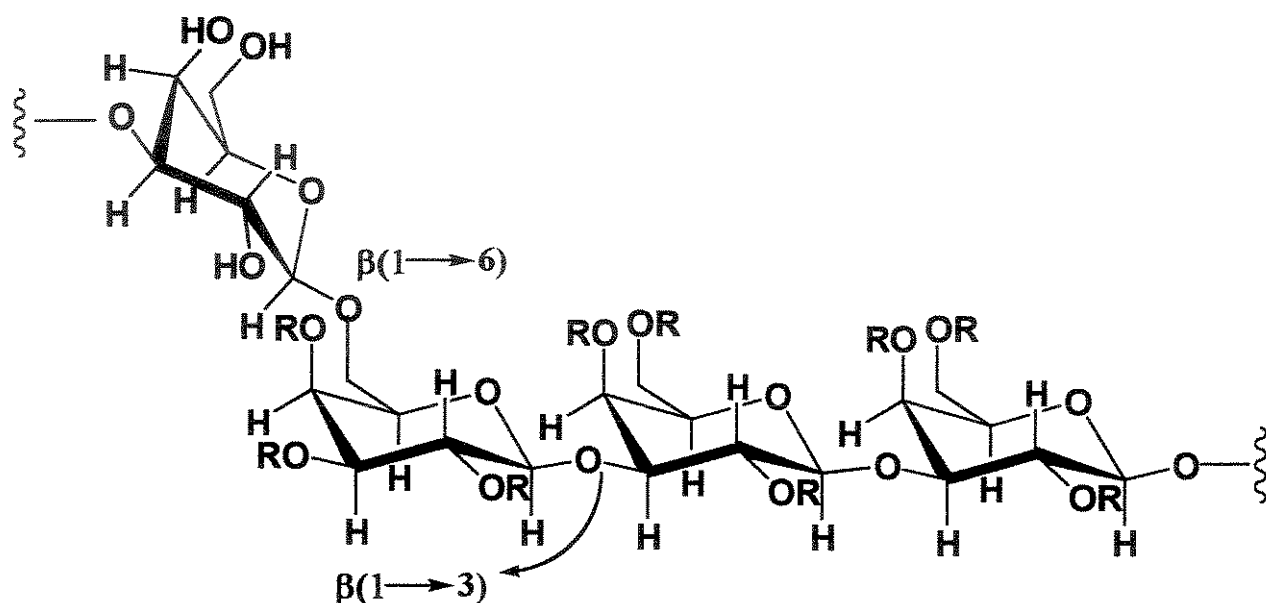


Figura 30 Esqueleto básico do proposto para o PS de *Clusia* com base nas análises de CG/EM e RMN de ^{13}C .

Em resumo, Com base nos resultados obtidos para os PS, pode-se concluir, que são facilmente isolados a partir do látex de *Clusia*, praticamente sem contaminação. Apresenta alto grau de homogeneidade, independente da espécie, que foi isolado. Em média, possuem uma massa molecular aproximada de 50.000 daltons. São constituídos por Arabinose, Galactose, Manose, Ramnose e Ácido Glucurônico, variando entre as espécies, apenas no percentual relativo destes constituintes. As razões molares obtidas a partir das análises por CG/EM com

relação aos representantes majoritários, ou seja, de 29,8 a 59,1% referentes a Arabinose e de 26,2 a 44,2% para Galactose, sugere para este **PS** uma classificação de polissacarídeo heterogêneo, caracterizando-se ainda pela sua solubilidade em água. Estes dados revelam que os látex das 12 espécies estudadas pertencem à classe das gomas do tipo Arabinogalactana.

CAPÍTULO IV

PARTE II: CULTIVO *IN VITRO* DE *Clusia Paralicola* X *Clusia Weddelliana*): ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS

1-INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos consistem no isolamento de células, tecidos ou órgãos vegetais, ou sua própria inoculação em condições assépticas, utilizando meios nutritivos adequados e condições controladas, com a finalidade de obter um rápido crescimento da biomassa ou a completa recuperação da planta quer diretamente (organogênese) ou através da formação de embiogênese.

A partir da década de 30, a utilização de fitormônios na suplementação dos meios de cultura, possibilitou maiores avanços nas técnicas de cultura de tecido vegetal. A estimulação da embriogênese somática e regeneração de plantas em culturas de calos pela combinação de auxinas e citocininas tem sido amplamente empregada⁹⁸.

A cultura de tecido tem sido usada como ferramenta na produção e acúmulo de metabólitos secundários de interesse farmacológico, ou para utilizar o potencial enzimático destas culturas para promover a transformação de substratos orgânicos exógenos em compostos de interesse⁹⁹. Outra aplicação desta técnica é a sua combinação com a química orgânica sintética, utilizando enzimas isoladas para promover biotransformações em substratos sintéticos para obtenção de compostos mais complexos com propriedades farmacológicas.

As principais vantagens na produção de metabólitos secundários por cultura de tecidos diante dos métodos tradicionais de extração direta da planta são:

⁹⁸Bhaskaran, S & Smith, R.h. .1990, *Crop Sci.* 30: 1328 -1336.

⁹⁹ Kutney, J. P.; Chen, D.; Stoynev, N.; Achiwa, K. e Takemoto, M. 1996. *Phytochemistry*, 42, 2, pp. 423.

- Simplicidade no isolamento do metabólito desejado devido a menor complexidade extrato.
- Aumentar a produção do metabólito manipulando as condições de crescimento, como constituição do meio de cultura, pH, luz, temperatura, etc.
- A produção de composto alvo independe de variação sazonal.
- Condições são mais favoráveis aos estudos biossintéticos.

Progressos recentes no campo da biotecnologia têm tornado esta área de pesquisa uma das mais promissoras da biologia experimental e as técnicas de cultura *in vitro* têm sido usadas na investigação de vários problemas básicos, não só na área de fisiologia vegetal, na genética ou biologia celular, mas também na agricultura, silvicultura, horticultura¹⁰⁰, etc. Entretanto, os resultados obtidos nem sempre são fáceis de se obter, ou mesmo satisfatórios, requerendo do pesquisador, paciência e muito trabalho para atingir seus objetivos. Um dos obstáculos encontrados é a oxidação de metabólitos liberados por células danificadas, na preparação dos explantes, que inviabilizam seu cultivo. Esse problema é mais facilmente encontrado na preparação de explantes de plantas lenhosas, cujo tecido vegetal é mais rico em compostos fenólicos¹⁰¹. Espécies do gênero *Clusia* são caracterizadas pela presença de látex, que além de outras substâncias, são constituídas por compostos fenólicos¹². No início da década de 40, Balansard & Pellissier¹⁰² reportaram a tentativa de cultivo *in vitro* com plantas laticíferas. Folhas de *C. rosea* foram imersas em uma solução aquosa de AIA (100 mg/L) e após 6 meses de cultivo, constataram que os metabólitos presentes no látex inibiam a ação da auxina.

¹⁰⁰Torres, C.A., Caldas, L. S., 1990 "Técnicas e aplicação da cultura de tecidos, ABCTP-EMBRAPA/CNPQ, Brasília, DF.

¹⁰¹Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1990. "Micropropagação in: Torres, A.C.; Caldas, L.S. – Técnica e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas". pag. 117-120. EMBRAPA, Brasília-DF.

¹⁰²Balansard, J.; Pellissier, F. 1942. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 136: 307-308.

Plantas do gênero *Clusia* são bastante usadas no tratamento de vários tipos de doenças, já mencionadas no capítulo 1 desta tese. A análise química das resinas e de outras partes da planta tem revelado que são basicamente constituídas de benzofenonas poliisopreniladas^{7a-c}. O estudo biológico, dessa classe de compostos, indicou atividade antimicrobiana e anti-HIV⁹. O fato de estas benzofenonas serem encontradas, quase que exclusivamente, nas resinas e nos frutos restringindo sua disponibilidade e uso na medicina popular, em qualquer época do ano, estimulou estudos em cultura de tecidos de espécies de *Clusia* visando uma fonte contínua destes metabólitos.

Com base no exposto acima, estudo inicial de cultura de tecido foi realizado com híbrido de *Clusia* com o intuito de estabelecer a melhor combinação entre os fitorreguladores: AIA, 2,4-D, BA e KIN para obtenção e manutenção de calos e investigar as principais classes de metabólitos biossintetizados. Com a finalidade de minimizar as possíveis dificuldades no cultivo de explantes de *Clusia*, vegetais que são caracterizados pela presença de canais laticíferos, a espécie escolhida foi o híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana*. Em geral, os híbridos possuem menor quantidade de látex do que os respectivos parentais.

2-RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1- CULTURA DE EXPLANTES FOLIARES DO HÍBRIDO *C. Paralicola* X *C. Weddelliana*

Os procedimentos usados na obtenção da cultura de explantes foliares de *Clusia*, encontram-se descritos no item 7 da parte experimental. Foi observado, nos 8 experimentos, que tanto os explantes cultivados no escuro ou sob luz branca houve baixa contaminação, promovida principalmente por fungos. O percentual de explantes contaminados, por experimentos, variou entre 1 e 5%. Em geral, o maior

percentual de explantes oxidados* foi encontrado naqueles cultivados na presença de luz. Dos 8 experimentos em que os explantes foram cultivados com diferentes combinações entre os fitorreguladores (Tabela 46, parte experimental), apenas o experimento 5 resultou em desdiferenciação, principalmente nos tratamentos 6 (melhor resultado) e 7 e em menor escala nos tratamentos 9, 10, 11 e 12 (Tabela 36). Observou-se ainda, que a melhor interação entre os fitorreguladores, que parece minimizar a oxidação dos explantes, é aquela em que os intervalos das concentrações entre AIA/KIN são respectivamente, 5,0 - 10,0 mg/L e 0,1 - 1,0 mg/L.

Tabela 36 Interação dialélica para o Experimento 5 entre AIA e KIN

AIA (mg/L) \ KIN (mg/L)	0,0	5,0	25
0,0	1*	5	9
0,1	2	6	10
1,0	3	7	11
5,0	4	8	12

* Os números de 1 à 12 referem-se aos tratamentos do experimento. Cada tratamento é constituído por 5 explantes, cultivados em frascos separados.

O cultivo dos explantes na ausência de luz foi imprescindível para formação de calo. Na luz, nenhuma combinação de fitorreguladores resultou na desdiferenciação, ou seja, na formação de calo.

Resumindo, este estudo mostrou que das combinações dialélicas entre os fitorreguladores (AIA/BA; AIA/KIN; 2,4-D/BA; 2,4-D/KIN e 2,4-D/BA) os melhores resultados foram obtidos entre AIA/KIN e que a oxidação dos explantes é mais intensa quando a quantidade de AIA é superior a de KIN. O cultivo na ausência de luz a temperatura ambiente, estimulou o crescimento de células não diferenciadas as quais podem ser selecionadas para otimização de calos friáveis.

*Entende-se por explante oxidado aquele de coloração marrom, na superfície superior e lateral do explante.

2.2-ANÁLISE QUÍMICA DA CULTURA DE TECIDOS DO HÍBRIDO *CLUSIA PARALICOLA* X *CLUSIA WEDDELLIANA*

A análise química dos calos e do meio de cultura foi realizada com calos obtidos após 1 mês e meio e 8 meses de crescimento, denominados respectivamente de Calo 1 e Calo 2 (Figuras 31-A, B e C).

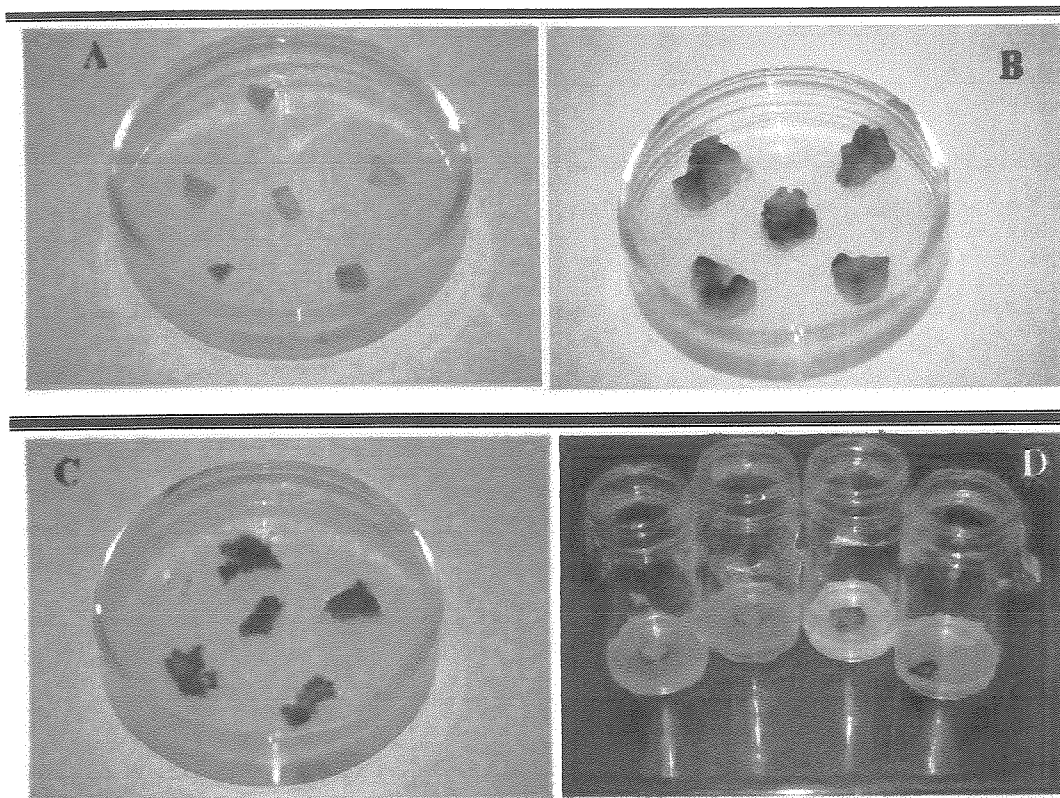


FIGURA 31 Tempo de cultivo ($25 \pm 2^\circ$, no escuro) e aspecto dos explantes mantidos na combinação hormonal padrão na desdiferenciação e formação de calos A) Inoculação de explantes no meio padrão b) 20 dias c) 3 meses e d) 8 meses.

Os procedimentos de obtenção dos extratos hexânico e metanólico dos calos e acetato de etila de seus respectivos meios de cultura, encontram-se descritos nos esquemas 8 e 9 na parte experimental, pág. 148 e 149 respectivamente. Análise por CG/EM dos extratos após metilação com diazometano, forneceu os cromatogramas (Figuras 32 e 33)

Figura 32 Cromatogramas do calo e meio de cultura após 28 dias de cultivo

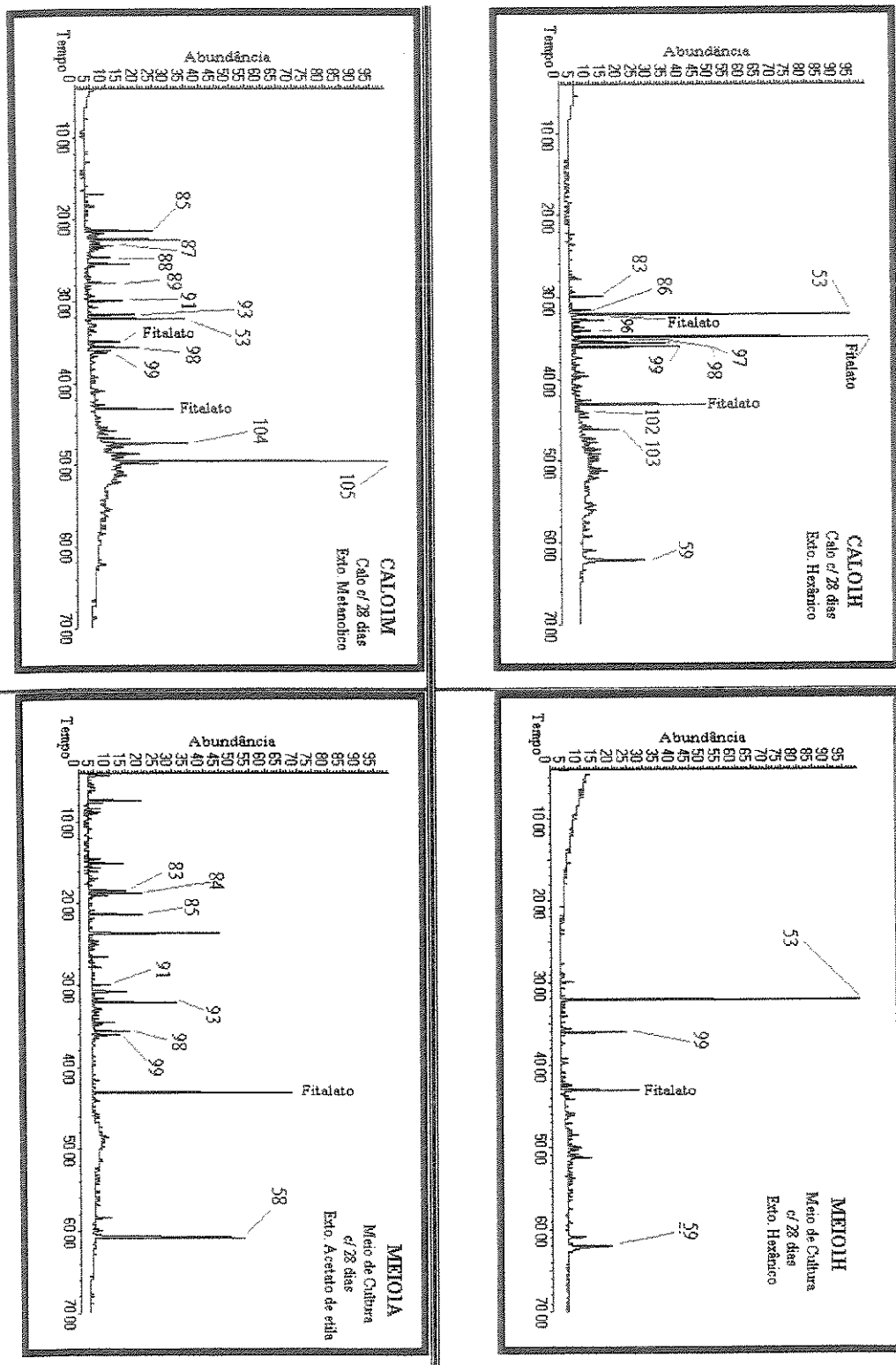
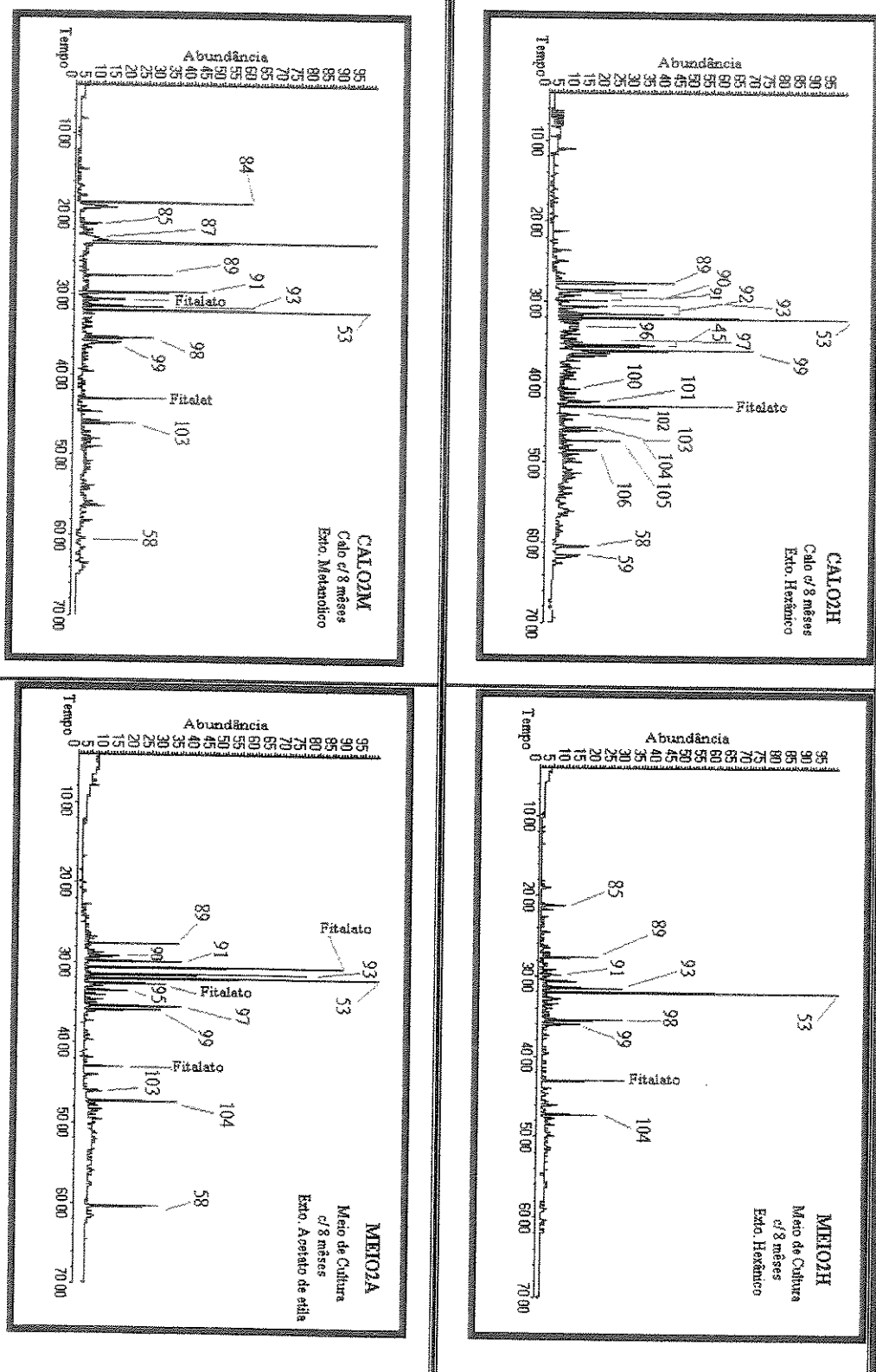


Figura 33 Cromatogramas do calo e meio de cultura após 8 meses de cultivo



A análise por CG/EM dos Calos 1 e 2 revelou que nestas condições de cultivo, foram produzidos principalmente ácidos graxos saturados, insaturados, normais e ramificados, álcoois de cadeia longa, hidrocarbonetos de cadeia longa compostos fenólicos (derivados do ácido benzóico) e triterpenos (Quadro 7, Tabela 37). A numeração dos compostos caracterizados nos calos e meios de cultura é continuação da numeração adotada para os compostos caracterizados nas ceras epicuticulares. Os ácidos palmítico e esteárico estão presentes no Calo 1 (28 dias de cultivo) e Calo 2 (8 meses de cultivo) e são os mais abundantes, dentre os ácidos graxos saturados. Ambos foram caracterizados tanto no calo como no meio de cultura. O mesmo foi observado para o ácido oléico, dentre os insaturados. Já os ramificados (metil-tetra, penta e hexadecanóico) foram produzidos apenas no calo 2 (8 meses de cultivo). A produção de ácido cítrico observado em ambos os calos pode estar relacionado às condições de estresse (anaeróbica e na ausência de luz) na indução dos calos. Há relatos na literatura^{103,104,105} de acúmulo de ácido cítrico, em resposta ao estresse, em plantas pertencentes ao Metabolismo Ácido de Crassuláceas (CAM), que estão adaptadas à ambientes com escassez de água, comum em algumas espécies de *Clusia*. Outros metabólitos caracterizados em ambos os calos, foram os ácidos olean-12-en-3-oxo-28-oico (L-58) e olean-3-oxo-28-oico (L-59). Neste Caso, os maiores percentuais relativos destes ácidos foram obtidos na análise do Calo 1 e no meio de cultura. É possível que o menor percentual relativo dos triterpenos no Calo 2 esteja relacionado à realização das subculturas em que o meio de cultura foi desprezado, já que os metabólitos produzidos são eliminados para o meio de cultura - Meio 1H = 26,10%, Meio 1A = 33,92% e Meio 2A = 8,71% - (Tabela 37).

¹⁰³ Tee, G.; Herzog, B. and Luttge, U. 1998. *Journal of Plant Physiology*, 152: (1) 1-9.

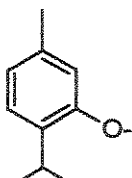
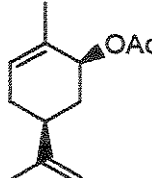
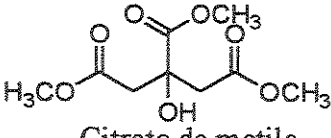
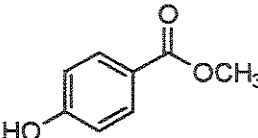
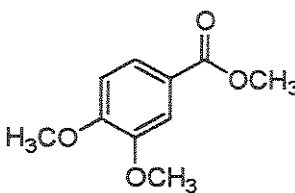
¹⁰⁴ Olivares, E.; Faist, K.; Kluge, M.; Luetge, U. 1993. *J. Exp. Bot.*, 44: (267), 1527-33.

¹⁰⁵ Franco, A.C.; Olivares, E. Luttge, U.; Haagkerwer, A. 1994, *New Phytologist*, 126: (2), 203-211.

O protocolo ora estabelecido para cultura de células do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddeliana* promoveu, principalmente, a produção dos ácidos olean-12-en-3-oxo-28-oico (L-58) e olean-3-oxo-28-oico (L-59) os quais estão presentes principalmente no látex dos frutos de *Clusia grandiflora*. Ácido cítrico tem sido caracterizado na casca do fruto de *C. nemorosa* e sua detecção nos calos (induzidos na ausência de luz) sugere que seu acúmulo favoreça um aumento na concentração de CO₂ prevenindo a fotoinibição, uma vez que sua degradação libera três moléculas de CO₂ e que o acúmulo de um outro ácido, comum em plantas do tipo CAM¹⁰⁶, por exemplo, o ácido málico só fornece uma molécula de CO₂.

Um fato observado, altamente relevante do ponto de vista biotecnológico, é que os metabólitos produzidos pelo calo são excretados para o meio o que facilita sua extração e minimiza os custos.

Quadro 7 Compostos identificados em calos de *Clusia*

 Timol acetato C-83	 cis-Carvil acetato C-84	 Citrato de metila C-85	 4-Hidroxibenzoato de metila C-86
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{CH}_3$ Dodecanoato de metila C-87	 3,4-Dimetoxibenzoato de metila C-88	$(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{CH}_3$ Metil-Tetradecanoato de metila C-90	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CO}_2\text{CH}_3$ Pentadecanoato demetila C-91
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{CH}_3$ Tetradecanoato de metila C-89			

¹⁰⁶ Franco, A.C., Ball, E., Luttge, U. 1992. *Plant Cell and Environment*, 15: (7) 821-829.

$(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Metil-Pentadecanoato de metila
C-92

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
Nonadecano
C-94

$(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Metil-Hexadecanoato de metila
C-95

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{CH}_3$
Hexadecenoato de metila
C-93

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Heptadecanoato de metila
C-96

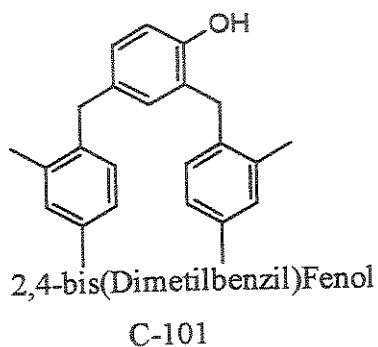
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{OH}$
Octadecanol
C-45

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$
Octadecadienolato de metila
C-97

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$
Octadecenoato de metila
C-98

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Octadecanoato de metila
C-99

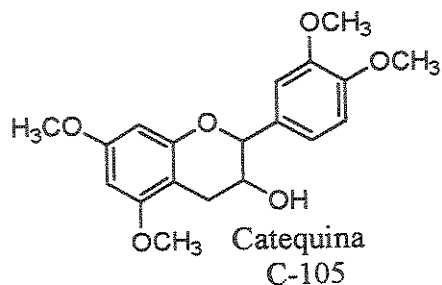
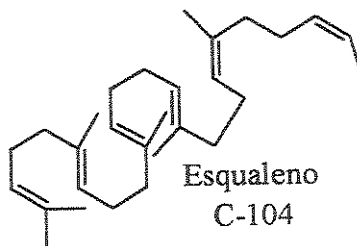
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}_3$
Tetracosano
C-100



$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$
Hexacosano
C-102

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{25}\text{CH}_3$
Heptacosano
C-69

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Tetracosanoato de metila
C-103



$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CO}_2\text{CH}_3$
Hexacosanoato de metila
C-106

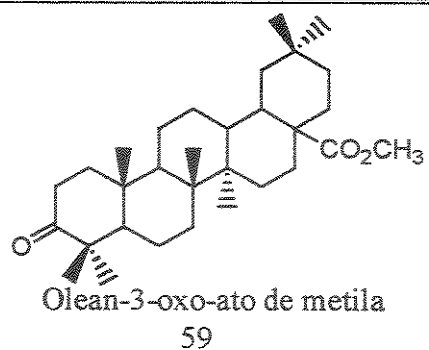
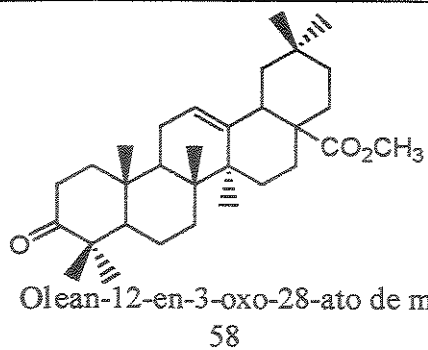


TABELA 37 Composição percentual relativa dos constituintes químicos dos calos e meios de cultura

Nº do Pico	SUBSTÂNCIA	IR _e Exp	IR _e Lit	CALO 1				CALO 2			
				M1H	M1A	C1H	C1M	M2H	M2A	C2H	C2M
83	Acetil-Timol	1354	1355		3,09						
84	Cis-Carvilacetato	1363	1362		4,65						7,96
85	Citrato de metila	1461	-		5,05		4,96				1,44
86	4-Hidroxibenzoato de metila	1475	-					4,16			
87	Dodecanoato de metila	1533	1525				3,53				1,55
88	3,4-Dimetoxibenzoato de metila	1592	-				1,54				
89	Tetradecanoato de metila	1724	-				1,94	6,46	5,75	5,69	12,74
90	Metil-tetradecanoato de metila	1794	-						1,87	1,54	
91	Pentadecanoato de metila	1823	-		1,82	2,10	2,39	4,50	5,54	2,21	
-	Fitalato	1858	-						15,38		4,36
-	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	1861	-		5,59			6,12		3,69	
92	Metil-pentadecanoato de metila	1890	-							0,86	
93	Hexadecenoato de metila	1897	-		9,97		3,16	9,01	12,57	5,34	3,10
94	Nonadecano	1900	-			1,71					
53	Hexadecanoato de metila	1924	1927	45,56		17,36	9,43	36,99	18,33	20,78	25,42
-	Fitalato	1957	-			3,20			7,24		
95	Metil-hexadecanoato de metila	1996	-						3,55		
96	Heptadecanoato de metila	2022	-			1,49				4,71	
-	Fitalato	2061	-			26,15	3,44				
45	Octadecanol	2080	2082							1,52	
97	Octadecadienoato de metila	2090	2092			3,99			5,11	7,96	
98	Octadecenoato de metila	2096	-		4,01	5,13	3,39	11,22			3,86
99	Octadecanoato de metila	2126	2128	9,72	2,17	7,08	1,72	6,12	4,21	14,39	3,98
100	Tetracosano	2396	2400							0,57	
-	Fitalato	2432	-		11,69						
101	2,4-bis(dimetilbenzil)fenol	2488	-							2,18	
-	Fitalato	2528	-	18,58		10,43	5,84	9,94	3,61	4,56	3,70
102	Hexacosano	2596	2600			2,14				1,06	
103	Heptacosano	2696	2700							1,75	
104	Tetracosanoato de metila	2725	-			2,47			1,83	1,12	2,18
105	Esqualeno	2808	-				5,09	5,44			
106	Tetrametil de catequina	2959	-				30,38		6,22	2,17	
107	Hexacosanoato de metila	3027	-							0,44	
58	Olean-12-en-3-oxo-28-ato de metila	3512	-	t	33,92			t	8,71	2,02	4,86
59	Olean-3-oxo-28-ato de metila	3560	-	26,10	t	t	T		t	0,97	
	Não identificados			-	17,97	4,72	23,08	-	-	14,28	21,85
	TOTAL			99,97	99,93	99,92	99,98	99,96	99,92	99,81	99,92

M1H e M1A = Ext. hexânico e Ext. Acto. de etila do meio de cultura do calo 1, C1H, C2H e C1M, C2M = Ext. hexânico e metanólico do calo 1 e 2. IR_e Exp. = Índice de Retenção Experimental, calculado aplicando a equação de van den Doll e Kratz⁷¹. IR_e Lit. = Índice de Retenção da Literatura⁷².

3- CONCLUSÃO –PARTE I E PARTE II

1- De acordo com os resultados dos testes de bioautografia, realizados com látex de diferentes espécies de *Clusia*, pode-se sugerir para o látex a função de proteção contra ataques de microorganismos, principalmente bactérias.

2- Baixa atividade dos látex de híbridos, comparada com os de parentais, sugere aos híbridos uma maior susceptibilidade de ataques por microorganismos e herbívoros.

2- Os látex provenientes dos frutos e ramos possuem basicamente a mesma constituição química. (sesquiterpenos, triterpenos, ácidos graxos, tocoferóis, benzofenonas e polissacarídeos).

3- A constituição química do látex de híbridos diverge da composição encontrada para os respectivos parentais. Nas frações apolares e polares dos híbridos não foram detectados sesquiterpenos oxigenados, benzofenonas e tocoferóis.

4- Contrariamente aos resultados de Lokvam e col., que isolou e caracterizou benzofenonas do látex de *C. grandiflora*, espécie nativa da Venezuela, a análise do látex de *C. grandiflora*, cultivada na fazenda Santa Eliza, IAC-Campinas-SP, não revelou a presença de benzofenonas.

5- A investigação da composição química da cera epicuticular de 5 espécies de *Clusia* permitiu a caracterização de 31 compostos pertencentes principalmente às classes de hidrocarbonetos e triterpenos das séries oleano, lupano, e friedelano. Este é o primeiro relato da composição química de ceras epicuticulares de espécies pertencentes ao gênero *Clusia*.

6- O protocolo estabelecido para cultura de tecidos promoveu a formação de metabólitos encontrados *in vivo* em espécie de *Clusia*. (derivados do ácido oleanólico)

6-As células excretam os metabólitos para o meio de cultura, fato relevante para produção contínua de metabólitos de interesse.

CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

1-ASPECTOS GERAIS SOBRE OS MATERIAIS E MÉTODOS EMPREGADOS

Os reagentes usados, foram todos analiticamente puros. Utilizaram-se solventes das marcas Merck, Synth, CRQ ou Carlo-Erba e também, provenientes da planta piloto do Instituto de Química da Unicamp.

Os solventes foram recuperados utilizando evaporador rotativo R-114 Waterbath B-480 da Büchi.

A sililação após metanólise do PS foi realizada com o sililante da Sigma constituído por piridina: hexametildisilano: trimetilclorosilano, (3:1:9 v/v/v), e os carboidratos padrões (açúcares livres e metilados) e gomas foram obtidos da Aldrich e Merck. Utilizou-se uma centrífuga HIMAC/CR21-HITACHI para as amostras sililadas. Para metilação das frações polares usou-se excesso de solução etérea de diazometano. As amostras de PS foram liofilizadas em liofilizador da marca LABCONCO.

Todo material incluindo vidrarias, meios de cultura, água destilada e demineralizada utilizadas nos experimentos de cultura de tecidos, isolamento de microorganismos e nos bioensaios foram esterilizadas em autoclave vertical, Phoenix-AV75 ou Luferco, à 120°C, com pressão de 1atm, por um período de 30 minutos para os materiais e 15min. para os meios de cultura e água.

As operações em condições assépticas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, Veco (HLFS-12 ou Veco (VLF5-09).

O equipamento usado nos ajustes de pH dos meios de cultura Básico e Definitivo foi medido no pH-Metro – B474 da Micronal.

Na preparação dos extratos das ceras epicuticulares usou-se um banho de ultra-som da marca THORNTON-T14.

1.2-MATERIAL VEGETAL

Frutos, ramos e ceras epicuticulares, foram coletadas a partir da coleção de clúsias cultivadas na Fazenda Santa Elisa” – IAC, Campinas-SP. Na tabela 38, estão discriminadas as espécies estudadas, com os números dos responsáveis pela coleta, (M.C.E. Amaral & V. Bittrich) e a parte da planta de interesse. As excicatas devidamente identificadas, estão depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas. As espécies foram identificadas por Dr. Volker Bittrich. Testes bioautográficos do látex e análise química da cera epicuticular e do látex foram investigados a partir de híbridos cultivados em casa de vegetação do Departamento de Biologia da UNICAMP (Tabela 39).

Tabela 38 Plantas analisadas (Polissacarídeo^b (PS), Cera Epicuticular^c), relacionando-as com a espécie. Origem do látex para realização dos testes bioautográficos^a (T.B.) e o número de identificação das excicatas.

SEÇÃO	ESPÉCIE	LÁTEX ET B ^A		PS ^B	CERA ^C	Nº EXCICATAS
Chlamydoclusia	<i>C. nemorosa</i> (masc.)					#95/151
	G. Mey. (hermafrodita)	X	X	X	X	#95/150
	<i>C. rosea</i> Jacq. (fêmea)	X		X		#95/154
	<i>C. grandiflora</i> Splitg. (fêmea)	X		X		#95/153
Criuva	<i>C. criuva</i> Cambess. <i>ssp. parviflora</i> (fêmea)	X		X		#97/7
	<i>Ssp. criuva</i> (fêmea)	X		X		#2001/56
Phloyanthera	<i>C. hilariana</i> Schltl. (fêmea)	X		X		#97/248
	<i>C. lanceolata</i> Cambess. (fêmea)	X	X	X	X	#96/27
Cordylandra	<i>C. paralicola</i> (fêmea)	X	X	X	X	#97/5
	G. Mariz (masc.)					#97/5a
	<i>C. weddelliana</i> (fêmea)	X		X		#2001/57
	Planch & Triana (masc.)					#97/4
	<i>C. fluminensis</i> Planch & Triana (fêmea)	X		X		#2001/54
	<i>C. panapanari</i> (Aubl.) Choisy (fêmea)	X		X		#95/156
	<i>C. spiritu-sanctensis</i> G. Mariz (fêmea)	X		X		#95/185a
	<i>C. pernambucensis</i> G. Mariz (masc.)			X		#95/186

Tabela 39 Partes das plantas analisadas, relacionando-as com a espécie. Origem do látex para realização dos testes bioautográficos^a (T.B.)

ESPÉCIE	Látex do Ramo	T.B. ^a	Cera ^b
<i>C. paralicola</i> X <i>C. nemorosa</i>	X	X	X
<i>C. lanceolata</i> X <i>C. nemorosa</i>	X	X	X

1.3- MICROORGANISMOS USADOS NOS TESTES BIOAUTOGRÁFICOS

Os testes bioautográficos dos látex foram realizados contra os seguintes microorganismos: *Escherichia coli*, gram (-) - CCT 5050; *Bacillus subtilis*, gram (+) CCT 0089; *Rhodococcus equi*, gram (+) - CCT 0541; *Staphylococcus aureus*, gram (+) - CCT 4295; *Micrococcus luteus*, gram (+) - CCT 2720; *Salmonella typhimurium*, gram (+) - CCT 0528; *Aspergillus niger*, CCT 1435; *Penicillium funiculosum*, CCT 0490; *Fusarium oxysporum*, CCT3244; *Rhizopus oryzae*, CCT 4964; *Alternaria alternata*, CCT 1250; *Aspergillus fumigatus*, CCT 01277; *Cladosporium cladosporioides*, CCT 5039 e *Candida albicans*, CCT 0776 da Coleção de Cultura Tropical, “Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello”.

2-EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES DAS ANÁLISES

2.1- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E EM CAMADA ESPESSA PREPARATIVA

As cromatografias em camada delgada (CCD), usadas para análise dos látex de diferentes clúsias e do monitoramento dos compostos isolados por cromatografia em camada espessa preparativa (CCEP), foram feitas utilizando-se cromatofolha com sílica gel como adsorvente, disponível na dimensão padrão 20x20cm, com indicador de fluorescência em UV_{254nm} da marca Merck. Cromatofolha (6x6 cm) foram usadas para os testes bioautográficos dos látex.

As CCEP usadas no isolamento de substâncias puras e das misturas de triterpenos, foram preparadas no espalhador "Quickfit" com 1mm de espessura, em suporte de vidro (20x20 cm), de uma mistura em 160ml de água destilada de sílica gel G (30 g) e GF₂₅₄ (50 g) da marca Merck. Em seguida, as placas foram ativadas, em estufa, à 100°C por um período mínimo de 1 hora. A recuperação das amostras foi efetuada por meio de lavagens da sílica com solventes utilizando papel de filtro desengordurado.

A revelação dos compostos nas cromatoplacas foi feita utilizando inicialmente, irradiação com lâmpada ultravioleta (254 nm) seguida da imersão ou pulverização com uma solução, previamente preparada de acordo com a literatura¹⁰⁷ de *p*-anisaldeído e posterior aquecimento em chapa quente ou pistola aquecedora. -Para imersão: na proporção de 1:2:100 em volume de *p*-anisaldeído, H₂SO₄, HOAc glacial e EtOH, respectivamente e para pulverizar: na proporção de ½:1:50 em volume de *p*-anisaldeído, H₂SO₄ e ácido acético glacial.

2.2-CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises dos látex foram feitas em um cromatógrafo Hewlett Packard 5890B SERIES II, acoplado a um espectrômetro de massas HP 5970, equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 ou HP-5 (30m x 0.25mm x 0.25µm). As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente de 290°C e 285°C. O gás de arraste foi Hélio e o programa de temperatura do forno foi de 40°C até 290°C à 4°C/min. Os espectros de massas foram obtidos à 70eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550. A análise por CG/EM dos PS, foi realizada na Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Empregou-se um cromatógrafo Shimadzu 17A, acoplado a um detector seletivo de massas Shimadzu

¹⁰⁷ Casey, M.; Leonard, J.; Lugo, B.; Procter, G. 1990, "Advanced practical organic chemistry". New York, Chapman & Hall, 264p.

QP 5000, equipado com uma coluna capilar fundida DB-5, Shimadzu (30 m x 0.25 mm x 0,25 μ m). As temperaturas usadas no injetor e detector, foram 300 e 250 °C respectivamente. O gás de arraste usado foi hélio, sob fluxo 1,0mL/min. (modo “split”). O programa de temperatura, empregado nesta análise, foi 150-220 °C, 2 °C min⁻¹. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV na faixa de m/z 40-550.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Micromass modelo VG Auto Spec, operando a 70 eV com setor magnético.

Os índices de retenção foram obtidos pela co-injeção das amostras com uma mistura padrão de hidrocarbonetos normais (C₁₁-C₃₀), aplicando a equação de van den Dool e Kratz⁷¹:

$$IR = [(TS - TC_{n-1}) / (TC_n - TC_{n-1}) + 100 \times TC_{n-1}]$$

Onde,

TS = Tempo de retenção da substância analisada,

TC_n = Tempo de retenção do hidrocarboneto que eluiu após a substancia analisada.

TC_{n-1} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que eluiu antes da substância analisada.

C_{n-1} = Número de átomos de carbono do alcano que eluiu antes da substância analisada.

2.3- CROMATOGRAFIA POR PERMEACÃO EM GEL

As análises de homogeneidade foram realizadas em um cromatógrafo Waters, de exclusão estérea de alta pressão, equipado com um detector de índice de refração diferencial, modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiangulos (Waytt Technology- Dawn DSP), com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se 4 colunas de gel

permeação (Watres), com limites de exclusão de $1,10^6$; $4,10^5$; $8,10^4$ e $5,10^3$, em série. O eluente usado foi solução de NaNO_2 $0,1\text{mol.L}^{-1}$ com 200 ppm de NaN_3 , a 20°C e pressão de 920psi. As análises foram feitas injetando-se $500\mu\text{L}$ da solução do PS, com fluxo de $0,6\text{mL/min}$

2.4-RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Com exceção dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT das misturas de triterpenos provenientes do látex das espécies *C. fluminensis* e *C. hilariana*, que foram registrados em um espectrômetro Gemini 300p – Varian Instruments (300 MHz), os espectros das substâncias puras, dos polissacarídeos e das outras mistura de triterpenos, foram registrados em um espectrômetro Varian Inova – 500 (500 MHz).

Todas as amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm. Todos os espectros foram adquiridos a $23,0 \pm 2^\circ\text{C}$, com exceção dos espectros de RMN de ^{13}C dos PS bruto, que foram realizados a $40,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Os deslocamentos químicos de ^{13}C das amostras de PS foram referenciados externamente com TMS (δ 0,00) e para as demais amostras, os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C foram referenciados internamente com o TMS (δ 0,00) ou o CHCl_3 (δ 7,27 para ^1H e δ 77,00 para ^{13}C). Os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^1H foram caracterizados como s = singleto, sl = singleto largo, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, q = quarteto e as constantes de acoplamento (j) foram citadas em Hz. O solvente usado na preparação das substâncias puras e das misturas de triterpenos foi CDCl_3 , e para as amostras brutas de PS, usou-se D_2O .

A distinção entre os carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e carbonos quaternários foi estabelecida através da aquisição de espectros de RMN de ^{13}C

DEPT 90 e 135, em que os carbonos metílicos e metínicos estão dispostos acima da linha base do espectro e os carbonos metilênicos encontram-se abaixo.

As técnicas bidimensionais de correlação homonucleares ^1H , ^1H (gCOSY) e heteronucleares ^1H , ^{13}C (HSQC e gHMBC) foram usadas para corroborar na interpretação dos espectros de RMN.

2.5-ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600, com transformada de Fourier, utilizando filmes sobre cela de KBr para amostras líquidas e pastilhas de KBr para amostras sólidas. A absorção em 1601cm^{-1} foi usada como padrão de referência de um filme de poliestireno.

2.6- ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

Os espectros de UV foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A, equipado com detector de absorção na região do UV visível e com conjunto de diodos.

2.7-ROTAÇÃO ÓTICA

Os valores de rotação ótica dos produtos naturais quirais isolados, foram adquiridos em um polarímetro da marca Carl Zeiss, modelo Polamat A, com lâmpada de mercúrio ($\lambda = 246\text{nm}$) e precisão de $0,005^\circ$. O solvente utilizado foi o clorofórmio. A rotação ótica específica $[\alpha]$, em função da raia D do sódio, foi obtida de acordo com as conversões e procedimentos descritos abaixo, recomendados pelo fabricante:

- a) Conversão da leitura de rotação ótica dos compostos com a lâmpada de Hg para a lâmpada de Na. Esta conversão é feita utilizando a fórmula I

$$\alpha_{\text{Na}}^T = \alpha_{\text{Hg}}/1,17543 \quad (\text{I})$$

onde, - α_{Na}^T é a rotação ótica desejada com a lâmpada de Na a uma dada temperatura.

- α_{Hg} é a rotação ótica inicialmente obtida com a lâmpada de mercúrio no comprimento de onda igual a 546nm;

b) Conversão da temperatura T para temperatura de 20°C. É usada A fórmula II

$$\alpha_{Na}^{20} = \alpha_{Na}^T / [1 + 0,000143 (T - 20)] \quad (II)$$

Onde,

- α_{Na}^{20} é a rotação ótica desejada a 20°C;

- α_{Na}^T é a rotação obtida e convertida para lâmpada de sódio a uma dada temperatura.

c) E por fim, a obtenção da rotação ótica específica através da fórmula III

$$[\alpha_{Na}^{20}] = \text{Rot. ótica observada} / c.l \quad (III)$$

onde,

- "c" é a concentração da amostra em g/mL;

- "l" é o comprimento da cela em decímetros.

3-EXPERIMENTAL REFERENTE À PARTE I

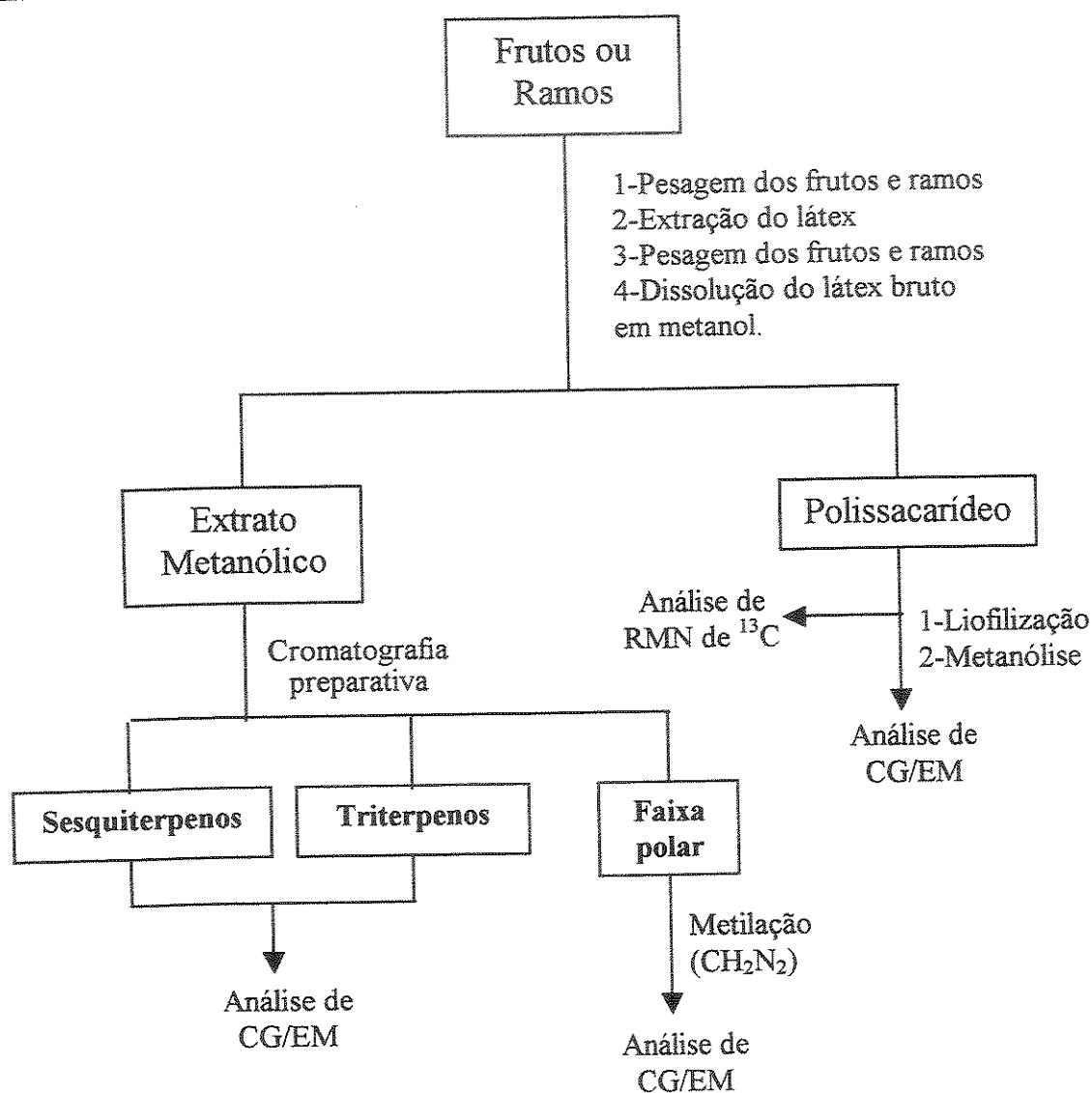
3.1- OBTENÇÃO DO LÁTEX DOS FRUTOS E RAMOS

Com o auxílio de um bisturi, o fruto foi cortado transversalmente e o látex exsudado foi recolhido, em um béquer, com metanol. O látex é facilmente oxidado em contato com o ar, e ao ser dissolvido em metanol obtém-se um precipitado branco, o qual foi posteriormente analisado e caracterizado como sendo um polissacarídeo do tipo arabinogalactano. o extrato obtido foi filtrado, evaporado, pesado e guardado em "freezer" até ser analisado. Para efeito da quantificação média de látex e polissacarídeo por fruto, este procedimento foi realizado em triplicatas, sendo o fruto e pedaços de ramos escolhidos aleatoriamente. O peso

médio do látex foi obtido pela diferença de massa do fruto ou ramo antes e após extração do látex.

Protocolo análogo foi aplicado para obtenção do látex a partir dos ramos de híbridos e seus respectivos parentais. Para quantificar o látex, PS e triterpeno, os ramos foram pesados antes da extração, em triplicata. (Esquema 7).

Esquema 7 procedimento de obtenção e análise do látex de *Clusia*



3.2-TESTE BIOAUTOGRÁFICO

A análise do potencial antimicrobiano do látex (frutos e ramos) das espécies descritas no item 1.2, pg 02, foi realizada através do método bioautográfico^{108,109}. Os resultados dos ensaios bioautográficos foram avaliados qualitativamente, observando-se a existência ou não de halos de inibição comparando-os com os padrões de nistatina e cloranfenicol.

Usou-se cromatoplasas analíticas (sílica gel 60 GF 254, Merck) nas dimensões 6x6cm. Foram aplicados 10 µL de extrato do látex de *Clusia* a partir de uma solução de 10 mg/mL em diclorometano. Para os padrões fungicida (nistatina 1mg/mL) e bactericida (cloranfenicol 4%) foram inoculados 1,0 µL. As placas foram eluídas com diclorometano. Para cada teste, foram preparadas duas placas idênticas, uma delas foi colocada em placa de petri (60mm de diâmetro) e encobertas com os meios de cultura para crescimento de fungos ("Malt Agar"/ MA-DIFCO) ou para bactéria ("Nutrient Broth"/NB-DIFCO). Após o endurecimento do meio de cultura foram feitas as inoculações das suspensões com concentrações 10⁶ células/mL para bactéria e 10⁶ micélio/mL para fungo. Os microorganismos de referência usados nestes testes, encontram-se relacionados no item 1.3, pág. 03. O tempo de incubação foi, para bactérias, de 24 h a 37 °C e para fungos, 48 h a 28 °C. Na leitura dos resultados, a outra cromatoplasa foi revelada com *p*-anisaldeído e comparadas com os resultados obtidos das placas pulverizadas com uma solução de MTT (cloreto de metil-tiazoil-tetrazolium – 1mg/mL)⁶⁰, usada com a finalidade de tornar mais visível o halo de inibição formado.

O manuseio dos materiais, meios de cultura e suspensões de microorganismos foram realizados em capela de fluxo laminar, para que contaminações indesejáveis fossem evitadas.

¹⁰⁸ Betina, V. 1973. *Journal of Chromatography*, 78,41.

¹⁰⁹ Saxena, G.; Farmer, S.; Towers, G.H.N. ; Hancock, R.E.W. 1995, *Phytochemical Analysis*, 6, 125-129.

3.2.1-TESTE BIOAUTOGRÁFICO COM COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO POLAR DO LÁTEX DE *C. grandiflora*.

Foram usados neste teste os compostos: Ácido *cis*- δ -tocotrienólico (18), *cis*- δ -tocotrienolato de metila (18A), *cis*- γ -tocotrienolato de metila (79) e Ácido Olean-12-en-3-oxo-28-óico (78) (Figura 34).

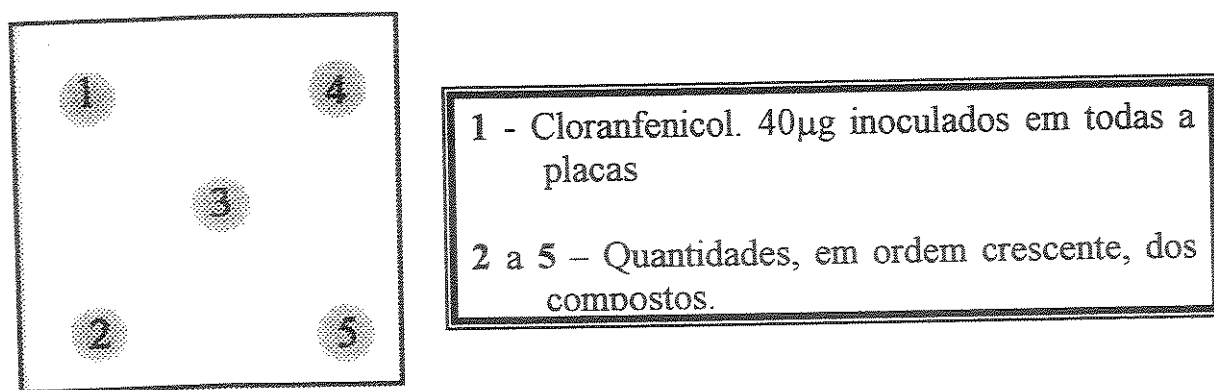


Figura 34 Posição dos compostos na cromatoplaça em sílica gel, com suporte de alumínio, previamente cortada na dimensão 6x6 cm.

O método usado foi semelhante daqueles usados para os extratos do látex. Os melhores resultados observado para o látex foi contra bactérias. Sendo assim, foram escolhidas para este ensaio bioautográfico as bactérias: *Bacillus subtilis*, gram (+) CCT 0089; *Rhodococcus equi*, gram (+) - CCT 0541; *Staphylococcus aureus*, gram (+) - CCT 4295 e *Micrococcus luteus*, gram (+) - CCT 2720; As placas nas dimensões 6x6 Cm foram usadas contendo 4 quantidades diferentes em μ g, para cada um dos compostos testados (Tabela 40). O padrão usado foi o cloranfenicol, 1 μ L de uma solução 4% (40 μ g).

Tabela 40 Quantidade das substâncias utilizadas no ensaio bioautográfico

Nº DE ORDEM	QUANTIDADE (μ g) DOS COMPOSTOS ANALISADOS			
	Composto18	Composto 18A	Composto 79	Composto 78
2	6,3	5	6	5
3	12,5	10	12	10
4	25	20	24	20
5	37	40	40	40

O mesmo procedimento usado para o látex, na leitura dos resultados, foi aplicado para este teste. As placas foram pulverizadas com uma solução de MTT (cloreto de metil-tiazolil-tetrazolium – 1mg/mL)⁶⁰.

3.3-ISOLAMENTO DE FUNGOS A PARTIR DO CAULE E FOLHAS LESIONADAS DE HÍBRIDOS DE *CLUSIA*.

As amostras escolhidas para o isolamento dos fungos, foram o caule de *Clusia lanceolata* x *C. nemorosa* e folha de *C. paralicola* x *C. fluminensis* (Figura 6, pág. 36). As partes coletadas foram encaminhadas à Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello para serem submetidas ao protocolo de isolamento e caracterização de microorganismos. O método usado foi o de esterilização de superfície. Na obtenção de explantes, das amostras coletadas, levou-se em consideração a região de expansão do microorganismo, ou seja, a interface da região sadia com a lesionada.

Os explantes selecionados foram lavados inicialmente com água estéril e, em seguida, foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio 5,% por aproximadamente 1 hora. Após esterilização, já que a solução de hipoclorito de sódio, mesmo em baixa concentração, poderia causar necrose no tecido vegetal, as extremidades dos explantes foram removidas para facilitar o espalhamento e o crescimento de microorganismos. Estes explantes foram inoculados em placas de

petri (60mm de diâmetro) contendo os meios padrões para o crescimento de fungos. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28 °C por um período de 5 dias.

Os meio de cultura sólidos usados para induzir o crescimento de fungos foram: “Malt Agar” – (MA-DIFCO), “Oat Meal” – (OA-DIFCO). Adicionou-se 20 mg de sulfato de estreptomicina nos meios MA e OA, para evitar o crescimento de bactérias.

3.3.1- TESTE DE CAMPO COM OS FUNGOS ISOLADOS

Este teste, bastante preliminar, foi realizado com o intuito de saber se algum dos fungos ou uma combinação entre eles poderiam causar as lesões encontradas em híbridos. O teste consiste em inocular uma solução contaminada pelo fungo ou fungos, através de perfurações, preferencialmente nas folhas de híbridos sadios, com o auxílio de agulhas esmereis. Os experimentos foram acompanhados mês a mês, por um período de seis meses.

3.3.2-TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM OS FUNGOS ISOLADOS.

A técnica modificada de disco de difusão em ágar, método bastante empregado para medir a sensibilidade das bactérias diante dos antibióticos¹¹⁰, foi usada para avaliar a atividade dos fungos isolados de clúsia, contra os microorganismos de referência usados nos testes bioautográficos do látex dos frutos e ramos, item 1.3 , pg. 03.

Os fungos isolados foram repicados em meio (MA) e incubados por uma semana a 28 °C. Suspensões 10^6 de células/mL para bactérias e de esporos para fungos, dos microorganismos referência, foram trazidas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. Os meios de cultura específicos para cada linhagem testada foram espalhados em placa de Petri (60 mm de diâmetro), com

¹¹⁰Allen, K.; Sammers, D. J. Diagnóstico microbiológico, Texto e Atlas Colorido, 2ª ed., Editora Médica Panamericana, São Paulo.1993.

auxílio de um "swab", em seguida retirou-se da placa contendo os fungos isolados, uma alíquota do meio sólido com o microorganismo em forma de um círculo com aproximadamente Ø5mm de diâmetro e os transferiu para cada uma das placas recém semeadas com os microorganismos de referência. As placas semeadas com bacterias e fungos foram incubadas a 37 °C por 24 horas e 28 °C por 5 dias, respectivamente.

3.4-METODOLOGIA APLICADA AO LÁTEX PARA CARACTERIZAÇÃO DE SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS.

Análise preliminar do látex por CCD, usando como eluente hexano/acetato de etila (9:1), apresentaram comportamento semelhantes, revelando 3 faixas distintas: polar, intermediária e apolar.

Uma alíquota de 100mg do extrato metanólico do látex foi submetida à cromatografia em camada espessa preparativa (CCEP), usando-se como eluente, hexano: acetato de etila (98:2). Todos os extratos brutos do látex das diferentes espécies, inclusive dos híbridos e seus parentais, tiveram comportamento semelhantes, quando submetidos a CCDEP, apresentando uma separação em 3 faixas principais, denominadas de apolar ($R_f = 0.90-0.50$), intermediária ($R_f = 0.45-0.35$) e polar ($R_f < 0.25$). As duas primeiras, foram extraídas da sílica com uma mistura de diclorometano e acetato de etila, enquanto que para a polar usou-se uma mistura de 3:1 dos solventes: acetato de etila e metanol. As análises preliminares, por CG/EM das faixas apolar e intermediária, revelaram que eram constituídas, respectivamente por sesquiterpenos e triterpenos. Sendo assim, decidiu-se reuni-las, passando-se a se chamar apenas de Faixa Apolar*. A fração polar foi guardada em freezer para análise posterior.

Desta forma, o estudo químico do látex seguiu o seguinte roteiro: 1- Análise da fração apolar; 2- Análise da fração polar; 3- Análise do polissacarídeo.

*A faixa apolar compreende ao intervalo de fator de retenção (R_f) igual a 0.90-0.35 e a polar de $R_f < 0.25$.

3.4.1- ANÁLISE DA FRAÇÃO APOLAR

A análise da faixa apolar foi realizada por CG/EM, cujos constituintes químicos foram identificados com base nos índices de retenção, comparação dos espectros de massas obtidos com banco de dados Wiley/NBS (270.000 espectros) e com os da literatura⁷²

3.4.1.1- ISOLAMENTO DAS MISTURAS DE TRITERPENOS

100mg do látex das espécies *C.paralicola*, *C.weddelliana*, *C.spiritu-sanctensis*, *C. rosea*, e *C. lanceolata* foram submetidos a CCEP. Análise por CCD com hexano/acetato de etila (9:1), mostrou uma única mancha de forte intensidade para faixa intermediária. O resultado da CCD, junto com a análise de RMN de ¹H e ¹³C, sugeriram que esta fração é constituída por triterpenos. A metodologia empregada para caracterizar os triterpenos que constituem a mistura, consiste na obtenção e análise dos espectros de RMN de ¹³C, auxiliado pela técnica DEPT 90 e 135° em conjunto com a CG/EM.

3.4.2- ANÁLISE DA FRAÇÃO POLAR

Foram analisadas as faixas polares dos látex provenientes de uma espécie, pertencente a cada seção taxonômica do gênero: (seção Cordylandra : *C. paralicola*; seção Chlamydoclusia: *C. grandiflora*; seção Criuva: *C. parviflora* e seção Phloianthera: *C. hilariana*).

Uma alíquota de 20mg das frações polares extraídas a partir da CCEP no item 6, pg. 12., foram metiladas com 1 mL de uma solução etérea de CH₂N₂. após 1 hora de reação, o solvente foi evaporado e mais 1ml de CH₂N₂ foi adicionado para garantir completa metilação do extrato. Após eliminar o excesso de CH₂N₂, o solvente foi evaporado, adicionou-se mais DCM, secou com Na₂SO₄, filtrou e evaporou o solvente. As frações polares metiladas foram submetidas à análise por

CG/EM e os compostos identificados de acordo com o procedimento descrito no item 6.1, pg. 12.

3.4.3- ISOLAMENTO DO POLISSACARÍDEO

O PS foi isolado do látex dos frutos de *Clusia* de acordo com o procedimento descrito no item 3, pg.08. O polissacarídeo precipitado em metanol foi filtrado, dializado contra água destilada e liofilizado. O método usado para caracterização parcial do PS foi por meio da CG/EM em conjunto da RMN de ^{13}C .

As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico⁹¹, utilizando-se como padrão galactose na concentração de $70\mu\text{g/mL}$. As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry e col⁹², utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e como padrão uma solução de soro-albumina cristalina. Ambas dosagens foram feitas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Os espectros na região do IV foram obtidos em pastilhas de KBr

3.4.3.1-ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE

Preparou-se uma solução de 2,0 mg do PS em 1,0 mL de solução de NaNO_2 0,1 M e outra de NaN_3 200ppm dissolvidas em água millQ, previamente filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 e $0,22\mu\text{m}$ (MILLIPORE).

3.4.3.2- METANÓLISE

A metanólise foi realizada por meio do procedimento de Ha e Thomas⁹³. 1,5 mg das amostras de PS liofilizadas, bem como dos carboidratos e das gomas vegetais (ácidos poligalacturônicos, goma guar, goma xantana) usadas como padrões, foram dissolvidas em uma solução previamente preparada de ácido metanólico, adicionando-se 0,4 mL de cloreto de acetila a 14,0 mL de metanol anidro. A solução foi submetida a 80°C por 24 h. Em seguida, O solvente foi

removido com fluxo de nitrogênio e 0.5 mL do agente sililante (piridina: hexametildisilazano: trimetilclorosilano, 3:1:9 v/v/v) foi adicionado ao resíduo e aquecido a 80°C por 2h. o excesso do agente sililante foi removido e 1 mL de hexano foi adicionado. Após centrifugação, 1 µL do sobrenadante das amostras foram analisados por CG/EM.

3.5-OBTENÇÃO DAS CERAS EPICUTICULARES

As espécies, cujas folhas foram analisadas, encontram-se relacionadas nas Tabelas 32 e 33, item 1.2, pg. 03. Folhas adultas foram coletadas em árvores que crescem em condições naturais.

O solvente usado para extração das ceras foi clorofórmio. O procedimento para obtenção dos extratos seguiu o seguinte roteiro:

- 1- As folhas coletadas foram lavadas, cuidadosamente, com água corrente.
- 2- As folhas limpas foram pesadas em triplicata e acondicionadas em becher, com clorofórmio, tendo o cuidado de sempre colocar a base do pecíolo para cima evitando alguma contaminação por látex.
- 3- As ceras foram extraídas de ambos os lados da folha, durante 30min., em banho de ultra-som.
- 4- Individualmente, os extratos foram evaporados e conservados em “freezer” até a análise química.

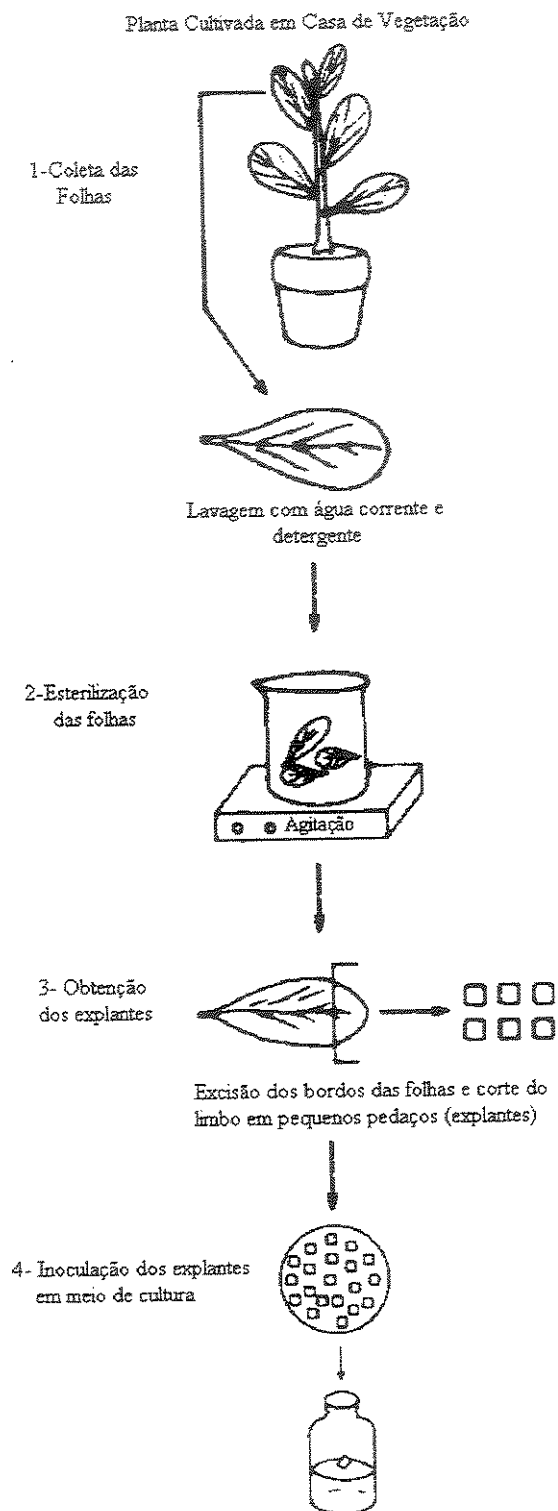
4-EXPERIMENTAL REFERENTE À PARTE II

4.1-CULTURA DE TECIDO DE ESPÉCIE NATIVA DE *CLUSIA*, FONTE E PREPARAÇÃO DOS EXPLANTES

O híbrido foi obtido através da polinização artificial (M.C.E. Amaral & V. Bittrich) a partir de clúsias cultivadas no Instituto Agronômicas de Campinas e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Botânica da UNICAMP. Os explantes foram preparados a partir das folhas mais apicais, já expandidas de *C. paralicola* x *C. weddelliana*. As folhas foram coletadas em julho de 1998. As folhas coletadas foram inicialmente lavadas com água corrente e detergente. Em seguida foram esterilizadas, inicialmente, por imersão, em uma solução 10% do fungicida comercial "Benlate" por 40 min. seguida da esterilização propriamente dita por meio de uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial 1,5% com água estéril, juntamente com uma gota de "Tween 20", por um período de 20 min.. Tanto o pré-tratamento, quanto à esterilização superficial foi realizada sob agitação constante.

As etapas de esterilização para folhas jovens e as obtenções de explantes para serem inoculados em meio de cultura, são mostrados no esquema 8.

Esquema 8 Etapas de esterilização e obtenção dos explantes



4.2-MEIO DE CULTURA

Neste trabalho, o meio de cultura usado foi baseado na composição salina descrita por Murashige & Skoog¹¹¹. Os componentes orgânicos (meso-inositol, sacarose, Agar e piridoxina) e as concentrações dos outros constituintes se basearam também em Murashige & Skoog¹¹⁰.

Este meio de cultura (composição salina + composição orgânica) foi padrão nos experimentos realizados neste trabalho e passou a ser denominado de meio Básico MS. O meio denominado de Definitivo MS é o meio básico MS suplementado com os fitorreguladores. Na preparação destes meios, o Agar é adicionado após ser ajustado o valor do pH do meio, contendo todos os outros constituintes, para 5,8 com soluções de KOH ou HCl, sendo autoclavado em seguida.

4.3- TESTE DE VIABILIDADE DOS EXPLANTES

O teste de viabilidade dos explantes foi realizado através do cultivo em meio Básico MS. Os explantes obtidos no item 7.1, pg. 16, foram transferidos para tubos com 3,0cm de diâmetro e 8,0 cm de comprimento.(um explante em cada tubo) contendo meio Básico MS. A incubação foi por um período de 3-5 dias, no escuro a temperatura ambiente. A avaliação dos explantes, após o período de incubação, levou em consideração a contaminação por fungos ou bactérias, ou sua oxidação para definir a viabilidade ou não do explante obtido.

4.4-PROTOCOLO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE CALO

O método utilizado para estabelecer a melhor relação entre os efeitos dos hormônios em meio de cultura definitivo foi o experimento de quadrado latino¹¹². Este experimento é realizado em duas dimensões, ou seja, os gradientes de

¹¹¹Murashige, T. & Skoog. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

¹¹² Gomes, F.P. 1976, "Curso de estatística experimental" Livraria nobel S.A, Piracicaba-SP. pag. 106 -129.

concentração são escolhidos para cada um dos fatores. Os fatores são os hormônios avaliados e se referem aos eixos da abscissa (x) e coordenada (y). Assim, cada nível do fator *x* é testado em combinação com todos os outros níveis do fator *y*.

Os explantes, considerados viáveis, foram testados no meio definitivo, suplementado pela combinação de uma fonte de auxina e outra de citocinina. Foram realizados 8 experimentos em duplicata (Tabela 41) com diferentes interações dialélicas, entre os fitorreguladores. Cada tratamento é constituído por 5 explantes, utilizando frascos redondos com 10mL de meio, com um explante por frasco.

Tabela 41 Combinação dialélica dos fitorreguladores no cultivo dos explantes

Exp. Nº	Combinações dos Fitorreguladores				Trat Nº	Expl. Nº	Mês/Ano
	Auxina – mg/L		Citocinina – mg/L				
01	AIA	0; 5; 10; 25	BA	0; 0.1; 1	12	5	Jul/1997
02	AIA	0; 2.5; 5; 10	BA	0; 0.1; 1; 5	12	5	Out/1997
03	2,4-D	0; 0.1; 1; 1.5	KIN	0; 0.1; 1	12	5	Abr/1998
04	2,4-D	0.1; 0.5; 1.5; 2.5	KIN	0; 0.1; 1	12	5	Jun/1998
05	AIA	0; 5; 25	KIN	0; 0.1; 1; 5	12	5	Jul/1998
06	AIA	2.5; 5; 10; 25	KIN	0; 0.1; 1	12	5	Ago/1998
07	2,4-D	2; 5; 10; 25	BA	0; 0.1; 1	12	5	Mar/1999
08	2,4-D	1; 2.5; 5	BA	0; 0.1; 1; 2	12	5	Mai/1999

Os experimentos foram feitos em duplicata, onde um dos experimentos, os explantes inoculados foram cultivados em presença de luz branca fluorescente e o outro na ausência de luz. O período de incubação para ambos os experimentos foi de 28 dias a temperatura ambiente com intervalos de 7 para avaliação.

Neste período, observou-se o percentual de contaminação, oxidação e se houve ou não desdiferenciação, ou seja, formação do calo.

4.5- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE CALOS

Ao término da cultura primária (cultivo dos explantes viáveis no meio Definitivo MS) foram avaliados: o nível de contaminações, explantes oxidados e o

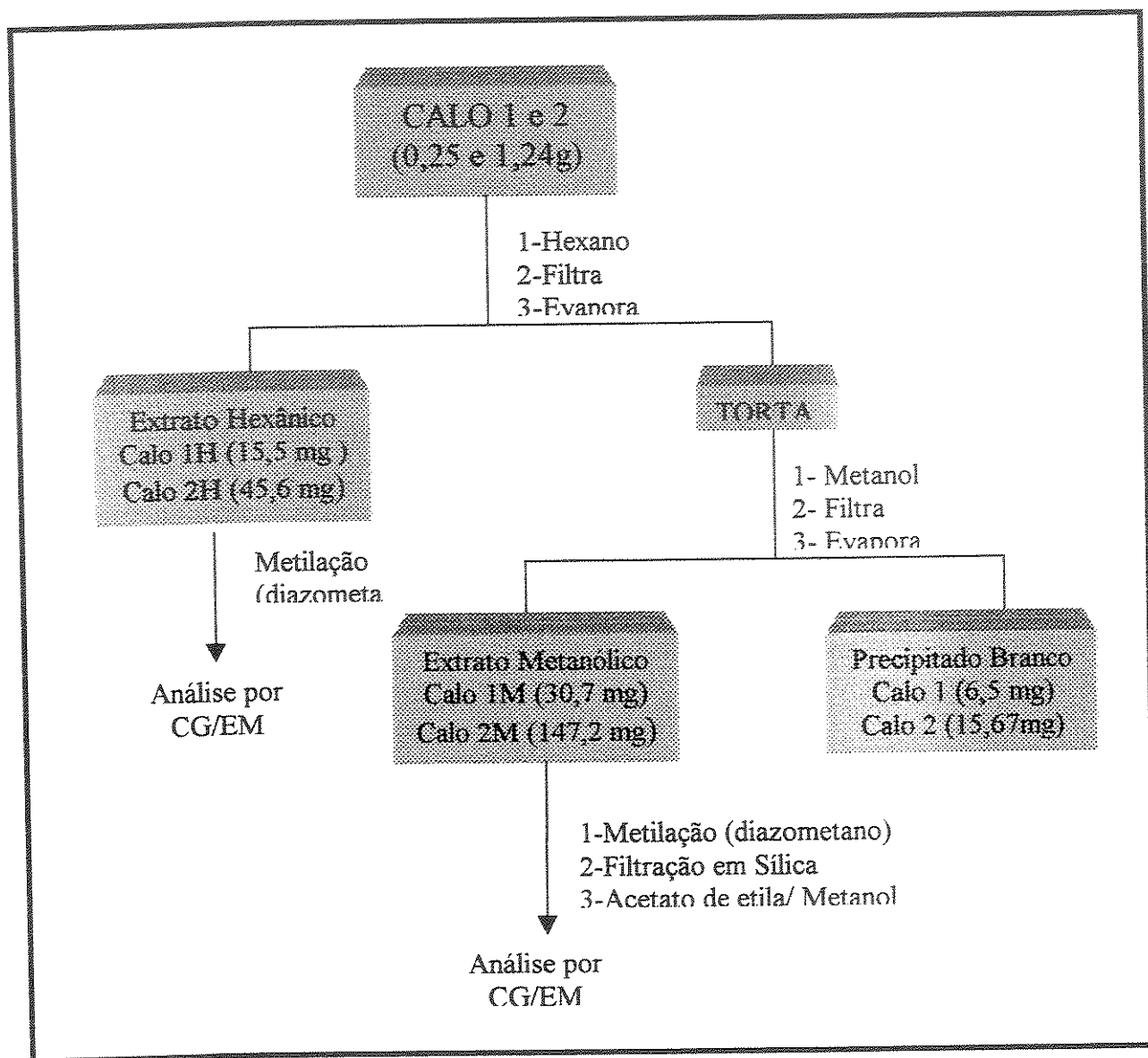
aspecto dos calos formados. Para avaliar o crescimento de calos, adotou-se o critério do aumento de peso fresco, que é o valor do peso fresco do calo formado dividido pelo peso do explante inicial. Nesta avaliação, dos 5 explantes inoculados em cada tratamento, aquele que formou o calo mais volumoso. Estas avaliações foram realizadas apenas com o experimento de número 05 por apresentar o melhor resultado para obtenção de calos. O valor do peso fresco dos calos e explantes após 28 dias de cultivo, foi dividido pelo peso do explante inicialmente inoculado, utilizando-se como avaliação de crescimento o aumento de peso fresco dos tecidos.

4.6-OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO CALO E MEIO DE CULTURA

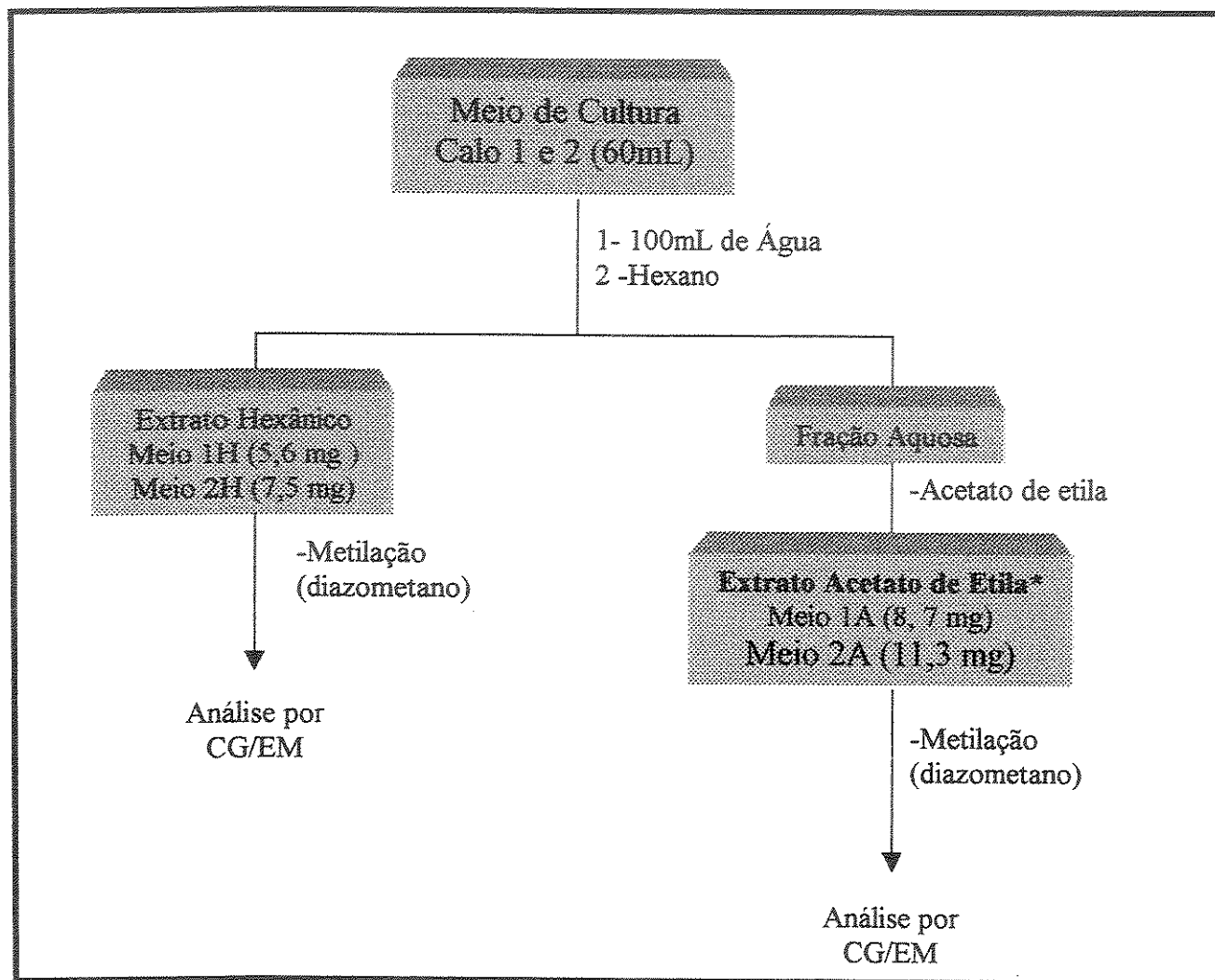
Os extratos hexânico, metanólico do Calo e acetato de etila dos respectivos meios de cultura foram obtidos a partir de diferentes idades, após 28 dias e com 8 meses de crescimento, denominados respectivamente de Calo 1 e Calo 2.

Com o calo cultivado em 8 meses, O meio de cultura analisado foi o da última subcultura. Obtiveram-se 2,57 g e 12,40 g, peso fresco, de Calo 1 e Calo 2, respectivamente, os quais foram secos à temperatura ambiente, fornecendo 0,25 g e 1,24 g respectivamente e submetidos a sucessivas extrações com hexano, e metanol (três vezes com intervalos de 24 horas) Esquema 8. A obtenção dos extratos (Meio 1 e 2) a partir do meio de cultura dos Calos 1 e 2 foi através de partição com hexano e acetato de etila (Esquema 9). Os extratos obtidos dos calos (Calo 1H, Calo 2H e Calo 1M, Calo 2M) e dos meios de cultura dos Calos 1 e 2 (Meio 1H, Meio 2H, Meio 1A, Meio 2A), após metilação com diazometano, foram submetidos à análise por CG/EM.

Esquema 9 Fluxograma da obtenção dos extratos a partir dos calos de *Clusia Paralicola* X *Clusia Weddeliana*



Esquema 10 Fluxograma da obtenção dos extratos a partir dos meios de cultura dos calos de *Clusia paralicola* X *Clusia weddeliana*

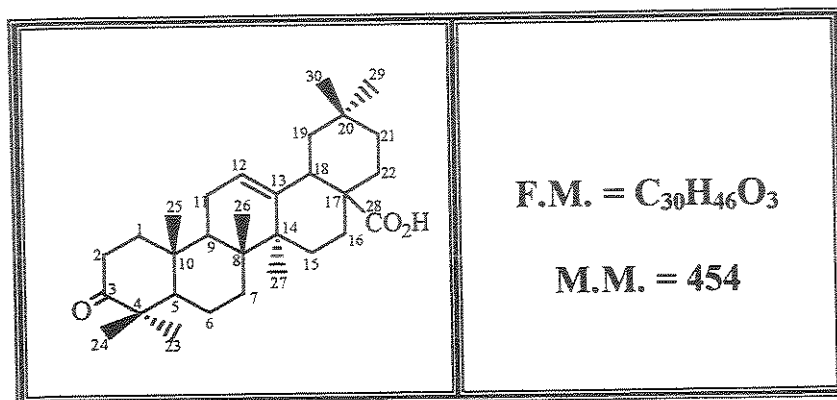


4.7-METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO CALO E MEIO DE CULTURA

Os extratos obtidos a partir do calo e meio de cultura foram metilados, com diazometano, de acordo com o procedimento descrito para fração polar do látex, item 6.2, pg. 14. Os extratos metilados foram analisados por CG/EM e os compostos identificados, como realizado para fração apolar e polar metilada do látex dos frutos.

5- DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO LÁTEX DE *CLUSIA*.

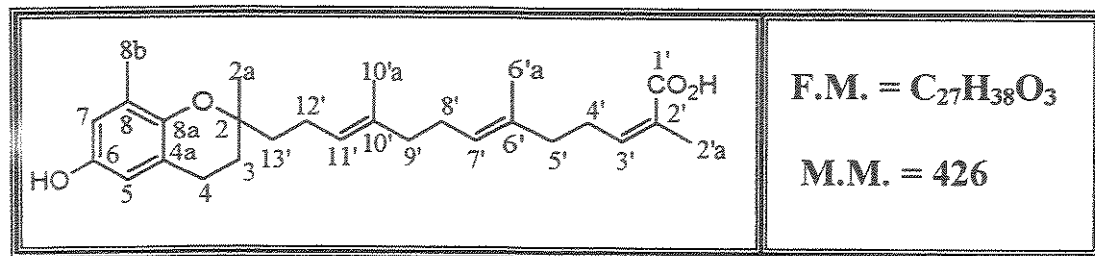
5.1-DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (78)



Nomenclatura: Ácido olean-12-en-3-oxo-28-óico

- **Propriedades Organolépticas:** Sólido branco inodoro
- **IV:** (Pastilha de KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3454-3300, 1687, 1637, 1222, 1265
- **EMAR:** M^+ Experimental = 454.3445 e M^+ Calculado para $C_{30}H_{46}O_3$ = 454.3447
- **EM:** m/z (%): 69 (16%), 203 (36%), 248 (100%), 249 (9%)
- **RMN¹H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 0,82 (s, 3H, CH_3 sobre C-8), 0,91 (s, 3H, CH_3 sobre C-20), 0,94 (s, 3H, CH_3 sobre C-20), 1,04 (s, 3H, CH_3 sobre C-4), 1,06 (s, 3H, CH_3 sobre C-10), 1,09 (s, 3H, CH_3 sobre C-4), 1,15 (s, 3H, CH_3 sobre C-14), 1,34 (m, 1H, H-5), 1,49 (m, 2H, H-6), 1,58 (m, 2H, H-19), 1,62 (m, 2H, H-11), 1,64 (M, 1H, H-9), 1,76 (m, 2H, H-22), 1,90 (m, 2H, H-1), 1,98, (m, 2H, H-16), 2,47 (m, 2H, H-2), 2,84 (m, 1H, H-18), 5,31 (sl, 1H, H-12).
- **RMN¹³C** (125,70 MHz, $CDCl_3$) δ : 217.7 (C-3), 183.0 (C-28), 143.6 (C-13), 122.4 (CH-12), 55.3 (CH-5), 47.4 (C-4), 46.9 (CH-9), 46.6 (C-17), 45.8 (CH₂-19), 41.8 (C-14), 41.1 (CH-18), 39.3 (C-8), 39.1 (CH₂-1), 36.8 (C-10), 34.2 (CH₂-2), 33.8 (CH₂-21), 33.1 (CH₃-29), 32.4 (CH₂-22), 32.2 (CH₂-7), 30.7 (C-20), 27.7 (CH₂-15), 26.4 (CH₃-23), 25.8 (CH₃-27), 23.6 (CH₃-30), 23.5 (CH₂-16), 22.8 (CH₂-11), 21.5 (CH₃-24), 19.6 (CH₂-6), 17.0 (CH₃-26), 15.0 (CH₃-25).

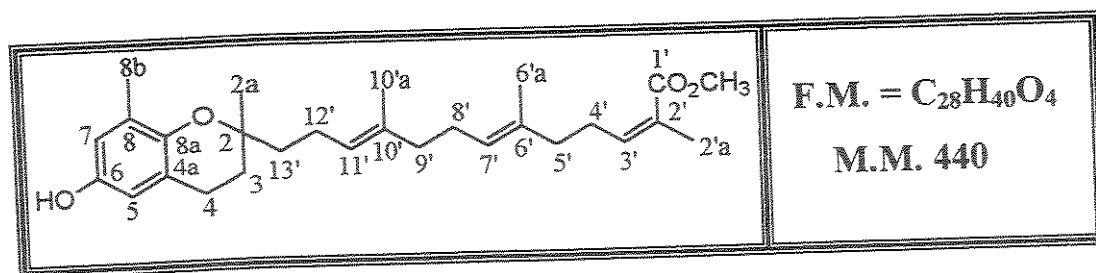
5.2-DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (18)



Nomenclatura: Ácido 13-(3,4-dihidro-6-hidroxi-2,8-dimetil-2H-1-benzopiran-2-il)-2,6,10-trimetiltrideca (2Z, 6E, 10E) trienóico

- **Propriedades Organolépticas:** Óleo amarelado, de cheiro característico adocicado.
- $[\alpha]_D^{20}$: -2,8° (0,1dm, c.6,13, CHCl₃)
- **UV**, λ_{max} : 298nm.
- **IV**: (filme, ν_{max} cm⁻¹), 3540-3200, 1668.
- **EMAR**: 426,27745 (M⁺). Calculado para C₂₇H₃₈O₃: 426,27701.
- **EM**: m/z (%): 426 (M⁺ 100), 192 (19), 191 (8), 177 (40), 137 (11), 136 (93), 121 (13), 93 (21), 81 (12), 55 (20).
- **RMN¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 1,26 (s, 3H, CH₃ sobre C-2), 1,58 (s, 6H, 2CH₃ sobre C-10'a e C-6'a), 1,77 (m, 2H, H-3), 1,91 (s, 3H sobre C-2'), 1,98 (tl, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-9'), 2,06 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-5'), 2,10 (m, 4H, H-12' e H-8'), 2,12 (s, 3H, CH₃ sobre C-8b), 2,62 (m, 2H, H-4'), 2,70 (td, 2H, $J = 6,7$ e $2,2$ Hz, H-4), 5,13 (tq, 2H, $J = 7,1$ e $1,2$ Hz, H-11' e H-7'), 6,07 (tq, 1H, $J = 7,3$ e $1,5$ Hz, H-3'), 6,39 (dl, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-5), 6,49 (dl, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-7).
- **RMN¹³C** (125,70 MHz, CDCl₃) δ : 172,7 (C-1'), 147,7 (C-6), 146,4 (CH-3'), 146,0 (C-8a), 135,0 (C-10'), 134,1 (C-6'), 127,4 (C-2'), 126,0 (C-8), 125,0 (CH-11'), 124,3 (CH-7'), 121,3 (C-4a), 115,6 (CH-7), 112,6 (CH-5), 75,3 (C-2), 39,6 (CH₂-13'), 39,0 (CH₂-9' e CH₂-5'), 31,4 (CH₂-3), 28,2 (CH₂-4'), 26,6 (CH₂-8'), 24,1 (CH₃-2a), 22,5 (CH₂-4), 22,2 (CH₂-12'), 20,5 (CH₃-2'), 16,1 (CH₃-8b), 15,8 (CH₃-6'a), 15,9 (CH₃-10'a).

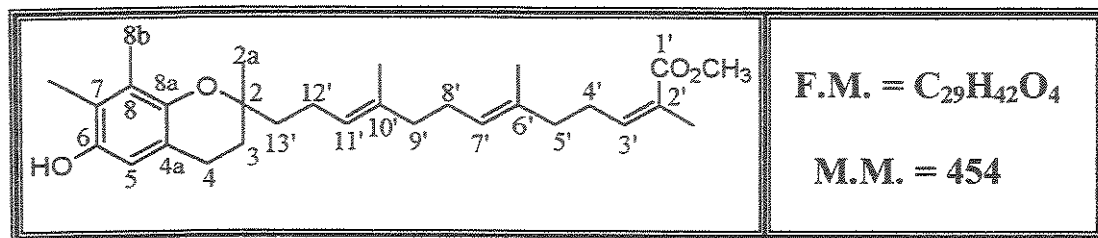
5.3-DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (18A)



Nomenclatura: 13-(3,4-dihidro-6-hidroxi-2,8-dimetil-2H-1-benzopiran-2-il)-2,6,10-trimetiltrideca (2Z, 6E, 10E) trienolato de metila.

- **Propriedades Organolépticas:** Óleo amarelado, de cheiro doce.
- $[\alpha]_D^{20}$: $-3,4^\circ$ (0,1dm, c. 2,53, $CHCl_3$)
- UV, λ_{max} : 298nm.
- IV: (filme, ν_{max} cm^{-1}), 3472, 1716, 1219.
- EM: m/z (%): 440 (M^+ 90), 192 (20), 177 (73), 175 (15), 137 (100), 121 (55), 93 (40), 81 (32), 55 (32).
- **RMN¹H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 1,26 (s, 3H, CH_3 sobre C-2), 1,57 (s, 6H, $2CH_3$ sobre C-10'a e C-6'), 1,77 (m, 2H, H-3), 1,88 (s, 3H sobre C-2'), 1,96 (tl, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-9'), 2,05 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-5'), 2,09 (m, 4H, H-12' e H-8'), 2,12 (s, 3H, CH_3 sobre C-8b), 2,54 (m, 2H, H-4'), 2,69 (td, 2H, $J = 6,7$ e $2,2$ Hz, H-4), 3,60 (s, 3H, $-OCH_3$), 5,12 (tq, 2H, $J = 7,1$ e $1,2$ Hz, H-11' e H-7'), 5,92 (tq, 1H, $J = 7,3$ e $1,5$ Hz, H-3'), 6,38 (dl, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-5), 6,48 (dl, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-7).
- **RMN¹³C** (125,70 MHz, $CDCl_3$) δ : 168,6 (C-1'), 147,8 (C-6), 146,4 (CH_3 '), 146,0 (C-8a), 135,0 (C-10'), 134,1 (C-6'), 126,6 (C-2'), 127,3 (C-8), 124,3 ($CH_{11'}$), 124,9 ($CH_{7'}$), 121,2 (C-4a), 115,6 (CH_7), 112,6 (CH_5), 75,3 (C-2), 51,2 ($-OCH_3$), 39,6 ($CH_2_{13'}$), 39,1 ($CH_2_{9'}$), 39,5 ($CH_2_{5'}$), 31,3 (CH_2_3), 28,0 ($CH_2_{4'}$), 26,5 ($CH_2_{8'}$), 24,0 (CH_3_{2a}), 22,1 (CH_2_4), 22,4 ($CH_2_{12'}$), 20,6 ($CH_3_{2'a}$), 16,1 (CH_3_{8b}), 15,8 ($CH_3_{6'a}$), 15,9 ($CH_3_{10'a}$).

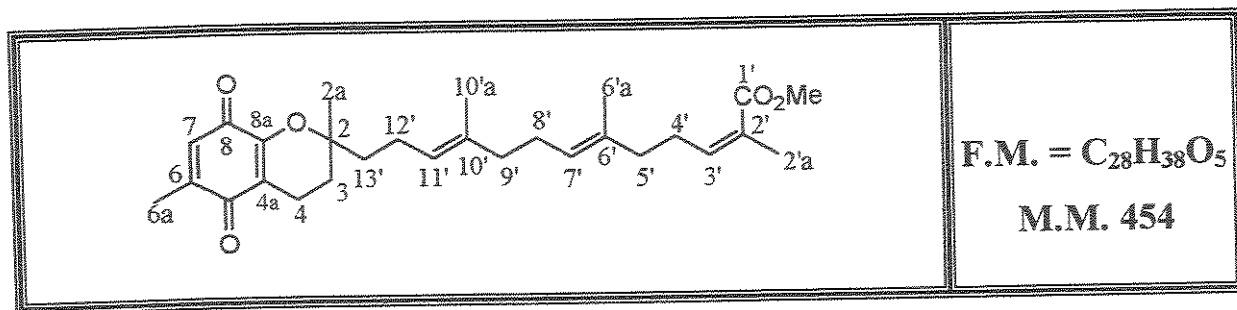
5.4-DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (79)



Nomenclatura: 13-(6-hidroxi-2,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano-2-il) 2-6,10-trimetiltrideca-(2Z,6E,10E)-trienolato de metila. (Cis- γ -tocotrienolato de metila).

- **Propriedades Organolépticas:** Óleo amarelado, de cheiro doce.
- $[\alpha]_D^{20}$: $-6,5^\circ$ (0,1dm, c. 0,09, $CHCl_3$)
- UV, λ_{max} : 298nm.
- IV: (filme, ν_{max} cm^{-1}), 3451, 1716, 1224.
- EMAR: 454,30840 (M^+). Calculado para $C_{29}H_{42}O_4$: 454,30831.
- EM: m/z (%): 454 (M^+ 63), 191 (25), 189 (18), 151 (100), 121 (27), 93 (20), 81 (12), 55 (22).
- RMN¹H (500 MHz, $CDCl_3$) δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 1,26 (s, 3H, CH_3 sobre C-2), 1,57 (s, 3H, CH_3 sobre C-6'), 1,59 (s, 3H, CH_3 sobre C-10'), 1,88 (m, 3H, CH_3 sobre C-2'), 1,97 (tl, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-9'), 2,03-2,09 (m, 6H, H-12', H-8', H-5'), 2,11 (s, 3H, CH_3 sobre C-8), 2,13 (s, 3H, CH_3 sobre C-7), 2,54 (m, 2H, H-4'), 2,68 (dd, 2H, $J = 11,6$ e $6,4$ Hz, H-4), 3,73 (s, 3H, $-OCH_3$), 5,12 (m, 2H, H-3' e H-7'), 5,93 (tq, 1H, $J = 7,2$ e $1,2$ Hz, H-3'), 6,37 (s, 1H, H-5).
- RMN ¹³C (125,70 MHz, $CDCl_3$) δ : 168,5 (C-1'), 146,3 (C-6), 145,7 (CH-3'), 143,7 (C-8a), 135,0 (C-10'), 134,2 (C-6'), 125,8 (C-2'), 126,8 (C-8), 124,4 (CH-11'), 124,9 (CH-7'), 118,2 (C-4a), 121,6 (CH-7), 112,1 (CH-5), 75,2 (C-2), 51,2 ($-OCH_3$), 39,7 (CH_2 -13'), 39,6 (CH_2 -9'), 39,1 (CH_2 -5'), 31,4 (CH_2 -3), 28,0 (CH_2 -4'), 26,6 (CH_2 -8'), 24,0 (CH_3 -2a), 22,3 (CH_2 -4), 22,2 (CH_2 -12'), 20,6 (CH_3 -2'a), 11,9 (CH_3 -8b), 15,9 (CH_3 -6'a), 15,8 (CH_3 -10'a).

5.5-DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (80)



Nomenclatura: 13-(2,6-dimetil-5,8-dioxo-3,4,5,8-tetraidro-2H-2-cromenil)-2,6,10-trimetiltrideca-(2Z,6E,10E)-trienolato de metila.

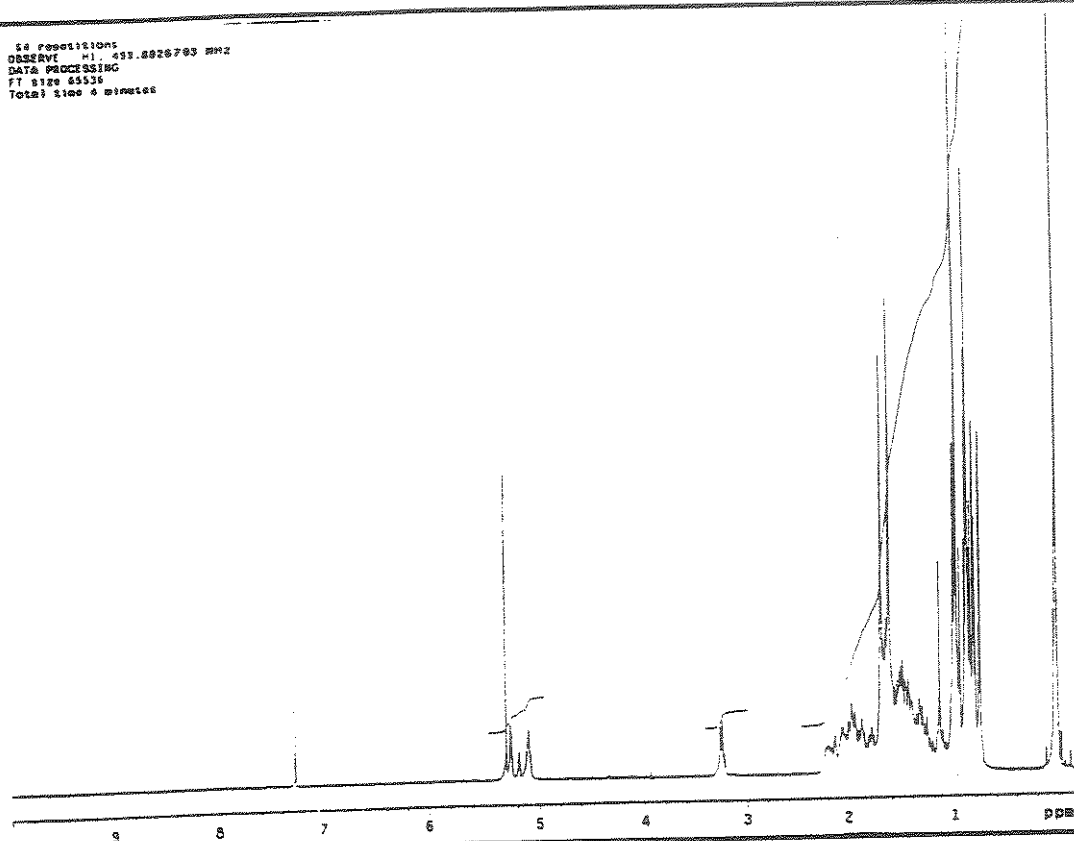
- **Propriedades Organolépticas:** Óleo amarelado, de cheiro doce.
- $[\alpha]_D^{20}$: -117,5° (0,1dm, c. 0,12, CHCl₃)
- **UV**, λ_{max} : 326nm.
- **IV**: (filme, ν_{max} cm⁻¹), 3385, 1715, 1242.
- **EMAR**: 456,28161 (M⁺). Calculado para C₂₈H₄₀O₅: 456,28153 .
- **EM**: m/z (%): 456 (M⁺ 37), 425 (2%), 193 (37), 189 (18), 153 (48), 121 (100).
- **RMN¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 1,32 (s, 3H, CH₃ sobre C-2), 1,60 (s, 3H, CH₃ sobre C-10'), 1,61 (s, 3H, CH₃ sobre C-6'), 1,80 (m, 2H, H-3), 1,88 (m, 3H, CH₃ sobre C-2'), 1,98 – 2,06 (m, 8H, H-12', H-5', H-8', H-5'), 2,10 (s, 3H, CH₃ sobre C-6), 2,32 (m, 2H, H-4), 2,56 (m, 2H, H-4'), 3,72 (s, 3H, -OCH₃), 5,11 (m, 2H, H-11' e H-7'), 5,85 (tq, 1H, $J = 7,2$ e $1,2$ Hz, H-3'), 6,16 (s, 1H, H-6).
- **RMN¹³C** (125,70 MHz, CDCl₃) δ : 180,7 (C-8), 177,9 (C-5), 168,5 (C-1'a), 162,1 (C-8a), 150,3 (C-7), 143,3 (CH-11), 136,0 (C-10'), 134,4 (C-6'), 126,7 (C-2'), 126,6 (CH-6), 124,6 (CH-11'), 123,1 (CH-7'), 112,2 (C-4a), 81,1 (C-2), 51,2 (-OCH₃), 39,6 (CH₂-9'), 39,6 (CH₂-5'), 39,1 (CH₂-13'), 29,6 (CH₂-3), 28,0 (CH₂-4'), 26,5 (CH₂-8'), 23,8 (CH₃-2a), 22,0 (CH₂-12'), 20,6 (CH₂-2'a), 17,9 (CH₃-7a), 16,0 (CH₃-6'a), 15,9 (CH₃-10'a), 15,6 (CH₂-4).

- **Espectros**

- **Correlação dos sinais de RMN de ^{13}C das misturas triterpênicas**

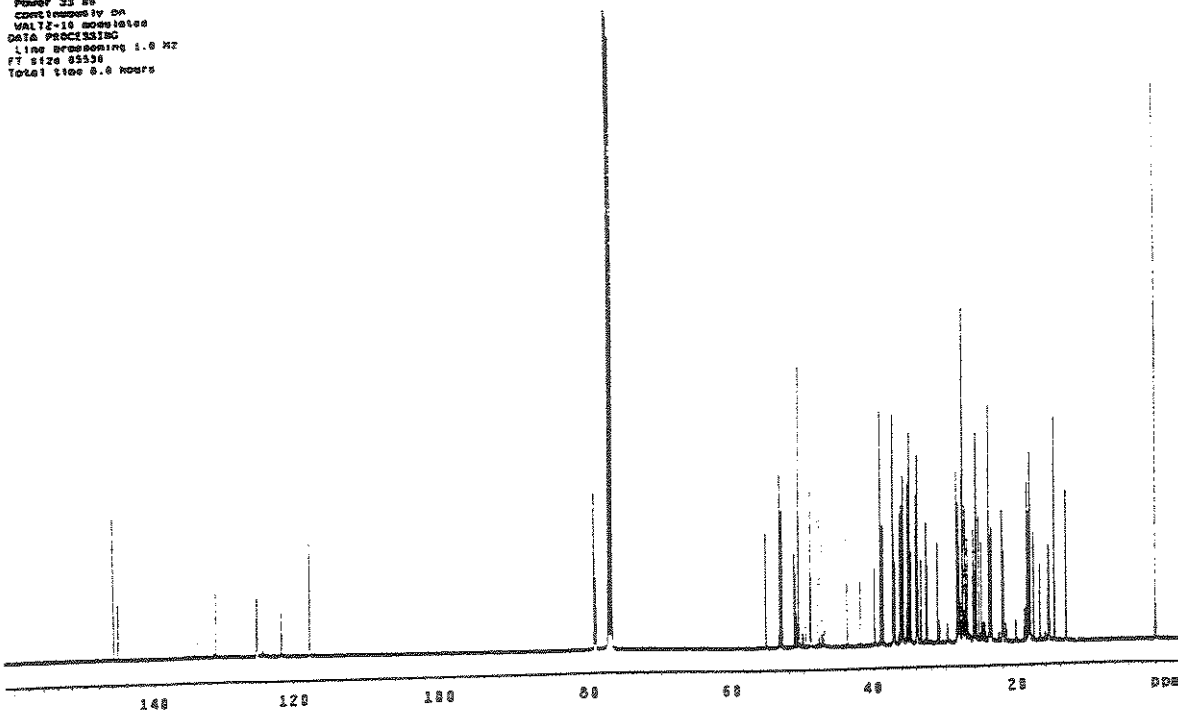
ESPECTROS

54 repetitions
OBSERVE H1. 499.8026789 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 6 minutes



E-01 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. paralicola*.

14166 repetitions
OBSERVE C13. 125.8055858 MHz
DECOUPLE H1. 499.8051652 MHz
Power 35 dB
Continuously on
WALTZ-16 decoupled
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 9.0 hours



E-02 Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. paralicola*.

ESPECTROS

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 20.0 degrees
Acq. time 1.024 sec
Width 32000.0 Hz
2358 repetitions
OBSERVE C13. 125.8655353 MHz
DECOUPLE H1. 499.8651832 MHz
Power 35 dB
On during acquisition
Off during delay
WALTZ-16 modulation
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 4.8 hours

A

B

130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

E-03 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. paralicola*

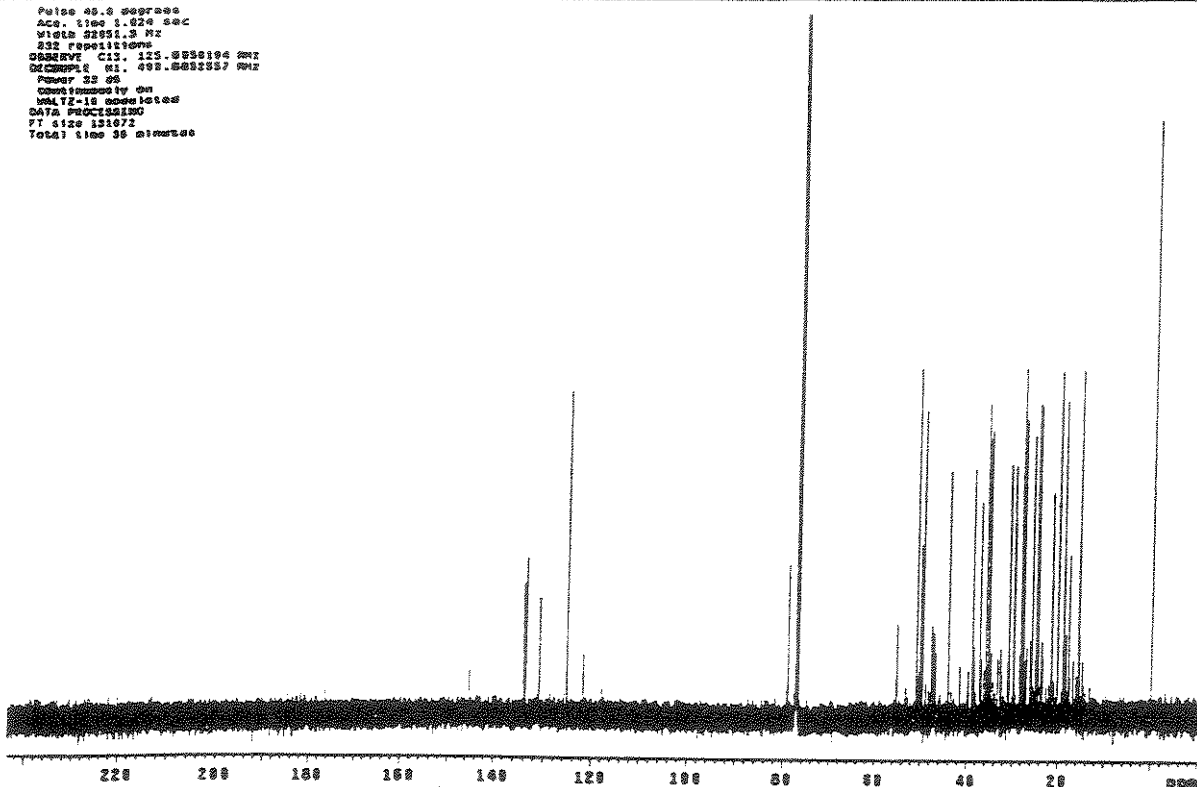
Solvent: CDCl_3
Temp. 23.8 C / 298.1 K
File: 001020001
100VH-500 "magnus"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 21.5 degrees
Acq. time 4.000 sec
Width 32000.0 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1. 499.8627000 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 minutes

12 10 8 6 4 2 0 -2 ppm

E-04 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de *C. weddelliana*.

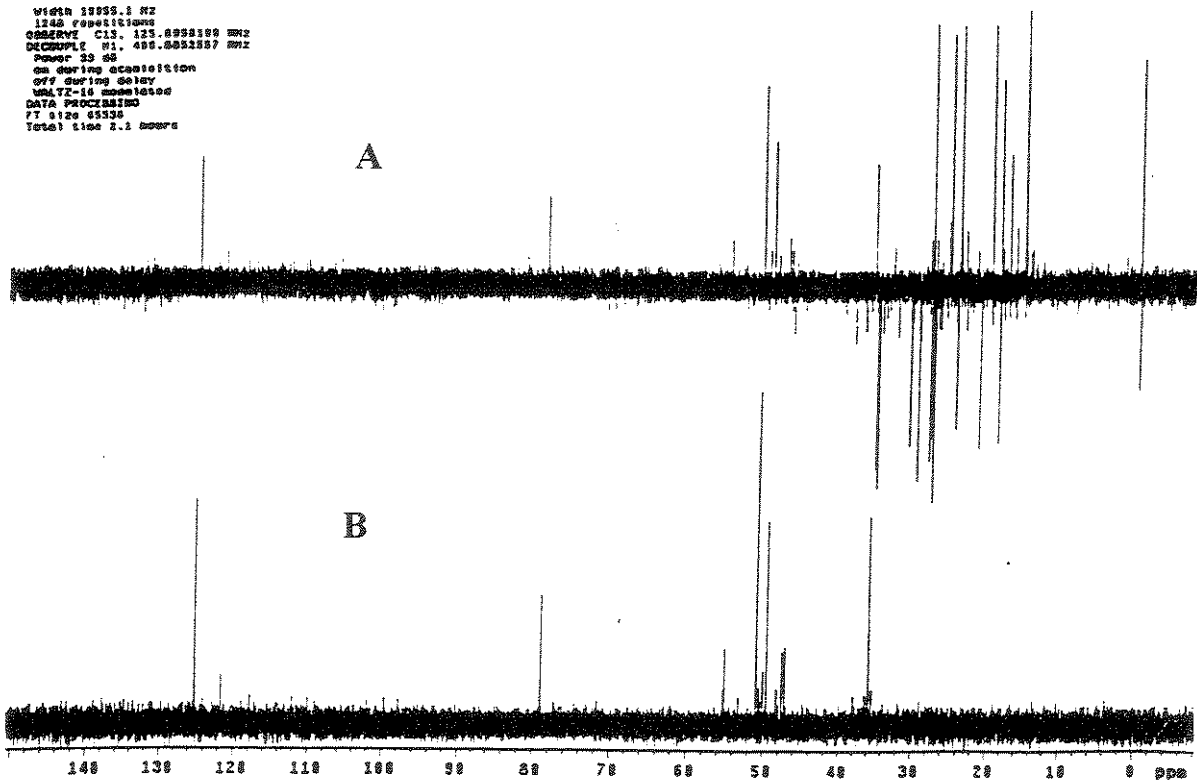
ESPECTROS

Pulse 49.9 degrees
Acq. time 1.024 sec
Width 53955.3 Hz
232 repetitions
OBSERVE C13. 125.8558194 MHz
DECOUPLE H1. 499.8532557 MHz
Power 22 dB
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
PT size 131072
Total time 38 minutes



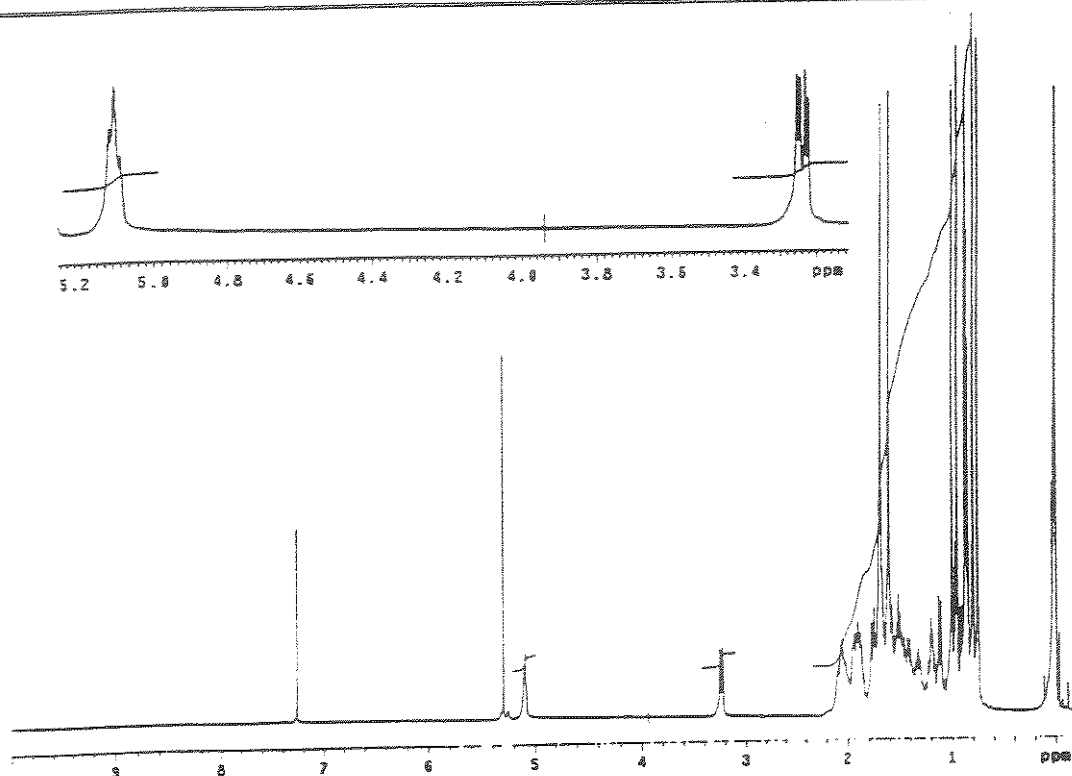
E-05 Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. weddelliana*

Width 53955.3 Hz
1248 repetitions
OBSERVE C13. 125.8558194 MHz
DECOUPLE H1. 499.8532557 MHz
Power 22 dB
on during excitation
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
PT size 65536
Total time 2.2 hours



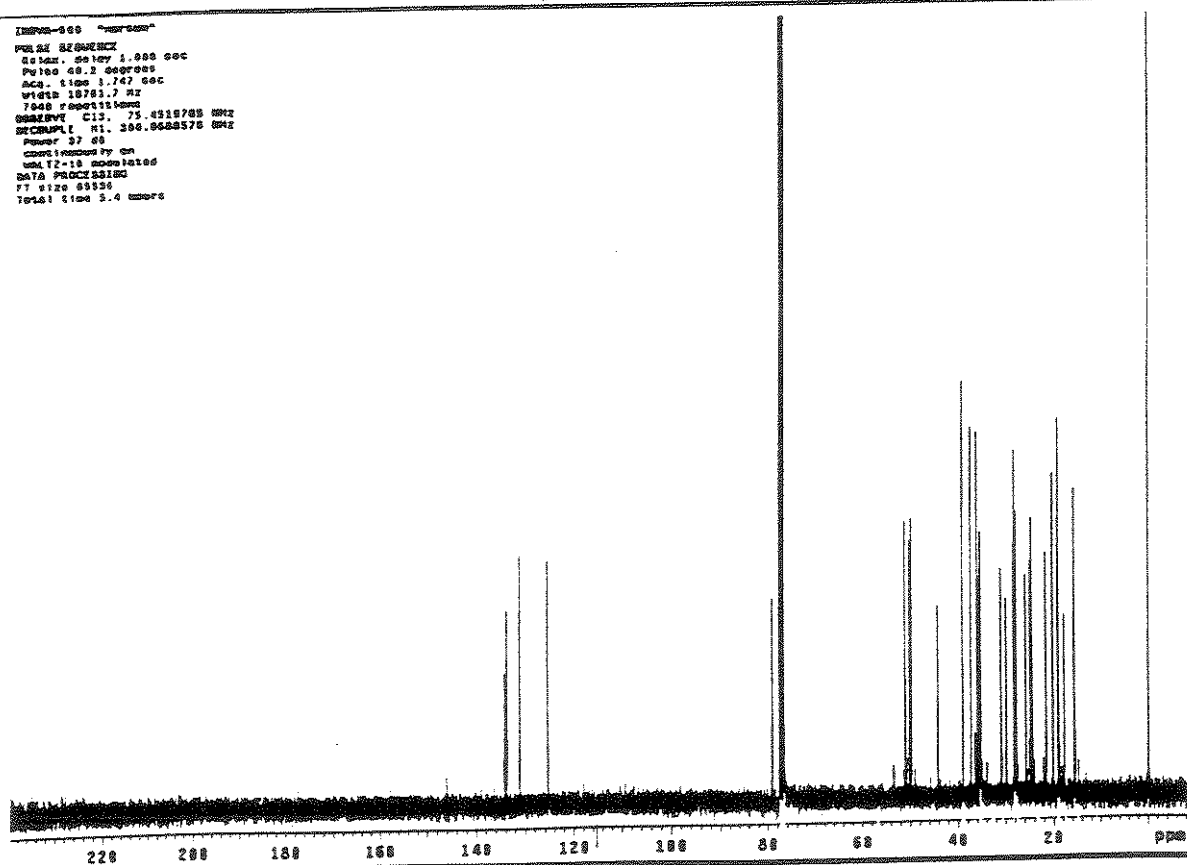
E-06 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. weddelliana*

ESPECTROS



E-07 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. fluminensis*

INSTR-000 "NMR-000"
PULSE PROGRAM
Acq. delay 1.000 sec
Pulse 40.2 degrees
Acq. time 0.707 sec
Width 10701.7 Hz
7000 repetitions
SOLVENT C13, 75.4516700 MHz
DECOUPLE H1, 306.960570 MHz
Power 37 dB
continuously on
Waltz-16 modulated
DATA PROCESSING
F1 size 65536
Total time 5.4 hours



E-08 Espectro de RMN de ^{13}C (75.45 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. fluminensis*.

ESPECTROS

1788 Repetitions
OBSERVE C13. 75.452638 MHz
DECOUPLE H1. 399.865576 MHz
Power 37 dB
ON during acquisition
OFF during delay
WALTZ-16 decoupled
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 3.7 hours

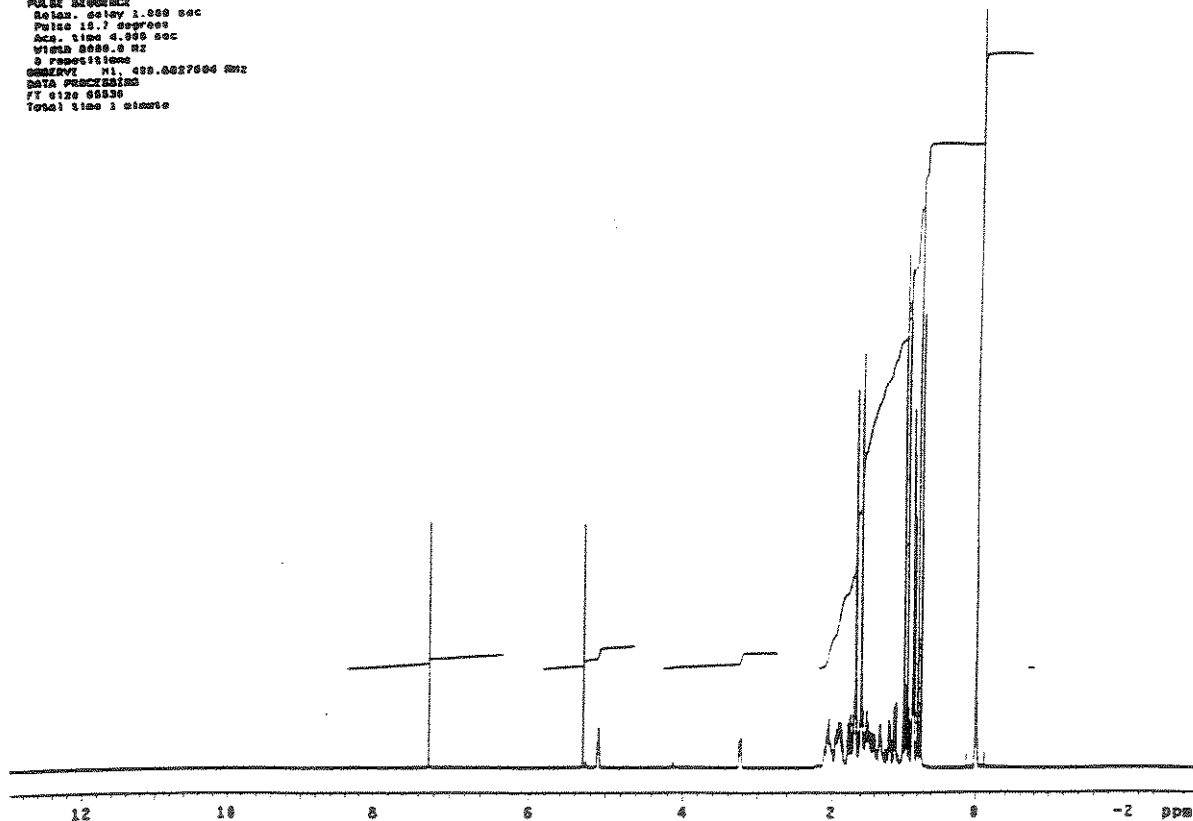
A

B

200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 -20 ppm

E-09 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. fluminensis*

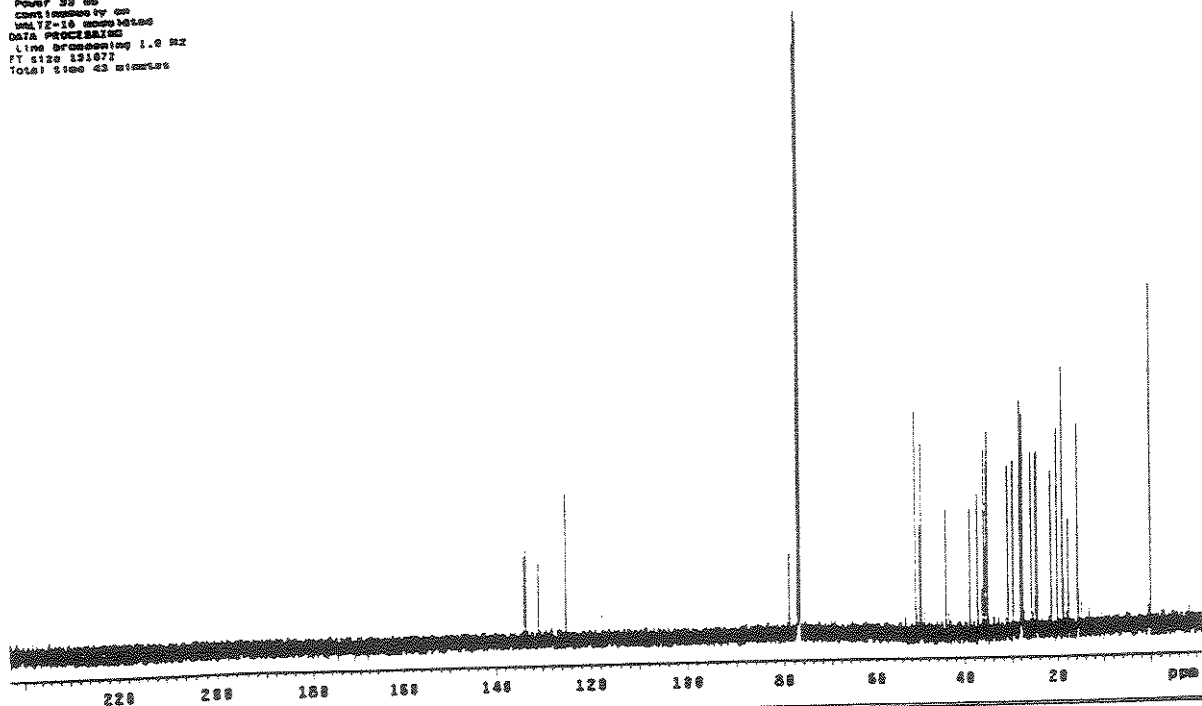
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 15.7 degree
Acq. time 4.999 sec
Width 8888.0 Hz
0 repetitions
OBSERVE H1. 499.8627604 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 1 minute



E- 10 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de *C. spirum-sanciensis*

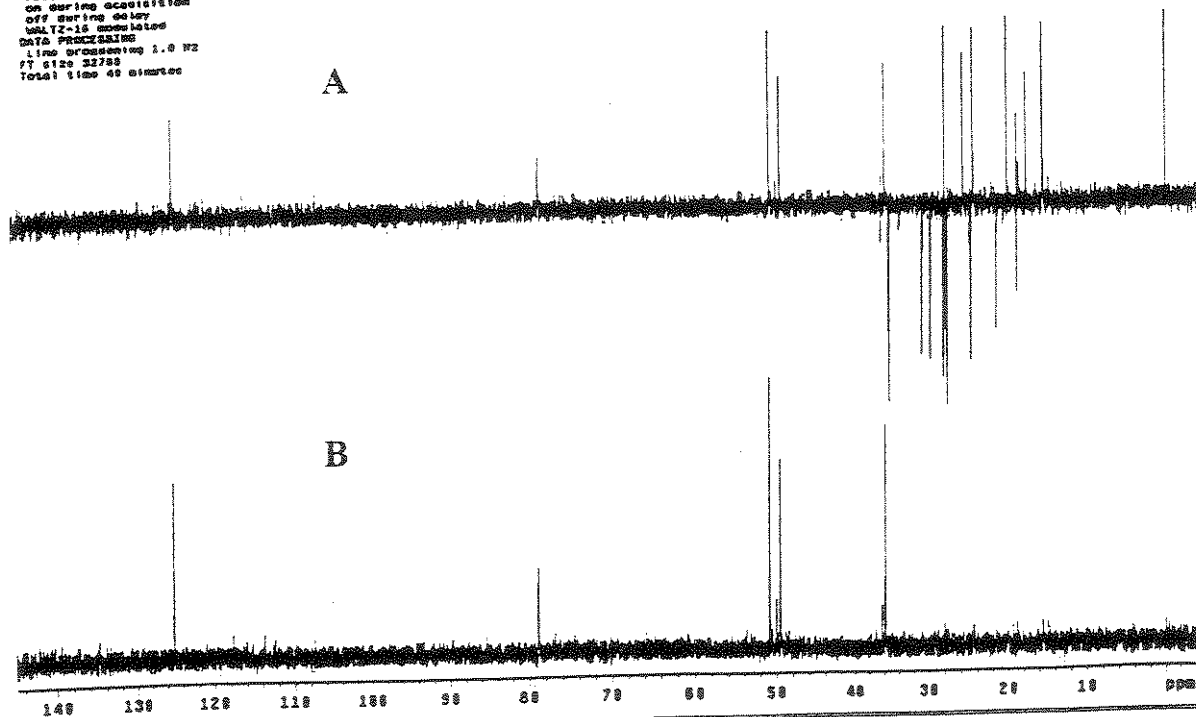
ESPECTROS

Viena 22551.2 MHz
 1624 repetitions
 OBSERVE C13. 125.0556190 MHz
 DECOUPLE H1. 499.852557 MHz
 Power 33 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line processing 1.0 Hz
 FT size 131072
 Total time 43 minutes



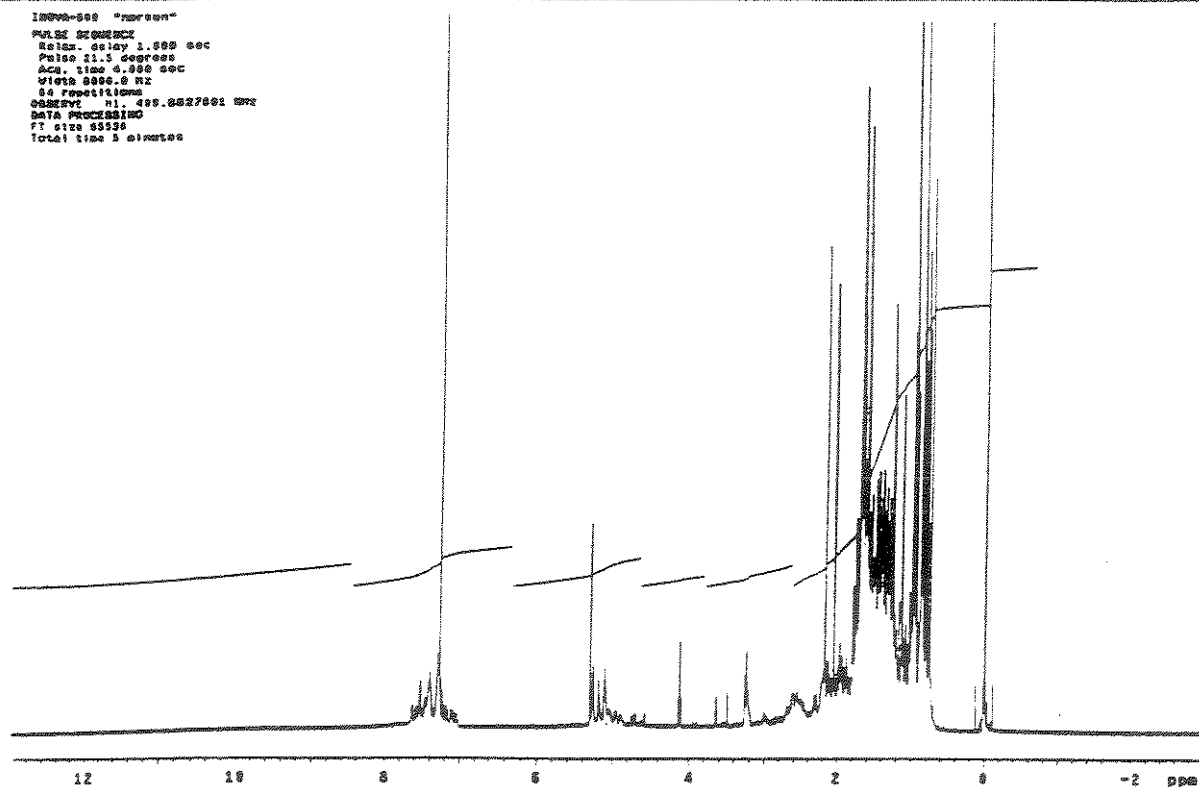
E-11 Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. spiritu-sanctensis*

PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 9.871 sec
 Width 16519.1 Hz
 512 repetitions
 OBSERVE C13. 125.0556190 MHz
 DECOUPLE H1. 499.852557 MHz
 Power 33 dB
 On during acquisition
 Off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line processing 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 40 minutes



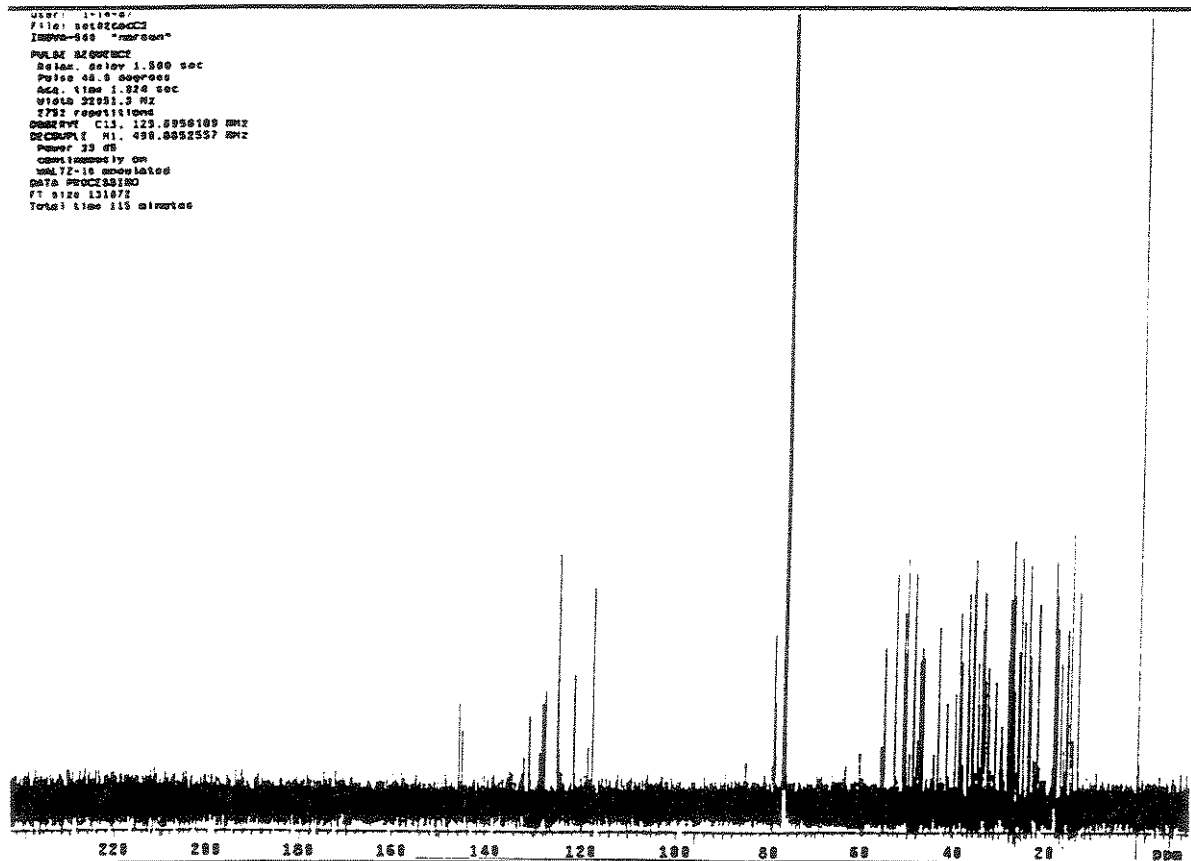
E-12 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. spiritu-sanctensis*.

ESPECTROS



E-13 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de *C.*

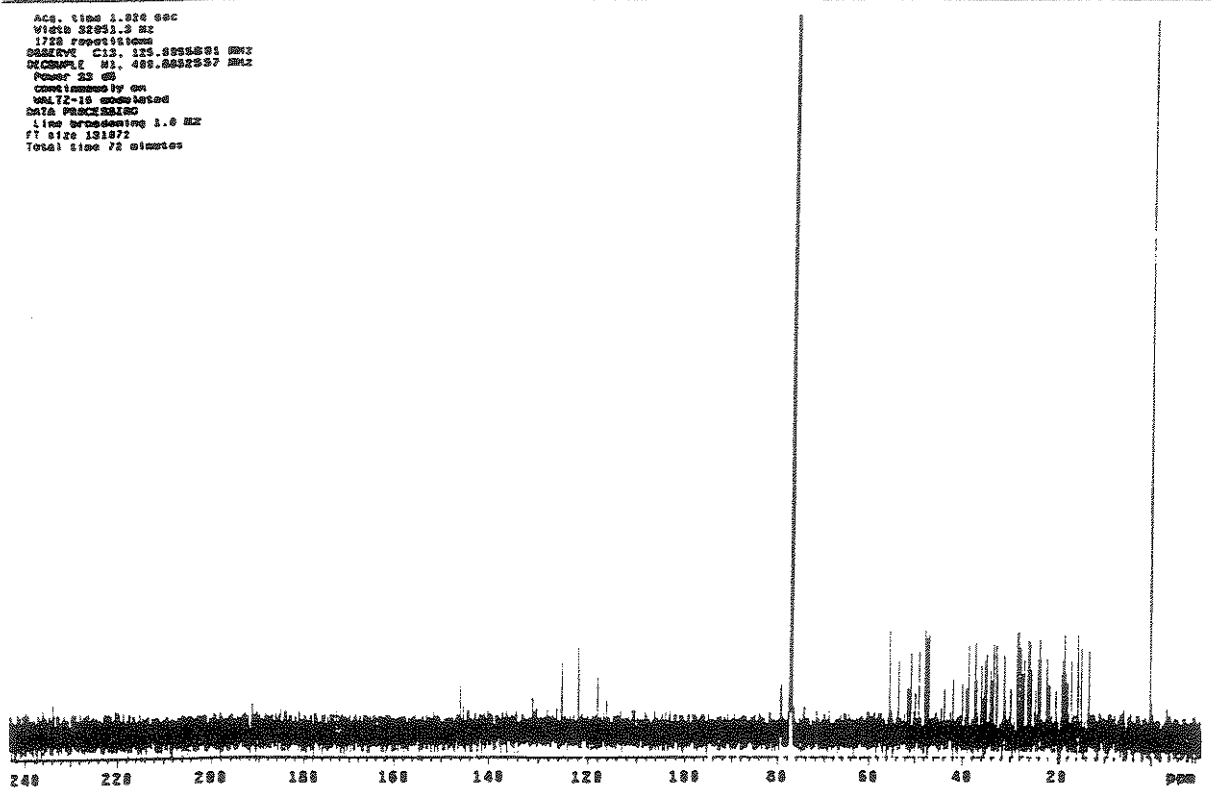
rosea



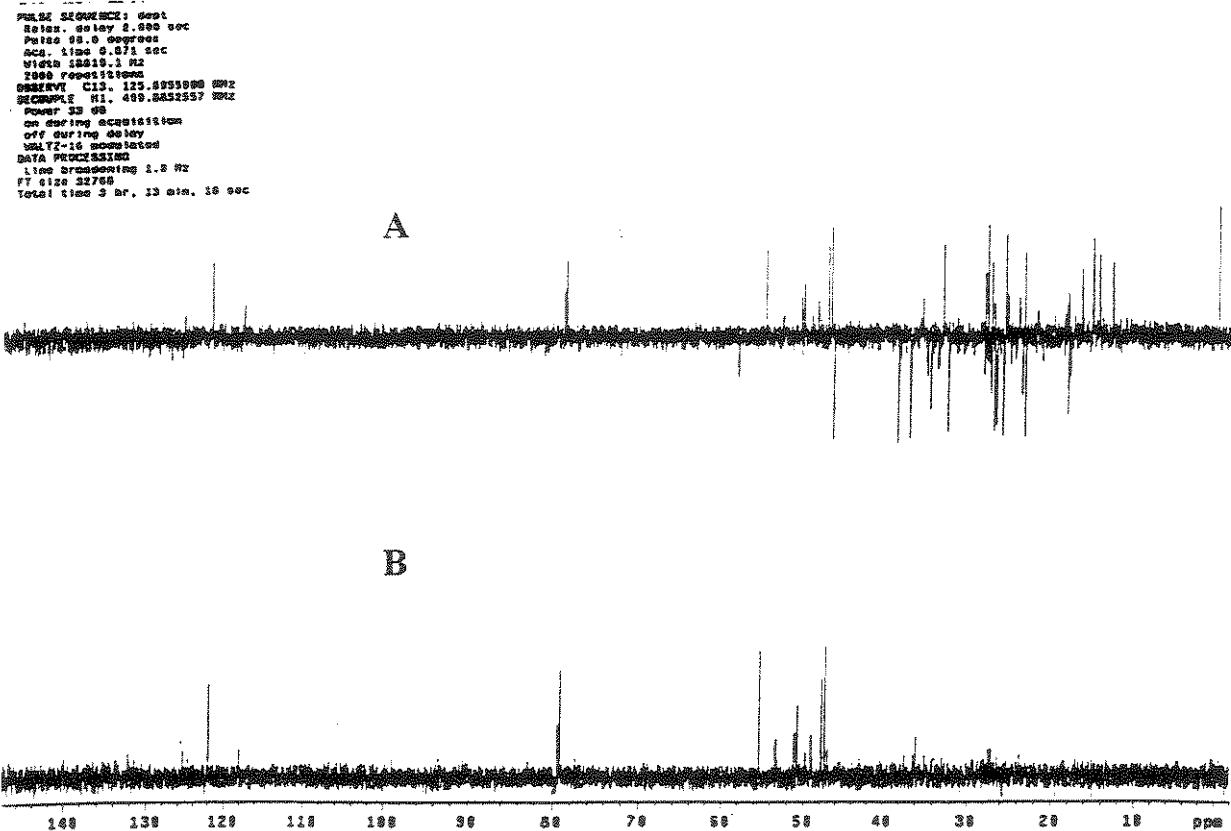
E-14 Espectro de RMN de ^{13}C (125.70 MHz, CDCl_3), da mistura triterpênica do látex de *C.*

rosea

ESPECTROS

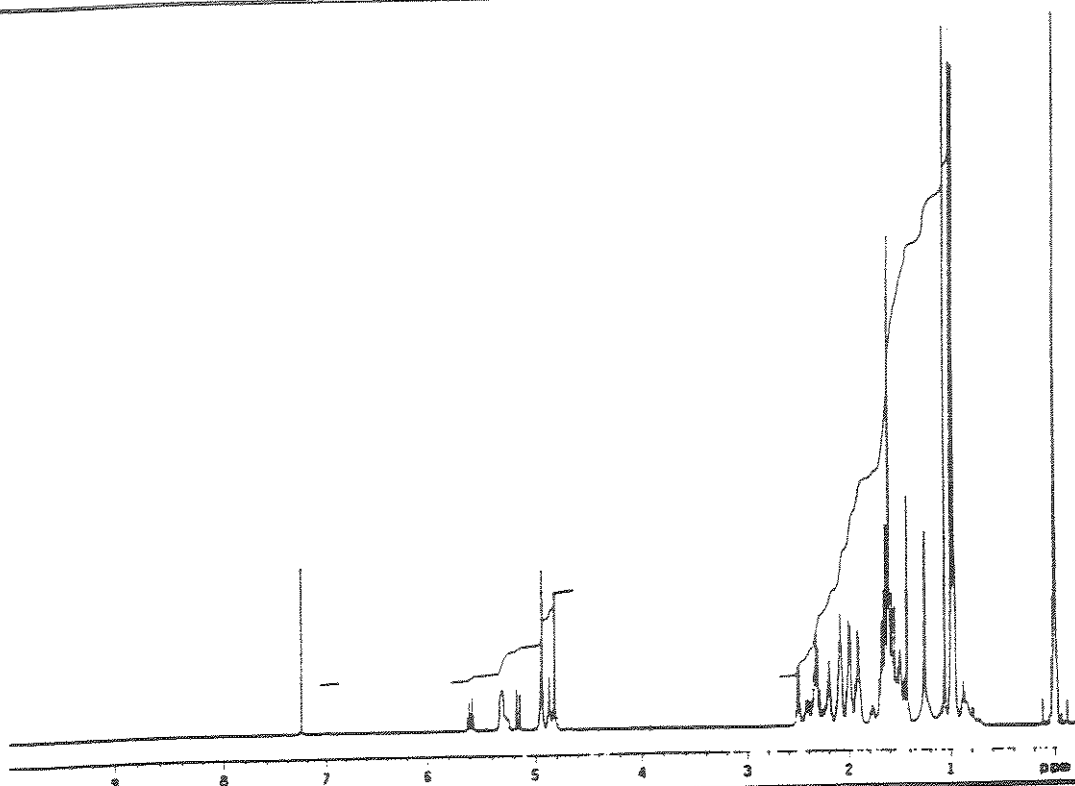


E- 17 Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura de triterpenos do látex de *C. lanceolata*



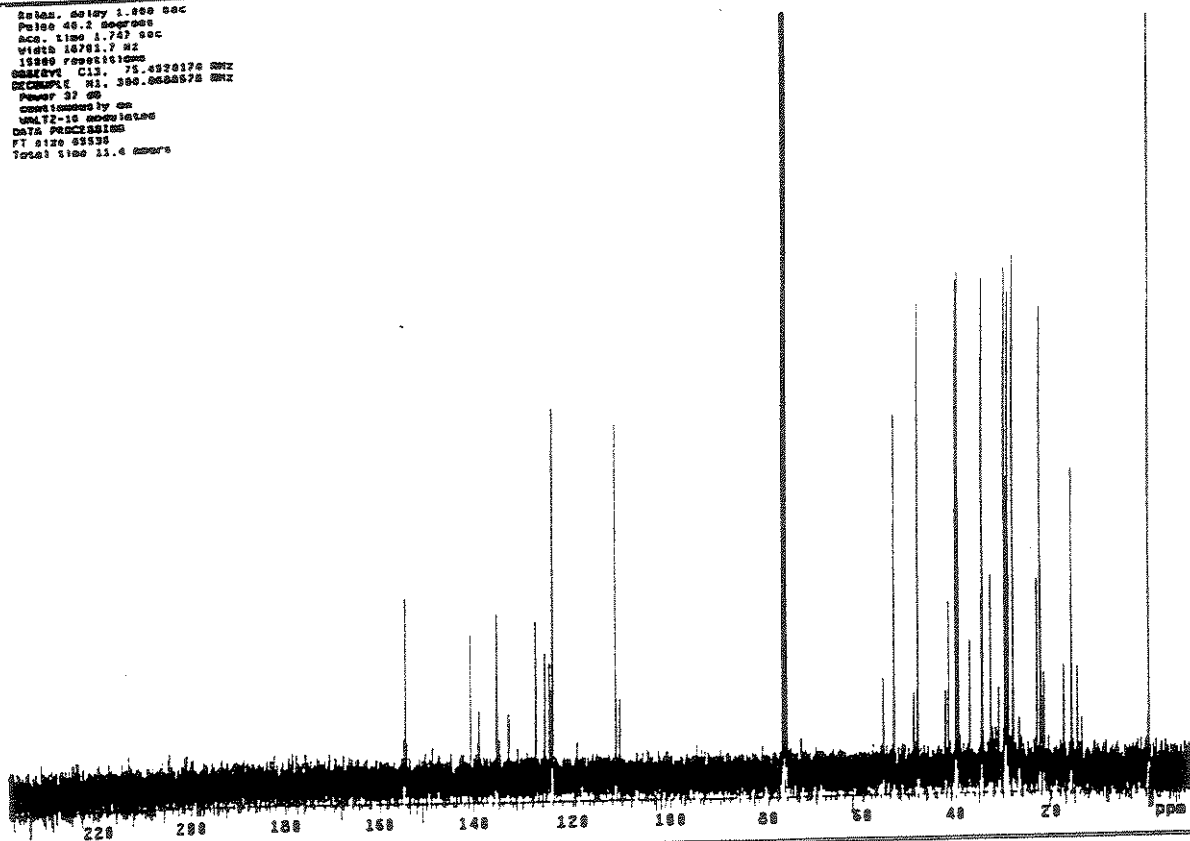
E-18 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. lanceolata*

ESPECTROS



E- 19 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. hilariana*

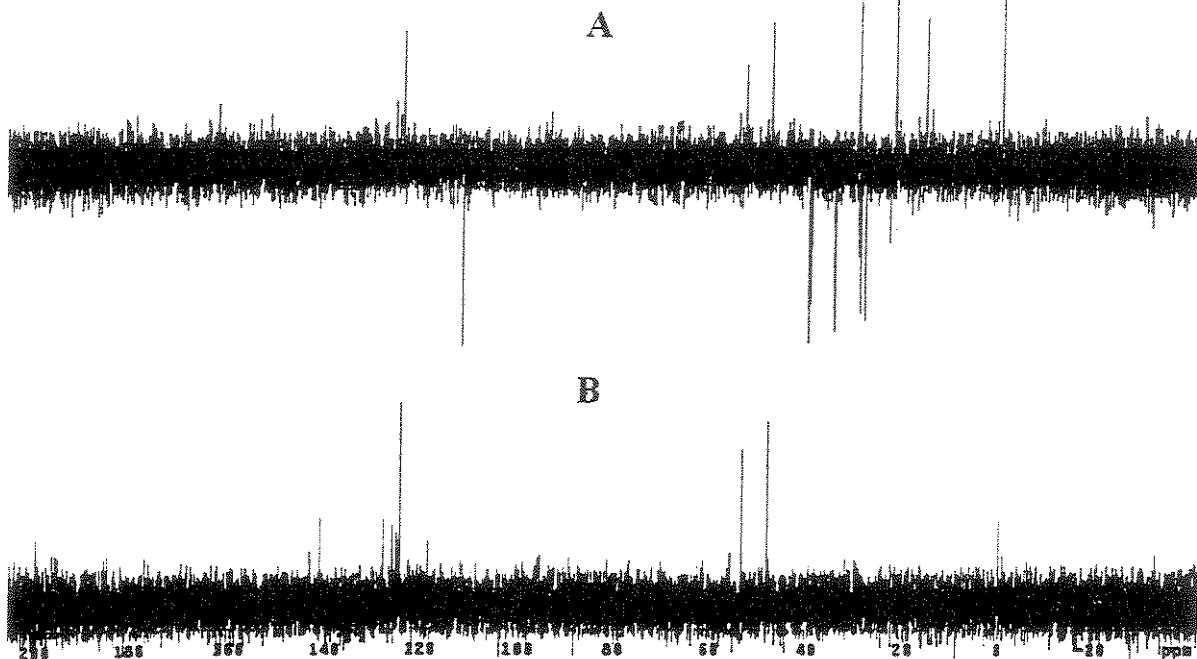
2000000000 1.000 sec
 Pulse 40.2 degrees
 Acc. time 1.747 sec
 Width 10701.7 Hz
 10000 resolutions
 OBSERVE C13, 75.4520170 MHz
 DECOUPLE H1, 300.6600570 MHz
 Power 27.00
 continuously on
 UNIT2-10 modulated
 DATA PRG100100
 FT size 65536
 Total time 11.4 hours



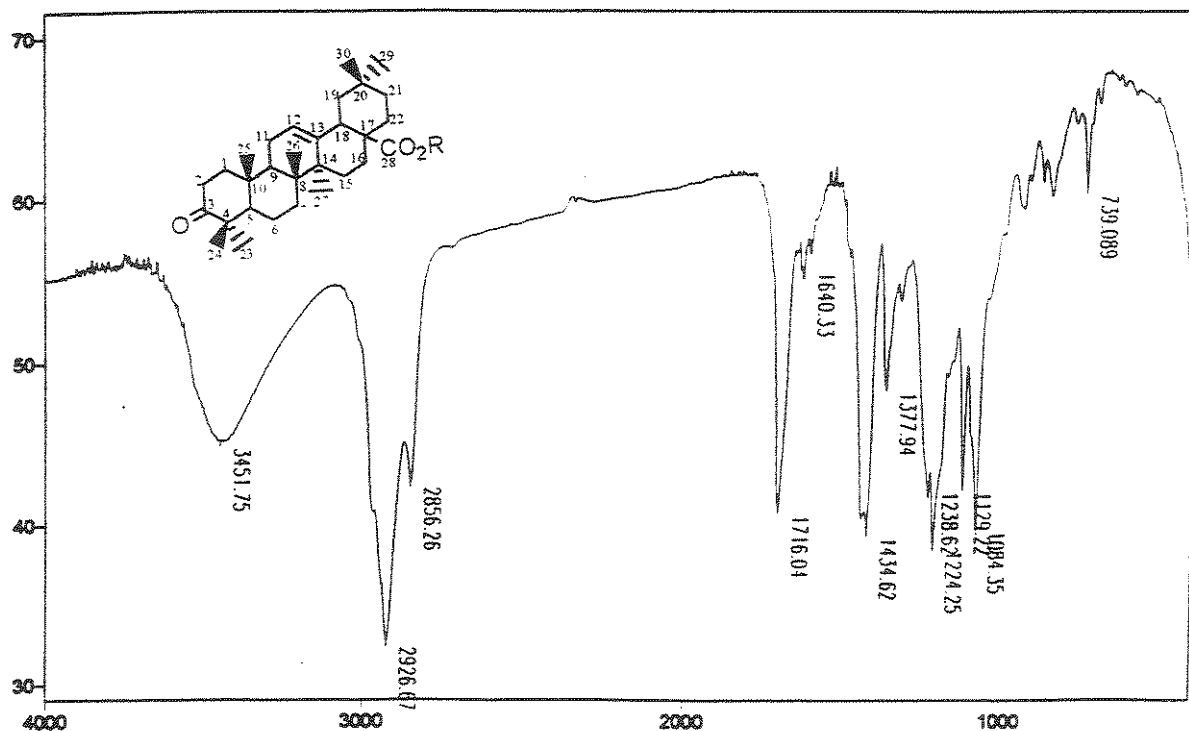
E-20 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. hilariana*

ESPECTROS

OBSERVE C13. 75.4519944 MHz
 REVERSE N1. 349.8688576 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 sequence
 DATA PROCESSING
 FT size 65535
 Total time 2.4 hours

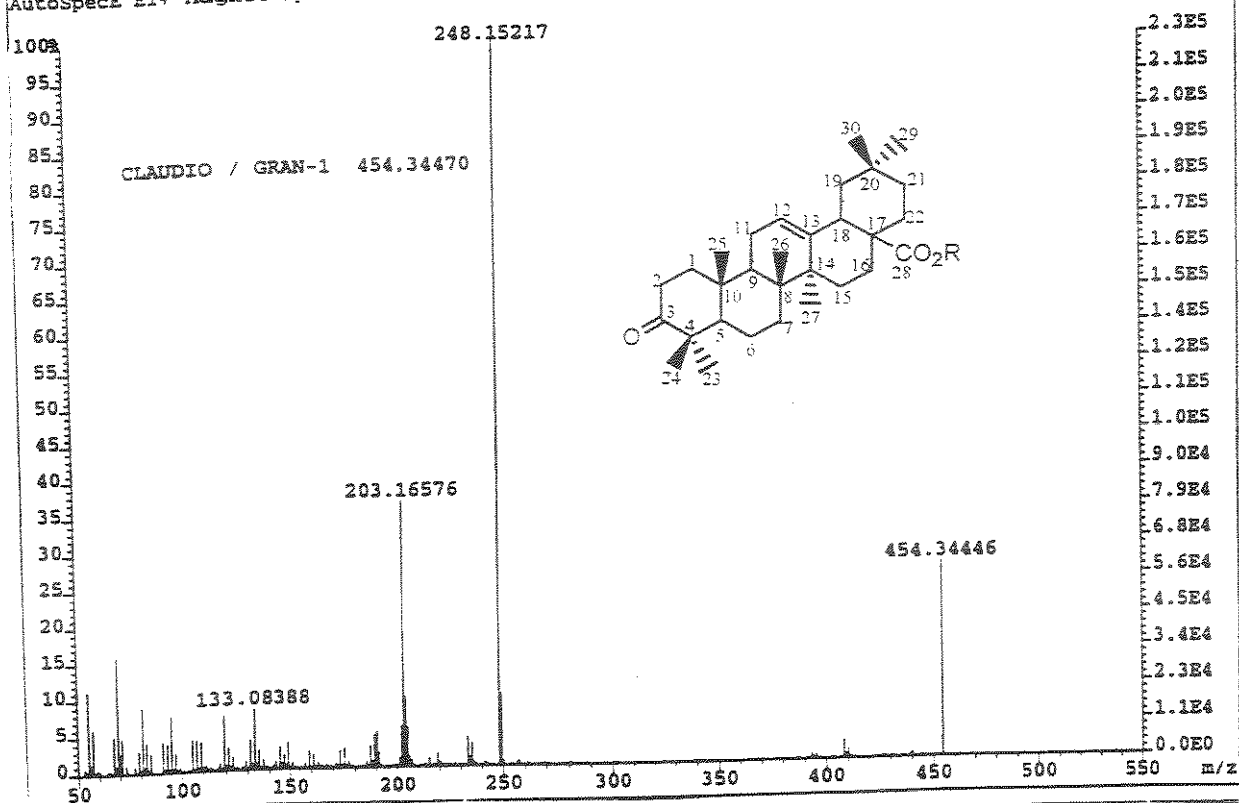


E-21 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura triterpênica do látex de *C. hilariana*

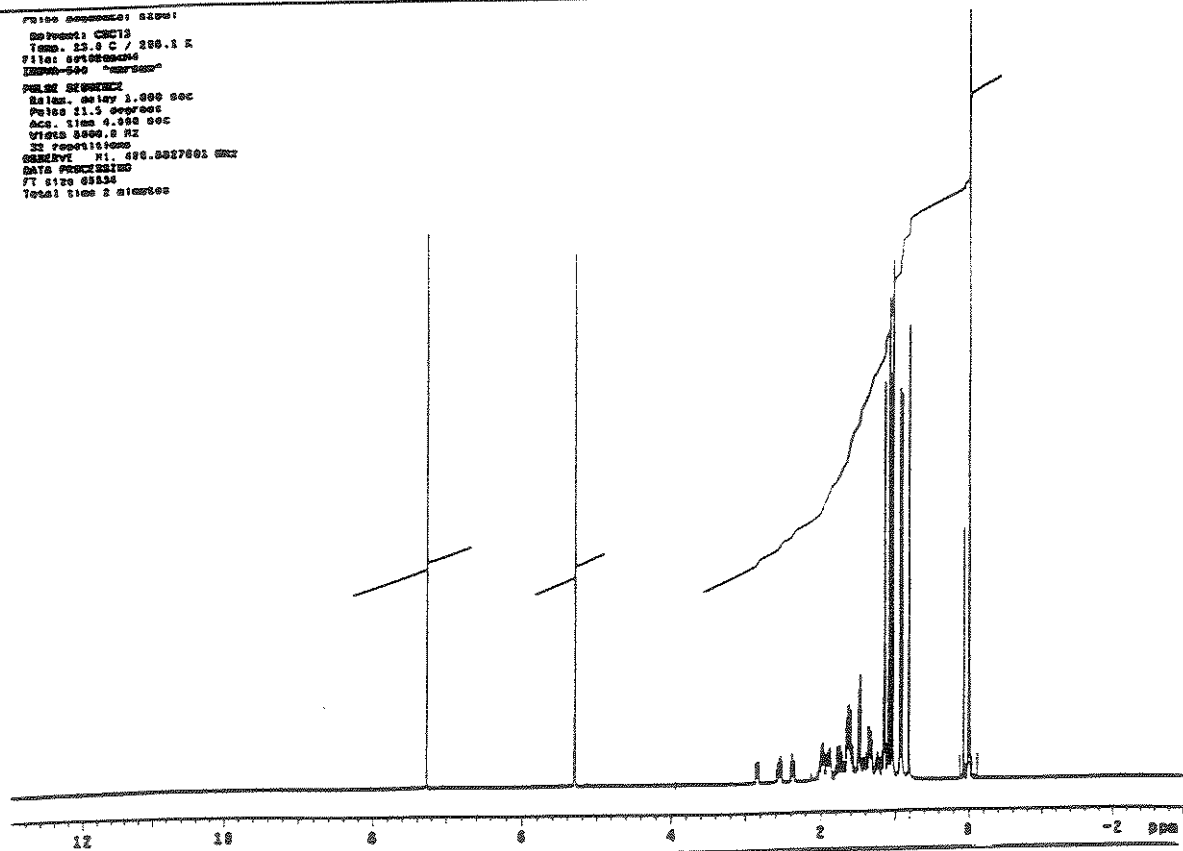
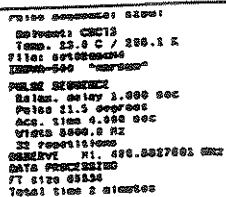


E-22 Espectro no Infravermelho (KBr), do composto (78)

File:MAR15-01B Ident:329 Acq:15-MAR-2001 12:11:01 745:55 Cal:MAR15-01B
AutoSpec# EI+ Magnet SpI:225142 TIC:1446129 Flags:HALL



E-23 Espectro de massas (alta resolução, IE, 70 eV.), do composto (78)



E-24 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), do composto (**78**)

ESPECTROS

12500-500 "F50" 500"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.500 sec

Pulse 40.0 degrees

Acq. time 1.024 sec

Width 32051.3 Hz

800 repetitions

OBSERVE C13, 125.0950184 MHz

DECOUPLE H1, 400.8032557 MHz

Power 33 dB

continuously on

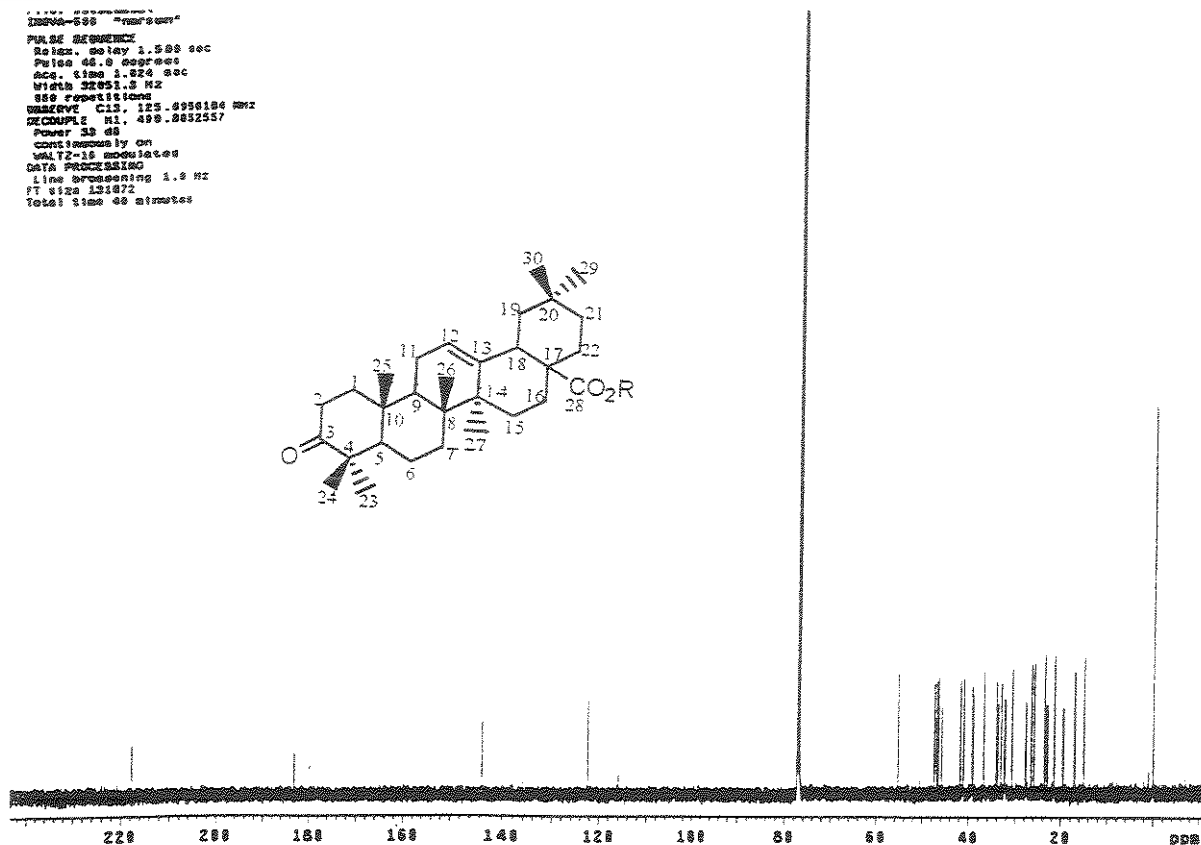
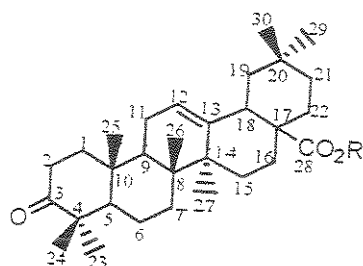
WALTZ-16 modulates

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 131072

Total time 40 minutes



E-25 Espectro de RMN ^{13}C (125.70 MHz, CDCl_3) do composto (78)

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.500 sec

Pulse 40.0 degrees

Acq. time 1.024 sec

Width 32051.3 Hz

800 repetitions

OBSERVE C13, 125.0950184 MHz

DECOUPLE H1, 400.8032557 MHz

Power 33 dB

continuously on

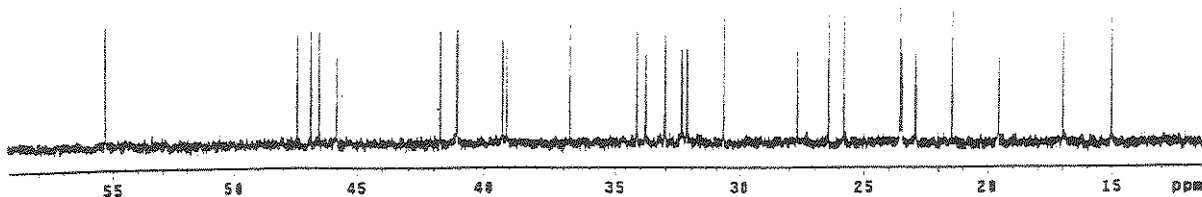
WALTZ-16 modulates

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 131072

Total time 40 minutes



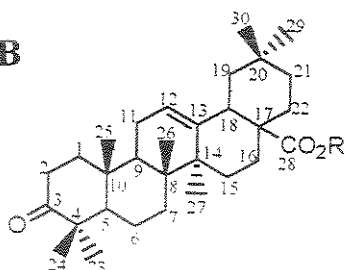
E- 25A Expansão do espectro E-25 na região entre δ 10-60

ESPECTROS

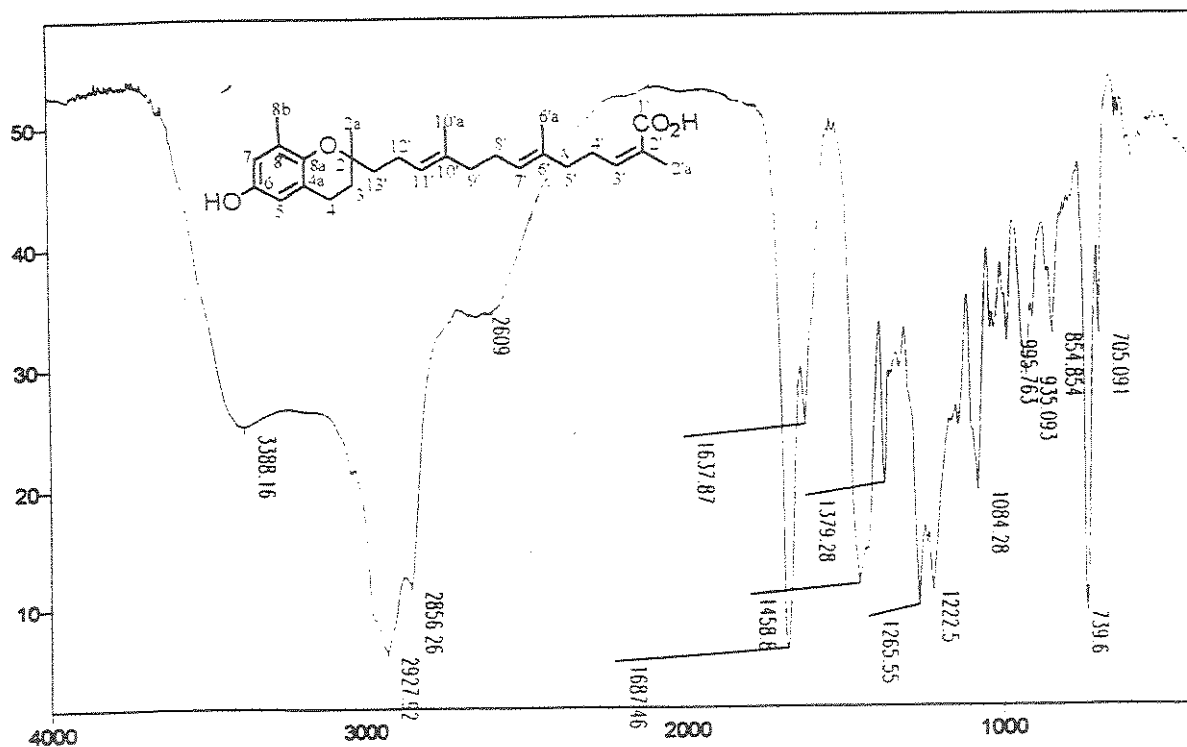
Filer: set02cacd4
 125MHz-800 "rnmrm"
 PULSE SEQUENCE: gpcst
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 3.825 sec
 Width 18888.0 Hz
 1000 Freq/points
 OBSERVE C13. 125.0556185 MHz
 DECOUPLE H1. 499.6452557 MHz
 Power 33.00
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 303 minutes

A

B



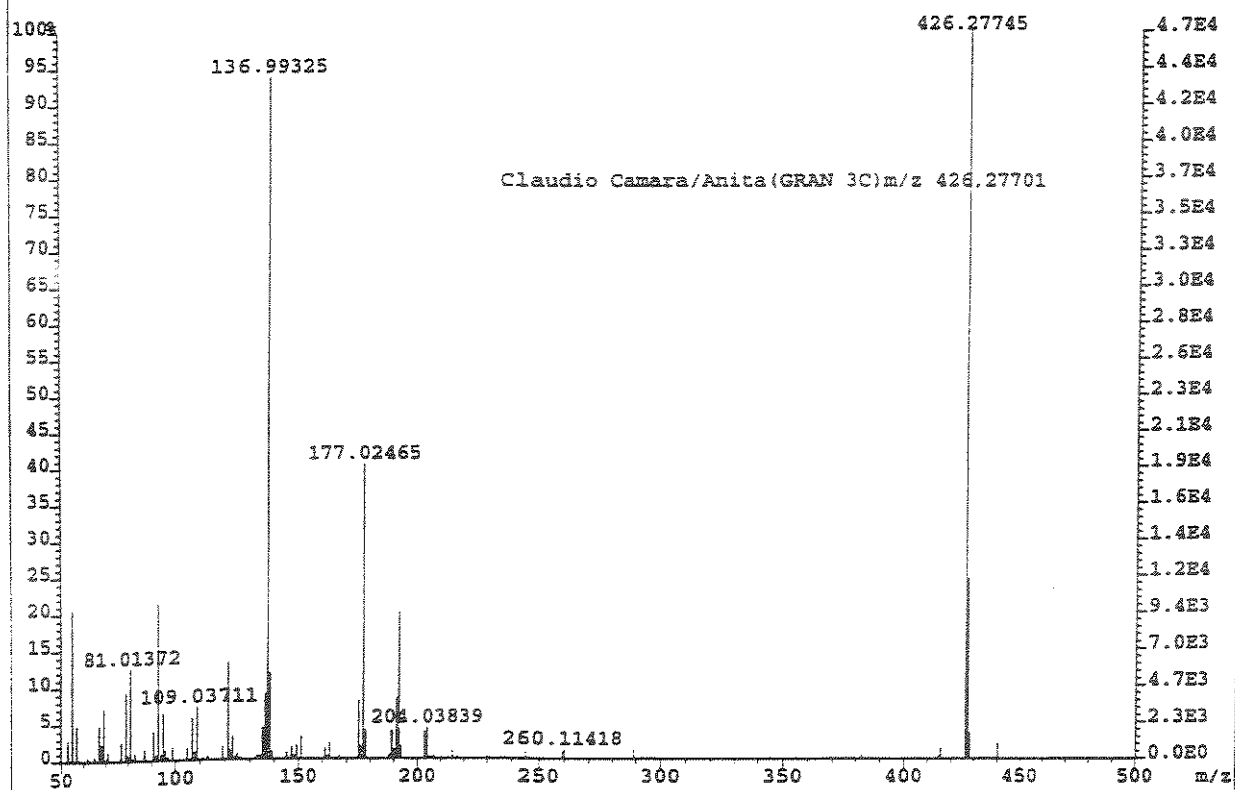
E-26 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125.70 MHz, CDCl_3) do composto (78)



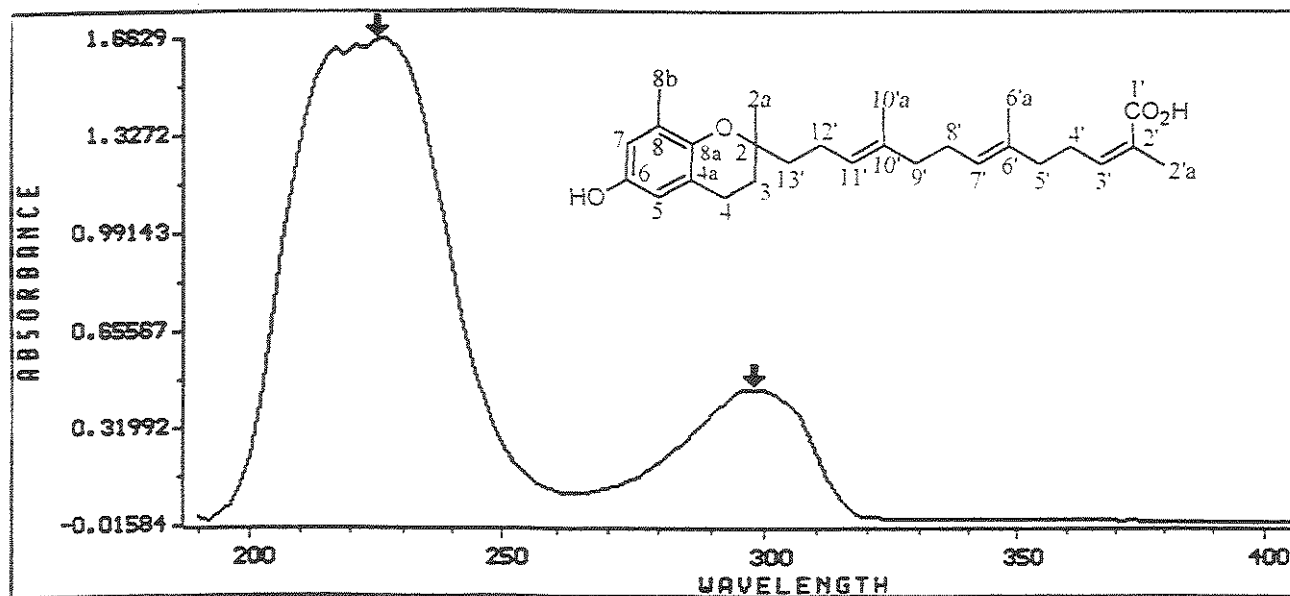
E-27 Espectro no infravermelho (KBr) do composto (18)

ESPECTROS

File: ABR2400 Ident: 346 Acq: 24-APR-2000 10:18:40 +43:38 Cal: ABR2400
 AutoSpec EI+ Magnet BpI: 46819 TIC: 271265 Flags: HALL



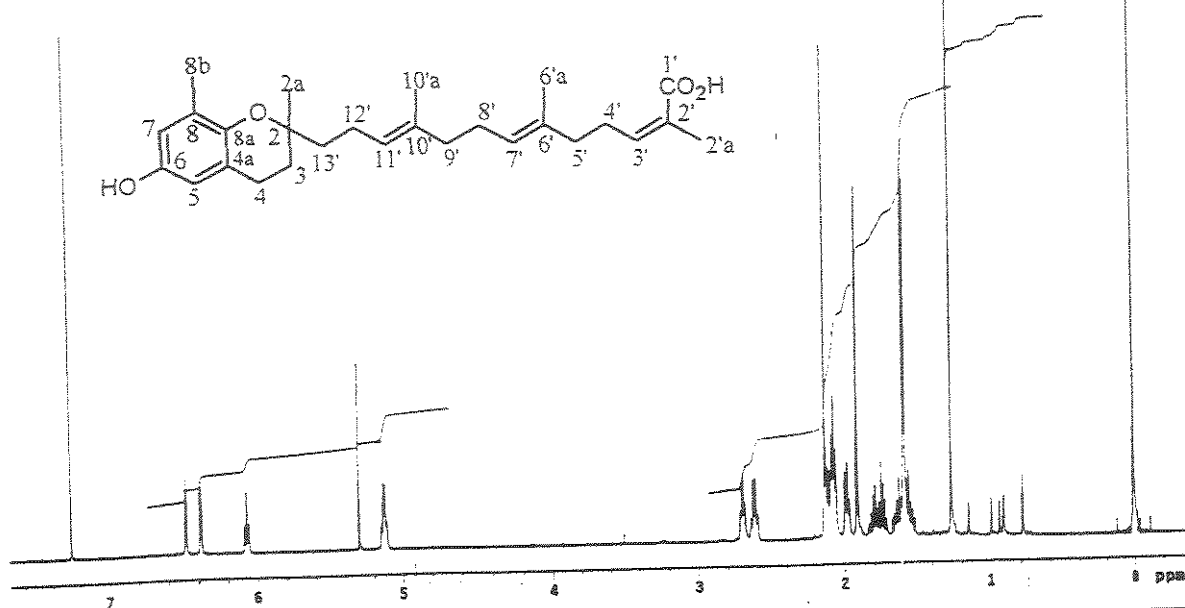
E-28 Espectro de massas (alta resolução. IE. 70 eV.) do composto (18)



E-29 Espectro no Ultravioleta do composto (18)

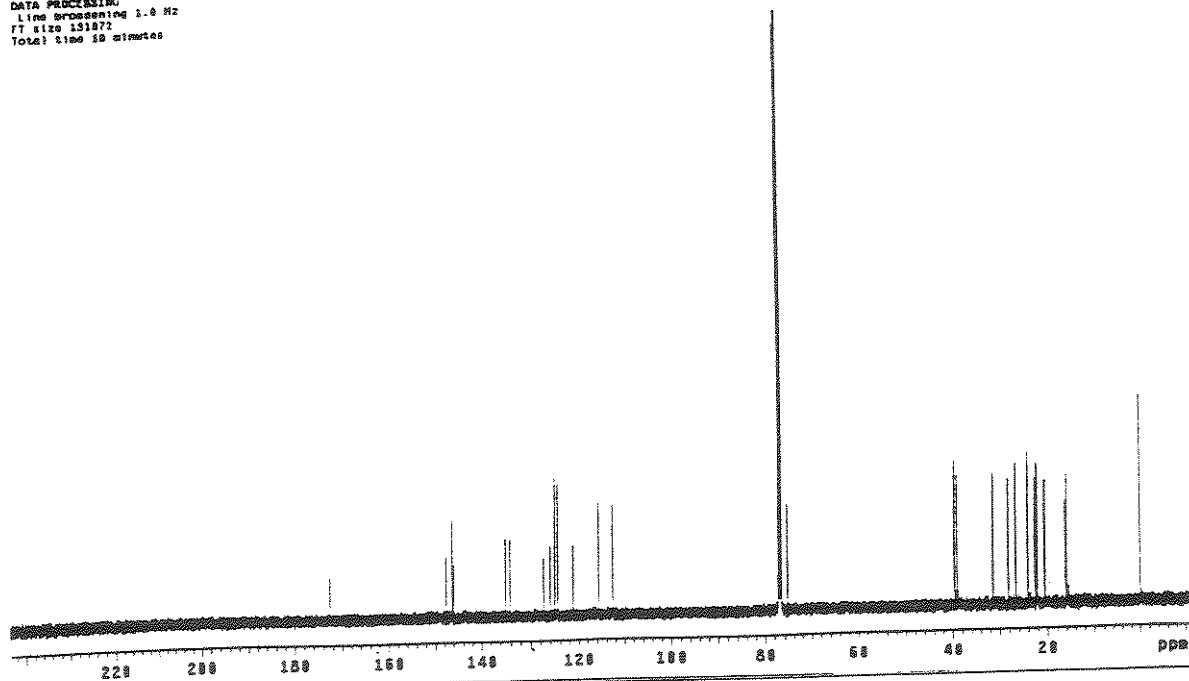
ESPECTROS

Solvent: CDCl₃
 Temp. 23.8 C / 296.3 K
 File: nat200003
 1000-500 "nucron"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 21.5 degrees
 Acq. time 4.000 sec
 Width 6500.0 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE N1. 499.827001 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 85536
 Total time 2 minutes



E-30 Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto (18)

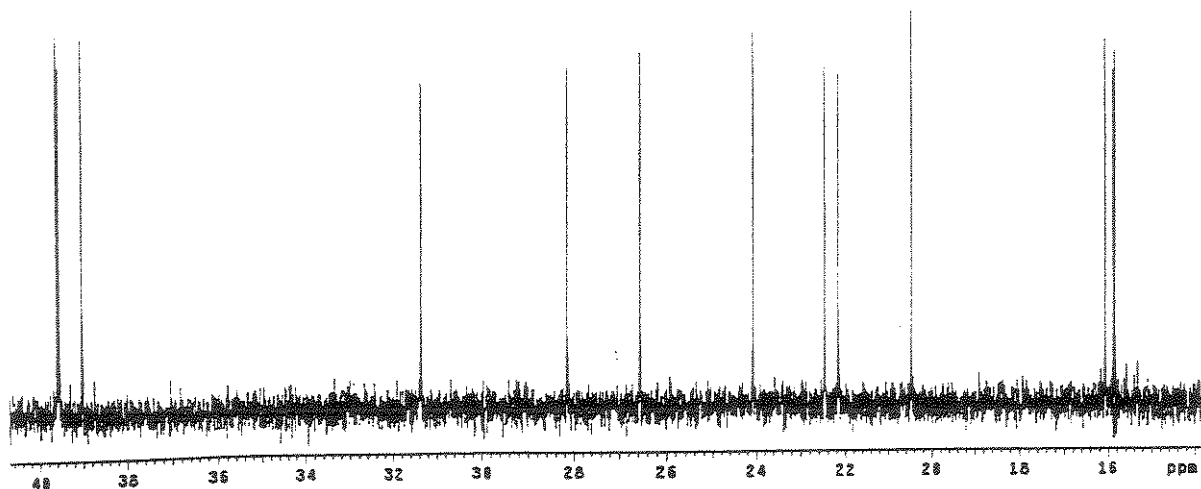
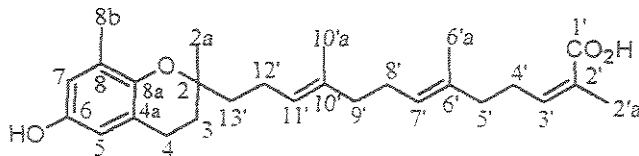
1000-500 "nucron"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 20.0 degrees
 Acq. time 1.024 sec
 Width 32001.3 Hz
 448 repetitions
 OBSERVE C15. 125.8956100 MHz
 DECOUPLE N1. 499.8252557 MHz
 Power 33 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 131872
 Total time 10 minutes



E-31 Espectro de RMN de ¹³C (125,70 MHz, CDCl₃) do composto (18)

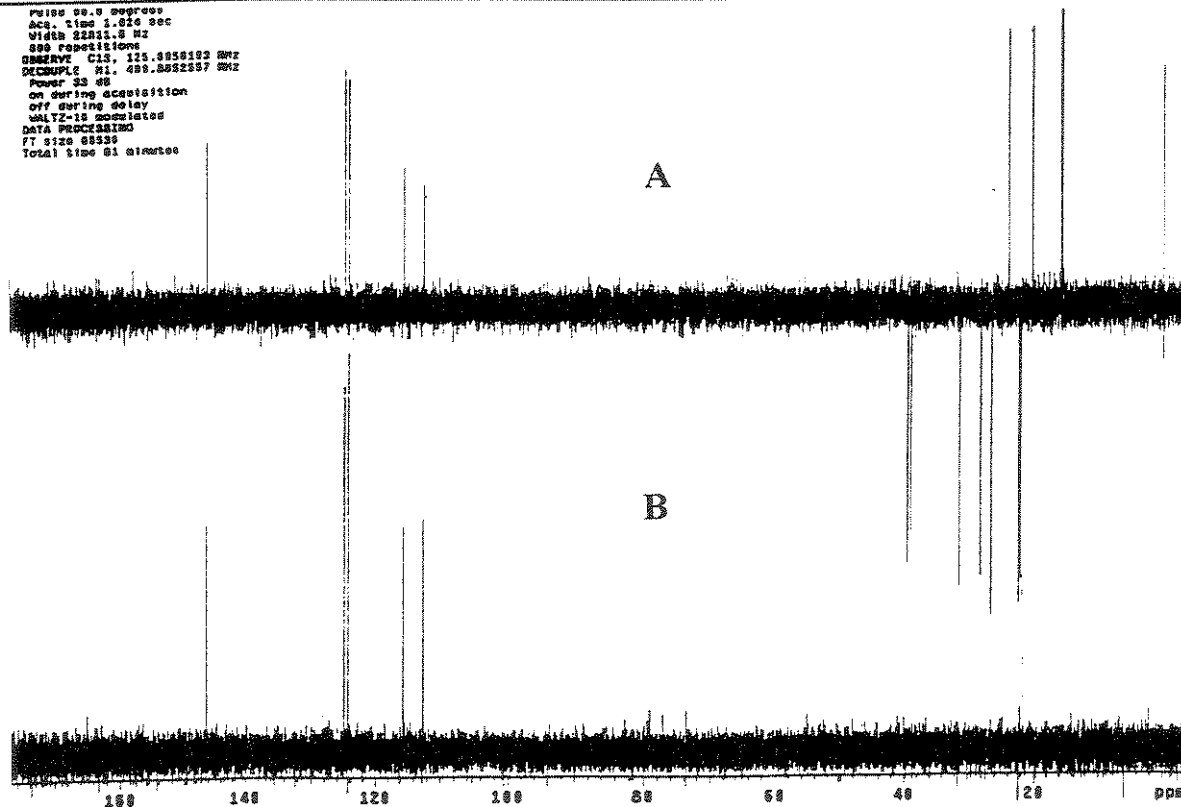
ESPECTROS

USER: 1-14-87
 FILE: 06102CACC3
 INOVA-800 "maroon"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.500 sec
 Pulse 40.0 degrees
 Acq. time 1.826 sec
 Width 22811.3 Hz
 400 repetitions
 OBSERVE C13, 125.0556189 MHz
 DECOUPLE H1, 400.6052557 MHz
 Power 33 dB
 continuously on
 WALTZ-16 acquisition
 DATA PROCESSING
 FT size 131072
 Total time 18 minutes



E-31A Expansão do espectro E-31 na região entre δ 15,0 – 40,0

Pulse 40.0 degrees
 Acq. time 1.826 sec
 Width 22811.3 Hz
 400 repetitions
 OBSERVE C13, 125.0556189 MHz
 DECOUPLE H1, 400.6052557 MHz
 Power 33 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 acquisition
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 01 minutes

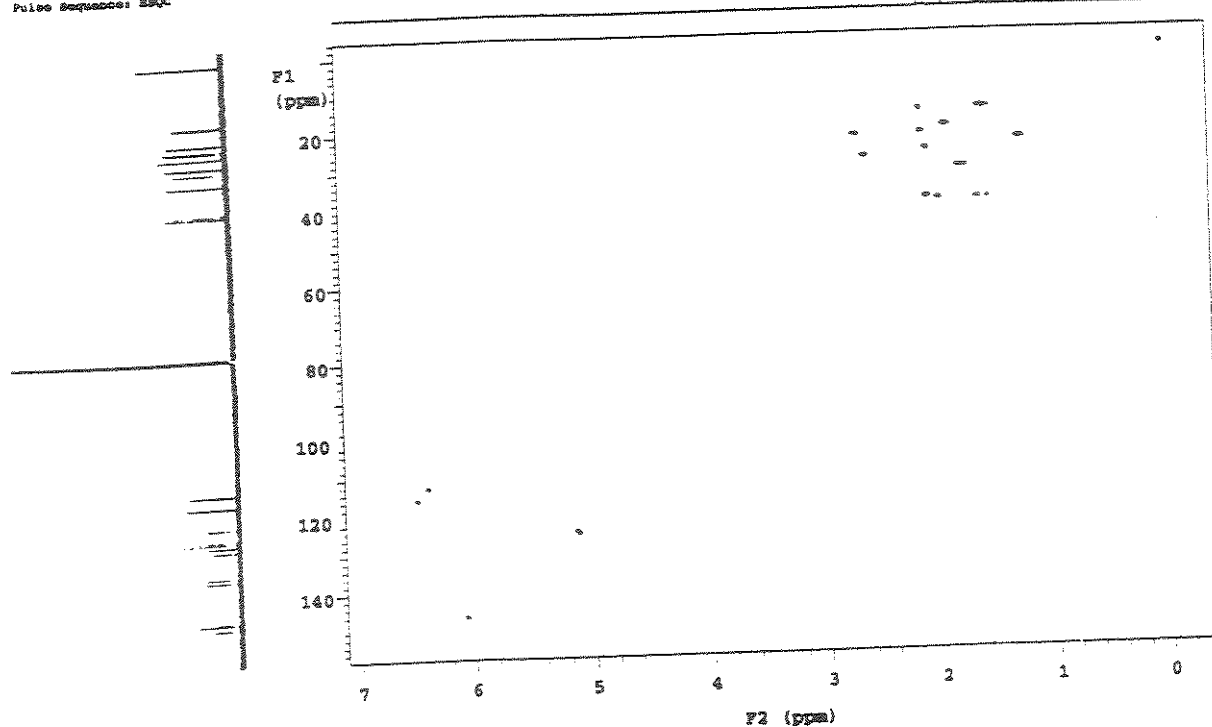


E-32 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18)

ESPECTROS

Claudio "GRABF3" est02cacHSQC3

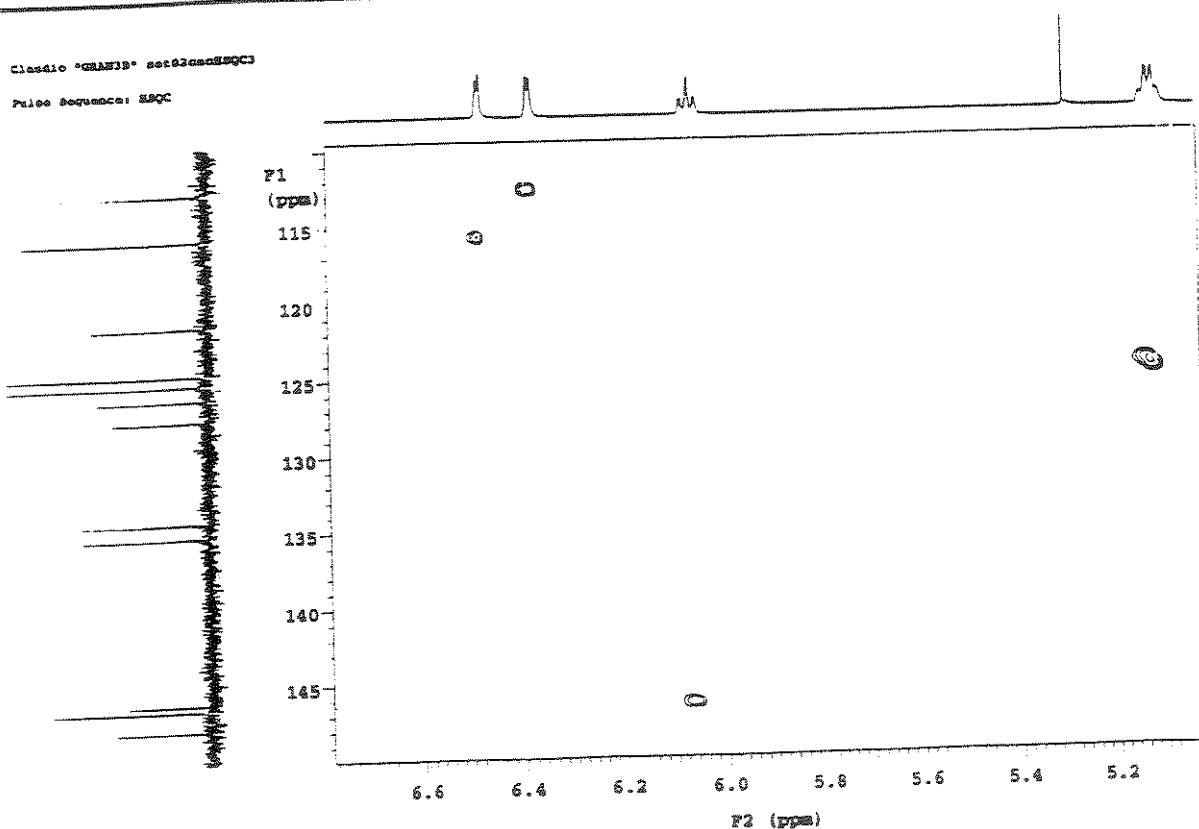
Pulse Sequence: HSQC



E-33 Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125.7 MHz) HSQC - CDCl_3 do composto (18)

Claudio "GRABF3" est02cacHSQC3

Pulse Sequence: HSQC

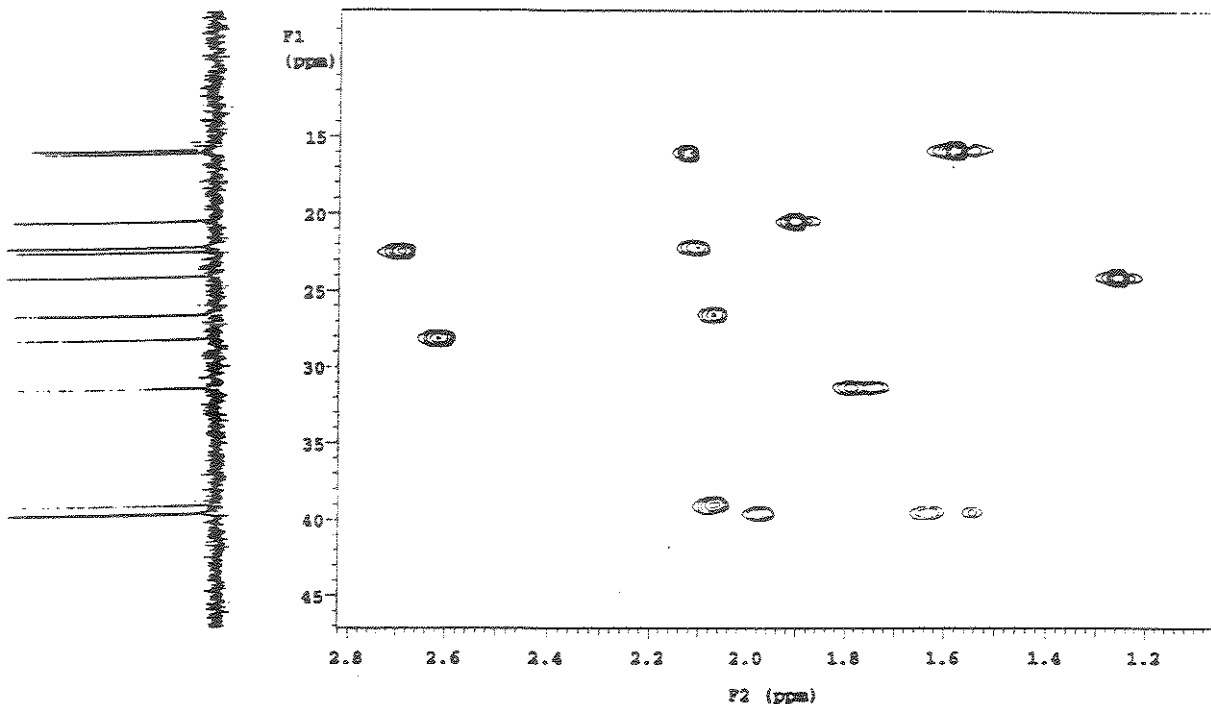


E-33A Expansão do espectro E-33 na região entre δ 5.02 - 6.78 (F2)

ESPECTROS

Clasidie "GRAMFIS" seta22cncsEQC3

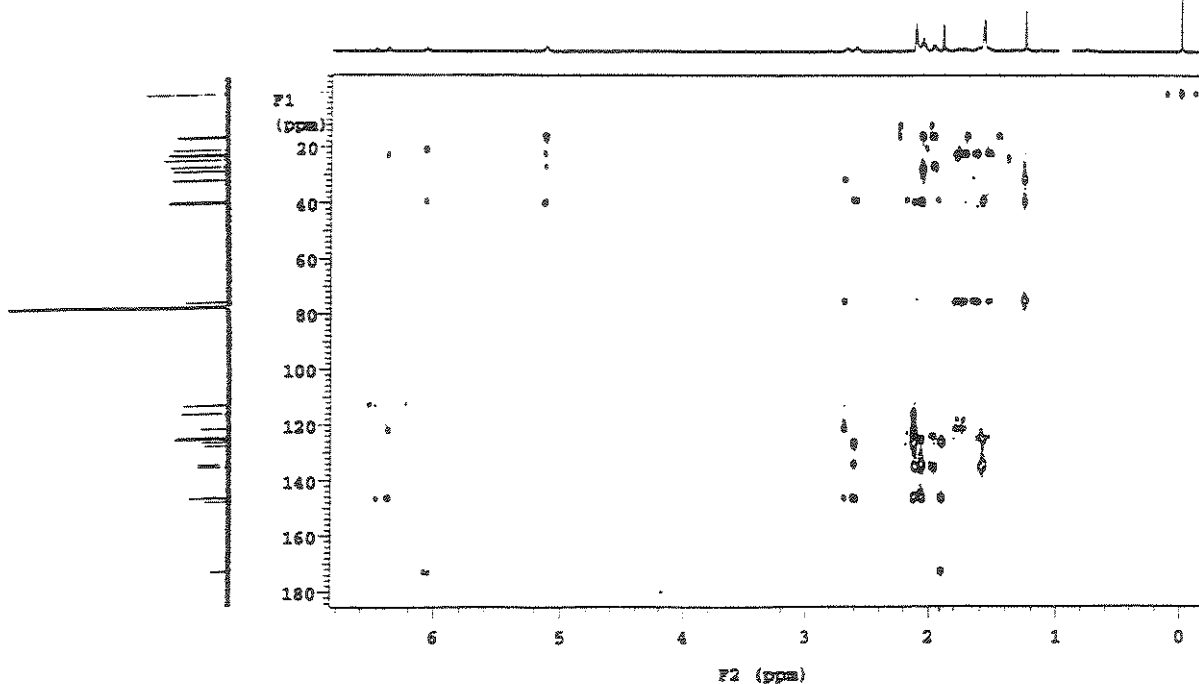
Pulse Sequence: ESQC



E-33 B Expansões do espectro E-33. nas regiões entre e 1.06 – 2.82 (F2)

Clasidie "GRAMFIC" abr25cncsEQC3

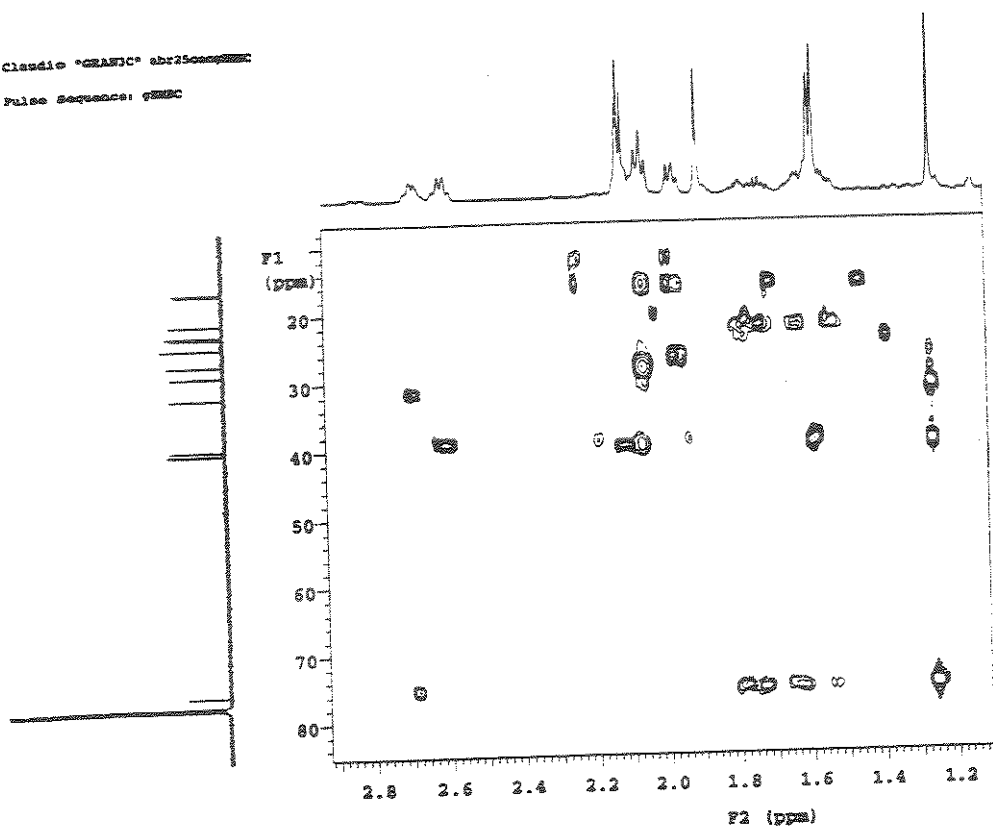
Pulse Sequence: gHMBC



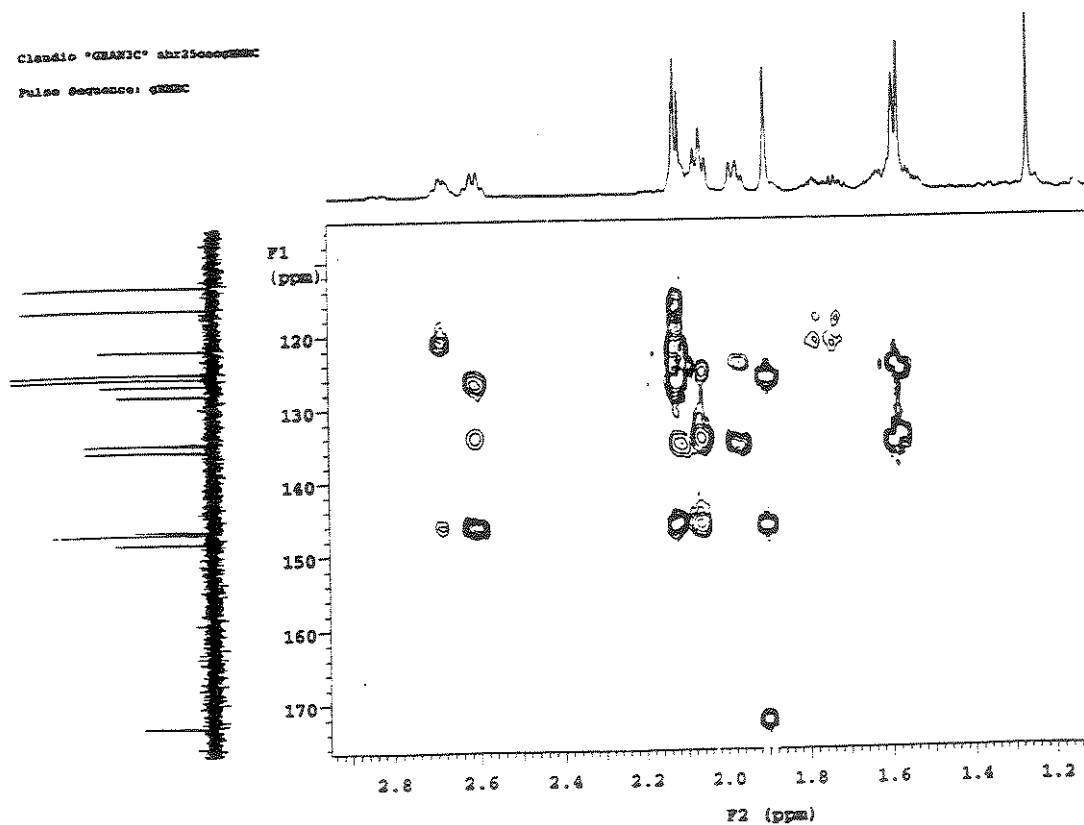
E-34 Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) a multiplas ligações (gHMBC -C CDCl_3) do composto (18)

ESPECTROS

Claudio "GRANIC" abrt5000p2000
Pulse Sequence: gmsc

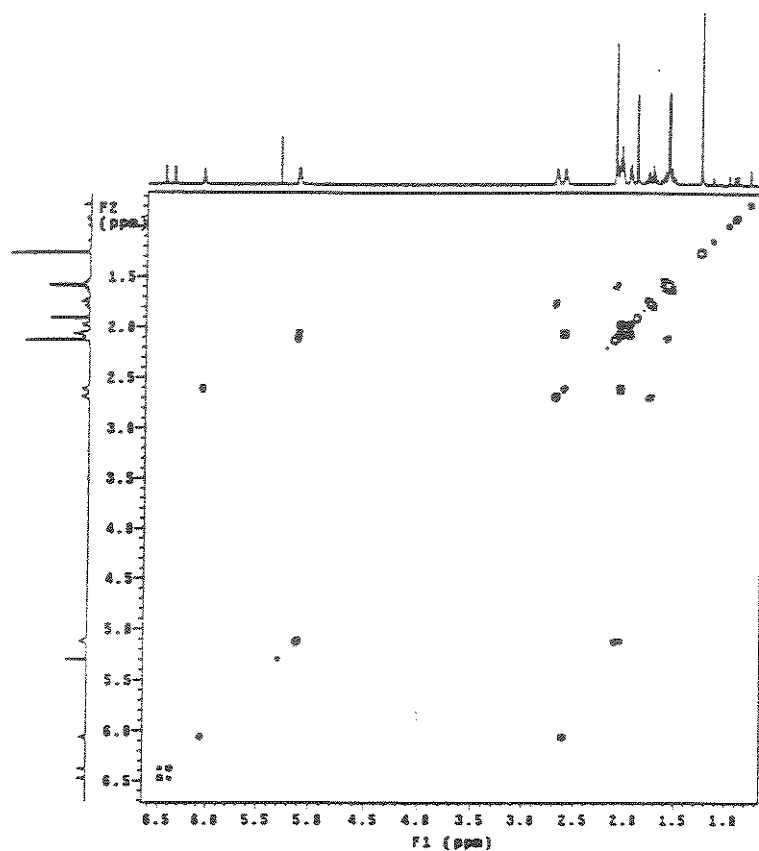


Claudio "GRANIC" abrt5000p2000
Pulse Sequence: gmsc

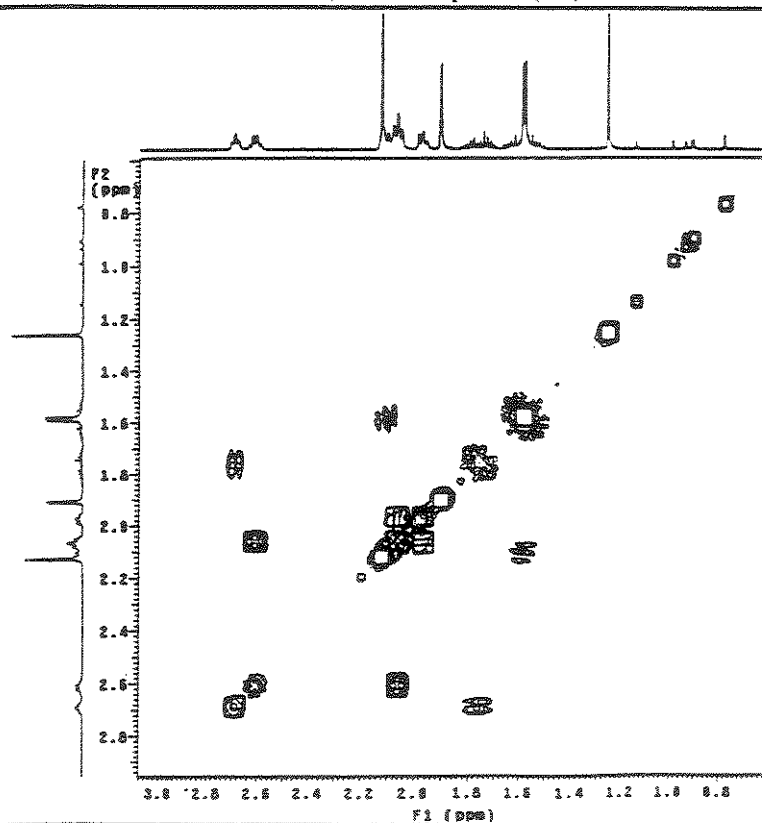


E-34A e B Expansões do espectro E-34 nas regiões entre δ 8,0 – 84,0 e 106,0 – 176,0

(F1)

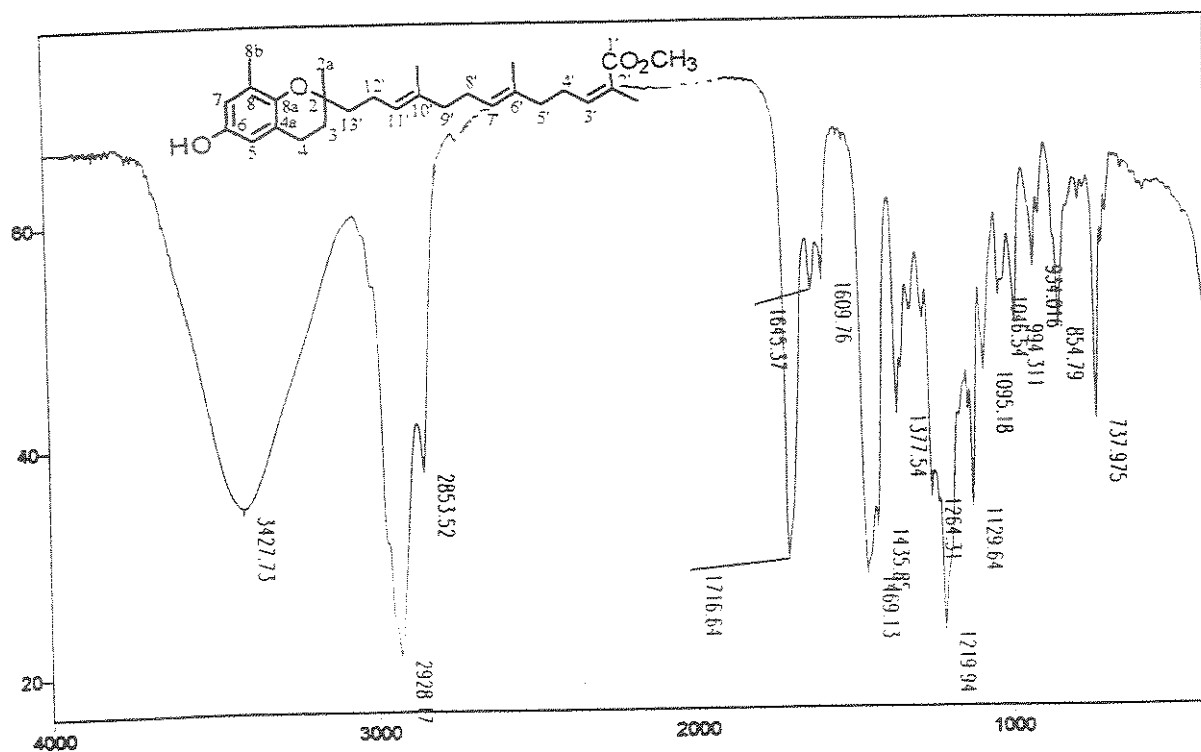


E-35 Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear ¹H-¹H (500 MHz) gCOSY - CDCl₃ do composto (18)

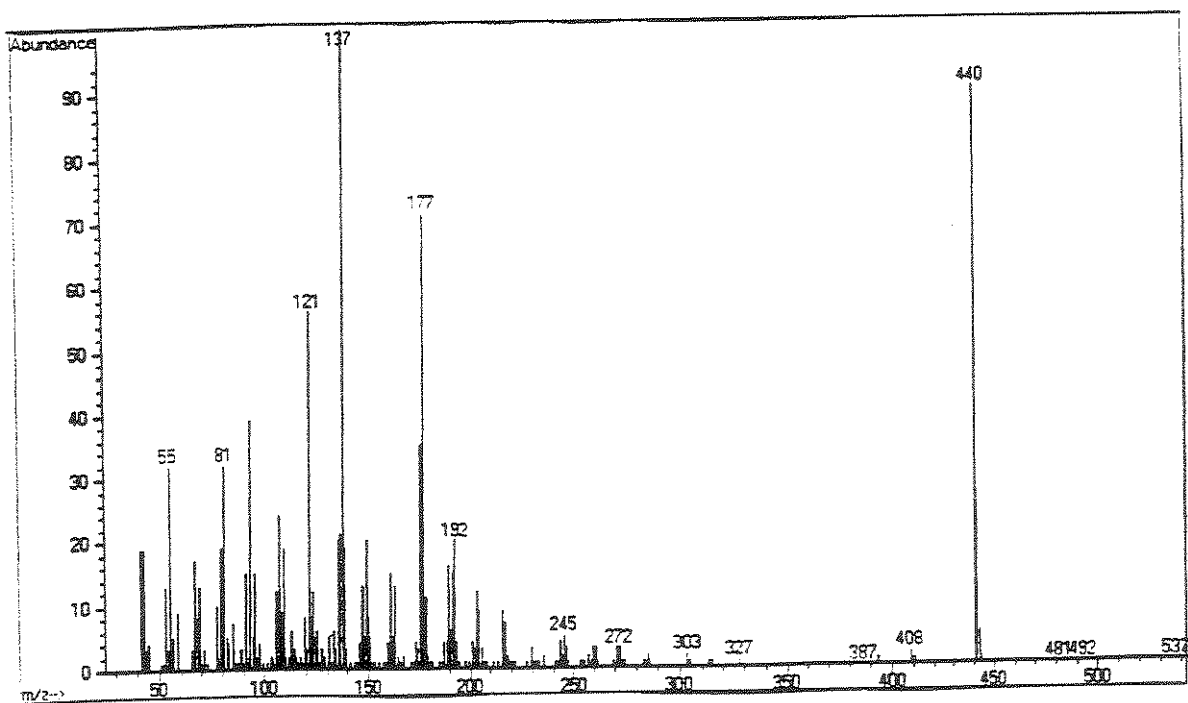


E-35A Expansão do espectro E-35, na região entre δ 0,68 – 3,08 (F1)

ESPECTROS

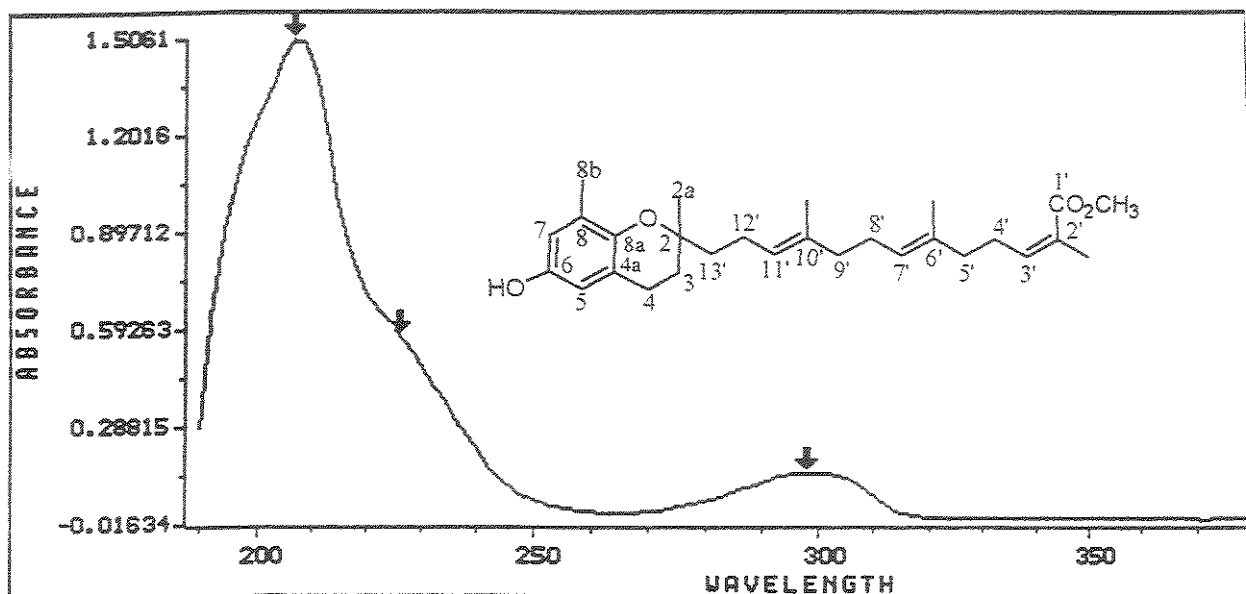


E-36 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (18A)



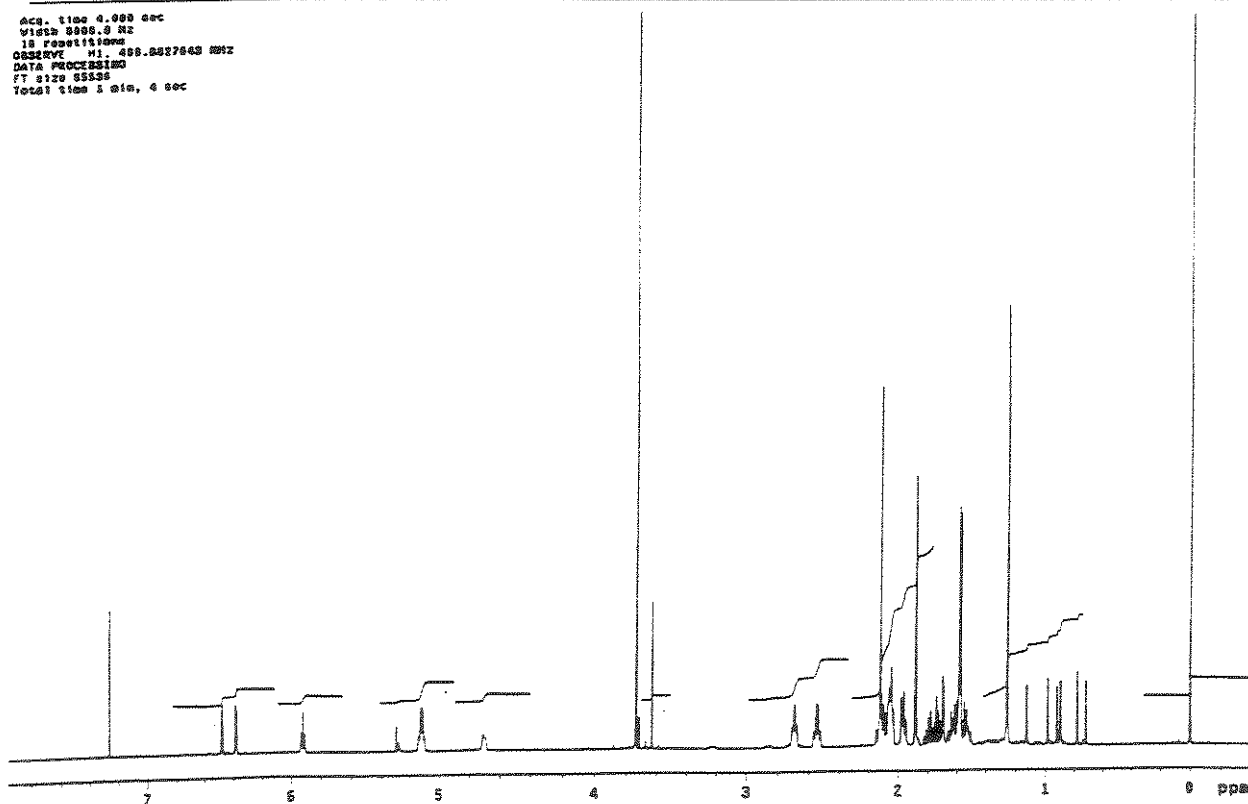
E-37 Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (18A)

ESPECTROS



E-38 Espectro no Ultravioleta do composto (18A)

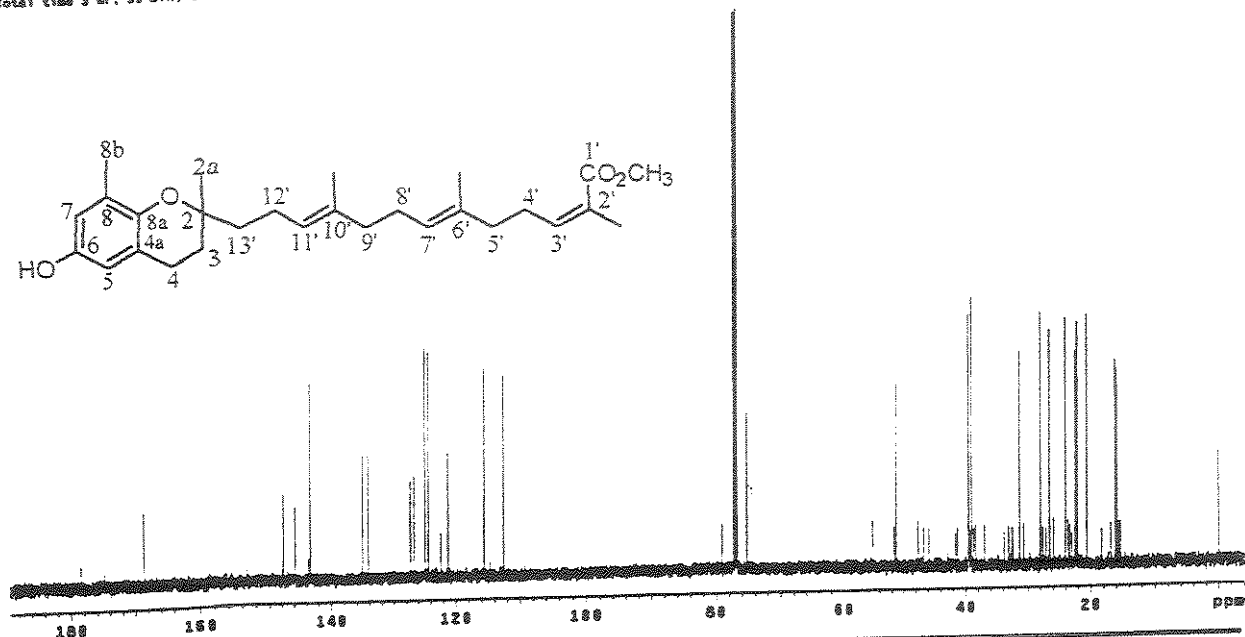
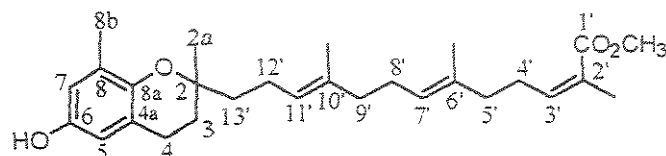
Acq. time 4.000 sec
 Width 8000.0 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE F1 400.2627640 MHz
 DATA PROCESSED
 FT size 65536
 Total time 1 min, 4 sec



E-39 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto (18A)

ESPECTROS

File: 74017000
INOVA-500 "nuc" "nmr"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.500 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.024 sec
Width 32051.3 Hz
1320 repetitions
OBSERVE C13, 125.695245 MHz
DECOUPLE H1, 400.8052557 MHz
Power 30 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line processing 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 3 hr, 31 min, 8 sec

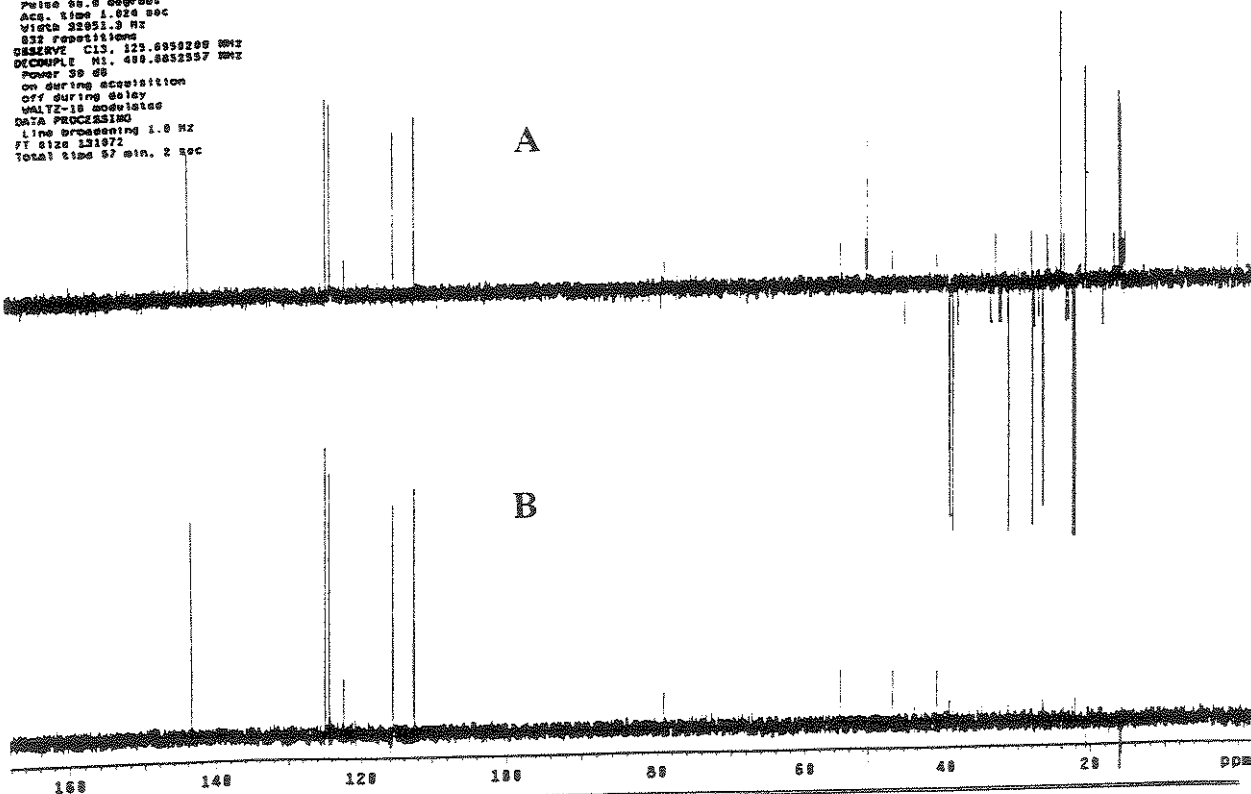


E-40 Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3), do composto (18A)

Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.024 sec
Width 32051.3 Hz
832 repetitions
OBSERVE C13, 125.695245 MHz
DECOUPLE H1, 400.8052557 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line processing 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 57 min, 2 sec

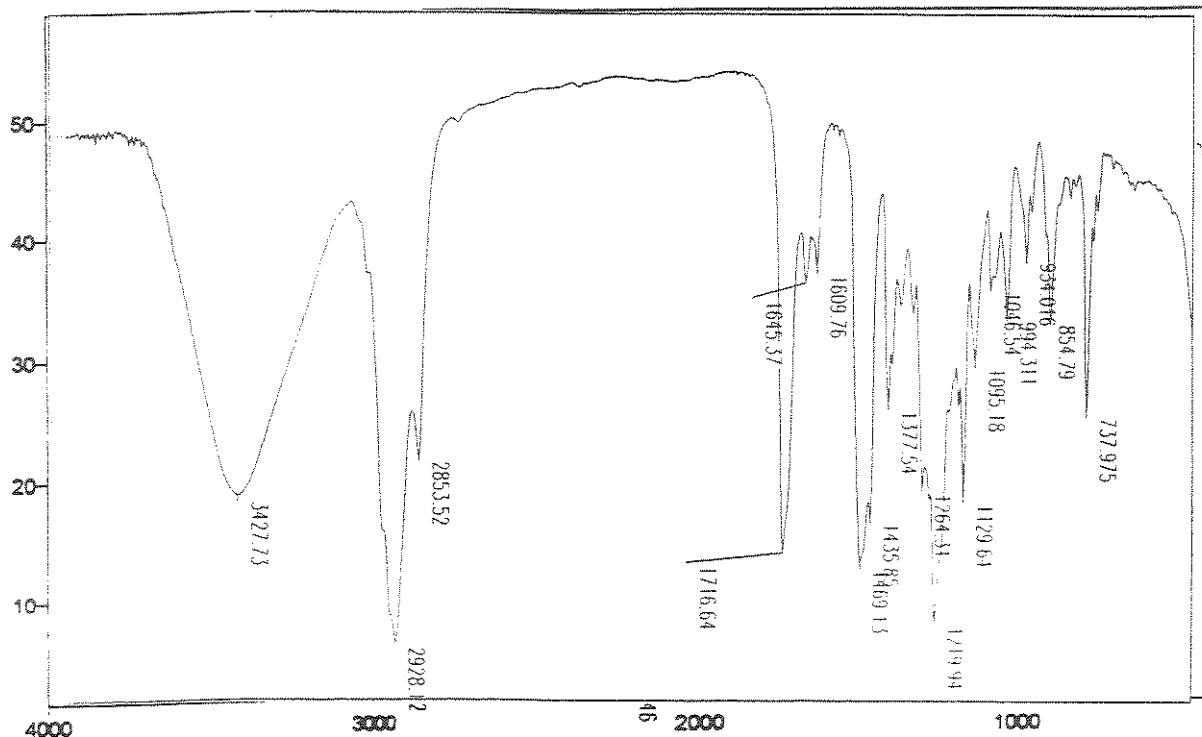
A

B



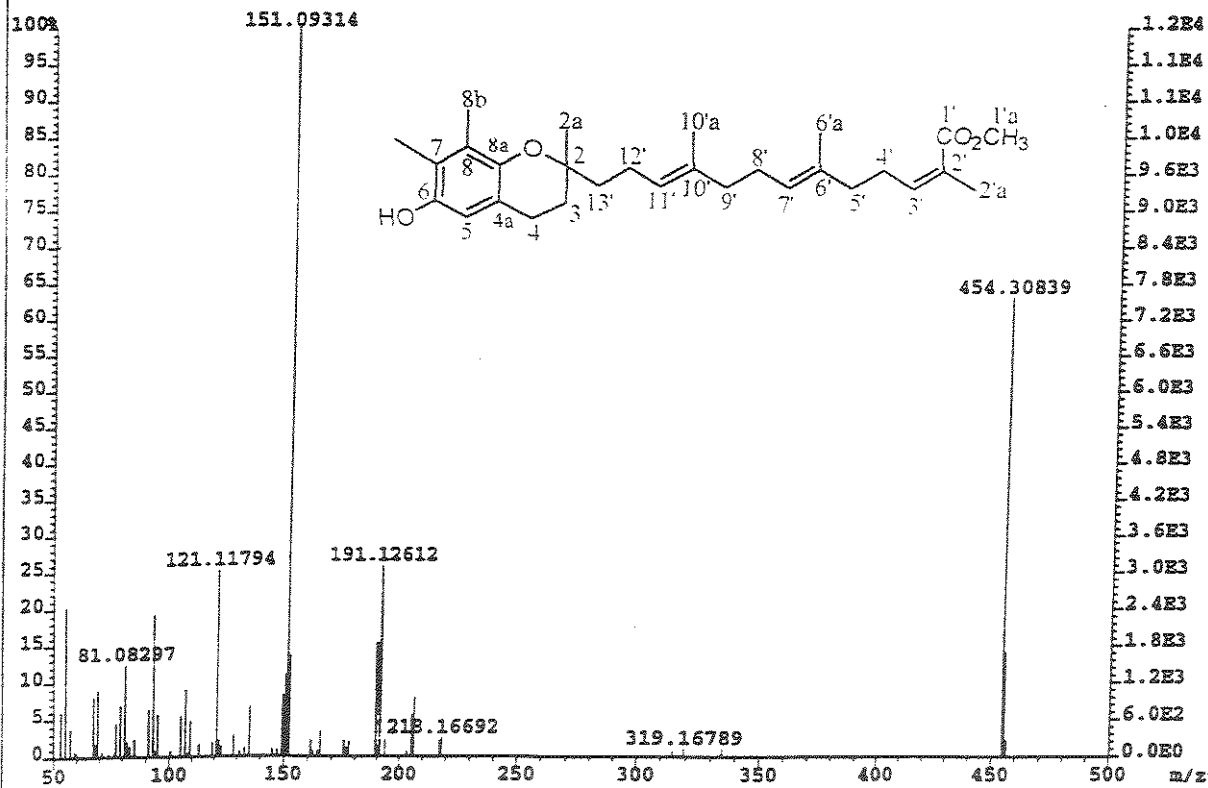
E-41 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3) do composto (18A)

ESPECTROS

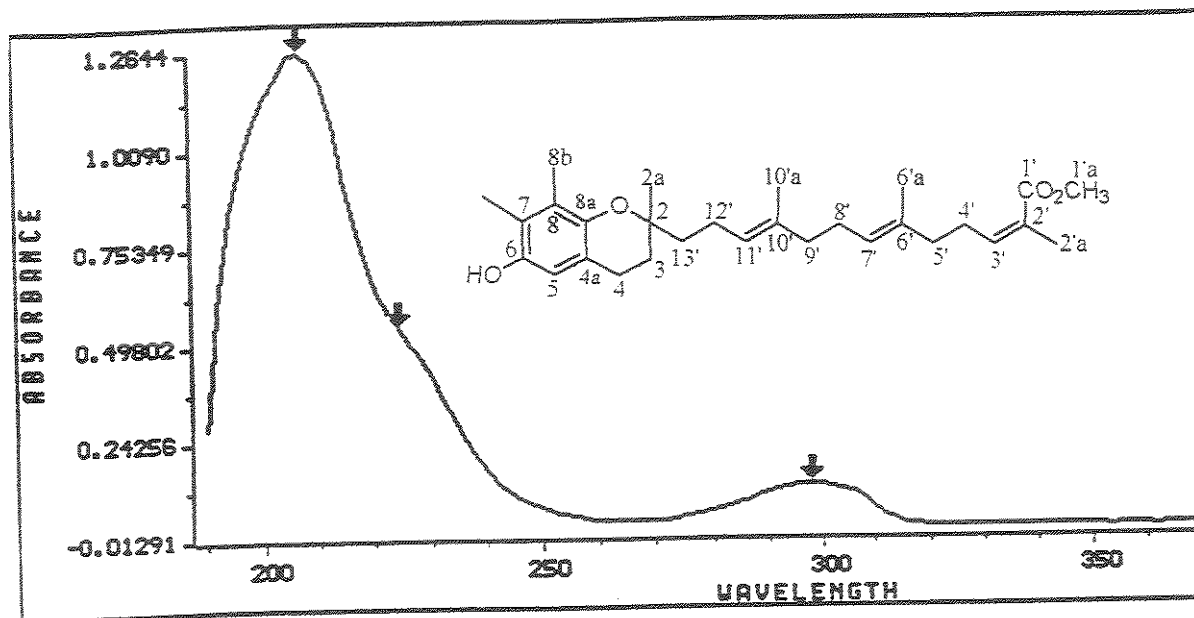


E-42 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (79)

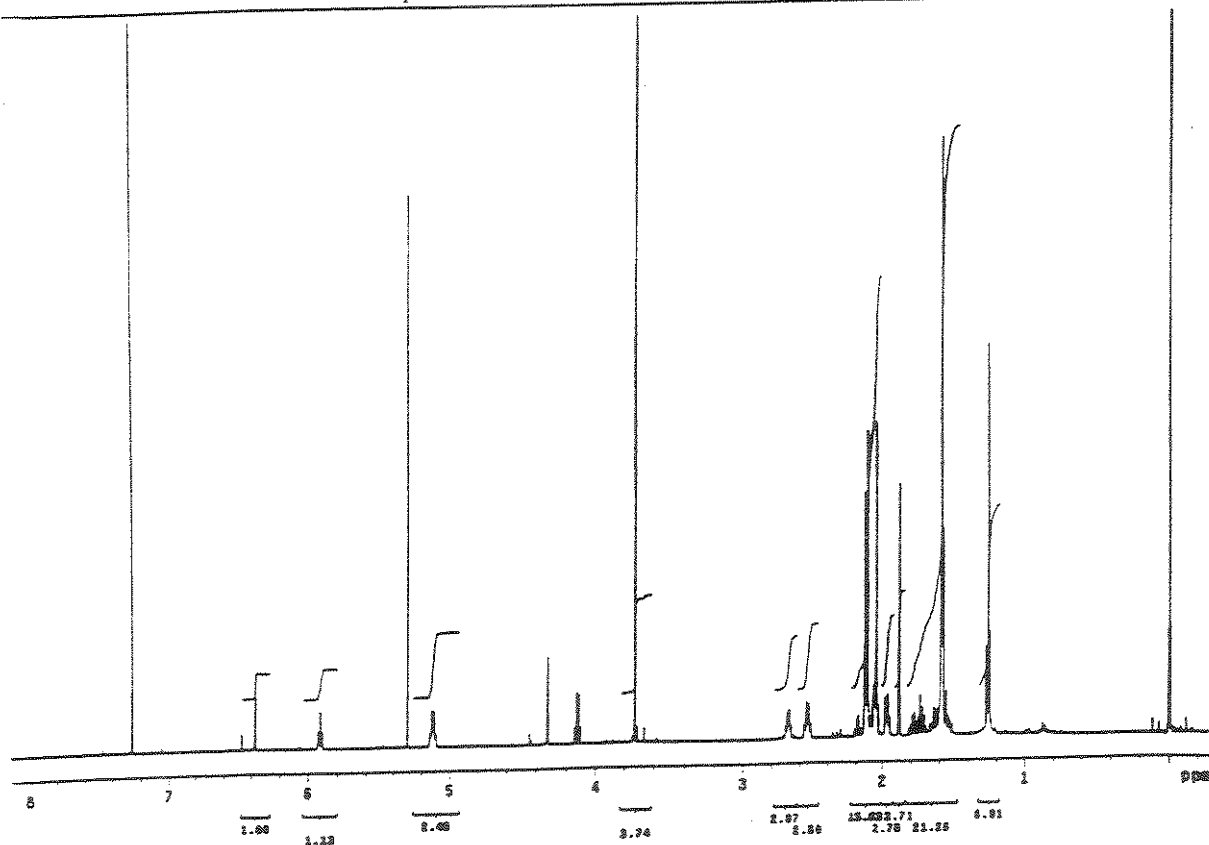
File:ABRI200A Ident:284_285 Win 1000PPM Acq:12-APR-2000 10:52:06 +15:45 Cal:ABRI200A
AutoSpec EI+ Magnet BpM:151 BpI:12028 TIC:56809 Flags:HALL



E 43 Espectro de Massas (alta resolução, IE, 70 eV.) do composto (79)



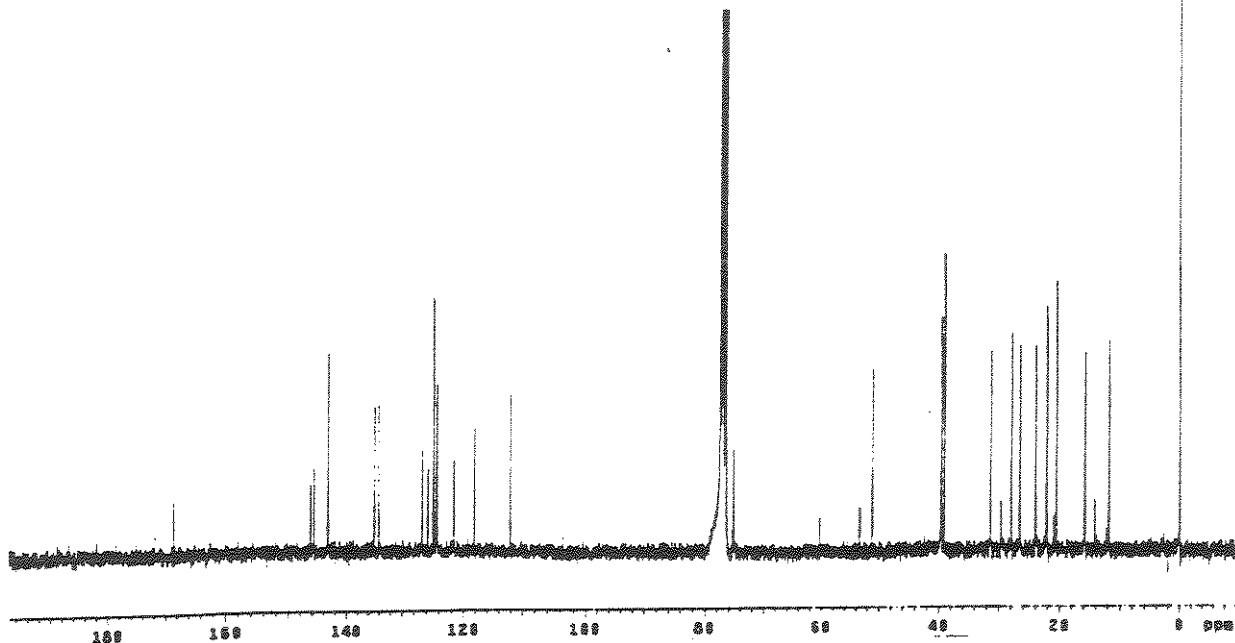
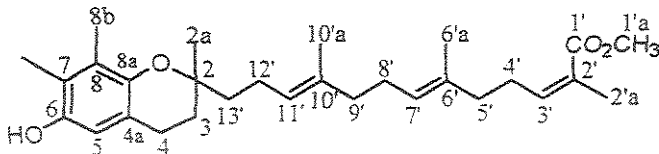
E-44 Espectro no Ultravioleta do composto (79)



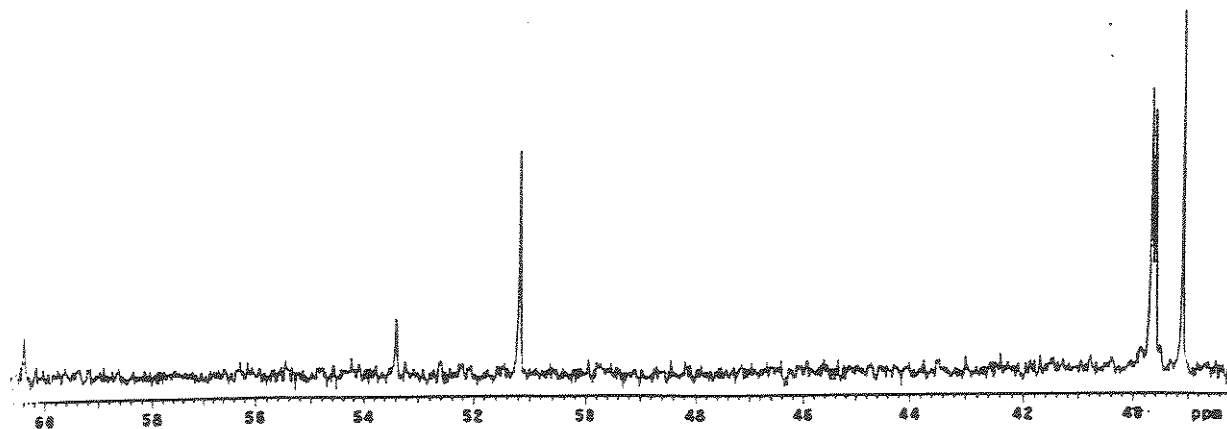
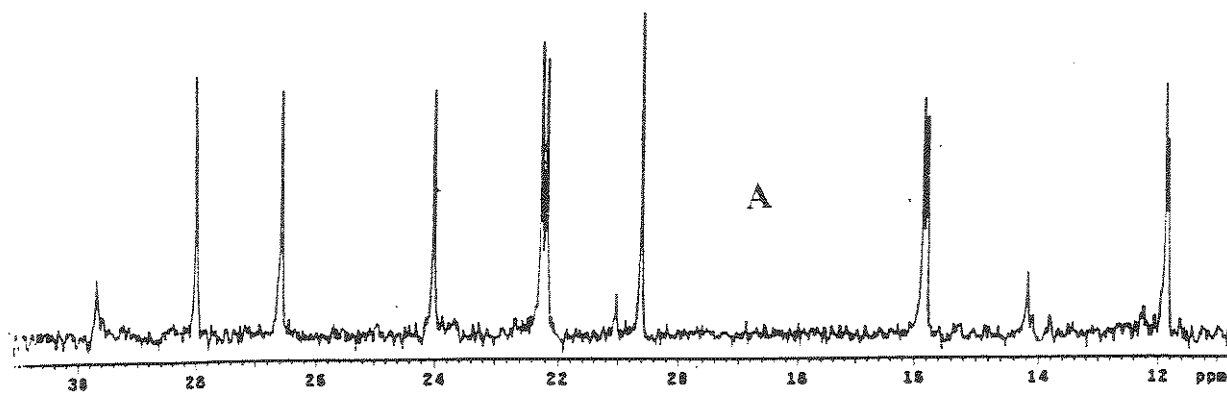
E-45 Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto (79)

ESPECTROS

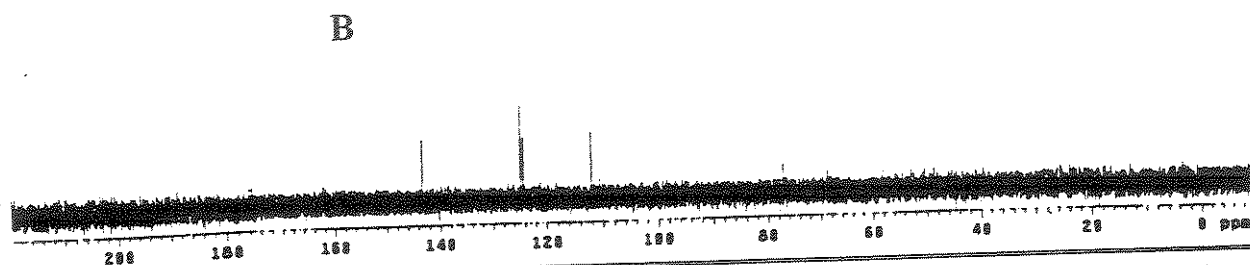
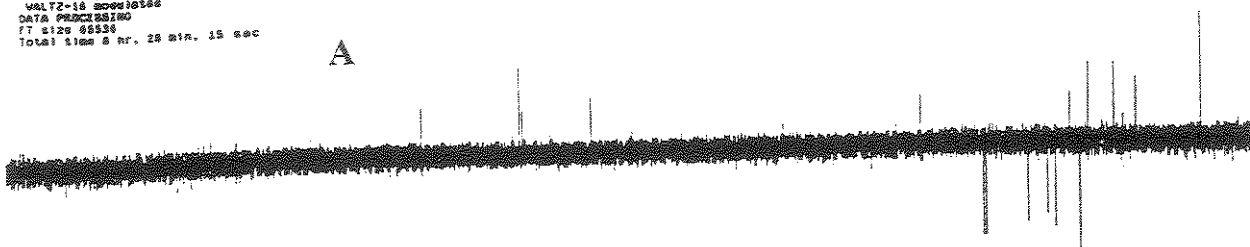
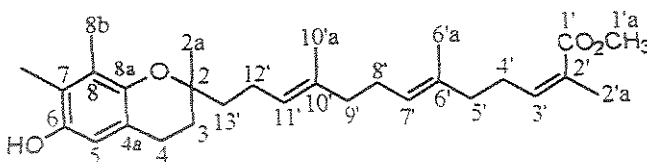
File: FV28CACC.001.CV
 INSTRUMENT: "nmrson"
 PULSE SEQUENCE: zgpg30
 Relax. delay 0.001 sec
 1st pulse 20.0 degrees
 2nd pulse 20.0 degrees
 Acq. time 0.010 sec
 Width 20000.0 Hz
 52027 acquisitions
 OBSERVE UNKNOWN, 75.4671897 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 9 min, 0 sec



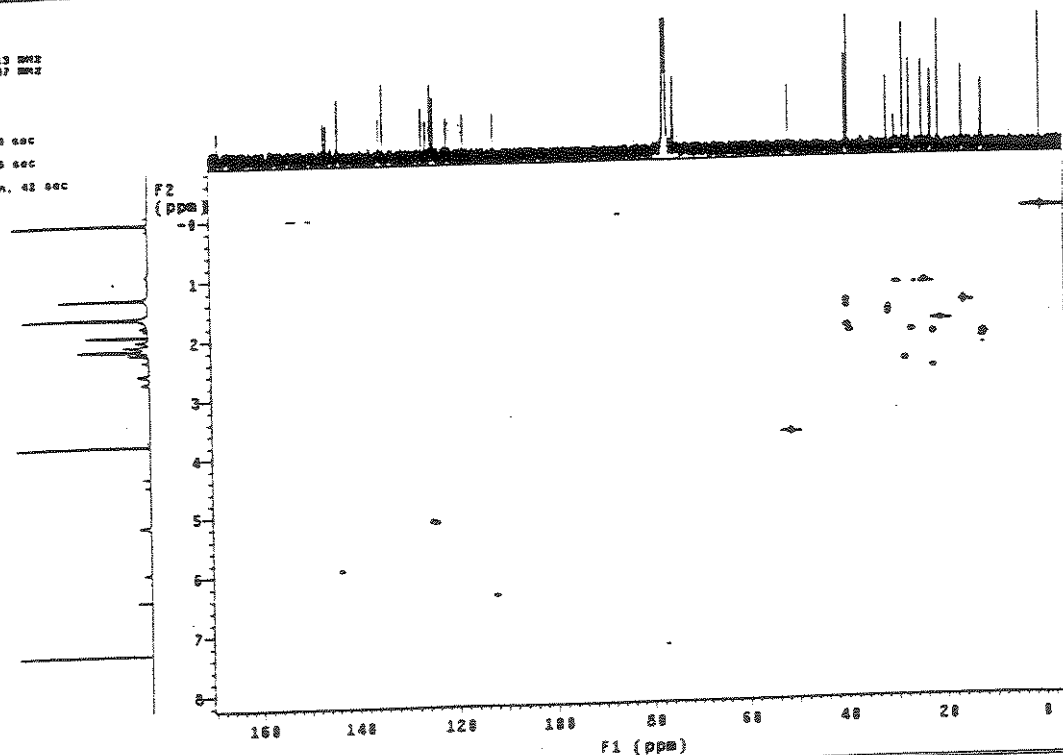
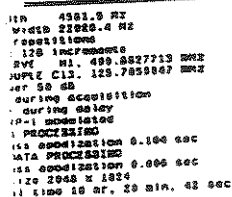
E-46 Espectro de RMN de ^{13}C (125.70 MHz, CDCl_3) do composto (79)



E-46 A e B Expansões do espectro E-46 nas regiões entre δ 10,0 – 31,0 e 39,0 – 60,0

[illegible]

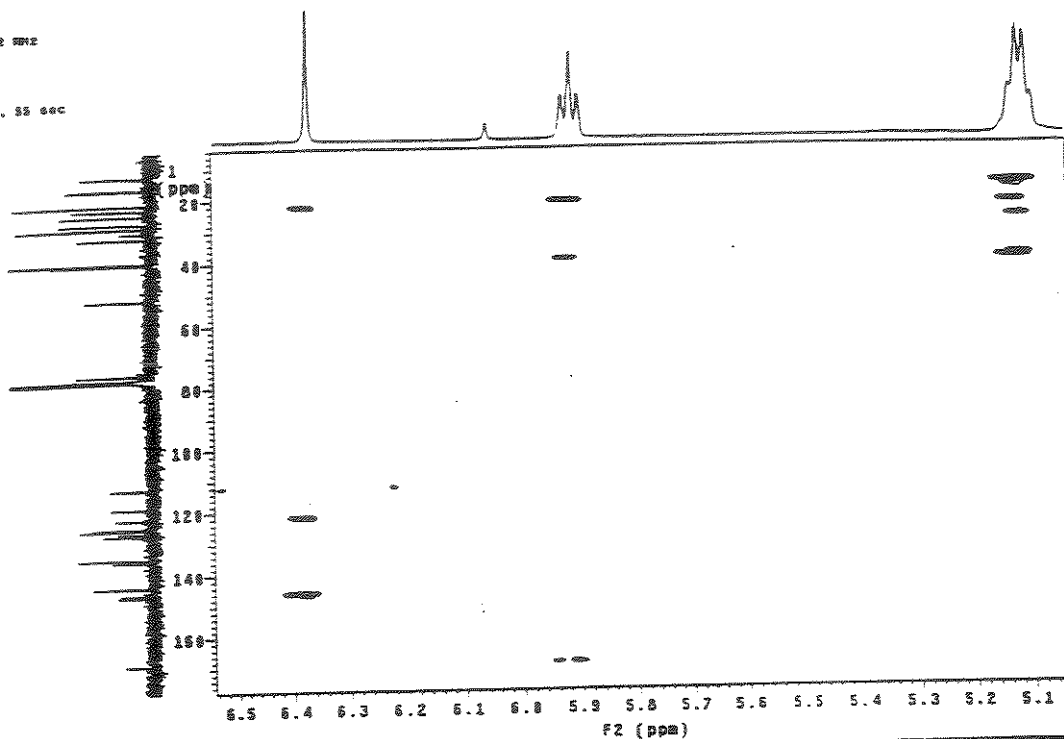
E-47 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125.70 MHz, CDCl_3), do composto (79)



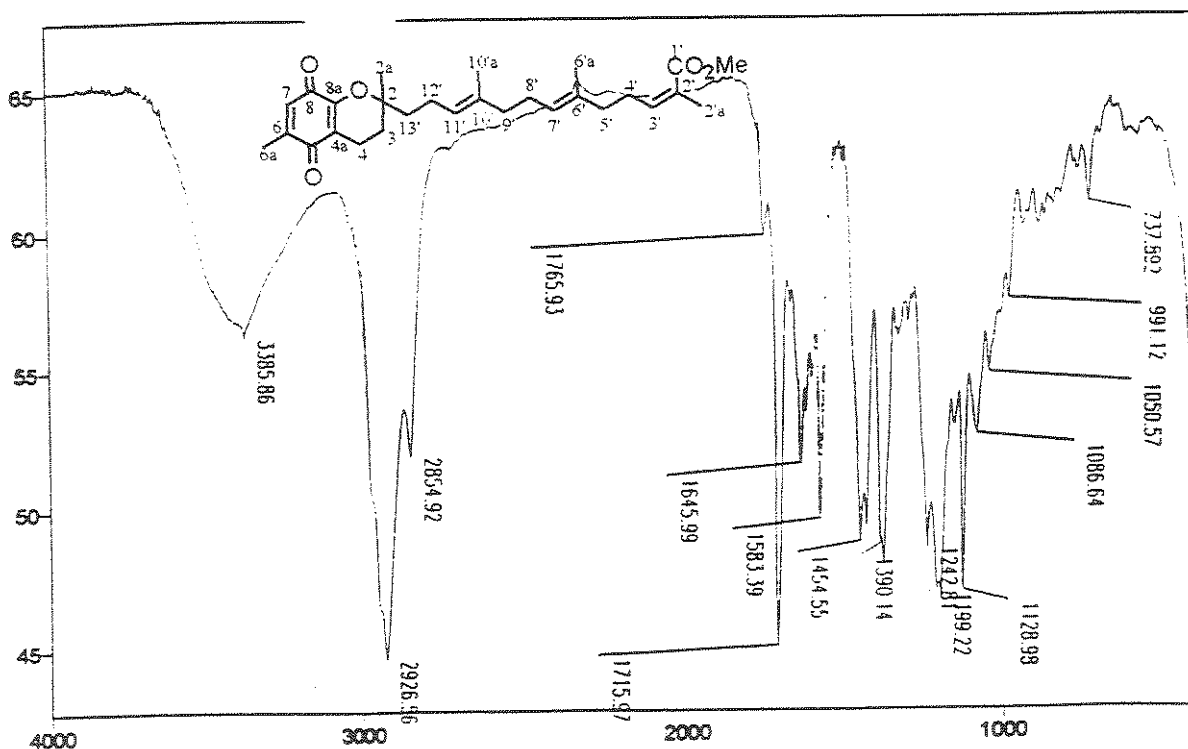
E-48 Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H (500MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) HSQC - CDCl_3 do composto (79)

ESPECTROS

1-14-87
OVA-500 "Innova500"
1H NMR: 400 MHz
Pulse delay 2.000 sec
Acq. time 0.230 sec
F2 400.142 MHz
F1 width 20472.5 Hz
AQ resolution
AQ increments
AQVE H1. 400.0827672 MHz
AQ PROCESSING
AQ delay 0.110 sec
AQ DATA PROCESSING
AQ delay 0.030 sec
AQ size 2048 x 2048
AQ 1 time 20 hr, 15 min, 55 sec



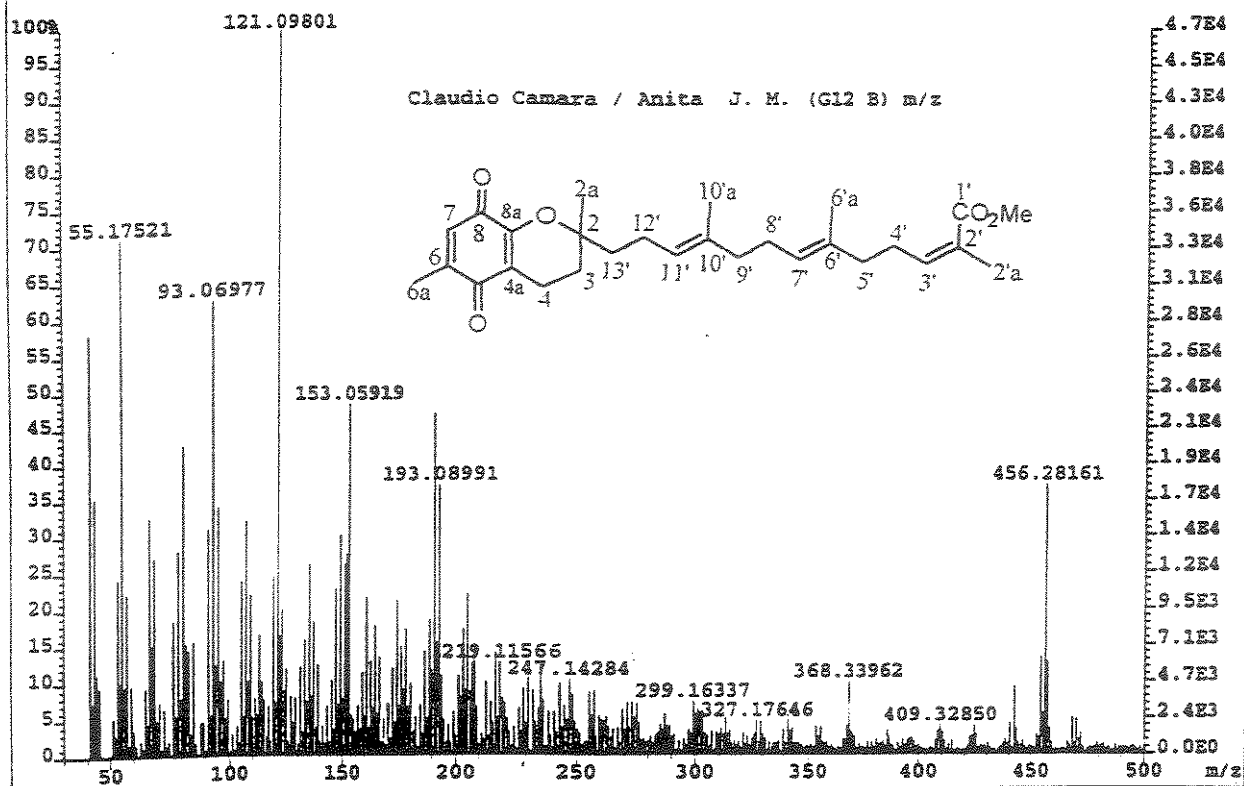
E-49A Expansão do espectro E-49 na região entre δ 5.06 – 6.54



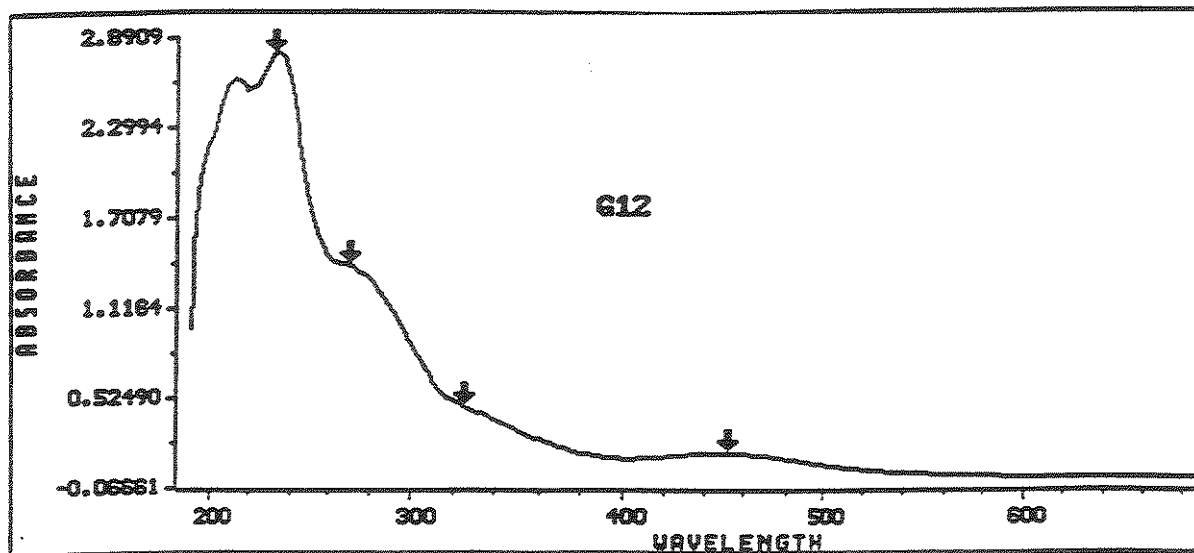
E-50 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (80).

ESPECTROS

File:MAI2201 Ident:222_229-216 Win 1000PPM Acq:22-MAY-2001 15:20:41 +32:54 Cal:MAI2201
 AutoSpecE EI+ Magnet BpM:121 SpI:47462 TIC:1456767 Flags:NORM



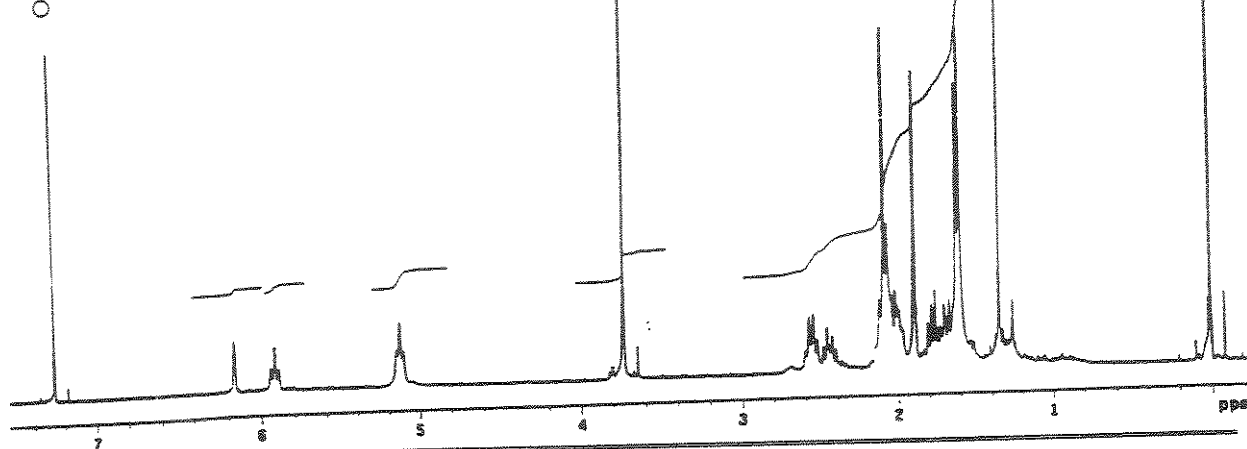
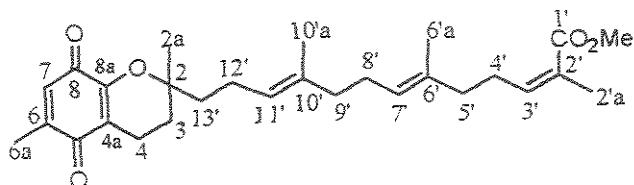
E-51 Espectro de Massas (IE, 70 eV.) do composto (80).



E-52 Espectro no Ultravioleta do composto (80)..

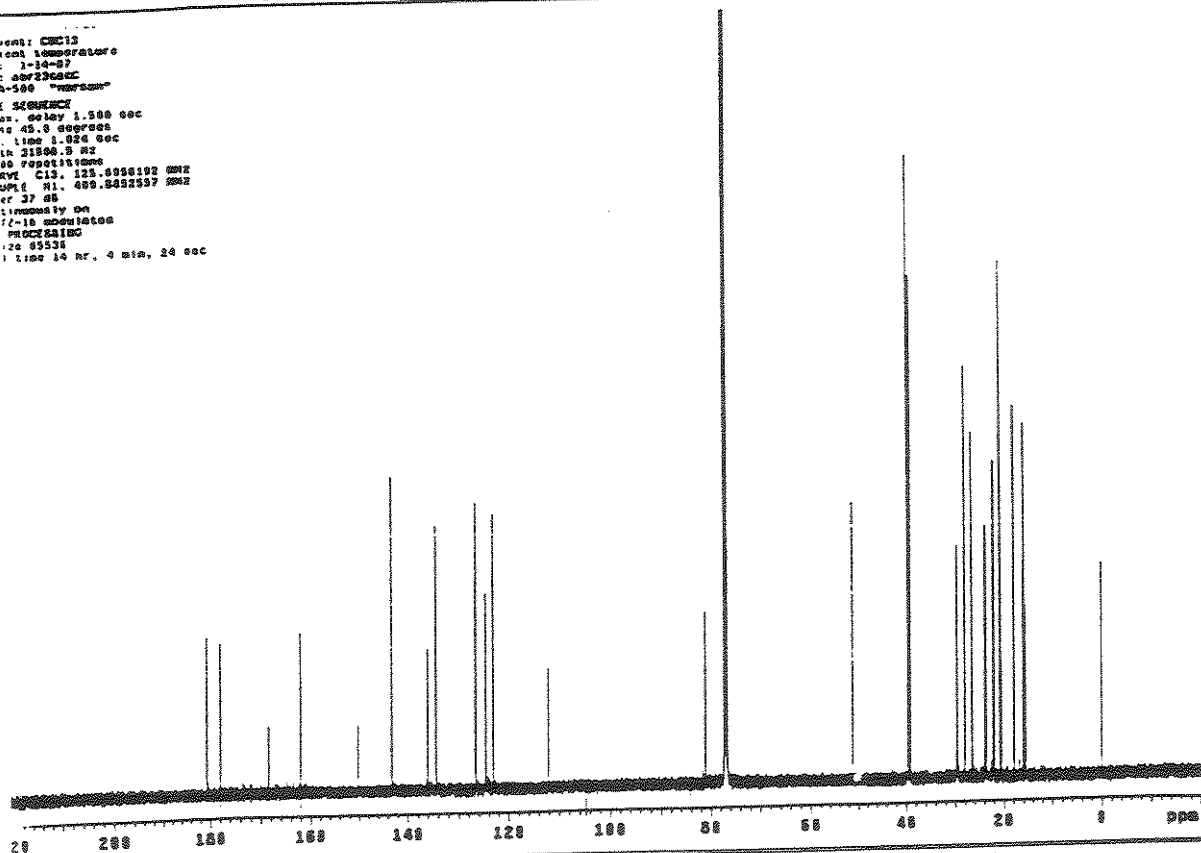
ESPECTROS

Solvent: CDCl₃
 Acq. Temp: 300.0 K
 File: 00100000
 INOVA-500 "nmr500"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 0.300 sec
 Pulse 21.5 degrees
 Acq. time 2.557 sec
 Width 6000.0 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE H1: 500.0073535 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min. 4 sec



E-53 Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto (80).

Solvent: CDCl₃
 Acq. Temp: 300.0 K
 File: 00100000
 INOVA-500 "nmr500"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.500 sec
 Pulse 15.0 degrees
 Acq. time 5.020 sec
 Width 21500.0 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13: 125.6956192 MHz
 UPFI H1: 400.8222537 MHz
 37 dB
 12-16 modulation
 PROCESSING
 26 85536
 Total time 10 hr. 4 min. 24 sec

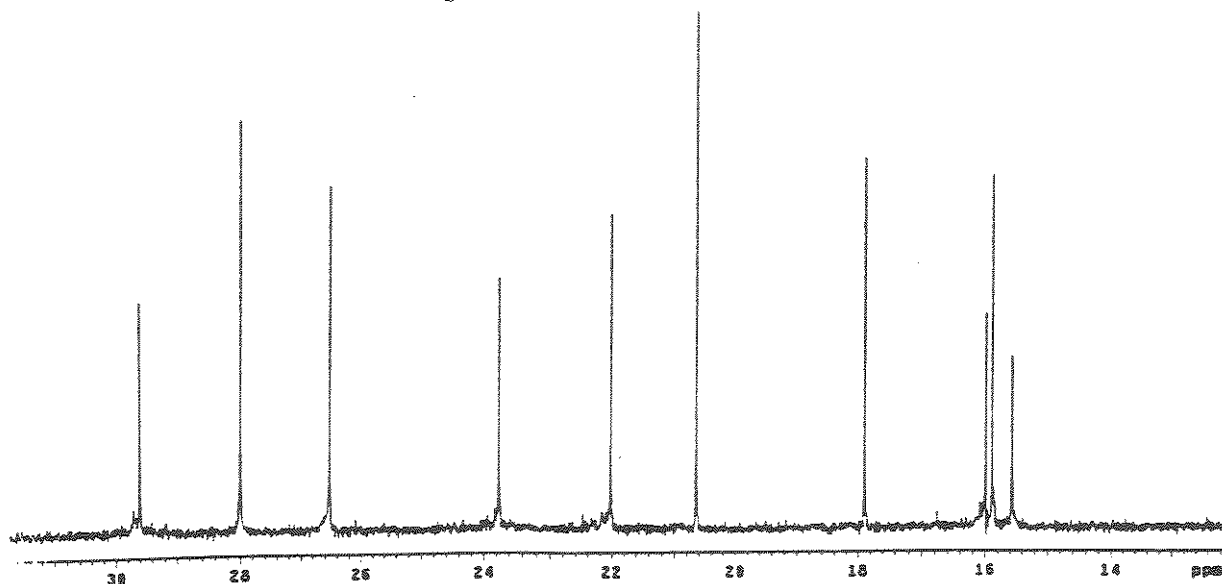
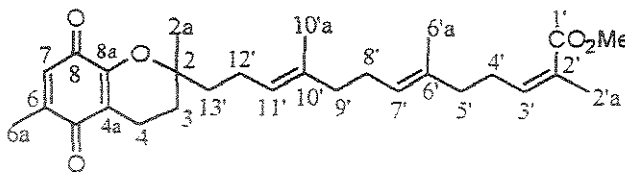
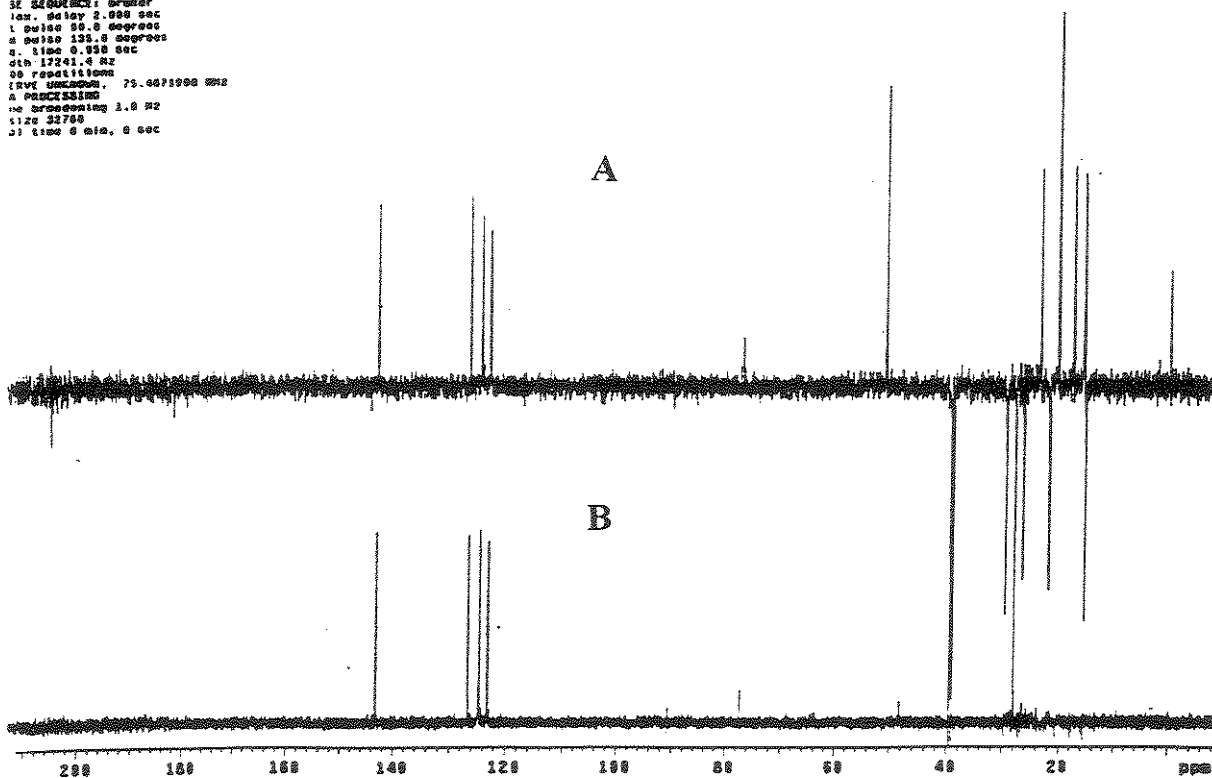


E-54 Espectro de RMN de ¹³C (125,70 MHz, CDCl₃) do composto (80).

```

1C: 00F25000.
700-500 700-500
SR 3100000000
1000 00000 1.500 000
1100 05.0 00000000
0. 1000 1.000 000
data 21000. 5 Hz
1000 0000000000
1100 013. 125.0000000 0000
"TRIPLE" H1. 000.0000000 0000
1000 00 0000
1100 0000000000
12-10 0000000000
1A 0000000000
1100 00000000
1000 0000 00 000. 000000. 00 0000

```

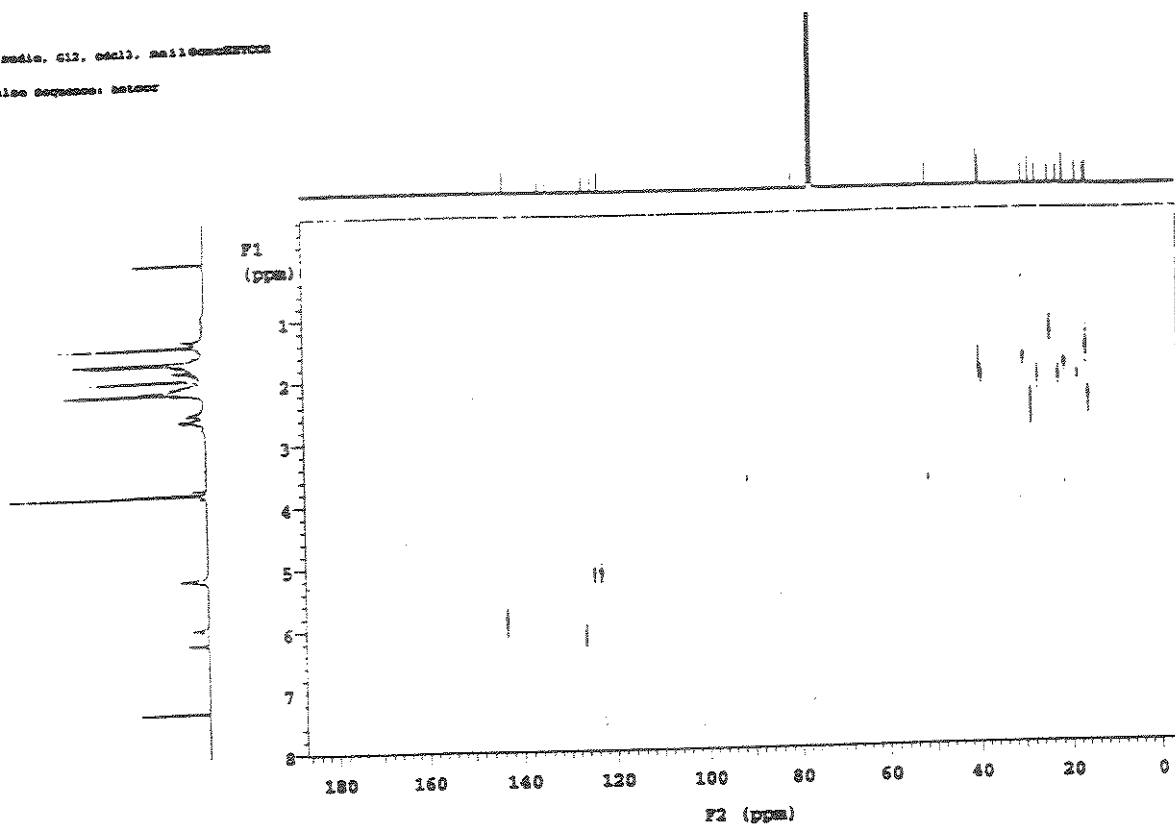
[illegible]

E-55 Espectro de RMN de ^{13}C A) DEPT 135 e B) DEPT 90 (125,70 MHz, CDCl_3), do composto (80).

ESPECTROS

Cisodis, 612, 0413, mail@ccc.ufsc.br

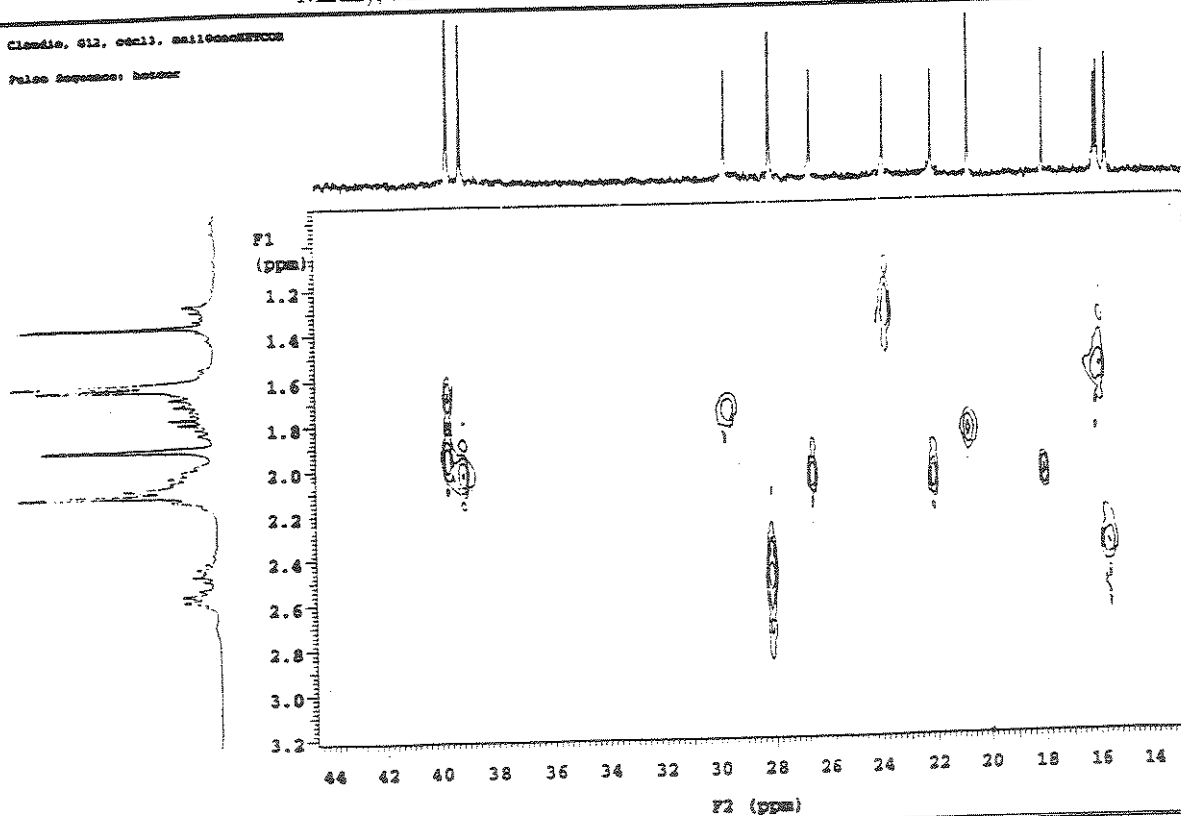
Pulse sequence: hetero



E-56 Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz), HETCOR - CDCl_3 do composto (80).

Cisodis, 612, 0413, mail@ccc.ufsc.br

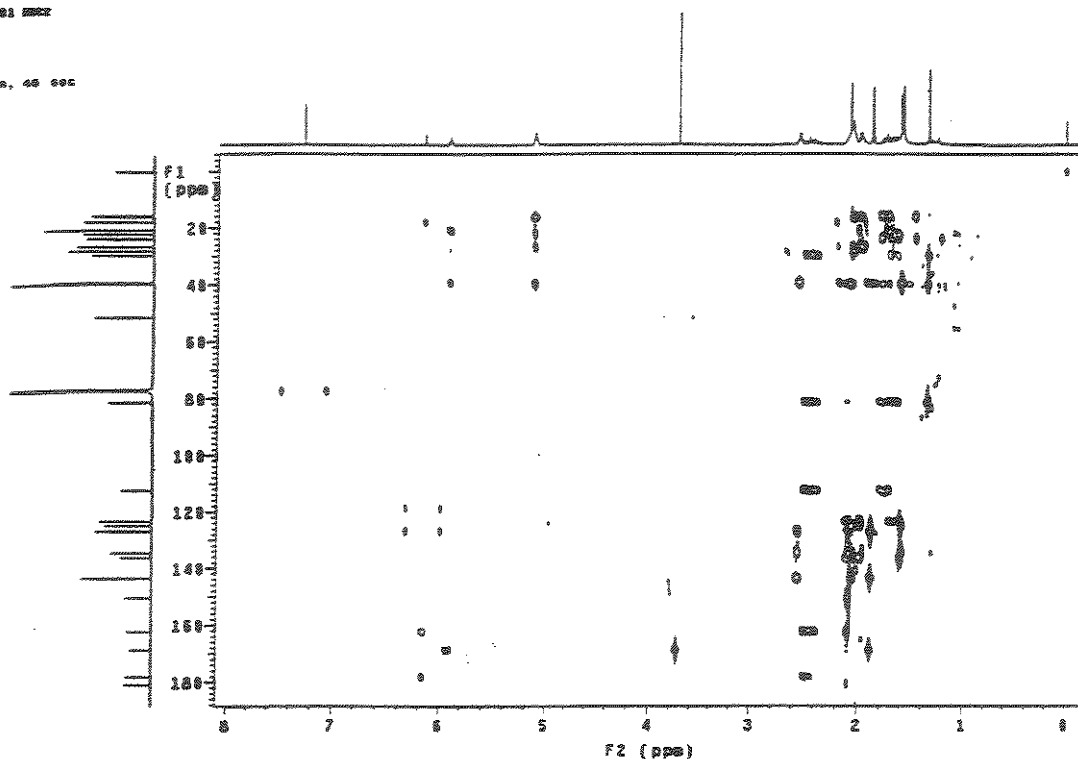
Pulse sequence: hetero



E-56 A Expansão do espectro E-56 na região entre δ 13,0 – 31,0

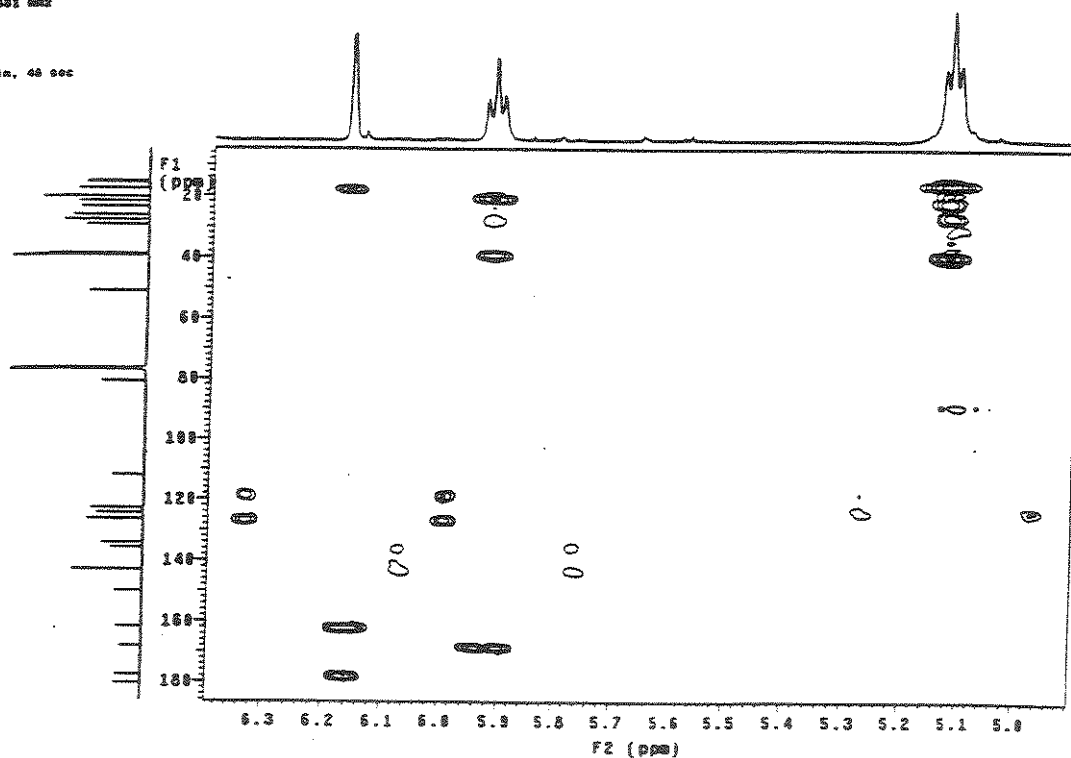
ESPECTROS

Acq. time 0.100 sec
width 3200.0 Hz
2D width 24045.7 Hz
400 repetitions
30 increments
OBSERVE F1, 400.0027501 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
FT size 2048 x 1024
Total time 15 hr, 40 min, 40 sec



E-57 Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,7 MHz) a múltiplas ligações (gHMBC, CDCl_3) do composto (80).

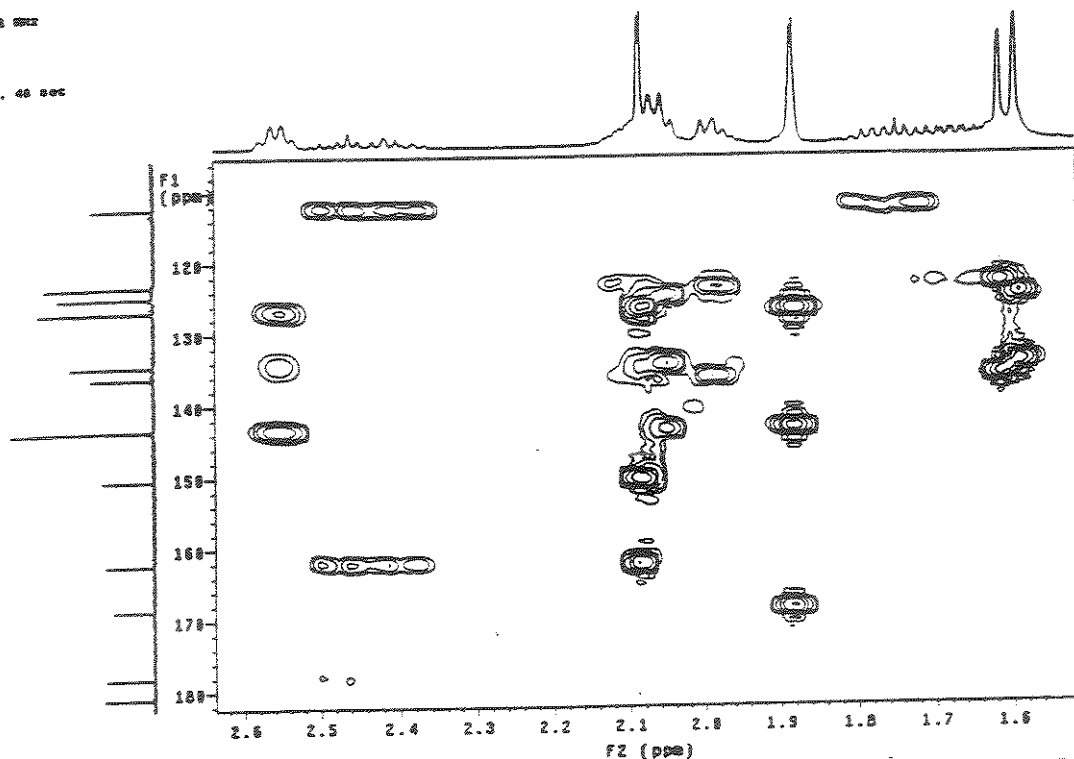
Acq. time 0.100 sec
width 3200.0 Hz
2D width 24045.7 Hz
400 repetitions
30 increments
OBSERVE F1, 400.0027501 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
FT size 2048 x 1024
Total time 15 hr, 40 min, 40 sec



E-57 A Expansão do espectro E-57 na região entre δ 4,9 – 6,4 (F2)

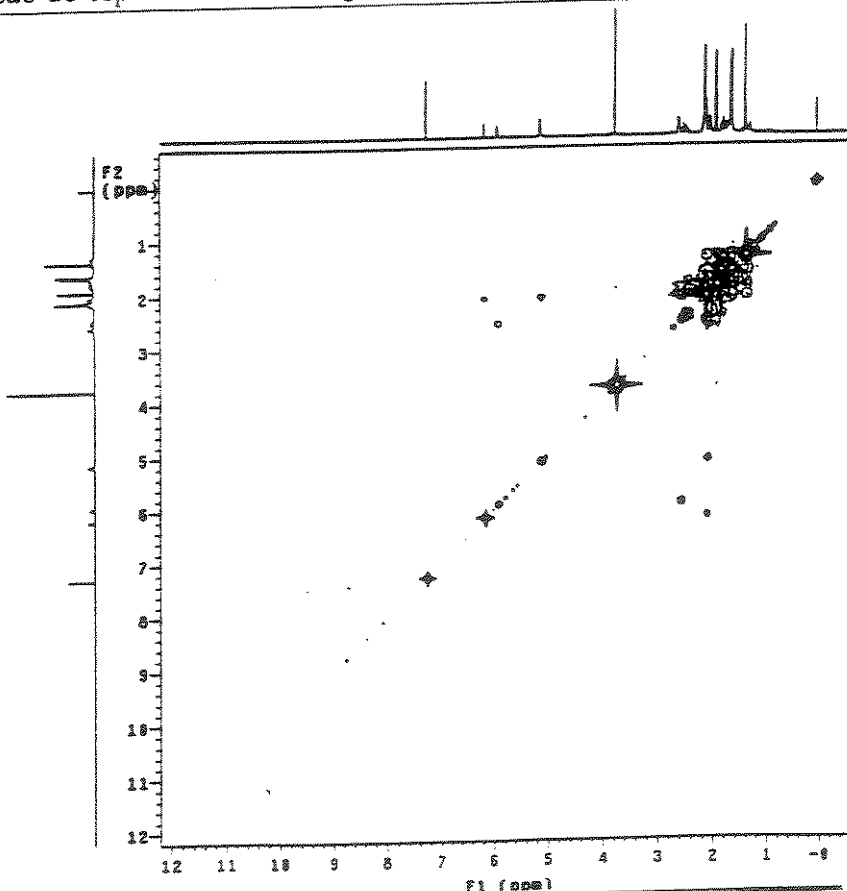
ESPECTROS

US 100000000
OBSERVE N1. 499.827581 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.004 sec
F1 size 1024 x 1024
Total time 15 hr, 40 min, 48 sec



E-57 B Expansão do espectro E-57 na região entre 1,5 – 2,6 (F2)

US 100000000
OBSERVE N1. 499.827581 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.004 sec
F1 size 1024 x 1024
Total time 50 min, 34 sec



E-58 Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear de ^1H , ^1H , (500 MHz), gCOSY - CDCl_3 do composto (80).

ESPECTROS

Clonidine 012 0011500000000000

Pulse Sequence: gzbv

Solvent: CDCl₃

Amplifier: 1000000000

INSTR-100 "1000000000"

Pulse Sequence: gzbv

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 6400.0 Hz

20 Width 6400.0 Hz

12 repetitions

128 increments

DSERVE F1: 400.000000 MHz

DATA PROCESSING

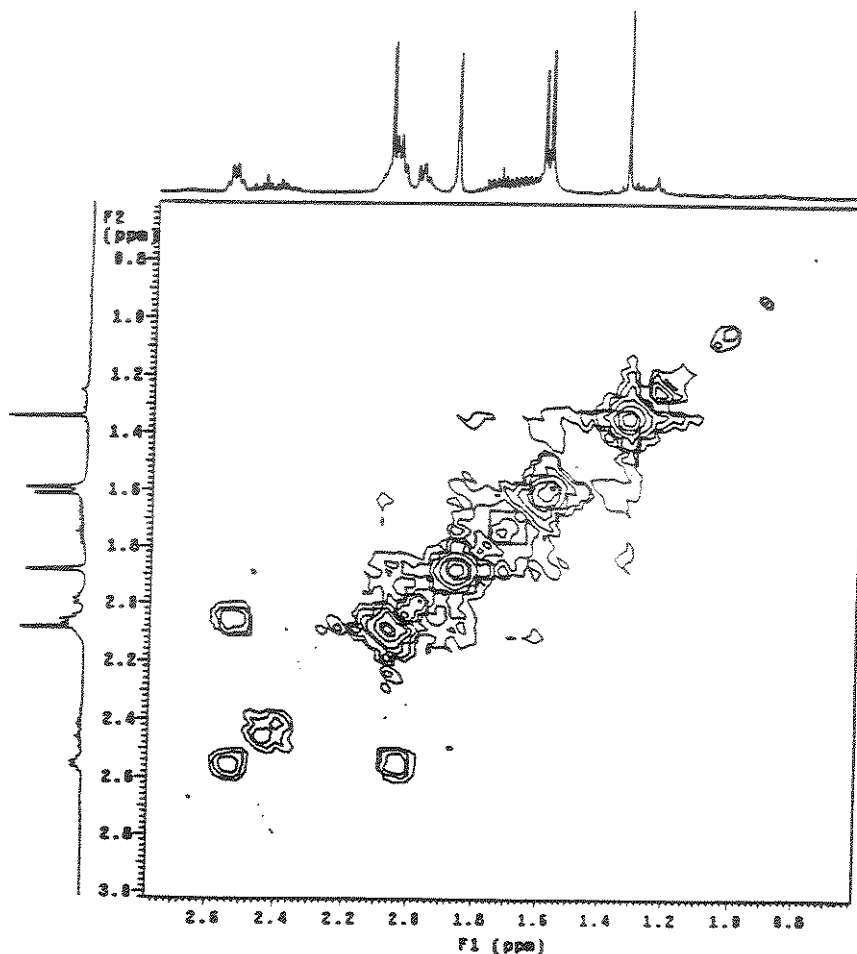
Sq. time 0.110 sec

F1 Data Processing

Sine Bell: 0.020 sec

FT size 1024 x 1024

Total time 30 min, 30 sec



E-58A Expansão do espectro E-58 na região entre δ 0.60 – 2.73 (F1)

TABELA 20 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura triterpênica do látex dos frutos de *C. paralicola*.

C	I	Lit.I ⁸⁴	II	Lit.II ⁸⁴	III	Lit.III ⁸⁰	IV	Lit.IV ⁸⁰	V	Lit.V ⁸³
1	37,2	37,1	37,1	37,1	35,2	35,4	35,1	35,3	38,6	38,5
2	27,6	27,6	27,9	27,6	27,9	27,8	26,9	27,7	27,2	27,0
3	79,2	78,8	79,0	79,0	79,0	78,9	79,0	78,7	79,2	78,9
4	38,9	38,8	38,8	38,8	36,9	37,3	38,8	38,9	38,9	38,7
5	50,6	50,5	50,9	50,5	50,9	51,1	50,9	51,0	55,2	55,1
6	23,9	24,1	23,5	23,9	18,9	19,1	18,4	18,9	18,4	18,3
7	117,8	117,3	117,8	117,3	28,2	28,0	27,6	27,9	32,6	32,6
8	145,9	145,3	145,3	145,3	134,0	134,1	134,0	134,1	38,8	39,7
9	48,9	48,8	48,9	48,9	133,5	133,6	135,5	133,5	47,6	47,6
10	34,9	34,8	36,4	35,8	39,8	39,0	36,9	37,2	36,9	37,0
11	27,6	27,6	27,2	27,2	21,5	21,6	21,5	21,5	23,5	23,4
12	33,8	33,9	34,0	34,0	28,2	28,1	28,2	28,1	121,7	121,7
13	43,5	43,3	44,1	43,4	44,1	44,2	44,1	44,1	145,2	145,0
14	51,1	50,9	51,3	51,0	50,0	50,1	50,0	50,0	41,7	41,7
15	33,7	33,9	34,0	33,8	30,8	31,0	30,9	30,9	28,2	28,3
16	27,6	27,6	28,5	28,1	29,7	29,8	29,7	29,8	26,1	26,2
17	53,2	52,8	52,9	52,8	49,6	49,8	49,6	49,6	32,5	32,5
18	13,1	13,1	13,1	13,1	15,6	15,7	15,5	15,6	47,2	47,2
19	18,3	18,0	18,1	18,1	20,1	20,2	20,1	20,1	46,8	46,8
20	36,0	36,0	35,9	36,1	35,4	35,7	35,8	35,3	31,1	31,1
21	18,1	18,0	18,1	18,1	18,7	19,1	18,6	18,9	34,7	34,8
22	36,2	36,0	36,3	36,1	36,0	36,1	36,2	35,9	37,1	37,2
23	25,0	24,9	25,4	25,0	23,5	23,9	24,7	24,7	28,1	28,1
24	38,6	39,3	125,1	124,7	38,6	39,5	125,2	125,3	15,5	15,5
25	27,7	27,6	130,9	130,3	28,2	28,0	130,9	130,5	15,6	15,5
26	22,1	22,5	25,7	25,6	23,7	22,8	17,6	17,6	16,8	16,8
27	22,1	22,5	17,7	17,6	23,7	22,8	25,9	25,5	25,9	26,0
28	21,9	21,5	21,9	21,8	24,4	24,5	24,5	24,5	27,3	27,3
29	27,3	27,6	27,3	27,6	28,0	28,0	28,1	28,1	33,3	33,2
30	14,7	14,6	14,7	14,3	15,4	15,5	15,5	15,6	23,7	23,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno (δ_c 0). ⁸⁴Polonsky, J.; Varon, Z. and Rabanal, R. M. 1977. *Israel Journal of Chemistry*. 16, 16-19. ⁸⁰Knight, S.A. 1974. *Organic Magnetic Resonance*. 6, 603-611. ⁸³Tori, K.; Seo, S. And Tomita, Y.. 1975. *Tetrahedron letters*. 1, 7-10.

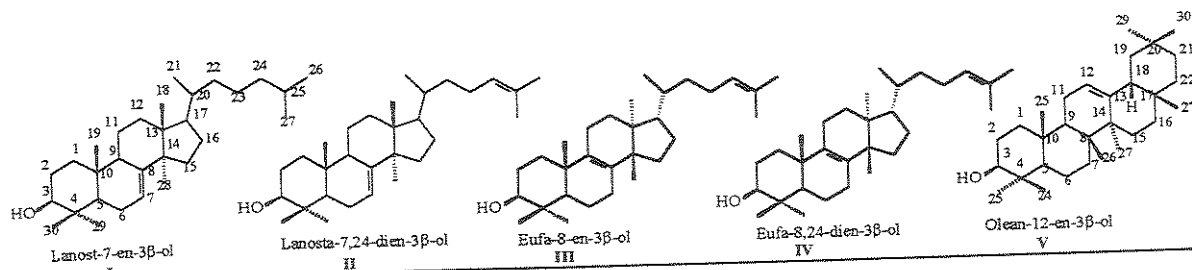


TABELA 21 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura de triterpenos do látex dos frutos de *C. weddelliana*.

C	I	Lit.I ⁸⁰	II	Lit.II ⁸⁰	III	Lit.III ⁸³
1	35,4	35,4	35,2	35,3	38,6	38,5
2	27,7	27,8	27,7	27,7	26,9	27,0
3	79,0	78,9	79,0	78,7	79,0	78,9
4	37,3	37,3	38,8	38,9	38,7	38,7
5	50,9	51,1	50,9	51,0	55,2	55,1
6	18,9	19,1	18,4	18,9	18,4	18,3
7	27,9	28,0	27,2	27,9	32,6	32,6
8	134,0	134,1	134,0	134,1	39,8	39,7
9	133,5	133,6	133,5	133,5	47,6	47,6
10	38,9	39,0	36,9	37,2	36,9	37,0
11	21,6	21,6	21,5	21,5	23,5	23,4
12	28,2	28,1	28,2	28,1	121,7	121,7
13	44,1	44,2	44,1	44,1	145,2	145,0
14	50,1	50,1	50,4	50,0	41,7	41,7
15	30,9	31,0	30,8	30,9	28,2	28,3
16	29,8	29,8	29,7	29,8	26,2	26,2
17	49,6	49,8	49,6	49,6	32,5	32,5
18	15,6	15,7	15,6	15,6	47,2	47,2
19	20,1	20,2	20,1	20,1	46,8	46,8
20	35,9	35,7	35,9	35,3	31,1	31,1
21	18,9	19,1	18,7	18,9	34,7	34,8
22	35,8	36,1	35,8	35,9	37,2	37,2
23	23,5	23,9	24,7	24,7	28,1	28,1
24	38,6	39,5	125,2	125,3	15,4	15,5
25	28,4	28,0	130,9	130,5	15,4	15,5
26	23,7	22,8	17,7	17,6	16,8	16,8
27	23,7	22,8	25,8	25,5	26,0	26,0
28	24,4	24,5	24,5	24,5	27,6	27,3
29	28,1	28,0	28,0	28,1	33,3	33,2
30	15,4	15,5	15,5	15,6	23,7	23,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno ($\delta_{\text{C}} 0$). ⁸⁰Knight, S.A., 1974. *Organic Magnetic Resonance*. 6, 603-611. ⁸³Seo, S.; Tomita, Y and Tori, K., 1975. *Tetrahedron letters*. 1, 7-10.

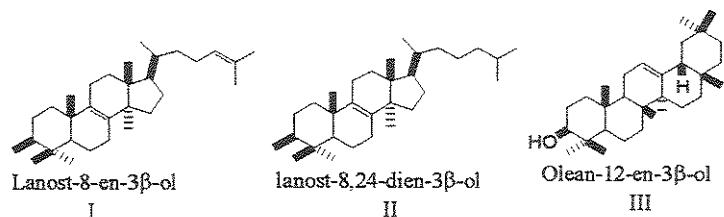


TABELA 22 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura de triterpenos do látex dos frutos de *C. fluminensis*.

C	I	Lit.I ⁸⁰	II	Lit.II ⁸⁰	III	Lit.III ⁸⁰	IV	Lit.IV ⁸⁰
1	35,5	35,8	35,3	35,7	35,3	35,4	35,3	35,3
2	28,0	27,9	28,0	27,9	27,7	27,8	27,7	27,7
3	79,1	79,0	79,1	79,0	79,1	78,9	79,1	78,7
4	39,0	39,0	39,0	39,0	37,3	37,3	39,0	38,9
5	50,2	50,5	50,2	50,5	51,0	51,1	51,0	51,0
6	19,0	19,2	19,0	19,2	19,0	19,1	19,0	18,9
7	28,2	28,3	28,2	28,3	28,0	28,0	28,0	27,9
8	134,3	134,4	134,3	134,4	134,3	134,1	134,1	134,1
9	134,3	133,4	134,3	134,4	133,8	133,6	133,8	133,5
10	37,3	37,2	37,3	37,1	39,0	39,0	37,7	37,2
11	21,6	21,1	21,6	21,1	21,6	21,6	21,6	21,5
12	27,7	26,7	27,7	26,6	28,2	28,1	28,0	28,1
13	44,2	44,6	44,2	44,6	44,2	44,2	44,2	44,1
14	50,0	49,9	49,0	49,4	50,1	50,1	50,0	50,0
15	31,0	31,2	31,0	31,1	31,0	31,0	30,8	30,9
16	30,8	31,0	30,8	30,9	29,8	29,8	29,8	29,8
17	50,7	50,7	50,7	50,7	49,7	49,8	49,7	49,6
18	15,6	15,9	15,6	15,8	15,6	15,7	15,6	15,6
19	18,7	18,3	18,7	18,3	20,2	20,2	20,2	20,1
20	36,4	36,5	36,5	36,6	36,0	35,7	35,5	35,3
21	18,9	18,8	18,9	18,8	18,9	19,1	18,9	18,9
22	36,5	36,5	36,5	36,3	35,5	36,1	35,5	35,9
23	25,0	24,2	25,0	25,0	24,8	23,9	24,8	24,7
24	39,2	39,6	125,5	125,3	39,2	39,5	125,5	125,3
25	28,1	28,1	131,1	130,8	28,1	28,0	131,1	130,5
26	22,1	22,6	17,7	17,6	22,1	22,8	17,7	17,6
27	22,1	22,8	25,8	25,7	22,1	22,8	25,8	25,5
28	24,4	24,3	24,4	24,3	24,5	24,5	24,5	24,5
29	28,1	28,1	28,1	28,1	28,1	28,0	28,1	28,1
30	15,5	15,4	15,5	15,4	15,6	15,5	15,6	15,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno ($\delta_{\text{C}} 0$). ⁸⁰Knight, S.A., 1974. *Organic Magnetic Resonance*. 6, 603-611.

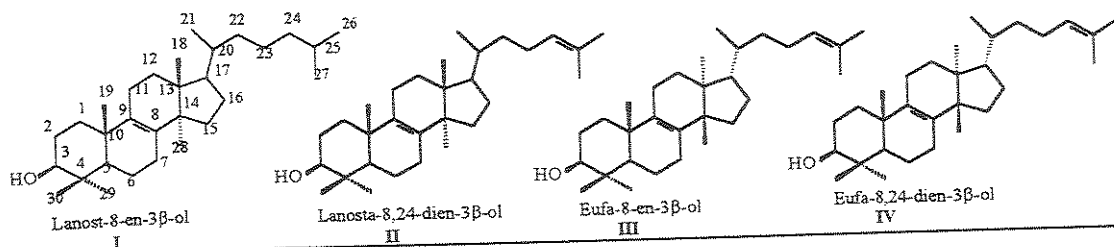


TABELA 23 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura de triterpenos do látex dos frutos de *C. spirictus-sanctensis*.

C	I	Lit. I ⁸⁰	II	Lit. II ⁷⁸⁰
1	35,4	35,7	35,2	35,3
2	27,9	27,9	27,7	27,7
3	79,0	79,0	78,7	78,7
4	38,9	39,0	38,9	38,9
5	50,1	50,5	51,0	51,0
6	18,9	19,2	18,9	18,9
7	28,2	28,3	27,9	27,9
8	134,0	134,4	134,0	134,1
9	134,0	134,4	133,5	133,5
10	37,3	37,1	37,2	37,2
11	21,5	21,1	21,5	21,5
12	27,7	26,6	28,1	28,1
13	44,1	44,6	44,1	44,1
14	50,0	49,4	50,0	50,0
15	30,9	31,1	30,9	30,9
16	30,8	30,9	29,8	29,8
17	49,6	50,7	49,6	49,6
18	15,6	15,8	15,6	15,6
19	18,7	18,3	20,1	20,1
20	36,3	36,6	35,3	35,3
21	18,9	18,8	18,9	18,9
22	36,4	36,3	35,9	35,9
23	24,9	25,0	24,7	24,7
24	125,2	125,3	125,3	125,3
25	130,9	130,8	130,5	130,5
26	17,7	17,6	17,6	17,6
27	25,8	25,7	25,7	25,5
28	24,4	24,3	24,5	24,5
29	28,0	28,1	28,1	28,1
30	15,6	15,4	15,6	15,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno (δ_{C} 0). ⁸⁰Knight, S.A., 1974. *Organic Magnetic Resonance*. 6, 603-611.

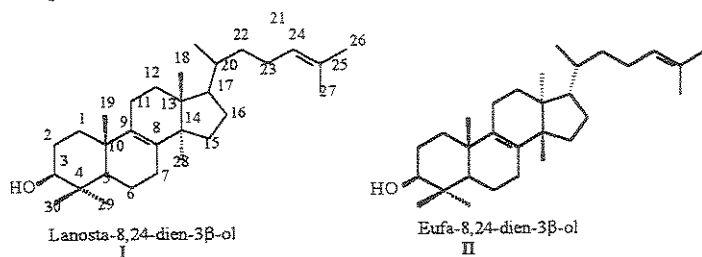


TABELA 24 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura de triterpenos do látex dos frutos de *C. rosea*.

C	I	Lit.I ⁸⁴	II	Lit.II ⁸⁴	III	Lit.III ⁸³
1	37,2	37,1	37,1	37,1	38,6	38,5
2	27,7	27,6	27,6	27,6	26,9	27,0
3	79,3	78,8	79,0	79,0	79,0	78,9
4	39,0	38,8	38,8	38,8	38,8	38,7
5	50,6	50,5	50,5	50,5	55,2	55,1
6	23,9	24,1	23,5	23,9	18,1	18,3
7	117,3	117,3	117,3	117,3	32,6	32,6
8	145,9	145,3	145,2	145,3	39,8	39,7
9	48,9	48,8	48,9	48,9	47,6	47,6
10	34,9	34,8	35,8	35,8	36,9	37,0
11	26,9	27,6	27,2	27,2	23,5	23,4
12	33,8	33,9	34,0	34,0	121,7	121,7
13	43,5	43,3	43,5	43,4	145,9	145,0
14	51,2	50,9	51,2	51,0	41,7	41,7
15	33,8	33,9	34,0	33,8	28,2	28,3
16	27,7	27,6	28,2	28,1	26,2	26,2
17	52,9	52,8	52,9	52,8	32,5	32,5
18	13,1	13,1	13,1	13,1	47,2	47,2
19	18,3	18,0	18,1	18,1	46,8	46,8
20	36,0	36,0	36,0	36,1	31,1	31,1
21	18,3	18,0	18,2	18,1	34,7	34,8
22	36,0	36,0	36,0	36,1	37,2	37,2
23	25,0	24,9	25,0	25,0	28,1	28,1
24	38,6	39,3	125,2	124,7	15,6	15,5
25	28,2	27,6	130,9	130,3	15,5	15,5
26	22,3	22,5	25,7	25,6	16,8	16,8
27	22,3	22,5	17,6	17,6	26,0	26,0
28	21,9	21,5	21,9	21,8	27,3	27,3
29	27,6	27,6	27,6	27,6	33,3	33,2
30	14,7	14,6	14,7	14,3	23,7	23,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno ($\delta_{\text{C}} 0$). ⁸⁴Polonsky, J.; Varon, Z. and Rabanal, R. M. 1977. ⁸³Tori, K.; Seo, S. And Tomita, Y., 1975. *Tetrahedron letters*. 1, 7-10.

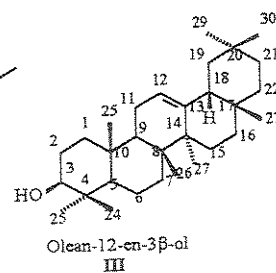
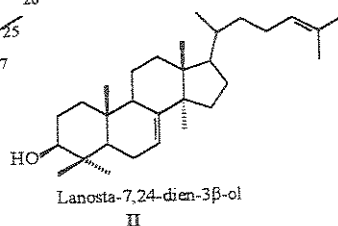
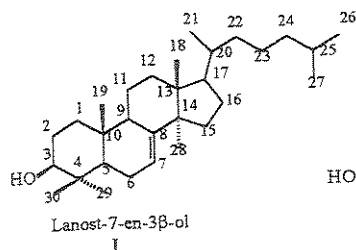


TABELA 25 Deslocamentos químicos (δ)* e comparação com dados da literatura dos componentes da mistura de triterpenos do látex dos frutos de *C. lanceolata*.

C	I	Lit.I ⁸⁴	II	Lit.II ⁸⁴	III	Lit.III ⁸³
1	37,4	37,1	37,3	37,1	38,8	38,5
2	27,4	27,6	27,9	27,6	27,2	27,0
3	79,5	78,8	79,3	79,0	79,3	78,9
4	39,0	38,8	39,2	38,8	39,2	38,7
5	50,8	50,5	49,1	50,5	55,4	55,1
6	24,2	24,1	23,8	23,9	18,6	18,3
7	118,0	117,3	118,0	117,3	32,9	32,6
8	146,1	145,3	146,1	145,3	40,0	39,7
9	49,1	48,8	47,9	48,9	47,5	47,6
10	35,2	34,8	35,2	35,8	37,2	37,0
11	27,4	27,6	27,2	27,2	23,8	23,4
12	34,0	33,9	34,0	34,0	121,9	121,7
13	43,8	43,3	43,8	43,4	145,1	145,0
14	51,5	50,9	51,5	51,0	41,9	41,7
15	34,0	33,9	34,0	33,8	28,7	28,3
16	27,2	27,6	28,7	28,1	26,4	26,2
17	53,5	52,8	53,5	52,8	32,7	32,5
18	13,3	13,1	13,3	13,1	47,5	47,2
19	18,7	18,0	18,8	18,1	47,1	46,8
20	36,0	36,0	36,1	36,1	31,3	31,1
21	18,7	18,0	18,8	18,1	34,9	34,8
22	35,4	36,0	35,4	36,1	37,3	37,2
23	24,2	24,9	24,2	25,0	28,3	28,1
24	38,8	39,3	125,3	124,7	15,8	15,5
25	27,6	27,6	131,2	130,3	15,8	15,5
26	22,3	22,5	25,6	25,6	17,0	16,8
27	22,3	22,5	17,0	17,6	25,9	26,0
28	21,8	21,5	21,8	21,8	28,6	27,3
28	26,2	27,6	27,8	27,6	33,6	33,2
30	14,9	14,6	14,9	14,3	23,9	23,6

*As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Tetrametilsilano foi usado como padrão interno ($\delta_{\text{C}} 0$). ⁸⁴Polonsky, J.; Varon, Z. and Rabanal, R. M. 1977. ⁸³Tori, K.; Seo, S. And Tomita, Y.. 1975. *Tetrahedron letters*. 1, 7-10.

