

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

A espécie foi coletada no Parque Metropolitano do Abaeté, na região metropolitana de Salvador, Bahia (Figura 03), sendo identificada pela professora Maria Lenise S. Guedes e registrada no Herbário “Alexandre Leal Costa” do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o número ALCB – 52166.



Figura 15: Vista do Parque Metropolitano do Abaeté (região próxima a de coleta)

2.2 Reagentes e Equipamentos

- Os reagentes utilizados foram das marcas Merck e Vetec, todos de grau analítico.
- Realizamos as concentrações dos extratos sob pressão reduzida em rota-evaporador BUCHI modelo R-3000.
- Para a trituração do caule utilizamos um moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.
- Nas separações cromatográficas em coluna utilizamos sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM / 0,063-0,200 mm / 40-63 μm , Merck).
- Nas análises por CCDC, utilizamos sílica gel 60 GF (90% < 45 μm , Merck). Preparamos as placas cromatográficas espalhando uma suspensão da sílica gel descrita, em água destilada sobre placas de vidro de 20 por 20 cm.
- Nas análises por CCDP, utilizamos sílica gel 60 PF_{254 e 366} (Merck). Preparamos as placas cromatográficas espalhando uma suspensão da sílica gel descrita, em água destilada sobre placas de vidro de 20 por 20 cm através de um espalhador mecânico (Heidelberg), obtendo camadas de 1 mm de espessura.
- Os cromatogramas em CD foram revelados através de irradiação de lâmpada ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 366 nm, assim como com vapores de iodo.
- Obtivemos os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135, HETCOR e COSY num espectrômetro Varian (GEMINI 300), operando a 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono, utilizando TMS como referência interna e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente (Nos espectros do ácido arjunólico o solvente utilizado foi a piridina deuterada).
- Para se obter os espectros de massas das substâncias contidas nos óleos voláteis, utilizamos um cromatógrafo a gás HP 6890 SERIES GC System,

equipado com uma coluna capilar HP-5MS com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme, interfaciado com um detetor seletivo de massas HP 5873 Mass Seletive Detector (70 eV), com ionização por impacto de elétrons.

- Para se medir a proporção das substâncias contidas nos óleos voláteis utilizamos um cromatógrafo a gás HP 5890, com integrador HP 3396 SERIES II, equipado com uma coluna capilar do tipo DB-17 (OV-17), com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de diâmetro de filme .

2.3 Obtenção dos Extratos

O caule da *M. rotundifolia* foi seco à temperatura ambiente e triturado (2576 g). Foram feitas três extrações sucessivas com hexano. Após a filtração e evaporação do hexano, obtivemos o **extrato hexânico** (4,5 g). Em seguida foram feitas três extrações sucessivas com metanol. Após a filtração e evaporação do metanol, obtivemos o **extrato metanólico** (78 g). Solubilizamos o extrato metanólico em uma mistura metanol / água numa proporção de 8:2 (v/v). Num funil de separação, fizemos partição líquido-líquido com diclorometano, sendo retiradas três porções da fase diclorometânica. Após a filtração e evaporação do diclorometano, obtivemos o **extrato diclorometânico** (10,4 g). Posteriormente fizemos nova partição líquido-líquido da fase metanólica, utilizando três porções de acetato de etila. Após a filtração e evaporação do acetato de etila, obtivemos o **extrato em acetato de etila** (4,9 g) (Figura 04).

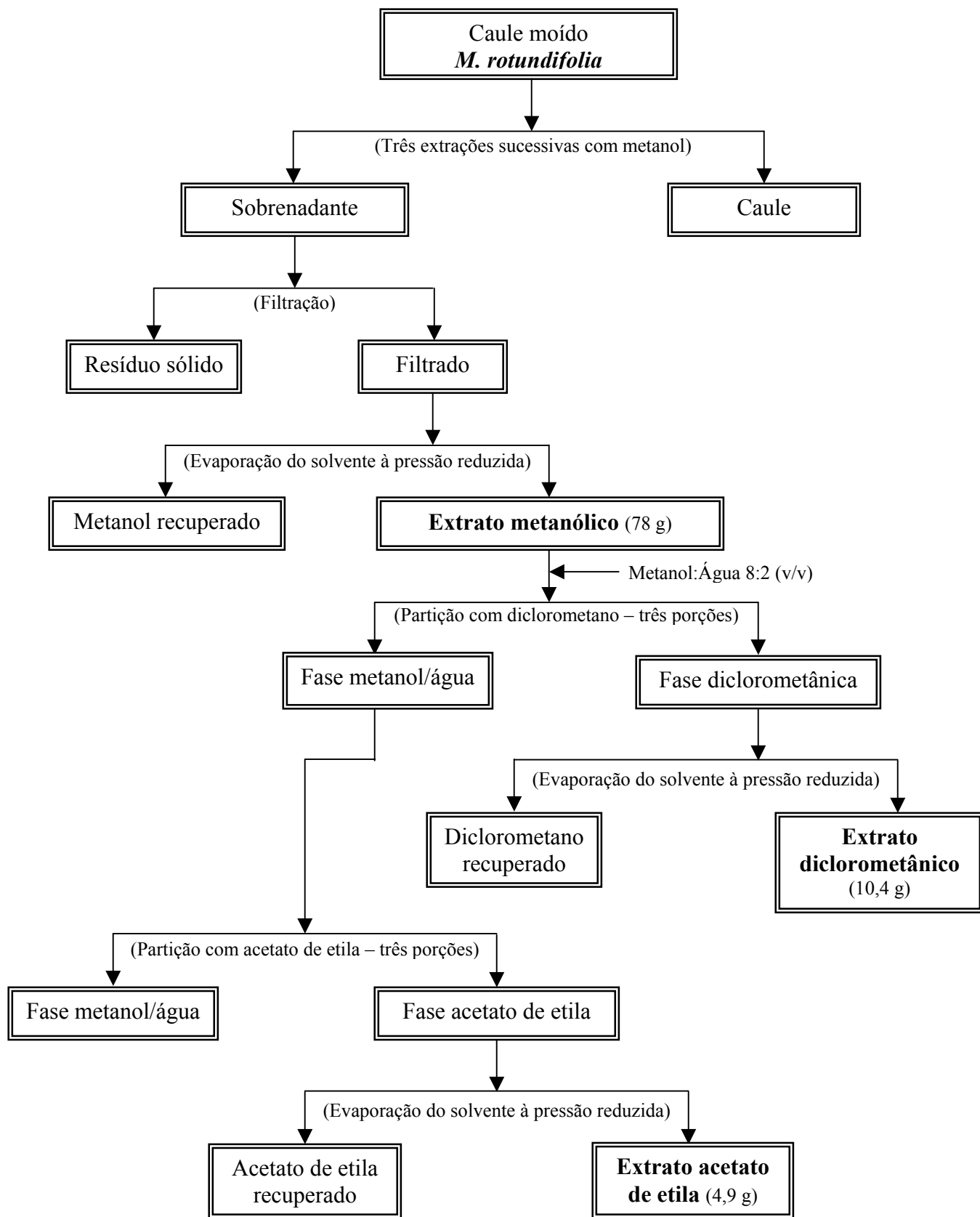


Figura 16: Esquema de preparação dos extratos diclorometânico e acetato de etila da *Myrcia rotundifolia*

2.4 Obtenção e Análise dos Óleos Voláteis

Os óleos de *M. rotundifolia* foram obtidos utilizando somente as folhas de cada espécime que, depois de separadas do caule, foram acondicionadas sob refrigeração.

As folhas foram imersas em água e acondicionadas em balão de fundo redondo. Fizemos hidrodestilações por cerca de 3 (três) horas com as folhas do espécime em cada coleta. Recolhemos ainda porções de óleo essencial com DCM.

Obtivemos os óleos voláteis usando hidrodestilação, com uma aparelhagem de destilação adaptada do tipo Clevenger (Figura 17).



Figura 17: Aparelhagem adaptada tipo Clevenger (Foto: prof. Miguel Fascio).

Com exceção do óleo essencial obtido da espécie coletada em fevereiro de 2001, cuja massa de óleo obtido foi de 0,51 g em uma massa úmida de 400 g de folhas (rendimento de 0,13 %), os rendimentos dos óleos obtidos foram baixos, não

sendo possível com a aparelhagem disponível realizar as medidas de massa dos óleos puros.

Com as porções de óleo essencial recolhidas com DCM, fizemos injeções de 1 µL no cromatógrafo a gás HP 5890, utilizando-se como gás de arraste o hidrogênio com fluxo de 1 mL/min. A temperatura de trabalho do detetor de ionização de chama foi 300 °C, sendo a mistura de gases de queima constituída de hidrogênio, com fluxo de 30 mL/min; nitrogênio, com fluxo de 30 mL/min e ar sintético, com fluxo de 300 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida em 220 °C durante toda a análise. A programação de temperatura do forno foi feita iniciando-se com 60 °C, variando-se a uma taxa de 3 °C/min até a temperatura de 240 °C, mantendo-se 10 minutos nesta temperatura .

Para se fazer os espectros de massas das substâncias contidas nos óleos essenciais obtidos, utilizamos um cromatógrafo a gás HP 6890 SERIES GC System, interfaciado com um detetor seletivo de massas HP 5873 Mass Seletive Detector (70 eV). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com uma vazão de 1 mL por minuto.

Os constituintes presentes nos respectivos óleos foram identificados por comparação dos seus espectros de massas com a base de dados NIST 98 (NIST Mass Spectral Library, 1998) e com os espectros de massas registrados na literatura (Adams, 1995; Joulain & König, 1998). Fizemos também a comparação dos índices de retenção calculados para cada substância com os tabelados.

Os índices de retenção foram calculados através de uma modificação do algoritmo proposto por Kovats (Kovats, 1958) como apresentado na expressão I (Lanças, 1993; Dool & Kratz, 1963), utilizando a série homóloga de hidrocarbonetos lineares de C₉H₂₀ (nonano) a C₂₆H₅₄ (hexacosano) como padrões;

$$\mathbf{I = 100 m \left(\frac{t'_{RX} - t'_{RZ}}{t'_{RZ+m} - t'_{RZ}} \right) + 100 Z} \quad \mathbf{(I)}$$

em que:

- $t'_{RZ} < t'_{RX} < t'_{RZ+m}$;
- t'_{RX} = tempo de retenção da substância X;
- t'_{RZ} = tempo de retenção do hidrocarboneto de menor massa molecular, que elui imediatamente antes da substância X;
- t'_{RZ+m} = tempo de retenção do hidrocarboneto de maior massa molecular, que elui imediatamente depois da substância X;
- m = diferença entre o número de átomos de carbono dos dois hidrocarbonetos envolvidos;
- Z = número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção t'_{RZ} .

2.5 Isolamento dos Constituintes Químicos da *Myrcia rotundifolia*

2.5.1 Extrato Hexânico

Submetemos o extrato hexânico obtido do caule da *M. rotundifolia* a uma coluna cromatográfica preparativa em gel de sílica (coluna filtrante), utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 20 frações (Figura 18).

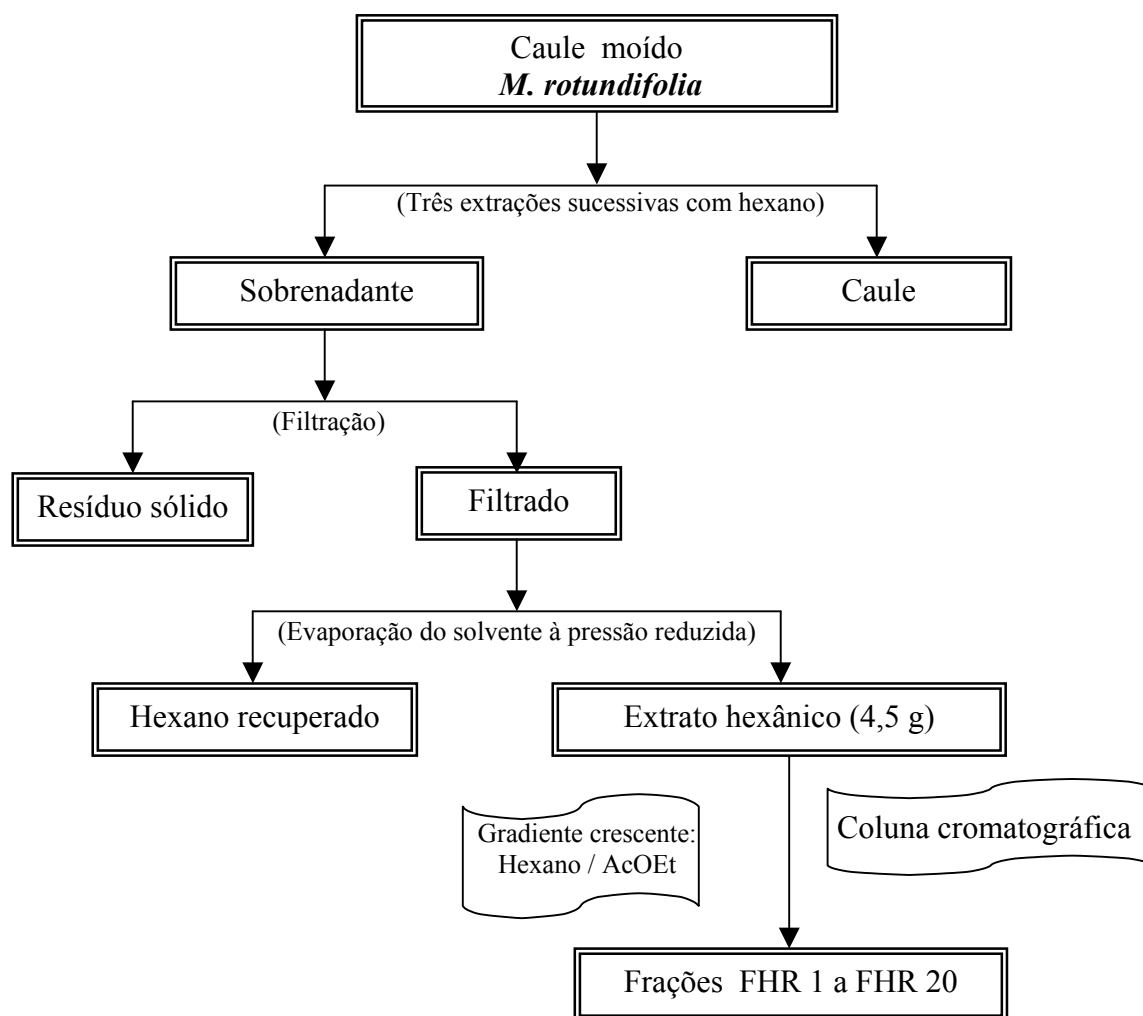


Figura 18: Esquema de obtenção e fracionamento do extrato hexânico da *Myrcia rotundifolia*

2.5.1.1 Isolamento da Substância I

As frações FHR 06 e FHR 07 (**Substância I**) da coluna filtrante foram analisadas por CCDC e reunidas (22 mg) (Figura 19).

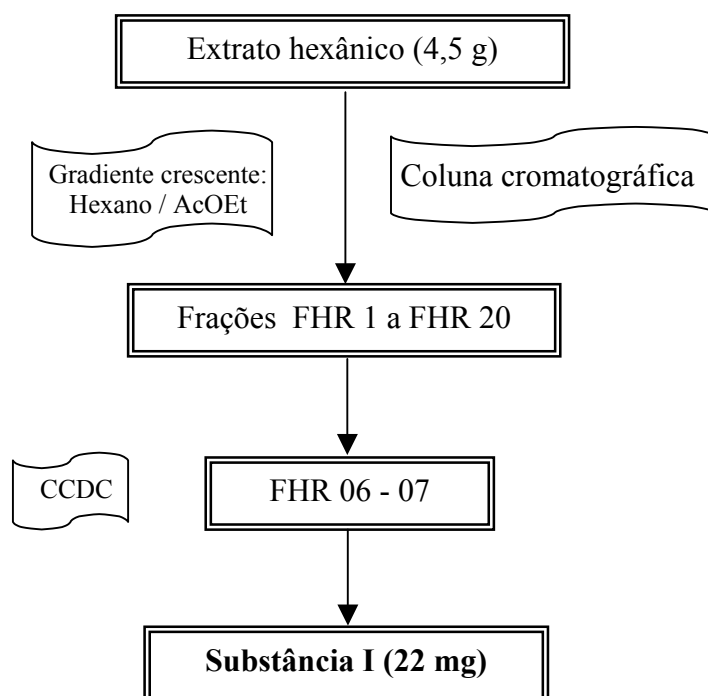


Figura 19: Esquema de isolamento da Substância I

2.5.1.2 Isolamento da Substância II

Nas frações FHR 15 a FHR 17, após evaporação do solvente, observamos a formação de cristais. Lavamos os cristais de cada fração individualmente com acetona, separando-se a parte solúvel em acetona dos cristais (Figura 20).

Através da análise por CCDC concluímos que as frações contendo substâncias solúveis em acetona eram todas iguais, sendo reunidas (168 mg).

Através da análise por CCDC concluímos que as frações contendo os cristais eram todas iguais (**Substância II**), sendo reunidas (752 mg).

O ponto de fusão dos cristais contidos na fração FHR 16 está na faixa de 234,6 a 239,0 °C. Fizemos recristalização em clorofórmio a fim de obtermos melhores cristais (Figura 20).

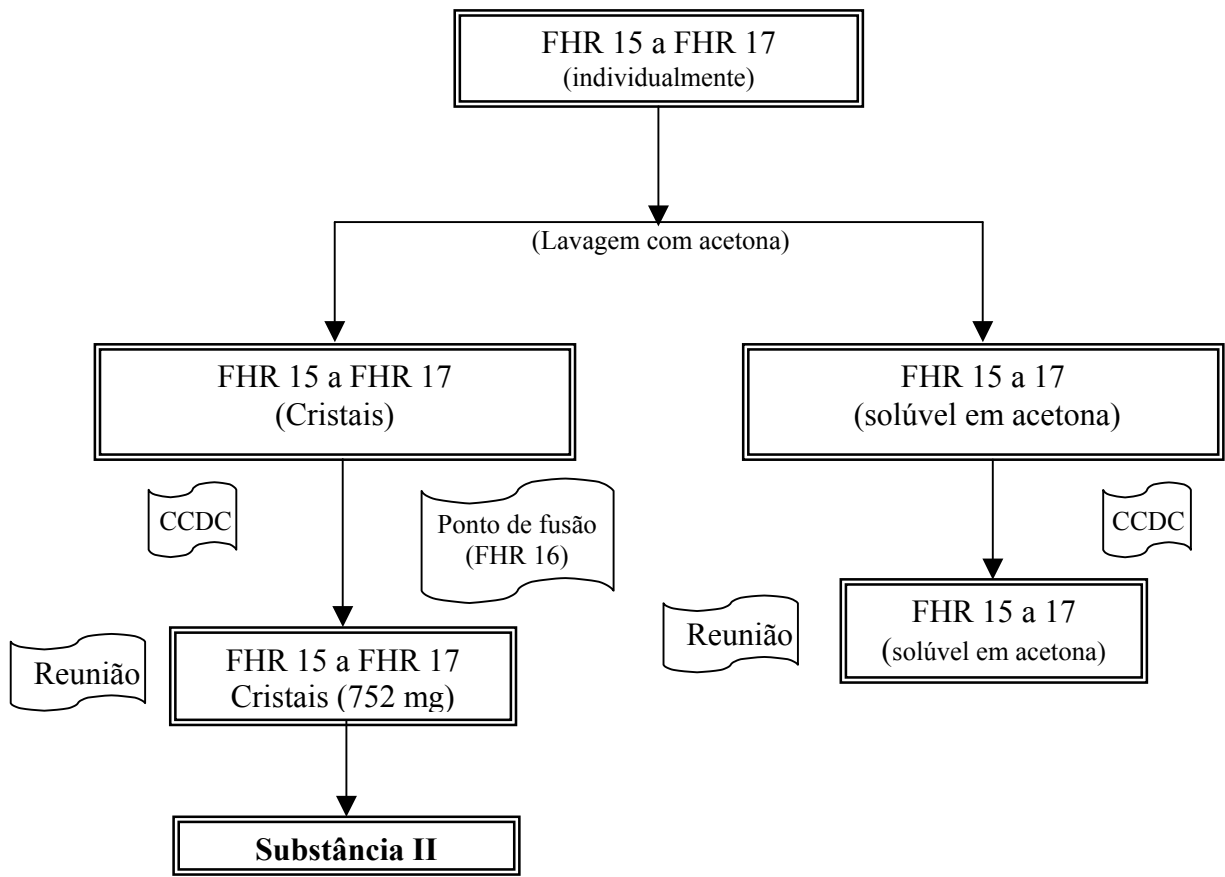


Figura 20: Esquema de isolamento da Substância II.

2.5.1.3 Obtenção da Mistura das Substâncias III, IV, V e VI

Selecionamos através de análise por CCDC a fração FHR 18 (2,1 g), para separação cromatográfica em coluna em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 65 frações (Figura 21).

Na fração FHR 18/P15 (17 mg), após a evaporação do solvente, observamos a formação de cristais (**Substância II**).

Através da análise por CCDC e por RMN ^1H concluímos que as frações FHR 18/P36 a FHR 18/P40 eram todas iguais, sendo reunidas (229 mg). Submetemos essas frações a uma nova separação cromatográfica em coluna em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 60 frações (Figura 21). Através da análise por CCDC e por RMN ^1H concluímos que as frações FHR 18/P36-40/FF27 a FHR 18/P36-40/FF31 eram todas iguais (**Substância III, Substância IV, Substância V e Substância VI**), sendo reunidas (117 mg) (Figura 21).

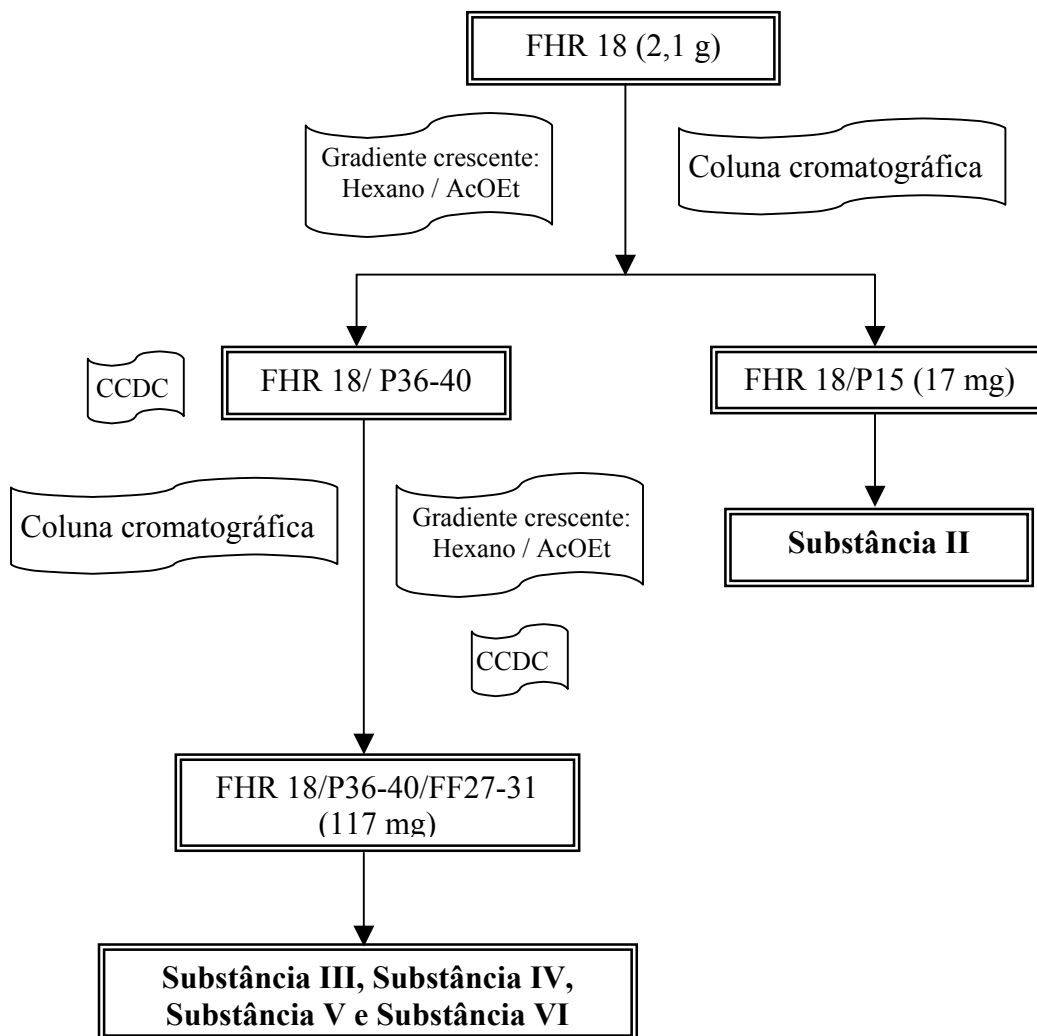


Figura 21: Esquema de isolamento das Substâncias III, IV, V e VI.

2.5.2 Extrato Diclorometânico

Submetemos o extrato diclorometânico obtido do caule da *M. rotundifolia* a uma coluna cromatográfica filtrante em gel de sílica, empacotada a seco, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 16 frações (Figura 22).

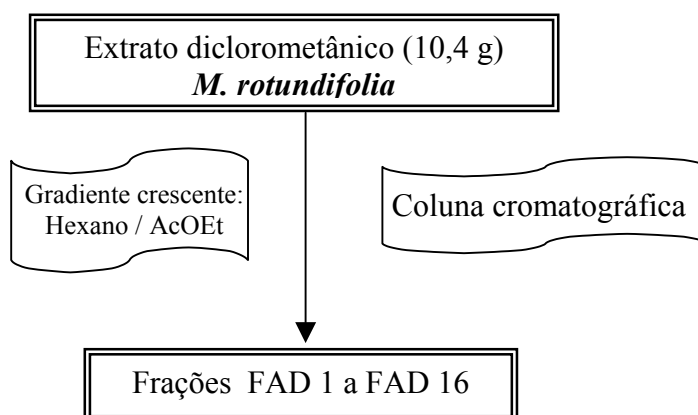


Figura 22: Esquema de fracionamento do extrato diclorometânico da *M. rotundifolia*.

2.5.2.1 Obtenção da Mistura das Substâncias VII e VIII

Através da análise por CCDC concluímos que as frações FAD 3 e FAD 4 eram iguais, sendo reunidas (970 mg). Estas foram submetidas a um novo fracionamento através de CC em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 76 frações (Figura 23).

Nas frações FAD 3-4/38 a FAD 3-4/56, observamos a formação de cristais. Lavamos os cristais de cada fração individualmente com hexano, separando-se a parte solúvel em hexano dos cristais, de modo análogo ao que foi feito com as frações FHR 15 a FHR 17 (Figura 20).

Através da análise por CCDC e por RMN de ^1H concluímos que as frações contendo cristais eram todas iguais (**Substância II**), sendo reunidas (180 mg).

Pela análise por CCDC concluímos que as frações solúveis em hexano FAD 3-4/38 até FAD 3-4/45 eram iguais, sendo reunidas (436 mg).

Através da análise por CCDC e por RMN de ^1H concluímos que as frações solúveis em hexano FAD 3-4/46 até FAD 3-4/56 eram iguais, sendo reunidas (139 mg). Em seguida fez-se partição com metanol, separando-se a parte insolúvel em metanol (41 mg) da parte solúvel no mesmo (91 mg – **Substância VII e Substância VIII**) (Figura 23).

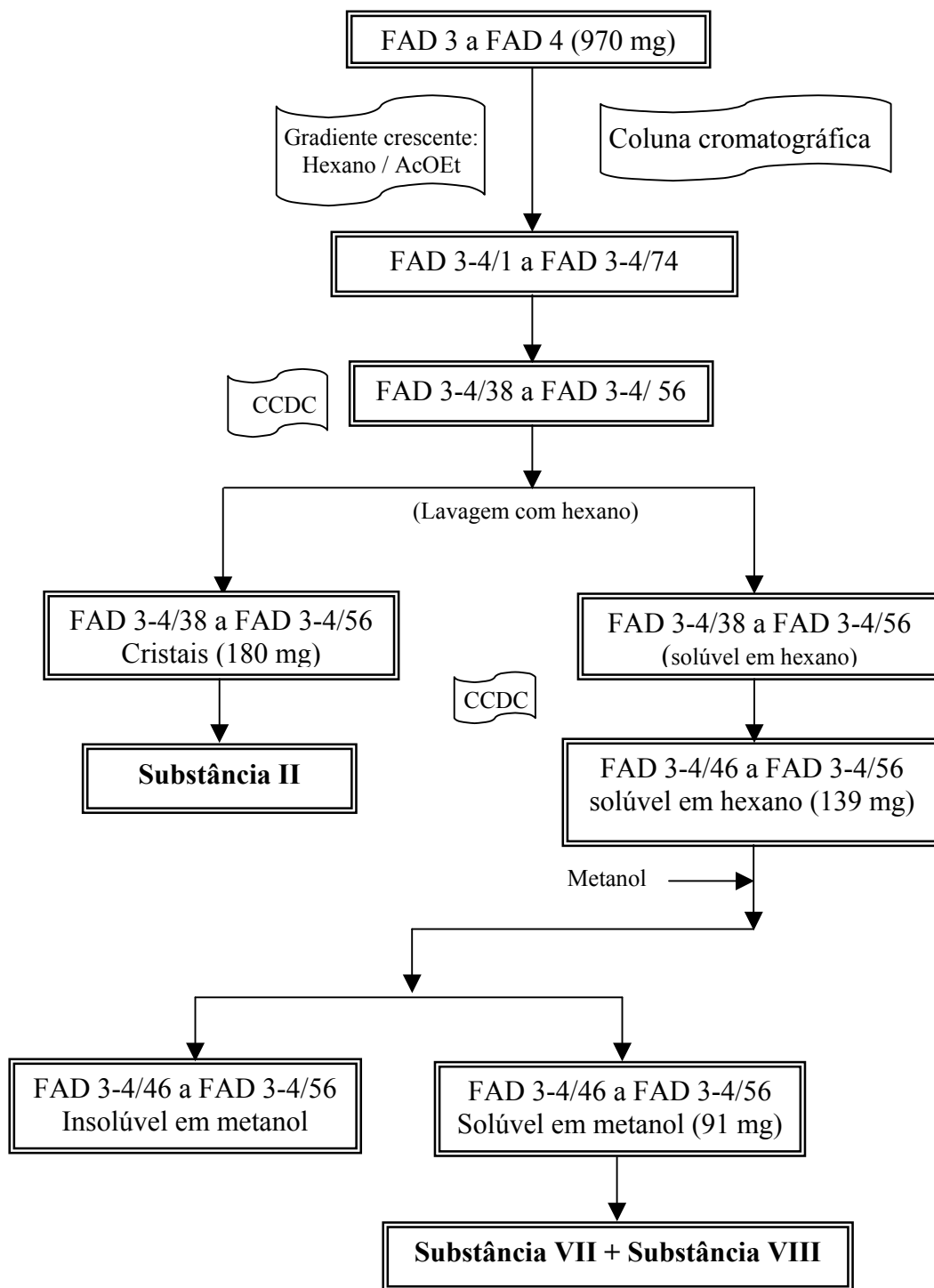


Figura 23: Esquema de isolamento das Substâncias II, VII e VIII.

2.5.2.2 Isolamento da Substância IX

Através da análise por CCDC e por RMH ^1H , concluímos que as frações FAD 13 e FAD 16 eram iguais, sendo reunidas (5,7 g). Estas foram submetidas a um novo fracionamento em coluna cromatográfica filtrante em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 12 frações (Figura 24).

Pela análise por CCDC e por RMH ^1H , concluímos que as frações FAD 13-16/B1 até FAD 13-16/B12 eram iguais, sendo reunidas (3,5 g). Estas foram submetidas a um novo fracionamento em CCP em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 26 frações (Figura 24).

Nas frações NPS 19 a NPS 23, fizemos extração com clorofórmio, separadamente. Através de análise por CCDC e por RMH ^1H , concluímos que as frações NPS 19 a NPS 23 solúveis em clorofórmio eram iguais, sendo reunidas e as frações NPS 19 a NPS 23 insolúveis em clorofórmio eram iguais (**Substância IX**), sendo também reunidas (713 mg).

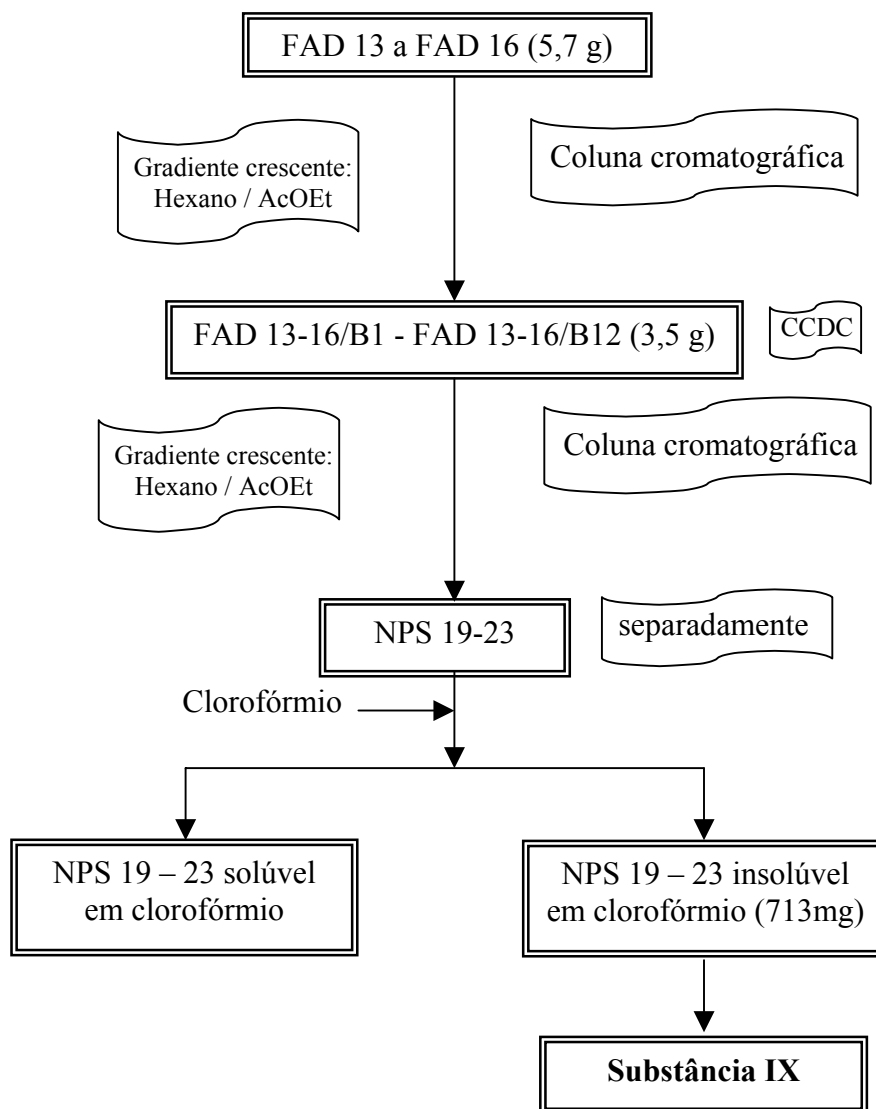


Figura 24: Esquema de isolamento da Substância IX.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Constituintes Químicos Isolados

A partir do caule da *Myrcia rotundifolia*, através do procedimento experimental descrito anteriormente (p. 47-56), foram isoladas as seguintes substâncias (Figura 25):

Substância I: ESQUALENO

Substância II: FRIEDELINA

Substância III: β -SITOSTEROL

Substância IV: ESTIGMASTEROL

Substância V: LUPENONA

Substância VI: ÁCIDO BETULÍNICO

Substância VII: LUPEOL

Substância VIII: β -AMIRINA

Substância IX: ÁCIDO ARJUNÓLICO

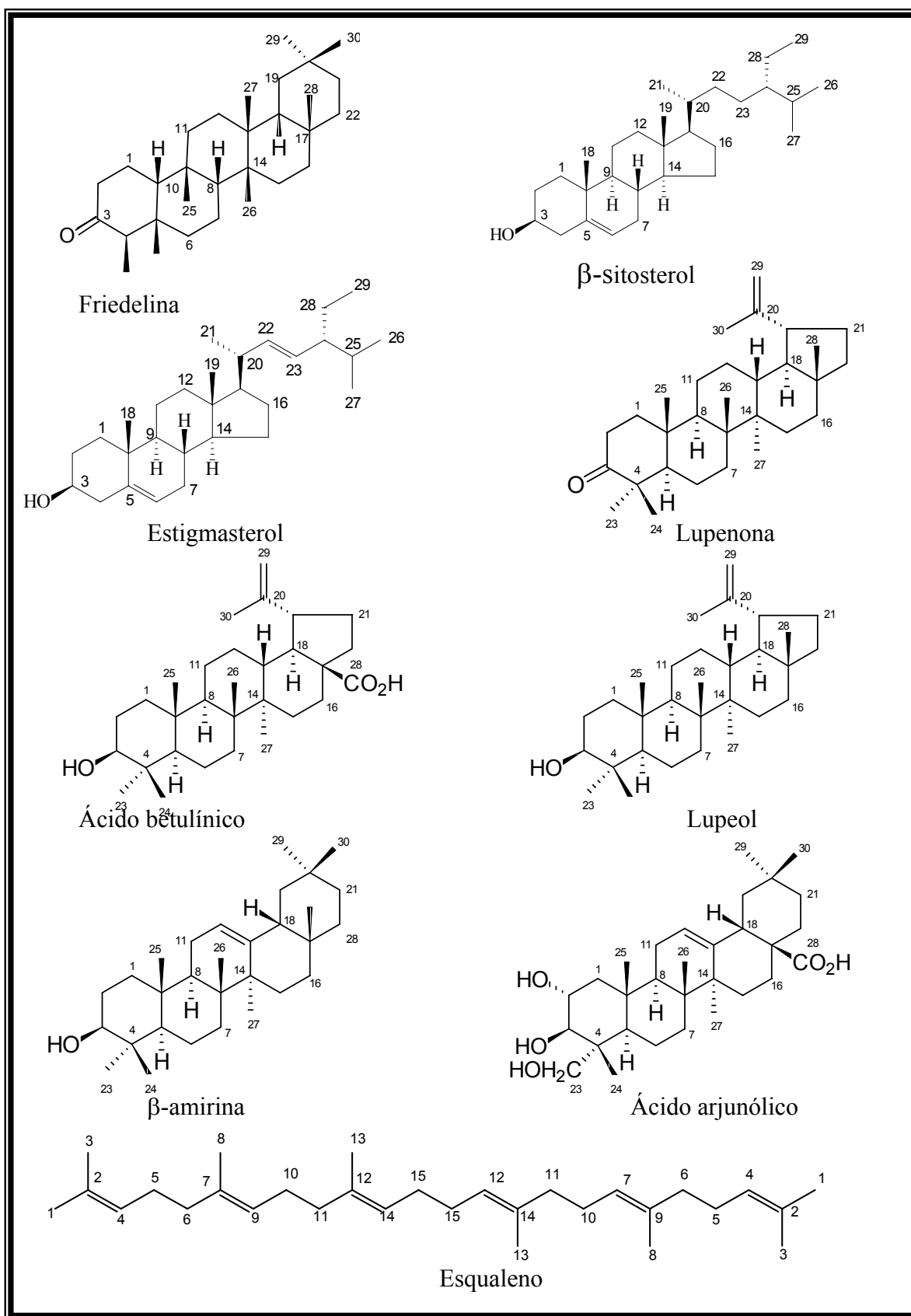


Figura 25: Estruturas das substâncias identificadas no caule de *M. rotundifolia*

3.1.1. Identificação e Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados

3.1.1.1 Identificação da Substância I: ESQUALENO (Figura 26)

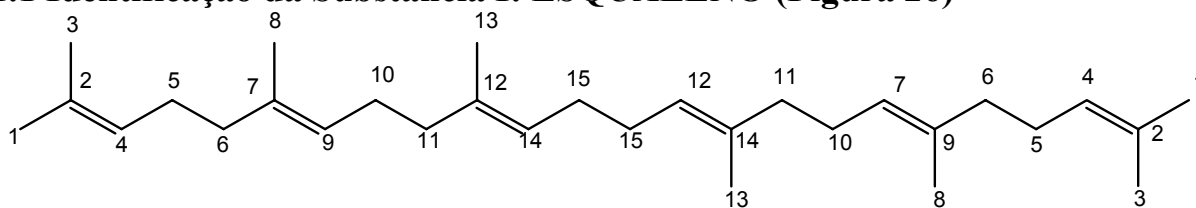


Figura 26: Estrutura do esqualeno

O espectro de RMN de ^1H (Figura 27) apresentou sinais importantes na identificação da Substância I:

- Multiplete entre 5,10 e 5,14 ppm, sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos;
- Multiplete entre 1,98 e 2,07 ppm, sugerindo a presença de grupos metilênicos ligados a carbonos olefínicos;
- Singlete em 1,68 ppm, atribuído a grupos metílicos ligados a carbonos olefínicos;
- Singlete em 1,60 ppm, atribuído a água associada ao clorofórmio deuterado, utilizado como solvente;
- Singlete em 1,26 ppm, sugerindo a presença de grupos metilênicos;

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 28) e DEPT 135° (Figura 29) apresentaram sinais importantes que contribuíram para a identificação da Substância I:

- Sinais em 135,10; 134,89 e 131,20 ppm, atribuídos a carbonos olefínicos, que por comparação com o espectro de DEPT 135° , constatamos que se tratavam de carbonos não hidrogenados;

- Sinais em 124,44; 124,34 e 124,31 ppm, atribuídos a carbonos olefínicos, que por comparação com o espectro de DEPT 135°, constatamos que se tratavam de carbonos metínicos.
- Sinais em 39,76; 39,73; 29,69; 28,29; 26,80 e 26,70 ppm, que por comparação com o espectro de DEPT 135°, constatamos que se tratavam de carbonos metilênicos. O sinal em 29,69 ppm foi atribuído a presença de material graxo contaminando a amostra;
- Sinais em 25,65; 17,65; 16,03 e 15,99 ppm, que por comparação com o espectro de DEPT 135°, constatamos que se tratavam de carbonos metílicos;

Como foram observados apenas quinze sinais no espectro de RMN de ^{13}C , inicialmente poderia sugerir que tratava-se de um sesquiterpeno. Não obstante, após a diluição da amostra em clorofórmio P.A., fizemos uma injeção num cromatógrafo a gás e em seguida no aparelho de CG-EM, sendo obtido seu espectro de massas (Figura 30). No espectro de massas pudemos observar o pico do íon molecular em m/z 410, compatível com uma substância de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$.

Através da análise dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massas da substância, e por comparação dos dados encontrados na literatura (Sozzani & Disilvestro, 1988) constatamos que a Substância I é o triterpeno esqualeno.

Tabela 03: Dados de ^{13}C RMN do ESQUALENO [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	ESQUALENO
1	25,65
2	131,20
3	17,65
4	124,44 ^a
5	26,80 ^b
6	39,76
7	134,88
8	16,03 ^c
9	124,31 ^a
10	26,70 ^b
11	39,76
12	135,10
13	15,99 ^c
14	124,34 ^a
15	28,29

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

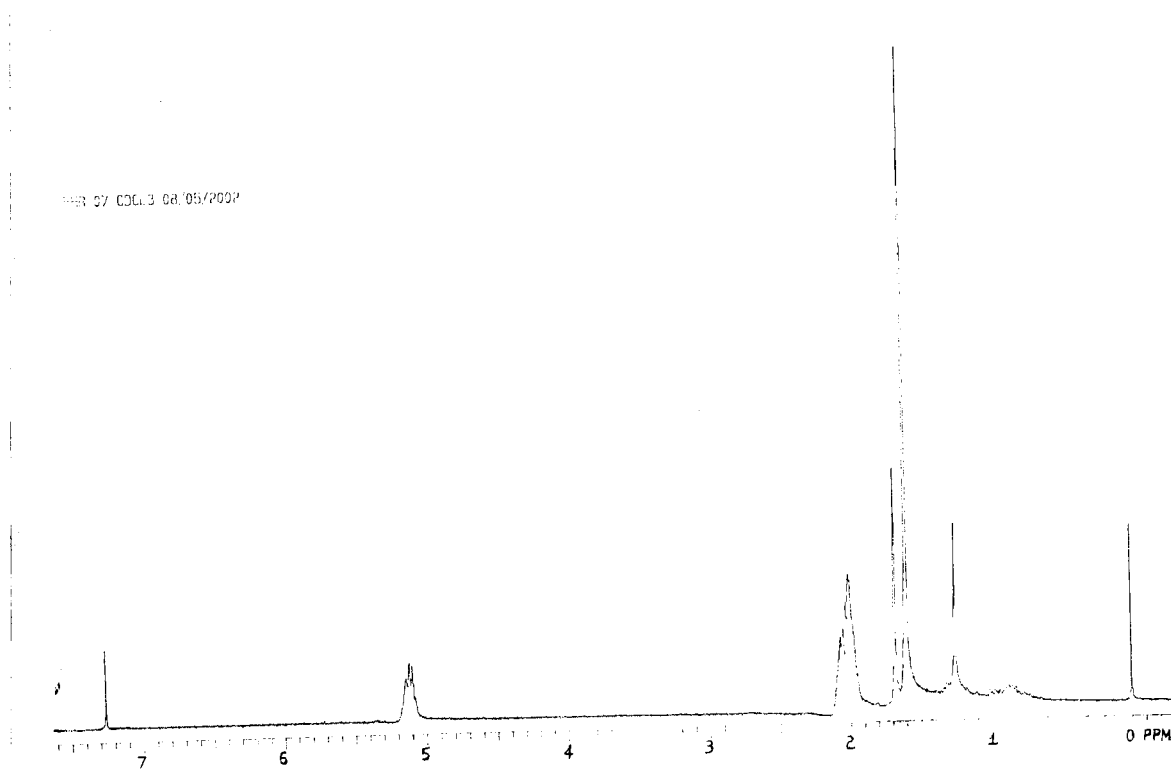


Figura 27: Espectro de RMN ^1H do ESQUALENO

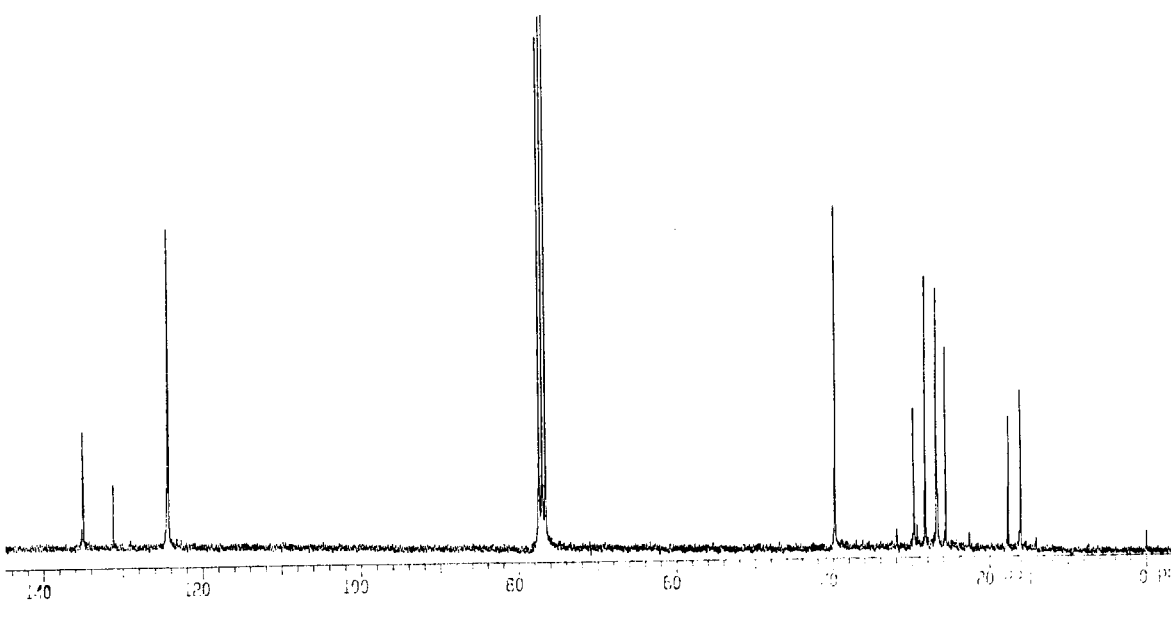


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C do ESQUALENO

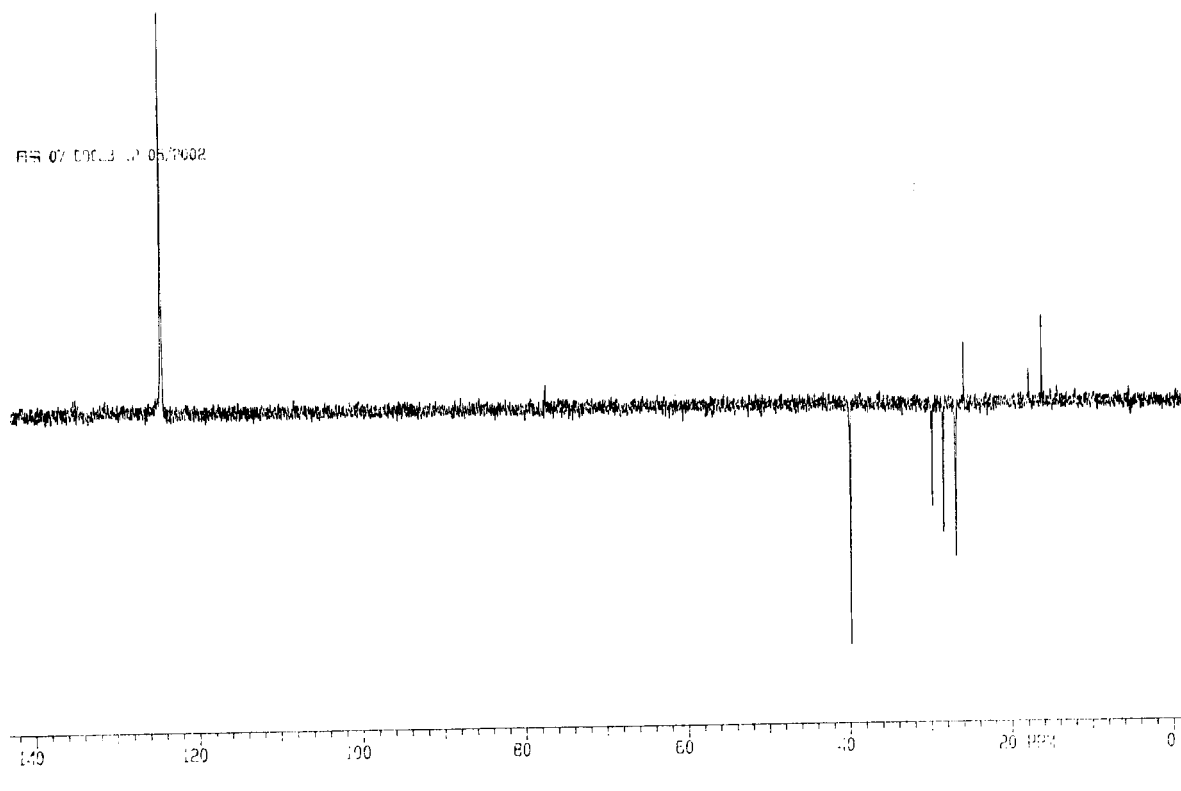


Figura 29: Espectro de DEPT 135° do ESQUALENO

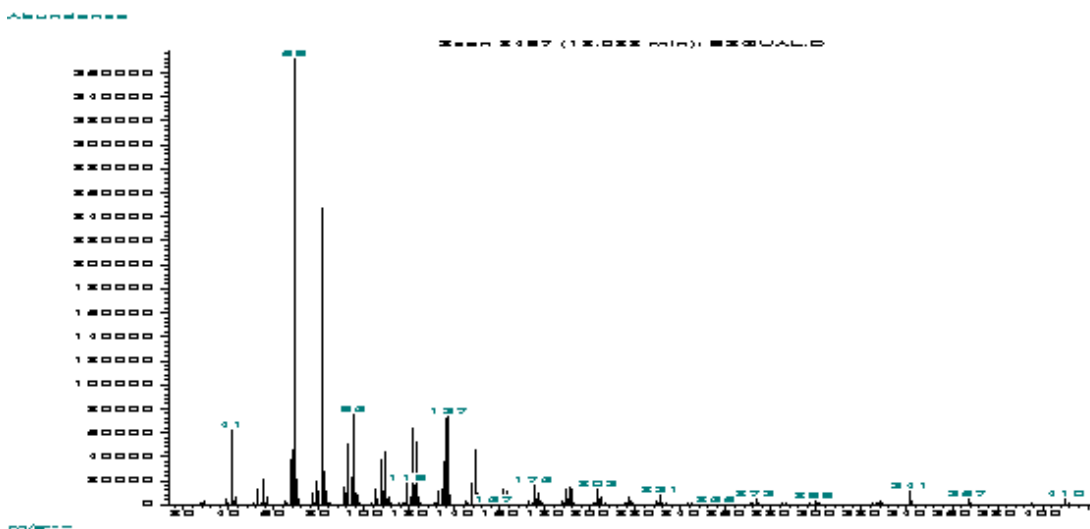


Figura 30: Espectro de massas do ESQUALENO

3.1.1.2 Identificação da Substância II: FRIEDELINA (Figura 31)

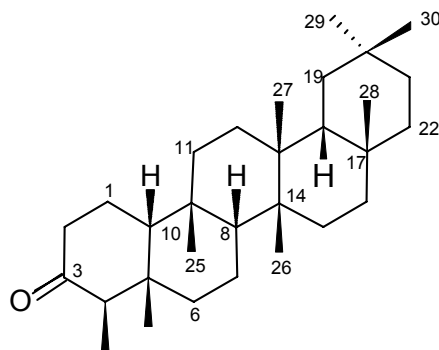


Figura 31: Estrutura da FRIEDELINA

O espectro de RMN de ^1H (Figura 32) apresentou sete singletos em 0,72; 0,86; 0,88; 0,95; 0,99; 1,04 e 1,17 ppm, indicando a presença de sete grupos metílicos na molécula, sugerindo tratar-se a mesma de um triterpeno. O espectro apresentou ainda um multiplete entre 2,20 e 2,39 ppm, indicando a presença de três hidrogênios α -carbonílicos, além de sinais entre 1,25 e 1,98 ppm, indicando a presença de hidrogênio metilênicos e metínicos na molécula.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 33) apresentou sinais importantes na identificação da substância:

Sinal em 213,0 ppm, indicando a presença de carbono cetônico;

Sinal em 6,8 ppm, indicando a presença de um grupo metílico bastante protegido. Essa proteção foi atribuída ao efeito γ -gauche da carbonila.

A comparação dos dados espectrais obtidos com os dados encontrados na literatura (Akihisa *et al*, 1992) permitiu identificar a Substância II como sendo o triterpeno FRIEDELINA.

Tabela 04: Dados de RMN de ^{13}C da FRIEDELINA [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	FRIEDELINA
1	22,3
2	41,5
3	213,2
4	58,2
5	42,1
6	41,3
7	18,2
8	53,1
9	37,4
10	59,4
11	35,6
12	30,5
13	39,7
14	38,3
15	32,4
16	36,0
17	30,0
18	42,8
19	35,3
20	28,1
21	32,7
22	39,2
23	6,8
24	14,6
25	17,9
26	20,2
27	18,6
28	32,1
29	35,0
30	31,8

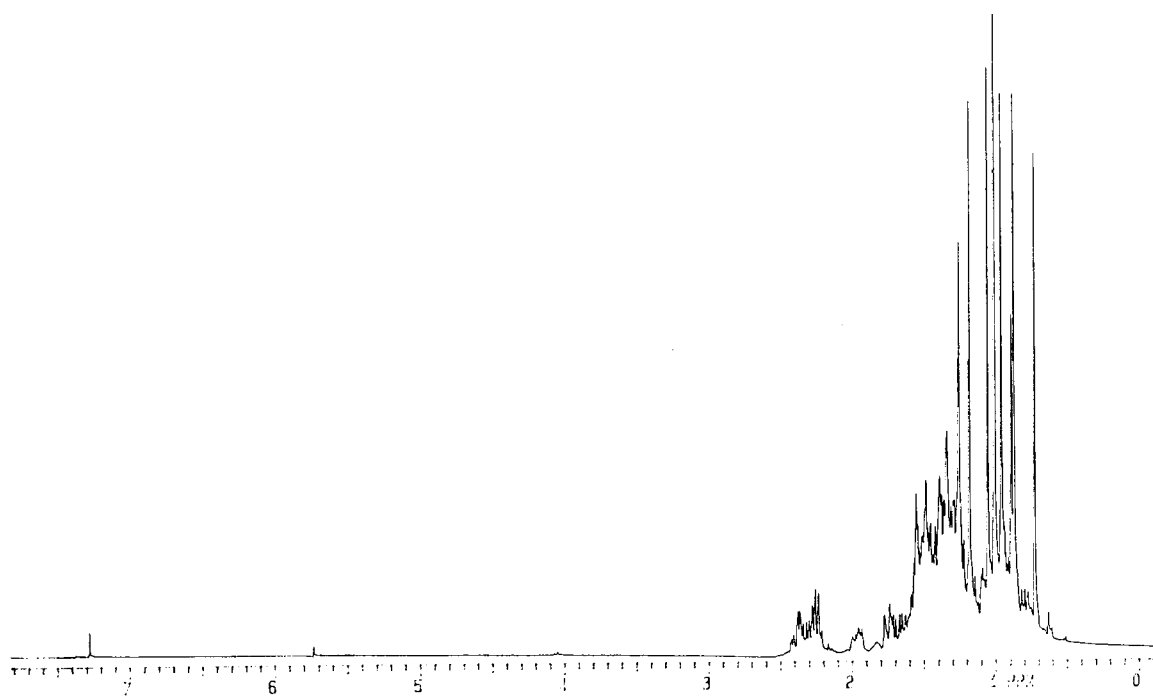


Figura 32: Espectro de RMN de ¹H da FRIEDELINA

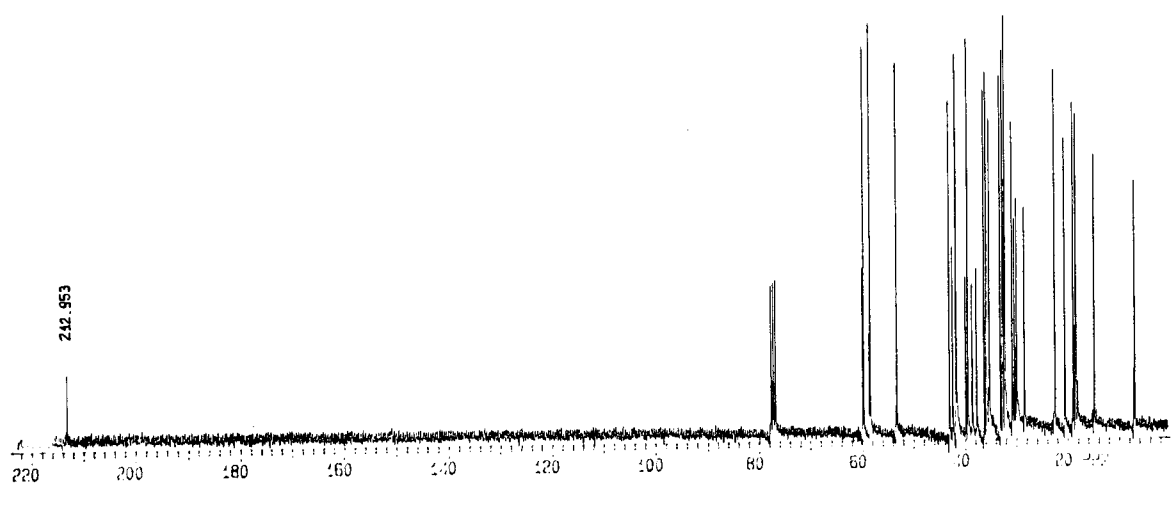


Figura 33: Espectro de RMN de ¹³C da FRIEDELINA

3.1.1.3 Identificação das Substâncias III (β -SITOSTEROL), IV (ESTIGMASTEROL), V (LUPENONA) e VI (ÁCIDO BETULÍNICO) (Figura 34)

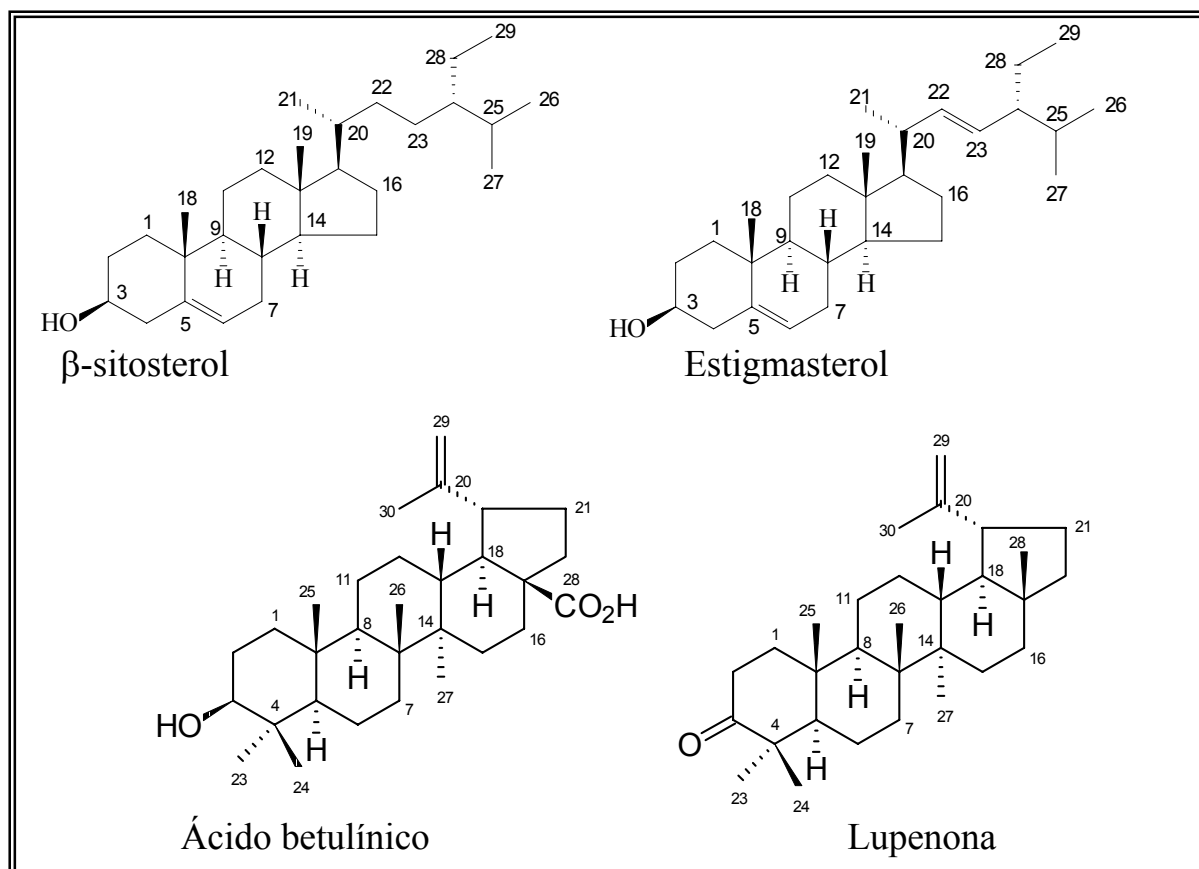


Figura 34: Estruturas das Substâncias β -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA

O espectro de RMN de ^1H (Figura 35) apresentou singletos em 0,66; 0,79; 0,81; 0,83; 0,84; 0,86; 0,87; 0,90; 0,92 e 0,99 ppm, atribuído aos grupos metílicos das substâncias presentes na da mistura. Observamos também um singlete em 1,26 ppm, atribuído à presença de material graxo na mistura.

Entre 1,27 ppm e 2,40 ppm observamos multipletos, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metínicos e metilênicos da molécula.

Um multiplete em 5,31 ppm foi atribuído aos hidrogênios olefínicos do β -sitosterol e do estigmasterol no carbono C-5 das respectivas moléculas.

Em 4,71 e 4,58 ppm, observamos dois singletos largos e de baixa intensidade, atribuídos a hidrogênios vinílicos, sugerindo a presença (em quantidades reduzidas) de substâncias com esqueleto carbônico diferente dos esqueletos dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 36) mostrou sinais que contribuíram na identificação dos quatro principais componentes da mistura:

- Sinal em 218,4 ppm atribuído à carbonila em C-3 da lupenona;
- Sinal em 181,5 ppm atribuído à carboxila em C-3 do ácido betulínico;
- Sinais em 150,3; 150,4; 109,6 e 109,7 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos C-20 e C-29 do ácido betulínico e da lupenona;
- Sinais em 140,7 e 121,6 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 do β -sitosterol e do estigmasterol;
- Sinal em 79,0 ppm atribuído ao carbono carbinólico C-3 do ácido betulínico;
- Sinal em 71,7 ppm atribuído aos carbonos carbinólicos C-3 do β -sitosterol e do estigmasterol;
- Sinais entre 57,0 e 11,9 ppm, atribuídos aos outros carbonos metínicos, metilênicos e metílicos das substâncias presentes na mistura;

A análise dos dados de RMN ^1H e de ^{13}C e a comparação destes com a literatura (Olea & Roque, 1990) permitiu a identificação em mistura do β -sitosterol (Macari *et al*, 1990), estigmasterol (Wright *et al*, 1978), ácido betulínico (Siddiqui *et al*, 1988) e lupenona (Olea e Roque, 1990);

Tabela 05: Dados de RMN de ^{13}C das Substâncias β -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	β -sitosterol	Estigmasterol	Ácido Betulínico	Lupenona
1.	37,2	37,2	38,7	39,6
2.	31,5	31,5	27,4	34,2
3.	71,7	71,7	79,0	218,4
4.	42,3	42,3	38,8	47,3
5.	140,7	140,7	55,2	54,9
6.	121,6	121,6	18,3	19,6
7.	31,5	31,5	34,2	33,5
8.	31,9	31,9	40,8	40,7
9.	50,1	50,1	50,4	49,8
10.	36,1	36,5	37,2	36,5
11.	21,1	21,0	20,9	21,4
12.	39,7	39,9	25,6	25,1
13.	42,3	42,3	38,3	38,1
14.	56,7	56,7	42,5	42,8
15.	24,3	24,3	30,5	27,4
16.	28,2	28,9	32,2	35,5
17.	56,0	55,9	56,3	42,9
18.	11,8	12,2	46,8	48,2
19.	19,3	19,0	49,2	47,9
20.	37,2	40,6	150,3	150,4
21.	18,7	21,2	29,7	29,7
22.	34,0	138,2	37,1	39,9
23.	26,1	129,7	27,9	26,6
24.	45,8	50,4	15,3	21,0
25.	29,2	29,7	16,0	15,8
26.	19,8	21,2	16,1	15,9
27.	19,2	19,3	14,7	14,5
28.	23,0	25,5	181,5	18,0
29.	11,9	12,1	109,6	109,7
30.	-	-	19,3	19,3

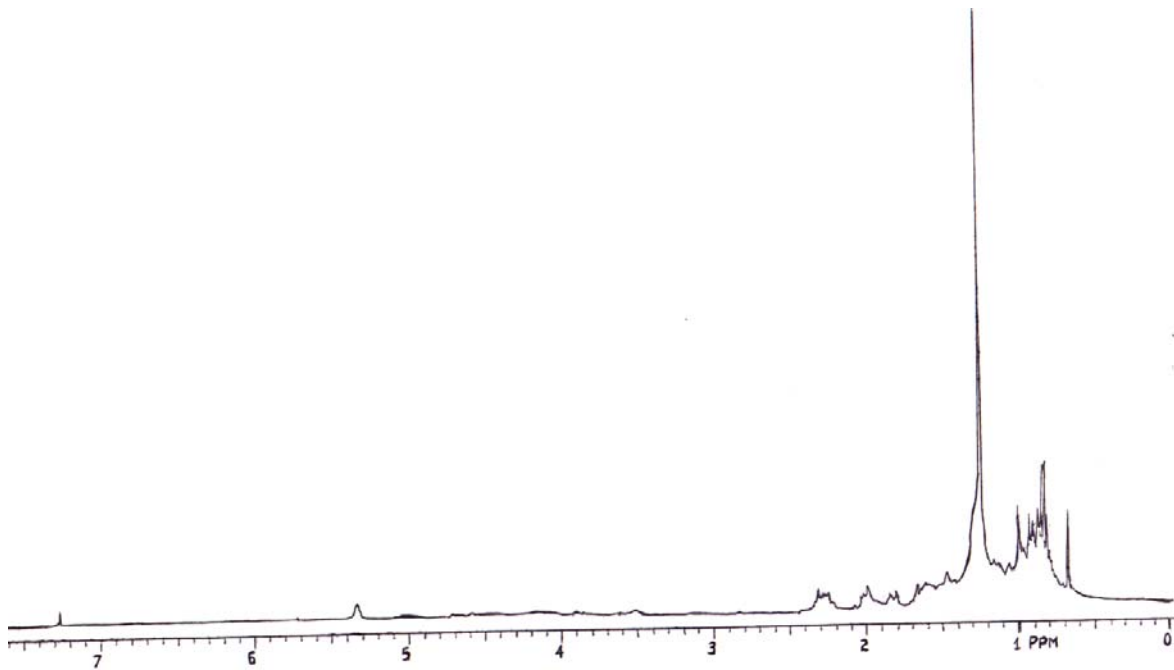


Figura 35: Espectro de RMN ^1H da mistura de β -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA

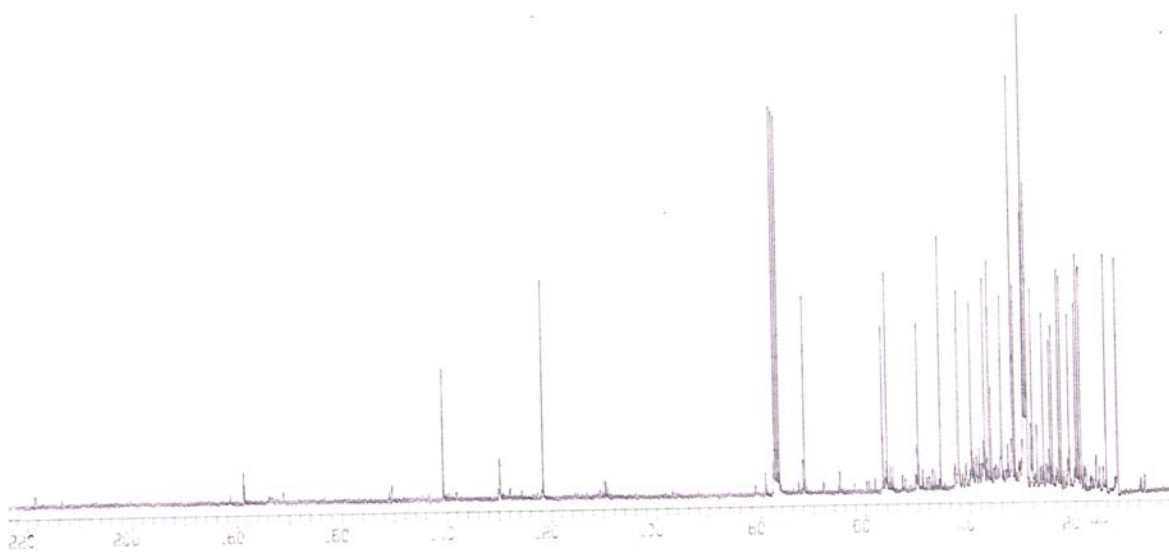


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C da mistura de β -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA

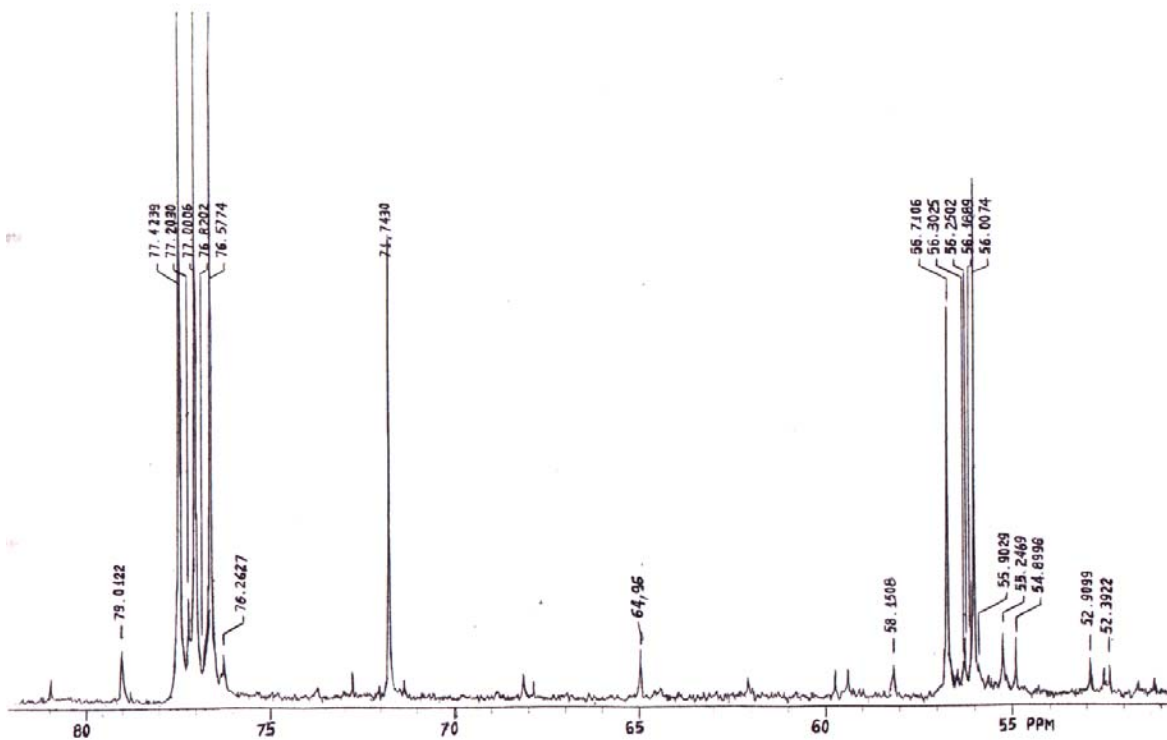


Figura 37: Ampliação da região de 50 à 85 ppm do espectro de RMN ¹³C da mistura de β-SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA

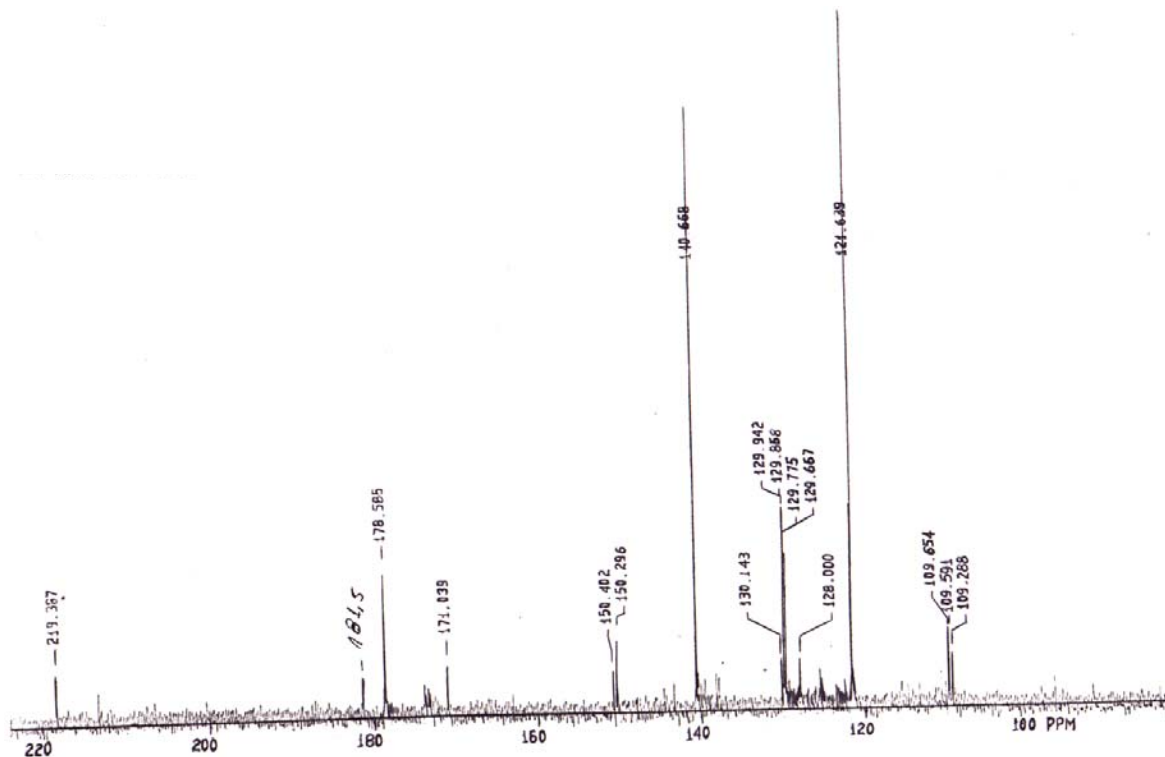


Figura 38: Ampliação da região de 100 à 220 ppm do espectro de RMN ¹³C da mistura de β-SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL, ÁCIDO BETULÍNICO e LUPENONA

3.1.1.4 Identificação das Substâncias VII (LUPEOL), VIII (β -AMIRINA) (Figura 39)

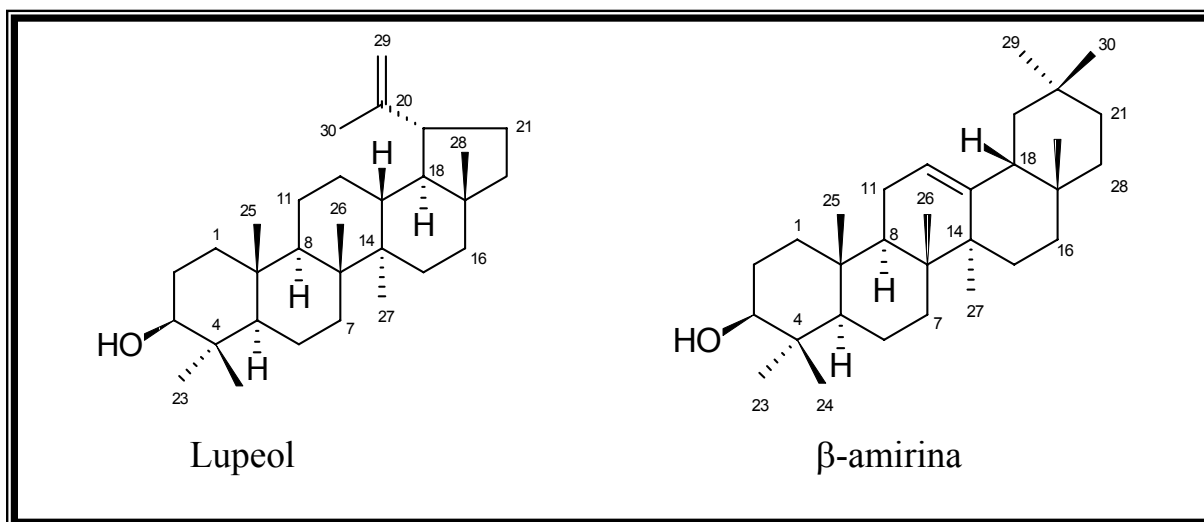


Figura 39: Estruturas das Substâncias VII e VIII

O espectro de RMN de ^1H (Figura 40) apresentou singletos 0,75; 0,78; 0,82; 0,86; 0,94; 0,96; 0,99; 1,01 e 1,69 ppm, atribuído aos grupos metílicos das substâncias presentes na mistura. Observamos também um singleto em 1,26 ppm, atribuído à presença de material de natureza graxa na mistura.

Apresentou também um singleto em 1,69 ppm, atribuído aos hidrogênios metílicos em C-24.

Observamos dois multipletos em 3,2 ppm e em 3,6 ppm, atribuídos aos hidrogênios α -carbinólicos das substâncias.

Observamos um dubleto em 4,57 e 4,67 ppm, atribuído aos hidrogênios vinílicos da molécula de lupeol. Observamos também um tripleto em 5,17 atribuído ao hidrogênio olefínico da molécula de β -amirina.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 41) mostrou sinais que contribuíram na identificação dos dois componentes da mistura:

- Sinais em 150,9 e 109,3 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos do lupeol;

- Sinais em 145,1 e 121,7 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos da β -amirina;
- Sinal em 79,0 ppm atribuído aos carbonos carbinólicos do lupeol e da β -amirina;
- Sinais em 55,3 e 55,1 ppm atribuídos aos carbonos não hidrogenados C-5 do lupeol e da β -amirina, respectivamente;
- Sinais entre 51,0 e 15,0 ppm atribuídos aos outros carbonos sp^3 das moléculas de lupeol e β -amirina.

A análise dos dados de RMN 1H e de ^{13}C e a comparação destes com a literatura permitiu a identificação em mistura do lupeol (Reynolds *et al*, 1986) e da β -amirina (Mahato & Kundu, 1994).

Tabela 06: Dados de ^{13}C RMN do LUPEOL e da β -AMIRINA (75 MHz / CDCl_3)

C	LUPEOL	β-AMIRINA
1	38,7	38,7
2	27,4	27,3
3	79,0	79,0
4	38,8	38,7
5	55,3	55,1
6	18,3	18,3
7	34,2	32,7
8	40,8	38,8
9	50,4	47,6
10	37,1	37,4
11	20,9	23,5
12	25,1	121,7
13	38,0	145,1
14	42,7	41,7
15	27,3	26,1
16	35,5	27,9
17	42,9	32,6
18	48,3	47,2
19	47,9	46,8
20	150,9	31,0
21	29,8	34,7
22	40,0	37,2
23	28,1	28,0
24	15,4	15,5
25	16,1	15,6
26	15,9	16,9
27	14,5	26,0
28	18,0	28,4
29	109,3	33,3
30	19,3	23,7

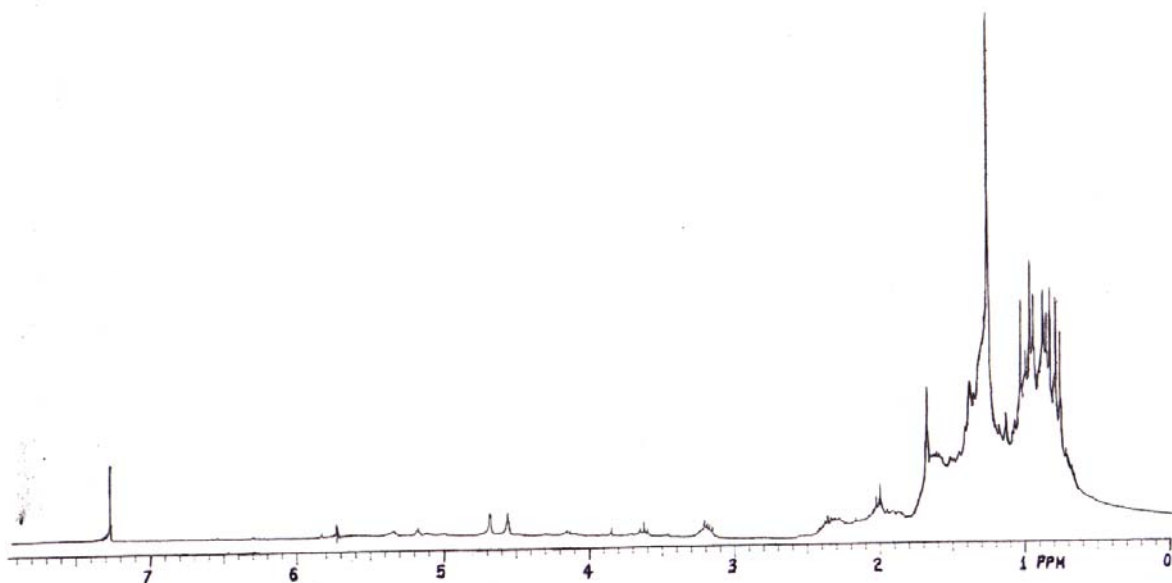


Figura 40: Espectro de RMN ^1H da mistura de LUPEOL e β -AMIRINA

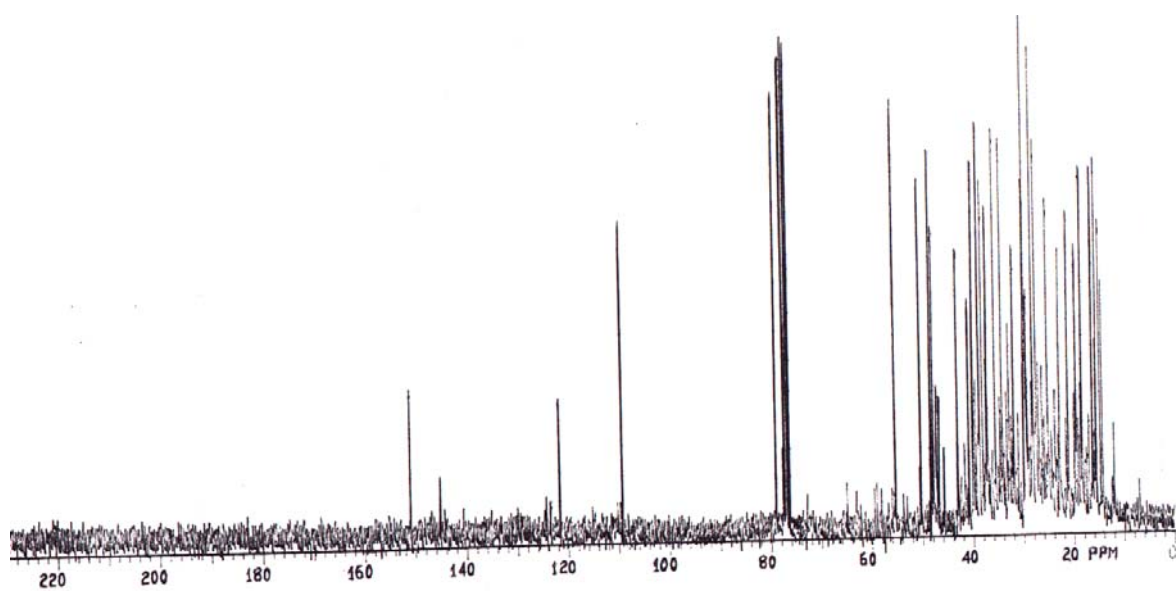


Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C da mistura de LUPEOL e β -AMIRINA

3.1.1.5 Identificação da Substância IX (ÁCIDO ARJUNÓLICO) (Figura 42)

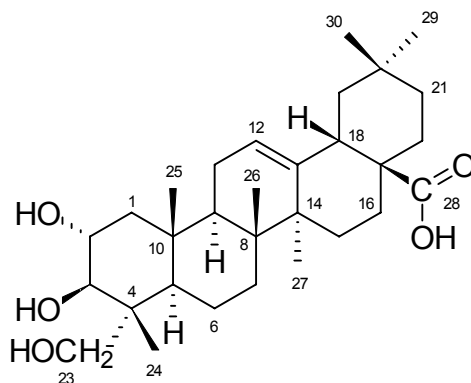


Figura 42: Estrutura do ÁCIDO ARJUNÓLICO

O espectro de RMN de ^1H (Figura 43) apresentou um singlete em 5,36 ppm, com integração para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio olefínico da Substância IX.

Apresentou também um conjunto de sinais em 4,11; 4,05 e 4,02 ppm, com integração para três hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios ligados nos carbonos carbinólicos C-2 e C-3, e a um dos hidrogênios do C-23 na Substância IX. Observamos ainda um duplete em 3,60 ppm (10,14 Hz), integrando para um hidrogênio, atribuído ao outro hidrogênio do C-23. Os sinais dos hidrogênios em C-23 aparecem separados no espectro de RMN de ^1H por que esses hidrogênios estão ligados a um carbono diretamente ligado a um centro quiral, portanto são diastereotópicos.

Observamos ainda no mesmo espectro um conjunto de sinais entre 2,20 e 1,20 ppm atribuídos aos outros hidrogênios metínicos e metilênicos da Substância IX.

Os espectros de DEPT 135 (Figura 45) e de RMN ^{13}C (Figura 44) mostraram sinais que foram importantes na identificação da Substância IX:

- Sinal em 179,9 ppm atribuído ao carbono carboxílico em C-28;

- Sinais em 144,5 e 122,1 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos, característicos de insaturação entre os carbonos C-12 e C-13 no esqueleto triterpênico oleanano (Mahato & Kundu, 1994);
- Sinais em 77,8; 68,5 e 66,2 ppm atribuído aos carbonos carbinólicos da Substância IX; pela análise do espectro de DEPT 135 concluímos que os sinais em 77,8 e 68,5 ppm são de carbonos metínicos, ao passo que o sinal em 66,21 ppm de carbono metilênico. O sinal em 77,8 ppm foi atribuído ao carbono C-3, que apesar de sofrer efeito de desproteção pela vizinhança do carbono carbinólico C-2 em β também sofre efeito de proteção devido ao efeito γ da hidroxila em C-23. O sinal em 68,5 foi atribuído metínico em C-2. O sinal em 66,2 ppm foi atribuído ao carbono metilênico C-23, que sofre efeito γ -gauche da hidroxila em C-3. Além disso, observamos um sinal de carbono metílico em 13,9 ppm, atribuído ao carbono em C-24, que sofre efeito γ -anti da hidroxila em C-23;
- Observamos ainda dois sinais de carbonos metínicos em 47,8 e 47,6 ppm. Como no ácido oleanólico o sinal do carbono de C-5 está em 55,2 ppm, concluímos que um dos dois sinais descritos são referentes ao carbono em C-5, que está sofrendo um efeito de proteção do tipo γ -gauche. No esqueleto oleanano há apenas duas possibilidades, neste caso, do efeito γ -gauche em C-5: a presença de hidroxila em C-7 α ou a presença de uma hidroxila em C-23; como o sinal do carbono em C-6 do ácido oleanólico aparece em 18,3 ppm, sendo o carbono metilênico mais protegido do espectro, e nós observamos um sinal de carbono metilênico em 18,2 ppm, concluímos que a hidroxila encontra-se no carbono C-23 da Substância IX. Com isso, um dos sinais acima mencionados (47,8 ou 47,6 ppm) são atribuídos ao carbno C-5;
- Observamos ainda sinais entre 47,2 e 13,9 atribuídos conforme a Tabela.

Pela análise dos espectros de RMN ^1H , DEPT 135 e RMN ^{13}C e por comparação com os dados encontrados na literatura (Kundu & Mahato, 1993) pudemos concluir que a Substância IX trata-se do triterpeno ácido $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxi-olean-12-en-28-óico, que por ter sido isolado pela primeira vez de *Terminalia arjuna* (Combretaceae) (King *et al*, 1954), recebeu o nome de ácido arjunólico.

A *Terminalia arjuna* é uma árvore de 18 a 27 metros de altura muito abundante na Índia, país em que é usada na medicina popular por mais de três séculos como tônico cardíaco. Avaliações clínicas já foram realizadas indicando o benefício de sua utilização no tratamento de doenças da artéria coronária, parada cardíaca e possivelmente hipercolesteromia (*Terminalia arjuna*, 1999). Além disso já foram comprovadas atividades antibacteriana (Samy & Ignacimuthu, 2001), antimutagênica (Kaur *et al*, 2002) e antioxidante (Chaminda *et al*, 2001).

Entre os constituintes ativos da *T. arjuna* estão alguns triterpenóides, como o ácido arjunólico, assim como flavonóides, protoantocianidinas e outros (*Terminalia arjuna*, 1999).

Foi também isolado de outras espécies do mesmo gênero: *Terminalia*, *T. tomentosa* (Row & Rao, 1962), *T. alata* (Anjaneyulu *et al*, 1986) *T. brassii* e *T. Complanata* (Collins *et al*, 1992) e *T. chebula* (Kundu & Mahato, 1993), além de outros gêneros da família Combretaceae: *Combretum leprosum* (Facundo *et al*, 1993). Foi isolado ainda em espécies de outras famílias como *Elaeagnus oldahmi* da família Elaeagnaceae (Ruo *et al*, 1976), *Myrianthus arboreus* da família Urticaceae (Ojinnaka *et al*, 1984) e *Anamirta cocculus* da família Menispermaceae (Jayasinghe *et al*, 1993). Há relatos do seu isolamento em dois gêneros de Myrtaceae, *Syzygium*: *S. samarangense* (Srivastava *et al*, 1995) e *S. cordatum* (Candy *et al*, 1968) e *Eucalyptus perriniana* (Furuya *et al*, 1987).

Algumas atividades biológicas já foram estudadas e atribuídas ao ácido arjunólico. Como fitoalexina (Resende *et al*, 1996), em tratamento de cardiopatias em ratos (Sumitra *et al*, 2001), na inibição do crescimento de insetos (Bhakuni *et al*, 2002) e no tratamento do câncer de pele (Diallo *et al*, 1999).

Tabela 07: Dados de RMN de ^{13}C do ÁCIDO ARJUNÓLICO [75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ (ppm)]

C	ÁCIDO ARJUNÓLICO
1	47,2
2	68,5
3	77,8
4	43,2
5	47,8
6	18,2
7	32,8
8	39,5
9	47,6
10	38,0
11	23,3
12	122,1
13	144,5
14	41,9
15	27,9
16	23,6
17	46,3
18	41,6
19	46,1
20	30,6
21	33,9
22	32,8
23	66,2
24	13,9
25	17,0
26	17,2
27	25,8
28	179,9
29	33,0
30	23,5

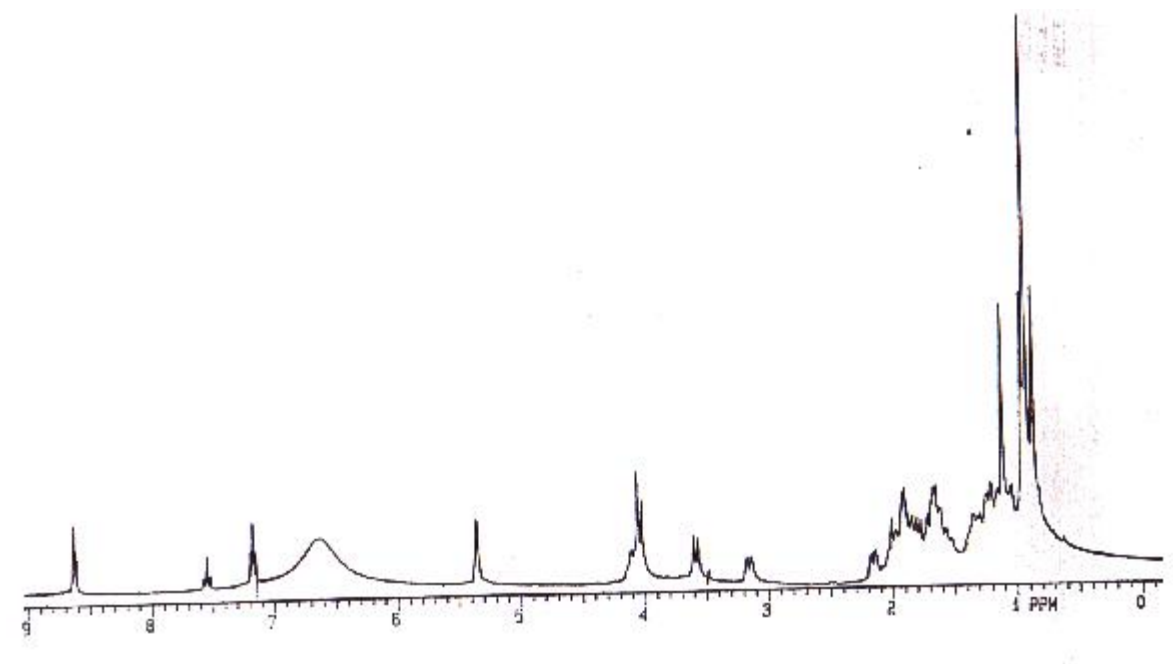


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H do ÁCIDO ARJUNÓLICO

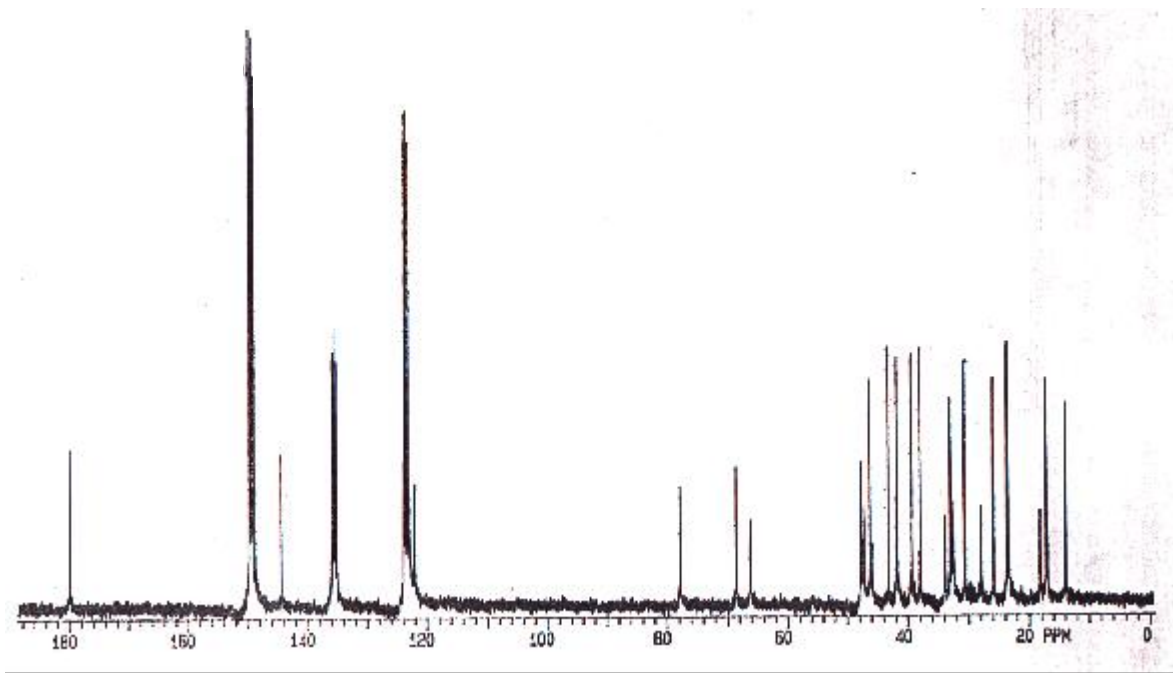


Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C do ÁCIDO ARJUNÓLICO

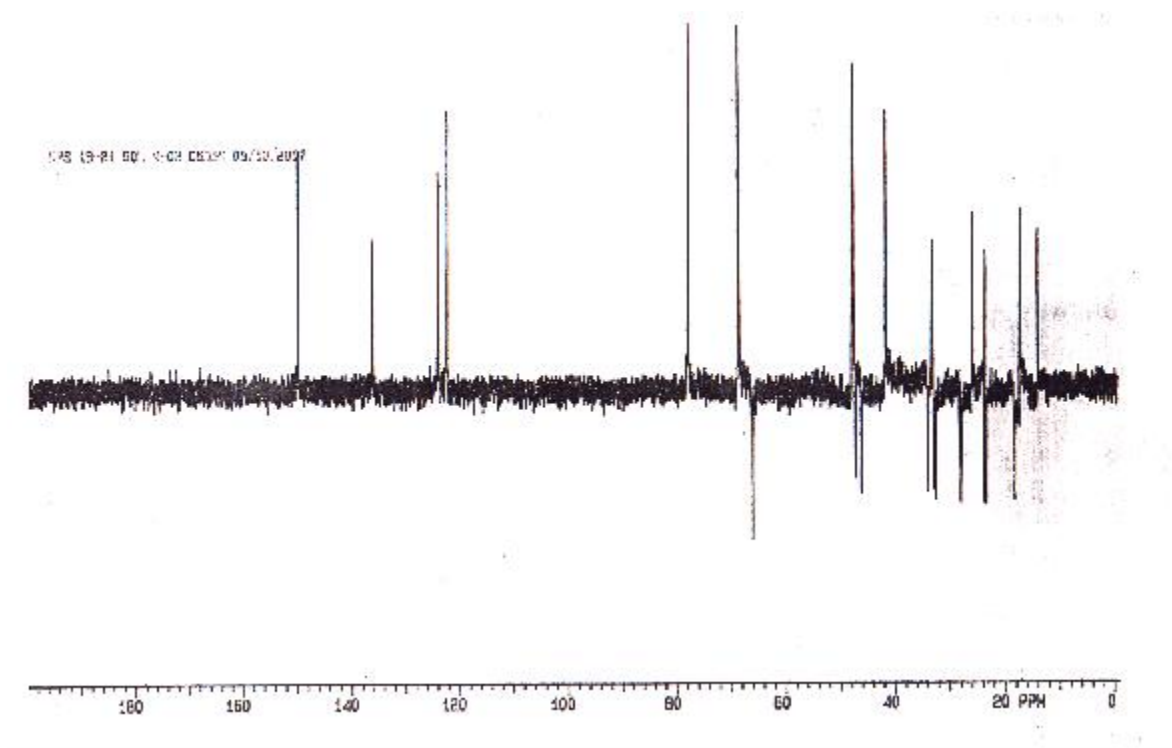


Figura 45: Espectro de DEPT 135 do ÁCIDO ARJUNÓLICO

3.2 Análise dos Óleos Voláteis

Foram identificadas 40 substâncias nos diferentes óleos, sendo um monoterpeno (α -pineno), um aldeído alifático (E-2-hexenal), um éster fenólico (salicilato de metila), 21 sesquiterpenos hidrocarbonetos e 16 sesquiterpenos oxigenados. Não foi possível a identificação de 12 substâncias.

Quatro sesquiterpenos foram encontradas nos óleos de quase todas as coletas em quantidade relativamente grande; o α -copaeno, que com exceção da coleta realizada em março de 2002 (03/02) em que apareceu em pequena quantidade (traços), apareceu em quantidade acima de 5 % nas demais coletas; o β -cariofileno e o germacreno D apareceram em quantidades sempre acima de 10 % e 12 %, respectivamente; o δ -cadineno foi entre estes sesquiterpenos o que teve uma maior variação de percentual relativo, sendo que não foi detectado na coleta de maio de 2002 (05/02), apareceu como um dos componentes menores (3,6 %) em outubro de 2001 (10/01), mas foi encontrado em quantidades acima de 20 % nas demais coletas.

Foram observados sinais acima de 45 minutos em alguns cromatogramas (Figuras 46, 48, 49 e 51) que foram atribuídos, pela análise dos espectros de massas, a hidrocarbonetos de cadeia linear oriundos da contaminação do diclorometano utilizado nessas análises. A fim de confirmar a contaminação por parte do DCM injetamos o mesmo “puro” (Figura 52) e constatamos a presença dos mesmos sinais.

As substâncias identificadas, os dados de índices de retenção e as percentagens de cada substância nos respectivos óleos estão mostradas na Tabela 08. As estruturas das substâncias identificadas, assim como os respectivos espectros de massas, estão mostradas na Tabela 09 (p. 87 – 99).

Tabela 08: Percentuais relativos e Índices de Kováts das substâncias contidas nos óleos voláteis obtidos das folhas de *Myrcia rotundifolia*, coletadas no Parque do Abaeté.

I _{Kováts}	Substância	Área(%)					
		02/01	10/01	03/02	05/02	07/02	10/02
876	E-2-hexenal	0,6	6,8	1,6	4,3	2,7	Traços
937	α -pineno	0,2	Traços	-	Traços	-	-
1192	Salicilato de metila	-	Traços	-	-	-	-
1337	δ -elemeno	0,3	-	Traços	Traços	-	-
1347	α -cubebeno	2,3	-	Traços	Traços	Traços	1,0
1373	α -copaeno	13,5	Traços	6,7	5,1	6,4	6,4
1387	β -cubebeno	1,5	-	Traços	-	1,1	-
1390	β -elemeno	-	1,1	-	-	Traços	-
1405	Não identificada	0,5	-	-	-	-	-
1416	β -cariofileno	16,1	24,2	19,5	10,7	12,7	14,2
1447	4 β H,10 α H-guaia-1(5),6-dieno	0,3	-	Traços	-	1,0	2,5
1451	α -cariofileno	2,0	2,8	2,9	-	2,0	-
1456	E- β -farneseno	1,5	-	Traços	-	-	-
1459	Seicheleno	-	-	Traços	-	1,7	-
1471	7 α H,10 β H-cadina-1(6),4-dieno	1,4	-	2,9	-	2,0	-
1474	γ -muuroleno	1,0	Traços	Traços	-	1,0	-
1478	Germacreno D	12,0	18,7	15,7	14,9	16,3	12,8
1488	Cis- β -guaieno	0,8	-	Traços	-	1,4	-
1494	Biciclogermacreno	1,4	3,9	Traços	-	2,4	-
1498	α -muuroleno	1,4	1,0	Traços	-	1,3	-
1508	Não identificada	0,5	-	-	-	-	-
1512	γ -cadineno	-	-	Traços	-	-	-
1525	δ -cadineno	27,3	3,6	26,6	-	21,6	27,2
1533	Cadina-1,4-dieno	1,6	-	4,2	18,3	-	-
1541	α -calacoreno	-	-	Traços	-	-	-
1555	Germacreno B	-	1,0	-	-	-	-
1576	Espatulenol	-	0,9	-	-	-	-
1582	Óxido de cariofileno	-	4,9	5,4	-	-	-
1587	E-dehidro-apofarnesol	1,6	-	-	-	-	-
1590	Carotol	-	1,5	Traços	-	-	-
1593	Não identificada	-	-	Traços	-	-	-
1593	Não identificada	-	1,3	-	-	-	-
1597	Guaiol	-	7,0	-	-	-	-
1601	<i>cis</i> -dihidro-occidentalol	-	2,5	-	-	-	-
1602	N.I.	-	-	Traços	-	-	-
1608	<i>cis</i> -isolongifolanona	-	-	Traços	-	-	-

Tabela 08: Continuação

1627	1-epi-cubenol	-	Traços	6,7	-	-	-
1634	Não identificada	1,7	-	-	-	-	-
1641	τ -muurolol	-	8,1	4,8	-	-	-
1646	α -muurolol	-	1,1	Traços	-	-	-
1648	Não identificada	0,8	-	-	-	-	-
1652	Não identificada	0,1	-	-	-	-	-
1654	α -cadinol	-	Traços	Traços	-	-	-
1659	Não identificada	0,3	1,0	Traços	-	-	4,8
1667	Bulnesol	-	Traços	-	-	-	-
1671	Não identificada	-	-	Traços	-	-	6,3
1678	Khusinol	-	-	Traços	-	-	-
1683	α -bisabolol	-	-	Traços	-	-	9,4
1685	Epi- α -bisabolol	-	-	8,3	-	4,3	3,0
1701	Não identificada	-	Traços	-	-	-	1,0
1725	Não identificada	-	-	-	-	-	2,9
1798	14-hidroxi- δ -cadineno	-	-	Traços	Traços	1,8	6,2

Tabela 09: Espectros de massas e estruturas das substâncias identificadas nos óleos essenciais estudados

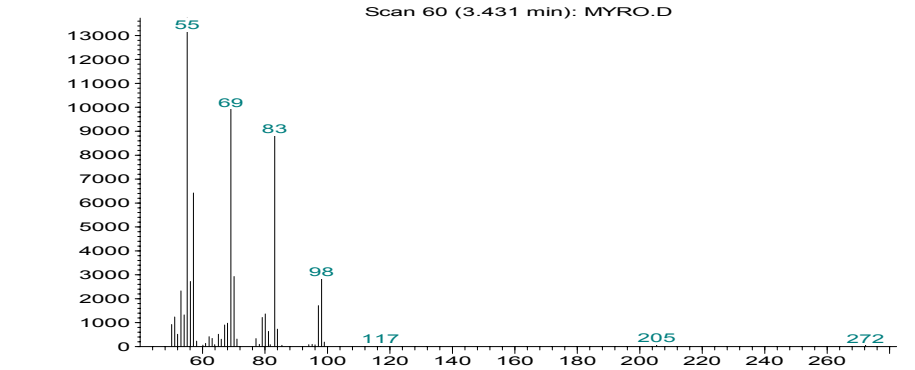
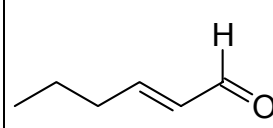
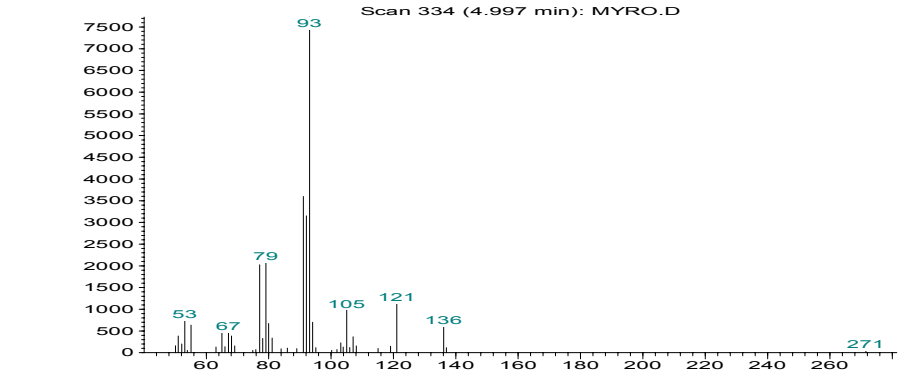
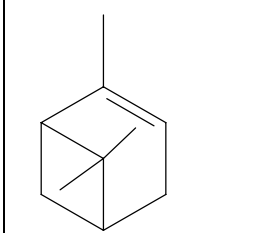
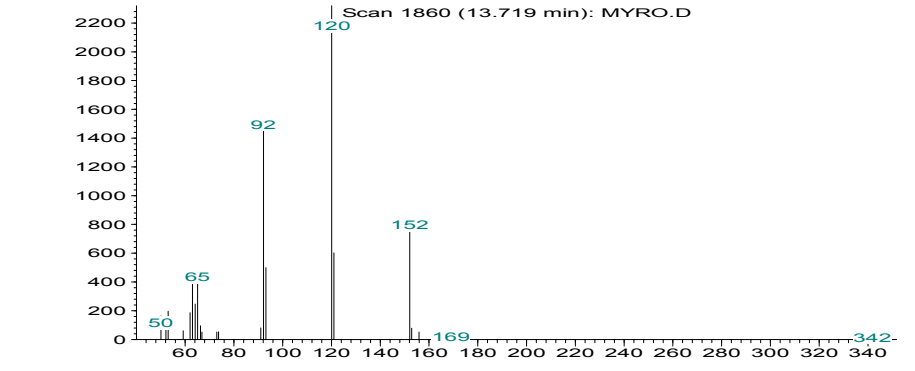
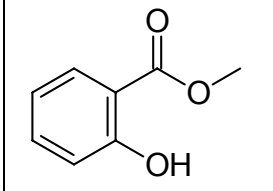
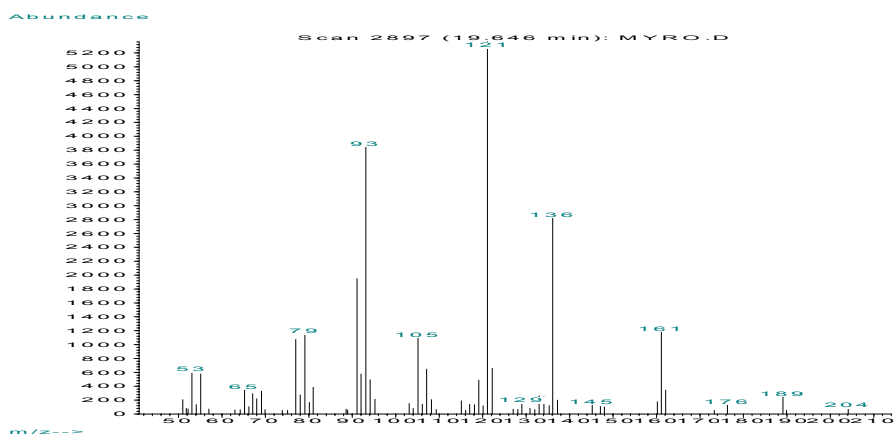
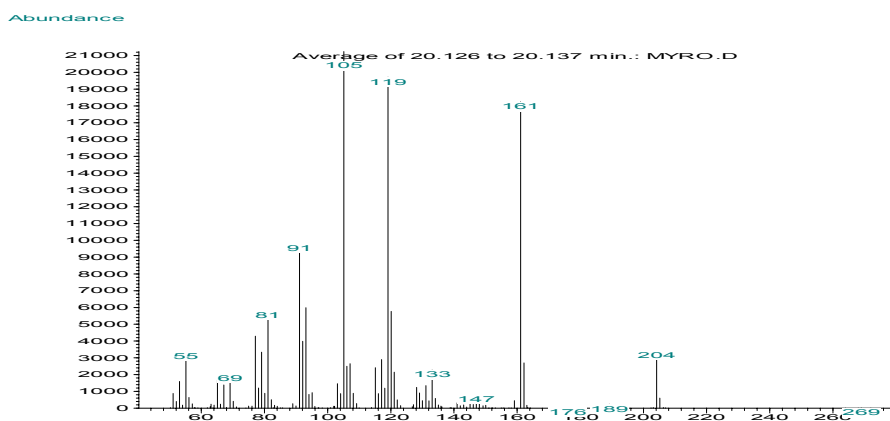
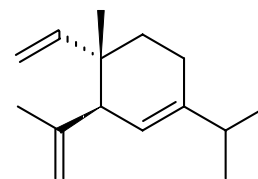
Substância / espectro de massas	Estrutura
<p>Abundance</p> <p>Scan 60 (3.431 min): MYRO.D</p>  <p>m/z--></p> <p>E-2-hexenal</p>	
<p>Abundance</p> <p>Scan 334 (4.997 min): MYRO.D</p>  <p>m/z--></p> <p>α-pineno</p>	
<p>Abundance</p> <p>Scan 1860 (13.719 min): MYRO.D</p>  <p>m/z--></p> <p>Salicilato de metila</p>	

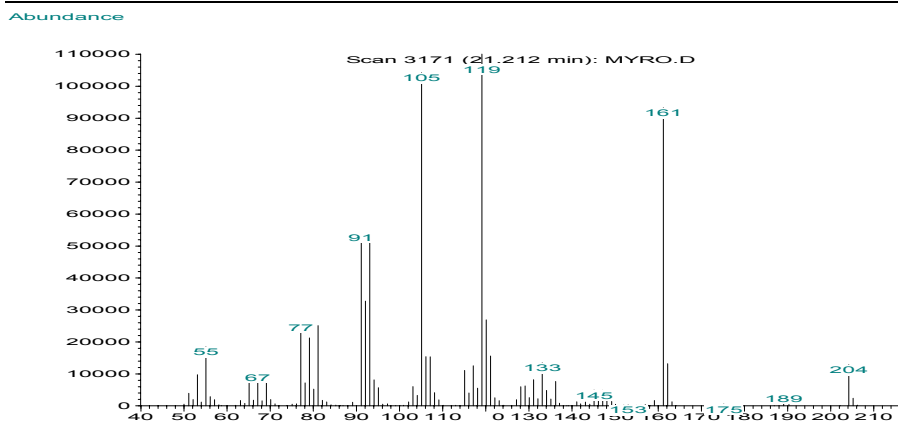
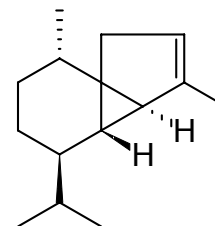
Tabela 09: Continuação



δ-elemeno



α-cubebeno



α-copaeno

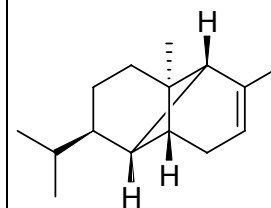
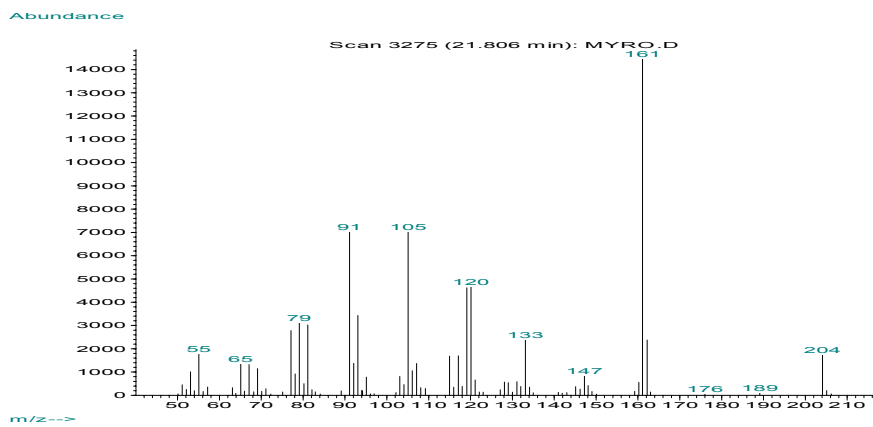
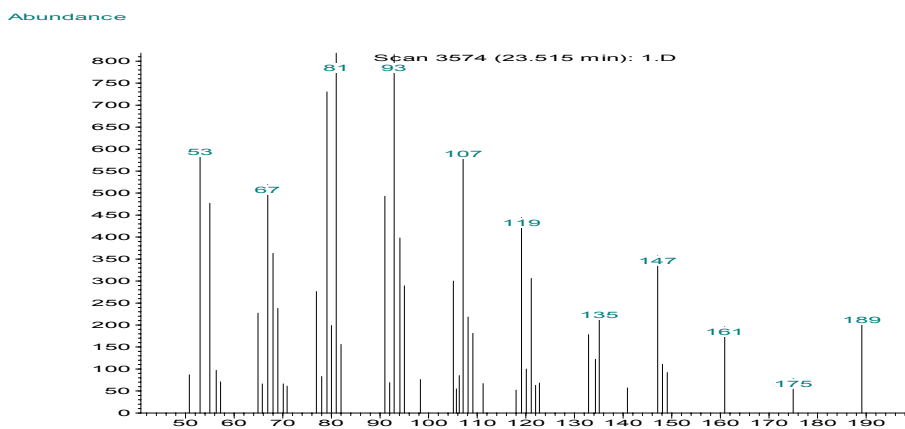
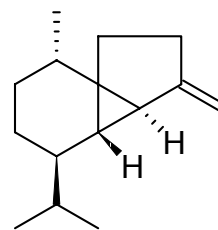


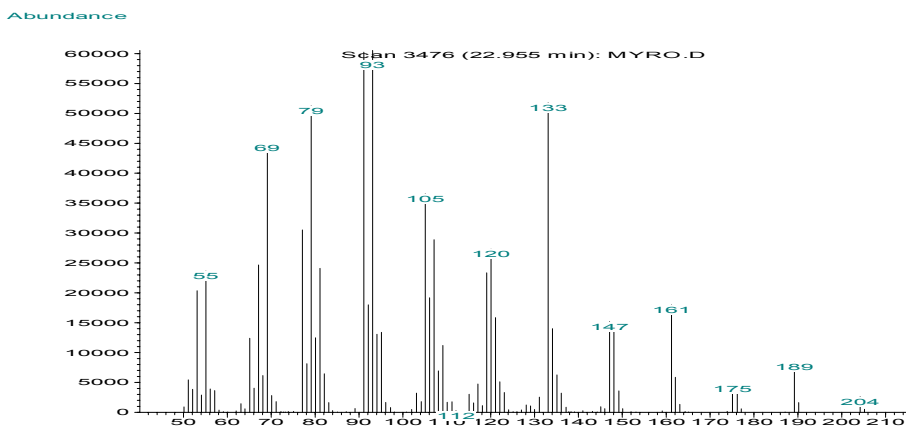
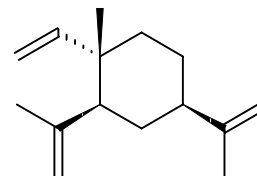
Tabela 09: Continuação



β -cubebene



β -elemeno



β -cariofileno

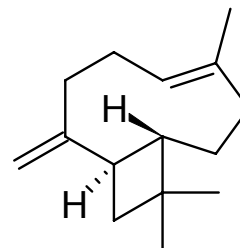
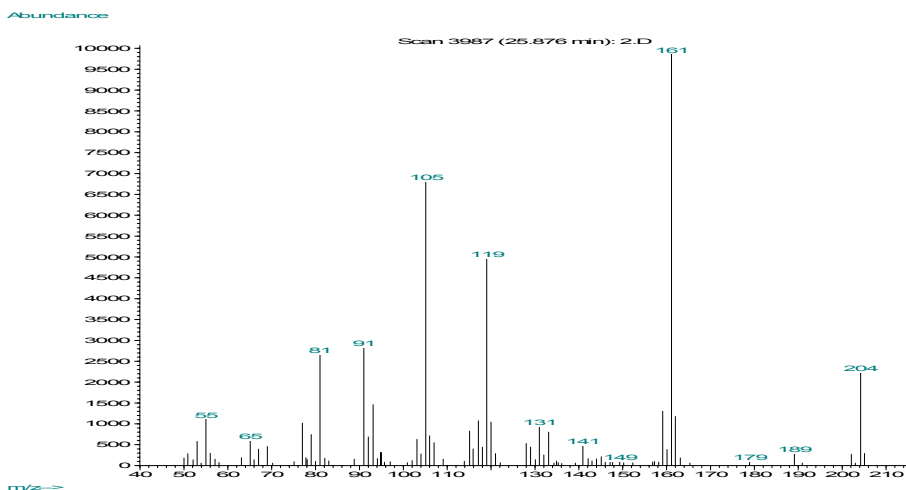
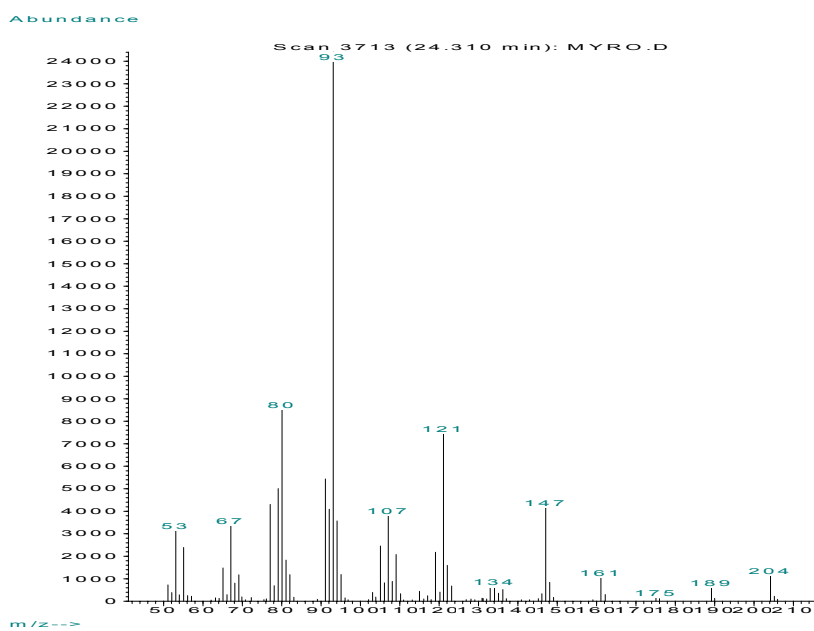
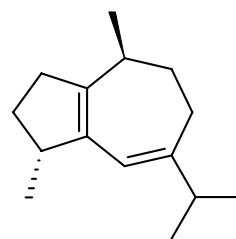


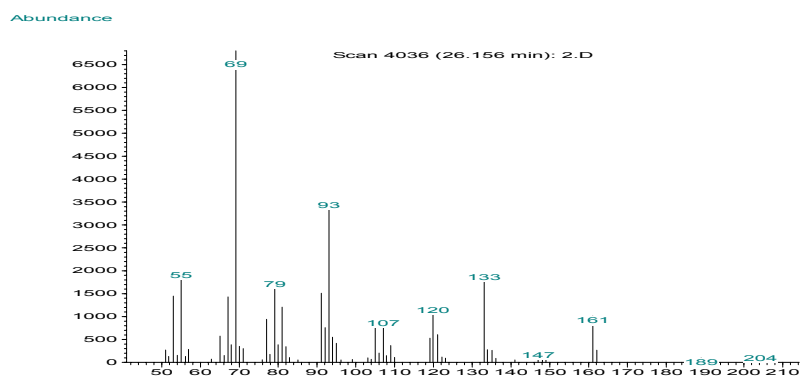
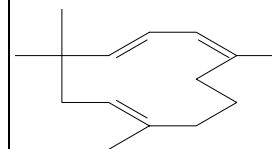
Tabela 09: Continuação



4βH,10αH-guaia-1(5),6-dieno



α-cariofileno (humuleno)



E-β-farneseno

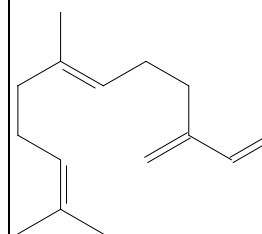
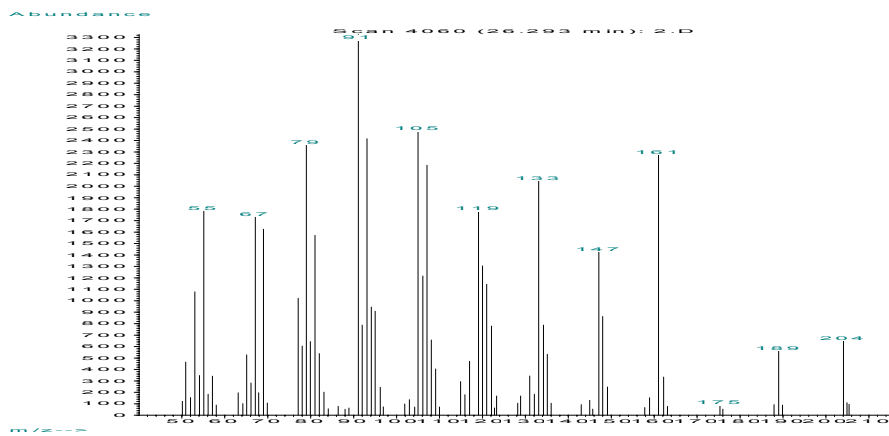
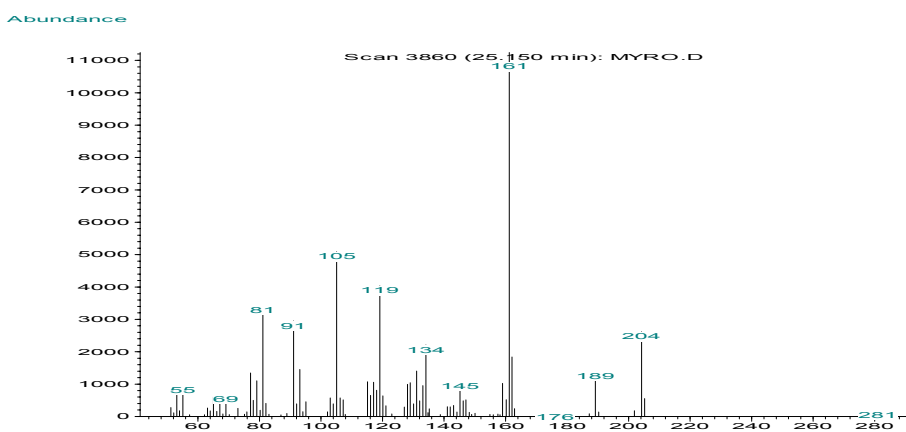
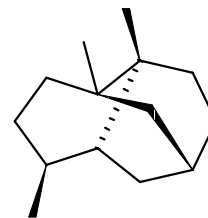


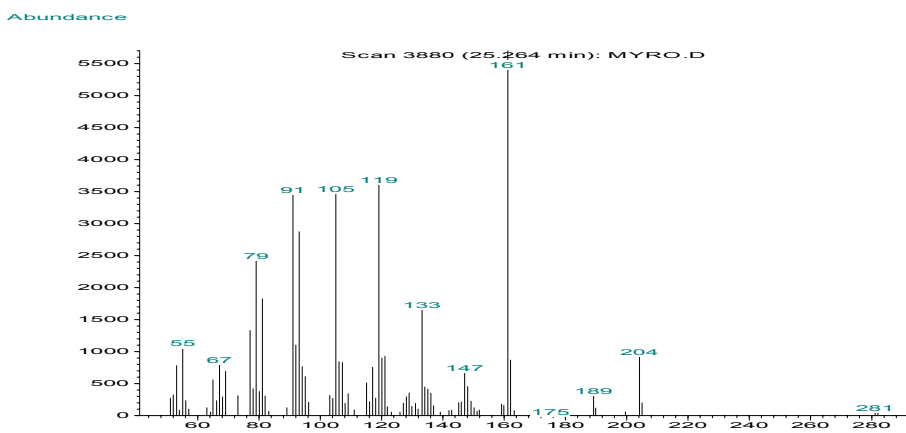
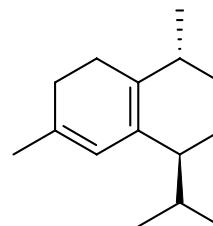
Tabela 09: Continuação



Sicheleno



7 α H,10 β H-cadina-1(6),4-dieno



γ -muuroleno

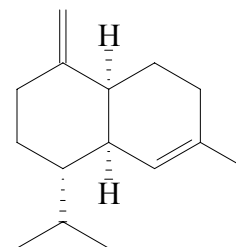


Tabela 09: Continuação

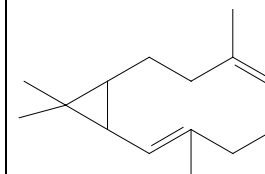
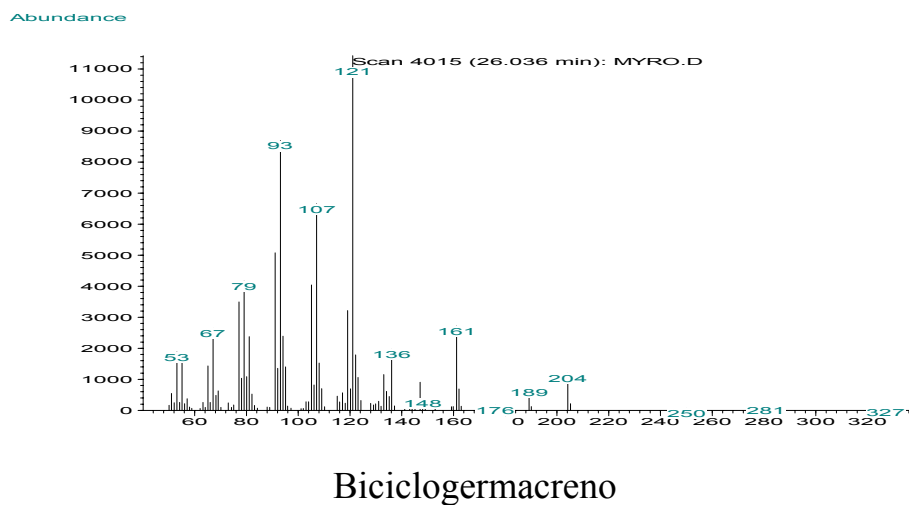
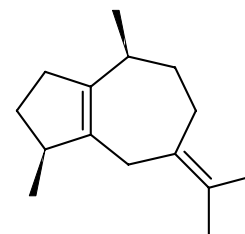
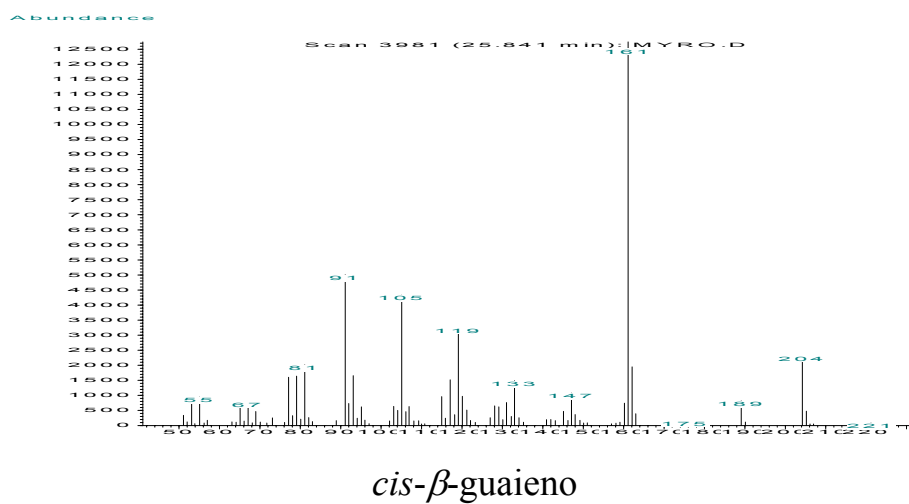
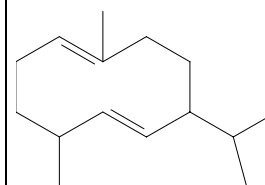
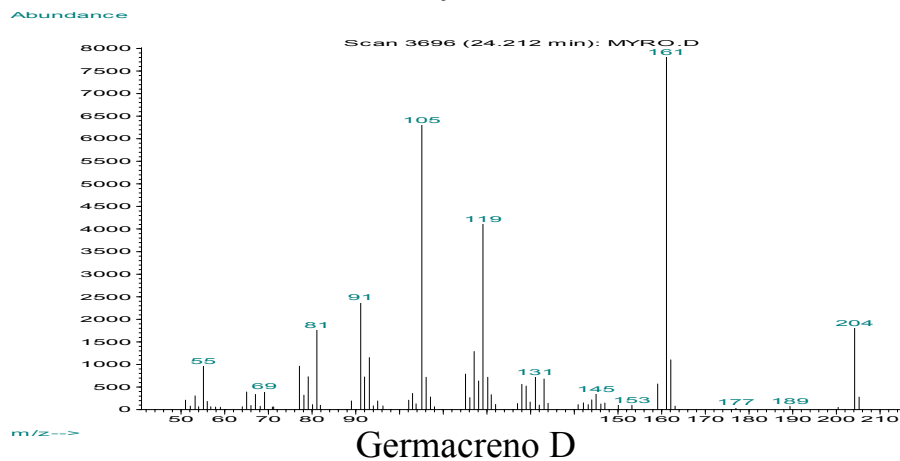


Tabela 09: Continuação

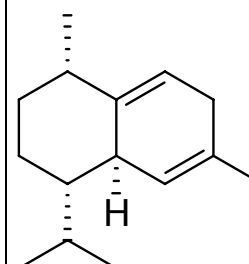
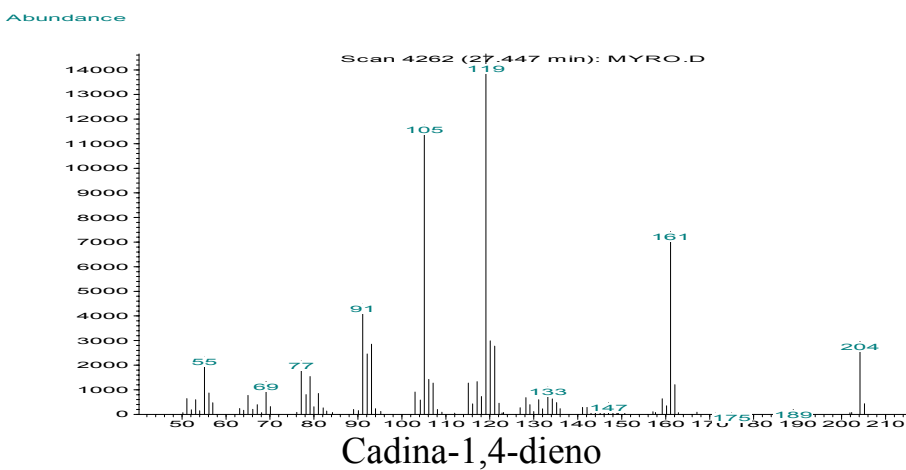
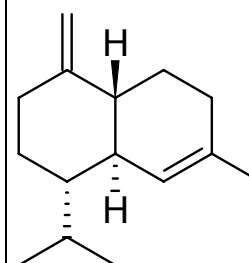
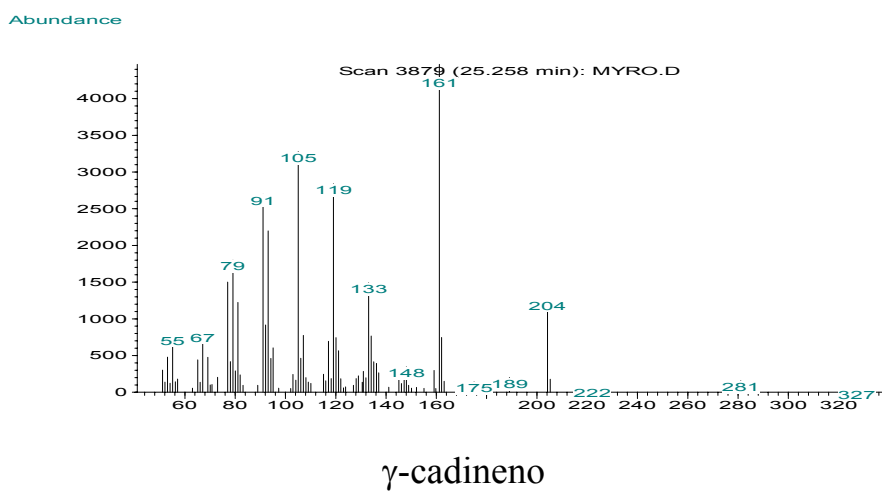
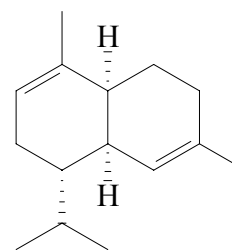
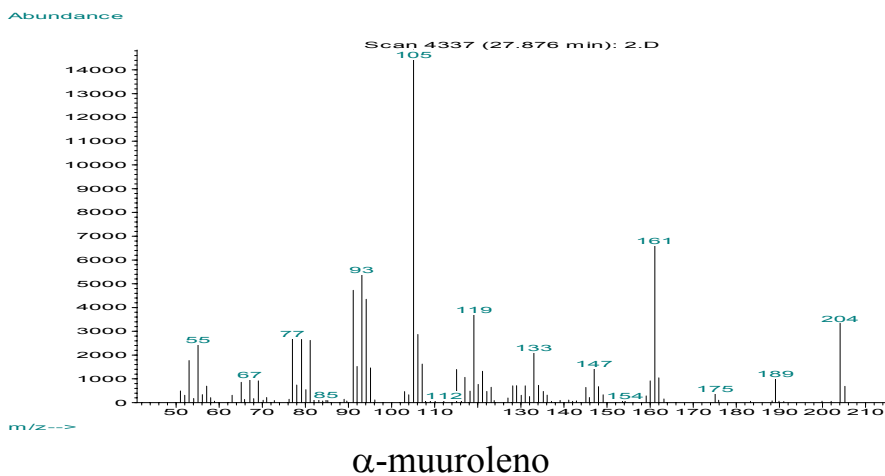


Tabela 09: Continuação

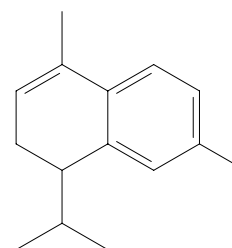
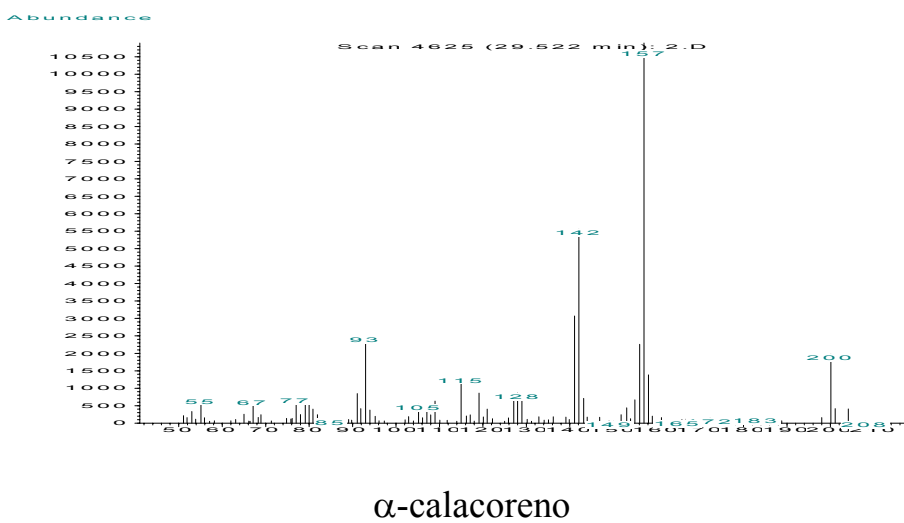
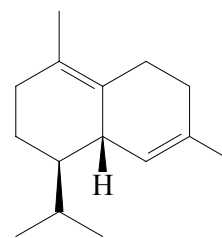
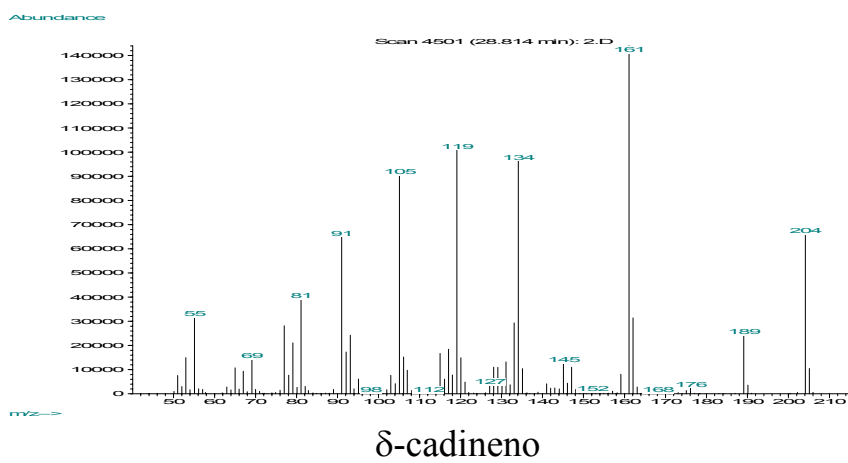
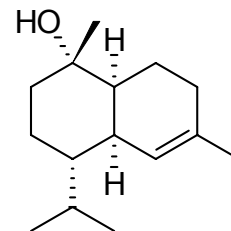
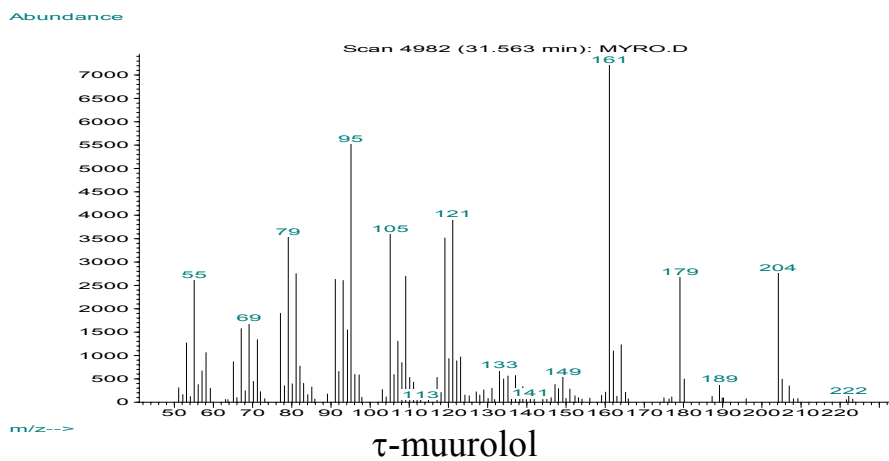


Tabela 09: Continuação

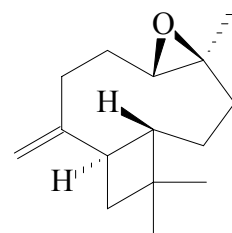
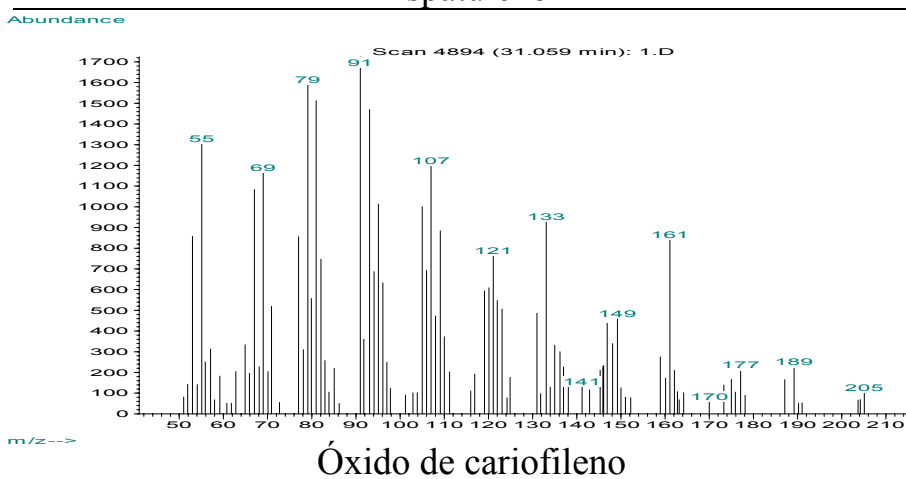
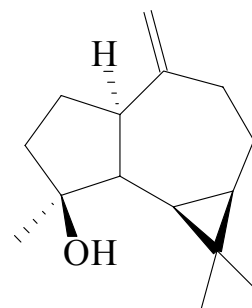
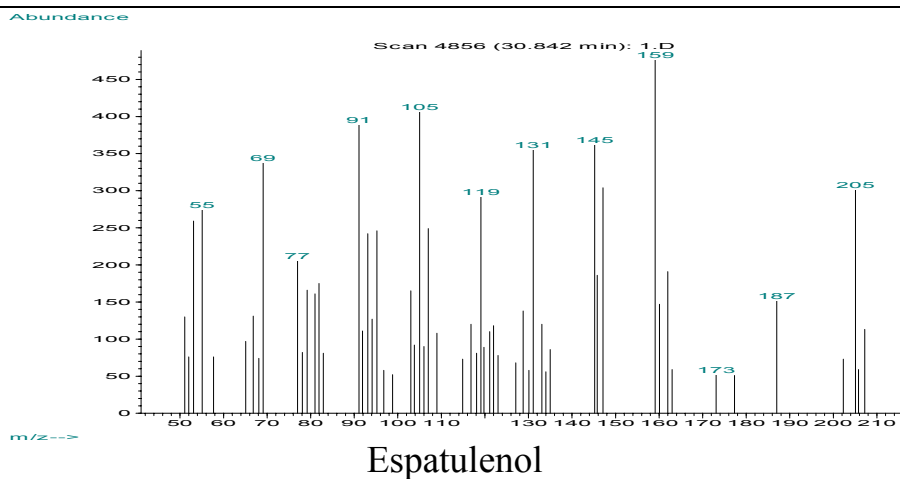
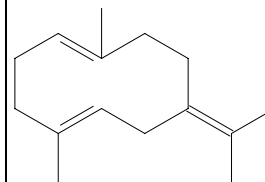
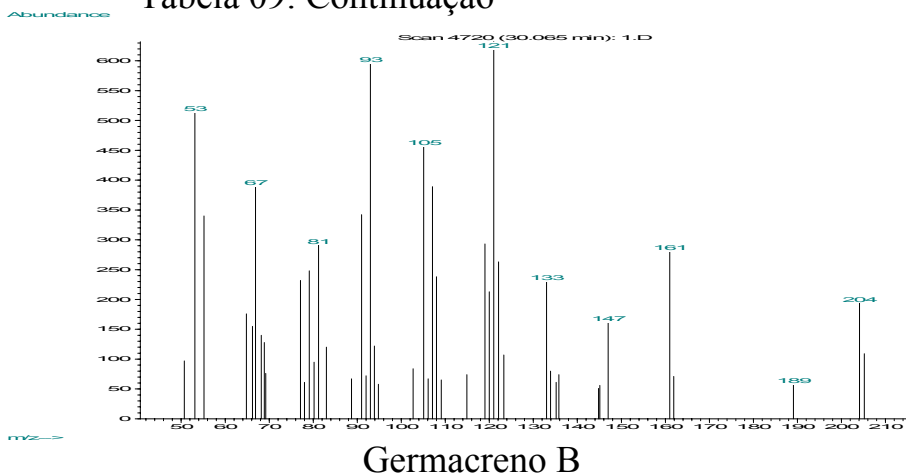
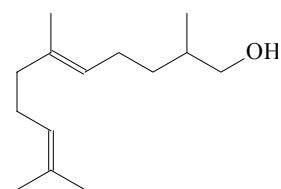
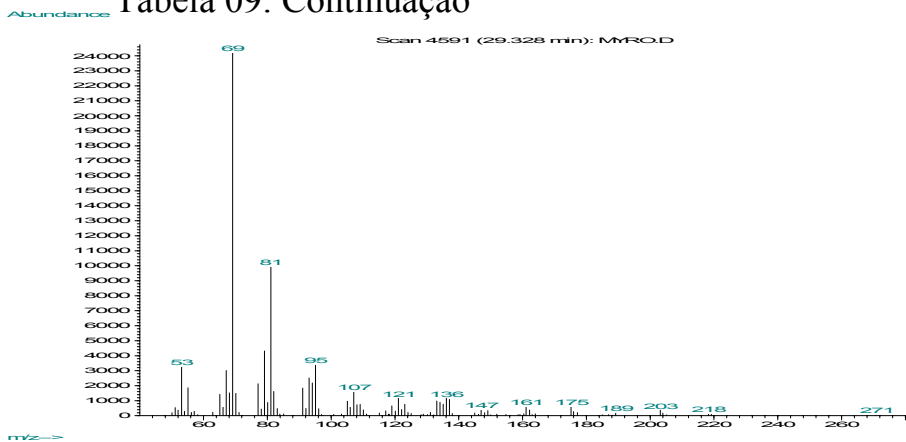
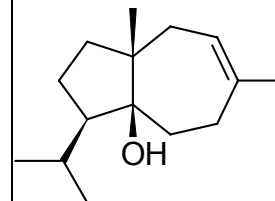
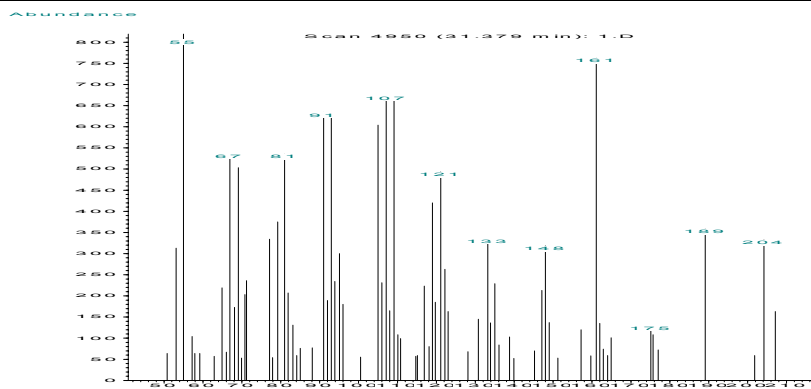


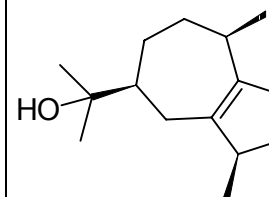
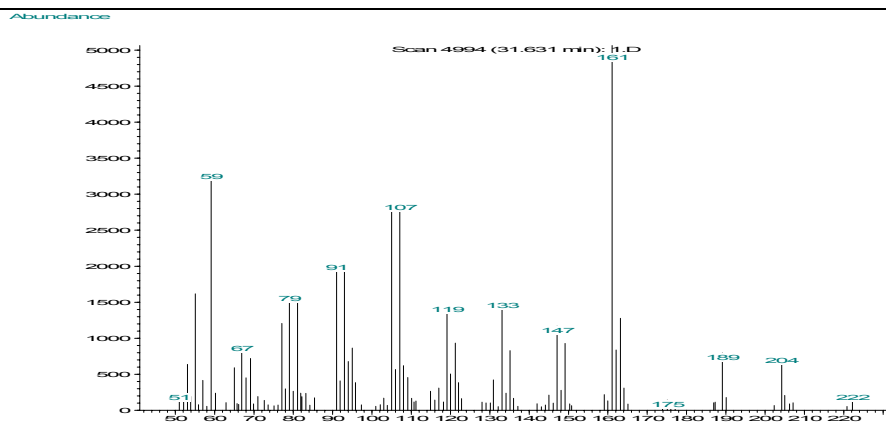
Tabela 09: Continuação



E-dehidro-apofarnesol

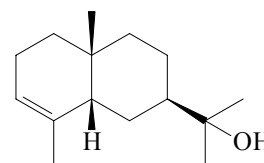
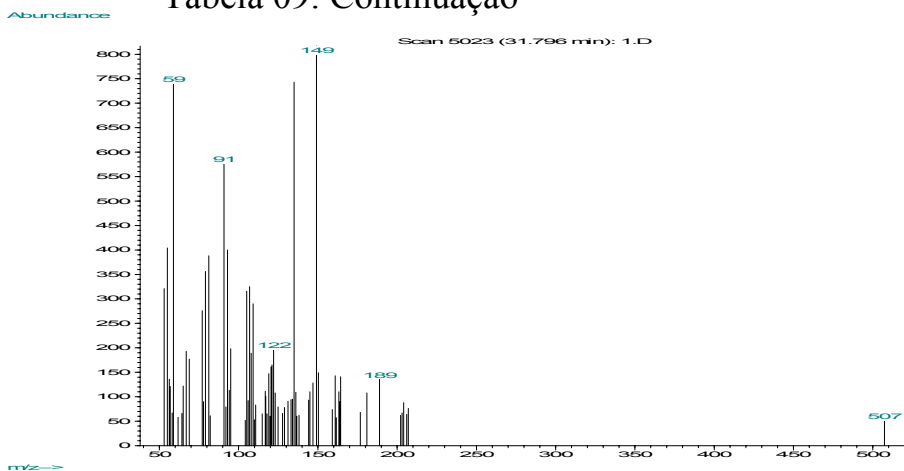


Carotol

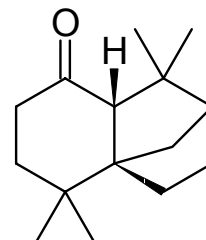
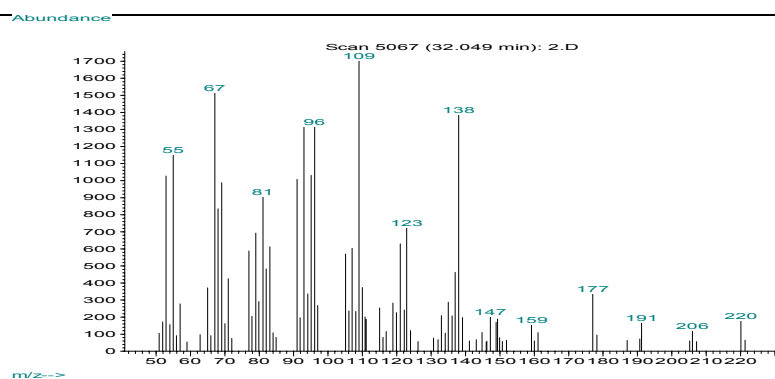


Guaiol

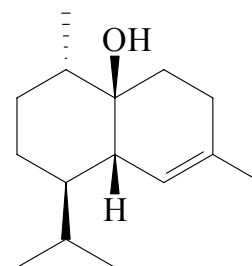
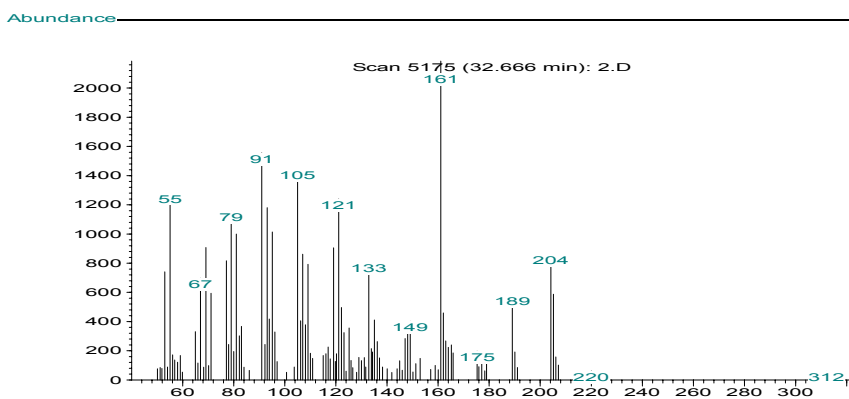
Tabela 09: Continuação



cis-dihidro-occidentalol

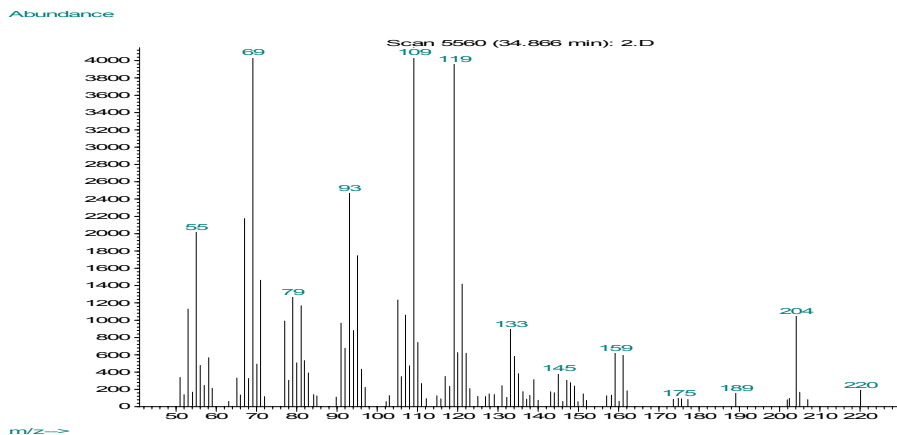


cis-isolongifolanona

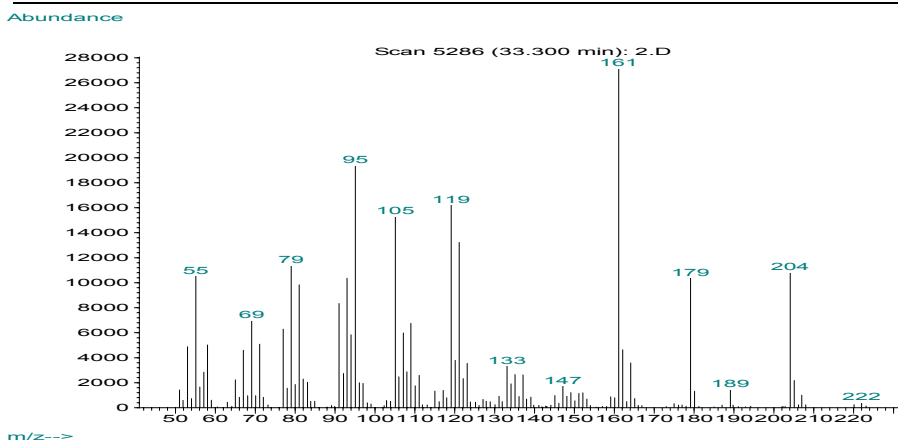
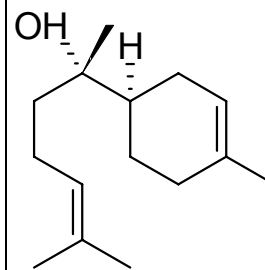


1-epi-cubenol

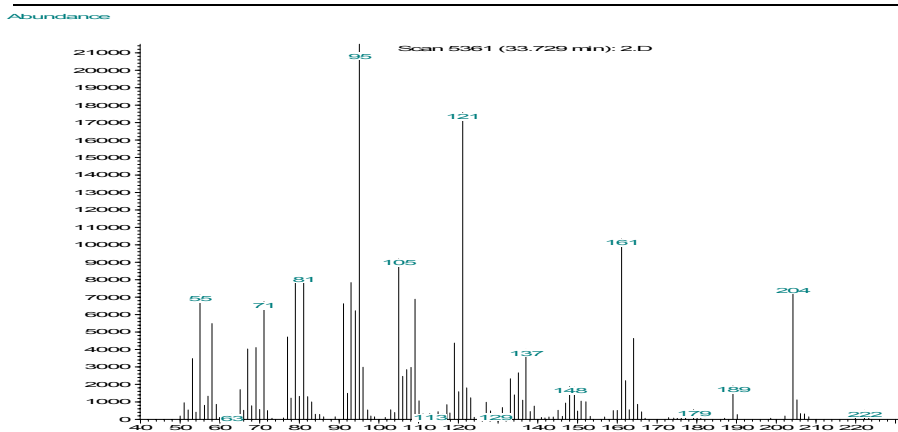
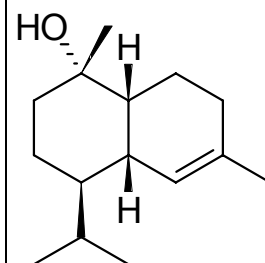
Tabela 09: Continuação



α -bisabolol



α -muurolol



α -cadinol

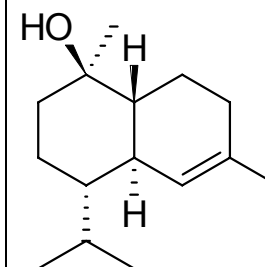
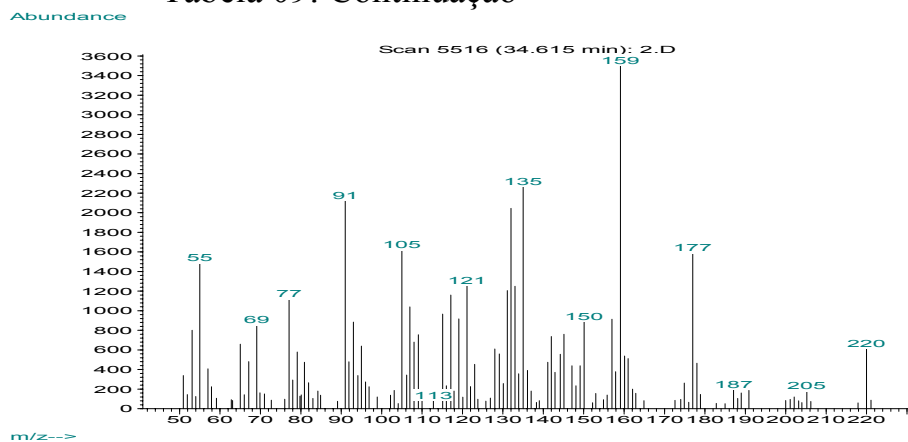
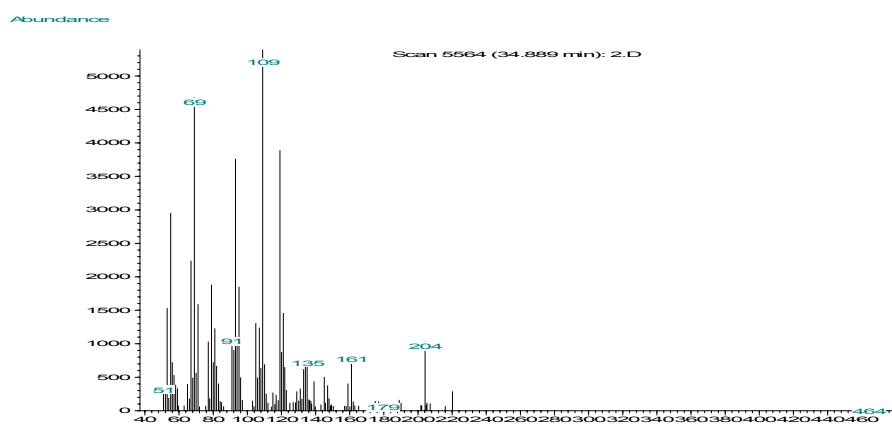
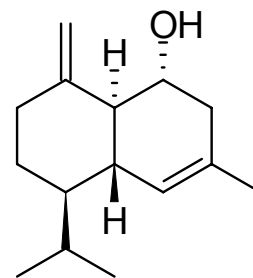


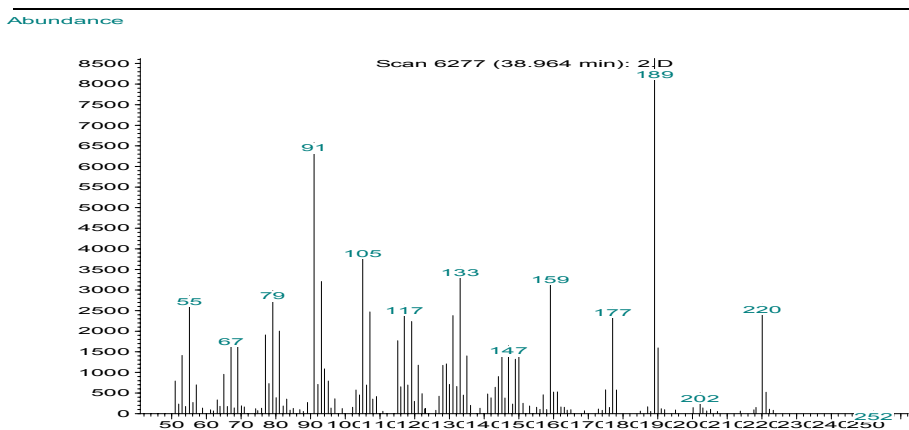
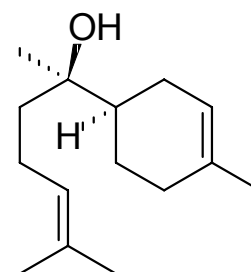
Tabela 09: Continuação



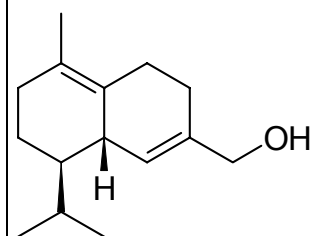
Khusinol



Epi- α -bisabolol



14-hidroxi- δ -cadineno



CONCLUSÕES

Foram identificados no extrato hexânico e na fase em diclorometano do caule da *Myrcia rotundifolia* dois esteróides: β -sitosterol e estigmasterol; e sete triterpenos: esqualeno, friedelina, lupenona, ácido betulínico, lupeol, β -amirina e o ácido arjunólico.

A composição química do óleo essencial obtido das folhas da *M. rotundifolia* não apresentou variação significativa durante as diferentes coletas do ano, havendo uma predominância de alguns sesquiterpenos como α -copaeno, β -cariofileno, germacreno D e δ -cadineno, cuja soma das quantidades nos respectivos óleos variou de 30,7 % em maio de 2002 a 68,9 % em fevereiro do mesmo ano.

A fase em acetato de etila obtida por partição do extrato metanólico, a fase mais polar do extrato metanólico e algumas frações do extrato hexânico e da fase em diclorometano da *M. rotundifolia* ainda não foram estudadas. Este estudo será feito com os trabalhos de doutorado.

ANEXO – Cromatogramas dos óleos essenciais estudados, obtidos no CG-DIC

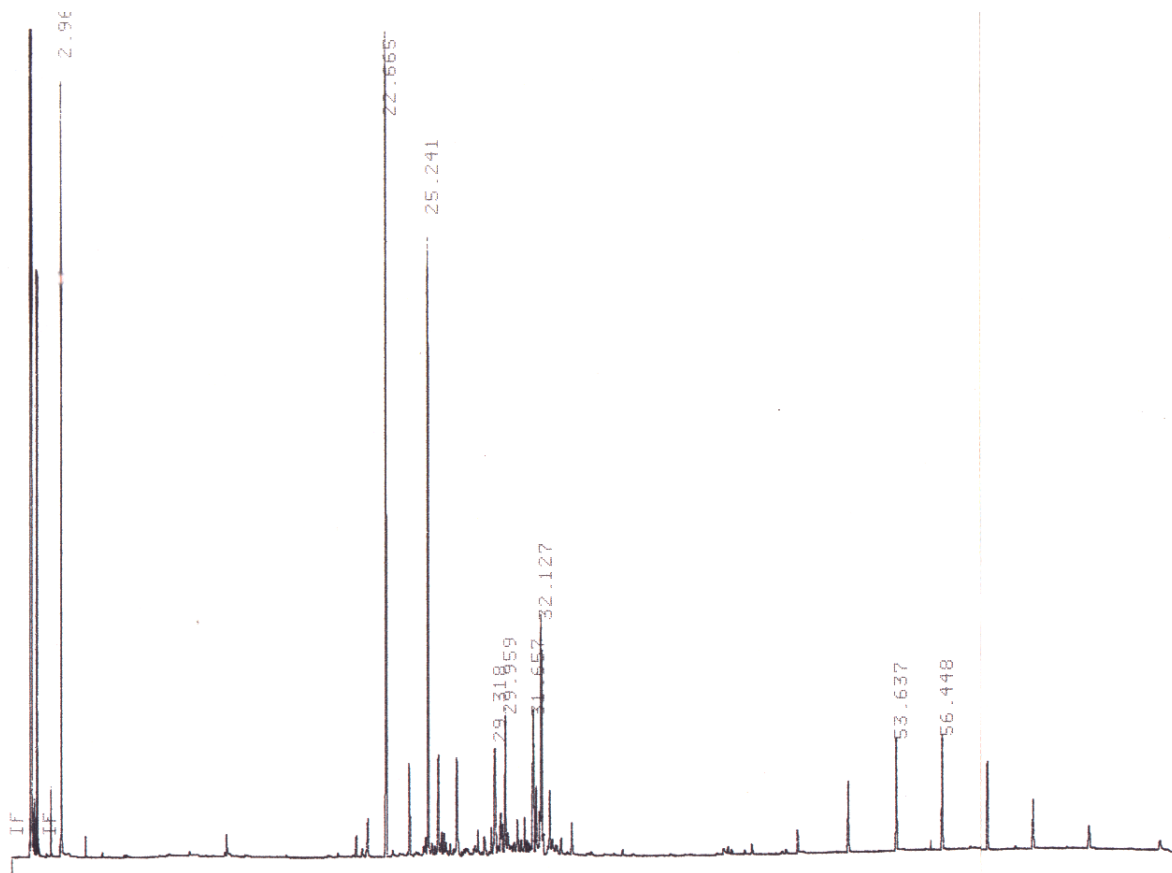


Figura 46: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 28/10/2001

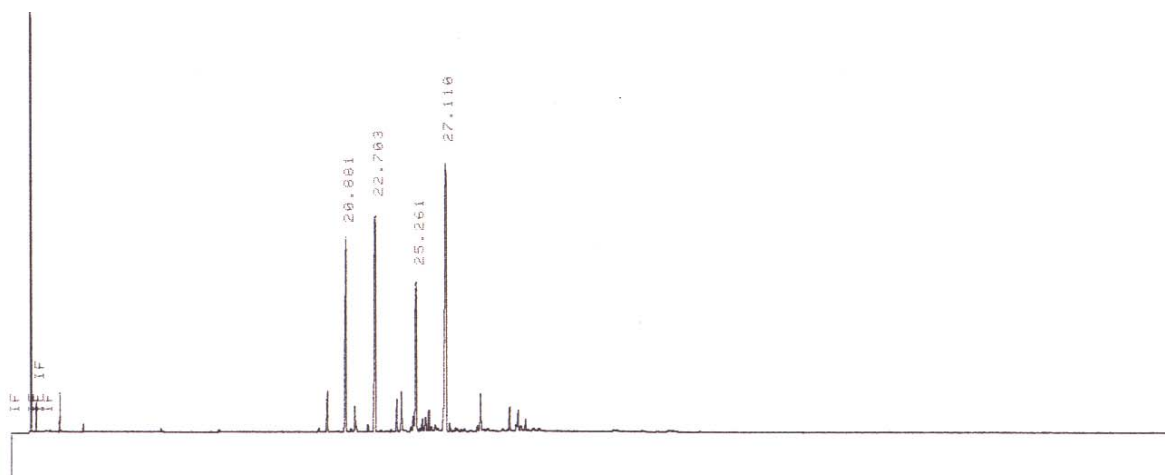


Figura 47: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 12/02/2001

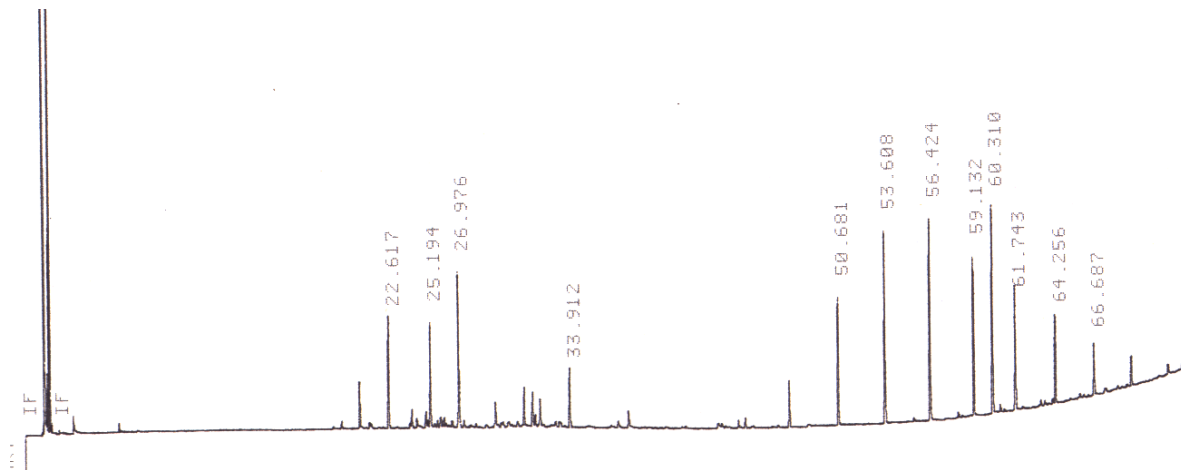


Figura 48: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 14/03/2002

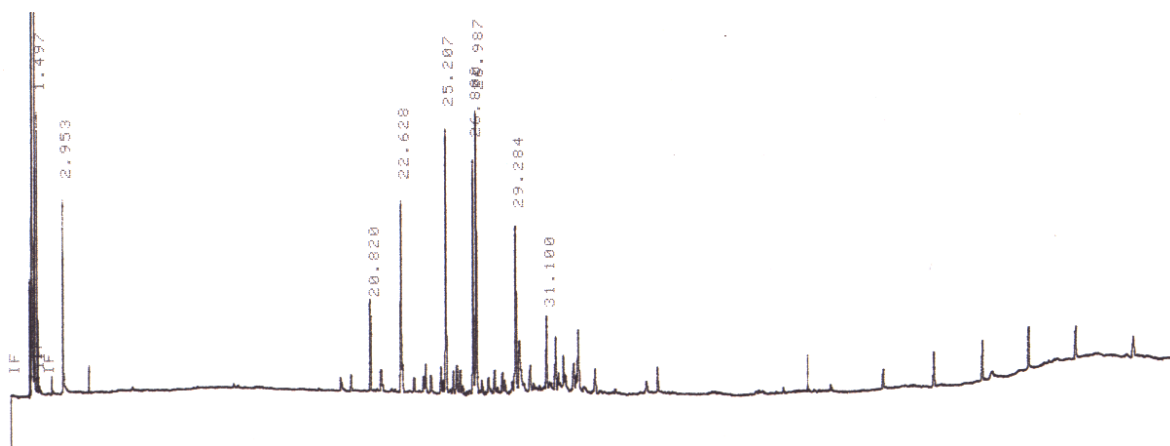


Figura 49: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 21/05/2002

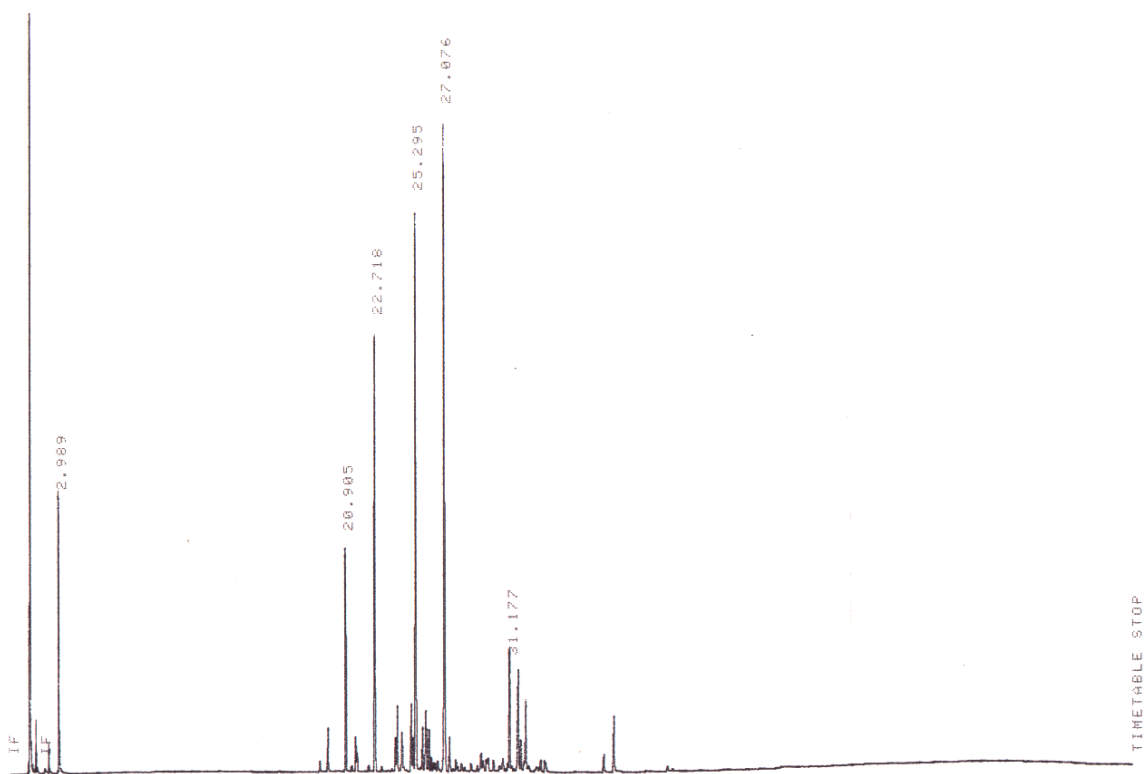


Figura 50: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 17/07/2002

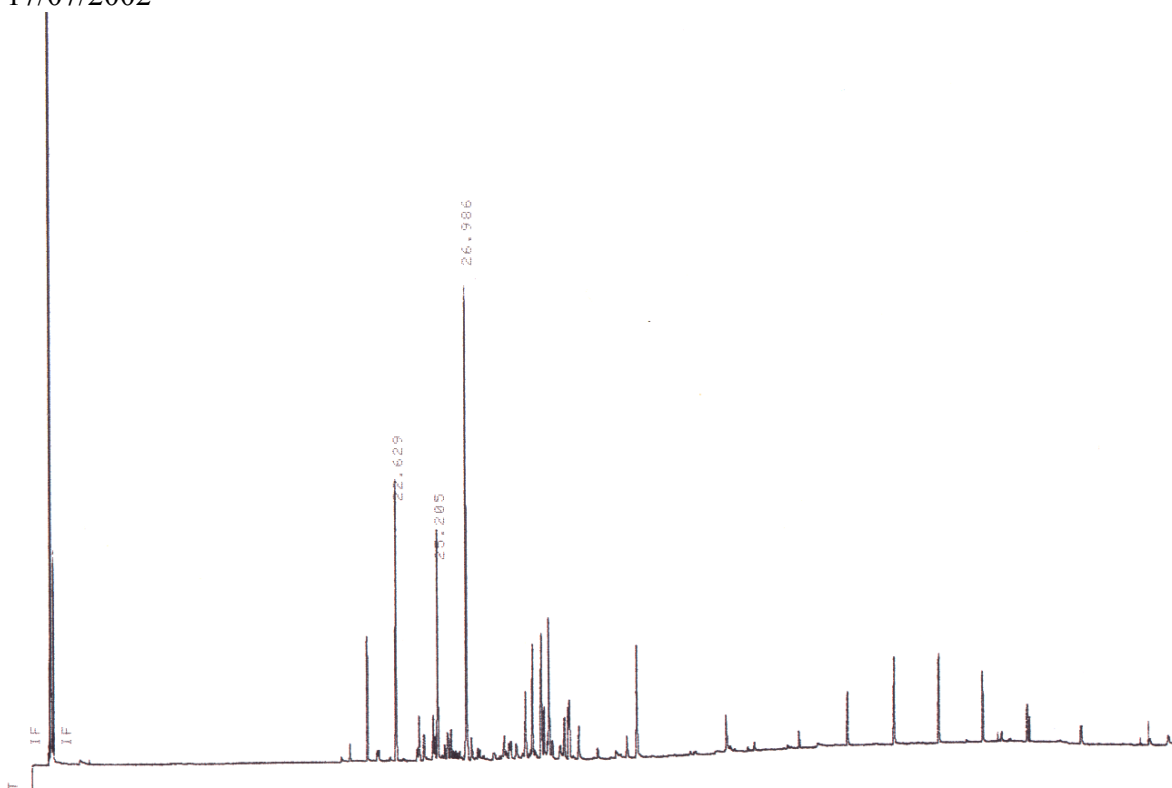


Figura 51: Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletada em 17/10/2002

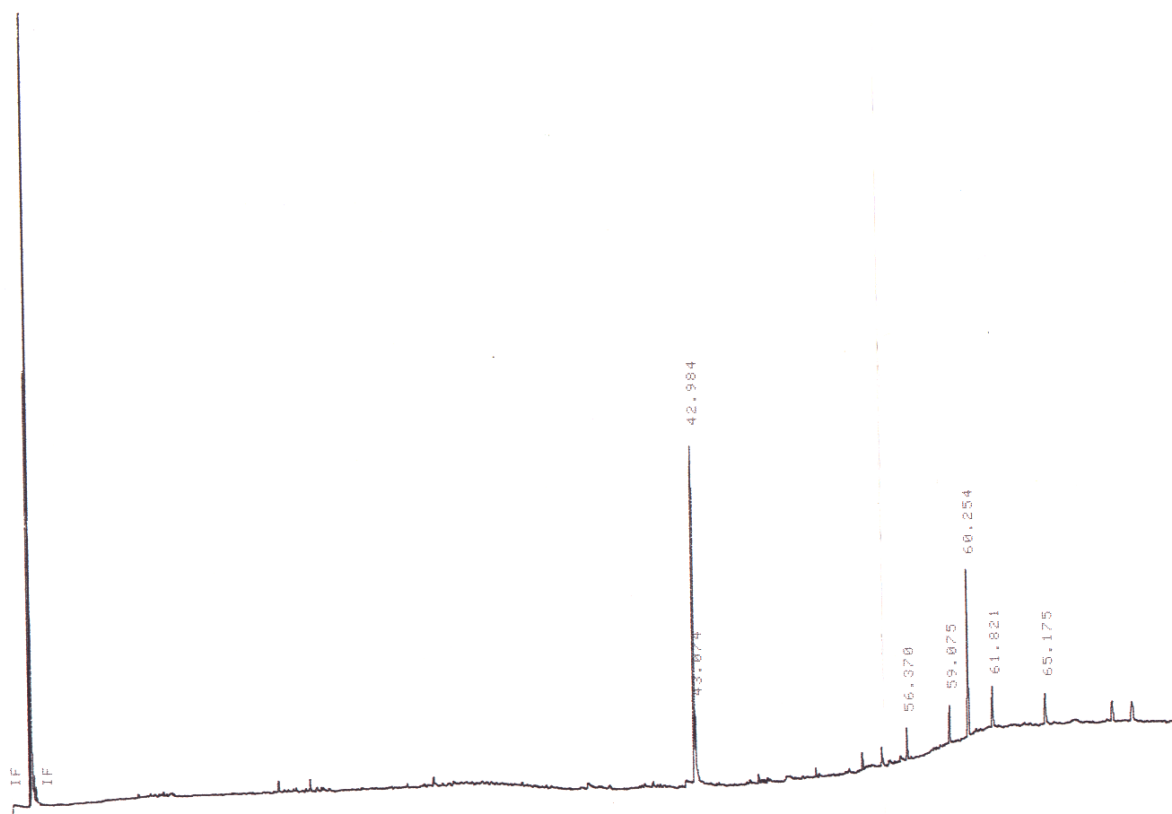


Figura 52: Cromatograma do diclorometano utilizado na coleta das amostras de óleos essenciais das folhas de *Myrcia rotundifolia* coletadas em 28/10/2001, 14/03/2002, 21/05/2002 e 17/10/2002

REFERÊNCIAS

ADAM, K.; ZAPP, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes, *Phytochemistry*, 48: (6), 953-959, **1998**.

ADAMS, R. P. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Pres Inc., San Diego, **1989**.

AKIHISA, T.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, T.; KIMURA, Y.; IIDA, T.; NAMBARA, T.; CHANG, F. C. Triterpenoid ketones from *Lingnania-Chungii* McClure - Arborinone, friedelin and glutinone, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40: (3) 789-791, **1992**.

AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; BESSA, W. de S.; BARNES, R. A.; KAPLAN, M. A. C.; WESSJOHANN, L. A. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: (6), 653-654, **2001**.

ANJANEYULU, A. S. R.; REDDY, A. V. R.; MALLAVARAPU, G. R.; CHANDRASEKHARA, r. s. 3-acetylmaslinic acid from the root bark of *Terminalia alata*, *Phytochemistry*, 25: (11), 2670-2671, **1986**.

BHAKUNI, R. S.; SHUKLA, Y. N.; TRIPATHI, A. K.; PRAJAPATI, V.; KUMAR, S. Insect growth inhibitor activity of arjunolic acid isolated from *Cornus capitata*, *Phytotherapy Research: PTR*, 16, Supplement 1, S68-S70, **2002**.

BALBACH, A. As plantas curam, 1^a ed., Itaquaquecetuba, EDEL, **1986**.

BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil, Vol. 2, 1^a ed., Viçosa, Universidade Federal de Viçosa – Imprensa Universitária, **1991**.

BROPHY, J. J.; FORSTER, P. I.; GOLDSACK, R. J.; HIBBERT, D. B. The essential oils of the yellow bloodwood eucalypts (*Corymbia*, section *Ochraria*, Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 26: (2), 239-249, **1998**.

BORG-KARLSON, A.; ENGLUND, F. O.; UNELIUS, C. R. Dimethyl oligosulphides, Major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*, *Phytochemistry*, 35: (2), 321-323, **1994**.

CANDY, H. A.; MCGARRY, E. J.; PEGEL, K. H. Constituents of *Syzygium cordatum*, *Phytochemistry*, 7: (5), 889-890, 1968.

CHAMINDA, T.; MUNASINGHE, J.; SENEVIRATNE, C. K.; THABREW, M. I.; ABEYSEKERA, A. M. Antiradical and antilipoperoxidative effects of some plant extracts used by sri lankan traditional medical practitioners for cardioprotection, *Phytotherapy Research*, 15: (6), 519-523, **2001**.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; de BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *Journal of Ethnopharmacology*, 79: (2), 213-220, **2002**.

COLLINS, D. J.; PILOTTI, C. A.; WALLIS, A. F. A. Triterpene acids from some Papua New Guinea *Terminalia* species, *Phytochemistry*, 31: (3), 881-884, **1992**.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants, Columbia University, New York, **1981**.

DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S. Essential oil variation in *Calypttranthes spruceana*, *Phytochemistry*, 23: (11), 2515-2516, **1984**.

D'AURIA, F. D.; LAINO, L.; STRIPPOLI, V.; TECCA, M.; SALVATORE, G.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G. In vitro activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi, *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, 13: (4), 377-383, **2001**.

DIALLO, B.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; TOKUDA, H. Studies on inhibitors of skin-tumor promotion. Inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation, *Journal of Natural Products*, 52: (4), 879-881, 1999.

DONEANU, C.; ANITESCU, G. Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, *The Journal of Supercritical Fluids*, 12: (1), 59-67, **1998**.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471, **1963**.

DUNLOP, P. J.; BIGNELL, C. M.; BROOKER, M. I. H.; BROPHY, J. J.; HIBBERT, D. B. Use of gas chromatograms of essential leaf oils to compare eight taxa of genus *Angophora* (Myrtaceae): possible relationships to the genus *Eucalyptus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: (8), 815-830, **1999**.

EGERTON-WARBURTON, L. M.; GHISALBERTI, E. L. Essential oil composition of *Chamelaucium uncinatum*, *Phytochemistry*, 40: (3), 837-839, **1995**.

EGERTON-WARBURTON, L. M.; GHISALBERTI, E. L.; CONSIDINE, J. A. Intraspecific variability in the volatile leaf oils of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 26: (8), 873-888, **1998**.

FACUNDO, V. A.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. H. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*, *Phytochemistry*, 32: (2), 411-415, **1993**.

FLYNN, T. M.; LASSAK, E. V.; SMYTH, M. P. The volatile leaf oils of three species of *Leptospermum*, *Phytochemistry*, 18: (12), 2030-2031, **1979**.

FRANICH, R. A. Essential oil composition of juvenile leaves from coppiced *Eucalyptus nitens*, *Phytochemistry*, 25: (1), 245-246, **1985**.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I. S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from

Syzigium claviflorum, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *Journal of Natural Products*, 57: (2), 243-247, **1994**.

FURUYA, T.; ORIHARA, Y.; HAYASHI, C. Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells, *Phytochemistry*, 26: (3), 715-719, **1987**.

GIAMAKIS, A.; KRETSI, O.; CHINOU, I.; SPYROPOULOS, C. G. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and α -pinene by in vitro cultures, *Phytochemistry*, 58: (2), 351-355, **2001**.

GOTTILIEB, O. R.; da SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species, *Phytochemistry*, 11: (3), 1185, **1972**.

GROS, E. G. Introduccion al estudio de los productos naturales, Washington DC, OEA, **1985**.

HÄBERLEIN, H.; TSCHIERSCH, K. On the occurrence of methylated and methoxylated flavonoids in *Leptospermum scoparium*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 26: (1), 97-103, **1998**.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity, *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40: (4), 535-543, **2002**.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIÈRE, J. M.; Essential oils from five southern brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae), *Journal of Essential Oil Research*, 9, 13-18, **1997**.

IRELAND, B. F.; HIBBERT, D. B.; GOLDSACK, R. J.; DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake, *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: (5), 457-470, **2002**.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from *Brazilian propolis*, *Journal of Natural Products*, 64: (10), 1278-1281, **2001**.

JAYASINGHE, G. L., WANNIGAMA, P.; MACLEOD, J. K. Triterpenoids from *Anamirta cocculus*, *Phytochemistry*, 34: (4), 1111-1116, **1993**.

JEDLICKOVÁ, Z.; MOTTL, O.; SERÝ, V. Antibacterial properties of the Vietnamese cajeput oil and ocimum oil in combination with antibacterial agents, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 36: (3), 303-309, **1992**.

JOLY, A. B. Introdução à taxonomia vegetal, São Paulo, CEN, **1966**.

JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E. B. – Verlang, Hamburg, **1998**.

KAJIMA, M.; PIRAUX, M. The biogenesis of cannabinoid in *Cannabis sativa*, *Phytochemistry*, 21, 67-69, **1982**.

KAUR, K.; ARORA, S.; KUMAR, S.; NAGPAL, A. Antimutagenic activities of acetone and methanol fractions of *Terminalia arjuna*, *Food and Chemical Toxicology*, 40: (10), 1475-1482, **2002**.

KING, F. E.; KING, T. J.; ROSS, J. M. The chemistry of extractives from hardwoods. Part XVIII. The constitution of arjunolic acid, a triterpene from *Terminalia arjuna*, *Journal of the Chemical Society*, 3995-4003, **1954**.

KOVATS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen .1. retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41: (7), 1915-1932, **1958**.

KUNDU, A. P.; MAHATO, S. B. Triterpenoids and their glycosides from *Terminalia chebula*, *Phytochemistry*, 32: (4), 999-1002, **1993**.

LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa, São Carlos, ACTA, **1993**.

LEE, C. Ursane triterpenoids from leaves of *Melaleuca leucadendron*, *Phytochemistry*, 49: (4), 1119-1122, **1998**.

LEE, L. S.; BROOKS, L. O.; HOMER, L. E.; ROSSETTO, M.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R. Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: (4), 343-360, **2002**.

LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.; YEN, K.; HATANO, T.; YOSHIDA, Y.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*, *Phytochemistry*, 44: (7), 1343-1349, **1997**.

LI, H.; MADDEN, J. L.; POTTS, B. M. Variation in Volatile Leaf Oils of the Tasmanian *Eucalyptus* Species II. Subgenus *Symphyomyrtus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 24: (6), 547-569, **1996**.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. L.; DEANS, S. G. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka* and *Kunzea ericoides* or *Kanuka*), originating in Australia and New Zealand, *Phytotherapy Research: PTR*, 14: (8), 623-629, **2000**.

LOW, D.; RAWAL, B. D.; GRIFFIN, W. J.; Antibacterial action of the essential oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of oil of *Eucalyptus citriodora*, *Planta Medica*, 26: (2), 184-185, **1974**.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Mikonia albiscanstriana* através de análise por microcomputador, *Química Nova*, 13: (4), 260-262, **1990**.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. Review article number 98, ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features, *Phytochemistry*, 37: (6), 1517-95, **1994**.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Review article number 18: advances in terpenoid research, 1990-1994, *Phytochemistry*, 44: (7), 1185-1236, **1997**.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV and V, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 50: (3), 429-431, **2002**.

MAYER, R. Flavonoids from *Leptospermum scoparium*, *Phytochemistry*, 29: (4), 1340-1342, **1990**.

MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; NTALANI, H.; VERIN, P.; HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. Two chromene derivatives from *Calyptanthes tricona*, *Phytochemistry*, 53: (8), 975-979, **2000**.

MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; SAMATE, A. D.; MILLOGO-RASOLODIMBY; NACRO, M. Apodophyllone and isotorquatone, two arenic ketones from *Eucalyptus apodophylla*, *Phytochemistry*, 51: (8), 975-978, **1999**.

NEWMAN, A. A. Chemistry of terpenes and terpenoids, Academic Press, New York, USA, **1972**.

OJINAKA, C. M.; OKOGUN, J. I.; AND OKORIE, D. A. Myrianthic acid: a triterpene acid from the rootwood of *Myrianthus arboreus*, *Phytochemistry*, 23: (5), 1125-1127, **1984**.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C , *Química Nova*, 13: (4), 278-281, **1990**.

PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats, *Diabetes Research (Edinburgh, Lothian)*, 22: (2), 49-57, **1993**.

PERRY, N. B.; BRENNAN, N. B.; van KLINK, J. W.; HARRIS, W.; DOUGLAS, M. H.; McGIMPSEY, J. A.; SMALLFIELD, B. M.; ANDERSON, R. E. Essential oils from New Zealand manuka and kanuka: chemotaxonomy of *Leptospermum*, *Phytochemistry*, 44: (8), 1485-1494, **1997a**.

PERRY, N. B.; van KLINK, J. W.; BRENNAN, N. J.; HARRIS, W.; ANDERSON, R. E.; DOUGLAS, M. H.; SMALLFIELD, B. M. Essential oils from New Zealand manuka and kanuka: chemotaxonomy of *Kunzea*, *Phytochemistry*, 45: (8), 1605-1612, **1997b**.

PORTER, N. G.; WILKINS, A. L. Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*, *Phytochemistry*, 50: (3), 407-415, **1998**.

POURGHOLAMI, M. H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOUB, S.; SAYYAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 64: (2), 167-171, **1999**.

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, A. A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert), *Journal of Supercritical Fluids*, 21: (3), 245–256, **2001**.

RAMANOELINA, A. R.; TERROM, G. P.; BIANCHINI, J. P.; COULANGES, P. Antibacterial action of essential oils extracted from Madagascar plants, *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 53: (1), 217-226, **1987**.

RAO, J. R.; RAO, R. S. Syzalterin, a new 6,8-di-C-methylflavone from *Syzygium alternifolium* leaves, *Indian Journal of Chemistry*, 30B, 60-67, **1991**.

REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S.; LEON, I. Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products, *Tetrahedron*, 42: (13), 3419-3428, **1986**.

RESENDE, M. L. V.; FLOOD, J.; RAMSDEN, J. D.; ROWAN, M. G.; BEALE, M. H.; COOPER, R. M. Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cocoa*L.) to *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae*Kleb.), *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48: (5), 347-359, **1996**.

RIBEIRO, J. E. L. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; de BRITO, J. M.; de SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. da C.; da SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke – Guia de

identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra – firme na Amazônia Central, Manaus, INPA, **1999**.

ROW, L. R.; RAO, G. S. R. S. Chemistry of *terminalia* species—VI; The constitution of tomentosic acid, a new triterpene carboxylic acid from *Terminalia tomentosa* Wight et Arn, *Tetrahedron*, 18: (7), 827-838, **1962**.

RUO, T.; CHEN, H. K. P. C.; HSÜ, H. Y. Terpenoids from *Elaeagnus oldahmi*, *Phytochemistry*, 15: (2), 335, **1976**.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial effects of the bark of *Terminalia arjuna*: Justification of folklore beliefs, *Pharmaceutical Biology* , 39 (6): 417-420 **2001**.

SANTOS, G. G.; ALVES, J. C. N.; RODILLA, J. M. L.; DUARTE, A., P.; LITHGOW, A . M.; URONES, J. G. Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*, *Phytochemistry*, 44: (7), 1309-1312, **1997**.

SARKER, S. D.; BARTHOLOMEW, B.; NASH, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. Sideroxylin and 8-demethylsideroxylin from *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: (7), 759-762, **2001**.

SCORA, R. W. Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis*, *Phytochemistry*, 12: (1), Pages 153-155, **1973**.

SEIGLER, D. S. Plant secondary metabolism, Kluwer Academic Publishers, Norrwell, USA, **1988**.

SHAW, G. J.; ALLEN, J. M.; YATES, M. K. Volatile flavour constituents in the skin oil from *Feijoa sellowiana*, *Phytochemistry*, 28: (5), 1529-1530, **1989**.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S.; MAHMOOD, T. Tetracyclic triterpenoids and their derivatives from *Azadirachta indica*, *Journal of Natural Products*, 51: (1), 30-43, **1988**.

SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, I.; BEGUM, S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* leaves, *Phytochemistry*, 54: (8), 861-865, **2000**.

SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMOND, B.; FILLIATRE, C.; BOURGEOIS, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis, *Industrial Crops and Products*, 6: (1), 27-33, **1997**.

SINGH, B.; DUBEY, M. M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. in vivo and in vitro. I. Antimicrobial screening, *Phytotherapy Research: PTR*, 15: (3), 231-234, 2001.

SLOWING, K.; SÖLLHUBER, M.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*, *Phytochemistry*, 37: (1), 255-258, **1994**.

SMITH, R. M.; SIWATIBAU, S. Sesquiterpene hydrocarbons of fijian guavas, *Phytochemistry*, 14: (9), 2013-2015, **1975**.

SOLZZANI, P.; DISILVESTRO, G. New assignment of C-13 NMR-spectrum of squalene, *Gazzetta Chimica Italiana*, 118: (5), 385-389, **1988**.

SOVOVÁ, H.; KOMERS, R.; KUERA, J.; JE, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil, *Chemical Engineering Science*, 49: (15), 2499-2505, **1994**.

SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K.; KULSHRESHTHA, D., K.; Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*, *Phytochemistry*, 38: (3), 687-689, **1995**.

SUMITRA, M.; MANIKANDAN, P.; KUMAR, D. A.; ARUTSELVAN, N.; BALAKRISHNA, K.; MANOHAR, B. M.; PUVANAKRISHNAN, R. Experimental myocardial necrosis in rats: role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation and antioxidant status, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 224: (1-2), 135-142, **2001**.

TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; KOUNO, I. Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*, *Phytochemistry*, 43: (6), 1345-1348, **1996**.

YANG, L.; LEE, C.; YEN, K. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells, *Cancer Letters*, 157: (1), 65-75, **2000**.

YOSHIDA, T.; MARUYAMA, T.; NITTA, T. O. An hydrolysable tannin and accompanying polyphenols from *Melaleuca leucadendron*, *Phytochemistry*, 42: (4), 1171-1173, **1996**.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; L. I., Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46: (1), 113-119, **1998**.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIZUMI, S.; MATSUMURA, N.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; HORI, K.; YAMAHARA, J. Medicinal foodstuffs .7. On the saponin constituents with glucose and alcohol absorption-inhibitory activity from a food garnish "Tonburi", the fruit of Japanese *Kochia scoparia* (L) SCHRAD: Structures of scoparianosides A, B, and C, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45: (8) 1300-1305, **1997**.

WANG, H.; FUGIMOTO, Y. Triterpene esters from *Eucalyptus tereticornis*, *Phytochemistry*, 33: (1), 151-153, **1993**.

WESTON, R. J. Composition of essential oil from leaves of *Eucalyptus delegatensis*, *Phytochemistry*, 23: (9), 1943-1945, **1984**.

WILSON, C. W.; SHAW, P. E. Terpene hydrocarbons from *Psidium guajava*, *Phytochemistry*, 17: (8), 1435-1436, **1978**.

WOLLENWEBER, E.; WEHDE, R.; DÖRR, M.; LANG, G.; STEVENS, J. F. C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae, *Phytochemistry*, 55: (8), 965-970, **2000**.

WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A. Identification of C-24 epimers of marine sterols by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Canadian Journal of Chemistry*, 56, 1898, **1978**.