



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA CERA
EPICUTICULAR DO TOMATE POR RMN**

CECÍLIA AMARAL BOTELHO

Florianópolis
Junho/2018

Cecília Amaral Botelho

**DETERMINAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA CERA
EPICUTICULAR DO TOMATE POR RMN**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Miguel Soriano Balparda Caro

Florianópolis
Junho/2018

“You are never “not enough”,
you are always “so much more”.

- L. Leyaki

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe que me acompanhou em grande parte desta jornada e agora me guia e ampara sempre; ao meu pai e minha irmã, pela força, estabilidade e carinho, ter vocês é um privilégio.

Ao meu orientador, Miguel Caro, pela paciência, dedicação, apoio e compreensão dado neste momento tão delicado do curso.

A Cnpq, capes, UFSC e departamento de química, juntamente com todos os funcionários, professores e alunos, que contribuíram de alguma forma com sua disponibilidade ou conhecimentos para este trabalho ser completo.

A minha melhor amiga, Emanuelle, que mesmo distante fisicamente, esteve mais perto que nunca, amadurecendo comigo e me apoiando sempre que necessário.

A minha namorada, Janaina, que me motivou sempre, e nunca poupou elogios que me deixaram sempre positiva e confiante.

Aos meus amigos, que estiveram do meu lado tanto nos bons quanto nos maus momentos desta jornada, em especial; Mariana e Steffany, que me acompanham desde o começo do curso; Edilon, que foi presente não só como chefe mas como amigo e confiante, sendo essencial nas escolhas que me trouxeram até aqui; Carolina, pelos desabafos e conselhos, Diogo, Gelso e todos do quimidex e monitoria, que dividiram suas tardes e manhãs comigo desta longa jornada.

Enfim, um agradecimento a todos que cruzaram meu caminho nestes anos, e deixaram pensamentos positivos e mensagens de apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	14
2.1.1 Espectrômetro de RMN.....	14
2.1.2 Deslocamento químico.....	15
2.2 O Tomate.....	16
2.3 Cera Epicuticular.....	17
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objeto Geral.....	22
3.2 Objetivo Específicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Amostras e Reagentes.....	22
4.1.1 Procedência das amostras de tomate.....	22
4.1.2 Escolha do solvente para extração da cera epicuticular.....	22
4.2 Instrumentação.....	23
4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	23
4.3 Método de extração.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1. Escolha do solvente.....	23
5.2. Variação da cera epicuticular com amadurecimento.....	27
5.2.1. Análise dos espectros de RMN ¹ H.....	27
5.2.2. Análise dos espectros de RMN ¹³ C.....	29
5.2.3. Excedentes da extração.....	31
5.3. Determinação da constituição química da cera epicuticular do tomate.....	32
5.3.1. Alcanos.....	32
5.3.2. Triterpenóides.....	35
5.3.3 Naringenina Chalcona.....	38

6. CONCLUSÃO.....43

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44

8. APÊNDICE.....48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de um espectrômetro de RMN.....	15
Figura 2. Registro da experiência de Arnold, em 1951 que mostra os sinais de ressonância magnética dos núcleos ^1H do álcool etílico.....	15
Figura 3. Montagem esquemática de uma seção transversal da cutícula da planta. A membrana cuticular é composta da matriz cutânea e ceras cuticulares, sobrepondo a parede celular de células epidérmicas. Na camada mais externa, está a cera epicuticular.....	17
Figura 4. Espectro de RMN de ^1H 400 MHz da espécie <i>Cordia monosperma</i> em CDCl_3	19
Figura 5. Derivados do ácido linoleico encontrados em ceras epicuticulares de diferentes folhas.....	20
Figura 6. Principais monômeros cutâneos de C18 e C16 encontrados em determinações de ceras epicuticulares.....	21
Figura 7. Espectros parciais referentes (a) RMN de ^1H com clorofórmio (b) RMN de ^{13}C com clorofórmio.....	24
Figura 8. Espectros referentes a escolha de solvente: (a) RMN de ^1H com acetona (b) RMN de ^{13}C com acetona.....	25
Figura 9. Estrutura química do Licopeno.....	26
Figura 10. Espectros referentes a diferentes estados de amadurecimento: (a) RMN de ^1H em acetona de amostras de tomate verde (b) RMN de ^1H em acetona de amostras de tomate maduro.....	27

Figura 11. Espectros referentes a diferentes estados de amadurecimento: (a) RMN de ^{13}C em acetona de amostras de tomate verde (b) RMN de ^{13}C em acetona de amostras de tomate maduro.....	30
Figura 12. Espectro de ^1H com a sobra de cera em metanol.....;	31
Figura 13. Estrutura do n-hentriacontano.....	33
Figura 14. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes ao n-hentriacontano.....	34
Figura 15. Estrutura química da Amirina.....	35
Figura 16. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes a β -amirina.....	37
Figura 17. Estrutura química da Naringenina chalcona.....	38
Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C teórico do composto Naringenina Chalcona em metanol- d_4	39
Figura 19. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes a Naringenina Chalcona.....	40
Figura 20. Espectro de RMN de 2D COSY da amostra de tomate maduro em Acetona- d_6	41
Figura 21. Espectro parcial de RMN de 2D HSQC do tomate maduro em Acetona- d_6	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinal característico dos solventes utilizados.....	24
Tabela 2. Valores de deslocamentos ^{13}C referentes ao licopeno.....	26
Tabela 3. Valores estimados de hidrogênios presentes na cera do fruto verde e maduro.....	28
Tabela 4. Comparação de deslocamentos químicos do composto n-hentriacontano.....	33
Tabela 5. Deslocamentos químicos típicos de alcanos de cadeia longa no RMN ^1H	34
Tabela 6. Deslocamentos químicos típicos de alcanos de cadeia longa no RMN ^{13}C	35
Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^{13}C da amirina.....	36
Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos da literatura e experimental da Naringenina Chalcona em RMN ^{13}C	39
Tabela 9. Deslocamentos químicos retirados do RMN 2D HSQC que relacionam hidrogênios e carbonos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

^1H – Próton (hidrogênio simples)

^{13}C – Carbono-13

δ - Deslocamento Químico (ppm)

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization by transfer

COSY – Espectroscopia correlacionada (homo e heteronuclear)

DOSY – Diffusion-Ordered Spectroscopy

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

ppm – Partes por milhão

2D – Duas dimensões

J – Constante de acoplamento

RESUMO

Neste trabalho, foi realizada uma detalhada análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono a 400 MHz e 100 MHz (RMN ^1H e ^{13}C), para estabelecer a composição química da cera existente na superfície do fruto tomate (*Solanum lycopersicum*).

Esta cera é consumida diariamente com as peles de legumes e frutas, mas apenas pouco é conhecido em detalhes sobre a composição química. Possuem diversas funções, como por exemplos reduzir perda de água, melhorar as condições para trocas gasosas e fotossíntese, proteger contra ataques de insetos, proteger os frutos de poluentes, entre outros.

O tomate é um dos frutos mais consumidos nas casas brasileiras, de diferentes formas, porém é um fruto muito susceptível a inúmeras pragas. A determinação da constituição da sua cera epicuticular é de grande utilidade no desenvolvimento de pesticidas para combater essas pragas.

A cera foi extraída com os solventes clorofórmio e acetona, visando determinar o que extraísse em maior quantidade nossa cera. Após a evaporação do solvente, as amostras foram dissolvidas em solventes deuterados. A complexidade dos espectros de RMN ^1H E ^{13}C reflete a variedade de constituintes deste tipo de cera.

Os resultados deste estudo permitem concluir que os compostos majoritários presentes na cera são a Naringenina Chalcona, β -amirina, n-hentriacontano (ou uma mistura de alcanos) e mais compostos minoritários.

Palavras-chave: tomate, cera epicuticular, RMN.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de revestimento das plantas as protege de diferentes formas, apresentando adaptações dependendo do ambiente em que as plantas vivem. A epiderme, camada mais superficial das plantas, apresenta vários tipos de células com diferentes funções. Na parede das células epidérmicas há uma camada cuticular fina, que pode apresentar estriamentos, mascarados porém por uma cobertura cerosa. Essa cobertura pode ser visualizada facilmente em alguns frutos como ameixas e maçãs ou em folhagens com uma aparência de verniz, como o repolho. Apesar de não tão visíveis, várias outras plantas contêm essa cobertura encerada que pode funcionar para auxiliar a redução da perda de água entre outras funções específicas.¹

Essas coberturas cerosas são as ceras epicuticulares, substâncias de caráter lipídico cuja na composição química compreende diferentes funções orgânicas. Essas ceras têm atraído atenção devido ao feito dos seus componentes contribuírem na conservação das frutas e folhas.

A cera adquire formas cristalinas ou também pode estar presente em camada derretida, algumas espécies também apresentam seus estômatos, que são sua comunicação do meio interno pra atmosfera, cobertos pelas ceras.²

As ceras variam a composição de espécie para espécie, principalmente pelas adaptações do meio que são cultivadas, como variações de temperatura, ataque de patógenos e herbívoros, estresse hídrico, entre outros.

O tomate é um fruto consumido quase diariamente pela população brasileira, seja na forma do produto fresco como em saladas, ou na forma industrializada como em molhos de tomate. Foi escolhido especificamente o tomate, por ser um fruto muito susceptível a diversas pragas, como broca-pequena, traça, ácaros, mosca-branca, tripes, pulgões, entre outras.³

A determinação da constituição química da cera epicuticular, além da possibilidade de uso comercial, se extraída em quantidade suficiente, é de grande importância também para a formulação de pesticidas, pois a cera epicuticular é a principal via de absorção dos mesmos, o que torna o conhecimento da sua constituição fundamental nos estudos de absorção desses compostos.

A técnica a ser utilizada neste estudo é a espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C que pode oferecer informações sobre a composição qualitativa e quantitativa dos constituintes das ceras em estudo.⁴

As técnicas de ressonância magnética nuclear se baseiam na absorção seletiva de ondas de rádio por amostras colocadas em um campo magnético. Quando a amostra é excitada, regressa ao estado inicial emitindo energia radiante no domínio das radiofrequências. A determinação precisa dos valores destas radiofrequências específicas emitidas e da velocidade com que a amostra regressa ao estado de partida, a relaxação, constituem a essência da informação que é possível obter sobre a estrutura molecular da amostra.⁵

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

2.1.1 Espectrômetro de RMN

Na década de 50, observou-se pela primeira vez o deslocamento químico, sinal que o RMN reflete sobre o núcleo da molécula analisada, avançando na área de determinação estrutural de moléculas. Quando as ondas de rádio frequência incidem na amostra, que tem isótopos com spin nuclear maior que zero, os de maior abundância são hidrogênio simples (^1H) e carbono-13 (^{13}C).

A espectroscopia de RMN é baseada na medida da absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência. A diferença encontrada na RMN às outras técnicas é que quem participa desse método são os núcleos dos átomos, ao contrário de ultravioleta, infravermelho e visível que utiliza os elétrons mais externos para suas análises.⁶

Quando a amostra é excitada, regressa ao estado inicial emitindo energia radiante no domínio das radiofrequências. A determinação precisa dos valores destas radiofrequências específicas emitidas e da velocidade com que a amostra regressa ao estado de partida (relaxação) constituem a essência da informação pormenorizada que é possível obter tanto sobre a estrutura molecular da amostra como sobre a dinâmica interna e global das respectivas moléculas.⁷

Atualmente, não há outra técnica analítica que em uma única análise seja capaz de fornecer informação qualitativa e quantitativa sem o uso de padrões externos, sem a aplicação de uma separação prévia dos diferentes compostos de uma amostra.

Alguns cuidados a serem tomados antes da análise, é em primeiro lugar, as amostras que serão analisadas, sejam elas misturas ou substâncias puras, devem ser completamente solúveis nos solventes deuterados a serem empregados. Caso este quesito não seja observado, a análise obtida apresentará um espectro de baixa qualidade, muitas vezes com sinais alargados, devido à presença de material insolúvel na amostra.⁸

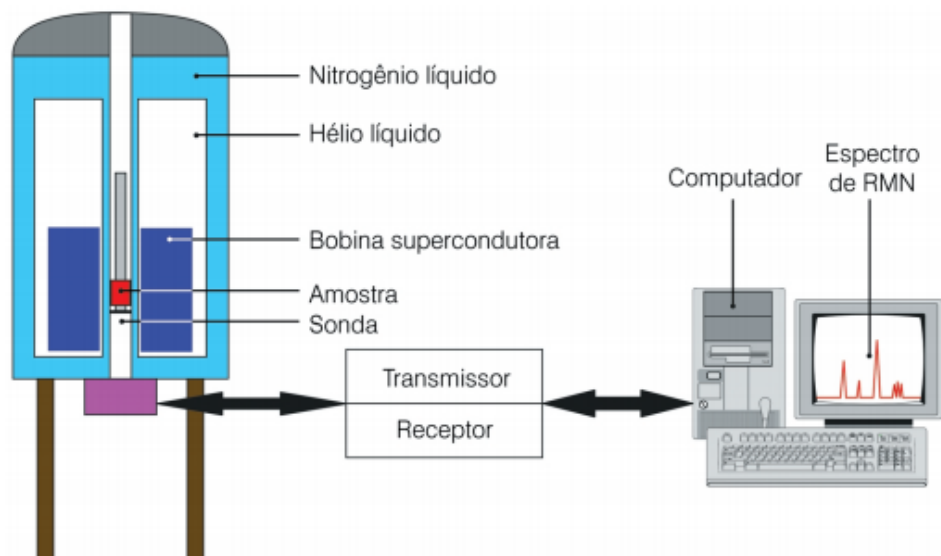


Figura 1. Diagrama de um espectrômetro de RMN.⁹

2.1.2 Deslocamento químico

Arnold Beckman e colaboradores, em 1951, substituíram uma amostra de água por etanol e registraram 3 linhas de ressonância no lugar de apenas uma, como normalmente era obtido com a água. Este fenômeno foi atribuído corretamente a estrutura molecular da substância, e é denominado deslocamento químico ou, em inglês, chemical shift. Os sinais observados com a substituição pelo etanol, apresentaram diferentes intensidades e frequências, correspondentes às diferentes quantidades de spins nucleares contidos nos grupos químicos existentes na molécula.

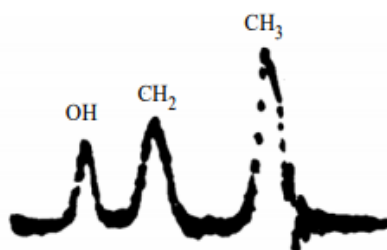


Figura 2. Registro da experiência de Arnold, em 1951 que mostra os sinais de ressonância magnética dos núcleos ^1H do álcool etílico.¹⁰

Cada sinal de RMN é caracterizado por um valor de deslocamento químico (δ) que é resultante do somatório do efeito do campo magnético aplicado e do local representada pela equação abaixo:

$$\delta = [(v - v^0) / v^0] \times 10^6,$$

Onde v é a frequência de ressonância do centro do grupo de linhas e v^0 é a frequência de ressonância de um padrão.¹¹

As intensidades dos sinais dependem do tempo de relaxação de cada núcleo (tempo necessário para a volta ao estado de equilíbrio após a absorção do pulso de radiofrequência). Sendo este tempo relativamente curto para núcleos de hidrogênio (1 a 3 s), a intensidade dos seus sinais pode ser relacionada com a concentração, sendo, portanto, espectros de hidrogênio integráveis. Para outros núcleos, por exemplo, ^{13}C , o processo de relaxação é mais lento, o que leva a espectros de rotina não integráveis.¹⁰

São considerados espectros de rotina os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e os da sequência DEPT que favoreceu informações de números de hidrogênios ligados a cada carbono. Adicionalmente podem ser usados na identificação de compostos orgânicos, espectros de RMN 2D como COSY (correlação H-H via acoplamento), HSQC (correlação ^{13}C e ^1H) e HMBC (acoplamentos de longa distância ^{3-4}J).⁴

2.2. O Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é a segunda hortaliça mais produzida no mundo, superada apenas pela batata, com participação efetiva na dieta humana. A origem do tomate foi registrada na América do sul, mais precisamente na Cordilheira dos andes, antes do século 16. A planta demorou pra ser difundida por que a princípio, acreditavam que era extremamente venenosa e considerada apenas enfeite nas plantações pelos seus belos frutos vermelhos.

Nos primeiros anos do século XIX, o tomate foi introduzido no Brasil, por imigrantes europeus e o aumento do seu consumo foi a partir da primeira guerra mundial.

De acordo com estudos, os tomates se desenvolvem melhor no clima fresco e seco e em clima tropical nas épocas mais frias do ano. Em função dessas limitações climáticas, tem maior susceptibilidade ao ataque de doenças e pragas. O período de cultivo tem dependência das condições climáticas, da fertilidade do solo, do ataque de pragas, da época do plantio e intensidade de irrigação.

Sua produção e cultivo se estendem em todas as regiões do Brasil, onde na safra de 2016 de Santa Catarina obteve-se um total de produção de 3.667.121 de toneladas segundo dados do IBGE.¹²

Por todas essas características específicas tanto de clima quanto de ambiente, que o tomate é um fruto no qual estimamos uma quantidade considerável de cera presente, onde é possível prever também em sua aparência cerosa e brilhosa.¹³

2.3. Ceras epicuticulares

As ceras epicuticulares formam a fração da cutícula, que é o revestimento presente na superfície dos tecidos vegetais. Em comparação com a cutícula, os tecidos de revestimento das raízes e caules são muito mais espessos, fazendo com que, seja muito mais fácil a extração dos compostos na cutícula.¹⁴

A cutícula está presente em todos os órgãos com crescimento primário, estando ausente nas raízes e em órgãos com crescimento secundário. Ela desempenha um importante papel na fisiologia e ecologia das plantas, sendo a principal interface entre as células epidérmicas e a atmosfera.¹⁵

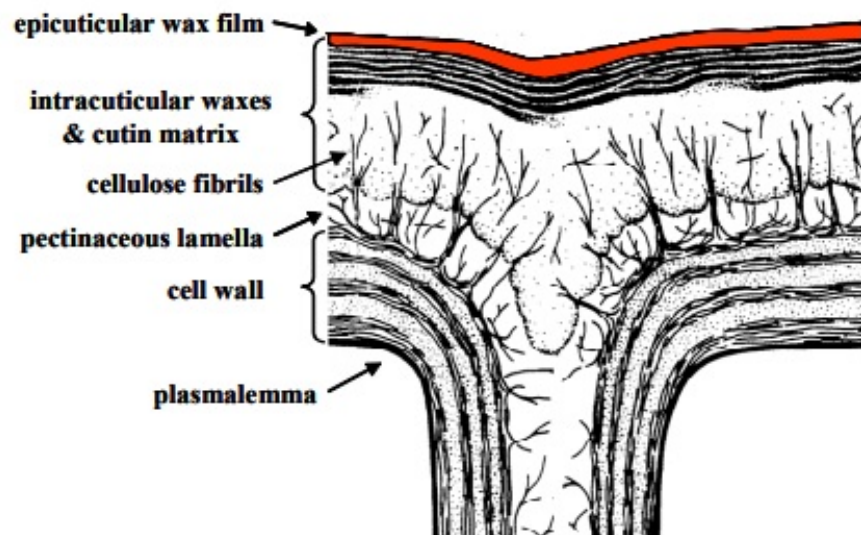


Figura 3. Montagem esquemática de uma seção transversal da cutícula da planta. A membrana cuticular é composta da matriz cutânea e ceras cuticulares, sobrepondo a parede celular de células epidérmicas. Na camada mais externa, está a cera epicuticular.¹⁶

Essas ceras que dá a aparência aveludada de alguns frutos e folhas, quando observamos por microscópio eletrônico, vemos a cera formar muitas dobras e projeções. São constituídas de um filme de cera amorfa, estruturas cristalinas de diferentes formas. As estruturas mais frequentes encontradas são placas, lamelas, túbulos, bastonetes, filamentos, grânulos de forma determinada ou não. Apesar da morfologia das ceras ser controlada geneticamente, a quantidade e a distribuição podem ser modificadas pelas condições ambientais de onde a planta cresce, como por exemplo, altitude.¹⁷

A formação da cera começa no estágio inicial de desenvolvimento do fruto e persiste até o final. Se a cera for retirada, por um método que não mate a planta ou tire o fruto da sua raiz plantada, ela se forma novamente.

A cera é encontrada normalmente na camada mais externa dos frutos ou folhas, porém existem casos onde podem ser encontradas em estruturas internas, como as vesículas de suco de frutas cítricas, onde é importante na adesão e integridade do segmento do fruto. Também podemos encontrar no lado interno de partes modificadas de folhas presentes na espécie *Nepenthes*, uma planta carnívora, na forma de uma camada de escamas sobrepostas que aderem às patas de insetos que tentarem escalá-las.¹⁸

Esta cera, de origem vegetal, se produzida numa quantidade suficiente, pode ter utilidade comercial, um exemplo muito popular é a cera de carnaúba, utilizada como lustrador de moveis, retirada de folhas de palmeira da espécie *Copernicia cerifera*, uma das ceras mais duras conhecidas. Outra grande importância dessas ceras, são para a indústria de pesticidas, pois a cera epicuticular é a principal via de absorção destes compostos. Conhecendo a constituição química da cera, é possível desenvolver um pesticida no qual não contamine o fruto e fique apenas na sua superfície.¹⁹

Outro exemplo muito comum encontrado na literatura, é o estudo com a cera de cana-de-açúcar. A cera de cana tem despertado grande interesse, tanto pela aplicação industrial, como pela composição química.²⁰ Por apresentar em sua composição álcoois alifáticos primários de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia longa, a cera de cana pode ser utilizada como matéria-prima pela indústria farmacêutica.²¹

Nas plantas, a síntese da cera acontece por processos de redução e carboxilação de lipídios simples, sendo convertidos para álcoois, ácidos e hidrocarbonetos de alto peso molecular. Estes processos são resultados das mudanças metabólicas que ocorrem,

diariamente, de acordo com a presença ou a ausência de luz, calor, períodos secos, chuvas abundantes, umidade e, principalmente, com a natureza de cada espécie.²²

Bondada et al (1996) investigou o estresse hídrico sobre a cera epicuticular do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e constatou um aumento significativo na cera encontrada nas folhas da planta. Além disso, a composição encontrada na cera sob stress hídrico foi majoritariamente alcanos de cadeia longa e curta, com um predomínio de cadeia longa.²³

Charles et al (2008) estudou o comportamento das ceras submetendo a tratamento com ultravioleta, constatou que a morfologia da cera da superfície do tomate é alterada em dois efeitos. Por um lado, aumentou a capacidade de resistir ao ataque de patógenos mas por outro, as camadas da cera alteradas podem afetar as características de luz refletida na superfície, mudando a aparência da fruta.²⁴

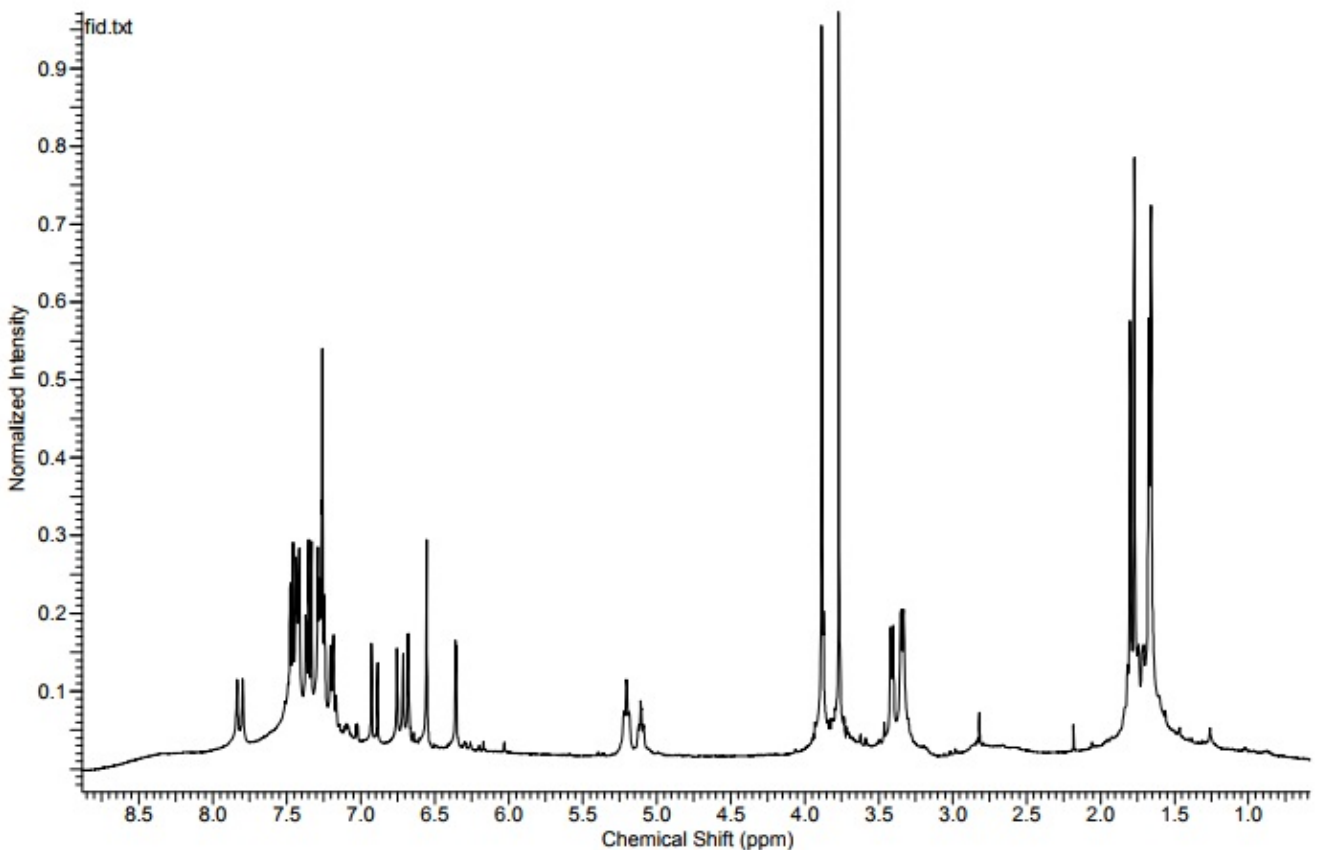


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H 400 MHz da espécie *Cordia monosperma* em CDCl_3 .²⁵

Estudos anteriores sobre determinação da composição química da cera epicuticular de outras espécies por RMN mostrou-se eficiente, determinando diferentes compostos orgânicos. Podemos analisar, por exemplo, o espectro de RMN de ^1H da folha da espécie *Cordia monosperma* na figura 4.

Analisando o espectro podemos identificar picos característicos de compostos aromáticos (6,5-8 ppm), éter e álcool (3,5-4,0 ppm) e alifáticos (1,5-2,0 ppm) de longa cadeia carbônica.

Em um estudo feito com várias espécies de folhas como *Dalbergia ecastaphyllum*, *Tithonia diversifolia*, *Trema micrantha*, entre outras, foram encontrados diferentes compostos, mostrando a variedade de composições existentes nas ceras epicuticulares. Na figura 5, também resultado da análise de ceras de folhas, foram encontrados epóxidos e hidróxidos derivados do ácido linoleico. Como observamos na figura 6, diversos monômeros de cadeia longa carbônica C18 e C16, apresentando ligação dupla, ligação -OH, entre outras.²⁵

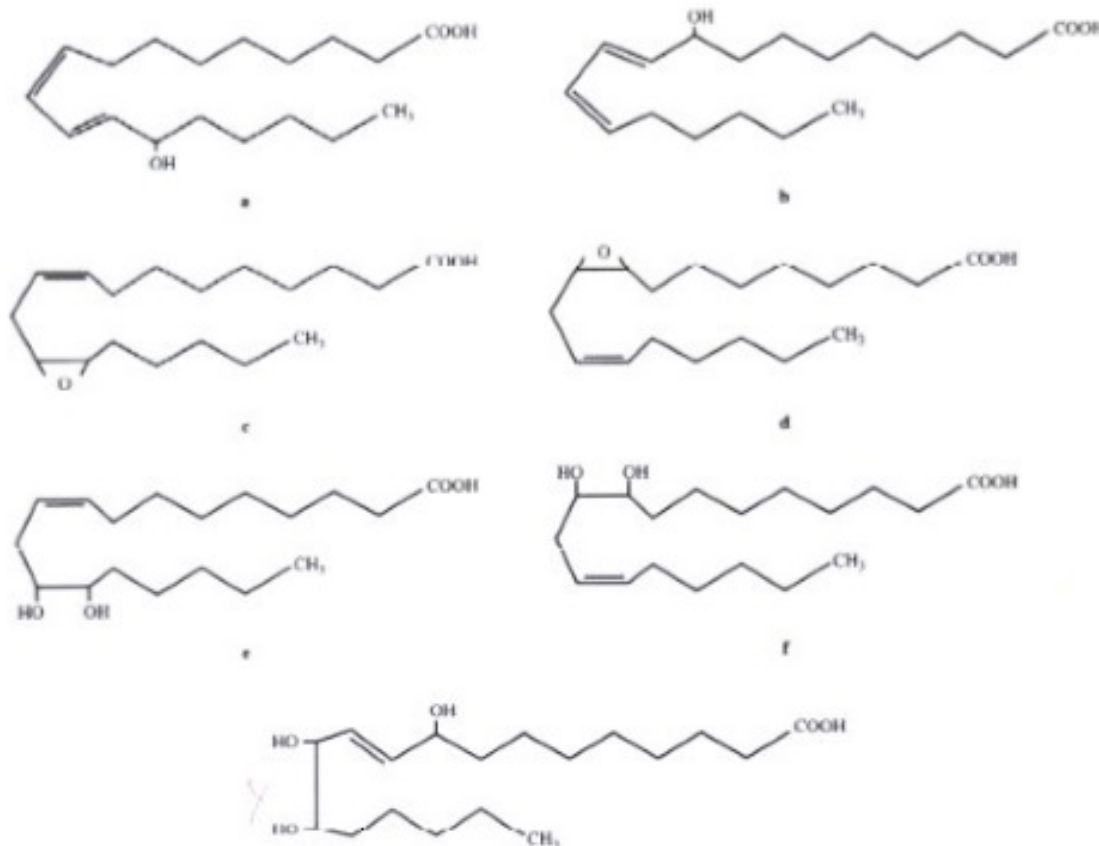
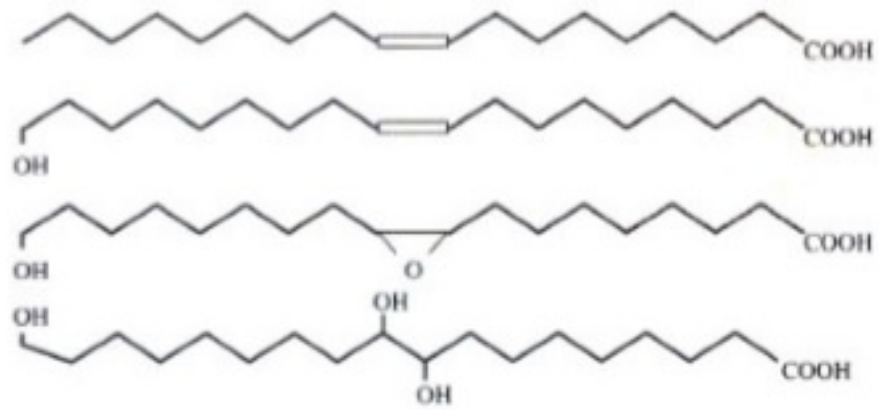


Figura 5. Derivados do ácido linoleico encontrados em ceras epicuticulares de diferentes folhas.²⁵

C18 Family



C16 Family

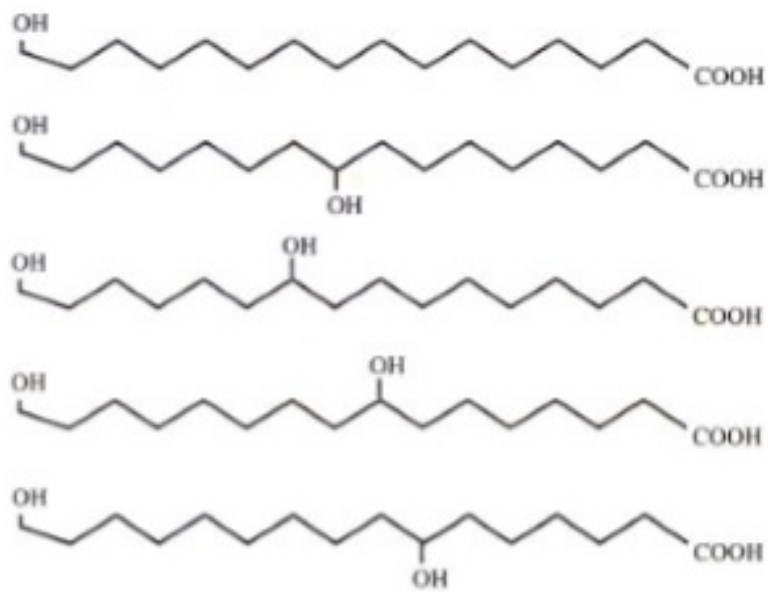


Figura 6. Principais monômeros cutâneos de C18 e C16 encontrados em determinações de ceras epicuticulares. ²⁵

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é analisar a composição química existente na cera epicuticular do tomate através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição das ceras epicuticulares do tomate.
- Comparar a possível variação da composição da cera epicuticular do fruto verde e maduro.

4. METODOLOGIA

Neste projeto será utilizada a técnica de RMN de ^1H e ^{13}C para a determinação da constituição química da cera epicuticular do tomate.

4.1 Amostras e Reagentes

4.1.1 Procedência das amostras de tomate

Para as análises, foram obtidas amostras de tomate em feiras orgânicas do comércio local de Florianópolis, com os cuidados de não haver rupturas em sua casca para não extrair nada além de sua cera epicuticular. Amostras de dois diferentes estados de amadurecimento serão analisadas.

4.1.2 Escolha do solvente para extração da cera epicuticular

Com o intuito de escolher o solvente mais adequado para as extrações, foi utilizado duas amostras de tomate do tipo Carmem, também conhecido como Longa vida, em estado de amadurecimento médio, o mais comum e mais vendido do Brasil, em dois solventes diferentes, sendo eles clorofórmio (Éxodo científica) e acetona (Vetec), ambas de padrão analítico. foi feito uma extração sólido líquido lavando várias vezes a casca do tomate para extrair sua cera. Após um procedimento de filtração, serão feita as análises em RMN ^1H e ^{13}C .

4.2 Instrumentação

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de identificação de produtos foram realizados através de medidas de ressonância magnética nuclear, RMN ^1H 400 Hz, RMN ^{13}C 100 Hz e espectros de RMN 2D COSY e HSQC, marca Bruker, disponibilizado pela Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros foram feitos em solventes deuterados de polaridade variável, dependendo do solvente de extração, tais como: CDCl_3 , acetona- D_6 e metanol- D_4 .

4.3 Método de extração

O método prévio escolhido foi a extração sólido líquido, onde com o solvente escolhido serão feitas cerca de 3 lavagens no tomate, para a retirada de toda a cera epicuticular, seguido da adição de sulfato de magnésio para secar a extração e filtração.

Após foi evaporado o solvente e feito um screening, ou seja, obter um perfil de RMN da cera obtida. Em uma segunda etapa, a fim de otimizar a separação de uma determinação mais precisa, foram feitas extrações de uma quantidade maior de amostra e refeitos os espectros com o solvente que demonstrar melhores resultados.

5. Resultados e discussão

5.1. Escolha do solvente

As extrações da cera foram efetuados inicialmente em acetona ($\mu = 2,88$ D) e clorofórmio ($\mu = 1,04$ D) utilizando-se a metodologia de Hamilton (1995)²⁶, com modificações, visando a escolha de um solvente adequado para retirar a maior quantidade de cera epicuticular da superfície do tomate.

Ferreira et al. 2005 obteve resultados satisfatórios utilizando clorofórmio como solvente em um estudo da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar¹⁸ enquanto Figueiredo et al. 2015 obteve melhores resultados utilizando acetona extraindo a cera epicuticular das folhas da espécie vegetal *Thalia geniculata*.²⁷ Ao utilizarmos o clorofórmio, os experimentos de RMN ^{13}C e ^1H observou-se a presença, além dos picos

correspondentes ao solvente utilizado (Tabela 1), poucos picos possivelmente referentes a aromáticos, não se comportando tão bem solvente para extrair nossa cera de interesse.

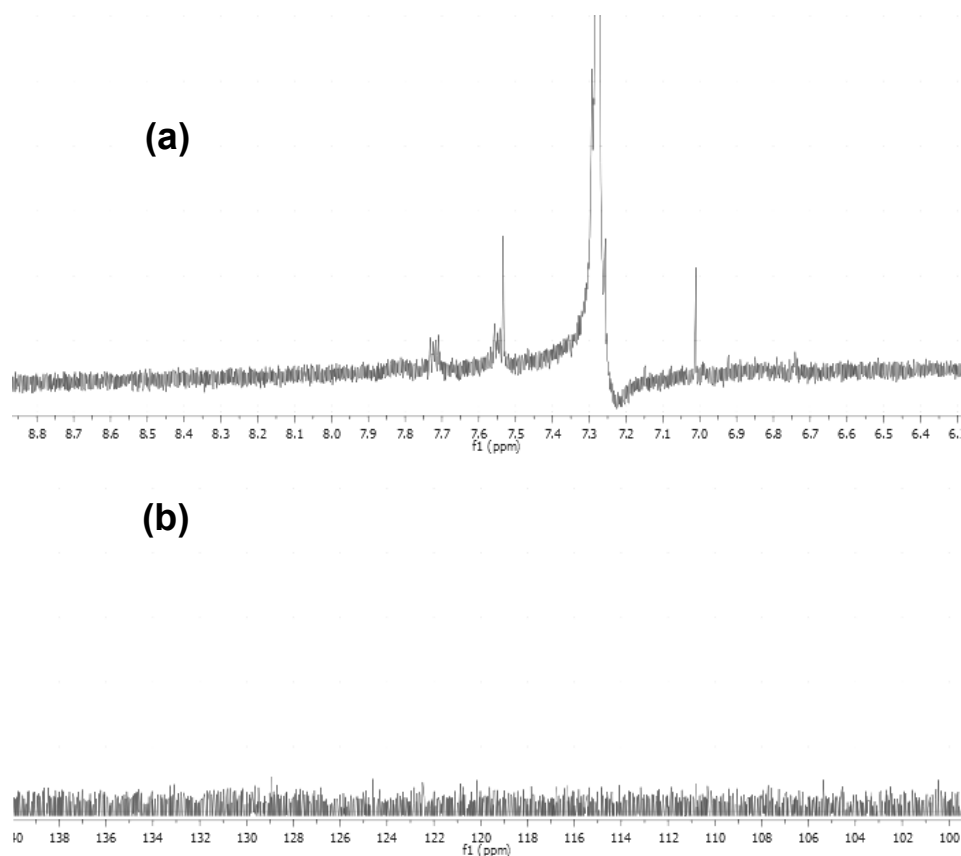


Figura 7. Espectros parciais referentes (a) RMN de ^1H com clorofórmio (b) RMN de ^{13}C com clorofórmio

Solvente	δ —Deslocamento Químico (ppm) RMN ^1H / multiplicidade	deslocamento Químico (ppm) RMN ^{13}C / multiplicidade
Acetona	2,050 - 5	206,260 – 1 30 - 7
Clorofórmio	7,260 - 1	77,160 - 3

Tabela 1. Sinal característico dos solventes utilizados. (MestReNova)

A extração da cera é realizada por imersão do fruto em solvente orgânico. É indicado o uso de um solvente com polaridade intermediária, que permite a extração de hidrocarbonetos extremamente hidrofóbicos e compostos polares com múltiplos grupos funcionais.²⁸

Em comparação com o Clorofórmio, a acetona apresentou mais picos de interesse, sendo o solvente escolhido para as próximas extrações para obtermos melhores resultados. No teste de solvente, foi realizado a extração com uma quantidade pequena de amostras de tomate (*Solanum lycopersicum*), 3 frutos para cada estudo, cerca de 360 gramas, o que explica um resultado dos picos majoritários serem os dos solventes estudados.

Em várias pesquisas, clorofórmio se mostrou o melhor solvente extrator para ceras epicuticulares, é possível que essa inversão de resultado esteja relacionada com a coleta e armazenamento dos frutos. Frutos desprotegidos dos raios solares após a coleta podem ter sofrido alguma alteração na composição química da cera epicuticular, como processos oxidativos.²⁹

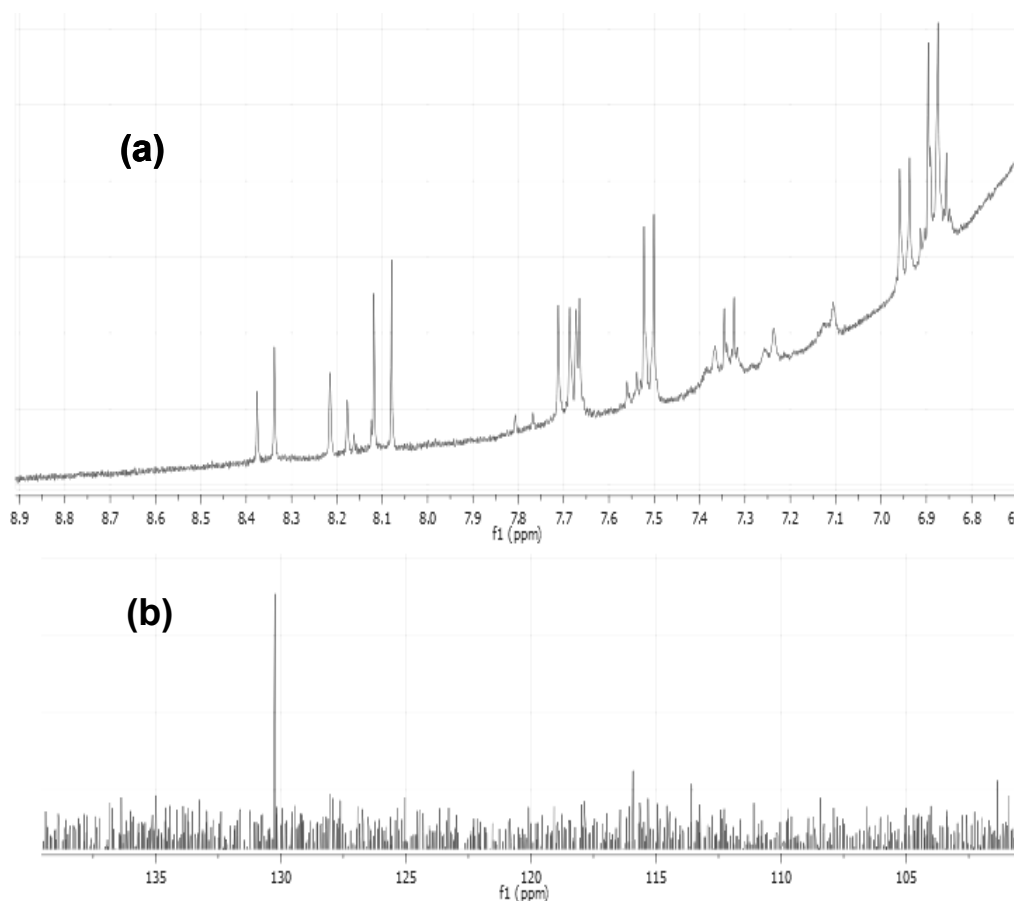


Figura 8. Espectros parciais referentes a escolha de solvente: (a) RMN de ^1H com acetona (b) RMN de ^{13}C com acetona.

Escolhido o solvente a ser utilizado, esperamos na pesquisa, determinar os componentes da cera de tomate, independente se forem compostos presentes em pequenas quantidades ou majoritariamente.

Podemos confirmar a eficacia da extração, comparando os deslocamentos dos espectros de ^{13}C retirados do site SpectraBase do licopeno, substância carotenóide que dá a cor avermelhada ao tomate, e analisarmos que diversos picos (120-140ppm) não estão presentes no nosso estudo experimental, logo, conseguimos extrair somente o material na superfície do nosso fruto.

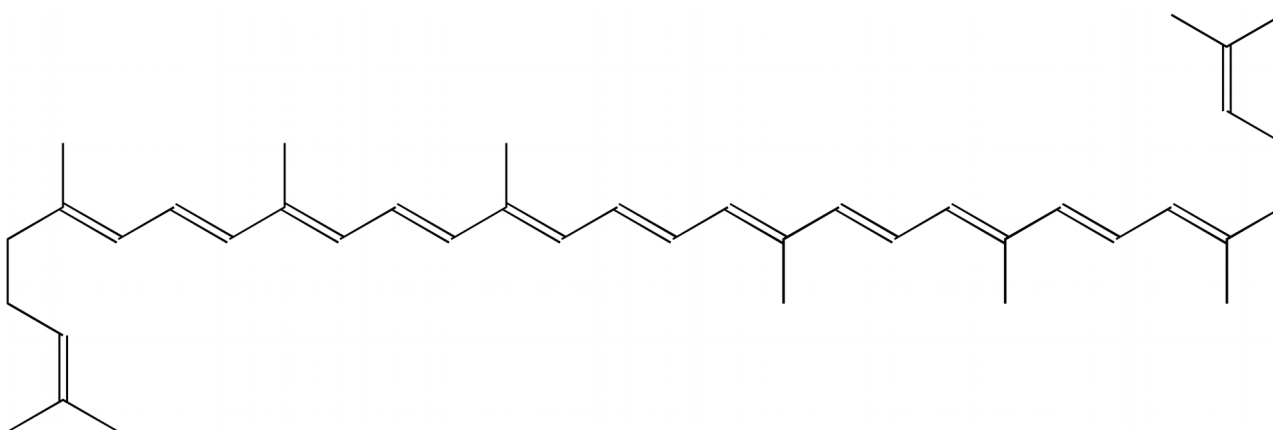


Figura 9. Estrutura química do Licopeno.
(Fonte: SpectraBase/2018)

Deslocamentos referentes ao Licopeno (^{13}C) - (ppm)	
139.3	124.9
137.5	124.1
136.5	40.3
136.1	26.8
135.5	25.6
132.7	17.8
130.2	17.0
125.9	12.9
125.2	12.8

Tabela 2. Valores de deslocamentos ^{13}C referentes ao licopeno em metanol-d4.
(fonte: SpectraBase/2018)

5.2. Variação da cera epicuticular com amadurecimento

5.2.1. Análise dos espectros de RMN ^1H

Com o solvente escolhido, a acetona, foi extraída a cera de 1,5 kg de amostras de tomates verdes e, a mesma quantidade, de tomates maduros.

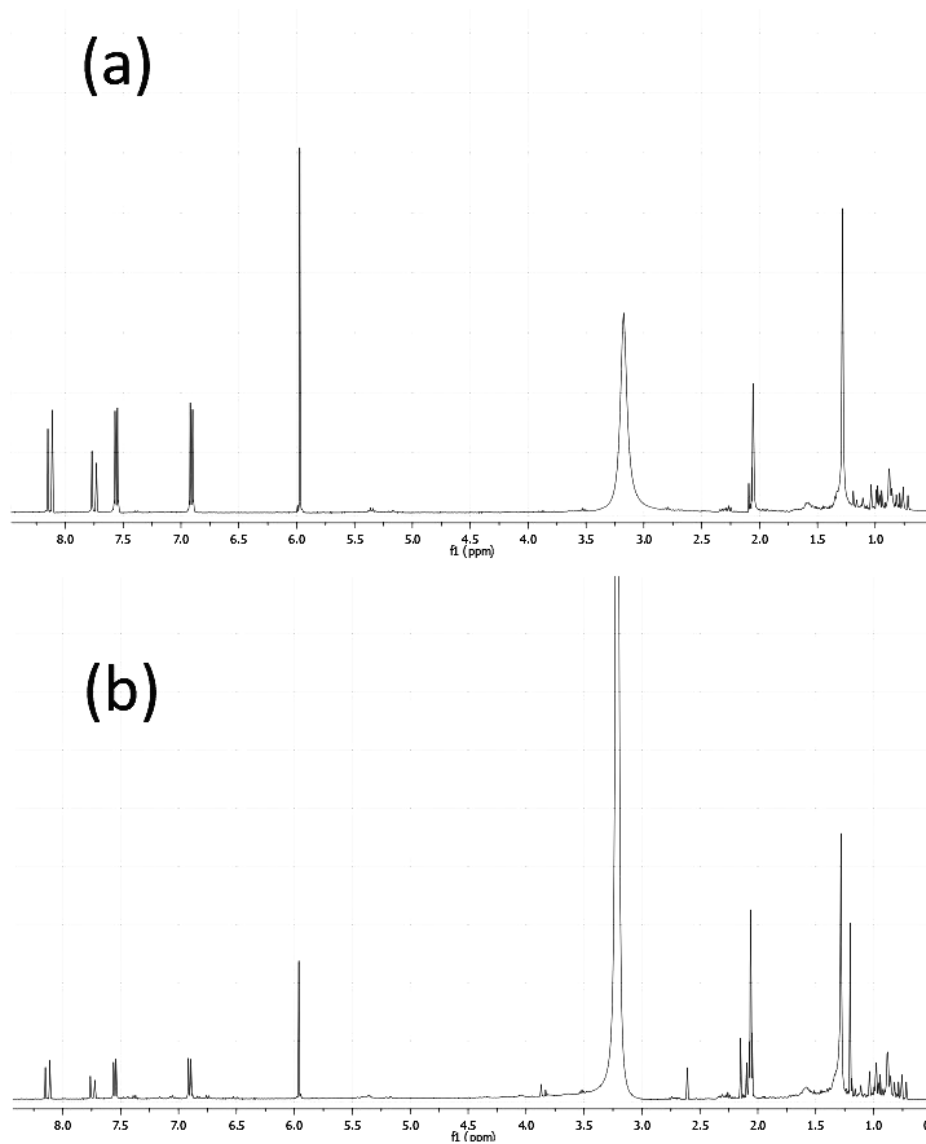


Figura 10. Espectros referentes a dois estados de amadurecimento: (a) RMN de ^1H em acetona de amostras cera de tomate verde (b) RMN de ^1H em acetona de amostras cera de tomate maduro.

Em uma visão geral dos espectros de ^1H , podemos perceber que temos um composto majoritário na cera epicuticular, os ruídos de 0,5-1,0 ppm podem representar compostos minoritários, que necessitam de outro método de análise para serem investigados com mais profundidade.

A proporção dos compostos entre os extratos de frutos verdes e maduros também mostram diferenças, de modo que os frutos não amadurecidos apresentam proporções maiores que aromáticos que os frutos maduros.

Baker *et al.* 1982 disse que a mistura de cera é bastante simples, consistindo em alcanos e triterpenoides.³⁰ Esta afirmação apoia os resultados obtidos, indicando a presença de compostos aromáticos nos perfis de extratos analisados, além da presença de compostos alifáticos.

Segundo Grover e Cessna (1991), existem evidências de que a penetração de agrotóxicos diminuem à medida que a idade dos frutos aumentam.³¹ Silva & Silva *et al.* 1991 disse que a absorção de herbicidas não está necessariamente relacionado à espessura ou ao peso da cutícula, mas ao seu grau de impermeabilidade que pode ser atribuído a mudanças na composição ou aumentos na formação de ceras.³²

Com o deslocamento químico dos picos e os valores de intensidade fornecidos pelo software MestReNova, conseguimos estimar a quantidade de hidrogênios presentes na nossa cera, bem como, qual função orgânica pertence cada hidrogênio. Como os compostos majoritários, já sabemos que são aromáticos e alcanos, foram divididos em 3 categorias para estimar a composição: aromáticos e carbonos sp^2 , alifáticos e outros.

Tabela 3. Valores estimados de hidrogênios presentes na cera do fruto verde e maduro.

	Alifáticos (0.0-3.0 ppm)	Aromáticos e Carbono sp^2 (5.0-8.5ppm)	Outros (3.0-5.0 + 8.5-13.0 ppm)
Fruto Verde	+/- 232	+/- 243	+/- 8
Fruto Maduro	+/- 258	+/- 97	+/- 9

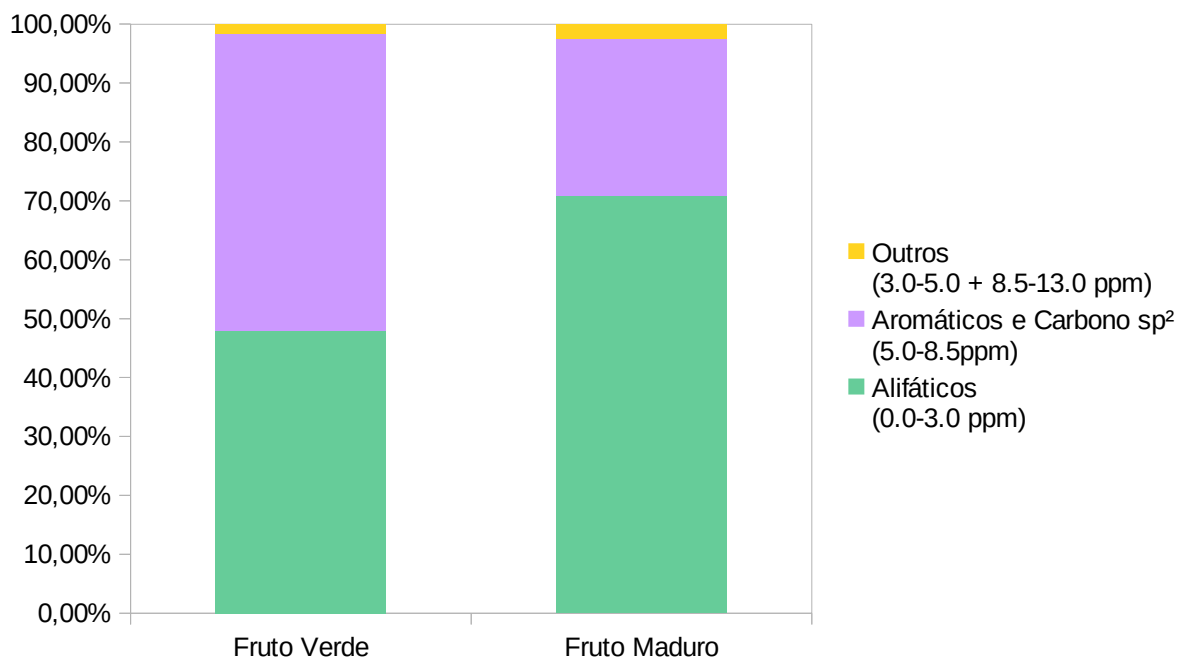


Gráfico 1. Proporção dos compostos presentes na cera investigada.

Neste gráfico 1 podemos analisar que a quantidade de aromáticos diminuiu fortemente do fruto verde para o maduro, enquanto a quantidade de alcanos se manteve na mesma média porém aumentou na proporção total da cera.

5.2.2. Análise dos espectros de RMN ¹³C

Ao contrário do RMN de hidrogênio, em que os núcleos sofrem o mesmo grau de relaxação, ou seja, a intensidade dos sinais é diretamente proporcional ao número de núcleos presente na molécula analisada, obtendo facilmente obtida uma análise quantitativa, o RMN de ¹³C, não tem a mesma relação, pois os núcleos de ¹³C não sofrem o mesmo grau de relaxação, logo a área de cada pico obtido não é proporcional ao número de núcleos que eles representam.³³

Como citado anterior, os picos dos espectros de RMN de ^{13}C não fornece informações quantitativas, logo, nesta comparação vamos analisar a presença de picos diferenciados entre os frutos verdes e maduros. Observamos picos presentes na cera do fruto verde que não encontramos no fruto maduro, como por exemplo 127,13 e 104,72 ppm.

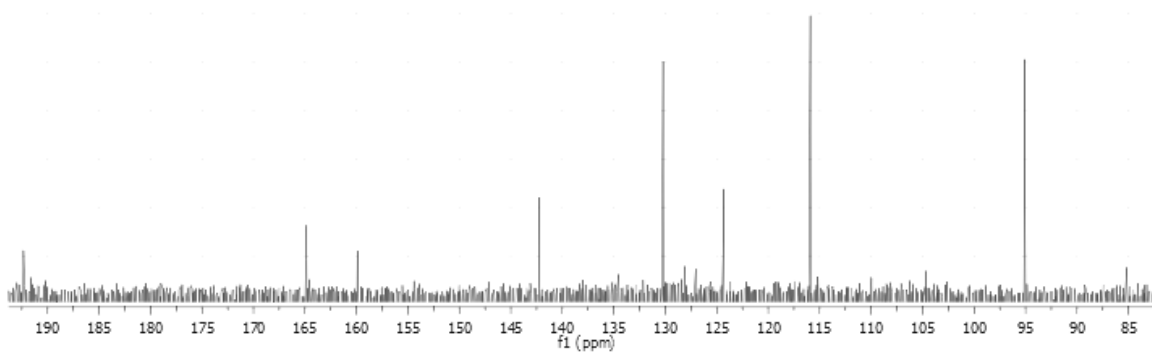
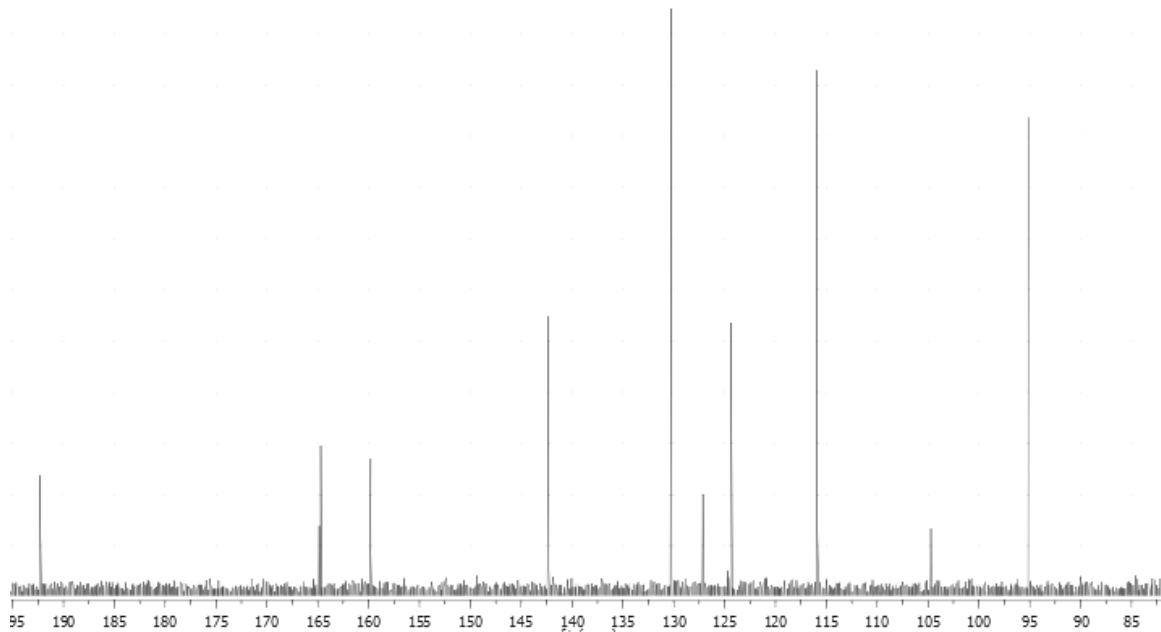


Figura 11. Espectros referentes a diferentes estados de amadurecimento: (a) RMN de ^{13}C em acetona de amostras cera de tomate verde (b) RMN de ^{13}C em acetona de amostras cera de tomate maduro.

5.2.3. Excedentes da extração

Ao realizarmos a extração seguindo a metodologia de Hamilton (1995), houve uma quantidade de cera que no preparo de amostra para analisar no RMN que não solubilizou no solvente. Com a desconfiança de que poderia haver compostos mais polares que não conseguiriam sair com acetona, foram retiradas essa quantidade de cera retida com o solvente metanol (momento dipolar: 1,70 D) e feito um espectro de RMN de ^1H para analisarmos se trava-se de compostos diferentes.

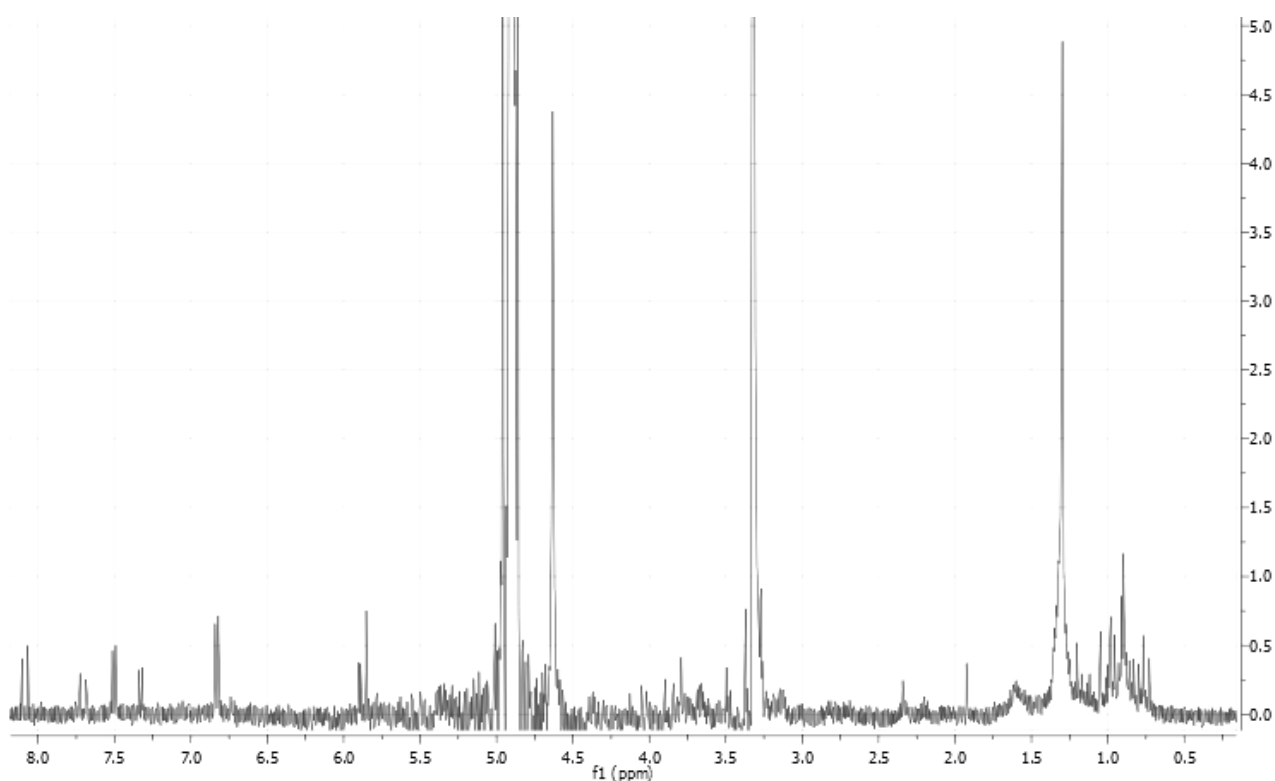


Figura 12. Espectro de ^1H com a sobra de cera em metanol.

Devido à quantidade pequena de cera, não foi possível igualar a escala dos espectros em diferentes solventes, mas analisando o perfil podemos perceber que se trata do mesmo composto. Os picos cortados na imagem 12 do espectro tratam-se da presença do solvente metanol que aparece em 4,87 (singleto) e 3,31 (quintupeto).

O motivo possível de não ter solubilizado com acetona pode ter sido apenas um limite de solubilização no solvente.

5.3. Determinação da constituição química da cera epicuticular do tomate

Segundo Eglinton & Hamilton (1983), as ceras epicuticulares de plantas terrestres geralmente possuem homólogos de n-alcenos com cadeias carbônicas de 15 a 35 átomos de carbono e predominância de cadeias com números ímpares de átomos de carbono.³⁴

Considerando todas as restrições que poderiam existir para este estudo, o tomate (*Lycopersicon esculentum*) foi uma boa escolha pois não possui estômatos e pela análise rápida dos espectros de RMN, temos detectado que a mistura de cera é bastante simples.³⁰

Os deslocamentos químicos encontrados para os espectros de RMN ^{13}C estão em uma faixa de até 209 ppm enquanto para ^1H estes atingem em torno de 12 ppm. Devido a esta larga faixa de absorção e pelos sinais desacoplados em ^{13}C serem agudos, a técnica de ^{13}C se torna mais adequada para a analisar misturas.³⁵ Apesar de na figura 11 visualizarmos picos mais intensos no espectro da cera epicuticular do tomate verde, obtivemos maior quantidade de sinais na cera do fruto maduro, optamos pelo estudo da cera do fruto maduro para avaliar a diversidade de compostos ali presentes.

A técnica de RMN ^{13}C requer um maior tempo de aquisição devido sua abundância natural ser muito baixa, apenas 1,08% de todos os átomos de carbono na natureza são átomos de ^{13}C , mas a vantagem que existe nessa técnica é a visualização de núcleos não ligados a hidrogênio, o que contribui para a identificação de grupos carbonilas, carbonos quaternários, nitrilas, alcenos e alcinos substituídos.³⁶

Na presente investigação, o foco foi definir as estruturas dos compostos presentes na cera, a fim de poder identificar o papel de cada um na proteção que a cera proporciona. Suas propriedades interfaciais são mais provavelmente determinadas pela composição química ou pelo arranjo espacial de seus componentes.³⁷

5.3.1 Alcanos

A primeira classe de compostos no qual direcionamos o estudo foram os n-alcenos, por serem compostos muito comuns na constituição das ceras em geral e a quantidade grande de picos na região referente a esses compostos tanto no espectro de ^1H quanto no espectro de ^{13}C terem sido bem significativas. Os deslocamentos químicos de ^{13}C foram

definidos segundo as regiões dos espectros: alifáticos (0 a 55 ppm), aromáticos ou carbonos sp^2 (110 a 160 ppm) e carbonílicas e acílicas (160 a 209 ppm).

Já vimos antes que a composição da cera varia de uma maneira específica das espécies, órgãos e tecidos e geralmente consiste em séries homólogas de moléculas alifáticas de cadeia muito longa (por exemplo, ácidos alcanóicos, alcanóis, aldeídos, alcanos, ésteres) e de compostos cíclicos (por exemplo, triterpenóides) ou fenilpropanóides.³⁹

Na região de 0-2.5ppm do RMN de 1H (apêndice I, podemos ver inúmeros picos referentes aos compostos alcanos de cadeia longa que eram esperados. A proporção relativa dos *n*-alcanos, uma das classes de componentes principais presentes na cera de frutos, foi de 45% em cera epicuticular total em estudos anteriores⁴⁰, enquanto na nossa pesquisa encontramos uma média de 70% de alcanos na cera total.

Em pesquisas anteriores, os *n*-alcanos com comprimento da cadeia carbonada identificado como maior de C25 até C37, com maiores proporções de C27, C29, C31 e C33.⁴¹ O primeiro hidrocarboneto a investigarmos na composição de ceras é o *n*-hentriacontano⁴² ($C_{31}H_{64}$), onde podemos encontrar na literatura os deslocamentos referentes a este composto. Este composto aparece no RMN 1H em 0.9 ppm, então cabe ao RMN ^{13}C confirmar a presença dele, por inúmeros alcanos aparecerem neste deslocamento.



Figura 13. Estrutura química do *n*-hentriacontano (fonte: spectrabase/2016)

Deslocamentos referentes ao composto <i>n</i>-hentriacontano	
δ-C (ppm) (Referência) – $CDCl_3$	δ-C (ppm) (Experimental) – Acetona-d_6
14.2	13.44
22.4	22.40
29.4	29.22
29.7	29.44

Tabela 4. Comparação de deslocamentos químicos do composto *n*-hentriacontano.
(fonte: SpectraBase/2016)

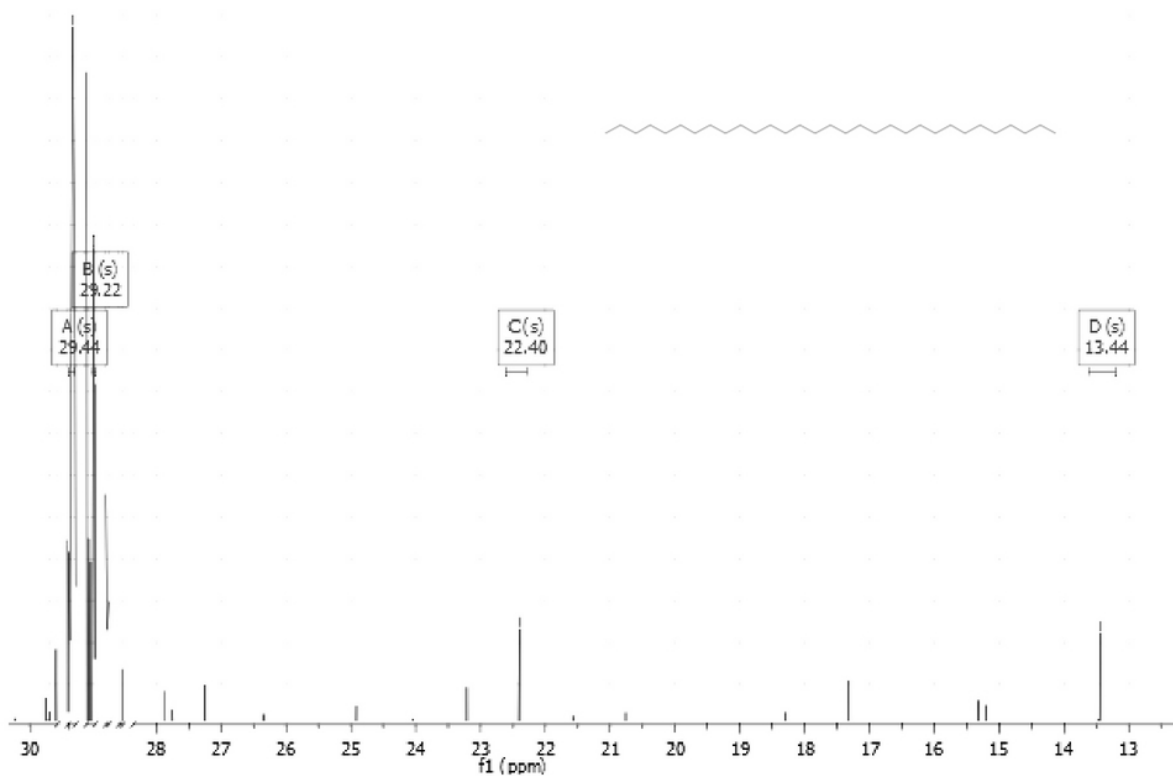


Figura 14. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes ao n-hentriacontano

A seguir, vemos os valores de deslocamento de alguns alcanos de cadeia longa em RMN de ^1H , o que sugere a presença dessa classe no estudo.

Compostos	$\delta\text{-H}$ (ppm) (Referência) - CDCl_3
C25	0.89 1.28
C27	0.89
C29	0.89
C31	0.89
C35	0.90

Tabela 5. Deslocamentos químicos típicos de alcanos de cadeia longa no RMN ^1H .

(fonte: Bio-Rad Laboratories, Inc SpectraBase, 2018).

Compostos	δ -C - (ppm) (Referência) - CDCl ₃
C29	14.1
	22.7
	29.4
	31.9
C33	14.0
	23.0
	29.5
	31.8

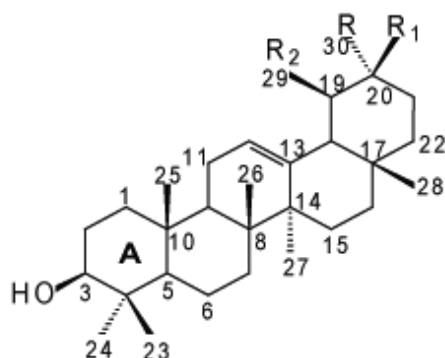
Tabela 6. Deslocamentos químicos típicos de alcanos de cadeia longa no RMN ¹³C.
(fonte: SpectraBase/2018)

Devido à semelhança dos deslocamentos de diversos n-alcanos, não podemos afirmar se existe o n-hentriacontano ou outro composto semelhante na nossa cera, mas podemos afirmar que existe uma mistura de n-alcanos e, devido ser mais comum, possivelmente possa ser o n-hentriacontano.

5.3.2 Triterpenóides

Do ponto de vista químico, os triterpenóides podem ser classificados como inúmeras funções orgânicas, depende dos ligantes existentes. Podem ser hidrocarbonetos, como o limoneno, porém, ao funcionalizar as ligações duplas presentes, podemos ter álcoois (mentol), aldeído (citral), cetona (cânfora), entre outros.

Dentre os triterpenóides comumente encontrados em ceras epicuticulares⁴³, destacamos a presença da amirina, confirmada nos dados a seguir.



- (1) $R_1=H$ $R_2=R=CH_3$ 3 α -hidroxiurs-12-eno (α -amirina)
 (2) $R_1=R=CH_3$ $R_2=H$ 3 β -hidroxiolean-12-eno (β -amirina)

Figura 15. Estrutura química da Amirina.
(fonte: P. N. Bandeira/2007)

Posição	δ -C (ppm) α – amirina [Referência] - CDCl ₃	δ -C (ppm) β – amirina [Referência] - CDCl ₃	δ -C (ppm) [Experimental] - Acetona – d ₆
1	38.7	38.7	38.78
2	27.2	28.7	25.25
3	79.3	79.6	85.41
4	38.5	38.7	35.14
5	55.1	55.1	56.73
6	18.6	18.4	18.27
7	32.4	32.2	31.69
8	39.8	40.0	40.94
9	47.6	47.7	47.73
10	36.9	36.9	35.64
11	23.6	23.3	23.28
12	121.7	124.4	128.27
13	145.2	139.5	142.28
14	41.7	42.0	43.17
15	26.2	27.2	28.39
16	26.1	26.6	24.96
17	32.6	33.7	31.69
18	47.2	59.0	56.73
19	46.8	39.6	39.24
20	31.0	39.6	39.24
21	34.7	31.2	31.11
22	37.1	41.5	40.94
23	28.0	28.1	27.94
24	15.4	15.6	15.54
25	15.4	15.6	15.54
26	16.8	16.8	16.55
27	25.9	23.2	23.28
28	28.4	28.1	28.58
29	33.8	17.4	17.57
30	23.7	21.4	22.40

Tabela 7. Deslocamentos químicos de ¹³C da amirina.

(fonte: P. N. Bandeira / 2007)

Com os valores de deslocamento de ^1H , podemos confirmar que amirina, mais especificamente a β -amirina está na constituição química da nossa cera. Os picos que definem isso são os 18, 19 e 20. Foi encontrado na literatura os sinais 5.16 e 3.15, referentes a triterpenoides⁴⁴ em espectros de ^1H , nos dados experimentais foram achados os valores 5.36 e 3.37.

Triterpenóides que foram citados em outros estudos não foram encontrados na nossa cera de estudo, como o taraxerol que tem seus sinais indicadores em 80 e 158 ppm, e o lupeol que tem sinal indicador em 150 ppm.

Lembrando que os triterpenóides existem em uma enorme variedade, quase 200 esqueletos diferentes são conhecidos de fontes naturais. Sua estrutura geral são os 5 anéis característicos mas pode aparecer com inúmeros ligantes.

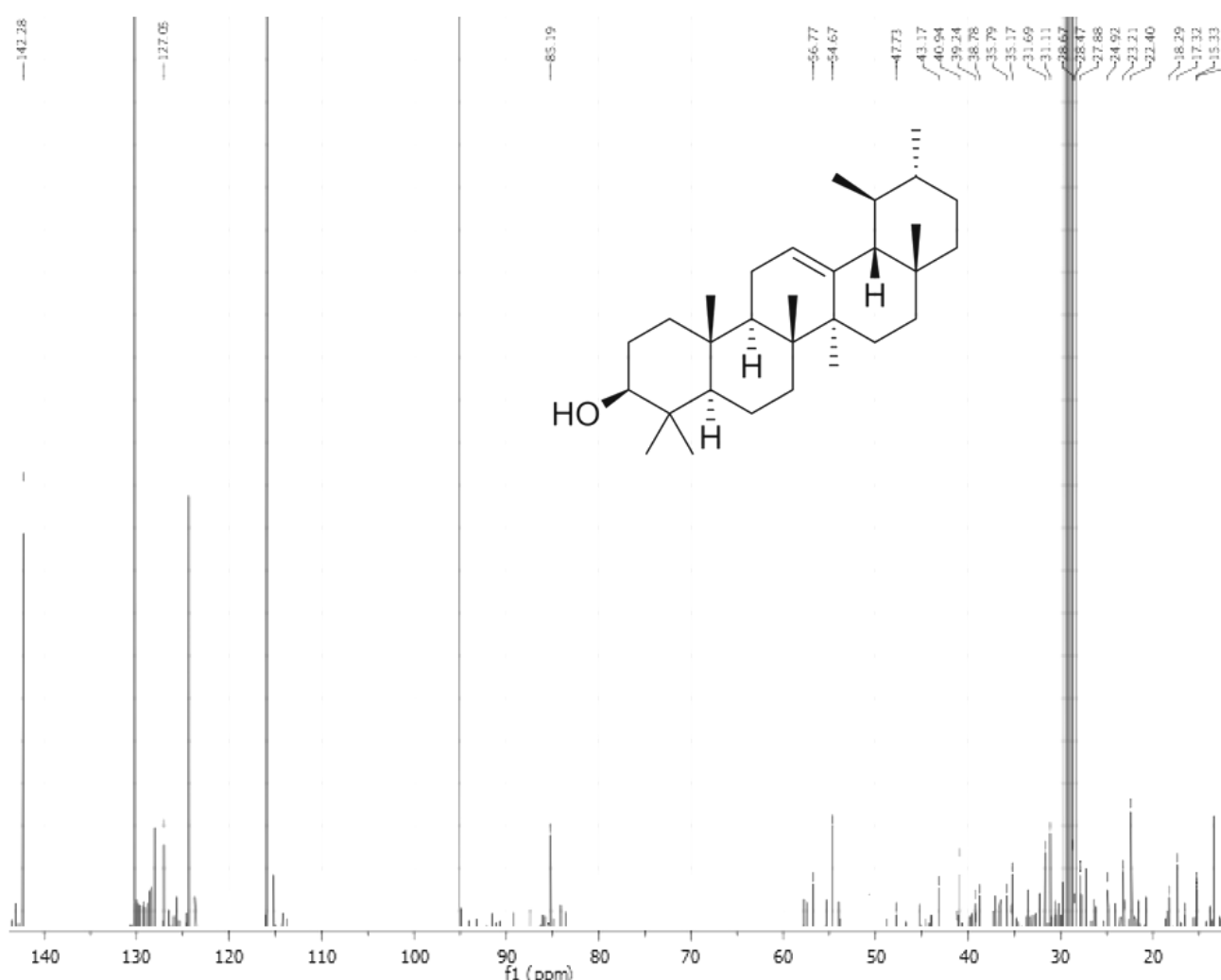


Figura 16. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes a β -amirina.

5.3.3 Naringenina Chalcona

Um composto que havia possibilidade de aparecer nos espectros é a Naringenina Chalcona (Fig. 12), tendo uma ação antialérgica muito eficaz. Na literatura podemos encontrar os deslocamentos químicos referentes a essa estrutura para comparar com os nossos obtidos.³⁸



Figura 17. Estrutura química da Naringenina Chalcona.

Os valores encontrados na literatura para os deslocamentos de α e β no espectro de ^1H foram respectivamente, 8.06 e 7.69 ppm.³⁸ Valores que encontramos muito próximos, no nosso espectro de hidrogênio também. (No apêndice I podemos observar os deslocamentos 8.11 (J=16hz) e 7.76 ppm (J=16hz). Os picos de 7.54 (J=8hz) e 7.43 (J=8hz) também são referências da Chalcona que existe na Naringenina Chalcona. Os valores de J (constante de acoplamento) são experimentalmente a distância em Hz entre as linhas de um multipeto, e teoricamente, a energia de interação entre dois núcleos.

A seguir, temos o espectro de ^{13}C da Naringenina Chalcona encontrado na literatura, bem como a tabela com os picos referentes comparando com os encontrados experimentalmente no nosso estudo.

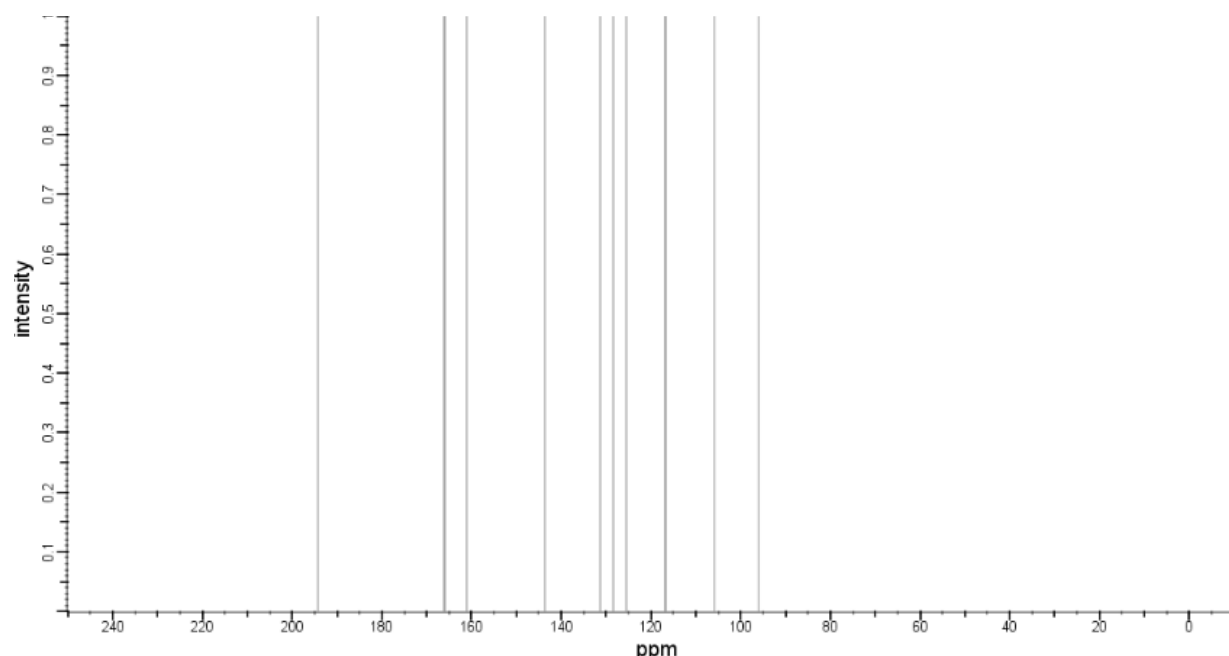


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C teórico do composto Naringenina Chalcona em metanol-d4.
(fonte: spectrabase/2016)

Deslocamentos referentes a Naringenina Chalcona (^{13}C)		
Posição	$\delta\text{-C}$ (ppm) (Referência) – Metanol—d4	$\delta\text{-C}$ - (ppm) (Experimental) – Acetona—d6
1	128.5	128.20
2-6	131.4	134.59
3-5	116.9	115.84
4	161	160.35
1'	106	104.85
2'-6'	166	164.35
3'-5'	96	95.51
4'	166.2	164.85
α	125.5	124.34
β	143.3	142.28
C=O	194.2	192.12

Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos da literatura e experimental da Naringenina Chalcona em RMN ^{13}C .

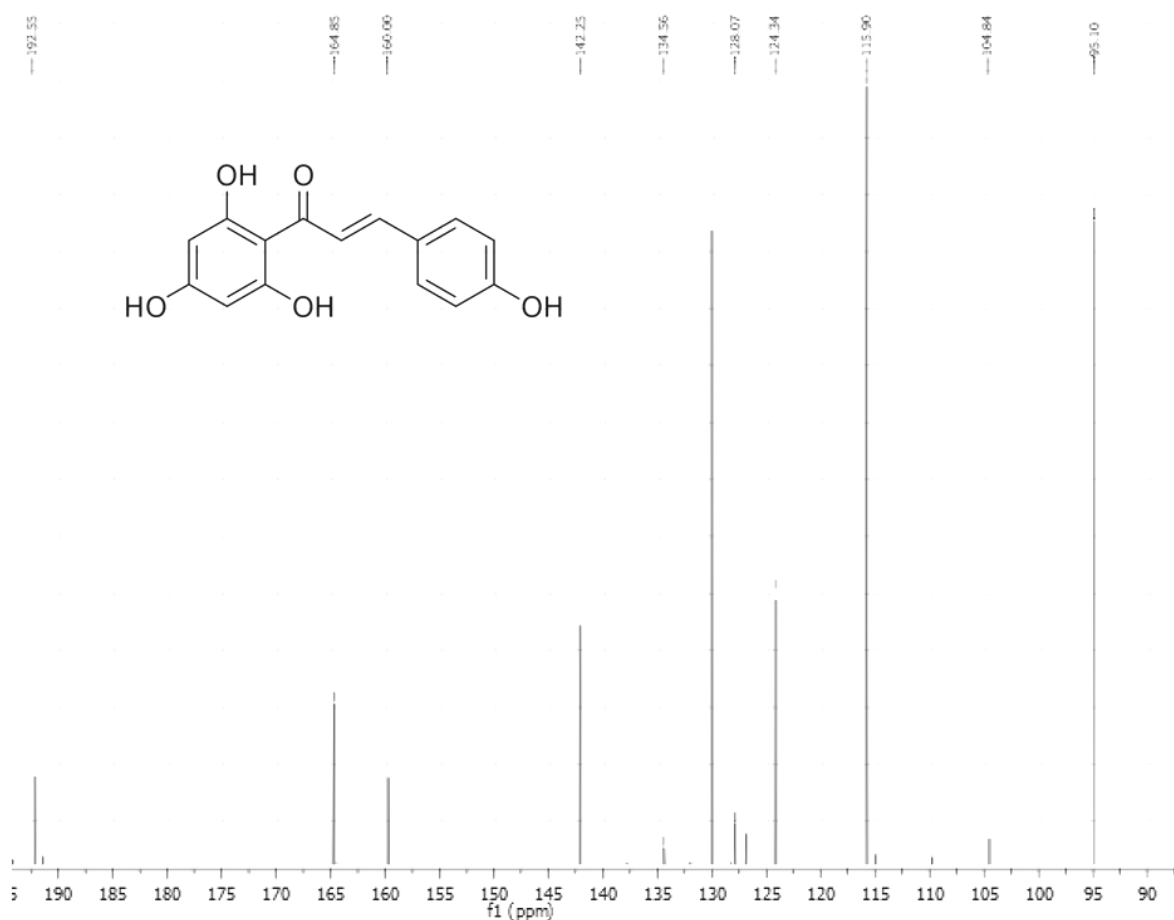


Figura 19. Espectro parcial de RMN ^{13}C com ênfase nos picos referentes a Naringenina Chalcona.

É possível notar no espectro geral, que os picos referentes a naringenina Chalcona, são os picos mais intensos e definidos do nosso espectro, por isso, é possível dizer que ela é nosso composto maioritário presente na nossa cera epicuticular.

Com o auxílio da técnica de RMN 2D COSY (Fig. 20) podemos confirmar alguns dados que foram mencionados no RMN ^1H , como acoplamentos entre os hidrogênios próximos 8.11 e 7.76 ppm e 7.54 e 7.43 ppm, criando um pico de cruzamento.

Este tipo de espectro, mostra melhor os compostos majoritários, podemos observar de 1.5-0.5 uma quantidade grande de sinais, que não conseguimos analisar por RMN COSY, pois aumentando muito a intensidade sendo vários picos sobrepostos, dificultando a análise.

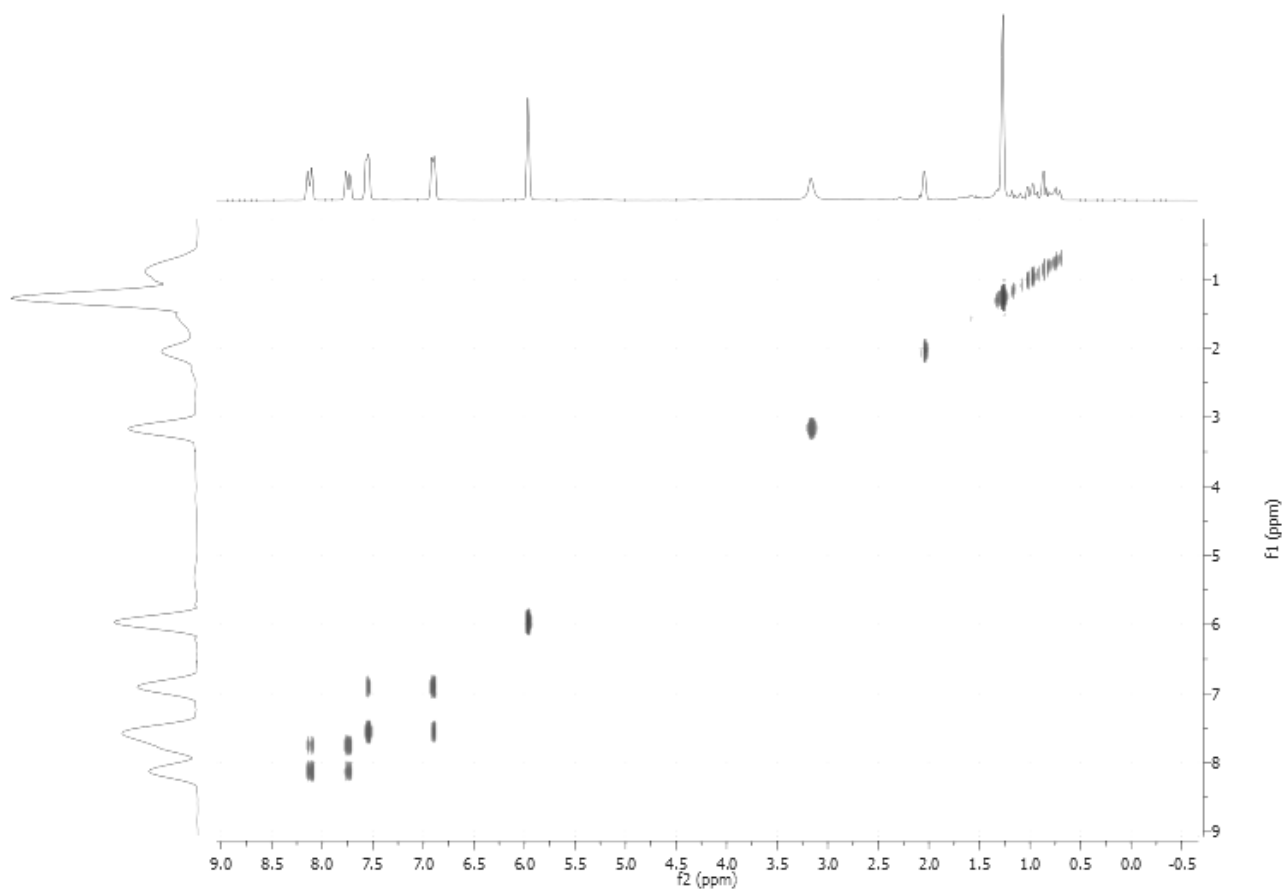


Figura 20. Espectro de RMN de 2D COSY da amostra de tomate maduro em Acetona-d6.

No HSQC (Fig. 21) os sinais de cruzamento relacionam os hidrogênios aos carbonos aos quais estão ligados. Novamente, os RMNs de 2D mostram os picos que existem em maior quantidade na cera.

Deslocamentos que relacionam hidrogênios e carbonos (ppm)		
α	8.14	124.08
β	7.75	141.91
2-6	7.57	130.20
3-5	6.89	115.64
3'-5'	5.97	94.84
n-alcanos	1.28	29.05

Tabela 9. Deslocamentos químicos retirados do RMN 2D HSQC que relacionam hidrogênios e carbonos.

Os conjuntos de picos 1, 2, 3 e 4 são referentes a Naringenina chalcona, enquanto o conjunto de picos 5 é possivelmente dos compostos alifáticos já comentados antes e presentes na mistura.

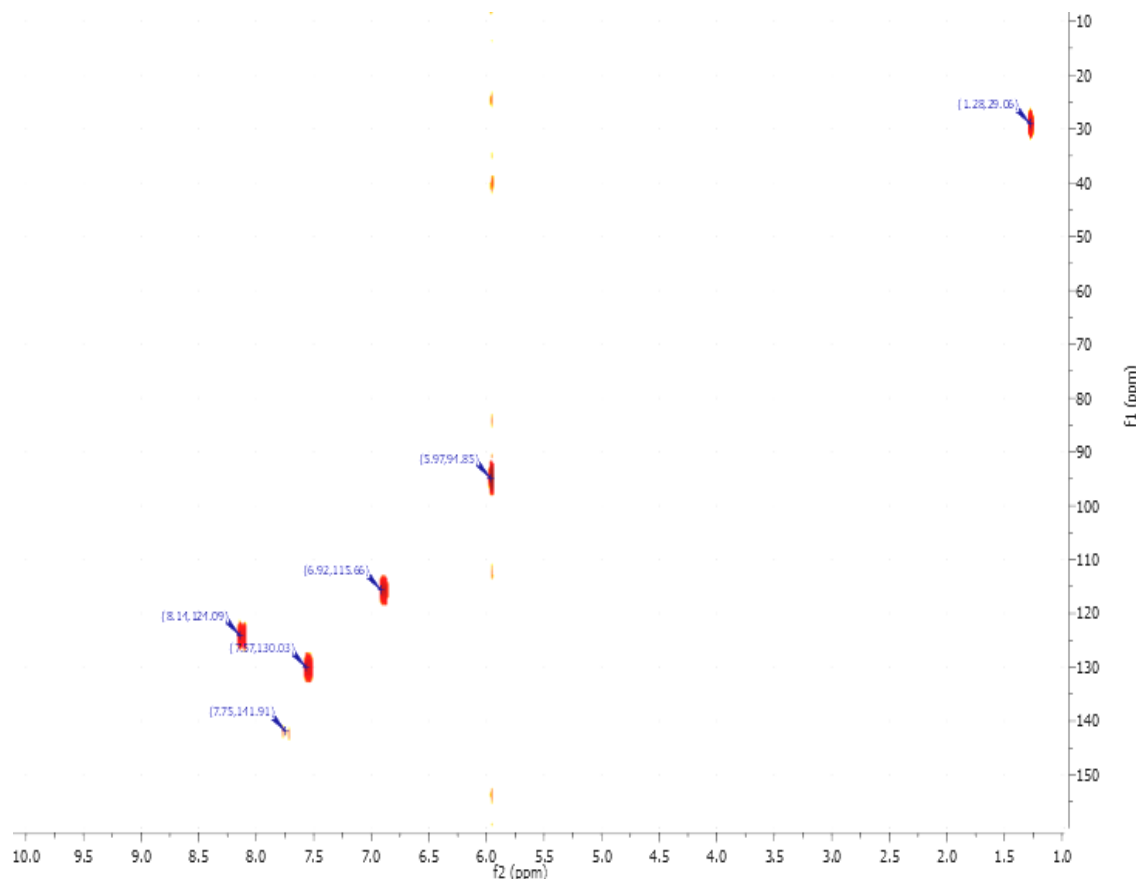


Figura 21. Espectro parcial de RMN de 2D HSQC do tomate maduro em Acetona-d₆.

5.3.4 Compostos Minoritários

Pela pequena quantidade destes compostos na nossa cera epicuticular, não podemos dizer com clareza de que se tratam os compostos minoritários de picos que não conseguimos uma definição precisa no estudo.

No RMN de ¹³C temos a existência de um pico em 208.85 ppm, possivelmente uma cetona, também temos a existência dos picos característicos de hidrogênios de carbonos vizinhos de cetona no RMN de ¹H em 2.09 e 2.15 ppm.

Os compostos majoritários da cera falam como ela se comporta. Ceras com maior quantidade de triterpenóides são hidrorepelentes, protegendo a superfície de muita umidade. Da mesma forma que ceras ricas em ésteres, tem mais afinidade como a água, ajudando o fruto em grande exposição ao sol. ⁴²

6. CONCLUSÃO

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear se mostrou eficaz para identificar os compostos majoritários presente na cera epicuticular do tomate. Devido a se tratar de uma mistura complexa, não foi possível identificar os compostos que existem em menor quantidade.

Com base dos dados obtidos na literatura e experimentais, foi possível dizer, com certeza, que não foi rompida a casca das nossas amostras de tomate durante a extração, pois não haviam picos referências do licopeno, que seria um indicativo de perfuração da casca.

A análise em dois estados de amadurecimento diferentes mostrou o decréscimo dos compostos aromáticos ao amadurecer do fruto e aumento de compostos alifáticos.

Através da comparação dos deslocamentos já conhecidos dos compostos que costumam existir em ceras comuns, foi definido que os compostos presentes na cera epicuticular do tomate são n-hentriacontano, β -amirina e majoritariamente, a Naringenina Chalcona.

Existem compostos minoritários que não foram identificados com clareza, necessitando um outro método de análise tentar caracterizá-los.

A identificação dos compostos acima citados mostra que o método de obtenção da cera com acetona foi apropriado.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ESAU, K. **Anatomia das Plantas Com Sementes**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1974.
2. SOUZA, L.A. **Sementes e Plântulas. Germinação, estrutura e adaptação**. Ponta Grossa: Editora Uepg, 2009.
3. BONATTO, M. I. **Produtividade e qualidade dos frutos de dois híbridos de tomate tipo cereja, quando produzidos em ambiente protegido e a campo, em Curitiba – SC**. 2014. 21 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Rurais, Ufsc, Curitiba, 2014.
4. SILVERSTEIN, R; WEBSTER, F. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2000.
5. NASCIMENTO, C. **Ressonância Magnética Nuclear**. São Paulo: Blucher, 2016.
6. BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. Cleveland: Pearson Education Inc, 2004.
7. GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. Lisboa: Função Calouste Gulbenkian, 1987.
8. RIBEIRO, F. Z. **Avaliação da qualidade de frutas por RMN em baixa resolução**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2008.
9. COLNAGO, L.A., ALMEIDA, F.C.L., VALENTE, A.P. **Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: revolução no estudo de macromoléculas biológicas**. Química Nova na Escola, v.16, p. 9-14, nov, 2002
10. BONAGAMBA, T. J.; ZUCCHI, M. R. **Ressonância Magnética Nuclear – RMN**. 2011. Curso de Química, Ifsc-usp, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.ifsc.usp.br/~lavfis2/BancoApostilasImagens/ArRMN/apRMN.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2017.
11. ATKINS, P.W.; JONES, L. **Princípios de química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001. 912p.
12. OLIVEIRA, O. C. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Florianópolis: Ibge, 2017.
13. ANDREUCETTI, C.; **Classification and standardization of tomatoes cv. Carmem and Debora in the CEAGESP**. 2004. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrícola,

Ceasgesp-cqh, Unicamp, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010069162004000300033>. Acesso em: 05 jun. 2017.

14. BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. **Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures**: How do plants seal their epidermal surfaces. 2010. 62 v. Tese (Doutorado) Curso de Botany, Department Of Botany, University Of British Columbia, Vancouver, 2010.

15. BUSCHHAUS, C.; HERZ, H. JETTER, R. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist**, [s.l.], v. 176, n. 2, p.311-316, out. 2007.

16. JEFFREE, C.E. **Structure and ontogeny of plant cuticles**. In G Kerstiens, ed, *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 33-82., nov. 1996.

17. CUTTER, E. G.. **Anatomia Vegetal**: Parte I Células e Tecidos. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2010

18. FERREIRA, E.A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A. **Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar**. 2005. 23 v. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Ufv, Viçosa - Mg, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582005000400008>. Acesso em: 10 jun. 2017.

19. SOUZA, L. A. **Morfologia Anatomia Vegetal**: Células, Tecidos, Órgãos e Plântula. São Paulo: Uepg, 2009.

20. LAGUNA, A. G.; CARVAJAL, D. H.; GARCÍA, M. M.; Policonasol, una mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores para el tratamiento de complicaciones ateroscleróticas tales como la hiperagregabilidad plaquetaria, los accidentes isquémicos, trombosis e incluso su efectividad contra úlceras gástricas químicamente inducidas y su proceso de obtención de la caña. **Patente Cubana** – CU. 1996.

21. GANDRA, K. M. **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUAS FRAÇÕES**. 126 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2006.

22. WARTH, A. H. **The Chemistry and Technology of Waxes**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1947.

23. BONDADA, B.R.; OOSTERHUIS, D.M.; MURPHY, J.B.; Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and boll. **Environmental and Experimental Botany**, v.36, p.61-69, 1996.
24. CHARLES , M.T.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. **Physiological basis of UV-C induced resistance to Botrytis cinerea in tomato fruit II**. Modification of fruit surface and changes in fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 21–26, 2008.
25. SALATINO, A. **Major Constituents of the Foliar Epicuticular Waxes of Species from the Caatinga and Cerrado**. 2000. 55 v. Tese (Doutorado) - Curso de Institute Of Biosciences, Usp, São Paulo, 2000.
26. HAMILTON, R. J. **Waxes: chemistry, molecular biology and functions**. Edinburgh: Orly Press, 1995. 149 p.
27. FIGUEIREDO, S. S.. **Estudo da Superhidrofobicidade de Folhas da Espécie Vegetal *Thalia geniculata***. 2015. 17 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Unifap, Rio de Janeiro, 2015.
28. STAMMITTI, L., S. DERRIDJ, J.P. GARREC, I. Unit, D. Phytopharmacie, M. Chimiques, & D. S. Cyr, 1996. **Leaf epicuticular lipids of prunu laurocerasus: importance of extracion methods**. *Phyto-chemistry* 43:45-48
29. SENA, K. **Efeito de extratos epicuticulares de frutos de duas cultivares de goiabeira sobre a germinação de uredíniosporos de puccinia psidii**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Uenf, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, 2008.
30. Baker E.A., Bukovac M.J., Hunt G.M. (1982) **Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development**. In DF Cutler, KL Alvin, CE Price, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, p 33-44
31. Grover R.; Cessna A.J. **Environmental chemistry of herbicides**. Boca Raton, CCR Press. 302P, 1991.
32. Silva A.A. & Silva J.F. **Tópicos em Manejos de Plantas Daninhas**. Viçosa, Editora UFV. 367P, 2007.
33. KLEIN, S. I. "**Ressonância magnética nuclear em química - conceitos básicos**" - UNESP, 1987

34. Eglinton, G. Hmlton, R. J., Martin-Smith, M. 1962b. **The alkane constituents of some new zealand plants and their possible taxonomic implecations**. *Phychemistry* 1:137-145
35. SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed.Rio de Janeiro: LTC, 2000. 406p
36. MERLIC, C. A.; STROUSE, J. **WEBSPECTRA: Problems in NMR and IR Spectroscopy**. Disponível em: <<https://webspectra.chem.ucla.edu/>>. Acesso em: 27 maio 2018.
37. RIEDERER, M, Schreiber L. **Wax - the transport barriers of plant cuticles: Chemistry, Molecular Biology and Functions**. The Oily Press, Dundee, Escócia, pp 130–156. Jan. 1995.
38. YOSHIMURA, M.; SANO, A.. Identification and Quantification of Metabolites of Orally Administered Naringenin Chalcone in Rats. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. Noda City, p. 6432-6437. 01 out. 2009.
39. VOGG, G. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. **Journal Of Experimental Botany**.Reino Unido, p. 1401-1410. 1 jun. 2004.
40. LEIDE, J. The Developmental Pattern of Tomato Fruit Wax Accumulation and Its Impact on Cuticular Transpiration Barrier Properties: Effects of a Deficiency in a β -Ketoacyl-Coenzyme A Synthase. **Plant Physiology**. Deutschland, p. 1667-1679. jul. 2007.
42. HAMILTON, R.J. POWER, D.M. The chemical composition of the surface wax of *Iolium perenne*. **Elsevier**. Salford, p. 1771-1775. set. 1969.
43. TESSMANN, D.J.; DIANESE, J. C. Hentriacontane: A leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimularoty effects on the germination of urediniospores of *puccinia psiddii*. **Fitopatol**. Brasília, p. 1678-1682. out. 2002.
44. MAGINA, M.**Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae)**. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2009, vol.45, n.1, pp.171-176.
45. Okoye, N. N.Beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity, **Pharmaceutical Biology**, vol.52 (2014) pp.1478-1486.

8. APÊNDICES

Apêndice I. Tabela de deslocamento químico (δ) dos espectros de ^1H do tomate verde e maduro.

Deslocamento químico da amostra de tomate verde			
δ -H multiplicidade (ppm) - Verde	Intensidade	δ -H multiplicidade (ppm) – Maduro	Intensidade
12.18 - s	2.2	12.17 – s	3.2
8.11 - d	85.3	8.11 – d	33.1
7.77 - d	51.1	7.76 – d	19.5
7.55 - d	87.2	7.54 – d	34.2
6.92 - d	91.3	7.43 – s	2.0
5.97 - s	308.3	7.37 – s	3.1
5.26 - t	3.6	7.16 – quint	2
3.17 - d	165.9	7.05 – d	2.8
2.06 - Quintupletto	107.8	6.89 – d	33.9
1.28 – s	253.3	6.84 - s	2.3
1.19 – s	17.5	6.76 – d	2.8
1.16 – s	10.1	6.52 – d	2
1.11 – t	11.8	5.96 – s	118.4
1.07 – s	5.3	5.26 – t	2.9
1.04 – s	22.8	3.87 – d	12.4
0.98 – d	22.1	3.21 – d	1945.0
0.96 – s	13.9	2.61 – s	26.9
0.94 – s	18.0	2.15 – s	52.2
0.92 – s	8.0	2.09 - s	31.3
0.88 – t	36.2	2.06 - quint	164.1
0.86 – d	19.6	1.28 – s	228.4
0.82 – t	14.4	1.20 – s	151.3

0.81 – d	8.5	1.16 – s	8.7
0.79 – s	15.9	1.11 – s	11.8
0.76 – s	20.8	1.03 – s	23.8
0.72 – s	13.9	0.97 – d	31.2
		0.94 – s	21.1
		0.87 – t	40.5
		0.85 – d	19.9
		0.82 – t	14.4
		0.78 – s	15.0
		0.75 – s	21.1
		0.71 – s	14.9

Apêndice II. Tabela de deslocamento químico (δ) dos espectros de ^{13}C das amostras de tomate verde e maduro.


Deslocamento amostra de tomate maduro	
$\delta\text{-C}$ (ppm) Tomate Verde	$\delta\text{-C}$ (ppm) Tomate Maduro
213.80	208.85
208.46	206.13
205.65	205.93
204.18	205.72
202.44	194.45
192.41	192.12 – A
176.08	191.75
164.88	164.35 – A
159.80	160.35 – A
156.36	147.06 – C
152.97	142.28 – A
149.65	134.59 – A
142.30	130.21
140.32	128.27 – A
136.93	127.05 - C
130.37	124.34 – A
127.32	115.84 – A
124.37	115.54
120.88	109.89
115.94	104.85 – A
104.76	95.51 – A
95.12	85.41 – C
90.16	77.73
84.44	67.05
78.12	56.73 – C
76.46	54.67 – C
61.70	47.73 – C
61.01	43.17 – C

59.37	41.73 – C
38.65	40.94 – C
31.94	39.24 – C
29.53	38.78 – C
29.46	35.64 – C
28.76 - 7	35.29 – C
22.62	31.69 – C
13.58	31.21 – C
	29.44 – B
	29.22 – B
	28.96 - 7
	28.46 – C
	27.26 – C
	25.25
	24.92 – C
	23.28 – C
	22.40 – B
	20.76
	18.27 – C
	17.57 – C
	16.55 – C
	15.54 – C
	13.44 – B

Legenda: A: Narigenina Chalcona

B: N-Hentriacontano

C: Beta-Amirina

 - Picos do solvente