

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDO DE *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* E
Macairea urundeuva NO CONTROLE DAS FORMIGAS
CORTADEIRAS”**

Liliane Nebo*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: João Batista Fernandes

*** bolsista Fapesp/CAPES**

**São Carlos - SP
2013**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

N361es Nebo, Liliane.
 Estudo de *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e
Macaírea urundeuva no controle das formigas cortadeiras /
Liliane Nebo. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
 356 f.

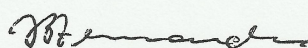
 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2013.

 1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Atividade
inseticida. 4. Formigas cortadeiras. 5. *Leucoagaricus*
gongylophorus. I. Título.

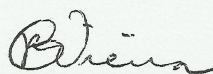
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

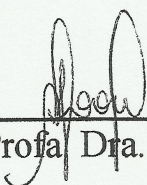
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Liliane Nebo**, realizada em 24 de abril de 2013:*



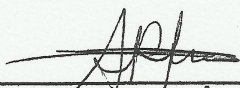
Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Profa. Dra. Marisi Gomes Soares



Profa. Dra. Ângela Regina Araujo



Prof. Dr. Odair Correa Bueno

“A busca do sucesso, nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem o busca vence obstáculos”

José de Alencar

DEDICO ESTA TESE,

À MINHA MÃE QUERIDA, OLGA FUMICO NEBO
E A TODA MINHA FAMÍLIA, PELO AMOR E DEDICAÇÃO..

E POR ESTAREM SEMPRE AO MEU LADO.....

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, aos meus irmãos, cunhados, cunhada, sobrinhas e sobrinhos, muito obrigada pelo amor, carinho e incentivo na realização deste sonho.

À minha irmã Carol pela amizade, conselhos e por me apoiar sempre.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes pelo apoio, ensinamentos e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos Professores, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr. Edson Rodrigues Filho, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. Tiago Venâncio e Dr. Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos e colaboração.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.

À Dra. Andréia Pereira Matos pelos ensinamentos, paciência, carinho e principalmente sua amizade.

Aos técnicos, Luciana, Paulo e Doraí pelo apoio e colaboração durante este trabalho.

Ao Prof. Odair Corrêa Bueno e suas alunas Marcela Ceccato e Tais G. Freitas do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS – Rio Claro/SP), pela colaboração na realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras.

À Dra. Ana Paula Terezan pela realização dos ensaios biológicos com o fungo simbiote.

Aos professores Francisco Antonio Macías, José Maria Molinillo, Rosa Maria Varela e Miguel Palma do Departamento de Química da Universidad de

Cádiz/Espanha e principalmente aos professores do Grupo de Alelopatia de Cádiz por terem me concedido a oportunidade do estágio Sanduíche.

Aos funcionários, amigos e professores do Departamento de Química da Universidad de Cádiz por toda amizade e agradável convivência e principalmente por me proporcionarem seis maravilhosos meses de estágio sanduíche.

À aluna de iniciação científica Katia Miyuki Inoue que colaborou com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, troca de experiências e ótimo convívio ao longo de vários anos.

Aos meus grandes amigos Keylla, Cris, Van (IC), Karlinha, Tati Albarici, Paulinha, Jaque, Cristovan (Desfoque), Fabi, Olivete, Diogo, Rosana e Babi pelo companheirismo, amizade, dedicação e por vários momentos felizes compartilhados durante esses anos.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP e CAPES, pelas bolsas concedidas.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
Atm	atmosferas
CC	Cromatografia em coluna
CCC	Cromatografia contracorrente
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
°C	Graus Celsius
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddt</i>	Duplo-duplo tripleto
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
ESI	Electrospray
EtOH	Etanol
e.V	Eletron volt
h	Altura
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSCCC	High-Speed Counter-Current Chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
i.d.	Diâmetro interno
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>K</i>	Coeficiente de partição
LC-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
<i>M</i>	Multiplete

<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
n-BuOH	n-Butanol
nm	Nanômetro
<i>ppm</i>	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoroetileno
<i>qt</i>	quintupeto
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
T	Tesla
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-vísivel
v/v	Proporção volume/volume

Lista de Tabelas

PARTE I

3.1	Extratos brutos da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	25
3.2	Extratos brutos das espécies <i>A. humile</i> e <i>M. urundeuva</i>	25
3.3	Sistemas de solventes avaliados no primeiro teste	28
3.4	Sistemas de solventes avaliados no segundo teste	31
3.5	Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato AHFE	34
3.6	Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato MUFE	38
3.7	Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato STFRM	53
3.8	Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato STFRM	54
4.1	Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982)	75
4.2	Dados de RMN de ^1H de L1 , L2 e L3 e comparação com a literatura	77
4.3	Dados de RMN de ^1H da substância L4 e comparação com a literatura	82
4.4	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de L5 e comparação com a literatura	85
4.5	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de L6 e comparação com a literatura	91
4.6	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de L7 e L5 e comparação com a literatura	92
4.7	Dados de RMN de ^1H de L8 e comparação com a literatura	96
4.8	Dados de RMN de ^1H de L4 e comparação com a literatura	96
4.9	Dados de RMN de ^1H da mistura dos flavonoides L9 e L10 e comparação com a literatura	100
4.10	Dados de RMN de ^1H de L14 e comparação com a literatura	104
4.11	Dados de RMN de ^1H de L19 e comparação com a literatura	105
4.12A	Dados dos flavonoides glicosilados obtidos através do estudo das frações AHFE-F1 A F6 de <i>Anacardium humile</i> via HPLC	115
4.12	Dados de RMN de ^1H de L9 , L10 e L11 e comparação com a literatura	116
4.13	Dados de RMN de ^{13}C de L9 , L10 e L11 e comparação com a literatura	117
4.14	Dados de RMN de ^1H da mistura dos flavonoides L12 e L13 e comparação com a literatura	123
4.15	Dados de RMN de ^1H da mistura dos flavonoides L12 e L13 e comparação com a literatura	124
4.16	Dados de RMN de ^1H de L14 , L15 e L16 e comparação com a	133

	literatura	
4.17	Dados de RMN de ^{13}C de L14 , L15 e L16 e comparação com a literatura	134
4.18	Dados de RMN de H de Robustaflavona e comparação com a literatura	143
4.19	Dados de RMN de ^{13}C de robustaflavona e comparação com a literatura	144
4.20	Dados de RMN de ^1H de B2 e comparação com a literatura	149
4.21	Dados de RMN de ^{13}C de B2 e comparação com a literatura	150
4.22	Dados de RMN de ^1H de B3 e comparação com a literatura	154
4.23	Dados de RMN de ^{13}C de B3 e comparação com a literatura	155
4.24	Dados de RMN de H de B4 e comparação com a literatura	158
4.25	Dados de RMN de ^1H de F1 e comparação com a literatura	160
4.26	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de F2 e comparação com a literatura	163
4.27	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de F3 e F4	163
4.28	Dados de RMN de ^1H de T1 e T2 e comparação com a literatura	168
4.29	Dados de RMN de ^{13}C de T1 e comparação com a literatura	169
4.30	Dados de RMN de ^{13}C da substância T1 e T3 e comparação com a literatura	178
4.31	Dados de RMN de ^{13}C das substâncias T4 e T5 e comparação com a literatura	179
4.32	Dados de RMN de ^1H de T6 e comparação com a literatura	181
4.33	Dados de RMN de ^1H de T7 e comparação com a literatura	185
4.34	Dados de RMN de ^{13}C de T8 e comparação com a literatura	187
4.35	Dados de RMN de ^1H dos compostos T1-A e comparação com a literatura	193
4.36	Dados de RMN de ^{13}C dos compostos T1-A e T1 e comparação com a literatura	194
4.37	Dados de RMN de ^1H de T1-B e T1 em comparação com a literatura	198
4.38	Dados de RMN de ^{13}C de T1-B e T1 em comparação com a literatura	199
4.39	Valores para as bandas características do flavonóide quercetina, complexo precursor [#] e complexo* obtidas através do espectro de IV	201
4.40	Dados de RMN de ^1H do ligante (quercetina).	204
4.41	Dados de RMN de ^1H do complexo precursor cis-Ru(Cl ₂)(2,2'-bipiridina) ₂ .2H ₂ O.	205
4.42	Dados de RMN de ^1H do complexo cis-[Ru(2,2'-	208

	bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O	
4.43	Dados do espectro no UV para o ligante (quercetina) e complexo	212
4.44	Valores para as bandas características do flavonóide quercetina e complexo ([Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄] obtidas através do espectro de IV.	213
4.45	Dados da análise elementar do complexo ([Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	214
4.46	Dados do espectro no UV para o ligante (quercetina) e complexo	216
4.47	Valores para as bandas características do flavonóide quercetina e complexo ([Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄] obtidas através do espectro de IV.	218
4.48	Dados da análise elementar do complexo ([Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄](CH ₃ COO) ₂ (H ₂ O) ₂	218
4.49	Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	221
4.50	Atividade das frações de AHFE nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	221
4.51	Atividade dos compostos isolados do extrato das folhas de <i>A. humile</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	224
4.52	Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	226
4.53	Atividade dos compostos isolados do extrato das folhas de <i>M. urundeuva</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	226
4.54	Atividade dos compostos isolados do extrato dos galhos de <i>M. urundeuva</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	229
4.55	Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	230
4.56	Atividade das frações obtidas dos extratos brutos de <i>S. terebinthifolius</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	233
4.57	Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	234
4.58	Atividade dos compostos isolados do extrato dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	235
4.59	Atividade dos compostos isolados do extrato diclorometânico dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	237
4.60	Atividade do ácido masticadienóico e seus derivados (T2 , T1-A e T1-B) nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens</i>	239

rubropilosa

4.61	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o flavonóide quercetina em diferentes concentrações	240
4.62	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão dos sais de cobre na concentração 0,1mg/mL.	241
4.63	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O, nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 1mg/mL e 2mg/mL.	243
4.64	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL	244

PARTE II

3.1	Níveis escolhidos para as variáveis:	283
3.2	Delineamento experimental	283
3.3	Parâmetros utilizados durante o processo	286
3.4	Otimização do método experimental	286
3.5	Parâmetros avaliados durante o processo de extração por ultra-som	291
4.1	Repetibilidade do método	294
4.2	Precisão intermediária do método	295
4.3	Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	296
4.4	Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por Microondas	298
4.5	Níveis escolhidos para as variáveis:	299
4.6	Delineamento experimental	299
4.7	Avaliação das variáveis da extração	303
4.8	Otimização das variáveis de extração de ricinina assistida por microondas	304
4.9	Parâmetros utilizados durante o estudo cinético da extração:	306
4.10	Variáveis otimizadas através do estudo do processo de extração de	307

	ricinina assistida por microondas	
4.11	Repetibilidade do método de extração	308
4.12	Precisão intermediária do método de extração	309
4.13	Parâmetros avaliados durante o processo de extração por ultra-som	313
4.14	Variáveis otimizadas através do estudo do processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	317
4.15	Extratos de folhas de <i>R. communis</i>	318
4.16	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com Ricenr nas concentrações: 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 0,4mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL	319
4.17	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com MAM nas concentrações: 0,2mg/mL; 0,4mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL.	319
4.18	Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial do composto ricinina na concentração de 0,1mg/mL	320

Lista de Figuras

PARTE I

1.1	Saúva-limão transportando folhas de eucalipto	3
1.2	Ninho de saúvas, mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais – Unesp/Rio Claro/ SP	4
1.3	Relação de simbiose entre as formigas cortadeiras e seu fungo simbionte (<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>)	6
1.4	Frutos de <i>S. terebinthifolius</i>	10
1.5	Compostos isolados de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi	11
1.6	Flores e frutos de <i>A. humile</i>	12
3.1	Cromatogramada do extrato etanólico das folhas de <i>A. humile</i> (AHFE) modo analítico. Equipamento Shimadzu LC 10AD, Coluna de fase estacionária C18-ODS Phenomenex, Luna (h x ϕ = 150 x 4,6 mm, 10 μ m).	29
3.2	Derivatizações do ácido masticadienóico (T1).	58
4.1	Classificação dos flavonóides por subclasses	73
4.2	Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual	74
4.3	Espectro de RMN de ^1H de L1 (200 MHz, CD_3OD).	78
4.4	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L1 (200 MHz, CD_3OD).	78
4.5	Espectro de RMN de ^1H de L2 (200 MHz, CD_3OD).	79
4.6	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L2 (200 MHz, CD_3OD).	79
4.7	Espectro de RMN de ^1H de L3 (200 MHz, CD_3OD).	81
4.8	Espectro de RMN de ^1H de L4 (200 MHz, CD_3OD).	82
4.9	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L4 (200 MHz, CD_3OD).	83
4.10	Espectro de RMN de ^1H de L5 (400 MHz, CD_3OD).	86
4.11	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L5 (400 MHz, CD_3OD)	86
4.12	Espectro de RMN de ^{13}C de L5 (100 MHz, CD_3OD).	87
4.13	Espectro de COSY de L5 (400 MHz, CD_3OD).	87
4.14	Mapa de correlações HSQC de L5 (400 MHz, CD_3OD).	88
4.15	Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz, CD_3OD).	93
4.16	Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz, CD_3OD).	93
4.17	Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz,	94

	CD ₃ OD).	
4.18	Mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz, CD ₃ OD).	94
4.19	Espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides L8, L4 e L5 (400 MHz, CD ₃ OD).	97
4.20	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides L8, L4 e L5 (400 MHz, CD ₃ OD).	97
4.21	Mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides L8, L4 e L5 (400 MHz, CD ₃ OD).	98
4.22	Ampliação do mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides L8, L4 e L5 (400 MHz, CD ₃ OD).	98
4.23	Espectro de RMN de ¹ H de L9 (400 MHz, CD ₃ OD)	101
4.24	Espectro de RMN de ¹ H da mistura de L9 e L10 (400 MHz, CD ₃ OD)	101
4.25	Espectro de Cosy da mistura de L9 e L10 (400 MHz, CD ₃ OD)	102
4.26	Espectro de RMN de ¹ H de L15 e L14 (400 MHz, CD ₃ OD).	106
4.27	Mapa de correlações do HSQC de L15 e L14 (400 MHz, CD ₃ OD).	106
4.28	Cromatogramas das frações (AHFE-F1 a F6) obtidas do fracionamento do extrato das folhas de <i>Anacardium humile</i> .	109
4.29	Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F1) L9, L10 e L11; b) Espectro de UV do flavonóide L10 e L11 (t _r = 29,5 min) c) Espectro de UV do flavonoides L9 (t _r = 33,1 min).	111
4.30	a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L9 (t _r = 33,1 min).	111
4.31	a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L10 e L11 (t _r = 29,5 min).	112
4.32	Espectro de massas no modo negativo da aglicona quercetina.	115
4.33	Espectro e ampliação do espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides (AHFE-F1): L9, L10 e L11 (400 MHz, CD ₃ OD).	118
4.34	Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: L9, L10 e L11 (400 MHz, CD ₃ OD).	116
4.35	Ampliação do mapa de correlações do conjunto de flavonoides (AHFE-F1) : L9, L10 e L11 (400 MHz, CD ₃ OD)	119
4.36	Ampliação do mapa de correlações do conjunto de flavonoides (AHFE-F1) : L9, L10 e L11 (400 MHz, CD ₃ OD)	120
4.37	Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F3) L12 e L13; b) Espectro de UV do flavonóide L12 (t _r = 30,6 min) c) Espectro de UV do flavonoides L13 (t _r = 31,9 min)	122
4.38	a) e c) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L13 (t _r = 31,8 min). b) e d) Espectro de	122

	massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L12 (t _r = 30,6 min).	
4.39	Espectro de massas no modo negativo da aglicona quercetina	123
4.40	Espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides: L12 e L13 (400 MHz, CD ₃ OD)	124
4.41	Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: L12 e L13 (400 MHz, CD ₃ OD).	125
4.42	Ampliação do mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: L12 e L13 (400 MHz, CD ₃ OD).	125
4.43	Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F4): L9 (t _r = 32,5 min), L14 (t _r = 32,6 min) e L15 (t _r = 31,4 min). b) Espectro de UV do flavonóide L14; c) Espectro de UV do flavonoide L15.	129
4.44	Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19. b) Espectro de UV do flavonóide L16 e L19; c) Espectro de UV do flavonoide L9; d) Espectro de UV do flavonoide L15; e) Espectro de UV do flavonoide L10.	129
4.45	Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F6) L9, L10, L16, L15, L17, L18 e L19. b) Espectro de UV do flavonóide L16 e L19; c) Espectro de UV do flavonoide L18; d) Espectro de UV do flavonoide L17.	130
4.46	a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L9 e L14 (t _r = 32,5 min). b) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular da substância L15 (t _r = 31,4 min). c) Espectro de massas no modo negativo da aglicona kaenferol.	130
4.46	c) Espectro de massas no modo negativo da aglicona kaenferol.	131
4.47	a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular das substâncias L16 e L19 (t _r = 36,5 min).	131
4.48	a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ como íon molecular das substâncias L17 (t _r = 35,5 min); b) L18 (t _r = 34,4 min).	132
4.49	Espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides (AHFE-F4): L9, L15 e L14 (400 MHz, CD ₃ OD)	135
4.50	Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD ₃ OD).	135
4.51	Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD ₃ OD).	136
4.52	Mapa de correlações HMBC do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD ₃ OD).	136
4.53	Espectro de RMN de ¹ H do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD ₃ OD).	137

4.54	Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD_3OD).	137
4.55	Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD_3OD)	138
4.56	Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD_3OD).	138
4.57	Ampliação do mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD_3OD).	139
4.58	Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides (AHFE-6): L9, L10, L15, L16, L17, L18 e L19 (400 MHz, CD_3OD)	139
4.59	Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides (AHFE-6): L9, L10, L15, L16, L17, L18 e L19 (400 MHz, CD_3OD).	140
4.60	Espectro de RMN de ^1H de B1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	145
4.61	Espectro de Cosy de B1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	145
4.62	Mapa de correlações HMBC de B1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	146
4.63	Ampliação do mapa de correlações HMBC de B1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	146
4.64	Ampliação do mapa de correlações HMBC de B1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	147
4.65	Espectro de RMN de ^1H de B2 (400 MHz, CD_3OD).	151
4.66	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de B2 (400 MHz, CD_3OD).	151
4.67	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de B2 (400 MHz, CD_3OD).	152
4.68	Espectro de RMN de ^{13}C de B2 (100 MHz, CD_3OD).	152
4.69	Espectro de RMN de ^1H de B3 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	156
4.70	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de B3 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	156
4.71	Espectro de RMN de ^{13}C de B3 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	157
4.72	Espectro de RMN de ^1H de B4 (400 MHz, CD_3OD).	159
4.73	Mapa de correlações HSQC de B4 (400 MHz, CD_3OD)	159
4.74	Espectro de RMN de ^1H de F1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	161
4.75	Espectro de RMN de ^{13}C de F1 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	161
4.76	Espectro de RMN de ^1H de F2 (400 MHz, CD_3OD).	164
4.77	Espectro de RMN de ^1H da mistura dos compostos fenólicos F2, F3 e F4 (400 MHz, CD_3OD).	164
4.78	Espectro de Cosy da mistura dos compostos fenólicos F2, F3 e F4 (400 MHz, CD_3OD).	165
4.79	Mapa de correlações HSQC da mistura dos compostos fenólicos F2, F3 e F4 (400 MHz, CD_3OD).	165

4.80	Ampliação do mapa de correlações HMBC da mistura dos compostos fenólicos F2, F3 e F4 (400 MHz, CD ₃ OD).	165
4.81	Espectro de RMN de ¹ H de T1 (400 MHz, CDCl ₃).	170
4.82	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de T1 (400 MHz, CDCl ₃).	170
4.83	Espectro de RMN de ¹³ C de T1 (100 MHz, CDCl ₃).	171
4.84	Espectro de RMN de ¹ H d de T2 (400 MHz, CDCl ₃)	171
4.85	Ampliação do espectro de RMN de T2 (400 MHz, CDCl ₃).	172
4.86	Cromatograma do conjunto de triterpenos: T1, T3, T4 e T5	174
4.87	Espectro de massas da substancia T5 (tr. = 21,3 min.)	174
4.88	Espectro de massas da substancia T4 (tr. = 21,7 min.)	174
4.89	Espectro de massas da substância T3 (tr. = 22,9 min.)	175
4.90	Espectro de massas da substância T1 (tr. = 24,2 min.)	175
4.91	Espectro de RMN de ¹ H do conjunto de triterpenos: T1, T3, T4 e T5.	177
4.92	Espectro de RMN de ¹³ C do conjunto de triterpenos: T1, T3, T4 e T5	177
4.93	Espectro e ampliação do espectro de RMN de ¹ H de T6 (400 MHz, CDCl ₃).	181
4.94	Cromatograma do composto T6 (tr. = 38,9 min.).	182
4.95	Espectro de massas de T6 (I.E.=70 eV).	182
4.96	Espectro de massas da substância (T7) (I.E.=70 eV).	184
4.97	Espectro de RMN de ¹ H de T7 (400 MHz, CDCl ₃)	185
4.98	Espectro de RMN de ¹ H de T8 (400 MHz, Piridina-d ₅).	188
4.99	Ampliação do espectro de RMN de T8 (400 MHz, Piridina-d ₅).	188
4.100	Espectro de RMN de ¹³ C de T8 (100 MHz, Piridina-d ₅).	189
4.101	Derivatizações do ácido masticadienóico (T1)	190
4.102	Cromatograma do composto T1-A.	191
4.103	Espectro de massas do composto T1-A.	191
4.104	Espectro de RMN de ¹ H do composto T1 (400 MHz, CDCl ₃).	195
4.105	Espectro de RMN de ¹ H do composto T1-A (400 MHz, CDCl ₃)	195
4.106	Espectro de RMN de ¹³ C do composto T1 (100 MHz, CDCl ₃).	196
4.107	Espectro de RMN de ¹³ C do derivado T1-A (100 MHz, CDCl ₃).	196
4.108	Espectro de RMN de ¹ H do derivado T1-B (400 MHz, CDCl ₃).	200
4.109	Espectro de RMN de ¹³ C do derivado T1-B (100 MHz, CDCl ₃).	200
4.110	Espectros de absorção no IV do ligante, complexo precursor cis-	202

	Ru(Cl ₂)(2,2'-bipiridina) ₂ .2H ₂ O e complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O.	
4.111	Espectro de RMN de ¹ H do ligante (flavonóide-quercetina) (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	203
4.112	Espectro de RMN de ¹ H do complexo precursor cis-Ru(Cl ₂)(2,2'-bipiridina) ₂ .2H ₂ O (200 MHz, DMSO).	204
4.113	Espectros de RMN de ¹ H; a) ligante (quercetina); b) complexo precursor; c) complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (200 MHz, DMSO).	207
4.114	Estrutura da quercetina e a divisão das bandas (A e B) relacionadas à absorção no UV.	209
4.115	Espectros de absorção no UV do ligante (quercetina) (MeOH).	209
4.116	Espectros de absorção no UV do complexo precursor cis-Ru(Cl ₂)(2,2'-bipiridina) ₂ .2H ₂ O (EtOH/H ₂ O).	210
4.117	Espectros de absorção no UV do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (EtOH/H ₂ O).	211
4.118	Espectros de absorção no UV do ligante (quercetina) e complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	212
4.119	Espectro de IV (KBr) do ligante quercetina e complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	214
4.120	Estrutura do complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	215
4.121	Espectro de absorção no UV do ligante (quercetina) e complexo [Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	216
4.122	Espectro de IV (KBr) do ligante quercetina e complexo [Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄].	214
4.123	Estrutura do complexo [Zn(Quercetina)(H ₂ O) ₄].	216
4.124	Triterpeno ácido masticadienóico e seus derivados (T2, T1-A e T1-B)	247
4.125	Atividade da partição MUFE-A (100 % de inibição; c = 500 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote (<i>L. gongylophorus</i>).	248

PARTE II

1.1	Folhas e frutos de <i>R. communis</i> , o alcaloide ricinina e as formigas cortadeiras (<i>Atta sexdens rubropilosa</i>).	274
3.1	Metodologia empregada no estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes condições de extração por microondas.	282
3.2	Metodologia empregada na extração de ricinina das folhas de <i>R. communis</i> assistida por microondas.	285

3.3	Metodologia empregada no estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes temperaturas de extração por ultra-som.	288
3.4	Metodologia empregada na escolha do solvente para extração de ricinina assistida por ultra-som.	289
3.5	Processo de extração de ricinina assistida por Ultra-som.	290
3.6	Metodologia empregada na extração de ricinina assistida por Ultra-som.	290

PARTE III

1.1	Plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae (1) <i>Ruta graveolens</i> (Rutaceae); 2) <i>Cedrela odorata</i> (Meliaceae); 3) <i>Spiranthera odoratíssima</i> (Rutaceae); 4) <i>Toona ciliata</i> (Meliaceae); 5) <i>Cabralea canjerana</i> (Meliaceae); 6) <i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae) e 7) idem ao 3.	328
3.1	Bioensaio em coleóptilo de trigo.	334
3.2	Dicotiledoneas: agrião (<i>Lepidium sativum</i> L.), alface (<i>Lactuca sativa</i>) e tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), monocotiledônea cebola (<i>Allium cepa</i> L.).	334
3.3	Bioensaio de fitotoxicidade.	336
4.1	Estrutura química dos alcaloides (1-3), cumarinas (4-15) e derivados do ácido cinâmico. (16-17).	338
4.2	Estrutura química dos flavonoides (18-31).	338
4.3	Estrutura química dos triterpenos (32-35).	339
4.4	Estrutura química dos limonoides (36-41).	339

Lista de Fluxogramas

PARTE I

3.1	Obtenção dos extratos da espécie <i>Schinus terebinthifolius</i>	26
3.2	Obtenção dos extratos das espécies <i>Macairea urundeuva</i> e <i>Anacardium humile</i>	26
3.3	Fracionamento de AHFE	33
3.4	Metodologia utilizada na partição do extrato AHFE	34
3.5	Fracionamento de AHFE-A	35
3.6	Fracionamento de AHFE-A (19-21) e AHFE-A (22)	36
3.7	Fracionamento da amostra AHFE-A(23-24)	37
3.8	Metodologia utilizada na partição do extrato MUFE	37
3.9	Fracionamento da partição MUFE-A	38
3.10	Fracionamento de MUFE-A (27-36).	39
3.11	Fracionamento da partição MUFE-A-(19-22)	40
3.12	Fracionamento de MUFE-A (23-26)	41
3.13	Fracionamento de MUFE-A (42-45) e MUFE-A (53-60)	41
3.14	Fracionamento da partição MUFE-Q	42
3.15	Fracionamento de MUFE-Q (29-30)	43
3.16	Fracionamento da fração MUFE-Q(20-24).	43
3.17	Fracionamento de MUGE	44
3.18	Fracionamento da partição MUGE-(B)	45
3.19	Fracionamento da partição MUGE-(D/E)	46
3.20	Fracionamento da partição MUGE-(D/E) (12-16/23-26)	47
3.21	Fracionamento da partição MUGE-(C)	48
3.22	Fracionamento de STFRD	49
3.23	Fracionamento de STFRD-3	50
3.24	Fracionamento de STFRD-4	51
3.25	Fracionamento de STFRD-5	52
3.26	Metodologia utilizada na partição do extrato STFRM	53
3.27	Metodologia utilizada na partição do extrato STFM	54
3.28	Metodologia utilizada na partição do extrato STFH	55
3.29	Fracionamento de STFRM-A-(16-24)	56
3.30	Fracionamento de STFRH	57

Lista de Gráficos

PARTE I

4.1	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos etanólicos de folhas de <i>Anacardium humile</i> e galhos e folhas de <i>Macairea urundeuva</i>	220
4.2	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato etanólico de folhas de <i>Anacardium humile</i> (AHFE).	222
4.3	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide amentoflavona (B2).	223
4.4	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com os flavonoides quercetina (L1) e quercitrina (L9).	223
4.5	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o conjunto de flavonoides glicosilados	224
4.6	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato etanólico das folhas de <i>Macairea urundeuva</i>	225
4.7	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (L4)	227
4.8	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o ácido elágico (F1)	228
4.9	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o epicatequina (F5).	228
4.10	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	230
4.11	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	231
4.12	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico dos galhos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	231
4.13	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações STFRM-H, STFRM-A e STFRM-M	232

4.14	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato hexânico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	233
4.15	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato metanólico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	234
4.16	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide agatisflavona (B3)	235
4.17	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide tetrahidrorobustaflavona (B1).	236
4.18	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com os triterpenos ácido masticadienólico (T1) e schinol (T2).	237
4.19	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do flavonóide quercetina, nas concentrações 0,1mg/mL; 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL	240
4.20	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão dos sais, acetato de cobre e acetato de zinco na concentração de 0,1mg/mL	241
4.21	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do Complexo** - cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O, nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 1mg/mL e 2mg/mL	242
4.22	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL	243
4.23	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL	244
4.24	Efeito dos extratos etanólicos das folhas de <i>A. humile</i> e <i>M. urundeuva</i> sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	245
4.25	Efeito das frações oriundas do extrato etanólico das folhas de <i>A. humile</i> sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	246
4.26	Efeito da fração MUFE-M sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	247

4.27	Efeito dos compostos isolados de <i>A. humile</i> e <i>M. urundeuva</i> sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	248
4.28	Efeito dos extratos das folhas e galhos de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .	250
4.29	Efeito dos extratos dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	251
4.30	Efeito dos biflavonoides agatisflavona e tetrahidrorobustaflavona, na concentração de 100 µg/mL, sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	252
4.31	Efeito dos complexos metálicos [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄] e (cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O na concentração de 100 µg/mL, sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	253

PARTE II

4.1	Curva de calibração da ricinina.	293
4.2	Efeito de diferentes temperaturas do processo na estabilidade do composto ricinina	297
4.3	Efeito de diferentes potências do microondas na estabilidade do composto ricinina	298
4.4	Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração (ANOVA).	301
4.5	Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração de ricinina assistida por microondas.	302
4.6	Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração de ricinina assistida por microondas.	302
4.7	Efeito da variável proporção solvente/amostra no processo de extração de ricinina assistida por microondas	304
4.8	Efeito da variável solvente (D) (% AcOEt em MeOH) no processo de extração de ricinina assistida por microondas	305
4.9	Estudo cinético do processo de extração de ricinina assistida por microondas	307
4.10	Efeito de diferentes temperaturas utilizadas no processo de extração por ultra-som na estabilidade do composto ricinina	311
4.11	Efeito de diferentes solventes no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	312
4.12	Efeito de diferentes temperaturas no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	314

4.13	Efeito da amplitude e ciclo de trabalho no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	315
4.14	Efeito de diferentes tempos no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	316
4.15	Efeito de diferentes proporções amostra/solvente (25,0 mL) no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	316
4.16	Efeito de diferentes proporções amostra/solvente no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	317

PARTE III

4.1	Bioatividade dos compostos (1-17) sobre coleóptilos de trigo	340
4.2	Bioatividade dos compostos (18-31) sobre coleóptilos de trigo.	341
4.3	Bioatividade dos compostos (32-41) sobre coleóptilos de trigo	343
4.4	Efeitos dos compostos 1, 3, 4, 8, 11, 12 e o herbicida comercial Logran [®] sobre o crescimento de <i>L. sativum</i> . Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch . ^a Valores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^b Valores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.	345
4.5	Efeitos dos compostos 1, 3, 4, 8, 11, 12 e o herbicida comercial Logran [®] sobre o crescimento de <i>L. esculentum</i> . Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch . ^a Valores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^b Valores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.	346
4.6	Efeitos dos compostos 1, 3, 4, 8, 11, 12 e o herbicida comercial Logran [®] sobre o crescimento de <i>A. cepa</i> . Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^a Valores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^b Valores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.	346
4.7	Efeitos dos compostos 18, 21, 23 e o herbicida comercial Logran [®] sobre o crescimento de <i>L. sativum</i> . Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^a Valores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^b Valores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.	347
4.8	Efeitos dos compostos 36, 41 e o herbicida comercial Logran [®] sobre o germinação das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^a Valores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^b Valores significativamente	348

- diferentes com $0,01 < P < 0,05$.
- 4.9 Efeitos dos compostos **36**, **41** e o herbicida comercial Logran[®] sobre o crescimento das raízes das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$. 349
- 4.10 Efeitos dos compostos **36**, **41** e o herbicida comercial Logran[®] sobre o crescimento das partes aéreas das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$. 349

Lista de Esquemas

PARTE I

4.1	Proposta de fragmentação para o composto L9	113
4.2	Proposta de fragmentação para os compostos L10 e L11	114
4.3	Proposta de fragmentação para o composto L16	132
4.4	Proposta de fragmentações do composto T4	175
4.5	Proposta de fragmentações do composto T5	176
4.6	Proposta de fragmentações do composto T1 e T3.	176
4.7	Proposta de fragmentações do composto T6	183
4.8	Proposta de fragmentações do composto T7	184
4.9	Proposta de fragmentações do composto T1-A	192

RESUMO

PARTE I: Estudo de *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* no controle das formigas cortadeiras.

As formigas cortadeiras são conhecidas pelo poder de destruição de um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura. Vários métodos têm sido utilizados para o controle dos mesmos, tais como, a utilização de substâncias orgânicas halogenadas, sulfuradas e fosforadas. No entanto, a utilização contínua desses compostos tem gerado vários problemas de contaminações ambientais, sendo de extrema importância, a busca de novas estratégias de controle das formigas cortadeiras. Nesse contexto, esse trabalho apresenta o estudo fitoquímico das espécies *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* e avaliação do potencial inseticida e fungicida dos extratos, frações e compostos obtidos frente às formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. O estudo fitoquímico destas espécies proporcionou o isolamento e identificação de diversos metabólitos secundários, dentre eles, triterpenos, esteroides, flavonoides, biflavonoides, flavonoides glicosilados e compostos fenólicos. Para as espécies *A. humile* e *M. urundeuva*, este é o primeiro relato de suas composições químicas. A partir dos ensaios biológicos realizados com as operárias de *Atta*, verificou-se que vários extratos provocaram aumento na mortalidade quando comparados ao controle (dieta pura) de acordo com o teste de log-rank ($p < 0,05$), assim, sugere-se que o potencial tóxico apresentado pelos mesmos estejam correlacionados ao efeito sinérgico. O ácido elágico e epicatequina isolados de *M. urundeuva* foram ativos sobre o crescimento do fungo simbiote. Os complexos metálicos com o flavonoide quercetina apresentarem resultados significativos sobre os ensaios de toxicidade por ingestão em *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote. Este trabalho contribui com um amplo projeto que vem sendo desenvolvido pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, que visa avaliar a atividade inseticida e fungicida de diversos complexos de coordenação com diferentes metais e flavonoides no controle de diversas pragas.

PARTE II: Otimização dos processos de extração de ricinina em folhas de *Ricinus communis* assistida por microondas e ultra-som.

O uso de plantas com propriedades inseticidas tem sido proposta como métodos alternativos para o controle das formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e seu fungo simbionte *L. gongylophorus*. *R. communis* foi descrita como uma planta tóxica às formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) e outros insetos. As folhas e as flores desta planta contém o alcaloide ricinina, sendo este, o responsável por *R. communis* possuir efeito inseticida sobre as formigas cortadeiras. Os processos de otimização de extração assistida por diversas técnicas aliadas à aplicação de delineamentos experimentais tem se tornado indispensáveis para otimização de novos processos de extração. A extração assistida por micro-ondas (MAE) e ultra-som tem sido amplamente utilizada na extração de compostos de diversas plantas apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais de extração de compostos orgânicos. Neste trabalho, dois novos processos de extração de ricinina de folhas de *R. communis* foram desenvolvidos. A extração de ricinina assistida por microondas mostrou-se como um método eficiente para extração e quantificação do alcaloide ricinina, proporcionando um tempo de extração reduzido, menor consumo de solvente e uma melhor qualidade dos extratos obtidos. Através do método desenvolvido no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som, foi possível obter extratos enriquecidos com o composto ativo ricinina em um tempo de extração reduzido (5 min.), empregando como solvente extrator AcOEt. Em ensaios sobre as formigas cortadeiras, o extrato enriquecido com o composto ativo ricinina obtido através da extração por ultra-som, apresentou maior potencial tóxico quando comparado a extratos de *R. communis* obtidos pelos métodos clássicos de extração.

PARTE III: Fitotoxicidade de compostos pertencentes às famílias Meliaceae e Rutaceae

Alelopatia é o termo criado por Molisch que demonstra interações prejudiciais ou benéficas entre organismos (do grego *allelon* = recíproca, e *phatos* = prejuízos). A definição abrange os efeitos benéficos e prejudiciais causados a organismos em torno de substâncias químicas liberadas pela planta no ambiente. A definição atualmente em uso foi criada pela Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS) como

“a ciência que estuda qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos”. Aleloquímicos (toxinas naturais de plantas que desempenham funções nas interações: planta-planta, planta-inseto e planta-microorganismos) são considerados fontes promissoras para o controle de plantas daninhas. Neste trabalho três alcaloides (**1-3**), doze cumarinas (**4-15**), dois derivados do ácido cinâmico (**16-17**), quatorze flavonoides (**18-31**), quatro triterpenos (**32-35**) e seis limonoides (**36-41**) isolados das famílias Meliaceae e Rutaceae, foram avaliados quanto aos perfis de bioatividade, através de bioensaios em coleóptilos de trigo seguido pelos ensaios de fitotoxicidade. Em resumo, os compostos **1**, **12**, **21**, **36** e **41** foram os mais promissores nos ensaios de fitotoxicidade em espécies-alvo (*Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum* e *Allium cepa*). **1**, **12**, **21** e **36** apresentaram resultados significativos de inibição do crescimento das raízes para a espécie *L. sativum*, sendo estes, específicos para esta espécie. O limonoide **41** apresentou inibição tanto na germinação quanto no desenvolvimento para todas as espécies dicotiledôneas. Para todas as espécies-alvo, o composto **41** apresentou melhores níveis de fitotoxicidade quando comparado ao herbicida comercial Logran[®] (controle positivo), demonstrando a alta atividade fitotóxica do mesmo em todas as espécies avaliadas (*L. sativum*, *L. sativa*, *L. esculentum* e *A. cepa*).

ABSTRACT

PART I: Study of *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* and *Macairea urundeuva* in leaf-cutting ants control.

Leaf-cutting ants are known by their strong power of pulling down several vegetable crops and to cause economic loss to the agriculture. Several methods have been used for their control such as the use of halogenated, sulfurous and phosphorus compounds. However, the continued use of these compounds leads to problems such as environmental contamination and then raising the need for new strategies to control of leaf-cutting ants. In this context, this work presents a phytochemical study of the species *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* and the insecticide and fungicide potential of the crude extracts, fractions and isolated compounds against the leaf-cutting ants, *Atta sexdens rubropilosa*, and its symbiotic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*. The study of these species allowed the isolation and/or identification of several secondary metabolites including triterpens, steroids, flavonoids, biflavonoids, glycosylated flavonoids and phenolic compounds. For both species *A. humile* and *M. urundeuva* this is the first report of their chemical composition. From the biological assays with leaf-cutting ants, it was found that several extracts showed insecticidal activity as a result of the synergistic effect of their chemical composition. The elagic acid isolated from *M. urundeuva* showed activity against the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. The metal complexes of flavonoid quercetin didn't present good results on biological assays against the workers of leaf-cutting ants and its symbiotic fungus. Besides these results, this study contributed to a project that has been developed by the Natural Product Laboratory at UFSCar, which aims to evaluate the biological activity of several metal complexes with different metals and flavonoids to the control of several agriculture pests.

PART II: Optimization of microwave and ultrasound-assisted extractions of ricinine from *R. communis* leaves.

The use of insecticidal plants has been proposed as an alternative method for leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa*) and its the symbiotic fungus (*Leucoagaricus gongylophorus*) control. *R. communis* was described as a toxic plant to leaf-cutting ants and other insects. The leaves and flowers of this plant contain the alkaloid ricinine. This alkaloid is the responsible for *R. communis* insecticide effects against leaf-cutting ants. The optimization of processes extraction assisted by various techniques with application of experimental design has become indispensable for optimization of these processes. The Microwave (MAE) and Ultrasound (UAE) assisted extractions have been widely employed for the extraction of compounds from plants and used as an alternative to conventional methods. This work presents the development of two new extraction processes for ricinine from leaves of *R. communis*. The Microwave-assisted extraction method was efficient for extraction and quantification of ricinine providing reduction of the extraction time, solvent consumption and also better quality of the extracts. Through the method developed by ultrasound-assisted extraction, it was obtained extracts with high level of the active compound ricinine and both, extraction time (5 min) and solvent (ethyl acetate) consumption, was considerably reduced and the yields were maximized. From the biological assays with leaf-cutting ants, the extract with high levels of ricinine obtained by ultrasound-assisted extraction showed higher toxicity than the extracts obtained by classical methods.

PART III: Phytotoxicity of compounds from Meliaceae and Rutaceae families.

Allelopathy is the term coined by Molisch to reflect all of these interactions (from the Greek allelon = reciprocal, and pathos = damage). The definition covers the beneficial and detrimental effects caused in the surrounding organisms by the chemicals released by the plant into the environment. The definition currently in use was established by the International Allelopathy Society (IAS) as “the science studying any process involving secondary metabolites produced by plants, algae, bacteria, and fungi that influence the growth and development of agricultural and

biological systems". Allelochemicals (natural plant toxins that play a role in plant–plant, plant–insect and plant–microorganism interactions) are considered to be promising sources for the control of weeds. In this work, three alkaloids (**1-3**), twelve coumarins (**4-15**), two dihydrocinnamic acids derivatives (**16-17**), fourteen flavonoids (**18-31**), four triterpens (**32-35**) and six limonoids (**36-41**) from Meliaceae and Rutaceae families were evaluated firstly on etilated coleoptile followed by phytotoxicity bioassays. The compounds **1**, **12**, **21**, **36** and **41** were the most important in the screening of phytotoxicity against target-species (*Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum* e *Allium cepa*). **1**, **12**, **21** e **36** showed significant results in the root growth for the specie *L. sativum*, being specific for this specie. The limonoid **41** showed inhibition during the germination and growth for all dicotyledons. For all target species, compound **41** showed better levels of toxicity when compared to the Logran herbicide (positive control), demonstrating the high phytotoxicity activity of it in all species evaluated (*L. sativum*, *L. sativa*, *L. esculentum* e *A. cepa*).

SUMÁRIO

Parte I

1	Introdução	3
1.1	Formigas Cortadeiras	3
1.2	Métodos de Controle de Formigas Cortadeiras	7
1.3	Ordem Sapindales	8
1.4	A Família Anacardiaceae	8
1.5	A espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	9
1.6	A espécie <i>Anacardium humile</i> A. St.-Hil	11
1.7	A espécie <i>Macairea urundeuva</i>	12
1.8	Atividade inseticida de produtos naturais associados a complexos metálicos	12
2	Objetivos	17
3	Procedimento Experimental	21
3.1	Materiais e Métodos	21
3.2	Equipamentos	21
3.3	Material Botânico	24
3.3.1	Preparação dos materiais vegetais e obtenção extratos brutos de <i>Anacardium humile</i> , <i>Macairea urundeuva</i> e <i>Schinus terebinthifolius</i>	24
3.4	Estudo do extrato AHFE	27
3.4.1	Cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (<i>HSCCC</i>)	27
3.4.2	Fracionamento do extrato AHFE por Cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (<i>HSCCC</i>)	28
3.4.3	Seleção do Sistema de Solventes	28
3.4.4	Cálculo do coeficiente de partição (<i>K</i>) por Cromatografia líquida	29
3.4.5	Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia em Contracorrente	31
3.4.6	Fracionamento do extrato AHFE via Cromatografia em Contracorrente	32
3.4.7	Fracionamento do extrato AHFE	33
3.4.8	Fracionamento de AHFE-A	34
3.4.9	Fracionamento de AHFE-A (16-18), (19-21) e AHFE-A (22)	35
3.4.10	Fracionamento de AHFE-A (23-24)	36
3.5	Estudo do extrato MUFE	37

3.5.1	Fracionamento da partição MUFE-A	38
3.5.2	Fracionamento de MUFE-A (27-36)	39
3.5.3	Fracionamento de MUFE-A (19-22)	40
3.5.4	Fracionamento de MUFE-A (23-26)	40
3.5.5	Fracionamento de MUFE-A (42-45) e MUFE-A (53-60)	41
3.5.6	Fracionamento de MUFE-Q	42
3.5.7	Fracionamento de MUFE-Q (29-30)	42
3.5.8	Fracionamento de MUFE-Q (19-24)	43
3.6	Estudo do extrato MUGE	44
3.6.1	Fracionamento de MUGE-B	45
3.6.2	Fracionamento de MUGE-(D/E)	45
3.6.3	Fracionamento de MUGE-C	47
3.7	Estudo do extrato STFRD	48
3.7.1	Fracionamento de STFRD-3	49
3.7.2	Fracionamento de STFRD-4	50
3.7.3	Fracionamento de STFRD-5	51
3.8	Estudo dos extratos STFRM e STFM	52
3.8.1	Fracionamento de STFRM-A	55
3.8.2	Fracionamento de STFRM-A (16-24)	55
3.8.3	Estudo do extrato STFRH	56
3.9	Derivatizações do ácido masticadienólico	58
3.10	Síntese dos complexos metálicos	59
3.10.1	Síntese de <i>cis</i> -Ru(Cl ₂)(2,2'-bipiridina) ₂ .	59
3.10.2	Síntese de <i>cis</i> -[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂	59
3.10.3	Síntese do complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄]	60
3.10.4	Síntese do complexo [Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄]	60
3.11	Metodologia dos Ensaio biológicos	61
3.11.1	Ensaio biológicos com as Formigas Cortadeiras	61
3.11.2	Ensaio Biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	62
4	Resultados e Discussões	65
4.1	Substâncias isoladas e/ou identificadas	65
4.2	Identificação Estrutural	73
4.2.1	Flavonoides	73

4.2.2	Identificação dos flavonoides quercetina (L1), kaempferol (L2) e miricetina (L3)	76
4.2.3	Identificação do flavonoide miricetrina (L41)	81
4.2.4	Identificação do flavonoide miricetina-3-O- β -galactosídeo (L5)	83
4.2.5	Identificação do conjunto de flavonóides: Miricetina-3-O- β -rutinosídeo (L6), Miricetina-3-O- β -glucosídeo (L7) e Miricetina-3-O- β -galactosídeo (L5)	89
4.2.6	Identificação do conjunto de flavonóides: Miricetina-3-O- α -arabinosídeo (L8), Miricetrina (L4) e Miricetina-3-O- β -galactosídeo (L5)	95
4.2.7	Identificação dos flavonóides Quercitrina (L9) e Quercetina-3-O- β -glucosídeo (L10)	99
4.2.8	Identificação dos flavonoides Kanferol-3-O-galactosídeo (L14) e Kanferol-3-O-glucosídeo (L15)	103
4.3	Identificação do conjunto de flavonoides glicosilados de <i>A. humile</i> por HPLC-UV-MS-MS	107
4.3.1	Identificação do conjunto de flavonoides: Quercitrina (L9), Quercetina-3-O- β -glucosídeo (L10) e Quercetina-3-O- β -galactosídeo (L11).	107
4.3.2	Identificação do conjunto de flavonoides: Quercetina-3-O- β -xilósídeo (L12) e Quercetina-3-O- β -arabinosídeo (L13).	120
4.3.3	Identificação do conjunto de flavonoides (Frações AHFE-F4, AHFE-F5 e AHFE-F6): Kaenferol-3-O- β -galactosídeo (L14) Kaenferol-3-O- β -glucosídeo (L15), Kaenferol-3-O- α -raminosídeo (L16), Kaenferol-3-O- β -xilósídeo (L17), Kaenferol-3-O- α -arabinosídeo (L18) e Kaenferol-7-O- β -glucosídeo (19).	126
4.4	Identificação estrutural dos biflavonoides	141
4.4.1	Identificação estrutural dos biflavonoide (B1)	141
4.4.2	Identificação estrutural dos biflavonoide Tetrahidrorobustaflavona (B2)	147
4.4.3	Identificação estrutural dos biflavonoide Amentoflavona (B3)	153
4.4.4	Identificação estrutural dos biflavonoide Agatisflavona (B4)	157
4.5.1	Identificação estrutural do ácido elágico (F1)	160
4.5.2	Identificação estrutural dos compostos fenólicos (F2, F3 e F4)	162
4.6	Identificação estrutural dos Triterpenos	167
4.6.1	Identificação estrutural dos triterpenos ácido masticadienólico (T1) e schinol (T2)	167
4.6.2	Identificação estrutural do conjunto de Triterpenos: Ácidos Masticadienólico (T1), Isomasticadienólico (T3), Morônico (T4) e Oleanônico (T5)	172

4.6.3	Identificação Estrutural do Triterpeno Lupenona (T6)	180
4.6.4	Identificação do Esteróide Sitostenona (T7)	183
4.6.5	Identificação estrutural de 3-O- β -glucopiranosil sitosterol (T8)	186
4.7	Derivatizações do ácido masticadienóico	190
4.8	Caracterização dos complexos metálicos	201
4.8.1	Caracterização do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina) ₂ (quercetina)](PF ₆) ₂ .2H ₂ O	201
4.8.2	Caracterização do complexo [Cu ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄]	211
4.8.3	Caracterização do complexo [Zn ₂ (Quercetina)(H ₂ O) ₄]	215
4.9	Ensaio bioórgico	220
4.9.1	Ensaio biológico realizado sobre as formigas cortadeiras com as espécies <i>Anacardium humile</i> e <i>Macairea urundeuva</i> .	220
4.9.2	Efeito das frações e substâncias puras do extrato etanólico das folhas de <i>Anacardium humile</i>	221
4.9.3	Efeito das frações e substâncias puras do extrato etanólico das folhas e galhos de <i>Macairea urundeuva</i>	225
4.9.4	Efeito das substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de <i>Macairea urundeuva</i>	227
4.9.5	Ensaio biológico realizado sobre as formigas cortadeiras com a espécie <i>Schinus terebinthifolius</i>	229
4.9.6	Efeito das frações e substâncias puras dos extratos dos frutos e folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	232
4.9.7	Efeito das substâncias isoladas do extrato diclorometânico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	236
4.9.8	Ensaio biológico realizado sobre as formigas cortadeiras com os derivados do ácido masticadienóico (T1)	238
4.9.9	Ensaio biológico realizado sobre as formigas cortadeiras com os complexos metálicos do flavonóide quercetina.	239
4.10	Ensaio com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	245
4.10.1	Atividades dos extratos e frações de <i>Anacardium humile</i> e <i>Macairea urundeuva</i> sobre o crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> .	245
4.10.2	Atividades das substâncias isoladas de <i>Anacardium humile</i> e <i>Macairea urundeuva</i> sobre o crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i>	248
4.10.3	Atividades dos extratos e substâncias puras de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre o crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i>	249
4.10.4	Atividades dos complexos metálicos do flavonóide quercetina	252

	sobre o crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i>	
5	Conclusões	257
6	Referências Bibliográficas	261

Parte II

1	Introdução	273
2	Objetivos	277
2.1	Objetivos específicos	277
3	Procedimentos Experimentais	279
3.1	Materiais e Métodos	279
3.2	Equipamentos	279
3.3	Material Botânico	279
3.4	Extração de Ricinina (Folhas – <i>Ricinus communis</i>) assistida por Microondas	280
3.4.1	Desenvolvimento do método de análise via UPLC-DAD	280
3.4.1.1	Validação do método analítico	281
3.4.1.2	Curva de Calibração e Linearidade	281
3.4.1.3	Precisão e exatidão do método	281
3.4.1.4	Limite de Quantificação e Detecção	281
3.4.2	Estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes condições de extração por microondas	282
3.4.3	Delineamento experimental do método	283
3.4.4	Processo de extração	285
3.4.5	Otimização do método experimental de extração de ricinina assistida por microondas	286
3.5	Extração de Ricinina (Folhas – <i>Ricinus communis</i>) assistida por Ultra-som	287
3.5.1	Estudo da estabilidade de ricinina via Ultra-som	287
3.5.2	Seleção do solvente de extração de ricinina assistida por Ultra-som	288
3.5.3	Processo de extração de ricinina assistida por Ultra-som	289
4	Resultados e Discussões	292
4.1	Extração de Ricinina de folhas de <i>Ricinus communis</i> assistida por Microondas	292
4.1.1	Desenvolvimento do método de análise de ricinina via UPLC-DAD	292

4.1.1.1	Validação do método analítico	292
4.1.1.2	Curva de Calibração e Linearidade	293
4.1.1.3	Precisão e exatidão do método	293
4.1.1.4	Limite de Quantificação e Detecção	296
4.1.2	Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por Microondas	296
4.1.3	Delineamento Experimental do processo de extração de ricinina assistida por Microondas	298
4.1.4	Seleção dos fatores para otimização do processo de extração de ricinina assistida por microondas	300
4.1.5	Otimização do processo de extração de ricinina assistida por microondas	303
4.1.6	Efeito da proporção solvente/amostra no processo de extração de ricinina assistida por microondas	304
4.1.7	Efeito do solvente no processo de extração de ricinina assistida por microondas	305
4.1.8	Estudo cinético do processo de extração de ricinina assistida por microondas	306
4.1.9	Resultados obtidos através da otimização do processo de extração de ricinina assistida por microondas	307
4.1.10	Validação do método de extração de ricinina assistida por microondas	308
4.1.10.1	Precisão do método	308
4.2	Extração de Ricinina de folhas de <i>Ricinus communis</i> assistida por Ultra-som	310
4.2.1	Estudo da estabilidade de ricinina via Ultra-som	310
4.2.2	Escolha do tipo de solvente para extração de ricinina assistida por ultra-som	311
4.2.3	Processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	313
4.2.4	Efeito da temperatura de extração	313
4.2.5	Efeito da amplitude e ciclos do ultra-som no processo de extração	314
4.2.6	Efeito tempo de extração	315
4.2.7	Efeito da relação amostra/solvente no processo de extração de ricinina assistida por microondas	316
4.2.8	Resultados obtidos através da otimização do processo de extração de ricinina assistida por ultra-som	317
4.3	Ensaio Biológicos	318

4.3.1	Ensaio biológico realizado sobre as formigas cortadeiras com os extratos de folhas de <i>R. communis</i> e o alcaloide ricinina.	318
5	Conclusões	321
6	Referências Bibliográficas	323

PARTE III

1	Introdução	327
2	Objetivos	331
3	Procedimento Experimental	333
3.1	Compostos estudados	333
3.2	Ensaio Biológico	333
3.2.1	Bioensaio em coleóptilos de trigo	333
3.2.2	Bioensaio de Fitotoxicidade	334
4	Resultados e Discussão	337
4.1	Resultados da bioatividade em ensaios em coleóptilos de trigo	337
4.2	Resultados dos ensaios de Fitotoxicidade	343
5	Conclusões	351
6	Referências Bibliográficas	353

Prefácio

Este trabalho compreende três partes, o estudo das espécies *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* no controle das formigas cortadeiras, no qual foram avaliados através do potencial inseticida e fungicida, diversos extratos, frações e substâncias oriundas dos mesmos, contando também com a síntese e avaliação biológica de complexos metálicos utilizando o flavonóide quercetina como ligante. No contexto do projeto temático desenvolvido pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar que visa o controle das formigas cortadeiras e para melhor formação da bolsista, foram desenvolvidos durante o Doutorado Sanduíche realizado no Grupo de Alelopatia de Cádiz – Universidad de Cádiz, dois novos processos de extração assistida por micro-ondas e ultra-som para o alcalóide ricinina em folhas de *Ricinus communis*. Aliado ao grande conhecimento e o trabalho desenvolvido durante vários anos com plantas dos gêneros Meliaceae e Rutaceae, o grupo de Produtos Naturais da UFSCar conta com uma grande diversidade estrutural de compostos ainda desconhecidos no seu âmbito de atividades biológicas. Assim, a terceira parte deste trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial fitotóxico através de ensaios alelopáticos de diversas classes de compostos, dentre elas, triterpenos, limonoides, alcaloides, cumarinas, flavonoides, todos estes pertencentes aos gêneros Meliaceae e Rutaceae.

PARTE I
INTRODUÇÃO

PARTE I: Estudo de *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* no controle das formigas cortadeiras

1. Introdução

1.1 Formigas Cortadeiras

Popularmente conhecidas como saúvas e quequéns, as formigas cortadeiras pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, família, Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini. A tribo Attini reúne as espécies do gênero *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) cultivadoras de fungo (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990, MARINHO *et al.*, 2006).

As formigas cortadeiras vivem em ninhos subterrâneos que apresentam muitas câmaras ligadas entre si por meio de longas galerias. Externamente, os ninhos são formados por montes de terra solta com vários orifícios, denominados olheiros, permitindo o acesso das formigas ao exterior. No interior dos ninhos, as câmaras conhecidas como panelas, contêm o jardim de fungos, ovos, larvas, a rainha e, separadamente, as panelas com o lixo. Como as câmaras de lixo possuem resíduos de material vegetal, fungo exaurido e cadáveres de formigas, o fungo encontra-se isolado do lixo, evitando a contaminação do fungo sadio (MARICONI, 1970; LIMA, 2010; MARINHO *et al.*, 2006).



Figura 1.1: Saúva-limão transportando folhas de eucalipto (Fonte: <http://www.fumace.net/formicida/formiga/>).



Figura 1.2: Ninho de saúvas, mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais – Unesp/Rio Claro/ SP. (Fonte: <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/formigascortadeiras.php>).

As cortadeiras são insetos herbívoros com grande eficiência no corte e transporte de folhas. Além disso, são insetos sociais, exibindo comportamentos sociais, como divisão de tarefas, de acordo com cada casta; cuidados e cooperação entre companheiras de ninho (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990, MARINHO *et al.*, 2006). As saúvas apresentam castas permanentes e temporárias. A casta temporária é constituída pelos indivíduos férteis que são as fêmeas aladas, denominadas rainhas, içás ou tanajuras, e pelos machos alados, conhecidos como bitus. Apenas uma rainha ocorre em cada saúveiro, desta forma com sua morte esse se extingue. Os machos possuem um período de sobrevivência curto, morrendo logo após o voo nupcial (MARICONI, 1970). A casta permanente é composta pela rainha e pelas quatro castas de operárias que não possuem função reprodutiva e que são encarregadas de diversas tarefas no ninho, são elas: as jardineiras, as generalistas, as forrageadoras e os soldados (DELLA LUCIA, 1993). A complexa organização desses insetos torna-se uma das barreiras no controle das mesmas, já que são pragas severas quando atacam plantas cultivadas (MARINHO *et al.*, 2006).

A destruição de um grande número de espécies vegetais e o prejuízo econômico causado à agricultura e silvicultura, principalmente nas espécies de

Eucalyptus e *Pinus*, fazem dessas formigas alvos de muitos estudos. Muitas culturas são atacadas e danificadas pelas formigas que cortam as folhas e ramos tenros, podendo destruir completamente as plantas. Elas chegam a consumir até 17 % da produção florestal em sistemas tropicais (FERNANDES *et al.*, 2007). A tribo Attini distribui-se desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina (FARJIBRENNER e RUGGIERO, 1994), constatando-se que os danos causados pelas formigas cortadeiras não são de exclusividade brasileira, mas também são pragas em culturas na América Central (PACHECO, 1987). As saúvas da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, popularmente conhecidas como saúva-limão, são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Paraná.

O fungo simbiote cultivado pelas formigas da tribo Attini é denominado *Leucoagaricus gongylophorus*. Este fungo constitui a base alimentar da colônia. As operárias adultas ingerem principalmente as seivas das plantas no momento de seus cortes e complementam sua alimentação com produtos de degradação do material vegetal pelo fungo, enquanto as larvas e a rainha são alimentadas com o fungo, que é rico em carboidratos e proteínas e pobre em lipídios (MARTIN & WEBER, 1969, FORTI & ANDRADE, 1999).

A relação de simbiose existente entre as formigas cortadeiras e o seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* é relatada em vários estudos (FISHER *et al.*, 1994, SINGER, 1986). O controle do formigueiro pode ser realizado tanto diretamente nas formigas (ação inseticida), quanto no fungo simbiote com base nesta simbiose (ação fungicida) utilizando produtos naturais com estas ações.

Diferentes espécies de formigas cortadeiras parecem cultivar a mesma espécie de fungo (SILVA-PINHATI *et al.*, 2004). Elas alimentam a cultura fúngica com substrato vegetal que é constituído por polímeros complexos e em sua maioria polissacarídeos que representam 70 a 90 % do seu peso seco (RODIONOVA & BEZBORODOV 1997). O fungo simbiote produz despolimerases que degradam a matéria vegetal (SIQUEIRA *et al.*, 1998), gerando carboidratos simples que são assimilados pelas formigas. Entre estas despolimerases, as amilases e pectinases parecem ser as mais importantes para a nutrição das formigas (SILVA *et al.*, 2003).

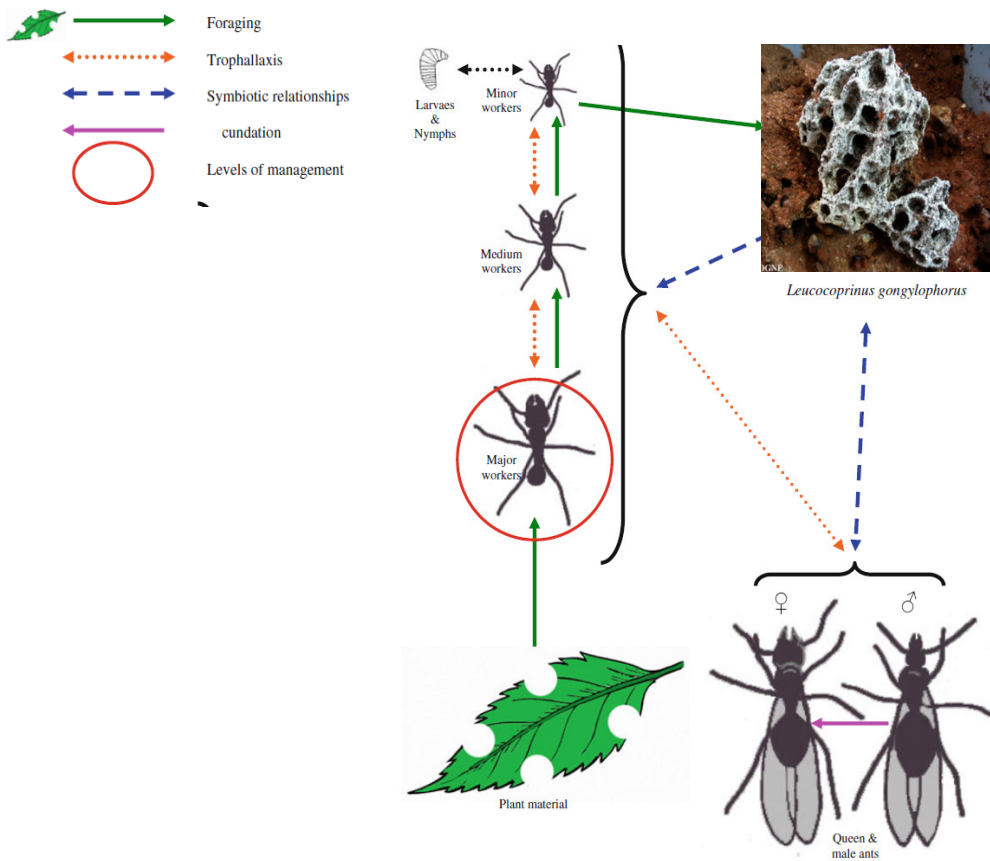


Figura 1.3: Relação de simbiose entre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) (BOULOGNE *et al.*, 2011).

Para o desenvolvimento deste fungo no formigueiro, o substrato vegetal coletado é preparado cuidadosamente pelas operárias que depositam o seu fluido fecal contendo enzimas que auxiliam na pré-degradação dos polissacarídeos foliares e facilitam o crescimento do fungo após este ser inoculado (WEBER, 1972). As pectinas presentes nos substratos vegetais que são fornecidos pela formiga ao fungo desempenham funções de agente hidratante e de material cimentador para a rede de fibras de celulose (SAKAI *et al.*, 1993; THAKUR *et al.*, 1997). As pectinas representam um terço do peso seco do tecido vegetal de dicotiledôneas e de algumas monocotiledôneas. Enzimas que degradam os polissacarídeos vegetais em açúcares redutores (mono e dissacarídeos) foram detectadas no fungo simbiote (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2003). Elas também foram encontradas no líquido fecal de *A. colombica tonsipes* (MARTIN *et al.*, 1975) e de *A. sexdens rubropilosa* (SIQUEIRA, 1997; SILVA, 1999). Portanto, as formigas utilizam

o fungo simbiote para promover esse processo de degradação, uma vez que não são capazes de degradar a pectina diretamente, tornando-se, as pectinases, um alvo factível para o controle dos formigueiros. O uso de bioensaio de inibição de pectinases tem perspectivas de ser um bom alvo para o controle de formigueiros, reduzindo a metabolização de polissacarídeos e, portanto a principal fonte de energia do formigueiro.

1.2 Métodos de Controle de Formigas Cortadeiras

Existem vários métodos para controle de formigas cortadeiras: mecânico, químico, biológico (BOARETTO & FORTI, 1997). O controle mecânico pode ser realizado utilizando barreiras físicas, dificultando o desfolhamento de mudas de espécies nativas (MORESSI, 2007); destruindo os ninhos através de escavação do formigueiro, porém está restrito a pequenas áreas e ninhos com até quatro meses de idade tornando-se uma técnica pouco utilizada (BOARETTO & FORTI, 1997).

O controle biológico consiste na aplicação de inimigos naturais, sejam eles predadores, parasitas ou patógenos. Em laboratório, foi possível verificar o efeito de fungos endopatógenos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*) para serem usados no controle biológico em formigas das espécies *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*, conhecidas como saúva-limão e saúva-mata-pasto, respectivamente (CASTILHO, 2010). O controle biológico é uma área promissora de pesquisa, mas são necessários mais conhecimentos biológicos básicos para que estratégias deste tipo de controle possam ser aplicadas com segurança, principalmente em relação ao ecossistema (SIMOTE, 2006).

Os métodos químicos são os frequentemente utilizados sendo aplicados diretamente nos ninhos nas formulações como pó, líquido ou líquidos nebulizáveis ou em formas de iscas granuladas com substâncias como fipronil, deltametrina e sulfluramida. No entanto, podem causar danos às outras espécies, ao solo e a fontes de água. Com isso, existe a busca por substâncias químicas menos impactantes, como o uso de produtos naturais, inibidores enzimáticos e feromônios (FERNANDES *et al.*, 2008). As iscas granuladas tem sido as mais utilizadas, pois oferecem maior segurança ao operador, dispensa mão de obra e equipamentos

especializados e permitem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK & NAKANO, 1984).

Algumas substâncias isoladas de plantas, como alcalóide ricinina, isolado do *Ricinus communis* L. apresentaram alta atividade contra as formigas cortadeiras como a saúva (*Atta sexdens rubropilosa*) e seu fungo simbionte (*Leucoagaricus gongylophorus*) (BIGI *et al.*, 2004). Assim como limonóides e triterpenos isolados de *Cipadessa fruticosa* e *Cedrela fissilis* também apresentaram atividades inseticida para as formigas cortadeiras (LEITE *et al.*, 2005). O fungo simbionte cultivado pela formiga teve seu desenvolvimento altamente inibido por frações de folhas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) e verificou-se que essa inibição foi causada por um conjunto de substâncias e não apenas uma (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Neste contexto, medidas que causem menor impacto ambiental são de grande importância, estimulando assim à busca por novos compostos inseticidas, fungitóxico e inibidores de enzimas com baixa toxicidade a outros organismos, visando um controle altamente específico de formigas cortadeiras e metodologias de aplicação.

1.3 Ordem Sapindales

A ordem Sapindales é composta pelas famílias Staphyceaceae, Melianthaceae, Bretschneideraceae, Akaniceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Aceraceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Julianiceae, e Zygophyllaceae (CRONQUIST, 1981, 1988). As principais famílias estudadas pelo grupo de produtos naturais da UFSCar, Simaroubaceae, Meliaceae e Rutaceae também pertencem à ordem Sapindales de acordo com os dados filogenéticos moleculares baseados em sequências de DNA nuclear e plátídeos de espécies das famílias (MUELLNER *et al.*, 2003).

1.4 A Família Anacardiaceae

A Família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindales de acordo com as classificações de Cronquist (1981 e 1988) e de MUELLNER *et al.* (2003). Ela é

composta por cerca de 76 gêneros e 600 espécies de árvores ou arbustos, conhecidas por serem frutíferas e apresentarem madeira de boa qualidade (PIO CORRÊA, 1984). Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae. Os gêneros mais conhecidos desta família são: *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lanea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*, destacando-se os gêneros *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* com relação as suas composições químicas e as atividades biológicas de seus extratos e metabólitos.

Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa sendo atribuída a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídeos fenólicos. A toxicidade está restrita a espécies das tribos Anacardieae, Rhoeeae e Semecarpeae.

Nesta família foi verificada a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente os lipídios fenólicos e derivados (CORRÊA *et al.*, 2006). Poucas espécies da família Anacardiaceae (cerca de 7%) tiveram seus estudos fitoquímico e de atividades biológicas realizadas. A diversidade de metabólitos e atividades biológicas já observadas e a importância econômica tem justificado o enorme interesse no estudo de espécies desta família.

1.5 A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi é nativa do Brasil, conhecida popularmente como aroeira-vermelha ou pimenteira. É uma árvore de porte médio e ocorre desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais, sendo mais comum em beira de rios (LORENZI, 1992). Devido à grande dispersão, apresenta diversas aplicações principalmente pela madeira, na extração de taninos, em paisagismo, na culinária e como medicinais (CERUKS *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2008).

Popularmente, a espécie *S. terebinthifolius* é conhecida no tratamento de úlceras, cicatrização de feridas (FENNER, 2006), hanseníase e tumores (SCHMOURLO *et al.*, 2005). Foram constatadas também diversas atividades, dentre elas, antioxidante, antimicrobiana e antibacteriana em seus óleos essenciais (EL-

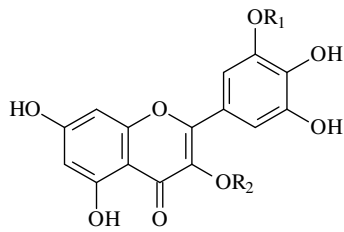
MASSRY, 2009; SILVA *et al.*, 2010), assim como foi demonstrado seu efeito antifúngico sobre *Botrytis* spp. (dos SANTOS *et al.*, 2010), agente causal do mofo cinzento que pode afetar um grande número de plantas frutíferas, ornamentais e oleráceas (TÖFOLI *et al.*, 2011).

Ceruks e colaboradores (2007) realizaram o estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* e, a partir dos resultados do potencial anti-radicalar observado, foram isolados cinco compostos fenólicos ativos: galato de etila, galato de metila, quercitrina, miricetrina e miricetina, descritos pela primeira vez neste gênero.



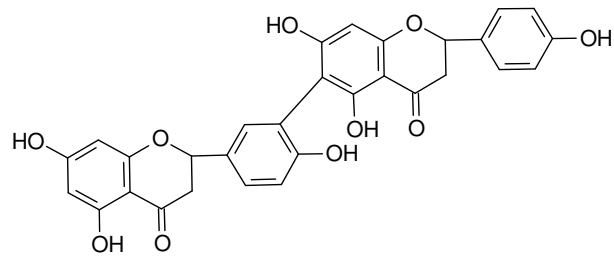
Figura 1.4: Frutos de *S. terebinthifolius* (Fonte: <http://lh2treeid.blogspot.com.br/2010/03/schinus-terebinthifolius-brazilian.html>).

Outros estudos fitoquímicos previamente realizados revelam a presença de terpenoides e ácidos graxos graxos (CAMPELLO & MARSAIOLI, 1974; 1975; LLOYD *et al.*, 1977; BARBOSA *et al.*, 2007), compostos fenólicos, bifenílésteres e flavonoides (CERUKS *et al.*, 2007; KASSEM *et al.*, 2004).

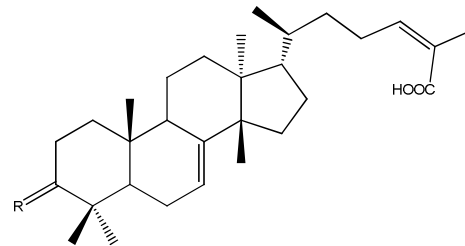
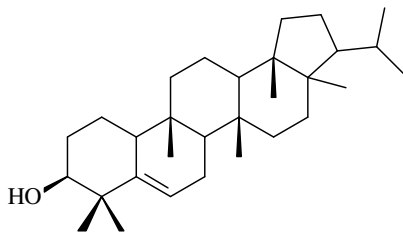


$R_1 = H$; $R_2 = \text{Ramnose}$; Miricitrina

$R_1 = H$; $R_2 = H$; Miricetina



Tetrahidrorobutaflavona



$R = O$ e OH

Terpenóides

Figura 1.5: Compostos isolados de *S. terebinthifolius* Raddi.

1.6 A espécie *Anacardium humile* A. St.-Hil.

Anacardium humile A. St.-Hil (Anacardiaceae) é uma planta subarborescente, heliófita, de aspecto esparramado, caule comprido, torturoso e subterrâneo. Essa espécie é popularmente conhecida como cajuí, cajuzinho-do-cerrado, caju-do campo, dentre outros. A espécie *A. humile* A. St.-Hil. distribuiu-se basicamente pelos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Com relação ao uso popular, as plantas da espécie *Anacardium* têm sido amplamente empregadas para fins terapêuticos em diversas afecções (MOTA *et al.*, 1985). Ainda que haja certo conhecimento sobre a utilização terapêutica de *A. humile*, pouco se conhece sobre sua composição química e outras atividades biológicas.



Figura 1.6: Flores e frutos de *A. humile* (Fonte: <http://www.pirenopolis.tur.br/multimedia/imagens/Flora/Anacardium%20humile>).

1.7 A espécie *Macairea urundeuva*

Macairea urundeuva pertence à família Melastomataceae que compreende 166 gêneros e cerca de 4.570 espécies. No Brasil ocorrem 69 gêneros e em torno de 1.500 espécies, que podem ser encontradas desde a região Amazônica até o Rio Grande do Sul, ocupando diversos ambientes (CLAUSING & RENNERT, 2001).

Na literatura não há nenhum relato relacionado aos constituintes químicos de espécies do gênero *Macairea*. Já os trabalhos encontrados se referem às outras áreas de conhecimento (classificação biológica, manutenção de sementes, dentre outros), fazendo com que o estudo desta espécie torne-se interessante do ponto de vista químico e biológico.

1.8 Atividade inseticida de produtos naturais associados a complexos metálicos

Outra estratégia possível para o controle das formigas cortadeiras envolve a coordenação de produtos naturais que possuam alguma atividade sobre o formigueiro (inseticida, fungicida e etc) a íons metálicos, na tentativa de examinar seus modos de ligação e possíveis efeitos sinérgicos (potencialização ou inibição).

Vários produtos naturais apresentam em suas estruturas grupos fenólicos, anéis aromáticos, metoxilas, carbonilas, dentre outros, sendo esses na maioria das vezes, responsáveis pelas atividades biológicas observadas em ensaios sobre formigueiros em laboratório, e com a possibilidade de complexação com metais, levando provavelmente, a novos compostos com maior ação sobre o ensaio inseticida e fungicida (ENAN, 2001; KOSTYUK, *et al.*, 2001; SOUZA & GIOVANI, 2005; SATTERFIELD & BRODBELT, 2001).

A química dos metais da primeira série de transição é caracterizada por estados de oxidação de valência baixa, sendo considerados metais “duros” segundo a classificação por BASOLO e PEARSON (1968). Como regra geral, metais duros (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) formam complexos estáveis com ligantes duros (H_2O , ROH , RCO_2^- , $-\text{NH}_3$, RNH_2). Além disso, esses metais não serão agressivos ao meio ambiente. Esses elementos destacam-se por serem os elementos em maior abundância na natureza. Isso fornece uma forte força motora no mundo da seleção natural (JORDÃO *et al.*, 2000, TATE, 1992; MALAVOLTA 1980). Por exemplo, os metais cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês e cobalto são geralmente requeridos por plantas e animais, pois atendem aos critérios de essencialidade, uma vez que na sua ausência as plantas não completam o seu ciclo vital. Além disso, são constituintes de uma variedade de enzimas celulares, participando de reações envolvendo sínteses de ácidos nucléicos e da manutenção da estabilidade das membranas das células tanto para o reino vegetal como animal (JORDÃO *et al.*, 2000, TATE, 1992 e MALAVOLTA 1980). Isto é fundamental para estabelecer um compromisso entre produção agrícola e um ambiente limpo e saudável. Um ponto chave na atividade biológica dos compostos é a identificação de seus sítios ativos. E finalmente, utilizar os resultados no controle de formigas cortadeiras.

PARTE I
OBJETIVOS

2. Objetivo

Os objetivos deste trabalho foram o estudo fitoquímico das espécies *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* biomonitorado por ensaios com formigas *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Estudo fitoquímico das espécies *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* biomonitorado por ensaios biológicos.
- ✓ Isolamento e caracterização dos compostos bioativos.
- ✓ Desenvolvimento e obtenção de complexos metálicos a partir do flavonoide quercetina para avaliação da atividade tóxica sobre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote.

PARTE I
PROCEDIMENTO
EXPERIMENTAL

3. Procedimentos Experimental

3.1 Materiais e métodos

◆ **Solventes:**

- Solventes comerciais destilados no DQ/UFSCar
- Solventes P.A. da Merck, Sinth, Vetec e Labsynth
- Solventes de grau CLAE da J. T. Baker e Tedia
- Solventes deuterados da Aldrich Chemical Company, Acros Organic, Cil – Cambridge Isotope Laboratories (TMS 0,03%).

◆ **Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna:**

- Sílica gel 60 (70-230 mesh) da Acros Organics
- Sílica gel 60 (230-400 mesh) da Acros Organics
- Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

◆ **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA):**

- ◆ Cromatofolhas – Sílica gel F₂₅₄ Al TLC 20 x 20 cm da Merck
- ◆ Reveladores: radiação UV (254 e 360 nm) e vanilina em ácido sulfúrico

3.2 Equipamentos

◆ **Evaporadores Rotatórios**

- BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

◆ **Balança Analítica**

- ◆ Sartorius modelo BP210S.

◆ **Centrífuga**

- Centrífuga Comb-spin FVL 2400.

◆ **Speed-Vac**

- Savant Speedvac Plus SC 10 A acoplado com um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bomba a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant.

◆ **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):**

- Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10avp (preparativo), equipado com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (*loop*) de 200 e 500 µL, bombas Shimadzu LC-6AD e detector: UV-Vis, Shimadzu, SPD-10vvp.
- Cromatógrafo: Shimadzu LC 10AD (analítico) com degaseificador de membrana Shimadzu DGU-14A, duas bombas Shimadzu e loop = 20 µL. Detector: UV-VIS (Arranjo de Diodos), Shimadzu SPD-M10A.
- Agilent Technologies modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A e detector UltraVioleta G1314B. Equipamento acoplado a uma interface G1369A, software EZChrom Ellite.

◆ **CG-EM:**

- CG-17A Shimadzu, CG-EM- QP 5000 Shimadzu
- Coluna DB-5 (30m x 0,25 mm)
- Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V)
- Todas as análises via CG-EM foram realizadas utilizando:

Temperatura do injetor: 250 °C

Temperatura do detector: 280 °C

Modo: Split; Volume injeção: 1 µL

- Programação de temperaturas utilizadas nas análises:
- Esteróides: 150 °C (3min); 6 °C/min até 280 °C; 280 °C (20 min). ; 8 °C/min até 290 °C (10 min).
- Terpenos: 200 °C (5min); 10 °C/min até 280 °C; 280 °C (20 min). ; 8 °C/min até 290 °C (10 min).

◆ **Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade**

- MK5 Quattro Quik-Prep (AECS Ltda. Reino Unido) equipado com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em politetraflouroetileno (PTFE) com diâmetro interno de 0,5 mm i.d. e diâmetro externo de 1,58 mm o.d., capacidade total de aproximadamente 500 mL. A velocidade de rotação é ajustável entre 0 a 1000 rpm e plano de rotação vertical. Aparelho com alça de injeção de 5 mL e sistema equipado com bomba de fluxo contínuo LabAlliance.

◆ **Espectrômetro de CL-EM**

- MICROMASS QUATTRO LC – Modo de ionização Eletrospray (ESI) (modo negativo).
- As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos LaBioMMi – DQ/UFSCar.

◆ **Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear**

- Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para ¹³C) – DQ/UFSCar;
- Bruker Modelo AVANCE III 400NANO Varian 9,4 T (400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para ¹³C) – DQ/UFSCar.
- Bruker Modelo AVANCE III 14,1 T (600 MHz para RMN ¹H e 150 MHz para ¹³C) – DQ/UFSCar.

- ◆ **Espetrofotômetros** operando nas regiões do ultravioleta (INTRALAB UV-VIS modelo DMS 100) e do infravermelho (BOMEM Hartmann & BRAUN modelo MB 102).
- ◆ **Análise Elementar** – Analisador de C, H, e N modelo EA 1108 da FISONs.
- ◆ **Medidas eletroquímicas** – Potenciostato/galvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS-100B/W, usando cela eletroquímica de vidro, com capacidade de 10 mL, três eletrodos: referência Ag/AgCl, eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de tarugos de platina (Pt) de 4 mm.

3.3 Material Botânico

Todas as partes vegetais das espécies *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* foram coletadas pelo grupo de pesquisa de Produtos Naturais da UFSCar nas cidades de Bandeirantes-MS, Paracatu-MG e Marataizes-ES, respectivamente, e identificados pelo prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica da USP – São Paulo.

3.3.1 Preparação dos materiais vegetais e obtenção extratos brutos de *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*.

As diversas partes vegetais foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 7 dias e posteriormente pulverizadas em moinhos do tipo Wiley. Após a moagem, para a espécie *Schinus terebinthifolius* foi realizada a extração à temperatura ambiente e em repouso, com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, CH₂Cl₂ e MeOH) por três vezes, durante 7 dias (Fluxograma 3.1, Tabela 3.1). Já para as espécies *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* foi

realizada a extração do material por maceração no solvente etanol por 3 vezes, durante 7 dias (Fluxograma 3.2). Após a evaporação dos solventes foram extraídos os extratos brutos descritos na Tabela 3.2.

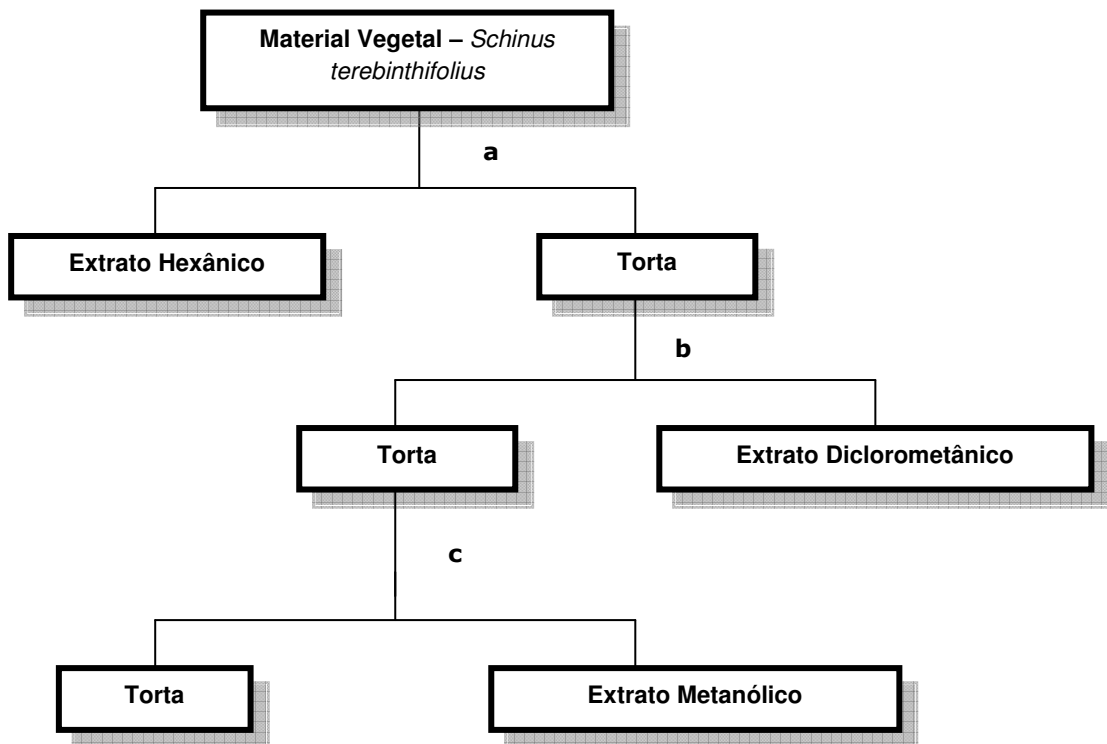
Tabela 3.1: Extratos brutos da espécie *S. terebinthifolius*

Parte Vegetal (g) <i>Schinus terebinthifolius</i>	Extrato	Código do extrato	Massa do extrato (g)
Folhas (266,0)	Hexânico	STFH	17,1
	Diclorometânico	STFD	3,57
	Metanólico	STFM	14,5
Galhos (115,0)	Hexânico	STGH	1,09
	Diclorometânico	STGD	1,60
	Metanólico	STGM	2,98
Frutos (198,0)	Hexânico	STFrH	6,89
	Diclorometânico	STFrD	8,46
	Metanólico	STFrM	10,5

Tabela 3.2: Extratos brutos das espécies *A. humile* e *M. urundeuva*

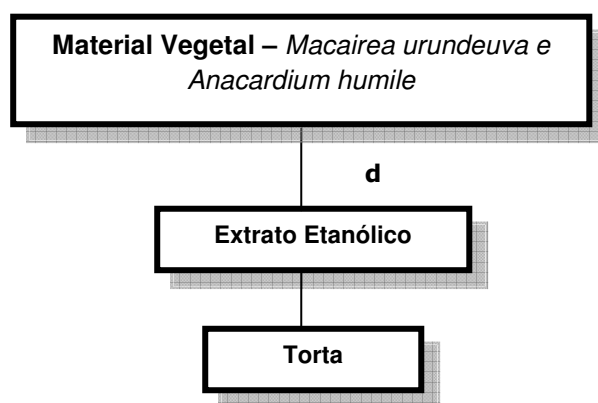
Planta	Parte Vegetal (g)	Código do extrato	Massa do extrato (g)
<i>A. humile</i>	Folhas (1600)	AHFE	15,0
<i>M. urundeuva</i>	Galhos (100,0)	MUGE	2,25
	Folhas (719,0)	MUFE	19,0

F: Folhas; G: Galhos; E:EtOH



Fluxograma 3.1: Obtenção dos extratos da espécie *Schinus terebinthifolius*.

- a) Extração com n-hexano por sete dias
- b) Extração com dicloro por sete dias.
- c) Extração com metanol por sete dias



Fluxograma 3.2: Obtenção dos extratos das espécies *Macairea urundeuva* e *Anacardium humile*

- d) Extração com etanol por sete dias.

3.4 Estudo do extrato AHFE

O extrato etanólico das folhas de *A. humile* (AHFE) foi fracionado através de dois métodos: Cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (*HSCCC - High Speed Counter Current Chromatograph*) e por partição líquido-líquido seguido de outros procedimentos cromatográficos.

3.4.1 Cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (*HSCCC*)

Várias classes de produtos naturais vêm sendo isoladas a partir da utilização da cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (*HSCCC*), incluindo: flavonoides (RINALDO *et al.*, 2006), alcaloides (CAZAL *et al.*, 2009; SEVERINO *et al.*, 2009), cumarinas (CAZAL *et al.*, 2009) dentre outros. Esta técnica apresenta várias vantagens se comparado aos métodos tradicionais de separação, tais como: a eliminação da adsorção irreversível da amostra no suporte sólido, total recuperação da amostra injetada, baixo consumo de solventes (SUTHERLAND, 2007; MARSTON *et al.*, 1994; 2006; 2007; ITO *et al.*, 2005).

A cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (*HSCCC*) é um método de separação por partição líquido-líquido, onde o sistema de solventes de duas fases é essencial para o sucesso da separação. Como a cromatografia por contracorrente utiliza sistemas de solventes bifásicos isto resulta em um grande número de combinações de solventes com ampla faixa de polaridade (STICHER, 2008). A separação baseia-se na distribuição do soluto entre as duas fases imiscíveis, onde o coeficiente de partição K (cálculo da distribuição do soluto em ambas as fases) é um dos parâmetros mais importantes no sistema de seleção dos solventes, que deve ser entre 0,5-2,5 para alcançar uma eficiente separação e um apropriado tempo de corrida (GAO, *et al.*, 2006).

3.4.2 Fracionamento do extrato AHFE por Cromatografia por contracorrente circular em alta velocidade (HSCCC)

3.4.3 Seleção do Sistema de Solventes

A seleção do sistema de solventes é a etapa mais importante da cromatografia contracorrente. Como a CCC utiliza sistemas de solventes bifásicos isto resulta em um grande número de combinações de solventes. Os primeiros sistemas de solventes foram escolhidos com base em sistemas para purificação de flavonoides por cromatografia em contracorrente. Dados da literatura relatam a grande ocorrência de flavonoides e compostos fenólicos em espécies pertencentes ao gênero *Anacardium*. Inicialmente, cinco sistemas de solventes obtidos da literatura conforme descrito na tabela 3.3, foram avaliados.

Tabela 3.3: Sistemas de solventes avaliados no primeiro teste:

	Sistema de solventes	v/v	Referências Bibliográficas
A	Hexano/BuOH/H ₂ O	1/0,5/0,5	SHI <i>et al.</i> , 2008
B	CH ₂ Cl ₂ /EtOH/ H ₂ O (Formou emulsão)	1/0,5/0,5	CHEN <i>et al.</i> , 2003
C	CH ₂ Cl ₂ /EtOH/ H ₂ O (Formou emulsão)	1/1/0,5	CHEN <i>et al.</i> , 2003
D	Hexano/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1/2/1/1,5	DENG <i>et al.</i> , 2009
E	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/3/0,5/1	GAO <i>et al.</i> , 2006

A partir da seleção dos sistemas de solventes bifásicos, estes foram preparados em tubos de ensaio, agitados em vortex e após o sistema entrar em equilíbrio, as fases aquosa e orgânica foram separadas. Adicionaram-se 3,0 mL de cada uma dessas fases a um tubo contendo 10 mg do extrato **AHFE**. O tubo contendo a amostra e os solventes foi novamente agitado em vortex e, após o sistema entrar em equilíbrio, foi centrifugado. As fases orgânica e aquosa, contendo

a amostra particionada, foram separadas. Iguais volumes de cada uma dessas fases foram secos em Speed-Vac, ressuspensos em MeOH e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.4.4 Cálculo do coeficiente de partição (k) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A otimização da metodologia utilizada no CLAE-DAD foi realizada utilizando o extrato bruto **AHFE**. Várias fases móveis (MeOH/H₂O e MeOH/H₂O 0,1% Ác.Acético) e eluições gradientes foram avaliadas.

Após análise de vários métodos desenvolvidos observou-se que o melhor sistema a ser utilizado para o cálculo do coeficiente de partição (K) de alguns componentes presentes em ambas as fases do sistema de solventes, era o que consistia do gradiente de eluição: 0-52 min., 5-80% **B (MeOH)**; 52-62 min., 80-100% **B**; 62-92 min., 100% de **B**. Esta metodologia foi utilizada para análise das duas fases (Fase aquosa/Fase orgânica) presentes nos sistemas de solventes.

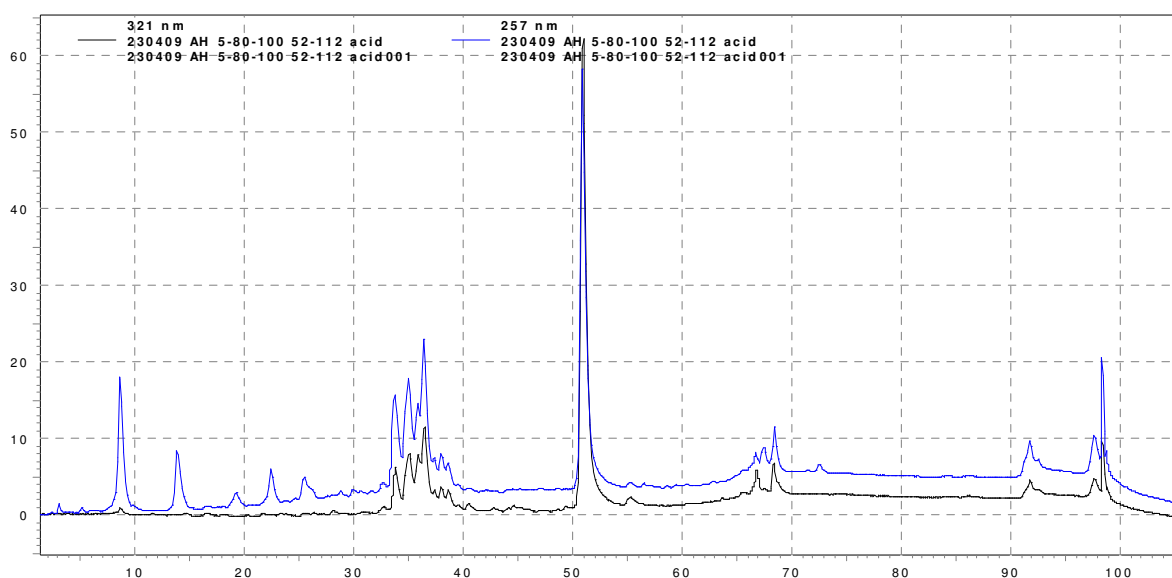


Figura 3.1: Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *A. humile* (AHFE) modo analítico. Equipamento Shimadzu LC 10AD, Coluna de fase estacionária C18-ODS Phenomenex, Luna ($h \times \phi = 150 \times 4,6 \text{ mm}, 10 \mu\text{m}$).

O coeficiente de partição (K) é definido pela razão da concentração dos constituintes da amostra na fase móvel pela concentração desses constituintes na fase estacionária. Nesta etapa, dada a quantidade de compostos presentes na amostra, inicialmente foi realizada apenas uma análise qualitativa dos cromatogramas, onde se avaliou a intensidade e distribuição dos picos nos dois cromatogramas (Fase aquosa/Fase orgânica).

Neste processo de análise, dada a quantidade de compostos presentes na amostra (extrato – **AHFE**), apenas a análise qualitativa dos cromatogramas foi realizada.

Os sistemas de solventes presentes na Tabela 3.3 foram então avaliados nas proporções acima indicadas pelo teste de partição em tubo falcon seguido de análise por CLAE-DAD onde o melhor resultado obtido foi para os sistemas de solventes **E (Hexano/AcOEt/EtOH/H₂O)**.

A partir da escolha do **sistema E**, diferentes proporções de solventes deste sistema foram avaliadas (segundo teste). Através da CCDA foi verificada a distribuição relativa dos compostos em ambas as fases dos sistemas de solventes (Tabela 3.4), onde os sistemas com as melhores distribuições dos componentes em ambas as fases foram escolhidos, e posteriormente analisados via CLAE-DAD.

Os sistemas **1 a 10** foram então avaliados nas proporções acima indicadas pelo teste de partição em tubo falcon seguido de análise por HPLC-DAD, onde os melhores resultados foram obtidos para os sistemas **2 e 8**.

Tabela 3.4: Sistemas de solventes avaliados no segundo teste:

	Sistema de solventes	v/v
1	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/3/0,5/1
2	Hexano/AcOEt/EtOH/H₂O	1/3,5/0,5/1
3	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/4/1/1
4	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2/1/1
5	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2/0,5/0,5
6	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2/1,5/1
7	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2/1/1,5
8	Hexano/AcOEt/EtOH/H₂O	1/2,5/1,5/1,0
9	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2/1,5/0,8
10	Hexano/AcOEt/EtOH/H ₂ O	1/2,7/1,5/1,0

3.4.5 Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia em contracorrente

Os sistemas de solventes selecionados para a separação por *HSCCC* foram misturados nas proporções definidas e equilibradas em funil de separação à temperatura ambiente. As fases superior e inferior foram separadas antes de serem utilizadas e desgaseificadas em aparelho de ultra-som por 15 min. Em cada corrida, as colunas foram primeiramente preenchidas com a fase aquosa, logo após a rotação ser ligada, e ao mesmo tempo, a fase orgânica foi bombeada para as colunas no fluxo previamente determinado.

A solução contendo a amostra foi preparada por solubilização da amostra em mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes.

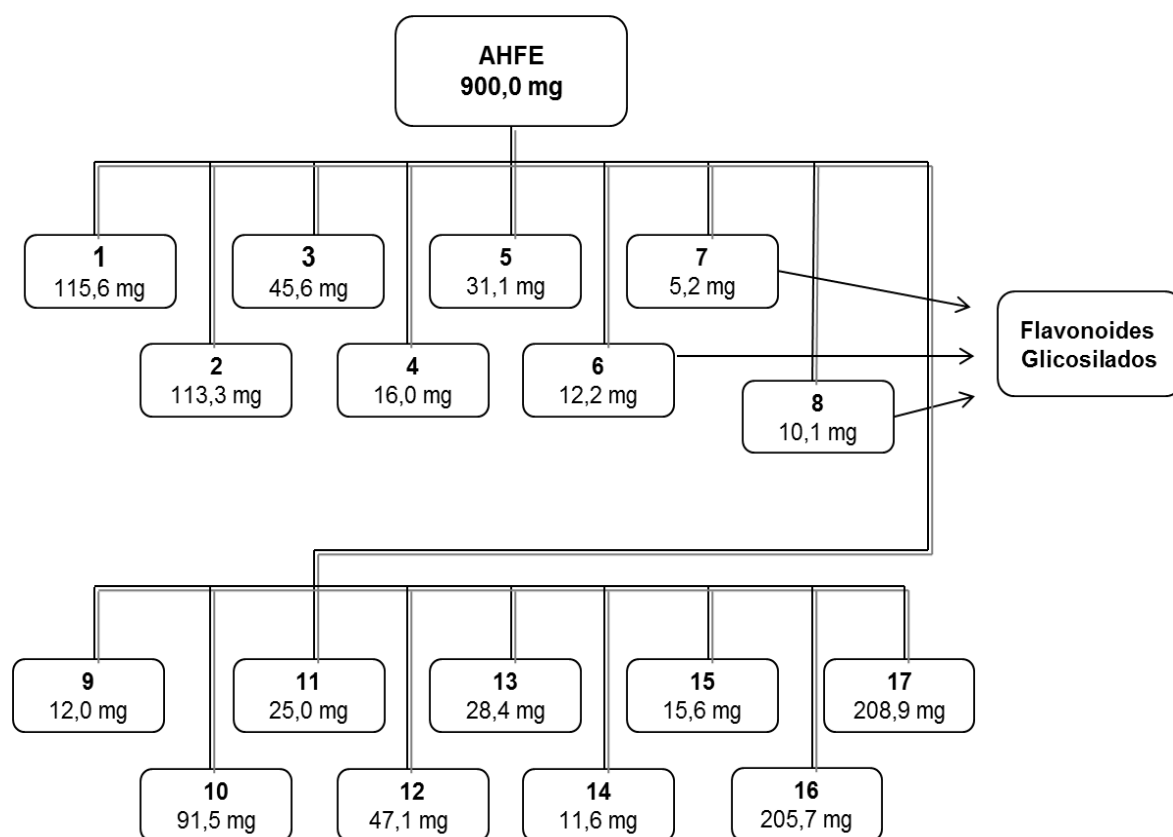
3.4.6 Fracionamento do extrato AHFE via Cromatografia em contracorrente

O fracionamento do extrato AHFE foi desenvolvido utilizando os sistemas de solventes **Hexano/AcOEt/EtOH/H₂O 1/3,5/0,5/1** e **1/2,5/1,5/1**, no modo de eluição normal (cauda-cabeça), fluxo de 3,0 mL/min, rotação de 850 rpm. O primeiro sistema a ser utilizado para a separação do extrato AHFE foi **Hex./AcOEt/EtOH/H₂O 1/3,5/0,5/1 (2)**.

Após análise dos dois sistemas de solventes, optou-se pela utilização do sistema de solventes **Hex./AcOEt/EtOH/H₂O 1/3,5/0,5/1**, devido a sua melhor performance de separação. No total, foram realizados 5 fracionamentos para se obter massas adequadas para estudos posteriores das frações. Para cada fracionamento a massa de amostra solubilizada era de aproximadamente 900 mg do extrato **AHFE**. Foram coletadas para cada fracionamento, frações de 10 mL cada, sendo 70 frações com a rotação ligada e 40 frações com a rotação desligada. As frações coletadas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCDA e RMN de ¹H, as mesmas foram agrupadas de acordo com as suas similaridades, gerando 17 frações.

As frações AHFE-(6) a AHFE-(9) apresentaram sinais característicos de flavonoides glicosilados no espectro de RMN de ¹H. Essas frações foram analisadas via CLAE-analítica e repurificadas através da CLAE- preparativa (**AHFE-F1 a F6**). Todo esse processo de separação gerou o isolamento e identificação do flavonoide quercitrina (**L9**) e dos demais conjuntos de flavonoides glicosilados (**L10-L19**) via HPLC-UV-MS-MS, tendo como aglicona o flavonoide quercetina e kaempferol.

Já as frações AHFE-(3) a AHFE-(4) foram repurificadas através da cromatografia por exclusão (Sephadex – LH20) utilizando como fase móvel MeOH/CH₂Cl₂ 1/1 levando ao isolamento dos biflavonoides robustalfavona (**B1**) e amentoflavona (**B3**).

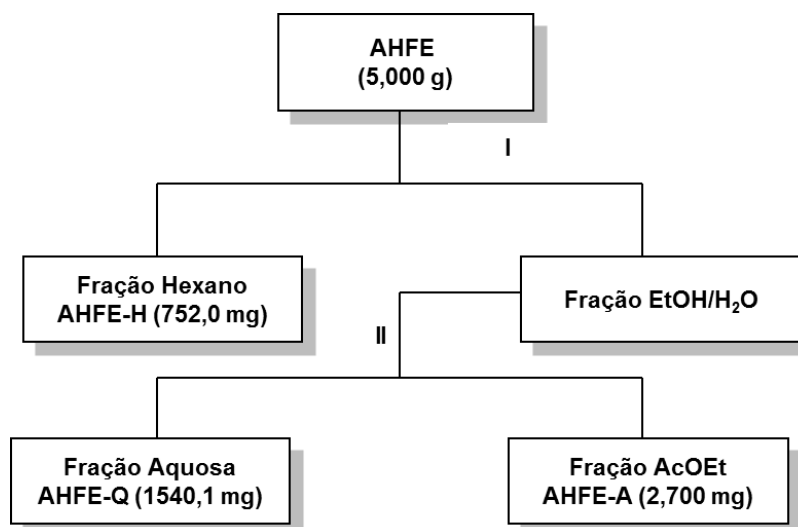


Fluxograma 3.3: Fracionamento de AHFE

Condição: Cromatografia por Contracorrente; Sistema de solventes: Hex./AcOEt/EtOH/H₂O 1/3,5/0,5/1; fluxo: 3,0 mL/min; 850 rpm; fase estacionária: Fase aquosa; fase móvel: fase orgânica.

3.4.7 Fracionamento do extrato AHFE

O extrato etanólico das folhas de *A. humile* (AHFE) também foi fracionado através da partição líquido-líquido seguido de outros procedimentos cromatográficos (Fluxograma 3.4, Tabela 3.5).



Fluxograma 3.4: Metodologia utilizada na partição do extrato AHFE.

Condição I: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com Hexano.

Condição II: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com AcOEt.

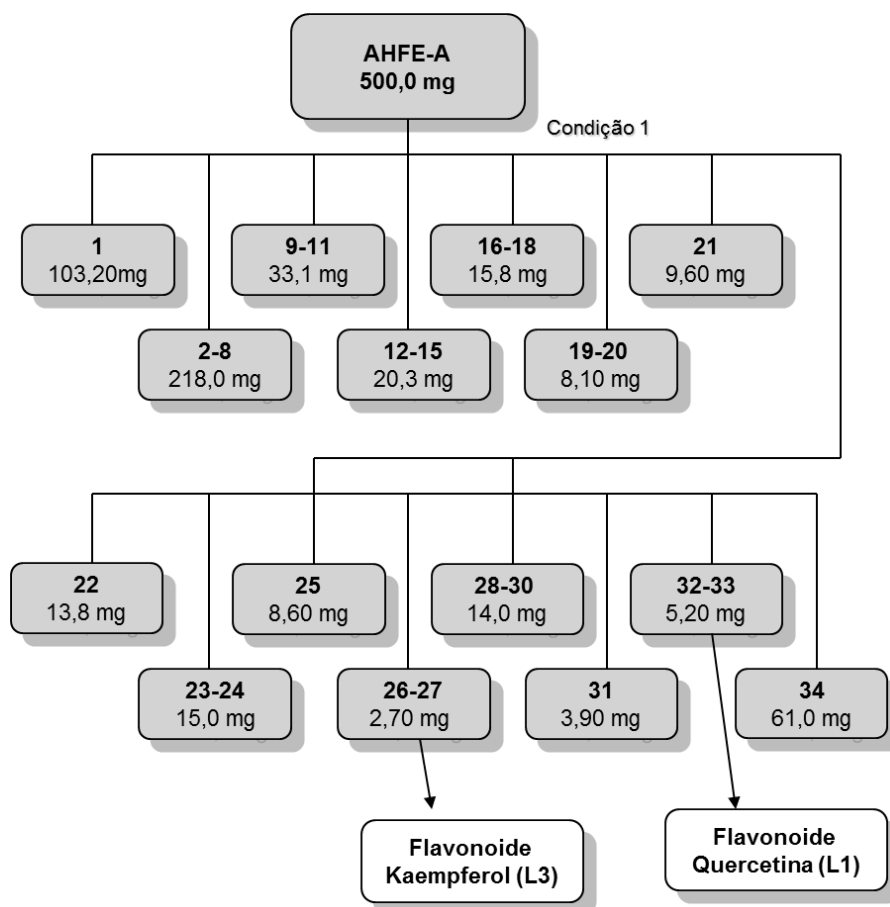
Tabela 3.5: Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato AHFE

<i>A. humile</i>	Massa do extrato	Código	Massa (mg)
Folhas	5,00 g	AHFE-H	752,0
		AHFE-A	2700,0
		AHFE- Q	1540,1

3.4.8 Fracionamento de AHFE-A

A fração AHFE-A foi fracionada utilizando-se Sephadex LH-20 (Fluxograma 3.5) fornecendo 34 frações, as quais foram submetidas à CCDA e pela análise dos Rf's foram agrupadas de acordo com as similaridades. Este procedimento de separação foi inicialmente realizado devido a grande quantidade de pigmentos presentes neste extrato.

As frações foram submetidas à RMN de ^1H , a qual possibilitou a identificação dos flavonóides quercetina (L1) e kaempferol (L3).



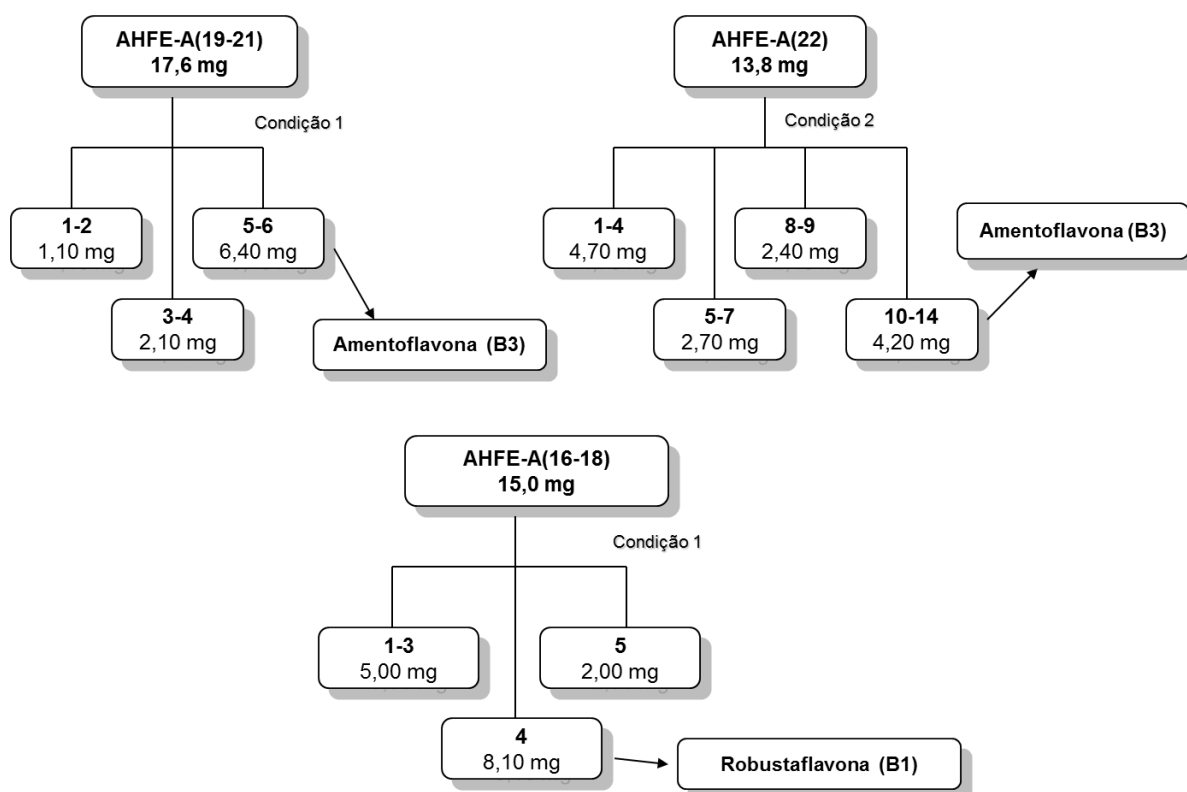
Fluxograma 3.5: Fracionamento de AHFE-A

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,0$ e $h = 71,0$ cm); eluição isocrática: MeOH/CH₂Cl₂ 1/1.

Este fracionamento foi realizado por 3 vezes consecutivas através das condições citadas acima.

3.4.9 Fracionamento de AHFE-A (16-18), AHFE-A (19-21) e AHFE-A (22)

O Fluxograma 3.6 ilustra o fracionamento realizado.

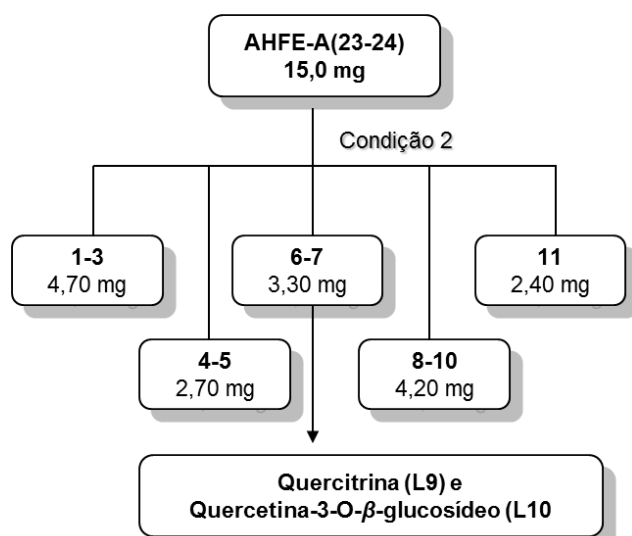


Fluxograma 3.6: Fracionamento de AHFE-A (16-18), AHFE-A (19-21) e AHFE-A (22)

Condição 1 e 2: CLAE analítico e preparativo: Colunas C-18 Phenomenex – Luna 10 μm ($\phi = 0,45 \times h = 150 \text{ mm}$) e ($\phi = 1,0 \times h = 310 \text{ mm}$) eluição isocrática: MeOH/ACN/H₂O 0,1% Ác.Acético (23/11/66) e posteriormente MeOH (100%); fluxos de 1,0 mL/min (analítico) e 5,5 mL/min (preparativo).

3.4.10 Fracionamento de AHFE-A (23-24)

O Fluxograma 3.7 ilustra o fracionamento realizado.

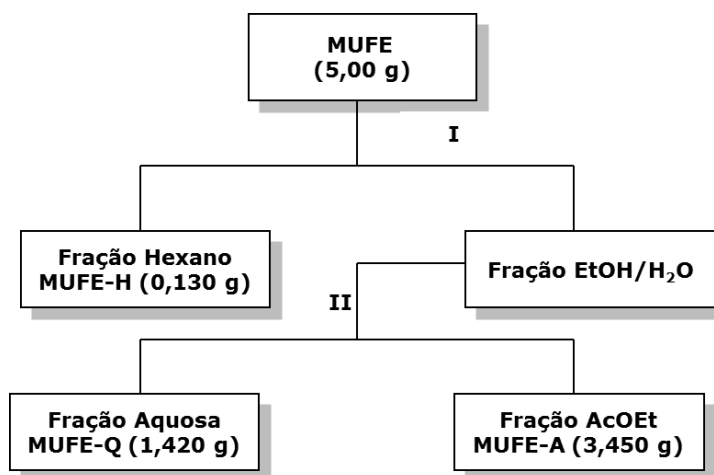


Fluxograma 3.7: Fracionamento da amostra AHFE-A (23-24)

Condição 2 : CLAE analítico e preparativo: Colunas C-18 Phenomenex – Luna 10 μm ($\phi = 0,45 \times h = 150 \text{ mm}$) e ($\phi = 1,0 \times h = 310 \text{ mm}$) eluição isocrática: MeOH/ACN/H₂O 0,1% Ác. Acético (23/11/66), fluxos de 1,0 mL/min (analítico) e 5,5 mL/min (preparativo).

3.5 Estudo do extrato MUFE

O extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* (MUFE) foi fracionado por partição líquido-líquido seguido de outros procedimentos cromatográficos (Fluxograma 3.8; Tabela 3.6).



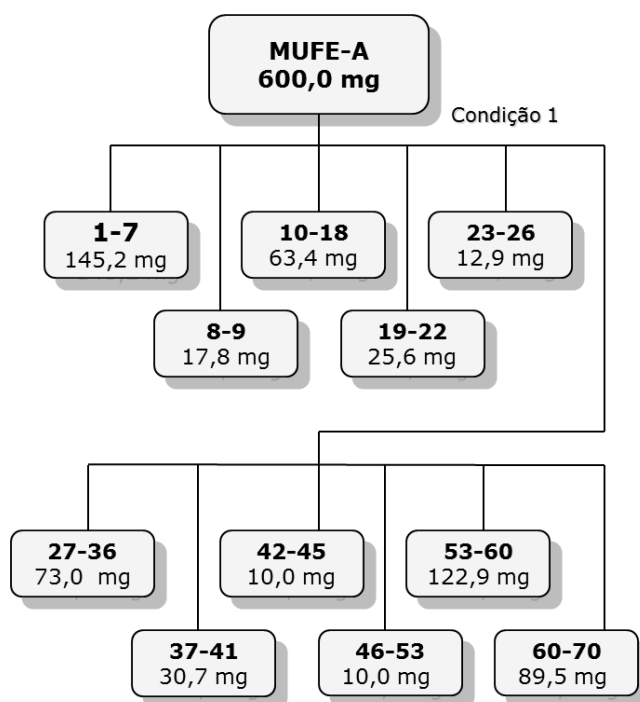
Fluxograma 3.8: Metodologia utilizada na partição do extrato MUFE Condição I: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com Hexano. Condição II: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com AcOEt.

Tabela 3.6: Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato MUFE

<i>M. urundeuva</i>	Massa do extrato	Código	Massa (g)
Folhas	5,00 g	MUFE-H	0,130
		MUFE-A	3,450
		MUFE-Q	1,420

3.5.1 Fracionamento da partição MUFE-A

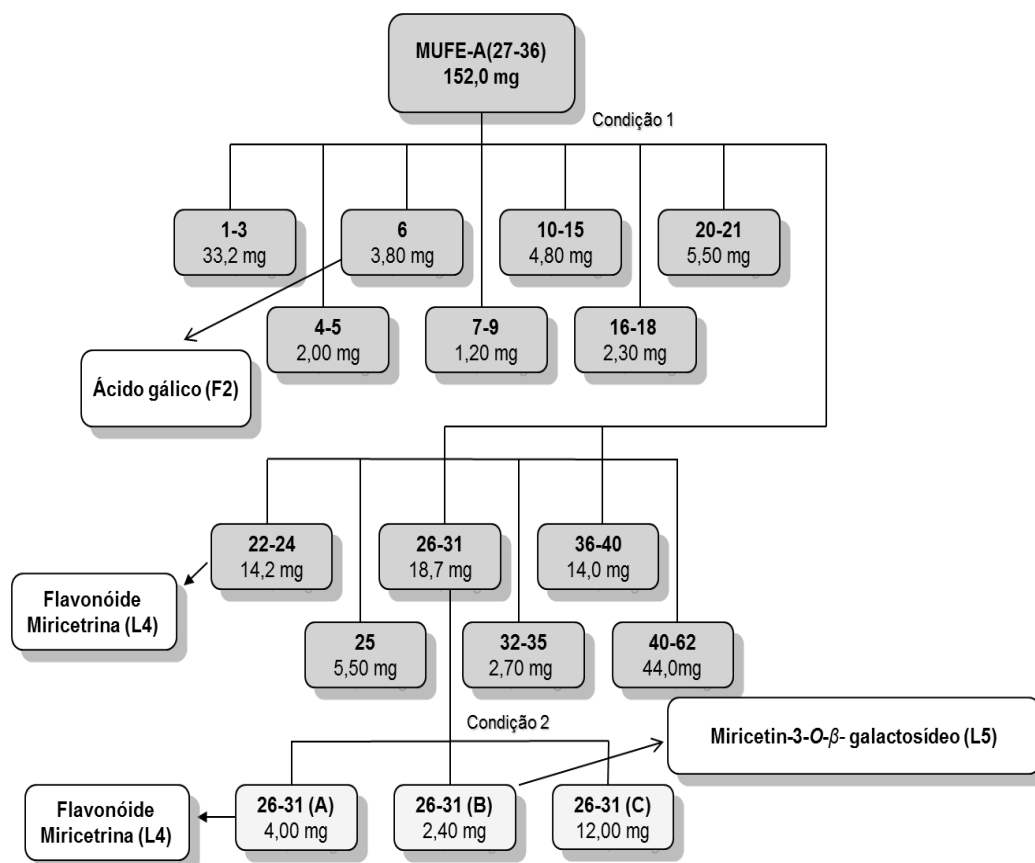
A partição MUFE-A foi fracionada utilizando Sephadex LH-20 (Fluxograma 3.9) fornecendo 70 frações, as quais foram submetidas à CCDA e pela análise do R_f foram agrupadas de acordo com as suas similaridades.

**Fluxograma 3.9:** Fracionamento da partição MUFE-A

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 4,0$ e $h = 70,0$ cm); eluição isocrática: MeOH/CH₂Cl₂ 1/1. Este fracionamento (MUFE-A) foi realizado por 3 vezes consecutivas através das condições citadas acima.

3.5.2 Fracionamento de MUFE-A (27-36)

O Fluxograma 3.10 ilustra o fracionamento realizado.



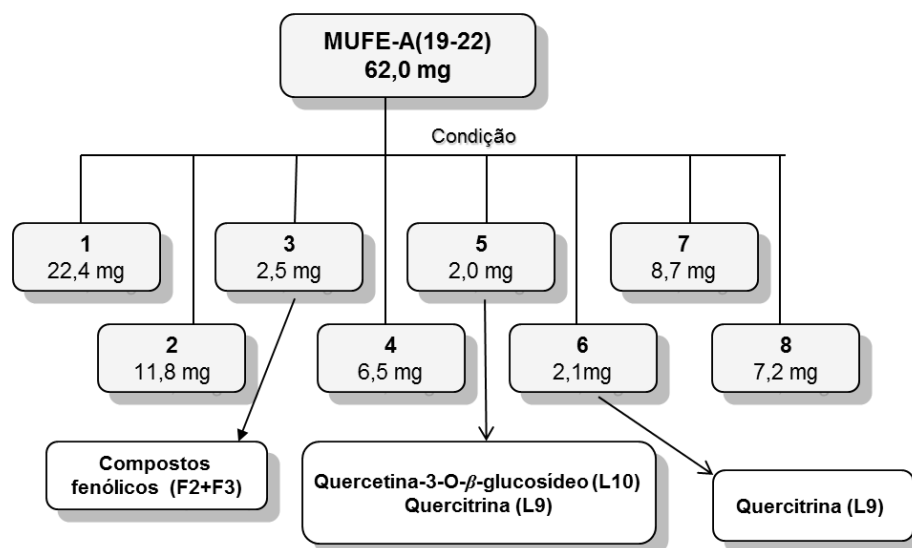
Fluxograma 3.10: Fracionamento de MUFE-A (27-36).

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,2$ e $h = 52,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

Condição 2 : CLAE analítico e preparativo: Colunas C-18 Phenomenex – Luna $10 \mu\text{m}$ ($\phi = 0,45$ x $h = 150$ mm) e ($\phi = 1,0$ x $h = 310$ mm) eluição isocrática: MeOH/ACN/H₂O 0,1% Ác. Acético (25/11/64), fluxos de 1,0 mL/min (analítico) e 5,5 mL/min (preparativo).

3.5.3 Fracionamento de MUFE-A-(19-22)

O Fluxograma 3.11 ilustra o fracionamento realizado.

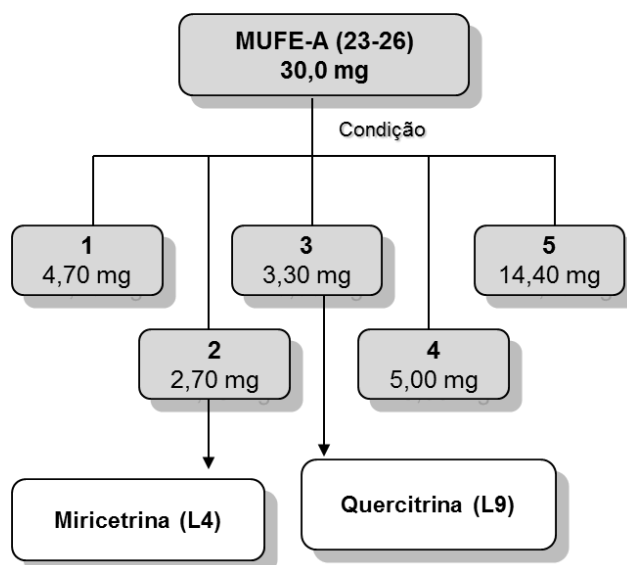


Fluxograma 3.11: Fracionamento da partição MUFE-A-(19-22)

Condição: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,00$ e $h = 133,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

3.5.4 Fracionamento de MUFE-A (23-26)

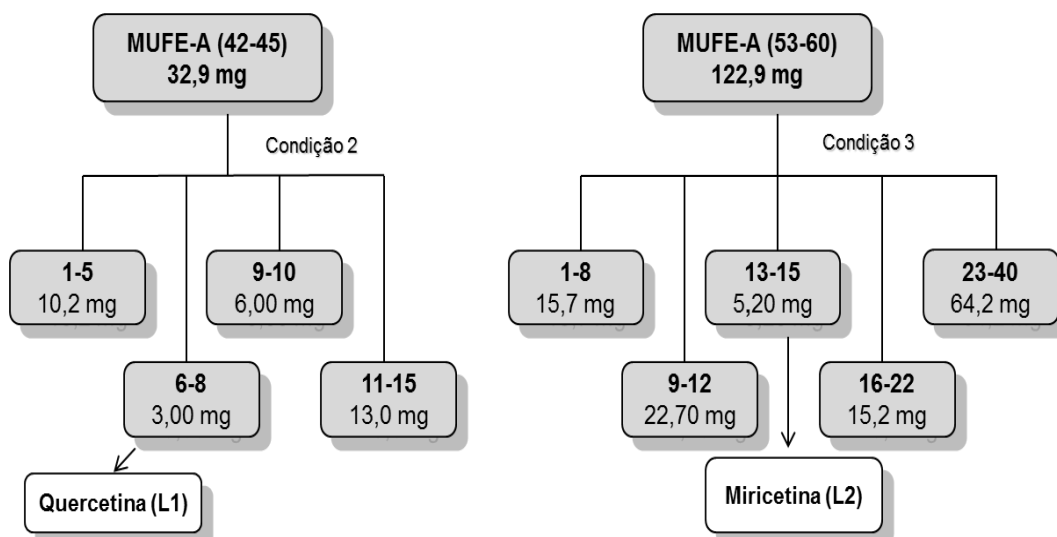
O Fluxograma 3.12 ilustra o fracionamento realizado.



Fluxograma 3.12: Fracionamento de MUFE-A (23-26).

Condição : CLAE analítico e preparativo: Colunas C-18 Phenomenex – Luna 10 μm ($\phi = 0,45 \times h = 150 \text{ mm}$) e ($\phi = 1,0 \times h = 310 \text{ mm}$) eluição isocrática: MeOH/ACN/H₂O 0,1% Ác. Acético (25/11/64), fluxos de 1,0 mL/min (analítico) e 5,5 mL/min (preparativo).

3.5.5 Fracionamento de MUFE-A (42-45) e MUFE-A (53-60)



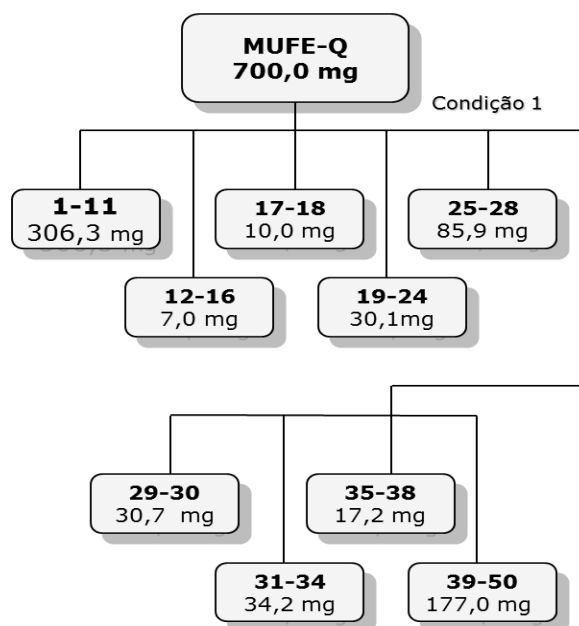
Fluxograma 3.13: Fracionamento de MUFE-A (42-45) e MUFE-A (53-60).

Condição 2: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,0$ e $h = 50,0 \text{ cm}$); eluição isocrática: MeOH.

Condição 3 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,0$ e $h = 67,0 \text{ cm}$); eluição isocrática: MeOH.

3.5.6 Fracionamento da partição MUFE-Q

A partição MUFE-Q foi fracionada utilizando Sephadex LH-20 (Fluxograma 3.14) fornecendo 50 frações, as quais foram submetidas à CCDA e pela análise do R_f foram agrupadas de acordo com as suas similaridades.

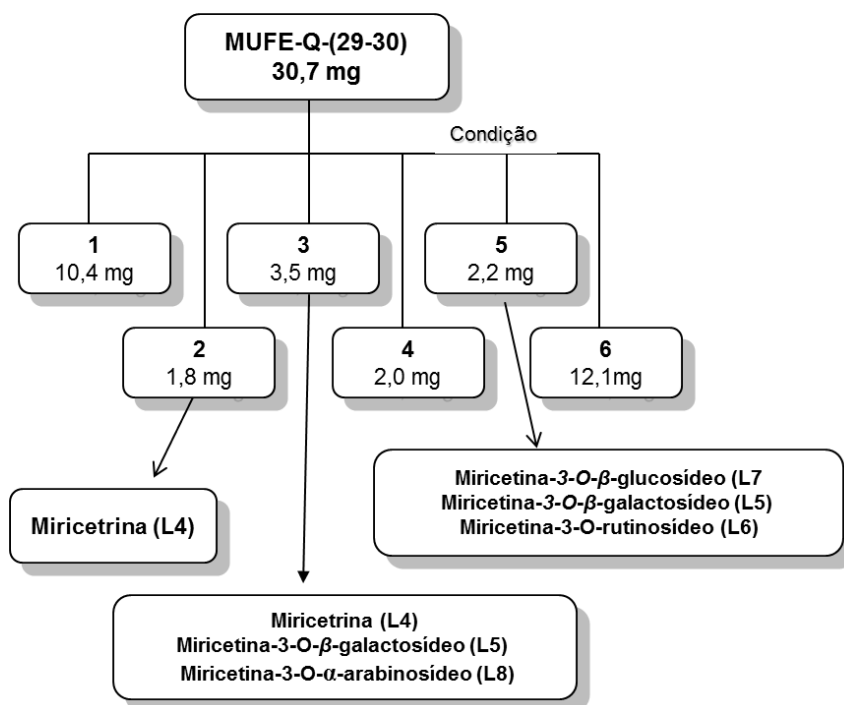


Fluxograma 3.14: Fracionamento da partição MUFE-Q

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,0$ e $h = 67,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

3.5.7 Fracionamento de MUFE-Q-(29-30)

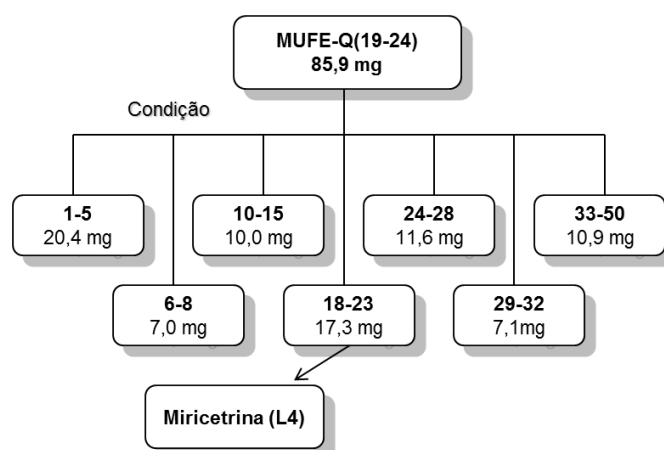
Através da análise do espectro de RMN de ^1H da fração MUFE-(Q)-(29-30), pode-se observar a presença de vários sinais característicos de flavonóides glicosilados, sendo a miricetrina o composto majoritário. Deste modo um estudo via CLAE-analítica utilizando diferentes proporções dos solventes MeOH e água acidificada foram avaliados, e a melhor proporção encontrada foi de 35/65 MeOH/H₂O 0,1% ácido acético. A CLAE-preparativa foi então realizada e, através das análises dos dados de RMN das frações, foi possível identificar distintos flavonóides glicosilados (Fluxograma 3.15).



Fluxograma 3.15: Fracionamento de MUFE-Q (29-30)

Condição: CLAE analítico e preparativo: Colunas C-18 Phenomenex – Luna 10 μm (φ = 0,45 x h = 150 mm) e (φ = 1,0 x h = 310 mm) eluição isocrática: MeOH/H₂O 0,1% Ác. Acético (35/65), fluxos de 1,0 mL/min (analítico) e 4,0 mL/min (preparativo).

3.5.8 Fracionamento de MUFE-Q(19-24)

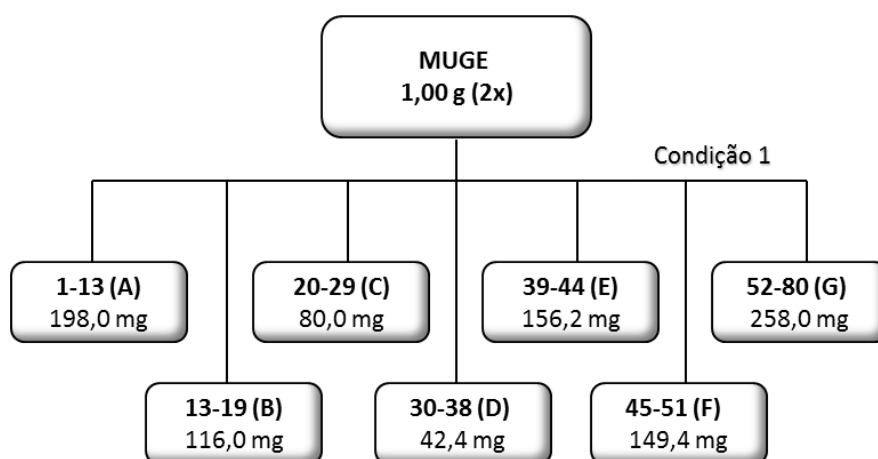


Fluxograma 3.16: Fracionamento da fração MUFE-Q(20-24).

Condição: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 (φ = 2,5 e h = 56,0 cm); eluição isocrática: MeOH.

3.6 Estudo do extrato MUGE

O extrato etanólico dos galhos de *M. urundeuva* (MUGE) foi fracionado utilizando Sephadex LH-20 seguido de outros procedimentos cromatográficos (Fluxograma 3.17). Este procedimento de separação foi inicialmente realizado devido a grande quantidade de pigmentos presentes neste extrato.



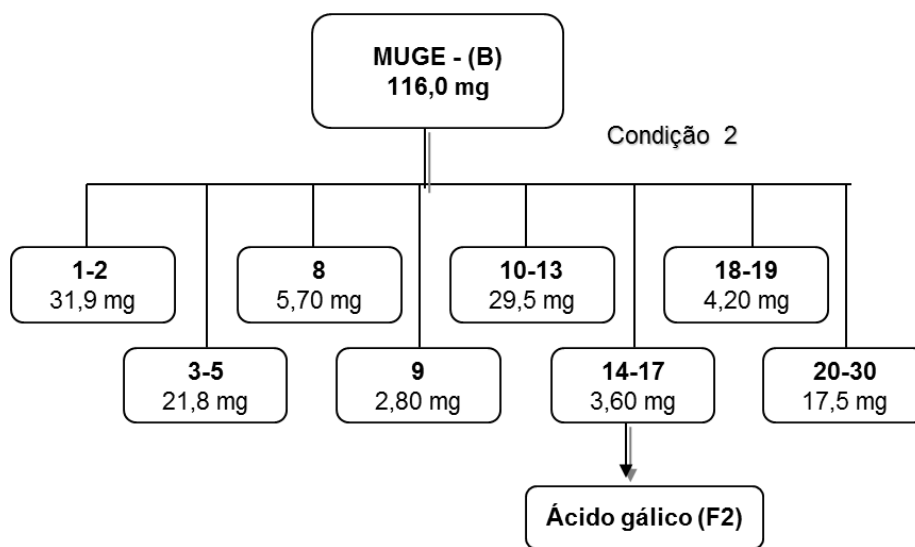
Fluxograma 3.17: Fracionamento de MUGE.

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,50$ e $h = 70,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

Este fracionamento (MUGE) foi realizado por 2 vezes consecutivas através das condições citadas acima.

3.6.1 Fracionamento de MUGE-B

Devido à alta polaridade da fração MUGE-B, esta foi fracionada utilizando Sephadex LH-20 (Fluxograma 3.18) fornecendo 30 frações, as quais foram submetidas à CCDA e pela análise do R_f foram agrupadas de acordo com as suas similaridades. Através dos espectros de RMN de ^1H das frações, foi possível identificar o composto fenólico ácido gálico (F2).

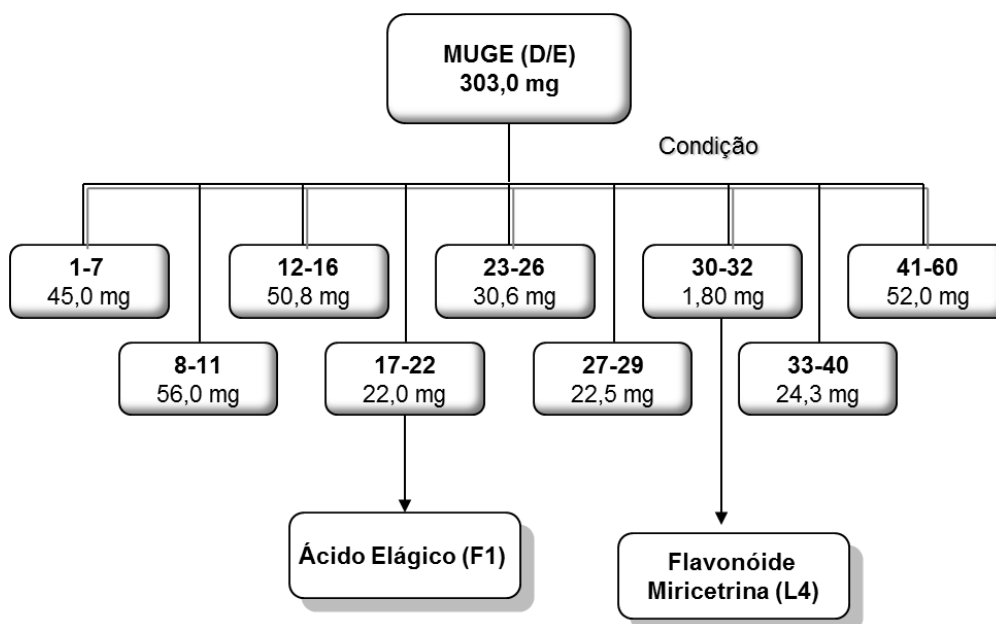


Fluxograma 3.18: Fracionamento da partição MUGE-(B).

Condição 2 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,50$ e $h = 126,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

3.6.2 Fracionamento de MUGE-(D/E)

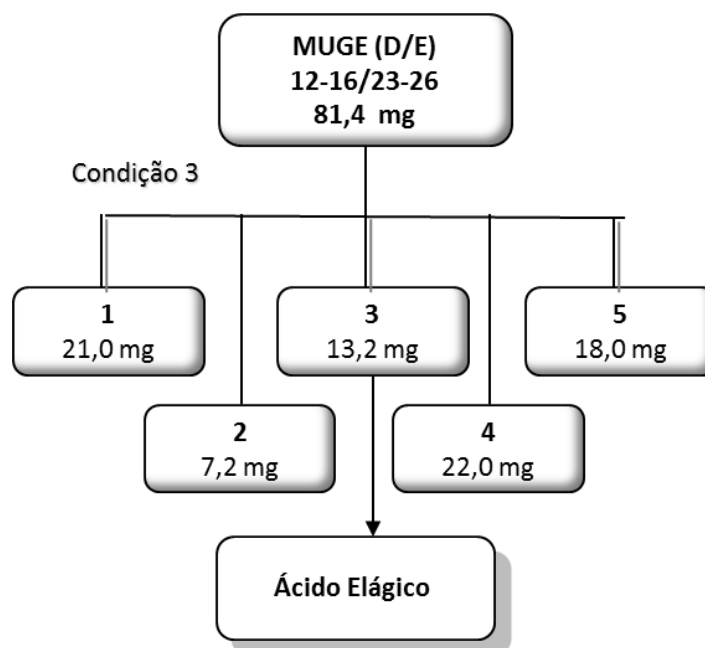
O Fluxograma 3.19 ilustra o fracionamento realizado.



Fluxograma 3.19: Fracionamento da partição MUGE-(D/E)

Condição: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,00$ e $h = 133,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

Como comentado anteriormente, as frações oriundas do extrato MUGE apresentam alta polaridade, deste modo para o fracionamento inicial, adotou-se o uso de Sephadex LH-20 (Fluxograma 3.19). Deste fracionamento foram coletadas 40 amostras, que posteriormente foram agrupadas através da análise por CCDA. Da fração MUGE-D/E-17-22 obtendo-se um sólido de coloração amarelada de difícil solubilização mesmo em solventes com alto grau de polaridade. Das análises dos espectros de RMN ^1H das frações, pode-se observar que este composto se tratava do ácido elágico (F1), já para o espectro de RMN ^1H da fração MUGE-D/E-30-32 foi observado a presença do flavonóide glicosilado miricetrina (L4). Sinais majoritários referente ao ácido elágico, também foram observados nos espectros de RMN de ^1H das frações MUGE-D/E 12-16 e 23-26, porém impuras, deste modo um novo fracionamento foi realizado para purificação da mesmo.

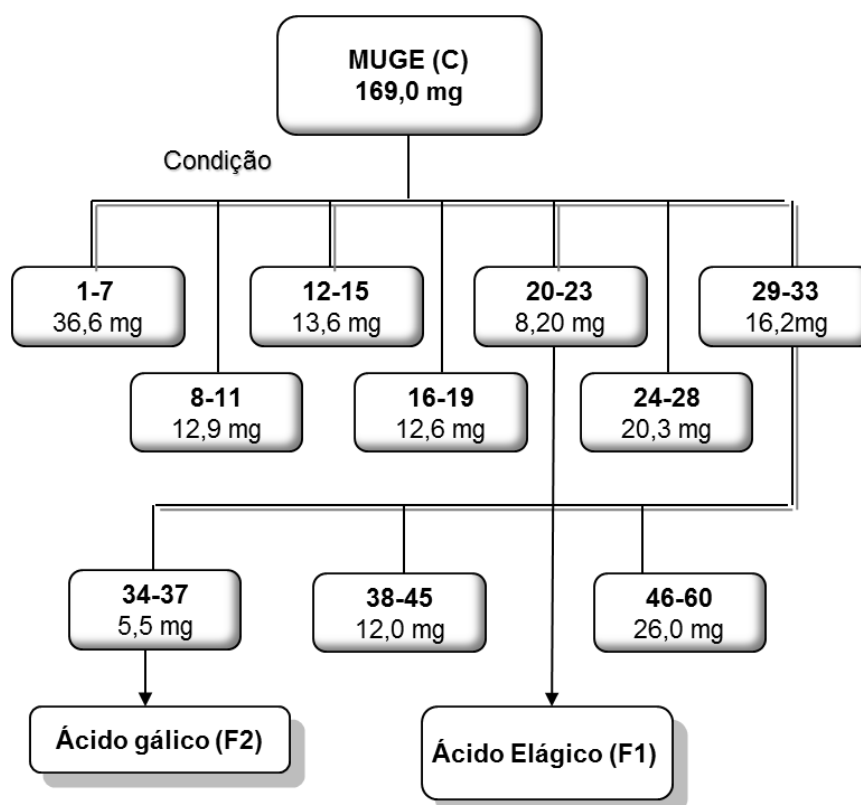


Fluxograma 3.20: Fracionamento da partição MUGE-(D/E) (12-16/23-26)

Condição: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,00$ e $h = 133,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

3.6.3 Fracionamento de MUGE-(C)

O Fluxograma 3.21 ilustra o fracionamento realizado. A partição MUGE-C foi fracionada e reagrupada através das análises por CCDA em 10 frações conforme fluxograma acima.

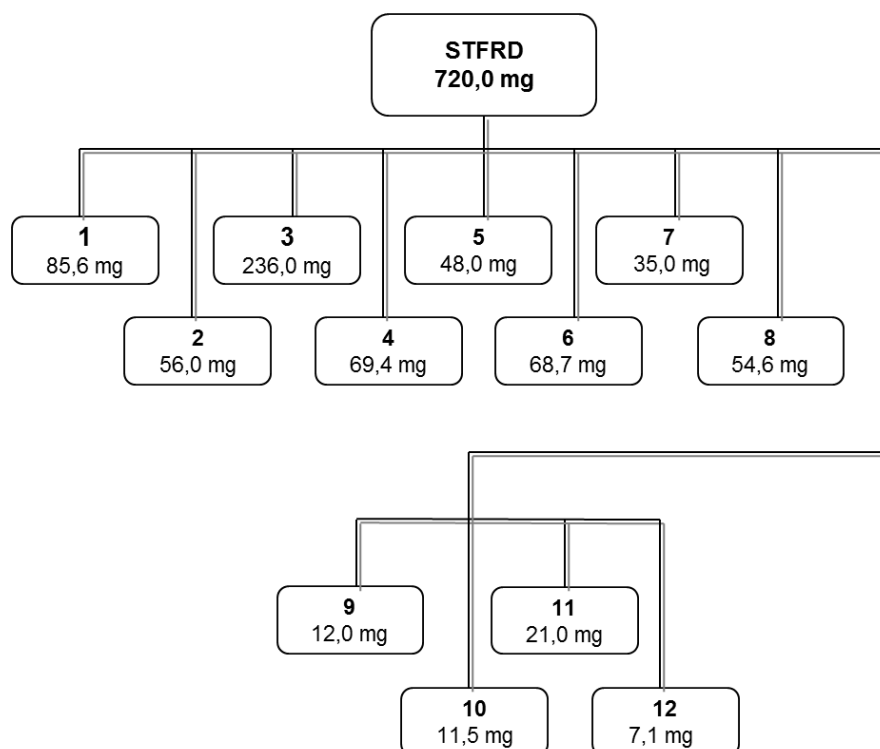


Fluxograma 3.21: Fracionamento da partição MUGE-(C)

Condição: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,50$ e $h = 126,0$ cm); eluição isocrática: MeOH.

3.7 Estudo do extrato STFRD

O Fluxograma 3.22 ilustra o fracionamento realizado. Este fracionamento (STFRD) foi realizado por 8 vezes consecutivas através das condições citadas acima. Este método de separação mostrou-se eficaz para retirada da grande quantidade de pigmentos contida neste extrato.

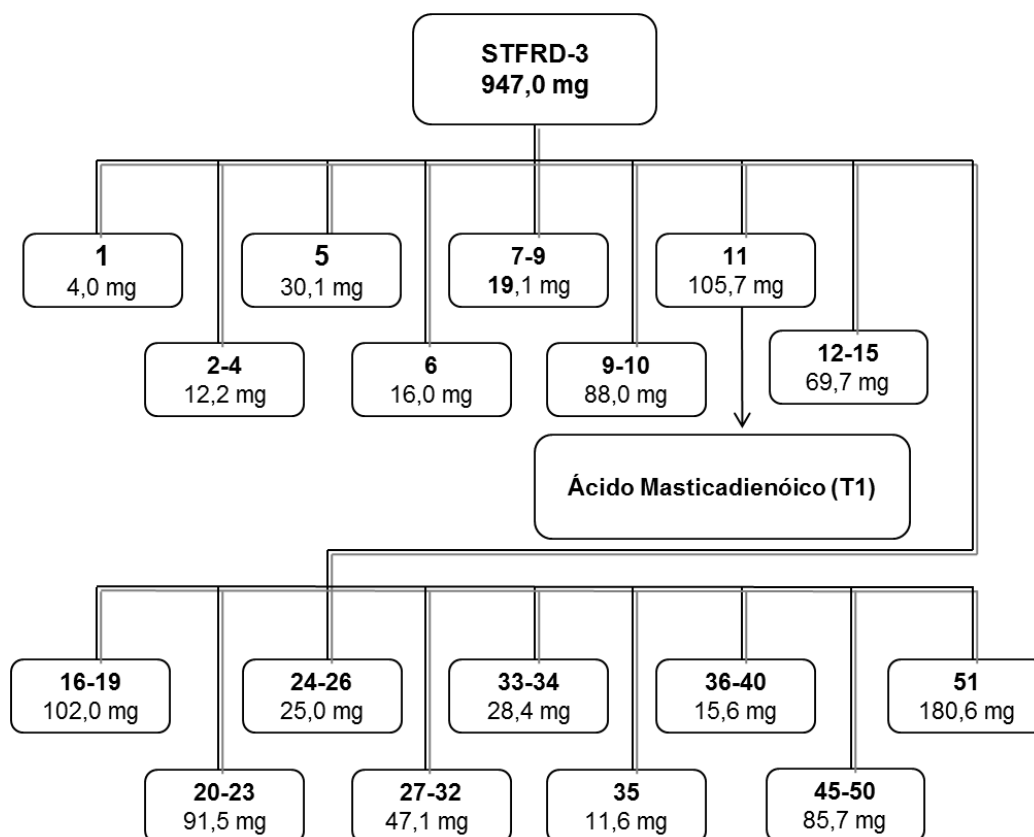


Fluxograma 3.22: Fracionamento de STFRD

Condição 1: Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,50$ e $h = 62,0$ cm); eluição isocrática: MeOH/CH₂Cl₂ 1/1 seguida por MeOH 100%.

3.7.1 Fracionamento de STFRD-3

O Fluxograma 3.23 ilustra o fracionamento realizado.

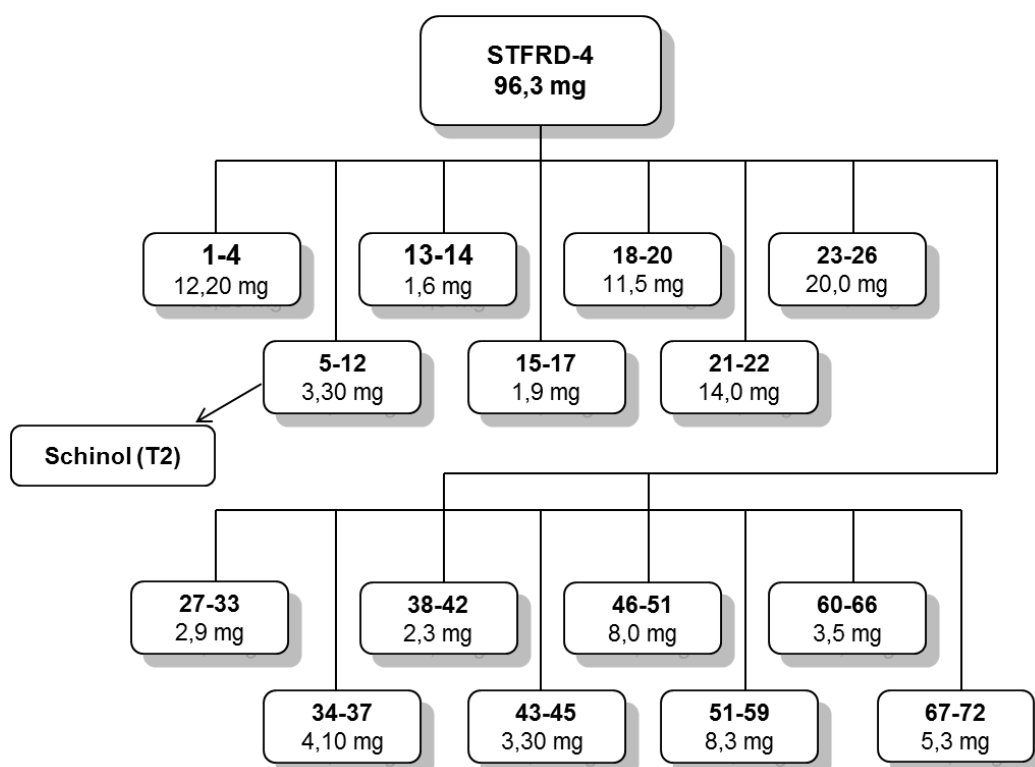


Fluxograma 3.23: Fracionamento de STFRD-3

Condição 1 : Cromatografia por adsorção; coluna de sílica do tipo flash (70-230 mesh) ($\phi = 4,50$ e $h = 48,0$ cm); Gradiente de eluição: Hexano/AcOEt 90/10% \rightarrow 100% AcOEt em ordem crescente de polaridade, seguida de AcOEt/MeOH 99/1% \rightarrow 100% MeOH em ordem crescente de polaridade.

3.7.2 Fracionamento de STFRD-4

O Fluxograma 3.24 ilustra o fracionamento realizado.

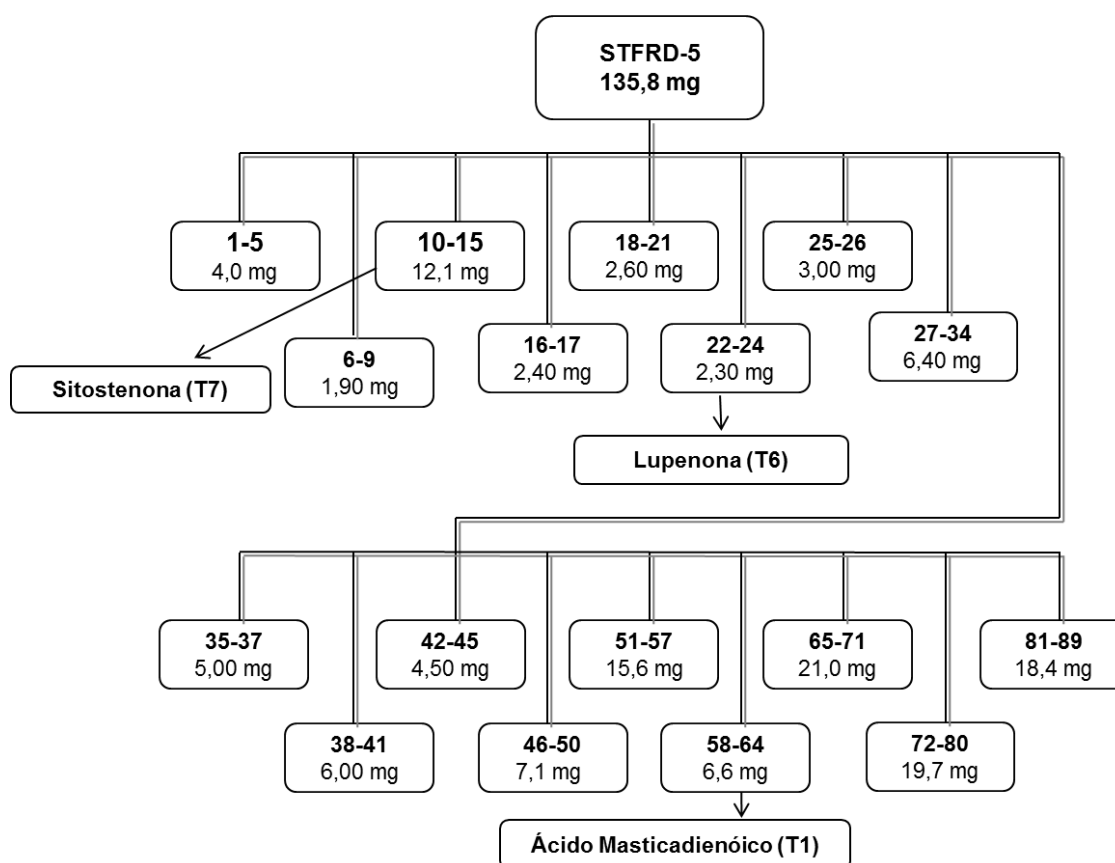


Fluxograma 3.24: Fracionamento de STFRD-4

Condição 1 : Cromatografia por adsorção; coluna de sílica do tipo flash (70-230 mesh) ($\phi = 2,50$ e $h = 30,0$ cm); Gradiente de eluição: Hexano/AcOEt 70/30% \rightarrow 100% AcOEt em ordem crescente de polaridade, seguida de AcOEt/MeOH 99/1% \rightarrow 50/50% em ordem crescente de polaridade.

3.7.3 Fracionamento de STFRD-5

O Fluxograma 3.25 ilustra o fracionamento realizado.

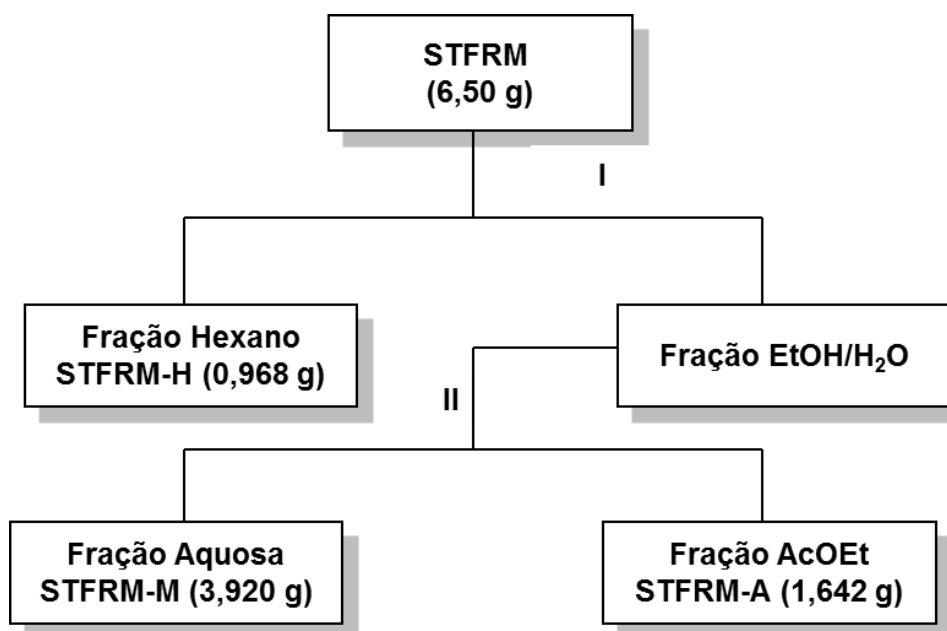


Fluxograma 3.25: Fracionamento de STFRD-5

Condição 1 : Cromatografia por adsorção; coluna de sílica do tipo flash (70-230 mesh) ($\phi = 3,0$ e $h = 28,0$ cm); Gradiente de eluição: Hexano/AcOEt 90/10% \rightarrow 100% AcOEt em ordem crescente de polaridade, seguida de AcOEt/MeOH 99/1% \rightarrow 100% MeOH em ordem crescente de polaridade.

3.8 Estudo dos extratos STFRM e STFM

Os extratos metanólicos dos frutos e folhas de *S. terebinthifollius* foram fracionados por partição líquido-líquido seguido de outros procedimentos cromatográficos (Fluxograma 3.26 e 3.27; Tabela 3.7 e 3.8).



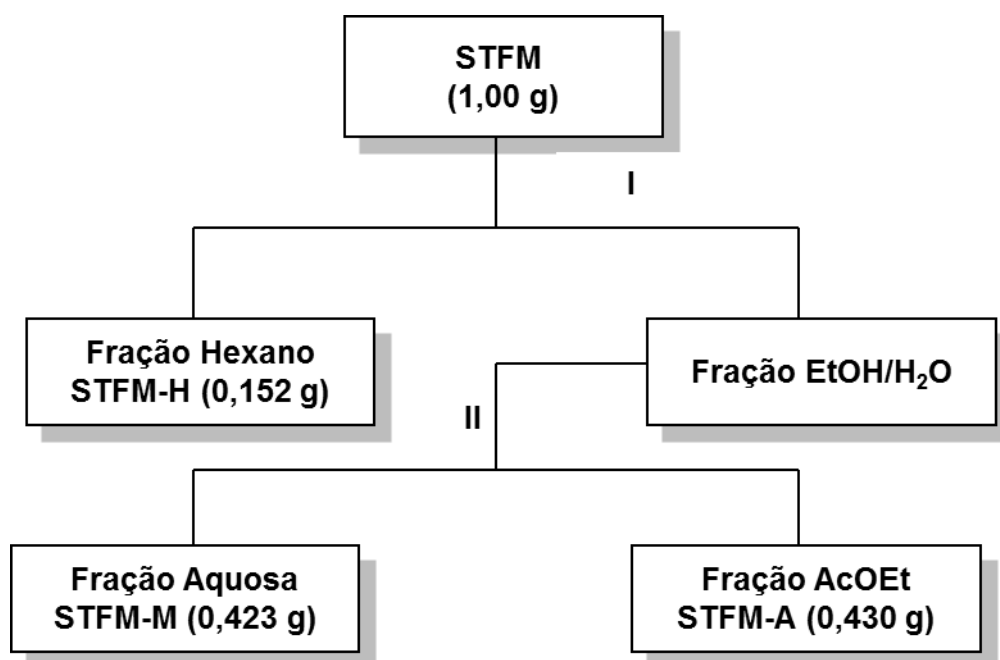
Fluxograma 3.26: Metodologia utilizada na partição do extrato STFRM

Condição I: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com Hexano.

Condição II: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com AcOEt.

Tabela 3.7: Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato STFRM

<i>S. terebinthifolius</i>	Massa do extrato	Código	Massa (g)
Frutos	6,50 g	STFRM-H	0,968
		STFRM-A	1,642
		STFRM-M	3,920



Fluxograma 3.27: Metodologia utilizada na partição do extrato STF

Condição I: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com Hexano.

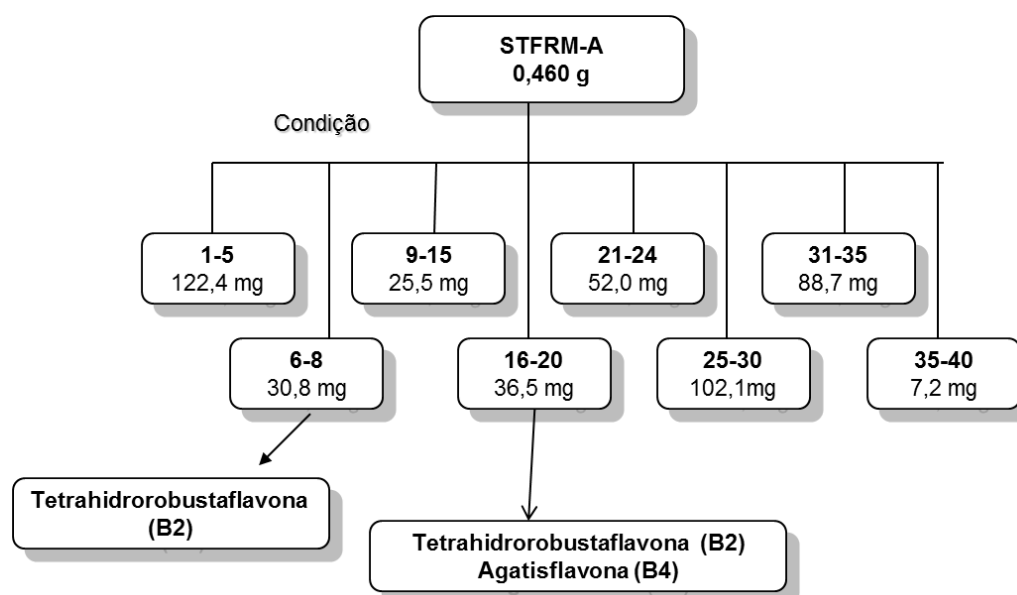
Condição II: Suspensão do extrato em H₂O/EtOH (3:1). Extração com AcOEt.

Tabela 3.8: Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato STF

<i>S. terebinthifolius</i>	Massa do extrato	Código	Massa (g)
Folhas	1,00 g	STFM-H	0,152
		STFM-A	0,423
		STFM-M	0.430

3.8.1 Fracionamento de STFRM-A

O Fluxograma 3.28 ilustra o fracionamento realizado.

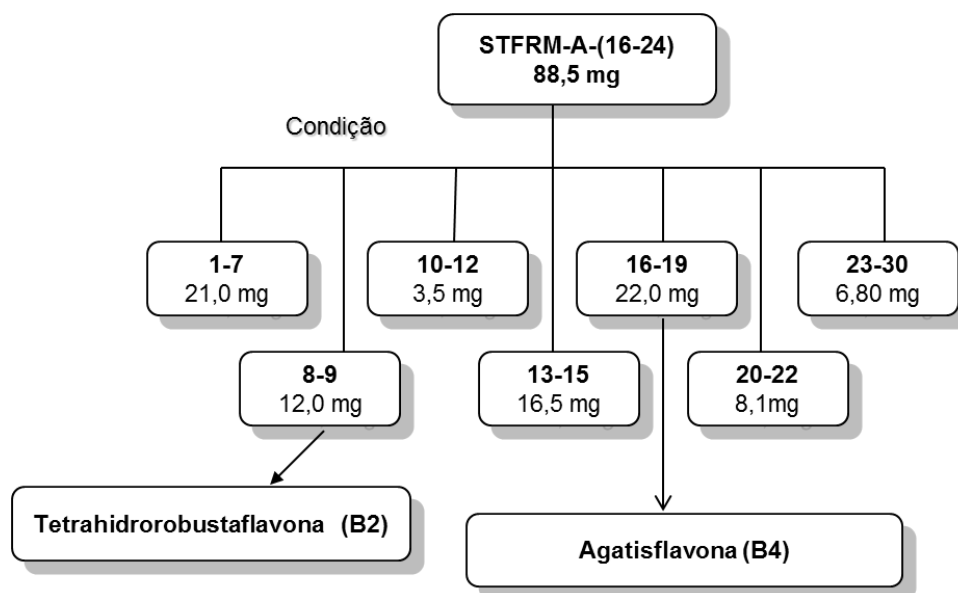


Fluxograma 3.28: Fracionamento de STFRM-A

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 3,00$ e $h = 57,0$ cm); eluição isocrática: MeOH 100%.

3.8.2 Fracionamento de STFRM-A-(16-24)

O Fluxograma 3.29 ilustra o fracionamento realizado.

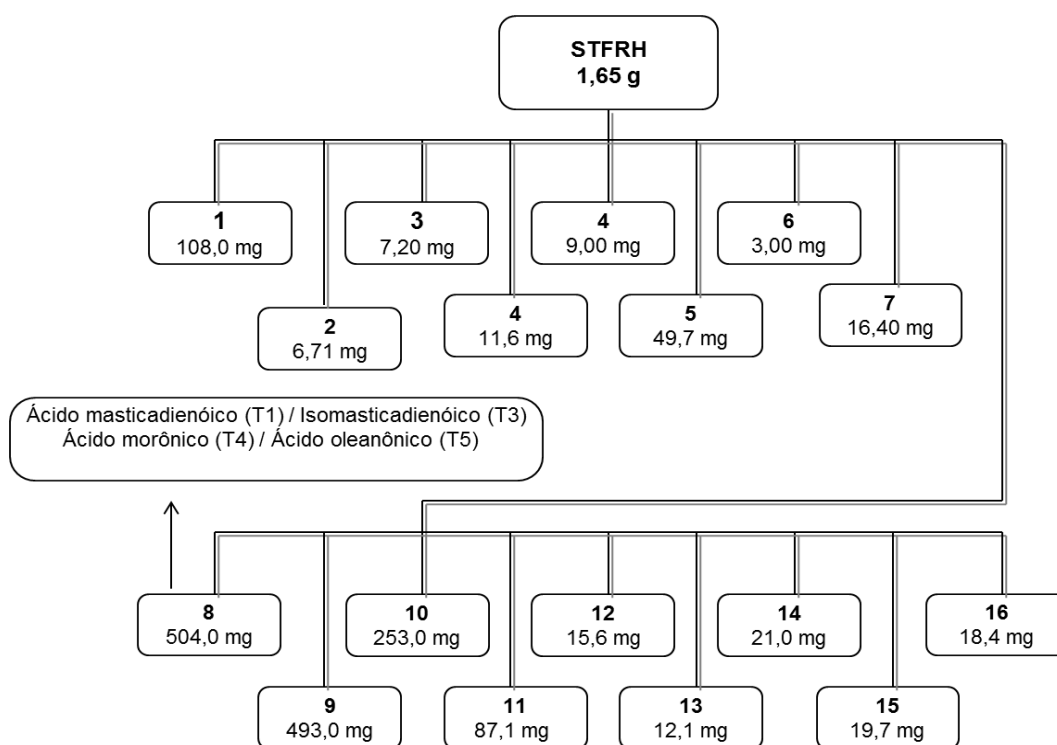


Fluxograma 3.29: Fracionamento de STFRM-A-(16-24)

Condição 1 : Cromatografia por exclusão; coluna Sephadex LH-20 ($\phi = 2,00$ e $h = 100,0$ cm); eluição isocrática: MeOH 100%.

3.8.3 Estudo do extrato STFRH

O Fluxograma 3.30 ilustra o fracionamento realizado.



Fluxograma 3.30: Fracionamento de STFRH

Condição 1 : Cromatografia por adsorção; coluna de sílica do tipo flash (70-230 mesh) ($\phi = 3,50$ e $h = 40,0$ cm); Gradiente de eluição: Hexano/AcOEt 70/30% \rightarrow 100% AcOEt em ordem crescente de polaridade, seguida de AcOEt/MeOH 99/1% \rightarrow 50/50% em ordem crescente de polaridade.

3.9 Derivatizações do ácido masticadienóico

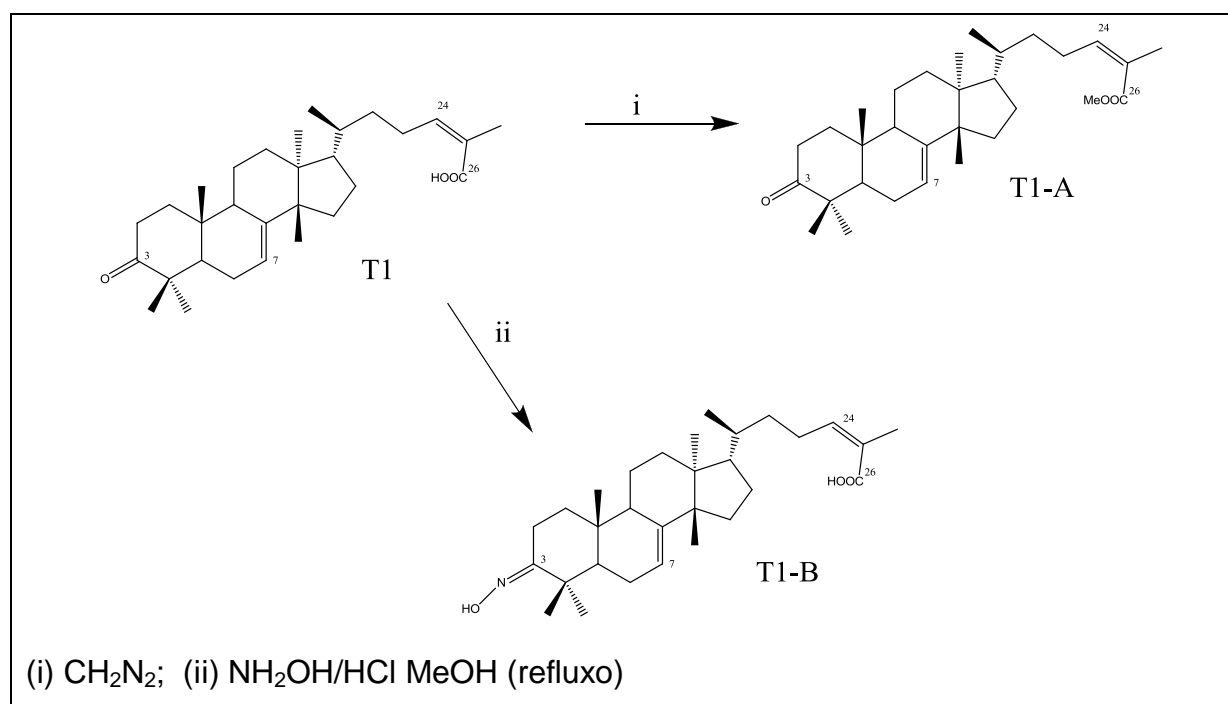


Figura 3.2: Derivatizações do ácido masticadienóico (**T1**).

A. Reação de esterificação com diazometano

A solução de diazometano foi preparada dissolvendo-se 2,14 g de *p*-toluilsulfonilmetilnitrosamida (diazald) em 30 mL de éter etílico. Resfriou-se a solução em banho de gelo e transferiu-a para um balão de destilação, onde se adicionou 1,0 g de KOH em 10 mL de etanol. Após 5 min em repouso e em banho de gelo, a solução etérea de diazometano foi destilada em banho de óleo a 65°C e o destilado foi coletado sobre éter etílico em banho de gelo. Terminando a destilação, a reação foi neutralizada com ácido acético glacial.

Para a realização das esterificações, adicionou-se aos compostos uma pequena fração da solução de diazometano em éter etílico até cessar o desprendimento de gás N_2 .

B. Formação do derivado T1-B

Em um balão de duas vias de 10 mL contendo de $\text{NH}_2\text{OH}/\text{HCl}$ (19,0 mg, 0,30 mmol) foram adicionados 0,5 mL de MeOH para solubilização dos reagentes, logo após foi adicionado o composto **T1** (13,4 mg, 0,03 mmol) solubilizado em 1,0 mL de MeOH. A mistura foi colocada em refluxo a 65 °C por 3-4 horas. Após cessada a reação, foram adicionados 20 mL de água e extraída com 3 porções de CH_2Cl_2 seguida de 3 porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com NaSO_4 e o solvente retirado por evaporação rotativa.

3.10 Síntese dos complexos metálicos

3.10.1 Síntese de *cis*- $\text{Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2$.

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de capacidade de 50,0 mL contendo 15,0 mL de DMF (dimetilformamida) previamente deaerado foi solubilizado 300,0 mg (1,15 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sob agitação com uma barra magnética e aquecimento. Adicionou-se 379,0 mg (1,15 mmol) de 2-2'-bipiridina (bpy) e 324,0 mg (2,30 mmol) de LiCl. A mistura reacional foi refluxada por oito horas sob atmosfera de nitrogênio, aquecimento e agitação. Posteriormente resfriado e ainda sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se 25,0 mL de acetona previamente resfriada em banho de gelo. A mistura resultante foi deixada por uma noite sob refrigeração a 0°C para precipitação do composto. Após este período, um sólido foi obtido, o qual foi separado por filtração à vácuo, lavado com água e dietil-éter previamente resfriados em banho de gelo e posteriormente seco à vácuo. (Rendimento: 48%).

3.10.2 Síntese de *cis*- $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2$

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de capacidade de 50,0 mL contendo 5,0 mL de etanol previamente deaerado foi solubilizado 200,0 mg

(0,352 mmol) de *cis*-Ru(Cl₂)(2,2'-bipiridina)₂ sob agitação com uma barra magnética e aquecimento. Adicionou-se 122,0 mg (0,404 mmol) de quercetina e 5,0 mL de H₂O Mili-Q. A mistura reacional foi refluxada inicialmente por 8 horas sob atmosfera de nitrogênio, aquecimento e agitação (diferentes tempos reacionais foram testados). Posteriormente resfriado e ainda sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se 115,0 mg (0,72 mmol) de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) previamente dissolvido com gotas de água e poucos mL de etanol. A mistura resultante foi filtrada à vácuo. O complexo foi seco à vácuo. (Rendimento: 25%)

3.10.3 Síntese do complexo [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄]

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de capacidade de 50,0 mL foi adicionado quercetina (100,0 mg; 296 μmol), metanol (15,0 mL) e o sistema foi mantido sob agitação até a completa solubilização do ligante. Após, sem cessar a agitação, foi adicionado trietilamina (10,0 mg/ 0,1 mmol) e posteriormente o acetato de cobre Cu(AcO)₂.H₂O (117,0 mg; 592 μmol) solubilizado em quantidades mínimas de água. O sistema foi mantido sob agitação por duas horas, após esse período a agitação foi cessada e adicionados 150,0 mL de água gelada. O precipitado foi lavado várias vezes com acetona e água. O rendimento da reação foi de 80%. O produto obtido apresentou-se como um sólido amarelo escuro.

3.10.4 Síntese do complexo [Zn₂(Quercetina)(H₂O)₄]

O procedimento experimental para este complexo foi o mesmo utilizado no item anterior (3.9.3). Quercetina (150,0 mg; 443 μmol); metanol (20,0 mL); trietilamina (10,0 mg/ 0,1 mmol) e Zn(AcO)₂.2H₂O (194,6 mg; 886 μmol). O rendimento da reação foi de 78%. O produto obtido apresentou-se como um sólido amarelo escuro.

3.11 Metodologia dos Ensaio Biológicos

3.11.1 Ensaio Biológicos com as Formigas Cortadeiras

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizadas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pela aluna Marcela Ceccato sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Nestes ensaios as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida constituída por: 5,0% de glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de agar bacteriológico e 100 mL de água destilada. Após mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas por aproximadamente 4 minutos e logo em seguida, autoclavada a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade. A dieta para manutenção das formigas (Controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 e 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada (BUENO *et al.*, 1997). Os extratos (2,0 mg/mL) e as substâncias (0,1 mg/mL) foram incorporados à dieta utilizando o método dry-mix, que consiste em acrescentar o princípio ativo à glicose e os demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada, não utilizando solvente.

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento divididas em grupos de dez formigas e mantidas em 5 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa acima de 70,0% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não

paramétrico log-rank ($p < 0,05$), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

3.11.2 Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Os ensaios com o fungo simbiote *L. gongylophorus* foram realizados no Laboratório de bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela aluna Denise Cristina Martins, sob coordenação da Dr^a Ana Paula Terezan.

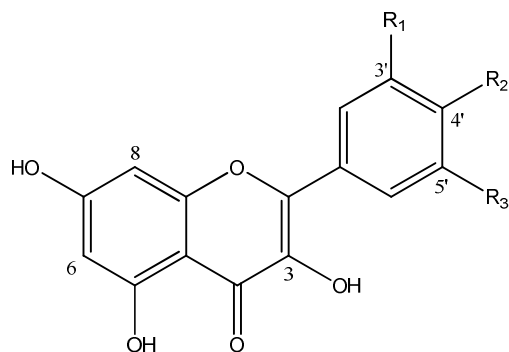
O fungo foi isolado de um ninho de formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura constituído por extrato de malte (20 g/L), peptona (5 g/L) extrato de levedura (2 g/L) e ágar (20 g/L).

Os extratos submetidos ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporados ao meio de cultura e dissolvidos em água destilada, obtendo concentração final igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120°C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*. Cada extrato foi preparado em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para o controle geral (meio de cultura e fungo simbiote). Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C (± 2) são realizadas as medidas do diâmetro médio final para cada placa, em cada extrato. A análise estatística é realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste comparativo de Tukey, ao nível 5% de probabilidade, para verificar se houve diferença significativa entre as médias. O software utilizado foi o Graph-Pad InStat 3.10 (Adaptação MIYASHIRA, 2007).

PARTE I
RESULTADOS
E DISCUSSÕES

4. Resultados e Discussões

4.1 Substâncias isoladas e/ou identificadas



Quercetina ($R_1, R_2 = \text{OH} / R_3 = \text{H}$)

Código: **L1**

Miricetina ($R_1, R_2 \text{ e } R_3 = \text{OH}$)

Código: **L2**

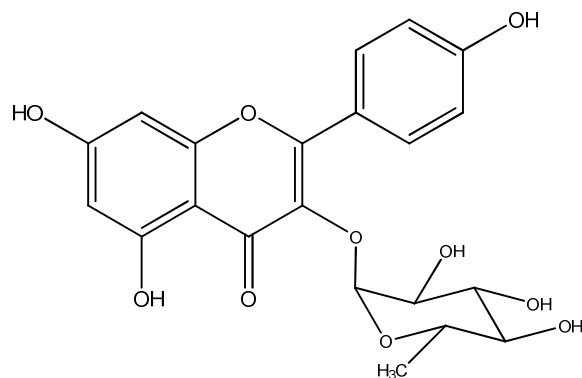
Origem (**L1 e L2**): Folhas de *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva*

Kaempferol ($R_2 = \text{OH} / R_1 \text{ e } R_3 = \text{H}$)

Código: **L3**

Origem: Folhas de *A. humile*

Identificação estrutural: p. 76

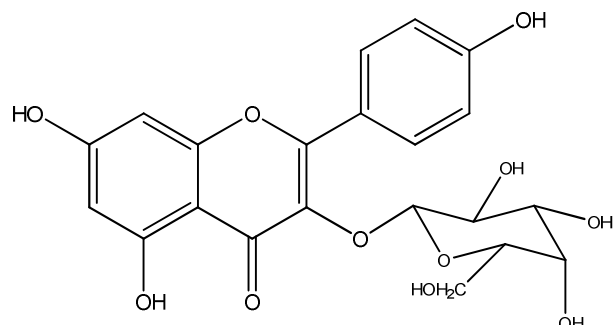


Miricetrina

Código: **L4**

Origem: Folhas de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 79

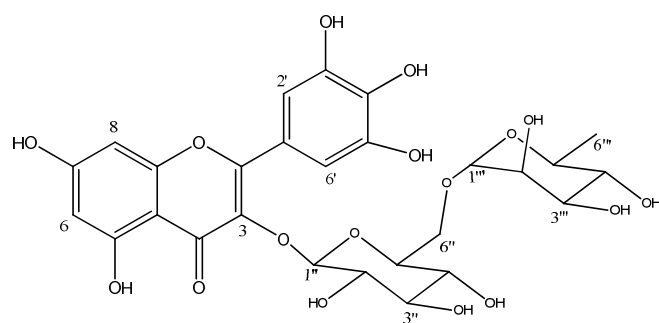


Miricetina-3-O- β -galactosídeo

Código: **L5**

Origem: Folhas de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 83

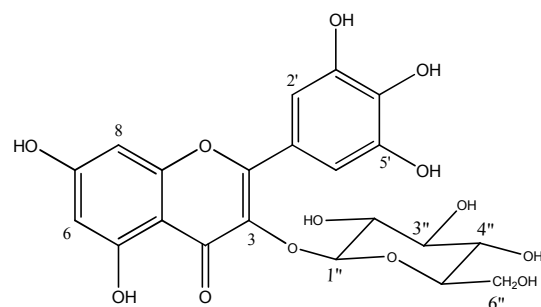


Miricetina-3-O- β -rutinosídeo

Código: **L6**

Origem: Folhas de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 89

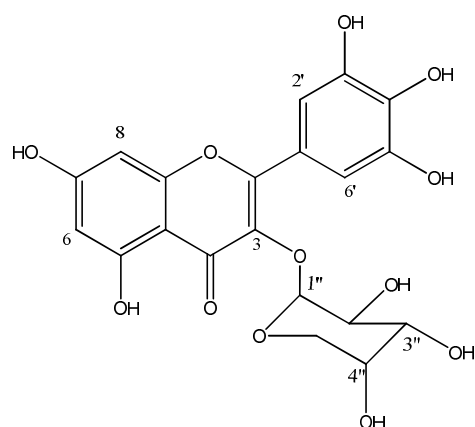


Miricetina-3-O- β -glucosídeo

Código: **L7**

Origem: Folhas de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 89

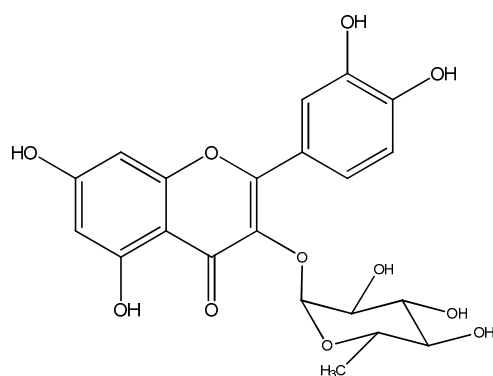


Miricetina-3-O- α -arabinosídeo

Código: **L8**

Origem: Folhas de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 95

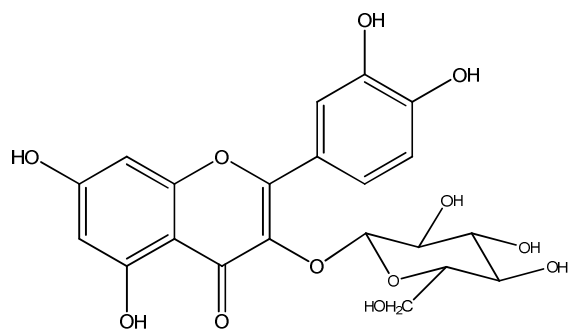


Quercitrina

Código: **L9**

Origem: Folhas de *A. humile* e *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 99

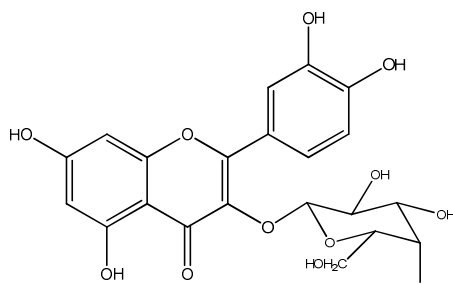


Quercetina-3-O- β -glucosídeo

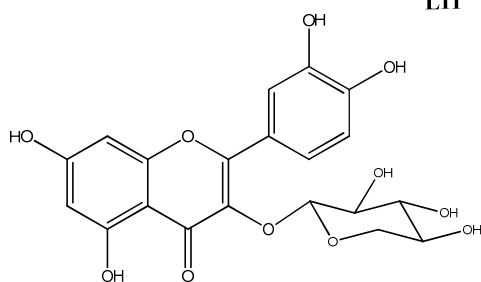
Código: **L10**

Origem: Folhas de *A. humile*
e *M. urundeuva*

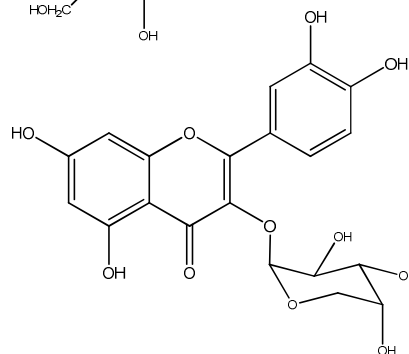
Identificação estrutural: p. 99



L11



L12



L13

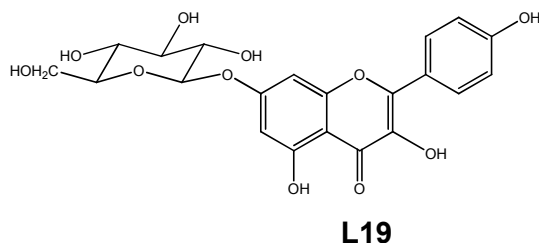
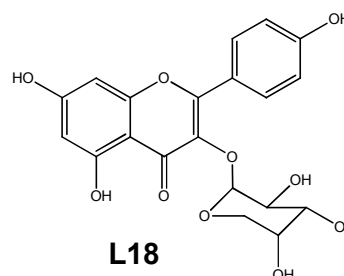
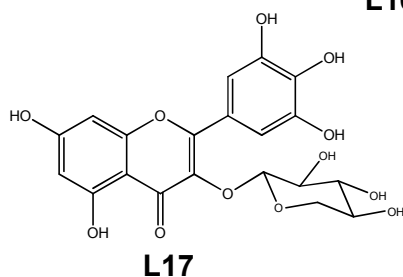
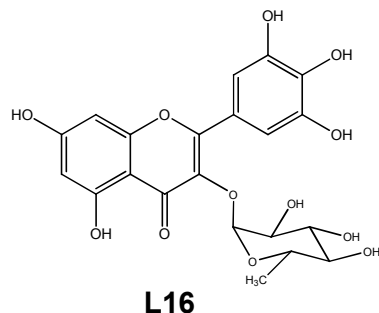
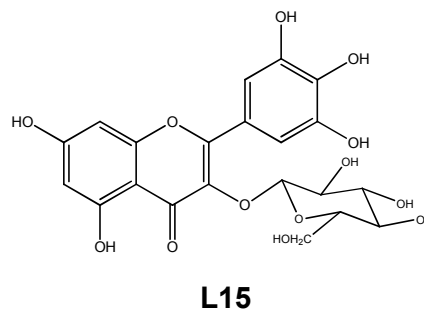
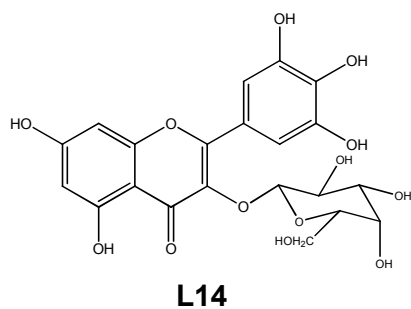
Quercetina-3-O- β -galactosídeo / Código: **L11**

Quercetina-3-O- β -xilósídeo / Código: **L12**

Quercetina-3-O- α -arabinosídeo / Código: **L13**

Origem: Folhas de *A. humile*

Identificação estrutural: p. 107



Kaempferol-3-O- β -galactosídeo / Código: **L14**

Kaempferol-3-O- β -glucosídeo / Código: **L15**

Kaempferol -3-O- α -raminosídeo / Código: **L16**

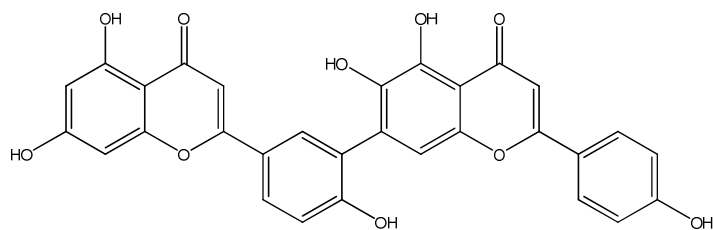
Kaempferol -3-O- β -xilosídeo / Código: **L17**

Kaempferol -3-O- α -arabinosídeo / Código: **L18**

Kaempferol -7-O- β -glucosídeo / Código: **L19**

Origem: Folhas de *A. humile*

Identificação estrutural: p. 126

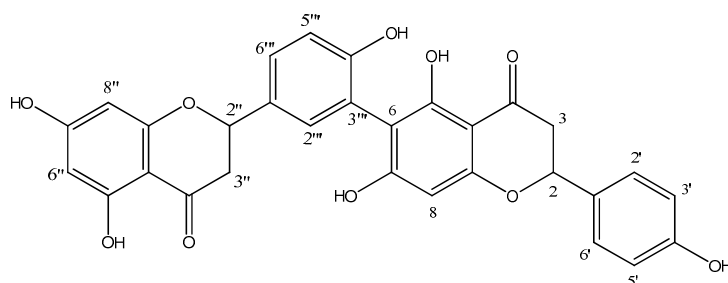


6-(5-(5,6-dihidroxi-4-oxo-4H-1-benzopirán-2-il)-2-hidroxi-fenil)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-4H-1-benzopirán-4-ona

Código: **B1**

Origem: Folhas de *A. humile*

Identificação estrutural: p. 141

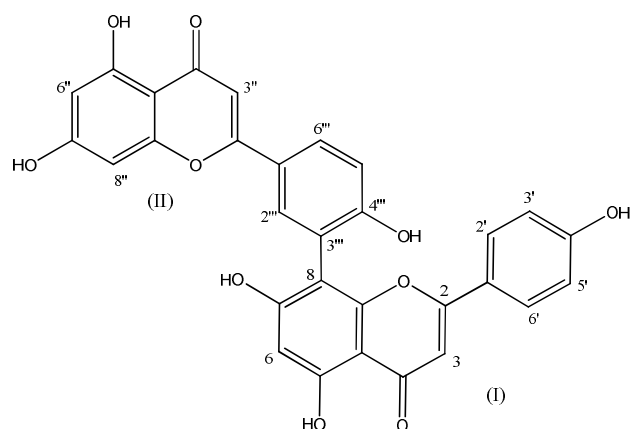


Tetrahidrorobustaflavona

Código: **B2**

Origem: Frutos de *Schinus terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 147

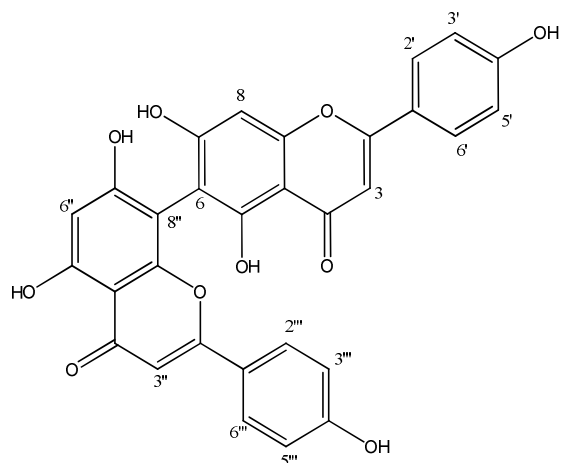


Amentoflavona

Código: **B3**

Origem: Folhas de *A. humile*

Identificação estrutural: p. 153

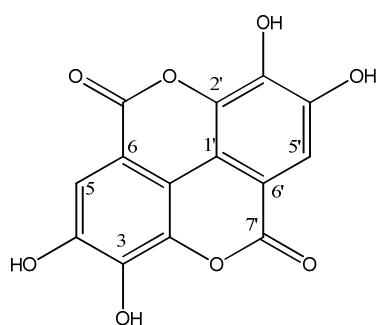


Agatisflavona

Código: **B4**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 157

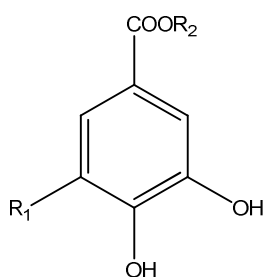


Ácido elágico

Código: **F1**

Origem: Galhos de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 160



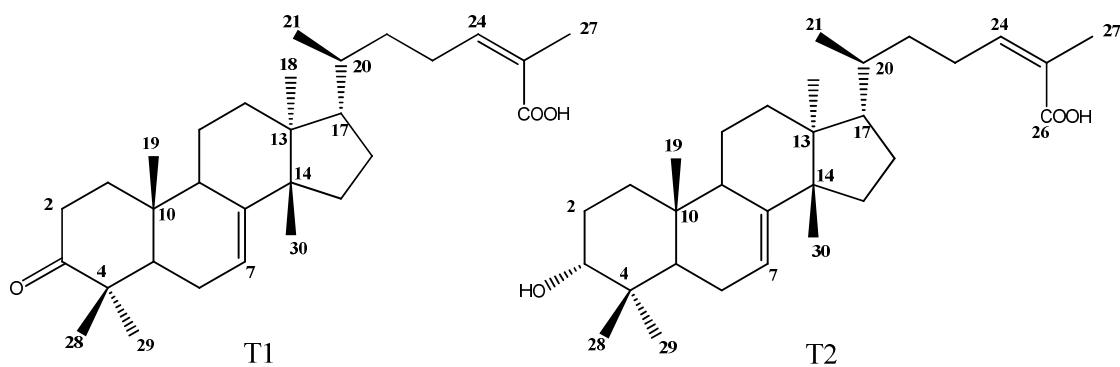
Ácido gálico ($R_1 = OH$; $R_2 = H$) / Código: **F2**

Ácido protocatequínico (R_1 e $R_2 = H$) / Código: **F3**

Ácido protocatequínico acetilado ($R_1 = H$; $R_2 = CH_2CH_3$) / Código: **F4**

Origem: Galhos de *M. urundeuva*

Identificação estrutural: p. 162

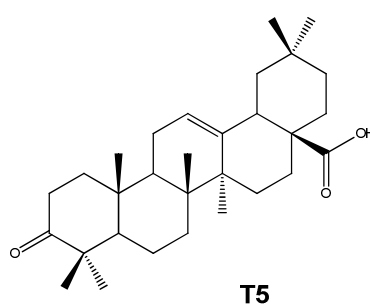
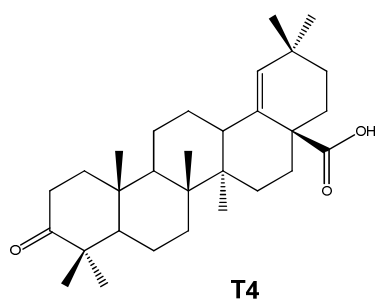
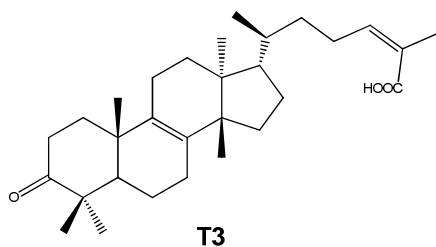


Ácido masticadienóico / Código: **T1**

Schinol / Código: **T2**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 167



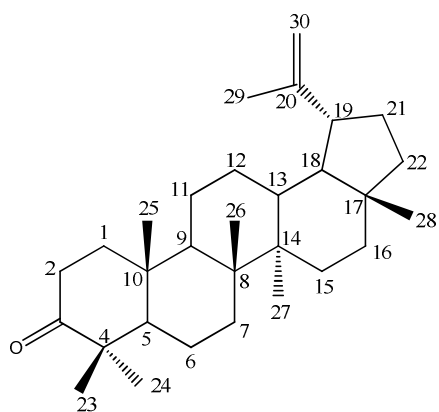
Isomasticadienóico / Código: **T3**

Ácido morônico / Código: **T4**

Ácido Olenônico / Código: **T5**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 172

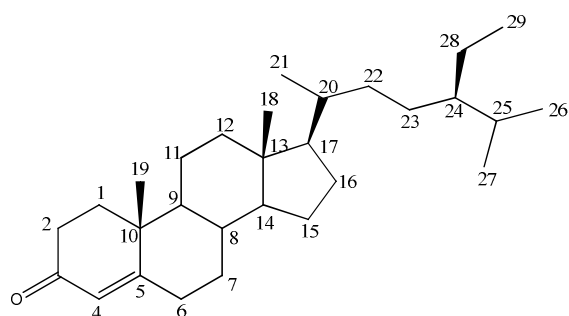


Lupenona

Código: **T6**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 180

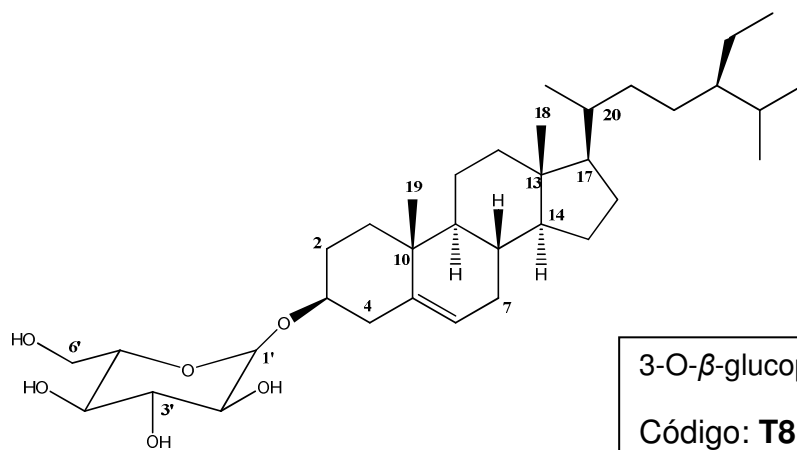


Sitostenona

Código: **T7**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 183



3-O- β -glucopiranosil sitosterol

Código: **T8**

Origem: Frutos de *S. terebinthifolius*

Identificação estrutural: p. 186

4.2 Flavonoides

Os flavonóides constituem um grupo de metabólitos secundários de ampla ocorrência na natureza (GATTUSO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). Várias propriedades biológicas e farmacológicas têm sido atribuídas a está esta classe de substâncias, tais como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatórias, dentre outras (VELÁSQUEZ *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2000; GATTUSO *et al.*, 2007; HARBONE e WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides estão divididos em nove subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonóis (flavan-3-ol ou catequinas) chalconas e dihidrochalconas (Figura 4.1) que são diferenciadas entre si por variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (WANG e HUANG, 2004; LIN *et al.*, 2008). A combinação das nove subclasses com glicosilações em diferentes sítios e a grande variedade de açúcares produz um enorme número de diferentes compostos para esta classe de substâncias naturais.

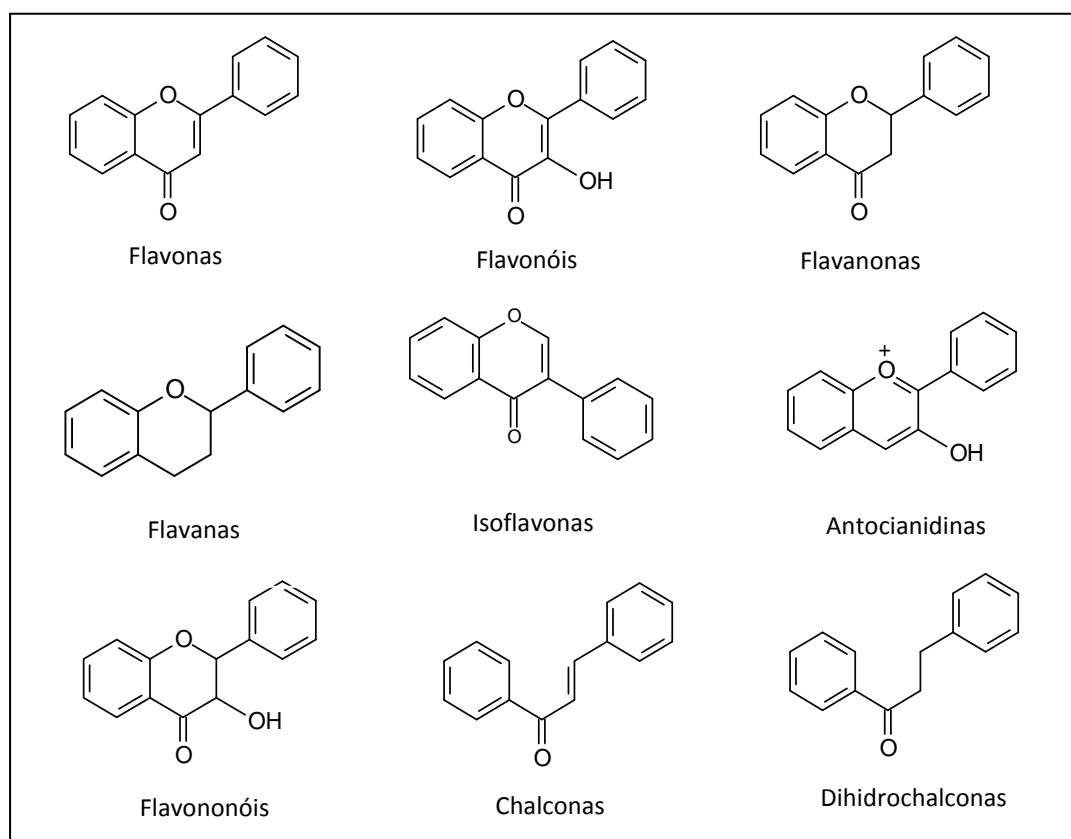


Figura 4.1: Classificação dos flavonóides por subclasses.

O esqueleto flavonoídico é composto por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico, a partir do qual é iniciada a numeração dos carbonos e determinada a nomenclatura sistemática oficial IUPAC. No caso das flavonas, que apresentam um grupo carbonila na posição C-4 e os dois anéis aromáticos são conectados com um anel pirano, o sistema passa a receber a nomenclatura 4H-1-benzopiran-4-ona e os substituintes recebem a numeração sistêmica. Na nomenclatura usual (MARKHAN, 1982) os anéis são designados como A, B e C (Figura 4.2) e os átomos de carbono individuais são numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e algarismos marcados linha (') para o anel B, na seqüência os substituintes recebem numeração de acordo com a posição e a subclasse flavonoídica é então especificada.

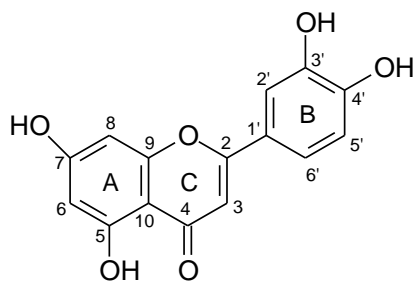


Figura 4.2: Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual.

A substituição, nos esqueletos flavonoídicos, por unidades glicosídicas é muito comum e aumenta significativamente a quantidade de diferentes flavonóides possíveis e/ou existentes. A confirmação da presença de glicosídeos como substituintes pode ser obtida através de dados de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. O sinal em torno de δ 5,0 ppm é característico de hidrogênio anomérico e, sinais na faixa de δ 4,0 e δ 3,0 ppm são característicos dos demais hidrogênios de glicosídeos. A presença de uma unidade de raminose pode ser confirmada através da observação de um dubleto com deslocamento químico de aproximadamente δ 1,0 ppm ($J = 6,0$ Hz) (HARBONE e MABRY, 1982). Nos espectros de RMN de ^{13}C observam-se os sinais com deslocamentos químicos em torno de δ 100,0 ppm característico de carbono anomérico para uma ligação C-O glicosídica e em torno de δ 73,0 ppm para carbono anomérico de ligação C-C

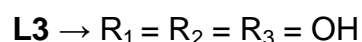
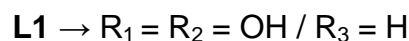
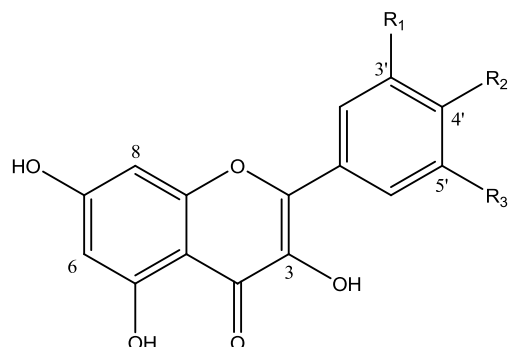
glicosídica. Sinais na faixa δ 61,0-70,0 ppm são característicos dos demais carbonos de unidades de glicosídeos. Novamente, uma unidade de raminose pode ser confirmada pelo sinal de carbono de metila em δ 17,0 ppm (AGRAWAL, 1989). A configuração do glicosídeo ligado à aglicona pode ser determinada pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico. A Tabela 4.1 traz a relação entre as constantes de acoplamento e as estereoquímicas relativas das ligações entre os glicosídeos e a aglicona.

Tabela 4.1: Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982)

Grupo	Glicosídeo	Configuração	$J_{H-1''/H-2''}$ (Hz)
Piranosídeo	D-glicose, galactose, xilose	$-\beta-$	7-8
	D-glicose, galactose, xilose	$-\alpha-$	3-4
	L-raminose	$-\beta-$	1
	L-raminose	$-\alpha-$	2
	L-arabinose	$-\beta-$	2,5
	L-arabinose	$-\alpha-$	8
Furanosídeo	D-glicose, galactose, xilose	$-\beta-$	0-2
	D-glicose, galactose, xilose	$-\alpha-$	4-4,5
	L-arabinose	$-\beta-$	4
	L-arabinose	$-\alpha-$	1

4.2.1 Identificação Estrutural

4.2.2 Identificação dos flavonoides quercetina (L1), kaempferol (L2) e miricetina (L3)



Os flavonoides quercetina (**L1**), kaempferol (**L2**) e miricetina (**L3**) são amplamente encontrados na família Anacardiaceae. Estes flavonoides apresentam sinais característicos em seus espectros, dentre eles, dois dubletos entre δ 6,15 a δ 6,40, típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2 hidrogênios que mantém relação meta entre si. Com relação aos hidrogênios aromáticos relativos ao anel B, para os compostos **L1**, **L2** e **L3** são observados diferentes tipos de substituições.

No espectro de RMN de ^1H de **L1**, foram observados sinais característicos de um flavonol com um sistema de substituição 3',4' no anel B, com um sinal em δ 7,72 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'); δ 7,62 (*dd*, $J = 8,4$ e $2,0$ Hz, H-6') e δ 6,87 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-5') além dos sinais em δ 6,16 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,37 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8), característicos do anel A.

Já para o espectro de RMN de ^1H de **L2**, foi observado dois sinais, referente à equivalência química dos hidrogênios 2'e 6' e dos hidrogênios 3'e 5' devido a livre rotação do anel B. Estes sinais em δ 8,08 ($J = 9,0$ Hz, H-2' e H-6') e δ 6,90 ($J = 9,0$ Hz, H-3' e H-5') indicam o anel B 4'-substituído. Já o anel A foi caracterizado pela presença dos sinais em δ 6,18 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) indicando um sistema de acoplamento meta.

Tabela 4.2: Dados de RMN de ^1H de **L1**, **L2** e **L3** e comparação com a literatura

H	L1 [§]	YANG & KONG, 2008*	L2 [§]	PIZZOLATTI <i>et al.</i> , 2003 ^o	L3 [§]	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003*
6	6,16 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
8	6,37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
2'	7,72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	8,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	8,12 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,33 (s)	7,29 (s)
3'	--	--	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	6,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	--	--
5'	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	6,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	6,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	--	--
6'	7,62 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 2,0 Hz)	7,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,2 Hz)	8,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	8,12 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,33 (s)	7,29 (s)

§ 200 MHz, CD₃OD*500 MHz, CD₃ODØ 600 MHz, DMSO-*d*₆

No espectro de RMN de ^1H de **L3**, a presença de um singlete em δ 7,33 (H-2'e H-6') integrando para 2H, caracterizou um sistema de substituição 3',4',5' no anel B, além dos sinais em δ 6,17 (*d*, *J* = 2,0 Hz, H-6) e δ 6,37 (*d*, *J* = 2,0 Hz, H-8) típicos do anel A.

Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H de **L1**, **L2** e **L3** estão de acordo com os dados da literatura (YANG & KONG, 2008; KAZUMA *et al.*, 2003).

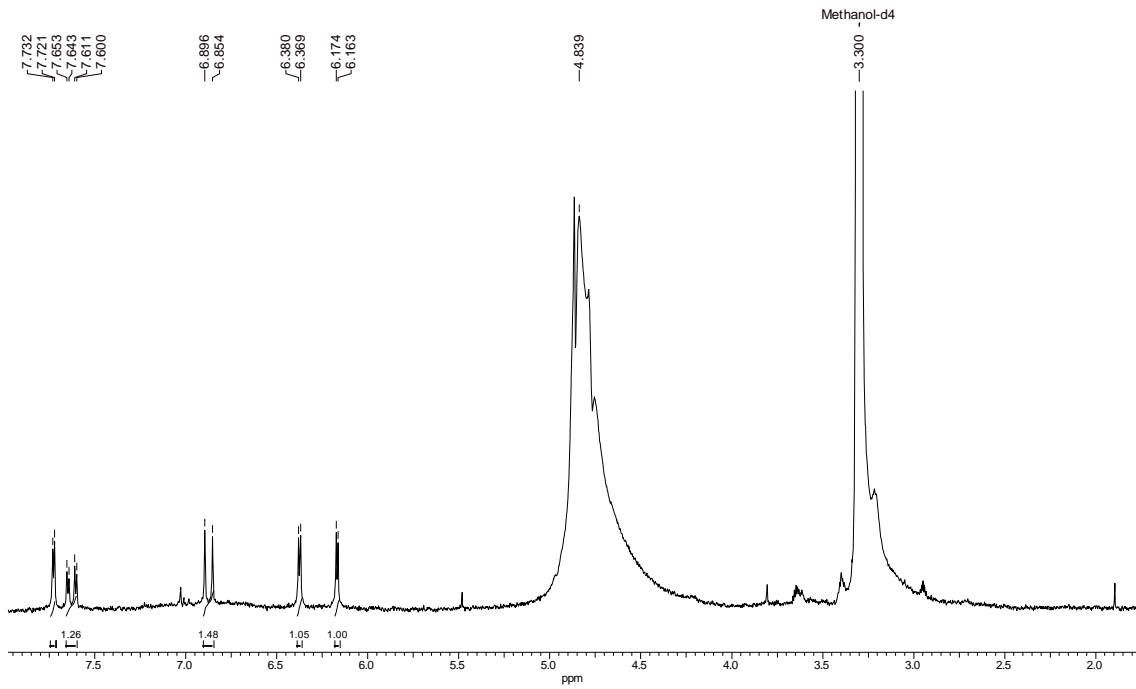


Figura 4.3: Espectro de RMN de ^1H de L1 (200 MHz, CD_3OD).

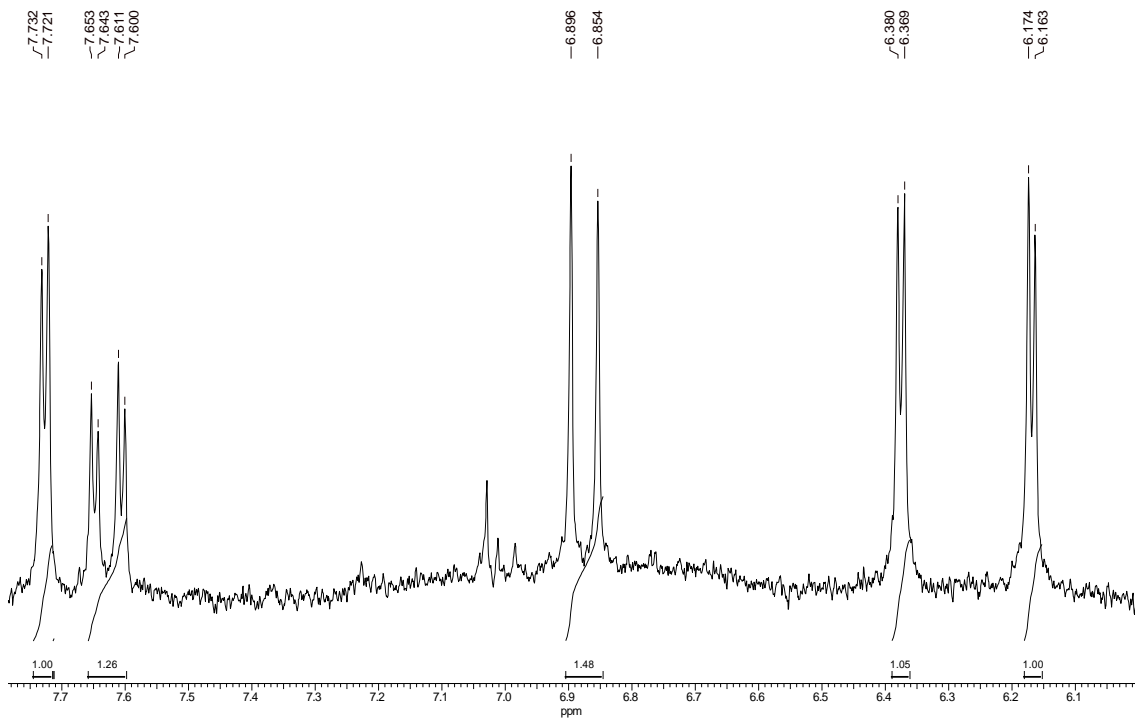


Figura 4.4: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L1 (200 MHz, CD_3OD).

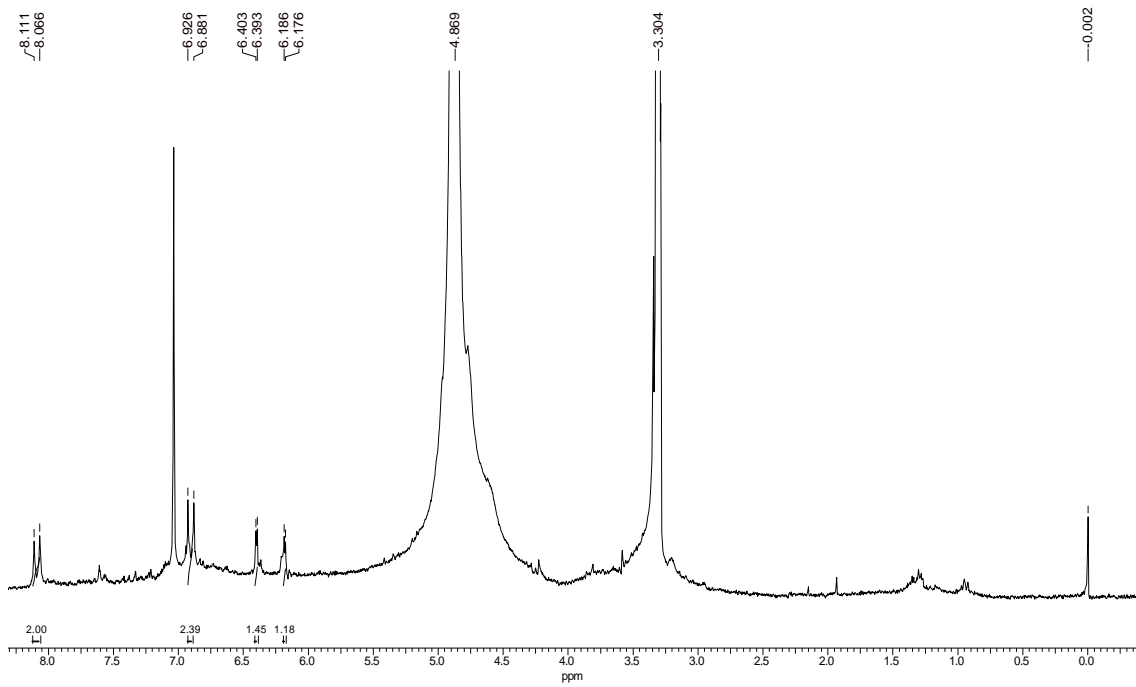


Figura 4.5: Espectro de RMN de ^1H de **L2** (200 MHz, CD_3OD).

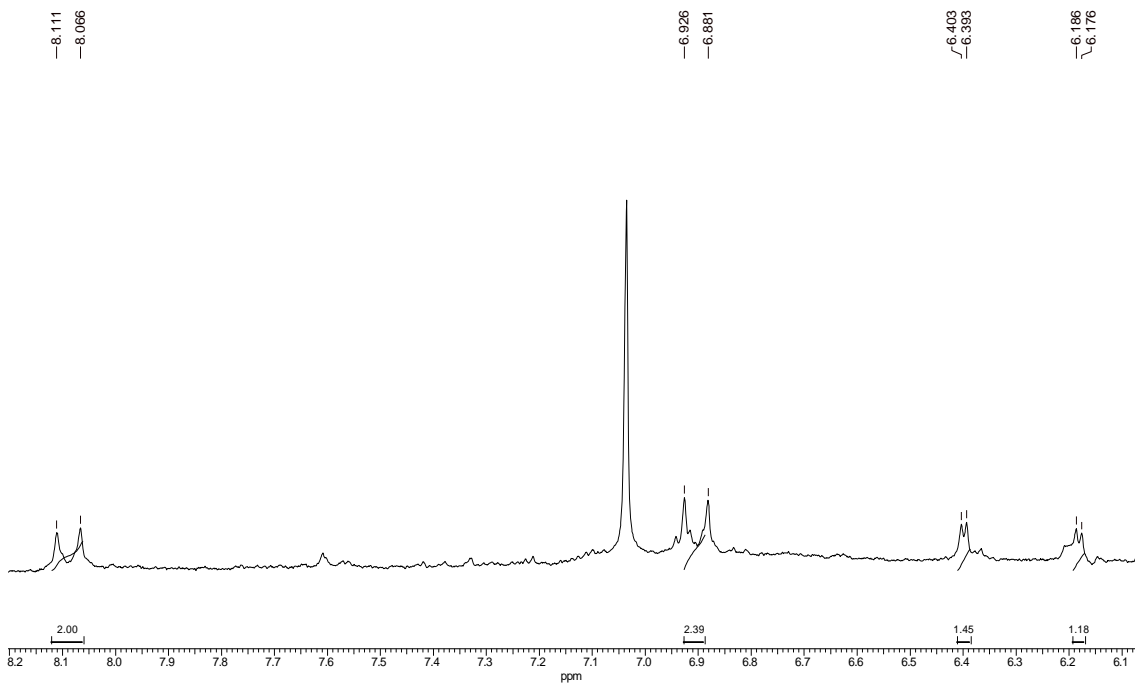


Figura 4.6: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **L2** (200 MHz, CD_3OD).

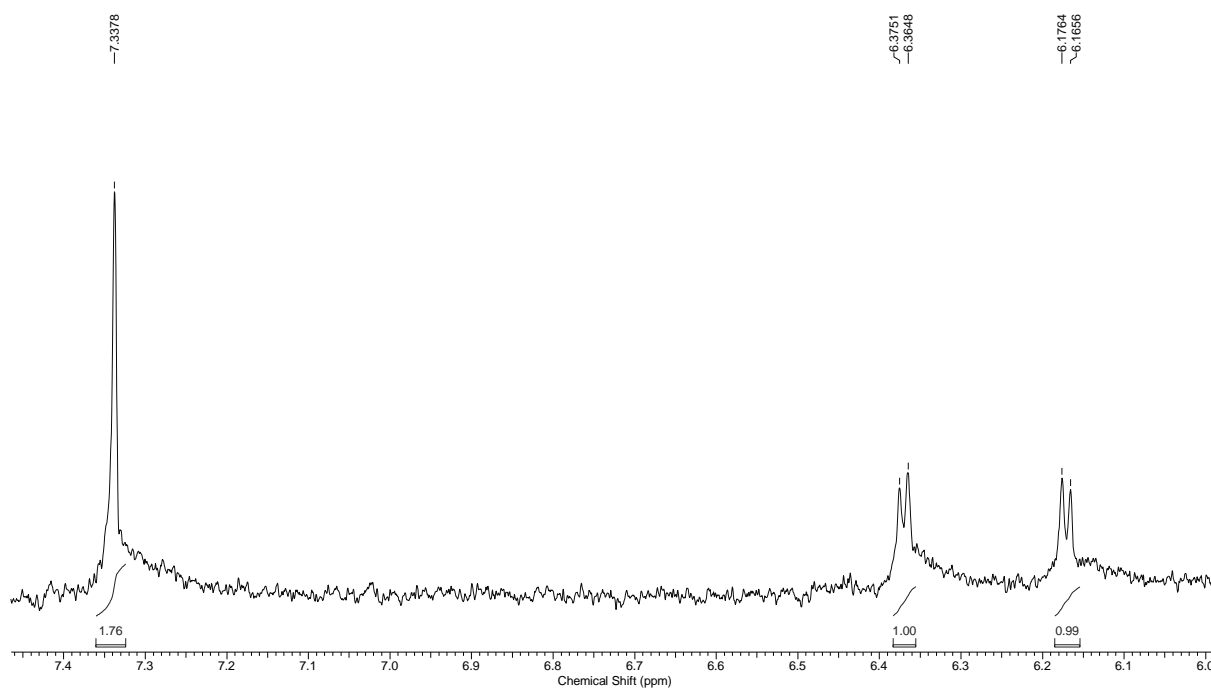
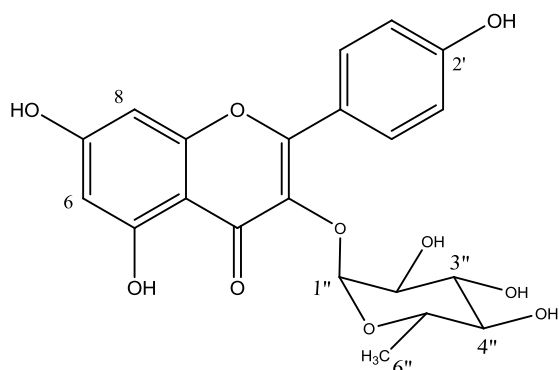


Figura 4.7: Espectro de RMN de ^1H de L3 (200 MHz, CD_3OD).

4.2.3 Identificação do flavonóide miricetrina (L4)

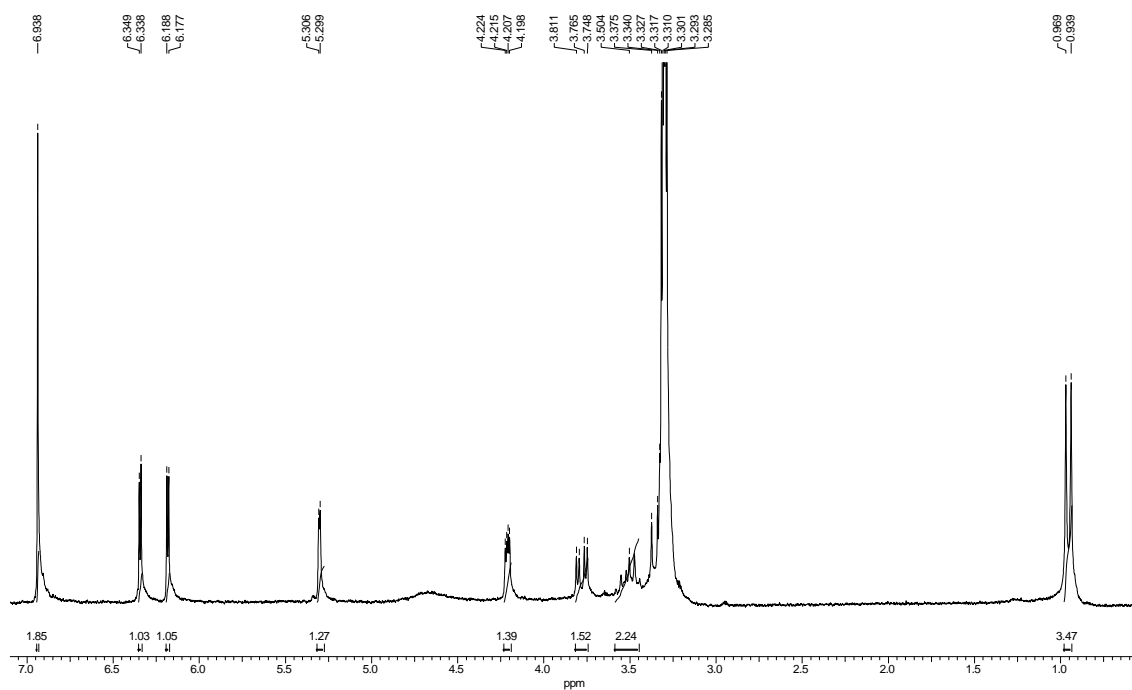


O flavonóide glicosilado **L4** foi isolado do extrato etanólico das folhas de *Macairea urundeuva* e identificado através da análise dos dados de RMN de ^1H (Figuras 4.8 e 4.9, Tabela 4.3) e por comparações com dados da literatura (SOUZA *et al.*, 2007).

A análise dos dados do espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.8 e 4.9) mostrou sinais característicos da aglicona miricetina, que consiste de um sistema de substituição 3',4',5' no anel B; com sinal em δ 6,93 (*s*) referente aos hidrogênios H-2' e H-6'; dois sinais em δ 6,19 (*d*, H-6) e δ 6,34 (*d*, H-8) com constantes de acoplamento de $J = 2,0$ Hz, correspondentes a 2 hidrogênios que mantêm uma relação meta entre si. A presença do monossacarídeo (raminose) foi confirmada pelo sinal em δ 5,30 (*d*, $J = 1,4$ Hz, H-1'') referente ao hidrogênio anomérico; em δ 4,21 (*dd*, $J = 3,4$ e $1,6$ Hz, H-2''); δ 3,78 (*dd*, $J = 9,2$ e $3,4$ Hz, H-3''); δ 3,40-3,50 (*m*, H-4'' e H-5'') e um sinal *m* δ 0,95 (*d*, $J = 6,0$ Hz, H-6'') caracterizando o grupo metila da ramnose. Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparação com dados da literatura (SOUZA *et al.*, 2007, Tabela, 4.3) a estrutura da miricetrina foi identificada.

Tabela 4.3: Dados de RMN de ^1H da substância **L4** e comparação com a literatura

H	L4	SOUZA <i>et al.</i> , 2007
	CD ₃ OD (200,0 MHz)	CD ₃ OD (300,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,19 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)
8	6,34 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,35 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)
2'	6,93 (<i>s</i>)	6,95 (<i>s</i>)
6'	6,93 (<i>s</i>)	6,95 (<i>s</i>)
1''	5,30 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	5,31 (<i>s</i>)
2''	4,21 (<i>dd</i> , $J = 3,4$ e $1,6$ Hz)	4,23 (<i>s</i>)
3''	3,78 (<i>dd</i> , $J = 9,2$ e $3,4$ Hz)	3,30-3,80 (<i>m</i>)
4''	3,40 – 3,50 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)
5''	3,40 – 3,50 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)
6''	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)


Figura 4.8: Espectro de RMN de ^1H de **L4** (200 MHz, CD₃OD).

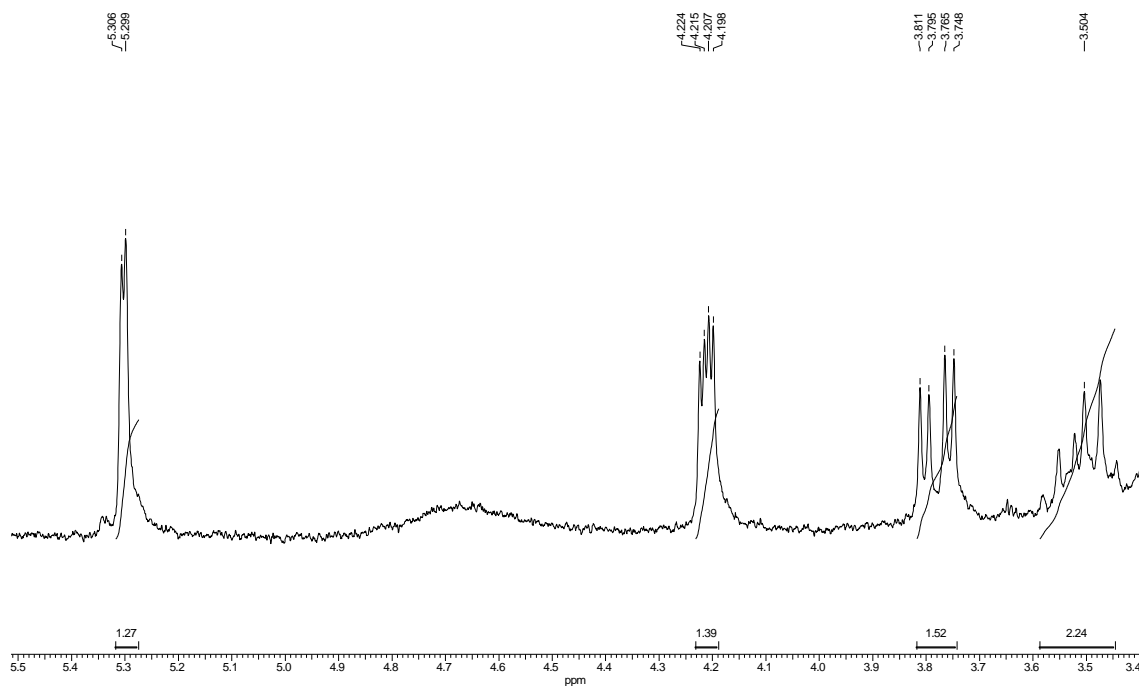
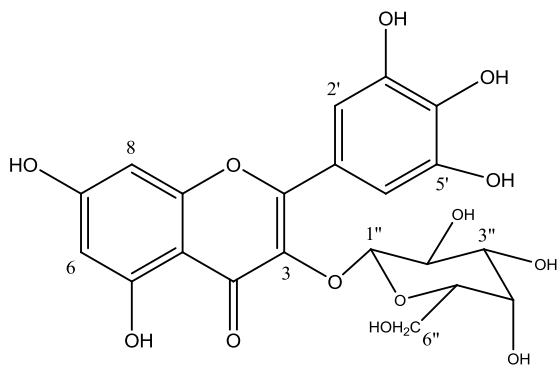


Figura 4.9: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **L4** (200 MHz, CD_3OD).

4.2.4 Identificação do flavonoide miricetina-3-O- β -galactosídeo (**L5**)



O flavonóide glicosilado **L5** foi identificado através da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , Cosy e HSQC (Figuras 4.10 a 4.14, Tabela 4.4) e por comparações com dados da literatura.

No espectro de RMN de ^1H de **L5** (Figuras 4.10 e 4.11, Tabela 4.4) observou-se sinais característicos da aglicona miricetina, que consistia dos sinais em δ 7,30, um singlete integrando para dois hidrogênios (H-2'e H-6') característico para o sistema de substituição 3',4'e 5' no anel B, e os sinais em δ 6,19 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-6) e δ 6,38 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-8) típicos do anel A. Na região dos açúcares do espectro de RMN de ^1H pode-se identificar a presença do monossacarídeo

galactose através do sinal em δ 5,17 (*d*, $J = 6,8$ Hz, H-1”) referente ao hidrogênio anomérico, que está correlacionada no mapa de correlações HSQC ao carbono anomérico δ 105,0 (C-1”). Já os demais sinais do monossacarídeo foram inferidos através das correlações do Cosy e com base nos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e mapa de correlações HSQC. Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparação com dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2005, Tabela 4.4) a estrutura de **L5** foi confirmada.

Tabela 4.4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **L5** e comparação com a literatura

C/H	L5 [§]	RAYYAN <i>et al.</i> , 2005 [§]	L5*	RAYYAN <i>et al.</i> , 2005*
2	--	--	158,6	158,4
3	--	--	135,9	135,1
4	--	--	179,6	179,4
5	--	--	163,2	162,5
6	6,19 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	100,0	100,0
7	--	--	166,7	166,2
8	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	94,9	94,7
9	--	--	158,9	158,7
10	--	--	105,6	105,5
1'	--	--	121,9	121,7
2'	7,30 (<i>s</i>)	7,30 (<i>s</i>)	110,0	110,0
3'	--	--	146,7	146,3
4'	--	--	138,3	138,2
5'	--	--	146,7	146,3
6'	7,30 (<i>s</i>)	7,30 (<i>s</i>)	110,0	110,0
1''	5,17 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	5,16 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	105,0	105,0
2''	3,90 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	3,92 (<i>dd</i> , $J = 9,8$ e $7,8$ Hz)	73,2	73,0
3''	3,83 (<i>m</i>)	3,74 (<i>t</i> , $J = 6,3$ Hz)	73,2	75,0
4''	3,90 (<i>m</i>)	3,90 (<i>dd</i> , $J = 3,5$ e $1,0$ Hz)	69,3	70,2
5''	3,65 (<i>dd</i> , $J = 7,5$ e $3,2$ Hz)	3,66 (<i>dd</i> , $J = 9,8$ e $3,5$ Hz)	74,0	75,0
6''	3,47 (<i>d</i> , $J = 11,2$ Hz)	3,50 (<i>dd</i> , $J = 10,2$ e $6,8$ Hz)	67,2	67,3
	3,84 (<i>m</i>)	3,84 (<i>dd</i> , $J = 10,2$ e $6,8$ Hz)		

[§]CD₃OD (400,0 MHz)*[§]CD₃OD (100,0 MHz)

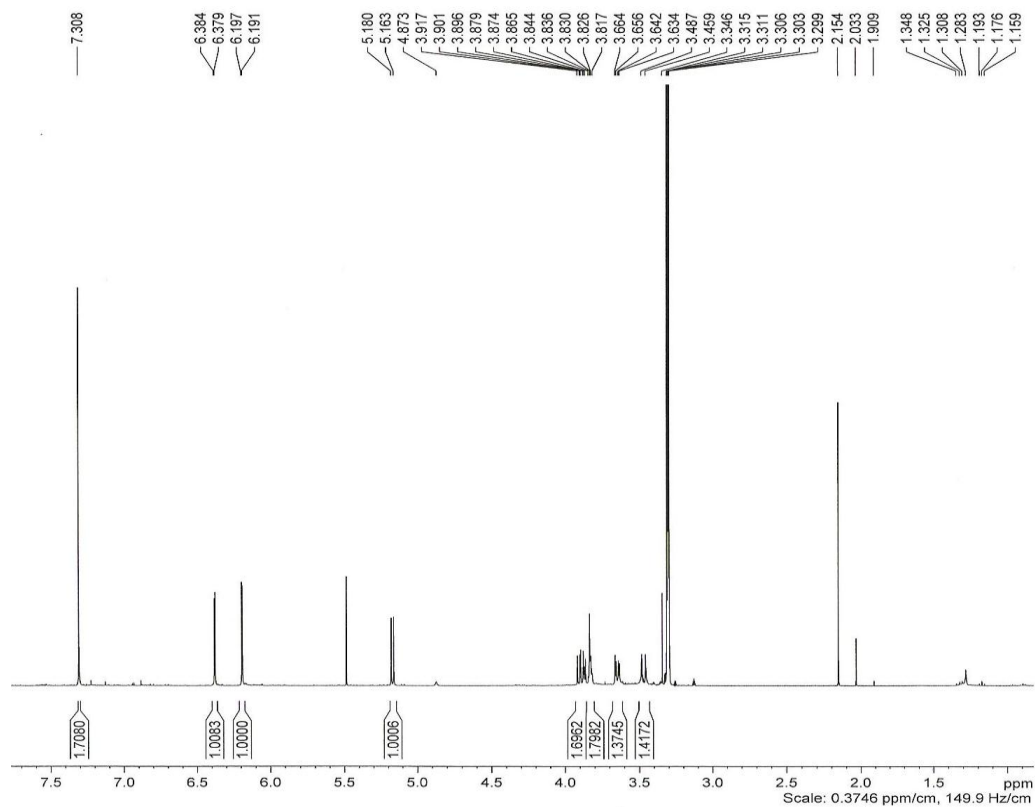


Figura 4.10: Espectro de RMN de ^1H de L5 (400 MHz, CD_3OD).

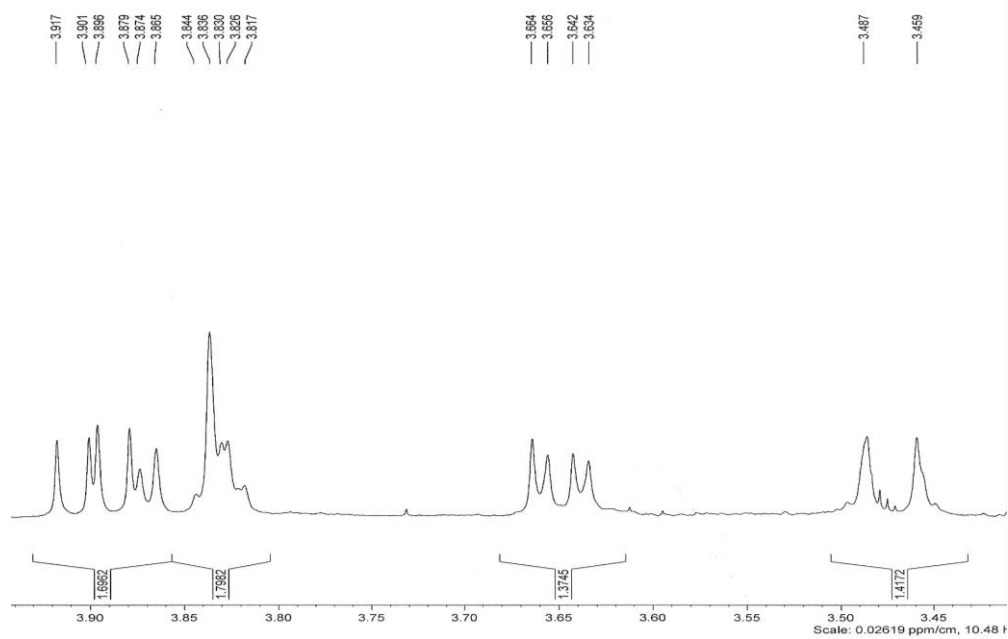


Figura 4.11: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de L5 (400 MHz, CD_3OD).

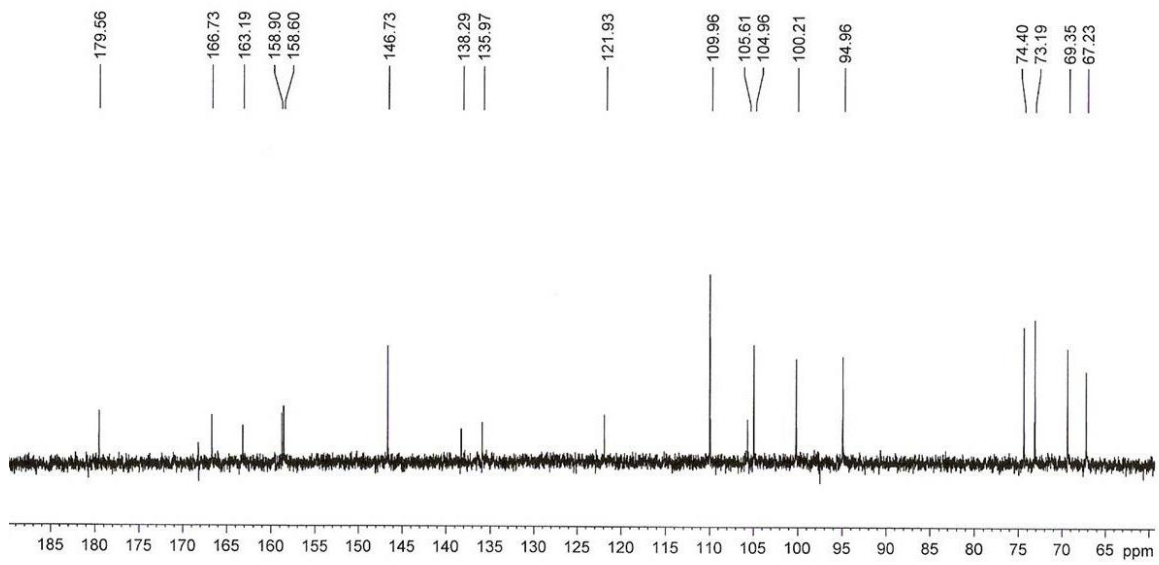


Figura 4.12 Espectro de RMN de ^{13}C de L5 (100 MHz, CD_3OD).

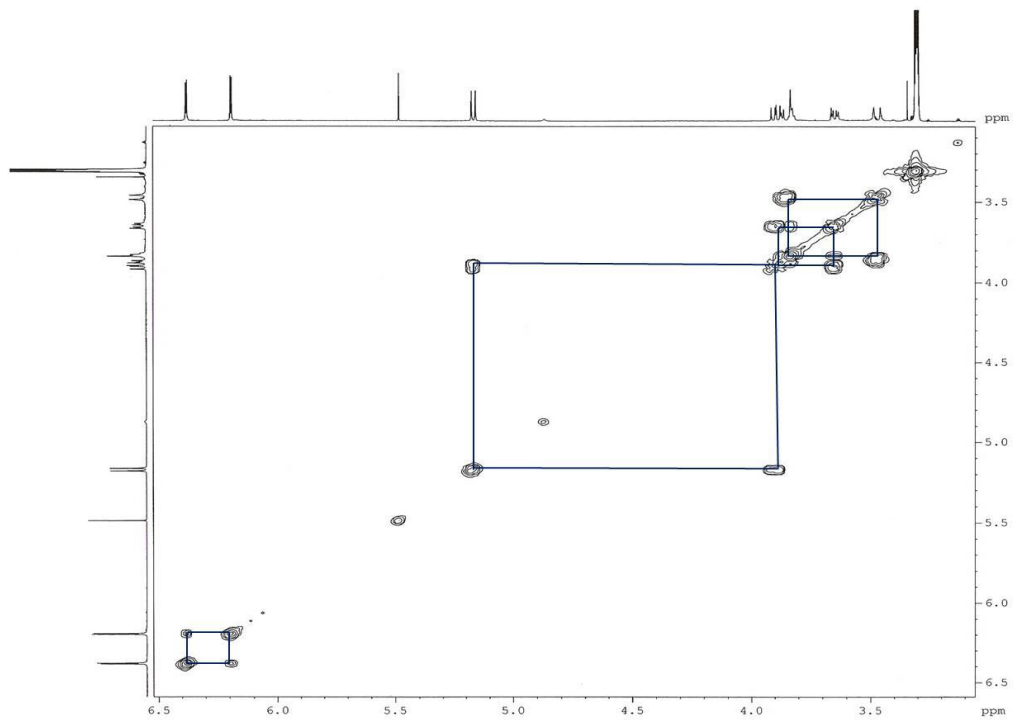


Figura 4.13: Espectro de COSY de L5 (400 MHz, CD_3OD).

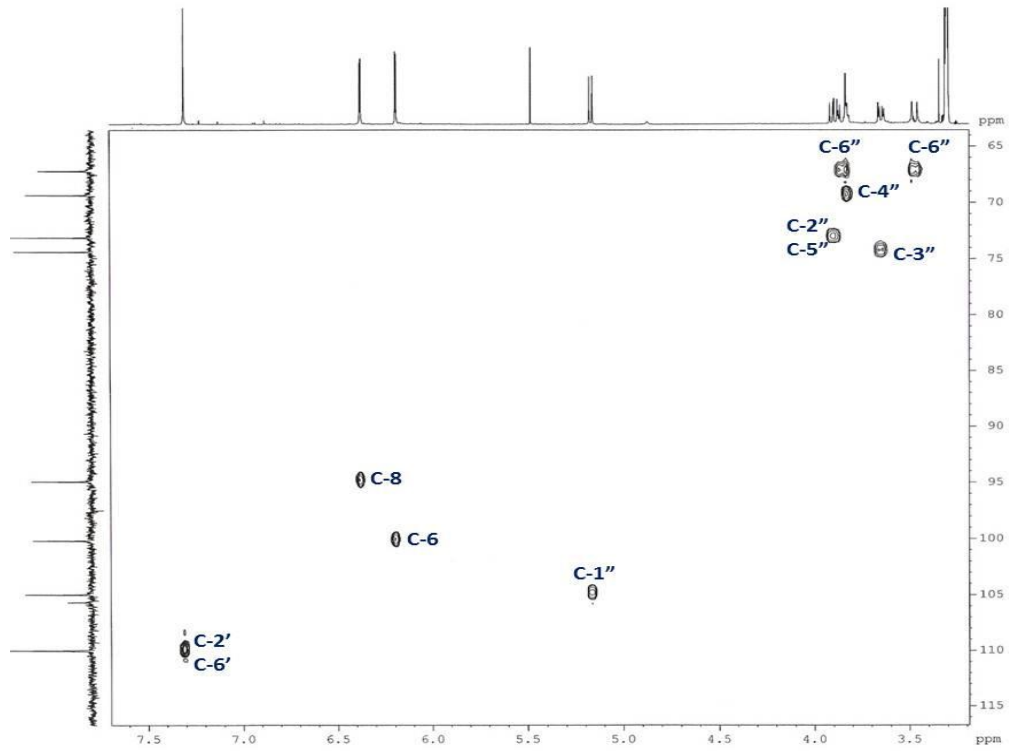
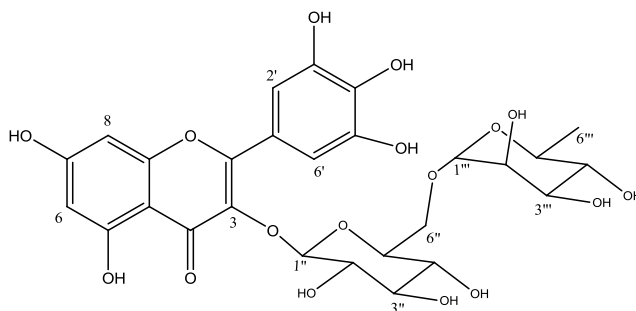
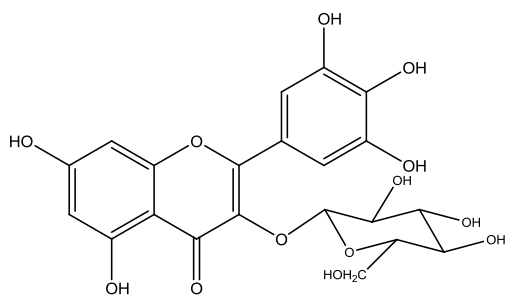


Figura 4.14: Mapa de correlações HSQC de L5 (400 MHz, CD₃OD).

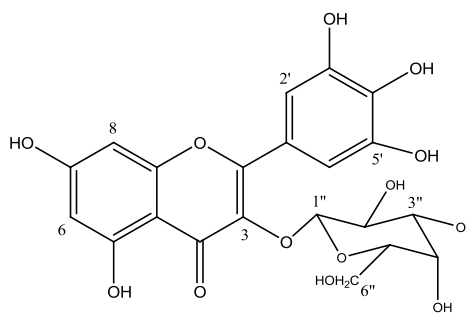
4.2.5 Identificação do conjunto de flavonóides: Miricetina-3-O- β -rutinosídeo (L6), Miricetina-3-O- β -glucosídeo (L7) e Miricetina-3-O- β -galactosídeo (L5)



L6



L7



L5

Os flavonóides **L5**, **L6** e **L7** foram isolados da partição acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Macaíerea urundeuva* e identificados através da análise dos dados de RMN de ^1H , Cosy e HSQC (Figuras 4.15 a 4.17, Tabela 4.5) e por comparações com dados da literatura.

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.15 e 4.16) foram observados sinais característicos da aglicona miricetina, que consiste de um sistema de substituição 3',4',5' no anel B; a mistura dos flavonóis glicosilados foi inicialmente observada devido a presença de três singletos em δ 7,37, δ 7,29 e δ 7,28, referente aos hidrogênios H-2' e H-6' e os diferentes glicosídeos foram observados pelos sinais em δ 5,24 (d , $J = 7,5$ Hz, H-1''), δ 5,18 (d , $J = 8,0$ Hz, H-1'') e δ 5,06 (d , $J = 8,0$ Hz, H-1'') correspondentes a diferentes hidrogênios anoméricos. Foram observados também dois sinais em δ 6,18 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,37 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8) correspondentes à 2 hidrogênios do Anel A que mantêm uma relação meta entre si.

Na região dos açúcares do espectro de RMN de ^1H pode-se identificar a presença dos monossacarídeos (glucose e galactose) através da presença dos sinais em δ 5,24 ($d, J = 7,5 \text{ Hz, H-1}''$) e δ 5,18 ($d, J = 8,0 \text{ Hz, H-1}''$) referente aos hidrogênios anoméricos, que estão correlacionados no mapa de correlações HSQC aos carbonos δ 104,2 e 103,0, respectivamente. C-1''). Já os demais sinais dos monossacarídeos foram inferidos através das correlações do Cosy e com base nos dados de RMN de ^1H e mapa de correlações HSQC. A presença do dissacarídeo (rutina) foi observada através da presença dos sinais em δ 5,06 ($d, J = 8,0 \text{ Hz, H-1}''$) e δ 4,51 ($d, J = 1,5 \text{ Hz, H-1}''$), os demais sinais foram identificados através do espectro de ^1H , Cosy e mapa de correlações HSQC.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparações com dados da literatura (KAZUMA *et al.*, 2003, CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2009, Tabela, 4.5) as estruturas de **L5**, **L6** e **L7** foram confirmadas.

Tabela 4.5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **L6** e comparação com a literatura

H/C	L6	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003	L6	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003
	CD_3OD (400,0 MHz)	CD_3OD (400,0 MHz)	CD_3OD (100,0 MHz)	CD_3OD (100,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,21 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	99,0	99,9
8	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,39 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	94,0	94,8
2`/6`	7,28 (<i>s</i>)	7,28 (<i>s</i>)	108,7	110,4
Glc-1"	5,06 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	5,07 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	104,0	104,8
Glc-2"	3,45 (<i>m</i>)	3,49 (<i>dd</i> , $J = 7,8$ e 8,6 Hz)	76,4	75,7
Glc-3"	3,45 (<i>m</i>)	3,40 (<i>t</i> , $J = 8,6$ Hz)	79,0	78,2
Glc-4"	3,25 (<i>m</i>)	3,26 (<i>t</i> , $J = 8,6$ Hz)	72,6	71,4
Glc-5"	3,35 (<i>m</i>)	3,31 (<i>m</i>)	78,0	77,3
Glc-6" _A	3,85 (<i>m</i>)	3,80 (<i>dd</i> , $J = 1,2$ e 11,0 Hz)	68,2	68,6
Glc-6" _B	3,50 (<i>m</i>)	3,39 (<i>dd</i> , $J = 5,7$ e 11,0 Hz)		
Ram-1"	4,51 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	4,51 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	103,0	102,4
Ram-2"	3,60-3,65 (<i>m</i>)	3,62 (<i>dd</i> , $J = 1,5$ e 3,2 Hz)	70,2	72,1
Ram-3"	3,60-3,65 (<i>m</i>)	3,54 (<i>dd</i> , $J = 3,2$ e 9,5 Hz)	**	72,2
Ram-4"	3,25 (<i>m</i>)	3,26 (<i>t</i> , $J = 9,5$ Hz)	72,6	74,0
Ram-5"	3,60-3,65 (<i>m</i>)	3,62 (<i>dq</i> , $J = 6,1$ e 9,5 Hz)	70,2	69,7
Ram-6"	1,11 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	1,11 (<i>d</i> , $J = 6,1$ Hz)	18,0	17,8

Tabela 4.6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **L7** e **L5** e comparação com a literatura

H/C	L7	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003	L7	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003
	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,21 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	99,0	99,9
8	6,37 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,39 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	94,0	94,7
2`/6`	7,29 (<i>s</i>)	7,29 (<i>s</i>)	108,7	110,2
1"	5,24 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	5,27 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	104,2	104,4
2"	3,55 (<i>m</i>)	3,50 (<i>dd</i> , $J = 7,5$ e 8,5 Hz)	74,0	75,7
3"	3,47 (<i>m</i>)	3,43 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	79,0	78,4
4"	3,40 (<i>m</i>)	3,37 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	nd	71,1
5"	3,25(<i>m</i>)	3,23 (<i>m</i>)	nd	78,2
6" _A	3,60-3,75 (<i>m</i>)	3,72 (<i>dd</i> , $J = 2,4$ e 12,0 Hz)	64,0	62,5
6" _B	3,60-3,75 (<i>m</i>)	3,61 (<i>dd</i> , $J = 5,4$ e 12,0 Hz)		

H/C	L5	CASTILLO-MUÑOZ <i>et al.</i> , 2009	L5	CASTILLO-MUÑOZ <i>et al.</i> , 2009
	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,23 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	98,4	98,4
8	6,37 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,42 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	93,0	93,2
2`/6`	7,37 (<i>s</i>)	7,40 (<i>s</i>)	108,0	108,4
1"	5,18 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	5,23 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	103,0	102,4
2"	3,80 (<i>m</i>)	3,87 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 10,0 Hz)	nd	71,7
3"	3,60 (<i>m</i>)	3,59 (<i>dd</i> , $J = 10,0$ e 4,0 Hz)	74,0	73,6
4"	3,85 (<i>m</i>)	3,89 (<i>d</i> , $J = 4,0$ Hz)	68,2	68,7
5"	3,50 (<i>m</i>)	3,51 (<i>dd</i> , $J = 6,0$ e 6,0 Hz)	nd	75,8
6" _A	3,60-3,65 (<i>m</i>)	3,68 (<i>dd</i> , $J = 6,0$ e 12,0 Hz)	60,7	60,6
6" _B	3,60-3,65 (<i>m</i>)	3,60 (<i>dd</i> , $J = 6,0$ e 12,0 Hz)		

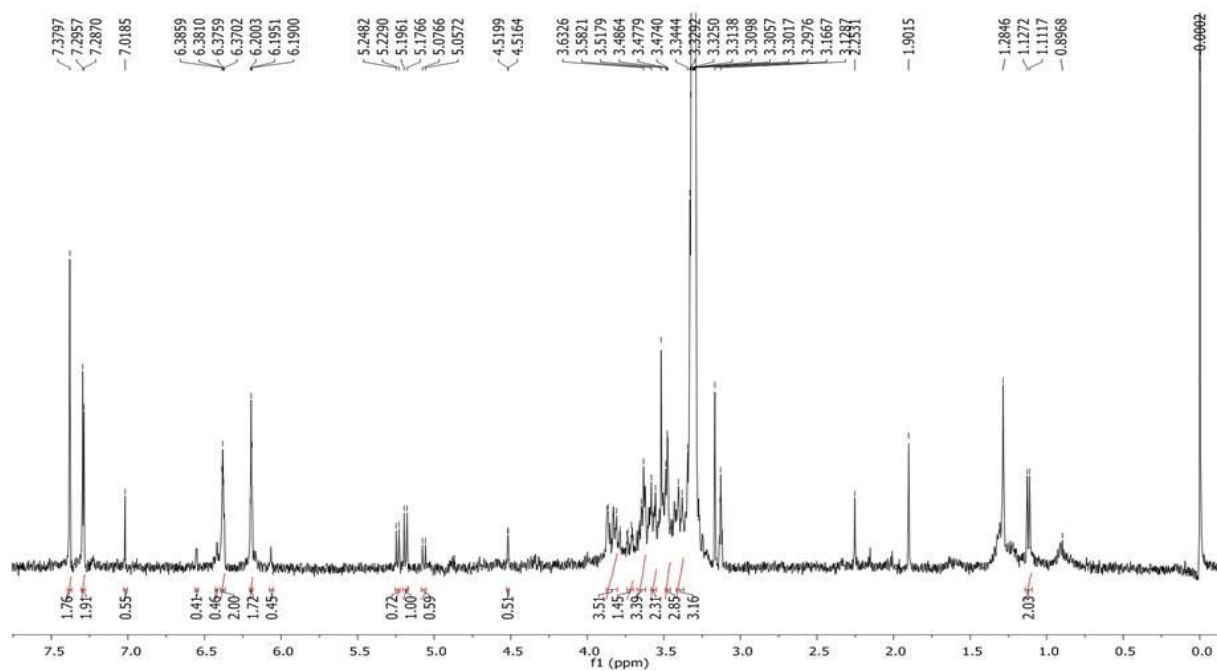


Figura 4.15: Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides **L5**, **L6** e **L7** (400 MHz, CD_3OD).

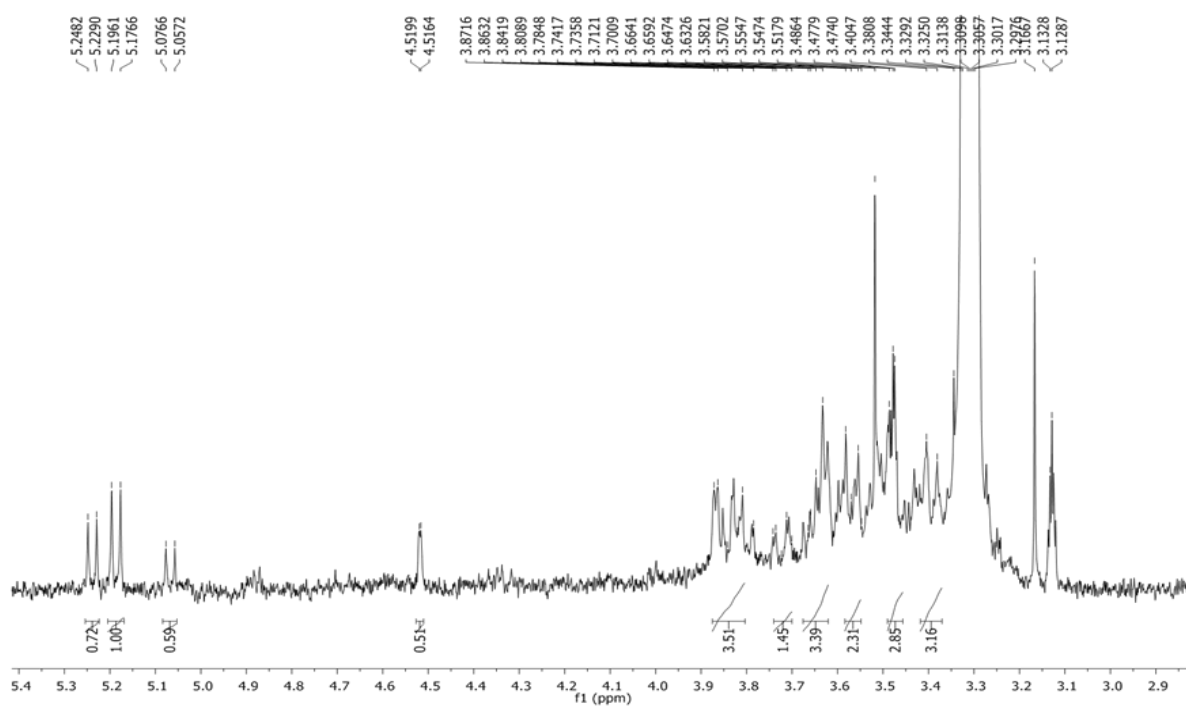


Figura 4.16: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides **L5**, **L6** e **L7** (400 MHz, CD_3OD).

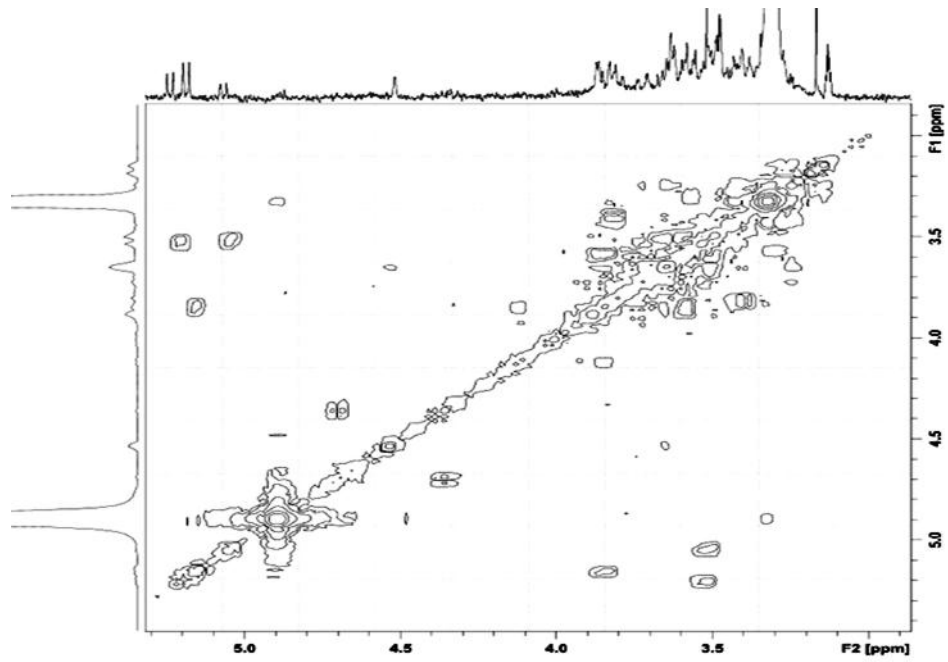


Figura 4.17: Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz, CD₃OD).

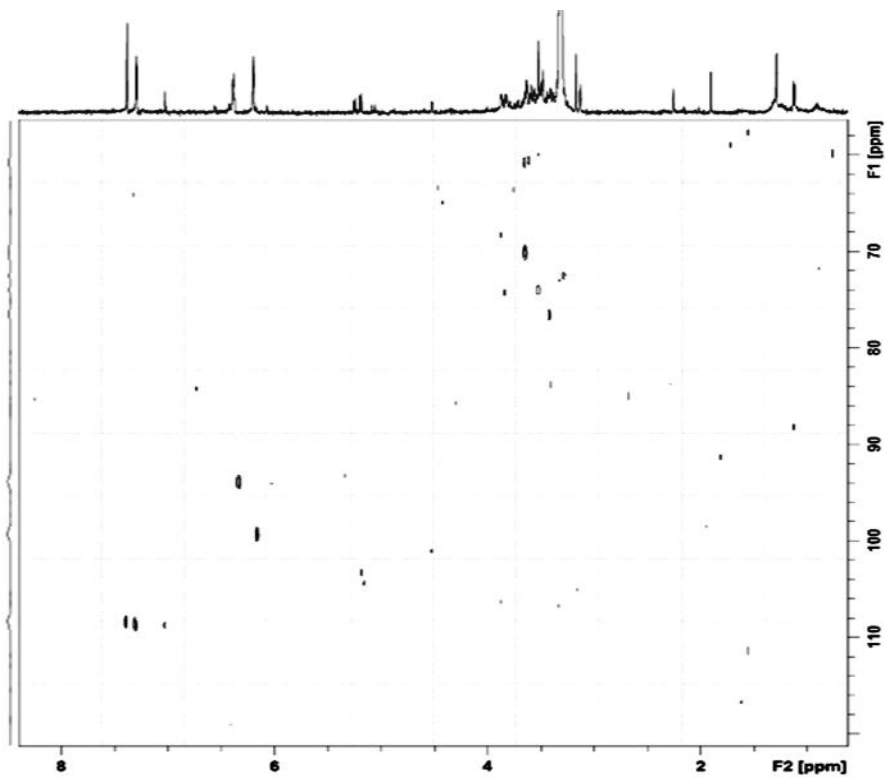
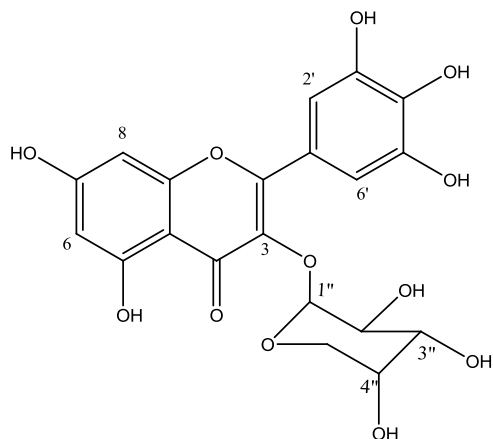


Figura 4.18: Mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides L5, L6 e L7 (400 MHz, CD₃OD).

4.2.6 Identificação do conjunto de flavonóides: Miricetina-3-O- α -arabinosídeo (L8), Miricetrina (L4) e Miricetina-3-O- β -galactosídeo (L5)



L8

O conjunto dos flavonóides glicosilados: miricetina-3-O- α -arabinosídeo (**L8**), miricetrina (**L4**), miricetina-3-O- β -galactosídeo (**L5**) foram identificados em mistura partição acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Macaíerea urundeuva* e identificados através da análise dos dados de RMN de ^1H , Cosy e HSQC (Figuras 4.19 a 4.22, Tabelas 4.7 e 4.8) e por comparações com dados da literatura.

A análise dos dados do espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.19 e 4.20) mostrou sinais característicos da aglicona miricetina, que consiste de um sistema de substituição 3',4',5' no anel B; com singletos em δ 6,93, δ 7,30 e δ 7,12, referente aos hidrogênios H-2' e H-6'; dois sinais em δ 6,19 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,34 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si. A presença de diferentes flavonóis glicosilados foi observada pelos sinais em δ 5,30 (*d*, $J = 1,4$ Hz, H-1''), δ 5,48 (*s*, H-1'') e δ 5,16 (*d*, $J = 7,2$ Hz, H-1'') correspondentes a diferentes hidrogênios anoméricos. Os monossacarídeos (ramnose, galactose e arabinose) foram identificados pelas correlações do espectro de HSQC (CD_3OD , 400 Mhz, Figuras 4.21 e 4.22) e por comparação com dados da literatura (SOUZA *et al.*, 2007).

O flavonóide glicosilado miricetrina apresentou-se como a substância majoritária do estudo do extrato MUFE, já os demais flavonóides glicosilados aparecem como minoritários neste estudo.

Tabela 4.7: Dados de RMN de ^1H de **L8** e comparação com a literatura

H/C	L8	SHEN <i>et al.</i> , 2009	L8	SHEN <i>et al.</i> , 2009
	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	98,4	99,9
8	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	93,0	94,8
2`/6`	7,12 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)	108,0	109,4
1"	5,46 (<i>s</i>)	5,46 (<i>sl</i>)	107,8	109,4
2"	4,33 (<i>sl</i>)	**	81,9	83,2
3"	3,85 (<i>m</i>)	**	77,1	78,7
4"	3,91 (<i>m</i>)	**	86,9	88,0
5"	3,50 (<i>m</i>)	**	61,2	62,5

Tabela 4.8: Dados de RMN de ^1H de **L4** e comparação com a literatura

H/C	L4	SOUZA <i>et al.</i> , 2007	L4	SHEN <i>et al.</i> , 2009
	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (400,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	6,19 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	98,4	99,8
8	6,35 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,34 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	93,0	94,7
2`/6`	6,93 (<i>s</i>)	6,95 (<i>s</i>)	108,0	109,2
1"	5,30 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	5,31 (<i>s</i>)	102,0	103,6
2"	4,21 (<i>dd</i> , $J = 3,4$ e $1,6$ Hz)	4,23 (<i>s</i>)	70,5	71,8
3"	3,77 (<i>dd</i> , $J = 9,6$ e $3,2$ Hz)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	71,0	72,0
4"	3,50 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	71,0	73,3
5"	3,30 - 3,40 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	71,6	72,0
6"	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	18,0	17,6

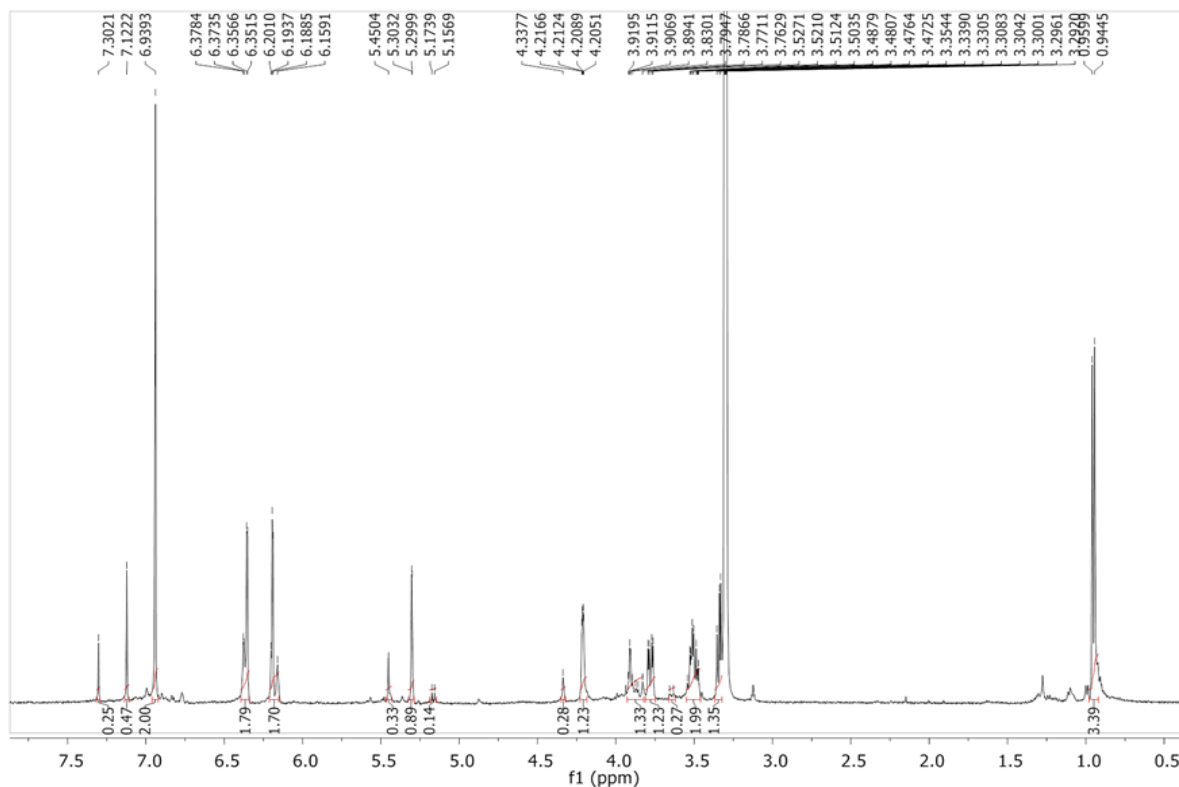


Figura 4.19: Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides **L8**, **L4** e **L5** (400 MHz, CD_3OD).

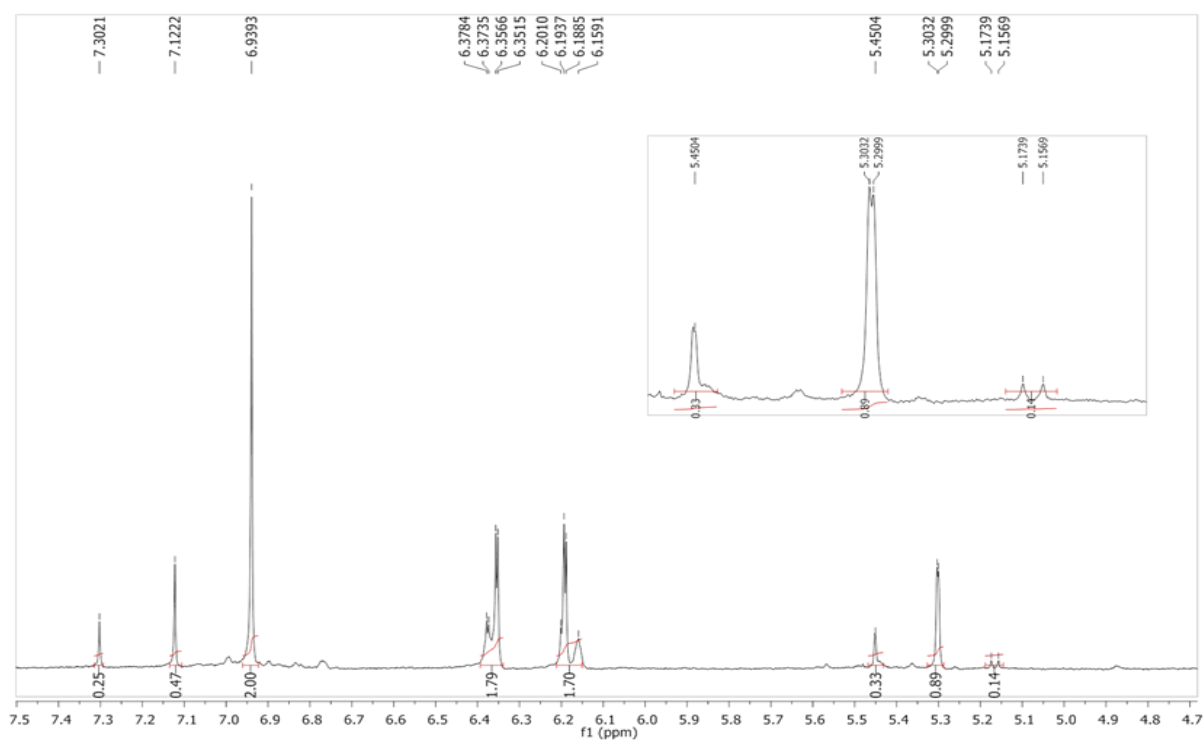


Figura 4.20: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides **L8**, **L4** e **L5** (400 MHz, CD_3OD).

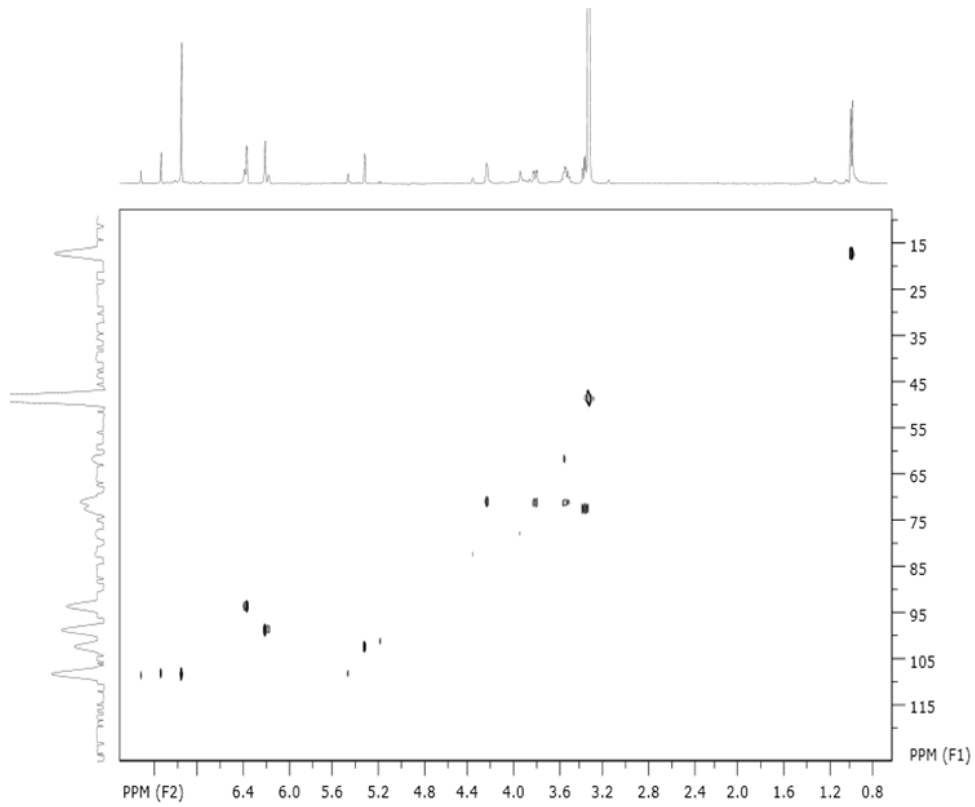


Figura 4.21: Mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides **L8**, **L4** e **L5** (400 MHz, CD₃OD).

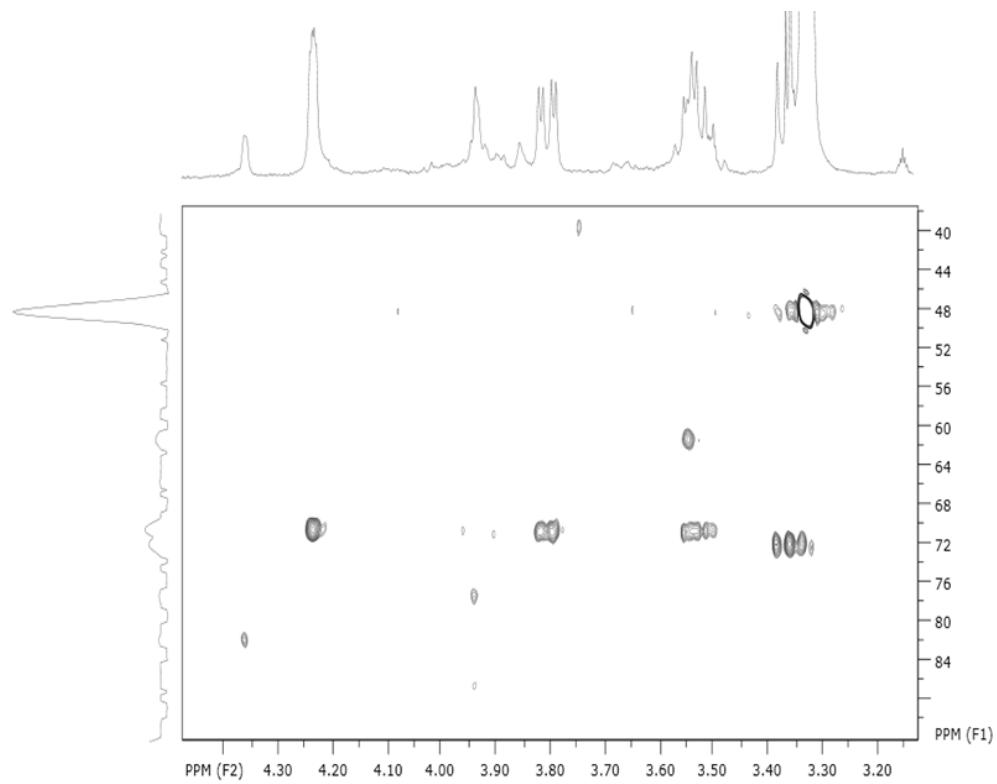
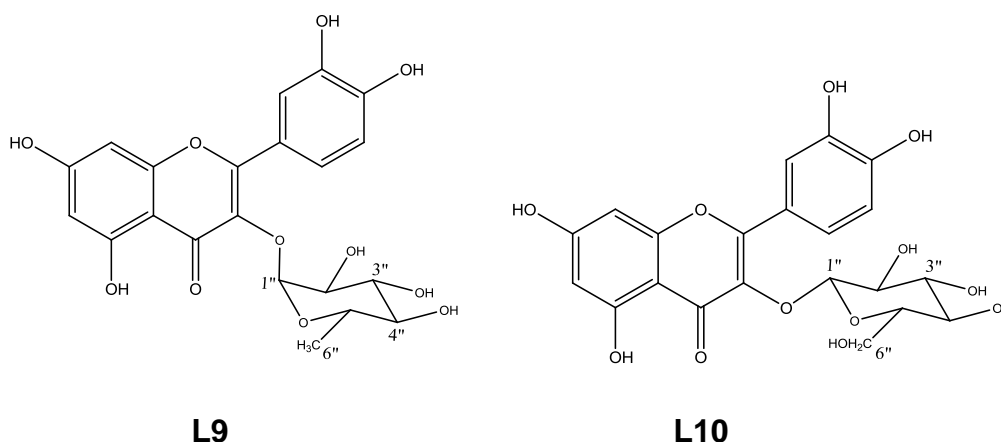


Figura 4.22: Ampliação do mapa de correlações do HSQC do conjunto de flavonoides **L8**, **L4** e **L5** (400 MHz, CD₃OD).

4.2.7 Identificação dos flavonóides Quercitrina (L9) e Quercetina-3-O- β -glucosídeo (L10)



Os flavonóides **L9** e **L10** foram isolados do extrato etanólico das folhas de *A. humile* através de RMN de ^1H , Cosy e HSQC. (Figuras 4.23 a 4.25, Tabela 4.9) e por comparações com os dados da literatura.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.23 e 4.24 e Tabela 4.9) observou-se sinais característicos de um sistema de substituição 3',4' no anel B; dois sinais típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si em δ 6,18 (*d*, $J = 2,0$; H-6); e δ 6,36 (*d*, $J = 2,0$; H-8); indicando tratar da aglicona quercetina. Foram observados sinais que indicavam a presença da ramnose, um sinal δ 5,34 (*d*, $J = 1,4$, H-1'') referente ao hidrogênio anomérico, em δ 4,20 (*m*, H-2''); δ 3,75 (*dd*, $J = 8,0$ e $3,20$; H-3''); δ 3,30-3,40 (*m*, H-4''/H-5'') e um sinal *m* δ 0,92 (*d*, $J = 6,0$ Hz, H-6'') caracterizando o grupo metila da ramnose; A presença de outro sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,24 (*d*, $J = 7,2$ Hz, H-1''), e os demais em δ 3,50 (*sl*, H-2''), δ 3,30-3,40 (*m*, H-3'', H-4'' e H-5'') e δ 3,55-3,68 (*m*, H-6''_A e H-6''_B), caracterizavam a presença do flavonóide quercetina-3-O- β -glucosídeo

As correlações dos hidrogênios dos glicosídeos acima mencionados foram observadas a partir do mapa de correlações do Cosy (Figura 4.25).

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; SOUZA *et al.*, 2007 e MOCO *et al.*, 2006; Tabela, 4.9) a estrutura dos flavonóides glicosilados **L9** e **L10** foram confirmadas.

Tabela 4.9: Dados de RMN de ^1H da mistura dos flavonoides **L9** e **L10** e comparação com a literatura

H	L9	SOUZA <i>et al.</i> , 2007	L10	MOCO <i>et al.</i> , 2006
	MeOD (400,0 MHz)	MeOD (400,0 MHz)	MeOD (400,0 MHz)	MeOD (400,0 MHz)
6	6,19 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	6,19 (<i>s</i>)	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
8	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	6,38 (<i>s</i>)	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
2'	7,33 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	7,29 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	7,70 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)	7,71 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
5'	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,88 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,85 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,87 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)
6'	7,28 (<i>d</i> , $J = 8,0$ e 2,0 Hz)	7,25 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 2,2 Hz)	7,58 (<i>d</i> , $J = 8,0$ e 2,4 Hz)	7,58 (<i>d</i> , $J = 8,5$ e 2,2 Hz)
1''	5,34 (<i>d</i> , $J = 1,4$ Hz)	5,38 (<i>s</i>)	5,24 (<i>d</i> , $J = 7,2$ Hz)	5,25 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz)
2''	4,20 (<i>m</i>)	4,23 (<i>s</i>)	3,50 (<i>s</i>)	3,48 (<i>d</i> , $J = 9,3$ Hz)
3''	3,75 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 3,2 Hz)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,40 (<i>m</i>)	3,42 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)
4''	3,30-3,40 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,35 (<i>m</i>)	3,34 (<i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
5''	3,30-3,40 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,20 (<i>m</i>)	3,22 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)
6''	0,92 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	3,55 (<i>m</i>) 3,68 (<i>m</i>)	3,57 (<i>m</i>) 3,71 (<i>m</i>)

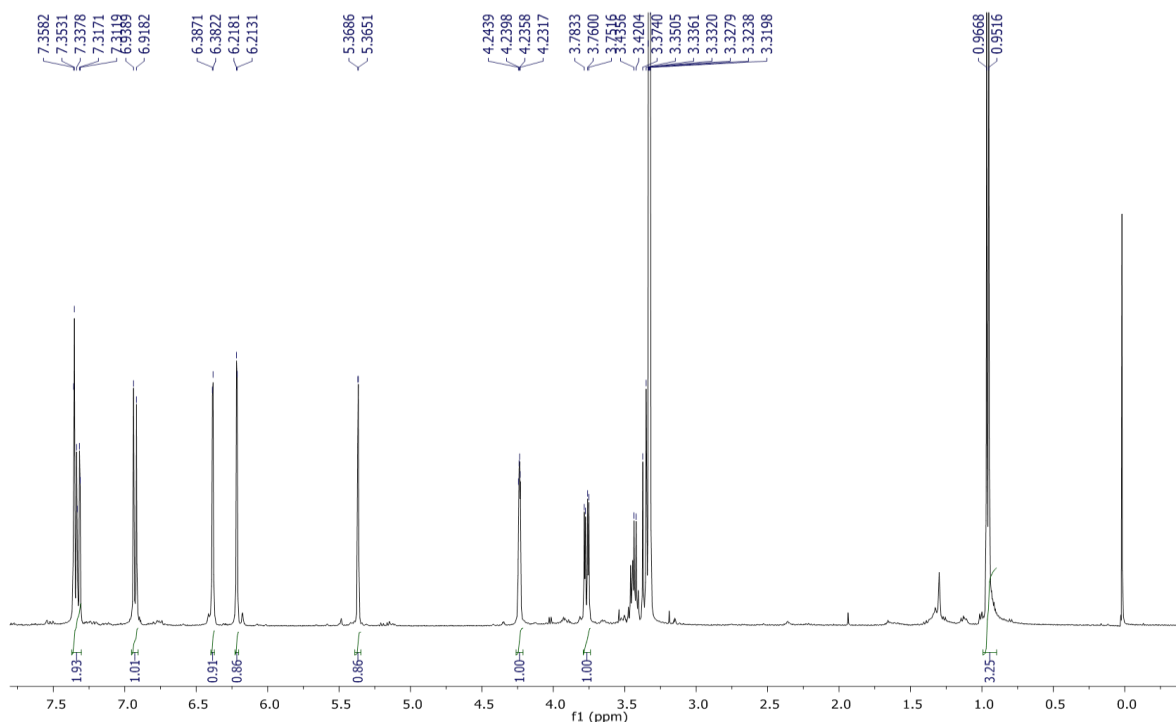


Figura 4.23: Espectro de RMN de ^1H de L9 (400 MHz, CD_3OD)

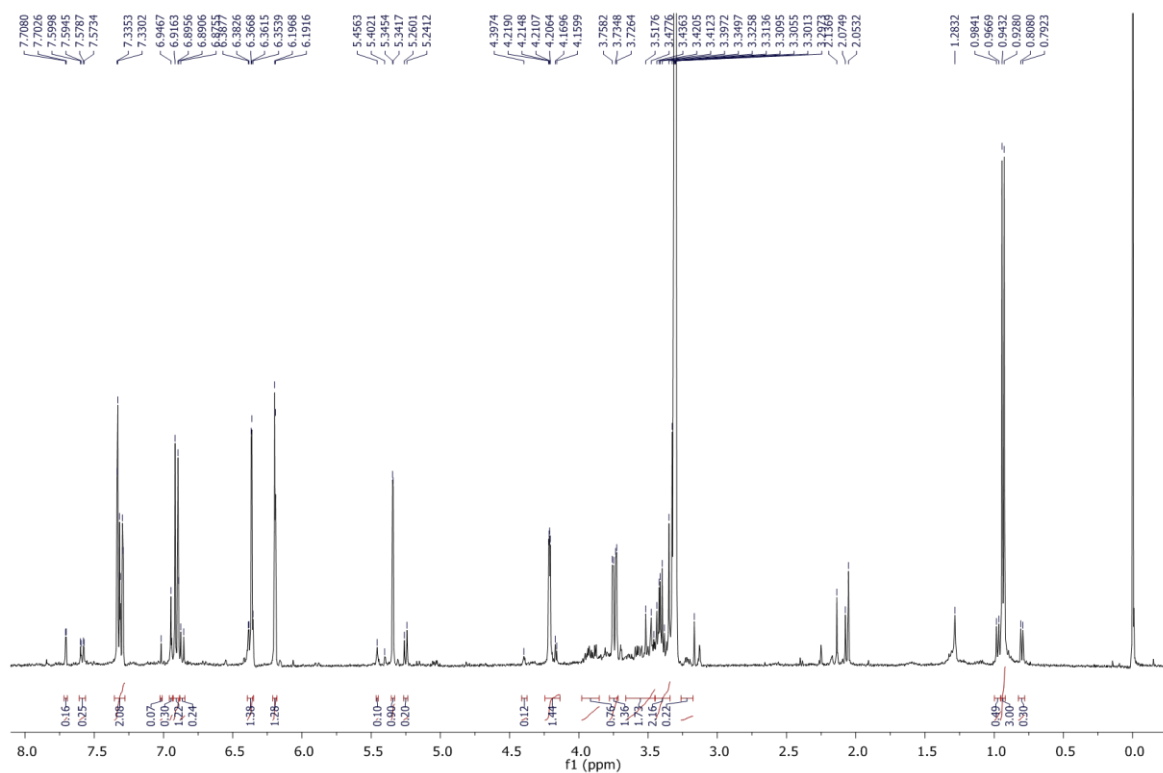


Figura 4.24: Espectro de RMN de ^1H da mistura de L9 e L10 (400 MHz, CD_3OD)

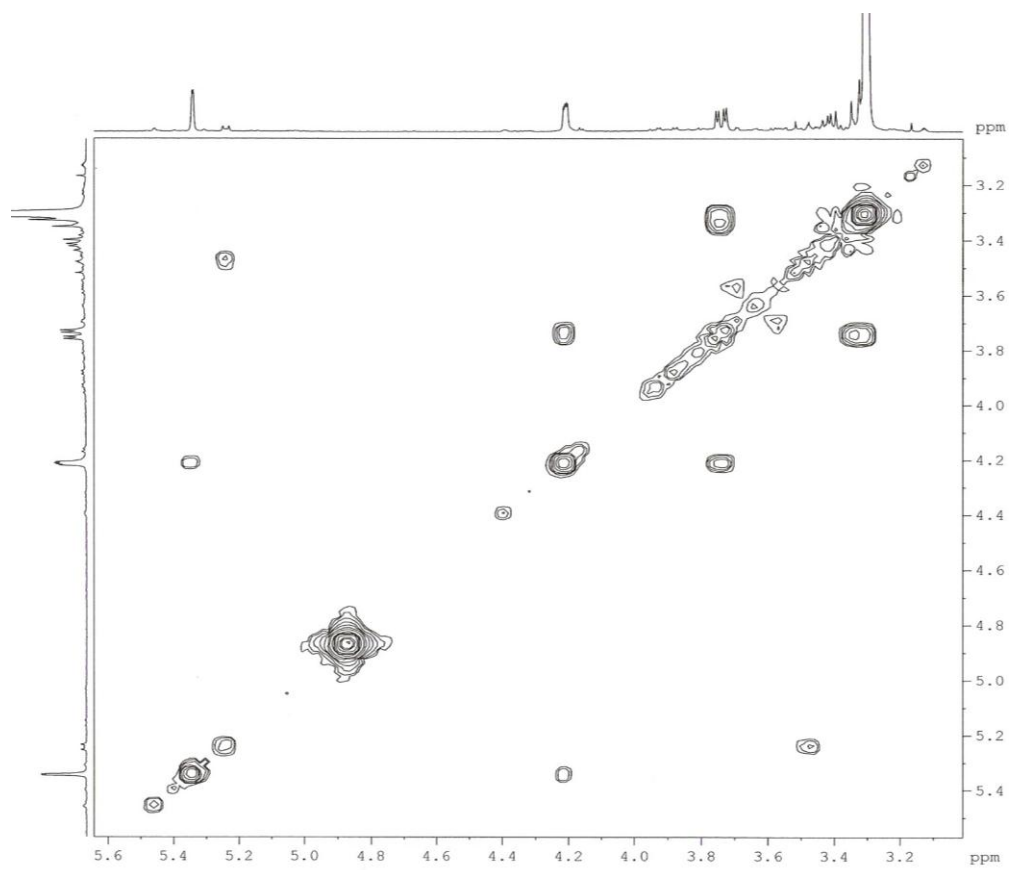
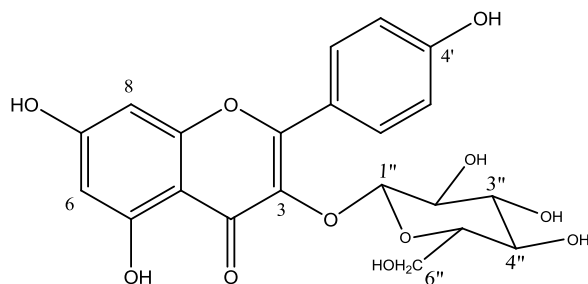
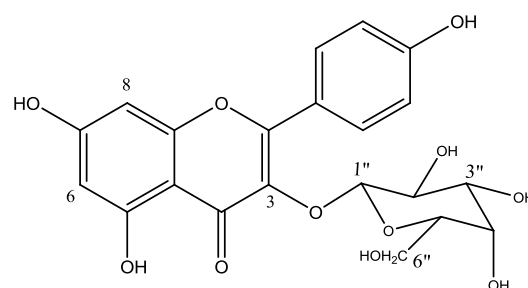


Figura 4.25: Espectro de Cosy da mistura de L9 e L10 (400 MHz, CD₃OD).

4.2.8 Identificação dos flavonoides Kaenferol-3-O-galactosídeo (L14) e Kaenferol-3-O-glucosídeo (L15)

Kaenferol-3-O- β -glucosídeo (L15)Kaenferol-3-O- β -galactosídeo (L14)

Os flavonóides glicosilados **L15** e **L14** foram identificados em mistura da fração AHFE-A(23-24) através da análise dos dados de RMN de ^1H , Cosy e HSQC (Figuras 4.26 e 4.27 e Tabela 4.10 e 4.11) e por comparações com dados da literatura.

A análise dos dados do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 Mhz, Figura 4.26) revelou que a amostra era uma mistura de dois flavonóis glicosilados com um sistema de substituição 4' no anel B; sinais em δ 8,04 e δ 8,06 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-2' e H-6'), um sinal em δ 6,87 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-3' e H-5'), dois sinais característicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si, em δ 6,28 (*s*, H-8) e δ 6,11 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6). Também revelou sinais que indicavam a presença de açúcar em ambos flavonóis em δ 5,04 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-1'') e δ 5,17 (*d*, $J = 7,2$ Hz, H-1'') além de vários sinais referentes a H carbinólicos em δ 3,36-3,80 (*m*). Através das correlações observadas no mapa de correlações HSQC (CD_3OD , 400 Mhz, Figura 4.27) dos hidrogênios anoméricos δ 5,04 e δ 5,17 com seus respectivos carbonos, juntamente com dados da literatura, foi possível determinar os glicosídeos.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparação com dados da literatura (LE GALL *et al.*, 2003; KAZUMA *et al.*, 2003, Tabela, 4.10 e 4.11) as

estruturas dos flavonóides: kaenferol-3-O-glucosídeo (**L15**) e kaenferol-3-O-galactosídeo (**L14**) foram identificadas.

Tabela 4.10: Dados de RMN de ^1H de **L14** e comparação com a literatura

H/C	L14 MeOD (400,0 MHz)	LE GALL <i>et al.</i> , 2003 MeOD (300,0 MHz)	L14 MeOD (100,0 MHz)	LE GALL <i>et al.</i> , 2003 MeOD (75,0 MHz)
6	6,11 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,21 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	102,0	104,4
8	6,28 (<i>s</i>)	6,43 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	96,0	98,8
2`/6`	8,06 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	8,09 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)	132,0	130,6
3`/5`	6,87 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)	116,0	118,0
1"	5,15 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	5,17 (<i>d</i> , $J = 7,2$ Hz)	105,0	103,9
2"	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,41 (<i>m</i>)	75,0	75,7
3"	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,40 (<i>m</i>)	78,0	78,0
4"	3,65 (<i>m</i>)	3,22 (<i>t</i> , $J = 9,0$ Hz)	73,0	71,6
5"	3,40-3,55 (<i>m</i>)	3,32 (<i>m</i>)	78,0	77,2
6" _A	3,80 (<i>m</i>)	3,80 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	69,0	68,2
6" _B	3,45 (<i>m</i>)	3,36 (<i>m</i>)		

Tabela 4.11: Dados de RMN de ^1H de **L15** e comparação com a literatura.

H	L15 CD ₃ OD (400,0 MHz)	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003 CD ₃ OD (300,0 MHz)	L15 CD ₃ OD (100,0 MHz)	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003 CD ₃ OD (75,0 MHz)
6	6,11 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,21 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	102,0	99,9
8	6,28 (<i>sl</i>)	6,40 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	96,0	94,9
2`/6`	8,04 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	8,05 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	132,0	132,4
3`/5`	6,87 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,89 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	116,0	116,0
1"	5,04 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	5,12 (<i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	101,0	100,3
2"	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,43 (<i>dd</i> , $J = 8,8$ e 7,3 Hz)	75,0	75,8
3"	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,40 (<i>m</i>)	78,0	78,1
4"	3,40 (<i>m</i>)	3,24 (<i>m</i>)	73,0	71,3
5"	3,60 (<i>m</i>)	3,32 (<i>m</i>)	78,0	78,4
6" _A	3,90 (<i>m</i>)	3,80 (<i>dd</i> , $J = 11,0$ e 1,0 Hz)	62,0	62,6
6" _B	3,30 (<i>m</i>)	3,37 (<i>dd</i> , $J = 11,0$ e 6,0 Hz)		

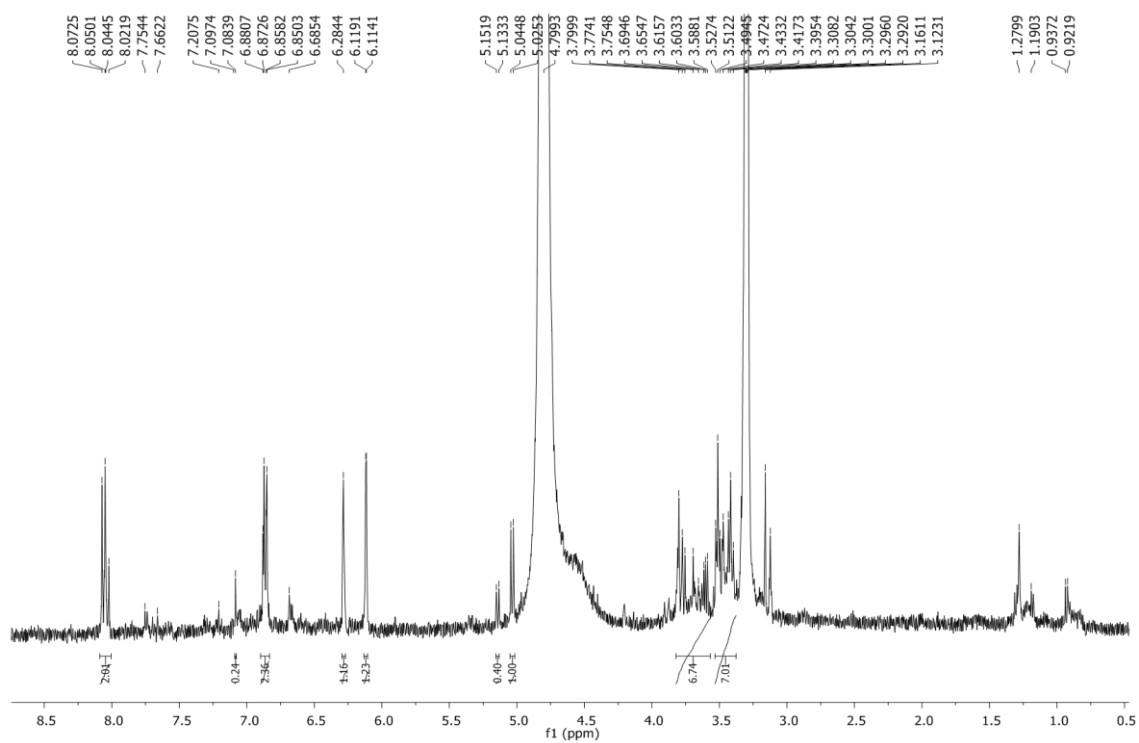


Figura 4.26: Espectro de RMN de ^1H de **L15** e **L14** (400 MHz, CD_3OD).

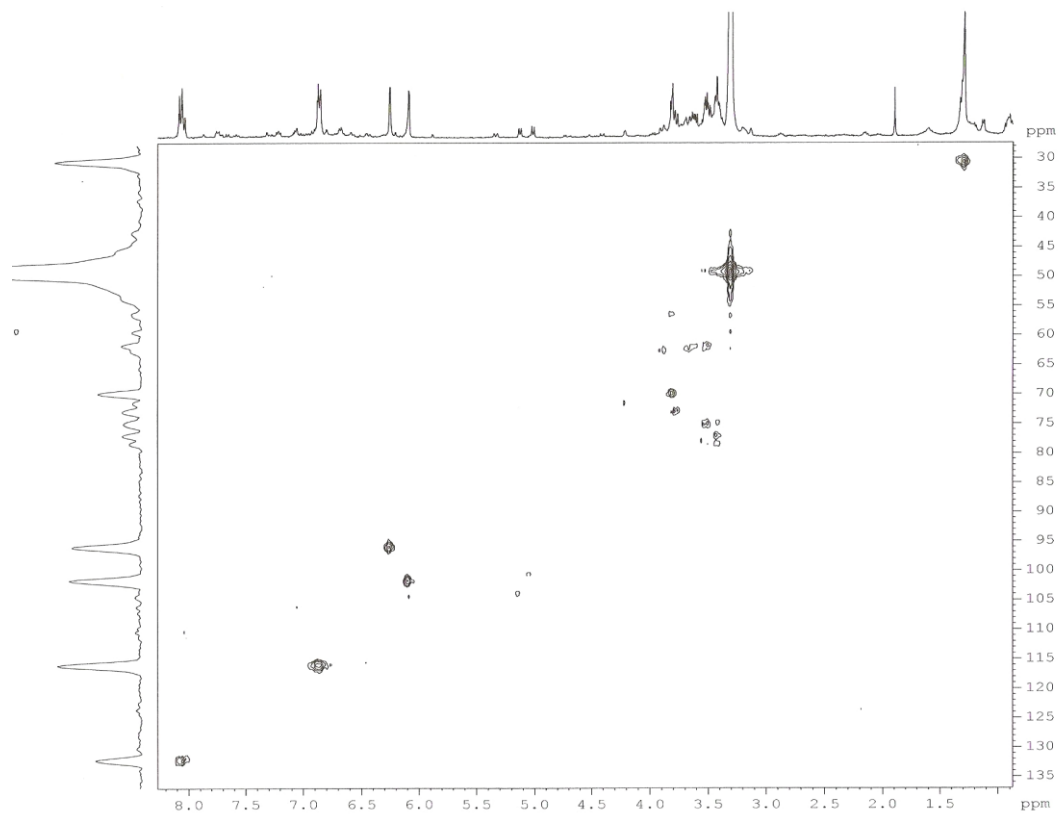
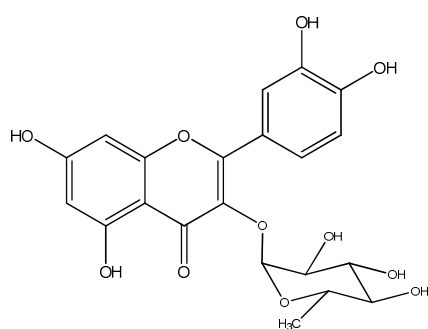
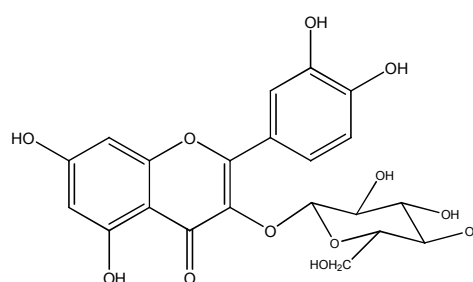
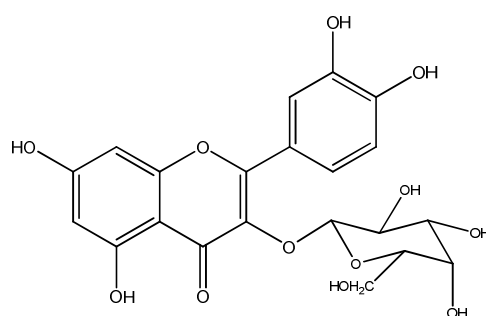


Figura 4.27: Mapa de correlações do HSQC de **L15** e **L14** (400 MHz, CD_3OD).

4.3 Identificação do conjunto de flavonoides glicosilados de *A. humile* por HPLC-UV-MS-MS

4.3.1 Identificação do conjunto de flavonoides (Fração AHFE-F1): Quercitrina (L9), Quercetina-3-O- β -glucosídeo (L10) e Quercetina-3-O- β -galactosídeo (L11).

**L9****L10****L11**

Os experimentos via HPLC-UV-MS-MS foram realizados a fim de se obter maiores informações sobre os diversos flavonoides glicosilados, constituintes estes minoritários na espécie *A. humile*.

Os espectros de massas dos flavonoides glicosilados apresentam em vários casos, um padrão característico, que depende principalmente da natureza do sacarídeo e sua ligação C-glicosídeo ou O-glicosídeo. Na maioria dos casos, a fragmentação se origina com a clivagem da ligação O-glicosídeo, sendo este comportamento, útil para identificação da aglicona. A perda dos fragmentos com

massa bem definidas a partir do íon molecular $[M-H]^-$, fornece informações sobre o tipo de sacarídeo presente (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; GATTUSO *et al.*, 2007, HVATTUM & EKERBERG, 2003; MARCH *et al.*, 2006). A utilização dos experimentos via MS-MS auxiliam na identificação de vários flavonoides mostrando-se uma ferramenta poderosa de análise para identificação de flavonoides, principalmente os glicosilados. A análise do padrão de fragmentação juntamente com os dados de RMN de 1H e ^{13}C e bidimensionais, possibilitou a identificação precisa do tipo estrutural de aglicona presente.

Através da análise via HPLC-UV-MS-MS de frações obtidas do fracionamento do extrato das folhas de *Anacardium humile* via Cromatografia em contracorrente (HSCCC), foram identificados diversos flavonoides glicosilados, como pode ser visto na Figura 4.28. Os dados de UV e massas de cada pico estão listados na Tabela 4.12.

As principais características dos flavonoides glicosilados foram resumidas a partir dos dados observados para os diversos picos, como, máximo de absorção no UV, que auxiliou na identificação dos diferentes tipos de agliconas ($\lambda = \sim 255; 357$ nm, aglicona quercetina; $\lambda = \sim 265; 348$ nm, aglicona kaenferol), dentre outros, sendo estes consistentes com os relatados na literatura (HVATTUM & EKERBERG, 2003).

No estudo por dissociação induzida por colisão, os flavonoides glicosilados desprotonados, produziram ambos os fragmentos, o íon radical da aglicona $[Y^0-H]^\bullet$ e aglicona $[Y^0]^-$. Vários autores abordam que os flavonóis podem ser glicosilados em qualquer grupo hidroxila pertencentes à molécula, entretanto, as posições 3-OH e 7-OH são favorecidas e a posição de substituição do grupo glicosídeo pode ser determinada pela comparação da abundância relativa do íon $[Y^0]^-$ e do íon radicalar $[Y^0-H]^\bullet$. A maior abundância relativa do íon radicalar $[Y^0-H]^\bullet$, formado através da clivagem homolítica da ligação *O-glicosídeo*, quando comparado ao íon $[Y^0]^-$ formado pelo rearranjo de hidrogênio a partir da porção glicosídica, é um indicativo da substituição 3-*O-glicosídica*, sendo consistente para as agliconas quercetina e kaenferol. A maior proporção do íon radicalar $[Y^0-H]^\bullet$ para ambas as agliconas quercetina e kaenferol 3-*O-glicosiladas*, se deve a estabilidade do íon

fragmento formado, que se estabiliza através dos grupos hidroxilas do anel B, como pode ser visualizado no Esquema 4.1 e 4.2. HVATTUM & EKERBERG (2003) citam que quanto maior o número de grupos hidroxilas substituintes no anel B, maior será a proporção relativa de formação do íon radical $[Y^{\circ}\text{-H}]^{\cdot}$. Isto é observado para os diversos flavonoides glicosilados da aglicona quercetina quando comparado aos flavonoides glicosilados do kaenferol.

A presença dos íons fragmentos m/z 271 $[Y^{\circ}\text{-H-CO-H}]^{\cdot}$ e m/z 255 $[Y^{\circ}\text{-H-CO}_2\text{-H}]^{\cdot}$ no espectro de massas de **L9** a **L13** (Figuras: 4.30 a 4.32) são característicos da substituição 3-*O*-glicosídica, não sendo observados para a substituição 7-*O*-glicosídica.

Através da presença dos íons m/z 300 como pico base nos espectros de massas de **L9** a **L13** (Figuras: 4.30 a 4.32) e m/z 284 como pico base nos espectros de **L14** a **L15**, formados através da clivagem homolítica da ligação glicosídica, as posições 3-*O*-glicosídicas foram confirmadas para os mesmos.

No estudo da fração **AHFE-F1**, foi observado no espectro de massas de **L9** (Figura 4.30) o pico m/z 447 $[\text{M-H}]^{\cdot}$ confirmando a massa molecular da quercitrina (**L9**). O fragmento $[\text{M-H-147}]^{\cdot}$, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade raminosídica e os demais fragmentos $[\text{M-H-147-29}]^{\cdot}$, $[\text{M-H-147-121}]^{\cdot}$ e $[\text{M-H-147-149}]^{\cdot}$ são referentes a quebras no anel C. A proposta de fragmentação para formação desses fragmentos está representada no Esquema 4.1.

O cromatograma de **AHFE-F1**, apresenta dois compostos em mistura com tempos de retenções muito próximos, sugerindo similaridade estrutural entre eles. Isto foi confirmado através do espectro de massas de **L10** e **L11**, onde foram confirmadas as massas moleculares idênticas para ambos.

No espectro de massas de **L10** e **L11** (Figuras 4.31 e 4.32), o pico m/z 463 $[\text{M-H}]^{\cdot}$ confirmou a massa molecular de **L10** e **L11**. O fragmento $[\text{M-H-163}]^{\cdot}$, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade glicosídica e os demais fragmentos $[\text{M-H-147-29}]^{\cdot}$, $[\text{M-H-147-122}]^{\cdot}$ e $[\text{M-H-147-149}]^{\cdot}$ são referentes a quebras no anel C. A proposta de fragmentação para formação desses fragmentos é similar àquela apresentada para a substância **L9** e está representada no Esquema 4.2.

Os flavonóides glicosilados são amplamente encontrados na família Anacardiaceae. Estes flavonoides apresentam sinais característicos em seus espectros de RMN de ^1H , como mostrados anteriormente, dentre eles, dois dubletos entre δ 6,15 a δ 6,40, típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a dois hidrogênios que mantêm relação meta entre si. Para distinguir a posição na qual o glicosídeo está ligado utilizou-se o deslocamento químico do sinal do hidrogênio anomérico. Baseando-se nos dados espectrais obtidos via RMN de ^1H , bidimensionais e por comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; SOUZA *et al.*, 2007 e MOCO *et al.*, 2006; Tabela, 4.12 e 4,13) a estrutura dos flavonóides glicosilados **L9** e **L10** e **L11** foram confirmadas.

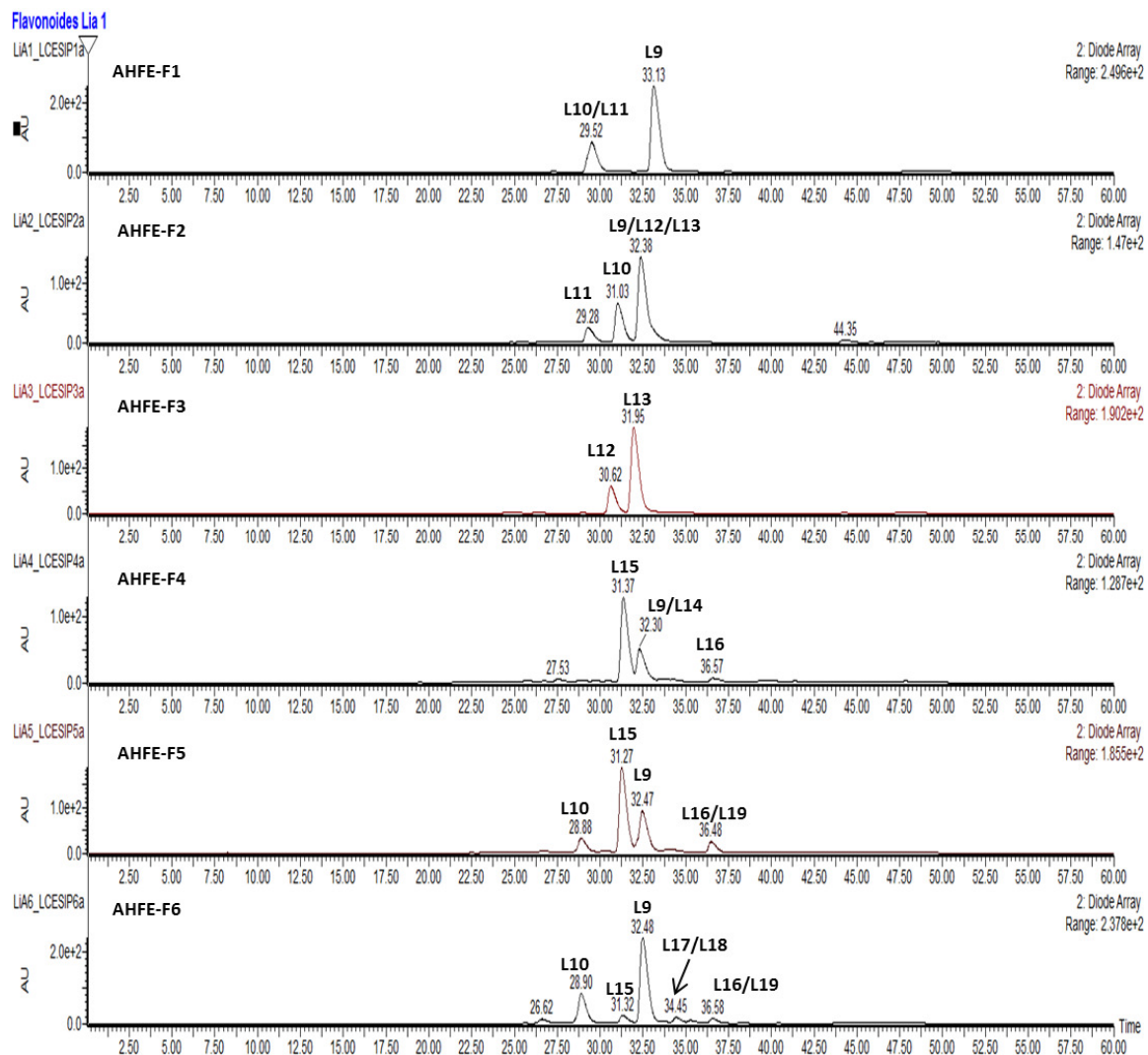


Figura 4.28: Cromatogramas das frações (AHFE-F1 a F6) obtidas do fracionamento do extrato das folhas de *Anacardium humile*.

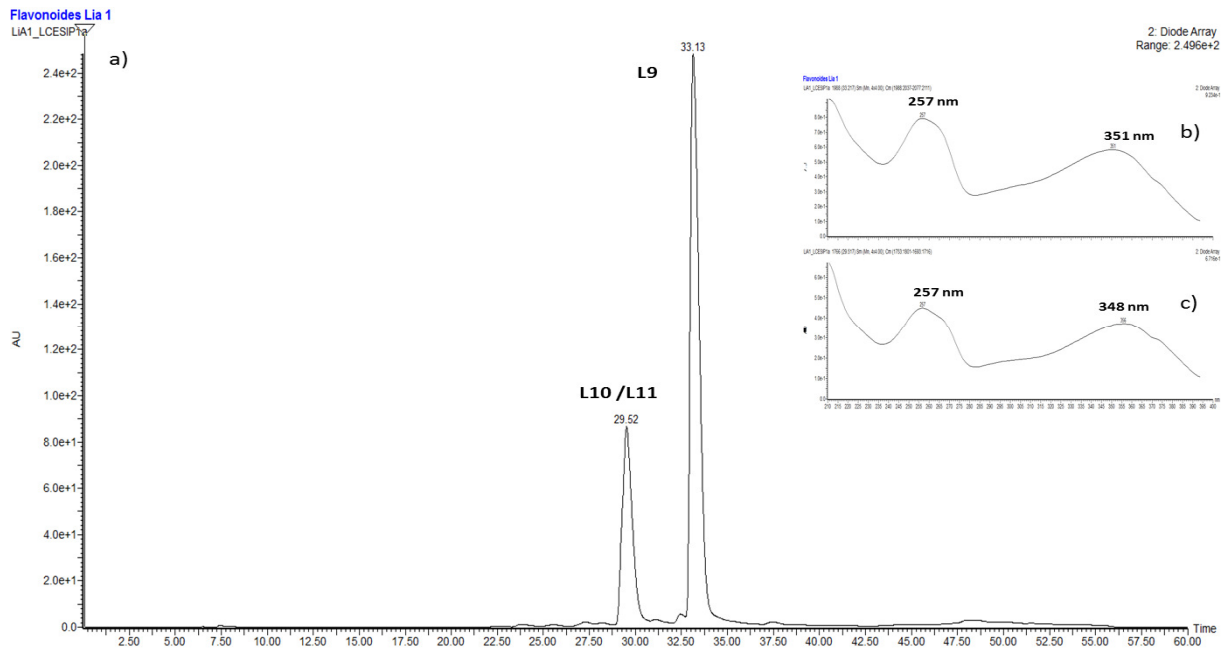


Figura 4.29: a) Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F1) L9, L10 e L11; b) Espectro de UV do flavonóide L10 e L11 ($t_r = 29,5$ min) c) Espectro de UV do flavonoides L9 ($t_r = 33,1$ min).

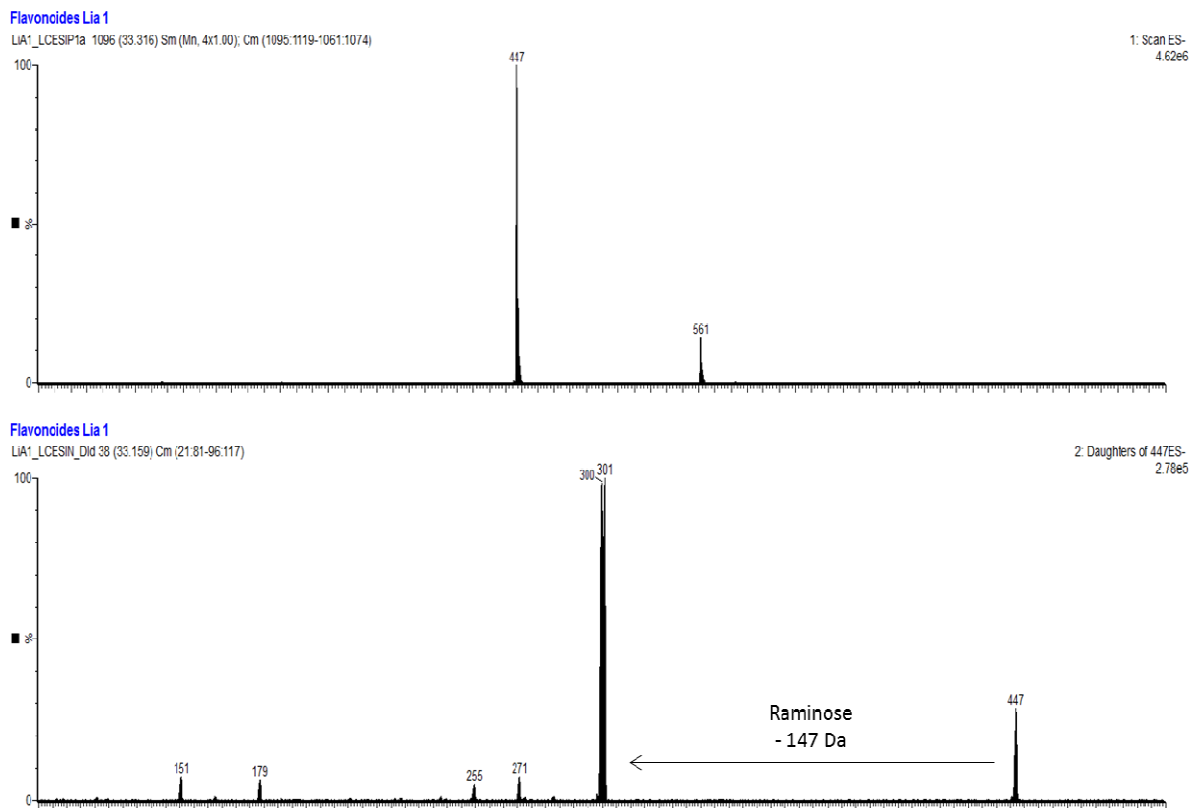


Figura 4.30: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância L9 ($t_r = 33,1$ min).

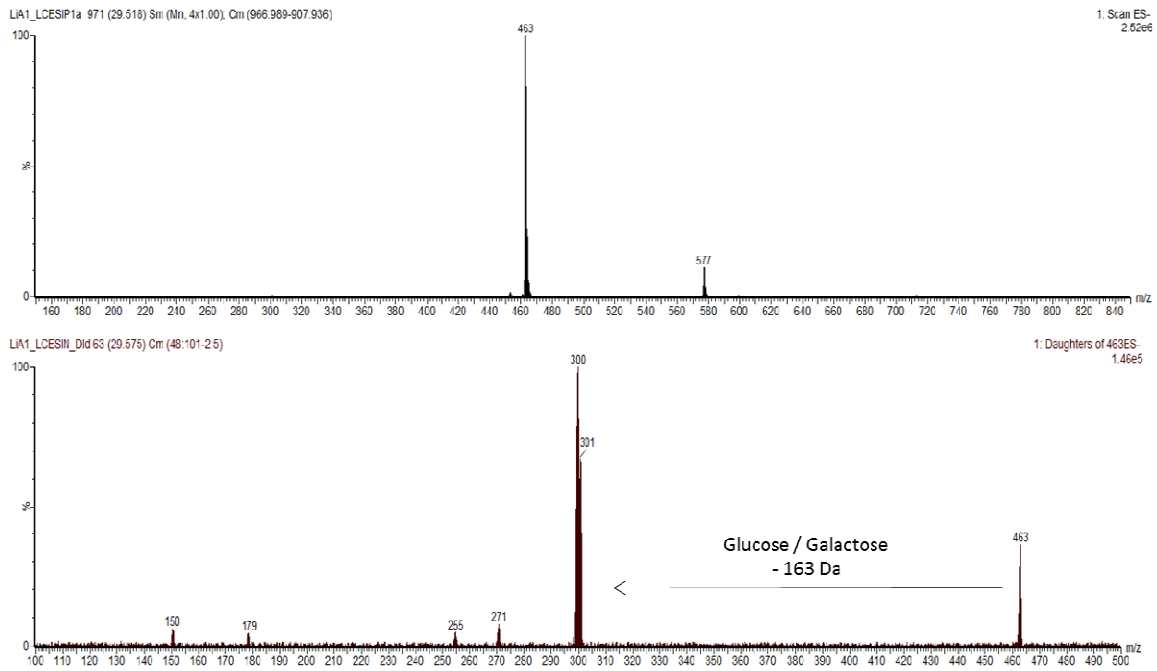


Figura 4.31: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância **L10** e **L11** ($t_r = 29,5$ min).

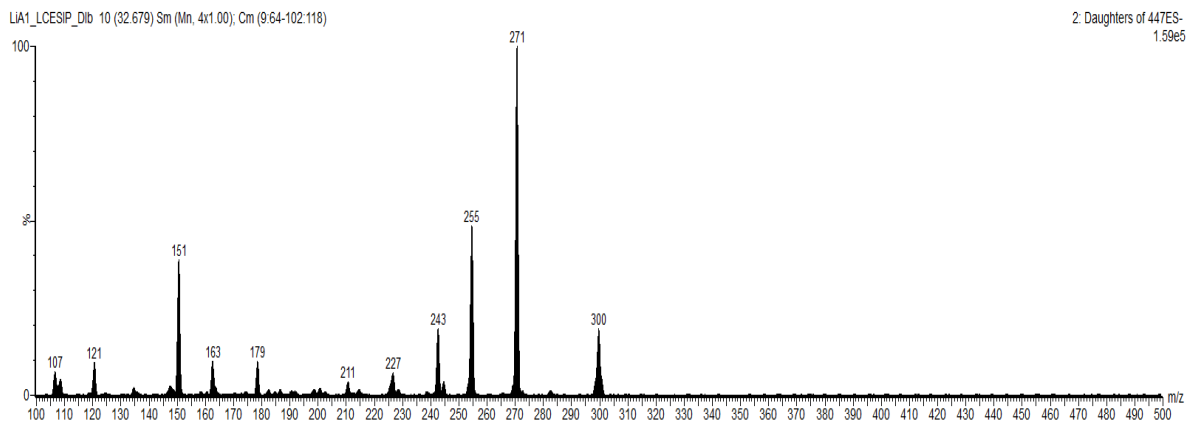
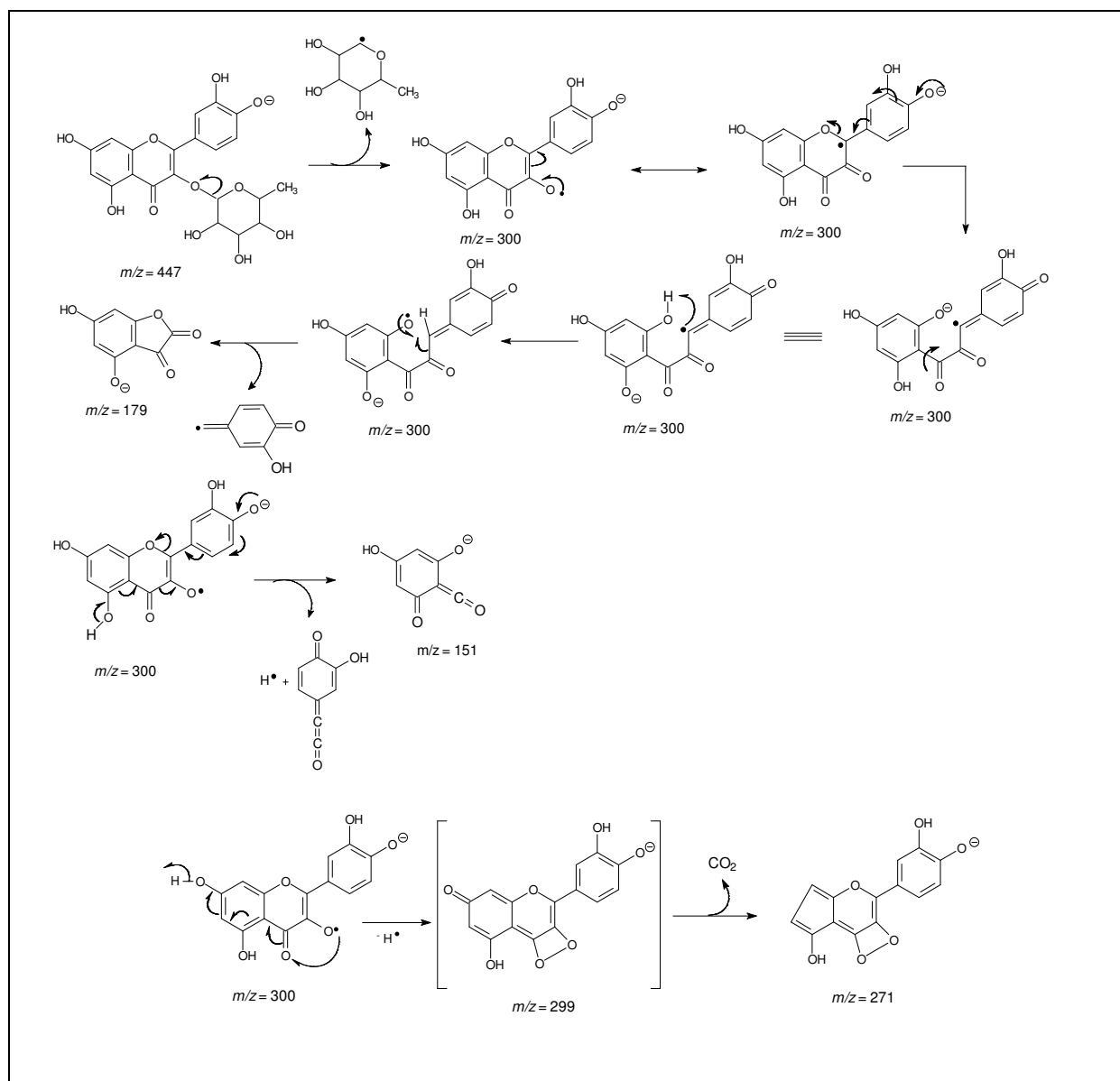
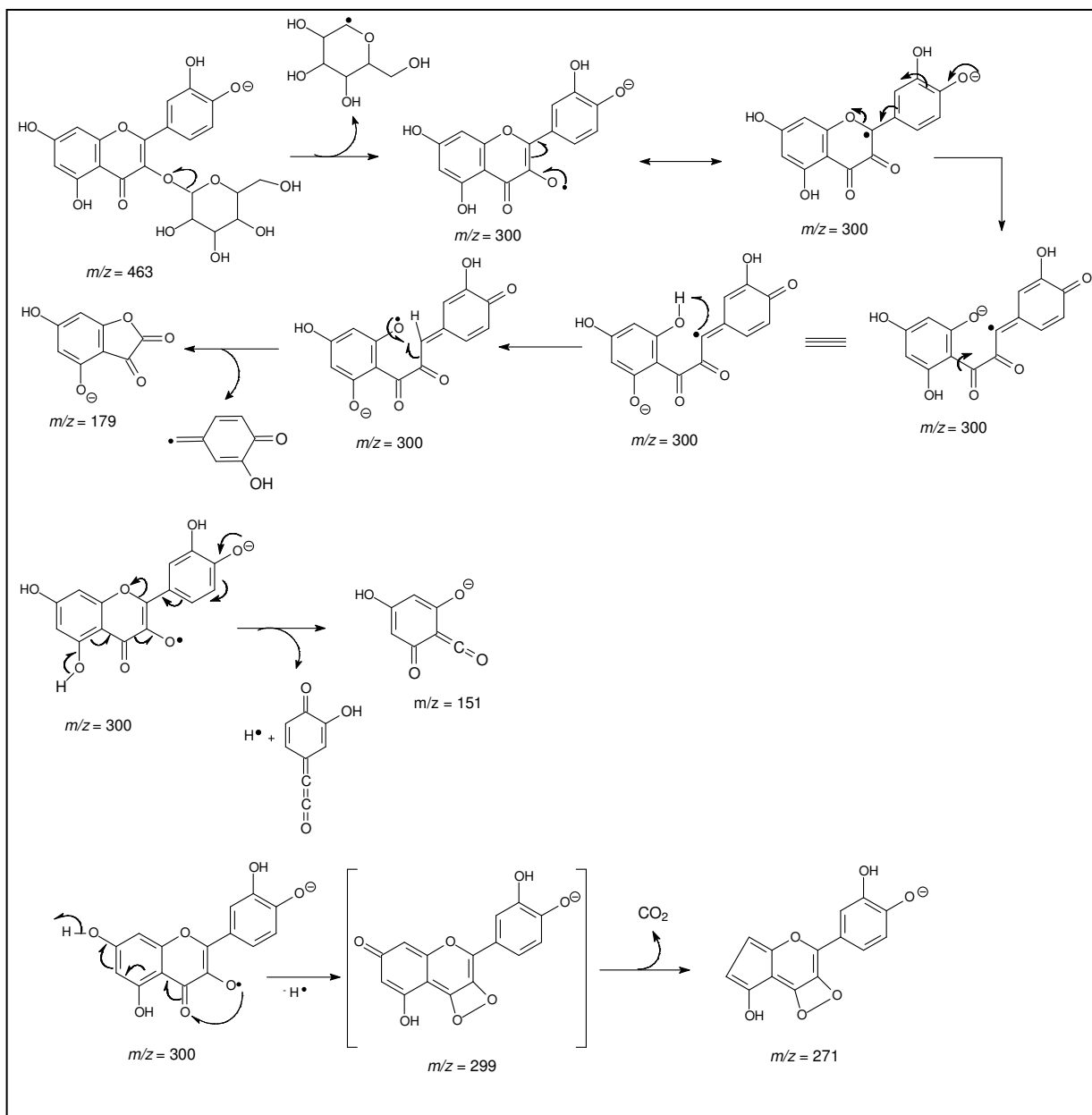


Figura 4.32: Espectro de massas no modo negativo da aglicona quercetina.



Esquema 4.1: Proposta de fragmentação para o composto L9.



Esquema 4.2: Proposta de fragmentação para os compostos L10 e L11.

Tabela 4.12A: Dados dos flavonoides glicosilados obtidos através do estudo das frações AHFE-F1 A F6 de *Anacardium humile* via HPLC-UV-MS-MS

	Cód.	Fração	tr. (min.)	Flavonoides Glicosilados	λ (nm)	[M-H] ⁻ m/z	MS ²	MS ³
1	L11	AHFE-F1	28,8	Quercetin-3-O- β -galactosídeo	256; 357	463	463 (35), 301 (70), 300 (100), 271 (10), 255 (10), 179 (10), 151 (10)	300 (20), 271 (100), 255 (50), 245 (20), 243 (20), 227 (10), 211 (5), 179 (10), 151 (40)
2	L10	AHFE-F1/F5/F6	29,5	Quercetin-3-O- β -glucosídeo	257; 355	463	463 (35), 301 (60), 300 (100), 271 (10), 255 (10), 179 (10), 151 (10)	300 (20), 271 (100), 255 (50), 245 (20), 243 (20), 227 (10), 211 (5), 179 (10), 151 (40)
3	L12	AHFE-F2 AHFE-F3	30,6	Quercetin-3-O- β -xilósídeo	256; 357	433	433 (20), 301 (30), 300 (100), 271 (10), 255 (10), 178 (10), 151 (10)	300 (20), 271 (100), 255 (50), 243 (20), 227 (10), 179 (10), 151 (40)
4	L15	AHFE-F4/F5/F6	31,4	Kaenferol-3-O- β -glucosídeo	266; 349	447	447 (90), 285 (45), 284 (100), 255 (25), 227 (15), 151 (10)	284 (10), 255 (100), 227 (85)
5	L13	AHFE-2 AHFE-3	31,9	Quercetin-3-O- α -arabinosídeo	256; 357	433	433 (20), 301 (60), 300 (100), 271 (10), 255 (10), 178 (10), 151 (10)	300 (20), 271 (100), 255 (50), 245 (20), 243 (20), 227 (10), 211 (5), 179 (10), 151 (40)
6	L14	AHFE-F4	32,6	Kaenferol-3-O- β -galactosídeo	266; 349	447	447 (80), 285 (30), 284 (100), 255 (25), 227 (15), 151 (10)	284 (10), 255 (100), 227 (85)
7	L9	AHFE F1/2/4/5/6	33,3	Quercitrina	257; 355	447	447 (30), 301 (100), 300 (100), 271 (10), 255 (10), 179 (10), 151 (10)	300 (20), 271 (100), 255 (50), 245 (20), 243 (20), 227 (10), 211 (5), 179 (10), 151 (40)
8	L17	AHFE-F6	34,4	Kaenferol-3-O- β -xilósídeo	265; 348	417	417 (100), 285 (5), 233 (10), 155 (5)	
10	L18	AHFE-6	35,3	Kaenferol-3-O- α -arabinosídeo	266; 350	417	417 (100)	
11	L16	AHFE-F4/F5/F6	36,5	Kaenferol-3-O- β -raminosídeo	265; 344	431	431 (100), 285 (5)	
12	L19	AHFE-F5/F6	36,7	Kaenferol-7-O-glucosídeo	265; 344	447	447 (50), 285 (10)	

Tabela 4.12: Dados de RMN de ^1H de **L9**, **L10** e **L11** e comparação com a literatura

	Quercitrina (L9) CD ₃ OD (400,0 MHz)	SOUZA et al. , 2007 CD ₃ OD (400,0 MHz)	Quercetina-3-O- β -glucosídeo (L10) CD ₃ OD (400,0 MHz)	MOCO et al. , 2006 CD ₃ OD (400,0 MHz)	Quercetina-3-O- β -galactosídeo (L11) CD ₃ OD (400,0 MHz)	YANG & KONG , 2008 CD ₃ OD (400,0 MHz)
6	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
8	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
2'	7,33 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,29 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	7,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	7,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	7,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
5'	6,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)
6'	7,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 e 2,0 Hz)	7,25 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 2,2 Hz)	7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 e 2,4 Hz)	7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,2 Hz)	7,59 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 e 2,0 Hz)	7,59 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,2 Hz)
1''	5,34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,4 Hz)	5,38 (<i>s</i>)	5,25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	5,25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,9 Hz)	5,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	5,16 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)
2''	4,22 (<i>m</i>)	4,23 (<i>sl</i>)	3,50 (<i>sl</i>)	3,48 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,3 Hz)	3,81 (<i>m</i>)	3,92 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,8 e 7,8 Hz)
3''	3,75 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 3,2 Hz)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,40 (<i>m</i>)	3,42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	3,73 (<i>m</i>)	3,74 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz)
4''	3,30-3,40 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,35 (<i>m</i>)	3,34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	3,81 (<i>m</i>)	3,90 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5 e 1,0 Hz)
5''	3,30-3,40 (<i>m</i>)	3,30-3,80 (<i>m</i>)	3,20 (<i>m</i>)	3,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	3,45 (<i>m</i>)	3,66 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,8 e 3,5 Hz)
6''	0,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	0,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	3,55 (<i>m</i>)	3,57 (<i>m</i>)	3,50 (<i>m</i>)	3,50 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,2 e 6,8 Hz)
			3,68 (<i>m</i>)	3,71 (<i>m</i>)	3,70 (<i>m</i>)	3,84 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,2 e 6,8 Hz)

Tabela 4.13: Dados de RMN de ^{13}C de **L9**, **L10** e **L11** e comparação com a literatura

C	L9 [§]	CORREIA <i>et al.</i> , 2008	L10 [§]	BRACA <i>et al.</i> , 2003	L11 [§]	YANG & KONG, 2008
		CD ₃ OD (75,0 MHz)		CD ₃ OD (150,0 MHz)		CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	98,4	100,0	98,4	99,9	98,4	99,9
8	93,4	94,9	93,4	94,7	93,4	94,7
2`	115,0	116,2	116,2	116,2	116,2	116,0
5'	115,0	117,0	114,6	117,5	114,6	117,8
6`	121,8	122,9	121,8	123,1	121,8	122,9
1"	103,0	103,9	103,2	102,5	103,8	105,9
2"	70,8	72,0	73,4	75,2	70,8	73,2
3"	70,8	72,1	75,4	78,2	71,9	75,1
4"	71,4	73,0	71,2	71,0	70,0	70,0
5"	75,0	72,0	73,0	78,0	75,4	77,2
6"	16,2	17,6	61,0	62,4	61,0	61,9

[§]CD₃OD (100,0 MHz)

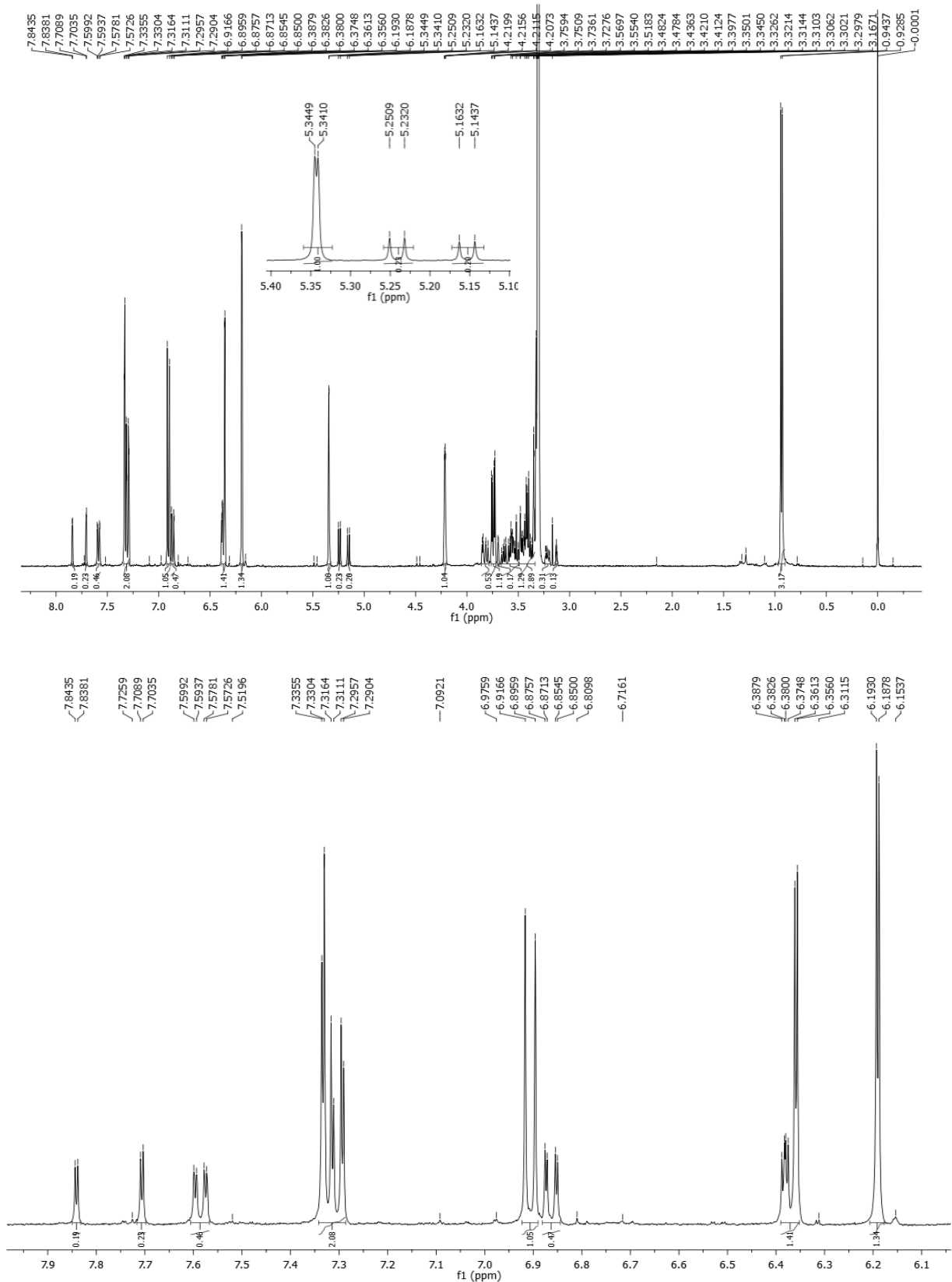


Figura 4.33: Espectro e ampliação do espectro de RMN de ¹H do conjunto de flavonoides (AHFE-F1): L9, L10 e L11 (400 MHz, CD₃OD).

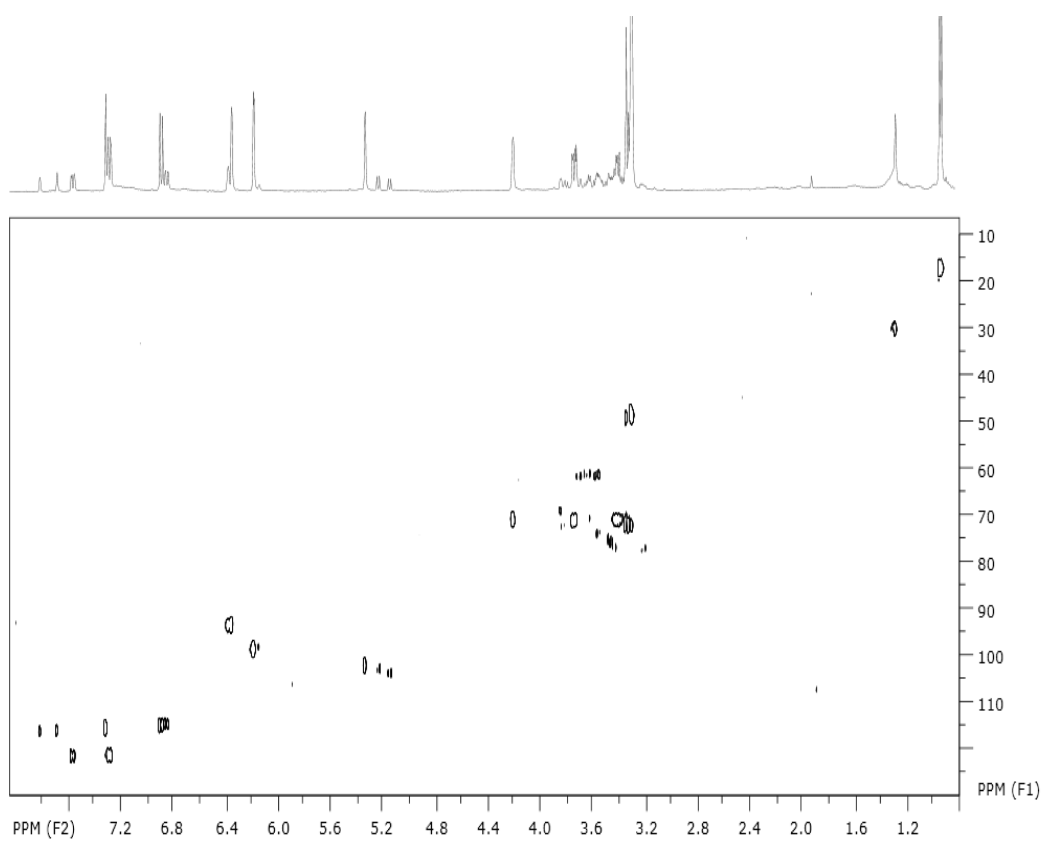


Figura 4.34: Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: **L9**, **L10** e **L11** (400 MHz, CD₃OD).

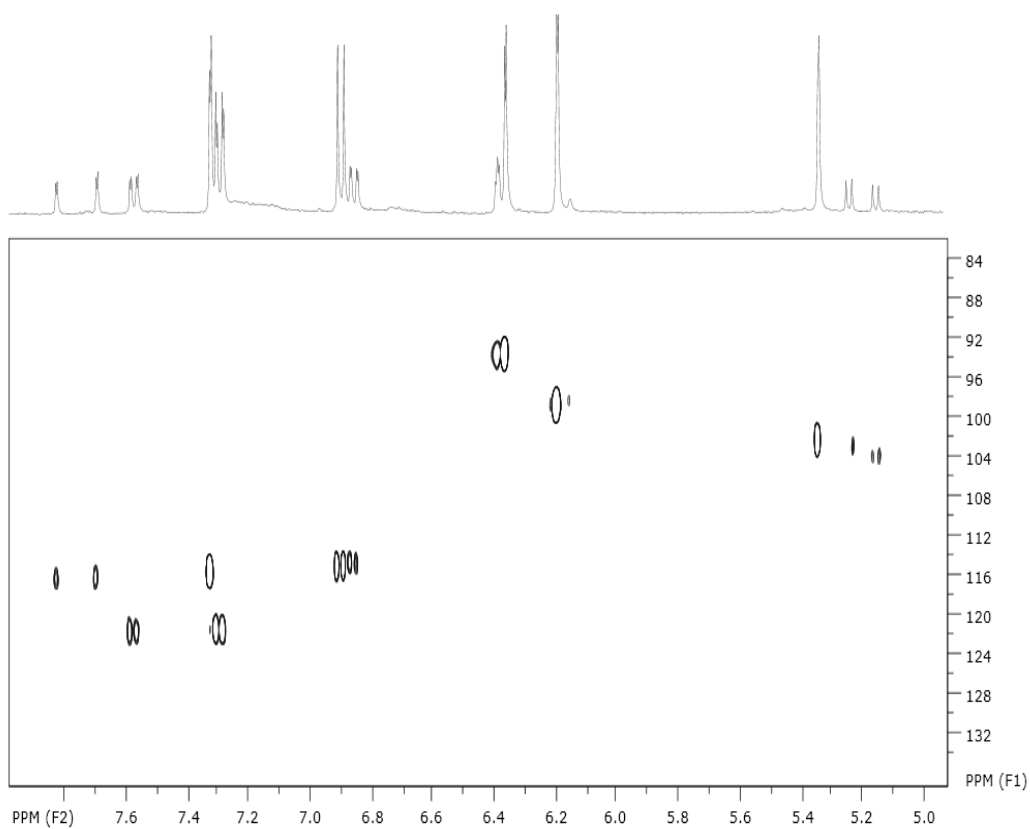


Figura 4.35: Ampliação do mapa de correlações do conjunto de flavonoides (AHFE-F1) : **L9**, **L10** e **L11** (400 MHz, CD₃OD)

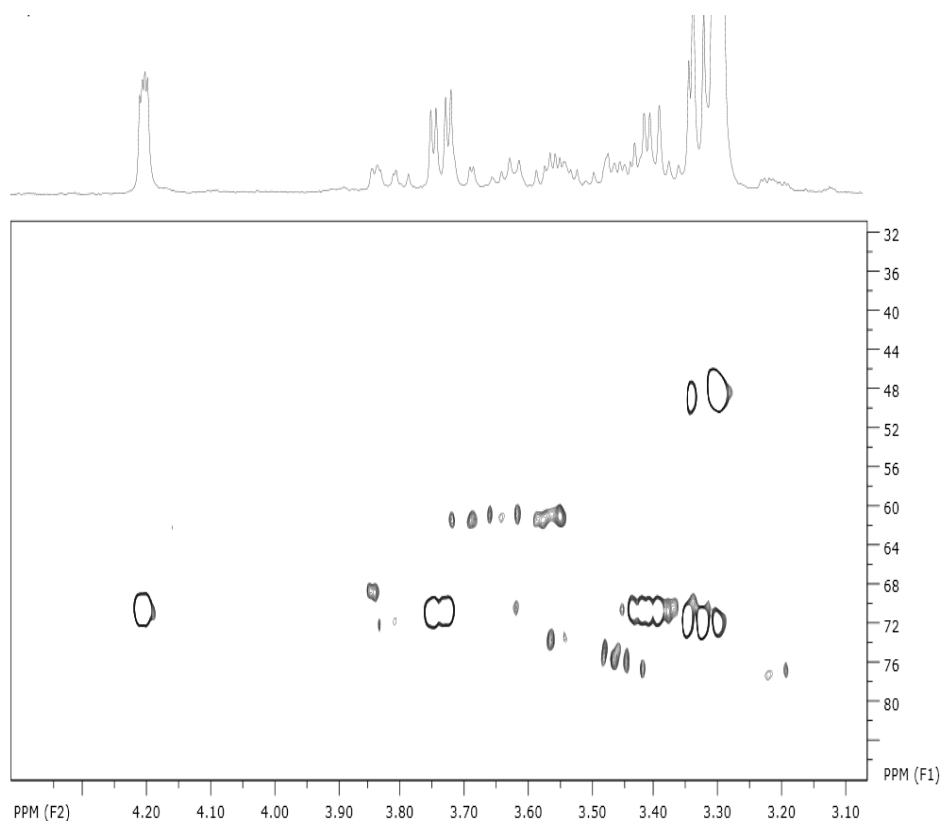
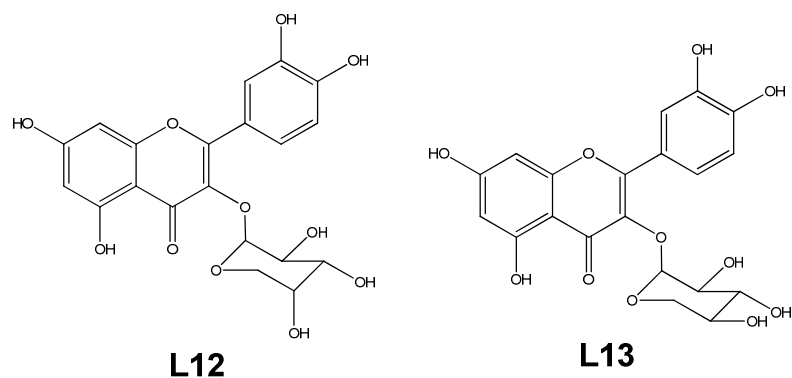


Figura 4.36: Ampliação do mapa de correlações do conjunto de flavonoides (AHFE-F1) : **L9**, **L10** e **L11** (400 MHz, CD₃OD)

4.3.2 Identificação do conjunto de flavonoides (Fração AHFE-F3): Quercetina-3-O- β -xilósídeo (**L12**) e Quercetina-3-O- α -arabinosídeo (**L13**).



Para análise dos demais conjuntos de flavonoides, o mesmo procedimento foi adotado. No estudo da fração **AHFE-F3**, foi observado no espectro de massas de **L12** (Figura 4.38), o pico m/z 433 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular

de **L12**. O fragmento [M-H-133]⁻, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade de xilose, e os demais fragmentos [M-H-133-29]⁻, [M-H-133-121]⁻ e [M-H-133-149]⁻ são referentes a quebras no anel C. No espectro de massas de **L13** (Figura 4.39), o pico m/z 433 [M-H]⁻ confirmou a massa molecular de **L13**. O fragmento [M-H-133]⁻, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade de arabinose e os demais fragmentos [M-H-133-29]⁻, [M-H-133-122]⁻ e [M-H-133-149]⁻ são referentes a quebras no anel C. A proposta de fragmentação para formação desses fragmentos é similar àquela apresentada para a substância **L12**.

Através da análise do espectro de RMN de ¹H da mistura de **L12** e **L13** (Figura 4.37, Tabela 4.14) observou-se sinais característicos de um sistema de substituição 3',4' no anel B; dois sinais típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si. Na região dos açúcares do espectro de RMN de ¹H de **L12** e **L13** pode-se identificar a presença dos monossacarídeos xilose e arabinose, através dos sinais em δ 5,17 (d , $J = 7,2$ Hz, H-1'') e δ 5,14 (d , $J = 6,5$ Hz, H-1'') referentes aos hidrogênios anoméricos, respectivamente. Já os demais sinais do monossacarídeo foram inferidos através dos dados espectrais uni e bidimensionais obtidos e por comparação com dados da literatura (SHEN *et al.*, 2009 e KORUL'KINA, *et al.*, 2004). O mapa de correlações HSQC da mistura permitiu a atribuição dos sinais de RMN ¹³C (Figuras 4.41-4.42, Tabela 4.15).

Analisando o cromatograma de **AHFE-F2** e espectros de massas dos respectivos picos, foi observada a presença dos flavonoides **L9** a **L13**, já relatados anteriormente.

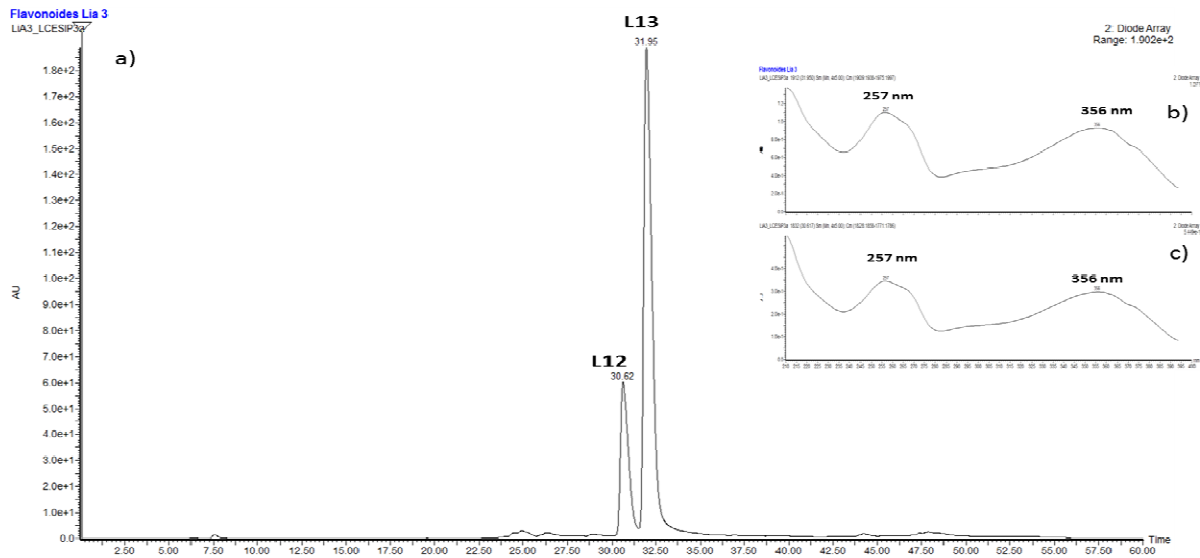


Figura 4.37: a) Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F3) L12 e L13; b) Espectro de UV do flavonóide L12 ($t_r = 30,6$ min) c) Espectro de UV do flavonóide L13 ($t_r = 31,9$ min).

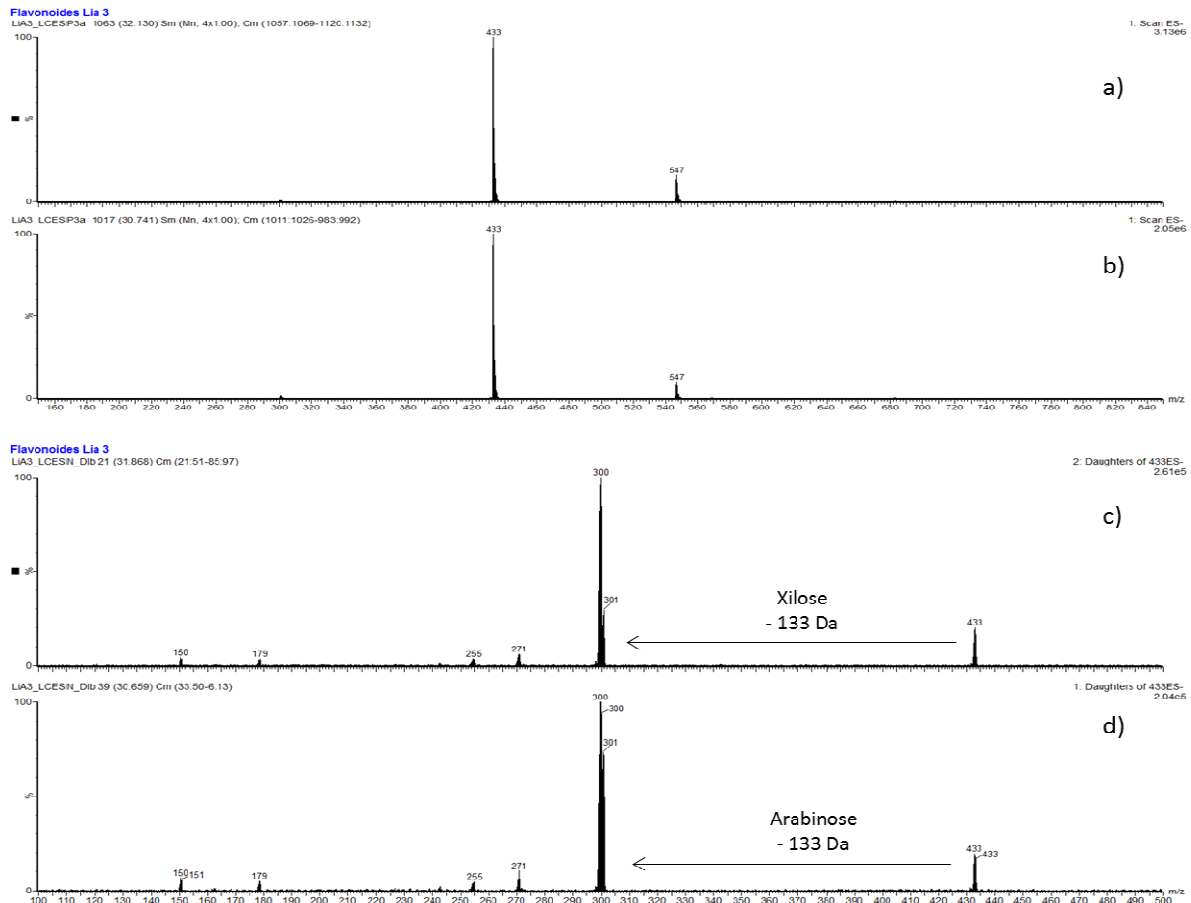


Figura 4.38: a) e c) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância L13 ($t_r = 31,8$ min). b) e d) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância L12 ($t_r = 30,6$ min).

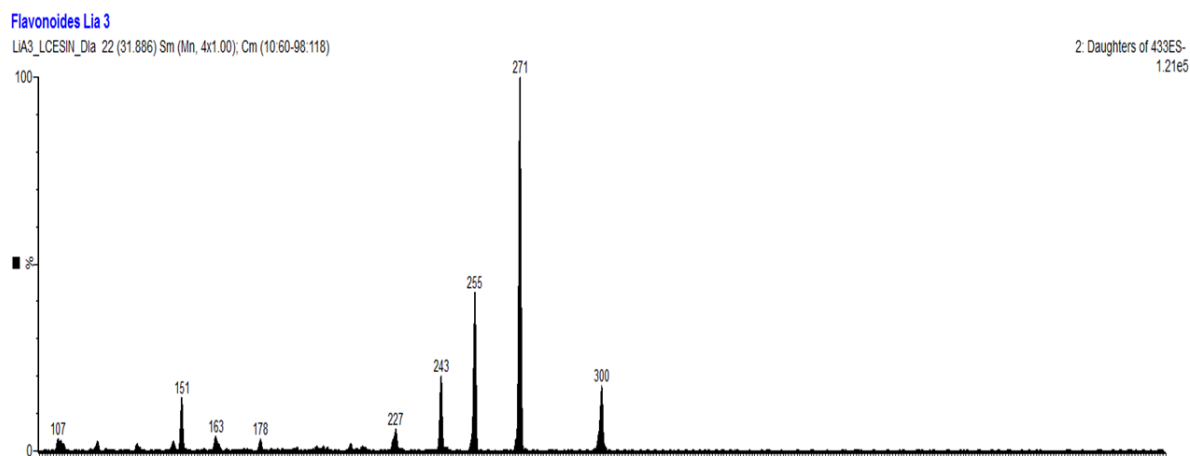


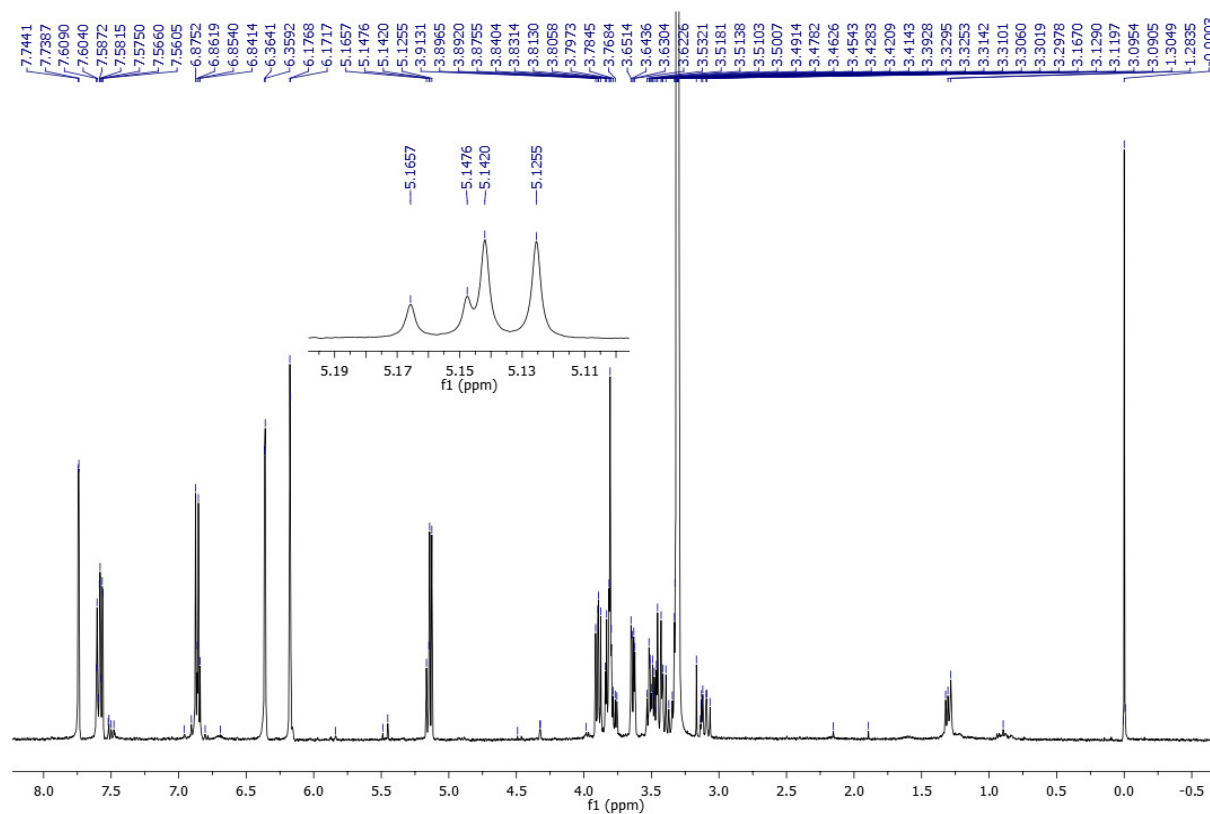
Figura 4.39: Espectro de massas no modo negativo da aglicona quercetina.

Tabela 4.14: Dados de RMN de ^1H da mistura dos flavonoides L12 e L13 e comparação com a literatura

H	Quercetina-3-O- β -arabinosídeo (L13) CD ₃ OD (400,0 MHz)	SHEN <i>et al.</i> , 2009 CD ₃ OD (400,0 MHz)	Quercetina-3-O- β -xilósídeo (L12) CD ₃ OD (400,0 MHz)	KORUL'KINA <i>et al.</i> , 2004 CD ₃ OD (200,0 MHz)
6	6,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
8	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
2'	7,74 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	7,60 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
5'	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)
6'	7,58 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 2,0 Hz)	7,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,2 Hz)	7,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 2,0 Hz)	7,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,2 Hz)
1''	5,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	5,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	5,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	5,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,8 Hz)
2''	3,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	3,82-3,90 (<i>m</i>)	3,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	3,82-3,90 (<i>m</i>)
3''	3,65-3,72 (<i>m</i>)	3,82-3,90 (<i>m</i>)	3,75-3,82 (<i>m</i>)	3,82-3,90 (<i>m</i>)
4''	3,35-3,50 (<i>m</i>)	3,45 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11,6 Hz)	3,35-3,50 (<i>m</i>)	3,68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz)
5''	3,80 (<i>m</i>)	3,63 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz)	3,35-3,50 (<i>m</i>)	3,50 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz)

Tabela 4.15: Dados de RMN de ^{13}C da mistura dos flavonoides **L12** e **L13** e comparação com a literatura

C	L13	SHEN <i>et al.</i> , 2009	L12	KORUL'KINA <i>et al.</i> , 2004
	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)	CD ₃ OD (100,0 MHz)
6	97,2	100,1	97,2	100,1
8	92,2	94,8	92,2	94,8
2'	114,0	117,0	114,0	117,0
5'	113,5	116,2	113,5	116,2
6'	120,4	122,9	120,4	122,9
1''	101,6	104,7	101,6	102,5
2''	70,2	72,9	70,2	74,0
3''	71,2	74,1	72,0	77,0
4''	71,9	69,1	71,2	70,2
5''	65,1	66,9	63,8	67,0


Figura 4.40: Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides: **L12** e **L13** (400 MHz, CD₃OD).

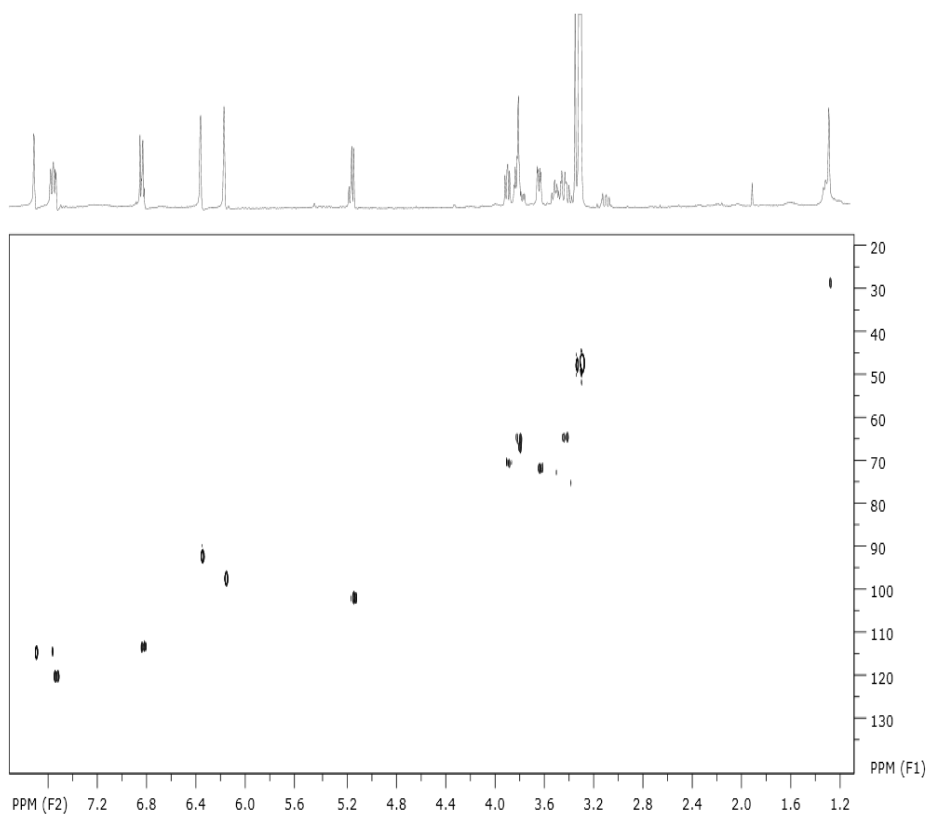


Figura 4.41: Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: **L12** e **L13** (400 MHz, CD_3OD).

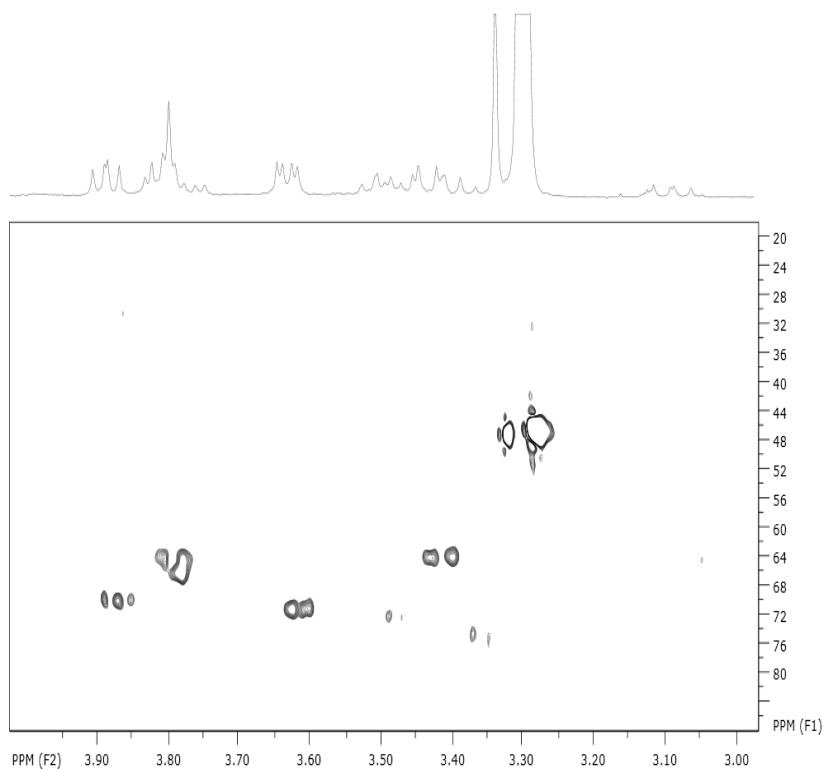
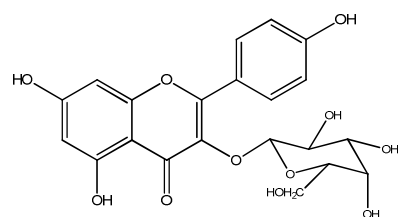
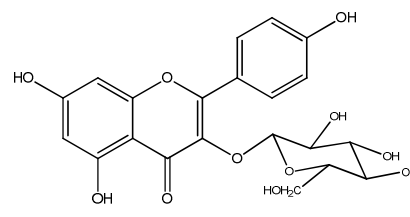
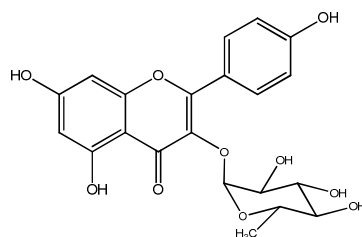
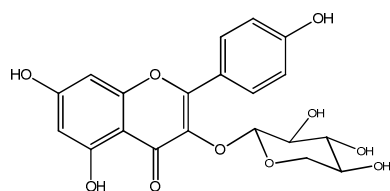
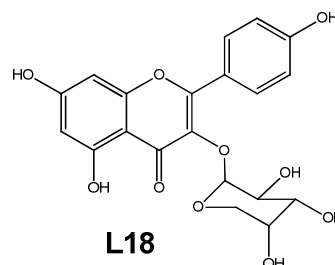
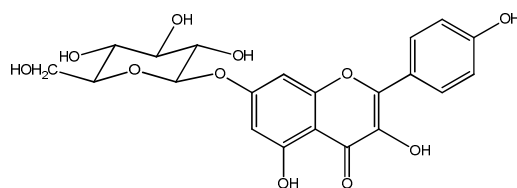


Figura 4.42: Ampliação do mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides: **L12** e **L13** (400 MHz, CD_3OD).

4.3.3 Identificação do conjunto de flavonoides (Frações AHFE-F4, AHFE-F5 e AHFE-F6): Kaenferol-3-O- β -galactosídeo (L14) Kaenferol-3-O- β -glucosídeo (L15), Kaenferol-3-O- α -raminosídeo (L16), Kaenferol-3-O- β -xilósídeo (L17), Kaenferol-3-O- α -arabinosídeo (L18) e Kaenferol-7-O- β -glucosídeo (19).

**L14****L15****L16****L17****L18****L19**

As frações **AHFE-F4** a **F6** foram estudadas por HPLC-MS (Figuras 4.43 a 4.48). No estudo da fração **AHFE-F4**, foi observado no espectro de massas de **L14** (Figura 4.46), o pico m/z 447 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular do mesmo.

O fragmento $[M-H-163]^-$ confirma a perda de uma unidade glicosídica, já o pico m/z 284, confirma a aglicona kaenferol.

No espectro de massas de **L15** (Figura 4.46), o pico m/z 447 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular dos mesmos. O fragmento $[M-H-163]^-$ confirma a perda de uma unidade de glucosídica, já o pico m/z 284, confirma a aglicona kaenferol (Figura 4.47). A proposta de fragmentação para **L14** e **L15** está apresentada no esquema 4.3.

No espectro de massas de **L16** (Figura 4.47), o pico m/z 431 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular do kaenferol-3-O- α -raminosídeo. O fragmento $[M-H-146]^-$, pico m/z 285, confirma a perda da unidade raminosídica, e a relação massa/carga 285 está de acordo com a aglicona kaenferol.

No estudo da fração **AHFE-F6**, foi observado no espectro de massas de **L17** (Figura 4.48), o pico m/z 417 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular do mesmo. O fragmento $[M-H-163]^-$ confirma a perda de uma unidade glicosídica, já o pico m/z 284, confirma a aglicona kaenferol.

O cromatograma de **AHFE-F6**, apresenta dois compostos em mistura com tempos de retenções muito próximos (tr. = 34,5 min), sugerindo similaridade estrutural entre eles. Isto foi confirmado através do espectro de massas de **L17** e **L18** (Figura 4.48), onde foram confirmadas as massas moleculares idênticas para ambos. No espectro de massas de **L17** e **L18** (Figura 4.42), o pico m/z 417 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular dos mesmos. O fragmento $[M-H-132]^-$, pico m/z 285, confirma a perda de uma unidade de xilose para **L17**, já o pico m/z 285, confirma a aglicona kaenferol (Figura 4.48). No espectro de massas de **L18** somente a presença do íon molecular m/z 417 foi observado, entretanto, através da RMN de 1H e ^{13}C e bidimensionais a estrutura de **L18** foi confirmada.

Analisando o cromatograma de **AHFE-F5** e espectros de massas dos respectivos picos, foi observada a presença dos flavonoides glicosilados **L9**, **L10**, **L15**, **L16** já relatados anteriormente.

No espectro de RMN de 1H foram observados sinais característicos de unidades glicosídicas, sugerindo a presença de um resíduo de açúcar como

substituinte no esqueleto flavonoídico. Através dos espectros de RMN de ^1H , Cosy, e mapa de correlações HSQC e HMBC (Figuras 4.51-4.61, Tabela 4.16 e 4.17) de **AHFE-F4** a **AHFE-F6** foram observados diversos sinais que caracterizam a aglicona kaenferol. Foram observados dois dubletos bastante intensos na região dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos, que indicou o padrão de substituição do anel B do flavonoíde em questão.

Sinais em torno de δ 8,00 (*d*, H-2'/ H-6') e δ 6,90 (*d*, H-3'/ H-5') com constantes de acoplamentos em torno de 8,5 Hz, confirmam o padrão de substituição *para* no anel B. Este padrão é caracterizado por apresentar sinais em um mesmo deslocamento químico, devido à simetria do anel B e sua livre rotação e assim, o mesmo ambiente químico, sendo estes hidrogênios considerados como equivalentes. Foram observados, ainda, sinais característicos em seus espectros de RMN de ^1H , dentre eles, dois dubletos entre δ 6,15 a δ 6,40, típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2 hidrogênios que mantém relação meta entre si. Baseando-se nos dados espectrais uni e bidimensionais obtidos e por comparação com dados da literatura, as estruturas dos flavonóides **L14** a **L19** foram identificadas.

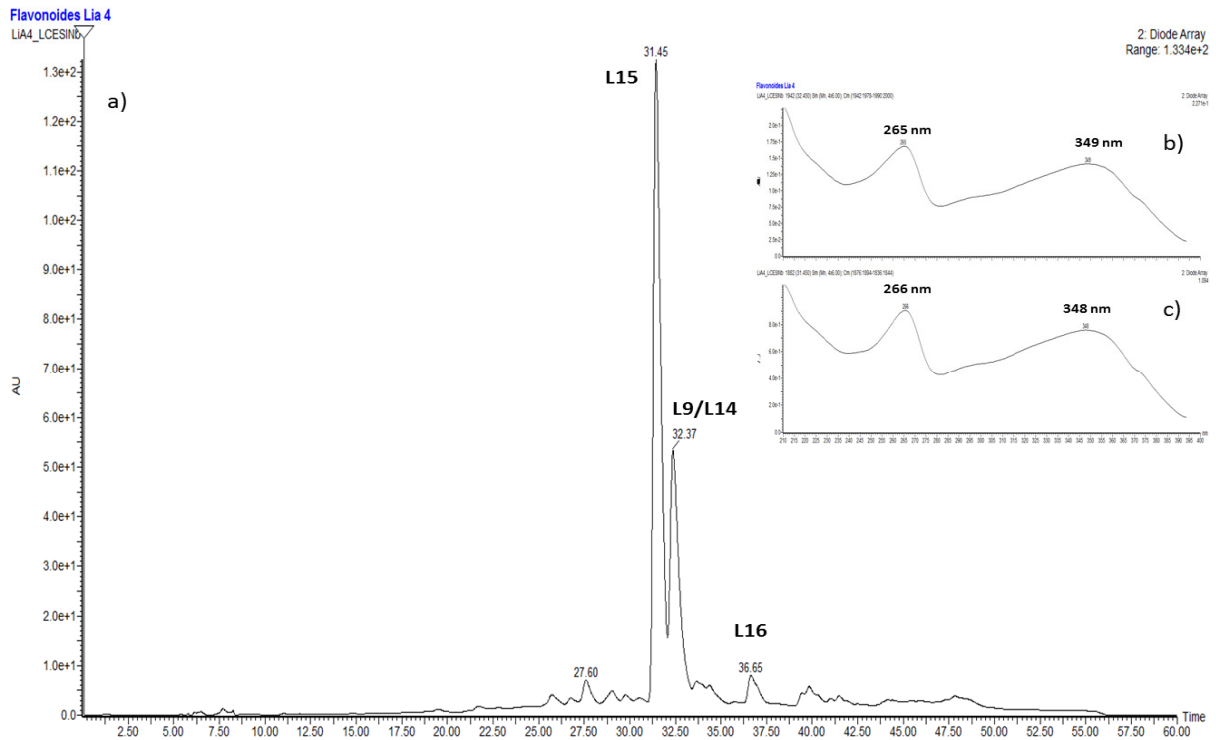


Figura 4.43: Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F4): **L9** ($t_r = 32,5$ min), **L14** ($t_r = 32,6$ min) e **L15** ($t_r = 31,4$ min). b) Espectro de UV do flavonóide **L14**; c) Espectro de UV do flavonóide **L15**.

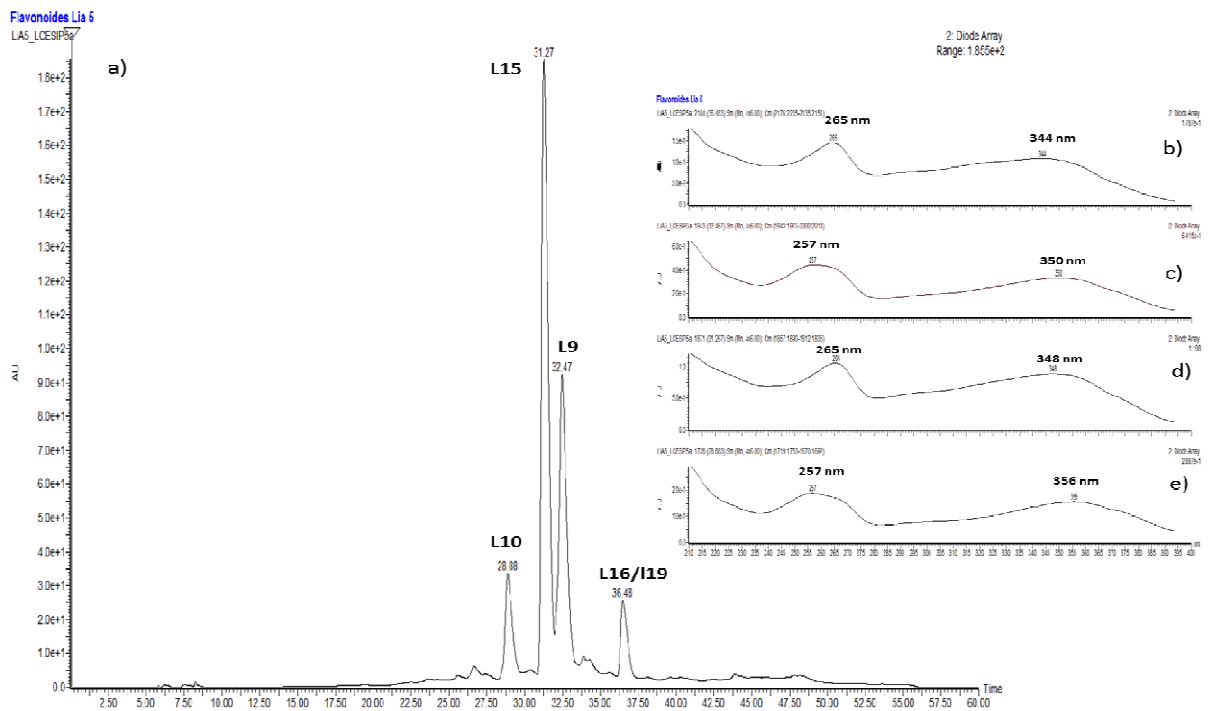


Figura 4.44: Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-5): **L9**, **L10**, **L15**, **L16** e **L19**. b) Espectro de UV do flavonóide **L16** e **L19**; c) Espectro de UV do flavonóide **L9**; d) Espectro de UV do flavonóide **L15**; e) Espectro de UV do flavonóide **L10**.

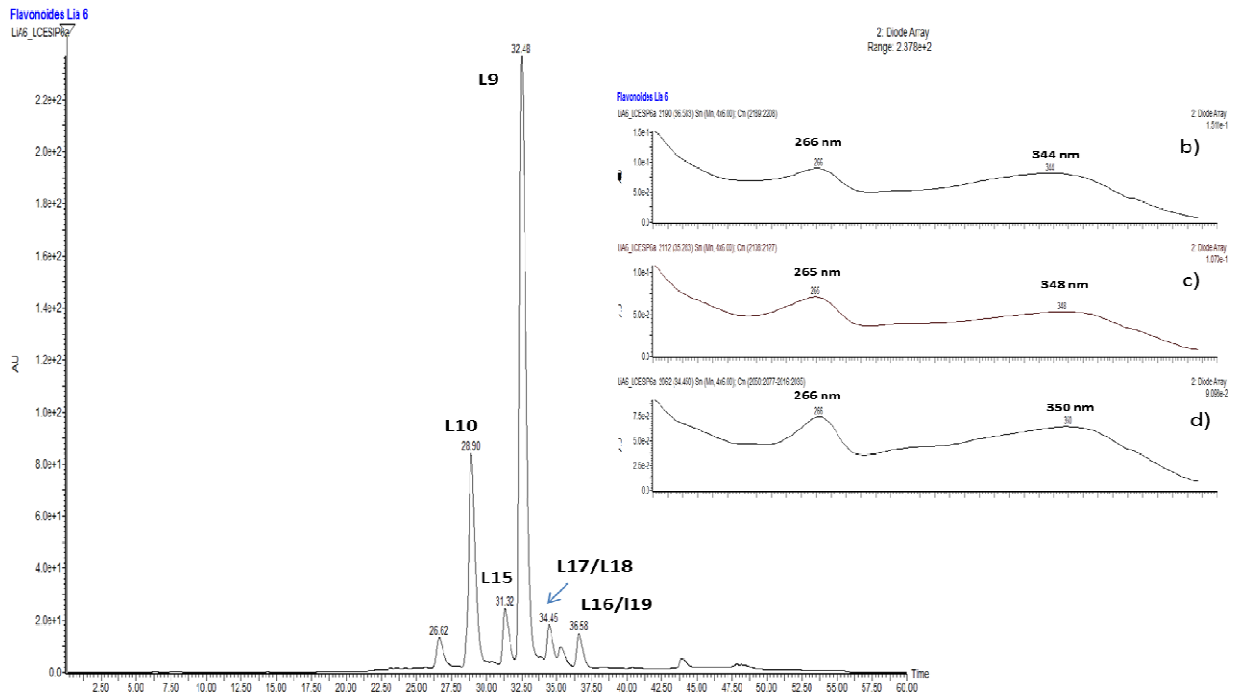


Figura 4.45: Cromatograma do conjunto de flavonoides glicosilados (AHFE-F6) **L9**, **L10**, **L16**, **L15**, **L17**, **L18** e **L19**. b) Espectro de UV do flavonóide **L16** e **L19**; c) Espectro de UV do flavonoide **L18**; d) Espectro de UV do flavonoide **L17**.

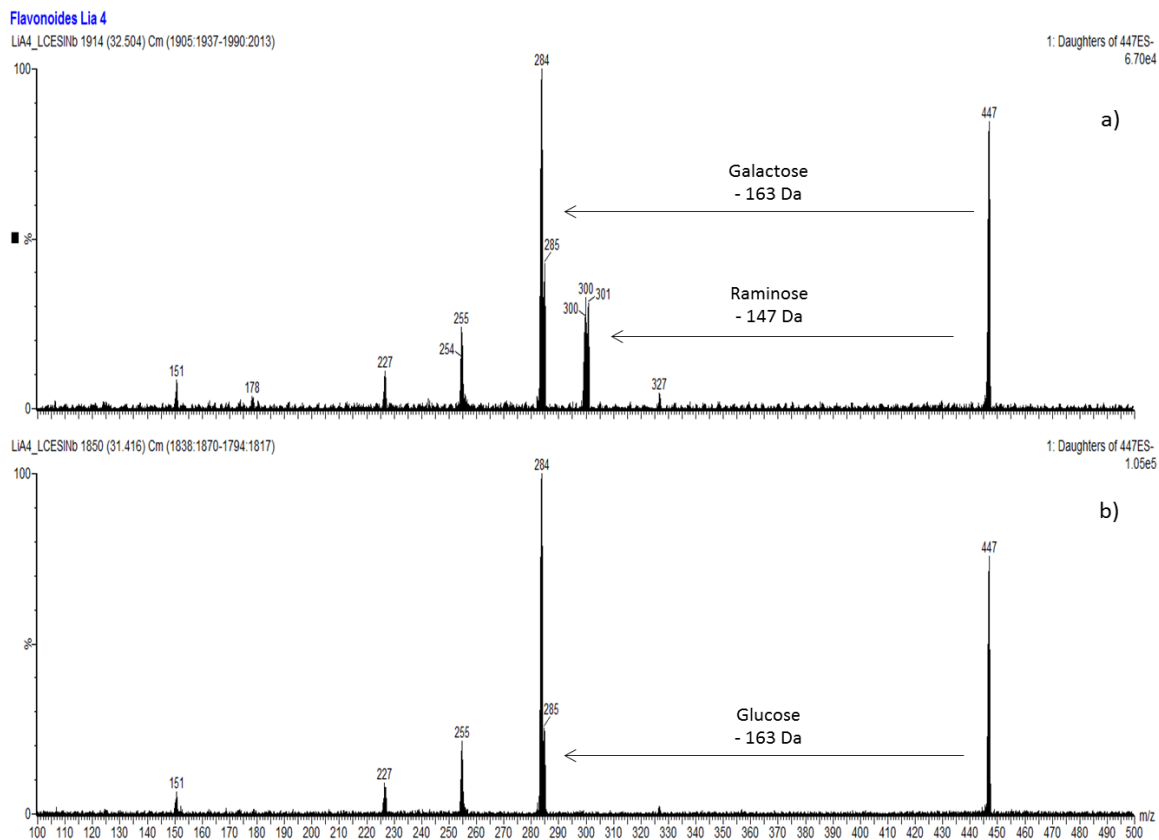


Figura 4.46: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância **L9** e **L14** ($t_r = 32,5$ min). b) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância **L15** ($t_r = 31,4$ min).

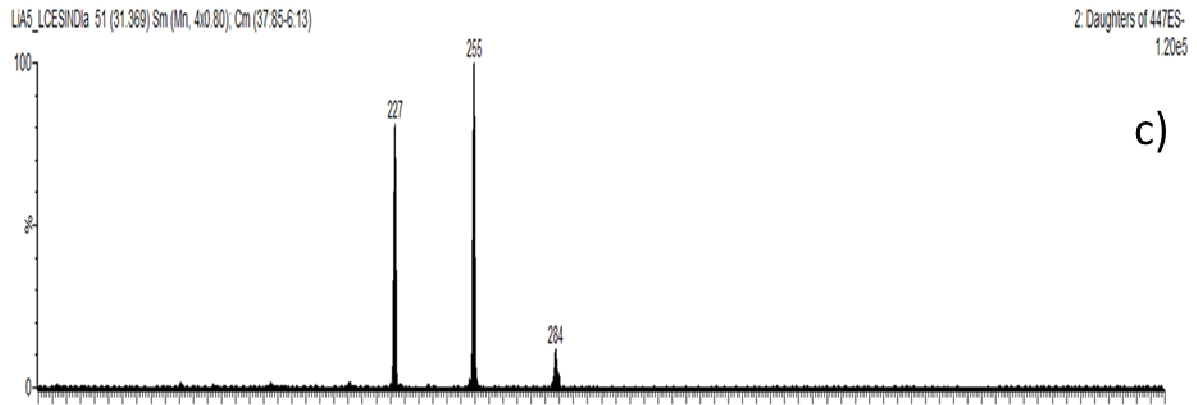


Figura 4.46: c) Espectro de massas no modo negativo da aglicona kaempferol.

Flavonoides Lia 5

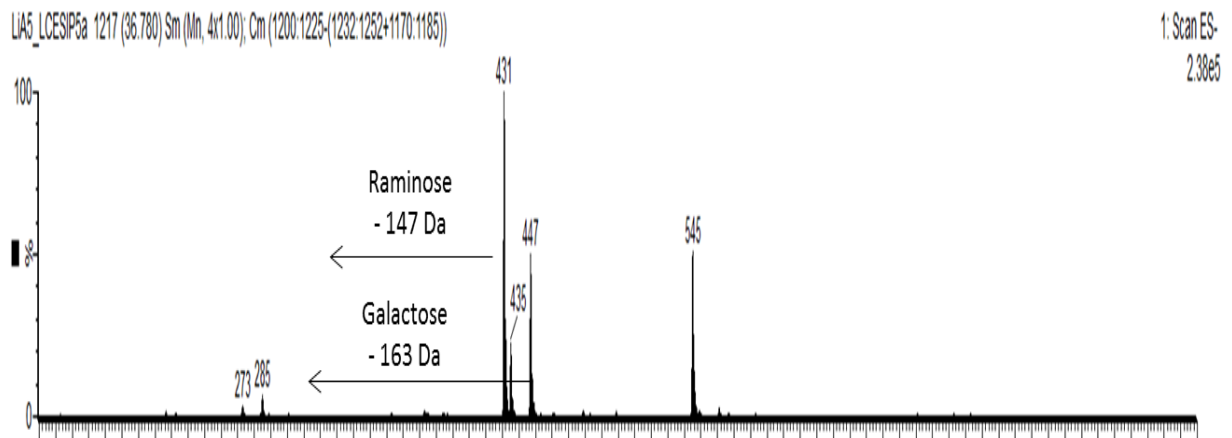


Figura 4.47: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular das substâncias **L16** e **L19** ($t_r = 36,5$ min).

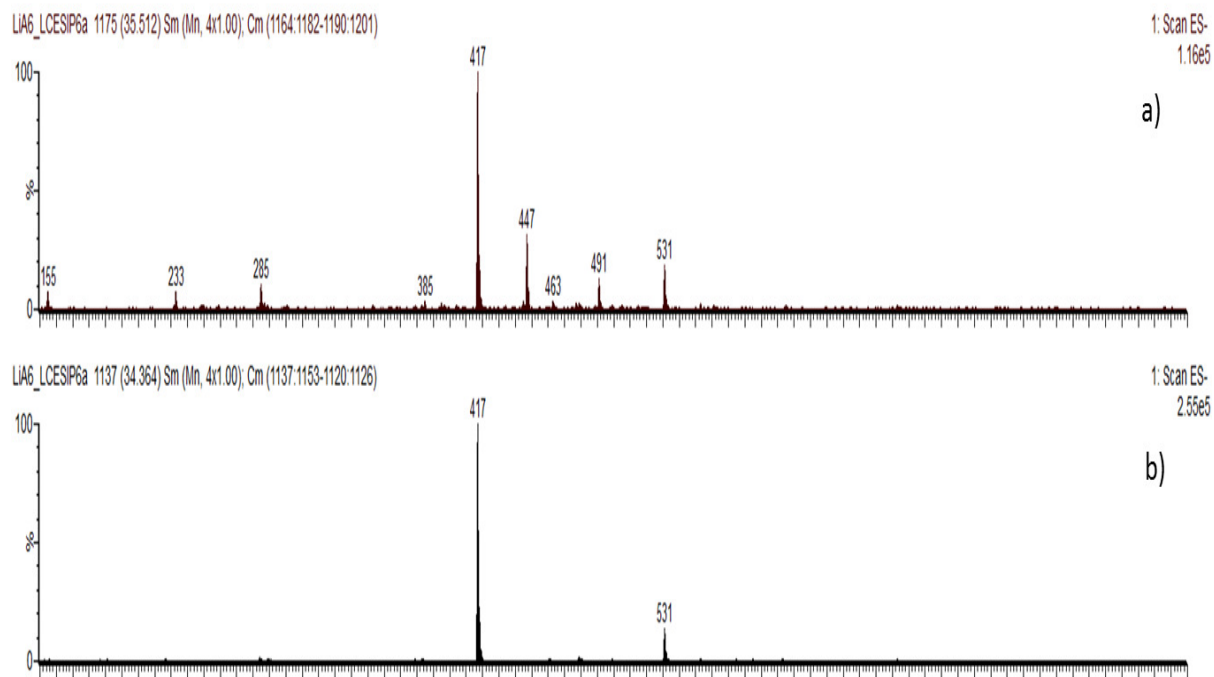
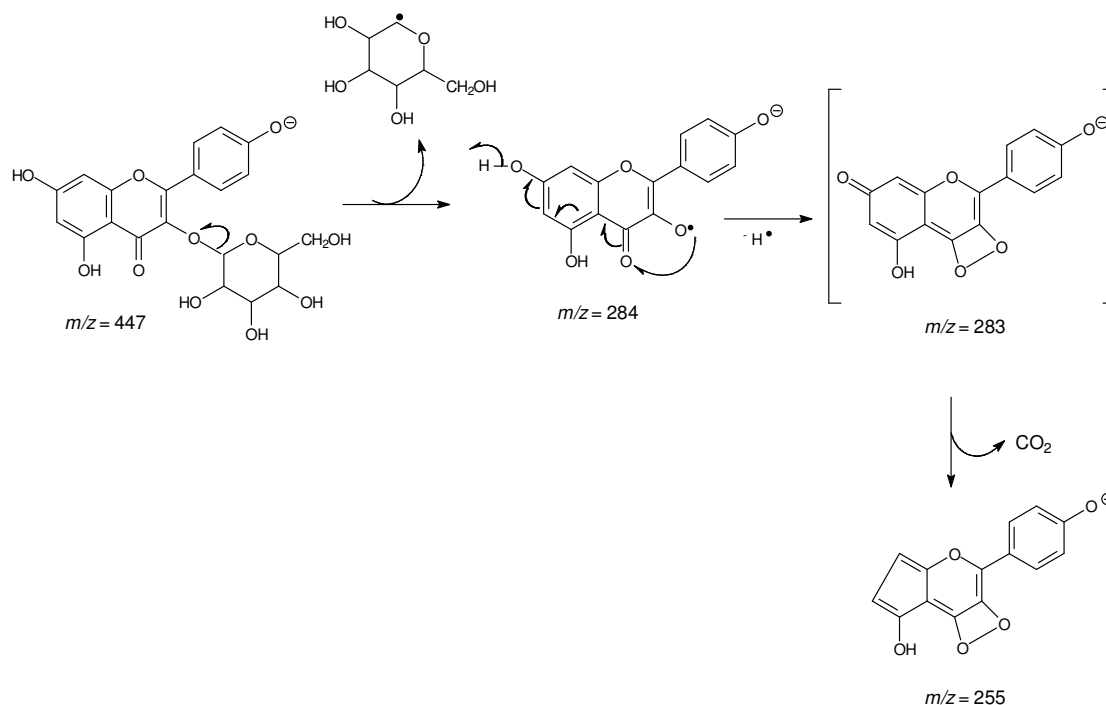


Figura 4.48: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular das substâncias **L17** ($t_r = 35,5$ min); b) **L18** ($t_r = 34,4$ min).



Esquema 4.3: Proposta de fragmentação para o composto **L14** e **L15**.

Tabela 4.16: Dados de RMN de ^1H de **L14**, **L15** e **L16** e comparação com a literatura

H/C	L14 [§]	LE GALL <i>et al.</i> , 2003	L15 [§]	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003	L16 [§]	CORREIA <i>et al.</i> , 2008
		CD ₃ OD (300,0 MHz)		CD ₃ OD (300,0 MHz)		CD ₃ OD (300,0 MHz)
6	6,11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,17 (<i>sl</i>)
8	6,28 (<i>sl</i>)	6,43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,28 (<i>sl</i>)	6,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,34 <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,34 (<i>sl</i>)
2'/6'	8,06 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	8,09 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	8,04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	8,05 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	7,78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,75 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)
3'/5'	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)
1''	5,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)	5,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	5,04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	5,12 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	5,36 (<i>sl</i>)	5,36 (<i>sl</i>)
2''	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,41 (<i>m</i>)	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,43 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,8 e 7,3 Hz)	4,24 (<i>m</i>)	4,23 (<i>m</i>)
3''	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,40 (<i>m</i>)	3,40 – 3,55 (<i>m</i>)	3,40	3,70 (<i>m</i>)	3,73 (<i>m</i>)
4''	3,65 (<i>m</i>)	3,22 (<i>t</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	3,40 (<i>m</i>)	3,24 (<i>m</i>)	3,40-3,50 (<i>m</i>)	3,41 (<i>m</i>)
5''	3,40-3,55 (<i>m</i>)	3,32 (<i>m</i>)	3,60 (<i>m</i>)	3,32 (<i>m</i>)	3,30-3,40 (<i>m</i>)	3,37 (<i>m</i>)
6'' _A	3,80 (<i>m</i>)	3,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	3,90 (<i>m</i>)	3,80 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0 e 1,0 Hz)	0,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	0,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1 Hz)
6'' _B	3,45 (<i>m</i>)	3,36 (<i>m</i>)	3,30 (<i>m</i>)	3,37 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0 e 6,0 Hz)		

[§] CD₃OD (400,0 MHz)

Tabela 4.17: Dados de RMN de ^{13}C de **L14**, **L15** e **L16** e comparação com a literatura

C	L14 ^s	LE GALL <i>et al.</i> , 2003	L15 ^s	KAZUMA <i>et al.</i> , 2003	L16 ^s	CORREIA <i>et al.</i> , 2008
		CD ₃ OD (75,0 MHz)		CD ₃ OD (75,0 MHz)		CD ₃ OD (75,0 MHz)
6	102,0	104,4	102,0	99,9	101,6	100,1
8	96,0	98,8	96,0	94,9	95,3	94,9
2`/6`	132,0	130,6	132,0	132,4	131,5	131,8
3`/5`	116,0	118,0	116,0	116,0	115,8	116,5
1"	105,0	103,9	101,0	100,3	103,8	103,5
2"	75,0	75,7	75,0	75,8	72,0	73,2
3"	78,0	78,0	78,0	78,1	73,5	72,1
4"	73,0	71,6	73,0	71,5	72,6	72,0
5"	78,0	77,2	78,0	77,2	72,0	71,9
6" _A	69,0	68,2	62,0	62,0	15,6	17,6

^s CD₃OD (100,0 MHz)

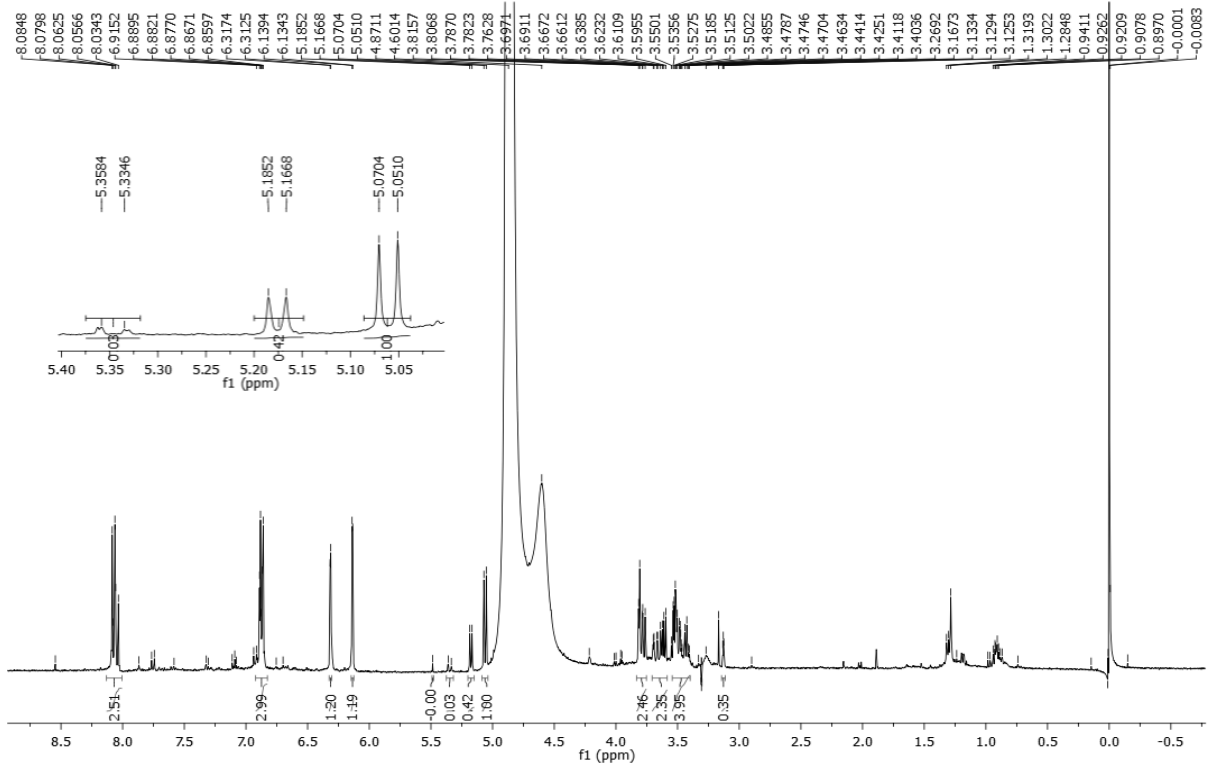


Figura 4.49: Espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides (AHFE-F4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD_3OD).

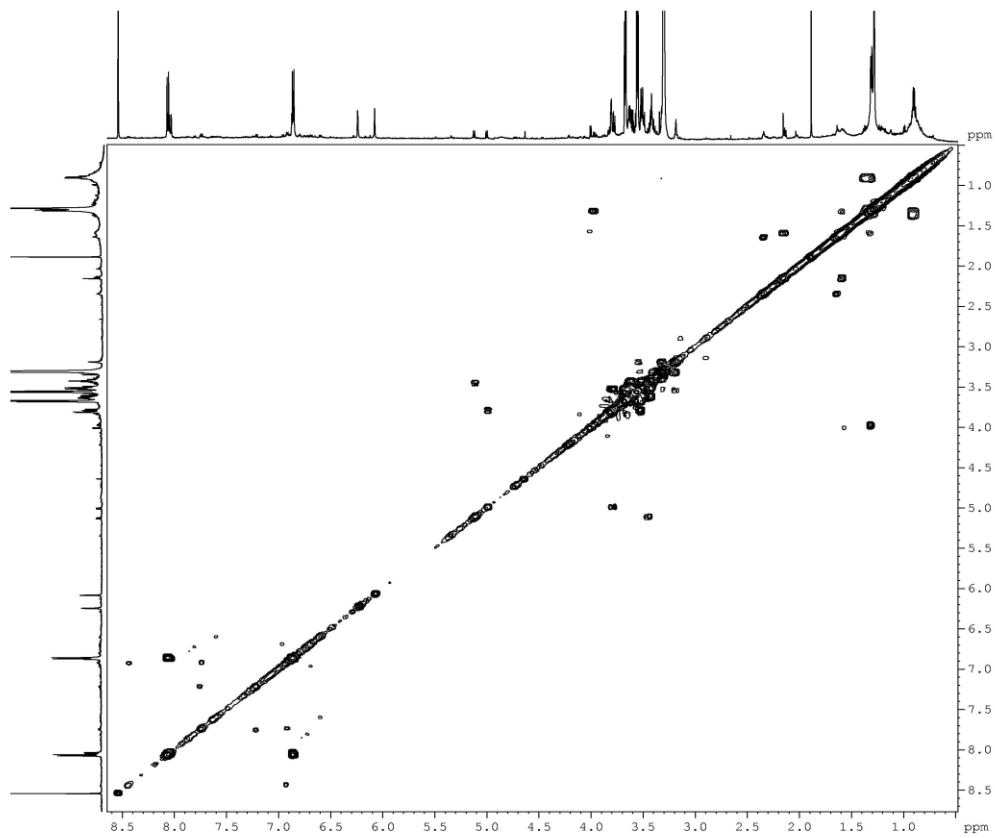


Figura 4.50: Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD_3OD).

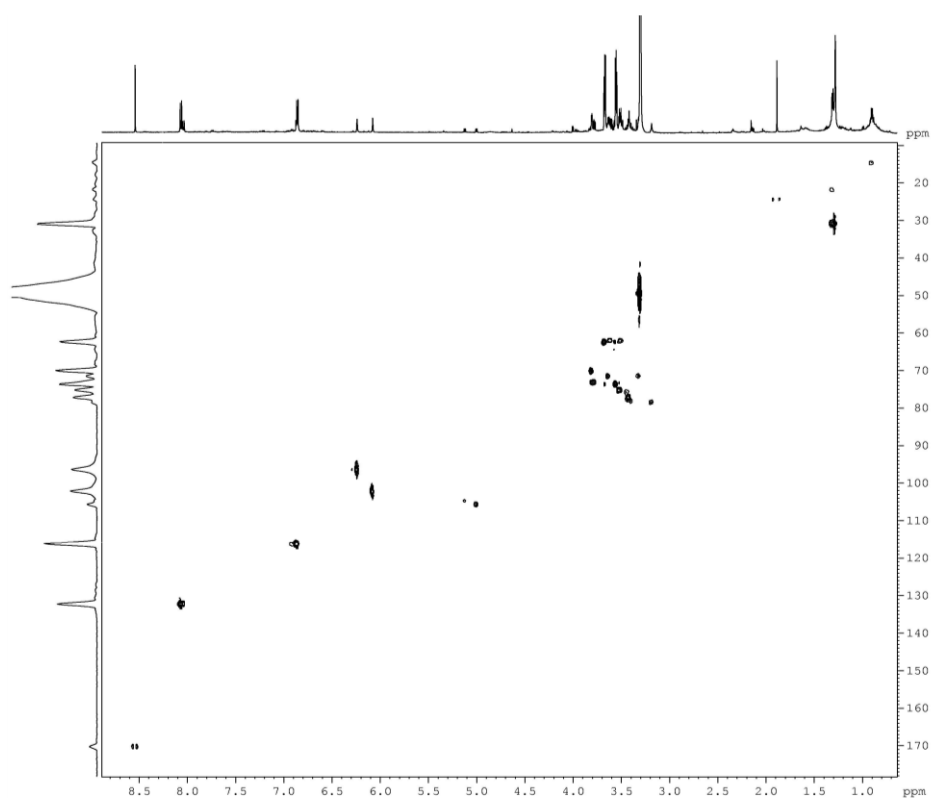


Figura 4.51: Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD₃OD).

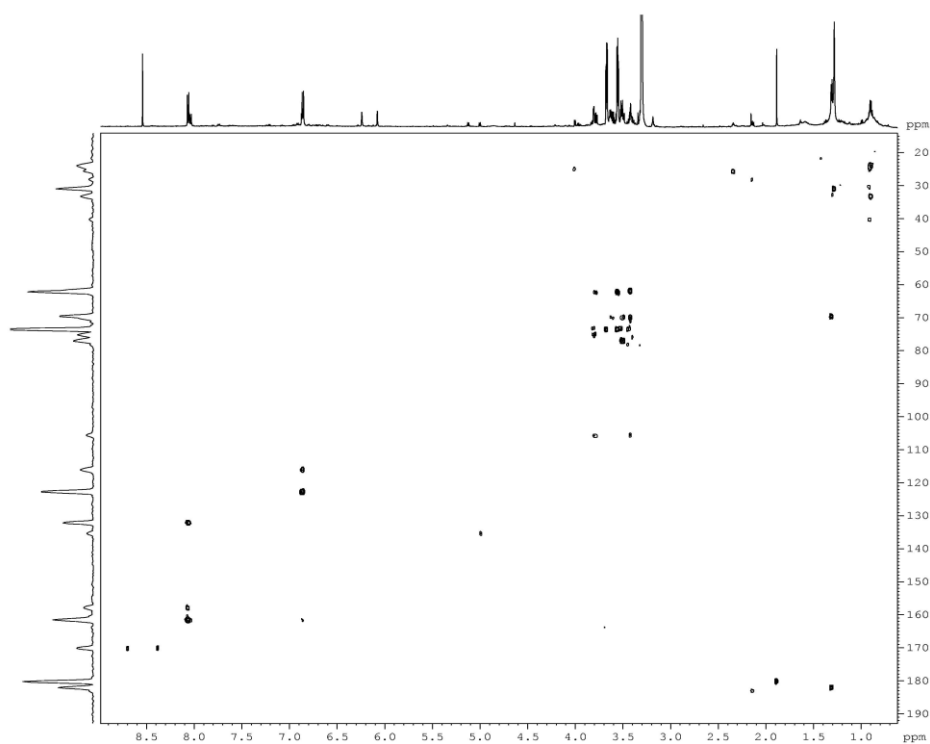


Figura 4.52: Mapa de correlações HMBC do conjunto de flavonoides (AHFE-4): L9, L14 e L15 (400 MHz, CD₃OD).

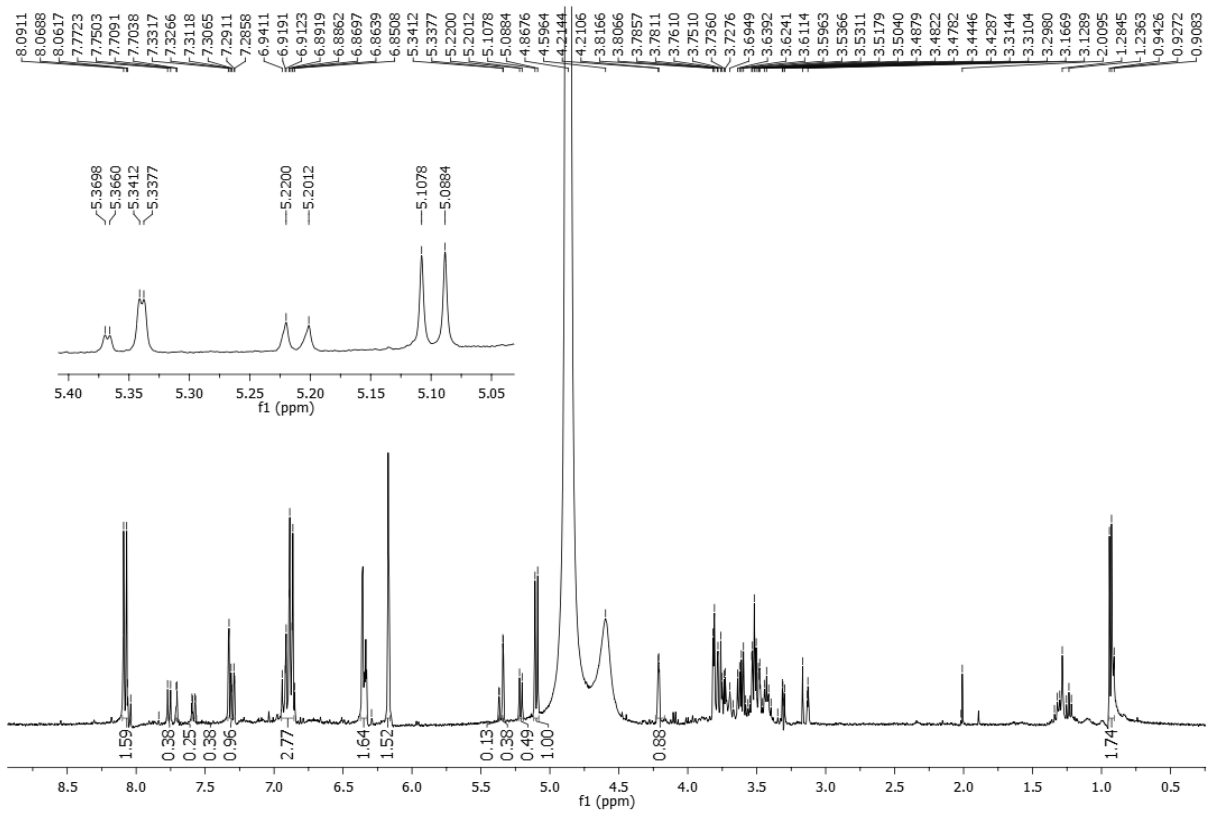


Figura 4.53: Espectro de RMN de ¹H do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

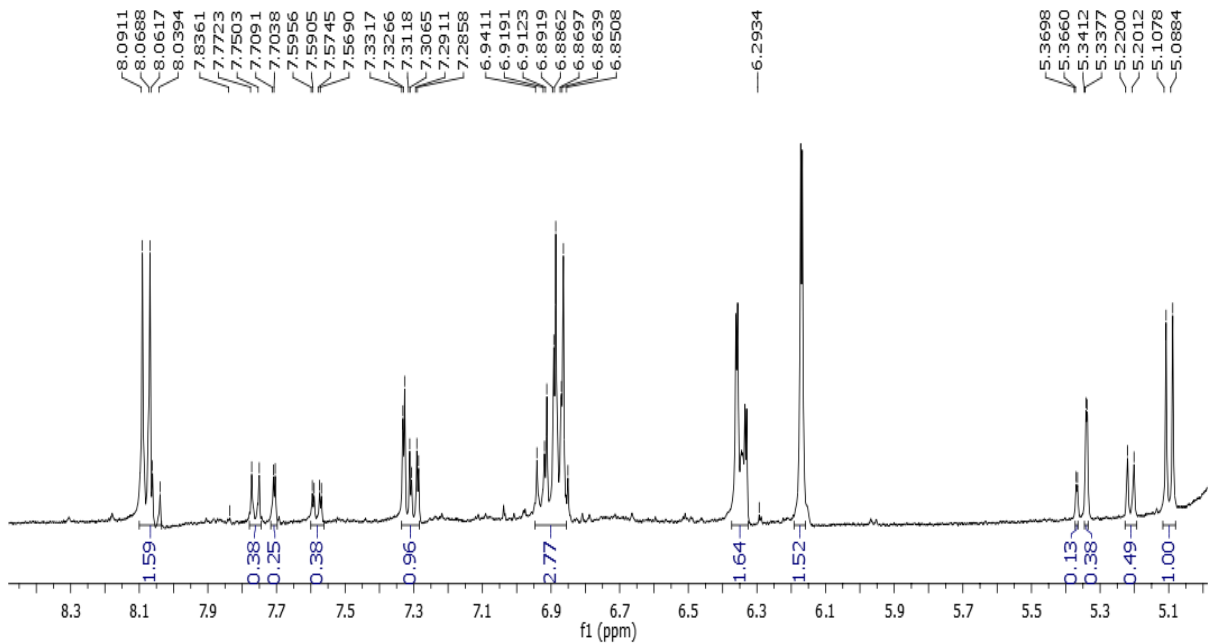


Figura 4.54: Ampliação do espectro de RMN de ¹H do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

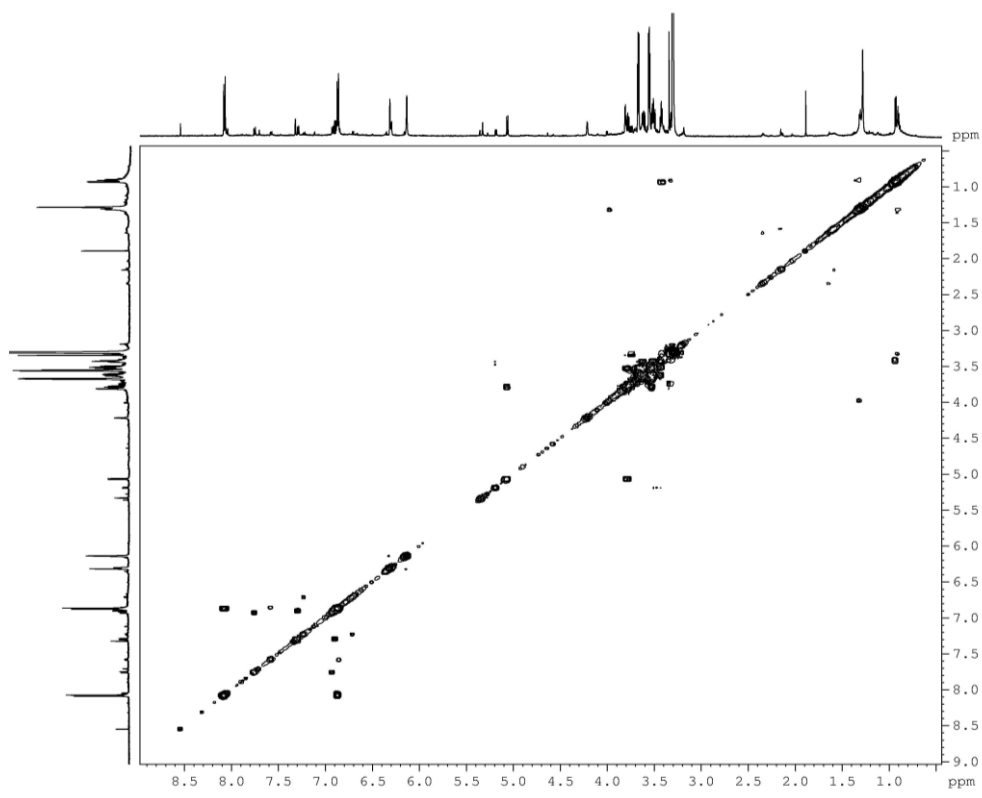


Figura 4.55: Espectro de Cosy do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

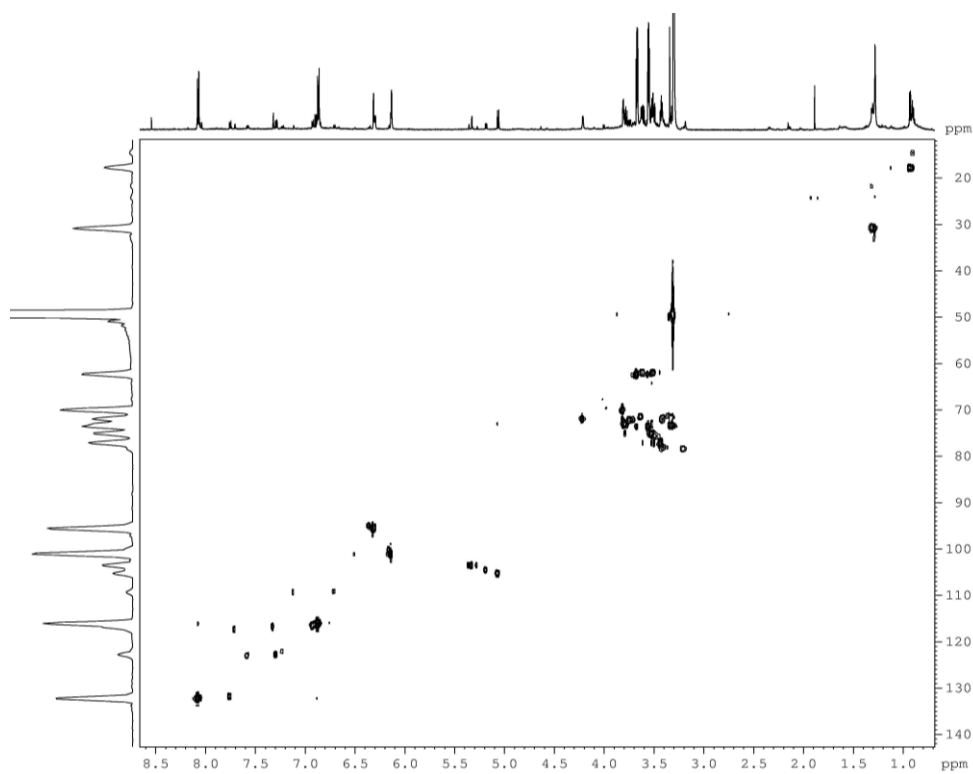


Figura 4.56: Mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

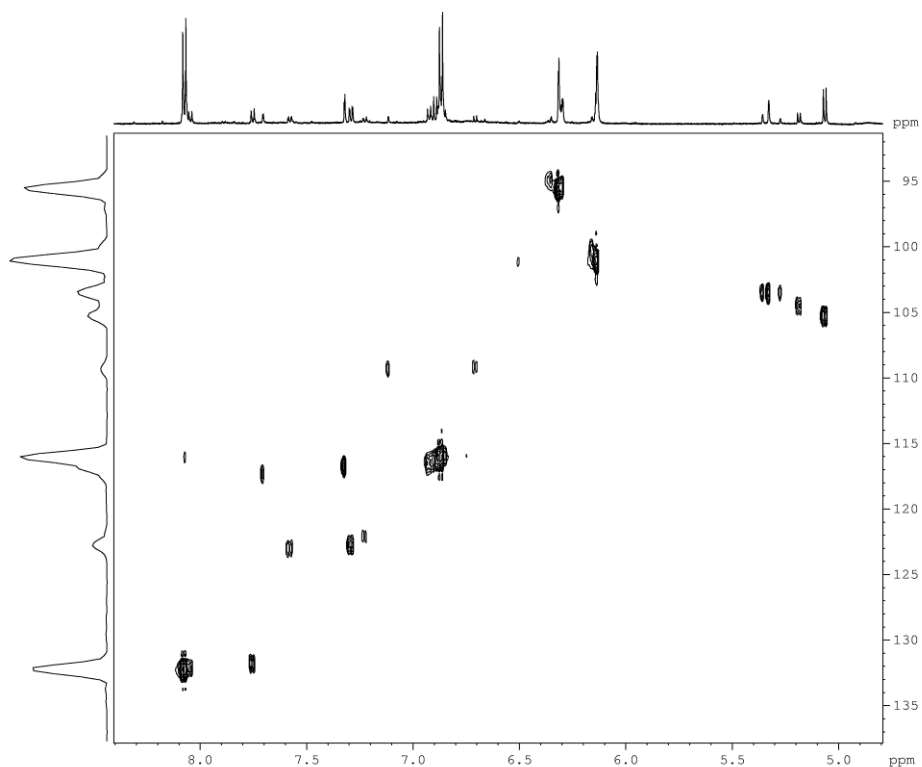


Figura 4.57: Ampliação do mapa de correlações HSQC do conjunto de flavonoides (AHFE-5): L9, L10, L15, L16 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

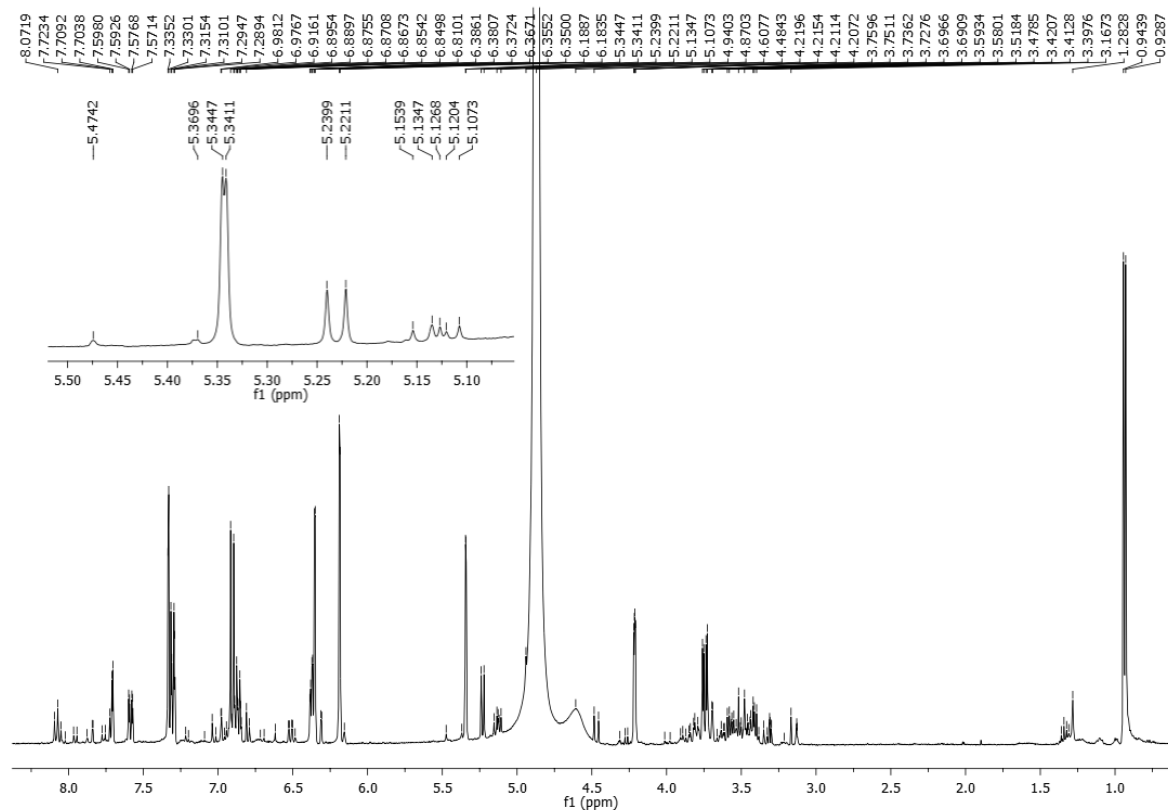


Figura 4.58: Espectro de RMN de ¹H do conjunto de flavonoides (AHFE-6): L9, L10, L15, L16, L17, L18 e L19 (400 MHz, CD₃OD).

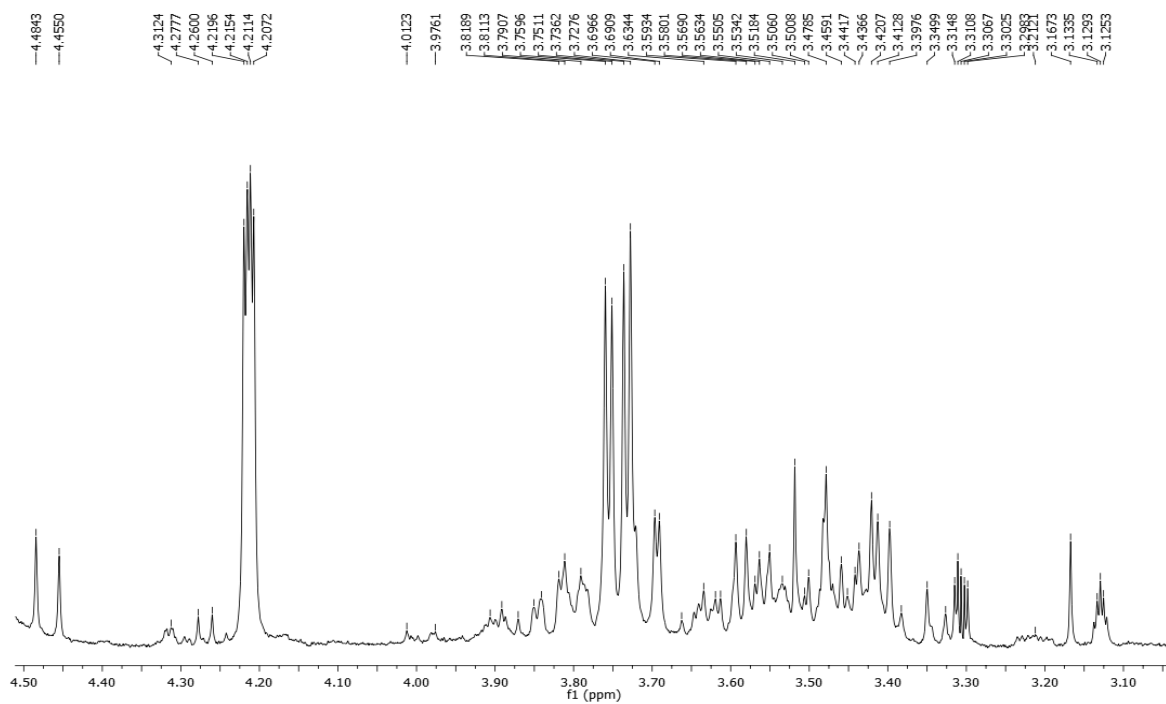
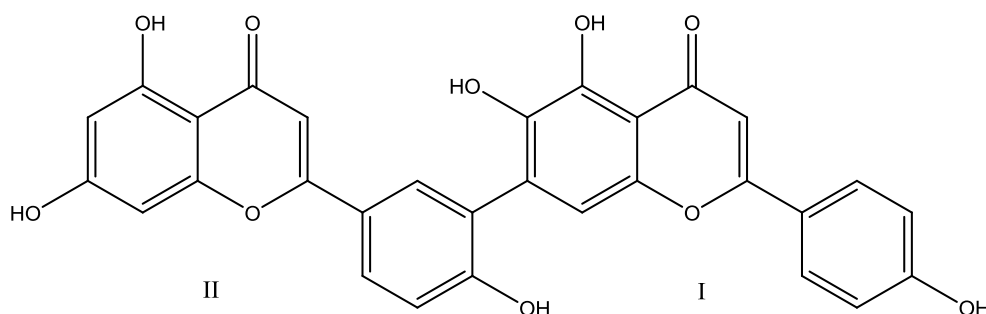


Figura 4.59: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do conjunto de flavonoides (AHFE-6): L9, L10, L15, L16, L17, L18 e L19 (400 MHz, CD_3OD).

4.4 Identificação estrutural dos Biflavonoides

4.4.1 Identificação estrutural do biflavonoide (B1)



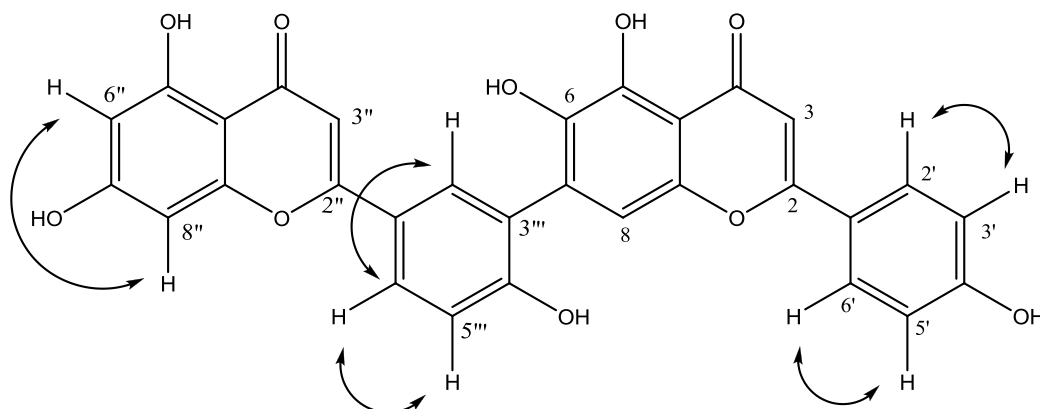
O biflavonóide 3''-[(4'-hidroxifenil)-5,6-dihidroxi-4-oxo-4*H*-1-benzopiran-7-il]-5'',7''-dihidroxi-2''-(4'''-hidroxifenil)-4''*H*-1''-benzopiran-4-ona (**B1**) foi isolado do extrato etanólico das folhas de *A. humile*. A sua identificação foi realizada através dos dados de RMN de ^1H e bidimensionais e por comparação com os dados da literatura do biflavonóide robustaflavona (LIN *et al.*, 1997; MARKHAM, *et al.*, 1987).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.60, Tabela 4.18), observou-se dois dubletos em δ 7,69 ($J = 8,7$ Hz, 2H) e δ 6,50 ($J = 8,7$ Hz, 2H) correspondentes aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' do anel B, referente à unidade I, respectivamente. As correlações entre os hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' foram observadas através do mapa de correlações Cosy ^1H - ^1H (Figura 4.61).

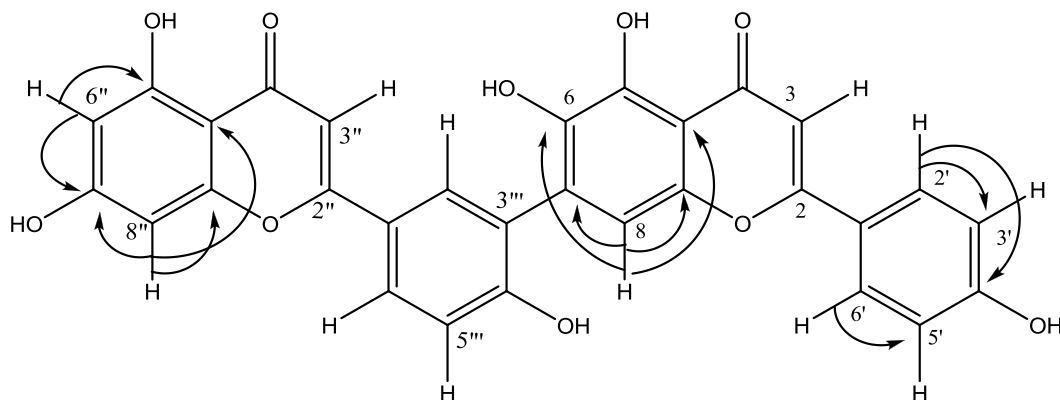
Os sinais em δ 8,32 (d , $J = 2,5$ Hz, 1H), δ 6,82 (d , $J = 8,5$ Hz, 1H) e δ 7,84 (dd , $J = 8,5$ e 2,5 Hz, 1H) correspondentes aos hidrogênios H-2''', H-5''' e H-6''', respectivamente, apresentaram correlações no espectro de Cosy ^1H - ^1H (Figura 4.61), sendo esses, característicos da dissubstituição do anel B da unidade II. Os dubletos em δ 6,13 ($J = 2,1$, 1H) e δ 6,24 ($J = 2,1$; 1H) com constantes de acoplamento que mantém a relação meta de substituição, foram atribuídos aos hidrogênios H-6'' e H-8'' (unidade II), respectivamente.

Os singletos em δ 6,65 e δ 6,74 integrando para um hidrogênio cada, não apresentaram correlações no espectro de Cosy, e após análise junto ao mapa

de correlações HMBC, foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-3'' do anel C, típicos de flavonas.

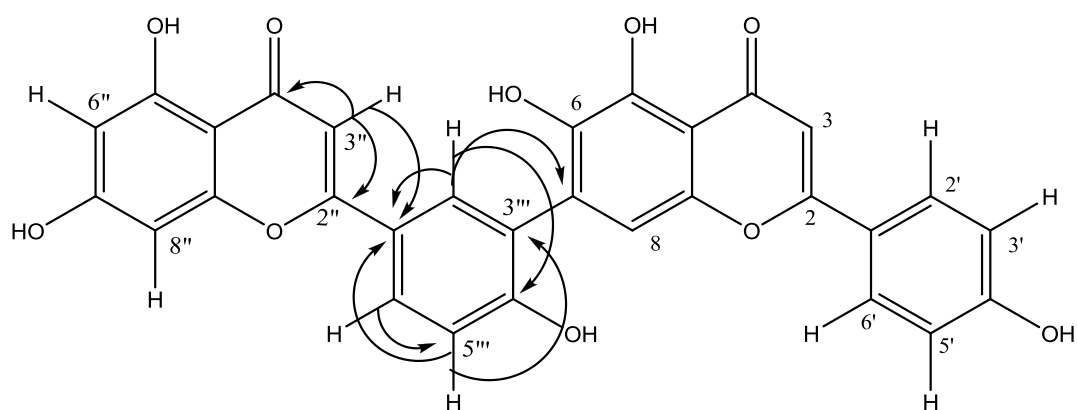


A presença do sinal em 5,92 (s, 1H) correspondente ao H-8, e a ausência de um sinal que poderia caracterizar a presença de um hidrogênio aromático na posição C-6, juntamente com as correlações observadas através do mapa de correlações do HMBC (Figura 4.62 e 4.63), entre o sinal do próton em 5,92 (s, 1H) com os sinais em δ 172,0 (C-6), δ 107,5 (C-7), δ 102,0 (C-10) e δ 160,7 (C-9), auxiliaram na caracterização do padrão de substituição do anel A da unidade I.



Através do mapa de correlações HMBC, foram observadas também as correlações do hidrogênio H-2''' (δ 8,32) com os sinais em δ 107,5 (C-7), δ 126,8 (C-3''') e δ 165,0 (C-4'''), de H-5''' (δ 6,82) com os sinais em δ 117,5 (C-1'''), δ 124,0 (C-3''') e δ 165,0 (C-4''') e do hidrogênio H-6''' (δ 7,84) com os sinais em δ 131,6 (C-2''') e δ 165,0 (C-4'''). A presença dos sinais em δ 124,0 (C-3'''), δ 172,0 (C-6) e δ 107,5 (C-7) mais desblindados em relação aos sinais observados em δ 115,8, δ 164,0 e δ

94,0 para os carbonos C-3', C-7'' e C-6'', respectivamente, as correlações dos protons ligados aos oxigênios fenólicos 5-OH e 5''-OH, respectivamente em δ 13,20 e 13,10 com os dos carbonos em δ 102,0 (C-10), 160,7 (C-5), 98,9 (C-6''), 103,7 (C-10'') e 161,7 (C-5'') juntamente com as correlações acima referidas, contribuíram para a identificação do padrão de substituição e de ligação entre as duas flavonas (I e II), que ocorre entre as posições C-7/C-3'', caracterizando assim, o biflavonoide 3''-[(4'-hidroxifenil)-5,6-dihidroxi-4-oxo-4*H*-1-benzopiran-7-il]-5'',7''-dihidroxi-2''-(4'''-hidroxifenil)-4''*H*-1''-benzopiran-4-ona (**B1**).



Todos os sinais de hidrogênios observados no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos e correlacionados aos seus respectivos carbonos através do mapa de correlações do HMBC (Figura 4.62 e 4.63; Tabela 4.19), sendo este, um biflavonoide novo na literatura. Os dados para este composto foram correlacionados aos dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura do biflavonoide robustaflavona.

Tabela 4.18: Dados de RMN de H de **B1** e comparação com a literatura.

H	B1	Robustaflavona
	400 MHz, DMSO- d_6	Lin <i>et al.</i> , 1997 400 MHz, DMSO- d_6
3	6,65 (s)	6,81 (s)
8	5,92 (s)	6,65 (s)
2'/6'	7,69 (<i>d</i> , J = 8,7 Hz)	7,99 (<i>d</i> , J = 8,9 Hz)
3'/5'	6,50 (<i>d</i> , J = 8,7 Hz)	6,96 (<i>d</i> , J = 8,9 Hz)

3''	6,74 (s)	6,84 (s)
6''	6,13 (<i>d</i> , J = 2,0 Hz)	6,20 (<i>d</i> , J = 2,0 Hz)
8''	6,24 (<i>d</i> , J = 2,0 Hz)	6,49 (<i>d</i> , J = 2,0 Hz)
2'''	8,32 (<i>d</i> , J = 2,5 Hz)	7,79 (<i>d</i> , J = 2,2 Hz)
5'''	6,82 (<i>d</i> , J = 8,5 Hz)	7,05 (<i>d</i> , J = 8,7 Hz)
6'''	7,84 (<i>dd</i> , J = 8,5 e 2,5 Hz)	7,93 (<i>dd</i> , J = 8,7 e 2,2 Hz)
5-OH	13,20 (s)	
5''-OH	13,10 (s)	

Tabela 4.19: Dados de RMN de ^{13}C de **B1** e comparação com a literatura

C	B1	Robustaflavona	C	B1	Robustaflavona
	100 MHz, DMSO- d_6	Lin <i>et al.</i> , 1997 100 MHz, DMSO- d_6		100 MHz, DMSO- d_6	Lin <i>et al.</i> , 1997 100 MHz, DMSO- d_6
2	165,0	164,1	2''	163,1	163,9
3	102,8	102,9	3''	102,3	102,9
4	181,7	181,7	4''	181,7	181,8
5	160,7	161,2	5''	161,7	159,6
6	172,0	108,9	6''	98,9	98,8
7	107,5	163,7	7''	164,4	162,1
8	--	93,4	8''	94,0	94,0
9	160,7	161,5	9''	157,6	157,5
10	102,0	103,6	10''	103,7	103,7
1'	122,2	121,1	1'''	117,5	120,9
2'	128,2	128,2	2'''	131,6	130,9
3'	115,7	116,0	3'''	124,0	120,8
4'	161,0	156,4	4'''	165,0	159,1
5'	115,7	116,0	5'''	---	116,1
6'	128,2	128,5	6'''	124,5	127,6

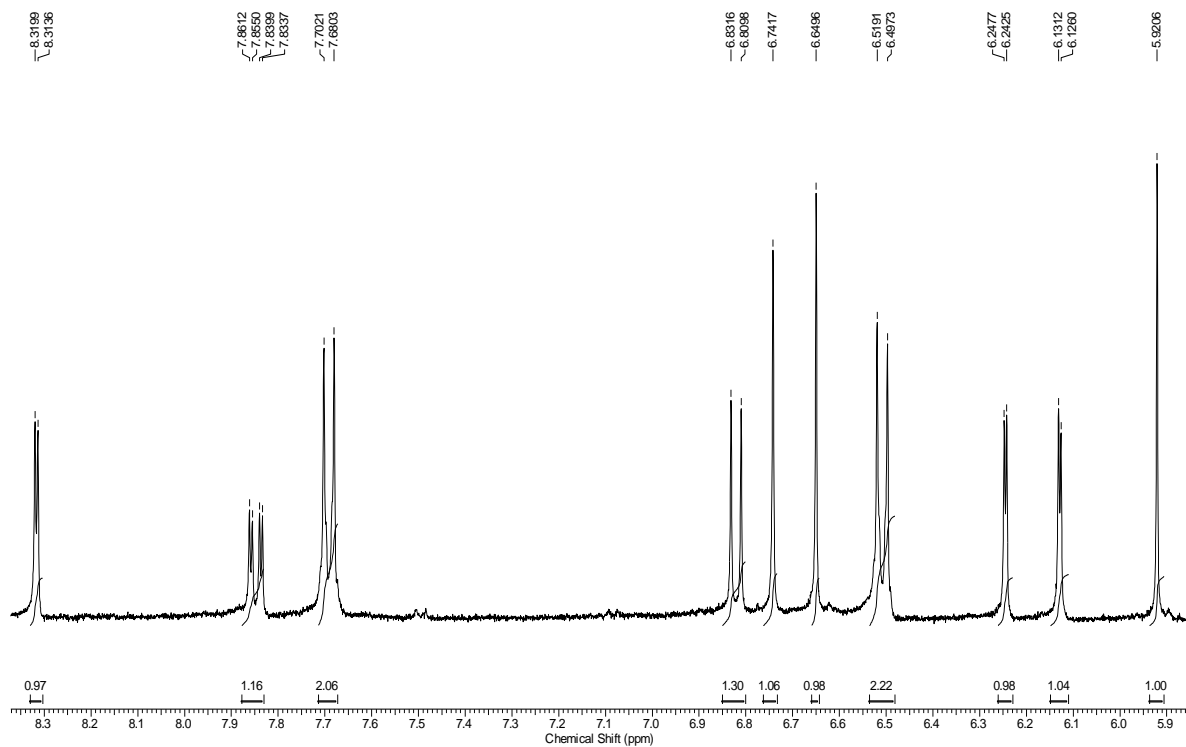


Figura 4.60: Espectro de RMN de ^1H de **B1** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

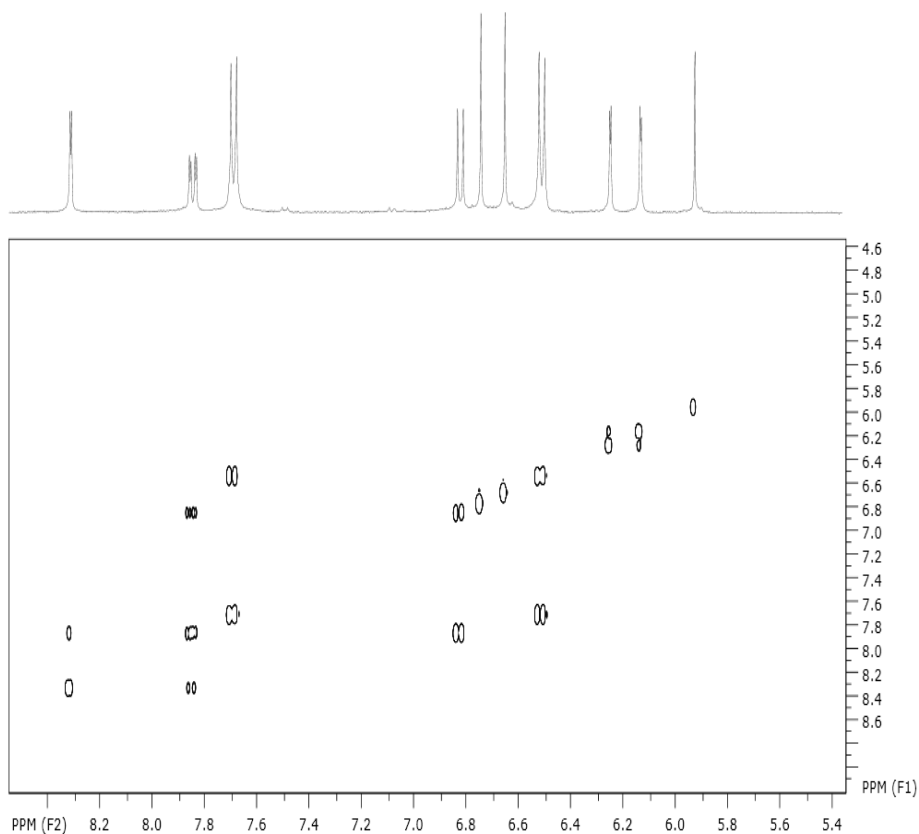


Figura 4.61: Espectro de Cosy de **B1** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

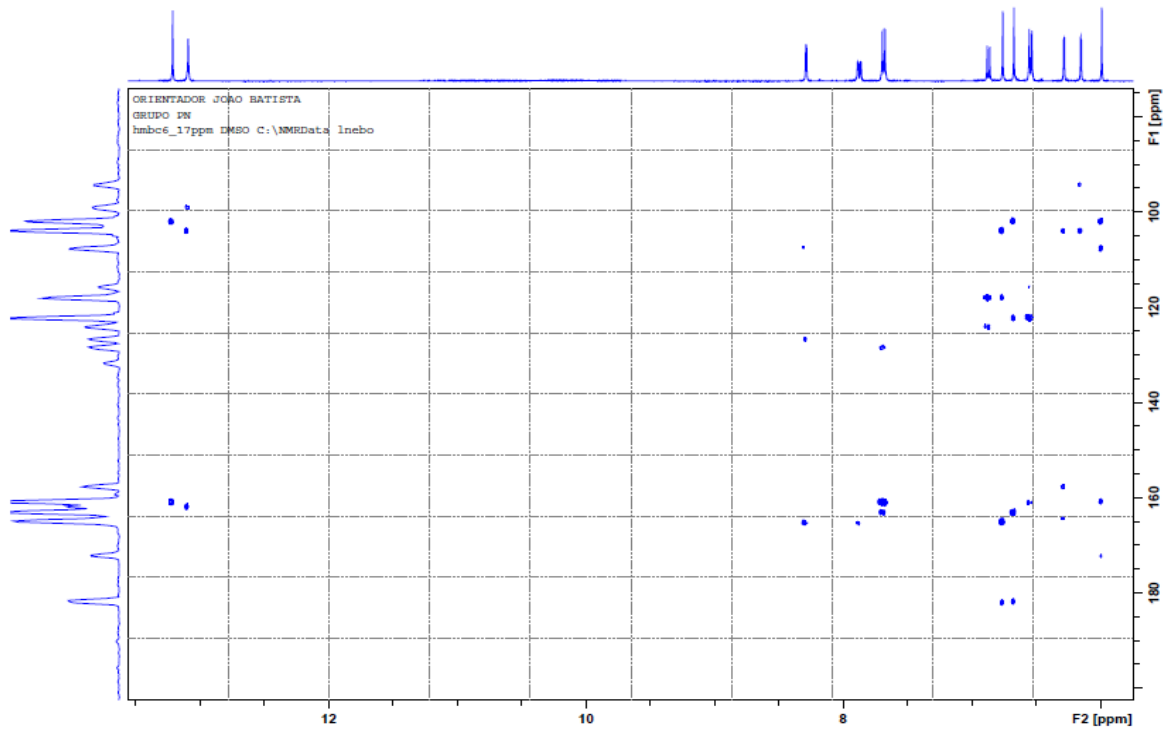


Figura 4.62: Mapa de correlações HMBC de **B1** (400 MHz, DMSO- d_6).

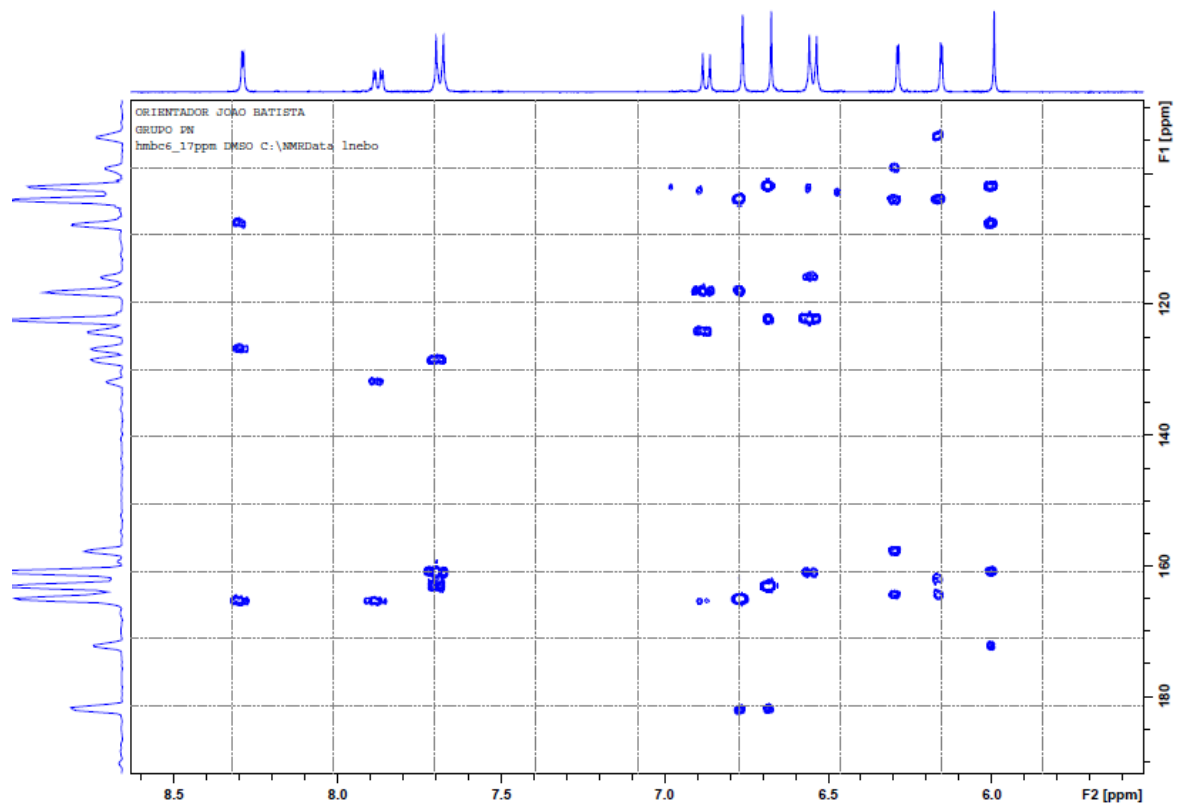


Figura 4.63: Ampliação do mapa de correlações HMBC de **B1** (400 MHz, DMSO- d_6).

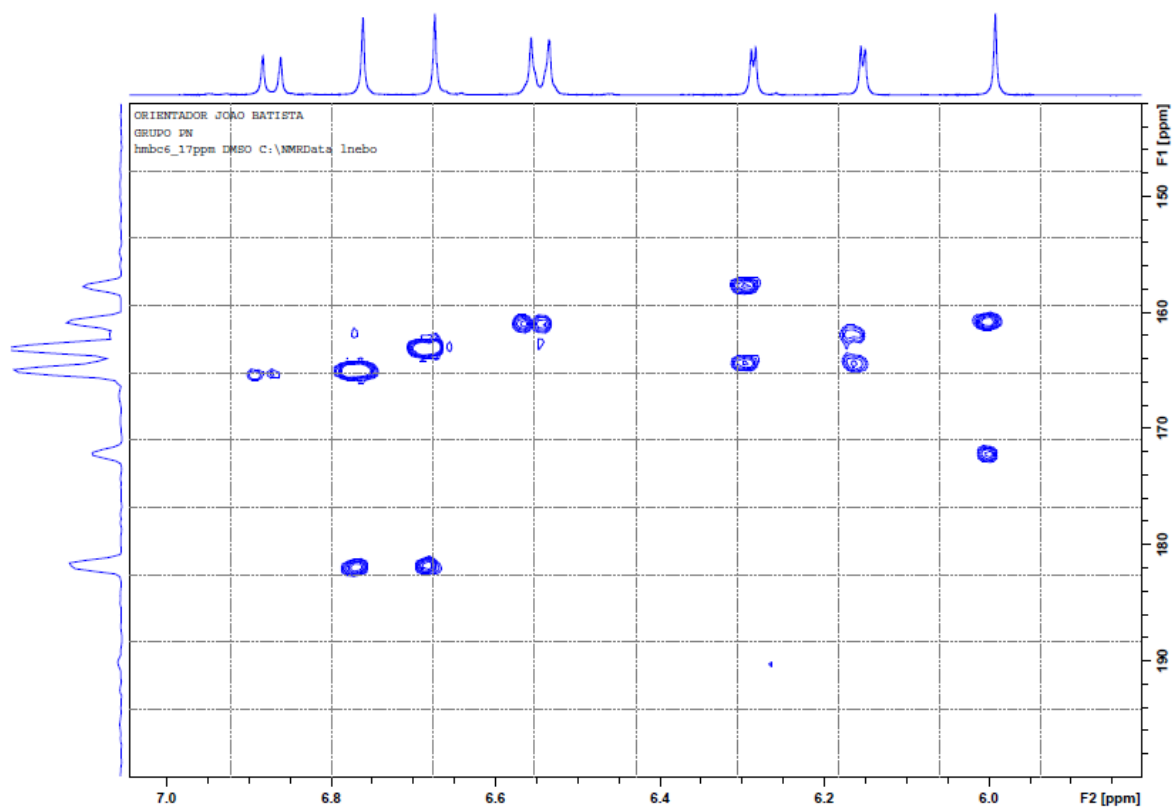
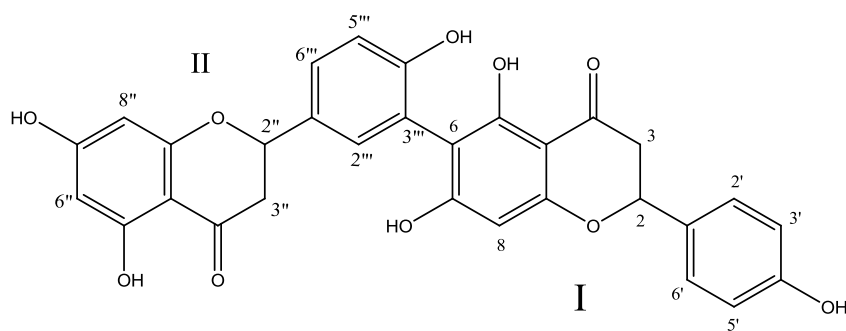


Figura 4.64: Ampliação do mapa de correlações HMBC de **B1** (400 MHz, DMSO- d_6).

4.4.1 Identificação Estrutural do biflavonoide Tetrahidrorobustaflavona (**B2**)



A biflavonóide tetrahidrorobustaflavona (**B2**) foi isolado através do fracionamento da partição diclorometânica do extrato metanólica dos frutos de *S. terebinthifolius*. A sua identificação foi realizada através de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparações com a literatura (KASSEM *et al.*, 2004).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.45 a 4.47, Tabela 4.16), observou-se dois dubletos em δ 7,18 ($J = 8,4$ Hz, 2H) e δ 6,71 ($J = 8,4$ Hz, 2H) correspondentes aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' do anel B, referente à unidade I, respectivamente. Os sinais em δ 6,88 (d , $J = 8,0$ Hz, 1H), δ 7,24 (d , $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ 7,26 (s , 1H), correspondentes aos hidrogênios H-5''', H-6''' e H-2''' , respectivamente, caracterizavam a dissubstituição do anel B da unidade II.

A presença do singleto em δ 6,03 integrando para um hidrogênio correspondente ao H-8, e a ausência de um sinal que poderia caracterizar a presença de um hidrogênio aromático na posição C-6, juntamente com os sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ 121,5 e δ 107,2, (Figura 4.65 a 4.68; Tabela 4.20 e 4.21), indicativos dos carbonos quaternários C-3''' e C-6, respectivamente, indicaram que a ligação entre as duas unidades (I e II) ocorria entre as posições C-6/C-3''' , caracterizando assim, o biflavonóide tetrahidrorobustaflavona (**B2**).

No espectro de RMN de ^1H foi observado também um multipletto integrando para dois hidrogênios em δ 5,31- 5,39 referente aos hidrogênios H-2 e H-2'' , já os sinais em δ 2,62-3,05 (m) foram associados aos hidrogênios H-3' e H-3'' (Figura 4.65). No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.68) foi observada a presença de vários sinais, dentre eles, dois deles localizados em δ 80,65 e δ 79,89 característicos dos carbonos C-2/C-2'' , enquanto os outros dois sinais observados em δ 43,68 e δ 44,27 correspondentes ao C-3/C-3'' . Já os carbonos C-4/C-4'' foram atribuídos aos carbonos δ 197,9 e δ 198,3. As demais atribuições estão de acordo com os dados da literatura para o composto **B2** (KASSEM *et al.*, 2004).

Tabela 4.20: Dados de RMN de ^1H de **B2** e comparação com a literatura

H	B2	KASSEM <i>et al</i> , 2004
	(400 MHz, CD_3OD)	(200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
2	5,31 – 5,39 (<i>m</i>)	5,40 (<i>q</i> , J= 4,12 Hz)
3	2,60 - 3,05 (<i>m</i>)	2,80 -3,10 (<i>m</i>)
8	6,03 (<i>s</i>)	6,10 (<i>s</i>)
2'/6'	7,18 (<i>d</i> , J= 8,4 Hz)	7,20 (<i>m</i>)
3'/5'	6,71 (<i>d</i> , J =8,4 Hz)	6,70 (<i>d</i> , J= 8,5 Hz)
3''	2,60 - 3,05 (<i>m</i>)	2,80-3,10(<i>m</i>)
6''	5,89 (<i>d</i> , J= 2,0 Hz)	5,85(<i>s</i>)
8''	5,87 (<i>d</i> , J = 2,0 Hz)	5,85(<i>s</i>)
2'''	7,26 (<i>s</i>)	7,20 (<i>m</i>)
5'''	6,88 (<i>d</i> , J= 8,0 Hz)	6,80 (<i>d</i> , J= 8,5 Hz)
6'''	7,24 (<i>d</i> , J= 8,0 Hz)	7,20 (<i>m</i>)

Tabela 4.21: Dados de RMN de ^{13}C de **B2** e comparação com a literatura

C	B2		C	B2	
	100 MHZ, CD ₃ OD	KASSEM et al, 2004 50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆		100 MHZ, CD ₃ OD	KASSEM et al, 2004 50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆
2	80,6	77,9	2''	79,9	78,7
3	43,8	41,5	3''	44,3	42,4
4	197,9	196,5	4''	198,3	196,9
5	164,6	160,2	5''	164,9	160,1
6	107,1	102,0	6''	97,0	95,6
7	165,5	164,7	7''	168,3	166,7
8	96,2	95,1	8''	97,0	95,9
9	162,0	160,1	9''	162,0	160,1
10	103,4	102,0	10''	103,4	101,8
1'	131,2	129,0	1'''	130,7	129,0
2'	128,0	127,2	2'''	128,6	128,0
3'	116,2	115,6	3'''	121,5	121,0
4'	162,0	160,1	4'''	158,6	157,7
5'	116,6	115,6	5'''	116,6	115,0
6'	132,5	131,5	6'''	128,6	128,0

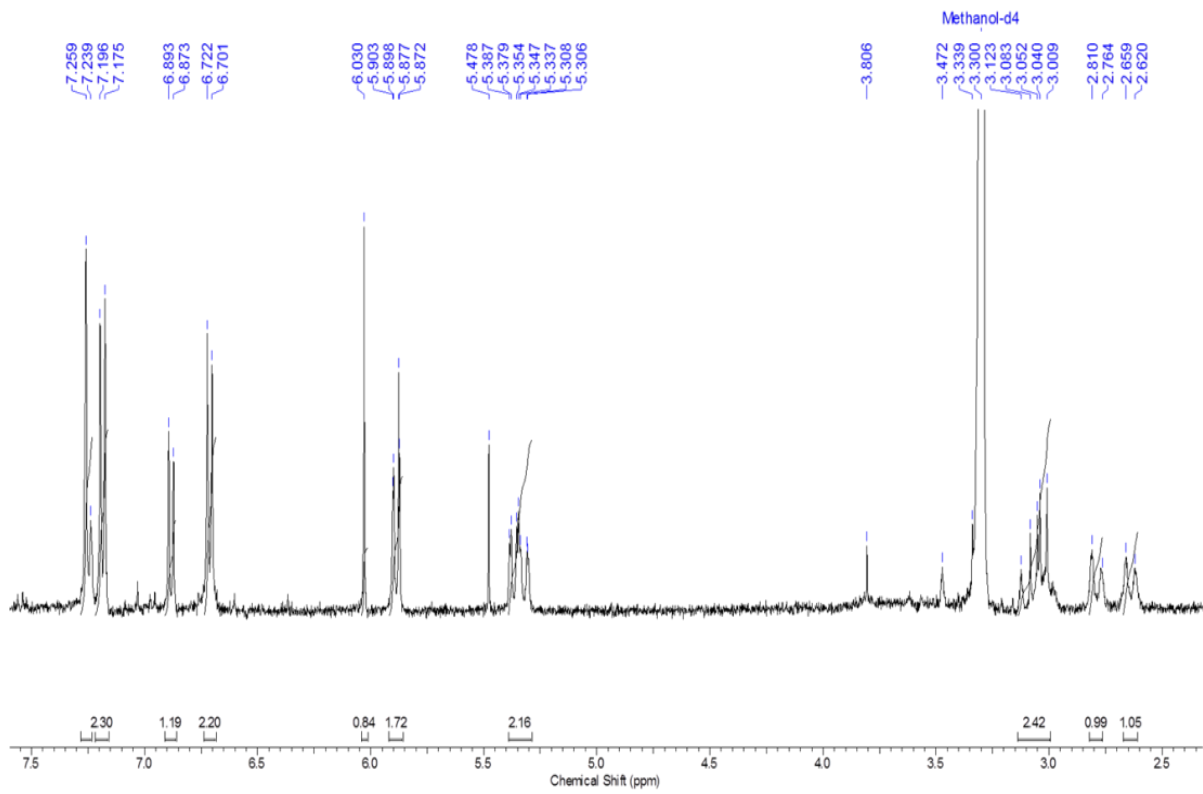


Figura 4.65: Espectro de RMN de ^1H de **B2** (400 MHz, CD_3OD).

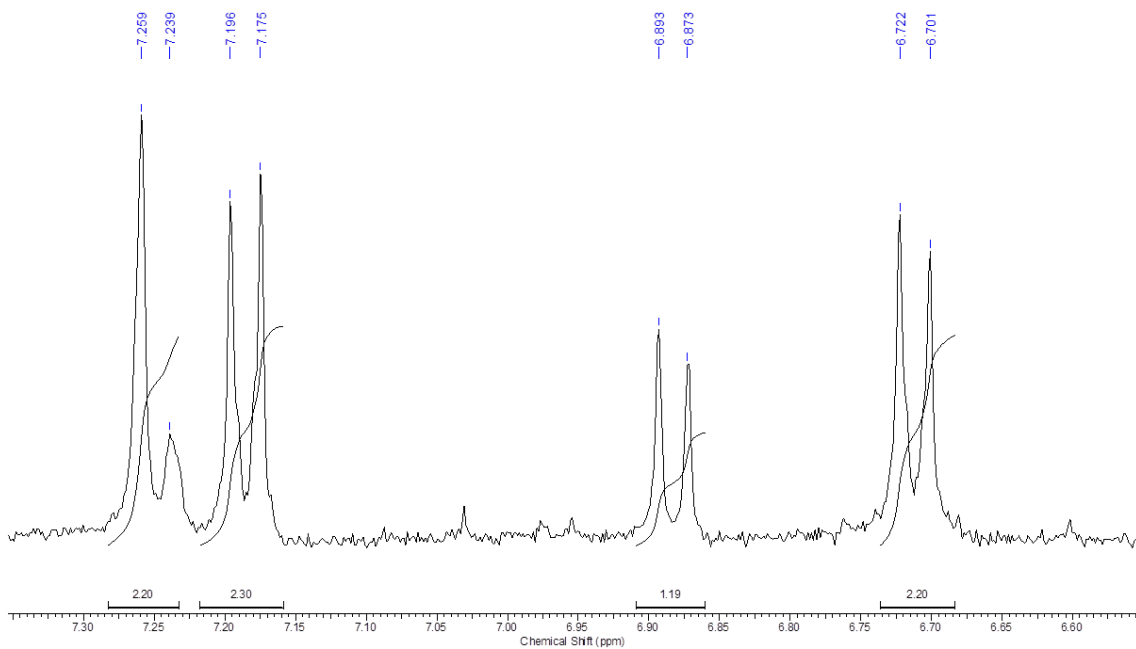


Figura 4.66: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **B2** (400 MHz, CD_3OD).

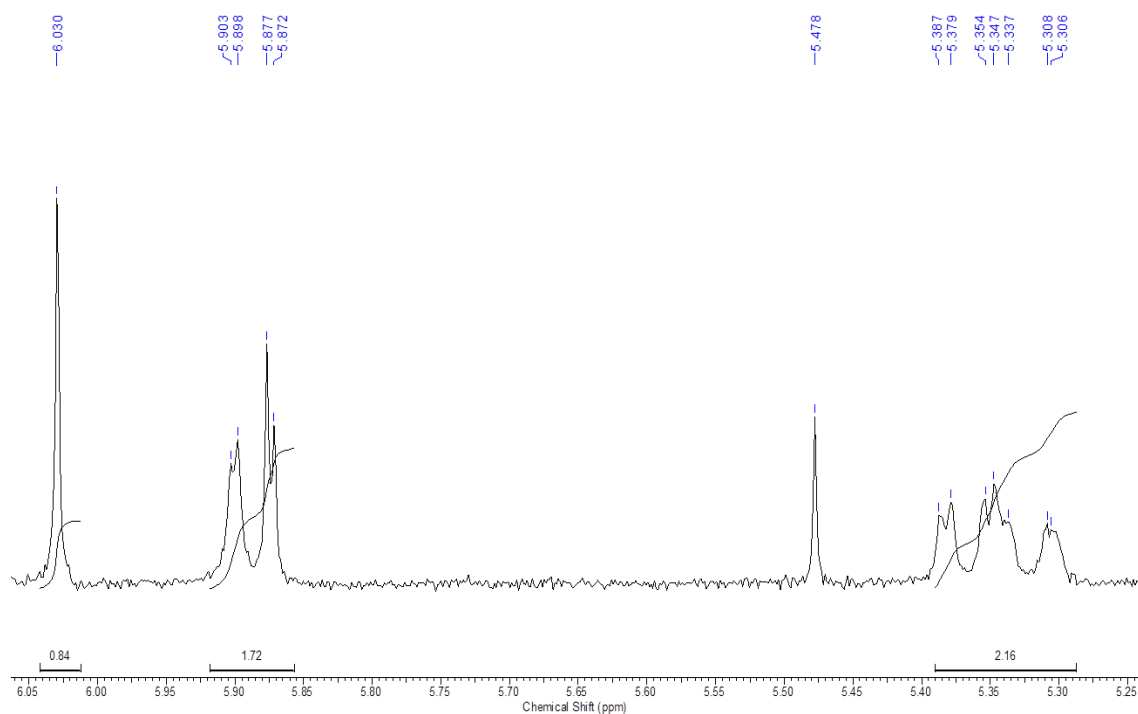


Figura 4.67: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **B2** (400 MHz, CD_3OD).

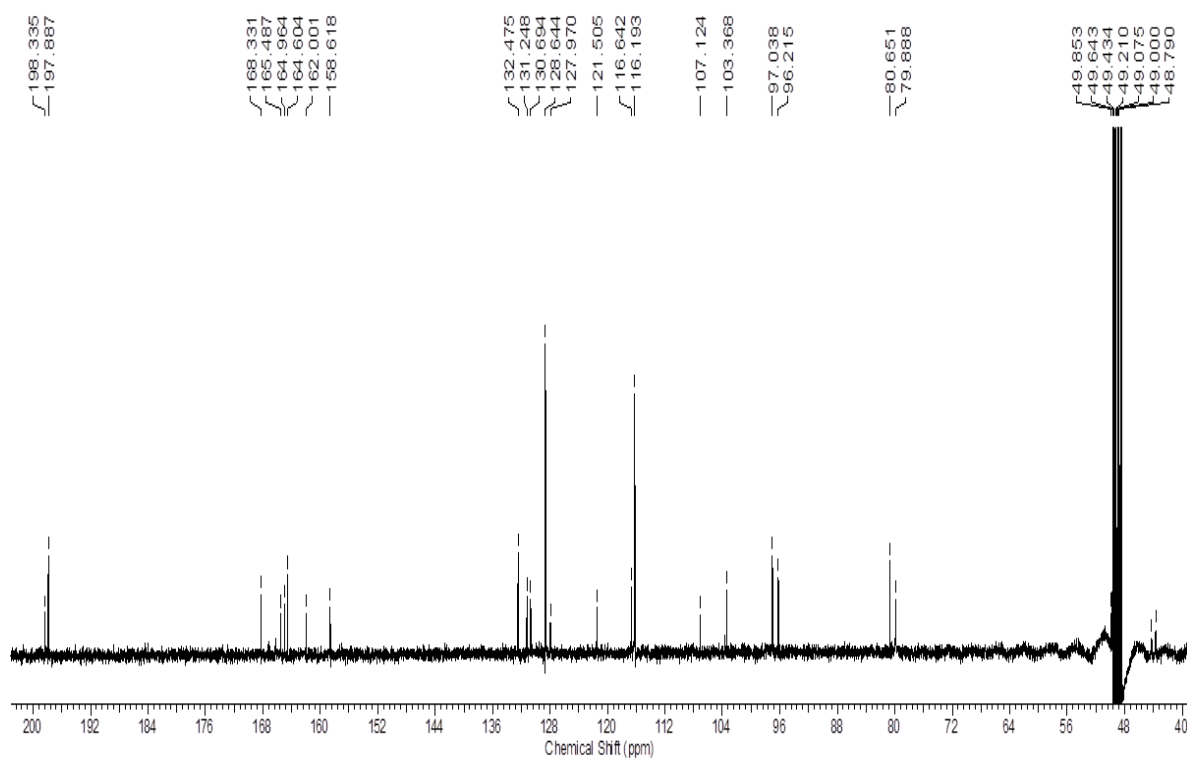
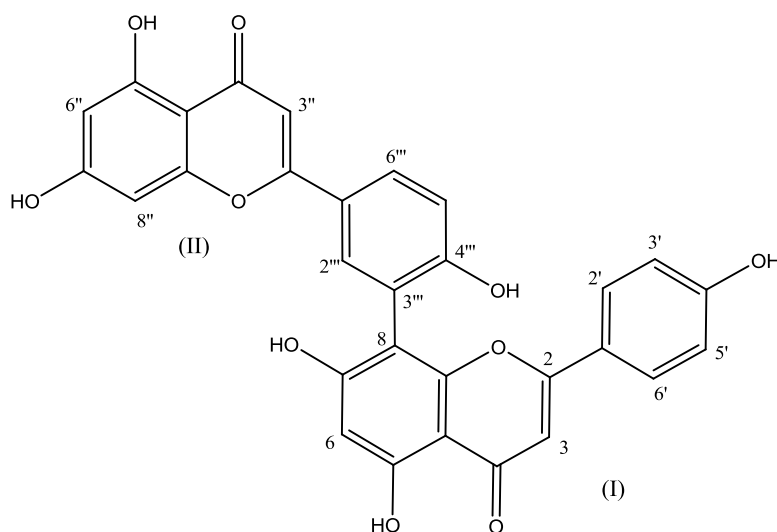


Figura 4.68: Espectro de RMN de ^{13}C de **B2** (100 MHz, CD_3OD).

4.4.2 Identificação Estrutural do biflavonóide Amentoflavona (B3)



O biflavonoide amentoflavona foi isolado do extrato etanólico das folhas de *Anacardium humile*. Esta substância foi identificada através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com a literatura (SANNOMIYA *et al.*, 2004).

Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.69 e 4.70; Tabela 4.22) de **B3** foi inicialmente observada a presença de dois singletos em δ 6,78 (1H) e δ 6,82 (1H) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-3'' do anel C (Unidade I e II), característicos de flavonas; dois dubletos em δ 6,72 ($J = 8,6$ Hz, 2H) e δ 7,56 ($J = 8,6$ Hz; 2H) correspondentes aos hidrogênios H-3'/5' e H-2'/6' do anel B, referente a unidade I, respectivamente. Os sinais em δ 7,15 (d , $J = 8,6$ Hz, 1H), δ 8,00 (dd , $J = 8,6$ e 2,4 Hz; 1H) e δ 7,98 (d , $J = 2,6$ Hz, 1H) caracterizavam a dissubstituição do anel B da unidade II. A presença de um singlete em δ 6,41 integrando para um hidrogênio, correspondente ao H-6 e a ausência do sinal que poderia indicar a presença de um hidrogênio aromático na posição C-8, juntamente com os sinais em δ 120,0 e δ 104,0 (Figura 4.71, Tabela 4.23) mais desblindados em relação aos sinais observados em δ 115,8 e δ 94,0 para os carbonos C-3' e C-8'', respectivamente, auxiliaram na identificação da ligação entre as duas flavonas (I e II), que ocorre entre as posições C-3'''/C-8, caracterizando assim, o biflavonóide amentoflavona (**B3**). As demais atribuições estão de acordo com os dados da literatura para o composto **B3** (SANNOMIYA *et al.*, 2004).

Tabela 4.22: Dados de RMN de ^1H de **B3** e comparação com a literatura.

H	B3 (400 MHz, DMSO- d_6)	SANNOMIYA <i>et al.</i>, 2004 (500 MHz, DMSO- d_6)
3	6,78 (s)	6,76 (s)
6	6,41 (s)	6,33 (s)
2'/6'	7,56 (d, J=8,6 Hz)	7,58 (d, J=8,5 Hz)
3'/5'	6,72 (d, J=8,6 Hz)	6,69 (d, J=8,5 Hz)
3''	6,82 (s)	6,81 (s)
6''	6,19 (d, J=2,6 Hz)	6,18 (d, J=2,5 Hz)
8''	6,46 (d, J=2,6 Hz)	6,43 (d, J=2,5 Hz)
2'''	7,98 (d, J=2,4 Hz)	7,98 (d, J=2,5 Hz)
5'''	8,00 (dd, J=8,6 e 2,4 Hz)	7,97 (dd, J=8,5 e 2,5 Hz)
6'''	7,15 (d, J=8,6 Hz)	7,09 (d, J=8,5 Hz)

Tabela 4.23: Dados de RMN de ^{13}C de **B3** e comparação com a literatura

C	B3 100 MHz, DMSO- d_6	SANNOMIYA et al., 2004 125 MHz, DMSO- d_6	C	B3 100 MHz, DMSO- d_6	SANNOMIYA et al., 2004 125 MHz, DMSO- d_6
2	163,75	163,2	2''	161,8	--
3	102,7	102,6	3''	103,0	102,9
4	182,2	182,0	4''	181,4	181,7
5	161,5	161,5	5''	163,9	163,7
6	98,6	98,9	6''	98,9	98,7
7	160,6	160,7	7''	164,2	164,1
8	104,0	104,0	8''	94,1	94,0
9	160,0	159,7	9''	160,6	--
10	103,7	103,7	10''	103,7	103,6
1'	121,3	121,4	1'''	121,4	--
2'	128,2	128,2	2'''	131,0	131,4
3'	115,8	115,8	3'''	120,0	120,0
4'	161,1	161,0	4'''	161,1	--
5'	115,8	115,8	5'''	116,3	116,3
6'	128,2	128,2	6'''	127,9	127,8

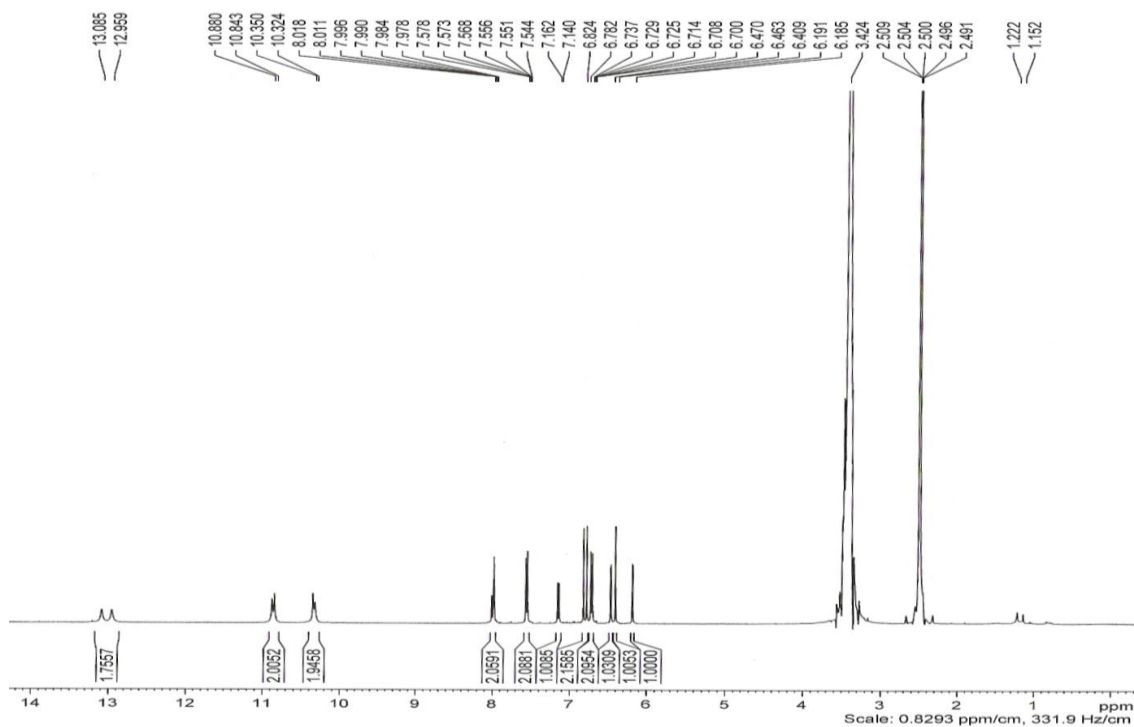


Figura 4.69: Espectro de RMN de ^1H de **B3** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

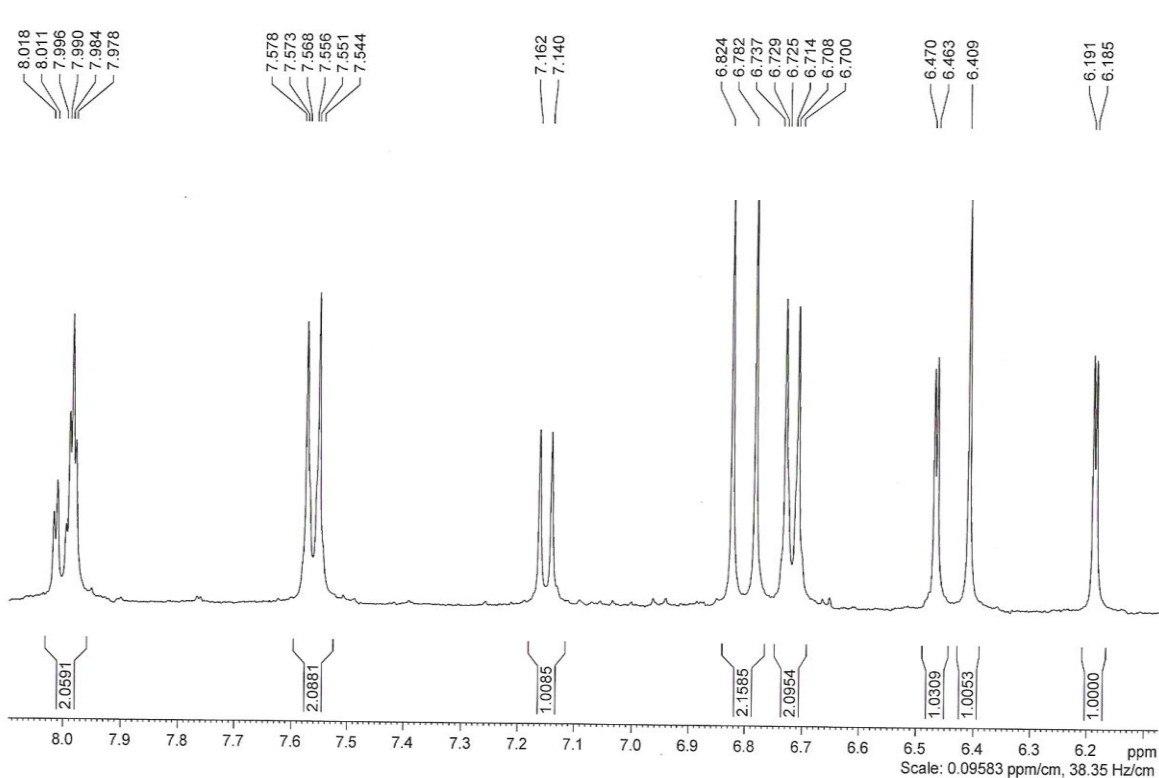


Figura 4.70: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **B3** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

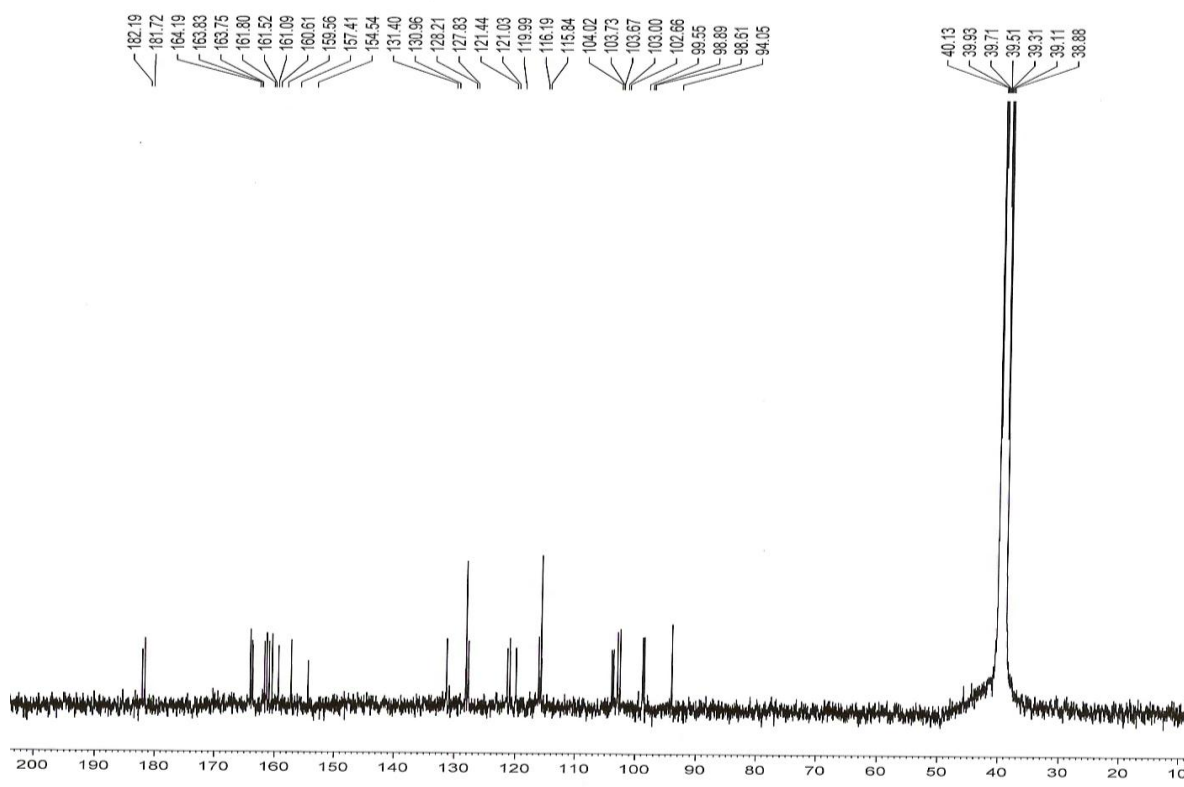
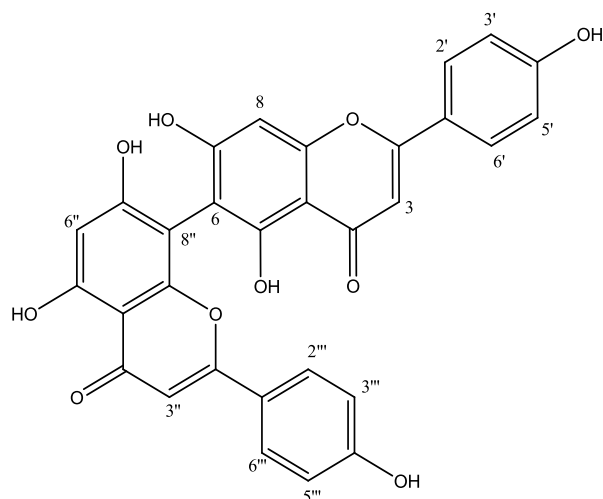


Figura 4.71: Espectro de RMN de ^{13}C de **B3** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

4.4.3 Identificação Estrutural do Biflavonóide Agatisflavona (**B4**)



O biflavonóide agatisflavona (**B4**) foi isolada através do fracionamento da partição acetato de etila do extrato metanólico dos frutos de *S. terebinthifolius*. Esta substância foi identificada através de RMN de ^1H e HSQC e por comparação com a literatura (CARVALHO et al., 2008; SVENNINGSEN, 2006).

Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figura 4.72, Tabela 4.24) de **B4**, foi observada a presença de dois singletos em δ 6,64 (1H) e δ 6,57 (1H) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-3'' do anel C, característicos de flavonas; dois dubletos em δ 6,93 (J = 9,0 Hz, 2H) e δ 7,88 (J = 9,0 Hz; 2H) correspondentes aos H-3'/5' e H-2'/6', respectivamente, e dois dubletos em δ 6,73 (J=9,0 Hz; 2H) e δ 7,53 (J = 9,0 Hz, 2H) atribuídos aos H-3'''/5''' e H-2'''/6''' do anel B (Figura 4.72).

Foi observado também um sinal em δ 6,36 (s, 1H) correspondente ao H-6'' porém não observado nenhum sinal para H-8'', mostrando assim que a ligação entre as flavonas ocorria entre as posições C-8''/C-6, caracterizando assim, a substância agatisflavona (**B4**).

Todos os sinais de hidrogênios observados no espectro de RMN de H^1 foram atribuídos e correlacionados a seus respectivos carbonos através do mapa de correlação HSQC (Figura 4.73, Tabela 4.24). Essas atribuições foram confirmadas através dos dados da literatura.

Tabela 4.24: Dados de RMN de H de **B4** e comparação com a literatura.

H	B4 400 MHz, CD_3OD	CARVALHO, 2008 200 MHz, CD_3OD	C	B4 [§]	SVENNINGSEN et al, 2006 [*]
3	6,64 (s)	6,66 (s)	3	102,26	102,77
8	6,68 (s)	-	8	93,30	93,30
2'	7,88 (d, J=9,0 Hz)	7,89 (d, J=8,0 Hz)	2'	128,04	128,46
3'	6,93 (d, J=9,0 Hz)	6,94 (d, J=8,0 Hz)	3'	115,18	115,79
5'	6,93 (d, J=9,0 Hz)	6,94 (d, J=8,0 Hz)	5'	115,18	115,79
6'	7,88 (d, J=9,0 Hz)	7,89 (d, J=8,0 Hz)	6'	128,04	128,46
3''	6,57 (s)	6,66 (s)	3''	101,90	102,51
6''	6,36 (s)	6,34 (s)	6''	98,71	98,46
2'''	7,53 (d, J=9,0 Hz)	7,54 (d, J=8,0 Hz)	2'''	127,8	127,95
3'''	6,73 (d, J=9,0 Hz)	6,73 (d, J=8,0 Hz)	3'''	115,50	115,91
5'''	6,73 (d, J=9,0 Hz)	6,73 (d, J=8,0 Hz)	5'''	115,50	115,91
6'''	7,53 (d, J=9,0 Hz)	7,54 (d, J=8,0 Hz)	6'''	127,8	127,95

[§] 400 MHz, CD_3OD / ^{*} 100 MHz, DMSO-d_6

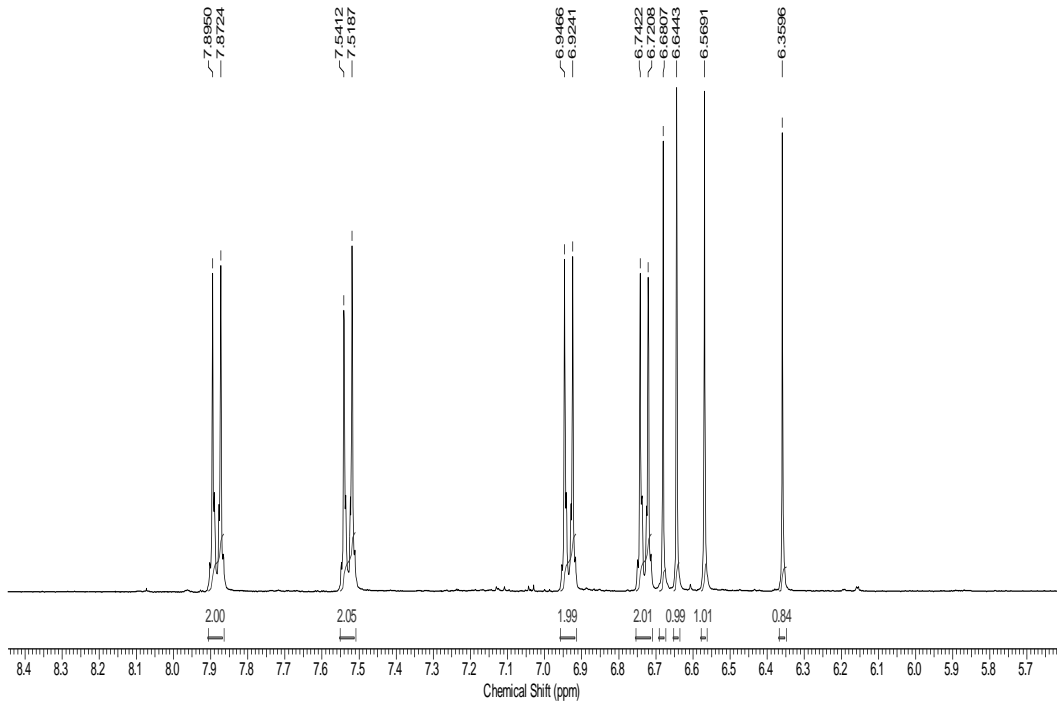


Figura 4.72: Espectro de RMN de ^1H de **B4** (400 MHz, CD_3OD).

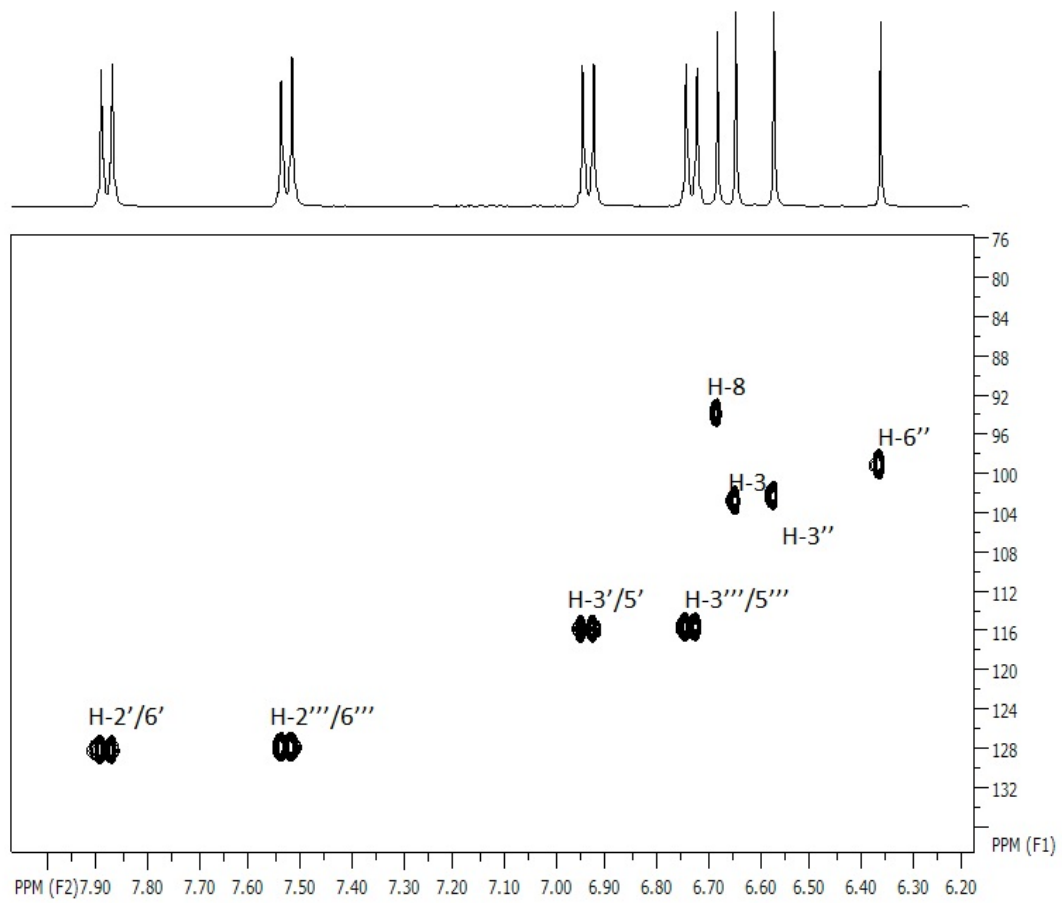
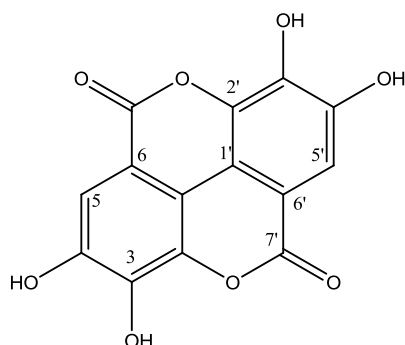


Figura 4.73: Mapa de correlações HSQC de **B4** (400 MHz, CD_3OD).

4.5.1 Identificação estrutural do ácido elágico (F1)



A substância **F1** apresentou-se como um pó amarelo, pouco solúvel até nos solventes de alta polaridade e foi identificada através RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com a literatura (BRACA *et al*, 2003).

A análise do espectro de RMN de ^1H da substância (Figura 4.74, Tabela 4.25) indicou um único sinal em δ 7,25 (s). Com base nos dados espectrais obtidos no RMN de ^{13}C (Figura 4.75, Tabela 4.25), foi observado um sinal em δ 160,1, característico da função lactona α - β -insaturada do ácido elágico, além dos demais sinais típicos desta substância. Através dos dados comparados à literatura (BRACA *et al*, 2003), foi proposta a estrutura do ácido elágico.

Tabela 4.25: Dados de RMN de ^1H de **F1** e comparação com a literatura

H/C	F1	BRACA <i>et al</i> , 2003	F1	LI <i>et al</i> , 1999
	400 MHz, DMSO	500 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, DMSO	125 MHz, CD ₃ OD
1/1"			107,35	106,8
2/2"			135,9	136,2
3/3"			135,9	139,7
4/4"			149,1	148,2
5/5"	7,25 (s)	7,37 (s)	107,3	109,8
6/6"			113,6	112,4
7/7"			160,1	159,1

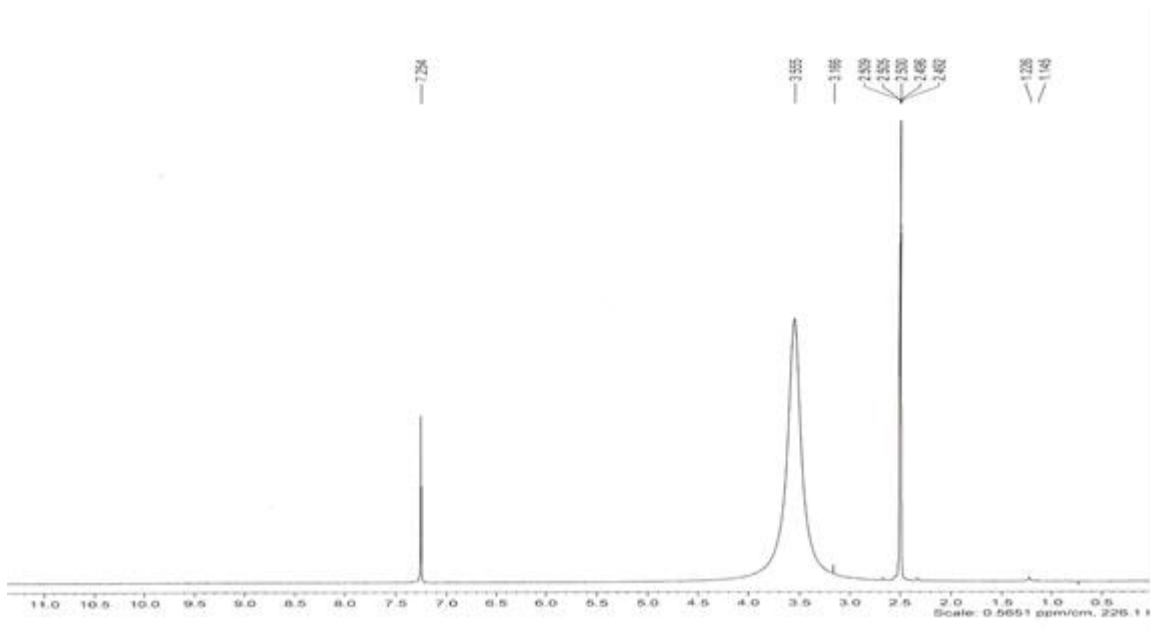


Figura 4.74: Espectro de RMN de ^1H de **F1** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

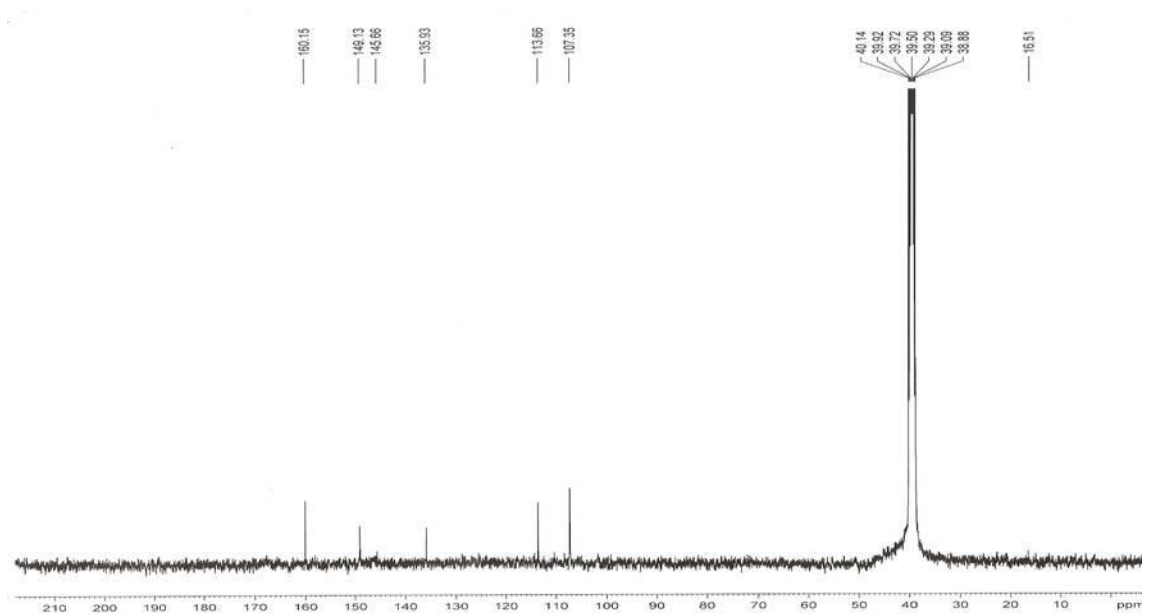
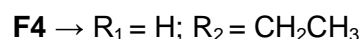
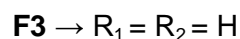
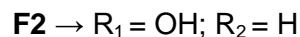
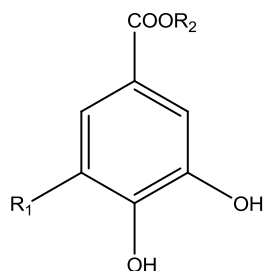


Figura 4.75: Espectro de RMN de ^{13}C de **F1** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

4.5.2 Identificação estrutural dos compostos fenólicos (F2, F3 e F4)



Os compostos fenólicos **F2** a **F4** foram identificados através dos dados de RMN de ^1H , Cosy, HMBC e HSQC e por comparação com a literatura (BRACA *et al*, 2003; SILVERSTEIN, 1991).

A análise do espectro de RMN de ^1H de **F2** (Figura 4.76, Tabela 4.26) indicou um único sinal em δ 7,04 (s). Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados relatados na literatura (BRACA *et al*, 2003), foi proposta a estrutura do ácido gálico.

Na análise do espectro de RMN de ^1H da mistura dos compostos **F2**, **F3** e **F4** (Figura 4.77 e Tabela 4.27) observou-se que em conjunto, pareciam ser características de um flavonóide, porém ao analisar a CCDA observou-se manchas muito próximas e, quando borrifadas com o revelador vanilina sulfúrica e posterior aquecimento, ficavam incolores, diferentemente dos flavonoides anteriormente isolados. Com relação ao espectro de RMN de ^1H , foi observado um sinal em δ 7,03 (s), que poderia ser atribuído a um hidrogênio de anel aromático cujos H são química e magneticamente equivalentes (**F2** - ácido gálico). Os sinais em δ 6,77 e δ 6,79 (ambos *d*, $J = 8,0$ Hz) seriam característicos de hidrogênios de anéis *p*-substituídos. Outros sinais em δ 7,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e δ 7,42 (*m*) poderiam estar relacionados a hidrogênios de anéis aromáticos trissubstituídos. Através das várias correlações observadas em ambos os espectros: Cosy, HSQC e HMBC, pode-se confirmar a presença de três compostos fenólicos. Baseando-se nos dados espectrais obtidos e por comparações com dados da literatura (BRACA *et al*, 2005; SILVERSTEIN, 1991) as estruturas dos ácidos benzóicos: ácido gálico (**F2**), protocatequínico (**F3**) e protocatequínico acetilado (**F4**) foram confirmados.

Tabela 4.26: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F2** e comparação com a literatura

H/C	F2	BRACA <i>et al</i> , 2005	F2	BRACA <i>et al</i> , 2005
	400 MHz, CD ₃ OD	500 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, CD ₃ OD	125 MHz, CD ₃ OD
1			128,0	122,5
2/6	7,03 (s)	7,04 (s)	110,0	110,3
3			146,0	146,3
4			139,7	139,5
5			146,0	**
COOH			168,0	171,0

Tabela 4.27: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F3** e **F4**

H/C	F3	F4	F3	F4
	400 MHz, CD ₃ OD	400 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, CD ₃ OD
1			124,4	124,4
2	7,39 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)	7,39 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	117,6	117,6
3			151,0	151,0
4			146,0	146,0
5	6,77 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,79 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)	115,6	116,8
6	7,42 (<i>m</i>)	7,42 (<i>m</i>)	123,3	123,3
COOCH ₂ CH ₃		1,34 (<i>t</i> , $J = 6,0$ Hz)	171,3	171,3
		4,27 (<i>q</i> , $J = 6,0$ Hz)		14,5/61,3

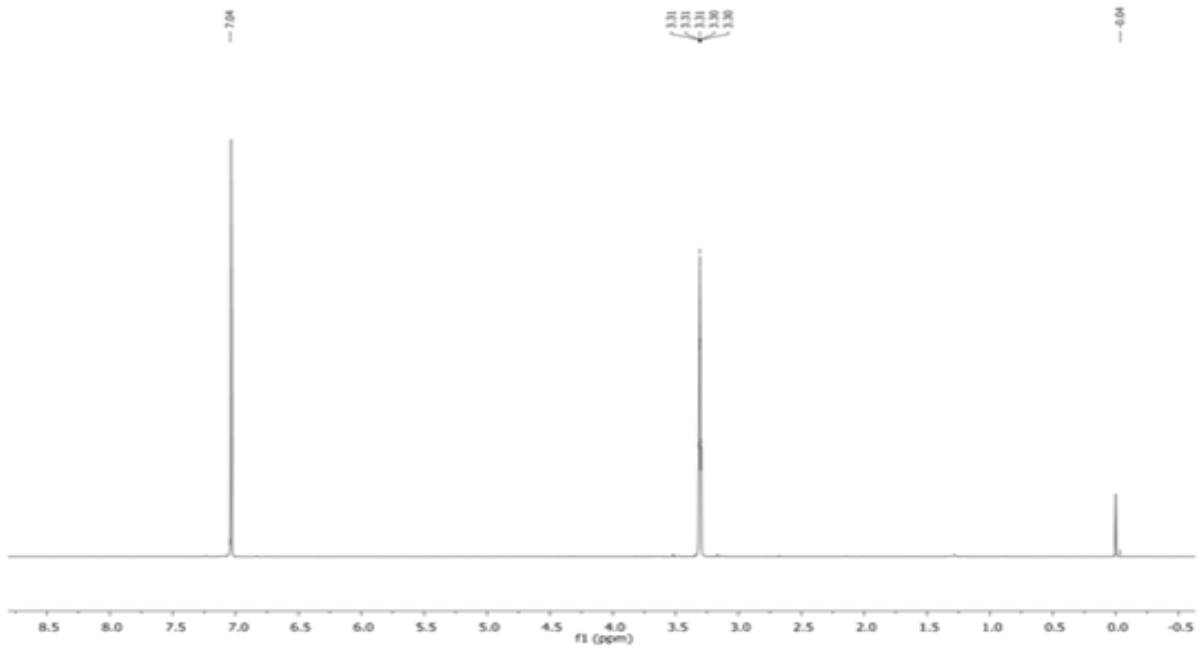


Figura 4.76: Espectro de RMN de ^1H de **F2** (400 MHz, CD_3OD).

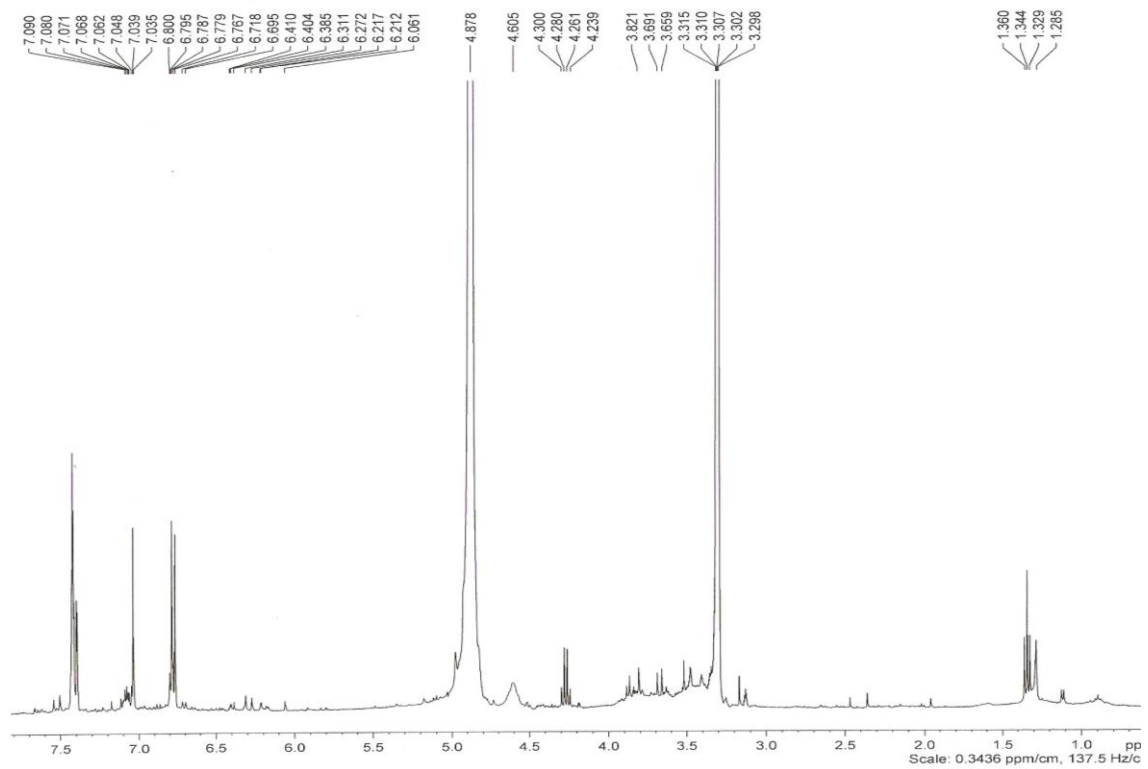


Figura 4.77: Espectro de RMN de ^1H da mistura dos compostos fenólicos **F2**, **F3** e **F4** (400 MHz, CD_3OD).

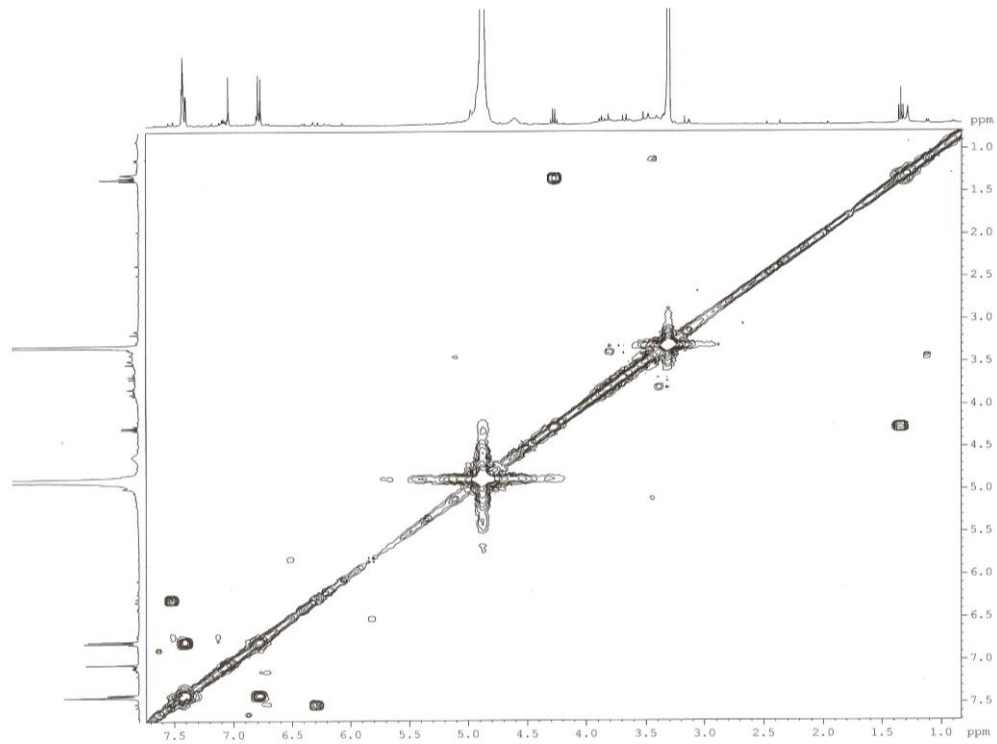


Figura 4.78: Espectro de Cosy da mistura dos compostos fenólicos **F2**, **F3** e **F4** (400 MHz, CD₃OD).

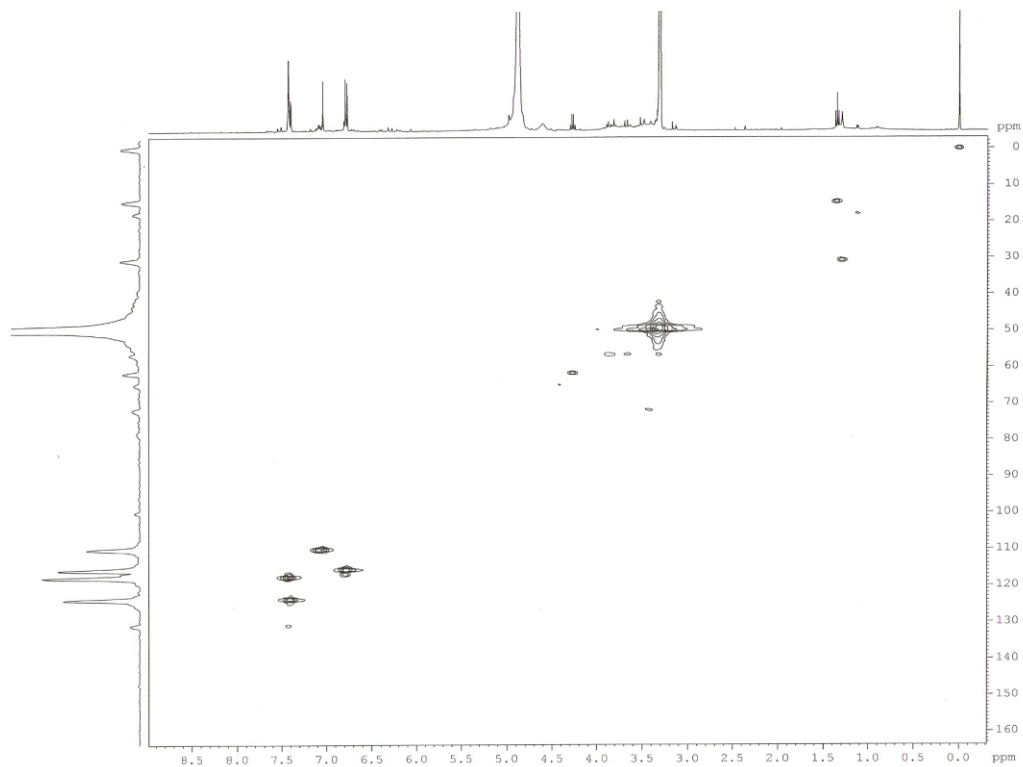


Figura 4.79: Mapa de correlações HSQC da mistura dos compostos fenólicos **F2**, **F3** e **F4** (400 MHz, CD₃OD).

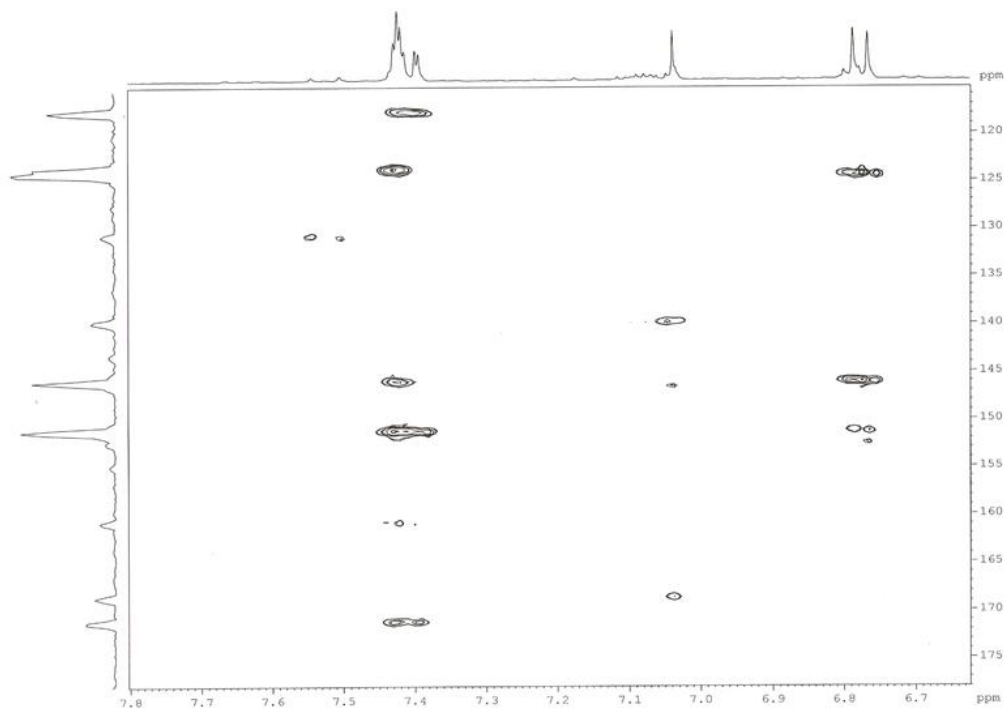
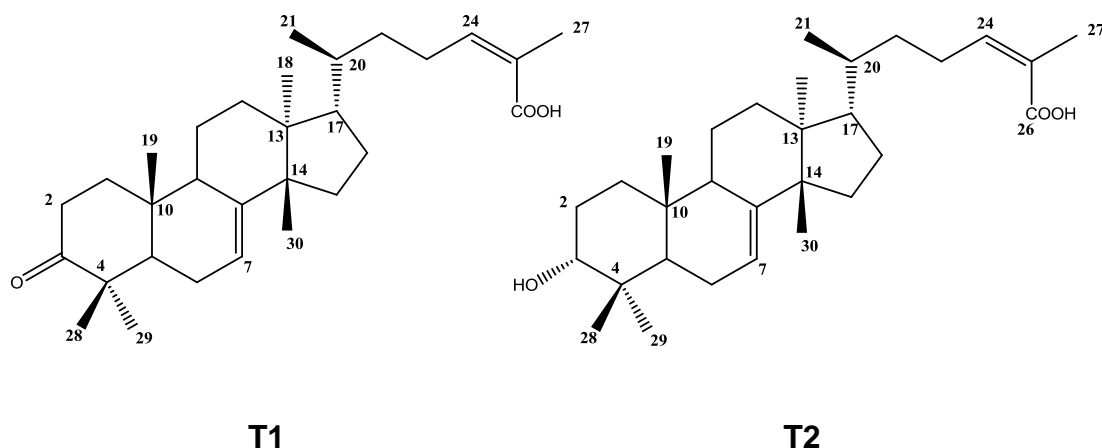


Figura 4.80: Ampliação do mapa de correlações HMBC da mistura dos compostos fenólicos **F2**, **F3** e **F4** (400 MHz, CD₃OD).

4.6 Identificação estrutural dos Triterpenos

4.6.1 Identificação estrutural dos triterpenos ácido masticadienólico (T1) e eschinol (T2).



Os triterpenos, ácido masticadienólico (**T1**) e Eschinol (**T2**) foram isolados do extrato diclorometânico dos frutos de *Schinus terebinthifolius*. Ambos foram identificados através de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 4.81 a 4.85, Tabelas 4.28 a 4.29) e por comparações com a literatura (JAIN *et al.*, 1995, MULHOLLAND *et al.*, 1994; MAKINO *et al.*, 2004). Nos espectros de RMN de ^1H de **T1** e **T2** (Figuras 4.81 e 4.84, Tabela 4.28) foram observadas a presença de seis singletos na região entre δ 0,81-1,92, referentes aos hidrogênios metílicos ligados a carbonos terciários. Esses dados, juntamente com os sinais em δ 6,09 (*t*, $J = 7,2$ Hz, H-24) e δ 5,31 (*dd*, $J = 6,0$ e $3,0$ Hz, H-7) referentes aos hidrogênios olefínicos, sugeriram a natureza dos triterpenos **T1** e **T2** como tendo o esqueleto do tipo tirucalano. O espectro de RMN de ^{13}C de **T1** (Figuras 4.83, Tabela 4.29) apresentou 30 sinais na região de δ 12,0 a δ 217,0. A presença dos sinais em δ 217,2 e δ 173,4 indicou a existência de uma carbonila em C-3 e uma carboxila em C-26, respectivamente, indicando ser o triterpeno ácido masticadienólico. Um sinal em δ 3,47 (*t*, $J = 2,8$ Hz), integrando para um hidrogênio, observado no espectro de RMN de ^1H de **T2** caracterizou a presença de um hidrogênio carbinólico, indicativo de um grupo hidroxila em C-3. A constante de acoplamento para este sinal sugeriu a posição α para o grupo hidroxila. Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H

e ^{13}C estão de acordo com os dados da literatura para as substâncias **T1** e **T2** (MAKINO *et al.*, 2004; MULHOLLAND *et al.*, 1994).

Tabela 4.28: Dados de RMN de ^1H de **T1** e **T2** e comparação com a literatura

H	MULHOLLAND <i>et al.</i> , 1994		T2 (400 MHz, CDCl_3)	MAKINO <i>et al.</i> , 2004 (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
	T1 (400 MHz, CDCl_3)	MAKINO <i>et al.</i> , 2004 (400 MHz, CDCl_3)		
1	1,80 (m)	1,80 (m)	1,50 (m)	1,45 (m)
	2,20 (m)	2,20 (m)	2,20 (m)	1,98 (m)
2	2,75 (dt, J = 14,4 e 5,2)	2,78 (dt, J = 14,7 e 5,9)	2,55 (m)	1,84 (dl, J = 9,6 Hz)
	2,40 (m)	2,40 (m)	2,40 (m)	2,01 (m)
3	--	--	3,47 (t, J = 2,8 Hz)	3,69 (s)
5	2,22 (m)	2,22 (m)	2,22 (m)	2,22 (m)
6	1,98 (m)	1,98 (m)	1,98 (m)	1,98 (m)
7	5,31 (t, J = 6,0 Hz)	5,36 (s)	5,26 (t, J = 3,0 Hz)	5,36 (s)
9	2,50 (m)	2,50 (m)	2,45 (m)	2,50 (m)
11	1,60 (m)	1,50 (m)	1,60 (m)	1,50 (m)
12	1,75 (m)	1,57 (m)	1,75 (m)	1,75 (m)
15	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
	1,60 (m)	1,60 (m)	1,60 (m)	1,60 (m)
16	1,32 (m)	1,32 (m)	1,32 (m)	1,32 (m)
	2,03 (m)	2,03 (m)	2,03 (m)	2,03 (m)
17	1,57 (m)	1,57 (m)	1,57 (m)	1,57 (m)
18	0,81 (s)	0,80 (s)	0,78 (s)	0,80 (s)
19	1,00 (s)	1,00 (s)	0,83 (s)	1,00 (s)
20	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
21	0,89 (d, J = 6,0 Hz)	0,97 (d, J = 5,9 Hz)	0,89 (d, J = 6,0 Hz)	0,89 (d, J = 5,9 Hz)
22	1,30 (m)	1,30 (m)	1,30 (m)	1,30 (m)
	1,68 (m)	1,68 (m)	1,68 (m)	1,68 (m)
23	2,65 (m)	2,78 (m)	2,55 (m)	2,78 (m)
	2,60 (m)	2,88 (m)	2,55 (m)	2,88 (m)
24	6,09 (t, J = 7,2 Hz)	6,06 (t, J = 7,0 Hz)	6,08 (t, J = 8,0 Hz)	6,09 (t, J = 7,0 Hz)
27	1,92 (s)	1,92 (s)	1,92 (s)	2,14 (s)
28	1,12 (s)	1,12 (s)	0,98 (s)	1,17 (s)
29	1,01 (s)	1,00 (s)	0,92 (s)	0,98 (s)
30	1,05 (s)	1,05 (s)	0,95 (s)	1,05 (s)

Tabela 4.29: Dados de RMN de ^{13}C de **T1** e comparação com a literatura

C	T1 (100 MHz, CDCl₃)	MULHOLLAND <i>et al.</i>, 1994 (100 MHz, CDCl₃)
1	34,0	34,0
2	24,6	24,5
3	217,2	217,1
4	47,9	47,9
5	52,3	51,1
6	24,4	24,3
7	117,8	117,8
8	147,2	147,2
9	52,3	52,2
10	35,9	36,0
11	18,2	18,2
12	35,0	34,9
13	48,5	48,5
14	52,9	52,8
15	35,6	35,6
16	28,2	28,2
17	53,5	52,8
18	21,6	21,6
19	12,8	12,7
20	43,5	43,5
21	18,3	18,3
22	38,5	38,5
23	27,0	26,9
24	145,2	145,9
25	125,9	125,8
26	173,8	173,4
27	20,5	20,5
28	33,6	33,6
29	21,9	21,9
30	27,4	27,4

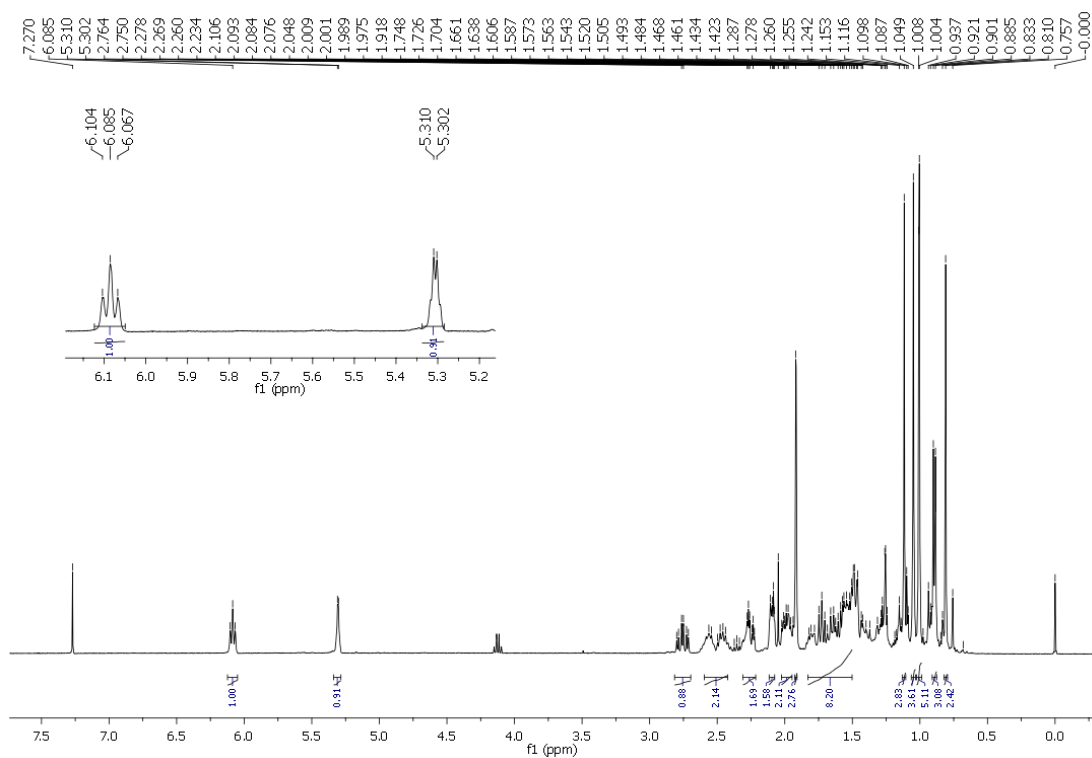


Figura 4.81: Espectro de RMN de ^1H de T1 (400 MHz, CDCl_3).

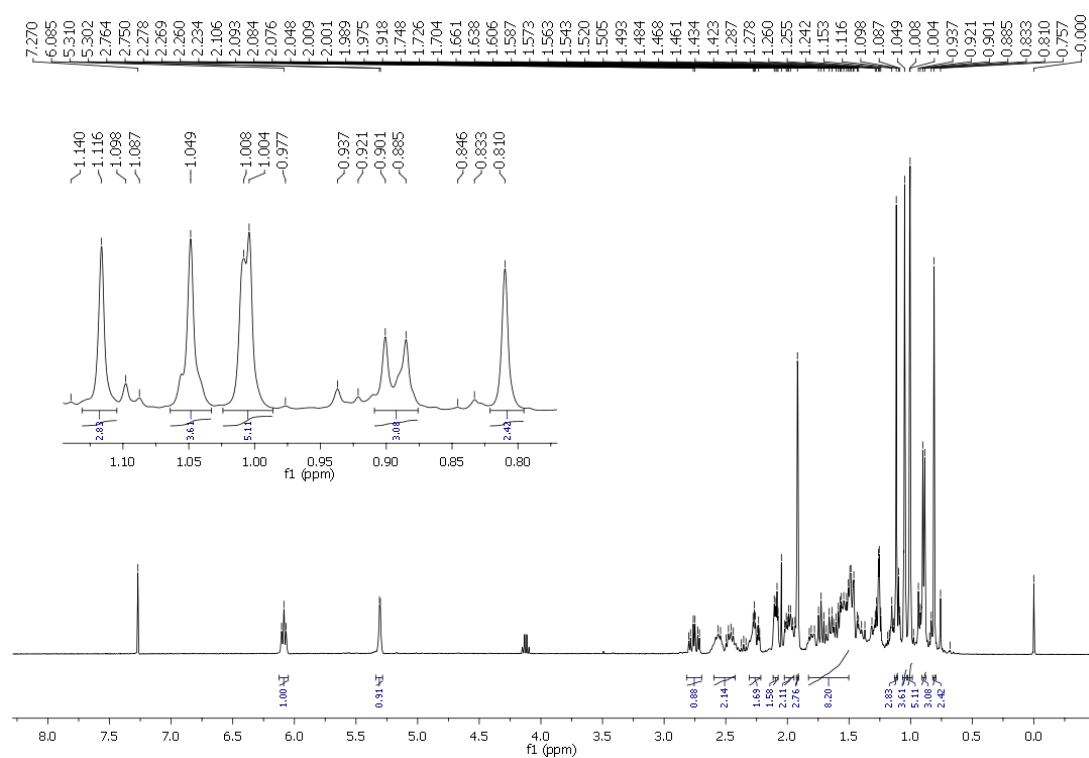


Figura 4.82: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de T1 (400 MHz, CDCl_3).

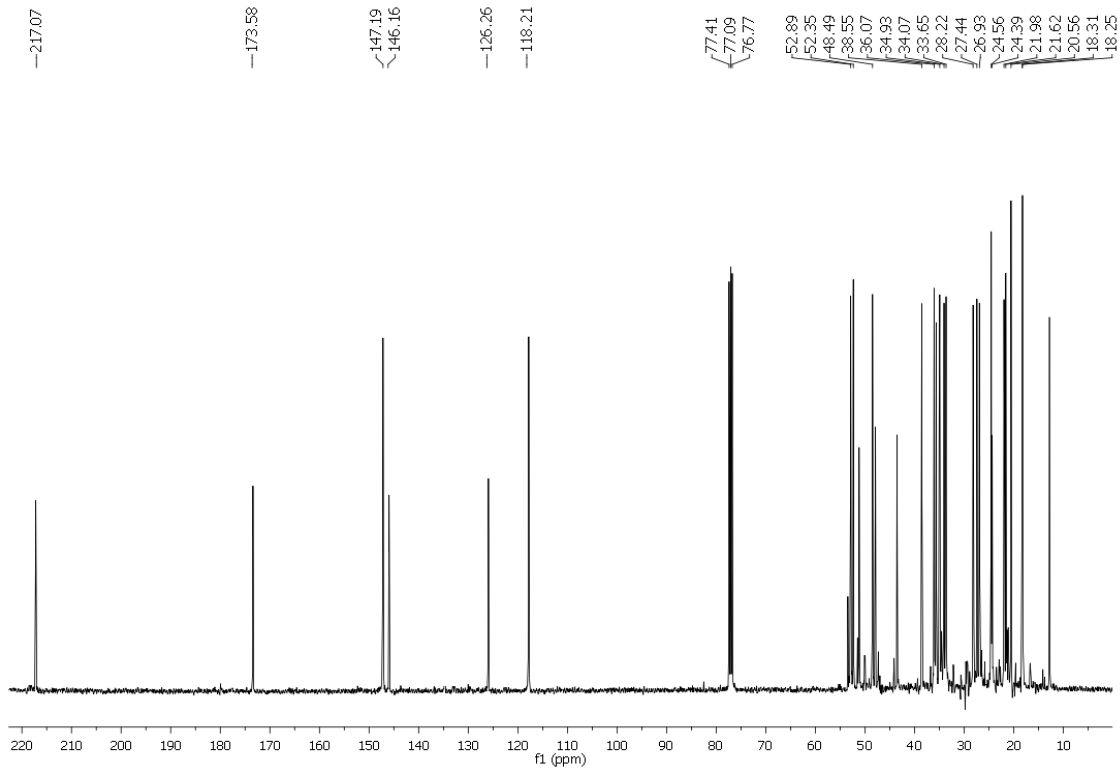


Figura 4.83: Espectro de RMN de ¹³C de T1 (100 MHz, CDCl₃).

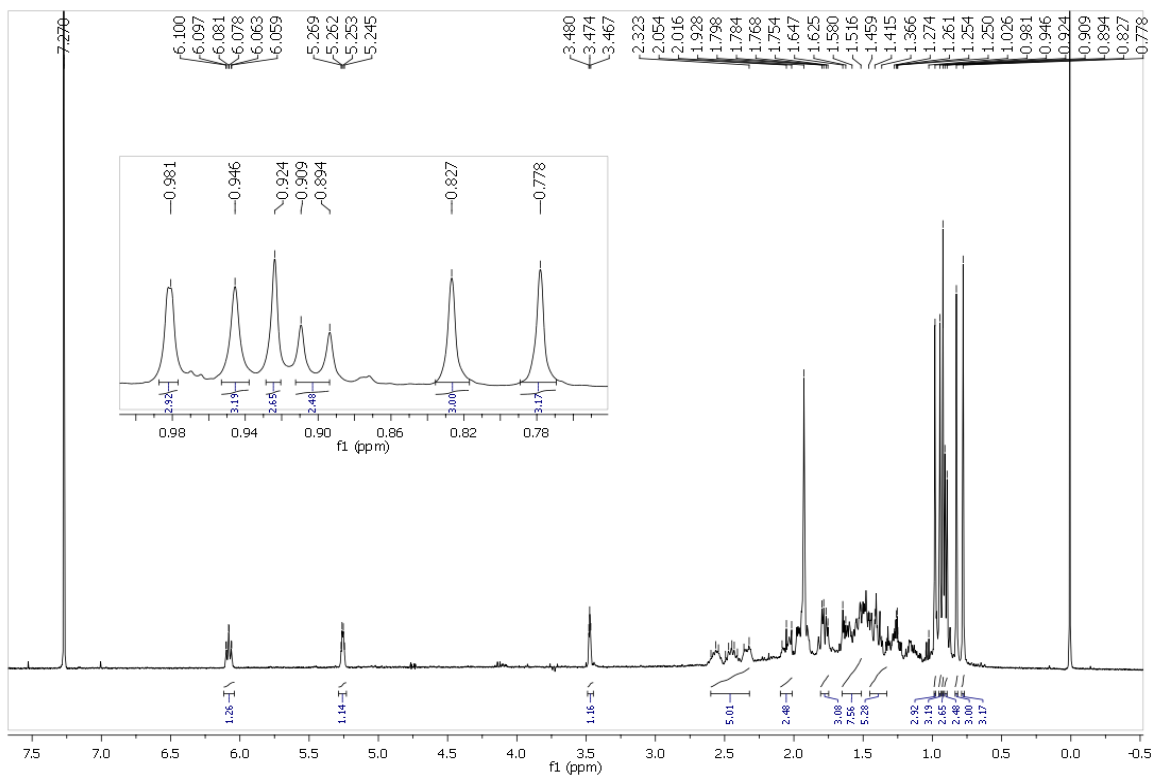


Figura 4.84: Espectro de RMN de ¹H d de T2 (400 MHz, CDCl₃).

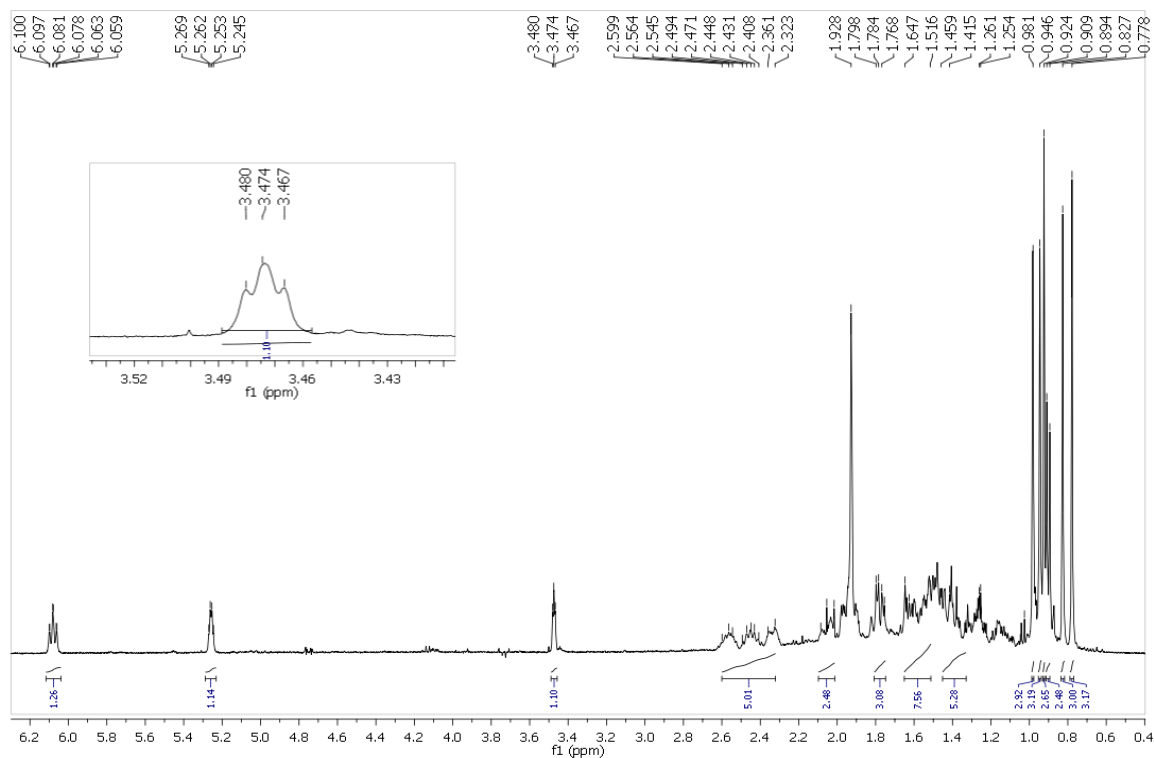
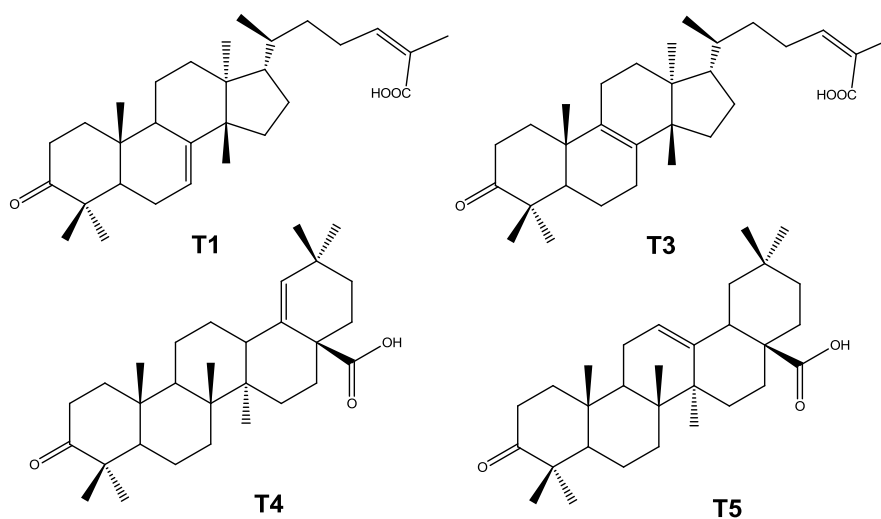


Figura 4.85: Ampliação do espectro de RMN de T2 (400 MHz, CDCl₃).

4.6.2 Identificação estrutural do conjunto de Triterpenos: Ácidos Masticadienóico (T1), Isomasticadienóico (T3), Morônico (T4) e Oleanônico (T5)



O conjunto de triterpenos, ácidos Masticadienóico (T1), Isomasticadienóico (T3), Morônico (T4) e Oleanônico (T5) foi isolado do extrato

hexânico dos frutos de *Schinus terebinthifolius*. As substâncias após a derivatização com diazometano, os ésteres triterpênicos foram identificadas através de RMN de ^1H e ^{13}C e via CG/EM.

Através do cromatograma obtido via CG/EM foi possível observar a presença de quatro compostos com pesos moleculares idênticos, se tratando então de um conjunto de isômeros triterpênicos.

Através da análise do cromatograma foi possível verificar a presença de quatro sinais com tempos de retenção em 21,3 min, 21,7 min, 22,9 min e 24,2 min. Através dos espectros de massas referentes aos picos com os tempos de retenção em 21,3 min (Figura 4.87) e 21,7 min (Figura 4.88), foi observada a presença de fragmentos característicos de triterpenos do tipo oleanônico com m/z 203 e 189 (Esquema 4.4). Segundo Nicholson e colaboradores (2011), a abundância dos fragmentos com m/z 203 e 189 caracterizam certos triterpenos, neste caso a relação de maior abundância do íon m/z 203 caracteriza a presença do ácido oleanônico (éster) (**T5**) e do íon m/z 189 o ácido morônico (éster) (**T4**).

Analisando os espectros de massas referentes aos picos com tempos de retenção de 22,9 min (Figura 4.89) e 24,2 min (Figura 4.90), foi possível verificar a presença de triterpenos do tipo tirucalano, os ácidos isomasticadienóico (**T3**) e masticadienóico (**T1**), respectivamente, através dos fragmentos característicos de m/z 257 e 421. Os espectros de massas dos isômeros **T1** e **T3** não apresentam diferenças significativas em suas fragmentações que pudessem auxiliar na identificação das duplas ligações existentes nos mesmos. Deste modo, analisou-se então o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.92) do conjunto de triterpenos, onde foi possível observar os sinais em δ 117,8 (C-7) e δ 145,9 (C-8) que caracterizavam a dupla ligação entre os carbonos C-7 e C-8 no composto **T1**, já os sinais em δ 134,7 (C-8) e δ 132,7 (C-9) correspondentes à dupla ligação entre C-8 e C-9 foram atribuídos ao composto **T3**.

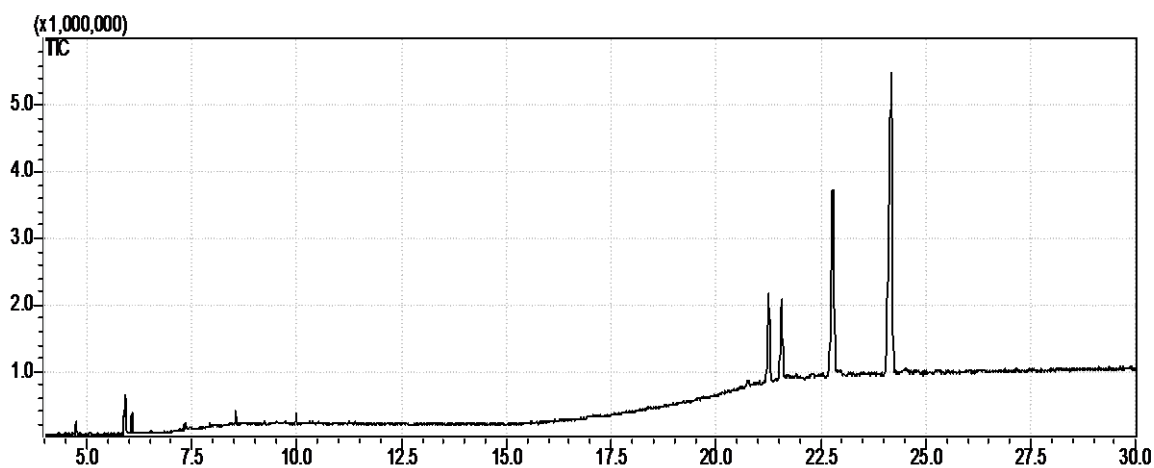


Figura 4.86: Cromatograma do conjunto de ésteres triterpenos T1, T3, T4 e T5.

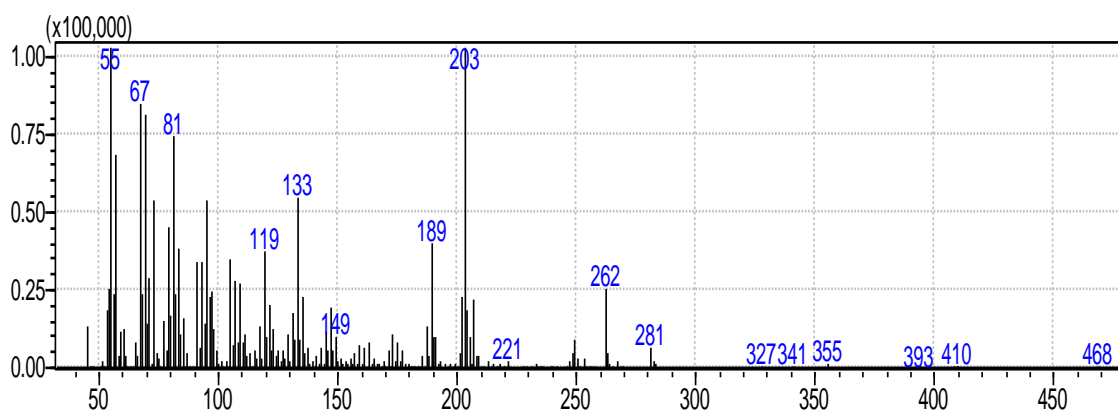


Figura 4.87: Espectro de massas da substancia T5 (tr. = 21,3 min.)

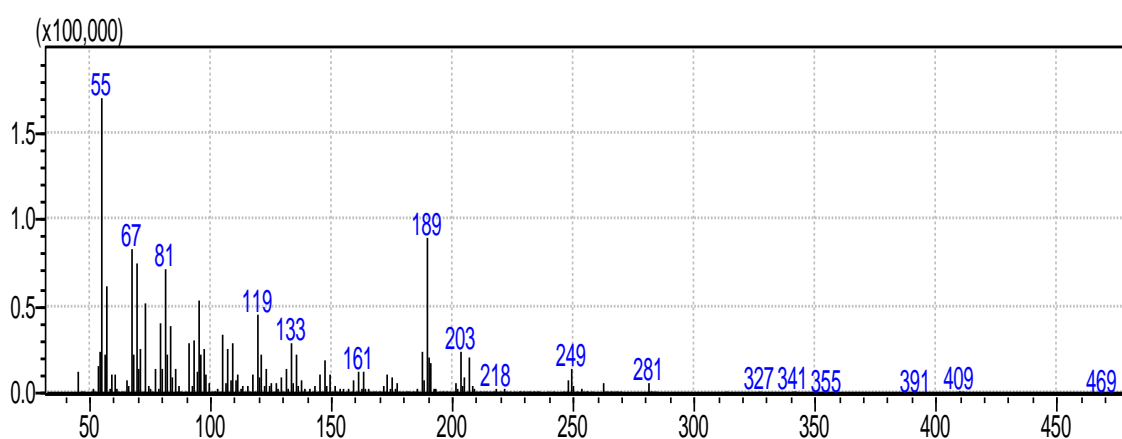


Figura 4.88: Espectro de massas da substancia T4 (tr. = 21,7 min.)

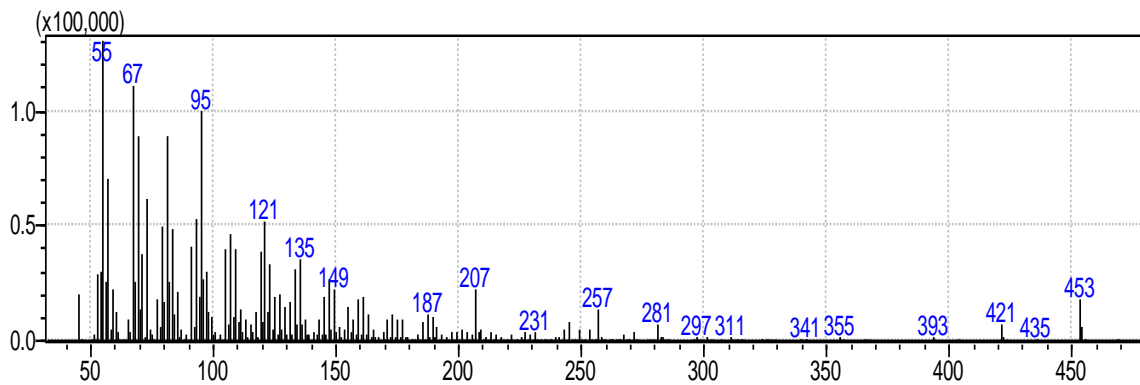


Figura 4.89: Espectro de massas da substância T3 (tr. = 22,9 min.)

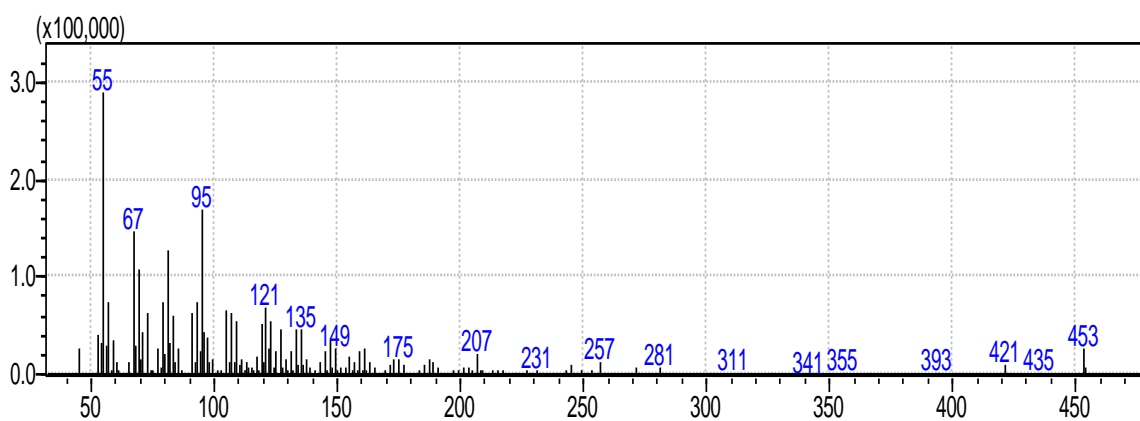
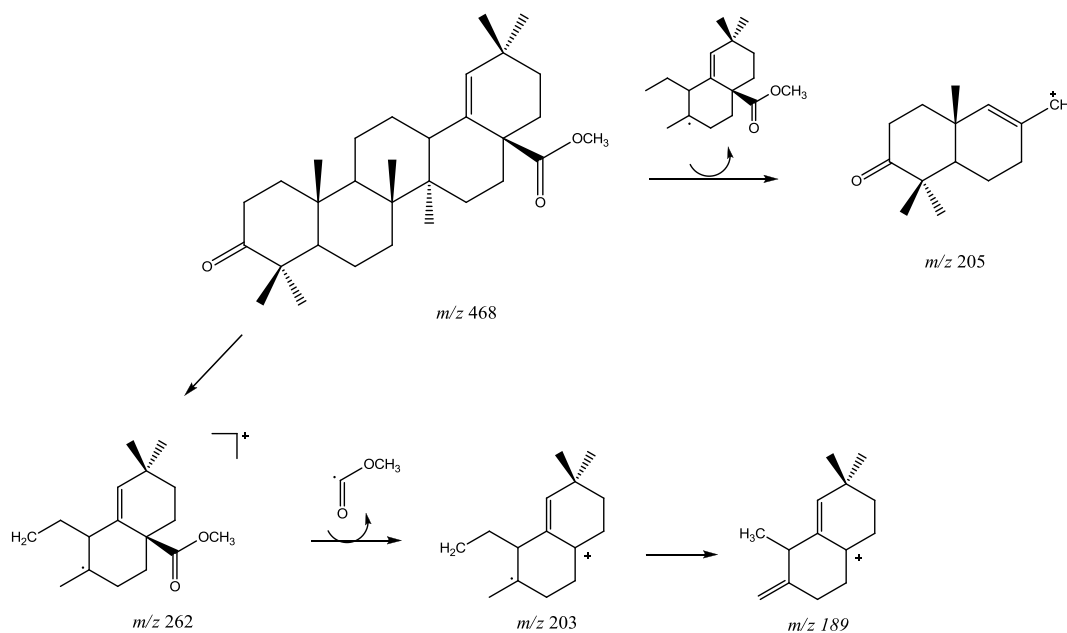
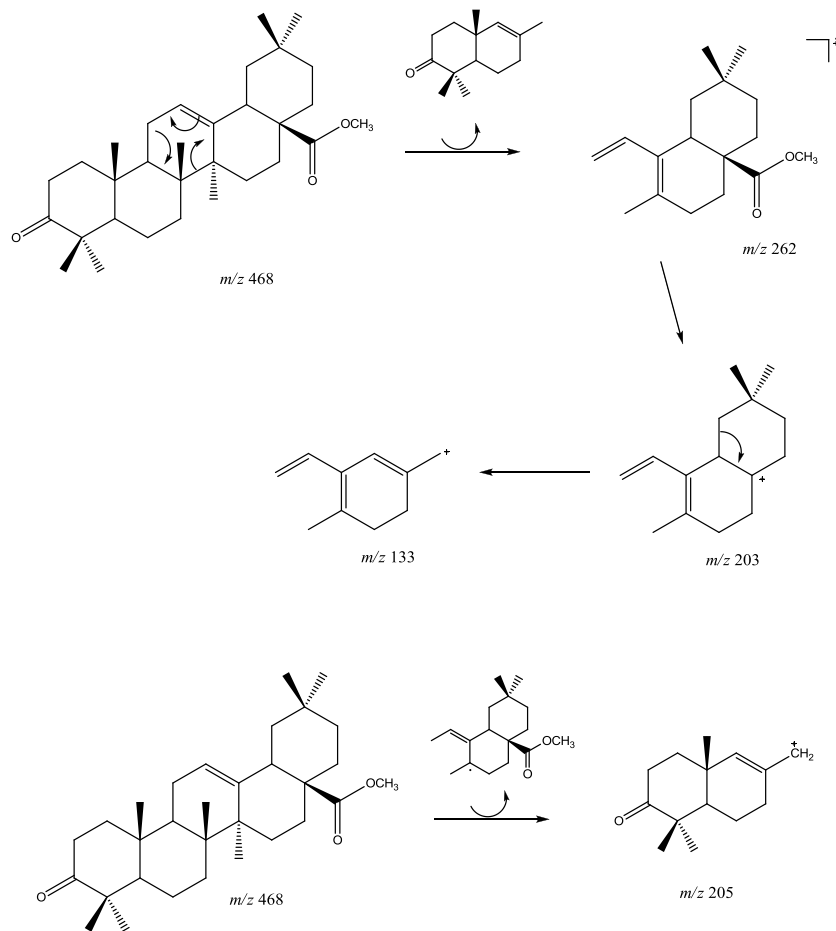


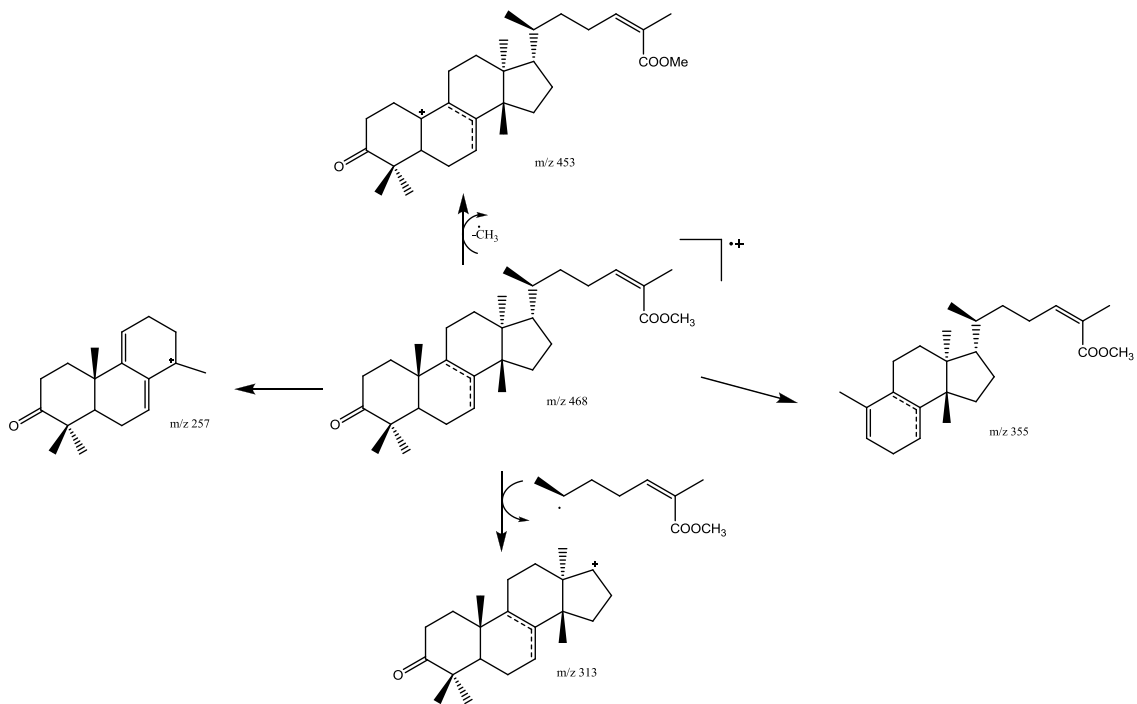
Figura 4.90: Espectro de massas da substância T1 (tr. = 24,2 min.)



Esquema 4.4: Proposta de fragmentações do composto T4.



Esquema 4.5: Proposta de fragmentações do composto T5.



Esquema 4.6: Proposta de fragmentações do composto T1 e T3.

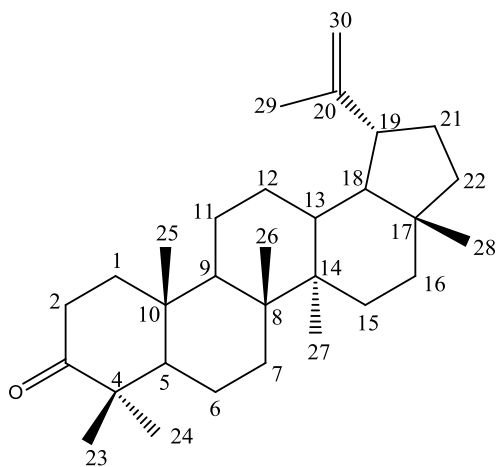
Tabela 4.30: Dados de RMN de ^{13}C da substância **T1** e **T3** e comparação com a literatura

C	T1 (100 MHz, CDCl ₃)	Ác. Masticadienónico MULHOLLAND <i>et al.</i> , 1994 (100 MHz, CDCl ₃)	T3 (100 MHz, CDCl ₃)	Ác. Isomastic. PARASCHOS <i>et al.</i> , 2006 (100 MHz, CDCl ₃)
1	34,0	34,0	35,6	35,5
2	24,4	24,5	34,6	34,6
3	217,0	217,1	218,3	218,3
4	47,8	47,9	47,3	47,2
5	51,1	51,1	51,5	51,4
6	24,4	24,3	20,3	20,2
7	117,8	117,8	27,5	27,4
8	145,9	147,2	134,7	134,6
9	52,2	52,2	132,7	132,6
10	35,9	36,0	37,1	37,1
11	18,2	18,2	28,1	28,0
12	35	34,9	30,7	30,7
13	48,4	48,5	50,1	50,0
14	52,8	52,8	50,1	50,0
15	35,6	35,6	29,7	29,7
16	28,1	28,2	21,4	21,3
17	52,8	52,8	50,1	50,0
18	21,5	21,6	15,6	15,5
19	12,7	12,7	20,3	20,5
20	43,4	43,5	36,4	36,40
21	18,2	18,3	18,6	18,5
22	38,43	38,5	35,9	35,8
23	26,6	26,9	26,9	26,8
24	144	145,9	146,0	147,4
25	126,4	125,8	126,5	125,8
26	168,5	173,4	168,5	173,4
27	20,6	20,5	19,8	19,7
28	33,5	33,6	21,1	21,1
29	21,8	21,9	26,7	26,7
30	27,3	27,4	24,2	24,2

Tabela 4.31: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **T4** e **T5** e comparação com a literatura.

C	T4 (100 MHz, CDCl_3)	Ác. Morônico ITO et al., 2001 (75 MHz, CDCl_3)	T5 (100 MHz, CDCl_3)	Ác. Oleanônico SEO et al., 1975 (75,0 MHz, CDCl_3)
1	39,9	39,7	39,1	39,1
2	33,9	33,9	34,2	34,2
3	218,3	218,3	217,1	216,8
4	46,9	47,1	47,5	47,3
5	54,9	54,7	55,4	55,2
6	19,6	19,5	19,6	19,5
7	33,55	33,4	32,1	32,1
8	40,5	40,4	39,3	39,1
9	50,5	50,3	46,8	46,7
10	36,9	36,8	36,8	36,6
11	21,5	21,4	23,1	23,0
12	26,0	25,9	121,1	121,9
13	41,4	41,3	143,9	143,5
14	42,6	42,4	41,8	41,7
15	29,4	29,2	27,7	27,6
16	33,6	33,6	23,6	23,5
17	47,9	47,8	46,8	46,7
18	137,0	136,4	40,5	41,2
19	-	113,0	45,8	45,7
20	31,9	31,9	30,7	30,5
21	33,5	33,3	33,8	33,7
22	33,48	33,2	31,2	32,1
23	26,7	26,7	26,4	26,4
24	20,9	20,8	21,3	21,3
25	16,5	16,4	15,0	14,8
26	15,8	15,7	16,8	16,7
27	14,9	14,7	25,8	25,7
28	178,3	182,8	177,2	177,7
29	30,4	30,2	33,1	33,0
30	29,1	29,0	23,5	23,5

4.6.3 Identificação Estrutural do Triterpeno Lupenona (T6)



O triterpeno lupenona (**T6**) foi isolado do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius*. Sua identificação foi realizada através de RMN de ^1H e por CG/EM.

No espectro de RMN de ^1H de **T6** (Figura 4.93, Tabela 4.32), foram observados seis singletos referentes a hidrogênios metílicos em δ 0,80, δ 0,93, δ 0,95, δ 1,03 e δ 1,07 (6H), e um singlete em δ 1,69, correspondente aos hidrogênios metílicos ligado a um carbono insaturado. Foram observados também um dubleto em δ 4,69 (*d*, $J = 2,4$ Hz) e um duplo dubleto em δ 4,57 (*dd*, $J = 2,4, 1,5$ Hz) (Figura 4.72), sugerindo que a substância tratava-se de um triterpeno com esqueleto lupânico (PHASHANT *et al*, 1993).

No CG espectro de massas (Figura 4.95) foi observado o pico de íon molecular em m/z 424, estando de acordo com sua formula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$. Os picos em m/z 205, 218 e 189 estão de acordo com a literatura para a substância lupenona (PHASHANT *et al.*, 1993; VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2005).

Tabela 4.32: Dados de RMN de ^1H de **T6** e comparação com a literatura.

H	T6	PHASHANT <i>et al.</i> , 1993
	400 MHz, CDCl_3	100 MHz, CDCl_3
23	1,07 (s)	0,97 (s)
24	0,80 (s)	0,75 (s)
25	0,95 (s)	0,82 (s)
26	1,07 (s)	1,02 (s)
27	1,03 (s)	0,94 (s)
28	0,93 (s)	0,78 (s)
29	1,69 (s)	1,76 (s)
30	4,69 (d, J= 2,4)	4,63 (s)
	4,57 (dd, J= 2,4 e 1,5)	4,50 (s)

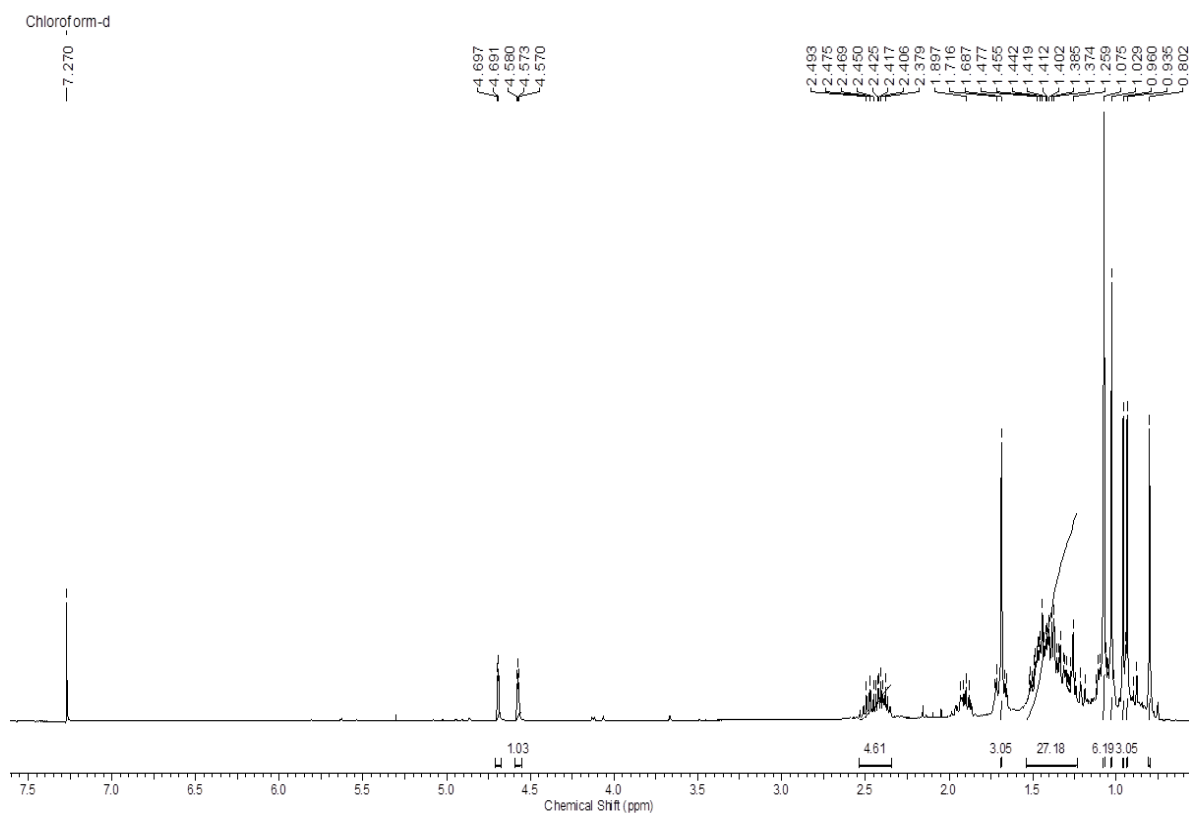


Figura 4.93: Espectro de RMN de ^1H de **T6** (400 MHz, CDCl_3).

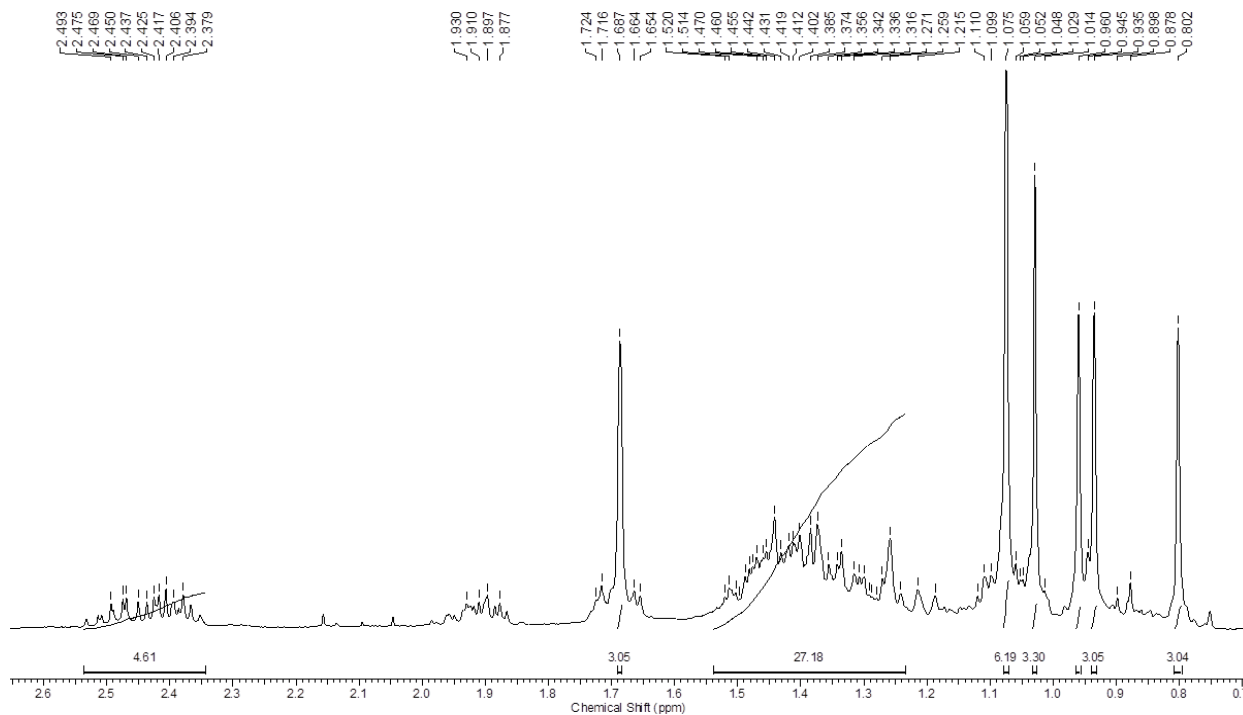


Figura 4.93: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de T6 (400 MHz, CDCl_3).

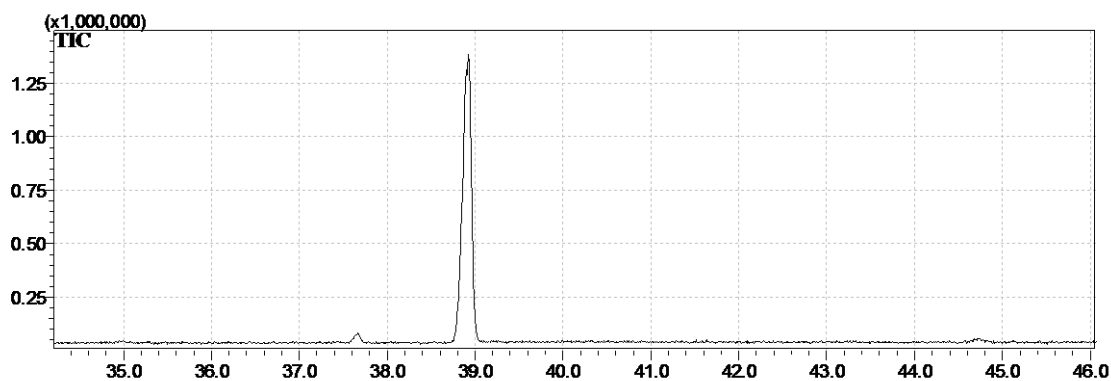


Figura 4.94: Cromatograma do composto T6 (tr. = 38,9 min.).

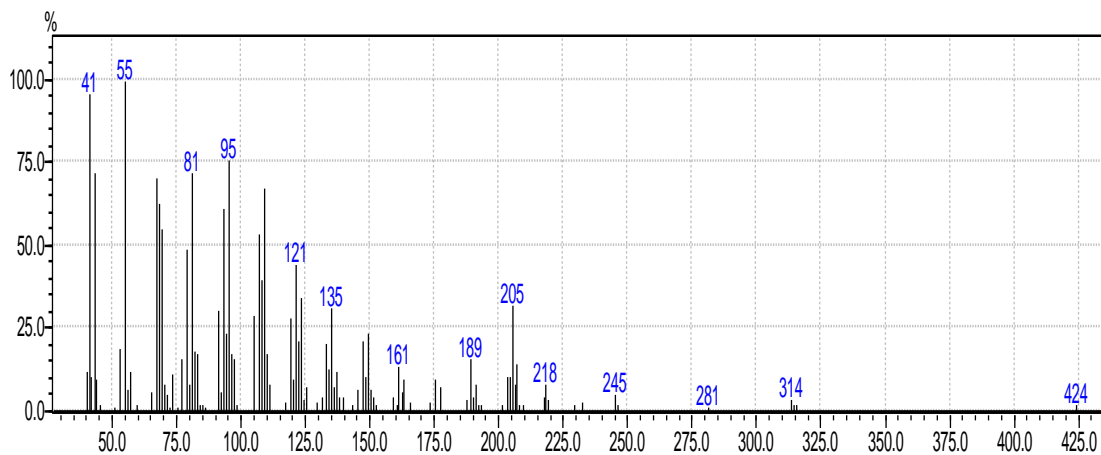
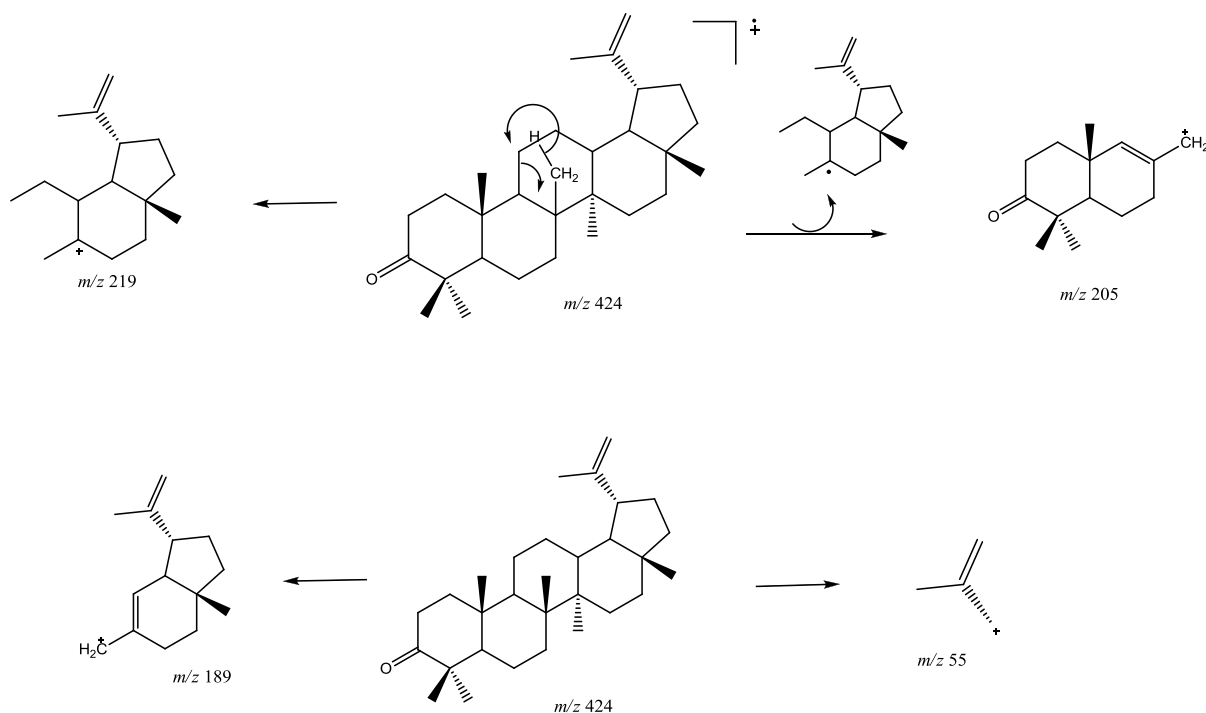
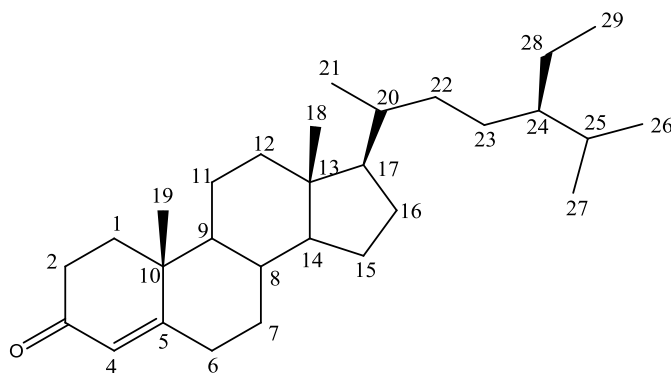


Figura 1.95: Espectro de massas de T6 (I.E.=70 eV).



Esquema 4.7: Proposta de fragmentações do composto T6.

4.6.4 Identificação do Esteróide Sitostenona (T7)



O esteróide sitostenona (**T7**) foi isolado do fracionamento do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius*. Esta substância foi isolada como um sólido branco e sua identificação foi realizada através dos dados de RMN de ^1H e por CG/EM.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.97) apresentou dois singletos em δ 5,73 e δ 0,71, relativo aos hidrogênios H-4 e H-18, respectivamente. Na região mais blindada, observou-se a presença de três singletos largos em δ 0,81, δ 0,83 e δ 0,85 relativos aos hidrogênios H-27, H-26 e H-29, respectivamente. Outros sinais entre δ 1,20–2,45

observados no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal.

O espectro de massas do pico com tempo de retenção 39,0 min, referente ao composto **T7** (Figura 4.96) apresentou o pico do íon molecular m/z 412, sendo compatível a fórmula molecular da substância **T7**. No esquema 4.6, estão representadas algumas das fragmentações para **T7**.

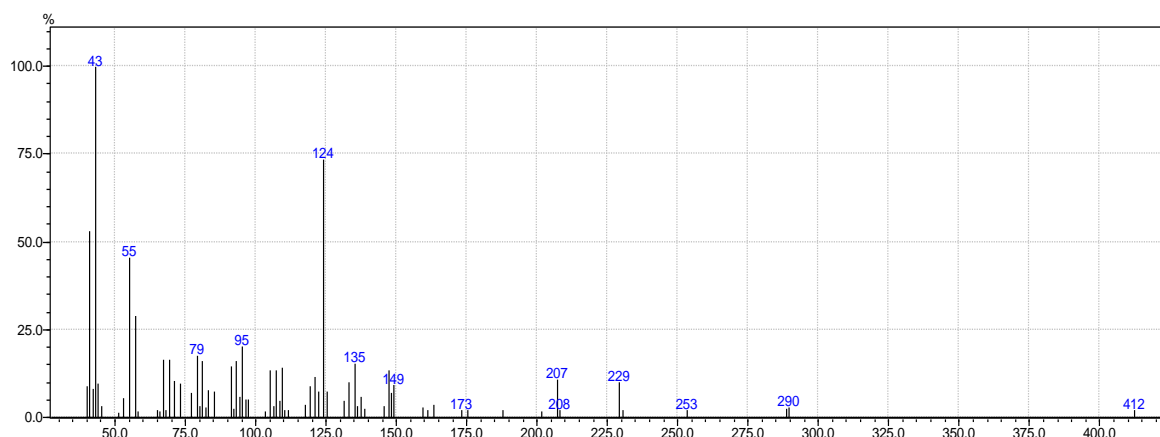
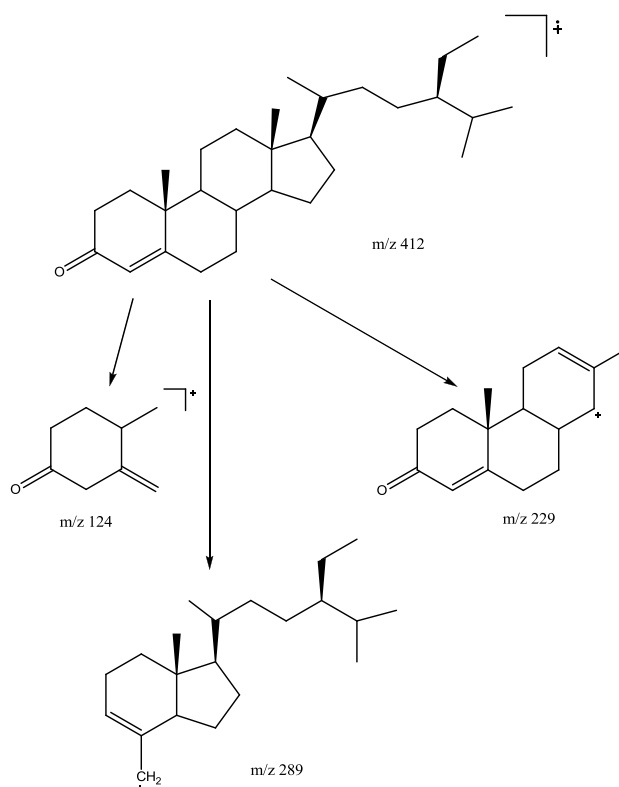
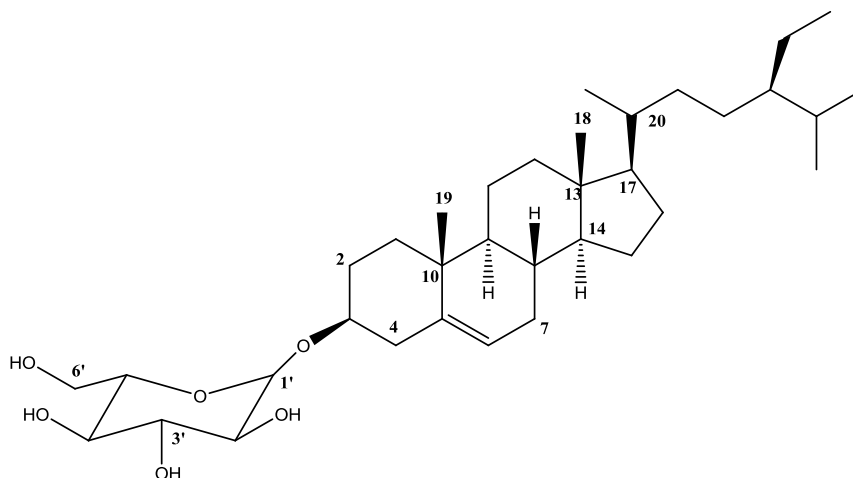


Figura 4.96: Espectro de massas da substância (**T7**) (I.E.=70 eV).



Esquema 4.8: Proposta de fragmentações do composto **T7**.

4.6.5 Identificação estrutural de 3-O- β -glucopiranosil sitosterol (T8)



A substância **T8** foi isolada do extrato diclorometânico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* e a sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (SAKAKIBARA *et al.*, 1983).

Através dos espectros de RMN de ^1H de **T8** (Figuras 4.98) observou-se um dubleto em δ 5,07 ($J = 7,6$ Hz) e um sinal em δ 102,5 no espectro de RMN de ^{13}C correspondente ao H-1' e o C-1', já os sinais nas regiões δ 4,00 a 5,20 referentes aos hidrogênios carbinólicos também foram observados.

O espectro de RMN de ^1H de **T8** mostra vários sinais nas regiões de δ 0,67 a 2,76 indicando a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos característicos do esqueleto esteroidal.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 4.34) estão de acordo com os dados da literatura para o esteróide 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol.

Tabela 4.34: Dados de RMN de ^{13}C de **T8** e comparação com a literatura.

C	T8 (100 MHz, CDCl₃)	SAKAKIBARA <i>et al.</i>, 1983 (100 MHz, CDCl₃)	C	T8 (100 MHz, CDCl₃)	SAKAKIBARA <i>et al.</i>, 1983 (100 MHz, CDCl₃)
1	37,5	37,5	19	19,5	19,4
2	30,3	30,2	20	36,4	36,4
3	78,5	78,5	21	19,0	19,1
4	40,0	40,0	22	34,2	34,3
5	140,9	140,9	23	26,3	26,5
6	122,0	121,8	24	46,0	46,0
7	32,2	32,2	25	29,4	29,5
8	32,1	32,1	26	19,2	19,2
9	50,3	50,3	27	20,0	20,0
10	37,0	36,9	28	23,4	23,4
11	21,3	21,3	29	12,2	12,2
12	39,3	39,3	1'	102,6	102,5
13	42,5	42,5	2'	75,4	75,3
14	56,8	56,9	3'	78,6	78,6
15	24,5	24,5	4'	71,7	71,7
16	28,6	28,6	5'	78,1	78,4
17	56,2	56,3	6'	62,8	62,8
18	12,0	12,0			

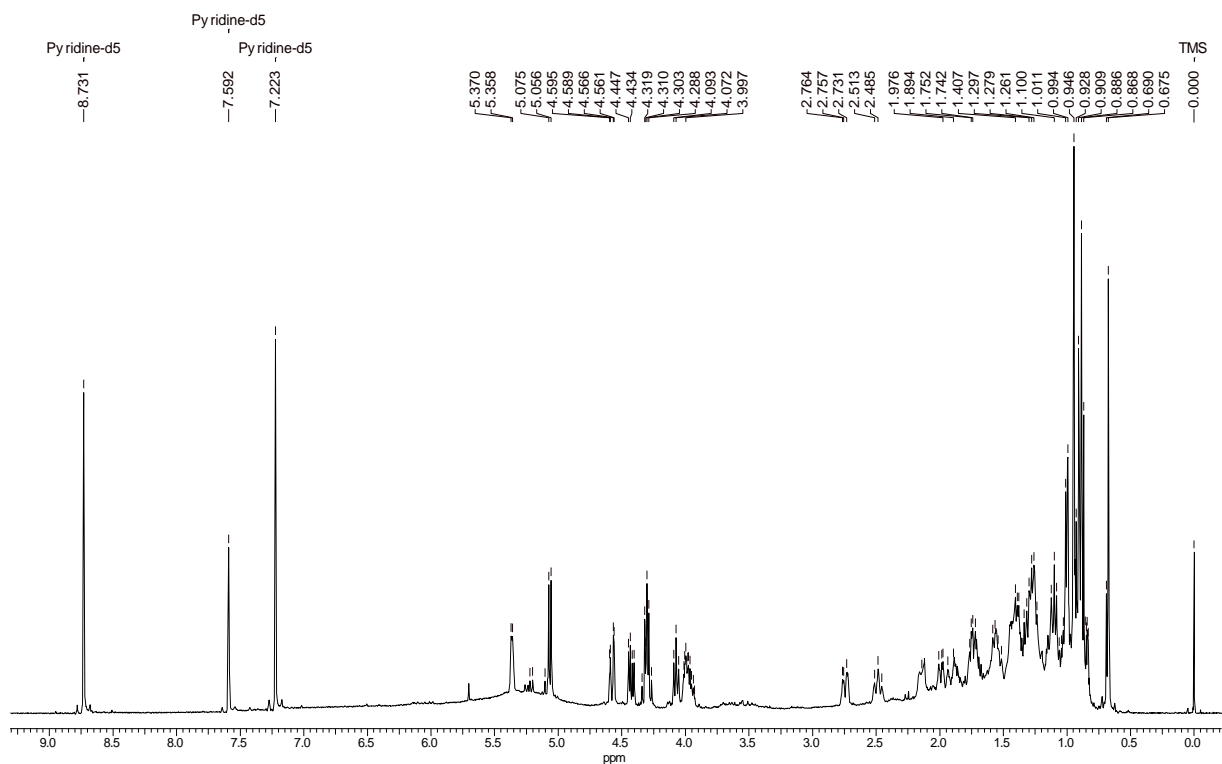


Figura 4.98: Espectro de RMN de ^1H de **T8** (400 MHz, Piridina- d_5).

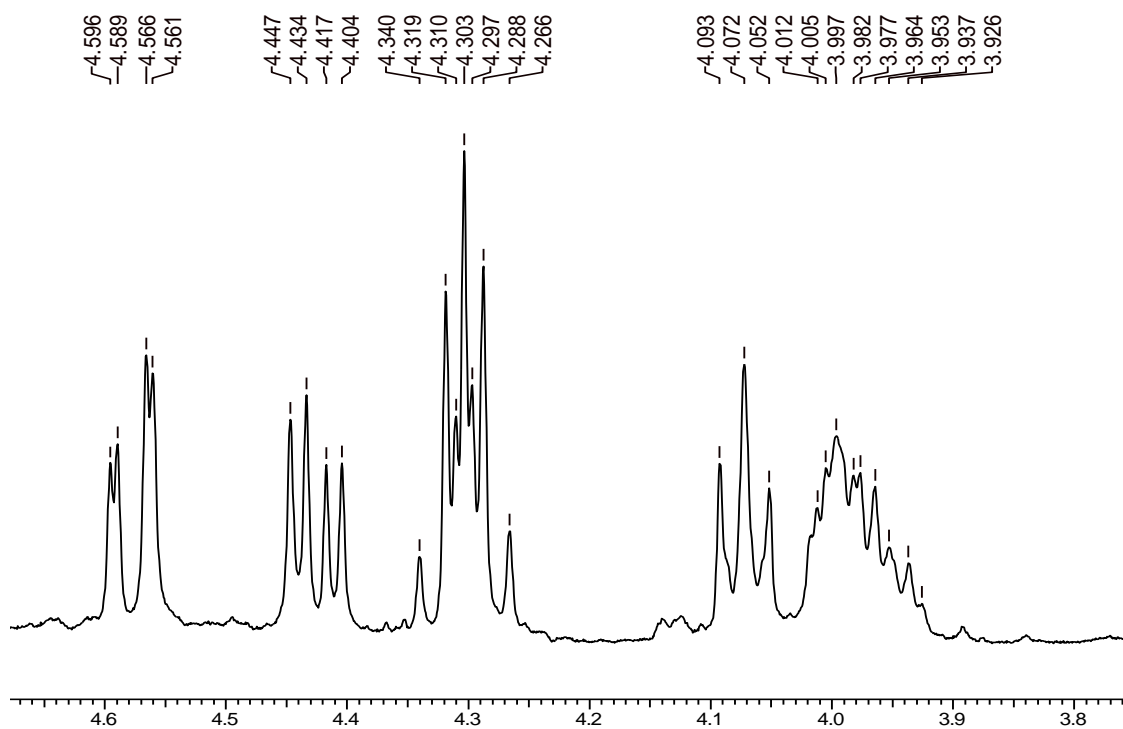


Figura 4.99: Ampliação do espectro de RMN de **T8** (400 MHz, Piridina- d_5).

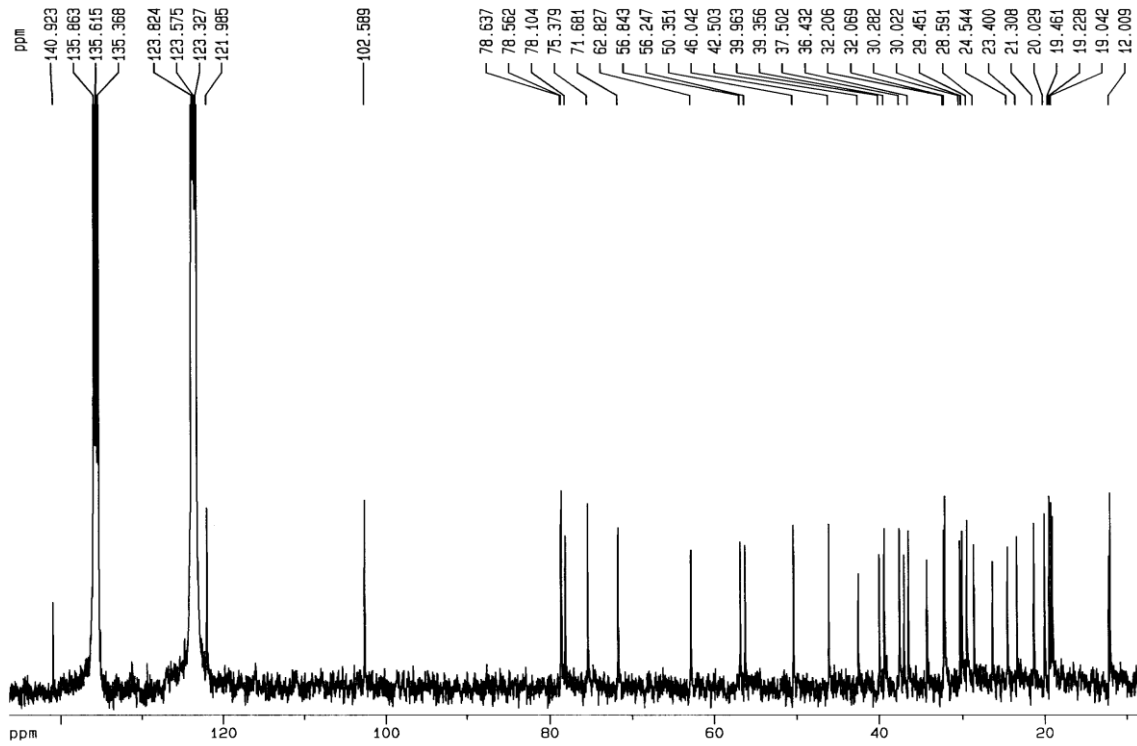


Figura 4.100: Espectro de RMN de ^{13}C de T8 (100 MHz, Piridina- d_5).

4.7 Derivatizações do ácido masticadienóico

Com o intuito de avaliar as relações entre estrutura/atividade do ácido masticadienóico (**T1**) sobre os ensaios biológicos propostos neste projeto, modificações estruturais para obtenção de novos derivados do composto **T1** foram realizadas (Figura 4.101). Para explorar os efeitos dos substituintes nas posições C-3 e C-26 sobre a avaliação biológica, primeiramente **T1** foi convertido em seu éster metílico **T1-A** (obtida pelo tratamento de **T1** com diazometano). Já para a síntese do composto **T1-B** o composto **T1** foi tratado com NH_2OH em MeOH sob refluxo ($65\text{ }^\circ\text{C}$). Os derivados **T1-A** e **T1-B** do ácido masticadienóico foram caracterizados através de análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , CG/EM e por comparações da literatura.

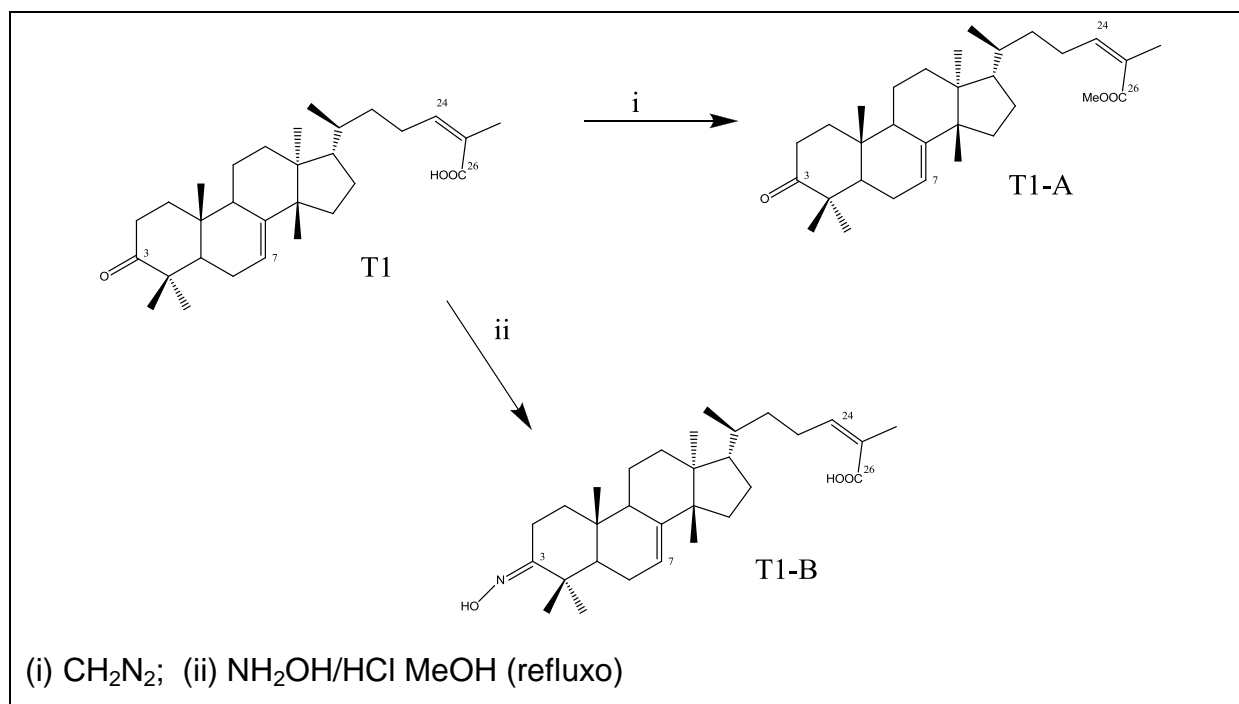
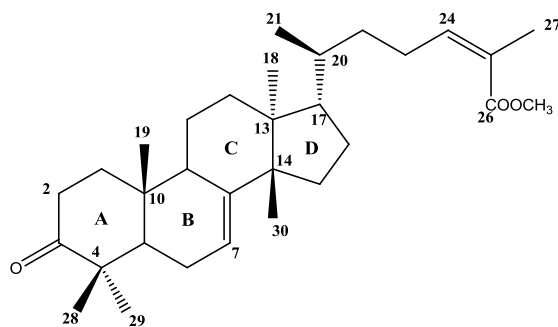
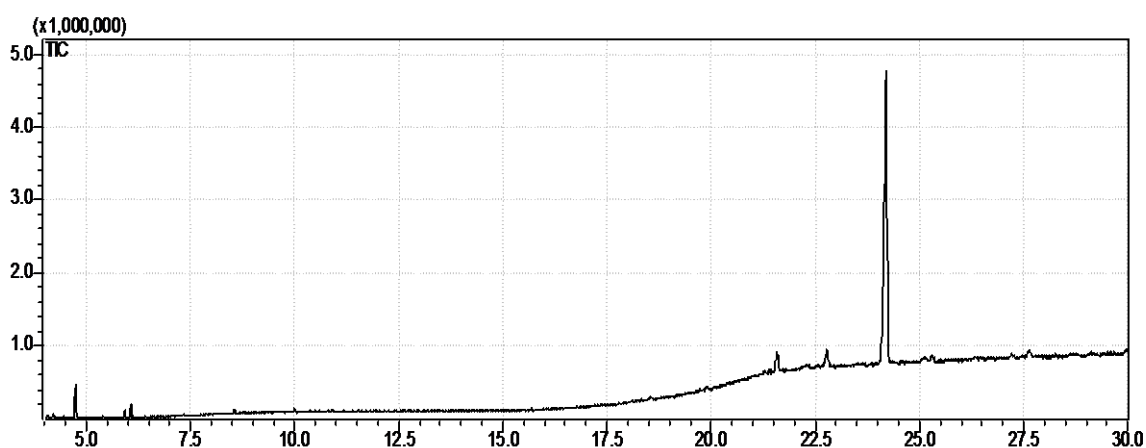


Figura 4.101: Derivatizações do ácido masticadienóico (**T1**).

**T1-A**

Através da análise do cromatograma (Figura 4.102) foi possível verificar um pico 24,2 min (Figura 4.103), já para o espectro de massas do mesmo, observou-se a presença do pico do íon molecular de m/z 468, estando de acordo com sua fórmula molecular $C_{31}H_{48}O_3$. Comparando os espectros RMN de 1H do ácido triterpênico **T1** e seu derivado **T1-A** (Figura 4.104 e 4.105, Tabela 4.35) foi possível verificar a formação do éster metílico, através da presença de um singlete em δ 3,71 integrando para três hidrogênios, característico de um grupo metoxila. No Esquema 4.9 estão apresentadas algumas das fragmentações para o derivado **T1-A**. Os dados RMN de ^{13}C (Figuras 4.106 e 4.007, Tabela 4.36) estão de acordo com os dados da literatura para o derivado **T1-A**.

**Figura 4.102:** Cromatograma do composto **T1-A**.

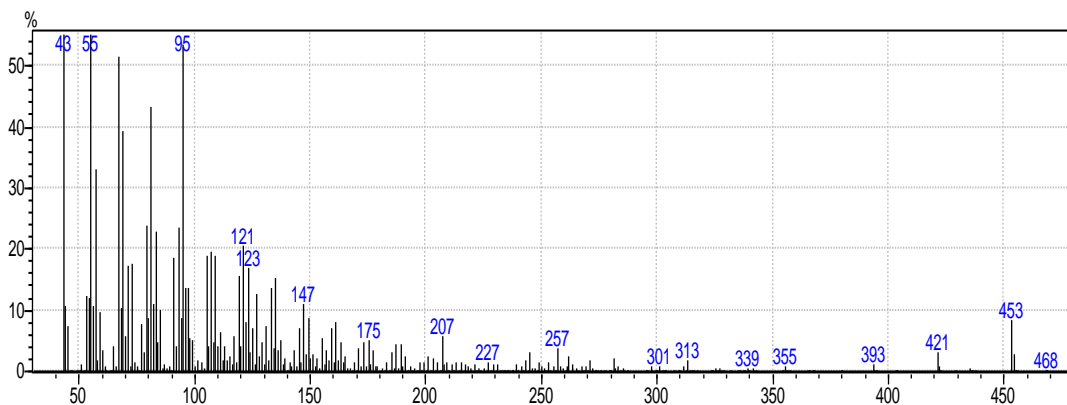
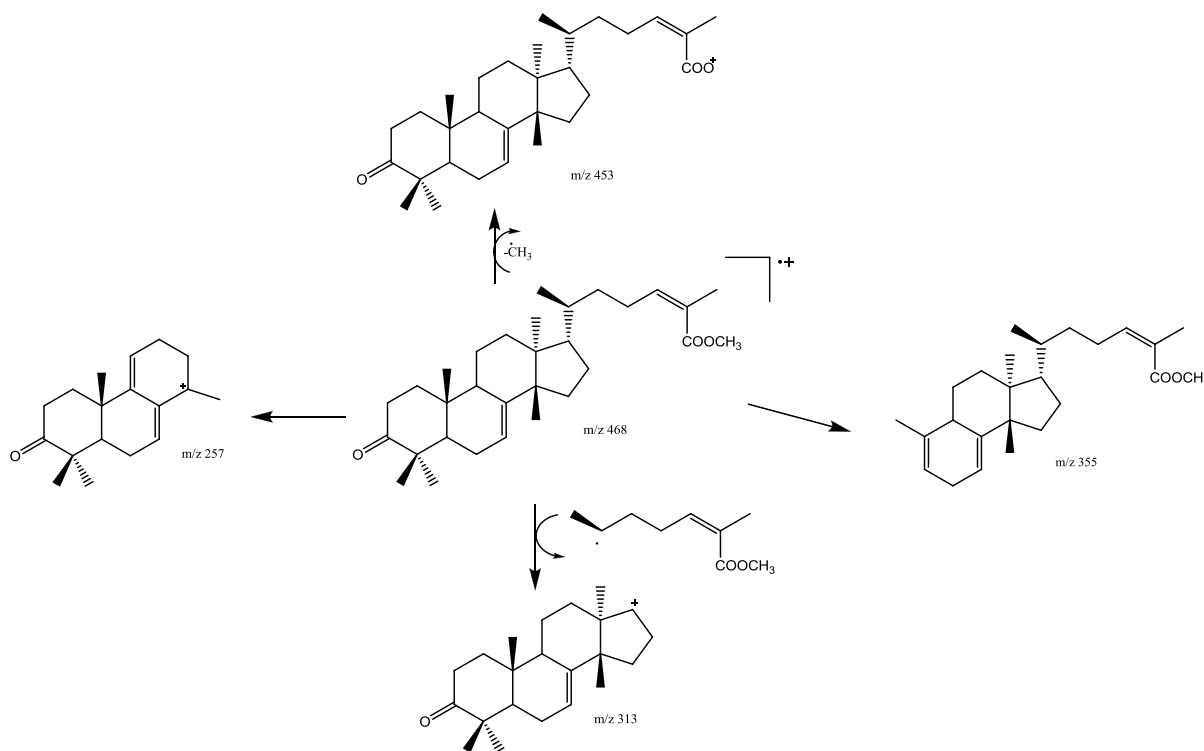


Figura 4.103: Espectro de massas do composto T1-A.



Esquema 4.9: Proposta de Fragmentações do composto T1-A.

Tabela 4.35: Dados de RMN de ^1H dos compostos T1-A e comparação com a literatura

H	Composto T1-A	T1	MULHOLLAND <i>et al.</i> , 1994 MAKINO <i>et al.</i> , 2004
	(400 MHz, CDCl_3)	(400 MHz, CDCl_3)	(400 MHz, CDCl_3)
1	1,80 (m)	1,80 (m)	1,80 (m)
	2,20 (m)	2,20 (m)	2,20 (m)
2	2,73 (dt, $J = 14,5$ e $5,3$)	2,75 (dt, $J = 14,4$ e $5,2$)	2,78 (dt, $J = 14,7$ e $5,9$)
	2,36 (m)	2,40 (m)	2,40 (m)
5	2,20 (m)	2,22 (m)	2,22 (m)
6	1,98 (m)	1,98 (m)	1,98 (m)
7	5,28 (sl)	5,31 (t, $J = 6,0$ Hz)	5,36 (sl)
9	1,50 (m)	1,50 (m)	2,50 (m)
11	1,60 (m)	1,60 (m)	1,50 (m)
12	1,75 (m)	1,75 (m)	1,57 (m)
15	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
	1,60 (m)	1,60 (m)	1,60 (m)
16	1,32 (m)	1,32 (m)	1,32 (m)
	2,03 (m)	2,03 (m)	2,03 (m)
17	1,57 (m)	1,57 (m)	1,57 (m)
18	0,78 (s)	0,81 (s)	0,80 (s)
19	0,98 (s)	1,00 (s)	1,00 (s)
20	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
21	0,88 (d, $J = 6,4$ Hz)	0,88 (d, $J = 6,0$ Hz)	0,97 (d, $J = 5,9$ Hz)
22	1,30 (m)	1,30 (m)	1,30 (m)
	1,68 (m)	1,68 (m)	1,68 (m)
23	2,50 (m)	2,65 (m)	2,78 (m)
	2,50 (m)	2,60 (m)	2,88 (m)
24	5,91 (t, $J = 7,6$ Hz)	6,09 (t, $J = 7,2$ Hz)	6,06 (t, $J = 7,0$ Hz)
27	1,87 (s)	1,92 (s)	1,92 (s)
28	1,10 (s)	1,12 (s)	1,12 (s)
29	0,98 (s)	1,01 (s)	1,00 (s)
30	1,02 (s)	1,05 (s)	1,05 (s)

Tabela 4.36: Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **T1-A** e **T1** e comparação com a literatura

C	Composto T1-A (100 MHz, CDCl₃)	T1 (100 MHz, CDCl₃)	MULHOLLAND <i>et al.</i>, 1994 (100 MHz, CDCl₃)
1	34,0	34,0	34,0
2	24,4	24,6	24,5
3	216,9	217,2	217,1
4	47,8	47,9	47,9
5	51,1	52,3	51,1
6	24,4	24,4	24,3
7	117,7	117,8	117,8
8	145,9	147,2	147,2
9	52,2	52,3	52,2
10	35,9	35,9	36,0
11	18,2	18,2	18,2
12	35,0	35,0	34,9
13	48,4	48,5	48,5
14	52,8	52,9	52,8
15	35,6	35,6	35,6
16	28,1	28,2	28,2
17	52,8	53,5	52,8
18	21,5	21,6	21,6
19	12,7	12,8	12,7
20	43,4	43,5	43,5
21	18,2	18,3	18,3
22	38,4	38,5	38,5
23	26,6	27,0	26,9
24	144,0	145,2	145,9
25	126,4	125,9	125,8
26	168,5	173,8	173,4
27	20,6	20,5	20,5
28	33,5	33,6	33,6
29	21,8	21,9	21,9
30	27,3	27,4	27,4

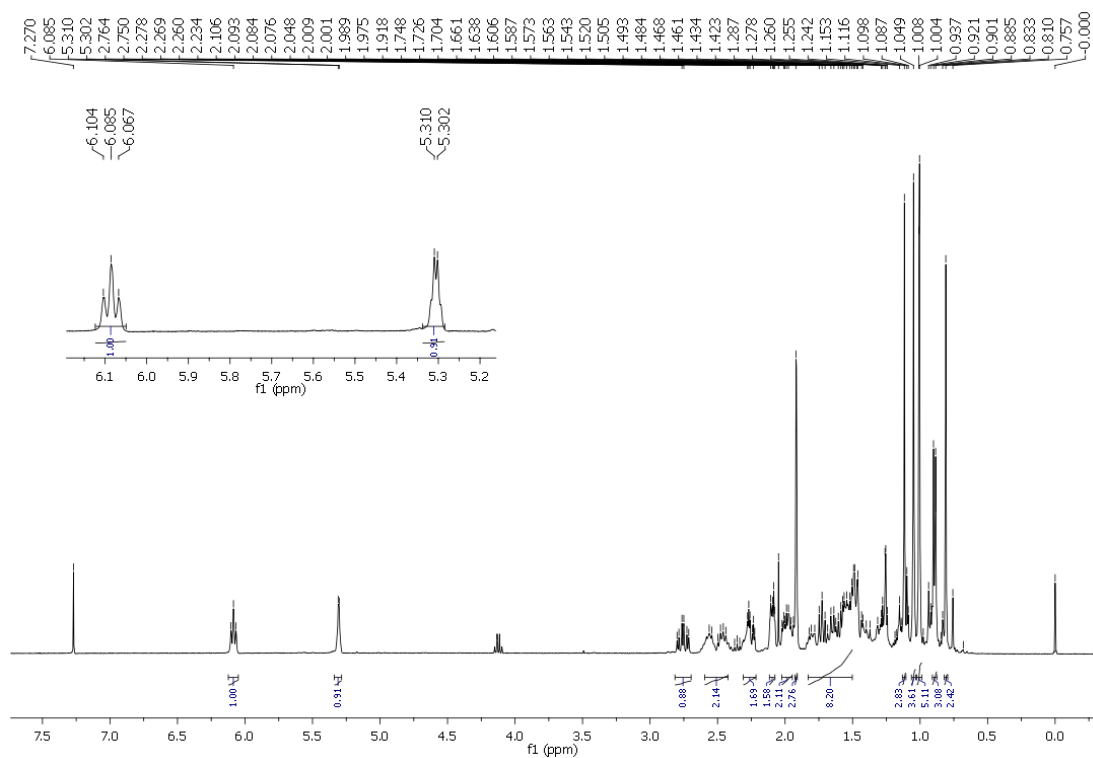


Figura 4.104: Espectro de RMN de ^1H do composto **T1** (400 MHz, CDCl_3).

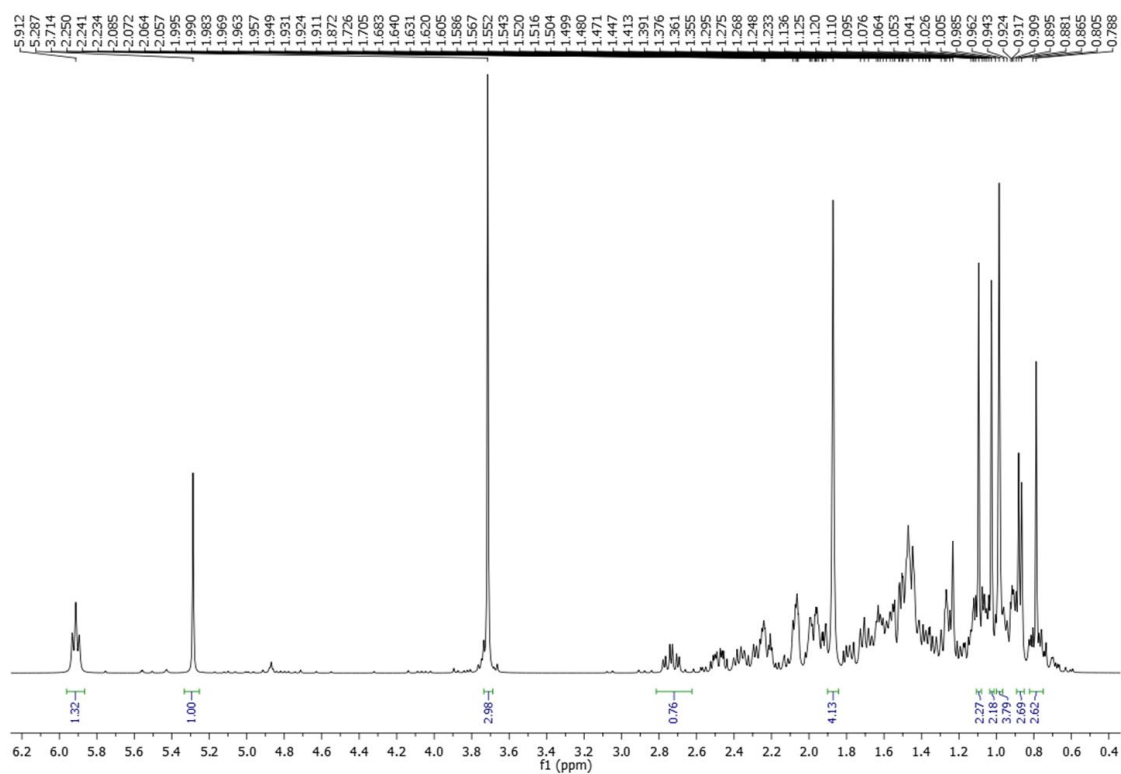


Figura 4.105: Espectro de RMN de ^1H do composto **T1-A** (400 MHz, CDCl_3).

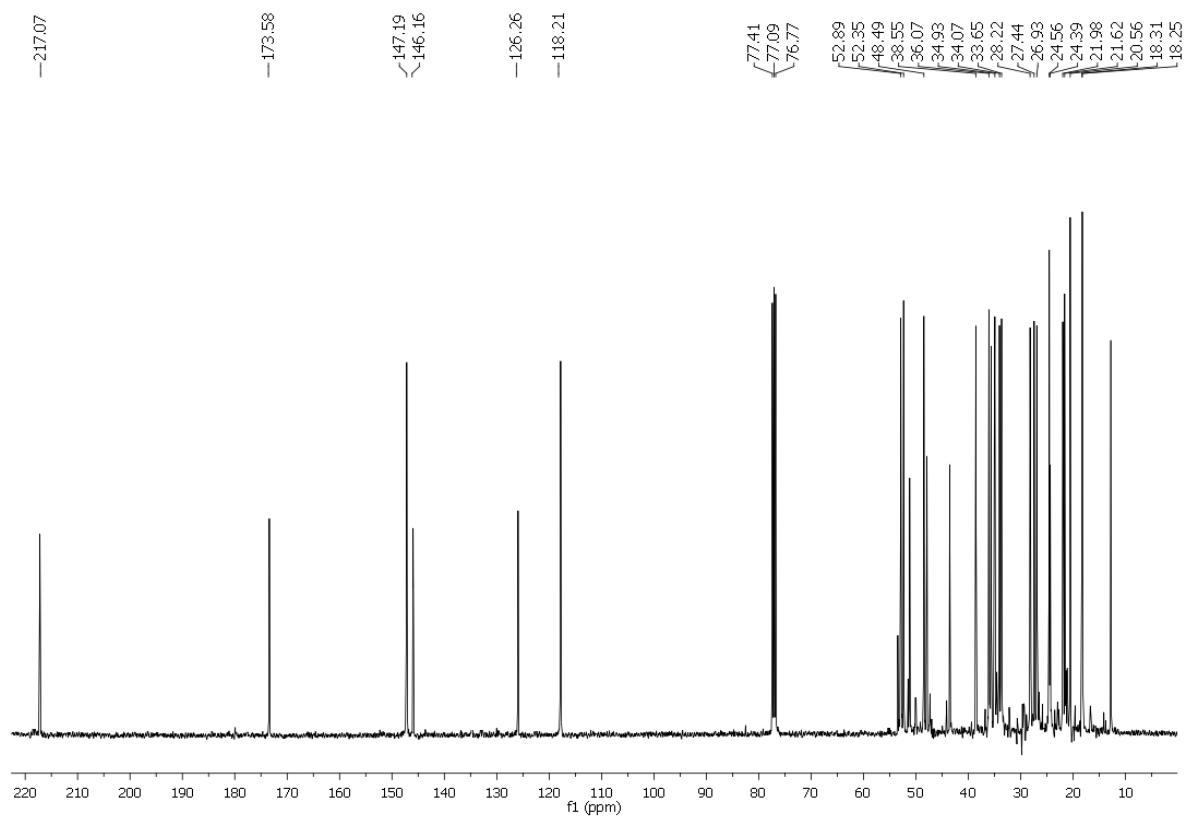


Figura 4.106: Espectro de RMN de ^{13}C do composto T1 (100 MHz, CDCl_3).

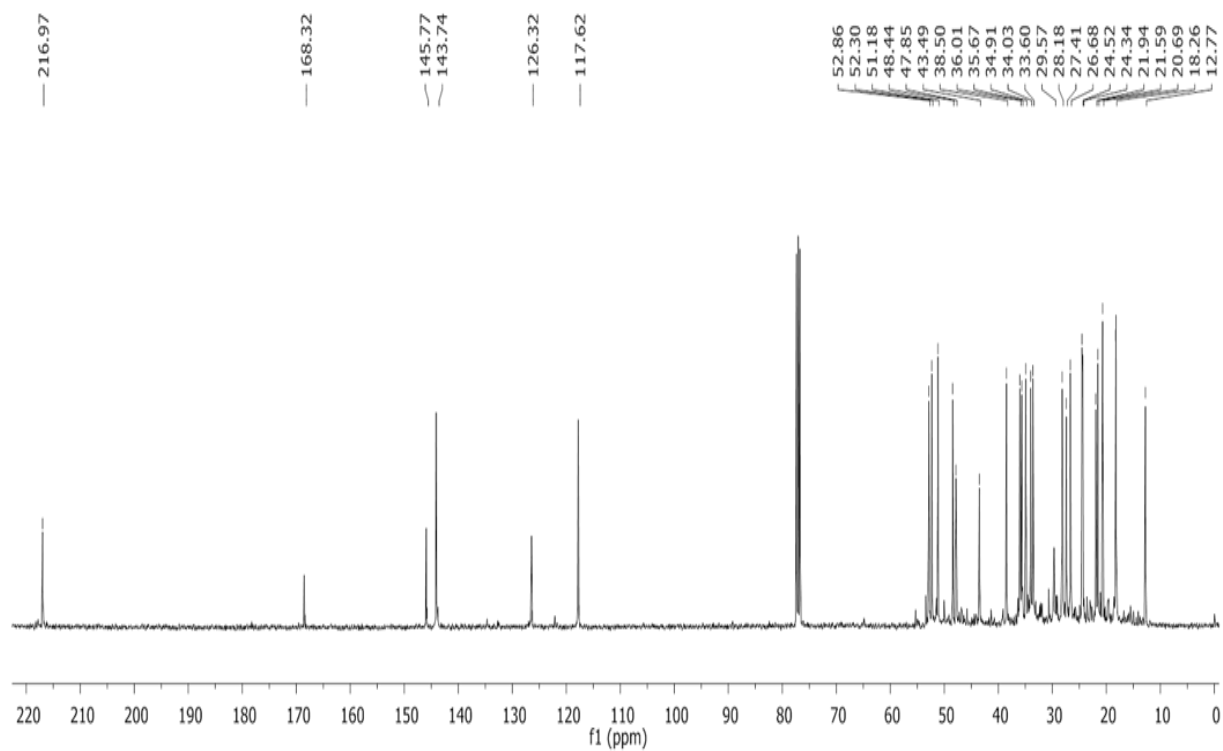
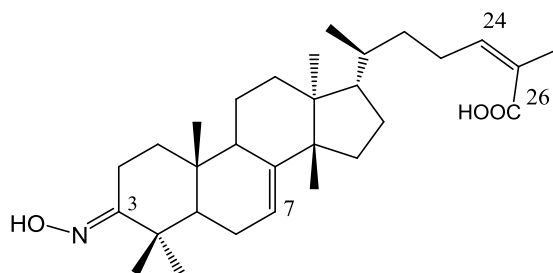


Figura 4.107: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado T1-A (100 MHz, CDCl_3).

Derivado **T1-B**

O Derivado **T1-B** foi caracterizado através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparações dos dados do composto **T1** com a literatura.

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.108, Tabela 4.37) foi observado à presença de seis singletos referentes a hidrogênios metílicos em δ 0,78, δ 0,92, δ 0,99, δ 1,11, δ 1,13, δ 1,92 e vários sinais entre δ 1,20 a δ 2,50. Foram observados também sinais em δ 6,03 (*t*, $J = 6,0$ Hz, H-24) e δ 5,27 (*sl*, H-7) referente aos hidrogênios olefínicos típicos do ácido masticadienóico (**T1**).

A presença do sinal em δ 3,33 (*dt*, $J = 14,0$ e $4,0$ Hz, H-2a) auxiliou na caracterização da função oxima no derivado **T1-B**, visto que, os pares eletrônicos do oxigênio da função oxima causam um efeito anisotrópico desprotetor sobre os núcleos próximos, ocasionando assim, a desblindagem de hidrogênio H-2a que anteriormente era observado em δ 2,75 (*dt*, $J = 14,0$ e $5,2$ Hz).

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou (Figuras 4.109, Tabela 4.38) vários sinais na região de δ 12,0 a δ 173,0. A presença do sinal em δ 168,0 indicou a formação da oxima na posição C-3, visto que o sinal em δ 216,0 característico da carbonila em C-3 não foi mais observado.

Tabela 4.37: Dados de RMN de ^1H de **T1-B** e **T1** em comparação com a literatura

H	Derivado T1-B	Composto T1	MULHOLLAND <i>et al.</i> , 1994
	(400 MHz, CDCl_3)	(400 MHz, CDCl_3)	MAKINO <i>et al.</i> , 2004 (400 MHz, CDCl_3)
1	1,80 (m)	1,80 (m)	1,80 (m)
	2,20 (m)	2,20 (m)	2,20 (m)
2a	3,33 (dt, $J = 14,0$ e $4,0$)	2,75 (dt, $J = 14,4$ e $5,2$)	2,78 (dt, $J = 14,7$ e $5,9$)
2b	2,00 (m)	2,40 (m)	2,40 (m)
5	2,20 (m)	2,22 (m)	2,22 (m)
6	1,98 (m)	1,98 (m)	1,98 (m)
7	5,27 (s)	5,31 (t, $J = 6,0$ Hz)	5,36 (s)
9	1,50 (m)	1,50 (m)	2,50 (m)
11	1,60 (m)	1,60 (m)	1,50 (m)
12	1,75 (m)	1,75 (m)	1,57 (m)
15	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
	1,60 (m)	1,60 (m)	1,60 (m)
16	1,32 (m)	1,32 (m)	1,32 (m)
	2,03 (m)	2,03 (m)	2,03 (m)
17	1,57 (m)	1,57 (m)	1,57 (m)
18	0,78 (s)	0,81 (s)	0,80 (s)
19	0,92 (s)	1,00 (s)	1,00 (s)
20	1,47 (m)	1,47 (m)	1,47 (m)
21	0,88 (d, $J = 6,0$ Hz)	0,88 (d, $J = 6,0$ Hz)	0,97 (d, $J = 5,9$ Hz)
22	1,30 (m)	1,30 (m)	1,30 (m)
	1,68 (m)	1,68 (m)	1,68 (m)
23	2,50 (m)	2,65 (m)	2,78 (m)
	2,50 (m)	2,60 (m)	2,88 (m)
24	6,02 (t, $J = 7,6$ Hz)	6,09 (t, $J = 7,2$ Hz)	6,06 (t, $J = 7,0$ Hz)
27	1,92 (s)	1,92 (s)	1,92 (s)
28	1,13 (s)	1,12 (s)	1,12 (s)
29	0,99 (s)	1,01 (s)	1,00 (s)
30	1,11 (s)	1,05 (s)	1,05 (s)

Tabela 4.38: Dados de RMN de ^{13}C de **T1-B** e **T1** em comparação com a literatura

C	Derivado T1-B (100 MHz, CDCl_3)	Composto T1 (100 MHz, CDCl_3)	MULHOLLAND <i>et al.</i>, 1994 (100 MHz, CDCl_3)
1	34,0	34,0	34,0
2	25,9	24,6	24,5
3	168,0	217,2	217,1
4	41,0	47,9	47,9
5	51,2	52,3	51,1
6	24,3	24,4	24,3
7	117,6	117,8	117,8
8	146,1	147,2	147,2
9	52,6	52,3	52,2
10	36,3	35,9	36,0
11	18,3	18,2	18,2
12	35,3	35,0	34,9
13	48,7	48,5	48,5
14	52,9	52,9	52,8
15	35,7	35,6	35,6
16	28,3	28,2	28,2
17	52,9	53,5	52,8
18	21,9	21,6	21,6
19	12,9	12,8	12,7
20	43,6	43,5	43,5
21	18,4	18,3	18,3
22	38,0	38,5	38,5
23	27,2	27,0	26,9
24	145,2	145,2	145,9
25	126,5	125,9	125,8
26	173,0	173,8	173,4
27	20,6	20,5	20,5
28	33,7	33,6	33,6
29	22,4	21,9	21,9
30	27,4	27,4	27,4

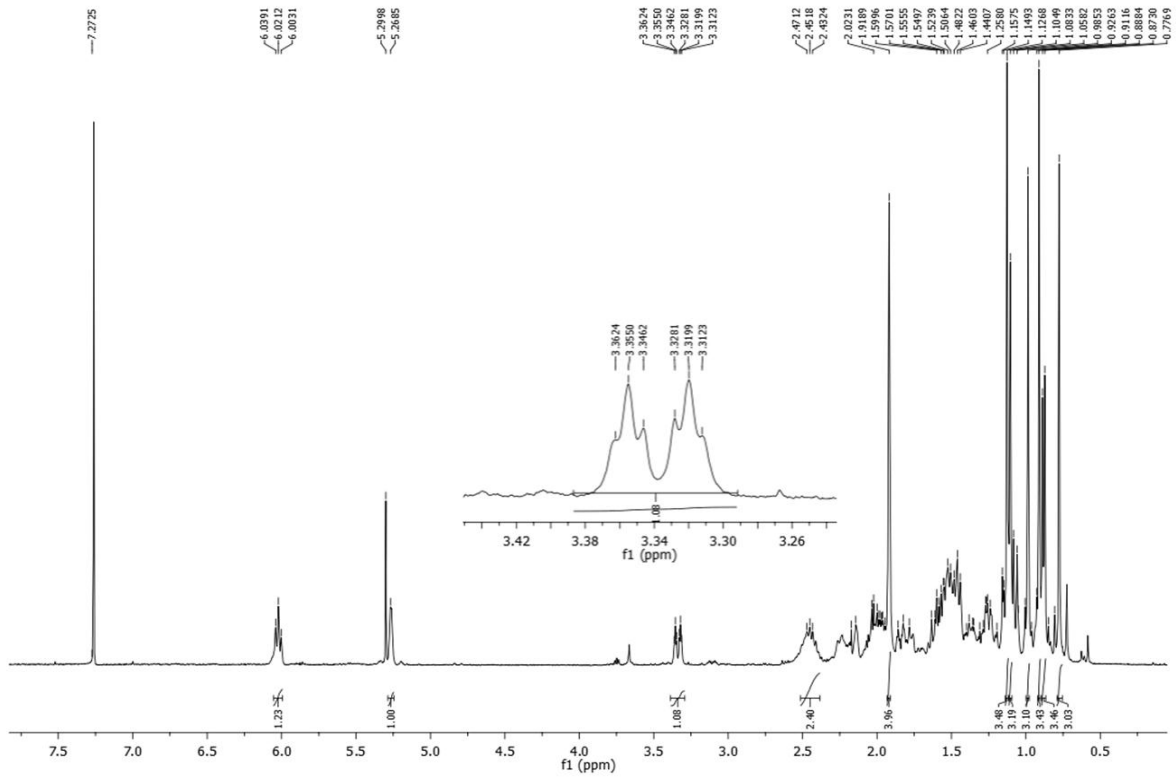


Figura 4.108: Espectro de RMN de ^1H do derivado **T1-B** (400 MHz, CDCl_3).

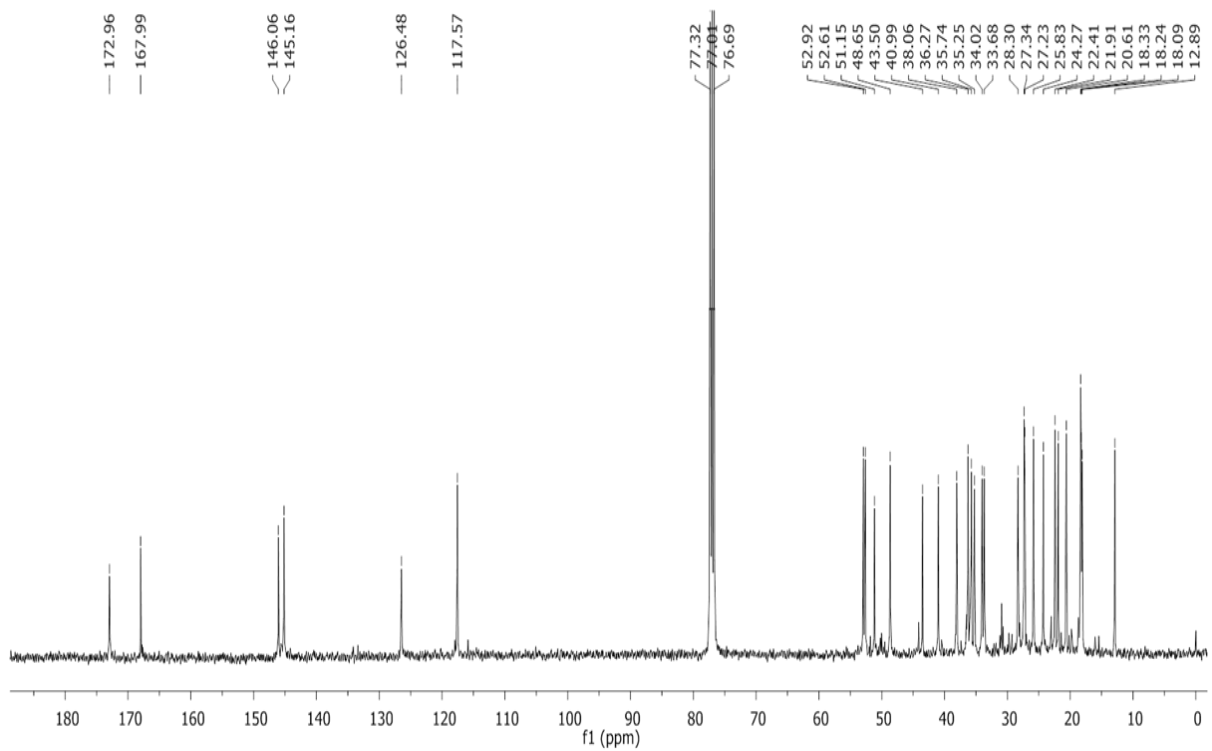


Figura 4.109: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **T1-B** (100 MHz, CDCl_3).

4.8 Caracterização dos complexos metálicos

4.8.1 Caracterização do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂·2H₂O

O espectro de IV do ligante (quercetina), complexo precursor e do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂·2H₂O apresentaram evidências da coordenação entre o metal de transição (Ru-complexo precursor) e o ligante. As frequências vibracionais mais características para os complexos e o ligante são mostradas na Tabela 4.39 (Figura 4.110).

Tabela 4.39: Valores para as bandas características do flavonóide quercetina, complexo precursor[#] e complexo* obtidas através do espectro de IV

cm ⁻¹	Quercetina	Complexo precursor [#]	Complexo*
u (C=O)	1668	-	1650
u (C=C)	1610	1610-1650	1610-1650
u (C=N)	-	1415-1460	1415-1460
u (Ru-N)	-	658	658
u (Ru-O)	-	-	557
u (N-O)	-	-	848

cis-Ru(Cl₂)(2,2'-bipiridina)₂·2H₂O

* cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂·2H₂O

Através das comparações dos espectros de IV do ligante (quercetina), complexo precursor e o complexo $\text{cis-[Ru(2,2'-bipiridina)}_2\text{(quercetina)](PF}_6\text{)}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, importantes informações foram obtidas, dentre elas o aparecimento das bandas em 557 cm^{-1} [ν (Ru-O)] e 848 cm^{-1} [ν (N-O)] no complexo formado. Estas bandas não eram observadas nos espectros de IV do ligante e do precursor (Figura 4.110), confirmando a formação do complexo $\text{cis-[Ru(2,2'-bipiridina)}_2\text{(quercetina)](PF}_6\text{)}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nota-se também através do espectro de IV que após 6 horas de síntese a intensidade das bandas características do complexo esperado eram pouco menos intensas, se comparado ao espectro do complexo formado, indicando a possível formação do produto esperado. Entretanto ao analisar outros dados, tais como o espectro de RMN de ^1H da reação de 6 horas, foi observado vários sinais característicos dos materiais de partida, indicando que pouco produto havia se formado.

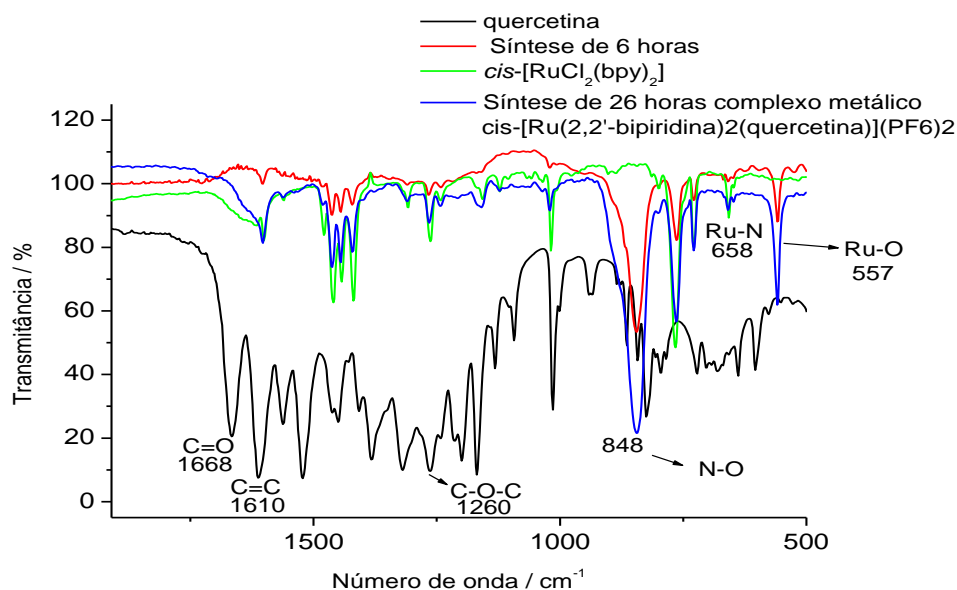


Figura 4.110: Espectros de absorção no IV do ligante, complexo precursor $\text{cis-Ru(Cl}_2\text{)(2,2'-bipiridina)}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e complexo $\text{cis-[Ru(2,2'-bipiridina)}_2\text{(quercetina)](PF}_6\text{)}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Todas as análises através de RMN de ^1H foram realizadas no mesmo solvente deuterado (DMSO). Os espectros de RMN de ^1H e os dados do ligante (quercetina) (Tabela 4.40; Figura 4.111), complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Tabela 4.41; Figura 4.112) e complexo $\text{cis-[Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estão listados abaixo.

A análise do espectro de RMN de ^1H do ligante (quercetina) (Figura 4.111) apresentou sinais característicos de um flavonol com um sistema de substituição 3',4' no anel B com um sinal em δ 7,79 (d , $J = 2,0$ Hz, H-2'); δ 7,65 (dd , $J = 9,0$ e $2,0$ Hz, H-6') e δ 6,99 (d , $J = 9,0$ Hz, H-5'). Foram observados dois sinais típicos de um sistema de acoplamento AX no anel A, correspondentes a 2H que mantém relação meta entre si, em δ 6,31 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,52 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8). Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H estão de acordo com os dados da literatura para a substância quercetina (MARKHAM, *et al.*, 1994).

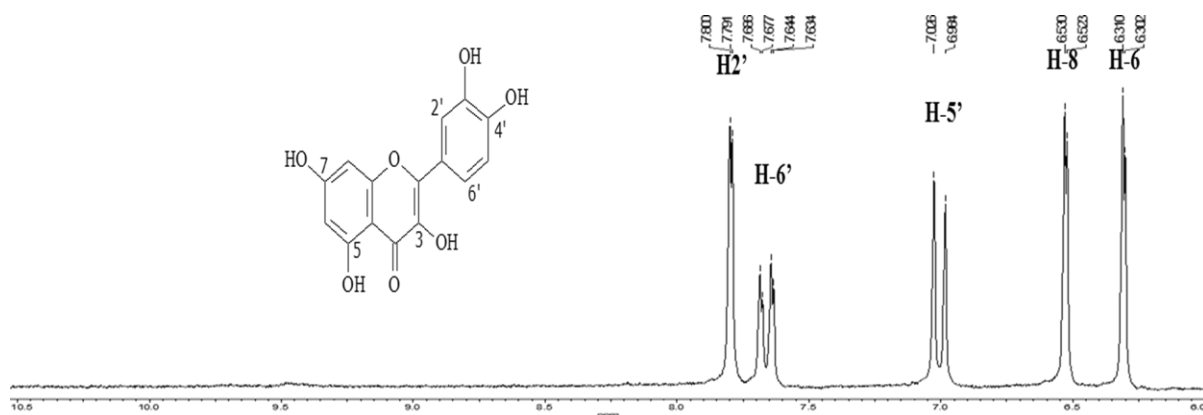
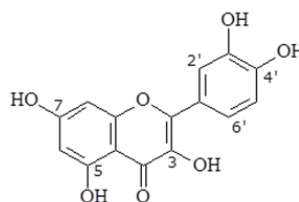


Figura 4.111: Espectro de RMN de ^1H do ligante (flavonóide-quercetina) (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Tabela 4.40: Dados de RMN de ^1H do ligante (quercetina).

Quercetina	
H	(200 MHz, DMSO)
6	6,31 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
8	6,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
2'	7,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
5'	6,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)
6'	7,65 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 2,0 Hz)



Os sinais dos prótons dos anéis da bipyridina do complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipyridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram comparados aos dados da literatura (BIRCHALL, *et al.*, 1979). O espectro do RMN de ^1H apresentou, na região dos deslocamentos químicos de prótons ligados a anéis aromáticos, 8 sinais distintos referentes aos 16 hidrogênios pertencentes ao precursor (Tabela 4.41), isto ocorre devido às piridinas da bipyridina serem inequivalentes.

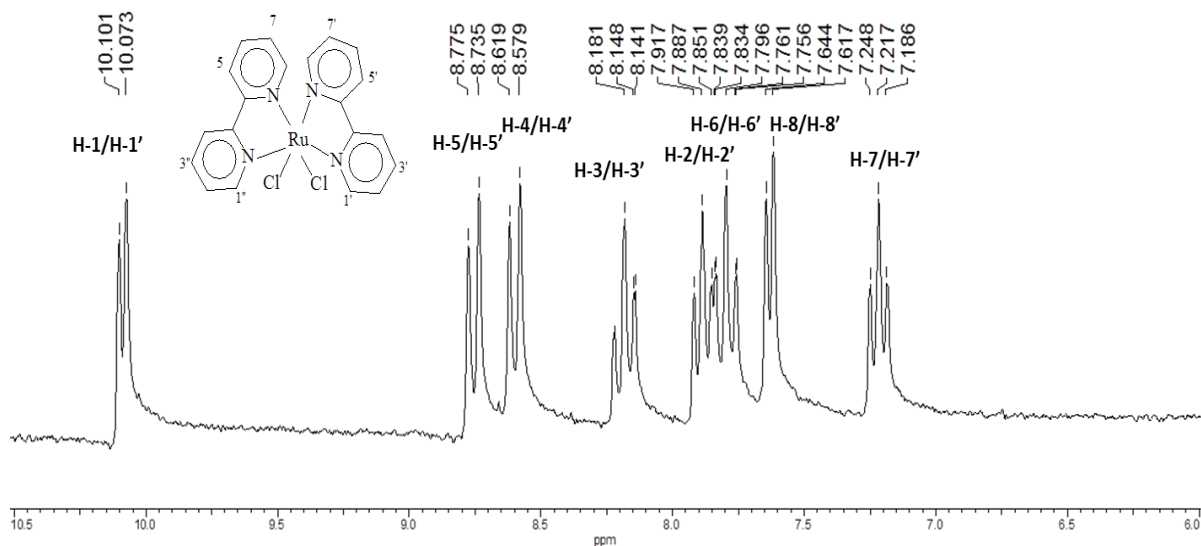
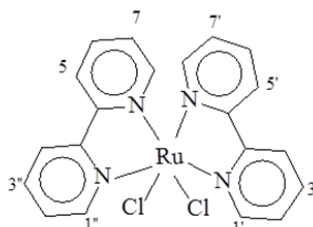

Figura 4.112: Espectro de RMN de ^1H do complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipyridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200 MHz, DMSO).

Tabela 4.41: Dados de RMN de ^1H do complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

H	Complexo precursor # (200 MHz, DMSO)
1/1'	10,10 (<i>dl</i> , $J = 6,0$ Hz)
2/2'	7,89 (<i>tl</i> , $J = 8,0$ Hz)
3/3'	8,18 (<i>tl</i> , $J = 8,0$ Hz)
4/4'	8,60 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)
5/5'	8,75 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)
6/6'	7,80 (<i>tl</i> , $J = 8,0$ Hz)
7/7'	7,22 (<i>tl</i> , $J = 6,0$ Hz)
8/8'	7,63 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)



$\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A Tabela 4.42 apresenta os dados obtidos de RMN de ^1H para o complexo $\text{cis-[Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200 MHz, DMSO). Os sinais dos hidrogênios do anel aromático da bipyridina apresentam uma série de sinais (dubletos, tripletos e multipletos) na região de δ 6,9 a 10,2 ppm. Uma característica dos complexos polipiridínicos de Ru(II) em posição *cis* é que cada uma das piridinas pertencentes ao anel se posicionam em posições não equivalentes. O mesmo foi observado para o complexo formado. Os anéis das bipyridinas estão representados pelos símbolos “ e “.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H do complexo formado (Figura 4.113), observou-se:

- Desdobramentos dos sinais dos hidrogênios das bipyridinas, visto que, com a complexação do metal Ru(II) ao ligante (quercetina), houve mudanças no ambiente químico anteriormente observado para o complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

- Dos sinais observados na região dos sinais de prótons do anel aromático em δ 9,65 e δ 10,17 foram atribuídos aos hidrogênios H-1” e H-1”’, respectivamente. O dubleto em δ 9,65 foi atribuído ao hidrogênio H-1” devido ao efeito de blindagem exercido pela nuvem eletrônica do anel A do flavonóide quercetina à biperidina (“).
- Foi observado também o deslocamento de todos os sinais, tanto para o complexo precursor quanto para o ligante (quercetina) anteriormente citados. A confirmação da complexação do metal Ru(II) nas posições 3 e 5 do flavonóide quercetina foi confirmada pelo efeito mesomérico (desblindagem 0,70 ppm) observado para ambos hidrogênios H-6 e H-8.

Através de todas as comparações realizadas entre os espectros de RMN de ^1H do ligante, complexo precursor e complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-biperidina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 4.113) pode-se confirmar a formação do produto desejado.

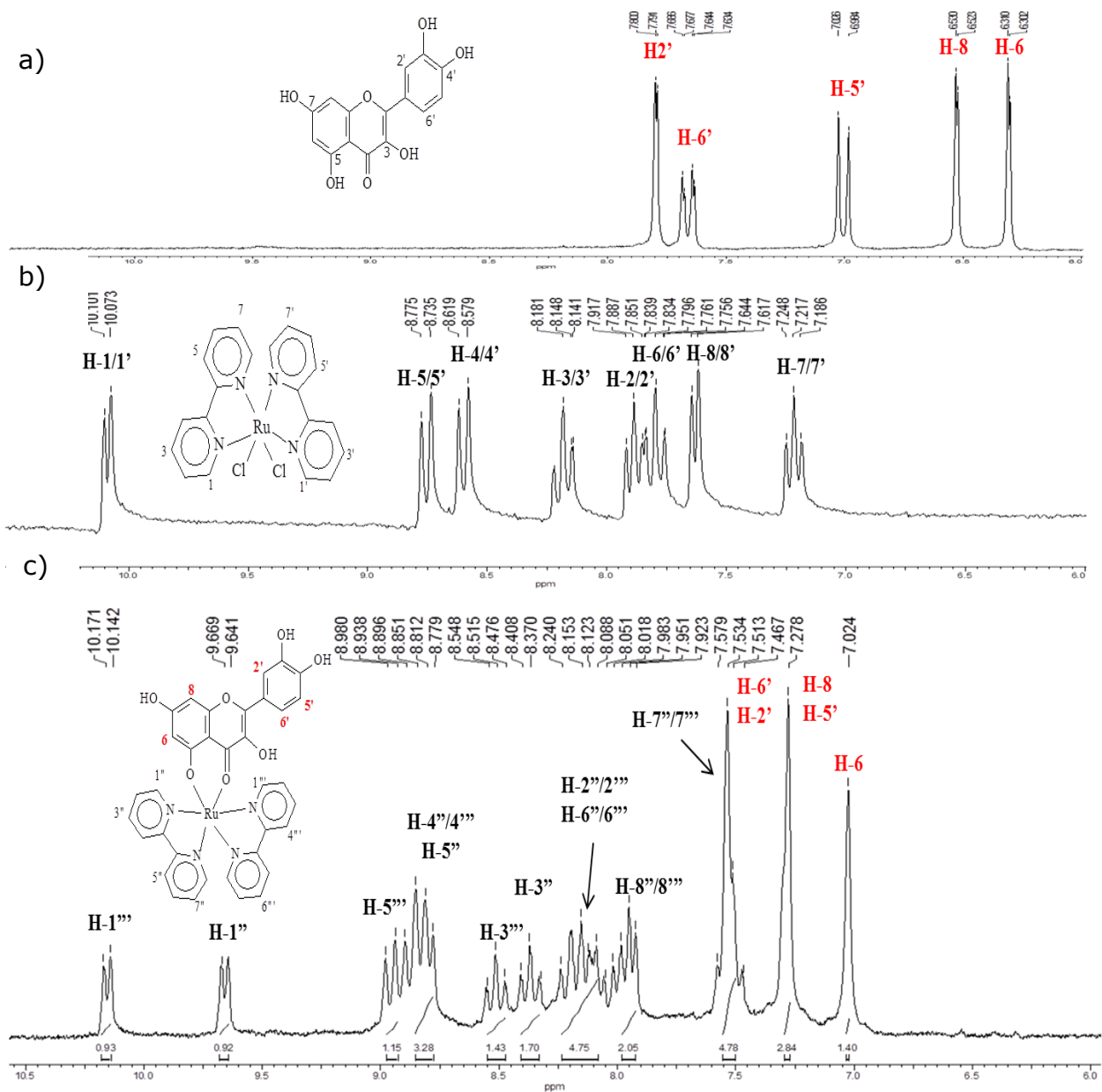
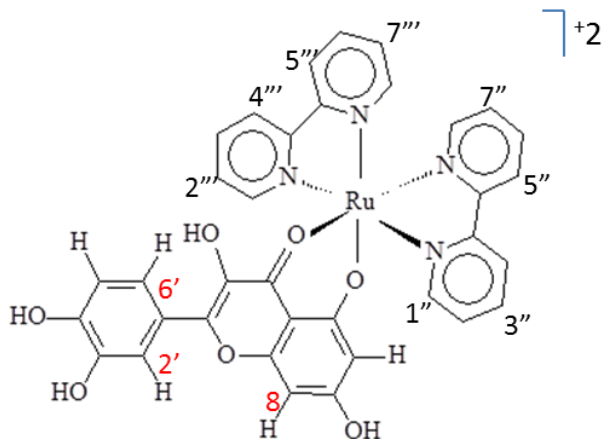


Figura 4.113: Espectros de RMN de ^1H ; a) ligante (quercetina); b) complexo precursor ; c) complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200 MHz, DMSO).

Tabela 4.42: Dados de RMN de ^1H do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

H	Complexo metálico*
6	7,02 (<i>sl</i>)
8	7,27 (<i>sl</i>)
2'	7,53 (<i>sl</i>)
5'	7,27 (<i>sl</i>)
6'	7,53 (<i>sl</i>)
1''	9,65 (<i>dl</i> , $J = 6,0$ Hz)
2''	8,15 (<i>m</i>)
3''	8,37 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
4''	8,81 (<i>m</i>)
5''	8,81 (<i>m</i>)
6''	8,15 (<i>m</i>)
7''	7,50 (<i>m</i>)
8''	7,98 (<i>m</i>)
1'''	10,17 (<i>dl</i> , $J = 6,0$ Hz)
2'''	8,15 (<i>m</i>)
3'''	8,51 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
4'''	8,85 (<i>m</i>)
5'''	8,93 (<i>m</i>)
6'''	8,15 (<i>m</i>)
7'''	7,50 (<i>m</i>)
8'''	7,98 (<i>m</i>)



* $\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Os espectros de absorção eletrônica dos compostos foram obtidos na região entre 200-800 nm. Os flavonóides exibem duas bandas de absorção na região do UV. As absorções entre 320-385 nm correspondem à parte do anel B, e a absorção entre 240-280 nm corresponde ao anel A (Figura 4.114).

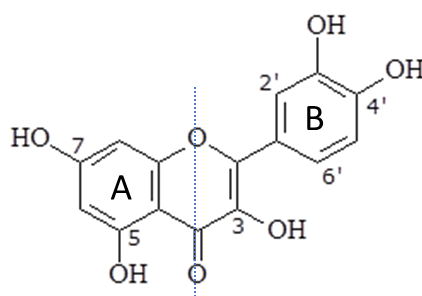


Figura 4.114: Estrutura da quercetina e a divisão das bandas (A e B) relacionadas à absorção no UV.

O espectro de UV do flavonóide quercetina está apresentado na Figura 4.115, nele são observadas as bandas em 255 e 374 nm, características do flavonoide quercetina.

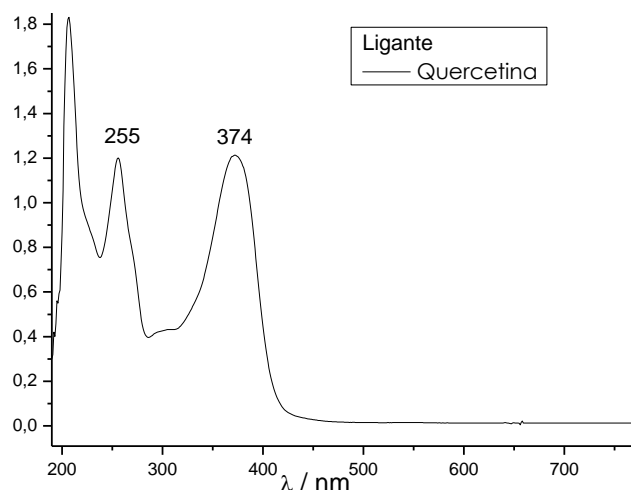


Figura 4.115: Espectros de absorção no UV do ligante (quercetina) (MeOH).

Para o complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são observadas várias bandas de absorção (245, 294, 351 e 505 nm) (Figura 4.116). Sabe-se que informações obtidas através dos espectros de absorção no UV apresentam dados significativos com relações aos complexos de coordenação. Entretanto para os complexos com misturas de ligantes, os espectros se tornam mais complexos, dificultando a análise de formação do produto formado através desta técnica. Neste caso, semelhantes bandas de absorção são observadas em ambos, ligante (quercetina) e o complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dificultando assim a análise e comparação das informações obtidas do produto formado e os das matérias de partida.

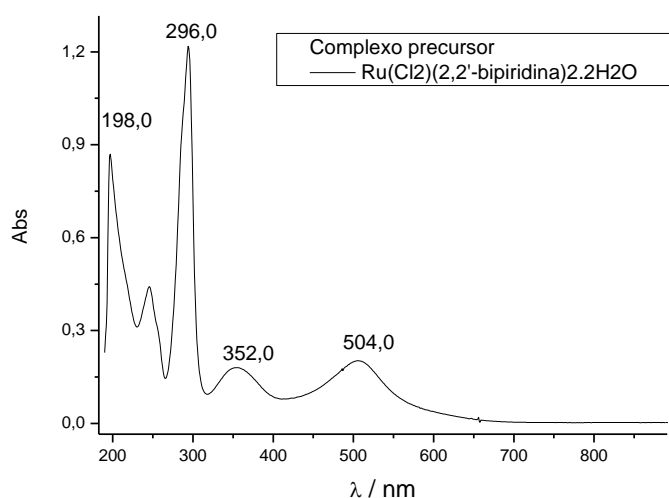


Figura 4.116: Espectros de absorção no UV do complexo precursor $\text{cis-Ru}(\text{Cl}_2)(2,2'\text{-bipiridina})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EtOH/H₂O).

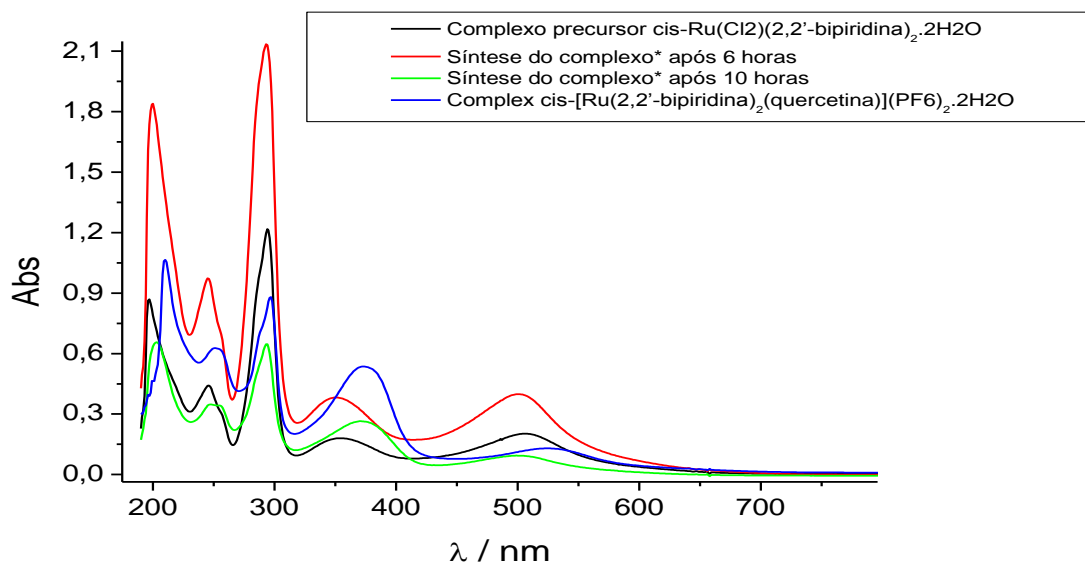


Figura 4.117: Espectros de absorção no UV do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂.2H₂O (EtOH/H₂O).

Das técnicas de análise acima mencionadas, duas se destacaram para a caracterização do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂.2H₂O: RMN de ¹H e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).

4.8.2 Caracterização do complexo [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄]

A análise do espectro de absorção no ultravioleta do ligante (quercetina) e o complexo formado (Figura 4.118), com varredura na faixa de λ 200-600 nm forneceu dados importantes sobre o produto formado. As bandas resultantes no espectro no UV do complexo [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄] em metanol, permitiu observar uma banda de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 434 nm, característico da formação do complexo. O deslocamento batocrômico em relação ao ligante pode ser explicado pela extensão do sistema de conjugação devido à formação do complexo. Os deslocamentos das bandas de absorção no UV fornecem dados importantes, visto que interações dos íons Cu^{II} com a quercetina na proporção de 2:1 (metal/ligante) produzem deslocamentos batocrômicos em ambas bandas de absorção.

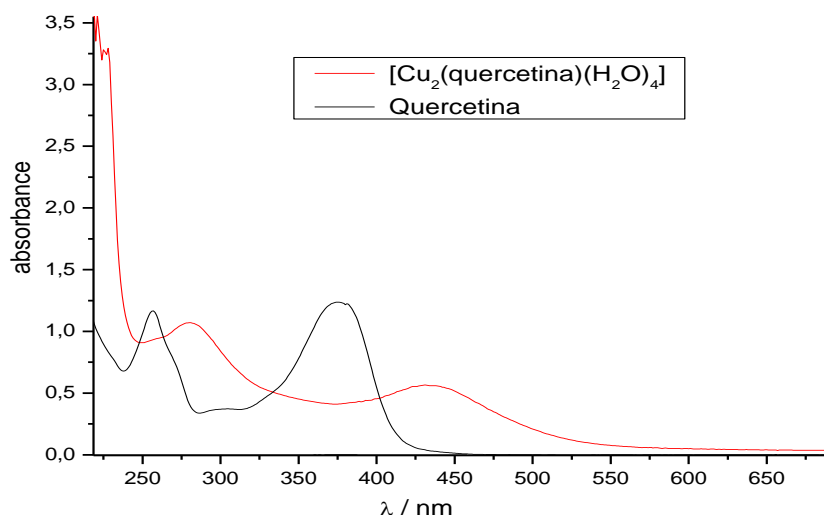


Figura 4.118: Espectros de absorção no UV do ligante (quercetina) e complexo $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$.

Tabela 4.43: Dados do espectro no UV para o ligante (quercetina) e complexo

Compostos	λ máx. (nm)	
	Banda I	Banda II
Quercetina	258	376
$[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$	275	434

Através de comparações dos espectros de IV do ligante (quercetina) e do complexo ($[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$) formado foram observados modificações que caracterizam a formação do complexo metálico.

No espectro de IV do ligante (quercetina) (Fig. 4.119) a banda de absorção na região carbonílica aparece em 1654 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] e para o espectro do complexo observou-se um deslocamento de aproximadamente 40 cm^{-1} . Esse deslocamento sugere que a coordenação do ligante está ocorrendo no grupo carbonílico. Pode ser notado também que as frequências $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{C})$ são pouco deslocadas quando comparadas ao espectro de IV do complexo formado,

indicando que o oxigênio do anel C não está envolvido nos pontos de coordenação, já a frequência ν (M-O) característica da coordenação metal-ligante é observada em 621 cm^{-1} (Tabela 4.44).

Tabela 4.44: Valores para as bandas características do flavonóide quercetina e complexo $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ obtidas através do espectro de IV.

cm^{-1}	Quercetina	Complexo #
ν (O-H)	3300-3500	3134-3458
ν (C=O)	1654	1618
ν (C=C)	1560	1580
ν (C-O-C)	1254	1270
ν (M-O)	--	621

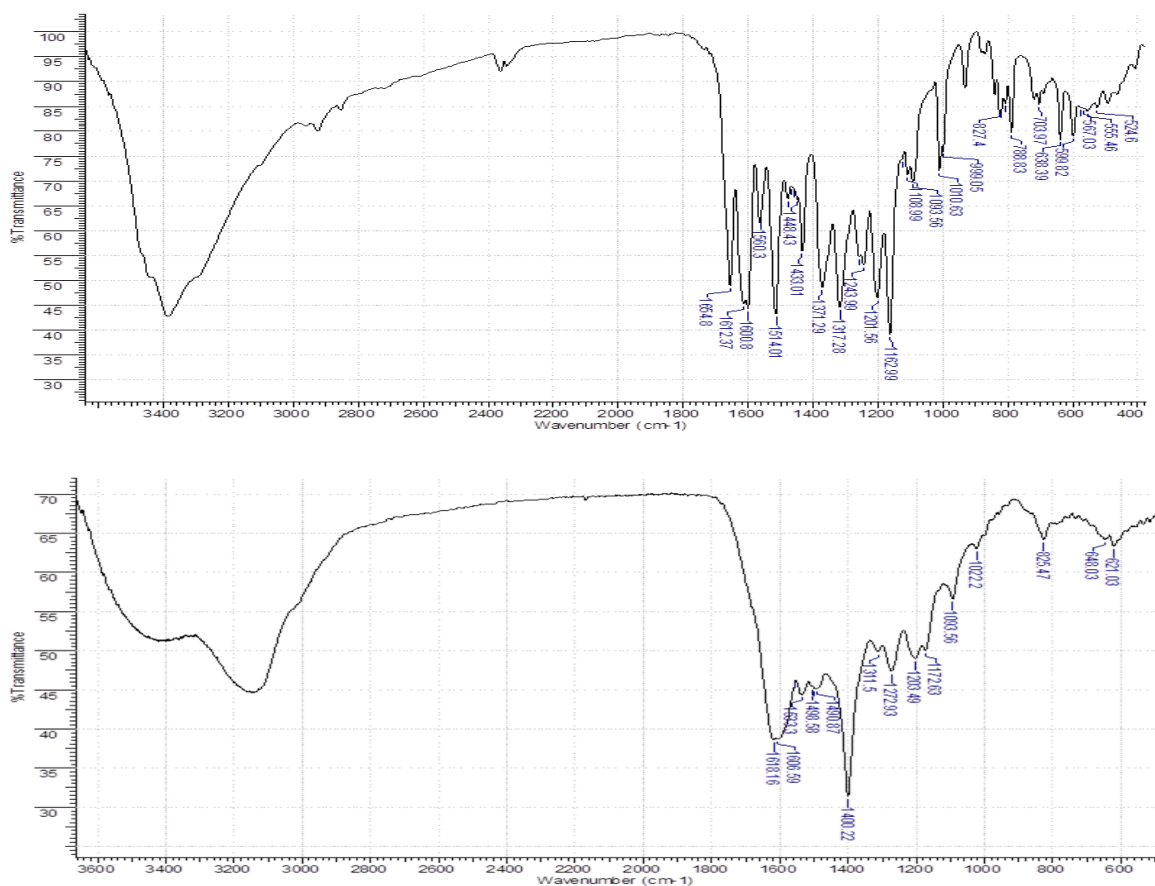


Figura 4.119: Espectro de IV (KBr) do ligante quercetina e complexo $[Cu_2(\text{Quercetina})(H_2O)_4]$.

Os dados de análise elementar estão apresentados na Tabela 4.45 e mostram os valores calculados e obtidos para o ligante (quercetina) e o complexo $[Cu_2(\text{Quercetina})(H_2O)_4]$.

Tabela 4.45: Dados da análise elementar do complexo $[Cu_2(\text{Quercetina})(H_2O)_4]$.

Complexo	Análise encontrada (calc.) %		
	C	H	O
$[Cu_2(L)(H_2O)_4]$	35,06(35,2)	2,37(3,70)	--

Espectros de RMN de ^1H foram realizados tanto para o ligante livre quanto para o complexo formado, porém a presença do metal paramagnética na estrutura do composto dificultou a análise do espectro de RMN do complexo formado. De acordo com os resultados obtidos e juntamente com dados da literatura (Bukhari *et al.*, 2009; Pekal *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2001) foi possível propor a estrutura do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ (Figura 4.120).

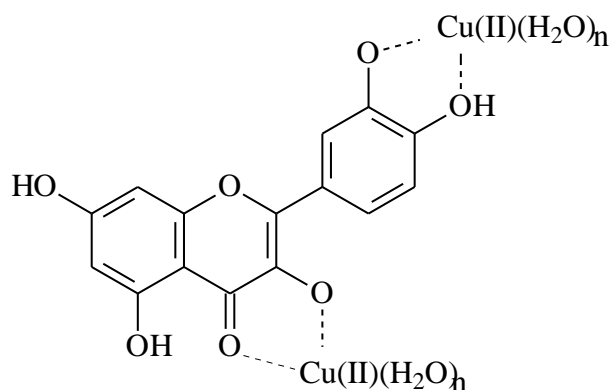


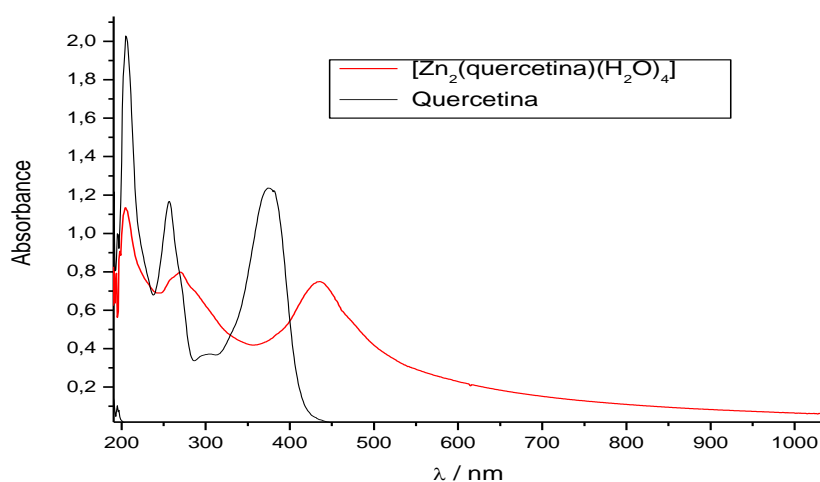
Figura 4.120: Estrutura do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$.

4.8.3: Caracterização do complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$

As análises e discussões para este complexo se assemelham muito as realizadas anteriormente. Primeiramente, através de comparações de ambos os espectros de absorção no UV, foi observado um deslocamento de absorção da banda $\lambda_{\text{máx}}$ 376 nm para $\lambda_{\text{máx}}$ 434 nm característico da formação do complexo (Tabela 4.121, Figura 4.46). O deslocamento batocrômico em relação ao ligante pode ser explicado pela extensão do sistema de conjugação devido à formação do complexo. Os deslocamentos das bandas de absorção no UV fornecem dados importantes, visto que interações dos íons Zn^{II} com o ligante na proporção de 2:1 (metal/ligante) produzem deslocamentos batocrômicos em ambas bandas de absorção.

Tabela 4.46: Dados do espectro no UV para o ligante (quercetina) e complexo

Compostos	λ máx. (nm)	
	Banda I	Banda II
Quercetina	258	376
$[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$	275	437

**Figura 4.121:** Espectro de absorção no UV do ligante (quercetina) e complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$.

Através de comparações dos espectros de IV do ligante (quercetina) e do complexo ($[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$) formado foram observados modificações que caracterizam a formação do complexo metálico.

No espectro de IV do ligante (quercetina) (Figura 4.122) a banda de absorção na região carbonílica aparece em 1654 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] já para o complexo observou-se um deslocamento de aproximadamente 38 cm^{-1} . Esse deslocamento sugere que a coordenação do ligante está ocorrendo no grupo carbonílico. Pode ser notado também que as frequências $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{C})$ são pouco deslocadas quando comparadas ao espectro de IV do complexo formado, indicando que o

oxigênio do anel C não está envolvido nos pontos de coordenação, já a frequência u (M-O) característica da coordenação metal-ligante é observada em 617 cm^{-1} (Tabela 4.47).

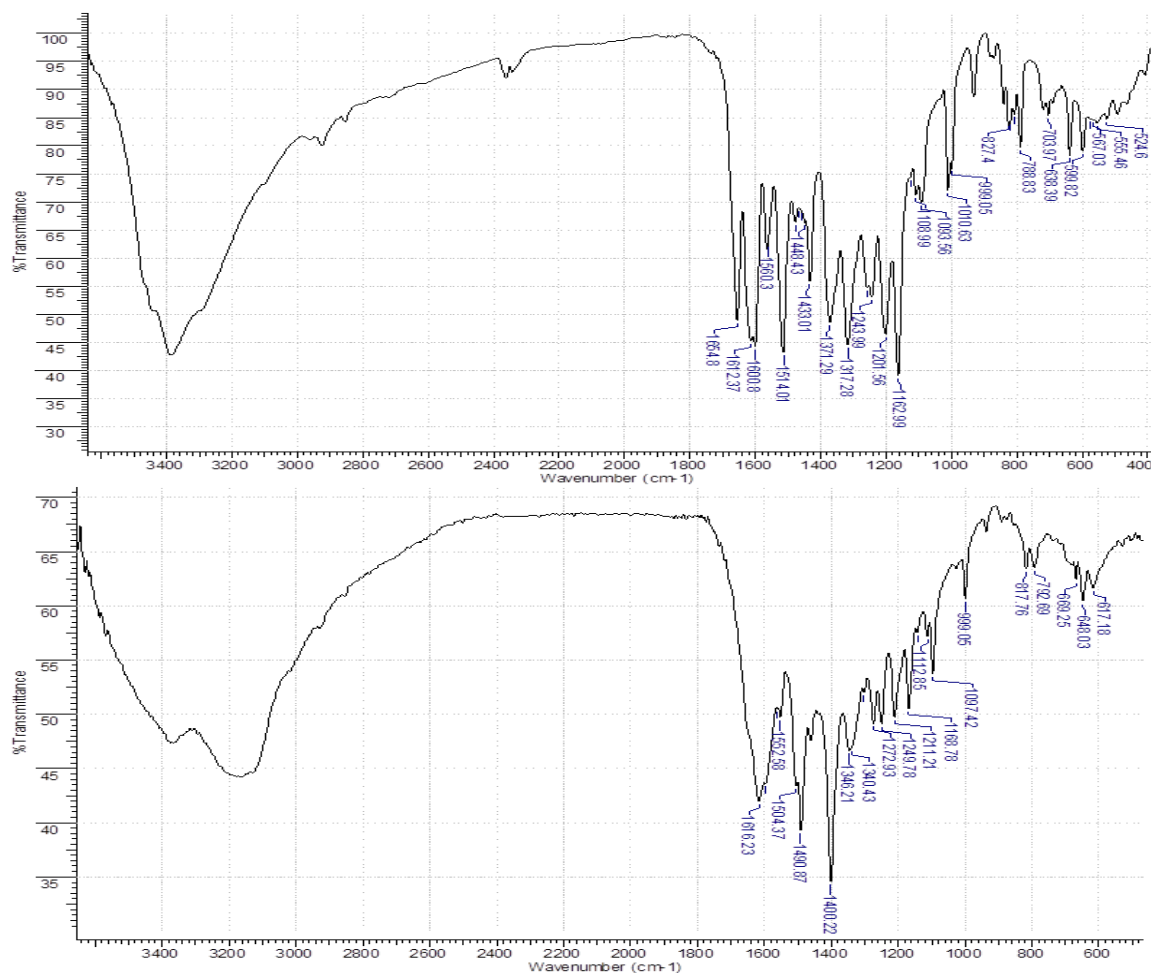


Figura 4.122: Espectro de IV (KBr) do ligante quercetina e complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$.

Tabela 4.47: Valores para as bandas características do flavonóide quercetina e complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ obtidas através do espectro de IV.

cm ⁻¹	Quercetina	Complexo #
u (O-H)	3300-3500	3100-3400
u (C=O)	1654	1616
u (C=C)	1560	1570
u (C-O-C)	1254	1250
u (M-O)	--	617

Os dados de análise elementar estão apresentados na Tabela 4.48 e apresentam os valores calculados e obtidos para o ligante (quercetina) e o complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$.

Tabela 4.48: Dados da análise elementar do complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_2$

Complexo	Análise encontrada (calc.) %		
	C	H	O
$[\text{Zn}_2(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_4]$	37,45(35,1)	2,84(3,73)	--

Espectros de RMN de ¹H também foram realizados para caracterização do complexo, porém a presença do metal dificultou a análise destes dados. De acordo com os resultados obtidos e juntamente com dados da literatura (Souza & De Giovanni 2005, Zhou *et al.*, 2001) foi possível propor a estrutura do complexo $[\text{Zn}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ (Figura 4.123).

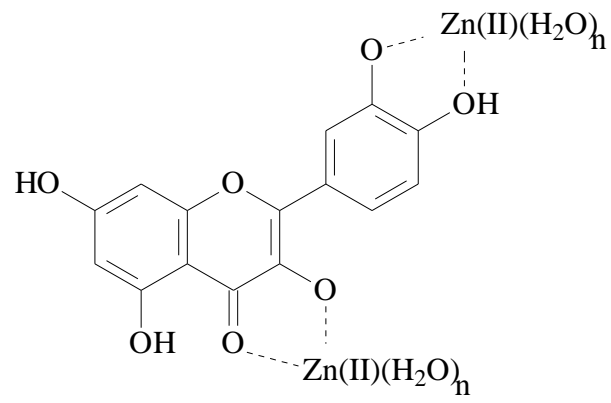


Figura 4.123: Estrutura do complexo $[Zn_2(\text{Quercetina})(H_2O)_4]$.

4.9 Ensaios biológicos

4.9.1 Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com as espécies *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva*.

Os extratos das espécies *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* foram submetidos a ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1. Os resultados foram avaliados através das curvas de sobrevivência de cada tratamento em relação ao controle, sobre um período de 25 dias, utilizando a análise estatística através do teste de “log-rank”.

Dos resultados obtidos nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras, observou-se os extratos **MUGE**, **MUFE** e **AHFE** apresentaram atividade inseticida significativa sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, destacando-se os extratos **MUGE** e **AHFE** que exibiram as maiores taxas de mortalidade, obtendo 50% de saúvas mortas já nos primeiros dias, dentre o 2º e 4º dia do tratamento, com mortalidade total acumulada de 90% e 84% no 25º dia, respectivamente. Este resultado pode ser visualizado no Gráfico 4.1 e na Tabela 4.49.

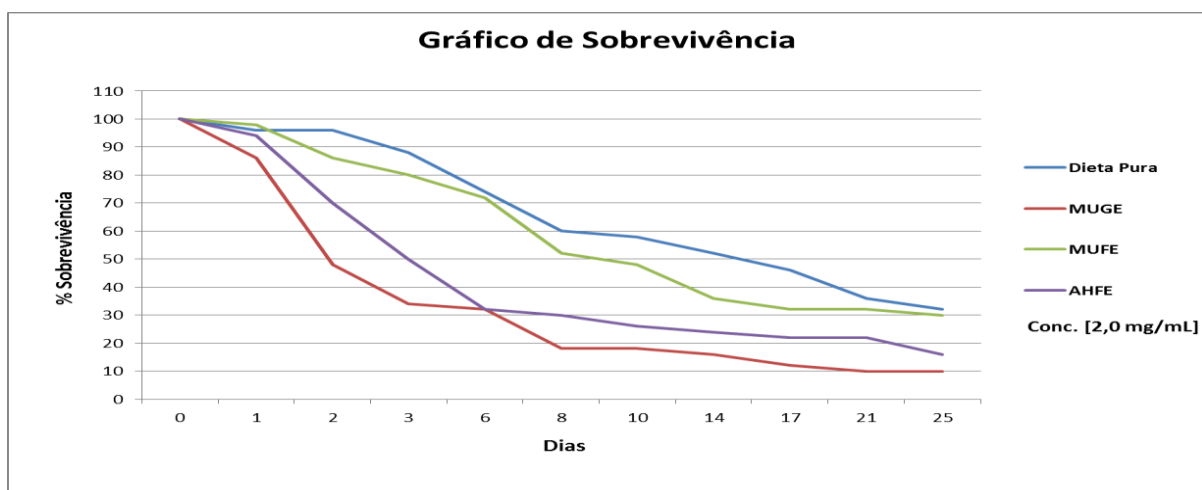


Gráfico 4.1: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos etanólicos de folhas de *Anacardium humile* e galhos e folhas de *Macairea urundeuva*.

Tabela 4.49: Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécies	Parte Vegetal	Extrato	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
<i>Anacardium humile</i>	Folhas	AHFE	4 ^d	16
<i>Macairea urundeuva</i>	Galhos	MUGE	2 ^d	16
	Folhas	MUFE	10 ^d	16

AH: *Anacardium humile*; MU: *Macairea urundeuva*; F: folhas; G: galhos; E: etanólico; Concentração: 2,0mg/mL

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

4.9.2 Efeito das frações e substâncias puras do extrato etanólico das folhas de *Anacardium humile*

As frações obtidas através da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *A. humile* (**AHFE**) foram submetidas ao ensaio de ingestão sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Analisando os resultados obtidos, observou-se que as frações **AHFE-A** e **AHFE-M** foram as mais ativas, apresentando sobrevivência mediana (S₅₀) no 6° e 10° dia, e mortalidades de 70% e 80% no final do experimento, respectivamente. Já a fração **AHFE-H** não apresentou resultados significativos de acordo com os dados estatísticos.

Tabela 4.50: Atividade das frações de **AHFE** nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécie	Frações	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
<i>Anacardium humile</i>	Hexânica	AHFE-H	15	20
AHFE - Folhas/Extrato Etanólico	Acetato de etila	AHFE-A	6 ^d	20
	Metanólica	AHFE-M	10 ^d	20

Concentração: 2,0mg/mL / * S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

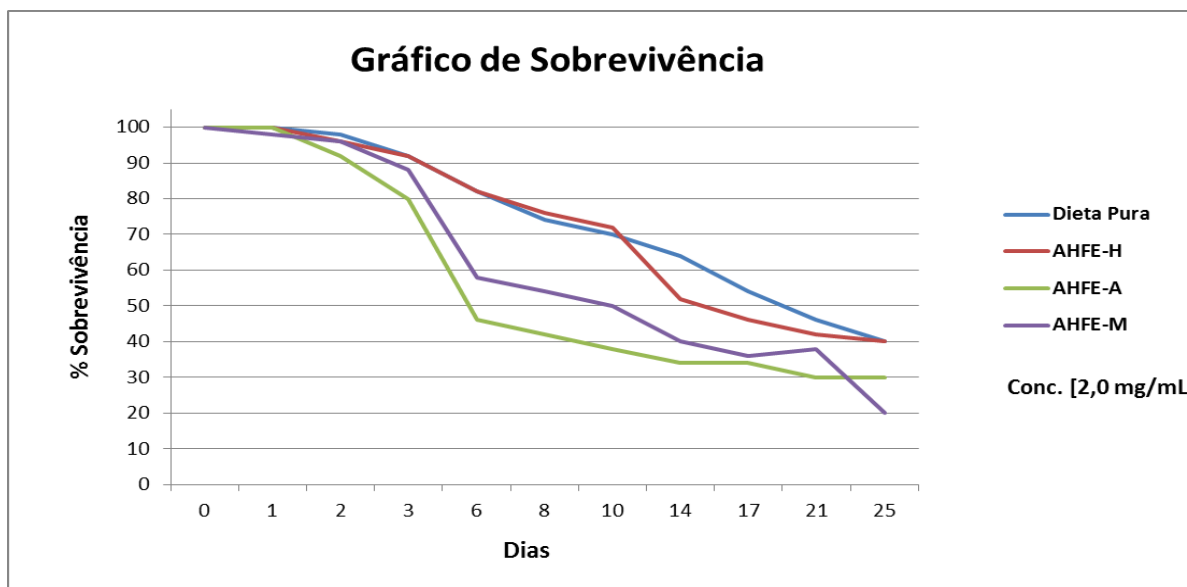


Gráfico 4.2: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato etanólico de folhas de *Anacardium humile* (AHFE).

Algumas das substâncias obtidas através do estudo fitoquímico de **AHFE-A** e **AHFE-M** foram submetidas ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras, de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1.

Do estudo químico das frações **AHFE-A** e **AHFE-M** foi identificado a presença de diversos flavonoides glicosilados, sendo a quercitrina, o flavonoide majoritário em ambos. O biflavonoide amentoflavona foi identificado como constituinte majoritário da fração **AHFE-A**, além de outros compostos, tais como, os compostos fenólicos.

Para os compostos avaliados observou-se que nenhum apresentou resultado estatístico significativo em relação ao controle (Gráficos 4.3 a 4.5 e Tabela 4.51). Esses resultados indicam que nenhuma das substâncias avaliadas apresenta potencial tóxico às formigas cortadeiras, sendo assim, consideradas não ativas. Deste modo, comparando os resultados obtidos do extrato **AHFE** e frações **AHFE-A** e **AHFE-M** com os dados obtidos para as substâncias, quercetina, quercitrina, conjunto de flavonoides glicosilados e a amentoflavona, propõe-se que a atividade apresentada pelo extrato e frações seria consequência do efeito sinérgico, ou algum composto em concentração muito pequena e que não foi possível isolá-lo.

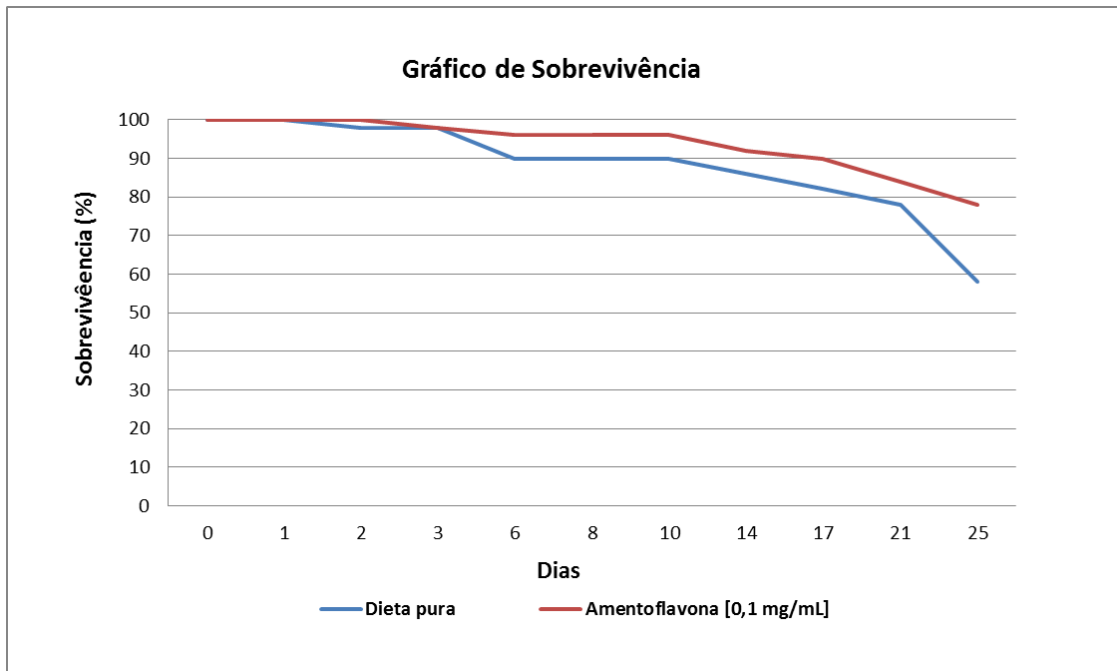


Gráfico 4.3: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide amentoflavona (B3).

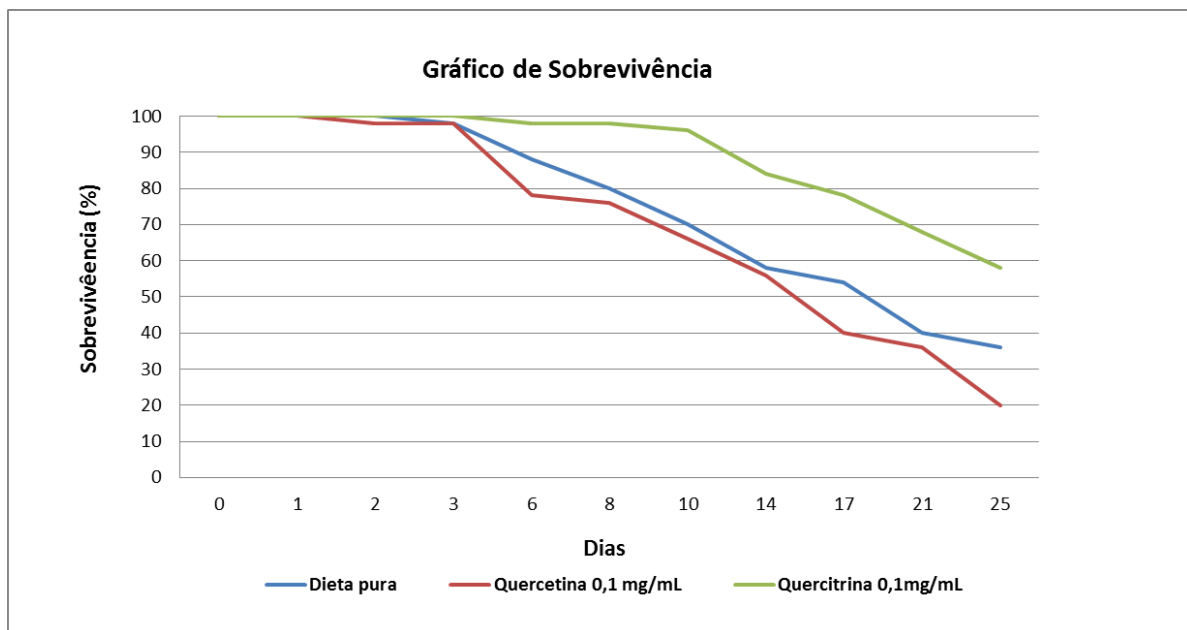


Gráfico 4.4: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com os flavonoides quercetina (L1) e quercitrina (L9).

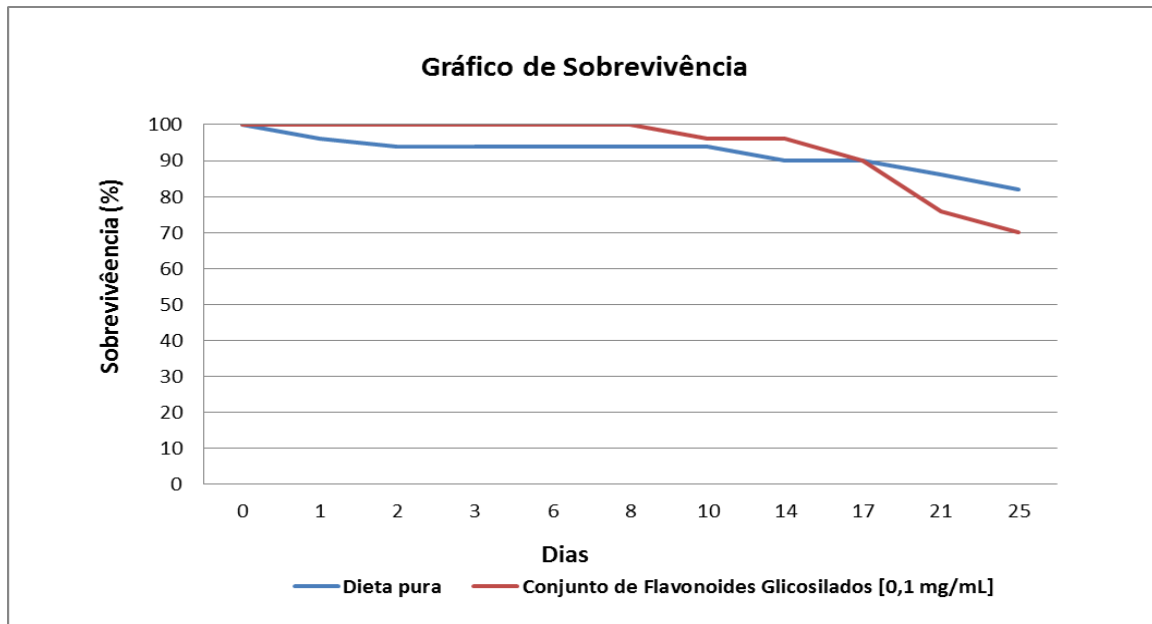


Gráfico 4.5: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o conjunto de flavonoides glicosilados.

Tabela 4.51: Atividade dos compostos isolados do extrato das folhas de *A. humile* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
Amentoflavona [0,1 mg/mL]	B3	25	25
Quercetina [0,1 mg/mL]	L1	15	18
Quercitrina [0,1 mg/mL]	L9	25	18
Conjunto de Flavonoides Glicosilados [0,1 mg/mL]	**	25	25

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

4.9.3 Efeito das frações e substâncias puras do extrato etanólico das folhas e galhos de *Macairea urundeuva*

As frações **MUFE-H**, **MUFE-A** e **MUFE-M** obtidas através da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* (**MUFE**) foram submetidas ao ensaio de ingestão sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Os resultados obtidos após 25 dias de experimento foram representados através de curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle (Gráfico 4.6).

Nesse experimento houve um aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento com taxas de mortalidade significativas, indicando potencial tóxico dessas frações sobre as formigas cortadeiras. Todas as frações apresentaram diferença significativa em relação ao controle, no entanto, destacam-se as frações **MUFE-A** e **MUFE-M** que apresentaram sobrevivência mediana (S_{50}) no 5° e 6° dia, e mortalidades de 100% e 82% no final do experimento, respectivamente (Tabela 4.52).

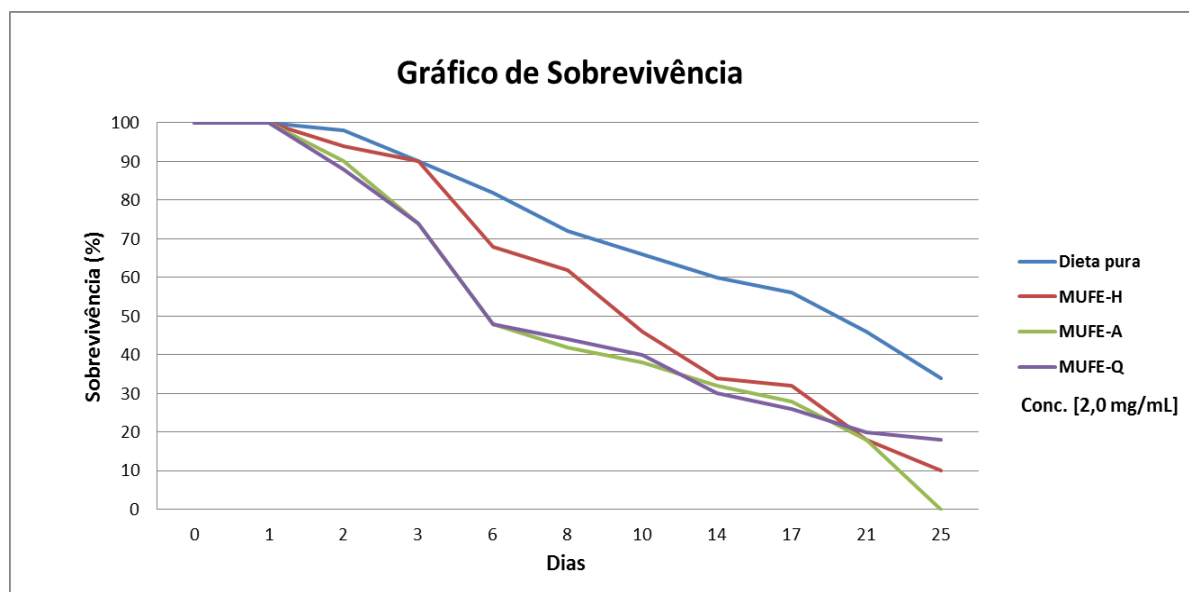


Gráfico 4.6: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato etanólico das folhas de *Macairea urundeuva*.

Tabela 4.52: Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécies	Frações	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
<i>Macaírea urundeuva</i>	Hexânica	MUFE-H	10 ^d	19
Folhas – Extrato	Acetato de etila	MUFE-A	6 ^d	19
Etanólico (MUFE)	Metanólica	MUFE-M	5 ^d	19

Concentração: 2,0 mg/mL

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

Do estudo químico das frações **MUFE-A** e **MUFE-M** foi identificado à presença de diversos flavonoides glicosilados, sendo a miricetrina (**L4**) o composto majoritário de ambos, além da presença dos diversos compostos fenólicos.

Para as substâncias ensaiadas observou-se que apenas o tratamento com o flavonoide glicosilado miricetrina resultou em maior mortalidade acumulada de 94%, sendo o controle com o valor de 68% após 25 dias de experimento (Gráfico 4.7 e Tabela 4.53). Todas as demais substâncias ensaiadas apresentaram menor mortalidade acumulada. Esses resultados indicam que possivelmente o flavonoide miricetrina está relacionado aos resultados dos ensaios sobre as formigas cortadeiras, previamente obtidos do extrato **MUFE** e frações **MUFE-A** e **MUFE-M**.

Tabela 4.53: Atividade dos compostos isolados do extrato das folhas de *M. urundeuva* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
Ácido gálico (0,1 mg/mL)	F2	25	25
Miricetina (0,1 mg/mL)	L2	25	25
Miricetrina (0,1 mg/mL)	L4	15,5 ^d	22

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

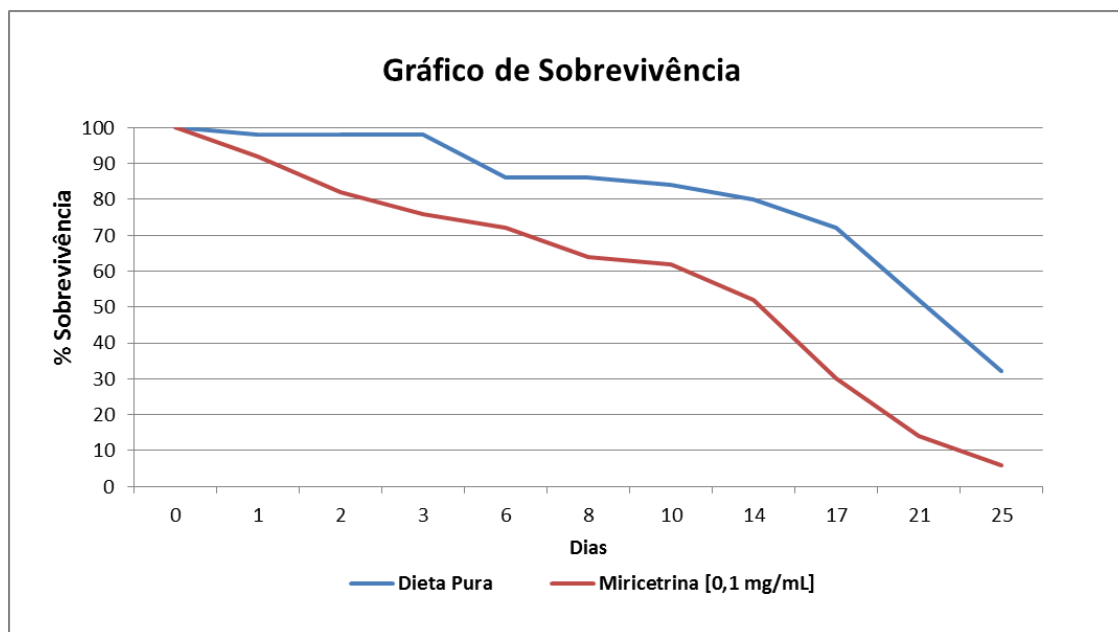


Gráfico 4.7: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (L4).

4.9.4 Efeito das substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de *Macairea urundeuva*

Do estudo fitoquímico do extrato **MUGE** foi identificado à presença de diversos compostos fenólicos, dentre eles, o ácido elágico e gálico, constituintes majoritários deste extrato, além da presença da epicatequina.

Os compostos, ácido gálico, elágico e a epicatequina obtidas através do estudo fitoquímico de **MUGE** foram submetidas ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras, de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1. Para os compostos avaliados, observou-se que o ácido elágico e a epicatequina apresentaram resultados significativos, com sobrevivência mediana (S_{50}) no 14° e 6,5° dia, e mortalidades de 96% e 98% no final do experimento, respectivamente (Gráficos 4.8 e 4.9 e Tabela 4.54). Esses resultados indicam que esses dois compostos testados apresentam potencial tóxico às formigas cortadeiras. Deste modo, comparando o resultado obtido a partir do extrato **MUGE** com os dados obtidos para as substâncias, o ácido elágico e a epicatequina, propõe-se que a

atividade apresentada pelo extrato esta correlacionada à presença desses constituintes.

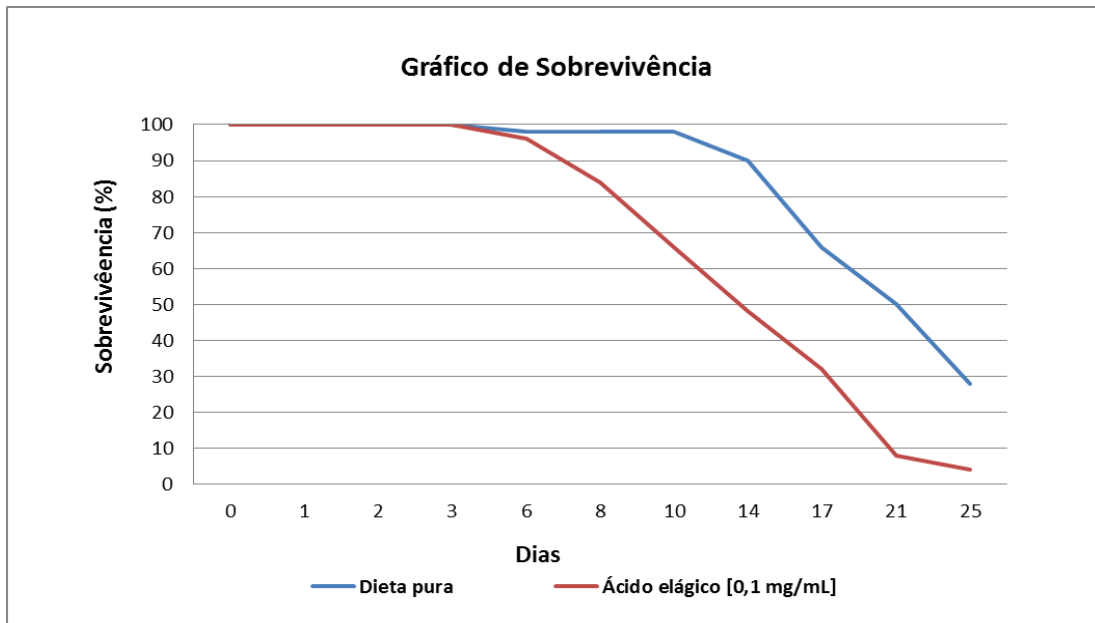


Gráfico 4.8: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o ácido elágico (F1).

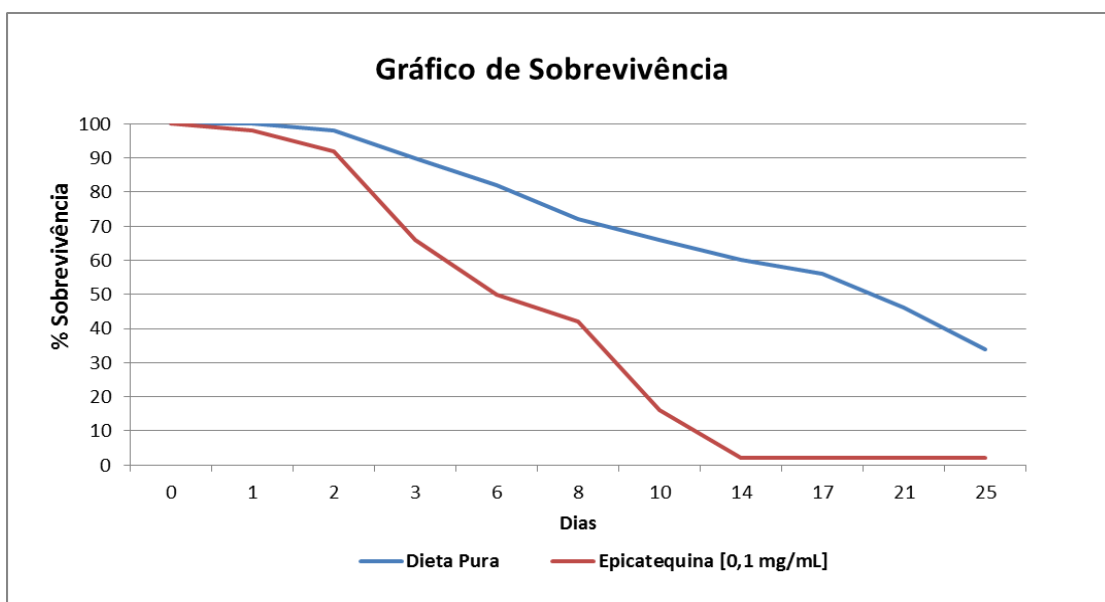


Gráfico 4.9: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o epicatequina (F5).

Tabela 4.54: Atividade dos compostos isolados do extrato dos galhos de *M. urundeuva* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
Ácido elágico [0,1 mg/mL]	F1	14 ^d	21,5
Epicatequina [0,1 mg/mL]	F5	6,5 ^d	19

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

4.9.5 Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com a espécie *Schinus terebinthifolius*.

Os extratos da espécie *S. terebinthifolius* foram submetidos a ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1. Os resultados foram avaliados através das curvas de sobrevivência de cada tratamento em relação ao controle. Através dos resultados obtidos (Gráficos 4.10 a 4.12; e Tabela 4.55), pode-se verificar que, com exceção dos extratos hexânico das folhas, diclorometânico e metanólico dos galhos de *S. Terebinthifolius* os demais extratos apresentaram atividade inseticida significativa frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Tabela 4.55: Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécies	Parte Vegetal	Extrato	S ₅₀ *	S ₅₀ controle
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Folhas	STFH	11,5	18
		STFD	4,0 ^d	18
		STFM	5,0 ^d	18
	Frutos	STFrH	4,0 ^d	18
		STFrD	5,0 ^d	18
		STFrM	4,0 ^d	18
	Galhos	STGH	4,0 ^d	18
		STGD	6,0	18
		STGM	6,5	18

ST: *Schinus terebinthifolius*; F: folhas; FR: frutos; G: galhos; H: hexânico; D: diclorometano e M: metanólico.

Concentração: 2,0 mg/mL / * S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

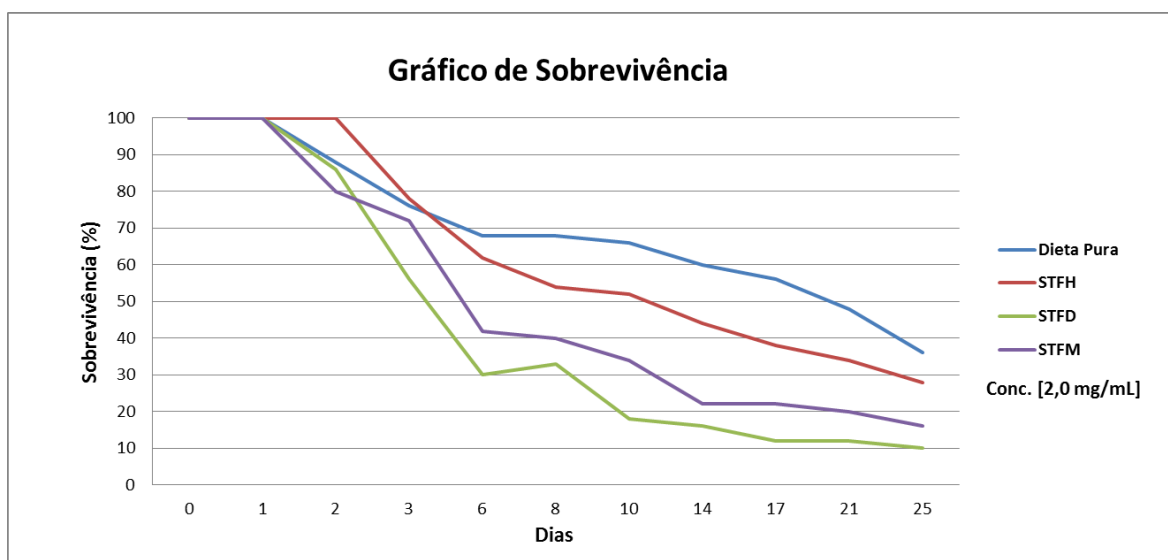


Gráfico 4.10: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

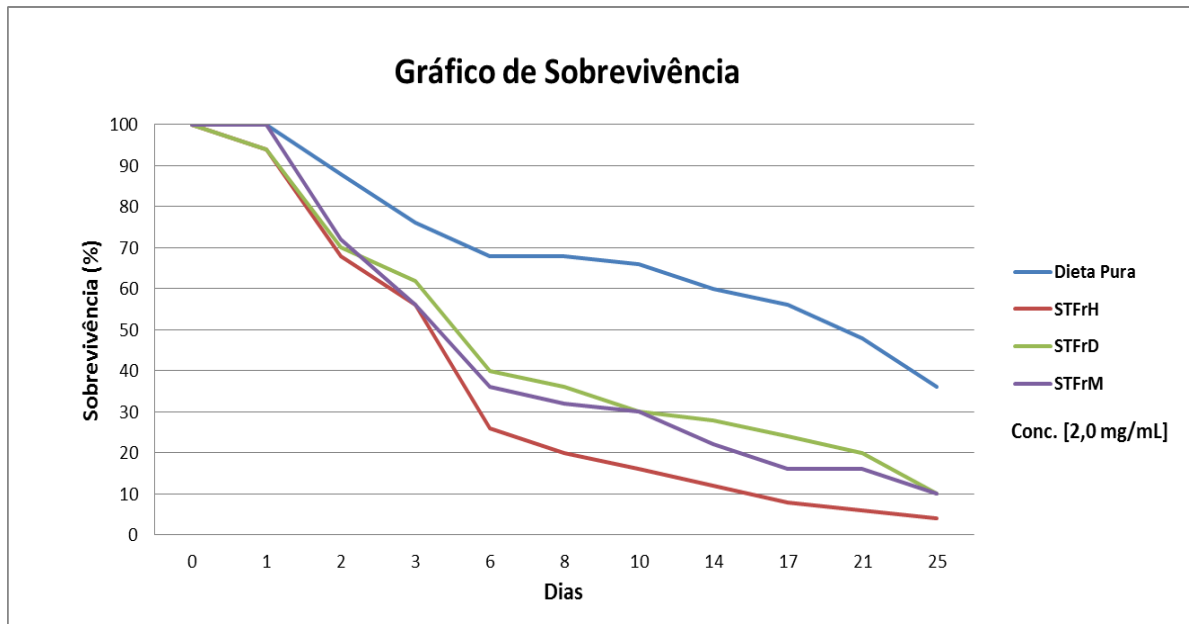


Gráfico 4.11: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius*

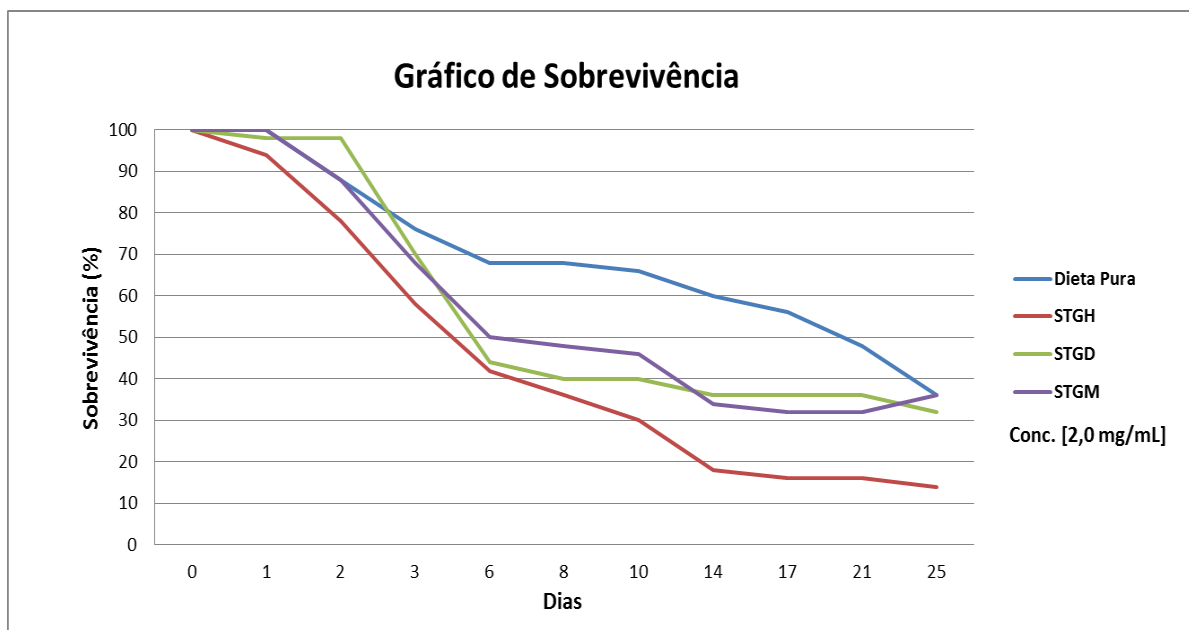


Gráfico 4.12: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos hexânico, diclorometânico e metanólico dos galhos de *Schinus terebinthifolius*.

4.9.6 Efeito das frações e substâncias puras dos extratos dos frutos e folhas de *Schinus terebinthifolius*

Através dos resultados obtidos dos extratos da espécie *S. terebinthifolius*, deu-se continuidade ao biomonitoramento das frações procedentes dos extratos ativos (Gráficos 4.13 a 4.15). Entretanto, os resultados apontaram que a partir do fracionamento dos extratos **STFRM**, **STFRH** e **STFM** (Tabela 4.56 a 4.57), houve a descontinuidade dos resultados anteriormente observados para os mesmos, indicando que possivelmente poderia estar ocorrendo sinergismo entre seus constituintes.

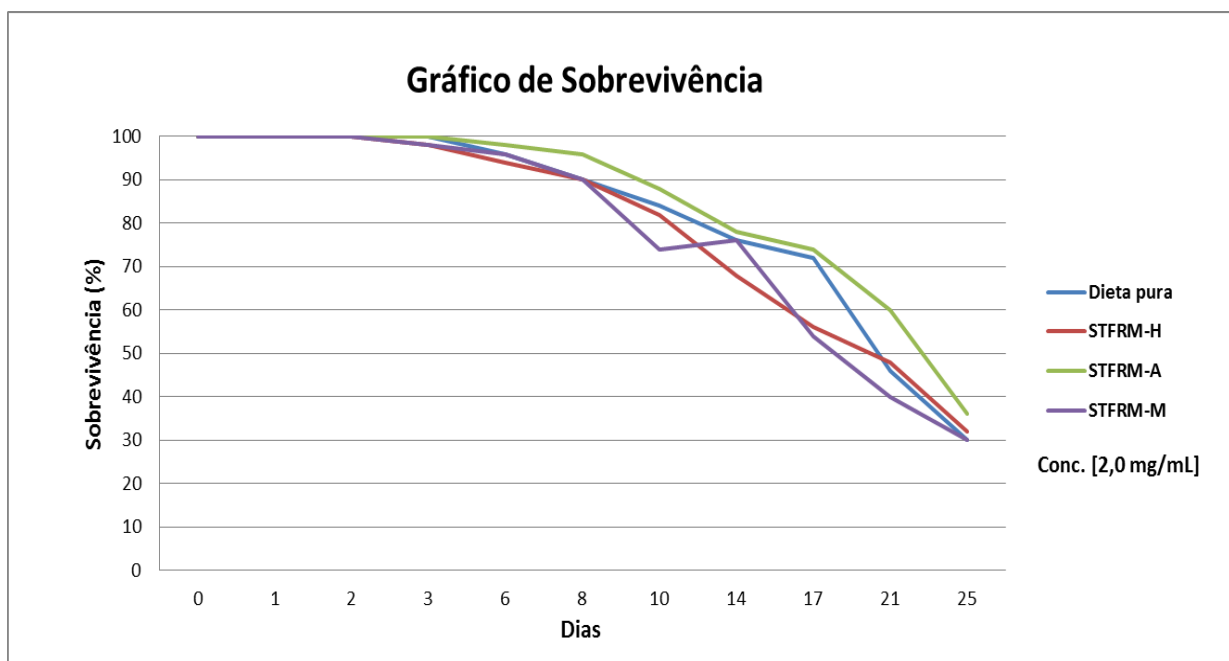


Gráfico 4.13: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações STFRM-H, STFRM-A e STFRM-M.

Tabela 4.56: Atividade das frações obtidas dos extratos brutos de *S. terebinthifolius* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécies	Frações	Código	S ₅₀ *	S ₅₀ controle
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Hexânica	STFRM-H	21	20
Frutos - Extrato	Acetato de etila	STFRM-A	22	20
Metanólico (STFRM)	Metanólica	STFRM -M	19	20
Frutos - Extrato	Hexânica	STFRH-H	21	18,5
Hexânico (STFRH)	Acetato de etila	STFRH-A	20	18,5

Concentração: 2,0mg/mL

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

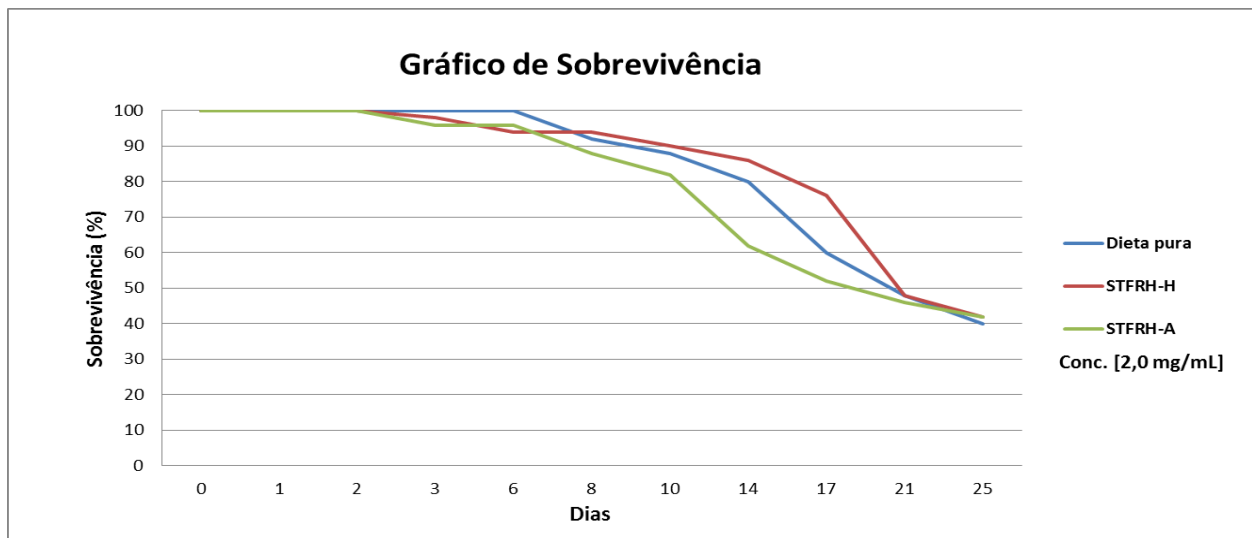


Gráfico 4.14: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato hexânico dos frutos de *Schinus terebinthifolius*.

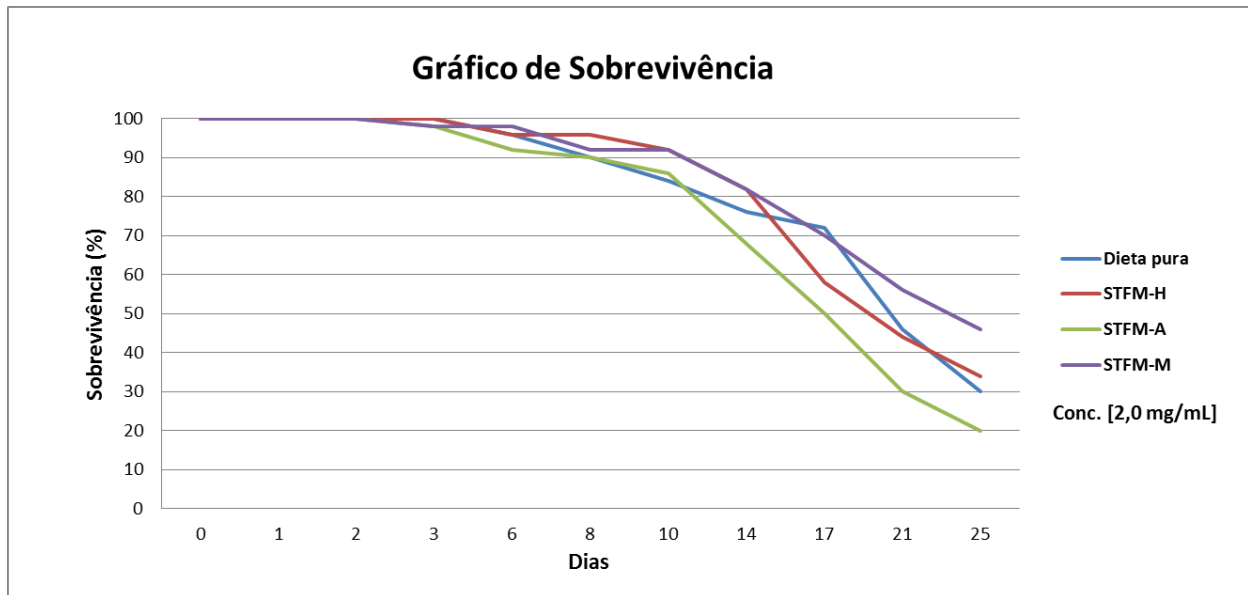


Gráfico 4.15: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações oriundas do extrato metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Tabela 4.57: Atividade dos extratos brutos nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Espécies	Frações	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Hexânica	STFM-H	19	20
Folhas - Extrato	Acetato de etila	STFM-A	17,5	20
Metanólico (STFM)	Metanólica	STFM-M	22	20

Concentração: 2,0mg/mL

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

Embora as frações oriundas de **STFRM** (Tabela 4.58) não tenham apresentado resultados significativos nos ensaios de ingestão sobre as formigas cortadeiras, estes foram selecionados para o estudo fitoquímico devido à atividade significativa sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (item 3.11.2).

Do estudo fitoquímico das frações de **STFRM** foi identificado à presença de biflavonóides, compostos fenólicos e flavonóides glicosilados.

Os biflavonóides, agatisflavona e tetrahidrorobustaflavona, obtidos através do estudo fitoquímico de **STFRM** foram submetidos ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras, de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1.

Para os compostos avaliados, observou-se que somente a agatisflavona apresentou resultado significativo, com sobrevivência mediana (S_{50}) no 15º dia, e mortalidade de 90% no final do experimento, respectivamente (Gráfico 4.16 e 4.17, Tabela 4.58).

Tabela 4.58: Atividade dos compostos isolados do extrato dos frutos de *S. terebinthifolius* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S_{50} *	S_{50} controle
Agatisflavona [0,1 mg/mL]	B4	15 ^d	22
Tetrahidrorobustaflavona [0,1 mg/mL]	B2	11	14,5

* S_{50} – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank ($p < 0,05$)

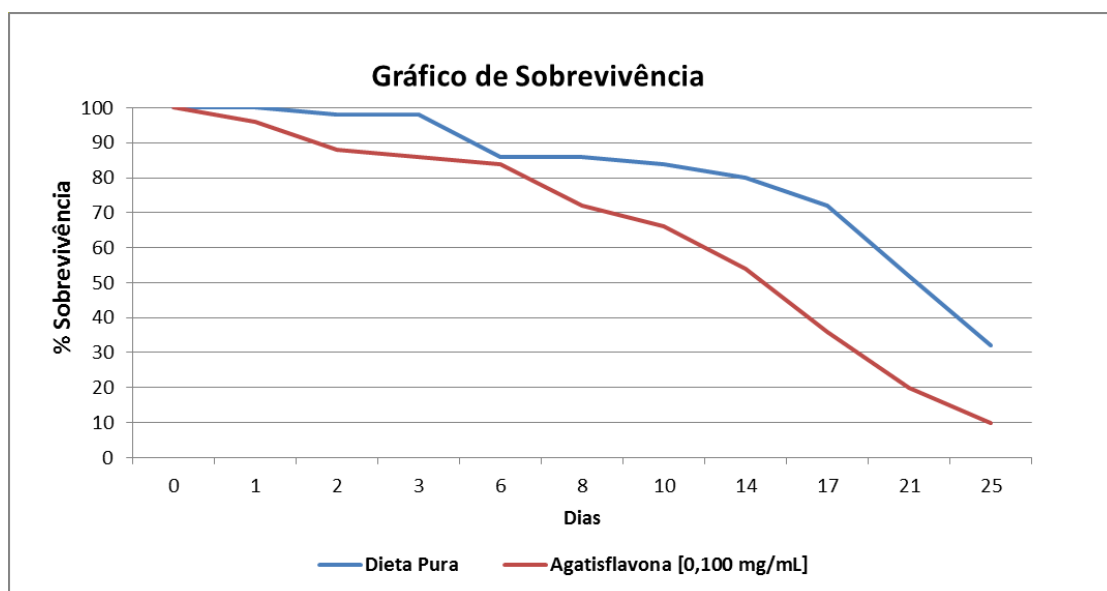


Gráfico 4.16: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide agatisflavona (**B4**).

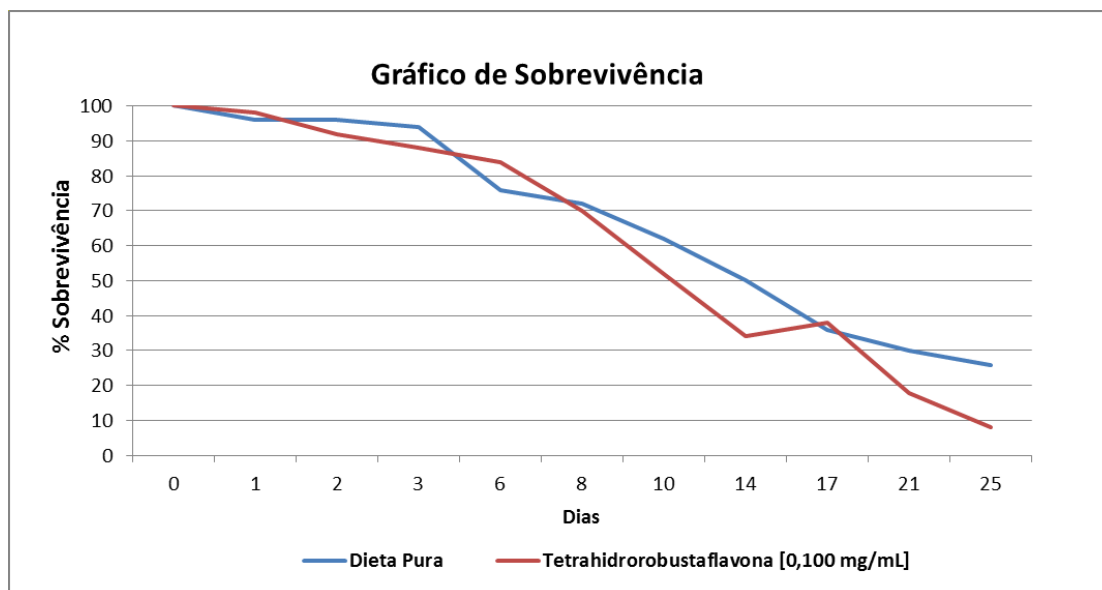


Gráfico 4.17: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o biflavonoide tetrahidrorobustaflavona (**B2**).

4.9.7 Efeito das substâncias isoladas do extrato diclorometânico dos frutos de *Schinus terebinthifolius*

Do estudo fitoquímico do extrato **STFRD** foi identificado e isolado diversos triterpenos, dentre eles, o ácido masticadienóico, schinol, lupenona e também o esteroide sistostenona.

Para os compostos avaliados do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius* (**STFRD**), observou-se que dentre os avaliados, nenhum apresentou resultado estatístico significativo sobre o controle (Gráfico 4.18 e Tabela 4.59). Esses resultados indicam que nenhuma das substâncias testadas apresenta potencial tóxico às formigas cortadeiras, sendo assim, consideradas não ativas. Deste modo, comparando os resultados obtidos do extrato **STFRD** com os dados obtidos para as substâncias avaliadas, propõe-se que a atividade apresentada pelo extrato seria consequência do efeito sinérgico dos mesmos.

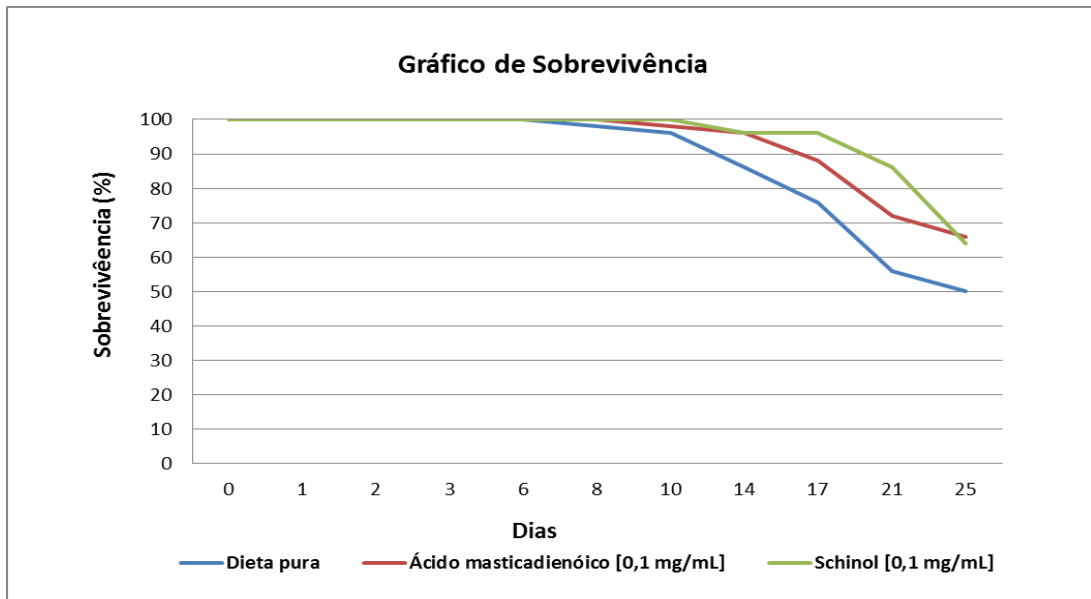


Gráfico 4.18: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com os triterpenos ácido masticadienólico (T1) e eschinol (T2).

Tabela 4.59: Atividade dos compostos isolados do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S ₅₀ *	S ₅₀ controle
Ác. masticadienólico [0,1 mg/mL]	T1	25	24,5
Eschinol [0,1 mg/mL]	T2	25	24,5

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

O triterpeno lupenona e o esteróide sitostenona isolados do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius* foram anteriormente avaliados por Peñaflo *et al.* (2009) e por Simote (2006), respectivamente. Para ambos os compostos, nenhuma atividade significativa sobre as formigas cortadeiras foi observada. Peñaflo e colaboradores (2009) mostraram que não houve diferença significativa de acordo com o teste estatístico “log-rank” (p<0,05), para a sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio, incorporando-se na dieta o triterpeno lupenona, apresentando com

$Md_{lupenona} = 16$ dias e o $Md_{controle} = 14$ dias. Já para o esteroide sitostenona, quando incorporado à dieta das operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, apresentou $Md_{sitostenona} = 23$ dias sendo o $Md_{controle} = 23$ dias, não apresentando atividade inseticida significativa, de acordo com os dados estatísticos (Simonte, 2006).

4.9.8 Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com os derivados do ácido masticadienólico (T1)

A fim de avaliarmos as atividades biológicas do ácido masticadienólico (T1) e seus derivados sobre as formigas cortadeiras, modificações estruturais para obtenção de novos derivados do composto T1 foram realizadas (Figura 4.127). Para explorar os efeitos dos substituintes nas posições C-3 e C-26 sobre a avaliação biológica, primeiramente T1 foi convertido em seu éster metílico T1-A. Para o composto T1-B, a função cetona em C-3 foi substituída pela função oxima na mesma posição.

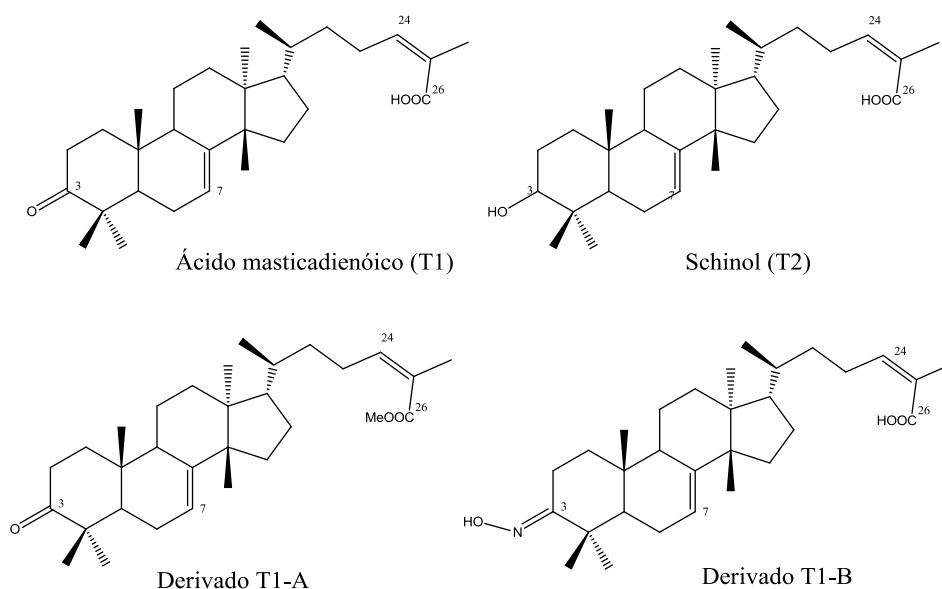


Figura 4.127: Triterpeno ácido masticadienólico e seus derivados (T2, T1-A e T1-B).

Os derivados do ácido masticadienóico foram incorporados à dieta artificial das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e os resultados estão apresentados na Tabela 4.60. Analisando os resultados obtidos, observou-se que para ambos, os valores não diferem do controle quanto ao tempo de mortalidade total, não apresentando diferença significativa comparada ao controle (dieta pura) de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$).

Tabela 4.60: Atividade do ácido masticadienóico e seus derivados (T2, T1-A e T1-B) nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Substâncias	Código	S ₅₀ [*]	S ₅₀ controle
Ác. masticadienóico [0,1 mg/mL]	T1	25	24,5
Schinol [0,1 mg/mL]	T2	25	24,5
Derivado [0,1 mg/mL]	T1-A	25	25
Derivado [0,1 mg/mL]	T1-B	25	25

* S₅₀ – Sobrevivência Mediana/Dias

^d Diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank ($p < 0,05$)

4.9.9 Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com os complexos metálicos do flavonóide quercetina.

Para a avaliação inicial da atividade biológica dos complexos metálicos, ensaios com os materiais de partida, ligante quercetina e os sais de cobre foram realizados. Através das análises dos resultados, pode-se observar que flavonóide quercetina mesmo em diferentes concentrações não apresentou atividade significativa quando comparada ao controle (Gráfico 4.19 e Tabela 4.61), resultados semelhantes foram observados para os ensaios com os sais de cobre e zinco (Gráfico 4.20 e Tabela 4.62).

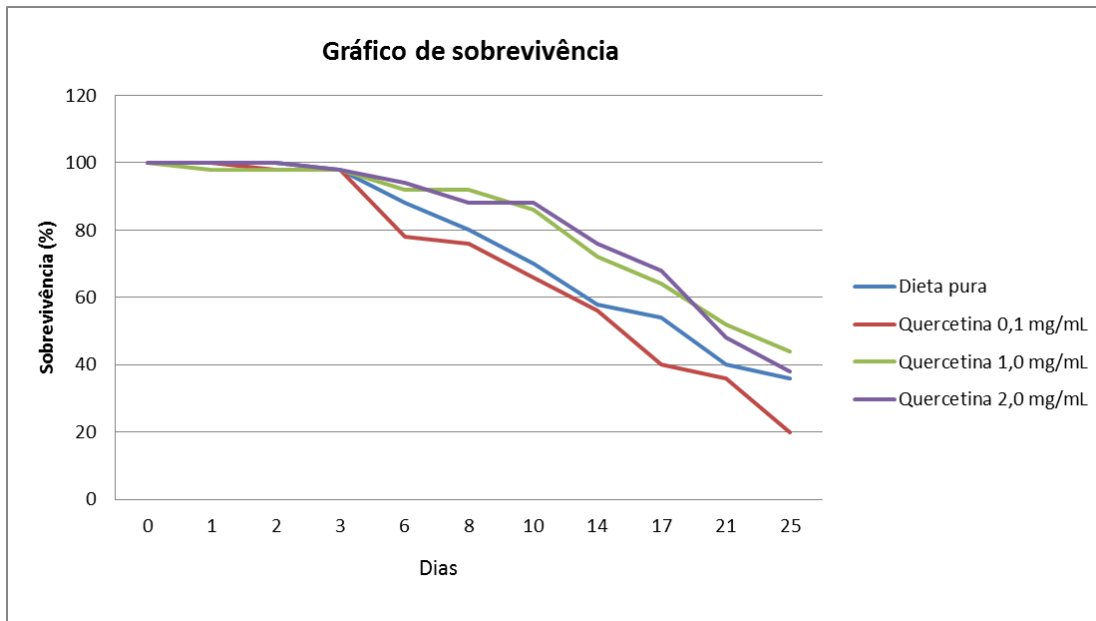


Gráfico 4.19: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do flavonóide quercetina, nas concentrações 0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL.

Tabela 4.61: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o flavonóide quercetina em diferentes concentrações.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	2	12	20	30	42	46	60	64	18 a
Querc. 0,1 mg/mL	0	2	2	22	24	34	44	60	74	80	15 a
Querc. 1,0 mg/mL	2	2	2	8	8	14	28	36	48	56	22 a
Querc. 2,0 mg/mL	0	0	2	6	12	12	24	32	52	62	21 a

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

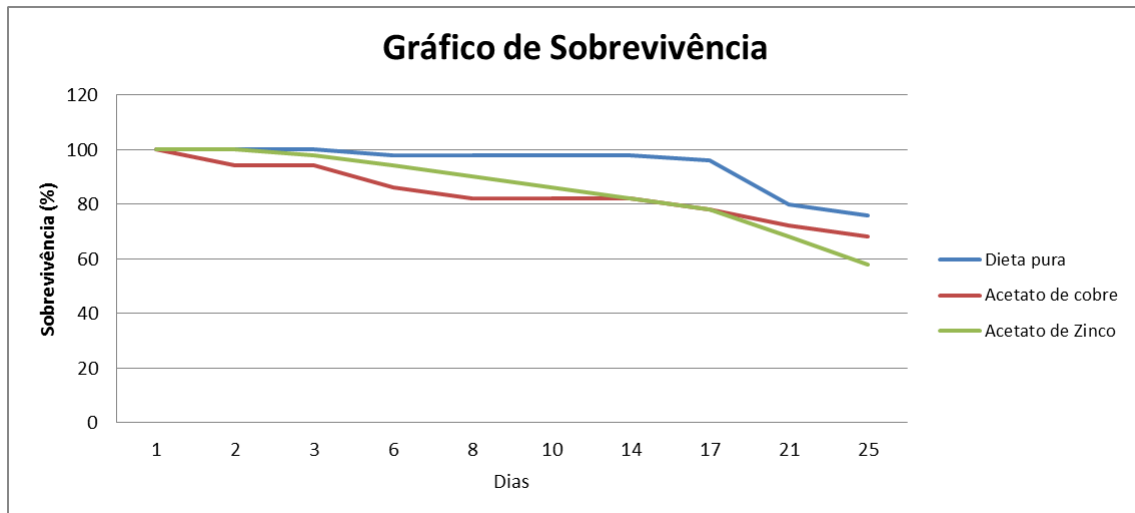


Gráfico 4.20: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão dos sais, acetato de cobre e acetato de zinco na concentração de 0,1mg/mL.

Tabela 4.62: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão dos sais de cobre na concentração 0,1mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	2	4	20	24	>25 ^a
Acetato de Cobre	0	6	6	14	18	18	18	22	28	32	>25 ^a
Acetato de Zinco	0	0	2	6	10	14	18	22	32	42	>25 ^b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

Para análise dos resultados nos ensaios sobre as formigas cortadeiras alguns dados devem ser avaliados, dentre eles: verificar se a mortalidade ocorre a partir do terceiro dia, pois é neste período aproximadamente em que as formigas cortadeiras carregam e espalham as iscas que contêm a substância inseticida nos formigueiros; outro dado importante é verificar a sobrevivência mediana (S_{50}) versus a concentração e também a mortalidade até a final do experimento (média de 25dias).

Nos ensaios com os complexos metálicos pode-se observar que ambos complexos ($\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$) apresentaram melhores resultados quando comparados ao ligante livre (quercetina). Comparando os resultados para os complexos ($\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$) observamos que ambos apresentam baixa porcentagem de mortalidade até o terceiro dia, o mesmo é notado para o ligante quercetina. Porém ao compararmos a sobrevivência mediana (S_{50}) em diferentes concentrações (0,1 mg/mL e 1,0 mg/mL) dos complexos, observamos através das análises estatísticas, diferenças significativas em relação ao controle. Para os complexos $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ (Gráfico 4.22 e Tabela 4.64) e ($\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Gráfico 4.21 e Tabela 4.63) nota-se que nas concentrações de 1,0 e 0,1 mg/mL resultados muito semelhantes são observados para ambos. Estes resultados demonstram que ao realizar a complexação de metais ao flavonóide quercetina a sua atividade inseticida aumenta significativamente sobre as formigas cortadeiras.

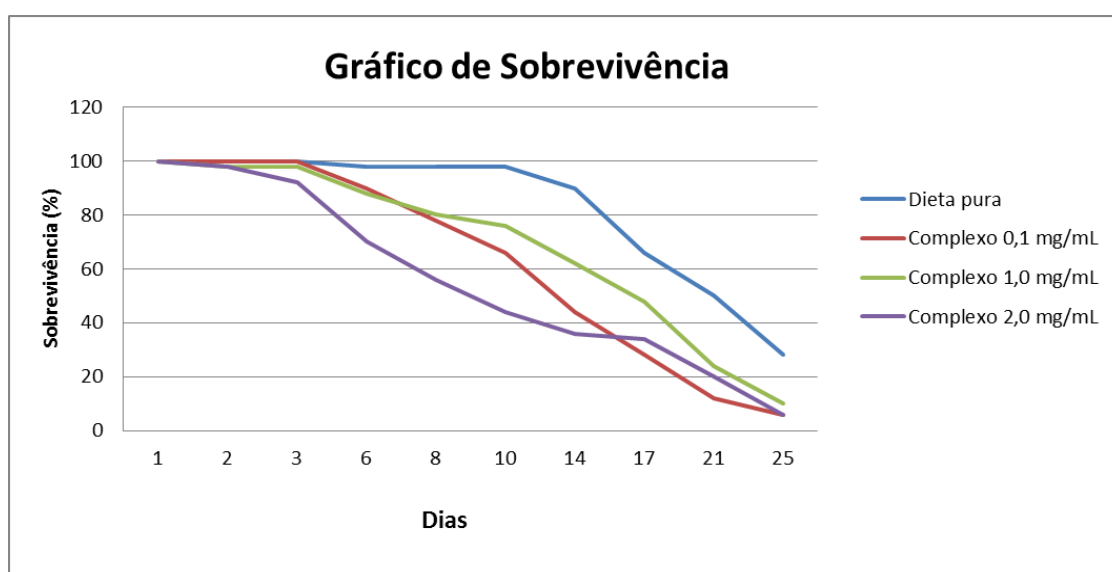


Gráfico 4.21: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do Complexo** - $\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 1mg/mL e 2mg/mL

Tabela 4.63: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂.2H₂O, nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 1mg/mL e 2mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	10	34	50	72	21,5 a
Complexo** 0,1mg/mL	0	0	0	10	22	34	56	72	88	94	14 b
Complexo** 1mg/mL	0	2	2	12	20	24	38	52	76	90	16,5 b
Complexo** 2mg/mL	0	2	8	30	44	56	64	76	80	94	9,5 b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p < 0,05). / Complexo** - cis-[Ru(2,2'-bipiridina)₂(quercetina)](PF₆)₂.2H₂O

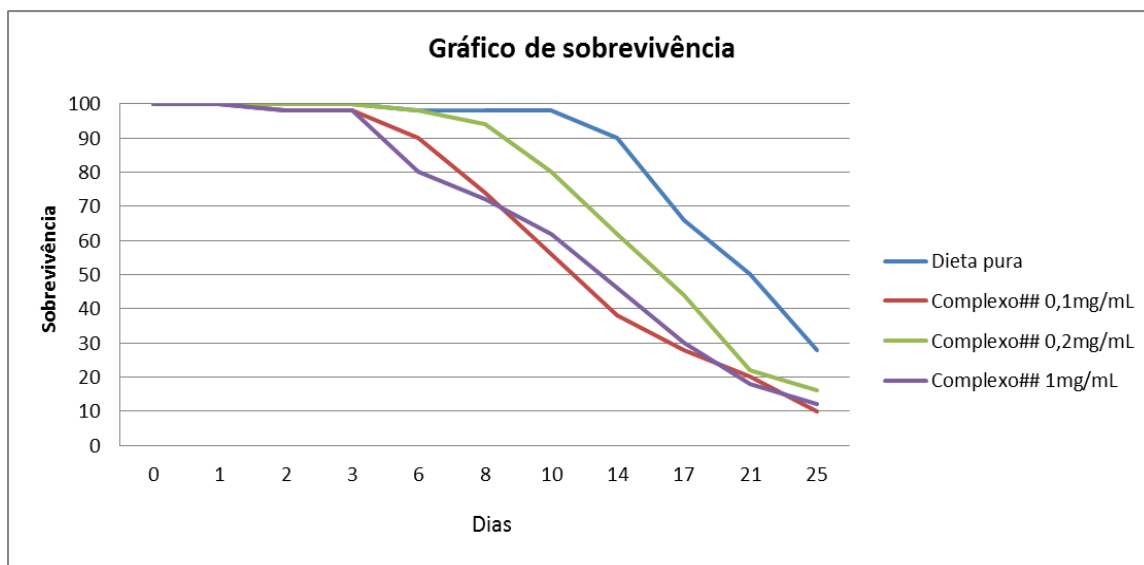


Gráfico 4.22: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL

Complexo## - [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄]

Tabela 4.64: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	10	34	50	72	21,5a
Complexo ^{##} 0,1mg/mL	0	2	2	10	26	44	62	72	80	90	11b
Complexo ^{##} 0,2mg/mL	0	0	0	2	6	20	38	56	78	84	16b
Complexo ^{##} 1mg/mL	0	2	2	20	28	38	54	70	82	88	12b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

Complexo^{##} - [Cu₂(Quercetina)(H₂O)₄]

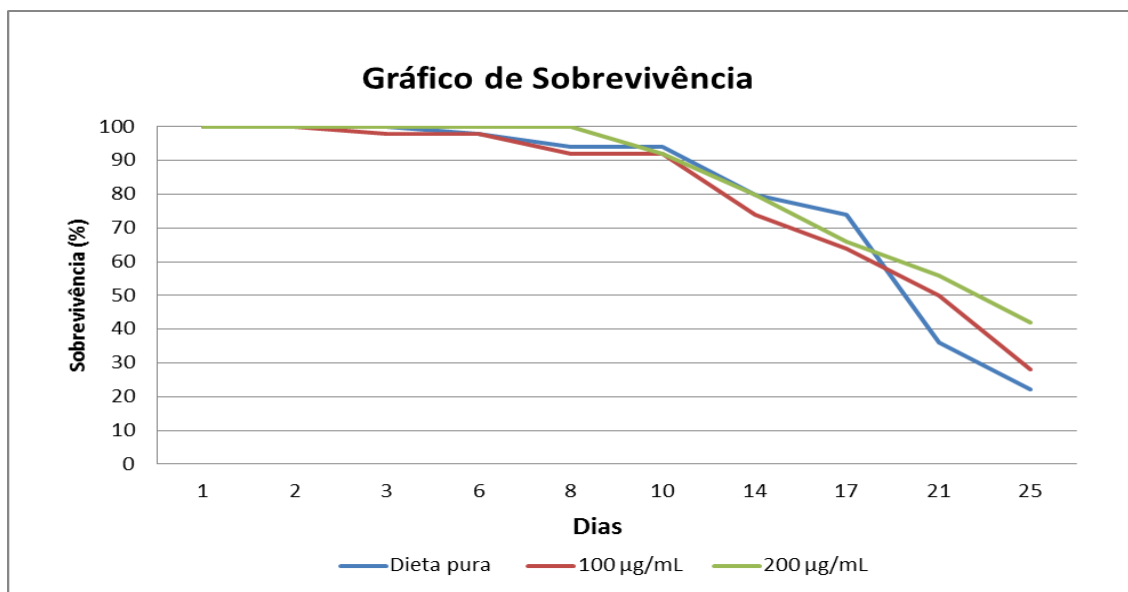


Gráfico 4.23: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão do complexo [Zn₂(Quercetina)(H₂O)₄], nas concentrações 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 1mg/mL

Complexo^{##} - [Zn₂(Quercetina)(H₂O)₄]

Analisando o resultados obtido para o complexo $[Zn_2(Quercetina)(H_2O)_4]$ (Gráfico 4.23), observou-se que os valores não diferem do controle quanto ao tempo de mortalidade total, não apresentando diferença significativa comparada ao controle (dieta pura) de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$).

4.10 Ensaios com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

4.10.1 Atividades inibitórias dos extratos e frações de *Anacardium humile* e *Macaírea urundeuva* sobre o fungo *L. gongylophorus*.

Os extratos etanólicos das folhas de *A. humile* (AHFE) e *M. urundeuva* (MUFE) foram submetidos a ensaios *in vitro* com o fungo simbiote *L. gongylophorus* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 4.24), de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.2.

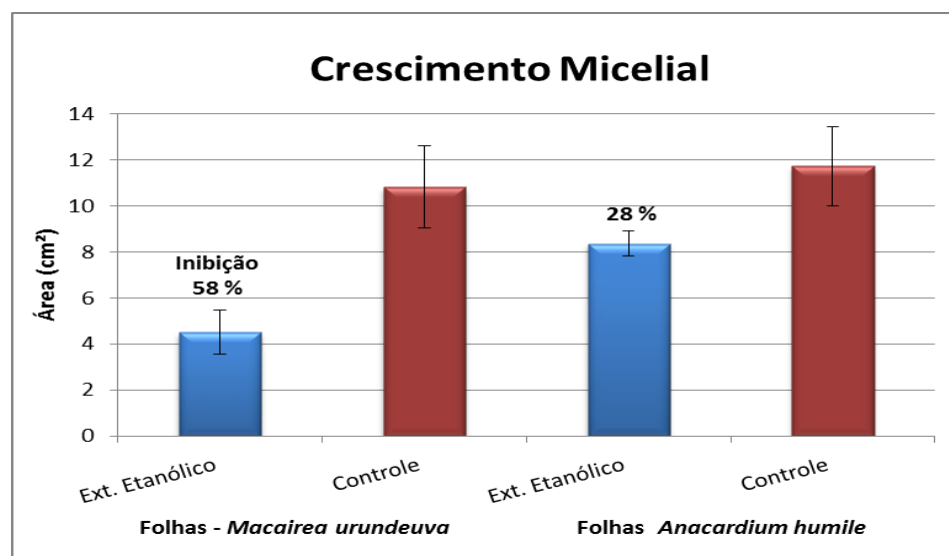


Gráfico 4.24: Efeito dos extratos etanólicos das folhas de *A. humile* e *M. urundeuva* sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Analisando os resultados obtidos com os extratos de *A. humile* e *M. urundeuva* (Gráfico 4.24), observou-se que o extrato **MUFE** (Extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva*) apresentou atividade moderada (58%) de inibição do crescimento do fungo, já para o **AHFE** (Extrato etanólico das folhas de *A. humile*), um baixo poder de inibição (28%) foi observado.

As frações obtidas do particionamento do extrato **AHFE** foram submetidas ao ensaio de inibição sobre o crescimento do fungo, na concentração de 500 µg/mL (Gráficos 4.25). Do ensaio realizado com as frações **AHFE-A** e **AHFE-M**, foi observado uma inibição de 29% para **AHFE-A**, enquanto para o **AHFE-M** nenhuma atividade de inibição foi observada.

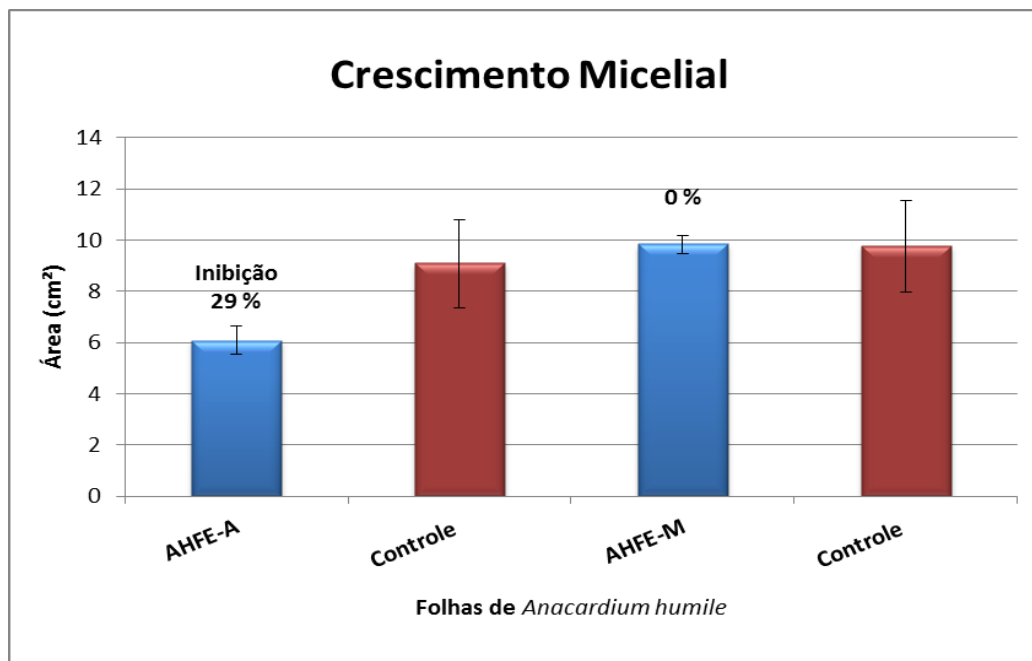


Gráfico 4.25: Efeito das frações oriundas do extrato etanólico das folhas de *A. humile* sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Do ensaio realizado com as frações **MUFE-A** e **MUFE-M** (Gráfico 4.26 e Figura 4.124), obtidas do particionamento líquido-líquido do extrato **MUFE**, na concentração de 500 µg/mL, foi observado bons resultados, visto que ambos proporcionaram mesmo em menores concentrações, um aumento significativo da

atividade inibitória. Para a fração **MUFE-A**, 100% de inibição do crescimento do fungo simbiote foi observada.

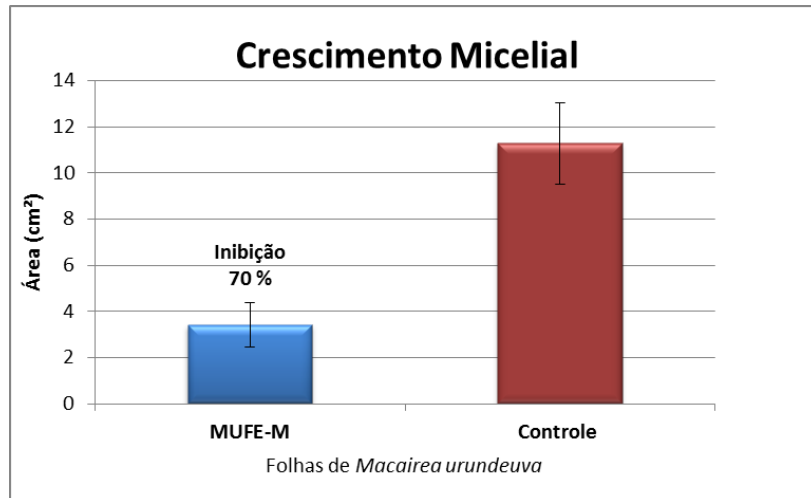


Gráfico 4.26: Efeito da fração **MUFE-M** sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

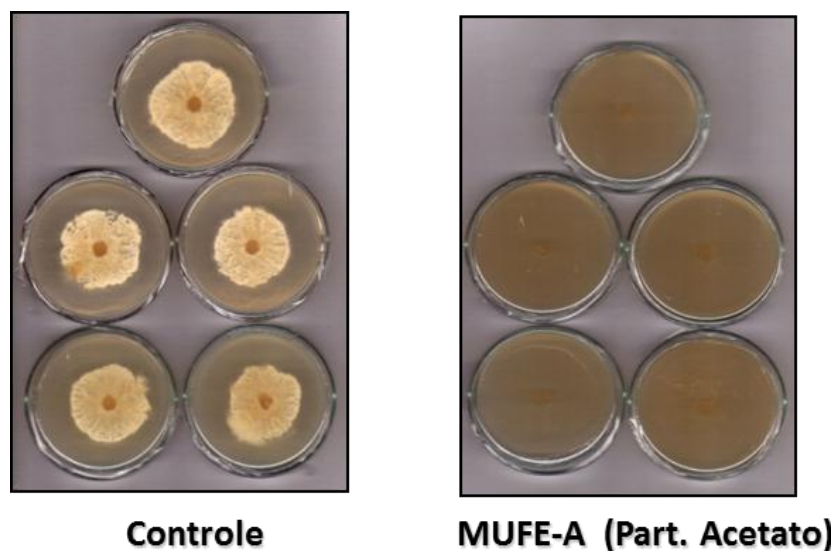


Figura 4.124: Atividade da partição **MUFE-A** (100 % de inibição; c = 500 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote (*L. gongylophorus*).

4.10.2 Atividades das substâncias isoladas de *Anacardium humile* e *Macairea urundeuva* sobre o crescimento do fungo *L. gongylophorus*.

Dentre as substâncias obtidas de *A. humile* e *M. urundeuva*, algumas delas foram submetidas ao ensaio de inibição sobre o fungo simbionte, cuja metodologia segue descrita no item 3.11.2. Todos os experimentos com as substâncias puras foram realizados na concentração de 100 µg/mL.

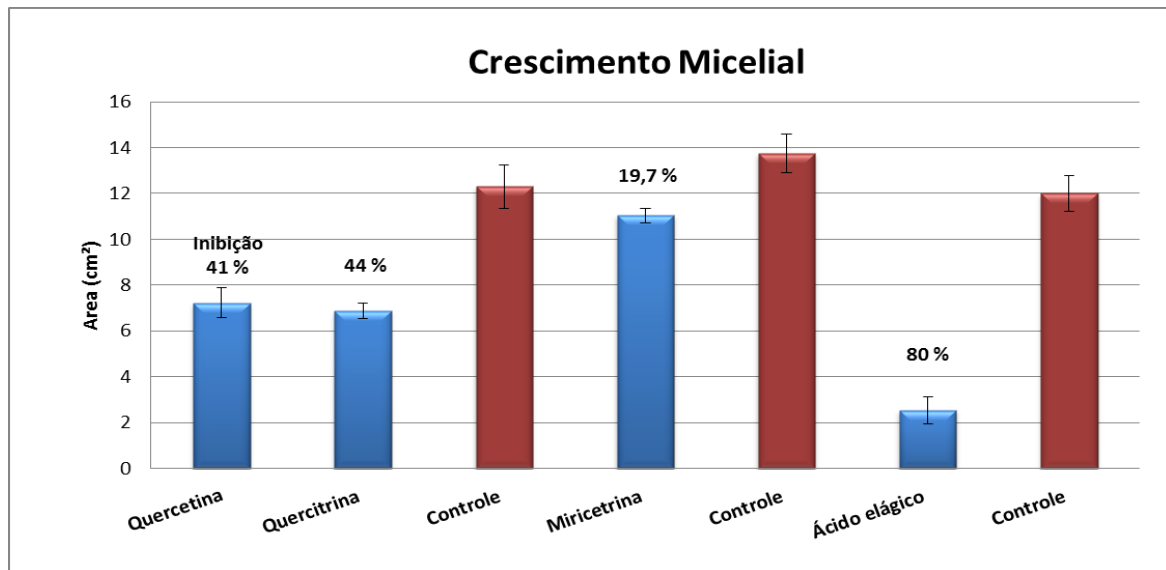


Gráfico 4.27: Efeito dos compostos isolados de *A. humile* e *M. urundeuva* sobre o crescimento do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

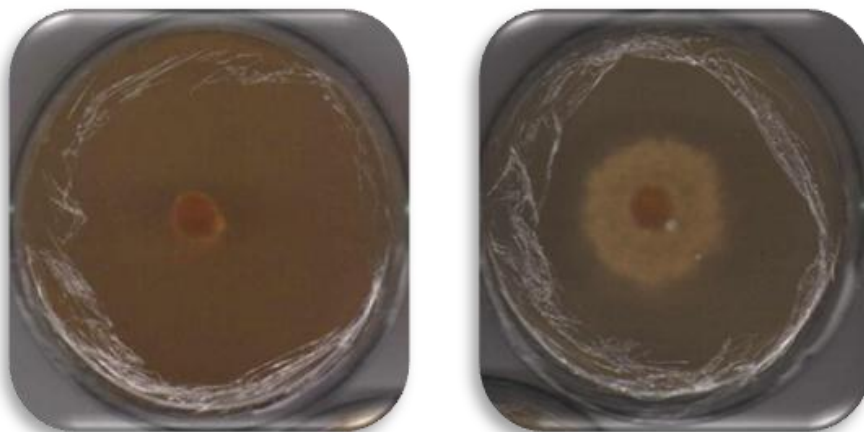


Figura 4.125: Atividade da substância ácido elágico (80 % de inibição; c = 100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte (*L. gongylophorus*).

Os compostos fenólicos ácido gálico e elágico isolados do extrato **MUGE** foram ensaiados sobre o fungo simbiote apresentando 35,0% e 80,0% de inibição na concentração de 100 µg/mL, respectivamente. Já o flavonóide miricetrina (**MUFE**), não apresentou atividade significativa quando comparado ao controle, apresentando 19,7% de inibição do crescimento do fungo, na concentração de 100 µg/mL. Dentre as substâncias isoladas de **AHFE**, foram avaliados sobre o fungo simbiote, os flavonóides quercetina e quercitrina, apresentando atividades moderadas (41% e 44%, respectivamente), já para o biflavonóide amentoflavona nenhuma atividade de inibição sobre o crescimento do fungo simbiote foi observada.

Através dos ensaios realizados com as substâncias provenientes dos extratos **MUFE** e **AHFE**, observou-se novamente a dificuldade de se encontrar os constituintes que viabilizem os resultados obtidos anteriores, através dos ensaios realizados com os extratos e frações, mostrando assim, que o conjunto dos seus constituintes são os responsáveis pela atividade inibitória sobre o crescimento do fungo simbiote.

Há relatos na literatura da atividade do flavonóide glicosilado astilbina sobre o crescimento do fungo simbiote, sendo este capaz de inibir 100% do crescimento micelial do fungo *L. gongylophorus* (ALMEIDA, 2007). Já a mistura dos flavonóides: orientina e isoorientina (GALLO, 2004), apresentou inibição micelial de 40%, quando avaliada sobre o crescimento do fungo simbiote.

4.10.3 Atividades inibitórias dos extratos e substâncias puras de *Schinus terebinthifolius* sobre o fungo *L. gongylophorus*.

Os extratos da espécie *S. terebinthifolius* foram submetidos a ensaios com o fungo simbiote (*L. gongylophorus*) de acordo com a metodologia representada no item 3.11.2. Os resultados obtidos estão descritos nos Gráficos 4.28.

Para os extratos das folhas, o extrato metanólico apresentou 25% de inibição, o extrato diclorometânico 28% e o hexânico, 27%. Os extratos diclorometânico, hexânico e o metanólico dos galhos apresentaram, respectivamente, 14, 28 e 37%. Nos frutos, o extrato metanólico apresentou 88% de inibição, a maior atividade inibitória dentre todos os extratos. O extrato diclorometânico do fruto teve 39% do seu crescimento micelial inibido e o hexânico, 30%. Deste modo, através dos resultados obtidos dos extratos de *S. terebinthifolius* no ensaio sobre o fungo simbiote, observou-se que todos os extratos testados, exceto o extrato STFrM, apresentaram baixa taxa de inibição.

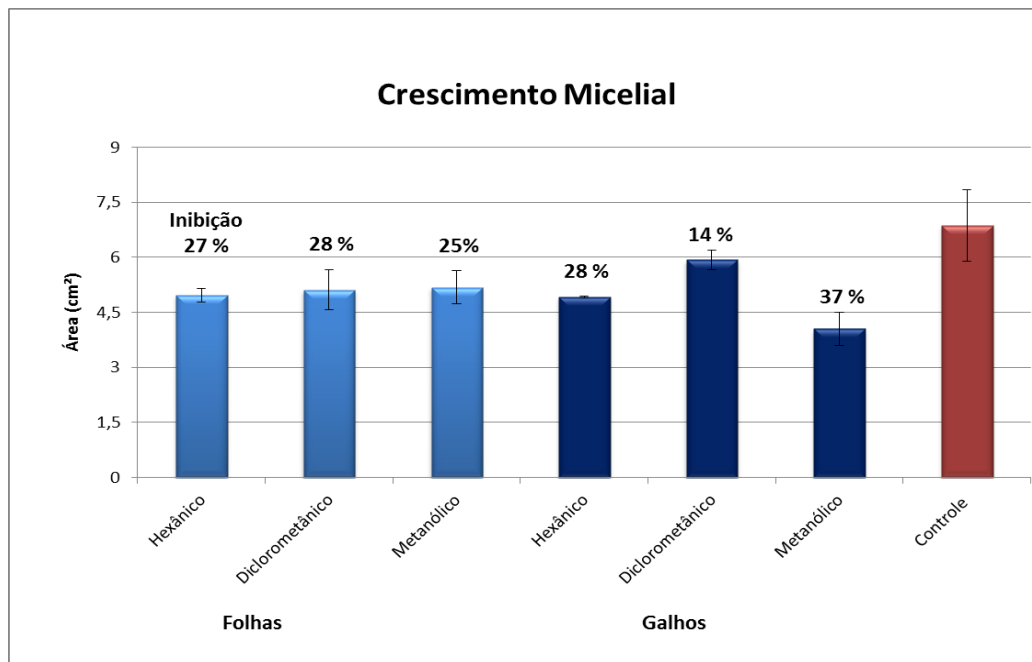


Gráfico 4.28: Efeito dos extratos das folhas e galhos de *Schinus terebinthifolius* sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

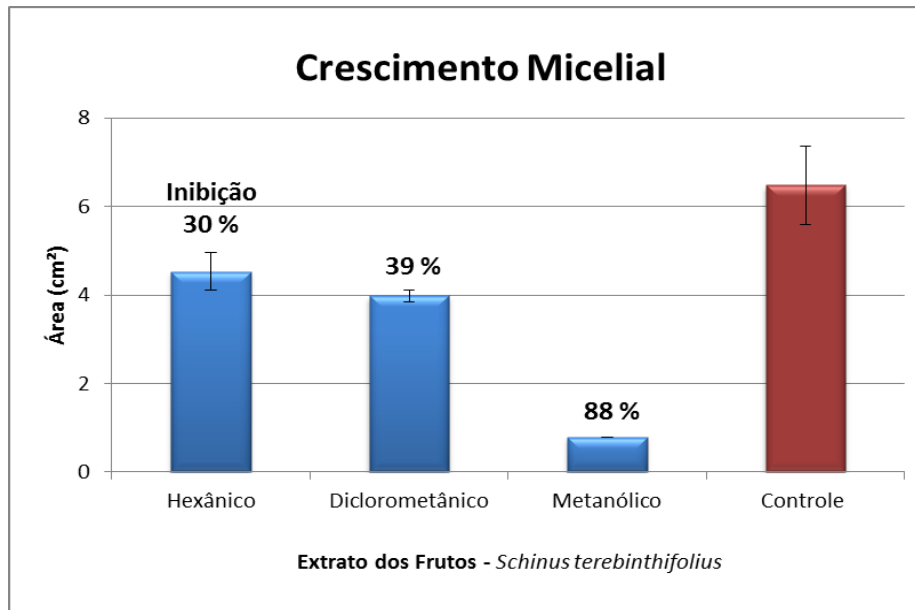


Gráfico 4.29: Efeito dos extratos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* sobre o crescimento do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

Do estudo fitoquímico do extrato **STFRM** foi identificado como compostos majoritários os biflavonóides, agatisflavona e tetrahidrorobustaflavona. Esses compostos foram submetidos ao ensaio de inibição sobre o fungo simbionte, cuja metodologia segue descrita no item 3.11.2. Todos os experimentos com as substâncias puras foram realizados na concentração de 100 µg/mL.

Avaliando os resultados obtidos, observou-se que ambos, a agatisflavona e tetrahidrorobustaflavona não apresentaram atividade significativa, com valores de 9,0% e 31,0% de inibição, respectivamente. Esses resultados sugerem que a inibição de 88% no crescimento micelial do fungo simbionte *L. gongylophorus* possa estar relacionada ao sinergismo entre os compostos presentes neste extrato (STFRM), uma vez que as substâncias avaliadas isoladamente não apresentaram resultados significativos.

O triterpeno lupenona e o esteróide sitostenona isolados do extrato diclorometânico dos frutos de *S. terebinthifolius* foram anteriormente avaliados por Peñaflor *et al.* (2009) e por Simote (2006), respectivamente. Para ambos os compostos na concentração de 100 µg/mL, nenhuma atividade significativa sobre a inibição do crescimento do fungo simbionte foi observada.

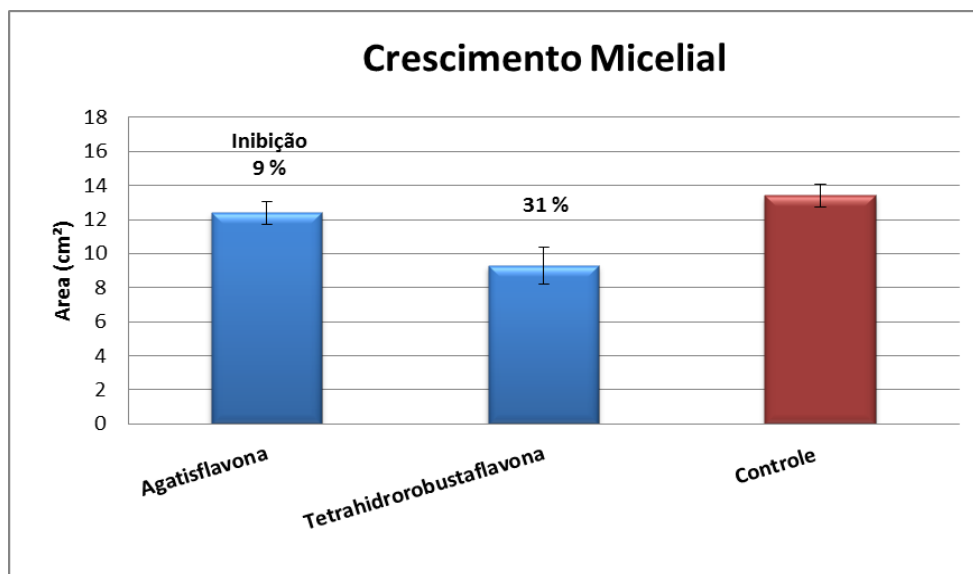


Gráfico 4.30: Efeito dos biflavonoides agatisflavona e tetrahidrorobustaflavona, na concentração de 100 µg/mL, sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.10.4 Atividades dos complexos metálicos do flavonóide quercetina sobre o crescimento do fungo *L. gongylophorus*.

Analisando os resultados obtidos nos ensaios (Gráfico 4.31) observou-se que ambos os complexos $[\text{Cu}_2(\text{Quercetina})(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $(\text{cis-}[\text{Ru}(2,2'\text{-bipiridina})_2(\text{quercetina})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ não apresentaram bons resultados de inibição sobre o fungo simbiote, visto que na mesma concentração o ligante quercetina apresentou 41% de inibição.

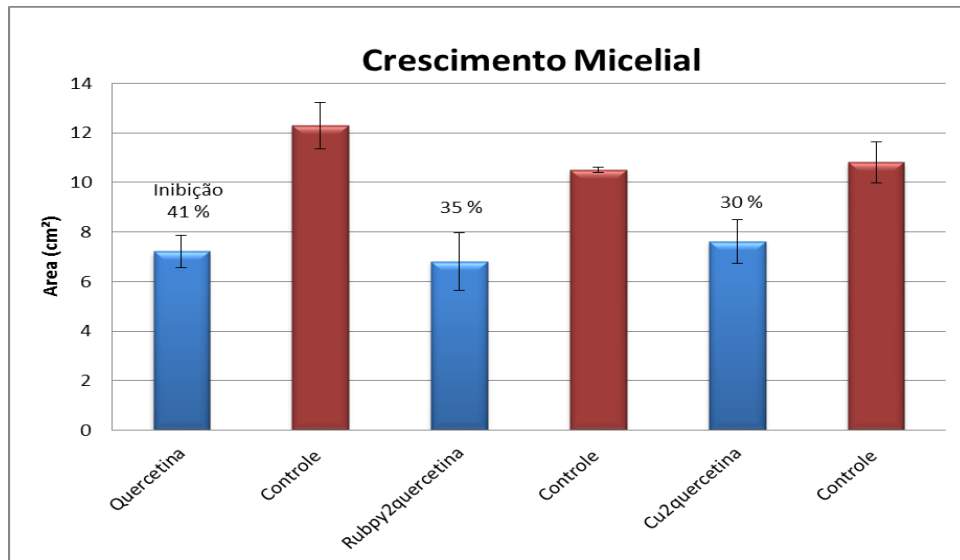


Gráfico 4.31: Efeito dos complexos metálicos $[Cu_2(Quercetina)(H_2O)_4]$ e $(cis-[Ru(2,2'-bipiridina)_2(quercetina)](PF_6)_2 \cdot 2H_2O)$ na concentração de $100 \mu g/mL$, sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

PARTE I
CONCLUSÕES

5. Conclusões

O estudo fitoquímico das espécies *Anacardium humile*, *Macairea urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* proporcionou o isolamento e identificação de diversos metabólitos secundários, dentre eles, triterpenos, esteroides, flavonoides, biflavonoides, flavonoides glicosilados e compostos fenólicos. O estudo das espécies *A. humile* e *M. urundeuva* contribuiu para o conhecimento de seus perfis químicos, visto que não há relatos na literatura sobre suas composições químicas.

Os ensaios realizados com os extratos brutos de diversas partes vegetais das espécies *A. humile*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* sobre *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que, com exceção dos extratos hexânico das folhas, diclorometânico e metanólico dos galhos de *S. terebinthifolius*, os demais extratos brutos provocaram aumento na mortalidade quando comparados ao controle (dieta pura) de acordo com o teste de log-rank ($p < 0,05$). O processo de purificação desses extratos e frações gerou substâncias que não foram ativas frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* e, assim, sugere-se que o potencial tóxico apresentado pelos mesmos esteja correlacionado ao efeito sinérgico.

Modificações estruturais do triterpeno ácido masticadienóico (**T1**) foram realizadas a fim de verificar as correlações estrutura/atividade, entretanto para ambos derivados **T1-A** e **T1-B**, nenhum aumento significativo da atividade inseticida sobre os ensaios de toxicidade sobre as formigas cortadeiras foi observado.

Os extratos brutos das espécies *A. humile*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* também foram submetidas a ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbionte das formigas cortadeiras, o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. Dos resultados avaliados, observou-se que o extrato **MUFE** (Extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva*) apresentou atividade moderada (58%) de inibição do crescimento do fungo, já para o **AHFE** (Extrato etanólico das folhas de *A. humile*), um baixo poder de inibição (28%) foi observado. Para as frações **MUFE-A** e **MUFE-M** na concentração de 500 µg/mL, foram observados bons resultados, visto que ambos proporcionaram mesmo em menores concentrações, um aumento

significativo da atividade inibitória. Para a fração **MUFE-A**, 100% de inibição do crescimento do fungo simbiote foi observada. Para os extratos de *S. terebinthifolius*, com exceção do extrato metanólico dos frutos, que apresentou 88% de inibição do crescimento do fungo simbiote, os demais apresentaram baixas taxas de inibição.

Dentre as substâncias isoladas e avaliadas sobre o fungo simbiote, os flavonóides quercetina e quercitrina apresentaram atividades moderadas (41% e 44%, respectivamente), já o ácido elágico na concentração de 100 µg/mL apresentou um grande potencial fungicida contra o *Leucoagaricus gongylophorus*, apresentando uma alta taxa de inibição (80,0%) do crescimento do mesmo. O flavonóide miricetrina, constituinte majoritário do extrato e frações de **MUFE**, não apresentou atividade significativa quando comparado ao controle, apresentando 19,7% de inibição do crescimento do fungo, na concentração de 100 µg/mL. Os biflavonóides tetrahidrorobustaflavona, amentoflavona e agatisflavona avaliados, não apresentaram atividade significativa de inibição sobre o crescimento do fungo simbiote.

A cromatografia por contracorrente (*HSCCC*) se mostrou eficiente no isolamento de compostos em maior escala a partir do extrato bruto, apresentando vantagens em relação a outras técnicas tais como economia de solvente e de tempo, eficiência e reprodutibilidade, além da recuperação total da amostra.

Os complexos metálicos com o flavonóide quercetina apresentarem resultados significativos sobre os ensaios de toxicidade por ingestão em *A. sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote. Este trabalho contribuiu com um amplo projeto que vem sendo desenvolvido pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, que visa avaliar a atividade inseticida e fungicida de diversos complexos de coordenação com diferentes metais e flavonóides no controle de diversas pragas.

PARTE I
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier Sc. Publishers Amsterdam: 444p., 1989.

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. “¹³C NMR spectroscopy of lignin and neolignan derivatives”. *Magn. Reson. Chem.*, 23 (6): 389-418, 1985.

ARA, K.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, A. H. M. M.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Terpenoids and Coumarin from *Bursera serrata* Wall. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 8 (2): 107-110, 2009.

BARBOSA, L. C.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; DE PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Quim. Nova* **30**: 1959-1965, 2007.

BASOLO, F. & PEARSON, R. G. *Mechanisms of inorganic reactions*. Academic press, 1968.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Manag. Sci.*, **60**:933–938, 2004.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. “Perspectivas no controle de formigas cortadeiras”. *Série Técnica IPEF*, 11: 31-46, 1997.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 10 (4): 325-347, 2012.

BRACA, A.; POLITO, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZAZZA, C.; TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidante activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Scherocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 6689-6695, 2003.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial, *An. Soc. Entomol. Brasil.* **26**:107-113, 1997.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; TAHIR, M. M.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidante activity of cobalto-quercetin complex. *J.Mol. Struct.* **892**., 39-46, 2008.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; TAHIR, M. M.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidante activity of copper--quercetin complex. *Spectrochim. Acta Part A* **71**: 1901-1906, 2009.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Terebenthifolic acid and bauerenone: New triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* **14**: 2300-2302, 1975.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* **13**: 659-660, 1974.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ, M. V.; VELDEERS, A. H.; HERMOSÍN-GUTIÉREZ, I. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinífera* Cv. Petit Verdot Red Wine grapes. *Journal of Agric.and Food Chem.* **57**: 209-219, 2009.

CASTILHO, A. M. C.; FRAGAN, M. E.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; ROSA, C. A. R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. *Ciência Rural*, 40 (6): 1243-1249, 2010.

CARVALHO, M. G.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; MENDES, L. S.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids And Terpenoids Isolated From The Leaves Of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae). *Rev. Latinoamer. Quím.* 36(3),71-75, 2008.

CAZAL, C. M.; BATALHÃO, J. R.; DOMINGUES, V. C.; BUENO, O. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. *J.Chromatogr. A*, **1216**: 4290-4294, 2009.

CAZAL, C. M.; DOMINGUES, V. C.; BATALHÃO, J. R.; BUENO, O. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**: 4307-4312, 2009.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova* **30**: 597-599, 2007.

CHEN, L.; GAMES, D. E.; JONES, J. Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **988**: 95-105, 2003.

CLAUSING, G. & RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications of character evolution. *Amer. J. Bot.* **88**: 486-498, 2001.

CORRÊA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quim. Nova*, **29**: 1287-1300, 2006.

CRONQUIST, A. J. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, NY. 1262. p.1981

CRONQUIST, A. J. *The evolution and classification of flowering plants*. 2nd. ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 1988.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **39**: 1-15, 2004.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). *As formigas cortadeiras*. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 1993. p.163-190.

DENG, S.; DENG, Z.; FAN, Y.; PENG, Y.; LI, J.; XIONG, D.; LIU, R. Isolation and purification of three flavonoid glycosides from the leaves of *Nelumbo nucifera* (Lotus) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr B* **877**: 2487-2492, 2009.

DOS SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* **20** (2): 154-159, 2010.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T. Chemical Compositions and Antioxidant/Antimicrobial Activities of Various Samples Prepared from *Schinus terebinthifolius* Leaves Cultivated in Egypt. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(12): 5265-5270, 2009.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol.* **130**: 325-337, 2001.

FARJI-BRENNER, A. G. F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhibiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. *J. Biogeography*, **21**: 391-399, 1994.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **42** (3): 369-394, 2006.

FERNADES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; CORREA, A. G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. O futuro dos produtos naturais no controle de formigas. *Biológico*, São Paulo, **69** (2): 221-224, 2007.

FERNANDES, J. B., ZAVAN, C., LEITE, A. C., SIMOTE, S. Y., FACCHINI, P. H., TEREZAN, A. P., GUERREIRO, G., AMBROZIN, A. R. P., DE ALMEIDA, S. S. M. S.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; PIRANI, J. R. Produtos Naturais no Controle de Formigas Cortadeiras. In: *Controle de formigas cortadeiras*. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2008.

- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist.*, **8**: 128-132, 1994.
- FORTI, L. C. & ANDRADE, A. P. P. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, **24**: 61-63, 1999.
- GAO, M.; GU, M.; LIU, C. Two-step purification of scutellarin from *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatog. B* **838**: 139-143, 2006.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C. "Flavonoid Composition of *Citrus* Juices". *Molecules*, **12**: 1641-1673, 2007.
- GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCADA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Rev. Cub. Plant. Med.* **5**: 23-25, 2000.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: 535p., 1982.
- HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**: 481-504, 2000.
- HUANG, T.; SHEN, P.; SHEN, Y. "Preparative separation and purification of deoxyschisandrin and γ -schisandrin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography". *J. Chrom. A.*, **1066**: 239-242, 2005.
- HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **38**: 43-49, 2003.
- HÖLLDOBLER B.; WILSON, E. O. *The Ants*. Berlin: Springer-Verlag, p. 732, 1990.
- ITO, Y., Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1065**: 145-168, 2005.
- ITO, J.; CHANG, F.; WANG, H.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from brazilian propolis. *J. Nat. Prod.*, **64**: 1278-1281, 2001.
- JAIN, M. K.; YU, B.; ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A.; OSTRANDER, R. L.; RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, **39** (3): 537-547, 1995.
- JORDÃO, C. P.; ALVES, N. M.; PEREIRA, J. L.; BELLATO, C. R.; ALVAREZ, V. V.H. Adsorption of Cu²⁺ ions by a humic yellow red oxisol. *Química Nova* **23**: 5-11, 2000.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. Biphenyl Esters and Biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chem. Nat. Comp.* **40**: 447-450, 2004.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* **62**: 229-237, 2003.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I.; VLADYKOVSKAYA, E. N.; KORKINA, L. G.; AFANAS, B. A. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 129-137, 2001.

LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JUNIOR, M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their Insecticidal Activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16 (6): 1391-1395, 2005.

LE GALL, G.; DUPONT, M. S.; MELLON, F.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E.; COLQUHOUN, I. J. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2438-2446, 2003.

LIMA, C. A. Manejo integrado das formigas cortadeiras. In: PIKANÇO, M. C. *Entomologia agrícola*. Viçosa:UFV/Departamento de Biologia Animal, 2010, p.281-287. Apostila.

LI, X.; ELSOHLY, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARCK, A. M. NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **37**: 856-859, 1999.

LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J. M. New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. *J. Agric. Food. Chem.*, **56**: 8130-8140, 2008.

LIN, Y.; ZEMBOWER, D. E.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R. M.; ANDERSON, H. M.; KORBA, B. E.; CHENG, F. Robustaflavone, a naturally occurring biflavonoid, is a potent non-nucleoside inhibitor of hepatitis B Virus replication in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7** (17): 2325-2328, 1997.

LOECK, A. E. & NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *O Solo, Piracicaba*, **76**: 25-30, 1984.

LORENZI, H. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova odessa: Plantarum, 1992, p.244

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F.; Terpenos of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* **16**: 1301-1302, 1997.

MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição de plantas*. Ed. Agronômica Ceres; São Paulo, 1980.

- MAKINO, M.; MOTEGI, T.; FUJIMOTO, Y. Tirucallane-type triterpenes from *Juliana adstringens*. *Phytochemistry*, **65**:891-896, 2004.
- MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **248**: 61-85, 2006.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agríc.*, 7 (2) : 18-21, 2006.
- MARICONI, F. A. M. *As Saúvas*. São Paulo. Agronômica Ceres, 1970, p. 167.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press; London, UK; 113p., 1982.
- MARTIN, M. M. e WEBER, N. A. The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by the Attini, *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **62**: 1386-1387, 1969.
- MARTIN, M. M.; BOYD, M. J.; GIESELMANN, M. J.; SILVER, R.G. Activity of fecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Phys.* **21**: 1887-1892, 1975.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *J. Chromatogr. A* **658**: 314-341, 1994.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J. Chromatogr. A* **1112**: 181-194, 2006.
- MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **68**: 2785-2797, 2007.
- MOCO, S.; TSENG, L.; SPRAUL, M.; CHEN, Z.; VERVOORT, J. Building-up a comprehensive database of flavonoids based on nuclear magnetic resonance data. *Chromatographia* **64**: 503-508, 2006.
- MORESSI, M.; MORAES NETO, A.; CREPALDI, R. A.; CARBONARI, V.; DEMÉTRIO, M. F.; SILVESTRE, R. Eficiência do controle mecânico de formigas cortadeiras (*Atta laevigata*) no reflorestamento com espécies nativas. *Biológico*, 69 (2): 471-473, 2007.
- MOTA, M. L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J.M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J. Ethnopharmacol.* **13**: 289-300, 1985.
- MUELLNER A. N.; SAMUEL, R.; JOHNSON, S. A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T. D.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* **90**: 471-480, 2003.

MULHOLLAND, D. A.; JERALD, J. N. Triterpenoids from *Dysoxylum peltigrewianum*. *Phytochemistry*, **37**: 1409-1411, 1994.

MIYASHIRA, C. H. "Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento in vitro de seu fungo mutualista. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 2007.PP. 26-28.

NICHOLSON, T. M.; GRADL, M.; WELTE, B.; METZGER, M.; PUSCH, C. M.; ALBERT, K. Enlightening the past: Analytical proof for the use of Pistacia exudates in ancient Egyptian embalming resins. *J. Sep. Sci.*, **34**: 3364–3371, 2011.

PACHECO, P.; BERTI-FILHO, E. Introdução. *Formigas cortadeiras e seu controle*. 1ed. Piracicaba: Instituto de pesquisa e estudos florestais, v.1, p4.

PARASCHOS, S.; MAGIATIS, P.; MITAKOU, S.; PETRAKI, K.; KALLIAROPOULOS, A.; MARAGKOUidakis, P.; MENTIS, A.; SGOURAS, D.; SKALTSOUNIS, A. In vitro and in vivo activities of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2): 551–559, 2007.

PEKAL, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *Biometals* 24, 41-49, 2011.

PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller *Bioassay*, 4 (1); 1, 2009.

PHASHANT, A.; KRUPADANAM, G. L. D. Dehydro-6-hidroxyrotenoid and Lupenone from *Tephrosia villosa*. *Phytochemistry*, 32 (2): 484-486, 1993.

PIO CORREA, M.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Ministério da Agricultura-IBDF, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, ANILDO JR.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quím. Nova* 26 (4): 466-469, 2003.

RAYYAN, S.; FOSSEN, T.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, O. M. Isolation and identification of flavonoids, including flavone, rotamers, from the herbal drug Crataegi Folium cum Flore'(Hawthorn). *Phytochem. Anal.* **16**: 334-341,2005.

RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; BACCI JR., M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Activity of Sesame Leaf Extracts Against the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens* L. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 27 (3): 421-426, 1998.

RINALDO, D.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, A.; BRITO, A. R. M. S.

Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill, by high-speed counter-current chromatography. *Quím. Nova*, 29 (5): 947-949, 2006.

RODIONOVA, N. A. & BEZBORODOV, A. M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (Review). *Appl. Biochem. Microb.* **33**: 415-432, 1997

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microb.* **39**: 213-294, 1993.

SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H. & OHKI, T. 6 β -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus*. *Phytochemistry*, **22**: 2553-2555, 1983.

SATTERFIELD, M. & BRODBELT, J. S. Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**: 537-549, 2001.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVINO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants, *J. Ethnopharmacol.* **96**: 563-568, 2005.

SEVERINO, V. G. P.; CAZAL, C. M.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed-counter chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**: 4275-4281, 2009.

SHEN, D.; CHEN, C.; LEE, S. Polar constituents from *Sageretia thea* leaf characterized by HPLC-SPE-NMR assisted approaches. *J.Chin. Chem. Soc.***56**: 1002-1009, 2009.

SHI, S.; HUANG, K.; ZHANG, Y.; LIU, S. Preparative isolation and purification of two flavonoid glycosides from *Taraxacum mongolicum* by high-speed counter-current chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **60**: 81-85, 2008.

SILVA-PINHATI, A. C.; BACCI JR., M.; HINKLE, M. L.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C. and HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**:1463-1472, 2004.

SILVA, A. *Participação do fungo Leucocoprinus gongylophorus na Produção de Enzimas Intestinais da Formiga Atta sexdens*. Rio Claro, Instituto de Biociências - UNESP, 1999. Dissertação de Mestrado. 104 p.

SILVA, A.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *J. Insect Phys.*, **49**: 307-313, 2003.

SILVA, A. B.; SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, S. A.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; DA CÂMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N. T., LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial activity, chemical compositions, and cytotoxicity of leaf's essential oil. *Braz. J. Microbiol.*, **41**: 158-163, 2010.

SIMOTE S. Y. Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativo visando o controle de formigas cortadeiras. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 2006. Tese de Doutorado. 200p.

SINGER, R. *The agaricales in modern taxonomy*, 4^a ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986, p. 477.

SIQUEIRA, C. G. *Estudo do potencial metabólico do fungo Leucocoprinus gongylophorus Heim, associado aos ninhos de Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae)*. Rio Claro, Instituto de Biociências - UNESP, 1997. Dissertação de Mestrado. 66 p.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO O. C.; HEBLING M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L.. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4820-4822, 1998.

STICHER, O. "Natural product isolation". *Nat. Prod. Rep.*, **25**: 517-554, 2008.

SVENNINGSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A. K. Biflavones from *Rhus* species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. *J. Ethnopharm.* **103**: 276-280, 2006.

SOUZA, R. F. V. & DE GIOVANI, W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A* **61**: 1985-1990, 2005.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. *Journal of Braz. Chem. Soc.* **118**(6): 1276-1280, 2007.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. *J. Chromatogr A* **1151**: 6-13, 2007.

TATE, R.L. *Biological and Ecological. Effect*. Malabar; Krieger, 1992.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K. and HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – A Review. *Crit. Food Sc. Nutr.* **37**: 47-73, 1997.

TÖFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. *Botritis* sp. Em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. *Biológico*, **73** (1): 11-20, 2011.

VELÁSQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; DAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* **74**: 91-97, 2003.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; DE SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina De *Protium heptaphyllum*: Isolamento, Caracterização Estrutural E Avaliação Das Propriedades Térmicas. *Quim. Nova*, **28** (2): 183-187, 2005.

ZHANG Y.; JIAO J.; LIU C.; WU X.; ZHANG Y. Isolation and purification of four flavones C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chem.***107**: 1326-1336, 2008.

ZHOU, J.; WANG, L.; WANG, J.; TANG, N. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. *Transit. Metal Chem.* **26**: 57-63, 2001.

YANG, M. & KONG I. Flavonols and Flavonol Glycosides from *Rhododendron irroratum*. *Chem.Nat. Compd.* **44**: 98-99, 2008.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J.Chrom. A* **1032**: 273-279, 2004.

WEBER, N. A. *Gardening ants: the Attines*. Philadelphia: The American Philosophical Society. 1972, p. 87-115.

**PARTE II: OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO
DE RICININA EM FOLHAS DE *RICINUS COMMUNIS*
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS E ULTRA-SOM**

ESTE CAPÍTULO COMPREENDE OS TÓPICOS:

- ✓ INTRODUÇÃO
- ✓ OBJETIVOS
- ✓ PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS
- ✓ RESULTADOS E DISCUSSÕES
- ✓ CONCLUSÕES
- ✓ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PARTE II: Otimização dos processos de extração de ricinina em folhas de *Ricinus communis* assistida por micro-ondas e ultra-som

1. Introdução

A evolução da produtividade agrícola brasileira nas últimas décadas foi expressiva, tornando o Brasil o terceiro maior produtor agrícola do mundo, superado apenas pelos Estados Unidos e União Européia. Mas como sabemos, o clima tropical do Brasil também favorece a proliferação de pragas, levando a um grande consumo de defensivos agrícolas. Em 2007, o consumo de defensivos agrícolas no Brasil chegou U\$ 4,0 bilhões, ocupando o terceiro lugar no consumo mundial de agroquímicos. No entanto, esse grande consumo girou em 2010 aproximadamente US\$ 48 bilhões no mundo, e somente em nosso país cerca de US\$ 6,1 bilhões.

O uso de plantas com propriedades inseticidas tem sido proposta como métodos alternativos para o controle das formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e seu fungo simbiote *L. gongylophorus*. Há evidências experimentais de que metabólitos secundários presentes em plantas podem ser prejudiciais às formigas cortadeiras e o seu fungo simbiote. O controle desta praga é ainda um desafio. Inseticidas sintéticos geralmente apresentam efeitos temporários e muitas vezes prejudiciais ao homem, meio ambiente e outros animais. Conseqüentemente, uma vasta pesquisa para encontrar métodos alternativos de controle desses insetos tem sido realizada, na tentativa de substituir, os inseticidas fipronil e sulfluramida, por outros menos agressivos ao meio ambiente.

Ricinus communis (Euphorbiaceae) é distribuída ao longo de muitas áreas tropicais (RODRIGUES *et al.*, 2002), é uma planta exótica encontrada em todas as regiões do Brasil, possuindo vários nomes populares, dentre elas, “mamona”, “carrapateira” ou “mamoeira”. *R. communis* foi descrita como uma planta tóxica às formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e outros insetos (UPSANI *et al.*, 2003; RAMOS-LÓPEZ *et al.*, 2010). As folhas e as flores desta planta contém o alcaloide ricinina (Figura 1.1), sendo este composto, o responsável por *R. communis* possuir efeito inseticida sobre as formigas cortadeiras (BIGI, *et al.*, 2004).

Em outros estudos, este alcaloide aparece como um fármaco promissor para o tratamento de amnésias humanas (FERRAZ *et al.*, 1999) e também na atividade anti-convulsiva (TRIPATHI *et al.*, 2011).



Figura 1.1: Folhas e frutos de *R. communis*, o alcaloide ricinina e as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*).

Outro fator importante aliado à busca por métodos alternativos de controle desses insetos é a viabilidade dos processos de extração para a identificação destes compostos. A otimização dos processos de extração assistida por diversas técnicas, aliadas a aplicação de delineamentos experimentais se torna importante para otimização desses processos.

A extração assistida por micro-ondas (MAE) tem sido amplamente utilizada na extração de compostos de diversas plantas (Li *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2011; Gallo *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2009) e alimentos (Liazid *et al.*, 2011, 2007, Rostagno *et al.*, 2007) apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais de extração de compostos orgânicos (Chan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Vários trabalhos mostram que diversos compostos podem ser extraídos de forma mais eficaz quando a energia fornecida pelo microondas é empregada, demonstrando que as extrações assistidas por micro-ondas podem reduzir consideravelmente o tempo de extração, consumo de solventes e os rendimentos podem ser maximizados. A eficiência da extração assistida por micro-ondas é fortemente relacionada com a seleção dos diversos parâmetros que afetam os mecanismos de extração. Os fatores mais influentes neste processo são: tempo de extração, potência de radiação, temperatura, solvente, relação solvente/amostra. Quando muitos fatores e interações afetam a resposta desejada, a metodologia do delineamento experimental apresenta-se como uma ferramenta eficaz para otimização destes processos.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo buscar novos processos de extração de ricinina em folhas de *R. communis*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Buscar um método eficaz de extração e quantificação de ricinina em folhas de *R. communis* através da extração assistida por micro-ondas
- ✓ Desenvolver um processo de extração de ricinina assistida por ultra-som para obtenção de extratos enriquecidos com o composto ativo ricinina em folhas de *R. communis*
- ✓ Avaliar a atividade biológica dos extratos obtidos através dos novos processos de extração.

3. Procedimentos Experimentais

3.1 Materiais e métodos

◆ Solventes

- ◆ Solventes de grau HPLC da Merck.
- ◆ O padrão de Ricinina foi isolado das folhas de *R. communis* e sua identificação foi realizada utilizando a RMN de ^1H e ^{13}C e LC-MS e comparado a literatura (Cazal *et al.*, 2009). Este composto foi gentilmente cedido pela aluna Cristiane de Melo Cazal do Laboratório de Produtos Naturais-UFSCar.

3.2 Equipamentos

◆ Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC):

- ◆ Cromatógrafo: Acquity Waters (analítico) com degaseificador, duas bombas Waters. Detector: UV-VIS (Arranjo de Diodos),

◆ Micro-ondas

- ◆ ETHOS 1600, Milestone (Soriso, Itália), equipado com

◆ Ultra-som

- ◆ UP200S (200W, 24kHz) (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemanha) acoplado a um Banho Termostático com controlador de temperatura

3.3 Material Botânico

As folhas de *Ricinus communis* L. foram coletadas no Jardim Experimental da Universidade Federal de São Carlos.

As folhas foram secas em estufas de circulação por 3 dias a 40 °C e moídas em moinho do tipo Willey.

3.4 Extração de Ricinina (Folhas – *Ricinus communis*) assistida por Microondas

Para o desenvolvimento do método de extração de ricinina assistida por microondas, diversas etapas foram seguidas, dentre elas:

- ◆ Desenvolvimento do método de análise de ricinina via UPLC-DAD;
- ◆ Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por microondas;
- ◆ Delineamento experimental do método;
- ◆ Processo de extração;
- ◆ Otimização dos parâmetros avaliados durante o processo de extração assistida por microondas;

3.4.1 Desenvolvimento do método de análise via UPLC-DAD

As análises foram realizadas no sistema UPLC-DAD Acquity Waters, coluna Acquity BEH C18 (1mm/1,7µm). A temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. O sistema de solvente binário utilizado foi: A (2% de ácido acético e 3% de acetonitrila em H₂O) e B (2% de ácido acético e 85% de acetonitrila em H₂O), utilizando um fluxo de 0,6 mL/min e volume de injeção de 1,5 µL. O gradiente de eluição empregado foi: 0-3,0 min., A 100%, 3,0-4,0 min., 100 a 90% A, 4,0-6,5 min., 90 a 25% A e de 6,5-7 min. 25 a 0% A e 7,5-11min. B 100%, seguido da limpeza da coluna com 100% B por 3 minutos. A identificação do composto ricinina foi realizada pela comparação do tempo de retenção e espectro de UV do pico obtido pela injeção do padrão de ricinina ($\lambda = 310\text{nm}$). O padrão de ricinina e os extratos obtidos através do processo de extração foram analisados sob as mesmas condições.

3.4.1.1 Validação do método analítico

O método foi validado após a investigação da faixa linear de trabalho, sensibilidade, exatidão e precisão, limite de quantificação e de detecção.

3.4.1.2 Curva de Calibração e Linearidade

A curva de calibração foi estabelecido entre as faixas lineares de trabalho de 0,5 a 10,0 (mg/L) e 7,5 a 150 (mg/L). Para essa análise uma solução estoque do padrão de ricinina foi preparada seguida das diversas diluições.

3.4.1.3 Precisão e exatidão do método

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A repetibilidade foi determinada realizando a análise de 10 replicatas no mesmo dia, enquanto que a precisão intermediária foi determinada através da análise de 5 replicatas em três dias não consecutivos.

3.4.1.4 Limite de Quantificação e Detecção

A sensibilidade do método foi definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os limites foram calculados através dos parâmetros da curva analítica. O limite de detecção foi expresso como $LD = 3,3 \cdot (s/a)$ (s = desvio padrão e a = coeficiente angular da curva de calibração). Já o limite de quantificação foi expresso como $LQ = 10 \cdot (s/a)$.

3.4.2 Estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes condições de extração por micro-ondas

Uma solução de ricinina padrão (20 ppm) foi utilizada para verificar a estabilidade do composto sobre diversas condições empregadas na extração por microondas, utilizando o metanol como solvente extrator em diferentes temperaturas (50 a 200 °C) e potências (100 a 1000W). Nesta etapa, foram fixados, o tempo de extração de 10 min. e potência mediana de 500W para análises com variações de temperatura, já para as variações das potências foram fixados os valores de 10 min. de extração e temperatura de 100°C. A metodologia baseou-se na diluição da solução estoque (1,0 mL) em 25,0 ml de MeOH, seguida da avaliação dos diferentes parâmetros empregados através da análise via UPLC-DAD. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma solução padrão, obtida nas mesmas condições, porém sem a utilização do microondas também foi avaliada. Os resultados obtidos foram correlacionados a recuperação da ricinina após o emprego do micro-ondas (Figura 3.1).

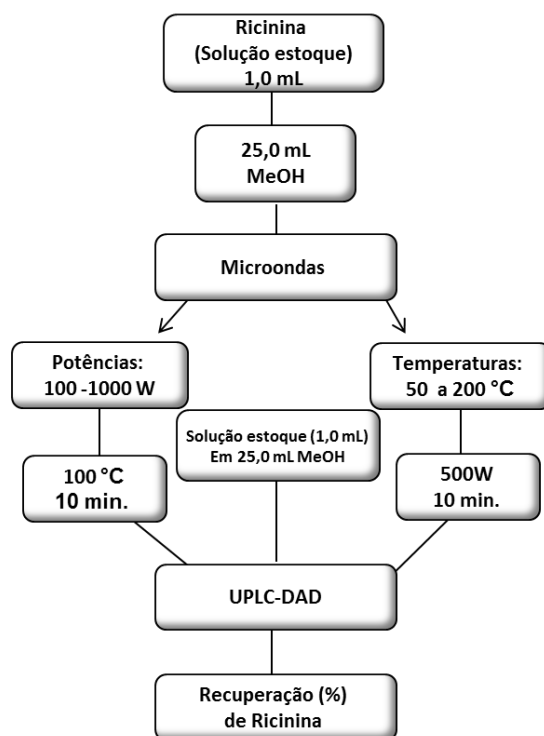


Figura 3.1: Metodologia empregada no estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes condições de extração por micro-ondas.

3.4.3 Delineamento experimental do método

Para o delineamento experimental do método de extração de ricinina assistida por micro-ondas (Tabela 3.1), cinco variáveis foram empregadas, temperatura, potência, tipo de solvente e proporção solvente/amostra. Os níveis escolhidos para as variáveis foram delimitados através do estudo da estabilidade do composto ricinina (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Níveis escolhidos para as variáveis a serem utilizadas na extração de ricinina:

Variáveis	Códigos	Níveis das variáveis		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	125	150	175
Potência (W)	X_2	500	750	1000
Tempo de Extração (min)	X_3	5	10	15
Solvente (%AcOEt)	X_4	10	50	90
Proporção solvente/amostra	X_5	25	37.5	50

Tabela 3.2: Delineamento experimental

Exp. nº	Código Variáveis					Variáveis de extração				
	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_4^d	X_5^e	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_4^d	X_5^e
1	1	-1	-1	-1	1	175	500	5	10	50
2	1	-1	-1	-1	-1	175	500	5	10	25
3	1	1	1	1	0	175	1000	15	90	37,5
4	-1	1	-1	-1	1	125	1000	5	10	50
5	0	1	1	0	1	150	1000	15	50	50
6	1	1	-1	-1	-1	175	1000	5	10	25
7	-1	1	-1	0	-1	125	1000	5	50	25
8	-1	-1	1	0	-1	125	500	15	50	25

9	1	1	1	0	-1	175	1000	15	50	25
10	1	-1	1	1	0	175	500	15	90	37,5
11	-1	0	1	1	-1	125	750	15	90	25
12	1	1	1	-1	1	175	1000	15	10	50
13	-1	1	0	1	0	125	1000	10	90	37,5
14	0	1	0	-1	-1	150	1000	10	10	25
15	-1	-1	1	-1	1	125	500	15	10	50
16	0	1	-1	1	-1	150	1000	5	90	25
17	0	-1	1	1	1	150	500	15	90	50
18	1	-1	0	1	-1	175	500	10	90	25
19	1	1	-1	1	1	175	1000	5	90	50
20	1	0	-1	1	-1	175	750	5	90	25
21	-1	-1	-1	1	0	125	500	5	90	37,5
22	-1	-1	-1	-1	-1	125	500	5	10	25
23	1	-1	-1	1	1	175	500	5	90	50
24	1	-1	1	-1	-1	175	500	15	10	25
25	-1	1	1	-1	0	125	1000	15	10	37,5
26	-1	0	0	1	1	125	750	10	90	50
27	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5
28	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5
29	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5

^a Temperatura (°C) / ^b Potência (W) / ^c Tempo de extração (min)

^d Solvent e(% AcOEt) / ^e Proporção solvent/amostra

3.4.4 Processo de extração

A metodologia empregada no processo de extração de ricinina em folhas de *R. communis* se encontra exemplificada na Figura 3.2. As extrações seguiram o delineamento experimental segundo a Tabela 3.2, sendo todas realizadas em duplicata.

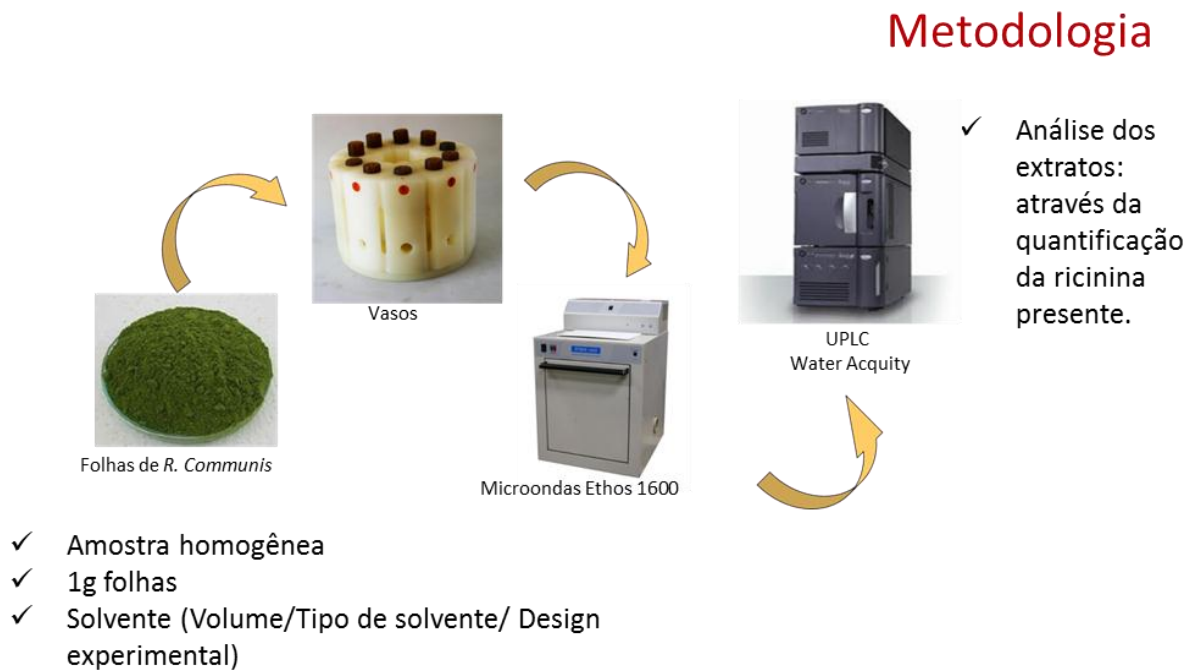


Figura 3.2: Metodologia empregada na extração de ricinina em folhas de *R. communis* assistida por micro-ondas.

Após o processo de extração, os vasos extratores (microondas) foram resfriados em um banho de gelo para evitar o prolongamento da extração. Os extratos foram então filtrados e posteriormente quantificados via UPLC-DAD.

3.4.5 Otimização do método experimental de extração de ricinina assistida por micro-ondas

Após a avaliação dos resultados do delineamento experimental, o processo de otimização do método foi desenvolvido.

Tabela 3.3: Parâmetros utilizados durante o processo de otimização:

Variáveis	Códigos	Nível
Temperatura (°C) (A)	X_1	175
Potência (W) (B)	X_2	1000
Tempo de extração (min) (C)	X_3	15

Tabela 3.4: Otimização do método experimental

Variáveis	Códigos	Níveis	das	Variáveis
Proporção solvente (mL)/amostra (1 g) (E)	X_5	25	20	15
Solvente (%AcOEt em MeOH) (D)	X_4	10	5	0

Baseado na otimização dos parâmetros acima referidos, o estudo cinético do método experimental foi realizado variando os tempos de extrações entre 5 a 25 min.

3.5 Extração de Ricinina (Folhas – *Ricinus communis*) assistida por Ultra-som

Para o desenvolvimento do método de extração de ricinina assistida por Ultra-som, diversas etapas foram seguidas, dentre elas:

- ◆ Estudo da estabilidade da ricinina em distintas temperaturas de extração (5 a 65°C) por Ultra-som;
- ◆ Seleção do solvente para extração;
- ◆ Avaliar as diferentes condições de extração, temperatura, potência do ultra-som, número de ciclos (amplitude), tempo de extração e a proporção solvente/amostra;
- ◆ Otimização do processo de extração.

3.5.1 Estudo da estabilidade de ricinina via Ultra-som

Uma solução estoque de ricinina padrão (20 ppm) foi utilizada para verificar a estabilidade do composto em diferentes temperaturas (5 a 65 °C) na extração por ultra-som, empregando o tempo de extração de 10 min., potência 50%, ciclos de 0,6 seg. A metodologia baseou-se na diluição da solução estoque (1,0 mL) em 25,0 ml de MeOH, seguida do processo de avaliação da influência das diferentes temperaturas empregadas na estabilidade de ricinina por ultra-som. Todas as análises foram realizadas em triplicata e posteriormente avaliadas via UPLC-DAD conforme metodologia do item 3.4.1. Uma solução padrão, obtida nas mesmas condições, porém sem a utilização do Ultra-som foi avaliada. Os resultados obtidos foram correlacionados a recuperação da ricinina após o emprego do Ultra-som (Figura 3.3).

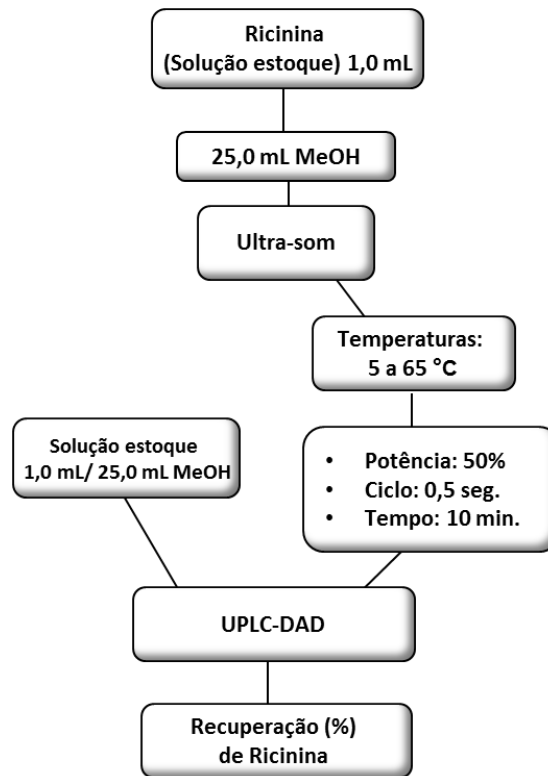


Figura 3.3: Metodologia empregada no estudo da estabilidade de ricinina sobre diferentes temperaturas de extração por ultra-som.

3.5.2 Seleção do solvente de extração de ricinina assistida por Ultra-som

A Figura 3.4 apresenta o resumo da metodologia aplicada na extração.

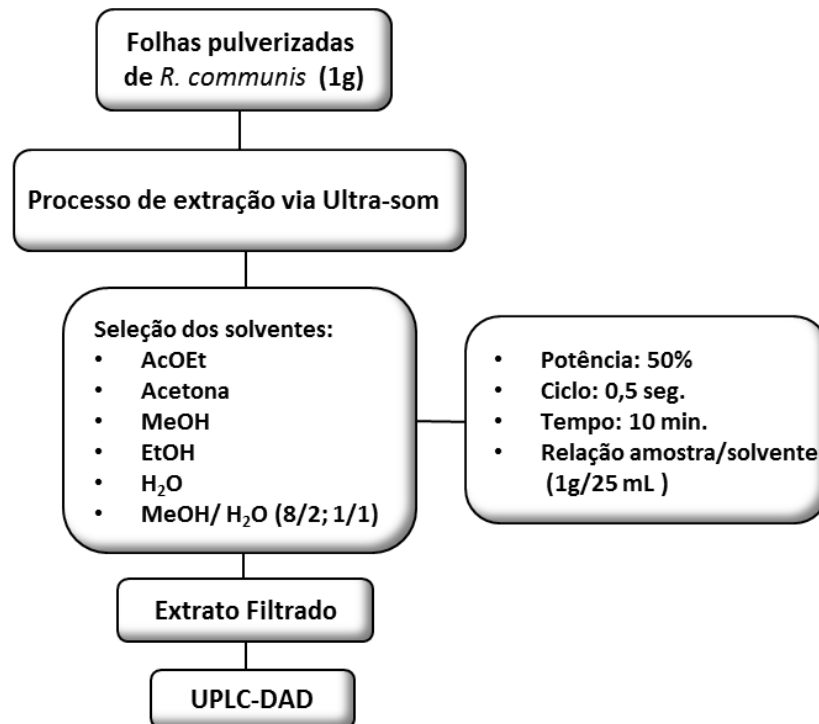


Figura 3.4: Metodologia empregada na escolha do solvente para extração de ricinina assistida por ultra-som.

3.5.3 Processo de extração de ricinina assistida por Ultra-som

Os parâmetros avaliados durante o processo de extração assistida por ultra-som foram: temperatura, potência, ciclos, tempo de extração e a proporção solvente/amostra (Tabela 3.5). A metodologia empregada no processo de extração de ricinina das folhas de *R. communis* se encontra exemplificada na figura 3.5. Todas as análises foram realizadas em duplicata e posteriormente avaliadas via UPLC-DAD conforme metodologia do item 3.4.1.

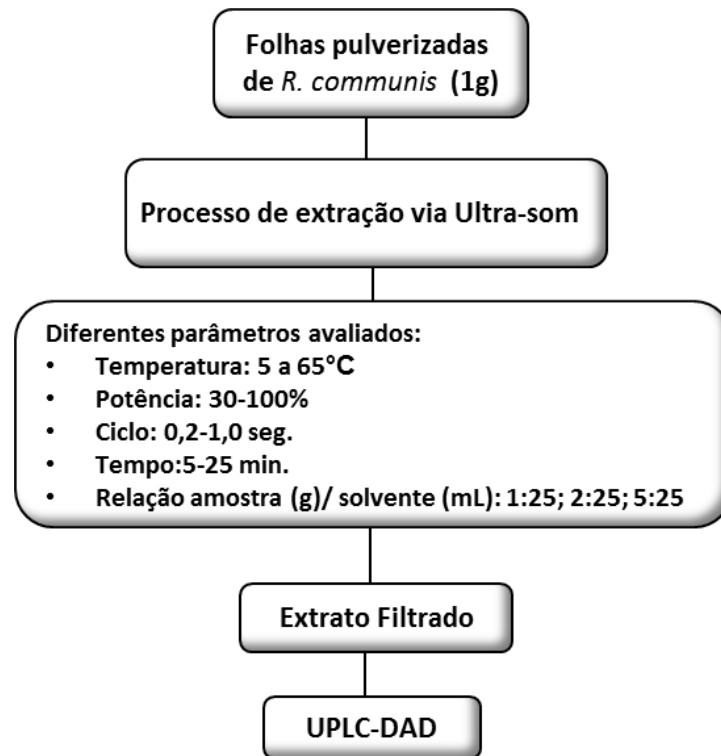


Figura 3.5: Processo de extração de ricinina assistida por Ultra-som.



Figura 3.6: Metodologia empregada na extração de ricinina assistida por Ultra-som.

Tabela 3.5: Parâmetros avaliados durante o processo de extração por ultra-som.

Variáveis				
Temperatura (°C)	Potência	Ciclos	Tempo de extração (min.)	Proporção solvente/amostra
5	30%	0,2	5	1g/25mL
20	50%	0,5	10	2g/25mL
35	100%	1,0	20	5g/25mL
50			25	
65				

4. Resultados e Discussões

Neste tópico serão discutidos dois novos processos de extração de ricinina de folhas de *R. communis*. O objetivo da extração de ricinina assistida por micro-ondas e ultra-som foi desenvolver um método eficaz de extração e quantificação da mesma em folhas de *R. communis* e obtenção de extratos enriquecidos com este composto ativo.

4.1 Extração de Ricinina de folhas de *Ricinus communis* assistida por Micro-ondas

Para o desenvolvimento do método de extração de ricinina assistida por micro-ondas, diversas etapas foram seguidas, dentre elas:

- ◆ Desenvolvimento do método de análise de ricinina via UPLC-DAD;
- ◆ Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por microondas;
- ◆ Delineamento experimental do método;
- ◆ Processo de extração;
- ◆ Otimização dos parâmetros avaliados durante o processo de extração assistida por microondas

4.1.1 Desenvolvimento do método de análise de ricinina via UPLC-DAD.

4.1.1.1 Validação do método analítico

A validação de um método inclui todos os procedimentos necessários para demonstrar que o método empregado para quantificação de um ou mais

compostos em uma matriz é eficaz, reprodutivo e específico para a aplicação desejada.

4.1.1.2 Curva de Calibração e Linearidade

As curvas de calibração foram obtidas através das áreas, relativas as concentrações de 0,5;1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e 10,0 (mg/L). A curva analítica para a ricinina obtida através da regressão linear está apresentada no Gráfico 4.1. A equação da reta ($y = 4469,3x + 496,58$, onde y é a área da banda cromatográfica e x é a concentração da ricinina na solução em (mg/L) foi linear na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,99.

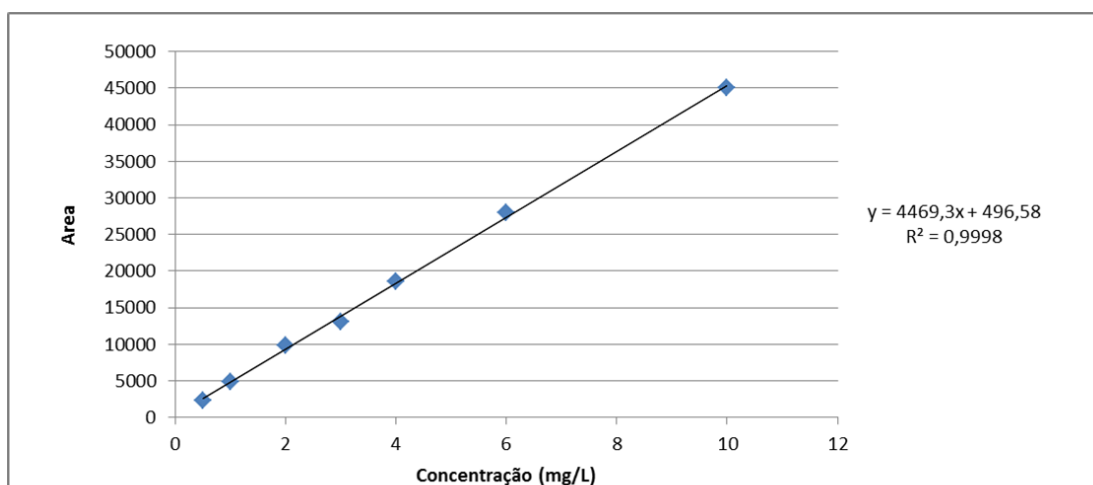


Gráfico 4.1: Curva de calibração da ricinina.

4.1.1.3 Precisão e exatidão do método

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A repetibilidade foi determinada realizando análises de 10 replicatas no mesmo dia, enquanto que a precisão intermediária foi determinada através da análise de 5 replicatas em três dias não consecutivos. O resultado da repetibilidade pode ser visualizado na Tabela 4.1

Tabela 4.1: Repetibilidade do método

Repetições	Resultados das análises	
	tr.	Área
1	2,485	46859
2	2,484	46443
3	2,484	48667
4	2,489	47212
5	2,484	46508
6	2,485	47411
7	2,492	47461
8	2,491	47843
9	2,498	46622
10	2,485	46859
Média	2,486	47225
Desvio padrão	0,005	681,1
Coefficiente de Variação	0,19%	1,44%

A precisão intermediária, similar a repetibilidade, porém, as análises são realizadas a partir de extrações em três dias distintos (Tabela 4.2). O coeficiente de variação foi determinado através dos dados obtidos das medidas realizadas durante três dias. Os coeficientes de variações para ambos, repetibilidade e precisão intermediária apresentaram valores inferiores aos limites aceitáveis definidos pela AOAC (1993).

Tabela 4.2: Precisão intermediária do método

Dias	Repetições	Resultados das análises	
		tr.	Área
1	1	2,535	48032
	2	2,534	46335
	3	2,537	49189
	4	2,539	49528
	5	2,551	50110
2	1	2,550	50101
	2	2,549	48132
	3	2,540	49183
	4	2,545	49302
	5	2,544	49510
3	1	2,485	46859
	2	2,484	46443
	3	2,484	48667
	4	2,489	47212
	5	2,484	46508
	Média	2,523	48340
	Desvio padrão	0,027	1318
	Coeficiente de Variação	1,09%	2,73

4.1.1.4 Limite de Quantificação e Detecção

A sensibilidade do método foi definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os limites foram calculados através dos parâmetros da curva analítica. O limite de detecção foi expresso como $LD = 3,3 \cdot (s/a)$ (s = desvio padrão e a = coeficiente angular da curva de calibração). Já o limite de quantificação foi expresso como $LQ = 10 \cdot (s/a)$ (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Curva de calibração (mg.L ⁻¹)	Equação	R ²	LOD (mg.Kg ¹)	LOQ (mg.Kg ¹)	Intra-dia, (CV) (%, n = 5 (3 dias))		Inter-dia (CV) (%, n = 5 (3 dias))	
					t _r	Área do pico	t _r	Área do pico
0,5 a 10	Y = 4469,5X+ 496,58	0,99	0,86	2,61	0,19	1,44	1,09	2,73

4.1.2 Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por Micro-ondas.

A fim de avaliar o desempenho das diferentes condições de extração, antes do desenvolvimento do método, dois fatores (temperatura e potência aplicada) que poderiam afetar a estabilidade da ricinina foram analisados. Estas análises auxiliaram no desenvolvimento da faixa de trabalho, nos quais foram delimitados através dos resultados obtidos.

A primeira variável a ser avaliada foi a influência da temperatura (50 a 200°C), sobre o tempo de extração de 10 min. e potência mediana de 500W. Os resultados obtidos, ilustrados na figura 4.1 mostraram que as diferentes temperaturas aplicadas no processo de extração não afetaram a estabilidade do composto ricinina. Os resultados da estabilidade da ricinina sobre as diferentes variáveis (Tabela 4.4) foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009).

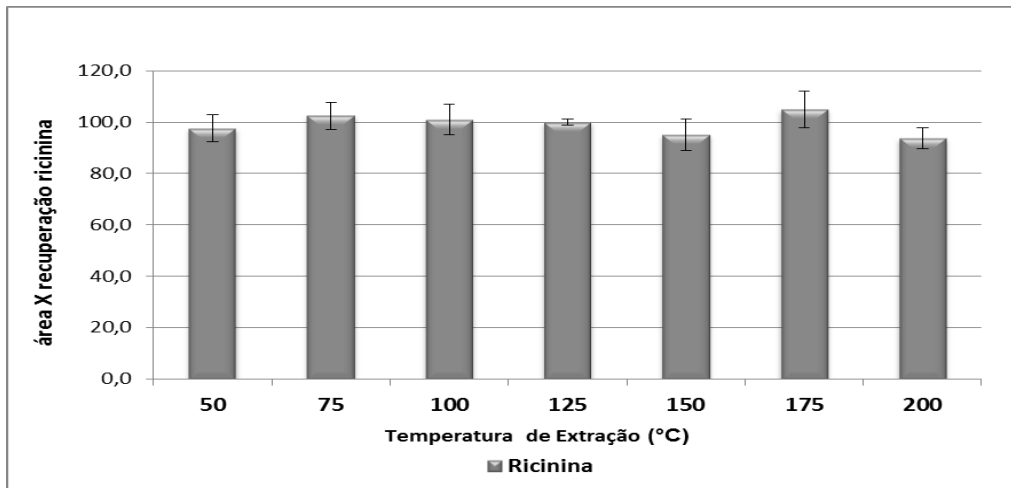


Gráfico 4.2: Efeito de diferentes temperaturas do processo na estabilidade do composto ricinina

Após analisar o comportamento da ricinina em diferentes temperaturas, a próxima etapa foi determinar a estabilidade do composto aplicando diferentes irradiações do microondas (100 a 1000W), utilizando a temperatura de 100°C e o tempo de extração de 10 min. Os resultados obtidos, ilustrados no Gráfico 4.3, mostraram que as diferentes potências aplicadas no processo de extração não afetaram a estabilidade do composto ricinina. Os resultados da estabilidade da ricinina sobre as diferentes potências aplicadas (Tabela 4.4) foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009).

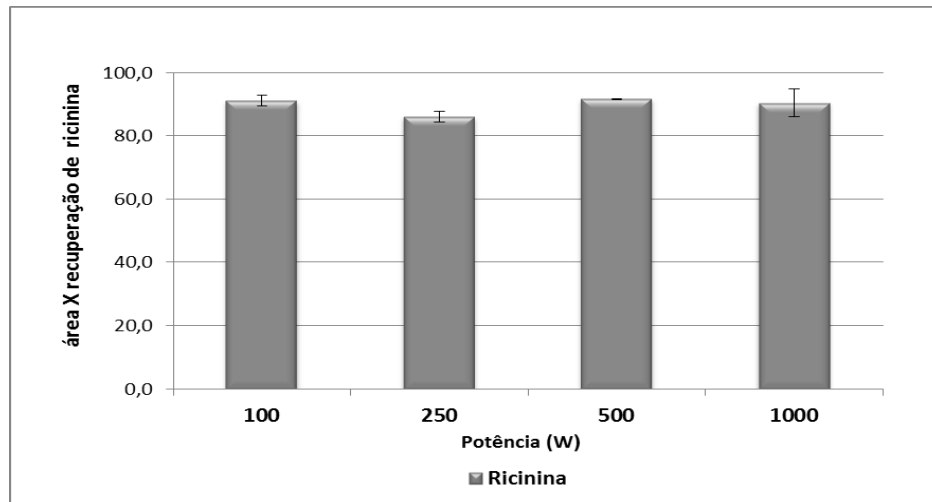


Gráfico 4.3: Efeito de diferentes potências do micro-ondas na estabilidade do composto ricinina

Tabela 4.4: Estudo da estabilidade da ricinina sobre diferentes condições de extração por Micro-ondas

Temperatura (°C)						
50	75	100	125	150	175	200
97.65 ^a	102.5 ^a	101.1 ^a	100.0 ^a	95.11 ^a	105.0 ^a	93.66 ^a
±5.16	±5.25	±5.86	±1.16	±6.23	±7.05	±4.04
Potência (W)						
100	250	500	1000			
91.10 ^a	86.00 ^a	91.66 ^a	90.38 ^a			
± 1.71	± 1.66	± 0.13	± 4.32			

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (P>0,05)

4.1.3 Delineamento Experimental do processo de extração de ricinina assistida por Micro-ondas.

A partir dos resultados obtidos (Tabela 4.4), um delineamento experimental foi montado utilizando o programa estatístico Unscrambler a fim de avaliar a influência de cinco variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de

extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) sobre o processo de extração de ricinina através de folhas de *Ricinus communis*. No total, 29 extrações foram realizadas. As respostas obtidas foram apresentadas em relação à máxima concentração observada nos extratos (100%) (Tabelas 4.5 e 4.6).

Tabela 4.5: Níveis escolhidos para as variáveis:

Variáveis	Códigos	Níveis das variáveis		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	125	150	175
Potênciar (W)	X_2	500	750	1000
Tempo de Extração (min)	X_3	5	10	15
Solvente (%AcOEt)	X_4	10	50	90
Proporção solvente/amostra	X_5	25	37.5	50

Tabela 4.6: Delineamento experimental

Exp. nº	Código Variáveis					Variáveis de extração					Valores Relativos
	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_4^d	X_5^e	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_4^d	X_5^e	Máxima resposta (%)
1	1	-1	-1	-1	1	175	500	5	10	50	48,8
2	1	-1	-1	-1	-1	175	500	5	10	25	83,2
3	1	1	1	1	0	175	1000	15	90	37,5	39,8
4	-1	1	-1	-1	1	125	1000	5	10	50	41,7
5	0	1	1	0	1	150	1000	15	50	50	58,9
6	1	1	-1	-1	-1	175	1000	5	10	25	76,0
7	-1	1	-1	0	-1	125	1000	5	50	25	95,9
8	-1	-1	1	0	-1	125	500	15	50	25	100,0
9	1	1	1	0	-1	175	1000	15	50	25	90,3
10	1	-1	1	1	0	175	500	15	90	37,5	41,1

11	-1	0	1	1	-1	125	750	15	90	25	60,6
12	1	1	1	-1	1	175	1000	15	10	50	71,9
13	-1	1	0	1	0	125	1000	10	90	37,5	31,1
14	0	1	0	-1	-1	150	1000	10	10	25	87,2
15	-1	-1	1	-1	1	125	500	15	10	50	47,9
16	0	1	-1	1	-1	150	1000	5	90	25	64,8
17	0	-1	1	1	1	150	500	15	90	50	38,8
18	1	-1	0	1	-1	175	500	10	90	25	75,8
19	1	1	-1	1	1	175	1000	5	90	50	41,9
20	1	0	-1	1	-1	175	750	5	90	25	67,5
21	-1	-1	-1	1	0	125	500	5	90	37,5	26,4
22	-1	-1	-1	-1	-1	125	500	5	10	25	87,3
23	1	-1	-1	1	1	175	500	5	90	50	38,5
24	1	-1	1	-1	-1	175	500	15	10	25	83,2
25	-1	1	1	-1	0	125	1000	15	10	37,5	47,4
26	-1	0	0	1	1	125	750	10	90	50	30,5
27	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5	56,9
28	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5	54,6
29	0	0	0	0	0	150	750	10	50	37,5	55,4

^a Temperatura (°C) / ^b Potência (W) / ^c Tempo de extração (min)

^d Solvente (% AcOEt) / ^e Proporção solvente/amostra

4.1.4 Seleção dos fatores para otimização do processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas.

O software Unscrambler foi utilizado para obtenção dos dados estatísticos para avaliação dos parâmetros experimentais, identificando assim os efeitos das diversas variáveis utilizadas no processo de extração. A partir da correlação dos resultados obtidos, foram identificados através da análise de variância (ANOVA), os fatores críticos, sendo estes, as variáveis mais significativas

no processo de extração. O Gráfico 4.4 aponta que os fatores solvente (D) e proporção solvente (mL)/amostra (g) (E) foram altamente significativos no rendimento do processo de extração de ricinina, devido aos baixos valores de P ($P < 0,05$) encontrados.

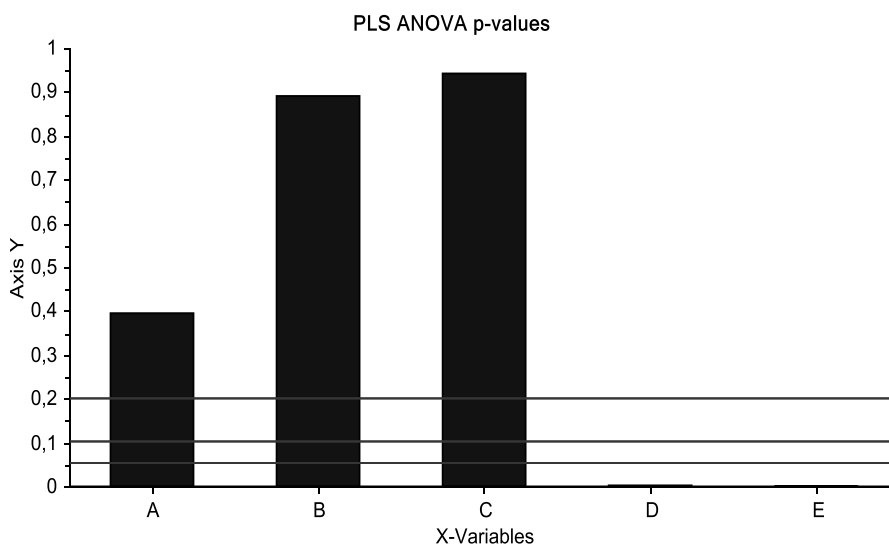


Gráfico 4.4: Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração (ANOVA).

Os demais fatores (temperatura, potência e tempo de extração) não apresentaram efeitos significativos no processo de extração.

A análise de regressão (Gráfico 4.5) foi utilizada para estabelecer o efeito das diversas variáveis no rendimento do processo de extração de ricinina. De acordo com a análise, ambos, solvente (D) e proporção solvente (mL)/amostra (g) (E) apresentam efeitos negativos. Através do gráfico 4.6, pode-se observar que ambos, (D) e (E) apresentaram efeito contrário ao rendimento do processo de extração de ricinina, mostrando que quanto maior for o valor empregado (níveis das variáveis) para os parâmetros D e E, menores serão os rendimentos obtidos no processo de extração. Para os fatores temperatura (A), potência (B) e tempo de extração (C), todos apresentaram efeitos positivos.

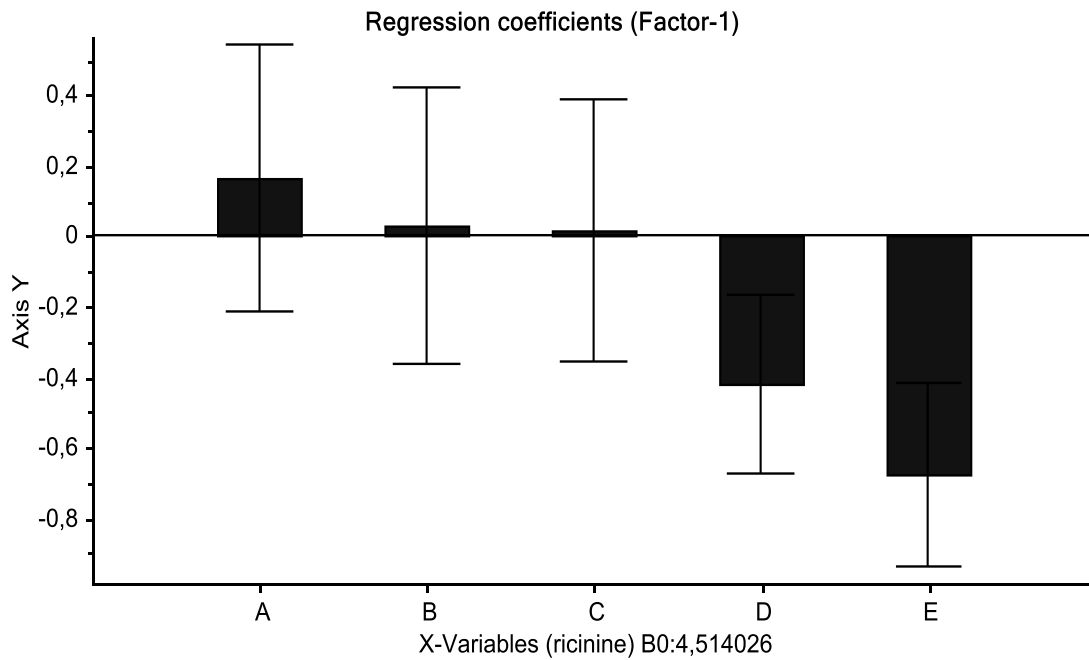


Gráfico 4.5: Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração de ricinina assistida por microondas.

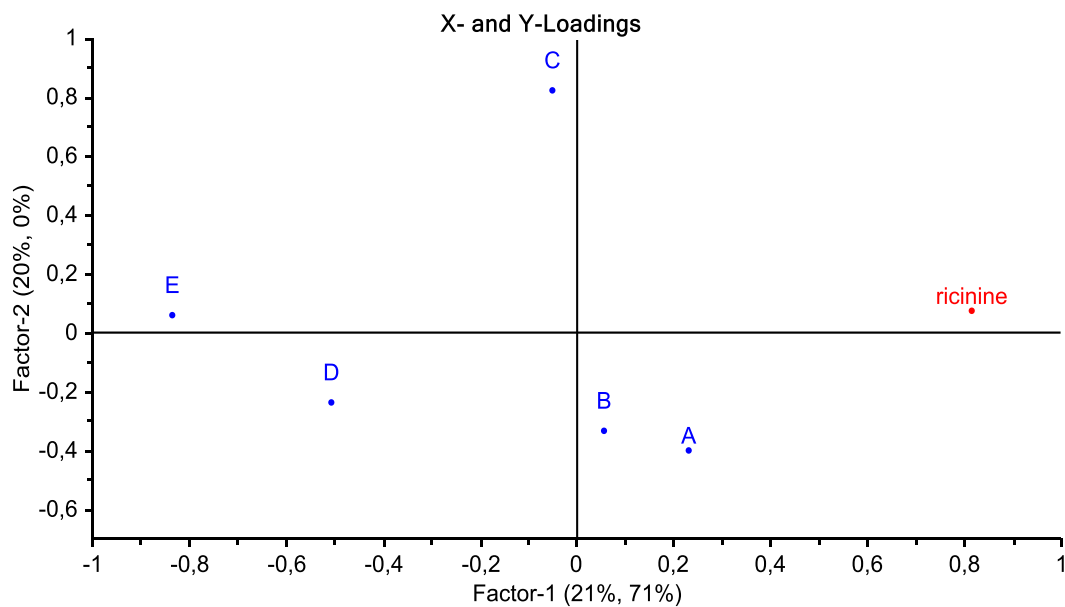


Gráfico 4.6: Efeito das variáveis: temperatura (A), potência (B), tempo de extração (C), solvente (D) e proporção solvente/amostra (E) no processo de extração de ricinina assistida por microondas.

Após a avaliação dos resultados obtidos (Gráfico 4.5 e 4.6, Tabela 4.7) do delineamento experimental, seguiu-se para o processo de otimização do método de extração, avaliando-se os menores níveis de faixa de trabalho para as variáveis D (solvente) e E (proporção solvente/amostra).

Tabela 4.7: Avaliação das variáveis da extração.

Variáveis	Códigos	Níveis das variáveis	Efeito	
Temperatura (°C)	A	X_1	125-175	Não significativo
Potênciar (W)	B	X_2	500-1000	Não significativo
Tempo de Extração (min)	C	X_3	5-15	Não significativo
Solvente (%AcOEt)	D	X_4	10-90	Significativo (-)
Proporção solvente/amostra	E	X_5	25-50	Significativo (-)

4.1.5 Otimização do processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas

Através dos resultados obtidos (Tabela 4.7), as variáveis significativas D e E, foram avaliadas, a fim de maximizar os rendimentos obtidos no processo de extração assistida por microondas. Os parâmetros para o processo de otimização foram selecionados a partir dos resultados obtidos na etapa anterior. As variáveis, temperatura, potência e tempo de extração foram mantidas com valor constante de 175 °C, 1000 W e 15 min.

Tabela 4.8: Otimização das variáveis de extração de ricinina assistida por micro-ondas.

Variáveis / Códigos	Níveis das variáveis	Efeito	Delineamento experimental da Otimização
Temperatura (°C) - A	125-175	Não significativo	175
Potênciar (W) – B	500-1000	Não significativo	1000
Tempo de Extração (min) – C	5-15	Não significativo	15
Solvente (%AcOEt) – D	10-90	Significativo (-)	0-10
Prop. Solvente (mL) /amostra (g) - E	25-50	Significativo (-)	15:1-25:1

4.1.6 Efeito da proporção solvente/amostra no processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas

Como observado, a variável (E) referente à proporção solvente/amostra apresentou efeitos negativos no processo de extração (Tabela 4.8), deste modo, a otimização do parâmetro E seguiu para níveis mais baixos que o utilizado nas medidas anteriores (Tabela 4.8).

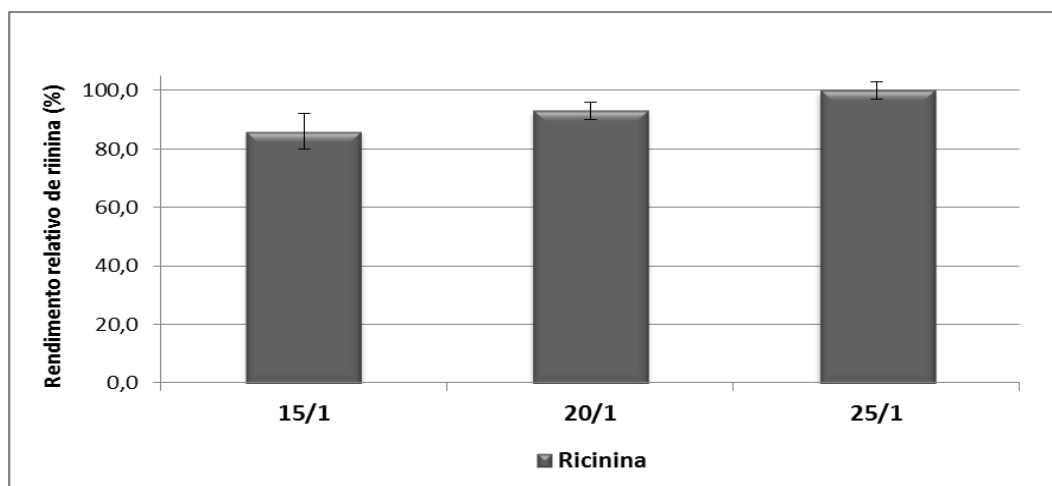


Gráfico 4.7: Efeito da variável proporção solvente (mL) /amostra (1g) no processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas

O efeito da proporção solvente/amostra (E) na extração de ricinina é apresentado no Gráfico 4.7, que claramente demonstra que a diminuição na proporção solvente/amostra diminui os rendimentos da extração de ricinina.

4.1.7 Efeito do solvente no processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas

A partir da variável E já estabelecida, partiu-se para análise do efeito de D, referente à porcentagem de solvente acetato de etila em metanol. A variável D apresentou efeitos negativos (Tabela 4.8) no processo de extração, deste modo, a otimização de D seguiu para níveis mais baixos que o utilizado nas medidas anteriores (Tabela 4.8). Os resultados obtidos são apresentados no gráfico 4.8. O efeito da mistura de solventes (AcOEt/MeOH) na eficiência do processo de extração, demonstrou que as proporções de 5 e 10% de AcOEt em MeOH apresentaram os maiores rendimentos na extração de ricinina por microondas, já para a utilização de 100% de MeOH, um menor rendimento foi obtido no processo de extração.

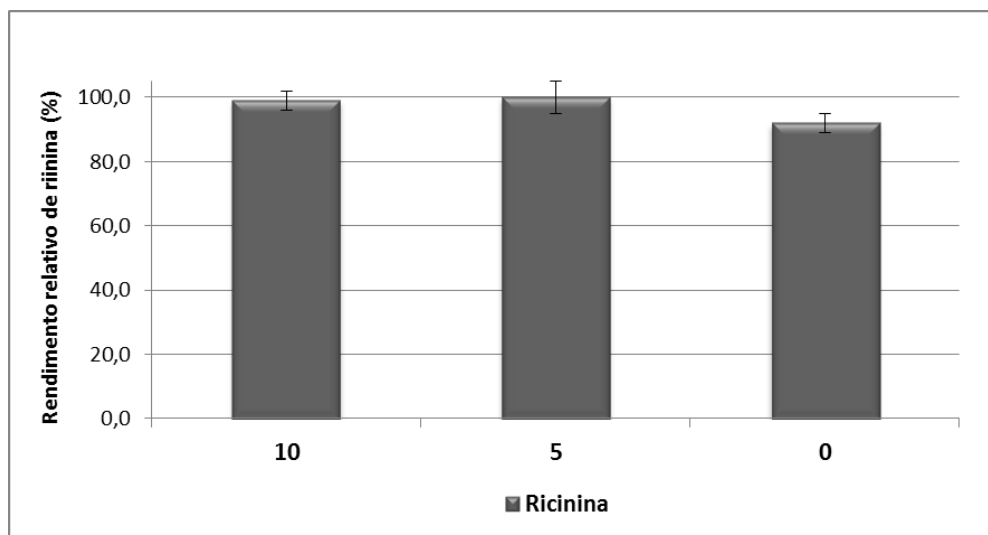


Gráfico 4.8: Efeito da variável solvente (D) (% AcOEt em MeOH) no processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas.

4.1.8 Estudo cinético do processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas.

Um estudo cinético do processo de extração foi realizado, a fim de avaliar a influência do tempo de extração (5-25 min) juntamente com os parâmetros (D) e (E) já otimizados (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Parâmetros utilizados durante o estudo cinético da extração:

Variáveis	Códigos	Níveis das variáveis
Temperatura (°C)	A	175
Potênciar (W)	B	100
Tempo de Extração (min)	C	5-25
Solvente (%AcOEt)	D	10
Proporção solvente/amostra	E	25

Os resultados obtidos do estudo da cinética de extração (Gráfico 4.9) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração avaliados. Considerando que o prolongamento do processo de extração pode levar a degradação dos compostos presentes no extrato, o tempo de extração de 5 minutos foi escolhido para este processo.

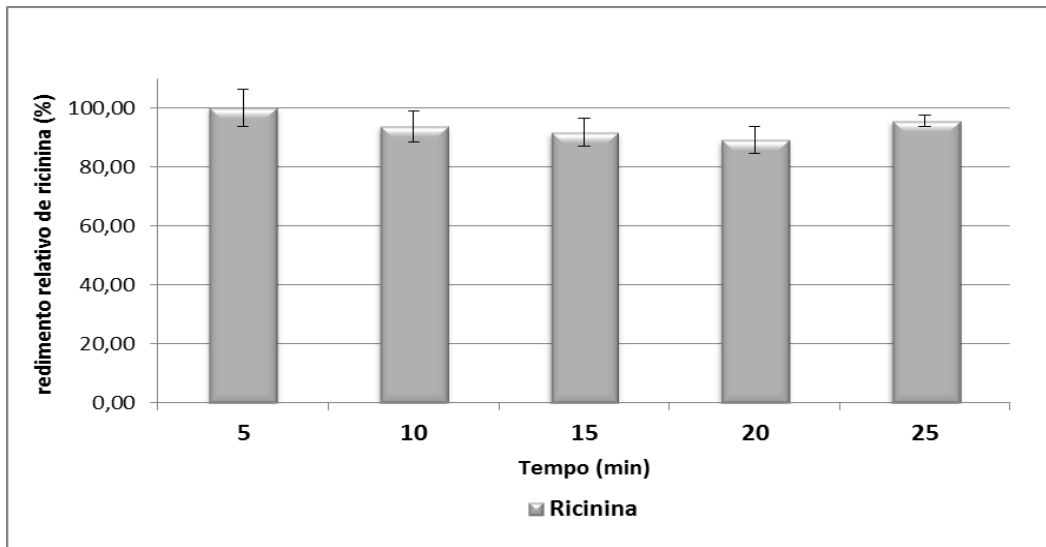


Gráfico 4.9: Estudo cinético do processo de extração de ricinina assistida por microondas

4.1.9 Resultados obtidos através da otimização do processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas.

Através do processo de extração de ricinina assistida por microondas, diversos parâmetros foram avaliados, levando a um estudo capaz de otimizar as diversas variáveis, considerando também a economia, eficiência e viabilidade deste método (Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Variáveis otimizadas através do estudo do processo de extração de ricinina assistida por micro-ondas

Variáveis	Códigos
Temperatura (°C)	A 175
Potênciar (W)	B 1000
Tempo de Extração (min)	C 5
Solvente (%AcOEt)	D 10
Proporção solvente/amostra	E 25

4.1.10 Validação do método de extração de ricinina assistida por microondas

4.1.10.1 Precisão do método

A precisão do método foi considerado em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A precisão é expressa como o coeficiente de variação de uma série de medida. A repetibilidade avalia a precisão do método de extração de ricinina assistida por microondas sobre as mesmas condições experimentais realizadas no mesmo dia. A repetibilidade foi medida através de dez extrações no mesmo dia. O resultado da repetibilidade pode ser visualizado na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Repetibilidade do método de extração

Repetições	Resultados das análises	
	tr.	Área
1	2,377	50112
2	2,383	46196
3	2,373	48806
4	2,379	43190
5	2,375	47197
6	2,369	49049
7	2,378	45335
8	2,375	46154
9	2,382	46421
10	2,378	46930
Média	2,377	47045
Desvio padrão	0,004	1862
Coeficiente de Variação	0,016%	3,95%

A precisão intermediária foi realizada a partir de cinco extrações em três dias distintos (Tabela 4.12). O coeficiente de variação foi determinado através dos dados obtidos das medidas realizadas durante três dias. Os coeficientes de variações para ambos, repetibilidade e precisão intermediária apresentaram valores inferiores aos limites aceitáveis definidos pela AOAC (1993).

Tabela 4.12: Precisão intermediária do método de extração

Dias	Repetições	Resultados das análises	
		tr.	Área
1	1	2,158	46940
	2	2,162	45511
	3	2,192	44385
	4	2,199	44495
	5	2,200	49662
2	1	2,217	40802
	2	2,219	44982
	3	2,220	47024
	4	2,229	43626
	5	2,227	47204
3	1	2,377	50112
	2	2,383	46196
	3	2,373	48806
	4	2,379	43190
	5	2,375	47197
Média		2,260	46009
Desvio padrão		0,085	2446
Coeficiente de Variação		3,76%	5,31%

4.2 Extração de Ricinina de folhas de *Ricinus communis* assistida por Ultra-som.

Para o desenvolvimento do método de extração de ricinina assistida por Ultra-som, diversas etapas foram seguidas, dentre elas:

- ◆ Estudo da estabilidade da ricinina em distintas temperaturas de extração (5 a 65°C) por Ultra-som;
- ◆ Escolha do tipo de solvente para extração assistida por ultra-som;
- ◆ Avaliação de diferentes condições de extração, dentre elas, temperatura, potência do ultra-som, número de ciclos (amplitude), tempo de extração e a proporção solvente/amostra;
- ◆ Otimização do processo de extração.

4.2.1 Estudo da estabilidade de ricinina via Ultra-som

A primeira etapa do trabalho, foi avaliar a influência da temperatura (50 a 200°C) sobre a estabilidade de ricinina por ultra-som. Nesta etapa foram avaliadas as temperaturas de 5 a 65°C utilizando o tempo de extração de 10 min., potência 50%, ciclos de 0,6 seg. Estas análises auxiliaram no desenvolvimento da faixa de trabalho, nos quais foram delimitados através dos resultados obtidos.

Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 4.10, mostrando que as diferentes temperaturas aplicadas no processo de extração por ultra-som não afetaram a estabilidade do composto ricinina. Os resultados da estabilidade da ricinina sobre as diferentes temperaturas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009).

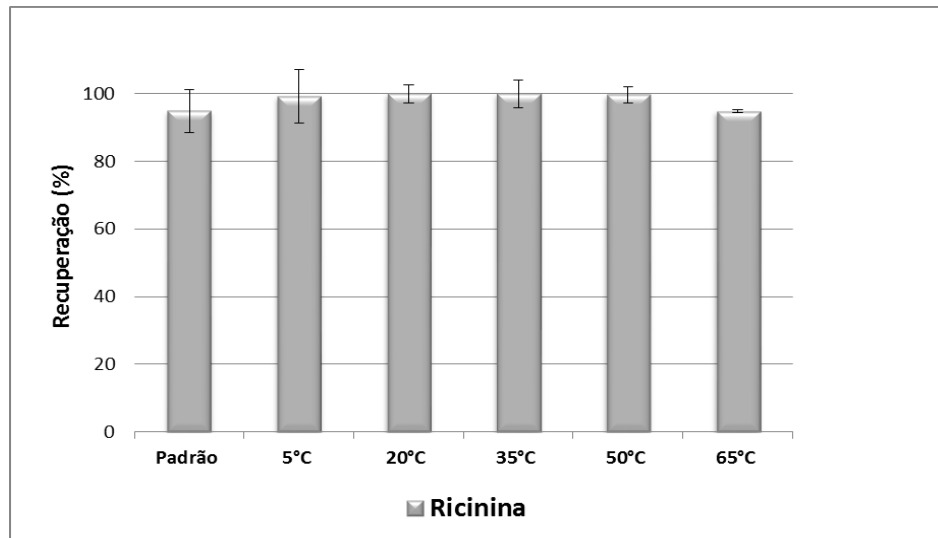


Gráfico 4.10: Efeito de diferentes temperaturas utilizadas no processo de extração por ultra-som na estabilidade do composto ricinina.

4.2.2 Escolha do tipo de solvente para extração de ricinina assistida por ultra-som

Como o objetivo deste processo de extração foi a obtenção de extratos enriquecidos com o composto ativo ricinina em folhas de *R. communis*, nesta etapa, foram analisados diferentes tipos de solventes, afim de avaliar a influência dos mesmos neste processo.

A partir dos resultados obtidos (Gráfico 4.11), verificou-se que solventes com maior polaridade apresentam altos rendimentos de extração do composto ricinina quando comparado aos solventes de média polaridade, entretanto, aumenta-se também a extração de compostos de maior polaridade, sendo estes indesejáveis para este processo. Considerando que a finalidade desta extração foi a obtenção de extratos enriquecidos com o composto ricinina, o solvente AcOEt foi escolhido para este trabalho (Figura 4.1).

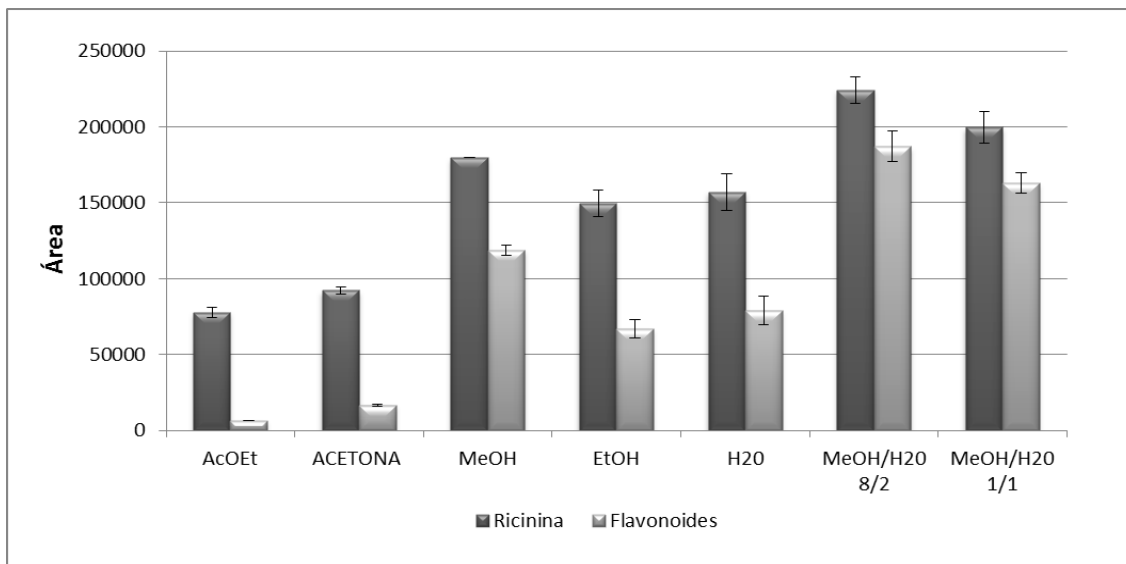


Gráfico 4.11: Efeito de diferentes solventes no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

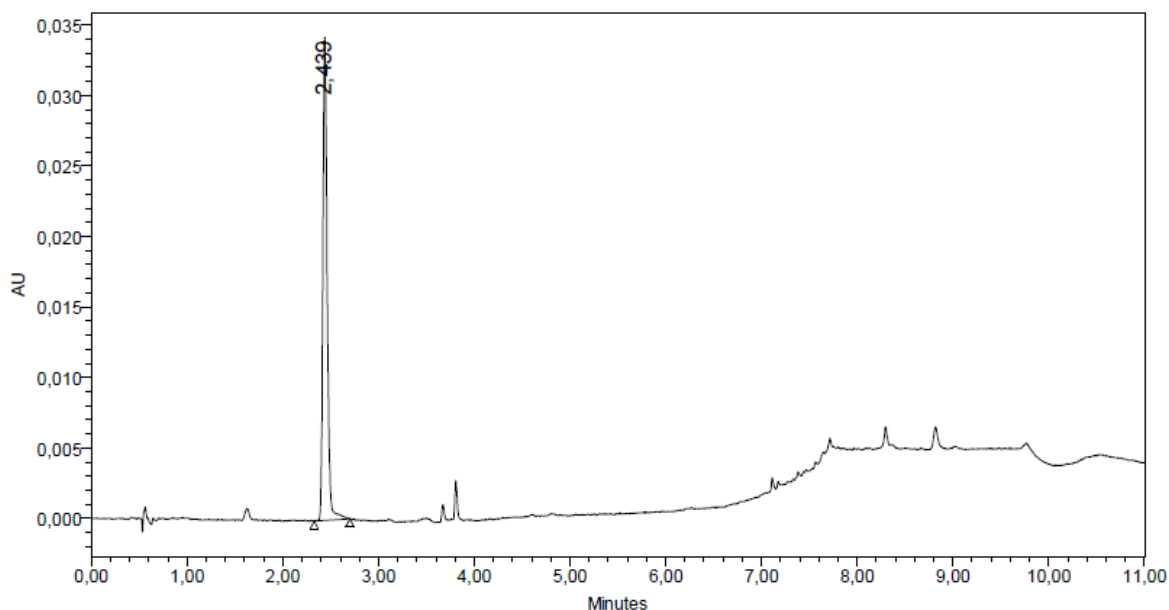


Figura 4.1: Cromatograma da extração de ricinina assistida por ultra-som utilizando acetato de etila como solvente. Equipamento UPLC-DAD Acquity Waters, coluna Acquity BEH C18 (1mm/1,7µm). A temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. Sistema de solvente binário: A (2% Ác. Acético/ 3% ACN em H₂O) e B (2% Ác. Acético/ 85% ACN em H₂O); fluxo de 0,6 mL/min e λ = 310 nm.

4.2.3 Processo de extração de ricinina assistida por ultra-som

A partir dos resultados obtidos (Gráfico 4.10 e 4.11), o desempenho de diferentes condições de extração, dentre elas, temperatura, potência, ciclos, tempo de extração e a relação solvente/amostra foram analisadas (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Parâmetros avaliados durante o processo de extração por ultra-som.

Variáveis				
Temperatura (°C)	Potência	Ciclos	Tempo de extração (min.)	Proporção solvente/amostra
5	30%	0,2	5	1g/25mL
20	50%	0,5	10	2g/25mL
35	100%	1,0	20	5g/25mL
50			25	
65				

4.2.4 Efeito da temperatura de extração

As extrações sólido-líquido são na maioria das vezes afetada pelo aumento da temperatura de extração. Geralmente, quanto maior a temperatura empregada, maior a recuperação do composto, entretanto, o uso de elevadas temperaturas promovem a degradação de diversas amostras. Estes efeitos contrários mostram a importância da avaliação do efeito da temperatura no processo de extração. As extrações foram realizadas utilizando 1g da folhas pulverizadas de *R. communis* em 25 mL de solvente (AcOEt), utilizando o tempo de extração de 10 min., potência 50% e ciclos de 0,6 seg. A quantidade de ricinina isolada no processo de extração em diferentes temperaturas estão apresentadas no gráfico 4.12. Os resultados obtidos através das diferentes temperaturas empregadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para

comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração avaliados. Para evitar a degradação do composto de interesse, a temperatura de 35°C foi utilizada nas posteriores etapas do processo de extração.

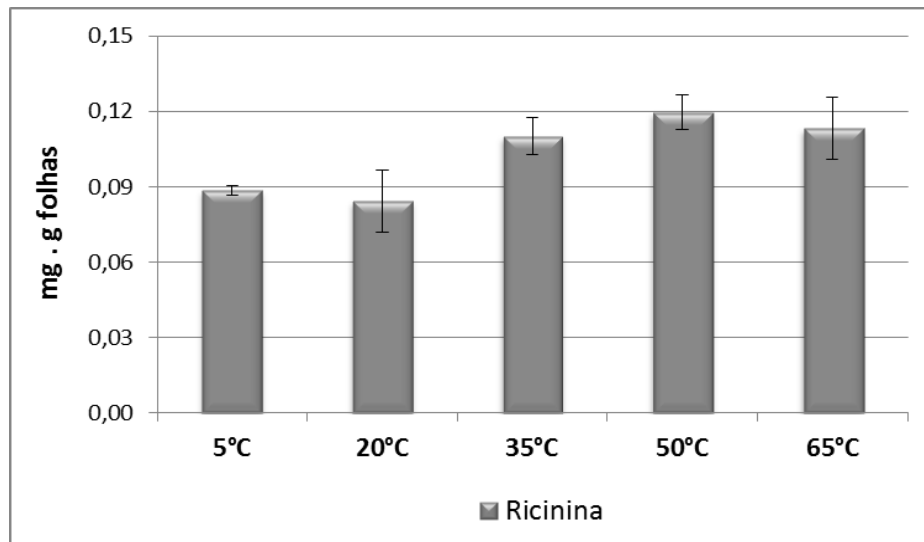


Gráfico 4.12: Efeito de diferentes temperaturas no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

4.2.5 Efeito da amplitude e ciclos do ultra-som no processo de extração

A eficiência da extração neste tipo de processo é atribuída ao uso da energia derivada do ultra-som que proporciona uma maior penetração do solvente no interior da matriz, aumentando assim, a superfície de contato e os rendimentos no processo de extração.

Nesta etapa, as extrações foram realizadas utilizando 1g da folhas pulverizadas de *R. communis*, em 25 mL de de AcOEt, utilizando o tempo de extração de 10 min., temperatura de 35°C, variando os níveis da potência do equipamento e também os ciclos. Pode-se notar para ambos, que quanto maior os níveis empregados para as duas variáveis, maiores foram os rendimentos da

extração (Gráfico 4.13). Os dados estatísticos, para os dois casos, não apresentaram nenhuma diferença significativa entre as respostas obtidas.

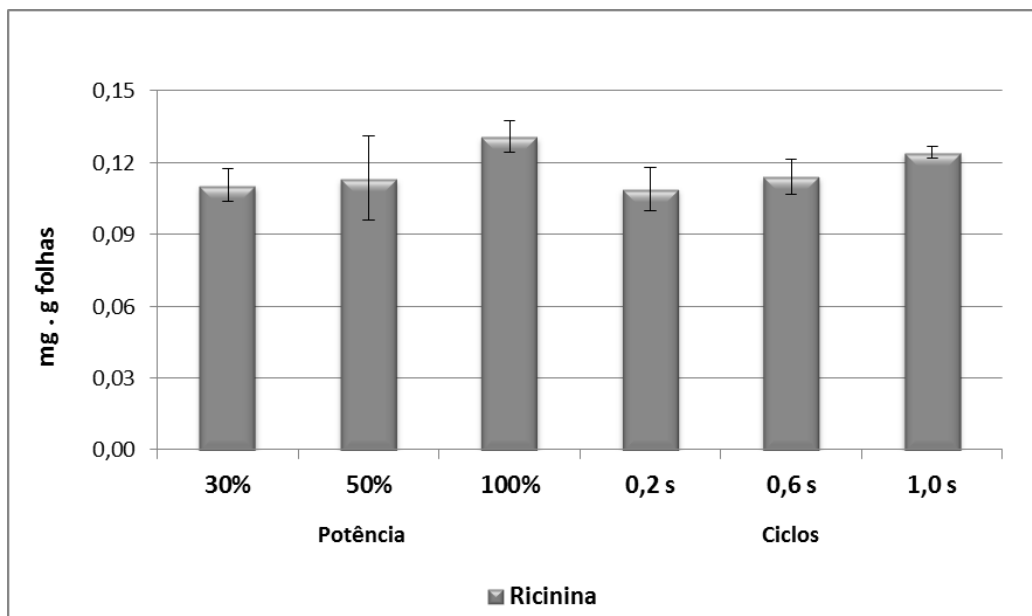


Gráfico 4.13: Efeito da amplitude e ciclo de trabalho no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

4.2.6 Efeito tempo de extração

A partir das variáveis, temperatura, amplitude e ciclo otimizadas no processo de extração, um estudo cinético foi realizado, a fim de avaliar a influência do tempo de extração (5-25 min) no método.

Os resultados obtidos do estudo da cinética de extração (Gráfico 4.14) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias, considerando nível de 5% de significância (Zar, 2009), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração avaliados. Considerando que o prolongamento do processo de extração pode levar a degradação dos compostos presentes no extrato, o tempo de extração de 5 minutos foi escolhido para este processo.

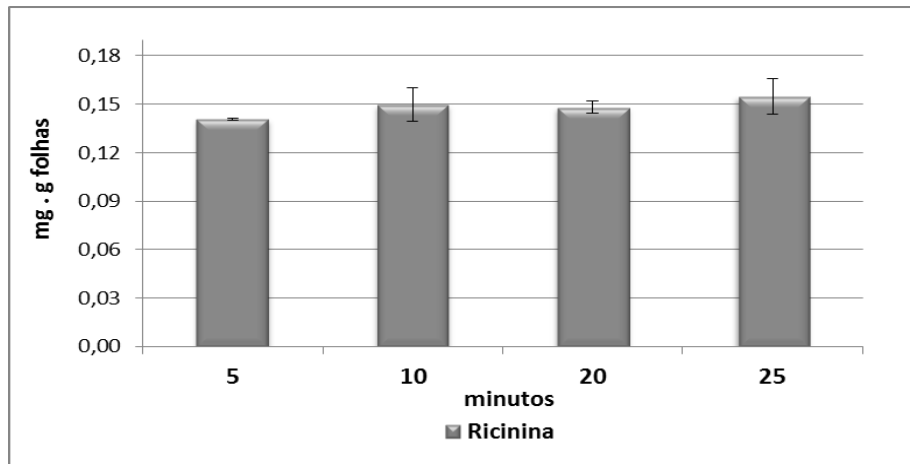


Gráfico 4.14: Efeito de diferentes tempos no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

4.2.7 Efeito da relação amostra/solvente no processo de extração de ricinina assistida por microondas.

O efeito da proporção amostra/solvente na extração de ricinina é mostrado no Gráfico 4.15, que claramente demonstra que a diminuição na proporção amostra/solvente diminui os rendimentos da extração de ricinina, entretanto, comparando-se os resultados que poderiam ser obtidos na relação de extração de ricinina para cada 1g de folhas, observamos um decaimento na eficiência no processo de extração (Gráfico 4.16).

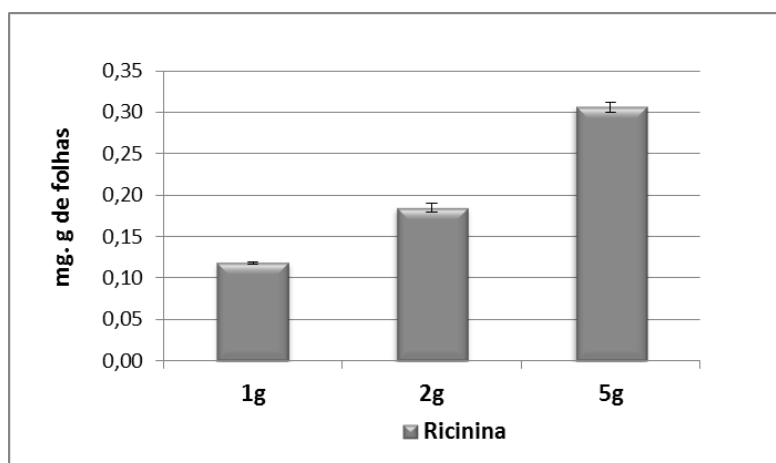


Gráfico 4.15: Efeito de diferentes proporções amostra/solvente (25,0 mL) no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

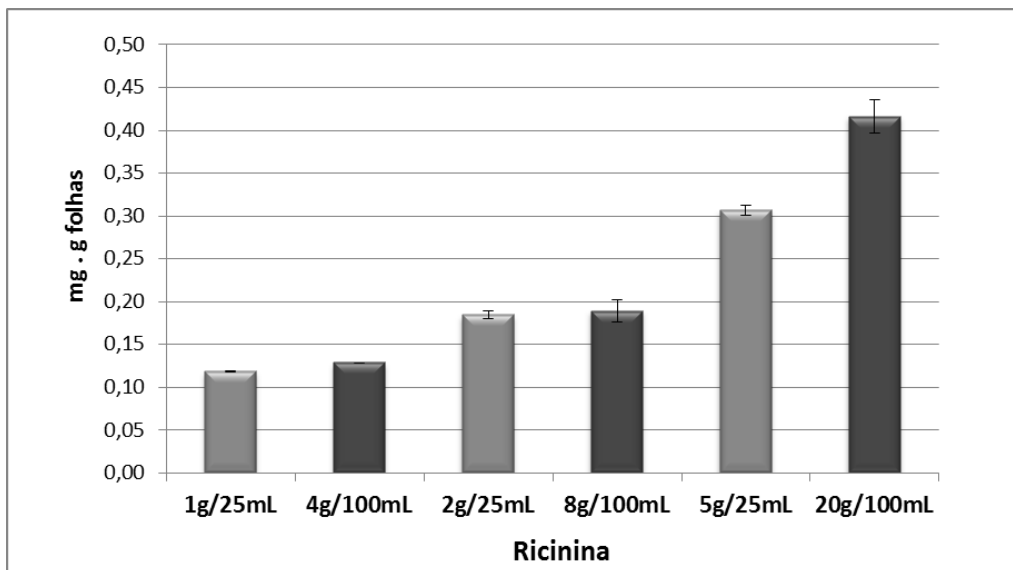


Gráfico 4.16: Efeito de diferentes proporções amostra/solvente no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

4.2.8 Resultados obtidos através da otimização do processo de extração de ricinina assistida por ultra-som

A Tabela 4.14 apresenta as variáveis otimizadas durante o processo de extração de ricinina assistida por ultra-som.

Tabela 4.14: Variáveis otimizadas através do estudo do processo de extração de ricinina assistida por ultra-som

Variáveis	
Temperatura (°C)	175
Potênciar (W)	1000
Tempo de Extração (min)	5
Solvente (%AcOEt)	10
Proporção amostra/solvente	1:25

4.3 Ensaios Biológicos

4.3.1 Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com os extratos de folhas de *R. communis* e o alcaloide ricinina.

Os extratos (Tabelas 4.15) obtidos através de diferentes processos de extração de folhas de *R. communis* e o alcaloide ricinina foram submetidos a ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* de acordo com a metodologia descrita no item 3.11.1 (Parte I). Os resultados foram avaliados através das curvas de sobrevivência de cada tratamento em relação ao controle, sobre um período de 25 dias, utilizando a análise estatística através do teste de “log-rank”.

Analisando os resultados obtidos (Tabela 4.16 e 4.17), observou-se que o extrato RICENR (extrato das folhas de *R. communis* obtido através da extração assistida por ultra-som) foi mais ativo em todas as concentrações, quando comparado ao extrato MAM, apresentando para as concentrações de 0,4, 1,0 e 2,0 mg/mL, sobrevivências medianas (S_{50}) no 7º, 5º e 4º dia, respectivamente, e mortalidades de 90 a 100% no final do experimento.

Tabela 4.15: Extratos de folhas de *R. communis*

Extratos das folhas de <i>R. communis</i>	Processo de extração	Solvente Extrator
MAM	Métodos clássicos*	EtOH
RICENR	Assistida por ultra-som	AcOET

*Percolação

Nesse ensaio (Tabela 4.16) foi possível observar, um aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante no decorrer do tempo de

experimento, com taxas de mortalidade significativas, indicando o potencial tóxico do extrato RICENR sobre as formigas cortadeiras.

Comparando os resultados obtidos para ambos os extratos (MAM e RICENR), foi possível observar efeitos semelhantes para os mesmos, porém em menores concentrações para o extrato RICENR, quando comparado ao extrato MAM.

A substância pura ricinina (0,1 mg/mL) também foi submetida aos ensaios sobre as formigas cortadeiras. O composto apresentou sobrevivência mediana (S_{50}) no 7º dia e mortalidade de 92,0 % no final do experimento (Tabela 4.18). Para o tratamento com o extrato RICENR e a substância pura ricinina, nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL, respectivamente, resultados semelhantes foram observados, mostrando assim, a eficiência do processo de extração para obtenção de um extrato enriquecido de um composto ativo, visto que para o extrato MAM, o mesmo perfil de atividade foi alcançado, porém, em uma concentração 20 vezes maior (2,0 mg/mL) quando comparado a substância pura.

Tabela 4.16: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com Ricenr nas concentrações: 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; 0,4mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL..

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	4	10	12	32	42	60	74	19α
Ricenr 1 (2,0 mg/mL)	0	6	40	86	86	94	98	100	100	100	4,0b
Ricenr 2 (1,0 mg/mL)	0	16	28	80	88	88	92	100	100	100	5,0b
Ricenr 3 (0,4 mg/mL)	0	6	6	46	60	74	80	82	84	90	7,0b
Ricenr 4 (0,2 mg/mL)	0	0	0	6	10	36	46	62	76	82	15α
Ricenr 5 (0,1 mg/mL)	0	0	2	6	16	24	36	56	60	66	16α

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

Tabela 4.17: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com MAM nas concentrações: 0,2mg/mL; 0,4mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	4	10	12	32	42	60	74	19 a
MAM 1 (2,0 mg/mL)	0	4	16	44	66	74	76	80	86	88	7,0 b
MAM 2 (1,0 mg/mL)	0	2	4	8	18	28	46	56	64	72	15 b
MAM 3 (0,4 mg/mL)	0	6	10	16	26	32	56	70	78	84	14 b
MAM 4 (0,2 mg/mL)	0	0	0	0	10	18	34	44	46	56	22 a

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

Tabela 4.18: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial do composto ricinina na concentração de 0,1mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	3	6	8	12	22	26	34	42	>25 a
Ricinina (0,1 mg/mL)	0	10	34	60	64	70	80	86	90	92	7,0 b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

5. Conclusões

A partir deste trabalho, dois novos processos de extração de ricinina de folhas de *R. communis* foram desenvolvidos.

A extração de ricinina assistida por microondas, mostrou-se como um método eficiente para extração e quantificação do alcaloide ricinina em folhas de *R. communis*, proporcionando um tempo de extração reduzido, menor consumo de solvente e uma melhor qualidade dos extratos obtidos.

Através do método desenvolvido no processo de extração de ricinina assistida por ultra-som foi possível obter extratos enriquecidos com o composto ativo ricinina em um tempo de extração reduzido (5 min.), empregando como solvente extrator AcOEt.

Os extratos obtidos através de diferentes processos de extração de folhas de *R. communis* e o alcaloide ricinina foram submetidos a ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, indicando o maior potencial tóxico do extrato RICENR (extração assistida por ultra-som) sobre as formigas cortadeiras, quando comparado ao extrato MAM obtido através do método clássico de extração. Para o tratamento com o extrato RICIENR e a substância pura ricinina, nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL, respectivamente, resultados semelhantes foram observados, mostrando assim, a eficiência do processo de extração para obtenção de um extrato enriquecido de um composto ativo, visto que para o extrato MAM, o mesmo resultado foi alcançado, porém em uma concentração 20 vezes maior (2,0 mg/mL) quando comparado a substância pura.

6 Referências Bibliográficas

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Manag. Sci.*, **60**:933–938, 2004.

CAZAL, C. M.; BATALHÃO, J. R.; DOMINGUES, V. C.; BUENO, O. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. *J.Chromatogr. A*, **1216**: 4290-4294, 2009.

CHAN, C.; YUSOFF, R.; NGOH, G.; KUNG, F. W.; Microwave assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A*. **1218**: 6213-6225, 2011.

FERRAZ, A. C.; ELIZABETH, M.; ANGELUCCI, M.; DA COSTA, M. L.; BATISTA, I. R.; OLIVEIRA, B. H.; CUNHA, C. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63** (3): 367-375, 1999.

GALO, M.; FERRACANE, R.; GRAZIANI, G.; RITTIENI, A.; FOGLIANO, V. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four diferente spices. *Molecules* **15**: 6365-6374, 2010.

LI, M.; SUN, S.; XU, F.; SUN, R. Microwave assisted organic acid extraction of lignina from bamboo: structure and antioxidante activity investigation. *Food Chemsitry* **134**: 1392-1398, 2012.

LIAZID, A, PALMA, M., BRIGUI, J., BARROSO, C.G. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.*, **1140**: 29-34, 2007.

RAMOS-LÓPEZ, M. A.; PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C.; GUEVARA-FEFER, P.; ZAVAIA-SÁNCHEZ, M. A. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepdopetera: Noctuidae). *Afr. J. Biotechnol.* **9**: 1359-1365, 2010.

RODRIGUES, R. F. O.; OLIVEIRA, F.; FONSECA, A. M. As folhas de palma christi-*Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. *Bragança Paulista*, **20**: 183-194, 2002.

ROSTAGNO, M.A., PALMA, BARROSO, C.G. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Anal. Chim. Acta.*, **588**: 274 - 282. 2007.

TRIPATHI, A. C.; GUPTA, R.; SARAF, S. K. Phitochemical investigation characterization and anticonvulsant activity of *Ricinus communis* seeds in mice. *Nat Prod. Res.* **25** (19): 1881-1884, 2011.

UPSANI, S. M.; KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; MAHESHWARI, V. L. Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids. *Pest Mang. Sci.* **59**: 1349-1354, 2003.

XIA, E.; CUI, B.; XU, X.; SONG, Y.; AI, X.; LI, H. Microwave assisted extraction of oxymatrine from *Sophora flavescens*. *Molecules* **16**: 7391-7400, 2011.

XIAO, X.; WANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LI, G. Evaluation of vacuum microwave-assisted extraction technique for extraction of antioxidants from plant samples. *J. Chromatogr. A* **1216**: 8867-8873, 2009.

ZHANG, H.; YANG, X.; WANG, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends Food Sci. Tech.* **22**: 672-688, 2011.

PARTE III: FITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS PERTENCENTES ÀS FAMÍLIAS MELIACEAE E RUTACEAE

ESTE CAPÍTULO ABRANGE OS TÓPICOS:

- ✓ INTRODUÇÃO
- ✓ OBJETIVOS
- ✓ PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS
- ✓ RESULTADOS E DISCUSSÕES
- ✓ CONCLUSÕES
- ✓ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PARTE III: Fitotoxicidade de compostos pertencentes às famílias Meliaceae e Rutaceae

1. Introdução

Fatores bióticos e abióticos, como o estresse, forçam a evolução dos organismos. Desta forma, as plantas vêm desenvolvendo vias biossintéticas para uma ampla variedade de metabólitos secundários em resposta as pressões ambientais, desempenhando um papel importante na interação das plantas com outros organismos presentes em seu ecossistema (plantas, fungos, bactérias, insetos, roedores, mamíferos e herbívoros; CALLAWAY, 2002).

Alelopatia é o termo criado por Molisch que demonstra todas essas interações (do grego *allelon* = recíproca, e *phatos* = prejuízos). A definição abrange os efeitos benéficos e prejudiciais causados a organismos em torno de substâncias químicas liberadas pela planta no ambiente. A definição atualmente em uso foi criada pela Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS) como “a ciência que estuda qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos”.

Aleloquímicos (toxinas naturais de plantas que desempenham funções nas interações: planta-planta, planta-inseto e planta-microorganismos) são considerados fontes promissoras de novos instrumentos para o controle de plantas daninhas (MACÍAS *et al.*, 2000).

As famílias Meliaceae e Rutaceae são conhecidas pela sua elevada diversidade de metabólitos secundários, incluindo muitos grupos que representam uma fonte rica de diversidade estrutural. Estas famílias são caracterizadas pela ocorrência frequente de limonóides (DA SILVA *et al.*, 1984; 1987, CHAMPAGNE *et al.*, 1992), uma classe interessante de compostos que possuem estruturas complexas altamente oxigenadas.

Os limonóides possuem uma vasta atividade biológica (TAN et al., 2011, Roy et al., 2006), incluindo atividade inseticida (Champagne et al., 1992, Suresh et al., 2002, Leite et al., 2005, Sarria et al., 2011), anti-câncer (Miller et al., 2004, Cazal et al., 2010, Kikuchi et al., 2011), anti-inflamatória (Xie et al., 2008), anti-fúngica (Govindachari et al., 2000) dentre outras, mostrando assim a importância dos mesmos.

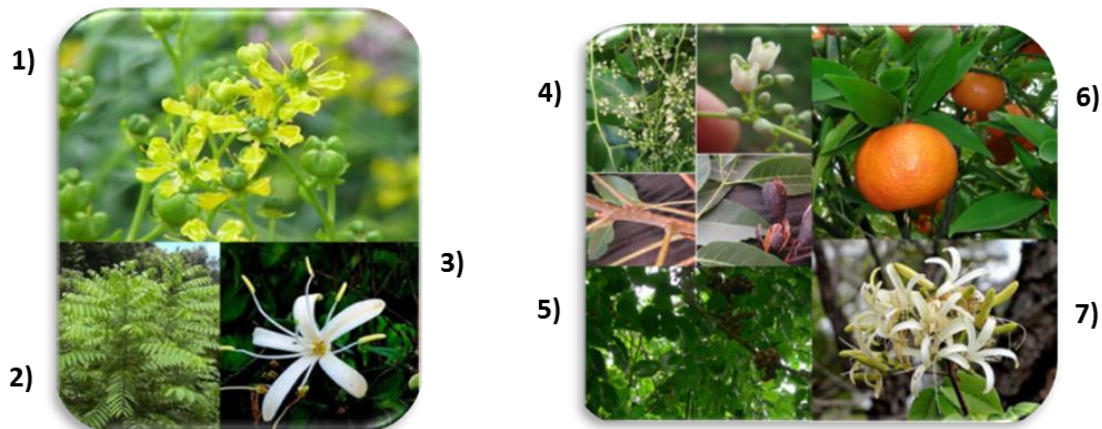


Figura 1.1: Plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae (1) *Ruta graveolens* (Rutaceae); 2) *Cedrela odorata* (Meliaceae); 3) *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae); 4) *Toona ciliata* (Meliaceae); 5) *Cabralea canjerana* (Meliaceae); 6) *Citrus sinensis* (Rutaceae) e 7) idem ao 3.

Os triterpenos em geral, são encontrados em várias espécies de plantas. Estes compostos se destacam em várias atividades biológicas, dentre elas: inseticida (González et al., 2011, Sarria et al., 2011), anti-câncer (Patlolla e Rao, 2012, Cazal, et al., 2010), doenças do sistema imunológico (Rios, 2010), anti-inflamatória (Zhang, et al., 2010, 2012), antimicrobiana dentre outras (Dzubak, et al., 2006). Os alcalóides (Michael 2007, 2005), cumarinas e flavonoides tem sido amplamente explorados em suas bioatividades, nestas incluem-se, atividade inseticida (Bermúdez-Torres et al., 2009, Pavela e Vrchotová, 2013, Li et al., 2009), anti-câncer (Duarte et al., 2010, Zhai et al., 2012, Harada et al., 2010; Pick et al., 2011), anti-inflamatória (Silva et al., 2012, Mbeunkui et al., 2012, Mishra et al., 2009, 2009, García-Lafuente et al., 2009) dentre outras.

O grande aumento no interesse de proteção de culturas contra plantas daninhas, o uso abundante dos defensivos agrícolas os problemas associados com o uso dos mesmos, tem levado à pesquisa de novos produtos naturais biologicamente ativos (DAYAN *et al.*, 2009). Assim, a descoberta de novos aleloquímicos é um método alternativo, em vez de herbicidas convencionais utilizados no controle de ervas daninhas. Os herbicidas utilizados atualmente têm causado alterações em populações de espécies invasoras, ocasionando um aumento da resistência a estes compostos e muitas vezes, levando ao risco de contaminação do meio ambiente (MACÍAS *et al.*, 2007). Deste modo, tornam-se atrativos, a procura por novos produtos de origem vegetal através do estudo da fitotoxicidade dos compostos pertencentes às famílias Meliaceae e Rutaceae.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar os perfis de bioatividade de três alcaloides (**1-3**), doze cumarinas (**4-15**), dois derivados do ácido cinâmico (**16-17**), quatorze flavonoides (**18-31**), quatro triterpenos (**32-35**) e seis limonoides (**36-41**) através do bioensaio em coleótilos de trigo e fitotoxicidade, com a finalidade de identificar novos compostos alelopáticos.

3. Procedimento Experimental

3.1 Compostos estudados

Foram avaliados 41 compostos de origem natural, entre esses, alcaloides, cumarinas, flavonoides, terpenos e limonoides. Todos os compostos foram isolados de plantas da família Meliaceae e Rutaceae coletadas em território brasileiro e gentilmente cedidos pelo laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

3.2 Ensaio biológicos

3.2.1 Bioensaio em coleóptilos de trigo

Sementes de trigo foram germinadas em placas de Petri (15 cm) em água destilada a 24° C, no escuro por 72 h. Em câmara escura sob luz verde, os coleóptilos das plântulas estioladas de trigo foram cortados, medindo 4 mm. Os compostos foram solubilizados em DMSO (0,1 %) e solução tampão ácido cítrico/hidrogenofostato pH 5,6 contendo 2% de sacarose. Nos tubos de ensaio, foram adicionados 2,0 mL de cada tratamento e cinco coleóptilos (n = 3 para cada diluição). Os tubos foram lacrados com filme plástico e colocados em centrífuga de rotação (0,25 rpm), na posição horizontal. O conjunto foi coberto a fim de evitar contato com a luz e mantido em estufa escura a 22°C. Após 24h, os coleóptilos foram medidos pela digitalização de suas imagens. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Welch (Martín Andrés e Luna del Castillo, 1990). Os dados são apresentados pelas diferenças percentuais do controle. Assim, zero representa o controle, os valores positivos representam estimulação do parâmetro estudado e valores negativos representam inibição do crescimento. Um controle positivo para inibição do crescimento foi realizado com o herbicida logran nas mesmas concentrações. O controle foi realizado com a solução tampão e DMSO (0,1%).

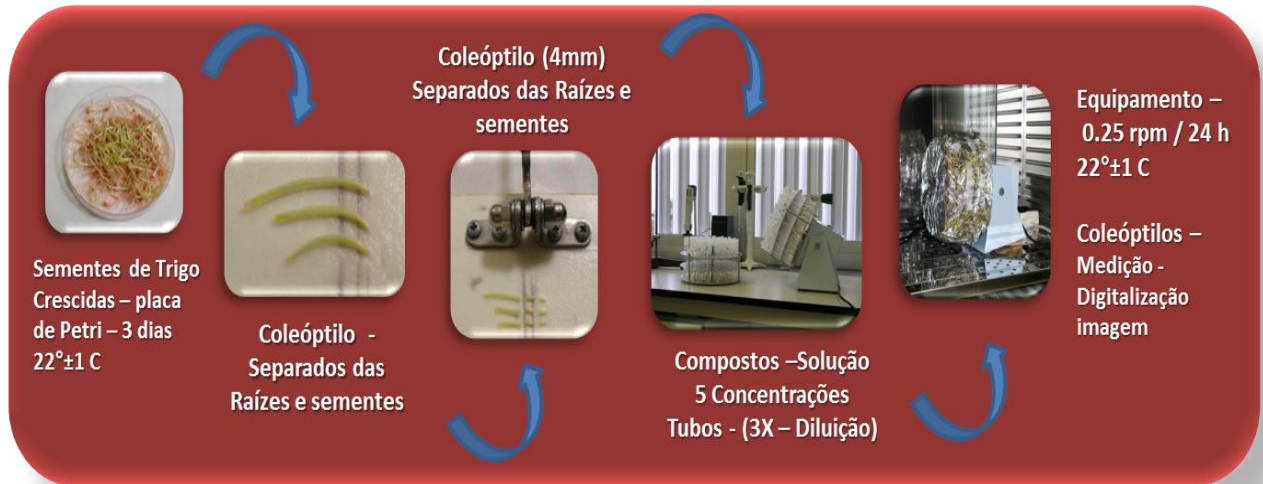


Figura 3.1: Metodologia adotada nos bioensaios sobre coleótilos de trigo.

3.2.2 Bioensaio de Fitotoxicidade

A seleção de espécies-alvo foi baseada em um processo de otimização desenvolvido pelo Grupo de Alelopatia de Cádiz de bioensaios de fitotoxicidade padrão (MACÍAS, *et al.*, 2000).



Figura 3.2: Sementes utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade; dicotiledoneas: agrião (*Lepidium sativum* L.), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L.).

Para o bioensaio de fitotoxicidade, foram utilizadas quatro espécies modelo, sendo estas, as dicotiledôneas agrião (*Lepidium sativum* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Além destas, foi incluída a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L.) a qual é representante de famílias de plantas invasoras de culturas de interesse agrícola. Este bioensaio foi realizado com quatro repetições, em placas de Petri (4 cm de diametro) sobre papel Whatman no 1 como substrato onde foram adicionadas 20 sementes por placa. A germinação e o crescimento ocorreram em solução aquosa, tamponada mediante o uso de solução de 10^{-2} M do ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) e 1M de NaOH com pH=5,6. Os compostos a serem ensaiados foram dissolvidos em DMSO (0,1, 0,02, 0,01 e 0,002 M) e estas soluções foram diluídas com tampão (5 μ L DMSO / mL solução tampão), nas concentrações de interesse do ensaio (10^{-3} , $3 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-5}$ e 10^{-5} M). O volume de solução para cada placa de Petri foi de 1 mL. Após a adição das sementes e solução, as placas foram seladas com Parafilm e incubadas em câmara de crescimento Memmert IC 700 com ausência de luz, sob 25 °C. As placas foram mantidas nessas condições durante quatro, cinco, seis e sete dias, respectivamente, para as sementes de agrião, tomate, alface e cebola. Decorridos os períodos de crescimento acima mencionados, as placas foram armazenadas a -10 °C durante 24 horas para cessar o crescimento das plântulas. O congelamento favoreceu a manipulação das plântulas, evitando torções tanto nas radículas como na parte aérea, além disso, permitiu que as medições pudessem ser realizadas em dias distintos. Uma vez descongeladas e esticadas, utilizou-se o programa FITOMED[®] para realizar as medições dos parâmetros taxa de germinação, de longitude da raiz e da parte aérea. Neste bioensaio utilizou-se como controle positivo, o herbicida comercial com atividade conhecida LOGRAN[®]. Os valores obtidos para cada um dos parâmetros considerados (porcentagem de germinação e comprimento da raiz e parte aérea) foram comparados com o controle negativo que continha somente à solução tampão com DMSO.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste de Welch, com nível de significância fixado em 0,01 e 0,05. Os resultados são apresentados como diferenças percentuais em relação ao controle. Zero representa

o controle, os valores positivos representam estimulação e valores negativos representam inibição.

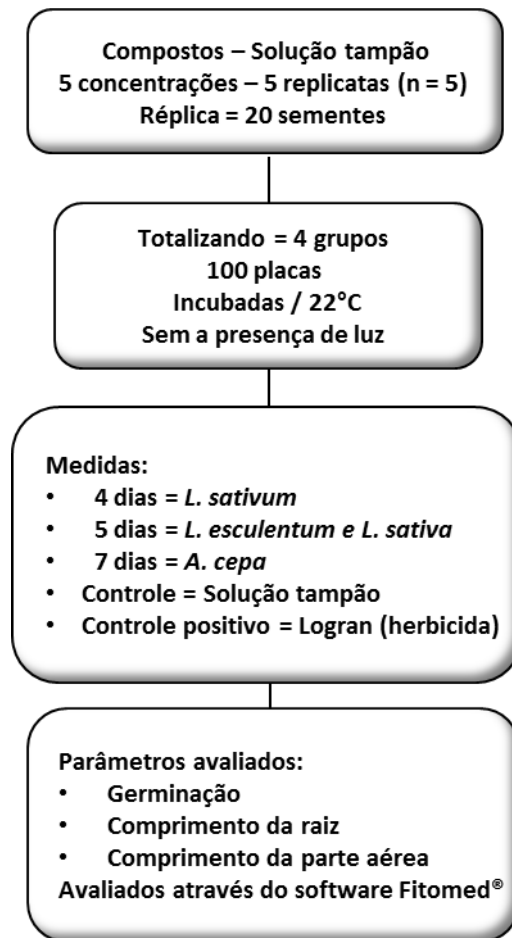


Figura 3.3: Metodologia adotada nos bioensaios de fitotoxicidade utilizando as espécies dicotiledoneas: agrião (*Lepidium sativum* L.), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) e a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L.).

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados da bioatividade em ensaios em coleóptilos de trigo

Este tipo de bioensaio é habitualmente utilizado para detectar atividades alelopáticas em geral de compostos e sua aptidão para tais aplicações foi totalmente confirmada (CUTLER, 1984, MACÍAS, *et al.*, 2005). Os ensaios são realizados em segmentos de 4 mm de meristemas apicais de trigo (coleóptilo) seccionadas abaixo da primeira secção de 2 mm que garante que eles são formados por tecidos indiferenciados, e permite que a atividade sobre o alongamento celular a ser avaliado seja de forma simples, rápida e de forma reprodutível. Uma vez que o bioensaio foi concluído, os coleóptilos de cada tubo foram avaliados em relação ao aumento do comprimento do coleóptilo, onde o nível de atividade é indicado pelo percentual de aumento no comprimento produzido pelo composto avaliado em comparação com o controle (tampão aquoso solução). Valores maiores que zero indicam um efeito estimulador e valores inferiores à zero, um efeito inibidor. Esse bioensaio foi utilizado porque permite uma determinação da bioatividade geral com uma baixa quantidade de amostra em um tempo muito curto e, também, com baixos custos.

No total, três alcaloides (**1-3**), doze cumarinas (**4-15**), dois derivados do ácido cinâmico (**16-17**), quatorze flavonoides (**18-31**), quatro triterpenos (**32-35**) e seis limonoides (**36-41**) (Figuras 4.1 a 4.4) isolados das famílias Meliaceae e Rutaceae foram primeiramente testados no ensaio de coleóptilos de trigo para avaliação de suas bioatividades.

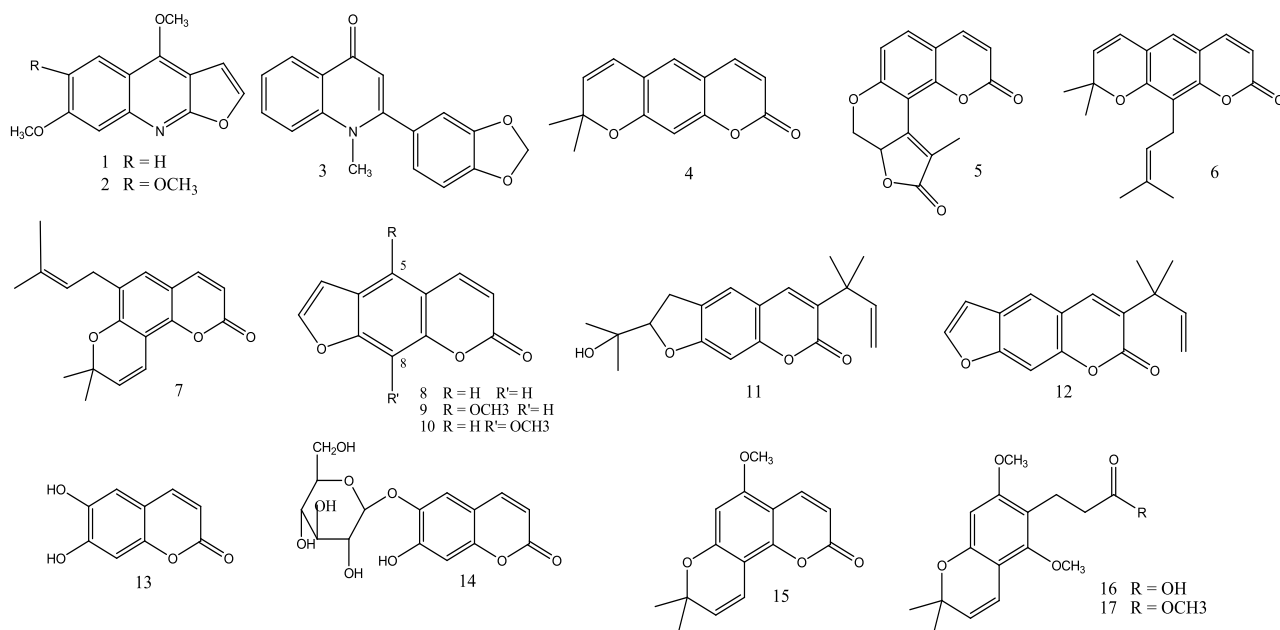


Figura 4.1: Estrutura química dos alcaloides (1-3), cumarinas (4-15) e derivados do ácido cinâmico. (16-17).

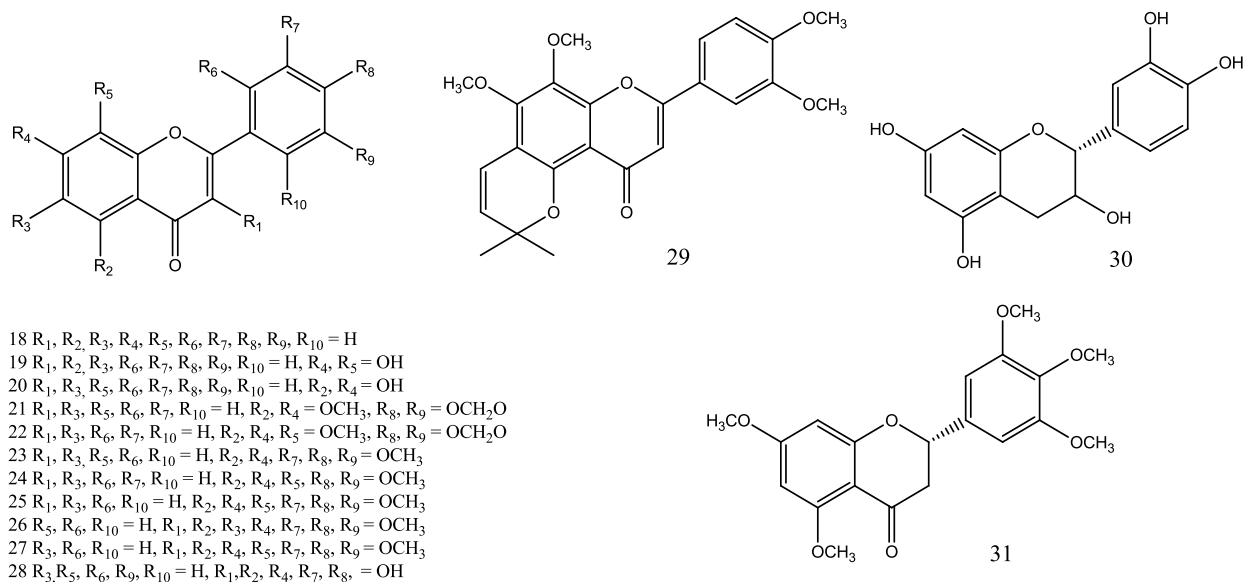


Figura 4.2: Estrutura química dos flavonoides (18-31).

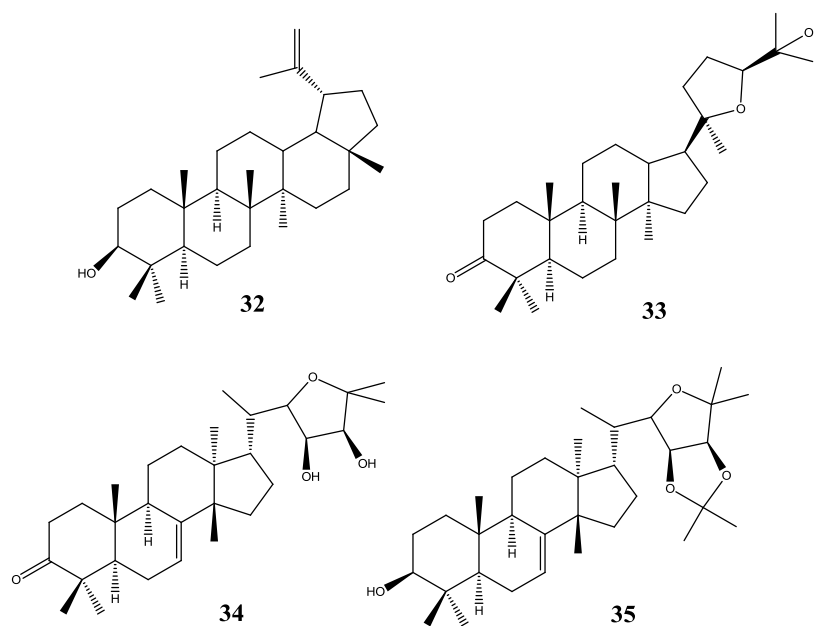


Figura 4.3: Estrutura química dos triterpenos (32-35).

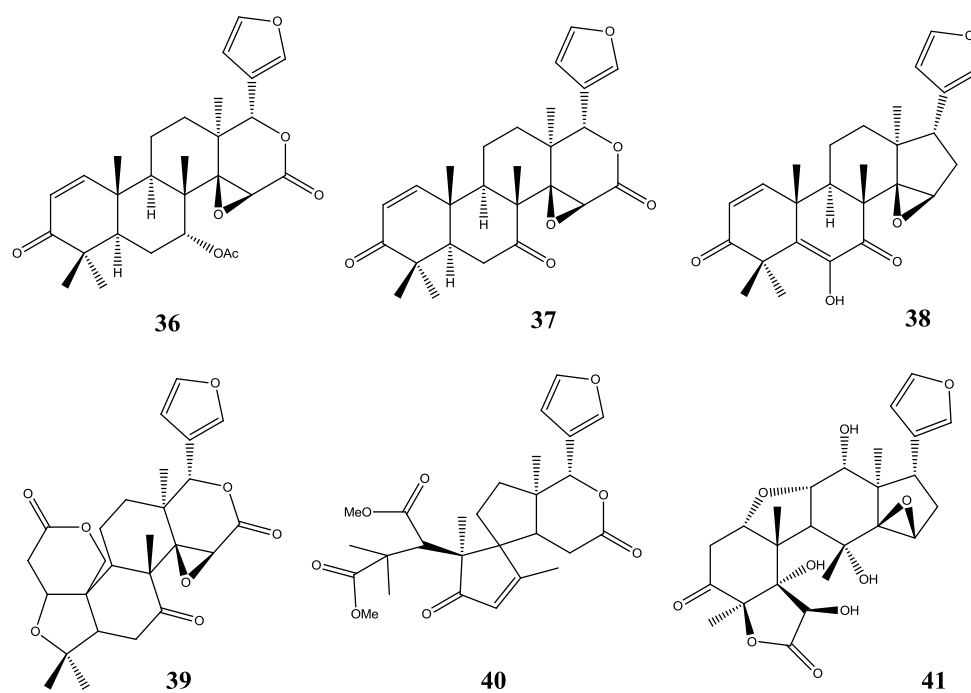


Figura 4.4: Estrutura química dos limonoides (36-41).

Os resultados obtidos através do ensaio biológico são mostrados nos gráficos 4.1 a 4.3, os valores negativos significam inibição, os valores positivos ativação e zero representa o controle.

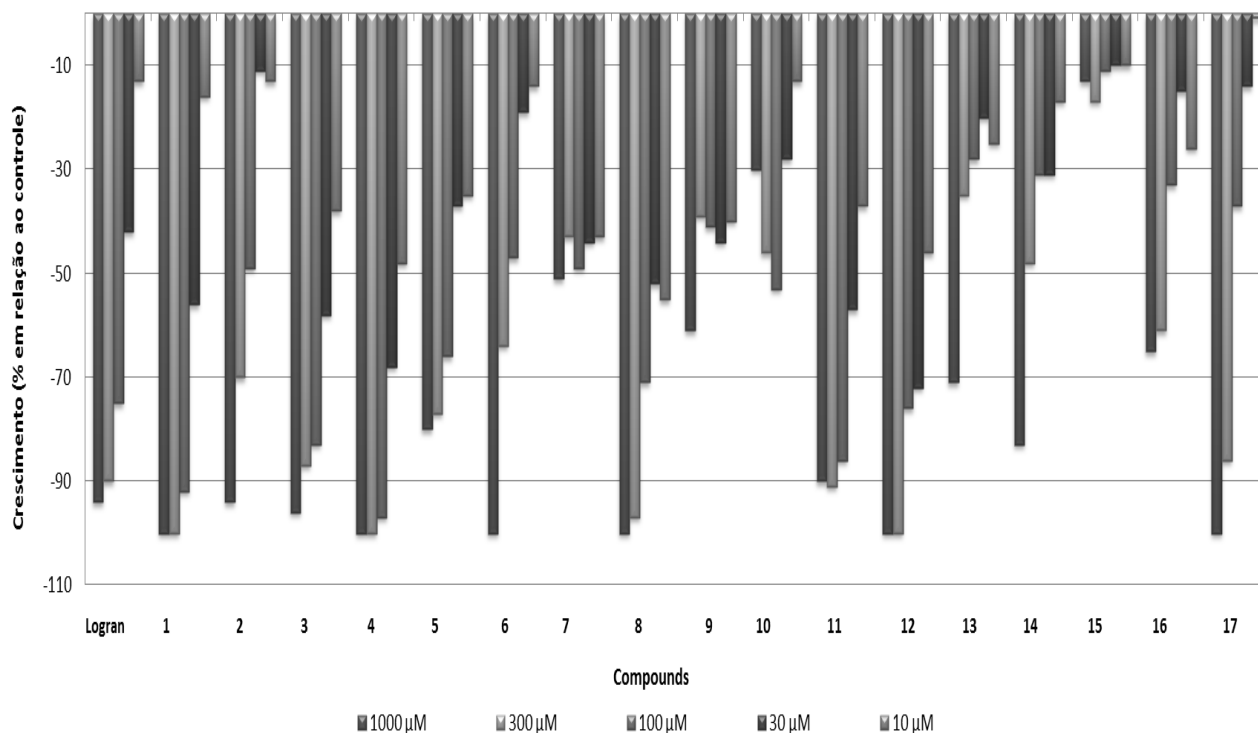


Gráfico 4.1: Bioatividade dos compostos (1-17) sobre coleótilos de trigo.

No grupo dos alcaloides (Gráfico 4.1) evolutrina (1) e graveolina (3) apresentaram níveis de atividade maiores que -85% nas concentrações de 10^{-3} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M and 10^{-4} M (Gráfico 4.1). O composto kokusaginina (2) mostrou atividade relevante nas concentrações 10^{-3} M and $3 \cdot 10^{-4}$ M (-94% and -70%), entretanto, nas menores concentrações não foi observada atividade significativa. No grupo das pirano-cumarinas (4-7), a xantiletina (4) foi a mais ativa, inibindo completamente o crescimento dos coleótilos nas concentrações de 10^{-3} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M and 10^{-4} M e a bioatividade foi mantida após as diluições (-68%, $3 \cdot 10^{-5}$ M; -48%, 10^{-5} M).

Para os compostos 4 e 6 que possuem esqueletos similares, onde a única diferença observada em suas estruturas é a presença do grupo prenila em 4, nota-se uma maior atividade para o composto 4 quando comparada as respostas obtidas para concentrações menores que $3 \cdot 10^{-4}$ M em relação ao composto 6.

As furanocumarinas, psoraleno (**8**), chalepina (**11**) e chalepentina (**12**) apresentaram bons níveis de atividade. O mais ativo foi o composto **12**, inibindo completamente o crescimento dos coleótipos nas concentrações de 10^{-3} M e $3 \cdot 10^{-4}$ M e mantendo a bioatividade em menores concentrações (-76%, 10^{-4} M; -72%, $3 \cdot 10^{-5}$ M and -46%, 10^{-5} M). Comparando a estrutura dos compostos psoraleno (**8**), bergapteno (**9**) e xantoxina (**10**), é notado que o grupo metoxila adicional em **9** e **10** parecem reduzir os níveis de bioatividade quando comparado ao composto **8**.

As cumarinas (**13-14**) e o derivado do ácido cinâmico (**17**) apresentaram efeitos inibitórios entre -70% a -100% nas maiores concentrações, entretanto, exibiram um rápido decréscimo na atividade em menores concentrações.

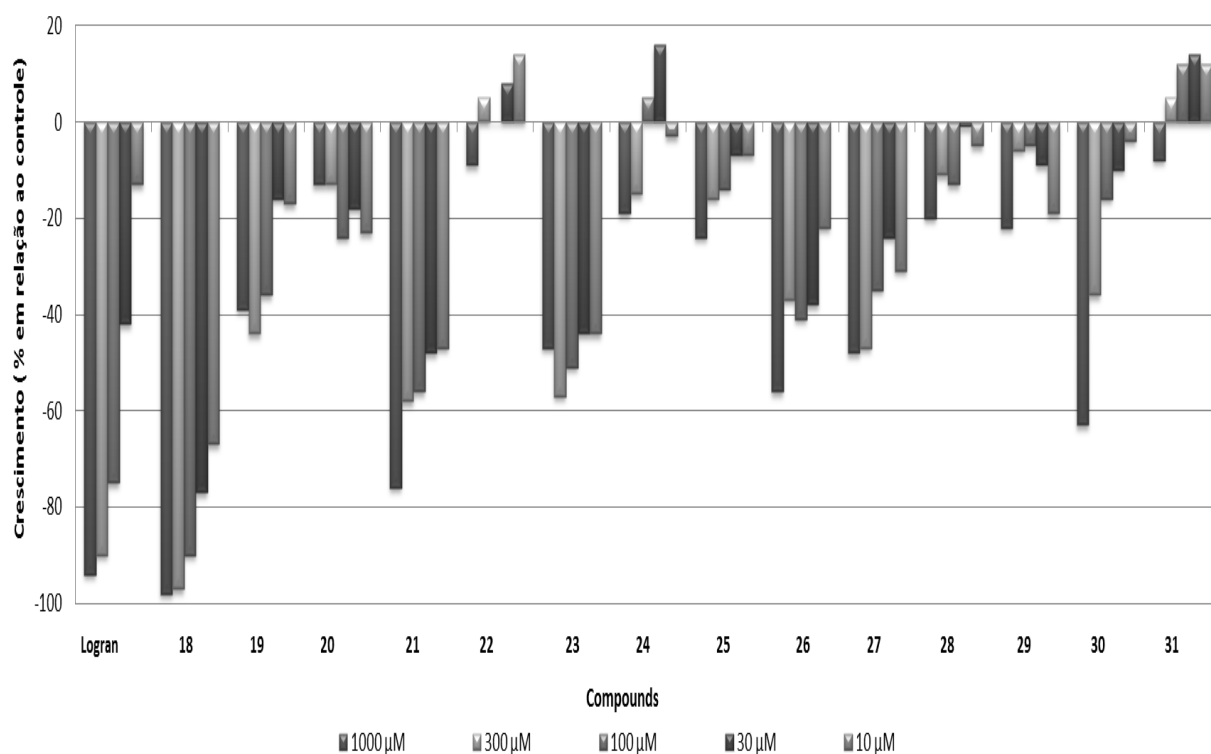


Gráfico 4.2: Bioatividade dos compostos (**18-31**) sobre coleótipos de trigo.

No grupo dos flavonoides (**18-31**) (Gráfico 4.2) os compostos mais ativos foram a flavona (**18**) e 3',4'-metileno-dioxi-5,7-dimetóxi-flavona (**21**), que apresentam inibições de -98% e -76% em 10^{-3} M, respectivamente. Embora o

composto (**23**) não tenha apresentado bons níveis de inibição do crescimento dos coleóptilos em 10^{-3} M e $3 \cdot 10^{-4}$ M (-47% e -57%, respectivamente), a bioatividade foi mantida em menores concentrações (-51%, 10^{-4} M; -44%, $3 \cdot 10^{-5}$ M and -44%, 10^{-5} M). Com relação aos compostos **23** a **27**, pode-se notar que as posições e o número de grupos metoxilas existentes nestas estruturas influenciam nos níveis de bioatividade, o mesmo foi observado para os compostos **21** e **22**.

No grupo dos terpenos, o triterpeno lupeol (**32**) inibiu completamente o crescimento dos coleóptilos na concentração de 10^{-3} M e a atividade foi mantida nas menores concentrações avaliadas (-100%, 10^{-3} M; -77%, $3 \cdot 10^{-4}$ M; -45%, 10^{-4} M; -48%, $3 \cdot 10^{-5}$ M e -45%, 10^{-5} M). O triterpeno tirucalano odoratona (**34**) apresentou níveis de atividade superiores a -70% nas maiores concentrações 10^{-3} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M e 10^{-4} M (-74%, -75% e -72%, respectively). Para os triterpenos damaranos, ocotilona (**33**) e acetónídeo de odoratol (**34**) não apresentaram níveis de atividade relevantes.

Comparando a estrutura dos triterpenos **34** e **35**, pode-se notar que a substituição do grupo cetona em C-3 no composto **34**, pelo grupo hidroxila em **35** e a formação do anel ligado ao anel furano alterou a bioatividade dos mesmos.

Para o grupo dos limonoides (Gráfico 4.3) os mais ativos foram: gedunina (**36**), guianina (**40**) e $5\alpha,6\beta,8\alpha,12\alpha$ -tetrahydro-28-norisotoonafolina (**41**). A guianina (**40**) apresentou valores maiores que -60% nas maiores concentrações, porém, a atividade não foi mantida em menores concentrações.

Para os limonóides gedunina (**36**) e 7-deacetoxy-7-oxogedunin (**37**), pode-se observar que a presença do grupo acetoxi em C-7 (**37**) ao invés do grupo carbonílico (**36**) mostrou influência na bioatividade.

Gedunina (**36**) e $5\alpha,6\beta,8\alpha,12\alpha$ -tetrahydro-28-norisotoonafolina (**41**) apresentaram os melhores resultados, no entanto, o mais notável foi para o limonóide **41**, que inibiu completamente o crescimento dos coleóptilos (-100%) nas maiores concentrações e apresentou -86% de inibição para a menor concentração ensaiada (10^{-5} M). O composto **41** apresentou em todas as concentrações avaliadas valores de inibição maiores que os obtidos para o herbicida comercial Logran[®]

(-94%, 10^{-3} M; -90%, $3 \cdot 10^{-4}$ M; -75%, 10^{-4} M; -42%, $3 \cdot 10^{-5}$ M and -13%, 10^{-5} M), empregado como controle positivo (Gráfico 4.3).

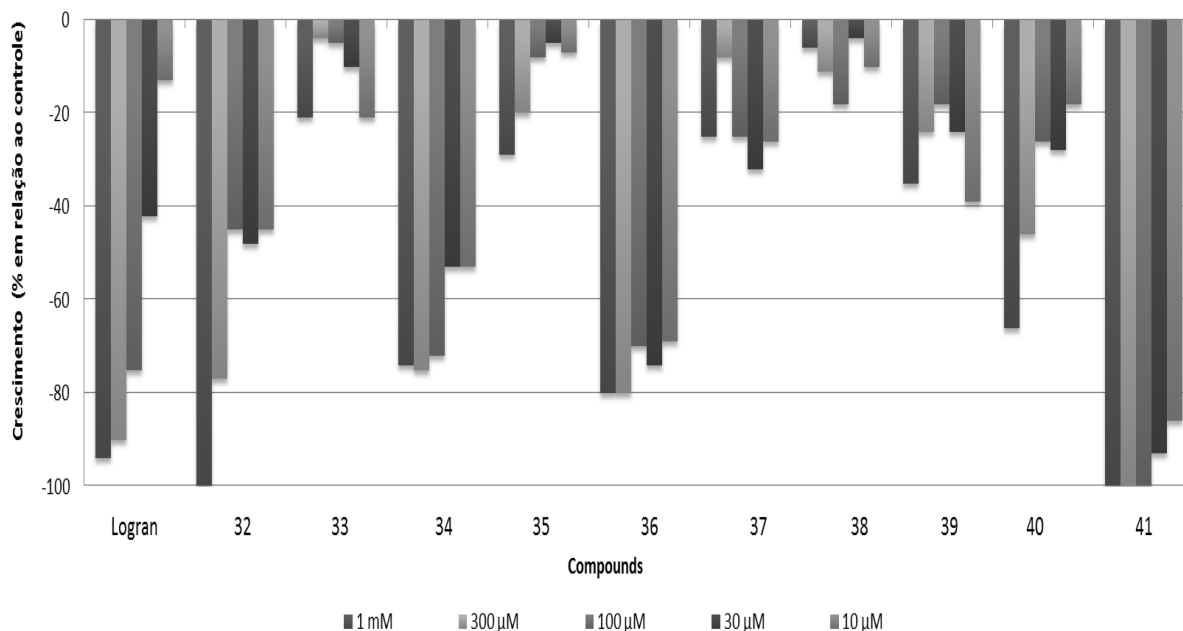


Gráfico 4.3: Bioatividade dos compostos (32-41) sobre coleóptilos de trigo.

4.2 Resultados dos ensaios de Fitotoxicidade

Os compostos mais ativos foram selecionados para os ensaios de fitotoxicidade. As espécies-alvo (STS) avaliadas foram: as dicotiledôneas agrião (*Lepidium sativum* L), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) e a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L.) e como controle positivo o herbicida comercial Logran® (MACÍAS *et al.*, 2000). Os resultados dos ensaios de fitotoxicidade estão apresentados nos Gráficos 4.4 a 4.10. Os dados estão apresentados como porcentagens em relação ao controle, onde os valores positivos representam estimulação, e os valores negativos inibição dos parâmetros avaliados. As concentrações ensaiadas seguiram as mesmas que os ensaios de bioatividade

em coleóptilos de trigo (10^{-3} a 10^{-5} M), com exceção aos compostos **1**, **36** e **41**, que foram avaliados a partir da concentração $3 \cdot 10^{-4}$ M.

Com relação à espécie dicotiledônea, *L. sativum* (agrião), os alcaloides evolutrina (**1**) e chelepensina (**12**) inibiram o crescimento das raízes em todas as concentrações avaliadas, com níveis semelhantes quando comparado ao herbicida Logran[®] (controle positivo). Relacionado ao crescimento das partes aéreas, a graveolina (**3**) e psoraleno (**8**) apresentaram bons resultados, com valores em torno de -75% e -69% para a maior concentração ensaiada (10^{-3} M), respectivamente. Os compostos **3** e **8** também afetaram a germinação (-62% e -83,% em 10^{-3} M, respectivamente) e o crescimento de *L. esculentum* (tomate), o mesmo foi observado para o crescimento da espécie *A. cepa* (cebola).

O efeito na germinação das espécies *L. sativum*, *L. esculentum* e *A. cepa*, com exceção dos compostos **3** e **8**, foram de baixa significância.

Hale e colaboradores (2004) demonstraram que **3** afetou o crescimento da planta aquática *Lemma paucicostata* na concentração de 10^{-4} M, causando degradação do tecido vegetal nas concentrações acima de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Para a espécie-alvo *L. sativa* (alface), **8** e **12** afetaram o crescimento das raízes na concentração mais elevada (-65% e -56% em 10^{-3} M, respectivamente), já os demais compostos avaliados não causaram efeitos significativos sobre a germinação e crescimento da espécie.

Embora a xantiletina (**5**) e chalepina (**11**) não tenham apresentado bons resultados sobre as espécies-alvo (STS), demonstraram inibir o crescimento de raízes de *Amaranthus hypochondriacus* (ANAYA *et al.*, 2005). Sampaio e colaboradores (2012) através da avaliação de furanocumarinas, mostraram o efeito inibidor da fotossíntese para o composto chalepina (**11**).

Em relação às espécies-alvo e os flavonoides, **21** foi o mais ativo correlacionado a germinação e crescimento para a espécie *L. sativum*, apresentando níveis de fitotoxicidade significativos quando comparado ao herbicida comercial Logran[®] (controle positivo), entretanto, não causou efeitos tanto no crescimento

quanto na germinação das demais espécies. Os compostos **18** e **23** não apresentaram resultados significativos sobre as espécies-alvo.

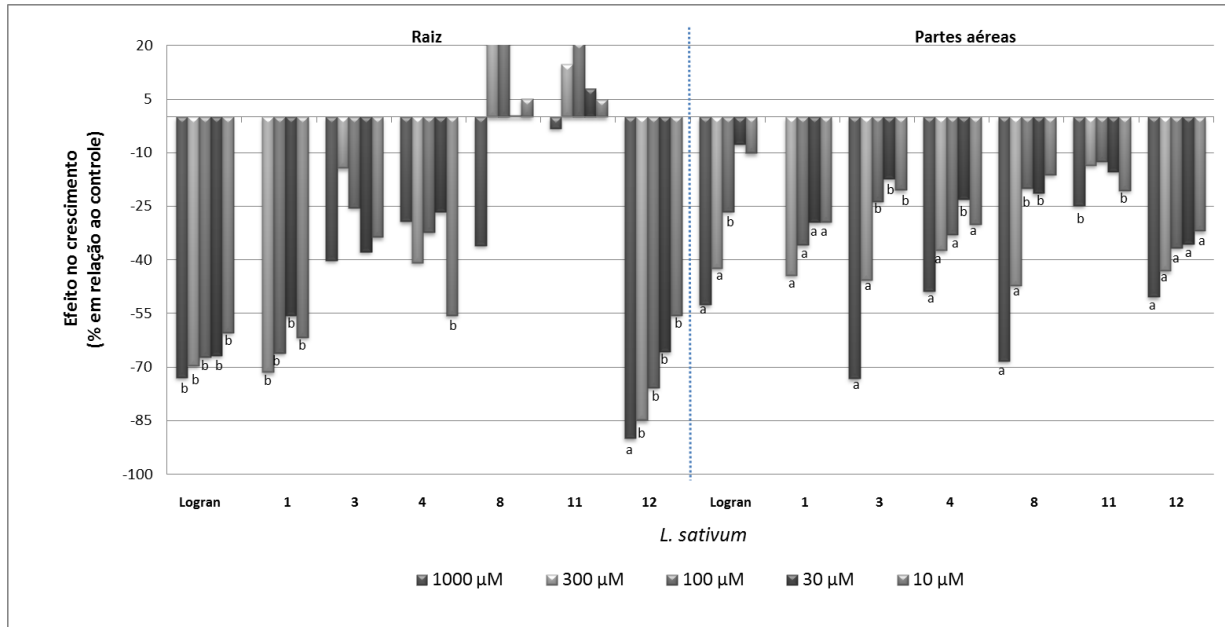


Gráfico 4.4: Efeitos dos compostos **1**, **3**, **4**, **8**, **11**, **12** e o herbicida comercial Logran[®] sobre o crescimento de *L. sativum*. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

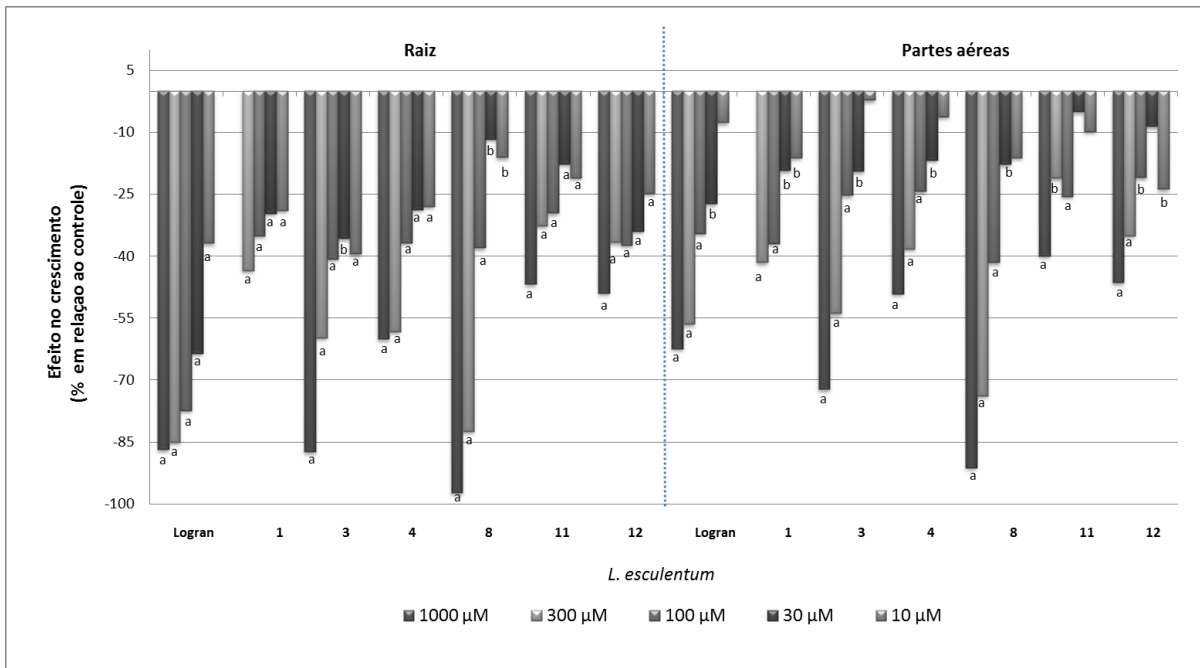


Gráfico 4.5: Efeitos dos compostos 1, 3, 4, 8, 11, 12 e o herbicida comercial Logran® sobre o crescimento de *L. esculentum*. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

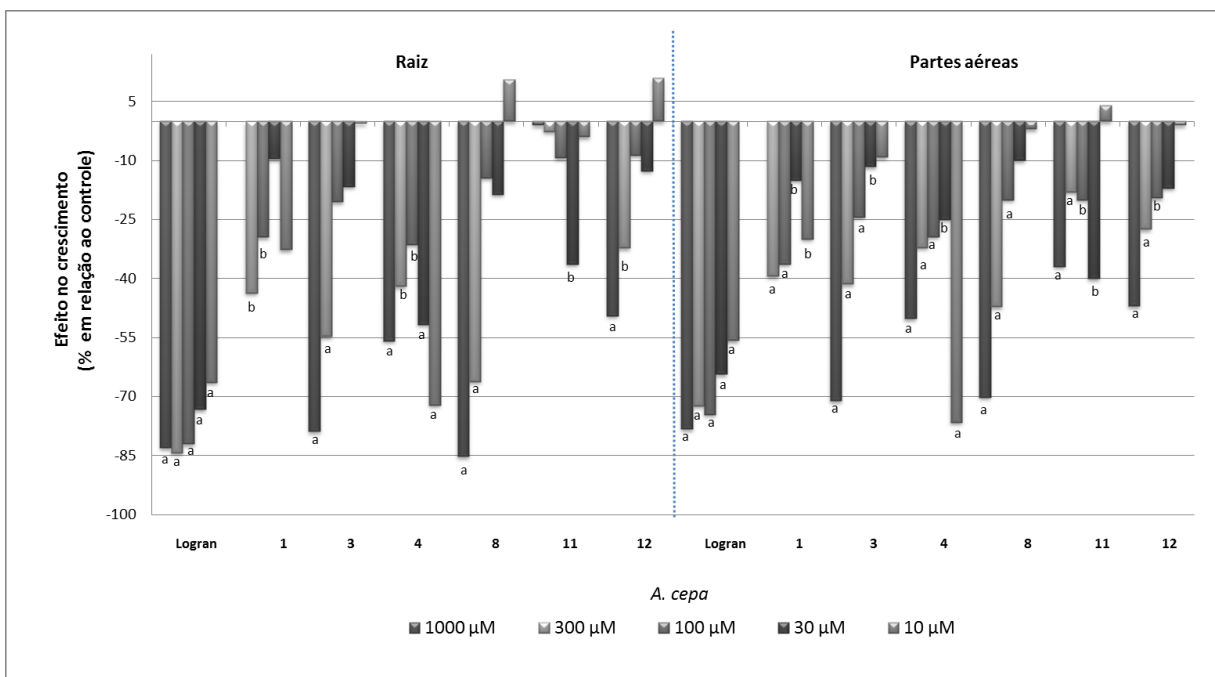


Gráfico 4.6: Efeitos dos compostos 1, 3, 4, 8, 11, 12 e o herbicida comercial Logran® sobre o crescimento de *A. cepa*. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

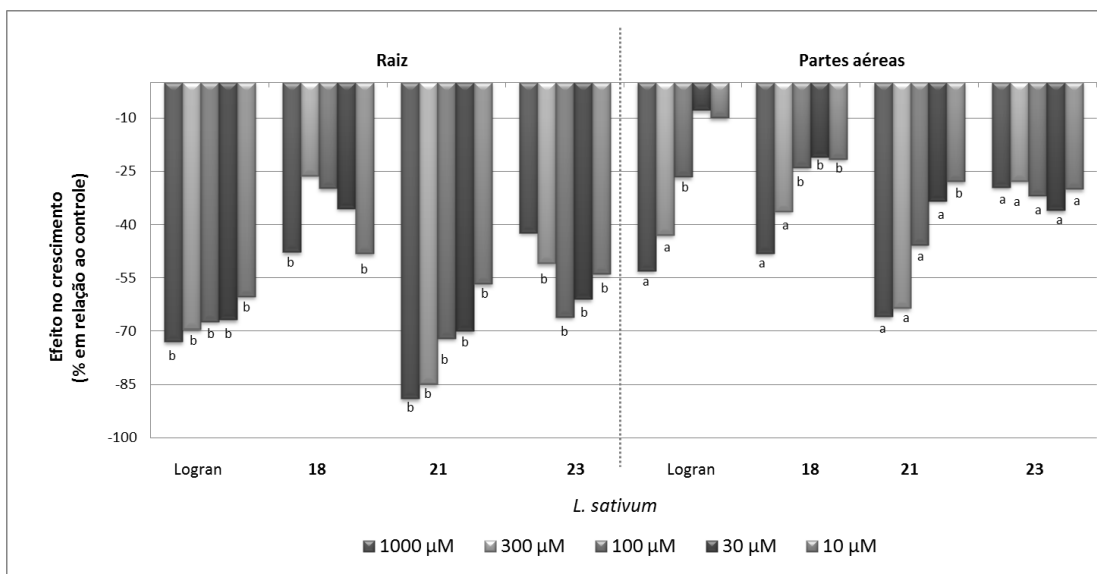


Gráfico 4.7: Efeitos dos compostos **18**, **21**, **23** e o herbicida comercial Logran® sobre o crescimento de *L. sativum*. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

Para os limonoides, o $5\alpha,6\beta,8\alpha,12\alpha$ -tetrahydro-28-norisotoonafolina (**41**) foi o mais ativo sobre a germinação e crescimento de todas as espécies dicotiledôneas.

Com relação à espécie dicotiledônea, *L. sativum*, a gedunina (**36**) afetou o crescimento das raízes (Gráfico 4.9) em todas as concentrações avaliadas, entretanto para o desenvolvimento das demais espécies-alvo não apresentaram resultados significativos (Gráfico 4.9).

O limonoide **41** apresentou inibição tanto na germinação quanto no desenvolvimento para todas as espécies dicotiledôneas (Gráfico 4.8 a 4.10), em todos os casos avaliados o composto **41** apresentou melhores níveis de fitotoxicidade quando comparado ao herbicida comercial Logran® (controle positivo). Para a espécie monocotiledônea *A. cepa* (cebola), o crescimento das raízes e partes aéreas foram os parâmetros mais afetados. O limonoide **41** apresentou valores de inibição em torno de 90%, tanto para o crescimento das raízes nas três primeiras concentrações avaliadas ($3 \cdot 10^{-4}$ M; 10^{-4} M; $3 \cdot 10^{-5}$ M) (Gráfico 4.9), quanto para o

crescimento das partes aéreas (-85%, $3 \cdot 10^{-4}$ M; -81%, 10^{-4} M; -56%, $3 \cdot 10^{-5}$ M and -25%, 10^{-5} M) (Gráfico 4.10).

A partir dos resultados avaliados através dos ensaios biológicos, foi demonstrado que o limonoide **41** é altamente fitotóxico para as espécies-alvo (*L. sativum*, *L. sativa L.* *esculentum* e *A. cepa*).

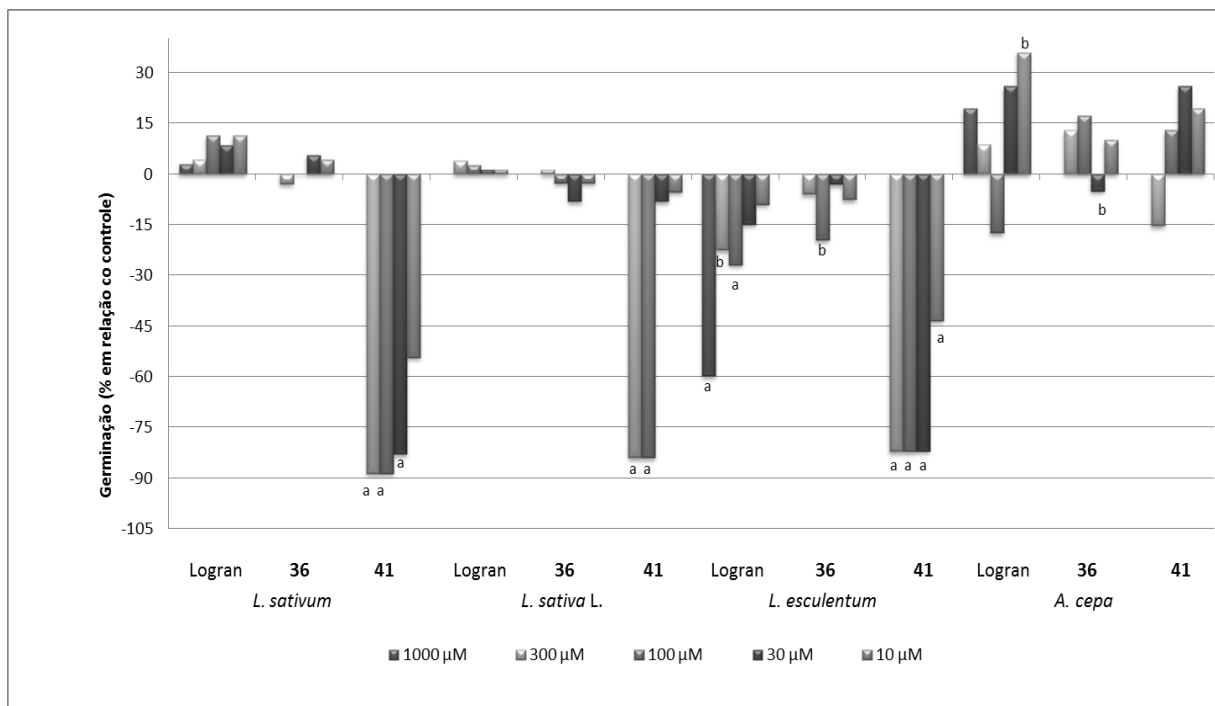


Gráfico 4.8: Efeitos dos compostos **36**, **41** e o herbicida comercial Logran® sobre o germinação das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

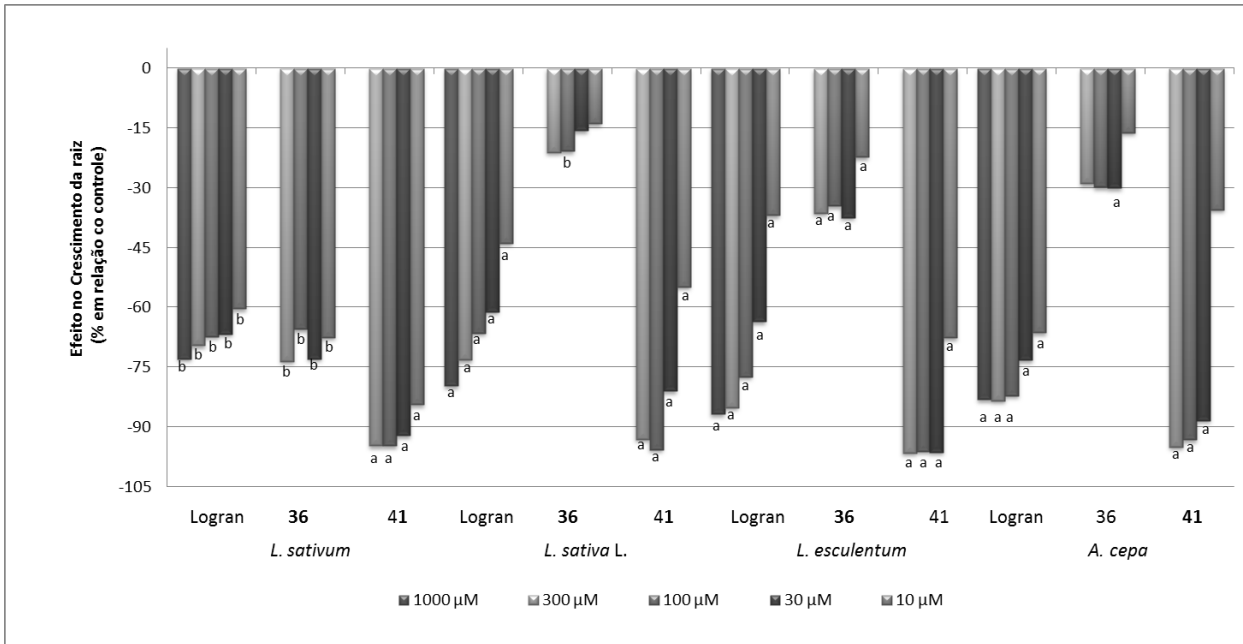


Gráfico 4.9: Efeitos dos compostos **36**, **41** e o herbicida comercial Logran® sobre o crescimento das raízes das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

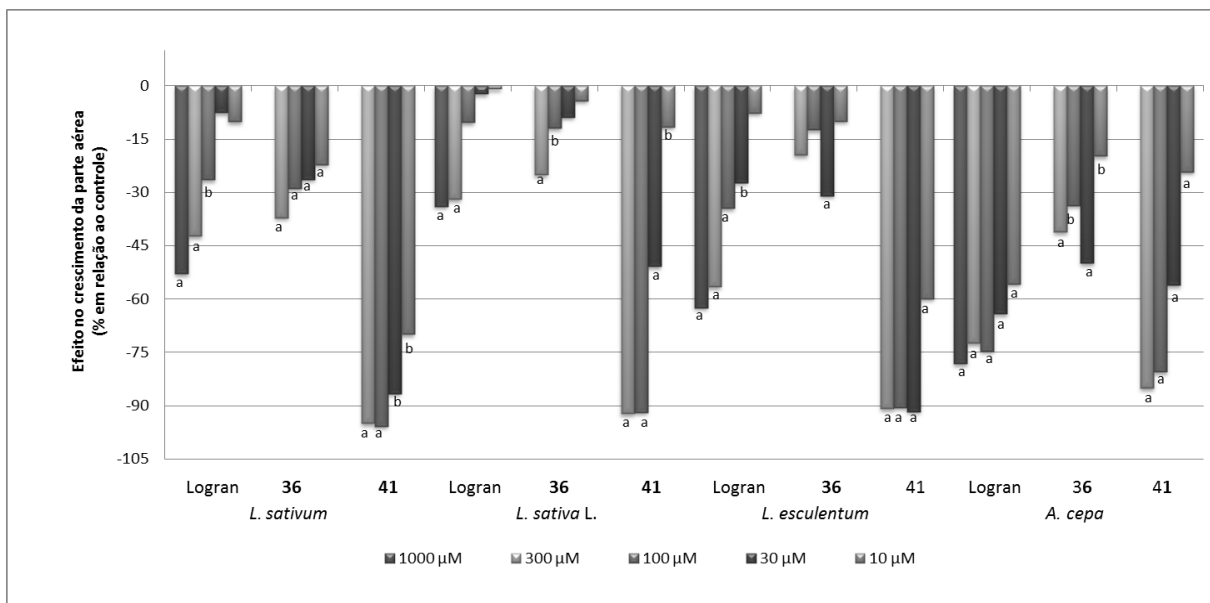


Gráfico 4.10: Efeitos dos compostos **36**, **41** e o herbicida comercial Logran® sobre o crescimento das partes aéreas das espécies-alvo. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa com $P > 0,05$ para o teste de Welch. ^aValores significativamente diferentes com $P < 0,01$. ^bValores significativamente diferentes com $0,01 < P < 0,05$.

5. Conclusões

Neste trabalho três alcaloides (**1-3**), doze cumarinas (**4-15**), dois derivados do ácido cinâmico (**16-17**), quatorze flavonoides (**18-31**), quatro triterpenos (**32-35**) e seis limonoides (**36-41**) isolados das famílias Meliaceae e Rutaceae, foram avaliados quanto aos perfis de bioatividade, através de bioensaios em coleóptilos de trigo seguido pelos ensaios de fitotoxicidade. Em resumo, os compostos **1**, **12**, **21**, **36** e **41** foram os mais promissores nos ensaios de fitotoxicidade em espécies-alvo (*L. sativum*, *L. sativa*, *L. esculentum* e *A. cepa*).

Os compostos **1**, **12**, **21** e **36** apresentaram resultados significativos de inibição do crescimento das raízes para a espécie *L. sativum*, sendo estes, específicos para esta espécie.

O limonoide **41** apresentou inibição tanto na germinação quanto no desenvolvimento para todas as espécies dicotiledôneas. Para todas as espécies-alvo, o composto **41** apresentou melhores níveis de fitotoxicidade quando comparado ao herbicida comercial Logran[®] (controle positivo), demonstrando a alta atividade fitotóxica do mesmo em todas as espécies avaliadas (*L. sativum*, *L. sativa*, *L. esculentum* e *A. cepa*).

6. Referências Bibliográficas

ANAYA, A. L.; MACÍAS-RUBALCAVA, M.; CRUZ-ORTEGA, R.; GARCÍA-SANTANA, C.; SÁNCHEZ-MONTEERRUBIO, P. N.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; MATA, R. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* **66**: 487-494, 2005.

BERMÚDEZ-TORRES, K.; HERRERA, J. M.; BRITO, R. F.; WINK, M.; LEGAL, L. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl* **54**: 459-466, 2009.

CALLAWAY, R. M. The detection of neighbors by plants. *Trends Ecol. Evol.* **17** (3): 104-105, 2002.

CASTELLANO, D.; MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, M.; CAMBRONERO, R. Spanish Patent N° P9901565, 2011.

CAZAL, C. M.; CHOOSANG, K.; SEVERINO, V. G. P.; SOARES, M. S., SARRIA, A. L. F.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAKKONG, P.; ALMEIDA, G. M.; VASCONCELOS, M. H.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M. M. M. Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **10**: 769-776, 2010.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry* **31**: 377-394, 1992.

CUTTLE, H. G. Fresh look at the wheat coleoptile bioassay, pp. 1-9, 1984 in Proceedings of the 11th Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America, PGRSA, Boston, MS, USA.

CUTTLE, S. J.; HOAGLAND, R. E.; CUTTLE, H. G. Evaluation of selected pharmaceuticals as potential herbicides: Bridging the gap between agrochemicals and pharmaceuticals, pp. 129-137, 2000 in s. s. Narwal, R. E. Hoagland, R. H. Dilday, and M. J. Reigosa Roger (eds.). *Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

DA SILVA, M. F. G. F.; GOTTILIEB, O. R.; DREYER, D. L. Evolution of Limonoids in the Meliaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**: 299-310, 1984.

DA SILVA, M. F. G. F. and GOTTILIEB, O. R. Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales. *Biochem. Syst. Ecol.* **15**: 85-103, 1987.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 4022-4034, 2009.

DUARTE, R. A.; MELLO, E. R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, T. G. A.; MORAIS, M. C. C.; XIMENES, V. F.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. *Tumor Biol.* **31**,513-522, 2010.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 394-411, 2006.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* **58**: 537-552, 2009.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; LÓPEZ-BALBOA, C.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.* **10**:245-260, 2011.

GOVINDACHARI, T. R.; SURESH, G.; GOPALADRISHNAN, G.; MASILAMANI, S.; BANUMATHI, B. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia* **71**: 317-320, 2000.

HARADA, K.; KUBO, H.; TOMIGAHARA, Y.; NISHIOKA, K.; TAKAHASHI, J.; MOMOSE, M.; INOUE, S.; KOJIMA, A. Coumarins as novel 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors for potential treatment of prostate cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 272-275, 2010.

JACINO, J. M. and CUTTLER, H. G. Detection of herbicidal properties: scope, and limitations of the etiolated wheat coleoptiles bioassay. *PGRSA Quaterly* **21**: 15-24, 1993.

KIKUCHI, T.; ISHI, K.; NOTO, T.; TAKAHASHI, A.; TABATA, K.; TAKASHI, S.; AKIHISA, T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (Neem). *J. Nat. Prod.* **74**: 866-870, 2011.

LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, JR. M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their Insecticidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **16**: 16391-1395, 2005.

LI, Z.; GU, Y.; IRWIN, D.; SHERIDAN, J.; CLOUGH, J.; CHEN, P.; PENG, S.; YANG, Y.; GUO, Y. Further *Daphniphyllum* alkaloids with insecticidal activity from the bark of *Daphniphyllum macropodum* MiQ. *Chem. Biodiv.* **6**: 1744-1750, 2009.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemical. Selection of standard target species. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2512-2521, 2000.

MACÍAS, F.A.; ELASCO, R.F.; CASTELLANO, D. Application of Hansch's model to guaianolide ester derivatives: a quantitative structure–activity relationship study. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3530-3539, 2005.

MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. G. Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Manag. Sci.* **63**: 327-348, 2007.

- MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *J. Ethnopharmacol.* **139**: 471-477, 2012.
- MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 223-246, 2007.
- MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **22**: 627-646, 2005.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWAN, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* **80**, 81-90, 2009.
- MILLER, E. G.; PORTER, J. L.; BINNIE, W. H.; GUO, I. Y.; HASEGAWA, S. Further studies on the anticancer activity of citrus limonoids. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 4908-4912, 2004.
- PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**: 147-155, 2012.
- PAVELA, R. and VRCHOTOVÁ, N. Insecticidal effect of furanocoumarins from fruits of *Angelica archangelic* L. against larvae *Spodoptera littoralis* Bois. *Ind. Crop Prod.* **43**: 33-39, 2003.
- PICK, A.; MULLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I. K.; WEIGHT, M.; BÖNISCH, H.; MULLER, C. E.; Wiese, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 2090-2102, 2011.
- RÍOS, J. Effects of triterpenes on the immune system. *J. Ethnopharmacol.* **128**:1-14, 2010.
- ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significance bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* **29**:191-201, 2006.
- SAMPAIO, O. M.; SILVA, M. F. G. F.; VEIGA, T. A. M.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Avaliação de furanocumarinas como inibidores da fotossíntese através de ensaios de fluorescência da Clorofila a. *Quím. Nova* **11**: 2115-2118, 2012.
- SARRIA, A. L. F.; SOARES, M. S.; MATOS, A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. F. G. F. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Z. Naturforsch.* **66**: 245-250, 2011.
- SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; WESLEY, S. D.; SINGH, N. D. P.; MALATHI, R.; RAJAN, S. S. Insect antifeedant activity of tetranortriterpenoids from the Rutales. A perusal of structural relations. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4484-4490, 2002.
- TAN, Q.; LUO, X. Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. *Chem. Rev.* **111**: 7437-7522, 2011.

XIE, F.; ZHANG, M.; ZHANG, C.; WANG, Z.; YU, B.; KOU, J. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit. *J. Ethnopharmacol.* **117**: 463-466, 2008.

ZHAI, H.; ZHAO, C.; ZHANG, N.; JIN, M.; TANG, S.; QIN, N.; KONG, D.; DUAN, H. Alkaloids from *Pachysandra terminalis* inhibit breast cancer invasion and have potential for development as antimetastasis therapeutic agents. *J. Nat. Prod.* **75**: 1305-1311, 2012.

ZHANG, F.; WANG, J.; GU, Y.; KONG, L. Triterpenoids from *Aglaia abbreviata* and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **73**: 2042-2046, 2010.

ZHANG, F.; WANG, J.; GU, Y.; KONG, L. Cytotoxic and anti-inflammatory triterpenoids from *Toona ciliata*. *J. Nat. Prod.* **75**: 538-546, 2012..