

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

“Busca de substâncias inseticidas e fungicidas para controle de formigas-cortadeiras através do estudo fitoquímico biomonitorado de espécies de *Picramnia* e avaliação da atividade bacteriostático em *Xanthomonas citri* subsp *citri*”

Artur da Silva Cruz*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

***BOLSISTA CNPq**

São Carlos – SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Artur da Silva Cruz, realizada em 31/10/2019:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. B. Fernandes', written above a horizontal line.

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Adriana', written above a horizontal line.

Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes
UNAERP

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Felipe Christoff Wouters', written above a horizontal line.

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
UFSCar

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Eracinete Dias da Silva, por todo apoio e amor principalmente na jornada acadêmica, ao meu avô Pedro Rodrigues da Silva (*in memoriam*), por ter ensinado valores e sido um pai para mim. A minha irmã Alana da Silva Cruz, por ser meu porto seguro durante os momentos de turbulência. A vocês, meu mais sincero obrigado!

“o senhor é meu pastor e nada me faltará”

Salmo 23

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da vida e por me dar forças e inteligência para concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Álvaro e Eracinete, por abrirem mãos de sonhos e por todos esforços que fizeram para que eu pudesse realizar meu sonho.

Aos meus avos Pedro e Alexandrina por participarem ativamente da minha educação.

A minha irmã Alana Cruz, por todo carinho e amor.

A minha amiga Camila Favaro, pelo carinho, companheirismo e sempre estar ao meu lado.

Ao Prof. Dr. João Batista, pela confiança, ensinamentos, paciência e orientação.

A Prof. Dra. Maria de Fátima G. F. da Silva, pelos ensinamentos e dicas para a realização desse trabalho e de outros.

Ao Prof. Dr. Odair C. Bueno, do centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP Rio Claro- SP, pela realização dos ensaios biológicos com as formigas cortadeiras.

A MSc. Dorai P. Zandonai da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelos ensaios biológicos com o fungo.

A Dra. Daniele F. da Silva, pelos ensaios bacteriostáticos.

Aos meus amigos do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de São Carlos, Luciano Rodrigues, Jéssica, Fernanda, Luiz Guilherme, Bia, Airton, Marina, Ricardo Alcântara, Gabriel Amaral.

A Leticia, por toda amizade, conselhos e companheirismo.

Aos meus amigos André, Sean, Luiz Felipe, Douglas e Wendell, pelos momentos bons e ruins que passamos e permanecemos com nossa amizade, alicerçando nossos vínculos.

Ao Luciano Pinto, pelo companheirismo, compressão, conselheiro e sempre disposto a me auxiliar quando não havia mais ninguém. Por tudo que fez por

mim, para contribuição da minha formação profissional e pessoal, tornou-se um grande amigo.

A Alany, que em momentos de aflição auxiliava-me no que estivesse a seu alcance e que se tornou uma grande amiga.

Ao meu amigo Carlos André, pela ajuda com a síntese do complexo e pela amizade.

A paloma prata, pelos conselhos e ajuda com análise de massas e CG-MS. Tornando-se uma grande amiga em tão pouco tempo, não medindo esforços tanto na cobrança quanto na ajuda.

Ao Hugo Cesar, pelas análises de massas e pelos momentos descontraídos, sempre dando boas ideias para auxílio dessa etapa da minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

A Fapesp pelo auxílio financeiro através do projeto temático Proc. 2012/25299-6.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

ABREVIACÕES

δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
ACN	-	Acetonitrila
AcOEt	-	Acetato de etila
atm	-	Atmosfera
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
CPC	-	Cromatografia de Partição Centrífuga
<i>d</i>	-	Dubleto
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
H ₂ O	-	Água
Hex	-	Hexano
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	-	High performance liquid chromatography
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>m</i>	-	Multiplete
M	-	Metal
mL	-	Mililitro
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
MeOH	-	Metanol
nm	-	Nanometro
ppm	-	Parte por milhão
RMN ¹³ C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
RMN ¹ H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	-	Singleto
<i>T</i>	-	Tesla
<i>t</i>	-	Tripleto

- μL - Microlitro
- MS^2 - Fragmentação do íon selecionado

LISTA DE TABELA

Tabela 3.1.- Método de eluição para a fração PRG_met F2- F100% met em HPLC-UV.39

Tabela 3.2- Gradientes de eluição para as fases do CPC em HPLC-DAD.40

Tabela 3.3- Bactérias fitopatogenas de *Xanthomonas citri* ssp *citri* (causadora da doença do cancro cítrico), sendo elas: resistentes, tolerantes e sensíveis a produtos derivados de cobre.49

Tabela 4.1- Levantamento e escolha dos extratos do Laboratório de Produtos Naturais57

Tabela 4.2- Sistema de solventes avaliados para o extrato de PRF_met58

Tabela 4.3-Referente a escolha do sistema de eluição60

Tabela 4.4- Rendimento usando CPC para extrato PRF_met.60

Tabela 4.5- Rendimento do fracionamento da fração PRG_met-F02-F100%met64

Tabela 4.6- Referente a óleos e ésteres de cadeias longas identificados66

Tabela 4.7- Dados referente a substância **9**, deslocamento de ^1H e ^{13}C comparados com dados da literatura68

Tabela 4.8- Deslocamento químico de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **10**, comparados com dados encontrados na literatura70

Tabela 4.9- Dados de descolamento de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 11, comparados dados encontrados na literatura75

Tabela 4.10- Dados de RMN de ^1H da substância **13**79

Tabela 4.11- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para extratos, aloe-emodina e complexo de aloe-emodina.101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1- **A)** Operarias de formigas cortadeiras transportando folhas para que sejam como fonte de nutrientes para o seu fungo simbiote; **B)** Operarias de formigas cortadeiras se alimentando de laranja, como ocorre na natureza. 20
- Figura 1.2- Quadro de castas de formigas, encontrado na Unesp-Rio Claro.21
- Figura 1.3- Exemplo de inseticidas naturais Azadiractina (**1**), Rotenona (**2**) Nicotina (**3**) e 2-nor-bornanol (**4**).23
- Figura 1.4- Exemplo de estruturas de quassinoides. 24
- Figura 1.5- Estruturas encontradas na literatura isoladas do gênero *Pricamnia*.25
- Figura 1.6- Sistema de solventes e proporções do sistema HEMWat. Adaptada de Friesen & Pauli⁴². 27
- Figura 1.7- Cromatograma de resolução cromatográfica de banda em função de K. Adaptada de Friesen & Pauli⁴².28
- Figura 1.8- Ilustração da escolha de eluição. Adaptada de Friesen & Pauli⁴².28
- Figura 1.9- Manifestação do ataque bacteriano da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: **A)** no fruto; **B)** nos galhos e **C)** nas folhas. D) ilustração do ataque da bactéria ao sistema vascular e tecido celular do mesófilo. Figura retirada e adaptada de Nature Reviews Microbiology, V9, p 344-345 (2011).⁶¹30
- Figura 1.10- Ciclo epidêmico do cancro cítrico. Adaptada de manual técnico de FUNDECITRUS⁶³31
- Figura 3.1- Fluxograma do fracionamento para o extrato de PRG_met. 36
- Figura 3.2- Fluxograma do primeiro fracionamento de PRG_met, coluna Sephadex LH-20.37
- Figura 3.3- Fluxograma do fracionamento de PRG-F2.38
- Figura 3.4- Fluxograma para escolha de método.41
- Figura 3.5- Fluxograma do fracionamento da fração PRF_met-F1-F3.44
- Figura 3.6- Vista geral do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP.46

- Figura 3.7- Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.47
- Figura 3.8- Exemplo de placa de 96 poços com teste de CIM..... 52
- Figura 3.9- Reação da resazurina para o ensaio de (CIM) dos extratos e compostos frente a bactéria em questão. **A)** coloração azul, inibição bacteriana; **B)** coloração rosa, crescimento bacteriano.53
- Figura 3.10- Variação de coloração do processo de síntese do complexo com antraquinona. (A) MeOH + M(NO₃) = azul claro, (B) MeOH + Et₃N = azul celeste com formação de precipitado, (C) MeOH + antraquinona = amarelo, (D) MeOH + antraquinona + Et₃N = vermelho, (E) MeOH +antraquinona+ M(NO₃)+Et₃N.55
- Figura 4.1- Comparação dos Cromatogramas para escolha do método de eluição do CPC..... 60
- Figura 4.2- Cromatograma da analisa da fração PRF_F1 analisadas e proposta de fracionamento.62
- Figura 4.3- Cromatograma do fracionamento da fração PRF_F1.62
- Figura 4.4- Cromatograma da fração PRF_met -F4.63
- Figura 4.5- Cromatograma referente ao perfil cromatográfico da fração PRM_F2-F100%.64
- Figura 4.6- Cromatograma referente as frações coletadas.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.7- Estruturas identificas na *P. Riedelli*..... 66
- Figura 4.8- **A)** Ampliação do espectro de RMN ¹H de Hidrogênios mais desblindados; **B)** Proposta de Hidrogênios quelados em carbonilas..... 68
- Figura 4.9- Estrutura da aloe-emodina **9**.68
- Figura 4.10- Proposta de fragmentação para a massa de m/z 269,0456.69
- Figura 4.11- Estrutura do Crisofanol.70
- Figura 4.12- Correlações observadas o COSY.71
- Figura 4.13- Proposta de fragmentação para o íon m/z 253,0511.72

- Figura 4.14- Cromatograma ampliado das substâncias **11** e **12**.72
- Figura 4.15- Proposta para hidrogênio quelado δ 12,60..... 76
- Figura 4.16- Sobreposição de espectros de RMN de ^1H . Em azul ampliação da substância **10** e em vermelho o espectro da substância **11**.74
- Figura 4.17- Proposta de fragmentação para o íon 415,1036.75
- Figura 4.18- Ampliação da região dos aromáticos de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD). Em azul espectro de Crisofanol e em vermelho espectro da substância **12**.77
- Figura 4.19- Proposta de fragmentação para o íon m/z 415,1039.78
- Figura 4.20- Estrutura do dímero de antraquinona proposto com as correlações observadas no experimento de COSY e RMN de ^1H .79
- Figura 4.21- Proposta de mecanismo de fragmentação para íon m/z 539,0963.81
- Figura 4.22- Espectro de massa Ms^2 do íon 539,0963.81
- Figura 4.23- Comparação dos espectros de absorção na região do infravermelho. **A)** Antraquinona, **B)** complexo [metal(antraquinona) $_2$], obtidos em KBr.83
- Figura 4.24- Espectro de absorção na região do Uv-Vis da antraquinona obtido em DMSO. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.84
- Figura 4.25- Espectro de absorção na região do Uv-Vis do [Metal(antraquinona) $_2$] obtido em DMSO.85
- Figura 4.26- Mecanismo de fragmentação complexo antraquinona85
- Figura 4.27- Espectro de massas Ms^2 do complexo antraquinona.86
- Figura 4.28- Fluxograma referente ao trabalho realizado com o fungo.87
- Figura 4.29- Gráficos referentes ao crescimento micelial da triagem dos extratos. Barras em cinza indicam controle e coloridas tratamentos realizados.88
- Figura 4.30- Ensaio referente ao segundo fracionamento para a fração PRG_F2.90
- Figura 4.31- Ensaio para avaliação do terceiro fracionamento..... 92

Figura 4.32- Gráfico dos ensaio fungicida do complexo avaliando a inibição micelial do fungo. Barra em cinza indica o controle e barra em preto indica inibição do complexo.93

Figura 4.33- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelle* feminina nas concentrações PRF (metanol) 0,002 mg/ml, PRF (éter de petróleo) 0,002 mg/ml, PRF (metanol) 0,002 mg/ml e PRF (éter de petróleo).94

Figura 4.34- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelle* nas concentrações PRG (metanol) 0,005 mg/ml e PRG (metanol) 0,003 mg/ml.94

Figura 4.35- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os ingredientes ativos..... 97

Figura 4.36- Estrutura de composto já testados contra a *Atta sexdens rubropilosa*.97

Figura 4.37- Avaliação do teste bacteriano, coloração azul indica ocorrência de inibição e rósea a não inibição.99

Figura 4.38- Valores mínimos que inibiram a bactéria, comparando o ligante em azul, sal do metal feito a síntese e a molécula formada da mesma cor.100

Figura 4.39- Porcentagem teórica de metal no complexo e no sal utilizando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L & Borel.102

RESUMO

Busca de substâncias inseticidas e fungicidas para controle de formigas-cortadeiras através do estudo fitoquímico biomonitorado de espécies de *Picramnia* e avaliação da atividade bacteriostático em *Xanthomonas citri*, subsp *citri*. A busca de substâncias com potencial atividade biológica é alvo de inúmeros estudos dentro da química de produtos naturais, envolvendo desde a elucidação/caracterização estrutural até o mecanismo de ação. Algumas espécies do gênero *Picramnia* apresentam diversas classes de metabólitos secundários com potencial biológico já descrito na literatura, justificando o estudo fitoquímico deste gênero. A espécie *Picramnia riedelii* possui apenas um registro na literatura quanto ao estudo fitoquímico, contudo não foram relatadas ainda aplicações biológicas das substâncias descritas nesta espécie. Neste contexto, esse trabalho foi desenvolvido a fim de realizar estudo biomonitorado de extratos de *Picramnia riedelii*, buscando princípios ativos, isolá-los e caracterizá-los. Com isso, foram avaliadas as atividades de extratos metanólico de folhas e galhos, frações e algumas substâncias isoladas, realizando ensaios fungicida, inseticida e bacteriostático. Foram identificados nesse trabalho 4 ácidos graxos de cadeia longa, 4 ésteres graxos de cadeia longa e 5 antraquinonas, e realizada a síntese de um novo complexo metálico tendo como ligante uma antraquinona, sendo a primeira vez o relato de tal molécula formada. Com o auxílio da técnica de cromatografia de partição centrífuga foi utilizada para o fracionamento do extrato metanólico de folhas. Os extratos de folhas, juntamente com a antraquinona Aloe-emodina e Crisofanol deram resultados nos ensaios contra a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*.

ABSTRACT

The search for insecticide and fungicide substances to control leaf-cutting ants through biomonitoring phytochemical study of *Picramnia* species and evaluation of bacteriostatic activity in *Xanthomonas citri* Subsp *citri*. The search for substances with potential activity is the target of numerous studies within the chemistry of natural products, ranging from structural elucidation to the mechanism of action. Some *Picramnia* species have a variety of class of secondary compounds, generating interest in their application, justifying the study of this family. The species *Picramnia riedelle* has little study regarding its chemical composition and biological activity of its constituents. In this context, this work was developed in order to perform biomonitoring study of *Picramnia riedelle* extracts, seeking isolated active principles and characterizing them. Thus, the activity of methanolic extracts of leaves and branches, fractions and some isolated substances was evaluated, performing fungicide, insecticide and bacterial assays. We identified in this work 4 long chain acids, 4 long chain esters and 5 anthraquinones, together with the synthesis of a new metal complex with an anthraquinone as the ligand, the first time the report of such a molecule formed. Together with the aid of the centrifugal partition chromatography technique used for the fractionation of methanolic leaf extract.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO18

- 1.1. INSETO PRAGA E AGRICULTURA18
- 1.2. FORMIGAS CORTADEIRAS19
- 1.3. MÉTODO DE CONTROLE DE INSETOS PRAGAS21
- 1.4. IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS COMO DEFENSORES AGRÍCOLAS22
- 1.5. O GÊNERO *PICRAMNIA* COM FONTE DE MOLÉCULAS COM APLICAÇÃO BIOLÓGICA23
- 1.6. CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA-CPC26
- 1.7. RELEVÂNCIA DE COMPLEXAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS29
- 1.8. COBRE29
- 1.9. CANCRO CÍTRICO30

2. OBJETIVOS32

- 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS32

3. MATERIAIS E MÉTODOS34

3.1. MATERIAIS34

- 3.1.1. *Solventes*34
- 3.1.2. *Colunas cromatográficas e fases estacionárias*34
- 3.1.3. *Equipamentos*34
- 3.1.4. *Reveladores cromatográficos*35
- 3.1.5. *Análises por Ressonância Magnética Nuclear*35
- 3.1.6. *Balanças*35
- 3.1.7. *Outros aparatos*35

3.2. MÉTODOS36

- 3.2.1. *Análise e seleção dos extratos por CCD e RMN ¹H*36
- 3.2.2. *Fracionamento por cromatografia em coluna do extrato PRG_met*36
- 3.2.3. *Fracionamento da fração PRG- F02*38
- 3.2.4. *Fracionamento da fração PRG_met F2- F100% met*38
- 3.2.5. *Uso do CPC para fracionamento de PRF_met*39
- 3.2.6. *Procedimento para cálculo e coeficiente de partição (k)*40
- 3.2.7. *Fracionamento do extrato Pricamnia riedelli- folhas- metanol (PRF_met)*41
- 3.2.8. *Análise e fracionamento da fração PRF_met F1*42
- 3.2.8.1. *Fracionamento da fração PRF_met-F1-F3*43
- 3.2.9. *Ensaio no fungo L. gongylophorus*44
- 3.2.9.1. *Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios*45
- 3.2.10 *Bioensaio para determinação da toxicidade*46
- 3.2.10.1 *Em dieta artificial*47
- 3.2.10.2 *Análise dos dados de toxicidade*48
- 3.2.11 *Ensaio bacteriostático in vitro.*49

- 3.2.11.1 *Antimicrobianos in vitro utilizando bactéria Xanthomonas citri ssp in experimentos isolados.*49
- 3.2.11.2 *Crescimento e manutenção dos isolados.*49
- 3.2.11.2 *Determinação de concentração inibitória mínima (cim) dos extratos e substâncias em avaliação sobre a bactéria Xanthomonas citri ssp. citri.*50
- 3.2.11.3 *Preparo de solução estoque (se), que são amostras a serem testadas*50
- 3.2.11.4 *Preparo da placa de 96 poços estéreis e realização da diluição seriada*51
- 3.2.11.5 *Preparo do inoculado*51
- 3.2.11.6 *Avaliação da concentração inibitória mínima das placas*52
- 3.3. **CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS NO CG**53
- 3.4. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO**54
 - 3.4.1. *Síntese*54
 - 3.4.2. *Caracterização por espectroscopia de infravermelho*55
 - 3.4.3. *Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível*55
- 3.5. **ESPECTROMETRIA DE MASSAS**56
 - 3.5.1. *Análises massas*56
 - 3.5.2. *Análises de massas por infusão direta*56
- 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**57
 - 4.1. **ESCOLHA DOS EXTRATOS POR CCD, RMH ¹H E FRACIONAMENTOS**57
 - 4.2. **SISTEMAS DE SOLVENTES UTILIZADOS NO CPC**58
 - 4.2.1. *Testes de sistemas de solventes*58
 - 4.2.2. *Escolha do modo de eluição: ascendente ou descendentes*59
 - 4.2.3. *Fracionamento do extrato PRF_met usando CPC*60
 - 4.2.4. *Análise do fracionamento do extrato PRF_met- F0161*
 - 4.2.5. *Análise da PRF_met- F463*
 - 4.2.6. *Trapeamento da fração PRG_met-F100%met*63
 - 4.3. **METABÓLITOS IDENTIFICADOS**65
 - 4.3.1. *Identificações de ésteres e ácidos de cadeias longas*66
 - 4.3.2. *Caracterização da substância 966*
 - 4.3.3. *Caracterização da substância 1069*
 - 4.4.4. *Caracterização das substâncias 11 e 1272*
 - 4.3.5. *Caracterização da substância 1378*
 - 4.4.6. *Complexo de antraquinona*82
 - 4.5. **ATIVIDADE BIOLÓGICA**87
 - 4.5.1. *Análise fungicida*87
 - 4.5.1.1. *Ensaio de inibição do crescimento micelial em Leucogarius gongylophorus*87
 - 4.5.1.2. *Pricamnia riedelli*88
 - 4.5.1.3. *Avaliação da inibição do crescimento micelial das frações de PRG*89
 - 4.5.1.4. *Segundo fracionamento da PRG- met*89
 - 4.5.1.5. *Terceiro fracionamento de PRG_met*90
 - 4.5.1.6. *Avaliação do complexo frente ao Leucogarius gongylophorus*92
 - 4.5.2. **ENSAIOS INSETICIDA FRENTE FORMIGA CORTADEIRA ATTA SEDENX RUBRIPILOSA**93

- 4.5.2.1. *Pricamnia riedelli- Extrato bruto “in vitro” .93*
- 4.5.2.2. *Frações obtidas a partir do CPC95*
- 4.5.2.3. *Comparação de atividade biológica96*
- 4.5.2.4. *Atividade do complexo98*
- 4.5.3. *Ensaio biológico “in vitro” com bactérias98*

5. CONCLUSÃO:103

6. REFERÊNCIA104

1. INTRODUÇÃO

1.1. INSETO PRAGA E AGRICULTURA

O Brasil, com tanta diversidade climática, geográfica e ecológica, o qual abriga em seu território uma variedade de microrganismos, insetos e plantas, mantem entre eles uma complexa relação ecológica. Além disso, muitas espécies vegetais podem ser cultivadas para fins comerciais no qual é possível gerar emprego e renda, impulsionando a economia brasileira. O setor primário de produção, mantém destaque nos dias atuais, principalmente através do abastecimento interno e exportação de frutas e vegetais, tais como a soja, milho e cana-de-açúcar¹⁻³. Devido à grande produção, essas culturas se tornam vulneráveis a ataques de praga, com perdas econômicas de bilhões de dólares ao ano. Pragas e doenças na agricultura mundial podem levar a até 37% de perda da produção e à perda de até 13% devido a insetos⁴. No Brasil, essas perdas podem chegar a 7,7% da produção anual, podendo atingir 25 milhões de toneladas de alimentos desaproveitado, cujo valor monetário significa perda de US\$ 17,7 bilhões³.

Na década de 90 foi iniciado no Brasil o MIP, Manejo Integrado de Pragas, o qual consiste em uma série de medidas socioeconômicas e ecológicas para manter os níveis de pragas baixos minimizando perdas econômicas, danos ao meio ambiente e ao homem. Com objetivo de potencializar o desempenho agrícola, algumas medidas de intervenção são usadas de cunho global, por exemplo, tendo enfoque nas formigas cortadeiras, uma das principais praga agrícola de difícil controle devido a sua alta complexidade ecológica⁵.

O gênero *Atta*, um dos principais representantes das formigas cortadeiras, juntamente do gênero *Acromyrmex* são considerados pragas agrícolas, principalmente encontradas em plantações de Eucaliptos^{6,7}. Através da intervenção humana no meio ambiente ao retirar a vegetação nativa e implantar principalmente sistemas de monoculturas pode trazer de abundância de

alimentos (monoculturas) e ausência de inimigos naturais contra esses insetos, fatores esses que contribuem para a proliferação das formigas, tornando-as pragas agrícolas.

1.2. FORMIGAS CORTADEIRAS

O hábito de desfolha (remoção de folhas) é característico de algumas espécies de formigas. As saúvas (*Atta*) e quenquéns (*Acromyrmex*), pertencem a família Formicidae, ordem Himenóptera, subfamília Myrmicinae, possuem o hábito de desfolha, cortar folhas, brotos e galhos transportá-las para o ninho, por isso são chamadas vulgarmente de formigas-cortadeiras⁸⁻⁹.

A *Atta* e a *Acromyrmex* constroem ninhos subterrâneos, formando suas colônias. Esses ninhos servem de proteção para toda a sociedade que ali habita e para o fungo simbiote que vive em relação de mutualismo com elas. Um ninho de 200 m² pode abrigar aproximadamente seis milhões de formigas⁵.

O cultivo fúngico é característico de três linhagem de insetos: formigas, cupins e besouro¹⁰. A prática de cortar folhas, Figura 1.1, traz consigo outra característica que é cultivar fungos, encaixando as formigas na tribo Attini, compreende 13 gêneros¹¹. Onde mantem uma relação ecológica mutualista obrigatória entre si¹². Essa tribo cultiva o fungo nutrindo-o com substrato vegetal, oferece proteção dentro dos câmaras e defesa antimicrobiana¹². O fungo por sua vez degrada a matéria orgânica em polissacarídeos, que são componentes essenciais para a nutrição das formigas¹³. O produto de degradação do fungo serve de alimento para a rainha e larvas, ainda podendo manter o valor energético de 9 % de uma formiga adulta, no entanto seivas e frutas fazem parte no da dieta principal dos operários¹⁴⁻¹⁶, Figura 1.1.

Associado ao hábito de corte de material vegetal, sua grande e descontrolada herbivoria em ambiente de monocultura causado pelo desequilíbrio ecológico faz com que esses insetos sejam considerados pragas de difícil controle, ocasionando graves danos à agricultura e silvicultura. Os

prejuízos são de âmbito econômico e ambiental, com quase todas as culturas atacadas e danificadas, principalmente florestas de *Pinus* e *Eucalyptus*¹⁷⁻¹⁸.

Por serem insetos sociais, tornam-se complexos os métodos de controle, sendo estas divididas por castas, com funções pré-determinadas ao nascer. Dentre tais insetos há sinalizadores químicos mediando a comunicação entre os mesmos, a fim de avisar se algo está afetando a existência do ninho. Ademais, há a comunicação com o seu fungo simbionte, no qual faz-se necessário o controle dele, por ser fonte de alimento para a formiga. Na sociedade na qual as formigas vivem, algumas castas são atribuídas de acordo com as funções que os indivíduos são designados a executar (Figura 1.2), como:

- Rainha: reprodução e formação do formigueiro;
- Bitu: única casta formada por macho, função de reprodução;
- Operárias: cortar folhas e transporta para o formigueiro;
- Soldados: proteção da colônia;
- Lixeiras: limpeza das câmaras do formigueiro, levando os resíduos para longe dos locais que está presente o fungo;
- Enfermeiras: cuida das larvas e pupas;

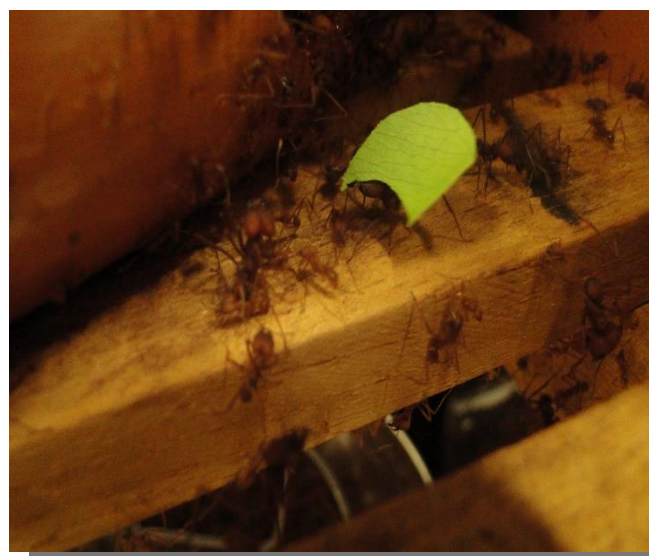
A**B**

Figura 1.1- **A)** Operárias de formigas cortadeiras transportando folhas para que sejam como fonte de nutrientes para o seu fungo simbionte; **B)** Operárias de formigas cortadeiras se alimentando de laranja, como ocorre na natureza.

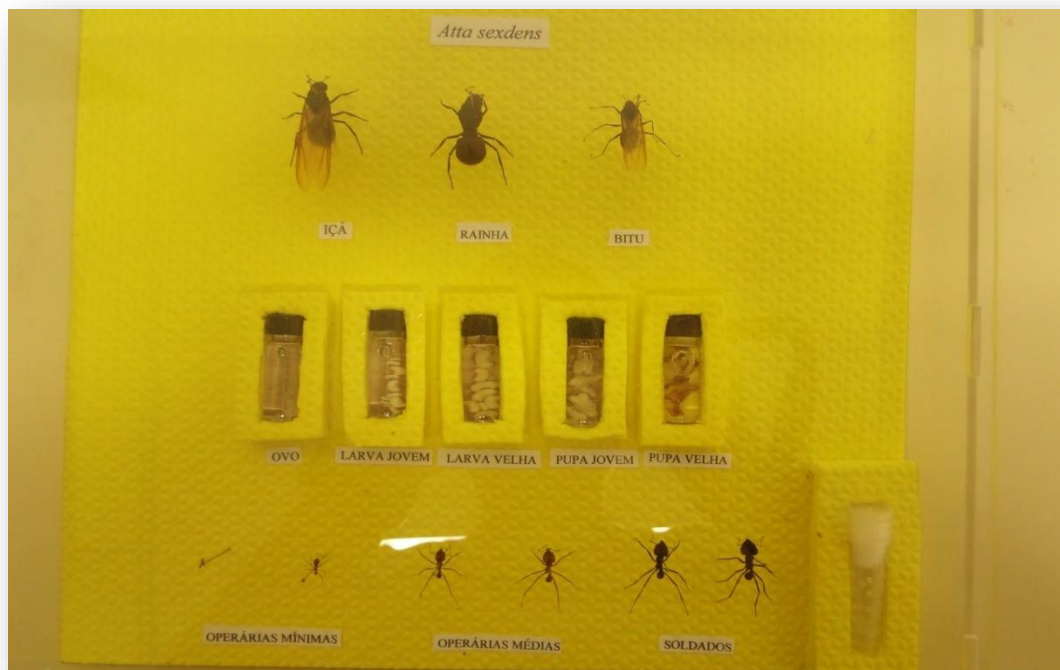


Figura 1.2- Quadro de castas de formigas, encontrado na Unesp-Rio Claro.

1.3. MÉTODO DE CONTROLE DE INSETOS PRAGAS

Na tentativa de erradicar pragas e proteger as plantações, vem sendo empregados diversos métodos de controle, dando enfoque para as formigas cortadeiras, podemos destacar: resistência de plantas, controle cultural, controle biológico e químico. Com maior utilização do controle químico (pesticidas) nas áreas florestais e com isso os ingredientes ativos mais usados são à base de sulfluramida, fipronil, deltametrina e fenitrotião^{1,5,19}.

A utilização de pesticidas é relevante considerando a importância do desenvolvimento da agricultura como um meio para produção de alimentos e aumento da economia de um país e, portanto, diversas técnicas são empregadas na tentativa de erradicação de várias pragas e proteção de colheitas agrícolas. Um dos pesticidas mais usados contra as formigas é a sulfluramida, registrado primeiramente em 1989²⁰. No entanto é um pesticida que possui na sua composição o N-etil perfluorooctanossulfonamida (EtFOSA; $C_8F_{17}SO_2NHC_2H_5$),

que se transforma em perfluorooctanossulfonato (PFOS; $C_8F_{17}SO_3^-$) um contaminante ambiental persistente²¹⁻²⁴. A alta exposição a esses compostos pode estar associada a inúmeros problemas, por exemplo: perda e ganho de peso, efeito carcinogênicos em humanos e animais, juntamente com redução de colesterol sérico e nos hormônios tireoidianos^{25,26}.

A biodegradabilidade aliada a menor toxicidade e especificidade do inseto alvo e das culturas, passaram a ser requisito de extrema importância avaliação, planejamento e registro de novos produtos¹.

1.4. IMPORTANCIA DOS PRODUTOS NATURAIS COMO DEFENSORES AGRÍCOLAS

Substâncias oriundas de fontes natural é alternativa para amenizar o desequilíbrio ambiental e que potencializa a produção agrícolas, acarretando melhorias de vida para os agricultores, consumidor final e menos danos ao ambiente. O crescente interesse na utilização de produtos de origem naturais para controle de pragas agrícolas constitui uma ferramenta valiosa que leva em consideração a eficácia, segurança e seletividade através do estudo de mecanismo ação, tendo como diferencial já estarem no meio ambiente e possuir facilidade para degradar e não causar malefícios^{1,27}.

Um exemplo de inseticida oriundo de fonte natural é a Azadiractina (1), pertencente à classe dos limonóides, extraída da planta *Azadirachta indica*, uma espécie pertencente à família Meliaceae. Essa substância possui atividade contra vários insetos e é rapidamente degradada no meio ambiente, a qual atende todos os requisitos do Programa de Integração de Insetos Pragas. Além disso, outras classes de substâncias extraídas de fontes naturais podem se destacar, como rotenoide (2), nicotina (3), e 2-norbornanol (4)²⁸⁻³⁰, são mostrados na Figura 1.3.

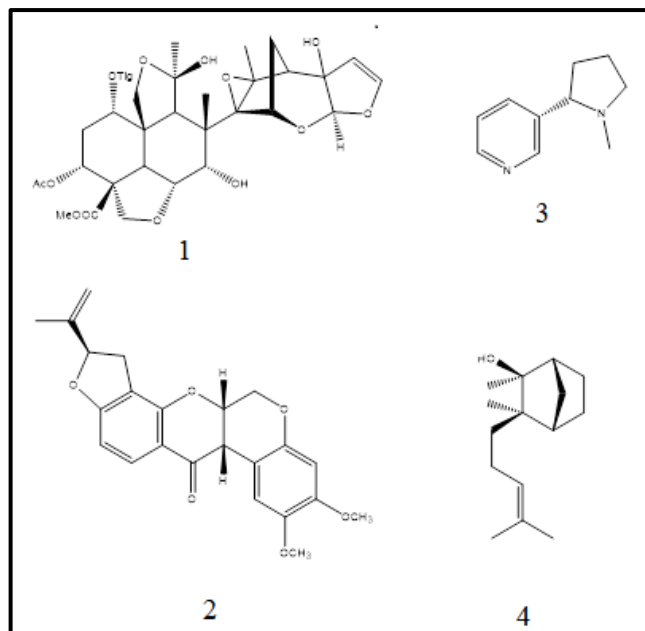


Figura 1.3- Exemplo de inseticidas naturais Azadiractina (1), Rotenona (2) Nicotina (3) e 2-nor-bornanol (4).

Um gênero de plantas que vem se destacando para busca de substâncias com atividade biológica é o das *Picramnias*, juntamente com metodologias viáveis de aplicação em grande escala de produtos naturais para combater pragas, sejam eles insetos, fungos e bactérias.

1.5. O GÊNERO *Picramnia* COMO FONTE DE MOLÉCULAS COM APLICAÇÃO BIOLÓGICA

As substâncias denominadas “quassina” (Figura 1.4), nome derivado e utilizado para identificação quassinoides, são marcadores taxonômicos da família de Simarubaceae. Estudos fitoquímicos comparativos forneceram evidências heterogêneas do gênero *Picramnia* o qual pertencia a família Simaroubaceae e a subfamília Pricamnioideae^{31,32}.

A ausência de compostos como quassinoides, levou a exclusão do gênero *Picramnia* da família de Simaroubaceae, o qual foi um passo importante para a classificação taxonômica da família. Com isso, o gênero *Picramnia*

passou a pertencer a uma nova família chamada de Pricamniaceae, pois não foram encontradas estruturas de quassinoides em sua composição química^{31,32}.

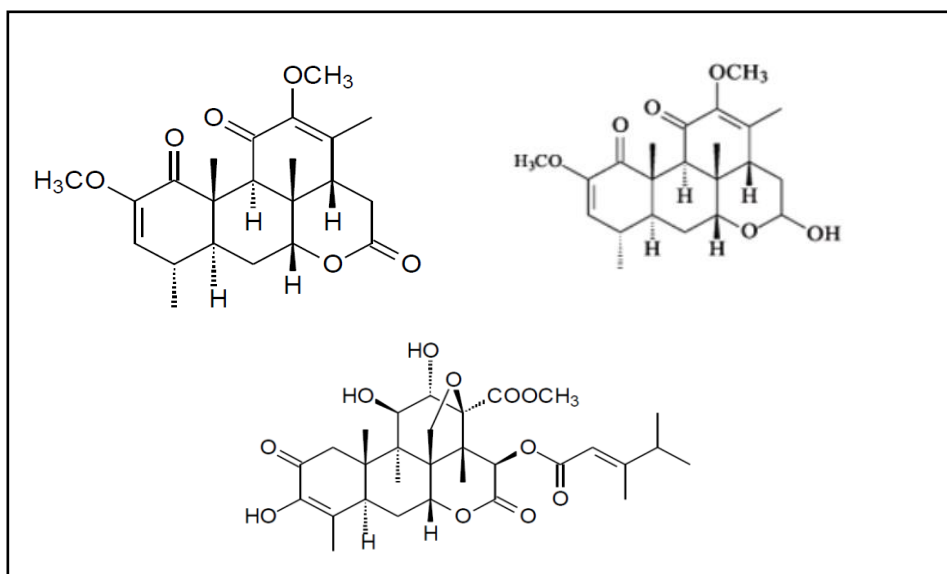
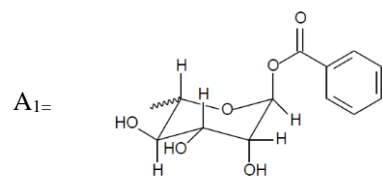


Figura 1.4- Exemplo de estruturas de quassinoides.

O gênero *Picramnia* possui mais de 40 espécies, identificadas em diversos países como Florida (EUA), México, Índia ocidental, Colômbia, Venezuela, Peru, Brasil, Paraguai e norte da Argentina. No Brasil já foram caracterizadas e identificadas 22 espécies. O gênero está classificado taxonomicamente no reino Plantae, classe Equisetopsida, subclasse Mogmoliidae, Ordem Pricamniales, família Pricamniaceae e subfamília Picramnioideae³³⁻³⁵.

Este gênero é identificado através de classes de compostos como as antraquinonas **1-13**, cumarinas **14-20**, antronas **21-25**, oxantronas **26-35**, terpenos do tipo lupano **36-41**^{32,34-39}. Alguns desses compostos possuem atividades biológicas como fungicida, inseticida e citotóxica³⁶⁻³⁹. Na Figura 1.5, estão listados alguns compostos já isolados e identificados do gênero *Picramnia*.



- (39)3 α OH; R=H
(40)3 β OH; R=H
(41)R=(CH₂)₁₉CH₃

Figura 1.5- Estruturas encontradas na literatura isoladas do gênero *Pricammia*.

Diante dessa diversidade de metabólitos secundários, o isolamento/identificação destes é um trabalho dispendioso e que requer o uso do conceito de ortogonalidade cromatográfica. Diante deste desafio, outras técnicas têm sido empregadas para sobrepor esta problemática para conferir eficiência, robustez e reprodutibilidade das análises cromatográficas.

1.6. CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRIFUGA-CPC

A cromatografia de partição centrífuga é uma técnica baseada no princípio da partição líquido-líquido, na qual a distribuição dos solutos é realizada entre as duas fases imiscíveis, embasados no seu coeficiente de partição, ou seja, a separação ocorre sem um suporte estacionário fixo. Com isso, a fase estacionária é mantida dentro das células da coluna por força centrífuga e a fase móvel é continuamente eluída por altas vazões⁴⁰⁻⁴³.

O sucesso da técnica de CPC depende do sistema de solventes ideal. Um sistema adequado pode ser selecionado através de duas maneiras: *i*) busca na literatura de sistemas que se adequem a amostra ou *ii*) através da criação de um sistema de solventes, utilizando diagramas, como é o caso do método usando Hex, MeOH, H₂O e AcOEt- HEMW.

Para a seleção do sistema deve haver a difusão igualitária da amostra entre as duas fases formadas, o qual é realizado a razão entre a fase superior pela parte inferior os compostos a ser separados devem estar distribuídos igualmente entre as duas fases ($K_d=1$). O coeficiente de distribuição(k_d) pode ser quantificado. Essa taxa de difusão determina como os compostos se comportarão durante a análise^{44,45}

As misturas de Hex, acetato de etila, H₂O e MeOH é mais usado para criação de sistema de solvente. Esse tipo de sistema é chamado de HEMWat, no qual para haver o ajuste do método basta variar a proporção dos solventes. Um exemplo de escolha sistemática de solventes, pode ser realizada

através do ajuste do grau de polaridade da mistura, diminuindo ou aumentando a proporção de um ou mais solventes, ajustando com a polaridade dos compostos presente na amostra, que é medida em uma escala de -7 a +8, o que pode ser observado na Figura 1.5. As proporções desses sistemas podem utilizar misturas bifásicas ou utilizar de 3 a 4 solventes para haver essa adequação^{44,46,47}. Esse método torna prática a escolha do sistema de solventes, pois a composição e polaridade pode ser ajustável devido à variedade de solventes em relação a separação de compostos da amostra de interesse⁴⁰.

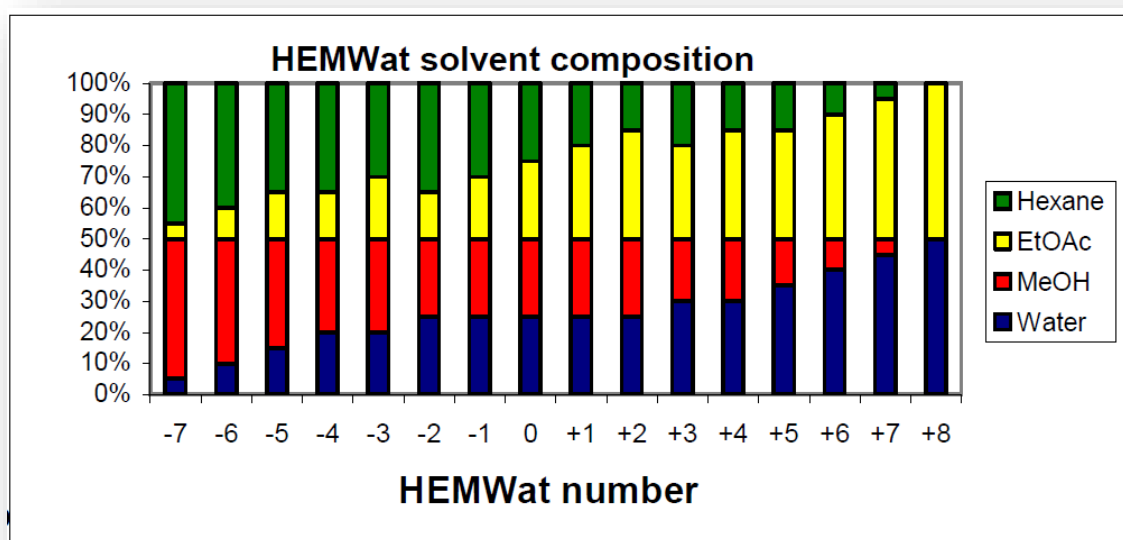


Figura 1.6- Sistema de solventes e proporções do sistema HEMWat. Adaptada de Friesen & Pauli⁴².

A não eficácia na separação de compostos por CPC dá-se principalmente pela escolha não ideal da combinação de solventes, contudo, quando se tem um sistema escolhido como ideal, mas ainda assim a separação não é perfeita, tende-se a buscar outro parâmetro para o aumento na resolução e por conseguinte na separação de substâncias. O **K** é uma coeficiente de partição de massa que expressa o valor quantitativo da concentração de um composto específico na fase móvel e fase estacionária, onde se faz a razão do composto em questão presente na fase estacionária pela concentração do mesmo presente na fase móvel⁴⁴.

Os valores de **K** têm uma faixa considerada ideal, que vai de 0,5 a 3. Esse valor está intrinsicamente ligado à resolução cromatográfica da análise, ou seja, valores menores que 0,5 indicam uma baixa resolução entre os picos e valores acima de 3 indicam alargamento das bandas cromatográficas e tempos de análise demasiadamente longos, como mostrado na Figura 1.7⁴⁴.

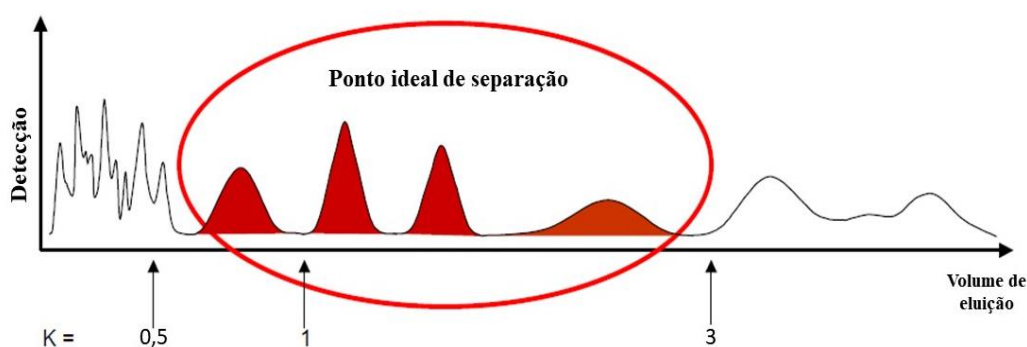


Figura 1.7- Cromatograma de resolução cromatográfica de banda em função de **K**. Adaptada de Friesen & Pauli⁴².

Em diversas situações o alvo a ser analisado não é conhecido, como em estudos biomonitoramento, e para tanto são comumente usadas as técnicas analíticas de CG ou HPLC, no qual avalia-se a concentração de picos conhecidos ou não, em ambas as fases.⁴⁴ Quando é escolhido o sistema de solventes, passa a usar o **K** como parâmetro avaliativo escolha quanto ao modo de eluição. É usado a fase superior como móvel e fase inferior como estacionária que é chamado de modo ascendente ou fase inferior como móvel e fase superiores como estacionária denominado de modo descendente, Figura 1.8.

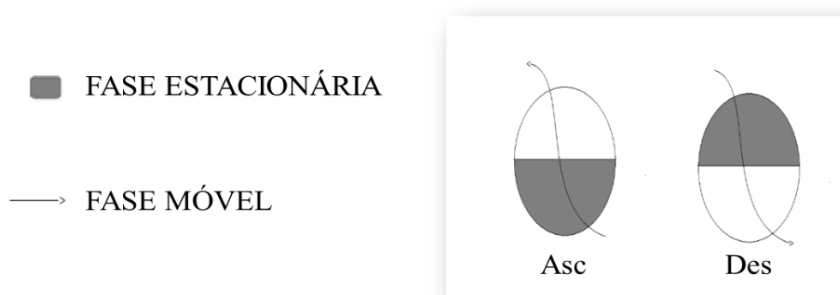


Figura 1.8- Ilustração da escolha de eluição. Adaptada de Friesen & Pauli⁴².

1.7 RELEVÂNCIA DE COMPLEXAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Os compostos de coordenação aplicados para a atividade biológica tiveram início em 1900. Em seguida, as pesquisas na área foram massificadas, abrindo um leque de possíveis utilidades e versatilidade para a sua aplicação nas indústrias farmacêuticas, agrícola e química⁴⁸.

A utilização da química de coordenação na potencialização de atividade biológica de compostos orgânicos vem aumentando. A investigação de novos agentes ativos faz-se necessária pela resistência adquirida de microrganismos, pragas agrícolas e no combate de doenças humanas⁴⁹⁻⁵⁵. O uso de classes de compostos flavonoides, pirozois e carboxina vem mostrando eficiência quanto suas propriedades inseticidas, fungicidas e bactericidas, quando complexados com íons metálicos, demonstrando uma alternativa eficiência em vários seguimentos⁵⁶.

1.8 COBRE

O cobre é um metal de transição pertencente à família 1B, que pode apresentar diversas geometrias, como a tetraédrica, quadrática planar, piramidal de base quadrada, bipiramidal trigonal e octaédrica, dependente da natureza do ligante e do seu estado de oxidação, sendo Cu^{2+} o mais estável.

Esse metal possui inúmeras propriedades em sistemas biológicos, exemplo disso, é sua ação em muitas enzimas permitindo o bom funcionamento, atua também para manter a força da pele, tecido conjuntivo e epitelial, na produção de hemoglobina, mielina, melanina, e pode atuar como agente antioxidante⁵⁷⁻⁶⁰.

É usado o cobre como profilaxia em doenças agrícolas, como cancro cítrico, por haver propriedades antimicrobianas. Um produto utilizado é a calda bordalesa, a qual é produzido a partir da mistura de cal e sulfato de cobre.

Por essa razão, o cobre foi utilizado para a formação do complexo neste trabalho, na tentativa de melhorar a atividade bacteriana contra doenças como o cancro cítrico.

1.9. CANCRO CÍTRICO

A bactéria de origem asiática, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é considerada uma das principais pragas agrícolas, causadora da doença cancro cítrico. O gênero *Xanthomona*, é considerado uma bactéria do tipo *Gram-negativa*, que utiliza diversos hospedeiros vegetais, principalmente culturas economicamente importantes, como: citros em geral, banana, arroz, couve, tomate, pimenta e feijão. As *Xanthomonas* exibem especificidade no ataque, e podem infectar o sistema vascular e as células do mesófilo, o que causa a necrose no local infectado, queda folhear prematura e até acometer os frutos em plantas adultas^{61,62}, Figura 1.9.

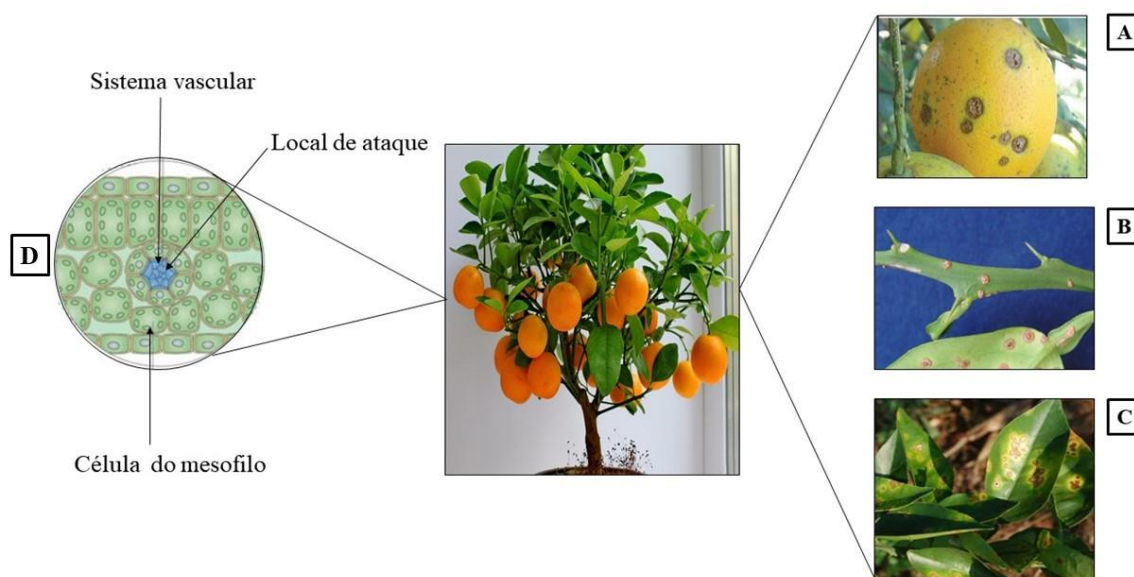


Figura 1.9- Manifestação do ataque bacteriano da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: **A)** no fruto; **B)** nos galhos e **C)** nas folhas. **D)** ilustração do ataque da bactéria ao sistema vascular e tecido celular do mesófilo. Figura retirada e adaptada de Nature Reviews Microbiology, V9, p 344-345 (2011)⁶¹.

Após a infecção, a bactéria pode ser disseminada facilmente pela plantação através da ação do homem, chuvas e vento. Após a disseminação, ocorre a infecção, que pode ocorrer por lacerações na planta causadas por insetos, minador de citros ou até mesmo pelo próprio estômato. Ao adentrar a célula vegetal, a bactéria passa por um período de colonização, no qual há a multiplicação e liberação de enzimas que degradam a célula e nessa etapa os sintomas da doença se manifestam. Um outro fator preocupante, é que essa bactéria pode permanecer adormecida em condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, como condições climáticas desfavoráveis, e até sem a presença de um hospedeiro ou tecido vegetal disponível. Após apresentar novamente condições ideais para o seu desenvolvimento, a bactéria volta a se manifestar, e todo este processo pode ser chamado de ciclo de sobrevivência. Todo esse processo é denominado de ciclo epidêmico do cancro cítrico^{63,64}. A Figura 1.9 ilustra todas as etapas contidas neste ciclo.

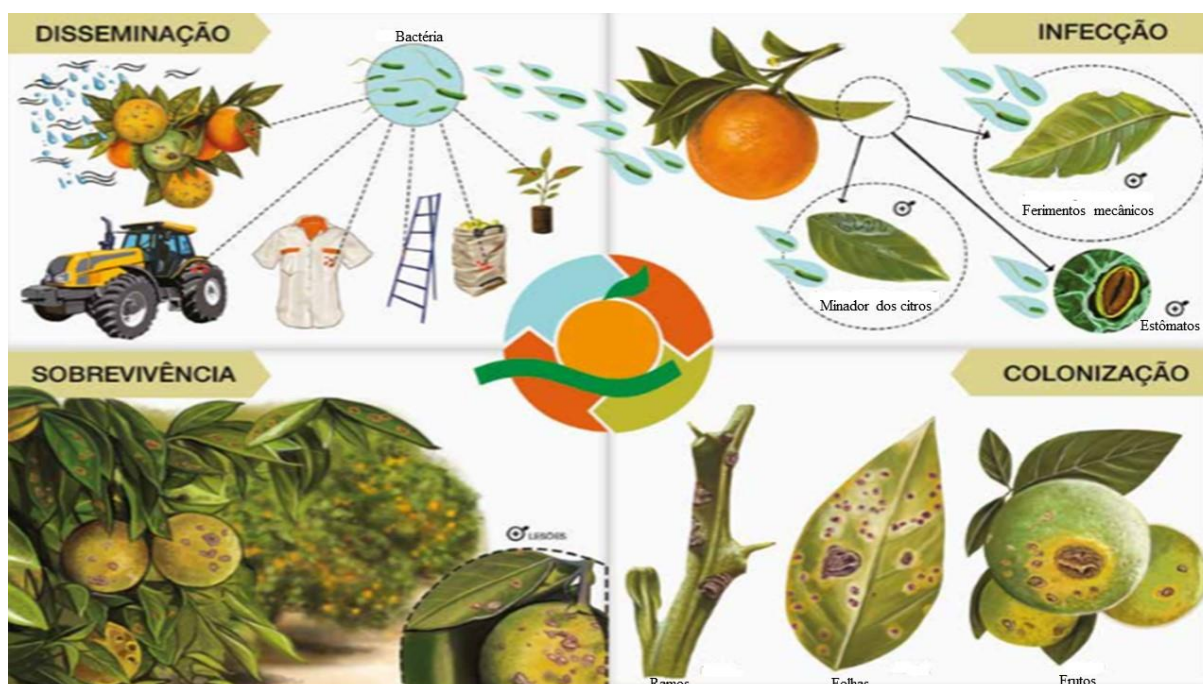


Figura 1.10- Ciclo epidêmico do cancro cítrico. Adaptada de manual técnico de FUNDECITRUS⁶³.

O Principal de controle da *X. citri* é a retirada da planta infectada, evitando assim a contaminação de plantas saudáveis. Contudo, uma forma

alternativa de evitar a contaminação é realizada através da profilaxia, caracterizada pelo uso de hidróxido e sulfato de cobre diretamente aplicada diretamente no solo, uma vez que a bateria é sensível a derivados de cobre. No entanto, algumas bactérias já apresentam resistência ao cobre, o primeiro relato foi na Florida(EUA)⁶⁵, desde então, há necessidade de novas de novas formulações afim de controlar essa praga⁶³.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram desenvolver estratégias para a obtenção de produtos naturais inseticidas, fungicidas e/ou bactericidas para o controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e da bactéria *Xanthomonas citri* causadora do cancro cítrico através do isolamento de substâncias de espécies do gênero *Picramnia* por cromatografia de contracorrente e formação de complexos com metais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os potenciais inseticida e fungicida dos extratos, frações dos mesmos e substâncias puras ou modificadas quimicamente de espécies de *Picramnia* frente à *A. sexdens rubropilosa* e *L. gongylophorus*;
- Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado de extratos e partições das mesmas, frente às atividades biológicas citadas acima visando o isolamento dos compostos bioativos presente na planta escolhida para estudo. Neste objetivo se fará uso principalmente cromatografia em contracorrente visando a obtenção de grandes quantidades de materiais;
- Analisar as frações bioativas via HPLC e ou UCLAE-EM/EM;
- Identificar ou determinar as estruturas dos compostos isolados que não apresentarem tais atividades, contribuindo com informações sobre a quimiosistemática dos gêneros estudados, por estes serem pouco conhecidos sobre o ponto de vista químico;

- Realizar ensaios biológicos inseticidas e fungicidas das substâncias e frações ativas no Grupo de Pesquisa do Centro de Estudo de Insetos Sociais da Unesp de Rio Claro (CEIS - UNESP) e ensaios frente ao fungo *L. gongylophorus*, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).
- Avaliação bacteriostático dos extratos/substâncias contra *Xanthomonas citri* ssp.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAS

3.1.1. Solventes

- Água ultrapura deionizada;
- Solventes Grau HPLC: n-Hexano, AcOEt, ACN e MeOH (J.T Baker, Panreac, Honeywell e Tedia);
- Solventes deuterados: CCl₃D, MeOD (Merck e Aldrich);
- Solventes n-Hexanos e AcOEt destilados no DQ-UFSCAR, utilizados como fase móvel para cromatografia líquida;

3.1.2. Colunas cromatográficas e fases estacionárias

- Coluna analítica PHENOMENEX Gemini 150 x 4,6 (5 µm);
- Placas de Cromatografia em Camada Delgada (MACHEREY – NAGEL) ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ Für die DC;
- Sílica gel 70-230 mesh;
- Sephadex® LH-20;

3.1.3. Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, e detector de UV-Vis (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A; Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV; com coletor automático Agilent G1364C.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Corporation modelo: M20A e detector Fotodiodo array UV-vis SPD-M20A DAD.
- CPC- Armen Instrumen, com coluna de 1L acoplado ao Cromatógrafo líquido de alta eficiência shimadzu Corporation modelo: M20A e detector DAD Agilent UV- Vis G1315D DAD;

- Cromatógrafo de massas Synapt G2-S (water Technologies), fonte de ionização: ESI, analisador híbrido Q-TOF (Quadrupole – Time Of Flight);

3.1.4. Reveladores cromatográficos

- Vanilina sulfúrica;
- Borrifador;
- Secador;
- Luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 310 m;

3.1.5. Análises por Ressonância Magnética Nuclear

- RMN BRUKER AVANCE DRX- 9,8 Teslas, com trocador automático de amostras (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para ^{13}C);
- RMN Bruker Avance III – 14,1 Tesla, cryo-sonda TCI de 5 mm (ATMA®), sonda de 5 mm BBI (ATMA®), (600 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C);

3.1.6. Balanças

- Shimadzu, modelo AY220;
- Toledo, modelo 9094C/5;

3.1.7. Outros aparatos

- Rotaevaporador BUCHI, R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5° C;
- Rotaevaporador BUCHI, R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5° C;
- Filtro de seringa, não estéril, 25 mm x 0,45 μm (Millopori);
- Micropipetas Eppendorf 1-10 μL ; 20-200 μL e 200-1000 μL ;
- Tubos de centrifugas de 1 mL da marca Eppendorf;

- Vial de HPLC de 1,5 mL;

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Análise e seleção dos extratos por CCD e RMN ^1H

Os extratos metanólico de *Pricamnia riedelli* galhos (PRG_met) e folhas (PRF_met), foram escolhidos após realização uma triagem a partir de 26 extratos brutos disponíveis no laboratório de produtos naturais da UFSCar. Os extratos escolhidos a partir da análise RMN de ^1H por CCD com sistemas de eluição: Hex/AcOEt (9:1; 4:1; 7:3; 3:2) e Hexano/Acetato/Metanol (7:2:1 e 5:3:2), os reveladores usados foram lâmpada de UV (λ de 254 e 310 nm) e vanilina sulfúrica, para observar a variedade de classes de compostos presentes no extrato.

3.2.2. Fracionamento por cromatografia em coluna do extrato PRG_met

Baseados nos resultados obtidos através dos ensaios biológicos fungicida, o extrato PRG_met foi submetido a vários fracionamentos cromatográficos, sendo guiados pela resposta biológica descrito na seção 4.5.1.2, como descrito no fluxograma na Figura 3.1.

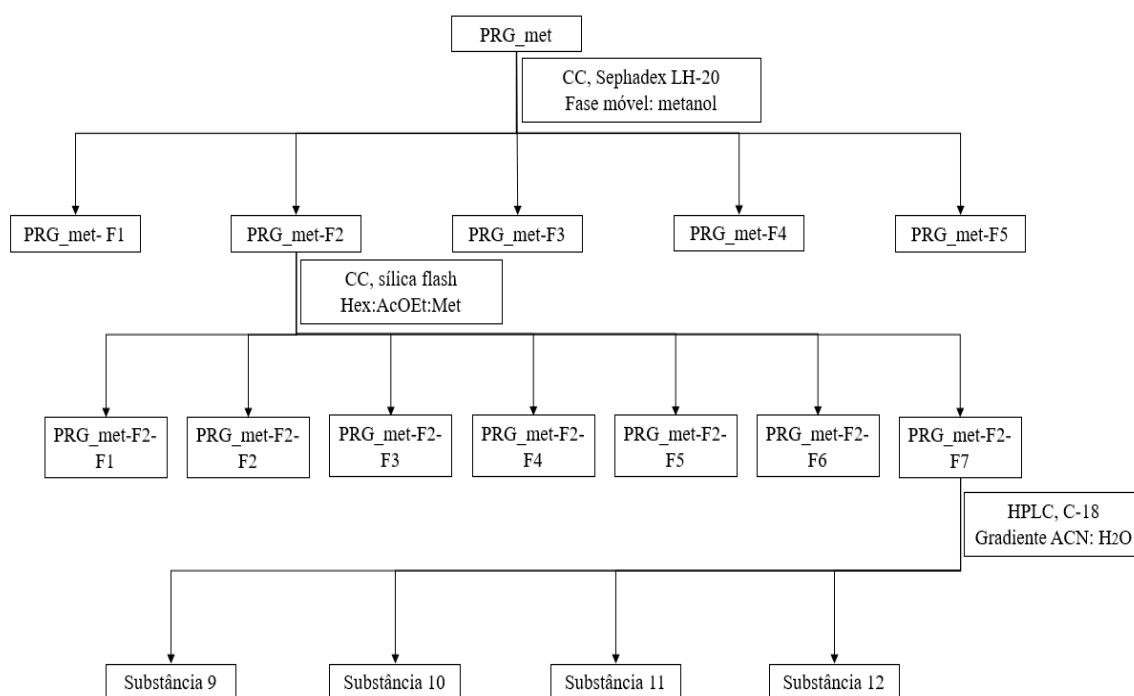


Figura 3.1- Fluxograma do fracionamento para o extrato de PRG_met.

O extrato PRG_{met} avaliado pelas técnicas de RMN de ¹H e CCD, observando a presença de composto de média a alta polaridade. Com isso, foi realizado a avaliação de sistemas de solvente para aplicar a técnica de Cromatografia de Partição Centrifuga- CPC. Foram avaliados os sistemas de solventes presentes na Tabela 4.2, no qual não foi possível a realização do fracionamento devido não encontrar condições adequadas para o fracionamento.

Para o primeiro fracionamento de PRG_{met}, foi utilizado cromatografia em Sephadex® LH- 20, (h= 38 cm e r= 1,5 cm), sendo metanol o eluente do sistema cromatográfico. A partir de 1g de PRG_{met}, o qual foi solubilizado em MeOH, a amostra foi centrifugada e coletado o sobrenadante (620 mg), o qual foi aplicado no sistema cromatográfico, rendendo 50 frações com volume de aproximadamente 20 mL cada, de modo que a partir da análise por CCD, estas foram reunidas por similaridade em 5 frações como pode ser observado na Figura 3.2. Em seguida, as frações PRG- F02 à PRG-F5 foram para ensaio biológico e a fração PRG-F2 mostrou-se a mais ativa e possuía maior massa.

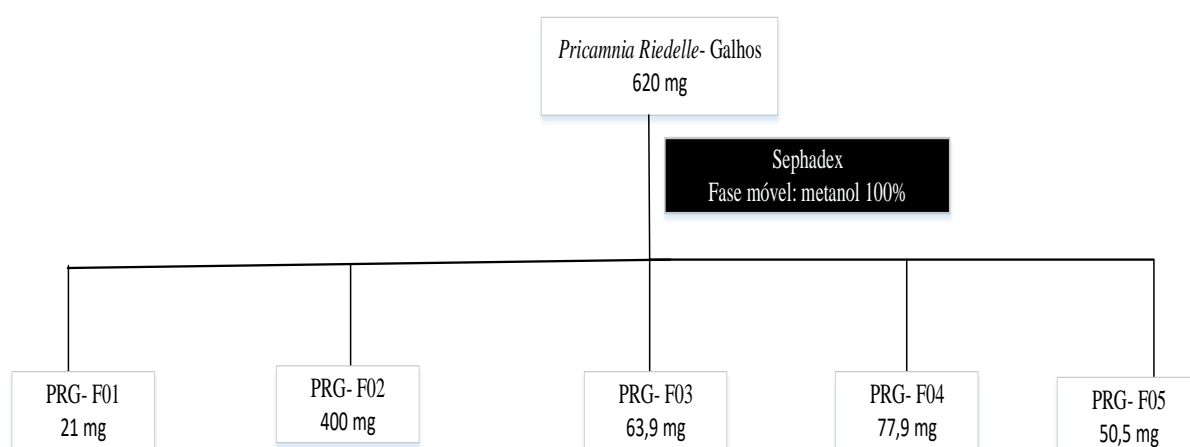


Figura 3.2- Fluxograma do primeiro fracionamento de PRG_{met}, coluna Sephadex LH-20.

3.2.3. Fracionamento da fração PRG- F02

A fração PRG_F02 foi submetida a cromatografia de sílica-gel ($h=40$ cm e $r=1,5$ cm). O fracionamento iniciou-se com n-hexanos e AcOEt na proporção 8:2 e foi aumentando a polaridade de 20% até atingir a polaridade de 100% de AcOEt, foi utilizado MeOH na proporção de 1:1 com AcOET, 100% MeOH e por fim utilizando H₂O a 10% para desativá-la, Figura 3.3.

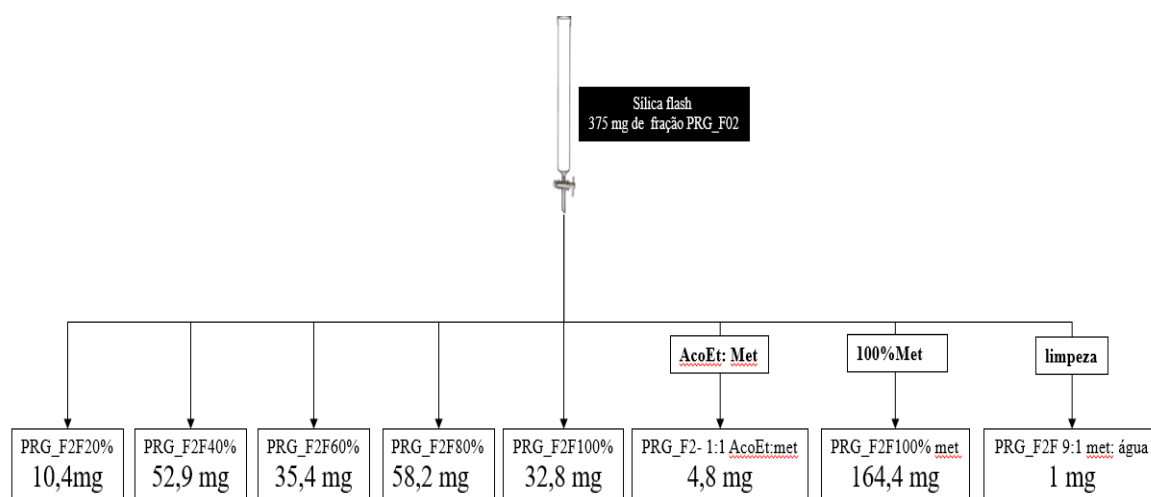


Figura 3.3 - Fluxograma do fracionamento de PRG-F2.

3.2.4. Fracionamento da fração PRG_met F2- F100% met

A fração PRG_met F2- F100% met, foi submetida a otimização de método cromatográfico em HPLC Shimadzu. Para isso, preparou-se a amostra na concentração de 10 mg/mL, a qual foi filtrada em filtro 0,45 μ m e injetado 20 μ L, em um sistema cromatográfico de sistema de eluição H₂O-ACN, em modo: gradiente exploratório. A condição cromatográfica está apresentada na Tabela 3.

1.

Tabela 3.1.- Método de eluição para a fração PRG_met F2- F100% met em HPLC-UV

Tempo (min)	A %	B %
0	95	5
10	75	25
15	75	25
30	0	100
35	0	100
40	95	5
55	95	5

A= Fase aquosa, B= Acetonitrila.

Para a coleta das frações, foi usado HPLC Agilent no comprimento de onda de 254 nm. Foi preparado uma solução de 40 mg/mL ressuspendido em ACN, filtrou-se em filtro 0,45 μm . Utilizou-se do mesmo método cromatográfico descrito acima, acrescentando a temperatura de 35 °C e aumentando a concentração da amostra. Foram coletadas 11 frações, sendo possível a identificação de apenas 4 compostos sendo eles **9** a **12**. Todos foram avaliados quanto a atividade biológica

3.2.5. Uso do CPC para fracionamento de PRF_met

Para o extrato PRF_met, foi utilizado a Cromatografia de Partição Centrifuga (CPC) para o primeiro fracionamento, a fim de se obter maior massa para que fosse submetido posteriormente para ensaio biológicos frente a formiga *A. sexdens rubropilosa*.

Para cada sistema de solventes, utilizou-se o seguinte procedimento: realizou-se a mistura do sistema de solventes a ser analisado nas proporções indicadas em um tubo de ensaio e observou-se se houve a formação de, e seriam descartados aqueles sistemas que tivessem formação de emulsão; Em seguida, os sistemas foram submetidos a agitação em vortex durante 5 minutos e averiguou-se o tempo de separação entre as fases, que não deveria ultrapassar 30 segundos; posteriormente, uma alíquota de 2 mL de cada fase foi retirada e

aproximadamente 10 mg de extrato bruto foi solubilizado, após a solubilização as fases eram separadas, secas e pesadas, e feito a razão entre fase inferior pela fase superior. Assim, foi calculado de distribuição (K_d) para todos os sistemas.

3.2.6. Procedimento para cálculo e coeficiente de partição (k)

Após selecionado o sistema de solvente, passou-se para escolha do modo de eluição. Foi ressuspendido ambas as fases, fase orgânica (FO) e fase aquosa (FA), em 1 mL de ACN e analisadas no HPLC com detector DAD, usando uma coluna C-18 de tamanho 5 μ m 4,6 x 250 mm, a fim de determina o coeficiente de partição (K).

Foi usado gradiente exploratório para as amostras, FO e FA, apresentado na Tabela 3.2. Para a determinação de K , realizou-se a razão entre a área das principais bandas cromatográficas observadas nas fases. É valido ressaltar que K é a razão entre a fase móvel/ fase estacionaria. De forma resumida a metodologia de escolhe de solventes a serem usados no CPC, é ilustrada Figura 3.4.

Tabela 3.2- Gradientes de eluição para as fases do CPC em HPLC-DAD

Tempo (min)	A %	B %
0	95	5
45	0	100
50	0	100
51	95	5
61	95	5

A= Fase aquosa, B= Acetonitrila.

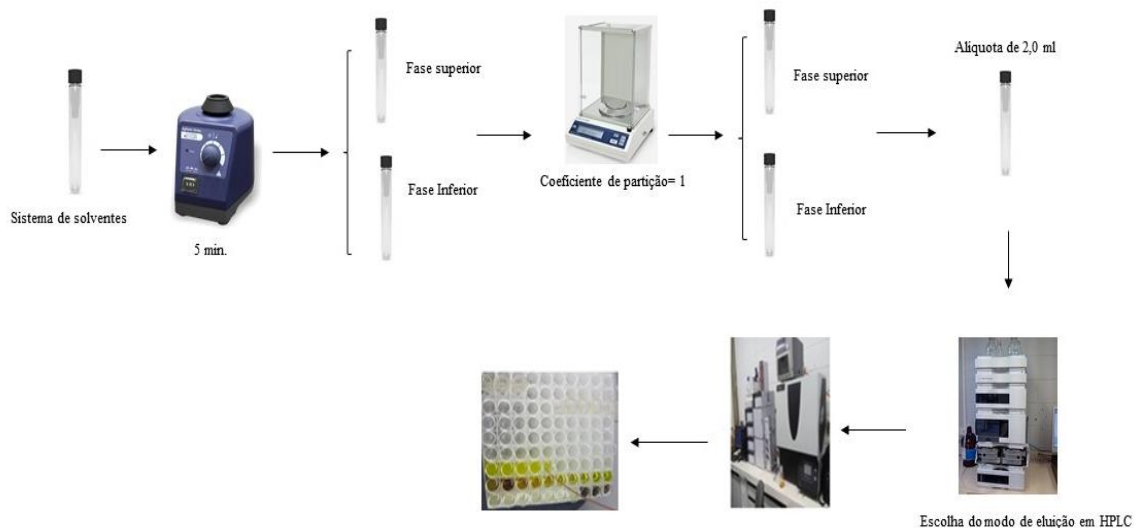


Figura 3.4- Fluxograma para escolha de método.

De posse dos **K**, foi escolhido os que mais se adequavam para a separação. Para a escolha do modo de eluição ascendente, foi usado os valores das áreas das bandas cromatográficas da fase superior-Hex: AcOEt e divididas pela valores das áreas das bandas cromatográficas da fração inferior Met-H₂O. para a avaliação se seria usado o modo descendente, foi usado os valores das áreas das bandas cromatográficas da fase superior (Met-H₂O) e divididas pela valores das áreas das bandas cromatográficas da fração superior (Hex: AcOEt). Os valores entre 0,5 e 3 são os ideais e foi o parâmetro avaliativo para a seleção.

3.2.7. Fracionamento do extrato *Pricamnia riedelli*- folhas-metanol (PRF_met)

Solubilizou-se 5 g de extrato em 15 mL de fase superior (Hex:AcOEt) e 15 mL de fase inferior (H₂O:MeOH) e injetado no equipamento. Ademais, para utilização do CPC foi usado o procedimento operacional padrão no qual baseia-se nos seguintes passos:

1. Preencher a coluna com a fase estacionaria, a uma rotação de 500 RPM;
2. Realizar o equilíbrio entre a fase móvel e fase estacionaria, bombeando fase móvel para a coluna e com isso aumentando a rotação para a condição que será usada na análise;

3. Realização da análise e coleta das frações;
4. Coleta da extrusão (fase estacionaria), na mesma rotação da análise e utilizando a própria fase estacionaria para que possa empurrar a mesma para fora da coluna;
5. Diminuição da rotação para 500 RPM e preenchimento da coluna com metanol para conservação do equipamento;

Em seguida, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas por similaridade, posteriormente foi realizada análise por RMN ^1H de cada fração. Após o término da corrida cromatográfica, a fase estacionaria foi coletada em 4 Erlenmeyer de 250 mL, foram analisadas por CCD e aquelas que tiveram a mesma similaridade foram agrupadas. As condições cromatográficas usadas para o fracionamento foram:

- Número de colunas: 1;
- Massa injetada: 5 g;
- Loop: 30 mL;
- Sistema de eluição: Hex/AcOET/Met/H₂O (1:0,8:1,3:0,9);
- Fase móvel: Hex/AcOET;
- Fase estacionaria: Met/H₂O;
- Fluxo: 20 mL/ minutos;
- Tempo de análise: 120 minutos.

As frações PRF_met-F01 à F05, foram submetidas à ensaios biológicos frente a formiga da espécie *A. sexdens rubropilosa*, e aquelas que apresentaram melhores resultados foram novamente fracionadas.

3.2.8. Análise e fracionamento da fração PRF_met F1

A fração com melhor resultado para o teste biológico foi a PRF_met F1, e por isso ela foi utilizada em novos fracionamentos guiadas através de técnicas como RMN de ^1H e HPLC com detector DAD. Além disso, a resposta biológica foi utilizada como parâmetro guia para o novo fracionamento.

Para a análise da fração PRF_met- F1, foi usado HPLC com detector Fotodiodo array UV-vis e coluna C-18 e 5 μm 4,6 x 250 mm. Foi usado como eluente a mistura de H_2O -ACN, com um gradiente exploratório de 95:5 a 100% de ACN com o fluxo de 1 mL/min.

A amostra foi ressuspensionado em ACN na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguida da filtração em filtros de seringa 25 mm x 0,45 μm .

Após a análise, a fração PRF_F01 foi fracionada em cartucho SPE C-18, (h= 2,5 cm e o r= 1,25 cm) utilizando como solventes de eluição H_2O :ACN (3:1) para a extração da fração F1, H_2O :ACN (55:45) para a obtenção da fração F2, H_2O :ACN (1:3) para F3 ACN (100%) para F4 e Met: CHCl_3 (1:1) para a obtenção da fração F5.

As frações foram analisadas por RMN de ^1H , a fração PRF_met-F4 foi submetida a análise por CG. Já a fração PRF_met-F1-F3 foi submetida a novo fracionamento.

3.2.8.1. Fracionamento da fração PRF_met-F1-F3

Foi realizado o fracionamento da fração PRF_met-F1-F3, utilizando fase normal, sílica-gel (tipo flash) 100-300 mesh, (h= 20 cm e r= 1,5 cm). Usando como eluente a mistura de Hex- AcOEt na proporção de 7:3 de modo isocrático, foram coletados 25 frações de 20 mL em cada. Em seguida foram analisadas por CCD e reunidas por similaridade. Figura 3.5. O composto Crisofanol foi submetido a ensaio biológico contra as formigas, já a fração PRF_met F1-F3-F2 foi submetida cromatografia gasosa para ser analisada, não havendo massa o suficiente para novos ensaios inseticidas.

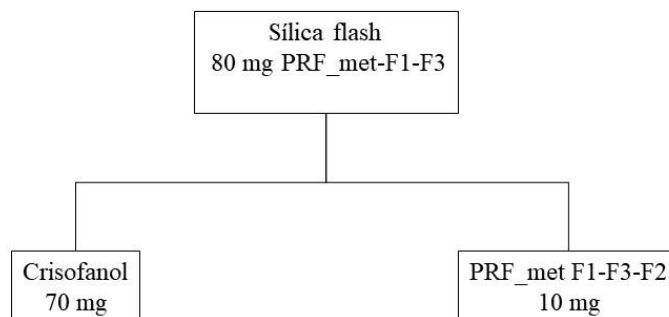


Figura 3.5- Fluxograma do fracionamento da fração PRF_met-F1-F3.

3.2.9. Ensaios no fungo *L. gongylophorus*

Os ensaios realizados com fungo *L. gongylophorus* foram feitos pela técnica Msc. Dorai Periotto Zandonai do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, o qual baseia-se na incorporação do extrato/substâncias no meio de cultura e avaliado o crescimento micelial do fungo as substâncias e/ou mistura delas como potencial fungicida.

O fungo isolado de um ninho de formigueiro de *A. sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura constituído por extrato de malte (20,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L) e ágar (20,0 g/L).

As amostras ensaiadas, foram solubilizados e incorporadas ao meio de cultura, obtido a concentração de 1000 µg/mL (extrato bruto), 500 µg/mL (fração) e 100 µg/mL (substância pura), em seguida deixadas de um dia para o outro até que todo o solvente orgânico (MeOH) pudesse ser evaporado por completo. Em seguida adicionado 50 ml de água destilada, transferida para um béquer e levado em banho maria a uma temperatura de 60 °C, por 30 minutos.

Foram adicionados 10 mL de meio de cultura-extrato. Os meios de cultura-extrato e placas de Petri® (80 x 15 mm) foram auto clavadas nas condições de 120 °C, 1 atm e durante 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos para as placas de Petri® dentro da capela de fluxo laminar, anteriormente esterilizado pelo tempo de 30 minutos

em luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura nas placas, foi inoculado o micélio do fungo *L. gongylophorus* no centro da placa de Petri®, em forma de disco de aproximadamente 9 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo.

Os experimentos foram realizados em quintuplicada avaliando o crescimento micelial a cada 7 dias ao decorrer do experimento, mantido o mesmo nas condições de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 30 dias armazenado em BOD, até o fim das análises. O percentual de inibição foi avaliado comparativamente com o crescimento da área micelial com extrato/substância incorporado com o controle com apenas meio de cultura. O controle foi considerado com a porcentagem de 0 % de inibição.

3.2.9.1. Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios

As operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP - *Campus* Rio Claro. Para a manutenção desses formigueiros, diariamente foram oferecidas folhas de *Eucalyptus* sp. e flocos de aveia e, ocasionalmente, outras plantas palatáveis às saúvas como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou folhas e pétalas de roseiras, Figura 3.6.

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro, conseqüentemente na ausência do fungo simbionte e de folhas considerados seus alimentos, foi utilizada uma dieta artificial sólida, preparada com 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0.1 g de extrato de levedura e 1.5 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada. Após a mistura das substâncias, a dieta foi levada ao forno de micro-ondas para melhor solubilização dos ingredientes e, posteriormente autoclavada a 120°C e 1 atm por 15 minutos. Em seguida foi vertida ainda quente em placas de Petri de 10

cm de diâmetro, previamente esterilizadas em estufa a 180 °C e, após o resfriamento e a solidificação, foi embrulhada em filme de PVC e mantida em geladeira, sendo utilizada nos dias subsequentes, durante o período do experimento⁶⁶.



Figura 3.6- Vista geral do formigueiro de *Atta sexdens* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP.

3.2.10 Bioensaio para determinação da toxicidade

Os ingredientes ativos foram obtidos na forma de produto técnico. Para o estabelecimento das concentrações testadas, não foram realizadas as correções das impurezas dos produtos técnicos.

Os ingredientes ativos foram pesados em balança analítica, dissolvidos e incorporados em dieta artificial, de concentração de 2,0 mg/mL (extrato bruto), 1,0 mg/mL (fração) e 0,1 mg/mL de substância pura.

Em todos os bioensaios as formigas foram retiradas dos formigueiros e distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração testada, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro, Figura 3.7. Essas placas foram colocadas em estufa para BOD com temperatura de 24°C + 1°C e umidade relativa acima de 70%. Os bioensaios foram examinados diariamente, para a

retirada e anotação do número de formigas mortas, durante um período de 25 dias.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou dieta acrescida dos ingredientes ativos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada e sempre que necessário, os papéis filtro (que geralmente são cortados pelas formigas) foram trocados, a fim de se evitar o desenvolvimento de fungos contaminantes, bem como manter o ambiente limpo para as formigas.

A dieta com o ativo foi oferecida nos 25 dias de experimento, sendo o período de realização dos experimentos de toxicidade, levando-se em conta o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial⁶⁶.



Figura 3.7- Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.

3.2.10.1 Em dieta artificial

Os ingredientes ativos, dissolvidos em mistura de acetona e óleo de soja (8:2), foram incorporados em dieta artificial ainda quente (logo após a retirada da autoclave), nas concentrações estipuladas. As formigas foram distribuídas nas placas de Petri e juntamente a elas foi acrescida a dieta contendo o ingrediente ativo.

No bioensaio por ingestão foram utilizados dois controles. No primeiro, a mistura de acetona e óleo de soja foi incorporada na dieta artificial e, no segundo apenas a dieta artificial. O objetivo do primeiro controle foi acompanhar e avaliar a sobrevivência das formigas com referência a toxicidade da acetona e do óleo, enquanto a do segundo foi verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas.

3.2.10.2 Análise dos dados de toxicidade

A análise gráfica foi realizada através das determinações das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediana foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico “log rank”, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

Nos bioensaios com os ingredientes ativos diluídos em mistura acetona e óleo, as curvas de sobrevivência de operárias tratadas com o primeiro controle e com o segundo controle foram comparadas através do teste “log-rank”. A ausência de diferença significativa entre elas indicou a não interferência do solvente e do óleo de soja. Em seguida, procedeu-se a comparação das curvas de sobrevivência de formigas submetidas aos tratamentos com aquelas do controle solvente + óleo.

3.2.11 Ensaios bacteriostático *in vitro*.

3.2.11.1 Antimicrobianos *in vitro* utilizando bactéria *Xanthomonas citri* ssp *in* experimentos isolados.

Os experimentos microbiológicos *in vitro* foi utilizado 15 isolados de bactérias *Xanthomonas citri*, Tabela 3.3. Esses isolados foram fornecidos pela Fundecitrus de Araraquara sob a supervisão da pesquisadora Dra. Danielle Fernandes da Silva.

Tabela 3.3 - Bactérias fitopatogenas de *Xanthomonas citri* ssp *citri* (causadora da doença do cancro citri), sendo elas: resistentes, tolerantes e sensíveis a produtos derivados de cobre

Isolado	Procedência/Origem	Data isolamento	Cu
1644	BELLA VISTA-CORRIENTES ARGENTINA	2003	Resistente
1645	TRES LAGUNA-FORMOSA ARGENTINA	08/11/2010	Resistente
1646	MONTE CASEROS-CORRIENTES ARGENTINA	25/07/2007	Resistente
1647	BELLA VISTA-CORRIENTES ARGENTINA	2003	Resistente
1648	SANTA ROSA-CORRIENTES ARGENTINA	01/10/2010	Resistente
1666	RONDON-PARANÁ	19/07/2011	Tolerante PR
1670	PARANÁ	20/09/2011	Tolerante PR
1705	PARANAVAÍ-PARANÁ	04/13	Tolerante PR
1707	ALTO PARANÁ-PARANÁ	04i/13	Tolerante PR
1733	PARANÁ	31/01/2014	Tolerante PR
12	PARANAVAÍ-PARANÁ	1997	Sensível
75	CASA BRANCA-SP	1998	Sensível
316	PRESIDENTE PRUDENTE-SP	02/02/2002	Sensível
621	CHAPECÓ-SC	2001	Sensível
10	UARARAPES-SP	06/80	Sensível

3.2.11.2 Crescimento e manutenção dos isolados.

O crescimento dessa bactéria e sua manutenção para a promoção das atividades inibitórias foram feitas em meio de cultura Caldo Nutriente com ou sem ágar, dependendo da metodologia aplicada. A marca utilizada foi Kasvi, o qual possui na sua composição: 1,0 g.L⁻¹ de extrato de carne, 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5,0 g.L⁻¹ de extrato de peptona e 5,0 g.L⁻¹ de cloreto de

sódio. A dose utilizada foi 25 g.L^{-1} e o pH aferido a 6.8. Os 15 isolados eram semeados a cada 72 horas para garantir que a bactéria estivesse em plena atividade metabólica.

3.2.11.3 Determinação de concentração inibitória mínima (cim) dos extratos e substâncias em avaliação sobre a bactéria *Xanthomonas citri* ssp *citri*.

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em microplaca. A técnica do CIM foi realizada segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Placas de 96 poços estéreis foram usadas. Foi usada a metodologia de diluição seriada iniciando-se em $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios antimicrobianos foram feitos em triplicata ($n=3$) com os 15 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp *citri* da Tabela 3.3. Testou-se a atividade antimicrobiana com os extratos e Aloe-emodina, complexo metálico com antraquinona, controle positivo, Streptomicina e o DMSO. Todos os testes realizados em triplicata.

3.2.11.4 Preparo de solução estoque (se), que são amostras a serem testadas

As amostras mencionadas anteriormente foram preparadas usando essa metodologia e todas chamadas de Solução Estoque (SE). Foi pesado 1 mg de amostra a qual foi dissolvida em 125 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), ficando essa solução com a concentração de $8.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta acrescentou-se 375 μL de caldo nutriente, ajustando a concentração da solução para $2.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo está classificada como Solução Estoque (SE).

3.2.11.5 Preparo da placa de 96 poços estéreis e realização da diluição seriada

Iniciou preenchendo os poços da placa estéril com a solução estoque: 50 μ L em todos os poços onde a SE seria testada; 59 μ L em todos os poços os quais foi avaliado o controle positivo (Streptomicina); 80 μ L em 3 afim de averigua a viabilidade do inoculo; 90 μ L em 3 poços afim de verificar o controle de assepsia da SE; 75 μ L, 76 μ L, 77 μ L, 78 μ L, 79 μ L, em poços para testar a atividade antisséptica do DMSO. Após os poços da placas estarem preenchidas com o caldo, foi pipetado 50 μ L da SE no primeiro poço onde a amostra seria avaliada, como a SE estava com 1600 μ g.mL⁻¹, a mesma foi ajustada para a concentração de 800 μ g.mL⁻¹, ao ser colocado no poço que continha 50 μ L de caldo. Iniciou-se a diluição seriada do poço 1 até o poço de número. Figura 3.8. O mesmo procedimento foi feito para a solução controle que continha Streptomicina. Para os poços com caldo com nutriente, pipetou-se 10 μ L da mesma, para se certificar que não haveria crescimento de outros microrganismos. Já para os poços que continham caldo com nutriente 75 μ L, 76 μ L, 77 μ L, 78 μ L, 79 μ L, para o controle de DMSO, pipetou-se doses consecutivas de 5, 4, 3, 2, 1 μ L. Depois dessa etapa, foi completado os poços testes de SE com 30 μ L de caldo de nutriente e os da Streptomicina com 21 μ L do caldo.

3.2.11.6 Preparo do inoculado

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento de 72 horas em solução salina 0,9% e a padronização foi feita através do Densimat®, um densitômetro que mede a densidade óptica de um inóculo microbiano. A leitura no Densimat® foi feita no comprimento de onda de 550 nm e a densidade óptica correspondente a 0,5 da escala McFarland é 1,2, que equivale a 108 UFC.mL⁻¹. Em seguida foram realizadas diluições para a concentração final de 105 UFC.mL⁻¹ de onde destes 3 mL do inoculo em

solução salina transferiu-se 500 μL para um tubo de 4,5 mL de solução salina e deste tubo transferiu 2000 μL para um outro tubo contendo 10 mL de caldo de nutriente, ficando o inoculo com 5×10^5 UFC.

Em seguida pipetou-se 20 μL do inoculo em cada poço com SM, Streptomicina e naqueles de controle do teste de atividade do inoculo. A Figura 3.8, representa uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

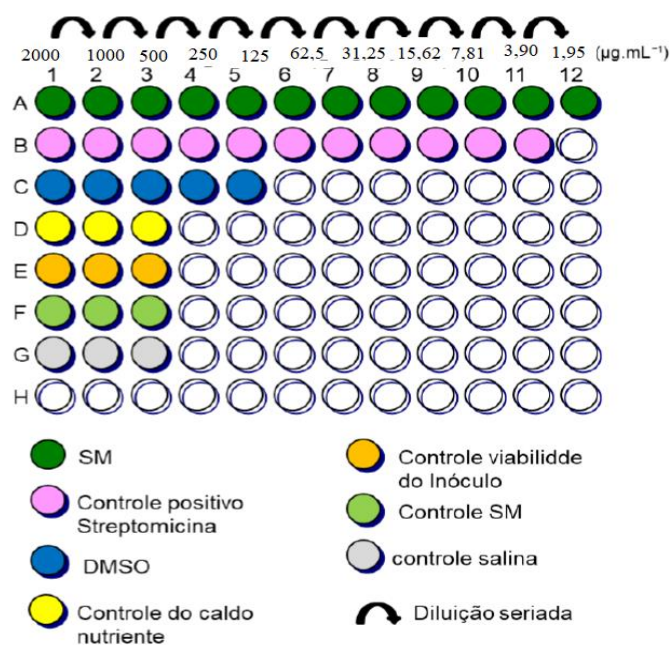


Figura 3.8- Exemplo de placa de 96 poços com teste de CIM.

Após a preparação da, as placas de Elisa foram acomodadas em câmara de BOD com a temperatura de 28 °C a qual, permaneceu por 72 horas para posteriormente ser realizado a leitura do experimento.

3.2.11.7 Avaliação da concentração inibitória mínima das placas

Após o período de 72 horas foram analisados a CIM, pipetou-se em cada poço 30 μL de solução aquosa de resazumira (Sigma) 0,02% (m/v), como revelador microbiano. A resazurina na presença de células bacterianas viáveis sofre uma reação de redução transformando-se em resofurina e mudando sua coloração de azul para rosa intenso.

Após adicionar a resazurina, as placas foram levadas à BOD novamente e, após 72 horas, realizou-se a leitura da CIM dos compostos frente à bactéria *Xanthomonas citri ssp. citri*. Os poços que apresentaram coloração rosa foram os que ocorreram crescimento bacteriano e os que permaneceram em azul onde indica que houve inibição, Figura 3.9.



Figura 3.9- Reação da resazurina para o ensaio de (CIM) dos extratos e compostos frente a bactéria em questão. **A)** coloração azul, inibição bacteriana; **B)** coloração rosa, crescimento bacteriano.

3.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS NO CG

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GCMS – TQ8040, Shimadzu, Tóquio, Japão) com coluna capilar de sílica fundida RTX-5ms (Restek Corporation, Pensilvania-EUA) (fase estacionária difenil-dimetilpolisiloxano) com 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial do forno 60 °C mantida por 2 min, com programação de temperatura de 60 °C a 200 °C a uma

faixa de $4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de uma programação de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma faixa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e mantida em isoterma a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. A temperatura do injetor foi de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fluxo de gás de arraste ajustado para $1.11\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com utilização de Hélio (99% de pureza) como gás de arraste e razão de divisão no injetor de 1:10. O volume de injeção foi de $1\text{ }\mu\text{L}$ e o tempo total de análise foi 57 minutos. A temperatura da fonte de íons foi $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ e da interface foi $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquisição de 5 Hz para o espectrômetro de massas (MS). O modo *SCAN* (varredura) foi utilizado com faixa de m/z 40 a 550 Da e ionização feita por impacto de elétrons a 70 eV. A aquisição dos dados foi realizada em software GCMS solution (Shimadzu).

3.4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO

3.4.1. Síntese

Uma antraquinona foi solubilizada em 12 mL de MeOH, previamente desairado por argônio. A solubilidade da amostra é boa em MeOH, apresentando coloração da amarelada para a molécula em solução.

Quando foi adicionado a $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, tem mudança na coloração da reação, que passa para vermelho (**D**). O $\text{M}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, foi solubilizado em 1 mL de MeOH e gotejada na solução, na formação do complexo (2:1) ligante:metal. Quando na solução contendo antraquinona foi adicionado o sal de cobre, ocorreu mudança instantânea na coloração e formação de precipitado roxo (**E**), Figura 3.5.

A solução foi filtrada e o solido roxo foi lavado 3 vezes com MeOH, para remoção do ligante que não reagiu, e lavado 3 vezes com H_2O na remoção da $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$. Foi levado para dessecador acoplado a bomba de vácuo, para secagem total da amostra.

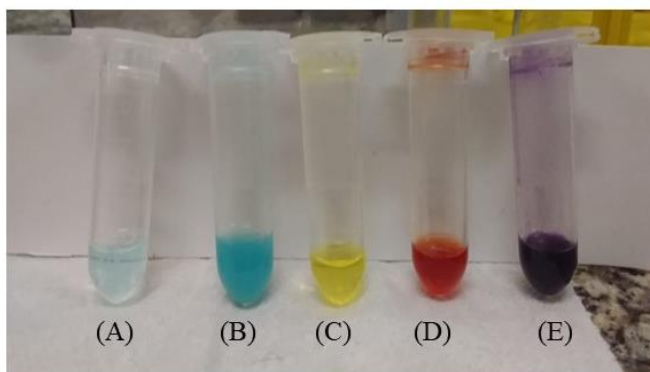


Figura 3.10- Variação de coloração do processo de síntese do complexo com antraquinona. (A) MeOH + $M(NO_3)$ = azul claro, (B) MeOH + Et_3N = azul celeste com formação de precipitado, (C) MeOH + antraquinona = amarelo, (D) MeOH + antraquinona + Et_3N = vermelho, (E) MeOH + antraquinona + $M(NO_3)$ + Et_3N .

3.4.2. Caracterização por espectroscopia de infravermelho

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho médio foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, com resolução de 4 cm^{-1} , modelo MB-102. Foi utilizado brometo de potássio (KBr), grau espectroscópico, como suporte. O KBr foi mantido em estufa a $120\text{ }^\circ\text{C}$ antes de ser usado na fabricação das pastilhas. Antecedendo a obtenção dos espectros de cada amostra, fez-se o espectro com 100 mg de KBr, denominado branco, para correção de ruídos.

As pastilhas contendo os complexos, sais e ligante foram preparados na proporção 1:100 amostra/KBr em mg, macerando a amostra junto com o KBr no almofariz com um pistilo de ágata, até que houvesse total trituração e homogeneização. Em seguida, foram colocados no pastilhador no qual foi posto em uma prensa para preparação das pastilhas sob pressão.

3.4.3. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram obtidos no espectrômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452^a.

Os espectros foram obtidos em DMSO, realizando várias diluições em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade de 4 mL, em faixas de 250 nm a 800 nm.

Os valores de absorvidade molar (ϵ) foram determinadas pela equação de lei Beer, e de posse dos valores foi aplicado a propriedade logarítmica (\log_{10}), e o valor da absorbância molar (ϵ) foi obtido em log de ϵ .

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A = Absorbância, b = caminho ótico (cm) e c = concentração molar (molL^{-1}).

3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.5.1. Análises massas

As análises em UPLC-DAD-TOF, foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos, utilizando as amostras na concentração de 100 ppm as quais foram injetadas 3 μL em sistema de eluição usando H₂O-ACN com 0,1% de ácido fórmico em modo gradiente (19:1 a 100% de ACN em 15 min) em coluna Zorbax Eclipse Plus C-18, Rapid Resolution HD (2,1 x 500 mm, 1,8 μm), temperatura de coluna de 35 °C.

3.5.2. Análises de massas por infusão direta

O complexo foi analisado em um espectrômetro de massas Water Xevo G2-XS QTOF, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), com analisador quadrupolo/Tempo de voo. As análises foram por infusão direta com variação de fluxo de 1 e 10 mL/min, com ionização por Eletrospray (IES) em modo negativo com varredura na faixa de 50 – 200 Da. Foram realizados experimentos de MS², através da fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ESCOLHA DOS EXTRATOS POR CCD, RMH ¹H E FRACIONAMENTOS

A partir do levantamento prévio dos extratos disponíveis no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCAR, foram elencados 21 extratos brutos (Tabela 4.1), com a ajuda de cromatografia de camada delegada e RMN de próton foram selecionados os extratos para serem desenvolvidos os trabalhos de mestrado.

Tabela 4.1 Levantamento e escolha dos extratos do Laboratório de Produtos Naturais

EXTRATOS	SOLVENTE	PARTE DA PLANTA
<i>Picramnia riedelli</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	HEXANO	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	DICLORO	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino- Artur</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	DICLORO	FOLHAS
<i>Picramnia riedelli feminina- Artur</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia riedelli feminina- Artur</i>	ÉTER DE PETRÓLEO	FOLHAS
<i>Picramnia glazioviana</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia glazioviana</i>	DICLORO	FOLHAS
<i>Picramnia parvifolia</i>	DICLORO	CAULE
<i>Picramnia parvifolia</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia parvifolia</i>	METANOL	CAULE
<i>Picramnia ciliata</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia ciliata</i>	ETANOL	FOLHAS

<i>Picramnia sellowi</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia sellowi</i>	HEXANO	GALHOS
<i>Picramnia orática</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia sp</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Toona ciliata</i>	HEXANO	FOLHAS
<i>Toona ciliata</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia guilherminiana</i>	DICLORO	FOLHAS

4.2. SISTEMAS DE SOLVENTES UTILIZADOS NO CPC

4.2.1. Testes de sistemas de solventes utilizados no CPC

As análises realizadas com os sistemas de solventes encontrados na literatura a priori avaliou a formação de emulsão ou não entre a fase orgânica (FO) e fase aquosa (FA), tempo de separação entre elas, as quais haveria necessidade de possuir um tempo bom de separação (até 30 s). Os sistemas de solventes que formaram emulsão foram descartados. Foram avaliados os sistemas não emulsionados no extrato de PRF_met, os demais foram analisados com objetivo de verificar o comportamento do extrato nos sistemas de solventes. Foi averiguada a massa em cada uma das fases determinando o coeficiente de partição. Os resultados da análise estão na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Sistema de solventes avaliados para o extrato de PRF_met

Teste	Mistura de solventes	Proporção de solventes (V/V)	Formação de emulsão	Coefficiente de partição (K)	Tempo de formação das fases
1	Hex/AcOEt/ MeOH/H ₂ O	1:2:1:2	não	1,824	40 seg
2	Hex/AcOEt/ MeOH/H ₂ O	2:1:2:1	não	1,554	40 seg
3	Hex/Met	03:02	não	5,452	45 seg
4	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:6:1:6	não	0,500	5 min
5	AcOEt/H ₂ O	1:1	sim	*	*
6	Hex/Met	1:1	não	3,230	*
7	Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	10:8:1:1	sim	*	*
8	Hex/ButOH/MeOH/H ₂ O	1:0,9:1:0,9	sim	*	*
9	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:1,5:2:1	não	2,332	1 min 10 seg
10	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:2:1,5:1	não	3,000	55 seg

11	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:2:1,75:1	não	2,000	50 seg
12	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:0,9:1:0,9	não	1,500	30 seg
13	Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	2:1:1:1	sim	*	*
14	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:0,8:1,3:0,9	não	0,900	15 seg

*Sistema não avaliados por formar emulsão.

Com os resultados obtidos, o qual mais se adequou foi a mistura de solventes Hex/AcOEt/MeOH/H₂O nas proporções 1:0,8:1,3:0,9 com um K = 0,9 o que mais aproximou-se de 1, nessa mistura de solvente estava melhor distribuição da massa do extrato aproximadamente 50% na fase orgânica e 50% na fase aquosa, com um tempo bom de separação entre as fases. Após ser decido a condição a ser usado para o fracionamento foi analisado quem seria a fase móvel e quem seria fase estacionaria.

4.2.2. Escolha do modo de eluição: ascendente ou descendentes

A escolha do método de eluição avaliou se a fase orgânica seria usada como fase móvel e a fase aquosa como fase estacionária ou vice-versa, utilizando a metodologia descrita na seção 3.2.8. Os cromatogramas referentes as duas estão apresentados na Figura 4.1, mostrando que havia algumas bandas cromatográficas que se repetia, em ambas. A Tabela 4.3, mostra os principais picos analisados, tempo de retenção e área deles, os quais permitiram o cálculo do KD, a fim de obter melhor separação. O KD tem a necessidade de estar no intervalo de 0,5 <KD> 3. Para cada modo de eluição foi feita a análise e o modo ascendente mostrou-se como mais adequado, havendo mais KD entre 0,5 e 3 que atendia as necessidades do método, no entanto foi realizado um fracionamento com o modo descendente que não foi bem-sucedido. Com isso, o fracionamento realizado foi com o modo ascendente de eluição.

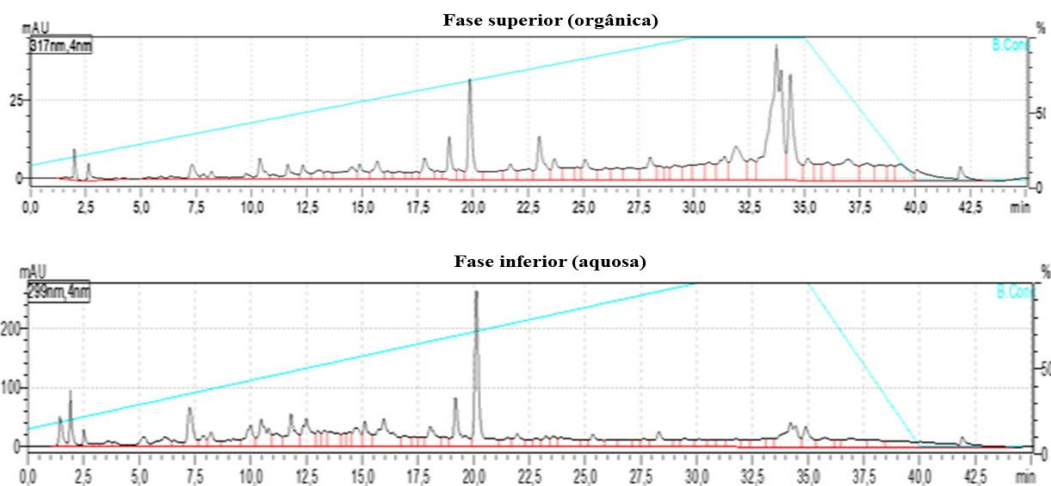


Figura 4.1 - Comparação dos Cromatogramas para escolha do método de eluição do CPC.

Tempo de Retenção	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O- 1:0,8:1,3:0,9			
	Área do Pico		Modos de Eluição	
	SUP	INF	ASC	DSC
7,463	45632	82325	0,55 ^a	1,8 ^a
17,801	60595	221962	3,66 ^b	0,27 ^b
18,914	32972	199063	6,03 ^b	0,16 ^b
19,853	6149340	9835798	1,59 ^a	0,62 ^a
21,268	28384	71217	2,50 ^a	0,39 ^b
25,102	25284	70657	2,79 ^a	0,35 ^b
28,008	624335	559362	0,89 ^a	1,11 ^a

Tabela 4.3-Referente a escolha do sistema de eluição

^a**K** adequados para separação. ^b**K** não adequados para separação.

4.2.3. Fracionamento do extrato PRF_met usando CPC

A partir da escolha de solventes e modo de eluição, foi aplicado a técnica. A intenção era de realizar o fracionamento com maior massa de amostra possível e desenvolver metodologias viáveis para a aplicação em ensaios laboratoriais frente as formigas e em grande escala, para que pudesse ser aplicado em campo posteriormente, assim, foram utilizadas 5 gramas de extrato para que fosse realizado o fracionamento.

Foi aplicada a metodologia descrita na seção 4.4.9, a qual resultou 50 frações de 20 mL, como as amostras possuíam variedades de compostos de polaridades distintas, parte do extrato ficou retido na fase estacionária, com isso a mesma foi retirada e coletada em 4 Erlenmeyer de 250 mL cada, que foram reunidas por haverem similaridade e chamada de extrusão. As 50 frações foram analisadas por CCD e RMN ^1H e reunidas por similaridade em 5 frações (Tabela 4.4). Todas as frações foram ensaiadas contra a formiga e a partir do ensaio biológico foi escolhido qual seria refractionada.

Tabela 4.4 Rendimento usando CPC para extrato PRF_met

Grupos	Frações reunidas	Massa
F01	1 a 4	1,065 g
F02	5 a 12	80 mg
F03	13 a 19	30 mg
F04	20 a 50	270 mg
F05	Extrusão	2,856 g

4.2.4. Análise do fracionamento do extrato PRF_met- F01

A fração F01 foi analisada por RMN de ^1H , no qual foram observados sinais presentes da classe de antraquinonas, em 12 ppm Hidrogênios fenólicos quelados e 6,30 a 8,30 ppm de Hidrogênios aromáticos, que são características dessa classe de substâncias, enfatizando que essa fração poderia estar enriquecida com tais substâncias, sendo assim ela foi submetida a ensaio biológico frente a formiga, a qual apresentou atividade. Com isso, o perfil cromatográfico da fração foi analisado por HPLC-DAD, descrito na seção 3.2.10, e o cromatograma apresentado na Figura 4.2. Foi proposto fazer um novo fracionamento como descrito na seção 3.2.11.

Após o fracionamento, as frações foram analisadas novamente em HPLC-DAD (Figura 4.3) e RMN ^1H . O cromatograma em vermelho é referente a fração F1 no qual foi observado o desaparecimento da banda cromatográfica

do mesmo, possivelmente tratava-se de Acetato de etila que não havia sido retirado totalmente da fração 01 do CPC. No Cromatograma em azul é referente a fração F2 e na fração F3 apresentado no Cromatograma em preto mostra que o fracionamento foi realizado como o esperado e em rosa é o Cromatograma referente a F4, sendo assim foram analisadas por RMN ^1H as frações, a fim de identificar sinais de compostos que pudessem justificar a atividade biológica do mesmo.

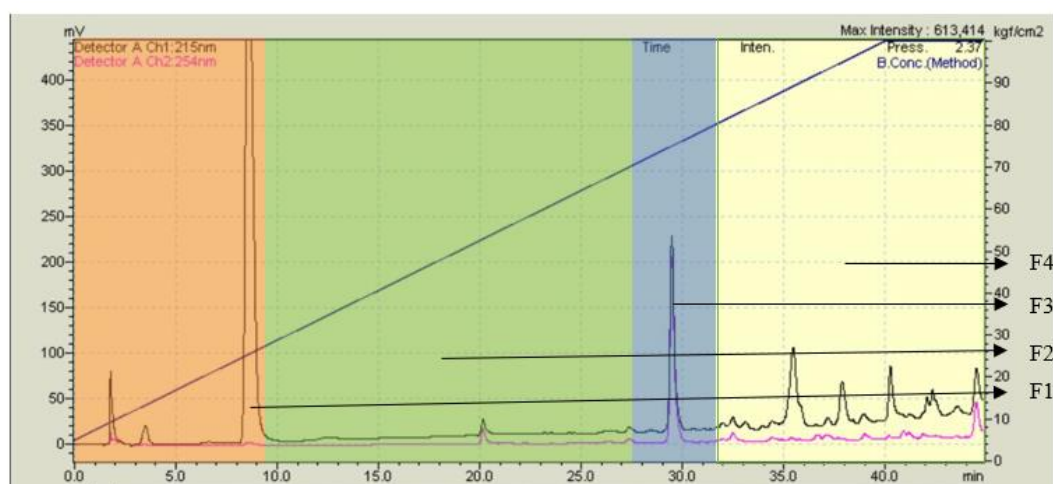


Figura 4.2- Cromatograma da análise da fração PRF_F1 analisadas e proposta de fracionamento.

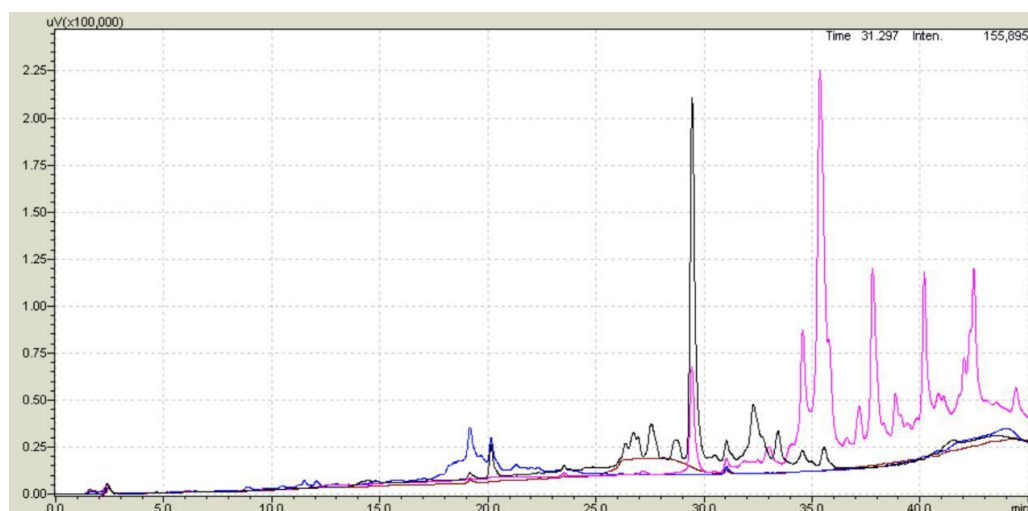


Figura 4.3- Cromatograma do fracionamento da fração PRF_F1.

Na fração PRF_met-F1-F3 pode ser observado que estava enriquecida com a substância **10**, observado através dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos 21 e 22). Esta fração foi submetida a novo

fracionamento o qual está descrito na seção 3.2.12. A substância **10** foi ensaiada novamente contra a formiga *A. sexdens rubropilosa*, a fim de poder confirmar se possuía propriedades inseticidas contra o alvo em questão.

4.2.5. Análise da PRF_met- F4

A fração PRF_met-F4 foi identificado a substância 9. Foi realizado a análise dela por RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com a análise cromatográfica em HPLC, Figura 4.4.

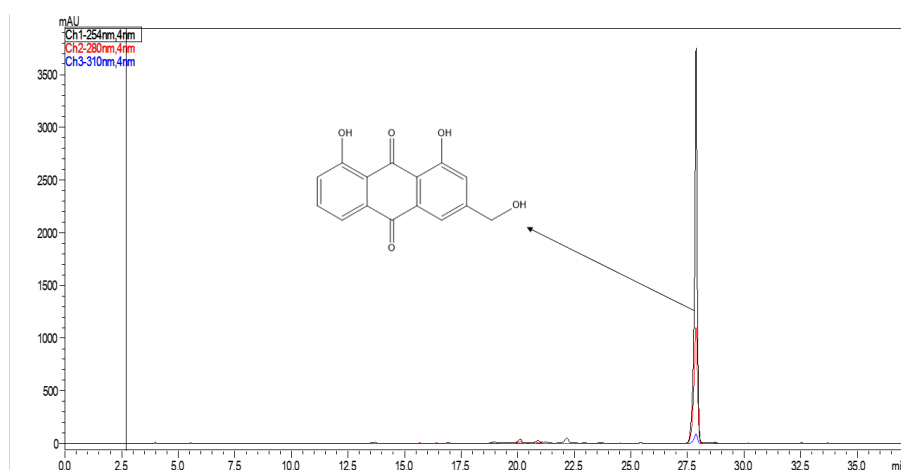


Figura 4.4 - Cromatograma da fração PRF_met -F4.

4.2.6. Trapeamento da fração PRG_met-F100%met

Foi utilizado a metodologia descrita na sessão 4.4.4, para realizar o trapeamento das bandas de interesse da fração em questão. O perfil cromatográfico da fração PRG_met-F100%met está apresentado nas Figura 4.5. Foram coletadas 11 frações referentes as bandas cromatográficas e foi possível a identificação de 4 compostos sendo eles, **9**, **10**, **11** e **12**, Tabela 4.5.

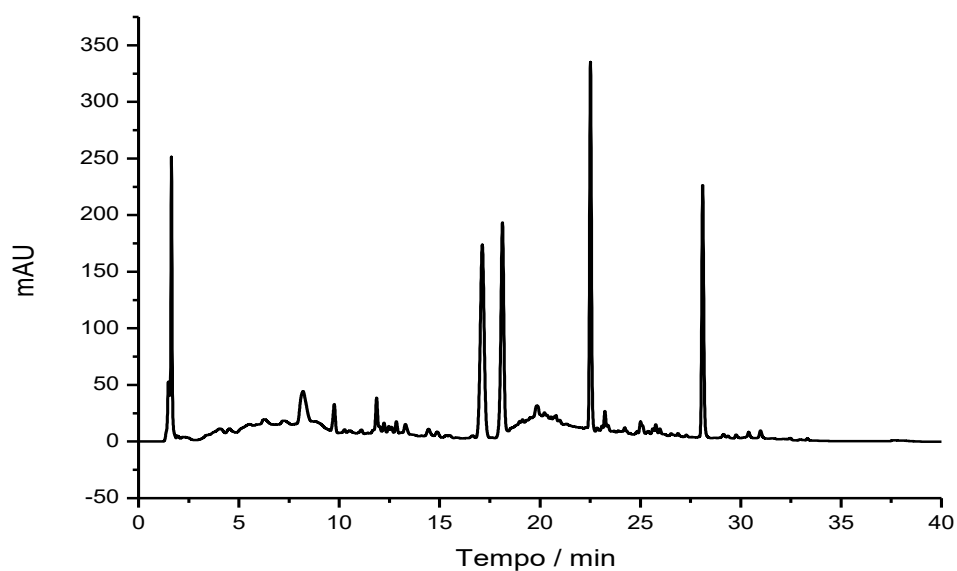


Figura 4.5 - Cromatograma referente ao perfil cromatográfico da fração PRM_F2-F100%.

Tabela 4.5- Rendimento fração PRG_met-F02-

do fracionamento da F100% met

Fração	Massa (mg)
F01	0,1
F02	0,1
F03	0
F04	*
sub 11	6,1
sub 12	5,1
F07	*
F8	*
sub 9	5,1
Sub 10	4,5
F11	*

*Massa insuficiente

4.3. METABOLITOS IDENTIFICADOS

O presente estudo culminou na identificação de 13 substâncias observadas na planta *P. Riedelle*, como mostra na Figura 4.7.

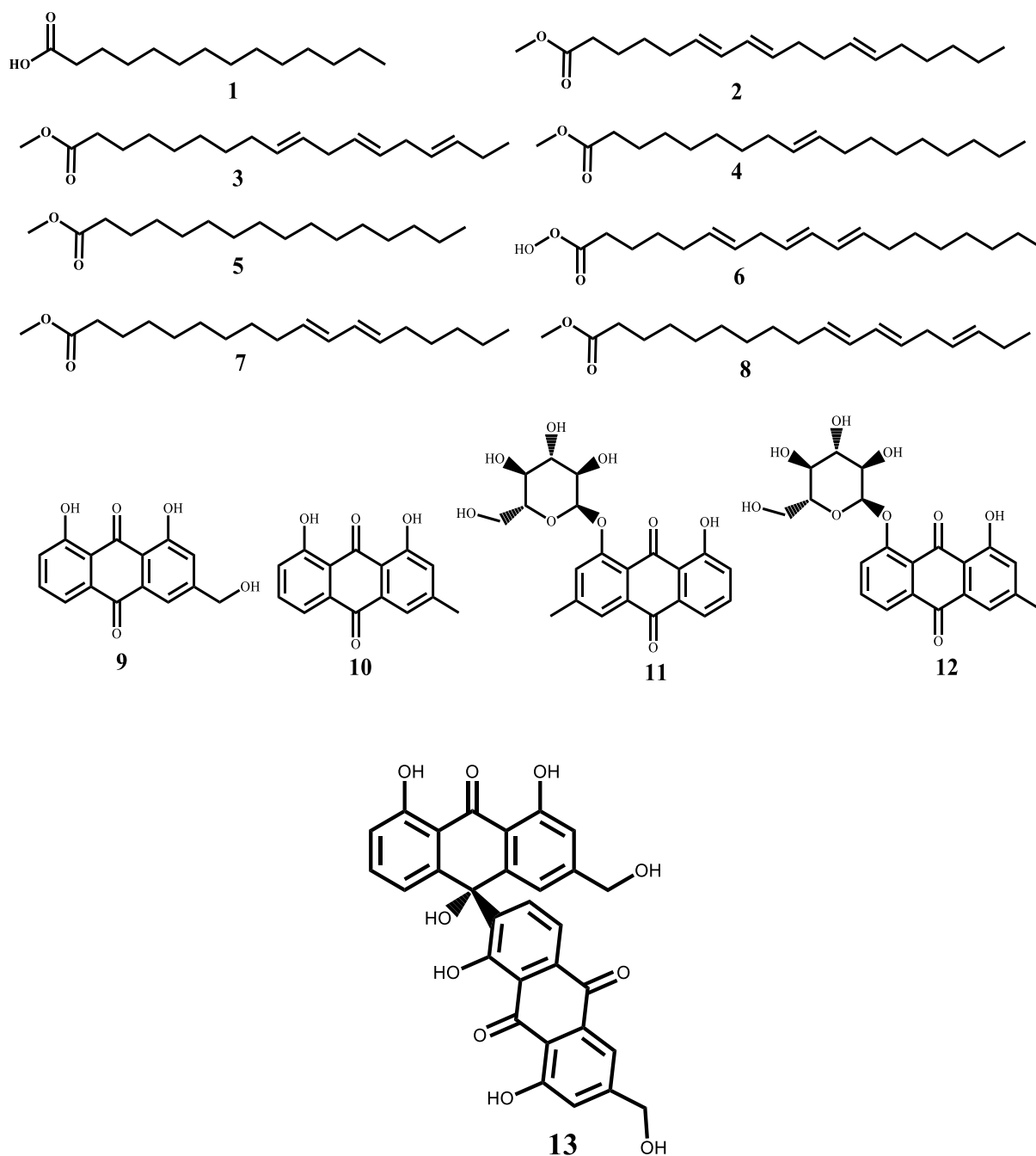


Figura 4.6- Estruturas identificadas na *P. riedelli*.

4.3.1. Identificações de ésteres e ácidos de cadeia longa

Foram analisadas as frações PRF_F1_F3_F2 e PRF_F1_F4, submetidas a análise no CG/EM, utilizando as mesmas condições apresentadas na seção 3.3. Sendo assim foram identificados 8 substâncias em mistura sendo eles: **(1)** ácido n-Hexadecanóico, **(2)** Gama-metillinolenato **(3)** 9,12,15-Octadecatrienoato de metila, (Z,Z,Z), **(4)** Ácido Oleico, **(5)** Hexadecanoato de metila, **(6)** ácido Gamolenóico, **(7)** ácido 10(E),12(Z)-Conjugado linoleico e **(8)** Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, (Z,Z,Z).

Na Tabela 4.6, está descrito os tempos de retenção, área de cada substância e fórmulas moleculares. Juntamente com os cromatogramas e espectros de massas de cada substâncias assim apresentadas no Anexo 4-15. É valido ressaltar que as análises foram feitas por comparação de similaridade de no mínimo 90% com o banco de dados do equipamento.

Tabela 4.6- Referente a óleos e ésteres de cadeia longa identificados

Substância	Tempo de retenção	Área	Área %	fórmula molecular
1	35.857	662339	8.62	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
2	38.400	290368	3.78	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
3	38.801	5144371	66.97	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
4	39.420	1167821	15.20	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
5	34.970	178261	1.45	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
6	39.140	165094	1.35	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
7	39.351	700304	5.71	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
8	39.490	9626447	78.42	C ₁₈ H ₃₀ O ₂

4.3.2. Caracterização da substância **9**

A substância **9** tem aspecto de pó de cor amarelo e foi identificada pelas técnicas de RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas. Os dados obtidos foram comparados com a literatura^{67,68}.

A partir da análise de RMN de ¹H presente no Anexo 16, pode ser observado sinais característico de antraquinonas, confirmado pela presença dois

sinais mais desblindados, em δ 12,90 e δ 12,10 (cada um integrando para ^1H , sendo já conhecidos como hidrogênios quelados com grupos acila em núcleos bases de antraquinonas, a proposta de presença de hidrogênios quelados apresentada na Figura 4.8. Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H , pode-se observar 5 sinais na região aromático, integrando para ^1H em δ 7,85 (*dd*, $J = 8,4, 1,1$ Hz), δ 7,80 (*d*, $J = 1,4$ Hz), δ 7,69 (*tap* $J = 8,4, 7,68$ Hz), δ 7,31(*dd*, $J = 7,6, 1,1$ Hz), δ 7,36 (*d*, $J = 1,4$ Hz) e associado a um singleto em δ 4,83 integrando para 2 de hidrogênios oximetilênicos.

A partir da análise de RMN de ^{13}C apresentado no Anexo 17, pode ser observado a presença 15 carbonos sendo eles, cinco carbonos aromáticos ligados a hidrogênios, cinco carbonos aromáticos totalmente substituídos, dois carbonos aromáticos oxigenados, dois carbonos acila e um carbono de metilênicos. A partir dos dados apresentados, a substância em questão poderia se tratar da aloe-emodina, Figura 4.9. Foi realizado uma busca na literatura para que pudesse ser comparado os dados do deslocamento químico de ^1H e ^{13}C . Tabela 4.7. A comparação com os dados encontrados na literatura, permitiu a confirmação da presença da aloe-emodina.

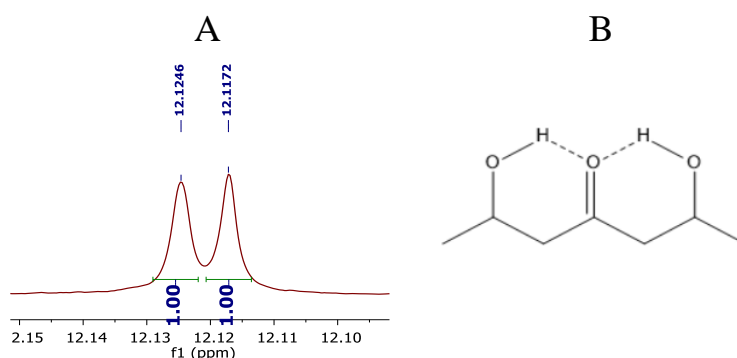


Figura 4.7- **A)** Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região mais desblindados; **B)** Proposta de Hidrogênios quelados em carbonilas.

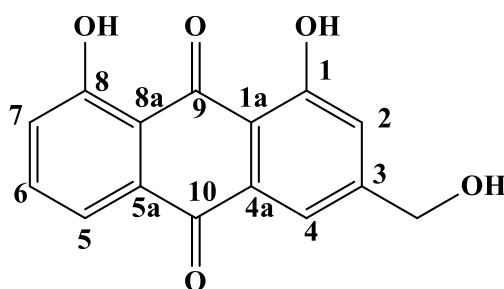


Figura 4.8- Estrutura da Aloe-emodina (9).

Tabela 4.7 - Dados referente a substância 9, deslocamento de ^1H e ^{13}C comparados com dados da literatura

Posição	H(JHz) δ	HLit (JHz) δ	C δ	CLit. δ
1	-	-	161,6	161,5
2	7,36 (<i>d</i> , $J = 1,4$)	7,35 (<i>sl,s</i>)	120,6	120,6
3	-	-	153,6	153,6
4	7,81 (<i>sl</i>)	7,79 (<i>sl</i>)	117,0	117,0
5	7,85 (<i>dd</i> , $J = 8,4, 1,1$)	7,81 (<i>d</i> , $J = 8,8$)	120,6	119,2
6	7,69 (<i>tap</i> $J = 8,4, 7,68$)	7,06 (<i>t</i> , $J = 8,0$)	137,3	137,2
7	(7,31 <i>dd</i> , $J = 7,6, 1,1$)	7,30 (<i>d</i> , $J = 8,8$)	124,4	124,2
8	-	-	161,3	161,2
9	-	-	191,6	191,5
10	-	-	181,5	181,4
1a	-	-	133,3	133,3
4a	-	-	115,9	116,8
5a	-	-	114,5	114,4
8a	-	-	133,1	133,1
1-OH	12,10 <i>s</i>	12,06 <i>s</i>	-	-
8-OH	12,9 <i>s</i>	12,11 <i>s</i>	-	-
CH ₂ OH	4,83 <i>s</i>	4,74 (<i>sl</i>)	62,0	62,0

Os valores de δ para espectro de RMN de ^1H foram obtidos em CDCl_3 a 400 MHz⁶⁹. Os valores de δ para espectro de RMN de ^{13}C foram obtidos em DMSO-d_6 a 400 MHz⁶⁸.

A partir da análise de HRMS(MS^1), foi registrado o íon 269,0456 $[\text{M-H}]^-$ e a fórmula calculada da análise desta massa $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, podendo assim calcular o erro para este íon, 2,33 ppm, espectro de massas está presente no Anexo 18. Assim, essa massa foi analisada por MS^2 e pode-se observar que o íon-fragmento mais intenso, tendo como fragmentos característicos 28 (-CO), 28

(-CO), 30 (-CH₂O) e a proposta de fragmentação está apresentado na Figura 4.10.

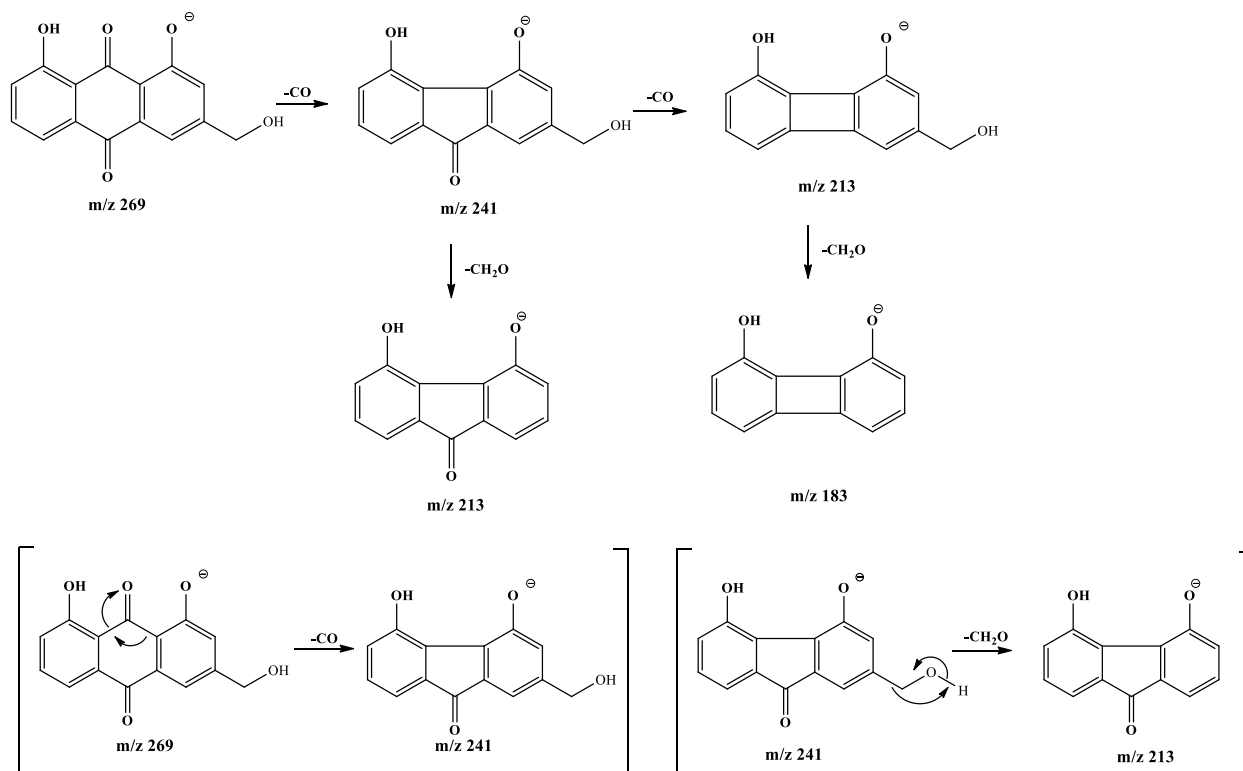


Figura 4.9- Proposta de fragmentação para a massa de m/z 269,0456.

4.3.3. Caracterização da substância **10**

A substância **10** foi identificada através das técnicas de RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas, foi observado como um sólido cristalino de cor laranja. Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura³¹.

A partir da análise de RMN de ¹H (registrado em CDCl₃ e 400 MHz) feito da fração PRF_met-F1-F3, foi observado dois sinais em 12,13 e 12,02 ppm, apêndice 20, característicos de antraquinonas, indicando hidrogênios quelados desta classe de substâncias, semelhantes com a substância **9**. Ainda, analisando o espectro de RMN de ¹H, 5 sinais foram observadas na região dos aromáticos em δ 7,83 (*dd*, $J = 7.5, 1.4$ Hz), 7,68 (*d*, $J = 8.1$ Hz), 7,66 (*d*, $J = 1.6$ Hz), 7,33 (*dd*, $J = 8.2, 1.4$ Hz), 7,17 (*s*). Todos esses sinais foram integrados para 1 (H), juntamente com um singlete em δ 2,48 integrando para 3(H). No

espectro de RMN ^{13}C , foram observados a presença 14 carbonos, cinco carbonos aromáticos ligados a hidrogênios, 4 carbonos aromáticos totalmente substituídos, dois carbonos aromáticos oxigenados, dois carbonos acila e um carbono de metila. A partir dos dados apresentados, a substância em questão poderia se tratar da Crisofanol, Figura 4.11. Foi realizado busca na literatura para que pudesse ser comparado os dados do deslocamento químico de $^1\text{H}^{69}$ e ^{13}C Tabela 4.8.

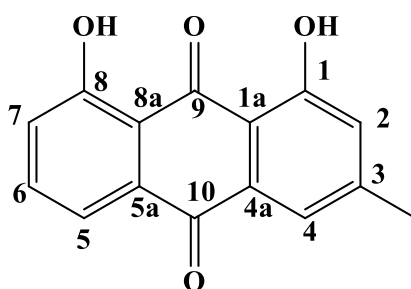


Figura 4.10- Estrutura do Crisofanol.

Tabela 4.8- Deslocamento químico de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **10**, comparados com dados encontrados na literatura

Posição	H(J/Hz) δ	HLit. ^a (J/Hz) δ	C δ	^C CLit. ^a (J) δ
1	-	-	162,7	162,6
1a	-	-	no	113,7
2	7,11 (<i>sl</i>)	7,10 (<i>dq</i> , $J = 1,6, 0,8$)	124,7	124,3
3	-	-	149,5	149,3
4	7,66 (<i>d</i> , $J = 1,6$)	7,66 (<i>dl</i> , $J = 1,6$)	124,5	119,9
4a	-	-	127,9	133,2
5	7,83 (<i>dd</i> , $J = 7,5, 1,4$)	7,82(<i>dd</i> , $J = 7,6$)	121,5	121,3
5 ^a	-	-	133,5	133,5
6	7,68 (<i>d</i> , $J = 8,1$)	7,67 (<i>tl</i> , $J = 7,6$)	120,1	136,9
7	7,30 (<i>dd</i> , $J = 8,2, 1,4$)	7,28 (<i>dd</i> , $J = 8,3, 1,3$)	137,1	124,5
8	-	-	162,6	162,5
8a	-	-	114,2	115,8
9	-	-	192,7	192,6
10	-	-	182,2	182,0
CH ₃	2,47 (<i>s</i>)	2,47 (<i>t</i> , $J = 0,8$ Hz)	22,4	22,2
1-OH	12,02 ^b (<i>s</i>)	12,02 ^b (<i>s</i>)	-	-
8-OH	12,13 ^b (<i>s</i>)	12,13 ^b (<i>s</i>)	-	-

Os valores de δ para espectro de RMN de ^1H e ^{13}C , foram obtidos em CDCl_3 a 400 MHz. ^aRODRIGUES⁷⁰. ^bSinais podem estar trocados. ^cVieira⁶⁷.

A fração contendo a substância **10**, foi observado interferente de material graxo, é possível observar é no experimento de COSY, Anexo 19, as correlações com H-2 com o $-\text{CH}_3$ e como H-4 e para o H-4 as mesmas correlações são observadas. Os hidrogênios H-5, H-6 e H-7 apresentam correlação entre si, como mostrado na figura 4.12.

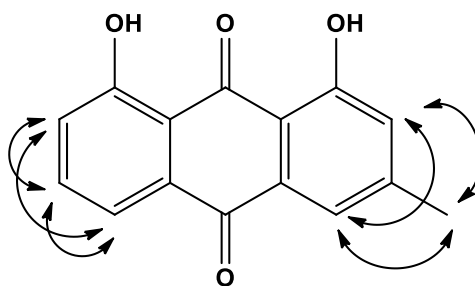


Figura 4.11 - Correlações no COSY.

A fração PRF_met-F1-F3 passou por novo fracionamento usando a metodologia descrita na seção 3.2.8.1, o espectro de RMN de ^1H está presente no Anexos 20 e 21. A partir da análise de espectrometria de massas, foi observado no espectro a presença massa de m/z 253,0504 no modo negativo (compatível com a fórmula molécula $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$). Corroborando para a confirmação de que se tratava do Crisofanol. A proposta de fragmentação apresentado na (Figura 13). O espectro está apresentado no Anexo 23.

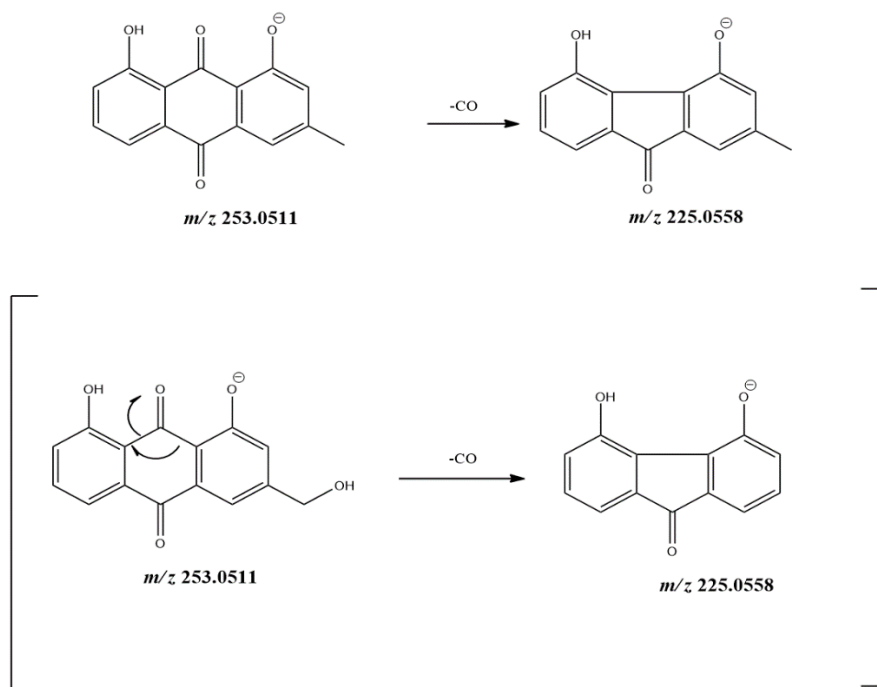


Figura 4.12 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 253,0511.

4.4.4. Caracterização das substâncias **11** e **12**

As substâncias **11** e **12** foram isoladas da fração PRG_met-F2-F100%met, e foram separadas por HPLC, Figura 4.14. Apresentaram semelhança estrutural a partir da análise de espectro de RMN de ^1H .

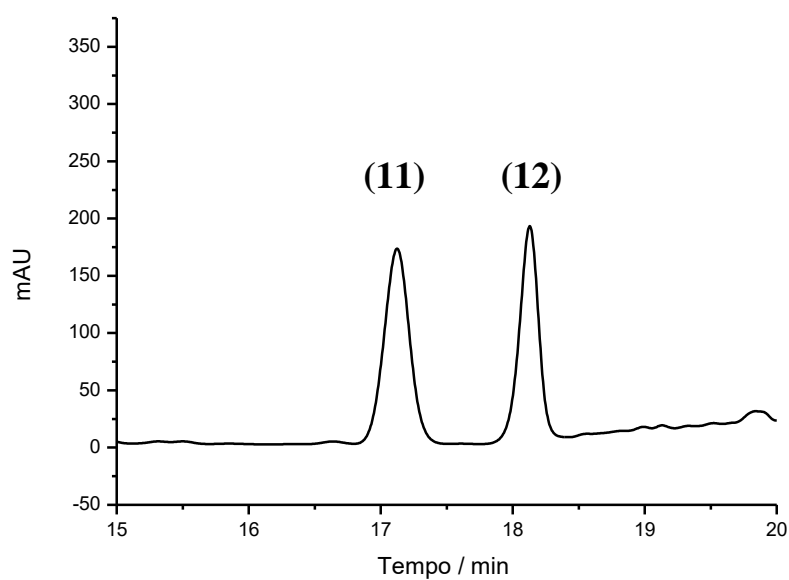


Figura 4.13- Cromatograma ampliado das substâncias **11** e **12**.

A substância **11**, apresentou como um pó de cor amarelo, foi identificada através das técnicas de RMN ^1H de (400 MHz, CDCl_3 , Anexo 24). A princípio, o uso do solvente CDCl_3 foi a fim de observar se a estrutura poderia ou não conter hidrogênio quelados em carbonilas. Um único singlete em δ 12,60 pode ser observado integrando para 1, indicando que a substância possuía apenas uma hidroxila, não havia hidrogênios β a carbonila, proposto na Figura 4.15.

Pela precipitação observada da substância no solvente CDCl_3 , passou a ser utilizado MeOD_4 para fazer as demais análises. Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H (600 MHz, Anexo 25), temos os seguintes sinais na região de hidrogênios ligados anéis aromáticos: 7,86 (d, $J = 1,5$ Hz), 7,75 (d, $J = 7,2$ Hz), 7,70 (t, $J = 7,9$ Hz), 7,63 (s), 7,31 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz) todos os sinais integrando para 1H, juntamente com um singlete em δ 2,52 integrando para 3H caracterizando uma metila que estaria ligada ao anel aromático. A partir dos dados observados é possível surgir que o composto se trata de um derivado de Crisofanol, foram observados também sinais na região de 3,46 a 3,69 ppm sugerindo a presença de glicosilação na molécula.

Através do experimento de HSQC (Anexo 26), foi evidenciado a presença de glicose onde foi possível determinar os carbonos da unidade δ (100,6, 73,2, 76,7, 69,5, 78,5, 60,0), foram comparados os dados com dados encontrados na literatura. Tabela 4.9, a qual estão comparadas com dados encontrados na literatura.

A ausência de sinais de Hidrogênios quelados, juntamente com efeito sofrido pelos hidrogênios H-2 e H-4 ao sítio de glicosilação pode-se concluir que a antraquinona **11** possui unidade de açúcar na posição 1, devido ao efeito de desproteção causado pelo substituinte, quando comparado com a substância **10**. Na Figura 4.16, está apresentado a ampliação da região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN ^1H da substância **10** com a substância **11** (em azul o espectro ampliado da região dos aromáticos da substância **10** e em

vermelho o espectro ampliado da região dos aromáticos da substância **11**), demonstrando o efeito de desproteção sofrido nos hidrogênios H-2 e H-4,

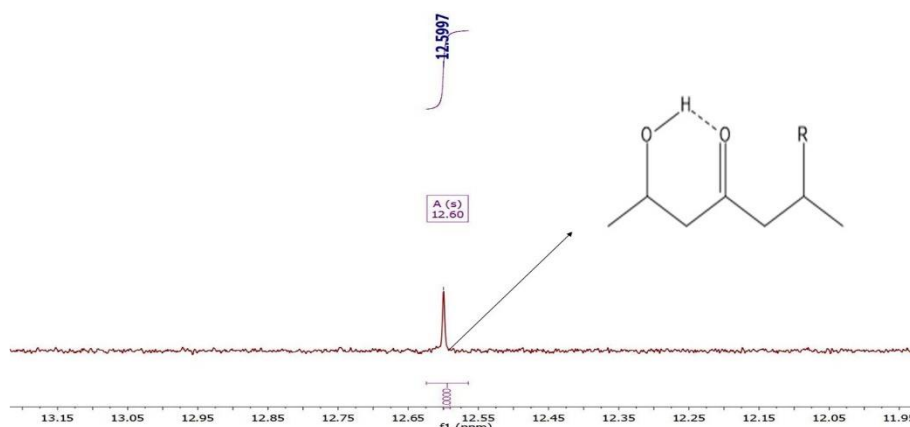


Figura 4.14- Proposta para hidrogênio quelado δ 12,60.

causado pelo substituinte.

Foi utilizado o espectro de massas para a confirmação estrutural, a partir do full scan pode ser observado o íon m/z 415,1036 da molécula desprotonada, apresentando um erro de 1,68 ppm, referente a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_9^-$, condizente com a proposta estrutural. Na figura 4.17, está a proposta de fragmentação para a molécula 1-O-Crisofanol.

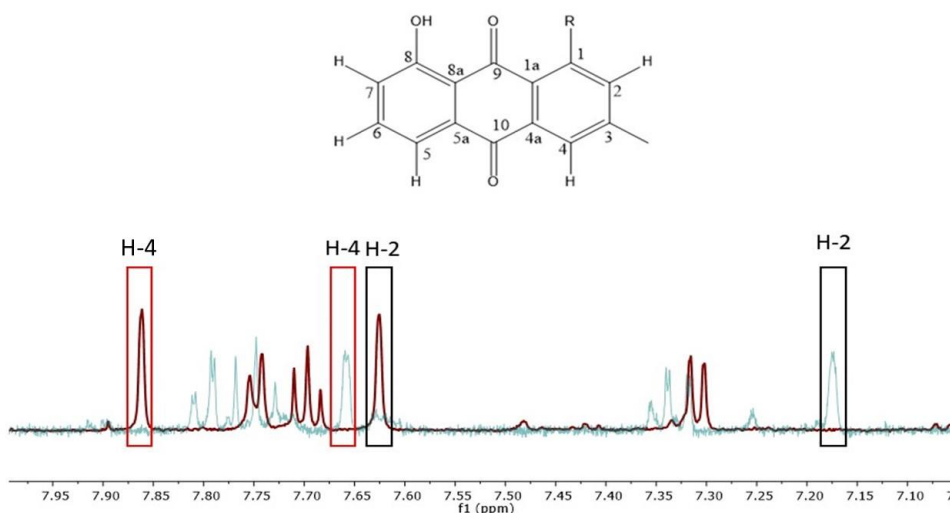


Figura 4.15- Sobreposição de espectros de RMN de 1H . Em azul ampliação da substância **10** e em vermelho o espectro da substância **11**.

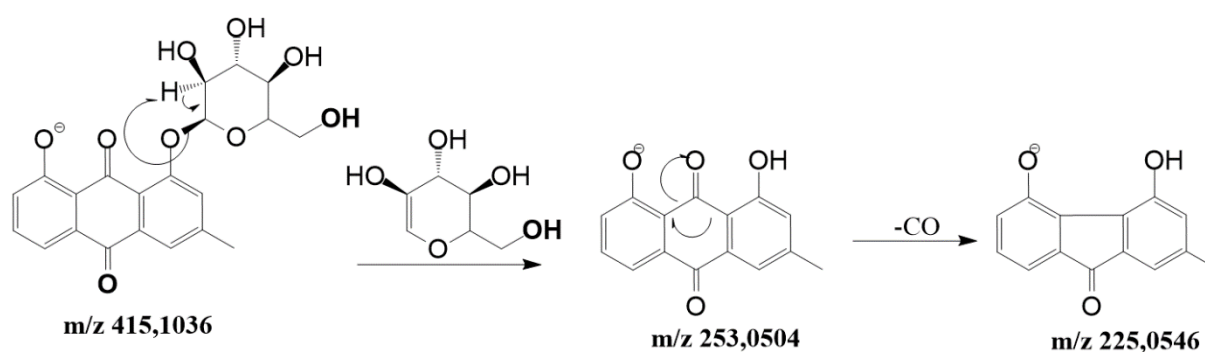


Tabela 4.9 - Dados de descolamento de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **11**, comparados dados encontrados na literatura

Posição	$^a\text{H}(J \text{ Hz})\delta$	$^b\text{HLit.}(J \text{ Hz})\delta$	$^a\text{C}\delta$	$^b\text{CLit.}(J)\delta$
1	-	-	-	-
1a	-	-	-	-
2	7,63 (s)	7,58 (q)	-	-
3	-	-	-	-
4	7,86 (d, $J = 1,5$)	7,79 (q)	-	-
4a	-	-	-	-
5	7,75 (dd, $J = 7,2$)	7,71 (d)	-	-
5a	-	-	-	-
6	7,70(d, $J = 7,9$)	7,71 (d)	-	-
7	7,31 (dd, $J = 8,2$ e, 1,3)	7,31 (d)	-	-
8	-	-	-	-
8a	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
CH ₃	2,52 (s)	2,50 (s)	-	-
Glicose			-	-
1'	5,1 (d, $J = 7,7$ Hz)	4,9 (d, $J = 7,6$ Hz)	100,6	100,5
2'	3,43	3,35 (dd, $J = 8,8$ e 7,6 Hz)	73,2	73,2
3'	3,69	3,22 (t, $J = 9,2$ Hz)	76,7	76,6
4'	3,64	3,60 (dd, $J = 12,2$ Hz)	69,5	69,7
5'	-	3,27 (m)	78,5	77,4
6'	3,56	3,41 (dd, $J = 5,6, 12,0$ Hz)	60,0	60,7

Figura 4.16 - Proposta de fragmentação para o íon 415,1036.

^aDados de RMN realizados no solvente CDCl_3 . ^bDados encontrado na literatura^{67,71}.

A substância **12** tem como aspecto de pó de cor amarelo, e foi possível a sua identificação utilizando as técnicas de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD_4) e massas de alta resolução (Anexos 27 e 28). Os resultados foram comparados com dados encontrados na literatura⁶⁷.

Na ampliação da região dos hidrogênios aromáticos foram observados 5 sinais e todos integrando para 1 e com um singlete integrando para 3, caracterizando uma metila ligada em aromático. Tais informações indicam que se tratava de um derivado de Crisofanol. Como mencionado anteriormente verificou-se que a estrutura poderia ser parecida com a substância 10, confirmando que possuía esqueleto de antraquinona.

Ainda no espectro de RMN ^1H , observa-se sinais correspondentes a hidrogênios ligados em anel aromático em 8,04 (*dd*, $J = 6,9, 1,9$ Hz, 1H), 7,87 (*m*, 1H), 7,81 (*d*, $J = 6,5$ Hz, 1H), 7,62 (*d*, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,18 (*d*, $J = 1,7$ Hz, 1H) e associado a um singlete em 2,48 (3H). Há um grupo de sinais característico de glicosídeo e foi observado o sinal de hidrogênio anomérico em 5,10 (*d*, $j = 7,6$ Hz), corroborando para a ideia de possa ser um Crisofanol glicosilado.

Como a substância é um derivado de Crisofanol, é esperado que o sítio de glicosilação cause desproteção para os hidrogênios vizinhos a ele, como demonstrado na substância **11**. Na Figura 4.18 é possível evidenciar com mais clareza esse efeito, onde em azul é o espectro de RMN ^1H da substância **10** e em vermelho o espectro ampliado da região dos aromáticos referente a substância **12**, demonstrando que os hidrogênios H-5, H-6 e H-7 sofrem desproteção quando comparados com o composto **10**.

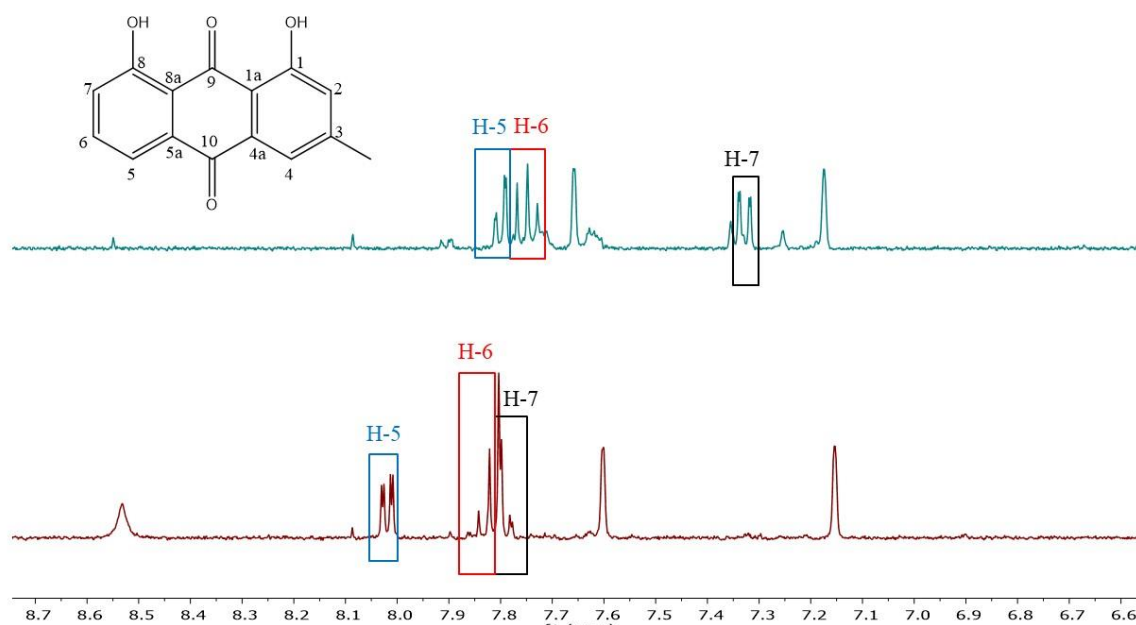


Figura 4.17- Ampliação da região dos aromáticos de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD_4). Em azul espectro de Crisofanol e em vermelho espectro da substância **12**.

A partir do espectro de massas da molécula, foi possível observar o íon m/z 415,1039, referente a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9^-$. Como a estrutura é parecida com a substância **11** o que muda é apenas a posição do substituinte os fragmentos observados são parecidos o qual está proposto na Figura 4.19. No Anexo 29 é possível verificar que o tempo de retenção da mesma é diferente da substância **11**, confirmando que se trata do 8-gli-O-crisofanol.

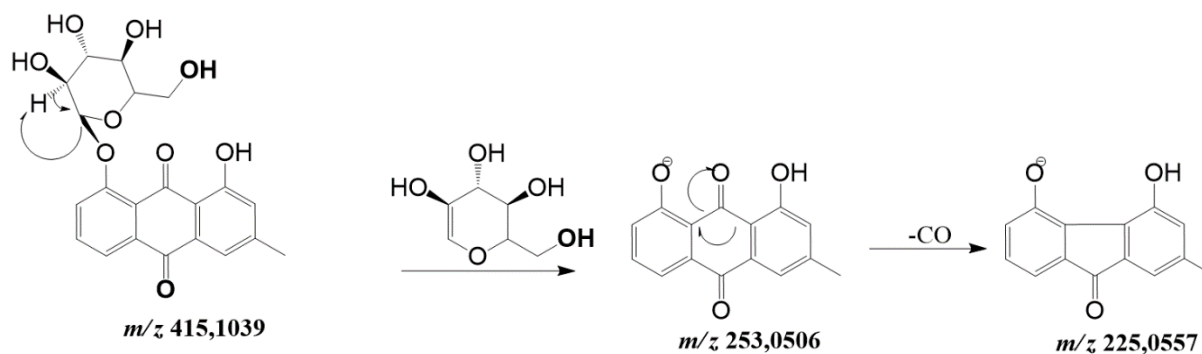


Figura 4.18- Proposta de fragmentação para o íon m/z 415,1039.

4.3.5. Caracterização da substância **13**

A substância **13** tem como aspecto pó de cor amarelo e foi identificado utilizando as técnicas de RMN de ^1H , COSY, HSQC (Anexos 30-32) e Massas de alta resolução. Quando analisado o espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CCl_3D), foi observado 4 sinais na região dos hidrogênios quelados, característico de antraquinonas, integrando para 1H cada um, no entanto foram observados 9 sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo eles 8,05 (*d*, $J = 8,6$ Hz), 7,85 (*d*, $J = 7,4$ Hz), 7,81 (*s*), 7,78 (*s*), 7,69 (*t*, $J = 8,0$ Hz), 7,56 (*d*, $J = 8,5$ Hz), 7,42 (*s*), 7,36 (*s*), 7,31 (*d*, $J = 9,1$ Hz), juntamente com dois singletos em 5,28 (*s*), 4,84 (*s*), Anexo 30. Sugerindo que a substância em questão poderia se tratar de um dímero de aloe-emodina, no entanto a possibilidade mais comum de dimerização é sistemas C10-C10 de antraquinona. A ausência de um hidrogênio, possivelmente indica dimerização diferente do comum.

Foi possível propor a dimerização formando uma oxantrona, pois não foram observados hidrogênios em aproximadamente 5 ppm, característicos de antrona e para a segunda antraquinona ligado da posição C-7. Com isso foi realizado o experimento COSY, e observado as correlações mostradas na Figura 4.20.

Através do mapa de contorto HSQC, foi possível construir a Tabela 4.10. Onde estão compilados os dados de carbono e hidrogênios que possuem correlação direta entre si, com isso foi possível propor a estrutura presente na Figura 4.4.13. como observado os hidrogênios H`-5 e H`-6 então sofrendo efeito juntamente com o CH₂OH que está sugerido o deslocamento em δ 5,28. Será determinado posteriormente a sua estereoquímica juntamente com a confirmação dos efeitos de desproteção dos sinais sugeridos através do experimento de NOE.

No espectro de massas, foi observado o íon m/z 539,0963 da molécula desprotonada, Figura 4.22, com um erro calculado de 2,78 ppm para a fórmula molecular C₃₀H₁₉O₁₀⁻, corroborando para a proposta de dímero. A proposta de fragmentação está na Figura 4.21.

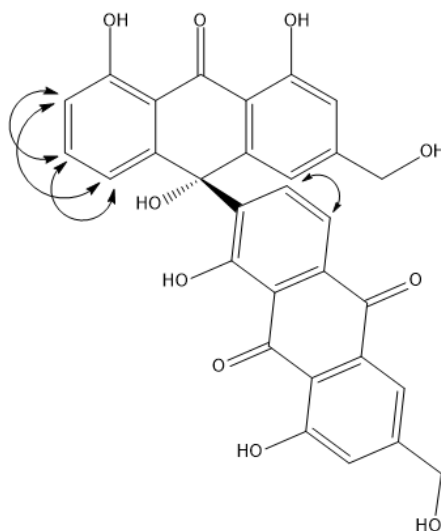


Figura 4.19- Estrutura do dímero de antraquinona proposto com as correlações observadas no experimento de COSY e RMN de ¹H

Tabela 4.10 - Dados de RMN de ¹H da substância **13**

Posição	H(J Hz) δ	C δ
1	-	-
2	7,42 (s)	115,0
3	-	-
4	7,78 (s)	136,7
5	7,31 (d, J = 9,1 Hz)	124,2
6	7,69 (t, J = 8,0 Hz)	136,8
7	7,85 (d, J = 7,4 Hz)	119,6
8	-	-

CH ₂	5,28 (s)	62
1'	-	-
2'	7,36 (s)	121,1
3'	-	-
4'	7,81 (s)	117,4
5'	8,05 (d, J = 8,6 Hz)	125,1
6'	7,56 (d, J = 8,5 Hz)	126,7
7'	-	-
8'	-	-
CH ₂ `	4,84 (s)	62,6
1-OH*	12,10 (s)	-
8-OH*	12,09 (s)	-
1-OH'*	13,62 (s)	-
8-OH'*	13,63 (s)	-

*sinais podem estar trocados.

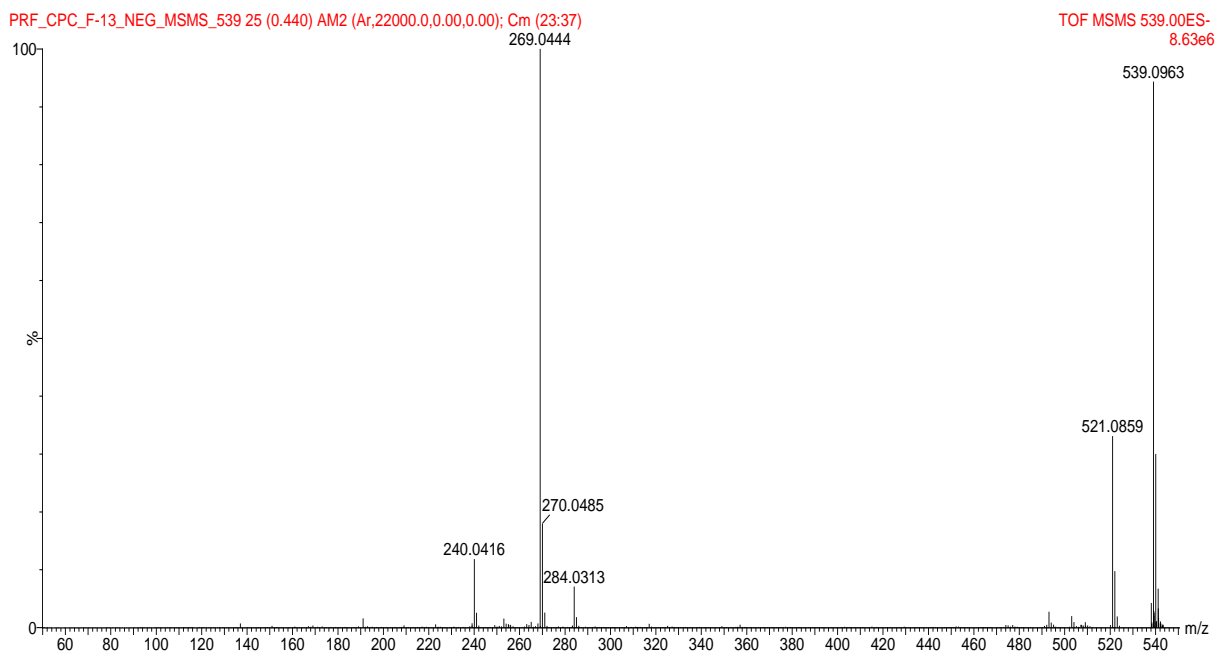


Figura 4.20- Proposta de mecanismo de fragmentação para íon m/z 539.0963.

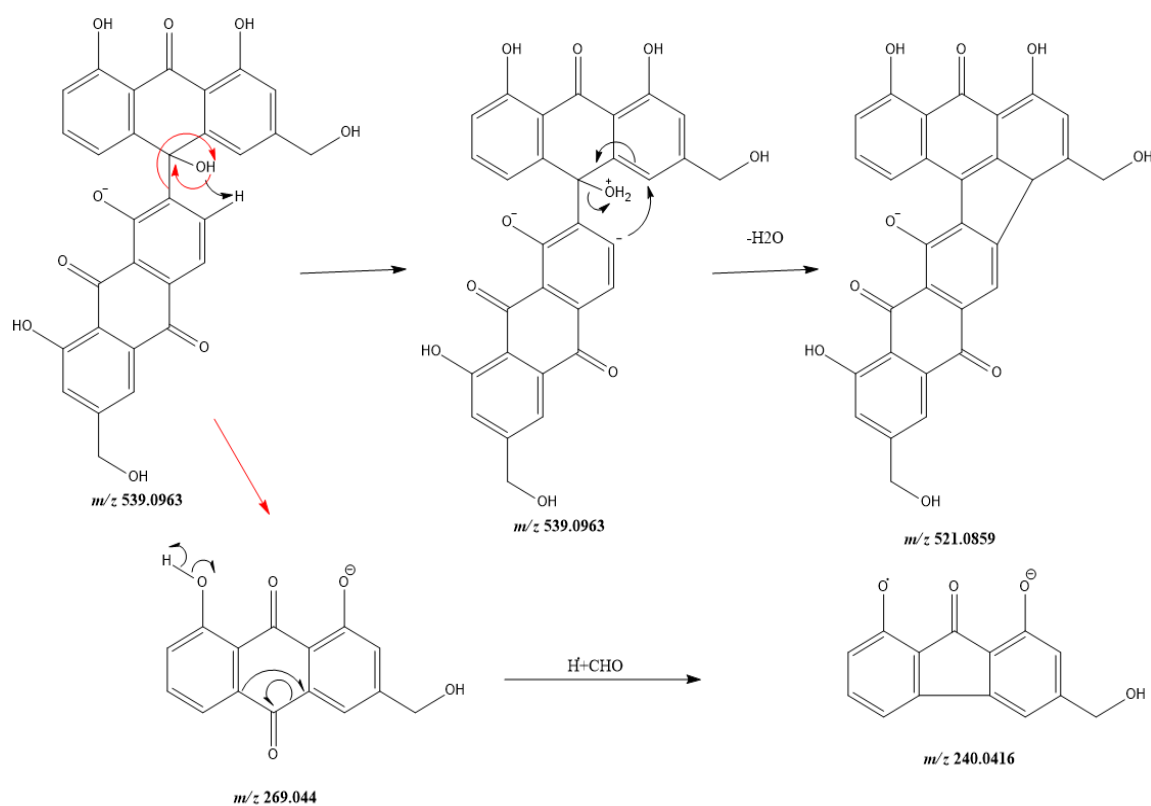


Figura 4.21 - Espectro de massa Ms2 do íon 539.0963.

4.4.6. Complexo de antraquinona

As atribuições das bandas de estiramento e dobramento foram atribuídas segundo Socrates⁷² e Nakamoto⁷³. Na comparação visual dos espectros de absorção na região do infravermelho da antraquinona (**A**) e complexo [Metal(antraquinona)₂] (**B**), Figura 4.23, foram observado as seguintes bandas para o ligante livre: Em 3340 cm⁻¹ o estiramento $\nu(\text{O-H})$, as duas bandas em 3082 cm⁻¹ e 3055 cm⁻¹ são referentes a deformação axial =C-H de sistemas aromáticos. As três bandas entre 2950 cm⁻¹ a 2850 cm⁻¹ pertencem ao dobramento C-H.

Foram observados dois estiramentos concernente aos C=O, o primeiro em 1728 cm⁻¹ da carbonila da posição C-10 e o segundo em 1630 cm⁻¹ da carbonila da posição C-9, a qual faz ligação de hidrogênio intramolecular e por esse motivo é deslocada para menores números de onda. Em 1572 cm⁻¹ e 1454 cm⁻¹ tem-se o estiramento C=C de sistemas aromáticos, a hidroxila do álcool tem dobramento fora do plano em 1419 cm⁻¹ e as hidroxilas fenólicas em 1388 cm⁻¹.

As duas bandas sobrepostas em 1290 cm⁻¹ e 1277 cm⁻¹ pertencem ao estiramento C-O, entre 1190 cm⁻¹ a 750 cm⁻¹ têm-se várias bandas referentes ao esqueleto carbônico de sistemas aromáticos, destas foram destacadas quatro bandas (1196; 1087; 867 e 754 cm⁻¹) designadas ao dobramento C-H de sistemas aromáticos. A absorção em 698 cm⁻¹ foi atribuída para o dobramento da ligação O-H. Quando comparado ao espectro do complexo em (B), é notório a mudança nas bandas de absorção e permitiu inferir a formação do complexo.

Dentre todas as variações nas bandas da antraquinona, é destacada a mudança na absorção do grupo carbonila da posição C-9, o qual foi proposto como ponto de coordenação, e após a formação do complexo, esta banda é deslocada para 1598 cm⁻¹, esse deslocamento é devido a coordenação ao centro metálico, pois o metal está retirando densidade eletrônica do oxigênio, gerando

um enfraquecimento da ligação C=O, ou seja, a ligação se torna menos energética e por esse motivo é deslocada no espectro do complexo.

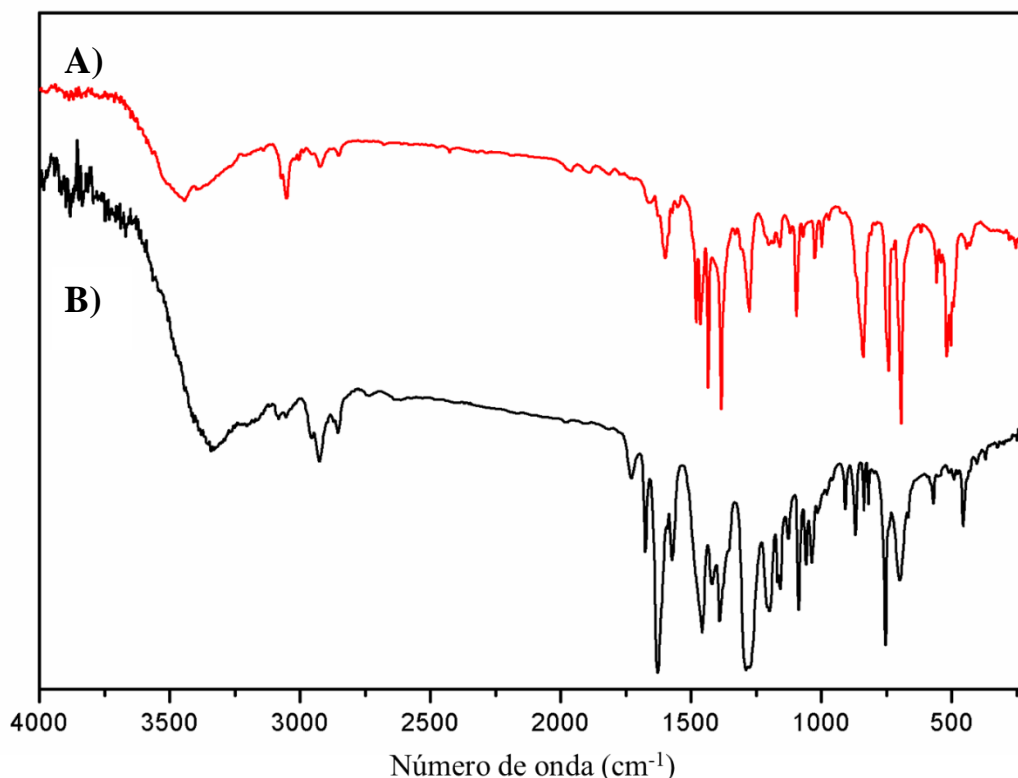


Figura 4.22- Comparação dos espectros de absorção na região do infravermelho. **A)** antraquinona, **B)** complexo [metal(antraquinona)₂], obtidos em KBr.

Na espectroscopia de Uv-Vis, o ligante antraquinona, Figura 4.24, apresentou duas bandas de absorção, em 290 nm e 434 nm, atribuídas as transições π - π^* . Uma absorção intensa em 264 nm não foi atribuída, pois provavelmente seja uma absorção do solvente. A banda em 558 nm de baixa intensidade, devido à forte interação dos hidrogênios das hidroxilas fenólicas com o solvente DMSO, ocasionando uma desprotonação em poucas moléculas e o aparecimento desta banda atribuída a transição n - π^* .⁷⁴

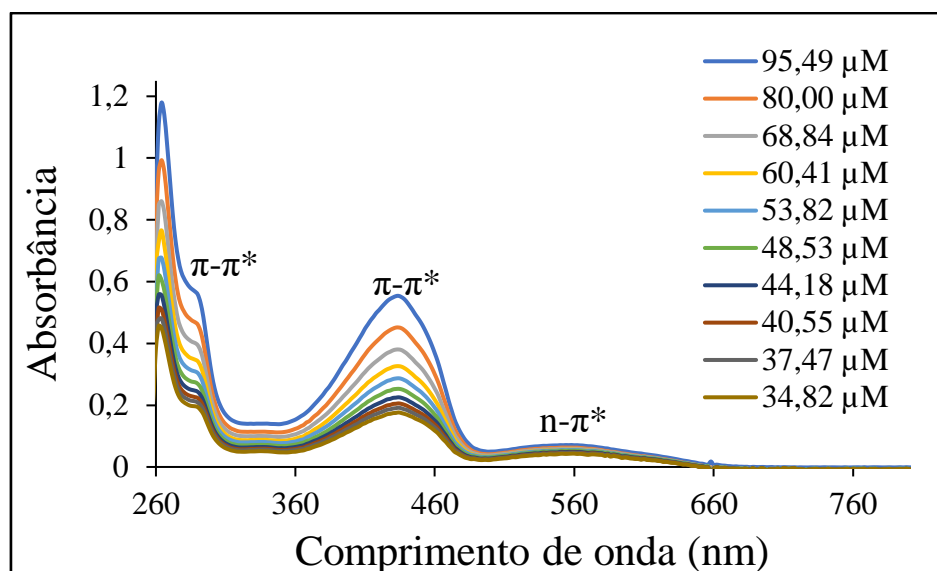


Figura 4.23 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis da antraquinona obtido em DMSO. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.

No espectro de Uv-Vis do complexo [Metal(antraquinona)₂], Figura 4.25, foram observadas as transições intramolecular do ligante em 290 nm e 434 nm, com um aumento da intensidade da transição em 290 nm (efeito hiperacrômico) e uma diminuição na intensidade da banda em 434 nm (efeito hipocrômico) ocasionado pela coordenação ao metal. A transição n- π^* sofreu um efeito hipsocrômico no complexo, tendo absorção em 510 nm, devido ao fenolato formado e este foi coordenado ao centro metálico de interesse, esta coordenação do fenolato ao metal é responsável pela coloração roxa do complexo⁷⁴, o que forneceu dados que suportam o modo de coordenação proposto.

A partir dos dados de massas de alta resolução foi feito aplicando a metodologia descrita na seção 3.5.2. Pode ser observado no full scan a presença da massa 600, 0135, referente a fórmula química C₃₀H₂₂MO₈⁻. Foi possível propor a estrutura era proposta de fragmentação está na Figura 4.26 a partir do espectro de MS², Figura 4.27.

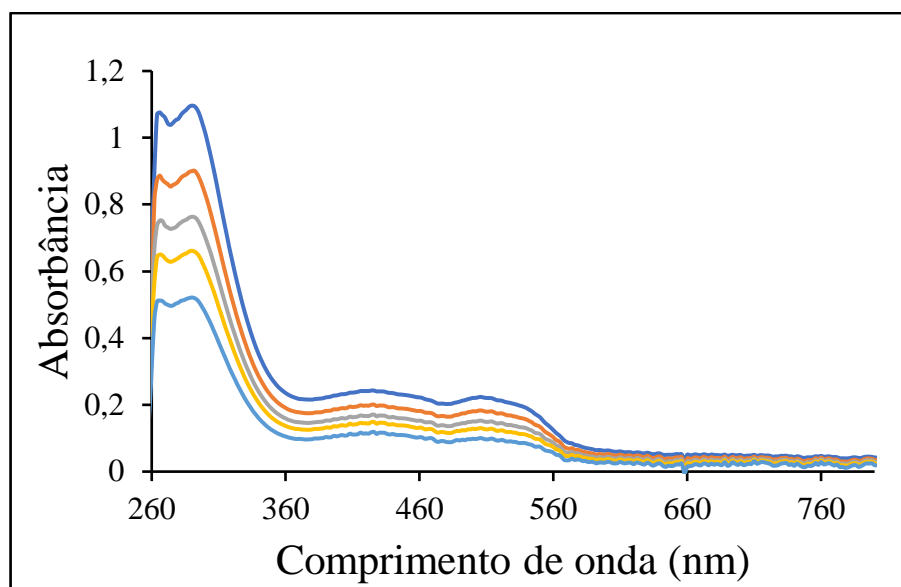


Figura 4.24- Espectro de absorção na região do Uv-Vis do [Metal(antraquinona)₂] obtido em DMSO.

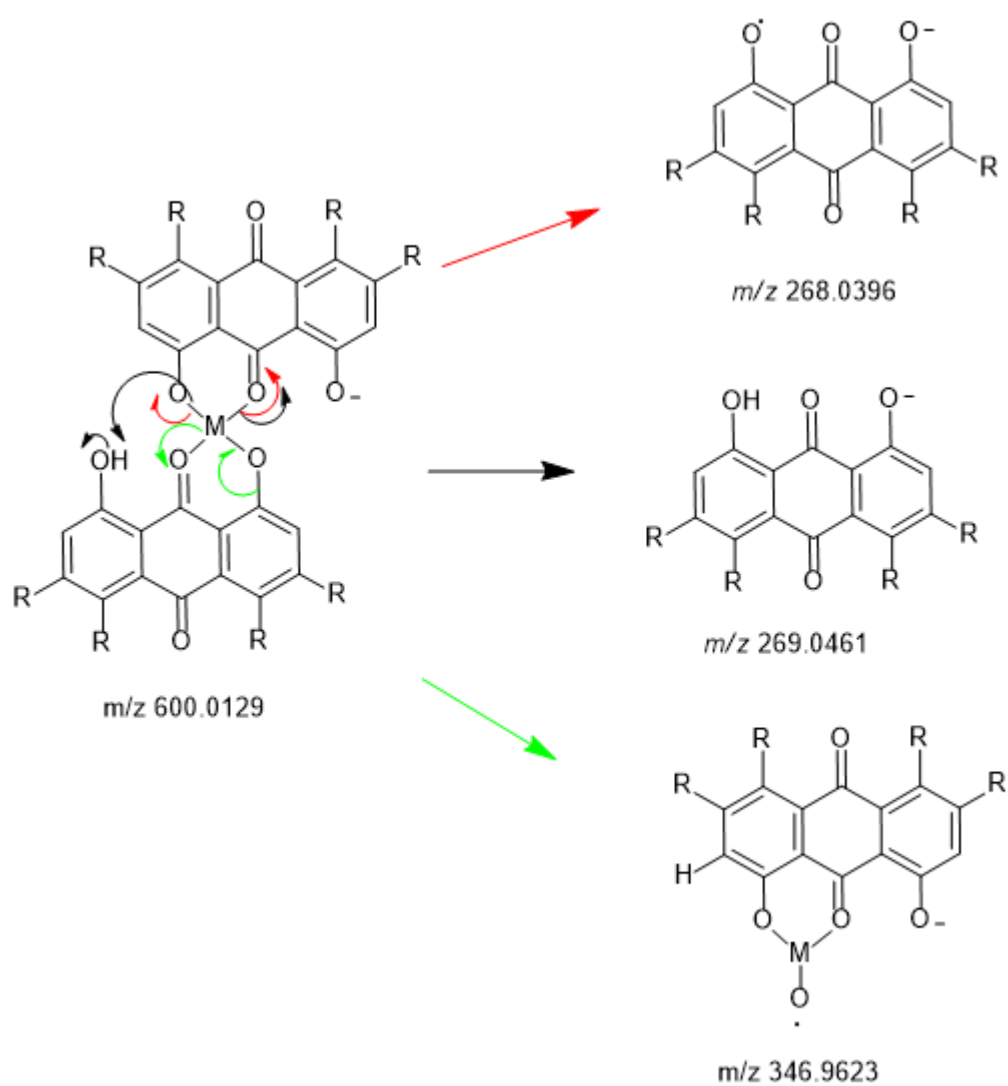


Figura 4.25- Mecanismo de fragmentação complexo antraquinona.

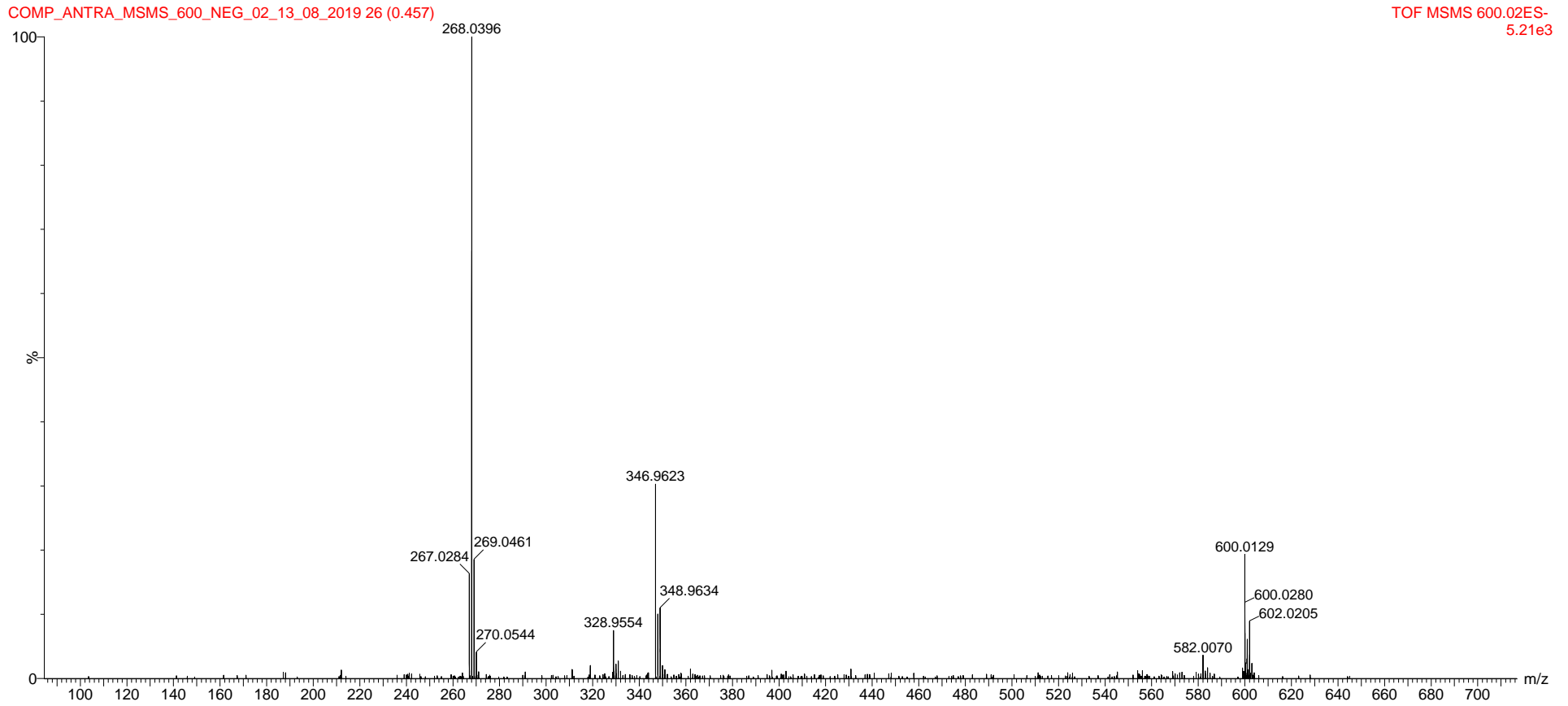


Figura 4.26- Espectro de massas Ms^2 do complexo antraquinona.

4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.5.1. Análise fungicida

4.5.1.1. Ensaio de inibição do crescimento micelial em *Leucogaricus gongylophorus*

Todas as atividades realizadas nesse trabalho frente ao fungo *L. gongylophorus* foi utilizando o extrato de PRG_met, utilizando a metodologia descrita na seção 3.2.9. Realizando biomonitoramento das frações com maior atividade e submetidas ao novo fracionamento. A Figura 4.28 mostra o esquema resumido das atividades realizadas.

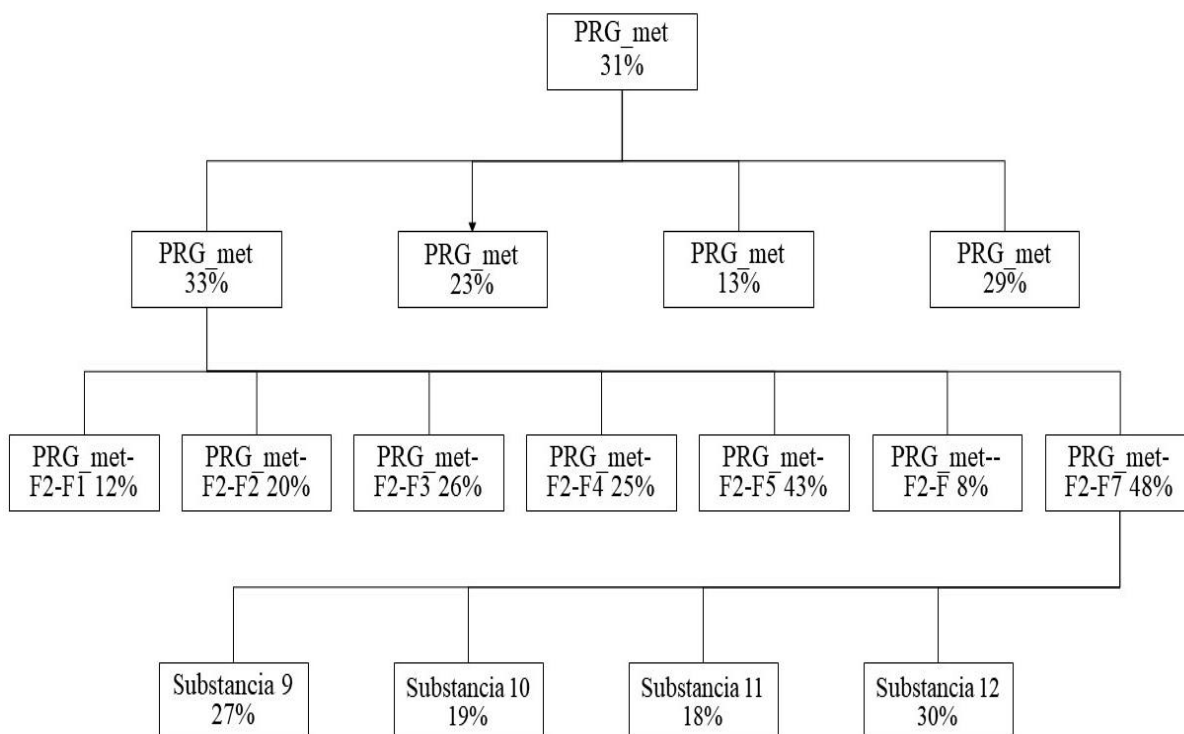


Figura 4.27- Fluxograma referente ao trabalho realizado com o fungo.

4.5.1.2. *Pricamnia riedelli*

Foi realizado primeiramente avaliação dos extratos brutos frente ao fungo, buscando inibição do crescimento do fungo simbionte. Dentre os extratos testados o *Pricamnia riedelli* metanólica do galho, o que apresentou melhor resultado, expressando 31% de inibição, **B**) Em contrapartida, para os extratos de éter de petróleo foi observada uma inibição de 10% **A**), enquanto que o extrato de folhas apresentou uma inibição de 21% **C**) (Figura 4.29), os dados estatísticos estão compilados no Anexo 33).

A partir dos resultados dos ensaios biológicos mencionados, foi usado o extrato metanólico de galho o qual foi submetido a fracionamentos e por conseguinte dar continuidade ao biomonitoramento do mesmo. É válido ressaltar que as atividades para os extratos foram marginais, mas para dar continuidade no estudo frente ao fungo e gerar mais informações sobre a quimiosistemática das *Pricamnias* e contribuir principalmente sobre as atividades dos mesmos frente ao alvo do projeto .

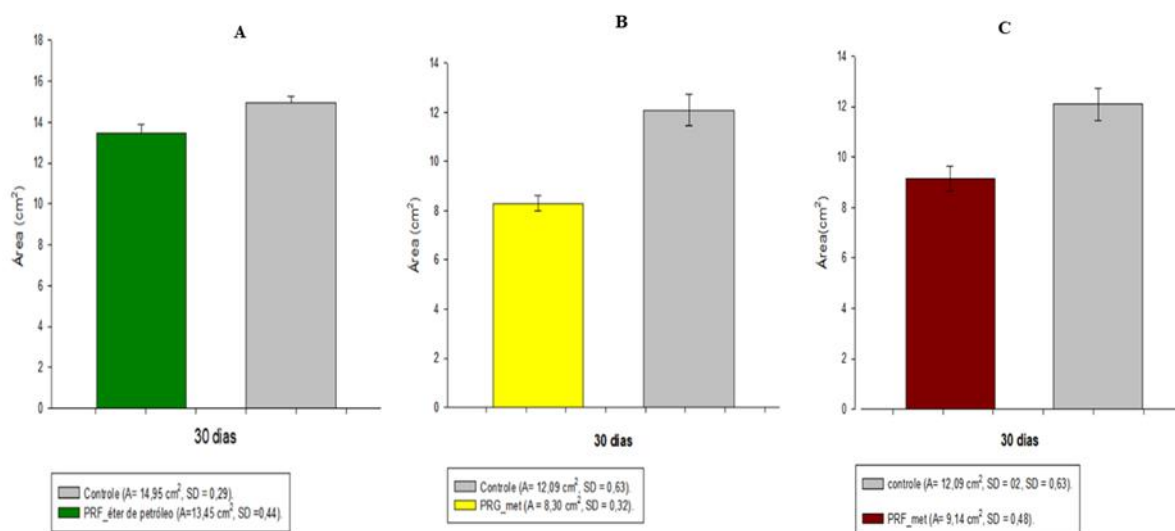


Figura 4.28 - Gráficos referentes ao crescimento micelial da triagem dos extratos.

4.5.1.3. Avaliação da inibição do crescimento micelial das frações de PRG

As frações obtidas de PRG_F1 a F5, apresentaram similaridade em seus espectros de RMN de ^1H no Anexo 1, com sinais característicos de antraquinonas δ 12,10, 12,01, 7,70; 7,63; 7,31. Foi testada a atividade biológica de PRG_F2 a F5 (por apresentarem massa suficiente) contra o *L. gongylophorus*, verificou-se percentual de inibição similar dentre elas (Anexo 34-35), resultando que a escolha da fração para estudos subsequentes que deu-se pela de maior massa, para que pudesse ser fracionada novamente.

Os percentuais de inibição 33%, 23%, 13% e 29% foram observados para as frações PRG_F2 à PRG_F5 (Anexo 31). Assim, foi escolhida a fração PRG_F2 para dar sequência no trabalho. Os dados estáticos estão no Anexo 35. Não foi utilizada a fração PRG_F1 pois não havia massa o suficiente para ser avaliada.

4.5.1.4. Segundo fracionamento da PRG- met

A fração PRG_met- F02 foi submetida a um novo refracionamento e foi possível verificar a mudança de atividades entre as frações, possivelmente pelo princípio ativo estar sendo concentrado em algumas delas. Como demonstrado na Figura 4.30, com o fracionamento foi possível aumentar a atividade em relação ao extrato bruto e a fração PRG_F2, foi observado os percentuais de atividade inibitória de 43% e 48 % para as frações PRG_ F2- F100% acetato e PRG_ F2- F100% met respectivamente.

Ao analisar a fração PRG_F2-F100%met, foi primeiramente submetida RMN de ^1H , como o solvente que melhor solubilizava a fração era metanol, foi realizado análise no mesmo. Não foi observado sinais a cima de 12 ppm, característico antraquinonas, no entanto foram observados sinais na região dos aromáticos e principalmente de sinais de glicose. O espectro de RMN de ^1H

está apresentado no Anexo 2. Podendo haver substâncias glicosiladas na fração, sendo assim gerando interesse maior na mesma, principalmente que haveria a possibilidade de um composto apenas após o isolamento ter atividade frente ao fungo, os dados estatísticos estão no Anexo 36.

A partir dessas informações, fez-se necessário um novo fracionamento para monitorar a atividade das substâncias ali presentes.

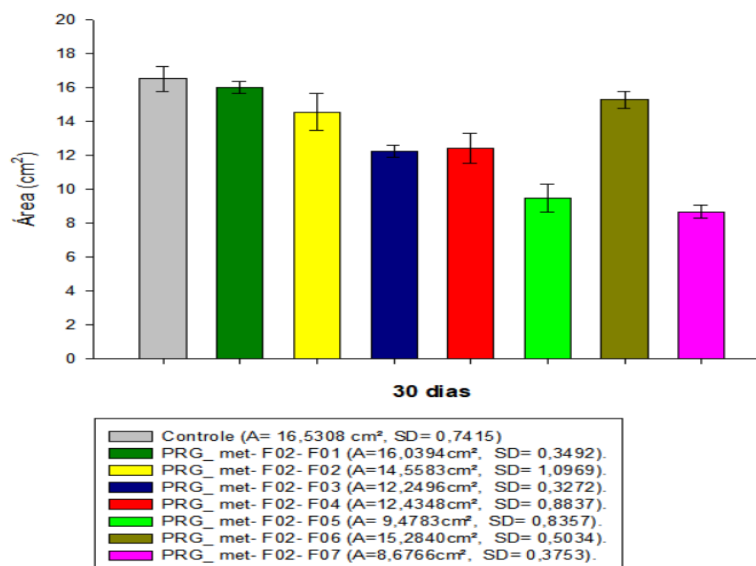


Figura 4.29- Ensaio referente ao segundo fracionamento para a fração PRG_F2.

4.5.1.5. Terceiro fracionamento de PRG_met

Foram isoladas 4 substâncias a partir da fração PRG_F2_100%met, seguindo a metodologia descrita na seção 3.2.4. O espectro de RMN de ^1H está apresentado no Anexo 3. Sendo assim, pode ser observados os seguintes percentuais de inibição do crescimento de micelial 28%, 19%, 18%, 30%, e para as substâncias **9**, **10**, **11** e **12**, Figura 4.31 (Anexo 37). Como observado, são substâncias pertencentes a classe de antraquinonas e não foram eficiente para o controle do fungo simbionte. É válido ressaltar que na literatura há relatos de antraquinonas com propriedades fungicidas. Como observado no presente trabalho as substâncias aqui apresentados não tiveram atividade relevante para o objeto de estudos.

A fração PRG_met- F2-F100%, apresentou maior atividade em comparação com as substâncias isoladas, possivelmente há potencialização na ação pelo efeito de sinergismo entre as substâncias identificadas ou algum composto minoritário que por alguma eventual fatalidade foi descartado possa estar expressando a atividade.

Um ponto interessante observado é a diferença de atividade inibitória entre as substâncias **11** e **12**, que seria a diferença da glicosilação, a qual está substituído na posição 1 do sistema de antraquinonas e a outra na posição 8. Pois o esqueleto seria o mesmo não esperava-se mudança na atividade biológica, mas o observado é que sutilmente a substância **11** apresentou maior atividade em relação a substância **12**.

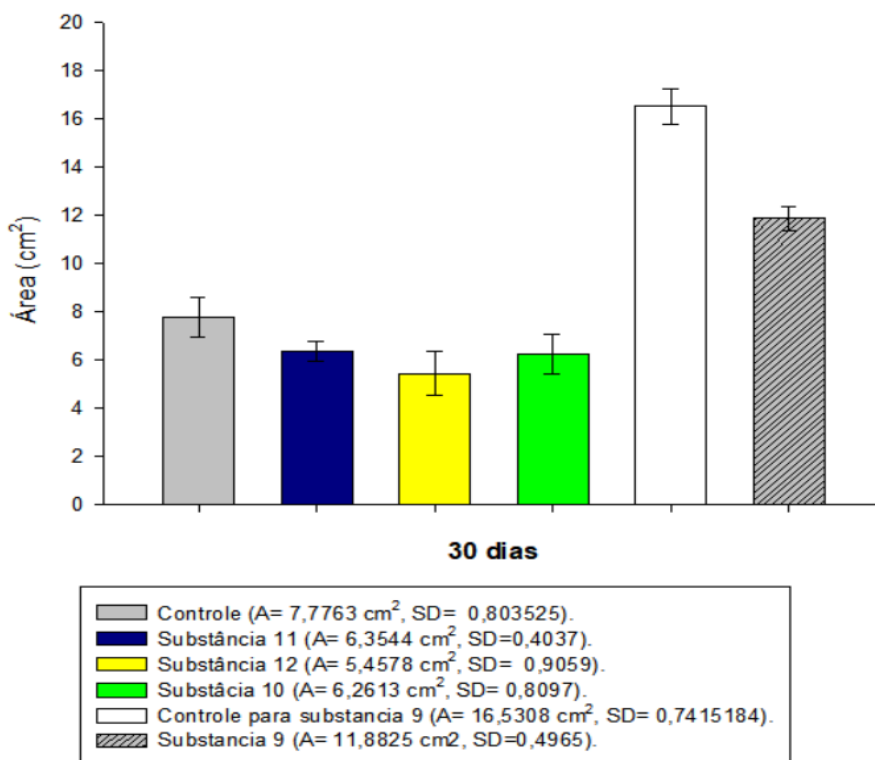


Figura 4.30- Ensaio para avaliação do terceiro fracionamento.

4.5.1.6. Avaliação do complexo frente ao *Leucogaricus gongylophorus*

Foi averiguado se a complexação da antraquinona haveria atribuído propriedades fungicidas, observado 27 % da molécula complexada, mostrando que para o estudo a estrutura proposta complexada não apresentou melhoramento na atividade biológica para o fungo, como mostrado na Figura 4.32. Os dados estatísticos estão no Anexo 38.

No entanto, é apenas o primeiro estudo desse cunho, mostrando que há possibilidades de novos estudos relacionados às antraquinonas e tentativa de potencialização de atividade biológica. Novos estudos utilizando ligantes isolados e complexação com novos centros metálicos será desenvolvida durante o período de doutorado, principalmente para melhor atividade biológica e focar em possíveis substâncias que possam ser aplicadas e agregado a isso gerar mais informações sobre tais estruturas, um vez que há apenas um relato de complexação com estruturas dessa classe.

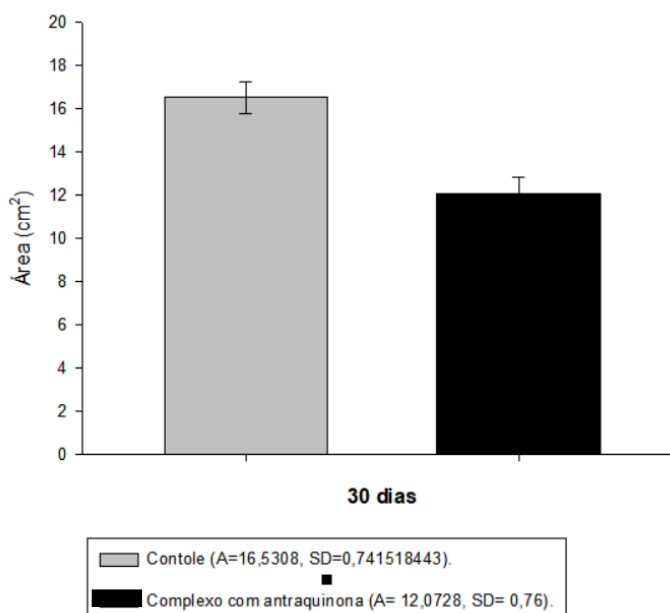


Figura 4.31 - Ensaio fungicida da antraquinona e do seu complexo avaliando a inibição micelial do fungo *L. gongylophorus*.

4.5.2. Ensaios inseticida frente formiga cortadeira *Atta sedenx rubripilosa*

4.5.2.1. *Pricamnia riedelli*- Extrato bruto “*in vitro*”.

Os ensaios biológicos aqui apresentados guiaram o fracionamento e identificação dos compostos bioativos, foram realizados seguindo a metodologia descrito na seção 3.2.9. Os resultados obtidos para cada bioensaio estão apresentados através das análises gráficas das curvas de sobrevivência e das tabelas que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana (Md) e a interpretação do teste “log rank”.

Todos os extratos ensaiados pertencem a mesma espécie e passaram pela avaliação de propriedades inseticidas. Foi observado 66% de mortalidade para o extrato de folhas feito com éter de petróleo ao final do experimento, não sendo tão eficiente para ser usado no trabalho. Já o extrato PRF_{met}, apresentou 96% de mortalidade sendo esse eficiente para o estudo, onde foi fracionado, Figura 4.33. Seguido pelo extrato de galhos com o qual foi obtido 58%, de máximo de mortalidade, Figura 4.34. Os resultados estatísticos estão apresentados no Anexo 39.

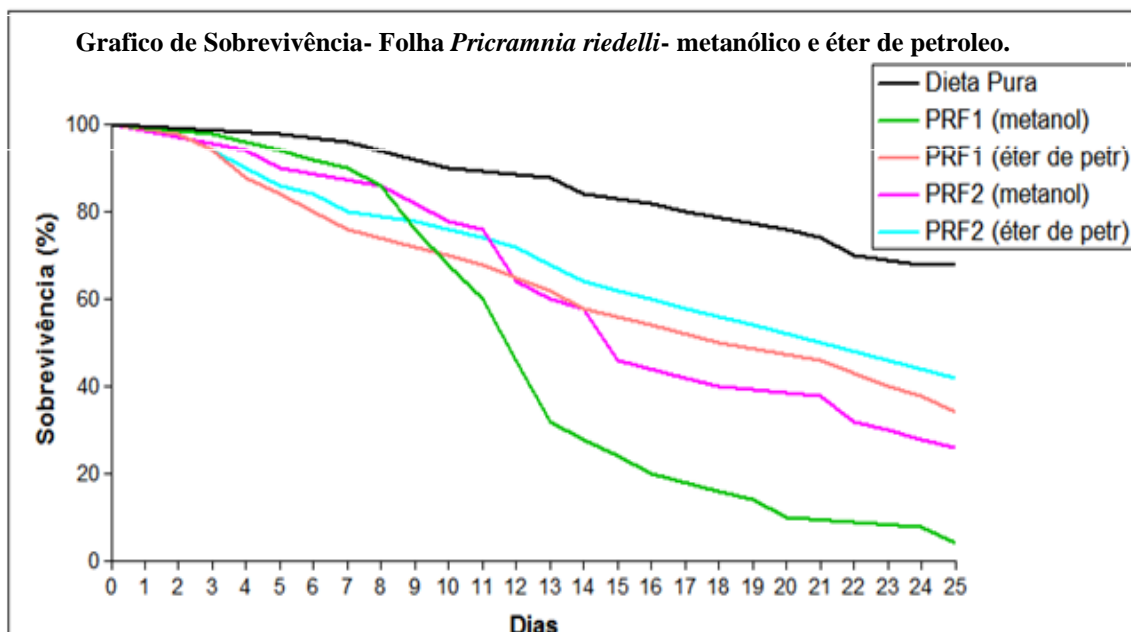


Figura 4.32 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelle* folhas nas concentrações PRF (metanol) 0,002 mg/ml, PRF (éter de petróleo) 0,002 mg/ml, PRF (metanol) 0,002 mg/ml e PRF (éter de petróleo).

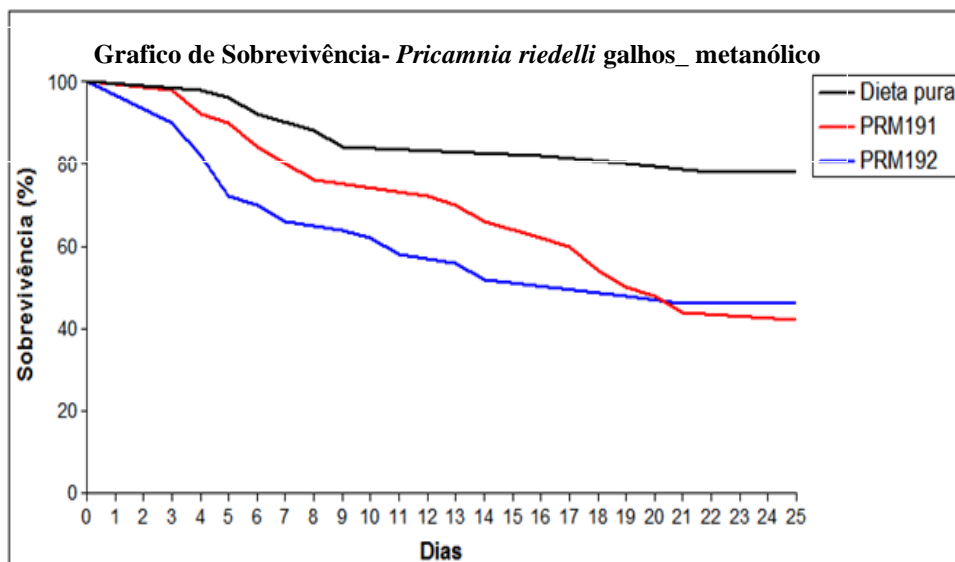


Figura 4.33- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelle* nas concentrações PRG (metanol) 0,005 mg/mL e PRG (metanol) 0,003 mg/mL.

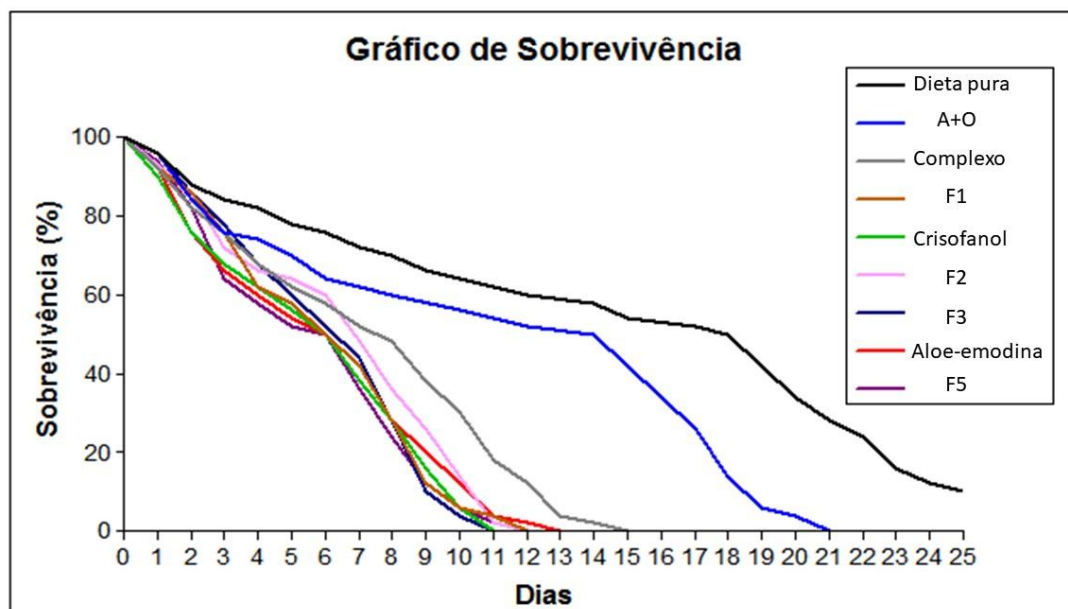
4.5.2.2. Frações obtidas a partir do CPC

O protocolo dos extratos de PRF_{met}, foi o mesmo aplicado as frações e compostos isolados. A partir do fracionamento cromatográfico aplicando a metodologia descrito na seção 3.2.7, gerou 5 frações, onde foram avaliadas, podendo ser observado que todas apresentaram propriedades inseticidas. As frações F1, F4 e F5 apresentaram 50% de mortalidade em 6 dias, frações potencialmente promissoras para dar continuidade ao estudo. Os resultados estatísticos e percentuais estão apresentados no Anexo 40.

A partir das informações assim apresentadas, atentou-se para as frações F1 e F4 para continuar com o estudo, uma vez que a fração F5 é hidroalcoólica e bastante complexa, requerendo maior tempo de estudo que será dado continuidade para mesma durante o doutorado. Com isso, foi identificada a substância **10** na fração F1 e a substância **9** na fração F4, ambos majoritários, as quais foram avaliadas quanto a sua atividade biológica. Mostrando que ambas substâncias apresentavam propriedades inseticida contra as formigas, 50% de mortalidade em 6 dias de experimento e 100% ao final. Demonstrando que são substâncias possuem alto valor de toxicidade frente ao alvo. Os resultados desse experimento estão apresentados na Figura 4.35 e os dados estatísticos estão no Anexo 40.

Uma hipótese para essa toxicidade e de vários compostos serem tóxicos na planta estudada é o mecanismo de defesa criado por ela durante seus desenvolvimentos evolucionários, mostrando que as substâncias podem vim a ser utilizada como um potencial inseticida, uma vez que a natureza nos mostra modelos estruturais para assim que possamos aplicar a nosso favor.

Figura 4.34 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os ingredientes ativos.



4.5.2.3. Comparação de atividade biológica

Foi realizada busca na literatura para avaliar se havia relatos da atividade biológicas dessa classe de substância frente as formigas. Foi

encontrado um trabalho desenvolvido pelo grupo de produtos naturais da UFSCar, KITAMURA⁶⁹, realizou análises de atividade inseticida de compostos comerciais naturais com estruturas similar com a classe em questão.

As substâncias avaliadas foram: alizarina, 2-metil-antraquinona, antraquinona, menadiona, 1,4-naftoquinona e Crisofanol. Como relatado, as substâncias: alizarina, 2-metil-antraquinona e antraquinona não apresentaram atividade biológica, já as substâncias: menadiona e 1,4-naftoquinona apresentaram atividade, Figura 4.36. Notou-se que a posição da metila interferia na atividade biológica, junto com a posição dos hidrogênios quelados pode ser um fator que esteja gerando tal ausência de atividade.

Como a diferença entre o Crisofanol e a aloe-emodina é uma oxidação a mais, foi observado que não havia diferença entre as suas respectivas atividades biológicas, mostrando que a oxidação nesse ponto da molécula não interfere na sua aplicação biológica.

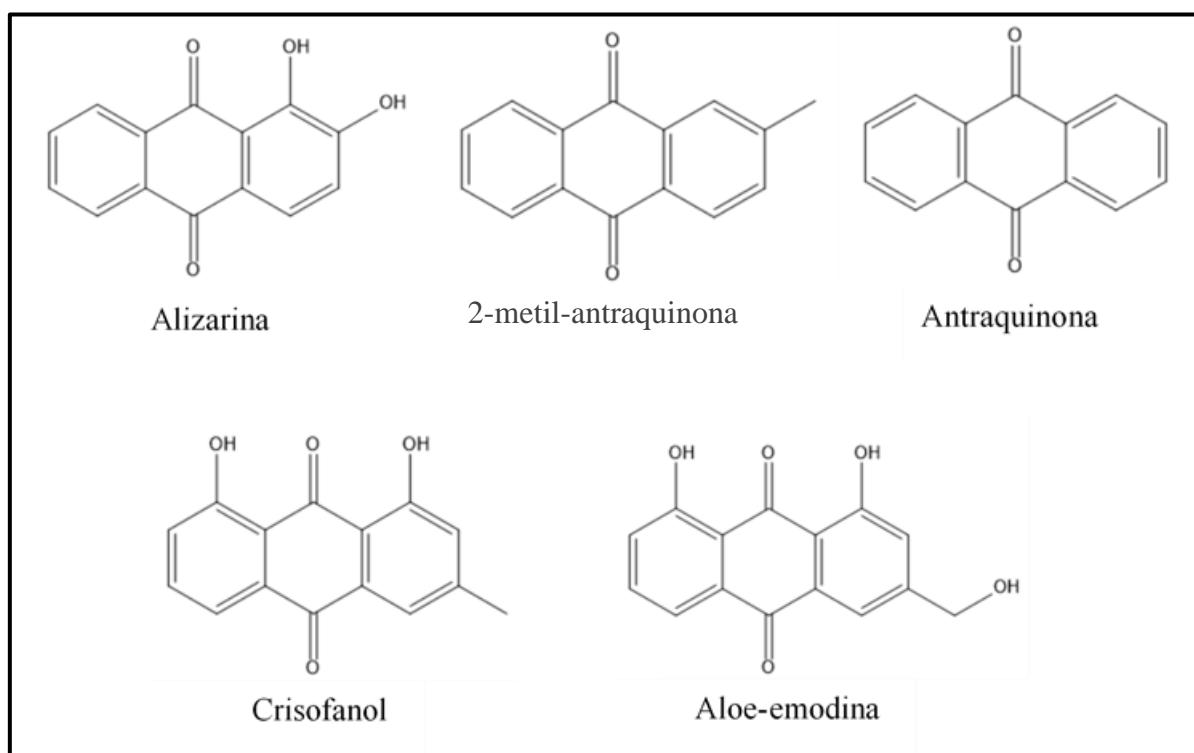


Figura 4.35- Estrutura de composto já testados contra a *Atta sexdens rubropilosa*.

No trabalho de JUNG⁷⁵, foi encontrado relatos de antraquinonas com poder inibitorio sobre a enzima acetilcolinesterase, sendo relatado 68% de inibição para crisofanol e 71% para aloe-emodina. Podendo criar a hipotese do mecanismo de ação dessas substâncias sobre a acetilcolinesterase presentes em formigas, a inibição dessa enzima pode levar à um colapso generalizado levando o inseto a morte.⁷⁶

4.5.2.4. Atividade do complexo

Como a complexação está atrelado a de potencialização da atividade biologica, uma vez que já havíamos identificado algumas estruturas bioativas. Como observado, a complexo continuou apresentando toxicidade frente as formigas mas atribuiu tempo menos rapido de ação, atribuindo controle maior para o composto.

Quando avaliado a molécula complexada, ela atingido 50% de mortalidade das formigas em 8 dias em comparação que com outras antraquinonas avaliadas, age em 6 dias pode se dizer que não há viabilidade na complexação. No entanto, entendendo o mecanismo de um formigueiro e pensando em uma possivel aplicação, podemos inferir que possivelmente não irá alertar o formigueiro que há algo tóxico agindo e será eficiente. Figura 4.35 e os dados estatísticos estão no Anexo 40.

4.5.3. Ensaio biológico *in vitro* com bactérias

A avaliação inibitória mínima (CIM) deu-se através de coloração utilizando corante resazurina. Onde na presença de bactérias sofrem redução para resorufina, passando da cor azul para a cor rósea, inferindo atividade bacteriostático em *Xantaromonas citri* subsp *citri*, Figura 4.37.



Figura 4.36 Avaliação do teste bacteriano, coloração azul indica ocorrência de inibição e rósea a não inibição.

A metodologia de avaliação inibitória mínima estar descrito na seção descrito na seção 3.2.11. Foi avaliado os extratos brutos de PRF_met e PRG_met, avaliando seu potencial bacteriostático, a concentração de CIM, sendo a menor quantidade de amostra necessária para inibição do crescimento do microrganismo *in vitro*, para ambos os extratos foi observado a concentração de $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, esse resultado se repetindo para 15 linhagens de *Xanthomonas* avaliadas apresentado na Tabela 4.11.

Na avaliação da substância aloe-emodina foi averiguado que possui um CIM de $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ seguindo o mesmo parâmetro de análise, o qual foi avaliado para as mesmas 15 bactérias, a análise mostrou a mesma concentração inibitória para todos. No entanto, quando foi avaliado a molécula complexada houve uma diminuição de concentração para a inibição, caracterizando a potencialização da atividade do composto, apresentado com $250 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

A antraquinona que sofreu complexação apresenta uma concentração de $3703 \mu\text{M}$, quando analisado a molécula complexada esse valor

cai para 412,5 μM , sendo uma melhora de aproximadamente 9 vezes em relação ao ligante e 2,5 vezes menor que o sal de cobre usado para realizar a complexação, como mostra na Figura 4.38.

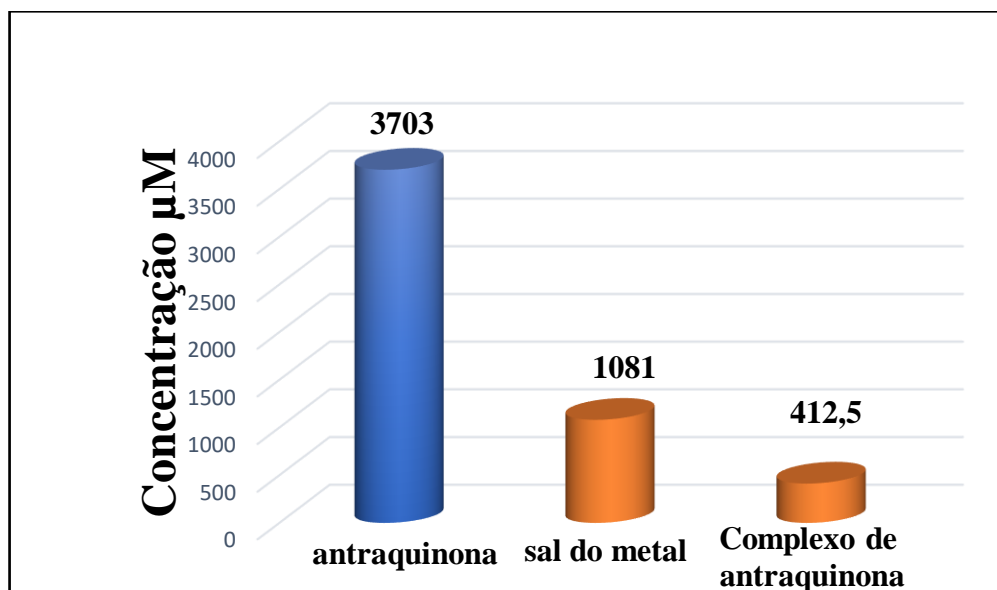


Figura 4.37 -Valores mínimos que inibiram a bactéria, comparando o ligante em azul, sal do metal feito a síntese e a molécula formada da mesma cor.

Tabela 4.11- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para extratos, antraquinona e complexo de antraquinona

Isolado	Extratos de Galhos MIC $\mu\text{g/ mL}$	Extrato de Folhas MIC $\mu\text{g/ mL}$	Antraquinona MIC $\mu\text{g/ mL}$	Complexo de Antraquinona MIC $\mu\text{g/ mL}$	Controle positivo MIC $\mu\text{g/ mL}$
1644	1000	1000	1000	1000	0,1844
1645	1000	1000	1000	1000	0,0922
1646	1000	1000	1000	1000	0,0922
1647	1000	1000	1000	1000	0,1844
1648	1000	1000	1000	1000	0,1844
1666	1000	1000	1000	1000	0,0922
1670	1000	1000	1000	250	0,0922
1705	1000	1000	1000	250	0,0922
1707	1000	1000	1000	250	0,0922
1733	1000	1000	1000	250	0,0922
12	1000	1000	1000	250	0,0922
75	1000	1000	1000	250	0,0922
316	1000	1000	1000	250	0,0922
621	1000	1000	1000	250	0,0922
10	1000	1000	1000	250	0,0922

Foi realizado calculo teórico do percentual do metal no complexo e no sal de cobre, $\text{M}(\text{NO}_2)_3$, usando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L e Borel,⁷⁷. Obtendo o resultado de 10% para a complexo e 31,52% para o sal do metal, Figura 4.39. Mostrando que a molécula complexada possui 1/3 a menos do percentual do M^{2+} na composição, inferindo que a melhoria da atividade biologia está atrelada a complexação.

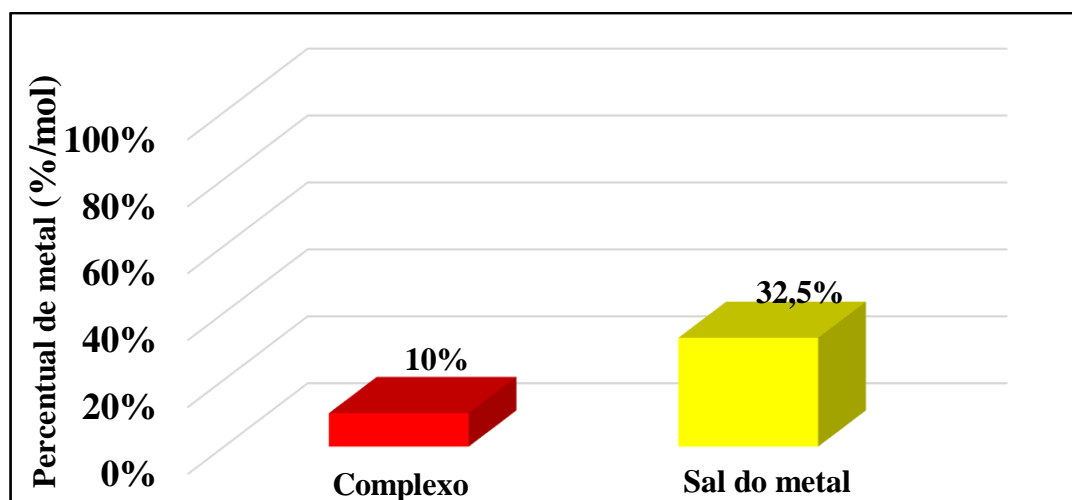


Figura 4.38- Porcentagem teórica de metal no complexo e no sal utilizando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L & Borel.

5. CONCLUSÃO:

O estudo biomonitorado com a espécie *Picramnia riedelli* levou a identificação de 14 compostos sendo 4 ácidos de cadeia longa, 5 antraquinonas e 4 ésteres de cadeia longa, já que existe pouco estudo na literatura sobre essa espécie.

O fracionamento no CPC, mostrou-se eficaz para obtenção de frações bioativas frente a formiga *Atta sexdens rubropilosa*, juntamente com isolamento da antraquinona aloe-emodina, sendo uma técnica alternativa para o isolamento de tal composto.

Os extratos analisados não apresentaram atividade considerável inibitória frente ao fungo *L. gongylophorus*, simbionte da formiga, juntamente com substância **9**, **10**, **11**, e **12** que não possuem atividade fungicida contra o alvo. Sendo assim, o relato para a contribuição quimiossistemática do gênero estudado.

Para o controle de formigas cortadeiras, foi obtido resultados promissores da antraquinona aloe-emodina, a qual mostrou ser potencial tóxica e eficiente. Indicando como uma forte alternativa de produto natural para o controle dessa praga agrícola.

A síntese de uma nova molécula (primeira vez relatada na literatura), bioativa, demonstrando que a complexação de antraquinonas pode em um futuro breve gerar bons resultados quanto a potencialização da atividade biológica, principalmente frente a bactéria *Xanthomonas citri*.

Os resultados aqui apresentados, demonstra a relevância no estudo da composição química de *Picramnia*, quanto a busca de compostos potencialmente ativos biologicamente, contribuindo para o combate de pragas agrícolas, como o foco deste trabalho. Colaborando para o desenvolver uma agricultura sustentável e com menos formulações tóxicas para o ser-humano e outros animais.

6. REFERÊNCIAS

1. JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* v. 26, p. 390–400, 2003.
2. LO, J.; LEONEL, J.; COUSINS, I. T. & BENSKIN, J. P. Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of Perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Env. Sci. Technol.* v. 50, p. 653-659, 2016. doi:10.1021/acs.est.5b04544.
3. OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M. & FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Prot.* v. 56, p. 50–54, 2014.
4. FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; SAES, N. B., Economics of grass-cutting ants. Chapt 4. in Lofgren, C. S. Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management. Imprint CRC Press, 452 p., 2019.
5. ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, T. & LEMES, P. G. An Overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* v. 5, p. 439–454, 2014. doi:10.3390/f5030439.
6. ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B. & SOUZA-SILVA, A. Systematic control of leaf-cutting ants in areas with eucalyptus stands under minimum cultivation system. *Rev. Árvore* v. 27, p. 387–392, 1996.
7. PODEROSO, J. C. M.; RIBEIRO, G.T.; GOLÇALVES, G.B.; MENDONÇA, P. D.; POLANCZYK, R. A.; ZANETTI, R.; SERRAO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Nest and Foraging Characteristics of *Acromyrmex landolti balzani* (Hymenoptera: Formicidae) in Northeast Brazil.

Sociobiology, v. 54, p. 361-370, 2014.

8. WARD P. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae)*. *Zootaxa* v. 563, p. 549–563, 2007.
9. MARICONI, F. DE A. M. Introdução sobre o estudo dos insetos, 1971.
10. BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C. & RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. *Pest Manag. Sci.* v. 73, p. 999–1009, 2017.
11. BRITTO, J. S.; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, A. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CARMARGO, R. S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting. *Int. J. Res. Environ. Stud.* v. 3, p. 11-92, 2016.
12. NORTH, R.D.; JACKSON, C.W. & HOWSE, P.E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends Ecol. Evol.* v. 12, p. 386-389, 1997.
13. PINHATI, A.C.O.S.; JR BACCI, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M.L.; PAGNOCCA, F.C.; MARTINS, V.G.; BUENO, O.G.; 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.* v. 37, p.1463–1472, 2004.
14. SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.; BUENO, O.; J A HEBLING, M. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. *Current Microb.*, v. 53, p. 68-71, 2006.
15. SAPOUNTZIS, P.; NASH, D. R.; SCHIØTT, M. & BOOMSMA, J. J. The

- evolution of abdominal microbiomes in fungus-growing ants. *Mol. Ecol.* v. 28, p. 879–899, 2019.
16. POWELL, R. & STRADLING, D. Fungiculture and the choice of substrate by Attine ants. In *Biology and evolution of social insects* (Billen J.). Stradling DJ, Powell RJ, Ed. Leuven: Leuven University Press; 133–143, 1992.
 17. FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; CORREA, A.G.; JUNIOR, M.B.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.G. O futuro dos produtos naturais no controle de formigas. *Biologico.* v. 69, p. 221–224, 2007.
 18. ALMEIDA, R. N.A.; PENAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S. Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, A.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Bioassay*, p. 1–8, 2007.
 19. LÖFSTEDT GILLJAM, J.; LEONEL, J.; COUSINS, I. T. & BENSKIN, J. P. Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environ. Sci. Technol.* v. 50, p. 653–659, 2016.
 20. USEPA. 1989 Sulfluramid(GX-071) EPA Pesticide Fact Sheet 3/89. Available at: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/propetamphos-zetacyperm/sulfluramid/insect-prof-sulfluramid.html>.
 21. PLUMLEE, M. H.; MCNEILL, K. & REINHARD, M. Indirect photolysis of perfluorochemicals: hydroxyl radical-initiated oxidation of N-ethyl perfluorooctane sulfonamido acetate (N-EtFOSAA) and other perfluoroalkanesulfonamides. *Environ. Sci. Technol.* v. 43, p. 3662–3668, 2009.
 22. BENSKIN, J. P. & HOLT, A. Isomer-specific biotransformation rates of a

- perfluorooctane sulfonate (PFOS)- precursor by cytochrome P450 isozymes and human liver microsomes. *Environ. Sci. Technol.* v. 43, p. 8566–8572, 2009.
23. MEJIA, S. & LIU, J. Chemosphere Production of PFOS from aerobic soil biotransformation of two perfluoroalkyl sulfonamide derivatives. *Chemosphere* v. 119, p. 1084–1090, 2015.
 24. GIESY, J. P. & KANNAN, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.* v. 35, p. 1339–1342, 2001.
 25. STAHL, T.; MATTERN, D. & BRUNN, H. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environ. Sci. Eur.* v. 23, article 38, 2011.
 26. LAU, C.; BUTENHOFF, J. L. & ROGERS, J. M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Tox. and Applied Pharmac.* v. 198, p. 231–241, 2004.
 27. FORIM, M. R.; MATOS, A.P.M.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: Reprodutibilidade da ação inseticida. *Quim. Nova*, v. 33, p. 1082–1087, 2010.
 28. BOULOGNE, I.; PETIT, P.; DESFONTAINES, H. O. L. & LORANGER-MERCIRIS, G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* v. 10, p. 325-347, 2012.
 29. ZARBIN, P. H.; RODRIGUES, M. A. C. M. & LIMA, E.R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quim. Nova*, v.32, p.722–731, 2009.
 30. CALDART, V. M.; IOP, S.; LUTINSKI, J. A. & ROBERTO, F. Diversidade de formigas (Hymenoptera, Formicidae) do perímetro urbano do município de Chapecó, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zootecias* v. 14, p. 81–94, 2012.

31. ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; DOS SANTOS, M. M. B. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R. & VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Quim. Nova.* v. 30, p. 935-951, 2007.
32. PAES, M. M. Constituintes químicos de *Picramnia ramiflora* (Picramniaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 120 p. 2012.
33. Available at: www.tropicos.org/Name/50318896. (Acessado: 11 setembro de 2019).
34. PIRANI, J. R. & DEVECCHI, M. F. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Picramniaceae. *Rodriguesia* v. 67, p. 1447–1449, 2016.
35. FERNANDO, E. S.; QUINN, C. J.; TAXON, S. & MAY, N. Picramniaceae, a new family, and a recircumscription of Simaroubaceae. *Taxon* v. 44, p. 177–181, 1995.
36. ROBLEDO, S. R.; CARDONA, W.; LIGARDO, K.; HENAO, J.; ARBELAEZ, N.; MONTOYA, A.; ALZATE, F.; PEREZ, J.M.; ARANGO, V.; VELEZ, I. D. SAEZ, J. Antileishmanial effect of 5,3'-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone of *Picramnia gracilis* tul. (Picramniaceae) fruit: *in vitro* and *in vivo* studies. *Adv. Pharmacol. Sci.* v. 2015, Article ID 978379, 1-8.
37. PHIFER, S.; LEE, D.; SEO, E.; KIM, N.; GRAF, T.; KROLL, D.; NAVARRO, H.; IZYDORE, R.; JIMÉNEZ, F.; GARCIA, R.; ROSE, W.; FAIRCHILD, C.; WILD, R.; SOEJARTO, D.; FARNSWORTH, N.; KINGHORN, A.; OBERLIES, N.; WALL, M.; WANI, M. Alvaradoins e-n, antitumor and cytotoxic anthracenone c-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*. *J. Nat. Prod.* v. 70, p. 954-961, 2007.
38. DIAZ, F.; CHAI, H. B.; MI, Q.; SU, B. N.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J.

- M.; SWANSON, S. M.; KINGHORN, A. D. Anthrone and oxanthrone C-glycosides from *Picramnia latifolia* collected in Peru. *J. Nat. Prod.* v. 67, p. 352–356, 2004.
39. Rodríguez-Gamboa, T.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Fo., E.; Da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C. & Castro, O. C, Two anthrones and one oxanthrone from *Picramnia teapensis*. *Phytochemistry.* v. 51, p. 583–586, 1999.
40. ROEHRER, S.; BEZOLD, F., GARCÍA, E. M. & MINCEVA, M. Deep eutectic solvents in countercurrent and centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* v. 1434, p. 102–110, 2016.
41. POPP, J. R.; PETRAKIS, E. A.; ANGELIS, A.; HALABALAKI, M.; BONN, G. K.; STRUPPNER, H.; SKALTSOUNIS, L. A. Rapid isolation of acidic cannabinoids from *Cannabis sativa* L. using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1599, p. 196–202, 2019.
42. BEZOLD, F. & MINCEVA, M. A water-free solvent system containing an L-menthol-based deep eutectic solvent for centrifugal partition chromatography applications. *J. Chromatogr. A* v. 1587, p. 166–171 (2019).
43. MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J. Chromatogr. A* v. 1112, p. 181–194, 2006.
44. FRIESEN, B. & PAULI, G. Solvent selection in countercurrent chromatography (CCC). *Countercurrent. Org.* p. 1–11, 2015.
45. DUBUIS, A.; LE MASLE, A.; CHAHEN, L., DESTANDAU, E.; CHARON, N. Centrifugal partition chromatography as a fractionation tool for the analysis of lignocellulosic biomass products by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1597, p. 159–166, 2019.

46. LIU, Y. The Generally useful estimate of solvent systems (GUESS) method enables the rapid purification of methylpyridoxine regioisomers by countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1426, p. 248–251, 2015.
47. OKA, F.; OKA, H. & ITO, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* v. 538, p. 99–108, 1991.
48. KUMAR, D.; DHAR, D. N. & SAXENA, P. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. *J. Sci. Ind. Res*, v. 68, p.181–187, 2009.
49. SMITHEEN, D. A.; YIN, H.; BEH, M. H. R.; HETU, M.; CAMEROM, T. S.; MCFARLAND, S. A.; THOMPSON, A. Synthesis and photobiological activity of Ru(II) dyads derived from pyrrole-2-carboxylate thionoesters. *Inorg. Chem.* v. 56, p. 4121-4232, 2017.
50. INTINI, F. P.; ZAJAC, J.; NOVOHRADSKY, V.; SALTARELLA, T.; PACIFICO, C.; BRABEC, V.; NATILE, G. & KASPARKOVA, J. Novel antitumor platinum(II) conjugates containing the nonsteroidal anti-inflammatory agent diclofenac: synthesis and dual mechanisms of antiproliferative effects. *Inorg. Chem.* v. 56, p. 1483-1497, 2017.
51. BOULMIER, A.; FENG, X.; OMS, O.; MIALENE, P.; RIVIERE, E.; SHIN, C. J.; YOA, J.; KUBO, T.; FURUTA, T.; OLDFIELD, R. & DOLBECQ, A. Anticancer activity of polyoxometalate-bisphosphonate complexes: synthesis, characterization, *In Vitro* and *In Vivo* results. *Inorg. Chem.* v. 56, p. 7558-7565, 2017.
52. DU, J.; KANG, Y.; ZHAO, Y.; ZHENG, W.; ZHANG, Y.; LIN, Y.; WANG.; WANG, Y.; LUO, Q.; WU, K. & WANG, F. Synthesis, characterization, and *in vitro* antitumor activity of ruthenium (II) polypyridyl complexes tethering EGFR-inhibiting 4-anilinoquinazolines.

- Inorg. Chem. v. 55, p. 4595-4605, 2016.
53. BAILEY, G. A.; PRICE, E. W.; ZEGLIS, B. M.; FERREIRA, C. L.; BOROS, E.; LACASSE, M. J.; PATRICK, B. O.; LEWIS, J. S.; ADAM, M. J. & ORVIG, C. H₂azapa: a versatile acyclic multifunctional chelator for ⁶⁷Ga, ⁶⁴Cu, ¹¹¹In, and ¹⁷⁷Lu. Inorg. Chem. v. 51, p. 12575–12589, 2012. doi:10.1021/ic302225z
 54. CUI, H.; GODDARD, R.; PO, K.; HAMACHER, A. & KASSACK, M. U. Bispidin-9,9-diol analogues of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin: synthesis, structures, and cytotoxicity. Inorg. Chem. v. 55, p. 2986–2997, 2016.
 55. WEIDMANN, A. G. & BARTON, J. K. A monofunctional platinum complex coordinated to a rhodium metalloinsertor selectively binds mismatched DNA in the minor groove. Inorg. Chem. v. 54, p. 9626-9636, 2016.
 56. HARRIS, R. J. & ETHERIDGE, N. D. Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps. New Zeal. J. Zool. v. 28, p. 39–48, 2001.
 57. BORKOW, G. Using copper to improve the well-being of the skin. Curr. Chem. Biol. v. 47, p. 89–102, 2014.
 58. DAVIS, C. D. Nutrition and cancer low dietary copper increases fecal free radical production, fecal water alkaline phosphatase activity and cytotoxicity in healthy men 1 , 2. J. Nutr. v. 133 p. 522–527, 2003.
 59. BONHAM, M.; CONNOR, J. M. O.; HANNIGAN, B. M. & STRAIN, J. J. Review article the immune system as a physiological indicator of marginal copper status? Brit. J. Nutr. v. 87, p. 393–403, 2002.
 60. OSREDKAR, J. & SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. J. Clin. Toxicol. v. S3, p. 1–18,

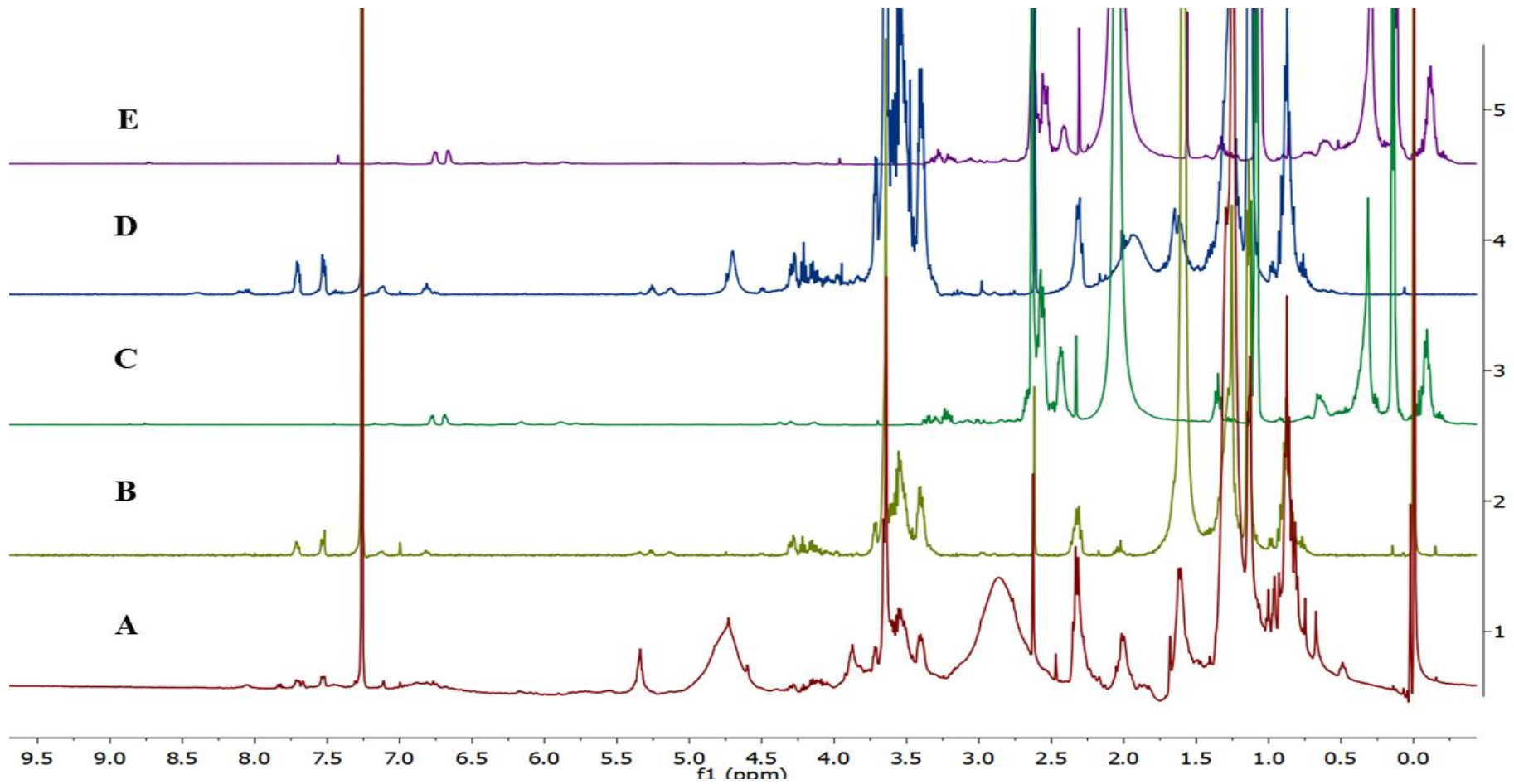
2011. doi:10.4172/2161-0495.S3-001

61. RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.; POTNIS, N. & JONES, J. B. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium – plant interactions. Nat. Publ. Gr. v. 9, p. 344–355, 2011.
62. OLIVEIRA, R. P. DE, UENO, B., SCIVITTARO, W. B. & KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 40 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 234).
63. FUNDECITRUS. Cancro cítrico: a doença e seu controle. Available at: <https://docplayer.com.br/63598889-Introducao-cancro-citrico-a-doenca-e-seu-controle.html>.
64. BOCK, C.; PARKER, P. E. & GOTTWALD, T. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. Plant Dis. v. 89, p. 71-80, 2005.
65. MARCO, G. M.; STALL, R. E. & PATHOLOGY, P. Control of bacterial spot of *Pepper* initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. Plant Disease v. 67, p. 779–781, 1983.
66. BUENO, O. C. Formigas urbanas: identificação e controle. Biológico v. 59, p. 17–19, 1997.
67. VIEIRA, I. J. C. Uma contribuição à química da família Simaroubaceae. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, 1995.
68. KAMETANI, S.; YUASA, A. K.; KIKUZAKI, H.; KENNEDY, D. O.; HONZAWA, M. & YUSA, I. M. Chemical constituents of *Cape aloe* and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich ascites tumor cells. Biosc. Biotech. Bioch. v. 71, p. 1220–1229, 2007.

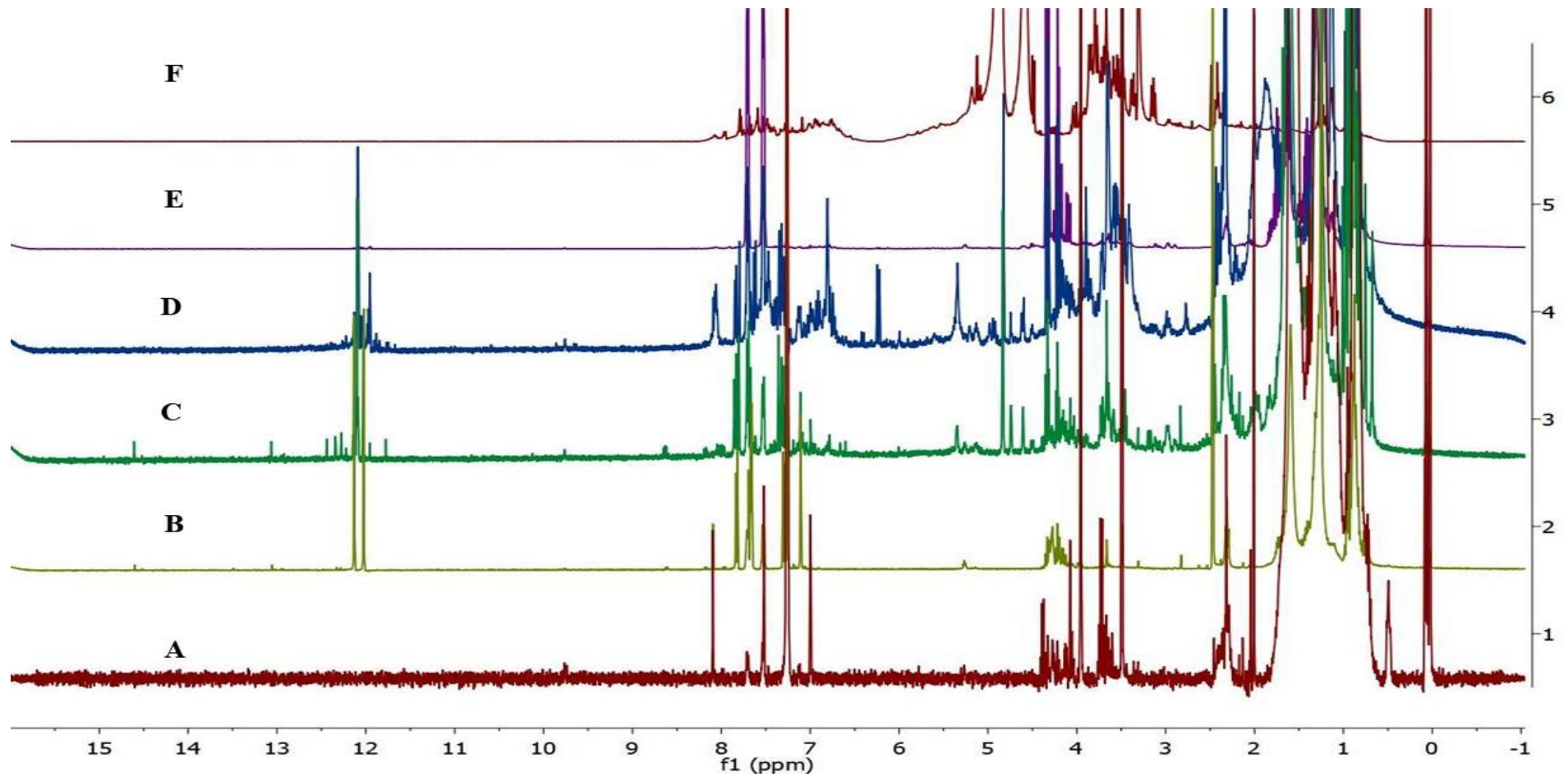
69. KITAMURA, R. O. S. Estudo Fitoquímico Biomonitorado em *Picramnia bahiensis* e *Thysodium schomburgkianum*- inceticidas, fungicidas e microencapsulação". Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, 343 p., 2013.
70. RODRIGUEZ GAMBOA, T. Estudo químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoea batatas* em associação ao controle de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophous*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2001.
71. GAO, L., XU, X. & YANG, J. Anthraquinone and naphthoquinone derivatives from the root of *Rheum officinale*. Chem. Nat. Compd. v. 53, p. 1160–1162, 2017.
72. SOCRATES, G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts, 3^a ed. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2004.
73. NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 6^a ed. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Inc., 2008.
74. MACHATOVÁ, Z.; BARBIERIKOV, Z.; POLIAK, P.; JANCOVICOVÁ, V.; LUKE, V. & BREZOVÁ, V. Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV / vis spectroscopy. Dye Pigment v. 132, p. 79-93, 2016.
75. JUNG, H. A.; ALI, M. Y.; JUNG, H. J.; JEONG, H. O.; CHUNG, H. Y. & CHOI, J. S. Inhibitory activities of major anthraquinones and other constituents from *Cassia obtusifolia* against β -secretase and cholinesterases. J. Ethnopharmacol. v. 191, p.152–160, 2016.
76. FOURNIER, D. & MUTERO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. v. 108, p. 19–31, 1994.

77. PATINY, L. & BOREL, A. CHEMCALC: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *J. Chem. Inf. Model*, v.53, p. 1223-1228, 2013.

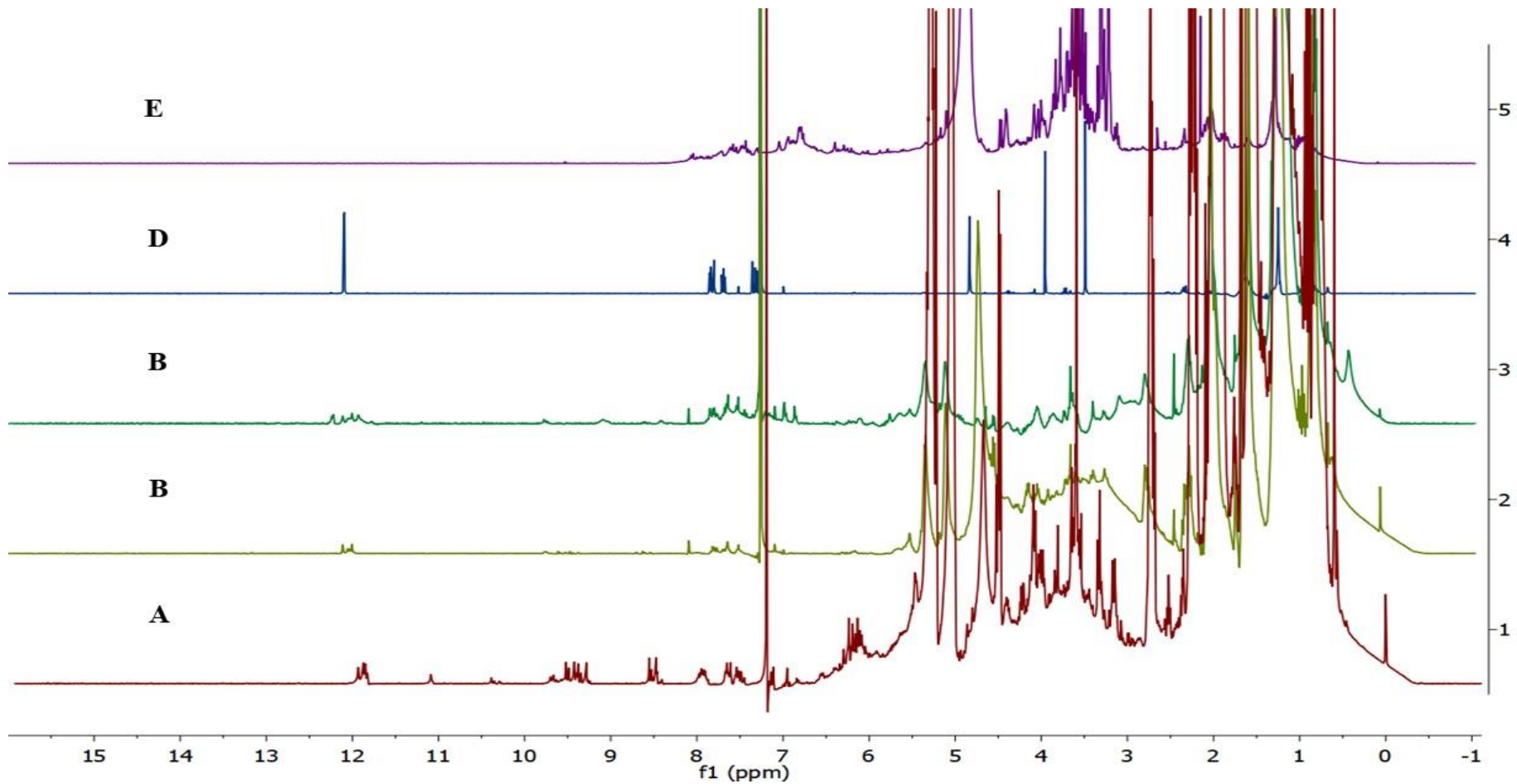
Anexos:



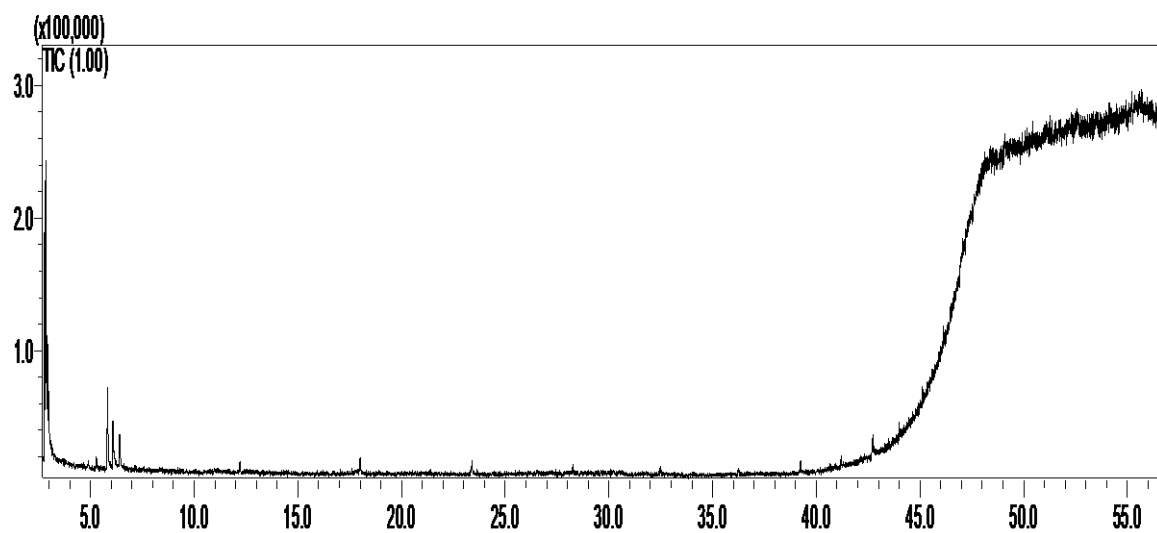
Anexo 1- Sobreposição de espectros da primeira separação de PRG_met. **A)** fração PRG_met F01; **B)** fração PRG_met F02; **C)** fração PRG_met F03; **D)** fração PRG_met F04; **E)** fração PRG_met F05.



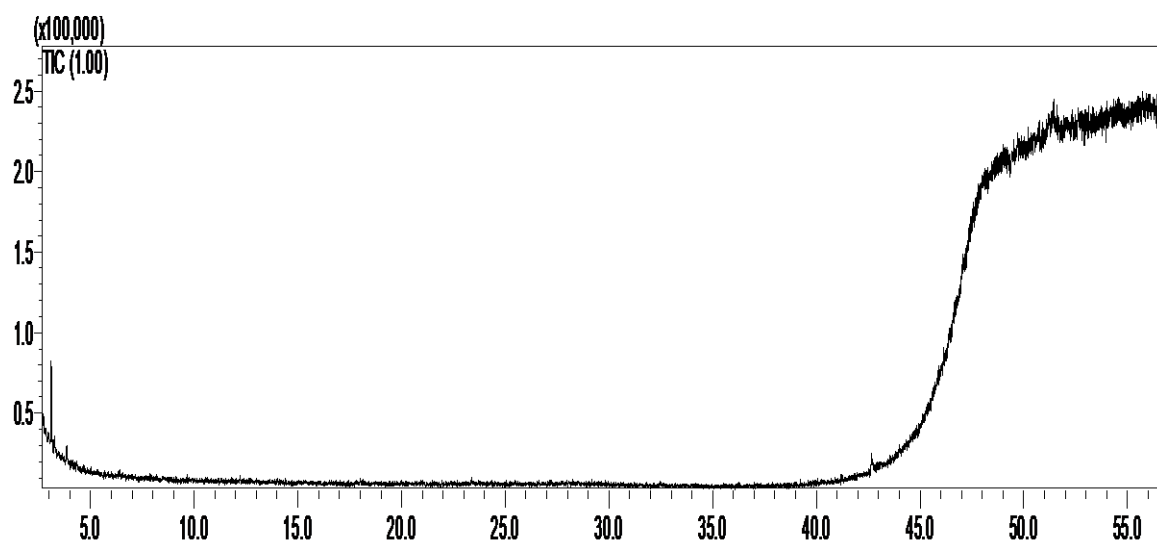
Anexo 2- Sobreposição de espectros de ^1H do segundo fracionamento de PRG_met (400 Mhz). **A)** fração PRG_met F1; **B)** fração PRG_met F2; **C)** fração PRG_met F3; **D)** fração PRG_met F4 ; fração PRG_met F4; **E)** fração PRG_met F5; fração PRG_met F100 % met (MeOD).



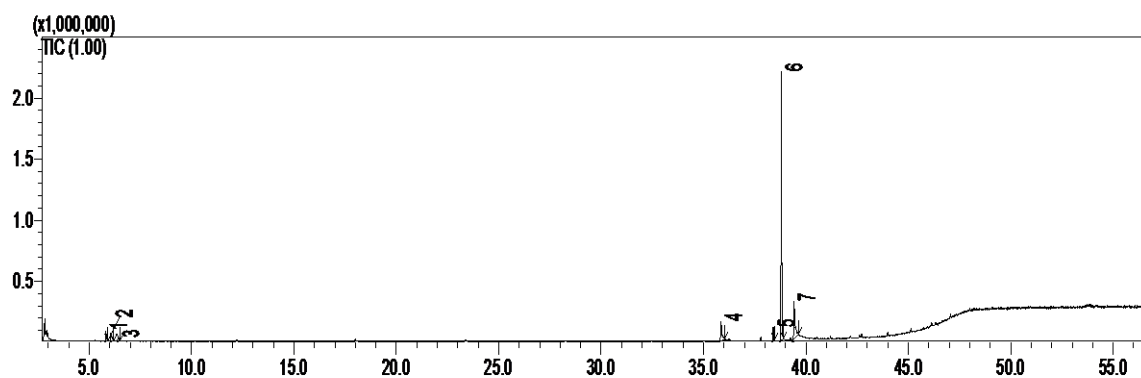
Anexo 3- Sobreposição de espectros de ¹H do primeiro fracionamento de PRF_met (400 Mhz). **A)** fração PRF_met F1; **B)** fração PRF_met F2; **C)** fração PRF_met F3; **D)** fração PRG_met F4 ; fração PRF_met F4; **E)** fração PRF_met F5(MeOD).



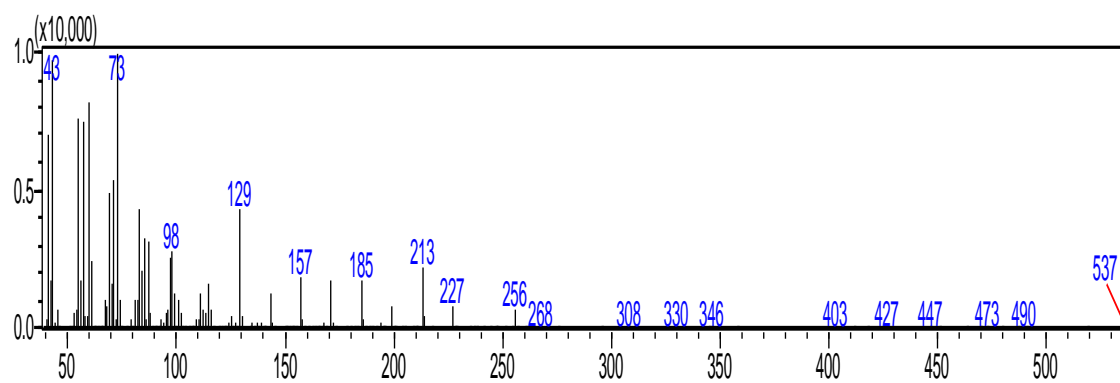
Anexo 4- Cromatograma do branco do solvente Hexano, CG/EM.



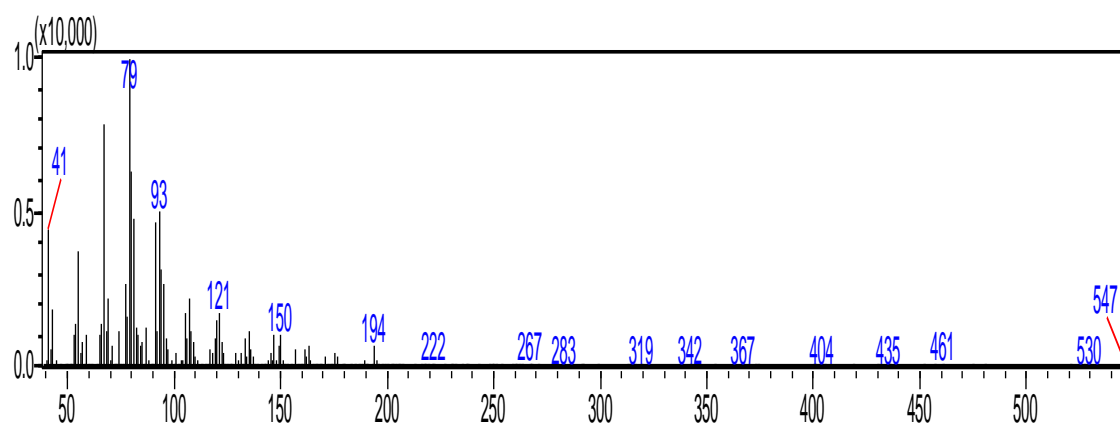
Anexo 5- Cromatograma do branco do solvente Dicloro, CG/EM.



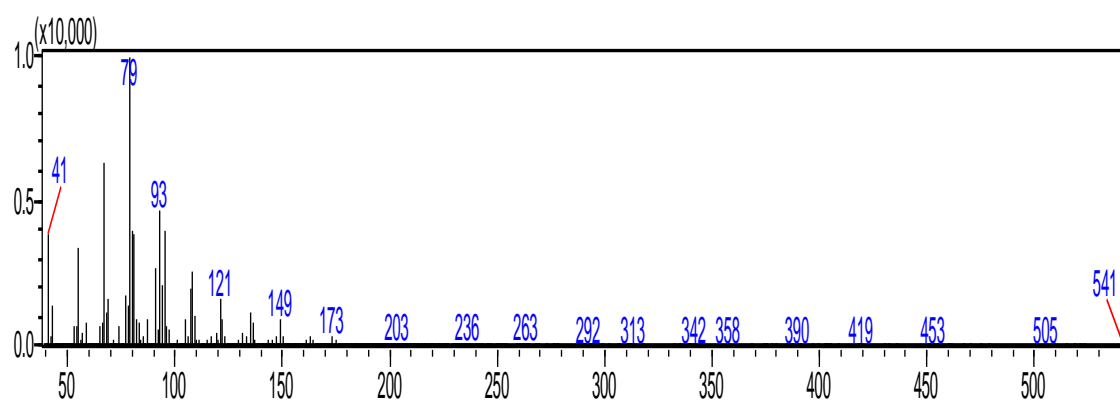
Anexo 6- Cromatograma da fração PRF_F1_F4(3 primeiros picos encontrados no branco do hexano).



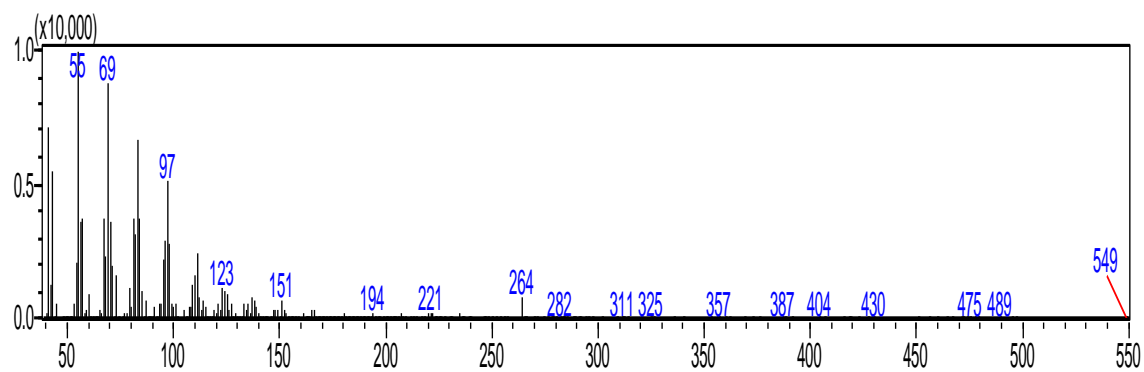
Anexo 7- Espectro de massas da substância 1.



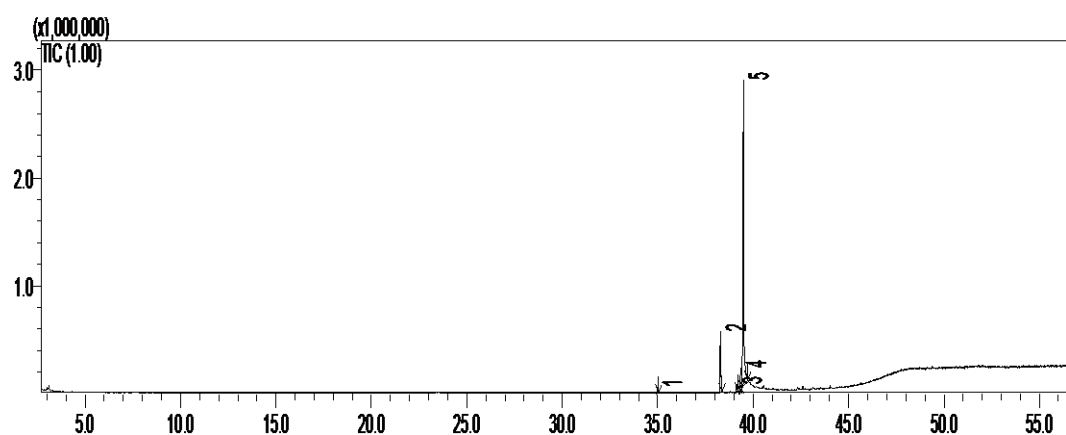
Anexo 8- Espectro de massas da substância 2.



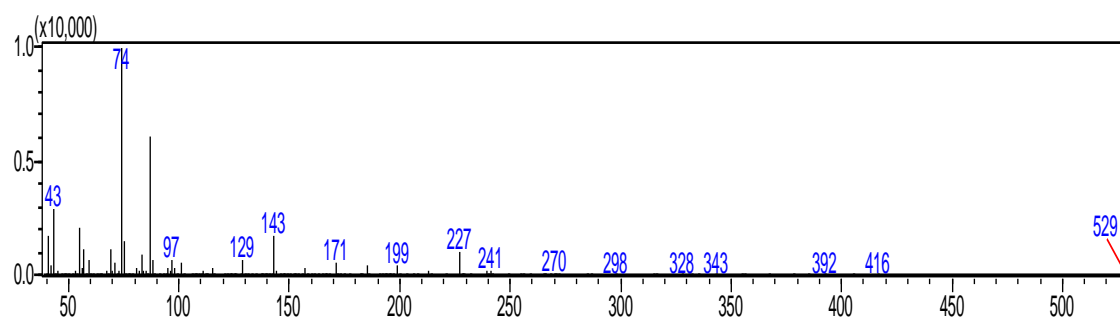
Anexo 9- Espectro de massas da substância 3.



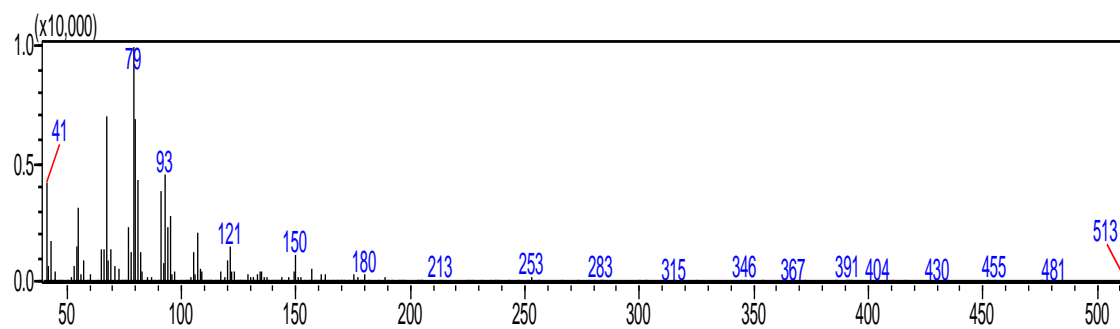
Anexo 10- Espectro de massas da substância 11.



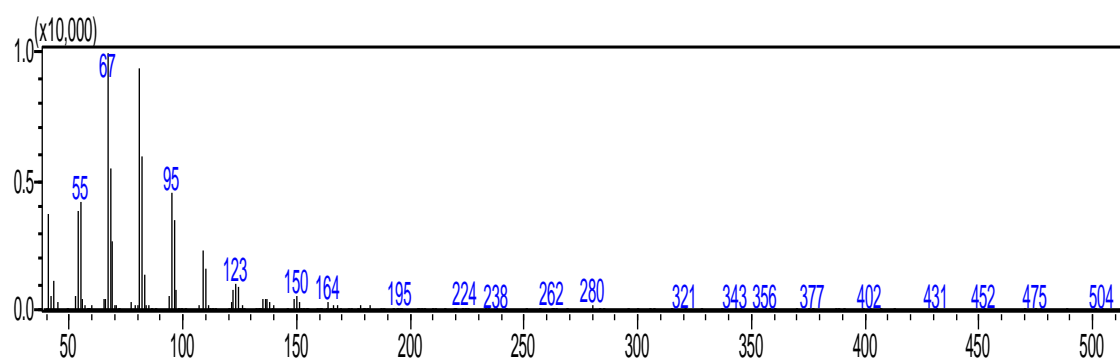
Anexo 11- Cromatograma da fração PRF_F1_F3_F2, CG/ME.



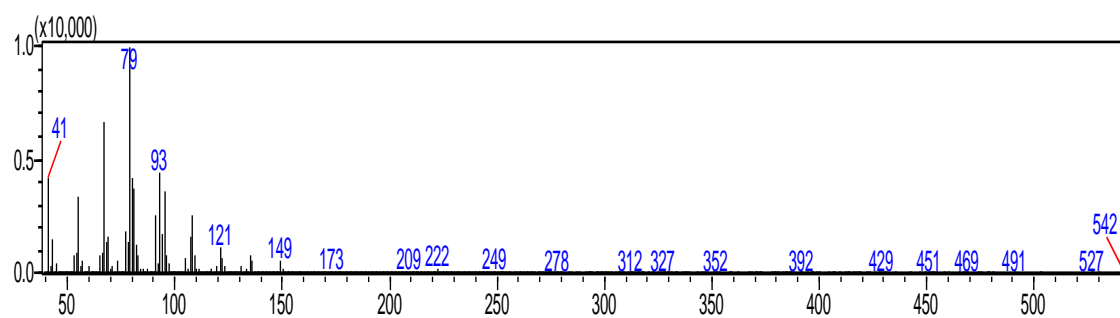
Anexo 12- Espectro de massas da substância 5.



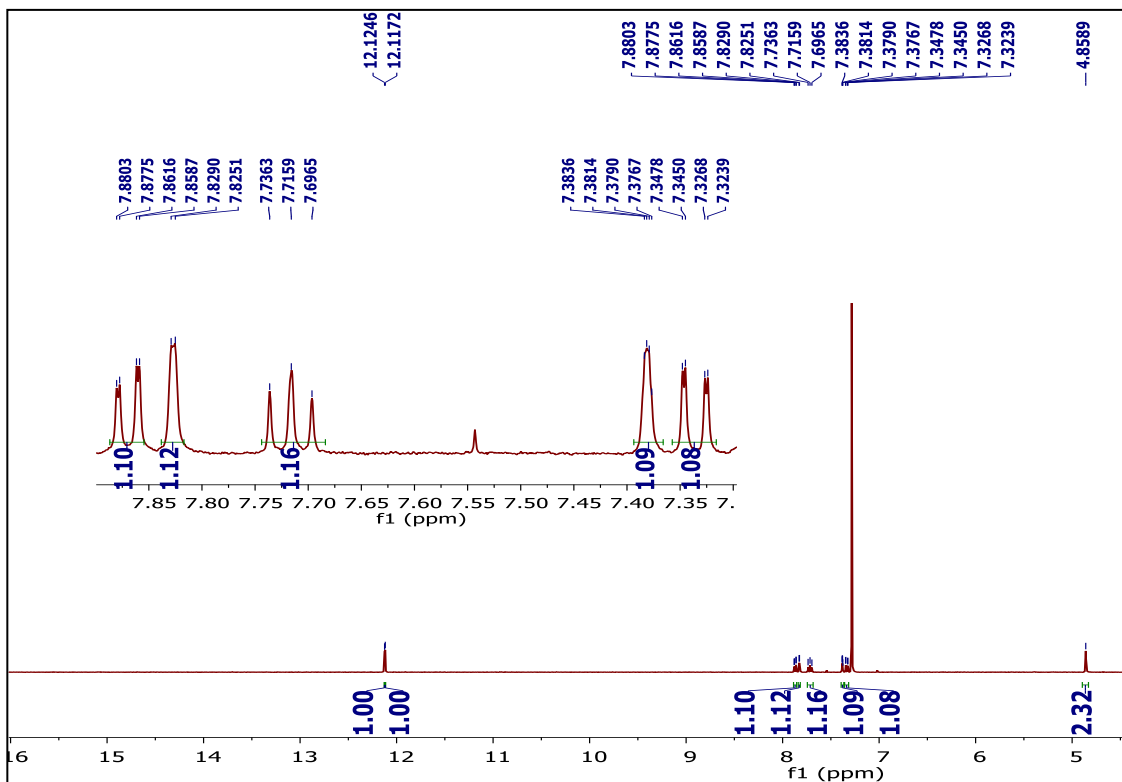
Anexo 13- Espectro de massas da substância 6.



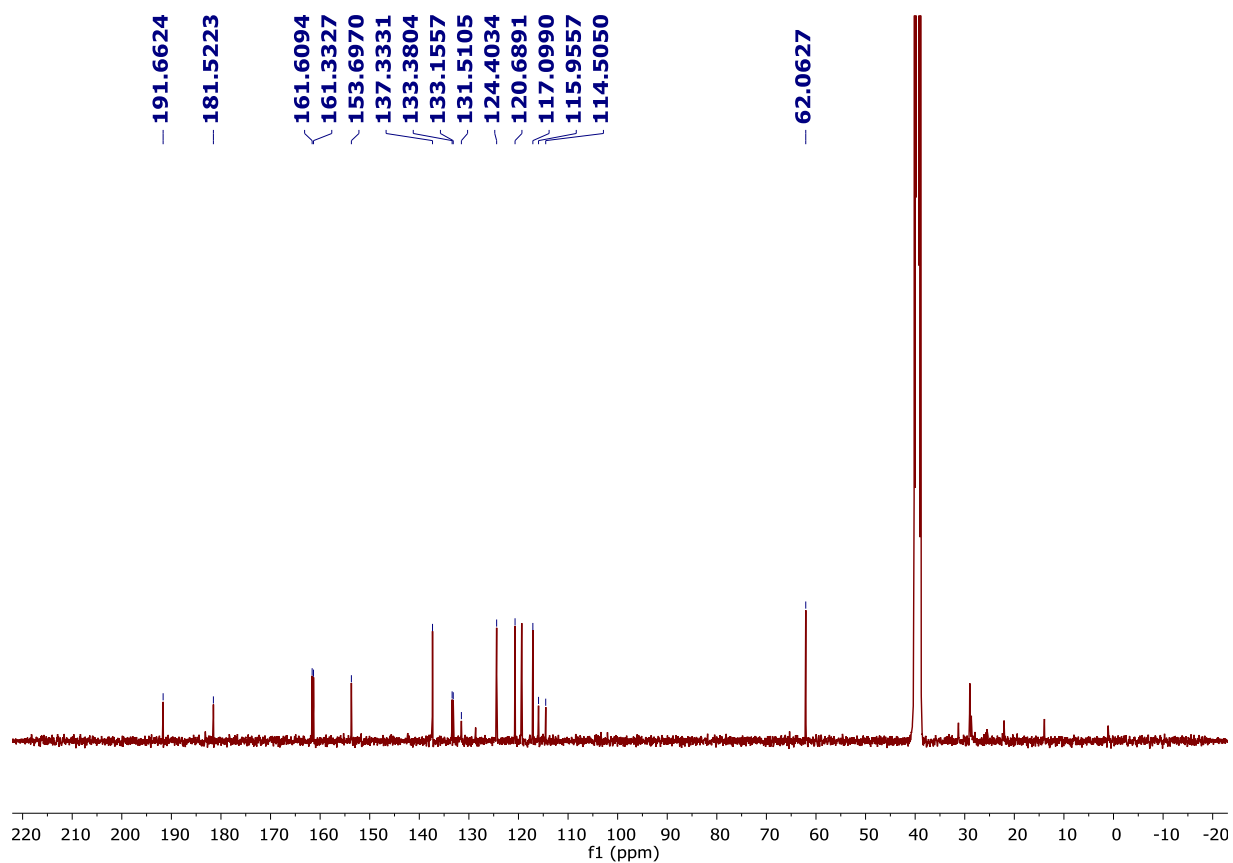
Anexo 14- Espectro de massas da substância 7.



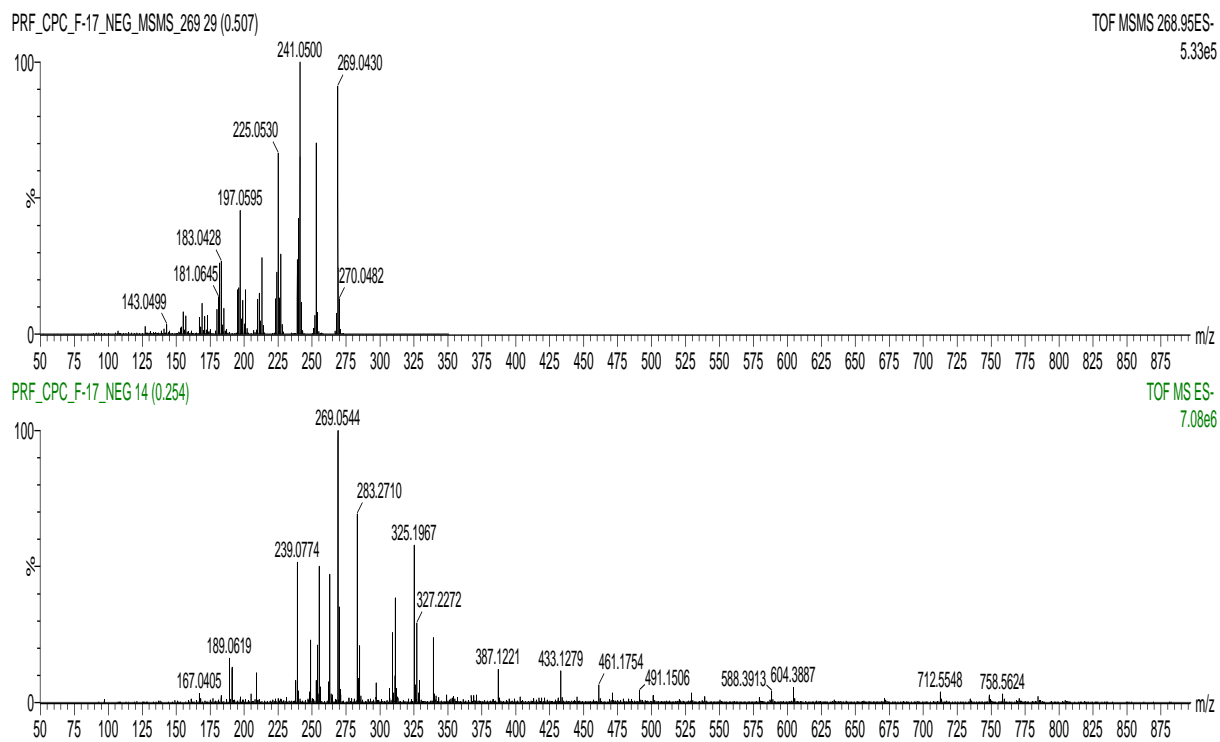
Anexo 15- Espectro de massas da substância 8.



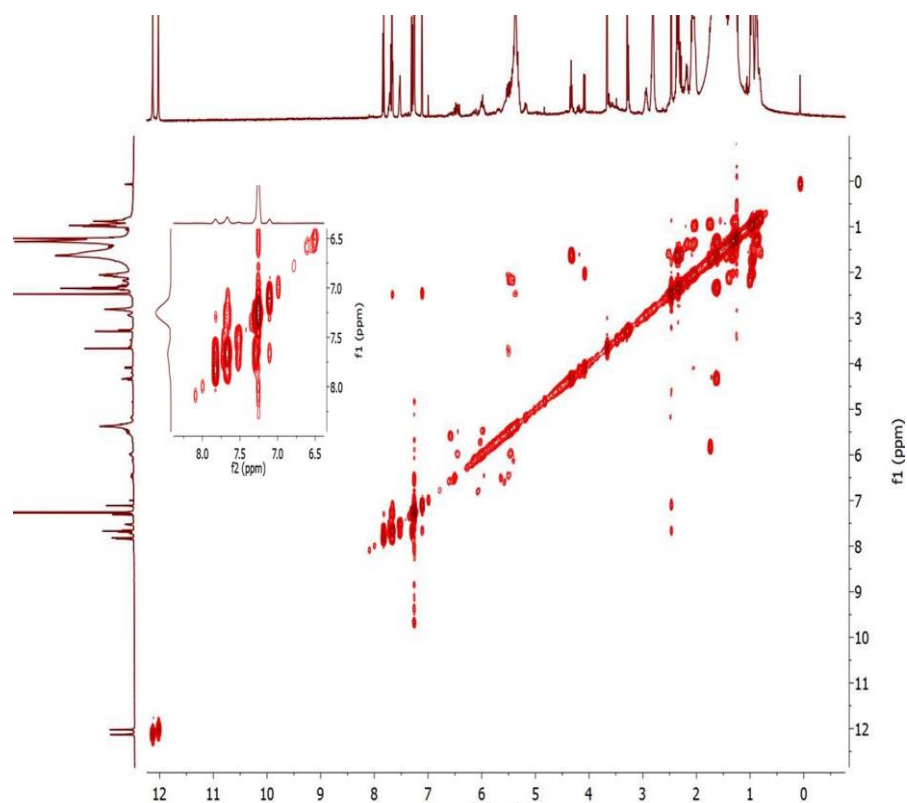
Anexo 16- Espectro de RMN ^1H da substância **9** (CDCl_3 , 400 Mhz).



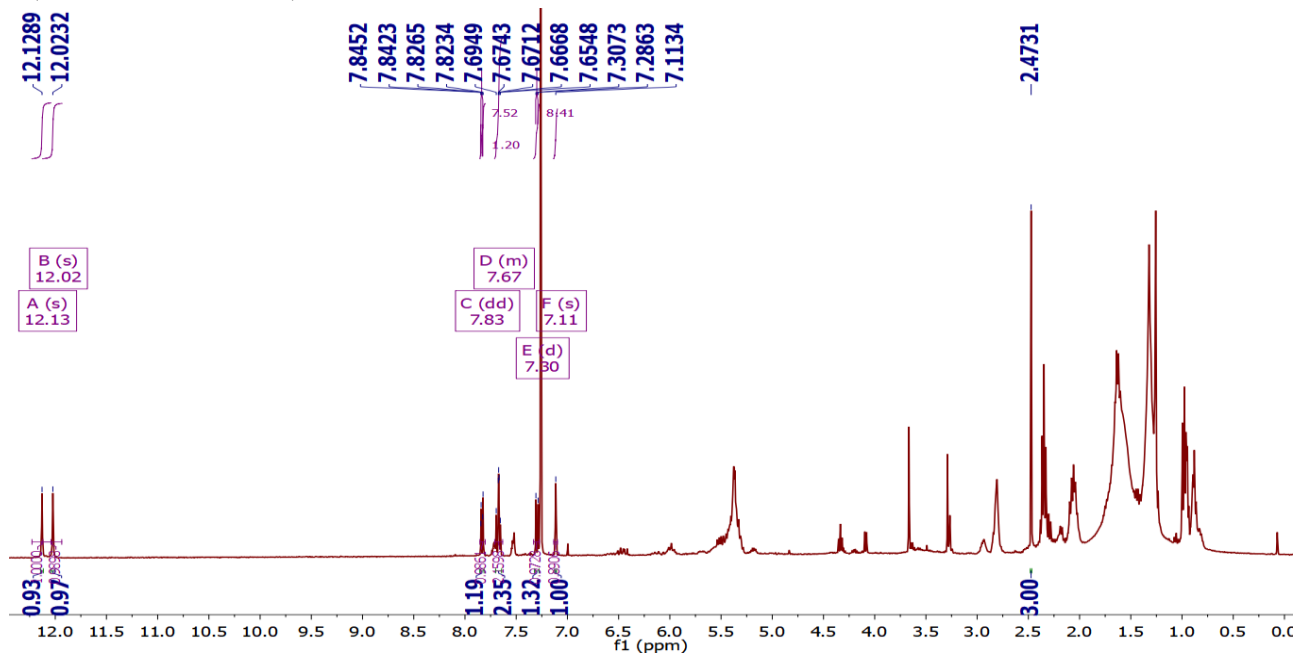
Anexo 17- Espectro de RMN ¹³C referente a substância **9** (DMSO-d₆, 100 MHz).



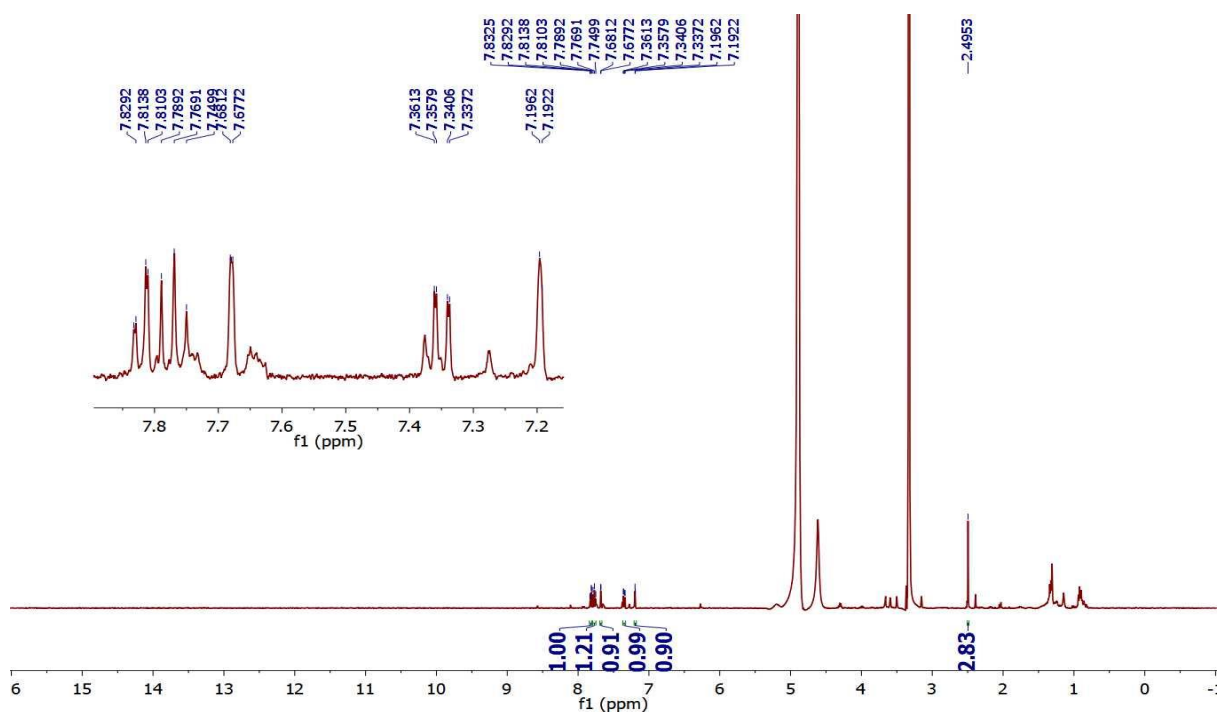
Anexo 18- Espectro de massas de alta resolução referente a substância **9** e MS² da do íon 269,0544.



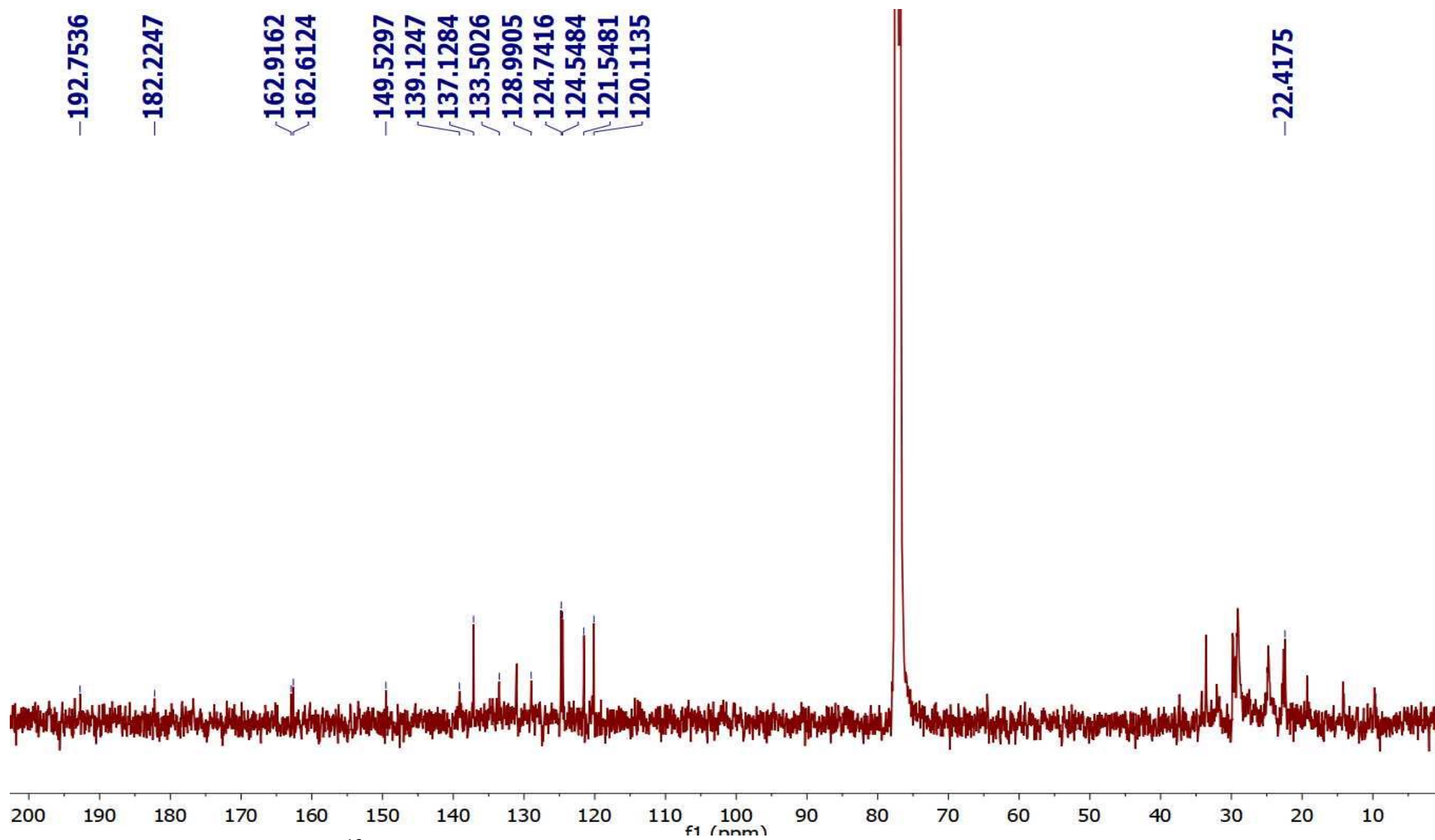
Anexo 19- Espectro de mapa de correlação de COSY da substância **10** (CDCl₃, 400 Mhz).



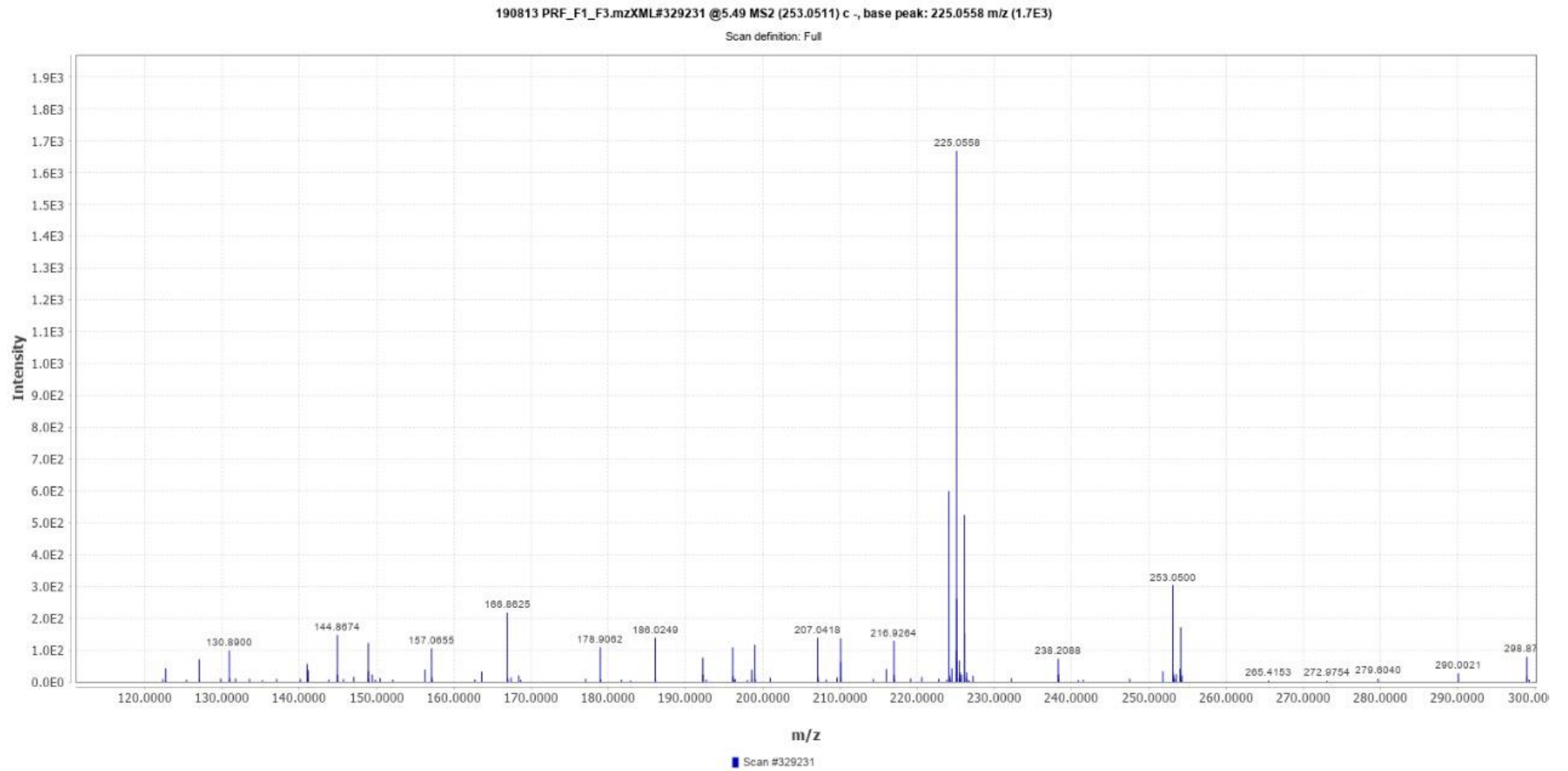
Anexo 20- Espectro de RMN ¹H da fração PRF_F1-F3, com presença de Crisofanol (CDCl₃, 400 Mhz).

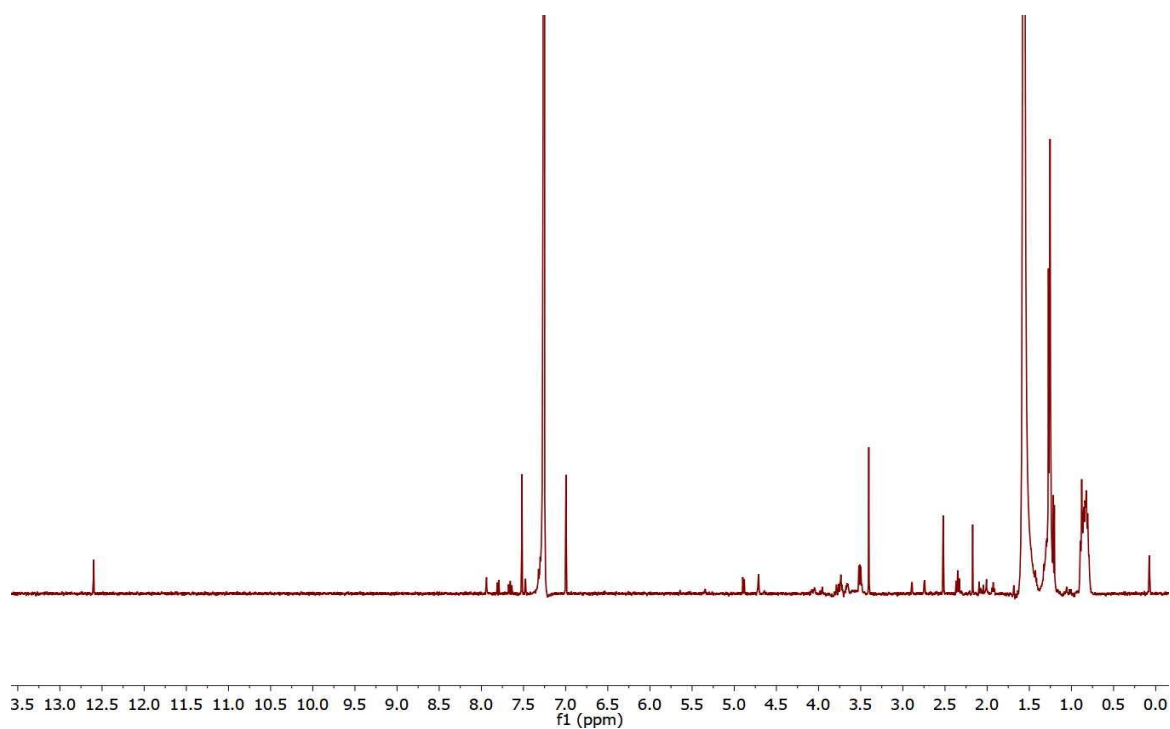


Anexo 21- Espectro de RMN de ^1H referente a substância **10** (MeOD_4 , 400 Mhz).

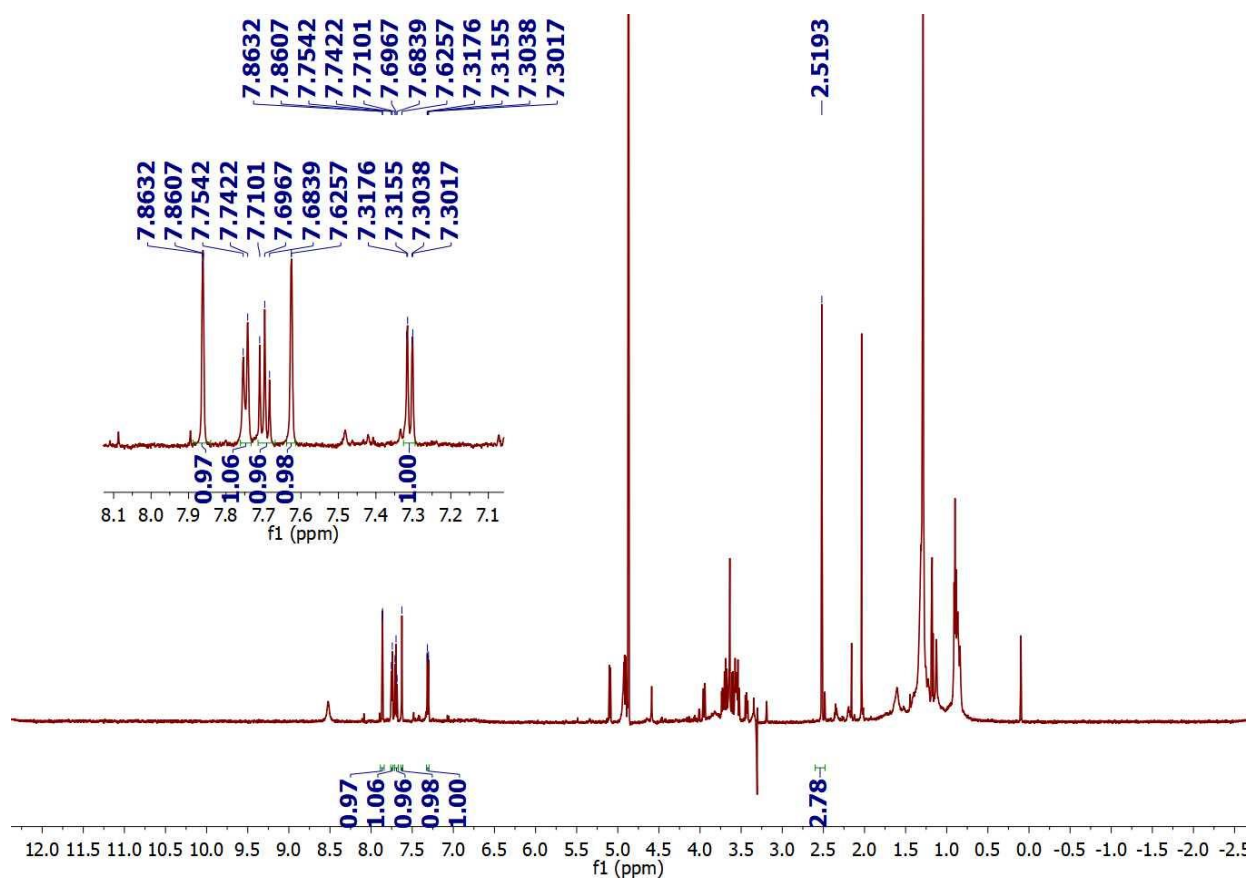


Anexo 22- Espectro de RMN ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 400 Mhz).

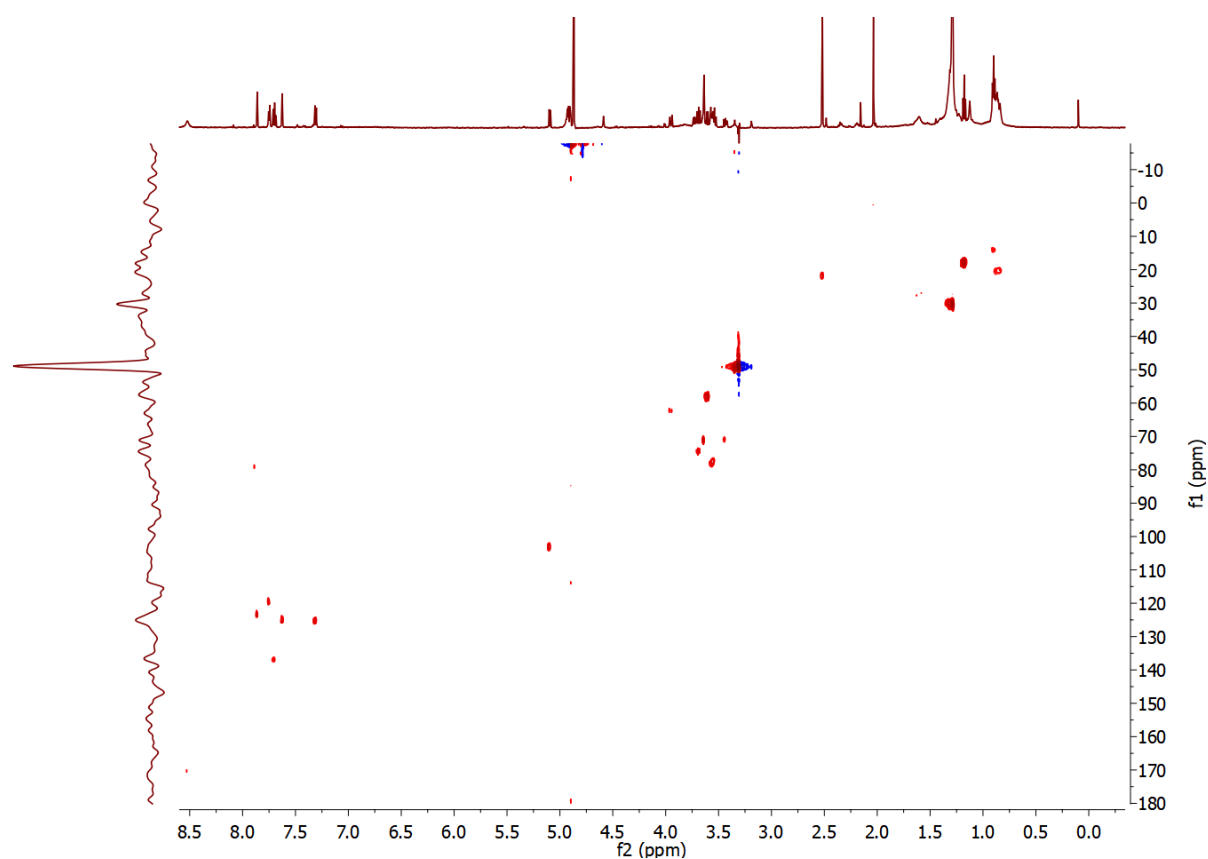
Anexo 23- Espectro de massas do íon selecionado Ms² 253,0504 no modo negativo



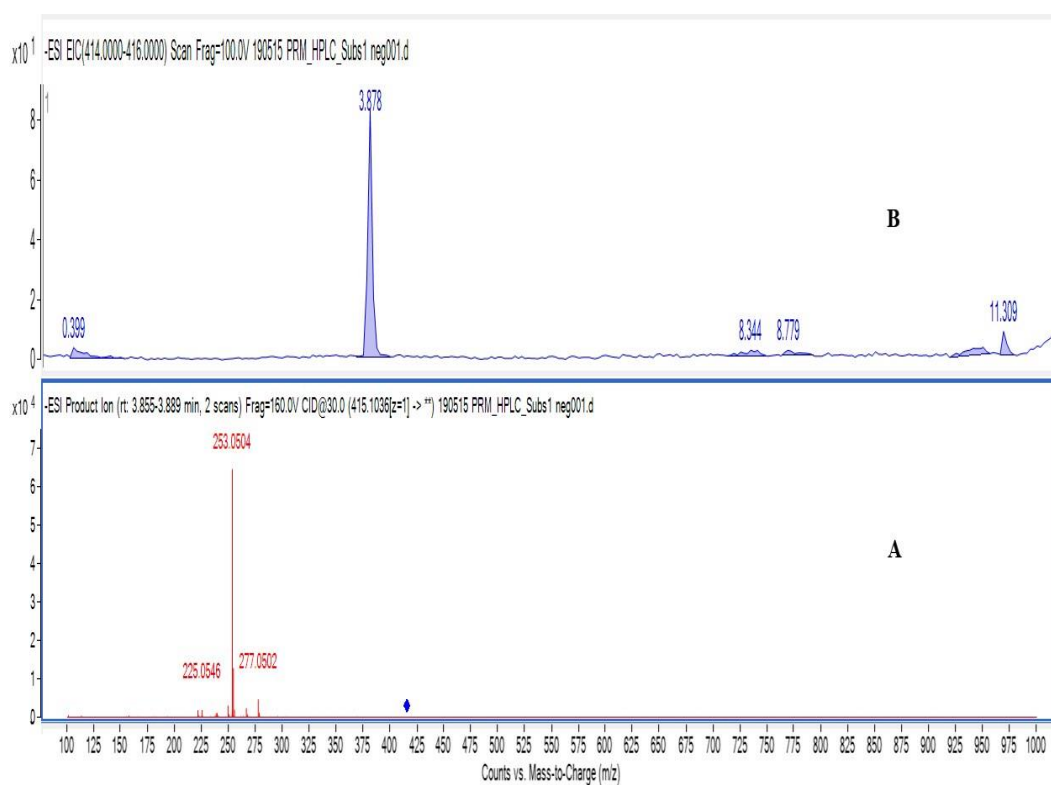
Anexo 24- Espectro de RMN ¹H da substância **11** (CDCl₃, 400 Mhz).



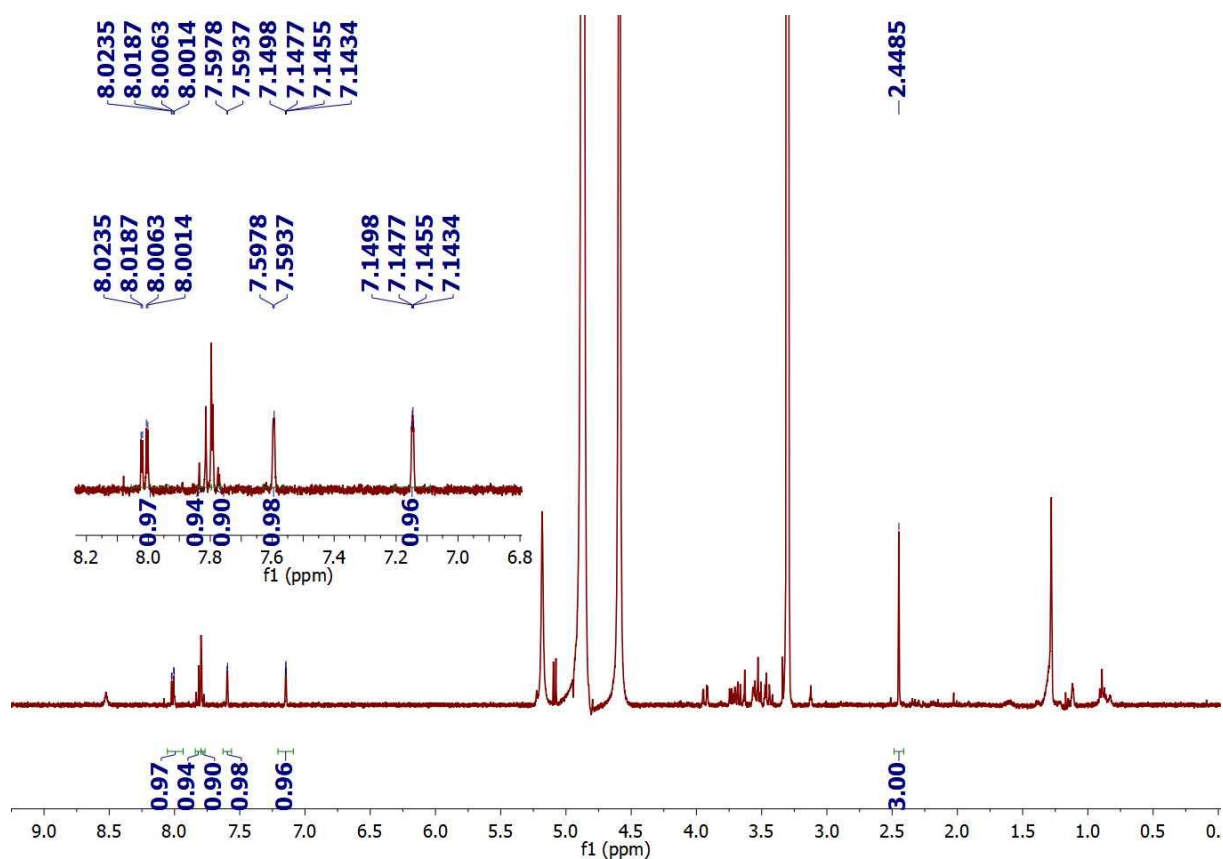
Anexo 25- Espectro de RMN ¹H da substância **11** (MeOD₄, 600 Mhz).



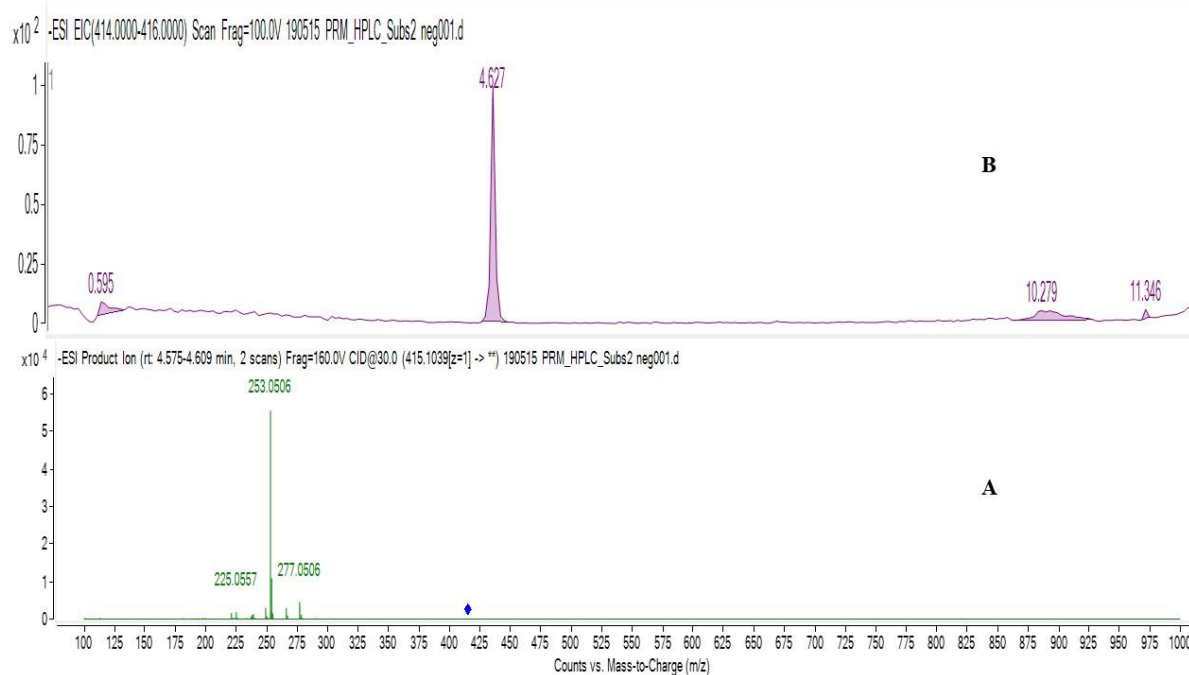
Anexo 26- Espectro de Mapa de correlação HSQC de **11** (MeOD, 600 Mhz).



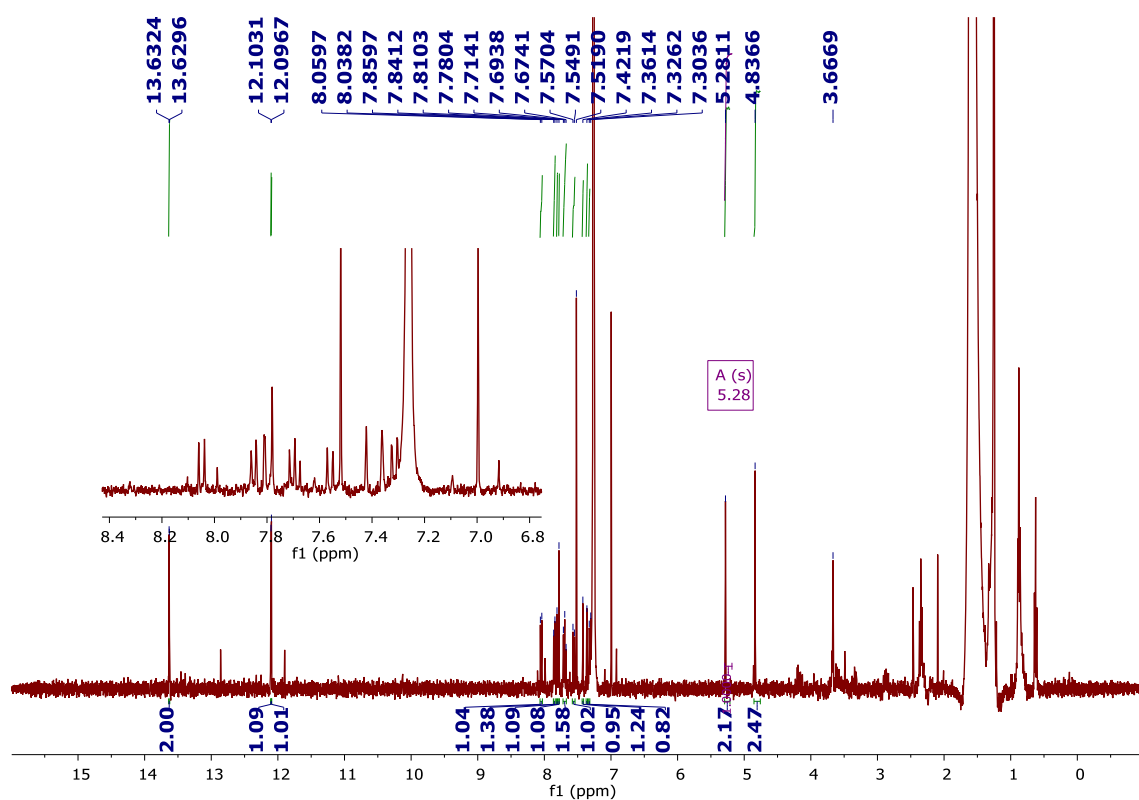
Anexo 27- Espectro de massas da substância **11**. **A)** espectro de MS² da massa 415,1036; **B)** tempo de retenção da substância **11**.



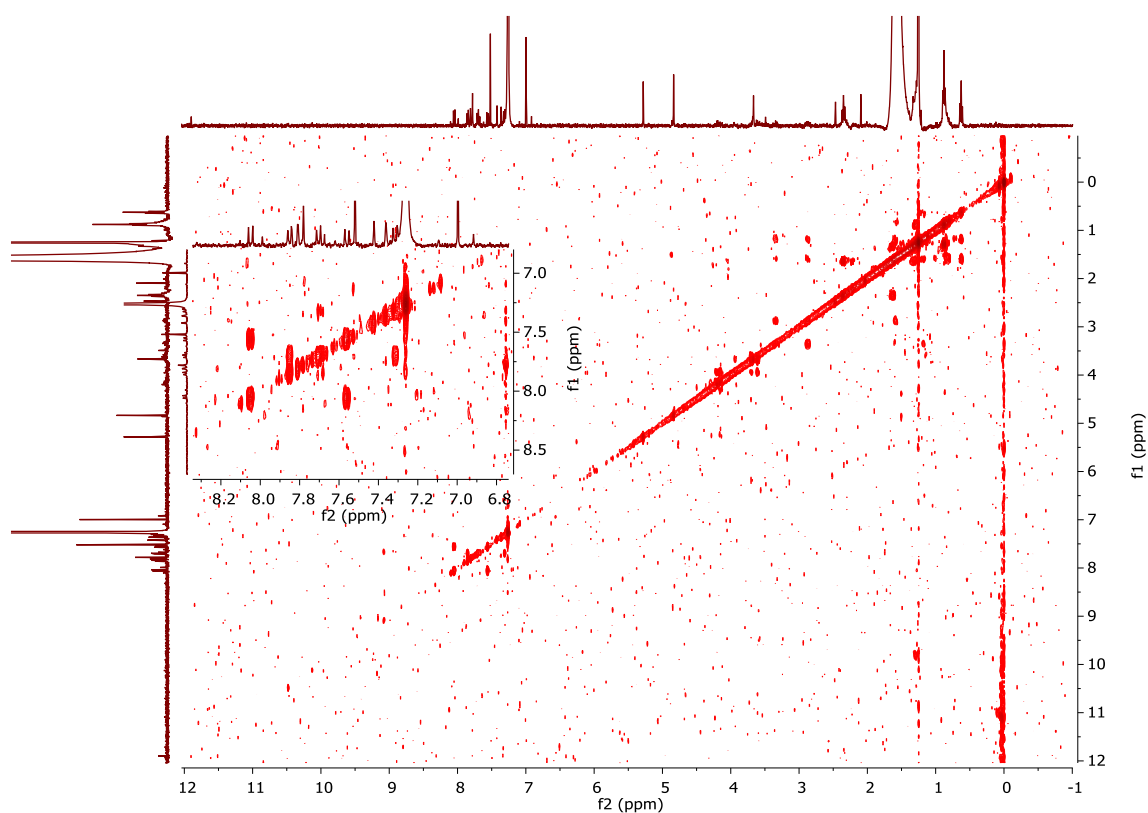
Anexo 28- Espectro de RMN de ^1H da substância **12** (MeOD_4 , 400 Mhz).



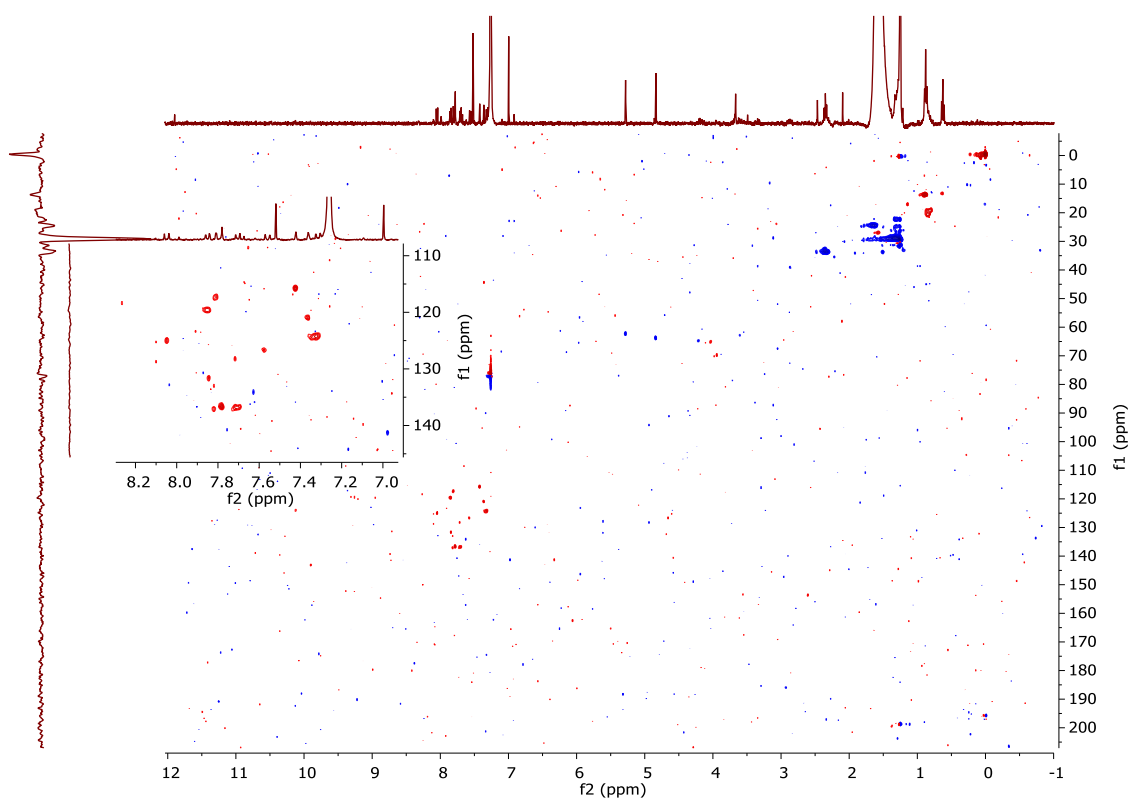
Anexo 29- Espectro de massas da substância **12**. **A)** Espectro de MS^2 da M/z da massa 415,1039; **B)** tempo de retenção da substância **12**.



Anexo 30- Espectro de RMN ^1H da substância **13** (400 MHz, CDCl_3).



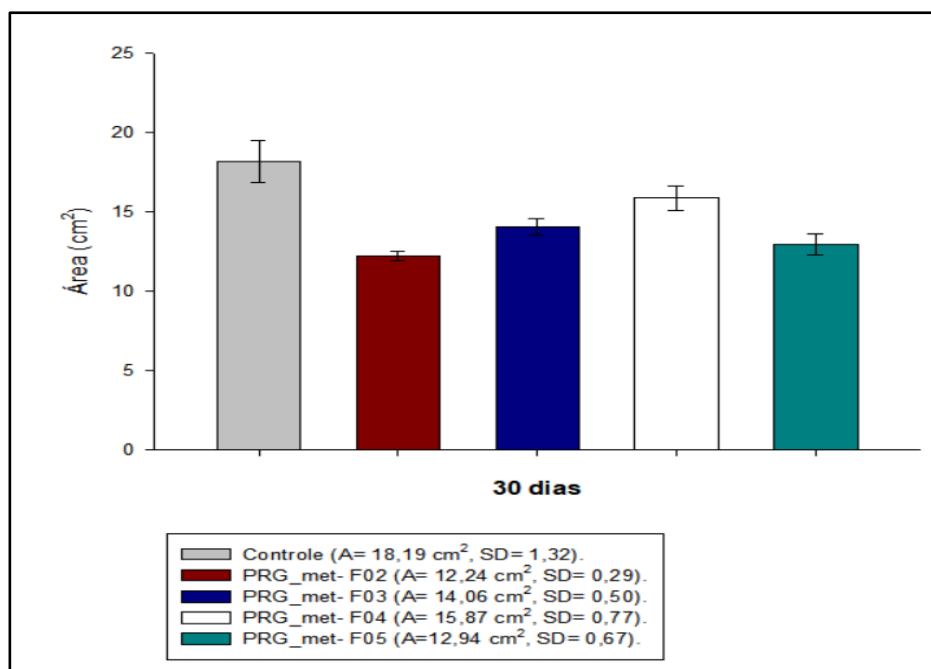
Anexo 31- Espectro de COSY da substância **13** (600 MHz, CDCl_3).



Anexo 32- Mapa de contorno HSQC da substância **13**.

Anexo 33 - Dados estatísticos e percentual inibitório do crescimento micelial do fungo dos extratos brutos

Réplicas								
Ensaio	PRG_ metanol	*Controle metanol	Ensaio	PRF_ metanol	*Controle metanol	Ensaio	PRF_ éter de petróleo	*Controle acetona
1	8,65	12,31	1	9,07	12,31	1	13,58	14,65
2	8,03	11,94	2	8,97	11,94	2	13,20	14,65
3	8,03	12,81	3	8,65	12,81	3	12,81	15,34
4	8,13	12,31	4	9,07	12,31	4	13,85	15,06
5	8,65	11,10	5	9,95	11,10	5	13,85	15,06
Média	8,30	12,09	Média	9,14	12,09	Média	13,46	14,95
SD	0,32	0,63	SD	0,48	0,64	SD	0,45	0,30
RSD	3,86	5,27	RSD	5,27	5,27	RSD	3,33	1,99
Inibição	31%	-	Inibição	24%	-	Inibição	10%	-



Anexo 34- Gráfico referente ao crescimento micelial e do primeiro fracionamento.

Anexo 35- Dados estatísticos e percentual inibitório do crescimento micelial do fungo das frações proveniente do primeiro fracionamento de PRG_met.

Réplicas					
Ensaio	PRG_met-F02	PRG_met-F03	PRG_met-F04	PRG_met-F05	controle metanol
1	11,94	13,85	16,61	13,85	19,63
2	12,06	13,72	16,47	13,45	19,16
3	12,43	14,11	15,76	12,31	16,32
4	12,56	13,72	15,90	12,43	18,39
5	12,56	14,92	14,65	12,69	17,49
Média	12,25	14,06	15,88	12,95	18,20
SD	0,30	0,51	0,78	0,67	1,32
RSD	2,41	3,61	4,89	5,19	7,28
Inibição	33%	23%	13%	29%	-

Anexo 36 - Dados estatísticos e percentual inibitório do crescimento micelial do fungo das frações proveniente do segundo fracionamento de PRG_met

Réplicas								
Ensaio	PRG-F02-F20	PRG-F02-F40	PRG-F02-F60	PRG-F02-F80	PRG-F02-F100	PRG-F02-F1:1	PRG-F02-F100%	Control e
1	16,61	15,34	12,19	12,43	8,55	15,34	8,14	19,63
2	15,76	15,90	12,43	12,56	8,76	15,90	10,06	19,16
3	16,038	13,07	11,82	12,43	8,34	14,51	9,51	16,32
4	15,76	14,25	12,56	12,31	9,29	15,20	10,29	18,39
5	16,04	14,25		12,43	8,45	15,48	9,40	17,49
Média	16,04	14,56	12,25	12,43	8,68	15,28	9,48	18,20
SD	0,35	1,10	0,32	0,09	0,38	0,50	0,84	1,32
RSD	2,18	7,53	2,67	0,71	4,33	3,29	8,82	7,28
Inibição	12%	20%	26%	25%	48%	8%	43%	-

Anexo 37- Dados estatísticos e percentual inibitório do crescimento micelial do fungo das frações proveniente do terceiro fracionamento de PRG_met

Réplicas						
Ensaio	Substância 11	Substância 12	Substância 10	*Control e Metanol (500 µL)	Substância 9	*Controle Metanol (500 µL)
1	5,98	4,45	7,45	6,69	12,56	15,48
2	6,69	5,14	5,89	8,34	11,46	16,04
3	6,07	5,64	6,07	7,45	11,58	16,90
4	6,15	6,60	5,64	7,64	11,94	17,19
5	6,88	4,83	7,25	8,76	-	17,05
Média	6,35	5,46	6,26	7,78	11,88	16,53
SD	0,40	0,91	0,81	0,80	0,50	0,74
RSD	6,35	16,60	12,93	10,33	4,18	4,49
Inibição	18%	30%	19%	-	28%	-

Anexo 38- Dados estatísticos e percentual inibitório do crescimento micelial do complexo

Réplicas		
Ensaio	Complexo	Controle
1	12,06	15,48
2	12,56	16,04
3	12,56	16,90
4	12,43	17,19
-	10,75	17,05
Média	12,07	16,53
SD	0,77	0,74
RSD	6,37	4,49
Inibição	27%	-

Anexo 39 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	4	10	16	20	26	32	25 ^a
PRF1 (met) 0,002mg/ml	0	0	2	8	14	32	72	80	90	96	12 ^b
PRF1 (ét p) 0,002mg/ml	0	2	6	20	24	30	42	46	54	66	19,5 ^b
PRF2 (met) 0,002mg/ml	0	0	0	10	14	22	42	60	64	76	15 ^b
PRF2(ét p) 0,004mg/ml	0	2	6	16	20	24	36	42	50	58	21 ^b
PRM191 0,005mg/ml	0	0	2	16	24	24	34	40	56	58	20 ^b
PRM192 0,003mg/ml	0	0	10	30	34	38	48	48	54	54	19 ^b

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

Anexo 40 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	12	14	18	20	
Dieta Pura	4	12	16	24	30	36	40	42	50	66	<25a
A+O	4	16	24	36	40	44	48	50	86	96	14b
Complexo	8	18	24	42	52	70	88	98	100	100	8b
F1	8	14	24	50	72	94	100	100	100	100	7b
Crisofanol	10	24	32	50	72	94	100	100	100	100	6,5b
F2	0	14	28	40	64	86	100	100	100	100	7b
F3	4	14	22	48	72	96	100	100	100	100	7b
Aloe-emodina	8	24	34	50	72	98	100	100	100	100	6,5b
F5	6	18	36	50	76	94	100	100	100	100	6,5b

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