

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

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
ATIVOS DE *Vismia guianensis* COM POTENCIAL
INSETICIDA CONTRA FORMIGAS CORTADEIRAS**

Yara Polianna Fonsêca Pio*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

***BOLSISTA CAPES**

**São Carlos – SP
2024**

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Yara Polianna Fonseca Pio, realizada em 28/03/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha (UFMA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

"Gratidão a Deus e à minha família por
serem minha fonte de amor, apoio e
inspiração constante."

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente. Quem sobrevive é o mais disposto à mudança."

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar gratidão a todos os indivíduos que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação de mestrado. Inicialmente, expresso minha gratidão a Deus por ter me concedido força, persistência e acolhimento, que foram fundamentais para superar os desafios encontrados ao longo deste percurso acadêmico.

À minha família, especialmente aos meus pais, Raimundo Cezar e Gardênia Pio, e meu irmão Cezar Henrique, assim como à minha avó Ezilda Fonseca, dirijo minha gratidão eterna. O amor incondicional e apoio incansável foram a âncora que me sustentou durante os momentos desafiadores desta trajetória acadêmica.

Expresso meu sincero reconhecimento ao Professor Dr. João Batista por sua orientação diligente, conselhos valiosos e apoio constante ao longo deste percurso acadêmico. Da mesma forma, agradeço ao Me. Artur Cruz, no qual a ajuda e amizade foram fundamentais para o sucesso deste projeto, e ao Me. Carlos André pela generosa assistência e amizade construída ao longo do processo. Dedico a vocês meus sinceros agradecimentos.

Não posso deixar de reconhecer e agradecer à Dra. Dorai Periotto e ao grupo do Dr. Odair Bueno pelas análises e contribuições valiosas fornecidas para o desenvolvimento deste estudo. Um agradecimento especial é estendido a todos os membros do Laboratório de Produtos Naturais, cuja amizade e apoio foram inestimáveis durante esta jornada de pesquisa.

Expresso minha gratidão às pessoas que estiveram ao meu lado nesta jornada em São Carlos, especialmente aos amigos Renato Leal e Antônio Neto, que foram grandes apoios em meio às dificuldades, ao Manoel Júnior, pelo suporte, momentos compartilhados e por acreditar no meu potencial. Agradeço também a Karen Borges, Maciel Lima e Katiana Patrocínio por todos os bons momentos compartilhados.

Agradeço ao grupo do laboratório de produtos naturais da UFPI - Campus Teresina, em particular ao Evaldo Filho, pela base que me proporcionou.

Não posso deixar de agradecer às amigas Tanna e Jurema, que mesmo distantes, estiveram sempre presentes.

Expresso também minha gratidão à CAPES pelo financiamento e suporte concedidos, essenciais para a realização deste trabalho. Ao corpo docente e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pelos recursos essenciais para a minha formação.

Por fim, expresso meus agradecimentos a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, incentivando, apoiando e acreditando em mim. Esta conquista não teria sido possível sem o apoio de cada um de vocês. Obrigado do fundo do meu coração.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EtOH	Etanol
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-SPE-NMR	<i>Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Nuclear Magnetic Ressonance</i>
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
EM	Espectrometria de massas
MS	<i>Mass Spectrum</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Ressonance</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
UHPLC-QTOF-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time of Fly - Tandem Mass Spectrometry</i>
PLF	Pau Lacre-Folhas
ECD	Extrato cipó d'alho
CDDi	Extrato Carapeté
F1	Fração 1
F2	Fração 2
F3	Fração 3
F4	Fração 4

Singleto (s); Dupleto (d); Dupleto de dupleto (dd); Tripleto (t); multipleto (m)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico do extrato.....	26
TABELA 3.2 – Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato etanólico da <i>Vismia guianensis</i> (PLF).....	27
TABELA 3.3 – Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico das frações.....	28
TABELA 4.1 – Rendimento dos extratos	34
Tabela 4.2 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com o extrato ECD em relação ao grupo controle.....	36
TABELA 4.3 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com o extrato CDDI em relação ao grupo controle.....	37
TABELA 4.4 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com o extrato PLF em relação ao grupo controle.....	37
TABELA 4.5 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com F1.....	39
TABELA 4.6 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com F2.....	40
TABELA 4.7 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com F3.....	40

TABELA 4.8 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com F4.....	40
TABELA 4.9 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com PLF.....	41
TABELA 4.10 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao complexo 1:2.....	42
TABELA 4.11– Rendimentos das frações do extrato etanólico de <i>Vismia guianensis</i>	45
TABELA 4.12– Dados de RMN para a Vismiaguienona 1.....	50
TABELA 4.13 – Dados de RMN para a Vismiaguienona 2	53
TABELA 4.14 - Dados de RMN para a Vismiaguienona 3.....	56
TABELA 4.15 - Dados de RMN para a Vismiaguienona 4.....	58
TABELA 4.16– Dados de RMN para a Vismiaguienona 5.....	60
TABELA 4.17 – Dados de RMN para a Vismiaguienona 6.....	62
TABELA 4.18 – Dados de RMN para a Hidroxiferruginin A.....	64
TABELA 4.19 – Comparação entre as bandas do espectro do ligante e seu complexo (CuF 1:2).....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Fungo simbiote a partir da visão interna de um formigueiro na Unesp–Rio Claro.....	4
FIGURA 1.2 – Exibição das castas de formigas na Unesp–Rio Claro.....	5
FIGURA 1.3 – Exemplo de inseticidas sintéticos: fipronil (1), deltametrina (2) e sulfluramida (3)	7
FIGURA 1.4 – Compostos isolados no gênero <i>Vismia</i>	10
FIGURA 1.5 – <i>Vismia guianensis</i> com suas flores e folhas.....	11
FIGURA 1.6 – <i>Vismia guianensis</i> com seu látex.....	12
FIGURA 3.1 – Vista geral do formigueiro de <i>Atta sexdens</i> mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).....	17
FIGURA 3.2 - Variação de coloração do processo de síntese do complexo com antranoide. (A) ligante = laranja, (B) Complexo 1:2 = Marrom amarelado.....	22
FIGURA 3.3 – Dieta ECD em suas 3 concentrações de cima para baixo da maior para a menor concentração (1%, 0,2% e 0,1%), distribuídas e prontas para o oferecimento para as operárias.....	23
FIGURA 3.4 – Fluxograma do fracionamento do extrato das folhas da <i>Vismia guianensis</i> (PLF).....	27
FIGURA 3.5 – Placas inoculadas com um disco de ágar colonizado pelo fungo simbiótico.	30
FIGURA 3.6 - Variação de coloração do processo de síntese do complexo com antranoide. (A) ligante = laranja, (B) Complexo 1:2.....	32
FIGURA 4.1 – Curvas de sobrevivências de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas aos extratos CDDi, PLF e ECD.....	36
FIGURA 4.2 – Curvas de sobrevivências de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e aos tratamentos: F1, F2, F3 e F4 oferecidos em dieta artificial sólida.....	39
FIGURA 4.3 – Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e aos tratamentos PLF oferecidos em dieta artificial	

sólida.....	41
FIGURA 4.4 – Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e ao complexo 1:2 oferecidos em dieta artificial sólida.....	42
FIGURA 4.5 – Gráfico da porcentagem de inibição do fungo <i>L. gongylophorus</i> na presença da amostra F1, F2, F3 e F4 em 7, 14, 21 e 30 dias de crescimento micelial.....	44
FIGURA 4.6 – Perfil cromatográfico de PLF e as frações F1 a F4, em gradiente exploratório em λ 254nm, H ₂ O:ACN – 95:5 a 100% ACN.....	46
FIGURA 4.7 – Perfil cromatográfico da F2, modo isocrático em λ 254nm, H ₂ O:ACN – 74 % ACN.....	47
FIGURA 4.8 – Estruturas isoladas e identificadas no extrato etanólico das folhas de <i>Vismia guianensi</i>	48
FIGURA 4.9 – Vismiaguienona 1.....	49
FIGURA 4.10 - Ampliação da região dos hidrogênios olefinícos RMN de ¹ H (400 MHz, CDCL ₃).....	50
FIGURA 4.11 – Correlações COSY	52
FIGURA 4.12 – Vismiaguienona 2.....	53
FIGURA 4.13. Ion fragmento <i>m/z</i> 269,08.....	55
FIGURA 4.14 – Vismiaguienona 3.....	55
FIGURA 4.15 – Vismiaguienona 4.....	59
FIGURA 4.16 – Vismiaguienona 5.....	59
FIGURA 4.17– Proposta de fragmentação para os ions-fragmentos <i>m/z</i> 309,1130; <i>m/z</i> 231,0658 e <i>m/z</i> 105,0335.....	61
FIGURA 4.18 - Ampliação da região dos hidrogênios das prenilas RMN de ¹ H (400 MHz, CDCL ₃).....	62
FIGURA 4.19 – Vismiaguienona 6.....	63
FIGURA 4.20 - Proposta dos íons fragmentos <i>m/z</i> 177,01; <i>m/z</i> 255,06 e <i>m/z</i> 311,12.....	63
FIGURA 4.21 – Hidroxiferruginin A.....	65

FIGURA 4.22 - Proposta dos íons fragmentos m/z 459,25; m/z 408,19 e m/z 392,20.....	66
FIGURA 4.23 – Comparação dos espectros de absorção na região do infravermelho.....	68
FIGURA 4.24 - Proposta da estrutura formada para o complexo CuF 1:2.....	69
FIGURA 4.25- Espectro de massas MS^2 do complexo CuF 1:2.....	70
FIGURA 4.26 - Fragmentos formados a partir do complexo CuF 1:2.....	70

RESUMO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE *Vismia guianensis* COM POTENCIAL INSETICIDA CONTRA FORMIGAS CORTADEIRAS. A *Vismia guianensis*, também conhecida como “pau lacre”, destaca-se do ponto de vista químico pela presença de uma grande variedade de compostos secundários em seus órgãos, incluindo raízes, cascas e folhas. Estes compostos têm despertado interesse devido ao seu potencial biológico e farmacológico. Sendo assim, este estudo tem como objetivo explorar *Vismia guianensis* como uma fonte promissora de inseticidas naturais no combate às formigas da espécie *Atta sexdens* e sintetizar complexos com cobre a partir dos compostos que foram isolados. A partir de técnicas de extração e métodos analíticos avançados, foram isoladas seis benzofenonas inéditas na espécie e entre elas quatro inéditas na literatura (Vismiaguienonas 1, 2, 3 e 6) foram identificadas, como também um antranóide comum no gênero, totalizando sete compostos isolados e um complexo do antranoide com cobre (CuF 1:2). O estudo partiu de três matrizes de extratos de diferentes espécies (*Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata*) observando-se que somente o extrato da *Vismia guianensis* (PLF) exibiu atividade inseticida contra a *Atta sexdens*, assim como as frações F1 e F2, conduzindo então ao isolamento de compostos. Apenas dois compostos não apresentaram atividade, o antranóide (composto 7) e a Vismiaguienona 4. Em relação ao complexo e o ligante, a complexação se mostrou eficiente no aumento da mortalidade das formigas cortadeiras, em que o ligante apresentou 66% de mortalidade, e o complexo formado a partir deste apresentou 92%, representando uma alternativa eficaz aos inseticidas sintéticos. Com isto, esta pesquisa contribui diretamente para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis para o manejo de formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens*, além de ampliar o conhecimento quimiosistemático da espécie *Vismia guianensis*.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM *Vismia guianensis* WITH INSECTICIDAL POTENTIAL AGAINST LEAF-CUTTING ANTS. *Vismia guianensis*, also known as "pau lacre," is chemically notable for the presence of a variety of secondary compounds in its organs, including roots, bark, and leaves. These compounds have garnered interest due to their biological and pharmacological potential. This study aimed to explore *Vismia guianensis* as a promising source of natural insecticides for combating the ant species *Atta sexdens* and to synthesize copper complexes from the isolated compounds. Using extraction techniques and advanced analytical methods, six novel benzophenones were isolated from the species, four of which (Vismiaguienones 1, 2, 3, and 6) are novel to the literature, along with a common anthraquinone in the genus, totaling seven isolated compounds and a copper-anthraquinone complex (CuF 1:2). The study examined three extract matrices from different species (*Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea*, and *Tabernaemontana angulata*), finding that only the *Vismia guianensis* extract (PLF) exhibited insecticidal activity against *Atta sexdens*, as did fractions F1 and F2, leading to compound isolation. Only two compounds, the anthraquinone (compound 7) and Vismiaguienone 4, did not exhibit activity. Regarding the complex and the ligand, complexation effectively increased the mortality rate of the leaf-cutting ants, with the ligand showing 66% mortality and the complex achieving 92%, representing an effective alternative to synthetic insecticides. Thus, this research directly contributes to the development of more sustainable strategies for managing leaf-cutting ants of the species *Atta sexdens*, as well as enhancing the chemotaxonomic knowledge of the species *Vismia guianensis*.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – INSETO PRAGA E AGRICULTURA.....	1
1.2 – FORMIGAS CORTADEIRAS.....	2
1.2.2 – Ecologia das Formigas <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i>	3
1.3-MÉTODO DE CONTROLE DE INSETOS PRAGAS.....	5
1.3.1 – A relevância dos produtos naturais no controle de insetos pragas.....	8
1.4 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Vismia</i>	9
1.4.1 – A espécie <i>Vismia guianensis</i> como fonte de compostos com aplicação biológica.....	11
1.4.1.1 – Composição química da <i>V. guianensis</i>	13
1.5 – RELEVÂNCIA DA COMPLEXAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS..	14
2 – OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 – MATERIAIS.....	18
3.1.1 – Solventes.....	18
3.1.2- Colunas cromatográficas e fases estacionárias.....	18
3.1.3-Equipamentos.....	18
3.1.4- Análises por ressonância magnética nuclear.....	18
3.1.5-Balanças.....	19
3.1.6-Outros aparatos.....	19
3.2 – MÉTODOS.....	19
3.2.1 – Material botânico.....	19
3.2.2 – Obtenção dos extratos.....	19
3.2.3 - Análise e seleção por toxicidade para a casta de operárias médias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).....	21
3.2.3.1– Extratos.....	21
3.2.3.1.1– Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios.....	21
3.2.3.1.2– Bioensaios para determinação da toxicidade.....	19
3.2.3.1.3 – Análise dos dados de toxicidade.....	24
3.2.3.2 – Frações.....	24
3.2.3.3 – Compostos isolados e sintetizados com cobre.....	25
3.2.4 -Análise do perfil químico do extrato por HPLC–DAD.....	26
3.2.5- Fracionamento por cromatografia de extração em fase sólida (EFS) do extrato das folhas da <i>Vismia guianensis</i> (PLF).....	27
3.2.6- Análise do perfil químico das frações obtidas do extrato da <i>Vismia guianensis</i> (PLF).....	29
3.2.7-Fracionamento da fração F2 obtida do extrato da <i>Vismia guianensis</i>	30
3.2.8-Ensaio biológico com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	30
3.2.9- Caracterização dos compostos isolados da <i>Vismia guianensis</i>	32
3.2.10-Síntese e caracterização do complexo.....	32

3.2.10.1– Síntese.....	32
3.2.10.2 – Caracterização do complexo por espectroscopia de infravermelho....	33
3.2.10.3 – Análises de massas por infusão direta.....	34
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	35
4.2 – ANÁLISE E SELEÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	35
4.2.1 – Análise de toxicidade para a casta de operárias médias de <i>Atta sexdens</i> (hymenoptera: formicidae).....	36
4.2.1.1-Extratos.....	36
4.2.1.2– Frações.....	39
4.2.1.3– Compostos isolados e sintetizados com cobre.....	42
4.2.2-Ensaio biológico com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> das frações e extrato da <i>Vismia guianensis</i>	44
4.3 – PERFIL QUÍMICO OBTIDO POR HPLC–DAD.....	45
4.3.1 – Perfil químico do extrato etanólico das folhas da <i>Vismia guianensis</i>	43
4.3.2– Perfil das frações da <i>Vismia guianensis</i> POR HPLC–DAD.....	43
4.3.3 – Cromatograma de isolamento da fração F2 por HPLC–DAD.....	47
4.4 – METABOLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS.....	48
4.4.1 – Vismiaguienona 1.....	50
4.4.2 – Vismiaguienona 2.....	53
4.4.3 – Vismiaguienona 3.....	56
4.4.4 – Vismiaguienona 4.....	58
4.4.5 – Vismiaguienona 5.....	60
4.4.6 – Vismiaguienona 6.....	62
4.4.7 – Antranoide – Hidroxiferruginin A.....	64
4.5 - COMPLEXO DE ANTRANOIDE.....	68
4.5.1-Espectroscopia de infravermelho.....	68
4.5.1 Espectrometria de Massas	70
5 – CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES.....	79
A. COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Vismia</i>.....	79
B. TABELAS OBTIDAS DOS ENSAIOS COM O FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>.....	81
C. ESPECTROS DE RMN.....	86
D. ANÁLISE POR HPLC-QTOF-MS/MS.....	107
E. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO.....	112

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – INSETO PRAGA E AGRICULTURA

As plantas quando crescem no ambiente equilibrado de acordo com sua espécie podem lidar com pragas e doenças sem prejuízos na produção de frutos e folhas. Estas se adaptam bem ao local onde vivem porque há disponibilidade de nutrientes no solo, como também, há boas condições de umidade, luz e controladores biológicos de pragas e doenças. A população das pragas nestes casos não aumenta, pois o ambiente não é favorável ao crescimento. Sendo assim, ao crescer em ambientes equilibrados, as plantas podem produzir materiais complexos como proteínas, vitaminas e gorduras por meio de seus processos de produção, que incluem fotossíntese e metabolismo (ZANÚNCIO JUNIOR et al., 2018).

Ao crescerem em condições desequilibradas, as plantas produzem predominantemente aminoácidos, tornando-as incapazes de produzir materiais mais complexos como proteínas. Desta forma, ficam mais suscetíveis aos ataques de insetos pragas (ZANÚNCIO JUNIOR et al., 2018).

Os insetos geralmente têm estruturas simples e sistemas digestivos com baixa capacidade de digestão. Por esta razão, quase todas as pragas só conseguem digerir aminoácidos, desta maneira, quando as plantas crescem em ambientes equilibrados de acordo com a sua natureza, fabricam os aminoácidos e os ligam rapidamente um ao outro para transformá-los em proteínas, que são substâncias mais complexas. Sendo assim, as pragas não encontram alimentos que possam ser digeridos e estas plantas não são atacadas (BURG e MAYER, 2001, ZANÚNCIO JUNIOR et al., 2018).

Para o controle destes insetos se iniciou o uso intensivo de agrotóxicos na agricultura e este está diretamente relacionado a vários problemas de ordem ambiental, incluindo: intoxicação de agricultores; contaminação de

alimentos, solo, água e animais; resistência a patógenos, pragas e plantas invasoras a certos agrotóxicos; desequilíbrio biológico, que altera a ciclagem de nutrientes e matéria orgânica; eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade (MICHEREFF e BARROS, 2001).

Uma prática que era comum entre os agricultores para o controle destes insetos, era a utilização de recursos naturais disponíveis em suas propriedades agrícolas ou nas proximidades com ação inseticida para combater a infestação de insetos. No entanto, com a introdução de agrotóxicos, a utilização de tais recursos naturais deixou de ser realizada. Sendo assim, os pesquisadores se empenhando em desenvolver abordagens que façam uso de produtos naturais como substitutos para o controle de doenças e pragas, promovendo a consciência agrícola e a produção sustentável (EMBRAPA, 2003).

1.2 – FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas cortadeiras, especialmente as espécies *Atta* e *Acromyrmex*, são consideradas as principais pragas nos reflorestamentos do Brasil. Elas representam uma ameaça constante, atacando as plantas de forma intensa durante todo o ano, independentemente da fase de desenvolvimento das plantas (ANJOS et al., 1993). Essas formigas cortam flores, ramos finos, brotos e folhas, que são encontrados e levados para dentro de seus ninhos (DA SILVA, 2001).

Estes insetos são encontrados em uma ampla faixa geográfica que se estende do sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina. No entanto, elas não foram registradas no Chile, nas Ilhas Antilhas ou no Canadá (MARICONI, 1970).

As formigas cortadeiras pertencentes ao gênero *Atta* são reconhecidas como as principais pragas florestais no continente americano. Este inseto praga realiza a atividade de corte de folhas de eucalipto com o propósito de cultivar simbioticamente um fungo, *Leucogarius gongylophorus* (FELIPE e

REIS, 2022).

Os danos causados por este comportamento de desfolha são significativos e persistentes, manifestando-se desde o estágio inicial do plantio das mudas no campo até a fase de colheita das árvores. Mudas jovens são suscetíveis a taxas elevadas de mortalidade, enquanto plantas adultas experimentam uma redução na área fotossintética, resultando conseqüentemente em menor volume de produção (FELIPE e REIS, 2022).

O Brasil lidera a lista dos países com o maior número de espécies de saúvas na América do Sul, seguido pela Argentina e Paraguai. Estas formigas têm se mostrado uma ameaça significativa para a agricultura e silvicultura brasileira, com foco especialmente nas espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*, que representam alvos econômicos de destaques. Suas atividades destrutivas causam danos severos e, em alguns casos, a destruição completa das plantas (FERNANDES et al., 2007).

A presença das saúvas é particularmente preocupante em sistemas tropicais, onde elas podem consumir uma parcela substancial da produção florestal, chegando a representar até 17% de perdas. Esta voracidade das formigas saúvas tem um impacto direto na produtividade e na economia, exigindo esforços constantes para o controle e a mitigação dos danos causados por essas pragas (FERNANDES et al., 2007).

1.2.2 – Ecologia das Formigas *Atta* e *Acromyrmex*

Em ninhos subterrâneos, as formigas *Atta* e *Acromyrmex* estabelecem suas colônias, estes podem ocupar uma área de 200 m² e abrigar uma população de cerca de seis milhões de formigas. Estas estruturas servem de moradia e proteção tanto para a sociedade de formigas que as habita quanto para o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* que mantém uma relação de mutualismo com elas (MARICONI, 2001; WARD, 2007; ZANETTI et al., 2014).

Curiosamente, esses insetos estão envolvidos em uma complexa prática de cultivo de fungos, juntamente com cupins e besouros, sendo estas dependentes da existência do fungo para sobreviver. A atividade de corte de folhas

está intimamente relacionada ao cultivo desses fungos. Estas formigas estão classificadas dentro da tribo Attini, que abrange 13 gêneros (BARCOTO, 2017; DE BRITTO et al, 2016).

Esta tribo desempenha um papel fundamental no cultivo do fungo (Figura 1.1), fornecendo-lhe substrato vegetativo, protegendo-o em suas câmaras e defendendo-o contra micróbios. O processo de degradação da matéria orgânica pelo fungo em polissacarídeos é essencial para a nutrição das formigas (CRUZ, 2019; NORTH et al., 1997; SILVA-PINHATI et al., 2004; SILVA et al., 2006;).



FIGURA 1.1 – Fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) a partir da visão interna de um formigueiro na Unesp–Rio Claro.

No entanto, o hábito de cortar vegetais e a herbívora excessiva em ambientes monoculturais têm um impacto negativo, causando desequilíbrios ecológicos. Isto levou à consideração desses insetos como prejudiciais para a agricultura e silvicultura, afetando praticamente todas as culturas, com destaque para as florestas de *Pinus* e *Eucalyptus* (ALMEIDA, 2009; CRUZ, 2019; FERNANDES et al, 2007).

Dada a sua natureza social, o controle desses insetos é uma tarefa complexa, uma vez que eles se dividem em castas e desempenham funções

específicas desde o nascimento. Além disso, a comunicação entre eles é influenciada por sinalizadores químicos que detectam qualquer ameaça à sua existência. É importante destacar que estes insetos mantêm contato constante com o fungo simbiote, sendo este uma fonte vital de alimento para as formigas (CRUZ, 2019). As castas desempenham funções específicas na sociedade das formigas (Figura 1.2) e incluem:

- Rainha: responsável pela reprodução e formação do formigueiro;
- Bitu: casta masculina, com o propósito de reprodução;
- Operárias: encarregadas das atividades gerais no formigueiro;
- Soldados: responsáveis pela defesa do formigueiro;
- Enfermeiras: cuida das larvas e pupas; Lixeiras: encarregadas da higienização do formigueiro, transportando os resíduos para longe das áreas onde o fungo está presente, incluindo as larvas e pupas (Cruz, 2019);
- Içá ou Tanajura é responsável pela perpetuação da espécie.



FIGURA 1.2 – Exibição das castas de formigas na Unesp–Rio Claro.

1.3 – MÉTODO DE CONTROLE DE INSETOS PRAGAS

O controle das formigas cortadeiras nos campos de agricultura é uma preocupação constante para os agricultores, uma vez que essas pragas podem causar danos significativos às plantações. Diversos métodos têm sido usados para enfrentar esse desafio, com o objetivo de garantir a produtividade das culturas.

Dentre os métodos disponíveis, é possível destacar os métodos mecânicos, biológicos e químicos (FERNANDES et al., 2007).

No contexto do controle químico, os compostos sintéticos têm sido amplamente empregados como uma das principais estratégias. Dentre os produtos químicos empregados, as iscas granuladas assumem uma posição de relevância, seguidas pela técnica de termo nebulização de líquidos e gases, assim como a utilização de pós– secos (BOYD e MARTIN, 1975). No entanto, é fundamental destacar que a utilização de inseticidas sintéticos, cuja propriedade não seja derivada de substâncias naturais, pode gerar consequências adversas (CHERRETT e PEREGRINE, 1976).

A utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos tem sido associada a uma série de problemas, incluindo impactos na saúde humana, contaminação ambiental, ressurgimento e surgimento de novas pragas, surtos de pragas secundárias, além da preocupante mortalidade de abelhas e outros insetos polinizadores. Este cenário resulta na presença de resíduos em alimentos e no desenvolvimento de resistência de pragas aos inseticidas (CELESTINO et al., 2015).

Desta forma, um dos principais desafios relacionados à utilização destes inseticidas sintéticos reside na sua falta de especificidade, o que implica que eles podem afetar não somente as formigas cortadeiras de folhas, mas também espécies não alvo, resultando em efeitos tóxicos indesejáveis. Além disso, é importante ressaltar que estes compostos químicos apresentam uma persistência prolongada no meio ambiente, o que pode resultar na contaminação do solo e das fontes de água (HEBLING et al., 2000).

Em virtude dos impactos ambientais adversos, os compostos organoclorados e fosforados foram proibidos, resultando no Brasil, a adoção dos inseticidas fipronil, deltametrina e sulfluramida como principais agentes de controle de formigas (Figura 1.3) (FERNANDES et al., 2007; HEBLING et al., 2000).

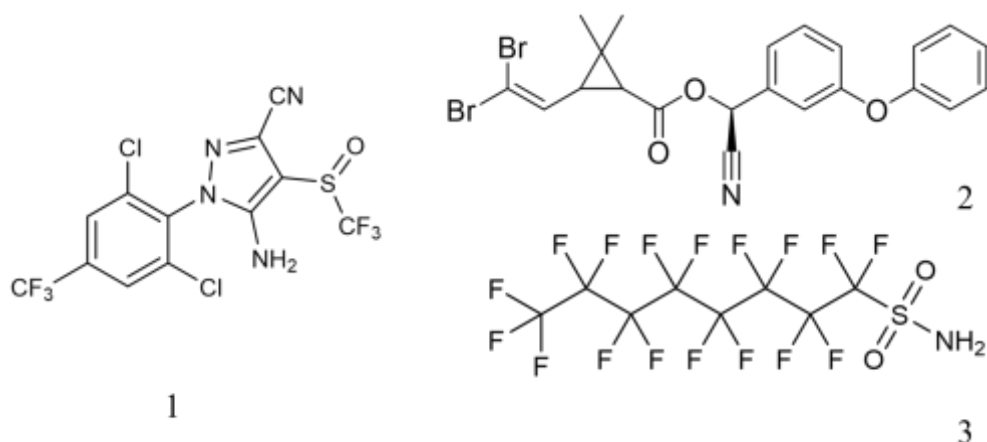


FIGURA 1.3 – Exemplo de inseticidas sintéticos: fipronil (1), deltametrina (2) e sulfluramida (3).

Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de desenvolver métodos de controle mais eficazes e específicos para as formigas cortadeiras de folhas, com o objetivo de minimizar os impactos ambientais negativos. A preservação da biodiversidade e da saúde dos ecossistemas requer a implementação de um controle mais direcionado e menos prejudicial ao meio ambiente (FERNANDES et al., 2007; MARICONI, 1974).

1.3.1 – A relevância dos produtos naturais no controle de insetos pragas

Diante do desafio das pragas resistentes, que demandam o uso de altas concentrações e aplicações mais frequentes de inseticidas, substâncias vegetais têm sido exploradas como alternativas de controle, visando reduzir os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos (CELESTINO et al., 2016).

As plantas produzem metabólitos primários essenciais para seu desenvolvimento, e também metabólitos secundários como defesa contra ataques de organismos, apresentando ação toxicológica ou repelente (CELESTINO et al., 2016; TRINDADE et al., 2012).

A eficácia de extratos botânicos no controle de diversas pragas e doenças de plantas tem sido comprovada em diversos estudos. Os inseticidas botânicos, devido ao menor risco para a saúde humana e o ambiente, surgem como uma alternativa promissora ao uso de agroquímicos sintéticos, representando uma estratégia importante no manejo de insetos-pragas (ARNASON, 2012; REGNAULT-ROGER, 2020).

O controle de pragas, realizado por meio de inseticidas químicos, enfrenta desafios importantes, devido a estes métodos serem tóxicos para mamíferos, deixarem resíduos nos alimentos e contaminarem o meio ambiente causando problemas de ordem ambiental (FREIRES, 2022).

Diante destas limitações, são crescentes os estudos em busca de compostos de origem natural que apresentem ações inseticidas, produtos naturais derivados de plantas, como extratos vegetais e óleos essenciais, são alternativas promissórias para o manejo de pragas (SANTOS et al., 2015).

Os inseticidas vegetais são considerados alternativas que possam vir a substituir os produtos químicos sintéticos no manejo de pragas, devido apresentarem riscos reduzidos para o ambiente e a saúde humana. Estes inseticidas vegetais, possuem degradação mais rápida, influenciada pela sensibilidade à luz solar, umidade ou calor, o que contribui para essa vantagem em relação aos compostos sintéticos (VIEIRA et al., 2016).

A azadiractina, proveniente da planta *Azadirachta indica*, da família Meliaceae, é um exemplo de inseticida de origem natural pertencente à classe dos limonóides. Esta substância exibe atividade contra diversos insetos e possui rápida degradação no meio ambiente. Além disto, outras classes de substâncias extraídas de fontes naturais que merecem destaque incluem o rotenoide, a nicotina e o 2-norbornanol (BOULOGNE et al., 2012; CRUZ, 2019).

Apesar da abundância de substâncias naturais com propriedades inseticidas na literatura, poucos destes produtos têm sido comercializados até o momento (VIEIRA et al., 2016). Baseado em conhecimento regional de atividades

de plantas agindo como inseticidas, folhas das espécies *Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* foram coletadas em julho de 2020, na cidade de Curuçá, PA, no norte do Brasil para estudos fitoquímicos e escolha de material a ser utilizado.

1.4 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Vismia*

O gênero *Vismia*, abrange cerca de 55 espécies e exibe uma vasta distribuição nas Américas Central e do Sul, apresentando uma significativa presença no Brasil. É constituído por pequenas árvores e arbusto, com sua ocorrência em diversos estados de variadas regiões geográficas do país, como Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Goiás, Mato Grosso e Espírito Santo (MOTA, 2020; NOBRE et al., 2015; RODRIGUES, 2013; VOGEL ET AL, 2020;).

Além disto, sua distribuição abrange distintos domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Esta ampla presença geográfica e diversidade fitogeográfica oferecem um panorama promissor para a pesquisa sobre o potencial biológico do gênero *Vismia* como fonte de moléculas com aplicações biológicas (MOTA, 2020; NOBRE et al, 2015; RODRIGUES, 2013; VOGEL et al, 2020;). Este gênero é classificado taxonomicamente conforme o Quadro1.

As espécies deste gênero são ricas fontes de compostos fenólicos, abrangendo antranas preniladas, antraquinonas, xantonas e benzofenonas (TALA et al., 2013). Estudos anteriores identificaram e caracterizaram diversos metabólitos secundários em espécies desse gênero, que incluem: flavonoides, flavonóis, xantonas, antranas, antraquinonas, benzofenonas, lignanas, esteroides, monoterpenos e triterpenos (APÊNCICES, A. **Estruturas isoladas de *Vismia***, BARBOSA et al., 2013; MOTA, 2020).

Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero *Vismia*.

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Malpighiales
Família:	Hypericaceae
Gênero:	<i>Vismia</i> Vand

Fonte: wordflora (wfo)

As antraquinonas emergem como os metabólitos mais proeminentes no gênero *Vismia*, sendo a classe de substâncias mais frequentemente isolada. Entre elas, as vismiaquinonas A e B se destacam, sendo notáveis por sua coloração e granulometria fina (MOTA, 2020; RODRIGUES, 2013; VIZCAYA et al., 2011). Como também os metabolitos secundários isovismiafenona B e hidroxiferruginin A, que pertencem a classe de benzofenonas e antranoides, respectivamente (Figura 1.4) (FULLER, 1999).

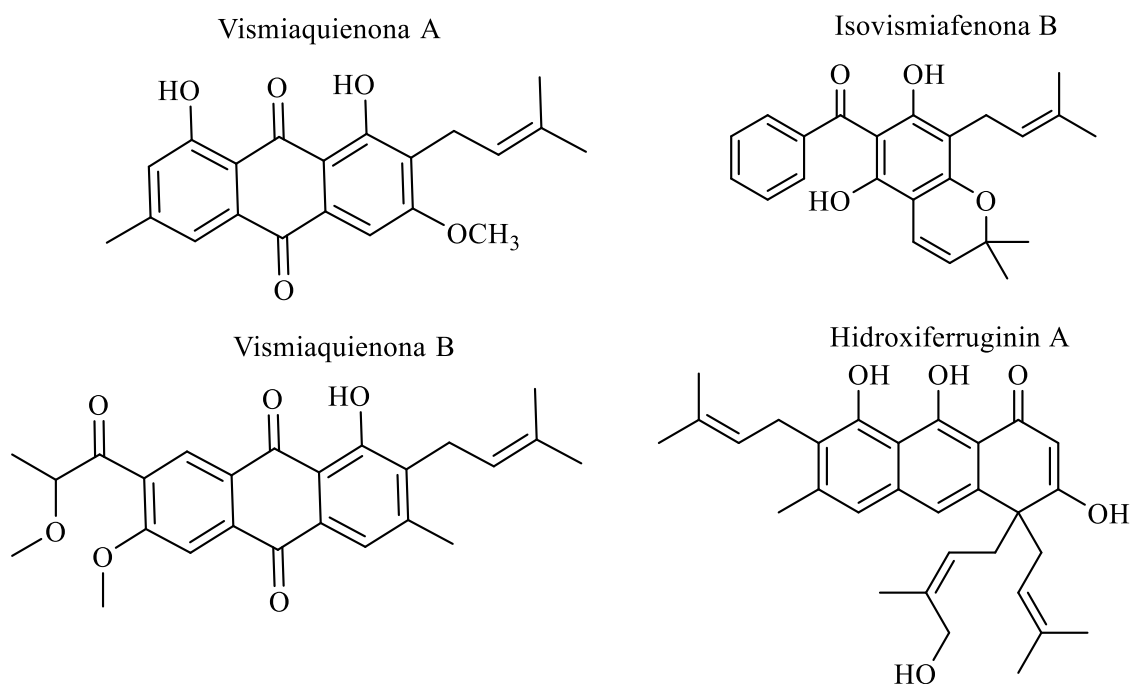


FIGURA 1.4 – Compostos isolados no gênero *Vismia*.

As espécies deste gênero têm sido utilizadas na medicina tradicional para tratar diversas doenças. Em particular, o látex produzido por várias espécies, como *V. augusta*, *V. confertiflora*, *V. dealbata*, *V. baccifera* ssp. *V. ferruginea* e *V. guianensis*, entre outras, foram empregadas no tratamento de feridas, ulcerações, afecções de pele e herpes, também são utilizadas como febrífugo e purgante (ALVAREZ et al, 2008). Além disto, a espécie *Vismia guianensis* apresentou em estudos anteriores potencial para atividade inseticida contra a broca-do-café, indicando que esta é uma fonte de compostos passíveis de serem empregados como inseticidas naturais (SOARES, 2020).

1.4.1 – A espécie *Vismia guianensis* como fonte de compostos com aplicação biológica

Vismia guianensis é caracterizada pela presença de frutos de coloração marrom em sua fase inicial, mudando-se em tonalidades verdes ao atingir a maturidade. Trata-se de um arbusto ou árvore de pequeno porte, apresentando folhas de formato oval e oblongo que exibem variações cromáticas diferentes na parte superior e inferior além de uma inflorescência disposta em panículas terminais (Figura 1.5) (MOTA, 2020; OLIVEIRA, 2017).



FIGURA 1.5 – *Vismia guianensis* com suas flores e folhas. Fonte: L.C. Marinho

(2016), retirado em REFLORA.

Os nomes que são sinônimos desta espécie incluem: *Hypericum guianense* Aubl., *Vismia guianensis* var. *acuminata* (Lam.) ME Berg, *Vismia acuminata* (Lam.) Pers., *Vismia caparosa* Kunth, *Vismia ferruginea* Kunth, *Vismia reichardtiana* (Kuntze) Ewan. (BITTRICH et al., 2015; MOTA, 2020; RODRIGUES, 2013).

A espécie *V. guianensis* (Aubl.) é conhecida popularmente como "lacre", pau-de-lacre, árvore-da-febre, caapiá e caopiá, é amplamente distribuída em países e regiões da América Tropical, como Colômbia, Venezuela, Guiana e diversas áreas do Norte e Nordeste do Brasil (ALMEIDA-CORTEZ 2006). O nome "lacre" é devido ao látex que exsuda da quebra dos galhos e das folhas, e ele é uma resina amarelo-avermelhada conhecida como goma ou goma-guta selante (Figura 1.6) (OLIVEIRA, 2017).



FIGURA 1.6 – *Vismia guianensis* com seu látex. Fonte: Artur Cruz (imagem capturada durante a coleta).

A utilização desta resina juntamente com a infusão das folhas é tradicionalmente usada para tratar dermatomicoses, além de outras aplicações com propriedades purgativas. A decocção e infusão das folhas e cascas também são empregadas para o tratamento de reumatismo e como tônico febrífugo (VIZCAYA et al., 2011).

Estudos mostram que os extratos de diversas espécies de *Vismia*

apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, inseticidas e antivirais, sendo historicamente usados por populações indígenas no tratamento de diversas doenças. No contexto antifúngico, por exemplo, relatos indicam que uma tribo Wayãpi, na Guiana Francesa, utiliza o látex para tratar infecções fúngicas orais em crianças (OLIVEIRA, 2017; VIZCAYA et al., 2011).

Pesquisas revelaram a capacidade de *V. guianensis* em combater células cancerígenas, indicando que o metabólito chamado de vismiona, presente na espécie, apresentou atividade *in vitro* contra linhagens de tumores experimentais, como carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16. Além disso, seu potencial também foi evidenciado na atividade antimalárica (DI STASI e HIRUMA–LIMA, 2002; PASQUA et al., 1995).

Outra pesquisa realizada por SUFFREDINI et al. (2007), destacaram uma atividade letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente à linhagem MCF–7 de adenocarcinoma de mama humana (SOUZA, 2014). Também foi constatado que esta espécie demonstrou potencial para exercer atividade inseticida contra a broca–do–café. Esse achado sugere que a planta pode apresentar compostos com ação inseticida, sendo necessários mais estudos para identificar quais possuem tal atividade e como podem ser aplicados em campo (SOARES, 2020).

1.4.1.1 – Composição química da *V. guianensis*

Esta espécie vegetal apresenta uma composição química diversificada, evidenciando a presença de metabólitos como vismiona e ferruginina, e classes variadas de compostos sendo estas: xantonas, antraquinonas, benzofenonas e benzocumarinas (DI STASI e HIRUMA–LIMA, 2002; PASQUA et al., 1995; SOUZA, 2014).

Pesquisas realizadas com os extratos das raízes de *Vismia guianensis*, resultou no isolamento de cinco benzofenonas (vismiaguianonas A, B, C, D e E) e duas benzocumarinas (vismiaguianinas A e B) (SEO et al., 2000). Além destas,

foi analisada a composição química dos frutos da espécie mencionada, identificando dois antranóides prenilados (γ -hidroxi-ferruginina A e γ,γ -dihidroxi-ferruginina A) (MONACHE et al.,1980).

De forma mais recente, estudos destacaram a presença de compostos fenólicos nos extratos dos frutos de *V. guianensis*, ressaltando sua atividade antioxidante. Entre esses compostos, mencionam-se os antranóides prenilados ferruginina A e γ -hidroxiferruginina, bem como a antraquinona vismiona A (ALVAREZ et al., 2008; SOUZA, 2014).

Estes estudos ampliaram o conhecimento sobre a complexidade da composição química da planta, evidenciando seu potencial na utilização de compostos para aplicações biológicas.

1.5 – RELEVÂNCIA DA COMPLEXAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Os complexos metálicos têm uma importância crucial em diversas áreas, incluindo a química farmacêutica, industrial e agrícola (KUMAR, 2009). Na química farmacêutica, estes complexos são frequentemente utilizados como agentes terapêuticos devido às suas propriedades de coordenação específicas, que podem influenciar a atividade biológica dos compostos (RONCONI e SADLER, 2006).

Na agricultura, os complexos metálicos são amplamente utilizados como fertilizantes e agroquímicos, visando não apenas melhorar a produção agrícola, mas também proteger as culturas contra pragas e doenças. Dentre estes complexos, a utilização do cobre emerge como uma escolha proeminente.

1.5.1 – Cobre

O cobre é um elemento químico de número atômico 29 e símbolo Cu, pertencente ao grupo dos metais de transição e tem o íon Cu^{2+} como o mais estável. Em relação ao número de coordenação, o cobre comumente forma compostos com número de coordenação 2 (linear), 4 (quadrado planar ou tetraédrico) e 6 (octaédrico) (COTTON e WILKINSON, 1988). Sendo este,

amplamente utilizado em diversas aplicações industriais e produtos agrícolas.

Entre as diversas utilizações do cobre, destaca-se a descoberta acidental da mistura bordalesa em 1885 pelo cientista francês Pierre-Marie Alexis Millardet, que marcou o surgimento dos compostos antimicrobianos à base de cobre (CBAC) na agricultura (GAYON e SAUVAGEAU, 1903). Estes compostos revolucionaram a proteção das culturas no século XX devido à sua eficácia contra patógenos de plantas, baixo custo e estabilidade química. Os CBACs são amplamente utilizados no controle de doenças bacterianas e fúngicas, sendo componentes essenciais do manejo integrado de pragas. Na agricultura orgânica, são os ingredientes ativos mais eficazes contra diversos patógenos, contribuindo para a sustentabilidade agrícola (CHA E COOKSEY 1991; FINCKH et al., 2015; LAMICHHANE, 2018).

Além disto, foi visto que a complexação de compostos naturais com cobre pode ser uma aplicação eficiente frente ao mecanismo de funcionamento de um formigueiro (CRUZ, 2019). Portanto, a complexação com cobre emerge como um recurso significativo para potencializar a toxicidade em ensaios conduzidos.

2 – OBJETIVOS GERAIS

Os principais objetivos deste estudo consistiram em desenvolver estratégias para encontrar produtos naturais com propriedades inseticidas e fungicidas, visando o controle de formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens*, por meio do isolamento de substâncias provenientes da espécie botânica *Vismia guianensis*.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar planta a ser estudada dentre folhas das espécies *Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* coletadas em julho de 2020, na cidade de Curuçá, PA, no norte do Brasil.
- Avaliar os potenciais inseticida e fungicida dos extratos e frações da espécie de *Vismia guianensis* frente à *A. sexdens*;
- Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado de extratos e partições das mesmas, frente às atividades biológicas visando o isolamento dos compostos bioativos presente na planta;
- Identificar as estruturas dos compostos isolados via RMN e HPLC–EM/EM;
- Sintetizar complexos metálicos mediante a incorporação de íons de cobre a partir de compostos isolados.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Solventes

- Água ultrapura deionizada;
- Solventes Grau HPLC: ACN, MeOH (J.T Baker, Panreac, Honeywell e Tedia);
- Solventes deuterados: CDCl₃, MeOD (Merck e Aldrich);
- Solvente EtOH utilizado para preparação dos extratos
- Solvente diclorometano (CH₂Cl₂) no teste de toxicidade dos extratos.

3.1.2 – Colunas cromatográficas e fases estacionárias

- Coluna analítica PHENOMENEX Gemini 150 x 4,6 mm (5 µm);
- Coluna semipreparativa Phenomenex® Gemini C18 250 x 10 mm (5 µm);
- Cartucho C-18 Supelco® (SUPELLEAN™ LC-18, com 10 g de massa e 60 mL de volume, partículas de 45 µm).

3.1.3 – Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência equipamento Agilent 1290 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas Agilent G6545B Q-TOF (Agilent Technologies Inc.) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Corporation modelo: M20A e detector Fotodiodo array UV-vis SPD-M20A DAD.
- Cromatógrafo de massas Synapt G2-S (Waters Technologies), fonte de ionização: ESI, analisador híbrido Q-TOF (Quadrupole – Time Of Flight);
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C{¹H}, equipamento Bruker® DRX 9,4 T (400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para RMN ¹³C).

3.1.4 – 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);
- Os espectros obtidos foram tratados no software MestReNova® (MNova©), Mestrelab Research S.L., versão 14.0.0 (Willcott, 2019).

3.1.5 – Balanças

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

3.1.6 – 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 – Material botânico

As folhas das espécies *Vismia guianensis* (MFS010807), *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* foram coletadas em julho de 2020, na cidade de Curuçá, PA, no norte do Brasil. E posteriormente estas matrizes foram depositadas no Parque Zoobotânico Museu Paraense Emílio Goeldi.

Para a preservação dessas amostras, optou-se pela dessecação, seguida pelo armazenamento em um recipiente fechado. A extração dos compostos e a subsequentes análises por meio das técnicas

HPLC–UV–SPE–RMN–MS foram executadas nas instalações da Universidade Federal de São Carlos, localizada em São Carlos, SP, Brasil.

3.2.2 – Obtenção dos extratos

Após a coleta, as folhas das plantas *Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* passaram por um processo de secagem em uma estufa com circulação de ar, mantida a uma temperatura de 40 °C, por um período de 6 dias. Após a desidratação, o material foi triturado usando um liquidificador industrial. Em seguida, procedeu-se à extração dos compostos.

As folhas trituradas da *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* foram submetidas à extração em etanol e diclorometano, enquanto para a *Vismia guianensis*, a extração foi realizada apenas com etanol (EtOH). O processo de extração envolveu o uso de um banho de ultrassom (sonicador), mantido a 40 °C, durante 1 hora, repetido por quatro vezes consecutivas.

Como resultado, obteve-se os extratos etanólicos das espécies *Vismia guianensis*, *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* (PLF, CDet e CPet), bem como os extratos obtidos com diclorometano de *Mansoa alliacea* e *Tabernaemontana angulata* (CDDi, CPDi respectivamente). Todos esses extratos foram filtrados através de papel filtro e submetidos a um processo de secagem em um evaporador rotativo BUCHI (Rotavapor® R–215), com banho de aquecimento B–491 e bomba de vácuo V–700, controlado pelo V–850.

Posteriormente, cada extrato foi transferido para recipientes individuais, pesados e etiquetados devidamente. Realizou-se o cálculo do rendimento de cada extrato, e todos foram direcionados para armazenamento em um refrigerador.

3.2.3 – Análise e seleção por toxicidade para a casta de operárias médias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

3.2.3.1 – Extratos

Foi realizada uma triagem entre três extratos brutos preparados no laboratório de produtos naturais da UFSCar. Essa escolha foi baseada na análise de toxicidade para a casta de operárias médias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

3.2.3.1.1 – Coleta e manutenção das formigas utilizadas nos bioensaios

As operárias de *Atta sexdens*, com massa corpórea variando de 15 mg a 25 mg, foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP – Campus Rio Claro (Figura 3.1).

Para a manutenção desse formigueiro, diariamente ocorre o oferecimento de folhas de *Eucalyptus* sp., *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp., *Acalypha wilkesiana* e *Syzygium cumini*, ocasionalmente flocos de aveia, farinha de milho ou outras plantas palatáveis às saúvas como folhas de amoreira.

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro, conseqüentemente na ausência do fungo simbiote e de folhas considerados seus alimentos, foram utilizadas dietas sólidas artificiais, preparadas com 1,5g de glicose, 0,3 g de peptona bacteriológica, 0,03 g de extrato de levedura e 0,3 g de ágar bacteriológico, cada uma dissolvida em 30 mL de água destilada. Após a mistura das substâncias, as dietas foram autoclavadas a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Em seguida foi colocada ainda quente em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que também foram autoclavadas da mesma maneira, adicionando os extratos dissolvidos em diclorometano e misturando com a dieta.



FIGURA 3.1 – Vista geral do formigueiro de *Atta sexdens* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).

Além das dietas com extratos, também foi preparada uma dieta com o solvente (diclorometano) diluído, utilizada como controle negativo. Após o resfriamento e a solidificação, as dietas foram embrulhadas em filme de PVC e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subsequentes, durante o período do experimento.

3.2.3.1.2 – Bioensaios para determinação da toxicidade

Inicialmente, foi pesado na balança analítica 250 mg do Extrato Pau Lacre (PLF) e 300 mg dos extratos de Carapeté (ECD) e Cipó de Alho (CDDI), separadamente, posteriormente inseriu-se em frascos de vidro, onde foram adicionados o solvente diclorometano nas quantidades de 20 mL para ECD e CDDI e 15 mL para PLF. Após a adição, os frascos foram levados ao vórtex para homogeneizar a solução (Figura 3.2). Após a diluição, os extratos foram adicionados e misturados a dietas, após sua solidificação foram embaladas com plástico filme e armazenadas em geladeira.



FIGURA 3.2 – Extratos utilizados no bioensaio, já diluídos com diclorometano (Vista lateral) (esquerda). Extratos utilizados no bioensaio, já diluídos com diclorometano (Vista dorsal) (direita).

Em todos os tratamentos as formigas foram retiradas dos formigueiros e distribuídas em lotes de 50 operárias para cada extrato testado, divididas em grupos de 10 formigas por placa de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Estas placas foram colocadas em estufa B.O.D com temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 21 dias.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou dieta acrescida dos extratos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa (Figura 3.3). A cada 24 horas a dieta foi renovada e sempre que necessário, os papéis filtro (geralmente são cortados pelas formigas) também, a fim de se evitar contaminantes bem como manter o ambiente limpo para as formigas.

As formigas nos tratamentos com extratos foram alimentadas com o mesmo durante todo o período do experimento, já as formigas do controle foram alimentadas com suas respectivas dietas, também por todo o período do experimento (21 dias).

Ao fim do experimento foi visto que apenas o extrato das *Vismia guianensis* (PLF) apresentou diferença significativa de mortalidade em relação ao

controle, sendo então submetido ao fracionamento e isolamento, nas quais as frações obtidas também foram analisadas e os ensaios apresentados estão na próxima sessão.



FIGURA 3.3 – Dieta ECD em suas 3 concentrações, de cima para baixo, da maior para a menor concentração (1 %, 0,2 % e 0,1 %), distribuídas e prontas para o oferecimento para as operárias.

3.2.3.1.3 – 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 mediano foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico “log rank”, com nível de significância de 5 % (ELANDT – JOHNSON et al., 1980), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

Os bioensaios, onde os extratos foram diluídos em diclorometano, foram comparados com o controle contendo dieta pura mais diclorometano. O controle foi comparado com todos os extratos, a fim de verificar a presença de diferença significativa entre os tratamentos.

3.2.3.2 – Frações

Cada ativo (F1, F2, F3 e F4 obtidas do PLF) foi fracionado em três (3) concentrações (em mg) proporcional à quantidade de dieta a ser inserido (em mL). Por tanto, implementou-se 6 mg do ativo para 30 mL de dieta, 30 mg/30 mL

e 60 mg/30 mL. O experimento contou com três tratamentos dos quais um foi utilizado como controle (DP I), as formigas submetidas a este receberam dieta pura (sem ativo) para a manutenção das operárias durante o período de realização do bioensaio (21 dias).

Com isto, iniciou-se o preparo das dietas artificiais seguindo as instruções de Bueno *et al* (1997) integrado ao método Dry Mix. Ocorreu, então, a maceração dos ingredientes junto ao ativo fracionado, seguido pela adição de água destilada. Ao final as dietas individualizadas em tubo Schott 80 mL (lavados anteriormente com acetona) foram encaminhadas para a autoclave à temperatura de 120 °C por 20 minutos e vertidas em placas de Petri de vidro, as quais foram submetidas a capela de exaustão até a sua completa solidificação.

As operárias médias de *Atta sexdens* foram dispostas em placa de Petri de acrílico (10 cm de diâmetro forradas com papel filtro circular), devidamente identificada, em grupos contendo 10 indivíduos em cinco repetições, totalizando 50 formigas-cortadeiras por tratamento.

A dieta para manutenção das formigas foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi substituída e sempre que necessário, os papéis filtro também (geralmente são cortados pelas formigas), a fim de se evitar contaminantes bem como manter o ambiente limpo.

As placas contendo as operárias foram mantidas em estufa B.O.D com temperatura de 24 °C ± 1 °C e umidade relativa acima de 70%. O bioensaio foi avaliado diariamente, para a retirada e anotação do número de formigas mortas, durante um período de 21 dias.

3.2.3.3 – Compostos isolados e sintetizados com cobre

Os compostos PLF-3, PLF-4, PLF-7, PLF-8, PLF-9, PLF-10 e o complexo 1:2 foram diluídos, de maneira isolada, em 0,5 mL de metanol. Posteriormente iniciou-se o preparo das dietas artificiais seguindo as instruções de Bueno *et al* (1997), entretanto, os ativos foram inseridos na dieta ainda líquida.

Os tratamentos individualizados em tubo Schott 100 mL, (lavados anteriormente com acetona), foram encaminhadas para a autoclave à temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, vertidos em placas de Petri de vidro, devidamente identificadas com o nome dos tratamentos, e submetidas a capela de exaustão até a sua completa solidificação.

O experimento contou com um grupo controle, totalizando nove tratamentos. Para as formigas submetidas a este, foi ofertada dieta sólida sem ativo: Dieta Pura (DP). As operárias médias de *Atta sexdens* foram dispostas em placa de Petri de acrílico (10 cm de diâmetro forradas com papel filtro circular), devidamente identificada, em grupos contendo 10 indivíduos em cinco repetições, totalizando 50 formigas–cortadeiras por tratamento.

A dieta para manutenção das formigas foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi substituída e sempre que necessário, os papéis filtro também (geralmente são cortados pelas formigas), a fim de se evitar contaminantes bem como manter o ambiente limpo.

As placas contendo as operárias foram mantidas em estufa B.O.D com temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa acima de 70%. O bioensaio foi avaliado diariamente, para a retirada e anotação do número de formigas mortas, durante um período de 17 dias.

3.2.4 – Análise do perfil químico do extrato por HPLC–DAD

A amostra do extrato das folhas da *Vismia guianensis* foi dissolvida em metanol de grau HPLC (Sigma–Aldrich®) para atingir uma concentração de 4 mg/mL. Após essa preparação, a amostra foi submetida a um processo de filtração em filtros de seringa 25 mm x 0,45 µm e armazenada em Vail para as análises.

Posteriormente, procedeu–se à análise do perfil químico dessa amostra utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo SHIMADZU® Prominence) equipado com três unidades de bombeamento de

solvente LC-20AR, um autoinjeter SIL-10AF, um controlador de sistema CBM-20A, um detector UV/VIS SPD-M20A, um degaseificador DGU-20A e empregando o software LabSolutions™ versão 5.90. A análise foi realizada utilizando uma coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm).

O processo de separação foi conduzido no modo reverso, empregando duas fases distintas: uma composta por água ultrapura Milli-Q® com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e a outra composta por acetonitrila (Sigma-Aldrich® HPLC) (fase B). Um gradiente de eluição padrão foi utilizado, com uma taxa de fluxo de 1 mL/min (Tabela 3.1), e um volume de injeção de 20 µL. A detecção das substâncias presentes nas amostras foi realizada a um comprimento de onda de λ 254 nm.

TABELA 3.1 – Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico do extrato

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v); Solvente B = ACN

3.2.5 – Fracionamento por extração em fase sólida (EFS) do extrato das folhas da *Vismia guianensis* (PLF)

Com base nos resultados obtidos na avaliação da toxicidade em *Atta sexdens*, procedeu-se o fracionamento do extrato PLF em quatro frações distintas (Figura 3.4). Este fracionamento foi realizado por meio de extração em fase sólida (EFS), empregando um cartucho C-18 Supelco® (SUPELLEAN™ LC-18, com 10 g de massa e 60 mL de volume, partículas de 45 µm).

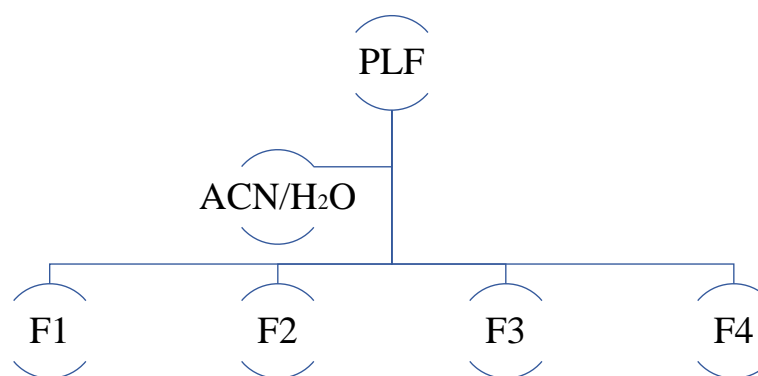


FIGURA 3.4 – Fluxograma do fracionamento do extrato das folhas da *Vismia guianensis* (PLF).

Inicialmente, o cartucho foi ativado com 60mL de metanol de grau HPLC (SigmaAldrich®). Para a eluição das frações, foi utilizado um volume quatro vezes maior que o volume morto de cada fração, determinando a porcentagem de solvente com base no perfil químico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC–PDA) (Tabela 3.2).

TABELA 3.2 – Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato etanólico da *Vismia guianensis* (PLF)

Frações coletadas	Fase móvel para eluição (%)
F1	60 ACN/H ₂ O
F2	80 ACN/H ₂ O
F3	100 ACN
F4	100 (MeOH/CHCl ₃)

Antes de aplicar a amostra, o cartucho foi condicionado com a primeira fase móvel, seguido pela solubilização de 1 g do extrato PLF nessa mistura. Após a coleta das frações de acordo com o planejamento das fases pelo cromatograma obtido da seção 3.2.4, o cartucho passou por uma limpeza com uma mistura de metanol e clorofórmio (MeOH:CHCl₃) e, em seguida, foi lavado apenas com metanol.

3.2.6 – Análise do perfil químico das frações obtidas do extrato da *Vismia guianensis* (PLF)

Nas análises por HPLC–DAD, as amostras foram primeiramente dissolvidas em metanol de grau HPLC da marca Sigma–Aldrich®, alcançando uma concentração de 5 mg/mL e submetidas a filtração em filtros de seringa 25 mm x 0,45 µm, em seguida, foram acondicionadas em vials.

Posteriormente, realizou-se à análise detalhada do perfil químico contido nessas frações. Isto foi realizado utilizando um equipamento do modelo SHIMADZU® Prominence. Nesse processo, empregou-se uma coluna analítica da Phenomenex® Gemini C18, que possui as dimensões de 250 x 4,6 mm, com partículas de tamanho de 5 µm.

A separação dos componentes presentes nas frações foi realizada por meio da utilização de duas fases distintas. A primeira fase consistia em água ultrapura Milli–Q® contendo 0,1% de ácido fórmico (denominada fase A), enquanto a segunda fase era composta por acetonitrila com 0,1% de ácido (Sigma–Aldrich® HPLC) (fase B). Foi utilizado um gradiente de eluição padrão, mantendo uma taxa de fluxo constante de 1 mL/min, conforme detalhado na Tabela 3.3, e um volume de injeção de 20 µL das amostras para análise.

A detecção dos constituintes presentes nas amostras foi efetuada a um comprimento de onda de λ 254 nm.

TABELA 3.3 – Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico das frações

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Solvente B = ACN + 0,1% ácido fórmico (v/v)

3.2.7 – Fracionamento da fração F2 obtida do extrato da *Vismia guianensis*

A fração com melhor resultado para o teste de toxicidade na formiga foi a PLF–F2, juntamente com uma análise prévia de compostos de interesse nos espectros de RMN. Sendo assim, esta foi utilizada em um novo fracionamento através da técnica de HPLC com detector DAD.

O fracionamento foi realizado em modo isocrático de eluição usando uma coluna semipreparativa de fase reversa Phenomenex® Gemini C18 (250 x 10 mm, partícula de 5 µm), onde as fases foram preparadas: H₂O (ultrapura Milli–Q®) + ácido fórmico 0,1% (linha A) e ACN (grau HPLC Sigma–Aldrich®) + ácido fórmico 0,1% (linha B). A eluição foi observada no comprimento de onda de 254 nm com fluxo de 2 mL/min, ACN de 74% em 65 min e volume de injeção de 50 µL. Posteriormente, estas subfrações foram analisadas por técnicas de RMN de ¹H e espectrometria de massas.

3.2.8 – Ensaio biológico com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Os experimentos com o microrganismo *Leucoagaricus gongylophorus* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos – campus de São Carlos – UFSCar.

O fungo (*Leucoagaricus gongylophorus*) foi isolado de um ninho de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* e mantido em laboratório em meio de cultivo composto de extrato de malte (20 g·L⁻¹), peptona G (5 g·L⁻¹), extrato de levedura (2 g·L⁻¹) e ágar (17 g·L⁻¹).

Para o ensaio, preparou-se o mesmo meio de cultura utilizado para seu crescimento. Um volume de 10 mL de meio foi adicionado em tubos de ensaio, foi autoclavado a 120 °C e à 1.0 atm., por 20 minutos. Deixou-se esfriar até aproximadamente na temperatura de 50 °C, em seguida foram incorporadas ao meio 5 mg das amostras solubilizadas em 200 µL de Dimetilsulfóxido

(DMSO). Agitou-se para melhor homogeneização das substâncias no meio de cultura. Na etapa seguinte os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri (75 × 15 mm), estéril, na cabine de fluxo laminar, previamente esterilizados por 30 minutos por luz ultravioleta.

Após a solidificação do meio de cultura, as placas dos ensaios foram reservadas para no outro dia seguir com o experimento. Este tempo é importante para a observar se houve alguma contaminação no ensaio. Cada placa de Petri foi inoculada com um disco de ágar (aproximadamente 9 mm) na posição central, previamente colonizado pelo fungo simbiótico *L. gongylophorus*. Após os períodos de incubação à 21 °C, foram realizadas medidas em 5 eixos da massa micelial, nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias, para os cálculos das áreas de crescimento micelial do fungo simbiótico em cada amostra.

Foi utilizado o Excel para serem calculados o desvio padrão (SD), desvio relativo (RSD) e a porcentagem de inibição nos respectivos dias de experimentos. As amostras foram feitas em quintuplicatas, conforme a Figura 3.5, assim como o controle do solvente (DMSO) e controle do fungo simbiote (meio de cultura e o fungo simbiote).

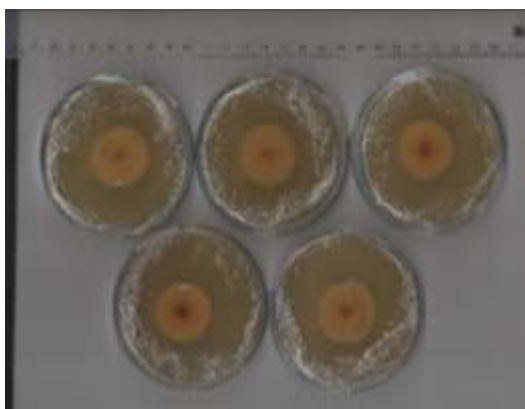


FIGURA 3.5 – Placas inoculadas com um disco de ágar colonizado pelo fungo simbiótico.

3.2.9 – Caracterização dos compostos isolados da *Vismia guianensis*

3.2.9.1 – Análises por Ressonância Magnética Nuclear

As bandas coletadas no HPLC–PDA no modo preparativo com o objetivo de isolamento das moléculas, foram secas em Rotaevaporador BUCHI, e analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, equipamento Bruker® DRX 9,4T (400 MHz para RMN H^1 e 100 MHz para RMN C^{13}). Os espectros unidimensionais e bidimensionais obtidos foram tratados no software MestReNova® (MNova©), Mestrelab Research S.L., versão 14.0.0 (Willcott, 2019).

3.2.9.2 – Análises por Espectrometria de Massas

As análises em UPLC–DAD–QTOF, foram realizadas EM um equipamento Agilent 1290 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas Agilent G6545B Q–TOF equipado com uma fonte de ionização eletrospray (ESI). As amostras estavam na concentração de 5 ppm as quais foram injetadas 3 μL em sistema de eluição usando $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ com 0,1% de ácido fórmico em modo gradiente (5 a 100% de ACN em 15min) em coluna Coluna Agilent® Zorbax SBC18 (50 \times 3,0 mm; partícula de 1.8 μm) temperatura de coluna de 35 °C.

3.2.10 – Síntese e caracterização do complexo

3.2.10.1– Síntese

Foram utilizados 0,042 mmol de um antranoide previamente isolado e identificado como Hidroxiferruginin A e destinado à realização da síntese com o sal de cobre.

A amostra foi dissolvida em 15 mL de metanol (MeOH) e adicionou-se à solução $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, previamente pesado e solubilizado em 1 mL de MeOH. O composto de cobre foi gotejado nas misturas, promovendo a formação do complexo: (2:1) de ligante para metal.

Após a reação, houve a formação de precipitados que foram submetidos a um processo de filtração, e posteriormente a uma sequência de três lavagens com MeOH. visando remover o ligante não reagido e em seguida, a três lavagens adicionais com H₂O.

O produto resultante desse procedimento foi, posteriormente, transferido para um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, permitindo a completa desidratação da amostra e armazenada em microtubo, conforme ilustrado na Figura 3.6. Este processo é essencial para assegurar a remoção eficaz de solventes residuais e garantir a estabilidade do complexo formado durante as análises subsequentes.



FIGURA 3.6 - Variação de coloração do processo de síntese do complexo com antranoide. (A) ligante = laranja, (B) Complexo 1:2 = Marrom amarelado.

3.2.10.2 – Caracterização do complexo por espectroscopia de infravermelho

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram realizados no equipamento de FT-IR, marca IR-Prestige 21, Shimadzu, para análises espectroscópicas, na faixa de 240–4000 cm⁻¹.

As pastilhas contendo os complexos, sais e ligantes, foram preparados, triturando em almofariz de ágata, na proporção de 1mg de amostra para 100mg de Brometo de potássio (KBr), marca Sigma-Aldrich, pureza 99,8%, até a completa homogeneização da amostra com o KBr.

Em seguida, a amostra foi transferida para um pastilhador e levado para uma prensa, onde permaneceu por alguns minutos. A pastilha pronta, foi adaptada a um suporte e o espectro no Infravermelho foi executado.

3.2.10.3 – Análises de massas por infusão direta

Para o complexo com cobre, as análises foram por infusão direta, com ionização por Eletrospray (IES) em modo negativo com varredura na faixa de 150 – 1500 Da. A amostra, com concentração de 5 ppm, foi introduzida no sistema de eluição por meio de uma injeção de 3 μ L. Além disso, foram conduzidos experimentos de MS/MS, nos quais a fragmentação foi realizada por dissociação induzida por colisão (CID).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS

No presente estudo, o material orgânico proveniente das folhas de *Mansoa alliacea* (Cipó d’alho) e *Tabernaemontana angulata* (Carapeté) foi inicialmente extraído com etanol por ser um solvente verde. No entanto, devido ao baixo rendimento obtido, a extração subsequente foi conduzida utilizando diclorometano, que demonstrou uma maior eficiência. Por outro lado, para as folhas de pau lacre (*Vismia guianensis*), o etanol evidenciou ser um solvente eficiente para a extração dos compostos desejados.

Os valores das massas das folhas e os rendimentos dos extratos foram determinados conforme apresentado na Tabela 4.1. Posteriormente, os extratos ECD, CDDi e PLF foram submetidos à análise do perfil cromatográfico por meio de HPLC–PDA, conforme descrito na seção 3.2.4.

TABELA 4.1 – Rendimento dos extratos

Extratos das folhas	Rendimento (%)
Carapeté _Etanólico (<i>Tabernaemontana angulata</i>)	2.7
Carapeté _Dicloro (ECD – <i>Tabernaemontana angulata</i>)	3.5
Cipó d’alho _Etanólico (<i>Mansoa alliacea</i>)	1.0
Cipó d’alho _Dicloro (CDDi – <i>Mansoa alliacea</i>)	2.0
Pau lacre _Etanólico (PLF – <i>Vismia guianensis</i>)	5.0

4.2 – ANÁLISE E SELEÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O estudo teve início com a preparação de extratos provenientes de três matrizes botânicas distintas, sendo estas: *Vismia guianensis* (PLF), *Mansoa alliacea* (CDDi) e *Tabernaemontana angulata* (ECD). Para conduzir a abordagem bioguiada, os referidos extratos foram submetidos a análises de toxicidade em relação à casta de operárias médias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

O extrato que apresentou atividade significativa foi posteriormente submetido ao fracionamento, sendo tanto o extrato original quanto as frações

obtidas submetidos a ensaios biológicos em associação com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, além de serem submetidos a análises de toxicidade em relação à mesma casta de formigas.

Em seguida, a fração mais ativa foi submetida a novos processos de fracionamento para isolar e analisar os compostos responsáveis pela atividade observada, os quais foram novamente testados quanto à sua toxicidade para as operárias médias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

4.2.1 – Análise de toxicidade para a casta de operárias médias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

4.2.1.1 Extratos

Os resultados derivados de cada bioensaio foram analisados, sendo apresentados por meio de análises gráficas das curvas de sobrevivência, bem como em tabelas que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediano (Md) e as interpretações do teste "log rank".

Ao analisar a Figura 4.1, observa-se a influência das diversas concentrações dos extratos sobre a sobrevivência das formigas, proporcionando uma representação visual das variações nos níveis de mortalidade ao longo do tempo. Essa abordagem gráfica é complementada pelas tabelas subsequentes (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4), que oferecem uma visão mais detalhada das porcentagens acumuladas de mortalidade em diferentes intervalos durante o experimento.

As Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4, por sua vez, destacam os valores percentuais específicos de mortalidade acumulada em dias determinados, proporcionando uma análise mais precisa dos efeitos temporais dos extratos testados sobre a população de formigas. Essas informações detalhadas auxiliam na compreensão da dinâmica temporal das respostas biológicas observadas no decorrer do experimento.

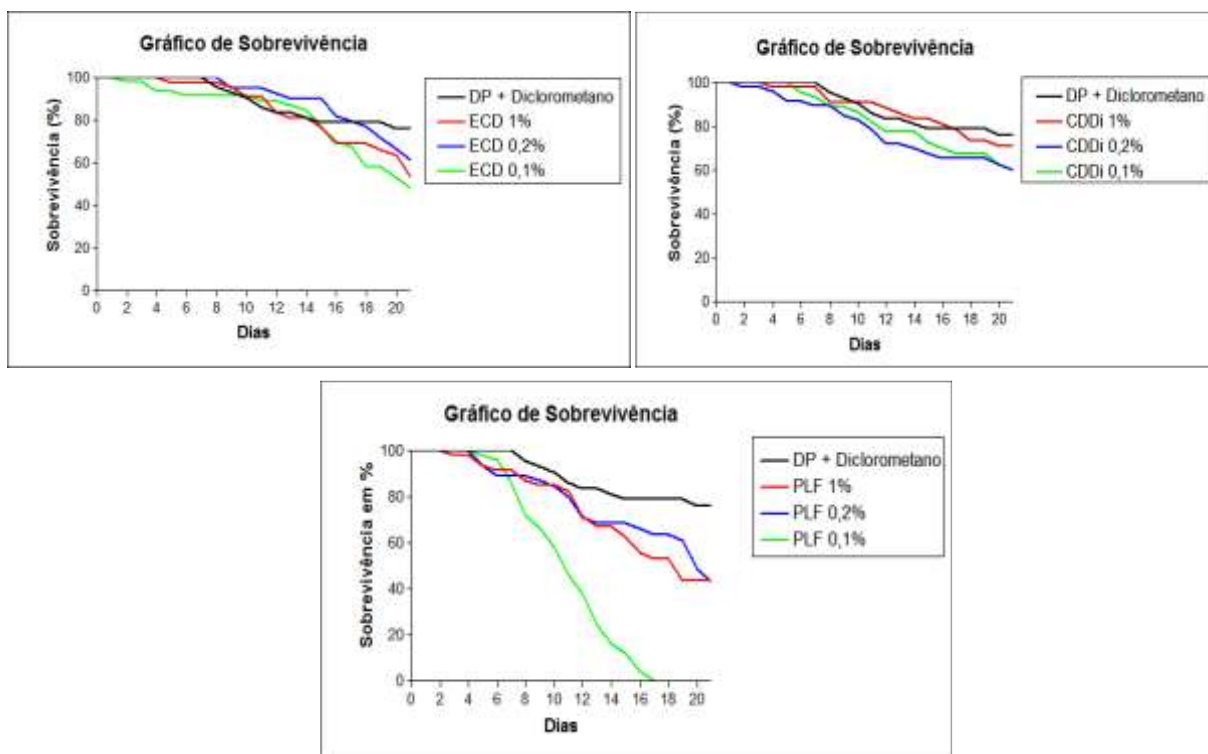


FIGURA 4.1 – Curvas de sobrevivências de operárias de *Atta sexdens* submetidas aos extratos CDDi (extrato obtido com diclorometano de *Mansoa alliacea*), PLF (Extrato etanólico da *Vismia guianensis*) e ECD (extrato obtido com diclorometano de *Tabernaemontana angulata*).

Tabela 4.2 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com o extrato ECD em relação ao grupo controle

TRATAMENTO	% acumulada de mortalidade por dia								Md *
	1	2	3	6	9	12	16	21	
DP + Dicloro	0	0	0	0	6	14	18	20	>21a
ECD 1%	0	0	0	2	4	14	26	38	>21a
ECD 0,2%	0	0	0	0	4	6	14	30	>21a
ECD 0,1%	0	2	2	8	8	10	26	44	>21a

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

TABELA 4.3 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com o extrato CDDi em relação ao grupo controle

TRATAMENTO	% acumulada de mortalidade por dia								Md *
	1	2	3	6	9	12	16	21	
DP + Dicloro	0	0	0	0	6	14	18	20	>21a
CDDi 1%	0	0	0	2	2	10	16	24	>21a
CDDi 0,2%	0	2	2	8	14	26	32	36	>21a
CDDi 0,1%	0	0	0	4	10	20	26	34	>21a

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

TABELA 4.4 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com o extrato PLF em relação ao grupo controle

TRATAMENTO	% acumulada de mortalidade por dia								Md *
	1	2	3	6	9	12	16	21	
DP+ Dicloro	0	0	0	0	6	14	18	20	>21a
PLF 1%	0	0	2	8	14	26	40	50	19a
PLF 0,2%	0	0	0	10	12	26	30	48	>21a
PLF 0,1%	0	0	0	4	34	62	96	100	11b

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

Após o término dos 21 dias de experimento e levando em consideração os resultados das análises estatísticas pode-se verificar que somente o extrato PLF 0,1% apresentou diferença significativa da mortalidade de operárias médias de *Atta sexdens* quando comparada com o controle.

O ECD não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle, assim como no tratamento CDDi. Ambos não atingiram 50% da

mortalidade antes dos 21 dias. Entretanto, o extrato PLF quando, também, comparado ao grupo controle, apresentou diferença significativa, ou seja, uma maior taxa mortalidade, e a constatação fica mais evidente quando a menor concentração (0,1%). Por exemplo, a análise no 17º dia revela 100% de mortalidade. O percentual de 50% foi atingido no 11º dia.

Após o término dos 21 dias de experimento e levando em consideração os resultados das análises estatísticas pode-se verificar que somente o extrato PLF 0,1% apresentou diferença significativa da mortalidade de operárias médias de *Atta sexdens* quando comparada com o controle. Sendo assim, apenas o extrato da *Vismia guianensis* foi escolhido para a busca dos compostos bioativos.

4.2.1.2– Frações obtidas da *Vismia guianensis*

Os resultados são 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*”. A Figura 4.2 ilustra as curvas de sobrevivência das operárias médias de *Atta sexdens* para as quatro frações analisadas.

A partir das análises estatísticas é observado que os tratamentos de menor massa utilizada (6 mg) não mostraram influência sobre a mortalidade das formigas, a diferença significativa apresentada pode estar relacionada à mortalidade do grupo controle que ao ser comparada a estes tratamentos (com 6 mg do ativo) manifestou mortalidade superior. Os testes F1 e F2 com 60 mg do ativo foram os únicos a atingir a mortalidade média durante o experimento, no 20º e 21º dia respectivamente.

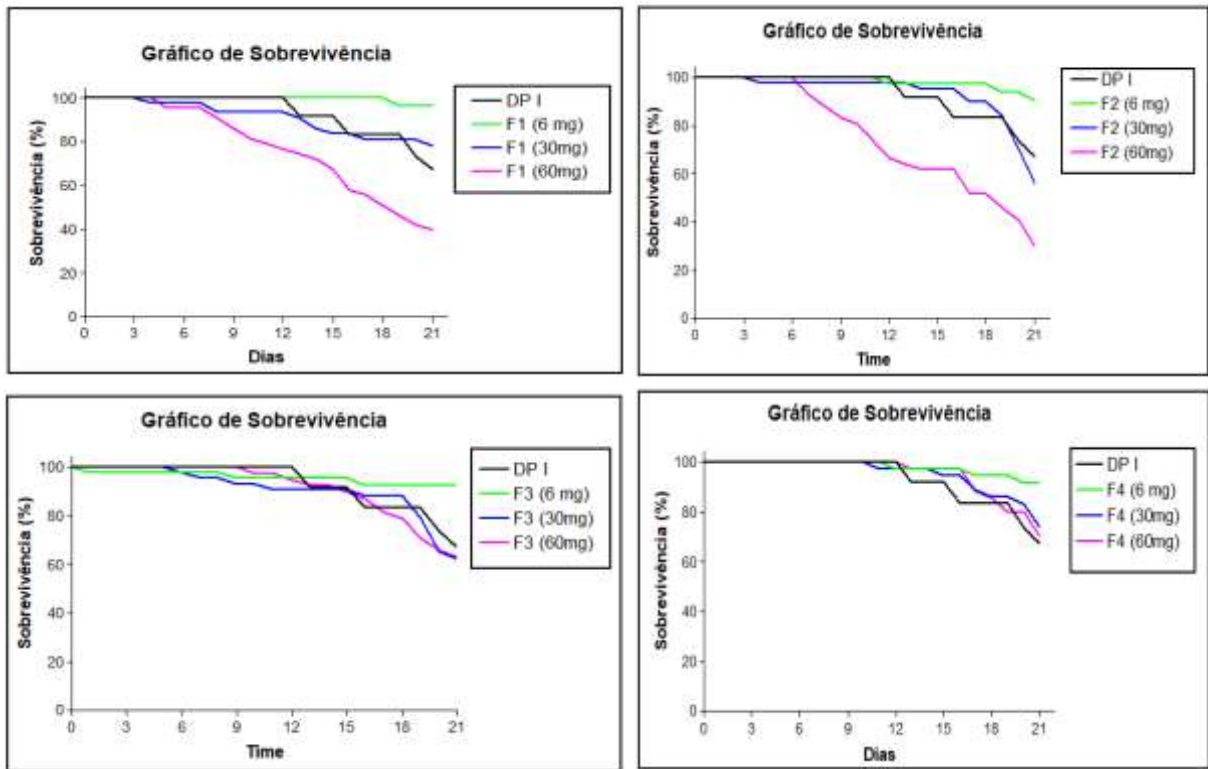


FIGURA 4.2 – Curvas de sobrevivências de operárias de *Atta sexdens* submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e aos tratamentos: F1, F2, F3 e F4 oferecidos em dieta artificial sólida.

As Tabelas 4.5 a 4.8 exibem as porcentagens de mortalidade acumulada em dias específicos durante o experimento, para os tratamentos F1, F2, F3 e F4, em comparação com o grupo controle (DP I).

TABELA 4.5 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com F1

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	5	6	9	12	15	18	21	
DP I	0	0	0	0	0	0	0	6	12	22	>21a
F1 6 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	>21b
F1 30 mg	0	0	0	2	2	6	6	14	16	18	>21a
F1 60 mg	0	0	0	6	6	12	20	28	42	52	20b

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

TABELA 4.6 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com F2

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	5	6	9	12	15	18	21	
DP I	0	0	0	0	0	0	0	6	12	22	>21a
F2 6 mg	0	0	0	0	0	0	2	2	2	6	>21b
F2 30 mg	0	0	0	0	0	0	0	2	6	30	>21a
F2 60 mg	0	0	0	0	0	14	28	32	40	56	21b

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

TABELA 4.7 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com F3

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	5	6	9	12	15	18	21	
DP I	0	0	0	0	0	0	0	6	12	22	>21a
F3 6 mg	2	0	0	0	0	4	4	4	6	6	>21b
F3 30 mg	0	0	0	0	2	4	6	6	8	26	>21a
F3 60 mg	0	0	0	0	0	0	4	8	16	28	>21a

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

TABELA 4.8 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com F4

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	5	6	9	12	15	18	21	
DP I	0	0	0	0	0	0	0	6	12	22	>21a
F4 6 mg	0	0	0	0	0	0	2	2	4	6	>21b
F4 30 mg	0	0	0	0	0	0	2	4	10	18	>21a
F4 60 mg	0	0	0	0	0	0	0	2	10	20	>21a

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

4.2.1.3 – Compostos isolados e sintetizados com cobre

Com base nas análises estatísticas apresentadas na Figuras 4.3 e 4.4 e nas Tabelas 4.9 e 4.10, pode-se inferir que, entre os tratamentos com os compostos isolados do extrato PLF, apenas os tratamentos vismiaguinenona 4 e hidroxiferruginin A não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento 4 foi o único a não alcançar a mortalidade média (50%) durante o período experimental de 17 dias.

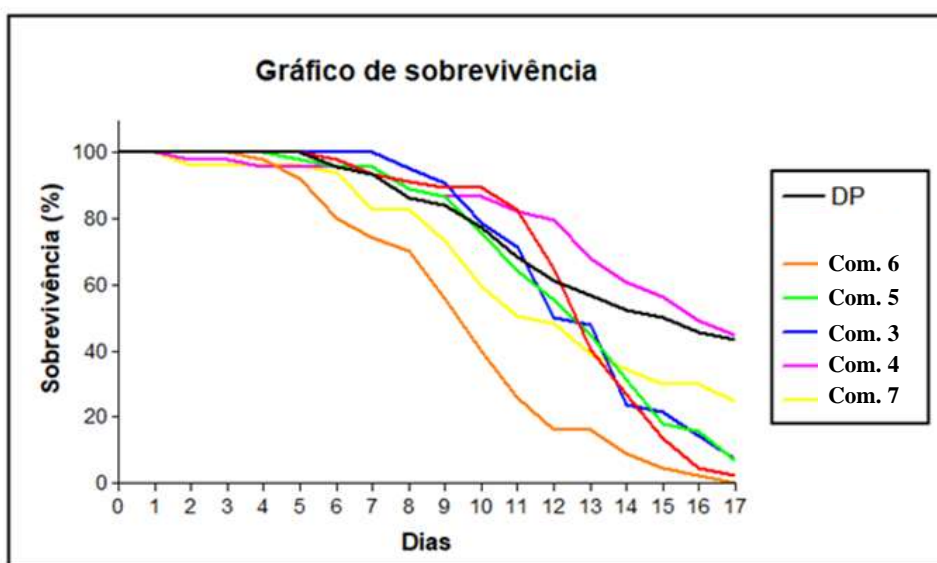


FIGURA 4.3 – Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e aos tratamentos PLF oferecidos em dieta artificial sólida.

TABELA 4.9 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com PLF

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia											Md*
	1	2	6	9	10	12	13	14	15	16	17	
DP	0	0	4	14	20	34	38	42	44	48	50	17a
Composto 6	0	0	20	44	60	84	44	90	94	96	98	10b
Composto 5	0	0	4	12	22	40	50	62	74	76	84	13b
Composto 3	0	0	0	8	18	42	44	64	66	72	78	14b
Composto 4	0	2	4	12	12	18	28	34	38	44	48	>17a
Composto 7	0	4	6	24	36	46	54	58	62	62	66	13a

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

Quanto ao complexo com cobre, apresentou diferença significativa em comparação com o grupo DP, indicando que a complexação com cobre aumentou a atividade contra *Atta sexdens*. Esta constatação é reforçada ao comparar o complexo 1:2 com o composto 7, que atua como ligante, evidenciando um aumento de atividade na presença do complexo de cobre.

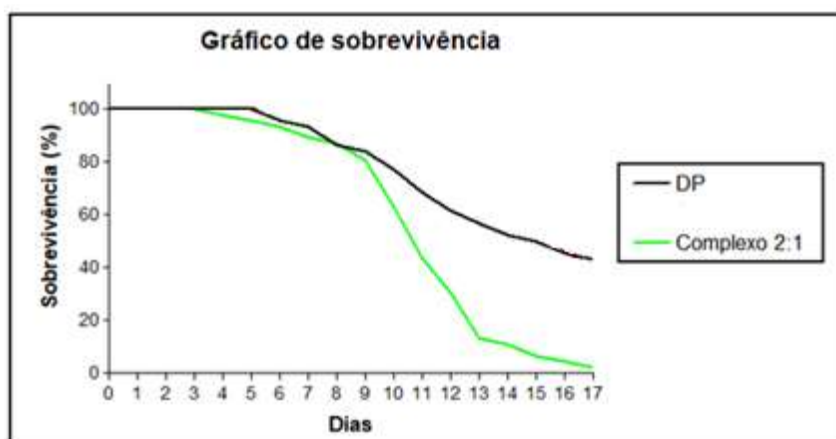


FIGURA 4.4 – Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas à Dieta Pura (grupo controle) e ao complexo 1:2 oferecidos em dieta artificial sólida.

TABELA 4.10 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao complexo 1:2

TRATAMENTO	% Acumulada de mortalidade por dia											Md*
	1	2	6	9	10	12	13	14	15	16	17	
DP	0	0	4	14	20	34	38	42	44	48	50	17a
Complexo 1:2	0	0	6	18	34	64	80	82	86	88	92	11b

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

4.2.2 – Ensaio biológico com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* das frações e extrato da *Vismia guianensis*

Os ensaios de inibição do crescimento micelial com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* foram conduzidos ao longo de um período de 30 dias, com medições realizadas nos dias 7, 14, 21 e 30, conforme apresentado nos gráficos da Figura 4.5, assim como em tabelas no **APENDICE B** (Tabelas A.1 a A.10) das frações do fracionamento cromatográfico, F-1 a F-4 e o extrato etanólico bruto de *Vismia guianensis*, PLF. Os resultados indicam variações na porcentagem de inibição ao longo do tempo para diferentes amostras.

Ao analisar os gráficos, notou-se que a amostra F3 exerceu uma inibição de 9% sobre o fungo *L. gongylophorus* após 7 dias de incubação, aumentando para 19% em 14 dias. Paralelamente, a amostra F4 apresentou 8% de inibição em 7 dias, atingindo 29% em 14 dias. Em comparação, o extrato PLF demonstrou 8% de inibição em 7 dias, alcançando uma porcentagem de 46% em 14 dias, mantendo-se como a amostra com a maior inibição ao longo do experimento.

Esses resultados sugerem que as amostras F3 e F4 não exibem uma atividade eficiente contra o fungo quando comparadas ao extrato PLF. Todos os cálculos foram realizados em relação ao controle do solvente DMSO.

Por outro lado, a amostra F1 apresentou uma inibição de 20% sobre o fungo *L. gongylophorus* após 7 dias de incubação a 21°C, alcançando 35% em 14 dias. Em contraste, a amostra F2 exibiu uma menor inibição inicial de 8% em 7 dias, mas superou a F1 com uma inibição mais elevada de 38% em 14 dias. Desta forma, a amostra F2 revelou uma inibição mais pronunciada do fungo em comparação com a F1 ao longo do período de 14 dias de incubação. Esses dados ressaltam a importância da análise temporal na avaliação da eficácia das amostras contra o crescimento micelial do fungo simbiote.

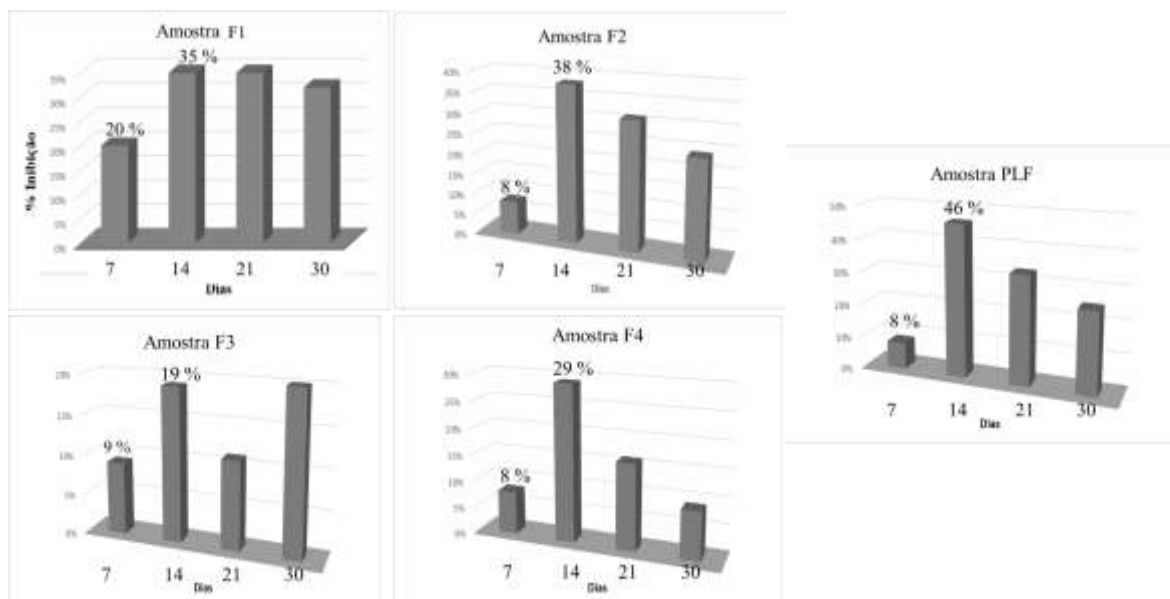


FIGURA 4.5 – Gráfico da porcentagem de inibição do fungo *L. gongylophorus* na presença da amostra F1, F2, F3 e F4 em 7, 14, 21 e 30 dias de crescimento micelial.

4.3 – PERFIL QUÍMICO OBTIDO POR HPLC–DAD

O perfil cromatográfico obtido é uma indicação preliminar das interferências presentes na amostra. Esta informação é importante na tomada de decisão em relação ao fracionamento, evitando possíveis problemas na detecção e concentração dos analitos de interesse na amostra original.

4.3.1 – Perfil químico do extrato etanólico das folhas da *Vismia guianensis*

O cromatograma obtido do extrato PLF, apresentado na Figura 4.6, forneceu uma avaliação preliminar das interferências específicas presente da constituição da amostra, com o objetivo principal de desenvolver um método de enriquecer e purificar esta amostra para prepará-la para análises subsequentes.

Diante deste cromatograma, propôs-se o fracionamento do extrato de acordo com a concentração dos solventes observadas no perfil cromatográfico, proporcionando assim uma separação mais eficaz para a obtenção de frações com maior potencial para o isolamento de substâncias puras.

4.3.2– Perfil das frações da *Vismia guianensis* POR HPLC–DAD

A busca por otimização nos processos analíticos a partir da análise do perfil cromatográfico do extrato contribui para um fracionamento mais eficiente. O objetivo principal foi enriquecer a fração F2, levando a uma sequência de fracionamentos do extrato, começando com 1 g em cada processo e progredindo gradualmente até o uso de 15 g de extrato. Os rendimentos precisos de cada fração foram registrados na Tabela 4.11, proporcionando uma visão abrangente do progresso ao longo do processo.

TABELA 4.11– Rendimentos das frações do extrato etanólico de *Vismia guianensis*

Frações	Rendimentos (%)	Massa (g)
F1	56.4	8,460
F2	14.2	2,130
F3	7.1	1,065
F4	5.4	0,810
Total	83.1	12,465

*Partindo de 15g de extrato

A fim de avaliar a eficácia do fracionamento, todas as frações resultantes do extrato foram direcionadas para a análise por HPLC–DAD. O cromatograma gerado revelou não apenas a recuperação bem-sucedida de cada fração enriquecida, mas também demonstrou a simplificação de cada amostra para proceder com o isolamento, conforme ilustrado na Figura 4.6.

Com isto, a extração em fase sólida (SPE) se mostrou eficiente para fracionar deste extrato, sendo cada vez mais aplicada em investigações metabólicas, destacando–se como uma ferramenta eficaz para extrair a amostra de interesse e remover substâncias interferentes, como a clorofila, abundante em extratos de folhas e conhecida por causar supressão de íons (SOUZA, 2023; ZWIR–FERENC E M. BIZIUK, 2006).

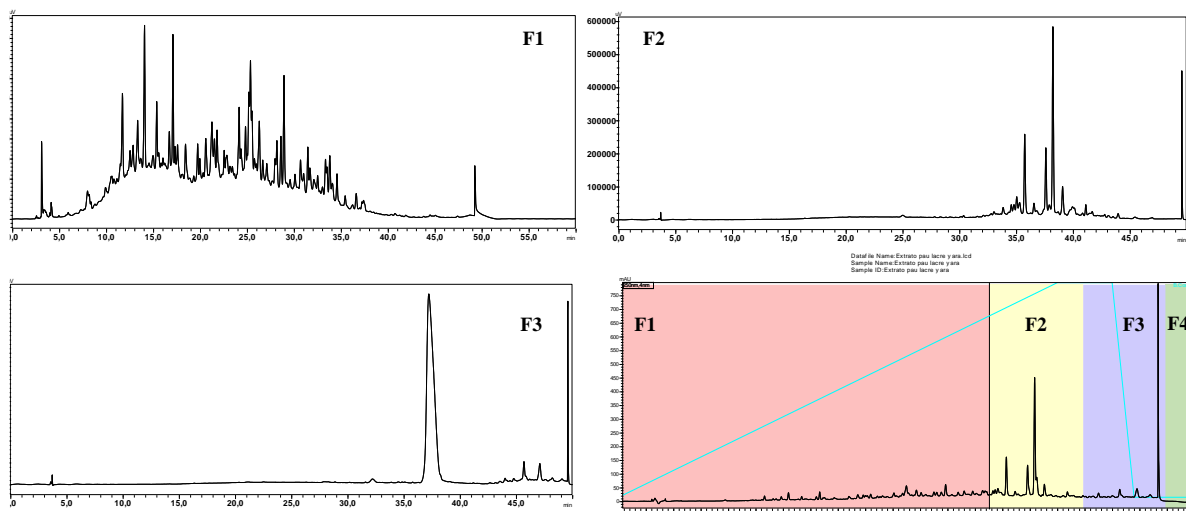


FIGURA 4.6 – Perfil cromatográfico de PLF e as frações F1 a F4, em gradiente exploratório em λ 254 nm, H₂O:ACN – 95:5 a 100% ACN.

Neste estudo, foi observado de maneira notável, que a implementação da SPE além de ser eficiente no rendimento total obtido, também enriqueceu significativamente as frações com os compostos de interesse. Estes aprimoramentos reforçam a eficiência e a relevância da SPE como parte integrante do processo analítico.

4.3.3 – Cromatograma de isolamento da fração F2 por HPLC–DAD

Com base nos resultados obtidos na seção 4.2.2, a fração F2 foi identificada como a mais promissora para o processo de isolamento de compostos. Visando a obtenção desses compostos de interesse, foram exploradas diversas metodologias utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC–PDA) no modo preparativo.

Durante a execução do método escolhido para proceder com o isolamento, as bandas de interesse foram coletadas durante o processo de eluição, empregando o modo isocrático de acordo com a seção 3.2.7 e o cromatograma correspondente ao procedimento de isolamento é visualizado na Figura 4.7. Este procedimento permitiu a separação eficaz das substâncias e também possibilitou a coleta precisa destes compostos.

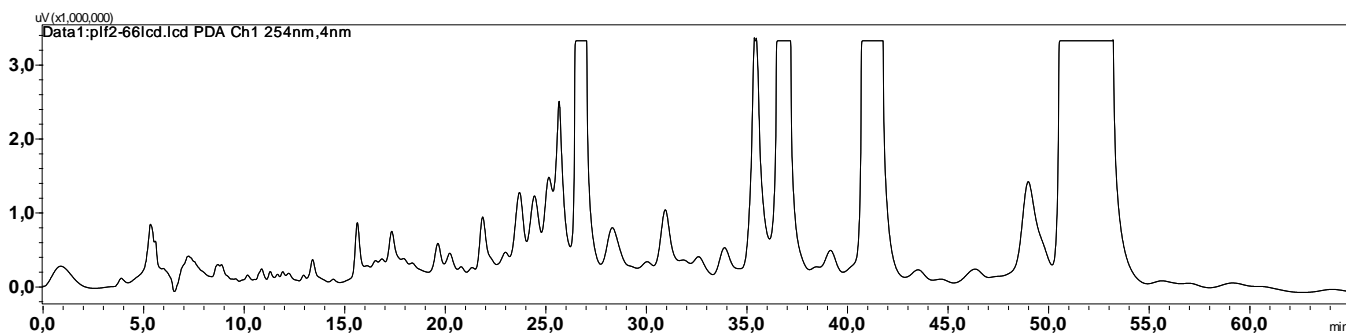


FIGURA 4.7 – Perfil cromatográfico da F2, modo isocrático em λ 254 nm, H₂O:ACN – 74% ACN.

É relevante destacar que as condições experimentais utilizadas, como a seleção adequada da fase estacionária e a otimização dos parâmetros de eluição, resultou na eficácia do método. Como também, o modo isocrático de eluição demonstrou ser vantajoso para o isolamento, devido a esta abordagem manter uma composição constante da fase móvel ao longo do processo, contribuindo para a estabilidade do sistema, resultando em uma eluição mais controlada das substâncias alvo.

Desta forma, a aplicação do HPLC–PDA no modo preparativo, aliada à escolha estratégica do modo isocrático e a otimização das condições experimentais, resultou em uma abordagem eficaz para o isolamento de compostos do extrato da *Vismia guianensis*.

4.4 – METABOLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS

Os compostos isolados a partir da F2 pertencem a duas classes, sendo elas a de antranóides e benzofenonas prenizadas, que são comuns no gênero *Vismia*, conforme ilustrado na Figura 4.8.

As benzofenonas são derivadas de anéis de benzeno mono substituídos. Todas apresentam características em comum e os substituintes variam entre: prenias epoxidadas, prenias acíclicas, grupos metoxil, e hidroxilas em diversas posições.

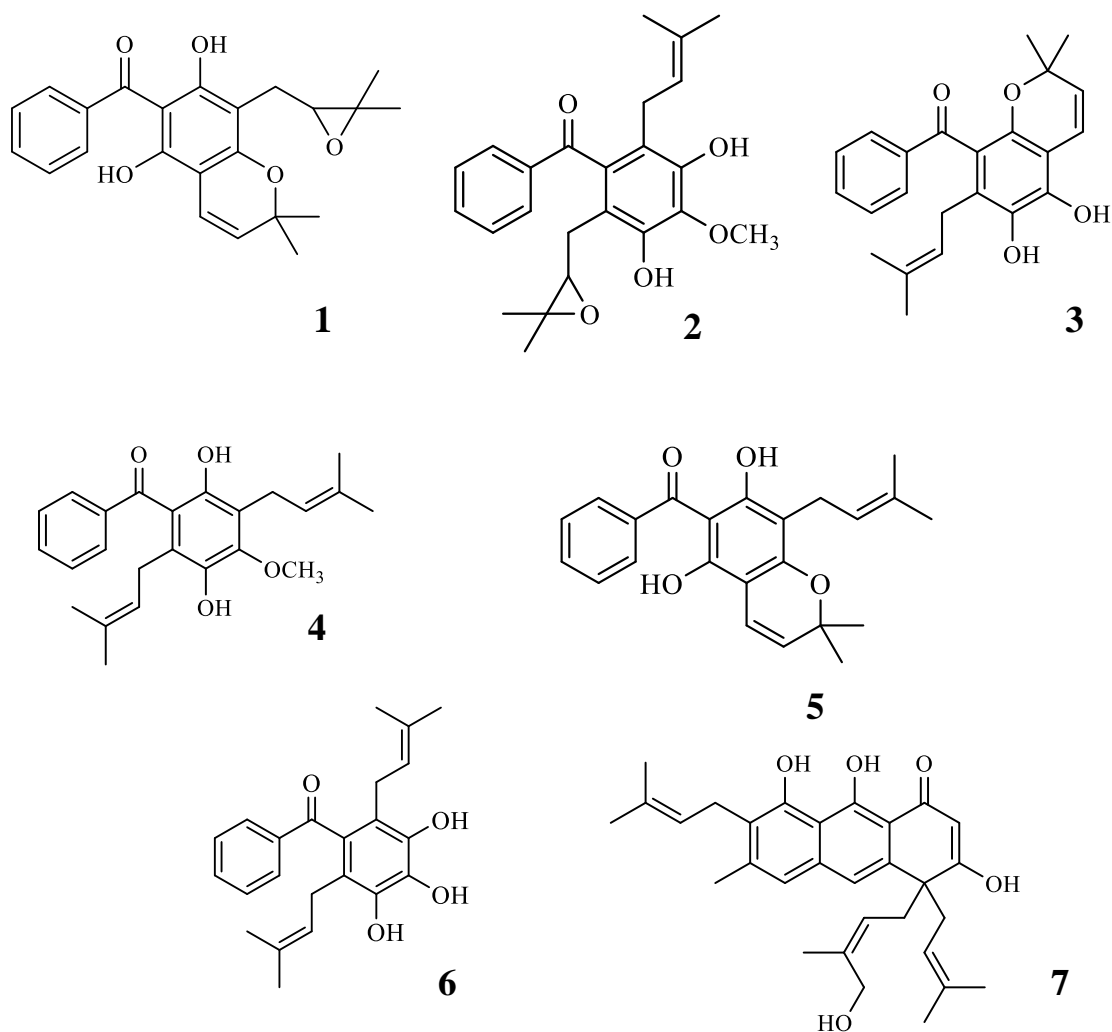


FIGURA 4.8 – Estruturas isoladas e identificadas no extrato etanólico das folhas de *Vismia guianensis*.

As análises foram feitas por EM e RMN ^1H e ^{13}C , juntamente com os bidimensionais, permitindo a identificação das estruturas e a atribuição das posições dos substituintes nos diferentes compostos.

Este estudo englobou a análise e caracterização dos espectros apresentados no **APÊNDICE C, ESPECTROS DE RMN**, Figuras A.1–A.40, após as referências da dissertação para cada composto identificado (1-7). As respectivas atribuições dos deslocamentos químicos, multiplicidades, integrações e observações pertinentes foram registradas nas Tabelas 4.12 a 4.18. Este procedimento visou proporcionar uma compreensão abrangente das propriedades

espectrais observadas, permitindo a interpretação e análise completa dos dados obtidos.

Estes resultados foram comparados com estudos anteriores de estruturas semelhantes. As benzofenonas foram nomeadas como vismiaguienonas 1 a 6, variando nas substituições nos anéis de benzeno. E o antranoide isolado, comum no gênero, foi previamente nomeado por Monache et al. (1980), como hidroxiferruginin A.

4.4.1 – Vismiaguienona 1

O espectro de RMN de ^1H (Figura A.1) do composto apresenta um sinal em δ_{H} 12.50 atribuído ao hidrogênio fenólico quelado com um grupo carbonílico que aparece em δ_{C} 200.0 (Figura A.2). Este grupo carbonila (C-7) apresenta ligação de hidrogênio a um grupo fenólico em C-2 (Figura 4.9). Sinais em δ_{H} 7,44/ δ_{C} 130,7; 7,37/127,6; 7,40/127,9 e δ_{C} 143,0 indicaram um anel de benzeno mono-substituído de acordo com as suas correlações vistas nos espectros bidimensionais de HSQC (Figura A.4), que se liga ao carbono carbonílico em C-7 de acordo com deslocamento químico apresentado. Estas características indicaram um esqueleto de benzofenona e estão apresentados na Tabela 4.12 (BOTTA et al., 1986 , FULLER et al., 1999, SEO et al, 2000).

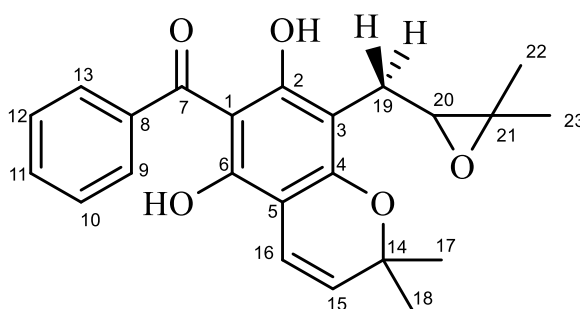


FIGURA 4.9 – Vismiaguienona 1.

TABELA 4.12 – Dados de RMN para a Vismiaguienona 1

Nº	¹ H (J/Hz) δ	¹ H (Lit.) δ*	¹³ C δ	¹³ C (Lit.) δ*	HMBC
1	–	–	105.0	104.0	
2	12.50 OH	–	159.0	158.3	–
3	–	–	98.3	–	–
4	–	–	158.9	156.7	–
5	–	–	102.0	107.4	–
6	–	–	154.9	150.0	–
7	–	–	200,0	198.3	–
8	–	–	143.1	143.0	–
9 e 13	7.40 m	7.40 m	127.9	127.3	C–8, C–12
10 e 12	7.37 (t, J = 7.4 Hz)	7.37 m	127.6	127.5	–
11	7.44 m	7.46 m	130.7	130.1	–
14	–	–	78.3	78.1	–
15	6.69 (d, J = 10.0 Hz)	6.56 (1H, d, J=10)	115.9	117.5	C–14
16	5.47 (d, J = 10.0 Hz)	5.52 (1H, d, J=10)	125.9	126.7	C–5, C–14
17 e 18	1.43 s	1.49 (6H, s)	28.3	28.2	C–14, C–16
19	2.54 (dd, J = 16.9, 5.8 Hz) 2.78 (dd, J = 16.9, 6.0 Hz)	2.60 (1H, dd, J=17.0, 5.3) 2.92 (1H, dd, J= 17.0, 7.0)	25.8	22.2	C–3, C–20, C–21
20	3.60 (t, J = 5.2 Hz)	3.60 (1H, dd, J=5.3)	69.2	69.6	–
21	–	–	77.9	78.5	–
22	0.82 s	–	21.0	20.5	C–23, C–20, C–21
23	0.93 s	–	25.0	25.3	C–21, C–20, C–22
OH-2 ou 6	12.50 s	-	-	-	-

Dados de RMN realizados no solvente CDCl₃ *(Fuller et al, 1999) (Seo et al, 2000)

O segundo anel benzênico se apresenta totalmente substituído por duas hidroxilas, uma prenila epoxidada e um grupo prenil ciclizado que forma o anel cromeno da molécula. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C do composto exibiram sinais característicos para um grupo prenil ciclizado com hidrogênios olefinícos em δ_H 6,69/δ_C 115,9 e δ_H 5,43/δ_C 121,9 (Figura 4.10) sinais de hidrogênios metilênicos em δ_H 1,43/δ_C 28,3 ligados a um carbono alcóxi em δ_C 78,3. Esta correlações podem ser vistas por HMBC, e com isto, o anel foi posicionado nos carbonos C–4 e C–5, devido ao próton H–15 pertencente a este anel mostrar uma conectividade com C–5 no espectro de HMBC (BOTTA et al., 1986, FULLER et al., 1999, SEO et al, 2000).

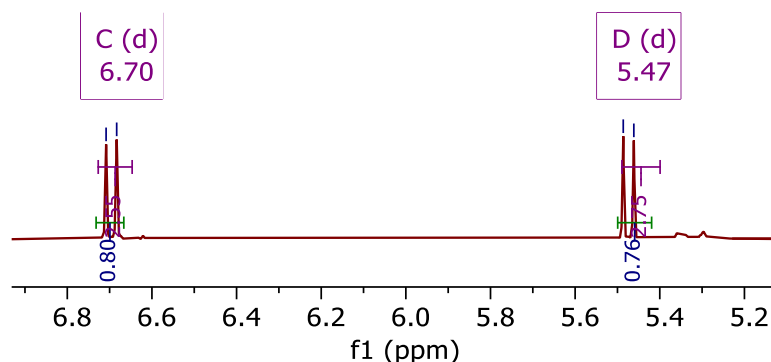


FIGURA 4.10 - Ampliação da região dos hidrogênios olefinícos. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3).

O grupo prenil epoxidado apresenta sinais característico de hidrogênio alílico em δ_{H} 2,55 e 2,78/ δ_{C} 25,8 (C-19), também apresenta sinais em δ_{H} 3,60/ δ_{C} 69,2 e em δ_{C} 77,9 confirmando a presença da epoxidação. Duas metilas em δ_{H} 0,82/ δ_{C} 21,0 e δ_{H} 0,93/ δ_{C} 25,0 estão ligadas ao C-21 de acordo com as correlações de HMBC.

Os hidrogênios em C-19, são chamados de diastereotópicos, por estarem ligados ao mesmo carbono, mas em ambientes químicos diferentes. Isto se deve a presença de um centro estereogênico, apresentando assim dois dupletos de dupletos, que correspondem ao acoplamento do hidrogênio com o hidrogênio do carbono equivalente e o hidrogênio do carbono vizinho (SIMPSON, 2008).

No espectro de COSY (Figura A.6, Figura 4.11) também é possível ver a proximidade entre o H-20 e H-19, e no espectro de HMBC é vista a correlação entre o C-19 e C-3, sendo assim, este grupo foi posicionado no C-3. Os grupos hidroxila foram posicionadas no C-2 e C-6 de acordo com seus deslocamentos químicos e por comparação dos dados da literatura. Com isto, este composto foi identificado como Vismiaguienona1.

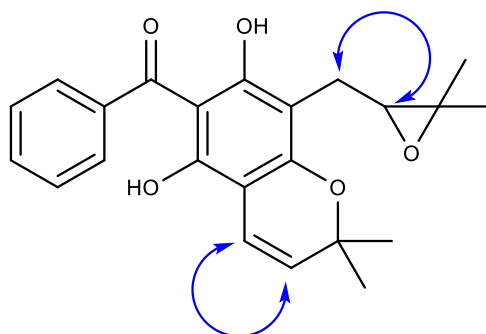


FIGURA 4.11 – Correlações COSY.

A análise por espectrometria de massas revelou a presença do íon 381,1697 $[M+H]^+$, com uma fórmula calculada de $C_{23}H_{24}O_5$. Essa observação possibilitou a determinação do erro associado a este íon, que foi de 0 ppm. O espectro de massas correspondente encontra-se anexado (**APÊNDICE D**). Posteriormente, a amostra foi submetida à análise de MS^2 , na qual foi identificado o íon-fragmento mais intenso com m/z 309,1117 ($-C_4H_8O$). Esta fragmentação corresponde à perda parcial de uma prenila e esse fragmento é visto nos outros compostos, conforme evidenciado na proposta de fragmentação ilustrada na Figura 4.13.

4.4.2 – Vismiaguienona 2

É possível observar no espectro de RMN de 1H e ^{13}C (Figuras A.7 e 8) do composto que são sinais similares a substância anterior, como os sinais em δ_H 7,81/ δ_C 129,2; 7,41/128,1; 7,54/132,7 e δ_C 138,8 e indicam a presença de um anel de benzeno mono-substituído. Estas correlações podem ser vistas nos espectros bidimensionais de HSQC (Figura A.11). A molécula também apresenta um grupo carbonílico que aparece em δ_C 195,4 (C-7) correlacionando com o H-9 (Figura 4.12) no espectro de HMBC, e estes dados estão apresentados na Tabela 4.13.

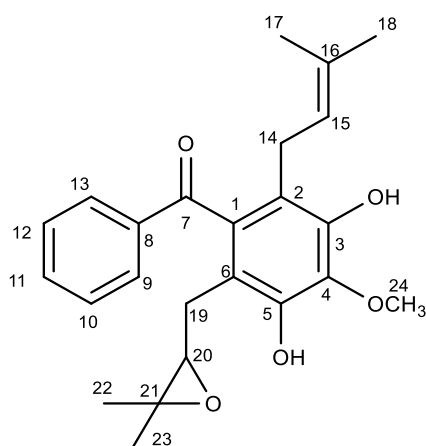


FIGURA 4.12 – Vismiaguienona 2.

TABELA 4.13 – Dados de RMN para a Vismiaguienona 2

Nº	^1H (J/Hz) δ	^{13}C δ	HMBC
1	–	115.5	–
2	–	103.6	–
3	–	152.0	–
4	–	155.2	–
5	–	155.4	–
6	–	111.7	–
7	–	195.4	–
8	–	138.8	–
9 e 13	7.81 m	129.2	C-7, C-11
10 e 12	7.41 m	128.1	C-9, C-13, C-8
	7.54 m		
11		132.7	C-9, C-13
14	3.39 (d, J = 7.1 Hz)	22.7	C-15
15	5.27 (t, J = 1.4 Hz)	121.8	–
16	–	136.4	–
17	1.81 s	25.8	C-18, C-15, C-16
18	1.89 s	18.3	C-17, C-15, C-16
19	2.86a (dd, J = 17.1, 5.1 Hz); 2.67b (dd, J = 17.1, 5.5 Hz)	26.3	–
20	3.74 m	69.1	–
21	–	77.3	–
22	1.10 s	21.6	C-22, C-21, C-20
23	1.09 s	24.4	C-23, C-21, C-20
24	3.65 s	63.1	C-4

Dados de RMN realizados no solvente CDCl_3

A molécula também apresenta sinais de prenila em δ_H 3,39/ δ_C 22,7; δ_H 5,27/ δ_C 121,8; δ_H 1,81/ δ_C 25,8; δ_H 1,89/ δ_C 18,3 e δ_C 136,4, características indicando que este composto é uma benzofenona prenilada que não apresenta hidroxila na posição C-2 pela ausência de sinal de hidrogênio quelado (BOTTA et al., 1986, FULLER et al., 1999, SEO et al., 2000).

O segundo anel de benzeno foi totalmente substituído por duas hidroxilas, uma prenila epoxidada, uma prenila acíclica e um grupo metoxil. O grupo prenil epoxidado apresenta sinais característico já discutidos para o composto 1. Nos espectros de RMN 1H e ^{13}C é possível observar os sinais do grupo metoxil δ_H 3,65/ δ_C 63,1, ligado ao C-4 devido a correlação com o H-24 (Tabela 4.13).

No espectro de COSY (Figura A.12) também é possível observar a proximidade entre o H-15 e H-14; H-17 e H-18 e as correlações de hidrogênio do anel monosubstituído. Os grupos fenólicos foram colocados nas posições C-3 e C-5 com base em seus deslocamentos químicos e informações disponíveis na literatura. Analisando o DEPT 135 (Figura A. 9) são observados dois sinais de CH_2 confirmando a presença das duas prenilas. Com isto, este composto foi identificado como Vismiaguienona 2.

Através da espectrometria de massas, foi identificado o íon 397,2010 $[M+H]^+$, com uma fórmula calculada de $C_{24}H_{28}O_5$. Essa análise permitiu a determinação do erro associado a este íon, o qual foi registrado como 0 ppm. O espectro de massas correspondente está disponível no **Apêndice D**. Posteriormente, a amostra foi submetida à análise de MS^2 , revelando a presença do íon-fragmento mais intenso com m/z 269,0804 ($-C_8H_{16}O$) representado na Figura 4.13.

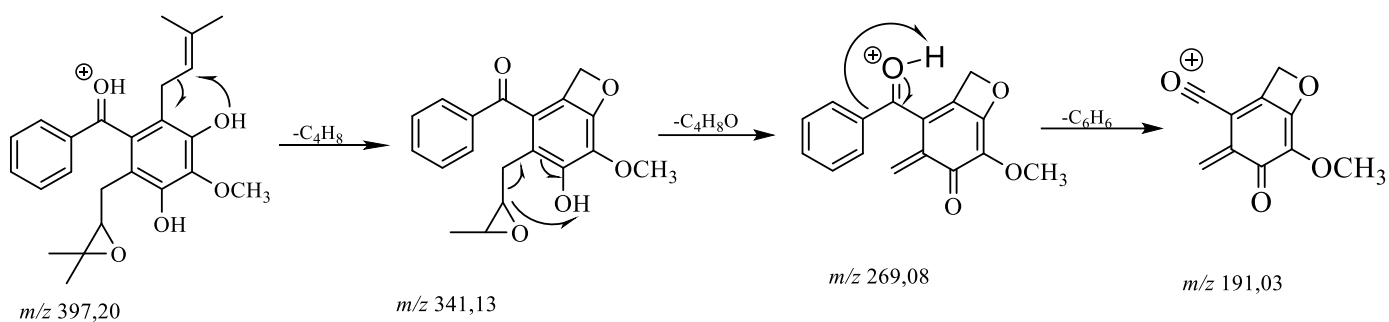


FIGURA 4.13 - Ion fragmento m/z 341,13, m/z 269,08, m/z 191,03

4.4.3 – Vismiaguienona 3

O composto possui características semelhantes às discutidas nos espectros anteriores. Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras A.13 e A.14), observam-se sinais que indicam a presença de um anel de benzeno mono-substituído, com correlações visíveis nos espectros bidimensionais de HSQC. Além disso, há a presença de um grupo carbonílico em δ_{C} 197,7 (C-7), que se correlaciona com H-9 no espectro de HMBC (Espectro A.15). Também são identificados sinais de prenilas. Essas características sugerem que o composto é uma benzofenona prenilada que não possui hidroxila na posição C-2, como indicado pela ausência de sinal de hidrogênio quelado, semelhante ao composto anterior mencionado em estudos anteriores (BOTTA et al., 1986, FULLER et al., 1999, SEO et al., 2000).

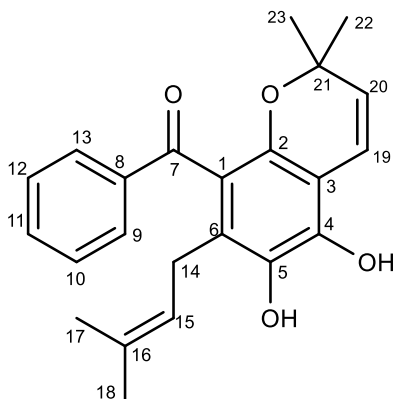


FIGURA 4.14 – Vismiaguienona 3.

O segundo anel de benzeno foi completamente substituído por duas

hidroxilas, um grupo prenil ciclizado (anel cromeno) e uma prenila acíclica. O grupo prenil ciclizado exibe características de sinais já discutidas anteriormente para o composto 1, estando relacionadas às posições C-2 e C-3, o que são observadas pelas correlações no espectro de HMBC com o H-19 (Espectro A.15). No espectro COSY (Figura A.17), também é possível notar a proximidade entre o H-15 e H-14, H-19 e H-20, bem como as correlações de hidrogênio no anel monosubstituído, conforme a Tabela 4.14

As hidroxilas foram identificadas nas posições C-4 e C-5 com base em seus deslocamentos químicos e informações disponíveis na literatura. Uma análise do espectro DEPT 135 (Figura A.18) revela a presença de um CH₂, confirmando a existência da prenila acíclica. Com base nesses dados, foi possível identificar este composto como Vismiaguionona 3 (BOTTA et al., 1986, FULLER et al., 1999, SEO et al., 2000).

TABELA 4.14. Dados de RMN para a Vismiaguionona 3

POSIÇÃO	¹ H (J/Hz) δ	¹³ C δ	HMBC	COSY
1	–	104.3	–	–
2	–	155.2	–	–
3	–	102.6	–	–
4	–	159.0	–	–
5	–	159.5	–	–
6	–	108.5	–	–
7	–	197.7	–	–
8	–	140.1	–	–
9 e 13	7.63 m	128.0	C-11, C-7	H-11
10 e 12	7.51 m	129.3	C-8	–
11	7.57 m	132.3	C-9	H-9
14	3.26 d	21.5	C-6, C-15, C-16, C-5	H-15
15	5,17 m	122.2	C-17, C-18, C-14	H-14
16	–	132.6	–	–
17	1.76 s	26.0	C-18, C-15, C-16	–
18	1.68 s	25.8	C-17, C-15, C-16	–
19	6.61 (d, J = 10.0 Hz)	116.3	C-21, C-2	H-20
20	5.49 (d, J = 10.0 Hz)	126.0	C-21, C-3	H-19
21	–	78.0	–	–
22 e 23	1.45 s	28.5	C-21, C-19	–

Dados de RMN realizados no solvente CDCl₃

Na análise por EM foi observado o íon em 365.1758 [M+H]⁺, com uma fórmula experimental de C₂₃H₂₅O₄ constatando-se que este erro foi de 0 ppm em relação a *m/z* experimental. O espectro de massas correspondente a esta análise está incluído como no anexo (Figura B.5). No espectro de MS² o íon-fragmento mais predominante com *m/z* 309,1132 coincide com o pico base da Vismiaguienona 1 e apresenta um fragmento característico das benzofenonas analisadas em *m/z* 231,0658. A proposta de fragmentação está representada na Figura 4.17.

4.4.4 – Vismiaguienona 4

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (Figuras A.19 e A.20, Tabela 4.15) deste composto apresentam sinais similares aos compostos anteriores, sendo esta uma benzofenona prenilada que apresenta hidroxila na posição C-2 indicada pelo sinal de hidrogênio quelado em δ_H 11.90 atribuído ao hidrogênio hidroxílico fenólico quelado com um grupo carbonílico que aparece em δ_C 199.9 (Figura A.19). (BOTTA et al., 1986, FULLER et al., 1999, SEO et al., 2000).

O segundo anel de benzeno é substituído por duas hidroxilas, duas prenilas e um grupo metoxil. O grupo metoxil foi discutido anteriormente para o composto 2, assim como os sinais das prenilas. Confirmando suas posições de acordo com o espectro de HMBC que apresenta correlações entre H-14 e C-5, H-19 e C-3. Desta forma, este composto teve sua estrutura determinada como Vismiaguienona 4.

TABELA 4.15. Dados de RMN para a Vismiaguienona 4

POSIÇÃO	¹ H (J/Hz) δ	¹³ C δ	HMBC	COSY
1	–	108.3	–	–
2	–	160.3	–	–
3	–	111.0	–	–
4	–	158.3	–	–
5	–	160.7	–	–
6	–	112.9	–	–
7	–	199.9	–	–
8	–	140.7	–	–
9 e 13	7.66 (d, J = 7.6 Hz)	128.9	C–11, C–7	–
10 e 12	7.40 (t, J = 7.6 Hz)	127.7	C–8	–
11	7.50 (t, J = 7.7 Hz)	131.7	C–9	–
			C–5, C–15, C–16, C–	
14	3.30 (d, J = 7.1 Hz)	22.7	4, C–6	H–15
15	5,18 (t, J = 2.4 Hz)	122.5	–	H–14
16	–	134.7	–	–
17	1.76 s	26.0	C–18, C–15, C–16	–
18	1.85 s	18.0	C–17, C–15, C–16	–
19	3.43 (d, J = 7.1 Hz)	22.2	C–20, C–3, C–21, C–2	H–20
20	5.29 (t, J = 3.9 Hz)	121.9	–	H–19
21	–	134.5	–	–
22	1.75 s	25.9	C–23, C–21	–
23	1.74 s	18.0	C–22, C–21	–
24	3.17 s	62.7	–	–
OH-2 ou 6	11.90 s	-	-	-

Dados de RMN realizados no solvente CDCl₃

Por meio da análise de espectrometria de massas, foi identificada a presença do pico em m/z 381,2075 no modo positivo, o que é consistente com a fórmula molecular C₂₄H₂₈O₄, apresentando um erro de 2,58 ppm. Similar a Vismiaguienona 2, o íon-fragmento mais intenso é m/z 269,0804 (-C₈H₁₆O) em o fragmento formado é vista na Figura 4.13. Os espectros correspondentes encontram-se anexados nas Figuras B.7 e B.8.

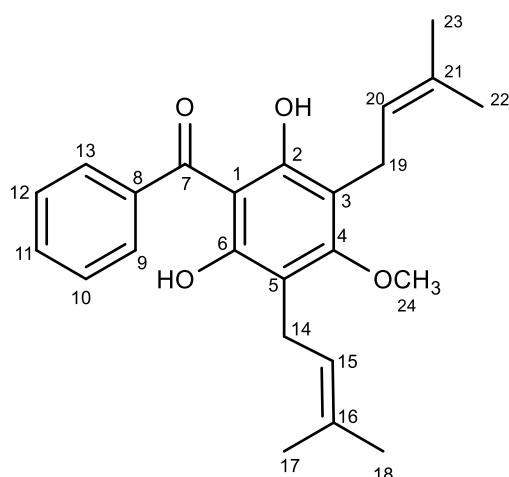


FIGURA 4.15 – Vismiaguienona 4.

4.4.5 – Vismiaguienona 5

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 4.16) se assemelham com os compostos anteriores, sendo esta uma benzofenona prenilada de estrutura similar as discutidas nos tópicos anteriores que apresenta um hidrogênio quelado a carbonila na posição C-2. Com modificações estruturais nas posições dos substituintes.

As posições foram atribuídas de acordo com as correlações verificadas no espectro de HMBC e deslocamentos químicos (Figuras A.25 a A.30). Duas hidroxilas fenólicas foram atribuídas nas posições C-2 e C-6, o grupo prenil ciclizado (anel cromeno) nas posições C-4 e C-5 e a prenila acíclica na posição C-3. Com isto, este composto foi determinado como a vismiaguienona 5.

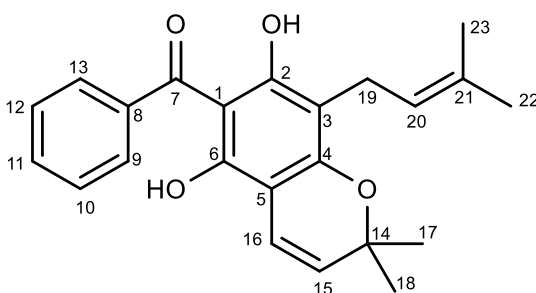


FIGURA 4.16 – Vismiaguienona 5.

TABELA 4.16– Dados de RMN para a Vismiaguienona 5

POSIÇÃO	¹ H (J/Hz) δ	¹³ C δ	HMBC	COSY
1	–	105.4	–	–
2	–	162.1	–	–
3	–	105.2	–	–
4	–	158.0	–	–
5	–	101.9	–	–
6	–	154.7	–	–
7	–	200,7	–	–
8	–	143.0	–	–
9 e 13	7.47 m	127.2	C–7, C–11	–
10 e 12	7.37 (t, J = 7.4 Hz)	127.7	C–8	–
11	7.43 (t, J = 7.7 Hz)	130.0	C–9	–
14	–	77.3	–	–
15	6.47 (d, J = 9.9 Hz)	116.0	C–14	H–16
16	5.20 (d, J = 10.0 Hz)	125.3	C–14, C–5	H–15
17 e 18	1.43 s	27.4	C–14, C–16	–
19	3.43 (d, J = 7.3 Hz)	21.8	C–20, C–21, C–3, C–4, C–2	H–20
20	5.30 (t, J = 3.9 Hz)	121.8	–	H–19
21	–	136.8	–	–
22	0.82 s	18.0	C–23, C–20, C–21	–
23	0.93 s	26.0	C–21, C–20, C–22	–
OH-2 ou 6	12.24 s	-	-	-

Dados de RMN realizados no solvente CDCl₃

De acordo com as observações dos espectros de massas, foi identificada a presença do pico base em m/z 365,1757 [M+H]⁺, correspondente com a fórmula molecular C₂₃H₂₅O₄, com o erro de 2,73 ppm. O íon-fragmento mais intenso é m/z 309,1130 em que a proposta de fragmentação é vista na Figura 4.17. Assim como a proposta de fragmentação para o íon em m/z 231,0658 e m/z 105,0335 (Figura 4.17).

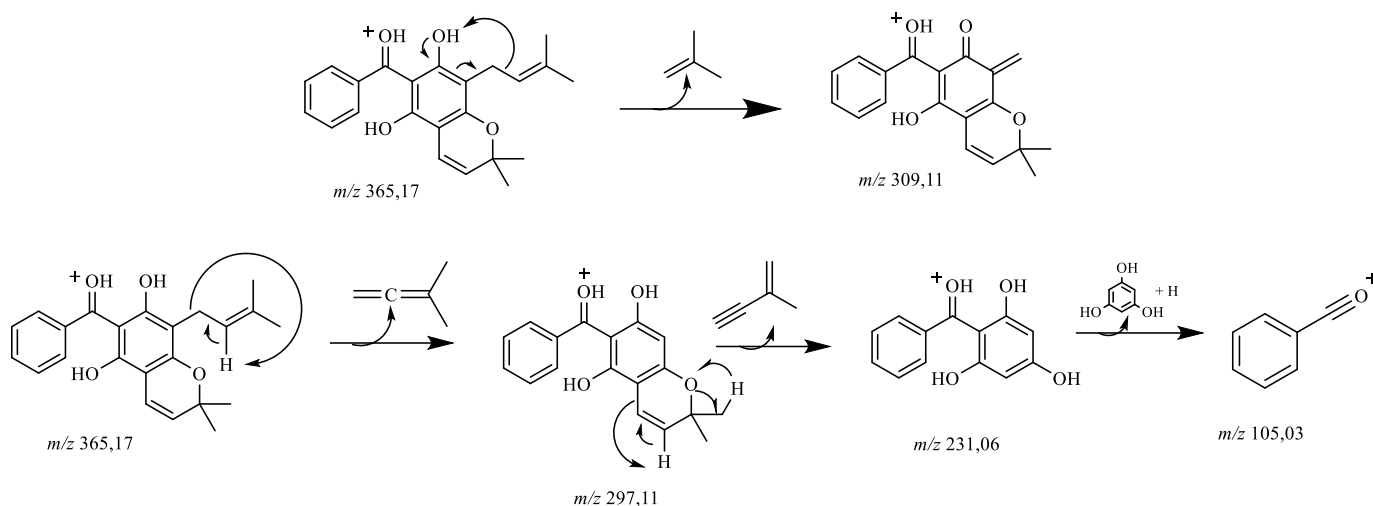


FIGURA 4.17 – Proposta de fragmentação para os íons-fragmentos m/z 309,1130; m/z 231,0658 e m/z 105,0335.

4.4.6 – Vismiaguienona 6

Os espectros de ressonância RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras A.31 e A.32) estão em concordância com os compostos previamente mencionados, caracterizando-se como uma benzofenona prenilada com estrutura similar aquelas discutidas nas seções anteriores.

Entretanto, a molécula apresenta sinais que indicam simetria molecular, observada pelos sinais de hidrogênios metílicos em δ_{H} 1.70 e 1.80 (Figura 4.18), que integram para 6 hidrogênios cada, confirmando a presença de 4 metilas, como também o sinal em δ_{H} 3.34 que compõe a prenila integrando para 4, sendo assim, duas prenilas em um mesmo ambiente químico. Esta simetria é confirmada no espectro de RMN ^{13}C pela intensidade dos sinais apresentados, como o δ_{c} 157.8, que correspondem aos carbonos C-3 e C-5 (Figura 4.12).

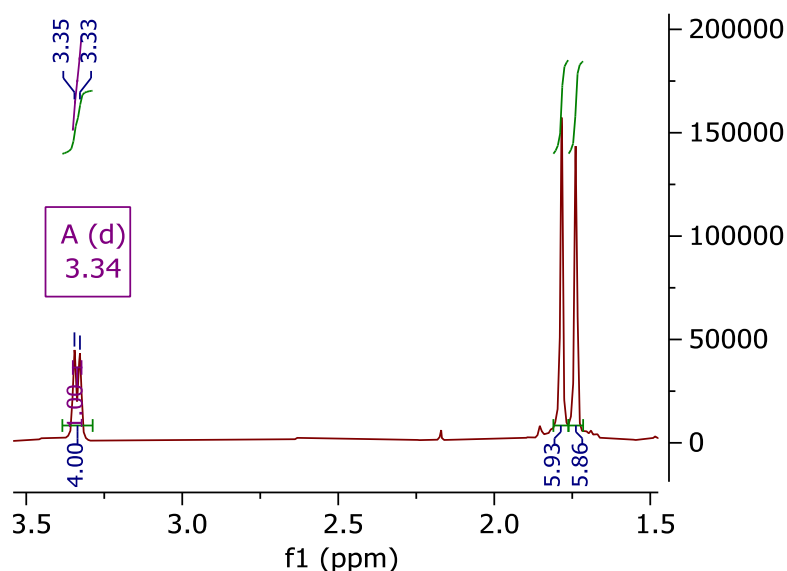


FIGURA 4.18 - Ampliação da região dos hidrogênios das prenilas. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3).

TABELA 4.17 – Dados de RMN para a Vismiaguienona 6

POSIÇÃO	RMN ^1H (J/Hz)	RMN ^{13}C	HMBC	COSY
1	–	104.7	–	–
2 e 6	–	106.4	–	–
3 e 5	–	157.8	–	–
4	–	161.2	–	–
7	–	198.2	–	–
8	–	140.41	–	–
9 e 13	7.64 m	128.1	C-11, C-7	–
10 e 12	7.51 m	129,2	C-8	–
11	7.57 m	132.2	C-9	–
14 e 19	3.34 (d, J = 7.1 Hz)	22.0	C-16, C-3, C-4, C-2	H-18, C-15
15 e 20	5.22 (t, J = 1.4 Hz)	121.9	C-21, C-19, C-17	H-17, C-14
16 e 21	–	135.2	–	–
17 e 23	1.70 s	25.9	C-16, C-18, C-15	H-15
18 e 22	1.80 s	18.0	C-16, C-17, C-15	H-14

Dados de RMN realizados no solvente CDCl_3

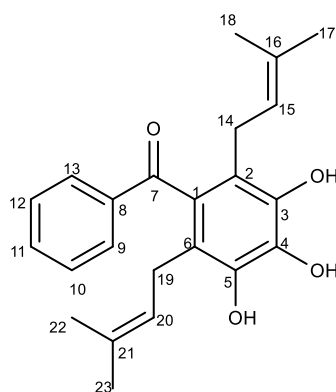


FIGURA 4.19 – Vismiaguienona 6.

Na análise por EM (Figuras B.11 e B.12) é observada a detecção do íon 367,1904 $[M+H]^+$, correspondente à fórmula molecular experimental $C_{23}H_{26}O_4$. A análise desses resultados possibilitou a determinação do erro associado a este íon, revelando-se como 1,9 ppm. Em seguida, à análise de MS^2 resultou na identificação do íon-fragmento mais proeminente com m/z 255,0659 (Figura 4.20). Sendo assim, esta observação contribuiu para a confirmação do composto como foi proposto.

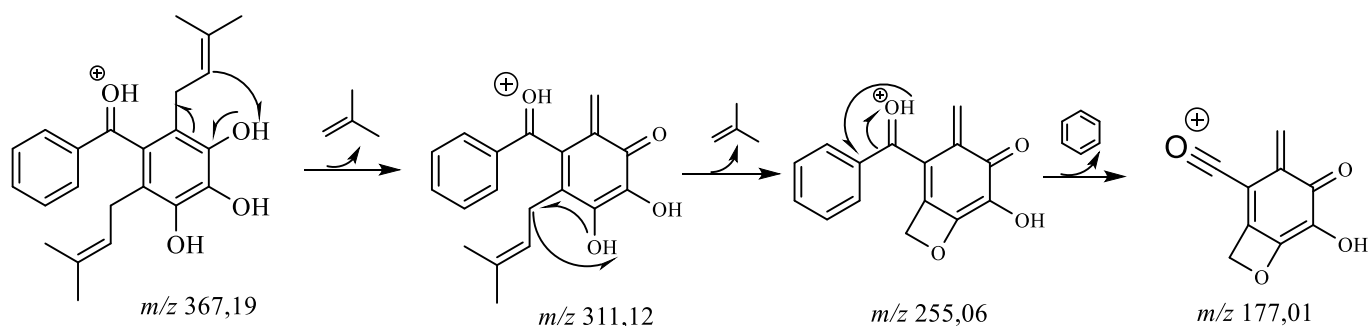


FIGURA 4.20 - Proposta dos íons fragmentos m/z 177,01; m/z 255,06 e m/z 311,12

4.4.7 – Antranoide – Hidroxiferruginin A

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A. 38) exibiu 30 sinais de carbono, que foram atribuídos associando também o espectro de HSQC (Figura A.39) em seis metilas, quatro metilenos, seis carbonos vinílicos hidrogenados e quatorze carbonos quaternários, incluindo um grupo carbonila em δ_C 192,2 (MONACHE et al., 1980; LENTA et al., 2007).

O espectro de RMN de 1H (Figura A. 37) apresentou sinais para um grupo de

hidroxila quelado em δ_H 10,09, dois hidrogênios aromáticos em δ_H 7,04 (1H, s) e 7,13 (1H, s) e hidrogênios metilênicos em δ_H 3,76 (2H, m). O deslocamento químico e o sinal desdobrado são resultantes da presença de uma hidroxila, que induz uma desblindagem devido à eletronegatividade do oxigênio (MONACHE et al., 1980; LENTA et al., 2007).

TABELA 4.18 – Dados de RMN para a Hidroxiferruginin A

POSIÇÃO	RMN ¹ H (J/Hz)	RMN ¹³ C	HMBC	COSY
1	–	192.2	–	–
1a	–	108.7	–	–
2	5.79 s	104.9	C-4, C-1a	–
3	–	181.9	–	–
4	–	50.2	–	–
4a	–	139.7	–	–
5	7.04 s	119.1	C-5a, C-10, C-7, C-8a, C-20	–
5a	–	111.5	–	–
6	–	142.2	–	–
7	–	122.9	–	–
8	–	154.5	–	–
8a	–	136.8	–	–
9	10.09 OH	163.1	–	–
10	7.13 s	115.7	C-1a, C-5a, C-5, C-8a, C-4	–
11	2.62 (td, J = 13.1, 5.7 Hz)	41.5	C-4, C-12	H-16, H-17, H-12
12	4.90 (t, J = 7.1 Hz)	121.5	–	–
13	–	137.2	–	–
14	1.54 s	14.5	C-15, C-12, C-13	–
15	3.76 m	68.9	C-12, C-13	–
16	3.03 (ddd, J = 23.0, 14.2, 8.1 Hz)	40.8	C-4, C-18, C-4a	H-11
17	4.63 (t, J = 7.1 Hz)	118.4	C-19, C-19a, C-16	H-19, H-19a, H-11
18	–	135.4	–	–
19	1.48 s	26.2	C-19a, C-17, C-18	H-17
19a	1.48 s	18.4	C-19, C-17, C-18	H-17
20	2.43 s	21.1	C-5, C-6, C-7	–
21	3.47 (d, J = 7.1 Hz)	25.4	C-7, C-23, C-6, C-8	H-22
22	5.15 (t, J = 6.8 Hz)	122.8	C-24, C-24 ^a	H-21
23	–	132.1	–	–
24	1.70 s	26.2	C-24a, C-22, C-23	–
24a	1.82 s	18.4	C-24, C-22, C-23	–

Dados de RMN realizados no solvente CDCl₃

O grupo metileno citado (CH₂–OH) faz parte de uma prenila presente no composto, no qual também foram identificados sinais características de mais duas prenilas, sendo estes: Hidrogênios metilênicos em δ_H 3,03 e duplete em δ_H 3,47 (2H, J 7,2 Hz), esta desblindagem é devido a proximidade com a dupla ligação; tripletos em δ_H 5,15 (1H, J=7,1 Hz) e δ_H 4,63 (1H, J=7,1 Hz) de hidrogênios vinílicos; e os quatro singletos para o grupo metil olefínicos na região entre δ_H 1,40–1,90 (Tabela 4.11) (MONACHE et al., 1980; LENTA et al., 2007).

Estas afirmações foram confirmadas por sinais de RMN de ¹³C, que indicam três metilenos em δ_c 25,4, δ_c 40,8 e δ_c 41,5, três carbono vinílicos em δ_c 118,4, 121,5 e 122,8, como também os sinais das cinco metilas entre δ_c 18,4–26,3. Além disto, este espectro também apresentou um sinal característico do grupo metila aromático em δ_c 21,1 (MONACHE et al., 1980; LENTA et al., 2007).

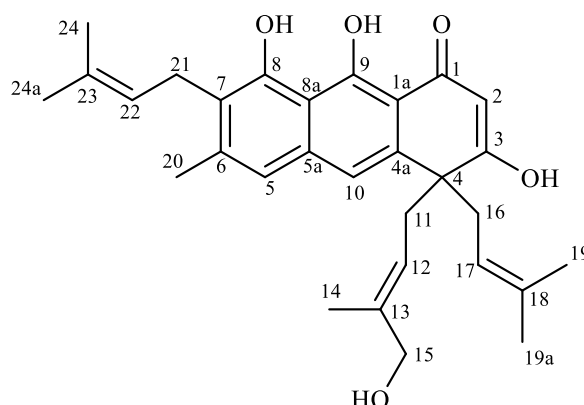


FIGURA 4.21 – Hidroxiferruginin A.

No espectro bidimensional de HMBC (Figura A.39), foram identificadas correlações entre os hidrogênios de metila em δ_H 2,39 e os carbonos C–7 e C–5. Essas correlações indicam a localização desses hidrogênios em C–6, conforme esperado por razões biogênicas (Figura 4.21). Além disto, os hidrogênios metilenos do grupo prenil apresentaram sinais cruzados com o carbono saturado em δ_H 50,2 (C–4), indicando claramente sua ligação ao C–4 (LENTA et al., 2007; MONACHE et al., 1980).

Uma hidroxila livre foi associada ao carbono C–3 (δ_c 181,9) em virtude de ser este um carbono quaternário, evidenciado pelo deslocamento químico característico de carbono vinílico ligado ao oxigênio. Também é possível

observar sinais dos dois hidrogênios aromáticos em δ_H 7,04 (1H, s) e 7,13 (1H, s) correlacionando com: (C-5a, C-10, C-7, C-8a, C-20); (C-1a, C-5a, C-5, C-8a, C-4), respectivamente. Estas observações indicam claramente que estes hidrogênios aromáticos estão em C-5 e C-10 (LENTA et al., 2007; MONACHE et al., 1980).

Os dados obtidos, em conjunto com as análises de massas, foram cruciais para a determinação deste composto. No espectro de MS (Figura B.13), foi observado um íon com uma massa de 477,2647 $[M+H]^+$, correspondente à fórmula molecular experimental $C_{30}H_{37}O_5$. Isso possibilitou o cálculo do erro em relação à massa teórica, revelando um desvio de apenas 2,51 ppm. Além disso, a análise subsequente de MS^2 (Figura B.14) levou à identificação do pico base com m/z 408,1939. Tanto este fragmento quanto outros observados estão representados na Figura 4.22. Portanto, essa observação foi fundamental para a confirmação da identidade desta substância.

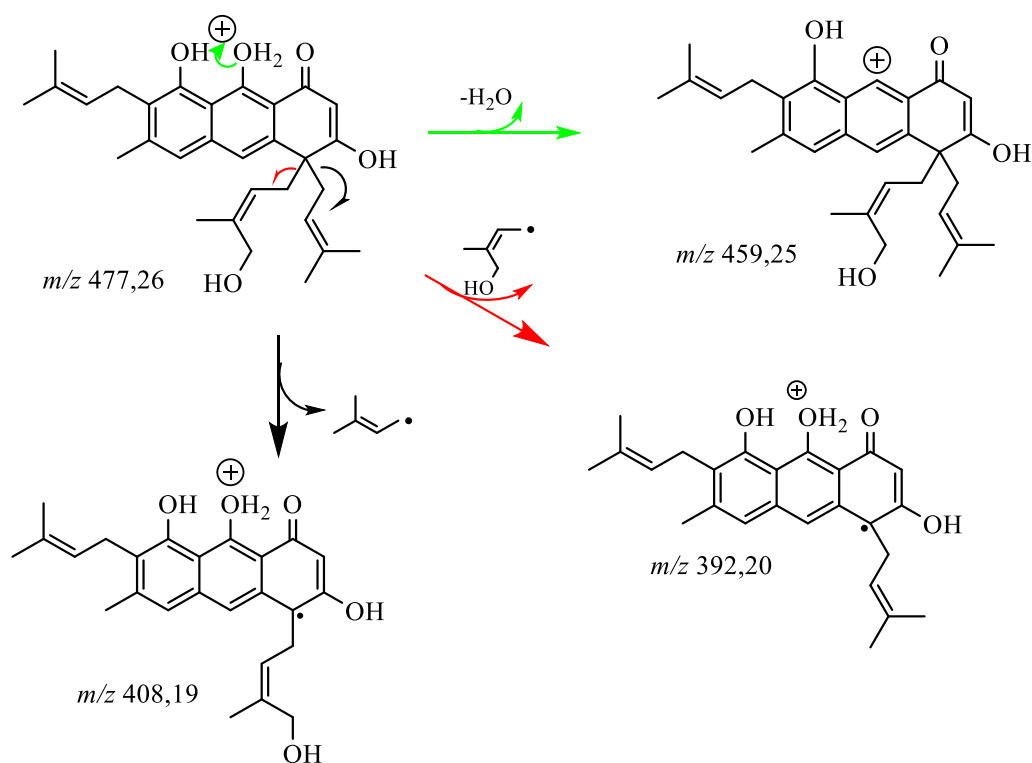


FIGURA 4.22 - Proposta dos íons fragmentos m/z 459,25; m/z 408,19 e m/z 392,20

Sendo assim, a estrutura 7 foi identificada como Hidroxiferruginin A

e os dados observados estão de acordo com a literatura (MONACHE et al., 1980; LENTA et al., 2007).

4.5 COMPLEXO DE ANTRANOIDE

4.5.1 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros vibracionais adquiridos na faixa do infravermelho para o ligante e o complexo (CuF 1:2) estão exemplificados na Figura C.1 (**Apêndice E**). Uma análise comparativa entre os espectros vibracionais dos referidos complexo e seu ligante livre correspondente estão descritas na Tabela 4.19. As observações espectrais do complexo manifestam semelhanças com aqueles observados para o ligante, sugerindo a presença deste último nos compostos. Todavia, algumas bandas espectrais sofreram deslocamentos devido à interação coordenativa com o metal.

TABELA 4.19 – Comparação entre as bandas do espectro do ligante e seu complexo (CuF 1:2)

Atribuição	Ligante (cm⁻¹)	CuF 1:2 (cm⁻¹)
$\nu(\text{O-H})$	3375	3429
$\nu(\text{C-H})$	2918	2920
$\nu(\text{C=C})$	1595	1593
$\nu(\text{C=O})$	1631	1620
$\nu(\text{C-O})$	1230	1226

Na análise comparativa dos espectros de absorção na região do infravermelho do antranóide e do complexo [Metal(antranóide)₂] (Figura 4.23, C.1), foram identificadas as seguintes bandas para o ligante livre: um estiramento em 3375 cm⁻¹ correspondente ao modo vibracional $\nu(\text{O-H})$, enquanto as três bandas situadas entre 2968 cm⁻¹ e 2858 cm⁻¹ foram atribuídas ao dobramento C-H. As atribuições das bandas de estiramento e dobramento foram realizadas conforme descrito por Nakamoto (1973) e Sócrates (1972).

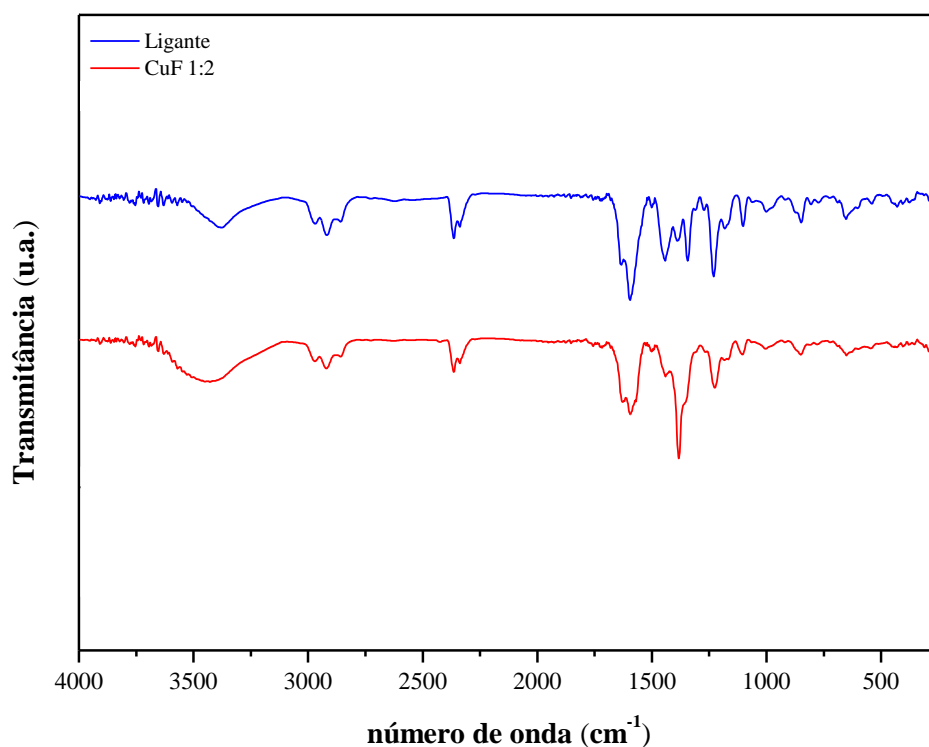


FIGURA 4.23 – Comparação dos espectros de absorção na região do infravermelho.

Adicionalmente, foram observados estiramentos do grupo C=O em 1631cm^{-1} , as absorções em 1595cm^{-1} e 1442cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C=C de sistemas aromáticos, evidenciando a intensidade da banda devido as conjugações presentes.

Os dobramentos das hidroxilas fenólicas são observados em 1390cm^{-1} , e a absorção em 1230cm^{-1} atribuída ao estiramento C–O, complementam as características do ligante livre, juntamente com as bandas de sistemas aromáticos entre 1182cm^{-1} e 848cm^{-1} associadas ao dobramento C–H. Além destas, a absorção em 651cm^{-1} também é observada e está relacionada ao dobramento da ligação O–H.

Uma das notáveis variações observadas nas bandas do antranóide em comparação com o complexo é a alteração na absorção do grupo carbonila, indicado como um potencial ponto de coordenação. Após a formação do complexo CuF 1:2, evidencia-se o deslocamento dessa banda para 1620cm^{-1} .

Este deslocamento é atribuído à coordenação do centro metálico que tende a reduzir o caráter de dupla na ligação C=O, levando a um aumento no estiramento vibracional e, conseqüentemente, uma diminuição no número de onda observado no espectro de infravermelho. Este fenômeno é atribuído ao aumento do caráter de ligação simples da ligação C=O, evidenciando a coordenação do centro metálico ao grupo carbonila.

Em uma investigação da estrutura CuF 1:2, supõe-se que moléculas de H₂O preencham a esfera de coordenação do metal, considerando o cobre empregado na síntese dos complexo, cuja valência é 2+ [cobre(II): [Ar]3d⁹]. A proposta estrutural está sendo apresentada na Figura 4.24, embasadas nas análises de espectroscopia no infravermelho previamente mencionadas e na espectrometria de massas a ser discutida no tópico subseqüente.

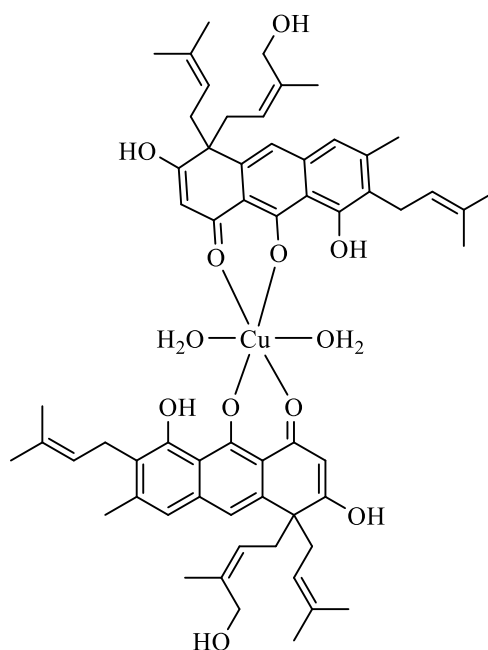


FIGURA 4.24 - Proposta da estrutura formada para o complexo CuF 1:2.

4.5.1 Espectrometria de Massas

No espectro de full scan do complexo CuF 1:2 (Apêndice D), foi identificado o pico de m/z em 1013.4259, correspondente à fórmula química C₆₀H₇₀CuO₁₀⁻, este valor apresentou um erro de apenas 0.3 ppm em relação ao m/z teórico. A partir dessas observações, tornou-se possível formular a estrutura

molecular do referido complexo. Nesse contexto, a proposta de fragmentação, baseada no espectro de MS² (Figura 4.25), encontra-se representada na Figura 4.26, proporcionando uma visualização detalhada do processo dos fragmentos formados.

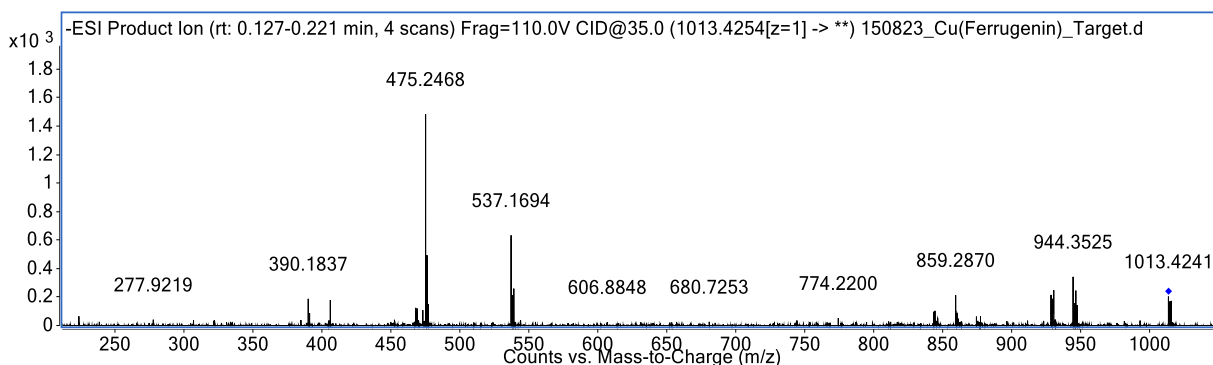


FIGURA 4.25 - Espectro de massas MS² do complexo CuF 1:2.

Durante estas análises no espectrômetro de massas o cobre reduz de Cu²⁺ para Cu¹⁺ devido ao potencial aplicado na fonte do equipamento (LAVANANT ET AL, 1998).

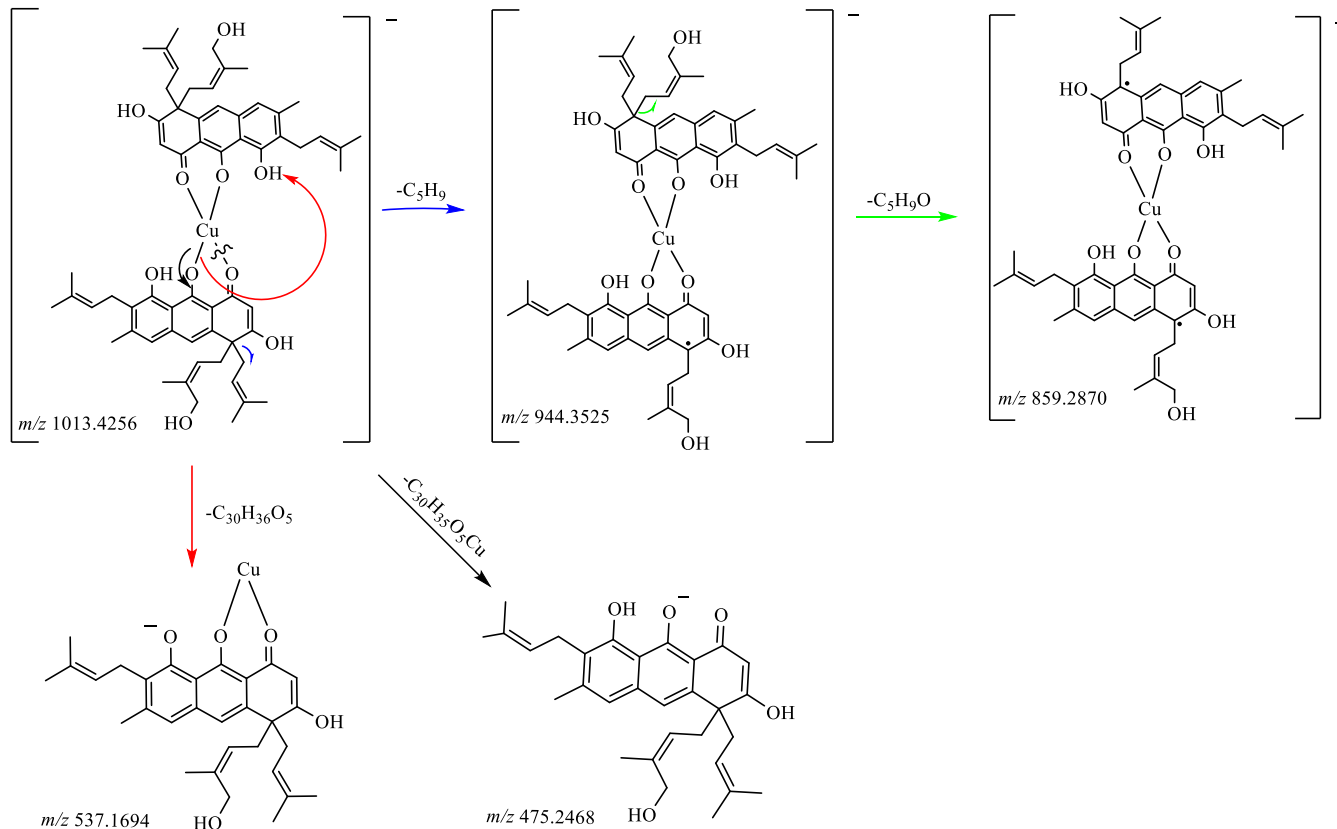


FIGURA 4.26 - Fragmentos formados a partir do complexo CuF 1:2.

5 – CONCLUSÃO

O estudo conduzido utilizando a espécie *Vismia guianensis* resultou na identificação de seis benzofenonas, designadas como vismiaguienonas 1 a 6, juntamente com um antranoide anteriormente caracterizado por Monache et al. (1980) como hidroxiferruginin A. A metodologia de fracionamento empregando Extração em Fase Sólida (SPE) e isolamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) demonstrou ser eficaz na obtenção de frações e compostos bioativos contra a formiga *Atta sexdens rubropilosa*.

Embora o extrato de *Vismia guianensis* não tenha exibido atividade inibitória considerável contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*, demonstrou-se eficaz na mortalidade de formigas, alcançando 100% de mortalidade. Das amostras derivadas desse extrato, a fração F2 exibiu um comportamento semelhante ao extrato em relação ao fungo *L. gongylophorus*, além de apresentar a maior porcentagem acumulada de mortalidade para *Atta sexdens*, justificando sua seleção para isolamento.

Dos compostos testados, apenas a Vismiaguienona 4 e o hidroxiferruginin A não demonstraram atividade significativa contra *Atta sexdens*. No entanto, o complexo CuF 1:2 sintetizado a partir do hidroxiferruginin A com cobre, evidenciou um aumento de atividade. Isso sugere que a complexação pode potencializar a atividade inseticida contra *Atta sexdens*.

Os resultados apresentados nesta pesquisa ressaltam a importância da investigação da composição química de *Vismia guianensis* na busca por compostos potencialmente ativos biologicamente, contribuindo para o controle de pragas agrícolas. Esta abordagem ajuda no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, diminuindo a necessidade de pesticidas tóxicos para o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, R., E.; JIMENEZ G., O.J.; POSADA, C.M.; ROJANO, B.A.; GIL G., J.H.; GARCÍA, C.M.; DURANGO, D.L. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). *Vitae*, v. 15, p.165–172, 2008.
- ALMEIDA, R.; PEÑAFLORES, M.; SIMOTE, S.; BUENO, O.; HEBLING, M.; PAGNOCCA, F.; FERNANDES, J.; VIEIRA, P.; DA SILVA, M. Toxicidade de substâncias isoladas de *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) à formiga cortadeira *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) e ao fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Bioensaio*, v. 2, p. 1-8, 2009.
- AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre as formigas saúvas *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) em formigueiros localizados no Estado de São Paulo.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1972. 95p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1972.
- ANJOS, N.; MOREIRA, D.D.O.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos. In: DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras.** Viçosa, MG: UFV. p. 212–241, 1993.
- BARBOSA, W.L.R.; VASCONCELOS, F.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JUNIOR, J.O.C. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**; v. 2 (12), p. 3224–3229, 2011.
- BARBOSA, M.F.; JEANNE, E.; LANTOVOLOLONA, R.; TALONTSI, F.M.; WABO, H.K.; TANE, P.; LAATSCH, H. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 50, p. 310–312, 2013.
- BETTIOL, W.; CAMPANHOLA, C. **Métodos alternativos de Controle Fitossanitário.** EMBRAPA: São Paulo. p. 157, 2003.
- BITRICH, V.; Trad, R.J.; Cabral, F.; Nascimento–Jr, J.E. Hypericaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil (reflora).** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.
- BOULOGNE, I., PETIT, P., DESFONTAINES, H. O. L. & LORANGER–MERCIRIS, G. Produtos químicos inseticidas e antifúngicos produzidos por plantas: uma revisão. **Environmental Chemistry Letters**, v.10, p. 325–347, 2012.

BOYD, N.D. & MARTIN, M.M. Faecal proteinases of the fungus–growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, p. 1815–1820, 1975.

BRITTO, J.S; FORTI, L.C; OLIVEIRA, M.A; WILCKEN, R.Z; ZANUNCIO, J.C; LOECK, A.E; CALDATO, N; NAGAMOTO, N.S; LEMES, P.G; CAMARGO, R.S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf–cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Engineering and Science** v. 3, p. 11–92, 2016.

BURG, I.C.; MAYER, P.H. **Alternativas Ecológicas para Prevenção de Pragas e Doenças**, 17. ed. Francisco Beltão, PR. ASSESOAR (Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural), p. 153, 2001.

CELESTINO, F.N.; PRATISSOLI, D.; MACHADO, L.C.; SANTOS, H.J.G.; MARDGAN, L.; RIBEIRO, L.V. Adaptação de técnicas de criação da broca–do–café (*Hypothenemus hampei* (Ferrari)). **Coffee Science**, Lavras, v. 11, p. 161–168, 2016.

CELESTINO, C.O.; VARÃO, C.A.R.; VELUDO, H.H.; BRAGA, A.G.S.; LIMA, R.A. Ação inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, 2016.

CHA, J.S.; COOKSEY, D.A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 15, n. 88(20), p. 8915-8919, 1991.

CHERRETT, J.M.; PEREGRINE, D.J. A review of the status of leaf–cutting ants and their control. **Annals of Applied Biology**, v. 84, p. 124–128, 1976.

COTTON, F.A.; WILKINSON, G. **Advanced inorganic chemistry** (5th ed.). WILEY. ISBN 0-471-84997-9, 1988.

CROTTI, A.E; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

CRUZ, A.S. **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***. Tese de mestrado (Pós–Graduação em Química) — Universidade Federal de São Carlos, 2019.

DA SILVA, E. **Identificação de formigas cortadeiras e efeito do desfolhamento simulado em plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis* mull arg.)**. Tese de mestrado (Pós-Graduação em Entomologia)—Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–CE, 2001.

DI STASI, L.C.; HIRUMA–LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. Sao Paulo: Unesp, 2002.

FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da; VIEIRA, P.C.; CORREA, A.G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. Palestra: O futuro dos produtos naturais no controle de formigas. **Suplementos**, v. 69, n. 2, p. 221–224, 2007.

FINCKH, M.R.; TAMM, L.; BRUNS, C. Organic potato disease management. p. 239–258, 2015. In **Plant Diseases and Their Management in Organic Agriculture** Chapter: 5.1. Publisher: APS PressEditors: M.R. Finckh, A. H. C. van Bruggen, and L. Tamm

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB25586>. Acesso em: 21 jan. 2024

FREIRES, S.T. **Utilização de inseticidas naturais na agricultura: uma revisão**. Curso de bacharelado em agronomia — Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, 2022.

FULLER, R.W.; WESTERGAARD, C.K.; COLLINS, J.W.; CARDELLINA, J.H.; BOYD, M.R. Vismiaphenones D–G, New Prenylated Benzophenones from *Vismia cayennensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 67–69, 1998.

KUMAR, S.; KUMAR, S.; DHAR, D.N.; SAXENA, P.N.. Applications of metal complexes of schiff bases-A reveiw. **Journal of Scientific & Industrial Research** v. 68, p. 181–187, 2009.

GAYON, U.; SAUVAGEAU, C. Notice sur la vie et les travaux de A. Millardet. **Mémoires de la Société des Sciences Physiques et Naturelles de Bordeaux**, v. 6, p. 9-47, 1903.

GONÇALVES, C.R. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, RJ. v. 5, p. 173–178, 1982.

HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; MAROTI, P.S.; PAGNOCCA, F.C.; SILVA O.A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf–cutting ants *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 249–252, 2000.

HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A.; SALEEM, M.; GREEN, I.R.; REE, T.VAN; GHULAM, A. Chemistry and biology of genus *Vismia*, **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 11, p. 1448–1462, 2012.

LAMICHHANE, J.R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J.B.; AUBERTOT, J.N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds Applied in agriculture: A review. **Agronomy for Sustainable Development**: n. 38, v. 28, p. 1-18, 2018.

LAVANANT, H.; VIRELIZIER, H.; HOPPILARD, Y. Reduction of copper(II) complexes by electron capture in an electrospray ionization source, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1217–1221, 1998.

LENTA, B.N.; NGOUELA, S.; BOYOM, F.F.; TANTANGMO, F.; TCHOUYA, G.R.F.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; CONNOLLY, J. D. Anti-plasmodial activity of some constituents of the root bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 464–467, 2007.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 167p. 1970.

MARICONI, F. DE A. M. **Introdução sobre o estudo dos insetos**, 1971.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas, insetos daninhos as plantas cultivadas**. Livraria Nobel: São Paulo, p. 123, 1974.

MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

MONACHE, F.D; TORRES, F.; MARINI-BETTOLO, G.B.; DE LIMA, R.A. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: g-hidroxi and g,g-dihidroxi-ferruginina A. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 4, p. 487–494, 1980.

MOTTA, E.A.P. **Atividade anti-Candida de *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy in vitro, in vivo e in silico**. Tese de doutorado (programa de pós graduação em ciências da saúde) —Universidade Federal do Maranhão, 2020.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 6a. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Inc., 2008.

NOBRE, V.F.; ROCHA, M.L.; ALMEIDA, D.M.M., LUCCHESI, A.M.; OLIVEIRA, A.T.S.; BARBOZA, A.C.M. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico das folhas de *Vismia guianensis* Aubl em camundongos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14: p. 69–73; 2015.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Evolutionary aspects of ant fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 12, n° 10, p. 386-389, 1997.

OLIVEIRA, A.H; DE OLIVEIRA, G.G; CARNEVALE, N. F; PORTUONDO, D.F; BATISTA-DUHARTE, A; CARLOS, I.Z. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 266-274, 2017.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; CUTERI, A; SPUNTARELLI, F. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis*. D.C. **Protoplasma**. v. 189, p. 9-16, 1995

POWELL, R.; J STRADLING, D. **Fungiculture and the choice of substrate by Attine ants**, 1992.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: Lowrisk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

REIS, M.A.; FELIPE, M.S. Levantamento de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* em florestas cultivadas de eucaliptos. **Scientia Generalis**, v. 2, n. Supl.1, p. 136-136, 2022.

RODRIGUES, I.C. **Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.)** Choisy com atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2013.

RONCONI, L.; SADLER, P.J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 13, p. 1633-1648, 2007.

SANTOS, C.A.B; SILVA, A.P.M. Extratos vegetais de plantas daninhas contra o pulgão *Aphis craccivora* Koch 1854, no feijão *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 69-75, 2015.

SAPOUNTZIS, P.; NASH, D.R.; SCHIØTT, M.; BOOMSMA, J.J. The evolution of abdominal microbiomes in fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, v. 28, p. 879-899, 2019.

SEO, E.K.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SEO, E.K; HUANG, L.; WALL, M.E; WANI, M.C.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. New biphenyl

compounds with DNA strand–scission activity from *Clusia paralicola*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 11, 1484–1487, 1999.

SIMPSON, J.H.; **Organic Structure Determination using 2–D NMR Spectroscopy**, 1st ed., Elsevier: London, 2008.

SILVA, A., BACCI, M., PAGNOCCA, F., BUENO, O.; HEBLING, M.J.A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf–cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current microbiology**, v. 53, n. 1, p. 68–71, 2006.

SILVA–PINHATI, A.C.O.; BACCI Jr, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M.L.; PAGNOCCA, F.C.; MARTINS, V.G.; BUENO O.C.; HEBLING, M.J.A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf–cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 10, n. 37, p. 1463–1472, 2004.

SOARES, W.; COSTA, J.; VIEIRA JÚNIOR, J.; CIPRIANI, H.; SOUZA, J.; FERNANDES, C. Atividade inseticida de extratos botânicos sobre a Broca–do–café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente – RAMA**, v. 15, n. 1, e8064, 2022.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts**, 3 ed. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2004.

SOUZA, A.L.C. **Estudo metabolômico de espécies de *Picramnia* e reavaliação da classificação morfológica do gênero**. Tese de mestrado (Pós–Graduação em Química) — Universidade Federal de São Carlos, 2023.

SOUZA, M.S.R. **Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis* (Hypericaceae)**. Tese de mestrado (Programa de Pós– Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde) Universidade Federal da Paraíba, 2014.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S.A.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, n. 10, p. 798–800, 2007.

TALA, M.F.; JEANNE E.; LANTOVOLOLONA, R.; TALONTSI, F.M.; WABO, H.K.; TANE, P.; LAATSCH, H. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 310–312, 2013.

VIEIRA, B.A.H.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. Brasília, DF. 2016. E–book (853p.) color. ISBN: 978–85–7035–642–0.

VIZCAYA, M.; MORALES, A.; ROJAS, J.; NUÑEZ, R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y atividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, p, 12–34, 2011.

VOGEL, C.; SHIMIZU, H.; MARTINS, M.; MARINHO, L. **Hypericaceae in Florado Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25586>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

WARD, P.S. Filogenia, classificação e taxonomia em nível de espécie de formigas (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, v. 1, p. 549–563, 2007.

WFO (2024): *Vismia* Vand. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000040349>. Acessado em: 11 de janeiro de 2024.

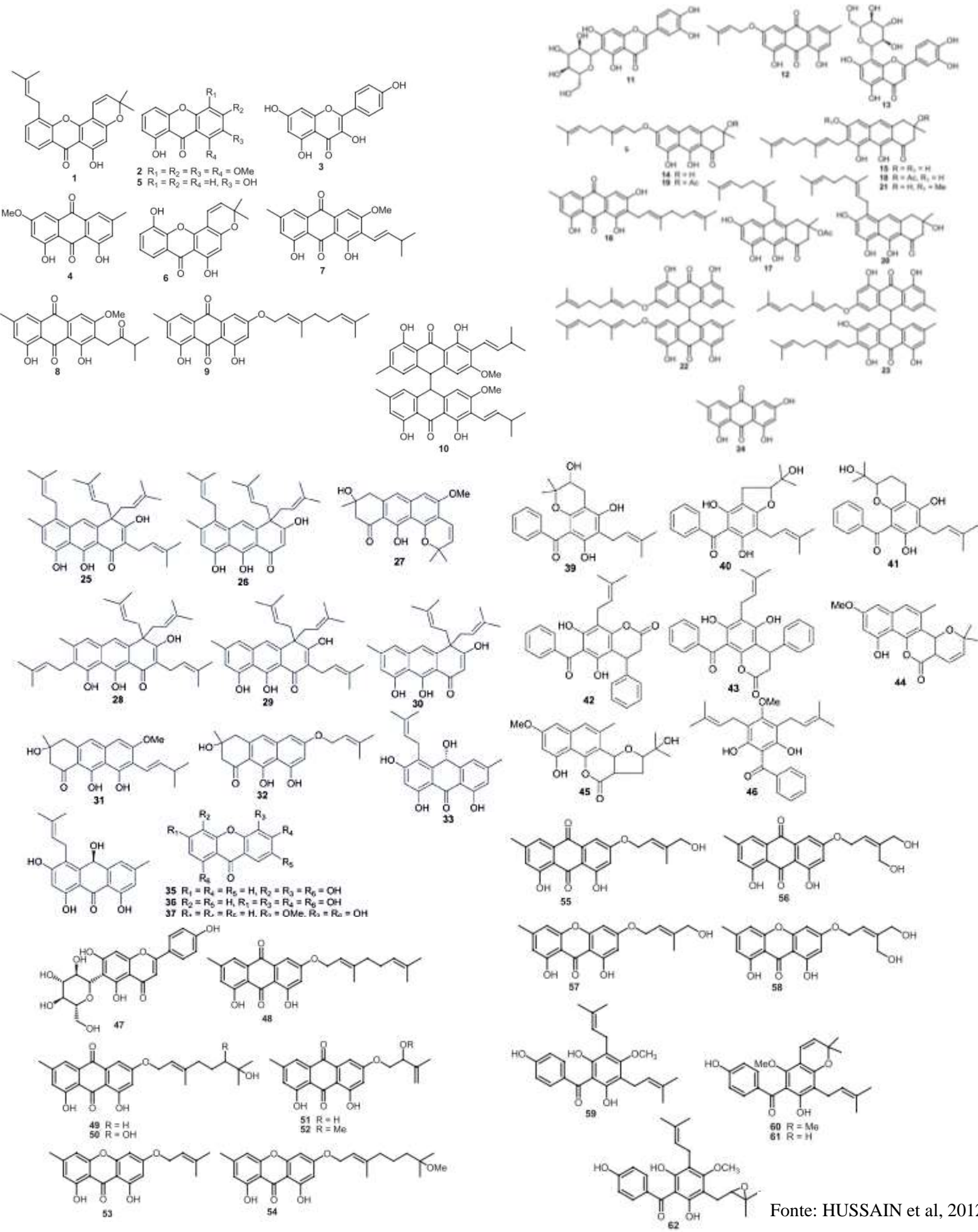
ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.; SANTOS, J.; DA SILVA, W.; LEMES, P. G. Uma Visão Geral do Manejo Integrado de Formigas Cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) em Plantações Florestais Brasileiras. **Florestas**, v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014.

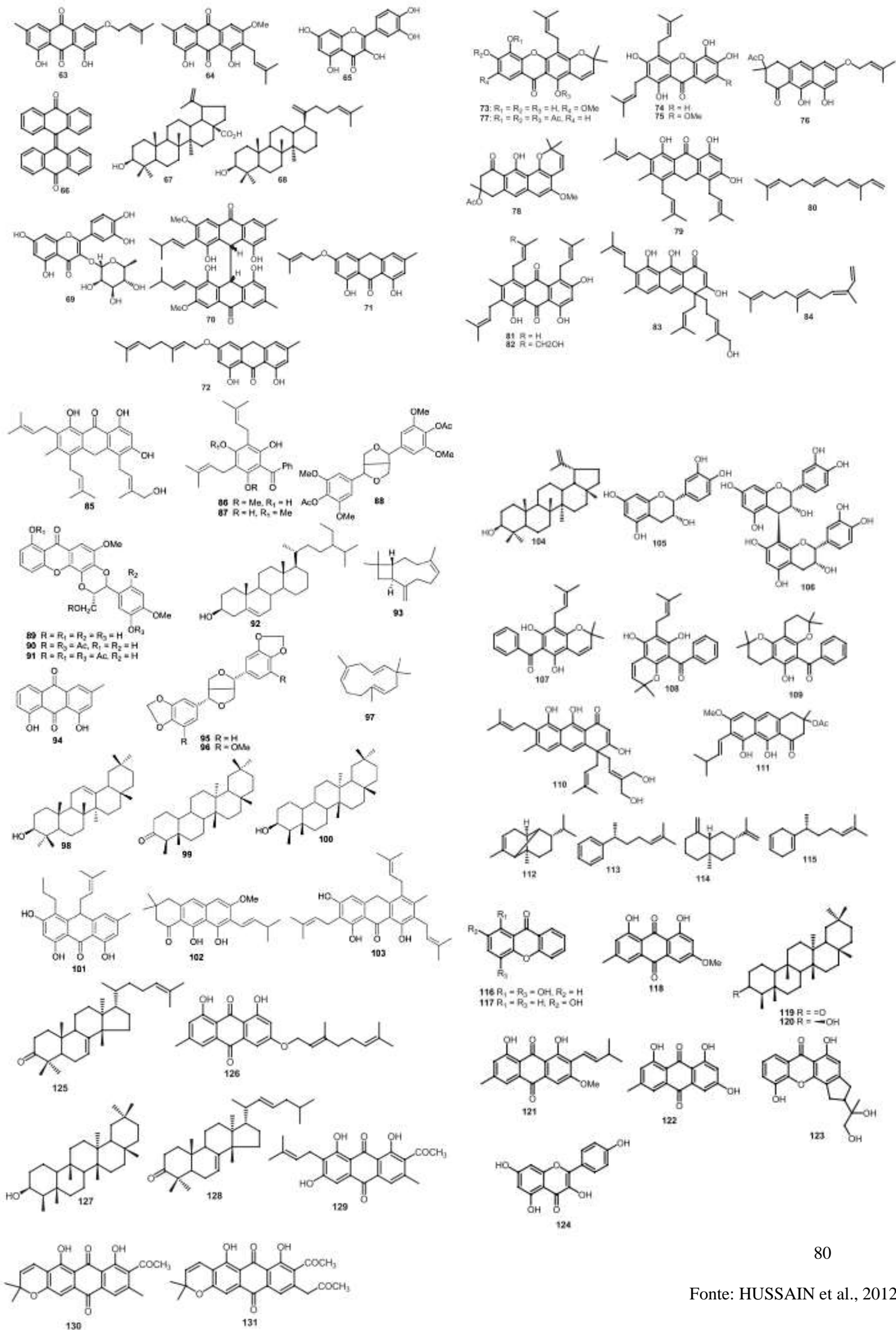
ZANÚNCIO, J.; LAZZARINI, A.L; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, L.A.; SOUZA, I.I.M; ANDRIKOPOULOS, F.B; FORNAZIER, M.J.; COSTA, A.F.J. Manejo agroecológico de pragas: alternativas para uma agricultura sustentável. **Revista Científica Intelletto**, v. 3, n. 3, p. 18–34, 2018.

ZWIR-FERENC, M.B.. Técnica de extração em fase sólida – tendências, oportunidades e aplicações. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 677–690, 2006.

APÊNDICES

A. COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Vismia*





B. TABELAS OBTIDAS DOS ENSAIOS COM O FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus*

Tabela A.1 – Médias das áreas do crescimento micelial, valores do desvio padrão (SD), desvio relativo (RSD), e porcentagem de inibição (% I) do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 7 e 14 dias de experimento com a amostra F1

Ensaio (Réplicas)	Amostra F1 7 dias	*Controle DMSO 7 dias	Amostra F1 14 dias	*Controle DMSO 14 dias
1	0,636	0,785	1,409	2,376
2	0,636	0,723	1,409	2,322
3	0,636	0,849	1,628	2,322
4	0,723	0,882	1,628	2,322
5	0,636	0,849	1,673	2,487
Média	0,653	0,818	1,549	2,366
SD	0,039	0,063	0,129	0,072
RSD	5,996	7,747	8,337	3,027
% inibição	20 %	–	35 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F1

Tabela A.2 – Médias das áreas do crescimento micelial, valores dos desvios padrões (SD), desvio relativo (RSD), e porcentagem de inibição (%I) do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 21 e 30 dias de experimento com a amostra F1

Ensaio (Réplicas)	Amostra F1 21 dias	*Controle DMSO 21 dias	Amostra F1 30 dias	*Controle DMSO 30 dias
1	3,267	6,067	7,255	9,837
2	3,396	5,145	6,971	11,455
3	3,528	4,906	7,159	10,174
4	3,528	5,065	6,785	10,980
5	3,662	5,554	7,447	10,061
Média	3,476	5,347	7,124	10,501
SD	0,150	0,468	0,255	0,686
RSD	4,322	8,752	3,584	6,531
Inibição	35 %	–	32 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

Tabela A.3 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 7 e 14 dias de experimento com a amostra F2

Ensaio (Réplicas)	Amostra F2 7 dias	*Controle DMSO 7 dias	Amostra F2 14 dias	*Controle DMSO 14 dias
1	0,694	0,785	1,628	2,377
2	0,723	0,723	1,327	2,322
3	0,754	0,849	1,583	2,322
4	0,849	0,882	1,286	2,322
5	0,754	0,849	–	2,487
Média	0,755	0,818	1,456	2,366
SD	0,058	0,063	0,174	0,071
RSD	7,728	7,748	11,975	3,027
Inibição	8 %	–	38 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F2

Tabela A.4 – Médias das áreas do crescimento micelial, valores dos desvios padrões (SD), desvio relativo (RSD), e porcentagem de inibição (%I) do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 21 e 30 dias de experimento com a amostra F2

Ensaio (Réplicas)	Amostra F2 21 dias	*Controle DMSO 21 dias	Amostra F2 30 dias	*Controle DMSO 30 dias
1	3,799	6,067	7,254	9,837
2	3,938	5,145	7,641	11,455
3	3,528104	4,906	9,181	10,173
4	3,461	5,064	8,038	10,980
5	–	5,554	–	10,060
Média	3,682	5,347	8,029	10,501
SD	0,225	0,468	0,832	0,685
RSD	6,111	8,752	10,366	6,530
Inibição	31 %	–	24 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F2

Tabela A.5 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 7 e 14 dias de experimento com a amostra F3

Ensaio (Réplicas)	Amostra F3 7 dias	*Controle DMSO 7 dias	AmostraF3 14 dias	*Controle DMSO 14 dias
1	0,816	0,785	1,814	2,376
2	0,753	0,723	1,910	2,322
3	0,753	0,849	1,959	2,322
4	0,693	0,882	1,910	2,322
5	0,693	0,849	1,959	2,487
Média	0,742	0,817	1,910	2,366
SD	0,051	0,063	0,059	0,072
RSD	6,916	7,747	3,119	3,027
Inibição	9 %	–	19 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F3

Tabela A.6 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 21 e 30 dias de experimento com a amostra F3

Ensaio (Réplicas)	Amostra F3 21 dias	*Controle DMSO 21 dias	Amostra F3 30 dias	*Controle DMSO 30 dias
1	4,906	6,066	7,938	9,837
2	4,446	5,144	8,139	11,455
3	5,064	4,906	8,652	10,173
4	4,906	5,064	8,968	10,980
5	4,446	5,554	–	10,060
Média	4,754	5,347	8,424	10,501
SD	0,288	0,468	0,471	0,685
RSD	6,058	8,752	5,590	6,530
Inibição	11 %	–	20 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F3

Tabela A.7 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 7 e 14 dias de experimento com a amostra F4

Ensaio (Réplicas)	Amostra F4 7 dias	*Controle DMSO 7 dias	Amostra F4 14 dias	*Controle DMSO 14 dias
1	0,816	0,785	1,719	2,377
2	0,753	0,723	1,719	2,322
3	0,753	0,849	1,628	2,322
4	0,693	0,882	1,628	2,322
5	0,693	0,849	1,719	2,487
Média	0,742	0,817	1,682	2,366
SD	0,051	0,063	0,050	0,071
RSD	6,916	7,747	2,984	3,026
Inibição	8 %	–	29 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F4

Tabela A.8 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 21 e 30 dias de experimento com a amostra F4

Ensaio (Réplicas)	Amostra F4 21 dias	*Controle DMSO 21 dias	Amostra F4 30 dias	*Controle DMSO 30 dias
1	4,521	6,066	9,397	9,837
2	4,597	5,144	9,181	11,455
3	4,225	4,906	9,948	10,173
4	4,597	5,064	9,289	10,980
5	4,447	5,554	9,948	10,061
Média	4,477	5,347	9,553	10,501
SD	0,154	0,468	0,369	0,685
RSD	3,446	8,752	3,863	6,530
Inibição	16 %	–	9 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra F4

Tabela A.9 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 7 e 14 dias de experimento com a amostra PLF

Ensaio (Réplicas)	Amostra PLF 7 dias	*Controle DMSO 7 dias	Amostra PLF 14 dias	*Controle DMSO 14 dias
1	0,816	0,785	1,246	2,376
2	0,753	0,723	1,286	2,322
3	0,753	0,849	1,286	2,322
4	0,693	0,882	1,326	2,322
5	0,693	0,849	–	2,487
Média	0,742	0,817	1,286	2,366
SD	0,051	0,063	0,032	0,072
RSD	6,916	7,747	2,551	3,026
Inibição	8%	–	46 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra PLF

Tabela A.10 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 21 e 30 dias de experimento com a amostra PLF

Ensaio (Réplicas)	Amostra PLF 21 dias	*Controle DMSO 21 dias	Amostra PLF 30 dias	*Controle DMSO 30 dias
1	3,331	6,067	7,739	9,837
2	3,396	5,144	8,240	11,455
3	3,662	4,906	7,938	10,174
4	3,662	5,064	7,838	10,980
5	3,730	5,554	7,543	10,067
Média	3,557	5,347	7,860	10,501
SD	0,180	0,468	0,257	0,685
RSD	5,053	8,752	3,279	6,530
Inibição	33 %	–	25 %	–

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

*Controles, 100% DMSO_200 µL, referente à amostra PLF

C. ESPECTROS DE RMN

400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para ^{13}C

Composto 1

PLF-02-05

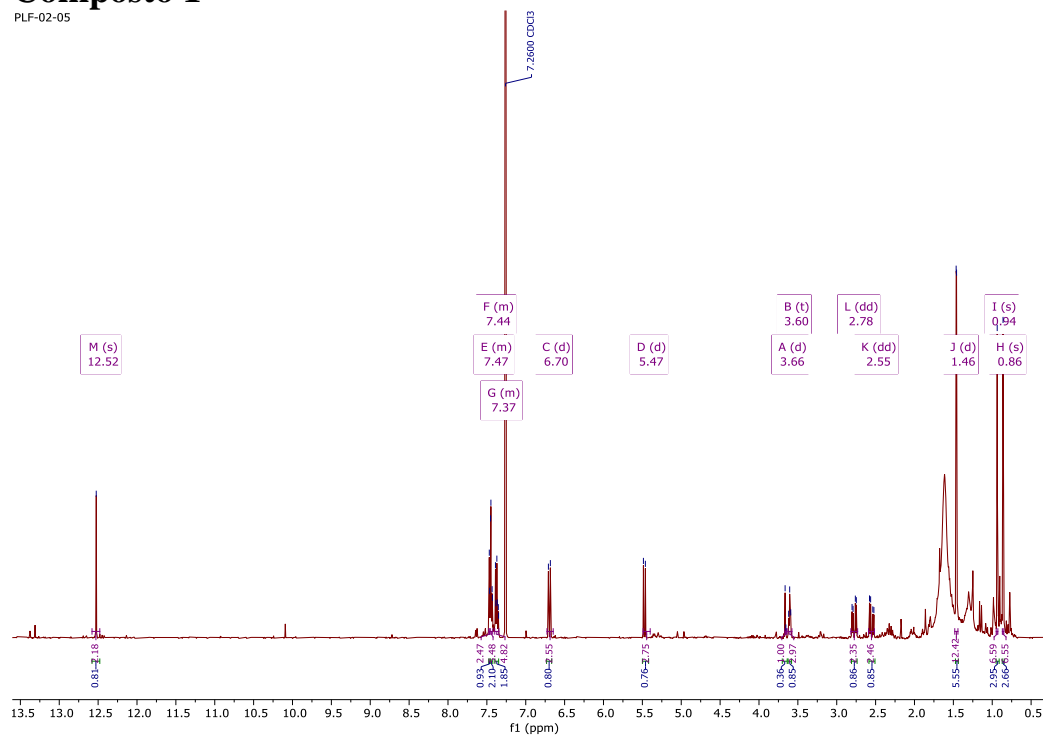


Figura A.1. Espectro de RMN de ^1H .

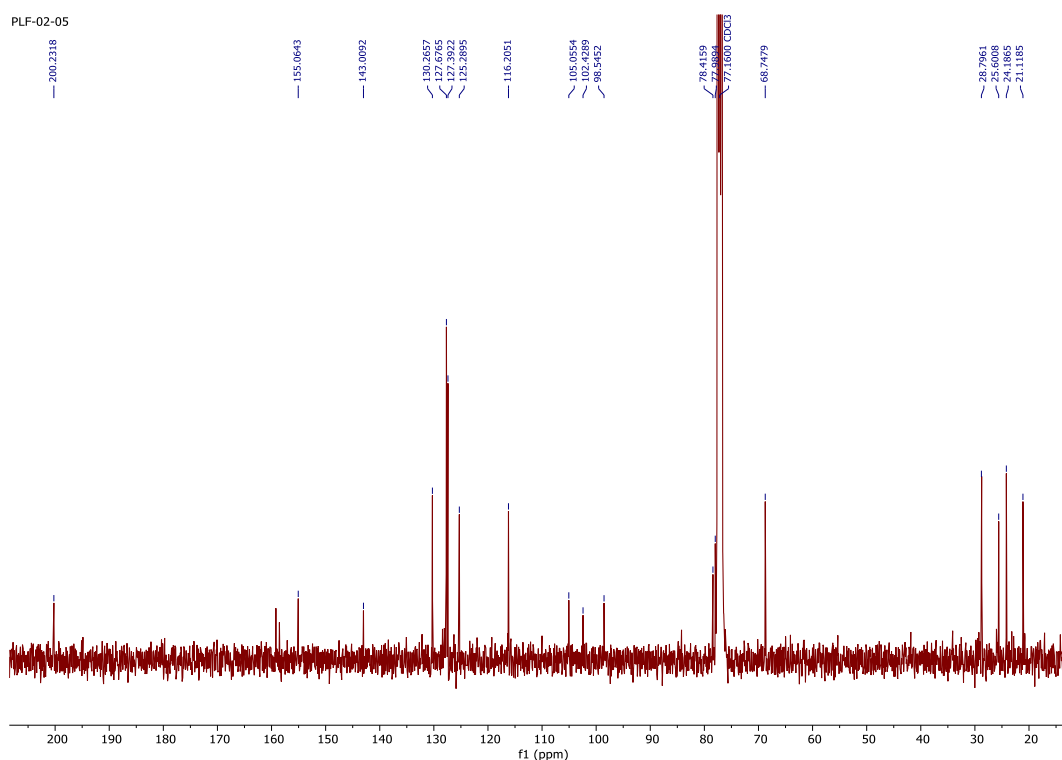


Figura A.2. Espectro de RMN de ^{13}C .

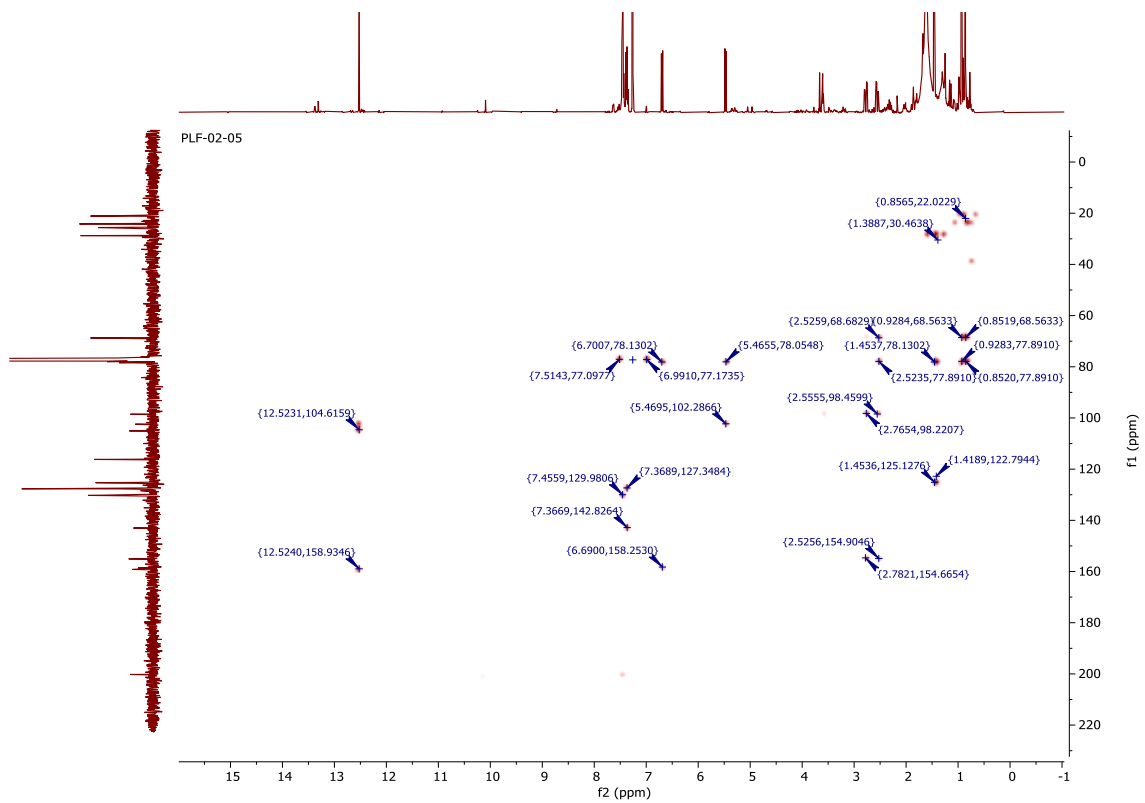


Figura A.3. Espectro bidimensional de HMBC.

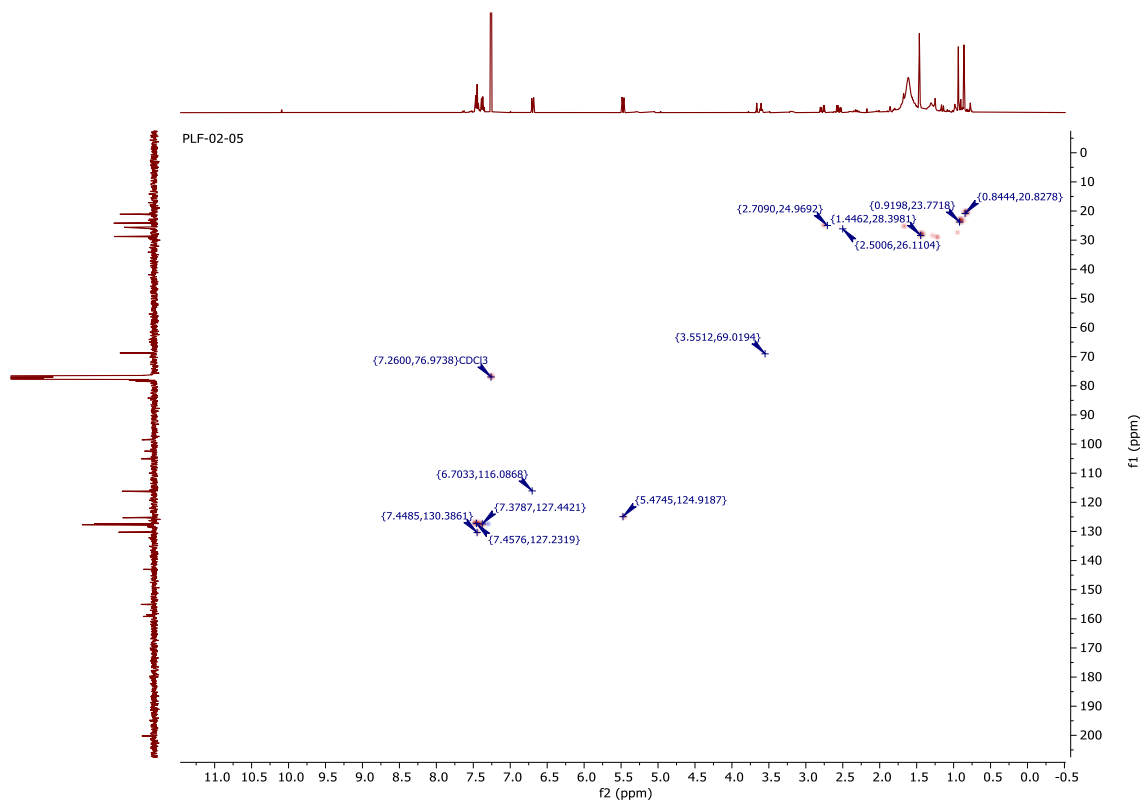


Figura A.4. Espectro bidimensional de HSQC.

PLF-02-05

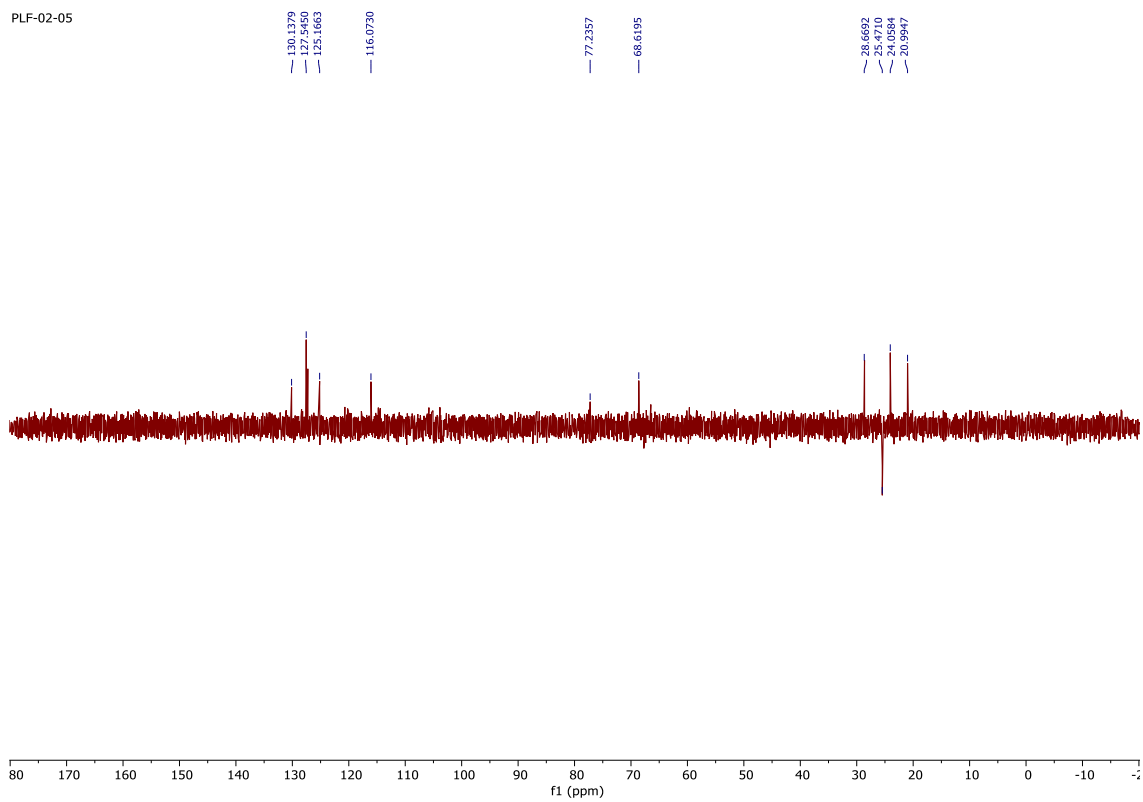


Figura A.5. Espectro ^{13}C DEPT 135.

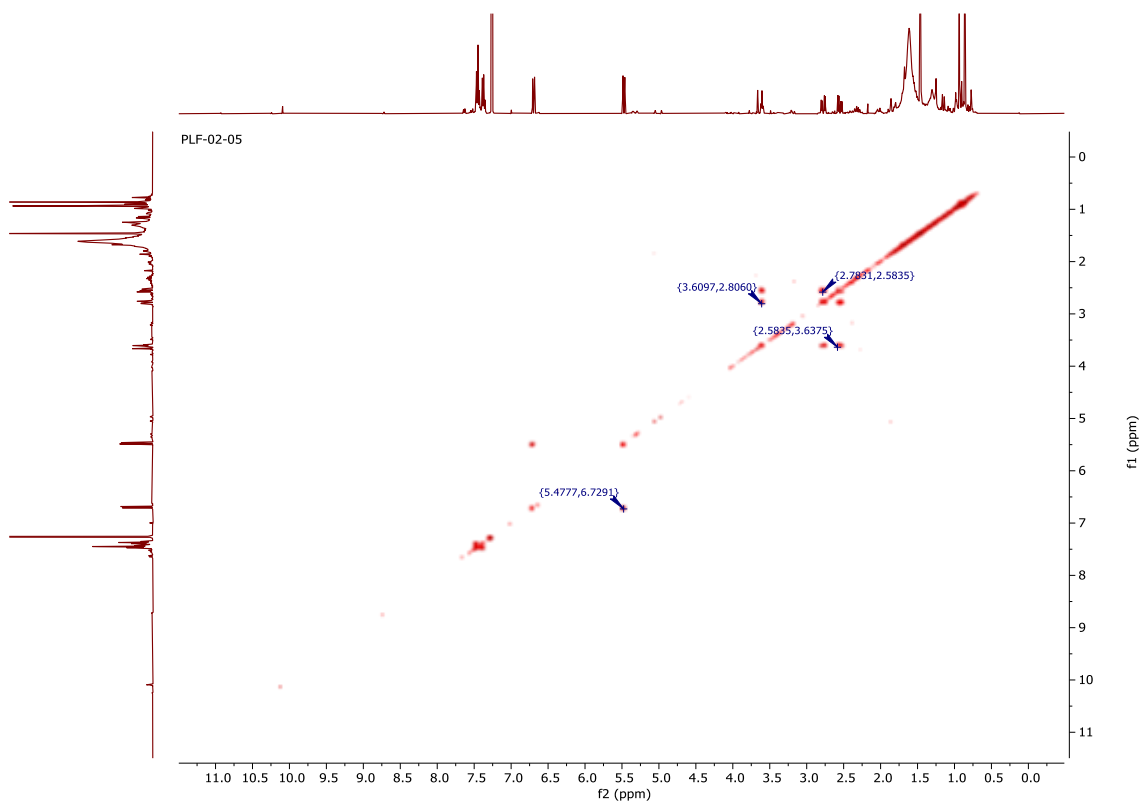


Figura A.6. Espectro ^1H COSY.

Composto 2

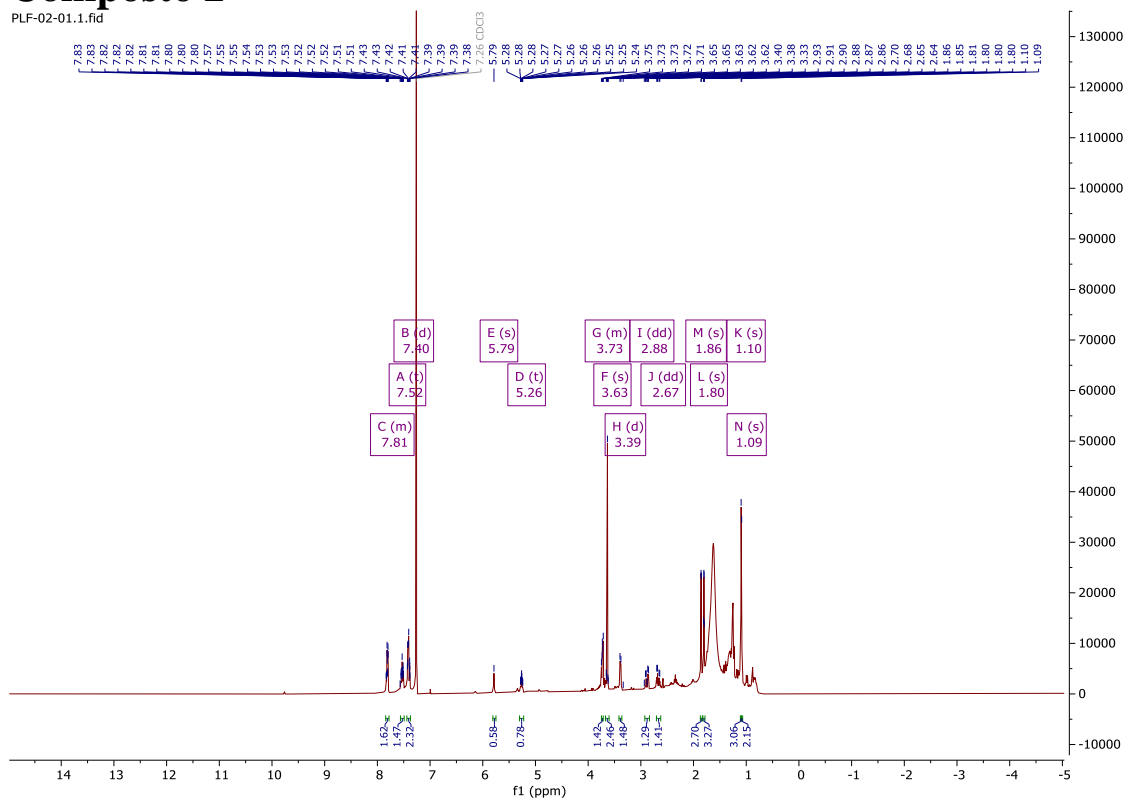


Figura A.7. Espectro de RMN de ^1H .

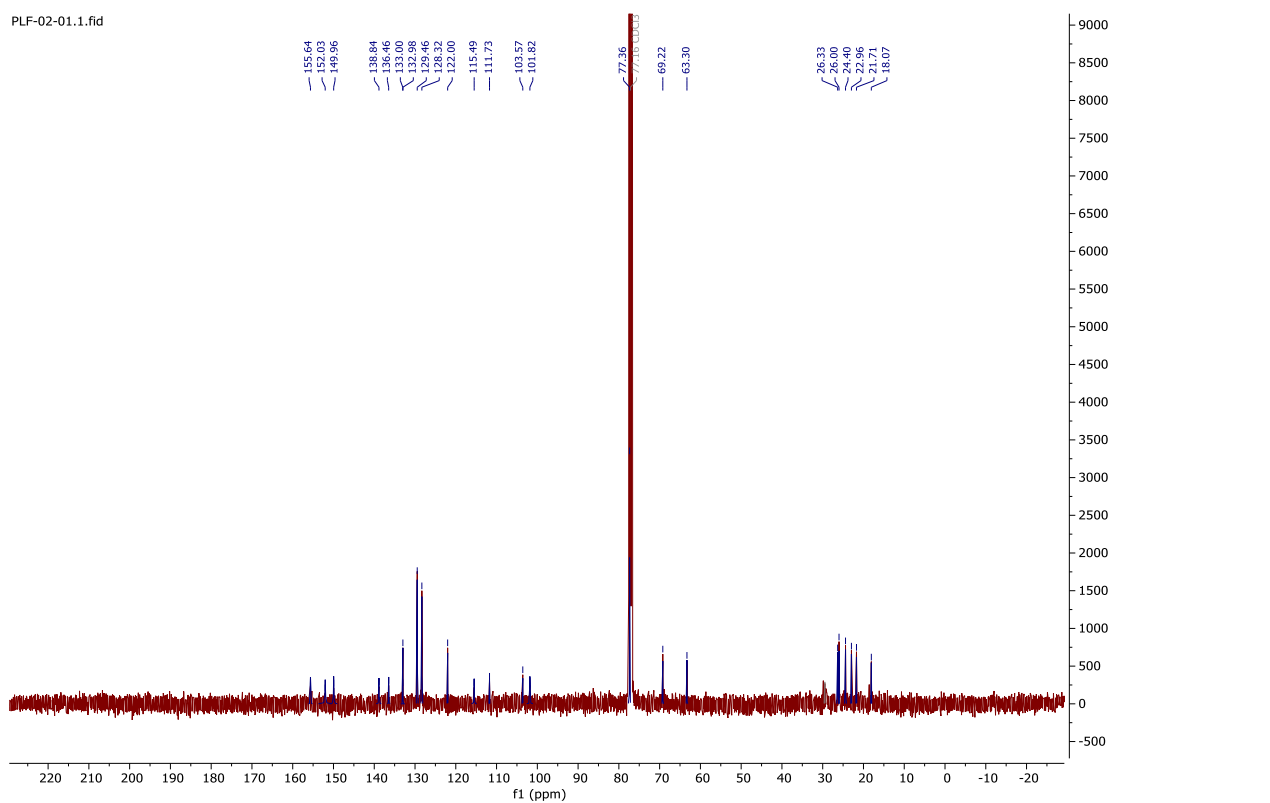


Figura A.8. Espectro de RMN de ^{13}C .

PLF-02-01.3.fid

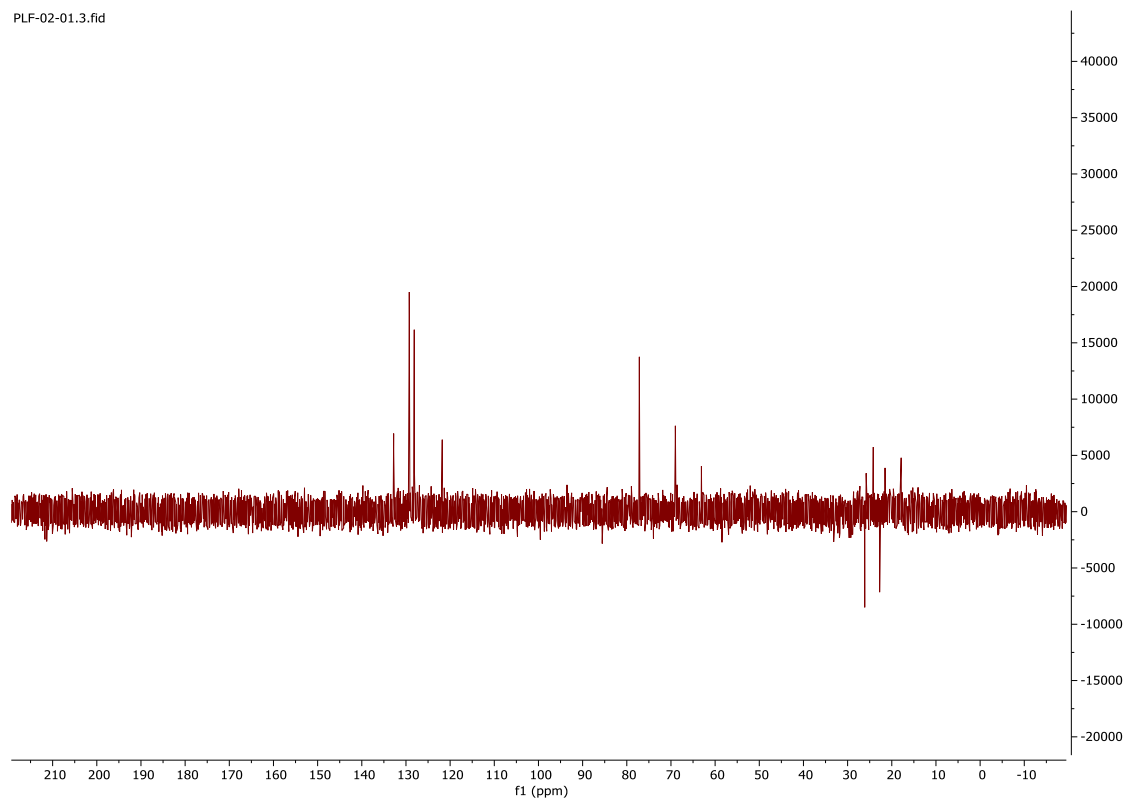


Figura A.9. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135.

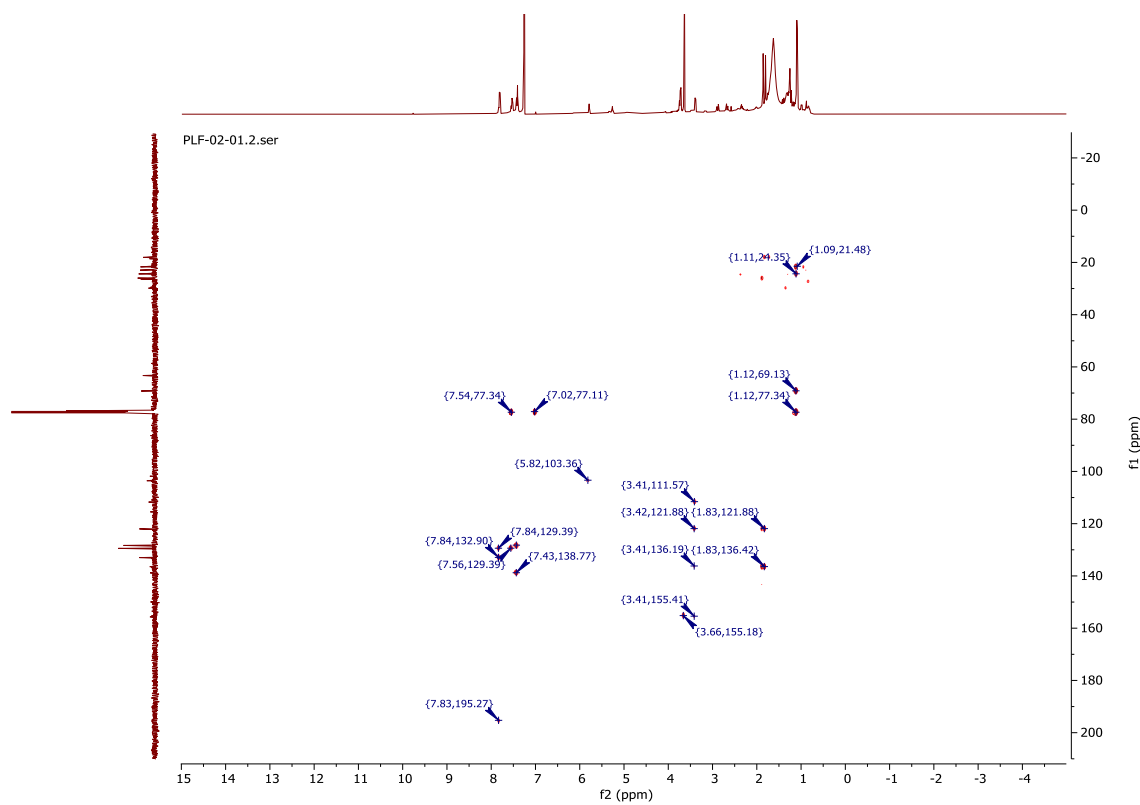


Figura A.10. Espectro HMBC.

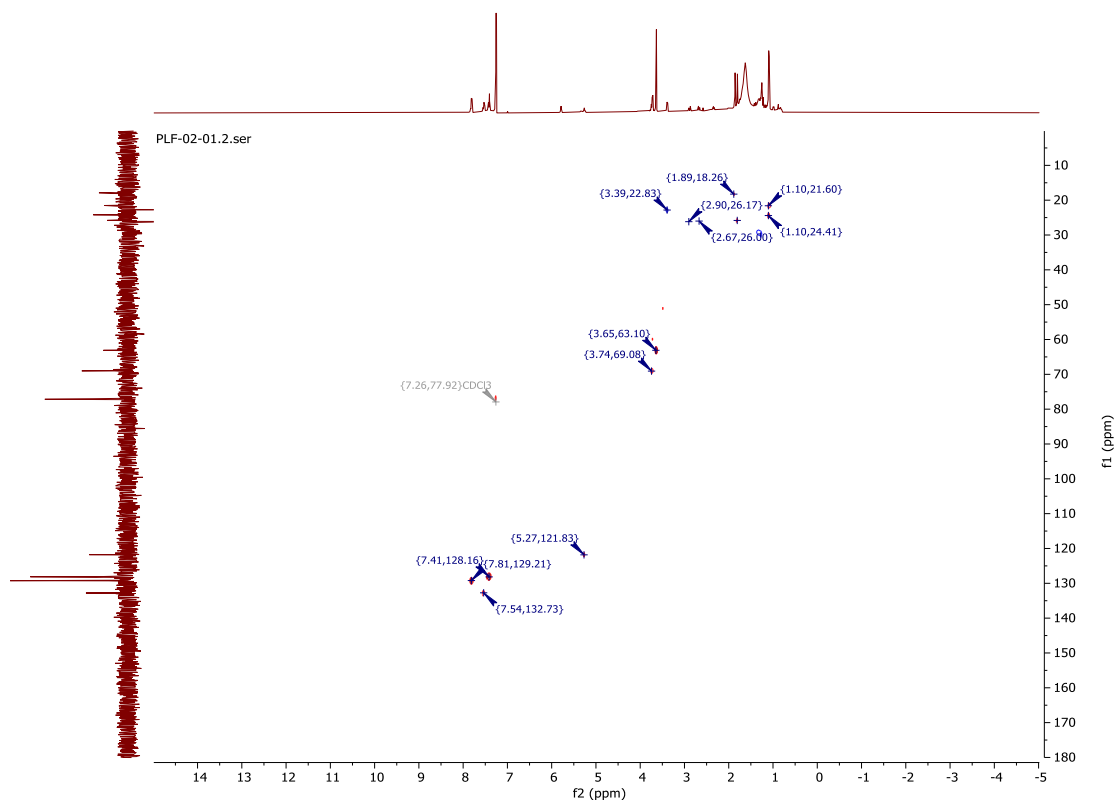


Figura A.11. Espectro HSQC.

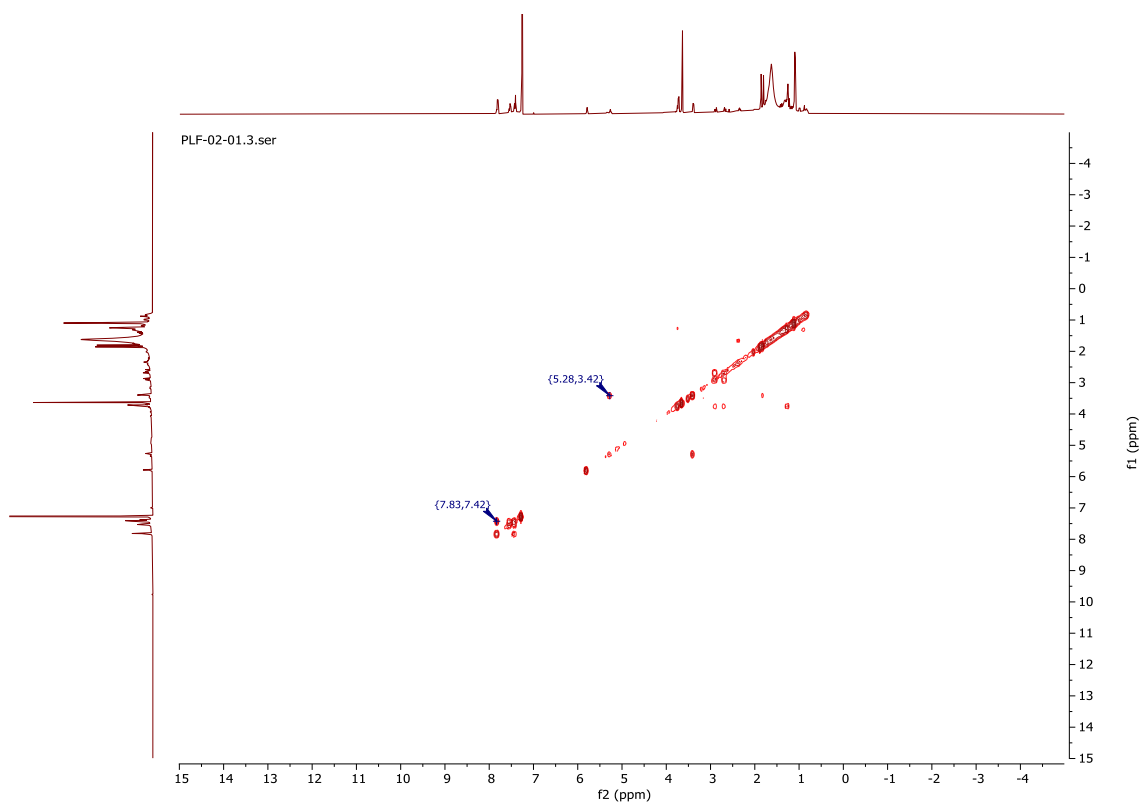


Figura A.12. Espectro ^1H COSY.

Composto 3

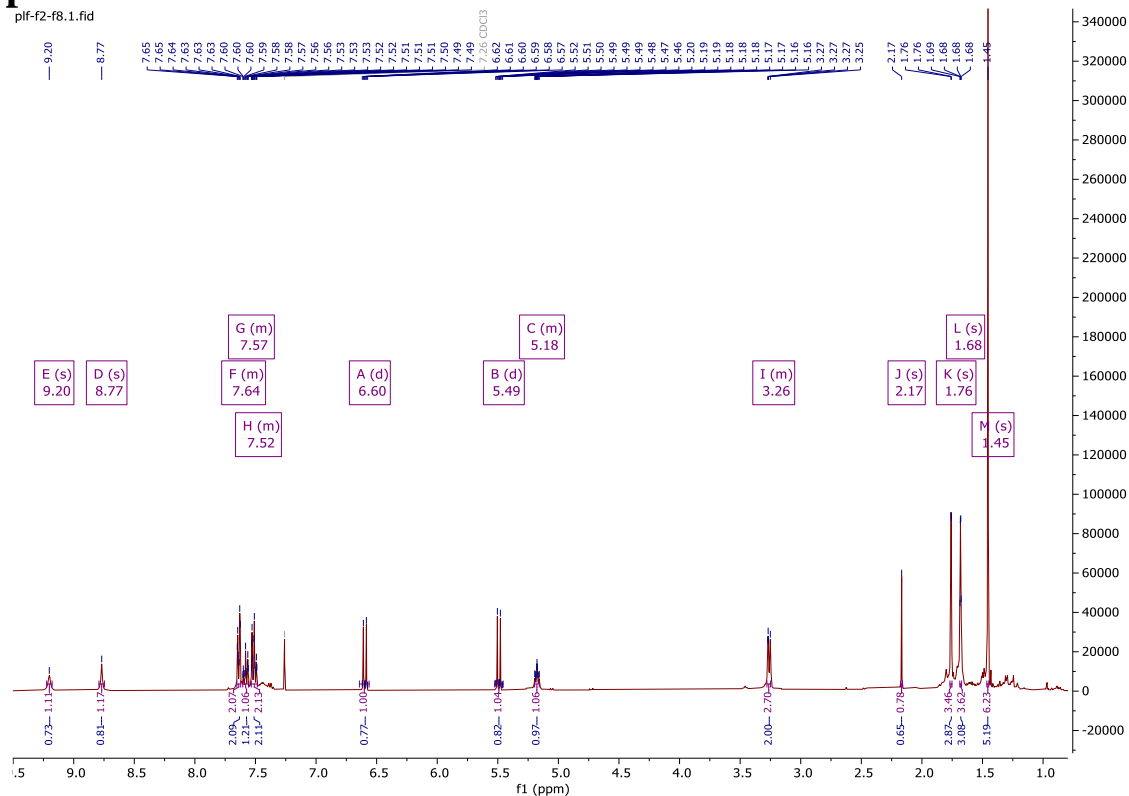


Figura A.13. Espectro de RMN de ^1H .

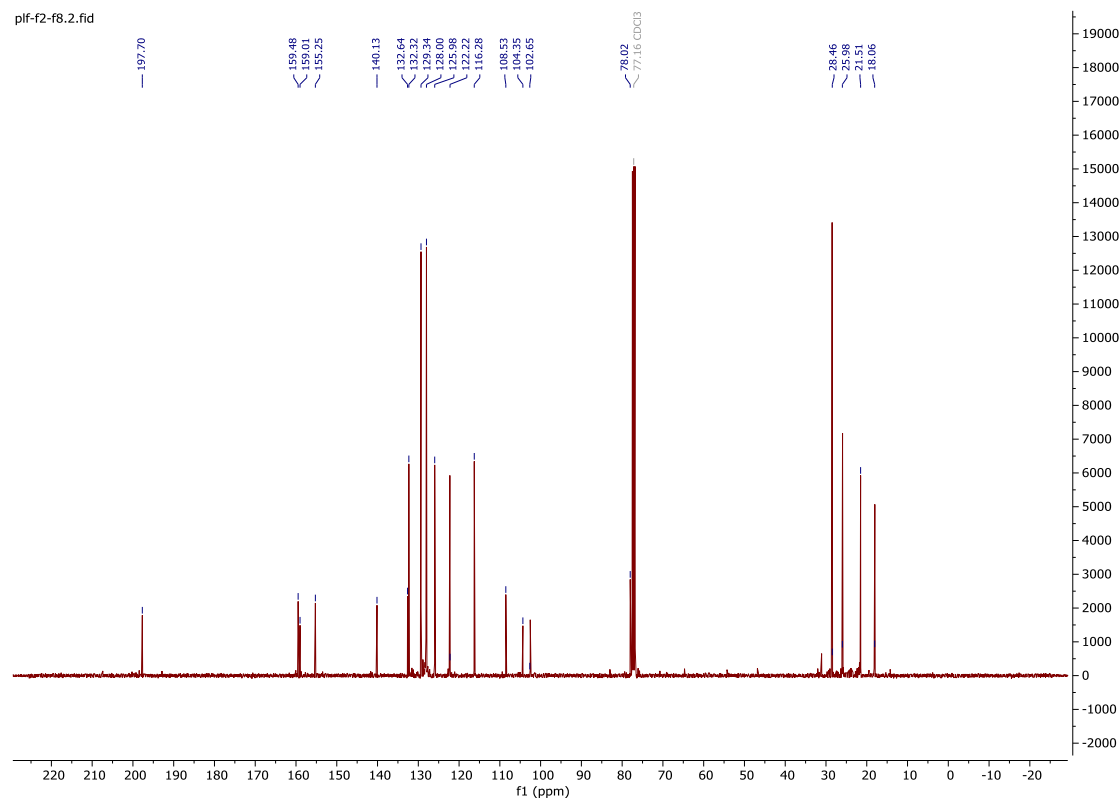


Figura A.14. Espectro de RMN de ^{13}C .

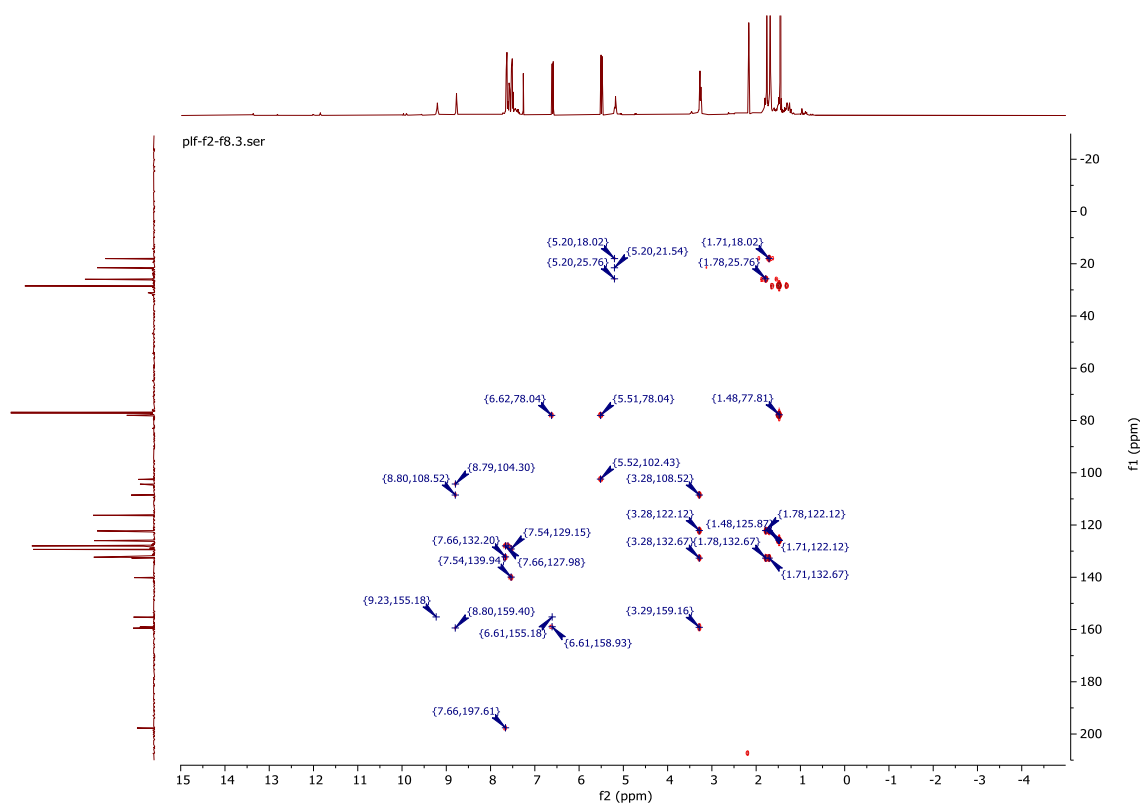


Figura A.15. Espectro bidimensional de HMBC.

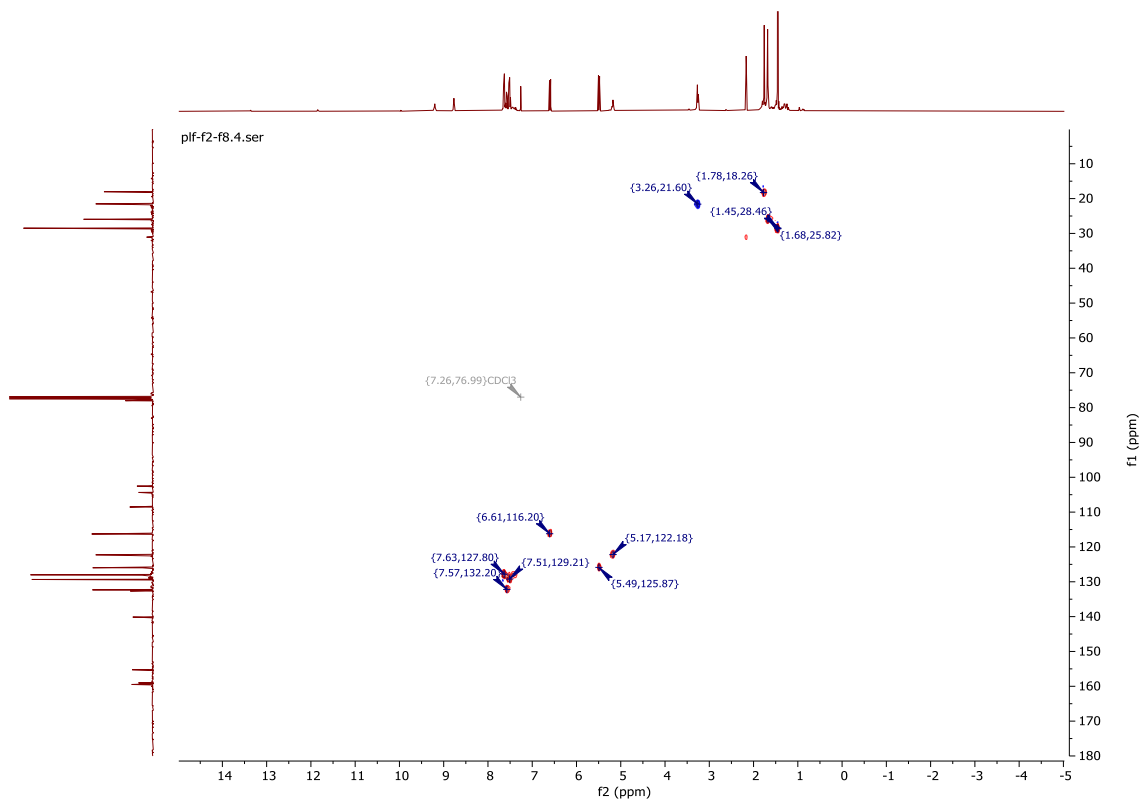


Figura A.16. Espectro bidimensional de HSQC.

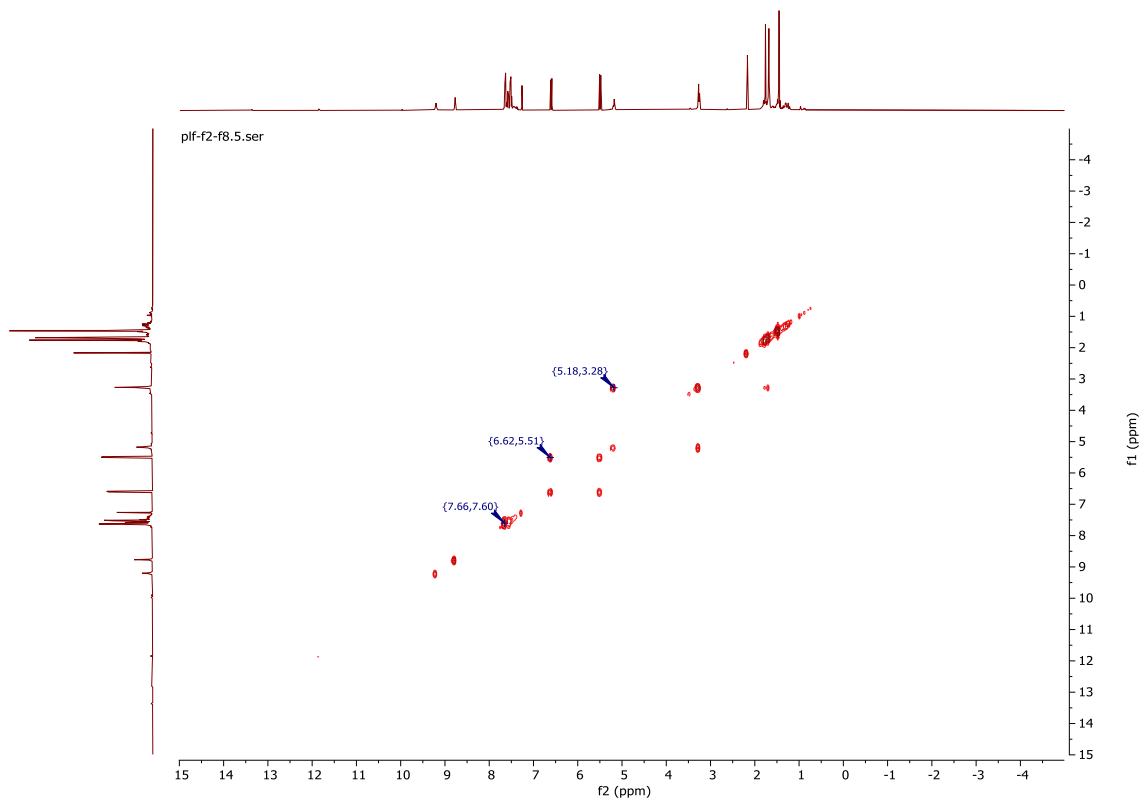


Figura A.17. Espectro ^1H COSY.

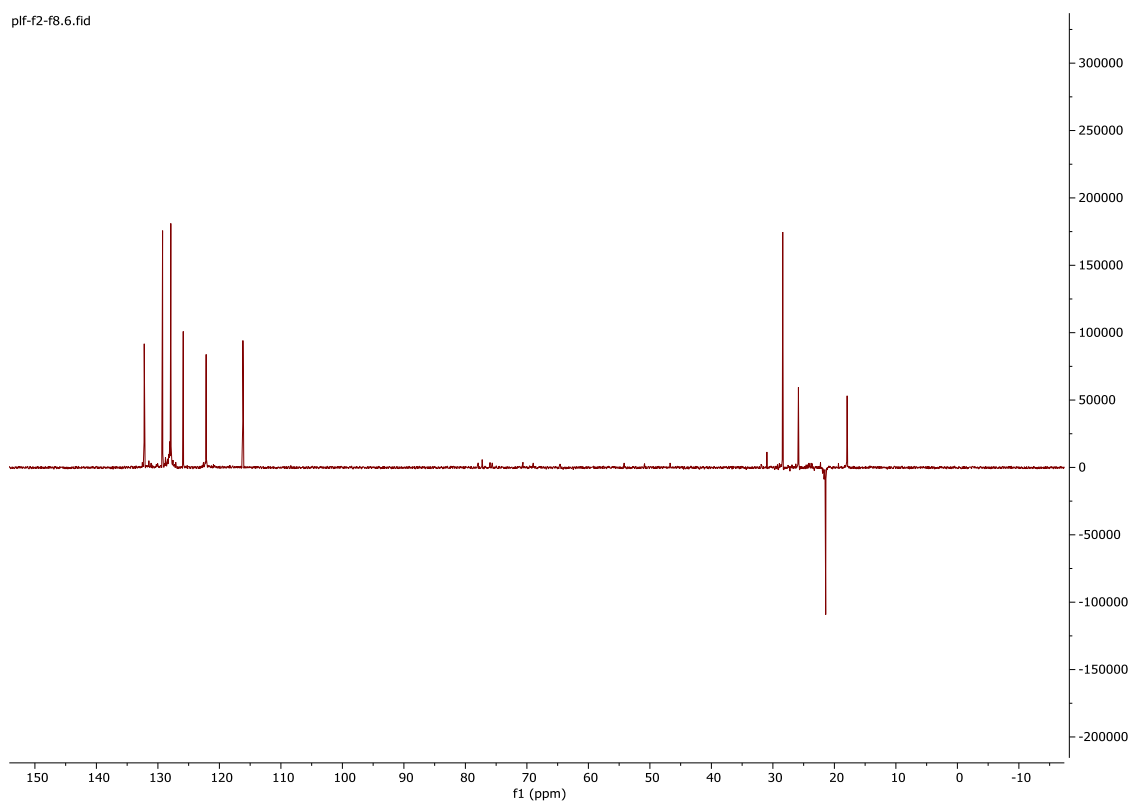


Figura A.18. Espectro ^{13}C DEPT 135.

Composto 4

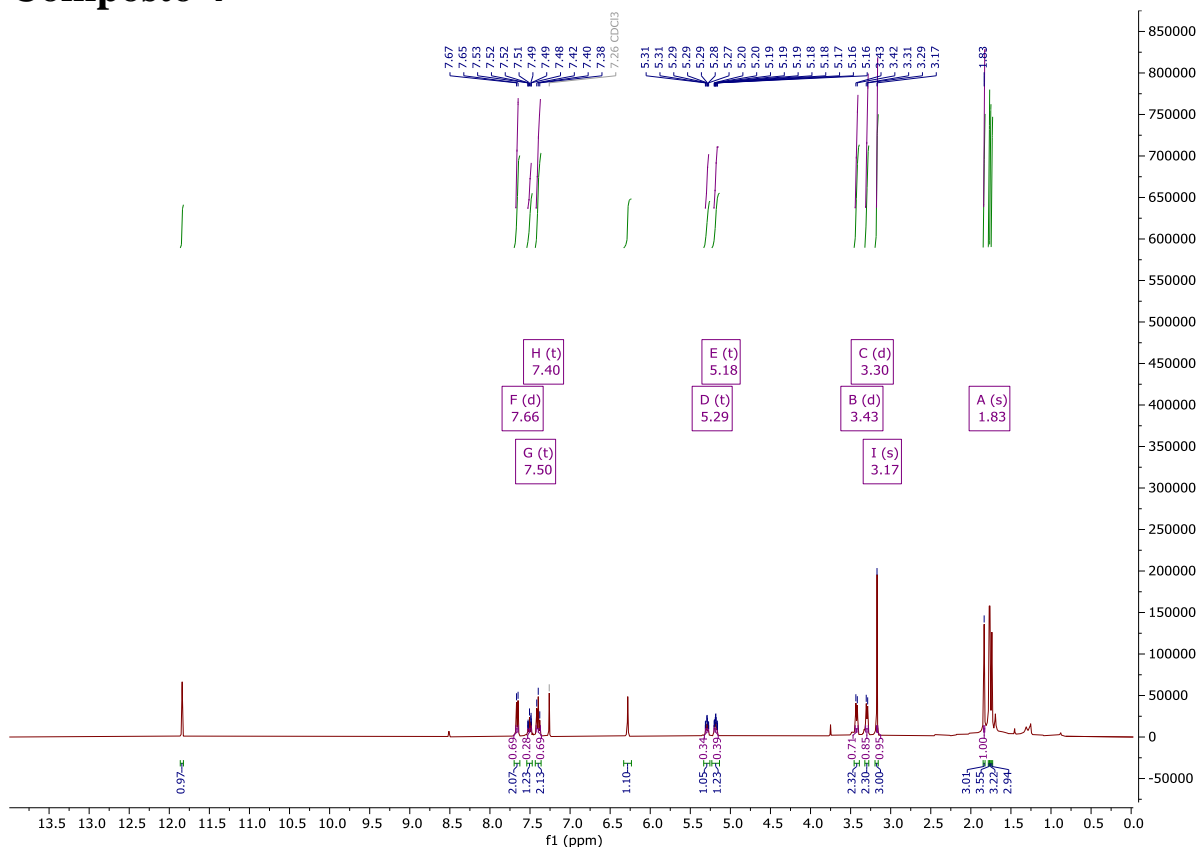


Figura A.19. Espectro de RMN de ¹H.

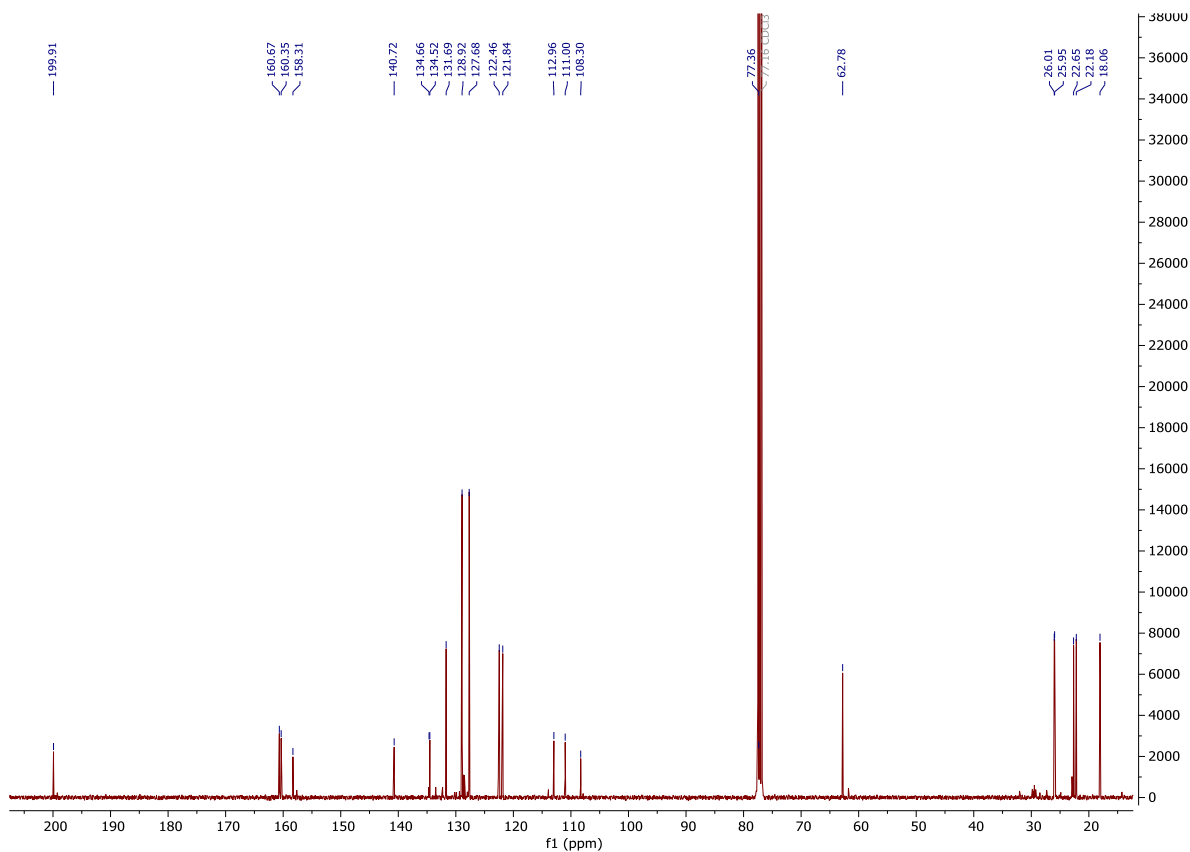


Figura A.20. Espectro de RMN de ¹³C.

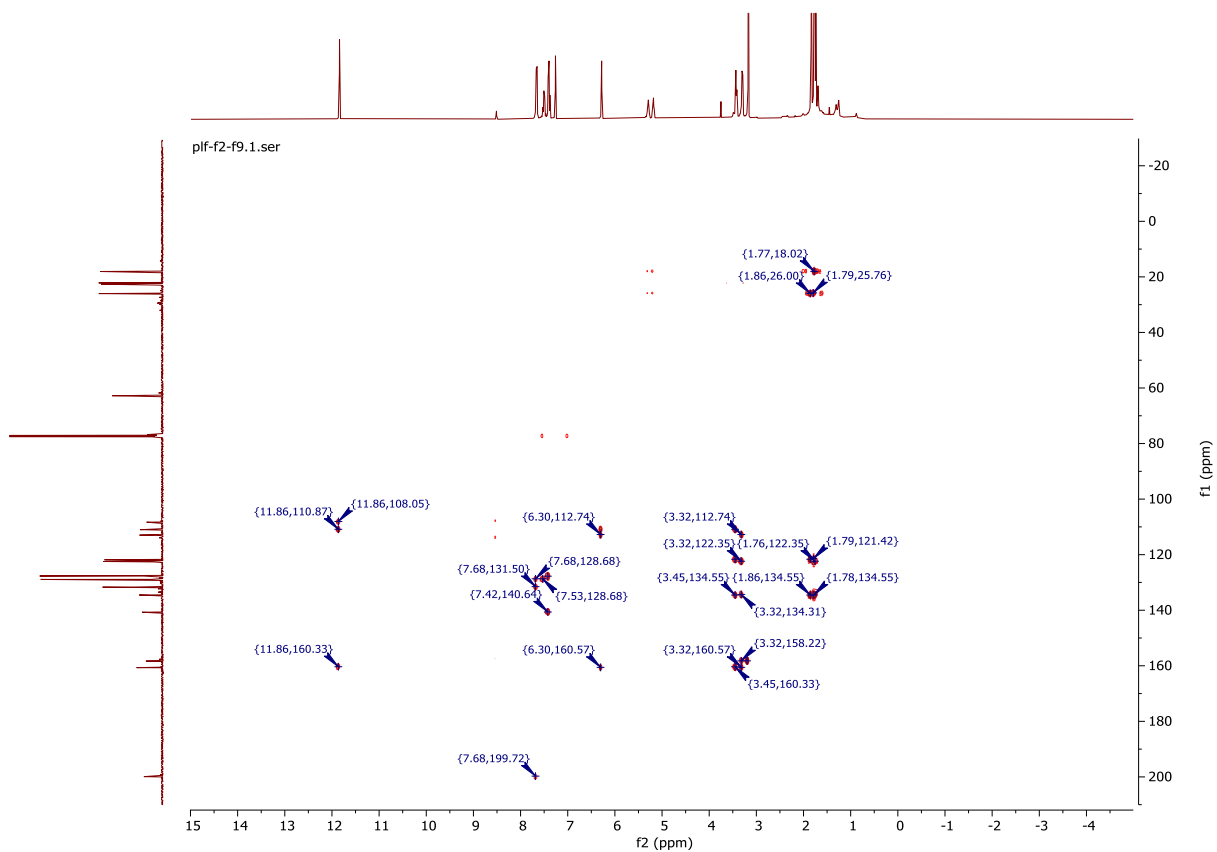


Figura A.21. Espectro bidimensional de HMBC.

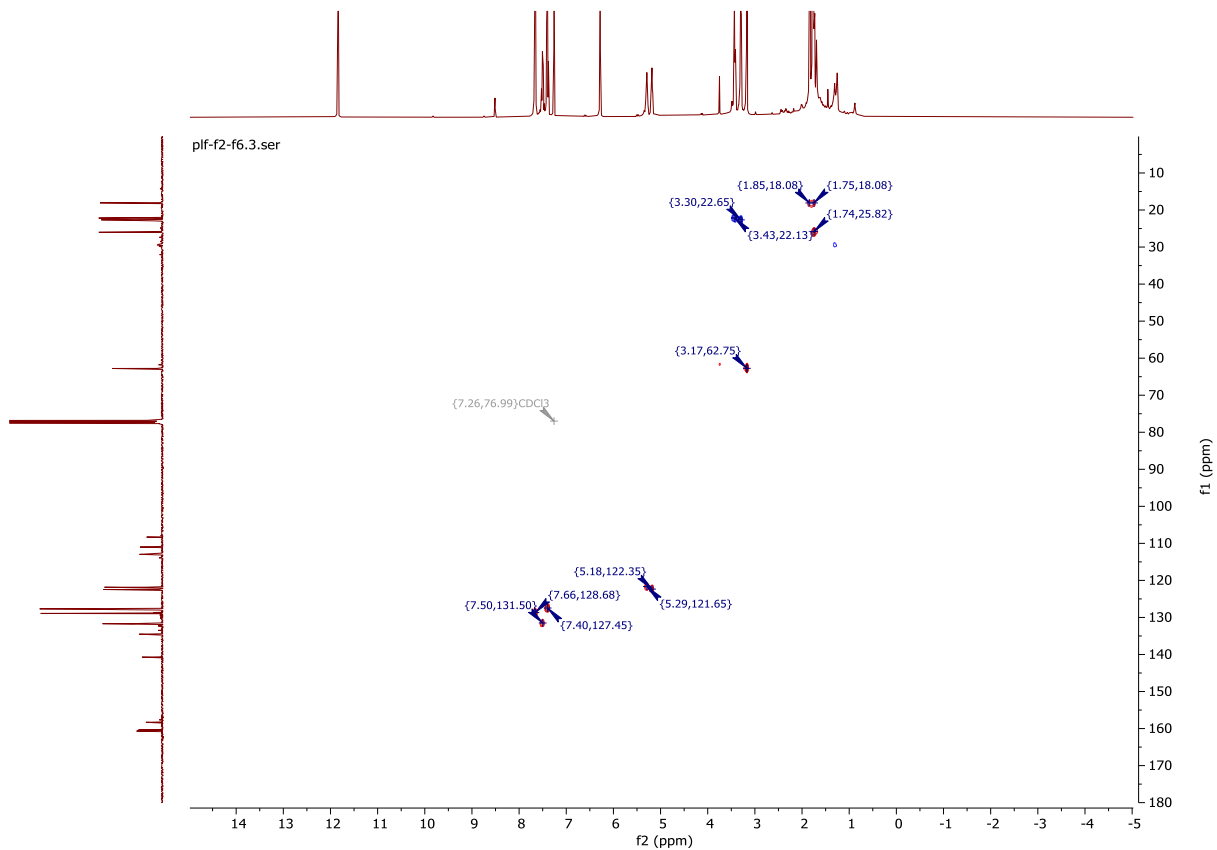


Figura A.22. Espectro bidimensional de HSQC.

plf-f2-f9.2.fid

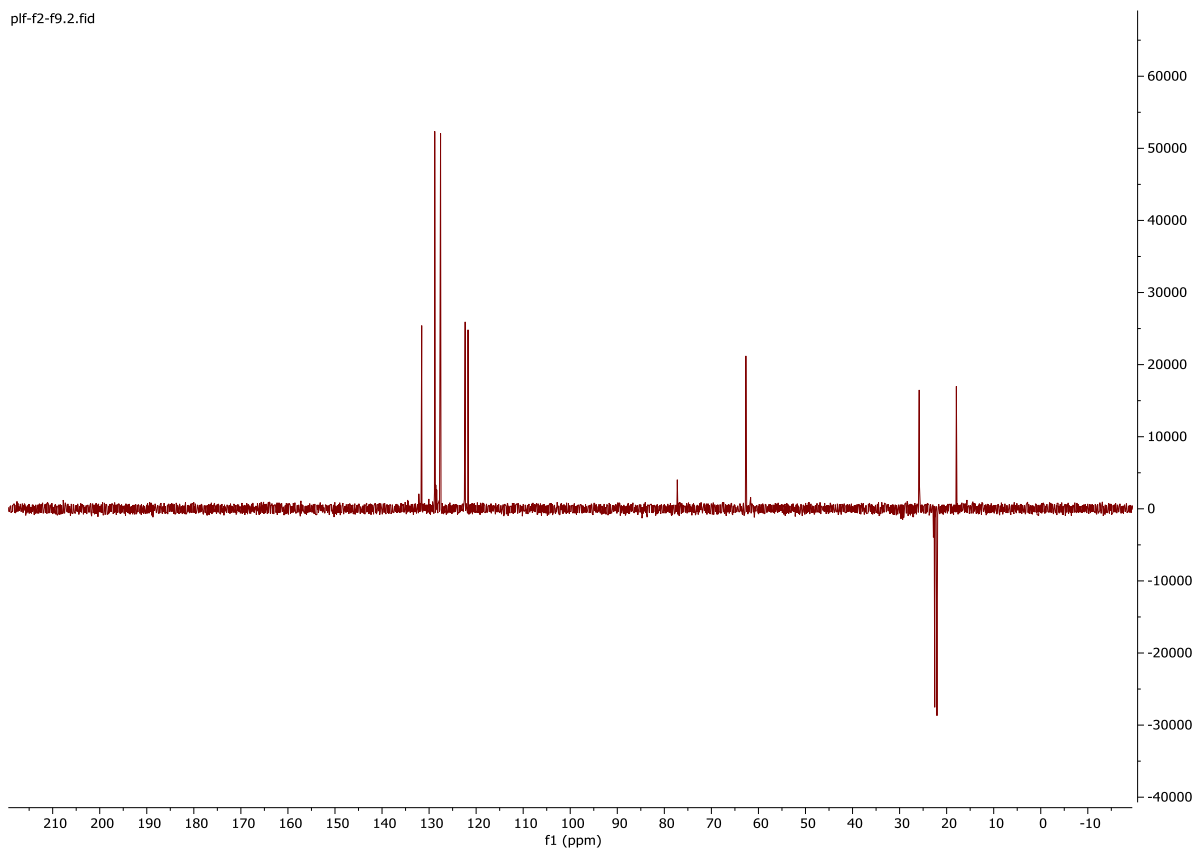


Figura A.23. Espectro ^{13}C DEPT 135.

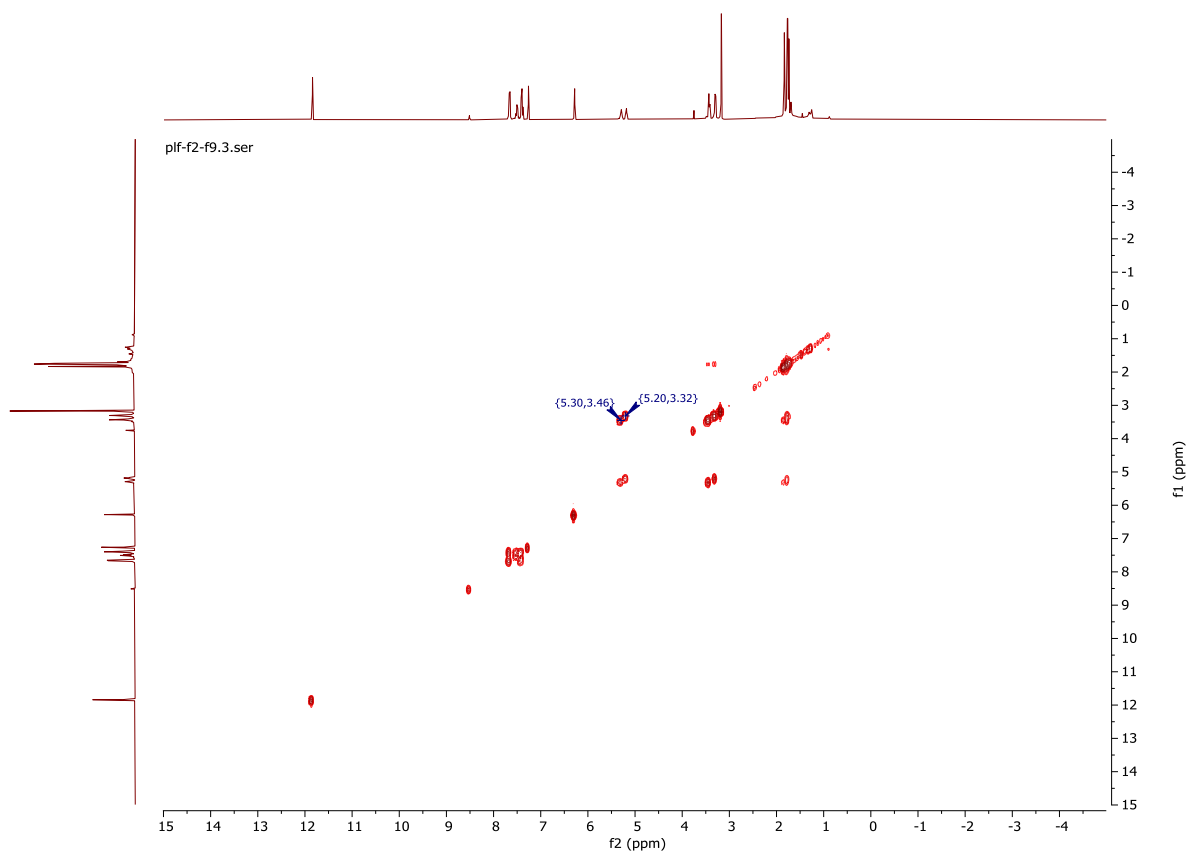


Figura A.24. Espectro ^1H COSY.

Composto 5

plf-f2-f7.1.fid

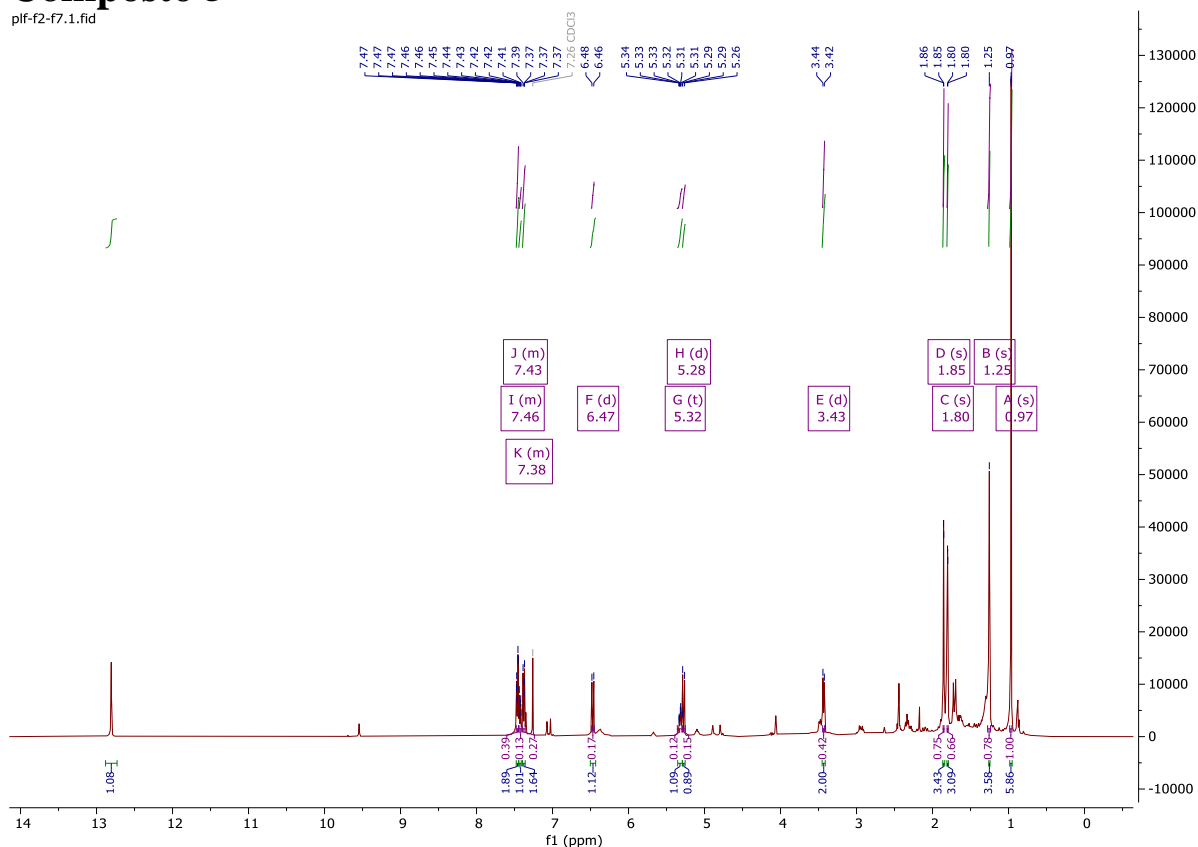


Figura A.25. Espectro de RMN de ¹H.

plf-f2-f7.2.fid

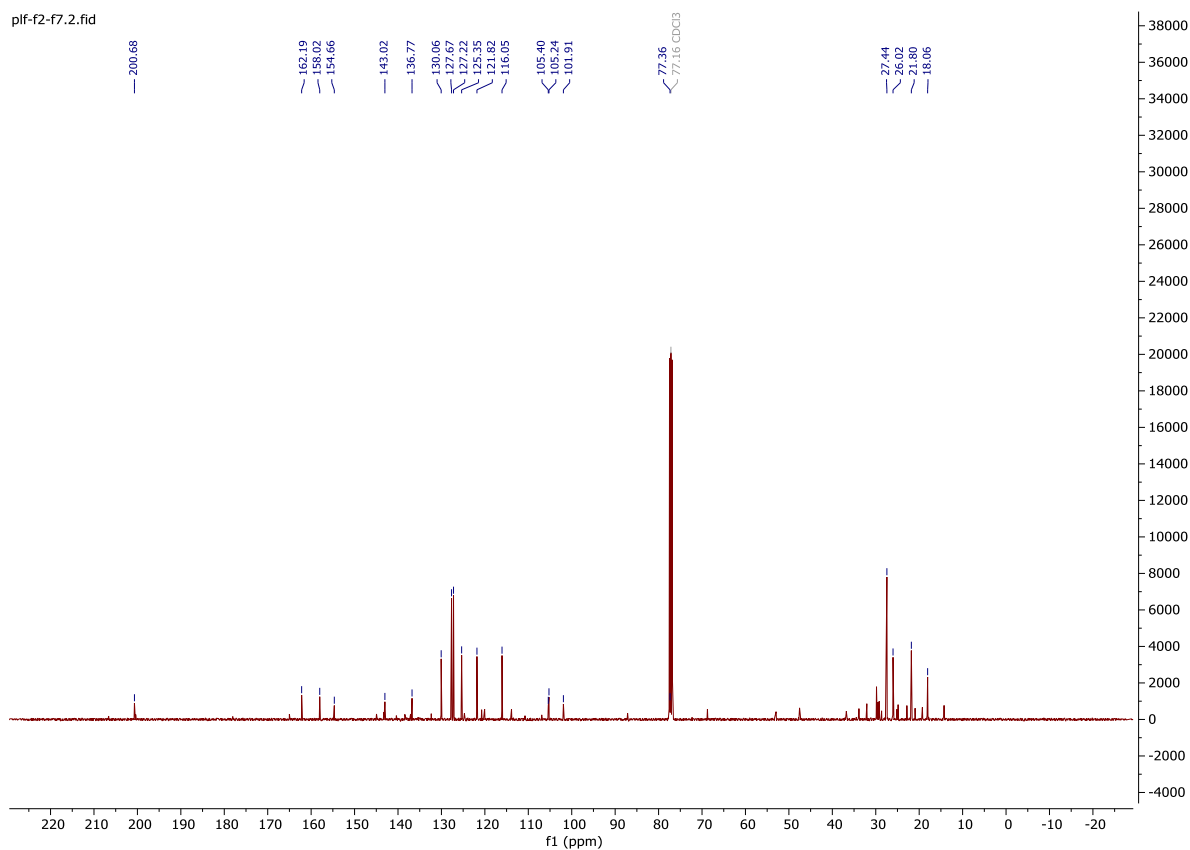


Figura A.26. Espectro de RMN de ¹³C.

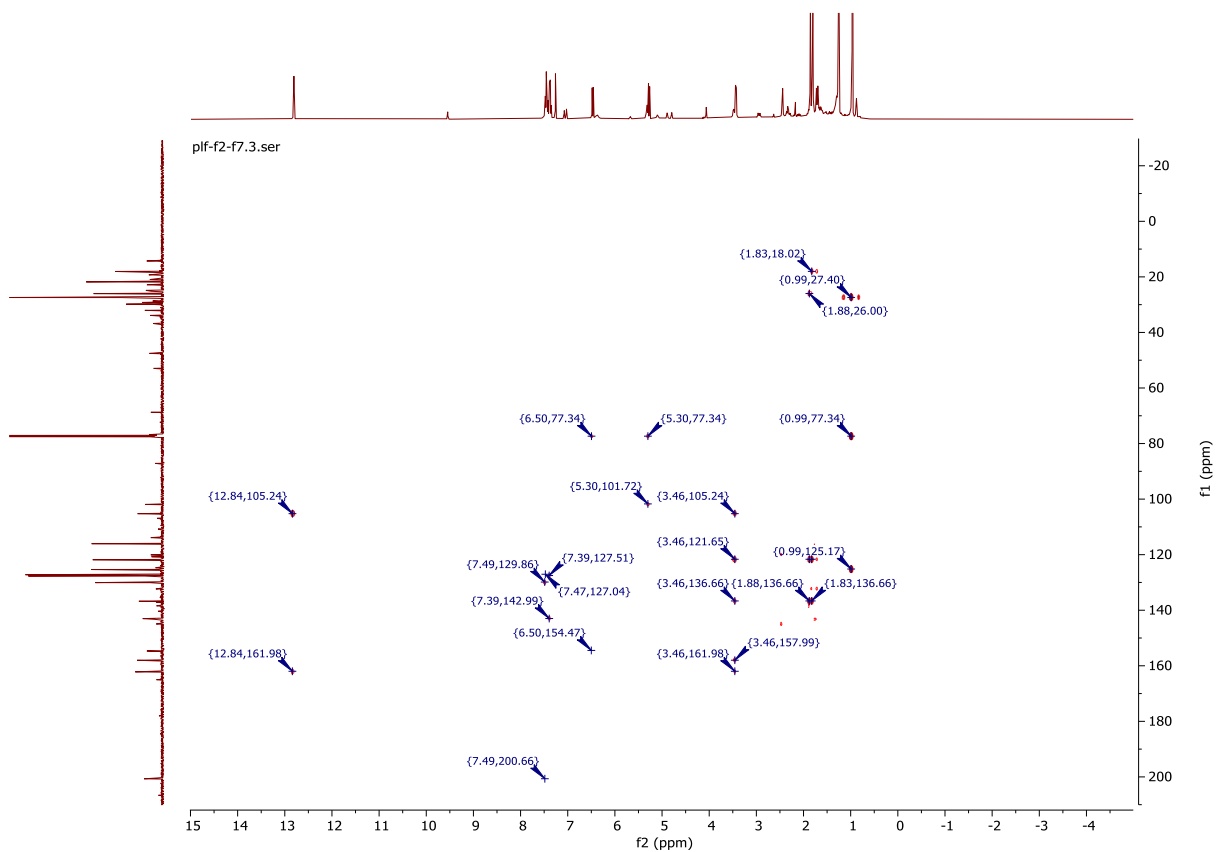


Figura A.27. Espectro bidimensional de HMBC.

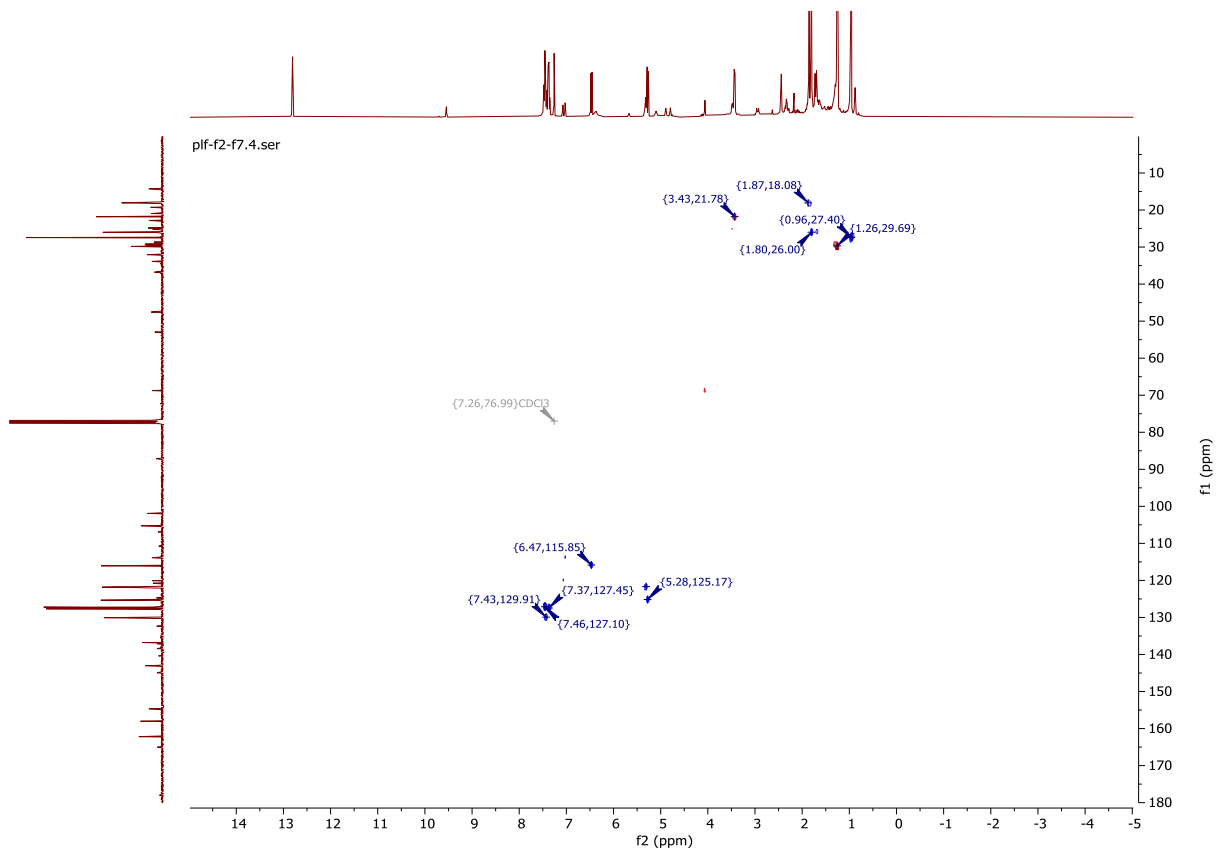


Figura A.28. Espectro bidimensional de HSQC.

plf-f2-f7.5.fid

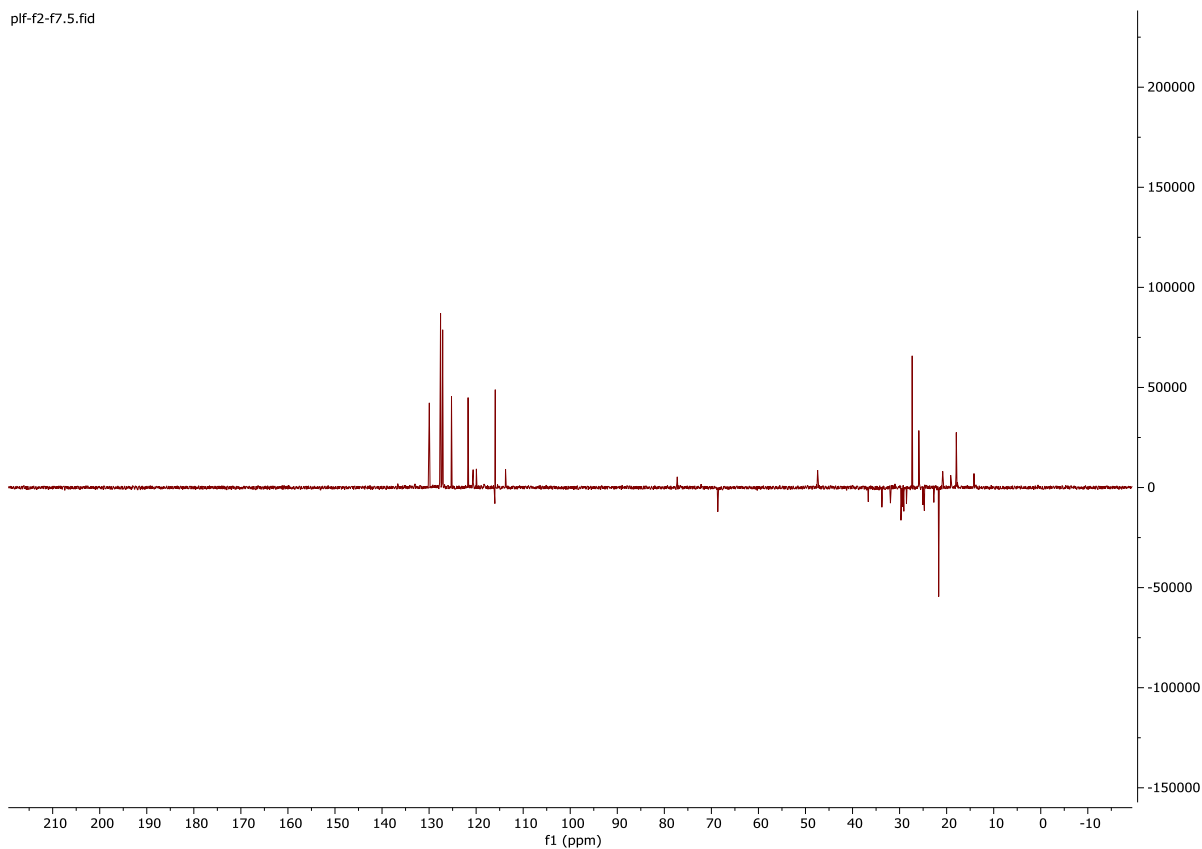


Figura A.29. Espectro ^{13}C DEPT 135.

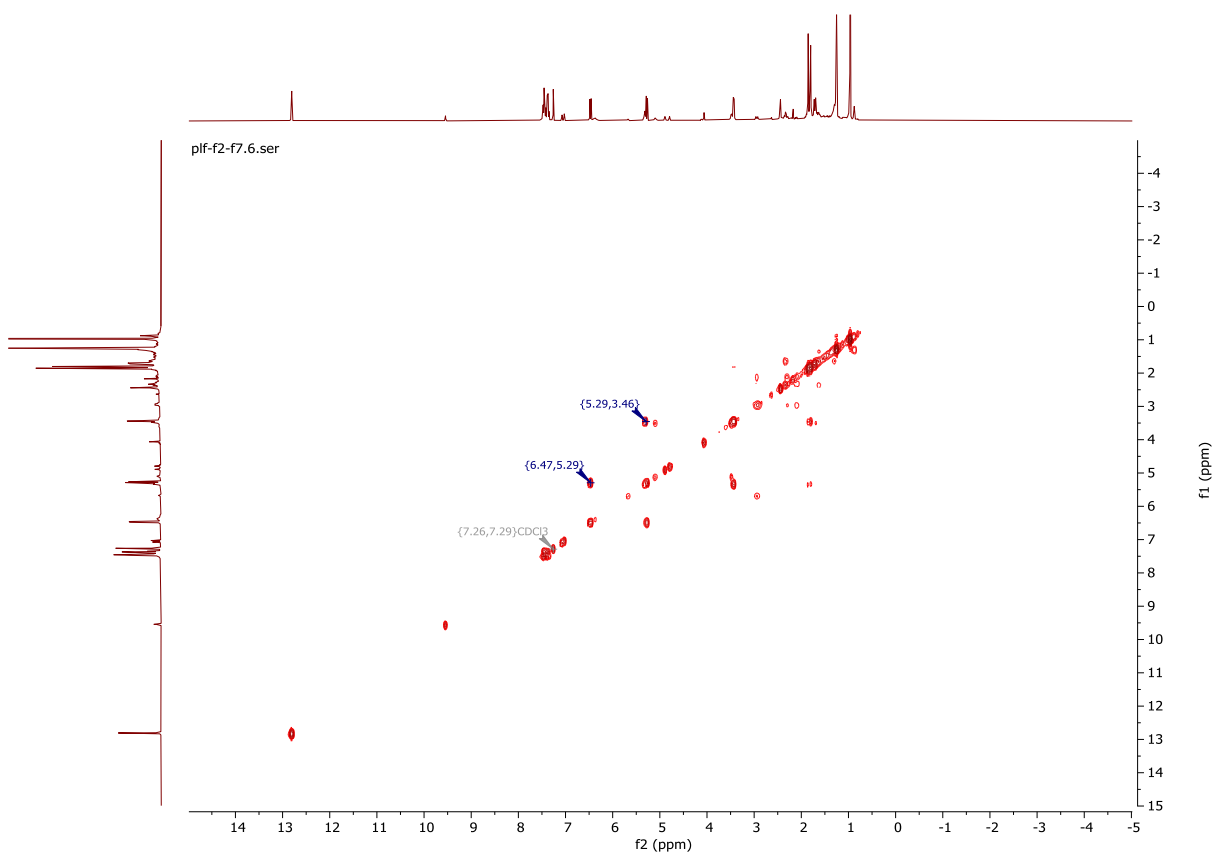


Figura A.30. Espectro ^1H COSY.

Composto 6

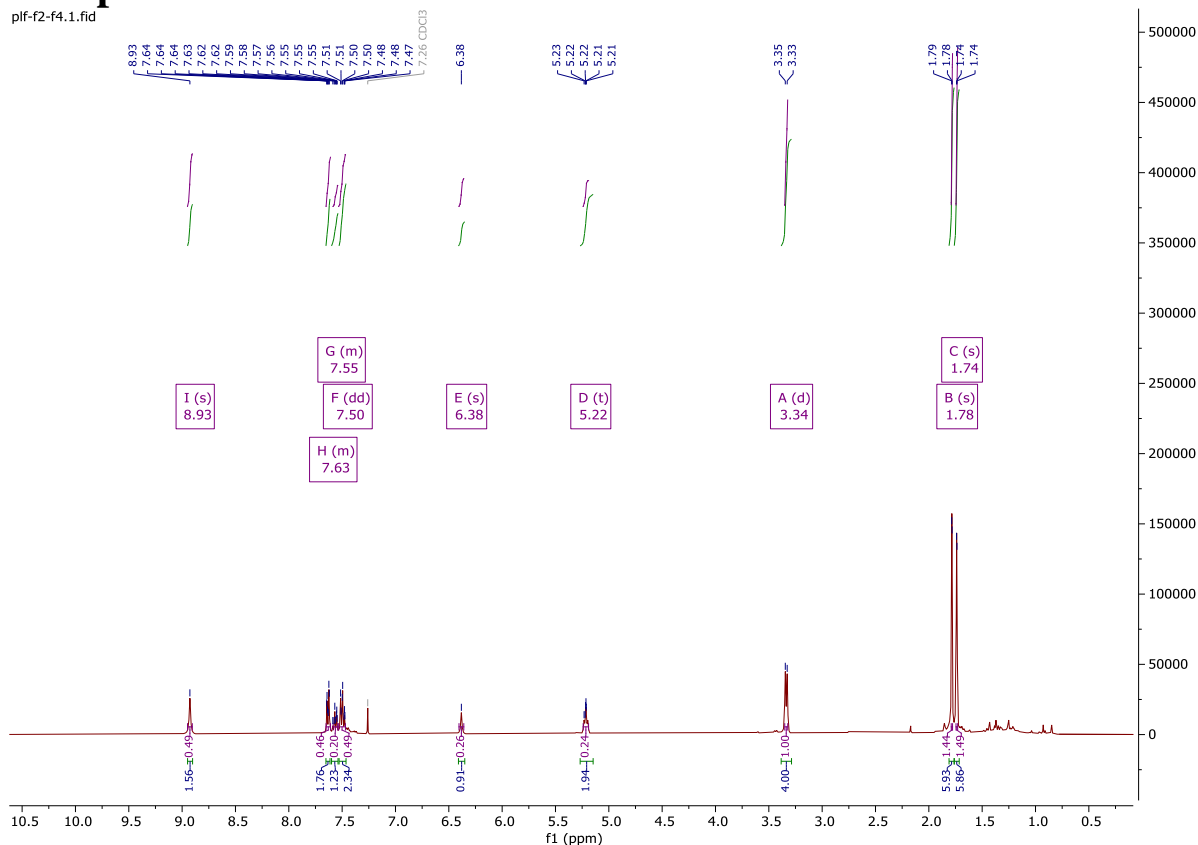


Figura A.31. Espectro de RMN de ¹H.

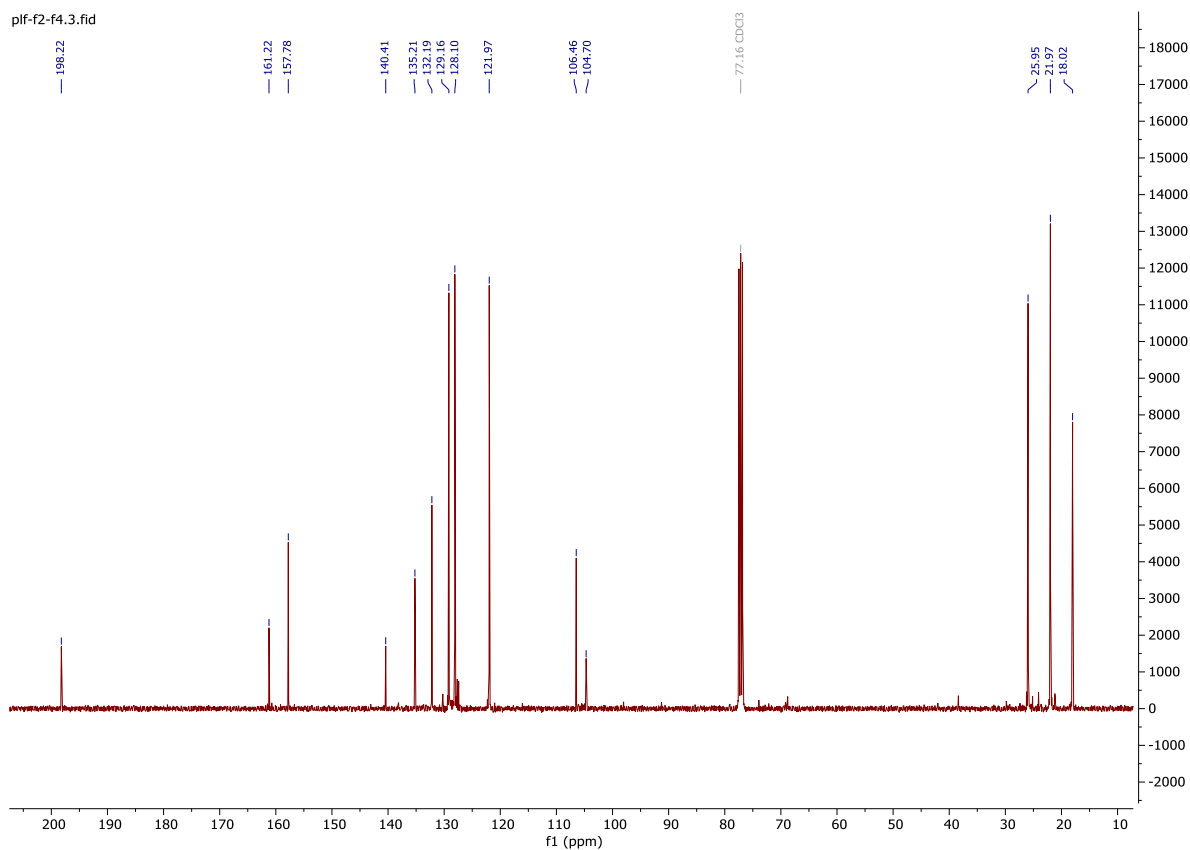


Figura A.32. Espectro de RMN de ¹³C.

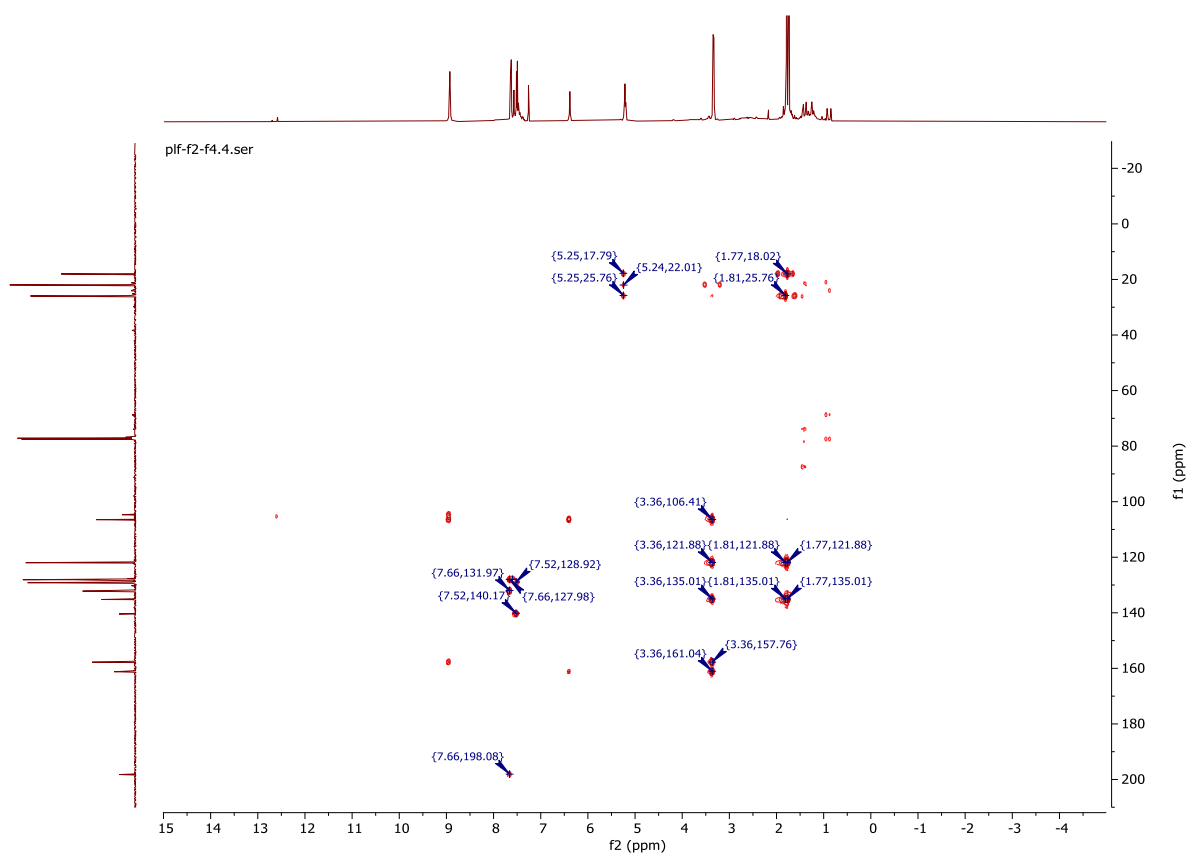


Figura A.33. Espectro bidimensional de HMBC.

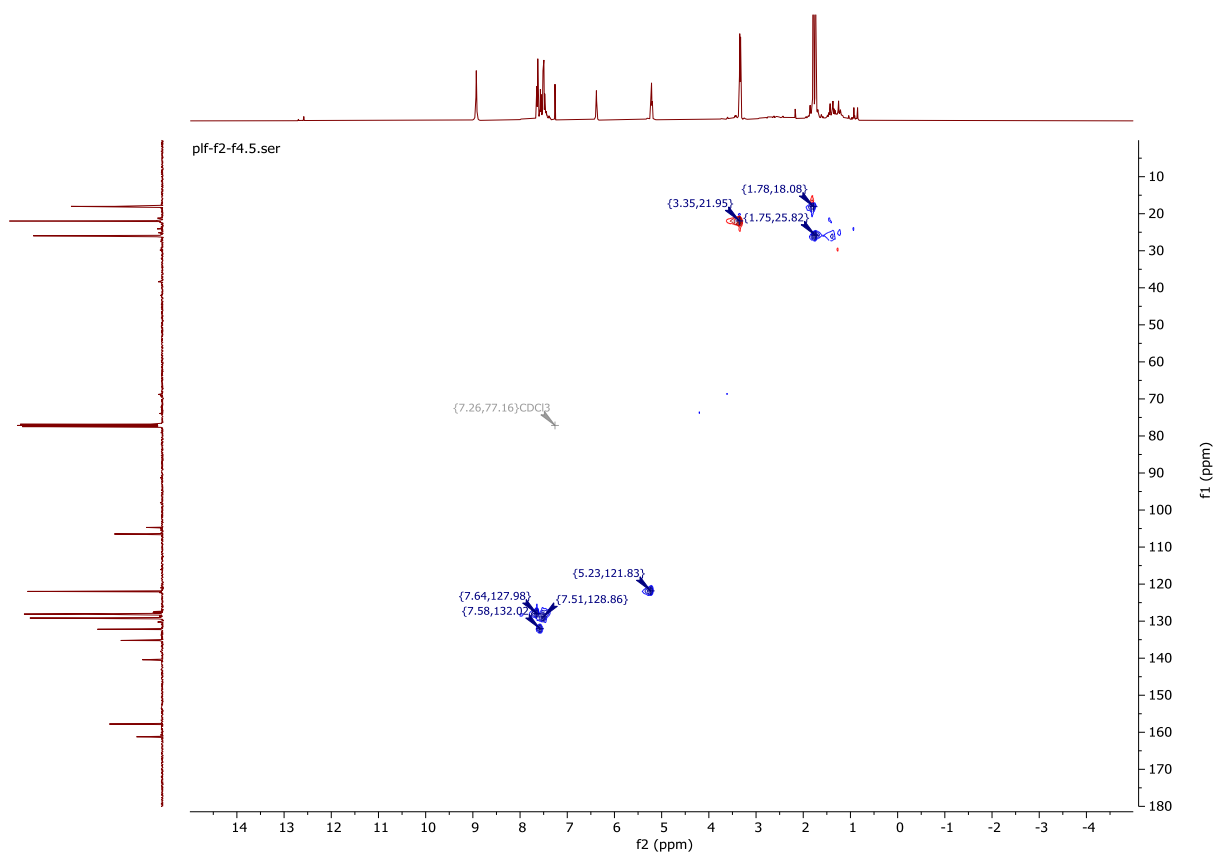


Figura A.34. Espectro bidimensional de HSQC.

plf-f2-f4.7.fid

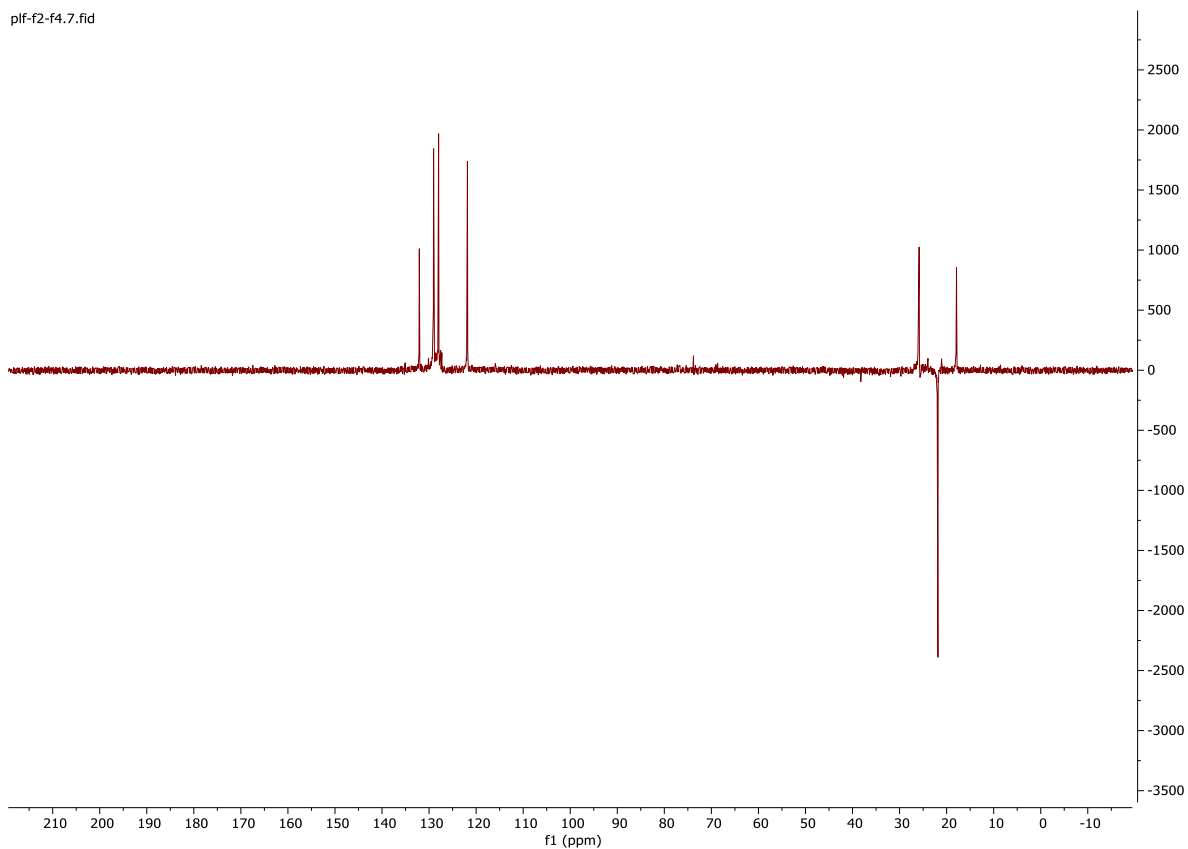


Figura A.35. Espectro ^{13}C DEPT 135.

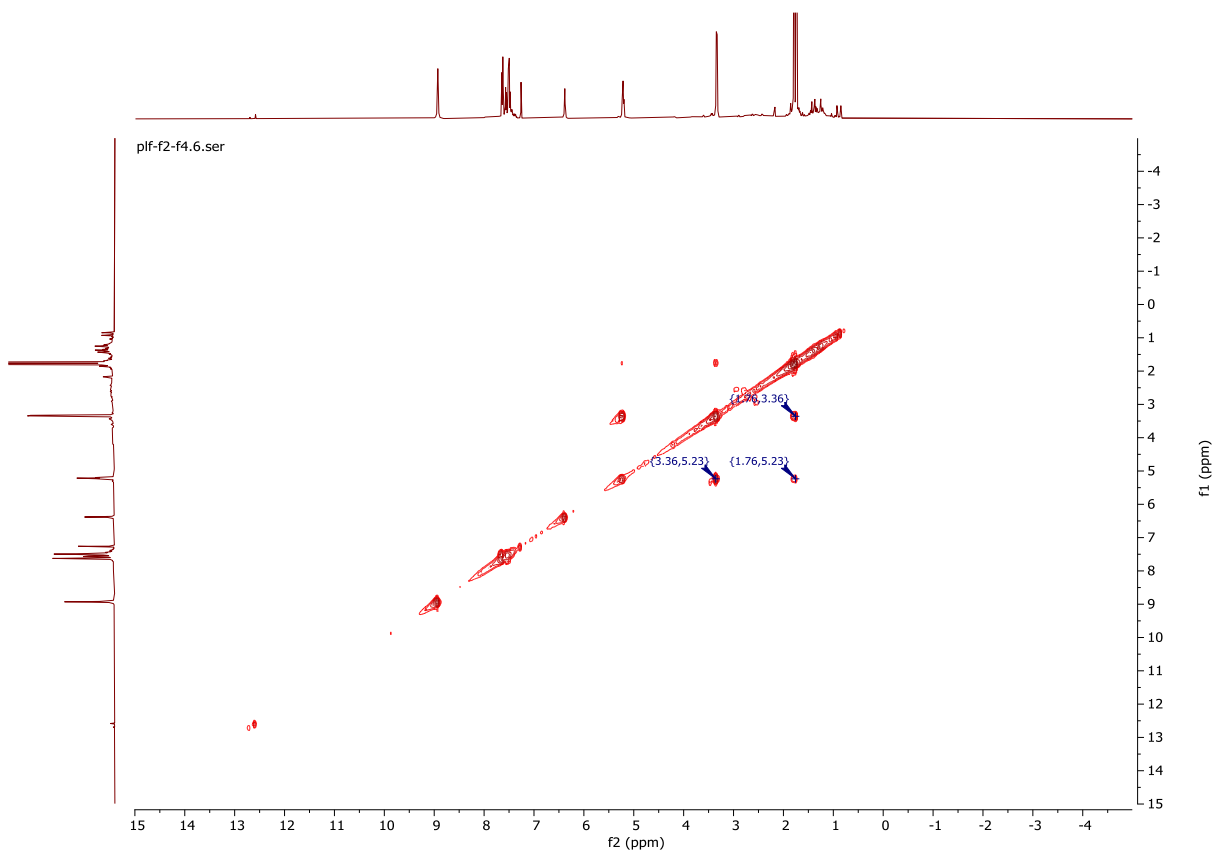


Figura A.36. Espectro ^1H COSY.

Composto 7

plf-03-02.1.fid

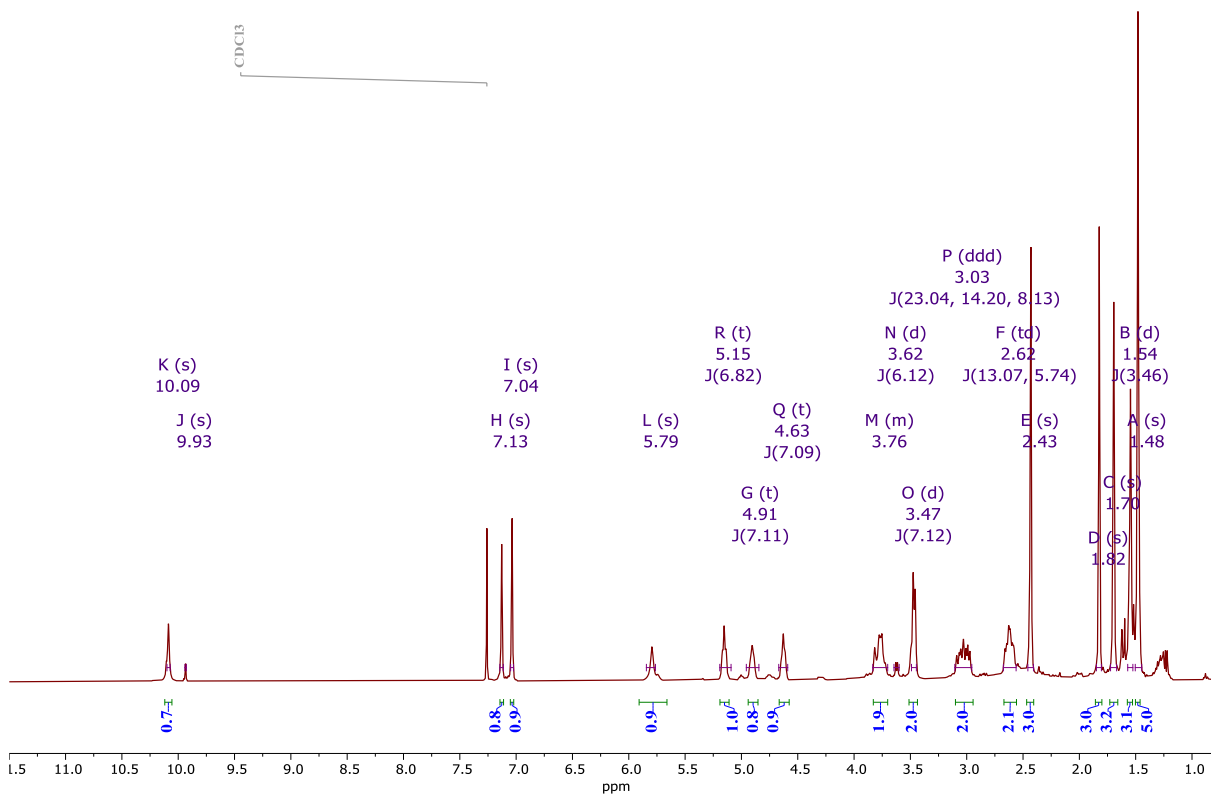


Figura A.37. Espectro de RMN de ¹H.

plf-03-02.2.fid

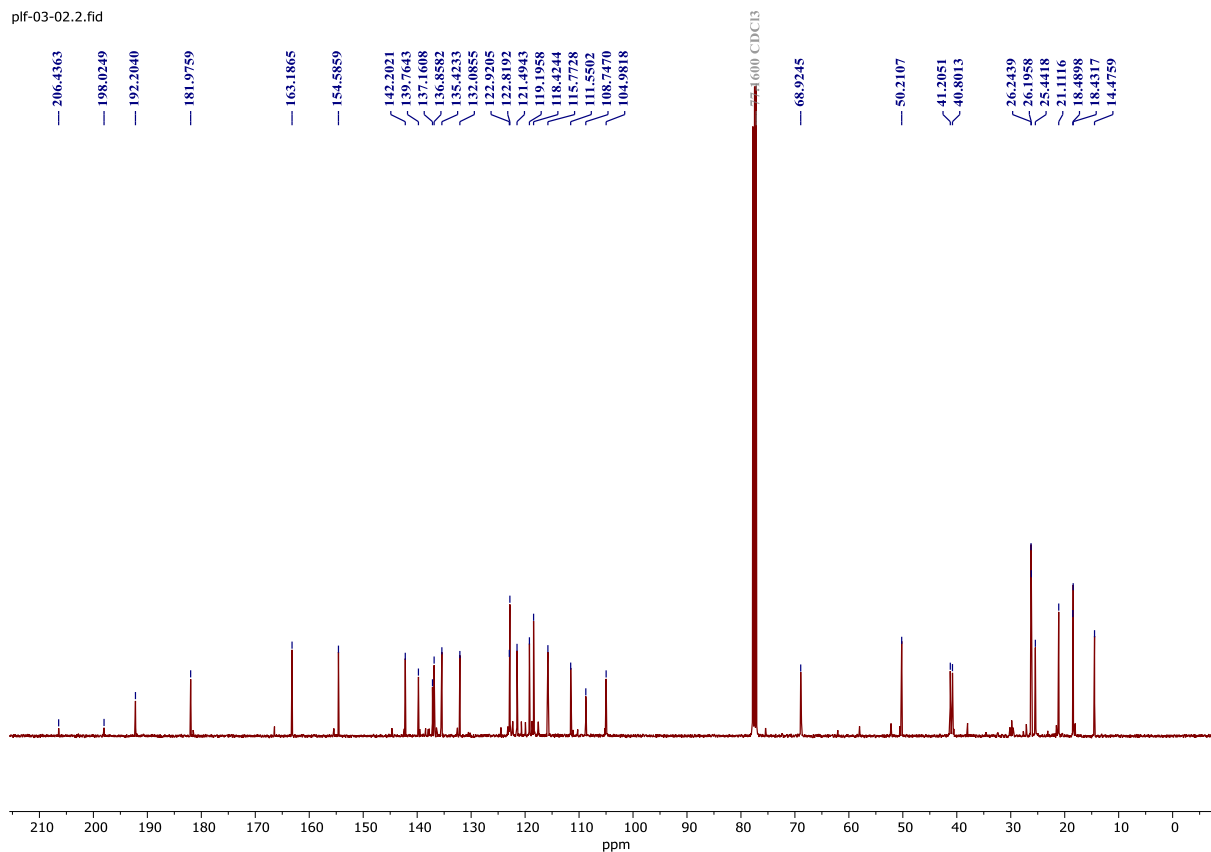


Figura A.38. Espectro de RMN de ¹³C.

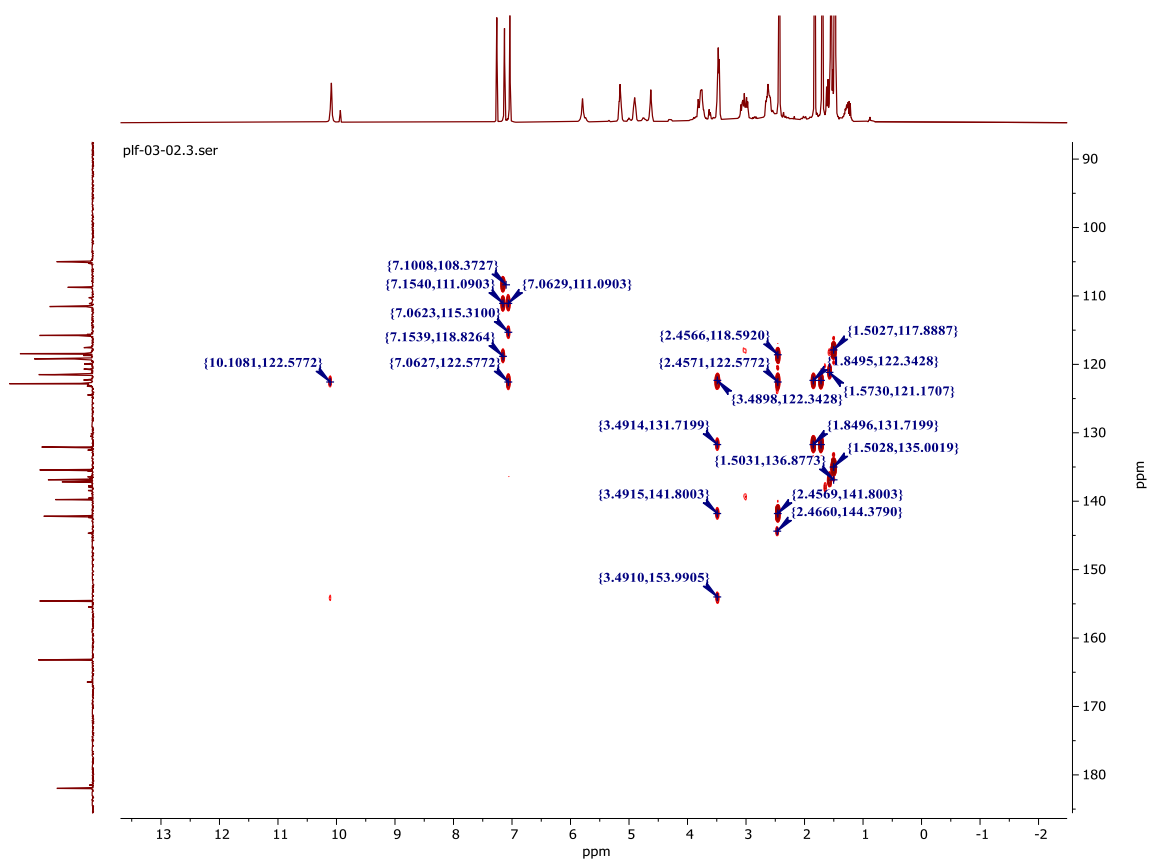


Figura A.39. Espectro bidimensional de HMBC.

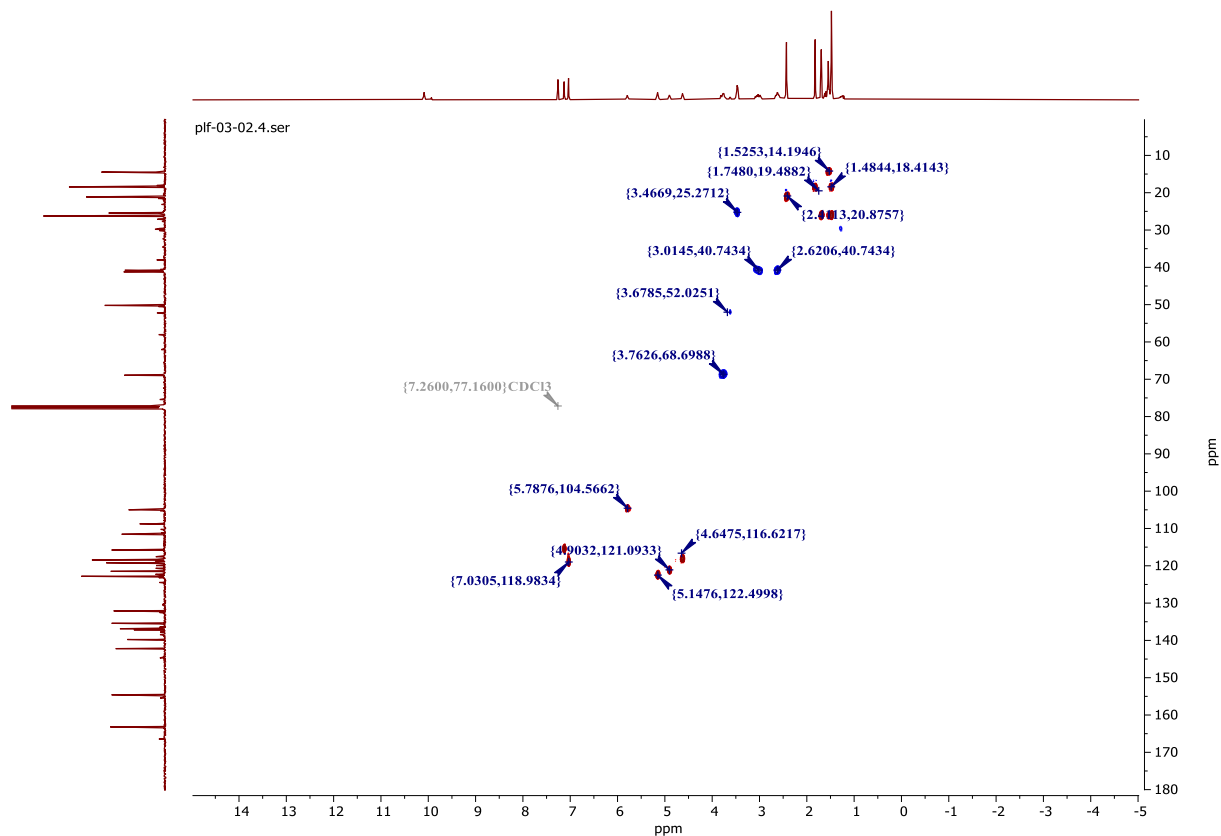


Figura A.40. Espectro bidimensional de HSQC.

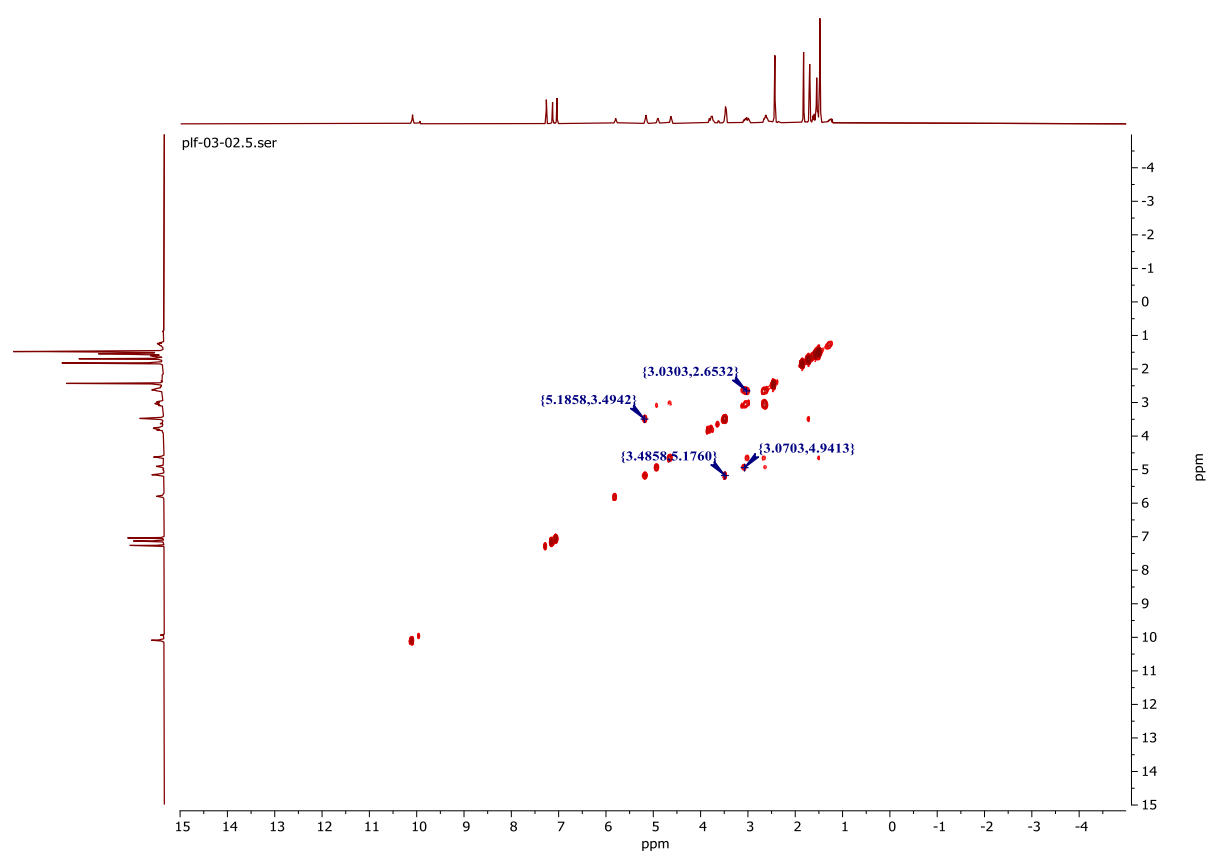


Figura A.41. Espectro ^1H COSY.

D. ANÁLISE POR HPLC-QTOF-MS/MS

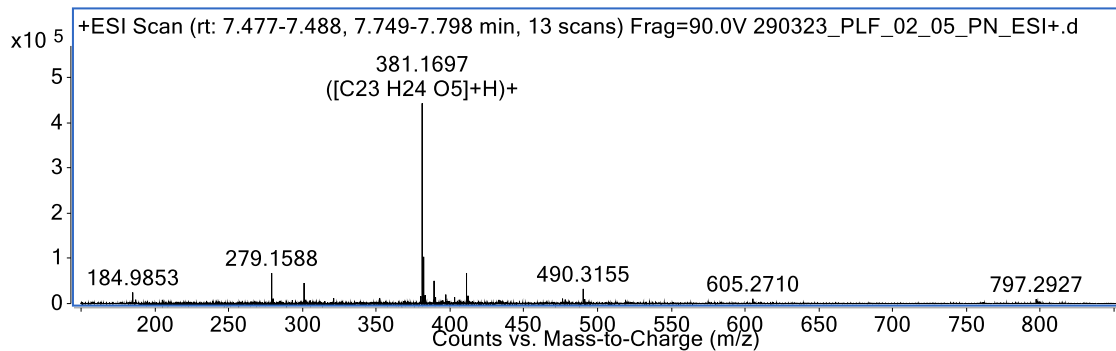


Figura B.1 - Espectro de massas da amostra Vismia guianensis 1.

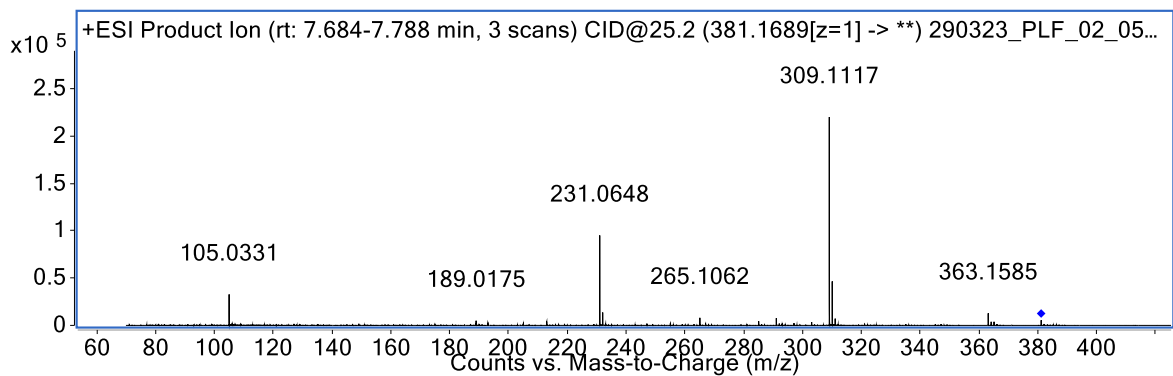


Figura B.2 - Espectro de massas/massas do íon m/z 381,16 Vismia guianensis 1.

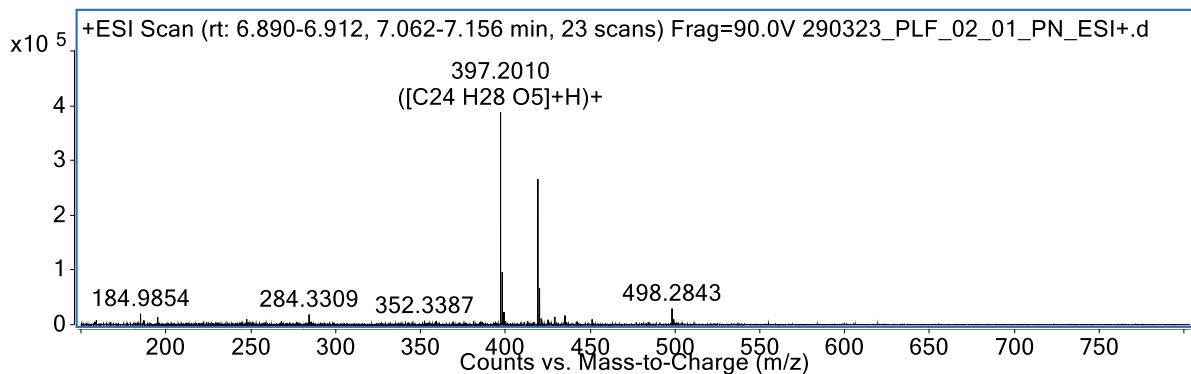


Figura B.3 - Espectro de massas da amostra Vismia guianensis 2.

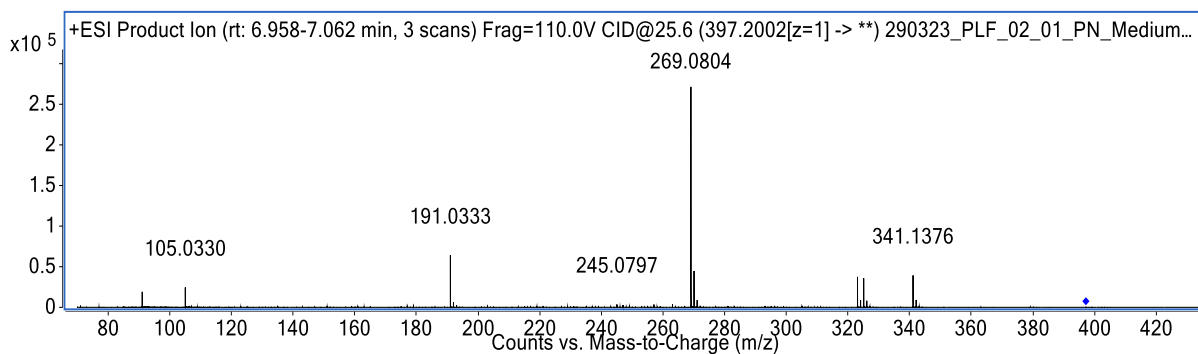


Figura B.4 - Espectro de MS/MS do íon m/z 397,20 - Vismiaguienona 2.

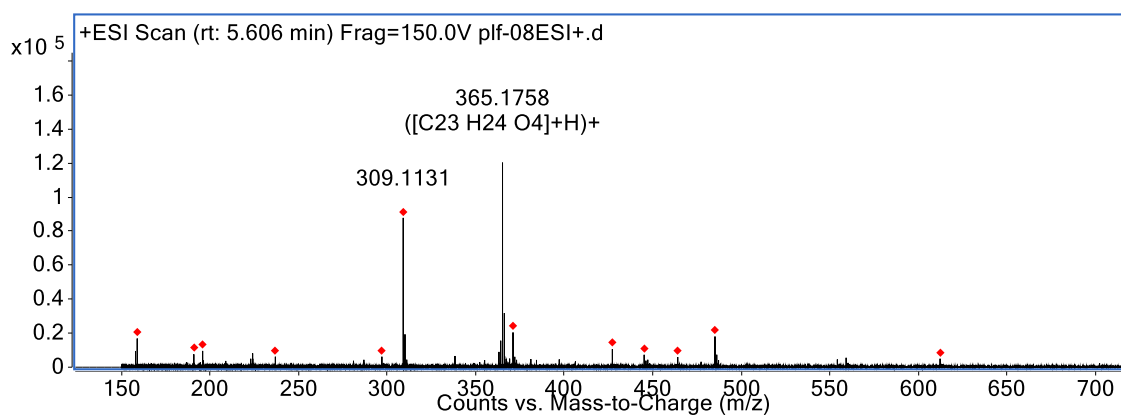


Figura B.5- Espectro de MS da amostra Vismiaguienona 3.

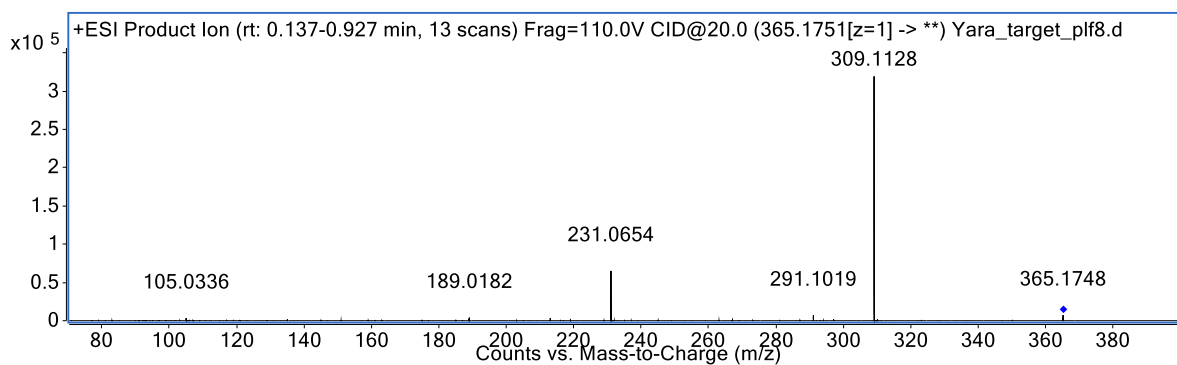


Figura B.6 - Espectro de MS/MS do íon m/z 365,17- Vismiaguienona 3.

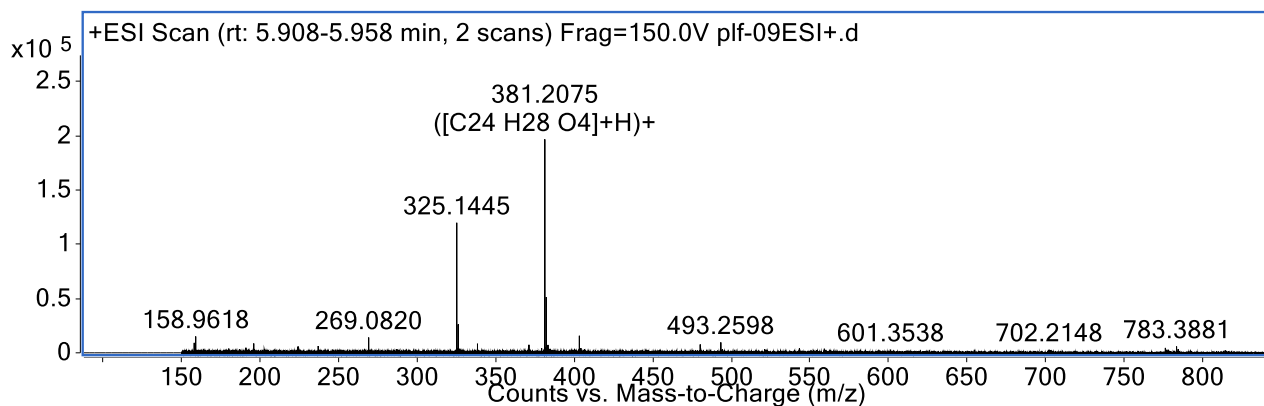


Figura B.7 - Espectro de MS da amostra Vismiaguienona 4.

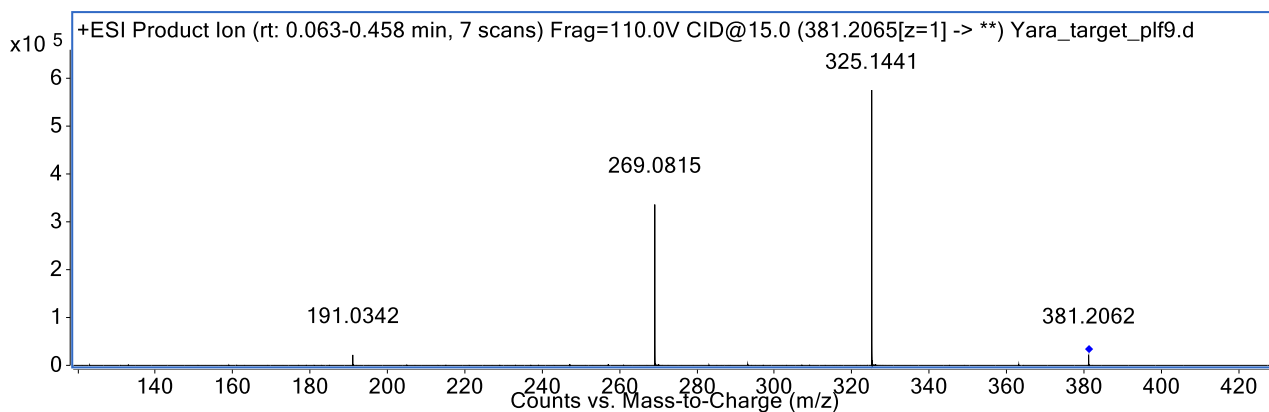


Figura B.8- Espectro de MS/MS do íon m/z 381,20 - Vismiaguienona 4.

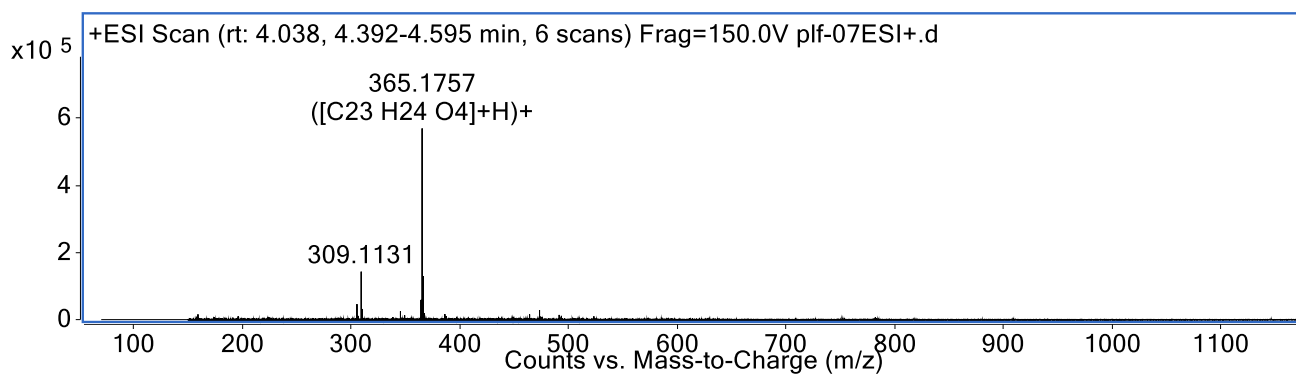


Figura B.9 - Espectro de MS da amostra Vismiaguienona 5.

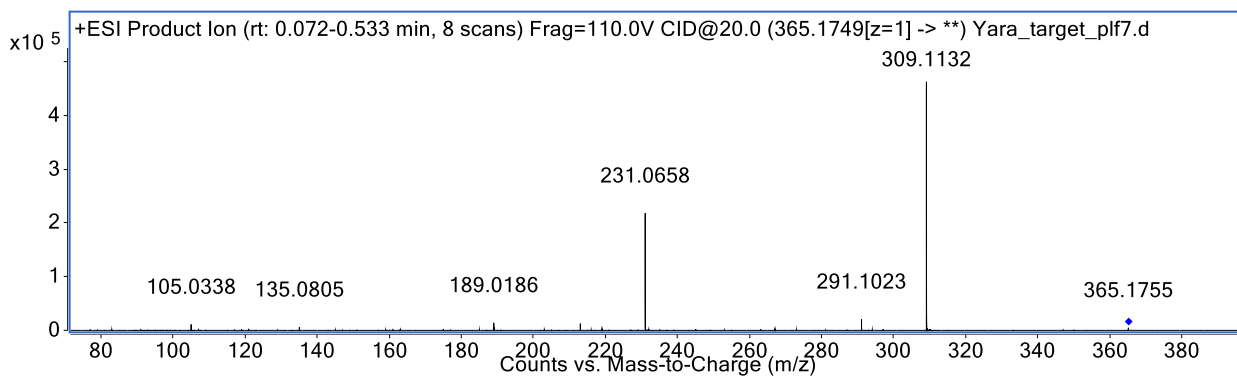


Figura B.10 - Espectro de MS/MS do íon m/z 365,17 - Vismiaguienona 5.

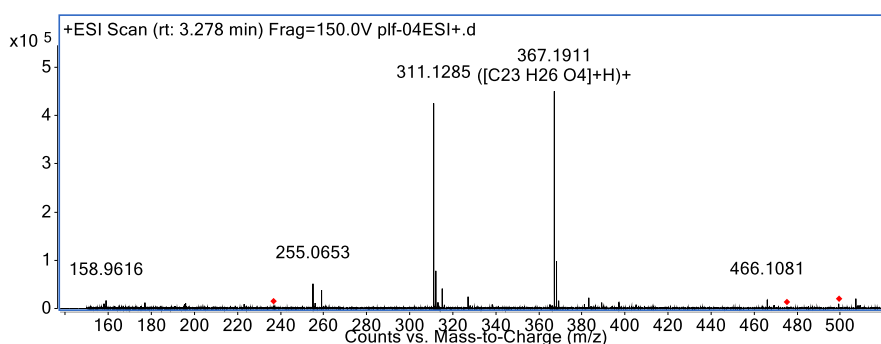


Figura B.11- Espectro de MS da amostra Vismiaguienona 6.

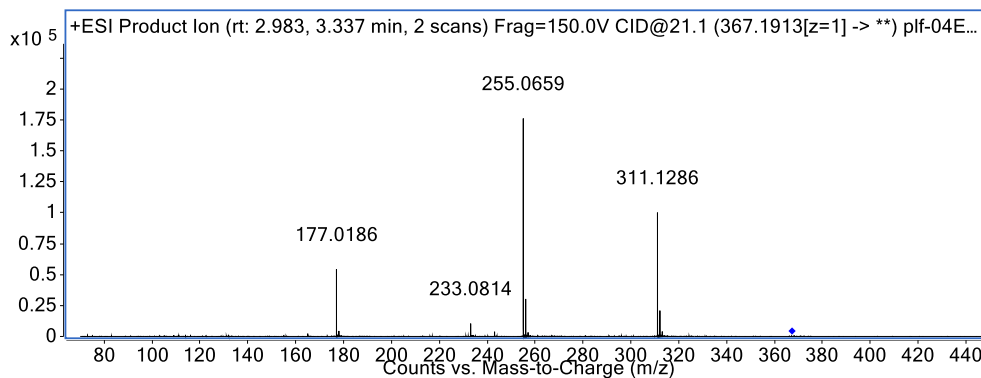


Figura B.12 - Espectro de MS/MS do íon m/z 367,19 - Vismiaguienona 6.

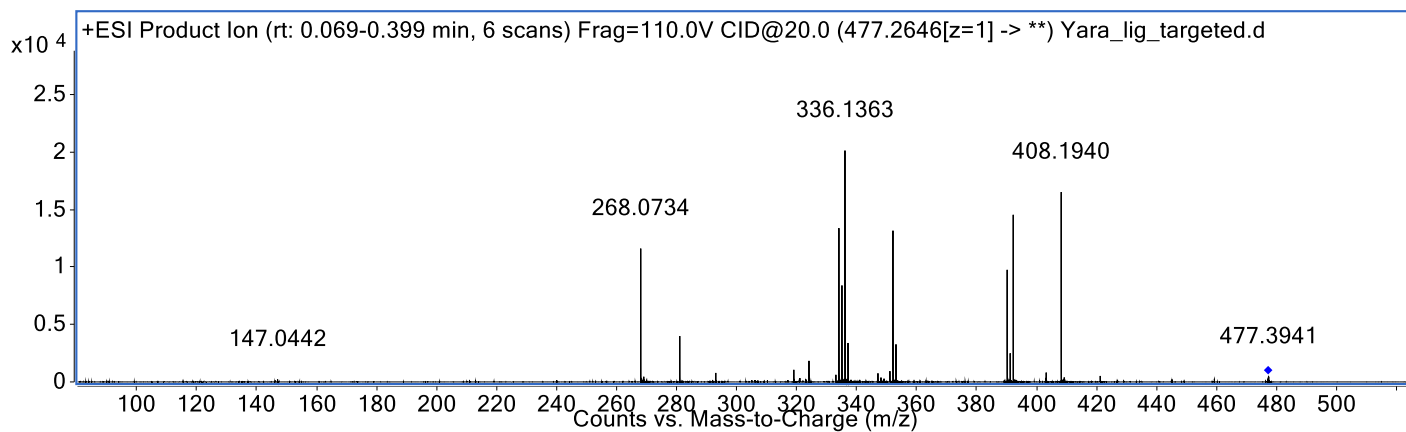


Figura B.13- Espectro de MS da amostra do Ferruginin.

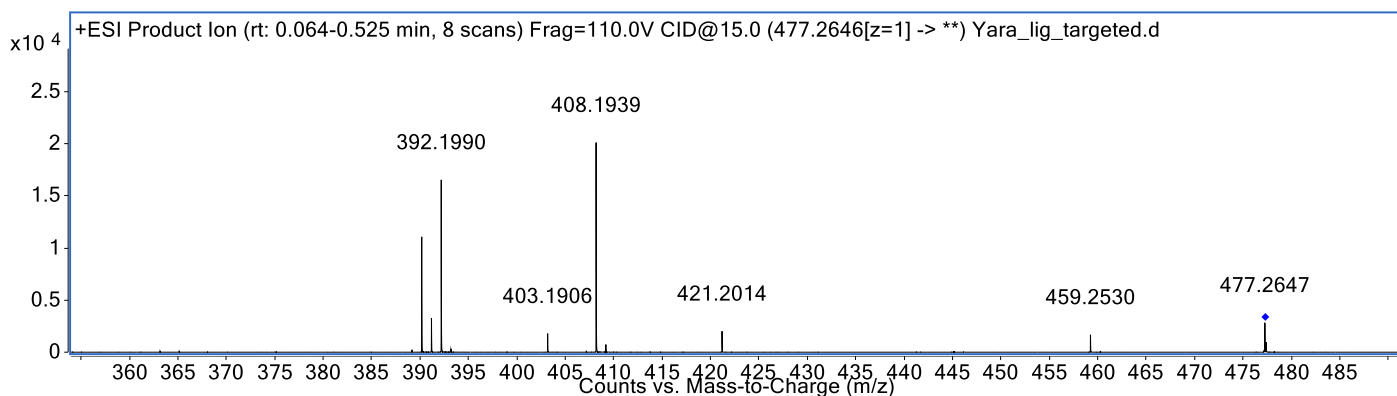


Figura B.14- Espectro de MS/MS do íon m/z 477,26- Ferruginin.

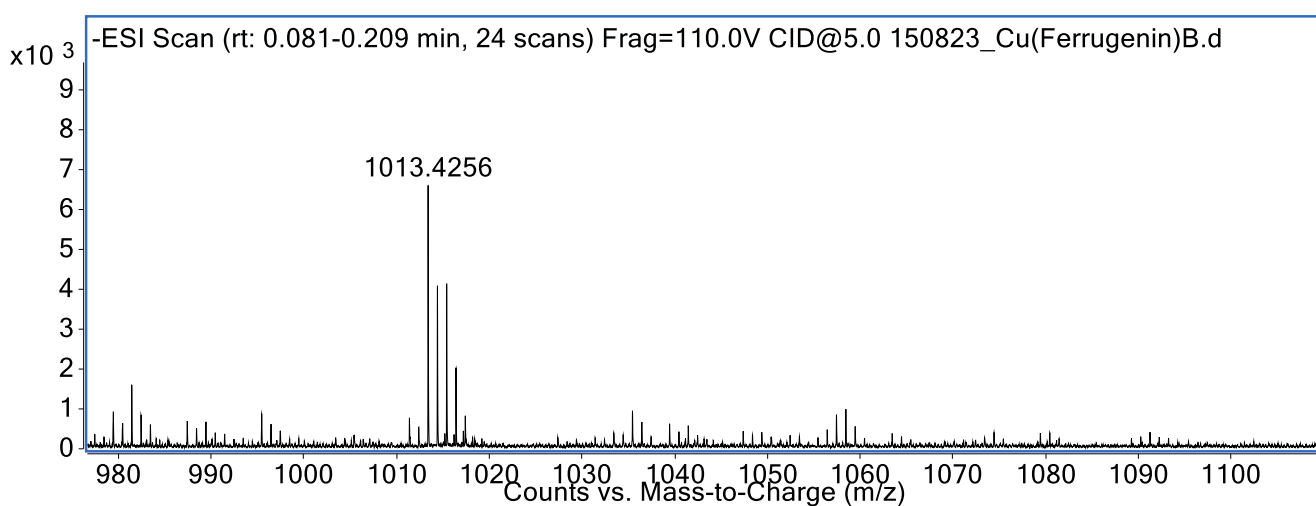


Figura B.15 - Espectro de MS do Cuf 1:2.

E. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

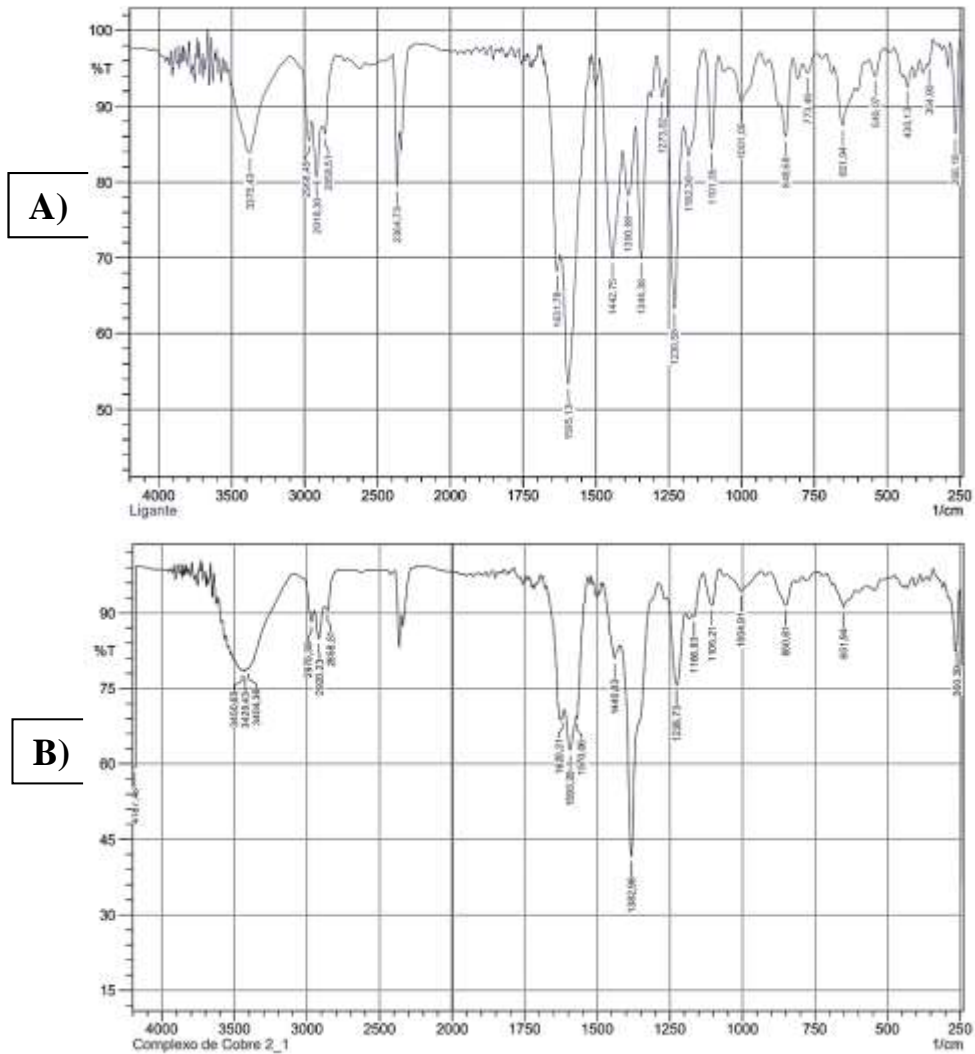


Figura C.1 - Espectros de absorção na região do infravermelho. **A)** Ligante, **B)** complexo [metal(antranoide)₂].