

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

Estudo Fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae),
Simarouba versicolor (Simaroubaceae) e Busca de um
Processo de Microencapsulação de Compostos Ativos,
Visando o Controle de Formigas Cortadeiras

Simone Yasue Simote*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
DOUTOR EM QUÍMICA, na área de
concentração QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

*bolsista FAPESP

SÃO CARLOS – SP

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S611ef

Simote, Simone Yasue.

Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae),
Simarouba versicolor (Simaroubaceae) e busca de um
processo de microencapsulação de compostos ativos
visando o controle de formigas cortadeiras / Simone Yasue
Simote. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

200 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2006.

1. Produtos naturais. 2. Formigas cortadeiras. 3. *Helietta
puberula*. 4. *Simarouba versicolor*. I. Título.

CDD: 5547.3 (20^a)

“A ciência no futuro terá que estar preparada para fornecer respostas para questões ligadas ao funcionamento da natureza, condição essencial para o futuro da vida no nosso planeta”

O. R. Gottlieb

Dedico este trabalho aos meus pais Ossamu e Toshie, aos meus irmãos Márcia e Gilberto e a minha sobrinha Bianca, que sempre me incentivaram em minha formação pessoal e profissional e por serem a alegria do meu viver...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, pela orientação e amizade

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. Paulo Cezar Vieira e Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos e colaboração

Às alunas Roberta N. A. Almeida, Maria Fernanda Gomes Villalba Penãflor e Cinthia Zavan do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Rio Claro – SP, pela realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras

Aos professores Dr. Odair Corrêa Bueno, Dr. Fernando Carlos Pagnocca e Dr. Maurício Bacci Junior do CEIS, pela colaboração

Aos amigos e professores dos laboratórios de Síntese, de HPLC, de RMN e da Inorgânica, pela ajuda, amizade e companheirismo

Aos professores Dr. Edson Leite e Dr. Orlando Fatibello pela colaboração na realização dos experimentos relacionados às microcápsulas

Aos professores, secretárias, amigos e funcionários do DQ/UFSCar, pelos ensinamentos, convivência e amizade

Aos amigos da Turma de Química 98 da UFSCar pela amizade

Ao Sebastião, pelo carinho, companheirismo, atenção e paciência

Aos amigos conquistados no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, desde novembro de 1999 a junho de 2006, obrigada pelos ensinamentos, brincadeiras, brigas, companheirismo, amizade... Enfim, por tudo... Impossível nomeá-los sem cometer falhas...

Aos meus pais, Ossamu e Toshie, que sempre incentivaram seus filhos a estudarem, mas respeitaram a decisão de cada um deles em traçar seus próprios caminhos...

Aos meus irmãos, Márcia e Gilberto e ao meu cunhado Milton pelo carinho, apoio e incentivo

À minha sobrinha Bianca, por me fazer sentir criança a cada encontro...

À FAPESP, pela bolsa concedida

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e tornaram minha vida em São Carlos sempre alegre

MUITO OBRIGADA

Resumo

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Helietta puberula* (RUTACEAE), *Simarouba versicolor* (SIMAROUBACEAE) E BUSCA DE UM PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS, VISANDO O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS – Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico de duas plantas: *Helietta puberula* (Rutaceae) e *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae), biomonitorado através de ensaios em três modelos biológicos: formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*), seu fungo simbionte (*Leucoagaricus gongylophorus*) e enzimas pectinases. Os ensaios biológicos de extratos e frações mostraram que as plantas selecionadas são promissoras no controle de formigas cortadeiras. O estudo fitoquímico dos extratos e frações ativas levou a identificação de 34 substâncias de diferentes classes: esteróides (sitosterol, estigmasterol, sitostenona, estigmastenona, campestenona e 3 β -O-3 β -D-glucopiranosil sitosterol); triterpenos do tipo tirucalano (22*S*,3 α -diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona); esqualeno (eurileno) e lupânico (lupeol e lupenona); alcalóides do tipo quinolônico (N-metil-4-metóxi-2-quinolona, furoquinolínicos (dictamina, γ -fagarina, kokusaginina, maculina, flindersiamina), acridônico (arborinina); cantinônicos (4,5-dimetóxicantin-6-ona e 5-metóxicantin-6-ona) e do tipo β -carbonílicos (7-hidroxi-1-etil β -carbolina e 7-hidroxi-1,1'-propionato de metila β -carbolina); flavonóides (flavona, isosakuranetina e da 5,7,3',4',5'-pentametóxi-flavona) e do estilbeno; de cumarinas (7-hidroxicumarina, 6,7-dimetóxicumarina, 6-hidroxi-7,8-dimetóxicumarina, 3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina, metileter-graveliferona); quassinóides (glaucarubolona e glaucarubinona) e de dois derivados do ácido cinâmico (3,4,5-trimetoxicinamato de metila e 3,4-dimetoxicinamato de geranila). Dentre essas substâncias, os alcalóides do tipo furoquinolínicos e cantinônicos, a flavona e os quassinóides, apresentaram inibição de até 100% no crescimento do fungo *L. gongylophorus* e sobrevivência média de 7 dias num experimento de 23 dias nos ensaios com *A. sexdens rubropilosa*. O estudo da quitosana como matriz no processo de microencapsulação, visando a estabilidade do princípio ativo, a redução na toxicidade em mamíferos e proteção ao homem e ao meio ambiente, mostrou-se muito promissora, necessitando-se ainda um estudo mais aprofundado para redução no tamanho das cápsulas para futuramente vir a ser utilizada para microencapsulamento de substâncias ativas.

Abstract

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *Helietta puberula* (RUTACEAE), *Simarouba versicolor* (SIMAROUBACEAE) AND SEARCH OF MICROENCAPSULATION TECHNICAL OF THE ACTIVES COMPOUNDS FOR THE CONTROL OF LEAF-CUTTING ANTS - This work involved the bioassay-guided study of *Helietta puberula* (Rutaceae) e *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae). The bioassays were carried out with leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa*, antifungal activity against the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and inhibition of the enzymatic activity of pectinases. The results obtained with extracts and fractions showed that the selected plants were promising source of compounds in the control against leaf-cutting ants. The phytochemical investigation of active extracts and fractions allowed the isolation of 31 compounds of differences types such as: steroids (β -sitosterol, stigmasterol, sitostenone, stigmastenone, campestenone and 3β -O- 3β -D-glucopyranosil sitosterol); triterpenes of the tirucalane type (22*S*,3 α -dihydroxytirucal-7,24-dien-23-one), squalene (eurilene) and lupanic (lupeol and lupenone); quinoline alkaloids (N-metil-4-methoxy-2-quinolone), furoquinolinic alkaloids (dictamine, γ -fagarine, kokusagine, maculine, flindersiamine), acridonic alkaloids (arborinine); canthinonic alkaloids (4,5-dimethoxycanthin-6-one and 5-methoxycanthin-6-one) and of the β -carboline types of alkaloids (7-hidroxy-ethyl β -carboline and 7-hidroxy-1,1'-propionate of methyl β -carboline); flavonoids (flavone, isosakuranetine and 5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone); one stilbene (**22**); coumarins (7-hidroxicoumarin, 6,7-dimethoxycoumarin, 6-hydroxy-7,8-dimethoxycoumarin, 3'-(1',1'-dimethylalyl)-isoescopoletin, methylether-graveliferone); quassinoids (glaucarubolone and glaucarubinone) and two cinnamic acids derivatives (methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate and geranyl 3,4-dimethoxycinnamate). Among these substances, furoquinoline and canthinonic alkaloids, flavone and the quassinoids were active against the *L. gongylophorus* fungus; inhibiting 100% of its growth and also showed inhibition against leaf-cutting ants survival bioassay. The study of chitosan as matrix on the microencapsulation process; to the encapsulation of the bioactive compound, reduction of the mammalian toxicity, protection Humans and also the environment; showed very promising results, but more study is necessary mainly to reduce the size of the particle

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ϕ	Diâmetro
δ	Deslocamento químico
h	Altura
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
acetona- <i>d</i> ₆	Acetona deuterada
AcO ⁻	Acetato
AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
CRV	Cromatografia rápida sob vácuo
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<i>dl</i>	Dubleto largo
DL ₅₀	Dose Letal
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>dt</i>	Duplo-tripleto
ESI	Electrospray
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz

IV	Infravermelho
Lit.	Dados da literatura
<i>m</i>	Multiplete
Me	Metila
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
MHz	Mega hertz
MS	Mass spectrometry
OMe	Metoxila
p.	Página
P.F.	Ponto de fusão
PENDANT	<i>Polarization Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing</i>
Pyr- <i>d</i> ₅	Piridina deuterada
<i>qq</i>	Quadroquaduplete
QTS	Quitosana
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
S ₅₀	Sobrevivência mediana
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	Tripleto largo
TMS	Tetrametil-silano
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA	3.1 –	Dados de coleta de <i>Simarouba versicolor</i> e <i>Helietta puberula</i>	17
TABELA	3.2 –	Extratos obtidos.....	19
TABELA	3.3 –	Frações dos extratos metanólicos.....	21
TABELA	4.1 –	Dados de RMN ¹ H de 2 (200 MHz, CDCl ₃).....	57
TABELA	4.2 –	Dados de RMN ¹ H e de RMN ¹³ C de 4	66
TABELA	4.3 –	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do triterpeno 5	69
TABELA	4.4 –	Dados de RMN ¹³ C dos triterpenos 6 e 7	75
TABELA	4.5 –	Dados de RMN ¹ H de 8	80
TABELA	4.6 –	Dados de RMN ¹³ C dos alcalóides 9 – 13	88
TABELA	4.7 –	Dados de RMN ¹ H dos alcalóides 9 – 13	89
TABELA	4.8 –	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do alcalóide 14	91
TABELA	4.9 –	Dados de RMN ¹ H dos alcalóides 15 e 16	99
TABELA	4.10 –	Dados de RMN ¹³ C de 15 e 16	100
TABELA	4.11 –	Correlações ¹ H – ¹³ C de 15 e 16 a J^2 e J^3 observadas no experimento de HMBC (400MHz, CDCl ₃).....	100
TABELA	4.12 –	Dados de RMN ¹ H de 17 e 18	107
TABELA	4.13 –	Correlações ¹ H- ¹ H de 18 observadas nos experimentos de COSY (400 MHz, CDCl ₃).....	107
TABELA	4.14 –	Correlações ¹ H – ¹³ C a J^1 , J^2 e J^3 de 18 observadas no experimento de HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl ₃).....	108
TABELA	4.15 –	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C das flavanonas 19 e 20	116
TABELA	4.16 –	Dados de HSQC e HMBC para a flavanona 20	117
TABELA	4.17 –	Dados de RMN ¹ H da flavona 21	119
TABELA	4.18 –	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de 22	127

TABELA	4.19 –	Dados de HMBC J^2 , J^3 e J^4 de 22	127
TABELA	4.20 –	Dados de RMN ¹ H das cumarinas 23-25	134
TABELA	4.21 –	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C das cumarinas 26 e 27	145
TABELA	4.22 –	Dados de HSQC e HMBC para as cumarinas 26 e 27	145
TABELA	4.23 –	Dados de RMN ¹ H de 28	153
TABELA	4.24 –	Dados de RMN ¹³ C de 28	153
TABELA	4.25 –	Dados de COSY ¹ H- ¹ H de 28	154
TABELA	4.26 –	Correlações de ¹ H – ¹³ C a J^l de 28 observadas no experimento de HSQC.....	154
TABELA	4.27 –	Correlações de ¹ H – ¹³ C a J^2 , J^3 e J^4 de 28 observadas no experimento de HSQC.....	155
TABELA	4.28 –	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 29	161
TABELA	4.29 –	Correlações ¹ H – ¹³ C de 29 observadas no experimento de HSQC.....	162
TABELA	4.30 –	Correlações ¹ H – ¹³ C com J^2 e J^3 de 29 observadas no experimento de HMBC.....	163
TABELA	4.31 –	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de 30	169
TABELA	4.32 –	Dados de RMN ¹ H de 31	171
TABELA	5.1 –	Efeito dos extratos de <i>S. versicolor</i> e <i>H. puberula</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta</i> <i>sexdens rubropilosa</i>	180
TABELA	5.2 –	Efeito das partições obtidas dos extratos metanólicos de <i>H. puberula</i> e <i>S. versicolor</i> nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras.....	184
TABELA	5.3 –	Efeito das partições obtidas dos extratos metanólicos de <i>H. puberula</i> e <i>S. versicolor</i> sobre o fungo simbiote.....	187
TABELA	5.4 –	Efeito dos extratos brutos de <i>S. versicolor</i> e <i>H.</i>	

		<i>puberula</i> sobre a atividade de pectinase.....	188
TABELA	5.5 –	Atividade das partições obtidas dos extratos metanólicos de <i>H. puberula</i> e <i>S. versicolor</i> sobre a enzima pectinase.....	189
TABELA	5.6 –	Efeito das substâncias puras nos ensaios por ingestão utilizando-se formigas cortadeiras, nos ensaios com o fungo simbiote e com as enzimas pectinases.....	191

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA	4.1 –	Proposta de Fragmentação do β -sitosterol.....	54
ESQUEMA	4.2 –	Proposta biogenética para a formação do triterpeno 5	76
ESQUEMA	4.3 –	Proposta biogenética para a formação dos triterpenos 4, 6 e 7	77
ESQUEMA	4.4 –	Proposta de fragmentação para o alcalóide 17 (ES+).....	104
ESQUEMA	4.5 –	Proposta biogenética para a formação do alcalóide 14	109
ESQUEMA	4.6 –	Proposta biogenética para a formação dos alcalóides 8 a 13	109
ESQUEMA	4.7 –	Proposta biogenética para a formação dos alcalóides 15 ao 18	110
ESQUEMA	4.8 –	Proposta biogenética para a formação dos flavonóides 19 – 21	126
ESQUEMA	4.9 –	Proposta de fragmentação para a cumarina 23	133
ESQUEMA	4.10 –	Proposta de fragmentação para a cumarina 24	133
ESQUEMA	4.11 –	Proposta de fragmentação para a cumarina 25	134
ESQUEMA	4.12 –	Proposta de fragmentação para a cumarina 26	139
ESQUEMA	4.13 –	Proposta de fragmentação para a cumarina 27	144
ESQUEMA	4.14 –	Proposta biogenética para as cumarinas 23-27	146
ESQUEMA	4.15 –	Proposta de fragmentação para o quassinóide 29 .	164
ESQUEMA	4.16 –	Proposta biogenética para os quassinóides 28 e 29	165
ESQUEMA	4.17 –	Proposta biogenética para formação do anel A dos quassinóides 28 e 29	166
ESQUEMA	4.18 –	Proposta biogenética para as substâncias 30 e 31	170

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1.1 – Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo <i>L. gongylophorus</i>	2
FIGURA	1.2 – Estrutura da quitina.....	6
FIGURA	1.3 – Estrutura da quitosana.....	6
FIGURA	1.4 – Reticulação da quitosana com glutaraldeído.....	8
FIGURA	1.5 – Substâncias isoladas de <i>Simarouba versicolor</i>	10
FIGURA	1.6 – Substâncias isoladas de <i>Helietta puberula</i>	12
FIGURA	4.1 – Espectro de RMN ¹ H da mistura 1A + 1B (CDCl ₃ , 200MHz).....	53
FIGURA	4.2 – Espectro de massas da mistura 1A e 1B (EIS = 70 e.V).....	54
FIGURA	4.3 – Espectro de RMN ¹ H de 2 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	56
FIGURA	4.4 – Espectro de RMN ¹³ C de 2 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	57
FIGURA	4.5 – Espectros de massas de 2A , 2B e 2C (ESI = 70 eV)..	58
FIGURA	4.6 – Espectro de RMN ¹ H de 3 (Pyr-d ₅ , 200 MHz).....	59
FIGURA	4.7 – Espectro de RMN ¹³ C de 3 (Pyr-d ₅ , 50 MHz).....	59
FIGURA	4.8 – Espectro de RMN ¹ H de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	62
FIGURA	4.9 – Espectro de RMN ¹³ C de 4 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	63
FIGURA	4.10 – Ampliação do Mapa de contorno de HMBC de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	63
FIGURA	4.11 – Ampliação do espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	64
FIGURA	4.12 – Mapa de contorno de HSQC de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	64
FIGURA	4.13 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	65
FIGURA	4.14 – Mapa de contorno de HMBC de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	65

FIGURA	4.15 – Espectro de RMN ¹ H do triterpeno 5 (CDCl ₃ , 200MHz).....	68
FIGURA	4.16 – Espectro de RMN ¹³ C do triterpeno 5 (CDCl ₃ , 50MHz).....	68
FIGURA	4.17 – Espectro de RMN ¹ H do triterpeno 6 (CDCl ₃ , 200MHz).....	71
FIGURA	4.18 – Espectro de RMN ¹ H do triterpeno 7 (CDCl ₃ , 200MHz).....	72
FIGURA	4.19 – Espectro de RMN ¹³ C do triterpeno 6 (CDCl ₃ , 50MHz).....	72
FIGURA	4.20 – Espectro de PENDANT do triterpeno 6 (CDCl ₃ , 200MHz).....	73
FIGURA	4.21 – Espectro de RMN ¹³ C do triterpeno 7 (CDCl ₃ , 50MHz).....	73
FIGURA	4.22 – Espectro de DEPT 135° do triterpeno 7 (CDCl ₃ , 200MHz).....	74
FIGURA	4.23 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 8 (CDCl ₃ , 200MHz).....	79
FIGURA	4.24 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 8 (CDCl ₃ , 50MHz).....	79
FIGURA	4.25 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 9 (CDCl ₃ , 200MHz).....	83
FIGURA	4.26 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 9 (CDCl ₃ , 50MHz).....	84
FIGURA	4.27 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 10 (CDCl ₃ , 200MHz).....	84
FIGURA	4.28 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 10 (CDCl ₃ , 50MHz).....	85
FIGURA	4.29 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 11 (CDCl ₃ ,	

	200MHz).....	85
FIGURA	4.30 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 11 (CDCl ₃ , 50MHz).....	86
FIGURA	4.31 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 12 (CDCl ₃ , 200MHz).....	86
FIGURA	4.32 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 12 (CDCl ₃ , 50MHz).....	87
FIGURA	4.33 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 13 (CDCl ₃ , 200MHz).....	87
FIGURA	4.34 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 13 (CDCl ₃ , 50MHz).....	88
FIGURA	4.35 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 14 (CDCl ₃ , 200MHz).....	90
FIGURA	4.36 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 14 (CDCl ₃ , 50MHz).....	91
FIGURA	4.37 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 15 (CDCl ₃ , 400MHz).....	94
FIGURA	4.38 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 16 (CDCl ₃ , 400MHz).....	95
FIGURA	4.39 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 15 (CDCl ₃ , 400MHz)..	95
FIGURA	4.40 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 16 (CDCl ₃ , 400MHz)..	96
FIGURA	4.41 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 15 (CDCl ₃ , 50MHz).....	96
FIGURA	4.42 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 16 (CDCl ₃ , 50MHz).....	97
FIGURA	4.43 – Mapa de contorno de HSQC do alcalóide 15 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	97
FIGURA	4.44 – Mapa de contorno de HMBC do alcalóide 15 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	98

FIGURA	4.45 – Mapa de contorno de HSQC do alcalóide 16 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	98
FIGURA	4.46 – Mapa de contorno de HMBC do alcalóide 16 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	99
FIGURA	4.47 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 17 (CDCl ₃ , 400MHz).....	102
FIGURA	4.48 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide 18 (CDCl ₃ , 400MHz).....	102
FIGURA	4.49 – Espectro de massas (ES+) de 17	103
FIGURA	4.50 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 18 (CDCl ₃ , 400MHz)..	104
FIGURA	4.51 – Ampliação do espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 18 (CDCl ₃ , 400MHz).....	105
FIGURA	4.52 – Mapa de contorno de HSQC de 18 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	106
FIGURA	4.53 – Mapa de contorno de HMBC de 18 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	107
FIGURA	4.54 – Espectro de RMN ¹ H do flavonóide 19 (CDCl ₃ , 200MHz).....	112
FIGURA	4.55 – Espectro de RMN ¹ H do flavonóide 20 (CDCl ₃ , 200MHz).....	112
FIGURA	4.56 – Espectro de RMN ¹³ C do flavonóide 19 (CDCl ₃ , 50MHz).....	113
FIGURA	4.57 – Mapa de contorno de HMBC de 20 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	114
FIGURA	4.58 – Mapa de contorno de HSQC de 20 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	115
FIGURA	4.59 – Espectro de RMN ¹ H do flavonóide 21 (CDCl ₃ , 200MHz).....	118
FIGURA	4.60 – Espectro de RMN ¹³ C do flavonóide 21 (CDCl ₃ ,	

	50MHz).....	118
FIGURA	4.61 – Espectro de RMN ¹ H de 22 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	121
FIGURA	4.62 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 22 (CDCl ₃ , 400 MHz).	122
FIGURA	4.63 – Espectro de RMN ¹³ C de 22 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	122
FIGURA	4.64 – Mapa de contorno de HSQC de 22 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	123
FIGURA	4.65 – Mapa de contorno de HMBC de 22 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	125
FIGURA	4.66 – Espectro de RMN ¹ H da cumarina 23 (CH ₃ OD, 200MHz).....	131
FIGURA	4.67 – Espectro de RMN ¹ H da cumarina 24 (CDCl ₃ , 200MHz).....	132
FIGURA	4.68 – Espectro de RMN ¹ H da cumarina 25 (CH ₃ OD, 200MHz).....	132
FIGURA	4.69 – Espectro de massas (EIS = 70 e.V.) da cumarina 23 ..	133
FIGURA	4.70 – Espectro de massas (EIS = 70 e.V.) da cumarina 24 ..	133
FIGURA	4.71 – Espectro de massas (EIS = 70 e.V.) da cumarina 25 ..	134
FIGURA	4.72 – Espectro de RMN ¹ H da cumarina 26 (CDCl ₃ , 400MHz).....	137
FIGURA	4.73 – Mapa de contorno do experimento de COSY de 26 (CDCl ₃ , 400MHz).....	137
FIGURA	4.74 – Espectro de HMBC da cumarina 26 (CDCl ₃ , 400MHz).....	138
FIGURA	4.75 – Espectro de Massas (EI = 70 e. V.) da cumarina 26 ..	138
FIGURA	4.76 – Espectro de RMN ¹³ C da cumarina 26 (CDCl ₃ , 40MHz).....	139
FIGURA	4.77 – Espectro de HSQC da cumarina 26 (CDCl ₃ , 400MHz).....	140
FIGURA	4.78 – Espectro de RMN ¹ H da cumarina 27 (CDCl ₃ , 400	

	MHz).....	142
FIGURA	4.79 – Espectro de HMBC da cumarina 27 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	142
FIGURA	4.80 – Espectro de HSQC da cumarina 27 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	143
FIGURA	4.81 – Espectro de RMN ¹³ C da cumarina 27	143
FIGURA	4.82 – Espectro de massas (ESI) da cumarina 27	144
FIGURA	4.83 – Esqueletos básicos de quassinóides.....	147
FIGURA	4.84 – Tipos de estruturas do anel A.....	148
FIGURA	4.85 – Espectro de RMN ¹³ C de 28 (Pyr-d ₅ , 50 MHz).....	150
FIGURA	4.86 – Espectro de RMN ¹ H de 28 (Pyr-d ₅ , 400 MHz).....	151
FIGURA	4.87 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H de 28 (Pyr-d ₅ , 400 MHz).....	151
FIGURA	4.88 – Mapa de contorno de HSQC de 28 (Pyr-d ₅ , 400 MHz).....	152
FIGURA	4.89 – Mapa de contorno de HMBC de 28 (Pyr-d ₅ , 400 MHz).....	152
FIGURA	4.90 – Espectro de RMN ¹³ C do quassinóide 29 (Pyr-d ₅ 50MHz).....	156
FIGURA	4.91 – Espectro de RMN ¹ H do quassinóide 29 (Pyr-d ₅ 400MHz).....	157
FIGURA	4.92 – Espectro de COSY H ¹ -H ¹ do quassinóide 29 (Pyr-d ₅ , 400MHz).....	158
FIGURA	4.93 – Mapa de contorno de HSQC do quassinóide 29	158
FIGURA	4.94 – Espectro de HSQC do quassinóide 29 (Pyr-d ₅ , 400MHz).....	159
FIGURA	4.95 – Espectro de HMBC do quassinóide 29 (Pyr-d ₅ , 400MHz).....	160
FIGURA	4.96 – Espectro de massas (ES-) da substância 29	163

FIGURA	4.97 – Espectro de RMN ¹ H de 30 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	167
FIGURA	4.98 – Espectro de RMN ¹ H de 31 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	168
FIGURA	4.99 – Espectro de RMN ¹³ C de 30 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	168
FIGURA	4.100 – Curva da titulação condutimétrica da quitosana.....	173
FIGURA	4.101 – Espectro de RMN ¹³ C da quitosana (D ₂ O/HCl 1% v/v, 100 MHz).....	174
FIGURA	4.102 – Imagens de MEV das microesferas de quitosana com aumento de 50x.....	176
FIGURA	4.103 – Imagens de MEV das microesferas de quitosana com aumento de 3000x.....	177
FIGURA	5.1 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos hexânicos das folhas, galhos e caule de <i>S. versicolor</i>	181
FIGURA	5.2 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos diclorometânicos das folhas, galhos e caule de <i>S. versicolor</i>	181
FIGURA	5.3 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos metanólicos das folhas, galhos e caule de <i>S. versicolor</i>	182
FIGURA	5.4 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos hexânicos das folhas, galhos e caule de <i>H. puberula</i>	182
FIGURA	5.5 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras utilizando os extratos diclorometânicos das folhas, galhos e caule de <i>H. puberula</i>	183
FIGURA	5.6 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos metanólicos das folhas, galhos e caule de <i>H. puberula</i>	183
FIGURA	5.7 – Efeito dos extratos de <i>S. versicolor</i> sobre o	

		desenvolvimento do fungo simbiote.....	186
FIGURA	5.8 –	Efeito dos extratos de <i>H. puberula</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.....	186

LISTA DE FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA	3.1 –	Obtenção dos extratos de <i>S. versicolor</i> e <i>H. puberula</i>	18
FLUXOGRAMA	3.2 –	Metodologia utilizada na partição de extratos.....	20
FLUXOGRAMA	3.3 –	Fracionamento do extrato HPGH.....	23
FLUXOGRAMA	3.4 –	Fracionamento do extrato HPGD.....	25
FLUXOGRAMA	3.5 –	Fracionamento do extrato HPFH.....	26
FLUXOGRAMA	3.6 –	Fracionamento do extrato HPFD.....	28
FLUXOGRAMA	3.7 –	Fracionamento da fração HPCMH.....	30
FLUXOGRAMA	3.8 –	Fracionamento da fração SVCMD.....	32
FLUXOGRAMA	3.9 –	Fracionamento da fração SVFMD.....	34
FLUXOGRAMA	3.10 –	Fracionamento da fração SVGMD.....	35

SUMÁRIO

1 – Introdução.....	1
1.1 – Formigas Cortadeiras.....	1
1.2 – Métodos de Controle.....	3
1.2.1 – Microencapsulação.....	5
1.3 – Plantas Estudadas.....	9
1.3.1 – Família Simaroubaceae.....	9
1.3.2 – Família Rutaceae.....	11
2 – Objetivos.....	13
3 – Procedimento Experimental.....	15
3.1 – Materiais e Métodos.....	15
3.2 – Equipamentos.....	16
3.3 – Coleta e Identificação do Material Botânico.....	17
3.4 – Obtenção dos Extratos.....	17
3.5 – Obtenção das Frações.....	20
3.6 – Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>H. puberula</i>	22
3.6.1 – Estudo Fitoquímico de HPGH.....	22
3.6.2 – Estudo Fitoquímico de HPGD.....	24
3.6.3 – Estudo Fitoquímico de HPFH.....	26
3.6.4 – Estudo Fitoquímico de HPFD.....	27
3.6.5 – Estudo Fitoquímico de HPCMH.....	29
3.7 – Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>S. versicolor</i>	31
3.7.1 – Estudo Fitoquímico de SVCMD.....	31
3.7.2 – Estudo Fitoquímico de SVFMD.....	33
3.7.3 – Estudo Fitoquímico de SVGMD.....	35
3.8 – Metodologia dos Ensaio Biológicos.....	36
3.8.1 – Ensaio Biológicos com as Formigas Cortadeiras.....	36
3.8.2 – Ensaio Biológicos com o Fungo Simbionte.....	37

3.8.3 – Ensaio Biológico com as Enzimas.....	38
3.9 – Caracterização da quitosana (QTS).....	39
3.9.1 – Grau de desacetilação (% GD).....	39
3.9.2 – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono	39
3.9.3 – Preparação das microesferas de quitosana.....	39
3.9.4 – Reticulação das microesferas de quitosana.....	40
3.9.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
3.9.6 – Análise de porosimetria.....	40
4 – Resultados e Discussões.....	43
4.1 – Substâncias Isoladas.....	43
4.2 – Esteróides.....	52
4.2.1 – Identificação estrutural do sitosterol (1A) e estigmasterol (1B).....	52
4.2.2 – Identificação estrutural da sitostenona (2A), estigmastenona (2B), campestenona (2C) e do 3 β -O-3 β -D-glucopiranosil-sitosterol (3).....	55
4.3 – Triterpenos.....	60
4.3.1 – Identificação estrutural do 22 <i>S</i> ,3 α - diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona (4).....	60
4.3.2 – Identificação estrutural do triterpeno eurileno (5).....	67
4.3.3 – Identificação estrutural dos triterpenos lupeol (6) e lupenona (7).....	70
4.4 – Alcalóides.....	78
4.4.1 – Identificação estrutural do alcalóide N-metil-4- metóxi-2-quinolona (8).....	78
4.4.2 – Identificação estrutural dos alcalóides furoquinolínicos 9 – 13	80
4.4.3 – Identificação estrutural do alcalóide 14	89
4.4.4 – Identificação estrutural dos alcalóides 15 e 16	92

4.4.5 – Identificação estrutural dos alcalóides 17 e 18	101
4.5 – Flavonóides.....	111
4.5.1 – Identificação estrutural dos flavonóides 19 -21	111
4.5.2 – Determinação estrutural do estilbeno 22	119
4.6 – Cumarinas	128
4.6.1 – Identificação estrutural das cumarinas 23 - 27	129
4.7 – Quassinóides.....	147
4.7.1 – Identificação estrutural do quassinóide 28	149
4.7.2 – Identificação estrutural do quassinóide 29	155
4.8 – Identificação estrutural dos derivados do ácido cinâmico 30 e 31	166
4.9 – Caracterização da quitosana.....	172
4.9.1 – Grau de desacetilação da quitosana (% GD).....	172
4.9.2 – RMN ¹³ C da quitosana.....	174
4.9.3 – Porosimetria de mercúrio.....	175
4.9.4 – Espectroscopia Eletrônica por Varredura (MEV).....	175
5 – Atividades biológicas.....	179
5.1 – Ensaio por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens</i> <i>rubropilosa</i>	179
5.2 – Atividade inibitória sobre o fungo simbiote.....	185
5.3 – Atividade inibitória nos ensaios com a enzima pectinase.....	187
5.4 – Atividade das substâncias isoladas nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras, no fungo simbiote e nas enzimas pectinases.....	190
6 – Conclusões.....	193
7 – Referências bibliográficas.....	195

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1 – Formigas Cortadeiras

As formigas são pertencentes à classe Insecta, ordem Hymenoptera, família Formicidae, subfamília Myrmicinae, tribo Attini e são consideradas formigas cortadeiras todas as espécies do gênero *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas; do gênero *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns e também algumas dos gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma*, porém, o ninho destes três últimos gêneros são muito pequenos e o dano causado são insignificantes (JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996).

Conhecidas pelo poder de destruição de um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura, estas formigas (BERTI FILHO *et al.*, 1992) encontram-se distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, não ocorrendo nas regiões transandinas da América do Sul e em algumas ilhas das Antilhas (FARJIBRENNER e RUGGIERO, 1994).

Na América do Sul, o Brasil é o país que possui o maior número de espécies de saúvas, seguido da Argentina e do Paraguai. Na agricultura e silvicultura brasileira, a subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida como “saúva-limão”, é considerada uma praga de grande importância, pois causa sérios prejuízos às espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* (BOARETTO & FORTI, 1997).

As formigas cortadeiras são caracterizadas por manterem uma relação de simbiose com um fungo existente em seu ninho. Em 1986, SINGER caracterizou esse fungo como sendo *Leucoagaricus gongylophorus*, nomenclatura esta, confirmada por FISHER e colaboradores em 1994.

Vários estudos relatam a relação de simbiose existente entre as formigas cortadeiras e o seu fungo simbiote *L. gongylophorus*. RODIONOVA e BEZBORODOV, 1997, relataram que as formigas alimentam a cultura fúngica

com substrato vegetal, que é composto por polímeros complexos que representam 70 a 90% do seu peso seco.

As pectinas representam um terço do peso seco do tecido vegetal de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, desempenhando funções de agente hidratante e de material cimentador para a rede de fibras de celulose (SAKAI et al., 1993; THARKUR *et al.*, 1997) sendo necessário um complexo enzimático para promover a degradação da pectina no tecido vegetal. Enzimas que degradam os polissacarídeos vegetais em açúcares redutores foram detectadas no fungo simbiote (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA, 1999) e também encontradas no líquido fecal de *A. colombica tonsipes* (MARTIN *et al.*, 1975) e *A. sexdens rufopilosa* (SIQUEIRA, 1997; SILVA, 1999). Sendo assim, as formigas utilizam o fungo simbiote para promover esse processo de degradação, uma vez que não são capazes de degradar a pectina diretamente, tornando-se as pectinases, um bom alvo no controle das formigas. A FIGURA 1.1 representa resumidamente a associação simbiótica entre as formigas cortadeiras e o fungo *L. gongylophorus*.



FIGURA 1.1 – Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo *L. gongylophorus*

1.2 – Métodos de Controle

Os prejuízos causados pelas formigas cortadeiras são consideráveis e, embora tenham preferência por determinadas espécies de plantas, quase todas as culturas são atacadas e danificadas pelas formigas. Elas cortam as folhas e ramos tenros, podendo destruir completamente as plantas e em sistemas tropicais, chegam a consumir até 17% da produção florestal (CHERRETT, 1986).

Em ecossistemas naturais as formigas cortadeiras não atacam todas as espécies disponíveis com igual frequência e estão em equilíbrio com outras espécies de insetos (HOWARD & WIEMER, 1986). Uma vez que as formigas são originárias das matas nativas, a substituição destas matas por grandes áreas de monoculturas favorece a multiplicação, podendo vir a se constituir em pragas, devido a fatores como: abundância de recursos alimentares, escassez de inimigos naturais, menor competição, entre outros (BENTO & DELLA LÚCIA, 1993). Sabendo-se que a ação das formigas cortadeiras também apresenta aspectos positivos ao meio ambiente, pois elas podam a vegetação estimulando o crescimento de algumas plantas, decompõem rapidamente o material vegetal e reviram e arejam o solo (Haines, 1978 *apud* SCHNEIDER, 2000), o combate a esses insetos não seria uma alternativa adequada, e sim o seu controle.

As formigas cortadeiras podem ser controladas através de métodos mecânicos, culturais, biológicos e químicos. O controle mecânico manual praticamente não é utilizado, em virtude de ser de viabilidade restrita a pequenas áreas e em ninhos com até 4 meses de idade.

O controle biológico é uma área promissora de pesquisa, mas atualmente está clara a necessidade de mais conhecimentos biológicos básicos para que estratégias de controle possam ser de fato aplicadas com segurança, principalmente em relação ao ecossistema.

Métodos químicos para controle de formigas cortadeiras são os mais frequentemente utilizados, sendo o produto químico tóxico aplicado

diretamente nos ninhos, nas formulações pó, líquido, gases ou iscas granuladas (BOARETTO & FORTI, 1997).

Atualmente o emprego de iscas granuladas tem sido o método mais empregado, pois oferece maior segurança ao operador, dispensa mão-de-obra e equipamentos especializados e permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK & NAKANO, 1984). Compreendem um substrato atrativo em mistura com um princípio ativo tóxico, em pastilhas. O inseticida é geralmente dissolvido em óleo de soja refinado e, posteriormente, incorporado ao substrato. O substrato atrativo efetivo e amplamente utilizado é a polpa cítrica desidratada. A polpa cítrica parece ser apropriada para utilização como substrato para o desenvolvimento do fungo simbiote, apresentando-se levemente ácida, alto conteúdo de carboidrato, contendo ainda nitrogênio e grande variedade de vitaminas e microelementos (BOARETTO & FORTI, 1997).

A inexistência de inseticidas de origem natural que fossem mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente, fizeram com que o Grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar em conjunto com o Centro de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP – Rio Claro, estudassem plantas potencialmente tóxica a essas formigas. Através de estudos realizados pelo grupo, LEITE, 2000 e GAMBOA, 2001, verificaram que substâncias como os ácidos graxos de cadeia curta (C6 – C12), as lignanas sesamina e sesamolina inibem em 80% o crescimento do fungo simbiote, a concentração de 100µg/ml. Em dados mais recentes, LEITE, 2005, verificou que o limonóide fotogedunina à concentração de 25µg/mL, inibe em 100% o crescimento do fungo simbiote, sendo que este mesmo limonóide, apresenta S_{50} de 9 dias, tendo um controle de 24 dias. Dentre as substâncias testadas, o alcalóide ricinina, foi o mais ativo frente às formigas cortadeiras, porém, apresenta efeito tóxico a mamíferos.

1.2.1 – Microencapsulação

Nos anos 80, a microencapsulação começou a se firmar como uma tecnologia de compartimentalização das substâncias diversas, possibilitando a manutenção ou o isolamento de agente ativo no interior das microesferas ou das microcápsulas cujas dimensões variam de nanômetros a alguns milímetros de diâmetros. Devido ao seu avanço promissor, os cientistas das áreas tecnológicas estão usando o processo de microencapsulação nas aplicações industriais de alimentos, de produtos de cosméticos, no setor de agricultura entre outros (OLIVEIRA et al., 1992; DONBROW, 1991; ANDREO FILHO & OLIVEIRA, 1999).

A técnica de microencapsulamento de substâncias ativas em iscas inseticidas tem sido muito utilizada tanto na agricultura, quanto no uso doméstico, por melhorarem a eficácia residual, possuírem estabilidade do princípio ativo contra a degradação no ambiente e principalmente por reduzirem a toxicidade para mamíferos (OHTSUBO, 1991). Baseado nestes relatos, esta técnica foi considerada adequada para ser utilizada com substâncias ativas.

A utilização de quitosana, polímero obtido através da desacetilação da quitina, no processo de encapsulamento de substâncias vem sendo uma técnica muito promissora. Após décadas sem esclarecer a estrutura e caracterizar a quitina, foi somente na metade dos anos 70 que o Professor Ricardo MUZZARELLI desvendou esse mito, esclarecendo algumas propriedades desta molécula. Desde então, pesquisadores se interessaram pelo estudo e pela descoberta de outras fontes desse composto natural.

A quitina é um dos maiores polímeros naturais, encontrada em vários animais marinhos e insetos (MATHUR and NARAUG, 1990). É um polímero de peso molecular relativamente alto ($1,6 \times 10^5$) e constituído principalmente de unidades de $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (FIGURA 1.2).

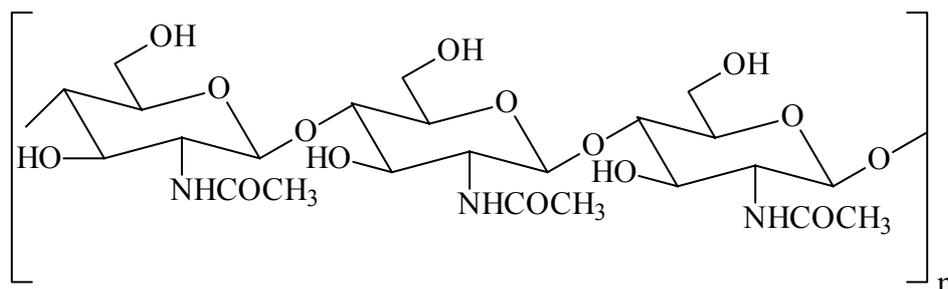


FIGURA 1.2 – Estrutura da quitina

Quando o grau de N-acetilação é inferior a 50% a quitina apresenta-se solúvel em soluções ácidas diluídas e é chamada de quitosana (KAZUHIRO *et al.*, 1987). Na natureza a quitina se encontra em diferentes formas, como microfibrilas nos tegumentos de crustáceos e insetos, cristalina hidratada, polimérica e γ -quitina (MATHUR and NARAUG, 1990).

A quitosana $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose obtida por N-desacetilação (FIGURA 1.3) é um polímero biodegradável (ANDREO FILHO & OLIVEIRA, 1999) e quase atóxico, com DL_{50} em camundongos de 16g/kg (LEITE & TELAROLLI JUNIOR, 1997). Devido a fácil degradação e por que os produtos gerados não são tóxicos, a quitosana tem atraído a atenção como excipiente para liberação controlada de fármacos, mas o seu uso tem sido limitado por causa de sua insolubilidade em água e em alguns solventes orgânicos, tais como acetona, DMF, entre outros.

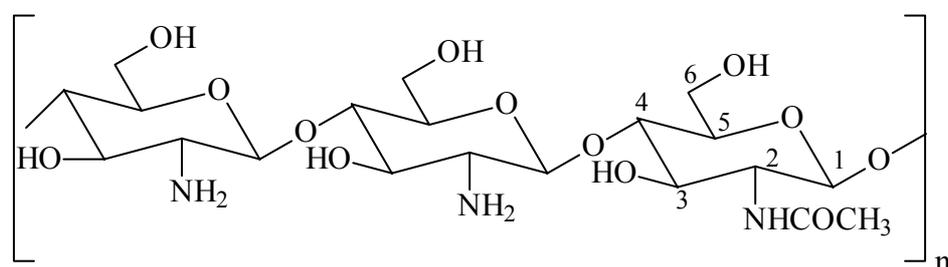


FIGURA 1.3 – Estrutura da quitosana

A presença de grupos amino confere a quitosana solubilidade em solventes orgânicos e inorgânicos, diluídos na faixa específica de pH até

aproximadamente 6,0 e mais versatilidade química do que a celulose, assim aumentando o seu campo de atuação.

De acordo com ASAKO e colaboradores, 1991, a estrutura molecular e as propriedades da quitosana são largamente afetadas pelo grau de desacetilação existindo várias técnicas para isso, como por exemplo, a titulação coloidal por condutometria, a análise elementar, absorção na região do infravermelho e a espectroscopia em RMN.

A quitosana, devido à presença de grupos amino livres na sua estrutura, pode reagir com glutaraldeído para formar ligações intermoleculares ou reticuladas através das bases de Schiff resultantes, obtendo um formato de redes. As ligações covalentes entre os grupos amino e os aldeídos terminais extremos do agente reticulante são irreversíveis e resistentes a pH e temperatura. A razão para o uso do agente reticulante bifuncional glutaraldeído (1-5 pentanodiol) é para inibir a solubilização através da formação de bases de Schiff com os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero, FIGURA 1.4. A reticulação ocasiona um aumento da resistência biológica, química e mecânica.

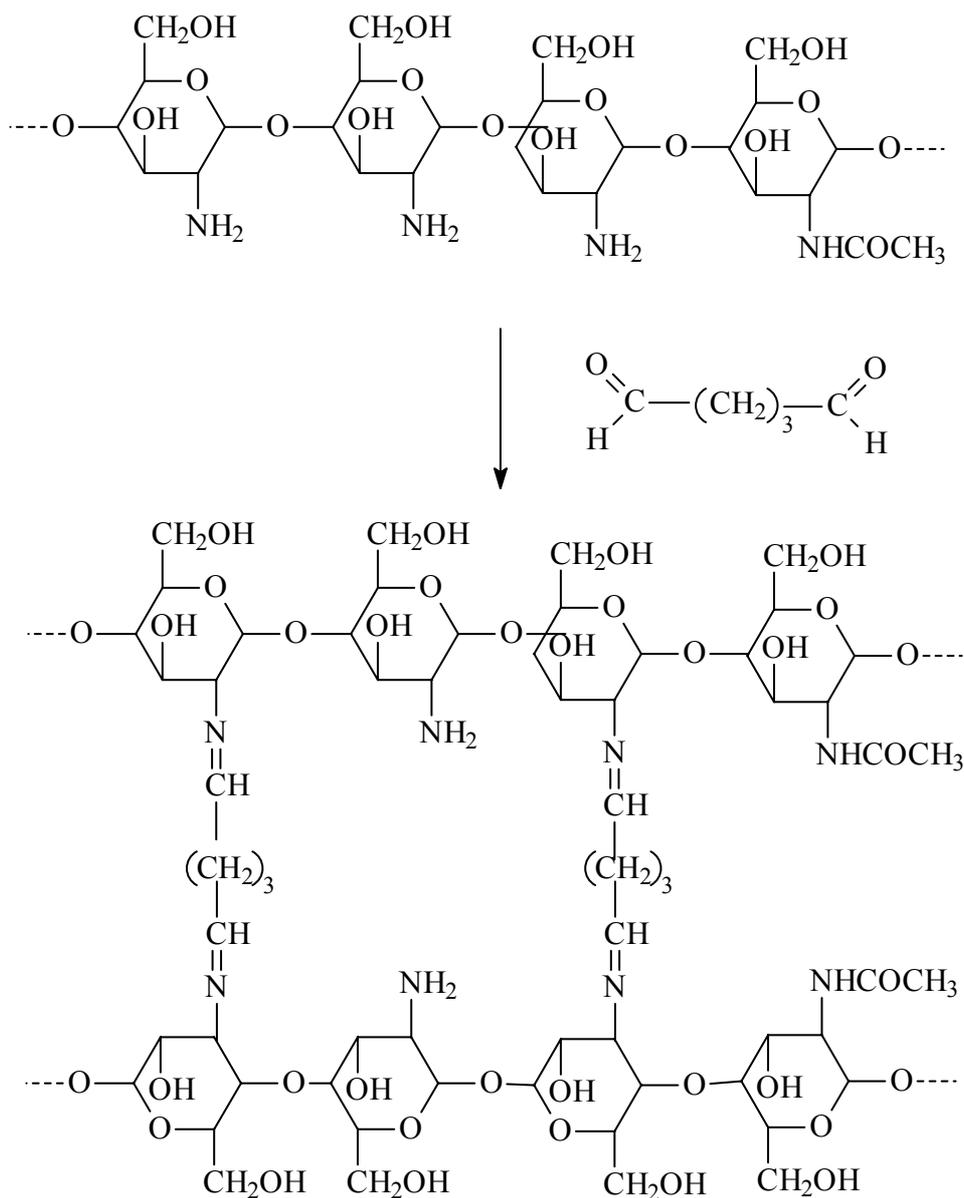


FIGURA 1.4 – Reticulação da quitosana com o glutaraldeído

1.3 – Plantas Estudadas

1.3.1 – Família Simaroubaceae

A família Simaroubaceae é composta de 32 gêneros, constituindo cerca de 250 espécies de arbustos e árvores distribuídos por todo o trópico. Ela tem sido empregada na construção, devido à qualidade de suas madeiras, e também muito utilizada na medicina folclórica (VIEIRA, 1995).

Nos últimos anos, aumentou-se o número de estudos com essa família, devido relatos de suas propriedades antimalárica, antiinflamatória, antileucêmica e atividades antivirais (MORETI, *et al.* 1995).

No Brasil, a família Simaroubaceae é representada pelos gêneros Quassia e Picrolemma, na região Amazônica; Castela e Picrasma, no sul do país; e Simaba, Simarouba e Picrolemma os quais estão presentes por todas as partes do Brasil (HALL *et al.* 1983).

Espécies do gênero *Simarouba*, além de possuírem todas as atividades acima mencionadas, possuem atividade inseticida (POLONSKY, 1985), motivo pelo qual, uma das plantas escolhidas para estudos, foi *Simarouba versicolor*.

Na FIGURA 1.5, estão representadas algumas substâncias isoladas de *S. versicolor* e seus derivados.

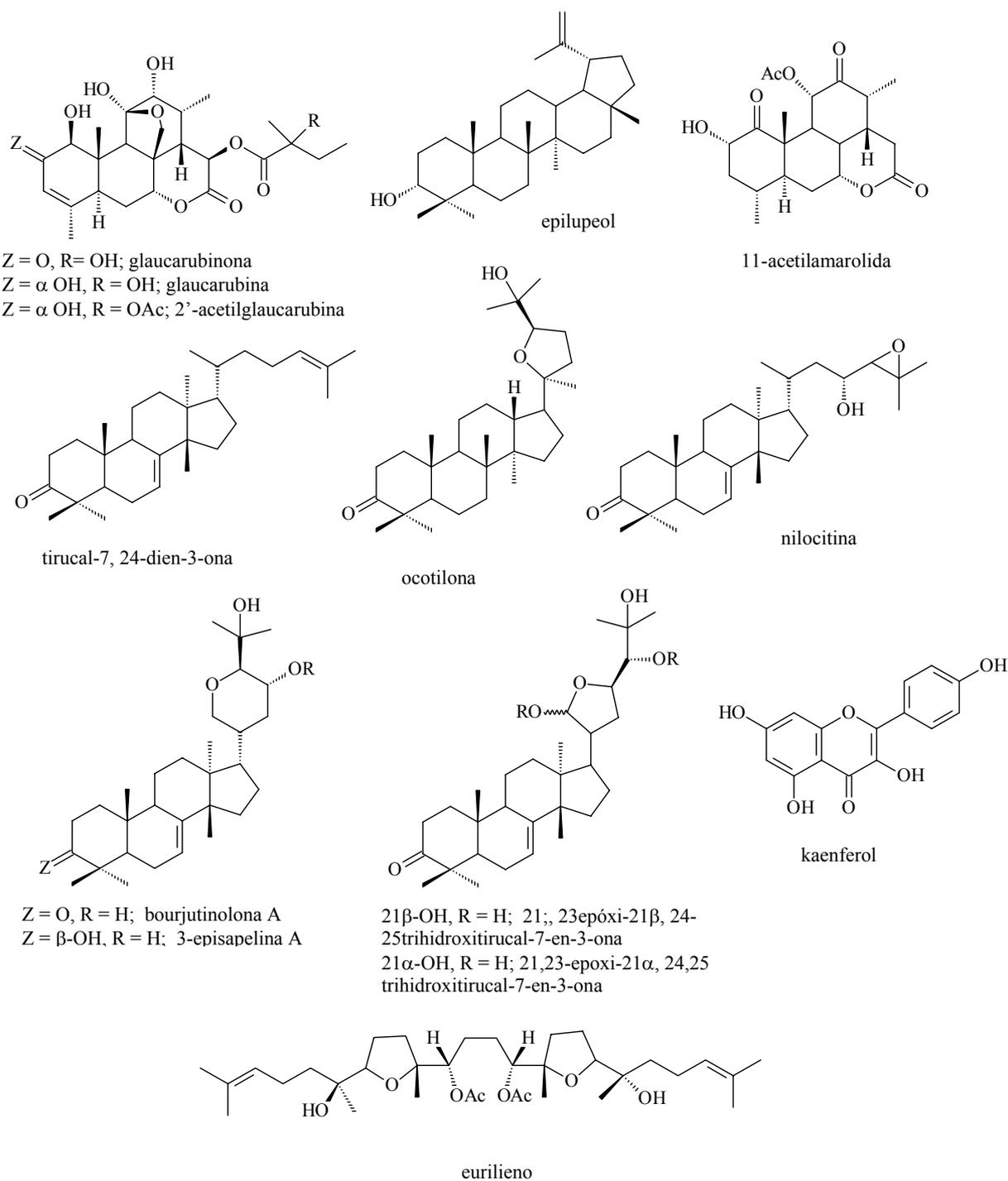


FIGURA 1.5 – Substâncias isoladas de *S. versicolor* (ARRIAGA et al., 2002)

1.3.2 – Família Rutaceae

Possuindo cerca de 150 gêneros, com 1500 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália, a família Rutaceae constitui o maior grupo de plantas da ordem Rurales (WATERMAN & GRUNDON, 1983). No Brasil existem cerca de 200 espécies, já descritas.

A família Rutaceae é muito conhecida pela presença de uma ampla diversidade de metabólitos secundários, entre eles, podem-se destacar os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, as cumarinas, as lignanas, os flavonóides, os terpenóides e os limonóides (WATERMAN, 1999).

Muitos desse metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica (WATERMAN e GRUNDON, 1983), despertando o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica dessa família.

Os gêneros da família Rutaceae já foram classificados de acordo com suas características morfológicas e químicas (SILVA et al. 1988), sendo que, segundo este último, em cada subfamília (e em cada tribo) foram agrupados os gêneros que apresentam diferenciação de cumarinas, alcalóides e limonóides. Existem ainda controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de alguns gêneros, estimulando o estudo de espécies ainda não investigadas.

O gênero *Helietta* tem distribuição neotropical, sendo encontrado no México, Texas, Cuba, Venezuela, Colômbia, Peru, Paraguai, norte da Argentina e no Brasil (PIRANI, 1998). A maioria das espécies de *Helietta* são pequenas árvores ou arbustos perenes e ramificados. Existem poucos estudos a respeito desse gênero, sendo a espécie mais estudada *H. apiculata*, apresentando vários alcalóides do tipo furoquinolinos, que demonstraram atividade biológica no sistema nervoso central (GOLOUBKOVA et al., 1998), algumas substâncias isoladas de plantas deste gênero estão representados na FIGURA 1.6.

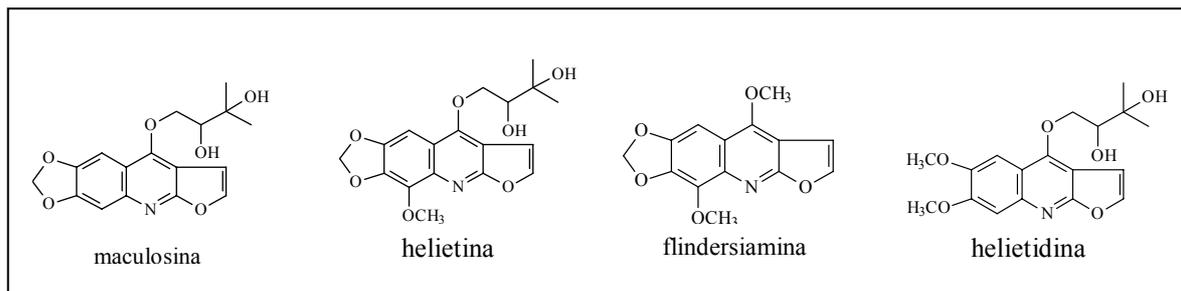


FIGURA 1.6 – Substâncias isoladas de *Helietta* (GOLOUBKOVA et al., 1998)

OBJETIVOS

2 – Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae);
- estudo fitoquímico de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae);
- realização de ensaios biológicos com extratos brutos, frações e substâncias puras, frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*, ao seu fungo simbionte e às enzimas pectinases;
- desenvolvimento de microcápsulas a partir de quitosana, para microencapsulação de substâncias ativas visando sua aplicação no controle de formigas cortadeiras.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3 – Procedimento Experimental

3.1 – Materiais e Métodos

Suportes para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica gel 60 (70-230 mesh)
- Sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- Sephadex LH-20

Solventes para cromatografia:

- solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.

Cromatografia em coluna:

- colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem cromatografadas.

Cromatografia em camada delgada:

- folhas de alumínio (com sílica gel 60 F₂₅₄, $\phi = 0,2$ mm) - Merck.

Reveladores:

- Radiação na região do UV (254 e 360 nm)
- reagente de Dragendorff
- vanilina em ácido sulfúrico.

Cromatografia em camada delgada preparativa:

- placas preparativas (20 x 20cm) de sílica gel 60 com indicador UV₂₅₄.

Solventes para obtenção de espectros de RMN:

- deuterados: CDCl₃, MeOD e Pyr-d₆

Materiais diversos utilizados para obtenção das microcápsulas:

- quitosa
- ácido acético glacial
- glutaraldeído

3.2 – Equipamentos

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- Brüker ARX 200 MHz e Brüker DRX 400 MHz

CG-EM:

- GC-17A Shimadzu, GCMS-QP5000 Shimadzu

Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) - Ionização por impacto eletrônico à 70 e.V.

Condutivímetro:

- Micronal B330 – equipado com célula condutimétrica Digimed DMC-010

Porosímetro:

- Micromeritics mod. Porosizer 9320

Microscópico Eletrônico por Varredura:

- ZEISS – Mod. DSM940 A

Bomba Peristáltica:

- Amershan Biosciences – Mod. Pump P-1

3.3 – Coleta e Identificação do Material Botânico

Todas as partes vegetais de *Simarouba versicolor* e *Helietta puberula* foram coletadas pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, juntamente com o professor Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica da USP – São Paulo, que foi o responsável pela identificação das mesmas, TABELA 3.1.

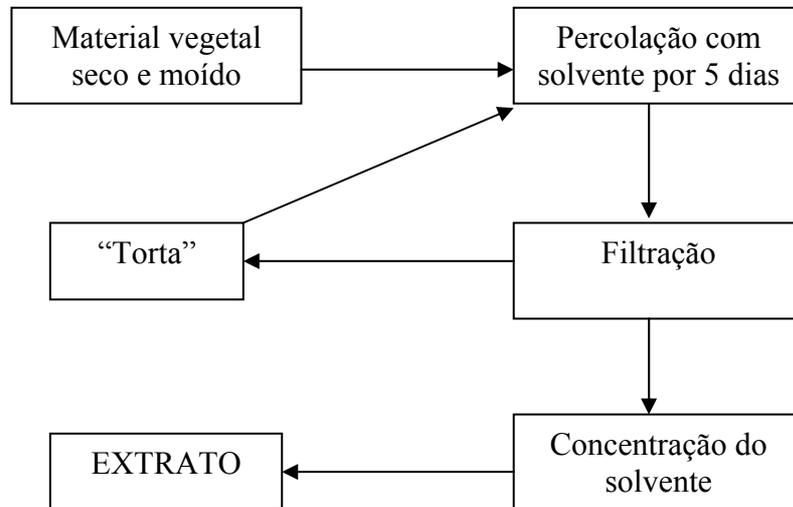
TABELA 3.1 – Dados de coleta de *Simarouba versicolor* e *Helietta puberula*

Planta	Partes Vegetais (g)	Local e Data da Coleta	Código de Identificação
<i>Simarouba versicolor</i>	Folhas (2.186,1)	Prata – Minas	4756
	Galhos (759,0)	Gerais	
	Caule (3.475,6)	20/01/2001	
<i>Helietta puberula</i>	Folhas (810,0)	Corumbá – Mato	4844
	Galhos (902,0)	Grosso do Sul	
	Caule (4.200,0)	25/01/2001	

3.4 – Obtenção dos Extratos

As diversas partes vegetais foram secas, separadamente, em estufa de ar a 45° C e pulverizadas em moinho do tipo Willey. A extração do material moído foi realizada por maceração nos solventes hexano, diclorometano e metanol, à temperatura ambiente, durante cinco dias, por três vezes obtendo-se os extratos conforme representado no FLUXOGRAMA 3.1. Foram obtidos no total 18 extratos (TABELA 3.2), todos eles foram enviados para ensaios

biológicos nas formigas cortadeiras, no fungo simbionte e nas enzimas pectinases (item 3.8, p. 36).



FLUXOGRAMA 3.1 – Obtenção dos extratos de *S. versicolor* e *H. puberula*

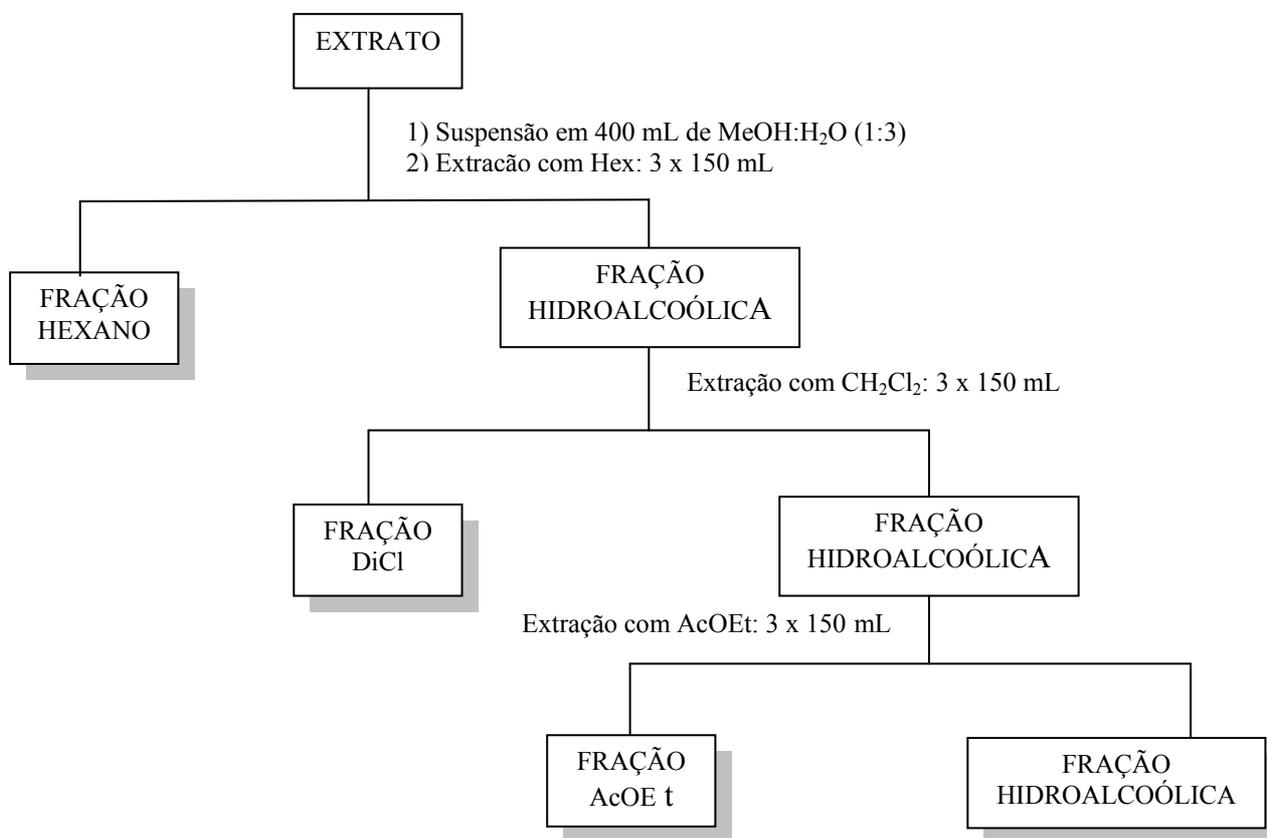
TABELA 3.2 – Extratos obtidos

Planta	Parte Vegetal	código	Massas dos Extratos (g)
<i>Simarouba versicolor</i>	Folhas	SVFH	17,900
		SVFD	20,000
		SVFM	30,000
	Galhos	SVGH	2,7680
		SVGD	3,400
		SVGM	18,800
	Caule	SVCH	9,500
		SVCD	9,400
		SVCM	35,000
<i>Helietta puberula</i>	Folhas	HPFH	8,631
		HPFD	20,600
		HPFM	25,000
	Galhos	HPGH	5,664
		HPGD	10,000
		HPGM	25,800
	Caule	HPCH	20,240
		HPCD	21,000
		HPCM	80,000

HP = *Helietta puberula*; SV = *Simarouba versicolor*; G = galhos; C = caule; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol

3.5 – Obtenção das Frações

Os extratos metanólicos das folhas, galhos e caule de *H. puberula* e *S. versicolor* foram fracionados através de uma partição líquido-líquido, FLUXOGRAMA 3.2, originando 4 partições de cada extrato. As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na TABELA 3.3. Já, os extratos HPGH, HPGD, HPFH e HPFD de *H. puberula* foram fracionados utilizando-se diferentes métodos cromatográficos.



FLUXOGRAMA 3.2 – Metodologia utilizada na partição de extratos

TABELA 3.3 –Frações dos extratos metanólicos

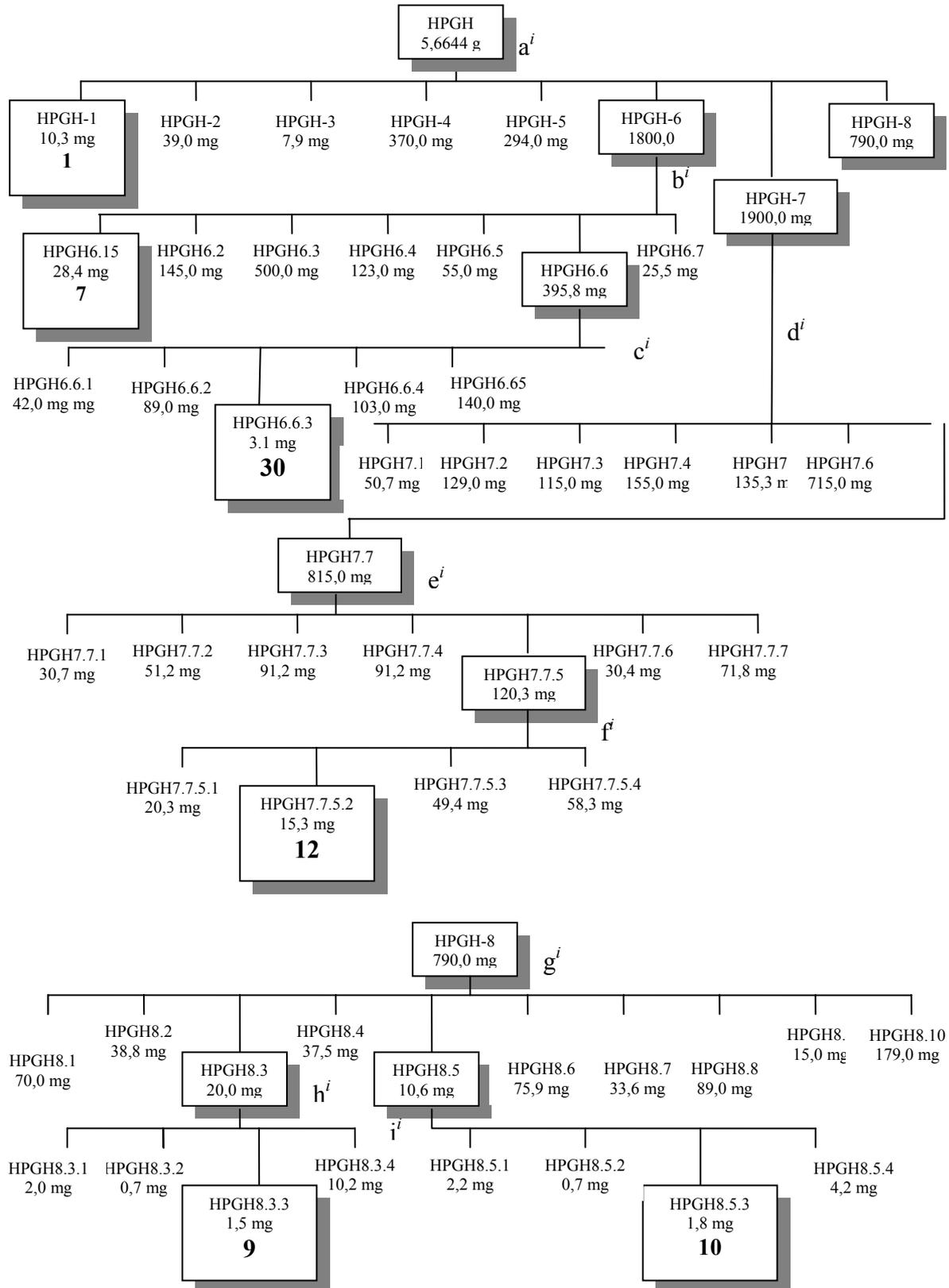
Espécie	Parte vegetal	Massas dos extratos	código	Massas das partições	código
<i>H. puberula</i>	folhas	25,00g	HPFM	Hexânico 3,4670 g	HPFMH
				Diclorometânico 3,0650 g	HPFMD
				acetato de etila 1,3100 g	HPFMA
				hidroalcoólico 5,4500 g	HPFMHid
<i>H. puberula</i>	caule	80,00g	HPCM	Hexânico 15,000 g	HPCMH
				Diclorometânico 21,465 g	HPCMD
				acetato de etila 1,2450 g	HPCMA
				hidroalcoólico 7,1436 g	HPCMHid
<i>H. puberula</i>	galhos	25,80g	HPGM	Hexânico 1,900 g	HPGMH
				Diclorometânico 4,7505 g	HPGMD
				acetato de etila 1,4149 g	HPGMA
				hidroalcoólico 0,6795 g	HPGMHid
<i>S. versicolor</i>	folhas	30,00g	SVFM	Hexânico 4,00g	SVFMH
				Diclorometânico 9,00g	SVFMD
				acetato de etila 15,00g	SVFMA
				hidroalcoólico 12,00g	SVFM Hid
<i>S. versicolor</i>	caule	35,00g	SVCM	Hexânico 1,34g	SVCMH
				Diclorometânico 9,00g	SVCMD
				acetato de etila 4,00g	SVCMA
				hidroalcoólico 13,00g	SVCMHid
<i>S. versicolor</i>	galhos	18,80g	SVGGM	Hexânico 0,92g	SVGGMH
				Diclorometânico 1,44g	SVGGMMD
				acetato de etila 4,00g	SVGGMMA
				hidroalcoólico 6,00g	SVGGMHid

HP = *Helietta puberula*; SV = *Simarouba versicolor*; G = galhos; C = caule; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol; A = acetato de etila; Hid = hidroalcoólico

3.6 – Isolamento dos Constituintes Químicos de *H. puberula*

3.6.1 – Estudo Fitoquímico de HPGH

O estudo da fração hexânica dos galhos de *H. puberula* permitiu o isolamento das substâncias **1, 7, 9, 10, 12 e 30**, que foram caracterizadas através de EM e RMN 1 e 2D. O estudo fitoquímico foi realizado utilizando diversas técnicas cromatográficas, o FLUXOGRAMA 3.3 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento do Extrato HPGH

a^i : cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 4,5 x 25 cm)

- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)

- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

bⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

cⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 1,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

dⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh): florisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

eⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- eluição isocrática: hex: dicl: AcOEt (5:3:2)

fⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,0 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- eluição isocrática: hex: dicl: AcOEt (4:2:2)

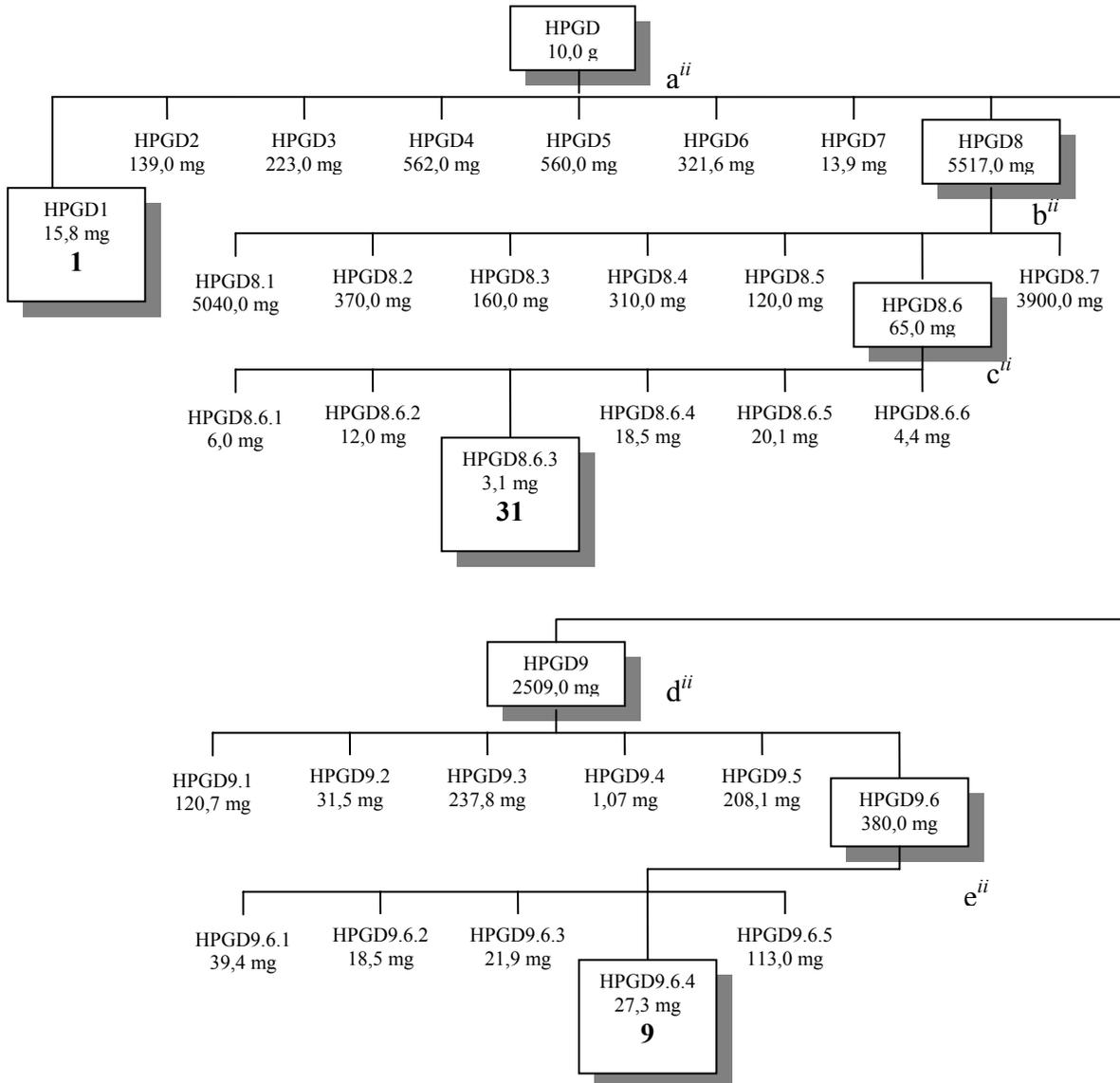
gⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

hⁱ = iⁱ = cⁱ

3.6.2 – Estudo Fitoquímico de HPGD

O estudo do extrato diclorometânico dos galhos de *H. puberula* levou ao isolamento das substâncias **1**, **9** e **31** que tiveram suas estruturas identificadas por EM e RMN¹H e RMN¹³C. O FLUXOGRAMA 3.4 apresenta de forma resumida, como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento do Extrato HPGD

aⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

bⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 20,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

cⁱⁱ: cromatografia por adsorção em camada delgada preparativa:

- placa de vidro ($h \times h = 25,0 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica gel 60, com indicador UV₂₅₄ (230-400 mesh)
- eluição isocrática: hex: diel: AcOEt (5:3:2)

dⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 31,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)

- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

eⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

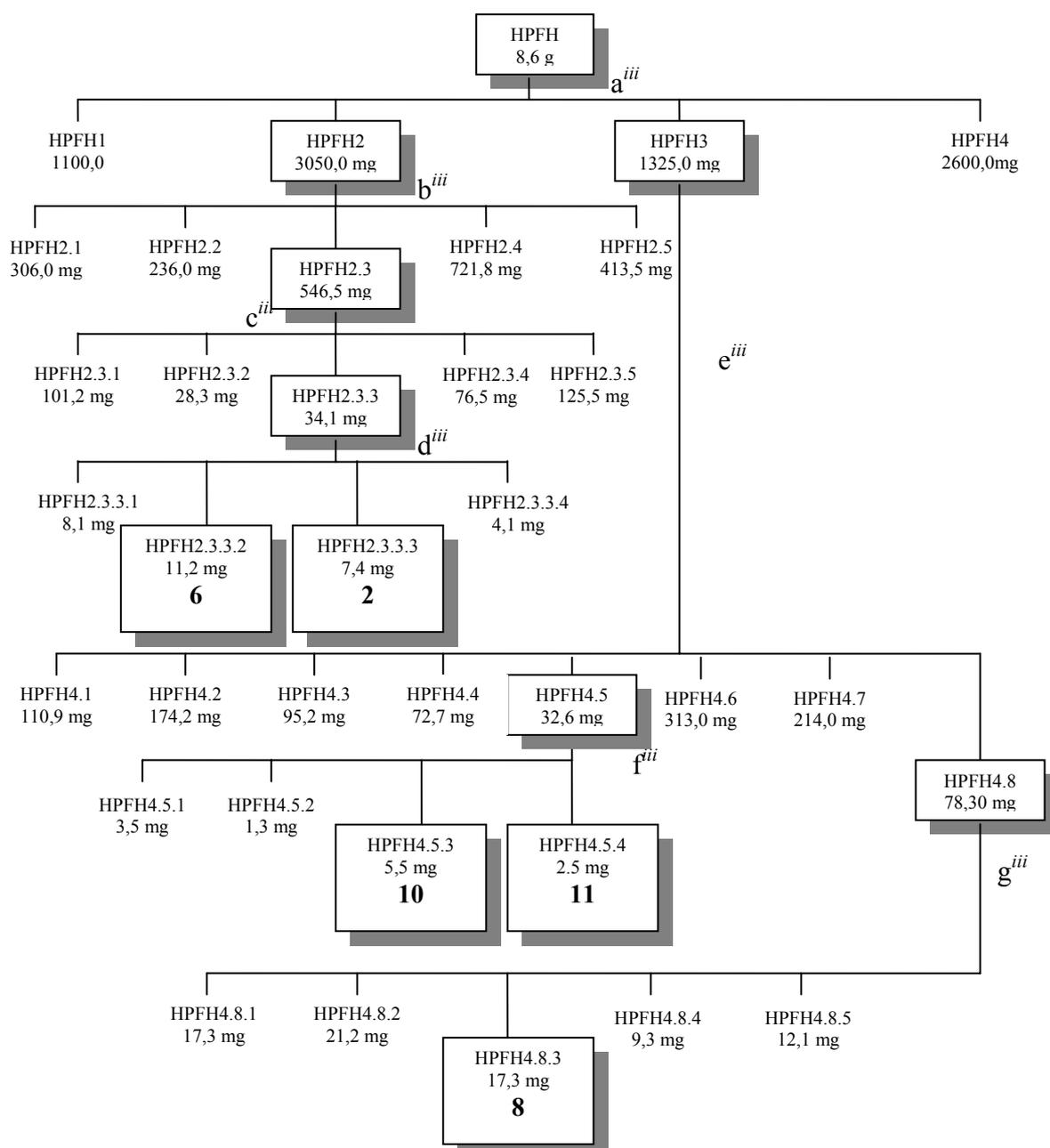
- coluna de vidro (φ x h = 2,0 x 30,0 cm)

- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)

- eluição isocrática: hex: dicl: AcOEt (4:2:2)

3.6.3 – Estudo Fitoquímico de HPFH

Do estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas de *H. puberula* foi possível isolar e identificar através de EM e RMN¹H e RMN¹³C as substâncias **2**, **6**, **8**, **10** e **11**, mostrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.5.



FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento do Extrato HPFH

aⁱⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 3,5 x 25,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

bⁱⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 3,0 x 30,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

cⁱⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 2,5 x 20 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

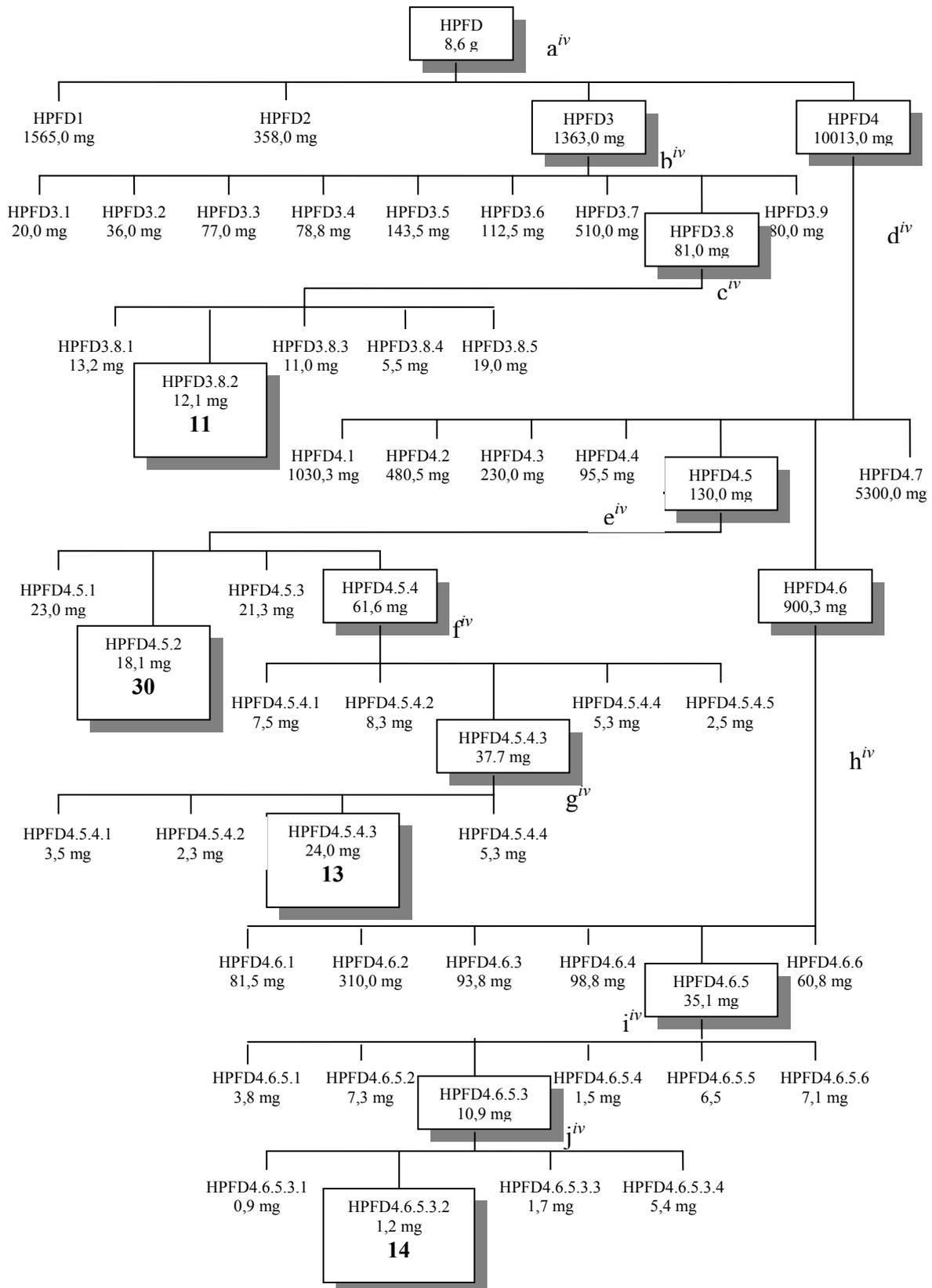
dⁱⁱⁱ: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 1,5 x 20 cm)
- fase estacionária: fluorisil
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

eⁱⁱⁱ = bⁱⁱⁱ, fⁱⁱⁱ = dⁱⁱⁱ, gⁱⁱⁱ = cⁱⁱⁱ

3.6.4 – Estudo Fitoquímico de HPFD

As substâncias **11**, **13**, **14** e **30** foram obtidas através do estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das folhas de *H. puberula*. Essas substâncias foram identificadas através de RMN¹H e RMN¹³C. O FLUXOGRAMA 3.6 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.6 – Fracionamento do Extrato HPFD

a^{iv}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 4,5 x 25,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

b^{iv}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 3,0 x 30,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

c^{iv}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 2,5 x 20 cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

d^{iv} = i^{iv}

e^{iv}: cromatografia circular por adsorção:

- placa de vidro (ϕ = 26,0 cm)
- fase estacionária: sílica gel (375 mesh, PF 254, 1mm)
- eluição isocrática: Hex:dicl:MeOH (4:2:0,5)

f^{iv} = e^{iv} = g^{iv} = i^{iv}

h^{iv} : cromatografia por adsorção:

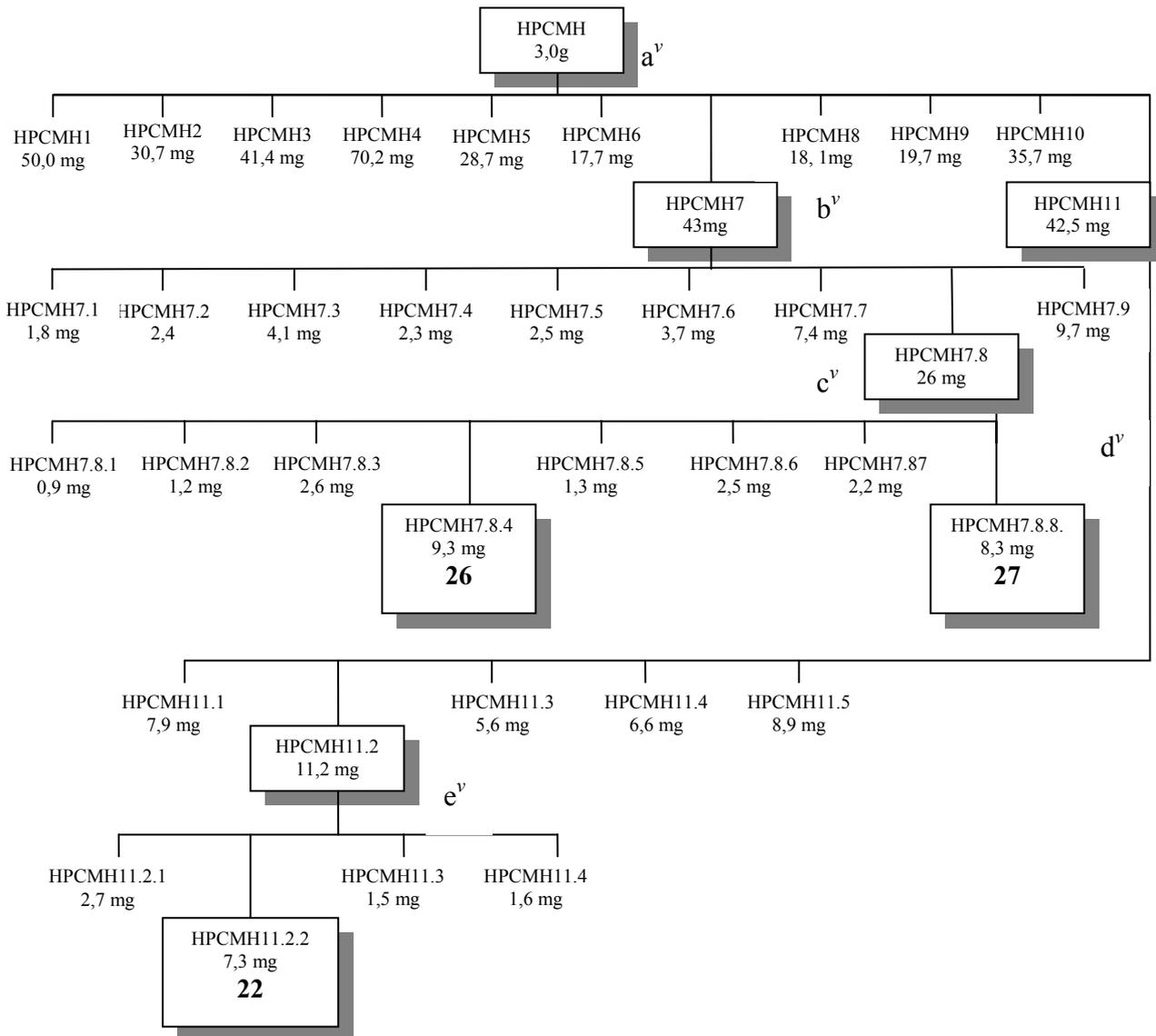
- coluna de vidro (ϕ x h = 3,0 x 30,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:dicl (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), dicl 100%, dicl:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

j^{iv} : cromatografia por adsorção em camada delgada preparativa:

- placa de vidro (h x h = 25,0 x 25,0 cm)
- fase estacionária: sílica gel 60, com indicador UV₂₅₄ (230-400 mesh)
- eluição isocrática: hex: dicl: AcOEt (5:3:2)

3.6.5 – Estudo Fitoquímico de HPCMH

A fração hexânica do extrato metanólico dos caules de *H. puberula* foi estudada fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. Deste estudo foi possível isolar as substâncias **22**, **26** e **27**. O FLUXOGRAMA 3.7 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.7 – Fracionamento da fração HPCMH

a^v: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 31,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

b^v: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

c^v: cromatografia circular por adsorção :

- placa de vidro ($\phi = 26,0$ cm)
- fase estacionária: sílica gel (375 mesh, PF 254, 1mm)
- eluição isocrática: Hex:diel:MeOH (5:3:1)

d^v: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 40,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

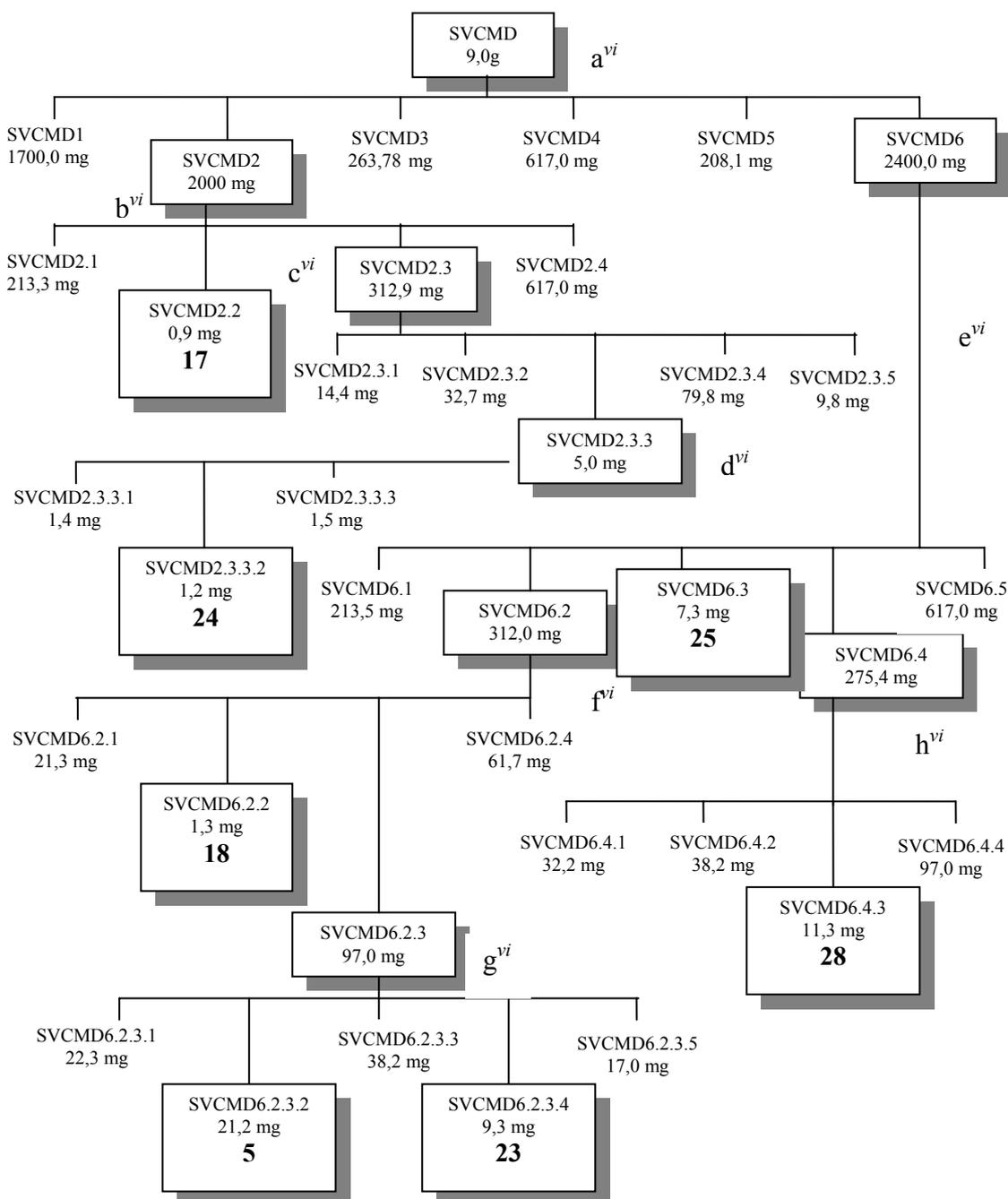
e^v: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna polimérica Asahipak
- eluição isocrática: MeOH 100%
- fluxo: 3,5 mL/min
- detector UV 245, 365 nm

3.7 – Isolamento dos Constituintes Químicos de *S. versicolor*

3.7.1 – Estudo Fitoquímico de SVCMD

A fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *S. versicolor* foi estudada fitoquimicamente utilizando-se diversas técnicas cromatográficas. Deste estudo foram isoladas as substâncias **5, 17, 18, 23, 24, 25** e **28**. O FLUXOGRAMA 3.8 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.8 – Fracionamento da fração SVCMD

a^{vi}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 35,0$ cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

b^{vi}: cromatografia por adsorção

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 20$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo “flash” (230-400 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

c^{vi}: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 40,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

d^{vi}= cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna polimérica Asahipak
- eluição isocrática: MeOH 100%
- fluxo: 4,0 mL/min
- detector UV 245, 365 nm

e^{vi}: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro (φ x h = 4,5 x 50,0 cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

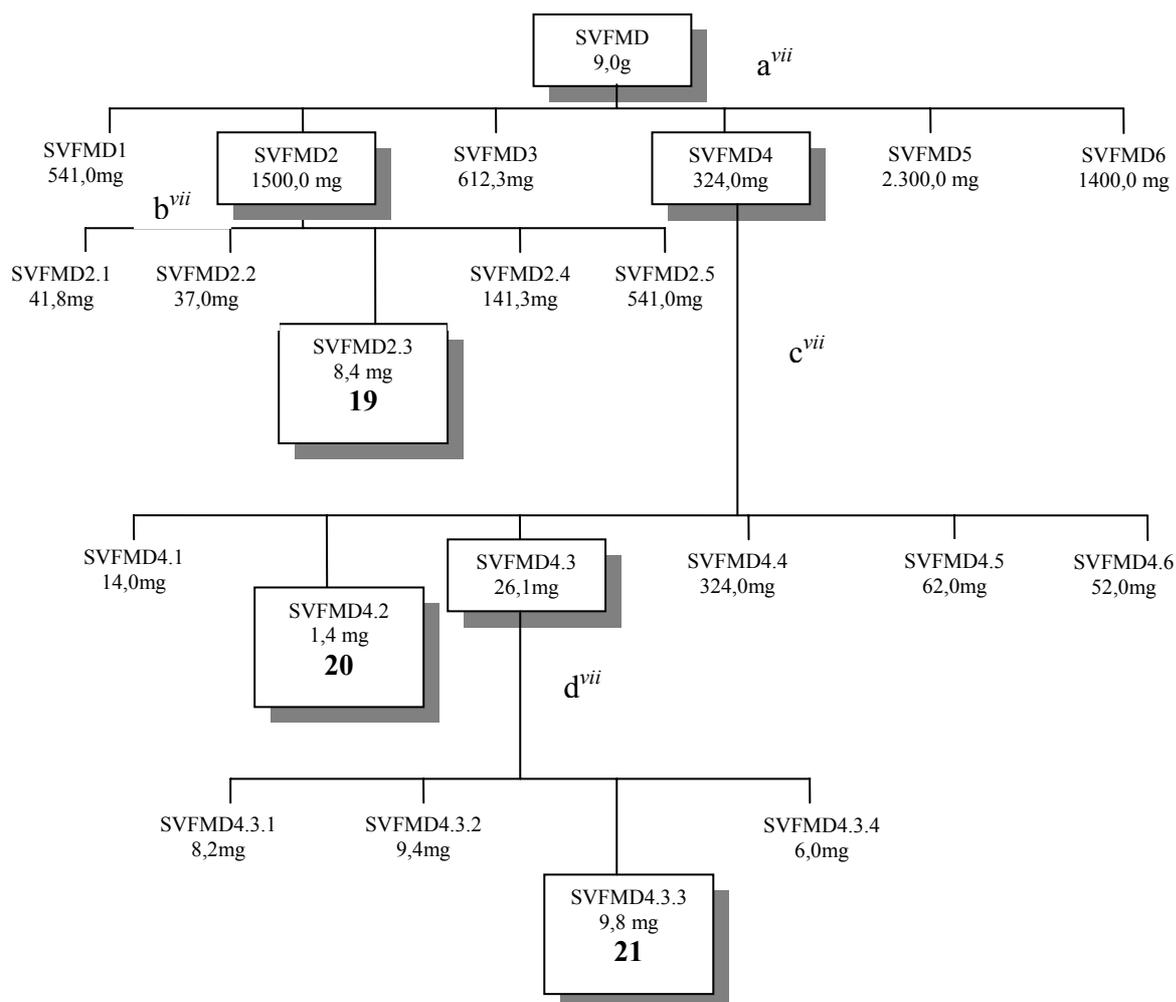
f^{vi}: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro (φ x h = 2,5 x 30,0 cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

$$g^{vi} = h^{vi} = f^{vi}$$

3.7.2 – Estudo Fitoquímico de SVFMD

Da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *S. versicolor* foi isolada as substâncias **19-21**, utilizando-se cromatografia por adsorção e exclusão. O FLUXOGRAMA 3.9 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.9 – Fracionamento da fração SVFMD

a^{vii}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 4,5 \times 25,0$ cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

b^{vii}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,0 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh): fluorisil (1:1)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

c^{vii}: cromatografia por exclusão:

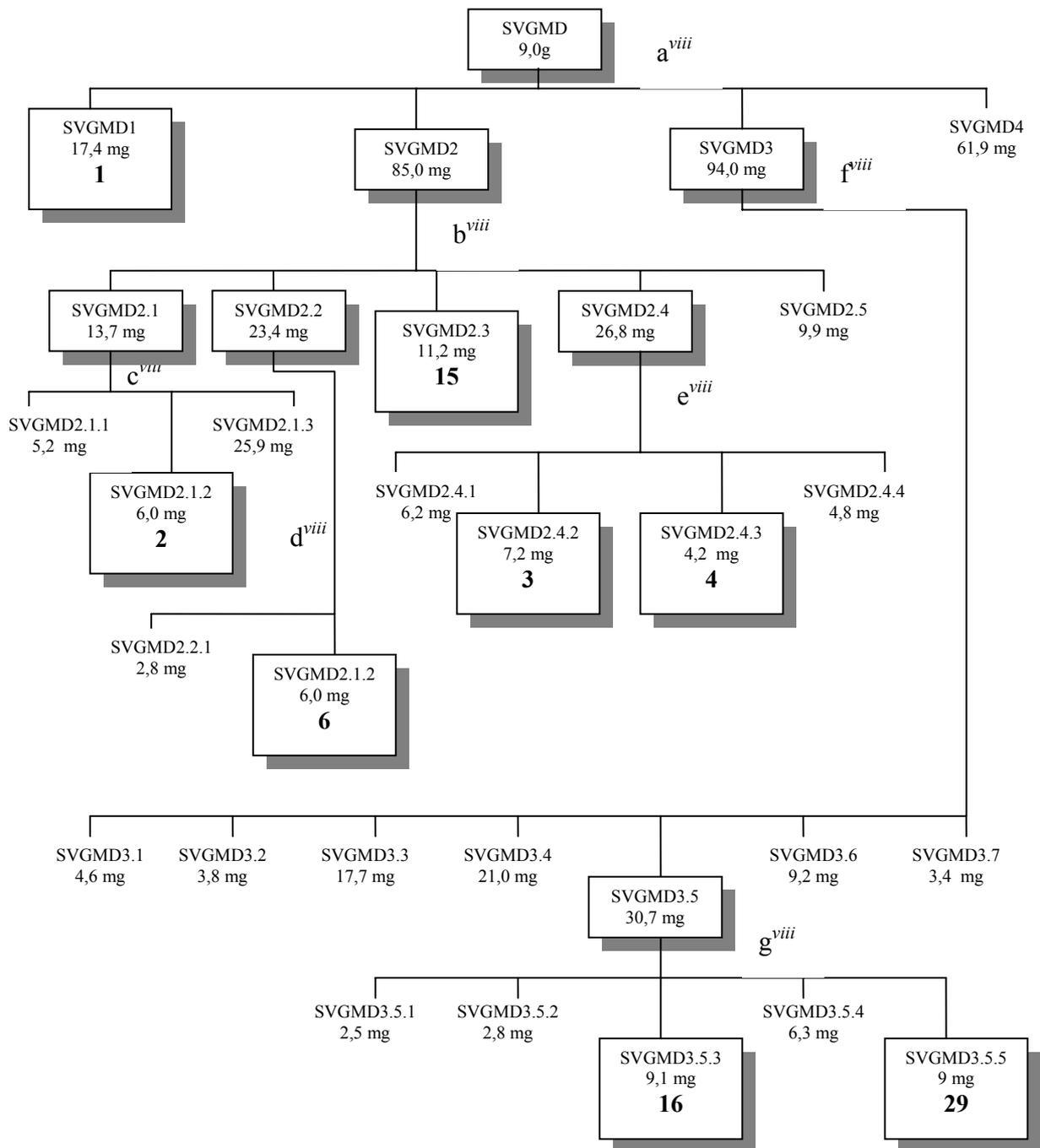
- coluna de vidro ($\phi \times h = 3,0 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

d^{vii}: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\phi \times h = 2,5 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

3.7.3 – Estudo Fitoquímico de SVGMD

Da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* foi isolada as substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **15**, **16** e **29**, utilizando-se basicamente cromatografia por adsorção e exclusão. O FLUXOGRAMA 3.10 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.10 – Fracionamento da fração SVGMD

a^{viii}: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro (ϕ x h = 4,5 x 25,0 cm)
- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)
- gradiente de eluição: hex 100%, hex:diel (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), diel 100%, diel:AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

b^{viii}: cromatografia circular por adsorção :

- placa de vidro (ϕ = 26,0 cm)
- fase estacionária: sílica gel (375 mesh, PF 254, 1mm)
- eluição isocrática: Hex:diel:MeOH (5:3:1)

c^{viii} = d^{viii} = e^{viii} = b^{viii}

f^{viii}: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro (ϕ x h = 3,0 x 30,0 cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH: diel (9:1)

g^{viii} = cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna polimérica Asahipak
- eluição isocrática: MeOH:diel (8:2)
- fluxo: 3,5 mL/min
- detector UV 245, 365 nm

3.8 – Metodologia dos Ensaios Biológicos

3.8.1 – Ensaios Biológicos com as Formigas Cortadeiras

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP - Rio Claro/SP, pela aluna Maria Fernanda Gomes Villalba Penãflor, sob a orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Neste ensaio as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida constituída por: 5% de glicose, 1% de peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico e 100 mL de água destilada. Após a mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas por aproximadamente 4 minutos e logo em seguida, autoclavada a 120° e 1 atm por 15 minutos. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel

filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada. O material a ser testado foi pesado, dissolvido no mesmo solvente em que ocorreu sua extração e incorporado na dieta (BUENO *et al.*, 1997).

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de dez formigas e mantidas em 5 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas.

A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ($p < 0,05$), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

3.8.2 – Ensaios Biológicos com o Fungo Simbionte

Os ensaios com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) - UNESP - Rio Claro/SP, pela aluna Roberta N. A. Almeida, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

O fungo foi isolado de um ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura constituído por dextrose (10 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), peptona (5 g/L), extrato de malte (10 g/L) e ágar (17 g/L); sendo que o pH do meio foi mantido em $6,0 \pm 0,2$.

As amostras submetidas aos ensaios foram preparadas e adicionadas ao meio de cultura, segundo a metodologia descrita por PAGNOCCA *et al.* (1990). Para cada amostra foram preparadas de 8 a 10

réplicas de tubos de cultura (massa fúngica), havendo um número idêntico de réplicas para o solvente e para o controle geral. Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 ± 2 °C, foram realizadas a observação visual do crescimento do micélio, comparando-se a massa fúngica do controle com a massa fúngica da amostra.

3.8.3 – Ensaio Biológicos com as Enzimas

Os ensaios frente às pectinases presentes no líquido fecal e nos ninho de *A. sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP pela aluna Cíntia Zavan sob a orientação do Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior.

Neste ensaio, 4µL de uma solução em DMSO (50 µg/µL) da amostra a ser testada foram adicionadas ao meio reacional (300 µL) constituído por 150 µL de pectina cítrica a $2\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ (Sigma P-9135) em 50 mmol/L de tampão citrato-fosfato (pH = 5); 75 µL de líquido fecal (contendo pectinases) diluído 500 vezes e 71 µL de água ultra-pura. Como controle foi preparada a mesma mistura reacional sem a adição da amostra a ser testada. As misturas reacionais foram incubadas a 37° C sob agitação por 30 minutos, sendo que alíquotas de 50 µL foram coletadas nos tempos de incubação zero e final. Estas alíquotas foram adicionadas a 100 µL de reagente ADNS (ácido dinitrosalisílico) (MILLER, 1959) e 100 µL de água. A mistura resultante foi fervida por 5 minutos, centrifugada por 3 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da densidade ótica (DO) a 540 nm. As diferenças de DO no tempo zero e final foram calculadas para os experimentos com a amostra testada (DO_E) e para o controle (DO_C). a atividade inibitória pectinásica foi calculada através da fórmula $I = 1 - (T C^{-1})$, onde T e C correspondem, respectivamente, à atividade pectinásica medida na presença e na ausência da amostra testada. Os

resultados das densidades óticas foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney (SIEGL, 1956).

3.9 – Caracterização da quitosana (QTS)

3.9.1 – Grau de desacetilação ($\overline{\% GD}$)

O grau de desacetilação ($\overline{\% GD}$) ou porcentagem de grupos aminos livres foi determinado por titulação condutimétrica com auxílio de um condutivímetro Micronal (modelo B330) e uma célula condutimétrica Digimed DMC-010.

Uma amostra de 200 mg de quitosana foi agitada em 40 mL de solução de ácido clorídrico $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ por 18 horas. Após a dissolução do polímero, a titulação foi conduzida com adição de NaOH $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ à temperatura de $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (SANTOS *et al*, 2003). A titulação condutimétrica foi realizada em triplicata.

3.9.2 – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C)

O espectro de RMN¹³C foi obtido em um espectrômetro BRUKER DRX400. O espectro foi obtido a partir de um procedimento descrito por SIGNINI E CAMPANA-FILHO, onde, aproximadamente 8 mg de amostra de quitosana são solubilizadas em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1 % (v/v), durante 24 horas formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para análise.

3.9.3 – Preparação das microesferas de quitosana.

Aproximadamente 4,0 g de quitosana foi dissolvida em 100,0 mL de ácido acético 5 %. A solução polimérica de quitosana foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica de marca Amershan Biosciences – Mod. Pump P-1, sobre uma solução de NaOH 2 mol.L^{-1} (método de inversão de fases). As microesferas

formadas foram deixadas durante 60 minutos numa solução de NaOH 2mol L⁻¹ sob agitação para completar a precipitação, posteriormente lavadas com água destilada até alcançar o meio neutro. O mesmo procedimento foi realizado incorporando-se uma flavona comercial, que após seca, a substância incorporada foi extraída com clorofórmio deuterado e realizado experimento de RMN¹H.

3.9.4 – Reticulação das microesferas de quitosana.

As microesferas de quitosana, aproximadamente 4,0 g foram colocadas em contato com uma solução de glutaraldeído 2,5 % cuja proporção foi de 1,5 mL por grama de microesferas. A mistura reacional foi mantida durante 24 horas, sob temperatura ambiente, para completar a reação de reticulação. Após esse tempo de permanência, o material foi filtrado com uma peneira, cujo diâmetro médio foi inferior a um milímetro, e lavado com água destilada para retirar o excesso do agente reticulante.

3.9.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microesferas de quitosana foram caracterizadas por microscopia de varredura em relação ao tamanho médio e a morfologia das partículas. As amostras foram colocadas em estabes, recobertas de ouro e micrografadas num microscópio eletrônico de varredura Zeiss – modelo DSM940A, do Laboratório Interdisciplinar e Cerâmica (LIEC) do Departamento de Química da UFSCar.

3.9.6 – Análise de porosimetria

A análise de porosimetria foi realizada utilizando-se um porosímetro da marca Micrometrics (USA) – modelo Porosizer 9320 do LIEC do Departamento de Química da UFSCar. Onde aproximadamente 0,5 g de microesferas de quitosana foram colocadas em uma câmara fechada ligada a um capilar graduado e um volume de mercúrio foi injetado sob pressão, preenchendo-a. A variação da pressão do sistema foi observada através do

capilar graduado pela variação do volume de mercúrio injetado. Desta maneira, pode-se aplicar a equação de Young-Laplace que correlaciona a pressão e o diâmetro possibilitando a determinação do tamanho médio dos poros, equação 1.

$$D = \frac{-4\gamma \cos \theta}{P}$$

Onde: D = diâmetro (m)

γ = tensão superficial (N/m)

θ = ângulo de contato superficial entre o mercúrio

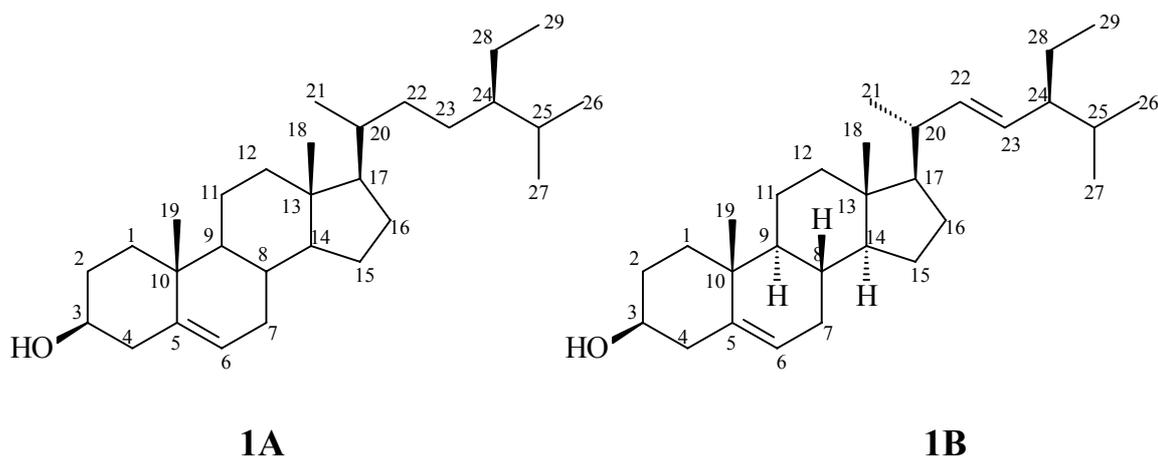
P = pressão

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 – Resultados e Discussões

4.1 – Substâncias Isoladas

Esteróides



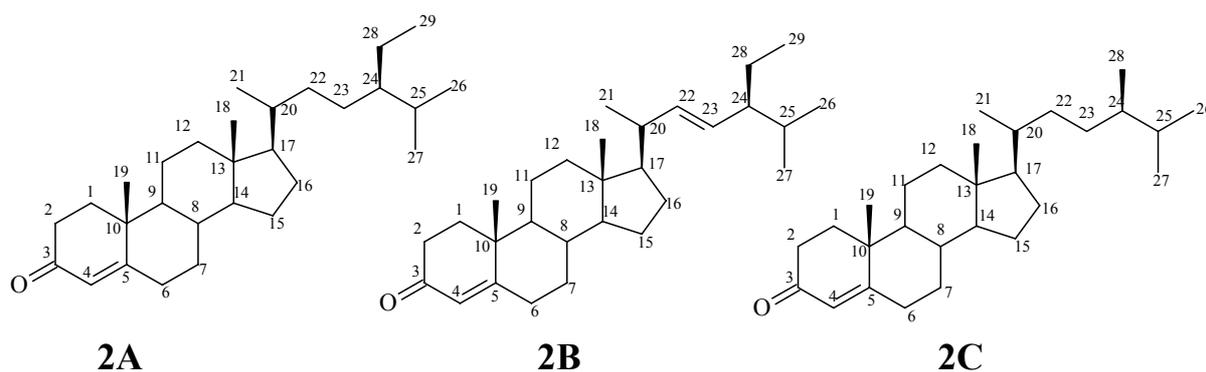
sitosterol (1A) e estigmasterol (1B) (em mistura)

m = 43,5 mg

procedência: galhos de *H. puberula* e de *S. versicolor*

isolamento: p. 22, 24 e 35

identificação: p. 52



sitostenona (2A), estigmasterona (2B) e campesterona (2C) (em mistura)

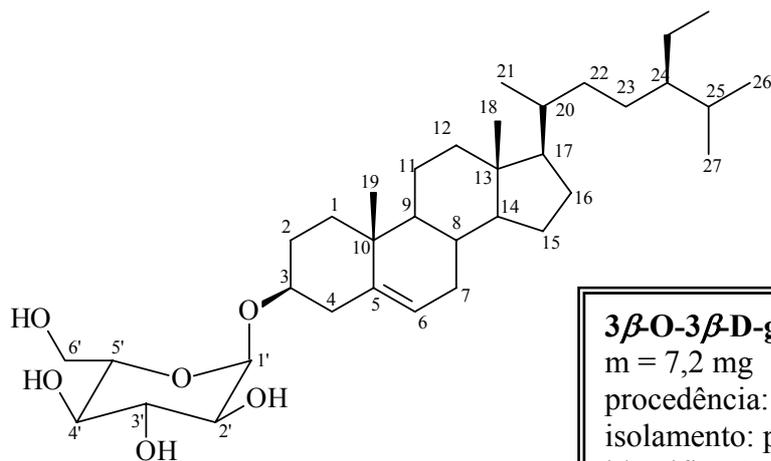
m = 13,4 mg

procedência: galhos de *H. puberula* e de *S. versicolor*

isolamento: p. 26 e 35

identificação: p. 55

referência: JOSHI *et al.*, 1974



3

3β-O-3β-D-glucopiranosil sitosterol

m = 7,2 mg

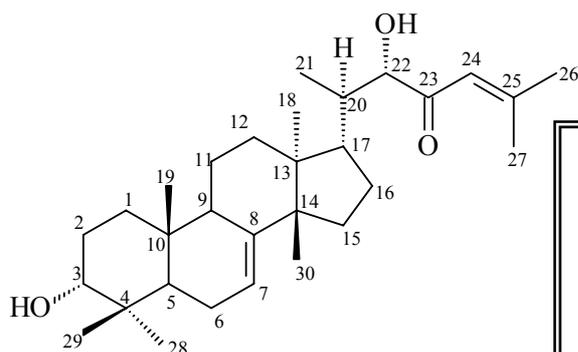
procedência: galhos de *S. versicolor*

isolamento: p. 35

identificação: p. 55

referência: SANTOS, 2005

Triterpenos



4

22S,3α-diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona

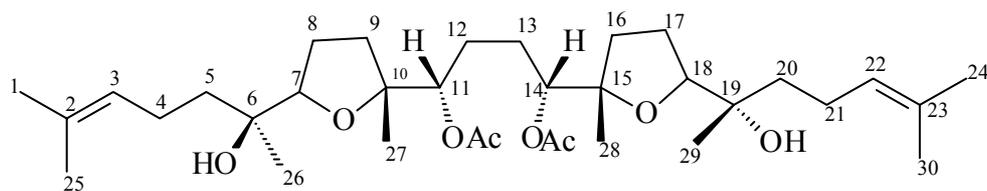
m = 4,2 mg

procedência: galhos de *S. versicolor*

isolamento: p. 35

identificação: p. 60

referência: LIANG *et al.*, 1989



5

eurileno

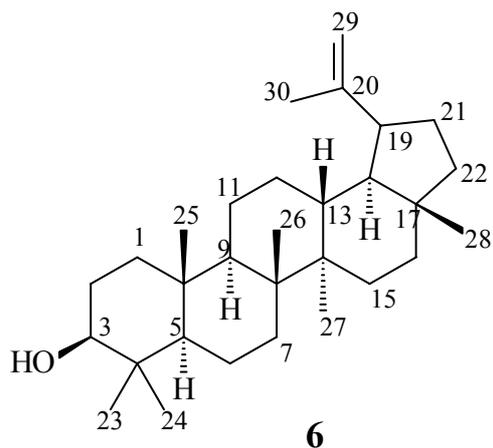
m = 21,2 mg

procedência: caule de *S. versicolor*

isolamento: p.31

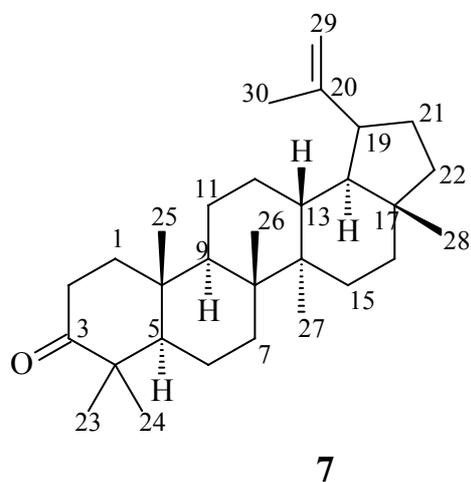
identificação: p. 67

referência: ARRIAGA *et al.*, 2002



lupeol

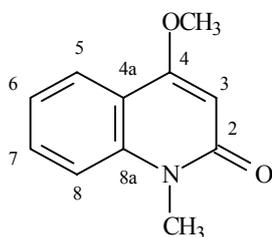
m = 17,2 mg
 procedência: folhas de *H. puberula* e galhos de *S. versicolor*
 isolamento: p. 26 e 35
 identificação: p. 70
 referência: ARRUDA, 1990



lupenona

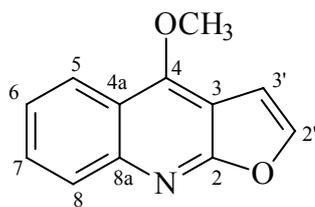
m = 28,4 mg
 procedência: galhos de *H. puberula*
 isolamento: p. 22
 identificação: p. 70
 referência: MAHATO *et al.*, 1994

Alcalóides



N-metil-4-metóxi-2-quinolona

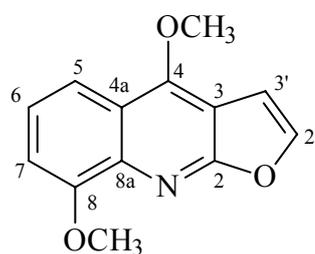
m = 17,3 mg
 procedência: folhas de *H. puberula*
 isolamento: p. 26
 identificação: p. 78
 referência: NAYAR *et al.*, 1971



9

dictamina

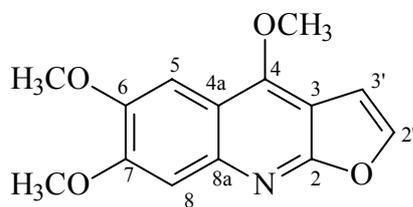
m = 28,8 mg
 procedência: galhos de *H. puberula*
 isolamento: p. 22 e 24
 identificação: p. 80
 referência: PAULINI *et al.*, 1989



10

δ-fagarina

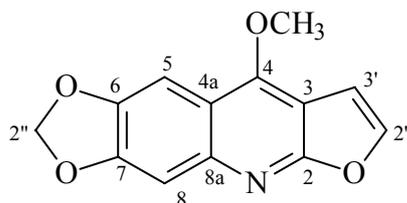
m = 7,8 mg
 procedência: folhas e galhos de *H. puberula*
 isolamento: p. 22 e 26
 identificação: p. 80
 referência: PAULINI *et al.*, 1989



11

kokusaginina

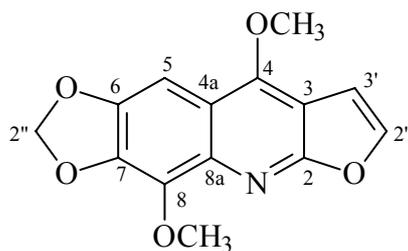
m = 37,1 mg
 procedência: folhas de *H. puberula*
 isolamento: p. 26 e 27
 identificação: p. 80
 referência: PAULINI *et al.*, 1989



12

maculina

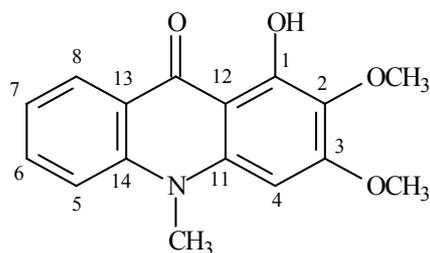
m = 15,3 mg
 procedência: galhos de *H. puberula*
 isolamento: p. 22
 identificação: p. 80
 referência: PAULINI *et al.*, 1989



13

flindersiamina

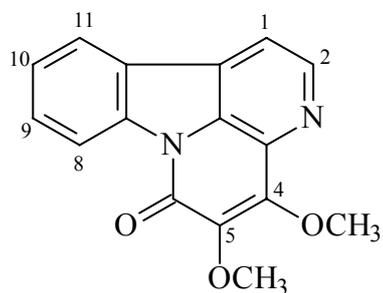
m = 24,0 mg
 procedência: folhas de *H. puberula*
 isolamento: p. 27
 identificação: p. 80
 referência: PAULINI *et al.*, 1989



14

arborinina

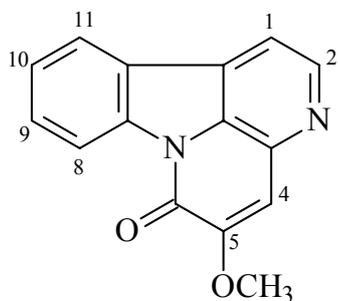
m = 1,2 mg
 procedência: folhas de *H. puberula*
 isolamento: p. 27
 identificação: p. 89
 referência: JANUÁRIO, 1995
 BERGENTHAL *et al.*, 1978



15

4,5-dimetóxicantin-6-ona

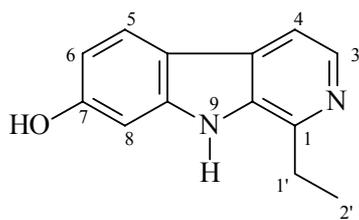
m = 11,2 mg
 procedência: galhos de *S. versicolor*
 isolamento: p. 35
 identificação: p. 92
 referência: RODRIGUES-FILHO, 1992



16

5-metóxicantin-6-ona

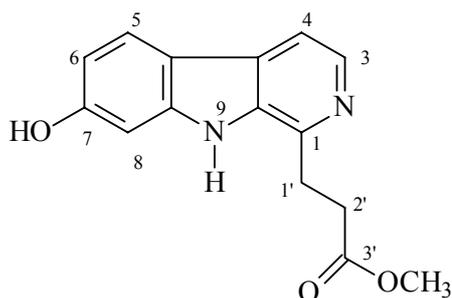
m = 9,1 mg
 procedência: galhos de *S. versicolor*
 isolamento: p. 35
 identificação: p. 92
 referência: VIEIRA, 1995



17

7-hidróxi-1-etil β -carbolina

m = 0,9 mg
 procedência: caule de *S. versicolor*
 isolamento: p. 31
 identificação: p. 101

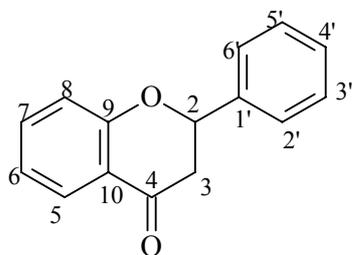


18

7-hidróxi-1,1'-propionato de metila β -carbolina

m = 1,3 mg
 procedência: caule de *S. versicolor*
 isolamento: p. 31
 identificação: p. 101

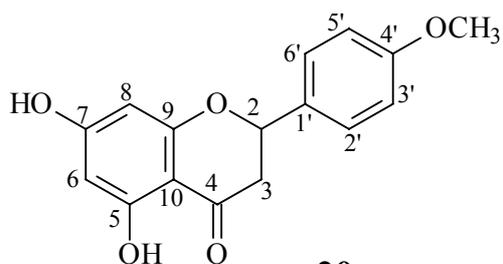
Flavonóides



19

flavanona

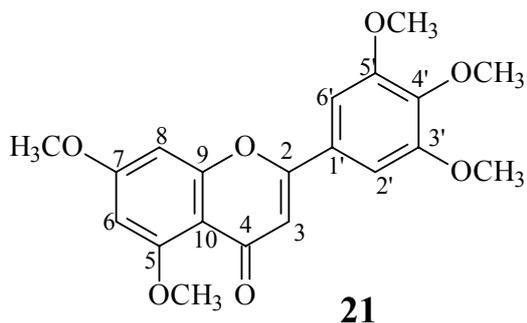
m = 8,4 mg
 procedência: folhas de *S. versicolor*
 isolamento: p. 33
 identificação: p. 111
 referência: PELTER *et al.*, 1976



20

isosakuranetina

m = 1,4 mg
 procedência: folhas de *S. versicolor*
 isolamento: p. 33
 identificação: p. 111
 referência: VASCONCELOS *et al.*, 1998



5,7,3',4',5'-pentametóxilavona

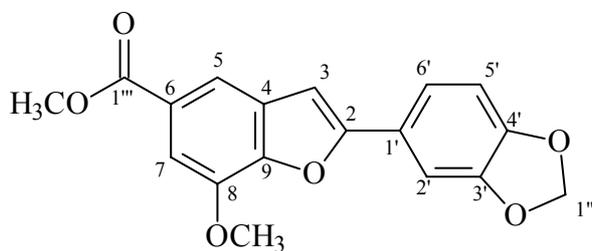
m = 9,8 mg

procedência: folhas de *S. versicolor*

isolamento: p. 33

identificação: p. 111

referência: FRASER & LEWIS, 1974



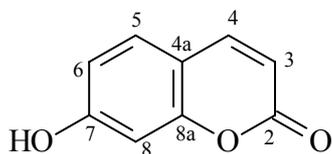
estilbeno 22

m = 7,3 mg

procedência: caule de *H. puberula*

isolamento: p. 29

identificação: p. 119



7-hidroxicumarina

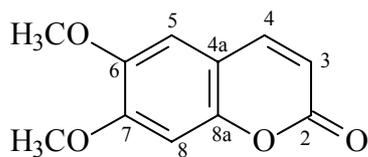
m = 9,3 mg

procedência: caule de *S. versicolor*

isolamento: p. 31

identificação: p. 129

referência: KONG *et al.*, 1995



6,7-dimetoxicumarina

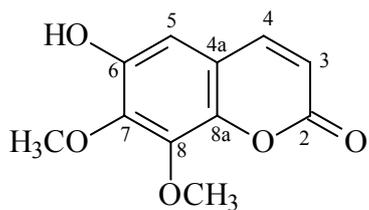
m = 9,3 mg

procedência: caule de *S. versicolor*

isolamento: p. 31

identificação: p. 129

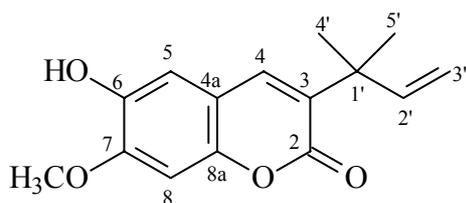
referência: MAFEZOLI, 2001



25

6-hidroxi-7,8-dimetoxicumarina

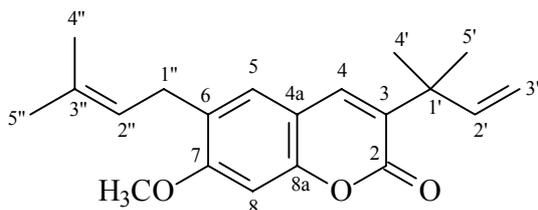
m = 1,2 mg
 procedência: caule de *S. versicolor*
 isolamento: p. 31
 identificação: p. 129
 referência: AHLUWALIA *et al.*, 1978



26

3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina

m = 9,3 mg
 procedência: caule de *H. puberula*
 isolamento: p.29
 identificação: p. 129
 referência: BERGENTHAL *et al.*, 1978

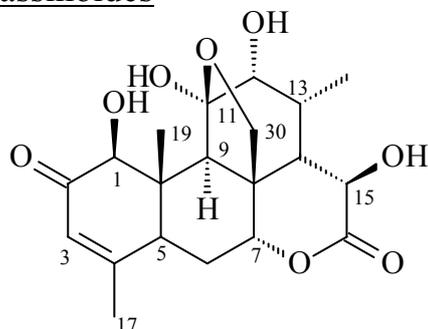


27

metileter-graveliferona

m = 8,3 mg
 procedência: caule de *H. puberula*
 isolamento: p. 29
 identificação: p. 129
 referência: BERGENTHAL *et al.*, 1978

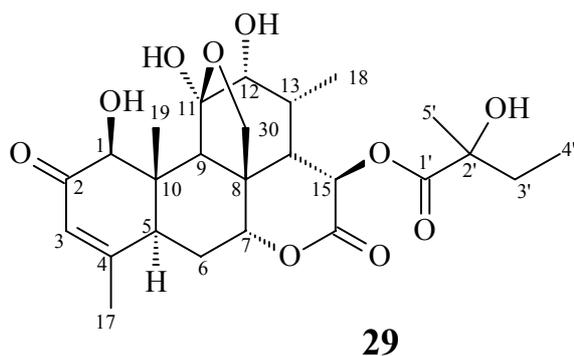
Quassinóides



28

glaucarubolona

m = 11,3 mg
 procedência: caule de *S. versicolor*
 isolamento: p. 31
 identificação: p. 149
 referência: VIEIRA, 1995



glaucarubinona

m = 9,0 mg

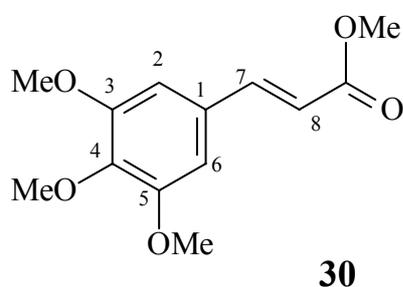
procedência: galhos de *S. versicolor*

isolamento: p. 35

identificação: p. 155

referência: WATERMAN *et al.*, 1984

Derivados do Ácido Cinâmico



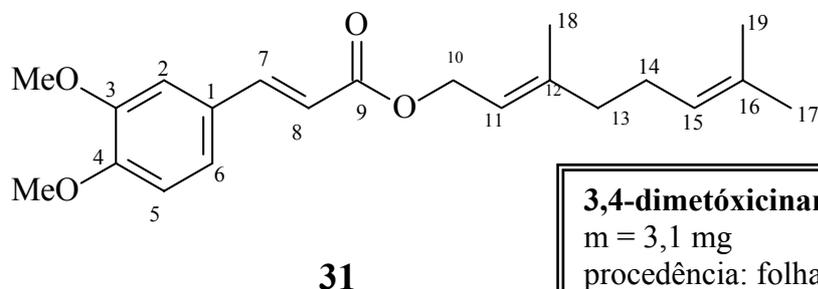
3,4,5-trimetóxicinamato de metila

m = 18,1 mg

procedência: folhas de *H. puberula*

isolamento: p. 22 e 27

identificação: p. 166



3,4-dimetóxicinamato de geranila

m = 3,1 mg

procedência: folhas de *H. puberula*

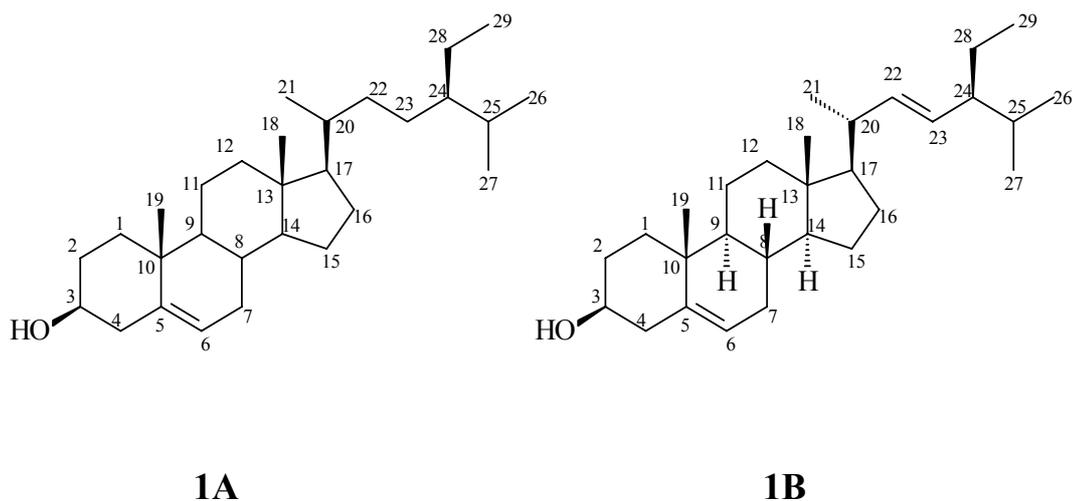
isolamento: p. 24

identificação: p. 166

4.2 – Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol e o estigmasterol são os esteróides mais freqüentemente encontrados no reino vegetal (DEWICK, 2001). Quase sempre esses esteróides encontram-se em mistura devido às suas semelhanças estruturais ocasionando dificuldades em suas separações, então, na maioria das vezes, suas identificações são realizadas em misturas através de CG/EM.

4.2.1 – Identificação estrutural do sitosterol (1A) e estigmasterol (1B)



Os esteróides sitosterol e estigmasterol foram obtidos em mistura nos extratos hexânico e diclorometânico dos galhos de *H. puberula* e da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* (p. 22, 24 e 35) e caracterizados por RMN¹H e EM.

Os sinais na região de δ 0,68 – 2,41, observados no espectro de RMN¹H (FIGURA 4.1) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal. O duplete largo em δ 5,34 e um multiplete em δ 3,55 foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente. Os

sinais em δ 5,07 (*dd*, $J = 15,0$ e $8,9$ Hz) e δ 5,14 (*dd*, $J = 15,0$ e $8,9$ Hz), foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol.

A presença da mistura do sitosterol **1A** e do estigmasterol **1B** foi confirmada por CG-EM, cujos picos do íon molecular em m/z 414 e 412 conferiram com as fórmulas moleculares $C_{29}H_{50}O$ e $C_{29}H_{48}O$, respectivamente (FIGURA 4.2). O ESQUEMA 4.1 apresenta propostas de fragmentação do sitosterol.

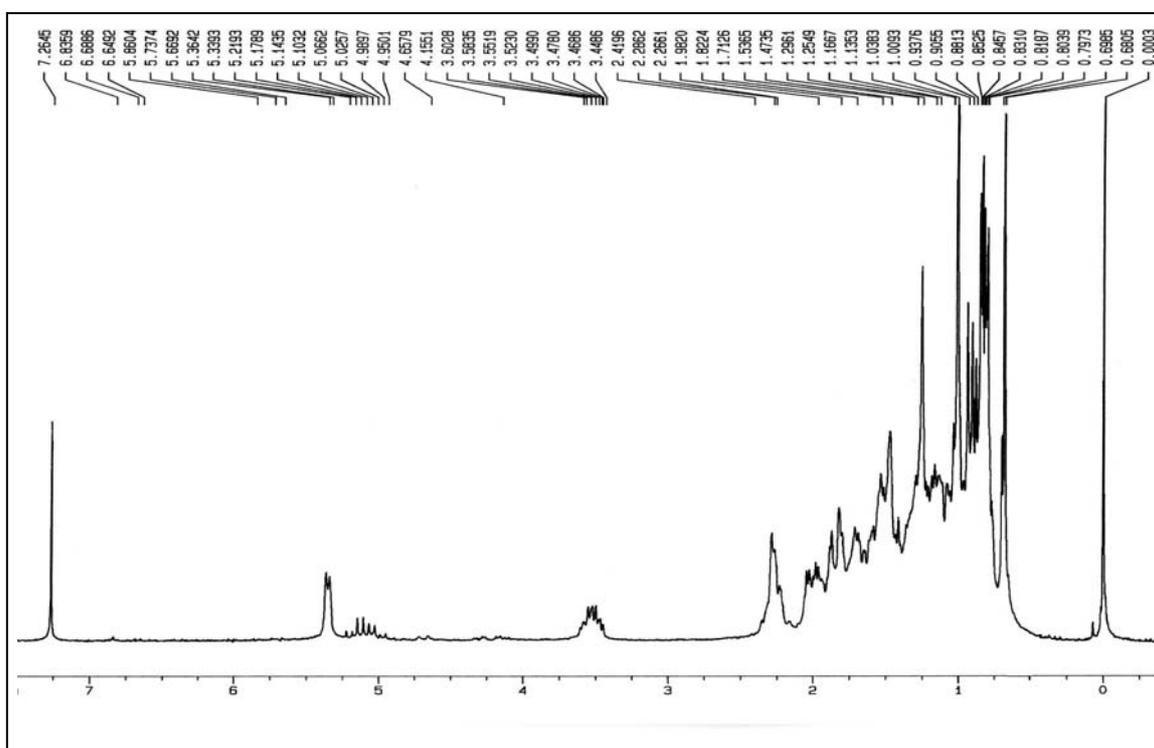


FIGURA 4.1 – Espectro de RMN^1H da mistura **1A** + **1B** ($CDCl_3$, 200MHz)

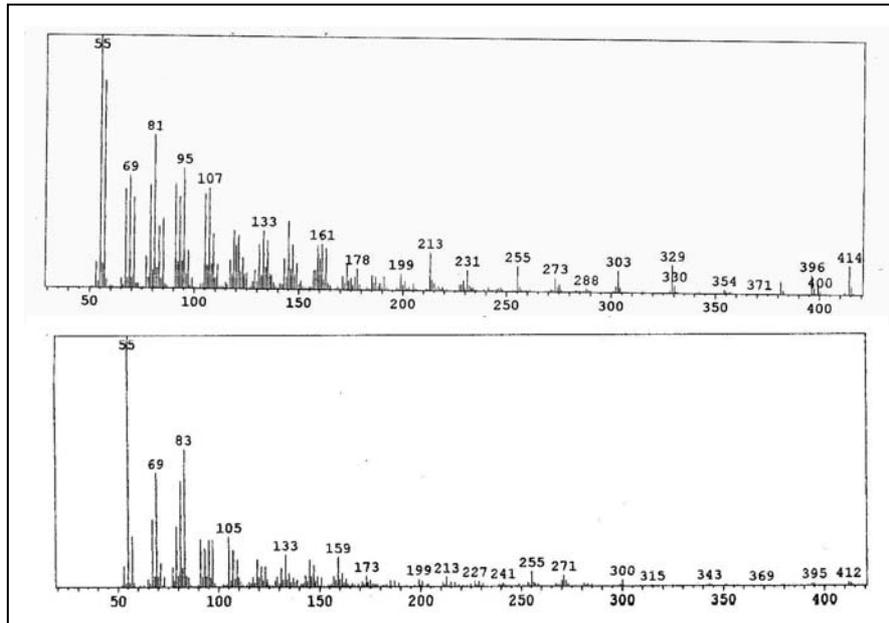
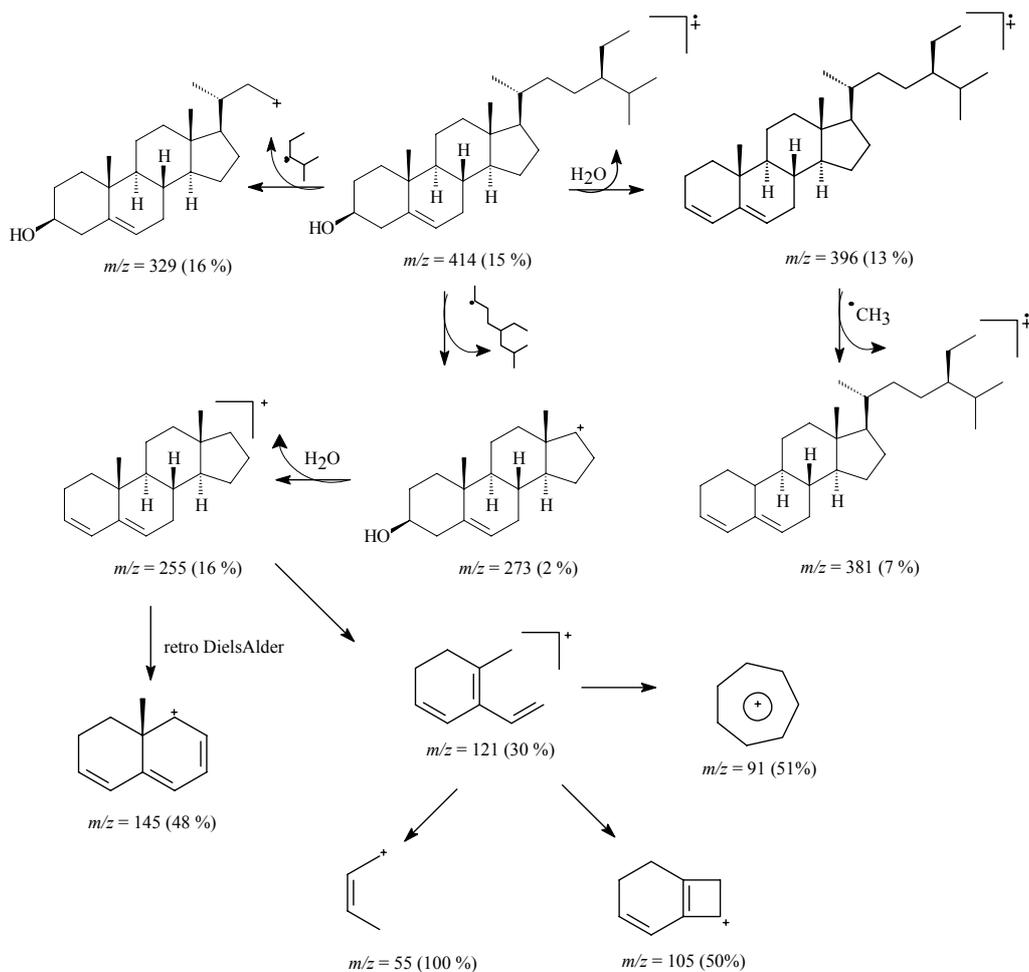
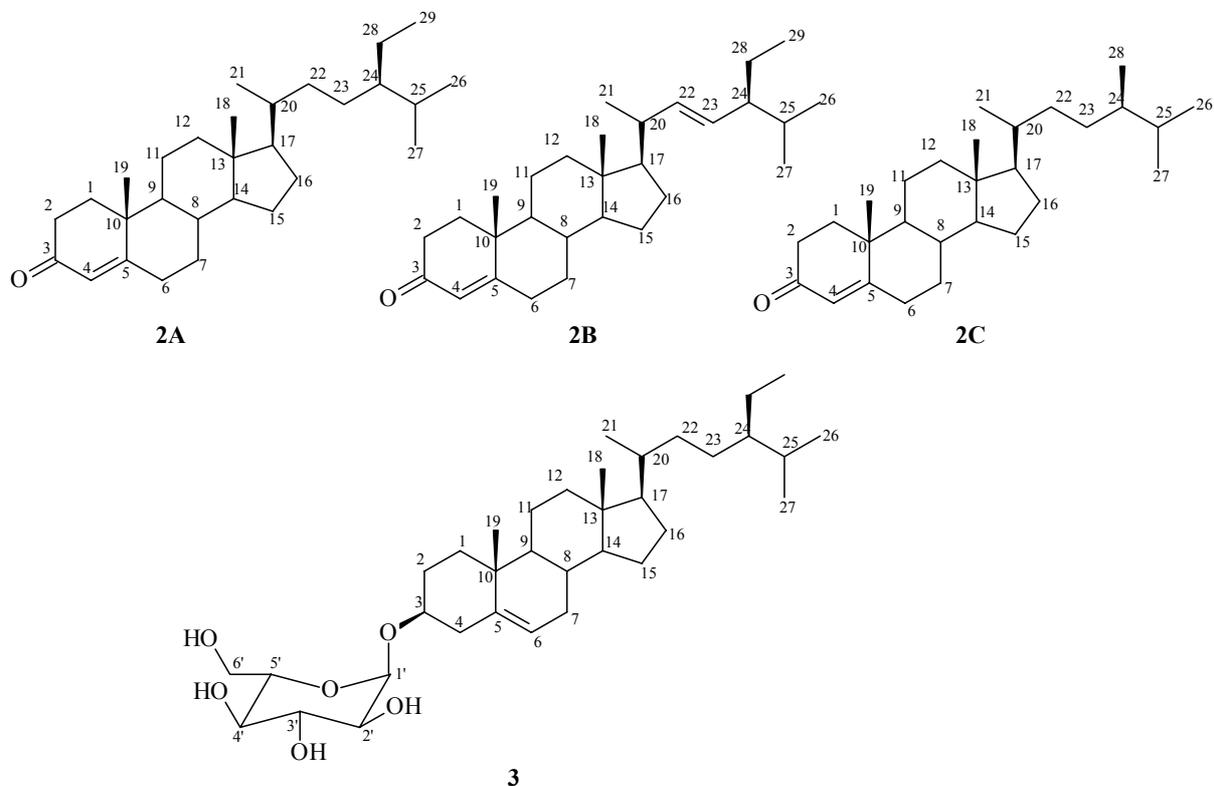


FIGURA 4.2 – Espectro de massas de **1A** e **1B** (ESI = 70 eV)



ESQUEMA 4.1 – Proposta de Fragmentação do sitosterol

4.2.2 – Identificação da mistura sitostenona (**2A**), estigmastenona (**2B**) e campestenona (**2C**) e do 3β -O- β -D-glucopiranosilsterol (**3**)



Os esteróides sitostenona (**2A**), estigmastenona (**2B**) e campestenona (**2C**) foram obtidos em mistura do extrato hexânico das folhas de *H. puberula* e da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* (p. 25 e 35), deste último, também foi isolado o esteróide 3β -O- β -D-glucopiranosilsterol **3**, (p. 35), ambos apresentaram-se como sólido branco amorfo.

Os espectros de RMN¹H da mistura **2A** + **2B** + **2C** e **3** (FIGURAS 4.3 e 4.6, respectivamente) apresentaram sinais semelhantes aos descritos anteriormente para a mistura **1A** e **1B**, ou seja, um conjunto de sinais na região mais blindada do espectro em δ 2,4 - 0,7 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do núcleo esteroidal.

No espectro de RMN¹H da mistura **2A** e **2B** foi observado um sinal na região de hidrogênios olefínicos em δ 5,72 (*sl*, 1H), o qual foi atribuído ao H-

4 e a ausência do hidrogênio carbinólico em C-3 sugeriu uma oxidação nessa posição. O sinal em δ 199,7 referente a carbono carbonílico, observado no espectro de RMN¹³C de **2** (FIGURA 4.4) indicou ser uma carbonila. A comparação com dados da literatura (JOSHI, *et al.*, 1974), (TABELA 4.1), confirmou ser a sitostenona a substância **2A**. Ainda no espectro de RMN¹H (FIGURA 4.3), a presença de um multipletto em δ 5,20 referentes a hidrogênios olefínicos, indicou que provavelmente a sitostenona encontrava-se em mistura. Esses dados foram comprovados pelo do espectro de ESI (FIGURA 4.5), onde pode-se observar a presença da sitostenona **2A** (m/z 412), da estigmastenona **2B** (m/z 410) e da campestenona **2C** (m/z 398).

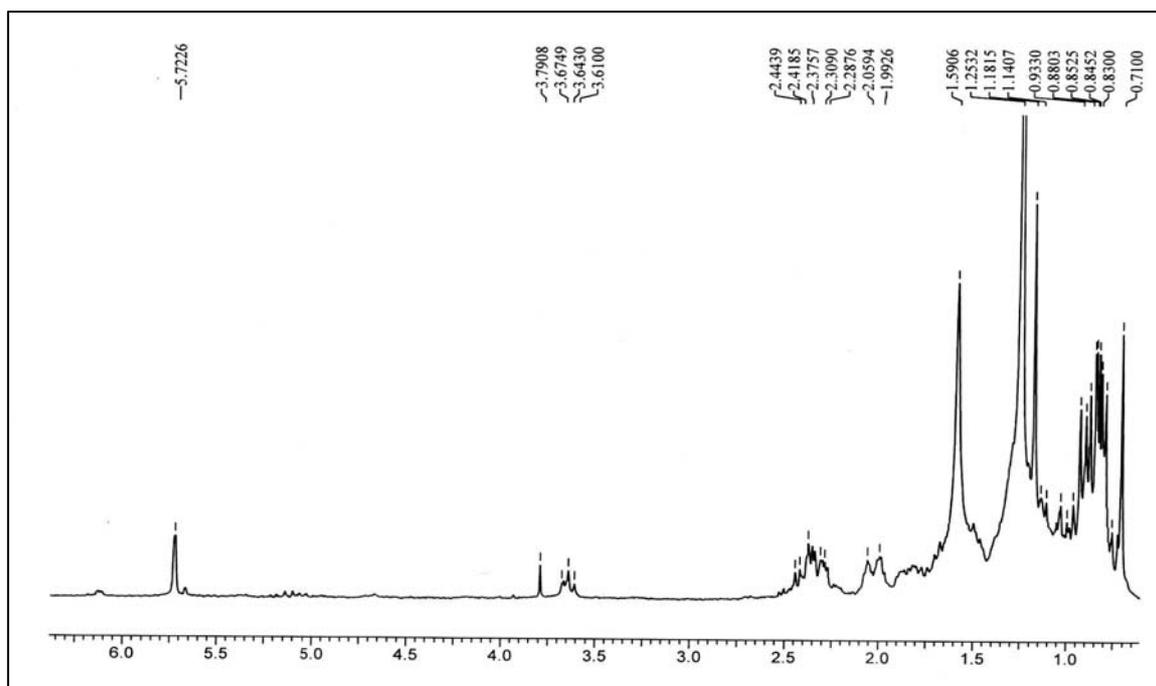


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN ¹H de **2** (CDCl₃, 200 MHz)

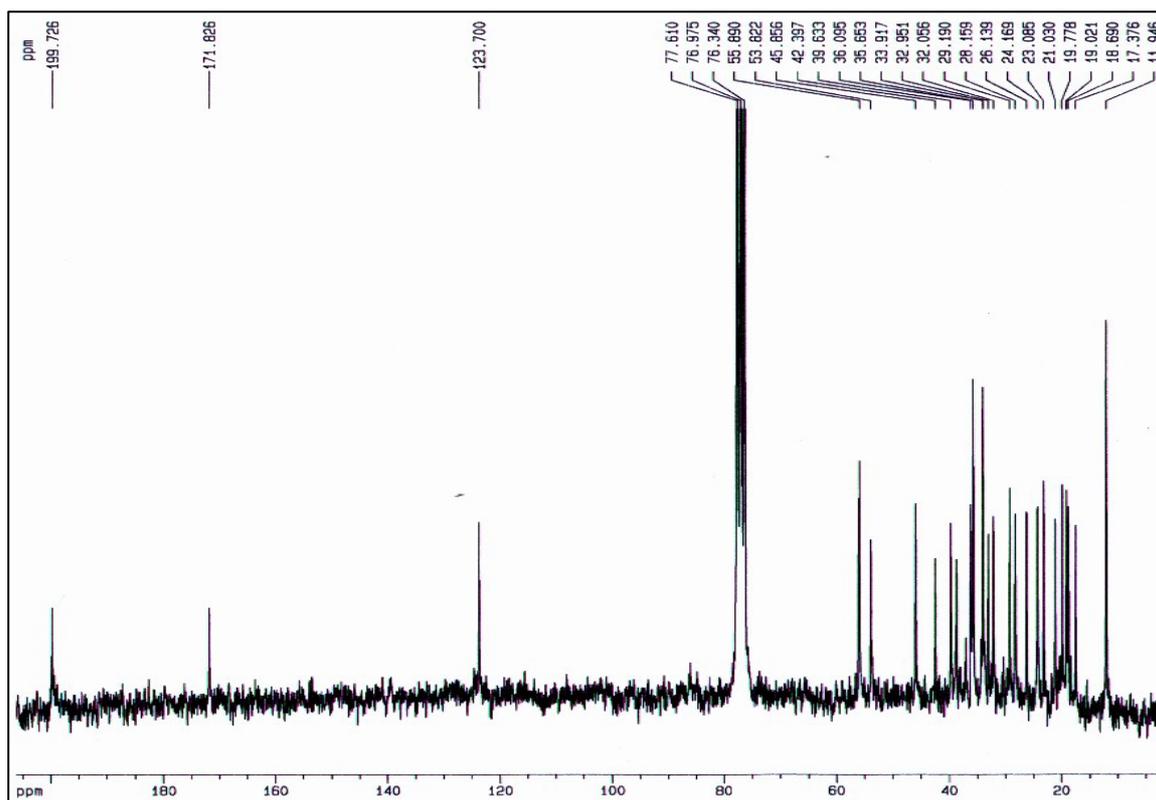


FIGURA 4.4 – Espectro de RMN¹³C de **2** (CDCl₃, 50 MHz).

TABELA 4.1 – Dados de RMN¹H de **2** (200 MHz, CDCl₃)

H	Sitostenona 2 (200 MHz, CDCl ₃)	JOSHI, <i>et al.</i> , 1974 (80MHz, CDCl ₃)
4	5,72 (<i>sl</i>)	5,80 (<i>sl</i>)
18	0,71 (3H, <i>s</i>)	0,70 (3H, <i>s</i>)
19	1,18 (3H, <i>s</i>)	1,20 (3H, <i>s</i>)
21	1,14 (3H, <i>d</i>)	1,09 (3H, <i>d</i>)
26	0,78 (3H, <i>d</i>)	0,78 (3H, <i>d</i>)
27	0,88 (3H, <i>d</i>)	0,88 (3H, <i>d</i>)
29	0,83 (3H, <i>t</i>)	0,80 (3H, <i>d</i>)

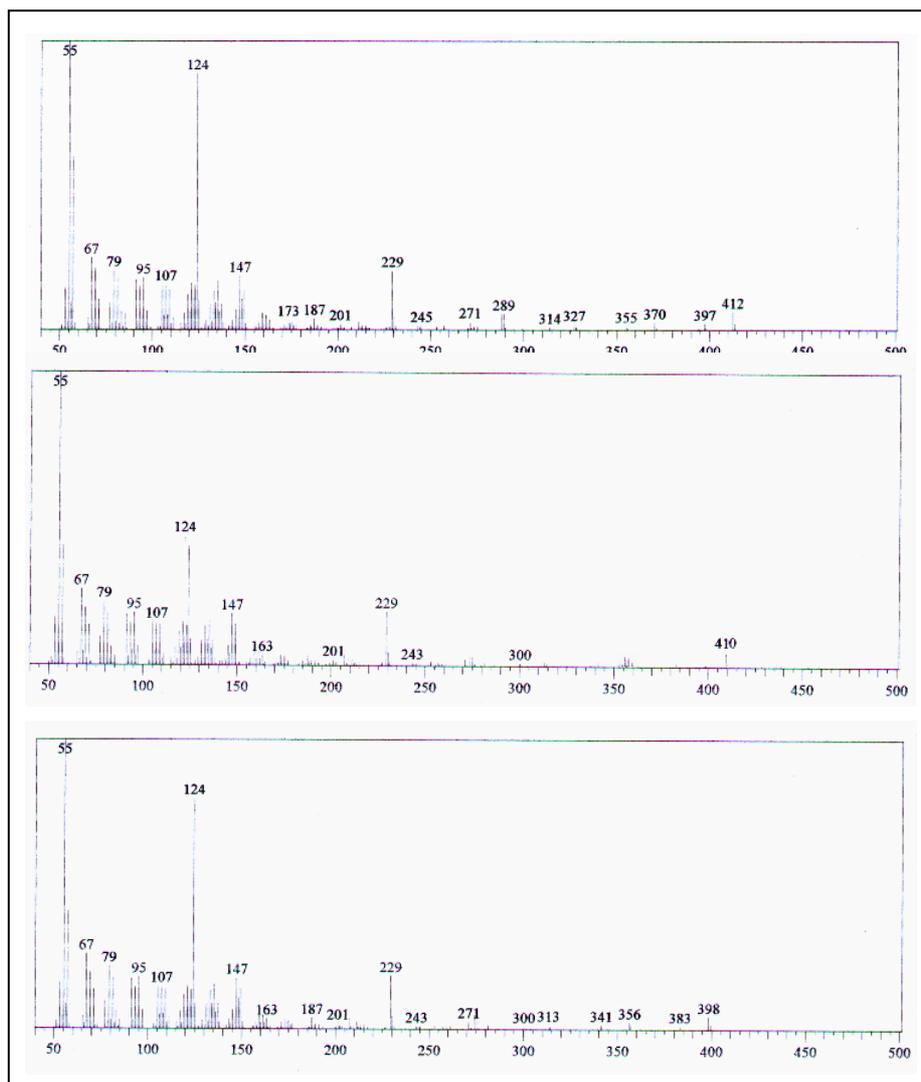


FIGURA 4.5 – Espectros de massas de **2A**, **2B** e **2C** (ESI = 70 eV)

No espectro de RMN¹H de **3** (FIGURA 4.6) pôde-se observar um acúmulo de sinais na região dos hidrogênios carbinólicos sugerindo a presença de um açúcar na estrutura.

O espectro de RMN¹³C **3** (FIGURA 4.7) apresentou cinco sinais referentes a carbonos carbinólicos entre δ 71,5 – 78,4, um sinal em δ 102,4 referente ao carbono anomérico em C-1' e um carbono metilênico em 62,7 δ caracterizando uma glicose ligada ao esqueleto esteroideal.

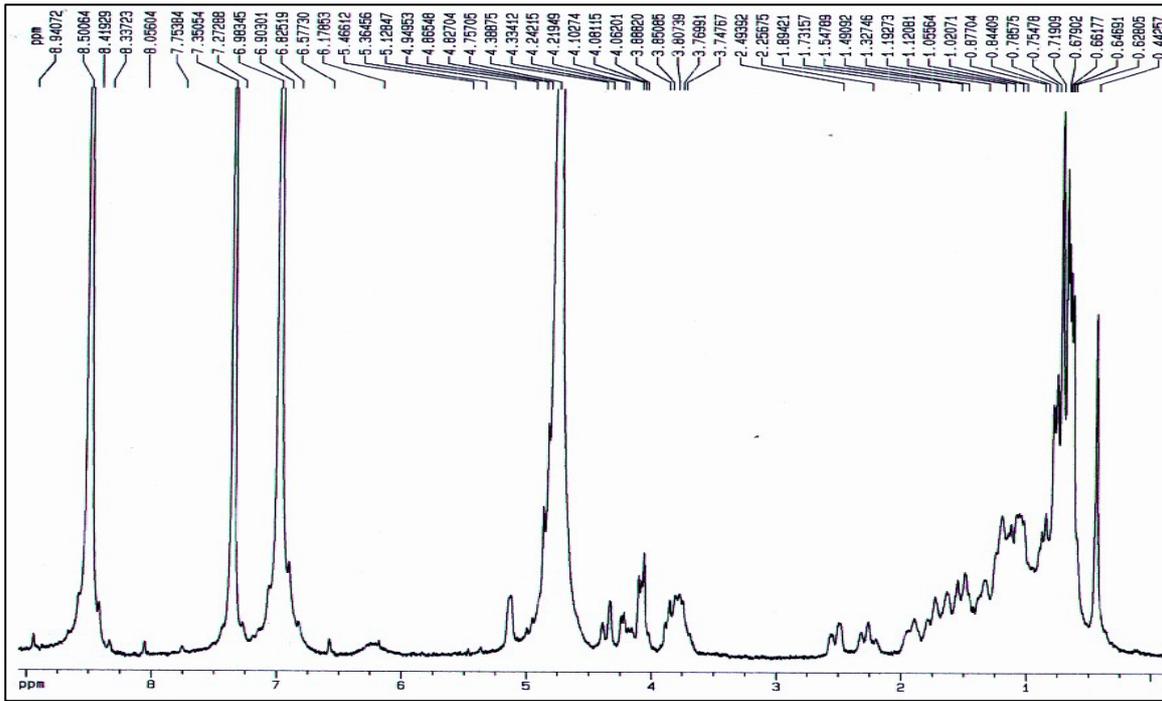


FIGURA 4.6 – Espectro de RMN ^1H de **3** (Pyr- d_5 , 200 MHz)

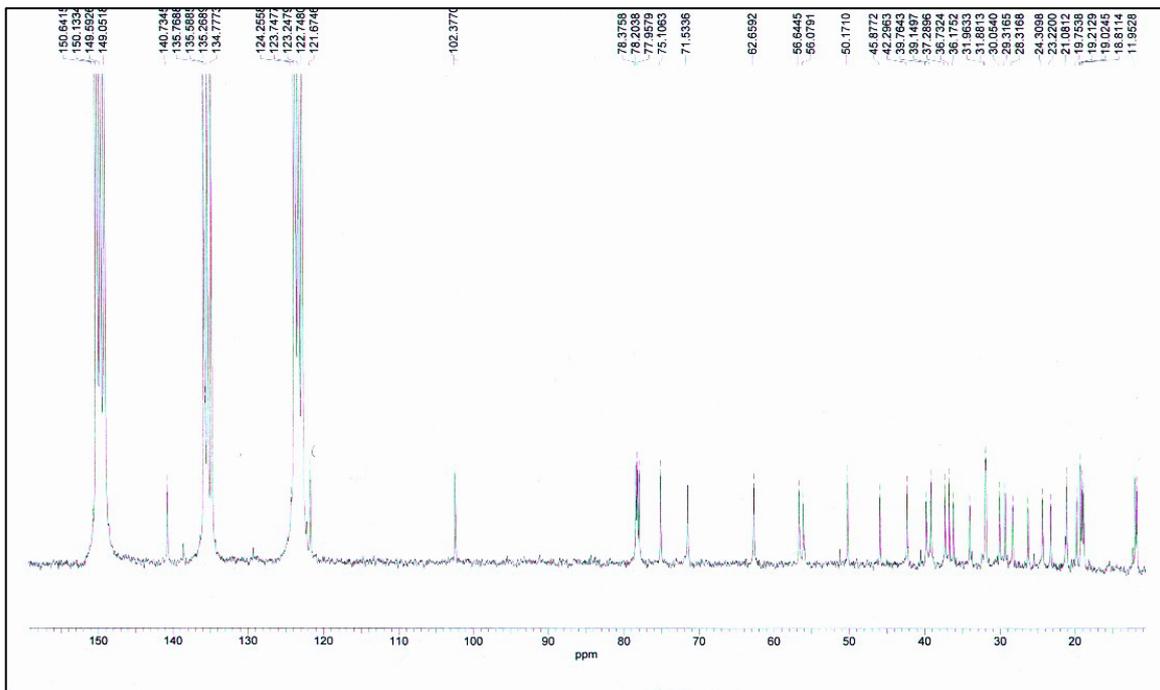
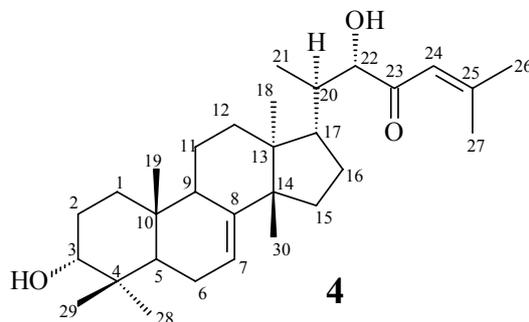


FIGURA 4.7 – Espectro de RMN ^{13}C de **3** (Pyr- d_5 , 50 MHz)

4.3 – Triterpenos

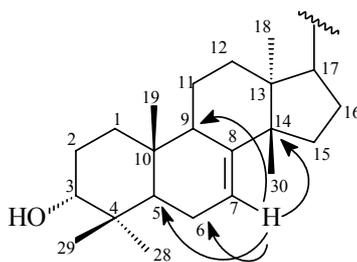
4.3.1 – Identificação estrutural do 22*S*,3 α -diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona (4)



O triterpeno **4**, cristais em forma de agulha, proveniente da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* (p. 35), foi caracterizado por RMN de 1 e 2 D e comparados com dados da literatura (LIANG *et al.*, 1989) como sendo o triterpeno 22*S*,3 α -diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona.

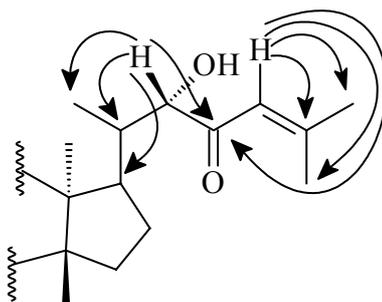
O espectro de RMN¹H de **4** (FIGURA 4.8) apresentou oito sinais de metilas em δ 0,64 (*d*, $J = 6,6$ Hz, 3H), δ 0,77 (*s*, 3H), δ 0,87 (*s*, 3H), δ 0,92 (*s*, 3H), δ 0,94 (*s*, 3H), δ 1,03 (*d*, 3H, $J = 0,64$ Hz), δ 1,97 (*d*, $J = 1,0$ Hz, 3H) e δ 2,22 (*d*, $J = 1,0$ Hz, 3H) e um sinal em δ 5,27 (*dd*, $J = 4$ e 2,5 Hz, 1H) referente ao hidrogênio olefínico H-7. Estes dados juntamente com os 30 sinais de carbono observados no espectro de RMN¹³C, (FIGURA 4.9), indicaram se tratar de um triterpeno do tipo tirucalano a substância **4**, classe esta, muito comum em plantas da família Simaroubaceae.

A posição da dupla ligação entre os C-7 e C-8 foi confirmada através das correlações do sinal δ 5,27 com os sinais referentes a C-5 (δ 44,6), C-9 (δ 48,7) e C-14 (δ 51,4), no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.10). O sinal em δ 5,27, também apresentou correlação no espectro de COSY ¹H-¹H 45° (FIGURA 4.11) com o multipletto em δ 2,00, que foi atribuído a H-6 (*m*, 2H).



Através da análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.12) foi possível realizar todas as atribuições dos carbonos hidrogenados de **4** e as correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.13) permitiram fazer as atribuições dos sinais referentes aos hidrogênios das metilas: Me-18 (δ 0,87), Me-19 (δ 0,77), Me-28 (δ 0,92), Me-29 (δ 0,94) e Me-30 (δ 1,03).

A cadeia lateral foi definida pela presença do dubleto em δ 4,17 (*d*, $J = 1,6$ Hz, 1H), do septupletto em δ 6,08 ($J = 1,2$ Hz, 1H) e de dois dubletos em δ 2,22 e δ 1,97 ($J = 1,0$ Hz). O sinal em δ 6,08 apresentou correlação no espectro de HMBC (FIGURA 4.14) com os sinais dos carbonos metílicos C-26 (δ 28,1) e C-27 (δ 21,3), do carbono carbonílico em δ 201,4 e do carbono olefinico em δ 159,3 e o sinal do dubleto em δ 4,17, correlacionou-se com os sinais do carbono carbinólico em δ 201,4, da metila C-21 (δ 11,9), do carbono em δ 39,5 e do carbono em δ 49,0 definidos através do espectro de HSQC (FIGURA 4.12) como sendo o C-20 e C-17, respectivamente. Portanto os sinais em δ 6,08 e δ 4,17, foram definidos como sendo H-24 e H-22, respectivamente.



Foram observados, ainda no espectro de HMBC (FIGURA 4.14) as correlações dos sinais das metilas vinílicas Me-26, δ 2,22 (d , $J = 1,0$ Hz, 3H) e Me-27, δ 1,97 (d , $J = 1,0$ Hz, 3H) com os sinais em δ 119,2 e δ 159,3 referentes aos carbonos olefinicos C-24 e C-25, respectivamente. A estereoquímica da cadeia lateral foi baseada em comparação com dados da literatura (PAULA, 1996 e LIANG *et al.*, 1989) (TABELA 4.2), cujo autor definiu a estereoquímica através de experimento utilizando éster de Mosher, sendo caracterizado como o 22*S*,3 α -diidroxitirucala-7,24-dien-23-ona, o triterpeno **4**.

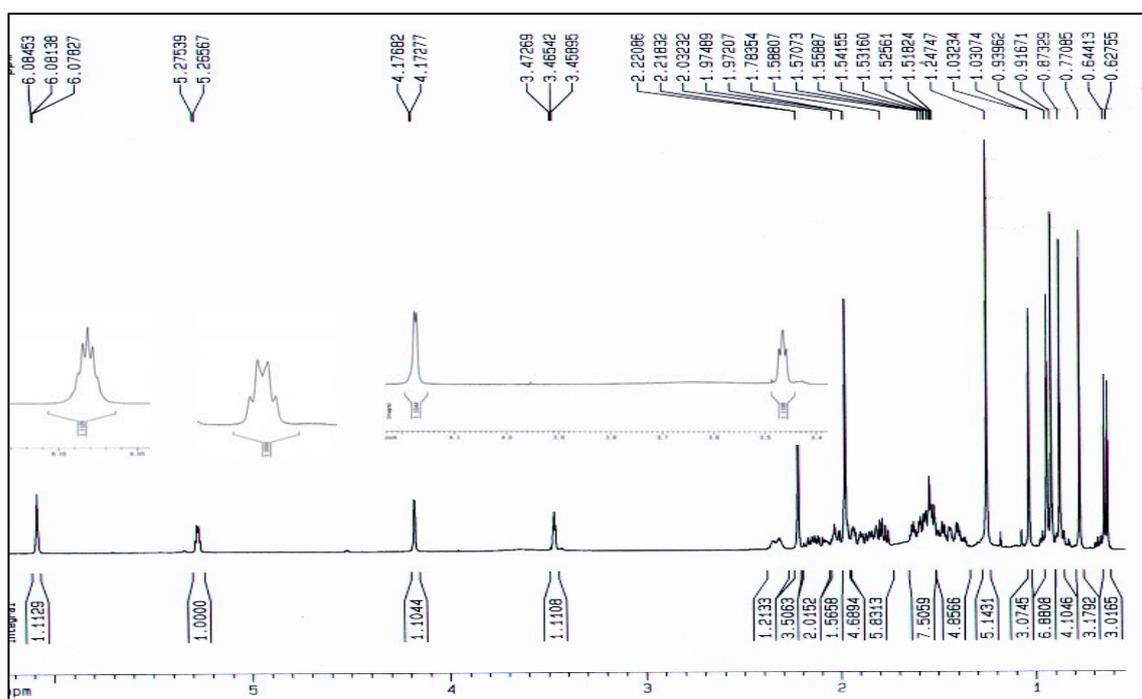


FIGURA 4.8 – Espectro de RMN ¹H de **4** (CDCl₃, 400 MHz)

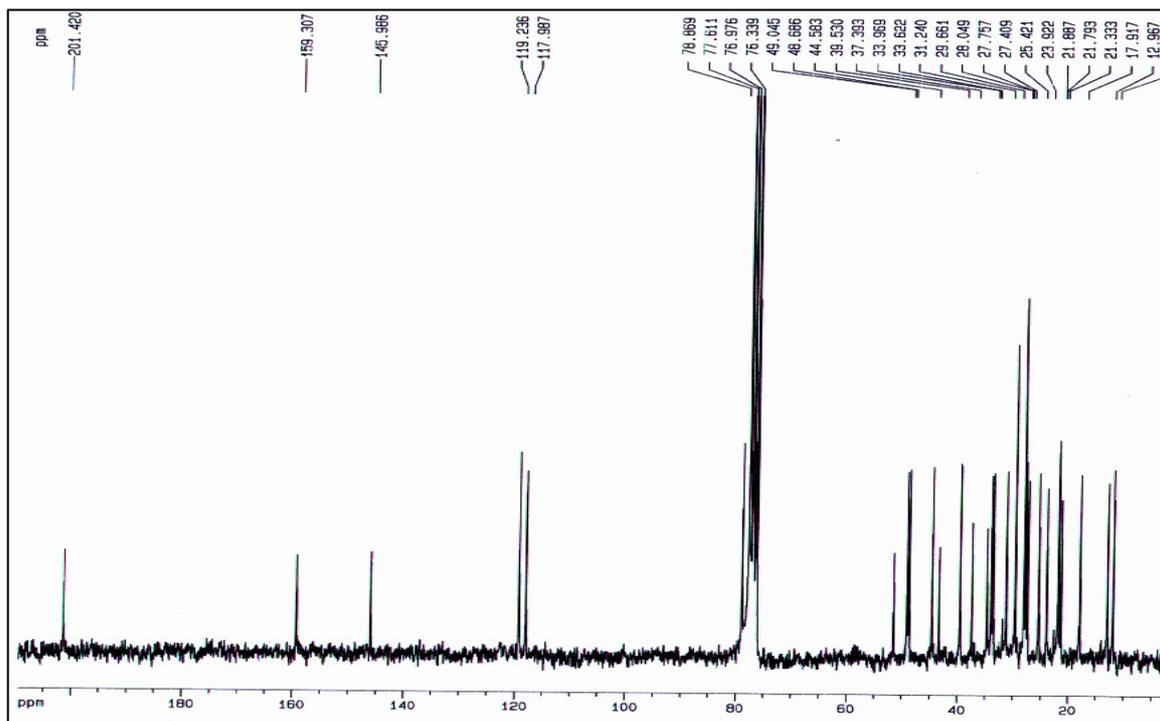


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN¹³C de **4** (CDCl₃, 100 MHz)

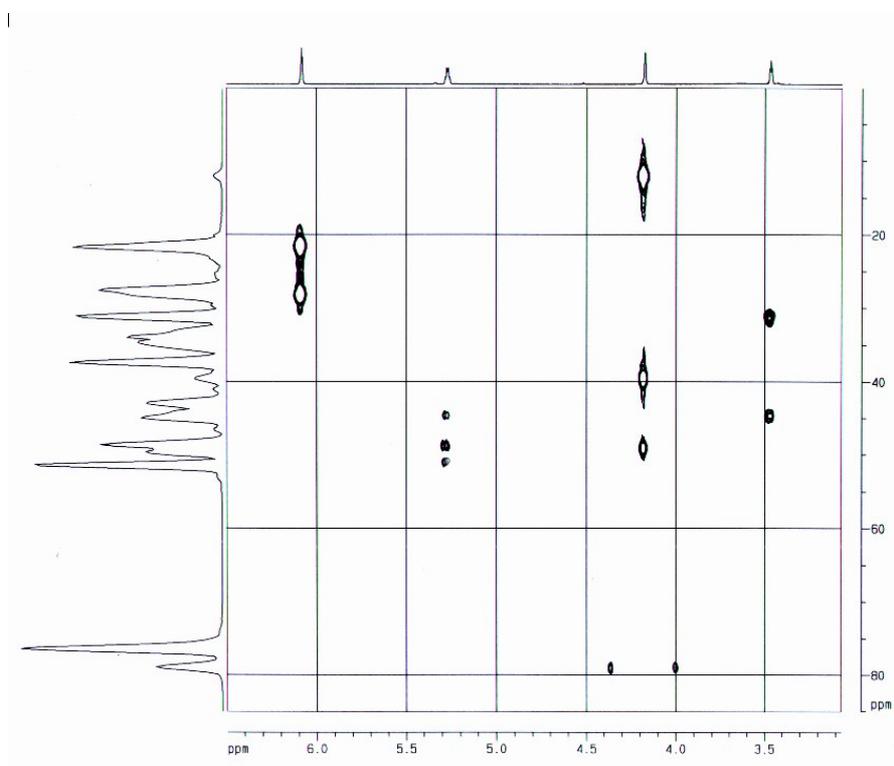


FIGURA 4.10 – Mapa de contorno de HMBC de **4** (CDCl₃, 400 MHz)

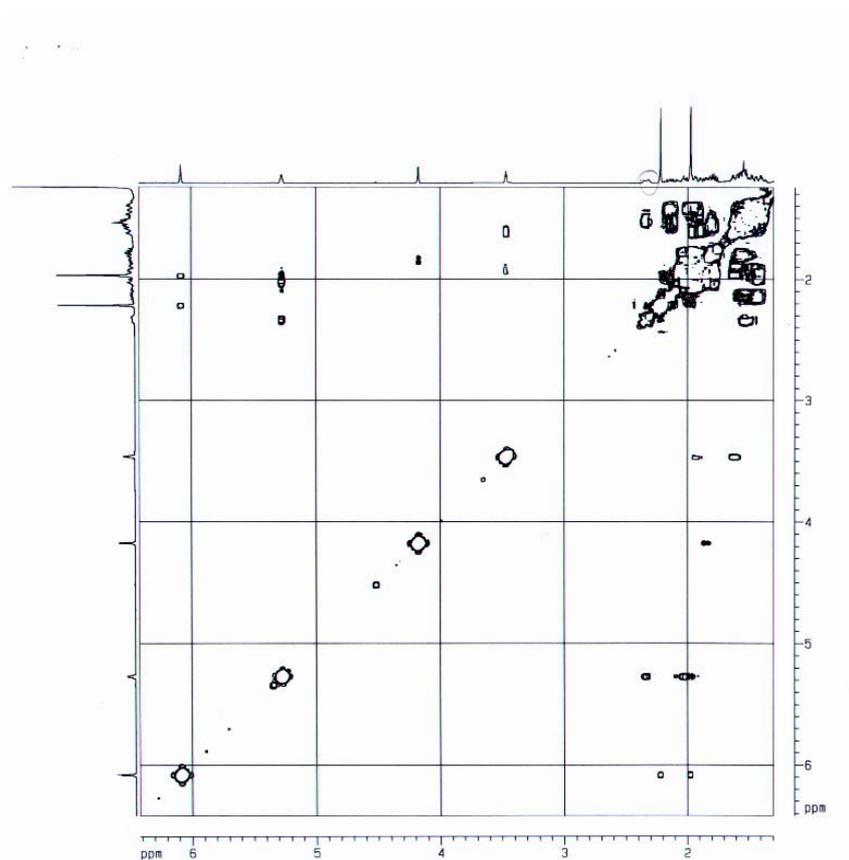


FIGURA 4.11 – Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H de **4** (CDCl_3 , 400 MHz)

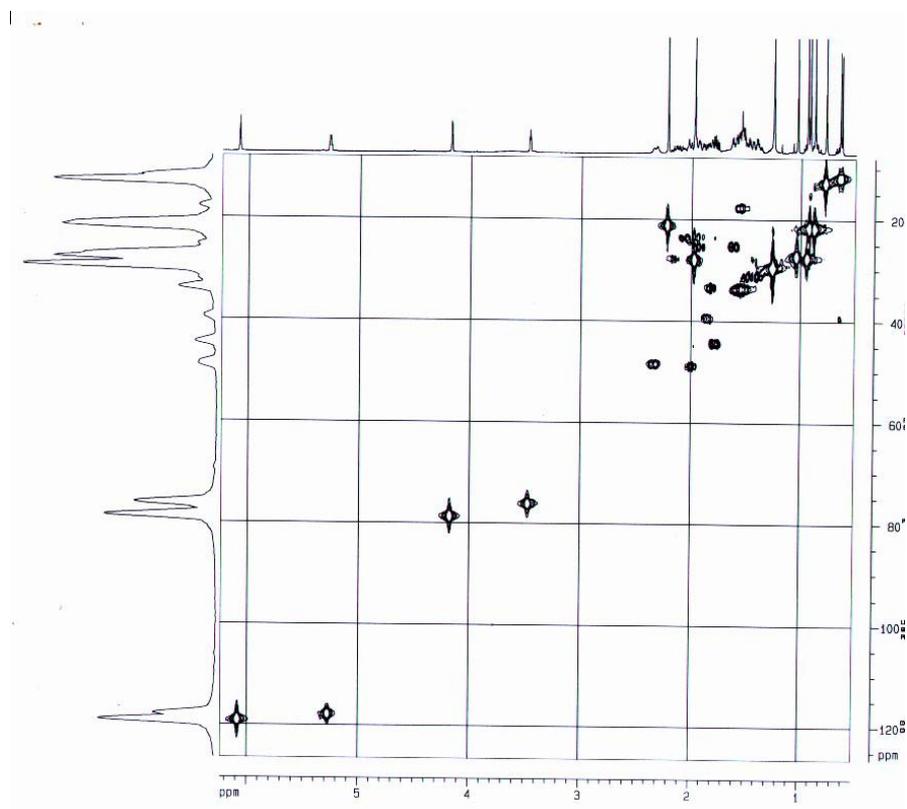


FIGURA 4.12 – Mapa de contorno de HSQC de **4** (CDCl_3 , 400 MHz)

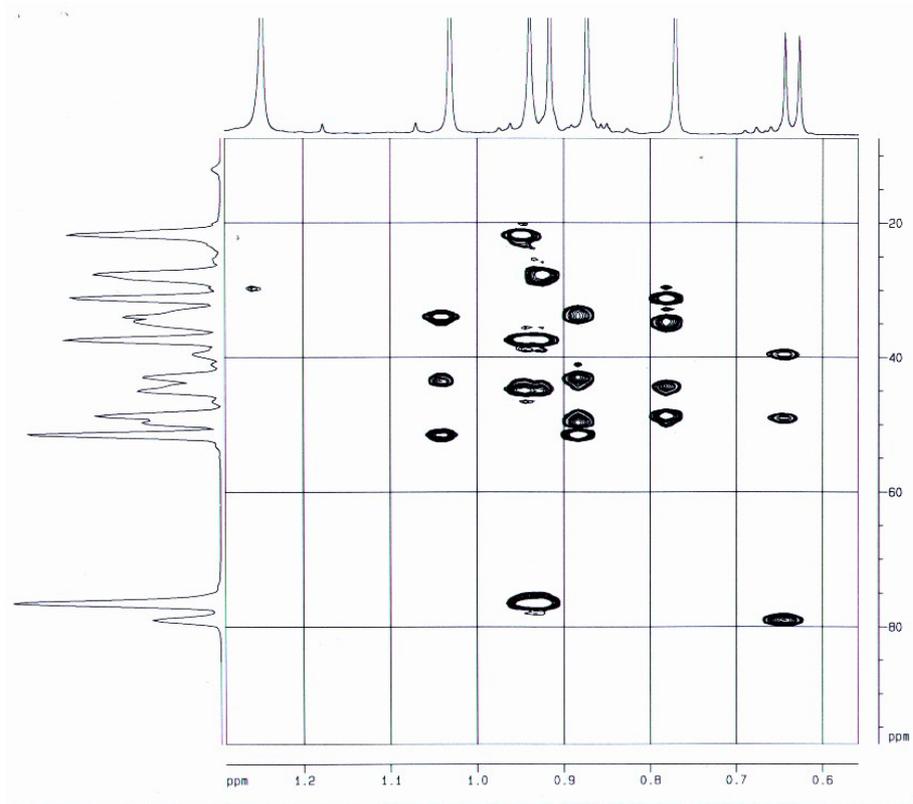


FIGURA 4.13 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC de **4** (CDCl₃, 400 MHz)

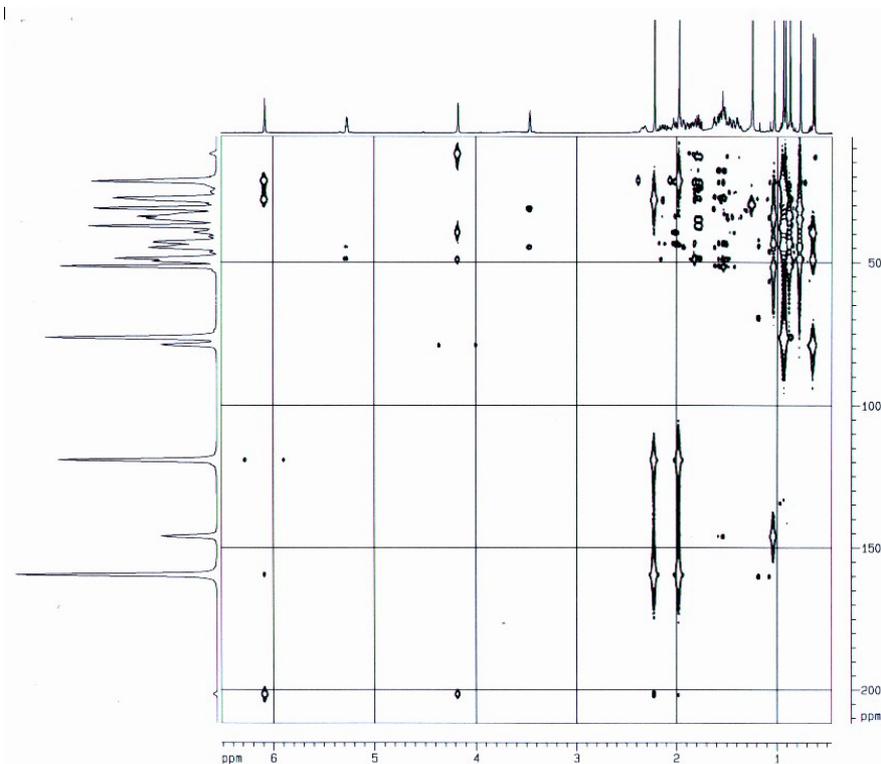


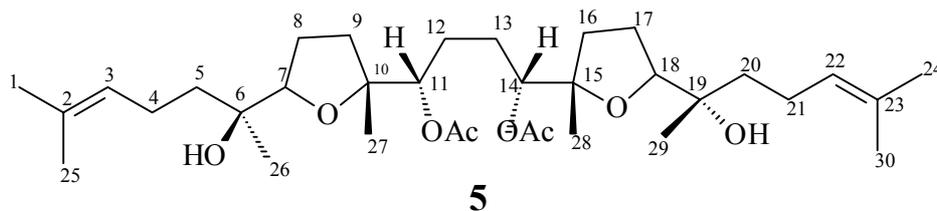
FIGURA 4.14 – Mapa de contorno de HMBC de **4** (CDCl₃, 400 MHz)

TABELA 4.2 – Dados de RMN¹H e de RMN¹³C de **4**

H/C	Triterpeno 4 (400MHz, CDCl ₃)	LIANG <i>et al.</i> , 1989 (400MHz, CDCl ₃)	Triterpeno 4 (100MHz, CDCl ₃)	LIANG <i>et al.</i> , 1989 (100MHz, CDCl ₃)
1	1,50 (<i>m</i>)	-	31,2	31,5
2	1,60 β e 1,94 α (<i>m</i>)	1,59 β e 1,94 α (<i>m</i>)	25,4	25,6
3	3,46 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz)	3,47 <i>sl</i>	76,9	76,9
4	-	-	37,4	37,6
5	1,80 (<i>m</i>)	-	44,6	44,8
6	1,97 (<i>m</i>) e 2,04 (<i>m</i>)	1,94 e 2,04 (<i>m</i>)	23,9	24,2
7	5,27 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 4 e 2,5 Hz)	5,28 (<i>m</i>)	117,9	118,2
8	-	-	146,0	146,2
9	2,43 (<i>m</i>)	-	48,7	48,9
10	-	-	34,0	34,9
11	1,60 (<i>m</i>)	-	17,9	18,2
12	1,57 (<i>m</i>) e 1,80 (<i>m</i>)	-	33,6	33,8
13	-	-	43,3	43,5
14	-	-	51,4	51,7
15	1,57 (<i>m</i>) e 1,80 (<i>m</i>)	-	34,0	34,2
16	1,44 (<i>m</i>)	-	28,0	28,3
17	2,03 (<i>m</i>)	-	49,0	49,3
18	0,87 (<i>s</i> , 3H)	0,88 (<i>s</i>)	21,9	22,2
19	0,77 (<i>s</i> , 3H)	0,78 (<i>s</i>)	13,0	13,2
20	1,90 (<i>m</i>)	1,85 (<i>m</i>)	39,5	39,8
21	0,64 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 6,6 Hz)	0,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8)	11,9	12,2
22	4,17 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 1,6 Hz)	4,17 <i>sl</i>	78,9	79,1
23	-	-	201,4	201,7
24	6,08 (<i>sept</i> , 1H, <i>J</i> = 1,0 Hz)	6,08 <i>sl</i>	119,2	119,4
25	-	-	159,3	159,7
26	2,22 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 1,0 Hz)	2,22 (<i>s</i> , <i>J</i> = 0,8 Hz)	28,0	28,4
27	1,97 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 1,0 Hz)	1,97 (<i>s</i> , <i>J</i> = 0,8 Hz)	21,3	21,6
28	0,92 (<i>s</i> , 3H)	0,92 (<i>s</i>)	27,8	28,1
29	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,94 (<i>s</i>)	21,8	22,1
30	1,03 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 0,64 Hz)	1,03 (<i>s</i>)	27,4	27,7

4.3.2 – Identificação estrutural do triterpeno eurileno (5)

O triterpeno **5** foi isolado da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *S. versicolor* (p. 31) como cristais transparentes. Sua determinação estrutural foi realizada através de RMN¹H, RMN¹³C e comparada com dados da literatura (ARRIAGA *et.al.*, 2002).



No espectro de RMN¹H de **5** (FIGURA 4.15) foi observado um sinal em δ 5.10, região de hidrogênios olefínicos (*t*, $J = 7,0$ Hz, 2H) atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-22; um duplo dubleto em δ 4,87 (*dd*, $J = 8,3$ e $8,1$ Hz, 2H) referentes aos hidrogênios H-11 e H-14, característico de hidrogênios acetilcarbinólicos e um multipletto em δ 3,68 (*m*, 2H) referentes aos hidrogênios carbinólicos H-7 e H-18.

Na região mais blindada do espectro de RMN¹H foi observado um singletto em δ 2,07 típico de hidrogênios metílicos de grupos acetilas; dois singletos em δ 1,68 (*s*, 6H) e δ 1,61 (*s*, 6H) atribuídos aos hidrogênios metílicos H-1 (3H) / H-24 (3H) e H-25 (3H) / H-30 (3H). Os hidrogênios metílicos H-26 e H-29 sofreram um acoplamento em “W” com os hidrogênios carbinólicos H-7 e H-18, respectivamente, resultando em dois dubletos cada (*d*, $J = 3,1$ Hz, 3H), cujos sinais coaleceram apresentando-se como um triplete em δ 1,17.

No espectro de RMN¹³C, (FIGURA 4.16) pode-se observar os sinais em δ 171,0 e δ 170,8, referentes aos carbonos carbonílicos C-31 e C-33, dos grupos acetilas; em δ 131,6 correspondente aos carbonos olefínicos totalmente substituídos C-2 e C-23; em δ 124,6 referente aos carbonos metínicos C-3 e C-22 e os sinais dos carbonos carbinólicos C-18 e C-7, em δ 86,6 e δ 84,4, respectivamente.

O triterpeno **5** teve seus dados de RMN¹³C comparados com a literatura (ARRIAGA *et al.*, 2002 e ITOKAWA *et al.*, 1991) (TABELA 4.3), e foi identificado como sendo o triterpeno eurileno, já isolado anteriormente de Simaroubaceae.

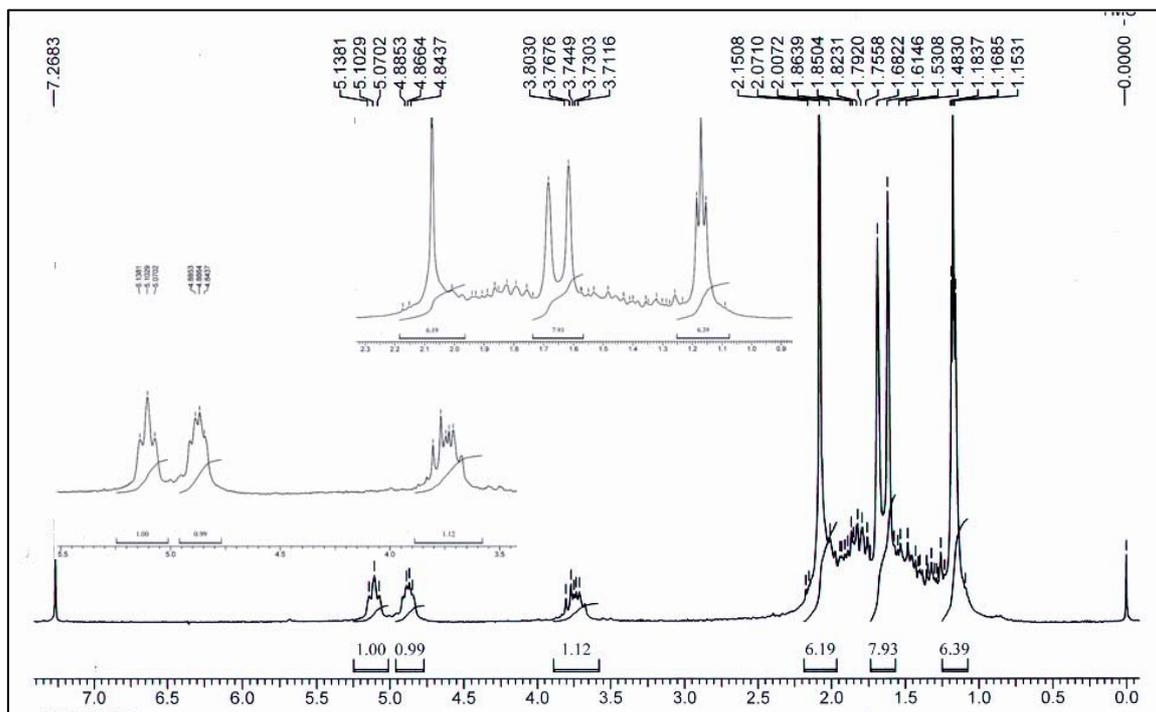


FIGURA 4.15 – Espectro de RMN¹H do triterpeno **5** (CDCl₃, 200MHz)

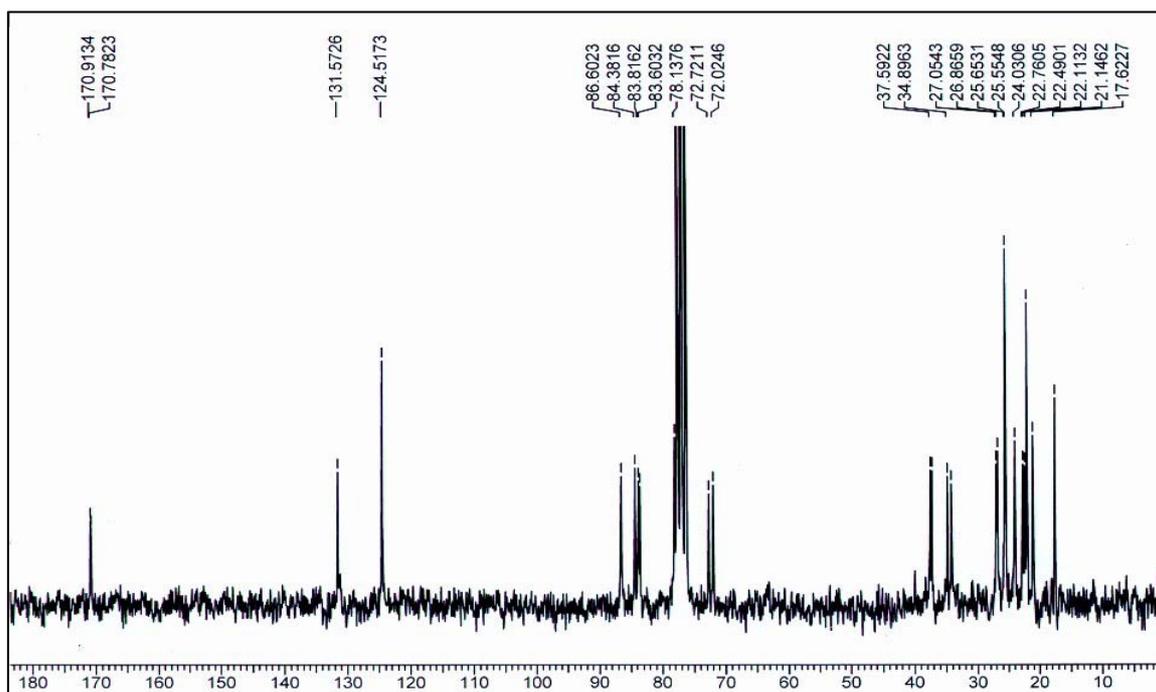
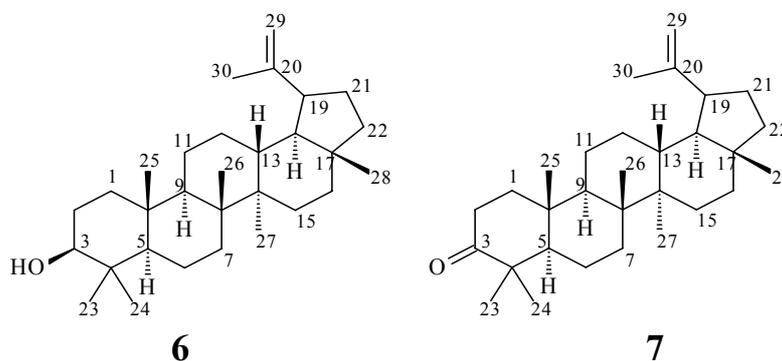


FIGURA 4.16 – Espectro de RMN¹³C do triterpeno **5** (CDCl₃, 50MHz)

TABELA 4.3 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do triterpeno **5**

C	Triterpeno 5 (100MHz, CDCl_3)	ARRIAGA <i>et al.</i> , 2002 (100MHz, CDCl_3)
1/24	25,7	25,6
2/23	131,6	131,5
3/22	124,5	124,4
4/21	21,2	22,0
5	37,3	37,2
6	72,0	71,9
7	86,6	86,5
8	25,6	25,6
9	34,9	34,8
10	83,6	83,6
11	78,1	78,0
12	27,0	26,9
13	26,9	26,7
14	77,0	77,5
15	83,8	83,8
16	34,2	34,1
17	25,6	25,5
18	84,4	84,3
19	72,7	72,6
20	37,6	37,4
25/30	17,6	17,6
26	24,2	24,1
27	22,8	22,7
28	22,5	22,5
29	24,0	24,0
Aço	170,9	170,9
Aço	170,8	170,8
Me-AcO	21,2	21,2
Me-AcO	21,1	21,1

4.3.3 – Identificação estrutural dos triterpenos lupeol (6) e lupenona (7)



O triterpeno **6** foi isolado do extrato hexânico das folhas de *H. puberula* e da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* (p. 26 e 35), já o triterpeno **7** foi isolado da fração hexânica dos galhos de *H. puberula* (p. 22). Ambos foram identificados através de experimentos de RMN¹H, RMN¹³C, PENDANT e DEPT 135 °.

Os espectros de RMN¹H tanto de **6** como de **7** (FIGURAS 4.17 e 4.18, respectivamente) mostraram a presença de seis singletos na região entre δ 0,70 – 1,07, referentes aos hidrogênios metílicos ligados a carbonos terciários e um singlete em aproximadamente δ 1,68, que corresponde aos hidrogênios metílicos ligado a um carbono insaturado. Esses dados, juntamente com os sinais em δ 4,57 (*dd*, $J = 2,4$ e $1,2$ Hz) e em δ 4,69 (*d*, $J = 2,1$ Hz), sugeriram a natureza dos triterpenos **6** e **7** como tendo o esqueleto do tipo lupânico.

O sinal em 3,20 δ (*dd*, $J = 10,0$ e $4,8$ Hz) observado no espectro de RMN¹H de **6** (FIGURA 4.17) indicou a presença de um hidrogênio carbinólico, sugerindo um grupo hidroxila em C-3.

No espectro de RMN¹³C de **6** (FIGURA 4.19) pode-se observar 30 sinais para carbonos, sendo 7 metílicos, 11 metilênicos, 6 metínicos, 5 carbonos quaternários e um carbono olefínico totalmente substituído. Esses sinais foram confirmados no experimento de PENDANT (FIGURA 4.20). As análises desses dados indicaram ser o lupeol o triterpeno **6**.

A ausência do hidrogênio carbinólico no espectro de RMN¹H do triterpeno **7**, (FIGURA 4.18) e a presença de um sinal de carbono carbonílico em δ 218,1 no espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.21) sugeriram ser a lupenona a substância (**7**), cujos dados de RMN¹³C juntamente com os dados de DEPT 135°, (FIGURA 4.22) mostraram a presença de 7 sinais de carbono metílico, 11 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos, carbonos quaternários, um carbono carbonílico e um carbono olefínico totalmente substituído. Os triterpenos **6** e **7** tiveram seus dados comparados com os da literatura (TABELA 4.4).

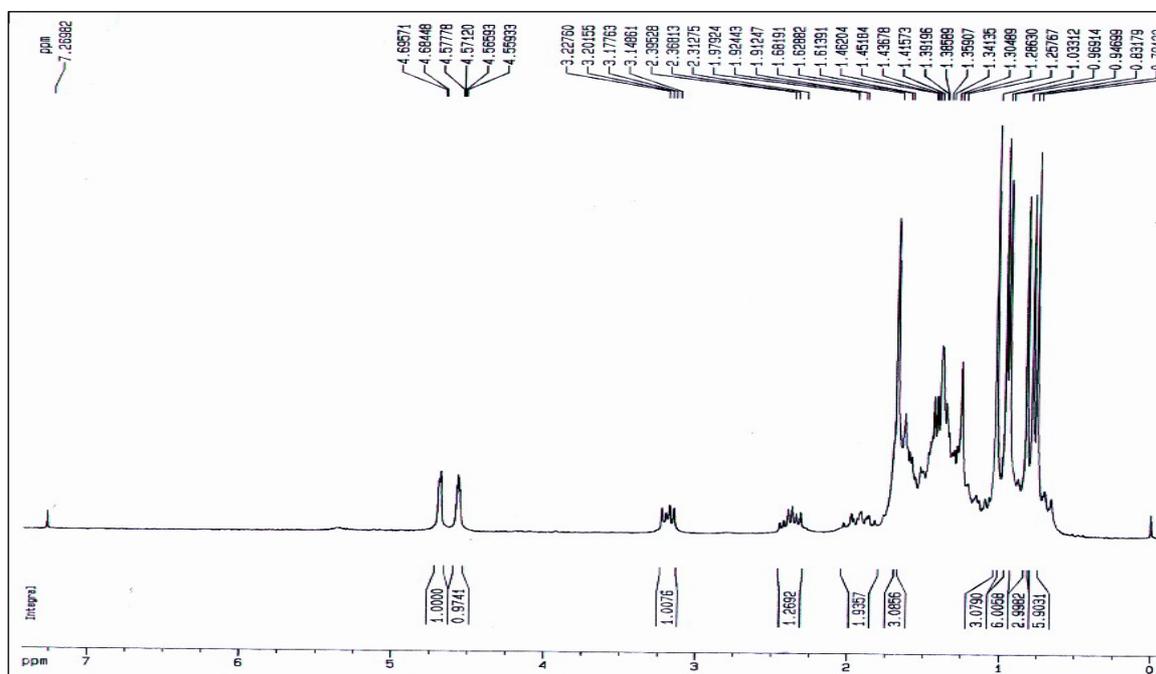


FIGURA 4.17 – Espectro de RMN¹H do triterpeno **6** (CDCl₃, 200MHz)

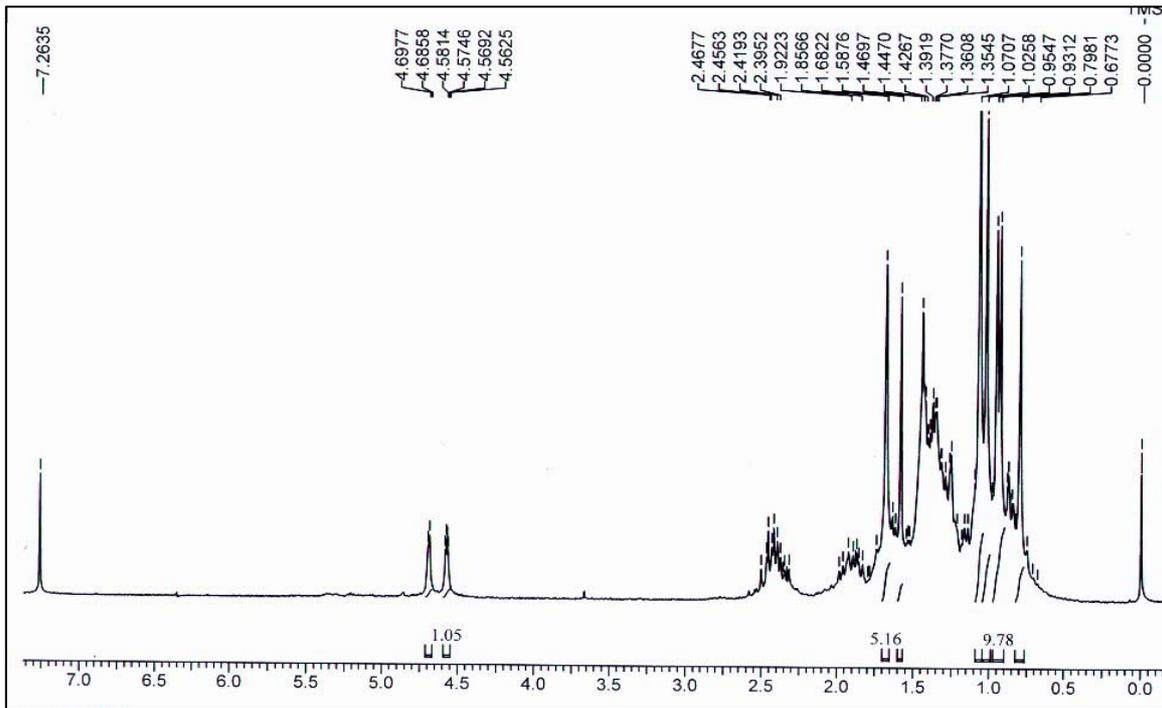


FIGURA 4.18 – Espectro de RMN¹H do triterpeno **7** (CDCl₃, 200MHz)

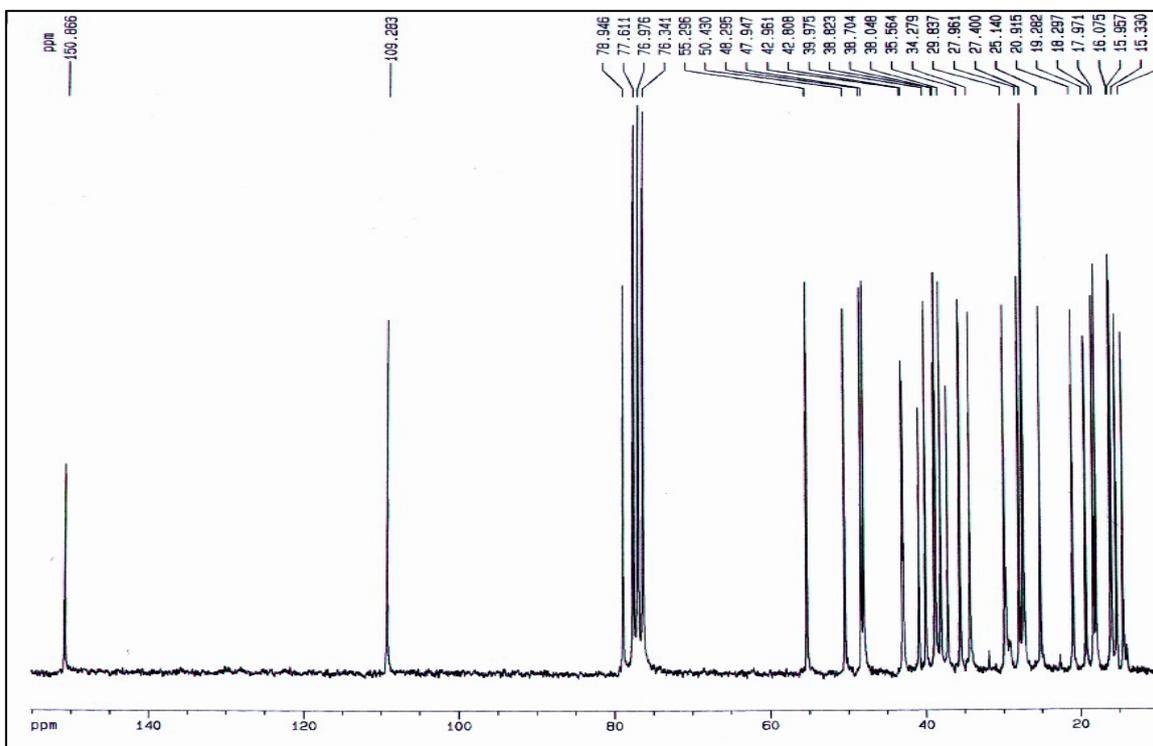


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN¹³C do triterpeno **6** (CDCl₃, 50MHz)

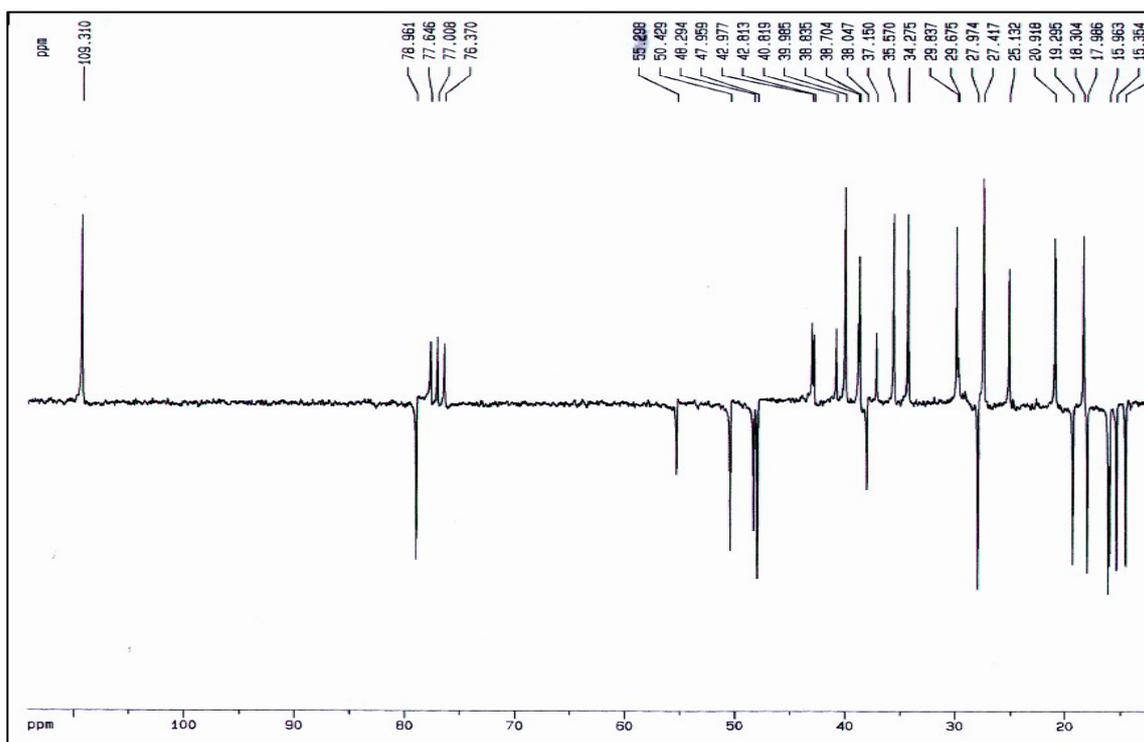


FIGURA 4.20 – Espectro de PENDANT do triterpeno 6 (CDCl_3 , 200MHz)

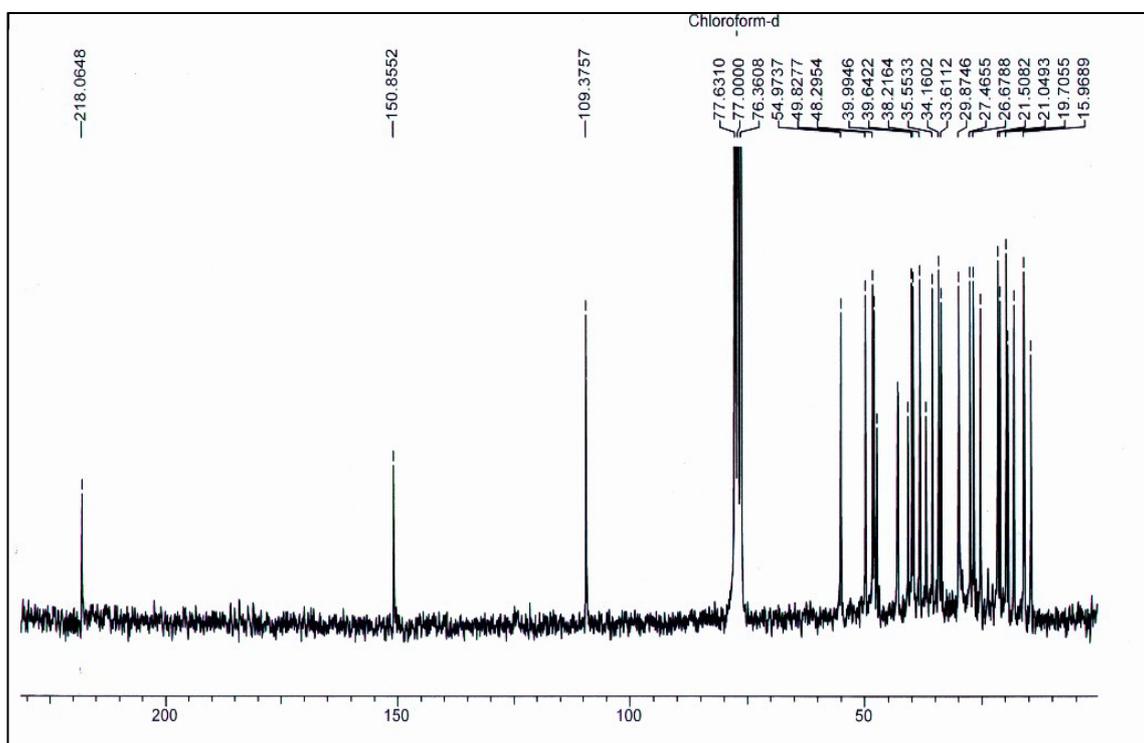


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN^{13}C do triterpeno 7 (CDCl_3 , 50MHz)

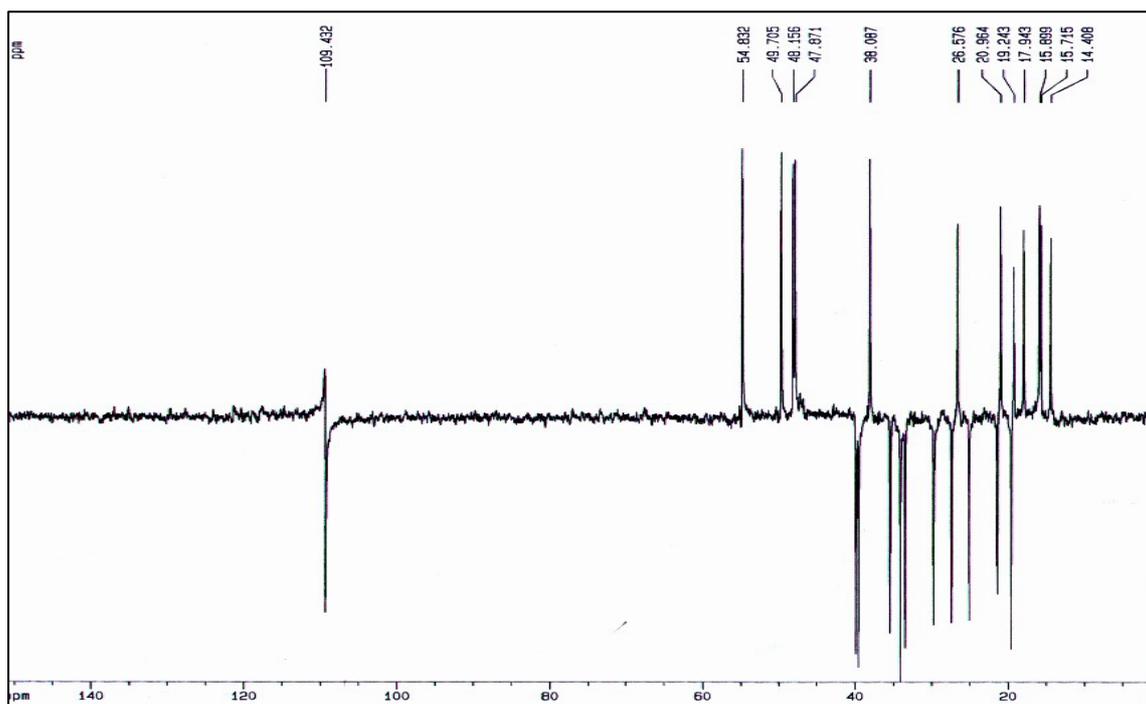
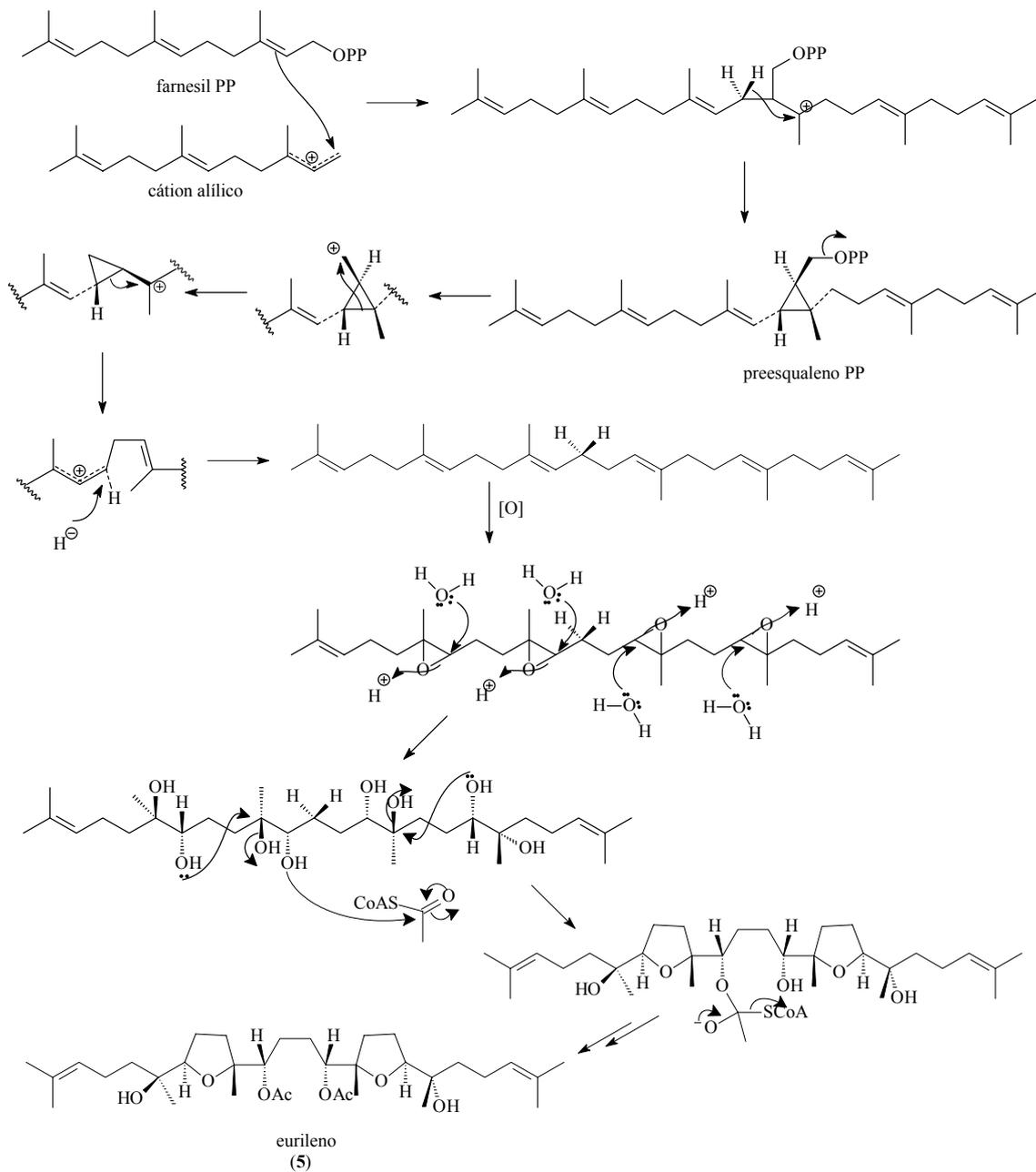


FIGURA 4.22 – Espectro de DEPT 135° do triterpeno **7** (CDCl₃, 200MHz)

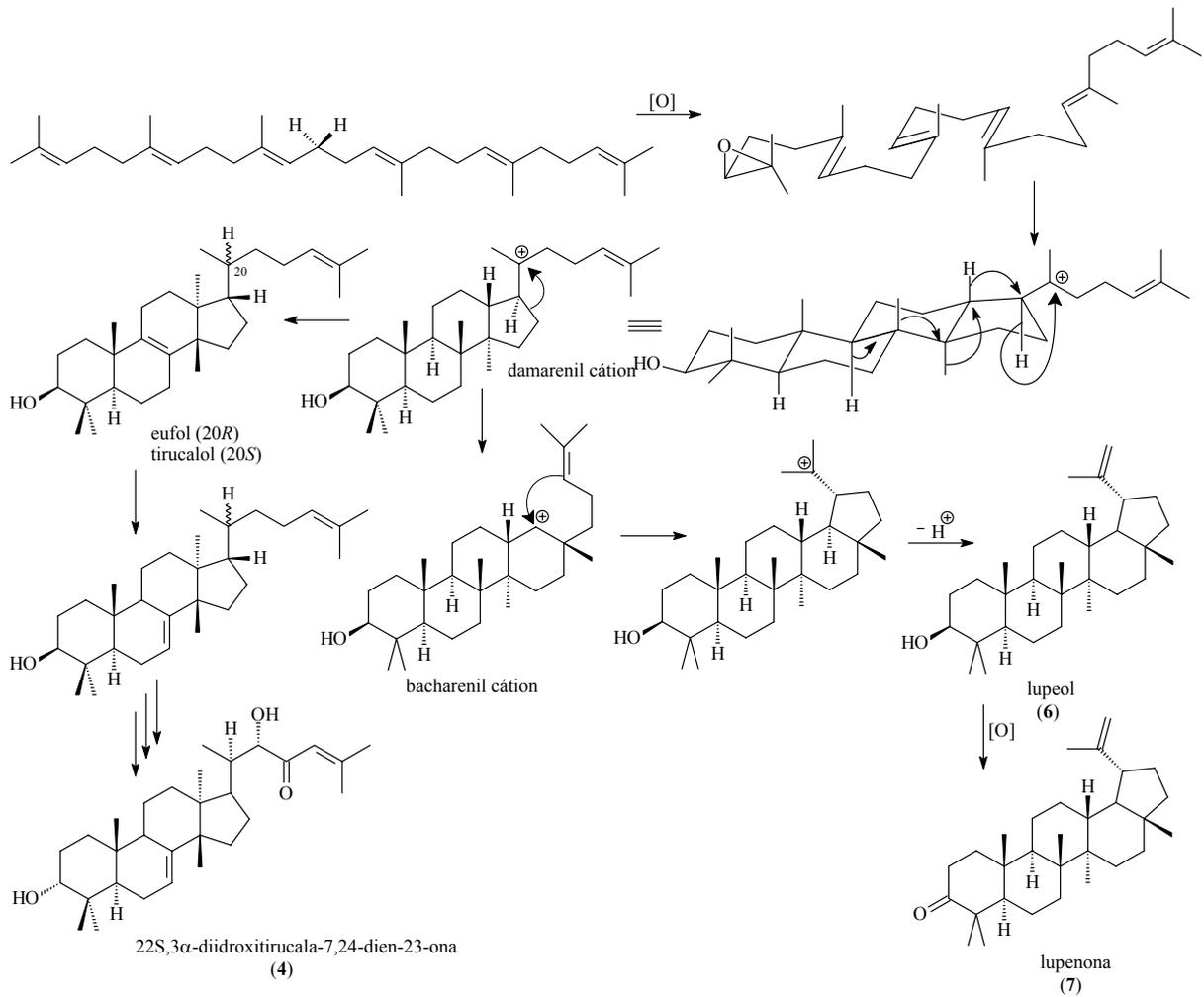
TABELA 4.4 – Dados de RMN¹³C dos triterpenos **6** e **7**

C	6	ARRUDA, 1990 (200 MHz, CDCl ₃)	7	MAHATO <i>et al.</i> , 1994 (200 MHz, CDCl ₃)
1	38,7	38,7	39,6	39,7
2	27,4	27,4	33,6	34,2
3	78,9	78,9	218,1	217,0
4	38,8	38,8	47,3	47,4
5	55,3	55,3	54,8	55,0
6	18,3	18,3	21,0	20,0
7	34,3	34,2	33,6	33,7
8	40,8	40,8	40,8	40,1
9	50,4	50,4	49,7	50,0
10	37,1	37,1	36,9	37,0
11	20,9	20,9	21,5	21,5
12	25,1	25,1	25,2	25,3
13	38,0	38,0	38,2	38,8
14	42,8	42,8	43,0	43,0
15	27,4	27,4	27,4	28,0
16	35,6	35,5	35,5	35,6
17	43,0	43,0	42,9	43,0
18	48,3	48,2	48,2	48,4
19	47,9	47,9	47,9	48,0
20	150,9	150,9	150,8	150,8
21	29,8	29,8	29,9	30,0
22	40,0	40,0	40,0	40,0
23	28,0	28,0	26,7	26,7
24	15,3	15,4	21,0	21,0
25	16,1	16,1	15,9	15,9
26	16,0	15,9	15,7	15,9
27	14,5	14,5	14,5	14,5
28	18,1	18,1	17,9	18,0
29	109,3	109,3	109,4	109,4
30	19,3	19,3	16,0	19,4

Os triterpenos são substâncias contendo 30 átomos de carbonos. Podem ser formados através da junção de duas unidades de farnesilpirofosfato, formando o esqualeno, cuja ciclização resulta em diferentes tipos de esqueletos, sendo conhecidos mais de 4000 triterpenos naturais (DEWICK, 2001). O ESQUEMA 4.2, representa uma rota biogenética do triterpeno **5** e no ESQUEMA 4.3 a dos triterpenos **4**, **6** e **7**.



ESQUEMA 4.2: Proposta biogenética para a formação do triterpeno **5** (adaptada de DEWICK, 2001)

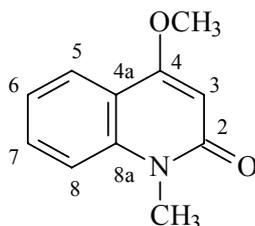


ESQUEMA 4.3: Proposta biogênica para a formação dos triterpenos 4, 6 e 7 (adaptada de DEWICK, 2001)

4.4 – Alcalóides

4.4.1 – Identificação estrutural do Alcalóide N-metil-4-metóxi-2-quinolona (8)

O alcalóide **8** foi isolado do extrato hexânico das folhas de *H. puberula* (p. 26) cuja caracterização foi realizada por RMN¹H e ¹³C e comparação com a literatura (NAYAR *et al.*, 1971).



8

O espectro de RMN¹H de **8** (FIGURA 4.23) apresentou quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ 7,97 (*dd*, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz), δ 7,60 (*ddd*, $J = 8,6$, $7,0$ e $1,5$ Hz), δ 7,33 (*dl*, $J = 8,6$ Hz) e δ 7,29 (*ddd*, $J = 8,0$, $7,0$ e $1,0$ Hz). As multiplicidades destes sinais indicaram a presença de um anel aromático *orto* dissustituído na estrutura de **8**. A presença do sinal em δ 6,04 (*s*, 1H) indicou se tratar de um alcalóide 4-R-2-quinolônico, pois esse sinal é típico do H-3, nesse tipo de estrutura. Foram observados também os sinais em δ 3,95 (*s*, 3H) e δ 3,67 (*s*, 3H), sendo estes, referentes às metilas ligadas a heteroátomos.

O espectro de RMN¹³C de **8** (FIGURA 4.24) mostrou a presença de onze sinais, quatro referentes a carbonos aromáticos, sendo o sinal em δ 164,0 referente a uma carbonila de sistema α,β insaturado; cinco carbonos metínicos e dois de carbonos metílicos. A presença do carbono metílico em δ 29,0, indicou que a metila encontrava-se diretamente ligada ao nitrogênio, pois se estivesse diretamente ligada ao oxigênio esta, estaria mais desblindada.

A análise dos dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura (NAYAR *et al.*, 1971) indicaram ser o alcalóide **8** a N-metil-4-metóxi-2-quinolona (TABELA 4.5).

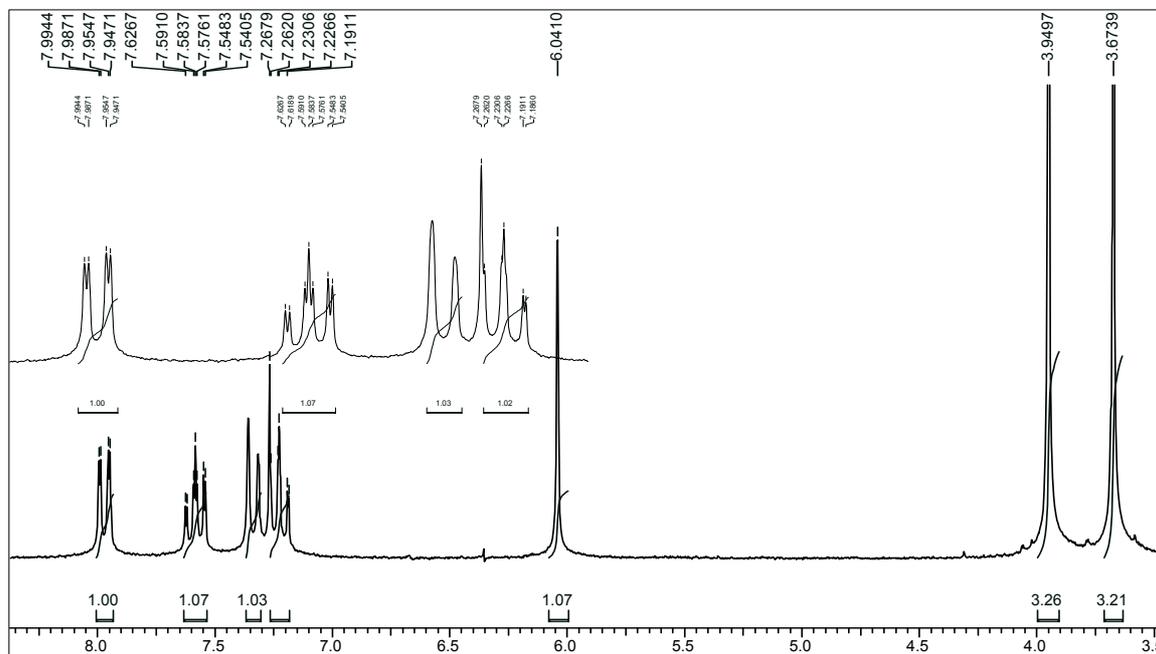


FIGURA 4.23 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **8** (CDCl₃, 200MHz)

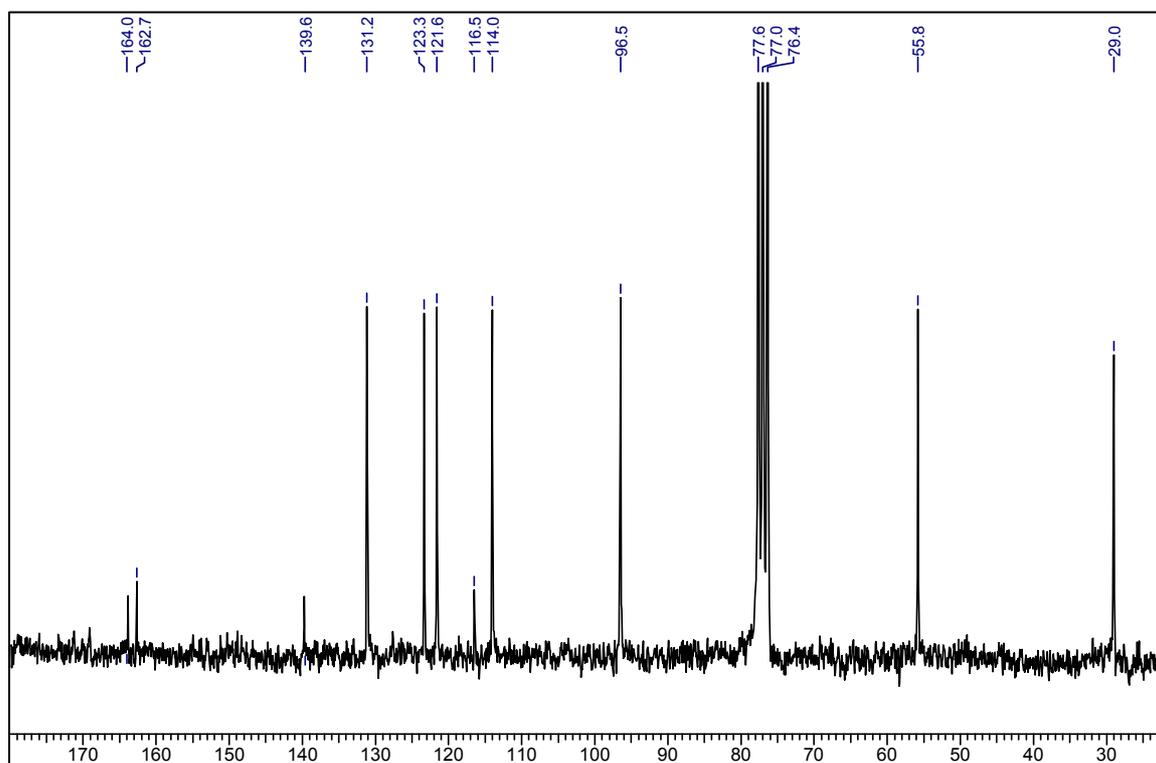


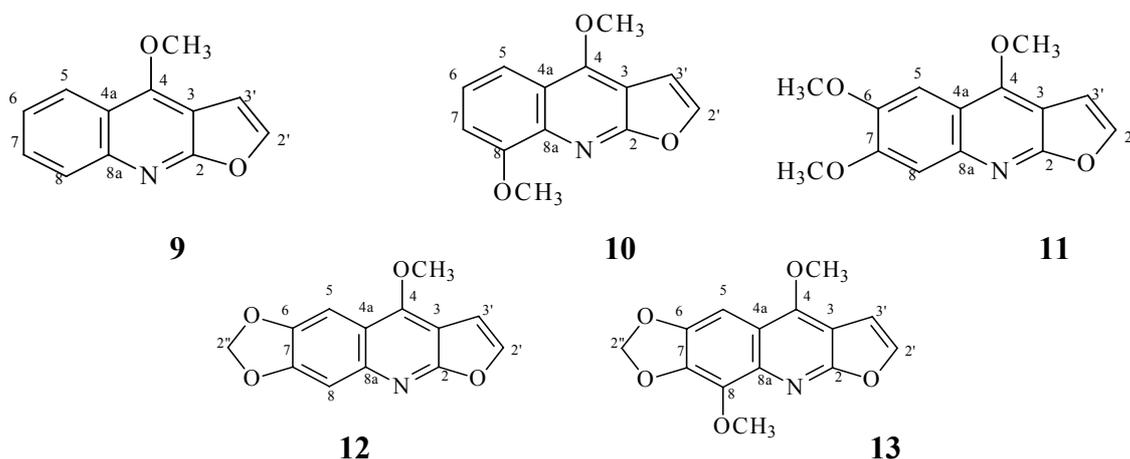
FIGURA 4.24 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **8** (CDCl₃, 50MHz)

TABELA 4.5 – Dados de RMN¹H de **8**

H/C	Alcaloide 8 (CDCl ₃ , 200MHz)	NAYAR <i>et al.</i> , 1971 (CDCl ₃ , 200MHz)	Alcaloide 8 (CDCl ₃ , 50MHz)
2	-	-	164,0
3	6,04 (s, 1H)	6,01 (s, 1H)	96,5
4	-	-	162,7
4a	-	-	116,5
5	7,97 δ (dd, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz, 1H)	8,00	123,3
6	7,29 δ (ddd, $J = 8,0$, $7,0$ e 1 Hz, 1H)	7,35	121,6
7	7,60 δ (dd, $J = 8,6$, $7,0$ e $1,5$ Hz, 1H)	7,55	131,2
8	7,33 δ (dl, $J = 8,6$ Hz, 1H)	7,35	114,0
8a	-	-	139,6
N-CH ₃	3,67 δ (s, 1H)	3,69 δ (s, 1H)	29,0
O-CH ₃	3,95 δ (s, 1H)	3,99 δ (s, 1H)	55,8

4.4.2 – Identificação estrutural dos Alcalóides furoquinolínicos (**9**) – (**13**)

Os alcalóides do tipo furoquinolínicos são muito comuns em várias espécies de Rutaceae (MESTER, 1983). Os alcalóides **9**, **10** e **12** foram isolados dos galhos de *H. puberula* (p. 22 e 24) e das folhas desta mesma planta foram isolados os alcalóides **10**, **11** e **13** (p. 26 e 27). Estes tipos de alcalóides apresentam características bastante peculiares em seus espectros de RMN¹H facilitando sua caracterização: um singlete em aproximadamente δ 4,40 relativo a metoxila em C-4 e dois dubletos ($J = 2,8$ Hz) próximo a δ 7,65 e δ 7,10 referente aos hidrogênios furânicos H-2' e H-3'.



Os espectros de RMN¹H dos alcalóides **9** – **13** (FIGURAS 4.25; 4.27; 4.29 e 4.31 respectivamente) apresentaram um sinal próximo a δ 4,40 (*s*, 3H) e dois sinais próximos a δ 7,65 (*d*, $J = 2,8$ Hz) e δ 7,10 (*d*, $J = 2,8$ Hz) indicando a presença dos hidrogênios H-2' e H-3' respectivamente, do núcleo furoquinolínico nas estruturas desses alcalóides.

Foram observados também no espectro de RMN¹H de **9** (FIGURA 4.23) quatro sinais referentes aos hidrogênios aromáticos. Nos alcalóides furoquinolínicos H-5 é sempre o mais desblindado devido ao efeito de compressão estérica da metoxila em C-4, desta forma, o sinal em δ 8,30 (*dd*, $J = 8,3$ e 1,2 Hz) foi atribuído a H-5; para H-6, por acoplar com duas constantes *orto* com H-5 e H-7, e uma constante *meta* com H-8, foi atribuído o sinal em δ 7,45 (*ddd*, $J = 8,3$; 7,0 e 1,5 Hz); o sinal em δ 7,70 (*ddd*, $J = 8,5$; 7,0 e 1,2 Hz) foi atribuído ao H-7 e em δ 8,0 (*dd*, $J = 8,5$ e 1,5 Hz) ao hidrogênio H-8; esses dados sugeriram que a substância **9** era um alcalóide furoquinolínico não substituído denominado dictamina.

No espectro de RMN¹³C do alcalóide **9** (FIGURA 4.26) foram observados doze sinais de carbonos, sendo cinco sinais referentes a carbonos aromáticos, seis a carbonos metínicos e um de carbono metílico (TABELA 4.6). Estes dados, comparados com os da literatura (PUSSET *et al.*, 1990), confirmaram a estrutura de **9**, como sendo o alcalóide dictamina (TABELA 4.6).

A substância **10** apresentou no seu espectro de RMN¹H (FIGURA 4.27) os sinais dos hidrogênios furânicos 2' e 3' em δ 7,66 (*d*, $J = 2,8$ Hz) e δ 7,08 (*d*, $J = 2,8$ Hz) e da metoxila em C-4 em δ 4,46.

O sinal desblindado em δ 7,86 (*dd*, $J = 8,5$ e 1,2 Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-5. Devido as constantes de acoplamento, esse sinal indicou a presença de H-6 e H-7. O sinal em δ 7,37 (*t*, $J = 8,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6, por acoplar com duas constantes *orto* com os núcleos dos hidrogênios H-5 e H-7. Já para H-7 foi atribuído o sinal em δ 7,05 (*dd*, $J = 8,5$ e 1,2 Hz), por acoplar com uma constante *orto* com H-6 e uma constante *meta*

com H-5. Observou-se ainda no espectro de RMN¹H um singlete em δ 4,09 (*s*, 3H) referente à metoxila situada em C-8.

Esses dados juntamente com os dados do espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.28) e comparação com a literatura (JACQUES PUSSET *et al.*, 1990) (TABELA 4.6) indicaram ser a substância **10**, o alcalóide δ -fagarina.

O espectro de RMN¹H da substância **11** (FIGURA 4.29) apresentou um sinal em δ 4,43, relativo à metoxila em C-4 e dois dubletos ($J = 2,8$ Hz) em δ 7,56 e δ 7,03, referentes aos hidrogênios furânicos H-2' e H-3', indicando se tratar de um alcalóide furoquinolínico. Observou-se ainda, dois singletos em δ 7,47 (*s*, 1H) e δ 7,33 (*s*, 1H) na região aromática, que foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente; a presença do grupo doador de elétrons (metoxila) em *orto* fez com que o sinal referente a H-5 ficasse mais blindado, que no alcalóide **9**. Foram observados também, dois singletos em δ 4,03 (*s*, 3H) e δ 4,02 (*s*, 3H) referentes a grupos metoxilas, que provavelmente estariam na posição C-6 e C-7.

No espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.30) foram observados 13 sinais, que somados aos dados anteriores e em comparação com a literatura (PUSSET, *et al.*, 1990) levaram ao alcalóide kokusaginina como sendo a substância **11** (TABELA 4.6).

A substância **12** apresentou no seu espectro de RMN¹H (FIGURA 4.31), além dos sinais característicos do núcleo de alcalóides furoquinolínicos, sinais muito parecidos com o da substância **11**, ou seja, dois singletos em δ 7,50 (*s*, 1H) e δ 7,30 (*s*, 1H), atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente. A ausência dos grupos metoxilas e a presença de um singlete em δ 6,09 integrando para dois hidrogênios, indicaram na molécula um grupo metilenodioxí na posição C-6 e C-7, esses dados foram confirmados através do carbono metilênico em δ 102,5 observado no espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.32) e comparação com a literatura (PUSSET, *et al.*, 1990) (TABELA 4.6) como sendo o alcalóide maculina.

A substância **13** apresentou no seu espectro de RMN¹H (FIGURA 4.33) os mesmos sinais que foram observados para o alcalóide **12**: os hidrogênios do anel furano em δ 7,59 (*d*, $J = 2,8$ Hz, 1H) e δ 7,03 (*d*, $J = 2,8$ Hz, 1H); a metoxila em C-4 em δ 4,41 (*s*, 3H) e um singlete integrando para dois hidrogênios em δ 6,09 (*s*, 2H) referente aos hidrogênios do grupo metilenodióxi. A presença de um hidrogênio aromático em δ 7,28 (*s*, 1H) e uma metoxila em δ 4,27 (*s*, 3H), sugeriu que uma das posições, C-5 ou C-8, estaria substituída. Baseados em estudos de RMN¹H (ROBERTSON, 1963) e de síntese orgânica (AYAFOR *et al.*, 1984) foi verificado que o grupo metoxílico estaria ligado a C-8. O composto **13** é relatado como sendo o alcalóide flindersiamina, que vem sendo isolado em espécies de Rutaceae desde 1957 (OKUGUM e AYAFOR, 1977). Os dados de RMN¹³C (FIGURA 4.34) em comparação com a literatura (PAULINI *et al.*, 1989) reforçam a estrutura do alcalóide **13** (TABELA 4.6).

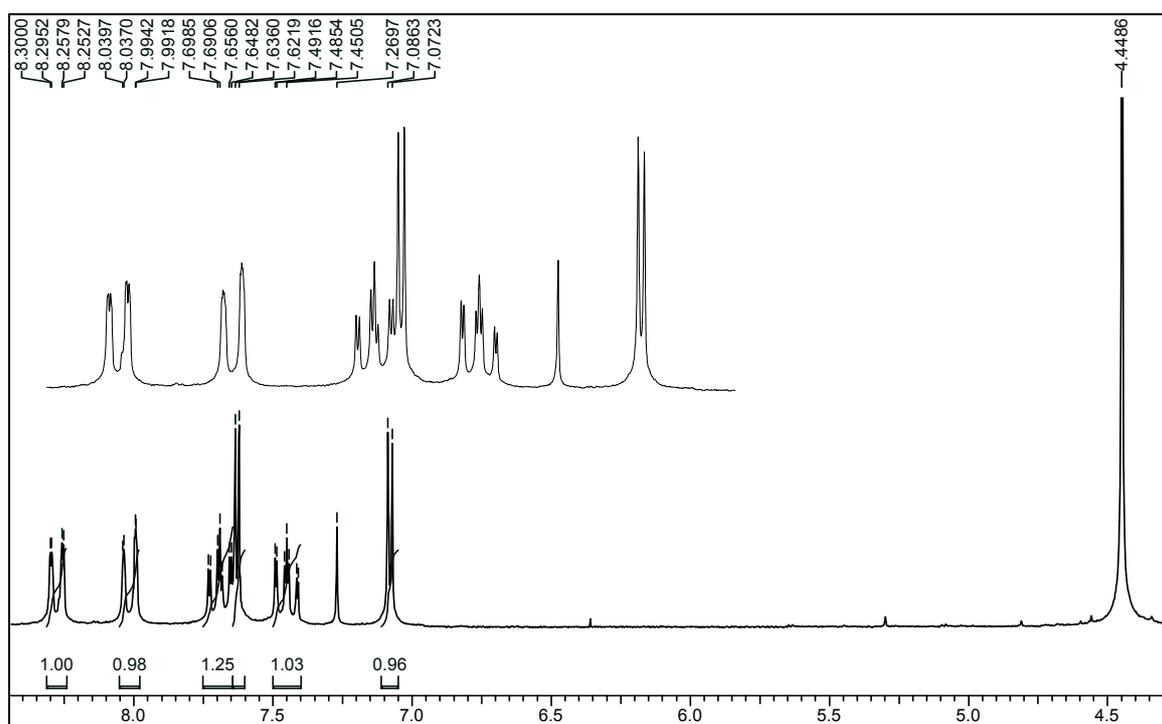


FIGURA 4.25 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **9** (CDCl₃, 200MHz)

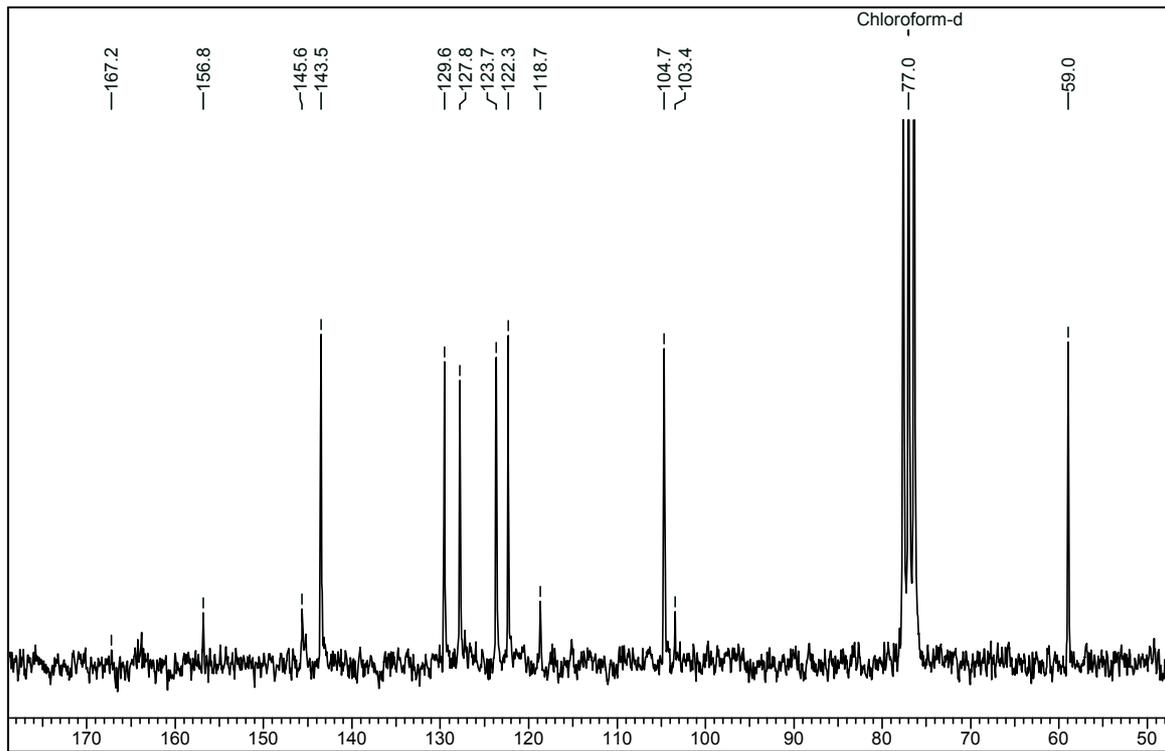


FIGURA 4.26 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **9** (CDCl₃, 50MHz)

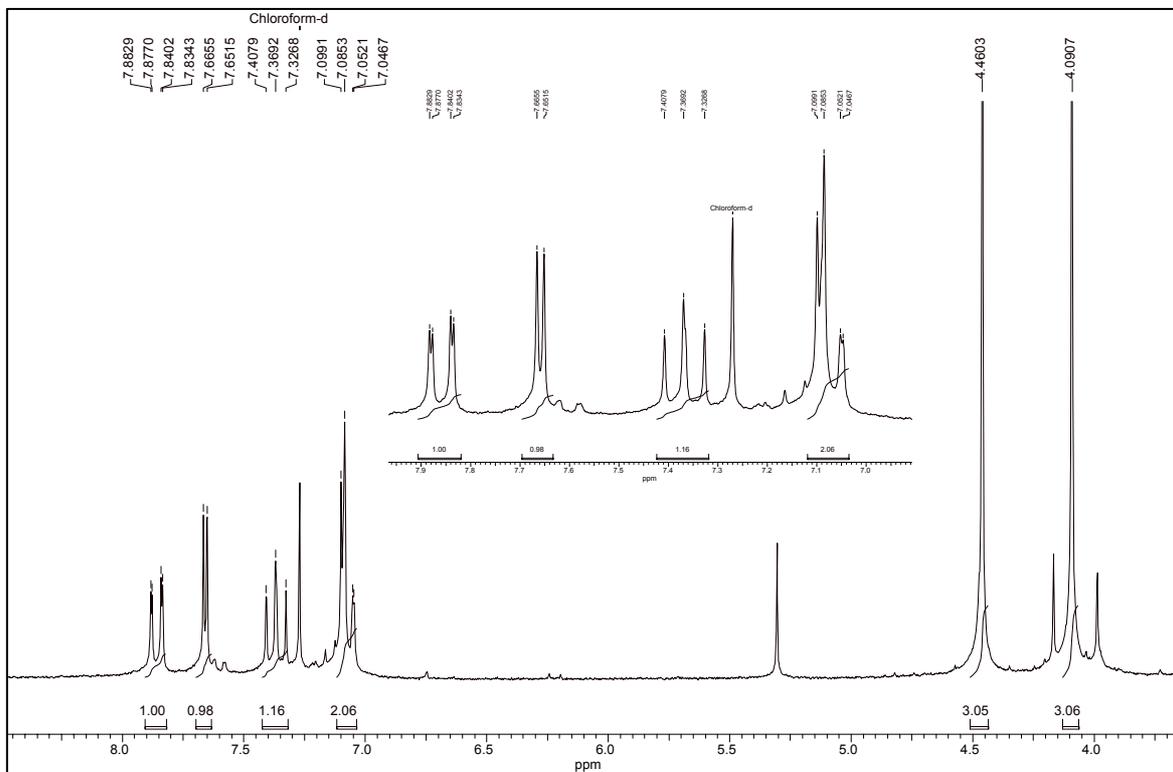
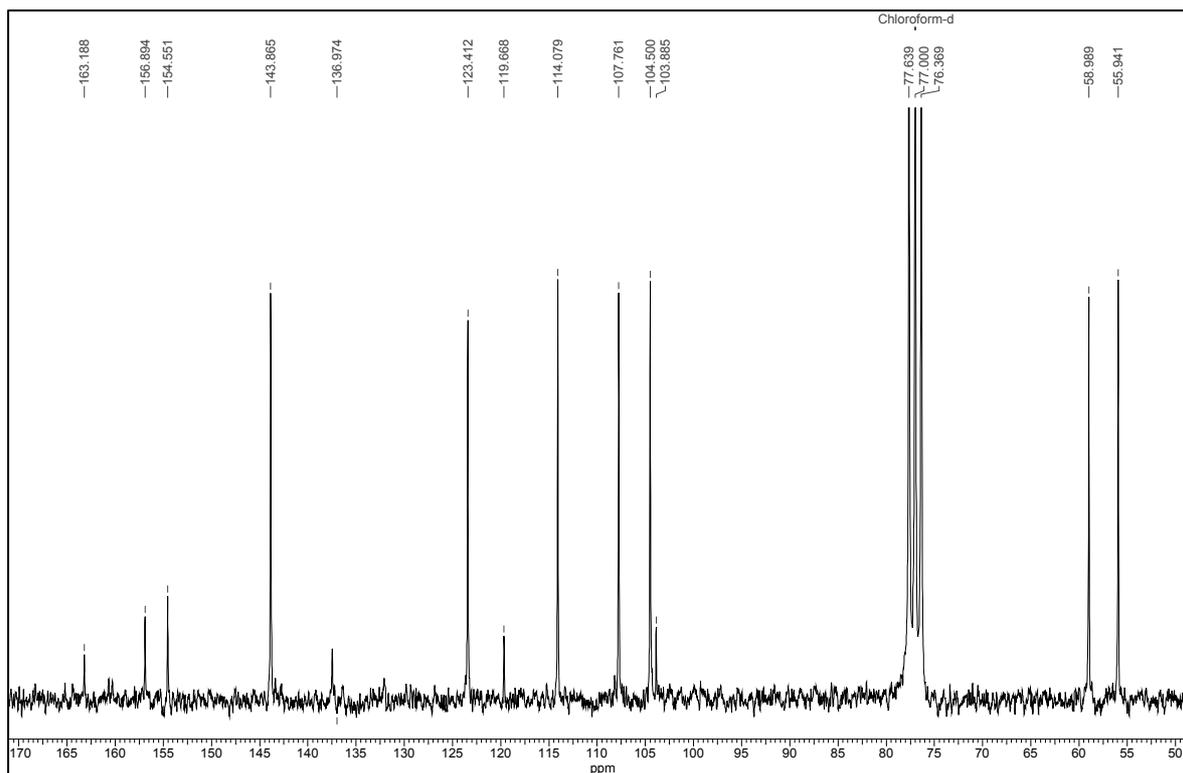
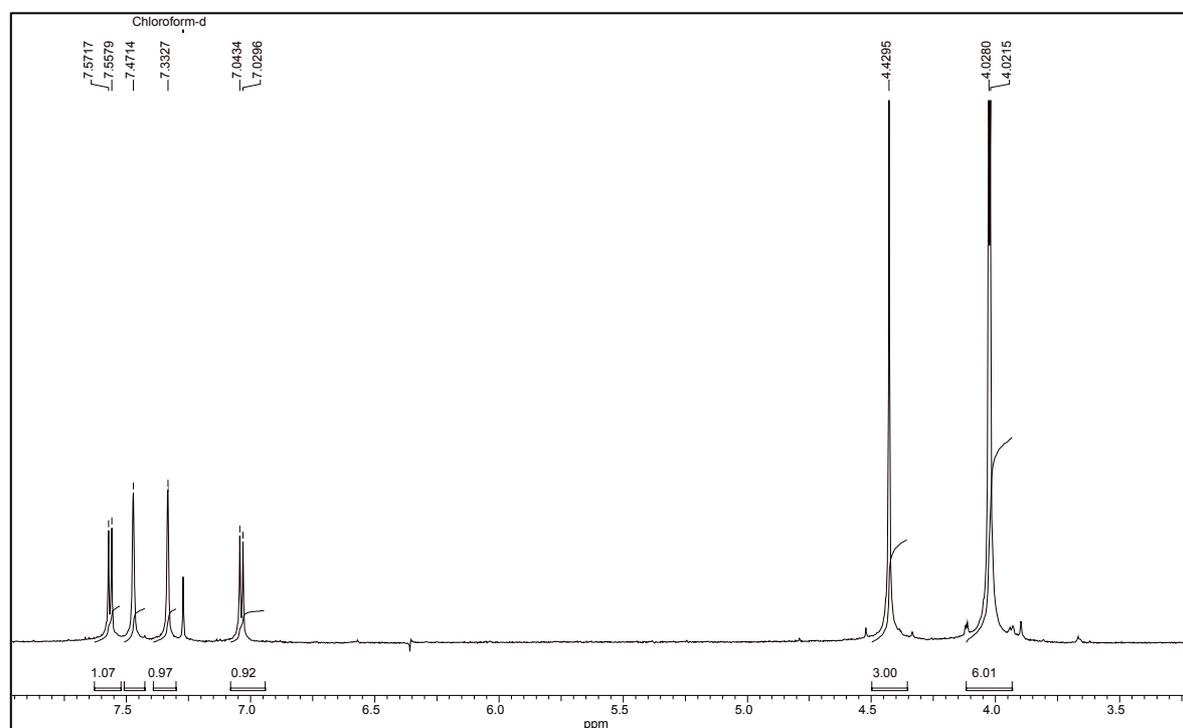
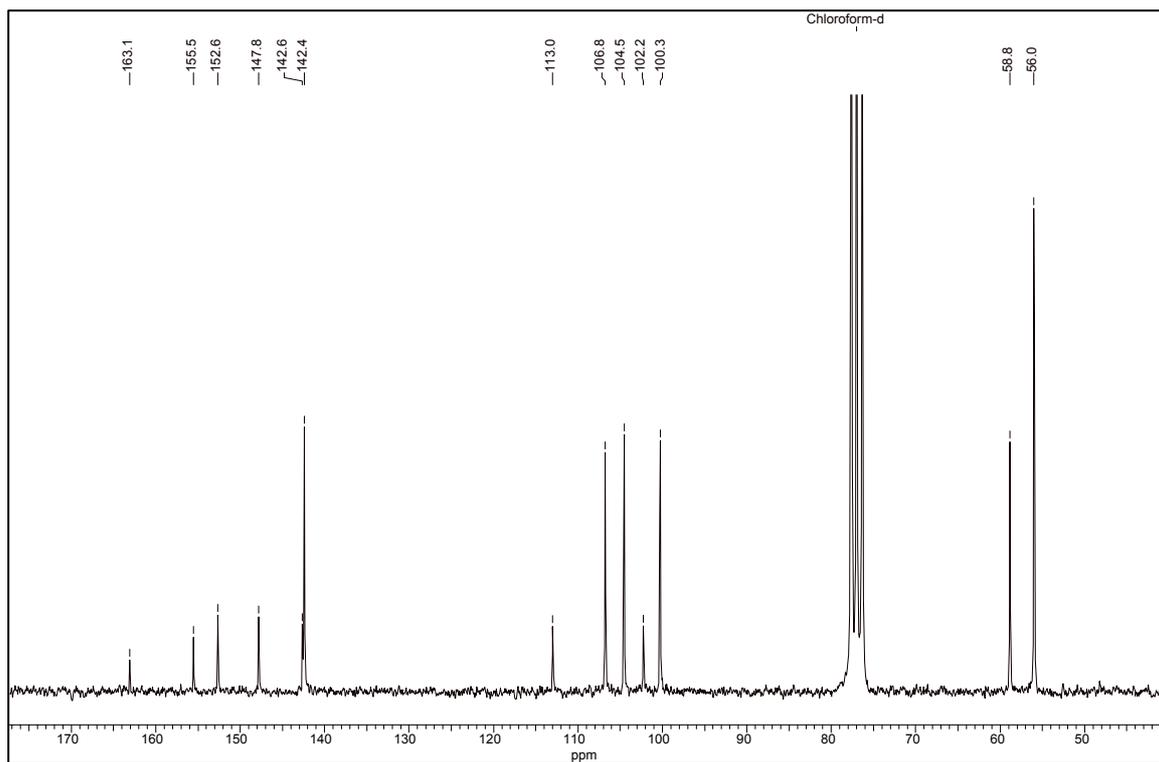
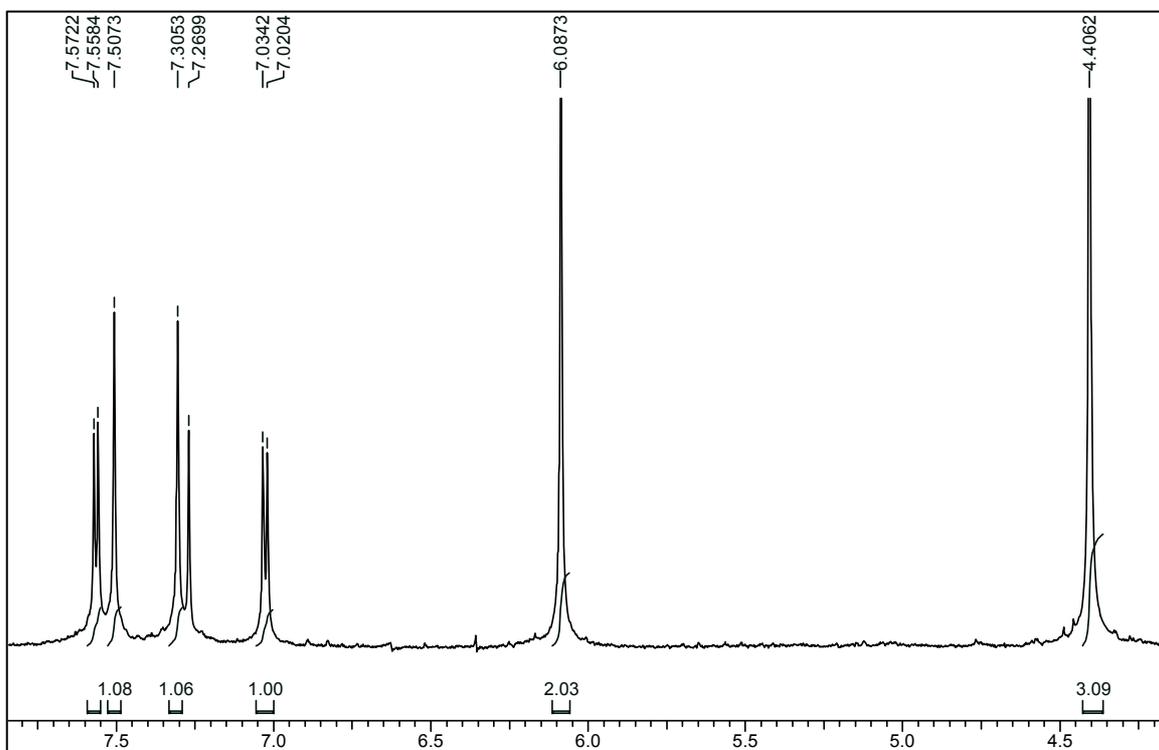


FIGURA 4.27 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **10** (CDCl₃, 200MHz)

FIGURA 4.28 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **10** (CDCl₃, 50MHz)FIGURA 4.29 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **11** (CDCl₃, 200MHz)

FIGURA 4.30 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **11** (CDCl₃, 50MHz)FIGURA 4.31 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **12** (CDCl₃, 200MHz)

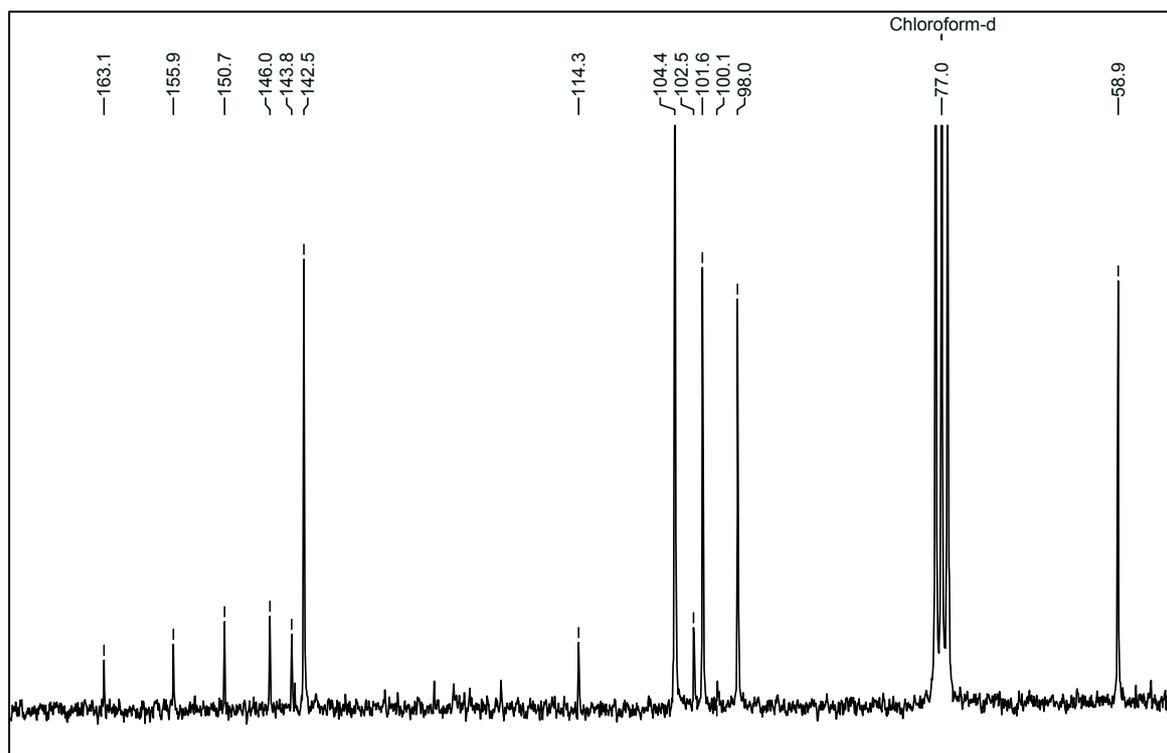


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **12** (CDCl₃, 50MHz)

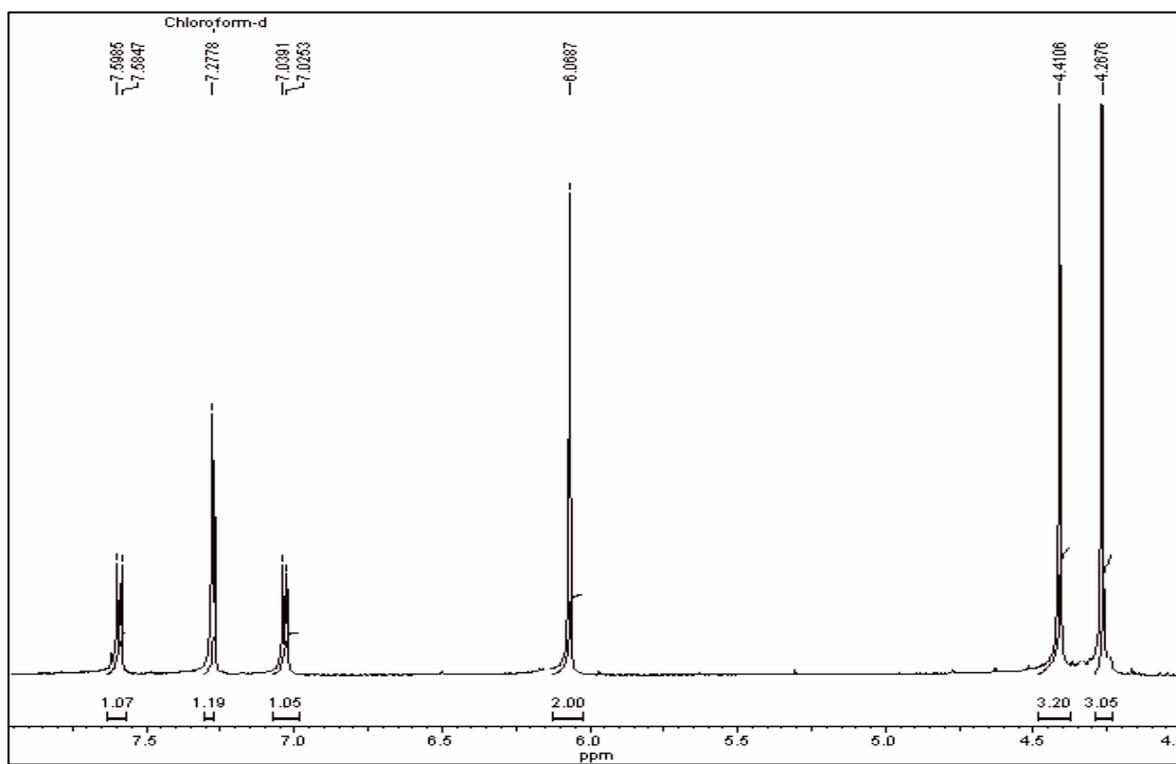
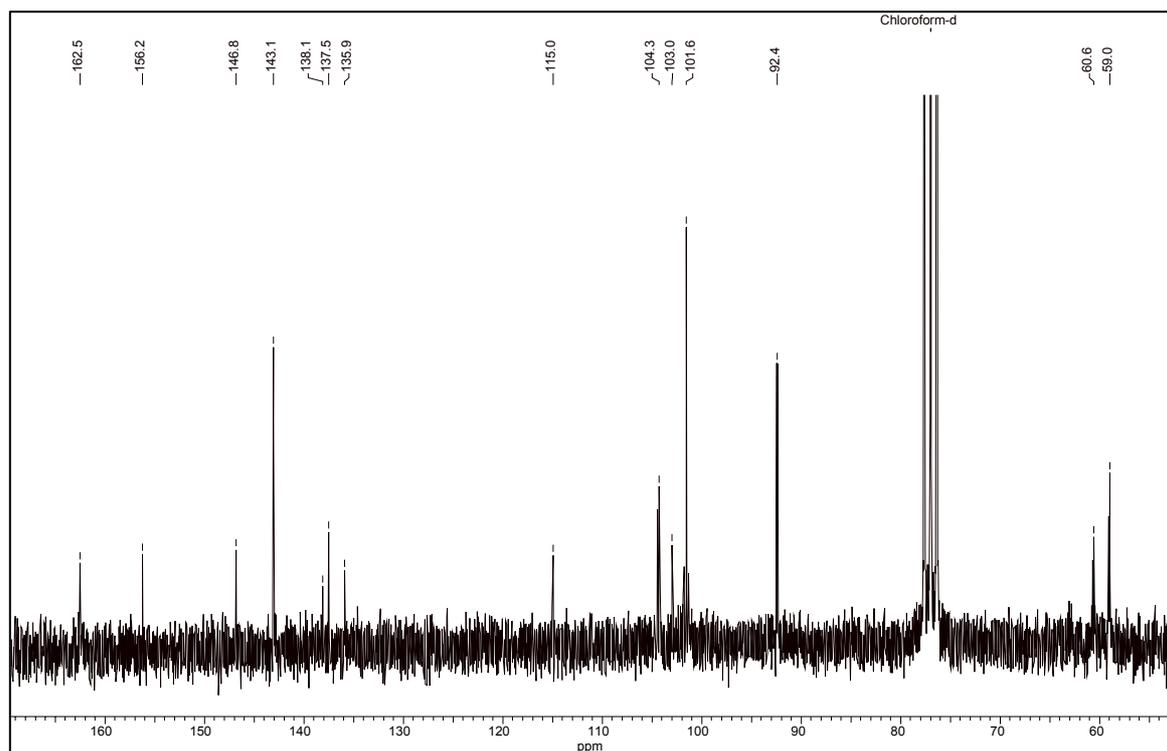


FIGURA 4.33 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **13** (CDCl₃, 200MHz)

FIGURA 4.34 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **13** (CDCl₃, 50MHz)TABELA 4.6 – Dados de RMN¹³C dos alcalóides **9** – **13**

C	9*	Lit. ^a	10*	Lit. ^a 10	11*	Lit. ^a 11	12*	Lit. ^a 12	13*	Lit. ^a 13
2'	143,5	143,6	143,9	143,9	142,4	142,4	142,5	142,6	143,0	143,0
3'	104,7	104,7	104,5	104,5	104,5	104,6	104,4	104,5	104,4	104,3
2	164,0	163,8	163,2	163,2	163,1	163,0	163,1	163,1	162,5	162,6
3	118,7	118,8	119,7	119,7	113,0	112,9	114,3	114,4	115,0	115,0
4	156,8	156,9	156,9	156,9	155,5	155,6	155,9	156,0	156,2	156,1
4a	103,4	103,6	103,9	103,9	102,2	102,2	100,1	101,6	103,0	103,0
5	122,3	122,4	123,4	114,1	100,3	100,1	101,6	102,5	92,5	93,4
6	123,7	123,8	123,4	123,5	147,8	147,8	146,0	146,1	146,8	146,7
7	129,6	129,7	107,8	107,8	152,6	152,6	150,7	150,8	138,1	138,0
8	127,8	127,8	154,5	154,6	106,8	106,7	102,5	104,5	137,5	137,7
8a	145,6	145,6	137,0	137,5	142,7	142,5	143,8	143,9	135,9	136,0
4-OCH ₃	59,0	59,0	59,0	59,0	58,8	58,8	58,9	58,9	59,0	58,9
6-OCH ₃	-	-	-	-	56,0	56,0	-	-	-	-
7-OCH ₃	-	-	-	-	56,0	55,9	-	-	-	-
8-OCH ₃	-	-	55,9	56,0	-	-	-	-	60,6	60,6
2''	-	-	-	-	-	-	98,0	98,0	101,6	101,5

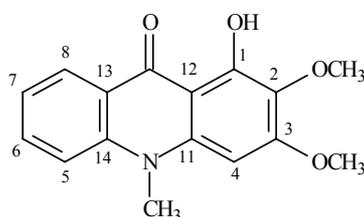
Lit.^a : PAULINI *et al.*, 1989 (CDCl₃, 100MHz)*: (CDCl₃, 50MHz)

TABELA 4.7 – Dados de RMN ^1H dos alcalóides **9** – **13**

H	alcalóide 9	alcalóide 10	alcalóide 11	alcalóide 12	alcalóide 13
2'	7,64 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,66 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,56 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,56 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,59 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)
3'	7,08 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,08 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,03 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,03 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,03 (<i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)
5	8,30 (<i>dd</i> , $J = 8,3$ e $1,2$ Hz)	7,86 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $1,2$ Hz)	7,47 (<i>s</i>)	7,50 (<i>s</i>)	7,28 (<i>s</i>)
6	7,45 (<i>ddd</i> , $J = 8,3$; $7,0$ e $1,5$ Hz)	7,37 (<i>t</i> , $J = 8,8$ Hz)	-	-	-
7	7,70 (<i>ddd</i> , $J = 8,5$; $7,0$ e $1,2$ Hz)	7,05 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $1,2$ Hz)	-	-	-
8	8,0 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $1,5$ Hz)	-	7,33 (<i>s</i>)	7,30 (<i>s</i>)	-
2''	-	-	-	6,09 (<i>s</i>)	6,09 (<i>s</i>)
4-OCH ₃	4,44 (<i>s</i>)	4,46 (<i>s</i>)	4,43 (<i>s</i>)	4,40 (<i>s</i>)	4,41
6-OCH ₃	-	-	4,03 (<i>s</i>)	-	-
7-OCH ₃	-	-	4,02 (<i>s</i>)	-	-
8-OCH ₃	-	4,09 (<i>s</i>)	-	-	4,27

4.4.3 – Identificação estrutural do Alcalóide **14**

O alcalóide **14** foi isolado do extrato diclorometânico das folhas de *H. puberula* (p. 27) e foi caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C e comparação com a literatura (JANUÁRIO, 1995).

**14**

O espectro de RMN ^1H de **14** (FIGURA 4.35) apresentou quatro sinais na região de hidrogênios aromáticos, evidenciando um anel *orto* dissubstituído: $\delta 8,37$ (*dd*, $J = 8,1$ e $1,4$ Hz), $\delta 7,68$ (*ddd*, $J = 8,7$, $7,0$ e $1,4$ Hz), $\delta 7,46$ (*dl*, $J = 8,7$ Hz) e $\delta 7,26$ (*ddd*, $J = 8,1$, $7,0$ e $0,8$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-8, H-6, H-5 e H-7, respectivamente. Observou-se ainda no espectro dois sinais de metoxilas em $\delta 3,92$ (*s*, 3H) e $\delta 4,00$ (*s*, 3H); um sinal de N-Me em $\delta 3,78$ (*s*, 3H) e um singlete em $\delta 6,21$ (1H), característico do hidrogênio H-4 de alcalóides acridônicos substituídos em C-2, C-3 e C-4. A presença de um singlete em $\delta 14,75$ é característico do hidrogênio da hidroxila

quando esta encontra-se quelada com o oxigênio do grupo carboxílico, confirmando a presença da hidroxila na posição C-1.

Através das informações descritas anteriormente, o alcalóide **14** foi caracterizado como a sendo a arborinina. A comparação dos valores de RMN¹³C (FIGURA 4.36) com os da literatura (BERGENTHAL *et al.*, 1978) (TABELA 4.8) confirma a estrutura proposta.

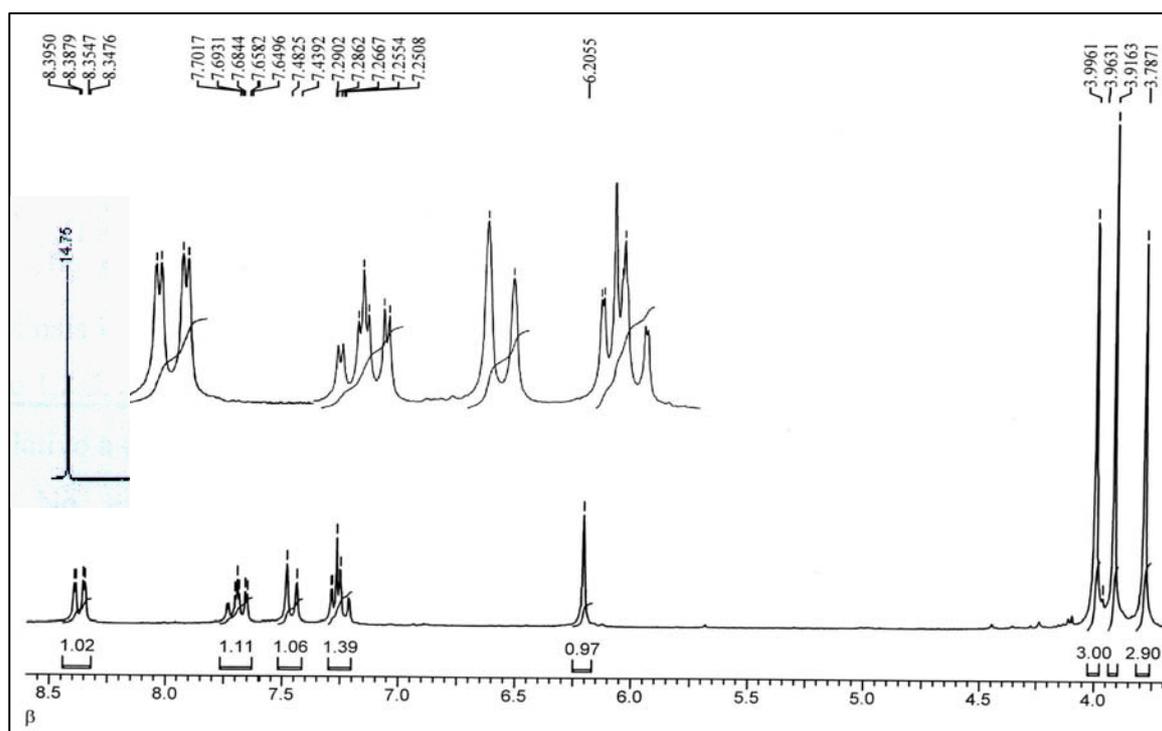
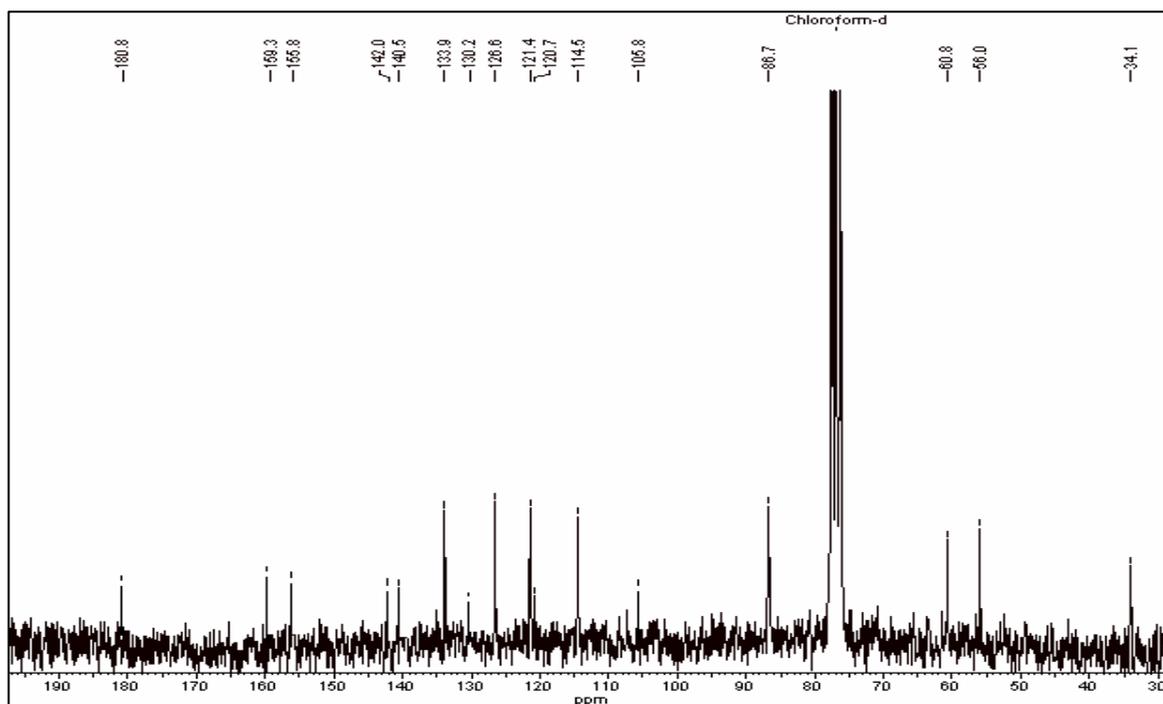


FIGURA 4.35 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **14** (CDCl₃, 200MHz)

FIGURA 4.36 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **14** (CDCl₃, 50MHz)TABELA 4.8 – Dados de RMN ¹H e ¹³C do alcalóide **14**

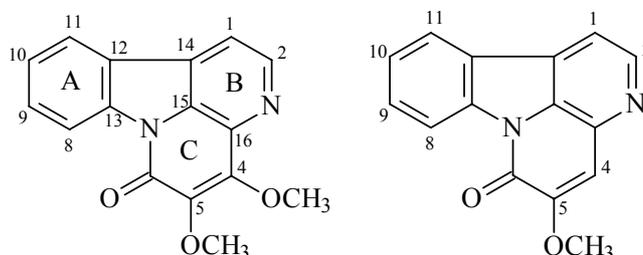
H/C	Alcaloide 14	Alcaloide 14 (CDCl ₃ , 50 MHz)	BERGENTHAL <i>et al.</i> , 1979 (CDCl ₃ , 50 MHz)
1	-	155,7	155,8
2	-	129,9	130,2
3	-	159,1	159,3
4	6,21 (s)	86,7	86,7
5	7,46 (dl, J = 8,7 Hz)	114,5	114,5
6	7,68 (ddd, J = 8,7, 7,0 e 1,4 Hz)	133,7	133,9
7	7,26 (ddd, J = 8,1, 7,0 e 0,8 Hz)	121,2	121,4
8	8,37 (dd, J = 8,1 e 1,4 Hz)	126,0	126,6
9	-	180,4	180,8
11	-	140,1	140,5
12	-	105,3	105,8
13	-	120,3	120,7
14	-	141,6	142,0
N-CH ₃	3,78 (s, 3H)	33,8	34,1
2-OCH ₃	3,92* (s, 3H)	60,6	60,8
3-OCH ₃	4,00* (s, 3H)	55,8	56,0

* = valores intercambiáveis

4.4.4– Identificação estrutural dos Alcalóides 15 e 16

Mais de trinta e cinco alcalóides do tipo cantin-6-ona tem sido isolados de trinta e seis espécies de plantas, sendo vinte e nove desses alcalóides isolados de espécies da família Simaroubaceae, portanto, estes compostos formam um importante grupo do ponto de vista quimiotaxonômico (OHMOTO e KOIKE, 1989).

Os alcalóides **15** e **16** foram isolados do caule da fração diclorometânica do extrato metanólico de *S. versicolor* (p. 35). Suas estruturas foram elucidadas através de RMN¹H, ¹³C, COSY, HMBC e HSQC.

**15****16**

Os alcalóides cantinônicos são de fácil identificação. Por serem altamente conjugados, possuem coloração às vezes fosforescente e forte absorção na luz UV. Possuem características estruturais que tornam seus espectros particulares, que são os dois dubletos em aproximadamente δ 7,95 e δ 8,86, ambos com $J = 5,0$ Hz, referentes aos hidrogênios H-1 e H-2 do anel piridínico (anel B).

Os espectros de hidrogênio dos alcalóides **15** e **16** (FIGURAS 4.37 e 4.38) além de apresentarem os dois dubletos referentes aos hidrogênios H-1 e H-2 em aproximadamente δ 8,80 e δ 7,80, apresentaram em comum, sinais de quatro hidrogênios aromáticos em δ 8,11 (*ddd*, $J = 7,8, 1,2$ e $0,8$ Hz) que foi atribuído ao hidrogênio H-8 por acoplar com H-9 com uma constante *orto*, em *meta* com H-10 e com uma constante *para* com H-11. Para o H-9 foi atribuído o sinal em δ 7,52 (*ddd*, $J = 7,8, 7,6$ e $1,00$ Hz) por acoplar com uma constante *orto*

com H-8 e H-10 e acoplar com uma constante *meta* com H-11. O sinal em δ 7,71 (*ddd*, $J = 8,0, 7,0$ e $0,8$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-10 por acoplar com duas constantes grandes com H-9 e H-11 e uma constante pequena com H-8, conseqüentemente o sinal em δ 8,67 (*td*, $J = 8,0$ e $1,00$ Hz) foi atribuído ao H-11. Esses dados foram confirmados no espectro de COSY ^1H - ^1H dos alcalóides **15** e **16** (FIGURAS 4.39 e 4.40), sugerindo para estas estruturas, um anel aromático *orto* dissustituído (TABELA 4.9).

Foi observado também no espectro de RMN ^1H de **16** (FIGURA 4.38) um sinal em δ 7,21 (*s*, 1H), indicando que apenas um dos carbonos, C-4 ou C-5, estaria substituído e que provavelmente o substituinte desta posição seria um grupo metoxila, evidenciado pela presença de um singlete em δ 4,09. Já no espectro de RMN ^1H de **15** (FIGURA 4.37) os sinais em δ 4,09 e δ 4,48, ambos integrando para três hidrogênios e a ausência do singlete em δ 7,21, presente na estrutura de **16**, evidenciaram dois grupos metoxilas nas posições C-4 e C-5. Esses dados foram confirmados através dos sinais dos carbonos metílicos em δ 61,5 e δ 61,3 observados no espectro de RMN ^{13}C de **15** (FIGURA 4.41). Foram observados também um carbono carbonílico em δ 158,4 e treze sinais de carbonos aromáticos, sendo sete deles, totalmente substituído. Já o espectro de RMN ^{13}C de **16** (FIGURA 4.40) apresentou somente um sinal de carbono metílico em δ 56,9, um carbono carbonílico em δ 155,4 e treze sinais de carbonos aromáticos sendo seis deles totalmente substituído. Os sinais de carbono metílicos em aproximadamente 61,0 δ em ambos os espectros indicaram que as metilas estavam ligadas diretamente ao oxigênio.

Os experimentos de HSQC e HMBC de **15** (FIGURAS 4.43 e 4.44) permitiram atribuir todos os sinais de carbono e hidrogênios na molécula (TABELA 4.11). Para o alcalóide **16** os experimentos de HSQC e HMBC (FIGURAS 4.45 e 4.46), além de permitirem as atribuições dos sinais dos carbonos e hidrogênios, confirmaram a posição da metoxila em C-5, através das correlações entre o sinal em δ 7,21 com os sinais em δ 127,6, δ 137,0 e δ 154,6

referentes aos carbonos C-15, C-16 e C-6, respectivamente, este sinal, foi atribuído ao hidrogênio H-4; identificando assim o alcalóide **15** como 4,5-dimetóxicantin-6-ona e o alcalóide **16** como sendo o 5-metóxicantin-6-ona, já descritos anteriormente na literatura (RODRIGUES-FILHO, 1992 e VIEIRA, 1995).

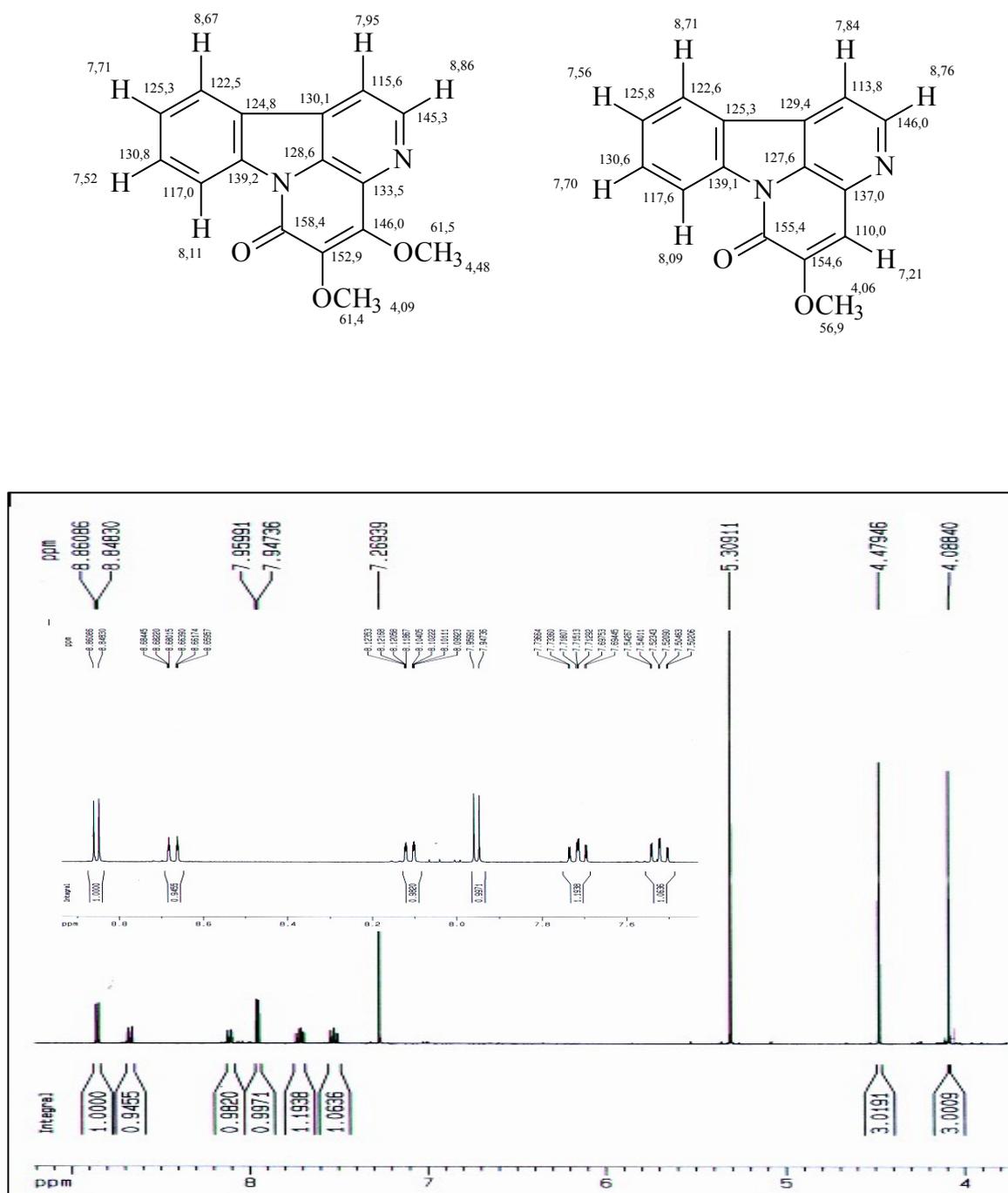


FIGURA 4.37 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **15** (CDCl₃, 400MHz)

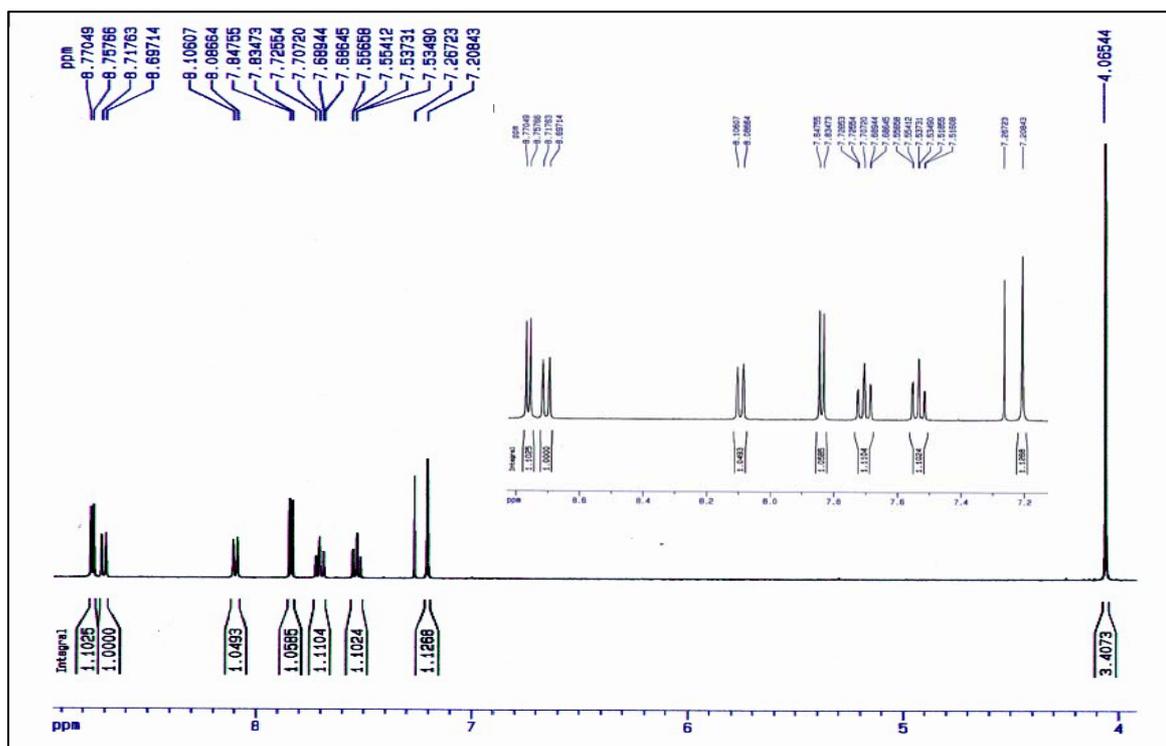


FIGURA 4.38 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **16** (CDCl₃, 400MHz)

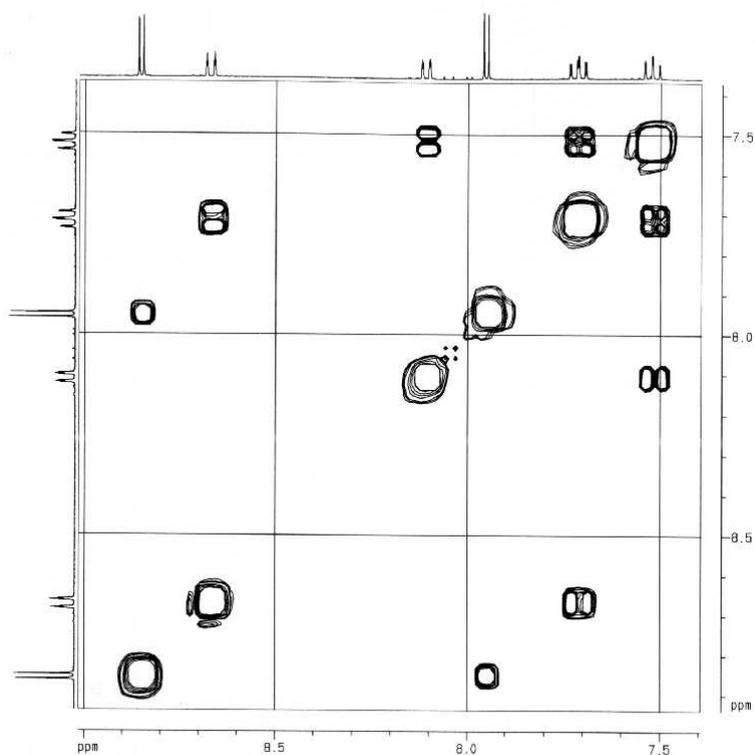


FIGURA 4.39 – Espectro de COSY ¹H-¹H de **15** (CDCl₃, 400MHz)

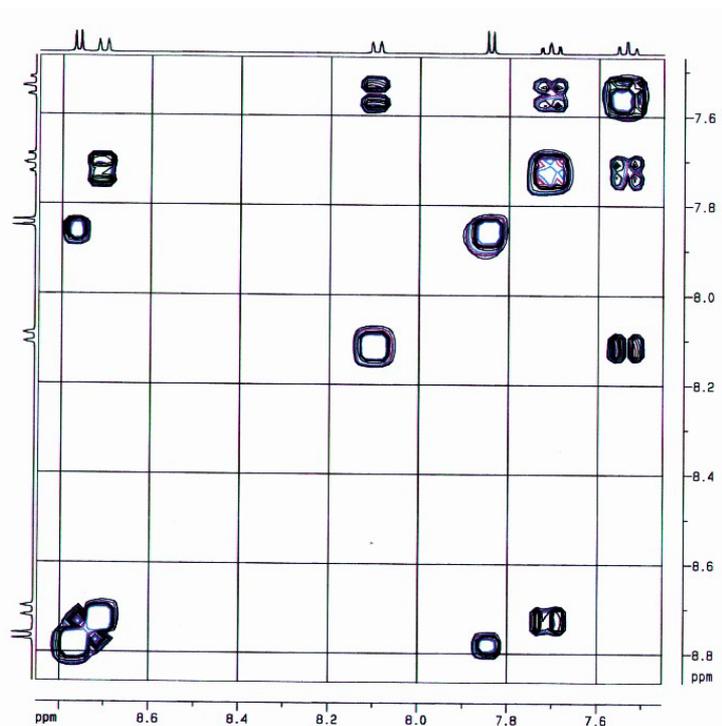


FIGURA 4.40 – Espectro de COSY ^1H - ^1H de **16** (CDCl_3 , 400MHz)

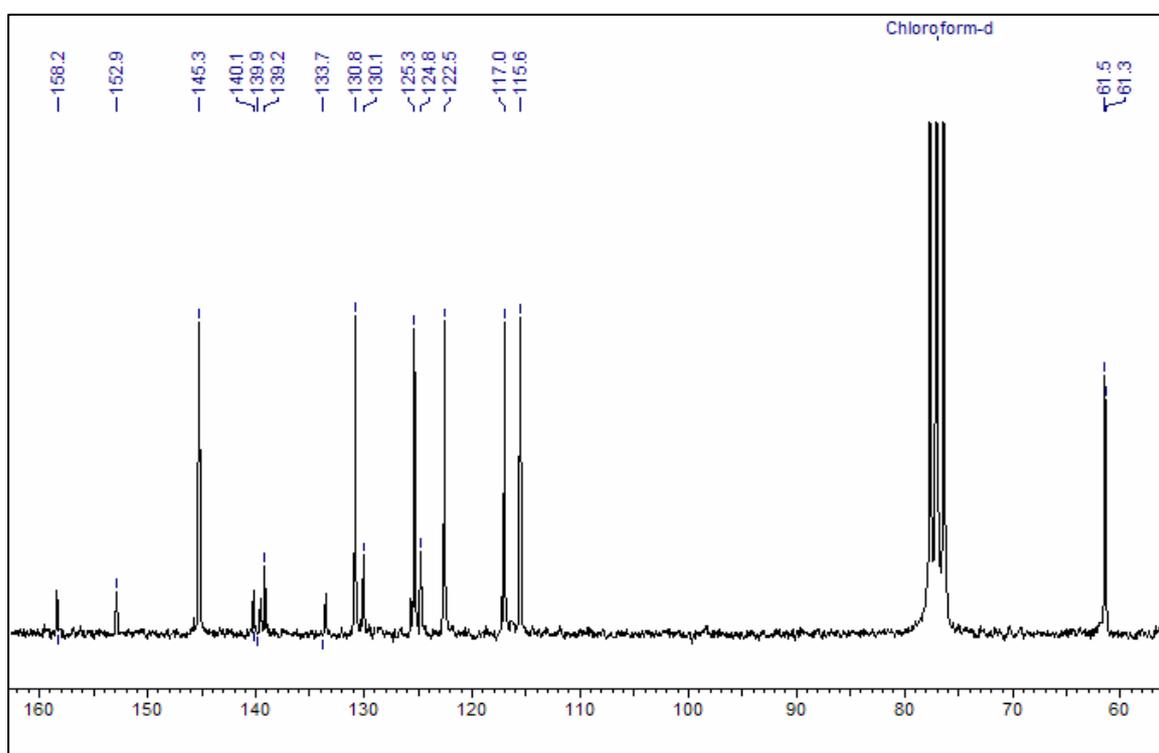
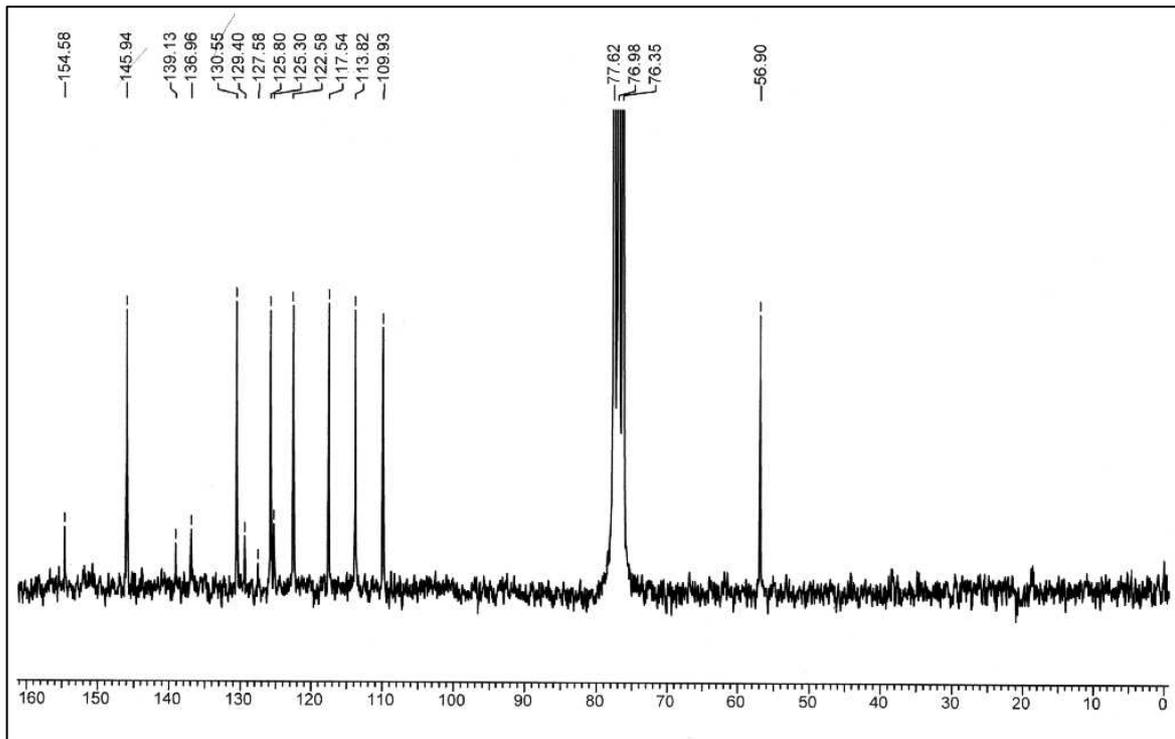
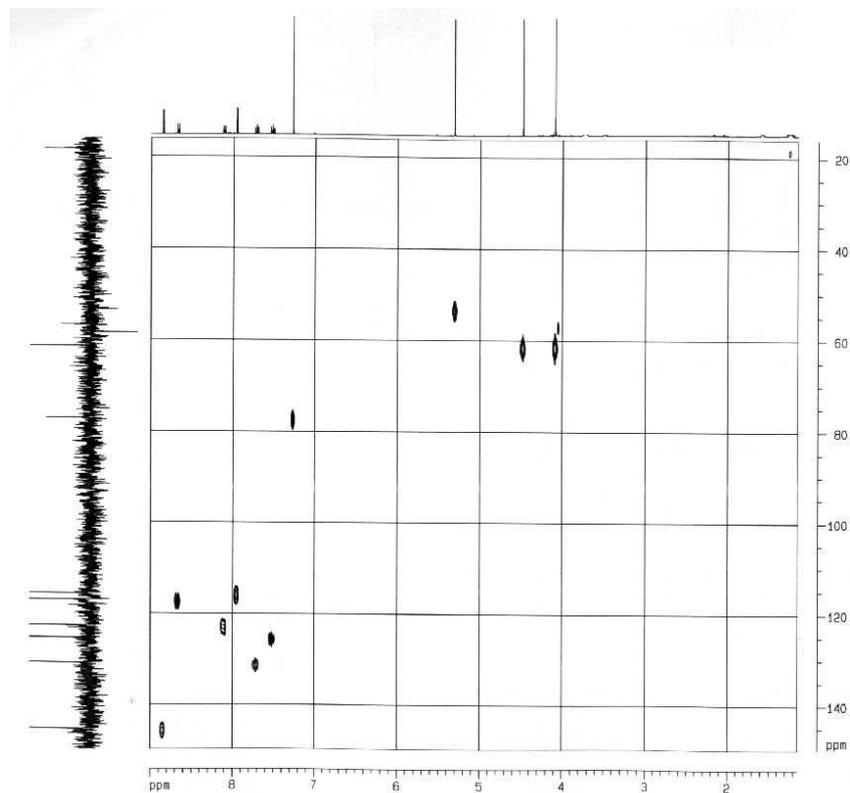


FIGURA 4.41 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **15** (CDCl_3 , 50MHz)

FIGURA 4.42 – Espectro de RMN¹³C do alcalóide **16** (CDCl₃, 50MHz)FIGURA 4.43 – Mapa de contorno de HSQC do alcalóide **15** (CDCl₃, 400 MHz)

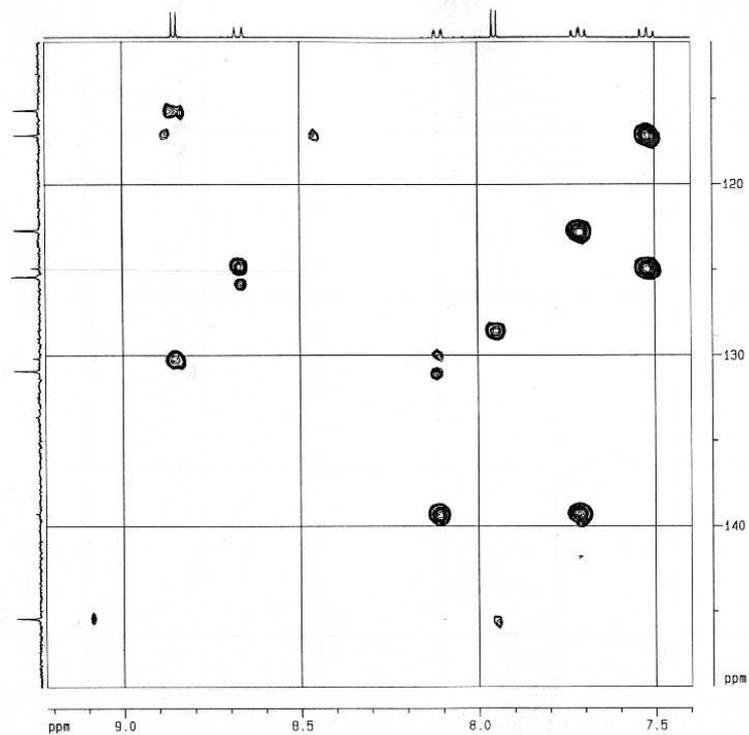


FIGURA 4.44 – Mapa de contorno de HMBC do alcalóide **15** (CDCl₃, 400 MHz)

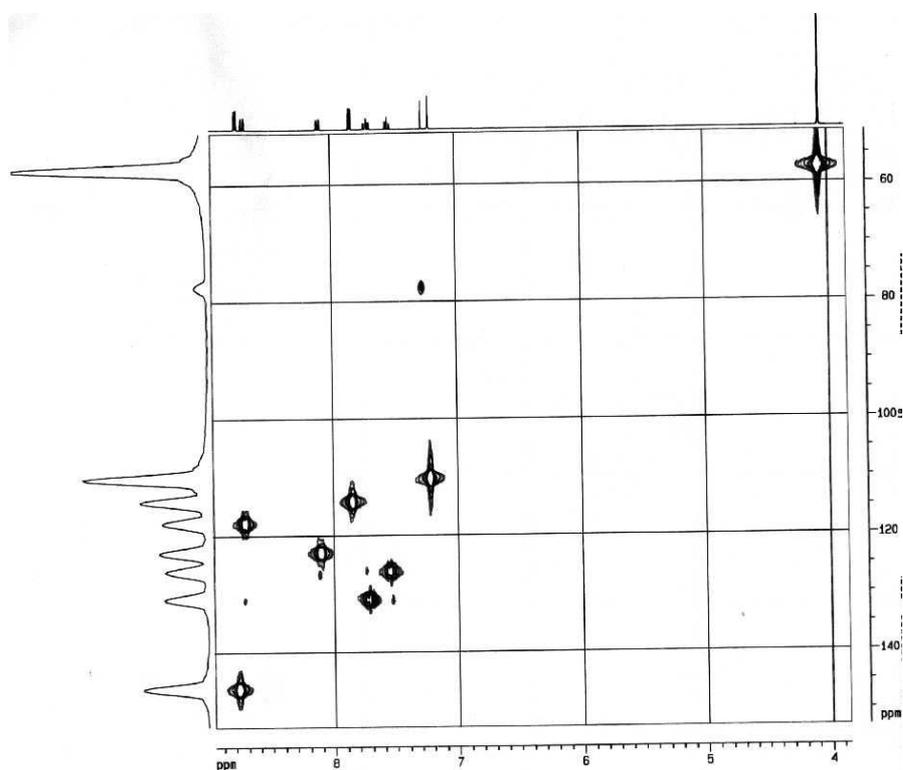


FIGURA 4.45 – Mapa de contorno de HSQC do alcalóide **16** (CDCl₃, 400 MHz)

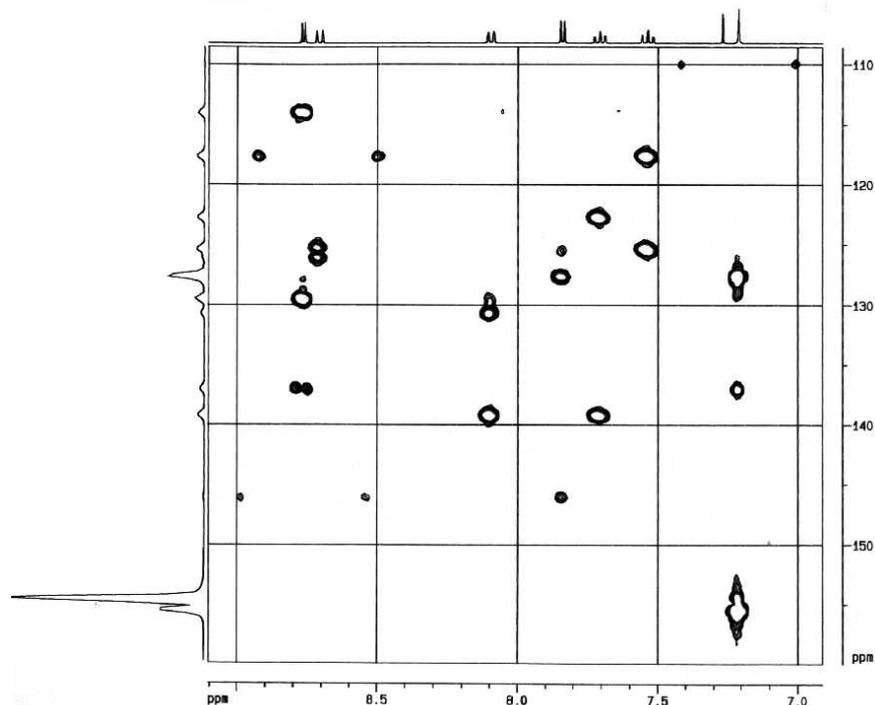


FIGURA 4.46 – Mapa de contorno de HMBC do alcalóide **16** (CDCl₃, 400 MHz)

TABELA 4.9 – Dados de RMN ¹H dos alcalóides **15** e **16**

H	15 (CDCl ₃ , 400 MHz)	(RODRIGUES-FILHO, 1992) (CDCl ₃ , 200 MHz)	16 (CDCl ₃ , 400 MHz)	(VIEIRA, 1995) (CDCl ₃ , 400 MHz)
1	7,95(<i>d</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz)	7,89(<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1 Hz)	7,84(<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1 Hz)	7,83(<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1Hz)
2	8,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz)	8,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1 Hz)	8,76 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1 Hz)	8,76 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1Hz)
4	---	---	7,21 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)
8	8,11 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,8, 1,2 e 0,8 Hz)	8,04 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,3 Hz)	8,09 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,0 Hz)	8,11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
9	7,52 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,8, 7,6 e 1,00 Hz)	7,47 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,0 Hz)	7,70 (<i>td</i> , <i>J</i> = 8,10 e 1,20 Hz)	7,70 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
10	7,71 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,0 e 0,8 Hz)	7,67 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,3 Hz)	7,56 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,80 e 1,20 Hz)	7,53 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
11	8,67 (<i>td</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,00 Hz)	8,60 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,0 Hz)	8,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,10 Hz)	8,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
4-OCH ₃	4,48, <i>s</i>	4,67, <i>s</i>	---	---
5-OCH ₃	4,09, <i>s</i>	4,08, <i>s</i>	4,06, <i>s</i>	4,07, <i>s</i>

TABELA 4.10 – Dados de RMN ^{13}C de **15** e **16**

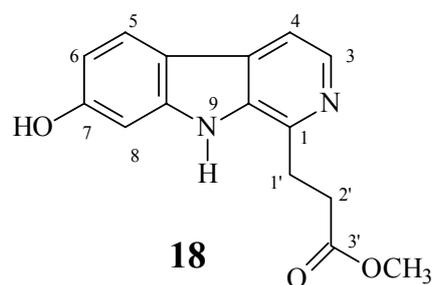
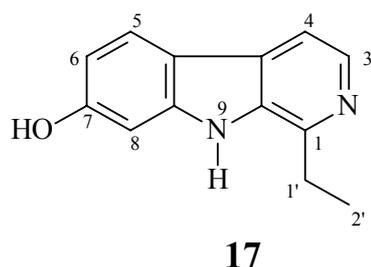
C	(15)	(OHMOTO & KOIKE, 1989)	(16)	(VIEIRA, 1995) (CDCl_3 , 400 MHz)
1	115,6	114,9	113,8	113,7
2	145,3	144,5	146,0	145,8
4	146,0	142,0	110,0	109,8
5	152,9	152,1	154,6	154,4
6	158,4	157,4	155,4	155,2
8	117,0	116,2	117,6	117,4
9	130,8	130,0	130,6	130,5
10	125,3	125,6	125,8	125,7
11	122,5	121,8	122,6	122,6
12	124,8	124,0	125,3	125,1
13	139,2	138,2	139,1	138,9
14	130,1	129,1	129,4	129,2
15	128,6	127,6	127,6	127,3
16	133,5	132,7	137,0	136,7
4-OCH ₃	61,5	61,2	-	-
5-OCH ₃	61,3	61,0	56,9	56,9

TABELA 4.11 – Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **15** e **16** a J^2 e J^3 observadas no experimento de HMBC (400MHz, CDCl_3)

	15 H δ	15 C δ	16 H δ	16 C δ
1	7,95	128,0 e 145,4	7,84	129,4
2	8,86	115,0 e 130	8,76	113,8, 129,4 e 136,9
4	-	-	7,21	127,6 e 136,9
8	8,11	130,0, 130,9 e 139,7	8,70	125,8 e 125,3
9	7,52	117,1 e 124	7,70	122,6 e 139,1
10	7,71	122,0 e 139,3	7,56	117,5 e 125,3
11	8,67	124,0 e 125,4	8,10	130,6 e 139,1
4-OCH ₃	4,48	152,0	-	-
5-OCH ₃	4,10	140 e 155,0	4,06	154,6 e 110

4.4.5– Identificação estrutural dos Alcalóides 17 e 18

Os alcalóides β -carbolínicos quando substituídos apenas na posição 1 podem ser facilmente identificados através dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-3 e H-4, δ 8,15 – 8,55 e δ 7,80 – 8,35, respectivamente, e com $J = 5,0$ a $6,0$ Hz. Substituintes com efeito doador eletrônico na posição 1 provocam um deslocamento do sinal de H-4 para região mais blindada, já os substituintes com efeito receptor eletrônico tem efeito oposto (VIEIRA, 1995).



Os alcalóides β -cantinônicos **17** e **18** foram isolados da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *S. versicolor* (p. 31) e tiveram suas estruturas elucidadas através de RMN de 1 e 2 D e espectrometria de massas.

O espectro de RMN¹H de **17** (FIGURA 4.47) apresentou dois dubletos em δ 7,94 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 1H) e δ 6,78 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 1H), indicando um acoplamento *orto*, que foram atribuídos aos H-5 e H-6, respectivamente. A presença de um singlete em δ 6,94 (*s*, 1H) indicou tratar-se de um anel aromático trissubstituído e esse sinal foi atribuído ao hidrogênio H-8. Os mesmos sinais, também puderam ser observados no espectro de RMN¹H de **18** (FIGURA 4.48), que também apresenta um anel aromático trissubstituído, tendo sido observado também um acoplamento em *meta* entre os hidrogênios H-8 e H-6.

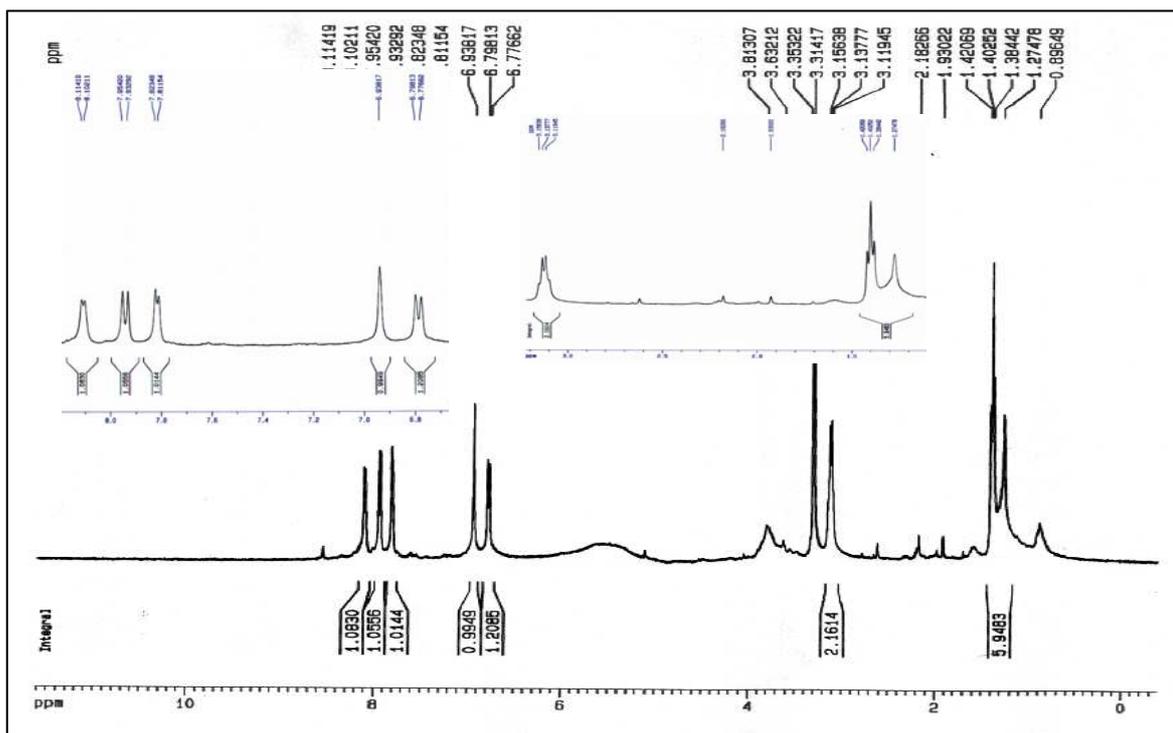


FIGURA 4.47 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **17** (CDCl₃, 400MHz)

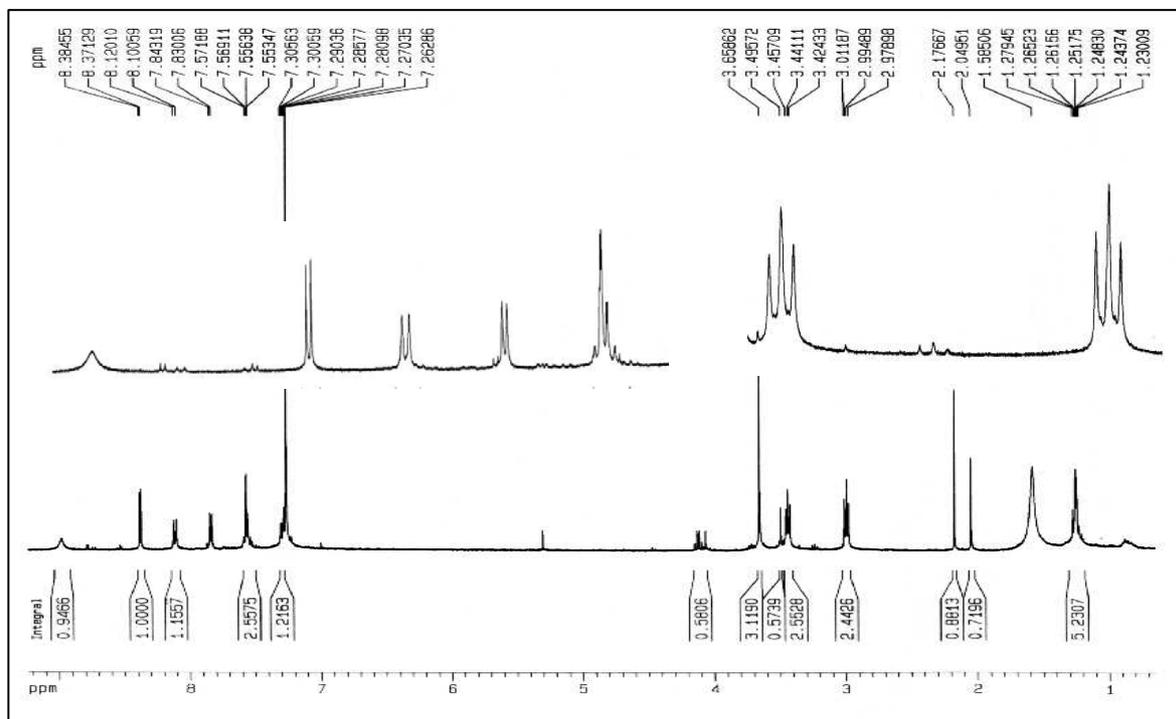


FIGURA 4.48 – Espectro de RMN¹H do alcalóide **18** (CDCl₃, 400MHz)

Os espectros, tanto do alcalóide **17** como o de **18**, apresentaram dois dubletos, sendo em δ 8,10 (d , $J = 4,8$ Hz, 1H) e δ 7,82 (d , $J = 4,8$ Hz, 1H) para **17** e δ 8,38 (d , $J = 5,3$ Hz, 1H) e δ 7,84 (d , $J = 5,3$ Hz, 1H) para o alcalóide **18**, que foram atribuídos aos hidrogênios do anel piridínico H-3 e H-4. Como os sinais referentes aos hidrogênios H-4 em ambos as estruturas encontraram-se blindados e a ausência do sinal referente a H-1 evidenciaram que a posição C-1 estaria substituída por um grupo doador de elétrons.

No espectro de RMN¹H de **17** (FIGURA 4.47) observou-se um quadrupletto em δ 3,14 (q , $J = 7,3$ Hz, 2H), e um triplete em δ 1,40 (t , $J = 7,3$ Hz, 3H) sugerindo ser uma etila o substituinte na posição C-1. O espectro de massas ES⁺ do alcalóide **17** (FIGURA 4.49) apresentou m/z 213,3, indicando que possivelmente o alcalóide **17** possui uma hidroxila, (TABELA 4.12). Uma proposta de fragmentação para este alcalóide foi representada no ESQUEMA 4.4.

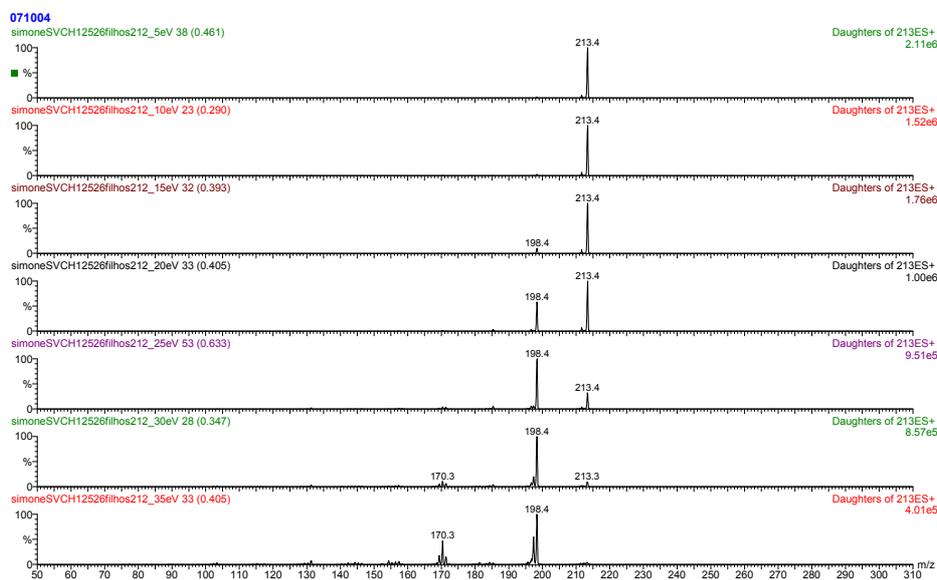
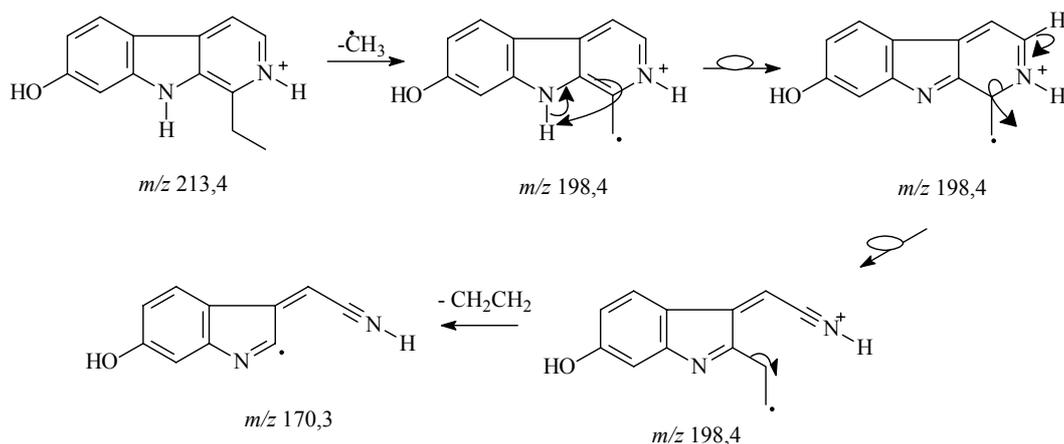
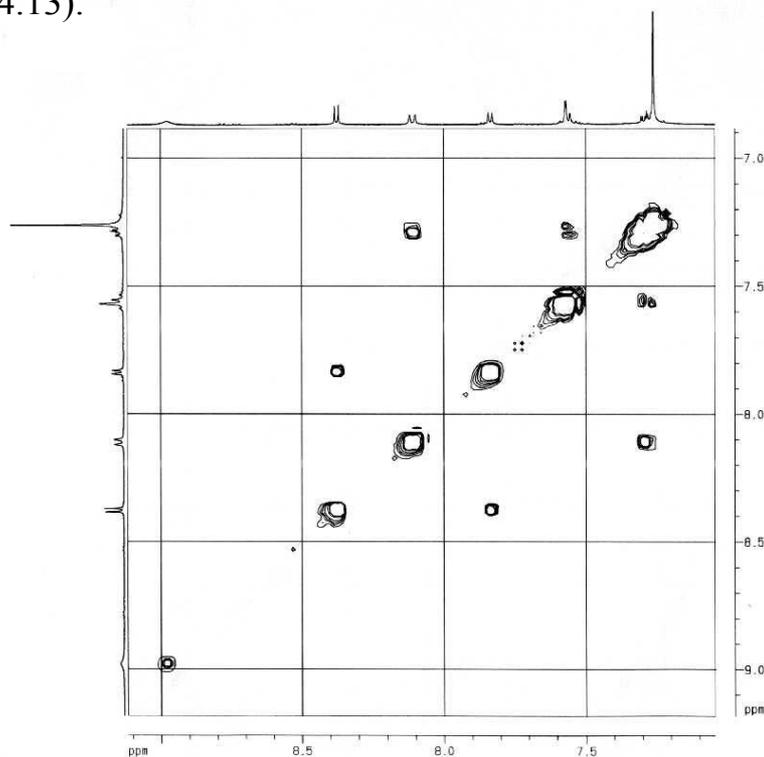


FIGURA 4.49 – Espectro de massas (ES⁺) de **17**

ESQUEMA 4.4 – Proposta de fragmentação para o alcalóide **17** (ES⁺)

O espectro de COSY ^1H - ^1H de **18** (FIGURA 4.50) confirmou as atribuições dadas aos hidrogênios aromáticos e aos do anel piridínico. Na ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H de **18** (FIGURA 4.51) foi observado o acoplamento entre os hidrogênios em δ 2,97 (*t*, $J = 6,7$ Hz) e δ 3,44 (*t*, $J = 6,7$ Hz) (TABELA 4.13).

FIGURA 4.50 – Espectro de COSY ^1H - ^1H de **18** (CDCl_3 , 400MHz)

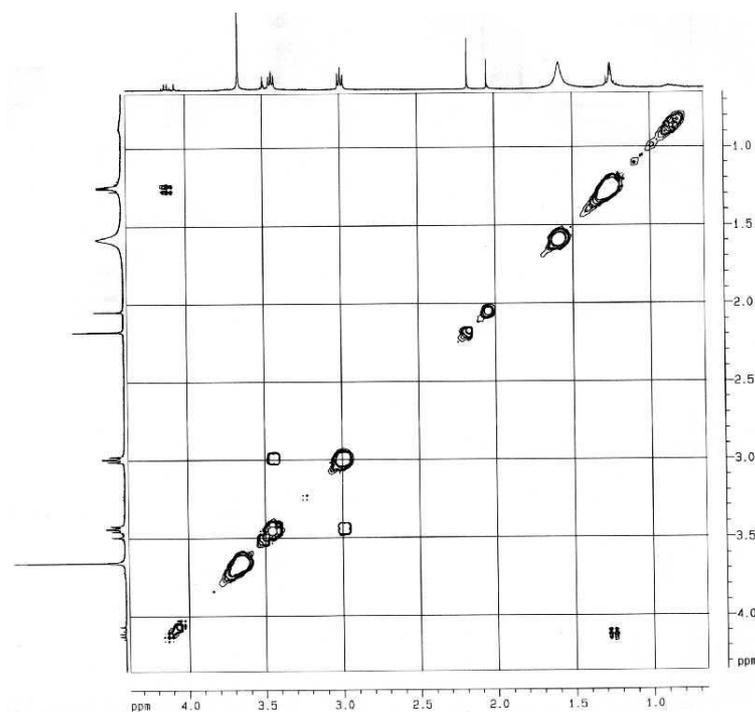
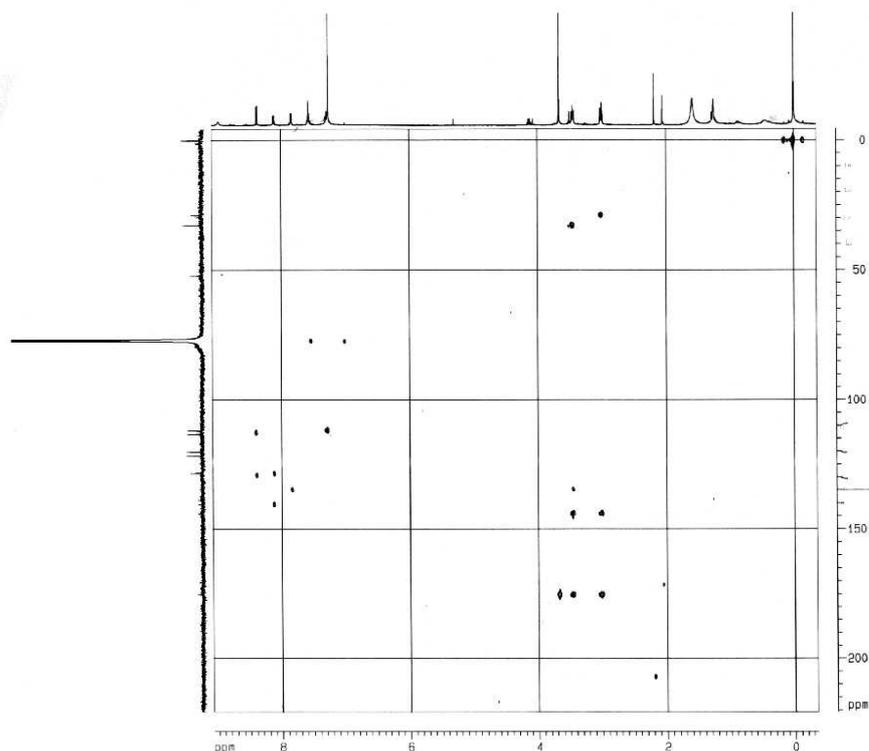


FIGURA 4.51 – Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H de **18** (CDCl_3 , 400MHz)

Os experimentos de HSQC (FIGURA 4.52) e HMBC (FIGURA 4.53) contribuíram para as atribuições dos sinais de hidrogênios e carbonos do alcalóide **18**, permitindo verificar as correlações do sinal em δ 2,97, referente aos hidrogênios H-2', com os dos sinais dos carbonos em δ 175,0; δ 143,0 e δ 28,8, atribuídos aos C-3'; C-1 e C-1'. Para sinal em δ 3,44, referente aos hidrogênios H-1', foram observados as correlações no espectro de HMBC com os sinais em δ 135,0; δ 143,0 e δ 175,0, referentes aos C-12; C-1 e C-3' e finalmente para o sinal dos hidrogênios do grupo metoxila em δ 3,66, foi verificado a correlação com o sinal em δ 175,0, sinal este, referente ao carbono carbonílico C-3'. A partir dessas correlações, foi verificado que a metoxila encontrava-se no C-3' e provavelmente o grupo hidroxila em C-7 e que o substituinte em C-1 seria o éster propionato de metila (TABELA 4.14).

FIGURA 4.53 – Mapa de contorno de HMBC de **18** (CDCl₃, 400 MHz)TABELA 4.12 – Dados de RMN ¹H de **17** e **18**

H	17	18
3	8,10 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,8 Hz)	8,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,3 Hz)
4	7,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,8 Hz)	7,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,3 Hz)
5	7,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	8,12 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)
6	6,78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	7,30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 e 1,0 Hz)
8	6,94 <i>s</i>	7,56 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,0 Hz)
1'	3,14 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	3,44 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)
2'	1,40 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	2,97 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)
N-H	9,0 <i>sl</i>	8,8 <i>sl</i>
3'OCH ₃	---	3,66, <i>s</i>

TABELA 4.13 – Correlações ¹H-¹H de **18** observadas nos experimentos de COSY (400 MHz, CDCl₃)

H	(18)
3	7,84
4	8,38
5	7,30
6	8,12 e 7,56
8	7,30
1'	2,97
2'	3,44

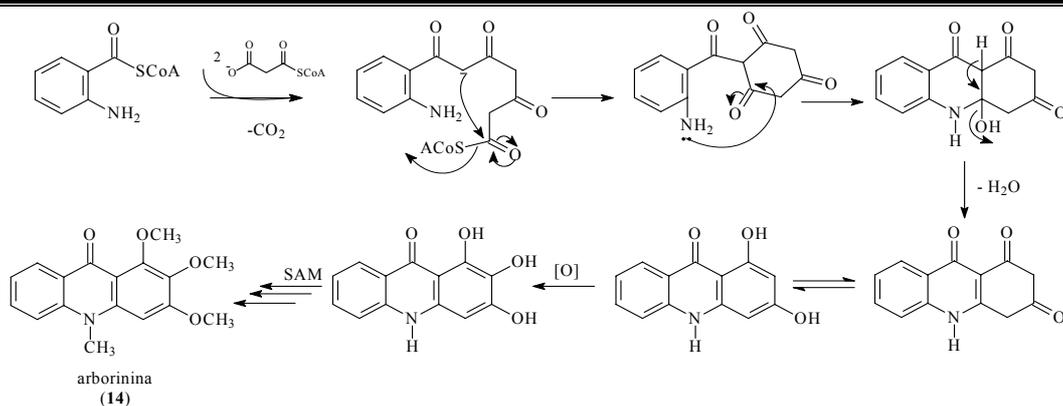
TABELA 4.14 – Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a J^1 , J^2 e J^3 de **18** observadas no experimento de HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl_3)

HSQC		HMBC	
H (δ)	C (δ)	H (δ)	C (δ)
8,38	140,0	8,38	113,3 e 129,5
8,12	121,7	8,12	128,4 e 141,5
7,84	113,3	7,84	135
7,56	111,9	7,56	---
7,30	120,0	7,30	111,9
3,66	52,0	3,66	175
3,44	28,8	3,44	175, 135,0 e 143,0
2,97	32,8	2,97	175, 143 e 28,8

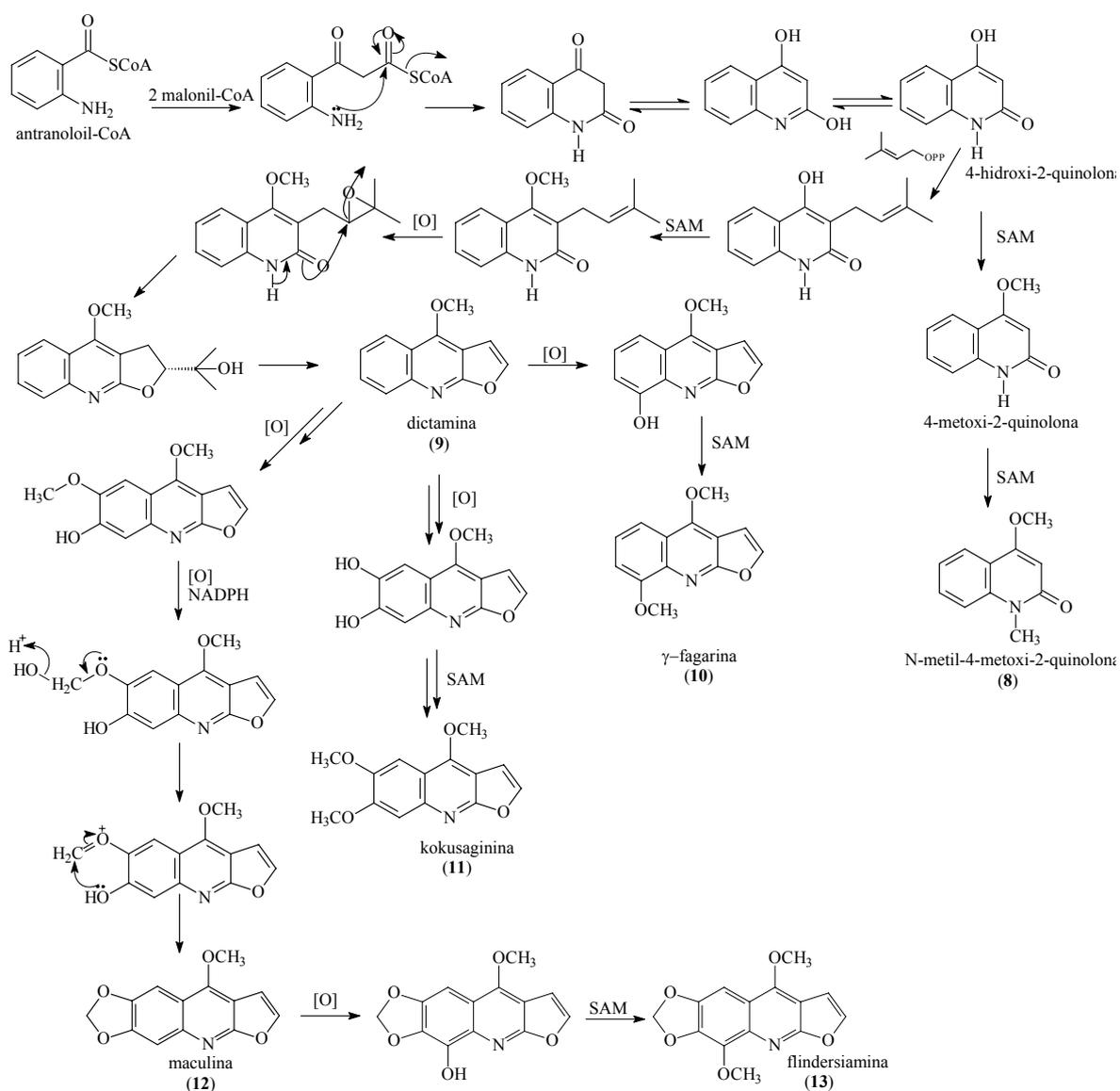
Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas presentes principalmente em plantas, mas também, há ocorrências em microorganismos, insetos e anfíbios. Sua basicidade é conferida pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio em anéis heterocíclicos (CORDELL, 1981).

Os alcalóides derivados da fenilalanina/tirosina, do triptofano, do ácido antranílico, derivados da histidina e alcalóides de origem não definidas, como os carbazóis, são os de maiores ocorrência na família Rutaceae, sendo os derivados do ácido antranílico considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (WATERMAN, 1999).

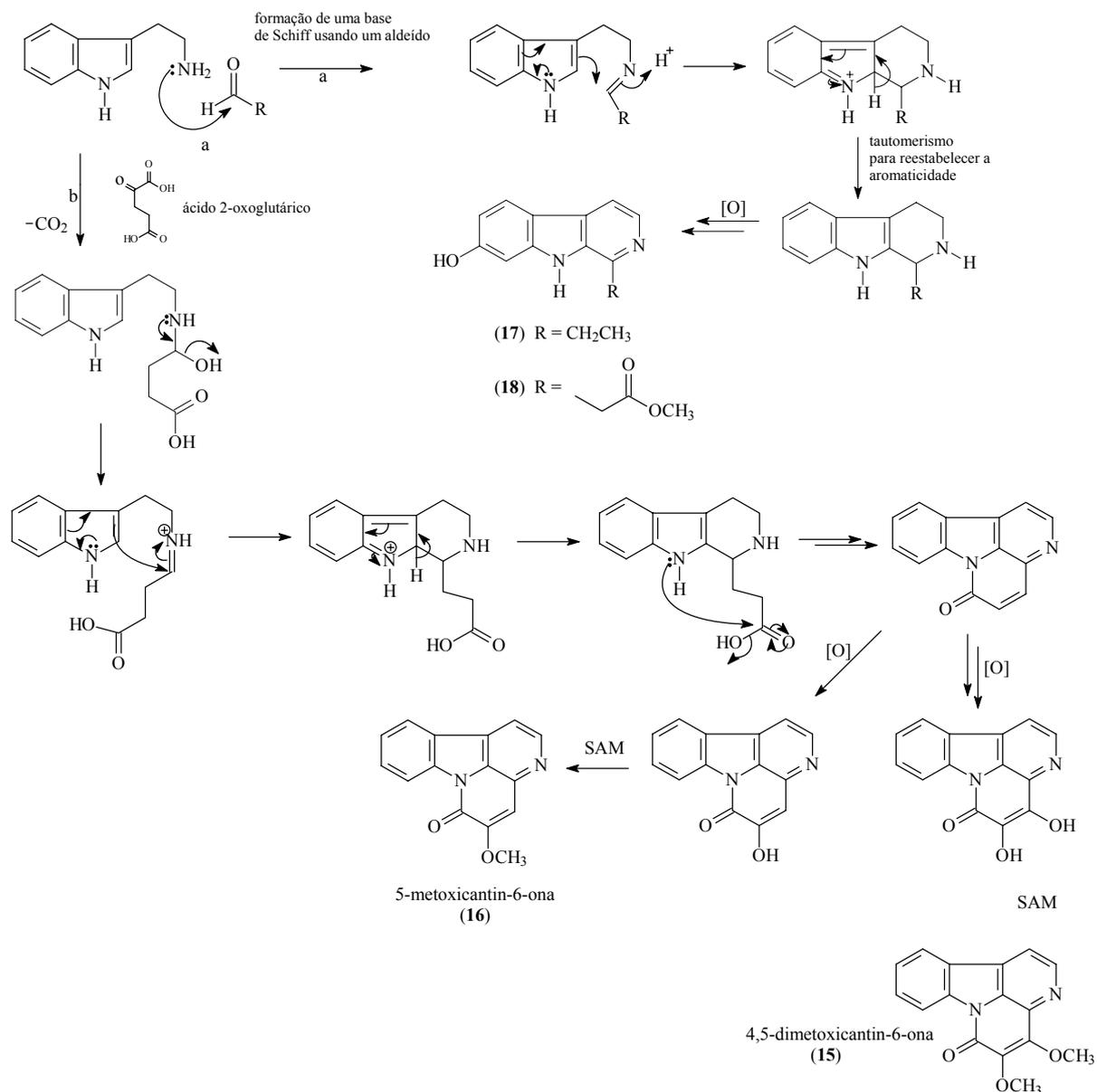
Nos ESQUEMAS 4.5 e 46 estão representados propostas biossintéticas para a formação dos alcalóides derivados do ácido antranílico, substâncias **8** a **14** e no ESQUEMA 4.7, proposta biossintética para a formação dos alcalóides derivados do triptofano, substâncias **15** a **18**.



ESQUEMA 4.5: Proposta biogenética para a formação do alcalóide 14 (adaptada de DEWICK, 2001)



ESQUEMA 4.6: Proposta biogenética para a formação dos alcalóides 8 a 13 (adaptada de DEWICK, 2001)

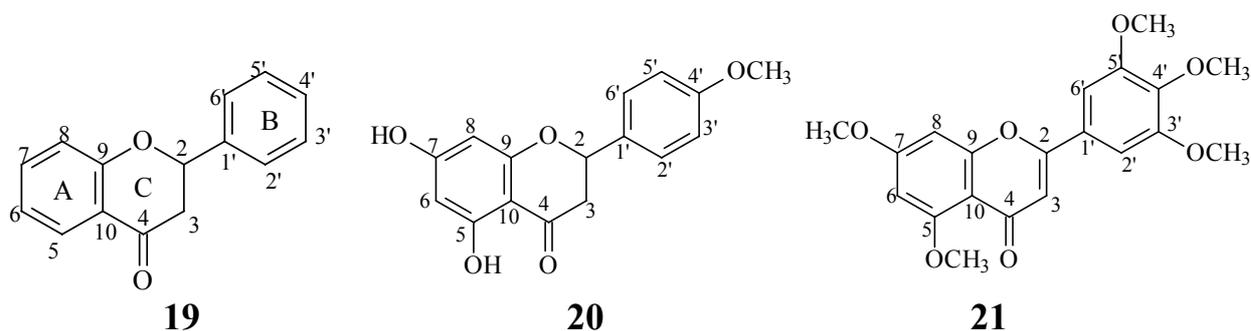


ESQUEMA 4.7: Proposta biogênica para a formação dos alcalóides **15** a **18** (adaptada de DEWICK, 2001)

4.5 – Flavonóides

4.5.1 – Identificação estrutural dos flavonóides 19 - 21

Os flavonóides **19-21** foram isolados da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *H. puberula* (p. 33) e foram identificados através de RMN¹H, RMN¹³C, HSQC e HMBC e comparados com dados da literatura (PELTER *et al.*, 1976, VASCONCELOS *et al.*, 1998 e FRASER & LEWIS, 1974).



Analisando os espectros de RMN¹H de **19** e **20** (FIGURAS 4.54 e 4.55) observaram-se sinais em δ 3,10 (*dd*, $J = 3,0$ e $17,1$ Hz), δ 2,78 (*dd*, $J = 13,0$ e $17,1$ Hz) e em δ 5,37 (*dd*, $J = 3,0$ e $13,0$ Hz) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-3a, H-3b e H-2 do anel C de flavonóide e estes sinais são típicos de uma flavanona.

A presença de nove sinais de hidrogênios na região aromática do espectro de RMN¹H de **19** em conjunto com a análise do espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.56), onde foi verificada a presença de um carbono carbonílico em 191,9 e doze sinais de carbonos aromáticos, sendo três deles totalmente substituído, indicaram a ausência de substituintes nos anéis A e B, sugerindo ser a substância **19** a flavanona. Os dados de RMN¹H e ¹³C de **19** foram comparados com a literatura (PELTER *et al.*, 1976), (TABELA 4.15) confirmando sua identificação.

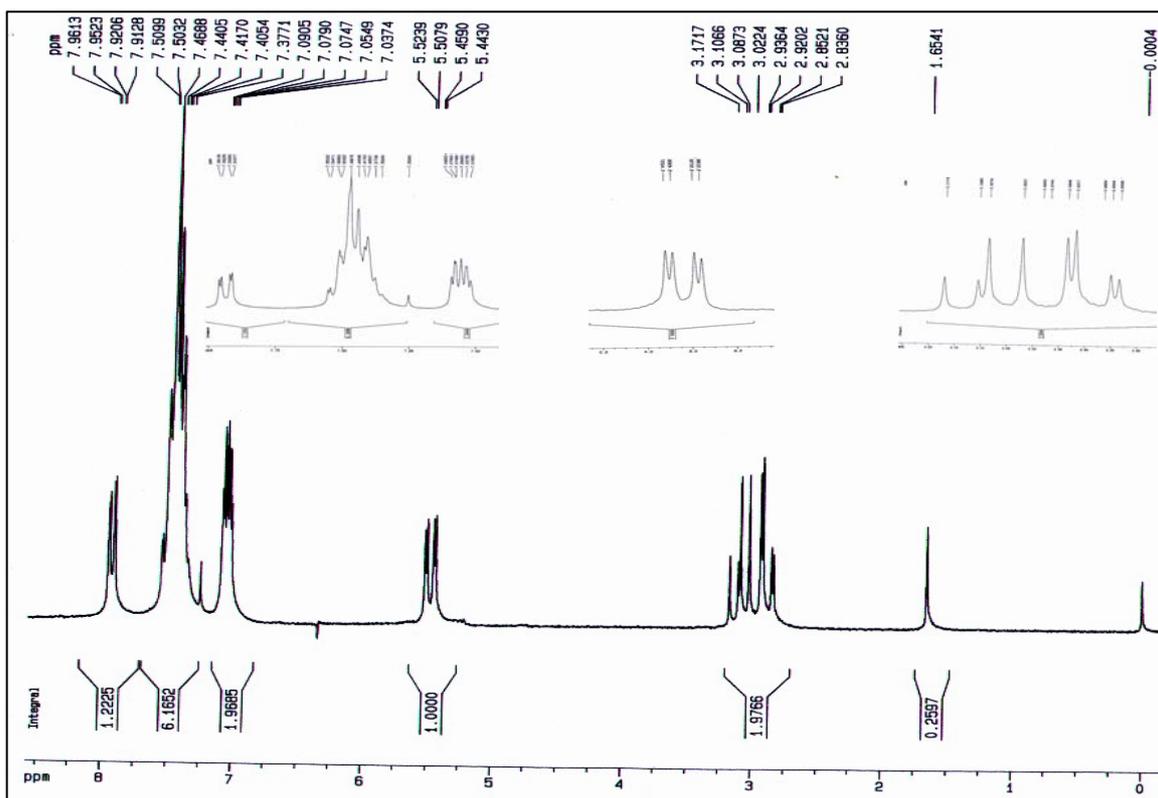


FIGURA 4.54 – Espectro de RMN¹H do flavonóide **19** (CDCl₃, 200MHz)

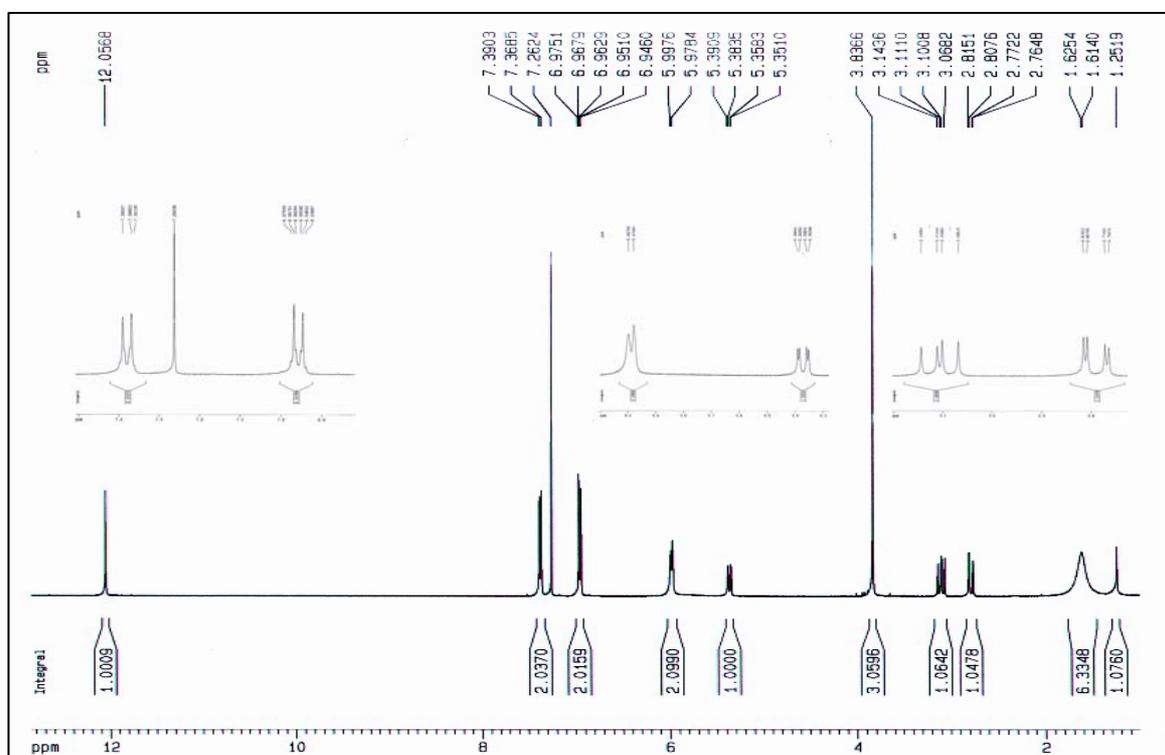


FIGURA 4.55 – Espectro de RMN¹H do flavonóide **20** (CDCl₃, 200MHz)

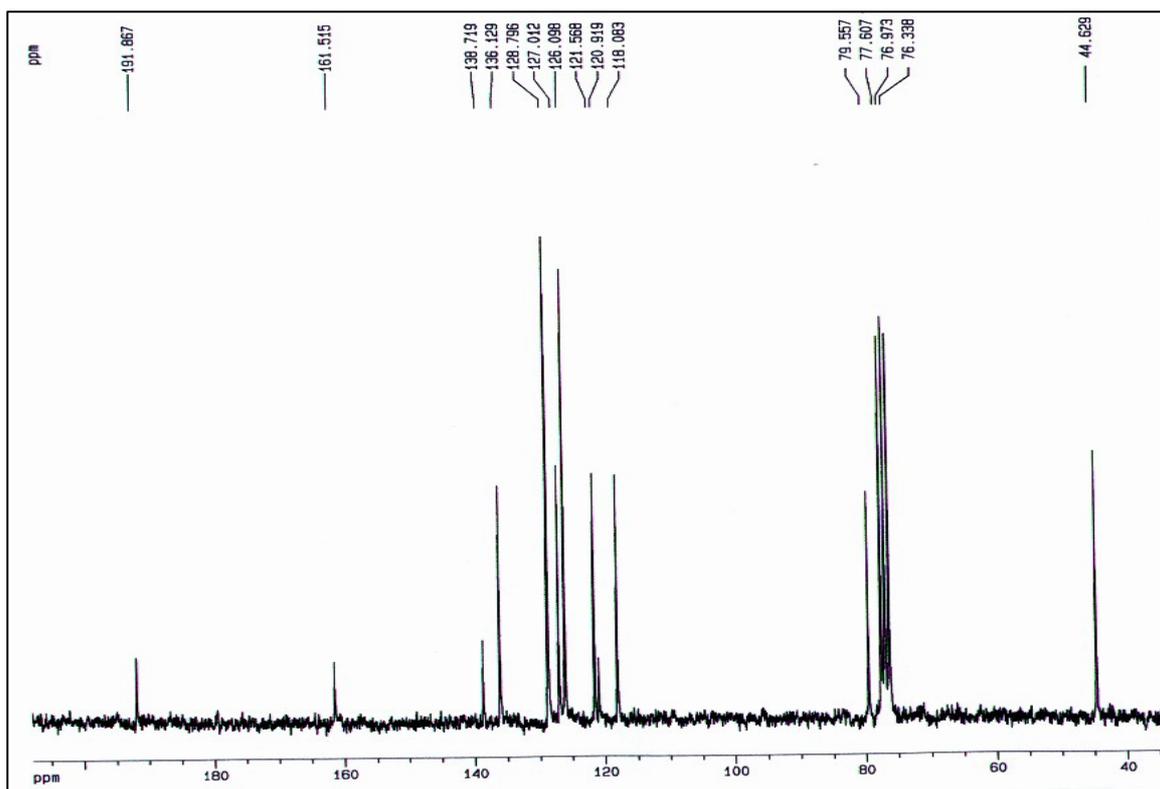
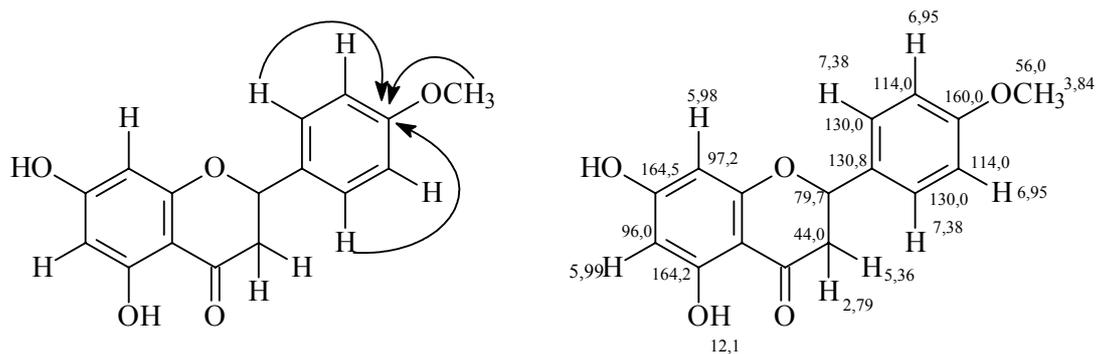


FIGURA 4.56 – Espectro de RMN¹³C do flavonóide **19** (CDCl₃, 50MHz)

Já para a substância **20** foi observado no espectro de RMN¹H (FIGURA 4.55) um sinal em δ 12,1 (*s*, 1H) característico de hidrogênio de hidroxila quando esta se encontra quelada, posicionada em C-5. Os dubletos em δ 6,96 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H) e δ 7,38 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H,) foram atribuídos aos hidrogênios H-3', H-5' e H-2', H-6' que são quimicamente equivalentes devido a livre rotação do anel B. No espectro de HMBC de **20**, (FIGURA 4.57) foi observado a correlação do sinal em δ 3,84, referente aos hidrogênios do grupo metoxila, com o sinal em δ 160,0; o qual também está correlacionado ao sinal em δ 7,38, correspondente aos hidrogênios H-2' e H-6'. Esses dados indicaram que o grupo metoxila encontrava-se em C-4'. Os sinais em δ 5,99 (*sl*, 1H) e δ 5,98 (*sl*, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente.



Através dos experimentos de HSQC (FIGURA 4.58) e HMBC (FIGURA 4.57), podem-se atribuir todos os carbonos da substância **20** (TABELA 4.16) que em comparação com a literatura (VASCONCELOS *et al.*, 1998) (TABELA 4.15) mostrou se tratar da flavanona Isosakuranetina.

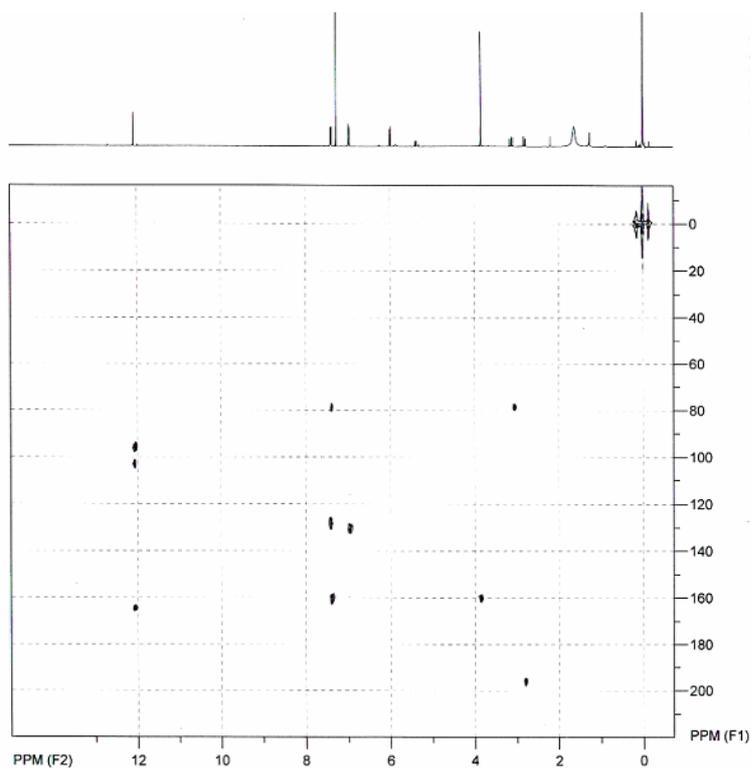


FIGURA 4.57 – Mapa de contorno de HMBC de **20** (CDCl_3 , 400 MHz)

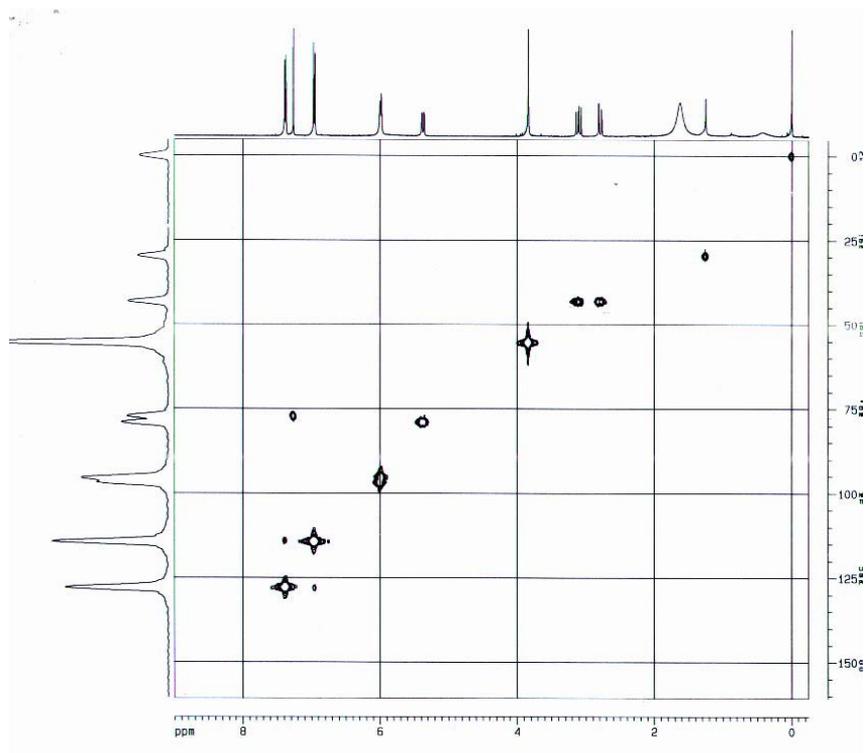


FIGURA 4.58 – Mapa de contorno de HSQC de **20** (CDCl₃, 400 MHz)

TABELA 4.15 – Dados de RMN¹H e RMN¹³C das flavanonas **19** e **20**

H/C	19 ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz)	19 ¹³ C (CDCl ₃ , 50MHz)	PELTER <i>et al.</i> , 1976	20 ¹ H (CDCl ₃ , 50MHz)	VASCONCELOS, <i>et al.</i> , 1998	20 ¹³ C (CDCl ₃ , 50MHz)	VASCONCELOS, <i>et al.</i> , 1998
2	5,48 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2 e 13,0 Hz)	79,6	79,5	5,37 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 e 13,0 Hz)	5,36 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,1 e 13,0 Hz)	79,7	78,9
3a	2,91 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2 e 16,8 Hz)	44,6	44,6	3,10 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13,0 e 17,1 Hz)	3,10 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13,5 e 17,2 Hz)	44,0	43,1
3b	2,09 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 16,9 e 13,0 Hz)	44,6	44,6	2,78 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 e 17,1 Hz)	2,79 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5 e 17,2 Hz)	44,0	43,1
4	-	191,9	191,6	-	-	195,6	196,1
5	7,93 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,6 e 8,0 Hz)	127,0	126,9	-	-	164,2	164,3
6	7,46 (<i>m</i>)	121,6	121,5	5,99 (<i>sl</i>)	6,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	96,0	96,7
7	7,06 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 1,6, 7,0 e 8,6 Hz)	136,1	136,0	-	-	164,5	164,9
8	7,52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,7 e 8,6 Hz)	118,1	118,0	5,98 (<i>sl</i>)	5,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	97,2	95,5
9	-	161,5	161,3	-	-	163,9	163,2
10	-	120,9	120,8	-	-	103,1	103,0
1'	-	138,7	138,6	-	-	130,8	130,3
2'	7,50 (<i>m</i>)	126,1	126,0	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	130,0	127,7
3'	7,40 (<i>m</i>)	128,8	128,7	6,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	114,0	114,2
4'	7,35 (<i>m</i>)	128,0	128,0	-	-	160,0	160,0
5'	7,40 (<i>m</i>)	128,8	128,7	6,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	114,0	114,2
6'	7,50 (<i>m</i>)	126,1	126,0	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	130,0	127,7
4'-OCH ₃	-	-	-	3,84 (<i>s</i>)	3,84 (<i>s</i>)	56,0	55,4

TABELA 4.16 – Dados de HSQC e HMBC para a flavanona **20**

	^{20}H	^{20}C J^1	^{20}C J^2 e J^3
2	5,37	79,7	-
3a	3,10	44,0	195,6
3b	2,78	44,0	79,7
4-OMe	3,84	56,0	160,0
5-OH	12,1	-	97,2, 103,8 e 164,5
6	5,99	96,0	-
8	5,98	97,2	-
3' e 5'	6,96	114,0	130,8
2' e 6'	7,38	130,0	79,7, 130,0 e 160,0

O flavonóide **21** apresentou no espectro de RMN¹H (FIGURA 4.59) dois dubletos com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,3$ Hz) em δ 6,57 e δ 6,40, indicando um anel A tetrasubstituído e esses deslocamentos foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, sendo H-6 o mais blindado devido ao efeito de blindagem exercido pelos substituintes em C-5 e C-7.

O anel B pode ser caracterizado pelo singlete em δ 7,08 (2H), correspondente aos hidrogênios H-6' e H-2', cuja equivalência é ocasionada pela livre rotação deste anel. A presença de um singlete em δ 6,63, sinal característico do hidrogênio H-3 em flavonas, e cinco metoxilas na região entre δ 3,92 e δ 3,97, indicam que, possivelmente trata-se de uma flavona pentametoxilada.

No espectro de RMN¹³C de **21** (FIGURA 4.60) notou-se a presença de cinco carbonos metílicos, cinco carbonos metínicos em δ 56,2, δ 56,4 (3C) e δ 61,0; um carbono carbonílico em δ 177,4 e quatorze carbonos aromáticos, sendo oito deles totalmente substituído.

A análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (FRASER & LEWIS, 1974) indicaram ser a flavona **21** a 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavona (TABELA 4.17).

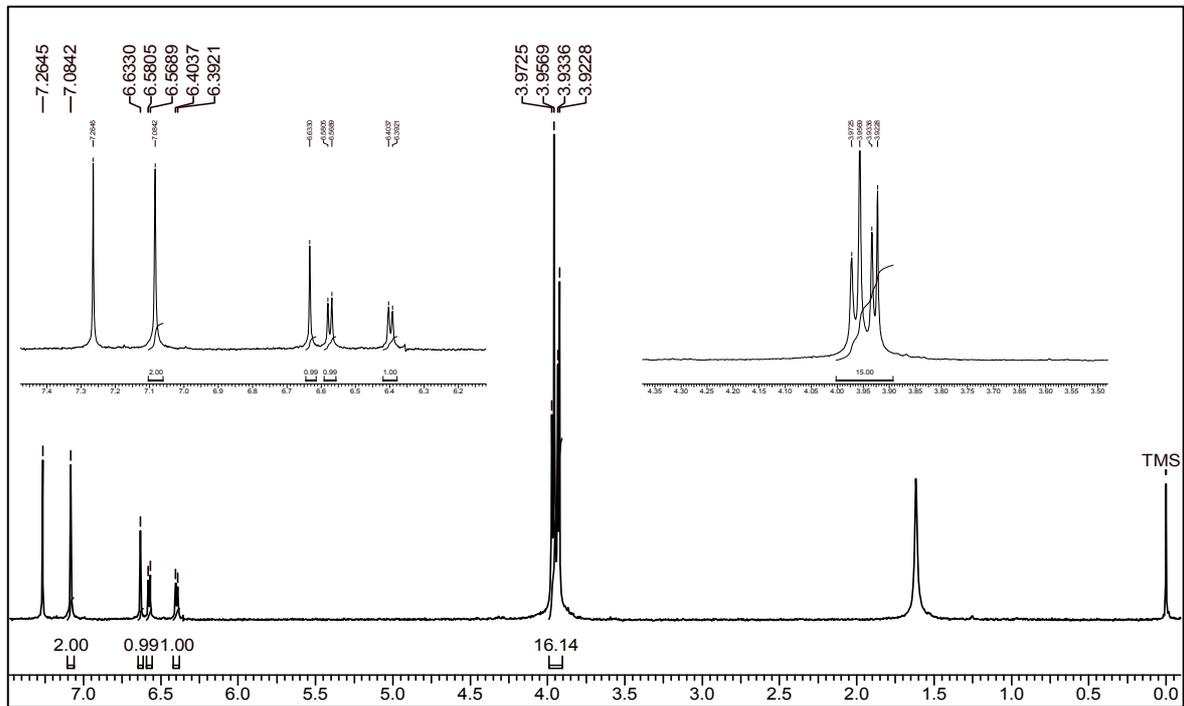


FIGURA 4.59 – Espectro de RMN¹H do flavonóide **21** (CDCl₃, 200MHz)

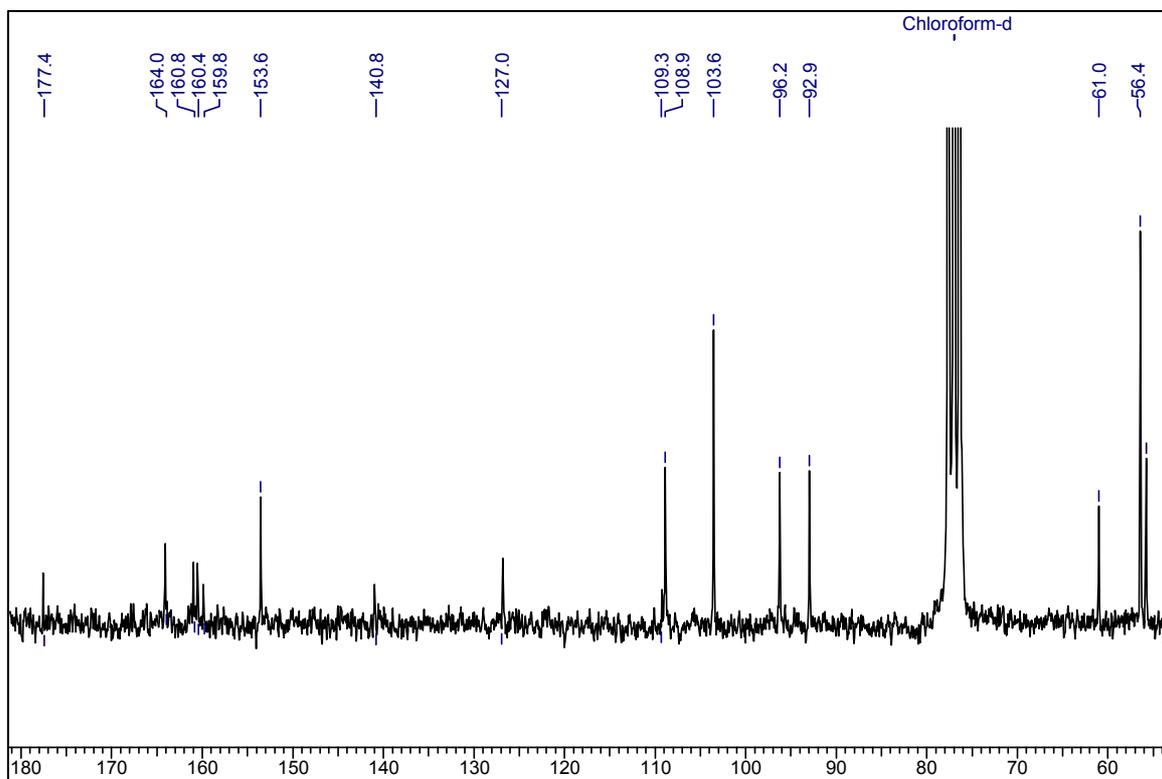


FIGURA 4.60 – Espectro de RMN¹³C do flavonóide **21** (CDCl₃, 50MHz)

TABELA 4.17 – Dados de RMN¹H da flavona **21**

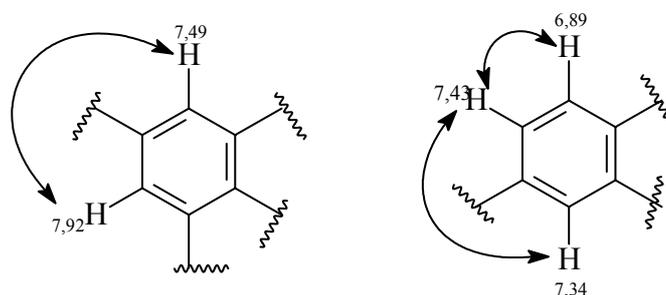
H/C	21 ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz)	FRASER & LEWIS, 1974	21 ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz)	FRASER & LEWIS, 1974
2	-	-	160,4	160,5
3	6,63 (s)	6,62 (s)	108,9	108,9
4	-	-	177,4	177,5
5	-	-	160,8	161,0
6	6,40 (d, <i>J</i> = 2,3Hz)	6,39 (d, <i>J</i> = 2,3Hz)	96,2	96,2
7	-	-	164,0	164,1
8	6,57 (d, <i>J</i> = 2,3Hz)	6,57(d, <i>J</i> = 2,3Hz)	92,9	92,9
9	-	-	159,8	159,9
10	-	-	109,3	109,3
1'	-	-	127,0	126,8
2'	7,08 (s)	7,09 (s)	103,6	103,5
3'	-	-	153,6	153,6
4'	-	-	140,8	140,9
5'	-	-	153,6	153,6
6'	7,08 (s)	7,09 (s)	103,6	103,5
OCH ₃	3,92 (s)	3,92 (s)	56,4	55,8
OCH ₃	3,93 (s)	3,93 (s)	56,4	56,4
OCH ₃	3,96 (s)	3,95 (s)	56,4	56,4
OCH ₃	3,96 (s)	3,95 (s)	56,4	56,4
4'-OCH ₃	3,97 (s)	3,96 (s)	61,0	61,0

4.5.2 – Determinação estrutural da substância **22**

A substância **22** foi isolada da fração hexânica do extrato metanólico do caule de *H. puberula* (p. 29). Através da análise de RMN de 1 e 2 D foi proposto um estilbeno, como sendo a substância **22**.

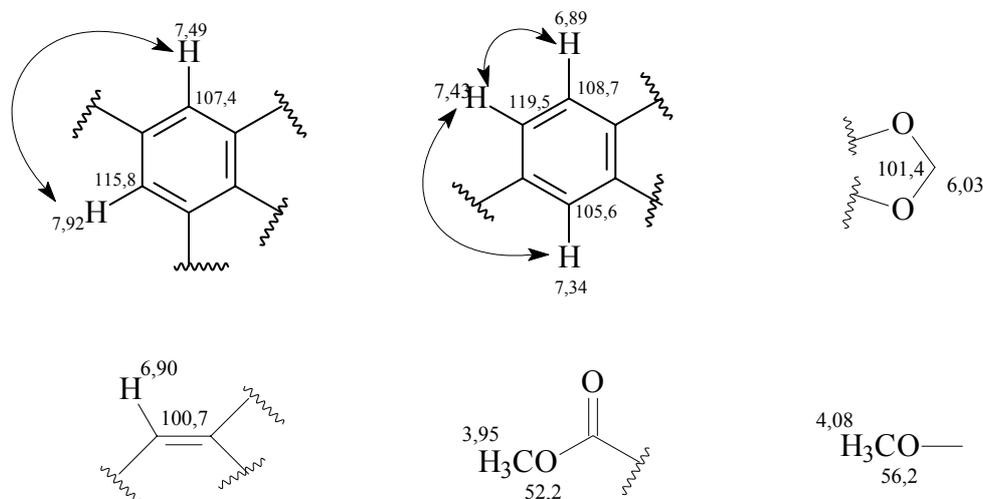
O espectro de RMN¹H de **22** (FIGURA 4.61) (TABELA 4.18) apresentou sinais relativos a cinco hidrogênios na região aromática em δ 7,92 (*s*, *J* = 1,4 Hz, 1H); δ 7,49 (*d*, *J* = 1,4 Hz, 1H); δ 7,43 (*dd*, *J* = 1,6 e 8,0 Hz, 1H); δ 7,34 (*d*, *J* = 1,6 Hz, 1H) e δ 6,89 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H). Esses dados indicaram na molécula dois anéis aromáticos, sendo um deles tetrasubstituído e o outro

trisubstituído, cujas correlações foram confirmadas no espectro de COSY (FIGURA 4.62).



O sinal em δ 6,90 (*s*, 1H) correlacionou-se no mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.64) com o carbono em δ 100,7, indicando que possivelmente se tratava de um hidrogênio ligado a um carbono sp^2 . Observou-se ainda no espectro de RMN de hidrogênio (FIGURA 4.61), um sinal em δ 6,03 (*s*, 2H) característico de hidrogênios de carbono do grupo metilenodióxi e dois sinais de hidrogênios de grupos metoxílicos em δ 4,08 e δ 3,95, sendo que este último encontrava-se ligado ao carbono em δ 52,2, característico de carbono de metoxila de grupo éster.

A análise do mapa de contorno de HSQC de **22** (FIGURA 4.64) permitiu atribuir os valores de deslocamento químico dos carbonos ligados a esses hidrogênios.



Através do espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.63) pode-se observar a presença de 18 carbonos, sendo um referente ao carbono do grupo metilenodioxi δ 101,4, dois de grupos metílicos (δ 52,2 e 56,2), um carbono carboxílico em δ 167,3, dois carbonos que através das correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.65) indicaram se tratar de carbonos sp^2 (δ 100,7 e δ 157,2) e doze carbonos aromáticos sendo seis deles totalmente substituídos.

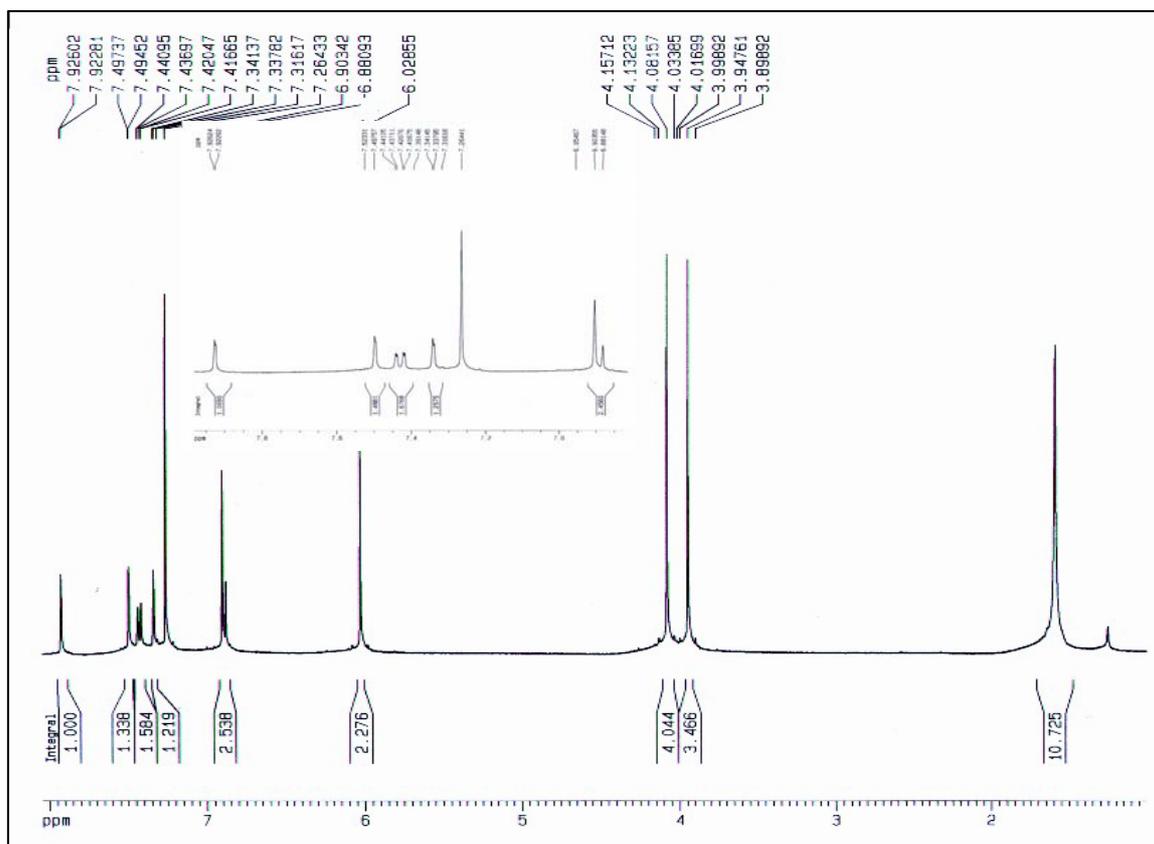
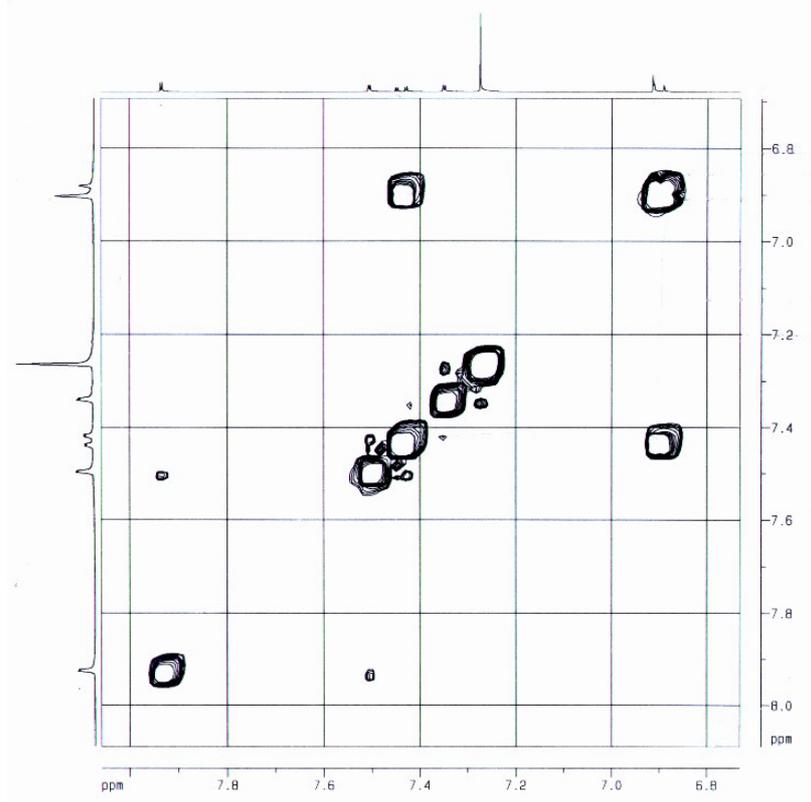
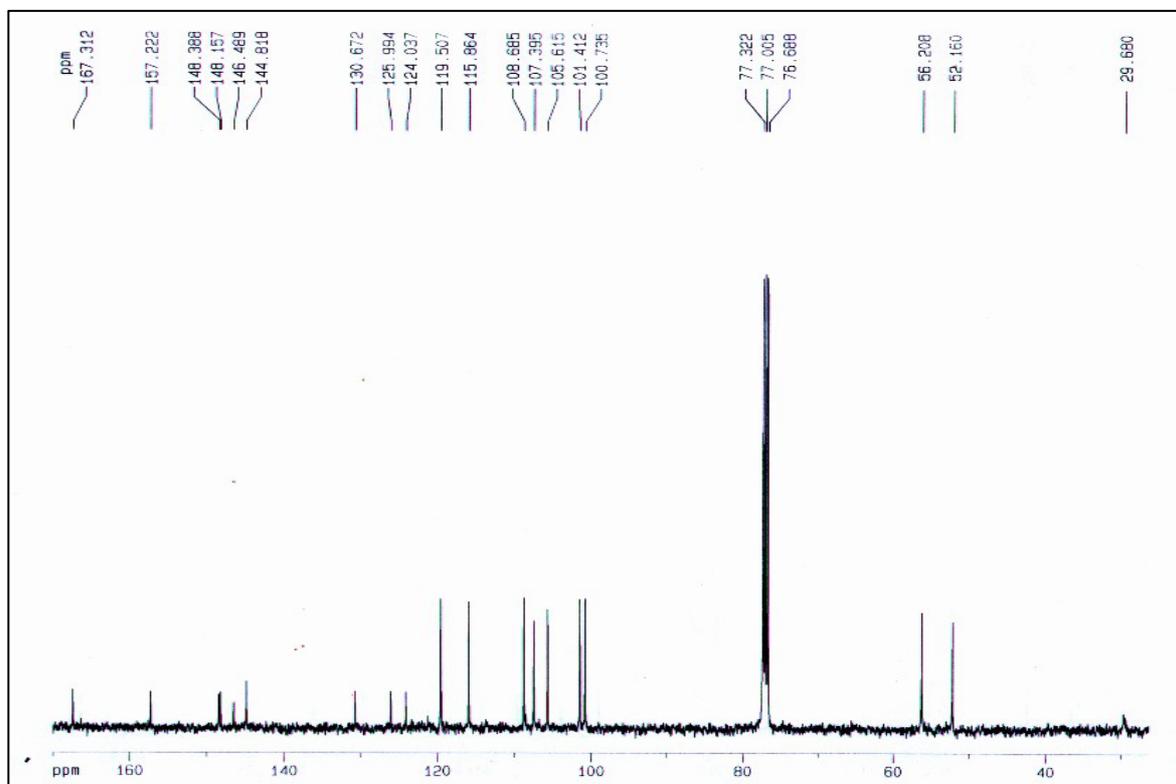


FIGURA 4.61 – Espectro de RMN ¹H de **22** (CDCl₃, 400 MHz)

FIGURA 4.62 – Espectro de COSY ^1H - ^1H de **22** (CDCl_3 , 400 MHz)FIGURA 4.63 – Espectro de RMN ^{13}C de **22** (CDCl_3 , 100 MHz)

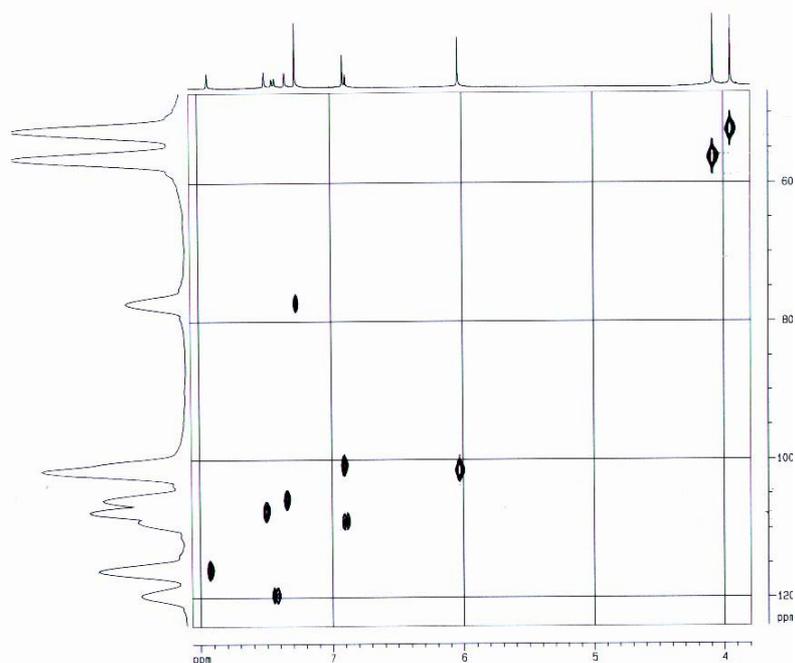
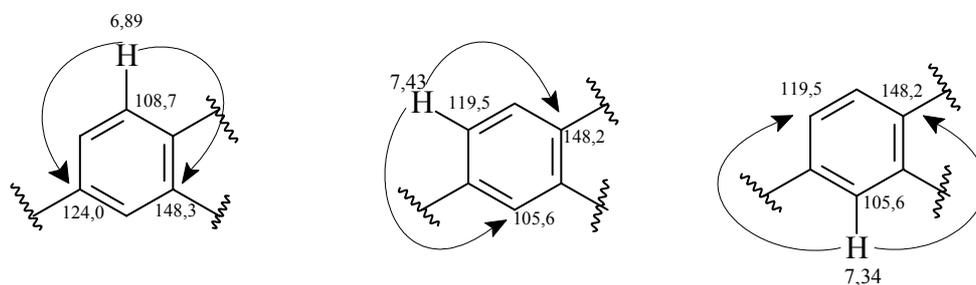


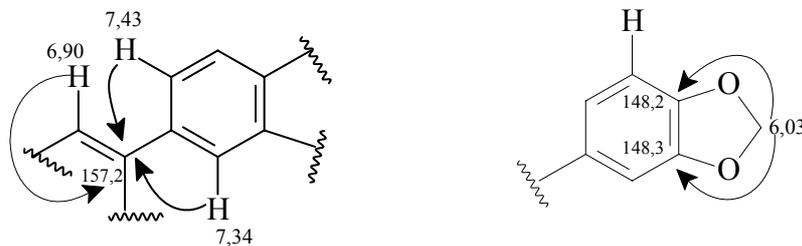
FIGURA 4.64 – Mapa de contorno de HSQC de **22** (CDCl₃, 400 MHz).

Através do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.65) foi possível fazer as correlações do sinal do hidrogênio em δ 6,89 com os sinais δ 124,0 e δ 148,3, que foram atribuídos aos carbonos C-1' e C-3', respectivamente. O hidrogênio em δ 7,43 apresentou correlação com os carbonos em δ 105,6; δ 148,2 e δ 157,2, atribuídos aos carbonos C-2'; C-4' e C-2. A correlação do hidrogênio em δ 7,34 com os carbonos em δ 119,5; δ 148,3 e δ 157,2 confirmaram a posição do carbono C-6'; C-4' e C-2.

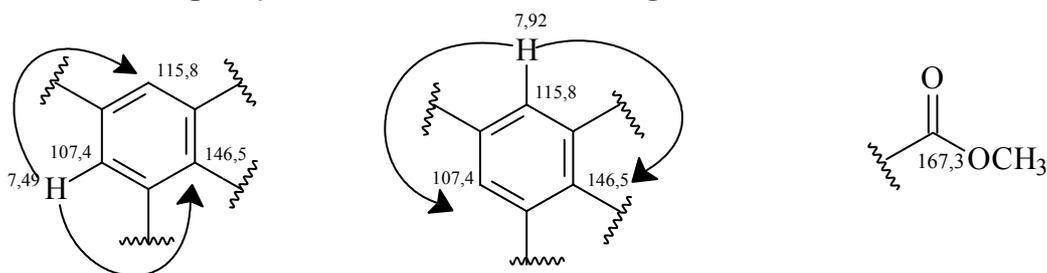


O carbono em δ 157,2 foi definido como sendo o carbono olefínico C-2, devido o mesmo também estar correlacionando-se no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.65) com o hidrogênio em δ 6,90, estando dessa forma,

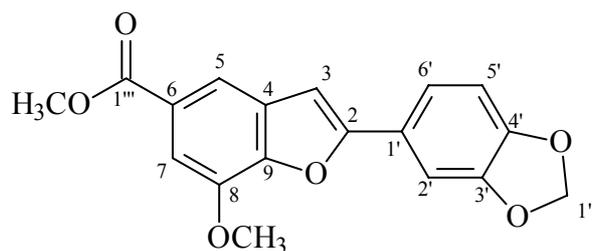
ligado ao C-1'. A correlação do hidrogênio em δ 6,03 com os carbonos em δ 148,3 e δ 148,3, indicaram o grupo metilenodióxi nas posições C-4' e C-3'.



Ainda no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.65), observou-se a correlação do hidrogênio em δ 7,49 com os carbonos em δ 146,5 (C-9); δ 115,8 (C-5); δ 144,8 (C-8) e δ 167,3 (C-1''') e o sinal do hidrogênio em δ 7,92 com os carbonos em δ 100,7 (C-3); δ 107,4 (C-7); δ 146,5 (C-9) e δ 167,3 (C-1'''), sendo o sinal em δ 167,3 já atribuído para o carbono carboxílico do grupo éster, indicando que possivelmente este seria o substituinte em C-6. A correlação dos hidrogênios da metila em δ 4,08 com o carbono aromático em δ 144,8, permitiu que se definisse uma das metoxilas como sendo o substituinte da posição C-8. A correlação do sinal do hidrogênio em δ 7,92 com o carbono em δ 100,7, fez com que fosse ligado as duas partes determinadas da molécula. Possivelmente as posições C-9 e C-2 estariam ligadas através de um éter.



Unindo as partes identificadas da molécula, foi possível propor um estilbeno, como sendo a substância **22**.



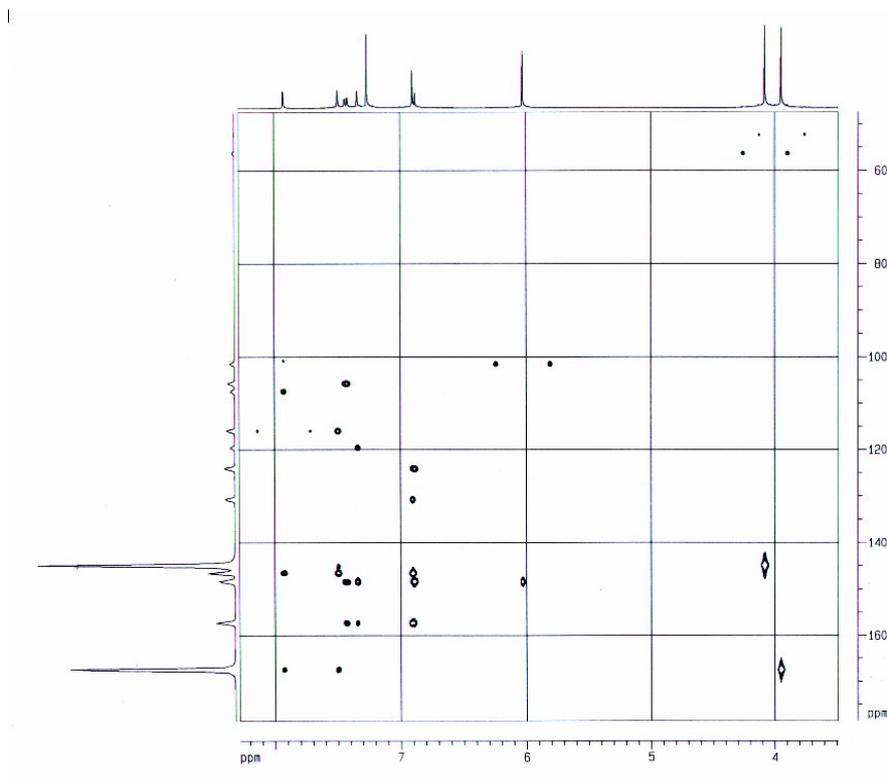
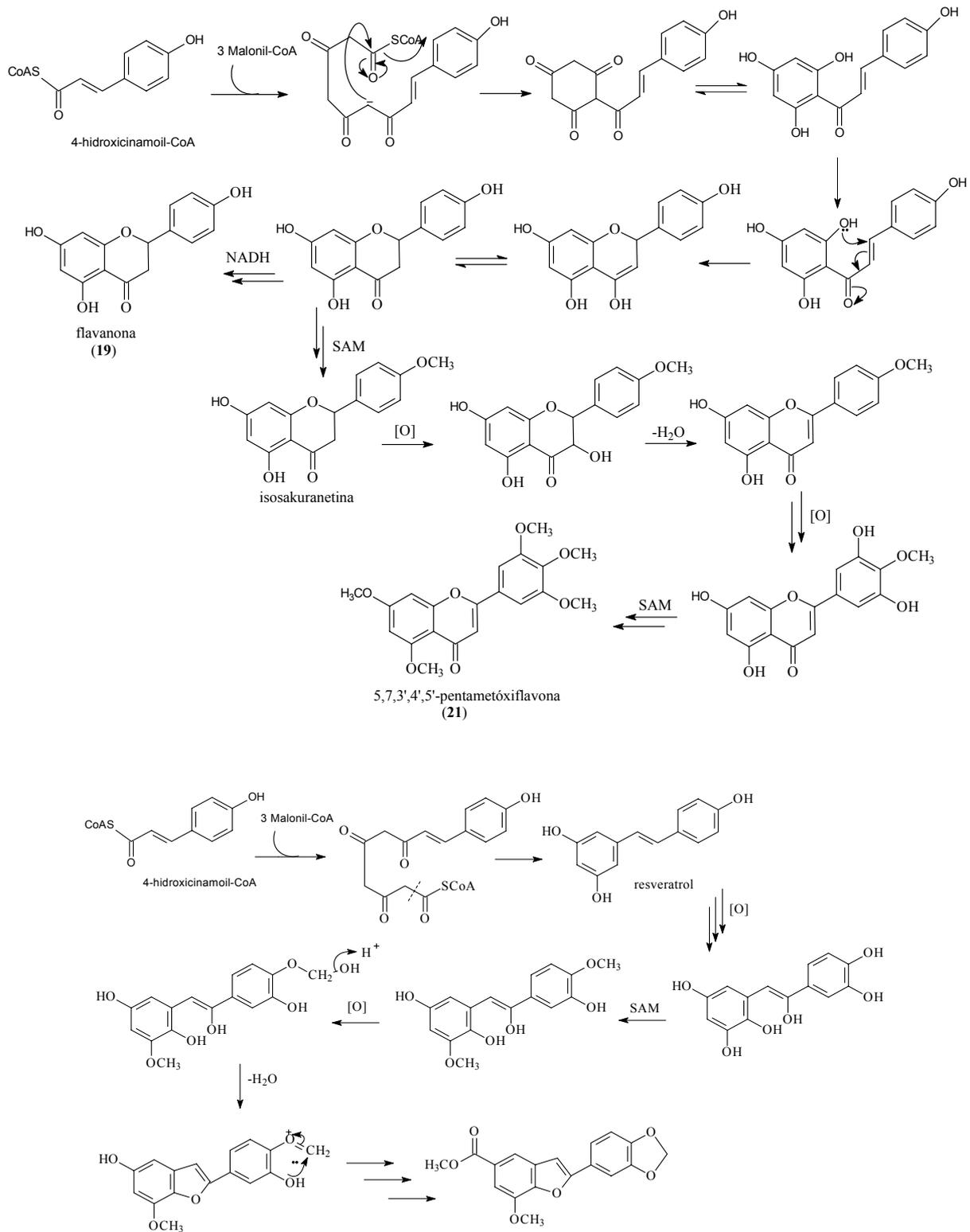


FIGURA 4.65 – Mapa de contorno de HMBC de **22** (CDCl_3 , 400 MHz)

Flavonóides são heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo substâncias fenólicas do tipo $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$. Podendo ser coloridos ou incolores e concentram-se mais na parte aérea das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e rizomas.

Os flavonóides têm origem biossintética mista, ou seja, parte do seu esqueleto deriva do caminho do acetato e a outra parte deriva do caminho do chiquimato, mais precisamente do ácido *p*-cumarico.

No ESQUEMA 4.8, está representado uma proposta biogenética para a formação dos flavonóides **19**, **20** e **21** e para o estilbeno **22**.



ESQUEMA 4.8: Proposta biogênica para a formação dos flavonóides **19** – **21** e para o estilbeno **22** (adaptado de DEWICK, 2001)

TABELA 4.18 – Dados de RMN¹H e RMN¹³C de **22**

H/C	C (δ)	H (δ)
1'	124,0	-
2'	105,6	7,34 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =1,6Hz)
3'	148,3	-
4'	148,2	-
5'	108,7	6,89 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =8,0 Hz)
6'	119,5	7,43 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> =8,0 e 1,6Hz)
2	157,2	-
3	100,7	6,90 (<i>s</i> , 1H)
4	130,7	-
5	115,8	7,92 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =1,4 Hz)
6	126,0	7,49 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =1,4Hz)
7	107,4	-
8	144,8	-
9	146,5	-
1'''	167,3	-
1''	101,4	6,03 (<i>s</i> , 2H)
5'-OMe	56,2	4,08 (<i>s</i> , 3H)
1'''-OMe	52,2	3,95 (<i>s</i> , 3H)

TABELA 4.19 – Dados de HMBC J^2 , J^3 e J^4 de **22**

H (δ)	C (δ)
7,92	100,7; 107,4; 146,5 e 167,3
7,49	115,9; 144,8; 146,5 e 167,3
7,43	105,6; 148,2 e 157,2
7,34	119,5; 148,2 e 157,2
6,90	130,7; 146,5 e 157,2
6,89	124,0 e 148,2
6,03	148,2 e 148,3
4,08	144,8
3,95	167,3

4.6 – Cumarinas

Quando analisadas por CCDA e expostas à luz ultravioleta (254 nm), as cumarinas apresentam uma fluorescência azulada tornando uma forte característica dessa classe de compostos.

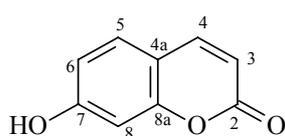
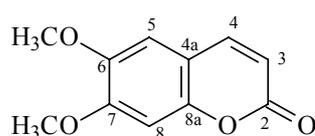
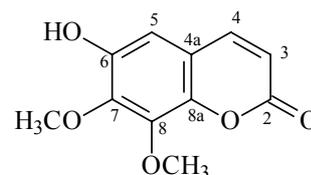
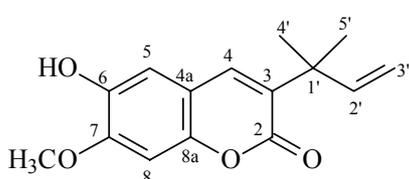
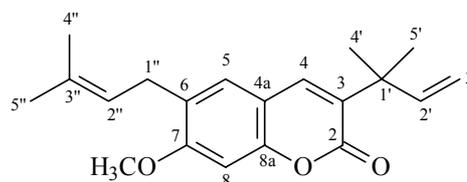
As cumarinas apresentam características bastante comuns em seus espectros de RMN¹H, facilitando sua caracterização. Quando não estão substituídas nas posições C-3 e C-4 apresentam dois dubletos em aproximadamente 6,30 e 7,60 δ ($J = 9,5 - 10$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, característico de hidrogênios de ligação dupla *cis* conjugada com grupo lactônico e com o anel aromático.

O hidrogênio H-4 encontra-se sempre mais desblindado que o H-3 devido à contribuição da estrutura de ressonância na qual se verifica uma deficiência eletrônica sobre o carbono a que este se encontra ligado. Quando há substituintes oxigenados na posição C-5, o sinal do dubleto correspondente ao hidrogênio H-4, que normalmente aparece em 7,60 δ , encontra-se desblindado acima de 8,00 δ . Este fato se deve ao efeito de anisotropia da ligação C-O da posição C-5 e do efeito de compressão estérica.

Das cumarinas isoladas neste trabalho nenhuma apresentou substituição em C-5.

4.6.1 – Identificação estrutural das cumarinas 23 – 27

As cumarinas **23-25** foram isoladas da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *S. versicolor* (p. 31) e as cumarinas **26** e **27** da fração hexânica do extrato metanólico do caule de *H. puberula* (p. 29) e tiveram suas caracterizações realizadas através de experimentos de RMN de 1, 2 D e EM.

**23****24****25****26****27**

Na análise dos espectros de RMN¹H de **23-25** (FIGURAS 4.66, 4.67 e 4.68) foi observado os sinais em δ 6,17 ($J = 9,5$ Hz) e δ 7,84 ($J = 9,5$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-3 e H-4 de um esqueleto cumarínico.

A cumarina **23** apresentou também um dubleto em δ 7,44 ($J = 8,5$ Hz) que foi atribuído ao hidrogênio H-5 que acopla com uma constante grande em *orto* com H-6; um duplo dubleto em δ 6,79 ($J = 8,5$ e 2,3 Hz) referente ao hidrogênio H-6 que acopla em *orto* com H-5 e em *meta* com H-8 e um dubleto em δ 6,70 ($J = 2,3$ Hz) referente ao hidrogênio H-8 que acopla com uma constante pequena em *meta* com H-6. Esses dados sugeriram como sendo a cumarina **23**, uma cumarina simples sem substituições, denominada 7-hidróxicumarina (TABELA 4.20). O espectro de massas da 7-hidróxicumarina (FIGURA 4.69) confirmou a fórmula molecular C₉H₆O₃ através do pico do íon

molecular m/z 162 e possíveis fragmentações (ESQUEMA 4.9). Os dados de RMN¹H foram comparados com os dados da literatura (KONG et al., 1995).

No espectro de RMN¹H da cumarina **24** (FIGURA 4.67) além dos sinais dos hidrogênios olefínicos do esqueleto cumarínico referente aos hidrogênios H-3 e H-4, foi observado um singlete em δ 6,85 integrando para dois hidrogênios sugerindo a existência de dois hidrogênios aromáticos na molécula que só poderiam ser atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, por não fazerem nenhum tipo de acoplamento entre si, indicando também que as posições C-6 e C-7 estariam substituídas. Os sinais em δ 3,96 e δ 3,93, integrando para três hidrogênios cada um, indicaram que possivelmente as substituições das posições C-6 e C-7 seriam por grupos metoxilas.

O espectro de massas da cumarina **24** (FIGURA 4.70) observou-se o pico do íon molecular m/z 206, o ESQUEMA 4.10, sugere possíveis fragmentações para essa cumarina, que juntamente com os dados da literatura (MAFEZOLI, 2001) confirmaram a estrutura proposta como sendo a 6,7-dimetóxicumarina (C₁₁H₁₀O₄) (TABELA 4.20).

O espectro de RMN¹H da cumarina **25** (FIGURA 4.68) mostrou-se bem característico de cumarinas simples, apresentando dois dubletos em δ 6,20 (d , $J = 9,4$ Hz) e δ 7,85 (d , $J = 9,4$ Hz) referentes aos hidrogênios da dupla ligação conjugada a carbonila lactônica H-3 e H-4, respectivamente. A presença de um singlete em δ 6,90 foi atribuída ao hidrogênio H-5, indicando que o anel aromático encontra-se substituído nas posições C-6, C-7 e C-8. Os singletos em δ 3,95 e δ 3,90, típicos de metoxilas, sugeriram serem estas, juntamente com um grupo hidroxila, os substituintes do anel aromático.

O espectro de massas da cumarina **25** (FIGURA 4.71) exibiu o pico do íon molecular m/z 222, confirmando os substituintes propostos para a estrutura de **23**. O pico em m/z 207 [M-15], cuja intensidade é de 18 %, sugere que na posição 6, provavelmente se encontra o grupo hidroxila, pois se nessa posição houvesse uma metoxila, este pico apresentaria intensidade maior, uma

vez que seria estabilizado pelo oxigênio do anel lactônico, e isso não é observado no espectro (ESQUEMA 4.11). Esses dados juntamente com a medida do ponto de fusão de **25** (pf = 191 °C), permitiram identificar a cumarina **25** como sendo a arscantina, diferenciando-a dos seus isômeros isofraxidina (pf = 148-149 °C) e isofraxidina (pf = 196-197 °C) (AHLUWALIA *et al.*, 1978) (TABELA 4.20).

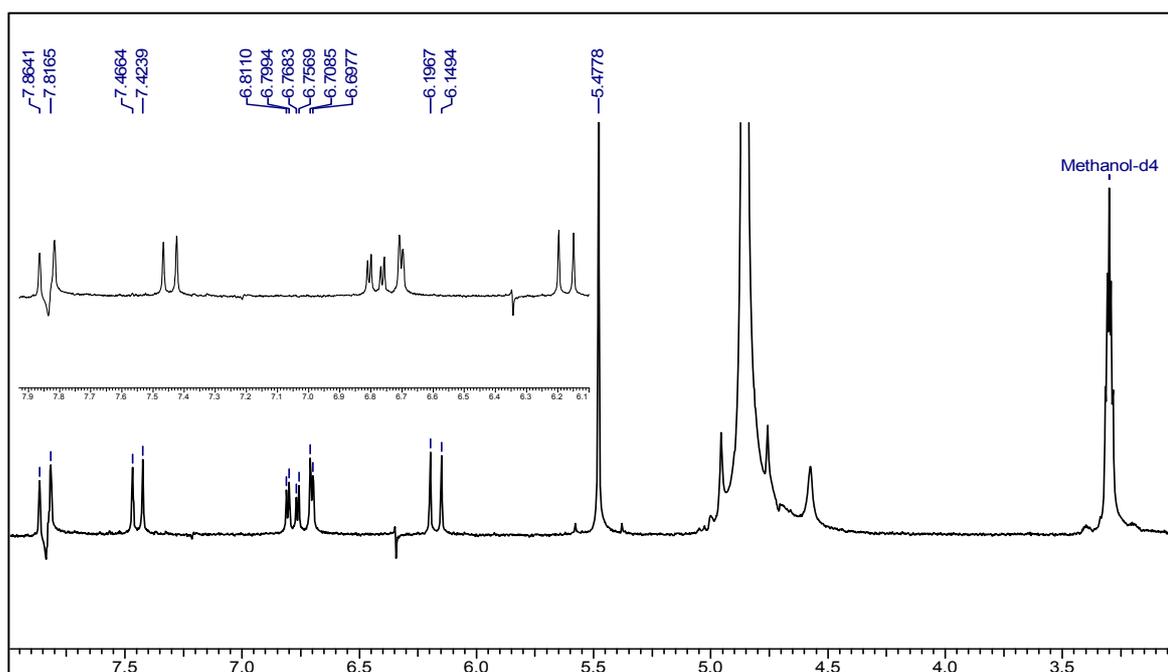
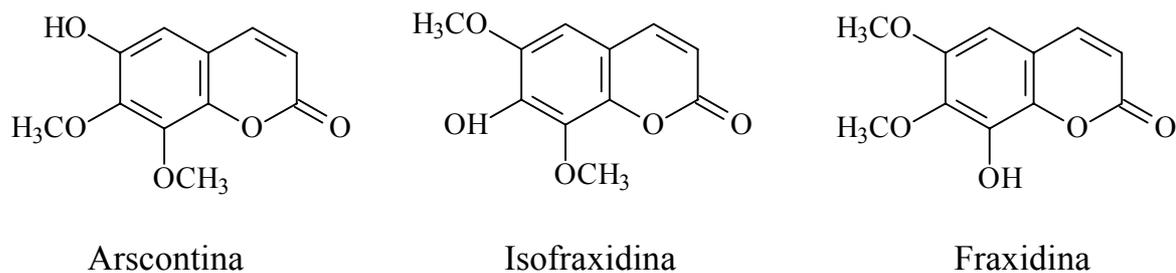
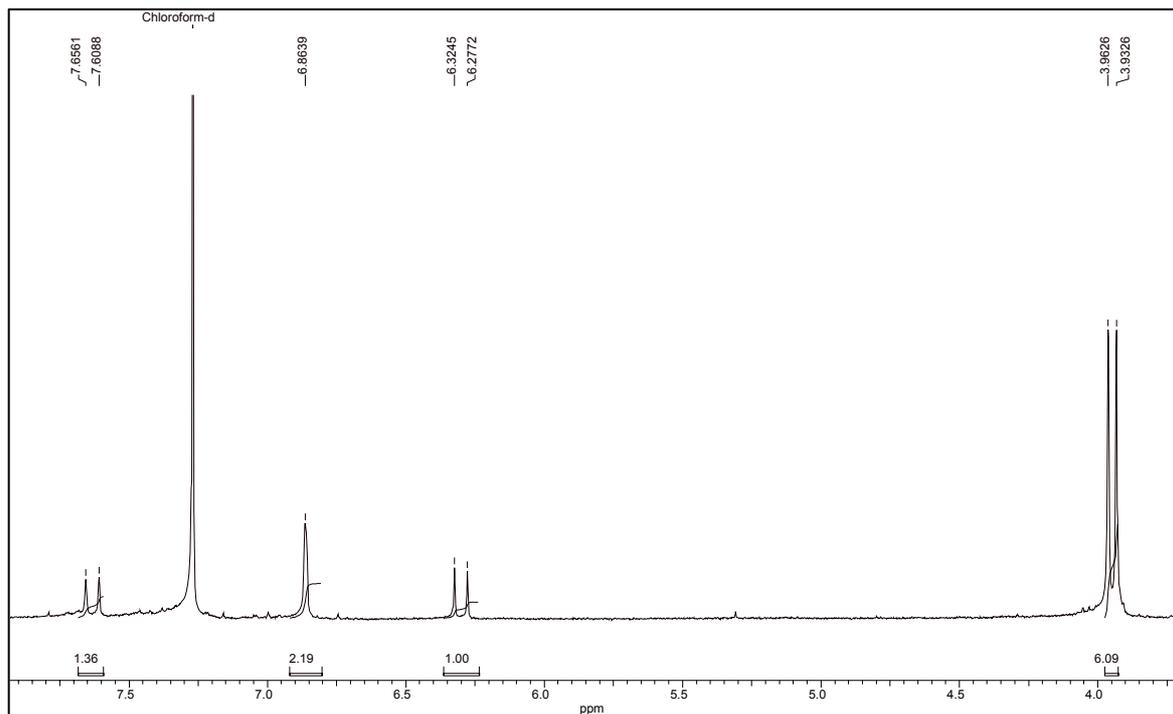
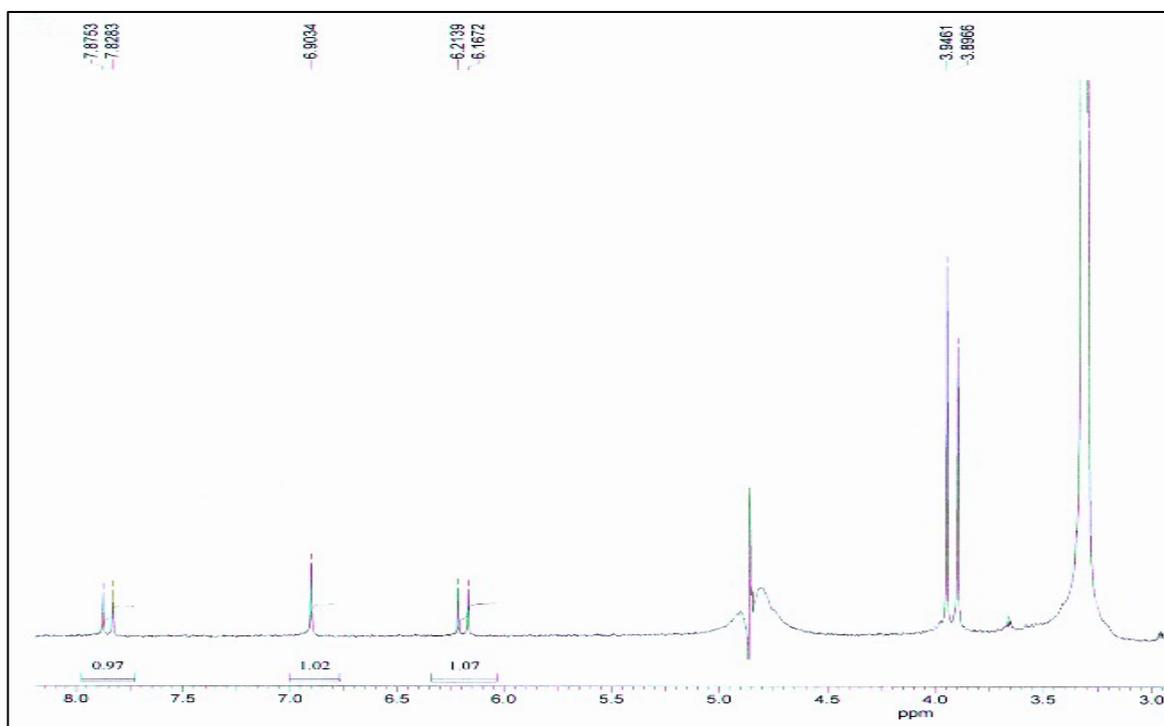


FIGURA 4.66 – Espectro de RMN¹H da cumarina **23** (CH₃OD, 200MHz)

FIGURA 4.67 – Espectro de RMN¹H da cumarina **24** (CDCl₃, 200MHz)FIGURA 4.68 – Espectro de RMN¹H da cumarina **25** (CH₃OD, 200MHz)

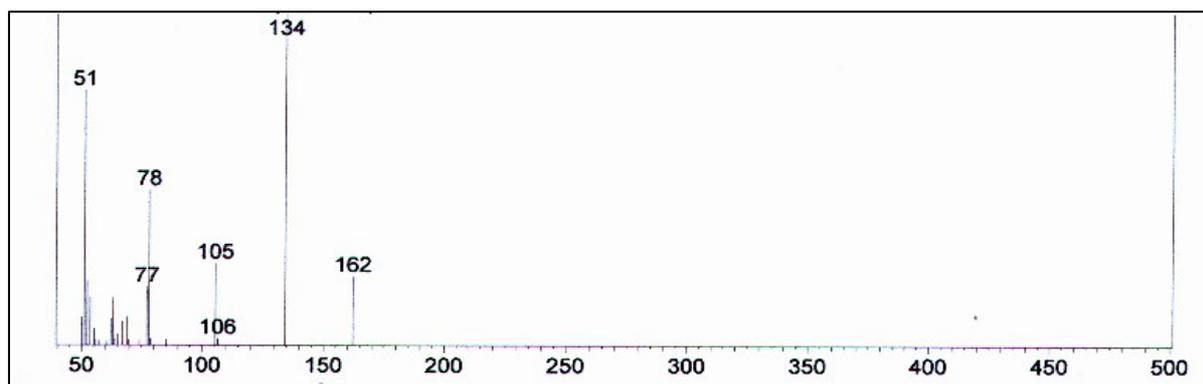
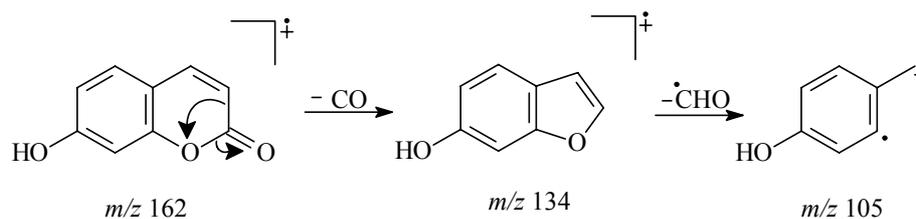


FIGURA 4.69 – Espectro de massas (ESI = 70 eV) da cumarina **23**



ESQUEMA 4.9: Proposta de fragmentação da cumarina **23**

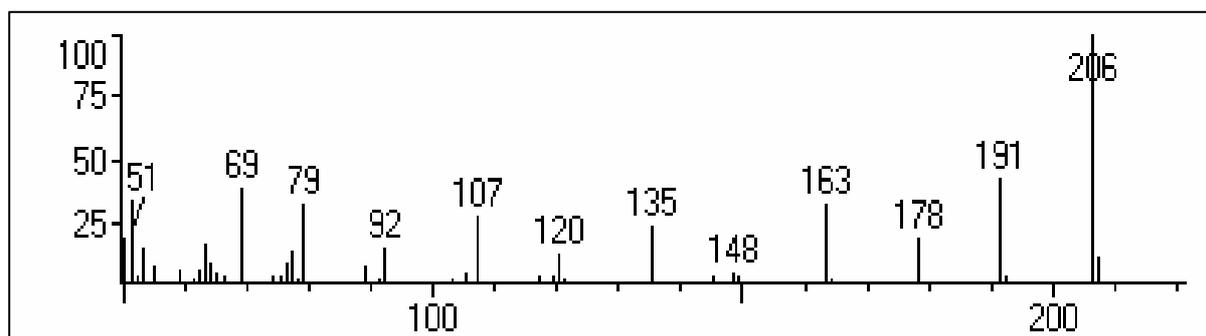
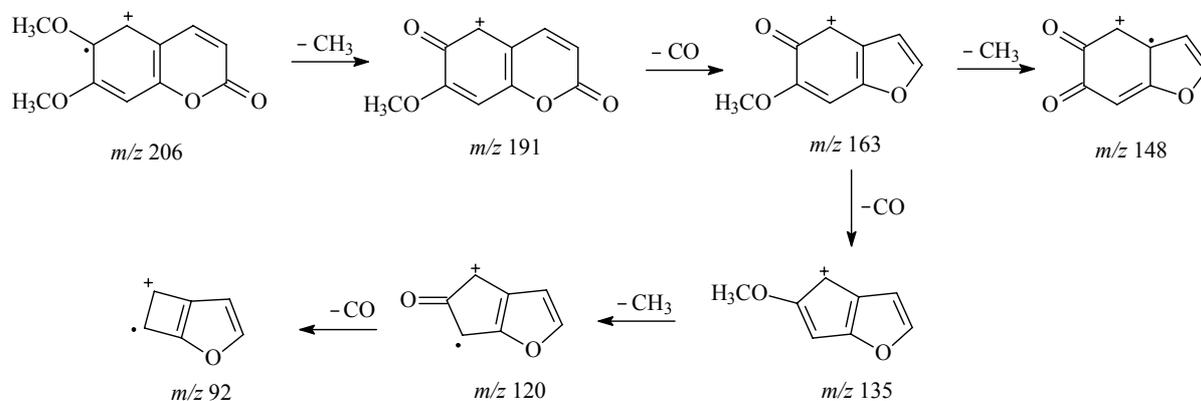
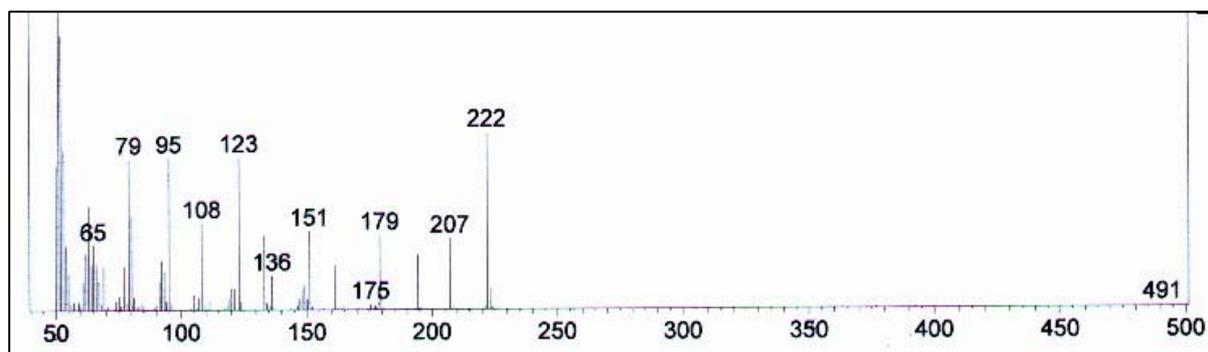
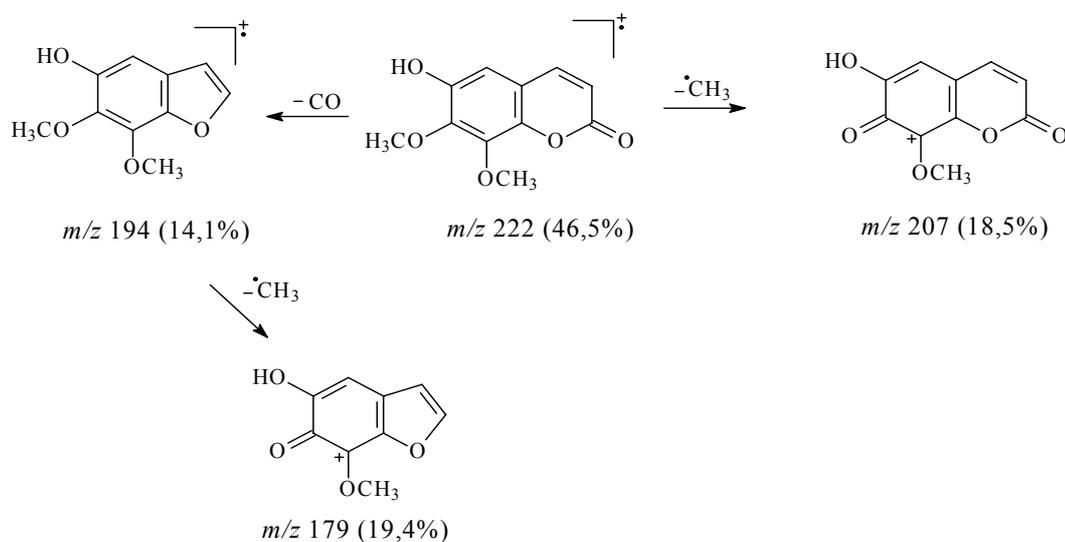


FIGURA 4.70 – Espectro de massas (ESI = 70 eV) da cumarina **24**

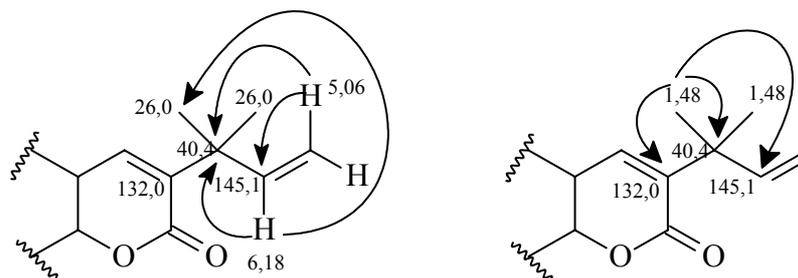


ESQUEMA 4.10: Proposta de fragmentação da cumarina **24**

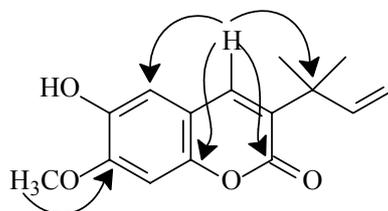
FIGURA 4.71 – Espectro de massas (ESI = 70 eV) da cumarina **25**ESQUEMA 4.11: Proposta de fragmentação para a cumarina **25**TABELA 4.20 – Dados de RMN¹H das cumarinas **23-25**

H	23 (CH ₃ OD, 200 MHz)	KONG et al., 1996 (DMSO, 400 MHz)	24 (CDCl ₃ , 200 MHz)	MAFEZOLI, 2001 (CDCl ₃ , 200 MHz)	25 (CH ₃ OD, 200 MHz)	AHLUWALIA et al., 1978
3	6,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,10 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz)	6,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
4	7,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,60 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,63 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz)	7,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
5	7,44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	7,42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	6,86 (<i>s</i>)	6,86 (<i>s</i>)	6,90 (<i>s</i>)	6,90 (<i>s</i>)
6	6,79 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 2,3 Hz)	6,77 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 2,2 Hz)	-	-	-	-
8	6,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,86 (<i>s</i>)	6,85 (<i>s</i>)	-	-
6-OCH ₃	-	-	3,95 (<i>s</i>)	3,96(<i>s</i>)	-	-
7-OCH ₃	-	-	3,93 (<i>s</i>)	3,93 (<i>s</i>)	3,95 (<i>s</i>)	3,94 (<i>s</i>)
8-OCH ₃	-	-	-	-	3,90 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i>)

No espectro de RMN¹H da cumarina **26** (FIGURA 4.72) não foram observados os dubletos correspondentes aos hidrogênios olefinicos H-3 e H-4 do esqueleto cumarínico. O singlete em δ 7,49 (*s*, 1H) foi atribuído ao hidrogênio H-4, indicando uma substituição na posição C-3, que foi confirmada pela presença dos sinais em δ 1,47 (*s*, 6H), do duplo dubleto em δ 5,06 (*dd*, 2H, $J = 11,0$ e $17,1$ Hz) e do sinal em δ 6,18 (*dd*, 1H, $J = 11,0$ e $17,1$ Hz) que juntamente com os dados de COSY (FIGURA 4.73) e HMBC (FIGURA 4.74) pode-se observar a correlação do sinal em δ 5,06 com os sinais em δ 40,4 e δ 145,1, referentes aos carbonos C-1' e C-2', respectivamente. Observou-se também a correlação do hidrogênio em δ 6,18 com os carbonos metílicos C-5' e C-6' (δ 26,0) e com o carbono C-1' (δ 40,4) e dos hidrogênios metílicos em δ 1,48 com os sinais em δ 132,0, δ 40,4 e δ 145,1, atribuídos aos carbonos C-3, C-1' e C-2' respectivamente, confirmando ser uma prenila rearranjada o substituinte em C-3.



A correlação do sinal de hidrogênio em 7,49 δ com os dos carbonos em δ 111,8, δ 40,4, δ 148,8 e δ 160,2, atribuídos aos carbonos C-5, C-1', C-8a e C-2, confirmaram este hidrogênio na posição C-4.



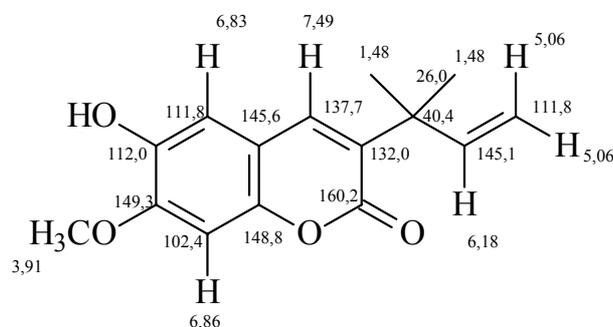
A correlação do sinal em δ 3,91 referente a metoxila, com o sinal em δ 149,3 indicaram que possivelmente a metoxila encontrava-se em C-7. Esses dados, associados com o espectro de massas (FIGURA 4.75) onde foi observado o pico do íon molecular m/z 260, indicaram ser a hidroxila o outro

substituente. A presença do pico m/z 245 com intensidade relativa de 33 %, indicam que o grupo hidroxila se encontra em C-6 e reafirmaram a metoxila na posição C-7, pois caso contrário, esse pico apresentaria intensidade acima de 50 %, pois estaria estabilizando por ressonância o íon obtido ESQUEMA 4.12.

Os singletos em δ 6,86 (*s*, 1H) e δ 6,83 (*s*, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-5, através das correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.73).

No espectro de RMN¹³C, (FIGURA 4.76) pode-se observar a presença dos sinais em δ 40,4, δ 145,1, δ 111,8 e δ 26,0 referentes aos carbonos do grupo prenila C-1', C-2', C-3', C-4' e C-5', respectivamente.

Através dos espectros de HMBC e HSQC (FIGURA 4.74 e 4.77) pode-se atribuir os valores de deslocamento químicos de todos os carbonos da substância **26**, sendo esta identificada como sendo a cumarina 3-(1', 1'-dimetilalil)-isoescopoletina.



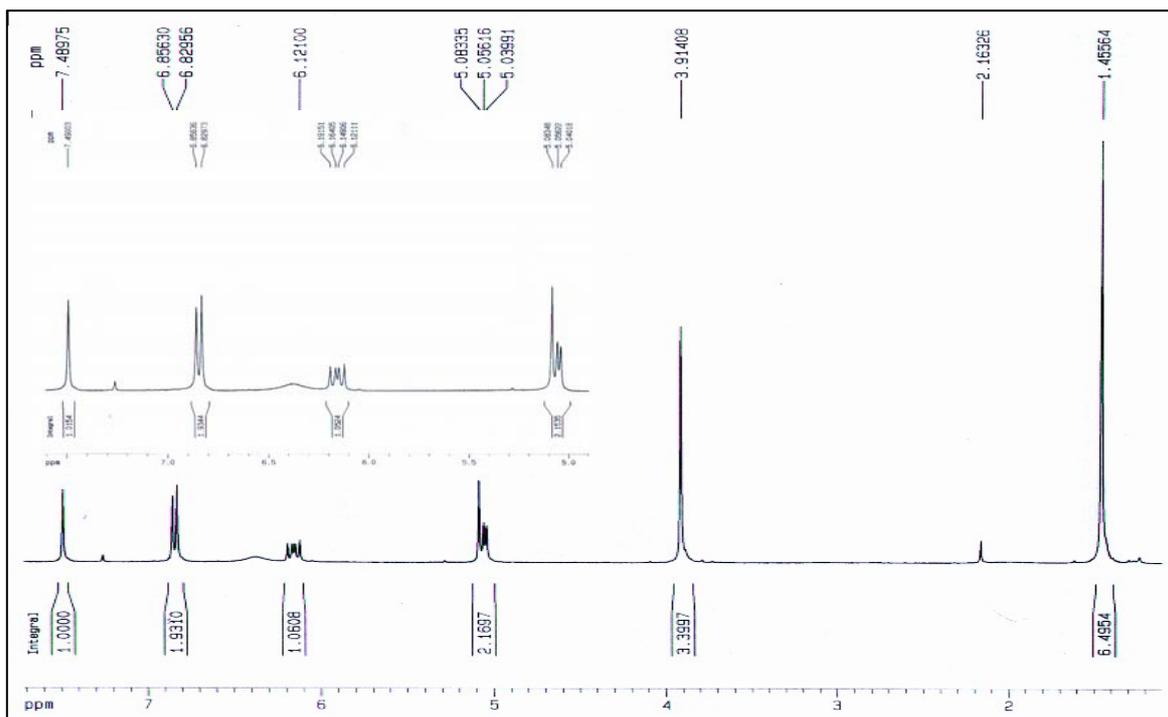


FIGURA 4.72 – Espectro de RMN¹H da cumarina **26** (CDCl₃, 400MHz).

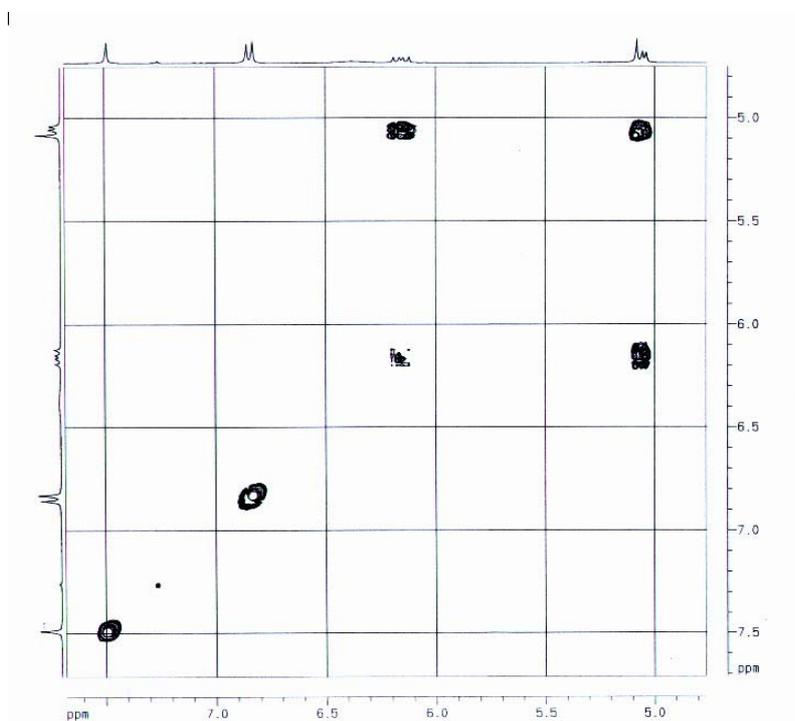


FIGURA 4.73 – Mapa de contorno do experimento de COSY de **26** (CDCl₃, 400MHz)

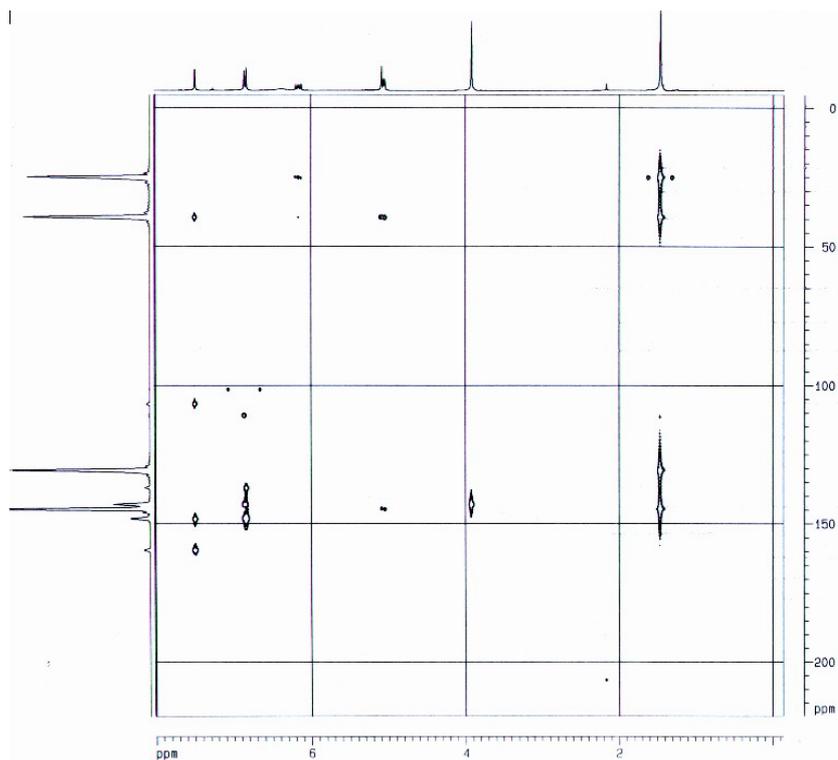


FIGURA 4.74 – Mapa de contorno de HMBC da cumarina **26** (CDCl₃, 400MHz)

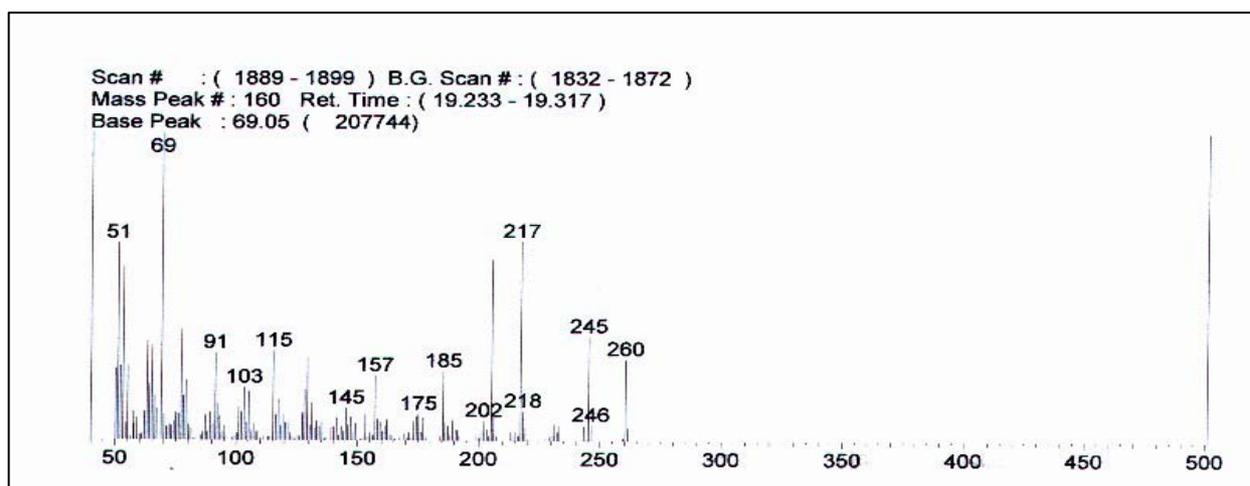
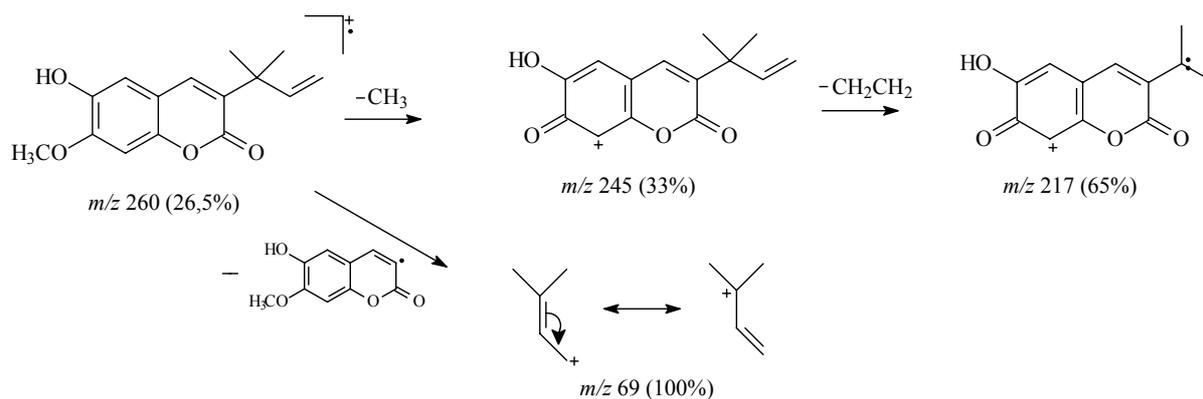
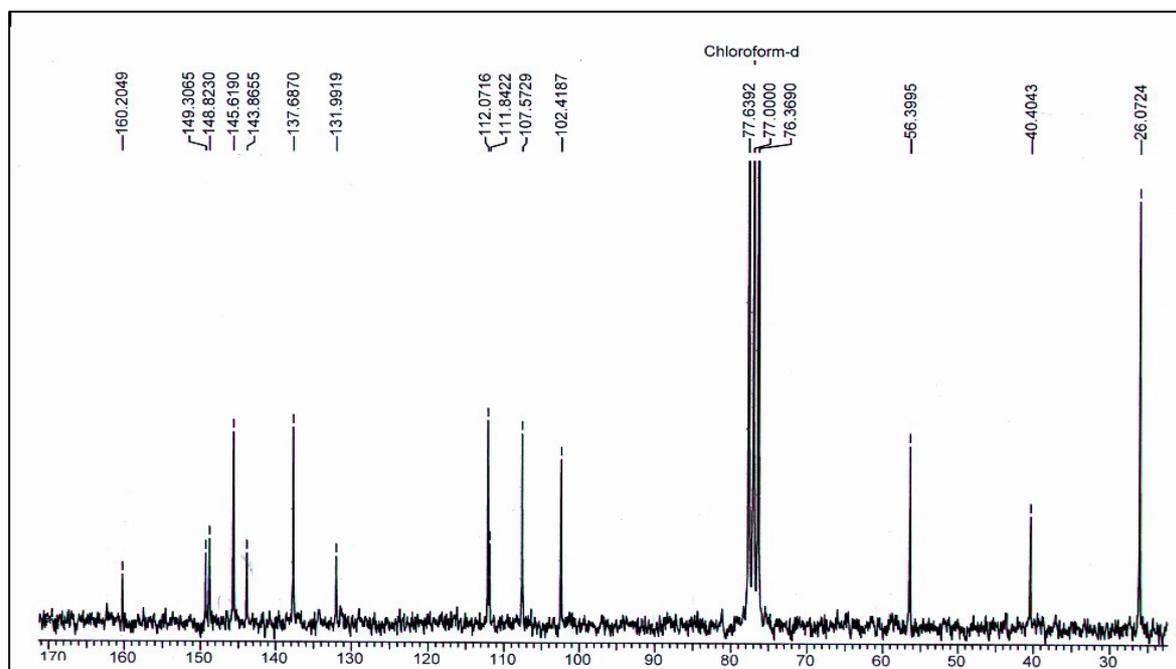


FIGURA 4.75 – Espectro de massas (ESI = 70 eV) da cumarina **26**

ESQUEMA 4.12: Proposta de fragmentação para a cumarina **26**FIGURA 4.76 – Espectro de RMN¹³C da cumarina **26** (CDCl₃, 40MHz)

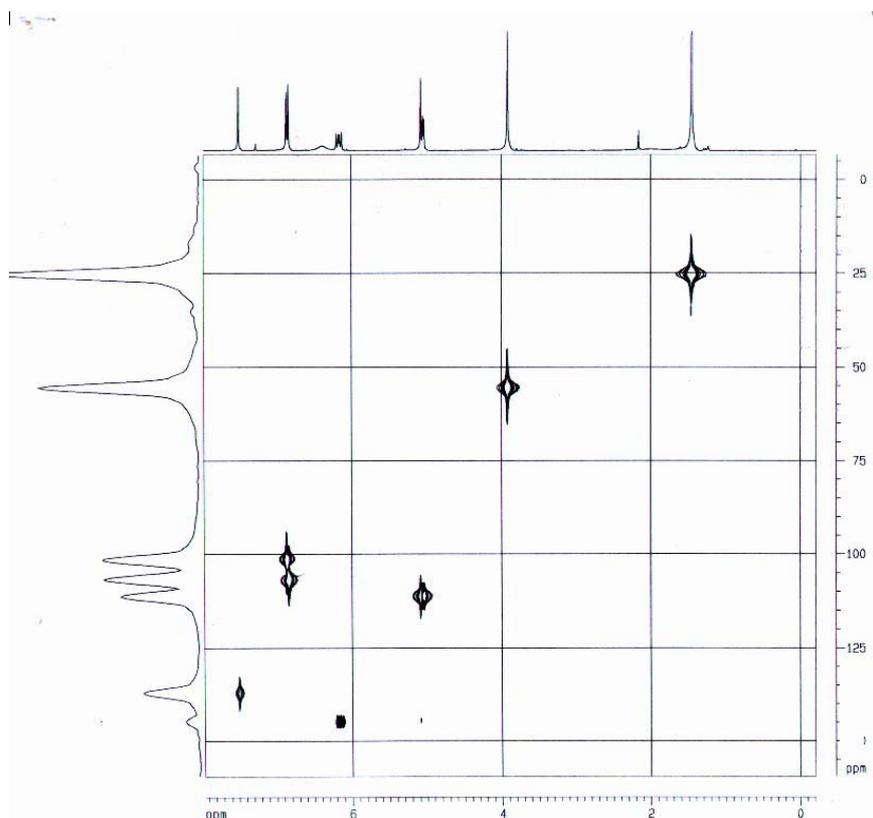


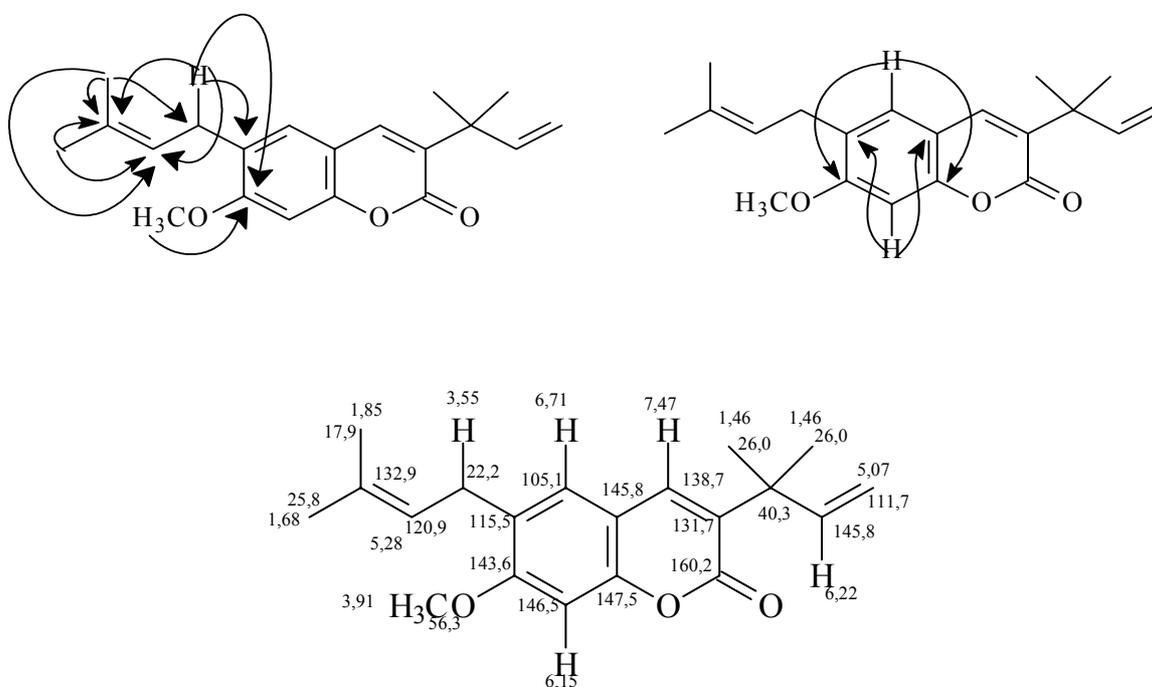
FIGURA 4.77 – Mapa de contorno de HSQC da cumarina **26** (CDCl_3 , 400MHz)

O espectro de RMN^1H da substância **27** (FIGURA 4.78) apresentou sinais similares aos relatados anteriormente para a cumarina **26**, ou seja, um sinal em δ 7,46 (*s*, 1H) referente ao hidrogênio H-4; um conjunto de sinais em δ 1,46 (*s*, 6H), δ 5,07 (*dd*, $J = 11,0$ e $17,1$ Hz, 2H) e do sinal em δ 6,22 (*dd*, $J = 11,0$ e $17,1$ Hz, 1H) correspondente aos hidrogênios H-4'/H-5', H-2' e H-3' correspondentes ao grupo prenila, quando esta se encontra rearranjada e os singletos em δ 6,71 e δ 6,15, dos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente e o sinal em δ 3,91 (*s*, 3H), referente a uma metoxila.

Pode-se observar ainda no espectro de RMN^1H a presença de um tripleto largo δ 3,55 (*tl*, 2H) que mostrou correlação no espectro de HMBC (FIGURA 4.79) com os sinais em δ 115,5; δ 120,9; δ 132,9 e δ 143,6 referentes aos carbonos C-6, C-2'', C-3'' e C-7, respectivamente, sendo este sinal atribuído

ao hidrogênio H-1". Os singletos em δ 1,85 e δ 1,68 são característicos de metilas, quando estas se encontram ligadas a carbono olefínico. Estes sinais mostraram correlações com os carbonos em δ 120,9 (C-2") e δ 132,9 (C-3") no espectro de HMBC, sendo que a metila em δ 1,85 correlacionou-se também com o sinal em δ 22,2 (C-1"). Esses dados indicaram se tratar de um grupo prenila que de acordo com as correlações observadas no espectro de HMBC, estaria na posição C-6. A correlação do sinal em δ 3,91 com o carbono em δ 143,6 (C-7) confirmaram as posições dos substituintes da cumarina **27**.

Através do espectro de HMBC, HSQC e RMN¹³C (FIGURA 4.79, 4.80 e 4.81) foi possível atribuir todos os valores dos carbonos e hidrogênios. Os dados de RMN¹³C foram comparados com a literatura (BERGENTHAL *et al.*, 1978) confirmando a proposta estrutural. No espectro de massas da cumarina **27** (FIGURA 4.82), pode-se observar o pico do íon molecular em m/z 312 confirmando a estrutura proposta para cumarina **27** (ESQUEMA 4.13).



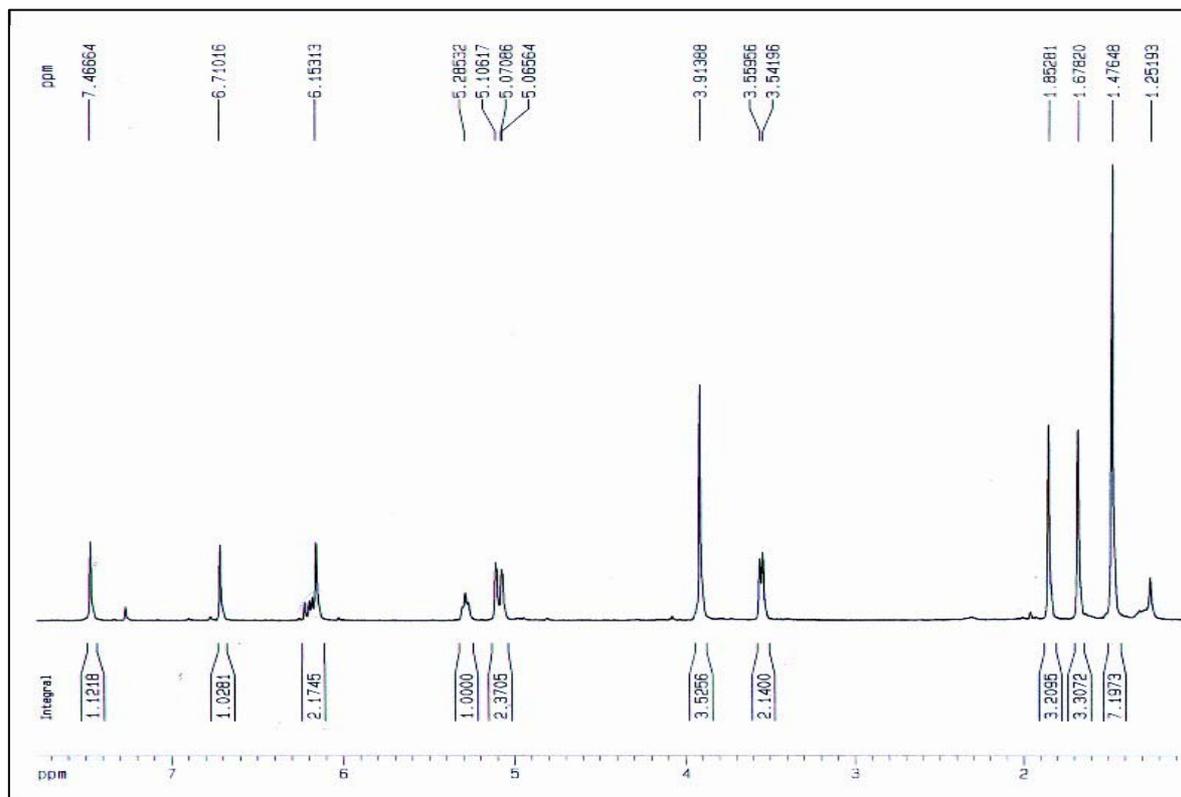


FIGURA 4.78 – Espectro de RMN¹H da cumarina **27** (CDCl₃, 400 MHz)

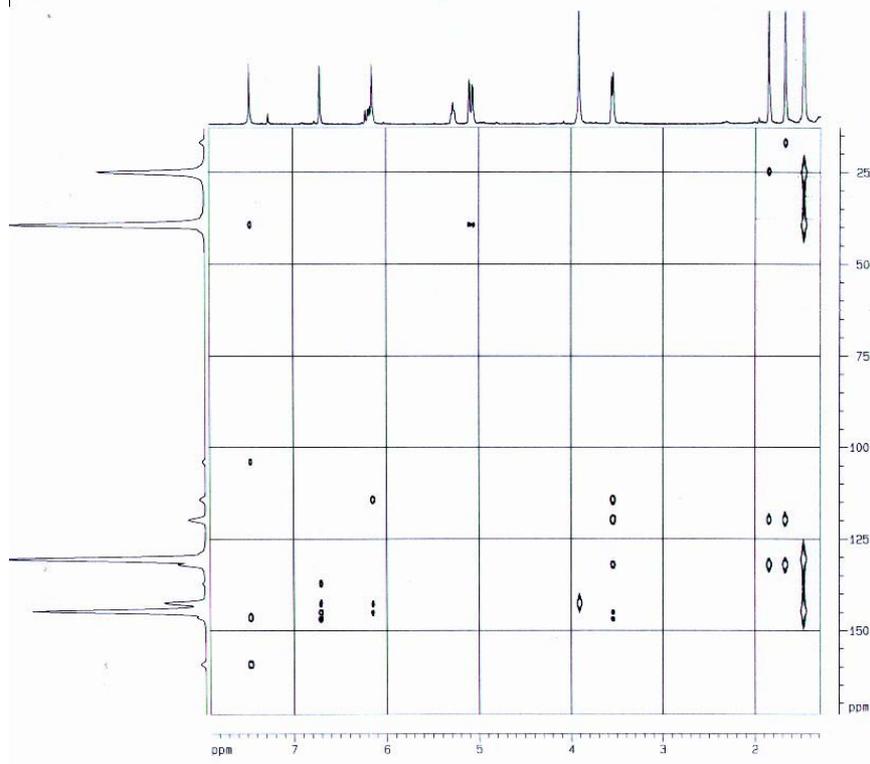


FIGURA 4.79 – Mapa de contorno de HMBC da cumarina **27** (CDCl₃, 400 MHz)

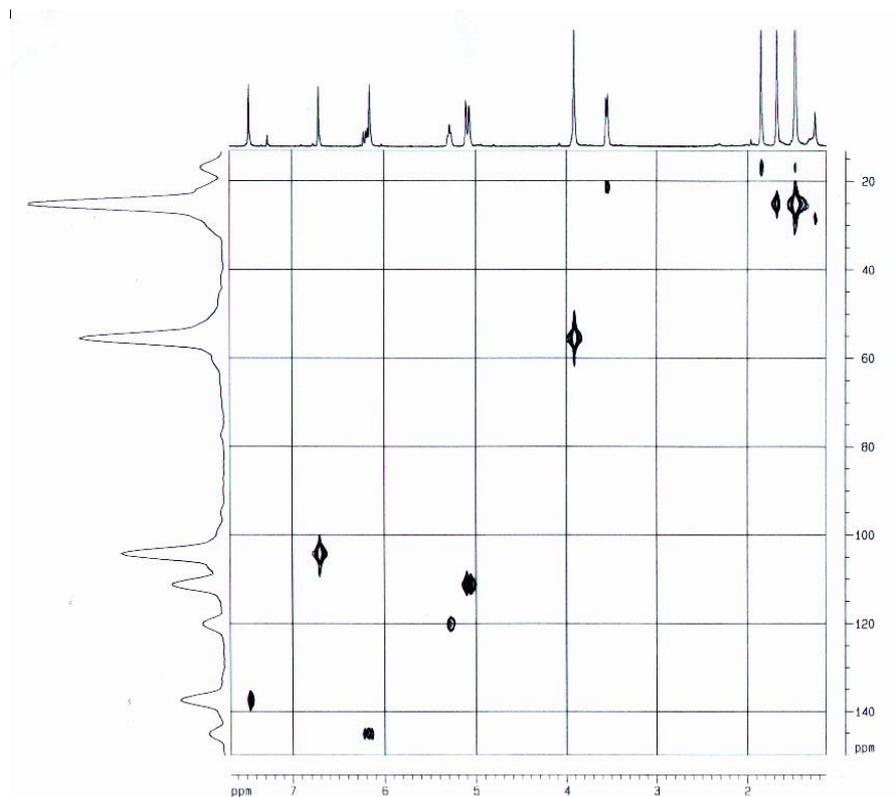


FIGURA 4.80 – Mapa de contorno de HSQC da cumarina **27** (CDCl_3 , 400 MHz)

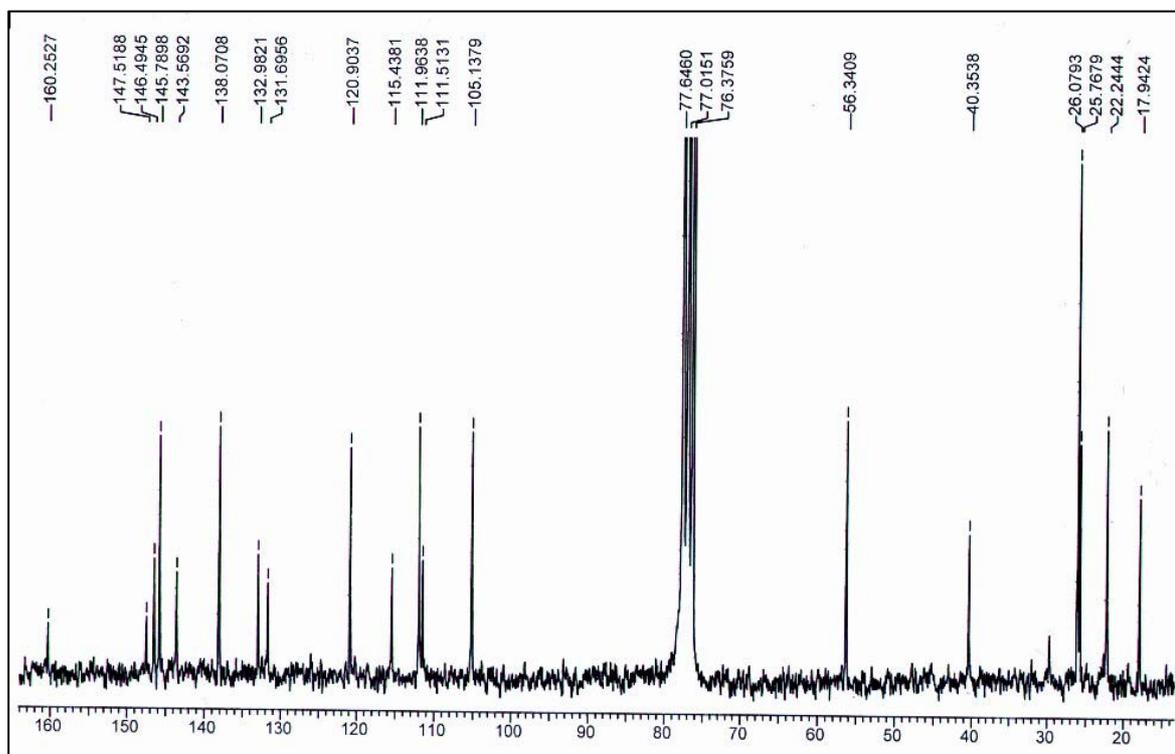


FIGURA 4.81 – Espectro de RMN^{13}C da cumarina **27** (CDCl_3 , 40 MHz)

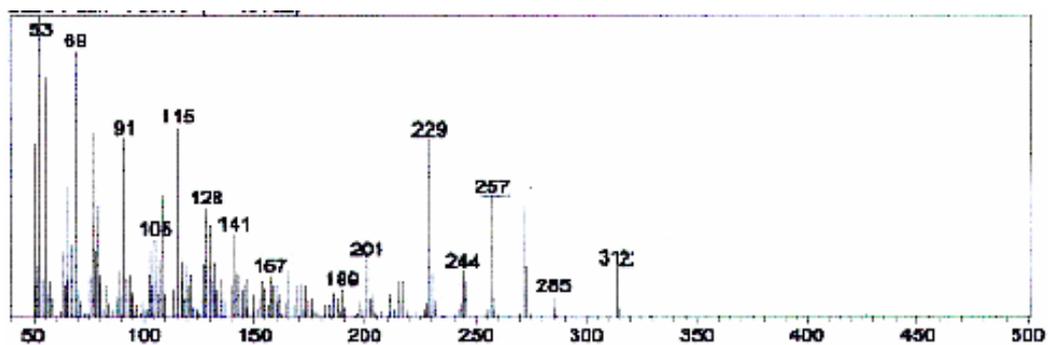
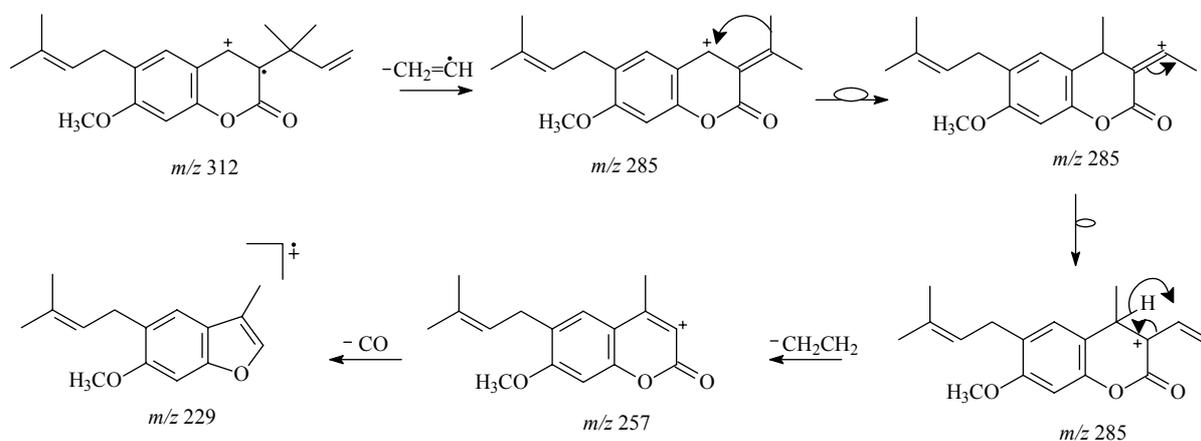


FIGURA 4.82 – Espectro de massas (ESI = 70 eV) da cumarina **27**



ESQUEMA 4.13: Proposta de fragmentação para a cumarina **27**

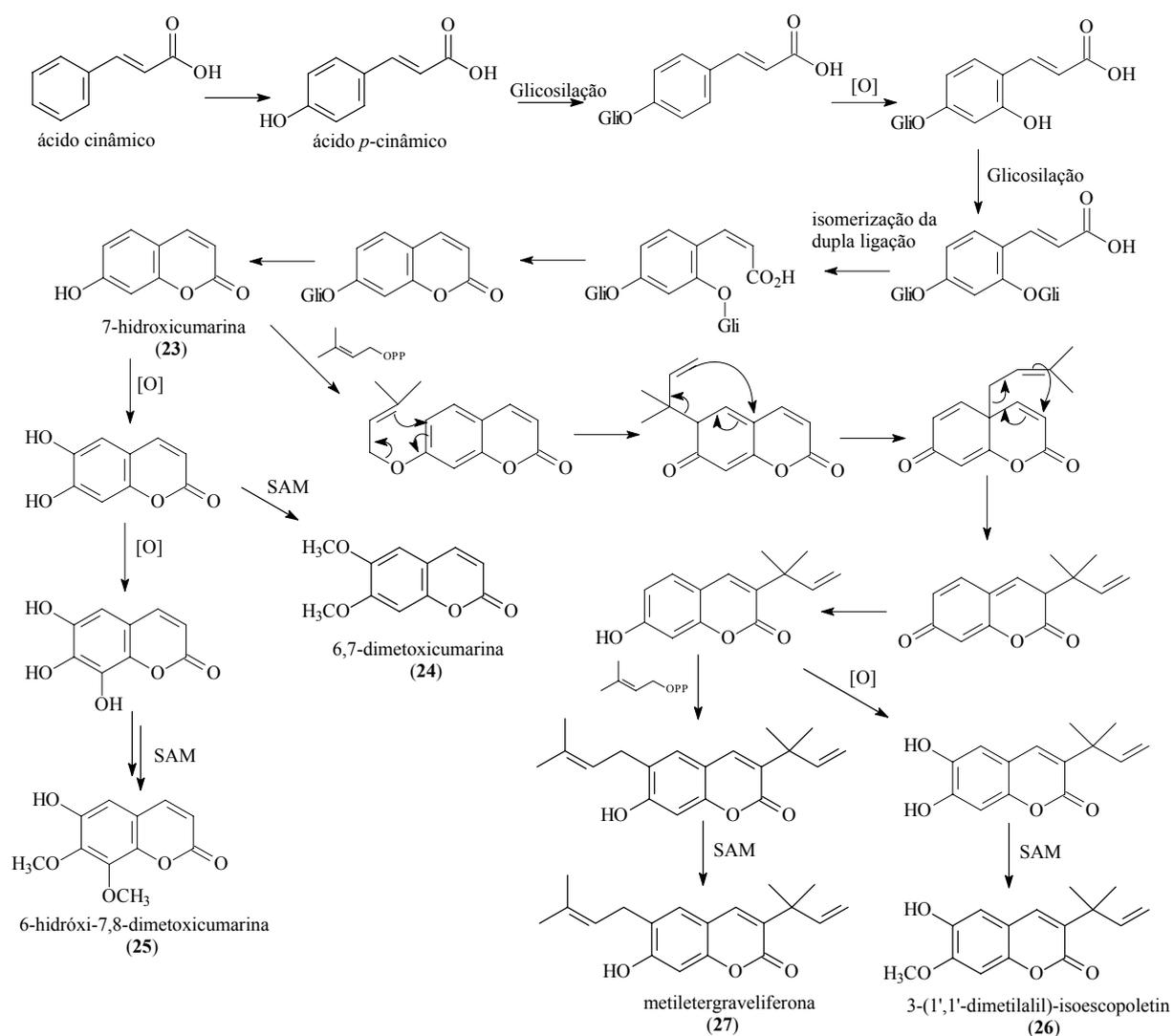
TABELA 4.21 – Dados de RMN¹H e RMN¹³C das cumarinas **26** e **27**

H/C	26 (CDC ₃ , 400MHz)	26 (CDC ₃ , 50MHz)	27 (CDC ₃ , 400MHz)	27 (CDC ₃ , 50MHz)	Lit ^b
2	-	160,2	-	160,2	160,2
3	-	132,0	-	131,7	131,5
4	7,49 (s)	137,7	7,47 (s)	138,7	137,9
4a	-	145,6	-	145,5	145,7
5	6,83 (s)	111,8	6,71 (s)	105,1	105,3
6	-	112,0	-	115,5	115,7
7	-	149,3	-	143,6	143,6
8	6,86 (s)	102,4	6,15 (s)	146,5	146,5
8a	-	148,8	-	147,5	147,7
1'	-	40,4	-	40,3	40,4
2'	6,18 (2H, dd, J = 11,0 e 17,1 Hz)	145,1	6,22 (1H, dd, J = 11,0 e 17,1 Hz)	145,8	145,8
3'	5,06 (2H, dd, J = 11,0 e 17,1 Hz)	111,8	5,07 (2H, dd, J = 11,0 e 17,1 Hz)	111,9	111,9
4'	1,48 (3H, s)	26,0	1,46 (3H, s)	26,0	26,2
5'	1,48 (3H, s)	26,0	1,46 (3H, s)	26,0	26,2
1''	-	-	3,55 (2H, d, J = 7,0 Hz)	22,2	21,8
2''	-	-	5,27 (1H, t, J = 7,0 Hz)	120,9	121,0
3''	-	-	-	132,9	133,0
4''	-	-	1,85 (3H, s)	17,9	17,7
5''	-	-	1,68 (3H, s)	25,8	25,8

Lit^b: BERGENTHAL *et al.*, 1978TABELA 4.22 – Dados de HSQC e HMBC para as cumarinas **26** e **27**

H/C	26 H	26 C J ¹	26 C J ² e J ³	27 H	27 C J ¹	27 C J ² e J ³
4	7,49	137,7	40,4, 111,8, 148,8 e 160,2	7,47	138,7	40,3, 105,1, 147,5 e 160,2
5	6,83	102,4	137,7 e 149,3	6,71	105,1	138,7, 143,6, 145,5 e 147,5
8	6,86	111,8	145,6 e 112,1	6,15	146,5	143,6 e 145,8
2'	6,16	145,1	26,0 e 40,4	6,22	145,8	-
3'	5,05	111,8	40,4 e 145,1	5,07	111,9	40,3
4'	1,46	26,0	40,4, 26,0, 132,0 e 145,1	1,48	26,0	131,7 e 145,8
5'	1,46	26,0	40,4, 26,0, 132,0 e 145,1	1,48	26,0	131,8 e 145,8
1''	-	-	-	3,55	22,2	115,4, 120,9, 132,9 e 145,0
2''	-	-	-	5,27	120,9	-
4''	-	-	-	1,85	17,9	120,9 e 132,9
5''	-	-	-	1,67	25,8	120,9 e 132,9

As cumarinas são substâncias de ampla ocorrência na ordem Rutales. Geralmente as cumarinas desta ordem são oxigenadas na posição C-7 e têm sua origem no ácido *trans-p*-cumárico que através de diversas transformações leva à formação da 7-hidroxycumarina, que vem a ser a estrutura mais simples das cumarinas. No ESQUEMA 4.14, está representada uma proposta biogenética para formação das cumarinas isoladas.



ESQUEMA 4.14: Proposta biogenética para as cumarinas **23-27** (adaptada de DEWICK, 2001)

4.7 – Quassinóides

Os quassinóides são considerados triterpenóides degradados devido a sua biossíntese que apresenta como precursor os triterpenos tirucalol e eufol que sofrem degradações oxidativas que levam a formação destas substâncias. Várias evidências, além de experimentos com o precursor mevalonato marcado, comprovam a sua biogênese (MORON e POLONSKY, 1968).

Podendo ser divididos em grupos de acordo com os seus esqueletos básicos (FIGURA 4.83), a grande maioria dos quassinóides são substâncias C_{20} tendo o esqueleto básico o esqueleto **a**. O anel A em quassinóides pode apresentar estruturas variadas (FIGURA 4.84), sendo as estruturas V, VI e VII as mais raras. O anel C pode possuir em C-8 uma metila ou um grupo hidroximetil (C-30) que forma uma ponte éter com C-11 ou C-13. O anel D pode ter uma hidroxila em C-15 que geralmente é esterificada com vários ácidos graxos pequenos.

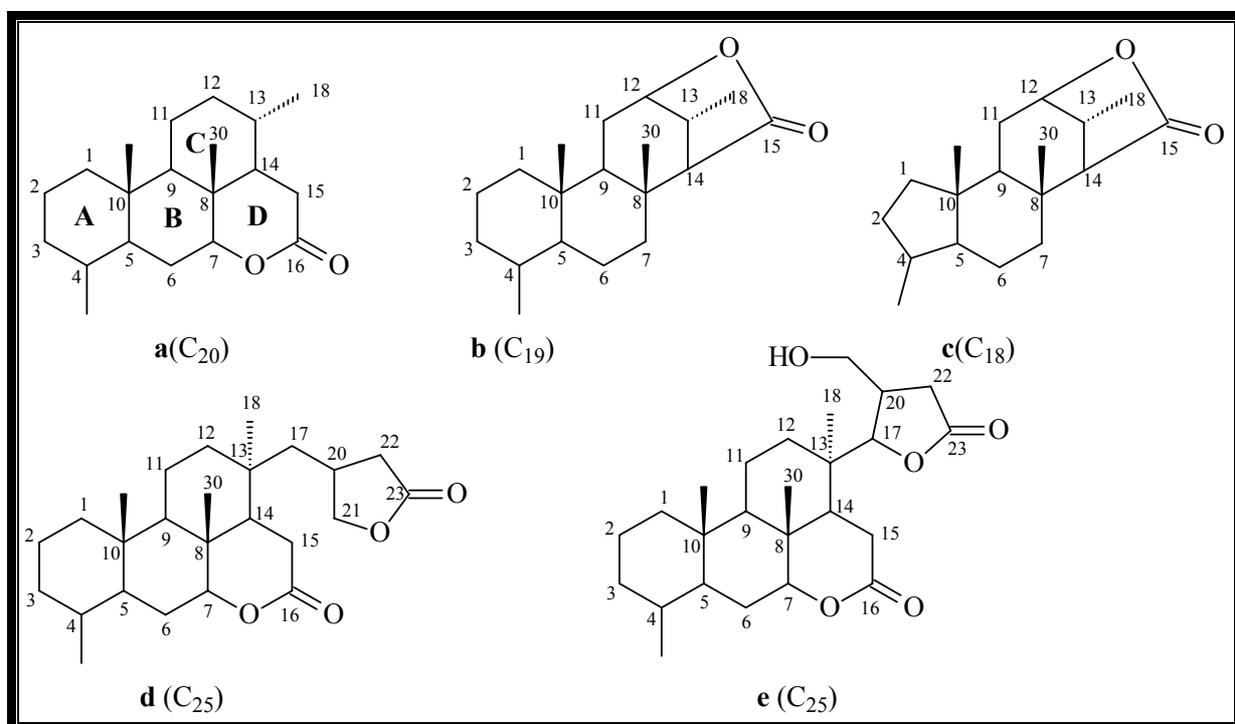


FIGURA 4.83 – Esqueletos básicos de quassinóides.

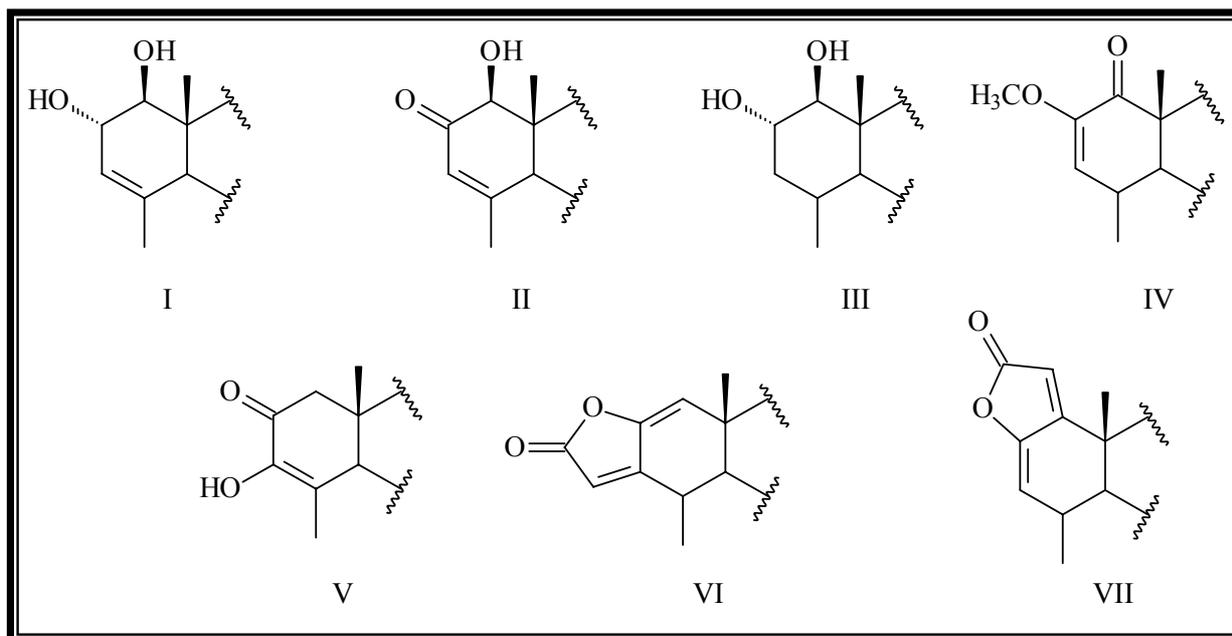


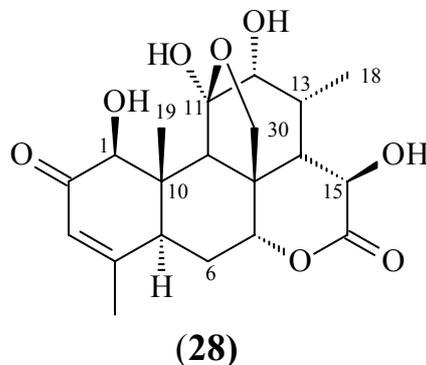
FIGURA 4.84 – Tipos de estruturas do anel A.

O anel B e D, podem ser caracterizados pela funcionalização no carbono C-15, determinada pelo deslocamento químico de C-16, ou seja, se C-16 for aproximadamente δ 173 é um grande indício que exista um grupo hidroxila livre no C-15; quando a hidroxila se encontra esterificada, o sinal para C-16 é de aproximadamente em δ 167 devido ao efeito γ . A configuração β para os substituintes em C-15 foi estabelecida com base na constante de acoplamento na faixa de 10-14 Hz, resultante do acoplamento de H-14 com H-15, em aproximadamente δ 5,0 para hidroxilas livres e δ 5,9 quando a hidroxila se encontra esterificada.

A configuração α para o oxigênio em C-7 foi determinada com base no sinal do próton carbinólico H-7 que aparece como um tripleto com constante de 2,0 Hz, indicando ângulos de 30° com os hidrogênios na posição C-6.

4.7.1 – Identificação estrutural do quassinóide 28

O quassinóide **28** foi isolado do caule da fração diclorometânica do extrato metanólico de *S. versicolor* (p. 31) e foi identificado através de RMN de 1 e 2D.



O tipo **a** para o anel A do quassinóide **28** foi identificado pelos deslocamentos químicos, característicos dos carbonos C-1, C-2, C-3 e C-4 que foram os sinais em δ 80,4, δ 197,4, δ 126,1 e δ 162,5, respectivamente, no espectro de RMN¹³C de **28** (FIGURA 4.85).

A indicação que o grupo metila C-30 no esqueleto do quassinóide sofreu uma oxidação para formar um anel tetraidrofurano no carbono C-11 ou C-13, pôde ser constatada pela presença de dois dubletos bastante característico no espectro de RMN¹H (FIGURA 4.86) referentes aos hidrogênios H-30a e H-30b, em aproximadamente δ 4,15 e δ 3,89, com $J = 8,0$ Hz (TABELA 4.23).

O espectro de RMN¹³C mostrou a presença de vinte sinais de carbono, indicando um esqueleto do tipo C₂₀ (TABELA 4.24).

A formação do anel tetraidrofurano do tipo C-30-O-C11 com formação do hemicetal em C-11 pôde ser caracterizado pela presença do sinal em δ 110,9, relativo ao carbono C-11, pois caso contrário, quando o anel é do tipo C-30-O-C-13, apareceria um sinal de carbono quaternário em aproximadamente δ 80,0, e o sinal em δ 110,0 não apareceria.

No espectro de COSY 45° (FIGURA 4.87) a correlação do hidrogênio δ 3,89 com δ 4,15 e δ 2,73, referentes aos H-30b e H-13; juntamente

com o singlete em δ 3,34 correspondente a H-9, reforçam a proposta para o anel tetraidrofurânico formado pela ponte C-30-O-C-11 (TABELA 4.25).

A funcionalização e a configuração β de C-15 foram determinadas pelo deslocamento de C-16 em δ 174,1 juntamente com o sinal em δ 5,51 dubleto com $J = 11,0$ Hz, referente ao acoplamento axial-axial do hidrogênio H-15 com o H-14.

Aparecem ainda no espectro de RMN¹H, dois singletos em δ 1,58 e δ 1,76 referentes as metilas em 19 e 29 respectivamente, e um dubleto largo em δ 1,73 referente a metila 18. As correlações dos hidrogênios e carbonos foram feitas através de experimentos de HSQC e HMBC (FIGURAS 4.88 e 4.89, TABELAS 4.26 e 4.27).

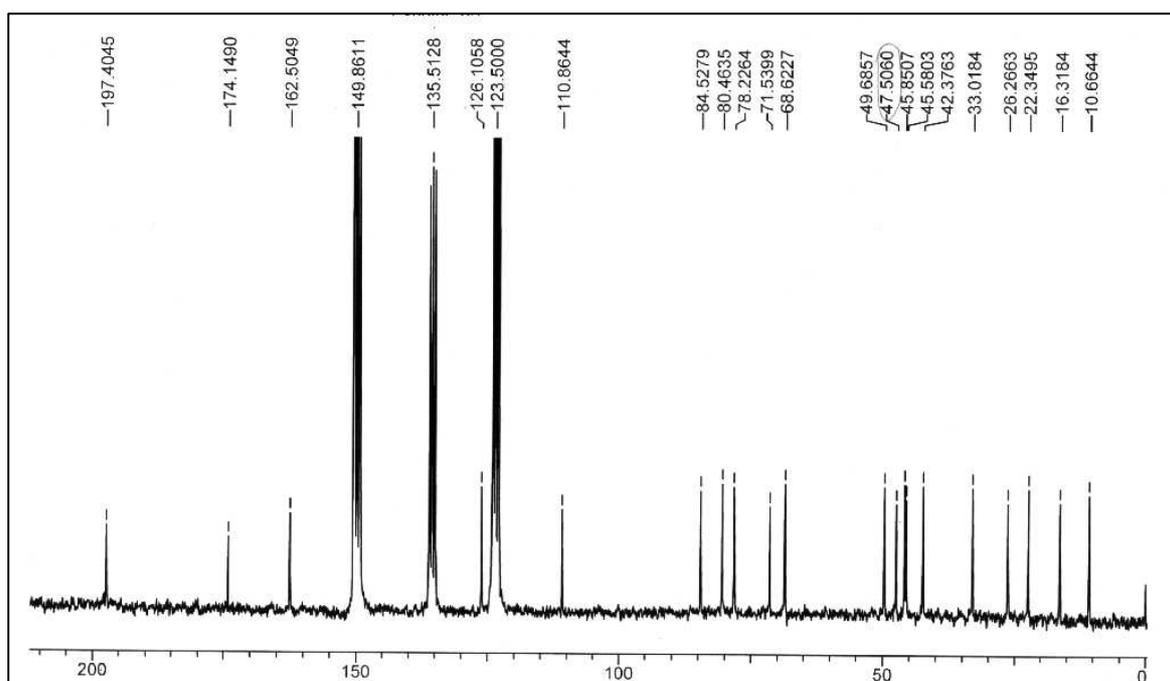
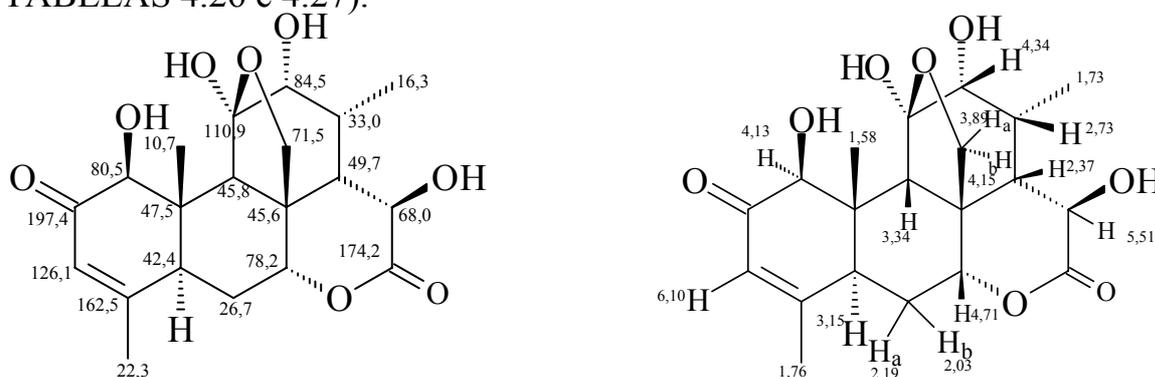


FIGURA 4.85 – Espectro de RMN ¹³C de 28 (Pyr-d₅, 50 MHz)

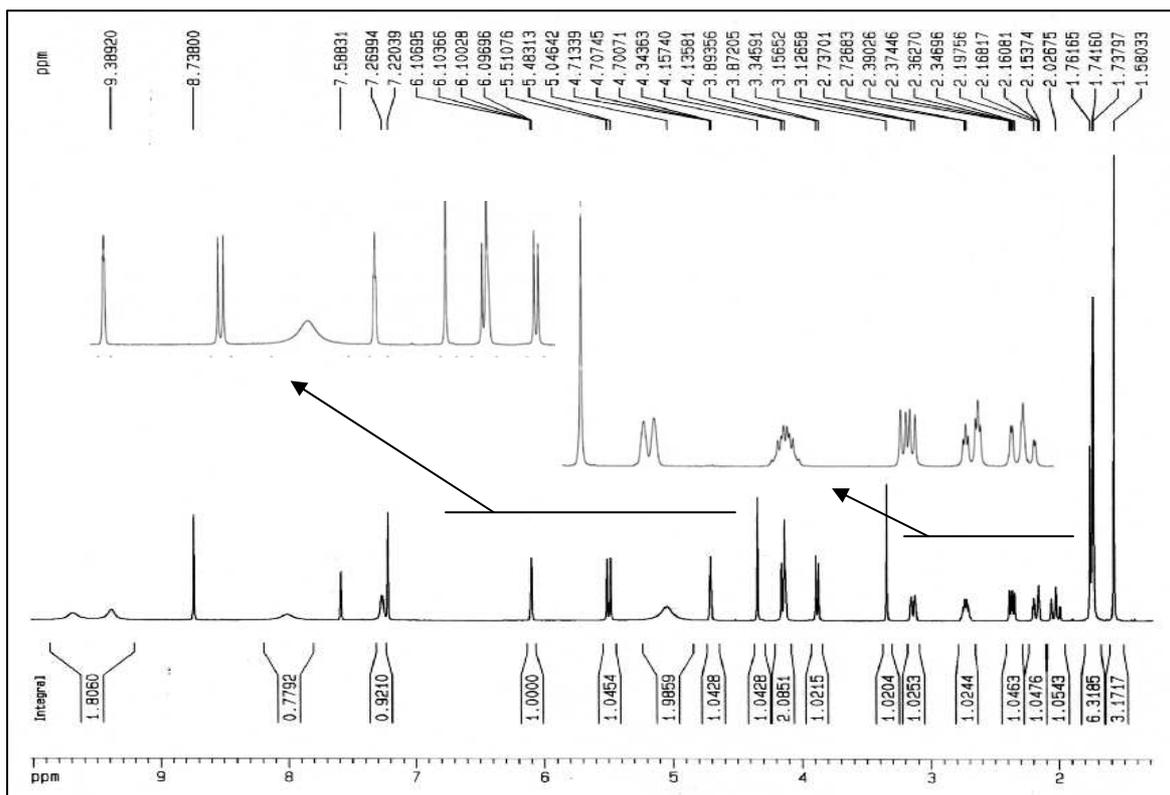


FIGURA 4.86 – Espectro de RMN ^1H de **28** (Pyr- d_5 , 400 MHz)

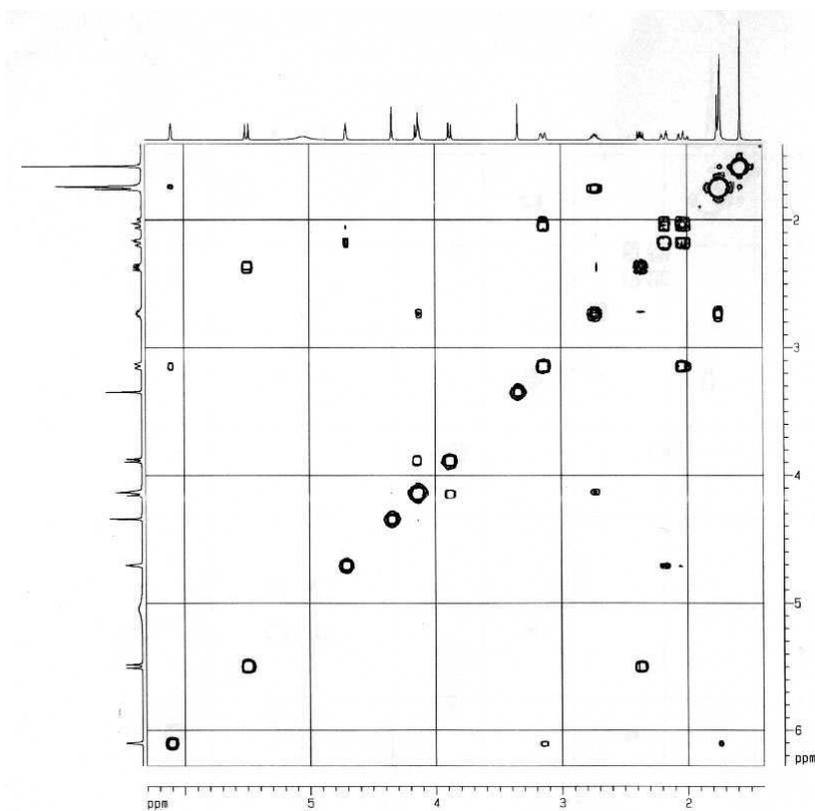


FIGURA 4.87 – Espectro de COSY ^1H - ^1H de **28** (Pyr- d_5 , 400 MHz)

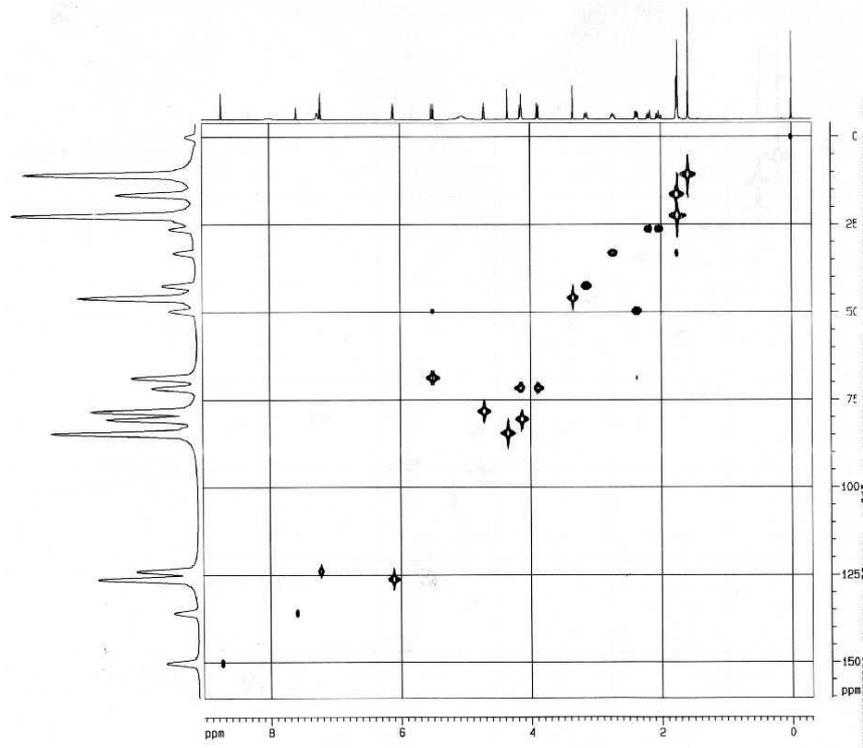
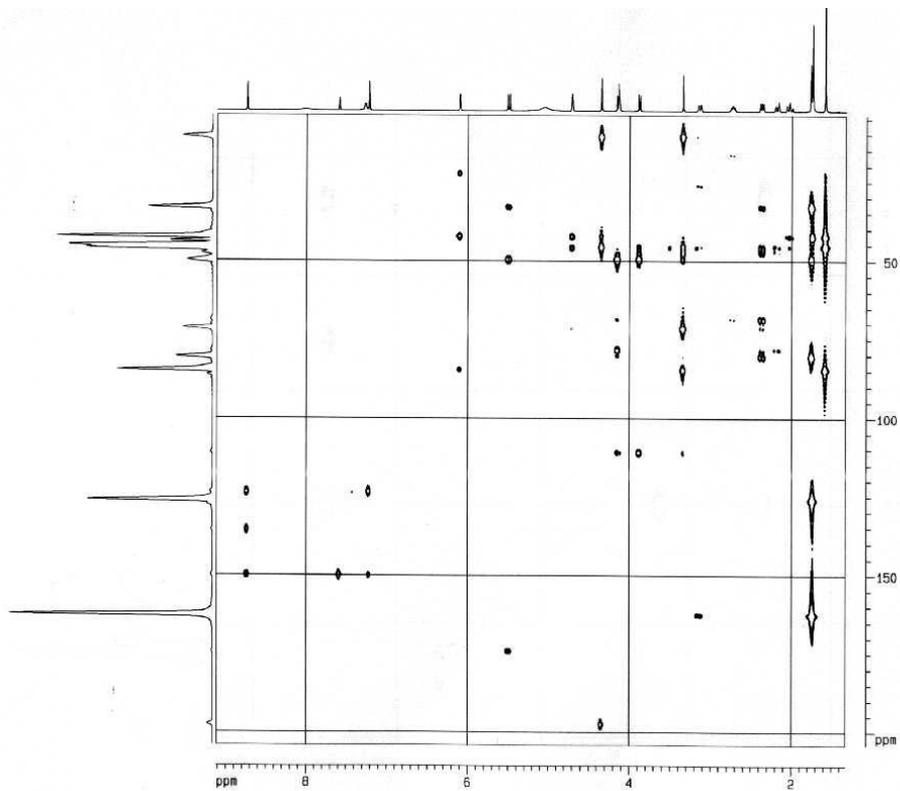
FIGURA 4.88 – Mapa de contorno de HSQC de **28** (Pyr-d₅, 400 MHz)FIGURA 4.89 – Mapa de contorno de HMBC de **28** (Pyr-d₅, 400 MHz)

TABELA 4.23 – Dados de RMN ^1H de **28**

H	28 (Pyr-d ₅ , 400MHz)	VIEIRA, 1995 (CDCl ₃ , 200MHz)
1	4,13 (s, 1H)	4,10 (s)
3	6,10 (m)	6,17 (s)
5	3,15 (dl, $J = 12\text{Hz}$)	2,88 (dl)
6a	2,19 (dt)	2,29 (m)
6b	2,03 (tl, $J = 2,9\text{ Hz}$)	1,96 (m)
7	4,71 (t)	4,56 (sl)
9	3,34 (s)	2,70 (s)
12	4,34 (s)	3,60 (dl)
13	2,73 (m)	2,46 (m)
14	2,37 (dd, $J = 6,3$ e $11,0\text{ Hz}$)	-
15	5,51 (d, $J = 11,0\text{ Hz}$)	4,66 (d)
18-OCH ₃	1,73 (dl)	1,28
19-OCH ₃	1,58 (s)	1,20
29-OCH ₃	1,76 (s)	2,03
30a	3,89 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$)	3,71 (d, $J = 8,8\text{ Hz}$)
30b	4,15 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$)	3,94 (d, $J = 8,8\text{ Hz}$)

TABELA 4.24 – Dados de RMN ^{13}C de **28**

C	28 (Pyr-d ₅ , 50MHz)	VIEIRA, 1995 (CDCl ₃ , 100MHz)
1	80,5	83,1
2	197,4	196,2
3	126,1	124,4
4	162,5	164,4
5	42,4	45,0
6	26,7	25,5
7	78,2	78,1
8	45,6	46,9
9	45,8	41,8
10	47,5	45,1
11	110,9	109,1
12	84,5	79,4
13	33,0	31,7
14	49,7	47,9
15	68,0	66,5
16	174,2	173,7
18	16,3	14,9
19	10,7	9,9
29	22,3	22,9
30	71,5	71,2

TABELA 4.25 – Dados de COSY ^1H - ^1H de **28**

H	28
1	6,10
3	4,13
5	2,03 e 6,10
6a	2,03 e 4,70
6b	2,19 e 3,15
7	2,19
9	---
12	---
13	2,37 e 4,13
14	2,73 e 5,51
15	2,37
18-OCH ₃	2,73
19-OCH ₃	---
29-OCH ₃	6,10
30a	4,15 e 2,73
30b	3,89

TABELA 4.26 – Correlações de ^1H – ^{13}C a J' de **28** observadas no experimento de HSQC

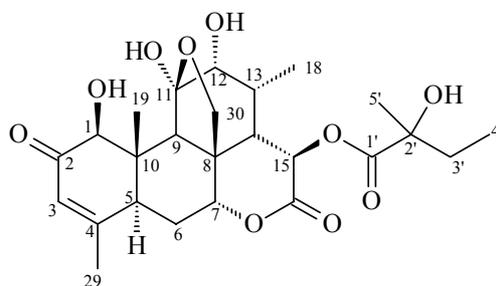
HSQC		
	H (δ)	C (δ)
1	4,13	80,5
3	6,10	126,1
5	3,15	42,4
6a	2,19	26,3
6b	2,03	26,3
7	4,70	78,2
9	3,34	45,6
12	4,34	84,5
13	2,73	33,0
14	2,37	49,7
15	5,51	68,0
18	1,73	16,3
19	1,58	10,7
29	1,76	22,3
30a	3,89	71,5
30b	4,15	71,5

TABELA 4.27 – Correlações de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a J^2 , J^3 e J^4 de **28** observadas no experimento de HSQC

HMBC		
	H (δ)	C (δ)
1	4,13	42,4 e 126,1
3	6,10	22,3, 42,4 e 80,5
5	3,15	26,3, 10,7 e 45,8
6a	2,19	45,6 e 78,2
6b	2,03	42,4 e 45,6
7	4,70	42,4 e 45,6
9	3,34	10,7, 45,6, 71,5, e 84,5
12	4,34	16,3 e 45,8
13	2,73	16,3 e 68,0
14	2,37	33,0, 45,8 e 78,2
15	5,51	33,0 e 49,7
18	1,73	33,0 e 49,7
19	1,58	47,5 e 80,5
29	1,76	42,4
30a	3,89	49,7
30b	4,15	49,7 e 78,2

4.7.2 – Identificação do quassinóide **29**

O quassinóide **29** foi obtido da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *S. versicolor* (p. 35). Sua identificação estrutural foi realizada através de RMN 1 e 2 D e espectroscopia de massas.



(29)

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.90) a presença dos sinais em δ 84,9, δ 198,0, δ 126,7 e δ 163,0, referentes aos C-1, C-2, C-3 e C-4

respectivamente, conferem o tipo **a** para o anel A do quassinóide **29** conforme discutido anteriormente para o quassinóide **2**.

Os dois dubletos em δ 3,9 e δ 4,20 (d , $J = 8,8$ Hz) (FIGURA 4.91) são característicos dos hidrogênios H-30a e H-30b, quando a metila C-30 sofre oxidação resultando na formação de um éter. A presença do sinal em δ 111,2 referente a um carbono carbinólico indica que o éter formado é do tipo C-30-O-C-11, ou seja, a formação do hemicetal ocorre no C-11, caracterizando o anel C.

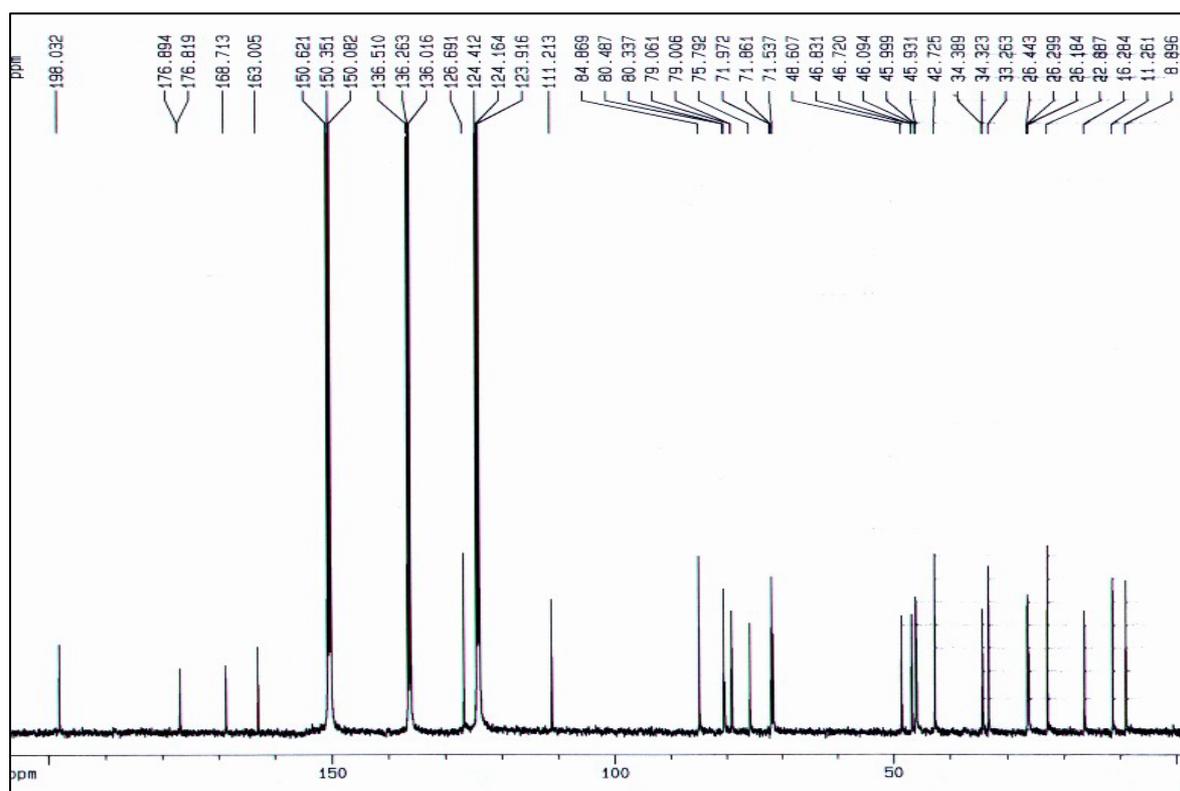


FIGURA 4.90 – Espectro de RMN¹³C do quassinóide **29** (Pyr-d₅ 50MHz)

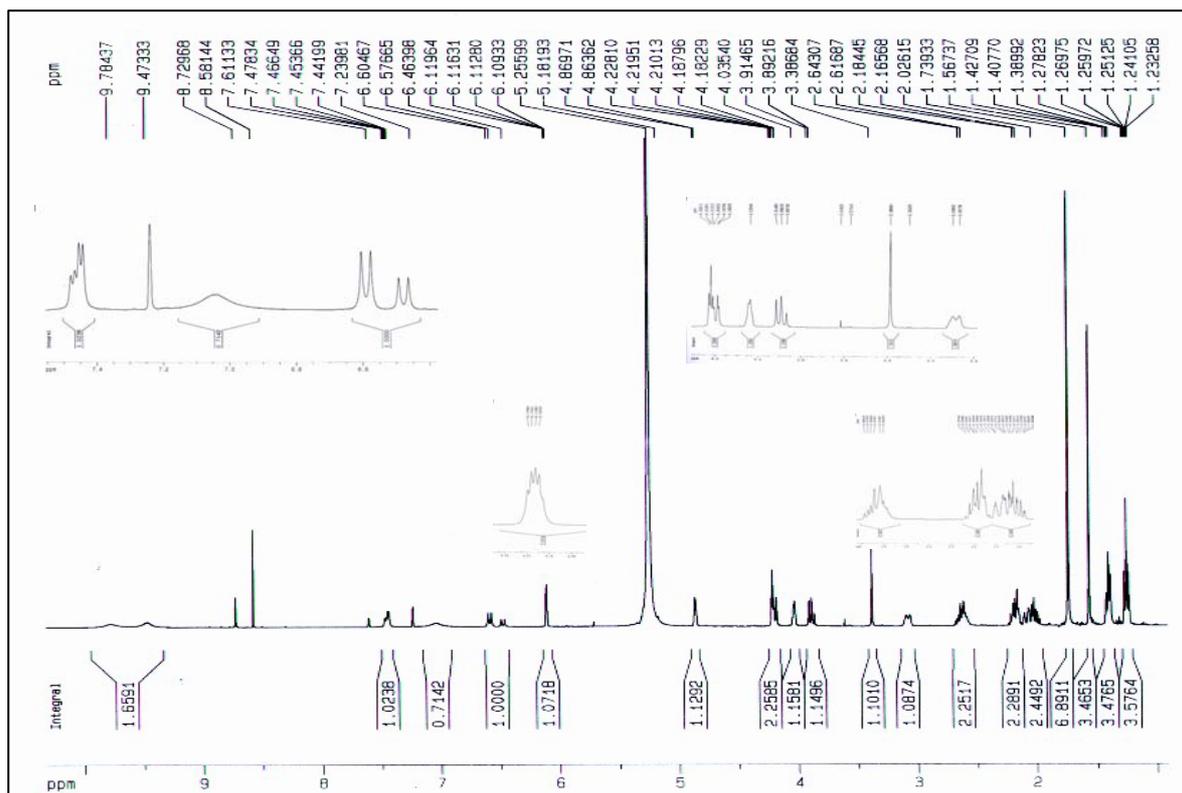
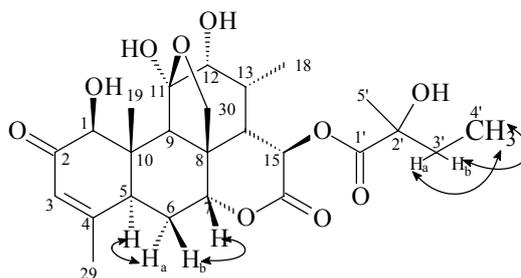


FIGURA 4.91 – Espectro de RMN¹H do quassinóide **29** (Pyr-d₅ 400MHz)

Através do experimento de COSY H¹-H¹ (FIGURA 4.92) pôde-se observar os acoplamentos do sinal em δ 1,27 (H-4') em com os sinais em δ 2,05 e δ 2,20 referentes aos hidrogênios H-3'a e H-3'b respectivamente. Observou-se ainda, o acoplamento do hidrogênio em δ 2,05 com o hidrogênio em δ 3,10 e o sinal do hidrogênio em δ 2,20 acoplando com o sinal em δ 4,86. Os sinais, tanto em δ 2,05 quanto em δ 2,20 integram para 2H cada um, conclui-se que os H-6a e H-6b possuem os mesmos deslocamentos químicos que H-3'a e H-3'b. Esses dados foram confirmados através do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.93) onde foi observado a correlação dos hidrogênios H-3'a e H-3'b com o carbono δ 38,4 e H-6a e H-6b com o carbono em δ 26,4.



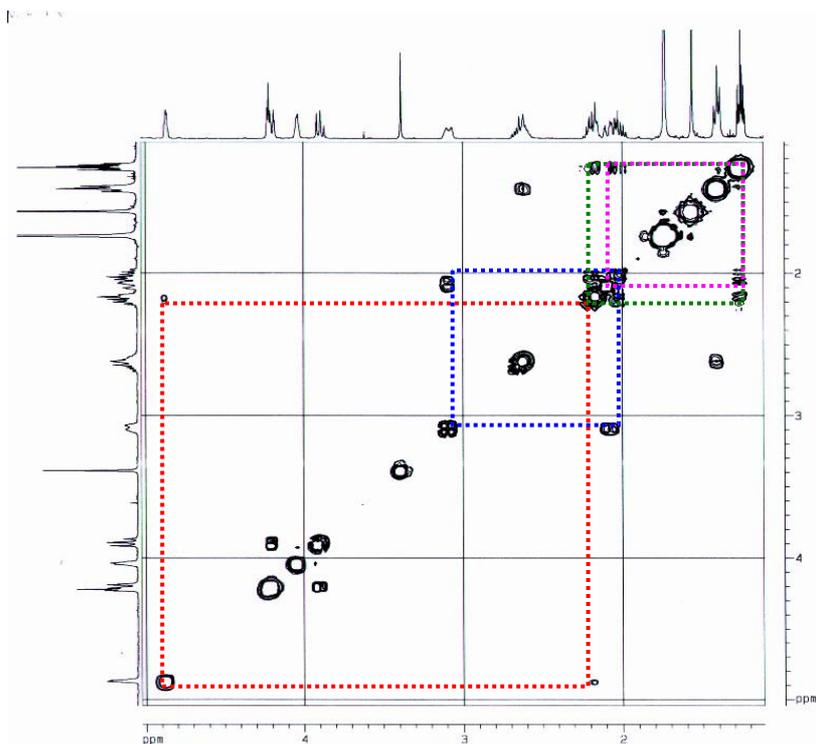


FIGURA 4.92 – Espectro de COSY H^1-H^1 do quassinóide **29** (Pyr- d_5 , 400MHz)

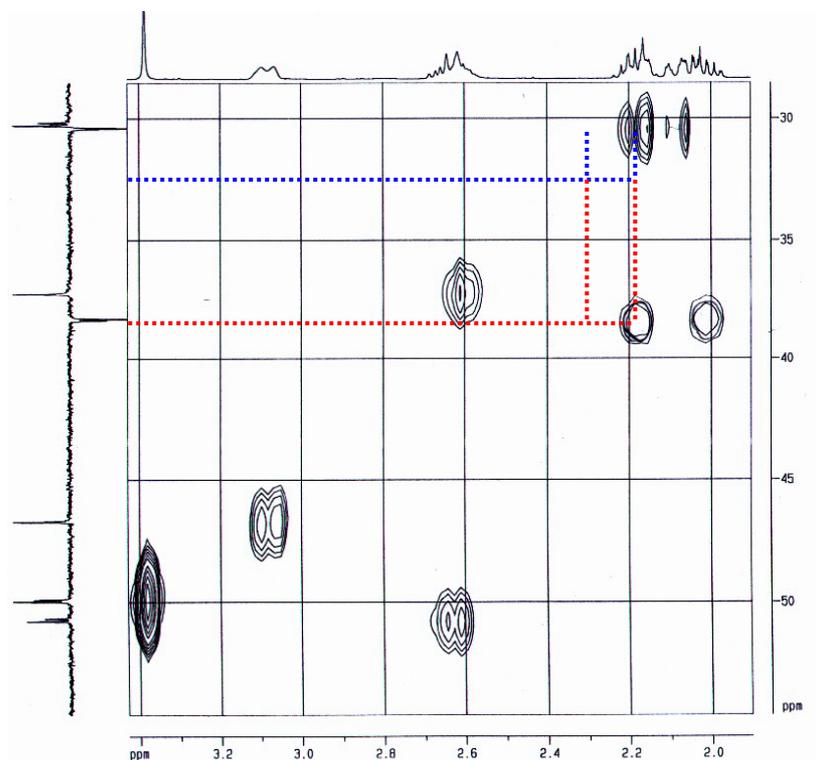


FIGURA 4.93 – Mapa de contorno de HSQC do quassinóide **29** (Pyr- d_5 , 400MHz)

A análise do mapa de contorno do espectro de HSQC (FIGURA 4.94) em conjunto com os dados observados no mapa de contorno do espectro

de HMBC (FIGURA 4.95) e dados da literatura (WATERMAN *et al.*, 1984), permitiu que fossem atribuídos os deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios do quassinóide **29** (TABELAS 4.28, 4.29 e 4.30).

O espectro de massas de **29** (FIGURA 4.96) obtido por *electrospray* modo negativo, mostrou os picos em m/z 493,5, 375,4, 345,4, 301,4 e 117,2, cujas fragmentações foi proposta no ESQUEMA 4.15, confirmando ser a glaucarubinona a substância **29**.

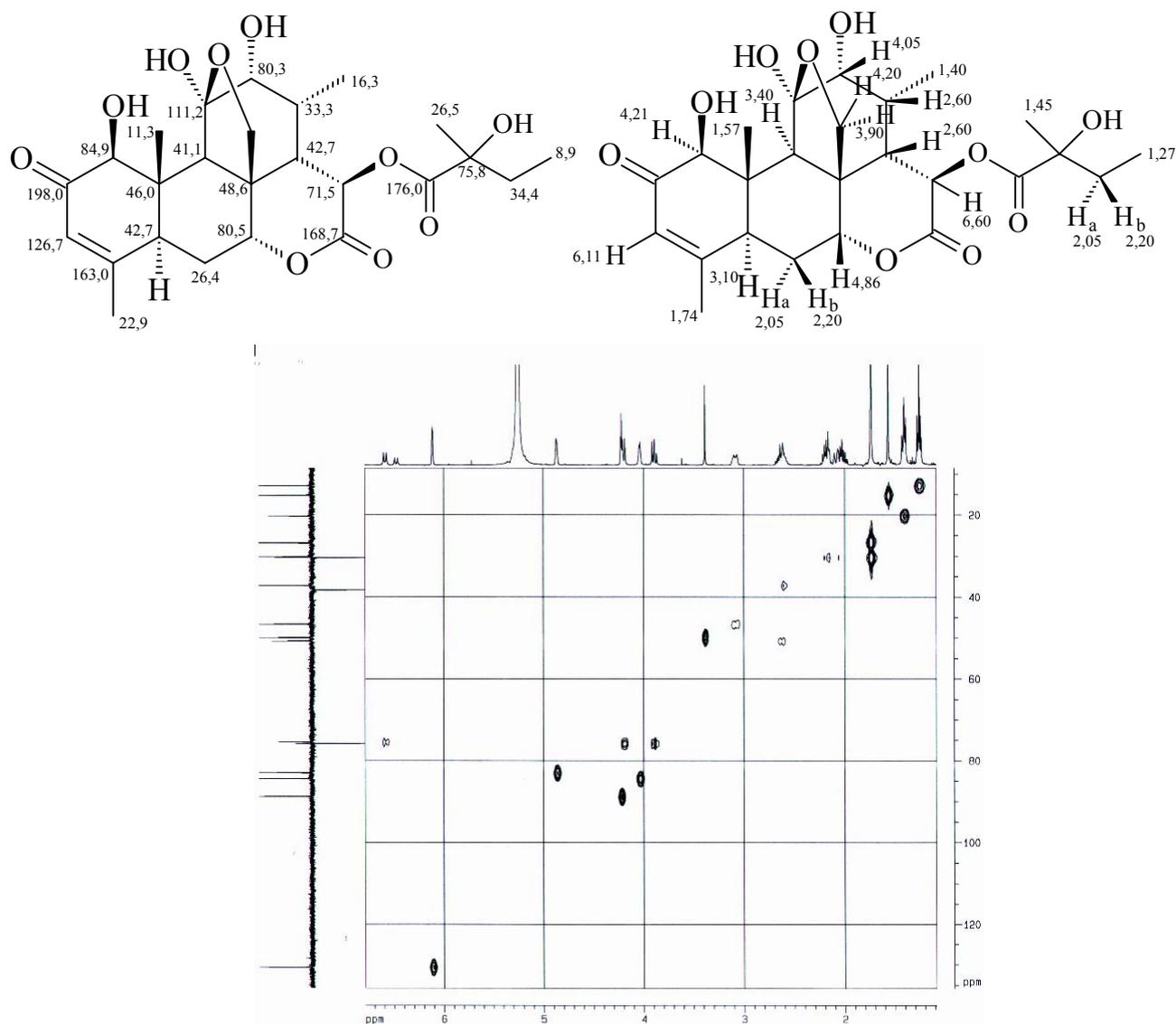


FIGURA 4.94 – Mapa de contorno de HSQC do quassinóide **29** (Pyr- d_5 , 400MHz)

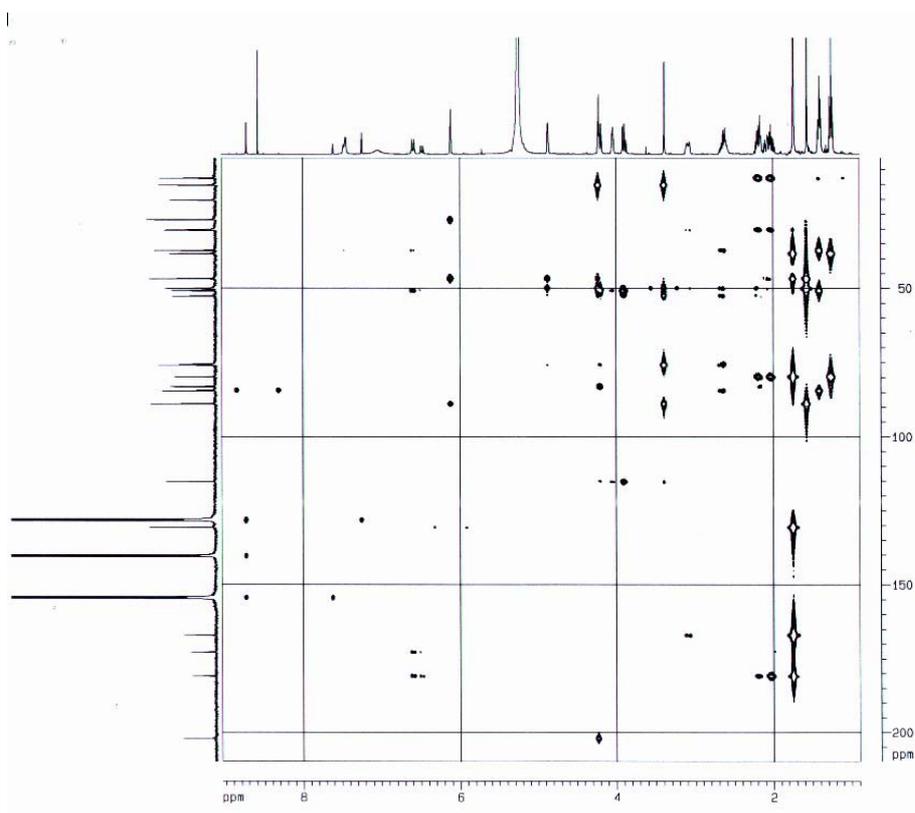


FIGURA 4.95 – Mapa de contorno de HMBC do quassinóide **29** (Pyr-d₅, 400MHz).

TABELA 4.28 – Dados de RMN¹H e RMN¹³C da substância **29**

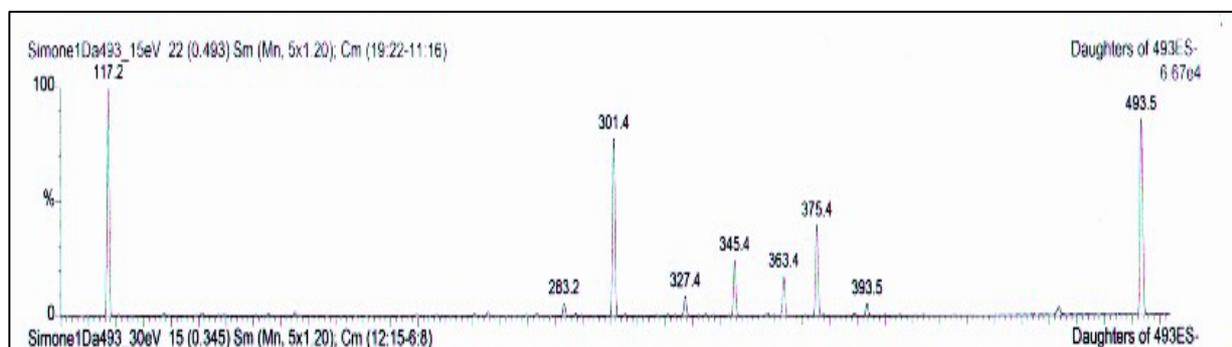
H/C	(29)	WATERMAN <i>et al.</i> , 1984	(29)	WATERMAN <i>et al.</i> , 1984
1	4,21 (s)	4,24 (s)	84,9	82,6
2	-	-	198,0	196,8
3	6,11(q, $J = 1,4\text{Hz}$)	6,12 (q, $J = 2\text{Hz}$)	126,7	124,8
4	-	-	163,0	162,3
5	3,10 (d, $J = 12\text{Hz}$)	3,11 (dd, $J = 10$ e 2 Hz)	42,7	43,9
6a	2,05 (m)	n.a.	26,4	24,7
6b	2,20 (m)	n.a.	26,4	24,7
7	4,86 (m)	4,83 (s)	80,5	77,4
8	-	-	48,6	46,8
9	3,40 (s)	3,46 (s)	41,1	41,1
10	-	-	46,0	44,5
11	-	-	111,2	108,9
12	4,05 (sl)	4,06 (sl)	80,3	78,4
13	2,63 (m)	-	33,3	31,4
14	2,60 (m)	2,10 (m)	42,7	44,5
15	6,6 (d, $J = 11,2\text{z}$)	6,50 (d, $J = 12\text{ Hz}$)	71,5	69,8
16	-	-	168,7	166,8
18	1,40 (d, $J = 8\text{Hz}$)	1,43 (d, $J = 8\text{Hz}$)	16,3	14,8
19	1,57 (sl)	1,58 (s)	11,3	9,9
29	1,74 (s)	1,74 (s)	22,9	22,1
30a	4,20 (d, $J = 9,1\text{Hz}$)	3,86 (d, $J = 9\text{Hz}$)	71,9	70,0
30b	3,90 (d, $J = 9,1\text{Hz}$)	3,67 (d, $J = 9,1\text{Hz}$)	71,9	70,0
1'	-	-	176,8	174,4
2'	-	-	75,8	73,9
3'a	2,20 (m)	n.a.	34,4	32,5
3'b	2,05 (m)	n.a.	34,4	32,5
4'	1,27 (t, $J = 7,1\text{Hz}$)	1,26 (t, $J = 7\text{Hz}$)	8,9	7,6
5'	1,45 (s)	1,43 (s)	26,5	24,7

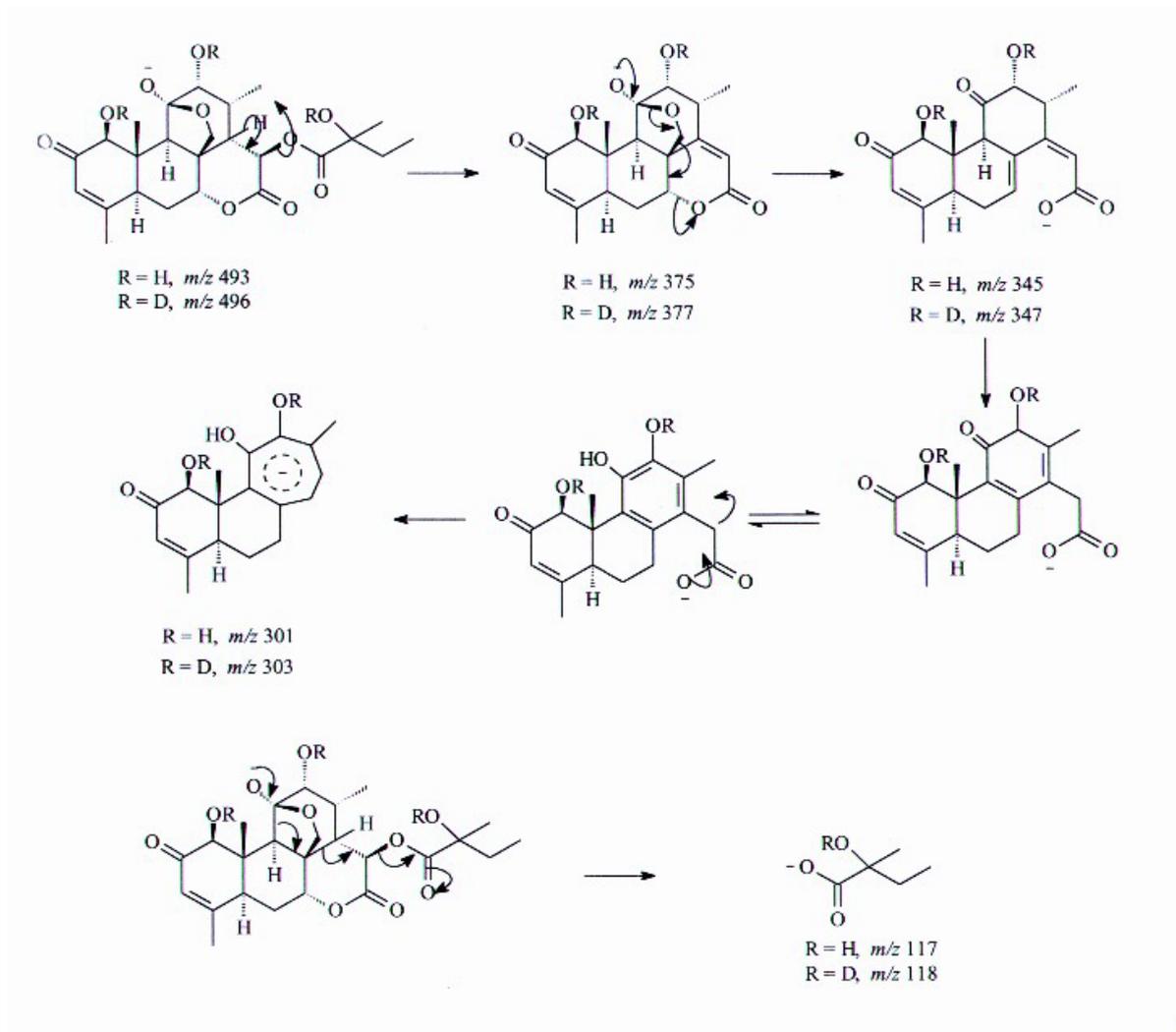
TABELA 4.29 – Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de **29** observadas no experimento de HSQC

	H (δ)	C (δ)
1	4,21	84,9
3	6,11	126,7
5	3,10	38,7
6a	2,05	26,4
6b	2,20	26,4
7	4,86	80,5
9	3,40	46,0
12	4,05	80,3
13	2,63	33,3
14	2,61	42,7
15	6,6	71,5
18	1,40	16,3
19	1,57	11,3
29	1,74	22,9
30a	4,20	71,9
30b	3,90	71,9
3'a	2,20	34,4
3'b	2,05	34,4
4'	1,27	8,9
5'	1,74	26,5

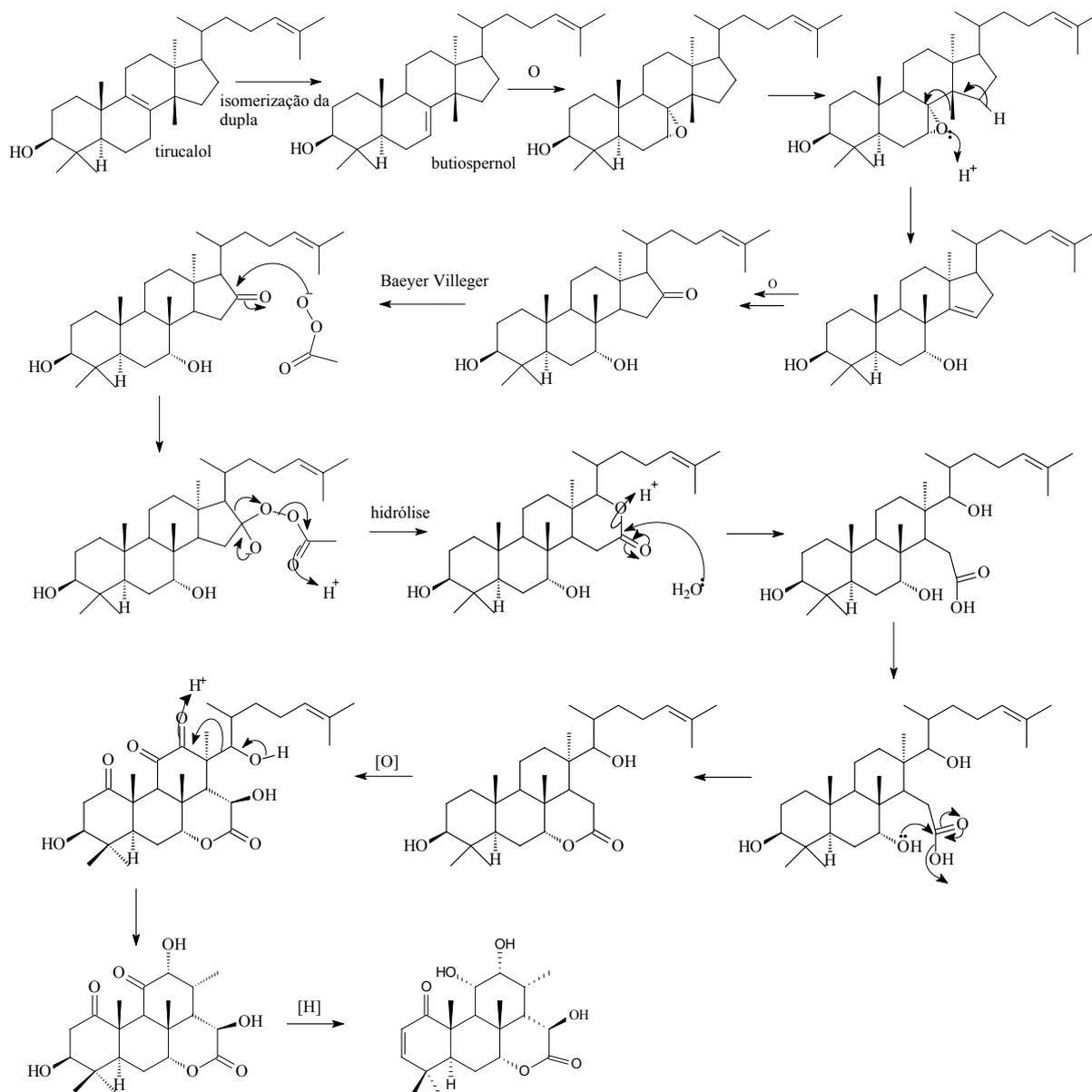
TABELA 4.30 – Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ com J^2 e J^3 de **29** observadas no experimento de HMBC

H/C	H (δ)	C (δ)
1	4,21	198,0, 42,7 e 126,7
3	6,11	22,9, 42,7 e 84,9
5	3,10	163,0
6a	2,05	80,5, 42,7 e 46,8
6b	2,20	80,5, 42,7 e 46,8
7	4,86	42,7 e 46,0
9	3,40	11,3, 48,6, 46,8, 71,9 e 84,9
12	4,05	46,0 e 111,2
13	2,63	46,1, 48,6, 71,9 e 80,3
14	2,61	33,3, 46,0, 168,0 e 176,0
15	6,6	33,3, 168,0 e 176,7
18	1,40	80,3, 33,3, e 42,7
19	1,57	42,7, 46,0 e 84,9
29	1,74	42,7, 126,7 e 163,0
30a	4,20	46,0 e 111,2
30b	3,90	11,3, 46,0 e 80,3
3'a	2,20	8,9, 46,0 e 75,8
3'b	2,05	8,9, 26,5 e 75,8
4'	1,27	34,4, 75,8 e 176,8
5'	1,74	34,4, 75,8 e 176,8

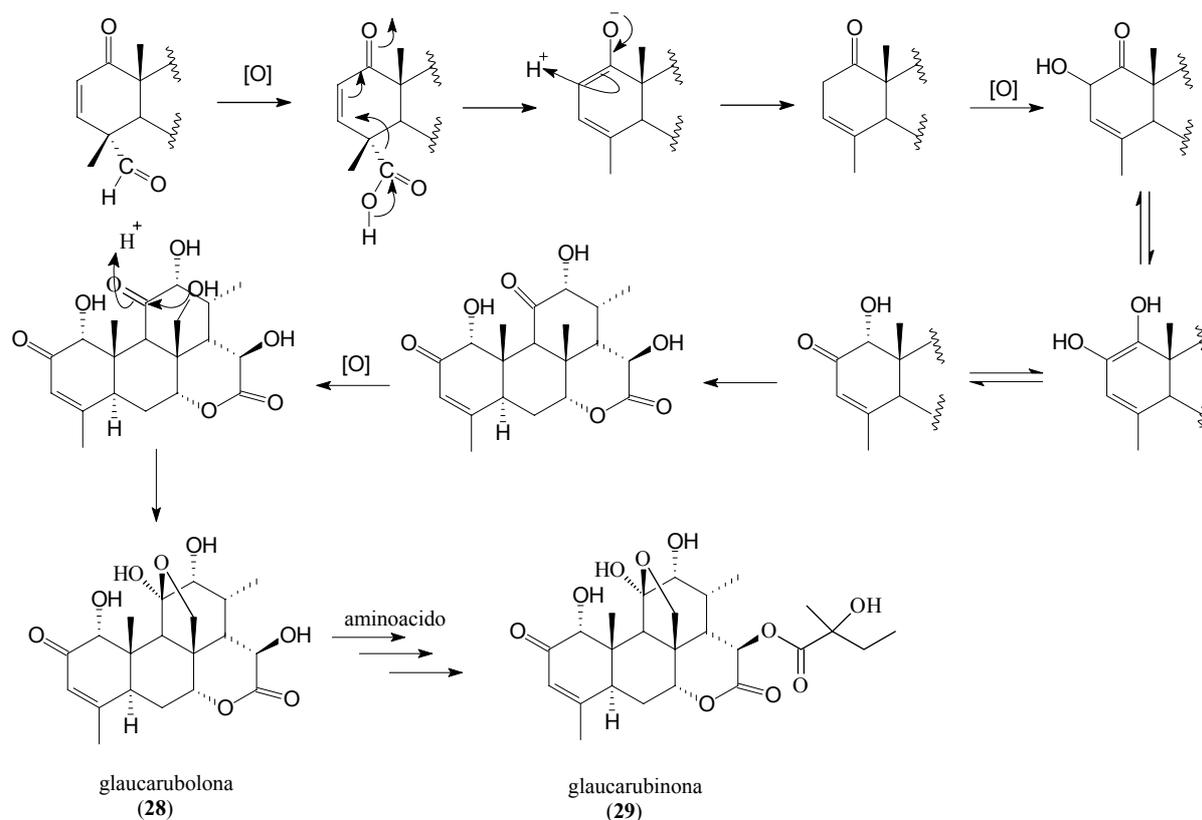
FIGURA 4.96 – Espectro de massas (ES-) da substância **29**



ESQUEMA 4.15: Proposta de fragmentação para o quassinóide **29**

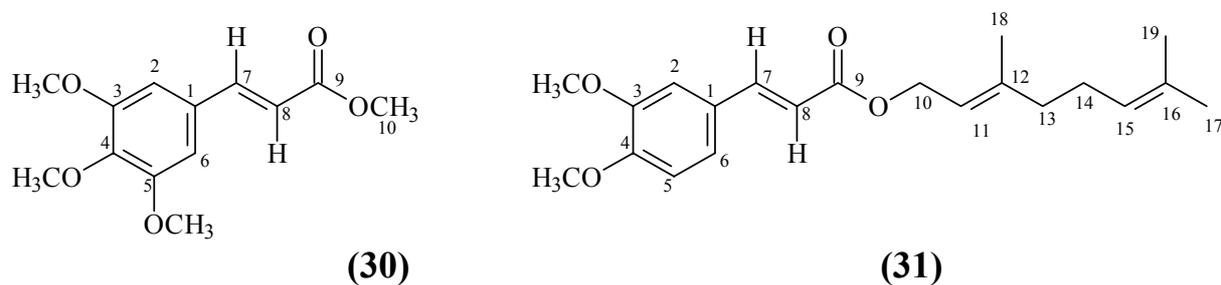


ESQUEMA 4.16: Proposta biogénica para os quassinóides **28** e **29** (adaptada de DEWICK, 2001)



ESQUEMA 4.17: Proposta biogênica para formação do anel A dos quassinóides **28** e **29** (adaptada de DEWICK, 2001)

4.8 – Identificação dos Derivados do Ácido cinâmico **30** e **31**



A substância **30** foi isolada dos galhos do extrato hexânico de *H. puberula* e das folhas do extrato diclorometânico (p. 22 e 27) e a **31** do extrato diclorometano dos galhos de *H. puberula* (p. 24).

Os espectros de RMN¹H de **30** e **31** (FIGURA 4.97 e 4.98) apresentaram dois dubletos em aproximadamente δ 7.60 ($J = 16$ Hz) e em δ 6.30 ($J = 16$ Hz), esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. As constantes de acoplamento de 16 Hz, sugeriram um acoplamento de hidrogênios em posição *trans*, sendo H-7, o mais desblindado devido ao efeito hiperconjugativo dos elétrons da dupla ligação com os da carbonila.

Ainda no espectro de RMN¹H de **30** (FIGURA 4.97) o singlete em δ 6.74 integrando para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6, que possuem o mesmo deslocamento químico por serem quimicamente equivalentes.

O espectro também indicou a presença de quatro metoxilas duas em δ 3.87, uma em δ 3.86 e outra em δ 3.79, que juntamente com o sinal em δ 52,2 observado no espectro de RMN¹³C de **30** (FIGURA 4.99) indicou que uma das metoxilas pertence a um grupo éster, o carbono carbonílico em δ 167,8 confirmou esse grupo na estrutura de **30**, que foi comparado com dados da literatura como sendo o 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (MIYASE *et al.*, 1983) (TABELA 4.31).

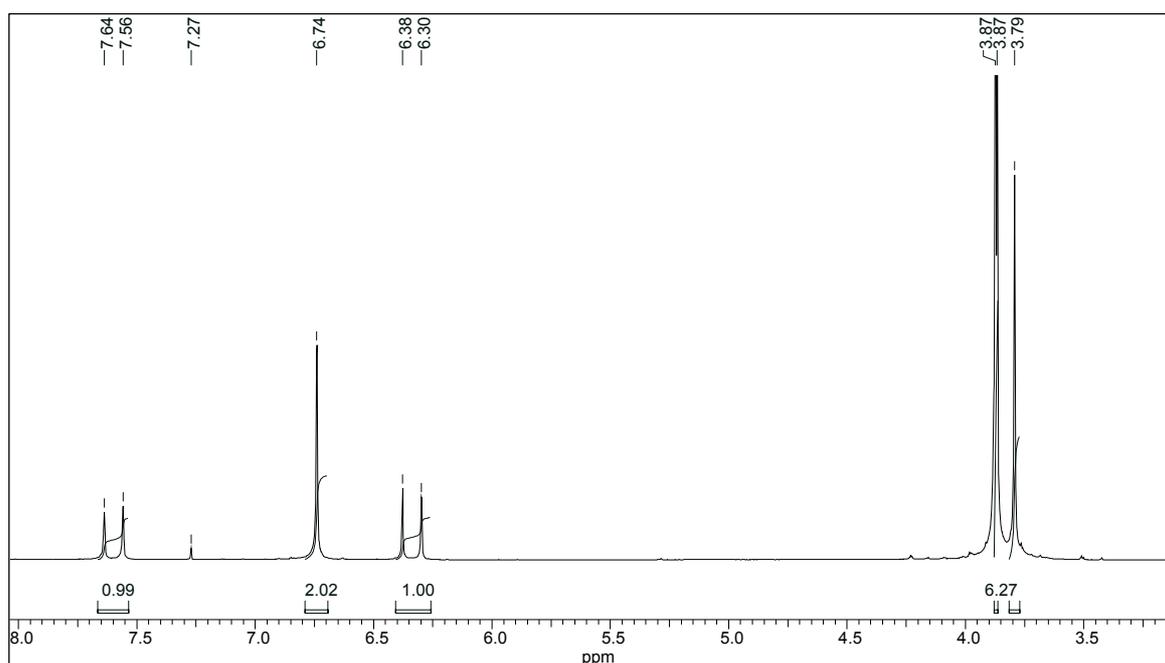


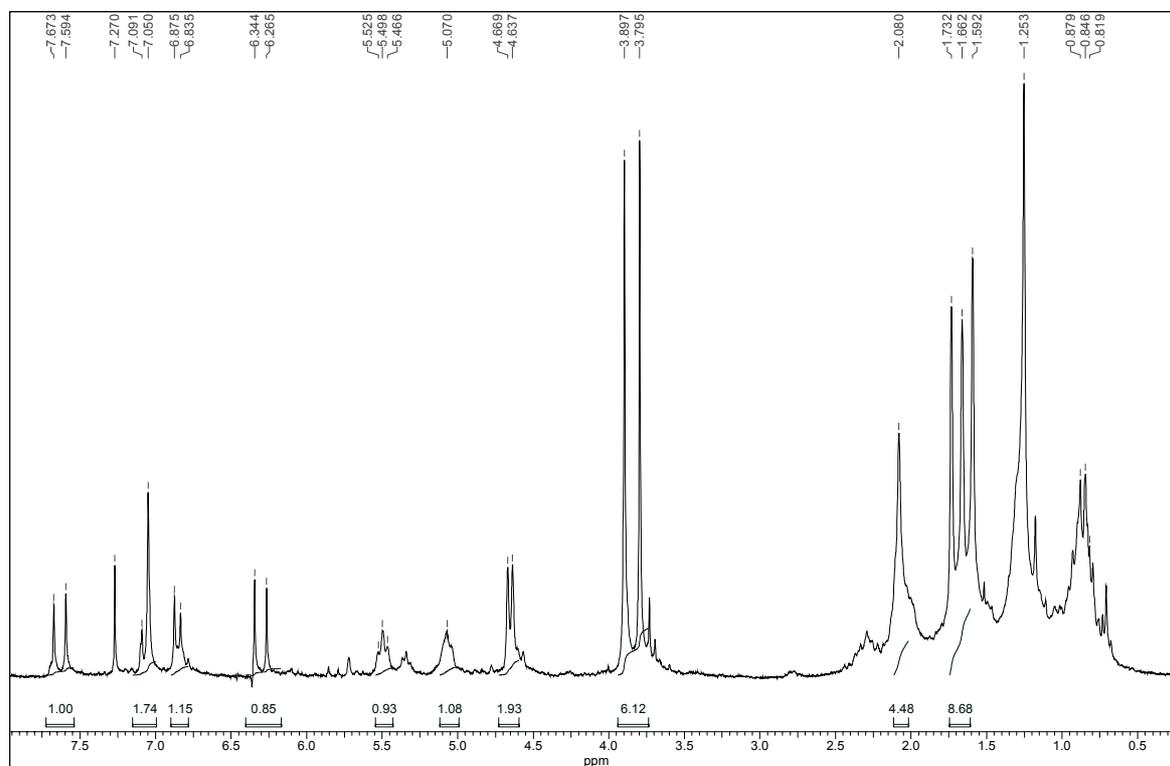
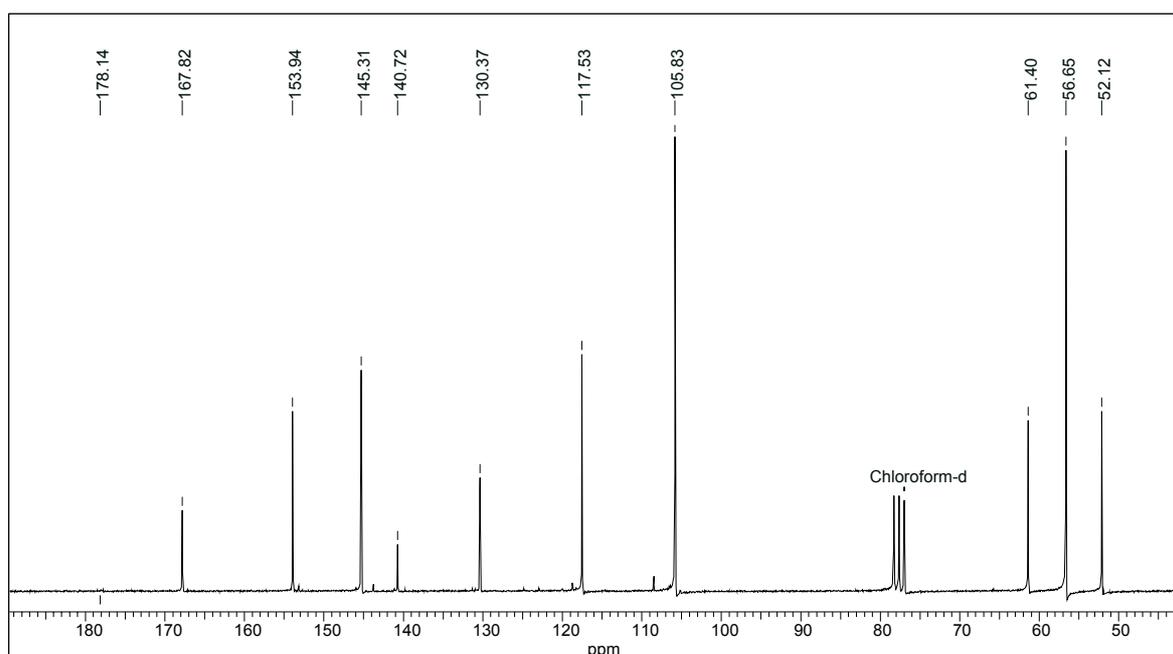
FIGURA 4.97 – Espectro de RMN¹H de **30** (CDCl₃, 200 MHz)FIGURA 4.98 – Espectro de RMN¹H de **31** (CDCl₃, 200 MHz)FIGURA 4.99 – Espectro de RMN¹³C de **30** (CDCl₃, 50 MHz)

TABELA 4.31 – Dados de RMN¹H e RMN¹³C de **30**

H/C	30 (CDCl ₃ , 200MHz)	MIYASE <i>et al.</i> , 1983 (CDCl ₃ , 200MHz)	30 (CDCl ₃ , 50MHz)
9	-	-	167,8
8	6.40 <i>d</i> (<i>J</i> = 16 Hz)	6.33 <i>d</i> (<i>J</i> = 16 Hz)	117,5
7	7.60 <i>d</i> (<i>J</i> = 16 Hz)	7.61 <i>d</i> (<i>J</i> = 16 Hz)	146,3
1	-	-	130,4
2 e 6	6.74 (<i>s</i>)	6.74 (<i>s</i>)	105,8
3 e 5	-	-	153,9
9-OCH ₃	3,79 (<i>s</i>)	3,81 (<i>s</i>)	52,12
3-OCH ₃	3,87 (<i>s</i>)	3,89 (<i>s</i>)	56,6
4-OCH ₃	3,86 (<i>s</i>)	3,87 (<i>s</i>)	61,4
5-OCH ₃	3,87 (<i>s</i>)	3,89 (<i>s</i>)	56,6

O espectro de RMN¹H de **31** (FIGURA 4.98) além de apresentar os dois dubletos em δ 7.64 (*J* = 16 Hz) e em δ 6.30 (*J* = 16 Hz) referentes aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, apresentou também, dois dubletos em δ 7.07 (*J* = 8,0 Hz) e em δ 6.85 (*J* = 8,0 Hz) e um singlete em δ 7.05 caracterizando os hidrogênios de um anel aromático tri-substituído, que foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-5 e H-2, respectivamente.

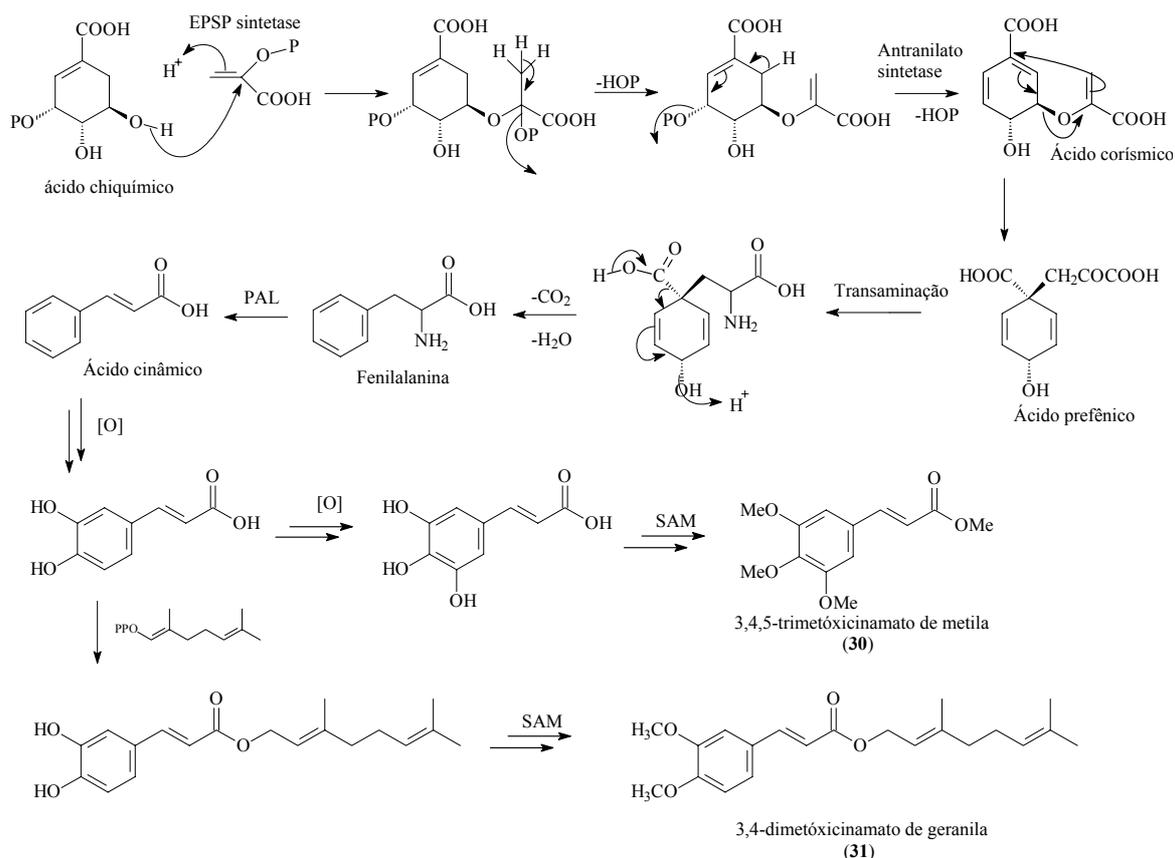
Pode-se observar a presença de duas metoxilas em δ 3.90 e δ 3.80, que provavelmente seriam os substituintes em C-3 e C-4.

Os sinais em δ 5.50 (*t*, *J* = 6,4 Hz, 1H) e em δ 4.65 (*d*, *J* = 6,4 Hz, 2H) foram atribuídos aos hidrogênios H-11 e H-10 que acoplam entre si dando um tripleto e um dubleto, respectivamente.

Os sinais dos hidrogênios H-12 e H-14 aparecem como um multipletto em δ 2.08. O tripleto largo em δ 5.07 foi atribuído a H-15. Os

singletos em δ 1.73, δ 1.66 e δ 1.59 foram atribuídos aos hidrogênios das metilas sobre dupla ligação: H-18, H-19 e H-17, respectivamente (TABELA 4.32).

As substâncias **30** e **31** foram definidas como sendo ésteres derivado do ácido cinâmico, proveniente do metabolismo de carboidratos via ácido chiquímico, que sofreram algumas modificações biogénéticas, sumarizadas no ESQUEMA 4.18.



ESQUEMA 4.18: Proposta biogénica para as substâncias **30** e **31** (adaptada de DEWICK, 2001)

TABELA 4.32 – Dados de RMN¹H de **31**

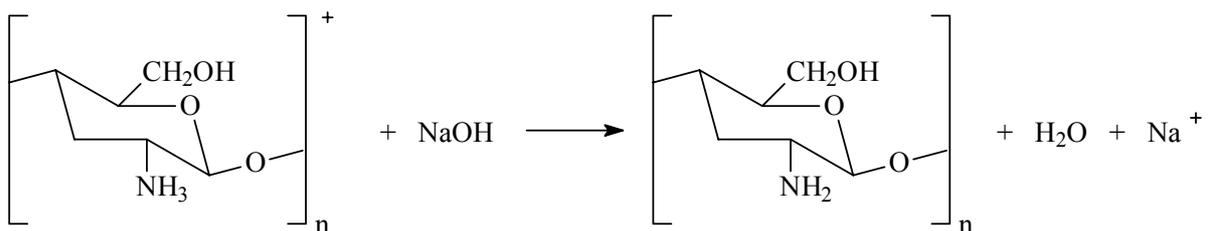
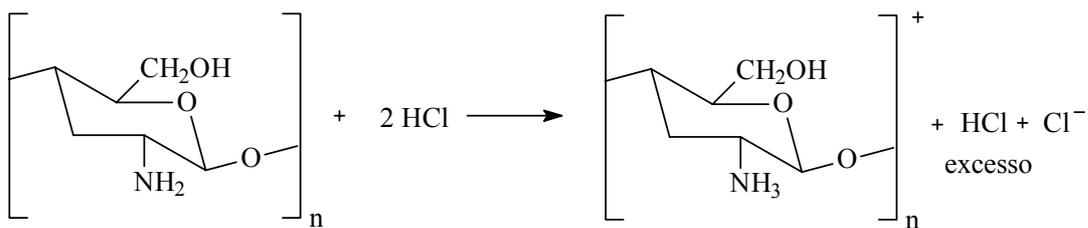
H	31
8	6.30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16 Hz)
7	7.64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16 Hz)
2	7.05 (<i>s</i>)
5	6.85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)
6	7.07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)
3-OCH ₃	3,90 (<i>s</i>)
4-OCH ₃	3,80 (<i>s</i>)
1'	4.65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)
2'	5.50 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)
4' e 5'	2.08 (<i>m</i>)
6'	5.07 (<i>t</i>)
8'-CH ₃	1.59 (<i>s</i>)*
10'-CH ₃	1.66 (<i>s</i>)*
9'-CH ₃	1,73 (<i>s</i>)*

*valores intercambiáveis

4.9 - Caracterização da quitosana

4.9.1 – Grau de desacetilação da quitosana (% $\overline{\text{GD}}$)

O grau de desacetilação da quitosana foi verificado através de uma titulação condutimétrica, realizada em triplicata, onde a uma solução de quitosana acidificada com HCl em excesso foi adicionada NaOH. A FIGURA 4.100 representa o protótipo da curva de titulação, sendo que, a curva apresentou dois pontos de inflexão, onde o primeiro representa o ponto de equivalência do excesso de ácido forte e o segundo, a forma ácida do polímero. A diferença entre esses pontos corresponde ao volume de base utilizada para neutralizar os grupos aminos livres. A reação ocorrida nessa titulação pôde ser representada pelas seguintes equações:



O grau médio de desacetilação (% $\overline{\text{GD}}$) foi calculado segundo a equação:

$$\% \overline{\text{GD}} = \frac{M \times (V_1 - V_2) \times 161 \times 100}{W}$$

Sendo:

M = molaridade da solução de NaOH

V_1 = volume de NaOH utilizado para neutralizar o excesso de HCl

V_2 = volume de NaOH utilizado para neutralizar a quitosana protonada

W = massa da amostra utilizada para a titulação

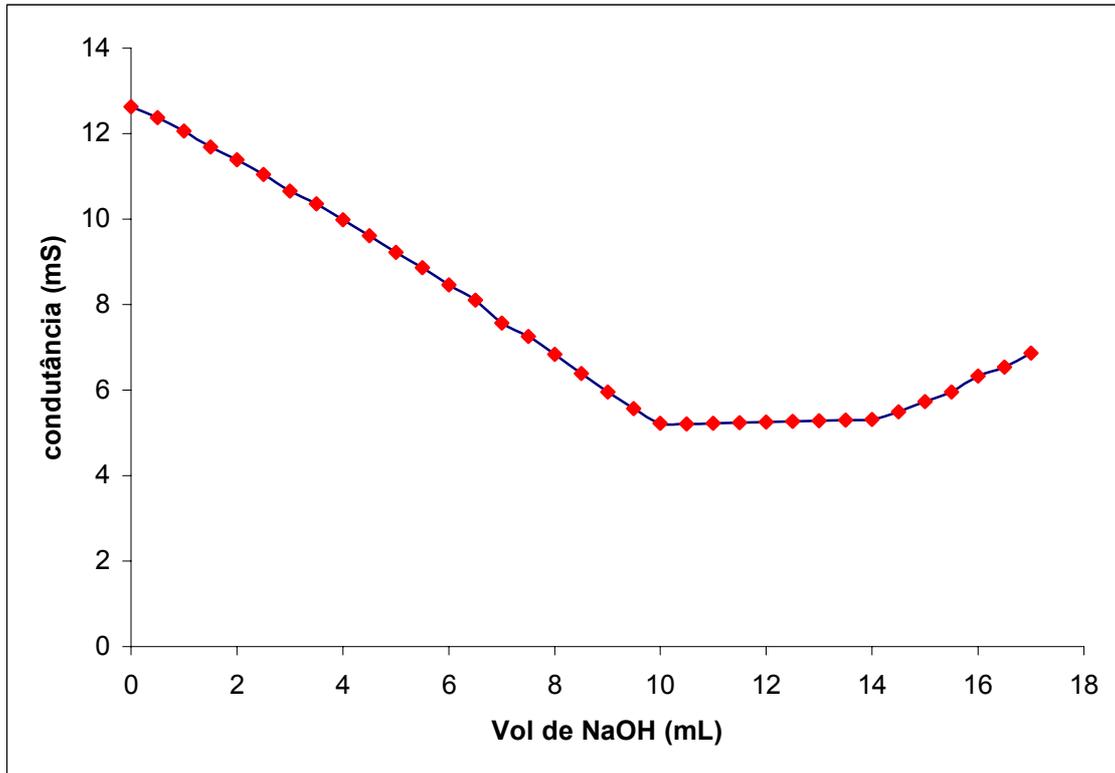


FIGURA 4.100 – Curva da titulação condutimétrica da quitosana.

Foi obtido para a quitosana testada $\overline{\% \text{GD}} = 66,7 \%$, significando que em 200 mg da amostra de quitosana, 66,7 % delas estão com os grupos aminos livres, ou seja, que 33,3 % dos grupos aminos se encontram acetilados, sendo este a $\overline{\% \text{GA}}$.

4.9.2 – RMN¹³C da quitosana

Através do experimento de RMN¹³C da quitosana (FIGURA 4.101) pôde-se observar a presença do carbono anomérico C-1 em aproximadamente δ 98,0. Os sinais em δ 60,1 e δ 70,5 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-3, respectivamente, sendo o sinal em δ 60,1, característico de carbono de álcool primário. Os sinais em δ 76,5, δ 75,0 e δ 56,0 foram atribuídos aos carbonos C-4, C-5 e C-2, respectivamente.

Os sinais com deslocamento químico em 180,1 δ e 22,5 δ estão relacionados ao carbono carbonílico e ao carbono metílico, sugerindo que a quitosana não se encontra totalmente desacetilada.

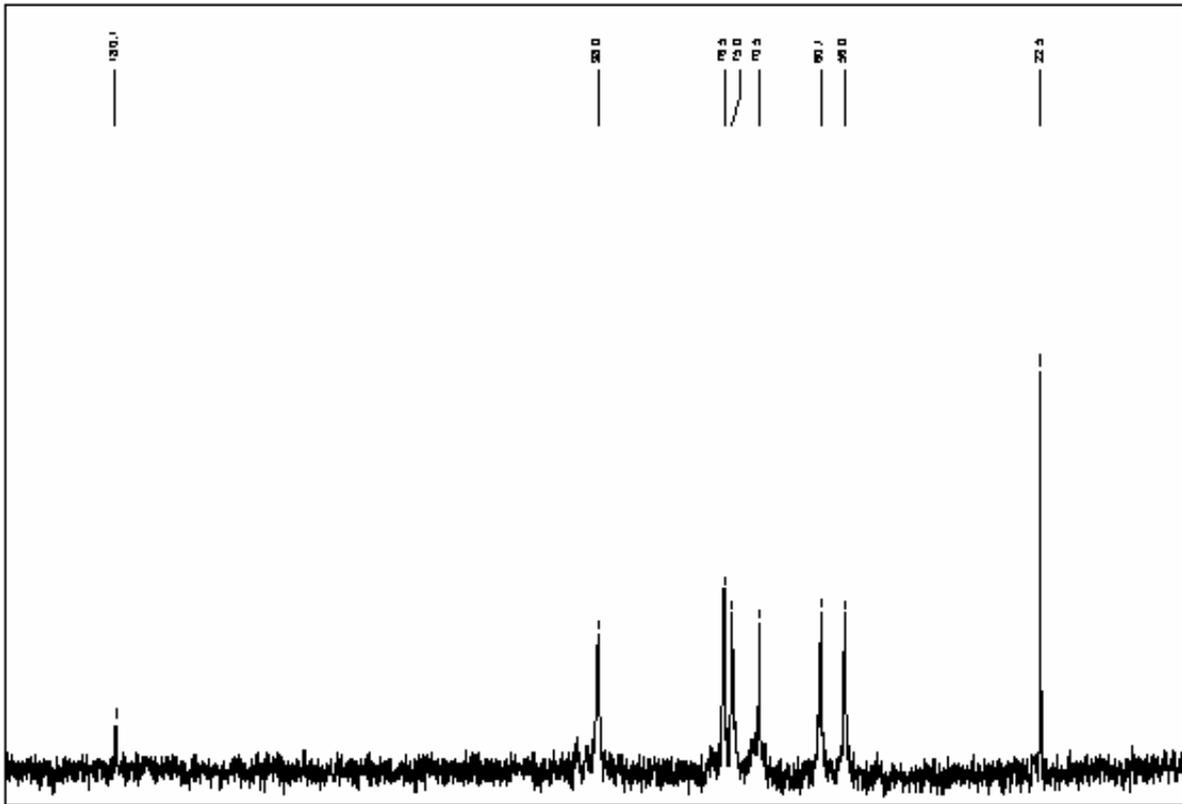
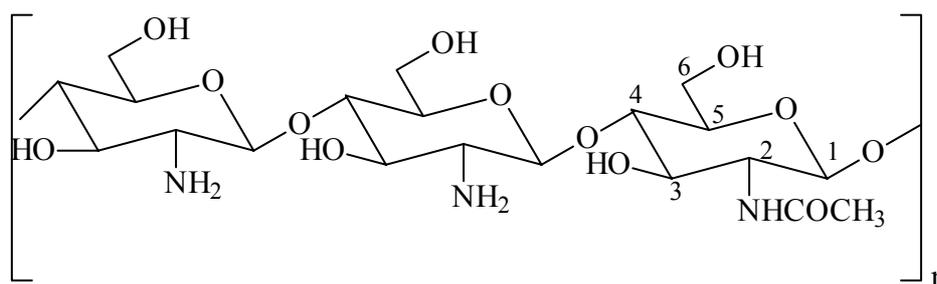


FIGURA 4.101 – Espectro de RMN ¹³C da quitosana (D₂O/HCl 1% v/v, 100 MHz)



Após a preparação das microesferas de quitosana através do processo de coacervação de fases, foi realizada análise da porosimetria das partículas formadas e posteriormente experimento de MEV para verificar a morfologia das mesmas.

Uma vez verificado que as partículas formadas possuíam poros, o mesmo procedimento para a obtenção das microesferas foi realizado incorporando uma flavona comercial no processo de coacervação de fases no qual foi verificado através de experimento de RMN¹H que a mesma não teve sua estrutura modificada.

4.9.3 – Porosimetria de Mercúrio

A análise de volume acumulado por grama de microesfera em função da distribuição do tamanho dos poros revelou que o tamanho médio dos poros é de 1.063 Å. A existência de poros facilitará a entrada e posteriormente a liberação da substância ativa.

4.9.4 – Espectroscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

A FIGURA 4.102 ilustra a fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura com aumento de 50x, mostrando um diâmetro médio de 1,43 (+- 0,20) mm, que foi determinado a partir da média de três esferas, utilizando-se as medidas dos diâmetros nos eixos vertical e horizontal de cada esfera.

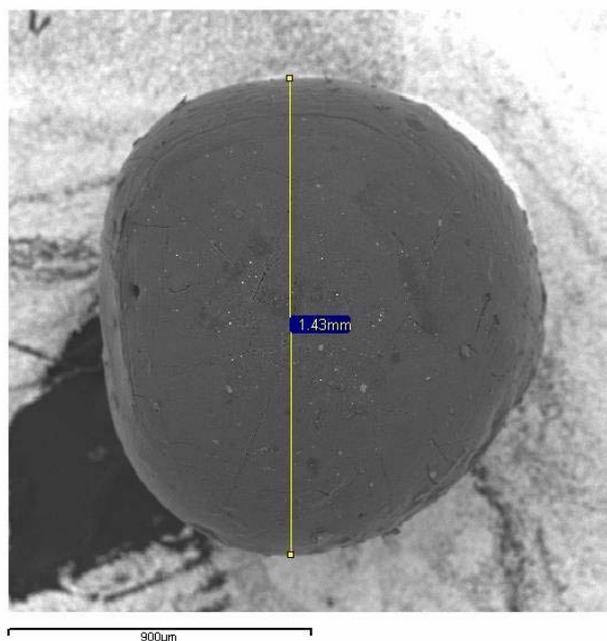


FIGURA 4.102 – Imagens de MEV das esferas de quitosana com aumento de 50x

Observou-se a presença de poros na superfície da esfera de quitosana (FIGURA 4.103) fotomicrografada com aumento de 3.000x. A presença destes poros, no processo de microencapsulamento das substâncias, é de extrema importância, pois indica que a substância pode ser incorporada às esferas e ser facilmente liberada posteriormente.

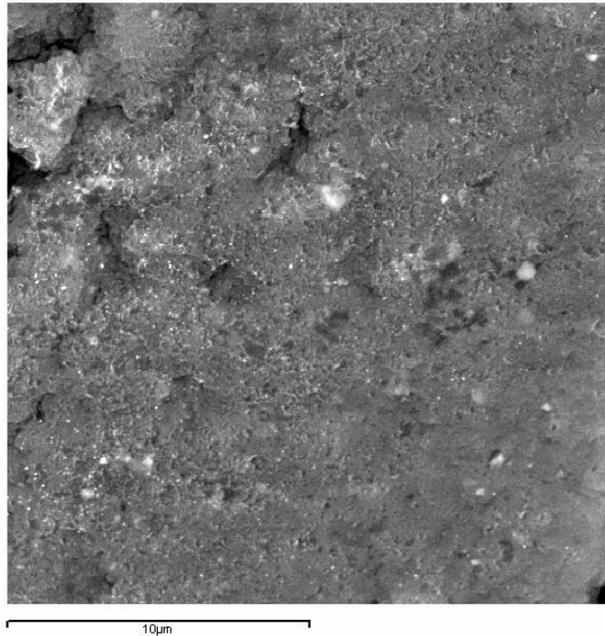


FIGURA 4.103 – Imagens de MEV das esferas de quitosana com aumento de 3000x

O uso do agente reticulante bifuncional glutaraldeído serviu para inibir a solubilização através da formação de bases de Schiff com os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero. A reticulação das esferas de quitosana com glutaraldeído fez com que elas ganhassem uma camada protetora, dando maior resistência às esferas, conforme mencionado no Item 1.2.1.

O trabalho realizado permitiu a obtenção de esferas com propriedades adequadas para o processo de microencapsulamento, porém o tamanho das partículas obtidas não atingiu o esperado, ou seja, não foram obtidas microcápsulas (100 a 1000µm). Como o diâmetro das partículas é dependente do processo utilizado, faz-se necessário à utilização de uma nova metodologia para obtenção de partículas menores.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5 – Atividades Biológicas

5.1 - Ensaio por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Analisando os resultados obtidos das atividades dos extratos de *H. puberula* e *S. versicolor* nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras (TABELA 5.1), observou-se que, com exceção dos extratos hexânico das folhas (SVFH), do caule (SVCH) e dos galhos (SVGH) os demais extratos de *S. versicolor* apresentaram atividade inseticida significativa nos ensaios com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Estes resultados podem ser facilmente visualizados nos gráficos de curva de sobrevivência das formigas cortadeiras representados nas FIGURAS 5.1, 5.2 e 5.3, que foram agrupadas com o intuito de se comparar os mesmos extratos (hexânico, diclorometânico e metanólico), mas de partes diferentes da planta.

Todos os extratos de *H. puberula* apresentaram atividade inseticida significativa nos ensaios realizados com *A. sexdens rubropilosa*, onde, comparando-se as curvas referentes aos extratos ensaiados, diferenciaram-se da curva referente ao controle, como apresentados nas FIGURAS 5.4, 5.5 e 5.6.

TABELA 5.1 – Efeito dos extratos de *S. versicolor* e *H. puberula* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Parte Vegetal	Extrato	S ₅₀	S ₅₀ controle
Folhas	SVFH	16	16
	SVFD	10 ^d	16
	SVFM	7 ^d	16
	HPFH	4 ^d	23
	HPFD	6 ^d	23
	HPFM	16 ^d	23
Galhos	SVGH	14	16
	SVGD	7 ^d	16
	SVGM	8 ^d	16
	HPGH	6 ^d	23
	HPGD	7 ^d	23
	HPGM	5 ^d	23
Caule	SVCH	15	16
	SVCD	9 ^d	16
	SVCM	6 ^d	16
	HPCH	4 ^d	23
	HPCD	6 ^d	23
	HPCM	16 ^d	23

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol

S₅₀ = sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

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

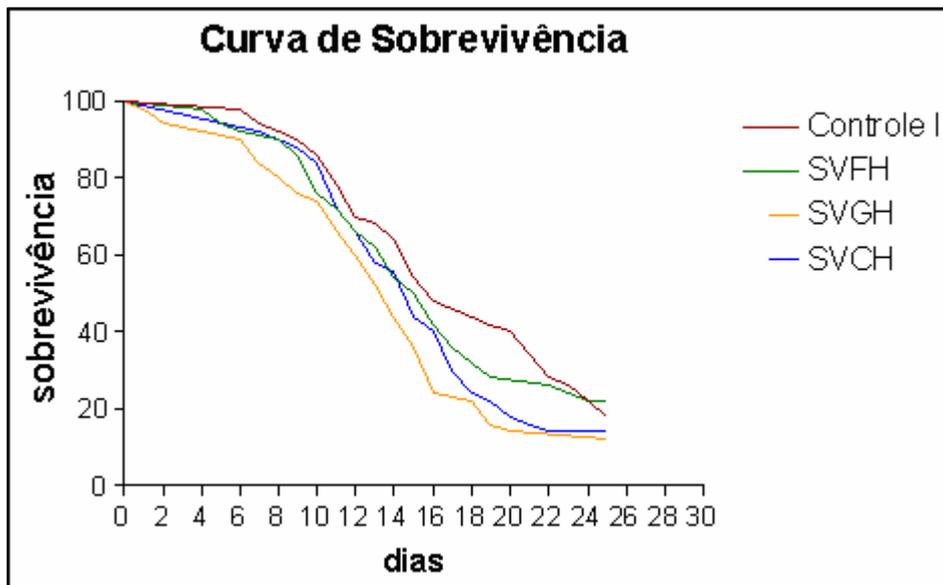


FIGURA 5.1 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos hexânicos das folhas, galhos e caule de *S. versicolor*

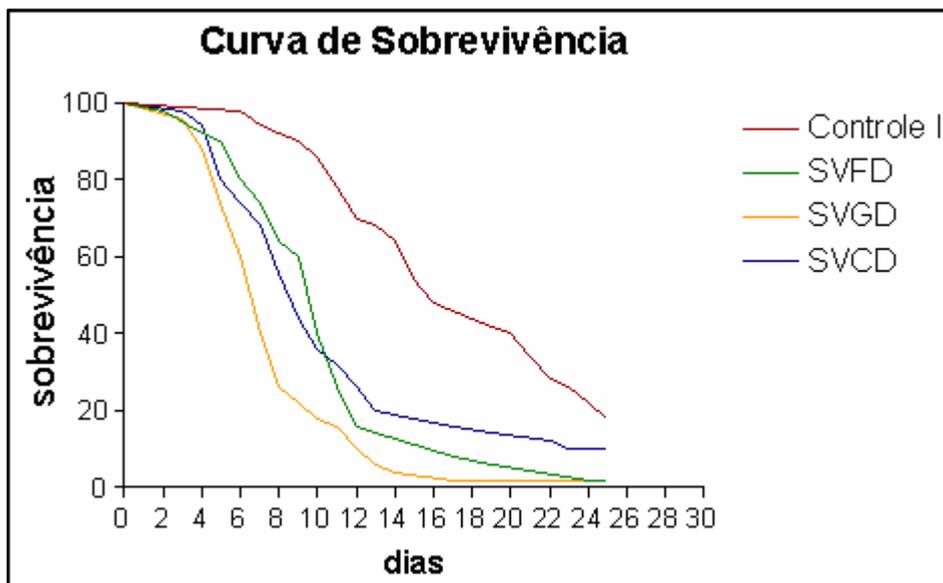


FIGURA 5.2 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos diclorometânicos das folhas, galhos e caule de *S. versicolor*

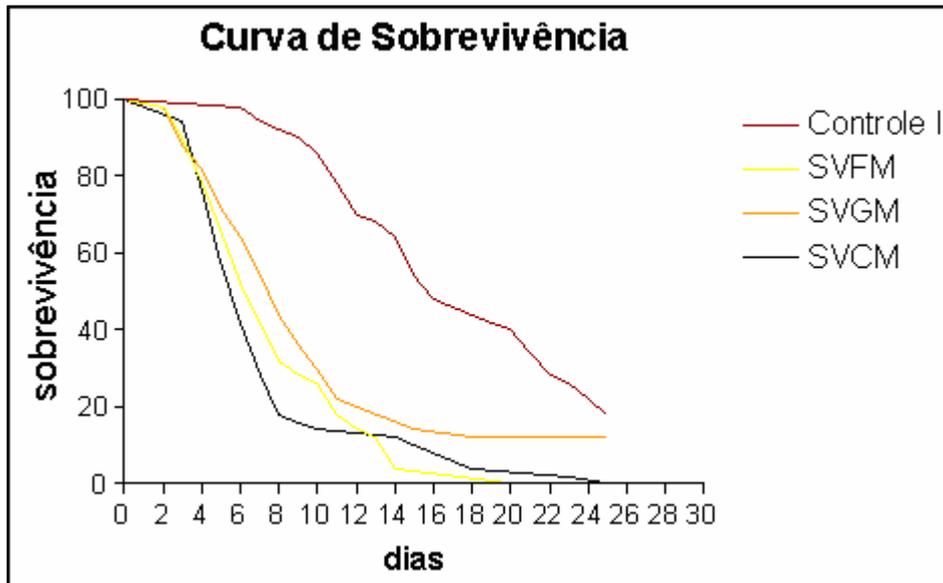


FIGURA 5.3 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos metanólicos das folhas, galhos e caule de *S. versicolor*

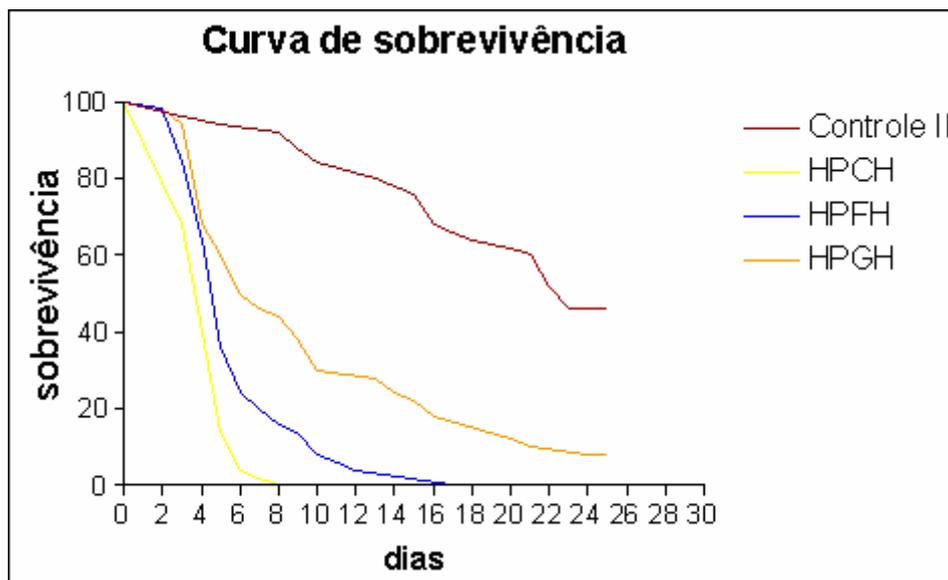


FIGURA 5.4 – Curva de sobrevivência das formigas cortadeiras, utilizando os extratos hexânicos das folhas, galhos e caule de *H. puberula*

dos extratos estão apresentados na TABELA 5.2. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste log-rank ($p < 0,05$).

TABELA 5.2 – Efeito das partições obtidas dos extratos metanólicos de *H. puberula* e *S. versicolor* nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras

Planta	Parte vegetal	Fração	Código	S ₅₀ *
<i>H. puberula</i>	caule	Hexânica	HPCMH	11
		Diclorometânica	HPCMD	9 ^d
		Acetato de etila	HPCMA	17
		hidroalcoólico	HPCMHid	17
	folhas	Hexânica	HPFMH	11
		Diclorometânica	HPFMD	7 ^d
		Acetato de etila	HPFMA	15
		hidroalcoólico	HPFMHid	17
	galhos	Hexânica	HPGMH	13
		Diclorometânica	HPGMD	10 ^d
		Acetato de etila	HPGMA	15
		hidroalcoólico	HPGMHid	15
<i>S. versicolor</i>	caule	Hexânica	SVCMH	10 ^d
		Diclorometânica	SVCMD	4 ^d
		Acetato de etila	SVCMA	4 ^d
		hidroalcoólico	SVCMHid	10 ^d
	folhas	Hexânica	SVFMH	16
		Diclorometânica	SVFMD	4 ^d
		Acetato de etila	SVFMA	9 ^d
		hidroalcoólico	SVFMHid	18
	galhos	Hexânica	SVG MH	11
		Diclorometânica	SVGMD	3 ^d
		Acetato de etila	SVGMA	7 ^d
		hidroalcoólico	SVG MHid	9 ^d

*controle = 18 dias

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*.; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol; A = acetato de etila; Hid = hidroalcoólico

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

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

5.2 – Atividade inibitória sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Os extratos brutos de *S. versicolor* e *H. puberula* foram utilizados para ensaios *in vitro* em relação ao crescimento do fungo simbiote das formigas cortadeiras. Todos os extratos foram ensaiados a concentração de 1000 µg/mL.

Na FIGURA 5.7, observou-se que, com exceção dos extratos SVFH, SVGH e SVCD, todos os demais extratos apresentaram atividade inibitória significativa no fungo *L. gongylophorus*, sendo os extratos SVFD, SVFM, SVCH e SVCM, os mais ativos, apresentando 100 % de inibição.

Na FIGURA 5.8 observou-se que os extratos HPFH, HPFD, HPFM, HPGH, HPGD, HPGM e HPCM de *H. puberula* foram os mais ativos, inibindo 100 % do desenvolvimento do fungo simbiote.

As frações HPCMH, SVCMHid, SVCMD, SVFMD, SVGMD, SVGMA e SVGMHid obtidas dos particionamentos dos extratos metanólicos de *H. puberula* e *S. versicolor* inibiram em 100 % o crescimento do fungo simbiote (TABELA 5.3).

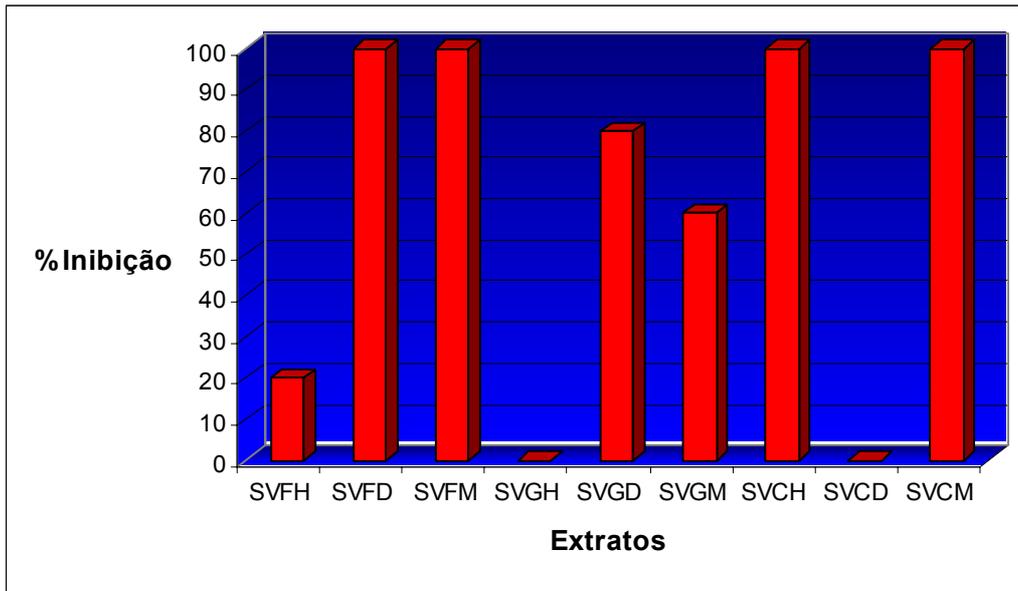


FIGURA 5.7 – Efeito dos extratos de *S. versicolor* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote [1000 μ g/mL]

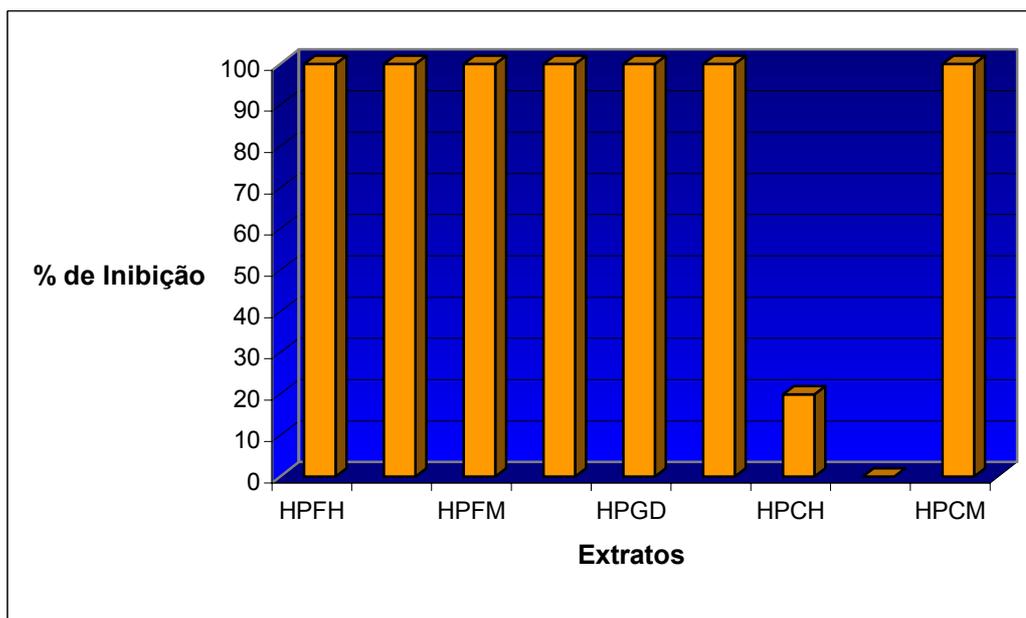


FIGURA 5.8 – Efeito dos extratos de *H. puberula* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote [1000 μ g/mL]

TABELA 5.3 – Efeito das partições obtidas dos extratos metanólicos de *H. puberula* e *S. versicolor* sobre o fungo simbionte

Planta	Parte vegetal	Fração	Código	% inibição
<i>H. puberula</i>	caule	Hexânica	HPCMH	100
		Diclorometânica	HPCMD	40
		Acetato de etila	HPCMA	80
		hidroalcoólico	HPCM Hid	60
	folhas	Hexânica	HPFMH	80
		Diclorometânica	HPFMD	80
		Acetato de etila	HPFMA	40
		hidroalcoólico	HPFM Hid	20
	galhos	Hexânica	HPGMH	60
		Diclorometânica	HPGMD	20
		Acetato de etila	HPGMA	20
		hidroalcoólico	HPGM Hid	40
<i>S. versicolor</i>	caule	Hexânica	SVCMH	20
		Diclorometânica	SVCMD	100
		Acetato de etila	SVCMA	60
		hidroalcoólico	SVCM Hid	100
	folhas	Hexânica	SVFMH	0
		Diclorometânica	SVFMD	100
		Acetato de etila	SVFMA	80
		hidroalcoólico	SVFM Hid	0
	galhos	Hexânica	SVG MH	40
		Diclorometânica	SVG MD	100
		Acetato de etila	SVG MA	100
		hidroalcoólico	SVG MHid	100

*concentração utilizada: 500 µg.mL⁻¹

*controle com e sem solvente: 0 % de inibição

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol; A = acetato de etila; Hid = hidroalcoólico

5.3 – Atividade inibitória frente às pectinases

Os extratos de *S. versicolor* e *H. puberula* foram submetidos a ensaios *in vitro* utilizando-se enzimas pectinases. Essas enzimas existem nas formigas cortadeiras e no seu fungo simbionte e são polissacaridases fúngicas necessárias para a degradação de polissacarídeos a mono e dissacarídeos que são parte da alimentação das formigas. Os resultados obtidos para os extratos, estão

representados na TABELA 5.4, onde os extratos diclorometânico dos galhos de *S. versicolor* (SVGD), os extratos hexânicos dos galhos e caules de *H. puberula* (HPGH e HPCH), foram os que apresentaram melhores resultados, inibindo em 96, 92 e 83 % a atividade enzimática. Segundo o teste estatístico Mann Whitney, o extrato metanólico dos galhos de *S. versicolor* (SVGGM) também pode ser considerado significativo. As frações provenientes dos extratos metanólicos de *H. puberula* não apresentaram bons resultados, mas as frações SVCMA, SVCMHid, SVFMHid, SVGMD, SVGMA e SVGMHid de *S. versicolor*, mostraram bons resultados.

TABELA 5.4 – Efeito dos extratos brutos de *S. versicolor* e *H. puberula* sobre a atividade de pectinase

Parte Vegetal	Extrato	Efeito (%)
Folhas	SVFH	-
	SVFD	-
	SVFM	-
	HPFH	-
	HPFD	-
	HPFM	-
Galhos	SVGH	-
	SVGD	96
	SVGGM	37*
	HPGH	92
	HPGD	-
	HPGM	-
Caule	SVCH	-
	SVCD	-
	SVCM	-
	HPCH	83
	HPCD	-
	HPCM	-

(*) extrato que apresentou inibição estatisticamente significativa segundo o teste Mann Whitney (95 %)

-: não apresentaram efeito significativo

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol

TABELA 5.5 – Atividade das partições obtidas dos extratos metanólicos de *H. puberula* e *S. versicolor* sobre a enzima pectinase

Planta	Parte vegetal	Partição	Código	% Efeito
<i>H. puberula</i>	caule	Hexânica	HPCMH	82
		Diclorometânica	HPCMD	85
		Acetato de etila	HPCMA	94
		hidroalcoólico	HPCMHid	86
	folhas	Hexânica	HPFMH	89
		Diclorometânica	HPFMD	-
		Acetato de etila	HPFMA	98
		hidroalcoólico	HPFMHid	-
	galhos	Hexânica	HPGMH	-
		Diclorometânica	HPGMD	90
		Acetato de etila	HPGMA	97
		hidroalcoólico	HPGMHid	98
<i>S. versicolor</i>	caule	Hexânica	SVCMH	72
		Diclorometânica	SVCMD	72
		Acetato de etila	SVCMA	20*
		hidroalcoólico	SVCMHid	15*
	folhas	Hexânica	SVFMH	88
		Diclorometânica	SVFMD	83
		Acetato de etila	SVFMA	40
		hidroalcoólico	SVFMHid	29*
	galhos	Hexânica	SVG MH	94
		Diclorometânica	SVGMD	31*
		Acetato de etila	SVGMA	6*
		hidroalcoólico	SVG MHid	6*

(*) frações que apresentaram inibição significativa segundo o teste Mann Whitney (95 %) ($p < 0,05$)

-: não apresentaram efeito significativo

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol; A = acetato de etila; Hid = hidroalcoólico

5.4 – Atividade das substâncias isoladas nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras, no fungo simbiote e nas enzimas pectinases

As substâncias puras isoladas em maiores quantidades foram submetidas aos ensaios biológicos por ingestão utilizando as formigas cortadeiras, o fungo *L. gongylophorus* e as enzimas pectinases (TABELA 5.6). Dentre as substâncias testadas, verificou-se que os esteróides **1** e **2**, triterpenos **6** e **7** e as cumarinas **23**, **24**, **26** e **27** não apresentaram efeito significativo nos modelos biológicos testados.

Os alcalóides do tipo furoquinolínicos **9** e **12**, apresentaram inibição de 100 % no crescimento do fungo simbiote . Já os alcalóides **10**, **11** e **13** apresentaram inibição de 80 % no crescimento dos mesmos. Analisando-se as estruturas dessas substâncias **9** – **13**, observou-se que os alcalóides não substituídos na posição C-8 são um pouco mais ativos para inibição do fungo. Os alcalóides **11** e **12**, também apresentaram bons resultados no ensaio com formigas cortadeiras, ocasionando uma sobrevivência mediana de 7 e 9 dias, respectivamente, num experimento de 23 dias (controle). As substâncias **9** e **13** também inibiram significativamente a atividade enzimática das pectinases. Sendo no geral, os alcalóides do tipo furoquinolínicos muito promissores para serem utilizados em iscas granuladas, uma vez que são muito comuns na família Rutaceae.

Os alcalóides do tipo cantin-6-ona **15** e **16** também encontrados com certa facilidade na família Simaroubaceae, apresentaram bons resultados nos ensaios por ingestão com as formigas cortadeiras e no ensaio com o fungo *L. gongylophorus*, ocasionando 100% de inibição no crescimento do fungo simbiote.

Os quassinóides **28** e **29** também apresentaram sobrevivência média de 10 dias, num experimento de 23 dias no controle de formigas cortadeiras,

sendo que o quassinóide **29** apresentou 80 % de inibição no crescimento do fungo simbiote.

A flavanona apresentou 80 % de inibição no desenvolvimento do fungo simbiote, esta substância já havia sido anteriormente testada por um aluno do grupo apresentando o mesmo resultado.

Foi observado que o triterpeno **5** provocou uma atividade estimulante no crescimento do fungo simbiote.

As demais substâncias testadas não apresentaram resultados satisfatórios nos modelos biológicos selecionados.

TABELA 5.6 – Efeito das substâncias puras nos ensaios por ingestão utilizando-se formigas cortadeiras, nos ensaios com o fungo simbiote e com as enzimas pectinases

substâncias	Extratos provenientes	S ₅₀ **	% inibição fungo simbiote*	% Efeito enzimático (0,7mg/mL)
Sitosterol (1)	HPGD/SVGMD/HPGH	23	0	◆
Sitostenona (2)	SVGMD/HPFH	23	0	◆
Eurileno (5)	SVCMD	-	#	◆
Lupeol (6)	HPFH	23	20	◆
Lupenona (7)	HPGH	16	0	◆
N-metil-4-metóxi-2-quinolona (8)	HPFH	-	80	96
Dictamina (9)	HPGH	10 ^d	100	100
δ-fagarina (10)	HPGH	19	80	◆
Kokusaginina (11)	HPFD	7 ^d	80	◆
Maculina (12)	HPGH	9 ^d	100	◆
Flindersiamina (13)	HPFD	18	80	94
4,5-dimetóxicantin-6-ona (15)	SVGMD	14 ^d	100	◆
5-metóxicantin-6-ona (16)	SVGMD	7 ^d	100	◆
7-hidróxicumarina (23)	SVCMD	-	0	◆
6,7-dimetóxicumarina (24)	SVCMD	-	0	◆
Glaucarubolona (28)	SVGMD	10 ^d	80	◆
Glaucarubinona (29)	SVCMD	10 ^d	80	◆
Flavanona (19)	SVFMD	-	80	◆
5,7,3',4',5'-pentametóxi-flavona (21)	SVFMD	-	0	◆
3-(1',1'-dimetilalil)cumarina (26)	HPCMH	-	0	◆
Metileter-graveliferona (27)	HPCMH	-	0	◆

*Controle positivo: 0% e Controle negativo (anfotericina ®) 10µg/mL: 20% concentração das substâncias puras.: 10µg/mL

**S₅₀ controle: 23 dias

-: substâncias não testadas

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

= ocasionou ativação no crescimento do fungo simbiote

◆ = não apresentaram resultados significativos

SV = *Simarouba versicolor*; HP = *Helietta puberula*; C = caule; G = galhos; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol; A = acetato de etila; Hid = hidroalcoólico

CONCLUSÕES

6 – Conclusões

O estudo fitoquímico de *H. puberula* (Rutaceae) e *S. versicolor* (Simaroubaceae), biomonitorado por ensaios biológicos nas formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*), no fungo simbionte (*Leucoagaricus gongylophorus*) e nas enzimas pectinases, permitiu o isolamento de 31 metabólitos secundários como os alcalóides do tipo furoquinólicos, acridônico, cantinônicos e β -carbolínicos; cumarinas; triterpenos; esteróides; flavonóides; derivados do ácido cinâmico e de quassinóides.

A ocorrência de quassinóides, triterpenos, flavonóides e alcalóides do tipo cantinônicos e β -carbolínicos em *S. versicolor*, já havia sido descrita em outros estudos com plantas da família Simaroubaceae sendo esta, uma característica marcante da mesma. Já o estudo fitoquímico realizado para *H. puberula* vem a contribuir para o conhecimento do gênero *Helietta*, pois poucos relatos existem na literatura sobre esta espécie. As substâncias como os alcalóides, cumarinas, esteróides e triterpenos, isoladas de *H. puberula* estão dentro do perfil químico da família Rutaceae.

Em concordância com as expectativas iniciais deste trabalho, os resultados dos ensaios biológicos com extratos e frações mostraram que as plantas selecionadas são bastante promissoras como fontes de compostos com potencial para novos estudos direcionados ao controle de formigas cortadeiras, pois com exceção dos extratos hexânico das folhas e do extrato hexânico do caule, os demais extratos de *S. versicolor* apresentaram atividade significativa frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e todos os extratos de *H. puberula* foram ativos frente às mesmas. Em relação aos extratos brutos de *S. versicolor*, com exceção dos extratos hexânico das folhas e galhos e do extrato diclorometânico do caule, os demais extratos inibiram totalmente o crescimento do fungo *L. gongylophorus*. Os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das folhas e dos galhos e o extrato metanólico do caule de *H. puberula* inibiram

em 100 % o desenvolvimento do fungo simbiote. Quanto ao efeito sobre a atividade enzimática, somente os extratos hexânico dos galhos e do caule de *H. puberula* e diclorometânico dos galhos de *S. versicolor* inibiram as enzimas pectinases.

Das substâncias isoladas das duas espécies estudadas, os alcalóides do tipo furoquinolínicos (**9 – 13**) e cantinônicos (**15 e 16**) e os quassinóides (**28 e 29**) foram os que apresentaram resultados mais promissores frente aos modelos biológicos selecionados, podendo futuramente serem objetos de estudos adicionais, para uma eventual utilização em iscas granuladas, pois são bastante comuns em suas famílias.

A atividade estimulante do crescimento do fungo *L. gongylophorus*, promovida pelo triterpeno **5**, é um resultado muito interessante, pois há a possibilidade de utilizar esse tipo de substância para reduzir o tempo utilizado para realização dos ensaios biológicos com o fungo simbiote.

Os resultados obtidos com a quitosana como matriz no processo de microencapsulamento de substâncias tóxicas, mostraram-se muito promissores, pois para sua decomposição e conseqüentemente liberação do material encapsulado ela requer meio ácido e elevada umidade, condições essas, presentes no interior do formigueiro, cujo pH varia em torno de 4 – 6 e possui umidade relativa de 90%, tornando-se muito viável a utilização dessa matriz. Sendo a quitosana uma substância de fácil obtenção, fácil manuseio e principalmente de baixo custo, torna-se viável um aprofundamento neste estudo com a finalidade de se obter partículas menores do que as obtidas deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – Referências Bibliográficas

- AHLUWALIA, V. K.; PRAKASH, C.; GUPTA, M. C. “Structures of isofraxetin, umckalin, arscotin and 7-geranyloxy-5-6-dimethoxycoumarin”. *Indian J. Chem.*, **16B**: 286-288, 1978
- ANDREO FILHO, N., OLIVEIRA, A.G. “Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos”. *Infarma*, **9**: 18-21, 1999
- ARRIAGA, A. M. C., MESQUITA, A. C., POULIQUEN, Y. B. M., LIMA, R. A., CAVALCANTE, S. J., CARVALHO, M. G., SIQUEIRA, J. A., ALEGRIO, L. V., BRAZ-FILHO, R., “Chemical constituents of *Simarouba versicolor*”. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **74** (3): 415-424, 2002
- ARRUDA, M.S.P., Constituintes Químicos de *Zanthoxylum acutifolium* e *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1990. Tese de doutorado, 215p
- ASAKO, H., HISASHI, O., AKIO, N., “Determination of degree of Deacetylation of Chitosan by H^1 NMR Spectroscopy”. *Pol. Bull.*, **26**: 87-94, 1991
- AYAFOR, J.F.; NGADJUI, B.T.; SONDEGAM, B.L.; TSAMO, E. “A contribution to the Phytochemistry of *Zanthoxylum tessmannii*” *Planta Medica* **50**(3): 210-212, 1984
- BENTO, J.M.S. & DELLA LÚCIA, T.M.C. “Acabar com a saúva sem acabar com o Brasil”. *Ciência Hoje*, **15**: 48, 1993
- BERGENTHAL, D., RÓZSA, Z., MESTER, I. und REISCH, J. “Beitrag zur ^{13}C -NMR-Spektroskopie von Rutaceen-Cumarinen”. *Arch. Pharm.* (Weinheim) **311**: 1026-1029, 1978
- BERGENTHAL, D.; MESTER, I.; RÓZSA, Z. S.; REISCH, J. “C-NMR-Spektren Einiger Acridon-Alkaloide”. *Phytochemistry* **18**: 161-163, 1979
- BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L.C & NAKANO, O. “Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura”. IN: Formigas Cortadeiras e Cupins. Piracicaba, FEALQ, 1992. p. 631-671
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. “Perspectivas no controle de formigas cortadeiras”. *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997
- BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. & SILVA, O.A. “Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial. *An.Soc. Entomol. Brasil.*, **26**: 107, 1997
- CHANG, P. and LEE, K. H. “Cytotoxic antileukemic anthraquinones from *Morinda pavifolia*”. *Phytochemistry*, **23**: 1737, 1984
- CHERRET, J.M. “History of the Leaf-cutting Ant Problems”. IN: *Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management*. LOFGREN, C.S. & VANDER MEER, R., K. (Eds). Boulder, Westview Press, 1986. p. 10-17
- CORDELL, G. A. “Introduction to Alkaloids – A Biogenetic Approach”.

- New York: John Willey & Sons, 1981. 1055 p.
- DEWICK, P. M. "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach". New York: John Wiley & Sons, 2ª ed., 2001, 507 p.
- DONBROW, M. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy. Boca Raton: CRC Press, 1-13, 1991
- FARJI-BRENNER, A.G.F. & RUGGIERO, A. "Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes". *J. Biogeography*, **21**(4): 391-399, 1994
- FISHER, P.J.; STRADLING, D.J. & PEGLER, D.N. "Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*". *Mycologist.*, **8**: 128, 1994
- FRASER, A. W. & LEWIS, J. R. "Flavonoids from *Merrilia caloxylon*". *Phytochemistry*, **13**(8): 1561-1564, 1974
- GAMBOA, T. P. R., Estudo químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoea batatas* em associação ao controle de formigas cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química UFSCar, 2001, Tese de Doutorado. 269p.
- GOLOUBKOVA, T.D., HECKLER, E., RATES, S.M.K., HENRIQUES, J.A.P. "Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiates the hypnotic action of pentobarbital". *J. Ethnopharm.* **60**: 141-148, 1998
- HALL, I.L.; LEE, K.H.; IMAKURA, Y.; OKANO, M.; JOHNSON, A.; "Antiinflammatory agents III. Structure-activity relationships of brusatol and related quassinoids", *J. Pharm. Sci.* **72**: 1282-1284, 1983
- HOWARD, J.J. & WIEMER, D.F. "Chemical Ecology of Host Plant by the Leaf-cutting Ant *Atta cephalotes*". IN: *Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management*. LOFGREN, C. C. & VANDER MEER, R., K., (Eds.). Londres, Westview Press, 1986. cap. 22, p. 260-273
- JANUÁRIO, A. H. *Estudo Fitoquímico de Esenbeckia grandiflora e Almeidaa rubra* (Rutaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de Doutorado
- JOSHI, K. C.; BANSAL, R. K. & SINGH, P. "Mass & NMR Spectral Studies of Sitost-4-en-3-one from *Tabebuia rósea* DC". *Indian j. Chem.*, **12**: 903-904, 1974
- JUSTI-JUNIOR, J., IMENES, S. DE LAMONICA, BERGAMANN, E.C., CAMPOS-FARINHA, A.E. DE.; ZORZENON, F.J. "Formigas Cortadeiras". *Boletim Técnico*. Instituto Biológico, São Paulo, **4**: 5-31, 1996
- KAZUHIRO, IL, YOSHIHARU, M., TAKANORI, S. TSUNEJI, N. "Sustained Release Tablets Based on Chitosan and Carboxymethylcellulose Sodium". *Drug Design and Delivery*, **1**: 297-306, 1987

- KINGSBURY, C. A. & LOOKER, J. H. "Carbon-13 spectra of methoxyflavones". *J. Org. Chem.*, **40**(8): 1120-1124, 1975
- KONG, L. Y.; LI, Y.; MIN, Z. D.; ZHU, T. R. "Coumarins from *Peucedanum praeruptorum*". *Phytochemistry*, **41**(5): 1423-1426, 1996
- LEITE, A. C., "Estudo químico de *Sesamum indicum* e *Ricinus communis* Relacionado ao controle de formigas cortadeiras". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2000. Dissertação de mestrado. 92p.
- LEITE, A. C., "Estudo químico e atividades biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado. 329 p.
- LEITE, C.W., TELAROLLI JUNIOR, R. "Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Tuberculose". *Rev. Ciênc. Farm.*, **18** (1): 17-28, 1997
- LIANG, G. Y., GRAY, A. I., PATALINGHUA, W. C.; SKELTON, B. W., WATERMAN, P. G. & WHITE, A. H. "Chemistry of Burseraceae, X-ray diffraction studies on some klaineana tirucall-7-ene triterpenes from *Aucoumea klaineana* (Burseraceae)". *Aust. J. Chem.*, **42**: 1169, 1989
- LOECK, A.E. & NAKANO, O. "Efeito de nova substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigatta* (Smith, 1858) (Hymenoptera – Formicidae)". *O Solo*, **1**: 25-30, 1984
- MAFEZOLI, J. *Atividade Tripanocida e Antimicrobiana de Plantas da Família Rutaceae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de Doutorado
- MAHATO, B. S. and KUNDU, A.P., "¹³CNMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and some salient features". *Phytochemistry*, **37** (6): 1517-1575, 1994
- MATHUR, N. K. and NARANG, C. K., "Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals". *J. Chem. Educ.*, **67** (11): 938-924, 1990
- MESTER, I. "Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales". IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). New York: Academic Press, 1983, p. 31-96
- MILLER, G. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.* **31**: 426, 1959
- MIYASE, T.; FUKUSHIMA, S. and AKIYAMA, Y. "Studies on the constituents of *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz". *Chem.Pharm.Bull* **32**(8): 3267-3270, 1983
- MORON, J.; POLONSKY, J. Sur L'origine triterpenique des constituants amers des Simaroubacées. *Tetrahedron Letters* **4**: 385, 1968
- MUZZARELLI, R.A.A. Chitin, 1ª ed. New York: Pergamon Press, 1977, p.253
- NAYAR, M.N.S.; SUTAR, C.V.; BHAN, M.K. "Alkaloids of the stem bark

- of *Hesperethysa crenulata*". *Phytochemistry*, **10**: 2843-2844, 1971
- OHMOTO, T.; KOIKE, K. "Canthin-6-one alkaloids". *The Alkaloids*. New York: Academic Press, 1989, p.135-170
- OHTSUBO, T.; TSUDA, S. & TSUJI, K. "A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules". *Polymer*, **32**, 2395-2399, 1991
- OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., BUENO, J.H.F., EVANGELISTA, R.C. "Micro e nanocápsulas: Um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados". *Rev. Ciênc. Farm.*, **9**: 18-21, 1999
- PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. & SILVA, O. A. "Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves". *Bull. Entomol. Res.*, **80**: 349, 1990
- PAULA, J. R. de. Estudo Fitoquímico do enxerto de *Cedrela odorata* sobre *Toona ciliata* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de doutorado, 1996, 331 p.
- PAULINI, H., WAIBEL, R. and SCHIMMER, O. "Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae". *Mutation Research*, **277**: 179-186, 1989
- PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. "The Carbonon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Flavonoids and Related Compounds". *J. C. S. Perkin I*, **23**: 2475-2483, 1976
- PIRANI, J.R.; "A revision of *Helietta* and *Balfourodendron*". *Brittonia*, **50(3)**: 348-380, 1998
- PUSSET, J.; LOPEZ, J.L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M.A.; VEILLON, J.M. "Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*". *Planta Medica*. **57**: 153-155, 1991
- ROBERTSON, A.V. "The proton magnetic resonance of furoquinoline alkaloids and related compounds". *Aust. J. Chem.* **16**: 451-458, 1963
- RODIONOVA, N.A. & BEZBORODOV, A.M. "Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (Review)". *Appl. Biochem. Microb.*, **33**: 415, 1997
- RODRIGUES-FILHO, E.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; ZUKERMAN-SCHEPECTOR, J.; CORREA, R.M.O.; NASCIMENTO, S.C.; THOMAS, W. "Protolimonoïds and quassinoid from *Picrolemma granatensis*". *Phytochemistry* **43** (4): 857-862, 1996
- RODRIGUES-FILHO, E. Constituintes químicos de *Picrolemma granatensis*, *Simarouba tulae* e *Simaba cuneata* (Simaroubaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1992. Tese de Doutorado. 221p.
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. "Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications". *Advances in Applied Microbiology*, **39**: 213, 1993

- SANTOS, D.A.P. DOS. Busca de metabólitos bioativos em plantas da família Bignoniaceae e Rutaceae contra parasitas causadores de doenças tropicais. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado. 231p.
- SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G.; “Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **13** (4): 242-249, 2003
- SCHENEIDER, M. DE OLIVEIRA. “Observações sobre os comportamentos envolvidos no cuidado da cria da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)”. Rio Claro, Instituto de Biociências – UNESP, 2003. Dissertação de Mestrado. 74 p.
- SIEGL, S. *Non parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, MacGraw – still, New York, 1956
- SIGNINI, R. & CAMPANA-FILHO, S.P.” On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride”. *Polymer. Bulletin*, **42** (2): 159-166, 1999
- SILVA, A. *Participação do fungo Leucocoprinus gongylophorus na Produção de Enzimas Intestinais da Formiga Atta sexdens*. Rio Claro, Instituto de Biociências – UNESP, 1999. Dissertação de Mestrado. 104 p.
- SILVA, M.F. DAS G.F. DA, GOTTLIEB, O.R., EHRENDORFER, F. “Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family”. *Plant Syst. Evol.*, **161**: 97-134, 1988
- SINGER, R. “The Agaricales in Modern Taxonomy”, 4^a ed. Loenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986, p. 477
- SIQUEIRA, C.G. *Identificação das Pectinases Predominantes em Ninhos de Formigas Atta sexdens (L)*. Rio Claro, Instituto de Biociências – UNESP, 2002. Tese de Doutorado. 150 p.
- SIQUEIRA, C.G.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. & HEBLING, M.F.A. “Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L.”. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4820, 1998
- SOLOMONS, T. W. G. “Química Orgânica 2”, 6^a ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, RJ, 1996, p. 417
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. “Chemistry and uses of pectin – A Review”. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **37**: 47, 1997
- VASCONCELOS, J. M. J., SILVA, A.M.S., CAVALEIRO, J. A. S., “Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*”. *Phytochemistry*, **49**(5): 1421-1424, 1998

- VIEIRA, I. J. C. *Uma contribuição à química da família Simaroubaceae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de Doutorado
- WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. *Chemistry And Chemical Taxonomy of Rutales*. Annual Proceedings of the Phytochemical society of Europe Number 22. Academic Press, 1983, p. 68
- WATERMAN, P. G. “The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer”. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27** (4): 395-406, 1999
- WATERMAN, P. G. and AMPOFO, S. A. “Cytotoxic Quassinoids from *Odyendyea gabonensis* stem bark: Isolation and High-field RMN”. *Planta Medica*, **50**(3): 261-263, 1984
- WATERMAN, P.G. “The chemical systematic of alkaloids: a review emphanzing the contribution of Robert Hegnauer”. *Biochem. Syst. Encol.*, **27**: 395-406, 1999