

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



**ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS COM ATIVIDADE
SOBRE INSETOS SOCIAIS**

Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida*

**Tese apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS
(área de concentração
QUÍMICA ORGÂNICA).**

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes.

***Bolsista: CNPq**

São Carlos – SP

2007

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

**ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS COM ATIVIDADE
SOBRE INSETOS SOCIAIS**

Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS (área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA).

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes.

***Bolsista: CNPq**

São Carlos – SP

2007

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

A447eq

Almeida, Sheylla Susan Moreira da Silva de.

Estudo químico de plantas com atividades sobre insetos sociais / Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

284 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Produtos naturais. 2. Formiga. 3. Abelha. 4. Inseticidas vegetais. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o Exame de Tese de Doutorado da candidata **Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida** realizado em 05/12/2007:*

Prof. Dr. João Batista Fernandes (Orientador)

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Prof. Dr. Osmar Malaspina

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Prof^a. Dr^a. Quezia Bezerra Cass

*Dedico esta Tese à minha querida e amada mãe Fátima,
por todo seu carinho, amor, dedicação, amizade, pela
paciência e a cima de tudo por ter proporcionado tudo
que hoje sou. Exemplo de mulher, fonte de pureza e
justiça. Mãe te amo.*

“... todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade.

... não se curvem às críticas insensatas, descomedidas, de pessoas que nem sempre têm a consciência do seu momento.

Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão, sempre, vencedores”.

M. Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda graça e ensinamento, proporcionando as condições necessárias para o êxito do trabalho desenvolvido.

Ao professor Dr. João Batista Fernandes, pelo apoio, incentivo, confiança e por seus ensinamentos indispensáveis em minha formação.

A UFSCar pela oportunidade e acolhimento.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos pela estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais, e dos demais do departamento de Química, pela disponibilidade em me auxiliar e pela dedicação exemplar ao trabalho científico.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP de Rio Claro - SP, pela realização dos testes biológicos e aos pesquisadores Cynthia, Roberta e Tiago pela contribuição na realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Marisa Narciso Fernandes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Biologia da UFSCar pelos ensaios de toxicidade em peixes modelos.

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck e seus alunos, os mestrandos Fábio Renato Pereira e Eli Fernando Pimenta do IQSC – USP de São Carlos, pela realização dos experimentos de LC-UV-MS, enorme contribuição com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças do IQSC – USP de São Carlos pela disponibilidade do equipamento de GC-MS, contribuindo com este trabalho.

Aos amigos Fábio de Oliveira e Fabiana Asano pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Produtos Naturais Alan (gxa), Alessandra (Lê), Andréia, André (Titi), Bárbara (Babi), Cristiane (Cris), Juliana Feijó, Juliana Munaretti, Lia, Marsele, Paulinha, Pat Loira, Simoni, Richelli, Tati Albarici, Tati Bondanci, Uir, Vanessa e Waldireni, pela convivência.

Aos amigos dos demais Laboratórios e do Departamento de Química, não poderia nomeá-los sem deixar alguém de fora.

Aos amigos Priscila e Alex, pela amizade, carinho, compreensão e excelente convivência.

Ao amigo Emerson, pelo companheirismo, carinho, compreensão e por todos os momentos alegres e agradáveis que passamos juntos.

As minhas estimáveis amigas Aline, Érida, Joana Luiza, Karina Santos, Kíria e Rafaela, por terem proporcionado os momentos maravilhosos que passei em São Carlos, pela grande afeição e apreço.

A minha querida amiga de todas as horas, tristes e felizes, Patrícia Verardi, pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação, paciência, compreensão, conselho, ajuda, apoio constante, por me deixar fazer parte de sua vida e tudo isso de tão maravilhoso que uma grande e verdadeira amizade tem, te amo.

A toda minha família, em especial, meu pai Rodrigo, minha mãe Fátima, meus irmãos Richardson, Rodrigo Jr., Rafael e Elias, pelo amor, carinho, amizade e paciência. Minha grande e eterna fonte de inspiração, fonte de carinho, fonte de honestidade, razão pelo o qual eu vivo.

A meus sobrinhos e sobrinhas, Victória, Victor, Alice, Vinícius e Rodriguinho, fonte de eterna alegria e amor, por proporcionarem o prazer de viver.

A todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	I
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Fluxogramas.....	IX
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	X
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL.....	2
1.2 – FORMIGAS CORTADEIRAS E SEU FUNGO SIMBIONTE.....	5
1.2.1 - Simbiose entre fungo e formigas.....	7
1.3 – ABELHAS SOCIAIS.....	11
1.4 – PEIXE MODELO PARA TESTE DE TOXICIDADE AQUÁTICA.....	17
1.5 – ESPÉCIES VEGETAIS.....	18
1.5.1 – <i>Stryphnodendron adstringens</i>	18
1.5.2 - <i>Dimorphandra mollis</i>	20
1.5.3 – <i>Helietta puberula</i>	21
2 – OBJETIVOS.....	23
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	25
3.1 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO FITOQUÍMICO.....	26
3.1.1 – EQUIPAMENTOS.....	26
3.1.2 – MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.....	29
3.1.2.1 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	29
3.1.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	29
3.1.2.3 – Cromatografia em Coluna de Vidro (CC).....	29
3.1.2.4 – Solventes.....	30
3.1.2.5 – Outros reagentes.....	30
3.1.2.6 - Procedimento de Reação.....	30
3.1.3 - MATERIAL BOTÂNICO.....	31
3.1.3.1 – <i>Dimorphandra mollis</i>	31
3.1.3.2 – <i>Stryphnodendron adstringens</i>	31
3.1.3.3 – <i>Helietta puberula</i>	31
3.1.4 – METODOLOGIA.....	32
3.1.4.1 – Obtenção dos Extratos Brutos.....	32
3.1.4.1.1 – Obtenção dos extratos brutos de <i>D. mollis</i>	32
3.1.4.1.2 – Obtenção dos extratos brutos de <i>S. adstringens</i>	34
3.1.4.1.3 – Obtenção dos extratos brutos de <i>H. puberula</i>	36
3.1.4.2 – Fracionamento Cromatográfico de <i>D. mollis</i>	36
3.1.4.2.1 – Fracionamento cromatográfico do cerne de <i>D. mollis</i>	36
3.1.4.2.2 – Fracionamento cromatográfico dos pedúnculos de <i>D. mollis</i>	38
3.1.4.2.3 – Fracionamento cromatográfico das inflorescências de <i>D. mollis</i>	39
3.1.4.3 – Fracionamento Cromatográfico de <i>S. adstringens</i>	40
3.1.4.3.1 – Fracionamento cromatográfico das inflorescências de <i>S. adstringens</i>	40
3.1.4.3.1.1 – Fracionamento cromatográfico do EBDI de <i>S. adstringens</i>	40
3.1.4.3.1.2 – Fracionamento cromatográfico do EBMI de <i>S. adstringens</i>	44
3.1.4.3.2 – Fracionamento cromatográfico dos pedúnculos de <i>S. adstringens</i>	45
3.1.4.3.2.1 – Fracionamento cromatográfico do EBDP de <i>S. adstringens</i>	45
3.1.4.3.2.2 – Fracionamento cromatográfico do EBMP de <i>S. adstringens</i>	48
3.1.4.4 – Fracionamento Cromatográfico de <i>H. puberula</i>	48
3.1.4.4.1 – Fracionamento cromatográfico do caule de <i>H. puberula</i>	48
3.1.4.4.1.1 – Fracionamento cromatográfico do EBMC de <i>H. puberula</i>	49

3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	51
3.2.1 – ATIVIDADE INSETICIDA.....	51
3.2.1.1 – Ensaio Inseticida Frente às Abelhas Sociais.....	51
3.2.1.1.1 – Obtenção das operárias.....	51
3.2.1.1.2 – Obtenção das larvas.....	51
3.2.1.1.3 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as operárias.....	52
3.2.1.1.4 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as larvas.....	52
3.2.1.2 – Ensaio Inseticida Frente às Formigas Cortadeiras.....	53
3.2.1.2.1 – Obtenção das formigas cortadeiras.....	53
3.2.1.2.2 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as operárias.....	53
3.2.1.3 – Ensaios Frente ao Fungo Simbionte.....	54
3.2.1.3.1 – Isolamento do fungo simbionte.....	54
3.2.1.3.2 – Preparação do meio de cultura e metodologia do ensaio para os fungos.....	54
3.2.1.4 – Ensaios Frente às Enzimas Pectinases.....	54
3.2.1.4.1 – Extração do fluído fecal das formigas.....	54
3.2.1.4.2 – Preparação do meio reacional e metodologia da atividade enzimática.....	55
3.2.1.5 – Ensaios de Toxicidade Frente ao Peixe Paulistinha.....	55
3.2.1.5.1 – Obtenção e manutenção dos peixes.....	55
3.2.1.5.2 – Metodologia do ensaio de toxicidade.....	56
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4.1 – ESTUDO FITOQUÍMICO: IDENTIFICAÇÕES E DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	58
4.1.1 – GENERALIDADES SOBRE FLAVONÓIDES.....	58
4.1.1.1 – Nomenclatura dos Flavonóides.....	58
4.1.1.1.1 – Nomenclatura Oficial (IUPAC, 1971).....	58
4.1.1.1.2 – Nomenclatura Usual.....	60
4.1.1.2 – Análise de Flavonóides por meio de RMN ¹ H.....	61
4.1.1.2.1 – Determinação do padrão de substituição do anel A e do anel B.....	61
4.1.1.3 – Espectrofotometria de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	68
4.1.1.3.1 – Espectro Geral de Flavonóides.....	69
4.2 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Dimorphandra mollis</i>.....	71
4.2.1 – Constituintes Químicos da Fração C₁ 2	72
4.2.2 – Constituintes Químicos da Fração C₁ 4	79
4.3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Stryphnodendron adstringens</i>.....	81
4.3.1 – Determinação Estrutural dos Constituintes do EBDI de <i>S. adstringens</i>	81
4.3.1.1 – Constituintes Químicos da Fração C₄ 1	82
4.3.1.2 – Constituintes Químicos da Fração C₄ 2	87
4.3.1.3 – Constituintes Químicos da Fração C₄ 3	97
4.3.1.4 – Constituintes Químicos da Fração C₄ 4	100
4.3.1.5 – Constituintes Químicos da Fração C₄ 5	105
4.3.1.5.1 – Constituintes Químicos da Coluna C₅ (Proveniente da Fração C₄ 5).....	105
4.3.1.5.1.1 – Constituintes Químicos da Fração C₅ 1	105
4.3.1.5.1.2 – Constituintes Químicos da Fração C₅ 2	107
4.3.1.5.1.3 – Constituintes Químicos da Fração C₅ 3	109
4.3.1.5.1.4 – Constituintes Químicos da Fração C₅ 4	112
4.3.1.5.2 – Constituintes Químicos da Coluna C₆ (Proveniente das Frações C₄ 6)..	114
4.3.1.5.2.1 – Constituintes Químicos da Fração C₆ 4	115
4.3.1.5.2.2 – Constituintes Químicos da Fração C₆ 11	117
4.3.1.5.2.3 – Constituintes Químicos da Fração C₆ 12	121
4.3.2 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBDP de <i>S. adstringens</i>	130
4.3.2.1 – Constituintes Químicos da Fração C₉ 1	130
4.3.2.2 – Constituintes Químicos da Fração C₉ 2, C₉ 3 e C₉ 4	132
4.3.2.3 – Constituintes Químicos das Frações C₉ 5-8 e da Fração C₉ 10	136

4.3.2.4 – Constituinte Químico da Fração C₉	137
4.3.3 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBMI de <i>S. adstringens</i>	142
4.3.3.1 – Constituintes Químicos da Fração C₇ 2	143
4.3.3.2 – Constituintes Químicos das Frações obtidas por HPLC.....	148
4.3.3.2.A - CLASSE I: Anéis A e B di-substituídos (Fração C₈ 3).....	153
4.3.3.2.B - CLASSE II: Anéis A di- e B tri-substituídos (Fração C₈ 5).....	158
4.3.3.2.C - CLASSE III: Anéis A tri- e B mono-substituídos (Fração C₁₅ 3).....	164
4.3.3.2.1 - Constituintes Químicos da Fração C₈ 9	174
4.3.3.2.2 - Constituintes Químicos da Fração C₈ 4	179
4.3.3.2.3 - Constituintes Químicos da Fração C₈ 2	189
4.3.3.2.4 - Constituintes Químicos da Fração C₈ 6	194
4.3.4 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBMP de <i>S. adstringens</i>	202
4.3.4.1 - Constituintes Químicos da Fração C₁₂ 3	202
4.3.4.2 - Constituintes Químicos da Fração C₁₂ 5	211
4.3.4.3 - Constituintes Químicos da Fração C₁₂ 7	219
4.3.4.4 - Constituintes Químicos da Fração C₁₂ 9	225
4.4 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	
DE <i>Helietta puberula</i>	231
4.4.1 – Determinação Estrutural dos Constituintes do Extrato Bruto Hexano do Caule (EBHC) de <i>H. puberula</i>	231
4.4.1.1 – Constituintes Químicos da Fração C₁₃ 2	231
4.4.1.2 - Constituintes Químicos da Fração C₁₃ 8	240
4.4.2 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBMC de <i>H. puberula</i>	248
4.5 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS	250
4.5.1 - ATIVIDADE INSETICIDA.....	250
4.5.1.1 – Atividade Inseticida de <i>S. adstringens</i> em Abelhas <i>A. mellifera</i> e <i>S. postica</i> ..	250
4.5.1.1.1 – Bioensaios com operárias.....	250
4.5.1.1.2 - Bioensaios com larvas.....	258
4.5.1.2 – Atividade Inseticida de <i>S. adstringens</i> em Formigas Cortadeiras, <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	260
4.5.1.2.1 – Bioensaios com operárias.....	260
4.5.1.3 – Atividade antifúngica de <i>S. adstringens</i> e <i>D. mollis</i> ao Fungo Simbionte <i>L. gongylophorus</i>	261
4.5.1.4 – Atividade Inibidora Enzimática.....	262
4.5.1.5 – Atividade Tóxica em Peixes.....	263
5- CONCLUSÕES.....	268
6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	271

Lista de Figuras

Figura 1 -	Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo <i>L. gongylophorus</i>	8
Figura 2 -	Aspectos microscópicos do fungo <i>L. gongylophorus</i> , o fungo simbiote de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> . (A) Estáfilas (setas) contrastando com hifas. (B) Estáfilas vista sob microscópio, cada esfera correspondendo a um gongilídeo.....	8
Figura 3 -	Operária media ingere a nova gota de líquido proctodeal com movimentos de sua glossa. A operária mínima mantém a estáfila em contato com a boca da larva.....	10
Figura 4 -	Operária média-pequena de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> carregando entre as mandíbulas, estáfila previamente mastigada, cuja parte líquida foi em grande parte sugada durante manuseio.....	11
Figura 5 -	Modelos de apiários racionais.....	11
Figura 6 -	Abelhas produtoras de mel em colméia racional.....	12
Figura 7 -	<i>Brachydanio rerio</i> em aquário ornamental.....	18
Figura 8 -	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	20
Figura 9 -	<i>Dimorphandra mollis</i>	21
Figura 10 -	<i>Helietta sp.</i>	22
Figura 11 -	Procedimento para obtenção dos extratos brutos.....	33
Figura 12 -	Sistema benzopirânico.....	58
Figura 13 -	Nomenclatura dos flavonóides.....	59
Figura 14 -	Nomenclatura dos flavonóides.....	59
Figura 15 -	Nomenclatura dos flavonóides.....	59
Figura 16 -	Nomenclatura dos flavonóides.....	60
Figura 17 -	Numeração usual do esqueleto dos flavonóides.....	61
Figura 18 -	Nomenclatura dos flavonóides.....	61
Figura 19 -	Alguns possíveis padrões de substituição para o anel B.....	62
Figura 20 -	Alguns possíveis padrões de substituição para o anel A.....	63
Figura 21 -	Estruturas dos glicosídeos com suas estereoquímicas.....	65
Figura 22 -	Cromatogramas da separação das substâncias S₁ e S₂ : A – cromatograma sem alteração; B – ampliação do cromatograma, evidenciando o uso de reciclo.....	71
Figura 23 -	Resíduo de ramosse com os dados obtidos dos espectros de RMN ¹ H e gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz).....	73
Figura 24 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	74
Figura 25 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	74
Figura 26 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	75
Figura 27 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	75
Figura 28 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	76
Figura 29 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	76
Figura 30 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	77
Figura 31 -	Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 200 MHz) da substância S₁ (astilbina).....	77
Figura 32 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) da substância S₃ (catequina).....	80
Figura 33 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₄ 1	82
Figura 34 -	Cromatograma obtido por GC-MS da Fração C₄ 1 . Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.....	83
Figura 35 -	Espectros de massas dos constituintes da Fração C₄ 1 obtidos por GC-MS.....	83
Figura 36 -	Comparação dos Cromatogramas obtidos por GC da Fração C₄ 1 (A) e dos padrões comerciais de hidrocarbonetos (B)	86
Figura 37 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₄ 2	88
Figura 38 -	Cromatogramas da mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos da Fração C₄ 2 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	89
Figura 39 -	Rearranjo do tipo McLafferty para os ésteres metílicos de ácidos graxos.....	89

Figura 40 -	Espectros de massas da Fração C₄ 2 obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	90
Figura 41 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₄ 3	98
Figura 42 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₄ 3 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	99
Figura 43 -	Espectros de massas da Fração C₄ 3 obtido por GC-MS em comparação com espectros obtido da biblioteca do equipamento.....	99
Figura 44 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₄ 4	101
Figura 45 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₄ 4 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	101
Figura 46 -	Espectros de massas dos compostos identificados como ésteres metílicos da Fração C₄ 4 obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento (São mostrados apenas os não identificados nas frações anteriores).....	103
Figura 47 -	Comparação dos Cromatogramas obtidos por GC da Fração C₅ 1 (A) e dos padrões comerciais de hidrocarbonetos (B).....	106
Figura 48 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₅ 2	108
Figura 49 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₅ 2 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	108
Figura 50 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₅ 3	110
Figura 51 -	Cromatograma obtido por GC-MS da Fração C₅ 3	111
Figura 52 -	Espectros de massas da Fração C₅ 3 obtidos por GC-MS.....	111
Figura 53 -	Subestruturas com dados RMN ¹ H para Fração C₅ 4 , sugerindo tratar-se de dois anéis aromáticos (a e b).....	112
Figura 54 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₅ 4	113
Figura 55 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₅ 4	113
Figura 56 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₆ 4	115
Figura 57 -	Cromatograma obtido por GC-MS da Fração C₆ 4	116
Figura 58 -	Espectros de massas da Fração C₆ 4 obtidos por GC-MS em comparação com dados obtidos da biblioteca do equipamento.....	116
Figura 59 -	Subestruturas com dados de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e gHSQC de sinais de hidrogênios que correlacionam-se (os δ dos sinais de acoplamentos estão indicados por meio de setas).....	117
Figura 60 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	118
Figura 61 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	118
Figura 62 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	119
Figura 63 -	Mapa de correlações de gHSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	119
Figura 64 -	Mapa de correlações de gHMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	120
Figura 65 -	Subestruturas com dados de gHMBC. As subestruturas a, c e b referem-se ao anel pirânico, as d e e à cadeia lateral e as f, g e h às posições das metoxilas.....	121
Figura 66 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 3-(5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-6-il)-propanoato de metila (S₅₀). A – dados de RMN ¹ H e B – dados de RMN ¹³ C.....	121
Figura 67 -	Subestruturas com dados de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e gHSQC. As subestruturas a e b referem-se cada uma a um anel pirânico, a c e a f a um anel aromático cada, e as d e e a duas cadeias laterais distintas.....	122
Figura 68 -	Subestruturas com os dados de gHMBC para os respectivos hidrogênios. As subestruturas a e b correspondem ao anel pirânico 1, as c e d ao anel pirânico 2, a e e f ao anel aromático 1, a g ao anel aromático 2, as h e i a cadeia lateral 1 e as j e k a cadeia lateral 2.....	123
Figura 69 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância S₅₁ . A – dados de RMN ¹ H e B – dados de RMN ¹³ C.....	124
Figura 70 -	Espectro RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	125
Figura 71 -	Ampliação do espectro RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	125
Figura 72 -	Ampliação do espectro RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	126
Figura 73 -	Espectro gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	126
Figura 74 -	Ampliação do espectro gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	127
Figura 75 -	Ampliação do espectro gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	127
Figura 76 -	Mapa de correlações de gHSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	128
Figura 77 -	Ampliação do mapa de correlações de gHSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	128

Figura 78 -	Mapa de correlações de gHMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	129
Figura 79 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	129
Figura 80 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	130
Figura 81 -	Cromatograma de Padrões de Hidrocarbonetos (A) e da Fração C₉ 1 (B)	131
Figura 82 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₉ 2 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	133
Figura 83 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₉ 3 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	134
Figura 84 -	Cromatogramas dos compostos presentes na Fração C₉ 4 . A – cromatograma sem alteração; B – cromatograma com aumento da intensidade dos picos.....	134
Figura 85 -	Subestruturas com dados de RMN ¹ H e gCOSY ¹ H x ¹ H dos anéis aromáticos <i>para</i> substituídos (a e b) e das cadeias laterais em configuração <i>trans</i> e <i>cis</i> (c e d , respectivamente).....	138
Figura 86 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	138
Figura 87 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	139
Figura 88 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	139
Figura 89 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	140
Figura 90 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	140
Figura 91 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8	141
Figura 92 -	Cromatogramas (A : λ = 250 nm e B : λ = 360 nm) de eluição gradiente por HPLC-DAD do EBMI de <i>S. adstringens</i>	143
Figura 93 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₇ 2	145
Figura 94 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₇ 2	145
Figura 95 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) na região de sinais de hidrogênios anomérico da Fração C₇ 2	146
Figura 96 -	Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 200 MHz) da Fração C₇ 2	146
Figura 97 -	Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 400 MHz) da Fração C₇ 2	147
Figura 98 -	Sacarídeos identificados na Fração C₇ 2 , α-glicose (S₆₅), β-glicose (S₆₆) e sacarose (S₆₇).....	147
Figura 99 -	Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe I.....	153
Figura 100 -	Subestruturas com dados de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e gHSQC para o resíduo de ramnose da Fração C₈ 3	154
Figura 101 -	Subestruturas com dados de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e gHSQC (os δ dos sinais de acoplamentos estão indicados por meio de setas).....	154
Figura 102 -	Subestruturas com dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC.....	155
Figura 103 -	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 3	155
Figura 104 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 3 , A – região dos sinais de H de aromático e B - região dos sinais de H de glicosídeo...	156
Figura 105 -	Mapa de correlações de gHSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 3	156
Figura 106 -	Mapa de correlações de gHMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 3 (A) e ampliação na região de sinais de H de aromático e o sinal de H anomérico do glicosídeo (B).....	157
Figura 107 -	Cromatograma de eluição gradiente da Fração C₈ 3 obtido por LC-UV-MS (λ = 254,0 nm, t _R = 35,707 min.).....	157
Figura 108 -	Espectros de MS e de UV obtidos por LC-UV-MS da Fração C₈ 3	158
Figura 109 -	Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe II.....	159
Figura 110 -	Subestruturas com dados obtidos do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (indicado por meio de setas) e mapa de correlações de gHSQC da Fração C₈ 5	159
Figura 111 -	Subestruturas com dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC da Fração C₈ 5	160
Figura 112 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5	160
Figura 113 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5	161
Figura 114 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5	161
Figura 115 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5	162
Figura 116 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5	162

Figura 117 - Cromatograma de eluição gradiente da Fração C₈ 5 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm, $t_R = 35,707$ min.).....	163
Figura 118 - Espectros de EM e de UV obtidos por LC-UV-MS da Fração C₈ 5	163
Figura 119 - Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe III.....	164
Figura 120 - Subestruturas com dados obtidos dos espectros de 2D homo e heteronuclear, respectivamente, de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H e <i>g</i> HSQC da Fração C₁₅ 3	165
Figura 121 - Subestruturas com dados obtidos do espectro heteronuclear de <i>g</i> HMBC da Fração C₁₅ 3	166
Figura 122 - Proposta para as agliconas dos flavonóides presentes na Fração C₁₅ 3	166
Figura 123 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3	168
Figura 124 - Espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3 (A) e ampliação na região de sinais H dos glicosídeo (B).....	169
Figura 125 - Ampliação do espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3 na região dos glicosídeos (C - D).....	169
Figura 126 - Mapa de correlações de <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3	170
Figura 127 - Mapa de correlações de <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3	170
Figura 128 - Cromatograma de eluição gradiente da Fração C₁₅ 3 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 253,4$ nm; t_R : A = 30,182 min.; B = 30,932 min.; C = 31,960 min.; D = 32,428 min. e E = 32,987 min.).....	172
Figura 129 - Espectros de EM e de UV dos componentes da Fração C₁₅ 3	173
Figura 130 - Dados obtidos do espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H e <i>g</i> HSQC para a substância presente na Fração C₈ 9	174
Figura 131 - Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	174
Figura 132 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	175
Figura 133 - Espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	175
Figura 134 - Ampliação do espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	176
Figura 135 - Mapa de correlações de <i>g</i> HSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	176
Figura 136 - Mapa de correlações de <i>g</i> HMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9	177
Figura 137 - Cromatograma de eluição gradiente da Fração C₈ 9 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 253,4$ nm, $t_R = 39,732$ min.).....	177
Figura 138 - Espectros de MS e de UV da Fração C₈ 9	178
Figura 139 - Dados de RMN ¹ H, <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H e <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) para as agliconas da Fração C₈ 4	179
Figura 140 - Dados obtidos dos mapas de correlações de <i>g</i> HSQC e de <i>g</i> HMBC da Fração C₈ 4	180
Figura 141 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 4	182
Figura 142 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 4	182
Figura 143 - Espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 4 (A) e ampliações nas regiões de sinais H dos glicosídeos (B - D).....	183
Figura 144 - Mapa de correlações de <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 4 (A); ampliações na região de sinais H aromáticos (B) e de H dos glicosídeos (C - D).....	184
Figura 145 - Mapa de correlações de <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) da Fração C₈ 4 (A); ampliações na região de sinais H aromáticos (B) e de H dos glicosídeos (C - D).....	185
Figura 146 - Cromatograma da Fração C₈ 4 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 288,2$ nm; t_R : A = 34,677 min.; B = 35,083 min.; C = 35,692 min. e D = 40,553 min.).....	186
Figura 147 - Espectros de MS e de UV da Fração C₈ 4	187
Figura 148 - Agliconas das Classes I e III com os dados obtidos dos espectros de RMN ¹ H, <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H e mapa de correlações de <i>g</i> HSQC da Fração C₈ 2	188
Figura 149 - Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	189
Figura 150 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	190
Figura 151 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	190
Figura 152 - Espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	191
Figura 153 - Ampliação do espectro de <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	191
Figura 154 - Mapa de correlação de <i>g</i> HSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	192
Figura 155 - Mapa de correlação de <i>g</i> HMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2	192
Figura 156 - Dados dos espectros de RMN ¹ H, <i>g</i> COSY ¹ H x ¹ H e mapa de correlações de <i>g</i> HSQC para as agliconas da Fração C₈ 6	194
Figura 157 - Dados do mapa de correlações de <i>g</i> HMBC para as agliconas da Fração C₈ 6	194
Figura 158 - Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	196

Figura 159 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	197
Figura 160 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	197
Figura 161 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	198
Figura 162 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	198
Figura 163 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	199
Figura 164 -	Mapa de correlação de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	199
Figura 165 -	Ampliação do mapa de correlação de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6 ...	200
Figura 166 -	Mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6	200
Figura 167 -	Ampliação do mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6 ..	201
Figura 168 -	Ampliação do mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6 ..	201
Figura 169 -	Dados dos espectros de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e mapa de correlações gHSQC para as agliconas da Fração C₁₂ 3	202
Figura 170 -	Correlação dos dados obtidos do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H, e comparação dos valores das projeções de carbono com os dados obtidos da literatura (106) para os resíduos de arabinose (a e b) e glicose (c e d).....	203
Figura 171 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	204
Figura 172 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	204
Figura 173 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	205
Figura 174 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	205
Figura 175 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	206
Figura 176 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	206
Figura 177 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	207
Figura 178 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3	207
Figura 179 -	Cromatograma da Fração C₁₂ 3 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm; t _R : A = 33,235 min.; B = 33,737 min.; C = 33,909 min.; D = 34,814 min.; E = 35,217 min. e F = 35,806 min.).....	208
Figura 180 -	Espectros de MS e de UV da Fração C₁₂ 3	209
Figura 181 -	Proposta para as agliconas presentes na Fração C₁₂ 5 com dados de RMN ¹ H e as projeções dos dados de carbono obtidos dos mapas de correlações de gHSQC e de gHMBC.....	211
Figura 182 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	212
Figura 183 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	213
Figura 184 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	213
Figura 185 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	214
Figura 186 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5 com um corte mais alto.....	214
Figura 187 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	215
Figura 188 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	215
Figura 189 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5	216
Figura 190 -	Cromatograma da Fração C₁₂ 5 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm; t _R : A = 33,902 min.; B = 34,800 min.; C = 35,214 min. e D = 35,795 min.).....	217
Figura 191 -	Espectros de MS e de UV da Fração C₁₂ 5	217
Figura 192 -	Dados obtidos do espectro de RMN ¹ H, gCOSY ¹ H x ¹ H e gHSQC para o composto majoritário.....	220
Figura 193 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	220
Figura 194 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	221
Figura 195 -	Espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	221
Figura 196 -	Ampliação do espectro de gCOSY ¹ H x ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	222
Figura 197 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	222
Figura 198 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7	223
Figura 199 -	Cromatograma da Fração C₁₂ 7 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254$ nm; t _R : A = 33,206 min.).....	224
Figura 200 -	Espectro de MS e de UV da Fração C₁₂ 7	224
Figura 201 -	Dados obtidos dos espectros de RMN ¹ H, e mapa de correlações de gHSQC e gHMBC da Fração C₁₂ 9	225
Figura 202 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	226
Figura 203 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	226

Figura 204 -	Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	227
Figura 205 -	Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	227
Figura 206 -	Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	228
Figura 207 -	Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	228
Figura 208 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	229
Figura 209 -	Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9	229
Figura 210 -	Cromatograma da Fração C₁₂ 9 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm, t_R : 36,089 min.).....	230
Figura 211 -	Espectros de MS e de UV da Fração C₁₂ 9	230
Figura 212 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₁₃ 2	233
Figura 213 -	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₁₃ 2 . δ 156,06 ppm, C=CH ₂ ; δ 122,30 ppm, CH ₂	234
Figura 214 -	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₁₃ 2 . δ 156,06 ppm, C quaternário; δ 106,01 ppm, CH ₂	234
Figura 215 -	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 200 MHz) da Fração C₁₃ 2	235
Figura 216 -	Cromatogramas da Fração C₁₃ 2 obtidos por GC-MS.....	235
Figura 217 -	Espectros de massas dos compostos identificados na Fração C₁₃ 2	236
Figura 218 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	244
Figura 219 -	Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	244
Figura 220 -	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	245
Figura 221 -	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	245
Figura 222 -	Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	246
Figura 223 -	Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	246
Figura 224 -	Mapa de correlações de gHSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	247
Figura 225 -	Mapa de correlações de gHMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₁₃ 8	247
Figura 226 -	Cromatogramas (A : sem alteração, B : ampliação) de eluição gradiente do EBMC de <i>H. puberula</i>	249
Figura 227 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBDI para operárias de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>S. postica</i> (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	251
Figura 228 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a Fração C₄ 1 para operárias de <i>A. mellifera</i> nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	252
Figura 229 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a Fração C₄ 2 para operárias de <i>A. mellifera</i> nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	252
Figura 230 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a Fração C₄ 3 para operárias de <i>A. mellifera</i> nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	252
Figura 231 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a Fração C₄ 4 para operárias de <i>A. mellifera</i> nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	253
Figura 232 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBMI para operárias de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>S. postica</i> (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	254
Figura 233 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBDP para operárias de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>S. postica</i> (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	255
Figura 234 -	Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBMP para operárias de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>S. postica</i> (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	257

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Extratos brutos obtidos do cerne, dos pedúnculos e das inflorescências de <i>D. mollis</i> ..	34
Tabela 2 -	Extratos brutos obtidos dos pedúnculos e das inflorescências de <i>S. adstringens</i>	36
Tabela 3 -	Dados de constantes de acoplamento relacionando com a estereoquímica do glicosídeo ligado.....	64
Tabela 4 -	δ (ppm) de hidrogênios anoméricos de açúcares de flavonóides <i>C</i> -glicosiolados (em DMSO- <i>d</i> ₆).....	66
Tabela 5 -	δ (ppm) de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonóides <i>O</i> -glicosiolados (em DMSO- <i>d</i> ₆).....	67
Tabela 6 -	Faixa de absorção no UV-Vis para flavonóides.....	70
Tabela 7 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a astilbina (S ₁) e isoastilbina (S ₂) em comparação com dados obtidos da Literatura 100 (MeOD, 200 MHz, δ = ppm).....	78
Tabela 8 -	Dados de <i>g</i> HMBC para a astilbina (S ₁) (MeOD, 400 MHz, δ = ppm).....	79
Tabela 9 -	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) da catequina (S ₃) em comparação com dados obtidos da Literatura 101	81
Tabela 10 -	Hidrocarbonetos identificados na Fração C₄ 1 . Os <i>t_R</i> foram obtidos por GC.....	86
Tabela 11 -	Compostos identificados como ésteres metílicos na Fração C₄ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	96
Tabela 12 -	Comparação dos índices de Kovats dos ésteres metílicos dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₄ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	97
Tabela 13 -	Compostos identificados como ésteres metílicos na Fração C₄ 3 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	100
Tabela 14 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₄ 3 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	100
Tabela 15 -	Compostos identificados na Fração C₄ 4 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	102
Tabela 16 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₄ 4 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	102
Tabela 17 -	Hidrocarbonetos identificados na Fração C₅ 1 . Os <i>t_R</i> foram obtidos por GC.....	107
Tabela 18 -	Compostos identificados como ésteres metílicos na Fração C₅ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	109
Tabela 19 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₅ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	109
Tabela 20 -	Dados de <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 11	120
Tabela 21 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração C₆ 12	124
Tabela 22 -	Hidrocarbonetos identificados na Fração C₉ 1 . Os <i>t_R</i> foram obtidos por GC.....	132
Tabela 23 -	Compostos identificados na Fração C₉ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	133
Tabela 24 -	Compostos identificados na Fração C₉ 3 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	134
Tabela 25 -	Compostos identificados na Fração C₉ 4 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	135
Tabela 26 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₉ 2 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	135
Tabela 27 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₉ 3 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	136
Tabela 28 -	Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da Fração C₉ 4 . Os <i>t_R</i> (min.) foram obtidos por GC-MS.....	136
Tabela 29 -	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) e RMN ¹³ C (MeOD, 200 MHz) da Fração C₇ 2 em comparação com dados obtidos da Literatura 104 (δ = ppm).....	148
Tabela 30 -	Dados das correlações heteronucleares obtidos do mapa de correlações de <i>g</i> HMBC da Fração C₁₅ 3	167
Tabela 31 -	Dados obtidos do mapa de correlações de <i>g</i> HMBC (MeOD, 400 MHz) para a substância da Fração C₈ 9	179

Tabela 32 -	Dados de <i>g</i> HMBC (MeOD, 400 MHz) para Flavonóide da Fração C₈ 4	182
Tabela 33 -	Dados espectrais para os compostos da Fração C₈ 2 (δ = ppm).....	194
Tabela 34 -	Constituintes químicos presentes na Fração C₁₃ 2 com comparação de seus índices de Kovats com os índices obtidos de ADAMS (103). A análise por GC-MS.....	233
Tabela 35 -	Dados de RMN ¹³ C da Fração C₁₃ 8 (CDCl ₃ , 200 MHz) em comparação com dados obtidos da Literatura 107	242
Tabela 36 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) Fração C₁₃ 8	243
Tabela 37 -	Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBDI para operárias de <i>A. mellifera</i> e <i>S. postica</i> , nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	252
Tabela 38 -	Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBMI para operárias de <i>A. mellifera</i> e <i>S. postica</i> , nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	255
Tabela 39 -	Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBDP para operárias de <i>A. mellifera</i> e <i>S. postica</i> , nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	257
Tabela 40 -	Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBMP para operárias de <i>A. mellifera</i> e <i>S. postica</i> , nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.....	258
Tabela 41 -	Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>A. mellifera</i> com 1 a 5 dias de idade durante o seu desenvolvimento, alimentadas com dieta e Extratos Brutos de <i>S. adstringens</i> em diferentes concentrações (%)......	260
Tabela 42 -	Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>S. postica</i> com 1 a 5 dias de idade durante o seu desenvolvimento, alimentadas com dieta e Extratos Brutos de <i>S. adstringens</i> em diferentes concentrações (%)......	260
Tabela 43 -	Porcentagem de mortalidade de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> alimentadas com extratos de <i>S. adstringens</i> na concentração de 2 mg/mL.....	261
Tabela 44 -	Efeito dos extratos de <i>D. mollis</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbiote de <i>Acromyrmex balzani</i>	263
Tabela 45 -	Efeito dos extratos <i>S. adstringens</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbiote de <i>Acromyrmex balzani</i>	263
Tabela 46 -	Atividade inibitória dos Extratos Brutos de <i>D. mollis</i> frente às pectinases.....	264
Tabela 47 -	Atividade inibitória dos Extratos Brutos de <i>S. adstringens</i> frente às pectinases.....	264
Tabela 48 -	Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em <i>Brachdanio rerio</i> com a substância astilbina (S₁).....	266
Tabela 49 -	Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em <i>Brachdanio rerio</i> com a substância isoastilbina (S₂).....	267
Tabela 50 -	Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em <i>Brachdanio rerio</i> com a substância catequina (S₃).....	268

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1 -	Obtenção dos extratos brutos do cerne, dos pedúnculos e das inflorescências de <i>D. mollis</i>	33
Fluxograma 2 -	Obtenção dos extratos brutos dos pedúnculos e das inflorescências de <i>S. adstringens</i>	35
Fluxograma 3 -	Fracionamento cromatográfico do EBMC de <i>D. mollis</i>	37
Fluxograma 4 -	Fracionamento cromatográfico do EBMP de <i>D. mollis</i>	39
Fluxograma 5 -	Fracionamento cromatográfico do EBMI de <i>D. mollis</i>	40
Fluxograma 6 -	Fracionamento cromatográfico do EBDI de <i>S. adstringens</i>	42
Fluxograma 7 -	CC da Fração C₄ 5 do EBDI de <i>S. adstringens</i>	43
Fluxograma 8 -	CC da Fração C₄ 6 do EBDI de <i>S. adstringens</i>	43
Fluxograma 9 -	Fracionamento cromatográfico do EBDP de <i>S. adstringens</i>	47
Fluxograma 10 -	Fracionamento da Fração C₉ 9 do EBDP de <i>S. adstringens</i>	48
Fluxograma 11 -	Fracionamento do EBHC de <i>Helietta puberula</i>	50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abreviaturas/ Símbolos	Item referido
API	Ionização a Pressão Ambiente
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
°C	Grau Celsius
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CL ₅₀	Concentração Letal a 50 %
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Centímetro a menos um
COSY	Correlation Spectroscopy
C _x	Coluna (X = número relativo à coluna)
C _x Y	Coluna (X = número relativo à coluna e Y = número relativo à fração)
δ	Deslocamento químico
δ_C	Deslocamento químico de carbono
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio
D	Daltons
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
<i>dl</i>	Dupleto largo
DO	Densidade óptica
DO _A	Densidade óptica da amostra
DO _C	Densidade óptica do controle
EBDC	Extrato Bruto Diclorometano do Cerne
EBDI	Extrato Bruto Diclorometano das Inflorescências
EBDP	Extrato Bruto Diclorometano dos Pedúnculos
EBHC	Extrato Bruto Hexânico do Caule
EBMC	Extrato Bruto Metanólico do Cerne
EBMI	Extrato Bruto Metanólico das Inflorescências

EBMP	Extrato Bruto Metanólico dos Pedúnculos
EI	Impacto eletrônico
ES-	Electro-spray negativo
eV	Eletrovolt
<i>g</i>	Gradiente de campo
<i>g</i>	Gramas
GC	Cromatografia a Gás
GC – MS	Cromatografia a Gás Acoplado ao Espectrômetro de Massas
<i>h</i>	Altura
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Espectrofotometria no Ultravioleta
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IK	Índice de retenção de Kovats
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Litro
LC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas
<i>m</i>	Metro
<i>m</i>	Multiplete
M^+	Pico do íon molecular
mg	Miligrama
MHz	Mega Hertz
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
m/m	Massa/massa
mol/dm^3	Mol por decímetro cúbico
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
N	Normal

nm	Nanômetro
p.	Página
P. A.	Para Análise
PDA	Detector de Arranjo de Fotodiodos
ppm	Parte por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
<i>s</i>	Singleto
Sinal/sinais	Sinal (is) de deslocamento (s) químico (s) nas discussões de dados de RMN
<i>sl</i>	Singleto largo
S _x	Substância (X = número da substância identificada)
<i>t</i>	Tripleto
t _R	Tempo de retenção
μ	Micra
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
UV	Ultravioleta
V _{inj}	Volume de injeção
v/v	Volume/volume
UV-Vis	Ultravioleta-visível
λ	Comprimento de onda
φ	Diâmetro
>	Maior
~	Aproximadamente
[]	Concentração

Resumo: Estudo Químico de Plantas com Atividade Sobre Insetos Sociais.

O controle químico de pragas, feito com utilização de inseticidas convencionais, é o que apresentam as maiores vantagens ao agricultor devido à sua eficiência, baixo custo e facilidade de uso em relação aos demais. Todavia, a contínua utilização do controle químico com agrotóxicos não seletivos, sem a rotação de culturas, pode causar desequilíbrios mediante a eliminação de insetos benéficos, explosões populacionais de pragas, e principalmente, a perda de eficácia de inseticidas mediante a seleção natural de linhagens de insetos resistentes a estes compostos químicos. Acrescentem-se ainda aspectos negativos relativos à contaminação do meio ambiente (solo, água, atmosfera e seres vivos) e danos acidentais ocasionados pela má utilização de agrotóxicos.

A pesquisa por busca de substâncias com atividade inseticida por meio de plantas visa o controle de insetos e baixo impacto ambiental. Partindo de informações de agricultores sobre a utilização de plantas para o controle de saúvas, observações de campo e de dados quimiossistemáticos da literatura, o Grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e do Centro de Estudo de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro vem estudando os efeitos de plantas potencialmente tóxicas para essas formigas. O “mau de outono”, como é conhecido pelos apicultores, que consiste na morte de abelhas melíferas no outono e que é causado por compostos tóxicos que são levados ao ninho das abelhas juntamente com o néctar das plantas, tem sido também estudado por este grupo.

Este trabalho descreve o estudo químico de *Dimorphandra mollis*, *Stryphnodendron adstringens* e *Helietta puberula* associadas as suas ações em formigas cortadeiras e abelhas. O estudo de toxicidade biológica em peixes modelo para esta

atividade visou avaliar o impacto que algumas substâncias com atividade inseticida pudessem causar ao meio ambiente.

O estudo fitoquímico, além da busca de metabólitos secundários para avaliação da atividade inseticida, visou contribuir com a quimiosistemática das espécies vegetais. As técnicas cromatográficas usadas foram desde técnicas clássicas, até técnicas avançadas como GC-MS e LC-UV-MS visando à obtenção dos constituintes químicos bem como ajuda na identificação, juntamente com os experimentos espectroscópicos de RMN. Do fracionamento dos extratos foram obtidas substâncias de classes diversas como álcoois (**S**₁₇) e ésteres graxos (**S**₁₈ – **S**₄₃, **S**₅₂ – **S**₆₂, **S**₈₉ – **S**₉₅), hidrocarbonetos (**S**₄ – **S**₁₆), derivados de ácido cinâmico (**S**₄₇, **S**₄₈, **S**₅₀, **S**₅₁, **S**₆₃ e **S**₆₄), açúcares (**S**₆₅ – **S**₆₇), esteróides (**S**₄₄ - **S**₄₆, **S**₉₆ - **S**₉₉), triterpeno (**S**₁₀₀), flavonóides (**S**₁ – **S**₃, **S**₆₈ – **S**₈₈, **S**₁₀₀ – **S**₁₀₅) e alcalóide (**S**₄₉).

Os extratos obtidos das espécies vegetais apresentaram atividades inseticidas frente à pelo menos um dos modelos testados. Os flavonóides astilbina, isoastilbina e catequina, obtidos de *D. mollis*, foram ensaiados em peixes modelo e não apresentou atividade tóxica, sendo assim, promissores para uso em plantações próximas a ambientes aquático, visto que, provavelmente, não causará danos a estes ecossistemas.

Uma vez isolados e identificados os compostos com atividade inseticida de plantas com potencial para utilização na produção de inseticida natural, espera-se uma redução do impacto ambiental nos ecossistemas causados por inseticidas sintéticos. Ressalta-se assim, que o desenvolvimento de ações de pesquisa no sentido da prospecção e avaliação de plantas com atividade inseticida é de grande importância econômica, assim como para a conservação ambiental dos agro-ecossistemas onde as frações ativas destas plantas poderão ser utilizadas como inseticidas naturais no manejo integrado de pragas.

Abstract: Chemical Investigation of Active Plants against Social Insects

The chemical control of pest, which uses conventional insecticides, shows a number of advantages to agriculturists due to its efficiency, lower cost and facility of use in related to others. However, the utilization of the chemical control with non-selective insecticides, without culture rotation, could cause instability eliminating beneficial insects, increasing populations of pests, and mainly losing insecticide efficacy due to natural selection from insects resistant to these chemicals. Besides that, there are more negative aspects referring to environmental contamination, such soil, water, atmosphere and others organisms contaminations, and accidental damage caused by bad utilization of insecticides.

The investigation for substances with insecticide activity from plants aims the insect control and lower environmental impact. Based on agriculturist information about plants utilized for leaf-cutting ant control, field observations and chemosystematic data from the literature, the Natural Products Group from the Chemistry Department of São Carlos Federal University together the Study Center of Social Insects of UNESP in Rio Claro have been studied the effects of plants potentially toxic to those ants. The “fall disease”, as it is known by beekeepers, consists in death of *Apis mellifera* in autumn and it is caused by toxic compounds, which are carried to beehives with nectar, has also been studied by this team.

This work describes the chemical study of *Dimorphandra mollis*, *Sthyphnodendro adstringens* and *Helietta puberula* associated to their actions in ants and bees. The toxicity study in model fish aims to evaluate the impact that several substances with insecticide activity could cause to the environment.

The phytochemical study, besides the search for secondary metabolic, aimed to contribute to chemosystematic of vegetal species. It was employed traditional chromatographic techniques and even on-line ones such as GC-MS and LC-UV-MS to obtain compounds from the plants studied and also to chemistry identification, associated with NMR spectroscopic experiments. From extracts fractionation were obtained several compounds of various classes such as alcohols (S₁₇), fatty acids (S₁₈ – S₄₃, S₅₂ – S₆₂, S₈₉ – S₉₅), hydrocarbons (S₄ – S₁₆), cinnamic acid derivative (S₄₇, S₄₈, S₅₀, S₅₁, S₆₃ e S₆₄), glycosides (S₆₅ – S₆₇), steroids (S₄₄ - S₄₆, S₉₆ - S₉₉), triterpenes (S₁₀₀), flavonoids (S₁ – S₃, S₆₈ – S₈₈, S₁₀₀ – S₁₀₅) and alkaloids (S₄₉).

The extracts from the vegetable species studied showed insecticide activity against at least one tested model. The flavonoids astilbin, isoastilbin and catechin, obtained from *D. mollis*, were tested in model fish and they did not show toxic activity, therefore they could be promising for the use in plantations near aquatic environments since they will not damage these ecosystems.

Once identified and isolated the compounds with insecticide activity from plants with potential utilization in the production of natural products, it is expected a reduction in the environmental ecosystems impact caused by synthetic insecticides. It is possible to note that the development of prospecting research and evaluation of plants with insecticide activity have great economic importance, as well as for environmental conservation of agroecosystems where the active fractions from these plants could be utilized as natural insecticides in pest integrated management.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL

O Brasil ocupa uma posição de destaque no abastecimento mundial de produtos de origem vegetal, portanto, o controle de pragas é um dos principais objetivos para o crescimento e melhoria do setor agrícola.

Antes do descobrimento do Brasil os insetos endêmicos desse território limitavam-se a alimentar-se de plantas silvestres, situação que se modificou com o processo de colonização, quando parte dos insetos nativos passou a se alimentar das novas plantas introduzidas e como estas normalmente apresentavam-se em grande quantidade e concentradas, houve multiplicação rápida e desequilibrada de insetos. Situação semelhante ocorreu com algumas das espécies estrangeiras, onde o clima mais favorável, predadores naturais em pequeno número e hospedeiros em grande concentração determinaram uma superpopulação de insetos. O desmatamento e a caça indiscriminada de pássaros insetívoros colaboraram para um desequilíbrio ainda maior que, aliado ao crescimento populacional rápido e contínuo, tem aumentado em muito a competição homem-inseto pelo mesmo tipo de alimentação e território, dificultando o controle, dentre outras, de infecções hospitalares e doenças que têm nos insetos os vetores de transmissão. Todos estes fatores têm levado à busca contínua por agentes inseticidas eficientes, que representem maior segurança ao homem e ao meio ambiente (1).

Inseticidas são substâncias químicas utilizadas para controlar insetos e existem ainda substâncias utilizadas para atrair e repelir insetos. Suas descobertas, isolamentos, sínteses, avaliações toxicológicas e de impacto ambiental constituem vasto tópico de pesquisa no mundo inteiro e que tem se desenvolvido bastante nas últimas décadas (2-3).

Num resumo histórico do aparecimento dos agrotóxicos, Bohmont (4) relata que, os romanos antigos já usavam a fumaça proveniente da queima de enxofre para controlar pulgões que atacavam as plantações de trigo e também usavam sal para controlar ervas daninhas. Nos primórdios do século XIX, os chineses utilizavam arsênio misturado em água para controlar insetos. Descobriu-se, no início do século passado, que produtos derivados de plantas como a rotenona e a piretrina controlavam diferentes tipos de insetos. O Verde Paris, uma mistura de derivados de arsênio e de cobre, foi descoberto em 1865 e foi muito utilizado, desde então, no controle do besouro da batata do Colorado. Em 1882, descobriu-se que uma mistura de sulfato de cobre e cal - Mistura Bordeaux - era um excelente fungicida para o controle de uma doença em videira denominada míldio (*Plasmopara viticula*). Essa mistura continua a ser utilizada até hoje, com grande sucesso, no controle de doenças em várias culturas. Em 1890, um pó contendo mercúrio começou a ser utilizado para tratamento de sementes e, em 1915, foi desenvolvida uma formulação líquida para ser utilizada em controle de doenças fúngicas e tratamento de sementes. Os primeiros herbicidas surgiram por volta de 1900, mas o grande avanço no desenvolvimento dos agrotóxicos, de maneira geral, aconteceu por volta de 1940, com a redescoberta do DDT e toda a gama de organoclorados e fosforados.

Akesson & Yates (5) dividem o desenvolvimento do controle de pragas em três períodos. O primeiro refere-se à época anterior a 1867 em que se utilizavam produtos odoríferos ou irritantes, tais como excrementos e cinzas, mas também se começava a utilizar enxofre, rotenona, piretro, nicotina, óleos animais ou de petróleo. O segundo compreendido entre 1867 a 1939, corresponde ao período da descoberta e refinamento da mistura Bordeaux, bem como de outras formulações cúpricas. O terceiro período inicia-se a partir de 1939, com a era dos organossintéticos.

Em 1946, foi iniciado o emprego maciço de inseticidas organoclorados, como o DDT (Dicloro Difenil Tricloro Etano), para o controle de insetos vetores de doenças. Como resultado disso, populações de insetos tornaram-se resistentes devido ao fenômeno de seleção natural, já desde 1947. Além disso, essa classe de inseticidas degrada-se muito lentamente no ambiente podendo persistir por décadas. Por esses motivos, esses inseticidas foram banidos em diversos países, entre eles o Brasil.

Nas décadas de 50 a 70, logo após a II Grande Guerra, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade inseticida. Naquela época começou a reforçar-se um propósito de proteção ao meio ambiente e um sério questionamento quanto ao uso de inseticidas clorados e fosforados que, além de causarem enorme impacto ambiental depois de certo tempo, perdiam o largo espectro de atividade que anteriormente mostraram. Percebeu-se que a natureza possui enorme capacidade de adaptação, e num processo de seleção natural estava elegendo os *especimens* mais resistentes e, portanto, trazendo certa ineficiência aos produtos utilizados no controle populacional. No mesmo período, o lançamento do livro “*Silent Spring*” de Carson (1962) motivou uma mudança filosófica que se estendeu ao comportamento dos cientistas, que passaram a procurar entender melhor o processo de interação inseto-planta e, desta forma, respeitar mais os mecanismos de adaptação da natureza. O efeito dessa nova filosofia de trabalho refletiu-se nas décadas seguintes, quando novos produtos passaram a ser planejados e sintetizados, buscando maior seletividade aos insetos alvo, procurando preservar os demais animais do mesmo *habitat*, incluindo predadores naturais dos insetos indesejados (1).

Novas substâncias são necessárias, portanto, para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e

aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixo impactos ambientais (1).

1.2 – FORMIGAS CORTADEIRAS E SEU FUNGO SIMBIONTE

As formigas pertencem à família Formicidae e sua população é cerca de 10^{16} indivíduos. A tribo Attini abrange cerca de 304 espécies divididas em 13 gêneros: *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (6-8). As Attini são restritas ao novo mundo, e constituem um grupo essencialmente de clima tropical, ocorrendo dos Estados Unidos ao centro da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe como Curaçao, Cuba, Trinidad e Tobago (9-10). Com exceção de *Acromyrmex striatus* dos Andes argentinos que já foi encontrada a 3.500 metros de altitude, as Attini em geral são encontradas em menores altitudes, como é o caso do gênero *Atta*, que mesmo na Colômbia, Equador e Bolívia são restritas a altitudes inferiores a 2.000 metros (9).

Estes gêneros podem ser subdivididos em três grandes grupos chamados de primitivos, intermediários e avançados de acordo com o tamanho da colônia, do polimorfismo de suas operárias e tipo de substrato que usam para cultivar seu fungo simbiote (11-14). Esta última característica é o grande diferencial desta tribo de formigas frente às outras (15). Dentre as Attini, os gêneros mais primitivos usam cadáveres, excremento de outros insetos e matéria vegetal morta como substrato para o fungo, e os gêneros mais derivados, como *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), usam material vegetal fresco para cultivar seu fungo sendo, portanto, consideradas herbívoras (16).

Todas as espécies da tribo Attini caracterizam-se por manterem uma relação obrigatória de simbiose com fungos da família Lepiotaceae (17).

Entre as Attini, os gêneros tidos como mais basais como *Apterostigma* utilizam matéria orgânica em decomposição como carcaças e fezes de insetos como substratos para seu fungo. Gêneros mais derivados exploram também fragmentos de material vegetal seco e o gênero *Trachymyrmex* chega a utilizar pedaços de pétalas frescas para o cultivo do simbionte.

O consenso em se tratando da filogenia das Attini é que os gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) representam o ápice evolutivo da tribo. Estas formigas cultivam seu fungo simbionte sobre material vegetal fresco, principalmente folhas, cortadas por elas mesmas, o que as torna conhecidas como formigas cortadeiras.

As plantas normalmente cortadas pelas formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são utilizadas como substrato para o crescimento do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (18-19).

Em trabalhos anteriores (20-21), foi relatado que as formigas se alimentam do fungo simbionte, porém em alguns trabalhos (22-23) é afirmado que as operárias de formigas cortadeiras ingerem seiva de plantas; e em outros (24), apenas as larvas que não têm contato com as folhas seriam exclusivamente alimentadas com o fungo simbionte.

Como as operárias de algumas espécies de formigas cortadeiras não podem ingerir partículas sólidas, que ficam retidas em um filtro infrabucal, a seiva das plantas é proposta como a principal fonte nutricional das formigas. Considerando a necessidade energética de operárias de *Atta cephalotes* durante o forrageamento, propõe-se que a quantidade de hifas fúngicas que uma operária ingere diariamente possibilitaria apenas a aquisição de 5 % de sua energia (23). Logo, a maior parte desta energia seria fornecida pelos nutrientes contidos na seiva das plantas, embora trabalhos recentes (25) indiquem que as formigas devam se alimentar diretamente dos produtos de hidrólise dos

polissacarídeos vegetais, que são gerados nos jardins de fungo pela ação das polissacaridasas.

O trabalho realizado por SILVA, A. em 2000 (26), comprova as observações de outros autores (27), mostrando que as formigas adultas sustentam seu trabalho predominantemente com a energia extraída de carboidratos. Entre eles, parecem ser essenciais os polissacarídeos (28), que representam 60 % da matéria sólida vegetal (29). Para assimilar estes compostos as formigas necessitam de polissacaridasas, que são produzidas pelo fungo simbiote (27), ingeridas e concentradas no intestino das formigas e então, distribuídas sobre a matéria vegetal, para provocar sua degradação dentro dos ninhos (26).

1.2.1 - Simbiose entre fungo e formigas

A **Figura 1** (p. 8) representa o ciclo do mutualismo entre as formigas cortadeiras e seu fungo, no qual a formiga corta o material vegetal e deposita sobre a massa fúngica para que este faça a degradação do mesmo para produzir os açúcares necessários para alimentação das formigas adultas e suas larvas.

Leucoagaricus gongylophorus, o fungo simbiose das *Atta*, produz estruturas únicas entre os fungos, denominadas gongilídeos, que aparentam ser uma adaptação especial à vida das formigas (30). Gongilídeos são estruturas arredondadas (**Figura 2 – B**, p. 8) repletas de líquido contendo concentrações maiores de lipídeos e carboidratos do que o resto do fungo (31). Conjuntos de gongilídeos, que se assemelham aos minúsculos cachos de uvas, são denominados estáfilas (**Figura 2 - A**, p. 8).

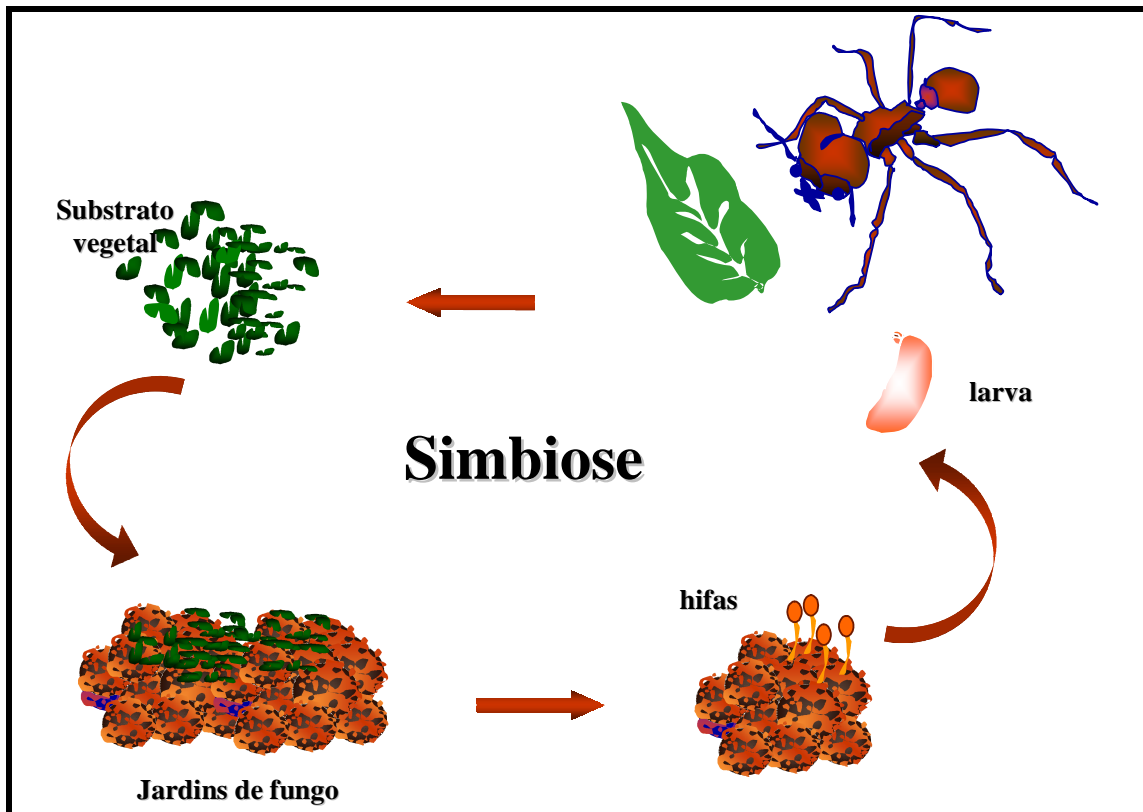


Figura 1 – Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo *L. gongylophorus*.

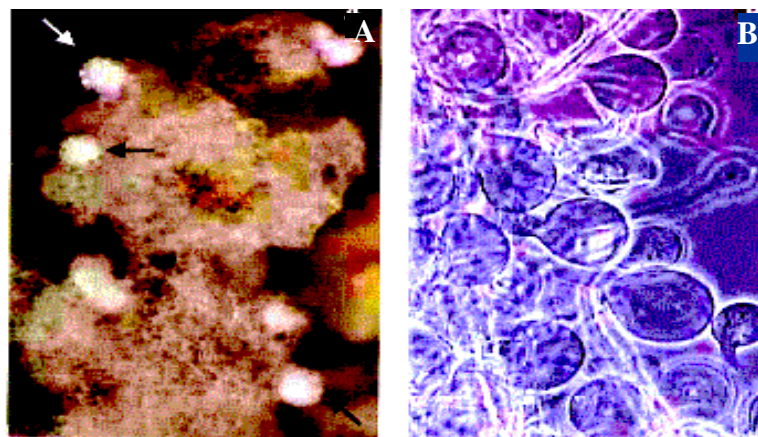


Figura 2 - Aspectos microscópicos do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa*. (A) Estáfidas (setas) contrastando com hifas. (B) Estáfidas vista sob microscópio, cada esfera correspondendo a um gongilídeo. (Aumento: 1000 X) (32).

O fungo fornece alimento e enzimas para as formigas e estas coletam e preparam o substrato para o fungo. Os fungos simbiotes foram inicialmente propostos como excelente fonte de alimentação para as formigas, uma vez que as hifas possuem 46,9 % em proteínas, 27,0 % em carboidratos, 17,7 % em aminoácidos e 0,2 % em lipídeos (33

e 25). Alguns estudos (33 e 25) relatam que as formigas se alimentam exclusivamente do fungo simbiote. Mas, também existem relatos da ingestão da seiva de plantas por operárias de formigas cortadeiras (34).

As formigas adultas sustentam seu trabalho predominantemente com a energia extraída de carboidratos (27-35), entre os quais parecem ser essenciais os polissacarídeos (28), que representam até 60,0 % da matéria sólida vegetal (36 e 29). A distribuição dos polissacarídeos nos vegetais faz com que microorganismos, de um modo geral, apresentem estratégias para acessar estes nutrientes dos vegetais. O fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote de *Atta sexdens rubropilosa*, apresenta atividade de polissacaridases, fornecendo às formigas enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas (33) como a amilase, xilanase, β -glicosidase e manosidase (37). Estudos sobre a atividade celulásica no fungo cultivado pela formiga *Atta sexdens rubropilosa* mostraram as diferentes atividades metabólicas do fungo cultivado, que degradou o polissacarídeo pectina em maior quantidade, seguido de amido, xilana, carboximetilcelulose e celulose (28). Já os fungos se beneficiam da atividade das formigas, uma vez que estas produzem compostos antimicrobianos que reduzem o crescimento de outros fungos e bactérias contaminantes dos ninhos (38).

As esponjas, que são constituintes do fungo simbiote crescendo nas folhas, são capazes de sustentar as formigas. A análise do conteúdo de glicose nas esponjas indica valores maiores do que aqueles encontrados no lixo e nas hifas, sugerindo que o crescimento do fungo sobre a matéria vegetal provoque o aumento da concentração de glicose, que seria originada da hidrólise dos polissacarídeos vegetais.

De fato, o fungo simbiote é capaz de produzir grandes quantidades de polissacaridases em meios de cultivo em laboratório e atividades desta natureza são também abundantes nas esponjas fúngicas (25). Estes resultados sugerem que as

formigas adultas se alimentem preferencialmente dos carboidratos originados pela hidrólise extracelular de polissacarídeos vegetais, que por sua vez, seria catalisada por polissacaridasas produzidas pelo fungo simbiote (**Figura 3**).

Além do fungo, outro componente dos ninhos parece ter um papel significativo na nutrição das formigas adultas. Observações recentes demonstraram que as larvas de *Atta sexdens* secretam e expelem um líquido nutritivo que é ingerido pelas formigas adultas. Este líquido é secretado após estímulo por parte das adultas, que tocam a região posterior das larvas. A análise do conteúdo de glicose (39) e o cálculo da frequência com que as formigas adultas ingerem, bem como do volume ingerido, sugerem que o líquido das larvas tem um papel significativo na nutrição dos adultos. Como as larvas se alimentam de esponjas fúngicas (28), é provável que elas atuem preparando e modificando estes nutrientes em compostos assimiláveis para as formigas adultas (**Figura 4**, p. 11).

A operária primeiramente coleta estáfila na esponja de fungo, manipula estáfila retirando grande parte do líquido contido. A operária posiciona estáfila na boca da larva e mantém em contato com peças bucais da mesma. E por último, a larva se alimenta da estáfila e secreta o líquido proctodeal (32).



Figura 3 - Operária média ingere a nova gota de líquido proctodeal com movimentos de sua glossa. A operária mínima mantém a estáfila em contato com a boca da larva (32).



Figura 4 - Operária média-pequena de *Atta sexdens rubropilosa* carregando entre as mandíbulas, estáfila previamente mastigada, cuja parte líquida foi em grande parte sugada durante manuseio (32).

1.3 – ABELHAS SOCIAIS:

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história e por vários séculos, foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente, matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, instalando-os em colméias racionais (**Figura 5**) e manejando-os de forma que houvesse maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas.



Figura 5 - Modelos de apiários racionais.

Essa atividade atravessou o tempo, ganhou o mundo e se tornou uma importante fonte de renda para várias famílias. Hoje, além do mel, é possível explorar, com a criação racional das abelhas, produtos como: pólen apícola, geléia real, rainhas,

polinização, apitoxina, cera e própolis. Existem casos de produtores que comercializam enxames e crias.

O Brasil é, atualmente, o 6º maior produtor de mel, ficando atrás somente da China, Estados Unidos, Argentina, México e Canadá. Entretanto, ainda existe um grande potencial apícola não explorado e grande possibilidade de se maximizar a produção, incrementando o agronegócio apícola. Para tanto, é necessário que o produtor possua conhecimentos sobre biologia das abelhas, técnicas de manejo e colheita do mel, pragas e doenças dos enxames, importância econômica, mercado e comercialização.

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores quando estas surgiram, há cerca de 135 milhões de anos. Durante esse processo evolutivo, surgiram várias espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam, aproximadamente, 40 mil ainda não-descobertas, sendo que, somente 5 % são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* (**Figura 6**) são as mais conhecidas e difundidas.



Figura 6 – Abelhas produtoras de mel em colméia racional.

O habitat das abelhas *Apis mellifera* (produtoras de mel) é bastante diversificado e inclui savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas. Essa

grande variedade de clima e vegetação acabou originando diversas subespécies ou raças de abelhas, com diferentes características e adaptadas às diversas condições ambientais.

Há as chamadas abelhas africanizadas, as quais são políbridos, resultantes dos cruzamentos entre as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (1836), anteriormente classificadas como *Apis mellifera adansonii* Latreille (1804), e as raças européias [*A. m. mellifera* Linnaeus (1758), *A. m. ligustica* Spinola (1806), *A. m. carnica* Pollmann (1879), *A. m. caucasica* Gorbachev (1916)], que foram introduzidas na América antes da chegada das africanas em 1956, predominando, nestes políbridos, as características morfológicas e comportamentais das africanas.

A abelha africanizada é mais bem adaptada ao nosso ambiente do que as européias, desde o início se apresentou como melhor produtora de mel e também são relativamente resistentes às pragas e doenças. Na década de 1950 o Brasil ocupava o 28º lugar como produtor de mel (com produção em torno de 5 mil toneladas de mel/ano) e em 1995 destacou-se no 5º lugar (com produção em torno de 40 mil toneladas de mel/ano) (40).

À medida que ocorria a africanização, cada vez mais se sentia a necessidade de se estudar a biologia dessas abelhas e de se desenvolverem novas técnicas de manejo. A literatura internacional contribuía com poucos trabalhos, de forma que os técnicos, apicultores e pesquisadores brasileiros tiveram que buscar com seus próprios meios os novos conhecimentos. Com tudo as verdadeiras conseqüências da africanização das abelhas do Brasil foram o aprimoramento das técnicas apícolas e o aumento da produção (40).

Grande parte das espécies de abelhas não forma colônias e são conhecidas como abelhas solitárias. Entre as que formam colônias, de 300 a 400 espécies não possuem ferrão e estão reunidas num grupo chamado Meliponíneos. Cerca de 200 espécies de abelhas sem ferrão vivem no Brasil, especialmente na região amazônica. Por isso, a Amazônia é conhecida como o berço mundial das abelhas sem ferrão.

Os meliponíneos constroem ninhos em locais protegidos, como ocos de árvores. Como não desenvolveram ferrão, quando atacados se defendem de outra forma, enrolam-se nos cabelos e pêlos, entram em ouvidos, nariz e olhos. Ou, então, lançam substâncias resinosas que ardem à pele. Conforme o local onde vivem, as abelhas sem ferrão são responsáveis por 40 % a 90 % da polinização das árvores nativas. Por isso, têm uma função muito importante na formação das florestas, contribuindo também para manter a diversidade de plantas e animais que vivem na várzea (41).

Cada vez mais as abelhas vêm sendo valorizadas pelo importante papel que cumprem nas comunidades ecológicas. As abelhas constituem os principais agentes polinizadores adaptados à visita às flores de Angiospermas, provendo e aumentando a produção de frutos comestíveis para o homem e muitos animais silvestres. Além disso, auxiliam na produção de sementes para a reprodução das plantas, mantendo a diversidade do ecossistema.

Os levantamentos melissofaunísticos em áreas restritas, por meio de amostragens padronizadas, tiveram início com o trabalho de SAKAGAMI & MATSUMURA (1967), no Japão e com o trabalho de SAKAGAMI *et al.* (1967), no sul do Brasil. Até essa época, poucas eram as contribuições sobre a ecologia de comunidades de visitantes florais e essas eram realizadas por meio de procedimentos parcialmente padronizados (COCKERELL, 1900; SCHROTTKY, 1902; DUCKE, 1906, 1907; FRIESE, 1910; DUCKE, 1925).

A partir da década de 70, vários levantamentos sobre a fauna de abelhas e a relação com a flora foram realizados em diferentes ecossistemas, mostrando que o estudo dessas comunidades representa uma abordagem adequada na procura de padrões de organização destas. No Brasil, existem inúmeros levantamentos da apifauna e flora apícola que mostram a importância das plantas na dieta e manutenção das populações das abelhas, assim como a importância das abelhas no processo de polinização das plantas que visitam (42).

Muitos metabólitos secundários de plantas produzem substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre organismos vivos e seriam formados com a função de defender a espécie de predadores, alguns desses compostos são encontrados no néctar de muitas plantas, e muitas vezes produzem néctar tóxico ou repelente para as abelhas (43).

Estudos realizados na Índia (Darang) mostraram que colônias de abelhas *Apis mellifera* apresentavam mortalidade da cria em outubro, quando os arbustos de chá (*Camellia thea*, Theaceae) estavam florescendo. As larvas tornavam-se amarelas e morriam, emitindo um odor desagradável. Larvas alimentadas em laboratório com o néctar das flores do chá demonstraram os mesmos sintomas. No entanto, larvas alimentadas com o néctar diluído desenvolveram-se normalmente (44).

A cria ensacada é uma doença causada por vírus e afeta principalmente as larvas de abelhas. No Brasil, nas regiões de cerrados foi possível verificar sintomas semelhantes dessa doença nas larvas, no entanto, nenhum vírus ou outro patógeno pode ser detectado (45).

Estudos realizados por CARVALHO (46) e CARVALHO *et al.* (47) mostraram que essa doença ocorre na mesma época do florescimento do barbatimão

(*Stryphnodendron polyphyllum*) e que, fornecendo pólen dessa planta na dieta de larvas de operárias em laboratório, os mesmos sintomas eram reproduzidos.

Em função dos sintomas serem semelhantes (48) passou a denominar essa doença no Brasil como “Cria Ensacada Brasileira”. Posteriormente, SANTOS & MESSAGE (49) verificaram que alimentando larvas de abelhas em laboratório com ácido tânico, os sintomas da doença também podiam ser reproduzidos sugerindo que os taninos normalmente encontrados em grande quantidade no barbatimão seriam os causadores da “Cria Ensacada Brasileira”.

Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar a toxicidade do pólen e do néctar para as abelhas, incluindo a especialização dos polinizadores, a tentativa de impedir o roubo do néctar, a prevenção da degradação de néctar e a adulteração do comportamento de polinização (44).

A introdução de espécies vegetais e animais, as mudanças climáticas e o processo evolutivo de polinização e defesa das plantas podem ser fatos que explicam a possibilidade de “substâncias” como o néctar e o pólen serem tóxicos para as abelhas. Os relatos de casos de mortalidade em apiários na época de florescimento de determinadas espécies vegetais são abundantes como, por exemplo, *Kalmia latifolia*, *Aesculus californica*, *Zigadenus venenosus*, *Astragalus* spp., *Gelsemium semprevirens* e *Cyrilla racemiflora*, mas a questão permanece sem resposta mais esclarecedoras (50).

O Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos juntamente com o Grupo de Pesquisa do Centro de Estudo de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro vêm realizando estudos em parceria há bastante tempo, os dados mais recentes (51-69) demonstram que esta parceria vêm proporcionando resultados significativos e bastante promissores, ajudando a reforçar que os grupos envolvidos realizam trabalhos produtivos e que devem continuar com a pesquisa em conjunto.

1.4 – PEIXE MODELO PARA TESTE DE TOXICIDADE AQUÁTICA

Os estudos ecotoxicológicos constituem importantes ferramentas para o monitoramento ambiental, pois as informações que fornecem a respeito dos ambientes degradados dão subsídios para comparações com estudos paralelos em habitat menos afetados, o que pode ajudar a avaliar os danos e identificar as causas dos impactos, além de auxiliar o entendimento das relações entre a poluição e suas conseqüências biológicas. Assim, o conhecimento das aplicações dos processos biológicos no controle da poluição e a compreensão das sérias conseqüências dos impactos no ambiente possibilitam oferecer subsídios para especialistas de diversas áreas, tais como químicos, engenheiros, administradores e legisladores, que dividem a responsabilidade do manejo dos recursos naturais.

A contaminação dos recursos hídricos com inseticidas pode colocar em risco não apenas os seres humanos, mas também a fauna aquática, uma vez que inseticidas usados em plantações próximas a lagos e rios, que por meio das águas das chuvas podem ser conduzidos a estes ambientes aquáticos (lixiviação) e causar sérios danos, contaminando as águas e os organismos presentes no mesmo.

Um dos organismos padronizados para testes de toxicidade aquática são os peixes da espécie *Brachydanio rerio* (Hamilton, 1822) devido não exigir muitos cuidados para criá-los em cativeiro. Pertence à classe Actinopterygii, à ordem Cypriniformes e à família Cyprinidae (70), é conhecido como Paulistinha, mas apesar do nome, é originário da Índia e recebeu esse nome devido às suas listras horizontais que lembram a bandeira paulista. *Brachydanio rerio* é um peixe ornamental transgênico que recebeu genes de água-viva e no escuro fica com luminosidade verde-amarelada, como a luz do vaga-lume (71-72) (Figura 7, p. 18).



Figura 7 - *Brachydanio rerio* em aquário ornamental.

Acostumado a viver em cardume da natureza, apreciará conviver com outros indivíduos da mesma espécie. Costumam nadar próximo a superfície, quando criados em cativeiro deve-se manter o pH em torno de 7,0 e temperatura entre 23 e 27° C, enquanto que a alimentação desse ágil ciprinídeo deve ser a mais variada possível a fim de garantir a saúde do peixe, artêmia salina, ração em flocos, alimentos liofilizados etc.

A maneira de diferenciar o macho da fêmea é que o macho é mais esguio e a fêmea possui seu ventre mais volumoso; sua reprodução não é muito difícil, mas deve-se tomar cuidado para que os ovos não sejam devorados pelos pais, a eclosão dos ovos deve ocorrer em 48 horas após a fêmea pára de depositá-los. A alimentação dos alevinos é, geralmente, feita com gema de ovo cozida, infusórios, náuplios de artêmia e rações para filhotes de ovíparos (70).

1.5 – ESPÉCIES VEGETAIS

1.5.1 – *Stryphnodendron adstringens*

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, cujo nome popular é verdadeiro barbatimão, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosaceae, ocorre do cerrado do Pará até São Paulo e Mato Grosso do Sul, em formações primárias ou secundárias, sendo utilizada como ornamental e, a madeira em construção civil, obras em lugares úmidos, trabalhos de torno e marcenaria. É também amplamente empregada

na medicina caseira na maioria das regiões do país, sendo seu decocto indicado contra leucorréia, hemorragia, diarreia, hemorróida, para limpeza de ferimento e na forma de gotas contra conjuntivite. O chá da casca é indicado para uso externo em hemorragia uterina, ferida ulcerosa e para pele excessivamente oleosa (73-75).

A altura média alcançada pelas árvores varia entre 4 a 5 m e seus troncos variam de 20 a 30 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas bipinadas, com 5 a 8 jugas e folíolos em número de 6 a 8 pares por pina. Fruto tipo vagem, séssil, grossa e carnosa, linear-oblonga, comprida, de aproximadamente 10 cm de comprimento (73).

As flores de *S. adstringens* têm forma elipsóide, achatada, com cerca de 6 mm no eixo maior. O tegumento é duro, constituído por camada externa de células em paliçada (camada de Malpighi) e o estrato profundo é constituído por cerca de dez camadas de células de paredes espessas. O endosperma mucilaginoso envolve o embrião que apresenta cotilédones foliáceos (76).

É descrita como uma espécie perenifólia, com pico de floração, produção de folhas novas e queda de folhas entre julho e outubro. Apresenta inflorescências com número variável de flores pequenas de cor marrom (**Figura 8**, p. 20), hermafroditas, com longevidade de apenas um dia, produzindo pequenas quantidades de néctar nas flores, o que atrai pequenos insetos, tais como *Apis mellifera*, *Bombus spp.*, moscas Tabanidae e, especialmente, abelhas Meliponinae, como principais polinizadores. Apresenta frutos em algum estágio de maturação durante o ano todo e a dispersão parece ser zoocórica (77).

A casca de *S. adstringens* é citada na Farmacopéia Brasileira, sendo a constituição mencionada de 20 % de taninos (78). A porcentagem de taninos na planta pode variar entre 10 a 37 % do seu peso, variando esta porcentagem de acordo com o local de coleta do material.

Mello e colaboradores (79) identificaram vários compostos de *S. adstringens*, em especial flavonóides e proantocianidinas. Constituintes químicos: taninos condensados, substâncias monoméricas (flavan-3-óis) e proantocianidinas (entre elas 8 tipos de prodelfinidinas e 8 prorobinetinidinas), substâncias tânicas (20 % a 30 %), taninos (18 a 27 %), alcalóides não determinados, amido, matérias resinosas, mucilaginosas, matéria corante vermelha, ácido tânico, estrifno, açúcar solúvel, flavonóides, flobafenos.



Figura 8 – *Stryphnodendron adstringens*.

1.5.2 - *Dimorphandra mollis*

Com a expansão da fronteira agrícola nas regiões de cerrado, muitas espécies arbóreas encontram-se ameaçadas de extinção, entre elas, o falso-barbatimão (*Dimorphandra mollis* Benth., **Figura 9**, p. 21), uma espécie nativa do Brasil, pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpiaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (80), com grande importância principalmente para a indústria farmacêutica, na produção de princípios ativos constituídos por compostos fenólicos, tanino e rutina. O fruto do falso-barbatimão é importante fonte de rutina, na proporção de 8 g para 100 g de pericarpo. A rutina tem importância terapêutica em virtude de determinar a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares (81).

A madeira do faveiro pode ser usada para tabuado, confecção de caixas, compensados, forros, painéis, brinquedos, lenha e carvão, além da espécie poder ser utilizada em paisagismo e regeneração de áreas degradadas (83). A sua casca é rica em tanino, bastante utilizado para curtir couro (82-83).



Figura 9 – *Dimorphandra mollis*.

A árvore pode ser pequena ou mediana e de porte tortuoso. As folhas são grandes e bipinadas, com folíolos alternos ou subopostos. As flores são pequenas de cor creme-amarelada, em espigas. Os frutos são vagens de comprimento entre 10 e 15 cm, com 3 a 4 cm de largura que produzem cada uma de 10 a 13 sementes alongadas e avermelhadas.

1.5.3 – *Helietta puberula*

A família Rutaceae está incluída na ordem Rurales (84) com aproximadamente 150 gêneros e 1500 espécies separadas em sete subfamílias largamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do mundo todo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália (85). Segundo Albuquerque (86), no Brasil existem cerca de 188 espécies.

A taxonomia da família Rutaceae encontra-se ainda desorganizada, sendo o trabalho de Engler (84) a última monografia sobre a família (85). A diversidade química

desta família é bastante significativa sendo observados limonóides, alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas, etc. (87).

Dentre os representantes desta família pode destacar-se a espécie *Helietta puberula*, sendo que a maioria das espécies deste gênero (**Figura 10**) são pequenas árvores ou arbustos encontrados no México, Texas, Cuba, Venezuela, Colômbia, Peru, Paraguai, norte da Argentina e no Brasil (88).

Há poucos estudos relacionados à química e a taxonomia de *Helietta puberula*, justificando o interesse pelo estudo desta espécie vegetal.



Figura 10 – *Helietta sp.*

2 - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o estudo fitoquímico das espécies *Stryphnodendron adstringens*, *Dimorphandra mollis* e *Helietta puberula* visando à obtenção de substâncias que possam ter atividade tóxica contra insetos sociais.

Sendo assim, foram propostos os seguintes passos:

2.1 – Realizar o estudo fitoquímico de *H. puberula*, visando obtenção de seus constituintes químicos, visto que se trata de uma espécie pouco estudada, contribuindo com a quimiosistemática da família, gênero e espécie.

2.2 – Testar os extratos e/ou substâncias isoladas de *S. adstringens* contra abelhas produtoras de mel (adultas e larvas) das espécies *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica*.

2.3 – Testar os extratos e/ou suas substâncias isoladas de *S. adstringens* e *D. mollis* sobre formigas cortadeiras (*Atta sexdens*), bem como ação sobre seu fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) e sobre as enzimas de seu fluido fecal (pectinases).

2.4 - Verificar a atividade tóxica em *Brachdanio rerio* das substâncias astilbina e neoastilbina, isoladas de *D. mollis*, por estas terem apresentado atividade inseticida contra formigas cortadeiras, em trabalhos anteriores (89).

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO FITOQUÍMICO

3.1.1 – EQUIPAMENTOS

Evaporadores Rotatórios

◆ BÜCHI, rotavapor R – 200, equipado com banho BÜCHI B – 490 e recirculador refrigerado OAKTON, modelo CFT - 25 mantido a 5° C, DQ – UFSCar.

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

◆ BRÜKER modelo DRX 400 MHz (9,4 Tesla), DQ – UFSCar.

◆ BRÜKER modelo ARX 200 MHz (4,7 Tesla), DQ – UFSCar.

Cromatógrafo a Gás (GC)

◆ SHIMADZU, GC – 17A (Gas Chromatograph), coluna DB – 5, comprimento = 30 m, diâmetro = 0,32 mm e filme = 0,25 µm, DQ – UFSCar.

Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectrômetro de Massas (GC – MS)

◆ SHIMADZU, GC/MS – QP 5000 (Gas Chromatograph Mass Spectrometer), coluna DB – 5, comprimento = 30 m, diâmetro: 0,32 mm. Ionização por impacto por elétrons a 70 eV, DQ – UFSCar.

Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectrômetro de Massas (GC – MS)

◆ SHIMADZU, GC/MS – QP 5000 (Gas Chromatograph Mass Spectrometer), coluna DB – 5, comprimento = 25 m, diâmetro: 0,32 mm. Ionização por impacto por elétrons a 70 eV, IQS USP - São Carlos.

Câmara Escura de UV

◆ CHROMATO – VUE ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e $\lambda = 365 \text{ nm}$).

Espectrofotômetro no Infravermelho (IV)

◆ BOMEM HARTMANN E BRAUN, MB 102. Utilizando-se partilhas de KBr.

Polarímetro: modelo Perkin Elmer – 241, DQ – UFSCar.

Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência (HPLC)

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado a Espectrofotômetro no Ultra-Violeta (HPLC-UV)

◆ SHIMADZU modelo LC – 10AD, DQ – UFSCar.

Detector: SHIMADZU, Espectrofotômetro UV–VIS modelo SPD-5AV, DQ – UFSCar.

Bomba: SHIMADZU modelo LC – 10AD VP, DQ – UFSCar.

Comunicação detector/computador: SHIMADZU, Módulo CBM – 10A.

SHIMADZU, Programa de computação Class - VP.

◆ SHIMADZU modelo LC – 8A, DQ – UFSCar.

Detector: SHIMADZU, Espectrofotômetro UV–VIS modelo SPD-6AV, DQ – UFSCar.

Bomba: SHIMADZU modelo LC – 10AD VP, DQ – UFSCar.

Comunicação detector/computador: SHIMADZU, Módulo CBM – 10A.

SHIMADZU, Programa de computação Class - VP.

◆ SHIMADZU modelo LC – 6D, DQ – UFSCar.

Detector: SHIMADZU, Espectrofotômetro UV–VIS modelo SPD-6AV, DQ – UFSCar.

Bomba: SHIMADZU modelo LC – 10AD VP, DQ – UFSCar.

Comunicação detector/computador: SHIMADZU, Módulo CBM – 10A.

SHIMADZU, Programa de computação Class - VP.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado a Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).

◆ SHIMADZU modelo LC – 10AD, DQ – UFSCar.

Detector: SHIMADZU, Detector de Arranjo de Diodos modelo SPD – M 10A VP, DQ – UFSCar.

Desgasificador: SHIMADZU, Desgasificador modelo DGU – 14A, DQ - UFSCar.

Comunicação detector/computador: SHIMADZU, Módulo CBM – 10A.

SHIMADZU, Programa de computação Class - VP.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado a Espectrômetro de Massas (LC-MS).

◆ ALLIANCE - WATERS 2695 Separations Module.

Detectores: Photodiode Array Detector (PDA)

◆ Massas: Waters Micromass ZQ

Colunas cromatográficas

◆ Coluna analítica C-18 (Luna 10 μ) 25,0 cm x 4,0 mm empacotada no DQ – UFSCar.

◆ Coluna semipreparativa C-18 (Luna 10 μ) 30,0 cm x 2,0 cm empacotada no DQ – UFSCar.

◆ Coluna preparativa C-18 (Luna 10 μ) 30,0 cm x 2,5 cm empacotada no DQ – UFSCar.

◆ Coluna C 18 Gemini (250 cm x 4,6 mm x 5 μ m)

3.1.2 – MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

3.1.2.1 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Fases estacionárias para cromatografia em camada delgada

◆ Sílica gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de vidro preparadas no laboratório, de dimensões 3 x 10 cm (0,25 mm espessura).

◆ Sílica gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de alumínio.

Agente revelador

◆ Vanilina em ácido sulfúrico - A vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo: 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ (concentrado). A solução foi estocada em frasco âmbar e a baixa temperatura (aproximadamente 10° C).

3.1.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

◆ Sílica gel 60 PF₂₅₄ (70 – 230 Mesh ASTM) em placas de vidro preparadas no laboratório, de dimensões 20 x 20 cm.

3.1.2.3 – Cromatografia em Coluna de Vidro (CC)

Fases estacionárias:

◆ Sílica 60 (230 – 400 Mesh ASTM) – “flash”.

◆ Sílica 60 (70 – 230 Mesh ASTM) – “comum”.

◆ Sephadex[®] LH – 20 (dextrana hidroxipropilada – Amersham Pharmacia Biotech).

◆ Florisil (230 – 400 Mesh ASTM).

Colunas: As colunas utilizadas nas análises por CC foram confeccionadas na vidraria do DQ – UFSCar.

3.1.2.4 – Solventes

Solventes para cromatografia

- ◆ Solventes P. A.
- ◆ Solventes graus cromatográfico/espectroscópico.

Solventes para obtenção dos espectros de RMN

- ◆ Solventes deuterados (ACROS organics; CIL Cambridge Isotope Laboratories, Inc. e ALDRICH Chemical Company, Inc.).

3.1.2.5 – Outros reagentes

- ◆ Padrões de hidrocarbonetos, ALDRICH Chemical Company, Inc.
- ◆ Reagentes para reação de esterificação: NaOH, NH₄Cl, H₂SO₄ e NaHCO₃ (SYNTH).

3.1.2.6 - Procedimento de Reação

Reação de Transesterificação: As reações de esterificação foram realizadas pelo método de Hartman e Logo (**90**), de acordo com o seguinte procedimento:

- 1 – Em 150 mg de amostra adicionar 4 mL de solução de NaOH metanólico 0,5 N em tubo de ensaio, tampar, agitar e aquecer em banho a 80° C por 10 min., resfriar a temperatura ambiente;
- 2 – Adicionar mistura de esterificação (2 g de NH₄Cl, 3 mL de H₂SO₄ e 60 mL de MeOH), tampar, agitar e aquecer em banho a 80° C por 5 min. e resfriar a temperatura ambiente;
- 3 – Adicionar 10 mL de solução de NaHCO₃, agitar e deixar em repouso por 5 min.
- 4 – Extrair por 3 vezes consecutivas com 2 mL de hexano.

3.1.3 - MATERIAL BOTÂNICO

3.1.3.1 – *Dimorphandra mollis*

O cerne, as inflorescências e os pedúnculos de *D. mollis* foram coletados em novembro de 2003, em bosque pertencente a Unesp de Rio Claro - SP, localizado na cidade de Corumbataí e identificados por botânicos daquela instituição, em cujo herbário encontra-se depositada uma excicata: 5464 HRCB – Rio Claro – SP.

3.1.3.2 – *Stryphnodendron adstringens*

As inflorescências e os pedúnculos de *S. adstringens* foram coletados em novembro de 2003, e uma segunda coleta em dezembro de 2004, em bosque pertencente a Unesp de Rio Claro - SP, localizado na cidade de Corumbataí e identificados, também, por botânicos daquela instituição, em cujo herbário encontra-se depositada uma excicata: 11.777 HRCB – Rio Claro – SP.

3.1.3.3 – *Helietta puberula*

O caule de *H. puberula* foi coletado em janeiro de 2001 na cidade de Corumbá – MG, 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, em cujo herbário daquela instituição possui depositada uma excicata: 4844 – São Carlos - SP.

3.1.4 - METODOLOGIA

3.1.4.1 – Obtenção dos Extratos Brutos

3.1.4.1.1 – Obtenção dos extratos brutos de *D. mollis*

As amostras do cerne, dos pedúnculos e das inflorescências foram secas em estufa a temperatura de, aproximadamente, 45° C durante quatro dias, sendo posteriormente moídas em moinho elétrico tipo Willey obtendo-se um total do material seco e moído de 800,0 g, 130,0 g e 440,0 g, respectivamente.

As extrações foram realizadas por percolação, nas quais o material foi submetido a três extrações consecutivas com os solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano e metanol (vide **Fluxograma 1**, p. 33; **Figura 11**), que após filtração e evaporação dos solventes forneceram os extratos brutos relacionados nas **Tabela 1** (p. 34).

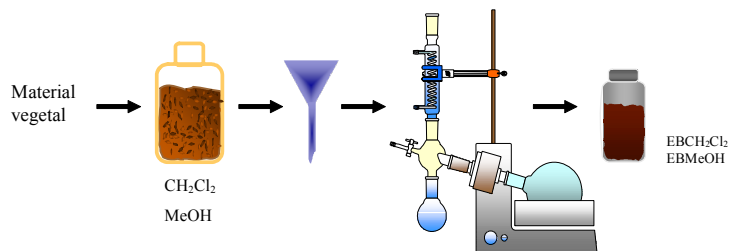
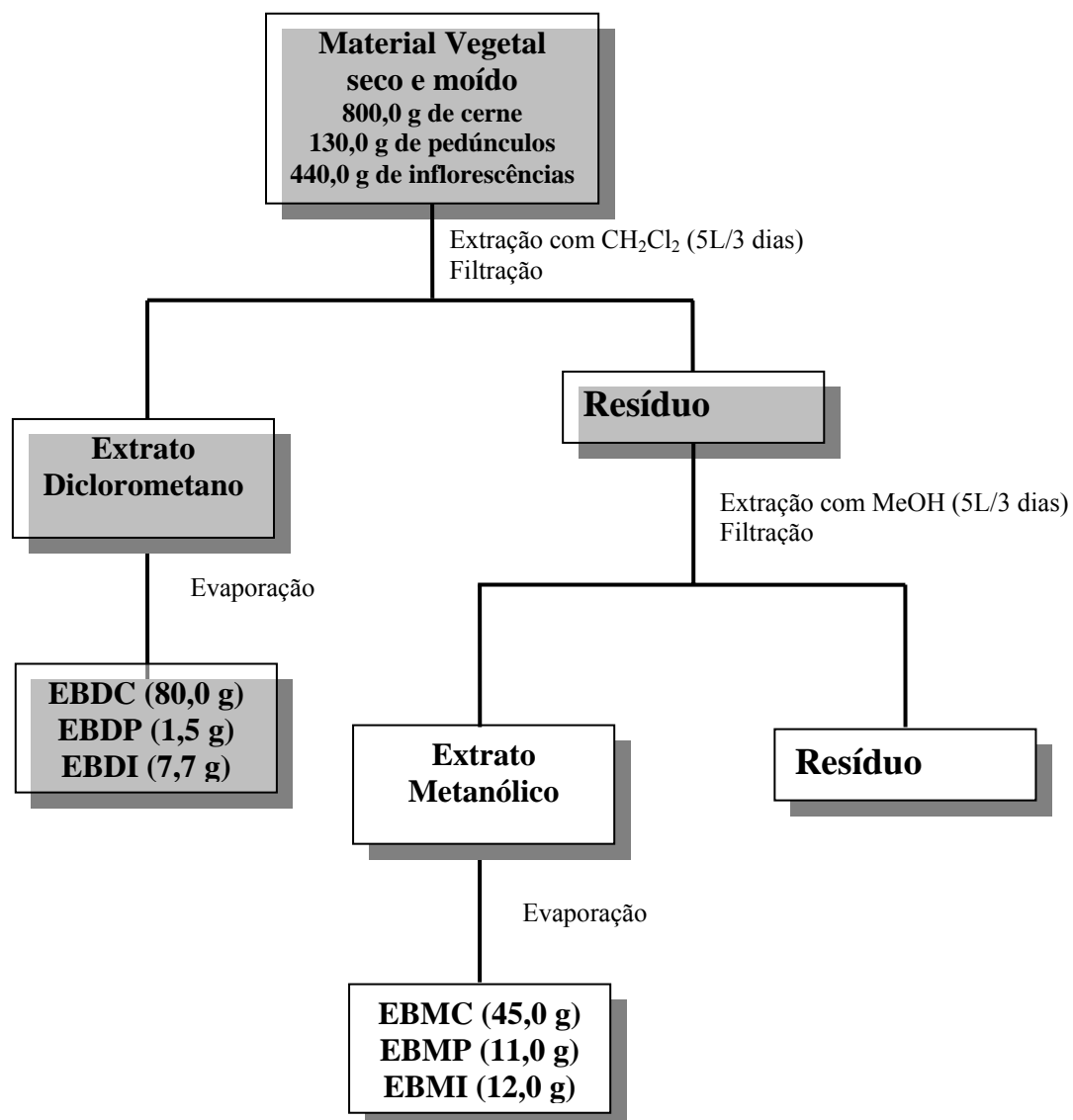


Figura 11 – Procedimento para obtenção dos extratos brutos.

Fluxograma 1 – Obtenção dos extratos brutos do cerne, dos pedúnculos e das inflorescências de *D. mollis*.



Obs: os extratos foram obtidos separadamente.

Tabela 1 - Extratos brutos obtidos do cerne, dos pedúnculos e das inflorescências de *D. mollis*.

Material Vegetal	Solventes	Extrato Bruto (g)	Código
Cerne	Diclorometano (5 L)	80,0	EBDC
	Metanol (5 L)	45,0	EBMC
Pedúnculos	Diclorometano (5 L)	1,5	EBDP
	Metanol (5 L)	11,0	EBMP
Inflorescências	Diclorometano (5 L)	7,7	EBDI
	Metanol (5 L)	12,0	EBMI

EBDC – Extrato Bruto Diclorometano do Cerne.

EBMC – Extrato Bruto Metanólico do Cerne.

EBDP – Extrato Bruto Diclorometano dos Pedúnculos.

EBMP – Extrato Bruto Metanólico dos Pedúnculos.

EBDI – Extrato Bruto Diclorometano das Inflorescências.

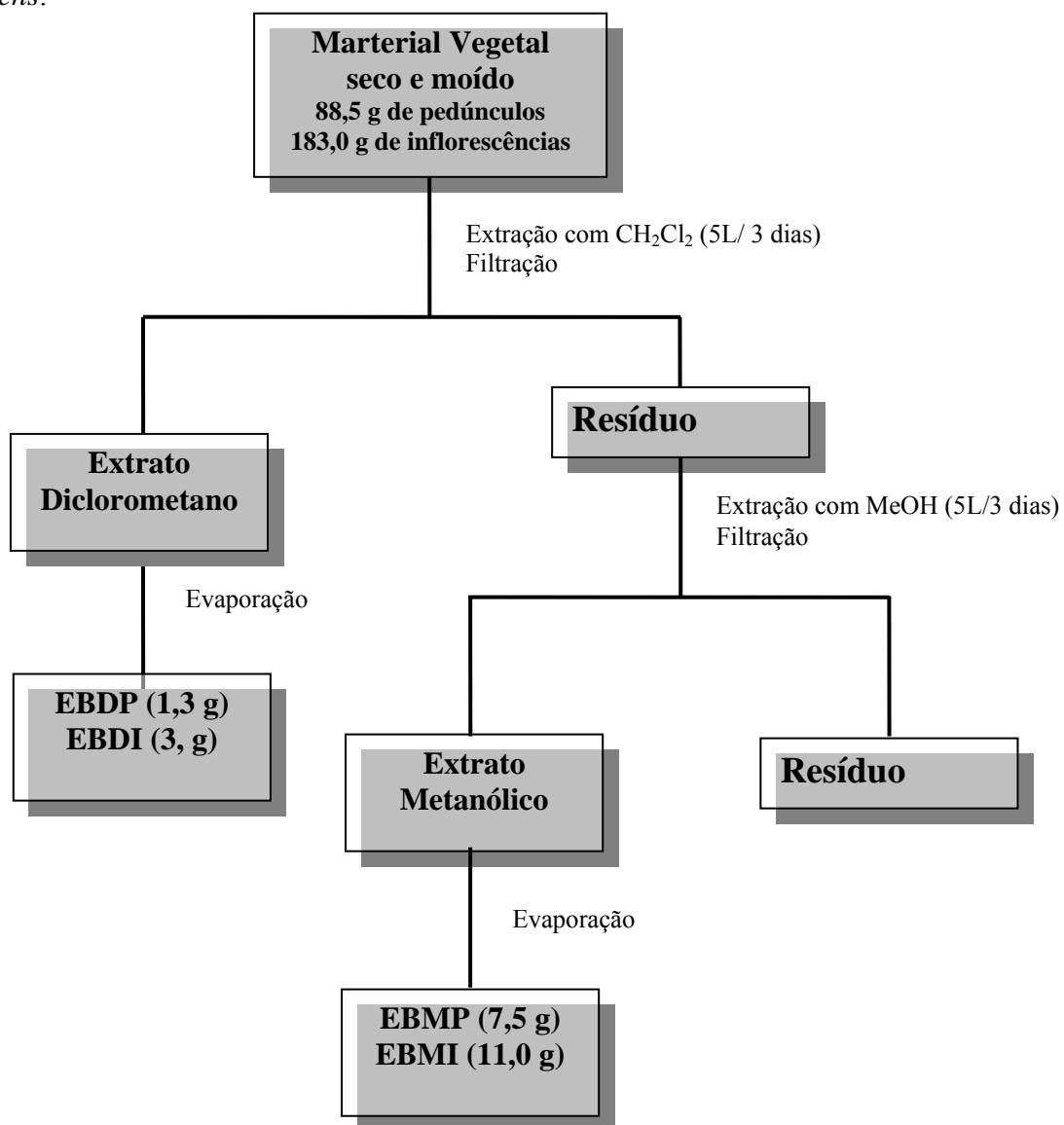
EBMI – Extrato Bruto Metanólico das Inflorescências.

3.1.4.1.2 – Obtenção dos extratos brutos de *S. adstringens*

As amostras utilizadas de *S. adstringens* foram apenas os pedúnculos e as inflorescências, as quais foram tratadas da mesma forma que as amostras de *D. mollis*, para obtenção do material seco e moído, proporcionando massa de 88,5 g e 183,0 g de pedúnculos e inflorescências, respectivamente.

As extrações foram realizadas por percolação com os solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano e metanol (vide **Fluxograma 2**, p. 35), que após filtração e evaporação dos solventes forneceram os extratos brutos relacionados na **Tabela 2** (p. 36).

Fluxograma 2 – Obtenção dos extratos brutos dos pedúnculos e das inflorescências de *S. adstringens*.



Obs: os extratos foram obtidos separadamente.

Tabela 2 - Extratos brutos obtidos dos pedúnculos e das inflorescências de *S. adstringens*.

Material Vegetal	Solventes	Extrato Bruto (g)	Código
Pedúnculos	Diclorometano (5 L)	1,3	EBDP
	Metanol (5 L)	7,5	EBMP
Inflorescências	Diclorometano (5 L)	3,0	EBDI
	Metanol (5 L)	11,0	EBMI

EBDP – Extrato Bruto Diclorometano dos Pedúnculos.

EBMP – Extrato Bruto Metanólico dos Pedúnculos.

EBDI – Extrato Bruto Diclorometano das Inflorescências.

EBMI – Extrato Bruto Metanólico das Inflorescências.

3.1.4.1.3 – Obtenção dos extratos brutos de *H. puberula*

Os extratos obtidos do Caule de *H. puberula* foram preparados no DQ - UFSCar pela técnica Dorai Pereotto Zandonai. Apenas os Extratos Brutos Hexânico e a Fração Hidroalcoólica obtida por partição líquido-líquido do Extrato Bruto Metanólico foram estudados neste trabalho.

3.1.4.2 – Fracionamento Cromatográfico de *D. mollis*

3.1.4.2.1 – Fracionamento cromatográfico do cerne de *D. mollis*

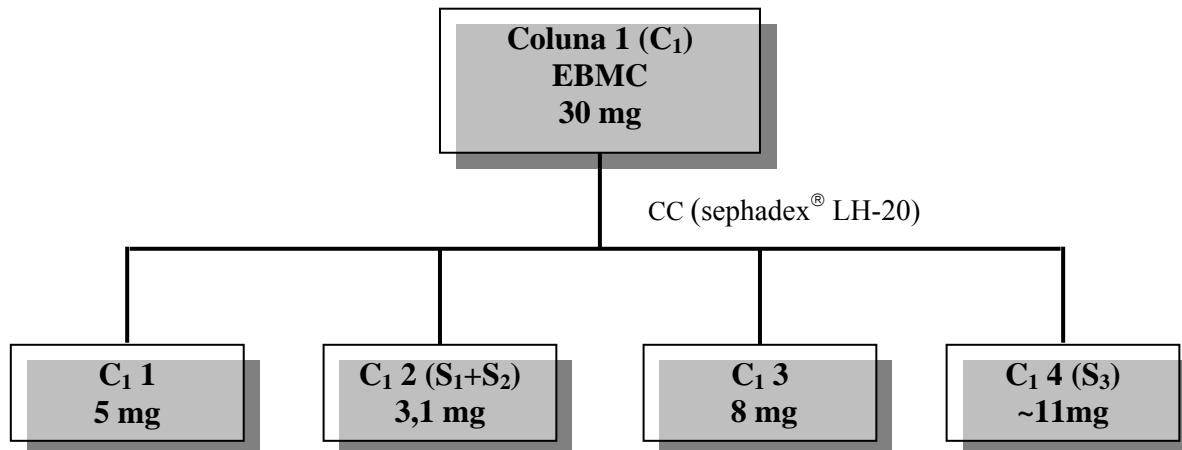
Realizou-se uma pré-análise em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), e foi observado que o extrato bruto metanólico demonstrava-se de maior interesse para obtenção dos flavonóides astilbina (**S₁**), isoastilbina (**S₂**) e catequina (**S₃**), visto que o objetivo era o isolamento dessas substâncias para realização de ensaios biológicos. Sendo assim, este foi fracionado por meio de métodos cromatográficos usuais.

O EBMC (30,0 mg) foi fracionado por Cromatografia em Coluna CC (**C₁**, $\phi = 4 \text{ cm} \times h = 60 \text{ cm}$) utilizando como fase estacionária Sephadex[®] LH – 20 e como fase

móvel metanol (vide **Fluxograma 3**). O EBMC foi previamente filtrado em algodão por três vezes e em seguida por filtros Iso-Disc™ (N-25-4 Nylon 25mm x 0,45 µm) para eliminação de resíduos ou impurezas. Por meio deste fracionamento foi possível a obtenção de, aproximadamente, 5,0 mg de catequina (**S₃**) e 3,1 mg de astilbina (**S₁**) e isoastilbina (**S₂**) em mistura. A identificação foi realizada por análise de RMN. As frações que deram origem a estas substâncias continham quantidades significativas de pigmentos, sendo necessária a purificação das mesmas.

As demais frações apresentaram-se como misturas nas quais havia grande concentração destes pigmentos, quando comparadas por CCDC com as substâncias identificadas ficando inviável a análise para determinação da composição química das mesmas.

Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico do EBMC de *D. mollis*.



As frações foram primeiramente analisados por HPLC acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (DAD) em sistema analítico no modo reverso de eluição em condições gradiente exploratório em coluna ODS (Luna 150 x 4,6 mm), fluxo de 1 mL/min., o volume de injeção foi de 20 µL em uma concentração de 1 mg/mL. E posteriormente separadas em modo preparativo, adequando as condições por cálculos de

escalonameto (S), para separação dos diastereoisômeros foi utilizado condições com válvula de reciclo.

$$S = \frac{R_P^2 L_P}{R_A^2 L_A}$$

$$S = 4,631$$

Onde: R_P e R_A são os diâmetros e L_P e L_A , o comprimento das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

O fracionamento por CC foi repetido para se obter uma quantidade mais elevada da **Fração C₁ 2** que foram reunidas após análise por CCDC de acordo com seus Rf's.

Sendo assim, a partir da reunião da **Fração C₁ 2** (~ 8,0 mg) obteve-se a separação dos dois flavonóides astilbina (**S₁**) e isoastilbina (**S₂**) (2,4 mg e 1,9 mg, respectivamente). Devido a pouca quantidade não foi possível a realização de experimentos de RMN a partir destas, sendo necessário para fracionamento uma maior quantidade do material de partida.

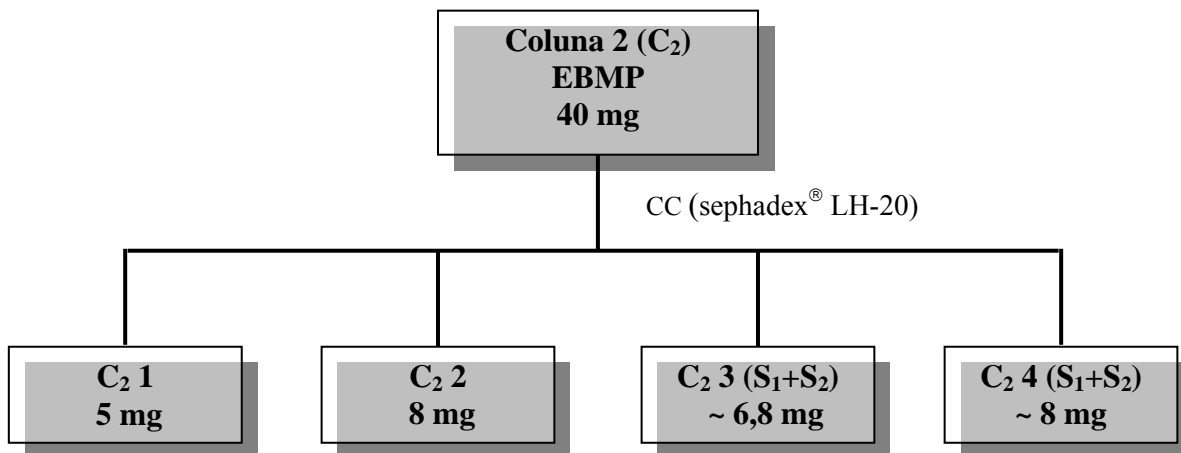
Portanto, estabelecida a metodologia para separação dos constituintes desejados, o procedimento foi repetido por várias vezes com o objetivo de se isolar a quantidade necessária para os experimentos de identificação e posterior ensaios biológicos.

3.1.4.2.2 – Fracionamento cromatográfico dos pedúnculos de *D. mollis*

Dos extratos brutos obtidos dos pedúnculos de *D. mollis*, o metanólico foi o que se apresentou mais interessante após análise em CCDC e RMN. Por este motivo o fracionamento foi iniciado a partir deste, seguindo-se o mesmo procedimento utilizado para o EBMP (40,0 mg), ou seja, CC (**C₂**, $\phi = 4$ cm x h = 60 cm) com fase estacionária

Sephadex[®] LH – 20 e como fase móvel apenas metanol (vide **Fluxograma 4**) o tratamento para eliminação de matrizes interferentes foi o mesmo.

Fluxograma 4 – Fracionamento cromatográfico do EBMP de *D. mollis*.

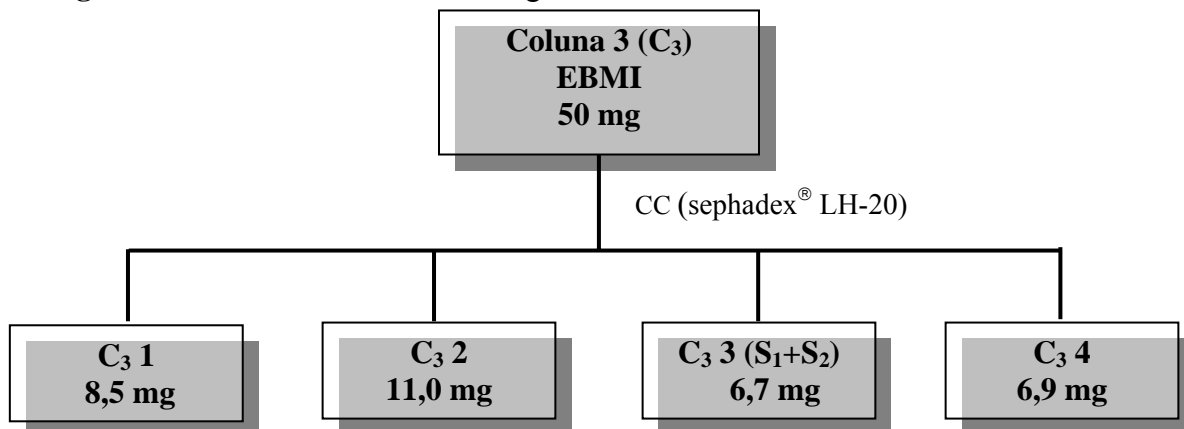


Do fracionamento em CC para o EBMP, as frações que continham a mistura das substâncias S_1 e S_2 foram refractionadas por HPLC utilizando a mesma metodologia utilizada para o EBMC, obtendo-se um total de 3,2 mg e 1,5 mg, respectivamente. Foi observada para este extrato que a substância S_1 apresentava-se em maior proporção, ou seja, era o composto majoritário.

3.1.4.2.3 – Fracionamento cromatográfico das inflorescências de *D. mollis*

Como foi observado nos fracionamentos anteriores o EBM é o que se apresenta de maior interesse, não sendo diferente para as inflorescências após análise por CCDC. Sendo assim, os procedimentos, tanto para o fracionamento do extrato (vide **Fluxograma 5**, p. 40) e obtenção das substâncias foram os mesmos, visto que foram bem eficientes.

Fluxograma 5 – Fracionamento cromatográfico do EBMI de *D. mollis*.



Utilizou-se HPLC para separar os diastereoisômeros por meio da metodologia descrita anteriormente. Sendo que, a partir deste extrato também a substância S_1 estava em maior proporção, quando comparado o rendimento de S_1 e S_2 (3,8 mg e 1,2 mg, respectivamente).

Para obtenção das quantidades necessárias (100 mg de cada substância) para a realização dos ensaios biológicos, os procedimentos de separação e purificação dos flavonóides astilbina (S_1), isoastilbina (S_2) e catequina (S_3), foram os mencionados anteriormente, ou seja, a metodologia, por meio de CC (Sephadex® LH – 20) e HPLC, foi repetida várias vezes.

Levando em consideração que para obtenção dos diastereoisômeros a partir do EBMC o rendimento foi mais elevado, optou-se pelo fracionamento apenas deste extrato.

3.1.4.3 – Fracionamento cromatográfico de *S. adstringens*

3.1.4.3.1 – Fracionamento cromatográfico das inflorescências de *S. adstringens*

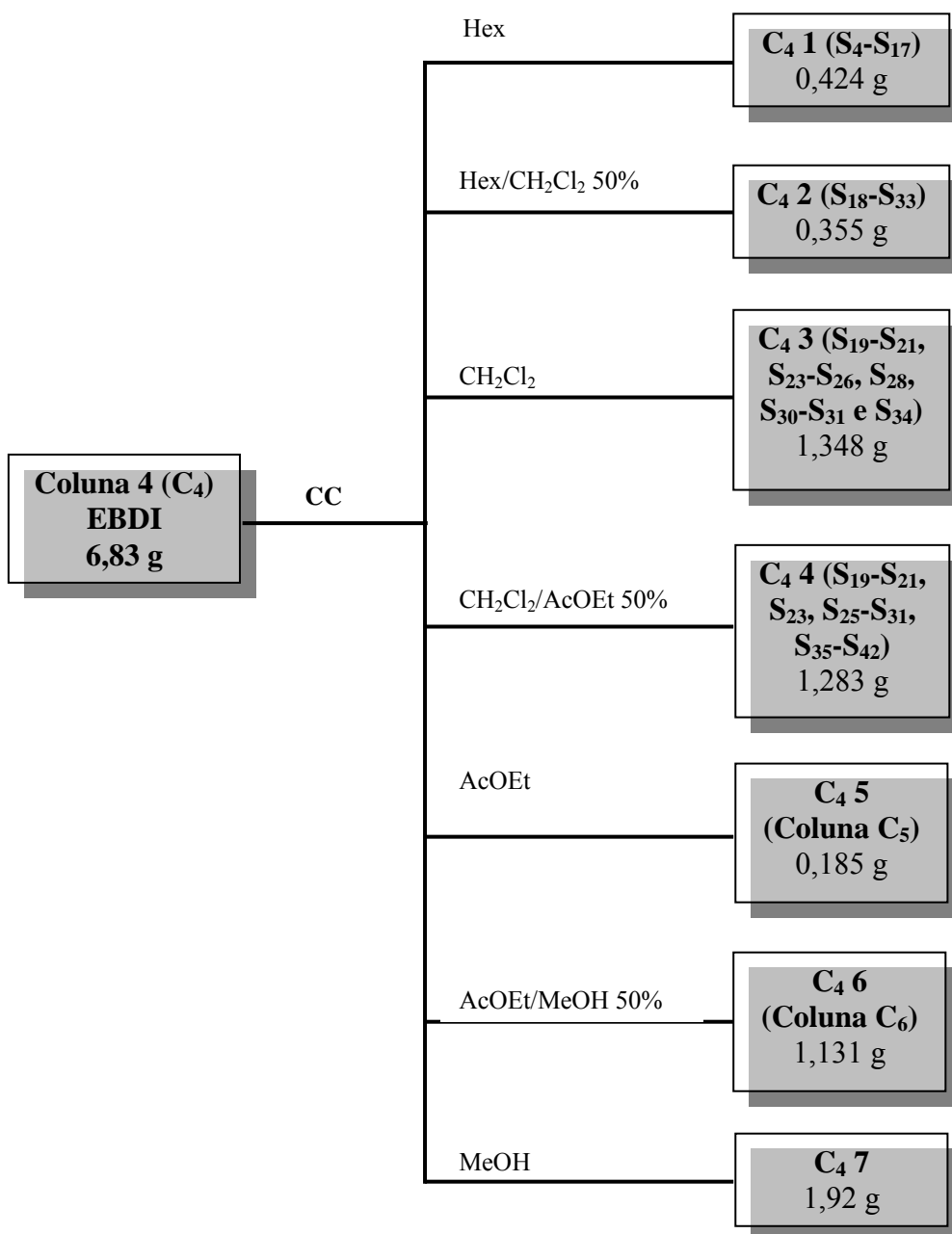
3.1.4.3.1.1 – Fracionamento cromatográfico do EBDI de *S. adstringens*

O EBDI foi submetido à CC (C_4 , $\phi = 6$ cm x h = 35 cm) utilizando como fase estacionária sílica 60 (70 - 230 Mesh ASTM) e como fase móvel misturas de solventes

(vide **Fluxograma 6**, p. 42) em ordem crescente de polaridade (2 L para cada eluição) obtendo-se um total de 7 frações que foram biomonitoradas por diferentes ensaios biológicos apresentando atividade em pelo menos um dos modelos testados. Com isso, seguiram-se os procedimentos usuais de identificação.

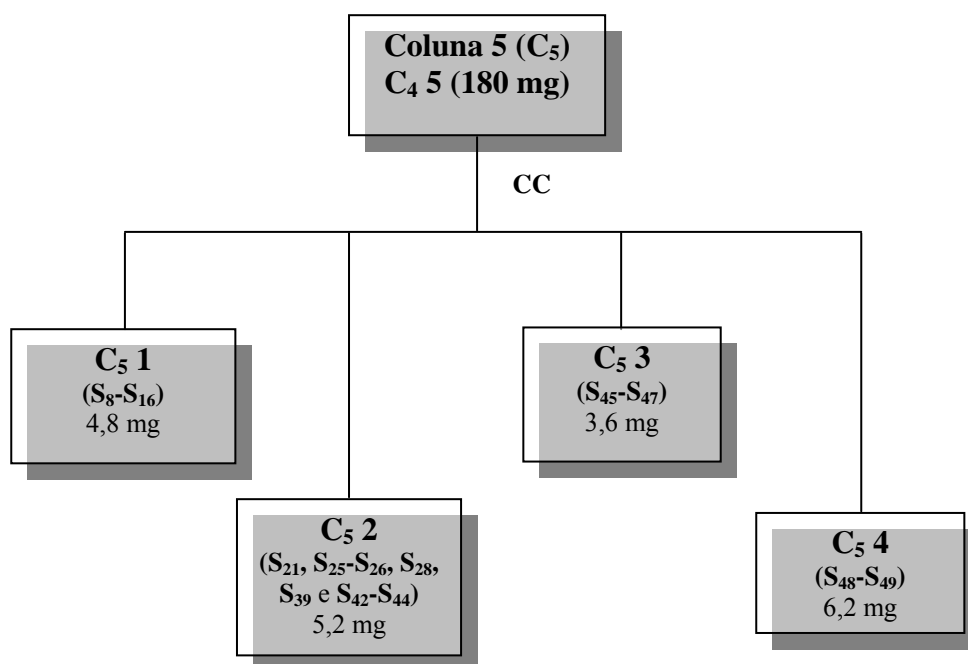
A análise por CCDC das **Frações C₄ 1 – 4** indicou a presença de substâncias de pouca polaridade, estas foram identificadas por meio de análise de RMN ¹H e GC-MS, bem como por comparação de algumas substâncias com amostras autênticas comerciais por meio de GC, enquanto que, as **Frações C₄ 5 – 7** apresentaram-se mais complexas, necessitando de mais fracionamentos para obtenção de seus constituintes. A **Fração C₄ 5** originou a **Coluna C₅**, e a **Fração C₄ 6** deu origem a **Coluna C₆**.

Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico do EBDI de *S. adstringens*.



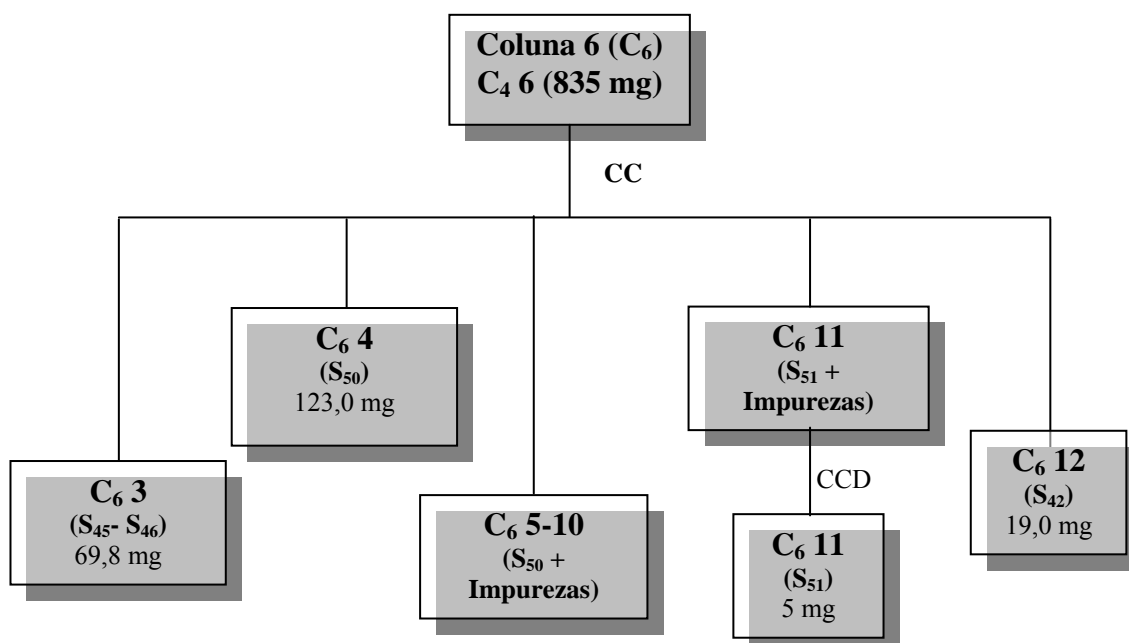
◆ O fracionamento da **Fração C₄ 5** (vide **Fluxograma 7**, p. 43) foi realizado por meio de CC (C₅, $\phi = 2,5$ cm x h = 40 cm) utilizando como fase estacionária sílica 60 (230 - 400 Mesh ASTM) e como fase móvel mistura de solventes (Hex – AcOEt) em ordem crescente de polaridade (para cada 350 mL aumento de 5 % de AcOEt). As frações foram reunidas de acordo com seu R_f's, após análise por CCDC.

Fluxograma 7 – CC da **Fração C₄ 5** do EBDI de *S. adstringens*.



♦ O refracionamento da **Fração C₄ 6** (vide **Fluxograma 8**) foi realizado por CC ($\phi = 2,5$ cm x h = 30 cm) utilizando com fase estacionária sílica 60 (230 - 400 Mesh ASTM) em sistema gradiente de eluição e como fase móvel mistura de solventes (Hex – AcOEt) em ordem crescente de polaridade (para cada 300 mL aumento de 5 % de AcOEt). As frações foram reunidas de acordo com seu RF's, após análise por CCDC.

Fluxograma 8 - CC da **Fração C₄ 6** do EBDI de *S. adstringens*.



A **Fração C₆ 11** foi purificada por CCDP utilizando como fase estacionária sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck e como fase móvel Hex/AcOEt 20 %, obtendo-se assim, a substância **S₅₁**.

◆ A **Fração C₄ 7** apresentou-se como uma mistura de açúcares e não foram realizadas análises para sua elucidação estrutural.

Posteriormente, o EBDI (aproximadamente 5,0 g) foi fracionamento por mais duas vezes por meio do mesmo procedimento, para obtenção de uma maior quantidade das Frações.

Do estudo fitoquímico do EBDI identificou-se um total de 49 substâncias (**S₄-S₅₂**).

3.1.4.3.1.2 – Fracionamento cromatográfico do EBMI de *S. adstringens*

Inicialmente o EBMI apresentou-se muito complexo para obtenção dos seus constituintes químicos, devido a uma quantidade elevada de pigmentos e açúcares. Sendo assim, foram testados vários métodos cromatográficos muitos dos quais ineficientes. Então, tentou-se obter metodologias para HPLC, das quais a mais adequada foi utilizando-se as seguintes condições para sistema analítico:

- ◆ Coluna C 18 Gemini (250 cm x 4,6 mm x 5 µm).
- ◆ Detector DAD (na região de $\lambda = 200$ nm a $\lambda = 500$ nm).
- ◆ Sistema gradiente: 5 % B - 100% B 60 min.
- ◆ Fase móvel: A (H₂O/HCOOH 1 % v/v): B (MeOH/ACN 48/48)
- ◆ Fluxo: 1,0 mL/min.
- ◆ Loop 20 µL.
- ◆ Concentração do extrato: 1 mg/mL de MeOH.

Após obtenção e adequação das condições cromatográfica para HPLC em sistema analítico, as condições foram otimizadas para sistema preparativo.

Para uma melhor análise dos constituintes, o EBMI (5 g) foi fracionado, primeiramente, por CC (**C₇**) utilizando-se como fase estacionária Sephadex[®] LH – 20 ($\phi = 4,0 \text{ cm} \times h = 120 \text{ cm}$) e como fase móvel, apenas metanol, deste fracionamento foi obtido um total de 32 frações que foram reunidas de acordo com seus RF's após análise por CCDC. Após reunião das frações, estas foram refractionadas por HPLC preparativo (**C₈**) adequando as condições analíticas por cálculos de escalonamento (S).

Das frações do EBMI obtidas por HPLC identificou-se às substâncias **S₆₅–S₆₉**, **S₇₄–S₈₈**.

3.1.4.3.2 – Fracionamento cromatográfico dos pedúnculos de *S. adstringens*

3.1.4.3.2.1 – Fracionamento cromatográfico do EBDP de *S. adstringens*

O EBDP de *S. adstringens* foi submetido à CC **C₉** ($\phi = 5,0 \text{ cm} \times h = 35 \text{ cm}$) utilizando como fase estacionária sílica 60 (70 - 230 Mesh ASTM) e como fase móvel, solventes e mistura destes em ordem crescente de polaridade (2 L para cada eluição), como é indicado no **Fluxograma 9** (p. 47), obtendo-se um total de 10 frações, as quais foram biomonitoradas em diversos ensaios biológicos, tendo apresentado alguma atividade em pelo menos um modelo testado. Sendo assim, a identificação de seus constituintes foi necessária.

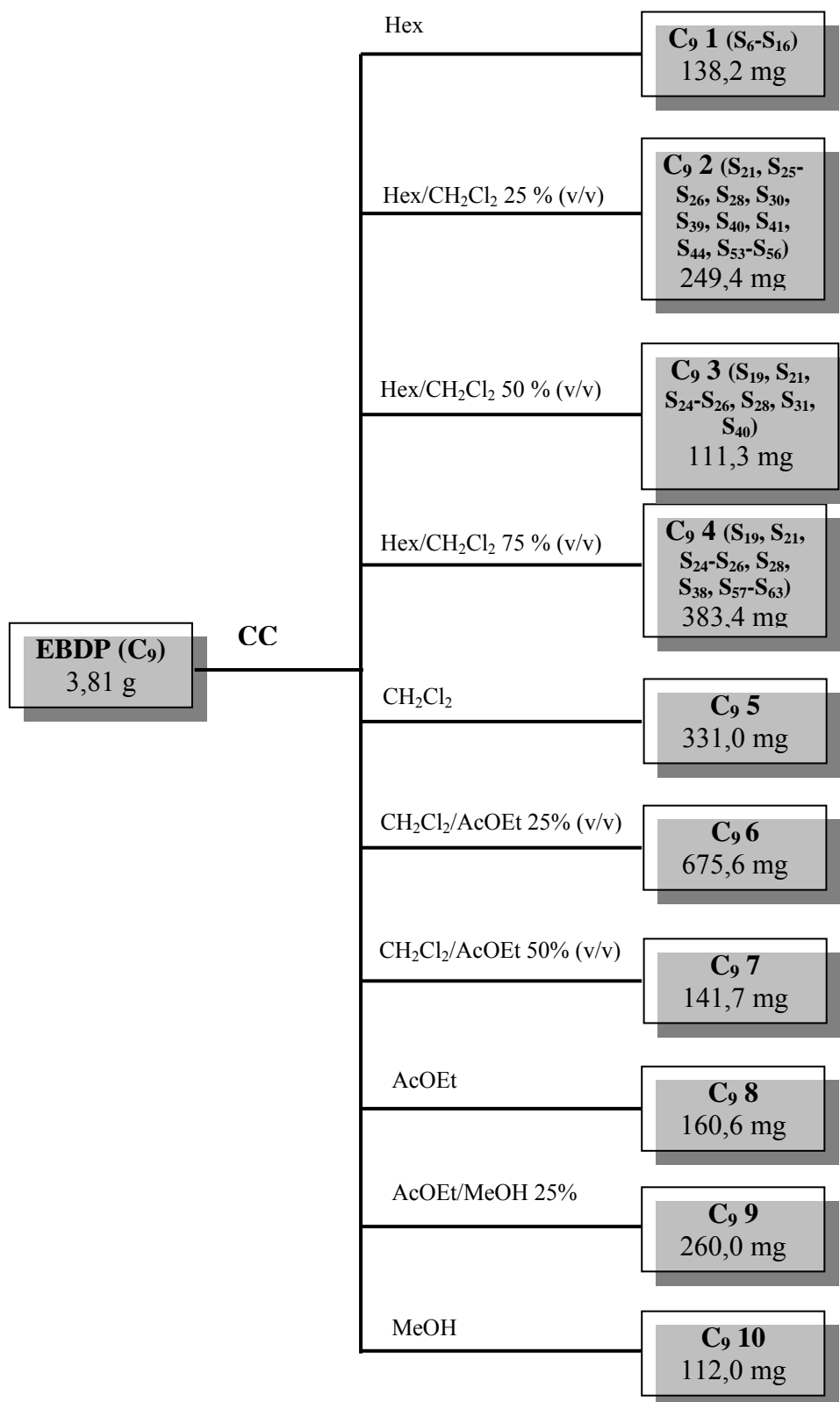
As **Frações C₉ 1 - 4**, após análise preliminar por CCDC verificou-se que continham substâncias apolares e isto foi confirmado através de experimentos de RMN ¹H. As substâncias destas frações foram identificadas por meio de análises de RMN e GC-MS e algumas se comparando por GC com padrões comerciais autênticos, não sendo necessário para isso um novo fracionamento destas frações.

As **Frações C₉ 5 – 9** apresentaram-se mais complexas para identificação dos constituintes químicos, sendo necessárias serem refractionadas. Foram submetidas à CC sendo que as metodologias estão indicadas na descrição de cada fracionamento.

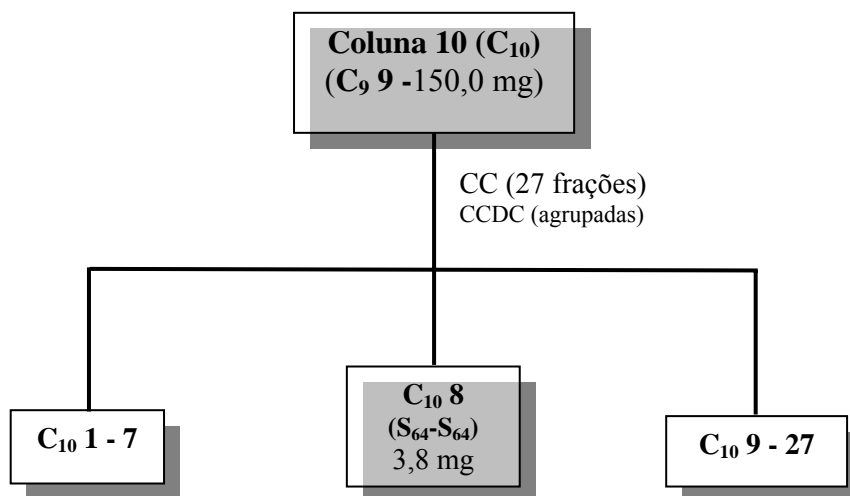
A **Fração C₉ 10**, após análise por RMN ¹H não se demonstrou de grande interesse, sendo que, provavelmente, trata-se de mistura de açúcares e pigmentos.

◆ A **Fração C₉ 9** foi refractionada por CC (**C₁₀**, $\phi = 2,5$ cm x h = 25 cm) utilizando-se como fase estacionária sílica 60 (230 - 400 Mesh ASTM) com uma camada superior de Florisil (230 – 400 Mesh ASTM) e como fase móvel misturas de solventes (Hex – AcOEt) em ordem crescente de polaridade (a cada 300 mL aumento de 5 % de AcOEt), **Fluxograma 10** (p. 48).

Fluxograma 9 – Fracionamento cromatográfico do EBDP de *S. adstringens*.



Fluxograma 10 – Fracionamento da **Fração C₉ 9** do EBDP de *S. adstringens*.



3.1.4.3.2.2 – Fracionamento cromatográfico do EBMP de *S. adstringens*

Para o fracionamento do EBMP foi utilizado a mesma metodologia e condições obtidas para o EBMI, visto que os dois extratos demonstravam-se similares.

O EBMP foi, então, fracionado por CC (C₁₁, $\phi = 4 \text{ cm} \times h = 120 \text{ cm}$) utilizou-se como fase estacionária Sephadex[®] LH - 20 e fase móvel metanol e as frações obtidas deste foram cromatografadas por HPLC sistema preparativo (C₁₂), obtendo-se desta forma as substâncias S₆₉, S₇₆, S₇₈ – S₇₉, S₈₅ – S₈₈.

3.1.4.4 – Fracionamento cromatográfico de *H. puberula*

3.1.4.4.1 – Fracionamento cromatográfico do caule de *H. puberula*

O EBHC (18,13 g) de *H. puberula* foi fracionado por CC (C₁₃, $\phi = 5,0 \text{ cm} \times h = 40 \text{ cm}$) utilizando como fase estacionária sílica 60 (70 - 230 Mesh ASTM) e como fase móvel, solventes e misturas destes (Hex/CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH) em ordem crescente de polaridade (3 L para cada eluição), como é indicado no **Fluxograma 11** (p. 50), obtendo-se um total de 8 frações.

A **Fração C₁₃ 2** foi analisada por RMN ¹H e GC–MS, bem como por GC em comparação de algumas substâncias com amostras de padrões comerciais autênticas.

◆ A **Fração C₁₃ 5** (3,0 g) foi submetida a mais um fracionamento por CC (**C₁₄**, $\phi = 4,0$ cm x h = 45 cm) utilizando como fase estacionária sílica 60 (230 – 400 Mesh ASTM) e como fase móvel Hex/AcOEt 8 % em sistema isocrático. As frações obtidas foram monitoradas por CCDC e reunidas de acordo com seus Rf's. Foi obtido um total de 51 frações. E desta, a **Fração C₁₄ 8** foi identificado à substância **S₁₀₀**.

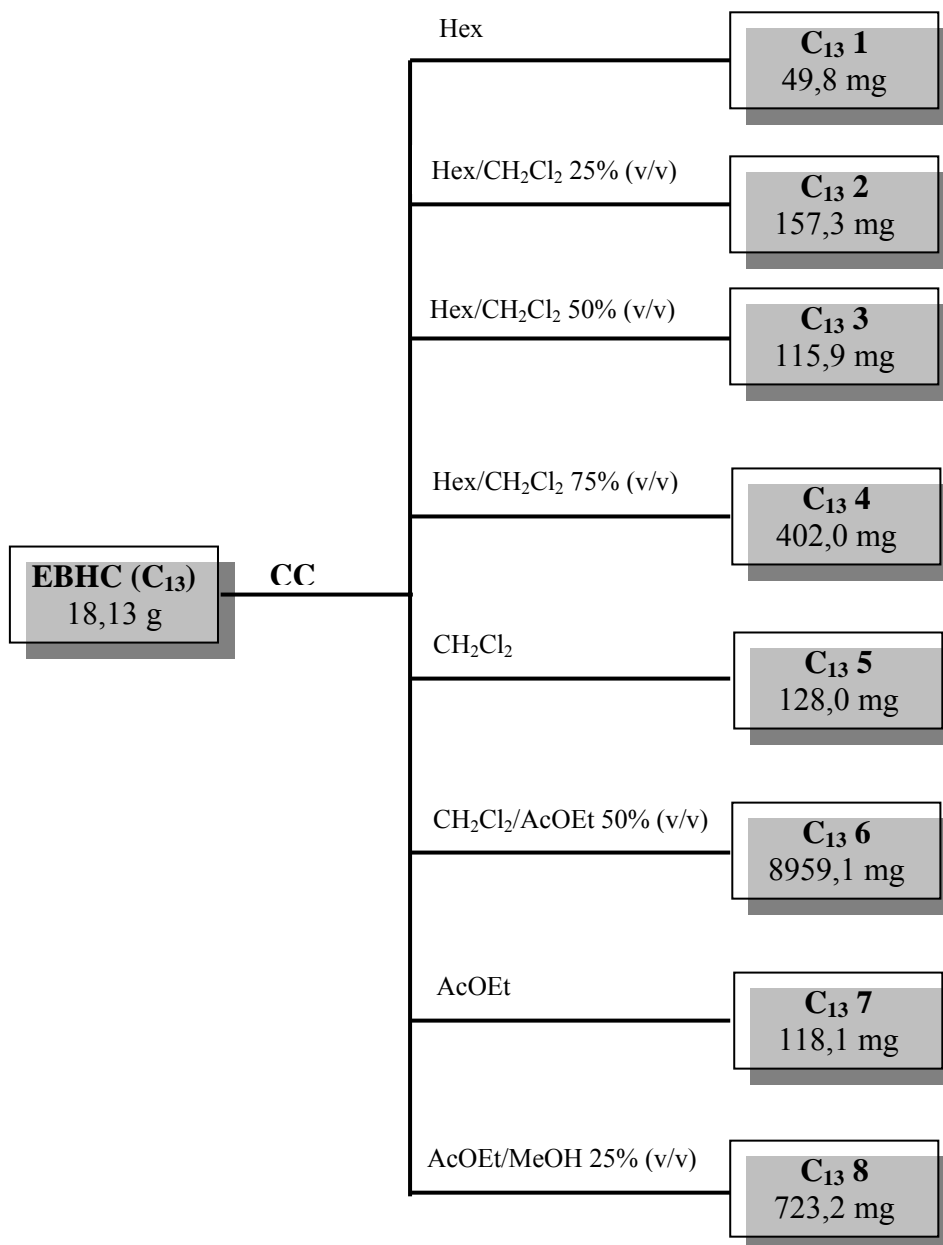
3.1.4.4.1.1 – Fracionamento cromatográfico do EBMC de *H. puberula*

O EBMC de *H. puberula* apresentou-se complexo após análise por CCDC e RMN ¹H, sendo assim, tentou-se obter uma metodologia para HPLC, o sistema mais adequado foi:

- ◆ Coluna C 18 Gemini (250 x 4,6 mm x 5 μ m).
- ◆ Detector DAD ($\lambda = 250$ nm e $\lambda = 360$ nm).
- ◆ Sistema gradiente: 5 % B – 100 % B 60 min.
- ◆ Fase móvel: A (H₂O/HCOOH 1 % v/v): B (MeOH/ACN 48/48)
- ◆ Fluxo: 1,0 mL/min.
- ◆ Loop 20 μ L.
- ◆ Concentração do extrato: 1 mg/mL de MeOH.

Depois de encontrada a metodologia mais adequada, o EBMC (5 g) de *H. puberula* foi, primeiramente filtrados e depois fracionado por CC (**C₁₅**) utilizando como fase estacionária Sephadex[®] LH – 20 ($\phi = 4,0$ cm x h = 120 cm) e como fase móvel, apenas metanol e as frações obtidas deste foram cromatografadas por HPLC sistema preparativo (**C₁₆**), obtendo-se desta forma as substâncias **S₇₀ - S₇₃, S₁₀₁ – S₁₀₅**.

Fluxograma 11 – Fracionamento do EBHC de *Helietta puberula*.



3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os ensaios de atividade inseticida e fungicida foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais – IB – UNESP de Rio Claro – SP. Os modelos utilizados foram frente às formigas cortadeiras, seu fungo simbionte e as enzimas pectinases provenientes do fluido fecal e frente às abelhas produtoras de mel, suas operárias e larvas.

Os ensaios de toxicidade em peixes da espécie *Brachdanio rerio* foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Biologia da UFSCar.

3.2.1 – ATIVIDADE INSETICIDA

3.2.1.1 – Ensaio Inseticida Frente às Abelhas Sociais

3.2.1.1.1 – Obtenção das operárias

A atividade foi realizada com as duas espécies de abelhas produtoras de mel *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica*. As espécies *Apis mellifera* foram coletadas diretamente dos favos, sendo observada a coloração e o tamanho das mesmas para a identificação. Já para as *Scaptotrigona postica*, os favos de cria coletados nos ninhos foram colocados em bandejas plásticas de 55 cm x 45 cm x 10 cm com paredes revestidas de fluon (resina de fluoroetireno) para evitar fugas, com alimento (cândi) e água, para que as operárias emergissem num intervalo de 24 horas.

3.2.1.1.2 – Obtenção das larvas

Para ensaios com larvas foram utilizados alvéolos artificiais segundo a técnica descrita por VANDENBER e SHIMANUKI (91), com algumas adaptações. Segundo essa técnica, com o auxílio de um estilete de ponta dobrada em ângulo reto as larvas de

aproximadamente um dia de idade foram transferidas para cúpulas de polietileno (9,8 mm de altura x 5,6 mm de raio inferior x 8,8 mm de raio), normalmente utilizadas para produção de rainha ou de geléia real. Previamente, as cúpulas foram esterilizadas em autoclave para evitar a contaminação das larvas.

3.2.1.1.3 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as operárias

A atividade inseticida frente às abelhas produtoras de mel foi realizada por ingestão do material vegetal incorporado em dieta artificial, a qual é composta de açúcar cândi (açúcar de confeitiro e mel 5:1). A concentração do material incorporado à dieta artificial foi de 0,2 %; 0,5 % e 1,0 % (m/m). As abelhas recém emergidas foram colocadas em caixas de madeiras em grupos de 20, encubadas em estufa BOD a uma temperatura de $32 \pm 1^\circ \text{C}$ para *A. mellifera* e $28 \pm 1^\circ \text{C}$ para *S. postica* e umidade relativa de 70 %, por um período de 25 dias. A mortalidade foi avaliada diariamente em planilha apropriada, e então, foi aplicado o teste não-paramétrico Log Rank test (92) para comparar as curvas de sobrevivência.

3.2.1.1.4 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as larvas

O alimento foi depositado para as larvas no fundo dos alvéolos com auxílio de uma micropipeta, durante cinco dias, recebendo em cada um deles: 15; 25; 50 e 75 μL de alimento contendo o material incorporado, gerando as concentrações do material incorporado na dieta de 0,2 %; 0,5 % e 1,0 % (m/m). A dieta utilizada foi preparada com 10 g de geléia real, 7,4 mL de água destilada, 1,4 g de D-glicose, 1,4 g de D-frutose e 0,2 g extrato de levedo.

Os alvéolos contendo as larvas foram colocados em placas de Petri dispostos em forma quadrangular com cinco alvéolos em cada lateral, contabilizando vinte alvéolos em cinco placas. Cada teste totalizou 100 larvas. As larvas foram observadas diariamente sob lupa e anotadas as alterações de coloração, desenvolvimento e o

número de indivíduos mortos por 24 e 48 horas. Dessa forma, foi calculada a porcentagem de larvas sobreviventes a cada 24 horas, comparando o resultado ao grupo controle.

3.2.1.2 – Ensaio Inseticida Frente às Formigas Cortadeiras

3.2.1.2.1 – Obtenção das formigas cortadeiras

As operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em condições de laboratório e mantidas com dieta artificial.

3.2.1.2.2 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as operárias

A atividade inseticida frente às formigas cortadeiras foi realizada por ingestão, por meio da incorporação do material vegetal em dieta artificial, que é composta por 5,0 % glicose, 1,0 % peptona, 1,0 % extrato de levedura e 1,5 % ágar bacteriológico dissolvidos em 10,0 mL de água destilada. Esta solução foi levada ao forno de microondas por 4 min. e posteriormente à autoclave por 15 min. a uma temperatura de 120° C. A concentração do material incorporado à dieta artificial foi de 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %. A dieta foi deixada em temperatura ambiente onde se solidificou e foi colocada em placas de Petri contendo grupos de 10 formigas por placa e incubadas em estufa BOD a uma temperatura de 25° C por um período de 25 dias onde foi verificado o índice diário de mortalidade e comparado com um controle. Após este período foi verificada a mortalidade média através de teste estatístico apropriado.

3.2.1.3 – Ensaio Frente ao Fungo simbiote

3.2.1.3.1 – Isolamento do fungo simbiote

Inicialmente isolou-se o fungo simbiote de um ninho de formigas cortadeiras (*Acromyrmex balzani*) e ele foi mantido em condições de laboratório por passagens mensais ao meio de cultura.

3.2.1.3.2 – Preparação do meio de cultura e metodologia do ensaio para os fungos

O preparo do meio de cultura para o fungo simbiote *Lecoagaricus gonyilophorus* foi realizado adicionando-se 10 g extrato de malte (Merk), 10 g glicose (Mallin Kradt), 5 g NaCl (Sinter/Difro), 5 g peptona (Difro), 15 g ágar (Difro), em 1000 mL água destilada, mantendo o pH entre 6 e 6,5 a uma temperatura aproximada de 25° C, em seguida aquecido por 5 min. em microondas em potência alta para homogeneizar.

Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo de PAGNOCCA *et al.* (93). Cada amostra foi ensaiada em triplicata de tubos de cultura contendo a massa fúngica, sendo que foi utilizado um número idêntico de réplicas para o solvente e o grupo controle. Estes foram incubados por um período de 30 dias a uma temperatura de 25 ± 2° C. Após este período foram realizadas observações visuais do crescimento do micélio e comparando-se a massa fúngica do controle com a massa fúngica da amostra.

3.2.1.4 – Ensaio Frente às Enzimas Pectinases

3.2.1.4.1 – Extração do fluido fecal das formigas

As formigas cortadeiras foram colocadas em recipiente e resfriadas a 9° C por 10 min. Os abdomens das formigas foram comprimidos com auxílio de uma pinça e o fluido fecal coletado por meio de uma pipeta automática. As amostras do fluido fecal e anal (ricos em enzimas pectinases) foram depositadas em tampão *Mcllvaine* 50 mM, pH 5,0, mantidas em banho de gelo e em seguida estocadas a – 20° C.

3.2.1.4.2 – Preparação do meio reacional e metodologia da atividade enzimática

Para os ensaios com as enzimas foi preparado 4 μL de uma solução de DMSO (dimetilsulfóxido) (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) da amostra a ser testada a qual foi adicionada ao meio reacional (300 μL) constituído por: 150 μL de pectina cítrica a 2 g/100 mL (Sigma P-9135) em 50 mmol/L de tampão citrato-fosfato em pH = 5; 75 μL de líquido fecal (contendo pectinases) diluído 500 vezes e 71 μL de água ultrapura. 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 min., sendo que alíquotas de 50 μL foram coletadas nos tempos de incubação zero e final de 30 min. Estas alíquotas foram adicionadas a 100 μL de reagente ADNS (ácido dinitrosalisílico) (94) e 100 μL de água. A mistura resultante foi fervida em banho maria por 5 min., centrifugada por 3 min. e o sobrenadante foi utilizado para determinação da densidade óptica (DO) a 540 nm. As diferenças de DO no tempo zero e final foram calculadas para os experimentos com a amostra testada (DO_A) e para o controle (DO_C). Os resultados das densidades ópticas foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney (95).

3.2.1.5 – Ensaio de Toxicidade Frente ao Peixe Paulistinha

3.2.1.5.1 – Obtenção e manutenção dos peixes

Os peixes foram adquiridos num aquarista da cidade de São Carlos e foram introduzidos em aquários no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Biologia da UFSCar sob as condições necessárias à sua sobrevivência, ou seja, água corrente, temperatura de aproximadamente 25° C, aeração constante, pH entre 6,8 e 7,0. Eles foram submetidos à adaptação durante 20 dias em aquários de 200 L e alimentados com ração apropriada todos os dias, sendo que durante os testes os peixes não foram alimentados. Após o tempo de incubação os peixes foram transferidos

para aquários menores, com dimensões de 10 cm x 13 cm x 20 cm de modo que o volume total de água foi de aproximadamente 1 g de massa corpórea / L em um total de 2,5 L em cada aquário, utilizando a água do aquário da fase de adaptação.

3.2.1.5.2 – Metodologia do ensaio de toxicidade

Os testes foram realizados em duplicata para as substâncias astilbina, isoastilbina e catequina isoladas de *D. mollis*. Elas foram administradas nas concentrações de 2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 e 2^4 mg/L e um dos aquários foi utilizado como controle, nas mesmas condições dos demais, porém sem a substância ensaiada. As observações foram feitas de 6 em 6 horas durante um período de 96 horas e anotadas em planilha apropriada.

Se a substância ensaiada apresentou-se tóxica, calculou-se a média aritmética aproximada dos peixes mortos e aplicaram-se esses dados ao programa estatístico JSPear test (96), para a determinação da CL_{50} .

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – ESTUDO FITOQUÍMICO: IDENTIFICAÇÕES E DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS ISOLADOS.

4.1.1 – GENERALIDADES SOBRE FLAVONÓIDES

Os flavonóides se apresentam como sólidos amorfos de cor amarela. No espectro no infravermelho apresentam principalmente uma banda característica do estiramento de carbonilas α,β -insaturadas em torno de 1650 cm^{-1} e também uma banda intensa na região de $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento da ligação O-H.

4.1.1.1 – Nomenclatura dos Flavonóides

4.1.1.1.1 – Nomenclatura Oficial (IUPAC, 1971)

Os flavonóides são constituídos basicamente por um sistema benzopirânico (cromeno), a partir do qual é iniciada a numeração das estruturas (**Figura 12**).

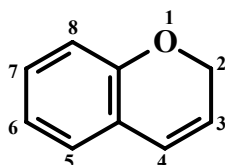
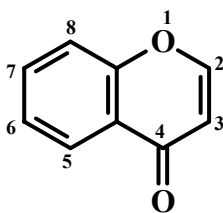
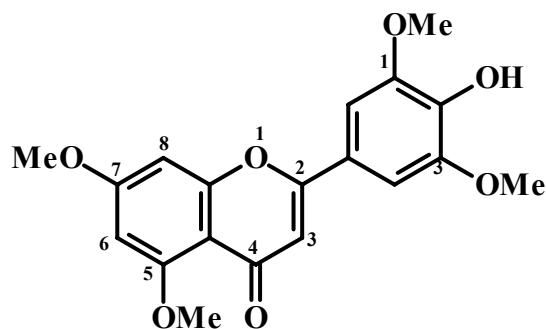


Figura 12 – Sistema benzopirânico.

No caso das flavonas, que apresentam carbonila em C-4, o sistema passa a receber a nomenclatura: 4H-1-benzopiran-4-ona **Figura 13** (p. 59). Os substituintes, desde que não formem anéis diretamente com o sistema benzopirânico, recebem a numeração e a nomenclatura sistemática, conforme o exemplo da **Figura 14** (p. 59).



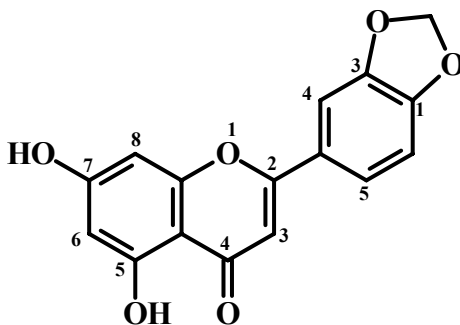
4H-1-benzopiran-4-ona.

Figura 13 – Nomenclatura dos flavonóides.

4H-1-benzopiran-4-ona-2-(1,3-dimetóxi-4-hidroxifenil)-5,7-dimetóxi.

Figura 14 - Nomenclatura dos flavonóides.

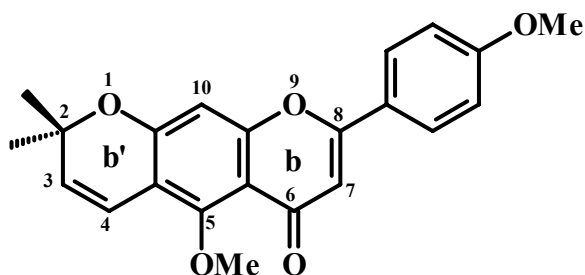
A presença do grupo metilenodióxi ligado ao anel B altera sua numeração, conforme indicado na **Figura 15**.



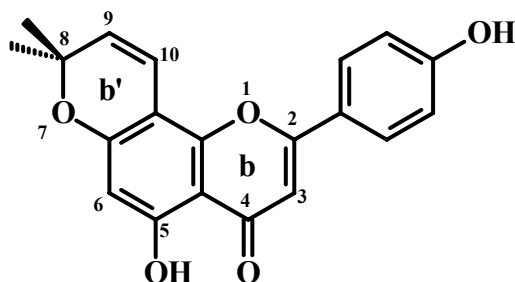
4H-1-benzopiran-4-ona-2-(1,3-benzodioxal-5-il)-5,7-dihidróxi.

Figura 25 – Nomenclatura dos flavonóides.

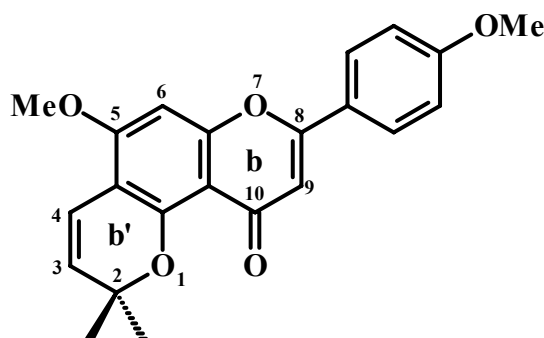
A ocorrência de outro anel pirânico, oriundo da ciclização de grupos C-prenil, leva à modificação na nomenclatura. O sistema central passa a ser chamado de benzodipirano e a numeração varia de acordo com a posição do novo anel formado (**Figura 16**, p. 60).



2H,6H-benzodipiran-[1,2-b:5,4-b']-6-ona-8-(4-metoxifenil)-2,2-dimetil-5-metóxi.



4H,8H-benzodipiran-[1,2-b:3,4-b']-4-ona-2-(4-hidroxifenil)-8,8-dimetil-5-hidróxi.



2H,10H-benzodipiran-[3,4-b:1,2-b']-10-ona-8-(4-metoxifenil)-2,2-dimetil-5-metóxi.

Figura 16 – Nomenclatura dos flavonóides.

O termo 2H, 6H situa os pontos onde houve perda de hidrogênio, o termo [1,2-b:5,4-b'] representa a posição relativa dos dois anéis pirânicos.

4.1.1.1.2 – Nomenclatura Usual

Na nomenclatura usual (97), os anéis são designados como anéis A, B e C e os átomos de carbono individuais são referidos por um sistema de numeração que utiliza números arábicos para os anéis A e C e números marcados com (') para o anel B (Figura 17).

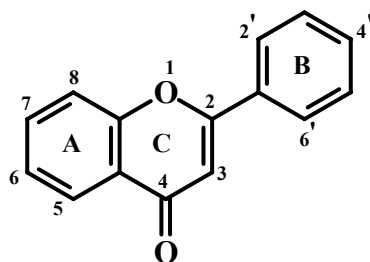
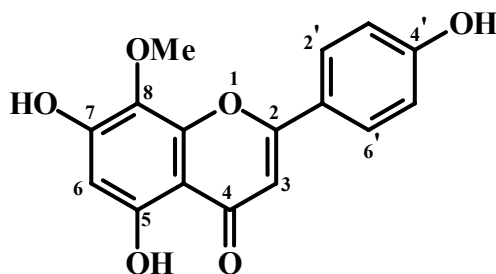


Figura 17 – Numeração usual do esqueleto dos flavonóides.

Os grupos substituintes recebem um número de acordo com a posição em que se encontram e o tipo de flavonóide é especificado no final, conforme ilustra o exemplo (**Figura 18**).



5,7,4'-trihidróxi-8-metoxiflavona.

Figura 318 – Nomenclatura dos flavonóides.

4.1.1.2 – Análise de Flavonóides por meio de RMN ^1H

O experimento de RMN ^1H é uma técnica bastante útil na determinação estrutural de flavonóides. Por meio deste experimento, pode-se determinar o tipo de flavonóide analisando-se apenas os sinais relativos ao anel C e, também, definir rapidamente o padrão de substituição dos anéis A e B.

4.1.1.2.1 – Determinação do padrão de substituição do anel A e do anel B

Alguns exemplos de possíveis padrões de substituição para o anel B estão indicados na **Figura 19** (p. 62).

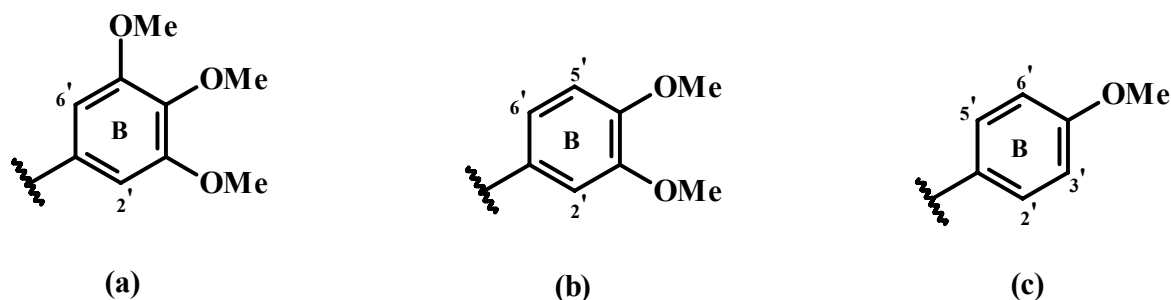


Figura 19 – Alguns possíveis padrões de substituição para o anel B.

Para o exemplo (a) da **Figura 19**, os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios 2' e 6' surgem como um singlete intenso na região entre δ 6,7 ppm e δ 7,5 ppm. Este fato se dá devido à equivalência dos hidrogênios 2' e 6' ocasionada pela livre rotação do anel. No caso (b) da **Figura 19** têm-se sinais para três hidrogênios, pois neste caso não há uma simetria do anel. O sinal de deslocamento químico do H-2' surge como um duplete com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,5$ Hz) devido ao acoplamento deste hidrogênio com H-6' em torno de δ 7,6 ppm. O sinal do H-5' também surge como um duplete devido ao acoplamento *orto* ($J = 8,5$ Hz) com H-6' em torno de δ 6,9 ppm. Finalmente, o sinal do H-6' surge como duplo duplete devido ao acoplamento em *meta* ($J = 2,5$ Hz) com H-2' e *orto* ($J = 8,5$ Hz) com H-5' próximo a δ 7,4 ppm.

No caso (c) da **Figura 19** surge como um exemplo de equivalência química dos hidrogênios 2' e 6' e dos hidrogênios 3' e 5' devido à livre rotação do anel B em torno de δ 8,0 ppm e δ 6,9 ppm, respectivamente. Neste caso os sinais apresentam-se como dois dupletos com constante de acoplamento *orto* ($J = 8,5$ Hz). O duplete correspondente a H-3' e H-5' aparece mais protegido com relação àquele correspondente a H-2' e H-6' devido ao efeito de proteção da metoxila em C-4'.

A **Figura 20** (p. 63) mostra alguns casos de substituição do anel A.

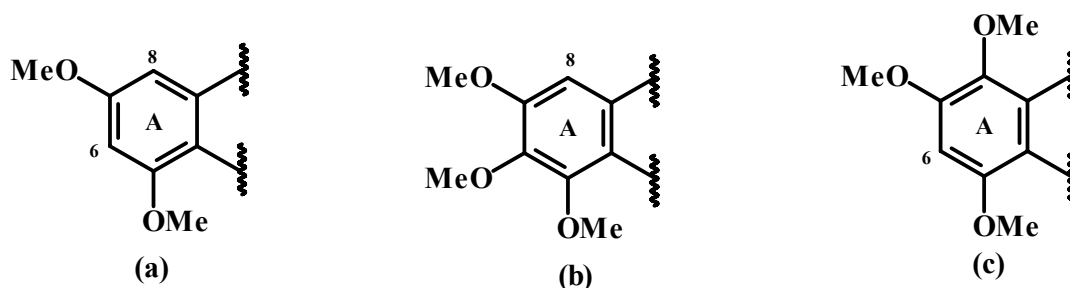


Figura 20 – Alguns possíveis padrões de substituição para o anel A.

No caso **(a)** da **Figura 20** tem-se um exemplo de dissustituição do anel A. Os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios 6 e 8 aparecem como dupletos com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,5$ Hz) em torno de δ 6,2 ppm e δ 6,4 ppm, respectivamente. Devido o efeito de proteção das metoxilas em C-5 e C-7, o sinal de H-6 aparece mais protegido em relação ao de H-8.

No caso de **(b)** e **(c)**, a única diferença no anel A está na posição da metoxila em C-6 e C-8. Desta forma, quando temos a posição 8 metoxilada, o sinal de H-6 aparece como singlete na região de δ 6,4 ppm e, quando a posição metoxilada é a 6, o sinal de H-8 surge como singlete em δ 6,8 ppm. Desta forma, pode-se dizer que quando a posição 8 é metoxilada, o sinal de H-6 aparece em região mais protegida do espectro devido ao efeito de proteção das metoxilas em C-5 e C-7.

Em flavonas 5,7,8 metoxilada, o sinal do H-3 pode ser confundido com o de H-6, porém um acoplamento a longa distância de H-6 com os hidrogênios metoxílicos torna o sinal de H-6 levemente mais alargado do que o relativo a H-3.

A presença de grupos metoxilas nos flavonóides é caracterizada por singletos intensos na faixa de δ 3,5 – 4,1 ppm.

Um sinal em torno de δ 5,0 ppm indica a presença de hidrogênio anomérico e também os multipletos, que em alguns casos são sinais alargados, entre δ 4,0 ppm e δ 3,0 ppm, indicam a presença de substituição por glicosídeo e quando este glicosídeo é a

ramnose, há presença de um duplete em torno de δ 1,0 ppm ($J = 6,0$ Hz), relativo ao sinal de deslocamento químico de sua metila.

Estas características são confirmadas pelos espectros de RMN ^{13}C , onde se observam, por exemplo, os sinais de deslocamentos químicos em torno de δ 177,0 ppm, característico de carbonilas em flavonóides e nos casos de glicosídeos destacam-se, por exemplo, os carbonos em torno de δ 61,0 ppm que são característico de glicose e no caso da ramnose o sinal de carbono em δ 17,0 ppm (metila), confirma a presença deste glicosídeo.

A constante de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos freqüentemente indica a configuração do glicosídeo ligado na aglicona (flavonóide sem o resíduo de açúcar). A **Tabela 3** indica algumas destas constantes de acoplamento (**98**) e as estereoquímicas específicas das ligações entre os glicosídeos e a aglicona.

Tabela 1 – Dados de constantes de acoplamento relacionando com a estereoquímica do glicosídeo ligado (**98**)

Grupo	Glicosídeo	Configuração	J (Hz)
Piranosídeo	D – glicose, galactose, xilose	$-\beta-$	7 - 8
	D – glicose, galactose, xilose	$-\alpha-$	3 - 4
	L – ramnose	$-\beta-$	1
	L – ramnose	$-\alpha-$	2
	L – arabinose	$-\beta-$	2,5
	L – arabinose	$-\alpha-$	8
Furanosídeos	D – glicose, galactose, xilose	$-\beta-$	0 - 2
	D – glicose, galactose, xilose	$-\alpha-$	4 – 4,5
	L – arabinose	$-\beta-$	4
	L – arabinose	$-\alpha-$	1

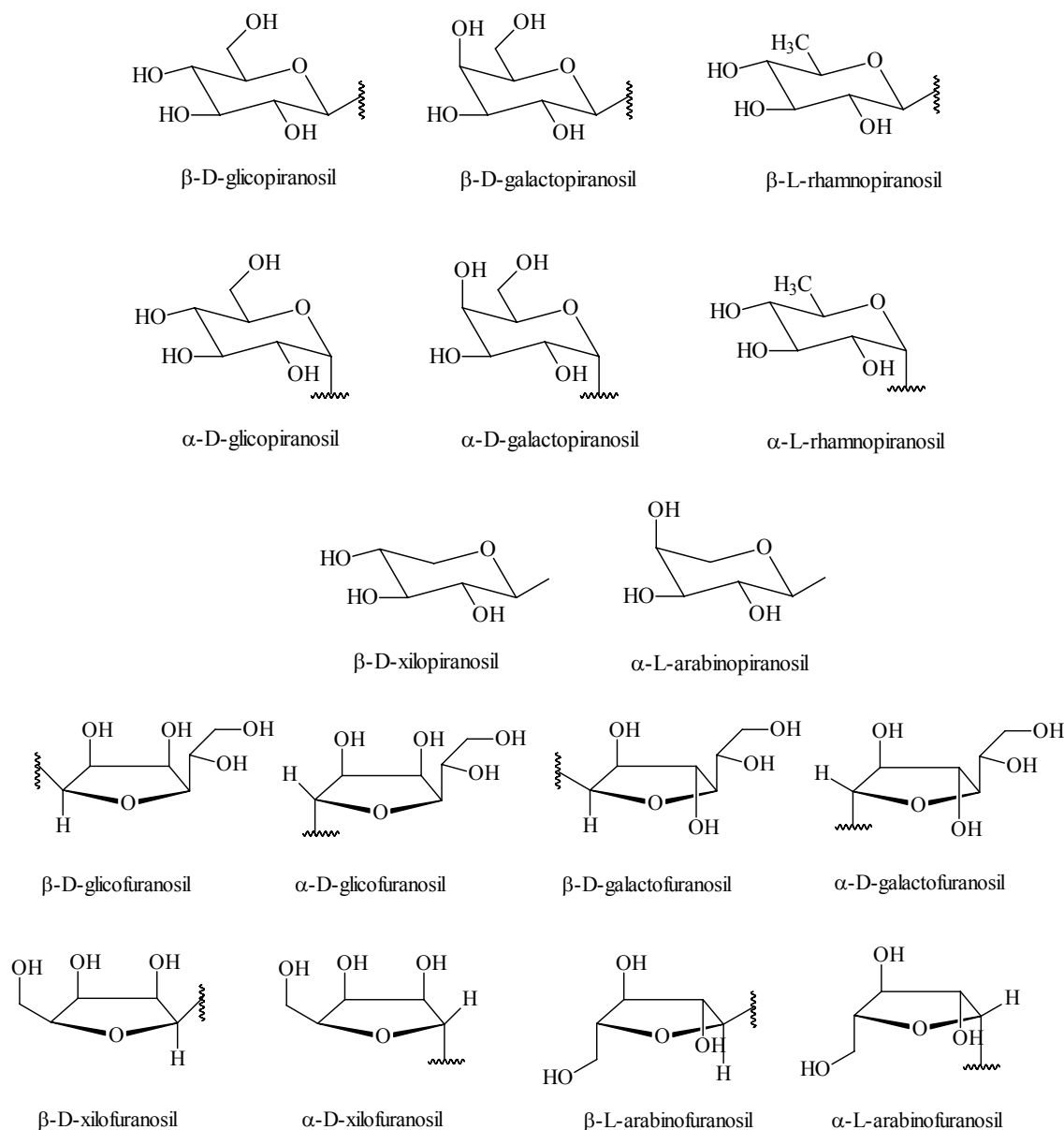


Figura 21 – Estruturas dos glicosídeos com suas estereoquímicas.

Para distinguir a posição na qual o glicosídeo está ligado, o deslocamento químico do sinal do hidrogênio anomérico pode ser utilizado, quando por meio dos dados espectrais não forem suficientes para esta atribuição. As **Tabelas 4 e 5** (p. 66-67) mostram alguns destes deslocamentos químicos para C- e O-glicosídeos, respectivamente.

Tabela 2 – δ (ppm) de hidrogênios anoméricos de açúcares de flavonóides C-glicosilados (em DMSO- d_6) (98)

Glicosídeo Primário	δ (ppm)	Glicosídeo terminal	δ (ppm)
6-C- β -D-Glucoside	4,58 – 4,90 (10)		
	4,70	2 ^G -O- α -L-Mannosyl	4,30 (2)
	4,77 – 4,81	(2 ^G -O-Acetilado)	
6-C- α -L-Rhamnoside	4,85 – 5,26		
6-C- α -L-Arabinoside	4,67 (8,2)		
6-C- β -D-Olioside	5,01 (11,7, 3,2)		
6-C- β -L-Boivinoside	5,33 (12,3, 3,1)		
8-C- β -D-Glucoside	4,64 – 4,88 (10)		
	4,69	2 ^G -O-Apiofuranosyl	4,98 (1,8)
	4,89	2 ^G -O- α -L-Rhamnosyl	5,00 <i>s</i>
	4,76	6 ^G -O-Apiofuranosyl	4,79 (3)
	4,88 – 4,92	(2 ^G -O-Acetilado)	
8-C- β -D-Xyloside	5,04 (8)		
8-C- β -L-Arabinoside	5,51 <i>s</i>		
8-C- α -L-Arabinoside	4,78 – 4,89 (9)		
6,8-Di-C- β -D-Glucoside	4,84 <i>sl</i>		
6,8-Di-C- β -D-Alloside	4,93 (9,9)		
6,8-Di-C- α -L-Arabinoside	4,70 – 4,83 (9,5)		
	4,52 – 4,66 (9,5)		

Na coluna glicosídeo terminal, o número indica a posição onde está ligado o glicosídeo terminal e a letra indica o glicosídeo que ele se liga. Por exemplo: 2^G-O- α -L-Rhamnosyl, indica que o resíduo de rarnnose está ligado na posição 2 de um resíduo de glicose, sendo que esta ligação se dá por meio do oxigênio desta posição. Os valores entre parêntesis correspondem às constantes de acoplamentos.

Tabela 3 – δ (ppm) de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonóides *O*-glicosilados (em DMSO-*d*₆) (**98**)

Glicosídeo Primário	δ (ppm)	Glicosídeo terminal	δ (ppm)
3- <i>O</i> - β -D-Glucoside	5,25 - 5,56		
	5,72 - 5,75	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,63 - 4,65
	5,40 - 5,66	2 ^G - <i>O</i> - α -L-Ramnosyl	4,90 - 5,10
	5,65 - 5,72	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Xylosyl	4,58 - 4,62
	5,28 - 5,46	6 ^G - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	3,96 - 4,02
	5,28	6 ^G - <i>O</i> - α -L-Rhamnosyl	4,37 - 4,39
3- <i>O</i> - α -L-Glucoside	5,63 <i>sl</i>		
3- <i>O</i> - β -D-Galactoside	5,33 - 5,52	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,56 - 4,58
	5,64 - 5,68	2 ^G - <i>O</i> - α -L-Ramnosyl	5,02 - 5,12
	5,59 - 5,71	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Apiofuranosyl	5,31 (1,4)
	5,60		
	5,30 - 5,32	6 ^G - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,04 - 4,08
	5,42 - 5,47	6 ^G - <i>O</i> - α -L-Rhamnosyl	4,37 - 4,46
3- <i>O</i> - β -D-Glucuronide	5,48		
3- <i>O</i> - α -L-Rhamnoside	4,96 - 5,36	(2 ^R - <i>O</i> -Acetilado)	
	5,56	2 ^R - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,10 - 4,23
	5,39 - 5,56	2 ^R - <i>O</i> - β -D-Xylosyl	4,17 - 4,73
	5,21 - 5,50	3 ^R - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,32 - 4,48
	5,33 - 5,44	3 ^R - <i>O</i> - β -D-Galactosyl	4,25
	5,31	3 ^R - <i>O</i> - α -L-Rhamnosyl	4,81
	5,31		
3- <i>O</i> - β -D-Alloside	5,67 - 5,68		
3- <i>O</i> - β -Xyloside	5,37		
3- <i>O</i> - α -D-Arabinofuranoside	5,27 - 5,55		
	5,59	(2 ^A - <i>O</i> -Acetilado)	
3- <i>O</i> - α -L-Arabinofuranoside	5,60 <i>s</i>		
3- <i>O</i> - α -L-Arabinopiranoside	5,25 <i>d</i>		
5- <i>O</i> - β -D-Glucoside	4,56 - 4,79		
	4,90 (diidroflavonol)		
6- <i>O</i> - α -L-Rhamnoside	5,53		
7- <i>O</i> - β -D-Glucoside	4,90 - 5,25	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Glucosyl	4,43 - 4,68
	5,05 - 5,56	2 ^G - <i>O</i> - α -L-Ramnosyl	5,56
	5,56	2 ^G - <i>O</i> - β -D-Apiofuranosyl	5,38 - 5,40
	4,95		
	4,80 - 5,10	6 ^G - <i>O</i> - α -L-Ramnosyl	4,48 - 4,60
	5,40 (aurona)		
7- <i>O</i> - β -D-Glucuronide	5,10 - 5,30		
	5,40	Metoxilado em 8	
7- <i>O</i> - α -L-Rhamnoside	5,22 - 5,75		
7- <i>O</i> - β -D-Xyloside	4,98		
7- <i>O</i> - α -L-Arabinofuranoside	5,61		
8- <i>O</i> - β -D-Glucoside	4,65		
8- <i>O</i> - β -D-Glucuronide	4,82		
2'- <i>O</i> - β -D-Glucoside	5,13	(2 ^G - <i>O</i> -Acetilado)	
2'- <i>O</i> - β -D-Glucuronide	5,00 - 5,11		
2'- <i>O</i> - β -D-Xyloside	4,87		
3'- <i>O</i> - β -D-Glucoside	4,92 - 5,00		
3'- <i>O</i> - α -L-Rhamnoside	5,37 - 5,43		
3'- <i>O</i> - β -D-Xyloside	4,80 - 4,90		
4'- <i>O</i> - β -D-Glucoside	4,80 - 5,04		
	5,35	(2 ^G - <i>O</i> -Acetilado)	
4'- <i>O</i> - β -D-Galactoside	5,00		

Na coluna glicosídeo terminal, o número indica a posição onde está ligado o glicosídeo terminal e a letra indica o glicosídeo que ele se liga. Por exemplo: 2^G-*O*- α -L-Rhamnosyl, indica que o resíduo de ramnose está ligado na posição 2 de um resíduo de glicose, sendo que esta ligação se dá por meio do oxigênio desta posição.

4.1.1.3 – Espectrofotometria de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

(99)

A absorção espectrofotométrica no UV é usada como auxiliar na identificação do tipo de flavonóide, indicando o padrão de oxigenação. Em adição, o modo de substituição no núcleo flavonoídico por grupos hidroxifenólico não substituídos pode ser obtido por adição de reagentes que provoquem deslocamentos das bandas de absorção no UV (deslocamentos batocrômico ou hipsocrômico), por exemplo, hidróxido de sódio e observando o resultado do deslocamento no pico de absorção. Assim, indiretamente, a técnica pode ser usada em determinar a localização de glicosídeos ou grupos metilas substituindo uma hidroxila fenólica.

A maior vantagem desse método é a pequena quantidade de flavonóide requerida para a completa análise (usualmente uma quantidade de 0,1 mg). Na prática, prepara-se uma solução estoque de aproximadamente 0,1 mg por 10 mL em metanol e em seguida dilui-se até o nível de absorção (absorbância) do maior pico que é cerca de 0,6. Esta solução estoque é então usada para todas as medidas subseqüentes.

Para análise quantitativa de flavonóides conhecidos aplica-se a lei de Beer-Lambert:

$$\text{Equação de Beer-Lambert: } A = \varepsilon \times c \times d$$

Onde: A = absorbância

ε = coeficiente de extinção molar

c = concentração do soluto (mol/dm³)

d = comprimento unitário da cela da amostra (cm)

4.1.1.3.1 – Espectro Geral de Flavonóides (99)

Os espectros de UV de flavonóides são obtidos em solução de metanol ou menos satisfatoriamente em etanol. O espectro basicamente consiste em duas absorções nas faixas entre 240-285 nm (banda II) e 300-500 nm (banda I). A posição precisa e a intensidade relativa destes valores máximos permitidos informa a natureza do flavonóide e seu padrão de oxigenação. Aspectos característicos desses espectros são, a pequena intensidade relativa da Banda I em hidroxiflavonas, dihidroxiflavonóis e flavonas, e o longo comprimento de onda da posição da Banda I no espectro de chalconas, auronas e antocianinas. Essas características são relativamente invariáveis mesmo mudando o padrão de oxigenação, embora a faixa de absorção máxima de diferentes tipos de flavonóides pode ser sobreposta, como resultado da variação no padrão de oxigenação. Alguns exemplos da faixa esperada de absorção máxima de cada tipo de flavonóide são mostrados na **Tabela 6** (p. 70).

Variação dentro destas faixas dependerá do padrão de hidroxilação e do grau de substituição das hidroxilas. Em resumo, são os seguintes:

1 – Alteração na substituição do anel A tende ser refletido na absorção da Banda II enquanto alteração na substituição dos anéis B e C tende ser mais aparente na absorção da Banda I.

2 – Oxigenação adicional (especialmente hidroxilação) geralmente causa um deslocamento da banda apropriada com aumento do comprimento de onda, exemplo: Banda I em 3,5,7-triidroxiflavona, 359 nm; 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona, 367 nm; 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona, 370 nm e 3,5,7,3',4',5'-hexaidroxiflavona, 374 nm.

3 – Metilação ou glicosilação (especialmente nos hidróxis 3,5,7 e 4') causa deslocamento da banda com diminuição do comprimento de onda. A natureza do glicosídeo na aglicona normalmente não interfere.

- 4 – Acetilação tende invalidar o efeito de grupos hidroxifenólicos sobre o espectro.
- 5 – A presença de ácidos cinâmicos como função acil sobre flavonóides pode ser detectada pela presença de absorção de banda em 320 nm.
- 6 – Em flavonas e flavonóis a presença de um sistema 3',4'-diidróxi é geralmente evidenciado por um pico secundário (ocasionalmente uma projeção) na Banda II.

Tabela 4 – Faixa de absorção no UV-Vis para flavonóides. (99)

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonóide
250-280	310-350	Flavona
250-280	330-360	Flavonol (3-OH substituído)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH livre)
245-275	310-330 curto	Isoflavonas
	pico em 320	Isoflavonas (5-deóxi-6,7-dihidro adicionado)
275-295	300-330 curto	Flavanonas e Dihidroflavonóis
230-270 (baixa intensidade)	340-390	Chalconas
230-270 (baixa intensidade)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas e antocianinas

4.2 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Dimorphandra mollis*.

O estudo fitoquímico do EBM do Cerne de *D. mollis* resultou no isolamento e identificação de três flavonóides: astilbina (S_1), isoastilbina (S_2) e catequina (S_3). Os diastereoisômeros (S_1 e S_2) apresentaram-se como cristais brancos que foram separados por HPLC, onde primeiramente verificaram-se as melhores condições de separação por HPLC-DAD modo analítico (cromatogramas A e B, **Figura 22**), para posterior separação em modo preparativo por HPLC-UV e neste foi utilizado reciclo. A catequina (S_3) apresentou-se como sólido de coloração vermelha e seu isolamento foi por meio de CC (Sephadex[®] LH-20) como indicado no procedimento experimental.

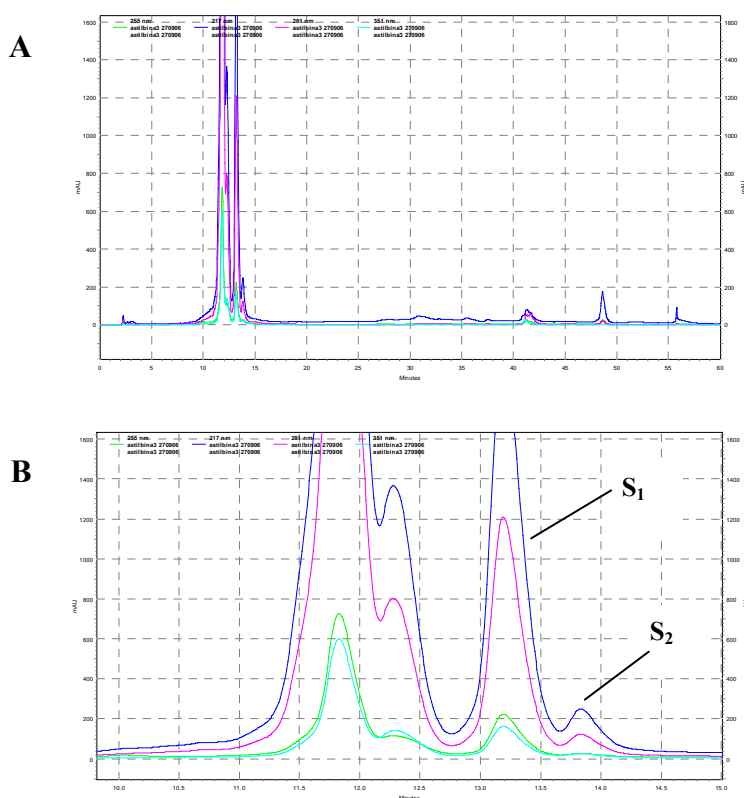


Figura 224 - Cromatogramas da separação das substâncias S_1 e S_2 : **A** – cromatograma sem alteração; **B** – ampliação do cromatograma, evidenciando o uso de reciclo. Coluna C 18 (Luna 250 x 4,6 mm), fase móvel MeOH, fluxo de 1 mL/min., detector de DAD, $\lambda = 212$ nm, $\lambda = 240$ nm, $\lambda = 315$ nm e $\lambda = 350$ nm, loop 20 μ L.

A determinação estrutural dos compostos isolados foi realizada por meio das análises espectroscópicas de RMN de 1D e 2D, e outras quando necessário.

Os flavonóides astilbina (S_1), isoastilbina (S_2) e catequina (S_3) apresentaram o mesmo padrão de substituição para o anel A e B. Para o anel A eles apresentaram sinais de hidrogênios das posições C-6 e C-8 com constante de acoplamento em *meta*. Para o anel B o padrão de substituição aparece com sinais de três hidrogênios, referente ao sinal do H-2' (*d* com acoplamento em *meta*), ao sinal H-5' (*d* com acoplamento em *orto*) e ao sinal H-6' (*dd* com acoplamentos em *orto* e *meta*).

4.2.1 – Constituintes Químicos da Fração C₁ 2.

A isoastilbina (S_2) foi diferenciada da astilbina (S_1) pelos sinais de hidrogênios das posições C-2 e C-3, visto que são diastereoisômeros. A identificação de S_2 foi realizada em mistura com S_1 .

O espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, **Figura 24**, p. 74) apresenta sinais de deslocamentos químicos característicos para o anel A das posições C-6 e C-8 em δ 5,88 ppm (*d*, $J = 2,00$ Hz) e em δ 5,91 ppm (*d*, $J = 2,00$ Hz), respectivamente. Para o anel B, o padrão de substituição aparece com sinais de três hidrogênios na região de aromáticos, referente ao sinal do H-2' em δ 6,97 ppm (*d*, $J = 1,2$ Hz), os sinais de H-5' e de H-6' encontram-se sobrepostos em δ 6,83 ppm. Os sinais relativos aos hidrogênios H-2 e H-3 aparecem em δ 5,05 ppm (*d*, $J = 10,0$ Hz) e δ 4,57 ppm (*d*, $J = 10,0$ Hz) para a S_1 , e em δ 5,10 ppm (*d*, $J = 2,5$ Hz) e δ 4,60 ppm (*d*, $J = 2,5$ Hz) para a S_2 , sendo que a constante de acoplamento é a principal diferença entre os diastereoisômeros. Os sinais entre δ 4,40 ppm e δ 3,30 ppm sugerem a presença de açúcares, onde se podem distinguir os em δ 4,27 ppm (*m*), δ 4,04 ppm (*d*, $J = 2,0$ Hz), δ 3,68 ppm (*dd*, $J = 2,6$ Hz e 9,6 Hz), δ 3,55 ppm (*m*) e δ 3,31 ppm (*dd*, $J = 2,0$ Hz e 2,6 Hz). Os Sinais em torno de δ 7,35 ppm são sinais relativos a impurezas numa porcentagem de, aproximadamente 12 %. Após

análise do espectro de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz, **Figuras 25 e 26**, p. 74-75) foi possível verificar as correlações homonucleares e propor a estrutura do glicosídeo, que tratou-se de ramnose, esta observação foi reforçada com o sinal em δ 1,19 ppm ($d, J = 6,80$ Hz) de metila característica deste resíduo de glicosídeo. As correlações encontram-se indicadas na subestrutura da **Figura 23**.

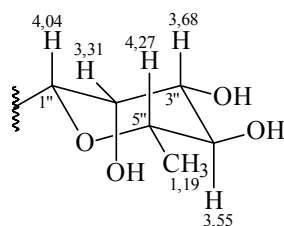
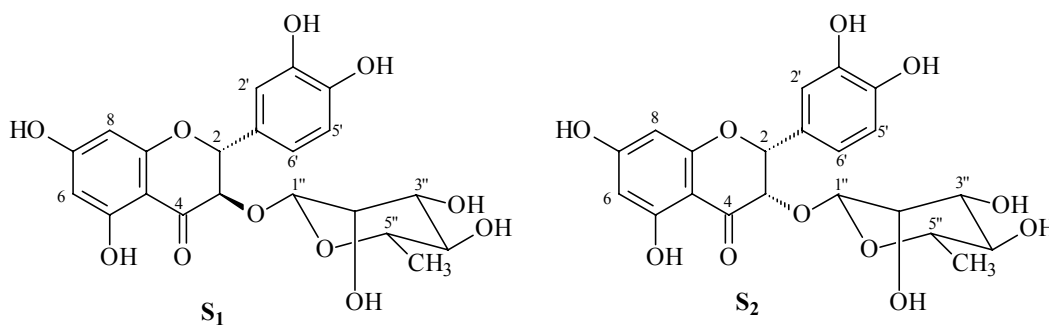


Figura 23 – Resíduo de ramnose com os dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$.



Os dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 400 MHz, **Figura 31**, p. 77) e dos mapas de correlações de $g\text{HSQC}$ e de $g\text{HMBC}$ (MeOD, 400 MHz, **Figuras 27-30**, p. 75-77) encontram-se listados na **Tabela 7** (p. 78).

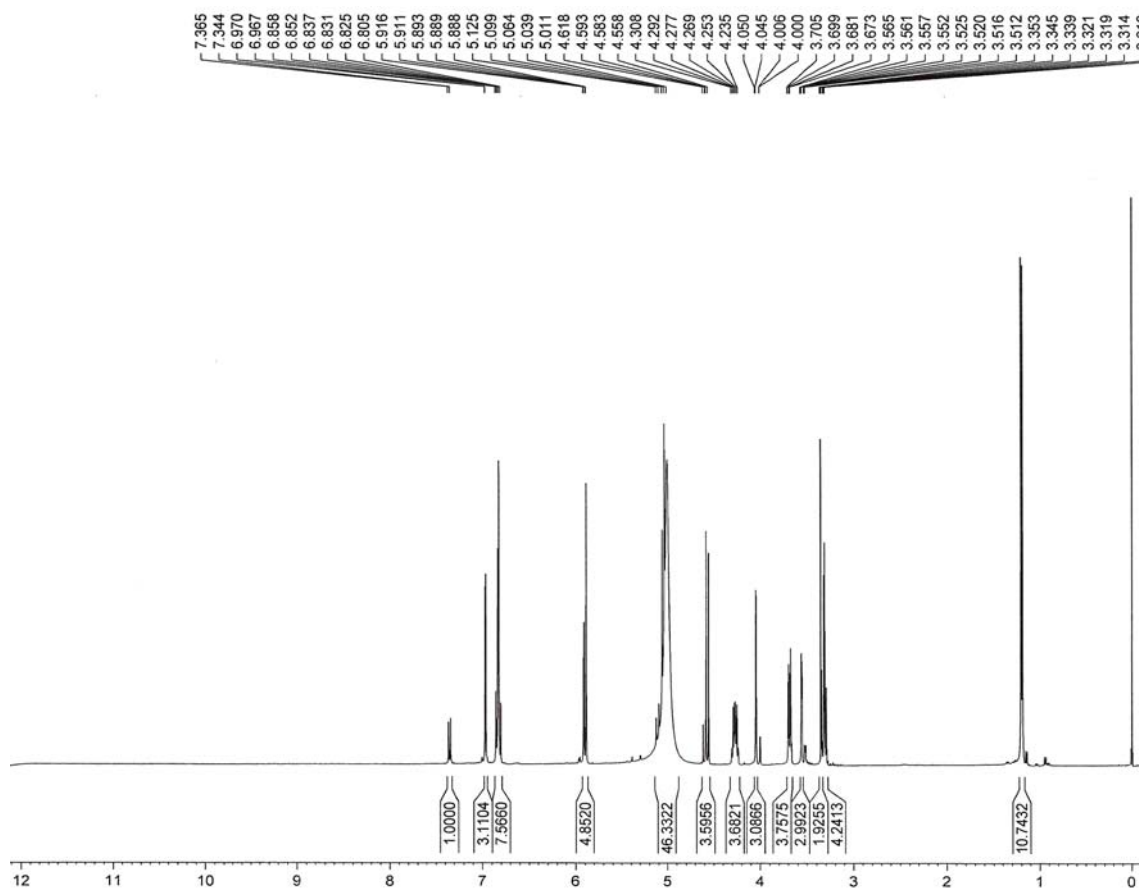


Figura 24 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) da substância S_1 (astilbina).

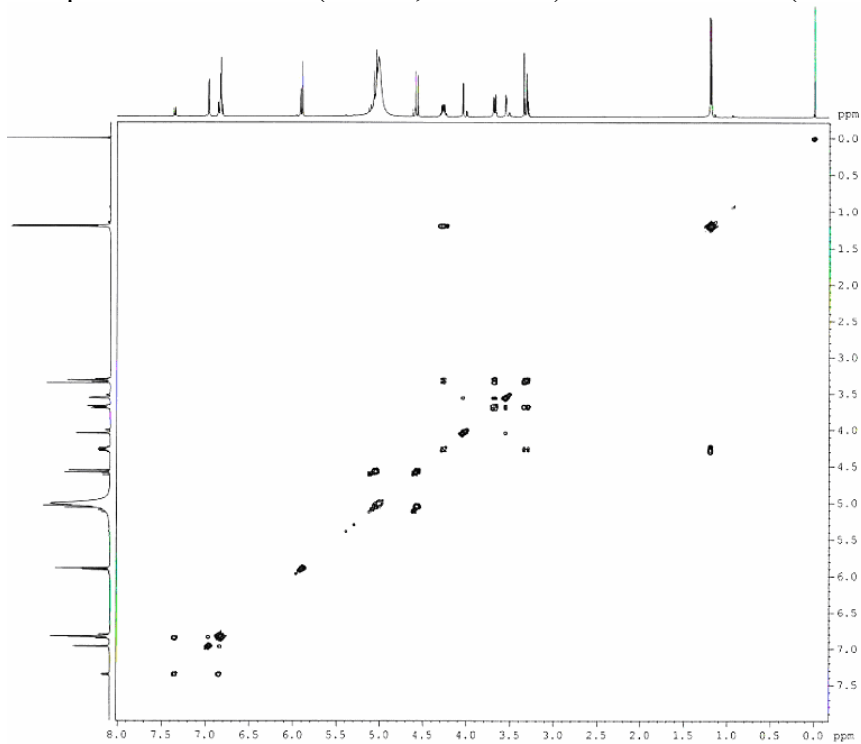


Figura 25 – Espectro de gCOSY ^1H x ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância S_1 (astilbina).

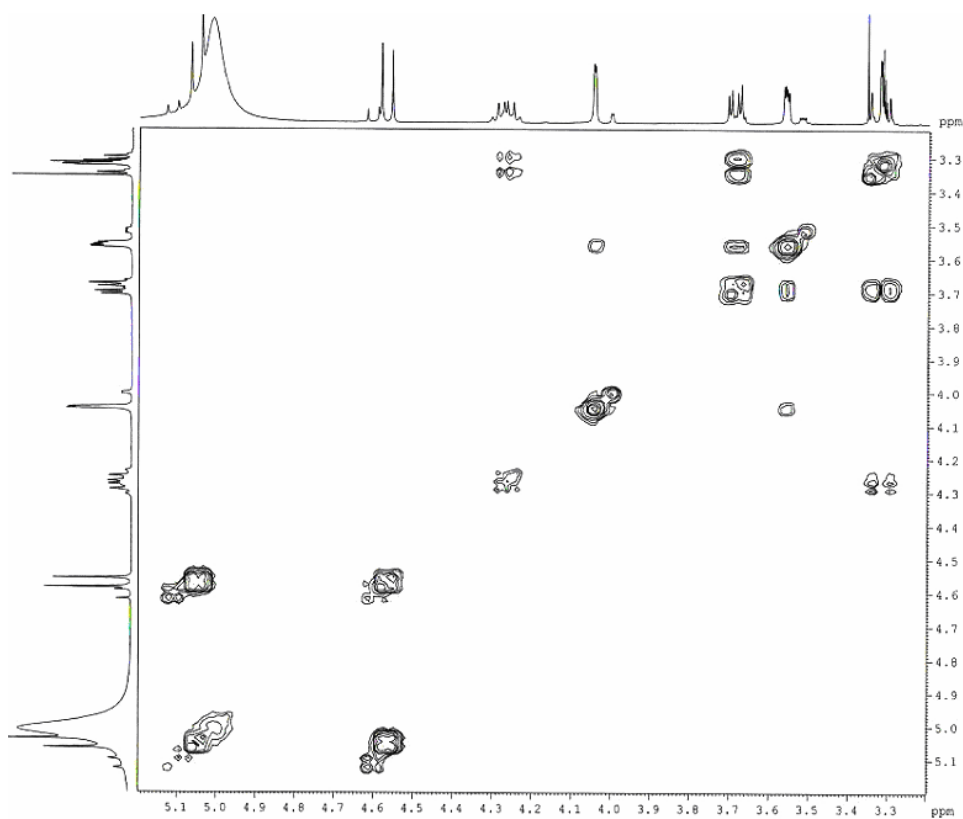


Figura 26 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da substância S_1 (astilbina).

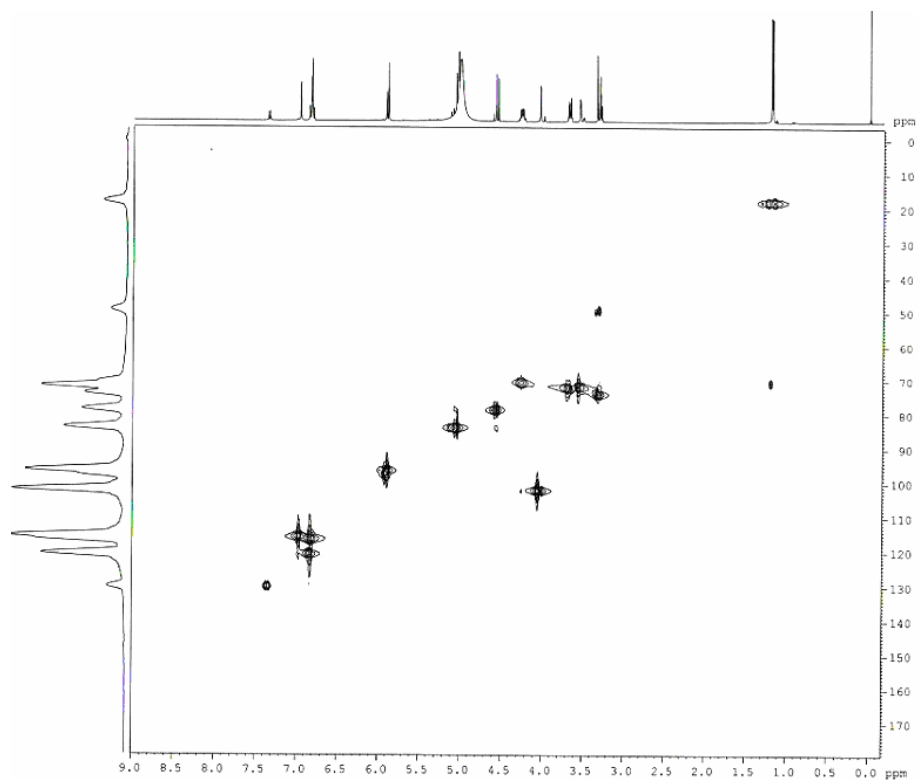


Figura 27 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da substância S_1 (astilbina).

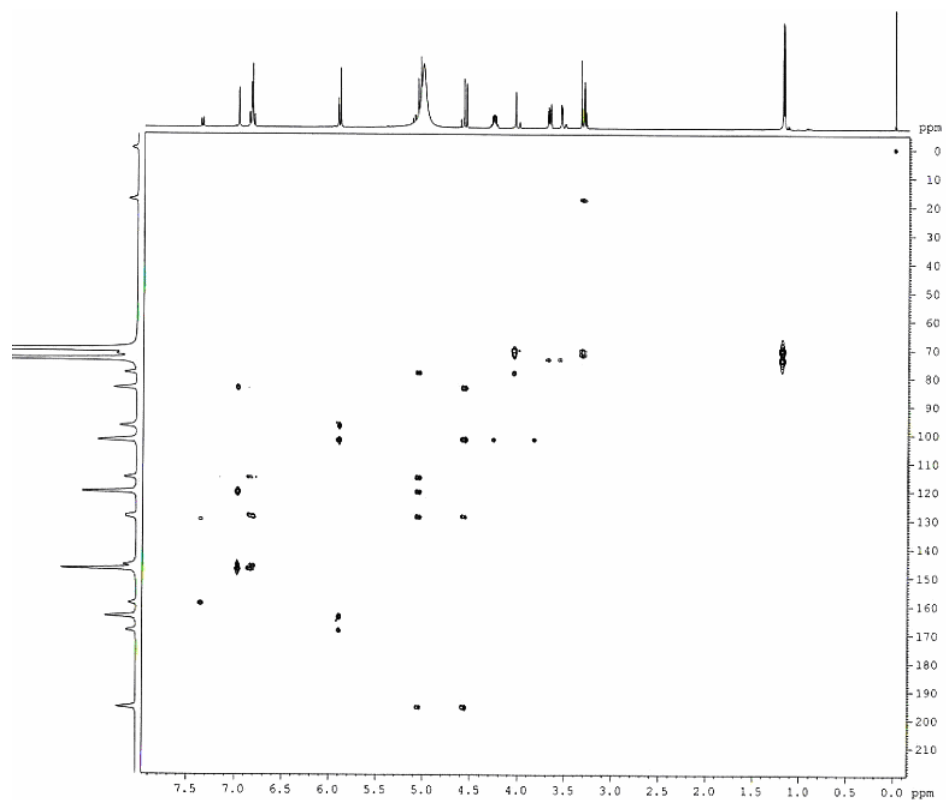


Figura 28 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância S_1 (astilbina).

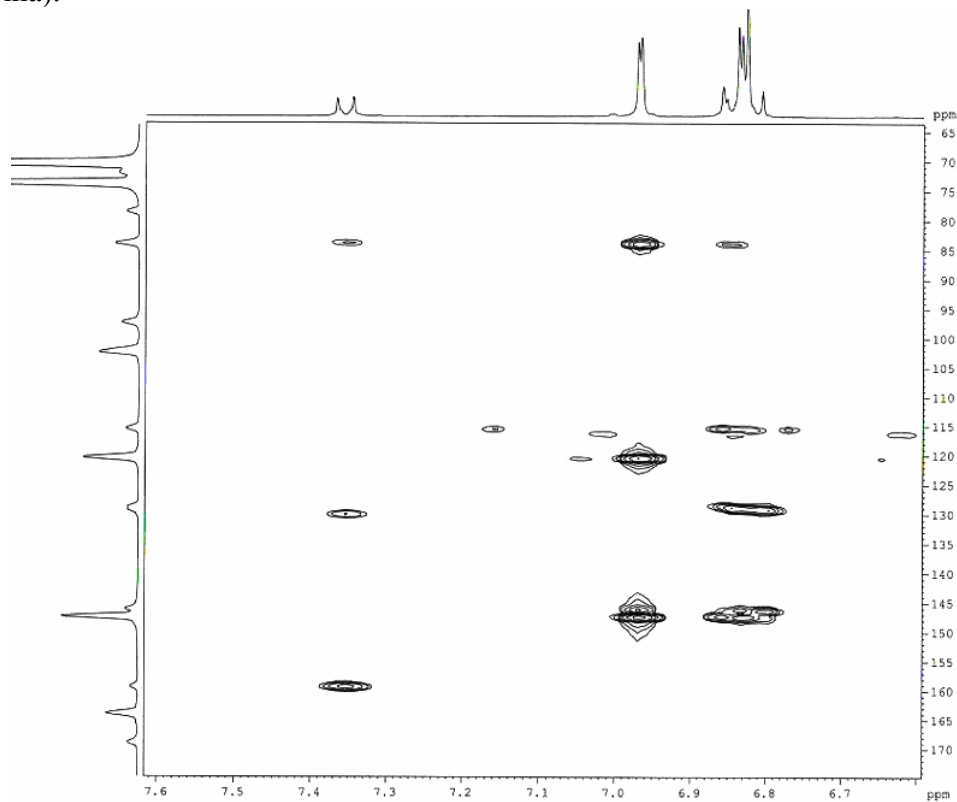


Figura 29 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância S_1 (astilbina).

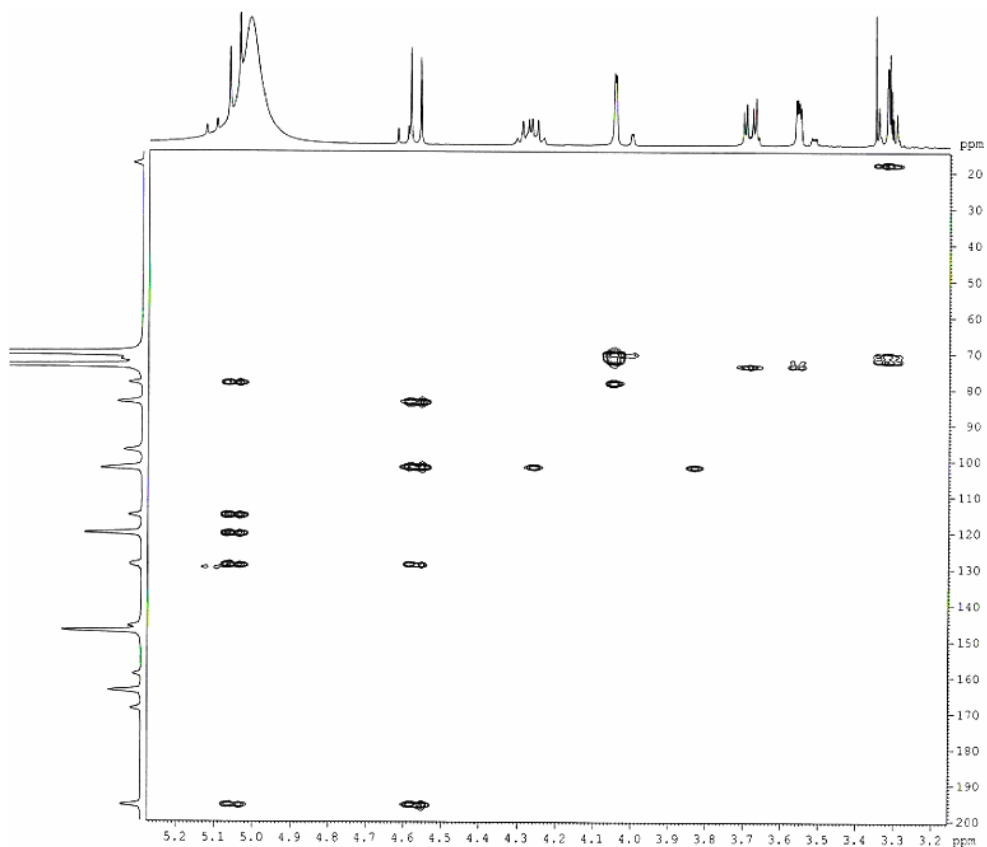


Figura 30 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da substância **S₁** (astilbina).

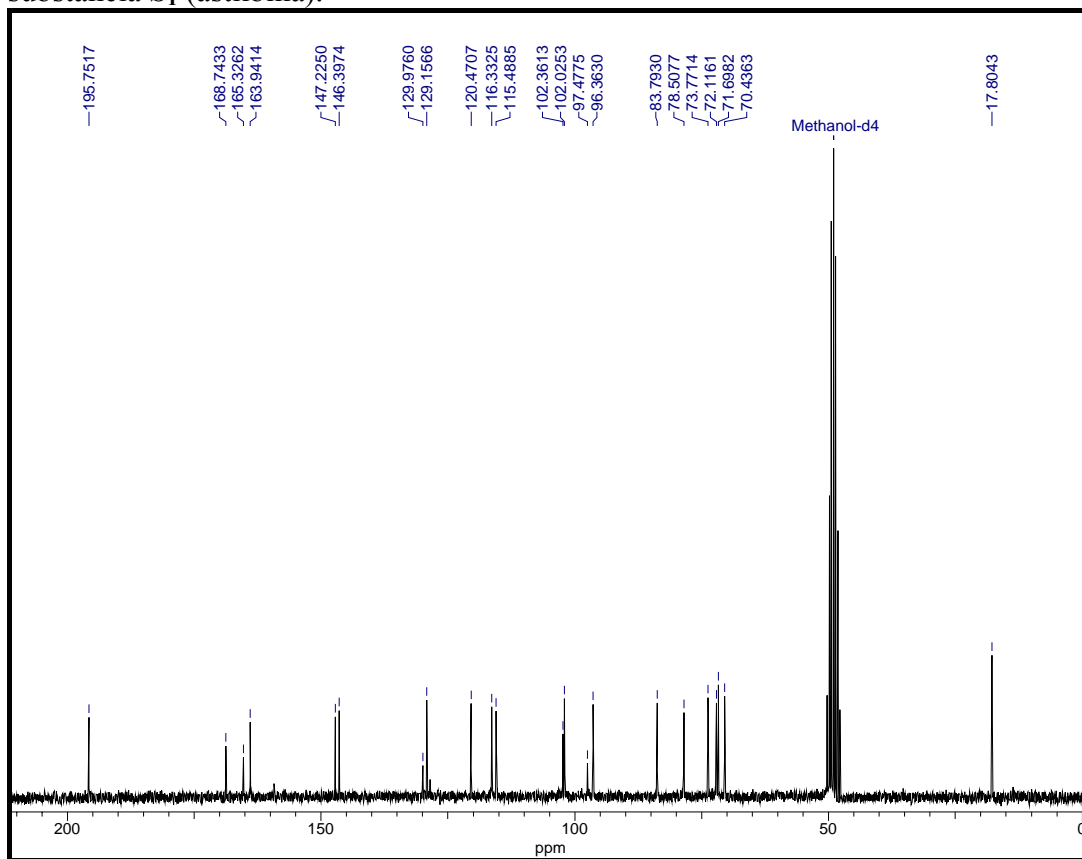


Figura 315 – Espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) da substância **S₁** (astilbina).

Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a astilbina (S_1) e isoastilbina (S_2) em comparação com dados obtidos da Literatura **100** (MeOD, 200 MHz, $\delta = \text{ppm}$).

Posição	RMN ^1H		RMN ^1H		RMN ^{13}C		RMN ^{13}C	
	S_1	Lit. 100	S_2	Lit. 100	S_1	Lit. 100	S_2	Lit. 100
2	5,05	5,20	5,11	5,50	83,79	84,70	83,79	82,00
3	4,57	4,60	4,62	4,20	78,50	79,30	78,50	76,90
4	-	-	-	-	195,75	196,80	195,75	194,10
5	-	-	-	-	165,32	166,30	165,32	166,20
6	5,88	5,85	5,88	5,86	96,36	98,20	97,47	97,60
7	-	-	-	-	168,74	169,30	168,74	169,80
8	5,91	5,86	5,91	5,90	96,36	97,10	97,47	96,50
9	-	-	-	-	163,94	164,90	163,94	164,50
10	-	-	-	-	102,36	103,2	102,36	101,60
1'	-	-	-	-	129,15	130,00	129,15	128,60
2'	6,97	6,87	6,97	6,84	116,33	117,10	116,33	116,30
3'	-	-	-	-	146,39	147,30	146,39	146,50
4'	-	-	-	-	147,22	148,10	147,22	146,60
5'	6,83	6,70	6,85	6,70	115,48	116,2	115,48	115,30
6'	6,83	6,75	6,81	6,75	120,47	121,30	120,47	119,40
1''	4,04	4,05	4,00	4,78	102,02	102,90	102,02	102,00
2''	3,31	3,34	3,30	3,45	71,69	72,60	71,69	72,00
3''	3,68	3,20	3,68	3,40	72,11	73,20	72,11	72,00
4''	3,55	3,12	3,52	3,02	73,77	74,60	73,77	73,40
5''	4,27	3,91	4,27	2,42	70,43	71,30	70,43	70,80
6''	1,19	1,10	1,19	0,83	17,80	18,70	17,80	17,80

Tabela 8 – Dados de gHMBC para a astilbina (**S₁**) (MeOD, 400 MHz, δ = ppm).

gHMBC	
Posição	S₁
2	195,75; 129,15; 120,47 e 116,73
3	195,75; 129,15; 120,47; 102,36; 102,02 e 83,79
4	-
5	-
6	168,74; 165,32; 102,36 e 96,36
7	-
8	168,74; 163,94; 102,36 e 97,47
9	-
10	-
1'	-
2'	147,22; 146,39; 129,47 e 129,15
3'	-
4'	-
5'	147,22; 129,47; 129,15 e 115,48
6'	147,22; 129,15; 116,33 e 115,48
1''	78,50 e 71,69
2''	102,02 e 72,11
3''	71,69
4''	72,11
5''	73,77
6''	70,43

4.2.2 – Constituintes Químicos da Fração C₁ 4.

A **Fração C₁ 4** apresentou-se como sólido vermelho, caracterizando impurezas presentes na amostra. A análise por CCDC indicou como substância pura, portanto, prosseguiram-se procedimentos usuais para identificação. Por análises preliminares do espectro de RMN ¹H (MeOD, 200 MHz, **Figura 32**, p. 80) da **Fração C₁ 4** foi possível observar sinais na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos em δ 5,92 ppm (*d*, *J* = 2,3 Hz) e δ 5,84 ppm (*d*, *J* = 2,3 Hz) referente aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente; o sinal em δ 6,83 ppm (*d*, *J* = 1,7 Hz) corresponde ao sinal do hidrogênio H-2' e o conjunto de sinais em δ 6,72 ppm (*m*) refere-se aos sinais dos hidrogênios H-5' e H-6'. Os sinais em δ 4,55 ppm (*d*, *J* = 7,9 Hz), δ 3,95 ppm (*ddd*, *J* =

5,4 Hz, 7,9 Hz e 8,0 Hz), δ 2,83 ppm (*dd*, $J = 5,4$ Hz e 16,0 Hz) e δ 2,48 ppm (*dd*, $J = 8,0$ Hz e 16,0 Hz) referem-se aos sinais dos hidrogênios H-2, H-3, H-4b e H-4a, respectivamente. Estes dados foram comparados (**Tabela 9**, p. 81) com dados obtidos da literatura (**101**) e confirmou que a substância **S₃** é a catequina.

A catequina (**S₃**) ocorre em duas formas estereoisoméricas que podem ser diferenciadas pelo desvio da luz plano-polarizada, denominado $[\alpha]_D$. O $[\alpha]_D$ determinado para a catequina foi de $-14,57^\circ$, portanto, trata-se do isômero S da mesma.

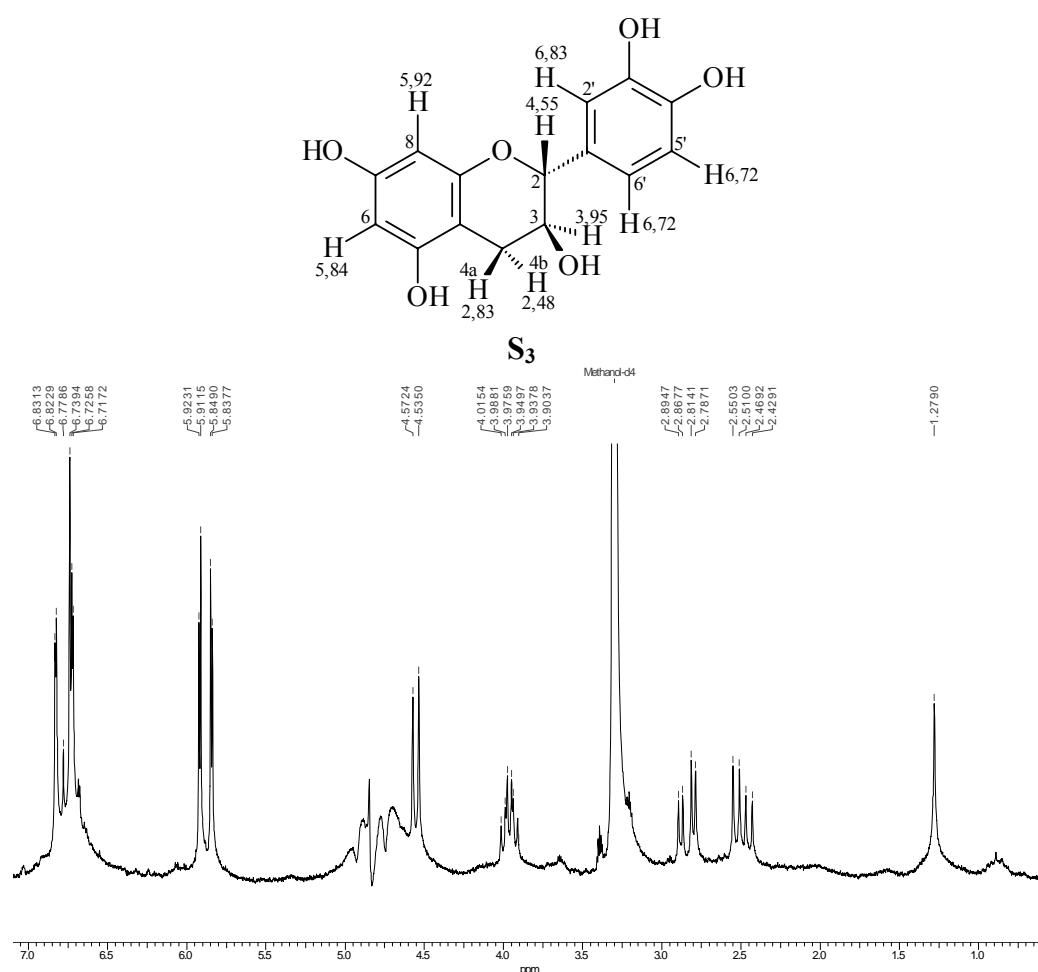


Figura 32 – Espectro de RMN ¹H (MeOD, 200 MHz) da substância **S₃** (catequina).

Tabela 9 – Dados de RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) da catequina (**S₃**) em comparação com dados obtidos da Literatura **101**.

Posição	S ₃	Literatura 101
2	-	-
3	3,95 (<i>ddd</i> , $J = 5,4$ Hz, 7,9 Hz e 8,0 Hz)	3,88 (<i>m</i>)
4 ^a	2,83 (<i>dd</i> , $J = 5,4$ Hz e 16,0 Hz)	2,75 (<i>dd</i> , $J = 5,4$ Hz e 16,0 Hz)
4b	2,48 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ Hz e 16,0 Hz)	2,40 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ Hz e 16,0 Hz)
5	-	-
6	5,84 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,75 (2 <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
7	-	-
8	5,92 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,78 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	6,83 (<i>d</i> , $J = 1,7$)	6,74 (<i>sl</i>)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,72 (<i>m</i>)	6,71 (<i>m</i>)
6'	6,72 (<i>m</i>)	6,71 (<i>m</i>)

4.3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Stryphnodendron adstringens*.

4.3.1 – Determinação Estrutural dos Constituintes do EBDI de *S. adstringens*.

O estudo fitoquímico do EBDI de *S. adstringens* levou a obtenção de 7 frações (**Fluxograma 6**, p. 42), das quais algumas foram analisadas diretamente por GC-MS para identificação de seus constituintes químicos. Sendo que destas algumas foram submetidas a reações químicas de transesterificações com objetivo de facilitar sua identificação e outras foram submetidas a novos fracionamentos cromatográficos devido à complexidade na constituição de seus componentes. Deste extrato foi possível identificar hidrocarbonetos, álcoois graxos, ácidos carboxílicos (ácidos graxos), esteróides, derivados de ácido cinâmico e alcalóide.

4.3.1.1 – Constituintes Químicos da **Fração C₄ 1**

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, **Figura 33**) da **Fração C₄ 1** apresenta apenas sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios metílicos em δ 0,89 ppm e de hidrogênios metilênicos em δ 1,25 ppm correspondentes à cadeia normal hidrocarbônica, sugerindo que se tratava de hidrocarbonetos.

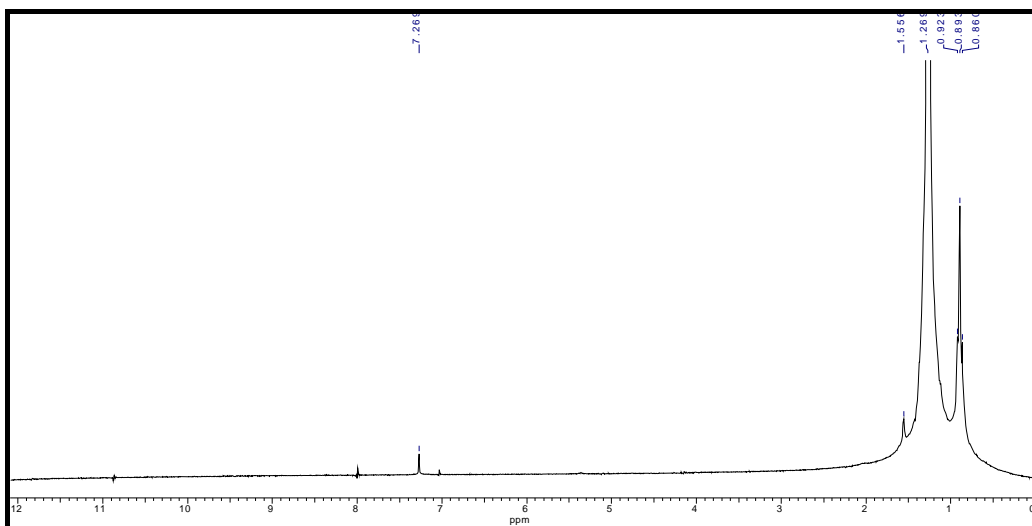


Figura 33 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₄ 1**.

Sendo assim, a **Fração C₄ 1** foi submetida à análise por GC-MS com objetivo de identificação dos constituintes presentes na mesma.

A análise do cromatograma gasoso (**Figura 34**, p. 83) e dos espectros de massas (**Figura 35**, p. 85) obtidos por GC-MS permitiram identificar picos característicos de hidrocarbonetos, em m/z 57 $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, m/z 71 $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, m/z 85 $[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, m/z 113 $[\text{C}_8\text{H}_{17}]^+$, reforçando a análise feita por meio do experimento de RMN.

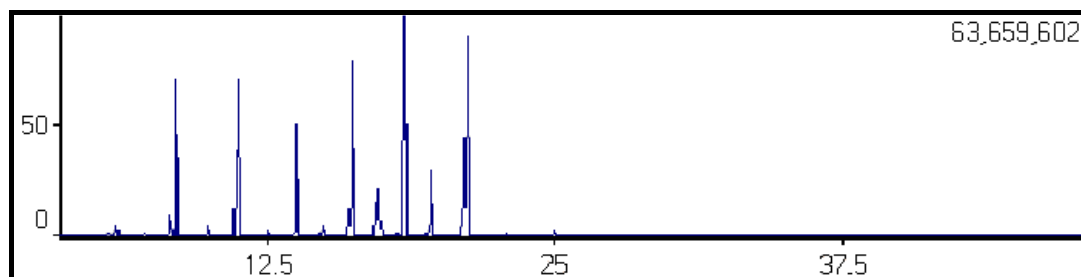
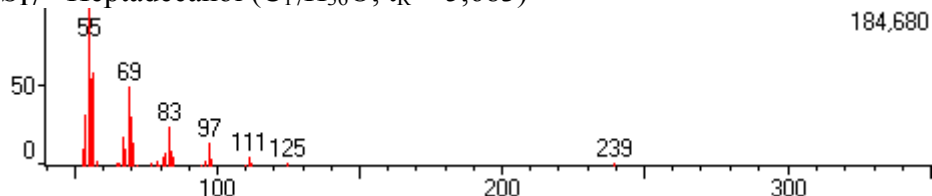
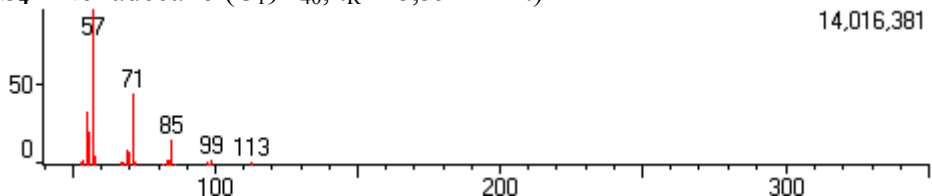


Figura 34 – Cromatograma obtido por GC-MS da **Fração C₄ 1**. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

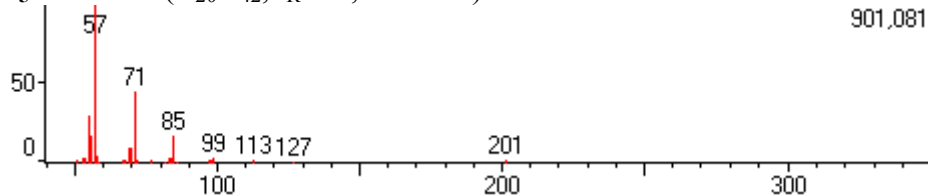
S₁₇ - Heptadecanol (C₁₇H₃₆O, t_R = 5,683)



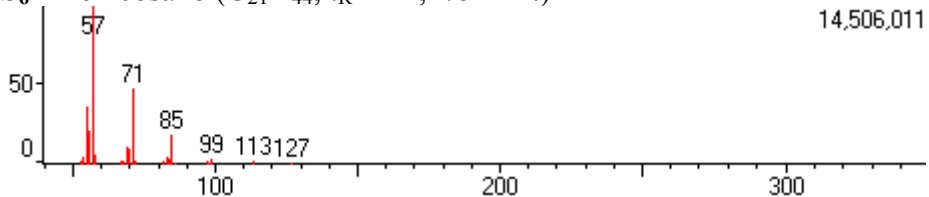
S₄ - Nonadecano (C₁₉H₄₀, t_R = 8,592 min.)



S₅ - Icosano (C₂₀H₄₂, t_R = 9,917 min.)



S₆ - Henicosano (C₂₁H₄₄, t_R = 11,275 min.)



S₇ - Docosano (C₂₂H₄₆, t_R = 12,542 min.)

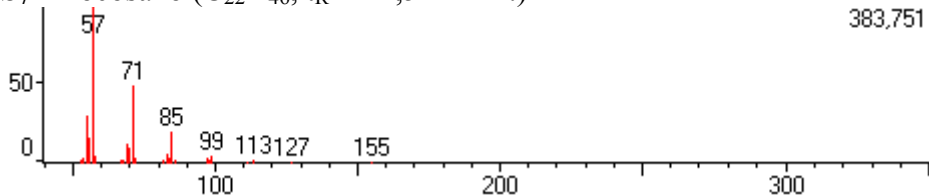


Figura 35 (continuação) - Espectros de massas dos constituintes da **Fração C₄ 1** obtidos por GC-MS.

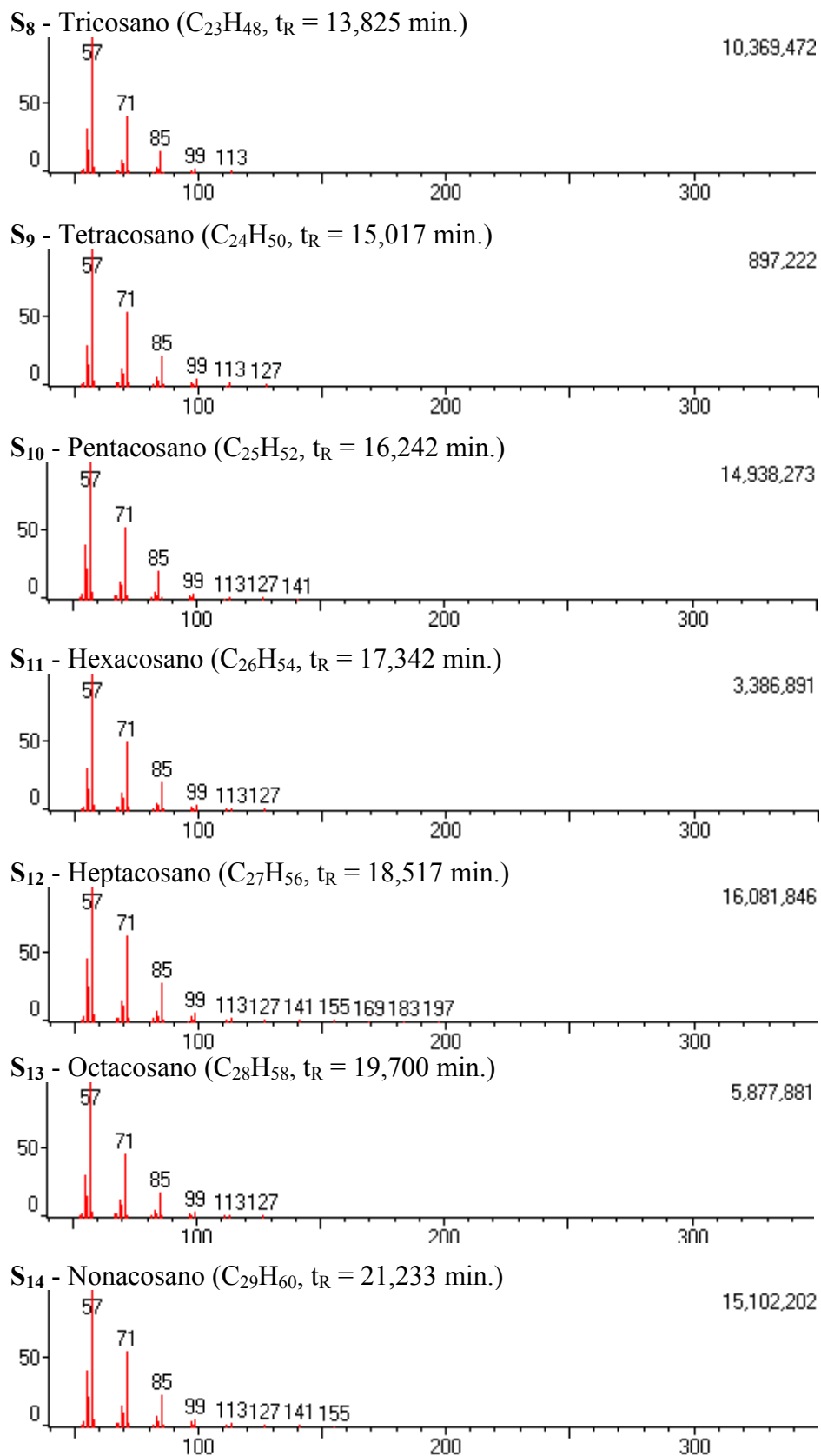


Figura 35 (continuação) - Espectros de massas dos constituintes da **Fração C₄ 1** obtidos por GC-MS.

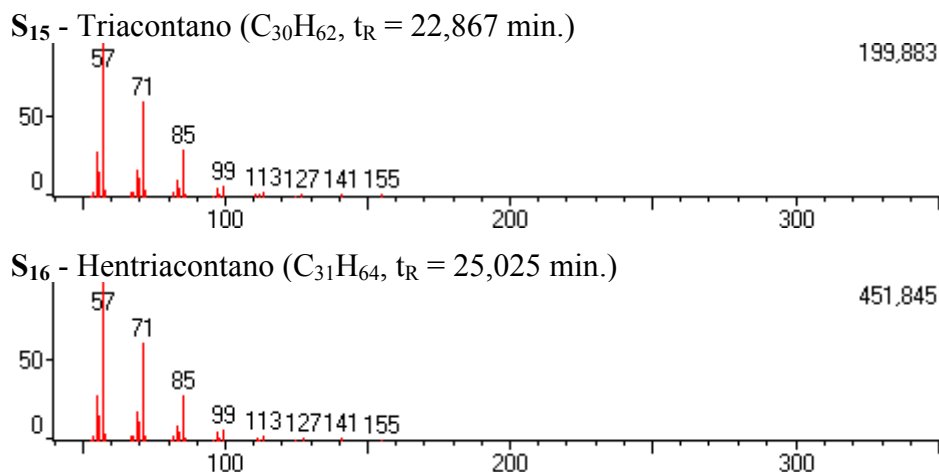


Figura 35 - Espectros de massas dos constituintes da **Fração C₄ 1** obtidos por GC-MS.

A ausência do pico do íon molecular (M^+) nos espectros de massas para os hidrocarbonetos não permitiu propor por meio de EM as estruturas dos mesmos, pois não possibilitou indicar qual o tamanho de cada cadeia hidrocarbônica. Sendo assim, foram utilizados padrões comerciais de hidrocarbonetos (C₆-C₂₈ e C₃₀) para comparação dos t_R das substâncias presentes na **Fração C₄ 1** com os t_R dos padrões comerciais (**Figura 36**, p. 86). A análise de comparação foi realizada por GC sem estar acoplada ao MS, conseqüentemente, os t_R verificados no cromatograma obtido por GC-MS não são exatamente iguais daqueles observados por GC, já que não era a mesma coluna cromatográfica. Com isso, foi possível verificar que os hidrocarbonetos presentes na amostra são os relacionados na **Tabela 10** (p. 86).

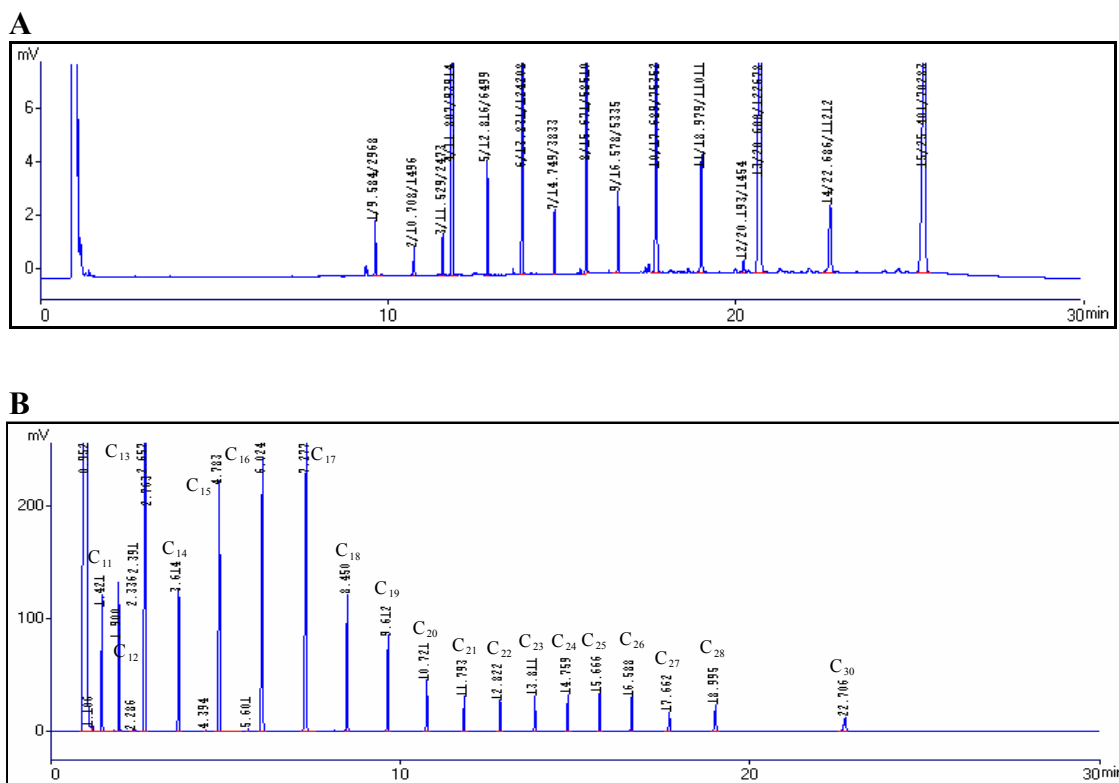


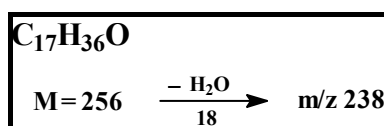
Figura 36 – Comparação dos Cromatogramas obtido por GC da **Fração C₄ 1 (A)** e dos padrões comerciais de hidrocarbonetos **(B)**. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 10 – Hidrocarbonetos identificados na **Fração C₄ 1**. Os t_R foram obtidos por GC.

Nome	Fórmula Molecular	t _R dos Padrões (min.)	t _R dos Picos da Fração C₄ 1 (min.)	Porcentagem relativa (%)
Nonadecano S₄	C ₁₉ H ₄₀	9,612	9,584	0,50
Icosano S₅	C ₂₀ H ₄₂	10,721	10,708	0,25
Henicosano S₆	C ₂₁ H ₄₄	11,793	11,807	15,99
Docosano S₇	C ₂₂ H ₄₆	12,822	12,816	1,10
Tricosano S₈	C ₂₃ H ₄₈	13,811	13,831	21,15
Tetracosano S₉	C ₂₄ H ₅₀	14,759	14,749	0,62
Pentacosano S₁₀	C ₂₅ H ₅₂	15,666	15,671	9,96
Hexacosano S₁₁	C ₂₆ H ₅₄	16,588	16,578	0,91
Heptacosano S₁₂	C ₂₇ H ₅₆	17,662	17,629	12,83
Octacosano S₁₃	C ₂₈ H ₅₈	18,995	18,979	1,87
Nonacosano S₁₄	C ₂₉ H ₆₀	-	20,688	20,88
Triacotano S₁₅	C ₃₀ H ₆₂	22,706	22,686	1,90
Hentriacotano S₁₆	C ₃₁ H ₆₄	-	25,401	11,96

t_R – Tempo de retenção em minutos.

O pico com tempo de retenção de 5,68 min. não apresenta espectro de massas típico de hidrocarbonetos e sim, com padrão de fragmentação de álcoois secundários (102). Os espectros de massas de álcoois primários obtidos por impacto por elétrons (IE) normalmente não apresentam o pico do íon molecular, devido à eliminação 1,4 de H₂O (M-[H₂O]⁺), e, portanto, seus espectros de massas se assemelham muito a um alqueno. A distinção entre um álcool e um alqueno é efetuada facilmente por meio do tempo de retenção. Os álcoois (C_n) eluem na mesma região de hidrocarbonetos, porém com 3 unidades de carbono a mais (C_{n+3}), sendo assim foi possível propor o álcool em questão seja o C₁₇H₃₆O (Heptadecanol – S₁₇), mas sem poder afirmar a posição da hidroxila.



Sendo assim, na **Fração C₄ 1** foi possível identificar os hidrocarbonetos C₁₉-C₃₁ (S₄ – S₁₆), e o álcool presente na fração é o heptadecanol (S₁₇), no qual a posição da hidroxila não foi definida e sua proporção em relação aos hidrocarbonetos é de apenas 0,08 %.

4.3.1.2 – Constituintes Químicos da **Fração C₄ 2**.

O espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, **Figura 37**, p. 88) da **Fração C₄ 2** apresenta sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,35 ppm, carbinólicos em δ 4,05 ppm e sinais de hidrogênios ligados a carbono em posição α a uma função carbonílica em δ 2,28 ppm, além dos sinais em δ 1,25 ppm e δ 0,86 ppm referentes à hidrogênios metilênicos e metílicos, respectivamente, sugerindo assim a presença de ácidos carboxílicos como compostos majoritários e ésteres oriundos de álcoois graxos e ácidos graxos.

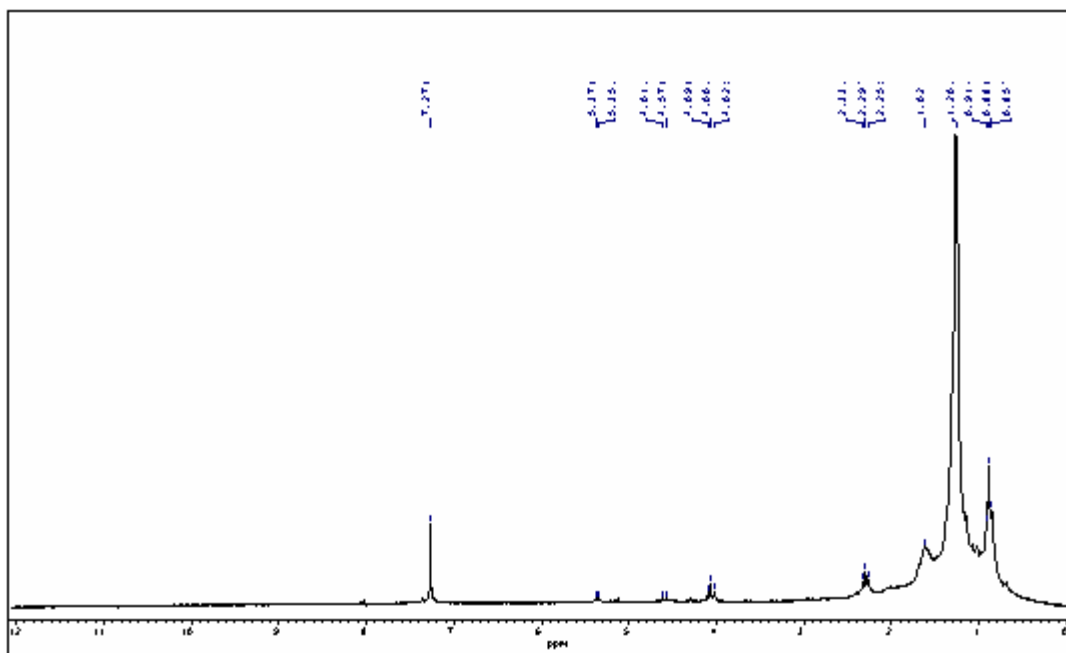


Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₄ 2**.

A análise dos espectros de massas obtidos por GC-MS apresentou, em alguns espectros padrões de fragmentações típicas de hidrocarbonetos, com pico do íon molecular muito pequeno, como já foi visto anteriormente; em outros, o padrão de fragmentação sugere a presença de ácidos carboxílicos. Os ácidos carboxílicos apresentam uma periodicidade marcante para íons com fragmentos começando em m/z 73 D e seguindo-se com três unidades de grupos metilênicos (m/z 129 D, m/z 185 D, m/z 241 D). Os ácidos carboxílicos, que devido à alta polaridade apresentam um alargamento de pico considerável em cromatografia gasosa, portanto, foi aconselhável transformar os ácidos graxos livres em seus ésteres metílicos.

Assim, realizaram-se a metilação de uma alíquota da **Fração C₄ 2** pelo método descrito no procedimento experimental. O material reacional foi analisado por GC-MS, mostrando a presença de picos bastante significativos, como pode ser observado no cromatograma gasoso (**Figura 38**, p. 89). Análises dos respectivos espectros de massas permitiram detectar a presença, principalmente, de ésteres metílicos de ácidos graxos caracterizados pela presença do pico base correspondente ao fragmento m/z 74 D,

originado pelo rearranjo do tipo McLafferty, no qual ocorre a clivagem da ligação C α – C β e a transferência de átomo de hidrogênio do C γ para o fragmento ionizado (**Figura 39**).

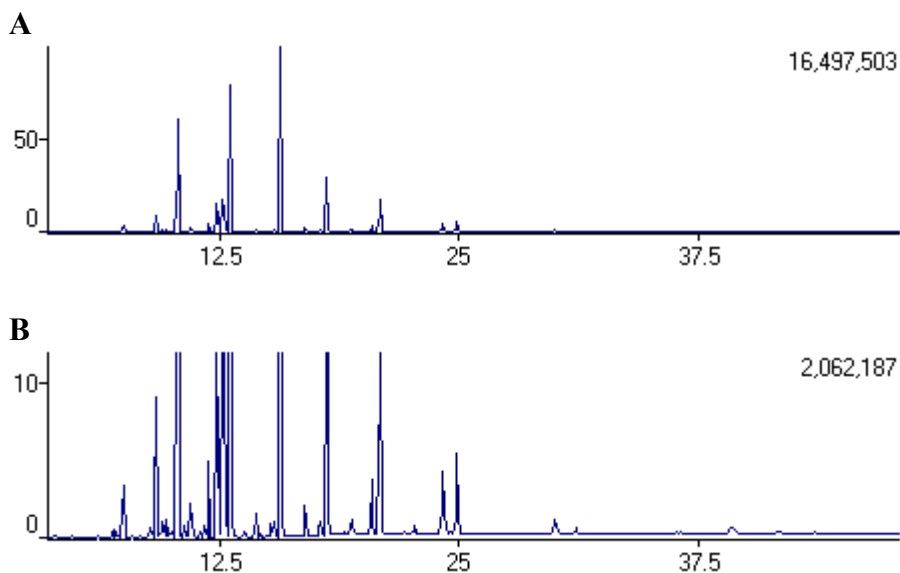


Figura 38 – Cromatogramas da mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos da **Fração C₄ 2**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min., temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta por 10,0 min.

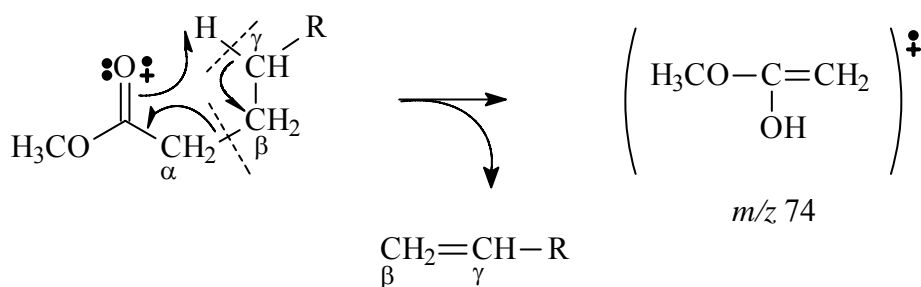
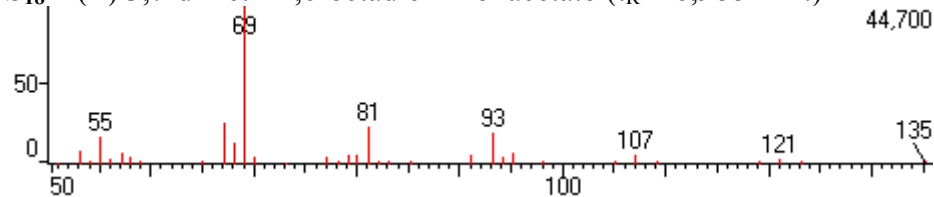


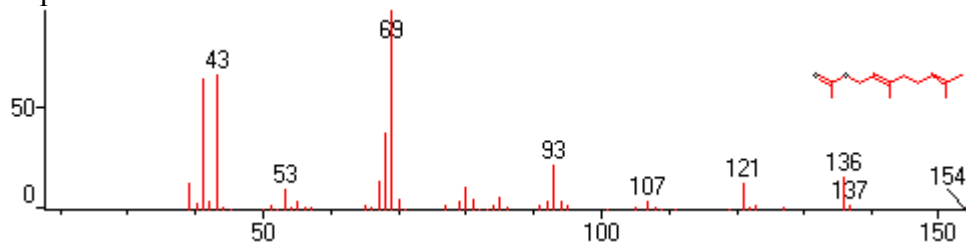
Figura 39 – Rearranjo do tipo McLafferty para os ésteres metílicos de ácidos graxos.

Os espectros de massas foram comparados com espectros de massas de ésteres de ácidos graxos encontrados na biblioteca Wily/PBM do sistema GC-MS. Esta comparação e identificação dos constituintes presentes na **Fração C₄ 2** encontram-se na **Figura 40** (p. 95), e os seus respectivos tempos de retenção e porcentagens constam na **Tabela 11** (p. 96).

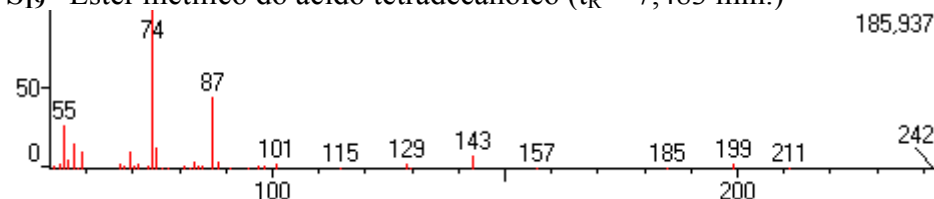
S₁₈ – (E) 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol acetato (t_R = 6,988 min.)



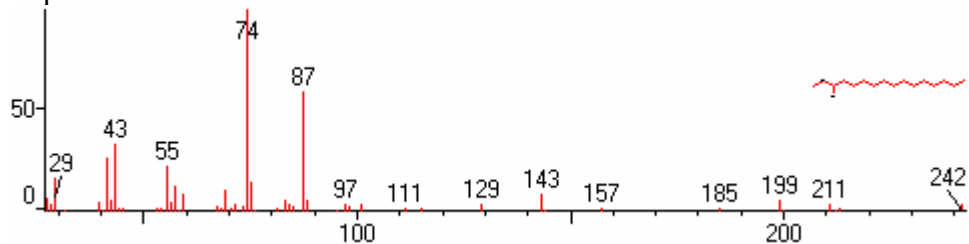
Espectro de massas da biblioteca:



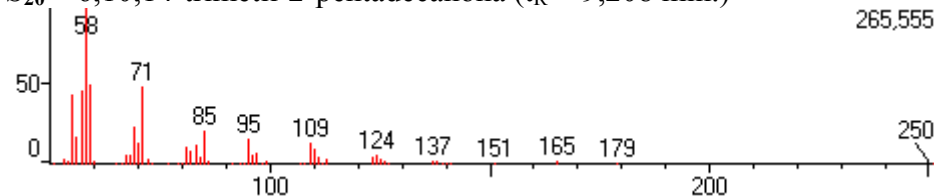
S₁₉ – Éster metílico do ácido tetradecanóico (t_R = 7,483 min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₂₀ – 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (t_R = 9,208 min.)



Espectro de massas da biblioteca:

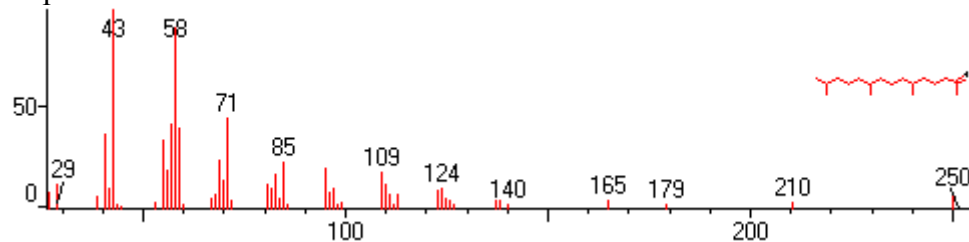


Figura 40 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

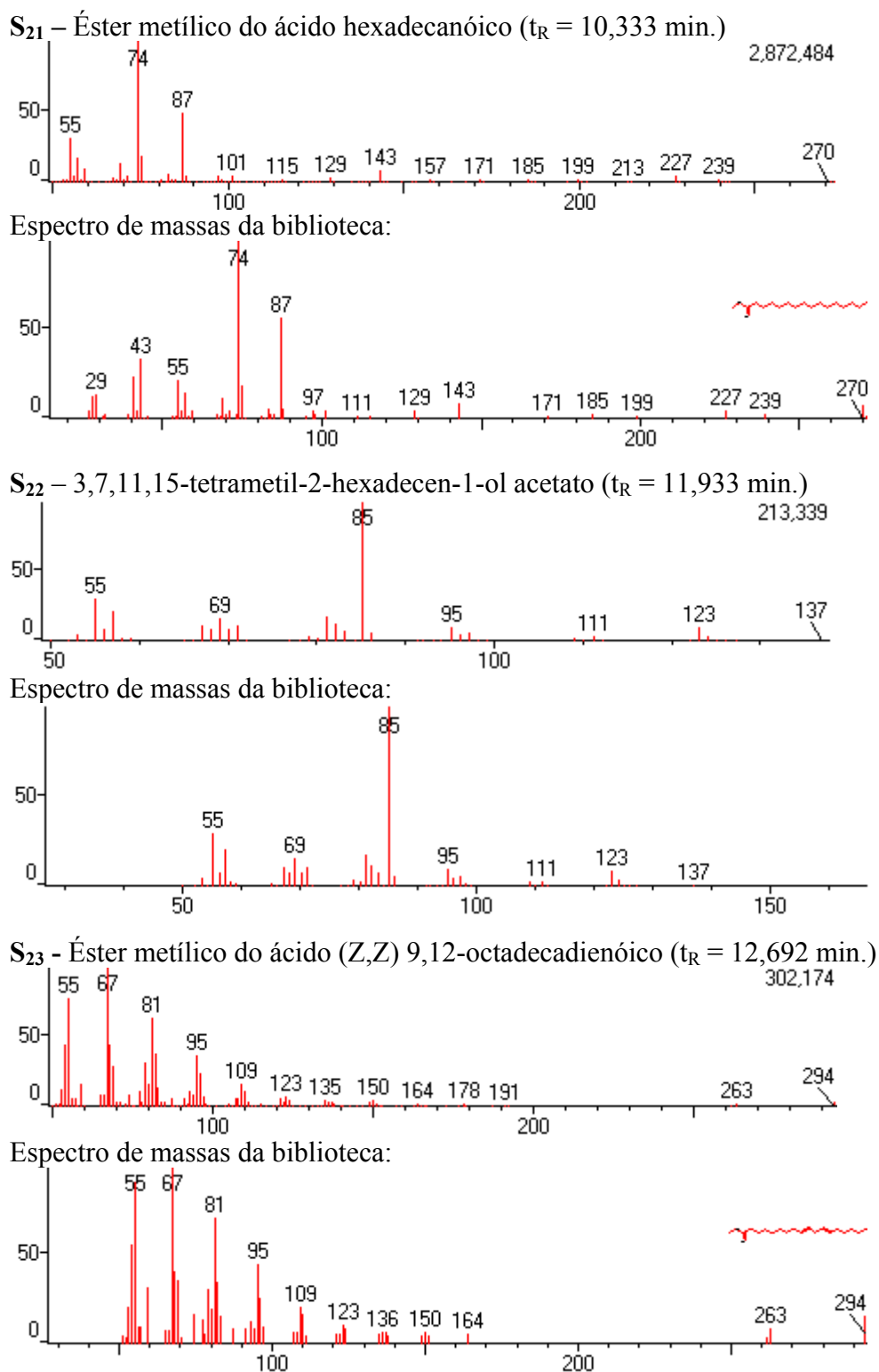
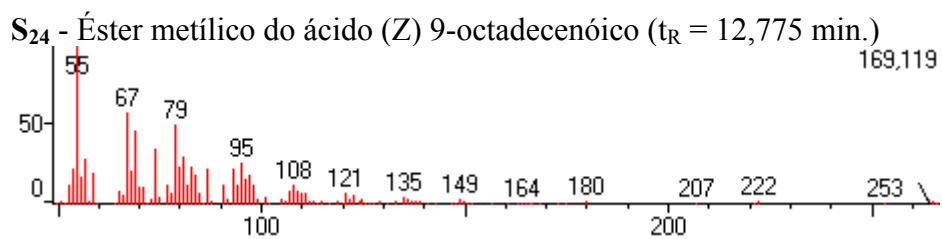
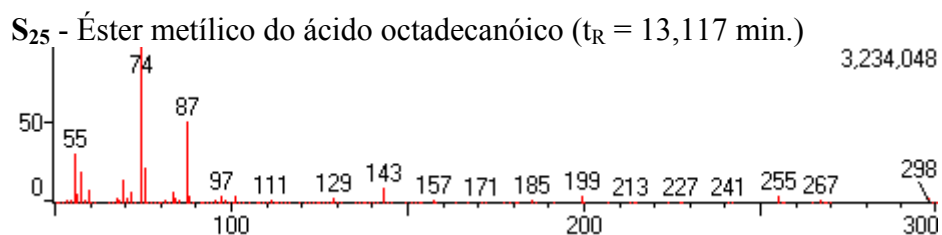
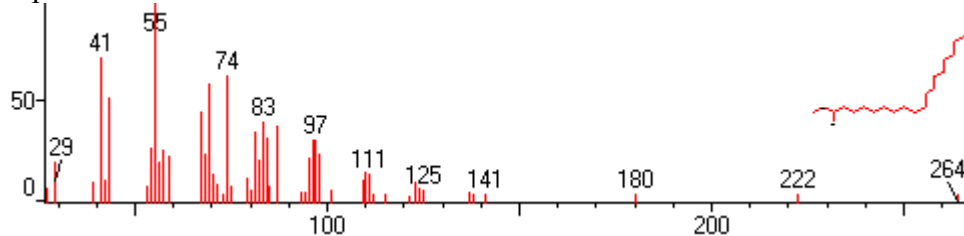


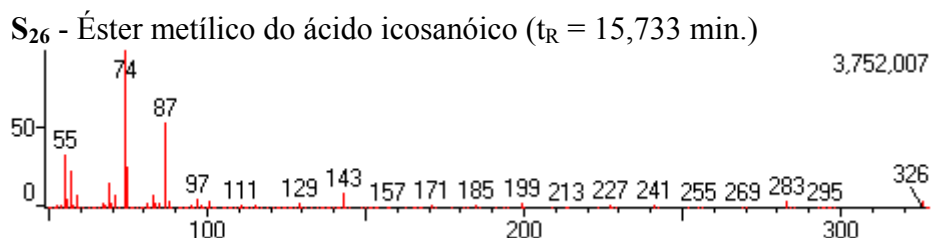
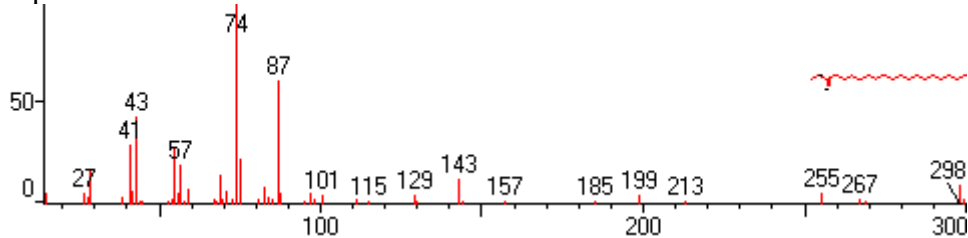
Figura 40 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.



Espectro de massas da biblioteca:



Espectro de massas da biblioteca:



Espectro de massas da biblioteca:

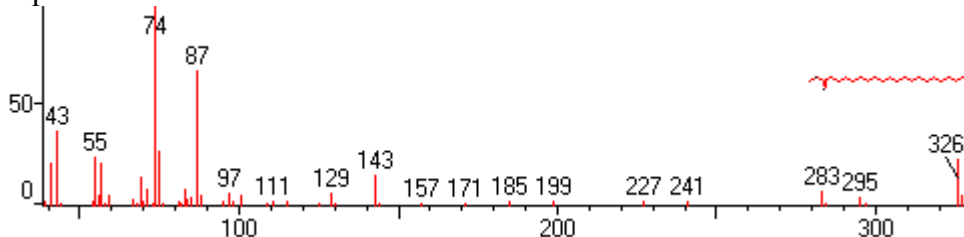


Figura 40 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

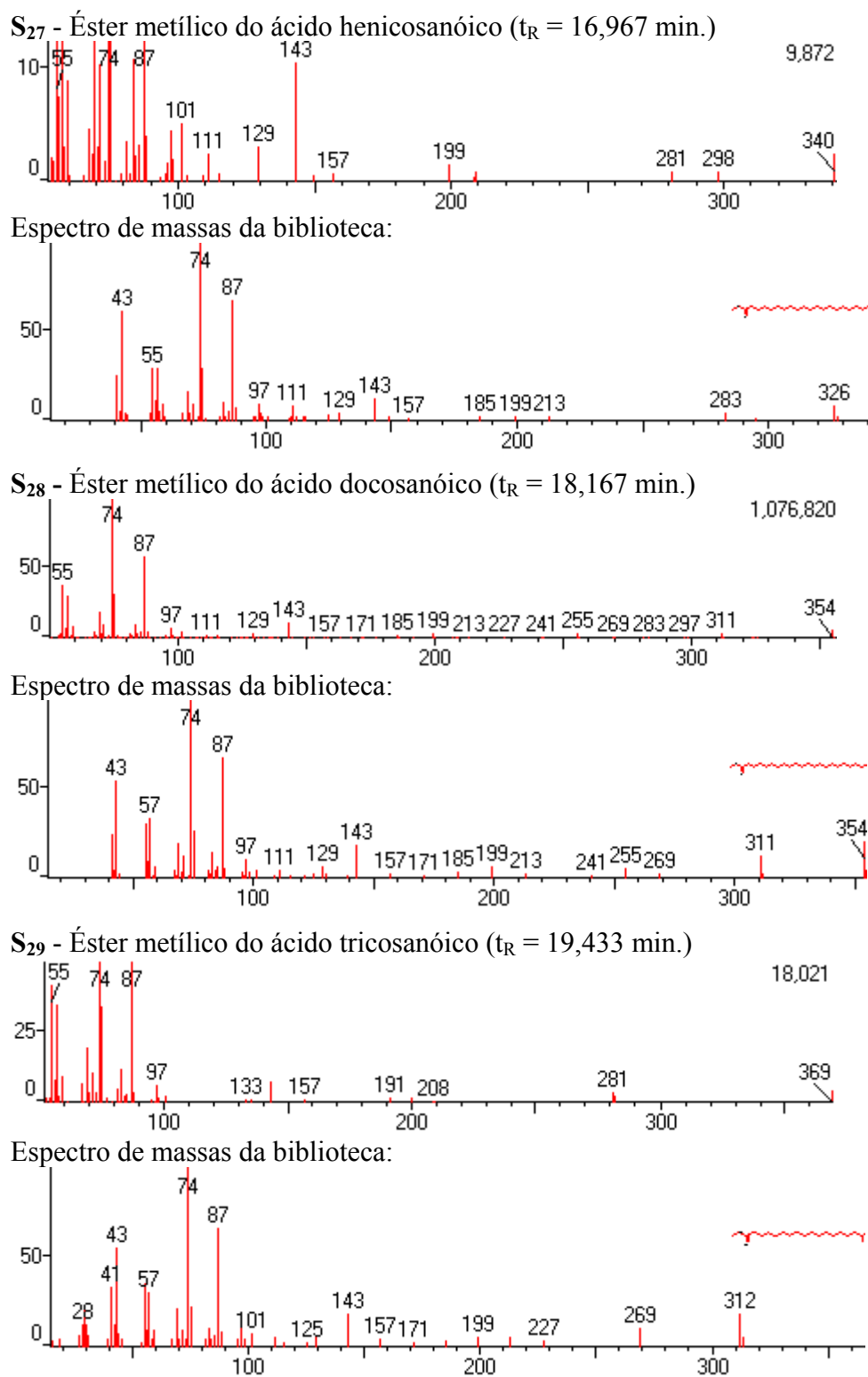
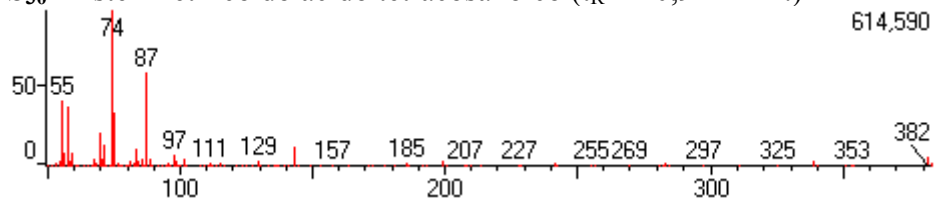
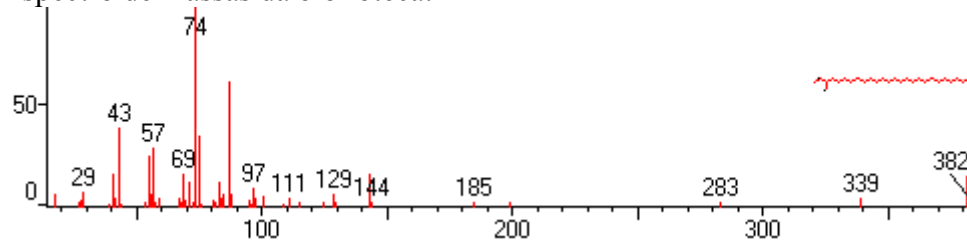


Figura 40 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

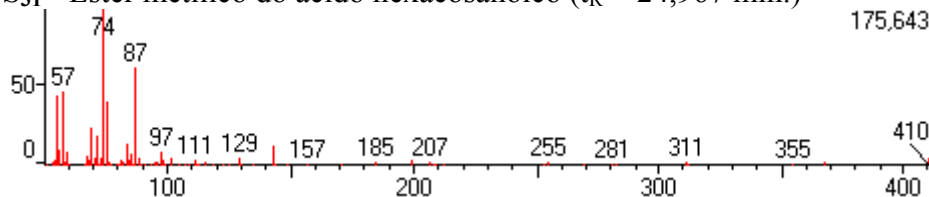
S₃₀ - Éster metílico do ácido tetracosanóico (t_R = 20,942 min.)



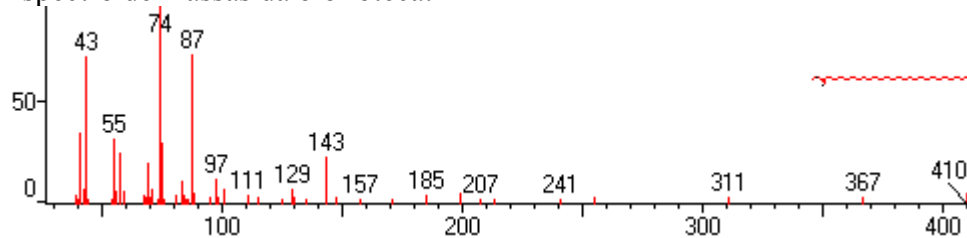
Espectro de massas da biblioteca:



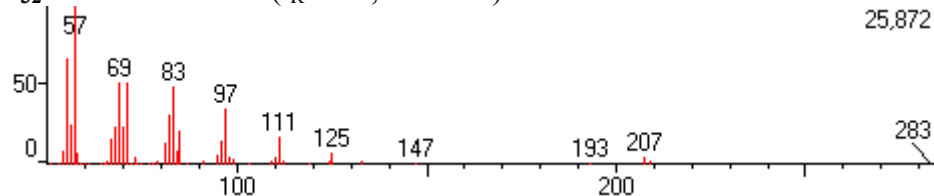
S₃₁ - Éster metílico do ácido hexacosanóico (t_R = 24,967 min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₃₂ - 1-nonadecanol (t_R = 30,042 min.)



Espectro de massas da biblioteca:

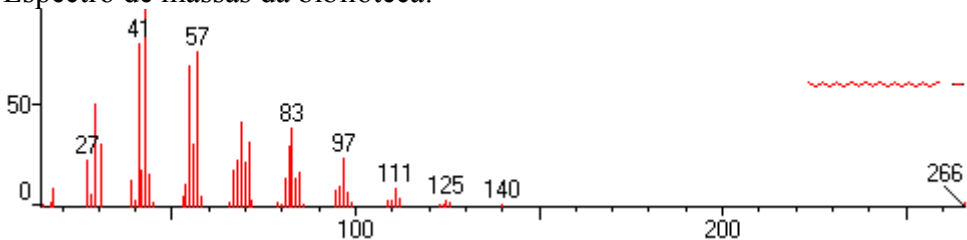
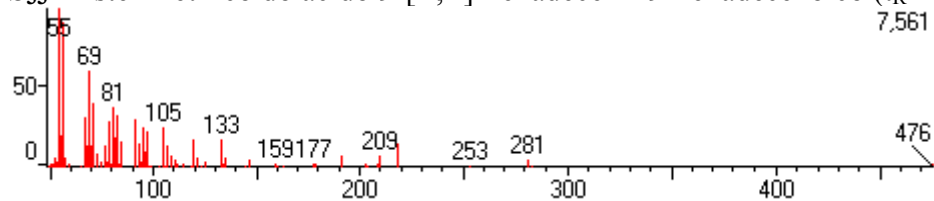


Figura 40 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

S₃₃ - Éster metílico do ácido 9-[Z,Z]-hexadecenil-9-hexadecenóico ($t_R = 39,242$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

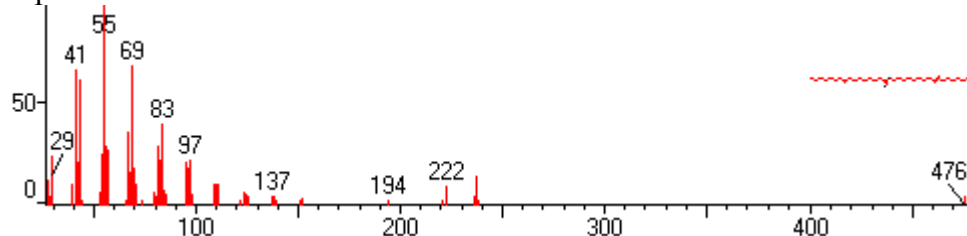


Figura 40 - Espectros de massas da **Fração C₄ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

Para alguns picos foi aplicada a equação de Van Den Dool e Kratz (**103**), que considera o tempo de retenção de cada composto e os números de carbonos de hidrocarbonetos injetados no GC:

$$IK = \frac{100 \cdot N \cdot (t_x - t_{n-1}) + 100 \cdot C_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

Onde:

IK = índice de retenção de Kovats.

$N = C_n - C_{n-1}$.

C_n = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada.

C_{n-1} = número de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada.

t_x = tempo de retenção da substância analisada.

t_n = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada.

t_{n-1} = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada.

Com isto, foi determinado o índice de retenção de Kovats para cada pico.

Kovats introduziu um índice de retenção em cromatografia gasosa de vários tipos de substâncias em relação ao tempo de retenção de hidrocarbonetos saturados de cadeia linear. Esse índice dá indicações de onde um determinado composto aparecerá

num cromatograma, em relação a um determinado n-alcano utilizando tempos de retenção ajustados. O índice de Kovats fornece informações consideráveis com relação a grupos funcionais e tamanhos de moléculas desconhecidas.

Portanto, os compostos foram identificados pela análise dos espectros de massas de cada pico, pela comparação de seus espectros de massas com os espectros obtidos da biblioteca do aparelho e pela comparação do índice de Kovats o qual reforçou a proposta para algumas substâncias (**Tabela 12**, p. 97).

Tabela 11 – Compostos identificados como ésteres metílicos na **Fração C₄ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t_R dos Picos da Fração C₄ 2	Porcentagem relativa (%)
(E) 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol acetato S₁₈ *	6,988	0,18
Ácido tetradecanóico S₁₉	7,483	0,89
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona S₂₀ *	9,208	2,43
Ácido hexadecanóico S₂₁	10,333	15,91
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol acetato S₂₂ *	11,933	1,35
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S₂₃	12,692	4,51
Ácido (Z) 9-octadecenóico S₂₄	12,775	3,18
Ácido octadecanóico S₂₅	13,117	21,38
Ácido icosanóico S₂₆	15,733	30,02
Ácido henicosanóico S₂₇	16,967	0,61
Ácido docosanóico S₂₈	18,167	8,10
Ácido tricosanóico S₂₉	19,433	0,32
Ácido tetracosanóico S₃₀	20,942	6,94
Ácido hexacosanóico S₃₁	24,967	3,17
1-nonadecanol S₃₂ *	30,042	0,71
Ácido (Z,Z) 9-hexadecenil-9-hexadecenóico S₃₃	39,242	0,30

* Presentes na fração e identificados por comparação com os dados dos espectros da Biblioteca, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

Tabela 12 – Comparação dos índices de Kovats dos ésteres metílicos dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (**103**) dos compostos da **Fração C₄ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Acetato do (E) 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol S₁₈ *	1885	1847
Ácido tetradecanóico S₁₉	1920	1922
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona S₂₀	2044	2025
Ácido hexadecanóico S₂₁	2123	2125
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol acetato S₂₂ *	2238	2218
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S₂₃	2293	-
Ácido (Z) 9-octadecenóico S₂₄	2297	-
Ácido octadecanóico S₂₅	2325	-
Ácido icosanóico S₂₆	2528	-
Ácido henicosanóico S₂₇	2627	-
Ácido docosanóico S₂₈	2727	-
Ácido tricosanóico S₂₉	2825	-
Ácido tetracosanóico S₃₀	2922	-
Ácido hexacosanóico S₃₁	-	-
1-nonadecanol S₃₂ *	-	-
Ácido (Z,Z) 9-hexadecenil-9-hexadecenóico S₃₃	-	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (**103**).

* Presentes na fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

4.3.1.3 – Constituintes Químicos da **Fração C₄ 3**.

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, **Figura 41**, p. 98) da **Fração C₄ 3** apresenta um sinal em δ 4,18 ppm (t , $J = 4,5$ Hz) referente à hidrogênios carbinólicos de ésteres, um sinal em δ 3,94 ppm (t , $J = 4,9$ Hz) correspondente a hidrogênios de CH_2 de uma função álcool, em δ 2,35 ppm (t , $J = 7,5$ Hz) sinal de hidrogênios de CH_2 em posição α a uma função carbonílica, os sinais em δ 1,62 ppm (m) e em δ 1,26 ppm (s) referentes a hidrogênios metilênicos e em δ 0,88 ppm (t , $J = 6,4$ Hz) a sinais de hidrogênios metílicos. Estes dados sugerem a presença de álcoois e ácidos graxos, além de ésteres de álcoois e ácidos graxos.

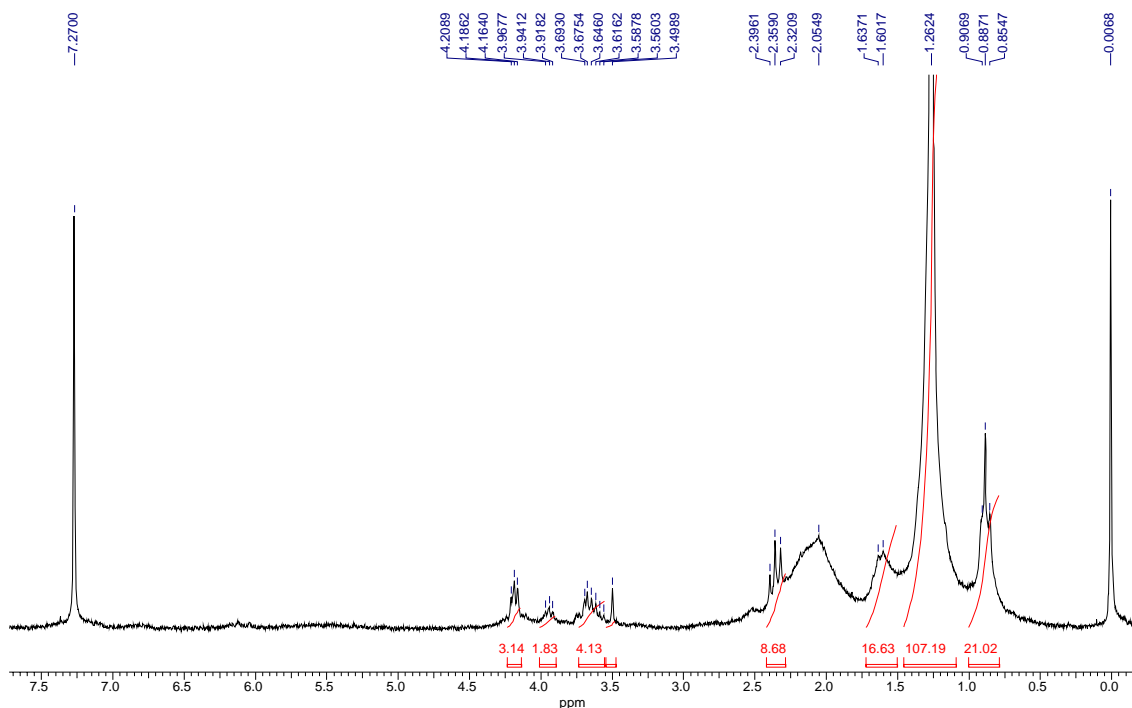


Figura 41 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₄ 3**.

Ao analisar o cromatograma gasoso (**Figura 42**, p. 99) e os espectros de massas obtidos por GC-MS foi possível observar a presença de álcoois e ácidos carboxílicos devidos o padrão de fragmentação típico para estas classes de compostos, já discutidos anteriormente, reforçando a análise realizada por RMN.

Devido às características dessas classes de compostos, as quais são de difíceis interpretações de seus espectros de massas, já discutido anteriormente, foram realizadas reações de transesterificações (metilação) para modificações estruturais para melhor análise por GC-MS de seus produtos. Os espectros de massas encontram-se na **Figura 43** (p. 99) e estes foram comparados com espectros de massas obtidos da biblioteca do equipamento.

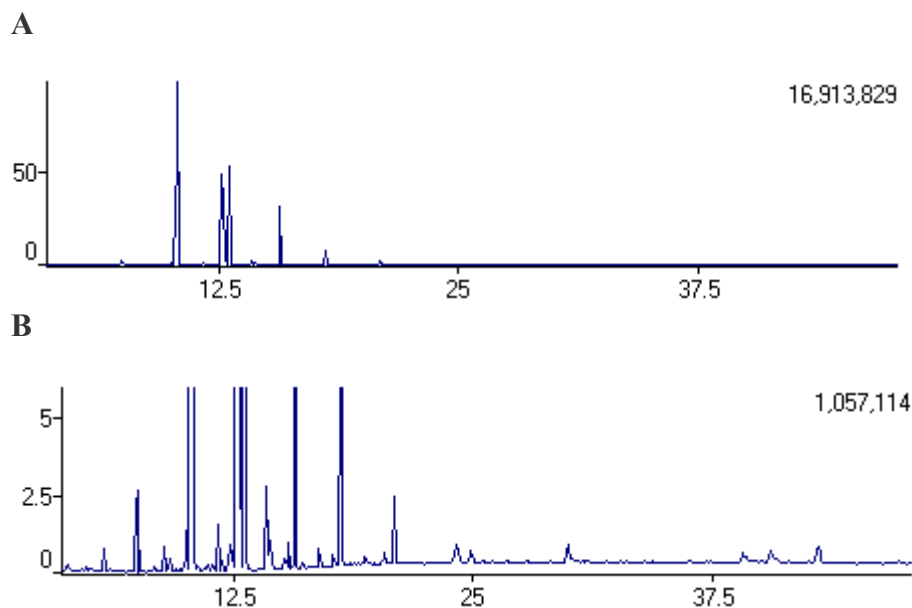


Figura 42 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₄ 3**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

S₃₄ - Éster metílico do ácido heptadecanóico ($t_R = 11,725$ min.)

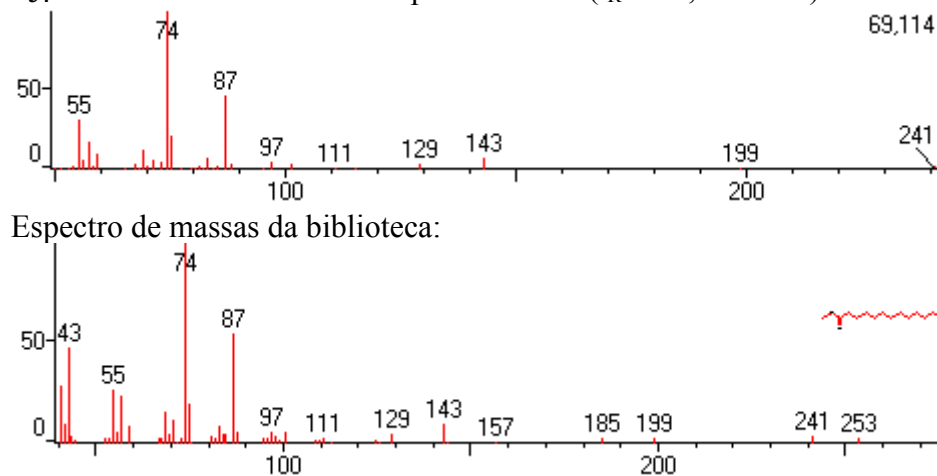


Figura 43 - Espectro de massas da **Fração C₄ 3** obtido por GC-MS em comparação com espectro obtido da biblioteca do equipamento (Os demais espectros são iguais aos já apresentados na **Figura 40**, p. 90).

Portanto, foi possível identificar na **Fração C₄ 3** as substâncias relacionadas nas **Tabelas 13 e 14** (p. 100).

Tabela 13 – Compostos identificados como ésteres metílicos na **Fração C₄ 3**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C₄ 3	Porcentagem relativa (%)
Ácido tetradecanóico S ₁₉	7,475	0,79
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,333	37,09
Ácido heptadecanóico S ₃₄	11,725	0,54
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S ₂₃	12,683	16,56
Ácido (Z) 9-octadecenóico S ₂₄	12,767	11,59
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,108	18,43
Ácido icosanóico S ₂₆	15,717	10,74
Ácido docosanóico S ₂₈	18,150	2,67
Ácido tetracosanóico S ₃₀	20,925	1,14
Ácido hexacosanóico S ₃₁	24,933	0,45

Tabela 14 – Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (**103**) dos compostos da **Fração C₄ 3**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Ácido tetradecanóico S ₁₉	1920	1922
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2123	2125
Ácido heptadecanóico S ₃₄	2223	-
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S ₂₃	2293	-
Ácido (Z) 9-octadecenóico S ₂₄	2299	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	2324	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2526	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2726	-
Ácido tetracosanóico S ₃₀	2920	-
Ácido hexacosanóico S ₃₁	-	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (**103**).

4.3.1.4 – Constituintes Químicos da **Fração C₄ 4**.

A **Fração C₄ 4** apresentou características espectroscópicas bastante semelhantes da **Fração C₄ 3** (**Figura 44**, p. 101), sendo assim seguiu-se o mesmo procedimento para determinação de seus constituintes químicos, ou seja, realização de modificação estrutural e análise por GC-MS (**Figura 45**, p. 101).

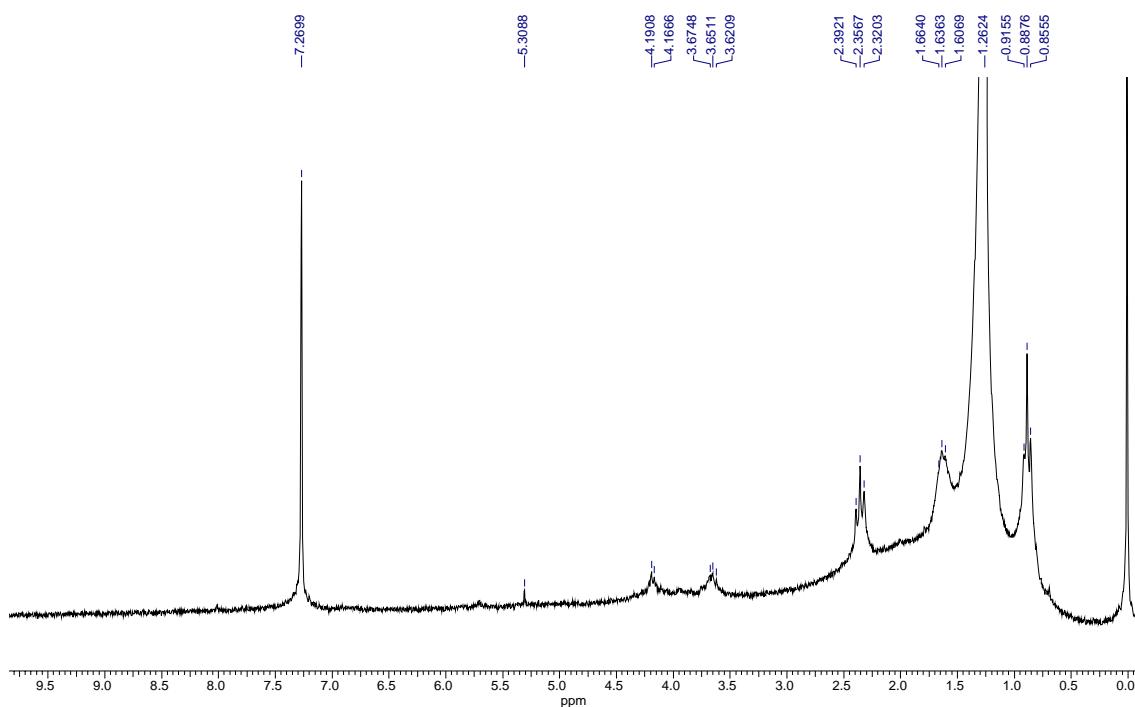


Figura 44 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₄ 4**.

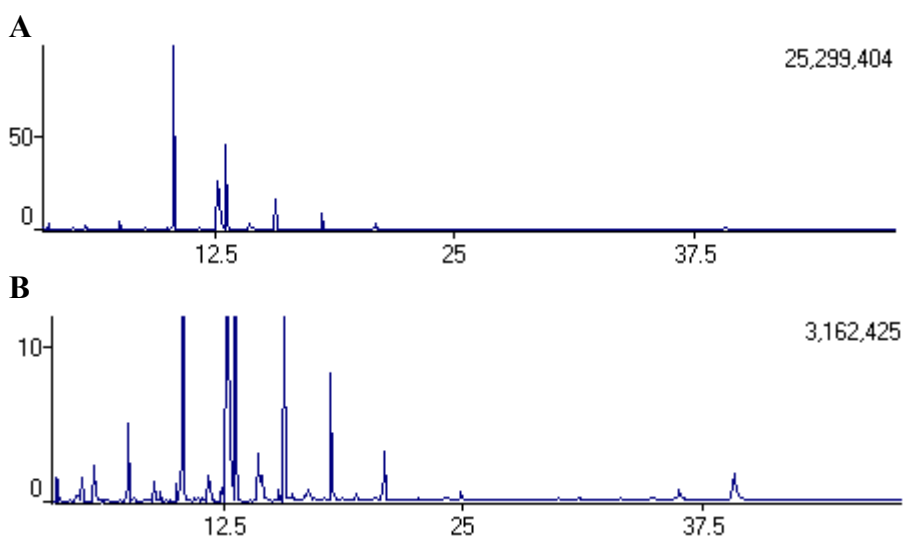


Figura 45 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₄ 4**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100°C ; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. até 250°C , permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Desta fração foi possível identificar as substâncias **S₁₉**, **S₂₁**, **S₂₃** e **S₂₅ – S₃₁** já identificadas em frações anteriores e as **S₃₅ – S₄₂** identificadas, até o momento, apenas nesta fração (**Tabela 15**, p. 102).

Tabela 15 – Compostos identificados na **Fração C₄ 4**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C₄ 4	Porcentagem relativa (%)
Ácido 9-oxo-nonadecanóico S ₃₅	3,867	1,48
Ácido octanóico S ₃₆	4,858	0,20
Ácido nonanedióico S ₃₇	5,117	0,61
Acetal dimetil decanal S ₃₈ *	5,758	1,15
Ácido tetradecanóico S ₁₉	7,500	1,79
Ácido dodecanóico S ₃₉	8,817	0,48
6,10-dimetil-2-undecanona S ₄₀ *	9,233	0,27
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,367	45,61
Ácido heptadecanóico S ₃₄	11,750	0,66
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S ₂₃	12,708	10,00
Ácido 13,16-octadecadienóico S ₄₁	12,792	7,04
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,128	18,16
Ácido icosanóico S ₂₆	15,733	6,17
Ácido henicosanóico S ₂₇	16,975	0,31
Ácido docosanóico S ₂₈	18,167	3,52
Ácido tricosanóico S ₂₉	19,442	0,22
Ácido tetracosanóico S ₃₀	20,950	1,83
Ácido hexacosanóico S ₃₁	24,967	0,50

* Presentes na fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

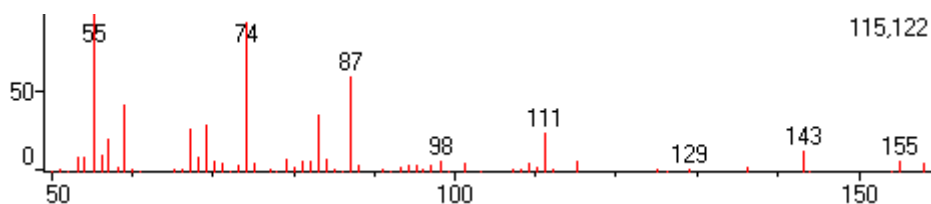
Tabela 16 – Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da **Fração C₄ 4**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Ácido 9-oxo-nonadecanóico S ₃₅	1629	1621
Ácido octanóico S ₃₆	1719	1724
Ácido nonanedióico S ₃₇	1740	-
Acetal dimetil decanal S ₃₈ *	1793	-
Ácido tetradecanóico S ₁₉	1922	1922
Ácido dodecanóico S ₃₉	2023	-
6,10-dimetil-2-undecanona S ₄₀ *	2045	-
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2126	2129
Ácido heptadecanóico S ₃₄	225	-
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S ₂₃	2294	2096
Ácido 13,16-octadecadienóico S ₄₁	2301	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	2326	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2527	-
Ácido henicosanóico S ₂₇	2628	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2727	-
Ácido tricosanóico S ₂₉	-	-
Ácido tetracosanóico S ₃₀	-	-
Ácido hexacosanóico S ₃₁	-	-

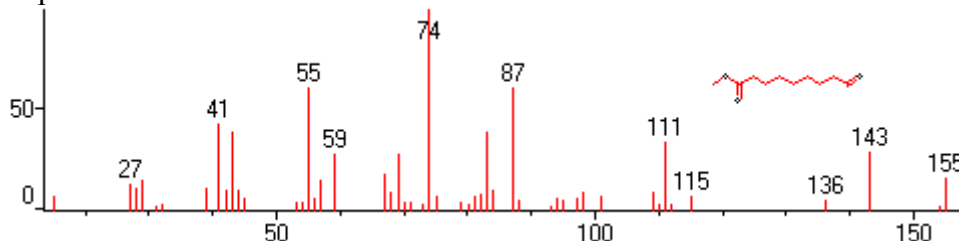
IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (103).

* Presentes na fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

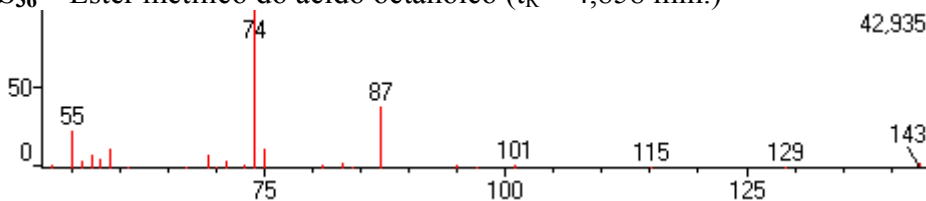
S₃₅ – Éster metílico do ácido 9-oxo-nonadecanóico ($t_R = 3,967$ min.)



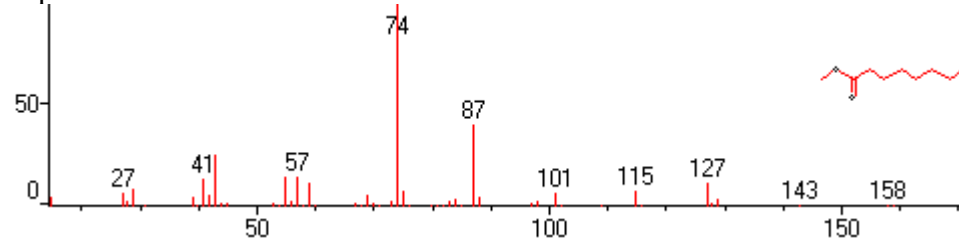
Espectro de massas da biblioteca:



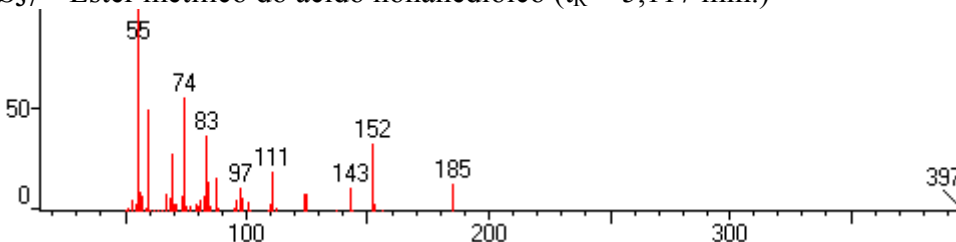
S₃₆ – Éster metílico do ácido octanóico ($t_R = 4,858$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₃₇ – Éster metílico do ácido nonanedióico ($t_R = 5,117$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

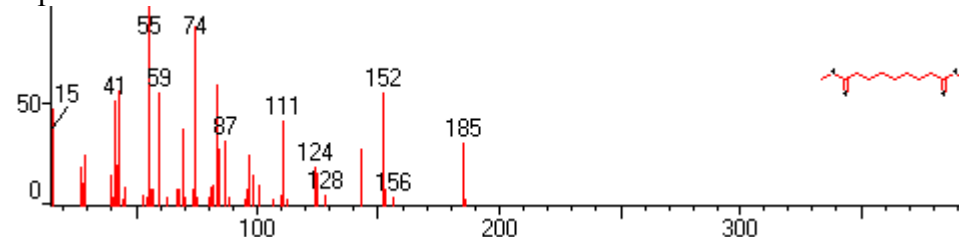
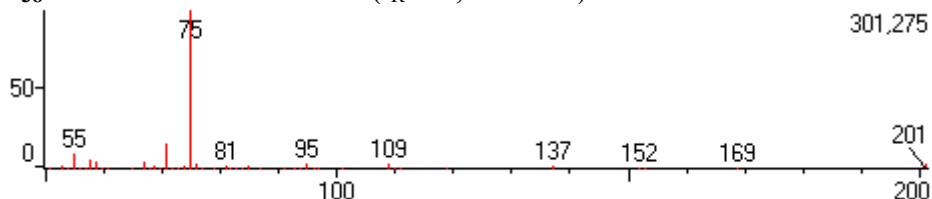
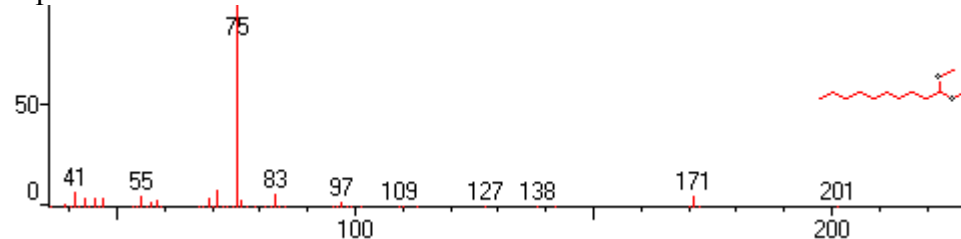


Figura 46 (continuação) - Espectros de massas dos compostos identificados como ésteres metílicos da **Fração C₄ 4** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento (São mostrados apenas os não identificados nas frações anteriores).

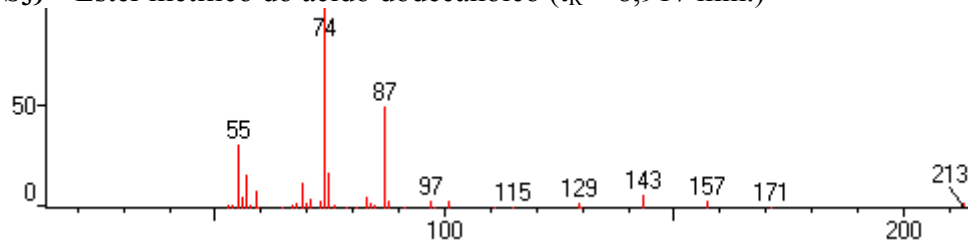
S₃₈ – Acetal dimetil decanal ($t_R = 5,758$ min.)



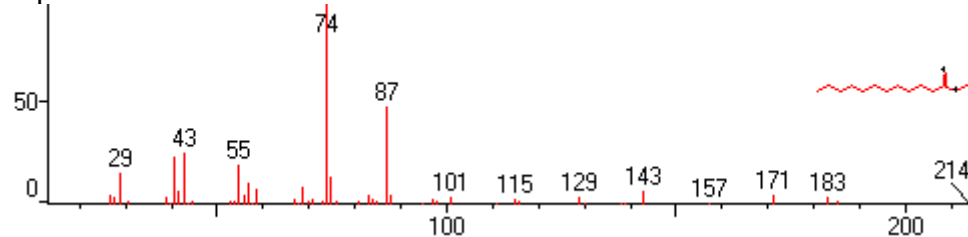
Espectro de massas da biblioteca:



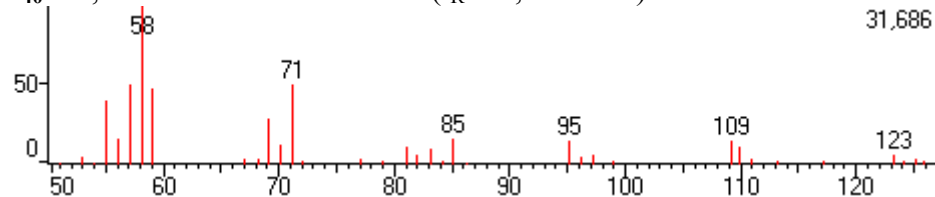
S₃₉ – Éster metílico do ácido dodecanóico ($t_R = 8,917$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₄₀ – 6,10-dimetil-2-undecanona ($t_R = 9,233$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

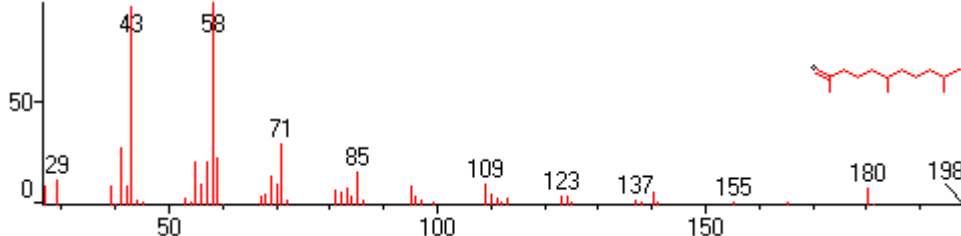


Figura 46 (continuação) - Espectros de massas dos compostos identificados como ésteres metílicos da **Fração C₄** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento (São mostrados apenas os não identificados nas frações anteriores).

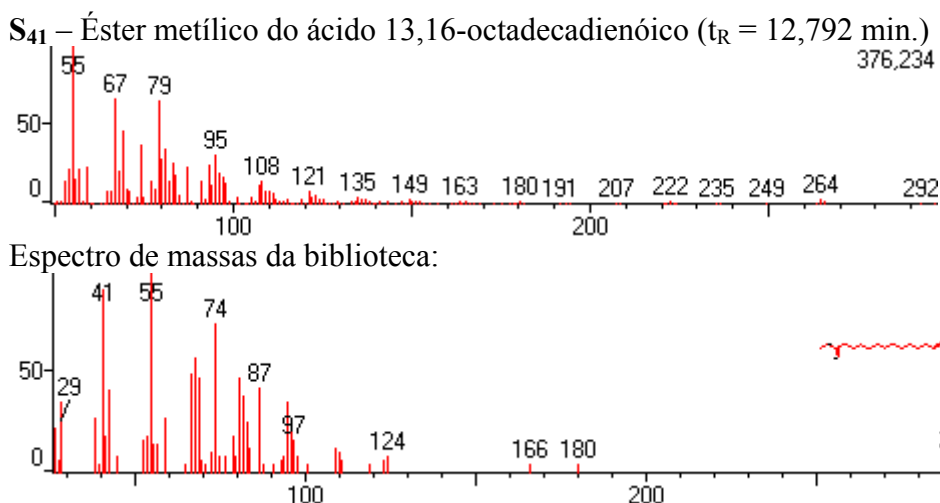


Figura 466 - Espectros de massas dos compostos identificados como ésteres metílicos da **Fração C₄ 4** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento (São mostrados apenas os não identificados nas frações anteriores).

4.3.1.5 – Constituintes Químicos da **Fração C₄ 5**.

Após análise por CCDC a **Fração C₄ 5** apresentou-se complexa para identificação direta de seus constituintes químicos, sendo então necessário novo fracionamento, este originou a coluna **C₅**, deste refracionamento obteve-se um total de 38 frações que foram reunidas em grupos após análise por CCDC e receberam nova numeração. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por meio de análises espectrais de RMN e espectrometria de massas.

4.3.1.5.1 – Constituintes Químicos da **Coluna C₅** (Proveniente da **Fração C₄ 5**).

4.3.1.5.1.1 – Constituintes Químicos da **Fração C₅ 1**.

Ao observar o espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, idêntica à **Figura 33**, p. 82) e o cromatograma (**Figura 47**, p. 106) da **Fração C₅ 1** pode-se sugerir que se trata basicamente de hidrocarbonetos devido à presença de sinais de hidrogênios metílicos e metilênicos em δ 0,86 ppm e δ 1,28 ppm, respectivamente. Como já foram analisadas anteriormente fração com esta classe de compostos, ficou bastante claro tratarem-se de hidrocarbonetos, portanto, optou-se pela não realização de análises por GC-MS, visto

que o espectro de RMN ^1H sugere a presença apenas dessas substâncias. Sendo assim, como realizado anteriormente, foram feitas comparações dos t_R dos compostos presentes na amostra e dos t_R de padrões comercial. Os hidrocarbonetos presentes na **Fração C₅ 1** encontram-se listados na **Tabela 17** (p. 107).

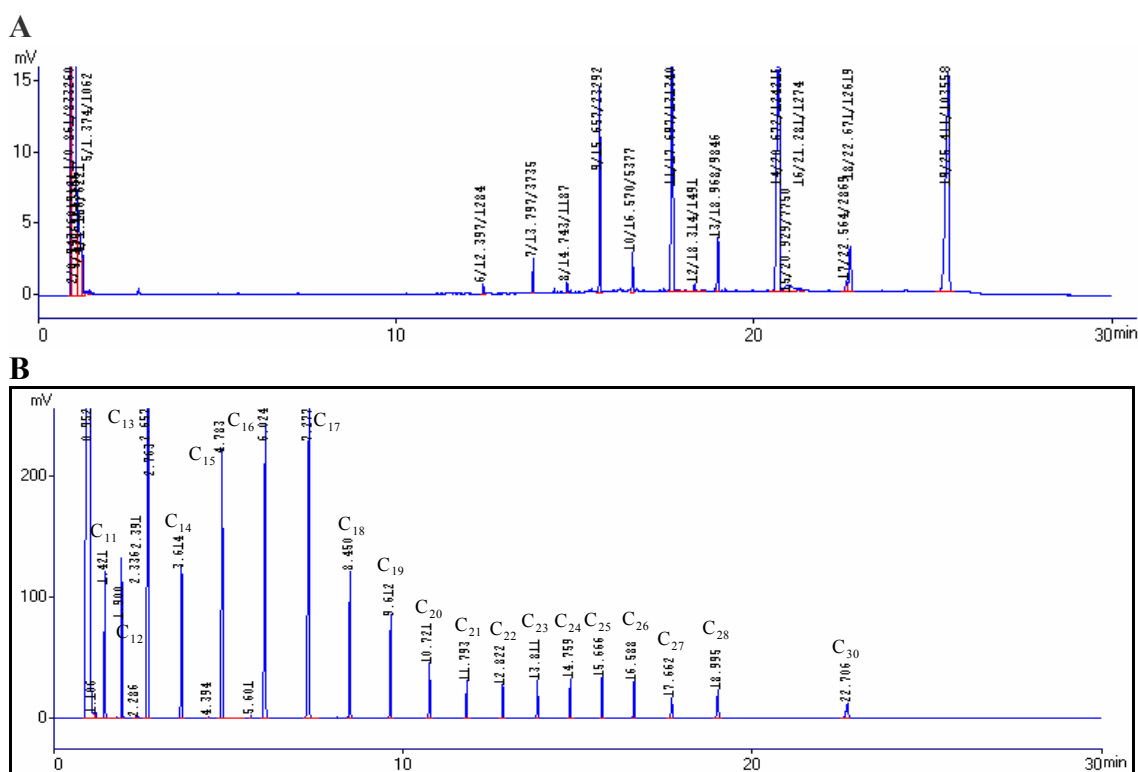


Figura 47 - Comparação dos Cromatogramas obtidos por GC da **Fração C₅ 1** (A) e dos padrões comerciais de hidrocarbonetos (B). Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 17 – Hidrocarbonetos identificados na **Fração C₅ 1**. Os t_R foram obtidos por GC.

Nome	Fórmula Molecular	t _R dos Padrões (min.)	t _R dos Picos da Fração C₅ 1 (min.)	Porcentagem relativa (%)
Tricosano S₈	C ₂₃ H ₄₈	13,811	13,797	0,90
Tetracosano S₉	C ₂₄ H ₅₀	14,759	14,743	0,29
Pentacosano S₁₀	C ₂₅ H ₅₂	15,666	15,657	5,61
Hexacosano S₁₁	C ₂₆ H ₅₄	16,588	16,570	1,29
Heptacosano S₁₂	C ₂₇ H ₅₆	17,662	17,697	31,64
Octacosano S₁₃	C ₂₈ H ₅₈	18,995	18,968	2,38
Nonacosano S₁₄	C ₂₉ H ₆₀	-	20,672	29,91
Triacotano S₁₅	C ₃₀ H ₆₂	22,706	22,671	3,04
Hentriacotano S₁₆	C ₃₁ H ₆₄	-	25,411	24,94

t_R – Tempo de retenção em minutos.

4.3.1.5.1.2 – Constituintes Químicos da **Fração C₅ 2**.

Ao analisar o espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, **Figura 48**, p. 108) da **Fração C₅ 2** foram observados sinais característicos de ácidos carboxílicos, δ 2,35 ppm (*t*, *J* = 7,3 Hz) referentes a hidrogênios de CH₂ em posição α a uma função carbonílica, sinal em δ 1,63 ppm (*t*, *J* = 6,97 Hz) e δ 1,26 ppm (*s*) correspondentes à sinais de hidrogênios metilênicos e em δ 0,88 ppm (*t*, *J* = 6,4 Hz) sinais de hidrogênios metílicos. O cromatograma desta fração é mostrado na **Figura 49** (p. 108). Realizou-se a transesterificação (metilação) desta fração e posterior análise por GC-MS comparando-se os espectros de massas dos picos provenientes da amostra com os espectros de massas obtidos da biblioteca do equipamento.

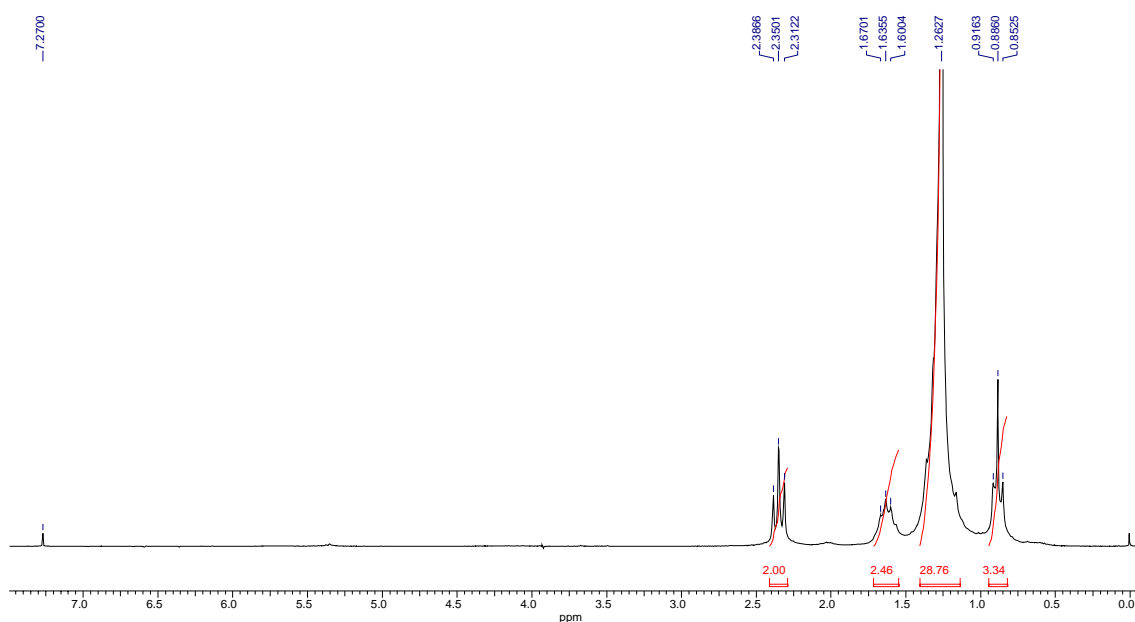


Figura 48 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₅ 2**.

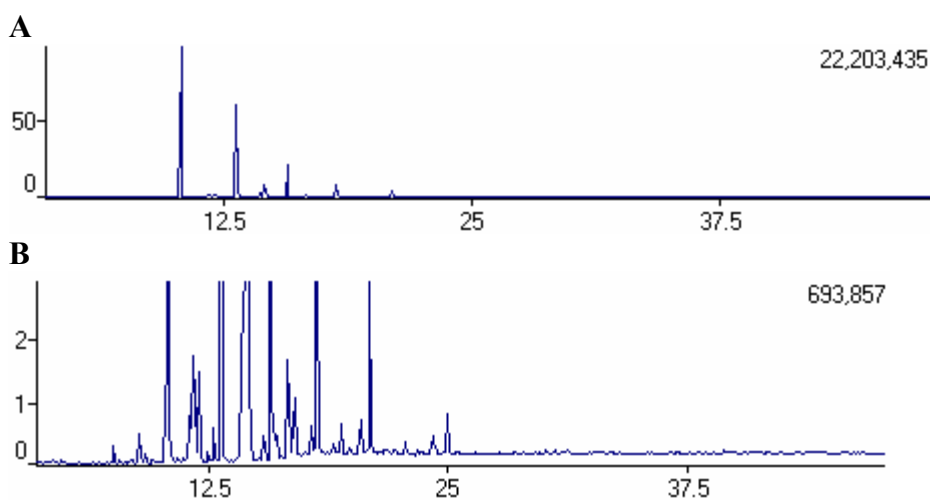


Figura 49 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₅ 2**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Foi possível identificar os compostos relacionados na **Tabela 18** (p. 109), os quais já foram identificados em frações anteriores.

Tabela 18 – Compostos identificados como ésteres metílicos na **Fração C₅ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C₅ 2	Porcentagem relativa (%)
Ácido dodecanóico S ₃₉	8,925	0,25
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,367	52,98
Ácido hexadecil icosanóico S ₄₂	12,058	0,80
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,142	29,59
Ácido 13,16-octadecadienóico S ₄₁	14,300	1,58
Ácido icosanóico S ₂₆	15,750	10,21
1,1-dimetóxi-hexadecano S ₄₃ *	17,042	0,56
Ácido docosanóico S ₂₈	18,183	4,03

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

Tabela 19 – Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados como ésteres metílicos com os índices obtidos de ADAMS (**103**) dos compostos da **Fração C₅ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Ácido dodecanóico S ₃₉	2045	-
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2125	2125
Ácido hexadecil icosanóico S ₄₂	2226	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	2327	-
Ácido 13,16-octadecadienóico S ₄₁	2415	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2528	-
1,1-dimetóxi-hexadecano S ₄₃ *	2634	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2729	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (**103**).

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

4.3.1.5.1.3 – Constituintes Químicos da **Fração C₅ 3**.

A **Fração C₅ 3** apresentou-se como sólido branco cristalino que após análise por CCDC verificou-se que pela sua coloração característica após a revelação e seu R_f, provavelmente, tratava-se de esteróides, possivelmente o sitosterol. Desta forma, seguiram-se os procedimentos usuais para sua identificação e confirmação da presença desta substância na **Fração C₅ 3**.

A análise do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, **Figura 50**, p. 110) apresentou um sinal em δ 5,34 ppm (*dl*, J = 5,0 Hz) o qual corresponde ao deslocamento químico do hidrogênio olefínico ligado ao carbono 6; em δ 3,51 ppm (*m*) corresponde

ao do hidrogênio ligado ao carbono 3; e os sinais entre δ 0,65 ppm e δ 2,30 ppm referem-se aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos. Estes sinais indicaram a presença do β -sitosterol. Foi possível observar, ainda, um sinal em δ 5,03 ppm (*dd*, $J = 15,4$ e $8,0$ Hz) referente ao deslocamento químico de hidrogênio olefínico, sugerindo a presença do estigmasterol, visto que este sinal pode ser do hidrogênio ligado ao carbono da posição 23 e em δ 5,11 ppm (*dd*, $J = 15,4$ e $8,0$ Hz), correspondente ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 22.

Para confirmação de que nesta fração havia apenas estas duas substâncias foi realizado experimento por GC-MS e obtiveram-se no cromatograma três picos majoritários (**Figura 51**, p. 111).

Após análise dos espectros de massas (**Figura 52**, p. 111) foi possível verificar que além do sitosterol (S_{44}) e do estigmasterol (S_{45}) havia também a presença do esteróide campesterol (S_{46}).

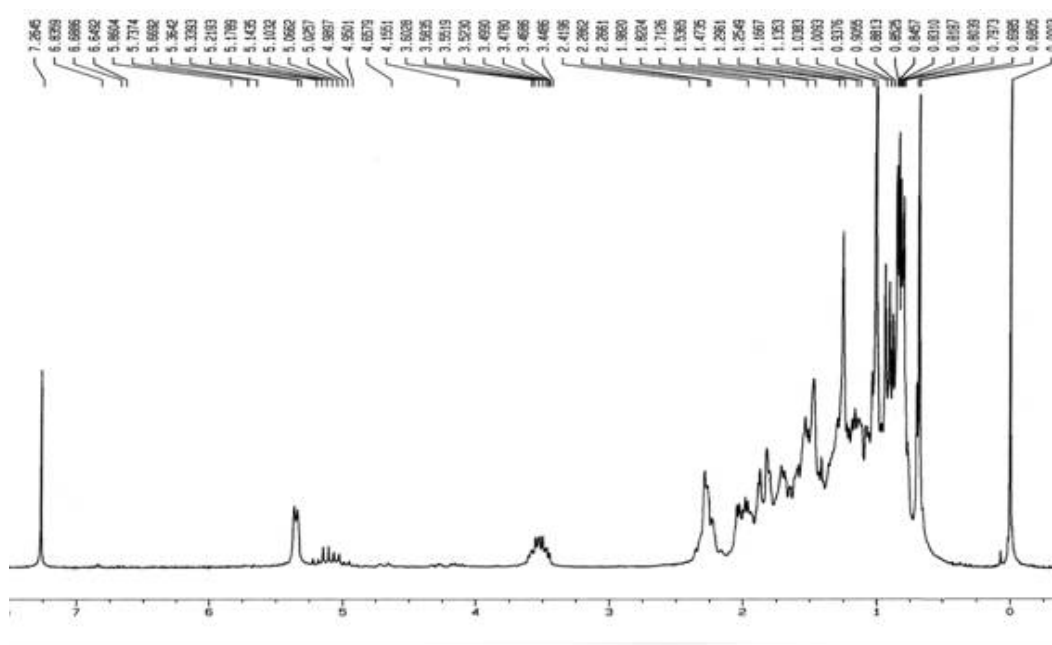


Figura 50 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da Fração C_5 3.

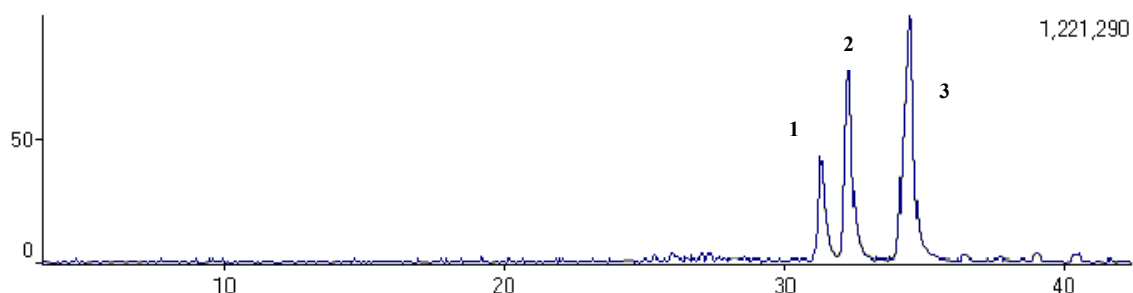
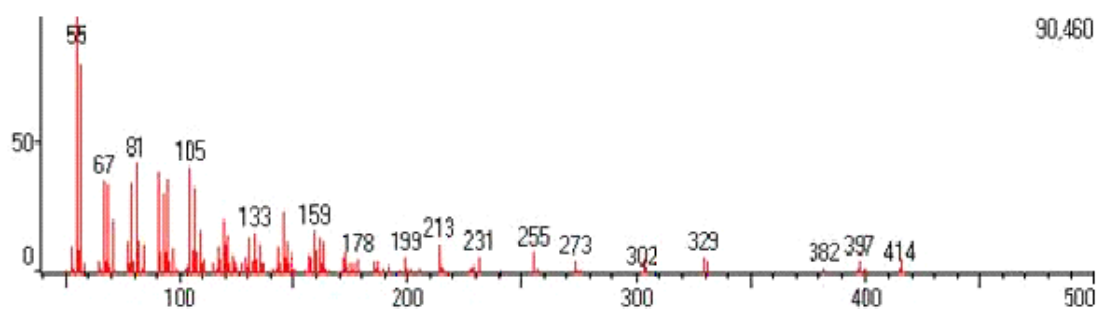
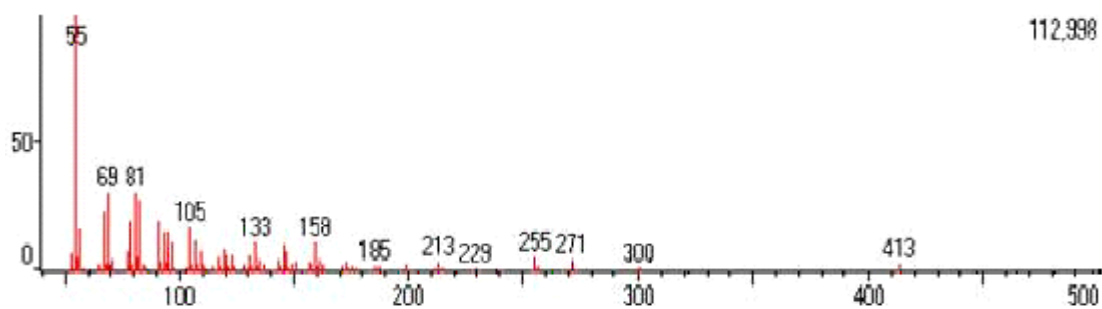


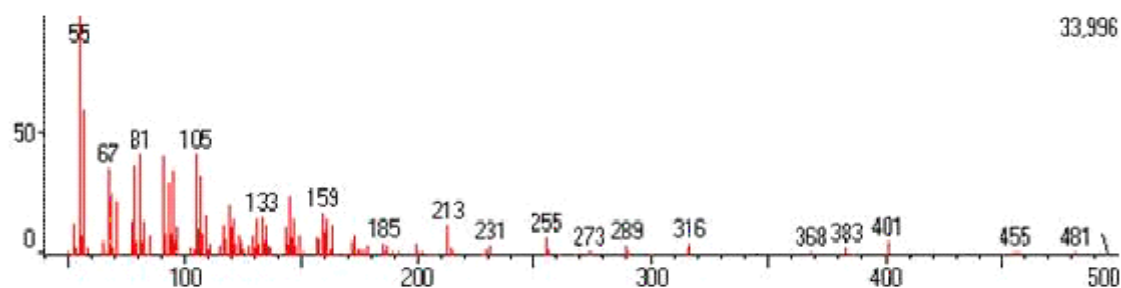
Figura 51 – Cromatograma obtido no GC-MS da **Fração C₅ 3**. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.



Pico 1 - Espectro de massas do sitosterol (S₄₄).

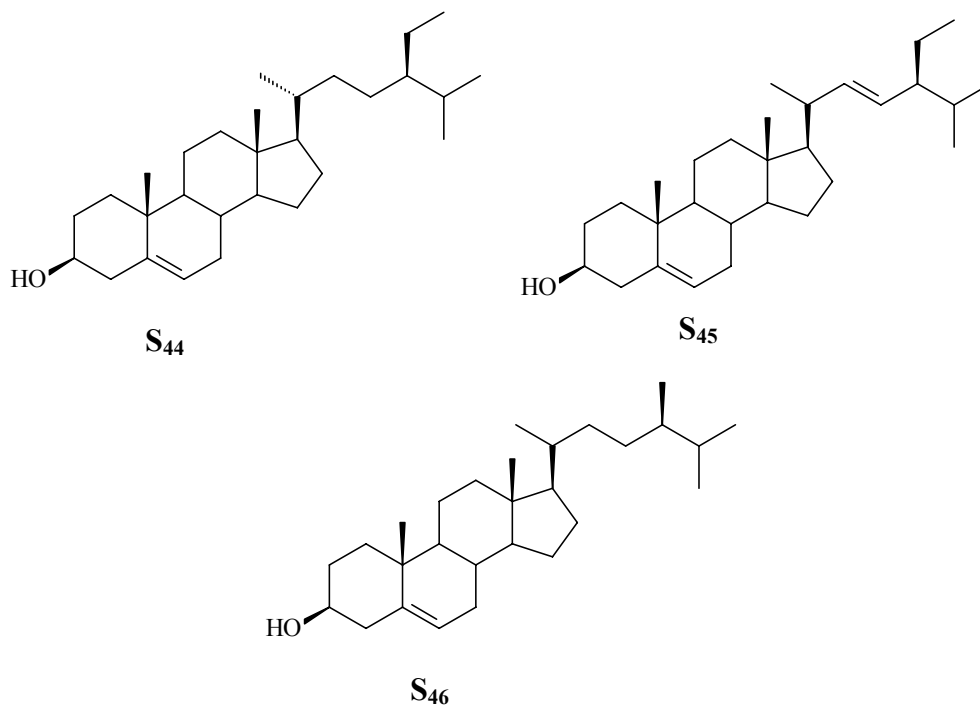


Pico 2 - Espectro de massas do estigmasterol (S₄₅).



Pico 3 - Espectro de massas do campesterol (S₄₆).

Figura 527 - Espectros de massas da **Fração C₅ 3** obtidos por GC-MS.



4.3.1.5.1.4 – Constituintes Químicos da Fração C₅ 4.

A Fração C₅ 4, após análise por RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, Figuras 54 e 55, p. 113), apresentou conjuntos de sinais em δ 7,64 ppm (*d*, $J = 8,7$ Hz) e δ 6,81 ppm (*d*, $J = 8,7$ Hz) e em δ 7,44 ppm (*d*, $J = 8,7$ Hz) e δ 6,84 ppm (*d*, $J = 8,7$ Hz) de hidrogênios ligados à carbonos aromáticos, de acoplamento *orto*, sendo que cada conjunto de sinais corresponde a um anel, como pode ser observado nas subestruturas da Figura 53.

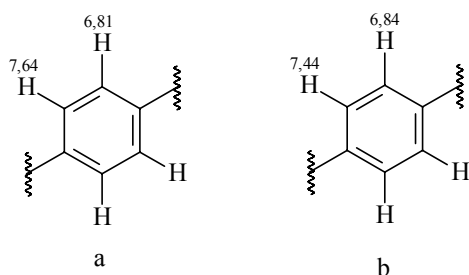


Figura 53 – Subestruturas com dados RMN ¹H para Fração C₅ 4, sugerindo tratar-se de dois anéis aromáticos (a e b).

Os sinais em δ 7,63 ppm (*d*, $J = 16,1$ Hz) e δ 6,31 ppm (*d*, $J = 16,1$ Hz) referem-se a sinais de hidrogênios olefínico em configuração *trans*, e os sinais em δ 6,83 ppm (*d*,

$J = 12,4$ Hz) e o sinal em δ 5,83 ppm (d , $J = 12,4$ Hz) referem-se à sinais de hidrogênios olefínicos em configuração *cis*. Ainda analisando o espectro de RMN ^1H , observam-se sinais em δ 1,58 ppm e δ 1,26 ppm referentes à sinais de hidrogênios metilênicos e em δ 0,88 ppm de sinais de hidrogênios metílicos da cadeia hidrocarbônica.

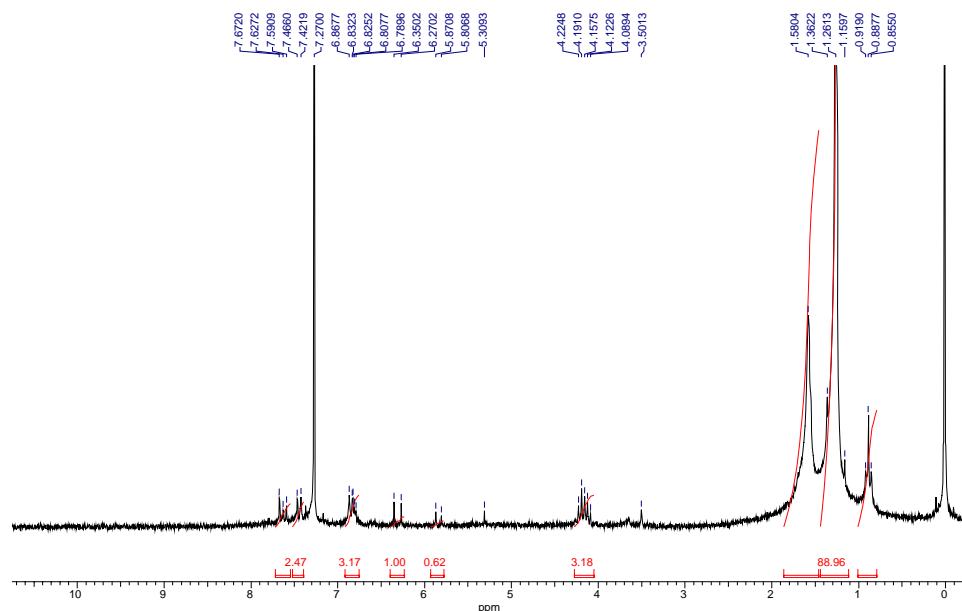


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da Fração C_5 4.

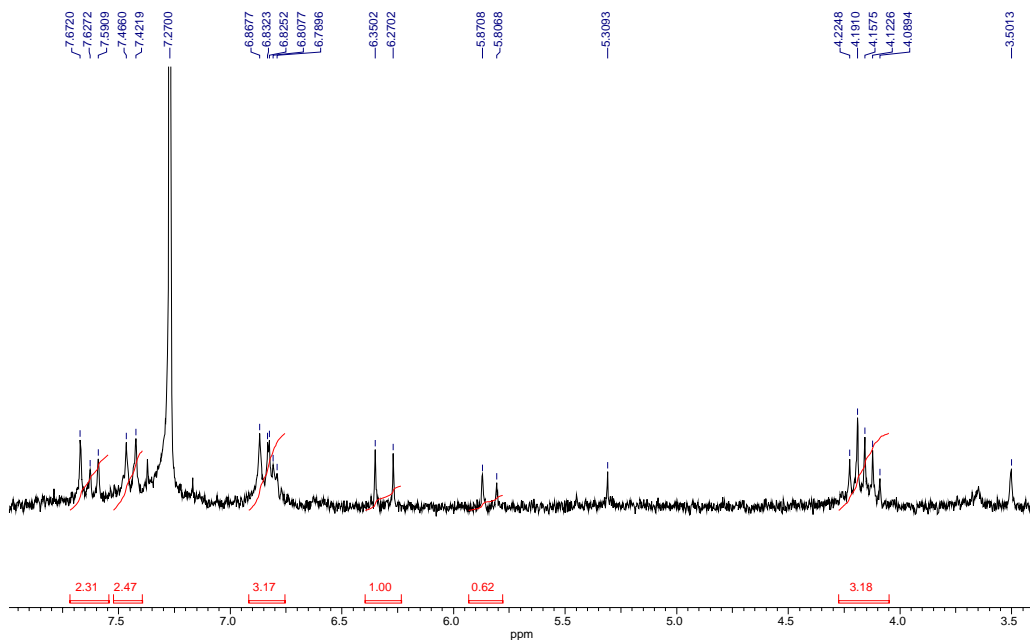
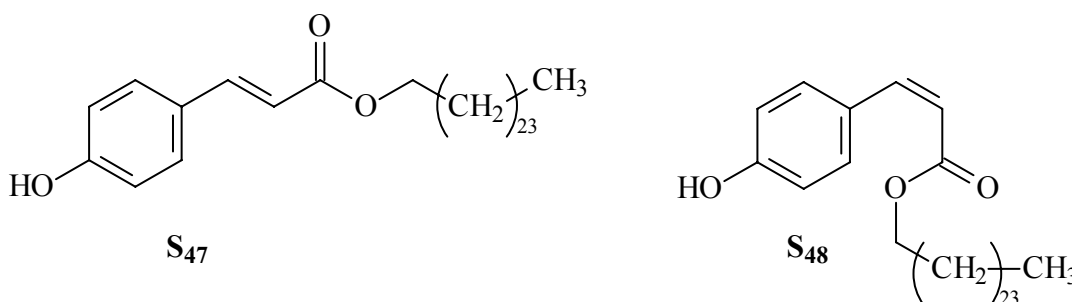


Figura 55 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da Fração C_5 4.

Este conjunto de dados propõe que a **Fração C₅ 4** é constituída por derivados de ácidos cinâmicos com cadeia lateral olefinica com configuração *cis* e *trans* esterificados por cadeia normal hidrocarbônica.

Esta fração foi analisada por GC-MS e não foi obtida nenhuma informação a cerca do tamanho das cadeias hidrocarbônicas, nas condições analisadas, ficando estas indeterminadas por este método. Utilizando a integração do espectro de RMN ¹H, pode-se propor que o número de metilenos com deslocamentos químicos entre δ 1,2-1,7 ppm é 23 e, portanto, a cadeia hidrocarbônica seja de 25 carbonos. Sendo assim, pode-se dizer que a **Fração C₅ 4** apresenta dois derivados do ácido cinâmico (**S₄₇** e **S₄₈**) com a cadeia lateral na configuração *cis* e *trans* e tamanho da cadeia esterificante de 25 carbonos.



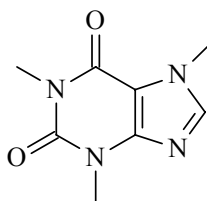
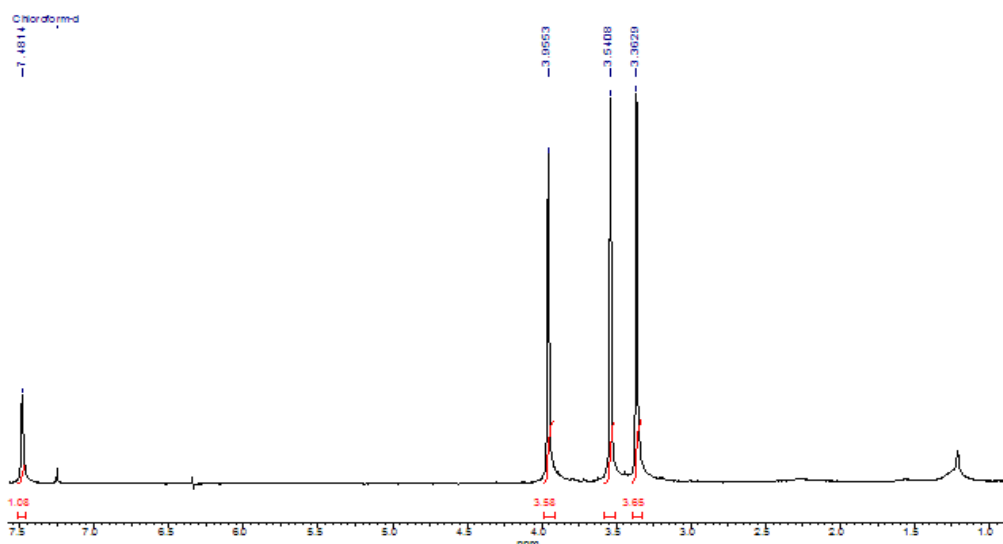
4.3.1.5.2 – Constituintes Químicos da Coluna C₆ (Proveniente da Fração C₄ 6).

Após análise por CCDC, a **Fração C₄ 6** apresentou-se muito similar a anterior e bastante complexa para determinação de seus constituintes químicos necessitando de mais um fracionamento dando origem a **Coluna C₆**. Sendo que nas frações iniciais (**Frações C₆ 1 – 3**) após análises preliminares por CCDC e RMN ¹H foi observada a presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos e as substâncias sitosterol (**S₄₄**) e estimasterol (**S₄₅**). Elas não serão discutidas visto que estes compostos já foram identificados anteriormente.

4.3.1.5.2.1 – Constituintes Químicos da **Fração C₆ 4**.

A **Fração C₆ 4** apresentou-se como sólido amorfo de coloração branca que após análise por CCDC constatou-se estar pura. O seu espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, **Figura 56**) apresentou poucos sinais, um em δ 7,48 ppm (*s*, 1H) e três em δ 3,95 ppm, δ 3,54 ppm e δ 3,36 ppm (*s*, 3H cada) característicos de sinais de hidrogênios de metilas ligadas a nitrogênio.

A amostra foi submetida à análise por GC-MS que confirmou, pela observação do cromatograma gasoso (**Figura 57**, p. 116), tratar-se de um único composto. Por comparação dos espectros de massas da amostra com o obtido da biblioteca do equipamento (**Figura 58**, p. 116), foi possível determinar que o composto presente na **Fração C₆ 4** trata-se do alcalóide cafeína (**S₄₉**).

**S₄₉****Figura 56** – Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da **Fração C₆ 4**.

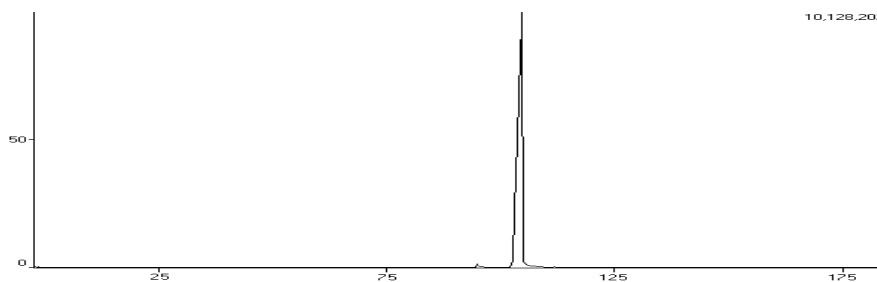
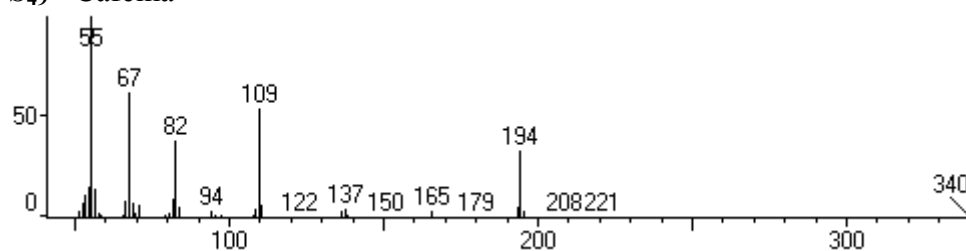


Figura 57 – Cromatograma obtido por GC-MS da **Fração C₆ 4**. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

S₄₉ - Cafeína



Espectro de massas da biblioteca:

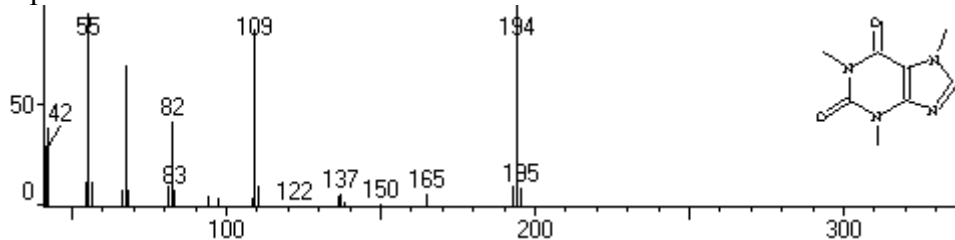


Figura 58 - Espectro de massas da **Fração C₆ 4** obtido por GC-MS em comparação com dados obtidos da biblioteca do equipamento.

Ao analisar por CCDC e RMN as **Frações C₆ 5 – 10** foi possível observar que estas contêm como componentes majoritários ácidos graxos e cafeína.

4.3.1.5.2.2 – Constituintes Químicos da **Fração C₆ 11**.

Ao analisar o espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figuras 60 e 61**, p. 118) da **Fração C₆ 11** foi possível observar dois sinais em δ 6,49 ppm e δ 5,48 ppm (*d*, *J* = 9,8 Hz, 1H cada), um em δ 6,19 ppm (*s*, 1H), três sinais correspondentes a sinais de hidrogênios de metoxilas em δ 3,76 ppm, δ 3,73 ppm e δ 3,68 ppm (*s*, 3H cada), dois sinais em δ 2,87 ppm e δ 2,51 ppm (*t*, *J* = 8,2 Hz, 2H cada) correspondentes à sinais de hidrogênios metilênicos e um em δ 1,42 ppm (*s*, 6H) de sinais de hidrogênios metílicos. O espectro de gCOSY ¹H x ¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figura 62**, p. 113) mostra que o sinal dos hidrogênios em δ 6,49 ppm correlaciona-se com o sinal em δ 5,48 ppm sugerindo tratarem de sinais de hidrogênios de anel pirânico e o sinal em δ 2,87 ppm com o sinal δ 2,51 ppm de hidrogênios metilênicos. De acordo com esses dados pode-se sugerir que a substância **S₅₀** apresenta um sistema benzopirânico. A **Figura 59** apresenta subestruturas para o anel pirânico e a cadeia lateral.

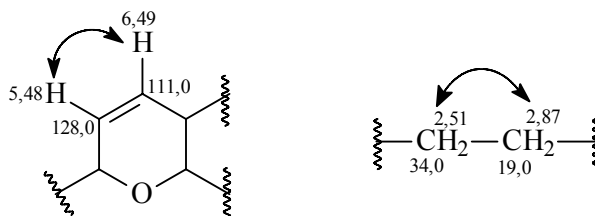


Figura 598 – Subestruturas com dados de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e gHSQC de sinais de hidrogênios que correlacionam-se (os δ dos sinais de acoplamentos estão indicados por meio de setas).

Os dados completos de gHSQC (**Figura 63**, p. 119) e gHMBC (**Figura 64**, p. 119) encontram-se listados na **Tabela 20** (p. 120), sendo os dados referentes aos sinais de carbono são os das projeções dos mesmos. A análise destes dados possibilitou propor as subestruturas constantes da **Figura 65** (p. 121) e a estrutura **S₅₀** cujos dados de RMN ¹H e ¹³C aparecem na **Figura 66** (p. 121).

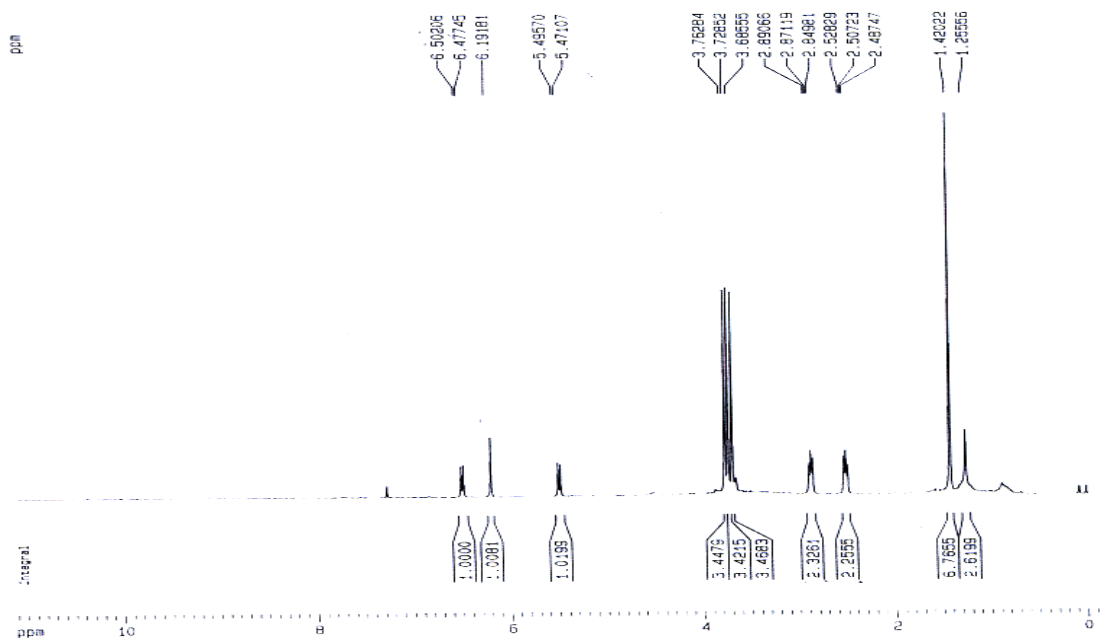


Figura 60 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 11.

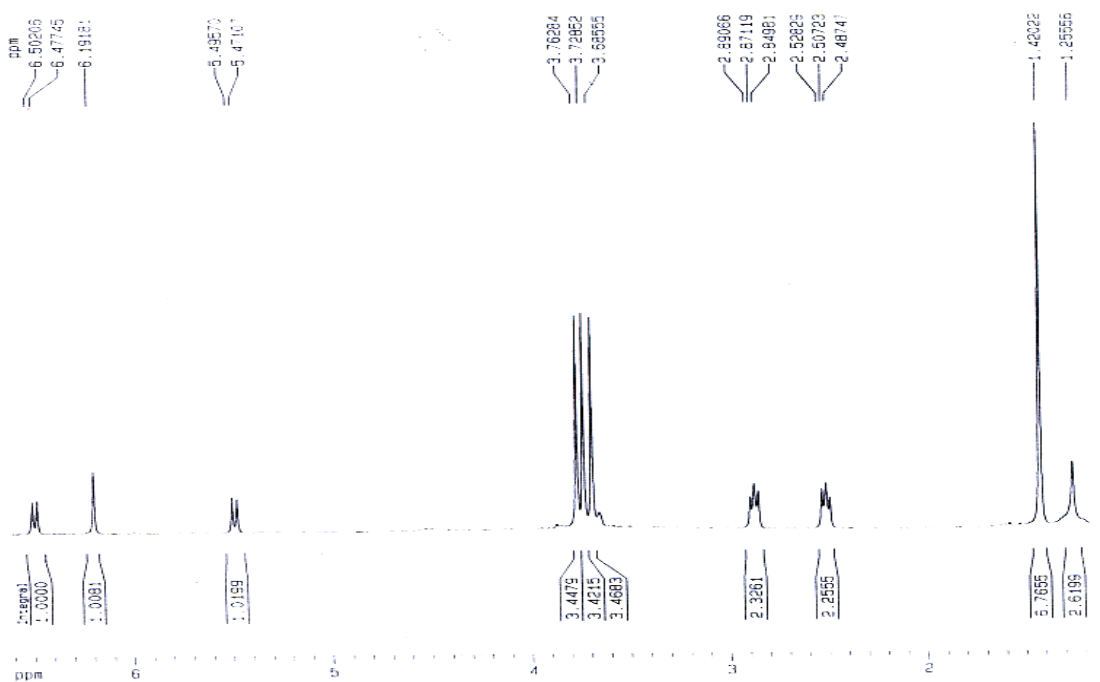


Figura 61 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 11.

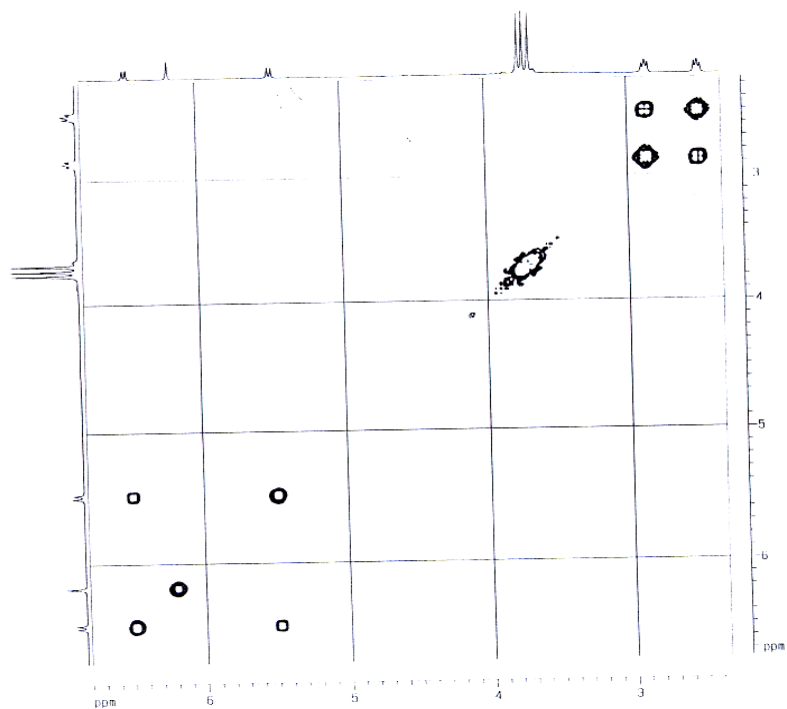


Figura 62 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da **Fração C₆ 11**.

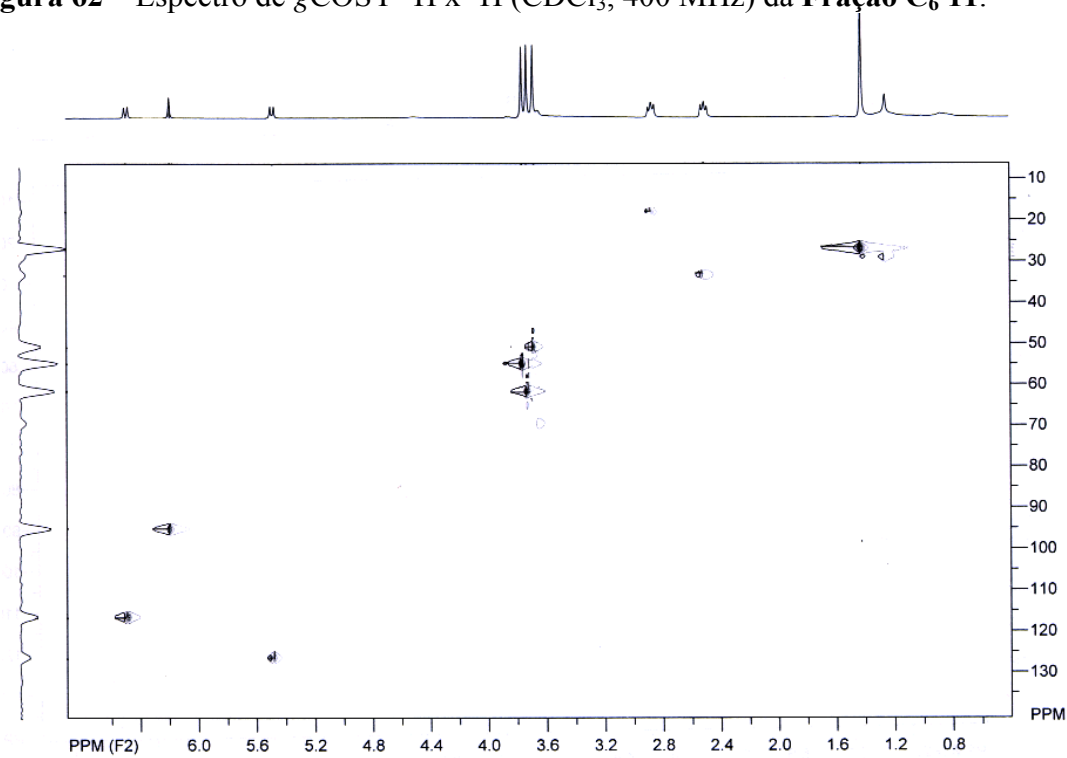


Figura 63 – Mapa de correlações de gHSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da **Fração C₆ 11**.



Figura 64 – Mapa de correlações de gHMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 11.

Tabela 20 – Dados de gHSQC e gHMBC da Fração C_6 11 (CDCl_3 , 400 MHz).

Fração C_6 11		
RMN ^1H	gHSQC ($^1J_{\text{CH}}$)	gHMBC ($^{2-3}J_{\text{CH}}$)
δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
6,49	111,0	76,0; 153,0 e 155,0
6,19	97,0	107,0; 114,0; 153,0 e 159,0
5,48	128,0	28,0; 76,0 e 107,0
3,76	55,0	159,0
3,73	63,0	155,0
3,68	52,0	174,0
2,87	19,0	34,0; 114,0; 155,0; 169,0 e 174,0
2,51	34,0	19,0; 115,0 e 174,9
1,42	28,0	28,0; 76,0 e 128,0

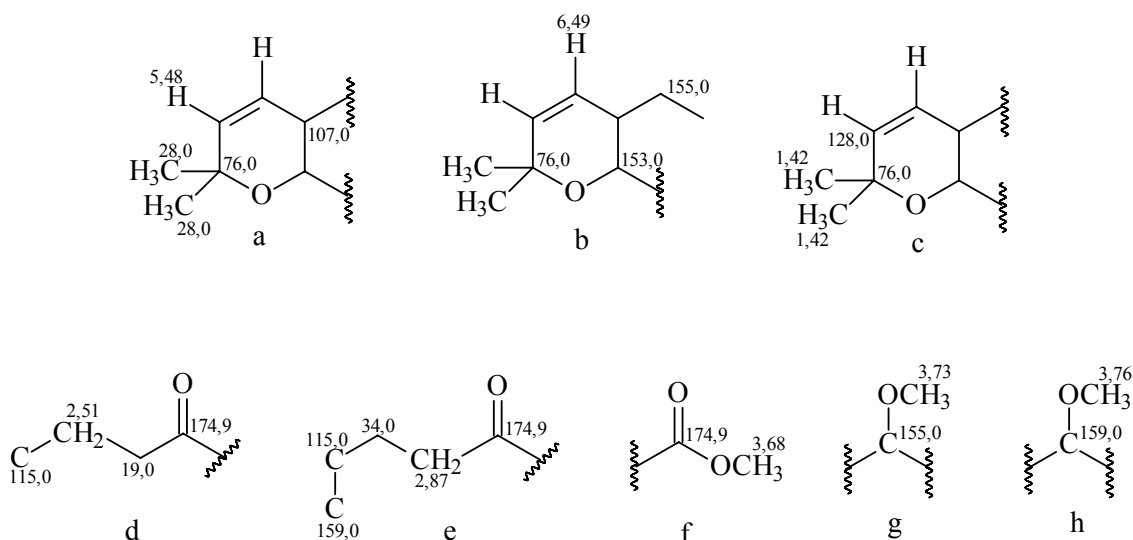


Figura 65 – Subestruturas com dados de gHMBC. As subestruturas **a**, **b** e **c** referem-se ao anel pirânico, as **d** e **e** à cadeia lateral e as **f**, **g** e **h** às posições das metoxilas.

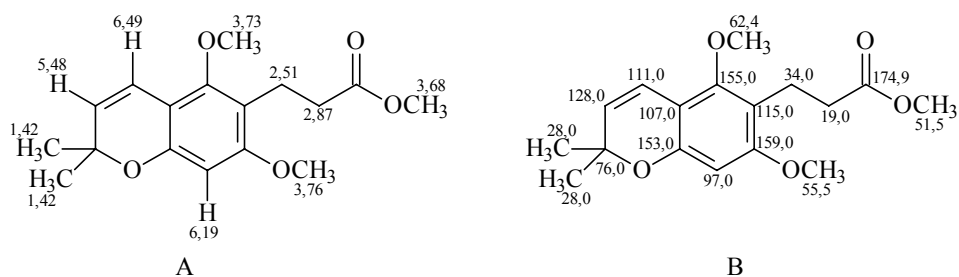


Figura 669 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 3-(5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-6-il)-propanoato de metila (**S**₅₀). **A** – dados de RMN ^1H e **B** – dados de RMN ^{13}C .

4.3.1.5.2.3 – Constituintes Químicos da Fração **C**₆ **12**.

A Fração **C**₆ **12** apresentou-se como sólido branco que após análise por CCDC foi verificado que se tratava de único composto.

Ao analisar o espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Figuras 70-72, p. 125-126) da Fração **C**₆ **12** foram observados dois sinais em δ 6,93 ppm e δ 6,52 ppm (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H cada), dois sinais em δ 6,56 ppm e δ 5,63 ppm (*d*, $J = 10,0$ Hz, 1H cada), mais dois sinais em δ 6,48 ppm e δ 5,48 ppm (*d*, $J = 9,8$ Hz, 1H cada), um sinal em δ 6,19 ppm (*s*, 1H), três sinais correspondentes a sinais de hidrogênios de metoxilas em δ 3,76 ppm, δ 3,75 ppm e δ 3,73 ppm (*s*, 3H cada). Foram observados também dois sinais

tripletos sobrepostos em δ 2,87 ppm e δ 2,85 ppm (4H) e mais dois em δ 2,60 ppm e δ 2,52 ppm (*t*, $J = 8,2$ Hz, 2H cada) correspondente à sinais de hidrogênios metilênicos e um em δ 1,42 ppm (*s*, 12H) de sinais de hidrogênios metílicos. Por meio desta análise preliminar, observa-se que a substância da **Fração C₆ 12** apresenta dados semelhantes aos da substância presente na **Fração C₆ 11**, propondo tratar-se da mesma classe de compostos.

No espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz, **Figuras 73-75**, p. 126-127) pode-se ver as correlações entre os sinais em δ 6,93 ppm e δ 6,52 ppm, sugerindo serem sinais de hidrogênios aromático em acoplamento *orto* ($J = 8,2$ Hz), as correlações dos sinais em δ 6,56 ppm e δ 5,63 ppm e dos sinais em δ 6,48 ppm e δ 5,48 ppm sugeriram a presença de dois sistemas pirânicos. As correlações entre os sinais δ 2,87 ppm e δ 2,52 ppm e os sinais δ 2,85 ppm e δ 2,60 ppm de grupos metilênicos podem corresponder a cadeias laterais. A **Figura 67** mostra subestruturas com as correlações e os dados obtidos dos espectros de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e mapa de correlações gHSQC (**Figuras 76-77**, p. 128) sendo que os dados de RMN ^{13}C foram obtidos por meio de suas respectivas projeções neste último.

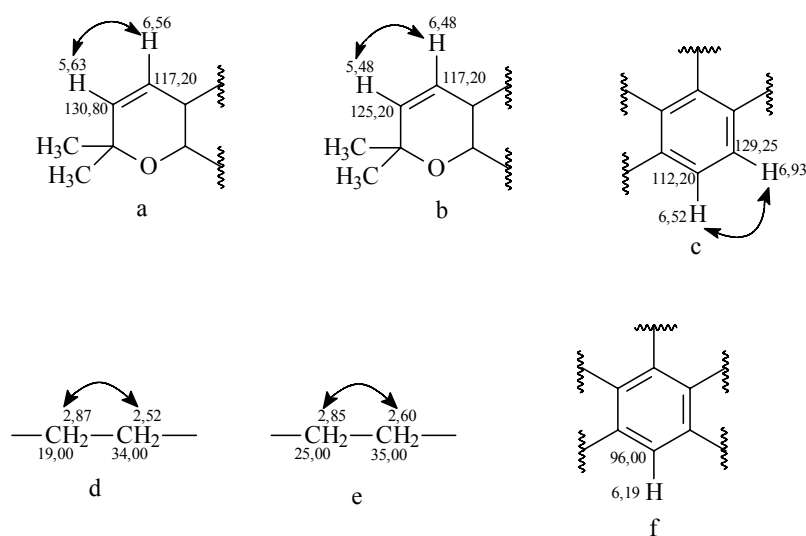


Figura 67 – Subestruturas com dados de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e gHSQC. As subestruturas **a** e **b** referem-se cada uma a um anel pirânico, **a c** e **a f** a um anel aromático cada, e **a d** e **e** a duas cadeias laterais distintas.

Os dados de gHSQC e gHMBC (**Figuras 76-78**, p. 128-129) encontram-se listados na **Tabela 21** (p. 1247); a **Figura 68** mostra subestruturas com dados de gHMBC, sendo que os valores de carbonos são os valores das suas projeções.

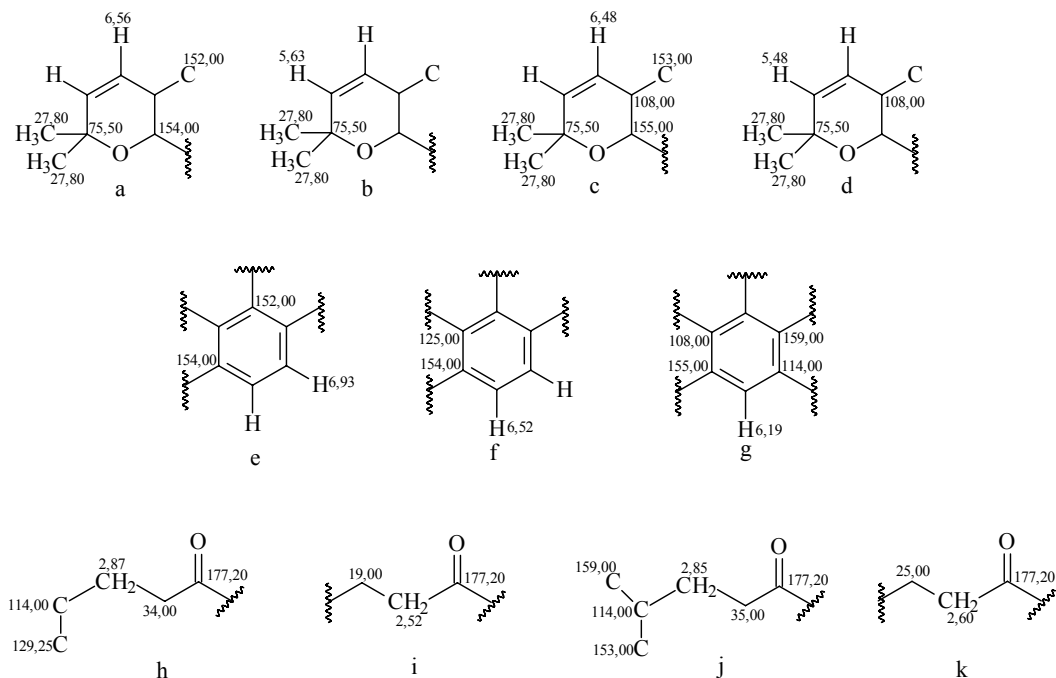


Figura 68 – Subestruturas com os dados de gHMBC para os respectivos hidrogênios. As subestruturas **a** e **b** correspondem ao anel pirânico 1, as **c** e **d** ao anel pirânico 2, a **e** e **f** ao anel aromático 1, a **g** ao anel aromático 2, as **h** e **i** a cadeia lateral 1 e as **j** e **k** a cadeia lateral 2.

Ainda analisando o mapa de correlações gHMBC (**Figuras 78-80**, p. 129-130) foi possível observar que o sinal correspondente a metoxila em δ 3,76 ppm correlaciona-se com o sinal em δ 159,0 ppm, o sinal em δ 3,75 ppm com o sinal em δ 153,0 ppm e não foi possível observar correlação para o sinal dos hidrogênios em δ 3,73 ppm. A **Figura 69** (p. 124) mostra a substância **S₅₁** com os dados de RMN ^1H e ^{13}C .

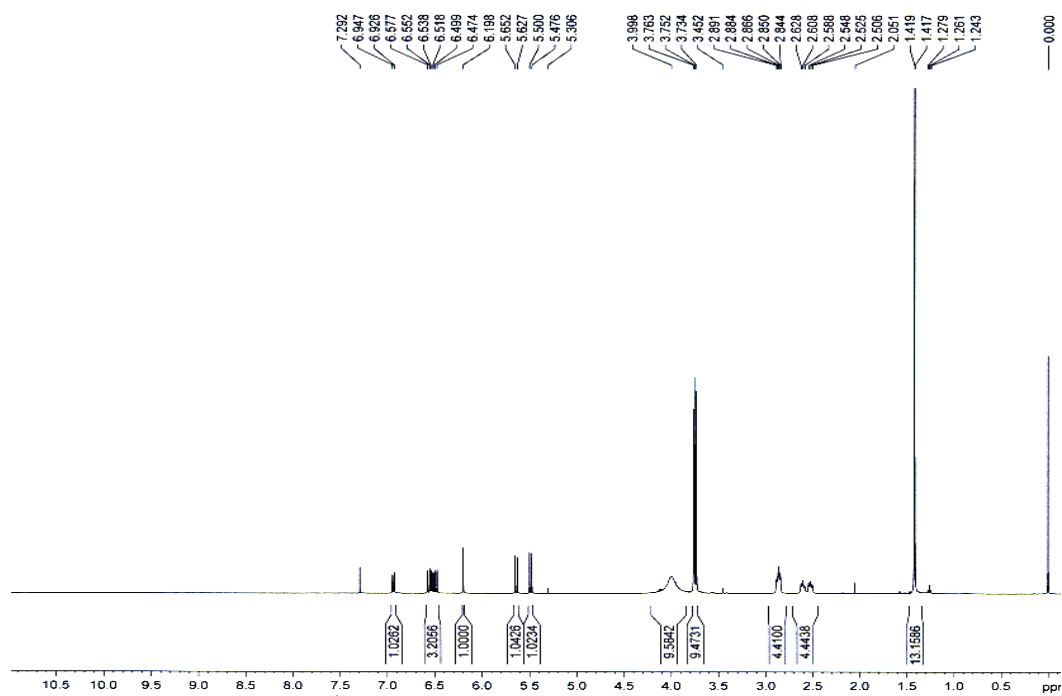


Figura 70 – Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

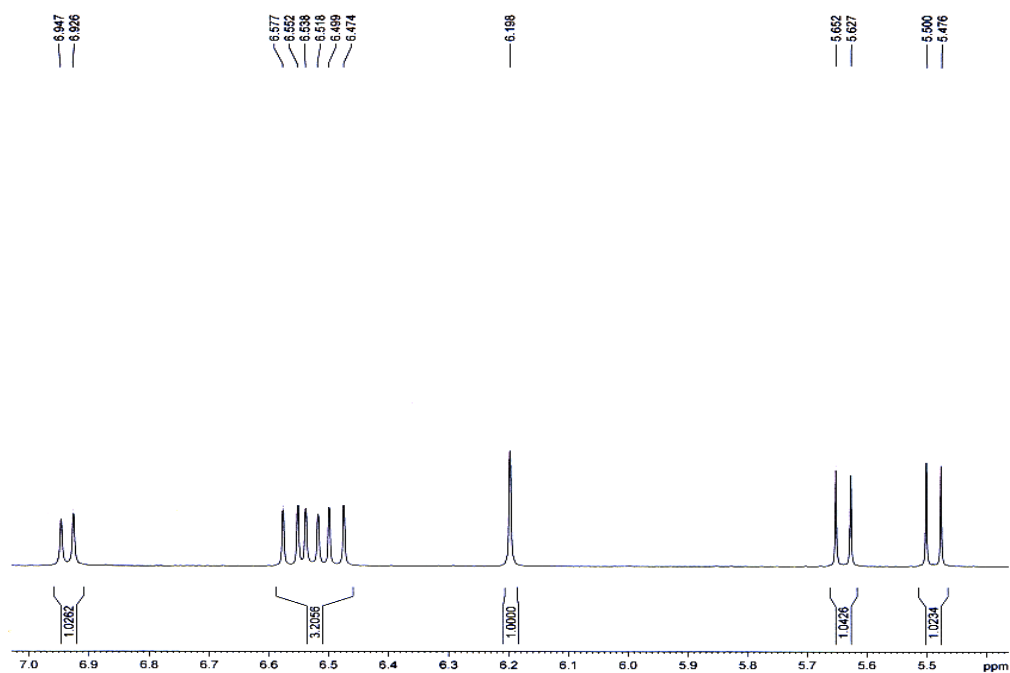


Figura 71 – Ampliação do espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

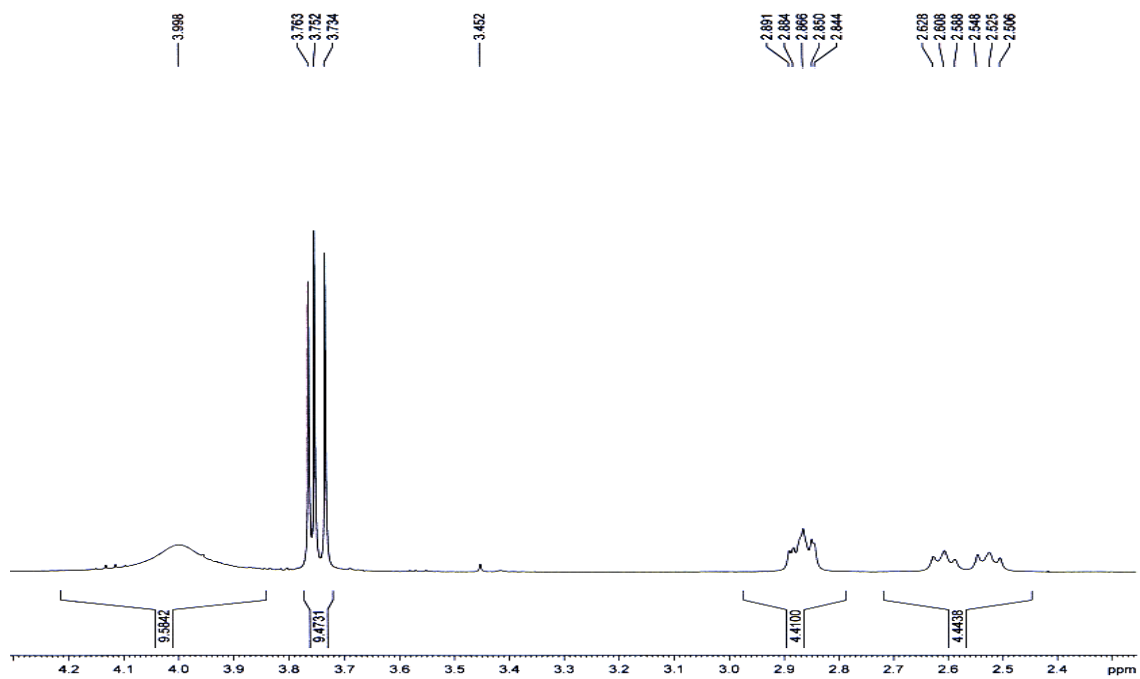


Figura 72 – Ampliação do espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

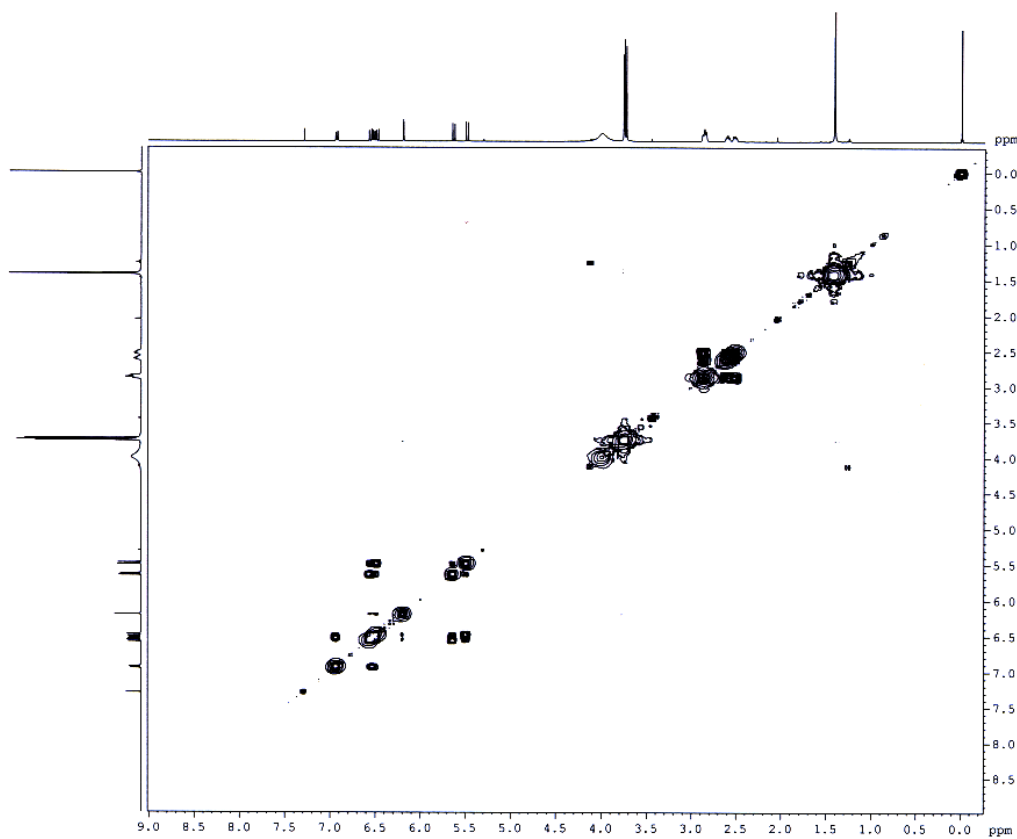


Figura 73 – Espectro gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

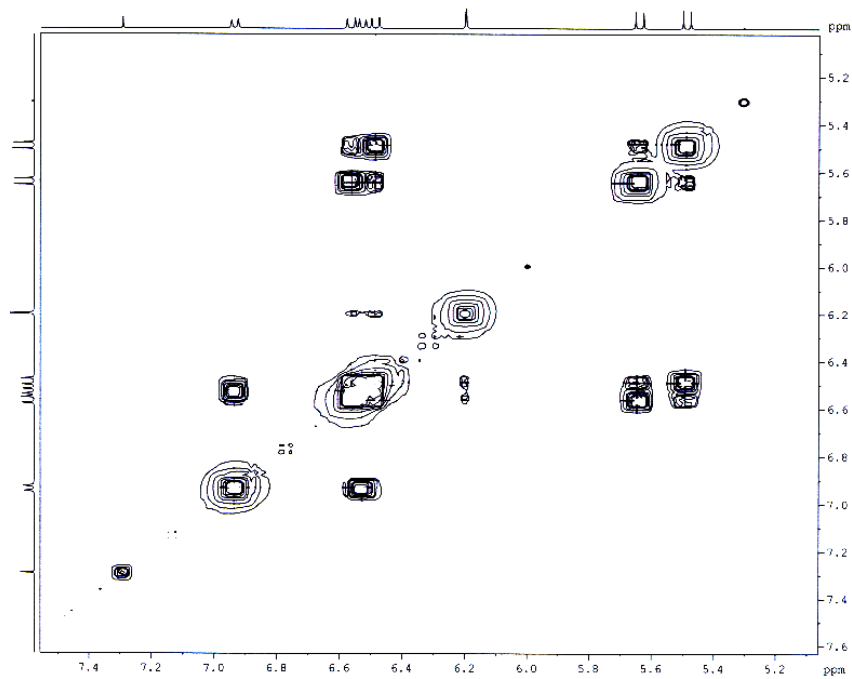


Figura 74 – Ampliação de espectro gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

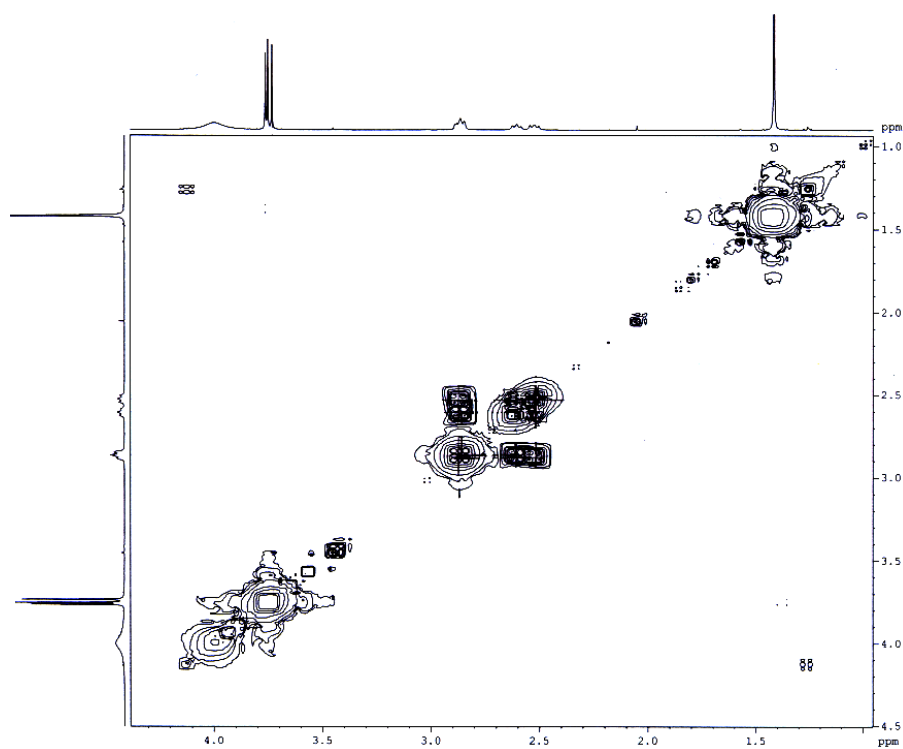


Figura 75 – Ampliação de espectro gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

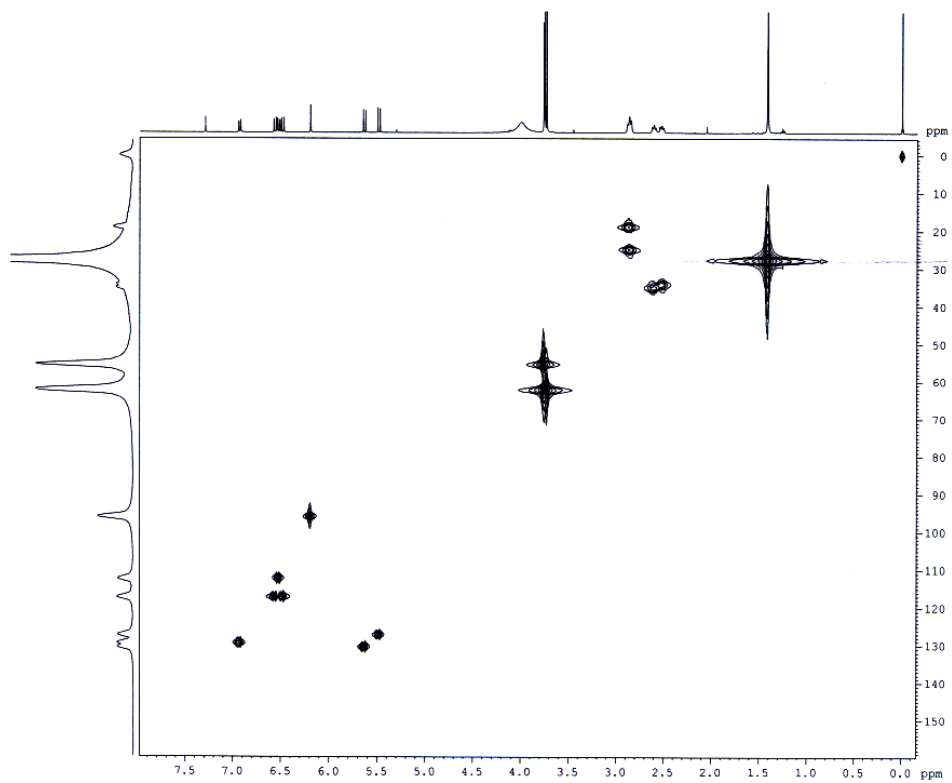


Figura 76 – Mapa de correlações de gHSQC (CDCl₃, 400 MHz) da Fração C₆ 12.

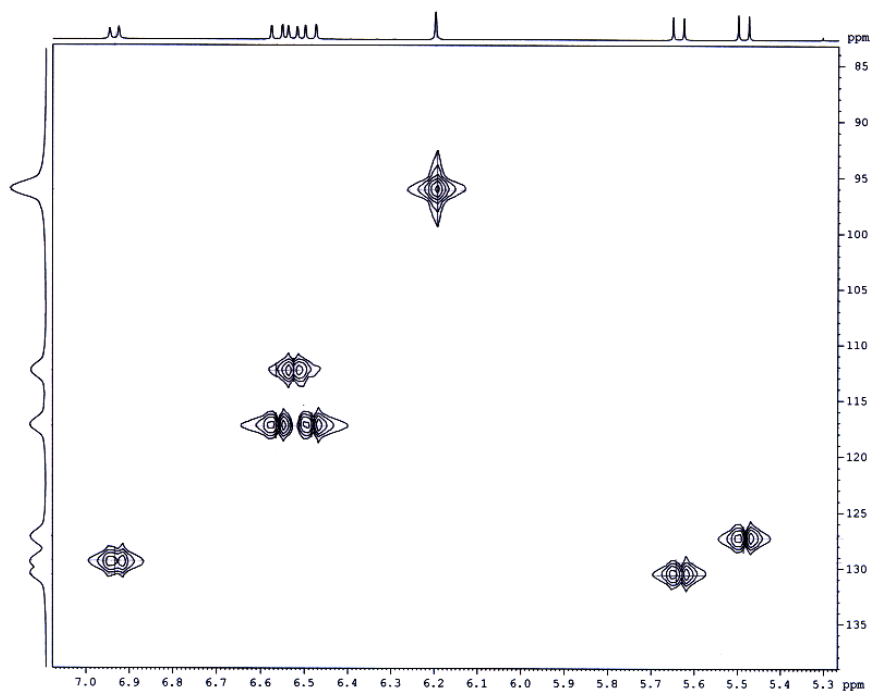


Figura 77 – Ampliação do mapa de correlações de gHSQC (CDCl₃, 400 MHz) da Fração C₆ 12.

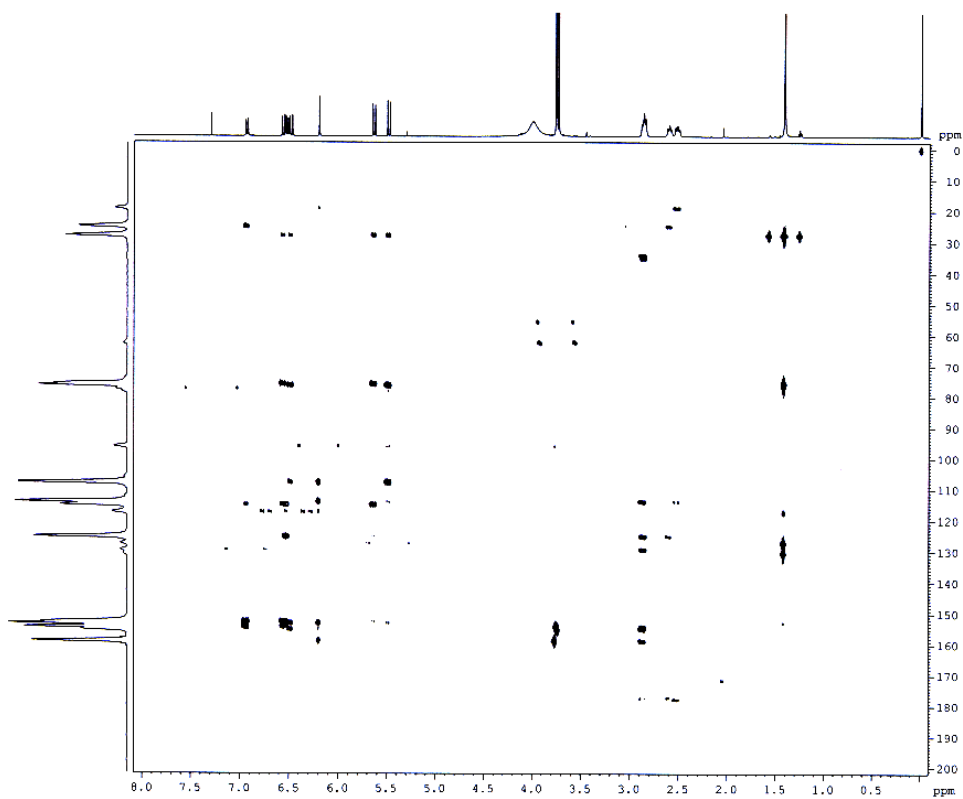


Figura 78 – Mapa de correlações de gHMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

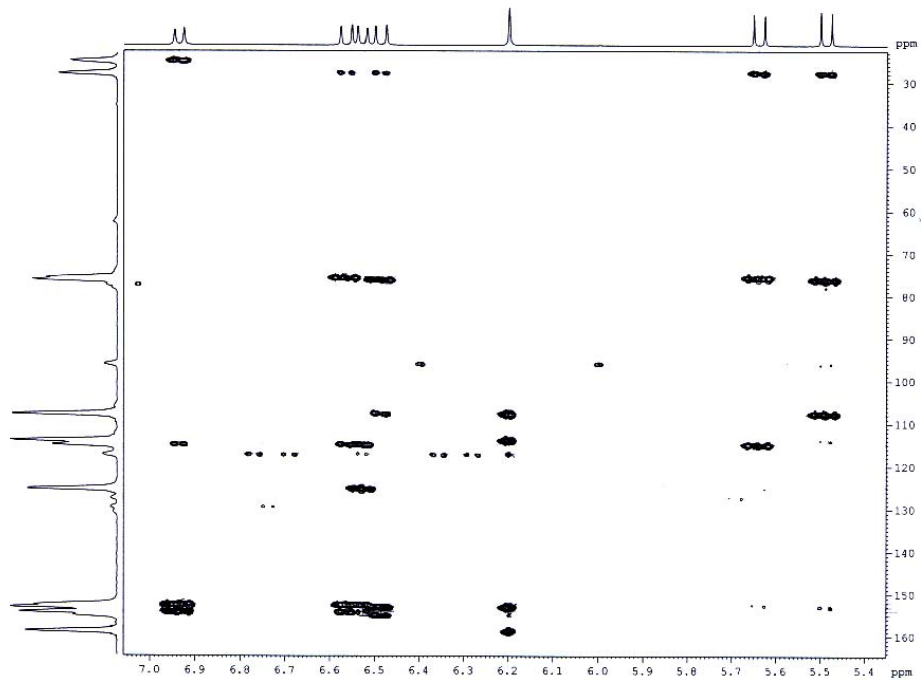


Figura 79 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_6 12.

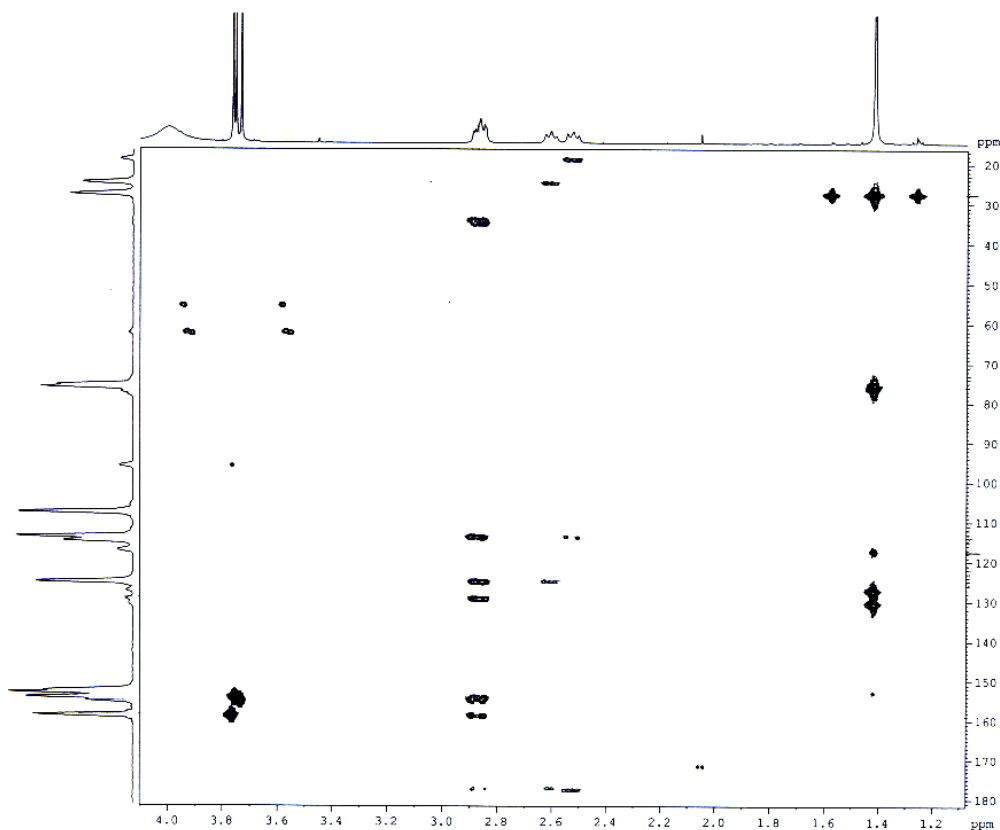


Figura 80 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (CDCl₃, 400 MHz) da Fração C₆ 12.

4.3.2 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBDP de *S. adstringens*

4.3.2.1 – Constituintes Químicos da Fração C₉ 1

O espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, idêntica a **Figura 35**, p. 85) apresentou sinais de hidrogênios metílicos em δ 0,88 ppm e de hidrogênios metilênicos em δ 1,26 ppm correspondentes à cadeia normal hidrocarbônica, sugerindo que esta fração contém hidrocarbonetos de cadeia linear como já discutido no item 4.3.1.1.

Ao analisar o cromatograma e os espectros de massas obtidos por GC-MS, pode-se confirmar que se tratava de hidrocarbonetos, com picos característicos para esta classe de compostos em m/z 57 [C₄H₉]⁺, m/z 71 [C₅H₁₁]⁺, m/z 85 [C₆H₁₃]⁺, m/z 113 [C₈H₁₇]⁺ e por meio do padrão de fragmentação característico para esta classe de

compostos, ou seja, pico do íon molecular muito pequeno ou ausente e dominado por íons $C_nH_{2n+1}^+$ e em menor extensão por $C_nH_{2n-1}^+$ com abundância máxima em torno de C_3 e C_4 decrescendo exponencialmente até o pico do íon molecular quando presente. A ausência do pico do íon molecular (M^+) não permitiu propor a estrutura dos hidrocarbonetos, por meio destes dados. Sendo assim, foram comparados os tempos de retenção de padrões comercial de hidrocarbonetos (C_6 - C_{28} e C_{30}) com os tempos de retenção das substâncias presentes na amostra por análise por GC (**Figura 81**). Portanto, os hidrocarbonetos presentes nesta fração são os $C_{21} - C_{31}$ (**S₆ - S₁₆**) (**Tabela 22**, p. 132).

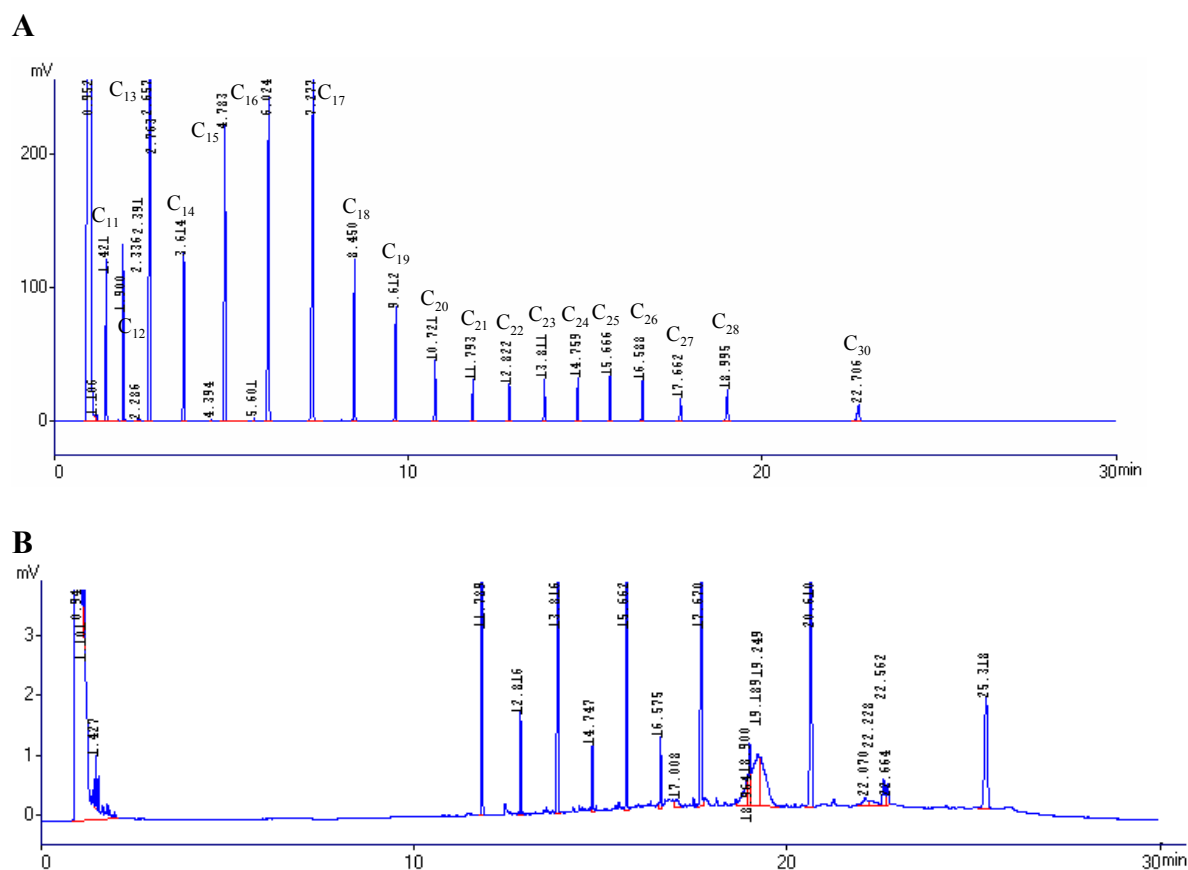


Figura 81 – Cromatograma de Padrões de Hidrocarbonetos (A) e da Fração C₉ 1 (B). Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 22 – Hidrocarbonetos identificados na **Fração C₉ 1**. Os t_R foram obtidos por GC.

Nome	Fórmula Molecular	t_R dos Padrões (min.)	t_R dos Picos da Fração C₉ 1 (min.)	Porcentagem relativa (%)
Henicosano S₆	C ₂₁ H ₄₄	11,793	11,789	6,19
Docosano S₇	C ₂₂ H ₄₆	12,822	12,816	6,72
Tricosano S₈	C ₂₃ H ₄₈	13,811	13,816	7,25
Tetracosano S₉	C ₂₄ H ₅₀	14,759	14,747	7,74
Pentacosano S₁₀	C ₂₅ H ₅₂	15,666	15,662	8,22
Hexacosano S₁₁	C ₂₆ H ₅₄	16,588	16,575	8,70
Heptacosano S₁₂	C ₂₇ H ₅₆	17,662	17,670	9,27
Octacosano S₁₃	C ₂₈ H ₅₈	18,995	18,900	9,92
Nonacosano S₁₄	C ₂₉ H ₆₀	-	20,610	10,81
Triacotano S₁₅	C ₃₀ H ₆₂	22,706	22,664	11,89
Hentriacotano S₁₆	C ₃₁ H ₆₄	-	25,318	13,29

t_R – Tempo de retenção em minutos.

4.3.2.2 – Constituintes Químicos das **Frações C₉ 2, C₉ 3 e C₉ 4**

Os espectros de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, idênticos ao da **Figura 37**, p. 88) das **Frações C₉ 2, C₉ 3 e C₉ 4** apresentaram sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,34 ppm (*m*), de hidrogênios ligados a carbono em posição α a uma função carbonílica δ 2,79 ppm (*t*, $J = 7,5$ Hz), além dos sinais em δ 1,60 ppm (*m*) e δ 1,25 ppm (*sl*) referentes à sinais de hidrogênios metilênicos e em δ 0,88 ppm (*t*, $J = 6,0$ Hz) referentes aos sinais de hidrogênios metílicos, sugerindo assim a presença de ácidos graxos como compostos majoritários. Alíquotas destas frações foram submetidas a reações de transesterificações (metilações) por meio do mesmo procedimento realizado para as frações do EBDI. Após derivatizações as **Frações C₉ 2, C₉ 3 e C₉ 4** foram submetidas às análises por GC-MS (cromatogramas, **Figuras 82-84**, p. 133-134), sendo possível identificar as substâncias constantes nas **Tabelas 23-25** (p. 133-135) e os dados de índice de Kovats aparecem nas **Tabelas 26-28** (p. 135-136).

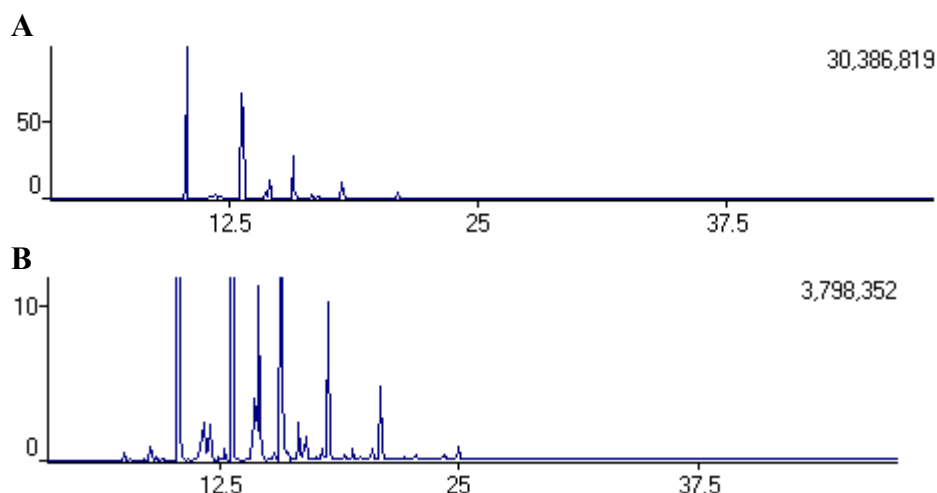


Figura 82 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₉ 2**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 23 – Compostos identificados na **Fração C₉ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C ₉ 2	Porcentagem relativa (%)
Ácido undecanóico S ₅₂	7,517	0,19
Ácido dodecanóico S ₃₉	8,933	0,32
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,383	49,42
Ácido heptadecanóico S ₄₁	11,758	0,93
Ácido 2-hidróxi-hexadecanóico S ₅₃	12,067	0,91
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,150	27,85
Ácido 10-nonadecenóico S ₅₄	14,317	1,61
Ácido icosanóico S ₂₆	15,758	10,21
Ácido 4,7-dimetil-decanedióico S ₅₅	16,637	1,24
1,1-dimetóxi-hexadecano S ₄₄ *	17,050	0,65
Ácido docosanóico S ₂₈	18,192	4,07
Ácido tetracosanóico S ₃₀	20,983	2,60

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

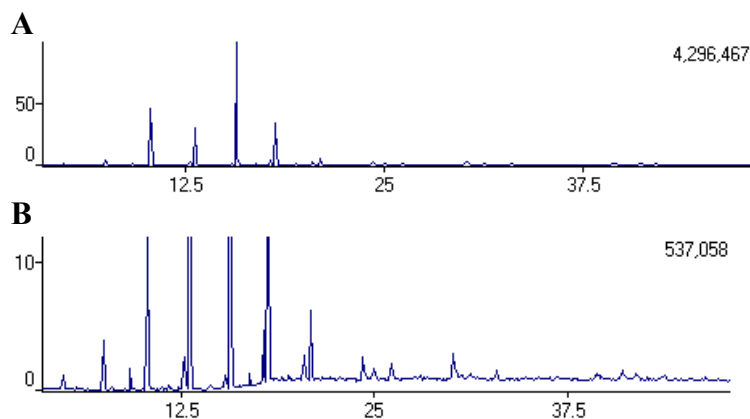


Figura 83 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₉ 3**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 24 – Compostos identificados na **Fração C₉ 3**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t_R dos Picos da Fração C₉ 3	Porcentagem relativa (%)
Ácido tetradecanóico S₁₉	7,508	1,76
6,10-dimetil-2-undecanona S₄₀ *	9,233	0,95
Ácido hexadecanóico S₂₁	10,342	23,66
Ácido 13,16-octadecadienóico S₂₄	12,792	1,05
Ácido octadecanóico S₂₅	13,133	12,65
Ácido icosanóico S₂₆	15,750	43,50
Ácido docosanóico S₂₈	18,183	15,54
Ácido hexacosanóico S₃₁	24,975	0,89

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

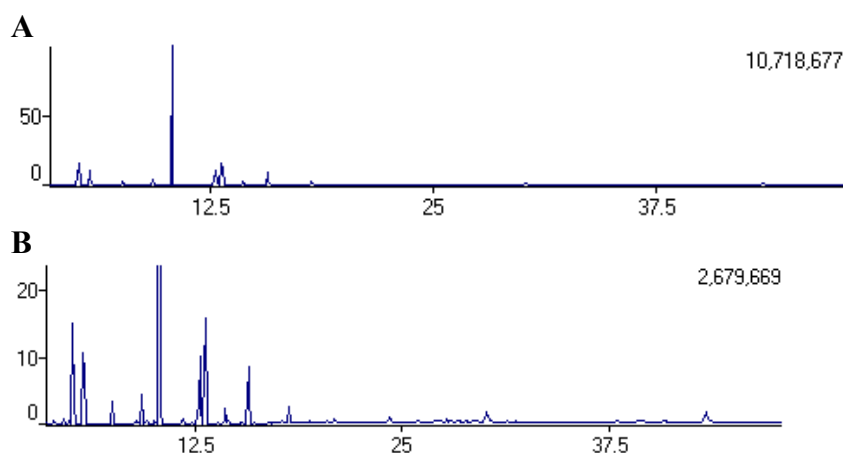


Figura 84 – Cromatogramas dos compostos presentes na **Fração C₉ 4**. **A** – cromatograma sem alteração; **B** – cromatograma com aumento da intensidade dos picos. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

Tabela 25 – Compostos identificados na **Fração C₉ 4**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C ₉ 4	Porcentagem relativa (%)
Ácido heptanóico S ₅₆	4,000	0,20
1,1-dimetóxi-heptano S ₅₇ *	4,558	0,48
Ácido undecanóico S ₅₃	4,900	0,39
Ácido nonadienóico S ₅₈	5,142	8,40
Acetal dimetil decanal S ₃₈ *	5,792	5,83
Ácido tetradecanóico S ₁₉	7,542	1,81
6,10,14-trimetil-2-undecanona S ₅₉ *	9,275	2,41
Ácido pentadecanóico S ₆₀	9,592	0,33
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,383	54,45
Ácido 11,14-icosanodienóico S ₆₁	12,742	2,42
Ácido 9-octadecenóico S ₂₄	12,817	5,87
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,158	9,30
13-metil oxacilciclotetradecan-2-ona S ₆₂ *	14,333	1,57
Ácido icosanóico S ₂₆	15,767	4,92
Ácido docosanóico S ₂₈	18,200	1,62

* Presentes na fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

Tabela 26 - Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da **Fração C₉ 2**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Ácido undecanóico S ₅₂	1923	1922
Ácido dodecanóico S ₃₉	2024	-
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2127	2125
Ácido heptadecanóico S ₄₁	2226	-
Ácido 2-hidróxi-hexadecanóico S ₅₃	2248	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	2328	-
Ácido 10-nonadecenóico S ₅₄	2416	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2529	-
Ácido 4,7-dimetil-decanedióico S ₅₅	2600	-
1,1-dimetóxi-hexadecano S ₄₄ *	2634	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2729	-
Ácido tetracosanóico S ₃₀	3041	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (103).

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

Tabela 27 – Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da **Fração C₉ 3**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	IK	IK*
Ácido tetradecanóico S ₁₉	1920	1922
6,10-dimetil-2-undecanona S ₄₀ *	2102	-
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2123	2125
Ácido 13,16-octadecadienóico S ₂₄	2299	2096
Ácido octadecanóico S ₂₅	2324	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2526	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2726	-
Ácido hexacosanóico S ₃₁	-	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (103).

* Presente na fração e identificado, apesar de não ser derivado de éster metílico.

Tabela 28 – Comparação dos índices de Kovats dos compostos identificados com os índices obtidos de ADAMS (103) dos compostos da **Fração C₉ 4**. Os t_R (min.) foram obtidos por GC-MS.

Nome	KI	KI*
Ácido heptanóico S ₅₆	1642	-
1,1-dimetóxi-heptano S ₅₇ *	1694	-
Ácido undecanóico S ₅₃	1722	1724
Ácido nonadienóico S ₅₈	1742	-
Acetal dimetil decanal S ₃₈ *	1796	-
Ácido tetradecanóico S ₁₉	-	-
6,10,14-trimetil-2-undecanona S ₅₉ *	2048	-
Ácido pentadecanóico S ₆₀	2070	-
Ácido hexadecanóico S ₂₁	2127	2125
Ácido 11,14-icosanodienóico S ₆₁	2297	-
Ácido 9-octadecenóico S ₂₄	2303	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	2328	-
13-metil oxacilciclotetradecan-2-ona S ₆₂ *	2417	-
Ácido icosanóico S ₂₆	2530	-
Ácido docosanóico S ₂₈	2730	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS (103).

* Presentes na fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

4.3.2.3 – Constituintes Químicos das Frações C₉ 5-8 e da Fração C₉ 10.

Análises dos espectros de RMN das **Frações C₉ 5-7** apresentaram características similares das observadas para as **Frações C₉ 2-4**, analisadas no parágrafo anterior e os cromatogramas obtidos por GC-MS destas frações apresentaram-se muito similares. A

análise dos espectros de RMN da **Fração C₉ 8** mostrou como componentes majoritários os esteróides sitosterol e estigmasterol, já identificados anteriormente.

A **Fração C₉ 10** mostrou sinais de deslocamento químicos de hidrogênios na região de glicosídeos, multipletos entre δ 5,00 ppm e δ 3,00 ppm e esta não foi analisada para identificação dos seus constituintes em razão da dificuldade de separar seus constituintes e a pequena quantidade da mesma.

4.3.2.4 – Constituinte Químico da Fração C₉ 9

O espectro de RMN ¹H da **Fração C₉ 9** apresentou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios ligados ao anel aromático. Esta fração continha também uma quantidade bastante significativa de compostos graxos e optou-se pela purificação em CC (C₁₀), onde se obteve um total de 27 frações que foram agrupadas de acordo com seus Rf's e renumeradas. Das frações obtidas, a **Fração C₁₀ 8**, que se apresentava pura, seguiu-se os procedimentos usuais de identificação. Os dados de RMN foram idênticos aos discutidos para a **Fração C₅ 4**, já discutida no item 4.3.1.5.1.4. O espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figuras 86-88**, p. 138-139) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 7,65 ppm e δ 6,80 ppm (*d*, *J* = 8,6 Hz, 2H), e em δ 7,44 ppm e δ 6,85 ppm (*d*, *J* = 8,6 Hz, 2H cada) característicos de anel aromático *para* substituídos; os sinais em δ 7,63 ppm e δ 6,32 ppm (*d*, *J* = 16,0 Hz, 1H cada) e δ 6,81 ppm e δ 5,84 ppm (*d*, *J* = 13,2 Hz, 0,6H) referem-se a sinais de hidrogênios olefínicos em configuração *trans* e *cis*, respectivamente. Os sinais em δ 4,18 ppm (*t*, *J* = 6,8 Hz, 2H) e δ 4,11 ppm (*t*, *J* = 6,8 Hz, 2H) característicos de sinais de hidrogênios carbinólico. Os sinais em δ 1,65 ppm (*m*), δ 1,57 ppm (*s*) e δ 1,24 ppm (*sl*) correspondente a sinais de hidrogênios metilênicos e o em δ 0,88 ppm (*t*, *J* = 6,9 Hz, 9H) a sinais de hidrogênios metílicos (**Figura 85**, p. 138).

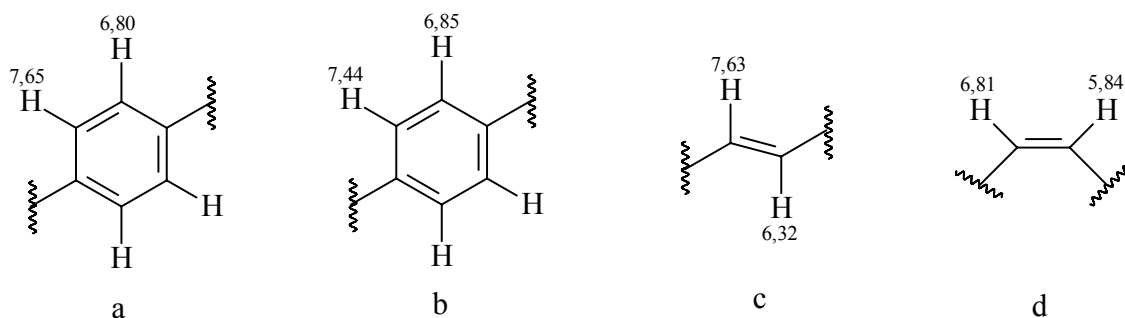


Figura 85 – Subestruturas com dados de RMN ^1H e $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ dos anéis aromáticos *para* substituídos (**a** e **b**) e das cadeias laterais em configuração *trans* e *cis* (**c** e **d**, respectivamente).

O espectro de correlação homonuclear de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz, **Figuras 89-91**, p. 140-141) confirmou as interações dos sinais dos hidrogênios, indicando tratar-se de derivados do ácido cinâmico nas configurações *trans* e *cis* com cadeia lateral hidrocarbônica normal longa.

As integrações observadas no espectro de RMN ^1H sugerem que o derivado na configuração *trans* encontra-se em maior proporção, numa relação aproximada de 1:6.

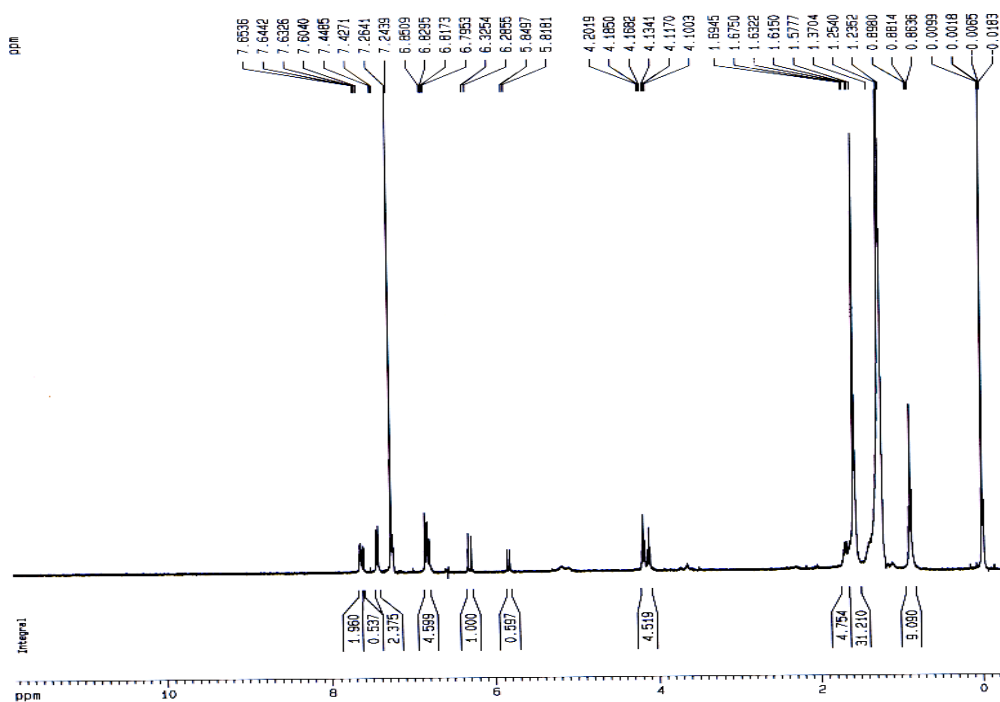


Figura 86 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{10} **8**.

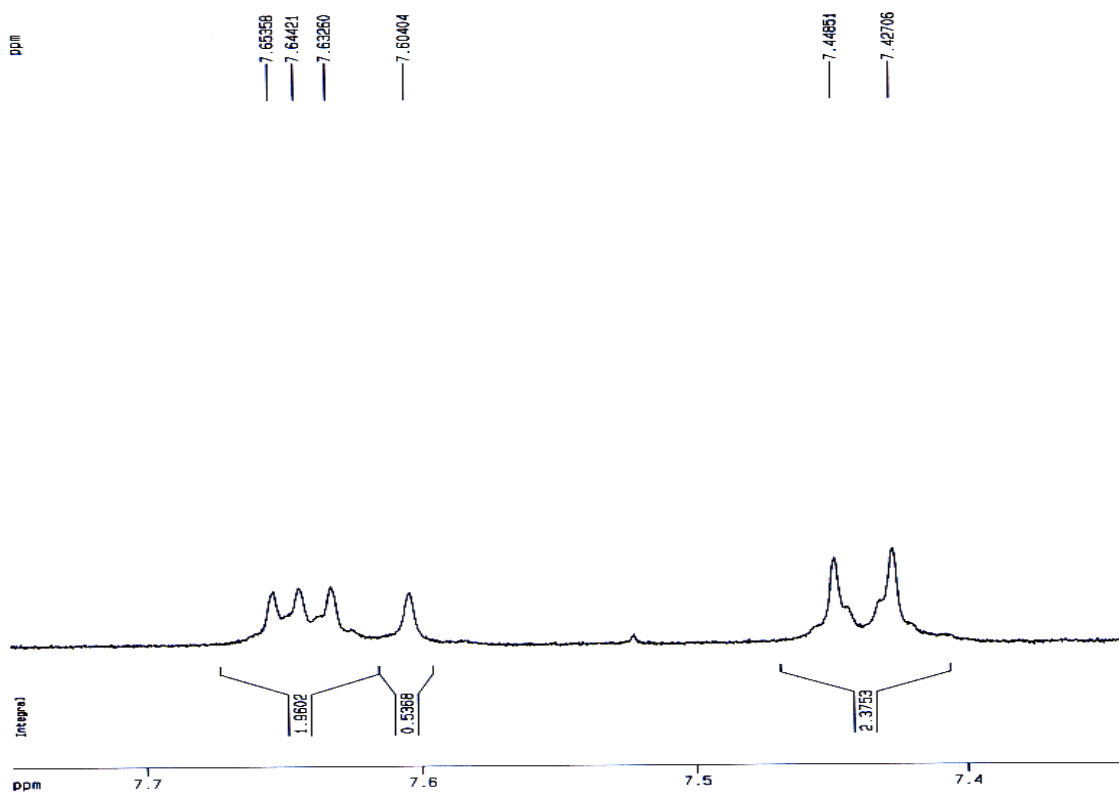


Figura 87 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{10} 8.

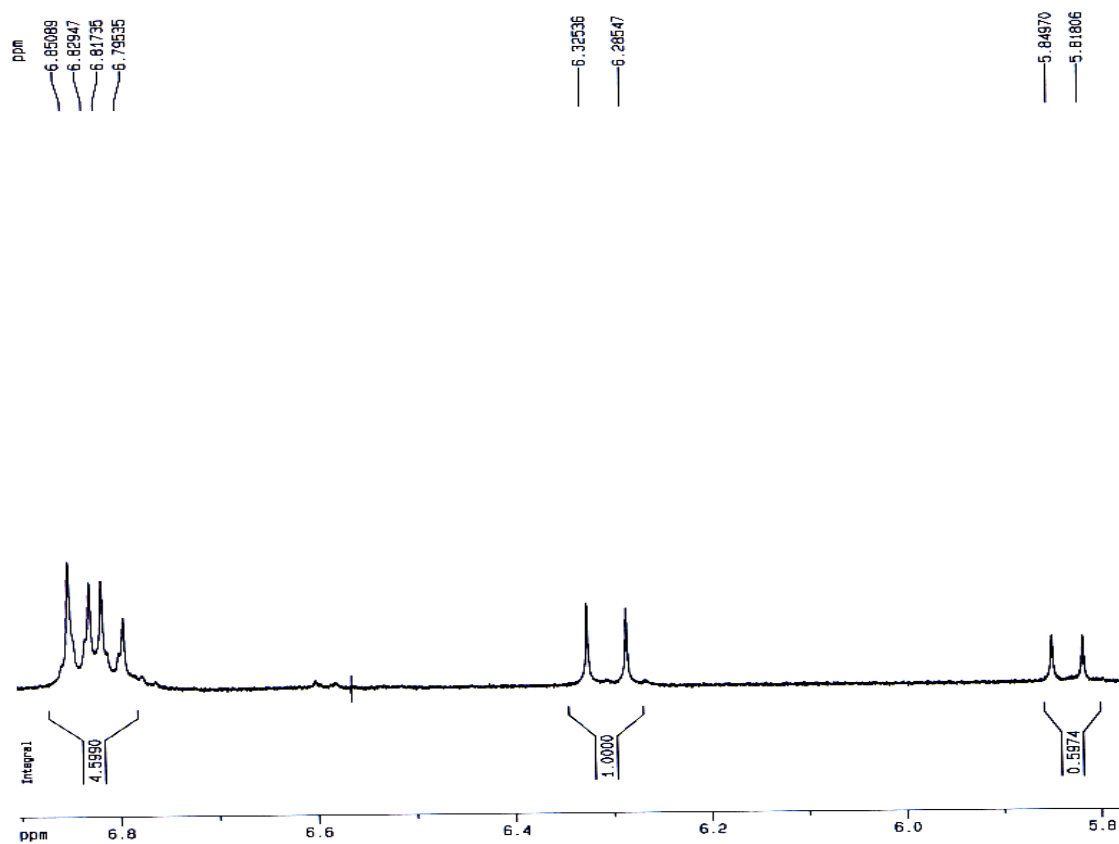


Figura 88 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{10} 8.

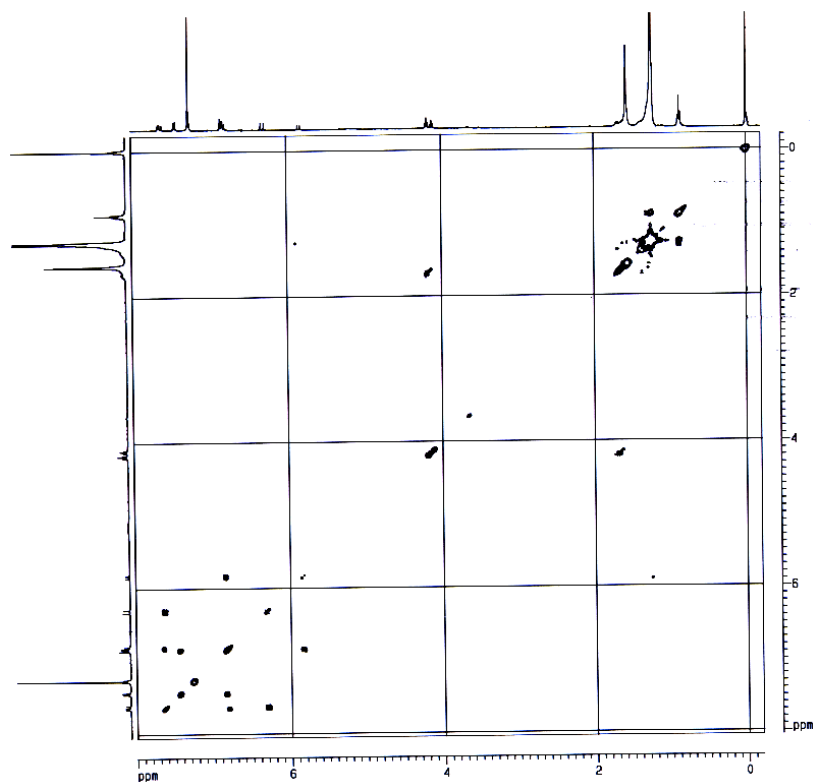


Figura 89 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8.

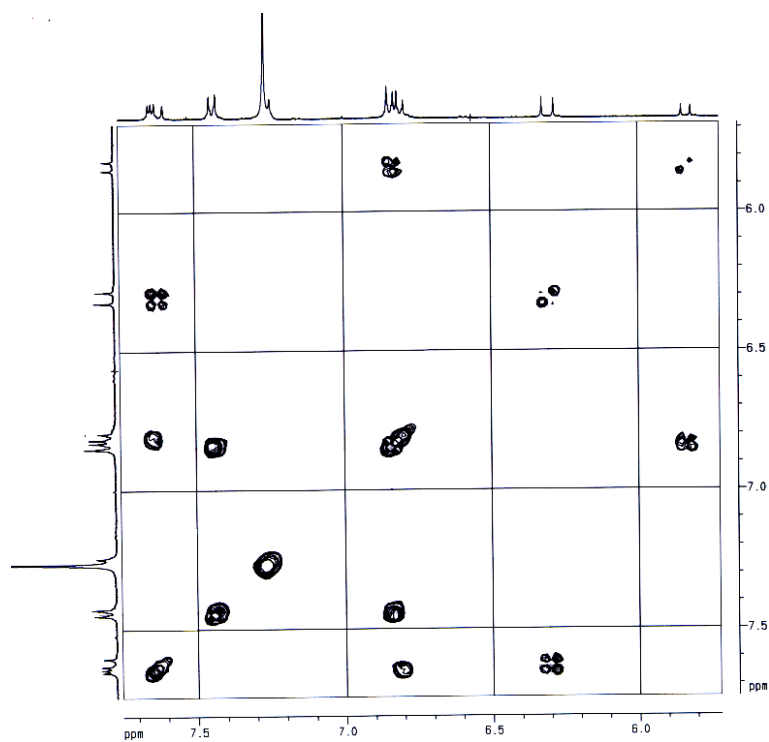


Figura 90 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C₁₀ 8.

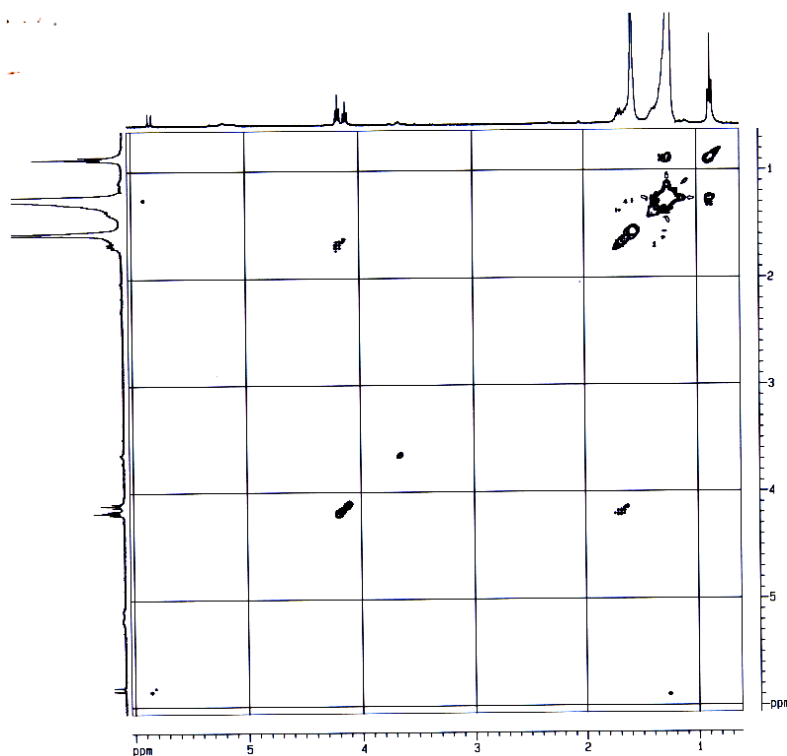
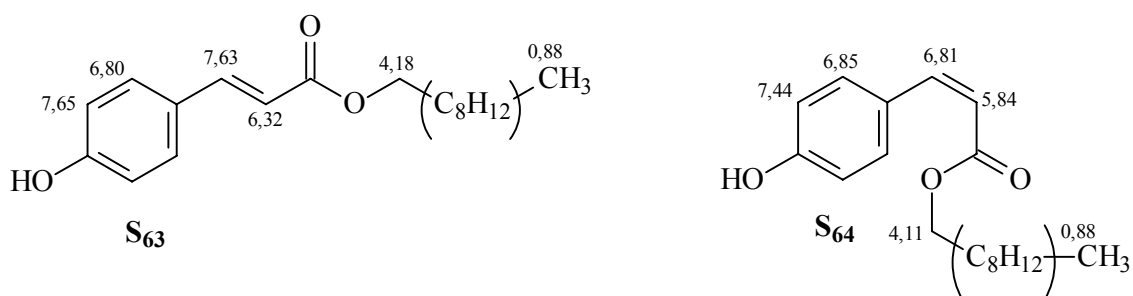


Figura 91 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da **Fração C₁₀ 8**.

Esta fração foi analisada por GC-MS e LC-MS para verificar o tamanho da cadeia hidrocarbônica, e a determinação do peso molecular (300 Daltons) indica a fórmula $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3\text{C}_{10}\text{H}_{17}$, com a cadeia longa do éster de 10 átomos de carbonos com 2 insaturações (**S₆₃** – **S₆₄**).



4.3.3 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBMI de *S. adstringens*

O EBMI apresentou, após análise por CCDC e RMN, uma concentração bastante elevada de açúcares, sendo, portanto de difícil análise para identificação de seus constituintes, visto que os açúcares são constituintes de difícil separação.

Portanto, foi analisado, primeiramente, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) com seleção da faixa de comprimento de onda entre 250-500 nm na região do UV, em sistema analítico no modo reverso de eluição com condições gradiente exploratória para desenvolvimento das condições experimentais, como é possível observar nos Cromatogramas A e B da **Figura 92** (p. 143). Depois de obtido as condições adequadas, o EBMI foi fracionado por CC (Sephadex[®] LH-20) dando origem a **Coluna 7** e este fracionamento foi realizado com objetivo de pré-purificação para que matrizes interferentes fossem eliminadas; deste fracionamento foram obtidas 32 frações que foram reunidas de acordo com seus Rf's após análise por CCDC obtendo-se um total de 15 frações, algumas das quais foram submetidos a fracionamento por HPLC-UV preparativo, com objetivo de isolamento dos constituintes presentes nas frações analisadas. Este fracionamento deu origem a **Coluna C₈** e algumas de suas frações foram analisadas por LC-UV-MS, para ajudar na identificação de seus constituintes. As condições utilizadas para a maioria das análises por LC-UV-MS foram por meio de modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 µm); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 *m/z*; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura

inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

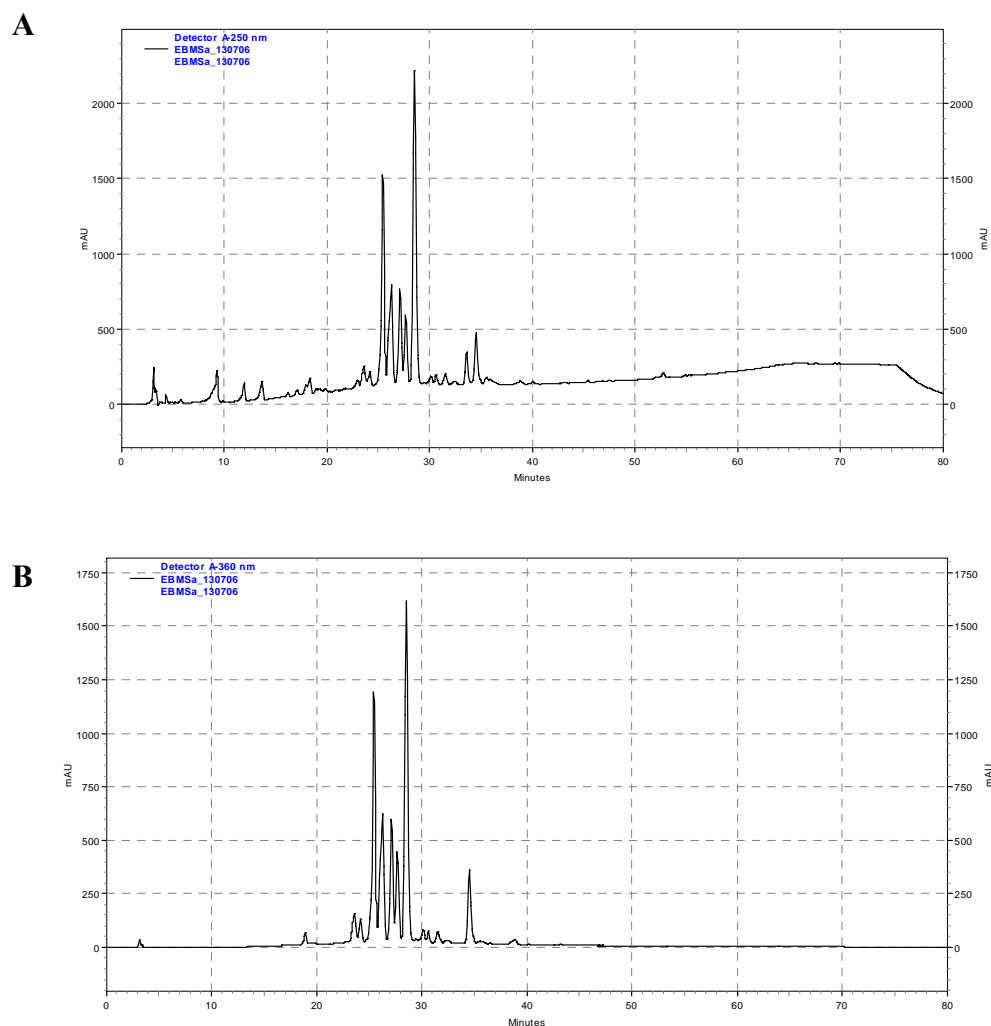


Figura 92 – Cromatogramas (A: $\lambda = 250$ nm e B: $\lambda = 360$ nm) de eluição gradiente por HPLC-DAD do EBMI de *S. adstringens*. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); usando gradiente linear de 5 % a 100 % B em 60 min. Fase móvel: A: H₂O:HCOOH 1 %, B MeOH:ACN 1:1, vazão 1 mL/min. Vinj = 20 μ L, [] = 1 mg/mL. Detector: DAD.

4.3.3.1 – Constituintes Químicos da **Fração C₇ 2**.

Ao analisar o espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, **Figuras 93-94**, p. 145), constatou-se que a **Fração C₇ 2** continha açúcares como componentes majoritários, o qual apresentou sinais de hidrogênios anoméricos, sendo que os mais intensos foram δ

5,39 ppm (*d*, *J* = 4,0 Hz), δ 5,11 ppm (*d*, *J* = 3,6 Hz) e δ 4,47 ppm (*d*, *J* = 8,0 Hz), característicos de sacarose e glicose. A região entre δ 4,20 ppm e δ 3,00 ppm apresentou sinais sobrepostos sendo de difícil interpretação. A região entre δ 2,50 ppm e δ 1,80 ppm sugerem a presença de aminoácidos e devido à pequena intensidade dos sinais não foram identificados.

Os espectros de correlação homo e heteronucleares apresentaram pouca resolução devido ao congestionamento de sinais, e não foi possível atribuir todos os valores das correlações. O mapa de correlações gHSQC (MeOD, 400 MHz, **Figura 95**, p. 146) proporcionou verificar o valor dos sinais dos carbonos dos hidrogênios anoméricos por meio das suas projeções a 1J no qual os sinais em δ 5,39 ppm, δ 5,11 ppm e δ 4,47 ppm correlacionam-se com os sinais das projeções em δ 94,00 ppm, δ 94,10 ppm e δ 98,00 ppm. Não foi possível atribuir os sinais obtidos no mapa de correlações de gHMBC.

O espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz, **Figuras 96-97**, p. 146-147) apresentou sinais correspondentes a carbonos carbinólicos de glicosídeos (entre δ 86,00 ppm e δ 58,00 ppm), os sinais entre δ 40,50 ppm e δ 24,00 ppm, provavelmente, correspondem aos sinais dos carbonos de aminoácidos.

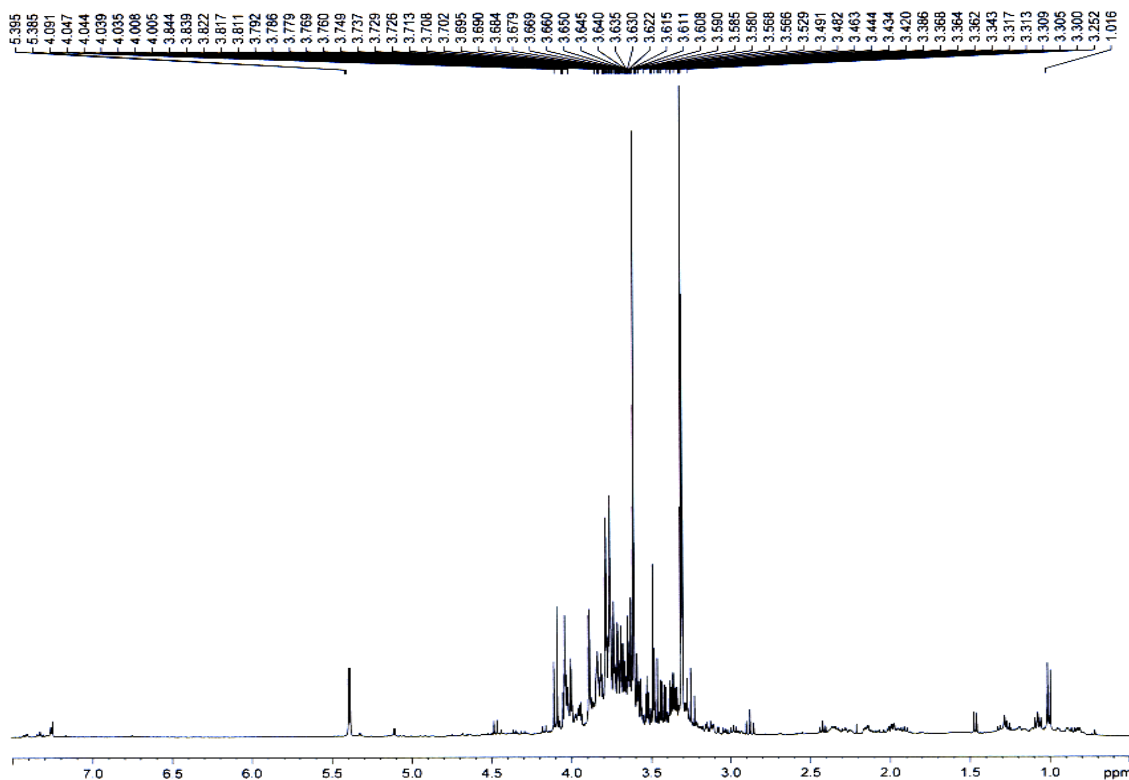


Figura 93 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₇ 2.

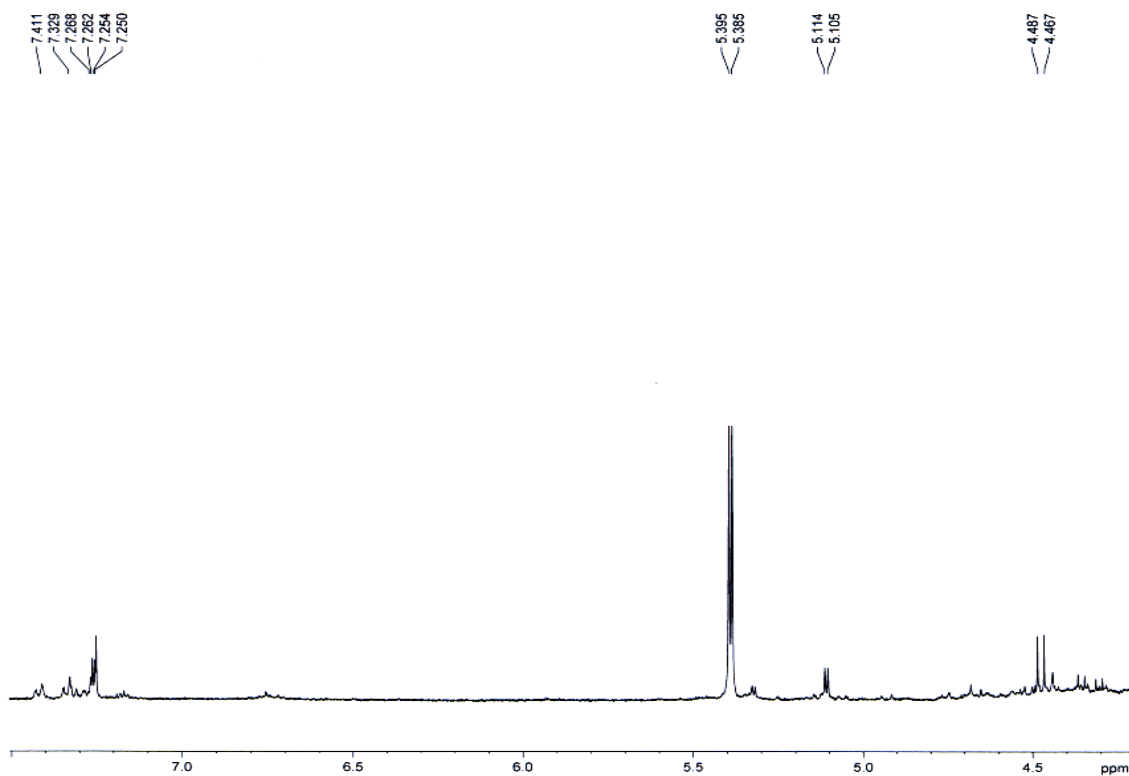


Figura 94 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₇ 2.

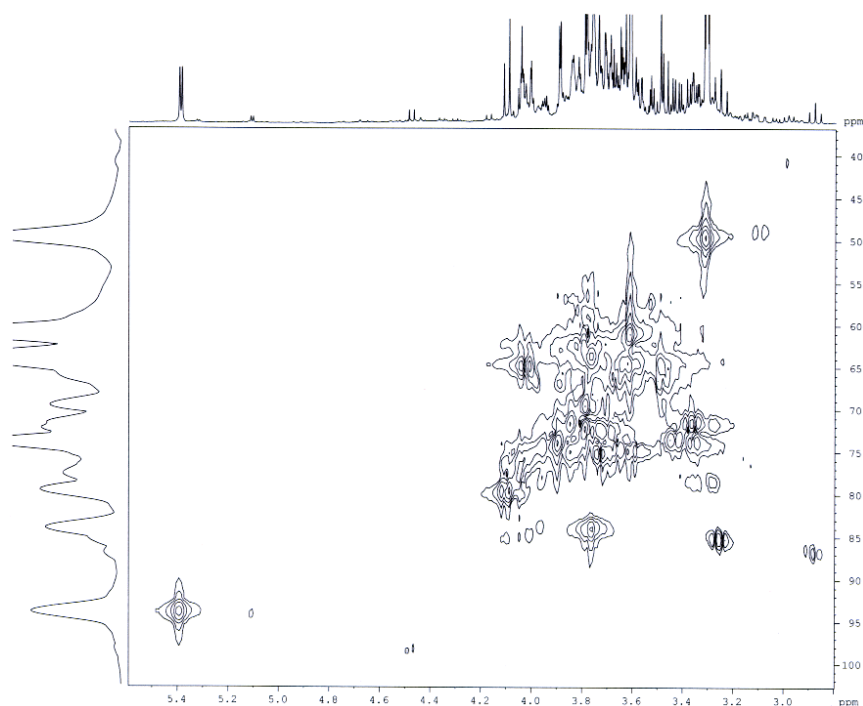


Figura 95 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) na região de sinais de hidrogênios anomérico da **Fração C₇ 2**.

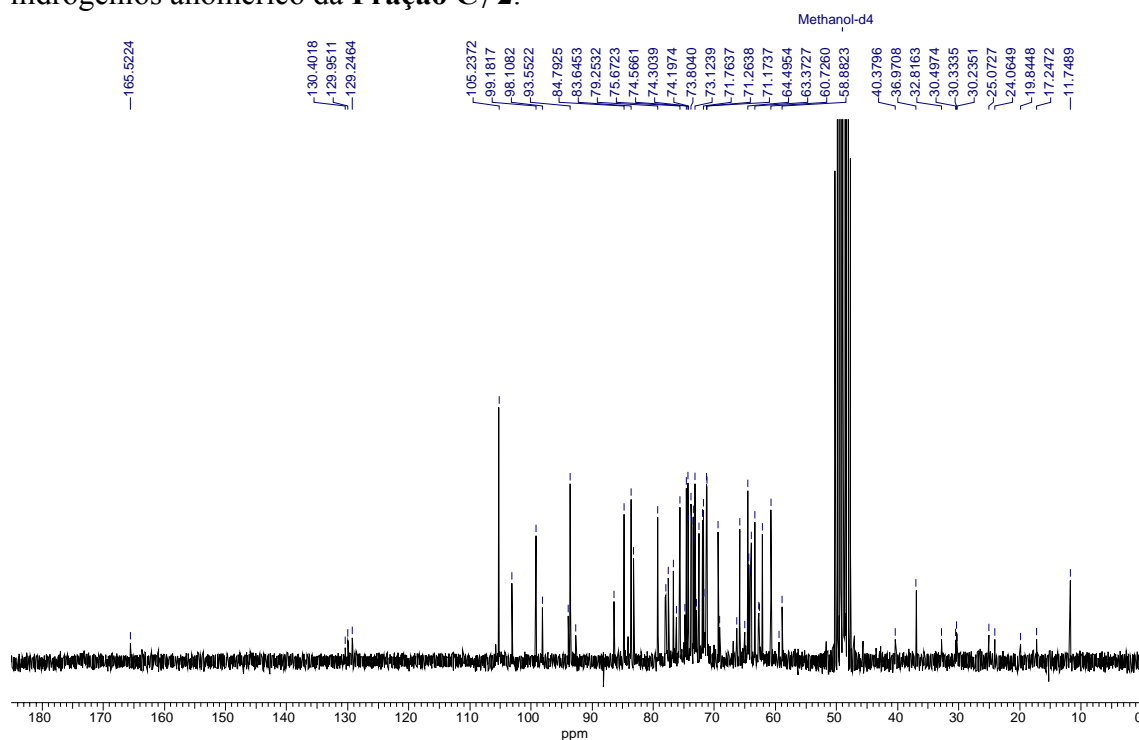


Figura 96 – Espectro de RMN ¹³C (MeOD, 200 MHz) da **Fração C₇ 2**.

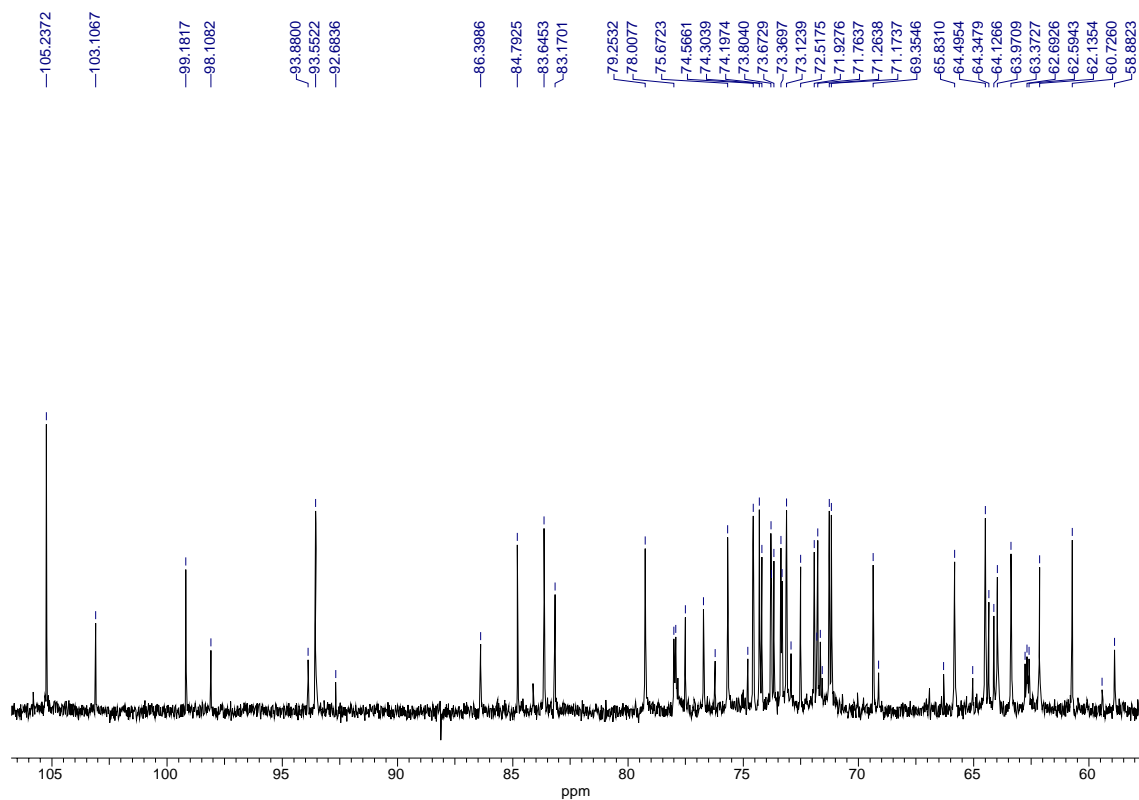


Figura 97 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) da Fração $\text{C}_7 \mathbf{2}$.

Por meio das análises dos dados espectroscópicos e comparação com dados obtido da literatura (**105**) foi possível identificar os açúcares majoritários presentes na Fração $\text{C}_7 \mathbf{2}$ como sendo a α -glicose (S_{65}), β -glicose (S_{66}) e sacarose (S_{67}) (Figura 98). Os dados encontram-se listados na Tabela 26.

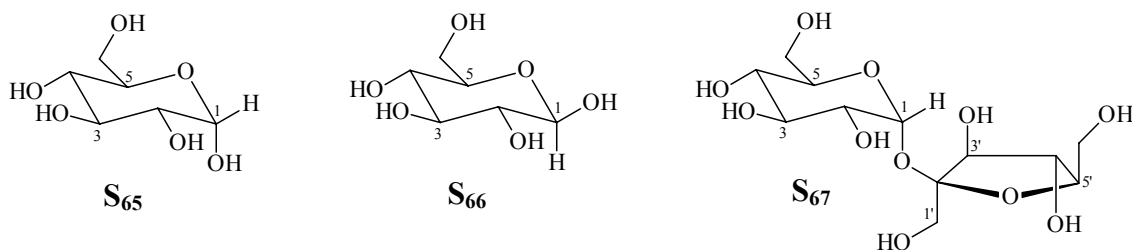


Figura 98 – Sacarídeos identificados na Fração $\text{C}_7 \mathbf{2}$, α -glicose (S_{65}), β -glicose (S_{66}) e sacarose (S_{67}).

Tabela 29 - Dados de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) e RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) da **Fração C₇ 2** em comparação com dados obtidos da Literatura **104** ($\delta = \text{ppm}$).

Sacarídeo	Posição	^1H Lit.	^{13}C Lit.	^1H amostra	^{13}C amostra
β -glicose	CH-1	4,66 <i>d</i> (7,9 Hz)	96,90	4,47 <i>d</i> (8,0 Hz)	98,10
	CH-2	3,26 <i>dd</i> (9,3; 8,0 Hz)	75,10	-	74,56
	CH-3	3,51 <i>t</i> (9,1 Hz)	76,90	-	75,67
	CH-4	3,41 <i>dd</i> (9,8; 9,2 Hz)	70,70	-	71,17
	CH-5	3,45	77,00	-	77,51
	CH-6	3,9	61,80	-	62,13
α -glicose	CH-1	5,25 <i>d</i> (3,8 Hz)	93,10	5,11 <i>d</i> (3,6 Hz)	93,55
	CH-2	3,55	72,50	-	72,51
	CH-3	3,73	73,80	-	73,8
	CH-4	3,42 <i>dd</i> (9,8; 9,2 Hz)	70,70	-	69,35
	CH-5	3,84	72,40	-	73,12
	CH-6	3,85	61,70	-	62,59
Sacarose	CH-1	5,42 <i>d</i> (3,0 Hz)	93,20	5,39 <i>d</i> (4,0 Hz)	93,88
	CH-2	3,57	72,10	-	71,92
	CH-3	3,78	73,60	-	73,67
	CH-4	3,48	70,20	-	69,13
	CH-5	3,85	73,40	-	73,36
	CH-6	3,83	61,10	-	60,72
	CH-1'	3,69	62,30	-	62,77
	CH-2'		104,70	-	105,23
	CH-3'	4,22	77,60	-	77,91
	CH-4'	4,06	75,00	-	76,22
	CH-5'	3,89	82,20	-	83,64
	CH-6'	3,83	63,30	-	63,37

4.3.3.2 – Constituintes Químicos das Frações obtidas por HPLC

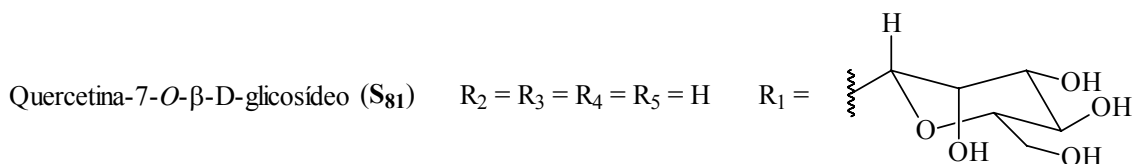
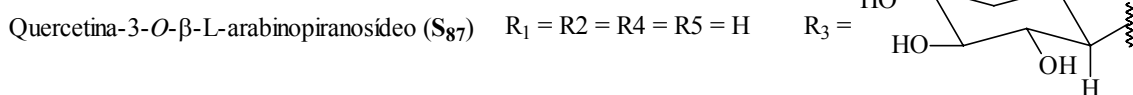
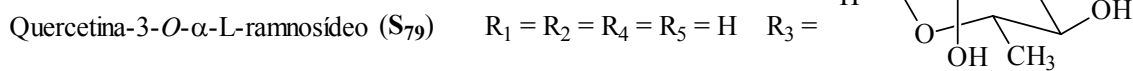
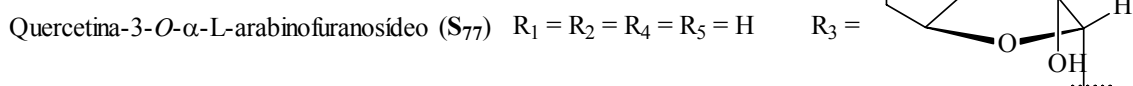
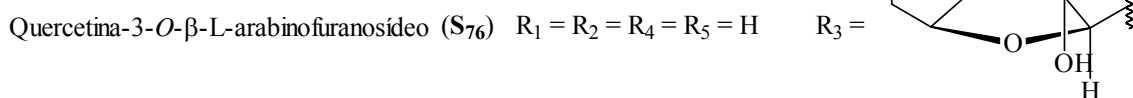
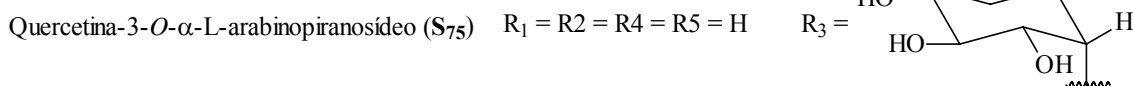
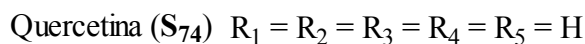
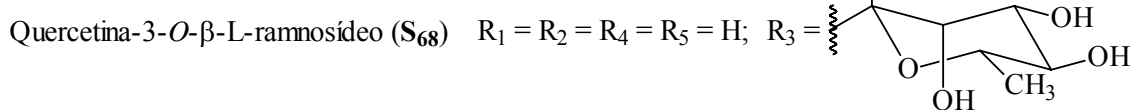
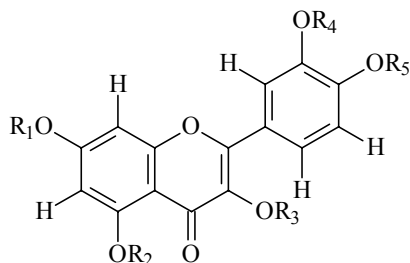
O fracionamento por HPLC preparativo das inflorescências e dos pedúnculos de *S. adstringens* e do caule de *H. puberula* foram denominadas de **Colunas C₈, C₁₂ e C₁₅**. As frações resultantes foram submetidas à análise por RMN 1D e 2D para identificação das substâncias presentes nas mesmas. Por meio de análises preliminares pode-se constatar que na maioria das frações havia flavonóides como componentes majoritários. Devido à pequena quantidade de amostra de muitas frações, estas foram analisadas em misturas, motivo pelos quais alguns experimentos espectroscópicos não apresentaram boa resolução.

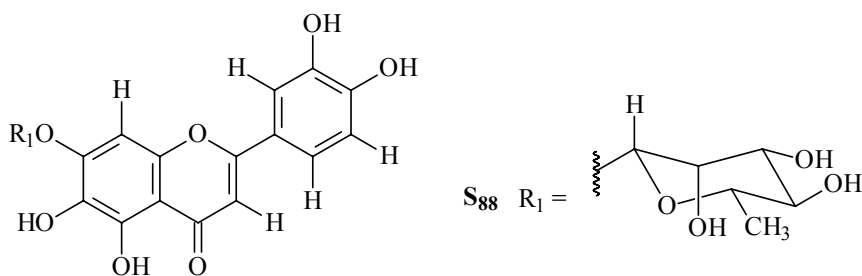
Os flavonóides geralmente fazem parte de uma mistura complexa obtida de um extrato de planta, sendo necessária a purificação para as análises, e dependendo do método de purificação estas análises podem demandar um tempo relativamente alto. Portanto, as amostras foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrofotômetro de Ultra Violeta e Espectrômetro de Massas (LC-UV-MS). Desde que foram desenvolvidas técnicas de Ionização a Pressão Ambiente (API), o acoplamento de Espectrômetro de Massas (EM) com Cromatografia Líquida (LC) tornou-se possível, e as análises ficaram mais rápidas, pois o método de purificação passou a ser on-line com o Espectrômetro de Massas. As técnicas de API são mais brandas que as técnicas de EI (ionização por Impacto por Elétrons) ou CID (Dissociação Induzida por Colisão), ou seja, detecta-se geralmente apenas o íon molecular, e os fragmentos subsequentes não são detectados, não sendo eficiente na elucidação estrutural utilizando apenas esta técnica, sendo necessário utilizar ferramentas adicionais, como a RMN.

Para facilitar a discussão dos dados espectrométricos e da identificação dos flavonóides, suas estruturas foram agrupadas em três CLASSES I, II e III. O agrupamento das estruturas foi feito pelo padrão de substituição nos anéis dos flavonóides responsáveis pelo perfil nos espectros de RMN ^1H . O **Quadro 1** apresenta todos os flavonóides identificados de acordo com as classes.

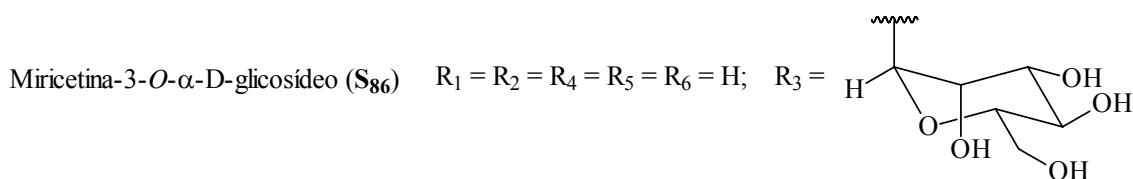
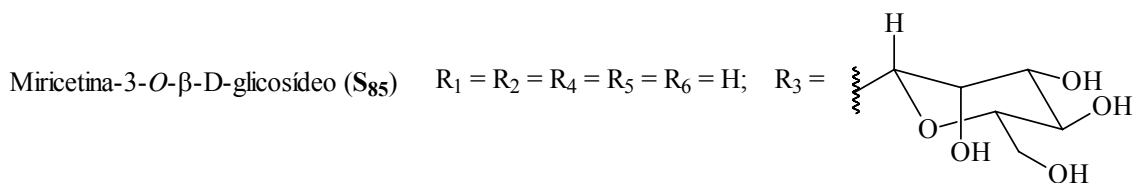
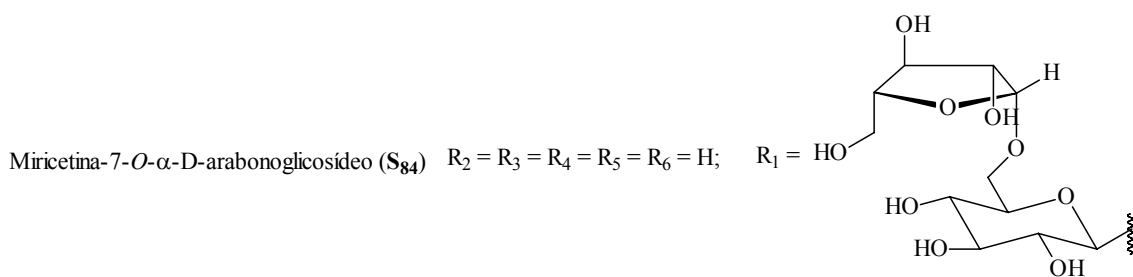
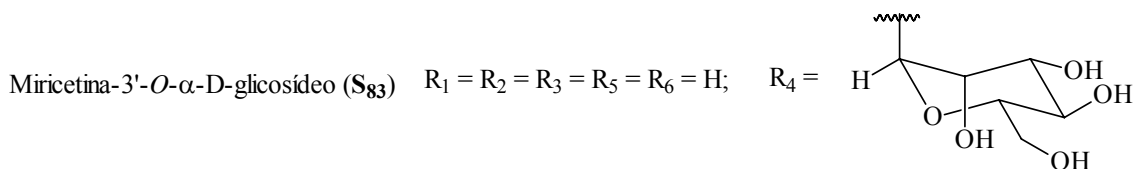
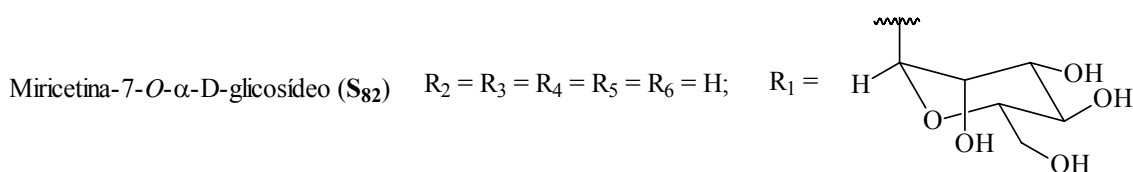
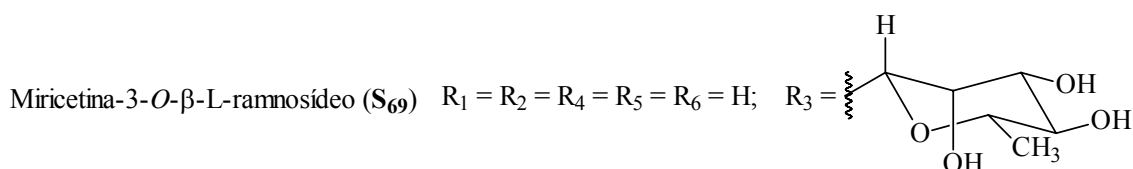
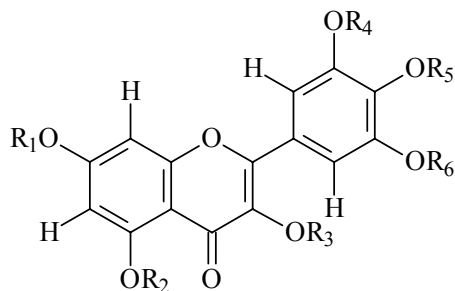
Quadro 1 – Flavonóides identificados dos Extratos Brutos Metanólicos das Inflorescências e dos Pedúnculos de *S. adstringens* e do Caule de *H. puberula* das Classes I-III.

Classe I

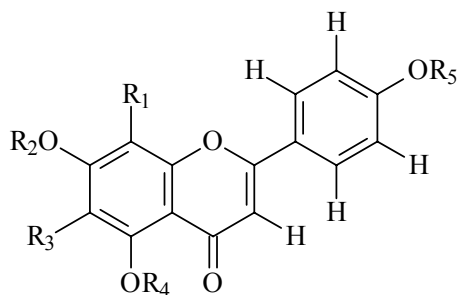




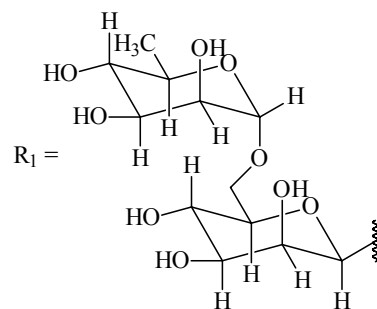
Classe II



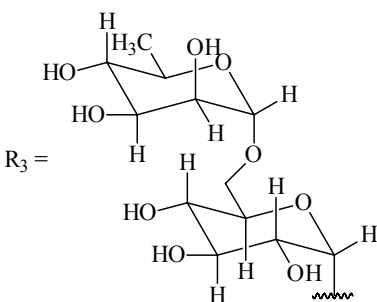
Classe III



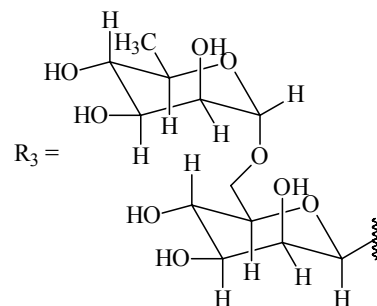
5,7,4'-trihidroxi flavona-8-C- β -glucuronídeo (S70) $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$;



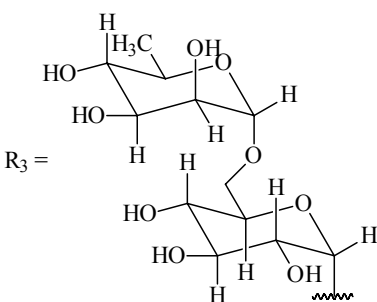
5,7,4'-trihidroxi flavona-8-C- α -glucuronídeo (S71) $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$;

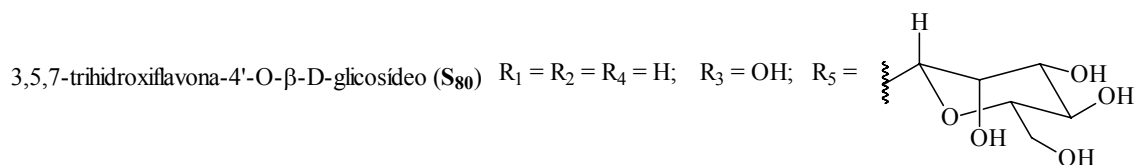


5,7,4'-trihidroxi flavona-6-C- β -glucuronídeo (S72) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$;



5,7,4'-trihidroxi flavona-6-C- α -glucuronídeo (S73) $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$;





A identificação ou elucidação estrutural de um flavonóide de cada Classe foi realizada como exemplo da interpretação dos dados espectrométricos. Estes exemplos (modelos) certamente facilitarão compreender as discussões dos dados relativos às demais estruturas. Foram escolhidos como exemplos as substâncias das **Frações C₈ 3**, **C₈ 5** e **C₁₅ 3** como representativas das Classes **I**, **II** e **III**, respectivamente.

Para os flavonóides glicosilados, foram utilizados, além dos dados espectroscópicos obtidos, aqueles da literatura (**Tabelas 3, 4 e 5**, p. 64-67) para determinação do glicosídeo e sua provável posição no núcleo flavonoídico.

4.3.3.2.A - CLASSE I: Anéis A e B di-substituídos (Fração C₈ 3)

A substância proveniente da **Fração C₈ 3** foi escolhida como modelo da Classe I (**Figura 99**).

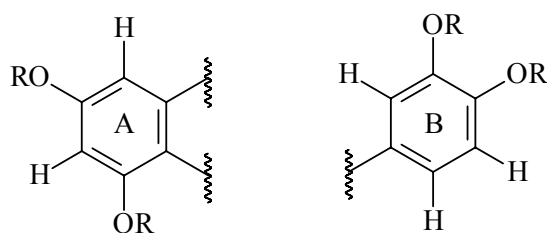


Figura 99 – Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe I.

O seu espectro de RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, **Figura 103**, p. 155) mostra sinais na região de aromáticos referentes a quatro átomos de hidrogênios, os sinais em δ 7,27 ppm (*d*, *J* = 2,0 Hz), δ 7,23 ppm (*dd*, *J* = 2,0 Hz e 8,3 Hz) e δ 6,83 ppm (*d*, *J* = 8,3 Hz) permitiram reconhecer a presença de átomos de hidrogênios formando um sistema ABX compatível com um anel B de flavonóides com substituições nas posições 3' e 4'. Os sinais em δ 6,27 ppm (*sl*) e δ 6,09 ppm (*sl*) foram atribuídos a hidrogênios C-8 e C-

6, respectivamente, de anel A di-oxigenado, o sinal em δ 12,64 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio de hidroxila quelada, sugerindo que a hidroxila encontra-se na posição C-5. O sinal em δ 5,25 ppm (*sl*) referente a sinal de hidrogênio anomérico e o sinal em δ 0,81 ppm (*d*, $J = 6,0$ ppm) correspondente sinal da metila do glicosídeo, sugerindo que a β -L-ramnose (ver **Tabela 3**, p. 64) seja o resíduo do glicosídeo presente na amostra.

O espectro 2D de correlação homonuclear de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (**Figura 104**, p. 156) foi usado para confirmação das interações spin-spin destes átomos de hidrogênios. As interações entre os sinais dos hidrogênios da ramnose encontram-se indicadas na subestrutura da **Figura 100**.

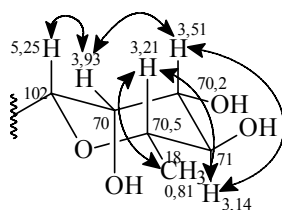


Figura 100 – Subestruturas com dados de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e gHSQC para o resíduo de ramnose da **Fração C₈ 3**.

As correlações obtidas no espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e mapa de correlações de gHSQC (DMSO- d_6 , 400 MHz, **Figura 105**, p. 156) são mostradas nas subestruturas da **Figura 101**, sendo que os dados de carbonos foram obtidos pela projeção dos seus respectivos carbonos.

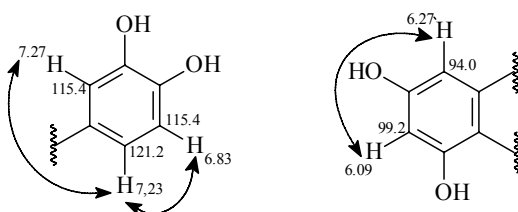


Figura 101 - Subestruturas com dados de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e gHSQC (os δ dos sinais de acoplamentos estão indicados por meio de setas).

O mapa de correlações de gHMBC (DMSO- d_6 , 400 MHz, **Figura 106**, p. 157) indicou as correlações dos sinais dos hidrogênios e da projeção dos sinais dos carbonos a duas ou três ligações. Por meio da correlação do sinal do hidrogênio anomérico com a projeção do sinal do carbono em δ 134,00 ppm, foi possível verificar que o resíduo de ramnose está ligado ao átomo de oxigênio ligado no C-3. As subestruturas com estes dados encontram-se na **Figura 102**.

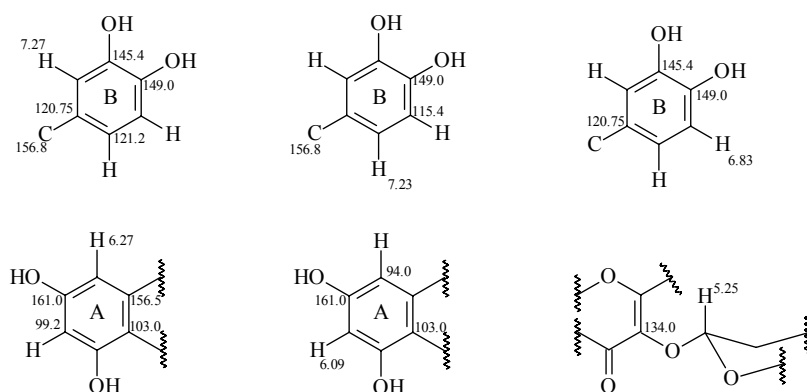


Figura 102 – Subestruturas com dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC.

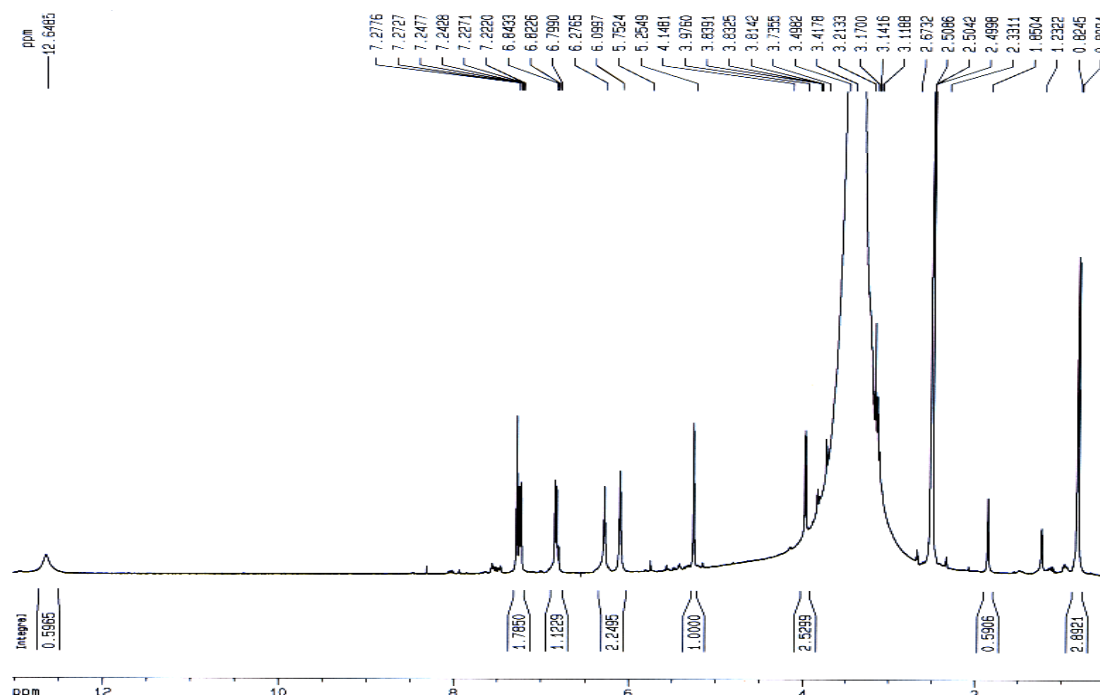


Figura 103 – Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da **Fração C₈ 3**.

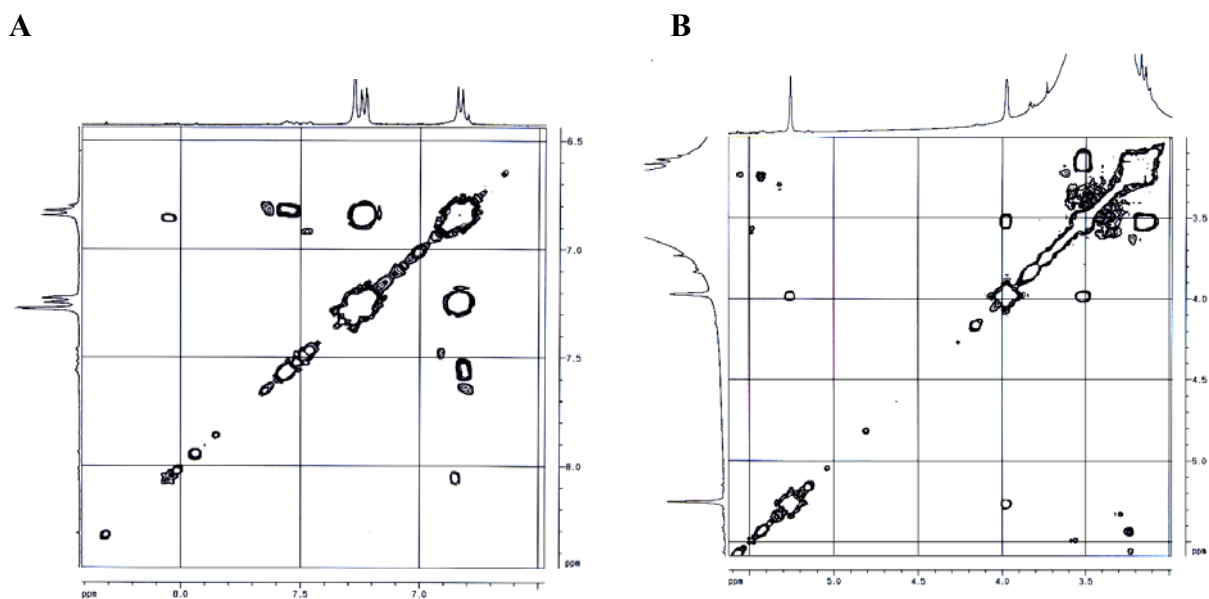


Figura 104 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₈ 3, **A** – região dos sinais de H de aromático e **B** - região dos sinais de H de glicosídeo.

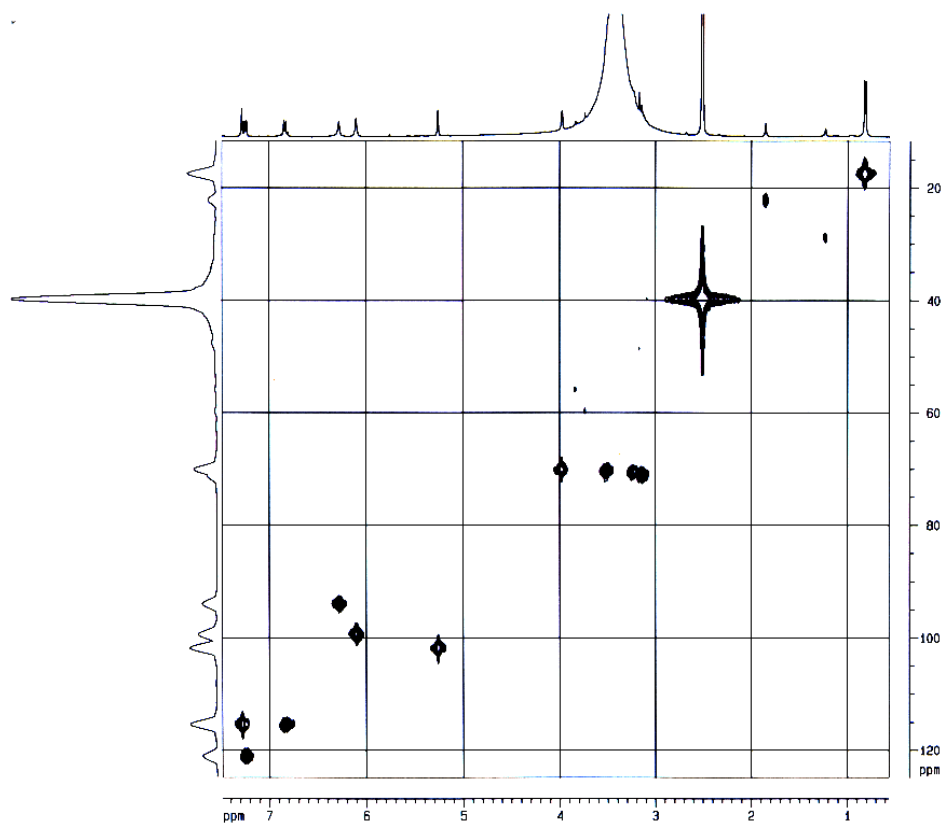


Figura 105 – Mapa de correlações de gHSQC (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₈ 3.

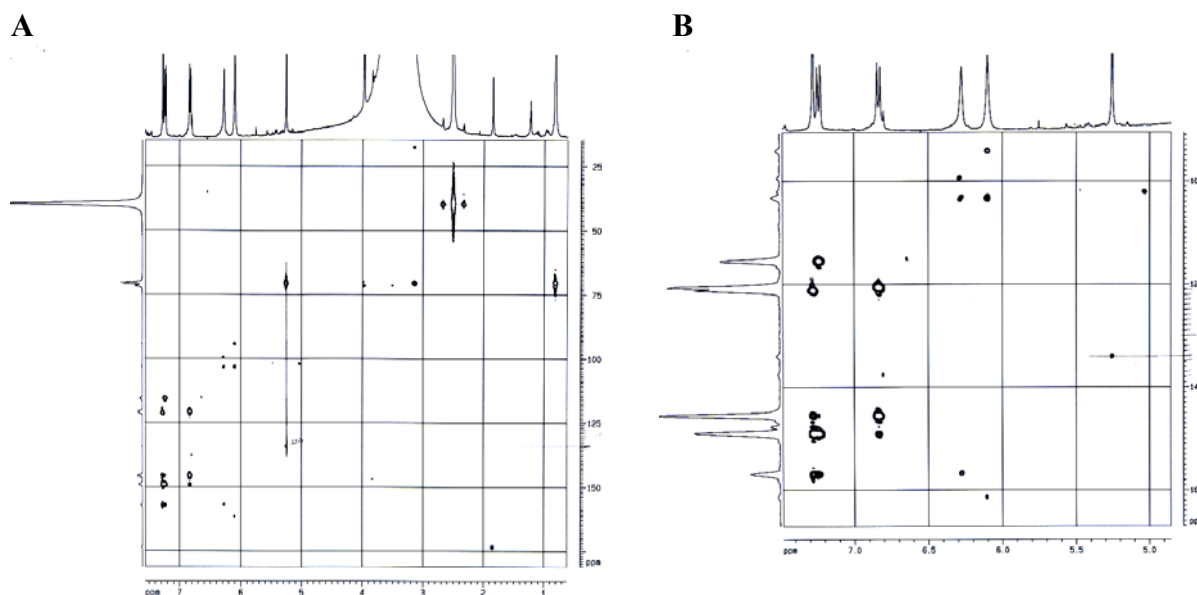


Figura 106 – Mapa de correlações de gHMBC (DMSO- d_6 , 400 MHz) da **Fração C₈ 3** (A) e ampliação na região de sinais de H de aromático e o sinal de H anomérico do glicosídeo (B).

A **Fração C₈ 3** foi analisada por LC-UV-MS e a análise do cromatograma

(**Figuras 107**) verifica-se que há uma banda mais intensa.

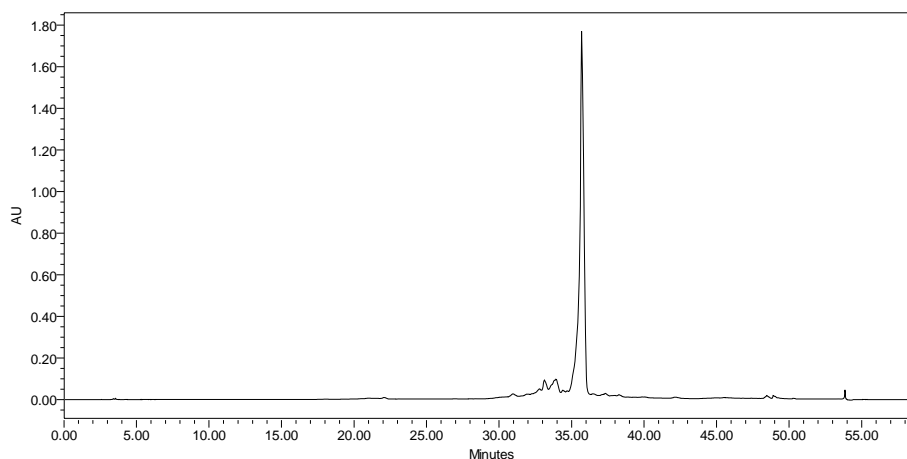


Figura 107 – Cromatograma de eluição gradiente da **Fração C₈ 3** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm, $t_R = 35,707$ min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100^o C; Dessolvation temperatura: 350^o C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

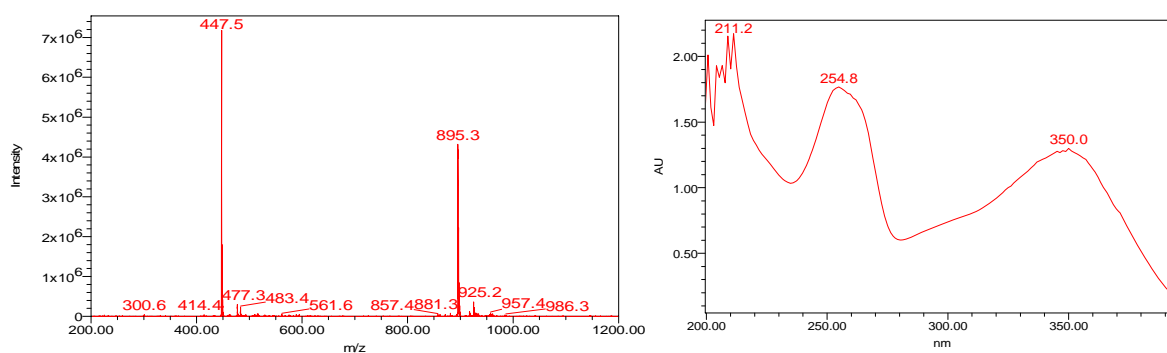
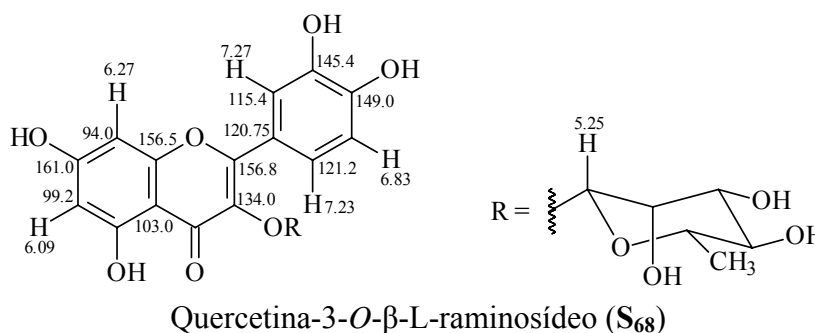


Figura 108 – Espectros de MS e de UV obtidos por LC-UV-MS da **Fração C₈ 3**.

A análise do espectro de massas com o íon pseudomolecular m/z 447,5 D, e o pico m/z 300,6 D com perda de m/z 147 D ($M^+ - C_6H_{11}O_4$) sugere a perda da ramnose. O espectro no UV apresenta absorção em $\lambda = 254,8$ nm (Banda II) e $\lambda = 350,0$ nm (Banda I) indicativo de flavonol com posições 5,7-hidroxiladas e posição 3-OH substituído, respectivamente, confirmam a proposta dada para a substância **S₆₈**.

De acordo com o que foi descrito, a substância identificada foi o flavonóide Quercetina-3-*O*- β -L-raminosídeo (**S₆₈**), modelo utilizado para a Classe I.



4.3.3.2.B - CLASSE II: Anéis A di- e B tri-substituídos (Fração C₈ 5)

A substância presente na **Fração C₈ 5** foi escolhida como modelo para a Classe II (**Figura 109**).

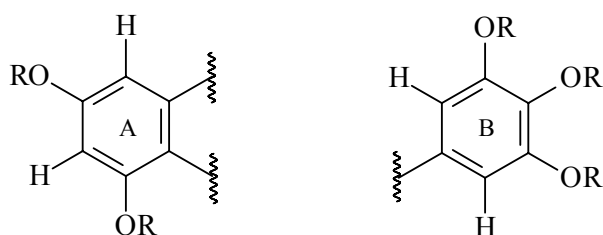


Figura 109 – Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe II.

O seu espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, **Figura 112**, p. 160) mostra apenas um sinal na região de aromático em δ 6,96 ppm (*s*) para os H-2' e H-6' do anel B e mantendo o mesmo padrão de substituição para o anel A, anteriormente descrito, onde os sinais em δ 6,39 ppm (*s*) e δ 6,21 ppm (*s*) correspondem aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. O sinal em δ 5,29 ppm (*sl*) e o sinal em δ 0,81 ppm (*d*, $J = 6,0$ Hz) sugerem que a β -L-ramnose (ver **Tabela 3**, p. 64) também seja o resíduo de açúcar presente na amostra.

O espectro 2D de correlação homonuclear de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz, **Figuras 113-114**, p. 161) confirmou as interações spin-spin destes átomos de hidrogênios H-6 e H-8, e as apresentadas pelos sinais de hidrogênios do glicosídeo, confirmando a presença do resíduo de ramnose. Estas correlações são apresentadas nas subestruturas da **Figura 110**, juntamente com os dados obtidos do mapa de correlações de $g\text{HSQC}$ (MeOD, 400 MHz, **Figura 115**, p. 162).

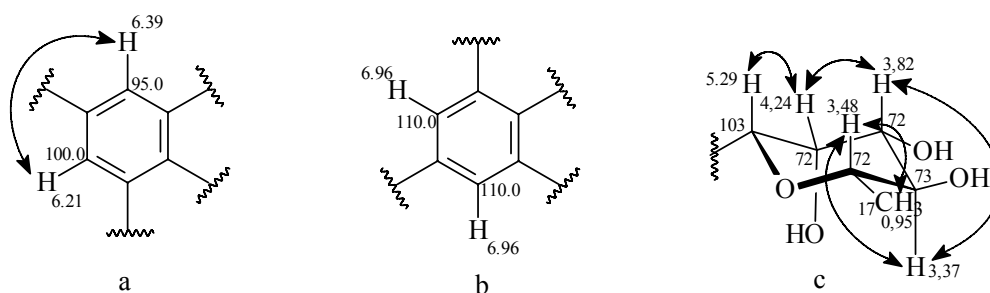


Figura 110 – Subestruturas com dados obtidos do espectro de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (indicado por meio de setas) e mapa de correlações de $g\text{HSQC}$ da **Fração C₈ 5**.

O mapa de correlações de $g\text{HMBC}$ (MeOD, 400 MHz, **Figura 116**, p. 162) mostrou correlação do sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,29 ppm com o sinal da

projeção do carbono em δ 136,00 ppm, indicando assim que a ramnose encontra-se ligada ao oxigênio do carbono C-3. A **Figura 111** mostra as correlações heteronucleares dos dados do mapa de correlações de gHMBC por meio de subestruturas.

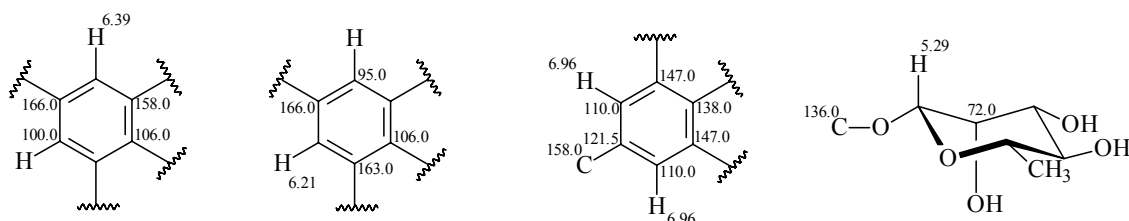


Figura 111 – Subestruturas com dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC da Fração C₈ 5.

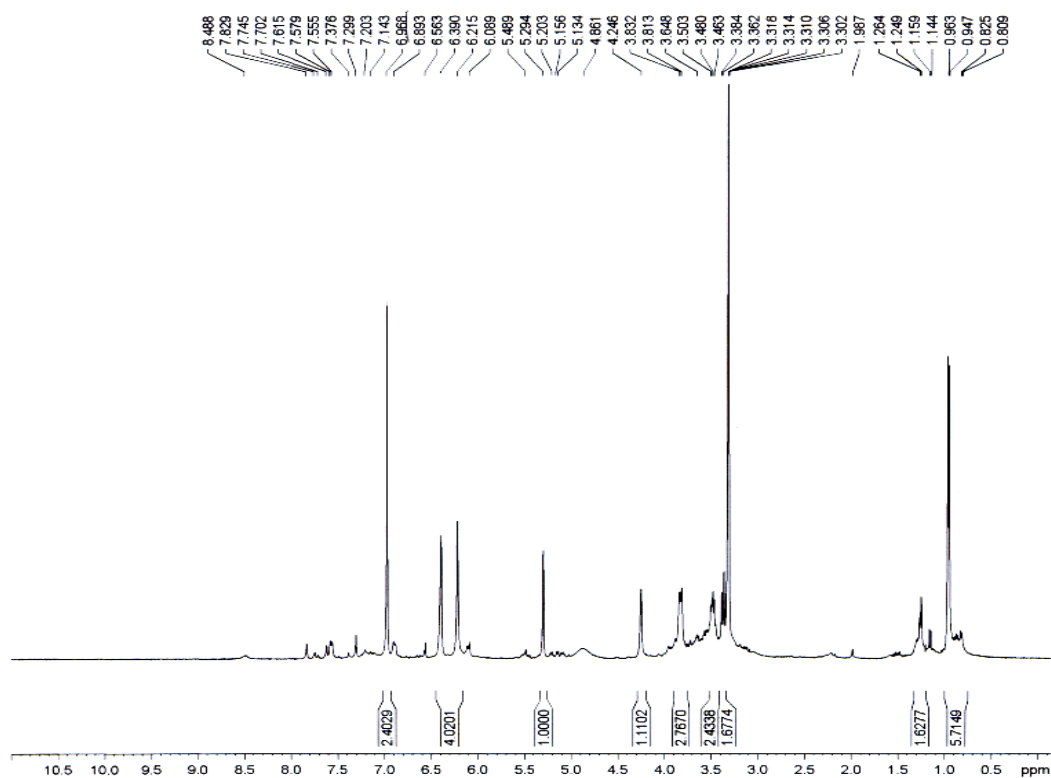


Figura 112 – Espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5.

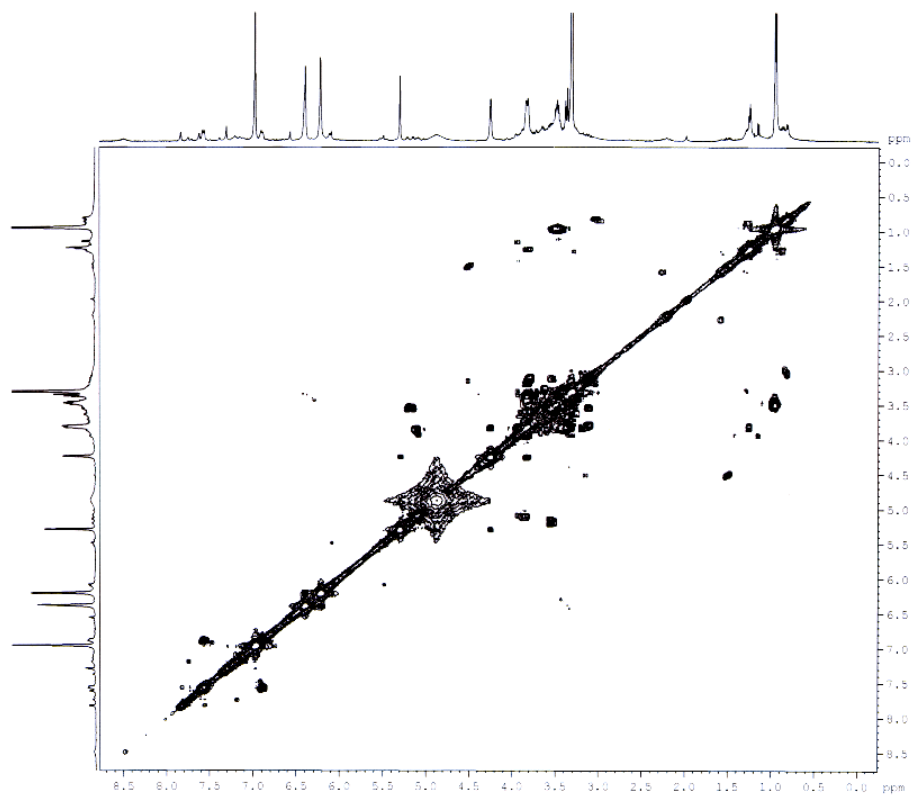


Figura 113 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5.

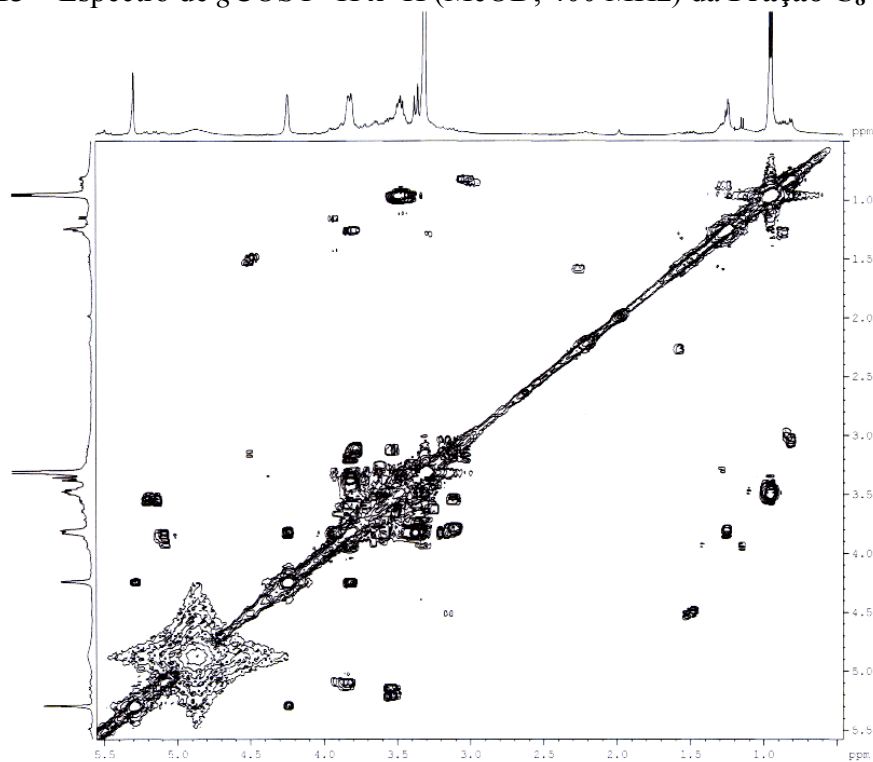


Figura 114 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5.

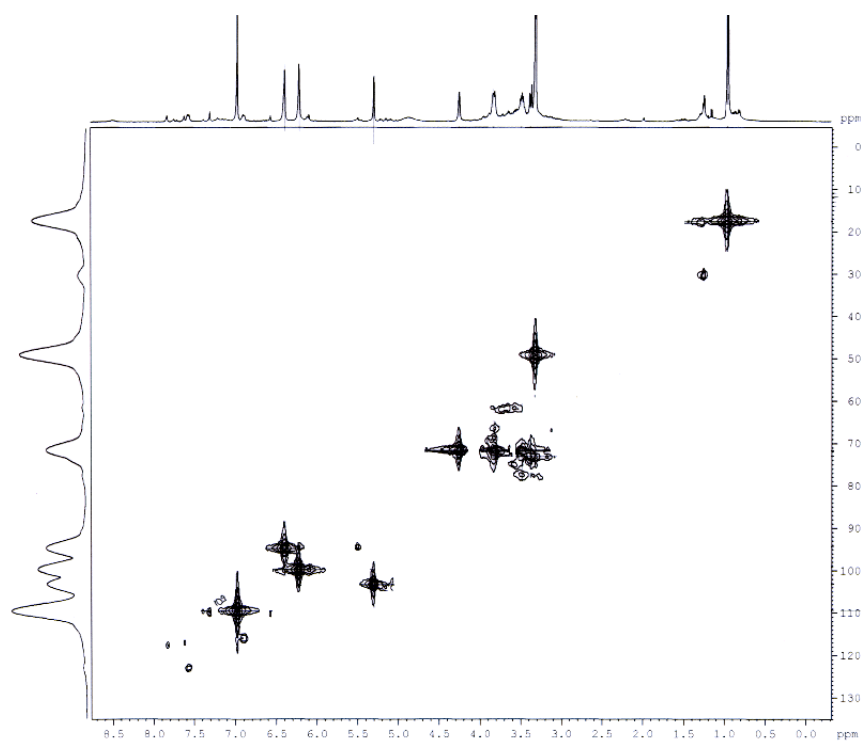


Figura 115 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5.

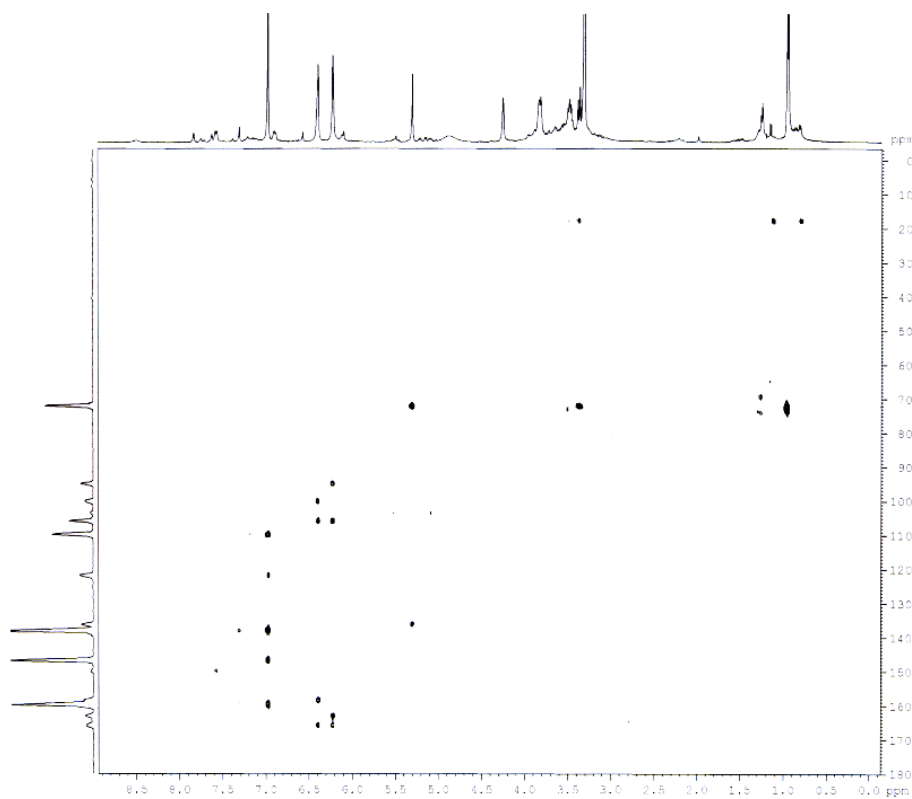


Figura 116 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 5.

Esta fração foi analisada por LC-UV-MS e foi possível observar no cromatograma (**Figura 117**) a presença de mais de uma banda cromatográfica, sendo que a mais intensa ($t_R = 33,206$ min.) corresponde ao composto majoritário observado no espectro de RMN, as demais bandas não foram analisadas visto que o objetivo é a identificação e classificação de um modelo para facilitar a determinação dos demais compostos nas frações subseqüentes.

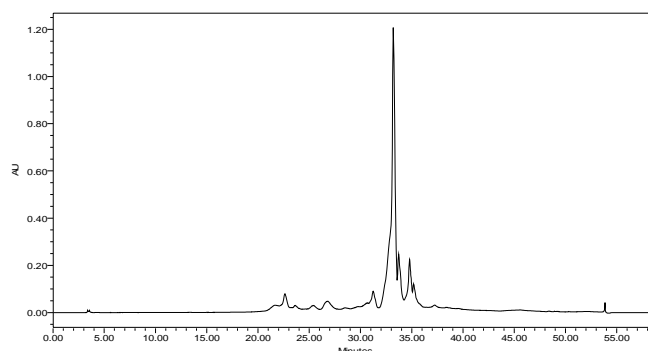


Figura 117 – Cromatograma de eluição gradiente da **Fração C₈ 5** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm, $t_R = 35,707$ min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

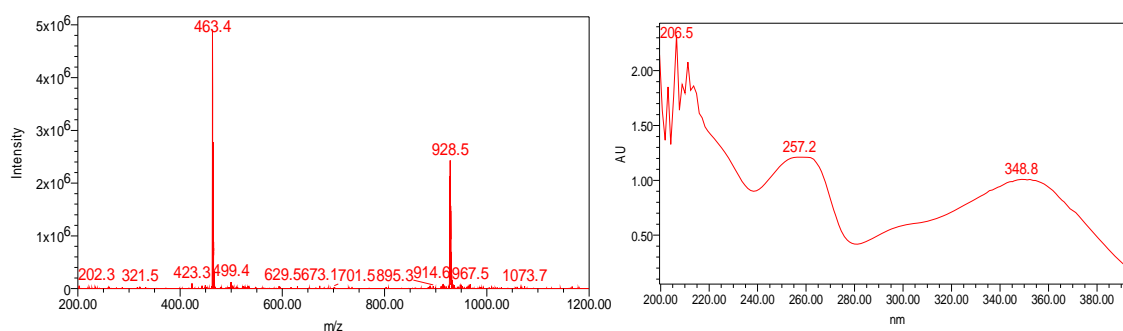
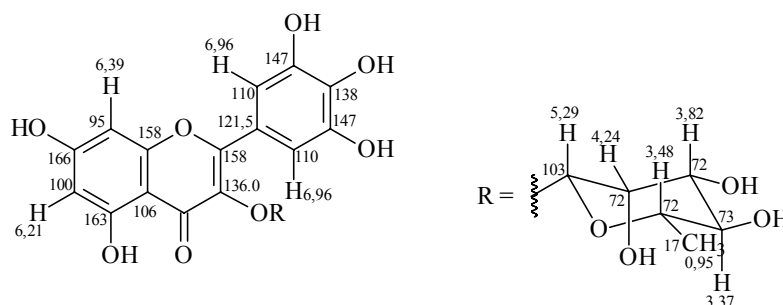


Figura 118 – Espectros de EM e de UV obtidos por LC-UV-MS da **Fração C₈ 5**.

De acordo com o que foi observado com os dados obtidos dos experimentos espectroscópicos foi possível identificar o flavonóide presente na **Fração C₈ 3** como

sendo o flavonóide Miricetina-3-*O*- β -L-ramnosídeo (**S₆₉**). O pico do íon pseudomolecular de m/z 463,4 D e o espectro de UV confirmam a presença da substância **S₆₉**.



Miricetina-3-*O*- β -L-ramnosídeo (**S₆₉**)

4.3.3.2.C - CLASSE III: Anéis A tri- e B mono-substituídos (Fração C₁₅ 3)

A Fração C₁₅ 3 proveniente do EBM do caule de *H. puberula*, foi escolhida para exemplificar a Classe III (Figura 119).

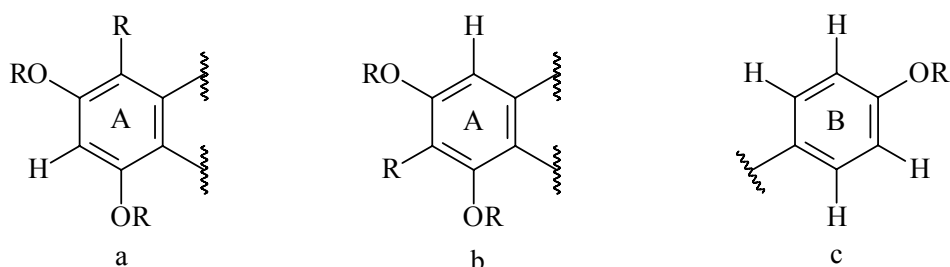


Figura 119 – Padrão de oxigenação para o anel A e B de flavonóides da Classe III.

Ao analisar o espectro de RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, **Figura 123**, p. 168) observa-se a presença de seis sinais na região de aromáticos, correspondentes a δ 8,00 ppm (*d*, $J = 8,8$ Hz), δ 7,85 ppm (*d*, $J = 8,8$ Hz), δ 6,95 ppm (*d*, $J = 8,8$ Hz) e δ 6,93 ppm (*d*, $J = 8,8$ Hz) de hidrogênios do anel B caracterizando tratar-se de uma mistura. Os três sinais em δ 6,61 ppm (*s*), δ 6,52 ppm (*s*) e δ 6,28 ppm (*s*), δ 6,61 ppm corresponde ao sinal do H-3 do anel C indicando a possibilidade de uma flavona e os outros dois sinais referem-se aos sinais dos hidrogênios do anel A indicando assim a tri-substituição do mesmo.

O espectro de correlação homonuclear de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (**Figuras 124-125**, p. 169) mostrou as interações spin-spin dos átomos de hidrogênios H-6 e H-8. Também indicou que os sinais em δ 8,00 ppm ($d, J = 8,8$ Hz) e δ 7,85 ppm ($d, J = 8,8$ Hz), e os em δ 6,95 ppm ($d, J = 8,8$ Hz) e δ 6,93 ppm ($d, J = 8,8$ Hz) correspondem a sinais de acoplamento *orto* entre o H-2'/H-6' e H-3'/H-5' de anéis independentes B, reforçando a hipótese de uma mistura. Na **Figura 120** estão indicados os dados obtidos do espectro de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e do mapa de correlações de $g\text{HSQC}$ (MeOD, 400 MHz, **Figura 126**, p. 170) referentes aos anéis aromáticos.

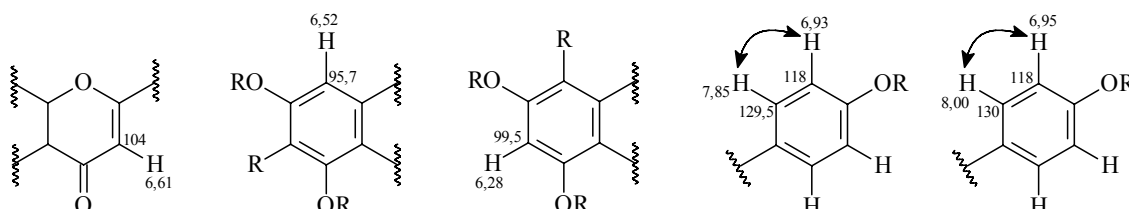


Figura 120 – Subestruturas com dados obtidos dos espectros de 2D homo e heteronucleares, respectivamente, de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e $g\text{HSQC}$ da **Fração C₁₅ 3**.

Observou-se a presença de sinais relativos à hidrogênios de resíduos de glicosídeos entre δ 5,22 ppm e δ 2,30 ppm, e foi possível verificar a presença de sinais correspondentes a hidrogênios anoméricos destacando os sinais em δ 5,12 ppm ($d, J \sim 10,0$ Hz), δ 5,02 ppm ($d, J = 10,0$ Hz), δ 5,20 ppm ($d, J > 2,0$ Hz), e δ 5,09 ppm ($d, J > 2,0$ Hz), característicos de hidrogênios anoméricos de glicose e ramnose, respectivamente, como é indicado na **Tabela 4** (p. 66). A presença de dois sinais em δ 0,79 ppm ($d, J = 6,2$ Hz) e δ 0,64 ppm ($d, J = 6,2$ Hz) que são sinais característicos de hidrogênio metílicos de resíduo de ramnose, reforçam a proposta feita anteriormente.

Pelo deslocamento químico o resíduo de ramnose encontra-se ligado ao oxigênio da posição C-2' de glicose, como indicado na **Tabela 4** (p. 66).

Por meio da análise do mapa de correlações de $g\text{HMBC}$ (**Figura 127**, p. 170) foi possível observar as correlações heteronucleares do hidrogênio δ 6,61 ppm com as

projeções dos sinais dos carbonos do anel C; a correlação com a projeção do sinal em δ 185 ppm referente a carbonila, confirmam tratar-se de uma flavona; as correlações com as projeções dos sinais de carbonos em δ 107 ppm/C-10, δ 124 ppm/C-1', δ 166 ppm/C-2 e δ 167 ppm/C-2 reforçam a proposta do núcleo de flavona, sendo que há dois sinais para o carbono C-2, confirmando assim, tratar-se de pelo menos dois sistemas com este padrão de substituição para o anel C. A **Figura 121** mostra as correlações observadas entre os sinais de hidrogênios e os sinais das projeções dos carbonos (2J ou 3J), os dados encontram-se listados na **Tabela 30** (p. 167).

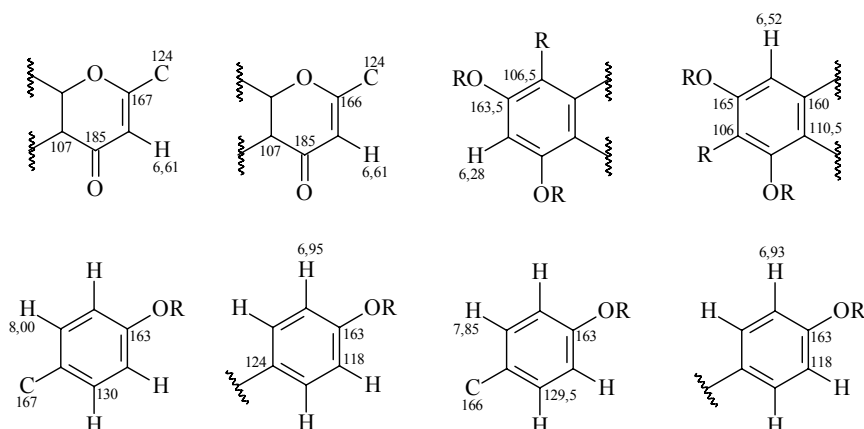


Figura 121 – Subestruturas com dados obtidos do espectro heteronuclear de gHMBC da Fração C₁₅ 3.

A proposta para as agliconas é demonstrada na **Figura 122**.

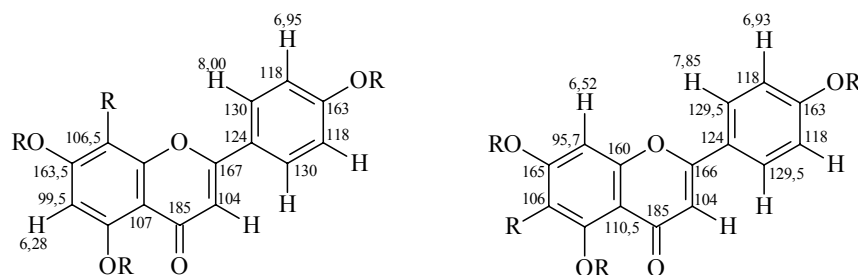


Figura 122 – Proposta para as agliconas dos flavonóides presentes na Fração C₁₅ 3.

Os dados de RMN para a substância S₇₀ foram comparados com obtidos por SOBOLEV (105) e estão de acordo para a proposta realizada para este flavonóide.

Tabela 30 – Dados das correlações heteronucleares obtidos do mapa de correlações de gHMBC da Fração C₁₅ 3.

C	gHMBC S ₇₀		gHMBC S ₇₂	
	δ_C	$^{2,3}J_{CH}$	δ_C	$^{2,3}J_{CH}$
2	167,0	H-2'/H-6'; H-3	166,0	H-2'/H-6'; H-3
3	104,0	-	104,0	-
4	185,0	H-3	185,0	H-3
5	-	-	158,0	H-1''
6	99,5	-	106,0	H-8; H-1''
7	163,5	H-6	165,0	H-8; H-1''
8	106,5	H-6; H-1''	95,7	-
9	158,0	H-1''	160,0	H-8
10	107,0	H-3	110,5	H-8
1'	124,0	H-3'/H-5'; H-3	124,0	H-3
2'	130,0	H-2'/H-6'	129,5	H-2'/H-6'
3'	118,0	H-3'/H-5'	118,0	H-3'/H-5'
4'	163,0	H-2'/H-6'; H-3'/H-5'	163,0	H-2'/H-6'; H-3'/H-5'
5'	118,0	H-3'/H-5'	118,0	H-3'/H-5'
6'	130,0	H-2'/H-6'	129,5	H-2'/H-6'
1''	73,7	-	73,7	-
2''	78,2	H-1''	78,2	H-1''
3''	81,6	H-1''; H-2''	81,6	H-1''; H-2''
4''	72,2	-	72,2	-
5''	82,9	-	82,9	-
6''	63,0	-	63,0	-
1'''	102,5	H-2''	102,5	H-2''
2'''	73,0	-	73,0	-
3'''	72,5	H-4''''	72,5	H-4''''
4'''	73,6	-	73,6	-
5'''	70,0	H-4''''	70,0	H-4''''
6'''	18,0	H-4''''	18,0	H-4''''

Os resíduos de glicosídeos presentes nas agliconas propostas, foram determinados com base nos dados espectroscópicos e dados teóricos obtidos das Tabelas 3-5 (p. 64-67), os sinais dos hidrogênios anoméricos em δ 5,22 ppm (*sl*), δ 5,09 ppm (*d*, $J > 1$ Hz), referentes a sinais de dois resíduos de β -L- e α -L-ramnose que por meio da análise do mapa de correlações de gHMBC estão correlacionado com o sinal em δ 78,0 ppm referente ao sinal do carbono C-2'' do resíduo de glicose indicando que

os glicosídeos estão ligados entre si dando origem ao glicosídeo conhecido de glucuronídeo (Rha-1,2-Glc-), e os sinais em δ 5,12 ppm ($d, J = 9,8$ Hz.), e δ 4,95 ppm ($d, J \sim 4$ Hz.) resíduos de β -D- e α -D-glicose. Ainda analisando o mapa de correlações de g HMBC, eles estão correlacionando com os sinais em δ 165,0 ppm (C-7), δ 158,0 ppm (C-9) e δ 159,0 ppm (C-9) referentes aos sinais dos carbonos do anel A, sendo os dois últimos de anéis distintos. Portanto, os resíduos de glucuronídeo encontram-se dois na posição C-8, e os outros dois na posição C-6 nos quais um na configuração α e outro β para cada posição, esta informação é confirmada pelos dados de correlações homo e heteronucleares listados na **Tabela 30** (p. 167).

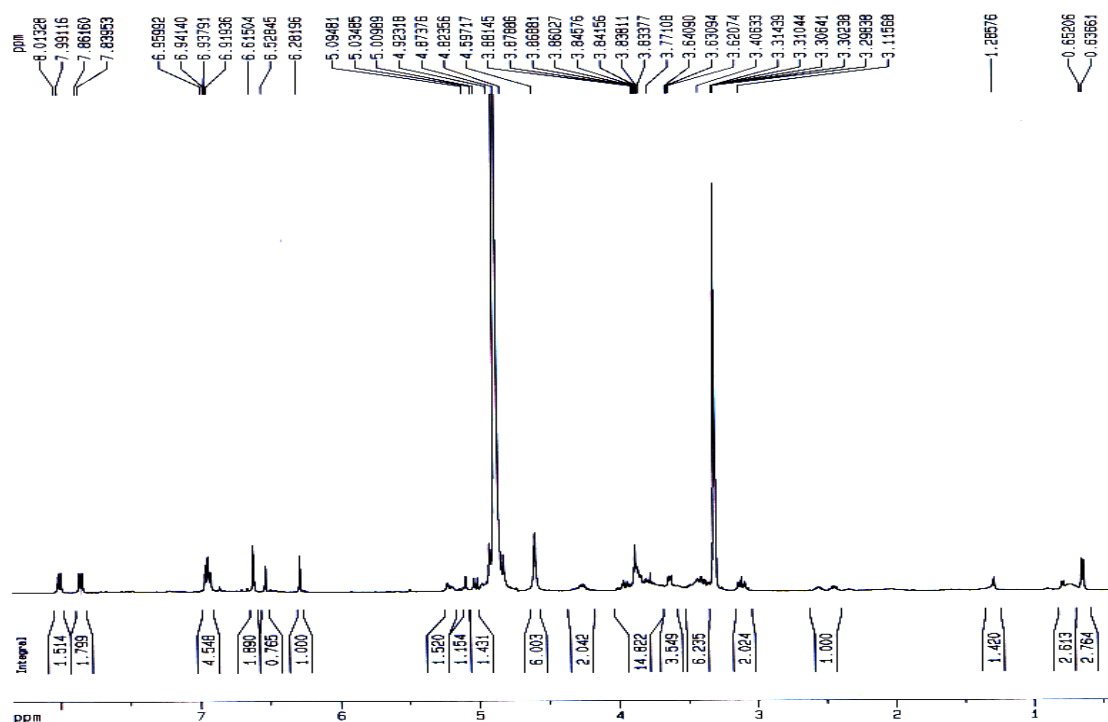


Figura 12310 – Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3.

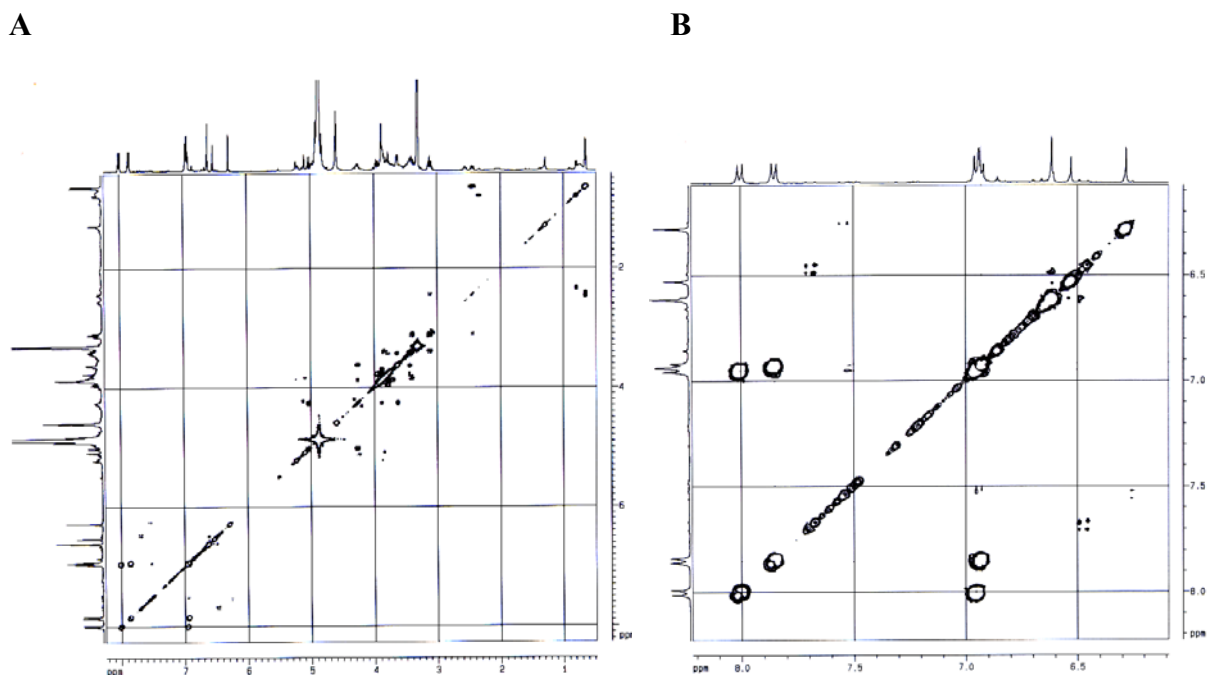


Figura 124 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3 (A) e ampliação na região de sinais H dos glicosídeos (B).

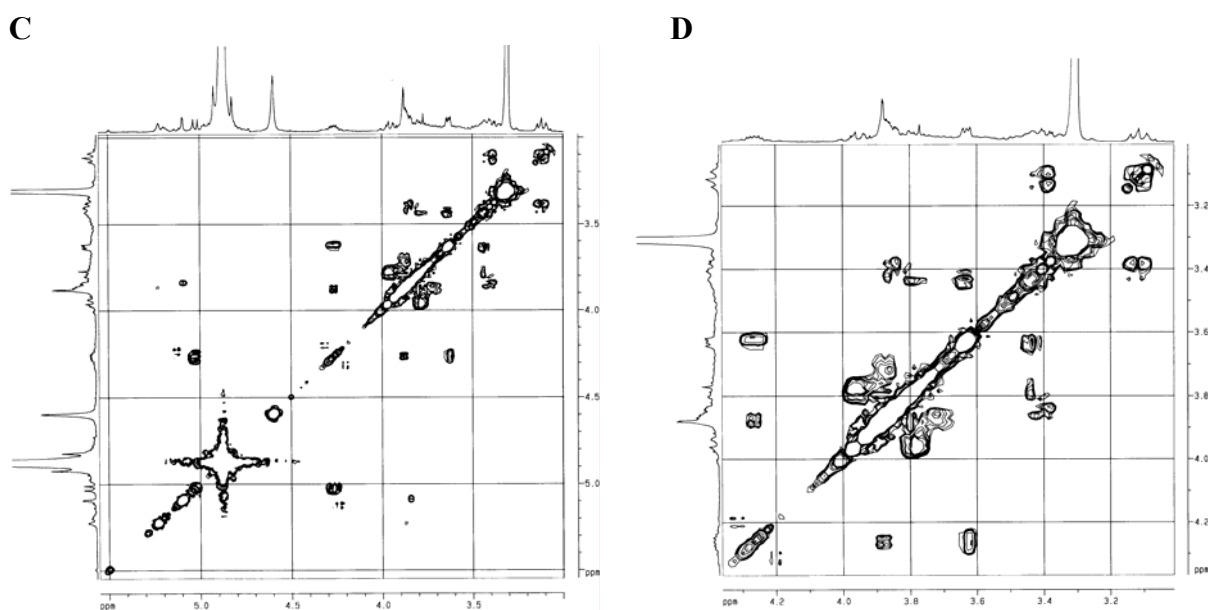


Figura 125 – Ampliação de espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3 na região dos glicosídeos (C - D).

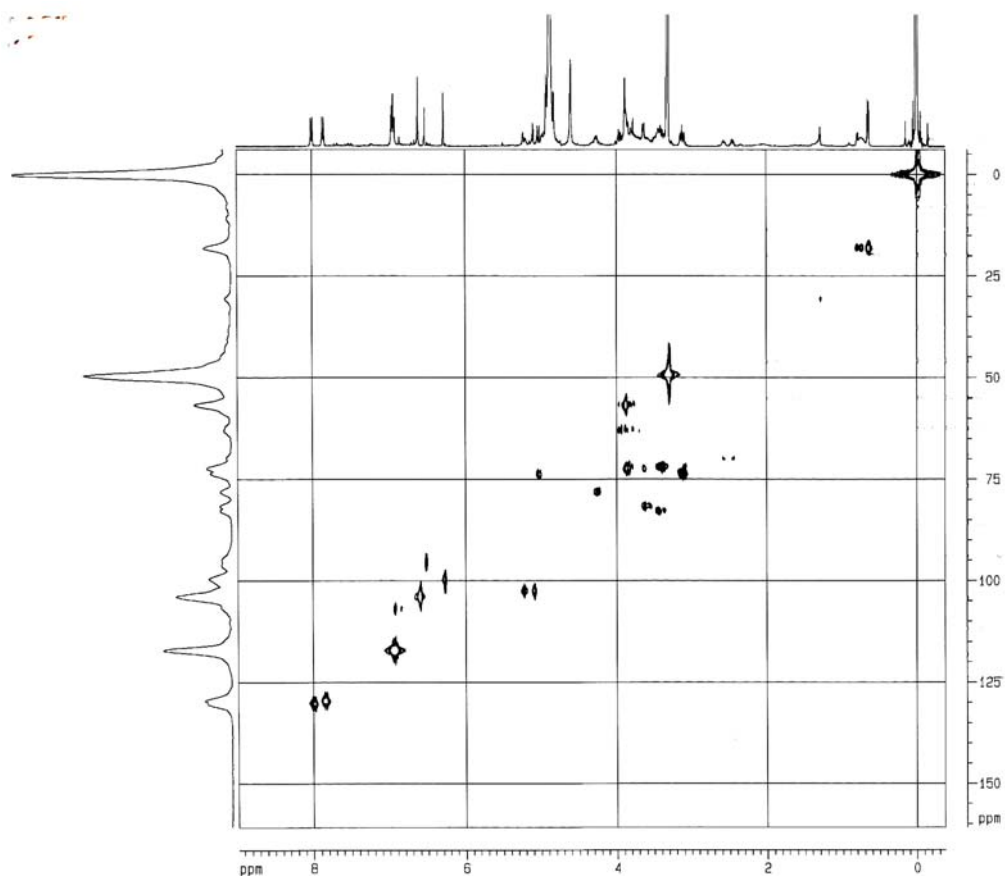


Figura 12611 – Mapa de correlações de gHSQC (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3.

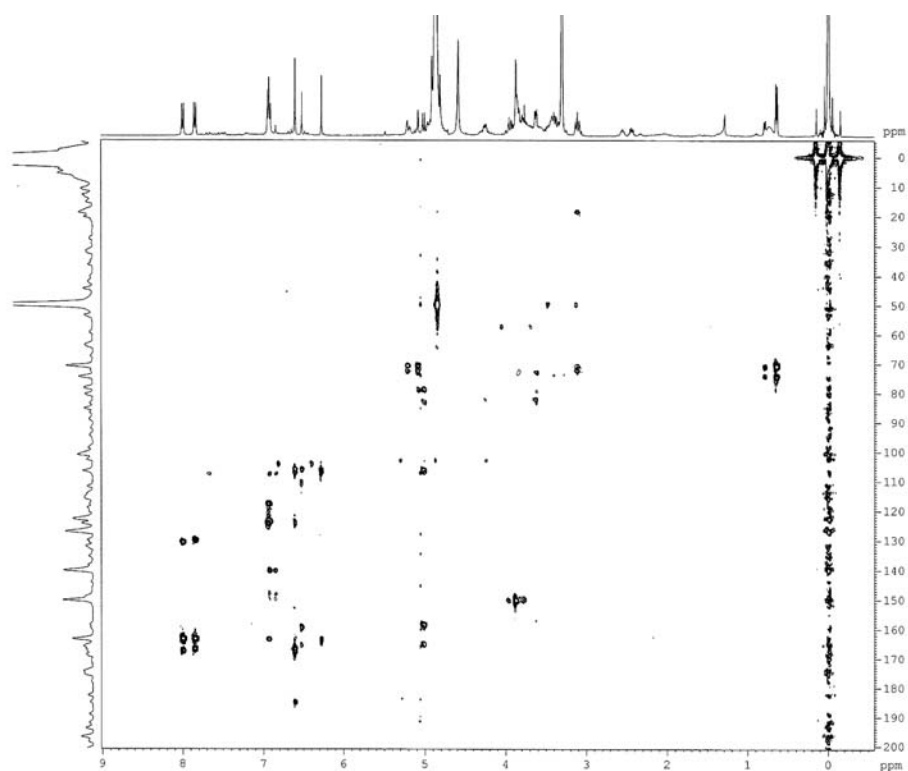
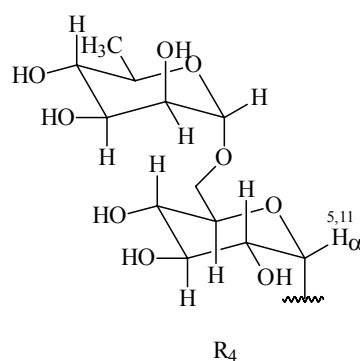
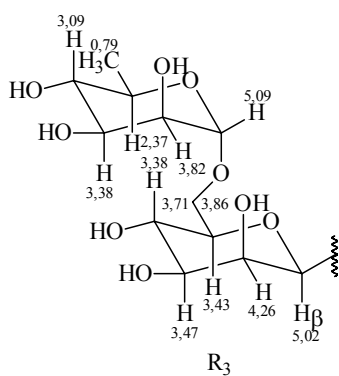
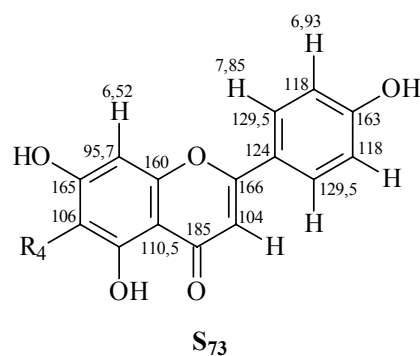
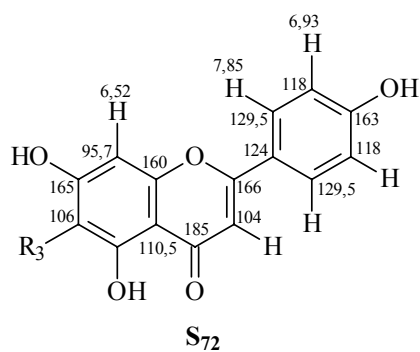
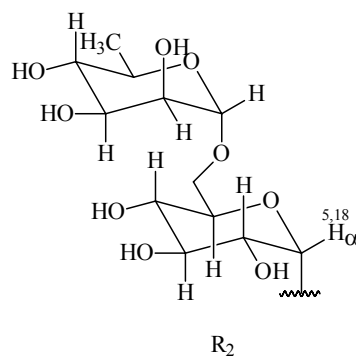
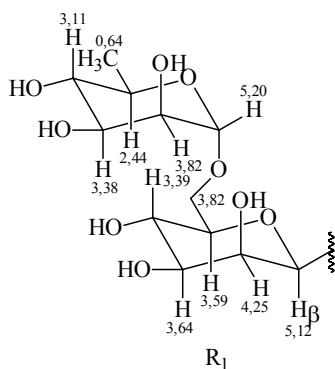
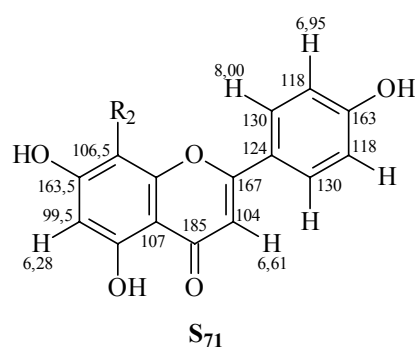
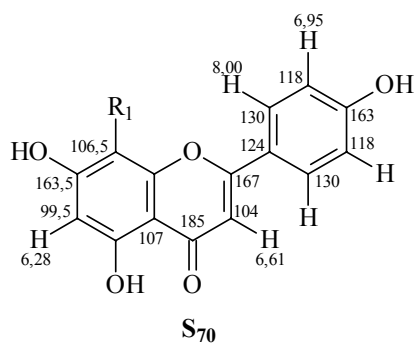


Figura 127 – Mapa de correlações de gHMBC (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₁₅ 3.



A Fração C₁₅ 3 foi submetida à análise por LC-UV-MS e foram observadas 5 bandas no cromatograma (**Figura 128**, p. 172), confirmando a presença de uma mistura na fração. As análises dos espectros de massas e de Ultra Violeta (**Figura 129**, p. 173) confirmam a proposta dada para os compostos presentes, onde para as bandas A, B, C e

D apresentam o pico do íon pseudomolecular para cada banda: íon pseudomolecular m/z 577,4 D; m/z 577,4 D; m/z 577,4 D e m/z 577,5 D, respectivamente, confirmando a presença dos quatro isômeros. A banda E apresenta o pico do íon pseudomolecular de m/z 607,4 D, indicando que há mais uma substância presente na **Fração C₁₅ 3** diferente das quatro identificadas e como ela se encontra em baixa concentração não foi possível atribuir a sua estrutura.

Portanto, foram identificados os flavonóides A: 5-7-4'-trihidroxi-flavona-8-C- β -glucuronídeo (**S₇₀**); B: 5-7-4'-trihidroxi-flavona-8-C- α -glucuronídeo (**S₇₁**); C: 5-7-4'-trihidroxi-flavona-6-C- β -glucuronídeo (**S₇₂**) e D: 5-7-4'-trihidroxi-flavona-6-C- α -glucuronídeo (**S₇₃**).

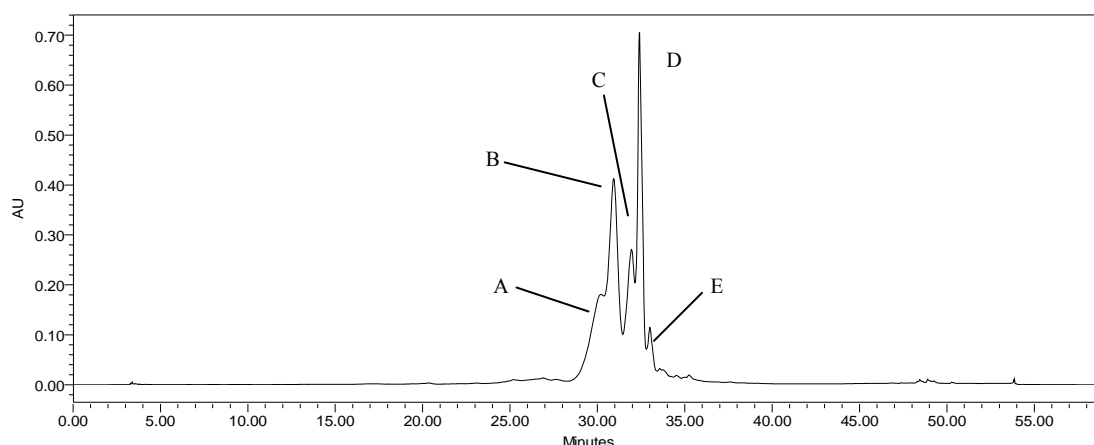
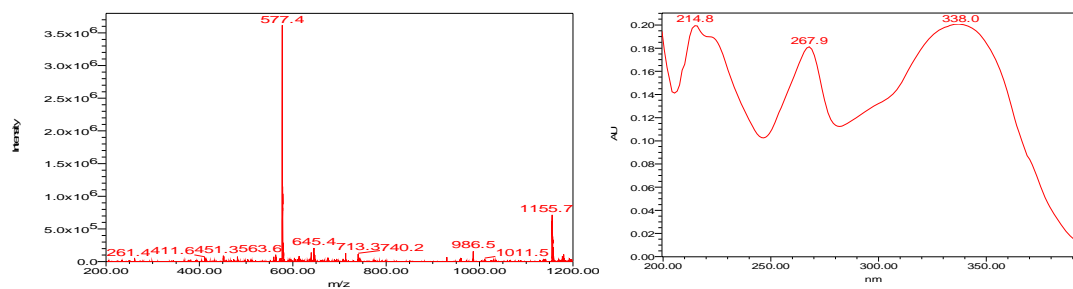
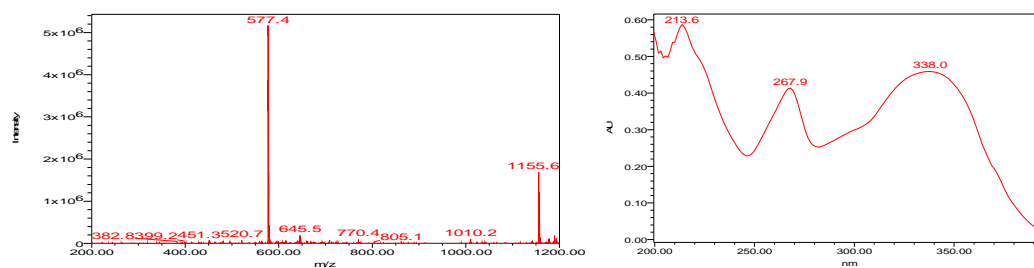


Figura 128 – Cromatograma de eluição gradiente da **Fração C₁₅ 3** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 253,4$ nm; $t_R = A = 30,182$ min.; $B = 30,932$ min.; $C = 31,960$ min.; $D = 32,428$ min. e $E = 32,987$ min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100^o C; Dessolvation temperatura: 350^o C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

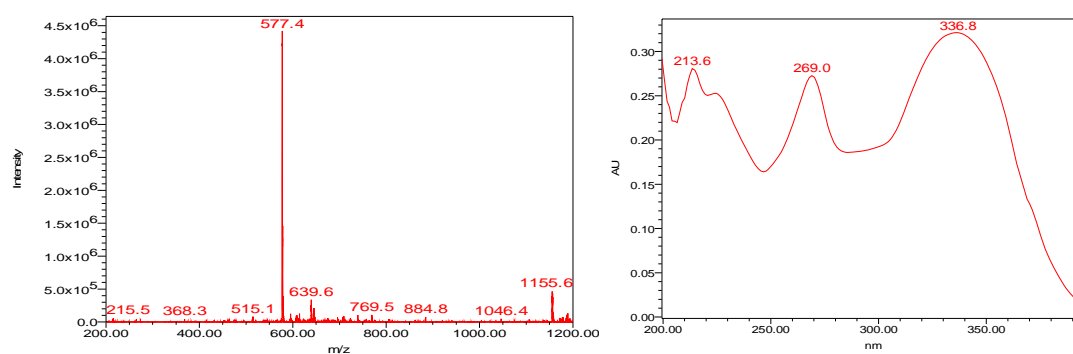
A : $t_R = 30,182$ min.



B: $t_R = 30,932$ min.



C: $t_R = 31,960$ min.



D: $t_R = 32,428$ min.

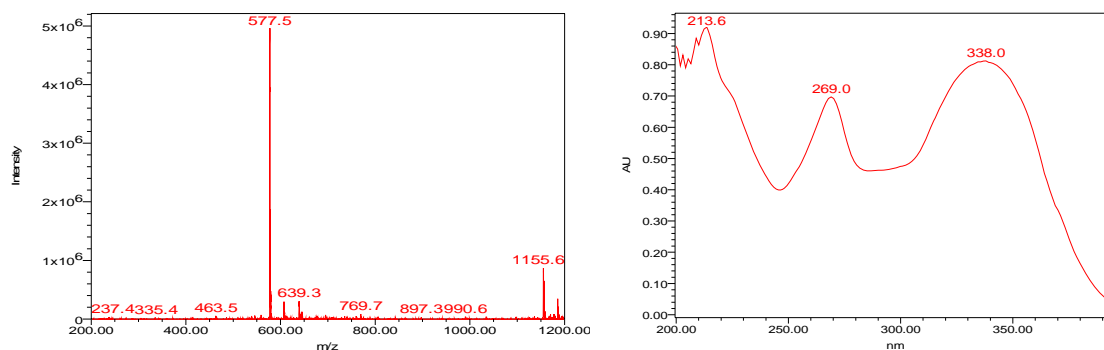


Figura 129 – Espectros de EM e de UV dos componentes da Fração C₁₅ 3.

4.3.3.2.1 - Constituintes Químicos da **Fração C₈ 9**

A **Fração C₈ 9** foi obtida do fracionamento por HPLC-UV. O espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, **Figuras 131-132**, p. 174-175) apresenta sinais característicos de flavonóide da Classe I e não foi observado sinal característico para o anel C, indicando tratar-se de um flavonol. Portanto, os sinais obtidos dos espectros de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (**Figuras 133-134**, p. 175-176) e mapa de correlações de $g\text{HSQC}$ (**Figura 135**, p. 176) encontram-se indicados no núcleo flavonoídico para Classe I (**Figura 130**).

Os dados de $g\text{HMBC}$ (**Figura 136**, p. 177) encontram-se listados na **Tabela 31** (p. 179), sendo que todos os dados dos carbonos foram obtidos das projeções dos sinais dos mesmos.

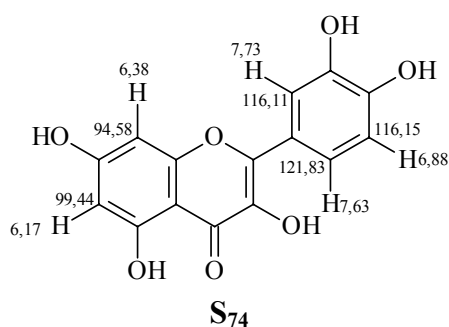


Figura 130 – Dados obtidos do espectro de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e $g\text{HSQC}$ para a substância presente na **Fração C₈ 9**.

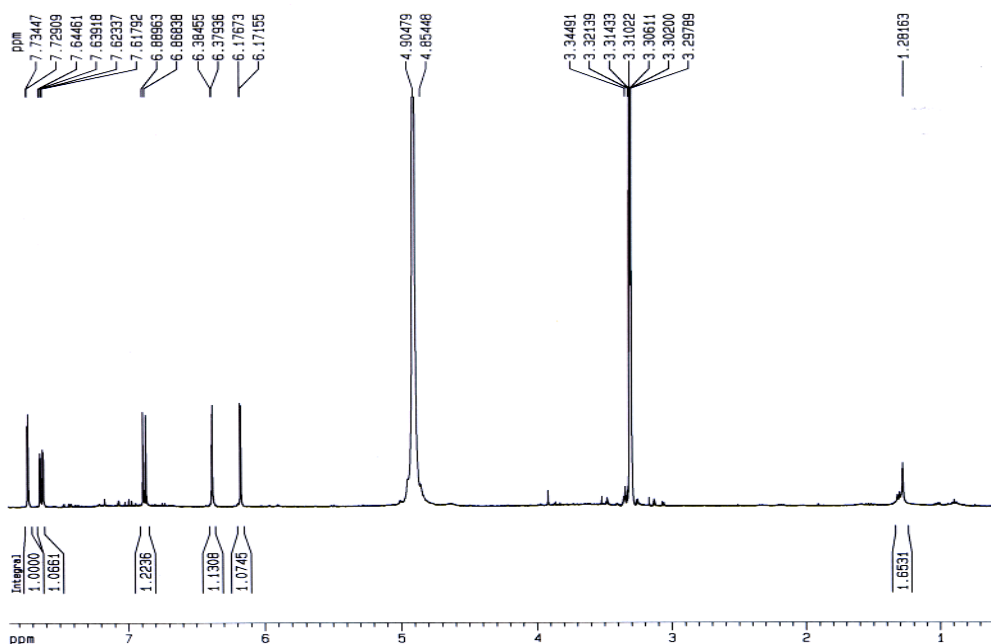


Figura 131 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₈ 9**.

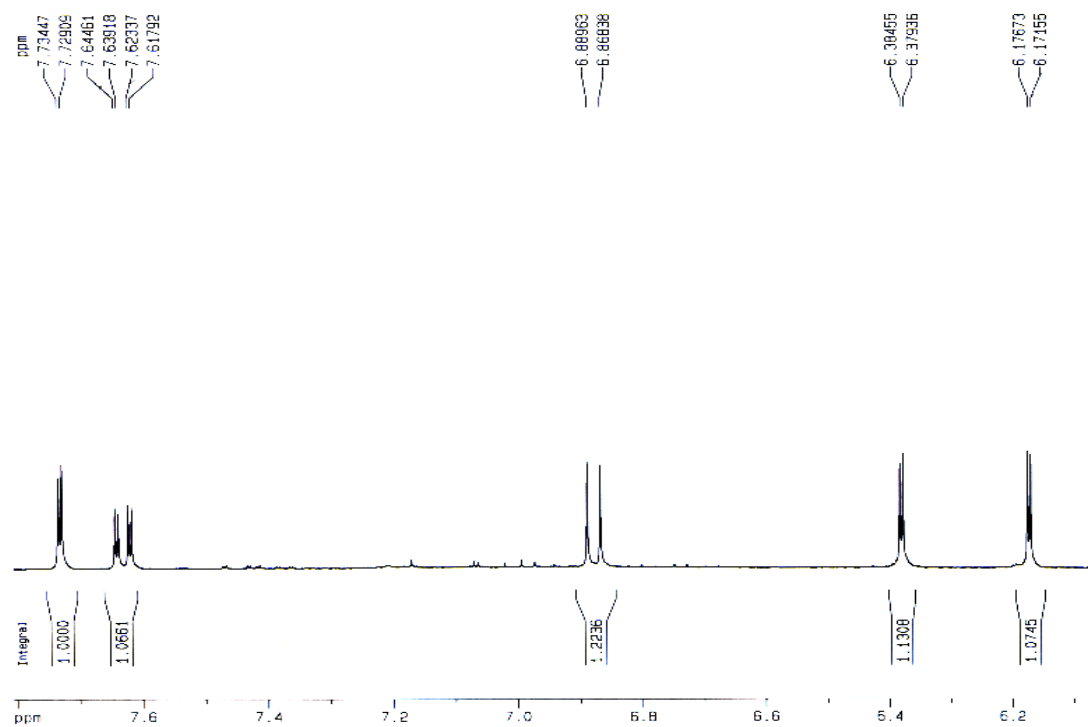


Figura 132 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C_8 9.

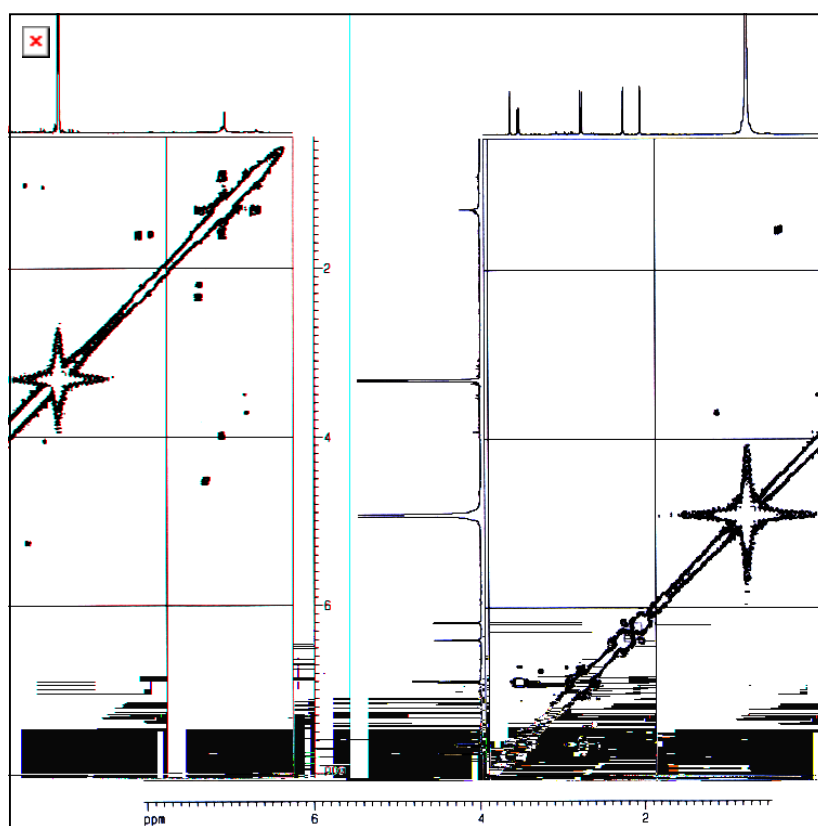


Figura 133 - Espectro de gCOSY ^1H x ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C_8 9.

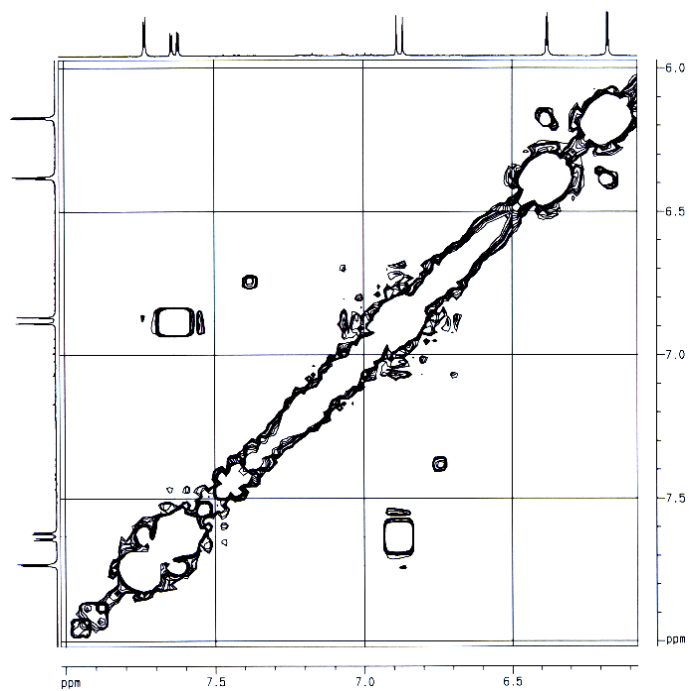


Figura 134 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9.

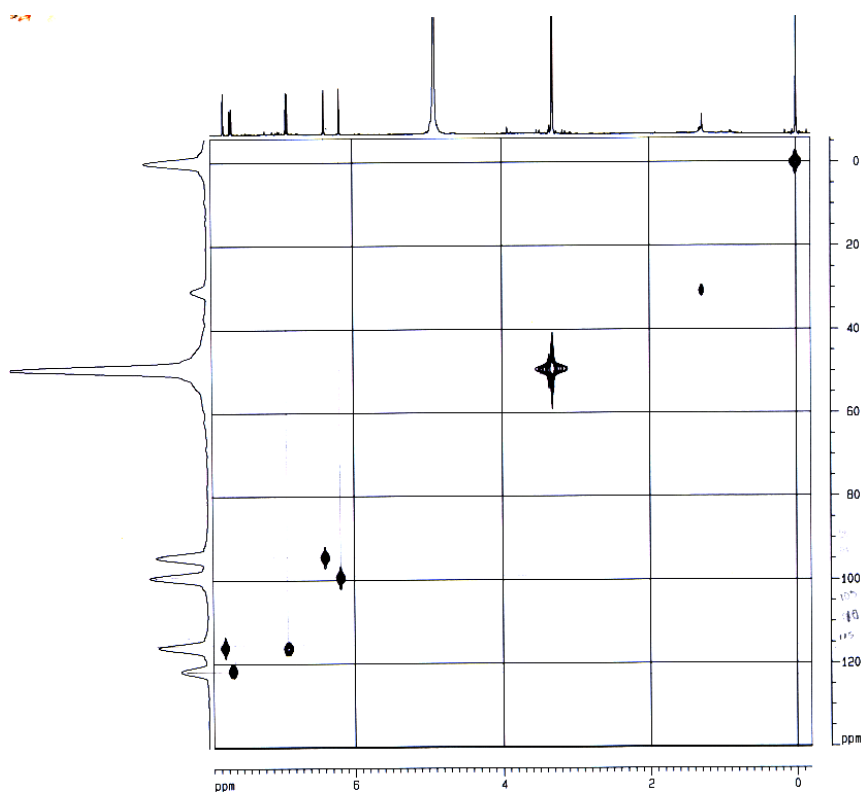


Figura 135 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 9.

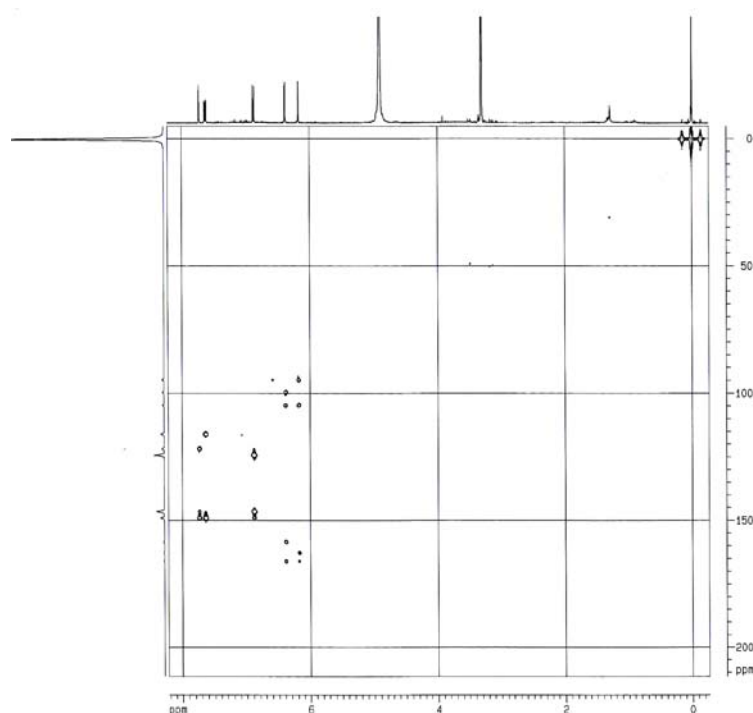


Figura 136 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₈ 9**.

A **Fração C₈ 9** foi analisada por LC-UV-MS e foi observado no Cromatograma (**Figura 137**) apenas uma banda, no comprimento de onda analisado. O espectro de massas (**Figura 138**) apresenta pico do íon pseudomolecular de m/z 301,4 D, confirmando que a substância presente nesta fração é o flavonóide conhecido de Quercetina.

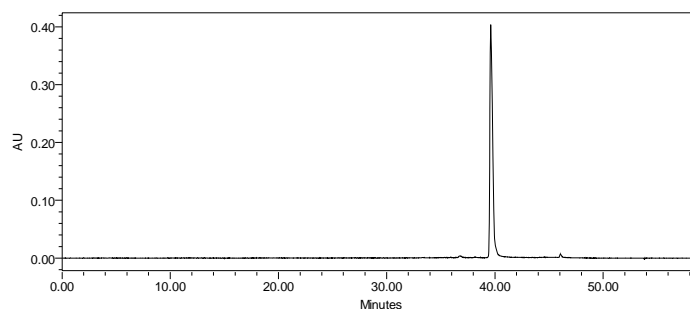


Figura 137 – Cromatograma de eluição gradiente da **Fração C₈ 9** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 253,4$ nm, $t_R = 39,732$ min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

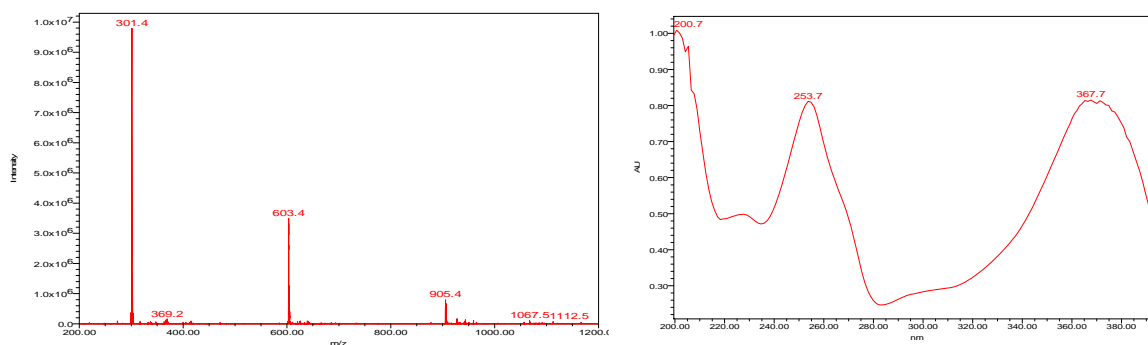
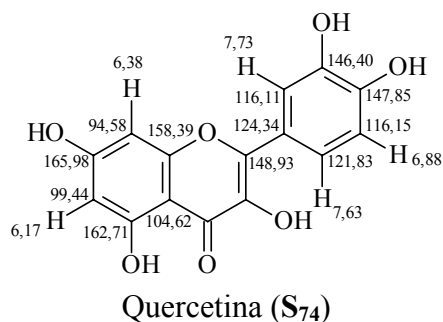


Figura 138 – Espectros de MS e de UV da Fração C₈ 9.

Tabela 31 – Dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC para a substância da Fração C₈ 9.

Posição	RMN ¹ H (δ = ppm)	gHMBC
6	6,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,07 Hz)	165,98; 162,71; 104,62 e 94,59
7	-	-
8	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,07 Hz)	165,98; 158,39; 104,62 e 99,47
2'	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,16 Hz)	148,93; 147,85; 146,40 e 121,87
5'	6,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,50 Hz)	149,93; 147,85; 146,40 e 124,34
6'	7,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,50 Hz e 2,16 Hz)	148,93; 147,85; 146,40 e 116,11



4.3.3.2.2 - Constituintes Químicos da **Fração C₈ 4**

A **Fração C₈ 4** foi proveniente do fracionamento por HPLC-UV da Fração do EBMI. Por meio da análise preliminar do espectro de RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, **Figuras 141-142**, p. 182-183) pode-se verificar que a amostra tratava-se de mistura de flavonóides glicosilados pertencentes às Classes I e III.

Após análise do espectro de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e mapa de correlações de gHSQC (DMSO-*d*₆, 400 MHz, **Figuras 143-144**, p. 184-185) foi possível atribuir os sinais dos hidrogênios para as Classes indicadas das substâncias presentes na **Fração C₈ 4** (**Figura 139**, p. 180), observou-se também que há uma sinal em δ 12,63 ppm referente ao sinal de hidrogênio de hidroxila quelada, informando que há flavonóide com a posição C-5 hidroxilada.

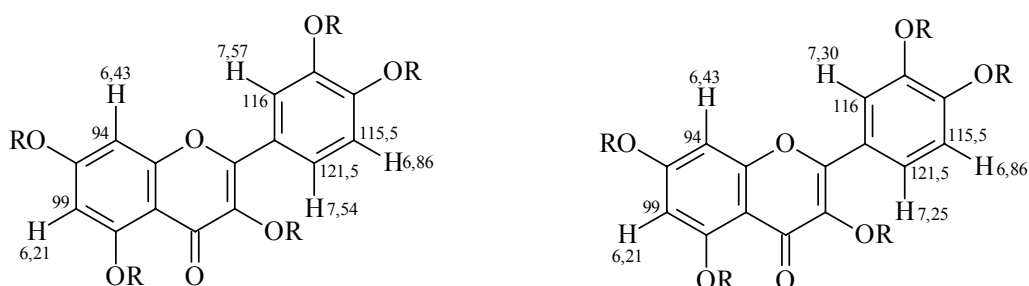


Figura 139 – Dados de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e gHSQC (DMSO-*d*₆, 400 MHz) para as agliconas da **Fração C₈ 4**.

Ainda analisando o espectro de RMN ¹H e o mapa de correlações de gHSQC verificou-se sinais de hidrogênio anomérico correspondentes ao resíduo de ramnose em δ 5,25 ppm (*sl*, β -L-ramnosídeo) correlacionando com δ 104,6 ppm; e os sinais correspondentes aos sinais de hidrogênios anoméricos de resíduos de arabinosil em δ 5,26 ppm (*d*, J = 5,4 Hz) de 3-*O*- β -L-arabinofuranosídeo, δ 5,34 ppm (*d*, J = 7,3 Hz) de 3-*O*- α -D-arabinopiranosídeo e δ 5,58 ppm (*d*, J = 1,3 Hz) de 3-*O*- α -D-arabinofuranosídeo, com correlações gHSQC com os sinais em δ 104,36 ppm e δ 109,00 ppm, respectivamente. Estes dados estão de acordo com os dados apresentados nas

(S₇₅); m/z 433,5 D relativo aos Quercetina-3-*O*- β -L-arabinofuranosídeo (S₇₆) + Quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (S₇₇); m/z 447,4 D relativo à Quercetina 3-*O*- β -L-ramnosídeo (S₆₈) e m/z 598,3 D (impureza) para as bandas A, B, C e D, respectivamente.

Tabela 32 – Dados de gHMBC para Flavonóide da Fração C₈ 4 (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ = ppm).

Posição	S ₇₅	S ₇₆
	gHMBC	gHMBC
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	94,0; 104,0; 161,0 e 164,0	94,0; 104,0; 161,0 e 164,0
7	-	-
8	99,0; 104,0; 156,0 e 164,0	99,0; 104,0; 156,0 e 164,0
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	121,5; 145,0 e 156,5	-
3'	-	-
4'	-	-
5'	122,0; 145,0 e 148,8	122,0; 145,0 e 148,8
6'	122,0; 145,0; 148,8 e 156,5	-

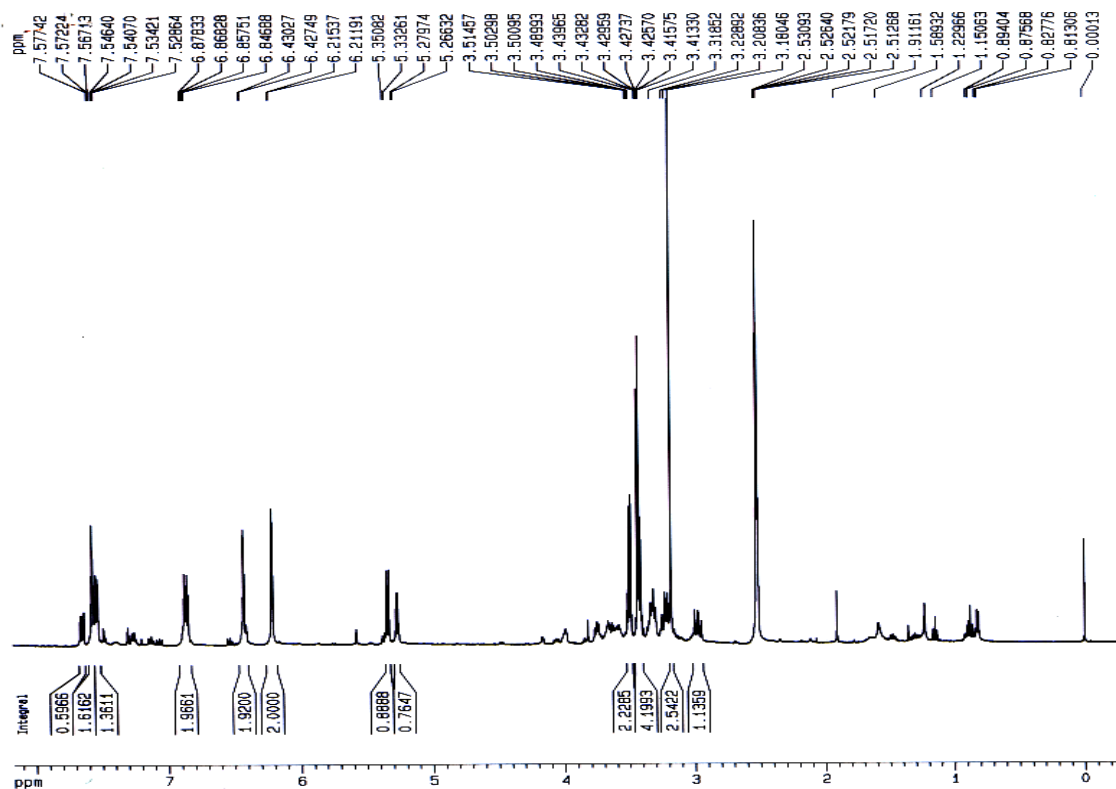


Figura 141 – Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₈ 4.

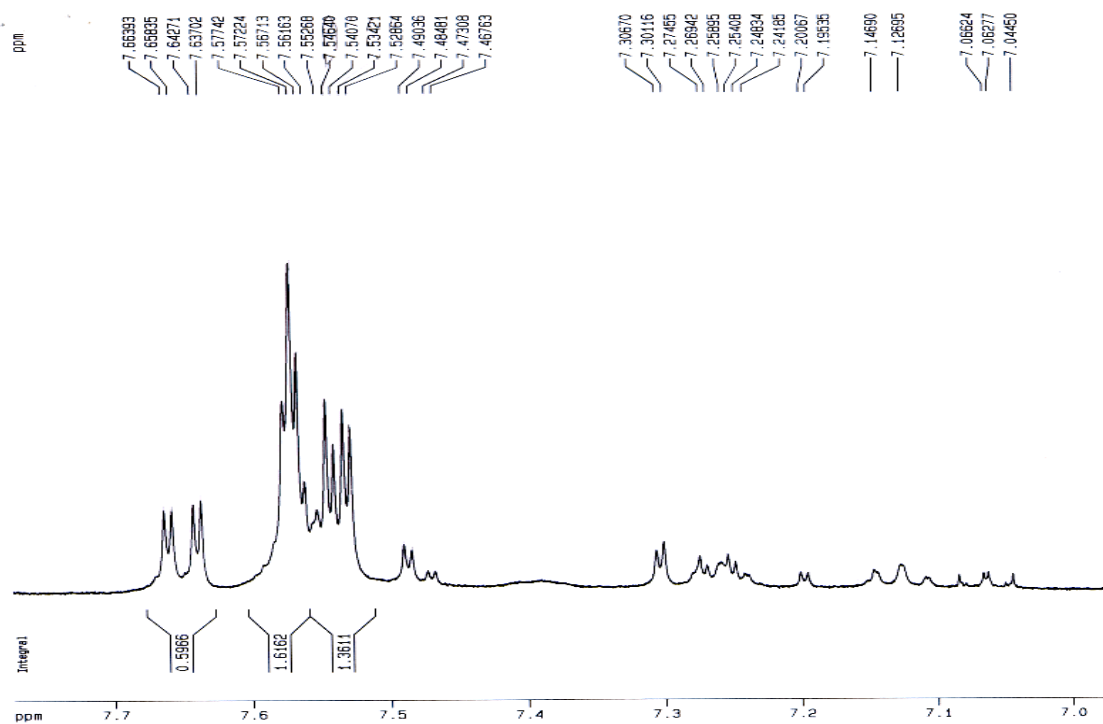


Figura 142 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₈ 4.

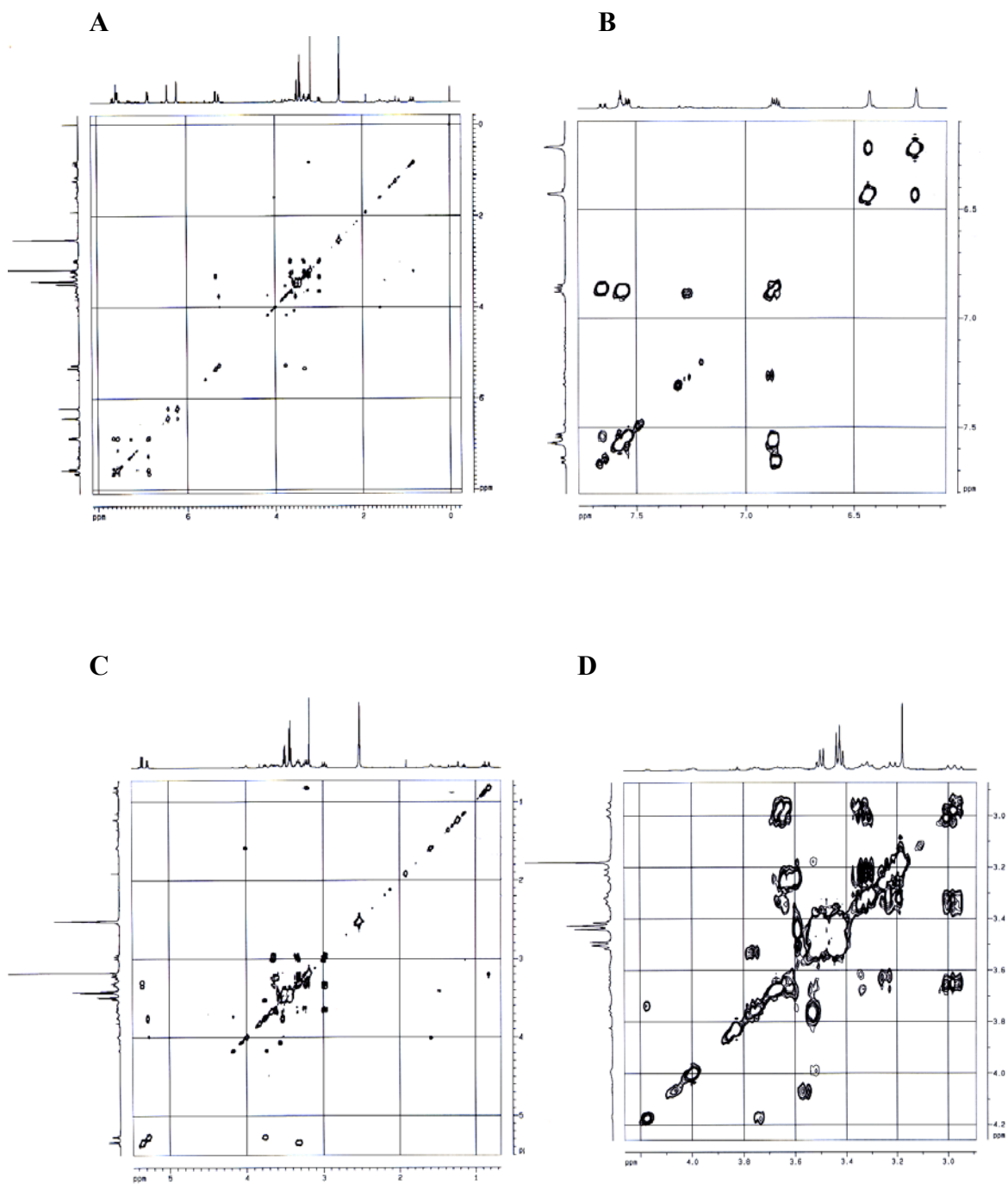


Figura 143 – Espectro de $g\text{COSY } ^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) da Fração $\text{C}_8 4$ (A) e ampliações nas regiões de sinais H dos glicosídeos (B - D).

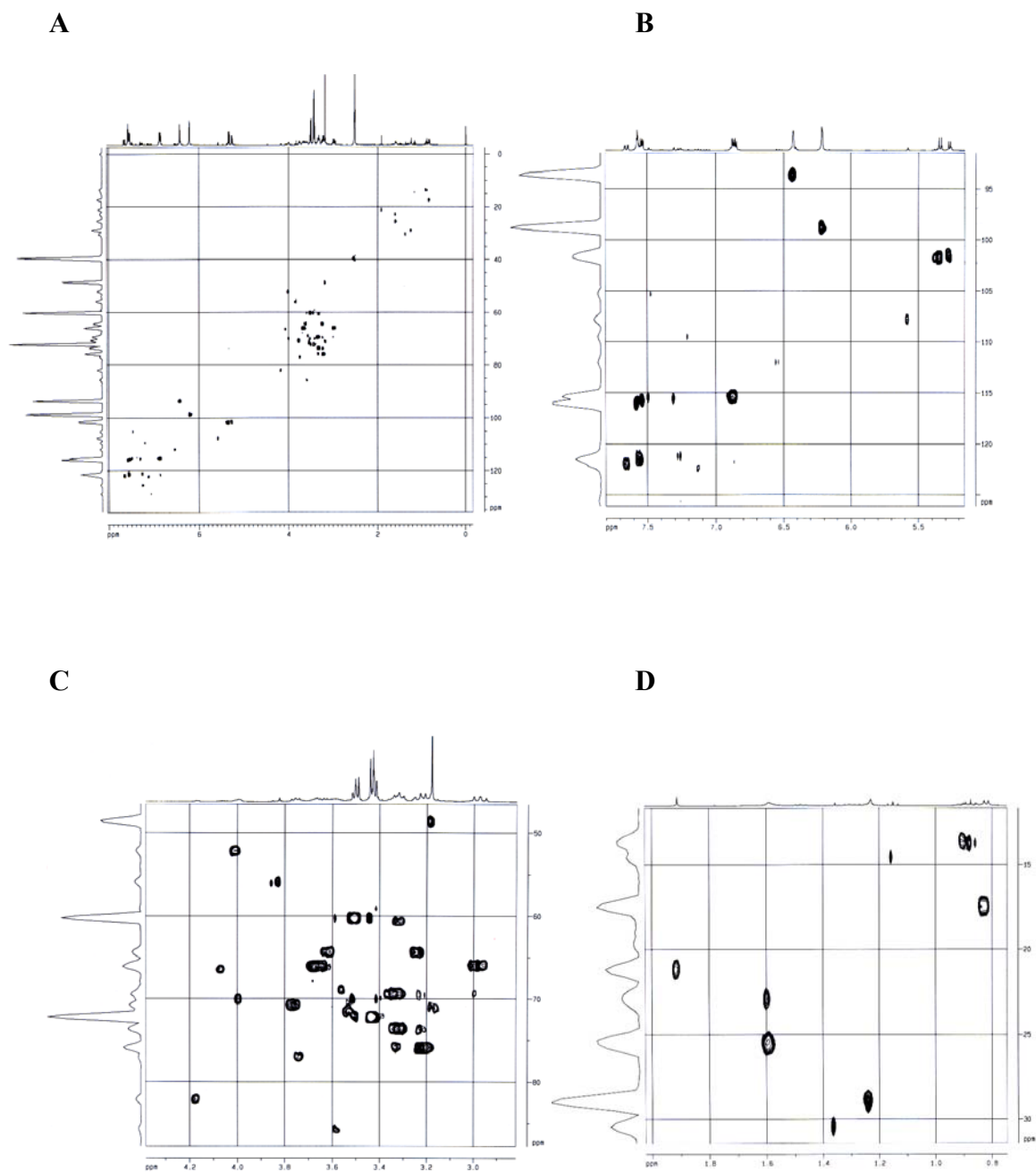


Figura 144 – Mapa de correlações de gHSQC (DMSO-*d*₆, 400 MHz) da **Fração C₈ 4** (A); ampliações na região de sinais H aromáticos (B) e de H dos glicosídeos (C - D).

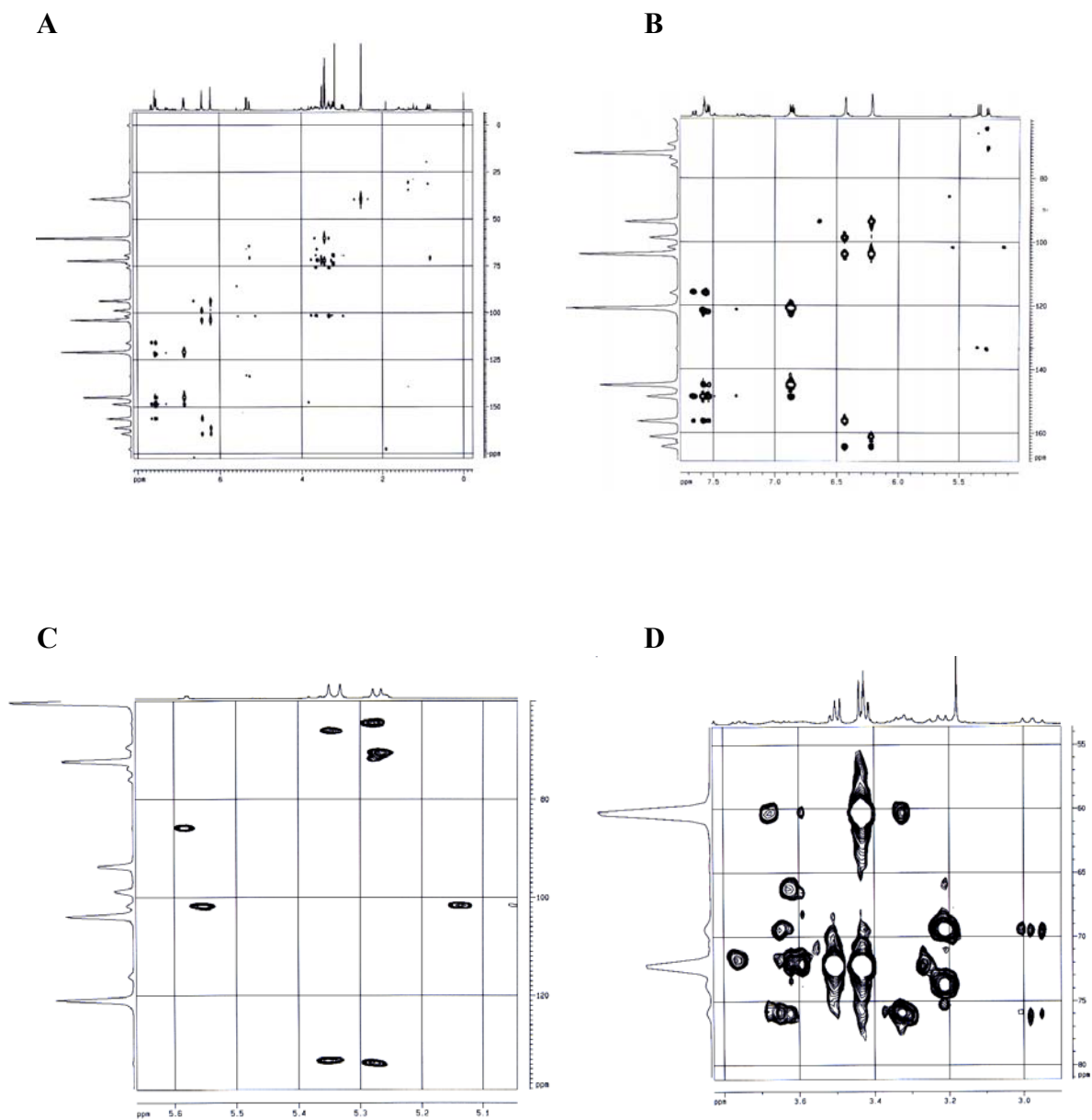


Figura 145 – Mapa de correlações de gHMBC (DMSO- d_6 , 400 MHz) da Fração C₈ 4 (A); ampliações na região de sinais H aromáticos (B) e de H dos glicosídeos (C - D).

Portanto, foram identificadas nesta fração às substâncias **S75**, **S76**, **S77**, e **S68**.

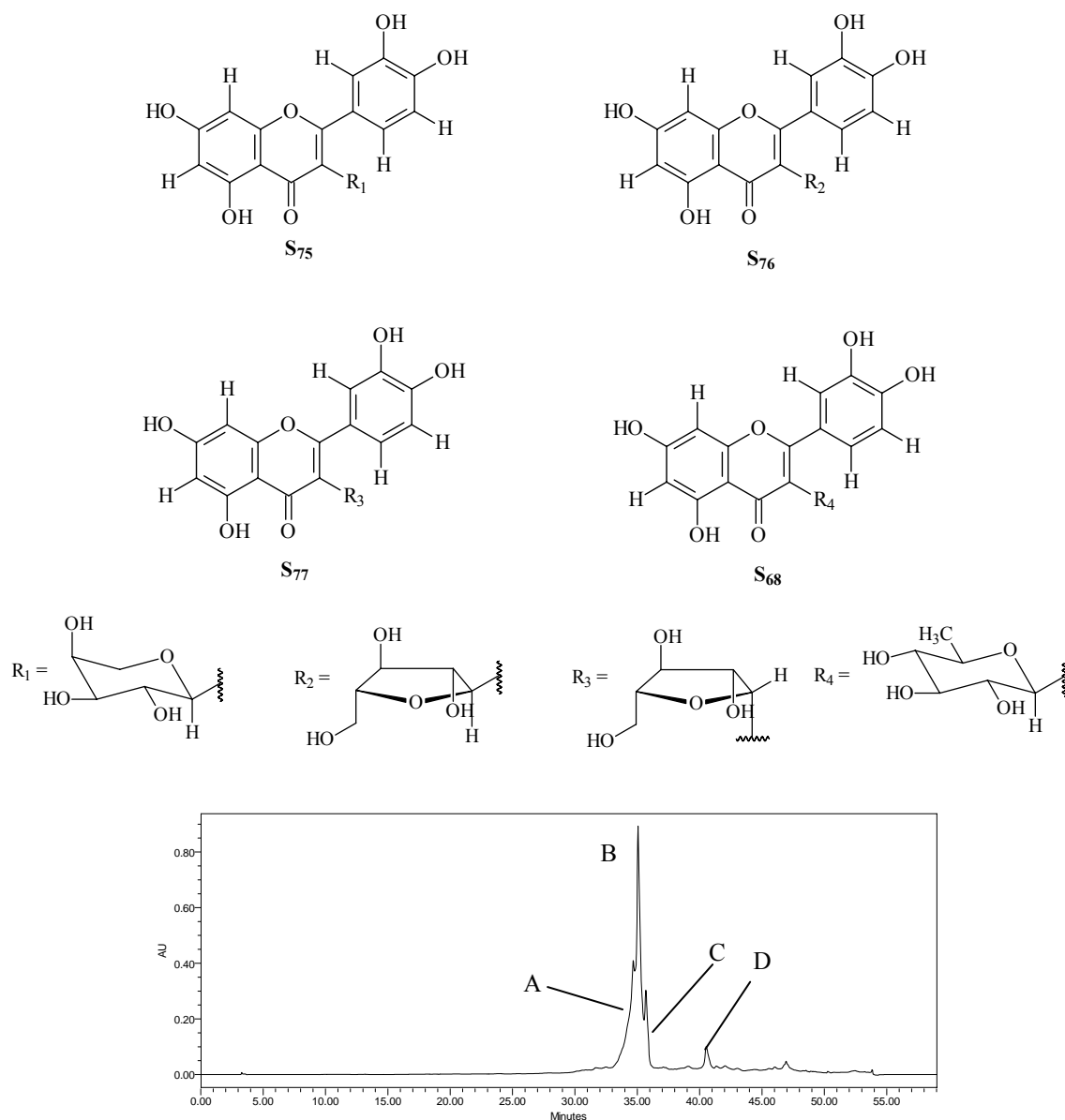
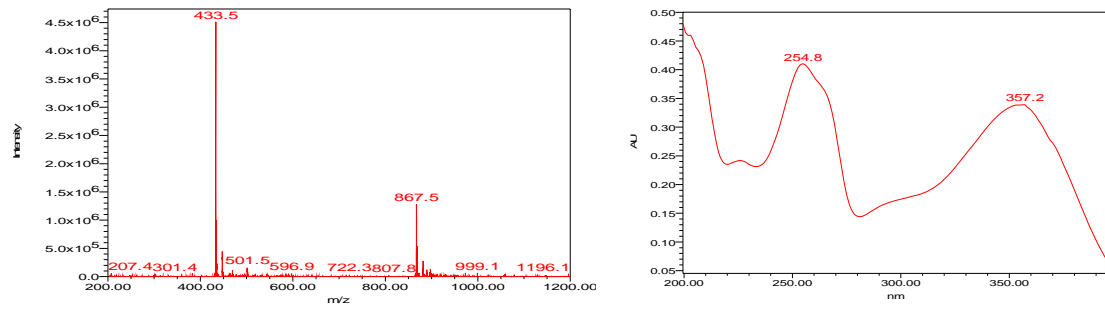
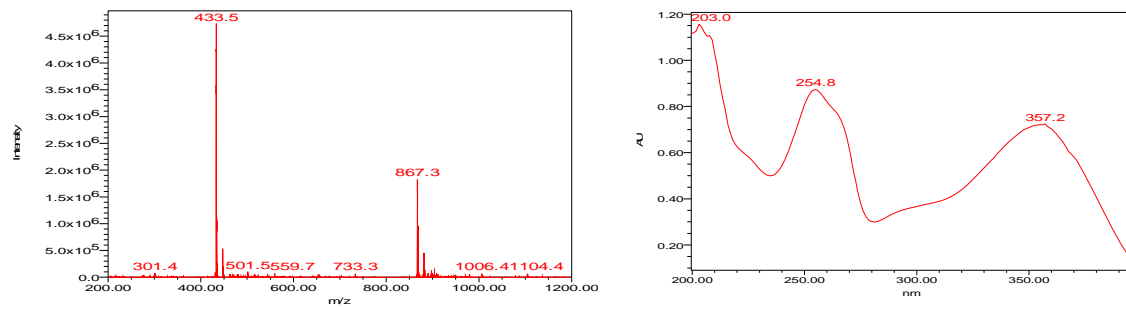


Figura 146 – Cromatograma da **Fração C₈ 4** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 288,2$ nm; t_R : A = 34,677 min.; B = 35,083 min.; C = 35,692 min. e D = 40,553 min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

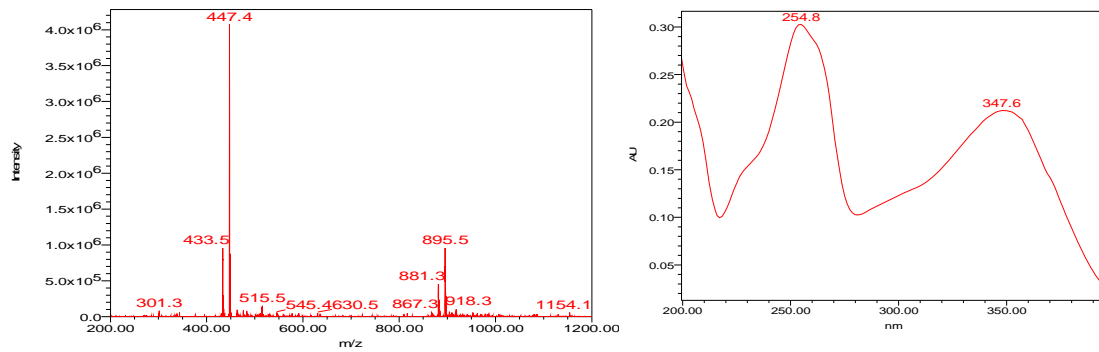
A



B



C



D

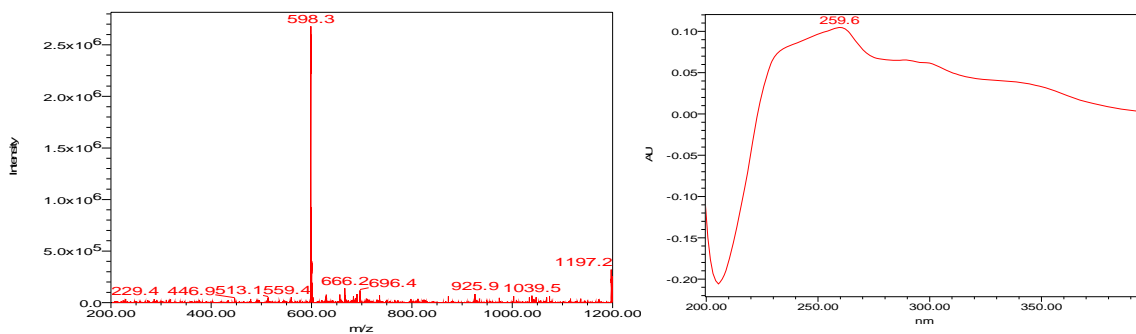


Figura 147 – Espectros de MS e de UV da Fração C₈ 4.

4.3.3.2.3 - Constituintes químicos da **Fração C₈ 2**.

A **Fração C₈ 2** apresentou compostos (**Figura 148**) com perfis de substituições característicos de flavonóides glicosilados pertencentes às Classes I e III, desta forma foram atribuídos os dados obtidos dos espectros de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e gHSQC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 149-154**, p. 190-193) para as agliconas correspondentes a estas classes referidas. Verificou que são dois da Classe I e apenas um da Classe III.

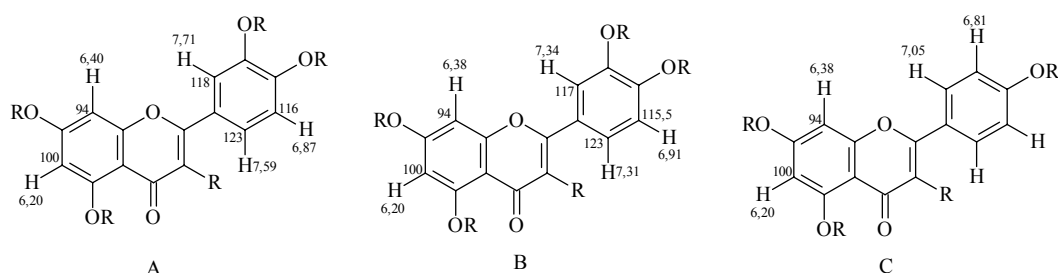


Figura 148 – Agliconas das Classes I e III com os dados obtidos dos espectros de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e mapa de correlações de gHSQC da **Fração C₈ 2**.

Os sinais relativos aos de hidrogênios anoméricos em $\delta = 5,26$ ppm (d , $J = 7,46$ Hz) com correlação ¹ J com δ 103 ppm e ² J com δ 135 ppm, δ 5,34 ppm (d , $J = 1,49$ Hz) com correlação ¹ J com δ 103 ppm e ² J com δ 136 ppm e δ 4,80 ppm (d , $J = 7,00$ Hz) com correlação não observada em razão da baixa concentração deste constituintes, são característicos de 3-*O*- β -D-glicose, 3-*O*- α -L-ramnose e 4'-*O*- β -D-glicose. Estes dados foram comparados com as constantes de acoplamento e deslocamento químico com os das **Tabelas 3-5** (p. 64-67) e da literatura para carbono-13 de glicosídeos (**106**).

Os dados obtidos do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figura 155**, p. 193) encontram-se listados na **Tabela 33** (p. 194) e observou-se que as correlações dos sinais dos hidrogênios anoméricos confirmam as propostas das posições dos glicosídeos. As estruturas propostas para os flavonóides da **Fração C₈ 2** com os valores obtidos deste e dos outros experimentos de RMN encontram-se na **Tabela 33** (p. 194).

De acordo com o que foi analisado foi possível propor que as substâncias presentes na **Fração C₈ 2** são A: Quercetina-3-*O*-β-D-glicosídeo (**S₇₈**), B: Quercetina-3-*O*-α-L-ramnosídeo (**S₇₉**) e C: 3,5,7-trihidroxi-flavona-4'-*O*-β-D-glicosídeo (**S₈₀**).

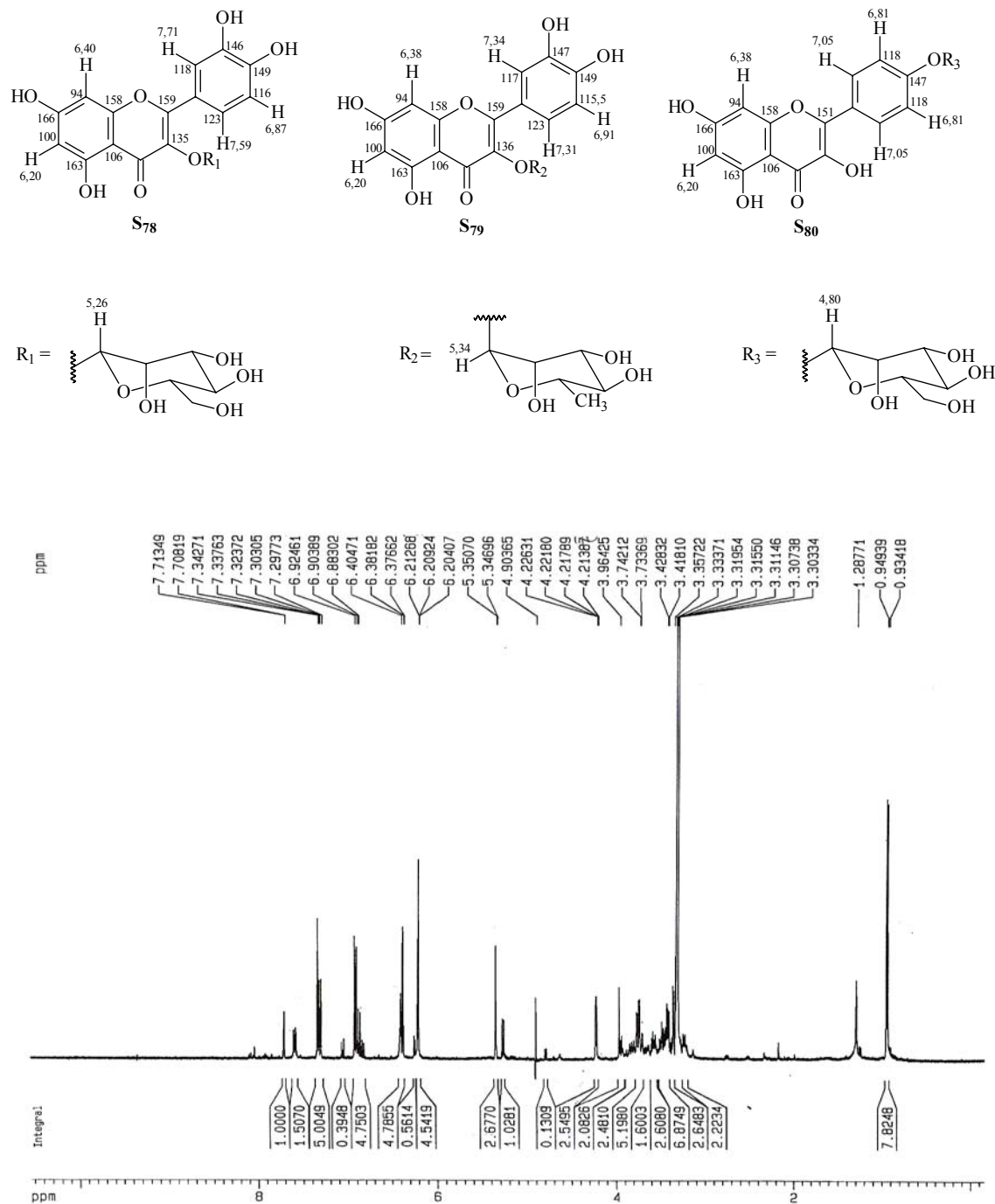


Figura 149 – Espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₈ 2**.

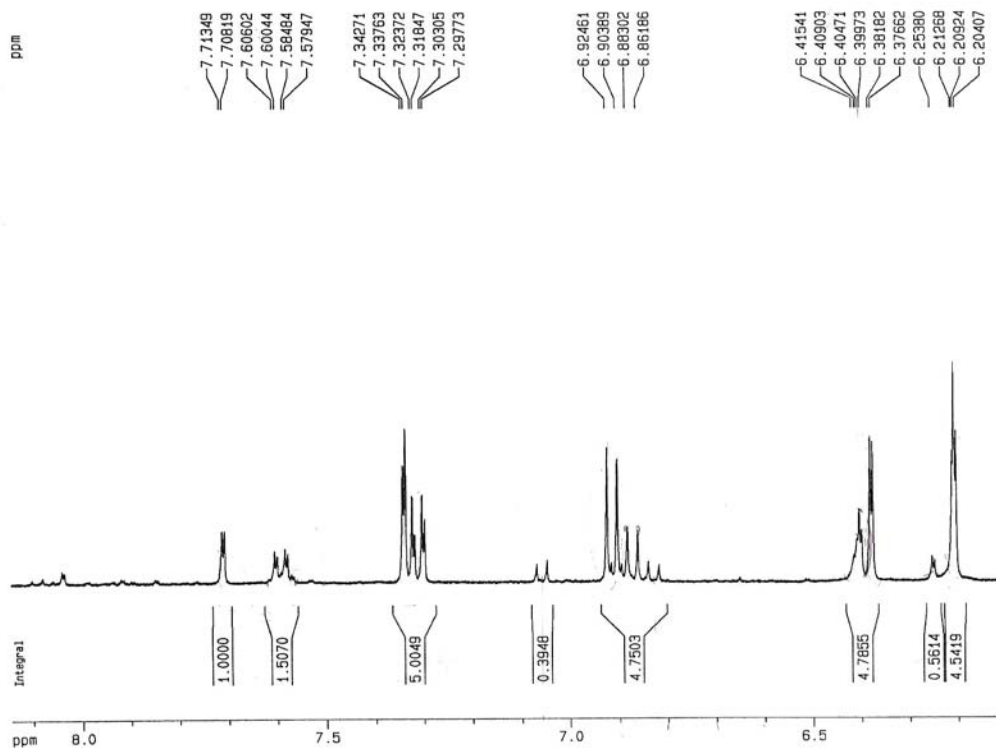


Figura 150 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2.

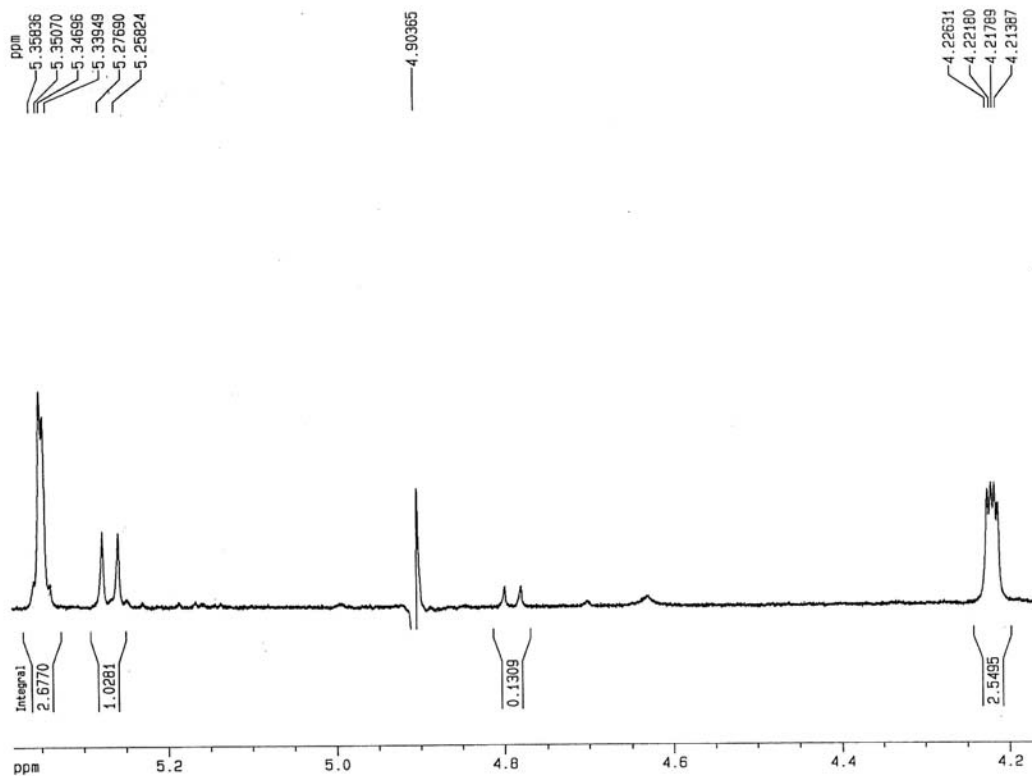


Figura 151 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2.

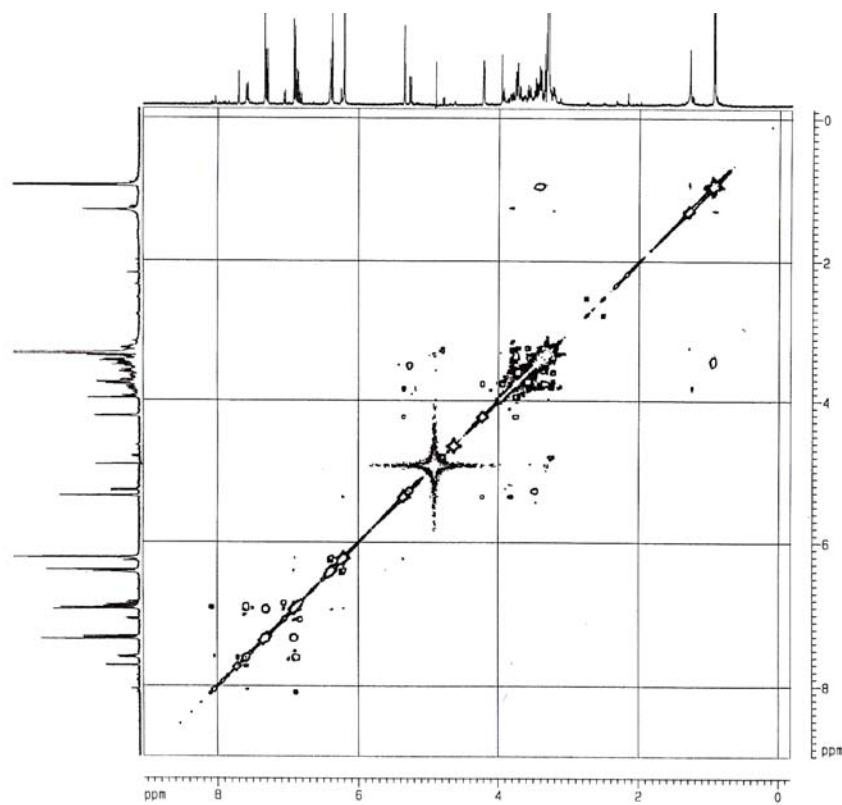


Figura 152 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₈ 2**.

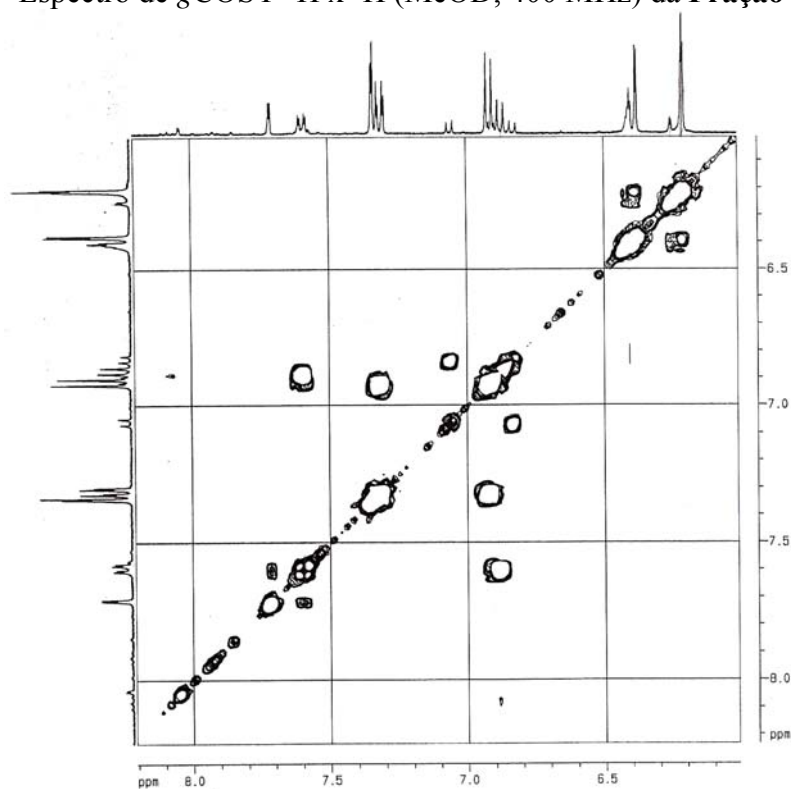


Figura 153 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₈ 2**.

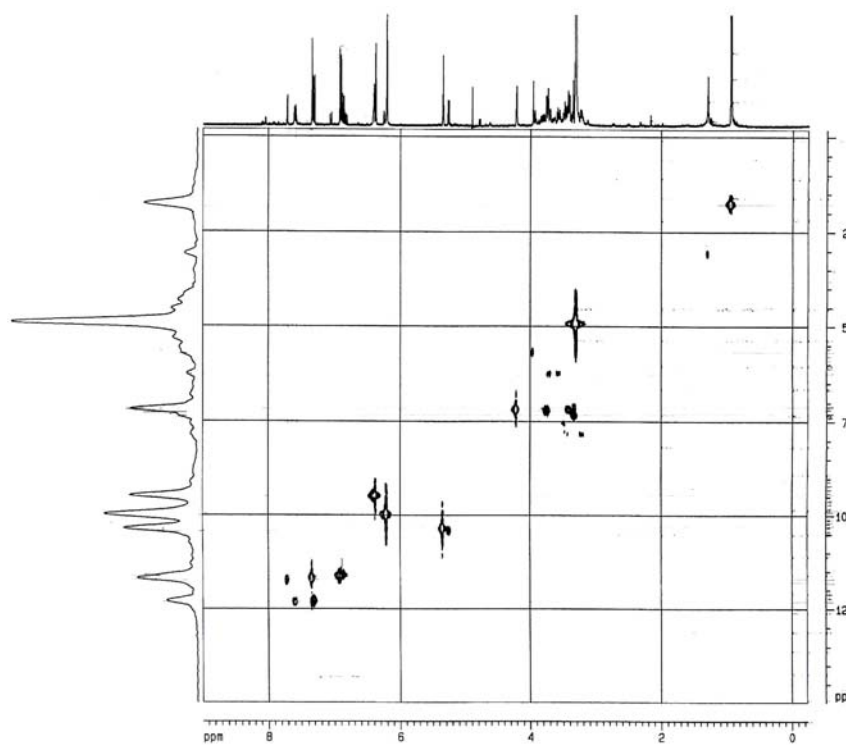


Figura 154 – Mapa de correlação de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2.

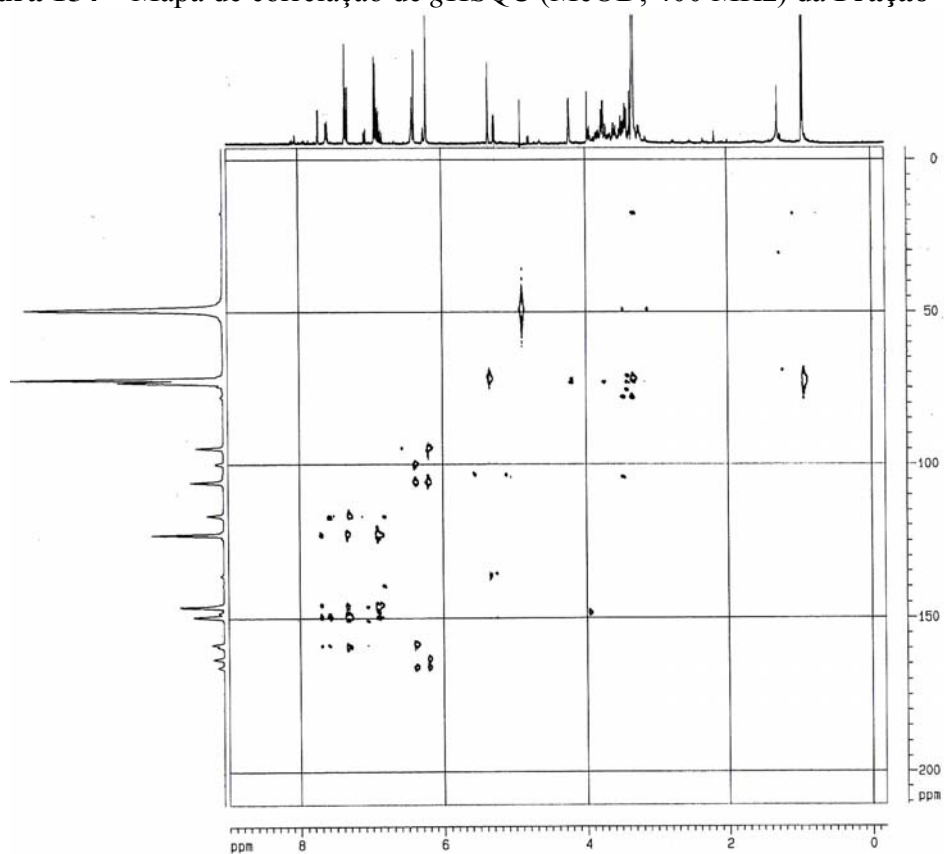


Figura 155 – Mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 2.

Tabela 33 – Dados espectrais para os compostos da **Fração C₈ 2** (δ = ppm).

Posição	RMN ¹ H/ gHSQC	gHMBC	RMN ¹ H/ gHSQC	gHMBC	RMN ¹ H/ gHSQC	gHMBC
	A	A	B	B	C	C
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	6,2/100	166; 163; 106 e 95	6,2/100	166; 163; 106 e 95	6,2/100	166; 163; 106 e 95
7	-	-	-	-	-	-
8	6,4/94	166; 158; 106 e 100	6,38/84	166; 158; 106 e 100	6,38/94	166; 158; 106 e 100
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-	-
2'	7,71/118	159; 149; 146 e 123	7,34/117	159;149; 147; e 123	7,05/-	151 e 147
3'	-	-	-	-	6,81/-	118
4'	-	-	-	-	-	-
5'	6,87/116	149; 146 e 123	6,91/115,5	159; 149; 147 e 117	6,81/-	118
6'	7,59/123	159; 149 e 118	7,31/123	149;147 e 123	7,05/-	151 e 147
1''	5,26/103	135	5,34/103	136	4,80/-	-

4.3.3.2.4 - Constituintes químicos da **Fração C₈ 6**

A análise do espectro de RMN ^1H (**Figuras 158-160**, p. 197-198) sugeriu a presença de flavonóides glicosilados pertencentes às Classes I e II, desta forma os dados dos sinais obtidos dos espectros de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e mapa de correlação gHSQC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 161-165**, p. 199-201) foram indicados nas agliconas (**Figura 156**). Os dados relativos aos sinais observados no mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 166-168**, p. 201-202) encontram-se indicados nas agliconas da **Figura 157**, sendo duas da Classe I e três da Classe II caracterizadas pelos sinais dos anéis B (Classe I: δ 7,74 ppm, *d*; δ 7,58 ppm, *dd*; δ 6,85 ppm, *d*; δ 7,60 ppm *d*; δ 7,58 ppm, *dd* e δ 6,87 ppm *d*; Classe II: δ 7,38 ppm; δ 7,23 ppm e δ 7,13 ppm).

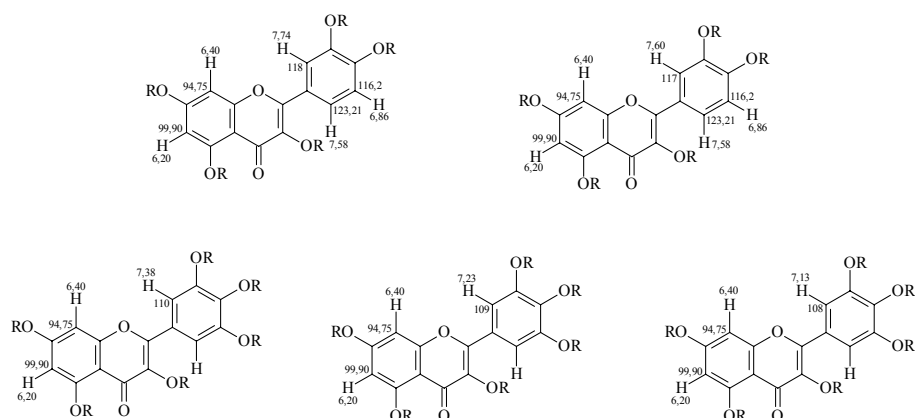


Figura 156 – Dados dos espectros de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ e mapa de correlações de gHSQC para as agliconas da **Fração C₈ 6**.

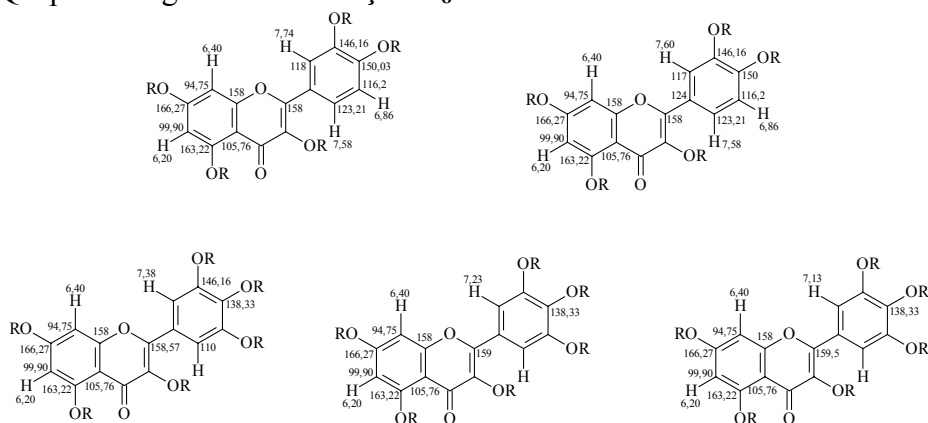
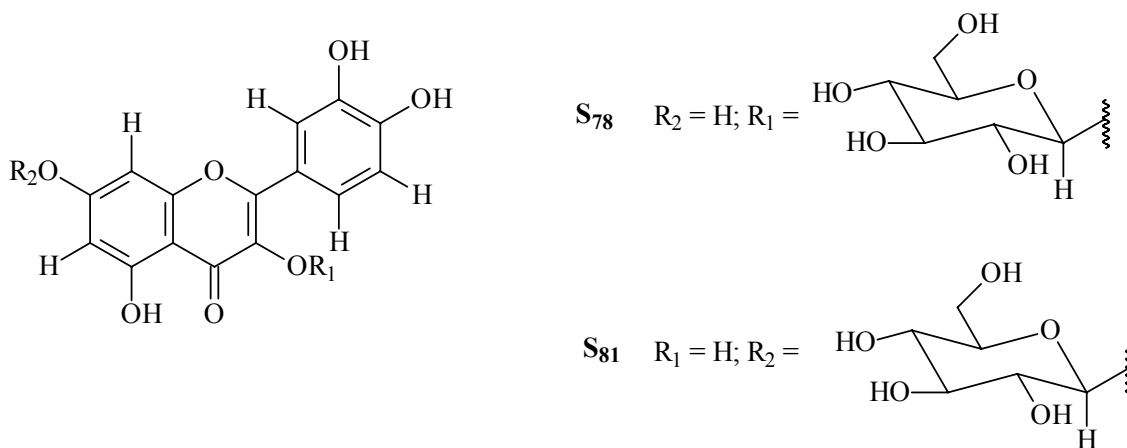


Figura 157 - Dados do mapa de correlações de gHMBC para as agliconas da **Fração C₈ 6**.

Analisando o espectro de RMN ^1H na região de sinais de hidrogênios anoméricos verificou-se que os sinais em δ 5,46 ppm (*sl*, α -L-arabinofuranosídeo) com correlação 1J com δ 109 ppm e 3J com δ 88 ppm; δ 5,24 ppm (*d*, $J = 2,9$ Hz, 3'-O- α -D-glicopiranosídeo) com correlação 1J com δ 104 ppm e 2J com não detectada; δ 5,25 ppm (*d*, $J = 2,9$ Hz, 7-O- α -D-glicopiranosídeo) com correlação 1J com δ 104 ppm e 2J não detectada; δ 5,19 ppm (*d*, $J = 6,9$ Hz, 7-O- β -D-glicopiranosídeo) com correlação 1J com δ 104 ppm e 2J não detectada; δ 5,18 ppm (*d*, $J = 7,0$ Hz, 3-O- β -D-glicopiranosídeo) com correlação 1J com δ 104 ppm e 2J com δ 136 ppm (C-3) e δ 5,15 ppm (*d*, $J = 6,7$ Hz, β -D-glicopiranosídeo) com correlação 1J com δ 104 ppm e 2J não detectada. Por meio da integração dos sinais de deslocamentos propõe-se que a aglicona da Classe I com maior deslocamento (δ 7,74 ppm) está em maior proporção na mistura e deve estar ligada por meio do seu carbono 3 com a glicose (**S₇₈**). A outra aglicona da Classe I que esta presente numa concentração próxima a anterior deve estar ligada à glicose, mas por meio do carbono 7 (**S₈₁**). Duas agliconas da Classe II estão ligadas à α -D-glicoses nas posições 7 e 3' (**S₈₂** e **S₈₃**, respectivamente) e a última à arabinoglicosil na posição 7 da aglicona e 1 da glicose (**S₈₄**).

Por meio das análises dos dados espectroscópicos pode-se propor que os compostos presentes na **Fração C₈ 6** são:



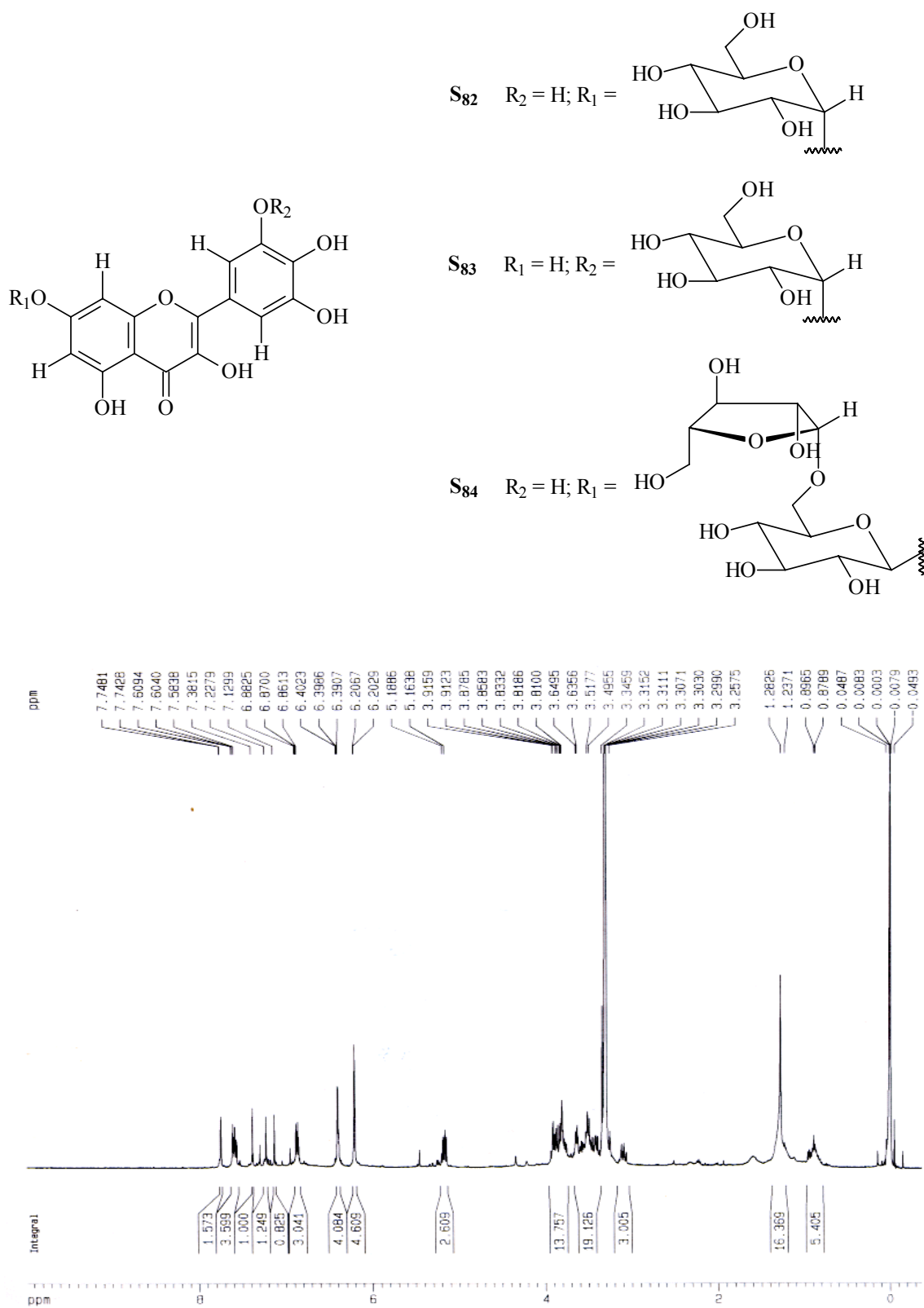


Figura 158 - Espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

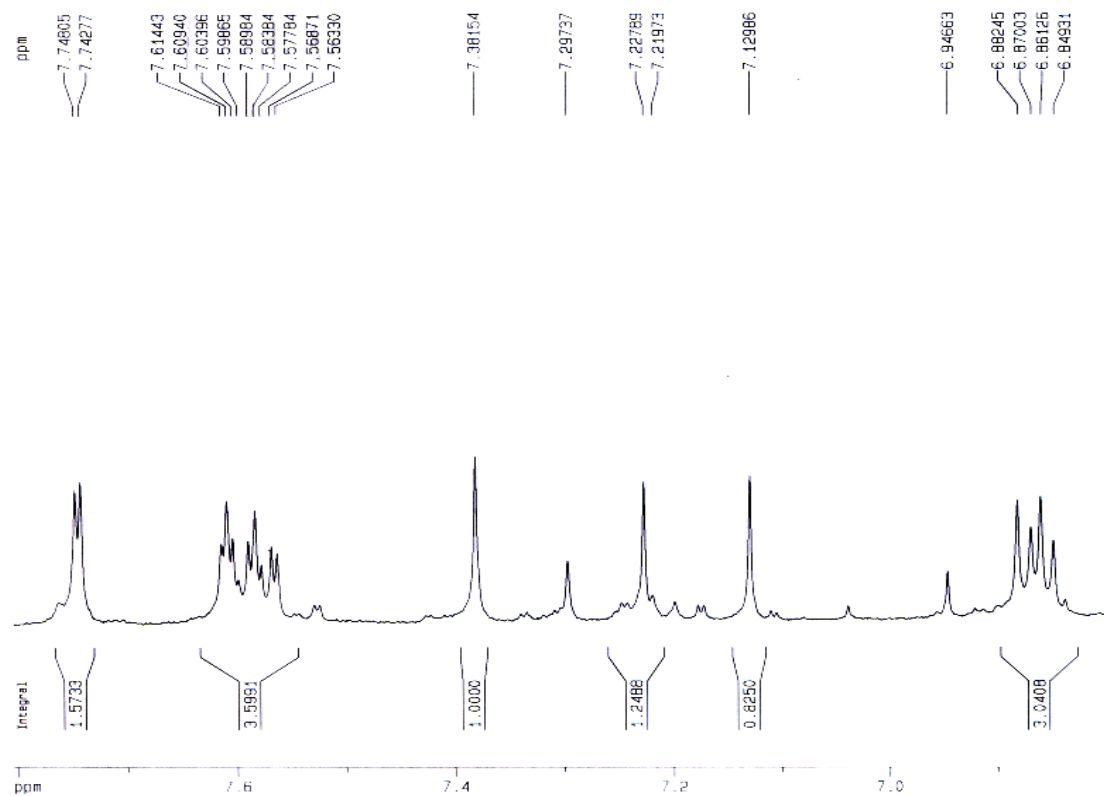


Figura 159 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

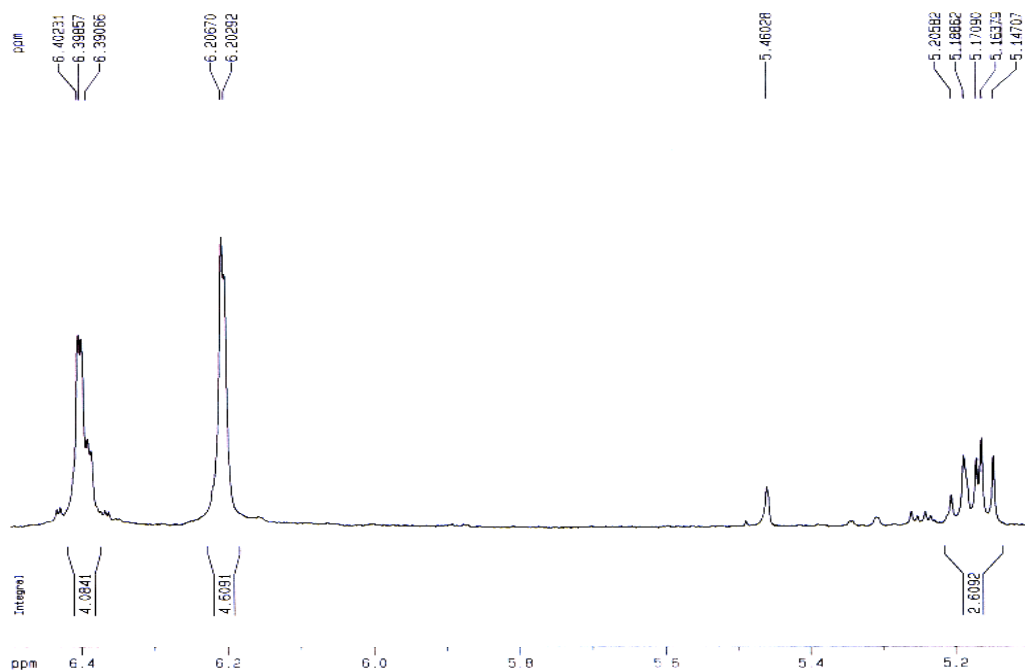


Figura 160 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

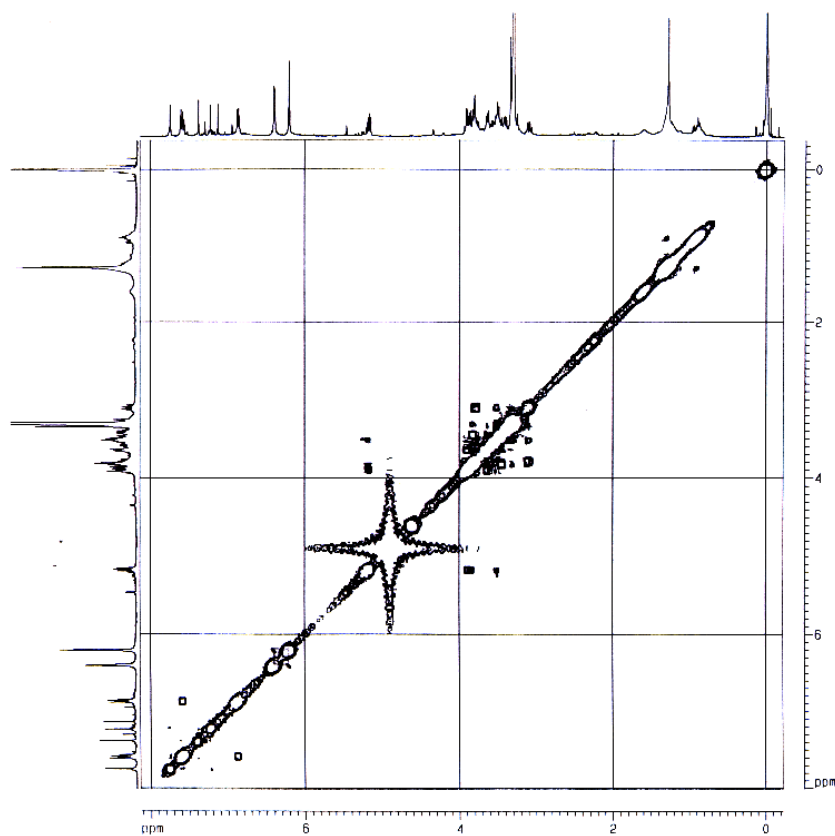


Figura 161 - Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

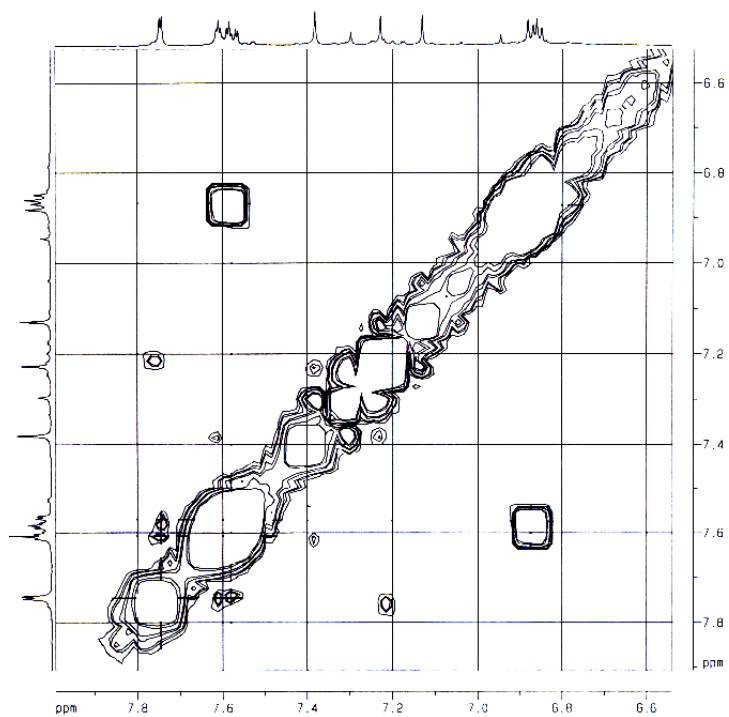


Figura 162 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

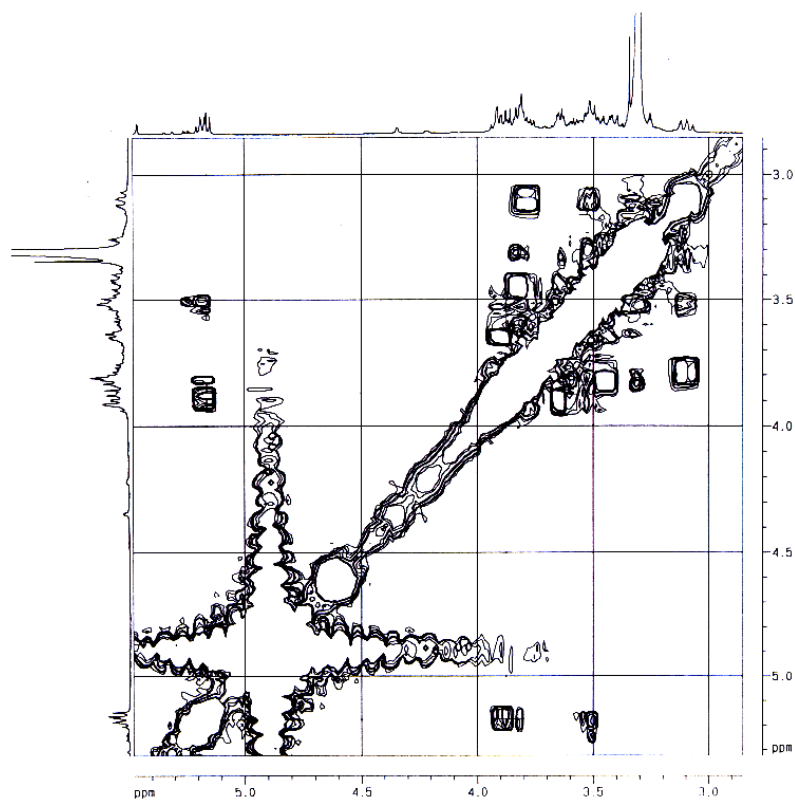


Figura 163 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

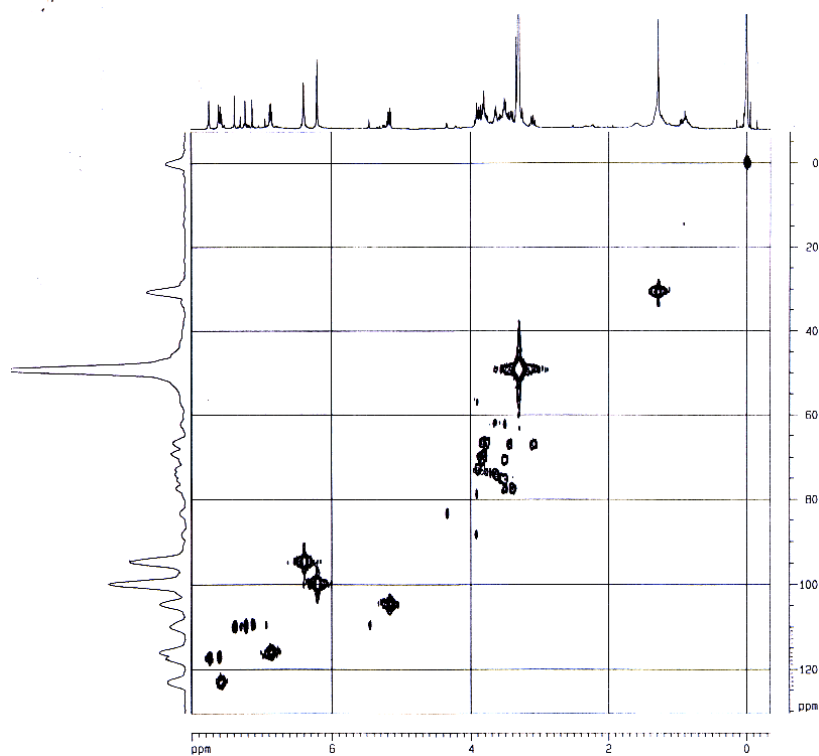


Figura 164 – Mapa de correlação de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

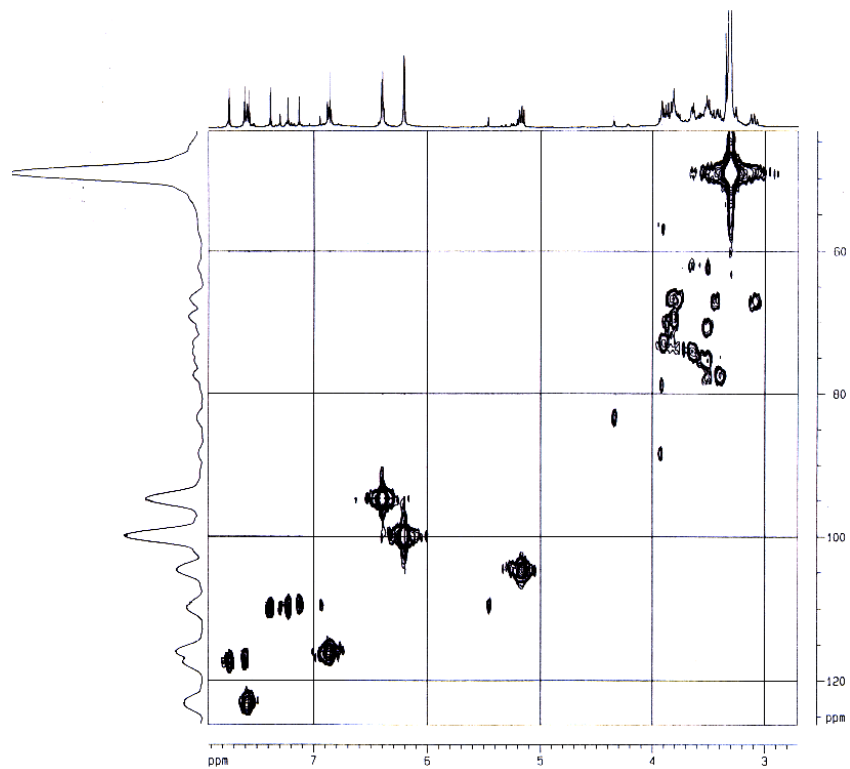


Figura 165 – Ampliação do mapa de correlação de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

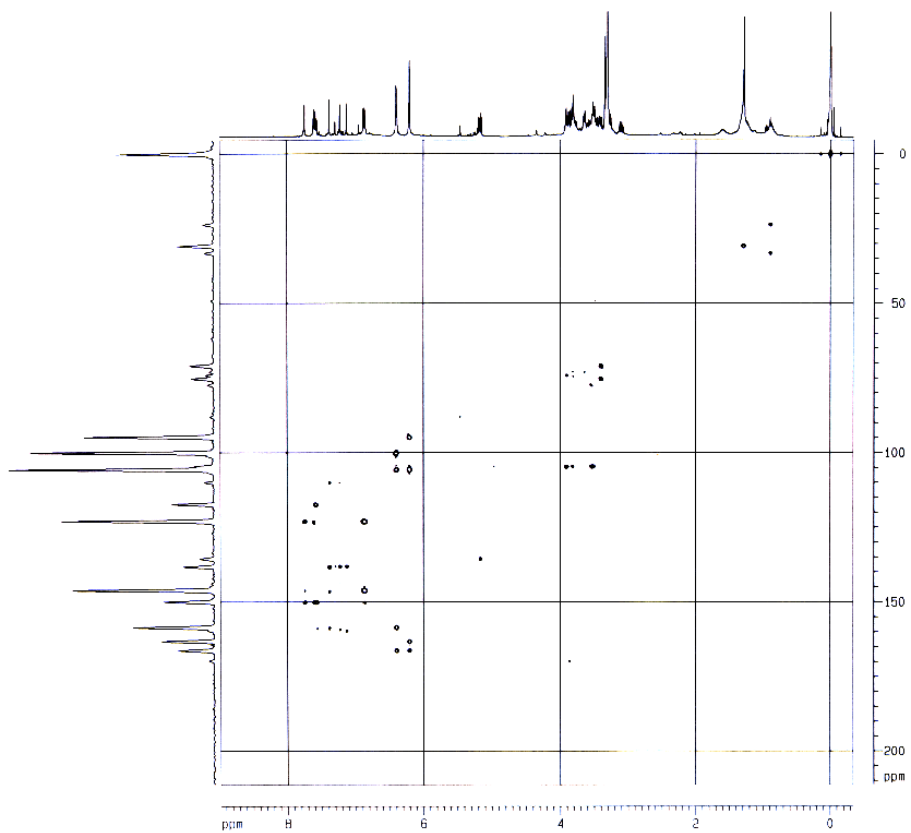


Figura 166 - Mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

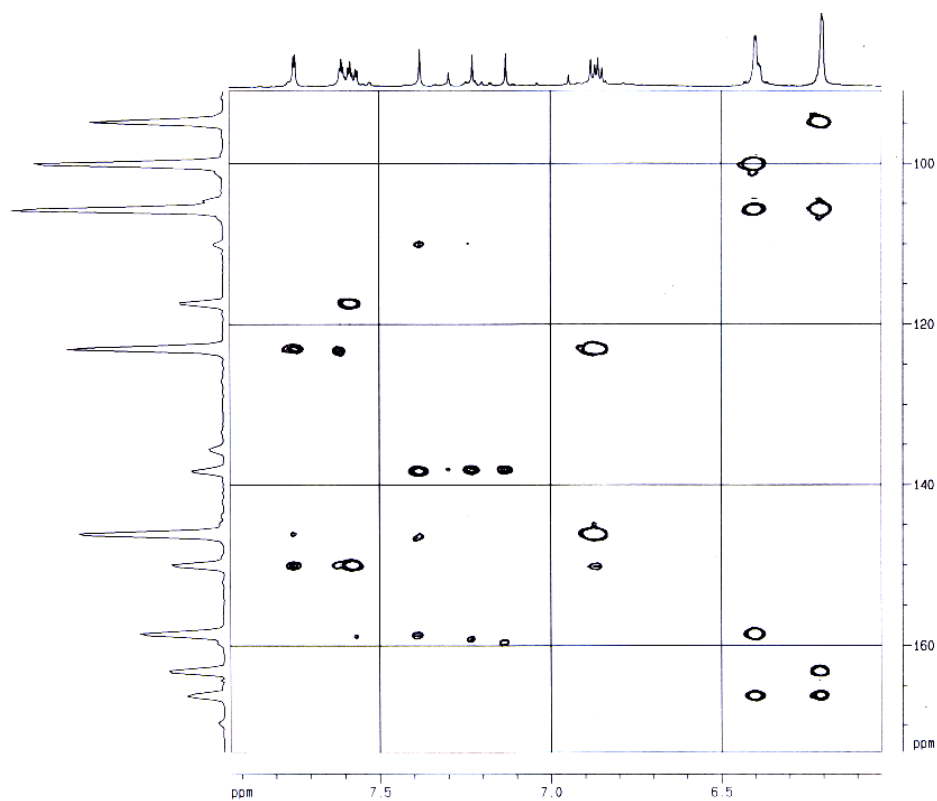


Figura 167 – Ampliação do mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

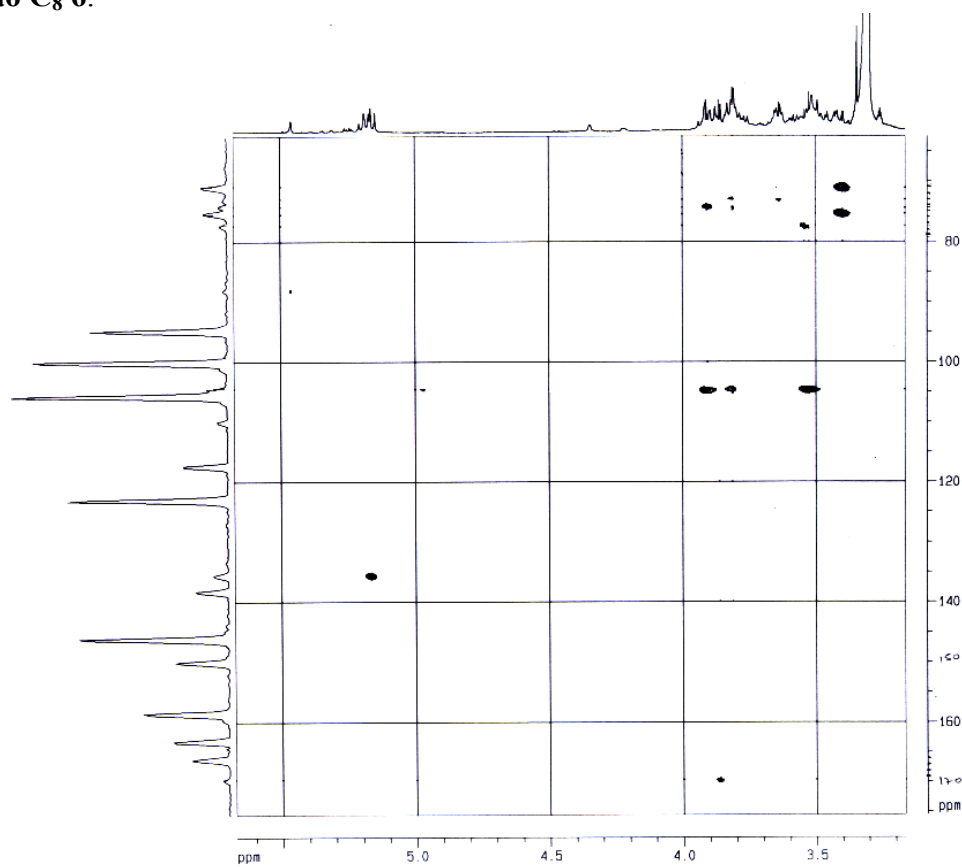


Figura 168 – Ampliação do mapa de correlação de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₈ 6.

4.3.4 - Determinação Estrutural dos Constituintes do EBMP de *S. adstringens*

O EBMP teve as mesmas características do EBMI, ou seja, uma quantidade bastante elevada de pigmentos e açúcares, desta forma optou-se pela mesma metodologia para o fracionamento cromatográfico por meio de CC com fase estacionário Sephadex[®] LH – 20 para posterior análise por HPLC – UV preparativo. As frações provenientes destes fracionamentos foram submetidas à análise por RMN 1D e 2D com objetivo de indentificar os constituintes presentes nas frações obtidas.

4.3.4.1. - Constituintes Químicos da Fração C₁₂ 3

As análises preliminares do espectro de RMN ¹H e gCOSY ¹H x ¹H (MeOD, 400 MHz, **Figuras 171-175**, p. 205-207) da **Fração C₁₂ 3** indicaram a presença de flavonóides glicosilados pertencentes às Classes I e II. Assim, foram atribuídos os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios nas Classes propostas e a partir dos dados obtidos do mapa de correlações de gHSQC (**Figura 176**, p. 207) determinaram-se os valores dos deslocamentos dos sinais dos carbonos hidrogenados (¹J). Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelo mapa de correlações de gHMBC por meio das correlações heteronucleares (**Figuras 177-178**, p. 208).

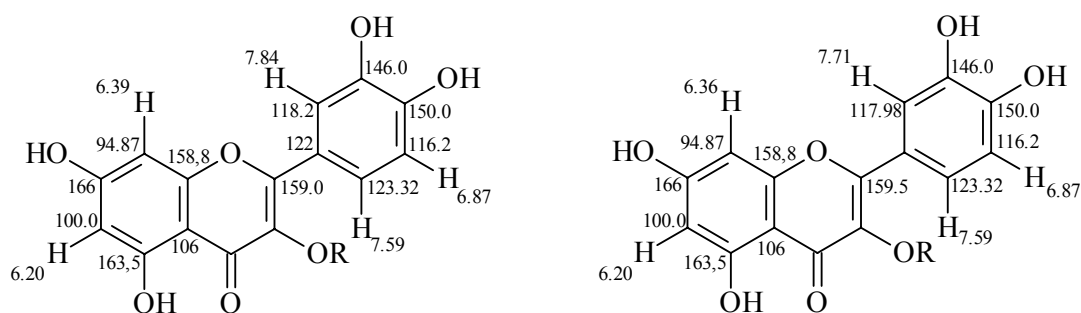


Figura 169 - Dados dos espectros de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H e mapa de correlações gHSQC para as agliconas da **Fração C₁₂ 3**.

Pela análise do mapa de correlações de gHMBC (**Figuras 177-178**, p. 208), os sinais dos H-anoméricos correlacionam-se com o sinal do C-3 ($\sim \delta$ 136 ppm), ou seja, os flavonóides se diferenciaram pelo resíduo de açúcar. Observando o espectro de RMN ^1H e o mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz, **Figura 176**, p. 207) na região de sinais de hidrogênios anoméricos pode-se constatar por meio dos dados obtidos das **Tabelas 3-5** (p. 64-67) que os sinais em δ 5,35 ppm e δ 5,31 ppm (d , $J \sim 1$ Hz, $^1J_{\text{C}}$ 103 cada) são característicos α -L-ramnose, os sinais em δ 0,96 ppm (d , $J = 6,17$ Hz) e em δ 0,94 ppm (d , sobreposto ao anterior) confirmaram a presença dos dois resíduos deste glicosídeo. Os outros sinais de H-anoméricos em δ 5,46 ppm (d , $J \sim 2,5$ Hz, $^1J_{\text{C}}$ 103) e δ 5,25 ppm (d , $J = 7,5$ Hz, $^1J_{\text{C}}$ 103), pertencem a 3-*O*- β -L-arabinofuranosídeo e 3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, respectivamente; os sinais em δ 5,18 ppm (d , $J = 7,6$ Hz, $^1J_{\text{C}}$ 104) e δ 5,16 ppm (d , $J = 7,5$ $^1J_{\text{C}}$ 104) de glicose. Esta análise se baseou nos valores das constantes de acoplamento e correlações de gHSQC.

Ao analisar o espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz, **Figuras 174-175**, p. 206-207) foi possível observar correlações para alguns resíduos de glicosídeos reforçando a proposta feita anteriormente, a comparação dos valores de carbonos obtidos das projeções com os valores obtidos da literatura (**98** e **104**) ajudaram a reforçar estas propostas, estas correlações, bem como os dados obtidos da literatura para os valores de carbonos encontram-se listados nas subestruturas da **Figura 170**.

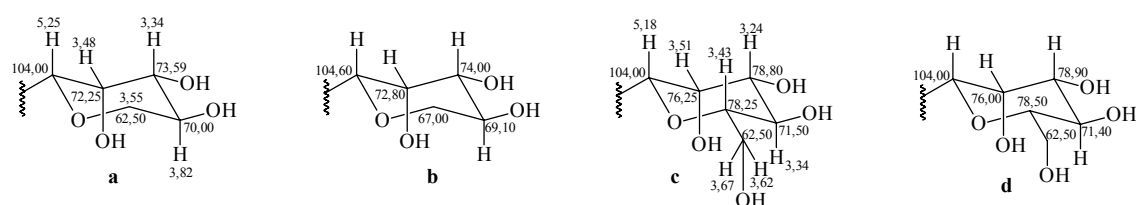


Figura 170 – Correlação dos dados obtidos do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$, e comparação dos valores das projeções de carbono com os dados obtidos da literatura (**106**) para os resíduos de arabinose (**a** e **b**) e glicose (**c** e **d**).

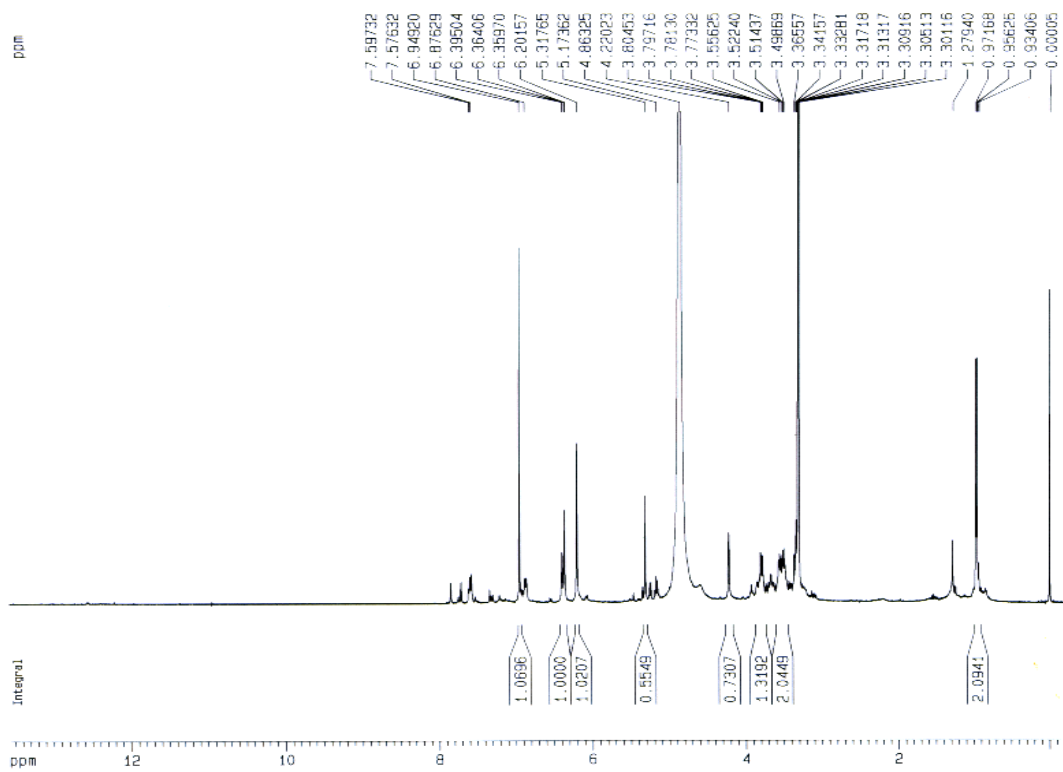


Figura 171 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C_{12} 3.

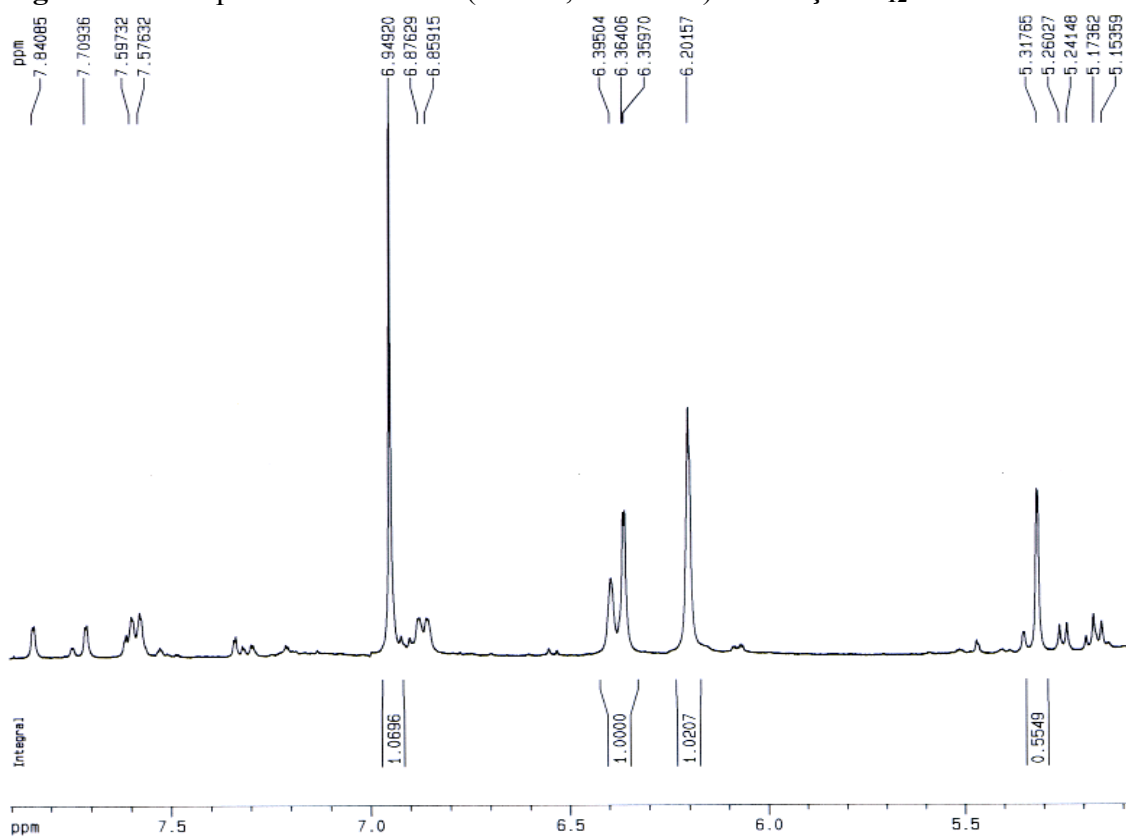


Figura 172 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C_{12} 3.

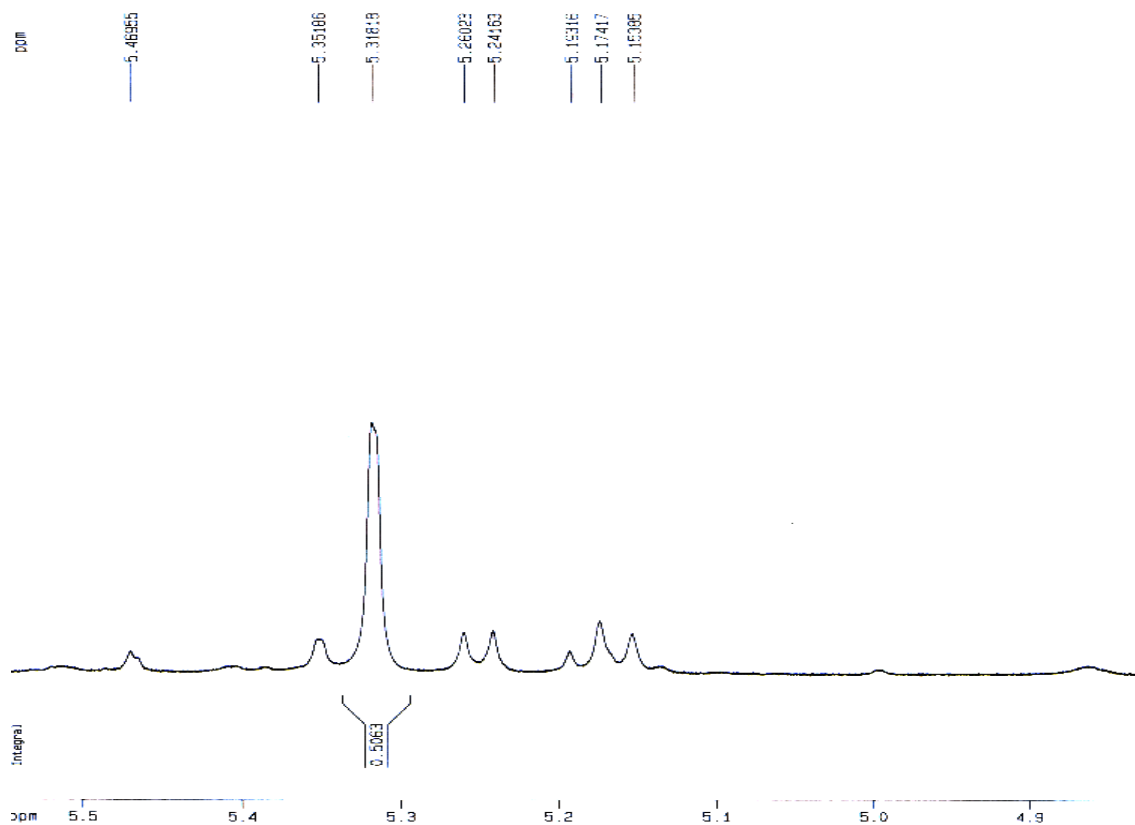


Figura 173 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C_{12} 3.

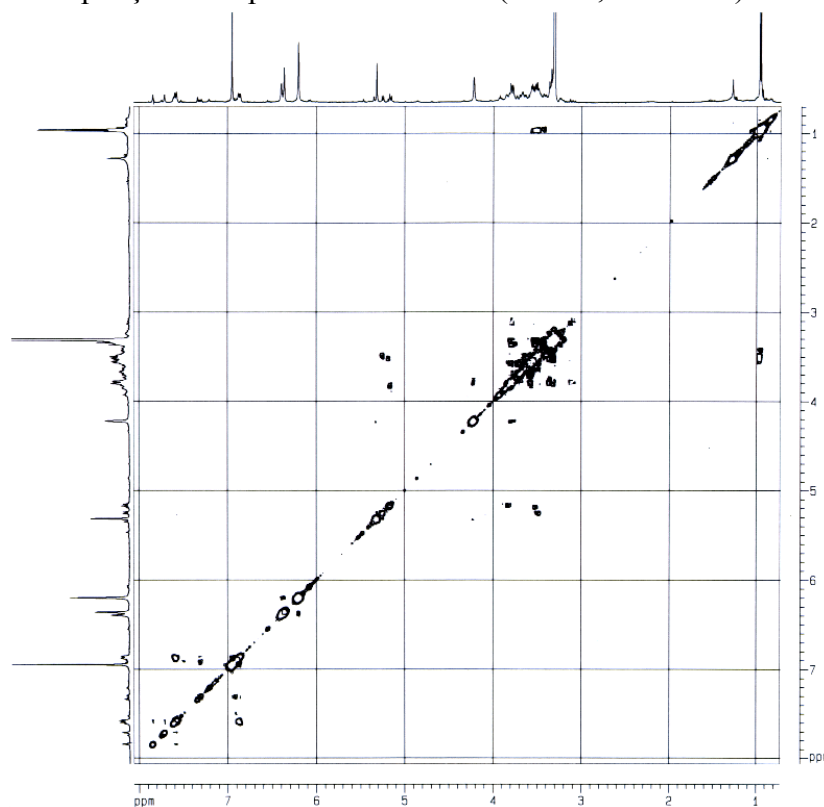


Figura 174 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C_{12} 3.

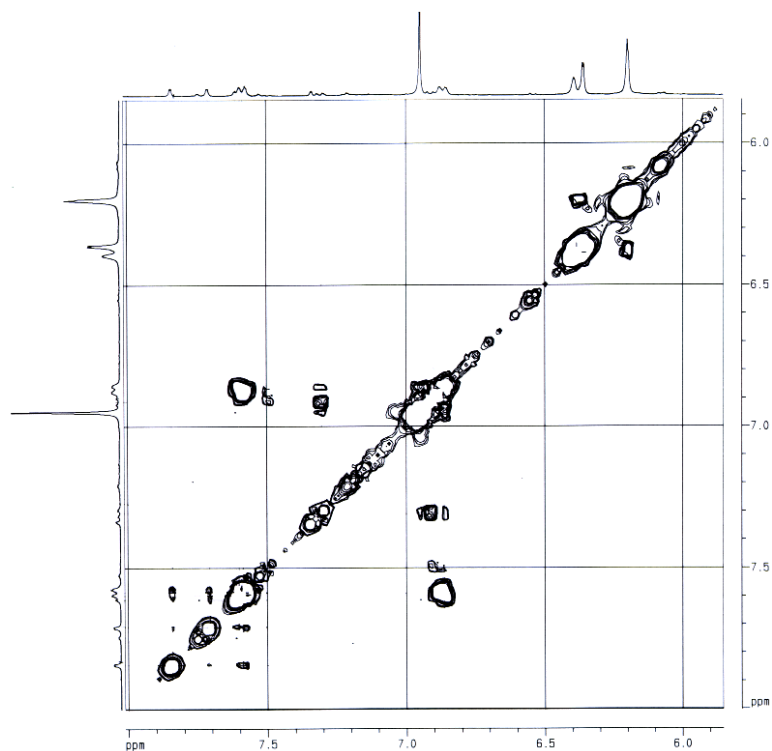


Figura 175 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 3**.

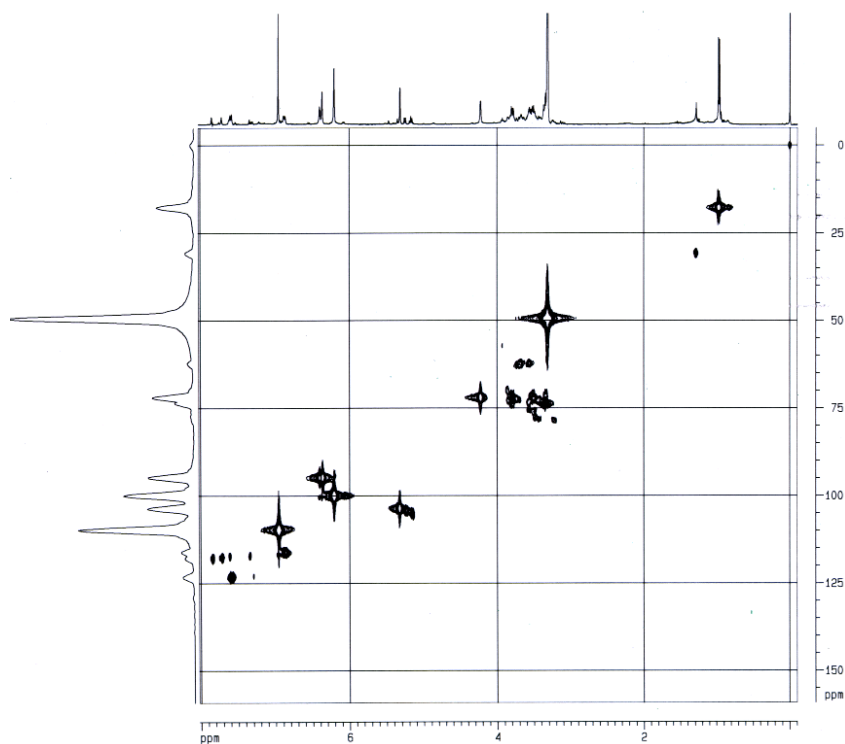


Figura 176 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 3**.

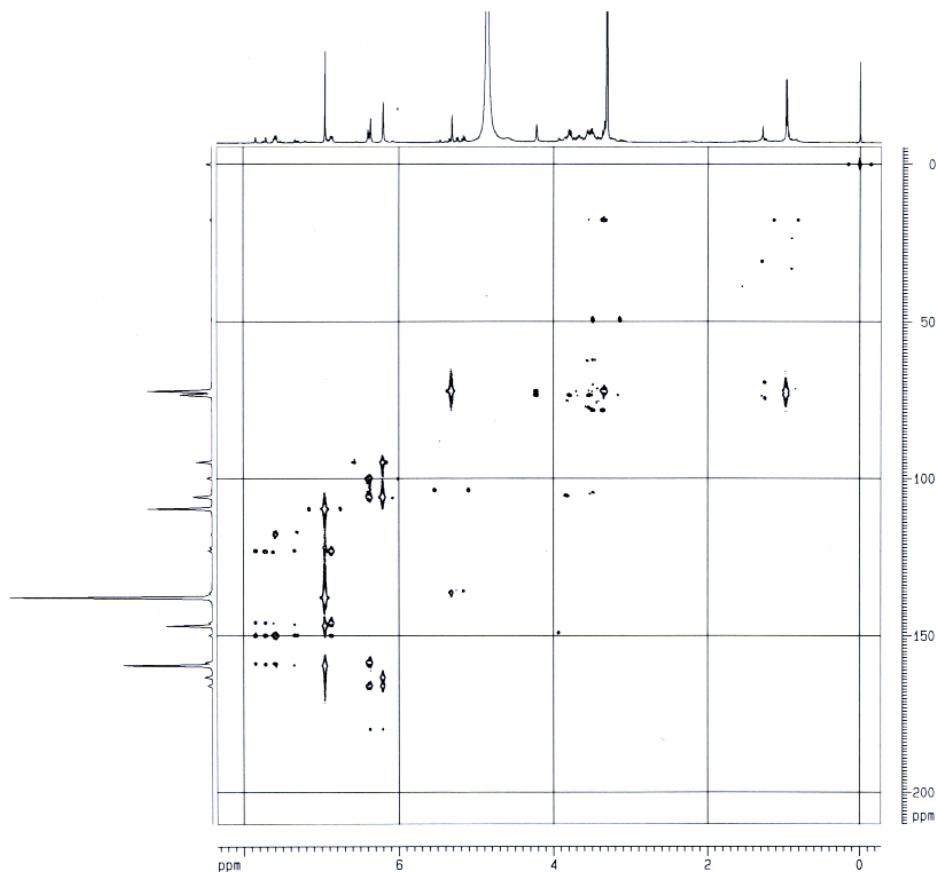


Figura 177 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3.

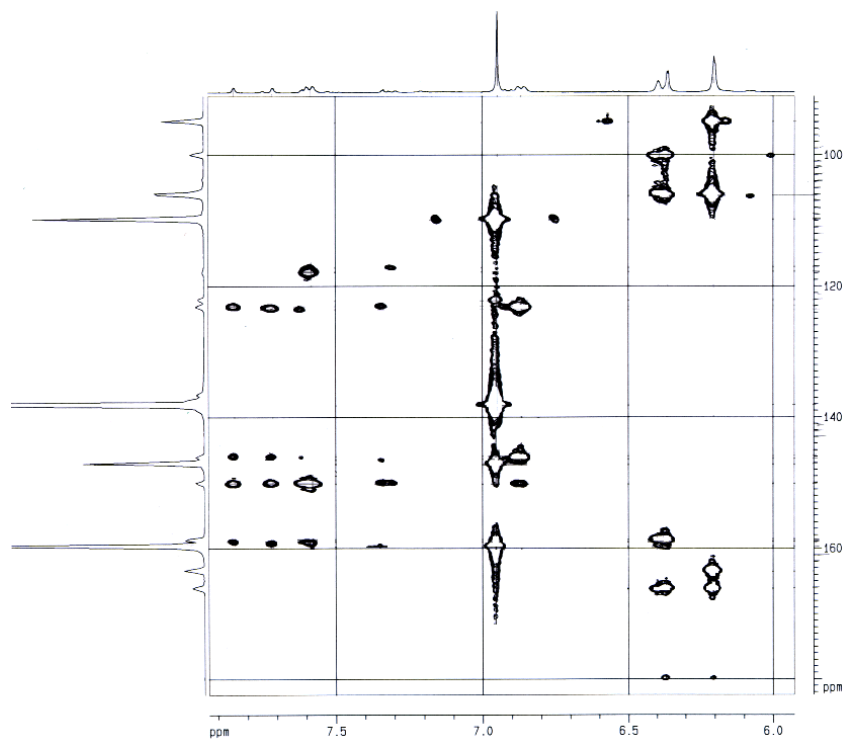


Figura 178 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 3.

A Fração C₁₂ 3 foi analisada por LC-UV-MS e no cromatograma (Figura 179) observam-se seis bandas, as quais apresentaram espectros de massas (Figura 180, p. 211) com os seguintes picos dos íons pseudomoleculares de A: m/z 464,4 D; B: m/z 463,4 D; C: m/z 463,4 D; D: m/z 433,3 D; E: m/z 433,4 D e F: m/z 447,5 D, confirmando as massas para cada pico com as propostas estruturais dos flavonóides.

Portanto, com as informações obtidas, foi possível determinar as estruturas dos flavonóides presentes na fração que são A: Miricetina-3-*O*- β -L-raminosídeo (S₆₉, componente majoritário na mistura), B: Mericetina-3-*O*- β -D-glicosídeo (S₈₅), C: Mericetina-3-*O*- α -D-glicosídeo (S₈₆); D: Quercetina-3-*O*- β -L-arabinofuranosídeo (S₇₆), E: Quercetina-3-*O*- β -L-arabinopiranosídeo (S₈₇) e F: Quercetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (S₇₉). Os espectros de UV confirmaram as propostas apresentadas, onde as absorções das Bandas II indicam que os anéis A encontraram-se dioxigenado e as Bandas I indicaram que as posições C-3 apresentam hidroxila substituída.

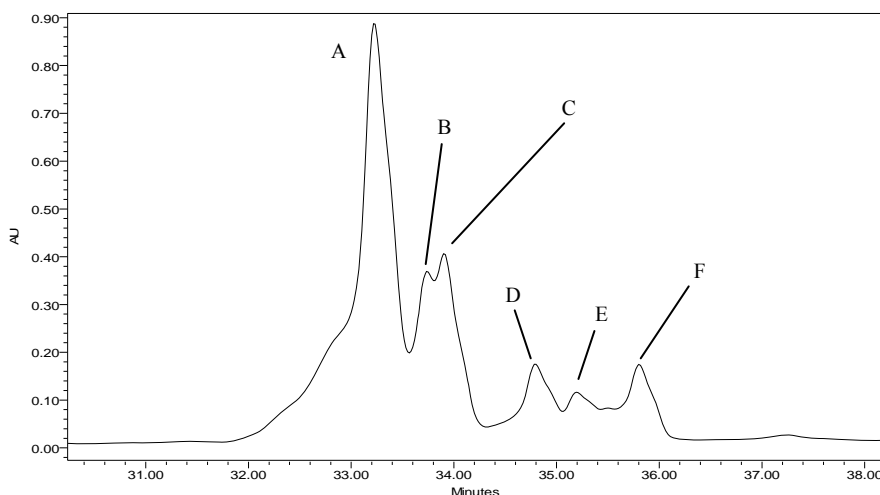
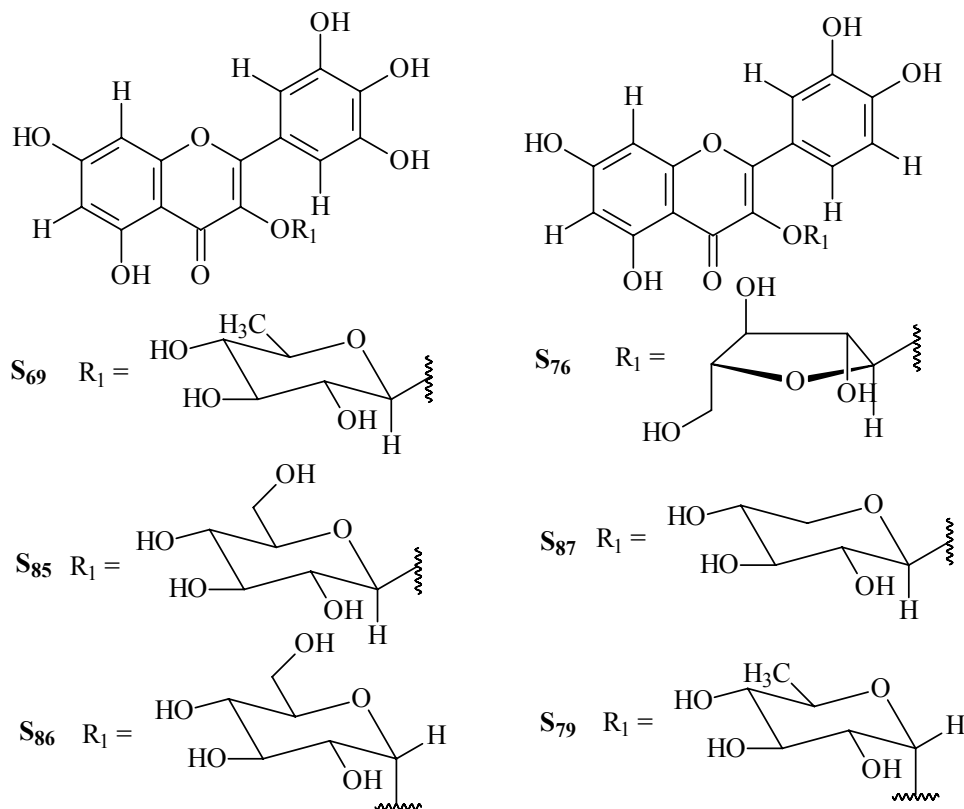
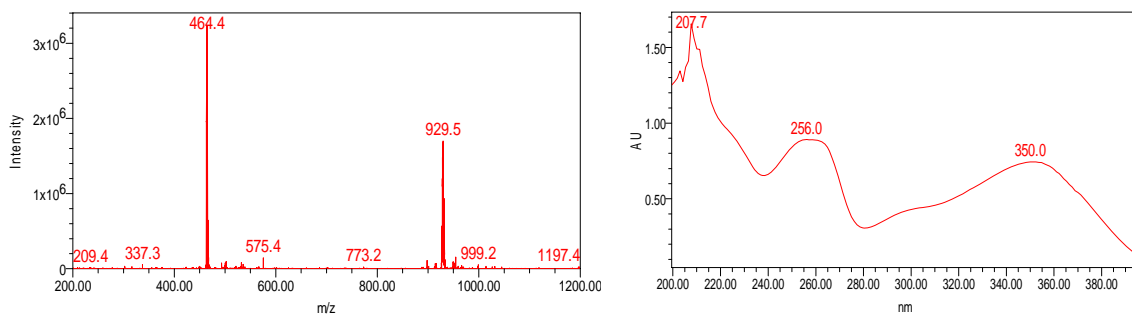


Figura 179 – Cromatograma da Fração C₁₂ 3 obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm; t_R : A = 33,235 min.; B = 33,737 min.; C = 33,909 min.; D = 34,814 min.; E = 35,217 min. e F = 35,806 min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100^o C; Dessolvation temperatura: 350^o C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.



A



B

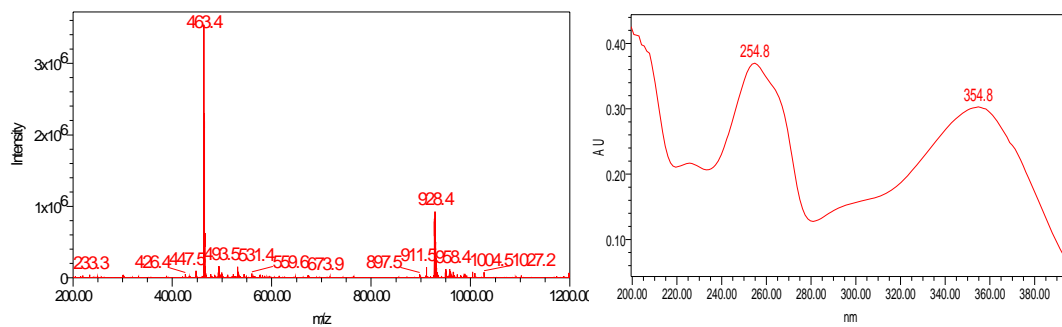
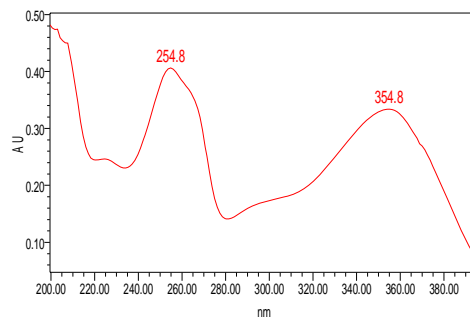
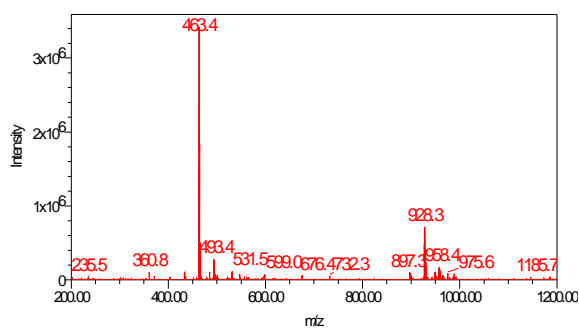
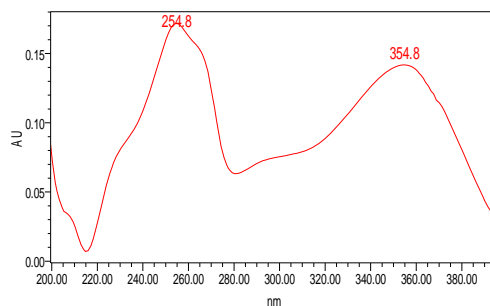
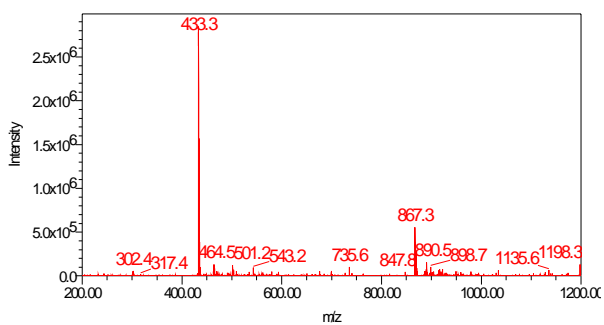


Figura 180 (continuação) - Espectros de MS e de UV da Fração C₁₂ 3.

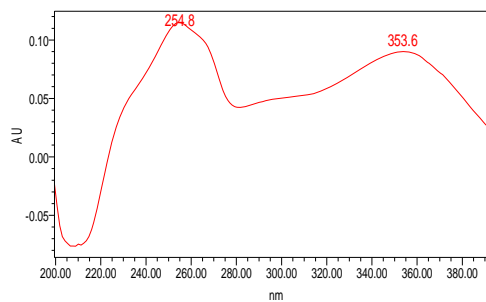
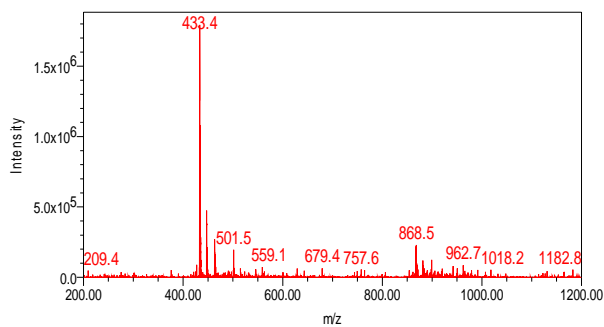
C



D



E



F

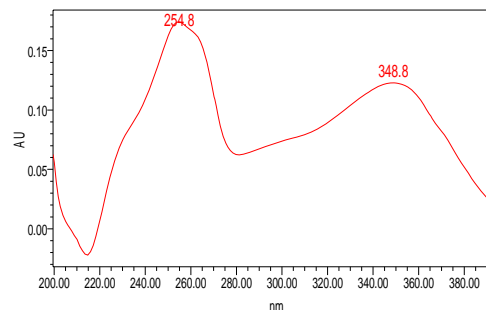
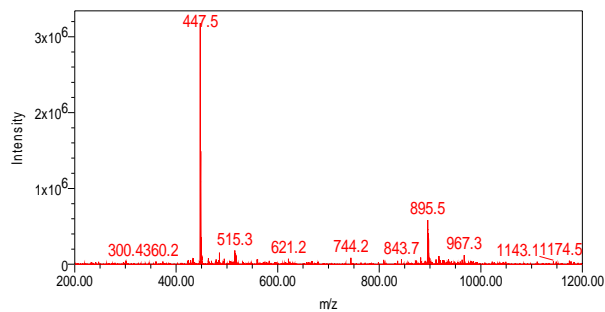


Figura 180 – Espectros de MS e de UV da Fração C₁₂ 3.

4.3.4.2 - Constituintes Químicos da **Fração C₁₂ 5**

Após análises preliminares por RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, **Figuras 182-183**, p. 213-214) da **Fração C₁₂ 5** verificou-se tratar de flavonóides glicosilados pertencentes à Classe I. Os dados obtidos do espectro de gCOSY ¹H x ¹H e mapas de correlações de gHSQC e de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 184-189**, p. 214-217) estão de acordo com os indicados para a aglicona desta classe na **Figura 181**. O sinal em δ 6,38 ppm (*s*), após análise por gHMBC correlaciona-se além dos sinais correspondente ao anel A, com um sinal em δ 177 ppm correspondente a sinal de carbono carbonílico, indicando que além do hidrogênio da posição 8, há um outro hidrogênio ligado na posição C-3, sugerindo a presença na mistura de uma flavona. A intensidade do sinal em δ 6,20 ppm correspondente ao hidrogênio 6, indica que uma das estruturas das moléculas da mistura teve a mesma substituída por hidroxila.

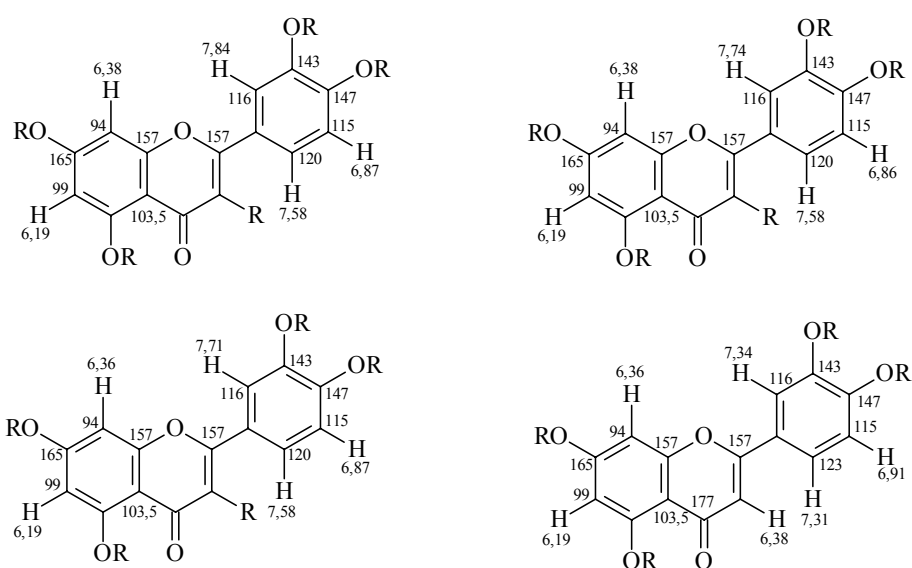


Figura 181 – Proposta para as agliconas presentes na **Fração C₁₂ 5** com dados de RMN ¹H e as projeções dos dados de carbono obtidos dos mapas de correlações de gHSQC e de gHMBC.

Os sinais na região de hidrogênios anoméricos em δ 5,50 ppm (*sl*, ¹J_C δ 108 ppm) referente a 3-*O*-α-L-arabinofuranosídeo; δ 5,34 ppm (*sl*, ¹J_C δ 103 ppm) característico de 3-*O*-β-L-raminosídeo, em δ 5,23 ppm (*d*, *J* = 7,5 Hz, ¹J_C δ 103 ppm)

característico de 3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e δ 5,18 ppm (*d*, $J = 7,5$ Hz, 1J_C δ 103 ppm) correspondente à unidade de 3-*O*- β -D-glucosídeo.

O mapa de correlações de gHMBC apresenta a correlação dos sinais de hidrogênios anoméricos com a projeção do sinal de carbonos em torno de δ 136 ppm exceto para δ 5,18 ppm, indicando que estes glicosídeos encontram-se ligados ao oxigênio da posição 3, e o da flavona em C-7, reforçando a proposta feita anteriormente.

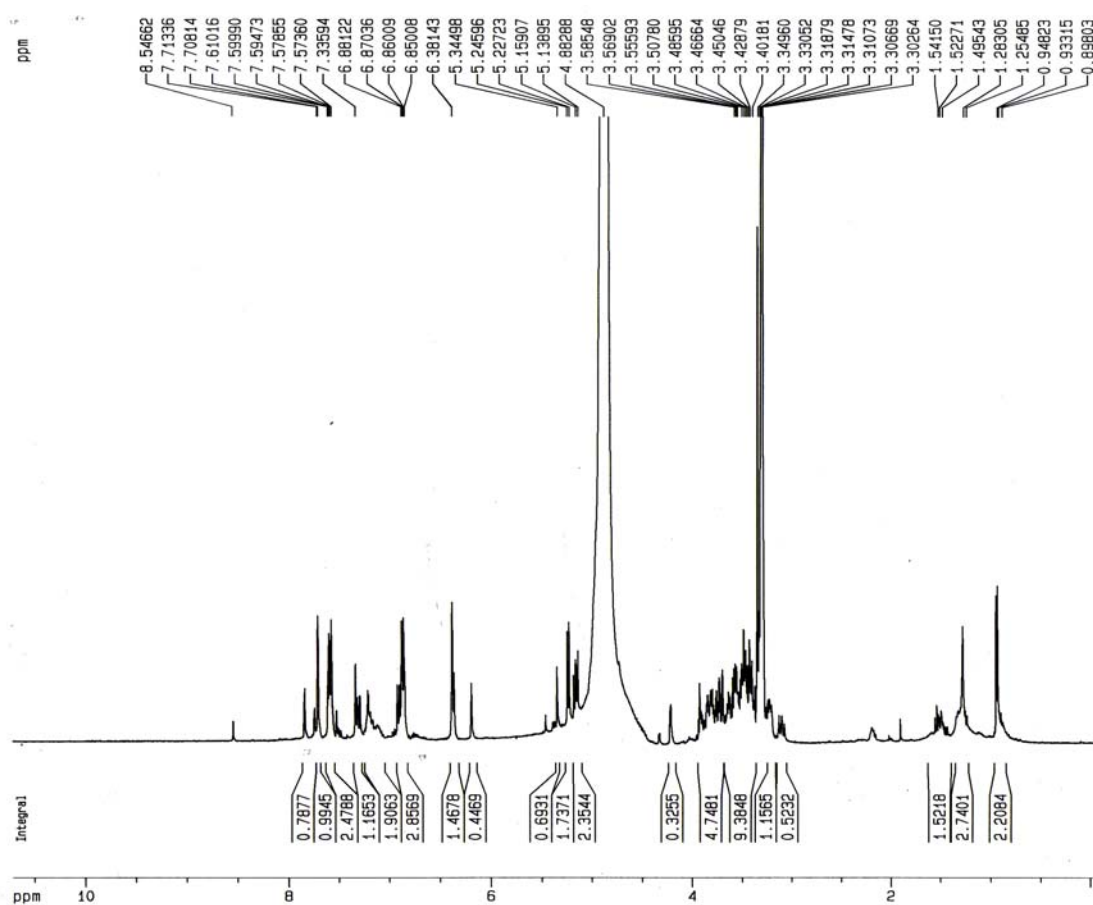


Figura 182 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

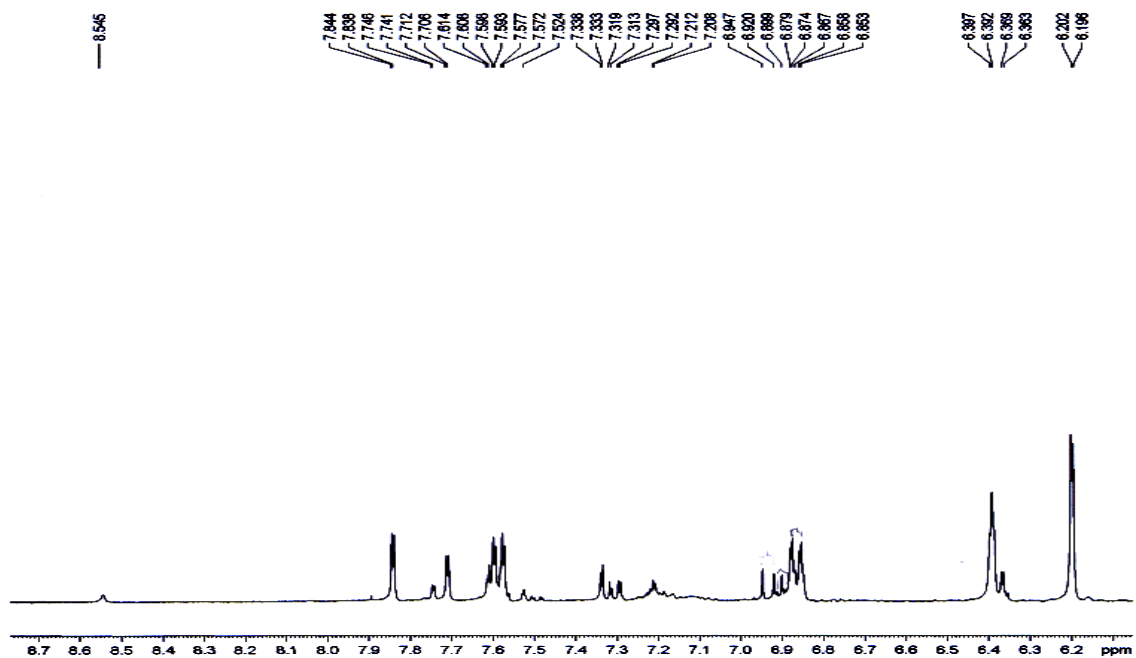


Figura 183 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

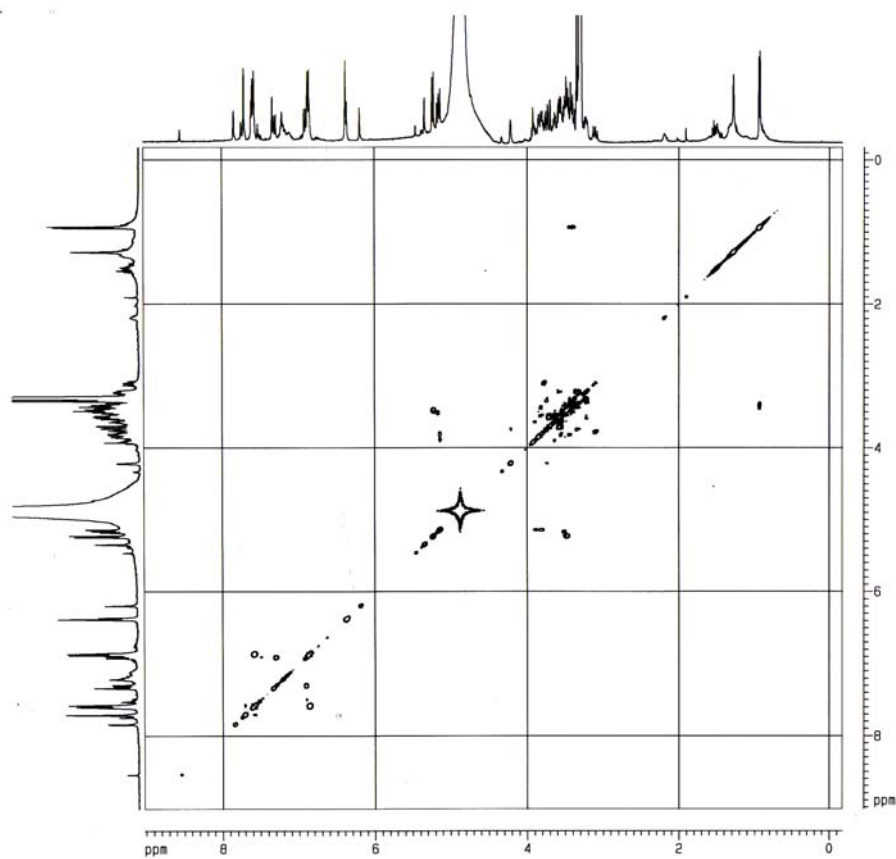


Figura 184 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

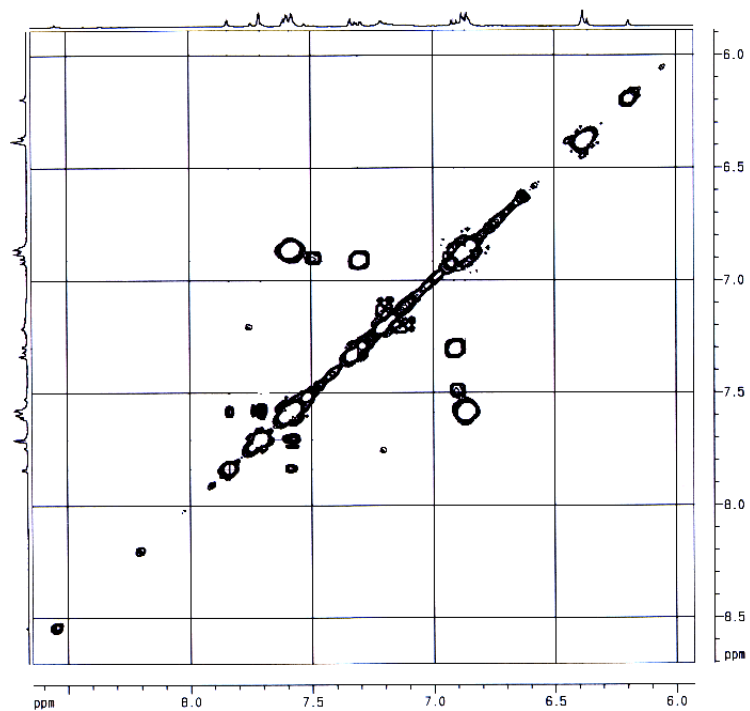


Figura 185 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 5**.

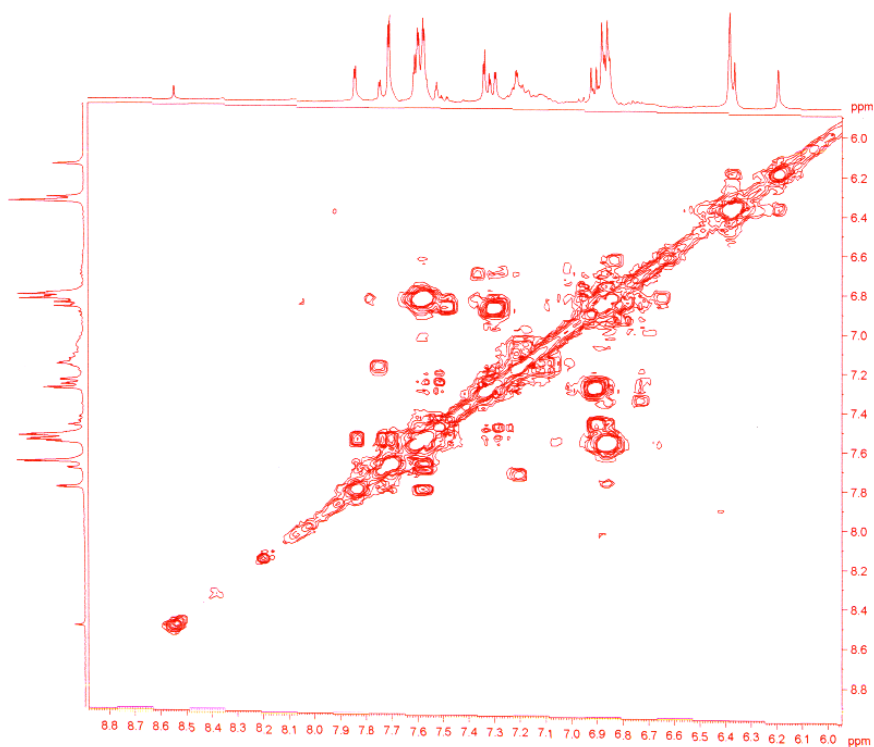


Figura 186 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 5** com um corte mais alto.

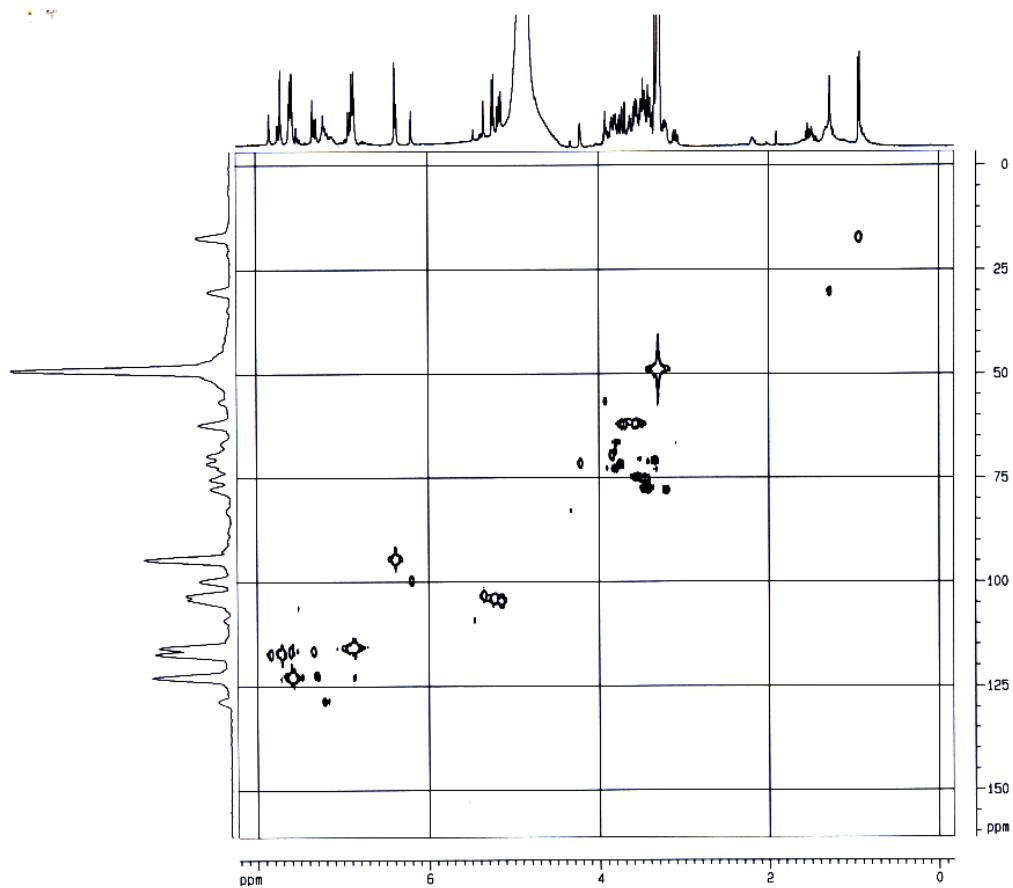


Figura 187 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

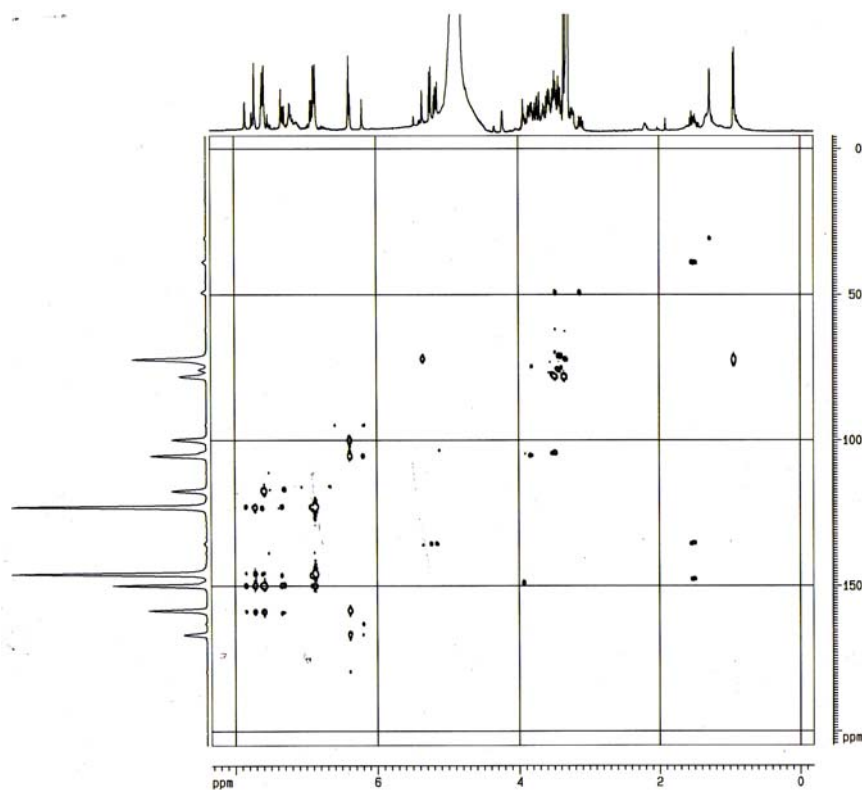


Figura 188 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

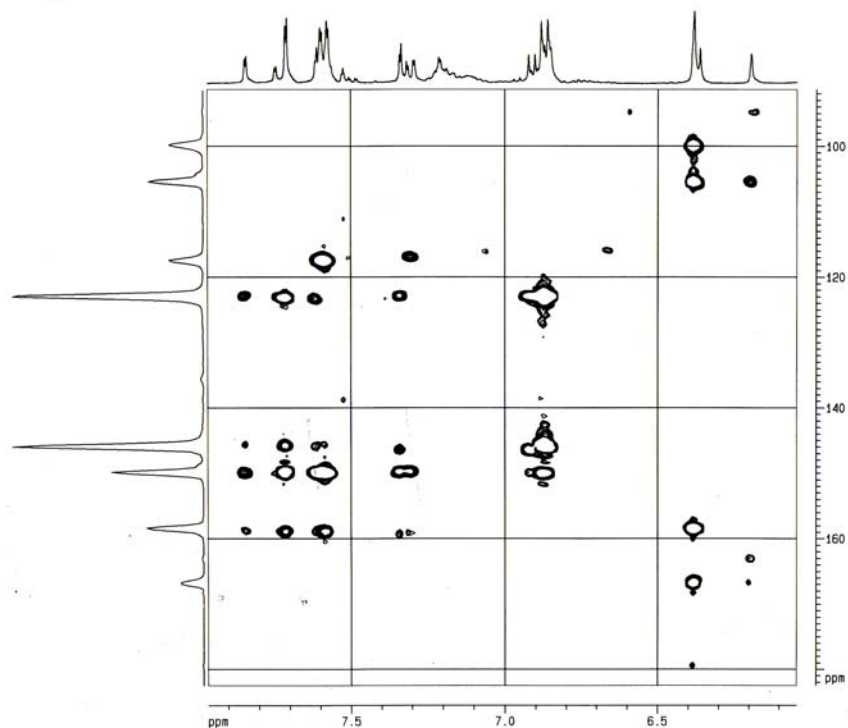


Figura 189 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 5.

A Fração C₁₂ 5 foi analisada por LC-UV-MS e o Cromatograma (**Figura 190**, p. 218) apresentou quatro bandas mais intensas, as quais apresentaram espectros de massas (**Figura 191**, p. 219) com picos dos íons pseudomoleculares de m/z 464,4 D; m/z 434,4 D; m/z 434,4 D e m/z 448,8 D para as bandas A, B, C e D, respectivamente.

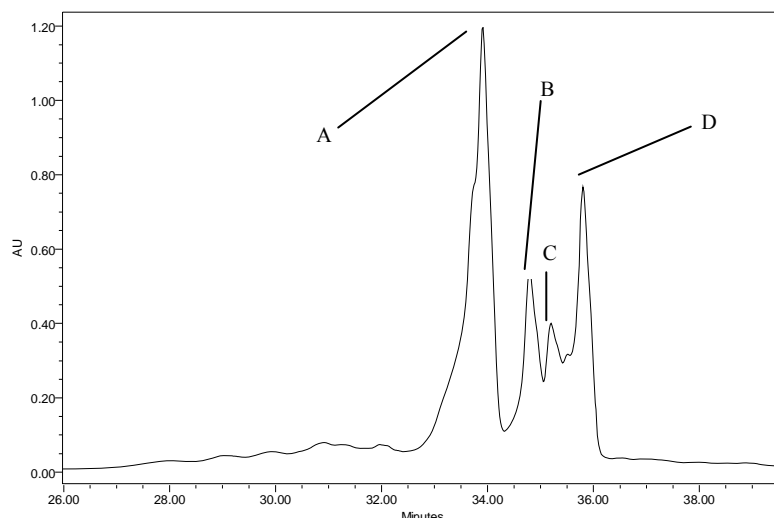
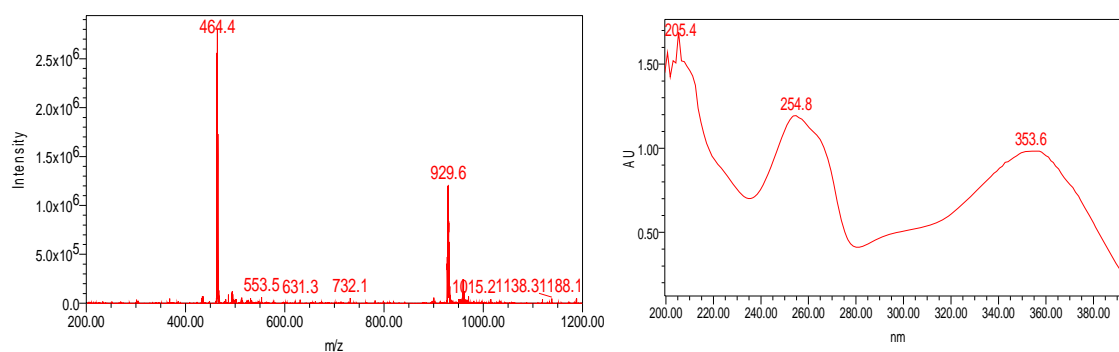


Figura 190 – Cromatograma da **Fração C₁₂ 5** obtido por LC-UV-MS ($\lambda = 254,0$ nm; t_R : A = 33,902 min.; B = 34,800 min.; C = 35,214 min. e D = 35,795 min.). Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

A



B

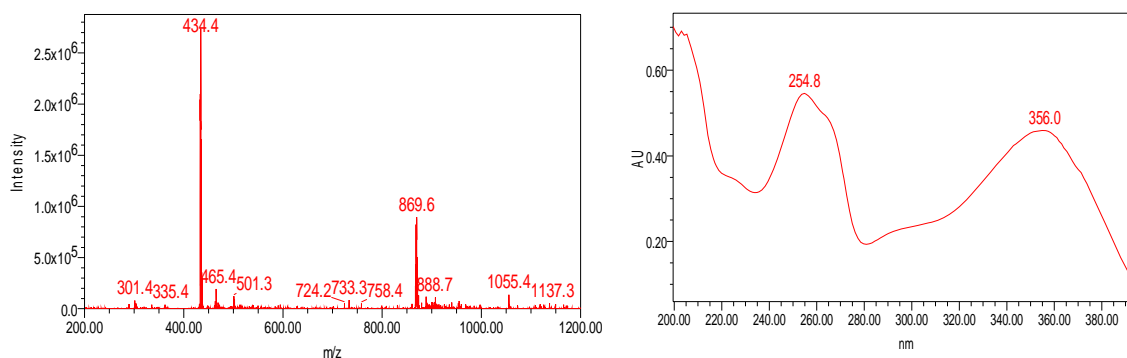


Figura 191 (continuação) – Espectros de MS e de UV da **Fração C₁₂ 5**.

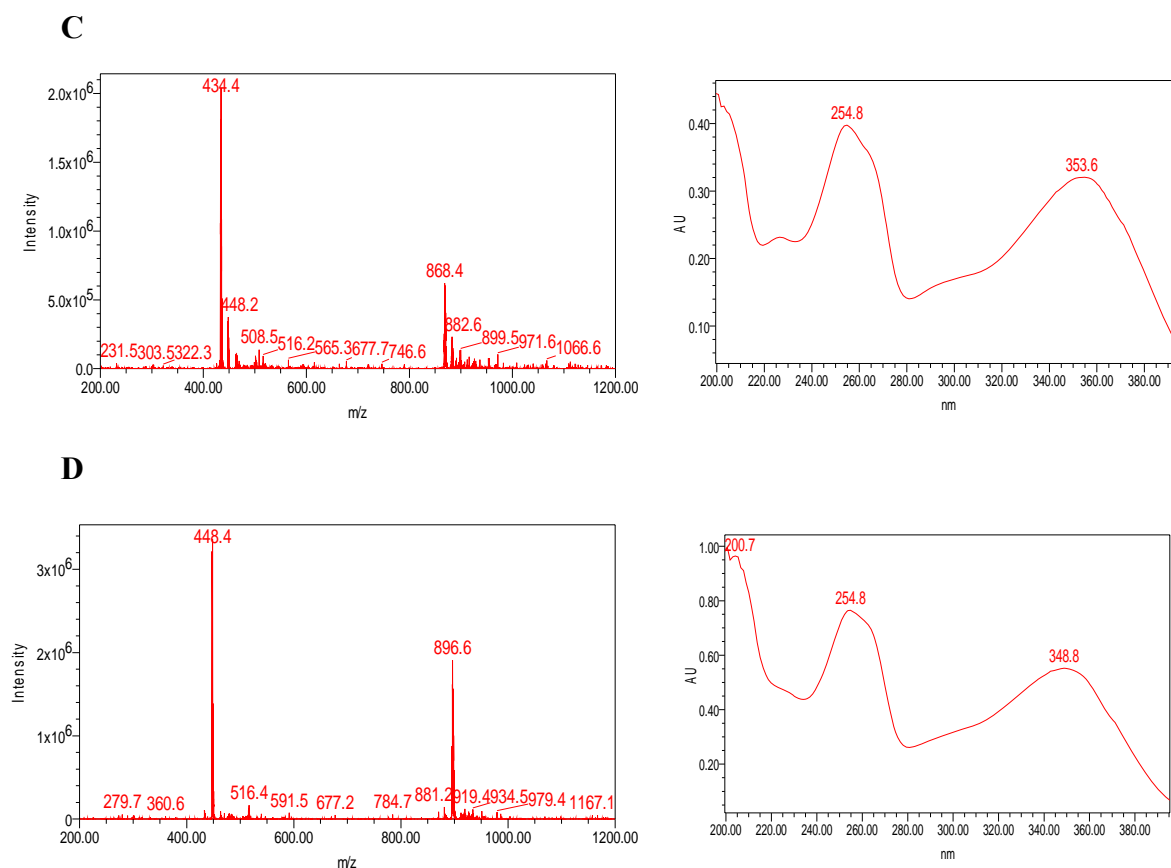
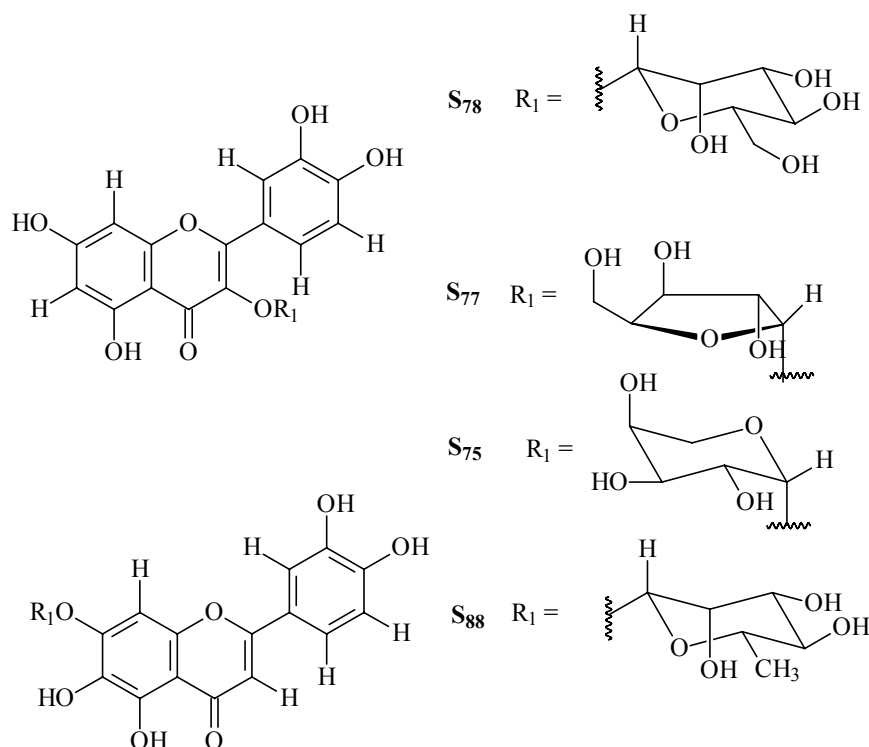


Figura 191 – Espectros de MS e de UV da **Fração C₁₂ 5**.

Foi possível observar que os espectros de UV demonstraram bandas que confirmaram as propostas apresentadas, onde as quatro bandas dos cromatogramas (A, B, C e D) apresentaram $\lambda = 254,8$ nm (Banda II) característico de flavonol de anel A di-oxigenado; para as bandas do cromatograma A, B e C a absorção da Banda I do espectro de UV são de $\lambda = 353,6$ nm, $\lambda = 356$, nm e $\lambda = 353,6$ nm, respectivamente, indicativos de flavonol de 3-OH substituído e a para a Banda D do cromatograma de $\lambda = 348,8$ nm indicativo de flavona, reforçando a identificação realizada por meio dos experimentos por RMN.

O conjunto dos dados obtido pelos experimentos analisados, proporcionou a identificação das seguintes substâncias: A: 5,6,7,3',4'-pentahidroflavona-7-*O*- α -L-raminosídeo (**S₈₈**); B: Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (**S₇₅**); C: Quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (**S₇₇**); D: Quercetina-3-*O*-D- β -glicosídeo (**S₇₈**).



4.3.4.3 - Constituintes Químicos da **Fração C₁₂ 7**

Ao analisar o espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, **Figuras 193-194**, p. 221-222) observou-se que se trata de flavonóides glicosilados pertencentes às Classes I e II, sendo que foi apenas determinado o composto majoritário, o qual pertencem à Classe II, devido a pouca resolução dos demais sinais. Portanto, foram atribuídos os valores obtidos dos espectros de RMN ^1H , gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz, **Figuras 195-196**, p. 222-223) e mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz, **Figura 197**, p. 223) para a aglicona correspondente a classe referida (**Figura 192**, p. 221). O mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figura 198**, p. 224), mostrou a correlação do sinal do H anomérico com o sinal em δ 136,0 ppm correspondente ao sinal do carbono na posição C-3.

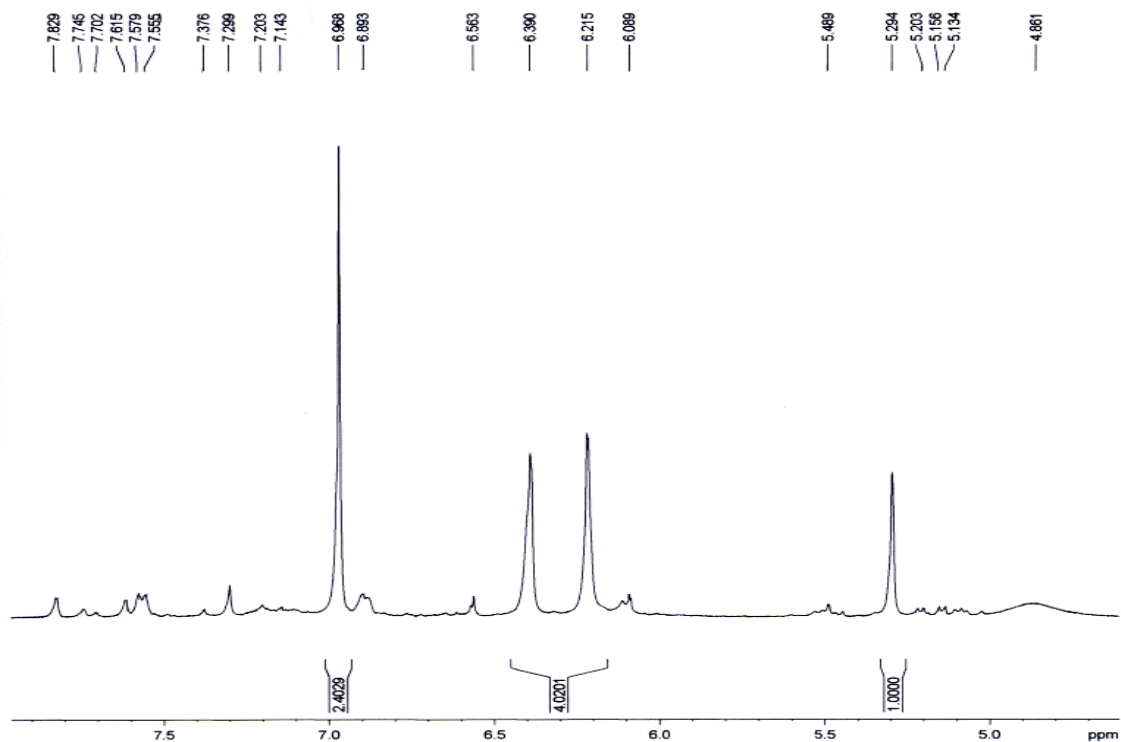


Figura 194 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7.

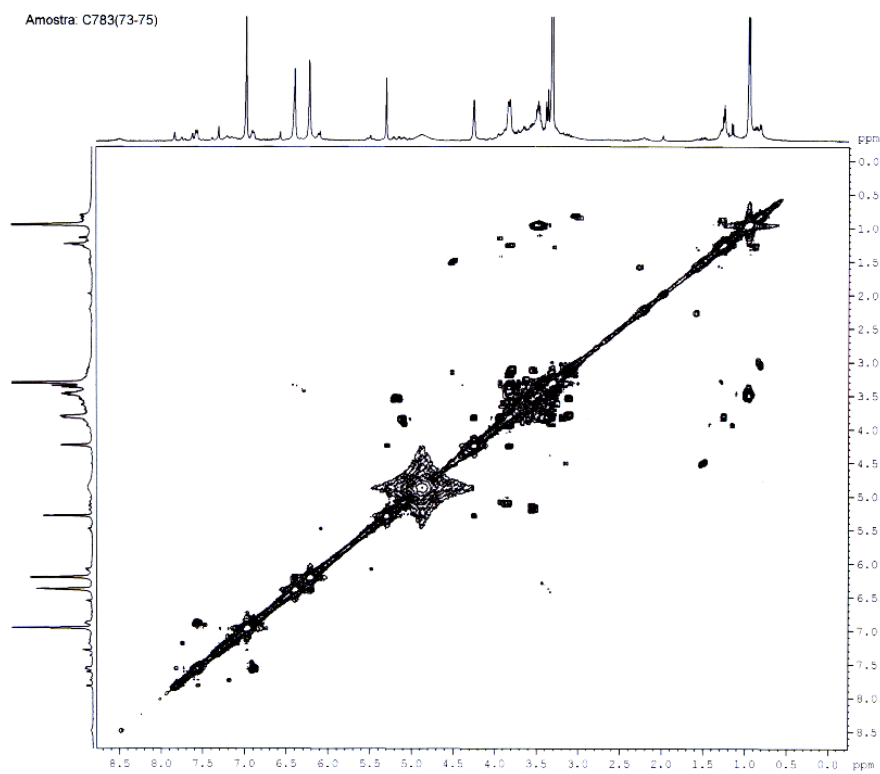


Figura 195 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 7.

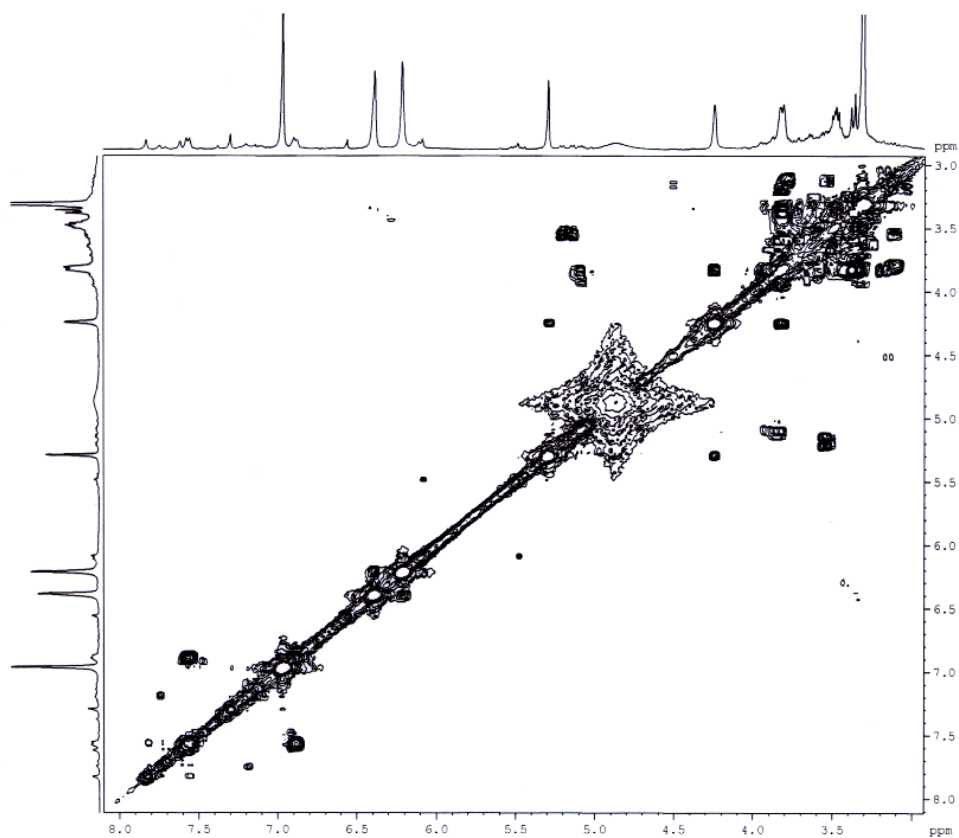


Figura 196 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 7**.

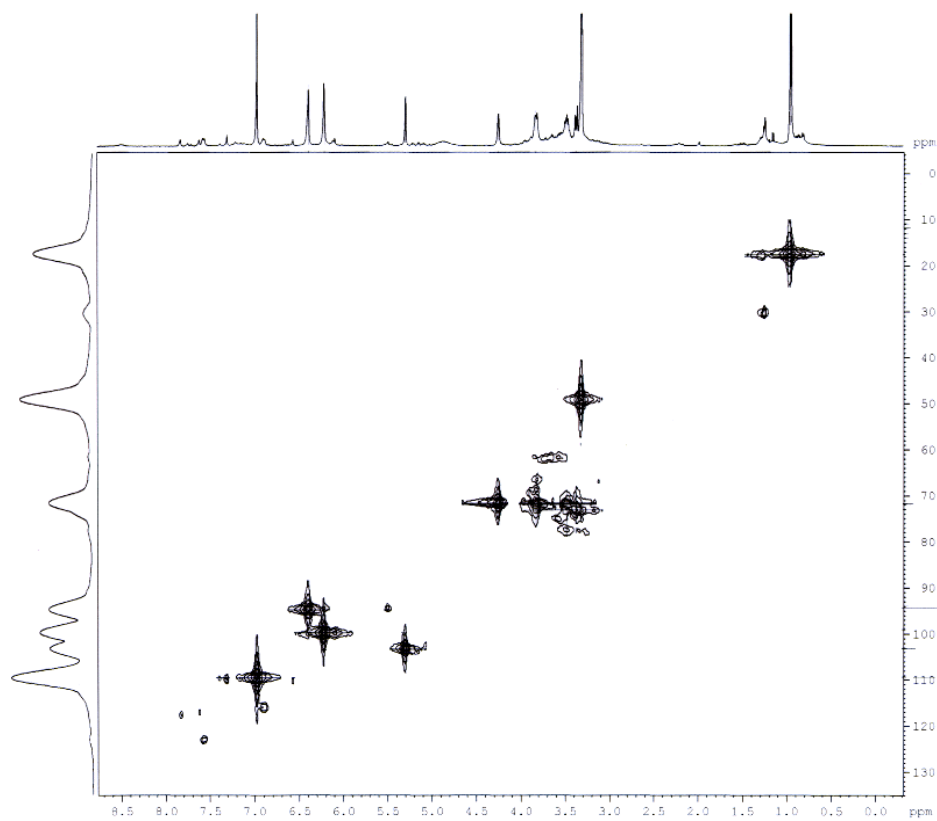


Figura 197 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 7**.

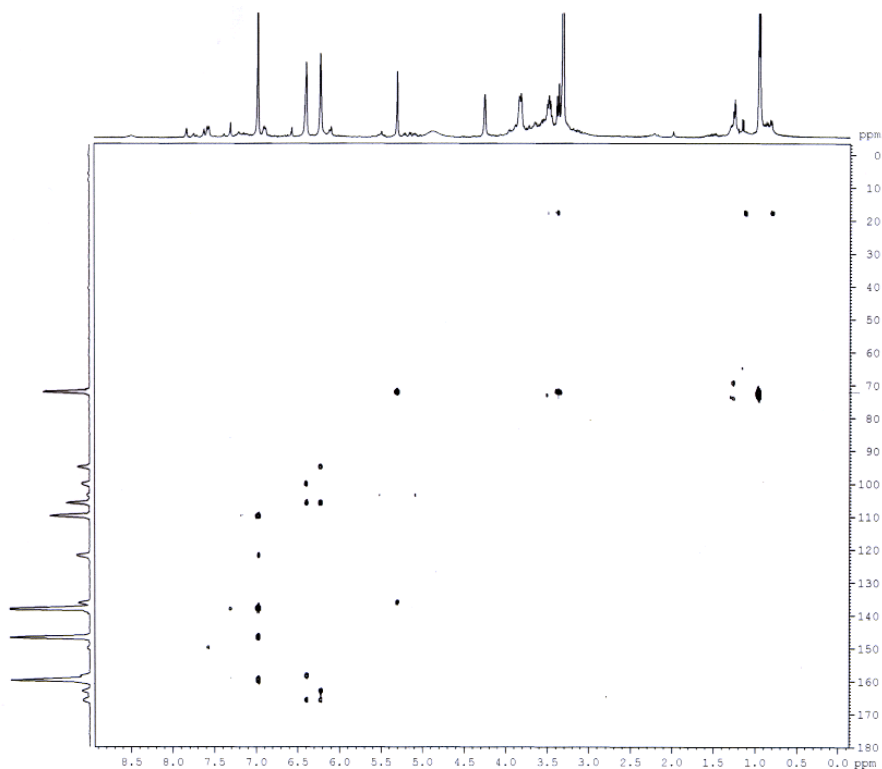


Figura 198 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da **Fração C₁₂ 7**.

Esta Fração foi analisada por LC-UV-MS e foi observado no cromatograma (**Figura 199**, p. 225) um pico majoritário, onde a análise do espectro de massas (**Figura 200**, p. 225), com pico do íon pseudomolecular de m/z 463,4 D e espectro de UV que apresenta bandas em $\lambda = 257,2$ nm (Banda II) e $\lambda = 348,8$ nm (Banda I) característicos de flavonóide de 3-OH substituído, confirmou a proposta para a Miricetina-3-*O*- β -L-ramnosídeo (**S₆₉**).

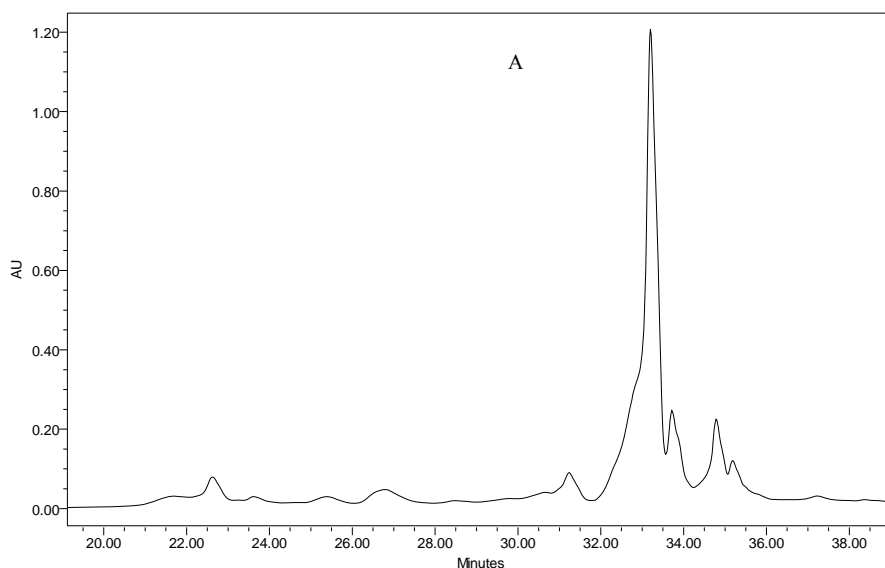


Figura 199 - Cromatograma da **Fração C₁₂ 7** obtido por LC-UV-MS. $\lambda = 254$ nm; t_R : A = 33,206 min. Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

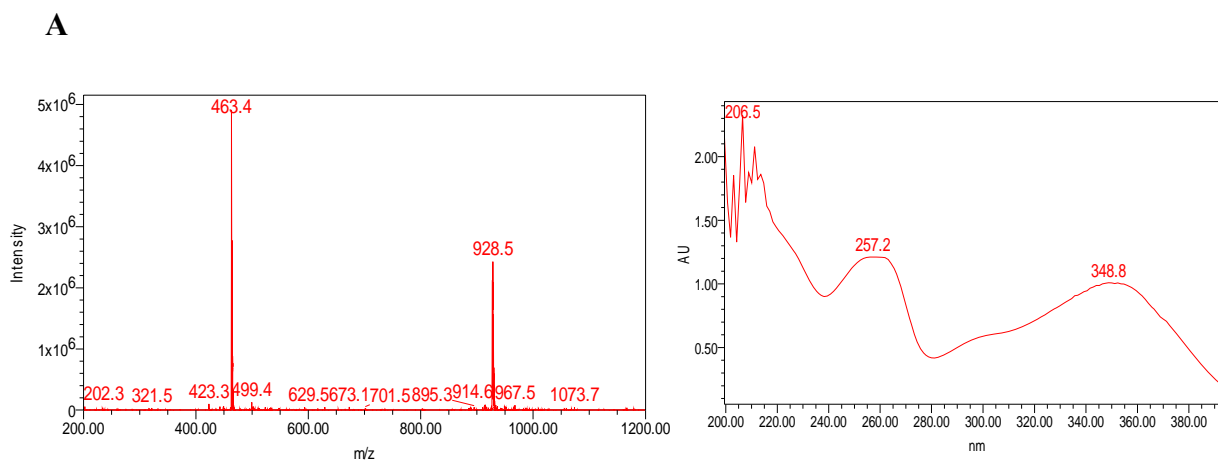


Figura 200 - Espectro de MS e de UV da **Fração C₁₂ 7**.

4.3.4.4 - Constituintes Químicos da **Fração C₁₂ 9**.

A análise dos seus espectros de RMN ¹H, gCOSY ¹H x ¹H, mapas de correlações de gHSQC e de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 202-209**, p. 227-230) indicou para aglicona a Classe I e na região de sinais de hidrogênios de glicosídeos indicou o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,34 ppm (d , $J = 1,60$ Hz) característico de 3-*O*- α -L-ramnosídeo (ver **Tabelas 3-5**, p. 64-67), o sinal em δ 0,93 ppm (d , $J = 6,12$ Hz) característico de hidrogênio de metila deste glicosídeo, reforça a proposta do glicosídeo ser a ramnose. As correlações obtidas do espectro de gCOSY ¹H x ¹H, e mapa de correlações de gHSQC e de gHMBC entre os sinais dos hidrogênios do resíduo de ramnose encontram-se indicadas na subestrutura da **Figura 201**.

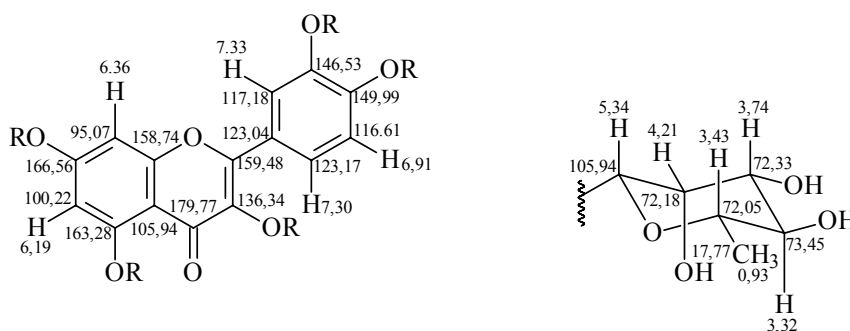


Figura 201 – Dados obtidos do espectro de RMN ¹H, e mapa de correlações de gHSQC e gHMBC da **Fração C₁₂ 9**.

O mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz, **Figuras 207-209**, p. 229-230) mostrou a correlação heteronuclear do sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,34 ppm, com o sinal do carbono em δ 136,34 ppm, confirmando a posição deste resíduo de glicosídeo em C-3.

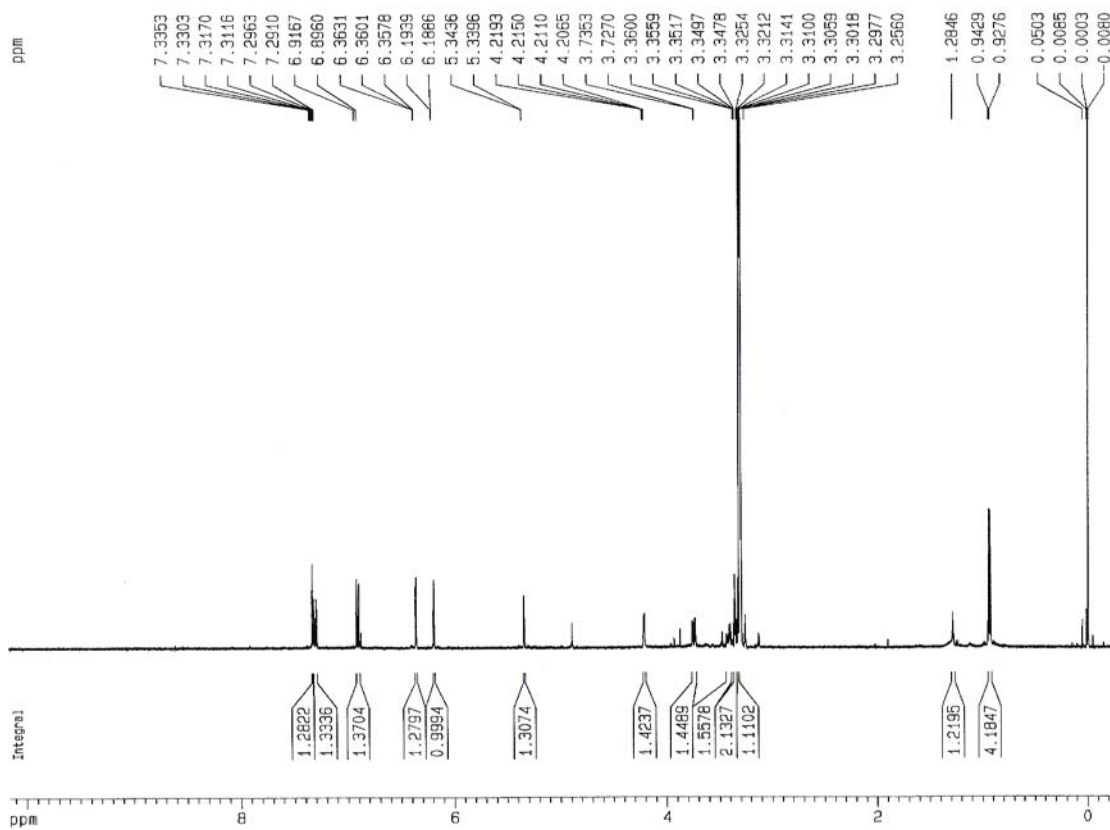


Figura 202 – Espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

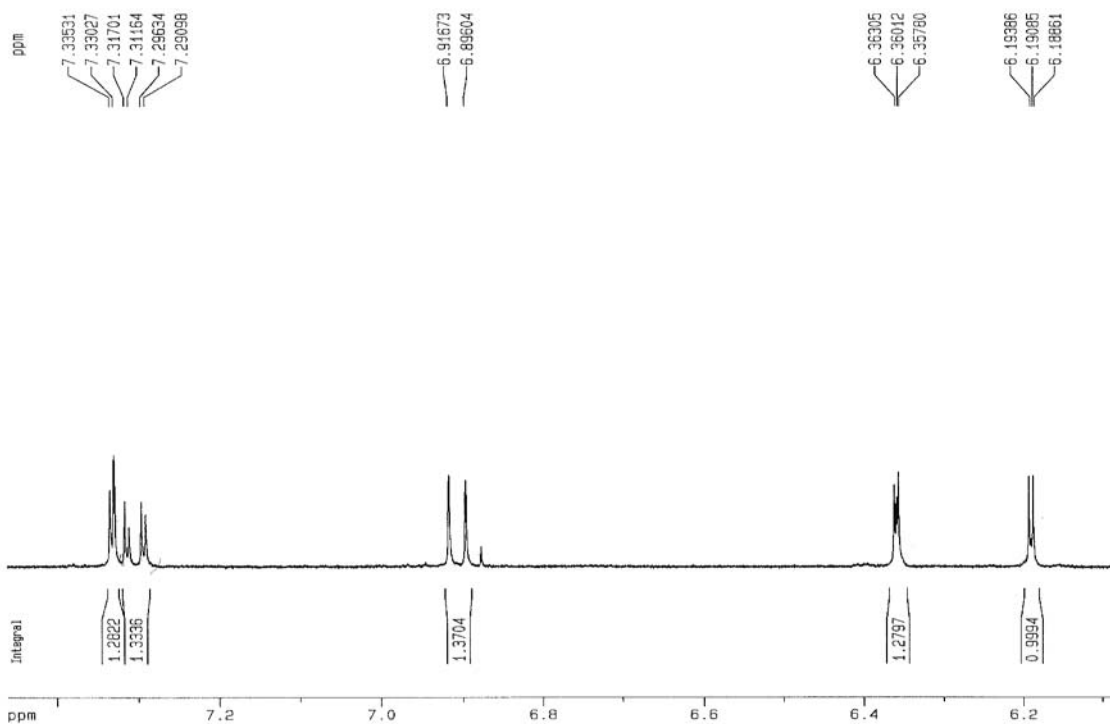


Figura 203 – Ampliação do espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

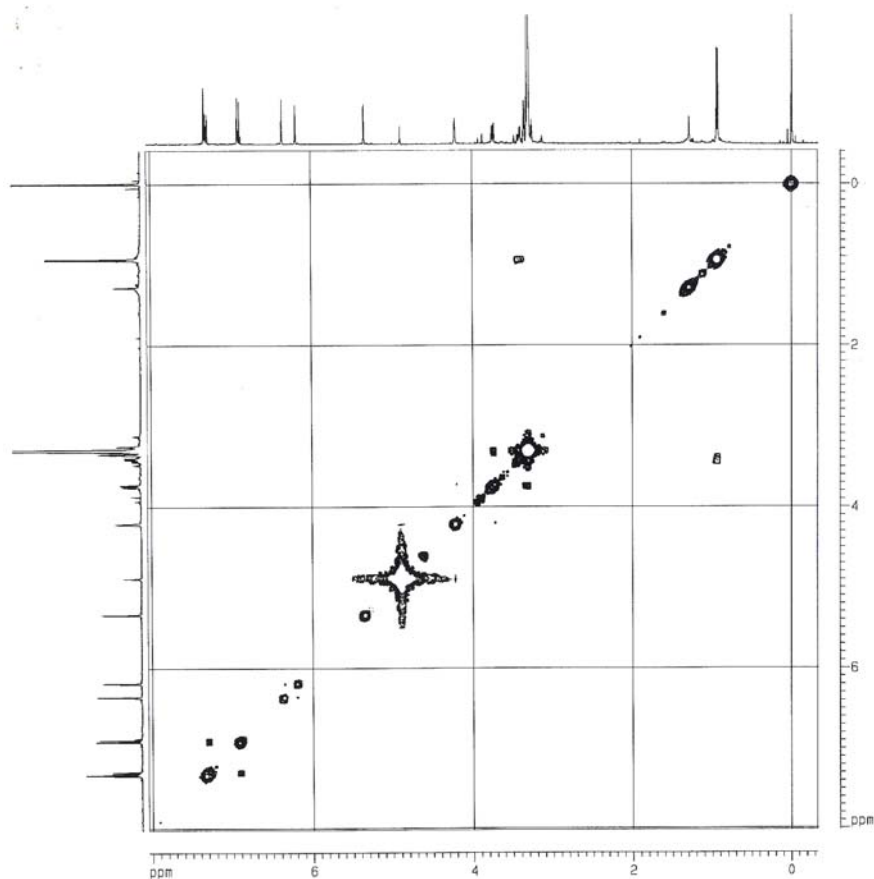


Figura 204 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

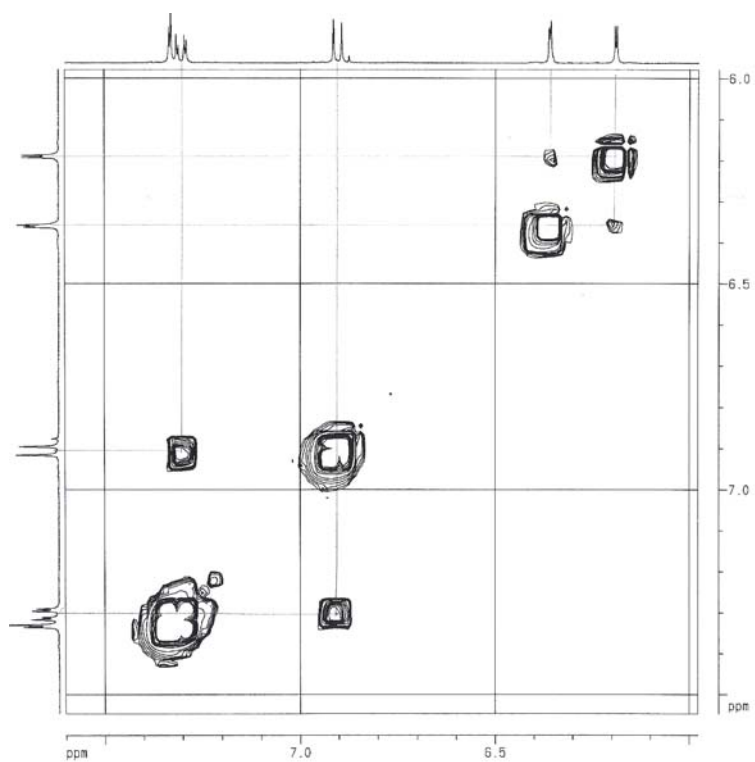


Figura 205 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

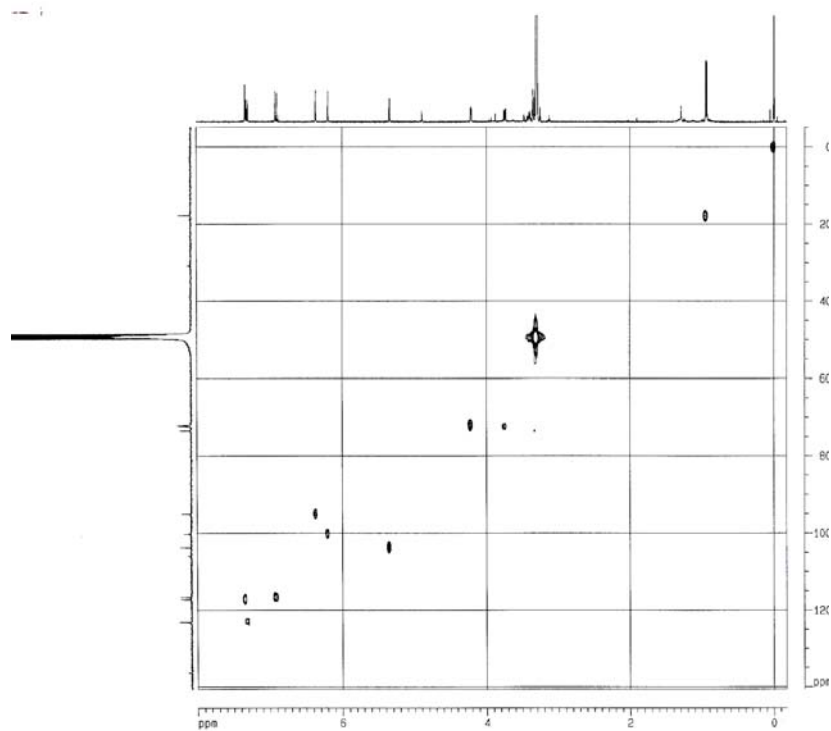


Figura 206 – Mapa de correlações de gHSQC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

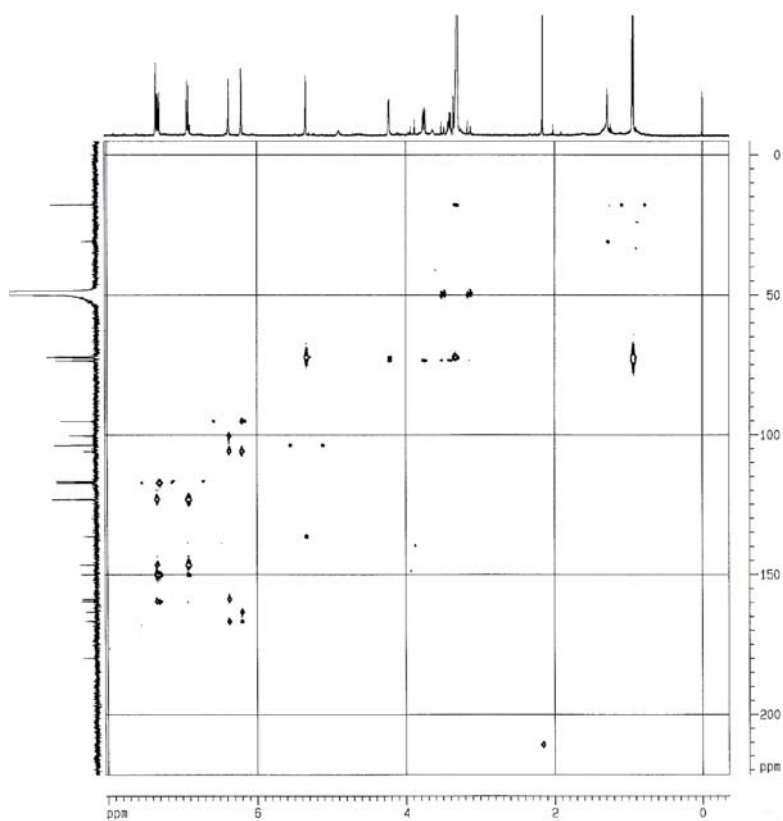


Figura 207 – Mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

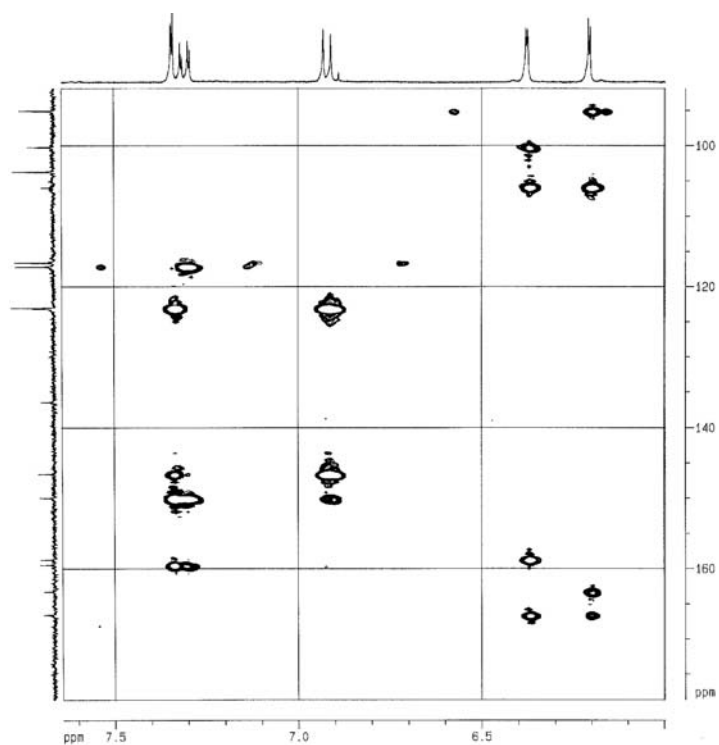


Figura 208 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

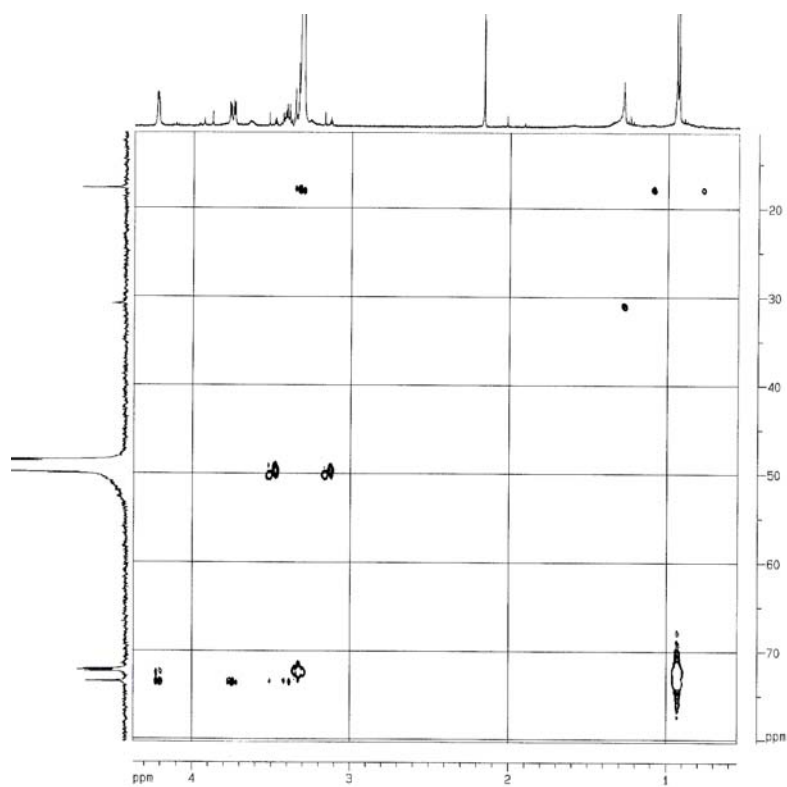


Figura 209 – Ampliação do mapa de correlações de gHMBC (MeOD, 400 MHz) da Fração C₁₂ 9.

Esta fração foi analisada por LC-UV-MS e o cromatograma (**Figura 210**) apresentou apenas uma banda indicando que se trata de apenas uma substância. O espectro de massas (**Figura 211**) apresenta pico do íon pseudomolecular de m/z 447,4 D.

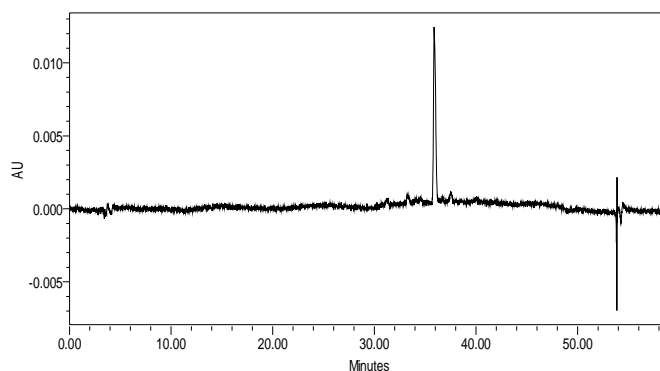


Figura 210 – Cromatograma da **Fração C₁₂ 9** obtido por LC-UV-MS. $\lambda = 254$ nm, $t_R = 36.089$ min. Condições: modo reverso de eluição, com fase móvel, A: H₂O:HCOOH 0,1 %, B MeOH:ACN 1:1; fase estacionária: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); em sistema gradiente início: 5:95 %; 20 min.: 25:75 %; 35 min.: 1:1; 45 min.: 100 % de MeOH/ACN 1:1 até 50 min. Detectores: Espectro de UV na região de 200 nm a 400 nm. Massas: Modo electro-spray negativo (ES-), varrendo de 200-1200 m/z ; Capilar: 3,50 kV; Cone: 30 V; Extrator: 3,0 V; RF lens: 0,5; temperatura inicial: 100° C; Dessolvation temperatura: 350° C; Fluxo de gás: dessolvation – 400 L/h; Cone – 50 L/h.

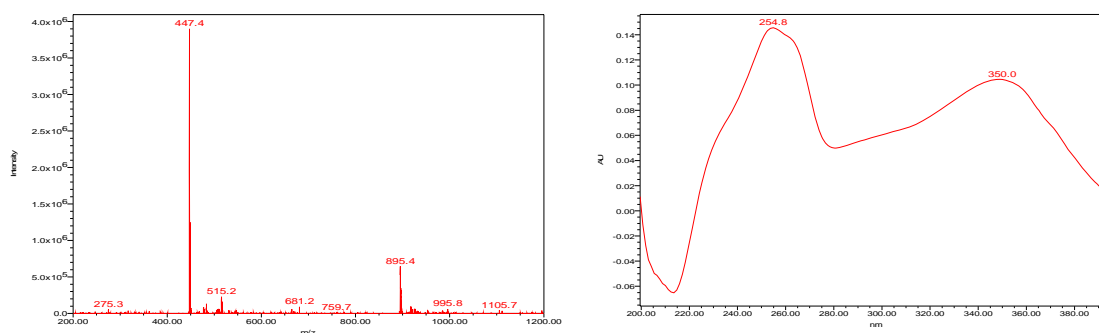


Figura 211 – Espectros de MS e de UV da **Fração C₁₂ 9**.

Portanto, o flavonóide presente na **Fração C₁₂ 9** é Quercetina-3-*O*- α -L-ramnosídeo (**S₇₉**) já identificada no EBMI.

4.4 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS DE *Helietta puberula*.

4.4.1 – Determinação Estrutural dos Constituintes do Extrato Bruto Hexano do Caule (EBHC) de *H. puberula*

O estudo fitoquímico do EBHC de *H. puberula* levou a obtenção de 8 frações (**Fluxograma 11**, p. 50), das quais parte foi analisada diretamente por GC-MS para identificação de seus constituintes químicos e parte foi submetida a novos fracionamentos cromatográficos. Deste extrato foi possível identificar hidrocarbonetos, álcoois e ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e triterpenos.

4.4.1.1 – Constituintes Químicos da **Fração C₁₃ 2**

Ao analisar o espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, **Figura 212**, p. 234) foi possível observar um sinal de deslocamento químico em δ 5,34 ppm (*m*) correspondente a sinal de hidrogênios olefinicos, referente a sinais de hidrogênios da posição C-5 de esteróides; os sinais entre δ 4,83 ppm e δ 4,50 ppm (*m*) referentes a hidrogênios olefinicos das posições C-22 e C-23; os sinais entre δ 0,65 ppm e δ 2,32 ppm referentes aos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos. Estes dados sugerem a presença de esteróides na **Fração C₁₃ 2**.

O espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz, **Figuras 213-215**, p. 235-236) apresentou sinais em δ 172,90 ppm, δ 172,65 ppm e δ 172,50 ppm referentes a sinais de carbonos de carbonilas; os sinais em δ 73,32 ppm e δ 72,87 ppm, sinais de carbonos C-3 e δ 139,43 ppm sinal do C-6 de núcleo esteroidal. De acordo com o que foi previamente analisado, observou-se que a amostra continha mais de uma substância.

Optou-se analisar esta fração por GC-MS para auxiliar na identificação dos constituintes presentes. Para verificar a presença de ácidos carboxílicos, que

provavelmente, poderiam estar presentes na amostra, uma alíquota da **Fração C₁₃ 2** foi submetida à reação de metilação para posterior análise.

Após análise do cromatograma e dos espectros de massas (**Figuras 216 e 217**, p. 237-240) verificou-se a presença de 27 compostos (**Tabela 34**), sendo que 5 foram identificados como os esteróides. Foi calculado o índice de Kovats para algumas substâncias e comparados com os obtidos por ADAMS (**103**), confirmando a proposta de identificação.

Tabela 34 – Constituintes químicos presentes na **Fração C₁₃ 2** com comparação de seus índices de Kovats com os índices obtidos de ADAMS (**103**). A análise por GC-MS.

Nome	t _R dos Picos da Fração C₁₃ 2	Porcentagem Relativa (%)	IK	IK*
Ácido octadienóico S ₈₉	3,926	2,84	1635	-
Ácido dodecanóico S ₃₉	4,833	0,90	1717	1724
Ácido nonanedióico S ₃₇	5,108	5,91	1740	1727
Ácido nonadióico S ₉₀	5,558	0,17	1776	-
Ácido tridecanóico S ₉₁	5,725	0,90	1790	-
Ácido tridecanedióico S ₉₂	6,400	0,67	1841	-
Ácido tetradecanóico S ₁₉	7,483	1,64	1921	1922
Ácido 12-metil-tetradecanóico S ₉₃	8,500	1,23	1994	-
Ácido pentadecanóico S ₆₁	8,908	0,90	2022	-
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona S ₂₀ *	9,217	0,27	2044	2025
Ácido hexadecanóico S ₂₁	10,392	20,50	2134	2125
Ácido 14-metil-hexadecanóico S ₉₄	11,400	5,84	2200	2197
Ácido heptadecanóico S ₃₄	11,758	2,10	2225	-
Ácido (Z) 9-octadecenóico S ₂₄	12,842	17,66	2264	-
Ácido octadecanóico S ₂₅	13,167	4,81	2329	-
Ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienóico S ₂₃	13,983	5,71	2391	-
Ácido icosanóico S ₂₆	15,750	2,77	2528	-
Ácido docosanóico S ₂₈	18,175	1,10	2728	-
Ácido tricosanóico S ₂₉	19,458	0,93	2826	-
Ácido tetracosanóico S ₃₀	20,967	1,84	-	-
Ácido pentacosanóico S ₉₅	22,767	0,90	-	-
Ergost-5-em-3β-ol S ₉₆ *	24,033	0,27	-	-
Ácido hexacosanóico S ₃₁	25,025	0,77	-	-
5,6-Ciclopropano-estigma-22(Z)-en-3-ona S ₉₇ *	26,150	1,00	-	-
Ergosta-5,22-dien-3-acetato S ₉₈ *	26,800	3,04	-	-
Estigma-5,22-dien-3-acetato S ₉₉ *	29,592	7,48	-	-
Sitosterol S ₄₅ *	39,100	7,85	-	-

IK - Índice de Retenção de Kovats calculado e IK* - Índice de Retenção de Kovats de ADAMS, (**103**).

*Presentes na Fração e identificados, apesar de não serem derivados de ésteres metílicos.

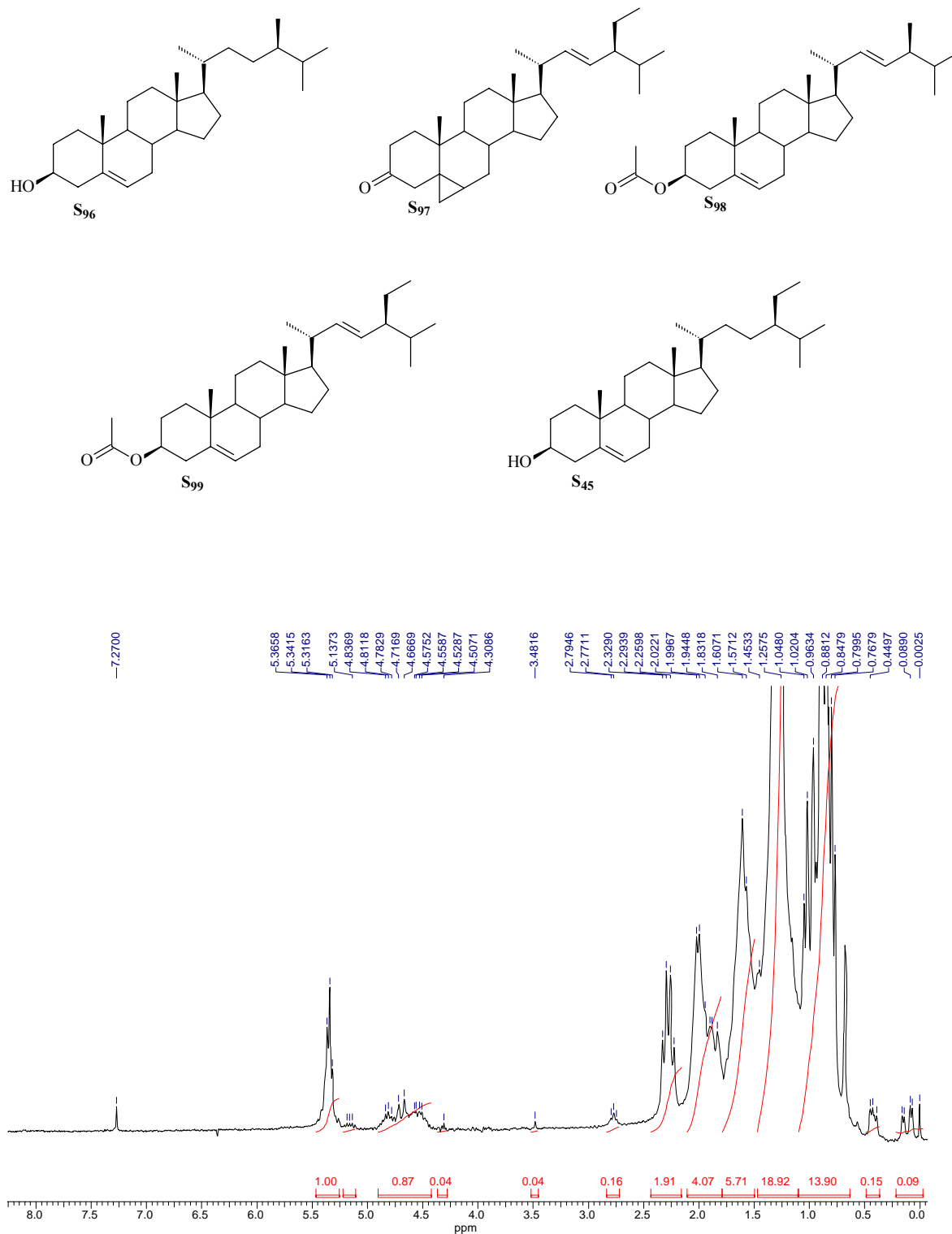


Figura 212 - Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da Fração C₁₃ 2.

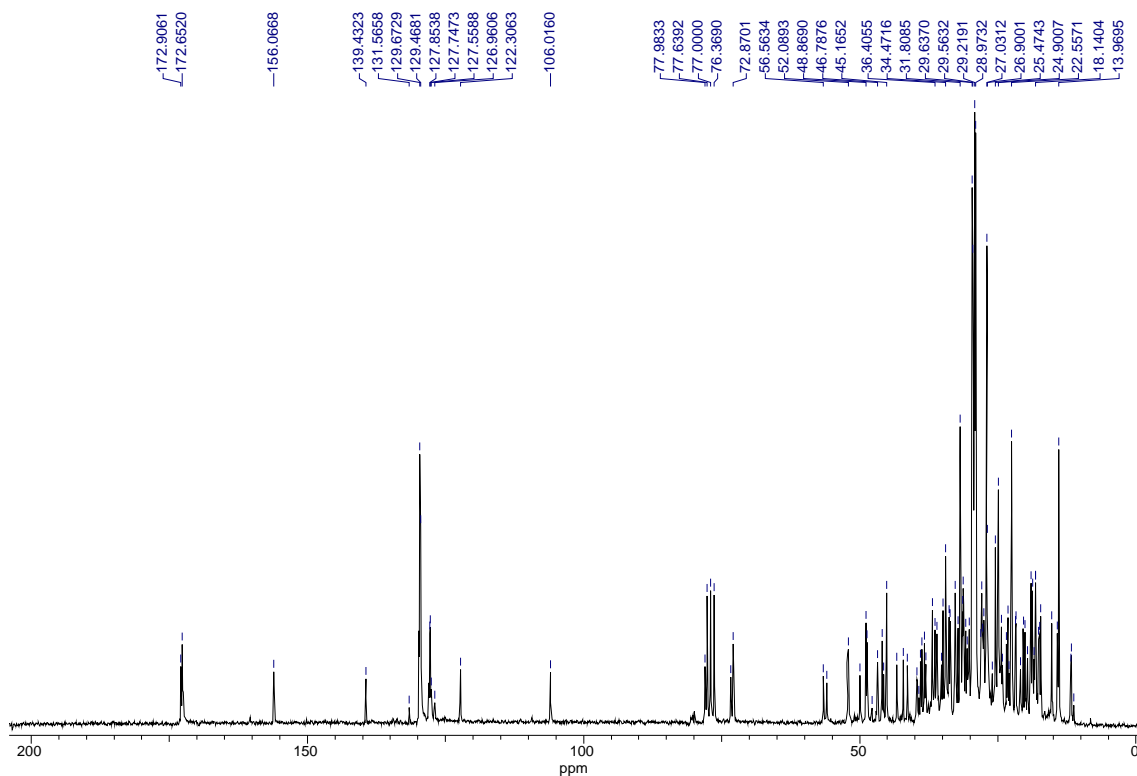


Figura 213 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₁₃ 2**.
 δ 156,06 ppm, $\text{C}=\text{CH}_2$; δ 122,30 ppm, CH_2 .

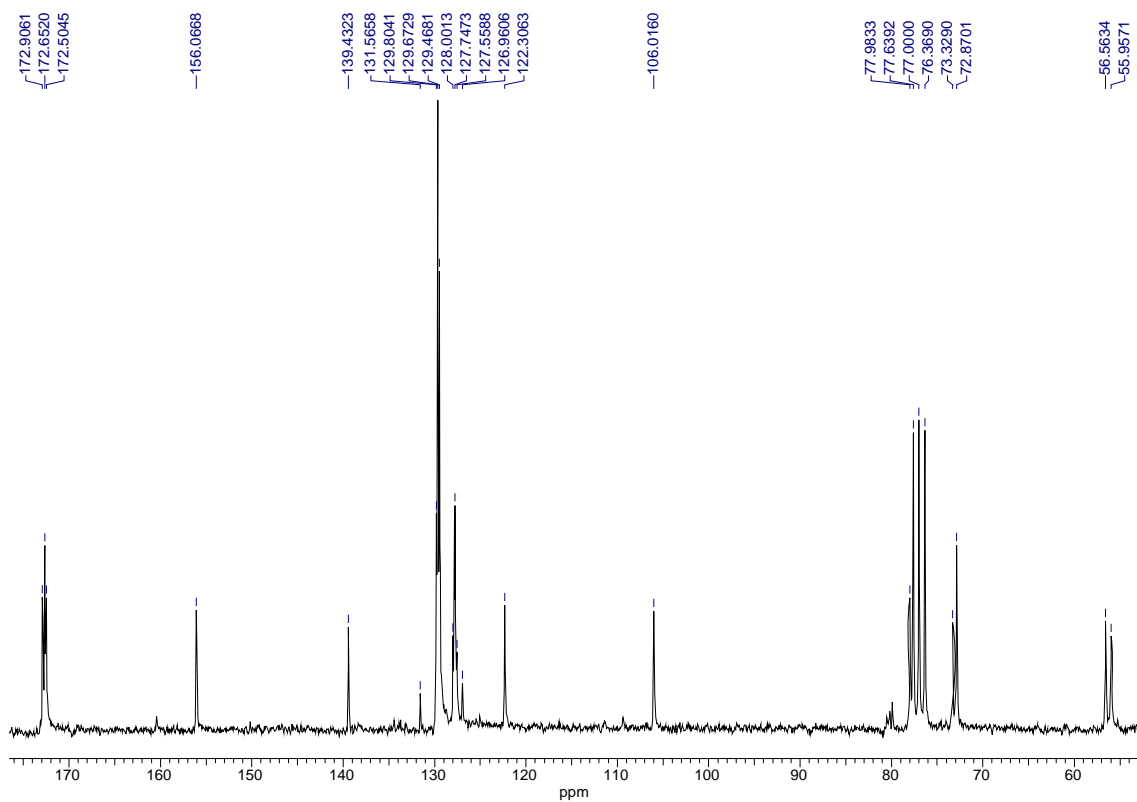


Figura 214 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) da **Fração C₁₃ 2**.
 δ 156,06 ppm, C quaternário; δ 106,01 ppm, CH_2 .

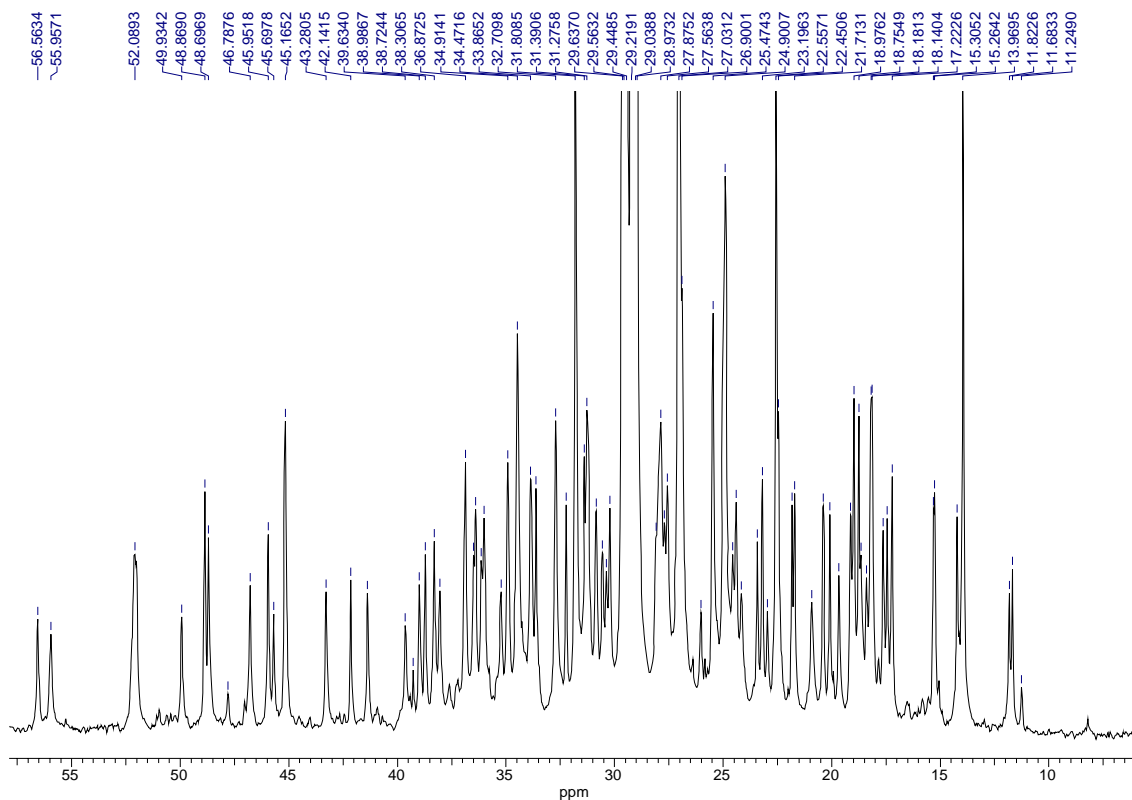


Figura 215 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) da Fração $\text{C}_{13} 2$.

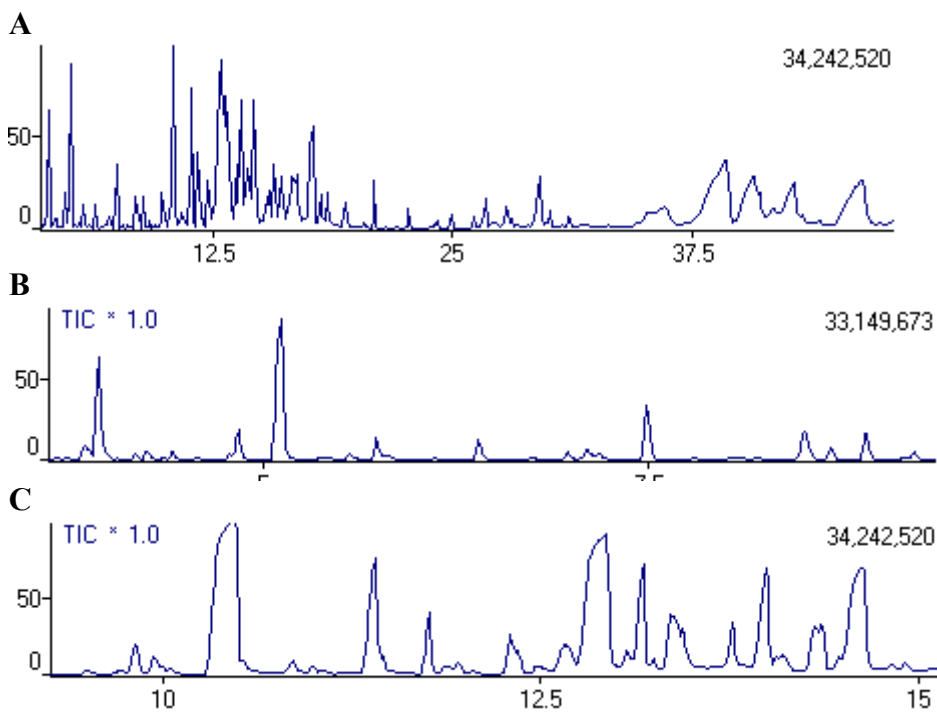


Figura 216 (continuação) - Cromatogramas da Fração $\text{C}_{13} 2$ obtidos por GC-MS.

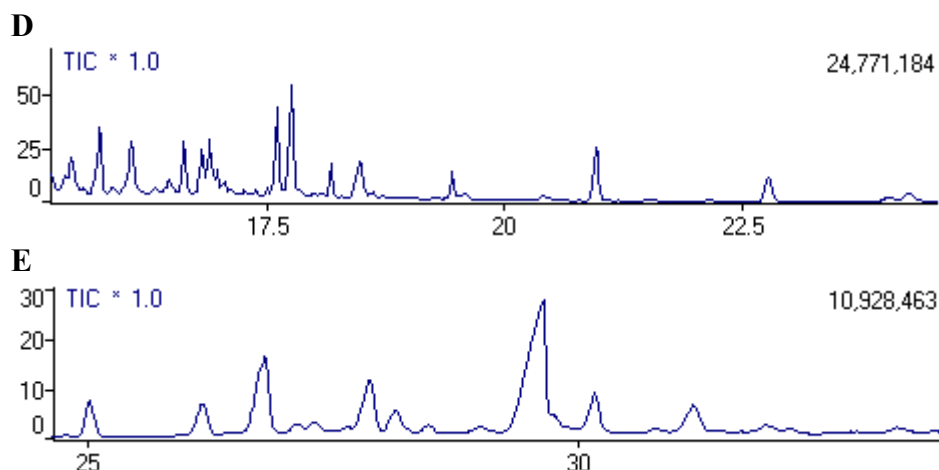
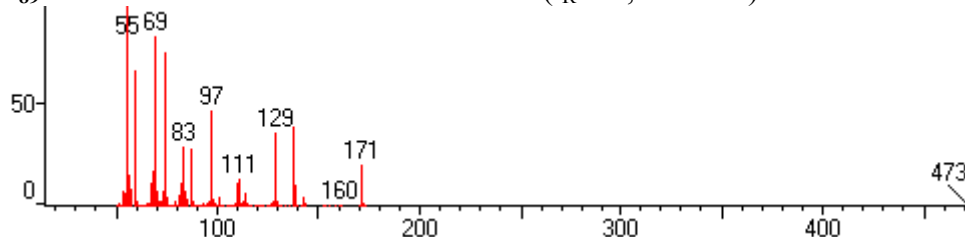
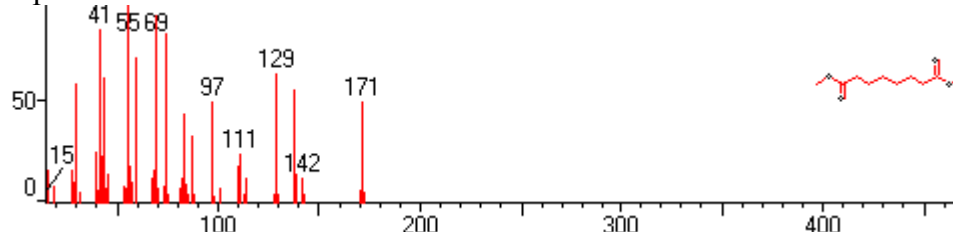


Figura 216 – Cromatogramas da **Fração C₁₃ 2** obtidos por GC-MS. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 10,0 min.

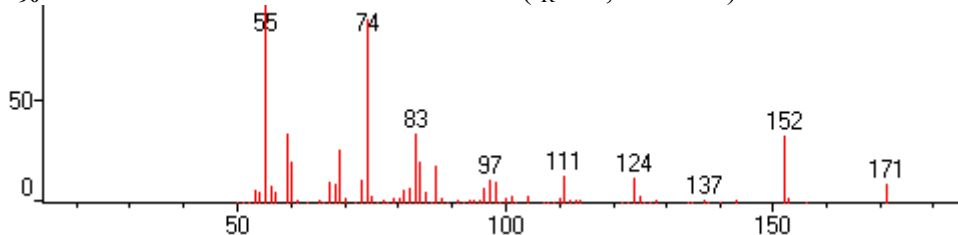
S₈₉ - Éster metílico do ácido octadienóico ($t_R = 3,926$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₉₀ - Éster metílico do ácido nonadióico ($t_R = 5,558$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

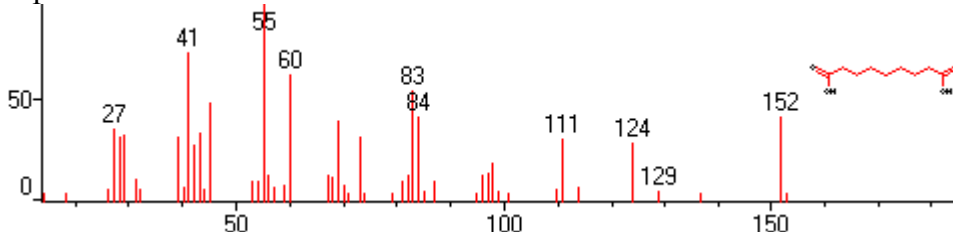
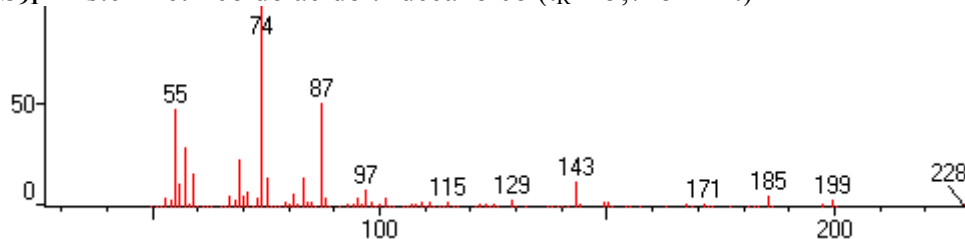
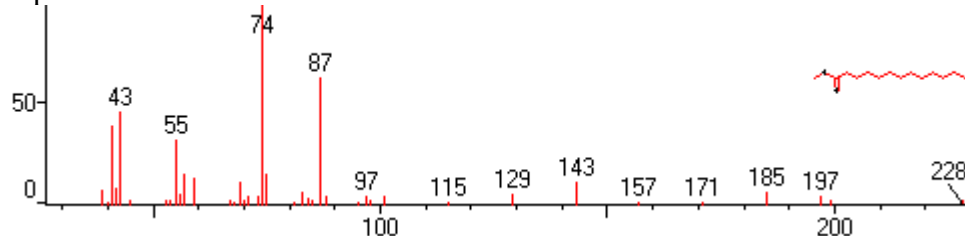


Figura 217 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₁₃ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

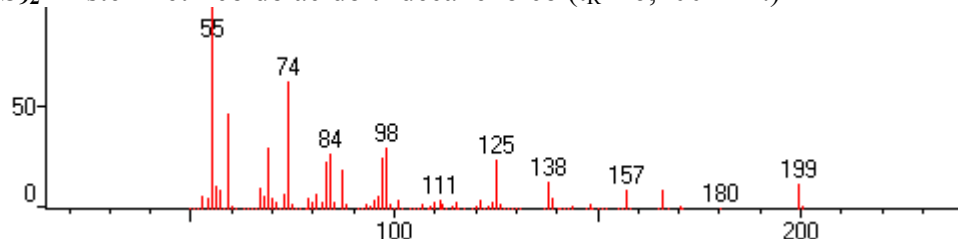
S₉₁ - Éster metílico do ácido tridecanóico ($t_R = 5,725$ min.)



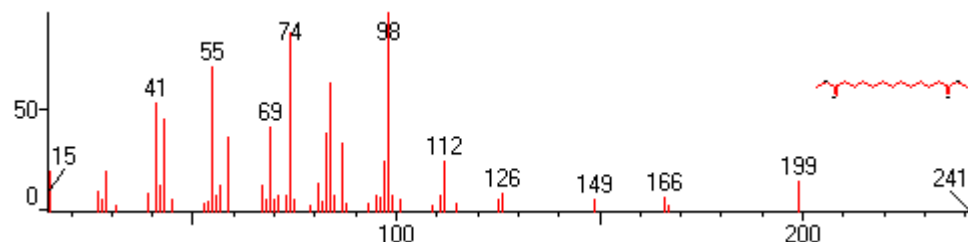
Espectro de massas da biblioteca:



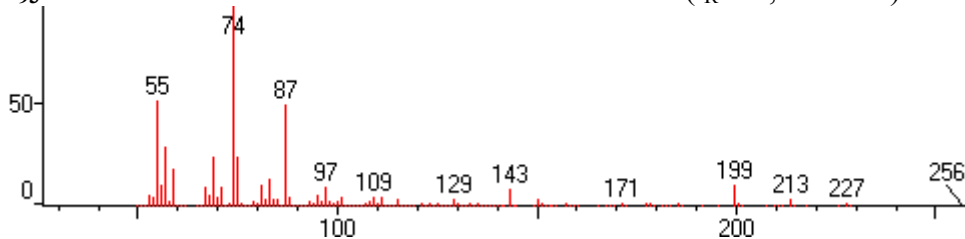
S₉₂ - Éster metílico do ácido tridecanenóico ($t_R = 6,400$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₉₃ - Éster metílico do ácido 12-metil-tetradecanóico ($t_R = 8,500$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

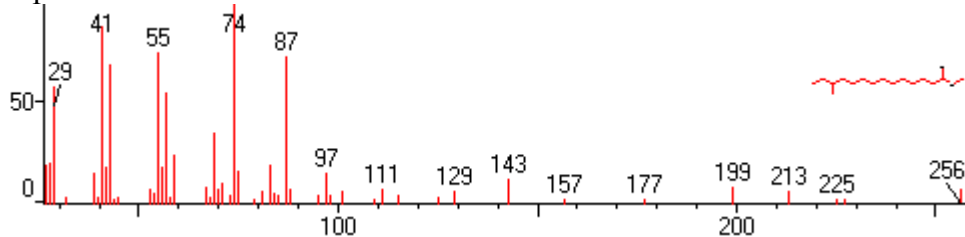
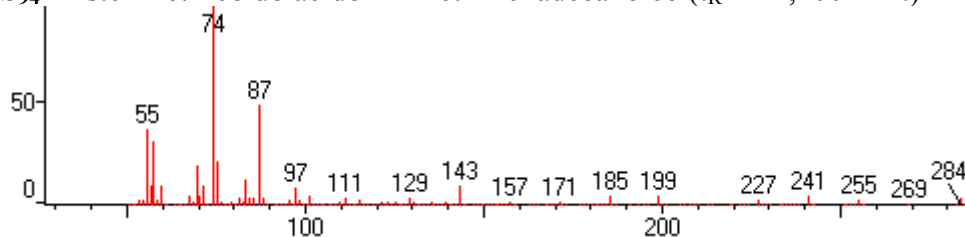
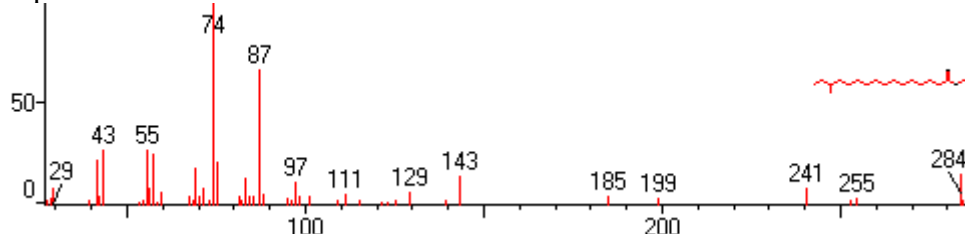


Figura 217 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₁₃ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

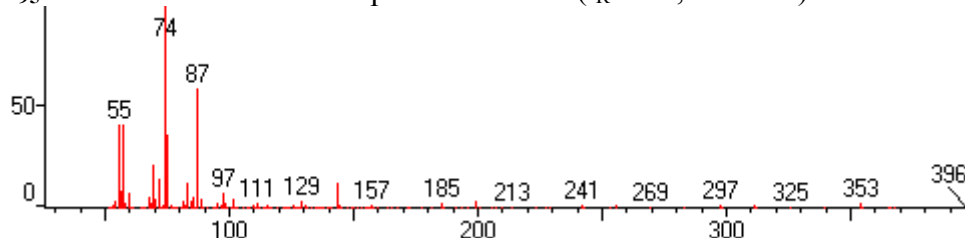
S₉₄ - Éster metílico do ácido 14-metil-hexadecanóico ($t_R = 11,400$ min.)



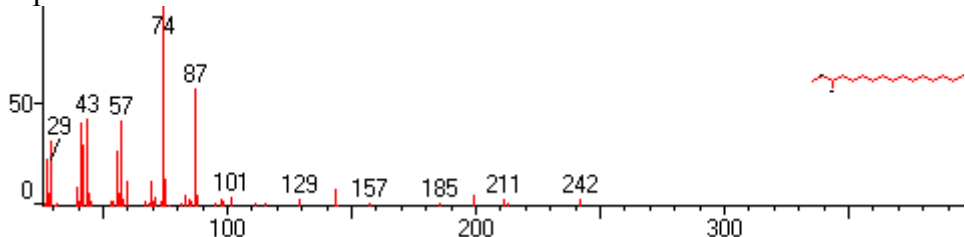
Espectro de massas da biblioteca:



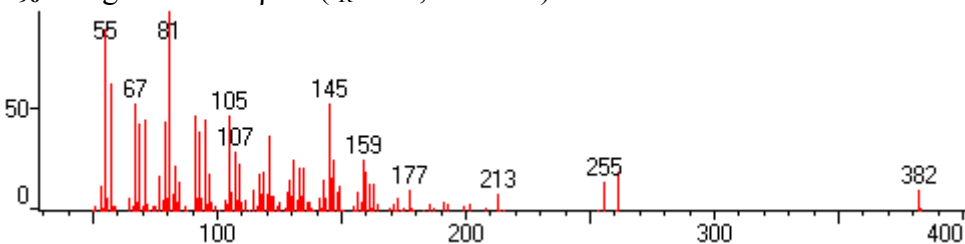
S₉₅ - Éster metílico do ácido pentacosanóico ($t_R = 22,767$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₉₆ - Ergost-5-em-3 β -ol ($t_R = 24,033$ min.)



Espectro de massas da biblioteca:

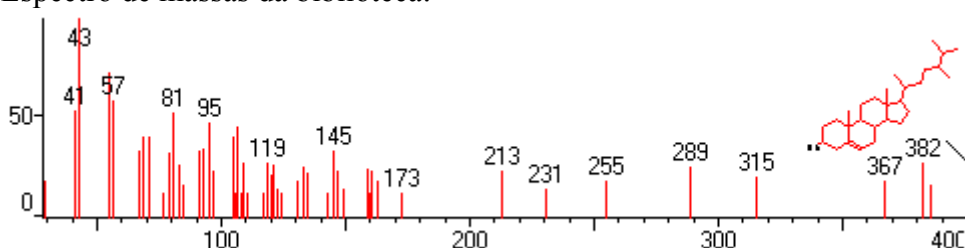
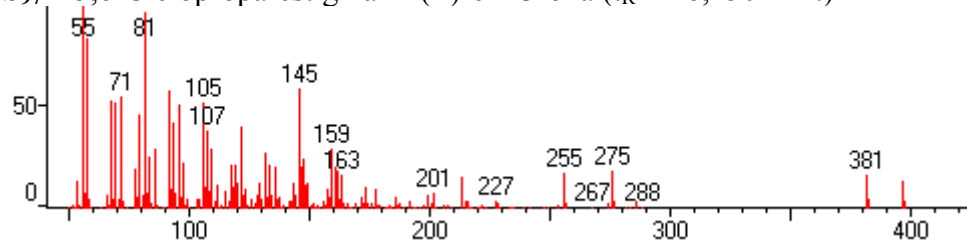
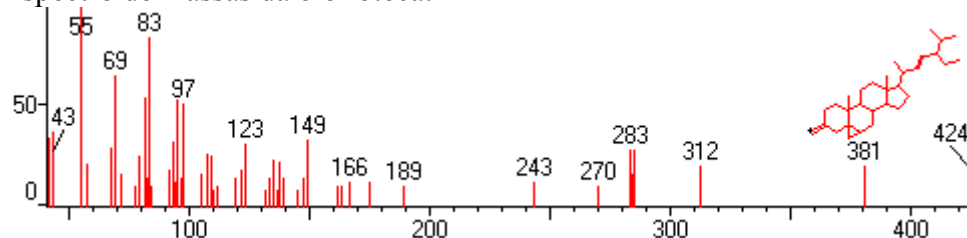


Figura 217 (continuação) - Espectros de massas da **Fração C₁₃ 2** obtidos por GC-MS em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

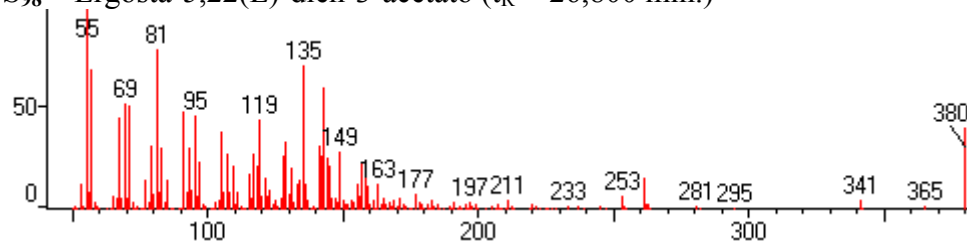
S₉₇ – 5,6-Ciclopropa-estigma-22(Z)-em-3-ona (t_R = 26,150 min.)



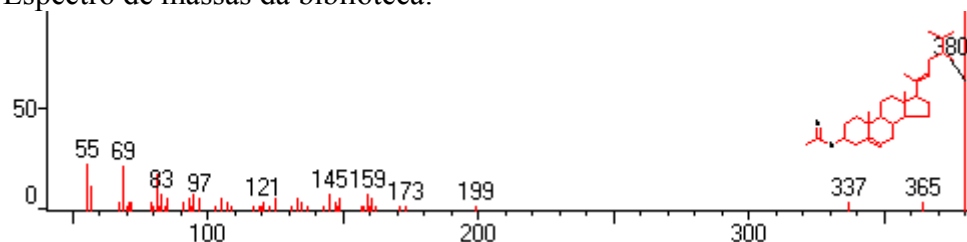
Espectro de massas da biblioteca:



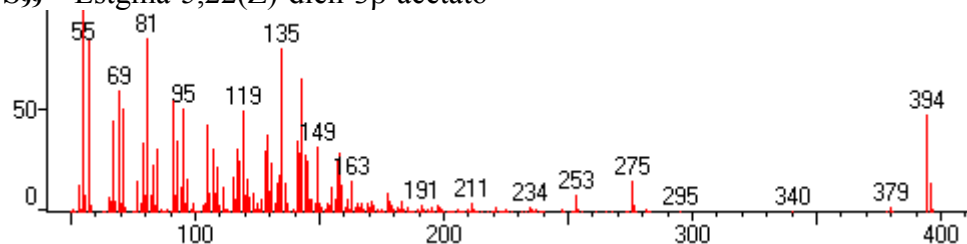
S₉₈ – Ergosta-5,22(E)-dien-3-acetato (t_R = 26,800 min.)



Espectro de massas da biblioteca:



S₉₉ – Estigma-5,22(Z)-dien-3β-acetato



Espectro de massas da biblioteca:

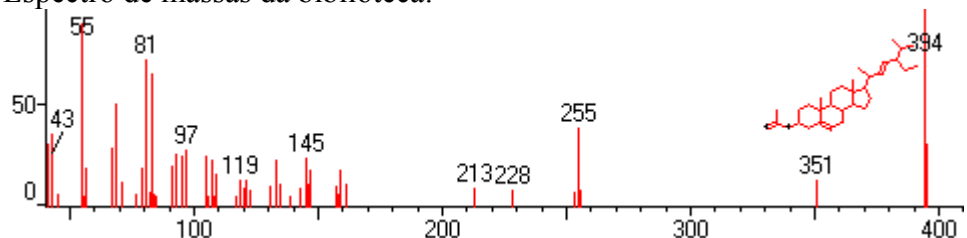


Figura 217 – Espectros de massas dos compostos identificados na Fração C₁₃ 2.

4.4.1.2 - Constituintes Químicos da Fração C₁₃ 8

A Fração C₁₃ 8 apresentou-se como sólido amorfo que após análise por CCDC observou-se estar pura e seguiram-se os procedimentos usuais para sua identificação.

A análise do espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, Figuras 218-219, p. 245) da Fração C₁₃ 8 pode-se verificar que a substância analisada era um triterpeno, portanto, foi possível observar o conjunto de sinais em δ 3,64 ppm (*dd*, $J = 6,0$ e $10,0$ Hz) correspondente ao sinal do hidrogênio carbinólico, outro sinal em δ 2,44 ppm (*m*) sugerindo a presença de hidrogênios adjacentes à carbonila. Na região entre δ 2,0 ppm e δ 0,80 ppm foram observados um conjunto de sinais sobrepostos referentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos. Observou-se também oito sinais singletos referentes aos hidrogênios metílicos em δ 1,92 ppm, δ 1,15 ppm, δ 1,11 ppm, δ 1,08 ppm, δ 1,04 ppm, δ 1,01 ppm, δ 0,94 ppm e δ 0,88 ppm.

O espectro de RMN ¹³C da Fração C₁₃ 8 (Figuras 220-221, p. 246), apresentou a presença de 30 sinais de deslocamentos químicos, reforçando a possibilidade de se tratar de um triterpeno. Observou-se um sinal em δ 218,17 ppm relativo a um sinal de carbono carbonílico; três sinais em δ 86,56 ppm, δ 86,38 ppm e δ 70,33 ppm sugerindo a presença de três carbonos carbinólicos. Na Tabela 35 (p. 242) são listados os dados obtidos e os da literatura para o composto identificado como ocotilona (S₁₀₀).

Tabela 35 - Dados de RMN ^{13}C da **Fração C₁₃ 8** (CDCl_3 , 200 MHz) em comparação com dados obtidos da Literatura **107** (CDCl_3 , 75,46 MHz).

Carbono	Lit. 107	Fração C ₁₄ 8	Carbono	Lit. 107	Fração C ₁₄ 8
C-1	39,90	39,90	C-16	27,00	26,99
C-2	34,10	34,11	C-17	50,20	50,20
C-3	218,10	218,17	C-18	16,10	16,12
C-4	47,40	47,44	C-19	15,20	15,20
C-5	55,40	55,42	C-20	86,50	86,56
C-6	19,70	19,66	C-21	24,10	24,10
C-7	34,80	34,86	C-22	34,60	34,65
C-8	40,30	40,33	C-23	26,40	26,39
C-9	49,80	49,80	C-24	86,40	86,38
C-10	36,90	36,90	C-25	70,30	70,33
C-11	22,30	22,31	C-26	26,80	26,74
C-12	25,80	25,85	C-27	27,20	27,24
C-13	43,00	43,01	C-28	27,80	27,82
C-14	50,00	50,00	C-29	21,00	21,02
C-15	31,40	31,46	C-30	16,30	16,34

A estrutura proposta foi confirmada pela análise dos dados de RMN 2D discutidos a seguir.

O espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz, **Figuras 222-223**, p. 247) da **Fração C₁₃ 8** mostrou correlações pouco resolvidas devido a grande sobreposição de sinais, podendo apenas fazer algumas atribuições nas quais o sinal em δ 3,64 ppm correlaciona-se com o sinal centrado em δ 1,88 ppm, o sinal em δ 2,44 ppm correlaciona-se com os sinais centrados em δ 1,92 ppm e δ 1,47 ppm, os sinais em δ 1,92 ppm e δ 1,47 ppm correlacionam-se entre si e este último também correlaciona-se com o sinal centrado em δ 1,09 ppm.

O mapa de correlações de gHSQC (CDCl_3 , 400 MHz, **Figura 224**, p. 248) da **Fração C₁₃ 8** mostrou as correlações entre sinais de carbonos e hidrogênios a 1J e o mapa de correlações de gHMBC (CDCl_3 , 400 MHz, **Figura 225**, p. 248) de difícil

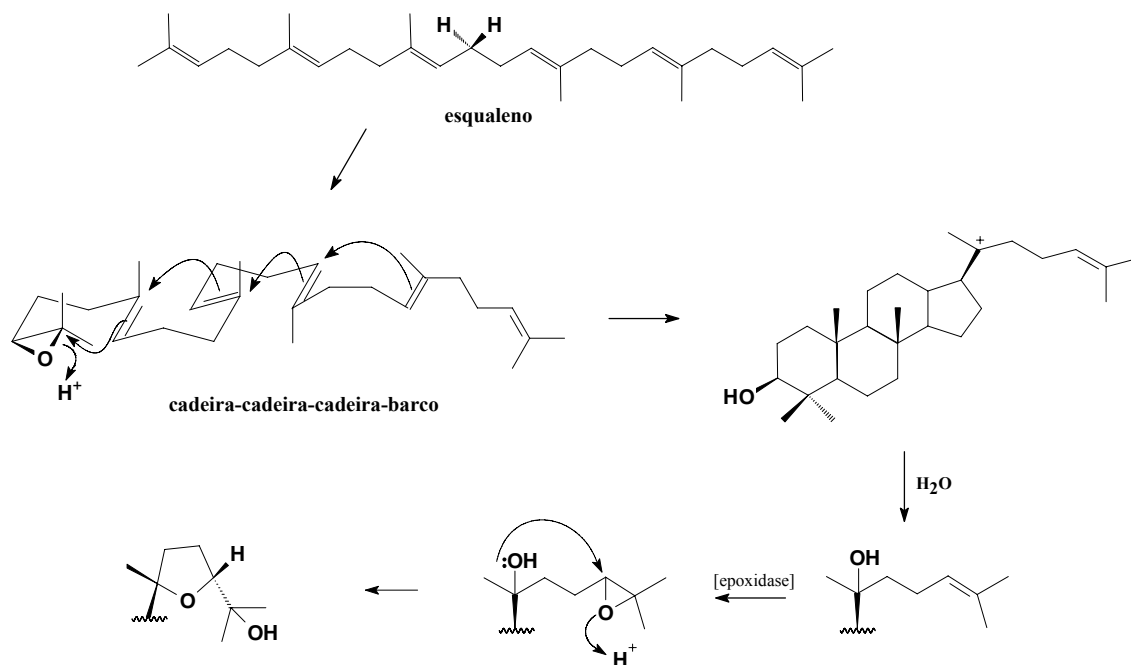
interpretação, permitiu interpretar apenas algumas correlações de carbonos e hidrogênios a ^{2-3}J . Estes dados encontram-se listados na **Tabela 36**.

Tabela 36 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) **Fração C₁₃ 8**.

Fração C₁₃ 8			
gHSQC ($^1J_{\text{CH}}$)		gHMBC ($^{2-3}J_{\text{CH}}$)	
δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
218,17	-	-	-
86,56	-	-	-
86,38	3,64	70,33	3,64
70,33	-	-	-
55,42	1,40	-	-
50,20	1,46	-	-
50,00	-	-	-
49,80	1,88	-	-
47,44	-	-	-
43,01	1,66	-	-
40,33	-	-	-
39,90	1,45	-	-
36,90	-	-	-
34,86	1,27	-	-
34,65	1,67	-	-
34,11	2,44	218,17; 39,90 e 34,11	2,44
31,46	1,47	-	-
27,82	1,19	-	-
27,24	1,15	86,40	1,15
26,99	1,79	-	-
26,74	1,08	-	-
26,39	1,86	-	-
25,85	1,81	-	-
24,10	1,11	-	-
22,31	1,51	-	-
21,02	1,04	218,17	1,04
19,66	1,50	-	-
16,34	0,88	-	-
16,12	0,94	40,33 e 50,00	0,94
15,20	1,01	49,80	1,01

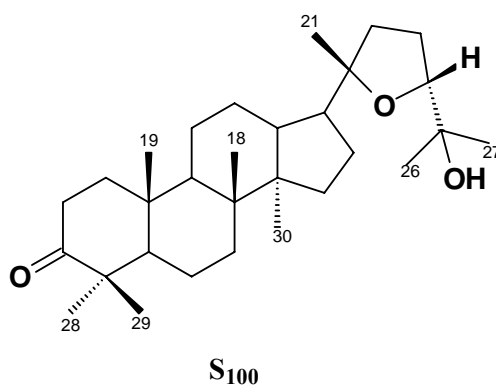
De acordo com esta análise verificou-se que o triterpeno em questão é do tipo damarano, que são triterpenos formados a partir da ciclização do esqualeno (precursor de todos os triterpenos) quando o mesmo se encontra na conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco. Este possui anel tetraidrofurano em seu esqueleto o qual é formado a

partir da epoxidação da ligação entre C-24 e C-25, favorecendo um ataque nucleofílico da hidroxila ao epóxido, promovendo a formação do anel de cinco membros (**Esquema 1**) (**108**).



Esquema 1 - Biogênese dos Triterpenos do Tipo Damarano.

Para identificação estrutural foram comparados os dados de RMN, principalmente, os de ¹³C (**Tabela 36**, p. 243) com dados da literatura e verificou-se tratar do triterpeno do tipo damarano conhecido como ocotilona.



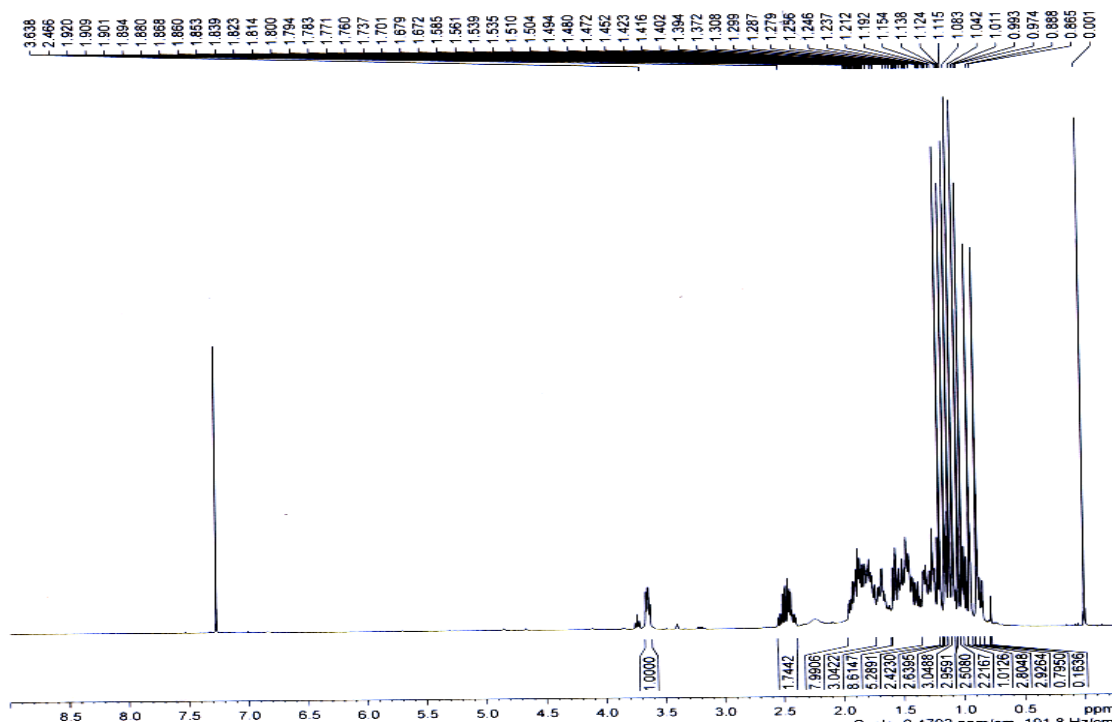


Figura 218 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

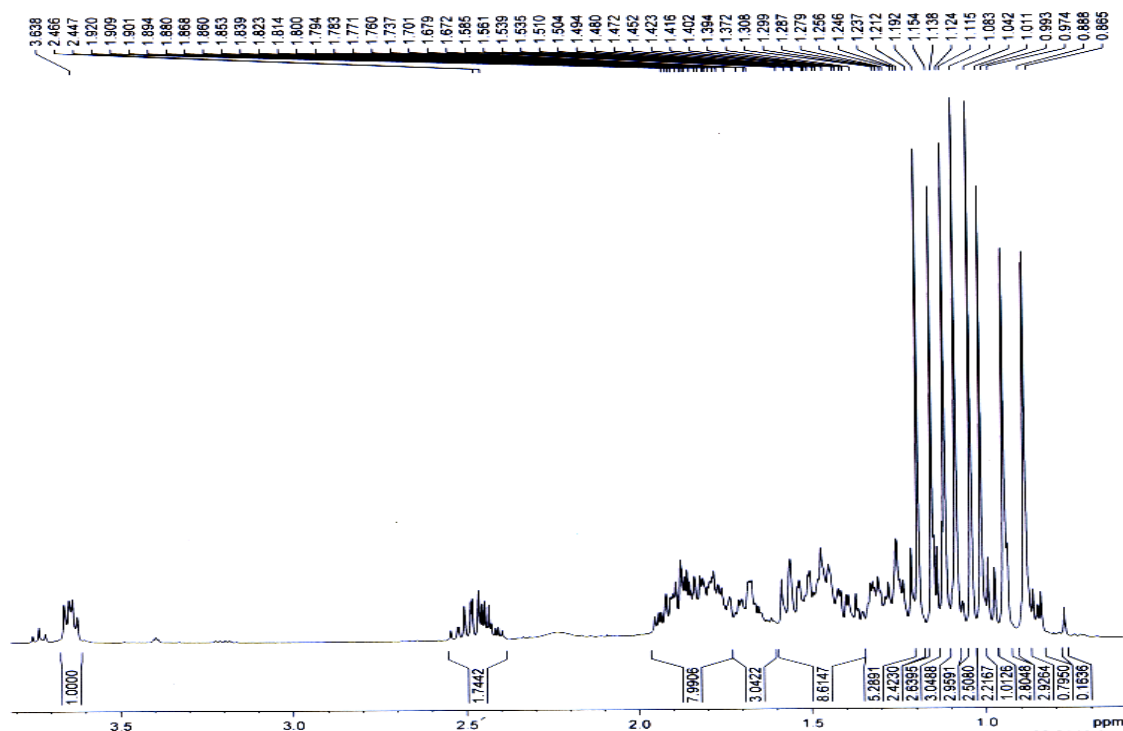


Figura 219 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

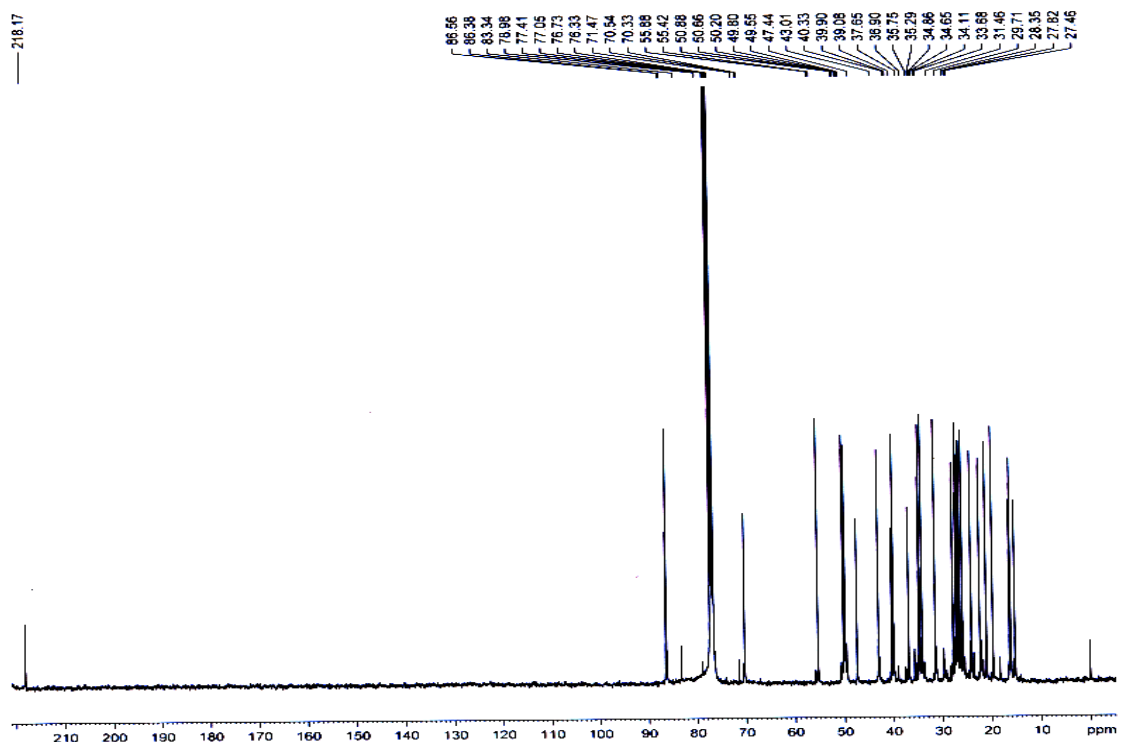


Figura 220 – Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

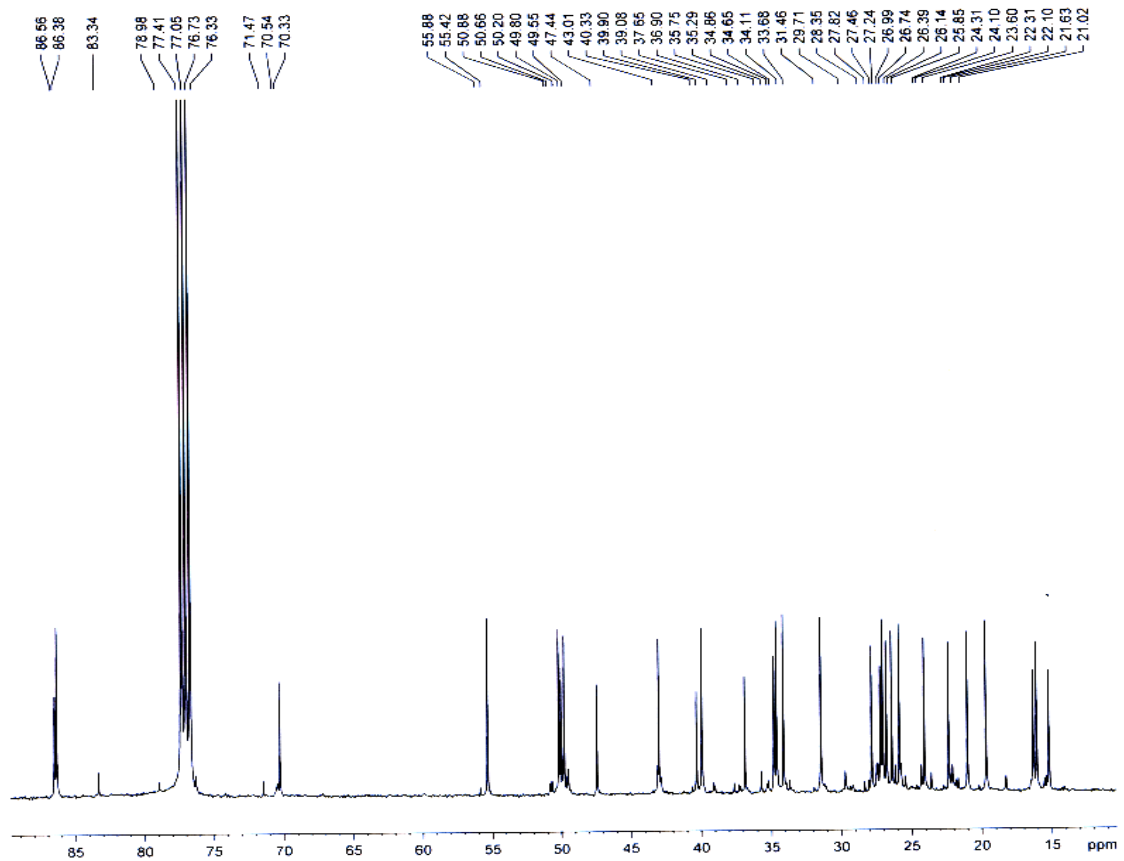


Figura 221 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

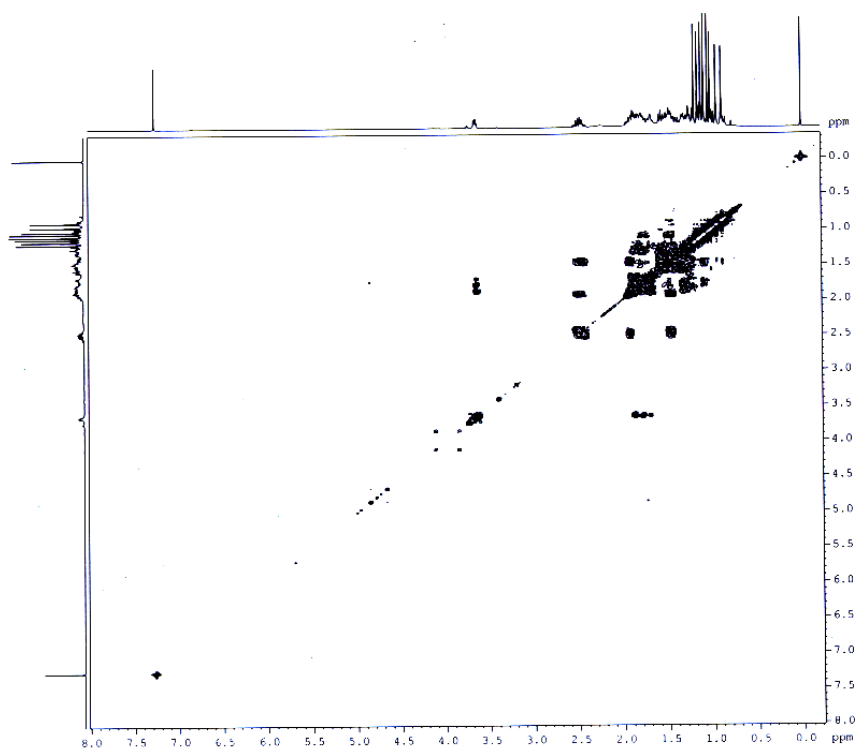


Figura 222 – Espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

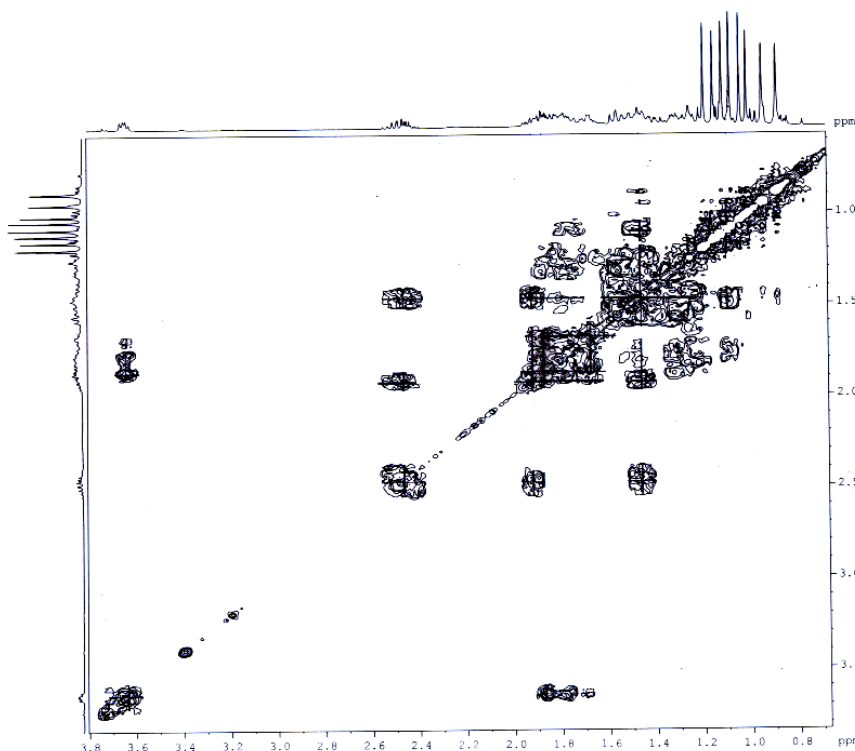


Figura 223 – Ampliação do espectro de gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração C_{13} 8.

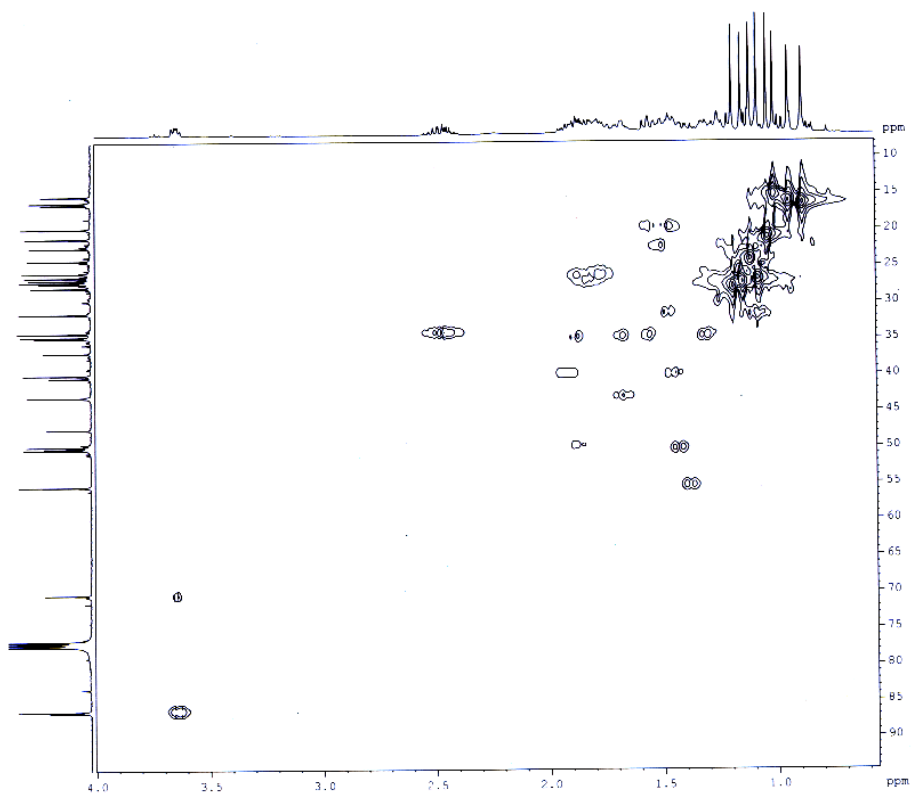


Figura 224 – Mapa de correlações de gHSQC (CDCl₃, 400 MHz) da Fração C₁₃ 8.

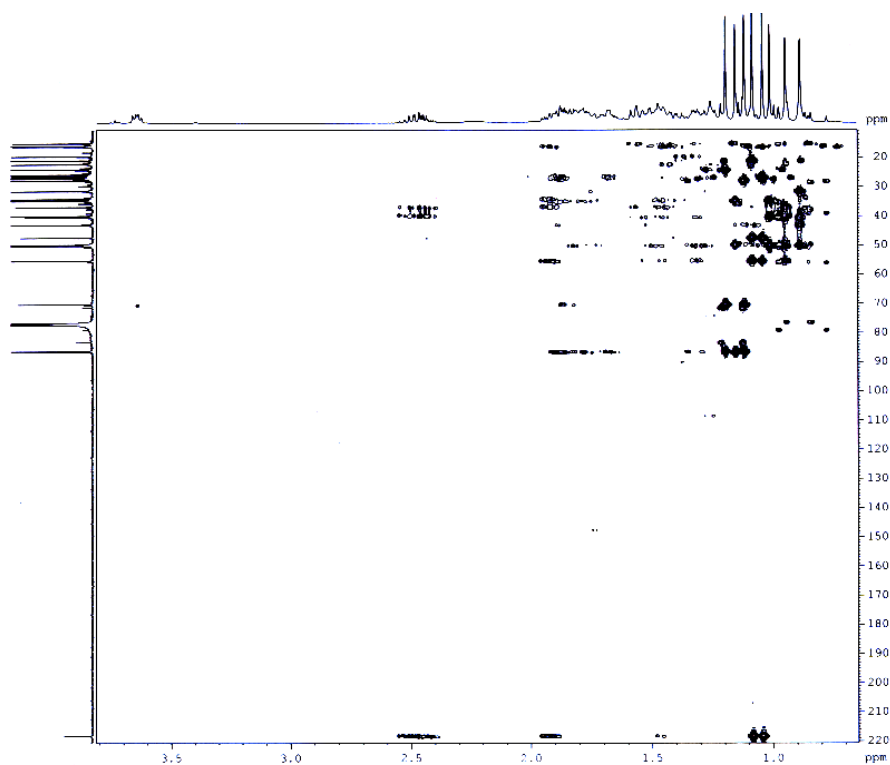


Figura 225 – Mapa de correlações de gHMBC (CDCl₃, 400 MHz) da Fração C₁₃ 8.

4.4.2 - Determinação Estrutural do Constituinte do EBMC de *H. puberula*

O EBMC de *H. puberula* foi analisado por CCDC e RMN e observou-se que era bem complexo para elucidação de seus constituintes químico devido à presença de açúcares e outros constituintes cuja classe não foi possível determinar apenas por esta análise. Sendo assim, este foi analisado também por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) com seleção da faixa de comprimento de onda entre 200-500 nm na região do UV, em sistema analítico no modo reverso de eluição com condições gradiente exploratória, como é possível observar nos Cromatogramas **A** e **B** da **Figura 226** (p. 250). Depois de obtidas as condições adequadas, o EBMC foi fracionado por CC (Sephadex[®] LH-20) dando origem a **Coluna C₁₅**. Deste fracionamento foram obtidas um total de 28 frações, algumas das quais foram submetidas ao fracionamento por HPLC-UV preparativo adequando as condições para este modo de análise por meio de cálculos de escalonamento, com objetivo de isolamento dos constituintes presentes das frações alisadas.

A **Fração C₁₅ 3** foi identificada como modelo para facilitar a determinação dos demais constituintes obtidos do fracionamento por HPLC das espécies *S. adstringens* e *H. puberula*, desta fração identificou-se os flavonóides **S₇₀ - S₇₃** (ver p. 164).

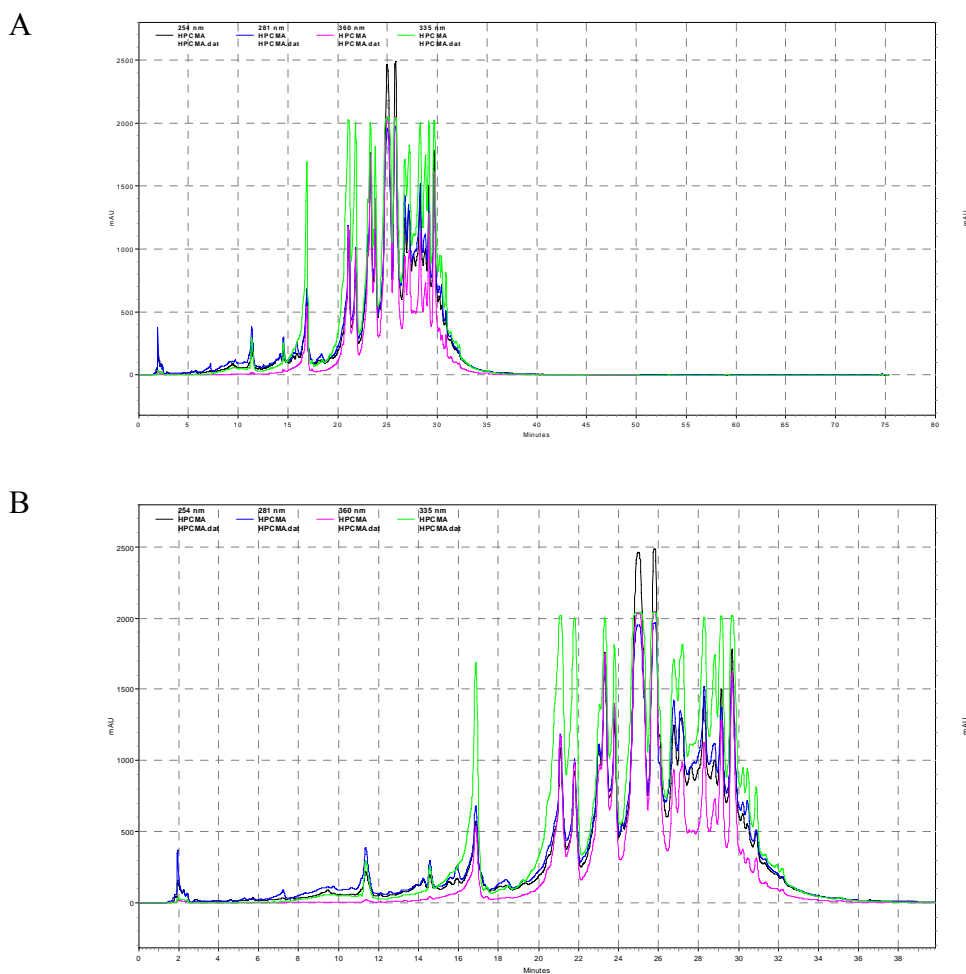


Figura 226 – Cromatogramas (A: sem alteração, B: ampliação) de eluição gradiente do EBMC de *H. puberula*. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5 μ m); usando gradiente linear de 5 % a 100 % B em 60 min. Fase móvel: A: H₂O:HCOOH 1 %, B MeOH:ACN 1:1, vazão 1 mL/min. Vinj = 20 μ L, [] = 1 mg/mL. Detector: DAD. λ = 212 nm; λ = 240 nm; λ = 315 nm e λ = 350 nm.

4.5 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1 - ATIVIDADE INSETICIDA

4.5.1.1 – Atividade Inseticida de *Stryphnodendron adstringens* em Abelhas *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica*

Os bioensaios de atividade frente às abelhas produtoras de mel foram realizados pelo aluno Tiago Favaro de Souza do Centro de Estudos de Insetos Sociais – IB – UNESP de Rio Claro - SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osmar Malaspina.

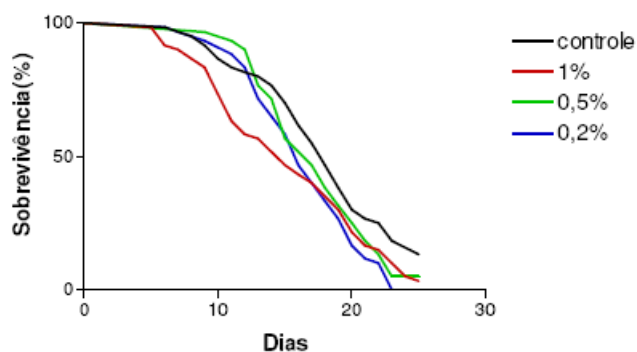
4.5.1.1.1 – Bioensaios com operárias

Nos experimentos com os Extratos Brutos Diclorometano e Metanólico obtidos das Inflorescências e dos Pedúnculos de *S. adstringens* foram utilizadas abelhas operárias das espécies *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* para o teste de toxicidade.

Foi possível verificar nos gráficos da **Figura 227** (p. 252) que o EBDI apresentou atividade tóxica frente às duas espécies de abelhas nas concentrações utilizadas, quando comparadas com o grupo controle, sendo que foi mais significativo para a espécie *S. postica* nas três concentrações testadas (0,2 %; 0,5 % e 1,0 %).

A **Tabela 37** (p. 252) apresenta os resultados da análise estatística para o experimento de toxicidade no experimento de ingestão do EBDI para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, nas concentrações de 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %. Foi possível observar que a concentração mais efetiva foi a de 1,0 %, quando comparadas com o grupo controle, e a espécie mais susceptível foi a *S. postica* em todas as concentrações testadas.

A.



B.

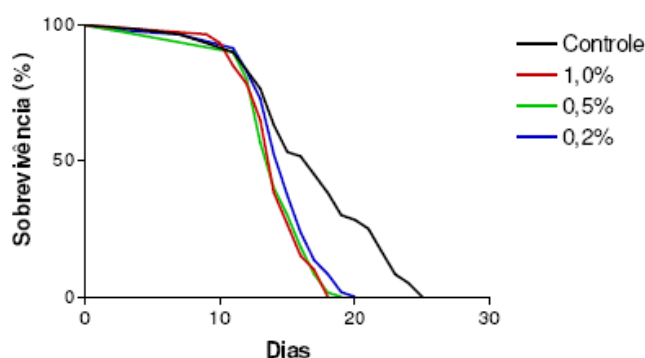


Figura 227 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBDI para operárias de *A. mellifera* (A) e *S. postica* (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Tabela 37 - Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBDI para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Espécies	<i>Apis mellifera</i>			<i>Scaptotrigona postica</i>		
	0,20 %	0,50 %	1,00 %	0,20 %	0,50 %	1,00 %
χ^2	6,999	5,173	9,225	26,400	23,020	15,870
Df	1	1	1	1	1	1
P	0,0082	0,0029	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Significativo	sim	sim	Sim	sim	sim	Sim
Méd. Controle	18	18	17	17	17	17
Méd. Tratamento	16	16	15	14	14	15

As quatro primeiras frações (**Frações C₄ 1-4**) obtidas do Fracionamento Cromatográfico do EBDI foram testadas frente às abelhas da espécie *A. mellifera*.

(Figuras 228-231). As **Frações C₄ 1-4** foram efetivas no teste de atividade inseticida por ingestão frente a esta espécie de abelhas, não perdendo assim, a atividade após o fracionamento do Extrato Bruto, sendo que, a **Fração C₄ 4** foi a mais significativa em todas as concentrações, quando comparada com as demais frações e ao grupo controle.

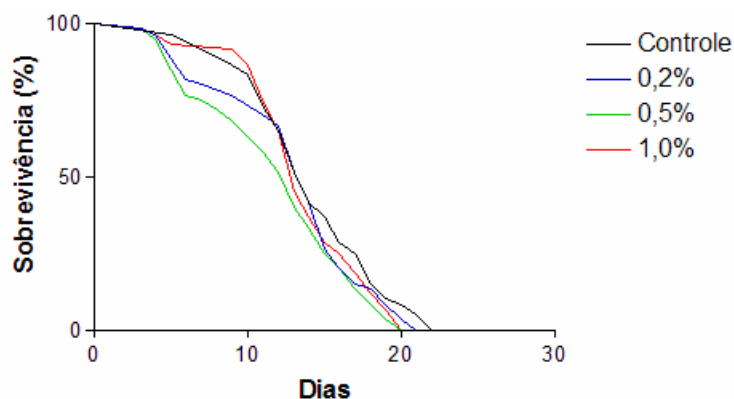


Figura 228 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a **Fração C₄ 1** para operárias de *A. mellifera* nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

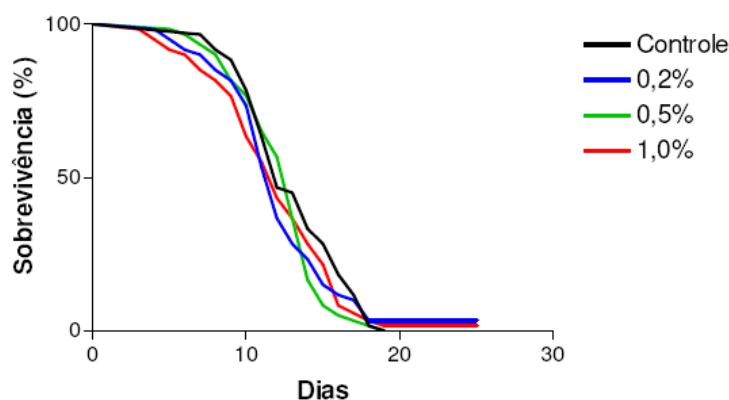


Figura 229 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a **Fração C₄ 2** para operárias de *A. mellifera* nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

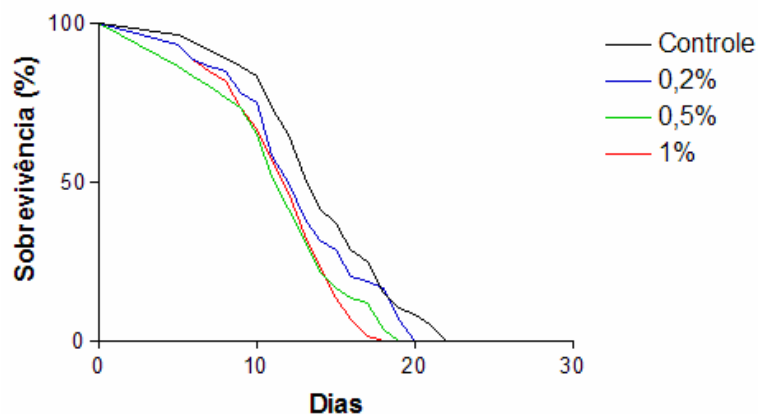


Figura 230 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a **Fração C₄ 3** para operárias de *A. mellifera* nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

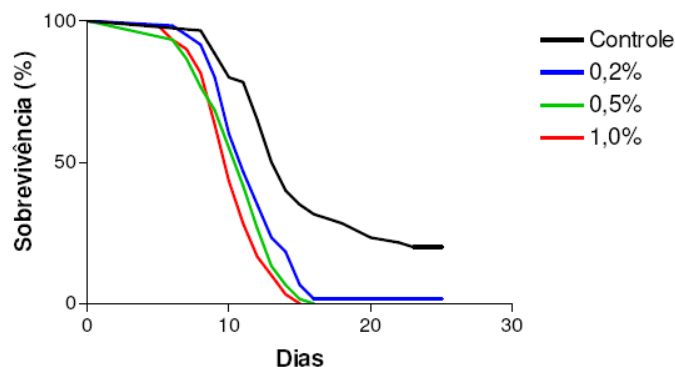


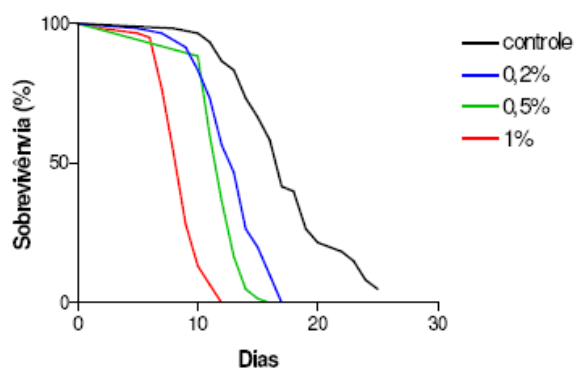
Figura 231 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com a Fração C₄ 4 para operárias de *A. mellifera* nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

A identificação dos constituintes químicos destas frações foi realizada e indicou a presença de ácidos graxos como compostos majoritários, principalmente na Fração C₄ 4, a mais ativa, indicando assim que esta classe de composto, provavelmente, seja a responsável pela atividade.

O experimento com o EBMI em todas as concentrações (Figura 232, p. 255) analisadas demonstrou atividade tóxica para as duas espécies de abelhas, *A. mellifera* e *S. postica*, para o mesmo, sendo que para este Extrato Bruto a primeira espécie foi a mais susceptível e que a atividade tóxica aumenta com o aumento da concentração, quando comparado com o grupo controle.

A Tabela 38 apresenta o resultado da análise estatística para o EBMI, e observa-se que a concentração de 1 % apresenta maior atividade frente à espécie *A. mellifera*, reforçando a análise feita anteriormente. Deste extrato foi possível identificar flavonóides glicosilados como compostos majoritários, sugerindo desta forma que é esta classe de compostos responsáveis pela atividade biológica neste extrato.

A.



B.

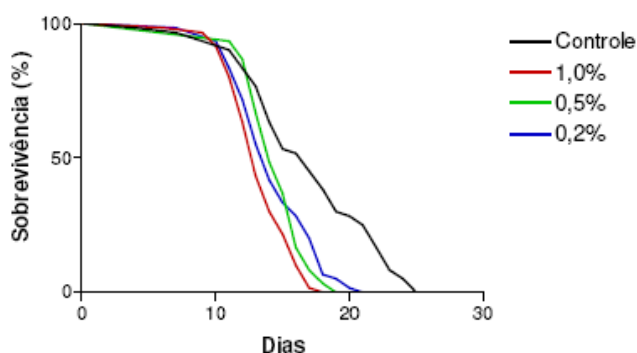


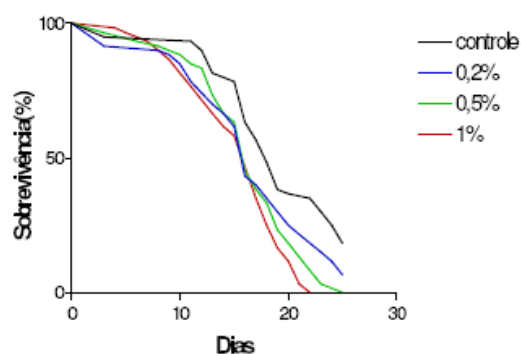
Figura 232 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBMI para operárias de *A. mellifera* (A) e *S. postica* (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Tabela 38 - Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBMI para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Espécies	<i>Apis mellifera</i>			<i>Scaptotrigona postica</i>			
	Concentração	0,20 %	0,50 %	1,00 %	0,20 %	0,50 %	1,00 %
χ^2		42,030	76,120	120,500	32,940	19,210	18,480
Df		1	1	1	1	1	1
P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Significativo		sim	sim	Sim	sim	sim	sim
Méd. Controle		17	17	17	17	17	17
Méd. Tratamento		13	12	9	14	14	13

O EBDP apresentou atividade inseticida frente às duas espécies de abelhas, em todas as suas concentrações, quando comparadas com o grupo controle, como pode ser observado na **Figura 233**. Observa-se que a espécie *S. postica* foi a mais susceptível para o experimento com este extrato. A **Tabela 39** apresenta o resultado da análise estatística para este experimento com o EBDP, confirmando a análise realizada anteriormente.

A.



B.

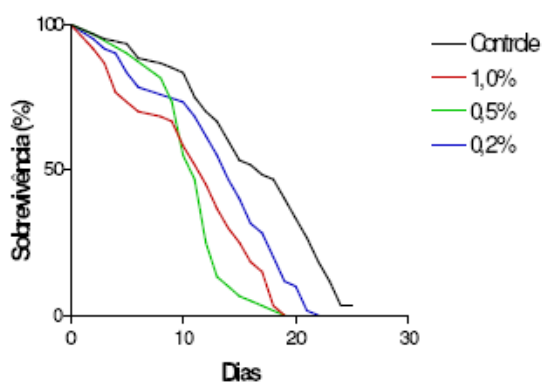


Figura 233 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBDP para operárias de *A. mellifera* (A) e *S. postica* (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

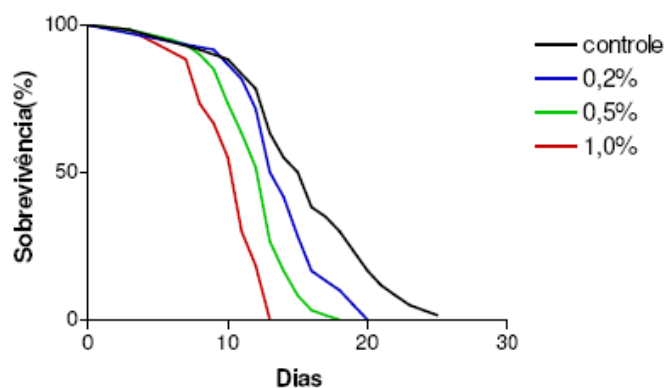
Tabela 39 - Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBDP para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Espécies	<i>Apis mellifera</i>			<i>Scaptotrigona postica</i>		
	0,20 %	0,50 %	1,00 %	0,20 %	0,50 %	1,00 %
Concentração	0,20 %	0,50 %	1,00 %	0,20 %	0,50 %	1,00 %
X^2	5,240	13,550	19,890	30,430	41,720	13,840
Df	1	1	1	1	1	1
P	0,0182	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
Significativo	sim	sim	Sim	sim	sim	Sim
Méd. Controle	18	18	18	17	17	17
Méd. Tratamento	16	16	16	12	11	13

A análise dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas da Cromatografia deste extrato foi bem similar da observada para o EBDI, desta forma, não foi necessária à realização dos ensaios com as frações provenientes.

O EBMP também apresentou efeito tóxico frente às duas espécies de abelhas (**Figura 234**, p. 258) e a atividade é mais efetiva à medida que se aumenta a concentração do mesmo, quando comparado com o grupo controle, sendo que na concentração de 1,0 % a espécie *A. mellifera* apresentou-se mais susceptível que a espécie *S. postica*, na mesma concentração. A análise estatística dos resultados deste experimento ajuda a reforçar esta observação (**Tabela 40**, p. 258).

A .



B .

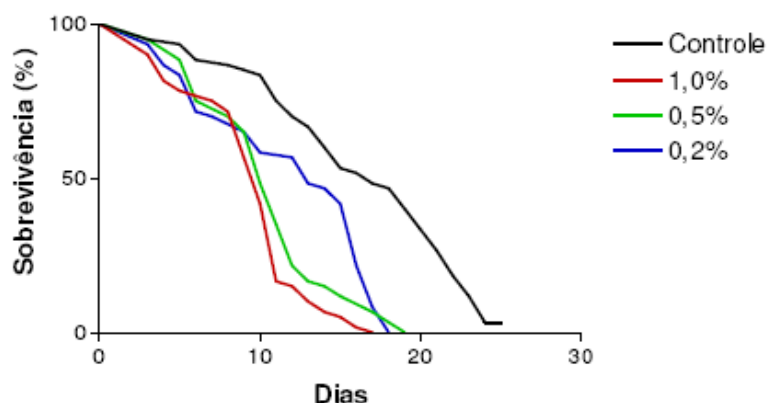


Figura 234 - Curvas de sobrevivência do experimento de ingestão realizado com o EBMP para operárias de *A. mellifera* (A) e *S. postica* (B), nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Tabela 40 - Resultado da análise estatística obtida na comparação entre as concentrações dos tratamentos e do grupo controle no experimento de ingestão do EBMP para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Espécies	<i>Apis mellifera</i>			<i>Scaptotrigona postica</i>		
	0,20 %	0,50 %	1,00 %	0,20 %	0,50 %	1,00 %
X ²	10,340	31,520	64,110	53,980	41,520	24,600
Df	1	1	1	1	1	1
P	0,0013	<0,0001	<0,0001	0,0013	<0,0001	<0,0001
Significativo	Sim	sim	Sim	sim	sim	sim
Méd. Controle	15,5	15,5	15,5	17	17	17
Méd. Tratamento	13	13	11	10	10	13

As curvas de sobrevivência para os experimentos de ingestões realizados com os Extratos Brutos Diclorometânicos e Metanólicos das Inflorescências e Pedúnculos para operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, e com as **Frações C₄ 1-4** obtidas do Extrato Bruto Diclorometano das Inflorescências de *S. adstringens* para operárias de *A. mellifera*, apresentaram-se tóxicas em todas nas concentrações 0,2 %; 0,5 % e 1,0 %.

Observou-se também, que a espécie *S. postica* é mais susceptível aos Extratos Brutos Diclorometânico, enquanto a espécie *A. mellifera* ao Extrato Bruto Metanólico no modelo e nas concentrações testadas.

4.5.1.1.2 - Bioensaios com larvas

Na **Tabela 41** encontram-se os resultados obtidos no experimento com larvas de *Apis mellifera* de 1 a 5 dias de idade, utilizando três concentrações diferentes dos Extratos Brutos Metanólicos e Diclorometânicos das Inflorescências e dos Pedúnculos de *S. adstringens* (0,2 %; 0,5 % e 1,0 %), adicionadas às dietas das larvas de operárias.

Na **Tabela 42** (p. 259) encontram-se os resultados obtidos no experimento com larvas de *Scaptotrigona postica* de 1 a 5 dias de idade, utilizando três concentrações diferentes dos extratos metanólicos e diclorometano, das inflorescências e pedúnculos de *S. adstringens* (0,2 %; 0,5 % e 1,0 %), adicionadas às dietas das larvas de operárias.

Os resultados mostraram uma elevada taxa de mortalidade para as larvas tratadas em relação às larvas do controle. Considerando também que para os bioensaios com larvas, a espécie *S. postica* mostrou-se mais resistente em comparação a espécies *A. mellifera*. No entanto, para as duas espécies de abelhas, foram idênticos os sintomas e as alterações no desenvolvimento provocadas pela alimentação com Extratos Brutos de *S. adstringens*.

Tabela 41 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. mellifera* com 1 a 5 dias de idade durante o seu desenvolvimento, alimentadas com dieta e Extratos Brutos de *S. adstringens* em diferentes concentrações (%).

Extratos dia\conc.	EBDI			EBMI			EBDP			EBMP			Cont.
	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	0,2%	0,5%	1,0%	0,2%	0,5%	1,0%	
1°	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2°	18	33	33	33	37,5	37,5	25	25	33	25	18	25	12,5
3°	37,5	60	75	72,5	72,5	75,0	50	60	60	50	60	60	25
4°	85	100	90	90	100	100	60	72,5	72,5	85	85	100	60
5°	95	-	100	100	-	-	72,5	90	100	100	100	-	75

O EBMI foi o mais efetivo que os demais extratos no modelo testado, visto que no quarto dia de experimento já havia morrido a maiorias das larvas de *A. mellifera* alimentadas com este extrato para as três concentrações utilizadas quando comparado com as demais alimentadas com os outros extratos.

Tabela 42 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *S. postica* com 1 a 5 dias de idade durante o seu desenvolvimento, alimentadas com dieta e Extratos Brutos de *S. adstringens* em diferentes concentrações (%).

Extratos dia\conc.	EBDI			EBMI			EBDP			EBMP			Cont.
	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	
1°	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2°	8	20	33	25	25	33	25	20	33	25	30	25	4
3°	20,5	33	60	50	55	75	50	40	60	55	60	60	12
4°	50	60	90	80	90	100	60	70	70	85	85	100	40
5°	80	95	100	100	100	-	95	90	100	100	100	-	70

Para as larvas de *S. postica* as que se desenvolveram menos foram às alimentadas com os extratos metanólicos apresentando pouca diferença de mortalidade no quarto dia nas concentrações de 0,2 % e 0,5 %.

4.5.1.2 – Atividade Inseticida de *Stryphnodendron adstringens* em Formigas Cortadeiras, *Atta sexdens rubropilosa*

Os bioensaios de atividade inseticida em formigas cortadeiras foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais – IB – UNESP de Rio Claro - SP, por alunos daquela instituição sob a orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

4.5.1.2.1 – Bioensaios com operárias

Foram realizados ensaios em formigas cortadeiras com os extratos brutos de *S. adstringens* (vide **Tabela 43**).

Tabela 43 – Porcentagem de mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* alimentadas com extratos de *Stryphnodendron adstringens* na concentração de 2 mg/mL.

EXTRATO	DIA										S ₅₀
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	0	0	10	16	18	60	80	86	100	14 ^a
EBDI	0	0	0	6	16	26	54	76	92	100	14 ^a
EBMI	0	2	10	38	48	56	74	86	96	100	10 ^b
EBDP	0	0	2	8	16	28	58	72	94	100	13 ^a
EBMP	0	4	16	28	46	66	86	92	98	100	9 ^c

S₅₀ = sobrevivência média. Letras após o valor do S₅₀ mostram diferenças significativas de acordo com o “log-rank test” (b = 0,01 < p < 0,05; c = p < 0,01).

O S₅₀ corresponde ao dia do experimento em que 50 % das formigas ainda estavam vivas. Letras distintas em relação à do controle indicam diferenças significativas, ou seja, que houve uma mortalidade maior que a do controle, assim o extrato, contém alguma substância tóxica às formigas cortadeiras que esteja afetando a sobrevivência das mesmas.

Por meio da **Tabela 40** (p. 257) pode-se perceber que os extratos metanólicos possam ser promissores na obtenção de substâncias que sejam tóxicas, já que os extratos

de inflorescência e pedúnculo obtidos a partir deste solvente causaram mortalidade significativa das formigas cortadeiras.

4.5.1.3 – Atividade anti-fúngica de *S. adstringens* e *D. mollis* ao Fungo Simbionte *L. gongylophorus*.

Os bioensaios frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus* das formigas cortadeiras foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais – IB da UNESP de Rio Claro - SP, pela aluna Roberta N. A. Almeida sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

Os extratos brutos de *D. mollis* e *S. adstringens* que foram submetidos a ensaios *in vitro* frente ao fungo simbionte das formigas cortadeiras nas concentrações de 1000 µg/mL são indicados nas **Tabelas 44 e 45** (p. 262).

Foi possível observar na **Tabela 44** que apenas o extrato diclorometânico obtido das inflorescências de *D. mollis* apresentou efeito inibitório contra o fungo simbionte em uma porcentagem de 100 %, ou seja, inibiu por completo o crescimento do micélio.

A única substância isolada até o momento testada, foi o flavonóide astilbina (**S₁**), devido a pouca quantidade das demais substâncias. Este flavonóide apresentou 100 % de inibição, demonstrando ser potencial agente fungicida.

Na **Tabela 45** (p. 262), os extratos diclorometânicos de *S. adstringens* apresentaram efeito inibitório em 100 % e 80 %, para os pedúnculos e as inflorescências, respectivamente.

Analisando as duas tabelas é possível observar que há necessidade de se testar os extratos metanólicos, nos quais os extratos obtidos das inflorescências contaminaram e os obtidos dos pedúnculos não foram testados para as duas espécies vegetais.

Tabela 44 - Efeito dos extratos de *D. mollis* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote de *Acromyrmex balzani*.

ÓRGÃO	EXTRATO BRUTO	% DE INIBIÇÃO DO FUNGO
Inflorescências	Diclorometânico	100
Inflorescências	Metanólico	Contaminou
Pedúnculos	Diclorometânico	20
Pedúnculos	Metanólico	-

Concentração dos extratos: 1000 µg.mL⁻¹; Controle: = 0 % de inibição; Peso seco do inóculo: média 11,8 mg.mL⁻¹; (-) não testado.

Tabela 45 - Efeito dos extratos *S. adstringens* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote de *Acromyrmex balzani*.

ÓRGÃO	EXTRATO BRUTO	% DE INIBIÇÃO DO FUNGO
Inflorescências	Diclorometânico	80
Inflorescências	Metanólico	Contaminou
Pedúnculos	Diclorometânico	100
Pedúnculos	Metanólico	-

Concentração dos extratos: 1000 µg.mL⁻¹; Controle: = 0 % de inibição; Peso seco do inóculo: média 11,8 mg.mL⁻¹; (-) não testado.

4.5.1.4 – Atividade Inibidora Enzimática

Os ensaios frente às enzimas pectinases presentes no líquido fecal e nos ninhos das formigas cortadeiras foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais – IB-UNESP de Rio Claro – SP, pela aluna Cíntia Zavan sob a orientação do Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior.

Os extratos brutos de *D. mollis* e *S. adstringens* que foram submetidos a ensaios frente às enzimas pectinases encontram-se listados nas **Tabelas 46 e 47** (p. 263).

Dos resultados obtidos apenas o extrato bruto metanólico de *D. mollis* apresentou atividade na metodologia utilizada, sendo assim o único extrato promissor para inibição desta atividade.

Tabela 46 - Atividade inibitória dos Extratos Brutos de *D. mollis* frente às pectinases.

	PEDÚNCULO		INFLORESCÊNCIA	
	P	IA (%)	P	IA (%)
EBD	0,88	104	0,68	102
EBM	0,02	119*	0,20	0,80

(*) extrato que apresentou atividade inibitória significativa segundo o teste Mann-Whitney (95 %) (95) $p < 0,05$.

Tabela 47 - Atividade inibitória dos Extratos Brutos de *S. adstringens* frente às pectinases.

	PEDÚNCULO		INFLORESCÊNCIA	
	P	IA (%)	P	IA (%)
EBD	0,85	100	0,40	100
EBM	0,40	87	0,48	102

4.5.1.5 – Atividade Tóxica em Peixes

Os ensaios em peixes da espécie *Brachdanio rerio* (Paulistinha) foram realizados pelo aluno de Fábio de Oliveira do laboratório de Química de Produtos Naturais - DQ da UFSCar, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Biologia da UFSCar sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Marisa Narciso Fernandes.

As substâncias astilbina, isoastilbina e catequina são os principais constituintes de *D. mollis* e astilbina e isoastilbina apresentaram efeito tóxico para *A. mellífera* (101), *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (109). A utilização destes compostos como inseticida necessita levar em consideração o efeito tóxico para outros organismos.

Os ensaios no modelo utilizando o peixe paulistinha (*B. rerio*) constituem uma das indicações para determinação de toxicidade. Assim o mesmo foi aplicado para estas substâncias. Ao analisar os resultados da **Tabelas 48 e 49** (p. 265-266) é possível observar que as substâncias astilbina e isoastilbina não apresentaram atividade tóxica em peixes da espécie *B. rerio*. Tendo em vista que catequina não havia sido ensaiada em abelha e formigas e ela tem uma alta distribuição na natureza sem ser citada como tóxica, e baseado nos resultados com astilbina e isoastilbina, ela foi testada apenas em duas concentrações como é indicado na **Tabela 50** (p. 267). Como já esperado catequina também não apresentou toxicidade.

Durante o tempo observado, os aquários estiveram constantemente aerados, com temperatura entre 21,5° C e 22° C e pH entre 7,0 e 7,5. Não se observou relação direta entre o aumento da concentração das substâncias ensaiadas e a morte dos peixes, e somente em um dos aquários de concentração 2³ mg/L, para astilbina, houve mortalidade acima da observada no controle. Os dados obtidos levam a constatação de que as substâncias testadas não foram tóxicas aos peixes nas concentrações referidas, atribuindo-se a morte de alguns dos peixes à falta de alimentação. Por este motivo não foi necessário calcular a CL₅₀ das mesmas através do programa estatístico (96) descrito no procedimento experimental do ensaio. Os ensaios de toxicidade em peixes que apresentam CL₅₀ para diversas outras substâncias são realizados em concentrações inferiores a 2 mg/L, sugerindo que não há necessidade da realização de novos testes em concentrações superiores. Além deste fato, a partir das concentrações testadas as substâncias não são solúveis na quantidade de água utilizada para os ensaios.

Tabela 48 - Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em *Brachdanio rerio* com a substância astilbina (S₁).

Observações		Concentração (mg/L)										
		2 ⁰	2 ⁰	2 ¹	2 ¹	2 ²	2 ²	2 ³	2 ³	2 ⁴	2 ⁴	Controle
1° dia	18:00	-	-	-	1 E	-	-	-	-	-	1 E	-
2° dia	00:00	-	-	-	1 M	-	-	-	-	-	1 M	-
	06:00	-	-	-	-	-	-	-	1 E	1 E	-	-
	12:00	-	1 M	-	-	-	1 E	-	1 M	1 M	-	-
	18:00	-	-	-	1 M	-	1 M	-	-	-	-	-
3° dia	00:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	06:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12:00	-	-	-	-	-	-	1 E	-	-	-	-
	18:00	-	-	-	-	-	-	1 E	-	-	-	1 M
4° dia	00:00	-	-	1 E	-	-	2 E	1 M	-	1 E	-	-
							1 E					
	06:00	-	-	-	-	-	2 M	-	-	1 M	-	1 M
	12:00	-	1 E	1 M	-	-	-	1 M	1 M	1 E	-	-
							1 E	1 E				
	18:00	-	1 M	-	-	-	-	1 E	1 E	1 M	-	-
5° dia	00:00	-	-	-	-	-	-	-	1 M	-	-	1 M
	06:00	-	1 M	-	-	-	-	1 M	1 E	-	-	1 E
	12:00	-	-	-	1 E	-	-	-	1 M	-	-	1 E
	18:00	-	-	1 E	-	-	-	-	-	-	-	-
N° total de peixes mortos		0	3	1	2	0	3	3	4	3	1	3

E – Peixe com coloração escura

M – Peixe morto

Tabela 49 - Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em *Brachdanio rerio* com a substância isoastilbina (S₂).

Observações		Concentração (mg/L)										
		2 ⁰	2 ⁰	2 ¹	2 ¹	2 ²	2 ²	2 ³	2 ³	2 ⁴	2 ⁴	Controle
1° dia	18:00	-	-	-	-	1 E	-	1 E	-	-	-	-
2° dia	00:00	-	-	-	-	1 M	1 E	1 M	-	-	-	-
	06:00	-	-	1 M	-	-	1 M	-	-	2 M	-	1 M
	12:00	-	-	-	-	1 E	-	-	-	1 E	-	-
	18:00	-	-	-	-	1 M	-	-	-	-	1 E	-
3° dia	00:00	1 E	-	-	-	-	-	-	-	-	1 E	-
	06:00	1 M	-	-	-	1 E	-	-	-	-	1 M	-
	12:00	-	-	-	-	1 M	-	-	-	-	-	-
	18:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4° dia	00:00	-	-	1 E	-	-	-	-	-	-	-	-
	06:00	-	-	-	1 E	-	1 E	-	-	-	-	-
	12:00	-	-	1 M	1 M	-	1 M	1 E	2 E	-	-	-
	18:00	-	-	-	-	-	-	1 M	1 M	-	-	-
5° dia	00:00	1 M	-	-	-	-	-	-	1 M	1 E	-	1 E
	06:00	-	-	-	1 E	-	1 E	-	-	1 M	1 E	1 M
	12:00	-	-	-	1 M	-	1 M	-	-	-	1 M	1 M
	18:00	-	1 E	1 E	-	-	-	1 E	-	-	-	-
N° total de peixes mortos		2	0	2	2	3	3	2	2	3	2	3

E – Peixe com coloração escura

M – Peixe morto

Tabela 50 - Observações realizadas durante o ensaio de toxicidade em *Brachdanio rerio* com a substância catequina (S₃).

Observações		Concentração (mg/L)		
		2 ⁴	2 ⁴	Controle
1° dia	18:00	-	-	-
2° dia	00:00	-	-	-
	06:00	-	-	-
	12:00	1 M	-	-
	18:00	-	-	-
3° dia	00:00	-	-	-
	06:00	-	1 M	-
	12:00	-	-	-
	18:00	-	-	-
4° dia	00:00	-	-	-
	06:00	-	-	-
	12:00	-	-	-
	18:00	-	-	-
5° dia	00:00	-	-	-
	06:00	-	-	-
	12:00	-	-	-
	18:00	-	-	-
N° total de peixes mortos		1	1	0

E – Peixe com coloração escura

M – Peixe morto

5 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies vegetais *D. mollis*, *S. adstringens* e *H. puberula* proporcionou a obtenção 6 extratos brutos, os quais foram submetidos a testes biológicos. Após o fracionamento cromatográfico, destes foram identificados um total de 100 substâncias, incluindo hidrocarbonetos, álcoois e ésteres graxos, derivados de ácidos cinâmicos, esteróides, triterpeno, alcalóide e flavonóides.

Os extratos brutos obtidos de *H. puberula* não foram submetidos a ensaios biológicos neste trabalho, sendo que, em trabalhos anteriores realizados pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar estes apresentaram atividade significativa frente às formigas cortadeiras, justificando o estudo fitoquímico para obtenção de metabólitos secundários, além de contribuir com a química da família, gênero e espécie, visto que, há poucos relatos de estudo nesta área para esta espécie vegetal.

Os EBD das inflorescências e pedúnculos de *D. mollis* apresentaram atividade frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus* das formigas cortadeira e apenas o EBM dos pedúnculos foram ativos frente às enzimas proveniente do fluido fecal, nos modelos testados; sendo assim promissores para obtenção de compostos que possam ser utilizados para controle destes insetos. O objetivo do fracionamento de *D. mollis*, neste trabalho, foi isolar os flavonóides astilbina (**S**₁), isoastilbina (**S**₂) e catequina (**S**₃), para realização de ensaios biológicos, vistos que estas já haviam sido identificadas em trabalhos anteriores e apresentaram atividade em alguns ensaios de atividade inseticidas. A astilbina apresentou 100 % de inibição do fungo simbiote e os três compostos (**S**₁, **S**₂ e **S**₃) foram submetidos a testes de toxicidade em peixes para verificar se estes poderiam causar danos a ecossistema aquáticos e nas concentrações testadas não se apresentaram tóxicos aos peixes da espécie *B. rerio*, sendo assim possíveis de serem utilizados como inseticidas naturais contra pragas em plantações próximas a lagos e rios.

Os EBD das inflorescências e dos pedúnculos de *S. adstringens* apresentaram inibição do crescimento do fungo simbionte em uma porcentagem de 80 % e 100 %, respectivamente. Tanto os extratos diclometânicos e metanólicos das inflorescências e dos pedúnculos apresentaram atividade frente às abelhas produtoras de mel nas concentrações testadas, desta forma os EBD foram fracionados e as **Frações C₄ 1 – 4** (inflorescências) apresentaram atividades significativas para as abelhas. Os compostos identificados destas frações foram hidrocarbonetos, álcoois e ácidos graxos, esteróides, derivados de ácidos cinâmicos, entre outros, sugerindo que as substâncias que apresentaram pouca polaridade são ativas frente as abelhas produtoras de mel. Em relação à atividade nos modelos frente às enzimas pectinases estes extratos não apresentaram atividades.

O EBM das inflorescências de *S. adstringens* foram ativos frente às formigas cortadeiras nas concentrações testadas e deste foram identificados, na sua grande maioria, flavonóides glicosilados.

Sendo assim, as espécies testadas apresentaram compostos promissores para utilização como agentes inseticidas e as substâncias astilbina, isoastilbina e catequina não apresentaram efeito tóxico a peixes, podendo assim ser utilizada próximo a ambientes aquáticos, não causando dano ao meio ambiente por este modelo de toxicidade.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VIEGAS JR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.
2. MARICINI, F. A. M. **Inseticidas e seu Emprego no Combate as Pregas**. 5^a ed. São Paulo: Nobel, 1981. v. 1, p. 122.
3. FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. 1^a ed. Florianópolis: UFSC e UFRGS, 1999.
4. BOHMONT, B. L. *The new pesticide user's guide*. Fort Collins: B. & K. Enterprises, 1981.
5. AKENSON, N. B.; YATES, W. E. *Pesticide application equipment and techniques*. Roma: FAO (Agricultural Services Bulletin), p. 257, 1979.
6. KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 15: p. 3–344, 1972.
7. BOLTON, B. *A new general catalogue of the ants of the world*. Cambridge: Harvard University Press, 1995.
8. BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). **Sociobiology**, v. 38, p. 635-650, 2001.
9. WEBER, N. A. Gardening ants: the Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, v. 92, p. 146, 1972.
10. NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 12, p. 386-389, 1997.

11. WILSON, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. Princípios de Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976.
12. WILSON, E. O. The insects societies. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1976.
13. WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980.
14. LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of the enzyme dissociation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56: p. 685-666, 1934.
15. HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The ants. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
16. WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, p. 587-604, 1966.
17. CHAPELA, I. H. ; REHNER, S. A. ; SCHULTZ, T. R.; *et al.* Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, p. 1691-1694, 1994.
18. HEIM, R. A propos du *Rozites gongylophora* A. Moller. **Revue of mycologie**, v. 22, p. 293-299, 1957.
19. MOELLER, A. As hortas de fungo de algumas formigas cortadeiras sul-americanas. **Revista de Entomologia**, v. 1, p. 129-130, 1893.
20. TURNER, J. A. The bioenergetics of leaf-cutting ants in Trinidad. **Ecological Entomology**, v. 4, p. 151-160, 1979.

21. TERRA, W. R. Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Brasília: Manole, 1991.
22. LITTLEDYKE, M.; CHERRET, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 66, p. 205-217, 1976.
23. QUINLAN, R. J.; CHERRET, J. M. Role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v. 4, p. 151-160, 1979.
24. QUINLAN, R. J.; CHERRET, J. M. Studies on role of infrabuccal pocket of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 25, p. 237-245, 1978.
25. SILVA, A.; BACCI Jr. R.; BUENO, O. C.; *et al.* A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.
26. SILVA, A. **Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens***. 2000. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, Rio Claro - SP.
27. ABBOTT, A. Nutrient dynamics of ants. In: BRIAN, M. V. Production Ecology of Ants and Termites. Cambridge University Press, 1978. PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Brasília – DF: Editora Manole Ltda, 1991.
28. SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR, M.; PAGNOCCA, F. C.; *et al.* A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the

- ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64: p. 4820-4822, 1998.
29. BERNAYS, E. A.; CHAPAMAN, R. F. *Host-plant selection by phytophagous insects*. New York: Chapman and Hall, 1994.
30. WEBER, N. A. Gardening ants. The Attines. **The American Philosophical Society**, v. 92: p. 146-158, 1972.
31. MARTIN, M. M.; CARMAN, R. M.; MacCoNNELL, J. G. Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus—growing ant *Atta colombica tonsipes* Sanstchi. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62: p. 11-13, 1969.
32. SCHNEIDER, M. O.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; *et al.* Observations on brood care behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). In: **International Congress of Entomology**, XX, 2000, Foz do Iguaçu – Paraná. Anais..., p. 895.
33. MARICONI, F. A. M. **As saúvas: insetos daninhos às plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo. Livraria Nobel. 1974.
34. QUINLAN, R. J.; CHERRET, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2: p. 161-170, 1979.
35. PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. Manole Ltda. 1991.
36. SILVA, A. C. **Isolamento do fungo simbiote da formiga *Myctarotes parallelus* e avaliação de suas habilidades metabólicas**, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado de São Paulo.

37. FEBVAY, G. ; KERMARREC, A. Activites enzymatiques des glandes salivaires et le l'intestin moyen d'une fourmi Attine (adultes et larves): *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae, Attini). **Archive of Biology**, v. 92: p. 299-316, 1981.
38. FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; SILVA, V. P.; *et al.* Economic of grass-cutting ants In: Lofgren, C.S.; Vandermeer, R.K. (eds): Fire ants and leaf-cutting ants. Biology and management. Westview Press, Bolder, Colorado, and London. 1986. p. 18-35.
39. SCHEIDER, M. O. **Os comportamentos de cuidado com a cria na saúva limão *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**, 2004. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Zoologia - Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Rio Claro – São Paulo.
40. GONÇALVES, L. S. Africanização nas Américas, impacto e perspectivas de aproveitamento do material genético. In: **Congresso Brasileiro de Apicultura**, 9., 1992, Candelária-RS. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1994. p. 35-41.
41. CARVALHO-ZILSE G. A.; SILVA, C. G. N.; ZILSE, N.; *et al.* Criação de abelhas sem ferrão / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea; – Brasília: Edições IBAMA, 2005. p. 21.
42. TRUYLIO, B.; HARTE-MARQUES, B. A comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em áreas florestais do Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS): diversidade, abundância relativa e atividade sazonal. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 97: p. 392-399, 2007.
43. ADLER, S. A. The ecological significance of toxic nectar. **Oikos**, v. 91: p. 409-420, 2000.

44. SHARMA, O. P.; RAJ, D.; GARG, R. Toxicity of Nectar of tea (*Camellia thea*) to honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 25: p. 106-108, 1986.
45. MESSAGE, D.; BALL, B. V.; SILVA, I. C. A serious brood disease affecting africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Proceedings Lausane: Apimondia**, v. 34: p. 203, 1995.
46. CARVALHO, A. C. P. **Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifera* L.**, 1998. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Departamento de Biologia Animas, Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.
47. CARVALHO, A. C. P.; MESSAGE, D.; CAMPOS, L. A.; *et al.* Pólen tóxico como causa da Cria Ensacada Brasileira. In: **Encontro Sobre Abelhas**, 3., 1998, Ribeirão Preto-SP. **Anais...** São Francisco Gráfica e Editora. p. 277.
48. MESSAGE, D. Management and disease problems of africanized bees in Brazil. **The Central Association of Bee-Keepers**, United Kingdon, 1997.
49. SANTOS, M. L. A.; MESSAGE, D. Taninos causando sintomas da Cria Ensacada Brasileira. In: **Congresso Brasileiro de Apicultura**, 12., p. 251, 1998.
50. CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas Tóxicas para Abelhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 547-551, 2005.
51. SEVERINO, R. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; *et al.* Biological activity of limonoids from meliaceae against a subterranean termite (*Heterotermes tenuis*) (Isoptera : Rhinotermitidae). **Sociobiology**, v. 50, p. 947-957, 2007.
52. FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; BACCI JR, M.; *et al.* O Futuro dos Produtos Naturais no Controle de Formigas. **O Biológico**, v. 69, p. 221-224, 2007.
53. ALMEIDA, R. N. A.; PENÃFLOR, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y.; *et al.* Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting

- Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay** (Piracicaba), v. II, p. 1-3, 2007.
54. AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; *et al.* Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 542-547, 2006.
55. PENAFLORES, M. F. G. V.; VICTOR, S. R.; BUENO, O. C.; *et al.* Toxicity of straight-chain fatty acids to leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Sociobiology**, v. 47, p. 843-858, 2006.
56. PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, F. C.; *et al.* Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, p. 17-23, 2006.
57. SOUZA, T. F.; CINTRA, P.; MALASPINA, O.; *et al.* Toxic effects of methanolic and dichloromethane extracts of flowers and peduncles of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae: Mimosoideae) on *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* workers. **Journal of Apicultural Research**, v. 45, p. 112-116, 2006.
58. PEREIRA, L. G. B.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; *et al.* Electrophysiological responses of *Atta sexdens rubropilosa* workers to essential oils of eucalyptus and its chemical composition. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v. 61, p. 749-755, 2006.
59. BUENO, F. C.; FERNANDES, J. B.; GODOY, M. P.; *et al.* Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 44, p. 389-399, 2005.

60. GODOY, M. F. P.; FERNANDES, J. B.; VICTOR, S. R.; *et al.* Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 669-672, 2005.
61. MORINI, M. S. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; *et al.* Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, p. 195-204, 2005.
62. SOUZA, R. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; *et al.* A New Imidazole Alkaloid and Other Constituents from *Pilocarpus grandiflorus* and their Antifungal Activity. **Zeitschrift für Naturforschung. B, A journal of Chemical Sciences**, v. 60, p. 787-791, 2005.
63. CINTRA, P.; FERNANDES, J. B.; BUENO, F. C.; *et al.* Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, p. 347-353, 2005.
64. CINTRA, P.; FERNANDES, J. B.; MALASPINA, O.; *et al.* Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphandra mollis* (Caesalpiniaceae) against honeybees (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 45, p. 141-149, 2005.
65. LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; OLIVEIRA, C. G.; *et al.* Toxicity of *Cipadessa fruticosa* to the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 46, p. 17-26, 2005.
66. LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, F. C.; *et al.* Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1391-1395, 2005.

67. BIAVATTI, M. W.; FERNANDES, J. B.; WESTERLON, R.; *et al.* Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1443-1447, 2005.
68. BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, F. C.; *et al.* Toxicity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, p. 599-606, 2004.
69. BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; FERNANDES, J. B.; *et al.* Activity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, p. 511-518, 2004.
70. http://en.wikipedia.org/wiki/Brachydanio_riero#Taxonomy. Acesso em: 20.10. 2007.
71. <http://www.aquariovgama.pt>. Acesso em: 20.10. 2007.
72. SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; ELLIS, S.; *et al.* Growth and Recruitment of Wild Zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 71: p. 304-309, 2007.
73. LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
74. FELFILI, J. M.; SILVA JR, M. C.; DIAS, B. J.; *et al.* Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22: p. 83-90, 1999.
75. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
76. CORNER, E. J. H. The leguminous seeds. **Phytomorphology**, v. 1: p. 117-150, 1951.

77. OLIVEIRA, P. E. The pollination and reproductive biology of a cerrado woody community in Brazil, 1991. Ph.D. Thesis, University of St. Andrews, St. Andrews.
78. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Ed. Siqueira, São Paulo, 1959.
79. MELLO, J. P.; PETEREIT, F.; NAHSTED, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41: p. 807-813, 1996.
80. SILVA, M. F. *Dimorphandra* (Caesalpinaceae). **Flora Neotropica**. The York Botanical Garden, New York, 1986.
81. TOMASSINI, E.; MORS, W. B. *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tull., novas e excepcionais fontes de rutina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38: p. 321-323, 1966.
82. BRANDÃO, M. *Plantas produtoras de tanino nos cerrados mineiros*. **Informe Agropecuário**, 1992.
83. LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum, Nova Odessa, 1992.
84. ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A. & PRANTL, K. Die **Natürlichen Pflanzenfamilien**. 2.ed. Leipzig, 1931.
85. PIRANI, J. R. **A ordem Rutales na serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**, 1982. Dissertação de Mestrado – Departamento de Botânica, Universidades de São Paulo-SP.
86. ALBUQUERQUE, B. W. P. Revisão taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 6: p. 1-67, 1976.
87. PAULA, J. R.; VIEIRA, C. J. I.; SILVA, M. F. G.; *et al.* Sesquiterpenes, Triterpenoids, Limonoids and Flavonoids of *Cedrela odorata* Graft and Speculations on the Induced Resistance Against *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, v. 44: p. 1449-1454, 1997.

88. PIRANI, J. R. A revision of *Helietta* and *Balfourodendron*. **Brittonia**, v. 50: p. 348-380, 1998.
89. PETACCI, F. Aspectos Químicos de Um Ninho de Saúvas (*Atta sexdens rubropilosa*) e Propriedades Inseticidas de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae, Caesalpinoidae), 2001. Tese de Doutorado. Departamento de Química – UFSCar, São Carlos – SP.
90. HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22: p. 475-477, 1973.
91. VANDENBERG J. D.; SHIMANUKI H. Technique for rearing worke honeybees in the laboratory. **Journal of Apicultural Research**, v. 26: p. 90-97, 1987.
92. MOTULSKY, M. D. H. Intuitive biostatistics. **Oxford University Press**; New York, USA, 1995.
93. PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; *et al.* Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80: p. 349-352, 1990.
94. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytic Chemistry**, v. 31: p. 426-428, 1959.
95. SIEGL, S. **Non parametric Statistics for the Behavioral Sciences**, MacGraw-Hill, New York, 1956.
96. HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON. V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v. 7: p. 714-719, 1977.
97. MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press; London, UK; 1982.

98. HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*, University Press, Cambridge, 1982.
99. MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press Inc. (London), 1982.
100. CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI A. F.; *et al.* Toxicity of *Dimorphantra mollis* to Workers of *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 115-118, 2002.
101. CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C.; *et al.* Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphantra mollis* (Caesalpiniaceae) against honeybees (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 45: p. 141-149, 2005.
102. TAGHIZADEH, T. Identificação de Substâncias Voláteis de Insetos Através de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas. In: **Produtos Naturais no Controle de Insetos**, 3. p. 84–87, 2001.
103. ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, 2001.
104. SOBOLEV, A. P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, R.; *et al.* Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43: p. 625-638, 2005.
105. JHOO, J. W.; ANG, C. Y. W.; HEINZE, T. M.; *et al.* Identification of C-glycoside Flavonoids as Potential Mutagenic Compounds in Kava. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 72: p. 120-125, 2007.
106. AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**, Elsevier Sc. Publishers, Amsterdam, 1989.

107. ALBERGSBERG, W.; YOGENDRAN, S. Dammarane Triterpenoids from *Dysoxylum richii*. **Phytochemistry**, v. 30: p. 921–926, 1991.
108. DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham, UK; 1997.
109. PEREIRA, L. G. P.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; MALASPINA, O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, v. 58: p. 503-507, 2002.