



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rauia* sp E ATIVIDADES SOBRE
FORMIGAS CORTADEIRAS E SOBRE A LAGARTA-DO-
CARTUCHO DO MILHO**

Tatiani Mesquita Bondancia*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

* Bolsista FAPESP

**São Carlos – SP
2009**

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

B711ef

Bondancia, Tatiani Mesquita.

Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e atividades sobre formigas cortadeiras e sobre a lagarta-do-cartucho do milho / Tatiani Mesquita Bondancia. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 336 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Química orgânica. 2. Rutaceae. 3. *Atta sexdens rubropilosa*. 4. *Spodoptera frugiperda*. 5. Atividade inseticida. I. Título.

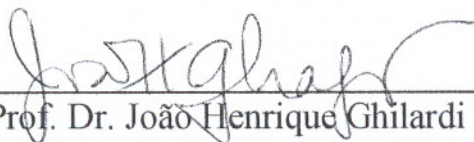
CDD: 547 (20^a)

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

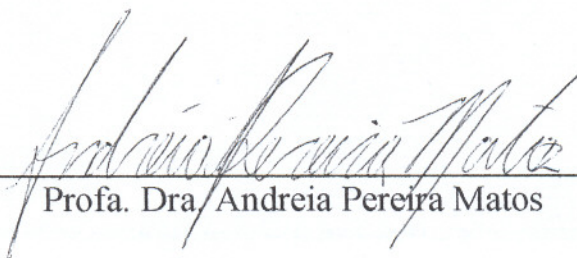
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Tatiani Mesquita Bondancia**, realizada em 11 de setembro de 2009:*



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago



Profa. Dra. Andrea Pereira Matos

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Hamilton e Vanir, pelo amor e dedicação e principalmente por nunca medirem esforços para que eu consiga atingir meus objetivos. Aos meus irmãos Leandro, Thiago e Jenifer pelo carinho e por estarem sempre do meu lado.

Ao meu namorado Kerton Carlos Corali, meu eterno amor, pelo companheirismo, amizade, carinho, atenção, amor e incentivo em todos os momentos.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muita para ser insignificante.

Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

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

Aos Professores, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dra. Arlene Gonçalves Corrêa, em especial ao Dr. Edson Rodrigues Filho pelos ensinamentos e grande colaboração.

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

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

Aos técnicos Waldir, Doraí, Paulo e em especial à Luciana pelo grande apoio e paciência durante este trabalho.

À aluna Tais do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Rio Claro – SP, pela realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras.

Aos professores Dr. Odair Corrêa Bueno, do CEIS, pela colaboração

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, troca de experiências e ótimo convívio. Um agradecimento muito especial à Cristiane, Marsele, ao Uir e principalmente à Bárbara pelo carinho, amizade, companheirismo, incentivo, ajuda e apoio durante todo o mestrado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Às alunas de iniciação científica Alini e Érika que colaboraram com a realização dos ensaios no controle da lagarta-do-cartucho do milho.

Aos amigos dos laboratórios de CLAE, SÍNTESE, MASSAS, RMN E LSPN.

À minha mãe, meu pai, aos meus irmãos, irmã, cunhados, cunhadas, à minha sogra Ana Paula e meu sogro Antonio Carlos, meu tio Marcos, minha tia Silvia e minha prima Carolina muito obrigada a todos pelo amor, carinho e incentivo constante na realização deste sonho.

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

À FAPESP, pela bolsa concedida

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e tornaram o ambiente no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar sempre muito alegre, satisfatório e familiar.

Muito Obrigada!!!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
Agl.	Aglicona
Ara	Arabinose
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDPR	Cromatografia em camada delgada preparativa rotativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CID	Collision-induced dissociation DMSO Dimetil sulfóxido
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
ddd	Duplo-duplo-dubleto
dt	Duplo-tripleteo
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
ESI/MS	Espectrometria de massas por ionização por <i>electrospray ionization</i>
eV	Elétron volt
Gal	Galactose
Glc	Glicose
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hex	Hexose
Hz	Hertz

IE	Impacto eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
Md	Sobrevivência mediana das operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
MHz	Mega hertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
OMe	Metoxila
O-Ru	Rutinose
<i>p.</i>	Página
Pent	Pentose
Rha	Rhaminose
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
SAM	S-Adenosil metionina
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
TMS	Tetrametil-silano
UV	Ultravioleta
UR	Umidade relativa
Xyl	Xilopiranoside
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
Φ	Diâmetro
λ	Comprimento de onda

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Formigas cortadeiras. Fonte: (MARINHO et al., 2006).	8
FIGURA 1.2: Içá ou tanajura (rainha). Fonte: http://flickr.com/photos/flaviocb	11
FIGURA 1.3: Interações presentes em ninhos de formigas da tribo Attini (Fonte: CURRIE, 2001).....	16
FIGURA 1.4: Pseudonocardia na cutícula de uma formiga do gênero Acromyrmex. Fonte: CURRIE et al., 1999.....	17
FIGURA 1.5: Fotomicrografias de luz do jardim de fungo de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> . A) região rica em estáfilas (setas). B) detalhe da região de estáfilas (setas). C) detalhe do exsudato das hifas (seta). D) detalhe da estáfila revelando os gongilídeos (seta). Fonte: Schneider (2003).....	18
FIGURA 1.6: Fotomicrografia de larvas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no último ínstar larval (maior) e no ínstar intermediário (menor) no momento de eliminação da secreção anal (setas), que é coletada pelas operárias. Fonte: Schneider (2003).....	18
FIGURA 1.7: Formigas cortadeiras. Fonte: (MARINHO et al., 2006).	22
FIGURA 1.8: Formigueiro com aproximadamente 3 a 4 meses, rainha a 1,5 m de profundidade.....	25
FIGURA 1.9: Polvilhadeira. Fonte: www.naturalrural.com.br	26
FIGURA 1.10: a) termonebulizador; b) cano aplicador no olheiro escolhido (fechar o espaço em volta com terra); c) fumaça saindo pelos outros olheiros (tampar com terra).	27
FIGURA 1.11: Ciclo biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Fonte: (PEREIRA, 2006).....	32
FIGURA 1.12: Danos na cultura do milho: A) lagarta de <i>S. frugiperda</i> já desenvolvida, retirada do interior do cartucho do milho; B) Folhas danificadas por lagartas-do-cartucho. Fonte: SOUZA & SOUZA, 2002.....	33
FIGURA 1.13: A) Danos da lagarta-do-cartucho do milho desde a planta jovem: folhas raspadas ou furadas. B) Falhas nas linhas de plantio mostram os prejuízos provocados pela lagarta no campo. Fonte: DBO, 2008.....	35
FIGURA 1.14: A) Aplicação tratorizada de inseticidas; B) Adultos de tesourinha (<i>Doru luteipes</i>), predadora de ovos e lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Nota: as tesourinhas medem de 17 a 20mm de comprimento incluindo os cercos. Fonte: a) DBO, 2008; b) SOUZA & SOUZA, 2002.....	36

FIGURA 4.1: Espectro de RMN ¹ H dos esteróides I, II e III (CDCl ₃ , 400MHz).	94
FIGURA 4.2: a) Cromatograma da mistura dos esteróides (I), (II) e (III), Espectros de massas (I.E. = 70 e.V.) do sitosterol (I, b); do estigmasterol (II, c) e do campesterol (III, d).....	95
FIGURA 4.3: Formação do precursor dos sesquiterpenos.....	96
FIGURA 4.4: Formação do precursor dos sesquiterpenos.....	97
FIGURA 4.5: Espectro de RMN ¹ H do clovane-2β,9α-diol (IV) (CDCl ₃ , 200 MHz).....	102
FIGURA 4.6: Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância (IV) (CDCl ₃ , 200 MHz).....	102
FIGURA 4.7: Espectro de RMN ¹³ C do clovane-2β,9α-diol IV (CDCl ₃ , 50 MHz).....	103
FIGURA 4.8: a) Cromatograma e b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) clovane-2β,9α-diol (IV)	103
FIGURA 4.9: Região aromática do espectro de RMN ¹ H de cumarinas substituídas nas posições 7 e 8.....	106
FIGURA 4.10: Espectro de RMN ¹ H da rauianina (V) (CDCl ₃ , 200 MHz)....	111
FIGURA 4.11: Espectro de RMN ¹³ C da rauianina V (CDCl ₃ , 50 MHz).....	111
FIGURA 4.12: a) Cromatograma e b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) da rauianina.....	112
FIGURA 4.13: Espectro de RMN ¹ H das substâncias VI, VII, VIII (CDCl ₃ , 400 MHz) com supressão do sinal em 1.26 ppm.....	118
FIGURA 4.14: Ampliação do espectro de RMN ¹ H da cumarina VI e alcalóide VIII (CDCl ₃ , 400 MHz).....	118
FIGURA 4.15: Espectro de COSY do diacetato de murrangatina (VI), do ácido hexadecanóico (VII) e zantodiolina (VIII) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	119
FIGURA 4.16: Mapa de correlações HSQC substâncias (VI-VIII) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	119
FIGURA 4.17: Mapa de correlações HMBC substâncias (VI-VIII) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	120
FIGURA 4.18: a) Cromatograma da fração contendo a mistura do ácido graxo (VII, banda 1) e da cumarina (VI, banda 2); b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) do ácido palmítico (VII) e c) EM do diacetato de murrangatina (VI).....	121

FIGURA 4.19: Espectro de RMN ^1H da murralongina (IX) (CDCl_3 , 200 MHz).....	127
FIGURA 4.20: a) Cromatograma da fração contendo a cumarina IX; b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) de IX (murralongina, banda 1).	128
FIGURA 4.21: Proposta biogenética para as cumarinas (adaptada de DEWICK, 2001).....	131
FIGURA 4.22: Proposta biogenética para as cumarinas V, VI e IX (adaptada de DEWICK, 2001).....	132
FIGURA 4.23: Nomenclatura IUPAC.....	135
FIGURA 4.24: Nomenclatura usual.....	135
FIGURA 4.25: Estruturas dos glicosídeos.....	141
FIGURA 4.26: Espectro de RMN com variação da temperatura da flavona (107) di-C-glicosilada em DMSO a 300 MHz.....	143
FIGURA 4.27: Espectro de UV da flavanona C-glicosilada (108).....	145
FIGURA 4.28: Espectro de UV da quercetina (93), quercetina 3-O-glucoside (109) e quercetina 3,4'-di-O-glucoside (110).....	145
FIGURA 4.29: Espectro de massas da hesperidina (108) no modo negativo (a) e no modo positivo (b).....	147
FIGURA 4.30: Espectro de massas da hesperetina (111) no modo negativo.....	147
FIGURA 4.31: Espectro de EM-EM da diosmetina 6,8-di-C-glucoside (107) no modo negativo.....	148
FIGURA 4.32: Espectro Q-TOF-MS-MS e IT-MS-MS com $[\text{M}+\text{H}]^+$ como íon precursor (m/z 433).....	149
FIGURA 4.33: Estruturas computacionais de luteolina 7-O-glicosídeo (a) protonada, (b) neutra, (c) deprotonada (d) luteolina. As setas indicam o ângulo diedro para o anel B.....	151
FIGURA 4.34: a) Cromatograma da subfração B b) Espectro de UV flavona Xa ($t_R = 2,53$ min); c) espectro de UV da flavona Xb ($t_R = 4,45$ min); d) Espectro de massas no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$ da flavona Xa ($t_R = 4,45$ min); e) e da flavona Xb ($t_R = 2,5$ min).....	153
FIGURA 4.35: Fragmentação de O-glicosídeos.....	154
FIGURA 4.36: Espectro de RMN ^1H da flavona (X) (DMSO, 400 MHz).....	162
FIGURA 4.37: Espectro de RMN ^1H da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	162

FIGURA 4.38: Espectro de RMN ¹ H da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	163
FIGURA 4.39: Mapa de correlações HSQC da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	163
FIGURA 4.40: Ampliação do mapa de correlações HSQC da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	164
FIGURA 4.41: Mapa de correlação HMBC da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	164
FIGURA 4.42: Ampliação do mapa de correlação HMBC da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	165
FIGURA 4.43: Espectro de COSY da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	165
FIGURA 4.44: Ampliação do espectro de COSY da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).....	166
FIGURA 4.45: Espectro de ¹³ C da flavona (X) (DMSO, 400 MHz).....	166
FIGURA 4.46: a) Cromatograma da subfração C b) Espectro de UV da flavona XIa (t _R = 2,53 min); c) espectro de UV da flavona XIb (t _R = 4,33 min).....	169
FIGURA 4.47a: a) Espectro de massa no modo negativo [M-H] ⁻ [íon pseudomolecular] da flavona XIa (t _R = 4,45 min); b) da flavona XIb (t _R = 2,5 min).....	170
FIGURA 4.48: Espectro de RMN ¹ H da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	175
FIGURA 4.49: Espectro de RMN ¹ H da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	175
FIGURA 4.50: Mapa de correlação HMBC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	176
FIGURA 4.51: Mapa de correlações HSQC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	176
FIGURA 4.52: Ampliação do mapa de correlações HSQC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	177
FIGURA 4.53: Espectro de COSY da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	177
FIGURA 4.54: Espectro de ¹³ C da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).....	178
FIGURA 4.55: Espectro de RMN ¹ H da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO, 400 MHz); os sinais em verde são referentes à glicose e os sinais em azul à raminose.....	181
FIGURA 4.56: Espectro de COSY da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO,	

400 MHz); os sinais em verde são referentes à glicose e os sinais em azul à raminose.....	181
FIGURA 4.57: Mapa de correlações HSQC da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO, 400 MHz).....	182
FIGURA 4.58: Mapa de correlações HMBC da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO, 400 MHz).....	182
FIGURA 4.59: a) Cromatograma da subfração H b) espectro de UV flavona XIIb ($t_R = 2,54$ min); c) espectro de UV da flavona XIIa ($t_R = 5,35$ min).....	183
FIGURA 4.60: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da flavona XIIa ($t_R = 5,35$ min) e b) da flavona XIIb ($t_R = 2,54$ min).....	184
FIGURA 4.61: Espectro de RMN 1H isovitexina (XIII) e vitexina (XIV) (DMSO, 400 MHz).....	193
FIGURA 4.62: Expansão do espectro de RMN 1H das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	193
FIGURA 4.63: Expansão da região do açúcar do espectro de RMN 1H das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	194
FIGURA 4.64: Espectro de COSY das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	194
FIGURA 4.65: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	195
FIGURA 4.66: Mapa de correlações HSQC das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	195
FIGURA 4.67: Mapa de correlações HMBC das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).....	196
FIGURA 4.68: Espectro de RMN ^{13}C das flavonas XIII e XIV (MeOH, 400 MHz).....	196
FIGURA 4.69: Cromatograma da subfração G a) modo analítico – HPLC; $\lambda = 219$ (rosa); 249 (azul); 336 (vermelho) nm; b) modo preparativo – Akta; $\lambda = 217$ (azul); 254 (vermelho); 336 (rosa) nm.....	200
FIGURA 4.70: Espectro de RMN 1H da fração G (DMSO, 400 MHz).....	200
FIGURA 4.71: a→e Cromatogramas das subfrações G1 a G5	203

FIGURA 4.72: Espectro de massas no modo negativo $[M-H]^-$ (íon pseudomolecular) das flavonas XV e XVI ($t_R = 8,55$ min, G1) experimento de scan com íon filhos do composto com MM 725,6.....	211
FIGURA 4.73: Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ (íon pseudomolecular) das flavonas a) XVI ($t_R = 9,12$ min, G1) e b) XV ($t_R = 8,88$ min, G1), experimento de scan com íon pseudomolecular de 725,6.	212
FIGURA 4.74: a) Cromatograma ($\lambda = 330$ nm) da subfração G1 ; b) Cromatograma ($\lambda = 330$ nm) da subfração G2	212
FIGURA 4.75: a) espectro de UV das flavonas XV e XVI ($t_R = 8,55$ min, G1); b) espectro de UV da flavona XVIII ($t_R = 9,43$ min, G1).....	213
FIGURA 4.76: Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ (íon pseudomolecular) da flavona XVIII ($t_R = 9,92$ min, G1).....	217
FIGURA 4.77: Espectro de RMN 1H da fração G1 (DMSO, 400 MHz).....	220
FIGURA 4.78: Ampliação do espectro de RMN 1H da fração G1 (DMSO, 400 MHz).....	220
FIGURA 4.79: Espectro de RMN 1H da fração G2 (DMSO, 400 MHz).....	221
FIGURA 4.80: Espectro de RMN 1H da fração G2 (DMSO, 400 MHz).....	221
FIGURA 4.81: Espectro de COSY da fração G1 (DMSO, 400 MHz).....	222
FIGURA 4.82: Espectro de COSY da fração G2 (DMSO, 400 MHz).....	222
FIGURA 4.83: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY de G2 (DMSO, 400 MHz).....	223
FIGURA 4.84: Mapa de correlações HSQC de G1 (DMSO, 400 MHz).....	223
FIGURA 4.85: Mapa de correlações HSQC de G2 (DMSO, 400 MHz).....	224
FIGURA 4.86: Ampliação do mapa de correlações HSQC de G2 (DMSO, 400 MHz).....	224
FIGURA 4.87: Mapa de correlação de HMBC de G1 (DMSO, 400 MHz).....	225
FIGURA 4.88: Mapa de correlação de HMBC de G2 (DMSO, 400 MHz)....	225
FIGURA 4.89: Espectro de RMN ^{13}C de G1 (DMSO, 100 MHz).....	226
FIGURA 4.90: Espectro de RMN ^{13}C de G2 (DMSO, 100 MHz).....	226
FIGURA 4.91: a) Cromatograma da subfração G3 ; b) Cromatograma da	

subfração G4 ; c) espectro de UV flavona XX e XXI ($t_R = 11,76$ min, G3); d) espectro de UV da flavona XVIII e XIX ($t_R = 13,35$ min, G3).....	228
FIGURA 4.92: a) Cromatograma da subfração G3 ; b) espectros de massas no modo negativo $[M-H]^-$ da fração G3 com o íon pseudomolecular 563,6 da flavona XVIII; c) de seu isômero XIX, d) e da flavona XX	229
FIGURA 4.93: a) Cromatograma da subfração G4 ; b) espectros de massas no modo negativo $[M-H]^-$ da fração G4 com o íon pseudomolecular 563,6 das flavona b) XXI ; c) XVIII , d) XIX e) e XX	230
FIGURA 4.94: Espectro de RMN 1H G3 (DMSO, 400 MHz).....	238
FIGURA 4.95: Espectro de RMN 1H G4 (DMSO, 400 MHz).....	238
FIGURA 4.96: Espectro de COSY G3 (DMSO, 400 MHz).....	239
FIGURA 4.97: Ampliação do espectro de COSY G3 (DMSO, 400 MHz).....	239
FIGURA 4.98: Espectro de COSY G4 (DMSO, 400 MHz).....	240
FIGURA 4.99: Ampliação do espectro de COSY G4 (DMSO, 400 MHz).....	240
FIGURA 4.100: Mapa de correlações HSQC da G3 (DMSO, 400 MHz).....	241
FIGURA 4.101: Ampliação do mapa de correlações HSQC da G3 (DMSO, 400 MHz).....	241
FIGURA 4.102: Mapa de correlações HSQC da G4 (DMSO, 400 MHz).....	242
FIGURA 4.103: Mapa de correlações de HMBC da G3 (DMSO, 400 MHz). 242	
FIGURA 4.104: Mapa de correlações de HMBC da G4 (DMSO, 400 MHz). 243	
FIGURA 4.105: Espectro de RMN ^{13}C da G3 (DMSO, 400 MHz).....	243
FIGURA 4.106: Espectro de RMN ^{13}C da G4 (DMSO, 400 MHz).....	244
FIGURA 4.107: a) Espectros de massas no modo negativo $[M-H]^-$ como íon pseudomolecular das flavonas XXI ($t_R = 19,05$ min); e b) XII ($t_R = 16,43$ min).....	245
FIGURA 4.108: a) Cromatograma da subfração G5 b) espectro de UV da flavona XII e ($t_R = 16,43$ min); c) espectro de UV da flavona XXII ($t_R = 19,05$ min).....	246
FIGURA 4.109: Espectro de RMN 1H 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	252

FIGURA 4.110: Expansão do espectro de RMN ^1H de 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	252
FIGURA 4.111: Expansão da região do açúcar do espectro de RMN ^1H 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	253
FIGURA 4.112: Espectro de COSY 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	253
FIGURA 4.113: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY (DMSO, 400 MHz).....	254
FIGURA 4.114: Mapa de correlações HSQC 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	254
FIGURA 4.115: Mapa de correlações HMBC 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXI) (DMSO, 400 MHz).....	255
FIGURA 4.116: Espectro de ^{13}C 2"-O-raminosilvitexina (XII) e 2"-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).....	255
FIGURA 4.117: Biossíntese de flavonóides (adaptado de DEWICK, 2001).....	256

LISTAS DE TABELAS

TABELA 3.1 - Massas de Material Vegetal e Quantidade de Extratos Obtidos.....	61
TABELA 3.2: Frações obtidas após reunião das subfrações de RFD1 e RFD2.....	62
TABELA 3.3: Frações obtidas do extrato metanólico (RFM).....	67
TABELA 3.4: Frações obtidas do extrato metanólico (EMRC).....	71
TABELA 3.5: Descrição da dieta artificial para <i>S. frugiperda</i> para 50 tubos.....	80
TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz / 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz / 100 MHz) do clovane-2 β ,9 α -diol (IV).....	101
TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da Rauianina (V).....	110
TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz/80 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz /50 MHz/100 MHz) do diacetato de murrangatina (VI)	117
TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz; CDCl_3 + gotas de MeOD, 50 MHz) da zantodiolina (VIII).....	125
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da murralongina (IX), CDCl_3 , 200 MHz.....	128
TABELA 4.6: Resumo das agliconas de flavonas e flavonols.....	136
TABELA 4.7: Polimetoxiflavonas.....	137
TABELA 4.8 – Configuração dos glicosídeos (HARBONE, 1982).....	140
TABELA 4.9 – Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento H1/H2 de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonóides ($\text{DMSO}-d_6$) (HARBONE, 1982).....	142
TABELA 4.10 – Dissacarídeos de flavonas e flavonols glicosilados (HARBONE, 1994).....	142
TABELA 4.11: Faixa de absorção no UV-Vis para flavonóides.....	144

TABELA 4.12: Dados de RMN de ^1H de apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside (Xa e Xb) e modelos utilizados na determinação da estrutura [Lit: a) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; rotâmero majoritário; b) VELOZO <i>et al.</i> , 2009; c) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; rotâmero minoritário].....	160
TABELA 4.13: Dados de RMN de ^{13}C de apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside (Xa e Xb) e modelos utilizados na determinação da estrutura [Lit: a) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; rotâmero majoritário; b) VELOZO <i>et al.</i> , 2009; c) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; rotâmero minoritário].....	161
TABELA 4.14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside (XIa , DMSO 400/100 MHz; Lit: a) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004, MeOD 600/300 MHz; b) VELOZO <i>et al.</i> , 2009, DMSO, 500/125 MHz).....	174
TABELA 4.15: Dados de RMN de ^1H de 2"-O-raminosi-vitexina [XIIa , confôrmero mais abundante, XIIb , confôrmero menos abundante DMSO, 400 MHz; Lit: a) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004, MeOD, 600 MHz; b) DOYAMA <i>et al.</i> , 2005, DMSO, 200 MHz].....	187
TABELA 4.16: Dados de RMN de ^{13}C de 2"-O-raminosilvitexina [XIIa , confôrmero mais abundante, XIIb , confôrmero menos abundante DMSO, 100 MHz; Lit: a) RAYYAN <i>et al.</i> , 2004, MeOD, 300 MHz; b) DOYAMA <i>et al.</i> , 2005, DMSO, 50 MHz].....	188
TABELA 4.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Isovitexina (XIII ; DMSO 400/100 MHz; Lit: PENG <i>et al.</i> , 2008; DMSO 500/125 MHz).....	192
TABELA 4.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Isovitexina (XIV ; DMSO 400/100 MHz; Lit: PENG <i>et al.</i> , 2008; DMSO 500/125 MHz).....	199
TABELA 4.19: Massa molar e porcentagem (%) das flavonas em cada fração (G1-G5).....	202
TABELA 4.20: Isômeros com esqueleto flavonoídico da apigenina.....	204
TABELA 4.21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Vicenin-2 (XVII , DMSO 400/100 MHz; Lit: VELOZO <i>et al.</i> , 2009, DMSO, 500/125 MHz).....	219

TABELA 4.22: Dados de RMN ¹ H de neoschaftoside, schaftoside, neoisochaftoside e isochaftoside (XVIII , XIX , XX e XXI ; DMSO, 400; Lit: XIE <i>et al.</i> , 2003; DMSO 400 MHz).....	236
TABELA 4.23: Dados de RMN ¹³ C de neoschaftoside, schaftoside, neoisochaftoside e isochaftoside (XVIII , XIX , XX e XXI ; DMSO, 100 MHz; Lit: XIE <i>et al.</i> , 2003; DMSO, 125 MHz; ÖSTERDHAL, 1979; DMSO 100 MHz).....	237
TABELA 4.24: Dados de RMN ¹ H de 2"-O-raminosil-vitexina (XII) e 2"-O-raminosil-isovitexina (XXII) (DMSO 400; Lit: DOYAMA <i>et al.</i> , 2005, DMSO 200 MHz; RAYYAN <i>et al.</i> , 2004, DMSO 600 MHz).....	250
TABELA 4.25: Dados de RMN de ¹³ C de 2"-O-raminosil-vitexina (XII) e 2"-O-raminosil-isovitexina (XXII) (DMSO 100 MHz; Lit: DOYAMA <i>et al.</i> , 2005, DMSO 50 MHz; RAYYAN <i>et al.</i> , 2004, DMSO 300 MHz).....	251
TABELA 4.26: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas de <i>Rauia</i> sp.....	259
TABELA 4.27: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos brutos do caule de <i>Rauia</i> sp.....	261
TABELA 4.28: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp.....	264
TABELA 4.29: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	268
TABELA 4.30: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Rauia</i> sp.....	269

TABELA 4.31: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	271
TABELA 4.32: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com a fração G e subfrações da partição hidroalcoólica do extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	274
TABELA 4.33: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	276
TABELA 4.34: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos do caule de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	278
TABELA 4.35: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	283
TABELA 4.36: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	286
TABELA 4.37: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	287
TABELA 4.38: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações da partição hidroalcoólica do extrato bruto	

metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	293
TABELA 4.39: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com extratos brutos de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).....	296
TABELA 4.40: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).....	297
TABELA 4.41: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato diclorometânico do caule de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).....	299
TABELA 4.42: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato metanólico de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).....	301

LISTAS DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1: Preparação dos Extratos de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp.....	60
FLUXOGRAMA 3.2: Fracionamento de RFD.....	62
FLUXOGRAMA 3.3: Fracionamento de RFDd.....	63
FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento de RFDe.....	64
FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento de RFDf.....	65
FLUXOGRAMA 3.6: Metodologia utilizada na partição do extrato.....	66
FLUXOGRAMA 3.7: Fracionamento de RCD.....	68
FLUXOGRAMA 3.8: Fracionamento de RCDd.....	69
FLUXOGRAMA 3.9: Fracionamento de RCDf.....	70
FLUXOGRAMA 3.10: Metodologia utilizada na partição do extrato.....	71
FLUXOGRAMA 3.11: Fracionamento de RCMD.....	72
FLUXOGRAMA 3.12: Fracionamento de RCMH.....	74
FLUXOGRAMA 3.13: Fracionamento dos extratos orgânicos de <i>Rauia</i> sp.....	77

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1: Proposta de fragmentação para o clovane-2 β ,9 α -diol (IV)	104
ESQUEMA 4.2: Proposta de fragmentação para a rauianina (V).....	112
ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para o diacetato de murrangatina (VI).....	122
ESQUEMA 4.4: Proposta de fragmentação para a murralongina (IX).....	129
ESQUEMA 4.5: Proposta de fragmentação da flavona (XI).....	173
ESQUEMA 4.6: Fragmentação da 2"-O-raminosilvitexina (XII).....	186
ESQUEMA 4.7: Fragmentação da flavona XV.....	215
ESQUEMA 4.8: Fragmentação da vicenin-2 (XVII).....	218
ESQUEMA 4.9: Fragmentação da neoisochaftoside (XVIII).....	235

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 4.1: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas de <i>Rauia</i> sp.....	259
GRÁFICO 4.2: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos do caule de <i>Rauia</i> sp.....	261
GRÁFICO 4.3: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp.....	262
GRÁFICO 4.4: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico de folha de <i>Rauia</i> sp.....	264
GRÁFICO 4.5: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	268
GRÁFICO 4.6: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com frações de partição líquido-líquido de extrato bruto metanólico de folhas de <i>Rauia</i> sp.....	270
GRÁFICO 4.7: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido de extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	271
GRÁFICO 4.8: Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com a fração G e subfrações da partição hidroalcoólica do extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.....	275
GRÁFICO 4.9: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.	276
GRÁFICO 4.10: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos do caule de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.	279
GRÁFICO 4.11: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	284

GRÁFICO 4.12: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	286
GRÁFICO 4.13: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	288
GRÁFICO 4.14: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações da partição hidroalcoólica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.....	294
GRÁFICO 4.15: Médias da mortalidade do ensaio realizado com os extratos brutos de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL.....	296
GRÁFICO 4.16: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL.....	298
GRÁFICO 4.17: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato diclorometânico de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL.....	299
GRÁFICO 4.18: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato metanólico de folhas e do caule de <i>Rauia</i> sp na concentração de 10 mg/mL.....	301

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rauia* sp E ATIVIDADES SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS E SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO – O controle de pragas agrícolas é muito relevante para o Brasil, que tem grandes áreas plantadas. Este controle, realizado por produtos naturais, geralmente menos tóxicos ao ser humano e animais e específico a determinada praga, é altamente recomendado. Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico e os ensaios inseticidas realizados com os extratos orgânicos de folhas e caule de *Rauia* sp. Dentre os extratos ensaiados os do caule foram mais ativos sobre formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e os extratos das folhas foram mais ativos sobre a lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*). O estudo químico do extrato diclorometano do caule levou a identificação das substâncias: sitosterol, estigmasterol, campesterol, clovane-2 β ,9 α -diol, apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside, apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside, 2''-O-raminosil-vitexina, 2''-O-raminosil-isovitexina, vitexina, isovitexina, apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2''''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside), apigenina 6-C-(2''''-O- α -L-arabinopiranosil-gluco-piranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside, vicenin-2, schaftoside, neoschaftoside, isoschaftoside e neoisoschaftoside. Dentre os compostos isolados, o sesquiterpeno clovane-2 β ,9 α -diol e os flavonóides glicosilados são relatados pela primeira vez no gênero *Rauia*.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY STUDY OF *Rauia* sp AND ACTIVITIES ON LEAF-CUTTING ANTS AND FALL ARMYWORM – The control of agriculture plague is relevant to Brazil that has large crop area. The control, by natural product, generally low toxic to humans and to animals and specific to target plague, is recommended. This work presents the phytochemical and insecticide assays carried out with organic extracts of leaves and stems of *Rauia* sp. Among the tested extracts, the stem extracts were more active on leaf cutter ants (*Atta sexdens rubropilosa*) and the extracts of leaves were more active against fall armyworm (*Spodopera frugiperda*). The study of dichloromethane extracts of the stem led to the identification of active substances: sitosterol, stigmasterol, campesterol, clovane-2 β ,9 α -diol, apigenin 6-C-neohesperidosyl-8-C-glucopyranoside, apigenin 6-C-glucopyranosyl-8-C-neohesperidoside, 2''-O-rhamnosyl-vitexin, 2''-O-rhamnosyl-isovitexin, vitexin, isovitexin, apigenin 6-C- β -D-glucopyranosyl-8-C-(2'''-O- α -L-arabinopyranosyl- β -D-glucopyranoside), apigenin 6-C-(2'''-O- α -L-arabinopyranosyl-glucopyranosyl)-8-C- β -D-glucopyranoside, vicienin-2, schaftoside, neoschaftoside, isoschaftoside e neoisoschaftoside. The sesquiterpene clovane-2 β ,9 α -diol and glycosides flavonoids were been reported for the first time in the genus *Rauia*.

SUMÁRIO

1 – Introdução	3
1.1 – Ordem Sapindales	3
1.2 – Família Rutaceae	3
1.3 – Gênero Rauia	4
1.4 – Formigas cortadeiras	8
1.4.1 – Seletividade de plantas por formigas cortadeiras	12
1.4.2 – Transferência de alimentos entre as formigas cortadeiras	13
1.4.3 – Interação com o fungo simbiote	14
1.4.4 – Ingestão de alimento pelas diferentes castas	20
1.4.5 – Formigas cortadeiras como pragas	21
1.4.6 – Métodos de controle de formigas cortadeiras	24
1.4.7 – Dificuldades no controle das formigas cortadeiras	30
1.5 – Aspectos biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidóptera: Noctuidae) (J. E. Smith, 1797)	31
1.5.1 – Prejuízos causados pela lagarta-do-cartucho do milho	34
1.5.2 – Métodos de controle da lagarta-do-cartucho do milho	36
1.6 – Produtos naturais no controle de insetos pragas	38
1.6.1 – Atividades inseticidas de produtos naturais sobre as formigas cortadeiras, fungicida sobre o fungo simbiote das mesmas e inibitórias da enzima pectinase.	40
1.6.2 – Atividades inseticidas de produtos naturais sobre a lagarta-do-cartucho do milho	43
2- Objetivo	53
3 – Procedimento Experimental	57
3.1 – Materiais e Métodos	57

3.2 – Equipamentos	58
3.3 – MATERIAL BOTÂNICO	60
3.4 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Rauia</i> sp	60
3.5 – FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS	61
3.5.1 – Estudo do extrato diclorometânico (RFD)	61
3.5.2 – Estudo da fração RFDd	63
3.5.3 – Estudo da fração RFDe	64
3.5.4 – Estudo da fração RFDf	65
3.5.5 – Estudo do extrato metanólico (RFM)	66
3.6 – FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE	67
3.6.1 – Estudo do extrato diclorometânico (RCD)	67
3.6.2 – Estudo da fração RCDd	68
3.6.3 – Estudo da fração RCDf	70
3.6.4 – Fracionamento de RCM de <i>Rauia</i> sp	71
3.6.5 – Estudo da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp (RCMD)	72
3.6.6 – Estudo da fração hidroalcoólica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp (RCMH)	73
3.7 – METODOLOGIA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	78
3.7.1 – Ensaio biológico realizados sobre as formigas cortadeiras	78
3.7.1.1 – Obtenção das formigas cortadeiras	78
3.7.1.2 – Preparação da dieta artificial e metodologia do ensaio para as operárias	78
3.7.2 – Ensaio biológico realizados sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	79
3.7.2.1 – Obtenção da lagarta-do-cartucho do milho	79
3.7.2.2 – Ensaio de ingestão sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	79

3.7.2.3 – Ensaio de toxicidade aguda sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	81
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1 – Substâncias Isoladas	85
4.2 – Esteróides	92
4.2.1 – Identificação estrutural das substâncias I, II e III	93
4.3 – Sesquiterpenos	96
4.3.1 – Identificação estrutural da substância IV	98
4.4 – Cumarinas	104
4.4.1 – Identificação estrutural da substância V	108
4.4.2 – Identificação estrutural das substâncias VI-VIII	113
4.4.3 – Identificação estrutural da substância IX	125
4.4.4 – Biogênese das cumarinas	129
4.5 – Flavonóides	133
4.5.1 – Nomenclatura dos Flavonóides	134
4.5.2 – RMN de flavonas e flavonols	135
4.5.3 – IV, UV e EM de flavonóides	143
4.5.4 – Determinação estrutural das substâncias X	151
4.5.5 – Determinação estrutural da substância XI	167
4.5.6 – Identificação estrutural da substância XII	178
4.5.7 – Identificação estrutural da substância XIII	189
4.5.8 – Determinação estrutural da substância XIV	197
4.5.9 – Determinação estrutural dos constituintes da subfração G	200
4.5.9.1 – Determinação estrutural dos constituintes da fração G1 e G2 (substâncias X, XI, XV, XVI e XVII)	209
4.5.9.2 – Determinação estrutural dos constituintes da fração G3 e	

G4 (substâncias XVIII , XIX , XX e XXI)	227
4.5.9.3 – Determinação estrutural dos constituintes da fração G5 (substâncias XVII , XVIII , XII e XIX)	244
4.5.10 – Biossíntese dos flavonóides	256
4.6 – Efeito de <i>Rauia</i> sp nos ensaios de ação inseticida por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	258
4.6.1 – Efeito dos extratos brutos de folhas	258
4.6.2 – Efeito dos extratos brutos do caule	259
4.6.3 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico de folhas	262
4.6.4 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico do caule	265
4.6.5 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico de folhas (RFM)	269
4.6.6 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico do caule (RCM)	270
4.6.7 – Efeito da fração G e suas subfrações da partição hidroalcoólica do extrato bruto metanólico do caule (RCM)	272
4.7 – Efeito de <i>Rauia</i> sp no desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> nos ensaios por ingestão	275
4.7.1 – Efeito dos extratos de folhas	275
4.7.2 – Efeito dos extratos do caule de <i>Rauia</i> sp	278
4.7.3 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico de folhas	282
4.7.4 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico de folhas	284
4.7.5 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico do caule	287
4.7.6 – Efeito das frações da partição hidroalcoólica do extrato metanólico do caule	290
4.8 – Efeito de <i>Rauia</i> sp em <i>Spodoptera frugiperda</i> nos ensaios por toxicidade aguda	294

4.8.1 – Efeito dos extratos brutos	294
4.8.2 – Efeito das frações do extrato diclorometânico de folhas	297
4.8.3 – Efeito das frações do extrato diclorometânico do caule	298
4.8.4 – Efeito das frações do extrato metanólico de folhas e caule	300
5- Conclusões	305
6- Referências Bibliográficas	311

1 – INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Ordem Sapindales

Segundo CRONQUIST (1981, 1988) a ordem Sapindales é constituída por 3000 a 3500 espécies distribuídas em 6 famílias: Rutaceae, Meliaceae, Ptaeroxylaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae e Burseraceae. Neste grupo de famílias é encontrada uma rica e diversificada gama de metabólitos secundários, muitos deles exclusivos desta ordem. Os metabólitos de maiores ocorrências são as cumarinas, alguns grupos de alcalóides (principalmente derivados do ácido antranílico), flavonóides e quassinóides (WATERMAN, 1975).

Com base nesta riqueza e diversidade, a ordem Sapindales tornou-se alvo de um considerável número de pesquisadores interessados na biogênese, no isolamento e na identificação de novos compostos.

1.2 – Família Rutaceae

A família Rutaceae é formada por cerca de 150 gêneros que englobam aproximadamente 1600 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália (PIRANI, 1998). A família Rutaceae constitui o maior grupo de plantas da ordem Sapindales (WATERMAN e GRUNDON, 1983). Na região neotropical ocorrem 52 gêneros, sendo 33 destes no Brasil, com centro de diversidade desses gêneros na Amazônia e na mata atlântica. Existem cerca de 200 espécies descritas no Brasil (SCHULTZ, 1968).

Esta família é subdividida em 7 subfamílias, 10 tribos e 25 subtribos. Os vegetais desta família são todos perenes, na maioria arbustos e árvores (ENGLER, 1964). A característica mais marcante da família Rutaceae é a presença de pontuações translúcidas nas folhas, que são glândulas multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos, típicos desta família. Essas glândulas estão distribuídas pela casca do caule e no parênquima foliar (PIRANI, 1982).

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

Do ponto de vista químico, a família Rutaceae é conhecida principalmente por sua grande diversidade de metabólitos secundários. Dentre eles podem-se destacar os alcalóides, terpenóides, flavonóides, cumarinas, lignanas e os limonóides (WATERMAN, 1975).

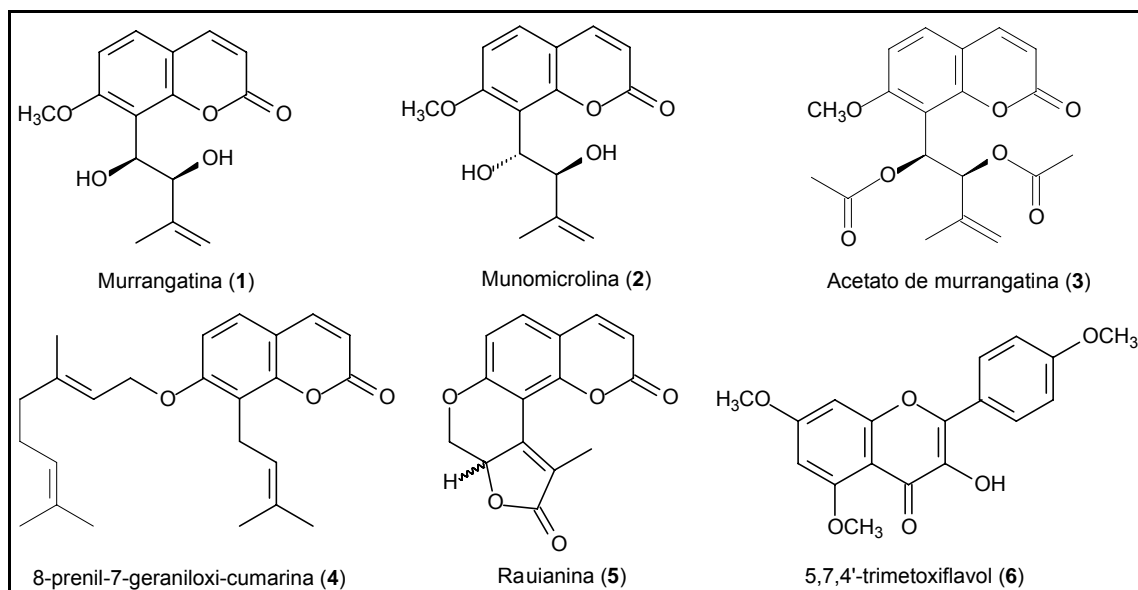
Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas de grande importância farmacológica (WATERMAN e GRUNDON, 1983) a qual desperta o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica dessa família. Inúmeros trabalhos sobre atividades antifúngicas, bactericidas, antivirais e inseticidas de alcalóides, cumarinas e limonóides de plantas desta família têm sido publicados. O grupo de produtos naturais da UFSCar tem purificado e identificado um grande número de compostos típicos de Rutaceae de espécies brasileiras, sendo alguns deles com atividade anticancerígena, antimicrobiana e fungicida (ativas contra o fungo de formigas cortadeiras) indicando que novos estudos utilizando plantas dessa família devem ser realizados.

1.3 – Gênero *Rauia*

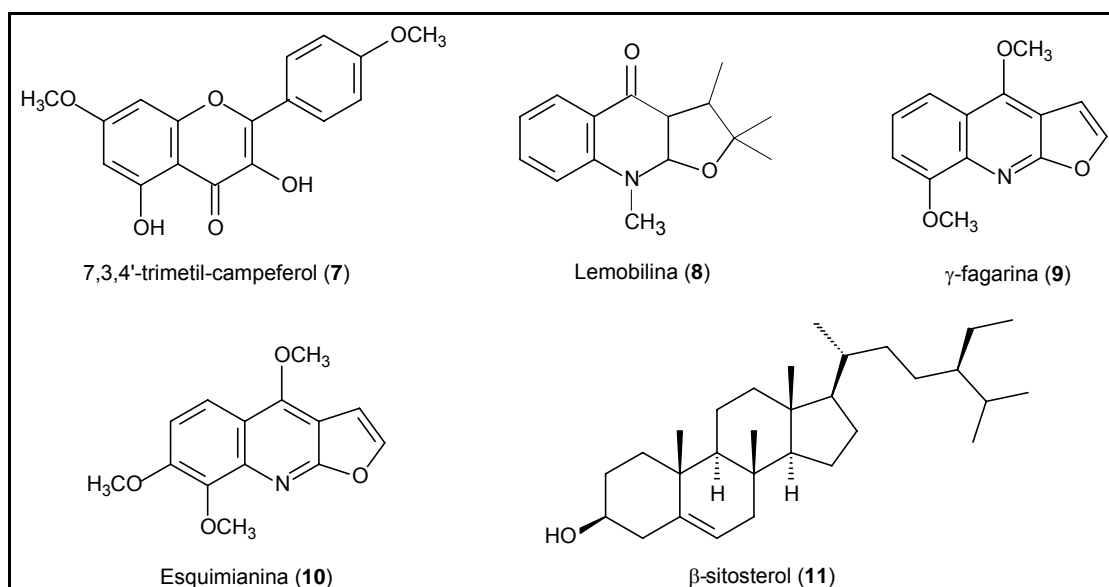
O gênero *Rauia* pertence à família Rutaceae, subfamília Rutoideae e tribo Cusparieae. A *Rauia ulei* é encontrada no Amazonas e a *Rauia resinosa* é encontrada no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. O gênero *Rauia* é ainda pouco conhecido com relação ao seu potencial químico (ALBARICI, 2006).

Em 1995, o estudo de óleos voláteis das folhas de *R. resinosa* mostrou a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (VELOSO, 1995). O estudo do extrato metanólico do caule e do extrato diclotometânico de folhas permitiu o isolamento de quatro cumarinas substituídas nas posições 7 e 8, murrangatina (**1**), munomicrolina (**2**), acetato de murrangatina (**3**), e 8-prenil-7-

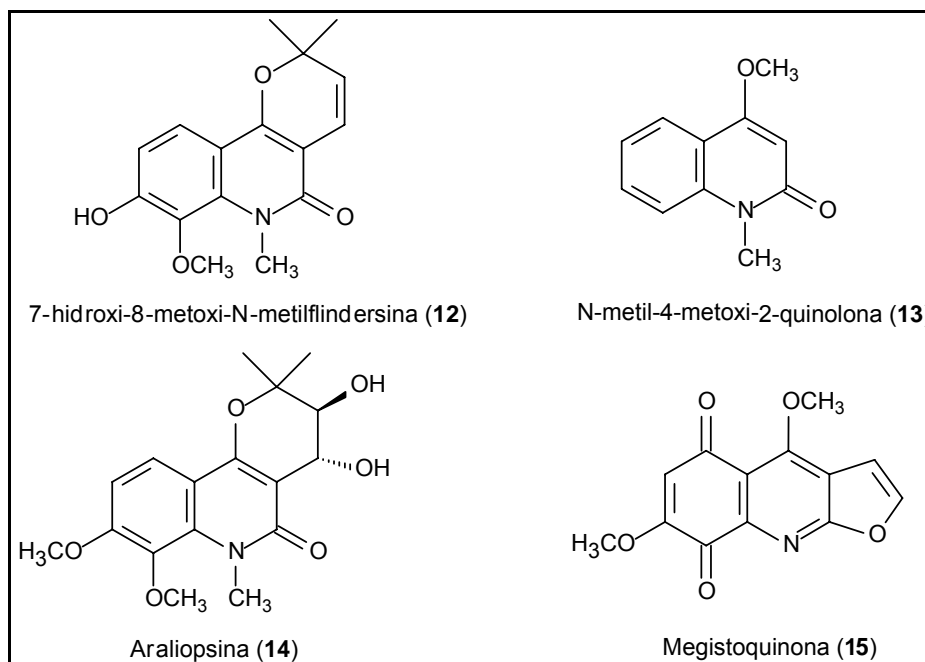
geraniloxicumarina (**4**) (VELOSO, 1995, p. 5). A partir do extrato de éter de petróleo de folhas de *R. resinosa* foi isolada uma nova cumarina que foi chamada de rauianina (**5**) (VELOSO *et al.*, 1997) e um flavonol (5,7,4'-trimetoxiflavonol, (**6**) (VELOSO, 1995, p. 5).



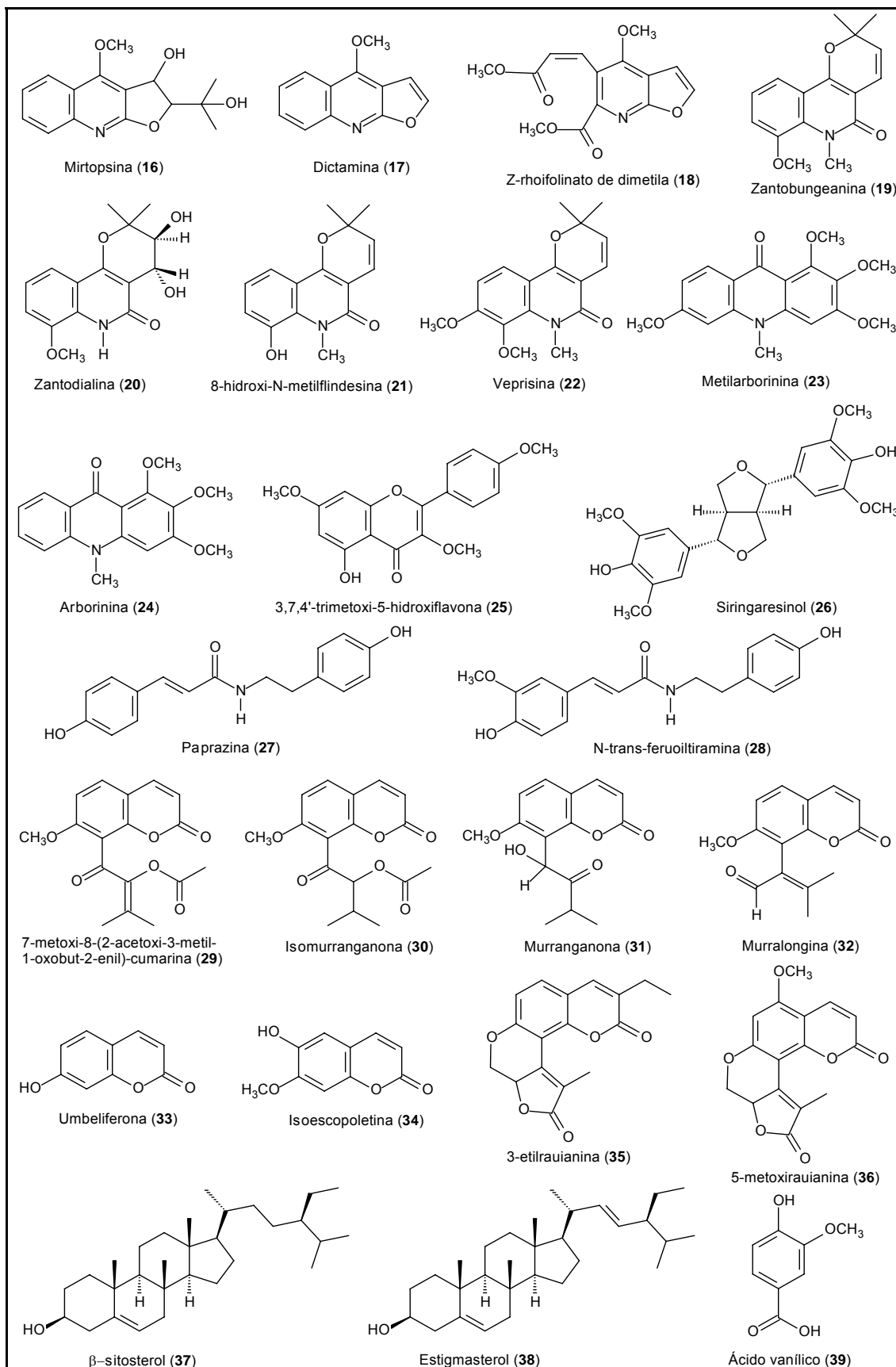
Um outro estudo com a mesma espécie desta planta levou ao isolamento da cumarina rauianina (**5**), da flavona 7,3,4-trimetilcampeferol (**7**), dos alcalóides lemobilina (**8**), γ -fagarina (**9**) e esquimianina (**10**) e do esteróide β -sitosterol (**11**) (OLIVEIRA, 1996 p. 5).



De uma espécie não identificada de *Rauia* sp foi isolada uma cumarina (rauianina, **5**) e quatro alcalóides (**12-15**) (FACCHINI, 2005, p. 6).



O estudo de *Rauia* sp por ALBARICI (2006) mostrou a presença dos alcalóides: γ -fagarina (**9**), esquimianina (**10**), 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (**12**), N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**13**), mirtopsina (**16**), dictamina (**17**), Z-rhoifolinato de dimetila (**18**), zantobungeanina (**19**), zantodialina (**20**), 8-hidroxi-8-N-metilflindersina (**21**), veprisina (**22**), metilarborinina (**23**), arborinina (**24**), da flavona 3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxiflavona (**25**), da lignana siringaresinol (**26**) e das amidas: paprazina (**27**), N-*trans*-feruoiltiramina (**28**). Foi observada também a presença das cumarinas murrangatina (**1**), munomicrolina (**2**), acetato de murrangatina (**3**), rauianina (**5**), 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metiloxobut-2-enil)-cumarina (**29**), isomurranganona (**30**), murranganona (**31**), murralongina (**32**), umbeliferona (**33**), isoescopoletina (**34**), 3-etilrauianina (**35**), 5-metoxirauianina (**36**), da mistura dos esteróides sitosterol (**37**) e estigmasterol (**38**) e do ácido vanílico (**39**) (p. 7).



1.4 – Formigas cortadeiras

As formigas constituem um dos grupos de insetos mais abundantes na biosfera, sua população é cerca de 10^{16} indivíduos (DELLA LUCIA, 1993; ANGELI-PAPA, 1984; CORRÊA e SANT'ANA, 2001).

Elas são animais dominantes e de grande importância em muitos ecossistemas terrestres. Estima-se que existam 15.000 espécies de formigas, entre as quais aproximadamente 12.080 estão descritas (PANIZZI e PARRA, 1991). Este número elevado de espécies é um indicador de sua importância biológica, reflete a grande variação de habitat, preferências alimentares, divisão de trabalho e defesa (WILSON, 1998).

O sucesso da adaptação destes insetos ao meio ambiente está intrinsecamente ligado ao alto grau de organização social de suas colônias, ou seja, convivem em sociedades onde os indivíduos têm atividades específicas para o bom andamento da colônia (BESTMANN *et al.*, 1997). Todas as espécies de formigas são insetos eussociais por apresentarem três características: sobreposição de gerações (apresentam mais de uma geração em determinado momento do desenvolvimento da colônia); divisão de trabalho (castas) e cuidados com a prole (FOWLER *et al.*, 1991).

As formigas cortadeiras (FIGURA 1.1, p. 8) pertencem à Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, subfamília Myracinae, tribo Attini. São consideradas formigas cortadeiras todas as espécies dos gêneros *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas, *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns e também algumas *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma* (JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996).



FIGURA 1.1: Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO *et al.*, 2006).

A tribo Attini abrange aproximadamente 304 espécies divididas em 13 gêneros: *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (KEMPF, 1972; BOLTON, 1995; BRANDÃO & MAYHÉ-NUNES, 2001).

As Attini constituem um grupo essencialmente de clima tropical. Apresentam uma ampla distribuição geográfica desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe como Curaçao, Cuba, Trinidad e Tobago, não ocorrendo no Chile (WEBER, 1972; NORTH *et al.*, 1997). Com exceção de *Acromyrmex striatus* dos Andes argentinos que já foi encontrada a 3.500 metros de altitude, as Attini são encontradas em altitudes inferiores a 2.000 metros, como é o caso do gênero *Atta*, restritas a essas altitudes menores mesmo na Colômbia, Equador e Bolívia (NORTH *et al.*, 1997).

Os gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) representam o ápice evolutivo da tribo em relação à filogenia das Attini. São caracterizadas por possuírem colônias bem desenvolvidas, polimorfismo funcional das operárias e uma distinta casta de soldados nas espécies do gênero *Atta* (STRADLING, 1991). Estas formigas cultivam seu fungo simbiote sobre material vegetal fresco, principalmente folhas, cortadas por elas mesmas, o que as tornam conhecidas como formigas cortadeiras.

Todas as espécies da tribo Attini caracterizam-se por manterem uma relação obrigatória de simbiose com fungos da família Lepiotaceae (CHAPELA *et al.*, 1994). As plantas cortadas pelas formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são utilizadas como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

O Brasil é o país da América do Sul com maior número de espécies de formigas cortadeiras, são 10 espécies, de um total de 15 espécies do gênero. Destas, cinco espécies possuem grande importância econômica: *Atta laevigata*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex niger* e *Acromyrmex crassipinus*; nas quais em florestas implantadas de *Pinus* e de *Eucalyptus*, destacam-se como as principais pragas, principalmente nas fases

de pré-corte (áreas de reforma ou condução da floresta) e imediatamente após o plantio ou no início da condução de brotação (FORTI e BOARETTO, 1997). As saúvas são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1976).

Os ninhos das saúvas são formados por montes de terra solta e encontram-se sempre no solo. Sob estes montes, e fora deles, podem ser observados vários orifícios, denominados olheiros, que permitem o acesso das formigas ao exterior. Internamente, o formigueiro é constituído por câmaras subterrâneas, interligadas por galerias. As câmaras apresentam níveis e utilizações diferentes, que podem servir desde um local para despejo de lixo até um local para abrigar a rainha (MARICONI, 1976).

A população de um sauveiro é composta de indivíduos que se diferenciam morfológicamente (polimorfismo) de acordo com as funções que desempenham na colônia (DELLA LUCIA *et al.*, 1993). As saúvas apresentam castas permanentes e temporárias. A casta temporária é constituída pelos indivíduos férteis que são as fêmeas aladas, denominadas rainhas, içás ou tanajuras (FIGURA 1.2, p. 11), e pelos machos alados, conhecidos como bitus. Ambos são produzidos pela colônia em determinadas épocas do ano, vindo à superfície dos ninhos durante a revoada ou vôo nupcial. As fêmeas aladas apresentam cabeça, mandíbulas, tórax e gáster bem desenvolvidos. Apenas uma rainha ocorre em cada sauveiro, desta forma com sua morte este se extingue (AUTORI, 1950). Os machos, que possuem cabeças e mandíbulas pouco desenvolvidas, têm uma única função, a reprodução, desta forma possuem um período de sobrevivência curto, morrendo logo após o vôo nupcial (MARICONI, 1970).

A casta permanente é composta pela fêmea fundadora do ninho (rainha), a qual pode viver de 15 a 20 anos, e pelas quatro castas de operárias que não possuem função reprodutiva e que são encarregadas de diversas tarefas no ninho (DELLA LUCIA, 1993).

As fêmeas estéreis são denominadas operárias, constituem a grande maioria do saueiro e são divididas de acordo com o tamanho:

- ❖ as jardineiras são menores, suas funções são triturar pedaços de vegetais e colocá-los à disposição do fungo simbiote, além de exercerem um papel importante na alimentação da rainha e das larvas, sendo então responsáveis pelo cuidado com a cria. Possuem grande capacidade olfativa, refugando qualquer material estranho que tenha sido trazido ao formigueiro;
- ❖ as generalistas têm tamanho médio, e função de cuidado com o fungo, prole, rainha e descarte do lixo;
- ❖ as forrageadoras recrutam operárias, cortam e coletam vegetação para o ninho, abrem galerias e novas panelas;
- ❖ os soldados são maiores com cabeças e mandíbulas bem desenvolvidas, têm como função principal proteger a colônia de inimigos naturais (MARICONI, 1976).



FIGURA 1.2: Içá ou tanajura (rainha) (Fonte: <http://flickr.com/photos/flaviocb>).

Uma colônia de *Atta* é considerada adulta quando ocorre seu primeiro vôo nupcial. O fenômeno ocorre no Sudeste e Centro Oeste do Brasil durante o período de setembro a dezembro, enquanto que no Sul do Brasil ocorre entre junho e dezembro. A revoada acontece geralmente em dias quentes, úmidos e claros (MARICONI, 1970).

O vôo caracteriza-se pela liberação de grande número de formas aladas que se acasalam no ar. A fêmea é fecundada por 3 a 8 machos, depois desce ao solo e corta suas asas. Após a fecundação o bitu morre e a içá começa a

escavar o solo construindo uma câmara inicial a uma profundidade de 8 a 25 cm (FORTI e BOARETTO, 1997).

Antes de saírem para a revoada, as içás carregam uma pequena porção de fungo em sua cavidade infrabucal. Após 48 horas do início da fundação da nova colônia, a rainha deposita o fungo armazenado na câmara inicial e começa a cultivá-lo com suas próprias fezes e secreções. Durante 80 a 100 dias, a rainha coloca ovos grandes (tróficos), os quais servem para sua própria alimentação e da prole inicial, ovos menores darão origem às operárias. Antes das primeiras operárias eclodirem, cabe a rainha os cuidados gerais com a prole, como alimentação e remoção de um local para outro. Assim que a colônia cresce, as primeiras operárias se desenvolvem e tornam-se então responsáveis pelo cuidado do fungo, das larvas, da limpeza mútua e da rainha (MARICONI, 1970).

O ciclo de vida de uma operária, de ovo a adulto, é de aproximadamente 55 dias em *Atta sexdens rubropilosa* e os ovos eclodem entre 14 e 22 dias. Os ovos colocados pela rainha originarão todos os tamanhos de operárias (FORTI e BOARETTO, 1997).

1.4.1 – Seletividade de plantas por formigas cortadeiras

Apesar das Attini serem consideradas herbívoros generalistas nos ecossistemas naturais, as formigas cortadeiras não atacam todas as espécies vegetais com a mesma frequência ou intensidade (ROCKWOOD, 1976).

O processo de seleção de plantas pelas formigas pode estar relacionado a uma série de fatores. Um deles é a presença de substâncias que podem ser tóxicas às formigas, ao fungo, ou a ambos (HUBBEL e WIEMER, 1983). Essas substâncias são localizadas, geralmente, na cutícula das folhas e representam uma defesa da planta à herbivoria. Outros fatores são as propriedades físicas das plantas, como dureza das folhas, pilosidade, produção de látex (STRADLING, 1978), conteúdo de água e densidade das folhas (WALLER, 1986).

De um modo geral, as espécies nativas, em seus ambientes naturais são quase imunes ao ataque desses insetos (ROCKWOOD, 1975). Já as espécies de plantas introduzidas e cultivadas são mais susceptíveis ao ataque das formigas cortadeiras (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1975).

Normalmente as operárias selecionam material vegetal de diferentes fontes para manter o balanço de nutrientes e umidade adequados ao fungo, sem sobrecarregá-lo com compostos secundários, que podem ser tóxicos à formiga e/ou ao fungo simbiote (HOWARD *et al.*, 1988).

1.4.2 – Transferência de alimentos entre as formigas cortadeiras

Todos os membros numa colônia de formigas apresentam determinadas habilidades para atuarem no ciclo energético pela distribuição de alimento (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Os mecanismos de transferência de alimento são diversificados, mas podem ser agrupados em três categorias:

- ❖ transferência de material armazenado no trato digestório: as operárias adultas podem transferir às larvas, às operárias especializadas em estocar alimento e à rainha o alimento contido no interior do papo. Por outro lado, as larvas transferem proteínas e aminoácidos para as operárias adultas (BUENO *et al.*; 2008);
- ❖ transferência através de ovos tróficos: principalmente pela postura de ovos de alimentação, uma vez que a fonte de energia das rainhas é a reserva alimentar contida no corpo gorduroso e a remodelação de alguns órgãos, como a degeneração da musculatura de vôo (CRUZ-LANDIM e MORAES, 1979);
- ❖ transferência de secreções glandulares: o sistema salivar das operárias pode contribuir para a alimentação das larvas (BUENO *et al.*; 2008).

A capacidade dos insetos atuarem como pragas ou vetores de várias doenças às plantas e aos animais se devem aos hábitos alimentares. Desta forma, o detalhamento das estruturas que compõe o sistema digestório e a interpretação correta do funcionamento do mecanismo de ingestão permite melhorar o manejo dos insetos. De acordo com descobertas recentes, novas

interpretações a respeito da ecologia nutricional das formigas podem ser estabelecidas, destacando-se (BUENO *et al.*; 2008):

- ❖ o aparato que constitui o filtro infrabucal de *Atta sexdens rubropilosa* impede a passagem de partículas maiores do que 1 μm ;
- ❖ as formigas realizam a separação seletiva de constituintes lipídicos e não lipídicos do alimento ingerido, com destinos específicos. Os compostos lipídicos atingem as glândulas pós-faríngeas e os não lipídicos se deslocam para o papo. Isto possibilita aos adultos obtenção de energia a partir dos lipídios disponíveis na natureza;
- ❖ ausência de trofalaxia entre os indivíduos adultos da colônia de *Atta sexdens rubropilosa*, mas presença de trofalaxia proctodeal entre as larvas e as operárias adultas;
- ❖ a alimentação das larvas, das formas aladas e dos soldados de algumas espécies é realizada completamente pelas operárias, mesmo que se encontrem no jardim de fungo;
- ❖ a obtenção do alimento pelas operárias adultas é diversificada, ou seja, ocorre no próprio local em que ela está realizando a atividade básica: forrageio, preparação do material vegetal, cuidado do jardim de fungo e cuidado com a cria.

1.4.3 – Interação com o fungo simbiote

A relação mutualística entre o fungo e as formigas cortadeiras é vista como um dos grandes fatores que levam a existência de muitas colônias, com grande sucesso de desenvolvimento nas áreas em que se instalam (SCHADE, 1973; HUBBEL e WIEMER, 1983). É uma das relações ecológicas mais antigas existente datando de aproximadamente 45-65 milhões de anos atrás (CURRIE, 2001), mostrando que os mesmos coevoluíram em associação (CURRIE *et al.*, 2006).

As formigas da tribo Attini cultivam um fungo simbiote denominado *Leucoagaricus gongylophorus*. O fungo simbiote constitui a base alimentar da colônia, os adultos ingerem principalmente líquidos e larvas de todo o fungo, rico

em carboidratos e proteínas e pobre em lipídios (MARTIN *et al.*, 1969), mas o fungo não é a única fonte alimentar, pois as operárias adultas ingerem seiva diretamente das plantas no momento do corte e recorte do material (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1976; QUINLAN e CHERRETT, 1979; FORTI e ANDRADE, 1999). De acordo com BASS e CHERRET (1995), apenas 9 % das necessidades energéticas das operárias adultas são provenientes diretamente do fungo.

A distribuição dos polissacarídeos nos vegetais, os quais aparentam ser essenciais para a obtenção de energia, faz com que microrganismos, de um modo geral, apresentem estratégias para acessar estes nutrientes dos vegetais. O fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, apresenta atividade de polissacaridases, fornecendo às formigas enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas (MARICONI, 1974) como pectinase, amilase, xilanase, β -glicosidase e manosidase (FEBVAY & KERMARREC, 1981). Estudos relatados sobre a atividade celulásica no fungo cultivado pela formiga *Atta sexdens rubropilosa* mostraram suas diferentes atividades metabólicas, a qual degradou em maior quantidade o polissacarídeo pectina, seguido de amido, xilana, carboximetilcelulose e celulose (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Por outro lado, a atividade das formigas traz benefícios aos fungos, uma vez que estas produzem compostos antimicrobianos que reduzem o crescimento de outros fungos e bactérias contaminantes dos ninhos (FOWLER *et al.*, 1986).

A manutenção do jardim de fungo é realizada constantemente, através da lambertura de sua superfície, pelas operárias de tamanho intermediário até o mínimo. Segundo SILVA *et al.* (2003) a glicose é a principal fonte energética dessas formigas, proveniente da digestão extracelular do simbionte, sendo responsável por 50 % de suas necessidades nutricionais.

Vários estudos têm mostrado a existência de outros microrganismos no jardim de fungo dos formigueiros (PAGNOCCA *et al.*, 1996). Nesta interação existem também um parasita do gênero *Escovopsis* e um actinomiceto (bactéria filamentosa). Segundo CURRIE (1999), o *Escovopsis* é patógeno do fungo simbionte da formiga, enquanto o actinomiceto mantém uma relação mutualista

com a formiga. A FIGURA 1.3 (p. 16) representa esta associação multilateral descrita acima.

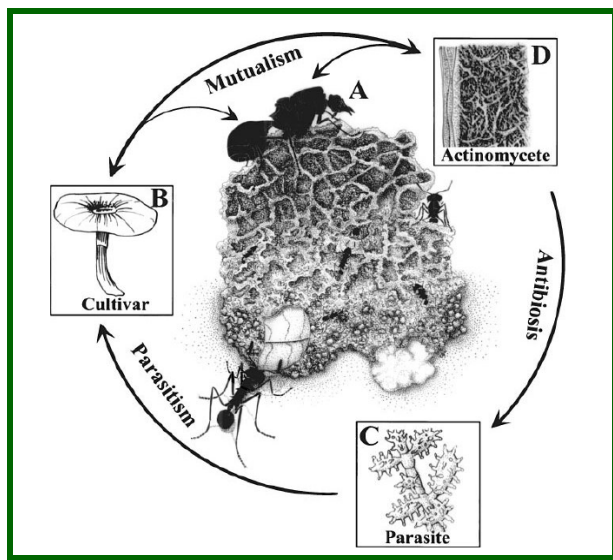


FIGURA 1.3: Interações presentes em ninhos de formigas da tribo Attini (A) A rainha no jardim de fungo; (B) representa o fungo simbiote cultivado pela formiga; (C) o microfungo representa o parasita *Escovopsis*; (D) actinobactéria que cresce na cutícula da formiga e produz antibióticos que suprimem o crescimento do *Escovopsis*. Seta dupla: representa a interação mutualista; Seta única: representa uma interação negativa (Fonte: CURRIE, 2001).

A convivência entre formigas, fungo mutualista e actinobactéria é pacífica, uma vez que estes sobrevivem assintomaticamente à associação (CURRIE *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2008). Nestes ninhos, o parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, levar as formigas e fungo à morte (CURRIE *et al.*, 2006).

A actinobactéria envolvida nesta interação foi inicialmente identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* (CURRIE *et al.*, 1999), um gênero conhecido por produzir antibióticos. Porém, recentemente, esta actinobactéria foi reclassificada como *Pseudonocardia* (CAFARO e CURRIE, 2005). Actinobactérias, principalmente do gênero *Pseudonocardia*, são relatadas como mutualistas em partes especializadas do corpo de formigas-cortadeiras (FIGURA 1.4, p. 17).

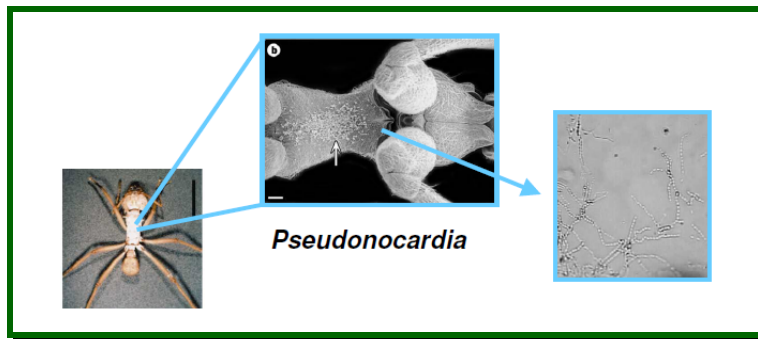


FIGURA 1.4: *Pseudonocardia* na cutícula de uma formiga do gênero *Acromyrmex* (Fonte: CURRIE *et al.*, 1999).

Essas bactérias filamentosas, o fungo mutualista *L. gongylophorus* e as formigas cortadeiras vivem em simbiose dentro do ninho e enfrentam um fungo parasita do gênero *Escovopsis* que tenta suprimir o crescimento do fungo simbiote e das formigas (REYNOLDS e CURRIE, 2004; KOST *et al.*, 2007). Essas actinobactérias são de grande interesse uma vez que são mutualistas metabólicos de diversos organismos, principalmente na fixação de nitrogênio e produção de antibióticos (MUELLER *et al.*, 2008). As espécies de *Pseudonocardia* presentes neste ambiente são produtoras de antibióticos e aparentemente são responsáveis pela inibição do crescimento deste parasita (CURRIE *et al.*, 1999; KOST *et al.*, 2007), pois produzem compostos que inibem o *Escovopsis* (REYNOLDS e CURRIE, 2004).

O fungo simbiote produz estruturas especializadas para a alimentação das larvas, denominadas de gongilídeos. Essas estruturas estão espalhadas por todo o jardim de fungo e, quando observadas sob microscópio, revelam as extremidades das hifas infladas, de forma arredondada e ocorrem em agrupamentos chamados de estáfilas (FIGURA 1.5, p. 18). Elas constituem o principal alimento das larvas, que apesar de estarem em contato constante com o fungo, não são capazes de se alimentar sozinhas, sendo desta forma totalmente dependentes das operárias.

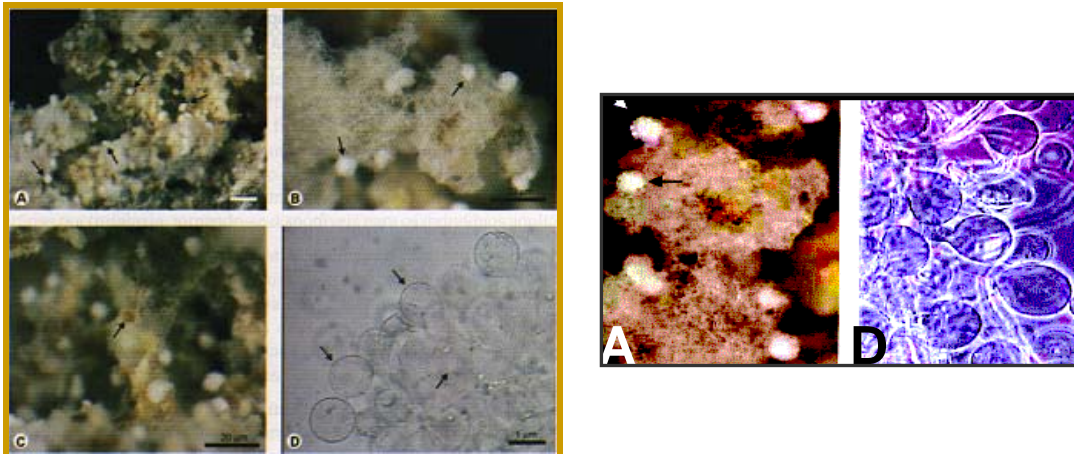


FIGURA 1.5: Fotomicrografias de luz do jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa*. A) região rica em estáfilas (setas). B) detalhe da região de estáfilas (setas). C) detalhe do exsudato das hifas (seta). D) detalhe da estáfila revelando os gongilídeos (seta) (Fonte: SCHNEIDER, 2003).

Quando a operária vai alimentar uma larva, ela pode fazê-lo de duas formas: coleta uma estáfila ou um tufo de hifas e coloca diretamente entre as peças bucais das larvas, ou coleta a estáfila e a manipula com as mandíbulas, lábios e pernas anteriores, sempre tocando com as antenas até que se obtenha uma consistência umedecida, e só então deposita entre as peças bucais da larva. Durante a manipulação, que é bastante freqüente, a operária pode ingerir o líquido extravasado e pequenas porções do fungo simbionte (SCHNEIDER, 2003).

SCHNEIDER *et al.* (2000) relatam que as formigas cortadeiras podem obter alimento de secreções oferecidas pelas larvas, mais especificamente da secreção de um líquido na região anal (FIGURA 1.6, p. 18), além da seiva e de outros componentes vegetais, das estáfilas e de substâncias resultantes da digestão extracelular promovida pelo fungo simbionte.

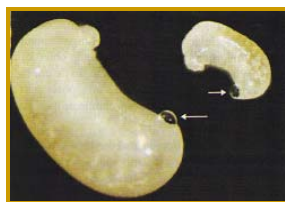


FIGURA 1.6: Fotomicrografia de larvas de *Atta sexdens rubropilosa* no último ínstar larval (maior) e no ínstar intermediário (menor) no momento de eliminação da secreção anal (setas), que é coletada pelas operárias (Fonte: SCHNEIDER, 2003).

A utilização pelas operárias do líquido anal das larvas, trofalaxia proctodeal, é um fato relativamente comum entre as formigas (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990), mas foi observado pela primeira vez para as formigas cortadeiras por SCHNEIDER *et al.* (2000). Estes autores relataram que, em dado momento, as operárias tocam a região anal das larvas, que podem ser de vários tamanhos, e ingerem imediatamente uma pequena gota transparente que as larvas liberam. Análises químicas deste líquido revelaram que ele é um alimento rico em nutrientes essenciais para as formigas, sendo composto por 5 – 8 mg/mL de proteína e 10,98 mg/mL de glicose (SCHNEIDER, 2003).

A análise do conteúdo de glicose 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 (SCHEIDER, 2003). Este fato revela que as larvas desempenham um papel fundamental no fluxo de nutrientes da colônia, uma vez que os indivíduos adultos são incapazes de se alimentar das partes sólidas do fungo, desta forma as larvas o fazem, digerindo suas paredes e transferindo os nutrientes para a hemolinfa (BUENO *et al.*, 2008).

De acordo com estes resultados sugere-se que as formigas adultas se alimentem preferencialmente dos carboidratos originados pela hidrólise extracelular de polissacarídeos vegetais, catalisados por polissacaridases produzidas pelo fungo simbiote (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

As formigas cortadeiras desenvolveram um processo complexo para a preparação das partes frescas dos vegetais antes da inoculação do fungo simbiote (WILSON, 1980). O processo começa quando as operárias forrageiras coletam e levam fragmentos de folhas para o formigueiro. Tais fragmentos são inspecionados e levados para dentro do ninho. Em seguida, as formigas lambem as superfícies adaxial e abaxial da folha para retirar possíveis microrganismos infectantes e outras impurezas, além de removerem a camada de cera epicuticular da folha (ANDRADE, 1997; DINIZ, 2000). Após a limpeza, as operárias cortam fragmentos em pedaços de 1 a 2 mm, prensam suas bordas, e podem depositar gotas de fluido fecal. Este comportamento é necessário para a

deposição de enzimas que auxiliam na degradação inicial de proteínas e polissacarídeos do substrato (QUINLAN; CHERRETT, 1977; DINIZ, 2000; ANDRADE *et al.*, 2002). Finalmente uma operária deposita o pequeno fragmento de folha previamente preparado no fungo e, posteriormente, inocula um pedaço de fungo sobre esse fragmento (DINIZ, 2000).

A simbiose estabelecida entre as formigas e o fungo, além de permitir a exploração de maior diversidade vegetal (polifagia), ou seja, possibilita que as operárias adquiram alimento de diversas fontes, tornando possível maior sucesso adaptativo, refletido por seus ninhos extremamente complexos e bastante populosos, além de sua grande importância ecológica, uma vez que são considerados herbívoros dominantes em vários ecossistemas (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

1.4.4 – Ingestão de alimento pelas diferentes castas

Análises detalhadas da região anterior do estomodeo, particularmente das estruturas do filtro infrabucal e do aparato que realiza a separação de substâncias lipídicas das não-lipídicas, associadas às observações comportamentais das diferentes castas no interior da colônia, permitem novas interpretações de como se dá a alimentação dos indivíduos (BUENO *et al.*, 2008).

As diferentes castas funcionais adultas de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa* utilizam fontes alimentares diversas, dentro das próprias atividades que estão desempenhando, num dado momento específico nas diferentes áreas do saueiro. As operárias que realizam atividades externas ao ninho, o forrageio, durante o corte e recorte das folhas, podem ingerir diretamente a seiva (QUINLAN e CHERRETT, 1979) e também lipídios a partir de várias outras estruturas da planta, entre elas os corpos de alimentação e os elaiossomos das sementes (BUENO *et al.*, 2008).

Quando os fragmentos vegetais cortados chegam ao ninho, inicia-se um complexo processo de preparação do substrato vegetal para incorporação no

jardim de fungo, com o objetivo de otimizar seu uso pelo fungo simbiote. Durante o processamento inicial, as operárias podem ingerir a seiva no ato de recortar e prensar as bordas do fragmento vegetal. Neste momento as operárias lambem com grande frequência as bordas do fragmento vegetal, de onde extravasa a seiva. Outro comportamento é raspar a superfície da folha, quando elas removem a camada de cera epicuticular para propiciar ao fungo maior facilidade em decompor o substrato. Elas ingerem, e armazenam na cavidade infrabucal, pequenos fragmentos de folha juntamente com a cera que potencialmente podem servir de alimento (DINIZ, 2000; ANDRADE *et al.*, 2002).

A rainha de *Atta sexdens rubropilosa* é dependente das operárias para todas as suas necessidades, como limpeza, proteção, postura e alimentação. Neste caso, as operárias fornecem alimento para a rainha da mesma forma que para as larvas, ou seja, coletam as estáfilas, manipulam e depositam diretamente na boca. Sendo assim, pode-se dizer que as rainhas são especializadas na alimentação pelo fungo simbiote, visto que não participam de outras atividades com possibilidade de adquirir alimento.

1.4.5 – Formigas cortadeiras como pragas

Interações entre formigas e plantas são extraordinariamente diversas. A maioria das espécies de formigas descritas é benéfica ao meio ambiente (FIGURA 1.7, p. 22). Quando em ambientes ecologicamente equilibrados, dispersam sementes, contribuindo para o reflorestamento de muitos ecossistemas; promovem a germinação de sementes, pois removem a polpa dos frutos; fazem a poda de algumas plantas, promovendo seu crescimento vegetativo; exercem importante papel na aeração do solo; incorporam matéria orgânica à terra, tornando-a fértil, rica em carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes; e, são predadoras de diversos artrópodes, muitos deles pragas agrícolas, além de serem predadoras de outras espécies de formigas (LINEWEAVER e BURK, 1934).



FIGURA 1.7: Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO *et al.*, 2006).

Entretanto, algumas formigas estão em posição destacada como pragas severas de culturas, pastagens naturais ou cultivadas agrícolas e aos programas de reflorestamento e silvicultura brasileiros, consideradas como o inseto que mais causa danos a agricultura, uma vez que são animais herbívoros dominantes em muitos ecossistemas.

A introdução de monoculturas agrícolas e florestais causa um desequilíbrio ecológico que fornece condições ideais de proliferação e estabelecimento das colônias de formigas cortadeiras (CHERRETT, 1986).

Altos prejuízos causados por essas formigas devem-se ao fato de que elas atacam muitas espécies vegetais, competindo por esses produtos com o homem e seus animais domésticos (AMANTE, 1972), além do efeito indireto em decorrência da contaminação ambiental pelos agrotóxicos utilizados no seu controle (DELLA LUCIA, 1993).

Dentre essas, pode-se citar as formigas cortadeiras pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que engloba também indivíduos dos gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma*, sendo que, os ninhos dos três últimos gêneros citados são pequenos e o dano que causam é insignificante (JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996).

No estado de São Paulo são descritas quatro espécies que causam danos às plantas florestais: saúva-cabeça-de-vidro (*Atta laeviagata*), saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa*), saúva-mata-pasto (*Atta bishaerica*), saúva-parda (*Atta capiguara*) (FORTI e BOARETTO, 1997). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* destacam-se por utilizar vegetais frescos cortados por elas como substrato para o fungo. Perdas causadas por essas formigas são bem

conhecidas, porém poucos dados quantitativos sobre esses prejuízos estão disponíveis. Muitos dos valores de perdas são calculados empiricamente, de modo que a quantificação dos prejuízos torna-se, na maioria dos casos, inadequada (DELLA LUCIA, 2003).

Grande parte das estimativas é feita em áreas de reflorestamento, principalmente com eucaliptos para celulose, papel e carvão. No Brasil, esses valores mais recentes datam de quase uma década atrás, como os 13% de perda de volume de madeira de *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae) em razão de uma desfolha total (OLIVEIRA, 1996). Foram relatadas, em 1998, perdas de 3,6 toneladas do vegetal por ano, o equivalente a perda de 450 Kg de açúcar/ano ou 300 litros de álcool/ano por um único formigueiro adulto (DOW AGROSCIENCES, 1998). Em pastagens brasileiras, esses danos sequer foram quantificados (DELLA LUCIA, 2008).

De acordo com CHERRETT (1986), estas formigas causam danos a diversas culturas como café, cana-de-açúcar, laranja, dentre outras, sendo que os principais alvos econômicos são as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*. As formigas cortadeiras são responsáveis por 75% do custo e do tempo total gasto utilizado no controle de pragas nos reflorestamentos (VILELA, 1986).

Estudos constataram que são necessárias folhas de 86 árvores de *Eucalyptus* ou de *Pinus* para abastecer com substrato, um saueiro durante um ano, num total de 1 tonelada de massa vegetal. Para todas as culturas, apesar de não haver dados conclusivos sobre as perdas, pode-se dizer que quando as plantas são novas, os prejuízos podem chegar a 100% (FORTI e BOARETTO, 1997).

Outros estudos realizados com *Atta cephalotes* mostram que a avaliação da espécie vegetal pelas formigas cortadeiras é feita pela combinação de fatores físicos (espinhos, pêlos, rizomas e folhas rígidas), fatores nutricionais (disponibilidade e qualidade de nutrientes) e fatores químicos (HOWARD e WIEMER, 1986).

Além dos prejuízos na área agrícola, tais formigas podem causar danos a prédios, pontes, estradas de rodagem e de ferro, pois as galerias e painéis dos

formigueiros são susceptíveis ao peso dessas construções. Assim, são inegáveis as perdas ocasionadas por estas formigas (MARICONI, 1970).

1.4.6 – Métodos de controle de formigas cortadeiras

Em razão de sua importância econômica, as saúvas têm sido alvo de várias tentativas de controle, que incluem desde receitas caseiras, que passam de geração para geração, até recursos de alta tecnologia, que não apresentaram resultados muito significativos (DELLA LUCIA, 1993; JAFFÉ e VILELA, 1987). Atualmente estas formigas podem ser controladas com barreiras mecânicas, métodos culturais, biológicos e químicos, estimando-se um consumo nacional de aproximadamente 12.000 toneladas/ano de iscas tóxicas, método de controle mais utilizado (BOARETTO e FORTI, 1997).

As maiores dificuldades no controle desses insetos são devido à facilidade de formação e estabilização de novas colônias e pela complexidade de um formigueiro adulto (WEBER, 1972). Os saúveiros de aproximadamente 6 anos podem abranger uma área de 100 m² e consumir por volta de 1 a 8 toneladas de folhas por ano (AUTUORI, 1947; JAFFÉ e VILELA, 1987).

O controle mecânico (FIGURA 1.8, p. 25) de formigas-cortadeiras consiste na destruição dos ninhos da área, através da escavação do formigueiro, que é efetuada até que a rainha seja localizada e morta. É uma alternativa razoável de controle quando realizado em pequenas áreas sempre que os ninhos estiverem superficiais, dado o esforço demandado (DELLA LUCIA e VILELA, 1993). Na prática, o controle mecânico torna-se inviável em áreas de plantios comerciais, em reflorestamentos e sistemas de pastagens, ou seja, é de viabilidade restrita a pequenas áreas e ninhos com até 4 meses de idade (BOARETTO e FORTI, 1997).



FIGURA 1.8: Formigueiro com aproximadamente 3 a 4 meses, rainha a 1,5 m de profundidade.

O controle cultural consiste na aração e gradagem da área, dentro do prazo de 4 meses do início do formigueiro. Esse método pode ser importante na eliminação de formigueiros pequenos, o que ocorrerá se a lâmina do arado matar a rainha (DELLA LUCIA e VILELA, 1993). Esse controle basicamente deixou de existir para formigueiros adultos, pois em *Atta*, o efeito pode ser até prejudicial, uma vez que a mecanização do solo pode descaracterizar parcialmente o formigueiro, cessando temporariamente a sua atividade, dando a falsa impressão de que foi controlado e dificultando a sua localização (BOARETTO e FORTI, 1997).

O controle biológico clássico consiste no emprego de predadores, parasitóides e microrganismos (fungos, bactérias e vírus), que utilizam formiga cortadeira como hospedeiro. As aves silvestres e domésticas, principalmente espécies insetívoras e onívoras, são importantes elementos dentre os inimigos naturais. Dentre os artrópodos, destacam-se como predadores de formigas cortadeiras as aranhas, ácaros, várias espécies de formigas predadoras e coleópteros. Destes, merecem atenção especial as espécies *Canthon virens* e *Canthon dives*, por se tratarem de predadores específicos de rainhas de saúvas. A espécie *C. virens* ataca as rainhas logo após a revoada, antes de terem iniciado o canal da penetração (BOARETTO e FORTI, 1997).

A dificuldade neste tipo de controle deve-se à vigilância social, base do controle higiênico do ninho das formigas-cortadeiras e detecção de microrganismos através das antenas das mesmas (KERMARRECA *et al.*, 1993).

Desta forma, o emprego de controle biológico pela introdução de inimigos naturais ainda não pode ser considerado uma estratégia de controle para as formigas cortadeiras, contudo deve ser sempre lembrado como técnica de manejo integrado de pragas (DELLA LUCIA e VILELA, 1993).

Apesar de suas várias restrições, o controle químico é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas cortadeiras, sendo assim é o método mais utilizado. Este controle pode ser efetuado por meio de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós secos e iscas granuladas (JUSTI JUNIOR *et al.*, 1996).

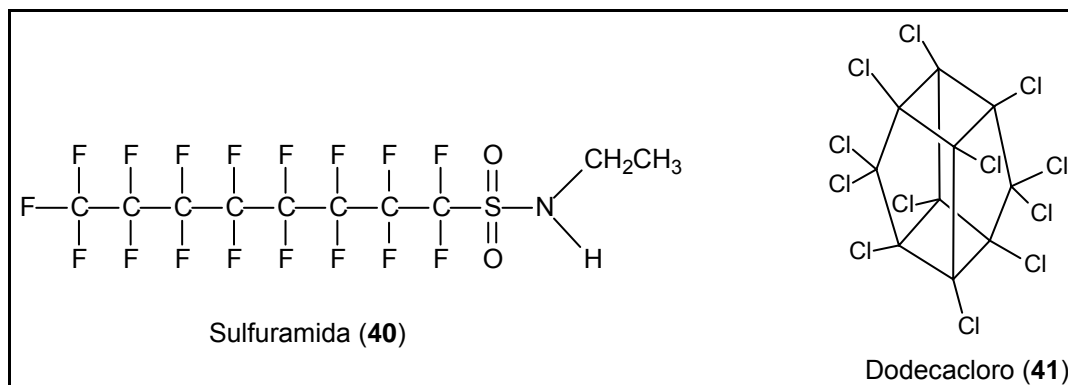
Os formicidas em pó são formulados em veículos sólidos, para serem aplicados com equipamentos manuais denominados polvilhadeiras (FIGURA 1.9, p. 26). A morte das formigas ocorre pelo contato direto com o produto, que é aplicado nos olheiros visando atingir o interior do formigueiro. Esse tipo de utilização tem como limitação a impossibilidade de penetração do produto em todas as câmaras de ninhos adultos de *Atta*, devido a sua complexidade estrutural e aderência do produto ao solo devido à umidade (FORTI e BOARETTO, 1997).



FIGURA 1.9: Polvilhadeira (Fonte: www.naturalrural.com.br)

As empresas de reflorestamento têm empregado o controle químico de formigas cortadeiras de forma sistemática, através de iscas, termonebulização e fumigantes, sendo o aspecto econômico das operações de grande importância, em virtude dos altos custos envolvidos. Além do maior custo das iscas à base de sulfloramida (40, p. 27), em relação àqueles à base de dodecacloro (41, p. 27), a adoção do cultivo mínimo e a proibição de queimadas, têm determinado aumentos na quantidade de iscas necessárias para um controle satisfatório. Os aspectos econômicos e ambientais têm levado as empresas a melhorar o

rendimento operacional das técnicas de controle químico empregadas (iscas, termonebulização), bem como a possibilitar a experimentação de novas tecnologias e de novos princípios ativos tóxicos (FORTI e BOARETTO, 1997).



A aplicação dos líquidos termonebulizáveis consiste na introdução de um inseticida líquido veiculado em óleo mineral ou diesel sob ação do calor, aplicado nos olheiros por aparelhos próprios, os termonebulizadores (FIGURA 1.10, p. 27), que produzem fumaça tóxica (BOARETTO e FORTI, 1997). Esse método destaca-se como eficiente no controle de grandes ninhos em áreas extensas. No entanto, ele também traz desvantagens operacionais e econômicas, como o custo para aquisição, a manutenção e o transporte do equipamento, a formulação especial do inseticida, a demanda de tempo no tratamento de cada formigueiro e o risco de intoxicação dos operadores (LARANJEIRO e LOUZADA, 2000).



FIGURA 1.10: a) termonebulizador; b) cano aplicador no olheiro escolhido (fechar o espaço em volta com terra); c) fumaça saindo pelos outros olheiros (tampar com terra).

O emprego de iscas tóxicas granuladas, principalmente através de porta-iscas (PI) e microporta-iscas (MIPIs), é considerado eficiente, prático e

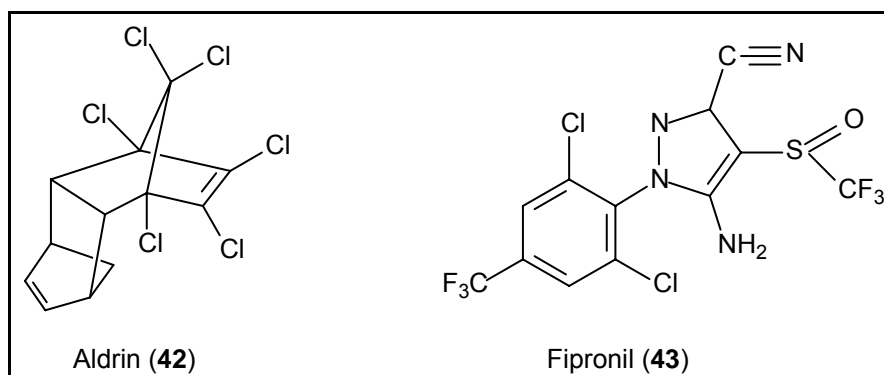
econômico. Oferecem maior segurança ao operador, dispensam mão-de-obra e equipamentos especializados e permitem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK e NAKANO, 1984).

As iscas tóxicas são constituídas da mistura de um substrato atrativo com um princípio ativo tóxico na forma de grânulos, os quais são distribuídas nas trilhas próximas às colônias e transportadas para o interior do formigueiro pelas formigas. O inseticida é geralmente dissolvido em óleo de soja refinado e posteriormente incorporado ao substrato. O substrato atrativo efetivo e amplamente utilizado é a polpa cítrica desidratada, particularmente aquela derivada da laranja, embora outros materiais orgânicos já tenham sido utilizados, como por exemplo, milho, folha de eucalipto, farinha de mandioca, farelo de soja, farinha de trigo, bagaço e melaço de cana. A polpa da laranja exerce grande atratividade às formigas que cortam preferencialmente dicotiledôneas. A polpa cítrica parece ser apropriada para utilização como substrato para o desenvolvimento do fungo simbiote, pois possui características levemente ácidas, alto conteúdo de carboidrato, contendo ainda nitrogênio e grande variedade de vitaminas e micro elementos (BOARETTO e FORTI, 1997).

O inseticida formulado em isca tóxica deve agir por ingestão e apresentar algumas características particulares, como a ação tóxica retardada, com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 85% após o décimo quarto dia a partir do oferecimento das iscas; deve ser letal em baixas concentrações e não causar danos ambientais. O inseticida deve ser ainda, inodoro e não repelente (FORTI e BOARETTO, 1997). As primeiras iscas tóxicas continham o aldrim (**42**) como princípio ativo; posteriormente, vários trabalhos indicaram maior eficiência do dodecacloro (**41**) em relação ao aldrim (**42**). Devido aos seus efeitos prejudiciais ao meio ambiente, houve conseqüentemente proibição de inseticidas clorados, dessa forma o dodecacloro (**41**) foi substituído pela sulfluramida (**40**) (p. 29) (BOARETTO e FORTI, 1997).

Dos novos grupos químicos utilizados no controle de formigas cortadeiras destaca-se o inseticida fipronil (**43**), um fenil-pirazol que atua no sistema nervoso

central, especificamente no sistema GABA (ácido gama-aminobutírico), o qual se apresenta ativo principalmente por ingestão (BOARETTO e FORTI, 1997).



O uso contínuo de pesticidas pode causar sérios danos ao meio ambiente. O desequilíbrio ecológico favorece o aparecimento de novas pragas, ou até mesmo o retorno de outras que estavam sob controle devido à supressão de inimigos naturais que são capazes de manter as populações de insetos nocivos abaixo do nível de dano (LARA e BATISTA, 1992).

Os inseticidas utilizados para o controle desses insetos muitas vezes não produzem bons resultados. Devido a alguns fatores, dentre eles: emprego de formicidas não eficazes; emprego de formicidas em dosagens erradas; distribuição parcial do formicida etc. Mesmo quando empregados de maneira correta, os inseticidas utilizados no controle de formigas cortadeiras e outras pragas podem causar vários problemas: a) sua toxidez (devido ao seu largo espectro de ação) não se restringe apenas aos insetos nocivos, mas também atinge outros insetos inócuos ou benéficos, causando um desequilíbrio ecológico no ecossistema da natureza; b) devido ao fato desses inseticidas serem utilizados em grande escala e associado às suas altas persistências no meio ambiente, eles incorporam-se na cadeia alimentar do homem, apresentando efeito cumulativo no organismo humano com efeito prejudicial à saúde; c) um grande número de insetos apresenta resistência a esses inseticidas (LARA e BATISTA, 1992).

Embora os pesticidas causem os danos mencionados anteriormente, a não utilização dos mesmos pode significar a perda da plantação. Atualmente,

pesquisadores e técnicos encontram-se empenhados em desenvolver estratégias mais eficazes e de menor risco ambiental em proteção contra as formigas cortadeiras nas áreas agrícolas e nos reflorestamentos. Mais importante, no entanto, é constatar que os próprios usuários desse combate às cortadeiras têm demonstrado uma preocupação constante e crescente com o ambiente (DELLA LUCIA, 2008).

Por este motivo, partindo de informações gerais de agricultores sobre a utilização de plantas no controle de formigas cortadeiras, observações de campo e dados da literatura, o Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos associado ao Centro de Estudo de Insetos Sociais da UNESP – Rio Claro vêm estudando os efeitos de plantas potencialmente tóxicas para *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote.

1.4.7 – Dificuldades no controle das formigas cortadeiras

Quando se considera o desenvolvimento de novas moléculas ou de qualquer outro método de controle de saúvas e quenquéns, o pesquisador se depara com diversos obstáculos, destacando-se:

- ❖ o fato de serem insetos eussociais lhes confere maior eficiência no seu desempenho, uma vez que o trabalho da colônia é feito em conjunto (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990);
- ❖ sua associação com o fungo mutualista, a qual permite explorar maior diversidade de espécies vegetais, inclusive algumas plantas que possuem metabólitos secundários tóxicos para outros insetos (MARTIN e WEBER, 1969);
- ❖ a ocorrência de um sistema de defesa bem elaborado, como as secreções da glândula metapleurálica, que possuem efeito antibiótico e que realizam a assepsia da colônia (POULSEN *et al.*, 2003);
- ❖ secreções salivares que minimizam a ação de compostos tóxicos presentes nas plantas, e o líquido fecal, que contém enzimas que são depositadas no substrato antes de ser incorporado ao fungo (DELLA LUCIA *et al.*, 2001);

- ❖ sistema de comunicação envolvendo feromônios de alarme, trilha e reconhecimento individual, impõe dificuldades no rompimento da estrutura colonial (DELLA LUCIA *et al.*, 2001);
- ❖ a capacidade de aprendizagem e a seleção de plantas por esses insetos praga estão diretamente associados ao processo de atratividade e carregamento das iscas granuladas que contêm o princípio ativo tóxico (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; RIDLEY *et al.*, 1996; HUBBEL e WIEMER, 1983).

Os itens citados acima podem representar dificuldades adicionais no desenvolvimento de produtos e técnicas de combate, além disso, o sistema de nidificação subterrâneo impõe obstáculos em veicular formicidas (MOREIRA e FORTI, 1999).

1.5 – Aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J. E. Smith, 1797)

Spodoptera frugiperda, conhecida como lagarta-do-cartucho, foi reconhecida em 1797 pela primeira vez, classificada inicialmente como *Phalaena frugiperda*, passando por várias denominações até receber o nome de *Spodoptera frugiperda*. Possui ampla distribuição geográfica, se distribui em todo o continente americano ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia. A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, ocorre praticamente o ano todo, principalmente em gramíneas (ZUCCHI, 1993).

Este inseto possui ciclo de vida holometábolo (FIGURA 1.11, p. 32) no qual se distinguem quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos são mariposas, medem cerca de 35 mm de envergadura e possuem coloração pardo-escura nas asas anteriores e branco acinzentada nas posteriores.

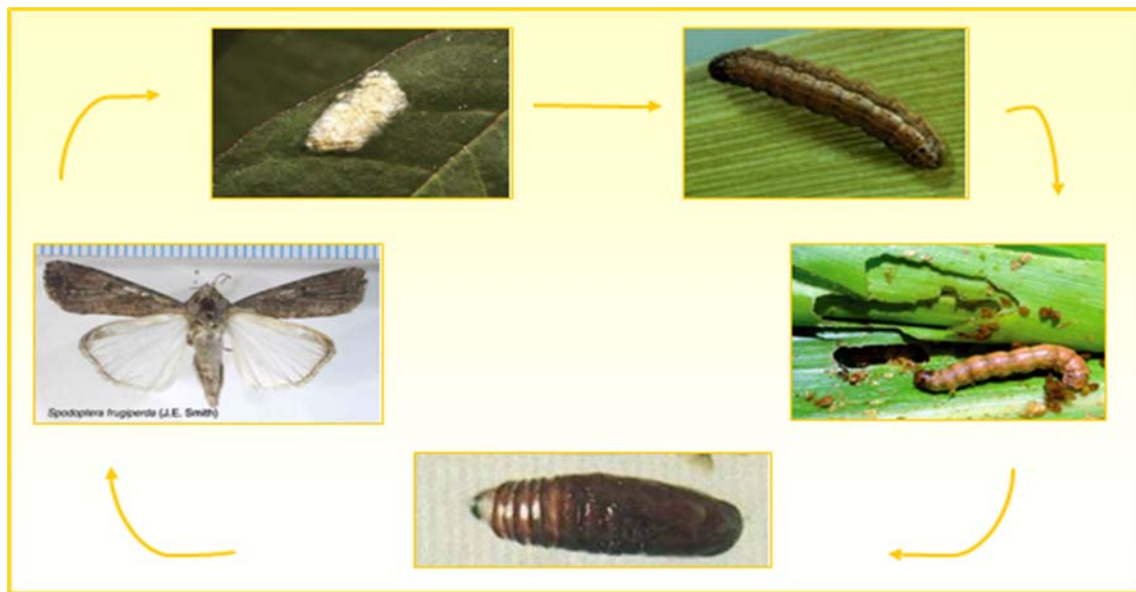


FIGURA 1.11: Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (Fonte: PEREIRA, 2006).

Apresentam longevidade de aproximadamente 10 dias a temperatura entre 25 e 29 °C, umidade relativa de 70% e fotofase de 12 horas (PATEL, 1981). Possuem hábitos noturnos, só voam à noite para suas atividades de acasalamento e oviposição. Durante o dia permanecem no interior do cartucho do milho ou em outras plantas próximas dessa cultura, não são vistas voando nas lavouras de milho. As mariposas fêmeas colocam os ovos em massa, num total médio de 150, nas superfícies superior e inferior das folhas, porém com incidência maior na superior (SOUZA e SOUZA, 2002). Uma fêmea pode depositar até 1000 ovos.

Após três dias, nascem as lagartinhas de primeiro ínstar, de coloração inicial verde e cabeça escura, são mastigadoras, alimentam-se dos tecidos verdes das folhas, raspando a superfície superior e deixam o sintoma característico de “folha raspada”, sendo esta uma evidência da presença da praga na lavoura. Com o seu desenvolvimento, à medida que raspam as folhas ao se alimentarem, vão aumentando de tamanho e sofrendo mudas de pele ou ecdises; passando por seis ínstars. No terceiro ínstar, ocasião em que estão maiores, a lagarta migra para o cartucho da planta, na qual continua a se alimentar (SOUZA e SOUZA, 2002).

A partir daí e até o sexto ínstar, atacam e comem todas as folhas centrais, sendo facilmente percebidas pelos excrementos ainda frescos encontrados na planta, na região do cartucho (FIGURA 1.12a, p. 33). As folhas são danificadas dentro do cartucho e, quando se abrem, apresentam áreas comidas simetricamente nos dois lados da nervura central (FIGURA 1.12b, p. 33). O maior volume consumido pelas lagartas, correspondente a 80% de todas as suas alimentações e ocorrem no sexto ínstar, onde elas já estão desenvolvidas e com grande capacidade para comer (SOUZA e SOUZA, 2002).



FIGURA 1.12: Danos na cultura do milho: a) lagarta de *S. frugiperda* já desenvolvida, retirada do interior do cartucho do milho; b) Folhas danificadas por lagartas-do-cartucho (Fonte: SOUZA e SOUZA, 2002).

O período larval varia de 12 a 30 dias (COSTA *et al.*, 1984; VALICENTE e CRUZ 1991), dependendo das condições climáticas (principalmente temperatura), fonte de alimentação, etc. Nos últimos ínstares, as lagartas medem aproximadamente 5 cm e apresentam coloração que varia do marrom, verde até quase preta. Quando completamente desenvolvida, ao atingirem cerca de 40 mm, completa-se a fase larval e a lagarta sai do cartucho e penetra no solo a pouca profundidade, onde se transforma em pupa, cor avermelhada, com aproximadamente 15 mm de comprimento. Nesta ocasião, término da fase larval, elas medem aproximadamente 50 mm de comprimento, possuem coloração avermelhada ou amarronzada, cabeça escura, com estrias claras que formam um “Y” invertido. Quando maiores apresentam coloração geral que varia do cinza-esverdeado ao quase preto, com listras longitudinais claras e escuras (SOUZA e SOUZA, 2002). A fase pupal tem em média duração de 7 a 27 dias,

em decorrência, principalmente das condições climáticas (VALICENTE e CRUZ 1991).

O estágio da planta de milho mais sensível ao ataque é o de 8-10 folhas. Para o controle, o ideal é realizar medidas quando 17% das folhas estiverem com o sintoma de folhas raspadas (CRUZ *et al.*, 2002). A planta de milho, mesmo atacada pelas lagartas no interior do cartucho, continua a emitir folhas novas normalmente (SOUZA e SOUZA, 2002).

Devido ao canibalismo, é comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho. No entanto, pode-se encontrar lagartas em instares diferentes num mesmo cartucho, separadas por lâminas das folhas. No Brasil, ocorrem cinco gerações anuais. Em uma mesma lavoura, pode-se encontrar lagartas nos mais diferentes instares, em diferentes fases do inseto, em gerações sobrepostas (SOUZA e SOUZA, 2002).

O período de desenvolvimento de *S. frugiperda* depende de vários fatores, sendo os referentes ao ambiente, especialmente a temperatura. Desta forma, têm sido observadas variações de 12 a 30 dias para a fase larval (com 5 a 7 instares) e de 7 a 27 dias para a fase pupal, além de grandes variações também na viabilidade das fases de ovo, lagarta, assim como no peso pupal. Além das condições ambientais, o substrato alimentar também pode afetar o desenvolvimento e sobrevivência larval de *S. frugiperda*, principalmente quando o inseto é criado em genótipos resistentes ao inseto (PEREIRA, 2006).

1.5.1 – Prejuízos causados pela lagarta-do-cartucho do milho

A lagarta-do-cartucho ocorre durante todo o ano, nos plantios de verão e no milho safrinha. Na entressafra, pode ser constatada sua presença pelo ataque que ocorrem em plantas de milho, em soqueiras de lavoura. É uma praga polífaga que além do milho ataca também sorgo, soja, trigo, algodão, alfafa, amendoim, arroz, capins, aveia, batata doce, cana-de-açúcar e hortaliças. Os adultos migram de uma lavoura a outra e até para outras regiões pelo próprio vôo e pelo vento (CRUZ *et al.*, 1983, GALLO *et al.*, 1988, VIANA *et al.*, 2001).

No Brasil, a partir da década de 20 foi relatada presença dessa praga em vários estados, causando severos danos em algumas culturas. Segundo CRUZ (1995), as perdas causadas pela lagarta-do-cartucho no Brasil atingem cerca de U\$ 40 milhões por ano.

A lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda* (J. E. Smith) é uma das principais pragas da cultura do milho (Figura 1.13, p. 35), na qual seu dano pode levar a redução de até 34% no rendimento de grãos, dependendo principalmente, do estágio de cultura em que ocorre o ataque (VALICENTE e CRUZ, 1991).

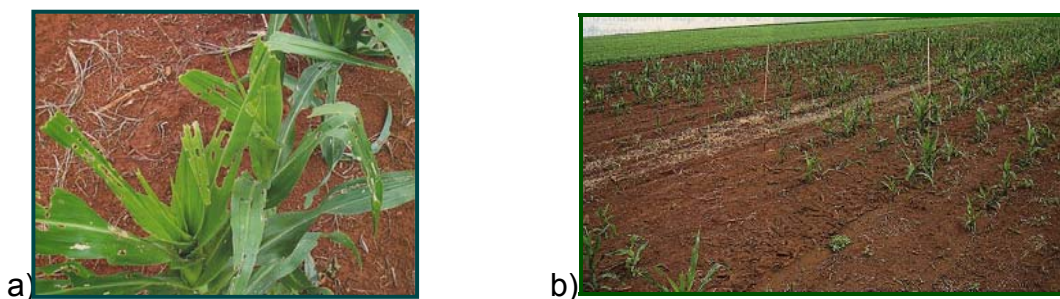


FIGURA 1.13: a) Danos da lagarta-do-cartucho do milho desde a planta jovem: folhas raspadas ou furadas; b) Falhas nas linhas de plantio mostram os prejuízos provocados pela lagarta no campo (Fonte: DBO, 2008).

O milho é uma das culturas mais importantes do Brasil em área plantada, com 13,9 milhões de hectares na safra de 2007/2008, com aproximadamente 90% da sua produção destinada ao mercado interno. A produtividade média brasileira na safra de 2006/2007 foi de 54.239 mil toneladas, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O gasto anual com inseticidas químicos na cultura do milho está estimado entre U\$ 500,00 milhões e U\$ 600 milhões (DBO, 2008).

GALLO *et al.* (1988) constataram que os danos são maiores quando o ataque ocorre em plantas mais novas, com oito a dez folhas, e isto se dá, aproximadamente, aos 40 dias da germinação, causando cerca de 18,7% de redução na produção de grãos. Por outro lado, um dano foliar severo não significa, necessariamente, que vai haver redução, pois depende do estágio de crescimento em que a planta é atacada. Há casos ainda que a lagarta ataca o

cartucho do milho chegando a destruí-lo completamente, e nesse caso, chama a atenção a quantidade de excreções existentes na planta.

As lagartinhas novas apenas raspam as folhas, mas depois de desenvolvidas, já no interior do cartucho, conseguem fazer furos, podendo destruí-las completamente. VALICENTE (1988) concluiu que uma lagarta de *S. frugiperda* pode consumir durante toda a sua fase larval cerca de 130 cm² de folha de milho. MELO e PIRES DA SILVA (1986) verificaram que os maiores danos são causados por lagartas do sexto ínstar, conferindo um consumo foliar neste estágio de 80% do consumo total.

1.5.2 – Métodos de controle da lagarta-do-cartucho do milho

Vários são os métodos de controle para este inseto praga, sendo que o principal método é através da utilização de agrotóxicos (FIGURA 1.14a, p. 36), empregados quando a desfolhação é notada nas plantações. No entanto, seu uso indiscriminado e incorreto tem aumentado o número de aplicações e diminuído sua eficiência, principalmente devido ao surgimento de populações de insetos resistentes e devido a redução de predadores (FIGURA 1.14b, p. 36) e insetos parasitóides, que comprometem o controle natural (CRUZ, 1995). Além disso, tal uso indiscriminado agrava o problema de contaminação dos produtos agrícolas, agricultores e do ambiente.

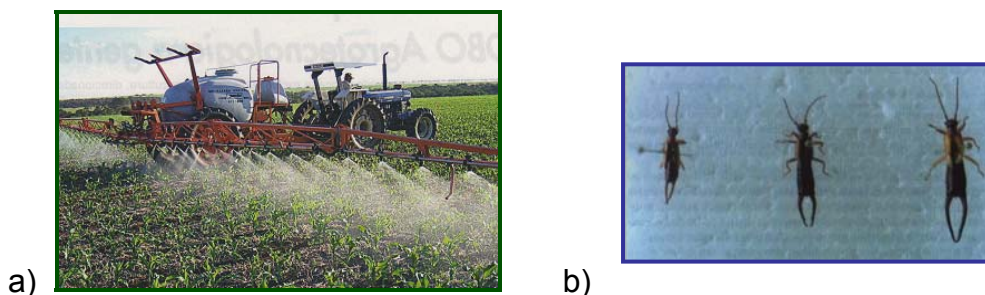


FIGURA 1.14: a) Aplicação tratorizada de inseticidas; b) Adultos de tesourinha (*Doru luteipes*), predadora de ovos e lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Nota: as tesourinhas medem de 17 a 20mm de comprimento incluindo os cercos (Fonte: a) DBO, 2008; b) SOUZA e SOUZA, 2002).

O controle da lagarta-do-cartucho também pode ser feito utilizando inseticidas microbianos. Os patógenos *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Baculovirus* são alternativas para o controle deste inseto (DBO, 2008):

❖ O Bt é uma bactéria Gram positiva que forma esporos e produz cristal protéico durante o processo de esporulação. Ocorrem naturalmente no solo, em insetos mortos, água e resíduos de grãos. Este cristal protéico, responsável por 20-30% da proteína total da célula, contém delta endotoxinas que possuem propriedades inseticidas. Este patógeno é ativo contra várias espécies de insetos e é considerado seguro em relação a mamíferos. Além disso, é específico em relação a insetos-praga alvos das culturas. Estima-se que exista mais de 70.000 cepas de Bt em todo o mundo. Este patógeno vem sendo usado como bioinseticida há décadas. Hoje há mais de 200 genes específicos conhecidos que produzem a endotoxina, embora vários destes genes sejam relatados como não eficientes no controle de *S. frugiperda*. A caracterização molecular das cepas mais eficientes contra a lagarta-do-cartucho mostrou que a maioria dos isolados apresentam os genes cry1Ab e cry1E e algumas dos genes cry1B, cry1, cry1Fb e apenas uma cepa (1644) o cry1C. Outra linha de pesquisa muito importante é a produção de biopesticida a base de *B. thuringiensis* usando produtos alternativos ou mesmo descarte da indústria. O Bt necessita de carbono, nitrogênio e sais minerais para seu crescimento. Bioensaios já foram realizados utilizando glucose de milho, arroz, farinha de soja, melão de cana, etc. como fontes de carbono e nitrogênio com excelentes resultados (DBO, 2008).

❖ O baculovírus é o grupo mais comum e mais estudado dentro de vírus patogênicos a insetos. Isto se deve ao fato de serem os vírus com maior potencial de serem usados como agentes de controle biológico de pragas. A família Baculoviridae é composta de vírus com uma simples fita dupla circular de DNA que infectam um grande número de artrópodes. Os baculovirus, denominados *Baculovirus spodoptera*, são muito eficientes em controlar a lagarta-do-cartucho em campo, mas dois fatores são limitantes na produção deste biopesticida em escala comercial. Dentre os problemas que afetam a

produção do *B. spodoptera*, a liquefação dos insetos mortos é o principal fator limitante, pois os insetos devem ser coletados e congelados para serem formulados. Isto aumenta a mão de obra, custo de produção e um grande espaço em laboratório com freezer. Este é o principal enclave da produção do *B. spodoptera* em larga escala (DBO, 2008).

Vale ressaltar que para um manejo adequado de insetos-praga na cultura do milho, é necessário um bom conhecimento de vários fatores que podem influenciar no desenvolvimento de uma praga, dentre eles o clima, época de plantio, fase da planta, identificação da espécie que está causando dano, amostragem correta em diferentes pontos, uma vez que a distribuição espacial da praga raramente é homogênea, os aspectos relacionados com monitoramento e a interação: praga x planta x ambiente (DBO, 2008).

1.6 – Produtos naturais no controle de insetos pragas

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.

Sabendo-se que as plantas podem produzir substâncias que as defendam de microrganismos, as mesmas podem ser consideradas como fontes alternativas de potenciais agentes antibacterianos e antifúngicos (LIMA, 1996).

Inseticidas são substâncias químicas utilizadas para controlar insetos e existem ainda substâncias utilizadas para atrair e repelir os mesmos. 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 (MARICONI, 1981; FERNANDES & VIEIRA, 1999).

Recentemente, novas pesquisas para obtenção de inseticidas naturais ocorreram por duas razões: o uso dos inseticidas organoclorados e fosforados de forma indiscriminada levaram a capacidade de adaptação dos insetos a este controle sistemático aleatório conseqüentemente, o processo de seleção natural produziu insetos mais resistentes e novos inseticidas foram necessários. A

segunda foi o alerta de Carson (1962) em seu livro Primavera Silenciosa (“Silent Spring”), quando se começou refletir um pouco mais sobre a relação inseto-planta, na qual o homem tornou-se mais respeitador do mecanismo natural de adaptação dos seres vivos. Desta forma tem-se um controle de pragas mais objetivo, uma vez que a introdução de novos agentes cada vez mais tóxicos não garantiria o controle de insetos além de causar aumento da poluição ambiental. Após as décadas de 50 e 60, ocorreu uma mudança radical nos métodos de combate a pragas, e a aplicação de grandes quantidades de compostos químicos perigosos esta sendo evitada. Os inseticidas sintéticos e principalmente os modos de aplicação começaram a ser desenvolvidos de forma a possuir: *seletividade* e *biodegradabilidade*, para atacar apenas o inseto-alvo, para não destruir simultaneamente seus inimigos naturais e de forma a contribuir para que o ambiente não acumule as substâncias tóxicas por longos períodos (FERNANDES *et al.*, 2008).

Novas substâncias naturais são excelentes opções para o efetivo controle de pragas, já que podem oferecer maior segurança, seletividade, biodegradabilidade mais rápida que os sintéticos, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixos impactos ambientais, não deixando resíduos nos alimentos ou no meio ambiente (VIEGAS, 2003). O uso de inseticida cuja síntese não foi baseada em produtos naturais é altamente inespecífico, além de causar efeitos tóxicos indesejáveis para as espécies não-alvo (FERNANDES *et al.*, 2007).

As principais plantas que originaram as substâncias puras com atividade inseticida no controle de formigas e insetos em geral pertencem aos gêneros: *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae), produtoras de rotenóides (RANGEL, 1946; FUKAMI e NAKAJIMA, 1961; BOYCE, 1974; ROY *et al.*, 1987); *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas (LAFORGE *et al.*, 1952; ELLIOT *et al.*, 1970; BOYCE 1974; CROMBIE, 1984, 1990; RAY, 1991; HENRICK, 1994); *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina e nornicotina (SHMELTZ, 1971; MARICONI, 1981); *Azadirachta* (Meliaceae) produtora de azadiractina, limonóides, terpenóides e *Quassia* (Simaroubaceae)

de quassinóides e terpenóides (BUTTERWORTH e MORGAN, 1968; CROSBY, 1971; ZANNO *et al.*, 1975; CONNOLLY, 1983; KRAUS *et al.*, 1985; HOWARD *et al.*, 1988; REMBOLD, 1989; LEE *et al.*, 1991; CHAMPAGNE *et al.*, 1992; ADDOR, 1994); furanocumarinas e cromenos (BEREMBAUM, 1978; BOHLMANN *et al.*, 1981; KLOCKE *et al.*, 1989; ISMAN, 1989; PROKSCH e RODRIGUEZ, 1983; ADDOR, 1994); são tipicamente encontradas em plantas das famílias Rutaceae e Apiaceae.

Dos compostos naturais citados acima, os mais utilizados como inseticida atualmente são as piretrinas obtidas de *Chrysanthemum* (Asteraceae). Elas deram origem aos compostos sintéticos baseados nas mesmas com menor custo de obtenção e com baixo impacto ao meio ambiente (FERNANDES *et al.*, 2007). Azadiractina, um limonóide obtido de *Azadirachta indica* como citado acima, foi o composto com maior impacto obtido recentemente. O uso deste composto puro ou do óleo que o contém (óleo de nim) vem sendo aplicado comercialmente (REMBOLD, 1989 *appud* FERNANDES *et al.*, 2007).

As buscas de extratos, frações contendo mistura de compostos e compostos puros com ações que possam controlar formigueiros, podem ser realizadas de 3 formas: aleatoriamente, onde se extraí e ensaia quaisquer extratos de plantas; ensaiando extratos de plantas indicadas pela população e finalmente ensaiando plantas usando a quimiosistemática das mesmas. Neste último caso, o conhecimento dos metabólitos característicos de cada planta já foi determinado (SILVA *et al.*, 1988) e constitui a forma mais rápida e racional para busca de compostos ativos e vem sendo utilizada nos trabalhos desenvolvidos pelos grupos da UFSCar e UNESP (FERNANDES *et al.*, 2007).

1.6.1 – Atividades inseticidas de produtos naturais sobre as formigas cortadeiras, fungicida sobre o fungo simbiote das mesmas e inibitórias da enzima pectinase.

Diante da nova tendência de controle específico inseto-alvo, tem-se avaliado o efeito tóxico de diversas plantas sobre formigas e/ou seu fungo simbiote (HOWARD *et al.*, 1988; BUENO *et al.*, 1990; PAGNOCCA *et al.*, 1990;

PAGNOCCA *et al.*, 1996), uma vez que o fungo simbiote é um importante mediador da nutrição das formigas pela hidrólise de polissacarídeos de plantas do qual, portanto dependem para sobreviver (SIQUEIRA *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2003).

Para uma ação mais imediata, o uso combinado de fungicida e inseticida deve levar a eliminação de formigueiros, mas se o objetivo for apenas o controle durante períodos em que as formigas têm grande influência na produção de certos vegetais, o uso de compostos fungicidas pode constituir uma forma de controle (FERNANDES *et al.*, 2007).

Neste contexto, com o objetivo de identificar substâncias que podem ser ativas contra as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote tem sido realizada investigação intensa relativa à química de plantas utilizadas popularmente como inseticida ou em famílias de plantas com atividade já relatada na literatura (PAGNOCCA *et al.*, 1990; ACÁCIO-BIGGI *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998; BOARETTO *et al.*, 1999a; BOARETTO *et al.*, 1999b; HEBLING *et al.*, 1999; KITAMURA *et al.*, 1999; MARSARO *et al.*, 1999; MORINI *et al.*, 1999; PETACCI *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 1999; TAKAHASHI-DEL BIANCO *et al.*, 1999; VICTOR *et al.*, 1999; VICTOR, *et al.*, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2002; FERNADES *et al.*, 2002; GODOY *et al.*, 2002; ACÁCIO-BIGI *et al.*, 2004; BUENO *et al.*, 2004a, BUENO *et al.*, 2004b; MARSARO *et al.*, 2004; BIAVATI *et al.*, 2005; BUENO *et al.*, 2005; CINTRA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005a, LEITE *et al.*, 2005b; MORINI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2005; GODOY *et al.*, 2005).

Segundo BUENO *et al.* (1995, 2004) os ninhos de laboratório tratados exclusivamente com folhas de *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) foram muito afetados. Nesta planta os compostos mais tóxicos encontram-se no extrato metanólico. A lignana sesamina, obtida de *Virola sebifera* (Miristicaceae) e ácidos graxos isolados de folhas de sesame, inibiram o crescimento do fungo simbiote em meio de cultura (PAGNOCCA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 1998). HEBLING *et al.* (1996) observaram que ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* alimentados diariamente com folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) mostraram gradual decréscimo no volume do jardim de fungo e

aumento da velocidade de morte de formigas, com extinção total dos ninhos após seis semanas de tratamento. Segundo MONTEIRO *et al.* (1998) e HEBLING *et al.* (2000a,b) reportaram que *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) e *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) causaram efeitos deletérios para os ninhos e para formigas operárias.

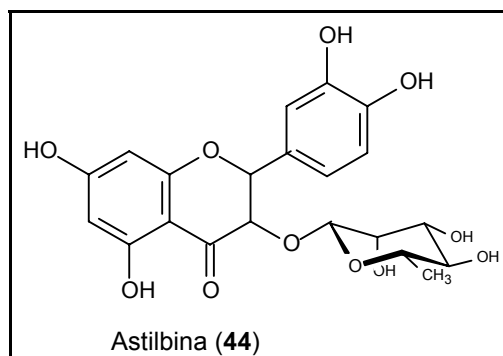
Através dos estudos realizados por LEITE (2000), verificou-se que substâncias como os ácidos graxos saturados com cadeia entre C6 – C12, as lignanas sesamina e sesamolina quando testadas sobre o fungo simbiote das formigas cortadeiras inibiram em 100% o crescimento do fungo, nas concentrações de 100 µg/mL, 70 µg/mL e 433 µg/mL, respectivamente. Em dados mais recentes, LEITE 2005a, verificou que o limonóide fotogedunina, na concentração de 25 µg/mL, inibe em 100% o crescimento do fungo simbiote, sendo que este mesmo limonóide apresenta ação inseticida sobre a formiga [sobrevivência mediana (MD) no 9º. dia de experimento, sendo que o controle teve sobrevida total de 24 dias]. Dentre as substâncias testadas pelo grupo de produtos naturais da UFSCar, o alcalóide ricinina, foi bastante ativo sobre as formigas cortadeiras e por ser bastante abundante tem boa probabilidade de uso no controle das mesmas (KITAMURA *et al.*, 1999; ACÁCIO-BIGI *et al.*, 2004).

Atualmente, está sendo desenvolvida uma nova abordagem em relação aos métodos de controle que deverá ser útil e específico para formigas cortadeiras de folhas. Esses estudos mostraram que algumas destas espécies contêm inibidores da atividade de pectinase que estão presentes no fluido fecal das larvas de formigas. Esta enzima parece ser essencial para a nutrição das formigas e do fungo em materiais vegetais (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003). Extratos de algumas espécies de plantas das famílias Anacardiaceae, Burseraceae, Fabaceae, Meliaceae, Rutaceae e Simaroubaceae agiram como inibidores de pectinases (ZAVAN, 2005; LEITE, 2005a). Os resultados mostrados por ZAVAN (2005) e LEITE (2005a) indicam que os extratos brutos de *Cedrella fissilis* (Meliaceae) *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) e *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) contêm componentes que inibem as pectinases encontradas. A atividade inibitória foi encontrada principalmente no extrato

metanólico das plantas, ou seja, as substâncias inibidoras são polares, e podem então serem solúveis em água e desta forma aplicadas no ninho em solução aquosa. Se este modo de aplicação for viável, será uma vantagem em relação aos produtos comerciais utilizados no controle de formigas cortadeiras que usam solventes orgânicos como diluentes, os quais são perigosos para as pessoas que trabalham na sua aplicação no campo.

1.6.2 – Atividades inseticidas de produtos naturais sobre a lagarta-do-cartucho do milho

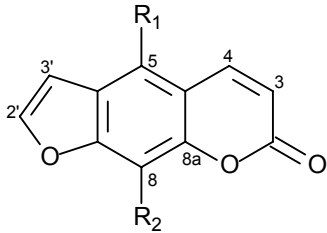
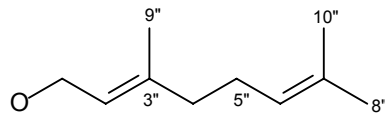
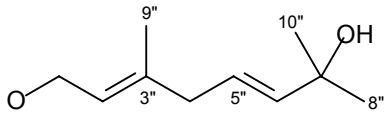
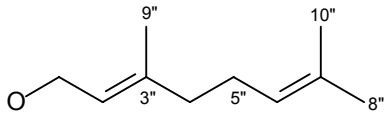
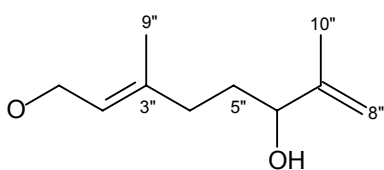
Considerando a busca de inseticidas a partir de plantas da ordem Rutales sobre *S. frugiperda*, BATISTA-PEREIRA (2002) avaliou a atividade do flavonóide astilbina (44, p. 43), isolado de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae). ROCHA (2005) realizou o estudo fitoquímico de *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *T. pallida* e *T. rubra* (Meliaceae) visando à busca de compostos que alterem a biologia do inseto. Trabalhos semelhantes foram realizados com *Trichilia catigua* (PEREIRA, 2001), *Siphoneugena densiflora* (Mirtaceae) e *Vitex polygama* (Verbenaceae) (GALLO *et al.*, 2006); *Trichilia catigua*, *T. clausenii* e *T. elegans* (MATOS *et al.*, 2006); *Cedrela fissilis* (Meliaceae) (LEITE *et al.*, 2008); *Trichilia catigua*, *T. clausenii* e *T. elegans* (MATOS *et al.*, 2009a); *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) (MATOS *et al.*, 2009b).



Das frutas secas de *Tetradium danielli* (Rutaceae), coletadas na província de Yunnan na China em setembro de 1917, foi isolada uma nova furanocumarina linear 5-(6-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,7-dieniloxy)-psoraleno,

juntamente com outras seis estruturas relatadas de furanocumarinas. Dos compostos identificados, quatro apresentaram um potente efeito antialimentar sobre larvas de *Spodoptera littoralis* e *Heliothis virescens*. Foram testados xantotoxina (45), bergapteno (46), isopimpineline (47), 8-geraniloxipsoraleno (48), bergamotina (49), notoptol [5-(7-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,5-dieniloxi)psoraleno] (50), 5-(6-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,7-dieniloxi)psoraleno (51, FIRURA 1.22, p. 45). Destes os compostos 45-48 (p. 45) apresentaram maior resposta em *S. littoralis* que *H. virescens* quando as larvas foram alimentadas com discos tratados com estas furanocumarinas. (STEVENSON *et al.*, 2003). A composição dos grupos funcionais em C-5 e C-8 modula a atividade das furanocumarinas. Por exemplo, uma comparação da atividade de (47) e (48) mostra que a atividade diminuiu quando o grupamento geraniloxil é anexado aos psoralenos em C-8 (49), em vez de em C-5. De fato a atividade antialimentar de (48) foi perdida quando testada sobre *H. virescens*. O composto (49) apresentou potente atividade contra ambas as espécies, mas a atividade diminuiu quando C-7" e C-6" foram substituídas por um grupo hidroxila como em (50) e (51) respectivamente (STEVENSON *et al.*, 2003). Em trabalho anterior demonstrou-se que os compostos de (45-47) apresentaram atividade antialimentar em *S. littoralis* (CALCAGNO *et al.*, 2002).

Os compostos de 45-51 (p. 45) foram dissolvidos em acetona e aplicados em discos de fibra de vidro em um teste de dupla escolha como descrito anteriormente por SIMMONDS *et al.* (1990) e testados sobre larvas no último instar (sexto instar) de *S. littoralis* Boisd. e *H. virescens* F., os quais tinham sido privados de alimentos durante 2-3 h antes do bioensaio. Os compostos foram testados na faixa de concentração entre 5×10^{-5} e 1×10^{-3} M. O Índice de Alimentação $[(C-T) / (C + T)] \times 100$ foi calculado usando a quantidade de discos consumidos do controle (C) e do tratamento (T) durante as 18 h de bioensaio. O teste WILCOXON foi utilizado para avaliar a significância da quantidade de discos consumidos do controle e do tratamento na concentração de 1×10^{-3} M. A concentração necessária para obter um Índice de Alimentação de 50% (FI₅₀) foi calculado por regressão.

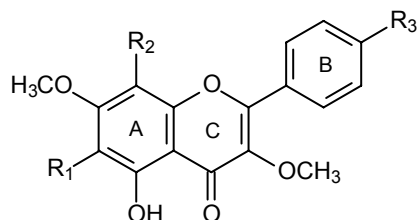
			
	R ₁	R ₂	FI ₅₀ (M)
45	H	OCH ₃	7,4 x 10 ⁻⁴
46	OCH ₃	H	7,1 x 10 ⁻⁵
47	OCH ₃	OCH ₃	6,4 x 10 ⁻⁴
48	H		8,0 x 10 ⁻⁴
49		H	4,4 x 10 ⁻⁴
50		H	> 10 ⁻³
51		H	> 10 ⁻³

De *Gnaphalium affine* D. Don (Compositae) foram isoladas as flavonas polimetiladas 5-hidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona (**52**), 5-hidroxi-3,6,7,8-tetrametoxiflavona (**53**), e 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (**54**). Estes flavonóides e análogos mostraram atividade antialimentar contra *Spodoptera litura* F. (MORIMOTO *et al.*, 2000; MORIMOTO *et al.*, 2003).

O bioensaio realizado neste trabalho foi o de escolha folha-disco. A configuração experimental foi baseada no bioensaio descrito por Escoubas *et al.* (1993). As folhas-disco possuem 2 cm de diâmetro e foram preparadas folhas de batata-doce (*Ipomoea batatas*) cultivadas sem agroquímicos. Dois discos foram tratados com uma quantidade específica de extratos de planta ou compostos a

serem testados solubilizados em acetona, e dois outros discos só com acetona foram usados como controle. Os quatro discos foram fixados em posições alternadas na mesma placa de Petri. Após a remoção completa do solvente, 15 larvas (terceiro ínstar) foram liberadas na placa. As placas de Petri foram mantidas em uma sala de criação de insetos em 26,5 °C no escuro por 2-5 h.

Para a avaliação da atividade antialimentar dos extratos e compostos de teste, utilizou-se o índice antialimentar [(AFI): (AFI% dos discos tratados consumidos) / (% de discos tratados consumidos + % de controle de discos consumidos) x 100]. Os discos de controle foram fixados em um valor AFI de 50. Os dados foram avaliados por análise probit. A linha reta foi montada com os pontos obtidos no bioensaio, e o ED₅₀ foi calculado como a dose correspondente ao ponto médio entre inibição completa e sem efeito pelo programa de computador.

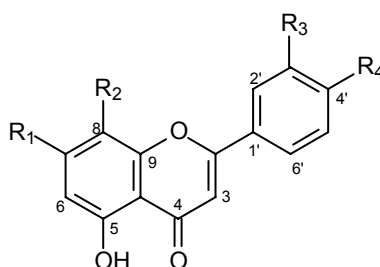


	R ₁	R ₂	R ₃	Atividade antialimentar ED ₅₀ (mol/cm ²)
5-hidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona (52)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	1,1 x 10 ⁻⁷
5-hidroxi-3,6,7,8-tetrametoxiflavona (53)	OCH ₃	OCH ₃	H	2,0 x 10 ⁻⁸
5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (54)	OH	H	H	2,5 x 10 ⁻⁸

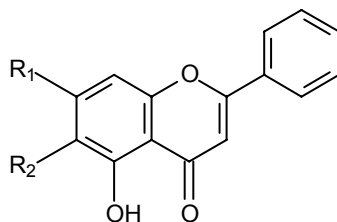
Estes autores (MORIMOTO *et al.*, 2000, MORIMOTO *et al.*, 2003) sugeriram que flavonóides sem substituintes no anel-B apresentavam atividade antialimentar contra *S. litura*. *Sculletaria baicarenensis* (Rutaceae) produz o 2-fenilflavonas, sendo assim foram utilizadas cromonas e flavonóides como

materiais de partida para testar a relação estrutura-atividade (SAR) antialimentar em insetos dos flavonóides e derivados metilados e foi observado que aqueles flavonóides deficientes de substituintes na posição 6 do anel A não possuíam ação antialimentar.

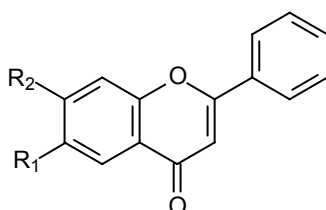
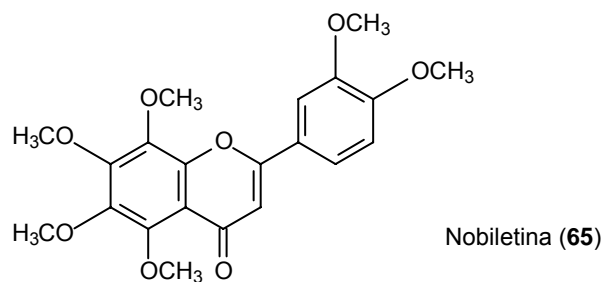
Os derivados substituídos na posição 6 mostraram forte atividade antialimentar contra *S. litura*. Além disso, os flavonóides testados com um grupo hidroxila como substituinte em qualquer das posições tendem a aumentar a atividade antialimentar. Portanto, os resultados obtidos sugeriram a importância da substituição na posição-6 do flavonóide e que substituintes hidrofílicos diminuem a atividade (MORIMOTO *et al.*, 2003). As estruturas dos compostos testados são apresentadas adiante **55-77** (p. 48-49).



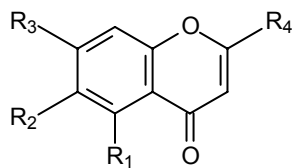
Flavonas não substituídas na posição-6	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Atividade antialimentar ED ₅₀ (μmol/cm ²)
Crisina (55)	OH	H	H	H	2,50
Apigenina (56)	OH	H	H	H	inativo
Luteolina (57)	OH	H	OH	OH	inativo
Wogonina (58)	OH	OCH ₃	H	H	2,00
Isowogonina (59)	OCH ₃	OH	H	H	inativo
Norwogonina (60)	OH	OH	H	H	1,52
Moslosooflavona (61)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	1,30



Flavonas substituídas na posição-6	R ₁	R ₂	Atividade antialimentar ED ₅₀ (μmol/cm ²)
Baicareina (62)	OH	OH	0,96
Oloxilina A (63)	OCH ₃	OCH ₃	inativo
Mosloflavona (64)	OCH ₃	OH	inativo



Flavonas monosubstituídas	R ₁	R ₂	Atividade antialimentar ED ₅₀ (μmol/cm ²)
Flavona (66)	H	H	0,11
6-metilflavona (67)	OCH ₃	H	0,035
6-hidroxi-flavona (68)	OH	H	inativo
6-metoxiflavona (69)	OCH ₃	H	0,15
7-hidroxi-flavona (70)	H	OH	inativo
7-metoxiflavona (71)	H	OCH ₃	0,059



Cromonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Atividade antialimentar
					ED ₅₀ (μmol/cm ²)
Cromona (72)	OH	H	H	H	0,168
2,7-Dimetilcromona (73)	OH	H	H	H	0,102
2-metil-5,7-dimetoxicromona (74)	OH	H	OH	OH	inativo
2-metil-5,6,7-trimetoxicromona (75)	OH	OCH ₃	H	H	0,41
2-metil-7-metoxicromona (76)	OCH ₃	OH	H	H	inativo
7-metoxicromona (77)	OH	OH	H	H	0,096

2 – OBJETIVOS

2 – OBJETIVO

O objetivo desta dissertação foi o estudo fitoquímico de *Rauia* sp (Rutaceae), biomonitorado por ensaios em formigas *Atta sexdens rubropilosa* (saúva-limão) e sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* visando o isolamento e a caracterização dos compostos bioativos.

3 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e Métodos

Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna (CC):

- ❖ Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da ACROS ORGANICS
- ❖ Sílica gel 60 (230-400 Mesh) da ACROS ORGANICS
- ❖ Sephadex LH 20 da Amersham Pharmacia Biotech AB
- ❖ Florisil (200 Mesh) da ALDRICH

Foram utilizadas colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem aplicadas.

Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- ❖ Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos.
- ❖ Solventes grau HPLC da JTB.
- ❖ Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL - CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para obtenção de espectros de RMN.

Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA):

Utilizada para monitoração dos fracionamentos efetuados:

- ❖ Cromatoplaça de sílica gel 60 HF₂₅₄ em alumínio da MERCK.

Cromatografia em camada delgada preparativa rotativa (CCDPR)

Equipamento de CCDPR: Cromatroton modelo 8924 – Harison Research, utilizando bomba modelo RHSY – Fluid Metering inc, placas de vidro de 26 cm de diâmetro com espessura de filme de 1,5 mm, preparadas no próprio laboratório, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck

com revelador ou sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck com revelador e florissil na proporção 1:1.

Reveladores:

- ❖ Radiação na região do UV (254 e 360 nm)
- ❖ Reagente de Dragendorff
- ❖ Vanilina em ácido sulfúrico

3.2 – Equipamentos

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:

As técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, COSY, HMBC, HSQC, NOESY foram realizadas via os seguintes aparelhos:

- ❖ BRUKER DRX 400 (9,4 Tesla)
- ❖ BRUKER ARX 200 (4,7 Tesla)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- ❖ Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10Avp (preparativo), equipado com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (loop) de 200, 500 e 2000 µL, bombas Shimadzu LC-6AD e detector: UV-VIS, Shimadzu SPD-10vvp.
- ❖ Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10Avp (analítico), equipado com: degaseificador de membrana Shimadzu DGU-14A, duas bombas Shimadzu LC-10ADvp e detectores de Foto-diodo Shimadzu SPD-M10Avp.

Cromatografia Líquida de Média Pressão:

- ❖ GE ÄKTA – Armerstam Biosciences, equipado com: válvula de injeção inv-907, alça de amostragem (loop) de 500 µL, bombas P-900 (P-901/903) e detector de UV-900.

CG-EM:

- ❖ GC – 17A Shimadzu, CG-EM – QP 5000 Shimadzu
- ❖ Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) filme = 0,25 µm
- ❖ Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V)

Todas as análises via CG-EM foram realizadas utilizando:

- ❖ Temperatura do injetor: 250 °C
- ❖ Temperatura do detector: 280 °C
- ❖ Modo: split; Volume de injeção: 1µL

Programações de temperaturas utilizadas nas análises:

- ❖ Mistura de Esteróides: 150 °C (3 min); 6 °C/min até 280 °C; 280 °C (20 min).
- ❖ Cumarinas: 100 °C (3 min.); 10 °C/min. até 280 °C; 280 °C (10 min.).

Sistema de CL-EM

- ❖ MICROMASS QUATTRO LC
- ❖ Modo de ionização: Eletrospray (ESI) (modo negativo)

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas (LEM) – DQ/UFSCar.

Balança analítica

- ❖ SARTORIUS modelo BP210S

Liofilizador

- ❖ Liofilizador modelo E.C. Modulyo-Pump Savant VLP 80

Evaporadores Rotativos

❖ BÜCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

❖ BÜCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

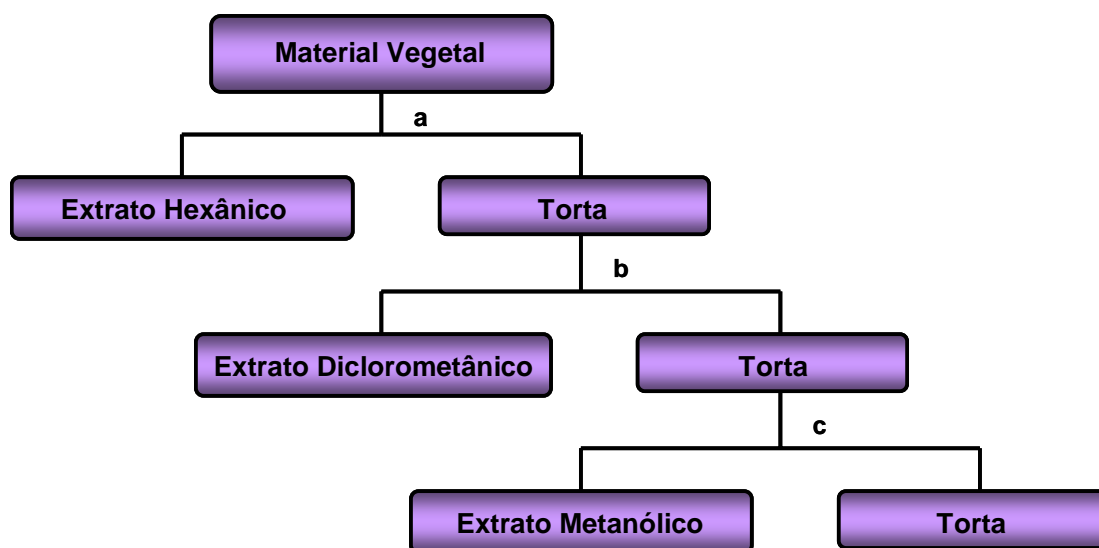
3.3 – MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *Rauia* sp foi coletada no município Aureliano Leal, Bahia, 01/02/1993 (coleta da Dra Jacquelyn Kallunki e Dr Jose Rubens Pirani n.415).

A Dra Jacquelyn Kallunki está realizando a revisão taxonômica do gênero *Rauia* na qual descreverá espécies ainda inéditas que inclui a espécie em estudo. Em análise prévia a Dra Jacquelyn Kallunki informou que a espécie em estudo neste trabalho parece ser uma subespécie de *Rauia resinosa*.

3.4 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *Rauia* sp

Os extratos brutos foram preparados anteriormente pela técnica Dorai Periotto Zandonai do laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As partes vegetais, caule e folhas, da espécie de *Rauia* sp foram secadas em estufa de circulação a 40 °C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada uma delas utilizando-se os solventes n-hexano (EH), diclorometano (ED), metanol (EM), nesta ordem de polaridade (FLUXOGRAMA 3.1, p. 60).



FLUXOGRAMA 3.1: Preparação dos Extratos de folhas e caule de *Rauia* sp.

- a) Maceração com Hexano por cinco dias por três vezes
- b) Maceração com Diclorometano por cinco dias por três vezes
- c) Maceração com Metanol por cinco dias por três vezes

Os extratos foram concentrados em rotaevaporadores. As partes vegetais utilizadas no preparo dos extratos assim como as quantidades de extrato obtidas para cada uma delas estão descritos na TABELA 3.1 (p. 61).

TABELA 3.1 - Massas de Material Vegetal e Quantidade de Extratos Obtidos

Material Vegetal	Massa Vegetal (g)	Código	Massa dos Extratos (g)
Folhas	1.324,00	RFH	7,02
		RFD	16,26
		RFM	24,92
Caule	4.986,00	RCH	5,61
		RCD	14,22
		RCM	242,79

R = *Rauia* sp; F = Folha; C = Caule; H = Hexano; D = Diclorometano; M = Metanol

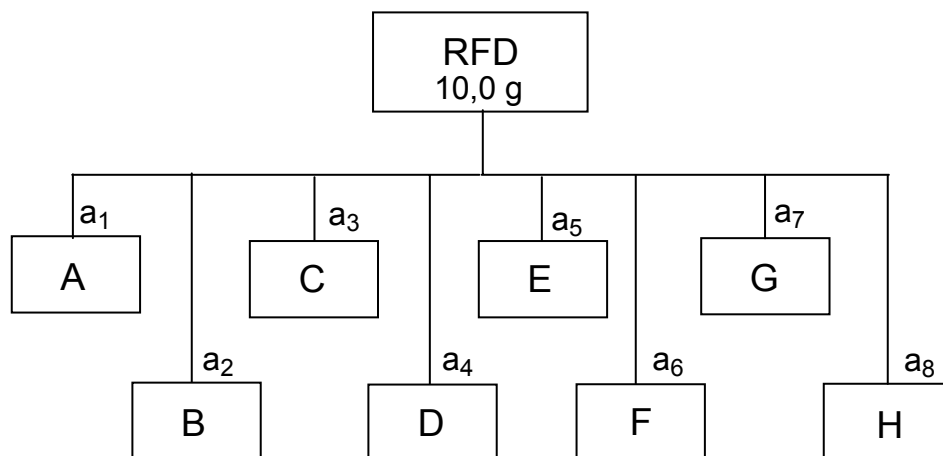
3.5 – FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS

3.5.1 – Estudo do extrato diclorometânico (RFD)

O extrato bruto diclorometânico das folhas de *Rauia* sp (RFD) foi fracionado utilizando-se sílica gel 70-230 Mesh como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.2 (p. 62) obtendo-se 8 frações.

As frações obtidas foram enviadas para ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) em ensaio por ingestão e por toxicidade aguda. Esses ensaios foram realizados para realizar os fracionamentos posteriores de forma biomonitorada.

Realizou-se novamente a mesma metodologia utilizada no fracionamento de RFD a fim de obter a massa necessária das frações para realização dos ensaios biológicos. As massas obtidas após reunião das subfrações de RFD1 e RFD2 são apresentadas na TABELA 3.2 (p. 62).



FLUXOGRAMA 3.2: Fracionamento de RFD

a) Cromatografia à vácuo em funil de placa sinterizada: sílica gel (70-230 Mesh), coluna de vidro ($\phi = 6,0$ cm, $h = 20$ cm), coleta realizada a cada 2,5 L de eluente. Sistema gradiente de eluição (% em v:v):

a¹) Hexano 100%

a⁵) Acetato de Etila:Acetona 5:5

a²) Hexano:Acetato de Etila 7,5:2,5

a⁶) Acetona 100%

a³) Hexano: Acetato de Etila 5:5

a⁷) Acetona:Metanol 5:5

a⁴) Acetato de Etila 100%

a⁸) Metanol 100%

TABELA 3.2: Frações obtidas após reunião das subfrações de RFD1 e RFD2

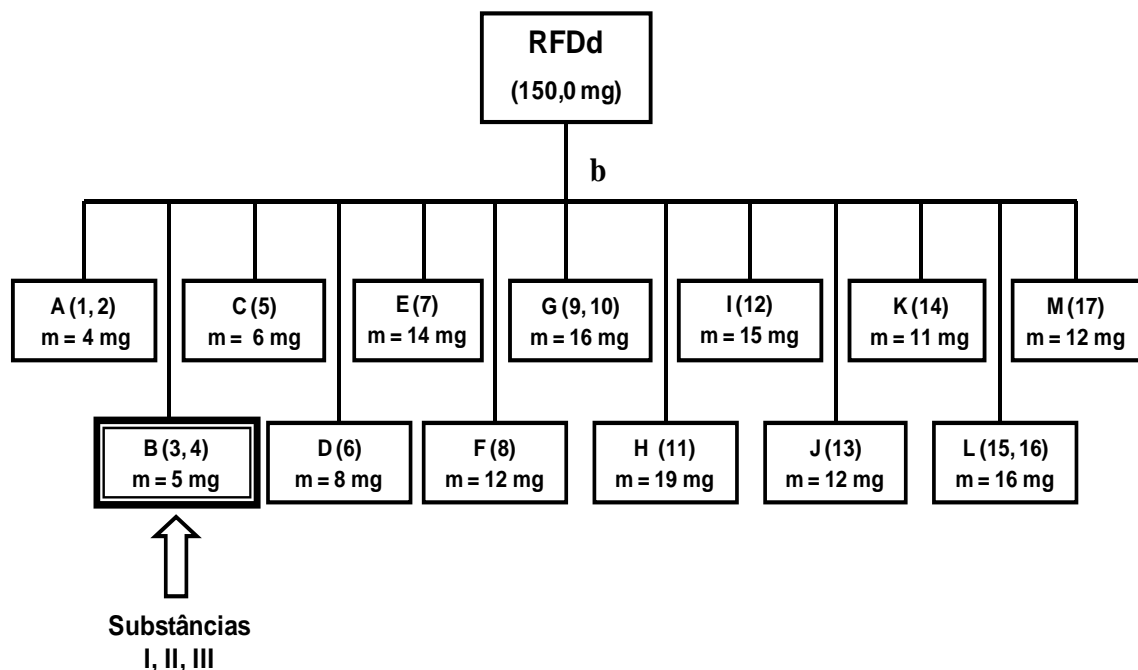
Fração	Reunião de:	Massa (g)
RFDa	A ₁ , A ₂	0,228
RFDb	B ₁ , B ₂	0,706
RFDc	C ₁ , C ₂	0,173
RFDd	D ₁ , D ₂	2,272
RFDe	E ₁ , E ₂	2,588
RFDf	F ₁ , F ₂	0,908
RFDg	G ₁ , G ₂	2,732
RFDh	H ₁ , H ₂	0,393

RFD = *Rauia* sp Folha Fração Diclorometânica; a → h = fração da coluna correspondente; Índice 1 = Coluna RFD1; Índice 2 = Coluna RFD2.

3.5.2 – Estudo da fração RFDd

A fração **d** obtida do fracionamento do extrato bruto diclorometânico foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa rotativa (CCDPR) utilizando sílica gel 375 Mesh, PF 254, 1 mm como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.3 (p. 63) obtendo-se 17 frações. As frações obtidas foram reunidas em 13 frações de acordo com as similaridades após análise por CCDC.

As frações foram submetidas à RMN ¹H no equipamento de 200 MHz e a fração B também foi submetida a CG-EM, a qual possibilitou a identificação da mistura dos esteróides (**I, II, III**) e de ácidos graxos presentes nas frações H, I, J. Para identificação dos ácidos presentes nessas subfrações serão realizadas, posteriormente, reações para obtenção dos ésteres metílicos em pequenas alíquotas das amostras para análise via CG-EM.

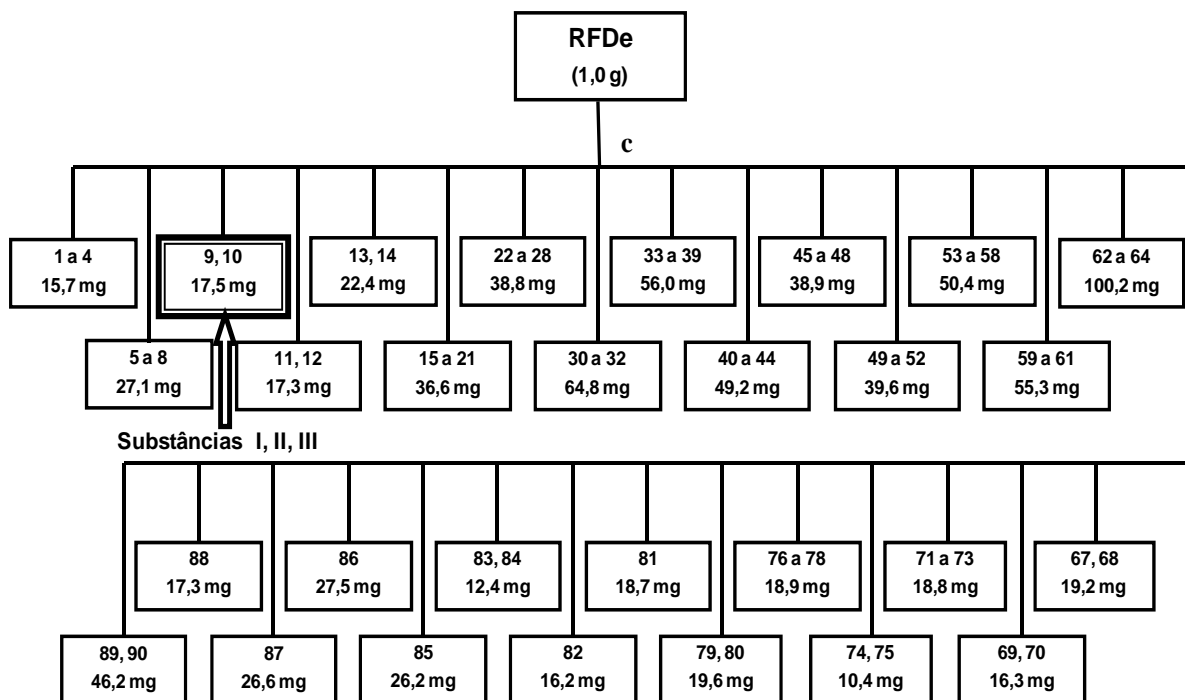


FLUXOGRAMA 3.3: Fracionamento de RFDd

b) cromatografia em camada delgada preparativa rotativa (CCDPR): placa de vidro ($\varphi = 26,0$ cm); fase estacionária: sílica gel (375 Mesh, PF 254 1mm); frações coletadas em frascos de 50 mL, volume utilizado de cada sistema de eluente. Sistema gradiente de eluição (% em v:v): Hexano 100%, Hexano:Acetato de Etila (9,5:5/9:1/8:2/7,5:2,5/7:3/6,5:3,5/ 6:4/5,5:4,5/1:1/4,5:5,5/3:7/2:8/1:9), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila:Metanol (9:1/7:3/1:1/4:6/ 3:7/2:8/1:9), Metanol 100%.

3.5.3 – Estudo da fração RFDe

A fração **e** foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi = 6,0$ cm, $h = 27$ cm) utilizando sílica gel do tipo “flash” (230-400 Mesh) como fase estacionária, a qual se adicionou uma pequena camada de florisil antes de adicionar a amostra e se utilizou gradiente de eluição como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.4 (p. 64).



FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento de RFDe

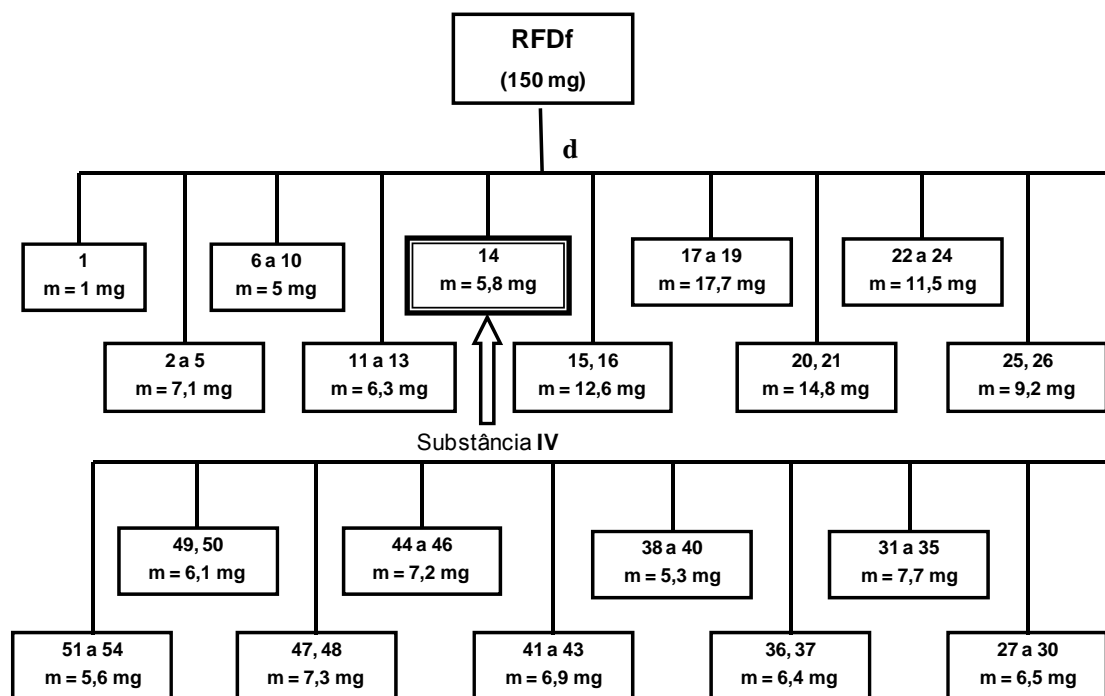
c) Cromatografia por adsorção, sílica gel (230-400 Mesh), coluna de vidro ($\Phi = 6$ cm, $h = 27$ cm) frações coletadas em frascos de 20 mL. Sistema gradiente de eluição (% em v:v), utilizando : Hexano 100%, Hexano:Acetato de Etila (9,5:5/9:1/8:2/7,5:2,5/7:3/6,5:3,5/ 6:4/5,5:4,5/1:1/4,5:5,5/3:7/2:8/1:9), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila:Metanol (9:1/7:3/1:1/4:6/ 3:7/2:8/1:9), Metanol 100%.

Foram obtidas 90 frações que foram reunidas em 29 frações em função da semelhança, após análise por CCDC. Após experimento de RMN ^1H no equipamento de 200 MHz verificou-se a presença de sinais característicos de ácidos graxos nas frações 49-52, 53-58, 81, 83-84, que serão submetidas posteriormente a reações para obtenção dos ésteres metílicos em pequenas alíquotas de amostra para análise via CG-EM para a identificação dos ácidos graxos presentes nas mesmas. A subfração RFDd 3-4 (item 3.5.2, p. 63), na

qual identificou-se a mistura das substâncias I, II e III, foi reunida com a subfração RFDc 9 (item 3.5.3, p. 64) e a subfração RFDc 49-52 (item 3.5.3, p. 64) foi reunida com a subfração RFDd 12 (item 3.5.2, p. 63).

3.5.4 – Estudo da fração RFDf

A fração f foi refractionada através de cromatografia em camada delgada preparativa rotativa (CCDPR) utilizando como fase estacionária sílica gel 375 Mesh, PF 254, 1 mm e como fase móvel gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade (FLUXOGRAMA 3.5, p. 65). Foram obtidas 54 frações que após análise por CCDC foram reunidas em 19 frações de acordo com as similaridades das mesmas.



FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento de RFDf (Rauia Folha Diclorometano - fração f).

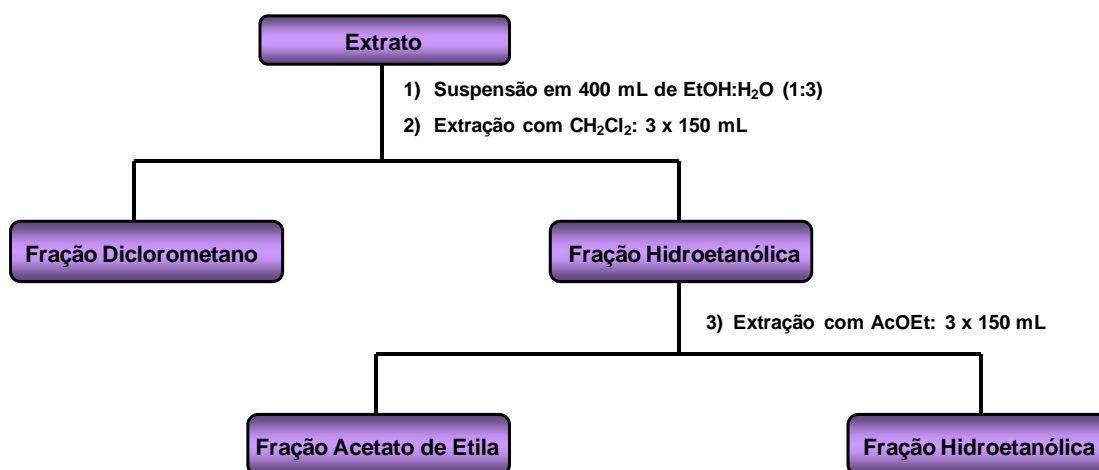
d) Cromatografia circular por adsorção: placa de vidro ($\varphi = 26,0$ cm); fase estacionária: sílica gel (375 Mesh, PF 254 1mm); frações coletadas em frascos de 50 mL, volume utilizado de cada sistema de eluente. Sistema gradiente de eluição: Hexano → Metanol aumentando de 10 em 10%.

Após experimento de RMN ^1H no equipamento de 200 MHz verificou-se a presença de sinais característicos de ácidos graxos nas frações 17-19, 22-24, 25-26, 27-30. Para identificação dos ácidos graxos, estas frações serão

submetidas posteriormente, a reações para obtenção dos ésteres metílicos em pequenas alíquotas de amostra para análise via CG-EM. A fração 25,26 foi reunida com a fração d-13 (RFDd – subfração 13, item ,p). A partir dos dados de RMN 200 MHz e CG-EM identificou-se a presença de um sesquiterpeno (substância IV) na fração 14.

3.5.5 – Estudo do extrato metanólico (RFM)

Parte do extrato bruto metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFM) foi fracionado através de uma partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 3.6, p. 66) originando três partições do extrato. As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na TABELA 3.3 (p. 67).



FLUXOGRAMA 3.6: Metodologia utilizada na partição do extrato

As partições resultantes foram concentradas sob vácuo em evaporador rotativo e a completa secagem do material vegetal foi obtida através do seu armazenamento em vidros sob capela de exaustão de gases, à temperatura ambiente.

As partições obtidas foram submetidas a ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) e ensaio por ingestão e/ou toxicidade aguda sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*).

TABELA 3.3: Frações obtidas do extrato metanólico (RFM)

Parte Vegetal	Massa do Extrato (g)	Código	Massa das Partições (g)
Folha	8,0	RFMD	0,9
		RFMA	1,3
		RFMHi	5,8

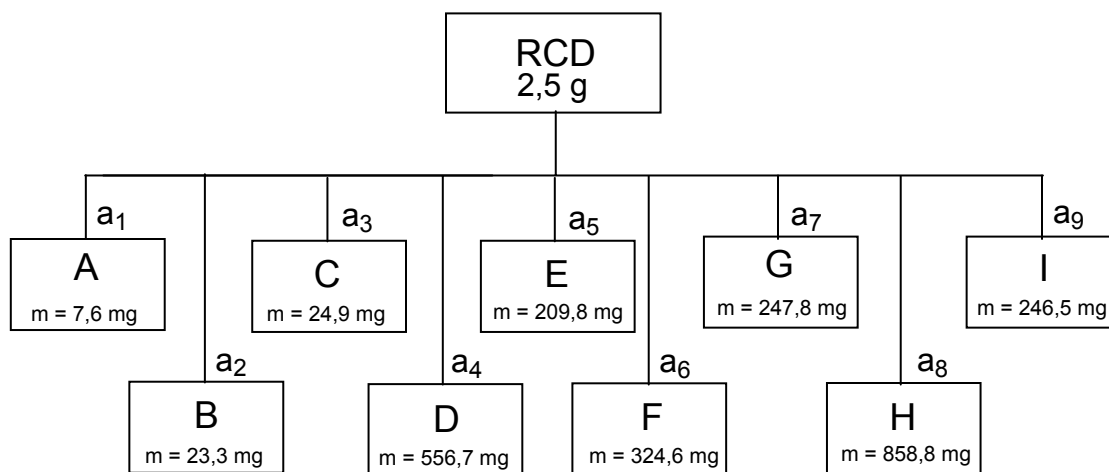
R = *Rauia* sp; F = Folha; M = Metanólico; D = Diclorometano; A = Acetato de Etila; Hi = Hidroetanólica

3.6 – FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE

3.6.1 – Estudo do extrato diclorometânico (RCD)

O extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp (RCD), foi fracionado utilizando-se como fase estacionária sílica gel 70-230 Mesh com eluição gradiente em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 9 frações como mostra resumidamente o FLUXOGRAMA 3.7 (p. 68).

As frações de 4 a 9 foram enviadas para ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) e sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*) em ensaio por toxicidade aguda. Nas frações de 1 a 3 só foi realizado o ensaio por toxicidade aguda devido à pequena massa obtida das mesmas. O ensaio por ingestão sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*) não foi realizado devido à massa necessária (300 mg).



FLUXOGRAMA 3.7: Fracionamento de RCD

a) Cromatografia à vácuo em funil de placa sinterizada: sílica gel (70-230 Mesh), coluna de vidro ($\phi = 6,0$ cm, $h = 14$ cm), coleta realizada a cada 1 L de eluente. Sistema gradiente de eluição (% em v:v):

a¹) Hexano 100%

a⁶) Acetato de Etila:Acetona 5:5

a²) Hexano:Acetato de Etila 7,5:2,5

a⁷) Acetona 100 %

a³) Hexano: Acetato de Etila 5:5

a⁸) Acetona:Metanol 5:5

a⁴) Acetato de Etila 100 %

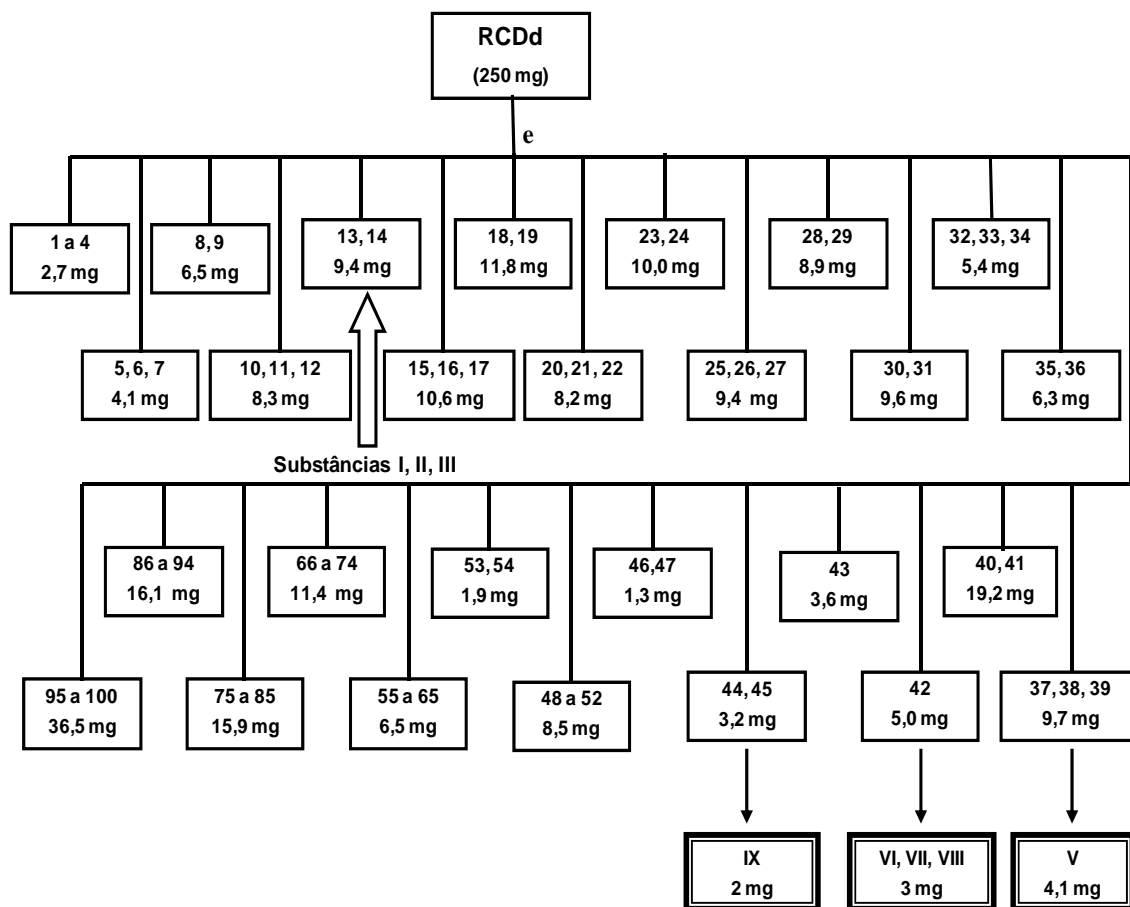
a⁹) Metanol 100 %

a⁵) Acetato de Etila:Acetona 7,5:2,5

3.6.2 – Estudo da fração RCDd

A fração **d** foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi = 4,0$ cm, $h = 20$ cm) utilizando sílica gel do tipo “flash” (230-400 Mesh) como fase estacionária e como fase móvel mistura de solventes com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.8 (p. 69).

Foram obtidas 100 frações as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC, foram reunidas em 32 frações. Através de experimento de RMN ¹H no equipamento de 200 MHz verificou-se a presença de sinais característicos de ácidos graxos nas frações 17-19, 22-24, 25-26, 27-30. Para identificação dos ácidos graxos estas frações serão submetidas posteriormente, a reações para obtenção dos ésteres metílicos em pequenas alíquotas de amostra para análise via CG-EM.



FLUXOGRAMA 3.8: Fracionamento de RCDD

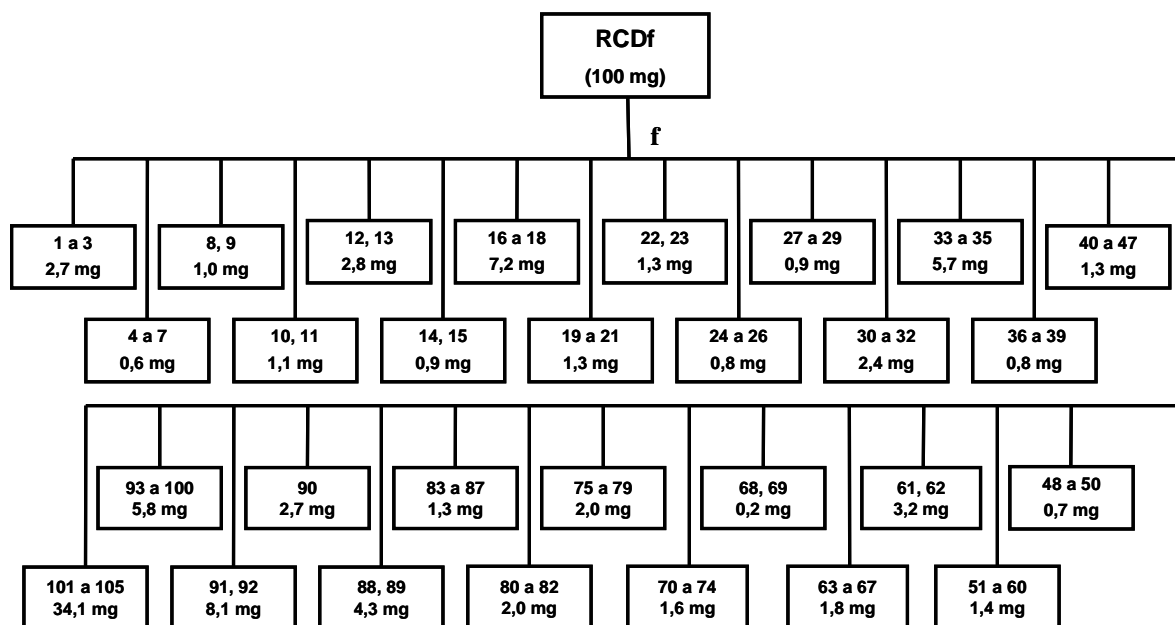
e) Cromatografia por adsorção, sílica gel (230-400 Mesh), coluna de vidro ($\Phi = 4$ cm, $h = 20$ cm) frações coletadas em frascos de 20 mL. Sistema gradiente de eluição (% em v:v), utilizando : Hexano 100%, Hexano:Acetato de Etila (9:1/8:2/7:3/6,5:3,5/6:4/5,5:4,5/1:1/4,5:5,5/4:6/3:7/2:8/1:9), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila:Metanol (9:1/7:3/1:1/3:7/1:9), Metanol 100%.

O estudo dessa fração permitiu a identificação de três cumarinas: substâncias **V** (fração 37-39), **VI** (fração 42), **IX** (fração 44, 45); de um ácido graxo **VII** (fração 42) e de um alcalóide **VIII**, após análise dos dados obtidos no espectro de RMN ^1H (200 MHz) para as frações (37-39) e (44,45). Para a fração (42) realizou-se experimentos de uma e duas dimensões (400 MHz) juntamente com os dados de CG-EM. As substâncias **I**, **II** e **III** (fração 13, 14) foram identificadas anteriormente em outras frações (itens 3.5.2, p. 63 e 3.5.3, p 64).

3.6.3 – Estudo da fração RCDf

A fração **f** foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi = 2,0$ cm, $h = 20$ cm) utilizando sílica gel do tipo “flash” (230-400 Mesh) como fase estacionária e como fase móvel mistura de solventes com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.9 (p. 70).

Obteve-se 105 frações as quais de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC foram reunidas em 28 frações.



FLUXOGRAMA 3.9: Fracionamento de RCDf

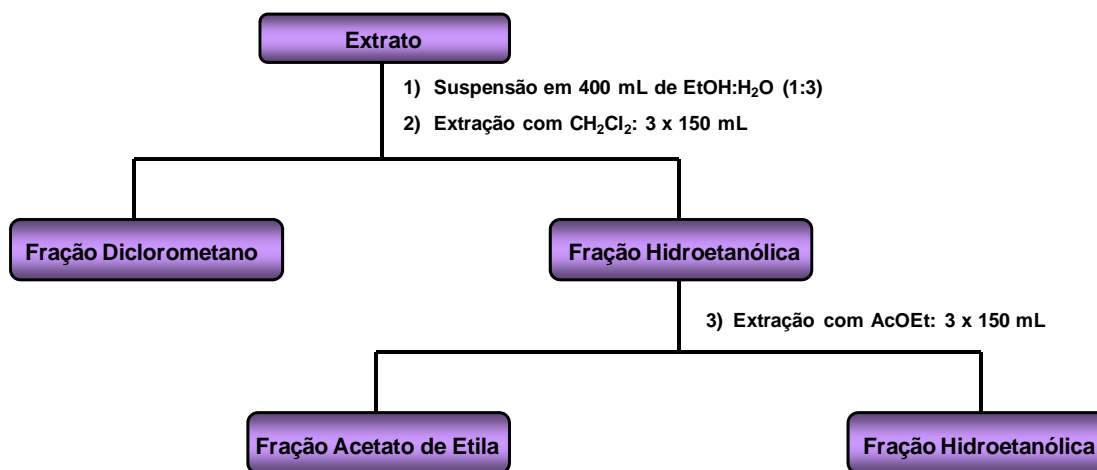
f) Cromatografia por adsorção, sílica gel (230-400 Mesh), coluna de vidro ($\Phi = 2,5$ cm, $h = 20$ cm) frações coletadas em vidros de 20 mL. Sistema gradiente de eluição (% em v:v), utilizando : Hexano 100%, Hexano:Acetato de Etila (9:1/8:2/7:3/6,5:3,5/6:4/5,5:4,5/1:1/4,5:5,5/4:6/3:7/2:8/1:9), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila:Metanol (9:1/7:3/1:1/3:7/1:9), Metanol 100%.

Após experimento de RMN ^1H no equipamento de 200 MHz verificou-se a presença de sinais característicos de ácidos graxos nas frações 51-60, 61-62, 63-67, 75-79. Para identificação dos ácidos graxos, estas frações serão submetidas posteriormente, a reações para obtenção dos ésteres metílicos em pequenas alíquotas de amostra para análise via CG-EM.

3.6.4 – Fracionamento de RCM de *Rauia* sp

O extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp (RCM) foi submetido a uma partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 3.10, p. 71) originando três partições do extrato.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporadores. A parte vegetal utilizada, a quantidade de extrato no preparo das frações assim como a quantidade obtida de cada uma delas está descrito na TABELA 3.4 (p. 71).



FLUXOGRAMA 3.10: Metodologia utilizada na partição do extrato

As partições obtidas foram submetidas a ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) e ensaio por ingestão e/ou toxicidade aguda sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*).

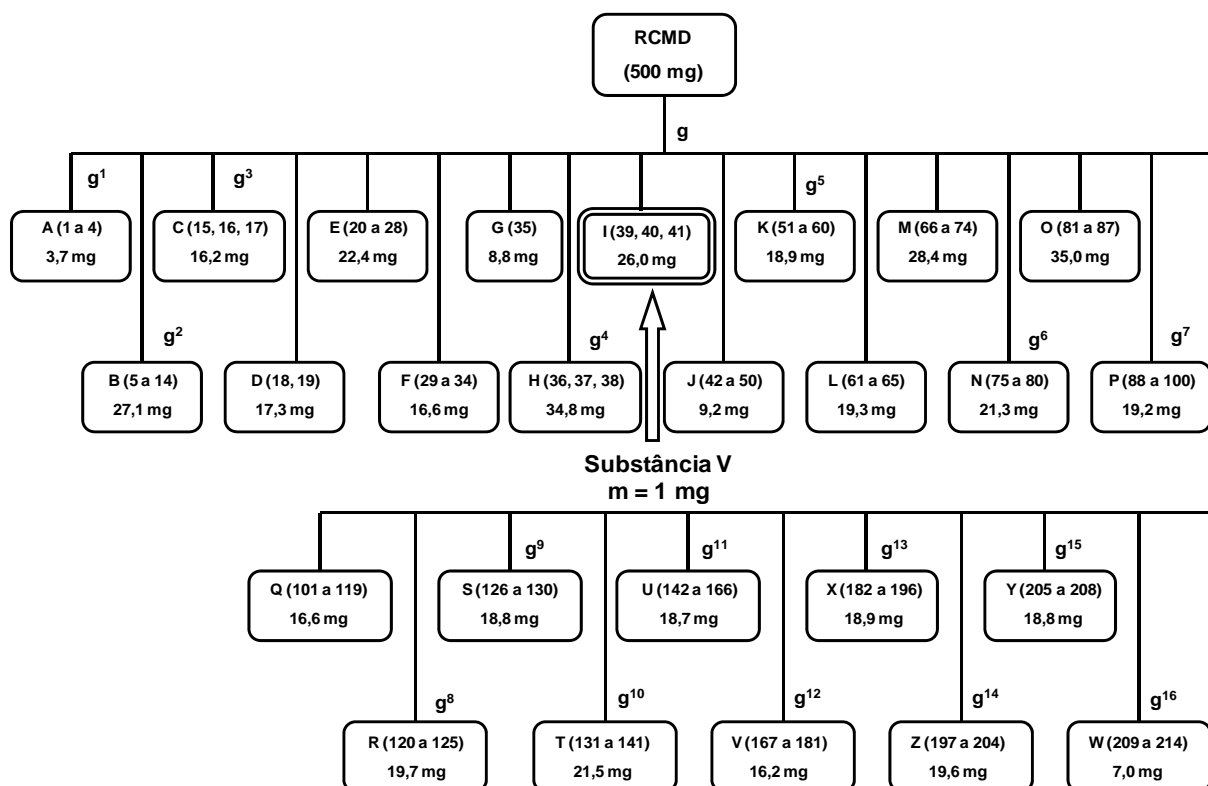
TABELA 3.4: Frações obtidas do extrato metanólico (RCM)

Parte Vegetal	Massa do Extrato (g)	Código	Massa das Partições (g)
Caule	17,00	RCMD	1,90
		RCMA	2,20
		RCMHi	12,90

R = *Rauia* sp; C = Caule; M = Metanólico; D = Diclorometano; A = Acetato de Etila; Hi = Hidroetanólica

3.6.5 – Estudo da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMD)

A fração diclorometânica obtida do particionamento do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMD) foi fracionada por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica do tipo “flash” (230-400 mesh) e como fase móvel um sistema gradiente de eluição como demonstrado resumidamente no FLUXOGRAMA 3.11 (p. 72).



FLUXOGRAMA 3.11: Fracionamento de RCMD

g) Cromatografia por adsorção sílica gel (230-400 Mesh), coluna de vidro ($\Phi = 3$ cm, $h = 23$ cm), coleta realizada a cada 100 mL de fração no erlenmeyer (de 1 a 4 e de 197 a 214) e coleta realizada em vidros de 20 mL (de 5 a 196). Sistema gradiente de eluição (% em v:v):

- | | |
|---|---|
| g¹) Hexano 100 % (800 mL) | g⁹) Hexano: Acetato de Etila 4:6 (500 mL) |
| g²) Hexano: Acetato de Etila 9:1 (1 L) | g¹⁰) Hexano: Acetato de Etila 3,5:6,5 (1,1 L) |
| g³) Hexano: Acetato de Etila 8:2 (2,1 L) | g¹¹) Hexano: Acetato de Etila 3:7 (2,5 L) |
| g⁴) Hexano: Acetato de Etila 7:3 (1,5 L) | g¹²) Hexano: Acetato de Etila 2,5:7,5 (1,5 L) |
| g⁵) Hexano: Acetato de Etila 6:4 (2,4 L) | g¹³) Hexano: Acetato de Etila 2:8 (1,5 L) |
| g⁶) Hexano: Acetato de Etila 5,5:4,5 (1,3 L) | g¹⁴) Hexano: Acetato de Etila 1,5:8,5 (1,6 L) |
| g⁷) Hexano: Acetato de Etila 5:5 (3,2 L) | g¹⁵) Hexano: Acetato de Etila 1:9 (800 mL) |
| g⁸) Hexano: Acetato de Etila 4,5:5,5 (600 mL) | g¹⁶) Metanol 100 % (1,2 L) |

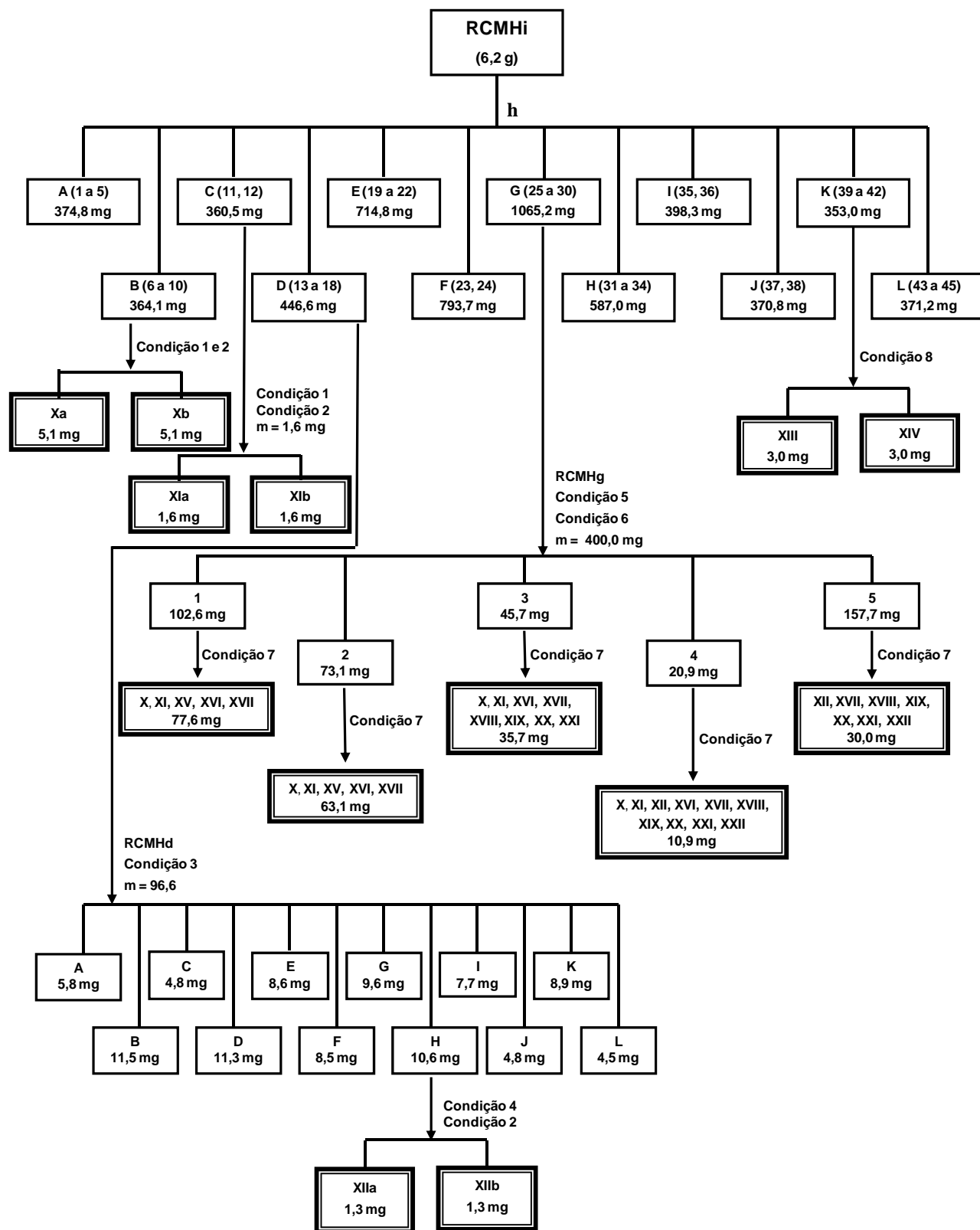
As subfrações foram analisadas por CCDA e reunidas em 26 subfrações das 214 obtidas inicialmente, de acordo com a semelhança de seus Rf's. Através do experimento de RMN ¹H no aparelho de 200 MHz foi possível identificar a presença de sinais característicos da cumarina (V) na subfração I, posteriormente reunida com a fração RCDd (37-39, item 3.6.2, p. 68).

3.6.6 – Estudo da fração hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMH)

A fração hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMH) foi estudada utilizando diversas técnicas cromatográficas. A partir deste estudo foi possível identificar em mistura os flavonóides glicosilados **Xa, Xb, Xla, Xlb, Xlla, Xllb, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI e XXII**. O FLUXOGRAMA 3.12 (p. 74) mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.

As frações obtidas (A-L) foram submetidas a ensaio por ingestão sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*) na qual foi utilizada a massa de 300 mg de cada fração conforme discussão nos itens 3.7.2.2 (p. 79) e 4.7.6 (p. 290).

A fração G e as subfrações da mesma (G1 a G5) foram submetidas a ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) na qual utilizou-se para a realização deste ensaio: 25 mg da fração G1; 10 mg das frações G2 a G4 e 30 mg da fração G5, de acordo com a disponibilidade de massa de cada fração, com concentração final de 2 mg/mL na dieta utilizada nos ensaios, em todas as frações conforme discussão nos itens 3.7.1.2 (p. 78) e 4.6.7 (p. 272). O restante da massa obtida foi utilizada para os experimentos de CL-EM, RMN 1D e 2D.



FLUXOGRAMA 3.12: Fracionamento de RCMH

h) Cromatografia por exclusão ; coluna de vidro ($\Phi = 5$ cm, $h = 98$ cm); fase estacionária: Sephadex LH-20; fase móvel: eluição isocrática - MeOH 100% (coleta realizada em vidro de 20 mL).

Condição 1: Extração com solvente MeOH 100%. A parte insolúvel foi submetida à CLAE preparativo: coluna C-18 Gemini 10 μm (h x Φ = 25 x 2,12 cm); eluição isocrática: H₂O:ACN 8:2 com 0,1% ácido acético v/v; pH = 3,35; loop: 500 μL ; fluxo: 4 mL/min; λ : 217 nm e 330 nm.

Condição 2: CLAE-EM/EM, Equipamento HPLC SHIMADZU analítico e preparativo, injetor para HPLC SHIMADZU Auto Injector SIL-10ADVP, detector de arranjo de diodos Waters 2696, módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-10A Communication BUS module; módulo de separação Waters 2695. Cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico: coluna C-18 Phenomenex - Luna 5 μm (h x Φ = 250 x 4,6 mm); gradiente de eluição H₂O:MeOH 20-45% B de 0 a 10 min; loop: 20 μL ; fluxo: 1,2 mL/min, com divisor 0,2 mL para massas e 1,0 mL para lixo; λ : 330 nm. EM/EM, Equipamento: Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo ESI, QuattroLC – Micromass. Condições de sintonia do espectrômetro de massas, fonte de ionização: electrospray no modo negativo (ESI (-)); capilar 3,5 KV; cone 20 V; extrator 5 V; lentes de radiofrequência 0,5 V; temperatura do bloco da fonte 50 °C; temperatura do probe 350 °C.

Condição 3: Cromatografia por exclusão; coluna de vidro (Φ = 3 cm, h= 109 cm); fase estacionária: Sephadex LH-20; eluição isocrática: MeOH 100%; coleta realizada em frascos de vidro de 20 mL.

Condição 4: CLAE preparativo: coluna C-18 Gemini 10 μm (h x Φ = 25 x 2,12 cm); eluição isocrática: H₂O:ACN 8:2 com 0,1% ácido acético v/v; pH = 3,35; loop: 500 μL ; fluxo: 4 mL/min; λ : 217 nm e 330 nm.

Condição 5: CLAE analítico; coluna C-18 Phenomenex - Luna 10 μm (h x Φ = 250 x 5,1 mm); gradiente de eluição H₂O:ACN 5-100% B por 60 minutos com 0,1% ácido acético v/v; loop: 20 μL ; fluxo: 1mL/min; λ : 219 nm; 249 nm e 336 nm.

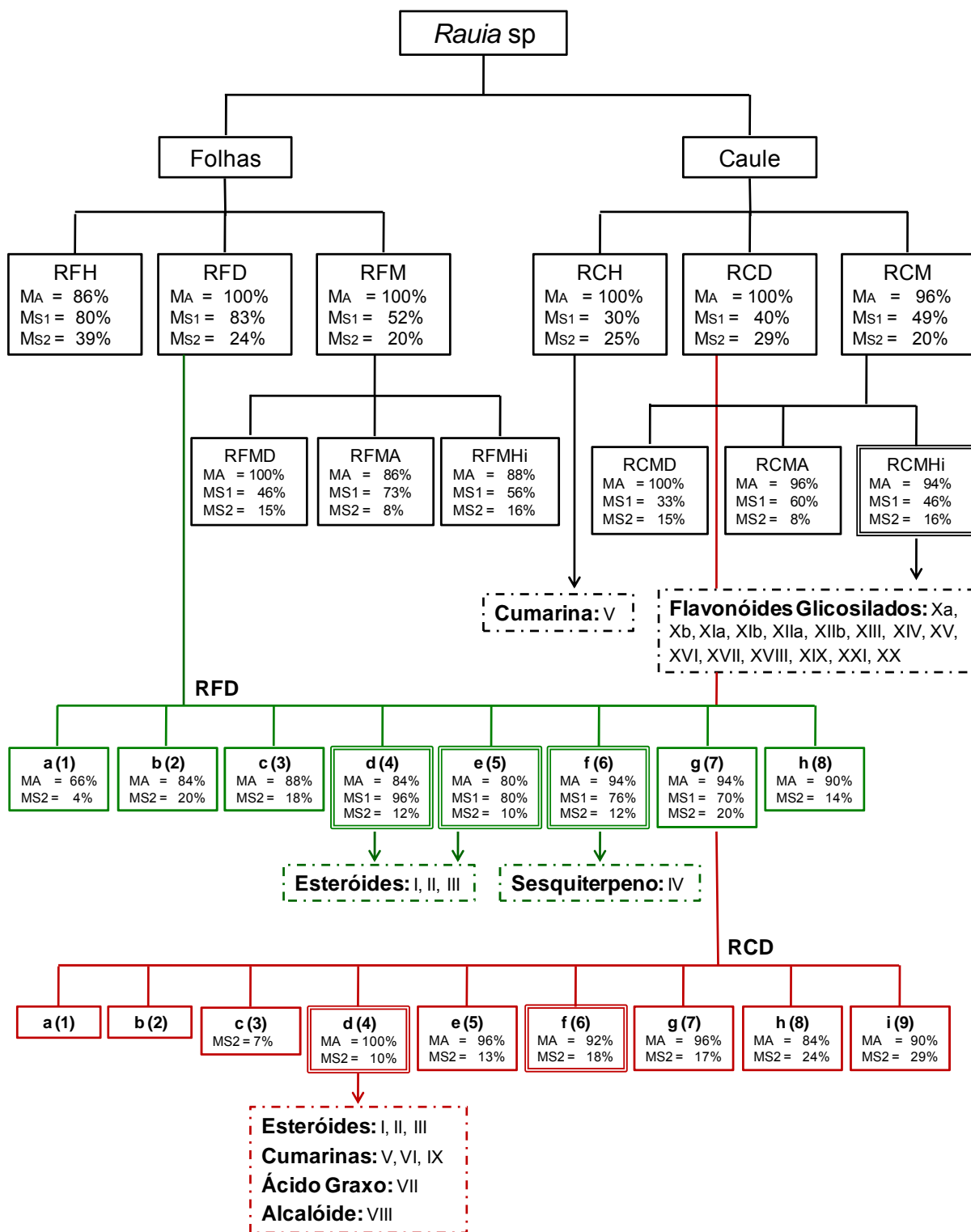
Condição 6: Cromatografia líquida de média pressão (Akta): coluna C-18 Gemini 10 μm (h x Φ = 25 x 2,12 cm); gradiente de eluição H₂O:ACN 5-100% B por 60 minutos com 0,1% ácido acético v/v; loop: 500 μL ; fluxo: 10 mL/min; coletor automático: 14 mL por fração; λ : 217 nm; 254 nm e 280 nm.

Condição 7: CLAE-EM, Equipamento HPLC SHIMADZU analítico e preparativo, injetor para HPLC SHIMADZU Auto Injector SIL-10ADVP, detector de arranjo de diodos Waters 2696, módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-10A Communication BUS module; módulo de separação Waters 2695. Cromatografia líquida de alta pressão no modo analítico: coluna C-18 Phenomenex - Luna 5 μm (h x Φ = 250 x 4,6 mm); gradiente de eluição H₂O:ACN:MeOH A:B:C 80:10:10 a 0 min; A:B:C 80:10:10

5.0 min; 60:10:30 a 22.0 min; 30:20:50 a 22.1 min; 30:20:50 a 25 min; 80:10:10 a 25.1 min; 80:10:10 a 30 min acidificado com 0,1% de TFA (ácido trifluoracético) v/v; loop: 20µL; fluxo: 1,0 mL/min, com divisor 0,2 mL para massas e 0,8 mL para lixo; λ: 330 nm . EM/EM. Equipamento: Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo ESI, QuattroLC – Micromass. Condições de sintonia do espectrômetro de massas, fonte de ionização: electrospray no modo negativo (ESI (-)); capilar 3,39 KV; cone 40 V; extrator 3 V; lentes de radiofrequência 0,8 V; temperatura da fonte 45 °C; temperatura do probe 300 °C.

Condição 8: CLAE analítico; coluna C-18 Phenomenex - Luna 10 µm (h x Φ = 250 x 5,1 mm); eluição isocrática H₂O:MeOH 9:1 com 0,1% ácido acético v/v; loop: 20µL; fluxo: 1 mL/min; λ: 254 nm e 330 nm.

O FLUXOGRAMA 3.13 (p. 77) mostra de forma resumida os fracionamentos realizados com os extratos orgânicos de *Rauia* sp e as porcentagens de mortalidade obtidas nos ensaios biológicos realizados com os extratos e frações de *Rauia* sp sobre *A. sexdens rubropilosa* e *S. frugiperda*. As subfrações obtidas que foram refracionadas estão marcadas com linha dupla no FLUXOGRAMA abaixo.



FLUXOGRAMA 3.13: Fracionamento dos extratos orgânicos de *Rauia* sp.

R = *Rauia* sp; **F** = Folhas; **C** = Caule; **H** = Hexano; **D** = Diclorometano; **M** = Metanol; **A** = Acetato de Etila; **Hi** = Hidroetanólica; **MA** = % mortalidade de *A. sexdens rubropilosa* no ensaio por ingestão; **MS1** = % mortalidade de *S. frugiperda* no ensaio por ingestão; **MS2** = % mortalidade de *S. frugiperda* no ensaio por toxicidade aguda.

3.7 – METODOLOGIA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.7.1 – Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras

3.7.1.1 – Obtenção das formigas cortadeiras

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

Neste ensaio as operárias foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada dieta sólida artificial constituída por: 5,0% glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% extrato de levedura e 1,5% ágar bacteriológico dissolvidos em 100 mL de água destilada.

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

A atividade inseticida sobre as formigas cortadeiras foi realizada por ingestão, através da incorporação do material vegetal na dieta artificial sólida. Após a mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas por 4 minutos e logo em seguida, à autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 120°C e 1 atm. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram ou serão embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo 25 dias para a realização do experimento de toxicidade.

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

a extração e incorporado na dieta na concentração de 2 mg/mL (BUENO *et al.*, 1997).

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas.

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

3.7.2 – Ensaios biológicos realizados sobre *Spodoptera frugiperda*

3.7.2.1 – Obtenção da lagarta-do-cartucho do milho

Os ensaios biológicos com os extratos e frações de *Rauia* sp foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em colaboração com as alunas de iniciação científica Alini Roberta Alves e Érica Elaine Kuba, sob a orientação da Dra. Andréia P. Matos. O Laboratório de Bioensaios é mantido a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.

Para realização dos testes foi mantida em laboratório criação de *S. frugiperda*, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial (TABELA 3.5, p. 80) (KASTEN *et al.*, 1978; PARRA, 1986) e os adultos com solução de mel 10%.

3.7.2.2 – Ensaios de ingestão sobre *Spodoptera frugiperda*

Para realização dos bioensaios, cada extrato foi solubilizado em uma pequena quantidade (10 mL) de uma mistura de solventes na proporção 3:4:3 hexano, diclorometano e metanol, respectivamente e misturado ao ácido ascórbico. Esta mistura foi seca para que todo o solvente fosse evaporado e posteriormente foi incorporada à dieta artificial (KASTEN *et al.*, 1978) para *S. frugiperda* (TABELA 3.5, p. 80), com o cuidado de adicioná-lo ao final, quando

a dieta estava à temperatura de 50°C. Os extratos e frações foram incorporados à dieta artificial na proporção de 100 mg de extrato para 100 g de dieta (1000 ppm), ou seja, para cada tratamento utilizou-se 300 mg de amostra uma vez que utilizam-se 30 tubos de vidro. A incorporação da mistura à dieta artificial vem sendo realizada com sucesso no Laboratório de Bioensaios (BATISTA-PEREIRA *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2008). Além das dietas correspondentes a cada tratamento, preparou-se uma dieta testemunha (controle), sem extrato, utilizando-se a mistura de solventes em que foram solubilizados os extratos.

TABELA 3.5: Descrição da dieta artificial para *S. frugiperda* para 50 tubos

Componentes	Quantidade
Feijão carioca	82,5 g
Gérmen de trigo	39,6 g
Levedura	25,3 g
Ácido ascórbico	2,6 g
Ácido sórbico	0,8 g
Nipagin	1,1 g
Formaldeído (40%)	6,3 MI
Tetraciclina	50 mg
Agar	10,3 g
Água	597,5 mL

Após a preparação, as dietas foram vertidas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm), previamente esterilizados em estufa a 170 °C por 1 hora e tampados com algodão hidrófugo. Após a colocação da dieta, os tubos foram mantidos por 24 horas em grades de arame para eliminação do excesso de umidade (gotículas) de suas paredes. A seguir, foi feita a inoculação das lagartas

recém-eclodidas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta por tubo de vidro. Foram utilizados 30 tubos para cada tratamento.

As pupas obtidas foram pesadas, 1 dia após a pupação e transferidas para copos plásticos de 50 mL de capacidade, onde permaneceram até a emergência dos adultos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: duração das fases larval e pupal, peso das pupas e porcentagem de insetos mortos (mortalidade) na fase larval e no ciclo total de desenvolvimento.

Para os resultados dos ensaios realizados, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Nestes bioensaios utilizaram-se médias de agrupamento de dados no total de 6 repetições por tratamento. A unidade experimental foi constituída por 5 tubos com uma lagarta cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (ZAR, 1984). A comparação entre médias dos tratamentos foi feita através do Teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.7.2.3 – Ensaios de toxicidade aguda sobre *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios biológicos com extratos brutos e frações de *Rauia* sp foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, nas condições descritas no item anterior.

Os ensaios de toxicidade aguda basearam-se na metodologia descrita por PAULA *et al.* (2000). Para realização dos bioensaios foram preparadas soluções dos extratos em acetona em concentrações diferentes.

Foram utilizados cinco grupos de 10 larvas de *S. frugiperda* no segundo ínstar (5 dias), onde cada grupo foi transferido para placas de Petri. As médias dos pesos dos cinco grupos de insetos foram obtidas pelas medidas realizadas em balança analítica. Em cada inseto foi aplicado topicamente 1 µL da solução do extrato em acetona, via uma micro-seringa. Para evitar a possível morte do inseto, em cada grupo de larvas foram colocadas pequenas porções (300,0 mg) da dieta artificial. Este processo foi realizado uma hora

após a aplicação da solução. O controle foi realizado sob as mesmas condições, 1 μ L de acetona foi aplicado em cada inseto.

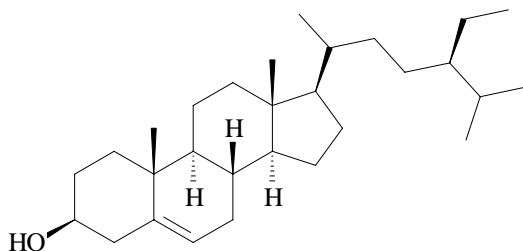
A mortalidade dos insetos foi verificada após 48 horas. Todos os experimentos e o respectivo controle foram realizados em 5 replicatas. Os ensaios com os extratos e frações de *Rauia* sp foram realizados na concentração de 10 mg/mL.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico da planta *Rauia* sp possibilitou o isolamento e identificação de 22 metabólitos secundários.



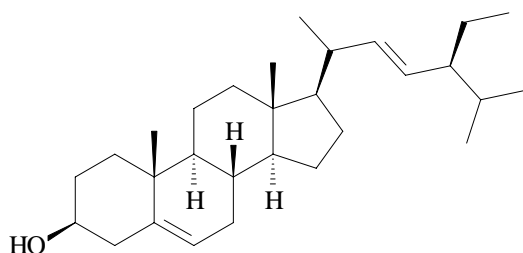
β -Sitosterol (I)

Procedência: Folhas de *Rauia* sp

Massa: 5 mg (em mistura)

Isolamento: p. 63

Identificação: p. 93



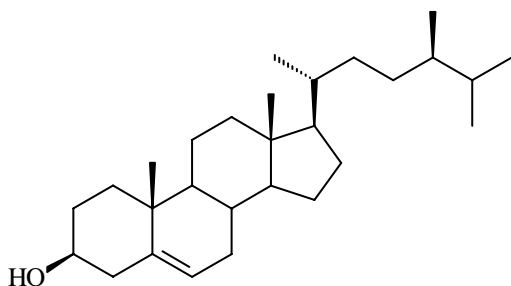
Estigmasterol (II)

Procedência: Folhas de *Rauia* sp

Massa: 5 mg (em mistura)

Isolamento: p. 63

Identificação: p. 93



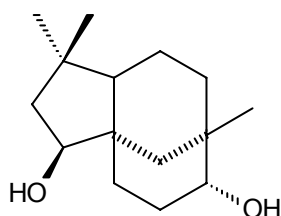
Campesterol (III)

Procedência: Folhas de *Rauia* sp

Massa: 5 mg (em mistura)

Isolamento: p. 63

Identificação: p. 93



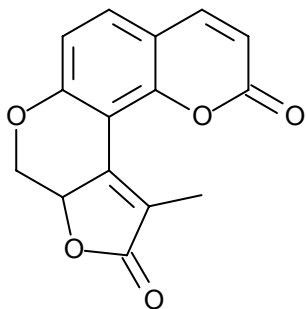
Clovane-2 β ,9 α -diol (IV)

Procedência: Folhas de *Rauia* sp

Massa: 5,8 mg

Isolamento: p. 65

Identificação: p. 98



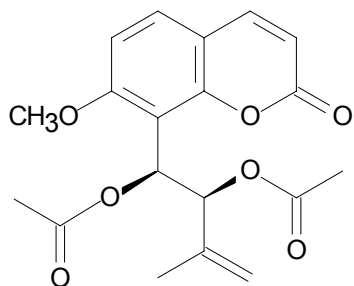
Rauianina (V)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 5,1 mg

Isolamento: p. 68

Identificação: p. 108



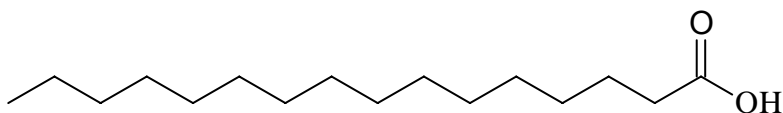
Diacetato de murrangatina (VI)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 3,0 mg (em mistura)

Isolamento: p. 68

Identificação: p. 113



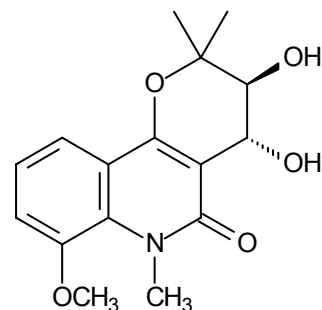
Ácido hexadecanóico (VII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 3,0 mg (em mistura)

Isolamento: p. 68

Identificação: p. 113



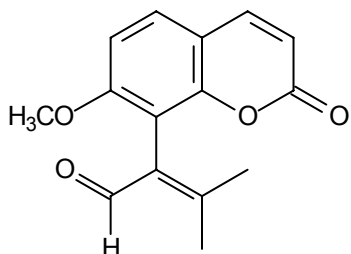
Zantodiolina (VIII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 3,0 mg (em mistura)

Isolamento: p. 68

Identificação: p. 113



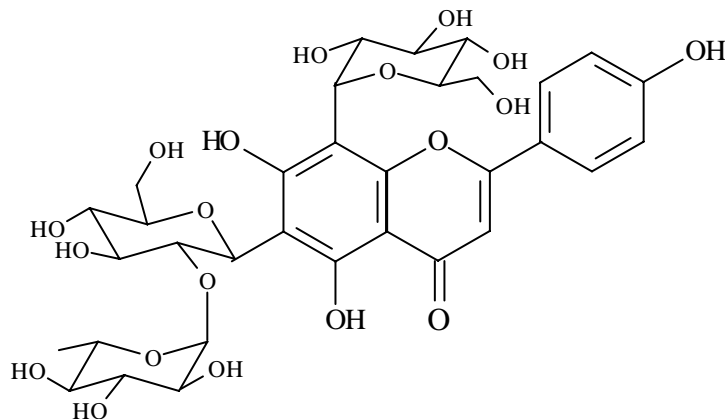
Murralongina (IX)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 2,0 mg

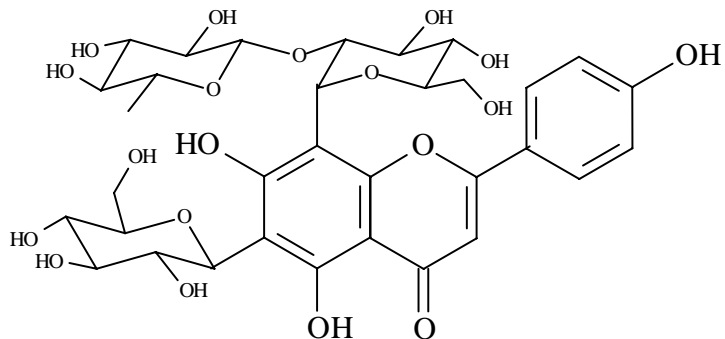
Isolamento: p. 68

Identificação: p. 125



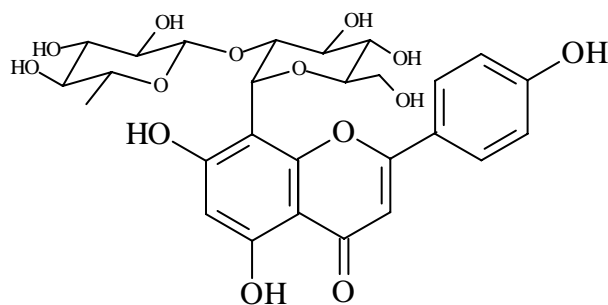
Apigenina-6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside (X)

Procedência: Caule de *Rauia* sp
 Massa: 5,1 mg (puro), 187,3 mg (em mistura)
 Isolamento: p. 73
 Identificação: p. 151



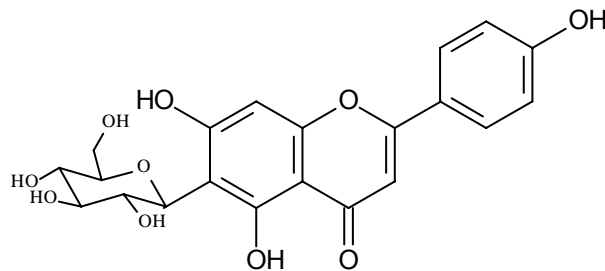
Apigenina-6-C-glicosil-8-C-neohesperidoside (XI)

Procedência: Caule de *Rauia* sp
 Massa: 1,6 mg (puro), 187,3 mg (em mistura)
 Isolamento: p. 73
 Identificação: p. 167



2''-O-raminosilvitexina (XII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp
 Massa: 1,3 mg
 Isolamento: p. 73
 Identificação: p. 178



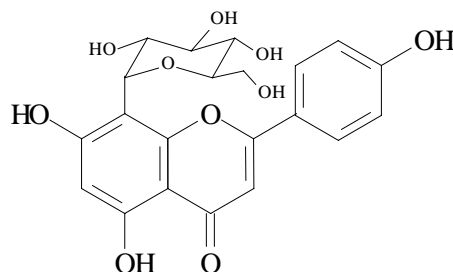
Isovitexina (XIII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 3,0 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 189



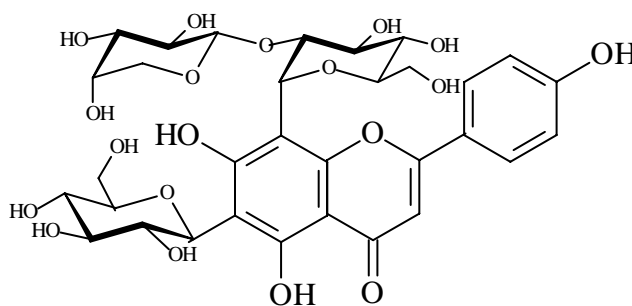
Vitexina (XIV)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 3,0 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 197



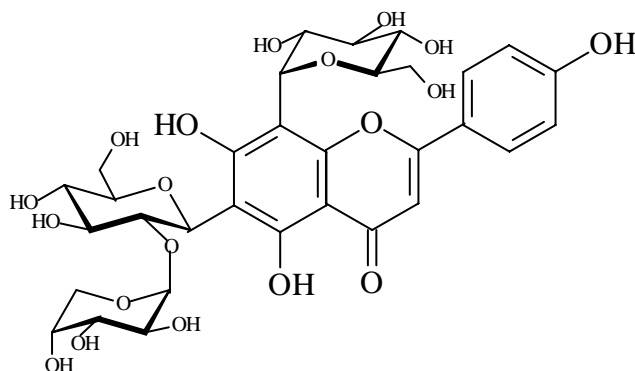
Apigenina-6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2''''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside) (XV)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 140,7 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 209



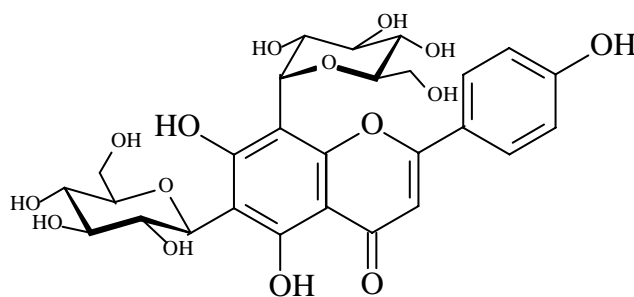
Apigenina-6-C-(2''-O-α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosil)-8-C-β-D-glucopiranoside (XVI)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 187,3 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 209



Vicenin-2 (XVII)

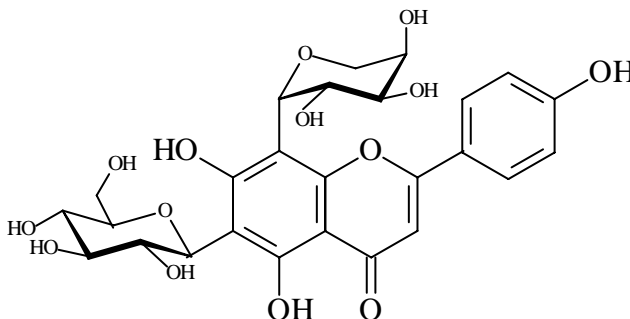
Vicenin-2 (XVII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 187,3 (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 209



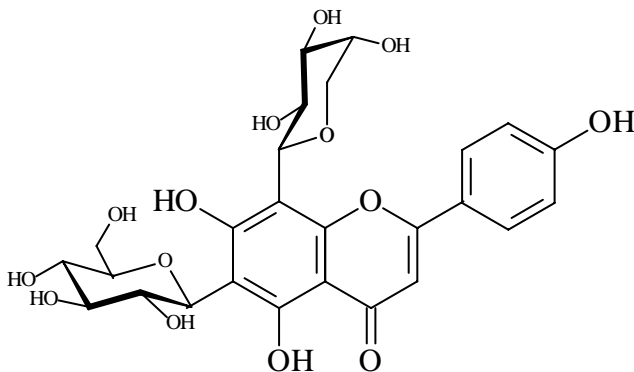
Neoschaftoside (XVIII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 76,6 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 227



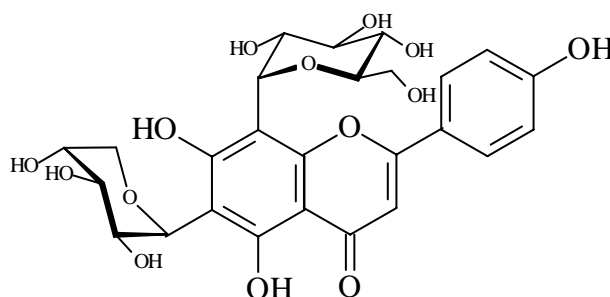
Schaftoside (XIX)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 76,6 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 227



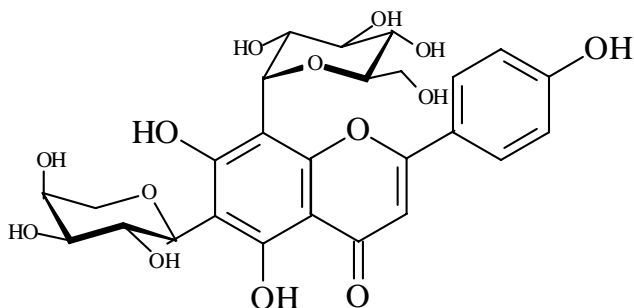
Neisoschaftoside (XX)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 76,6 mg (em mistura)

Isolamento: p.73

Identificação: p. 227



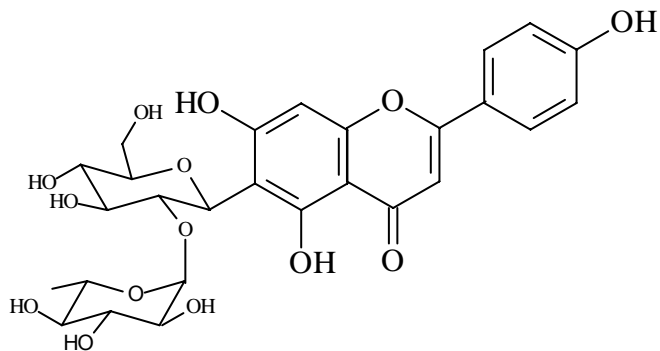
Isoschaftoside (XXI)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

Massa: 40,9 mg (em mistura)

Isolamento: p. 73

Identificação: p. 227



2''-rhamnosilisolvitexina (XXII)

Procedência: Caule de *Rauia* sp

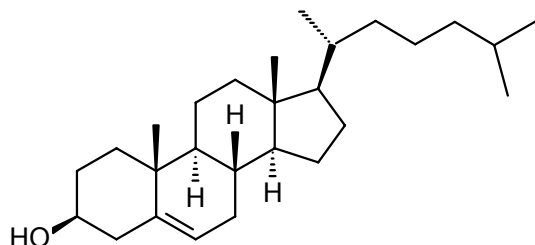
Massa: 40,9 mg (em mistura)

Isolamento: p.73

Identificação: p. 244

4.2 – Esteróides

Os esteróides são de ampla ocorrência no reino vegetal e em frações lipídicas nos animais (DEWICK, 2001). Eles são triterpenos degradados (em geral 27 carbonos) similares em estrutura ao colesterol (78, p. 92), no qual o núcleo do esteróide é composto por quatro anéis ligados. O grupo 3 β -hidroxil e freqüentemente a dupla ligação entre C-5 e C-6, tem como função propiciar estabilização às membranas celulares (FERNANDES e CABRAL, 2007).



Entretanto, o colesterol tem uma cadeia lateral composta por oito carbonos enquanto que a maioria dos fitoesteróides tem nove ou dez carbonos na cadeia lateral, num total de 28 ou 29 átomos de carbono. Alguns podem conter uma cadeia lateral alquílica com dupla ligação. Mais de 100 tipos de fitoesteróides foram encontrados em plantas, nos quais os mais abundantes são sitosterol, estigmasterol e campesterol (FERNANDES e CABRAL, 2007). Estes três esteróides citados acima encontram-se na maioria das vezes em mistura e devido às suas semelhanças estruturais são de difícil separação. Desta forma a identificação dos mesmos é realizada em mistura por CG-EM.

A biossíntese destes fitoesteróides em células de plantas demonstra que as unidades isoprênicas são fornecidas exclusivamente do caminho mevalonato (MVA) que está localizado no citoplasma. Por outro lado, nos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos são predominantemente biossintetizadas pelo caminho deoxixilulose fosfato (DXP) localizado no plastídeo (KONGDUANG *et al.*, 2008).

4.2.1 – Identificação estrutural das substâncias I, II e III

As substâncias **I**, **II** e **III** foram obtidas das frações **d** do extrato diclorometânico das folhas e do caule: RFD_d, RCD_d e da fração **e** do extrato diclorometânico das folhas (RFD_e), conforme descrito nos itens 3.5.2 (p. 63), 3.5.3 (p. 64) e 3.6.2 (p. 68). A identificação destes esteróides foi realizada através de dados dos espectros de RMN ¹H (FIGURA 4.1, p. 94) e dados de CG-EM (FIGURA 4.2, p. 95).

No espectro de RMN ¹H observou-se a presença de um dubleto largo em δ_H 5,35 (H-6; $J = 5,6$ Hz), de sinais de hidrogênios vinílicos em δ_H 5,14 (dd, $J = 8,4$ e $15,2$ Hz), δ_H 5,05 (dd, $J = 8,4$ e $15,6$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-22 e H-23 da cadeia lateral do estigmasterol; um multipletto em δ_H 3,53 característico dos hidrogênios H-3 dos esteróides sitosterol, estigmasterol e campesterol e pode-se verificar ainda a presença de um grande número de sinais referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos na região entre δ_H 0,68 – 2,31 característicos do esqueleto esteroidal. O sitosterol e o campesterol possuem cadeias laterais muito parecidas, desta forma é difícil diferenciá-los apenas pelo espectro de RMN ¹H. Sendo assim realizou-se a análise por CG-EM para confirmar a presença dos fitoesteróides. O cromatograma (FIGURA 4.2a, p. 95) da junção das frações citadas acima (RFD_d, RCD_d e RFD_e) apresentou 3 picos, indicando a presença de uma mistura de três substâncias. As estruturas destas substâncias foram confirmadas através dos picos referentes aos íons moleculares com m/z 414, 412 e 400 (FIGURA 4.2b-d, p. 95), cujas proporções são 7,2 : 2,2 : 0,6, os quais apresentam as massas moleculares esperadas C₂₉H₅₀O, C₂₉H₄₈O e C₂₈H₄₈O para sitosterol (**I**), estigmasterol (**II**) e campesterol (**III**), respectivamente.

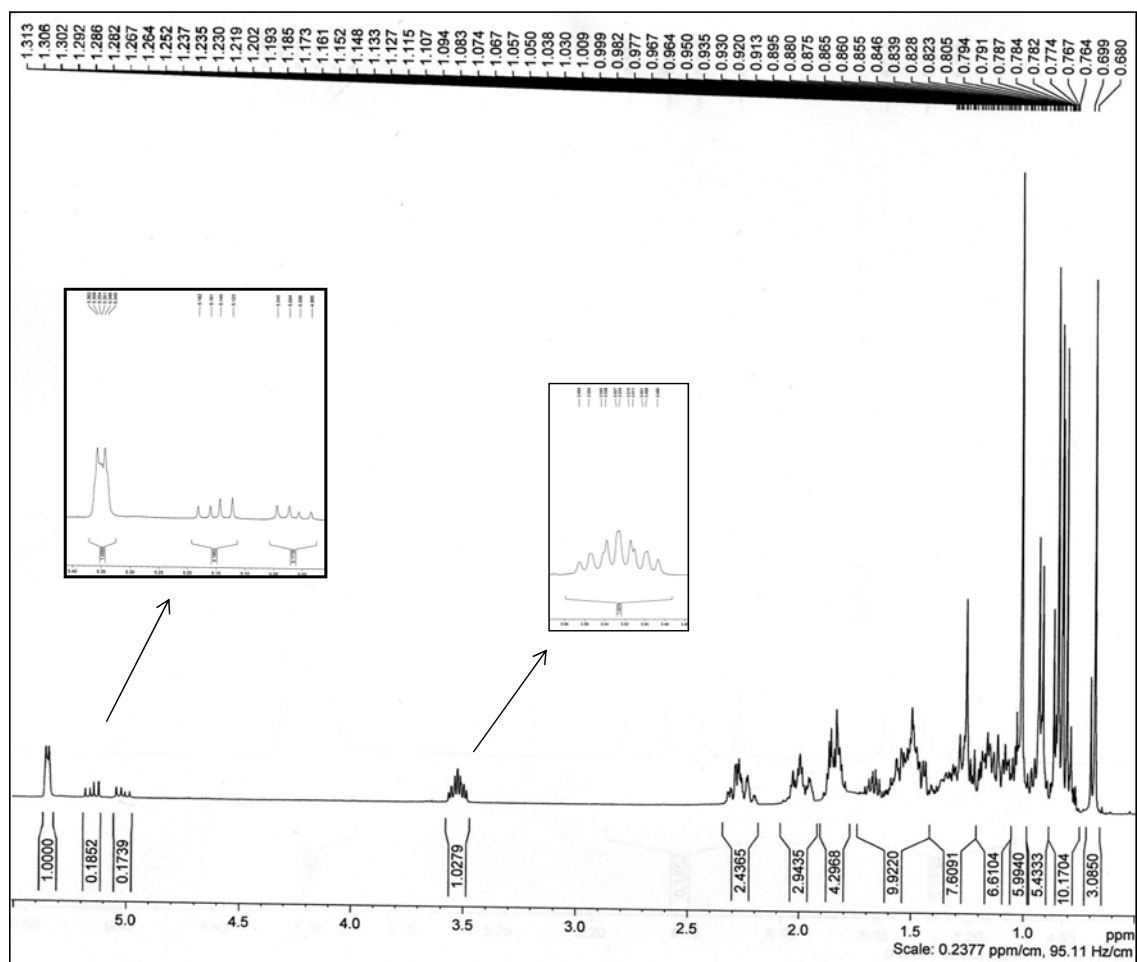
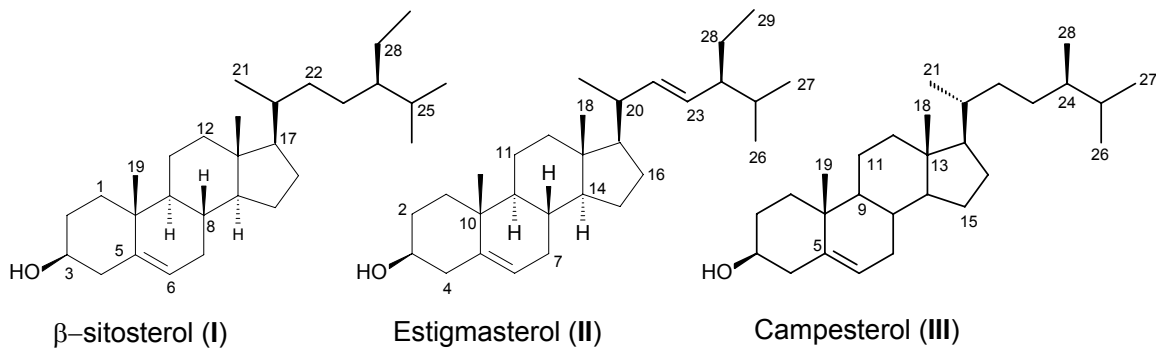


FIGURA 4.1: Espectro de RMN ^1H dos esteróides I, II e III (CDCl_3 , 400MHz).

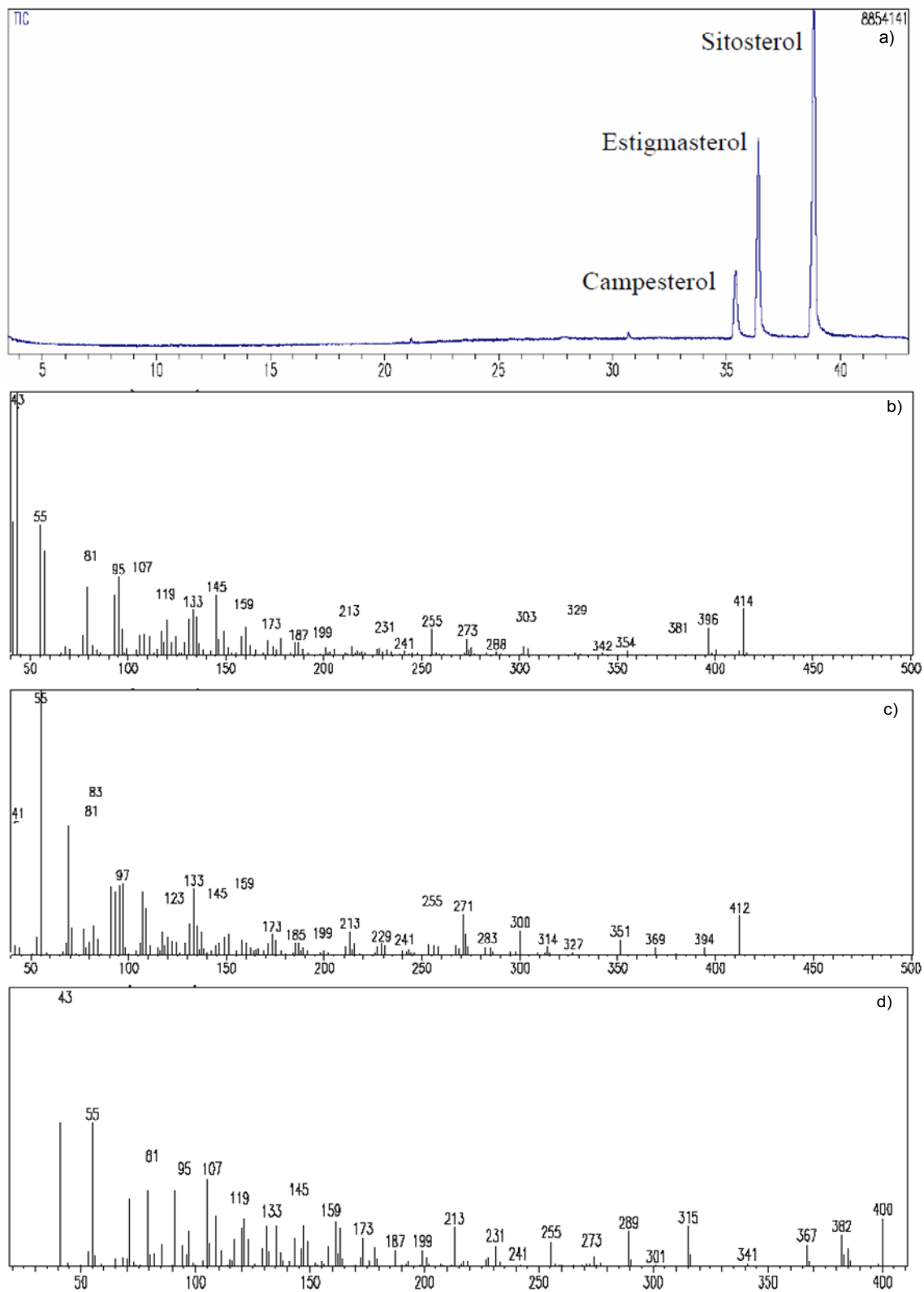


FIGURA 4.2: a) Cromatograma da mistura dos esteróides; espectros de massas (I.E. = 70 e.V.) do sitosterol (I, b); do estigmasterol (II, c); e do campesterol (III, d).

4.3 – Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos são substâncias contendo 15 átomos de carbonos, e como esperado os compostos desta classe de terpenóides são menos voláteis que os monoterpenos. O esqueleto básico provém do mesmo mecanismo de formação dos monoterpenos, seguindo o caminho do mevalonato. Através do acoplamento cabeça-cauda de uma unidade isopentenil pirofosfato (IPP) a uma unidade de geranyl pirofosfato (GPP) conduz a formação do precursor dos sesquiterpenos, o farnesil pirofosfato (FPP) como mostra a FIGURA 4.3 (p. 96) (DEWICK, 2001).

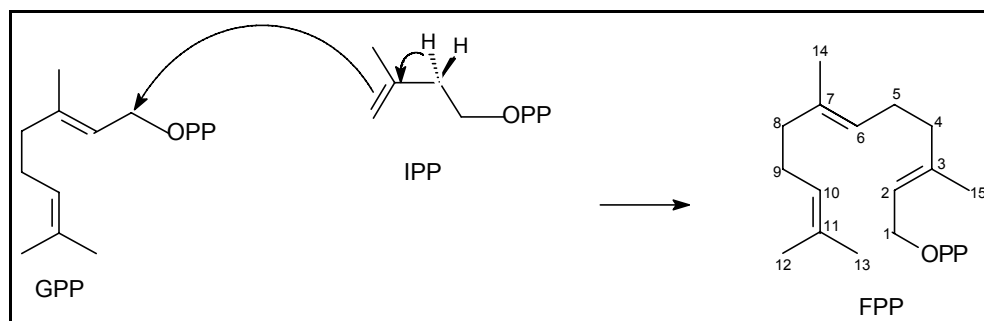


FIGURA 4.3: Formação do precursor dos sesquiterpenos.

O farnesil pirofosfato (FPP) pode então dar origem a sesquiterpenos lineares e cíclicos. Os compostos acíclicos são muito comuns em óleos essenciais, sendo menores na natureza uma vez que possuem três duplas que podem reagir entre si. Os compostos ciclizados são geralmente mono, bi e tricíclicos, o que resulta em uma enorme gama de diferentes tipos de esqueletos. A estereoquímica da dupla ligação pode ser de uma configuração *E* (como em FPP) ou através de ionização uma configuração *Z* como encontrado em geranyl/neril PP (FIGURA 4.4, p. 97). Assim como para os monoterpenos, as reações com carbocátions podem explicar a maior parte dos esqueletos de sesquiterpenos encontrados. Em alguns casos a função do grupo pirofosfato é mantida e as ciclizações ocorrem sem a participação do mesmo. Pode ocorrer ainda a formação de um carbocátion, com ciclizações possíveis em várias posições, ocorrendo em alguns casos, via íon não-clássico (DEWICK, 2001).

Outras ciclizações podem levar aos sistemas de anéis maiores que seis carbonos, por exemplo, de sete, dez e 11 membros. Os sistemas de anéis de

dez membros (cátions germacril e cis-germacril) ou de 11 membros (cátions humulil e cis-humulil) diferem apenas na estereoquímica associada às duplas ligações. Contudo isso afeta mais os processos de ciclização que é responsável pela extensão da variedade dos derivados de sesquiterpenos. O carbono 11 do anel do carbocátion humulil pode ser mantido, como na formação do humuleno, ou modificado para fornecer o cátion cariofilil contendo um anel de nove membros fundindo a um anel de quatro membros, como em β -cariofileno (DEWICK, 2001; FIGURA 4.4; p. 97).

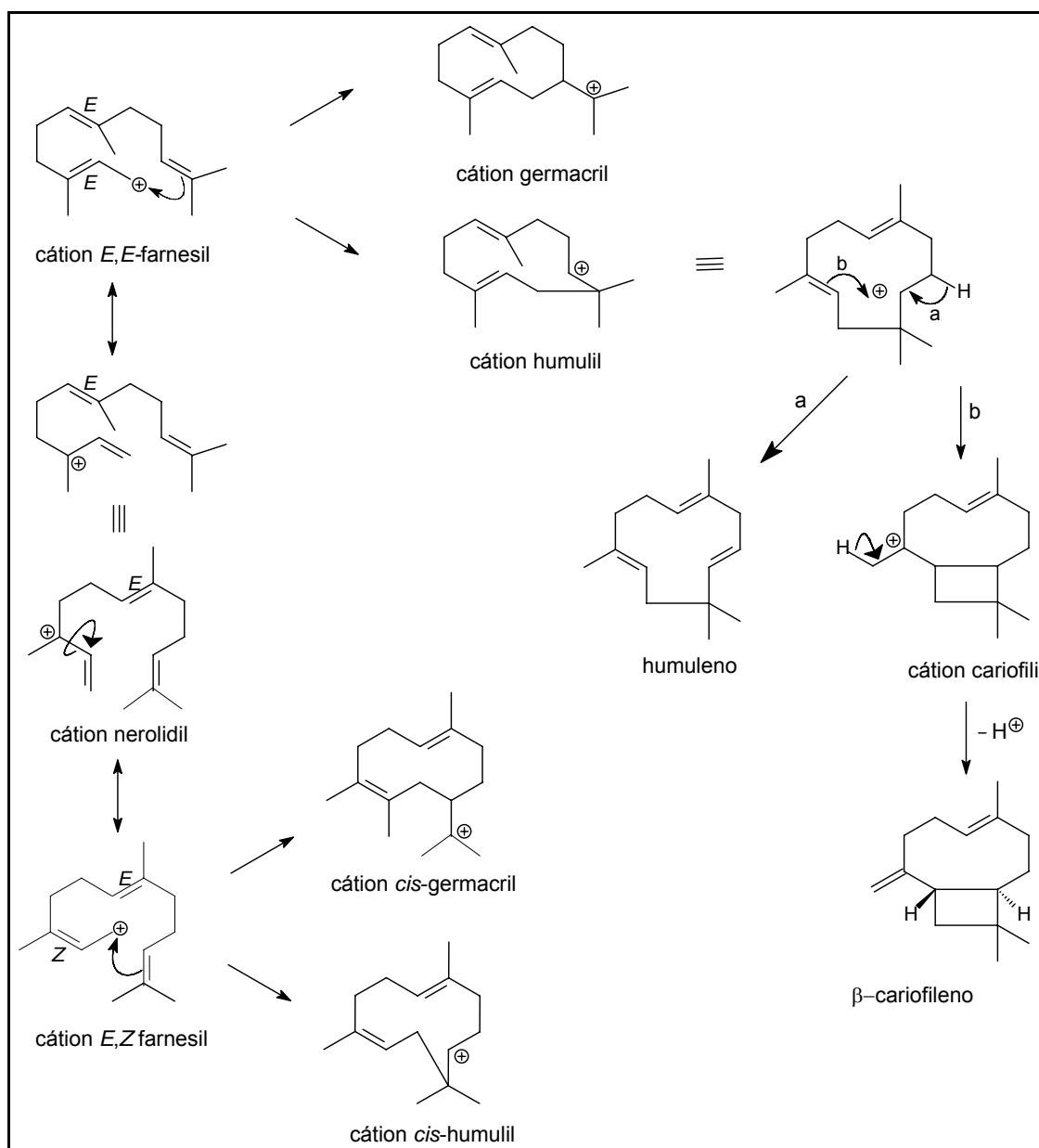


FIGURA 4.4: Formação do precursor dos sesquiterpenos.

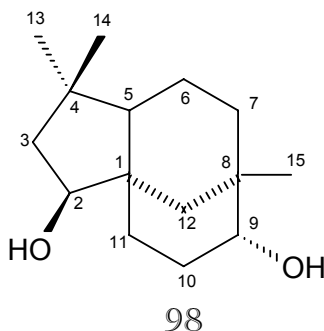
Há vários relatos sobre a atividade biológica desta classe de metabólitos secundários, por exemplo, os sesquiterpenos isolados do caule de *Pilocarpus riedelianus* apresentaram atividade sobre microorganismos (GUERREIRO *et al.*, 2005); os isolados de *Helianthus annuus L.* (sunflower) sobre *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (*on western corn rootworm*) (CHOU e MULLIN, 1993). MULLIN *et al.* (1991) observaram que o efeito antialimentar dos metabólitos isolados de *Helianthus annuus L.* (sunflower) (Asteraceae) diminui na seguinte ordem: sesquiterpenos lactônicos >> diterpenos > flavonóides > ácidos dicafeoilquínicos cuja atividade inseticida foi testada sobre *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae).

4.3.1 – Identificação estrutural da substância IV

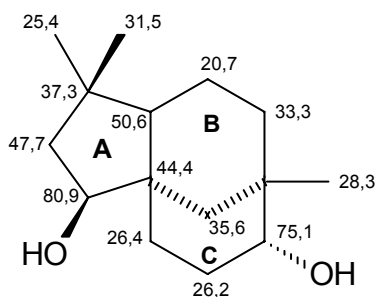
A substância **IV** foi isolada da fração **f** do extrato diclorometânico das folhas (RFD_f) de *Rauia* sp conforme descrito no item 3.5.4 (p. 65). A identificação deste sesquiterpeno foi realizada através de dados dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e dados de CG-EM em comparação com dados da literatura (HEYMANN *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2006; p. 101).

No espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.5-4.6; p. 102; TABELA 4.1; p. 101) verificou-se a presença de três sinais de metilas em δ_H 0,84 (3H, s), δ_H 0,95 (3H, s) e δ_H 1,02 (3H, s) referentes aos hidrogênios H-13, H-15 e H-14 respectivamente.

O sinal em δ_H 3,78 (dd, $J = 10,1$ e $5,8$ Hz) e o singlete largo em δ_H 3,31 observados no espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.5; p. 102) indicaram a presença de dois hidrogênios carbinólicos, sugerindo dois grupos hidroxilas em C-2 e C-9, respectivamente. Observou-se também (RMN ¹H; FIGURA 4.5-4.6; p. 102) dois sinais em δ_H 1,50 (dd, $J = 10,1$ e $11,8$ Hz) e δ_H 1,70 (dd, $J = 11,8$ e $5,8$ Hz) atribuídos aos dois prótons de H-3.



Estes dados juntamente com os 15 sinais de carbono observados no espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.7; p. 103) sugeriram a presença de um sesquiterpeno. No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 4.7; p. 103; TABELA 4.1; p.101) verificou-se a presença de 3 carbonos metílicos (CH_3), 6 metilênicos (CH_2), 3 metínicos (CH) sendo dois deles carbonos carbinólicos e 3 carbonos quaternários.



Na análise do CG-EM (FIGURA 4.8; p. 103) da fração (RCD_f), verificou-se um pico ($t_R = 11,6$) com íon molecular M^+ : 238 que de acordo com comparações da biblioteca NIST do equipamento e da literatura trata-se do sesquiterpeno com fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$, cujos dados de RMN de 1D e 2D confirmam a proposta.

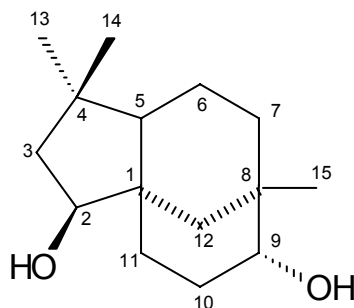
Desta forma a estrutura da substância **IV** foi definida como o sesquiterpeno conhecido como clovane-2 β ,9 α -diol isolado pela primeira vez no gênero *Rauia*. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão apresentados na TABELA 4.1 (p. 101) e no ESQUEMA 4.1 (p. 104) tem-se a proposta de fragmentação dos principais picos observados no espectro de massas de clovane-2 β ,9 α -diol (**IV**).

A análise detalhada (HEYMANN *et al.*, 1994) dos espectos de RMN ^1H , COSY (^1H - ^1H), HSQC (^1H - ^{13}C) e HMBC (^1H - ^{13}C a longa distância) confirmaram a estrutura planar do clovanediol. Sua estereoquímica foi proposta inicialmente por AEBI *et al.* (1954 *apud* HEYMANN *et al.*, 1994) baseado em evidências químicas e espectroscópicas de infravermelho. HEYMANN *et al.* (1994) relataram a reinvestigação de sua estereoquímica baseando-se nas constantes de acoplamento de RMN ^1H e os resultados de uma série de experimentos de NOESY. Com a irradiação do próton metílico H-14 (δ_{H} 1,04) verificou-se NOE no sinal relativo à H-5 (δ_{H} 1,42). Quando o sinal de H-2 (δ_{H} 3,79) foi irradiado

foi possível observar NOE também entre os sinais δ_H 0,86 (H-13) e δ_H 0,91 (H-12), respectivamente. Baseados nestas informações e na estereoquímica C-12 foi elucidado como tendo uma configuração α e o substituinte 2-OH com configuração β (HEYMANN *et al.*, 1994).

Com relação à conformação do anel C, observou-se NOE entre o próton metilênico H-10 em δ_H 1,99 e o sinal H-5 em δ_H 1,42 e entre o próton metilênico H-12 em δ_H 1,56 e H-11 (δ_H 1,66). Em ambas as conformações cadeira o sinal de H-12 (δ_H 1,56) e H-11 (δ_H 1,66) poderiam ter uma estereoquímica 1,3-diaxial e, portanto apresentar proximidade espacial. Da mesma forma, H-10 (δ_H 1,99) poderia ser axial e assim ser espacialmente próximo do próton 5-metino. Além disso, no espectro de COSY foi possível observar o acoplamento entre o próton δ_H 0,91 (H-12 β) e o sinal em δ_H 1,07 (H-11 β) e o sinal em δ_H 3,32 (H-9), respectivamente, que poderia ser explicado em termos de acoplamento a longa distância via interações W (HEYMANN *et al.*, 1994).

Baseado nestes resultados e também pela natureza do sinal de H-9 (singleto largo) a estereoquímica do substituinte hidroxil em H-9 foi definido como α (9 *R*). No anel B da molécula, a conformação bote pode ser preferencial a conformação cadeira, os prótons 6- e 10- podem ser forçados perto uns dos outros, levando então a instabilidade devido a fatores estéricos como racionalizado por AEBI *et al.* (1954 *apud* HEYMANN *et al.*, 1994). Desta forma, os resultados obtidos por HEYMANN *et al.* (1994) estão de acordo com a estereoquímica proposta anteriormente.

Clovane-2 β ,9 α -diol (IV)**TABELA 4.1:** Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz/100 MHz) do clovane-2 β ,9 α -diol (IV).

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz) (HEYMANN <i>et al.</i> , 1994)	δ_{C} (ppm)
1		44,4		44,6
2	3,78 (dd; 10,1; 5,8)	80,9	3,79 (dd; 10,5; 5,5)	80,8
3	1,50 (dd; 10,1; 11,8)	47,7	1,51 (dd; 10,5; 11,5)	47,5
	1,70 (dd; 11,8; 5,8)		1,71 (dd; 11,5; 5,5)	
4		37,13		37,1
5	1,43 (m)	50,6	1,42 (m)	50,6
6	1,32 (m); 1,35 (m)	20,7	1,32 (m); 1,35 (m)	20,7
7	1,11 (m); 1,46 (m)	33,3	1,11 (m); 1,50 (m)	33,2
8		*no		34,7
9	3,31 (sl)	75,1	3,32 (sl)	75,1
10	1,64 (m); 1,99 (m)	26,2	1,64 (m); 1,99 (m)	26,0
11	1,07 (m); 1,66 (m)	26,4	1,07 (m); 1,66 (m)	26,4
12	0,91 (d; 12,8)	35,6	0,91 (dl; 12,5)	35,6
	1,53 (d; 12,8)		1,56 (d; 12,5)	
13	0,84 (s)	25,4	0,86 (s)	25,4
14	1,02 (s)	31,5	1,04 (s)	31,4
15	0,95 (s)	28,3	0,96 (s)	28,4

*no = não observado.

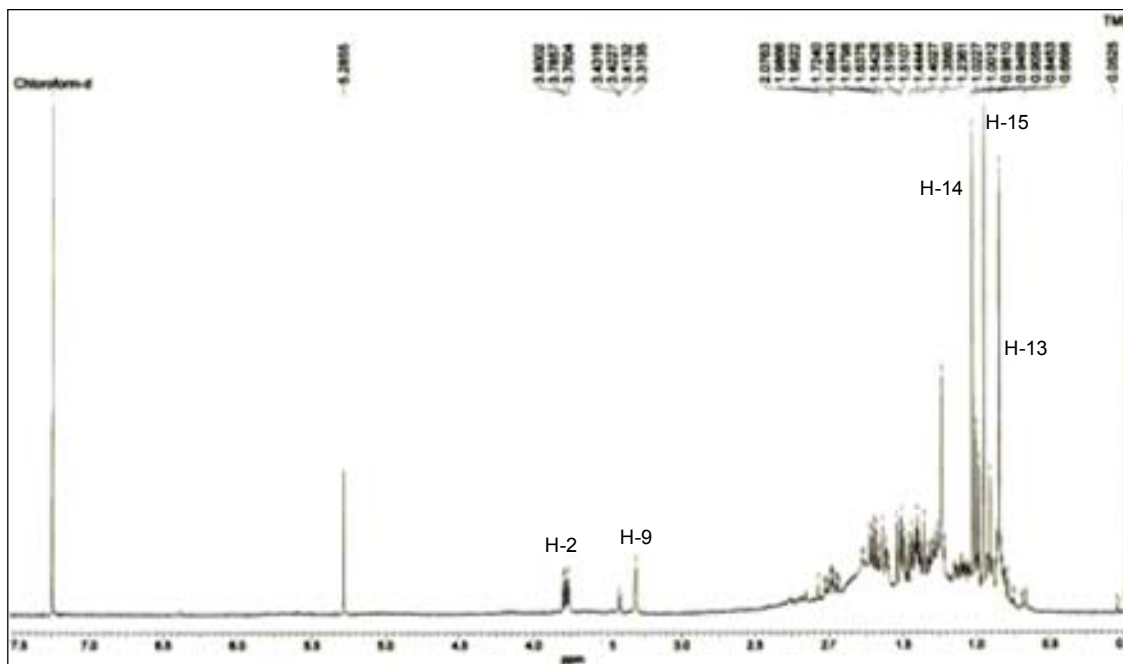


FIGURA 4.5: Espectro de RMN ^1H do clovane-2 β ,9 α -diol (IV) (CDCl_3 , 400 MHz).

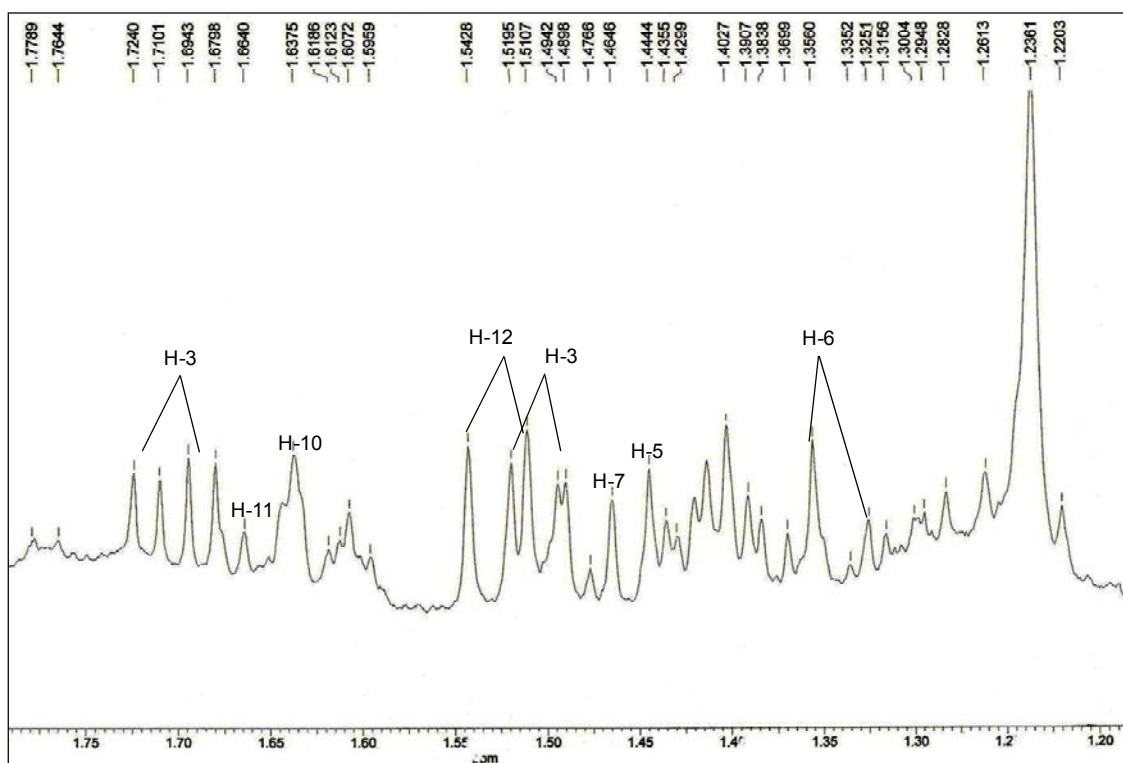


FIGURA 4.6: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância (IV) (CDCl_3 , 400 MHz).

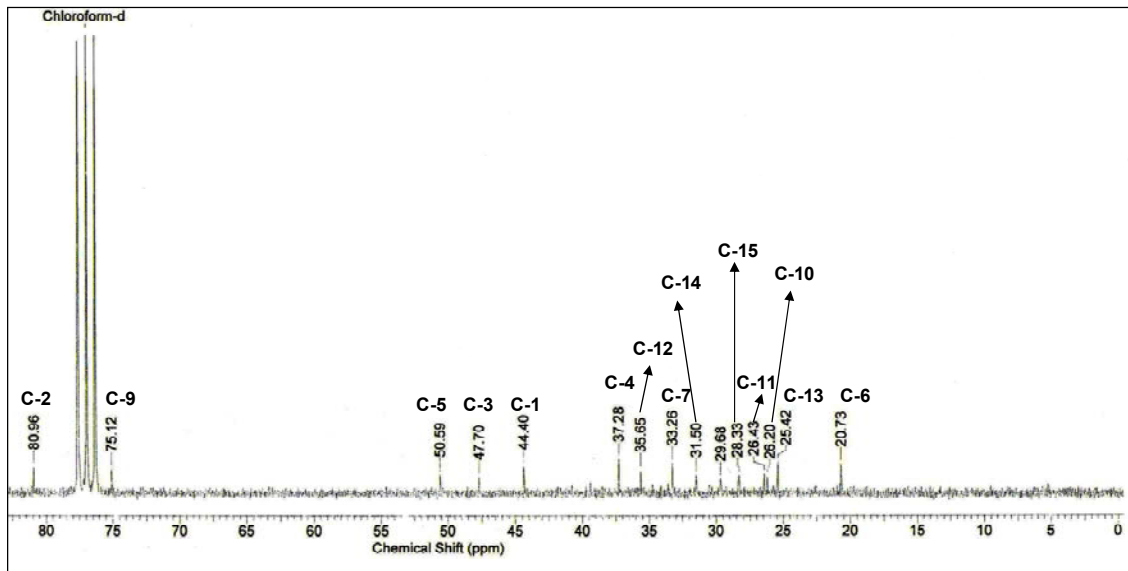


FIGURA 4.7: Espectro de RMN ^{13}C do clovane-2 β ,9 α -diol **IV** (CDCl_3 , 50 MHz).

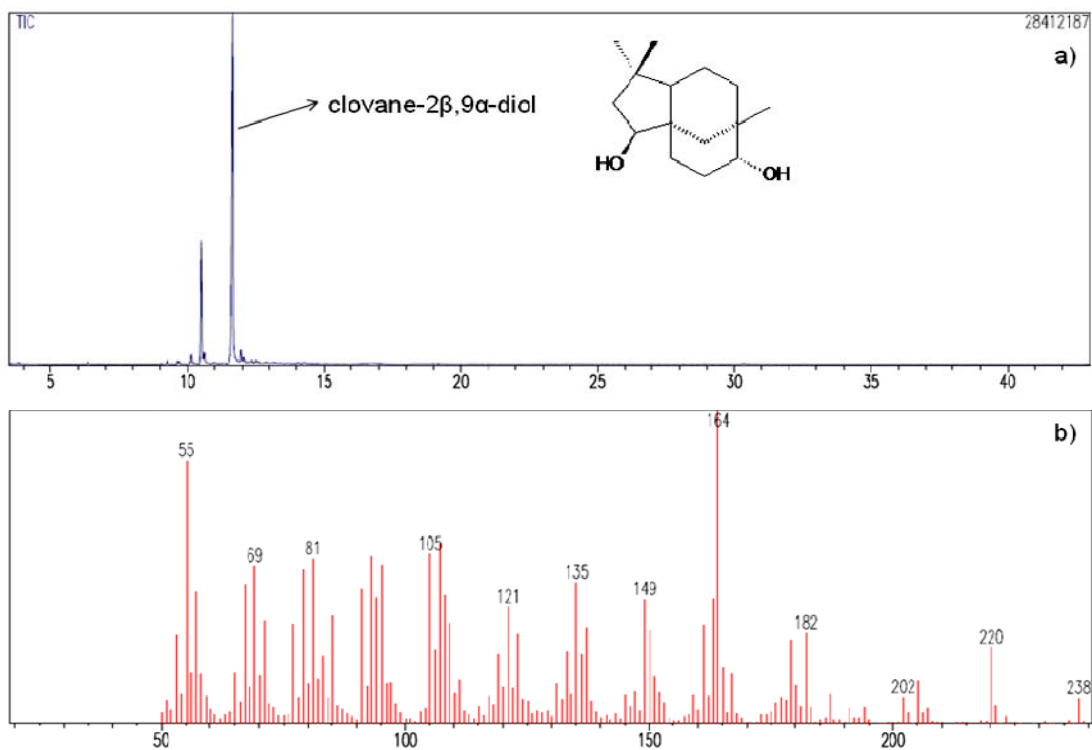


FIGURA 4.8: a) Cromatograma e espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) do clovane-2 β ,9 α -diol (**IV**, b).

Quando analisadas por CCDA e expostas à luz ultravioleta (254 nm) as cumarinas apresentam uma fluorescência azulada, que se constitui uma forte característica dessa classe de metabólitos secundários (GRAY e WATERMAN, 1978).

O espectro de UV das cumarinas mostra bandas de absorção em 274 e 311 nm, atribuídas aos anéis benzeno e pirano, respectivamente. A introdução de um grupo metil no núcleo da cumarina resulta num pequeno deslocamento batocrômico. A introdução de um grupo hidroxil causa deslocamento batocrômico na principal banda de absorção (274 nm) (MURRAY *et al.*, 1982). O espectro da umbeliferona, cumarina com a posição 7 oxigenada, mostra bandas com forte absorção em 217 e 315-330 nm. Já as furanocumarinas lineares (psoralenos) mostram quatro zonas de absorções 205-225, 240-225, 260-270, 298-316 nm. As furanocumarinas angulares (angelicinas) podem ser distinguidas das lineares pela ausência das bandas 242-245 e 260-270 nm, características da série linear (MURRAY *et al.*, 1982).

O infravermelho (IV) é uma técnica espectroscópica usada principalmente para identificar grupos funcionais. As cumarinas são isômeras das cromonas, mas as duas classes diferem consideravelmente em seu espectro de IV. A frequência do estiramento do grupo carbonil em cumarinas (α -pironas) é observada na região de 1700-1750 cm^{-1} enquanto que nas cromonas (γ -pironas) é encontrado em aproximadamente 1650 cm^{-1} (MURRAY *et al.*, 1982). Duas ou três bandas de fraca a média intensidade podem ser observadas na região de 3025-3175 cm^{-1} devido ao estiramento da vibração da ligação C-H do pirano, do benzeno e do anel furano. A frequência do estiramento do grupo pirano-carbonila C=O é usualmente encontrada na região de 1700-1750 cm^{-1} e da ligação C=C na região de 1600-1660 cm^{-1} , que normalmente apresentam três bandas de forte absorção no espectro de IV das cumarinas (MURRAY *et al.*, 1982).

As cumarinas apresentam características bastante comuns em seus espectros de RMN ^1H , facilitando sua caracterização. Quando não estão substituídas nas posições C-3 e/ou C-4 apresentam dois dubletos em

aproximadamente δ_H 6,30 e 7,60 ($J = 9,5 - 10$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, característico de hidrogênio de ligação dupla *cis* conjugada com grupo lactônico e com anel aromático (MURRAY *et al.*, 1982). O hidrogênio H-4 encontra-se sempre mais desblindado que o H-3 devido à contribuição da estrutura de ressonância com o grupo carbonil, na qual se verifica uma deficiência eletrônica sobre o carbono a que este se encontra ligado (MURRAY *et al.*, 1982). Quando há substituintes oxigenados na posição C-5, o sinal do duplete referente ao hidrogênio H-4, que normalmente aparece em δ_H 7,60, encontra-se numa região mais desblindada do espectro, ou seja, acima de δ_H 8,00. Este fato se deve ao efeito de anisotropia da ligação C-O da posição C-5 e do efeito de compressão estérica (MURRAY *et al.*, 1982).

Em estudo anterior, (ALBARICI, 2006) foram isoladas de *Rauia* sp oito substâncias que apresentam o mesmo padrão de sinais na região aromática do espectro de RMN 1H (FIGURA 4.9; p. 106), quatro dubletos integrando para um hidrogênio cada, característicos de sistemas AX. Dois deles em δ_H 6,1-6,4 e δ_H 7,5-8,3 com constante de acoplamento em torno de 9,5 Hz referentes aos hidrogênios das posições 3 e 4, respectivamente e outros dois com constante de acoplamento de aproximadamente 8,5 Hz em torno de δ_H 6,6-6,9 e em δ_H 7,1-7,5 indicando substituição no carbono 8. Um singlete integrando para três hidrogênios em aproximadamente δ_H 3,8 indica a presença de uma metoxila na posição 7 (MURRAY *et al.*, 1982).

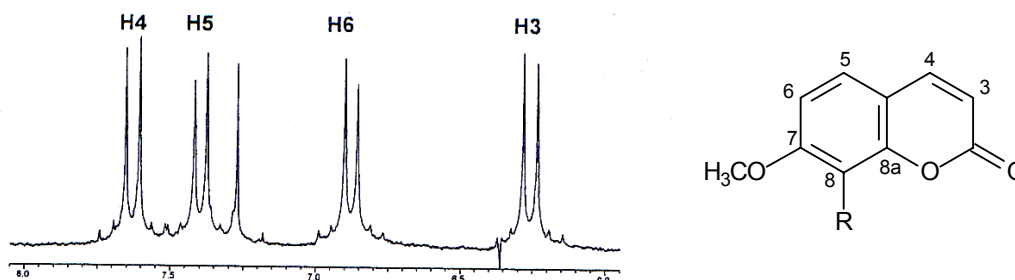
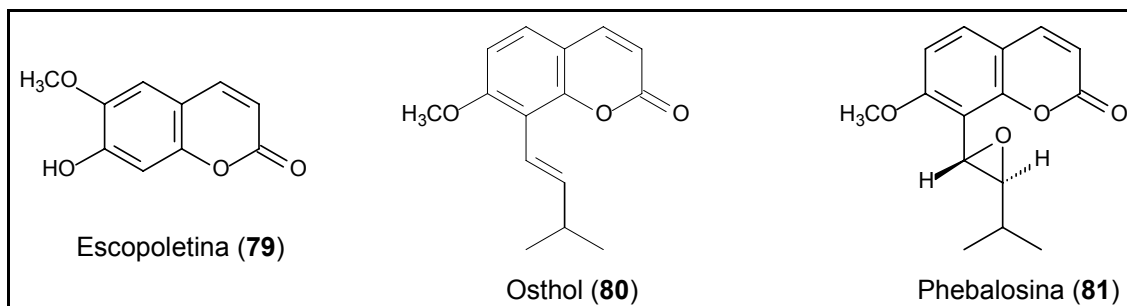


FIGURA 4.9: Região aromática do espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) de cumarinas substituídas nas posições 7 e 8.

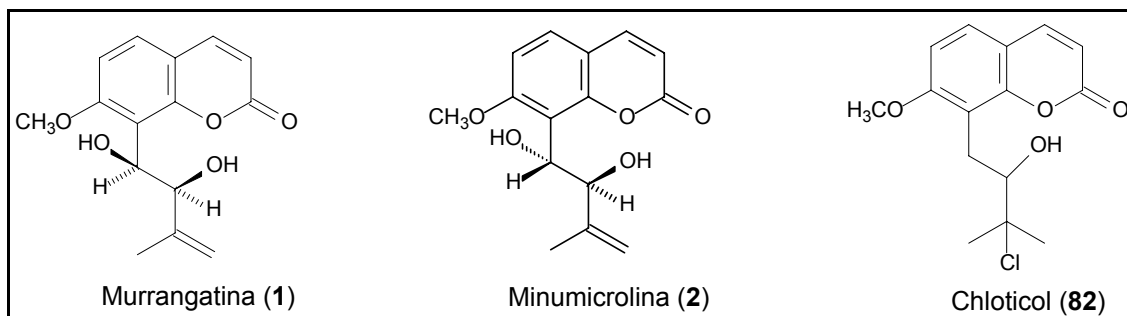
O espectro de RMN ^{13}C de cumarinas substituídas na posição 8 apresenta sinais característicos para o esqueleto cumarínico: δ_C 160,8-160,0

(C-2); δ_C 113,6-112,8 (C-3); δ_C 143,9-143,3 (C-4); δ_C 113,6-111,8 (C-4a); δ_C 130,0-126,6 (C-5); δ_C 108,1-107,1 (C-6); δ_C 161,6-159,7 (C-7); δ_C 116,1-112,1 (C-8); δ_C 154,7-152,0 (C-8a); δ_C 56,4-55,8 (C-7-OMe) (SUAREZ e MONACHE, 1991).

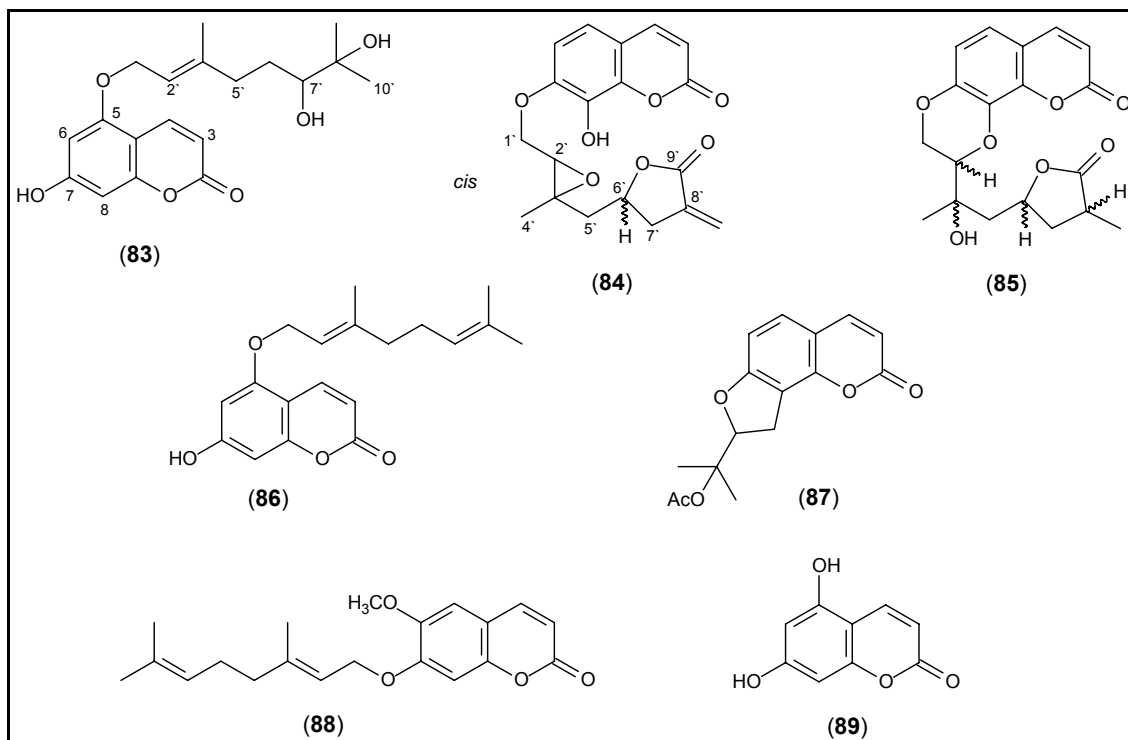
Há relatos na literatura sobre diferentes atividades biológicas das cumarinas. No item 1.6.2 (p. 43) mostrou-se a atividade inseticida das furanocumarinas sobre larvas de *Spodoptera littoralis* e *Heliothis virescens* (STEVENSON *et al.*, 2003). VIEIRA *et al.* (2001) testou a atividade das cumarinas escopoletina (**79**), osthol (**80**), phebalosina (**81**) (p. 107) sobre a forma tripomastigota do *Tripanossoma cruzi* as quais mostraram valores de IC_{50} de 59, 268 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Isto demonstra que esta classe de substâncias de produtos naturais possuem atividade inibitória sobre a enzima gGAPDH.



Há relatos ainda (ITO *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2005) sobre o efeito antitumoral das metoxicumarinas substituídas nas posições 7 e 8. No primeiro estudo, a murrangatina (**1**), minumicrolina (**2**) e chlotalcol (**82**) mostraram significativa inibição das células Raji (cancerígenas, p. 107).



No segundo trabalho verificou-se que as sete cumarinas testadas apresentaram atividade no ensaio *in vitro* sobre as mesmas células. As cumarinas testadas foram: murrayacoumarina A (**83**), murrayacoumarina B (**84**), murrayacoumarina C (**85**), 5-geraniiloxi-7-hidroxycumarina (**86**), acetato columbianetina (**87**), 7-geraniiloxi-6-metoxicumarina (**88**) e 5,7-dihidroxycumarina (**89**) (p. 108).



4.4.1 – Identificação estrutural da substância V

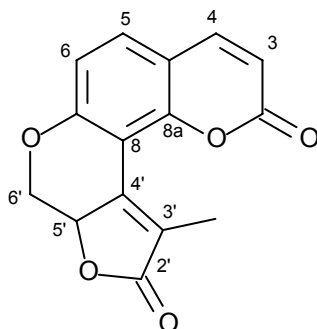
A substância **V** foi isolada da fração **d** do extrato diclorometânico do caule (RCD_d) e da subfração **i** da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMD_i) como descrito no item 3.6.2 (p. 68) e 3.6.5 (p. 72). Esta substância apresentou-se como sólido cristalino de coloração branca e sua identificação foi realizada através de dados dos espectros de RMN ¹H (FIGURA 4.10, p. 111), RMN ¹³C (FIGURA 4.11, 111) e dados de CG-EM em comparação com dados da literatura (VELOSO *et al.*, 1997, TABELA 4.2, p. 110).

No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.10, p. 111; TABELA 4.2, p. 110) verificou-se a presença de quatro dubletos na região dos sinais de hidrogênios aromáticos, característicos do esqueleto cumarínico substituídos na posição 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) conforme discutido no item 4.4 (p. 104). Sendo assim, os sinais em δ_{H} 7,67 ($J = 9,4$ Hz), δ_{H} 7,45 ($J = 8,6$ Hz), δ_{H} 6,89 ($J = 8,6$ Hz) e δ_{H} 6,34 ($J = 9,4$ Hz) foram atribuídos à H-4, 5, 6 e 3, respectivamente. Ainda no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.10; p. 111) observou-se sinais referentes a seis hidrogênios, um sinal em δ_{H} 5,10 (1H, ddq, $J = 12,0; 6,0; 2,0$ Hz) atribuído a H-5'; sinais em δ_{H} 4,85 (1H, dd, $J = 10,0; 6,0$ Hz) e δ_{H} 3,96 (1H, dd, $J = 12,0; 10,0$ Hz) atribuídos a H-6' e um dubleto em δ_{H} 2,33 (3H, d, $J = 2,0$ Hz) referente à H-7'. De acordo com os resultados obtidos, juntamente com a ausência do sinal da metoxila em aproximadamente δ_{H} 3,96, pode-se propor que houve ciclização entre os substituintes dos carbonos 7 e 8.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 4.11, p. 111; TABELA 4.2, p. 110) verificou-se a presença de 13 sinais relativos à carbonos, no entanto dois carbonos quaternários referentes à C-4a e C-2' não foram observados, uma vez que a substância foi isolada em pequena quantidade e o tempo de aquisição do espectro não foi suficiente para que os sinais referentes a estes carbonos quaternários fossem adquiridos.

O espectro de massas (I.E.) apresentou pico do íon molecular M^+ 270 (FIGURA 4.12b, p. 112), estando de acordo com sua fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, confirmando a proposta estrutural para a cumarina **V**.

A estrutura da substância **V** foi definida como a cumarina conhecida como rauianina, após análise dos dados de RMN ^1H , de CG-EM e a comparação com dados da literatura (VELOSO *et al.*, 1997), isolada anteriormente de *Rauia resinosa* e de *Rauia* sp (VELOSO *et al.*, 1997; ALBARICI, 2006). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão apresentados na TABELA 4.2 (p. 110) e no ESQUEMA 4.2 (p. 112) tem-se a proposta de fragmentação dos principais picos observados no espectro de massas da rauianina (**V**).



Rauianina (V)

TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da Rauianina (V)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz) (VELOSO <i>et al.</i> , 1997)	δ_{C} (ppm)
2		159,5		159,5
3	6,34 (d; 9,4)	113,1	6,35 (d; 9,6)	113,6
4	7,67 (d; 9,4)	143,3	7,73 (d; 9,6)	143,5
4a		*no		113,0
5	7,45 (d; 8,6)	131,0	7,50 (d; 8,6)	131,2
6	6,89 (d; 8,6)	113,9	6,92 (d; 8,6)	113,9
7		157,3		157,3
8		105,8		105,6
8a		151,5		151,7
2'		*no		174,0
3'		145,3		145,3
4'		123,3		122,9
5'	5,10 (ddq; 12,0; 6,0; 2,0)	71,1	5,15 (ddq; 11,8; 6,0; 1,7)	71,0
6'	4,85 (dd; 10,0; 6,0)	69,7	4,85 (dd; 10,3; 6,0)	69,5
	3,96 (dd; 12,0; 10,0)		3,95 (dd; 11,8; 10,3)	
7'	2,33 (d; 2,0)	12,6	2,32 (d; 1,7)	12,5

*no = não observado.

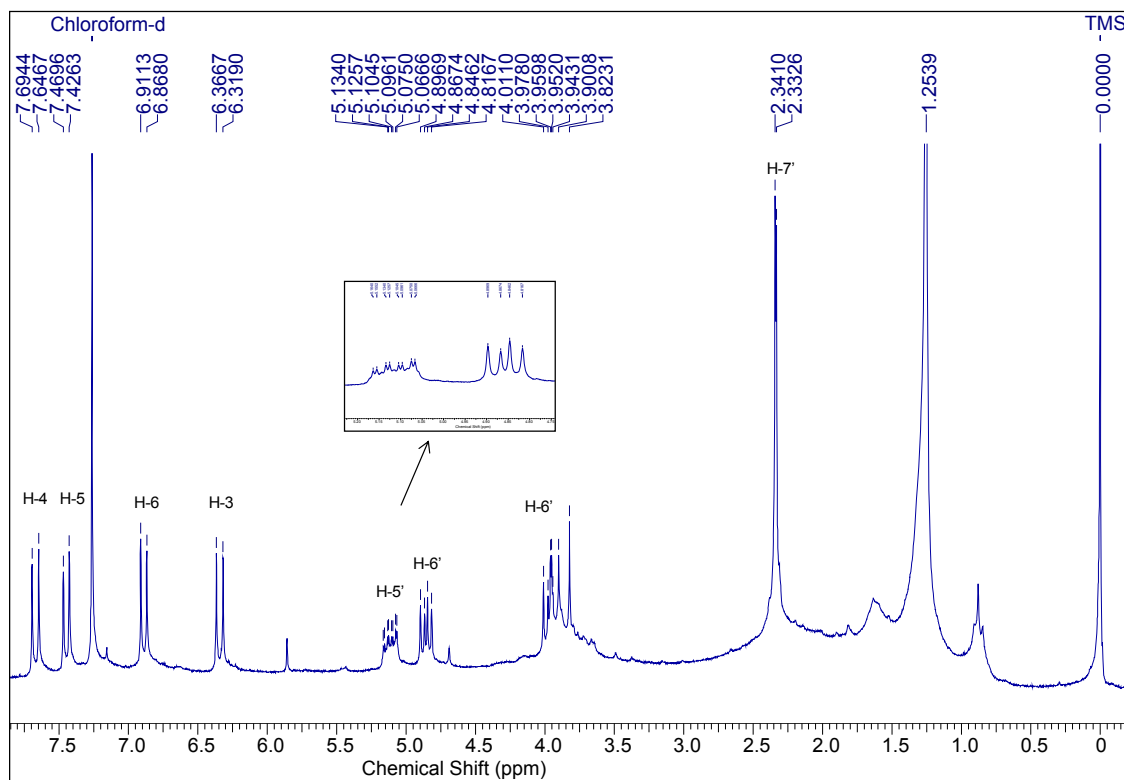


FIGURA 4.10: Espectro de RMN ^1H da rauianina (V) (CDCl_3 , 200 MHz).

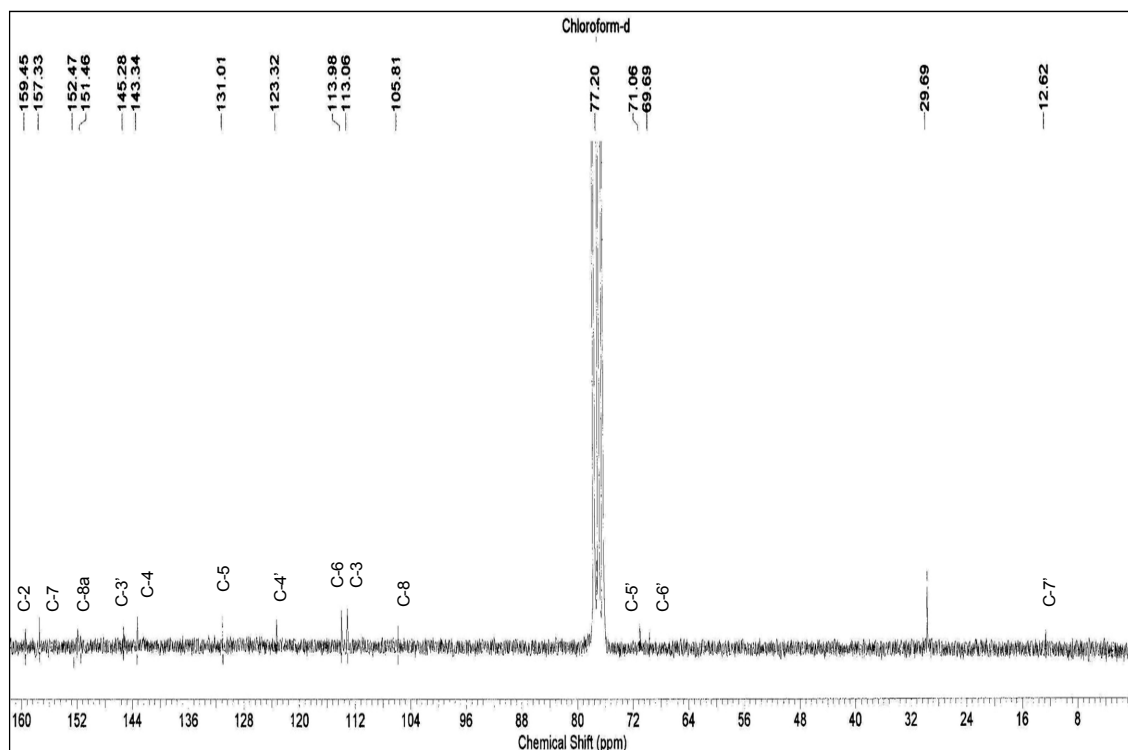


FIGURA 4.11: Espectro de RMN ^{13}C da rauianina (V) (CDCl_3 , 50 MHz).

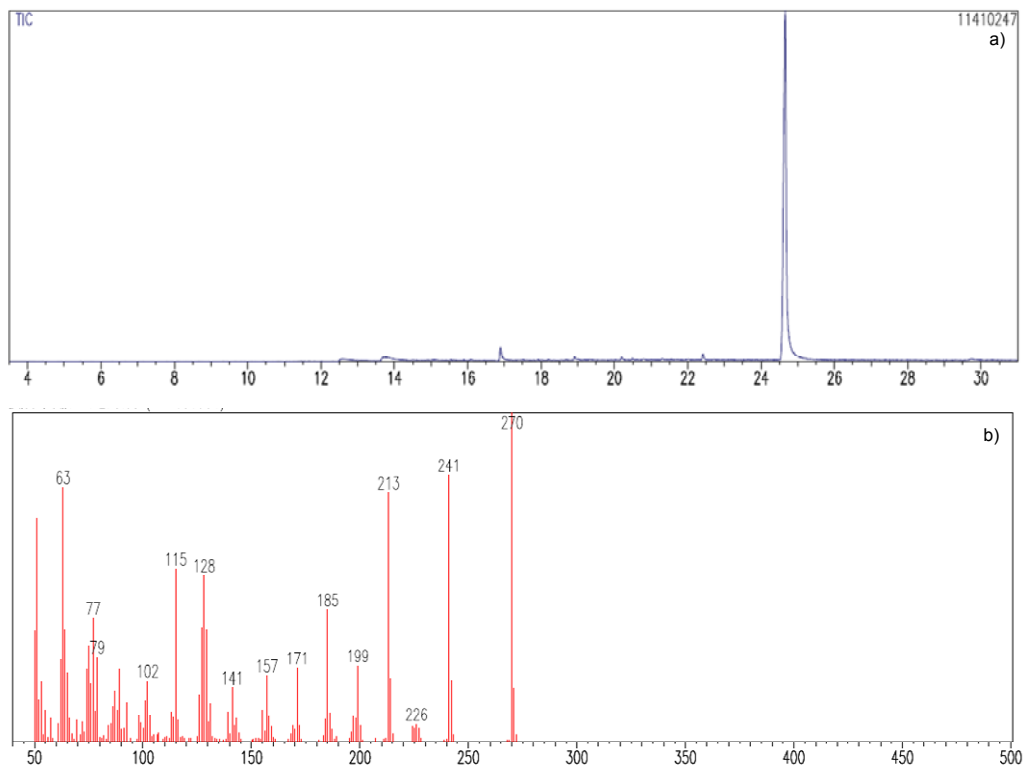
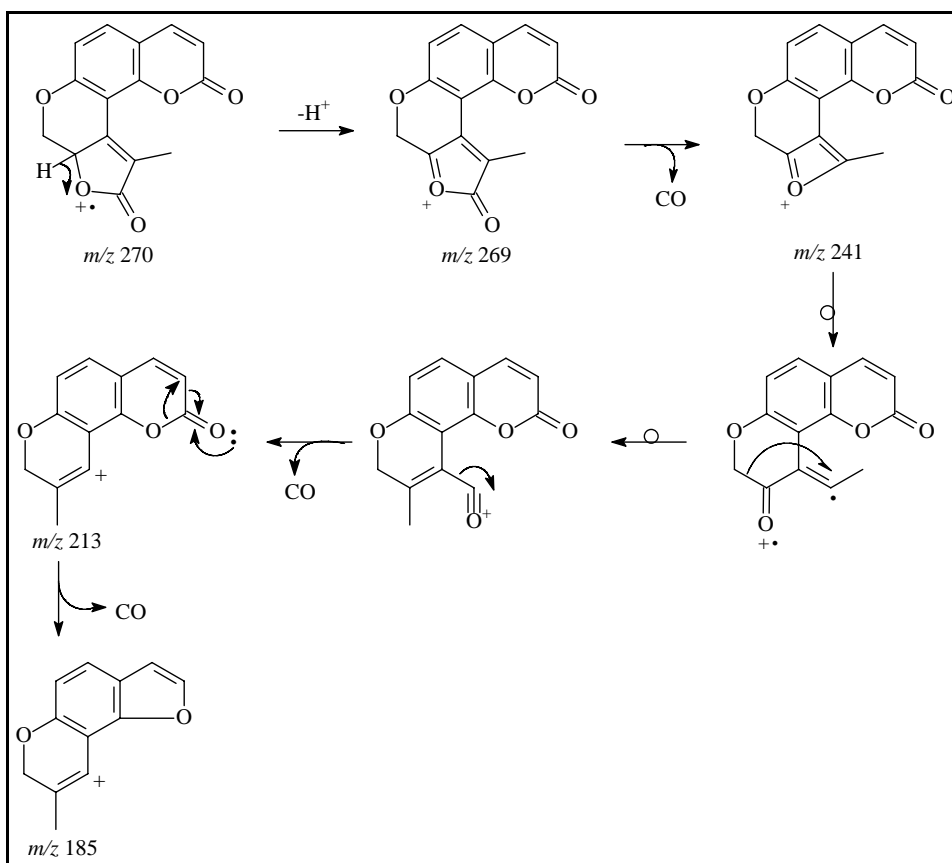


FIGURA 4.12: a) Cromatograma e b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) da rauianina.



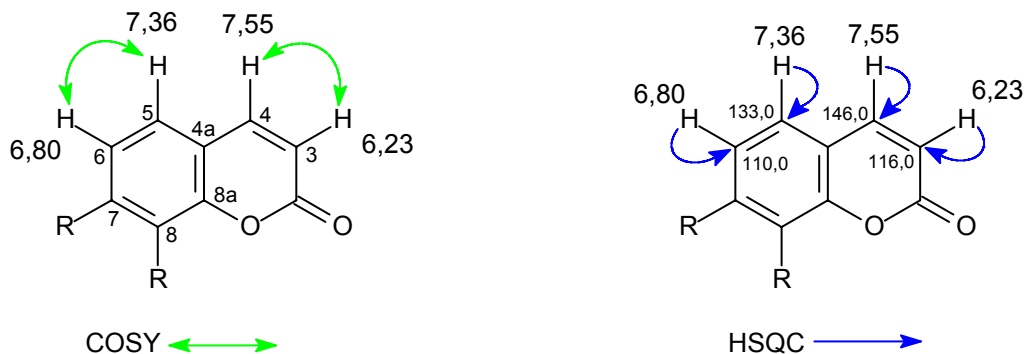
ESQUEMA 4.2: Proposta de fragmentação para a rauianina (V).

4.4.2 – Identificação estrutural das substâncias VI-VIII

As substâncias **VI-VIII** foram identificadas na fração **d** do extrato diclorometânico do caule (RCD_d) de *Rauia* sp conforme item 3.6.2 (p. 68) em mistura.

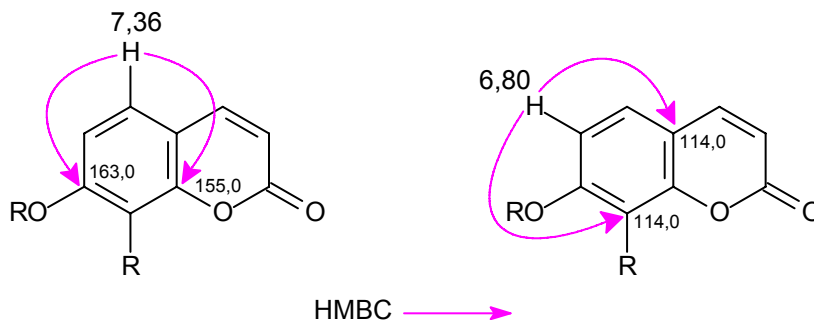
A identificação da cumarina **VI** foi realizada através de dados dos espectros de RMN ¹H, COSY, HSQC, HMBC e dados de CG-EM em comparação com dados da literatura (BARIK *et al.*, 1983; VELOZO, 1995; KINOSHITA *et al.*, 1996; TALAPATRA *et al.*, 1973).

Através da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURAS 4.13-4.14, p. 118; TABELA 4.3, p. 117) observou-se a presença de uma mistura de compostos sendo os sinais majoritários característicos de uma cumarina, de acordo com discussão no item 4.4 (p. 104). Os dubletos característicos de cumarinas 7,8-dissubstituídas foram atribuídos aos hidrogênios H-4, H-5, H-6 e H-3 com seus respectivos sinais em δ_H 7,55 ($J = 8,4$ Hz), δ_H 7,36 ($J = 8,4$ Hz), δ_H 6,80 ($J = 8,4$ Hz) e δ_H 6,23 ($J = 8,4$ Hz). No espectro de COSY (FIGURA 4.15, p. 119) confirmou-se os acoplamentos dos hidrogênios H-3 e 4 do anel lactônico e H-5 e 6 do anel benzeno. Os hidrogênios H-4, H-5, H-6 e H-3 mostram correlação no espectro de HSQC (FIGURA 4.16, p. 119) com os carbonos em δ_C 146,0 (C-4); δ_C 133,0 (C-5); δ_C 110,0 (C-6) e δ_C 116,0 (C-3).

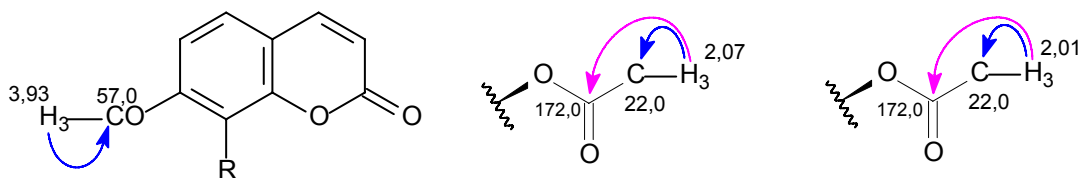


O mapa de correlações HMBC mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos ligados a duas e três ligações. Através da análise do mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.17, p. 120) verificou-se que o hidrogênio H-5 (δ_H 7,36) mostra correlação com um sinal de carbono em δ_C 163,0 referente à C-7 e com um sinal em δ_C 155,0 atribuído à C-8a. O

hidrogênio H-6 (δ_H 6,80) mostra correlações com o sinal em δ_C 114,0 relativo aos carbonos quaternários C-4a e C-8.

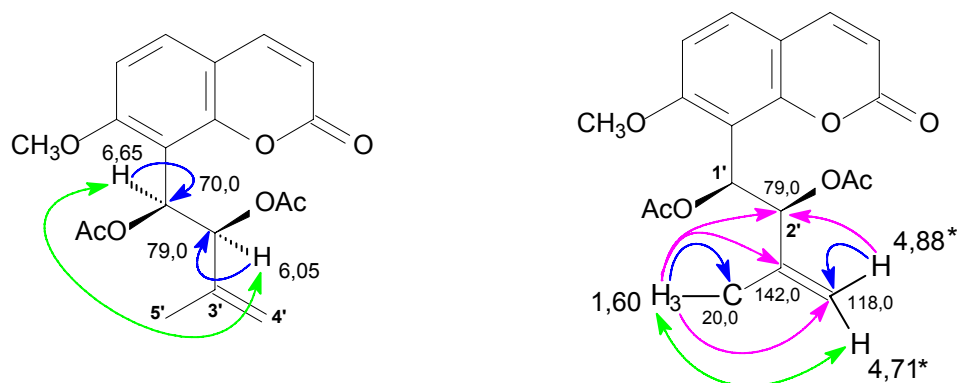


Observa-se também três singletos, integrando pra três hidrogênios cada, com deslocamentos em δ_H 3,93; δ_H 2,04 e δ_H 2,01 (RMN 1H , FIGURA 4.13, p. 118) atribuídos a uma metoxila (OCH_3 -7) e os outros dois sinais sugerem a presença de duas metilas de grupo acetato. No mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.16, p. 119) verificou-se a correlação dos hidrogênios da metoxila com o carbono em δ_C 57,0 e dos hidrogênios das duas metilas com sinal em δ_C 22,0 relativo aos dois carbonos dos grupos acetis.

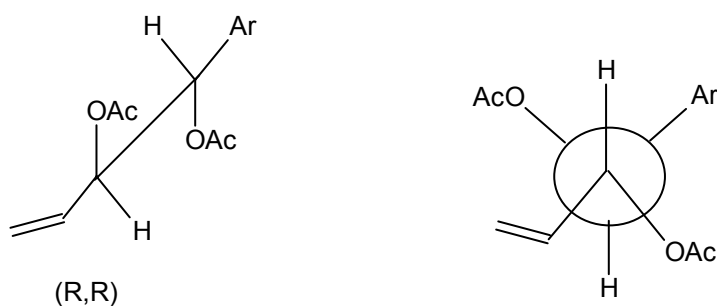


Ainda no espectro de RMN 1H (FIGURA 4.13, p. 118) observou-se dois dubletos em δ_H 6,65 e 6,05 ($J = 9,6$ Hz) atribuídos respectivamente a H-1' e H-2' da unidade isoprênica, e dois multipletos referentes à H-4' com sinal em δ_H 4,88 (1H) e δ_H 4,71 (1H) que indicam a presença de um grupo metilênico terminal. No mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.20) observou-se que estes multipletos se correlacionam com o carbono em δ_C 118,0 e que H-1' (δ_H 6,65) e H-2' (δ_H 6,05) mostram correlações com dois carbonos carbinólicos δ_C 70,0 e com δ_C 79,0, respectivamente. Através do espectro de COSY (FIGURA 4.15, p. 119) verificou-se que o sinal do hidrogênio H-4' (δ_H 4,71) apresenta correlação com um sinal em δ_H 1,60 que sugere a presença de uma metila a qual foi atribuída à H-5'. No mapa de correlações HMBC observou-se que os hidrogênios H-4' (δ_H 4,71) e H-5' (δ_H 1,60) se correlacionam com um

sinal em δ_C 79,0 referente à C-2'; o hidrogênio H-5' (δ_H 1,60) mostra correlação também com o carbono em δ_C 142,0 atribuído à C-3' (FIGURA 4.17, p. 120).

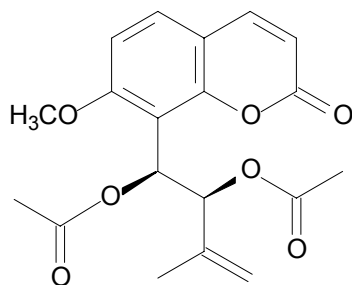


A estrutura do diacetato de murrangatina possui dois centros quirais e desta forma quatro possíveis estereoisômeros [dois pares de enantiômeros entre si (R,S)/(S,R) e (R,R)/(S,S)]. Comparando-se as projeções de Newman dos estereoisômeros pode-se verificar que a conformação mais estável é aquela em que os maiores grupos substituintes possuem menor interação repulsiva, ou seja, maior distância entre os grupos substituintes, e, portanto, os enantiômeros (R,R) ou (S,S) são os mais estáveis. Analisando as multiplicidades dos sinais de RMN 1H de H-1' e H-2' para os enantiômeros (R,S) ou (S,R) observou-se que têm-se dois singletos largos (QUADER *et al.*, 1992). Por outro lado para os enantiômeros (R,R) ou (S,S) (DAS *et al.*, 1984) aparecem dois dubletos com grande valor de constante de acoplamento entre os hidrogênios H-1' e H-2'. Desta forma, de acordo com DAS *et al.* (1984), a configuração da cumarina (VI) isolada, devido à observação de dois dubletos para os hidrogênios H-1' e H-2' (RMN 1H , FIGURA 4.8; TABELA 4.2), possui configuração relativa (R,R) ou (S,S).



O cromatograma obtido por CG-EM (I.E.) (FIGURA 4.18a, p. 121) apresentou duas bandas e pico 2 ($t_R = 21,4$) foi caracterizado como aquele correspondente à cumarina (**VI**) e não foi possível visualizar o seu pico do íon molecular (M^+ : 360 Daltons; FIGURA 4.18b, p. 121), sendo que o EM mostra apenas o fragmento de m/z 300 referente a perda de um grupo acetato, sob a forma de ácido acético ($C_2H_4O_2$), cuja perda é muito freqüente, e desta forma a cumarina (**VI**) possui fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_7$, a qual confirma a presença do diacetato de murrangatina nesta fração.

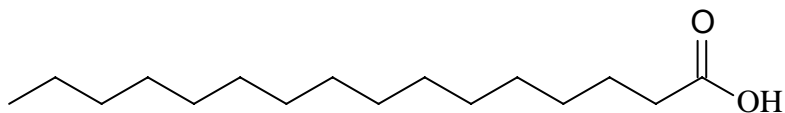
Os dados espectroscópicos observados e encontrados na literatura (QUADER *et al.*, 1992) para a substância (**VI**), representados na TABELA 4.3 (p. 117), confirmam a presença do diacetato de murrangatina na mistura analisada. Esta cumarina foi isolada anteriormente pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar por VELOSO (1995) de *Rauia resinosa* e de *Rauia* sp por ALBARICI (2006). No ESQUEMA 4.3 (p. 122) está representada a proposta para os principais fragmentos observados para a cumarina (**VI**) em seu espectro de massas.



Diacetato de murrangatina (**VI**)

Analisando o espectro de RMN 1H original, sem a supressão do mesmo, verificou-se o sinal em δ_H 1.27 em alta intensidade caracterizando um cadeia longa de metilenos de ácidos graxos, assim como o tripleto distorcido em δ_H 0,90 e o multiplete em δ_H 2,40 caracterizam a presença na mistura de ácido graxo. Na análise do CG-EM (FIGURA 4.18a, p. 121) da fração (RCD_d), verificou-se um pico ($t_R = 16,9$) com íon molecular m/z 256 (FIGURA 4.18c, p. 121) e fragmentação característica de ácido graxo, a qual permitiu identificá-lo como ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (**VII**) com fórmula molecular

$C_{16}H_{32}O_2$, de acordo com comparações da biblioteca NIST do equipamento e da literatura.



Ácido hexadecanóico (VII)

TABELA 4.3: Dados de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz/80 MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz /50 MHz/100 MHz) do diacetato de murrangatina (VI)

H/C	δ_H (ppm), J (Hz)		δ_C (ppm)		
	(VI)	BARIK <i>et al.</i> , 1983	(VI)	VELOSO 1995 ^a	KINOSHITA <i>et al.</i> , 1996 ^b
2			*no	160,2	160,2
3	6,23 (d; 8,4)	6,23 (d; 9,0)	116,0	113,4	113,4
4	7,55 (d; 8,4)	7,56 (d; 9,0)	146,0	144,7	143,8
4a			114,0	110,4	113,3
5	7,36 (d; 8,4)	7,36 (d; 8,8)	133,0	130,3	128,6
6	6,80 (d; 8,4)	6,81 (d; 8,8)	110,0	105,1	107,9
7			163,0	161,0	160,2
7-OMe	3,93 (s)	3,94 (s)	57,0	56,5	56,3
8			114,0	114,7	116,1
8a			155,0	156,0	152,9
1'	6,65 (d; 9,6)	6,70 (d; 9,0)	70,0	63,4	69,2
2'	6,05 (d; 9,6)	6,06 (d; 9,0)	79,0	83,0	78,4
3'			*no	126,0	143,9
4'	4,88 (sl); 4,71 (m)	4,80 (2H, m)	118,0	109,2	113,1
5'	1,60 (sl)	1,62 (s)	20,0	17,4	17,4
2 x OAc	2,01 (s); 2,07 (s)	1,99 (s); 2,01 (s)	22,0	20,7	
O ₂ COCH ₃			172,0	170,3	

a) VELOSO, 1995: dados de RMN ^{13}C do diacetato de murrangatina ($CDCl_3$, 50MHz)

b) KINOSHITA *et al.*, 1996: dados de ^{13}C da murrangatina ($CDCl_3$, 100MHz)

*no: não observado

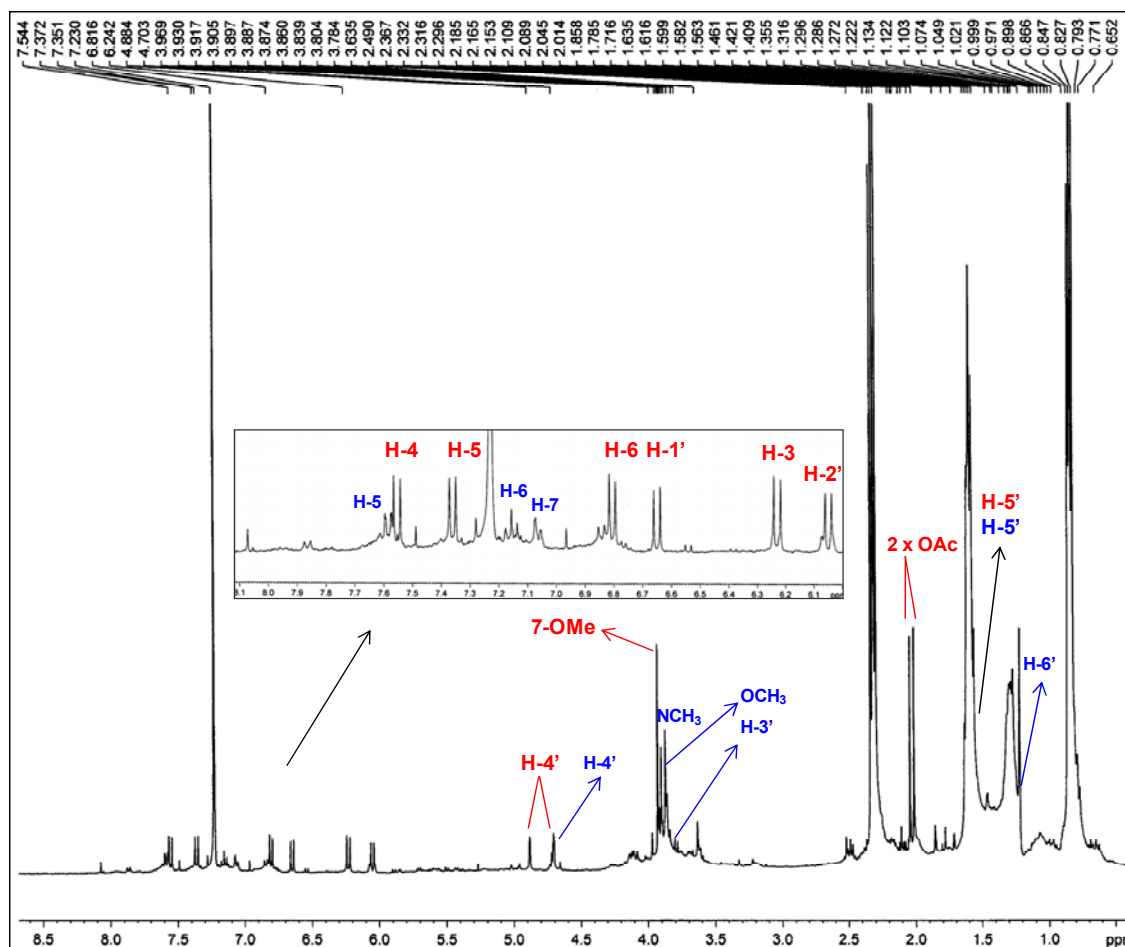


FIGURA 4.13: Espectro de RMN ^1H das substâncias **VI**, **VII**, **VIII** (CDCl_3 , 400 MHz) com supressão do sinal em 1.26 ppm.

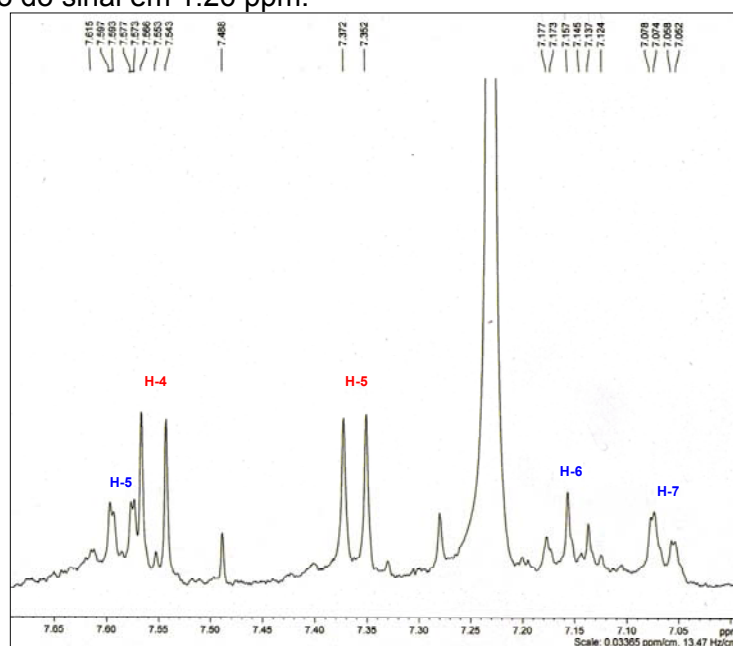


FIGURA 4.14: Ampliação do espectro de RMN ^1H da **cumarina VI** e **alcalóide VIII** (CDCl_3 , 400 MHz).

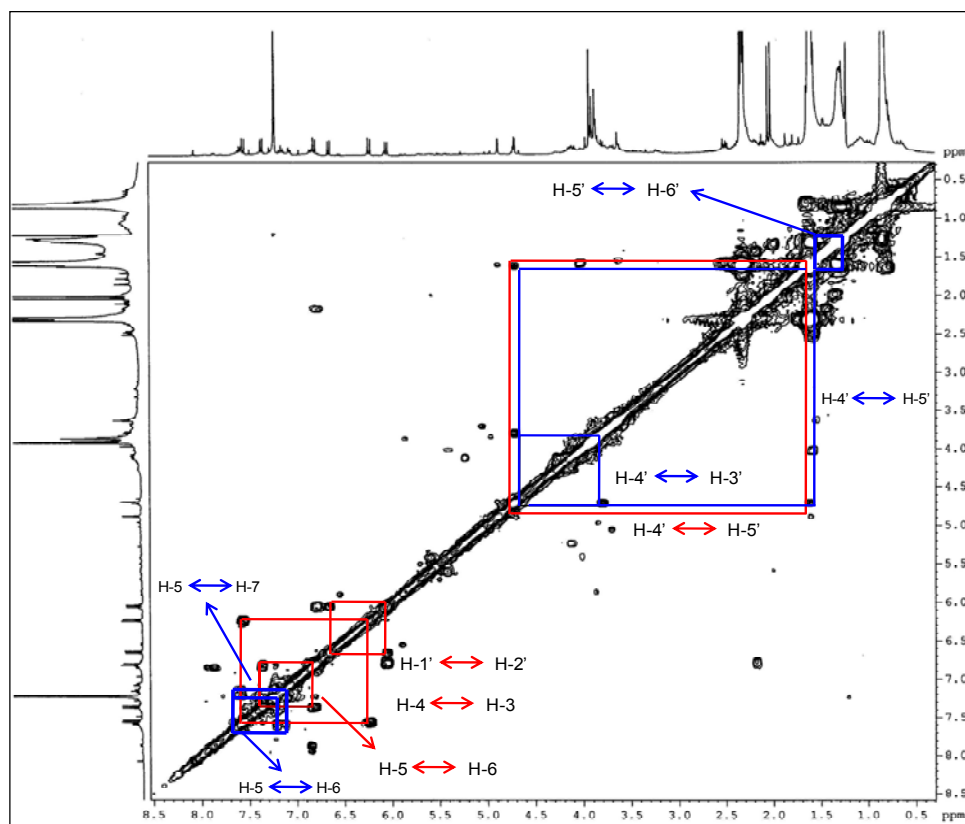


FIGURA 4.15: Espectro de COSY do diacetato de murrangatina (VI), do ácido hexadecanóico (VII) e zantodiolina (VIII) (CDCl₃, 400 MHz).

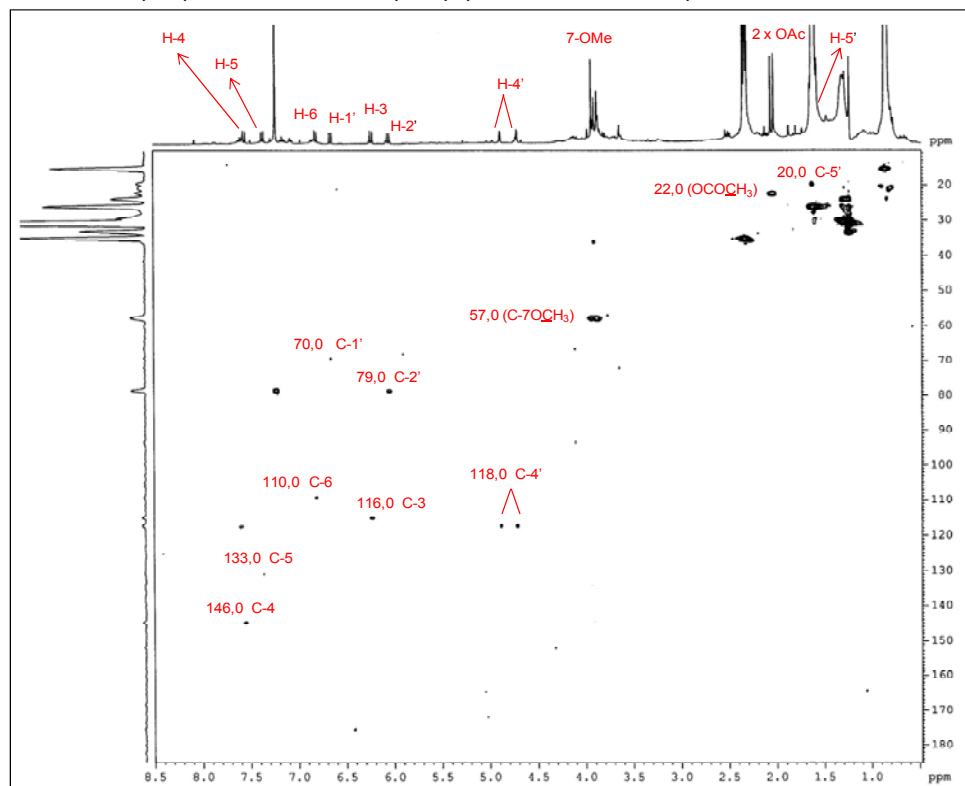


FIGURA 4.16: Mapa de correlações HSQC substâncias VI, VII, VIII (CDCl₃, 400 MHz).

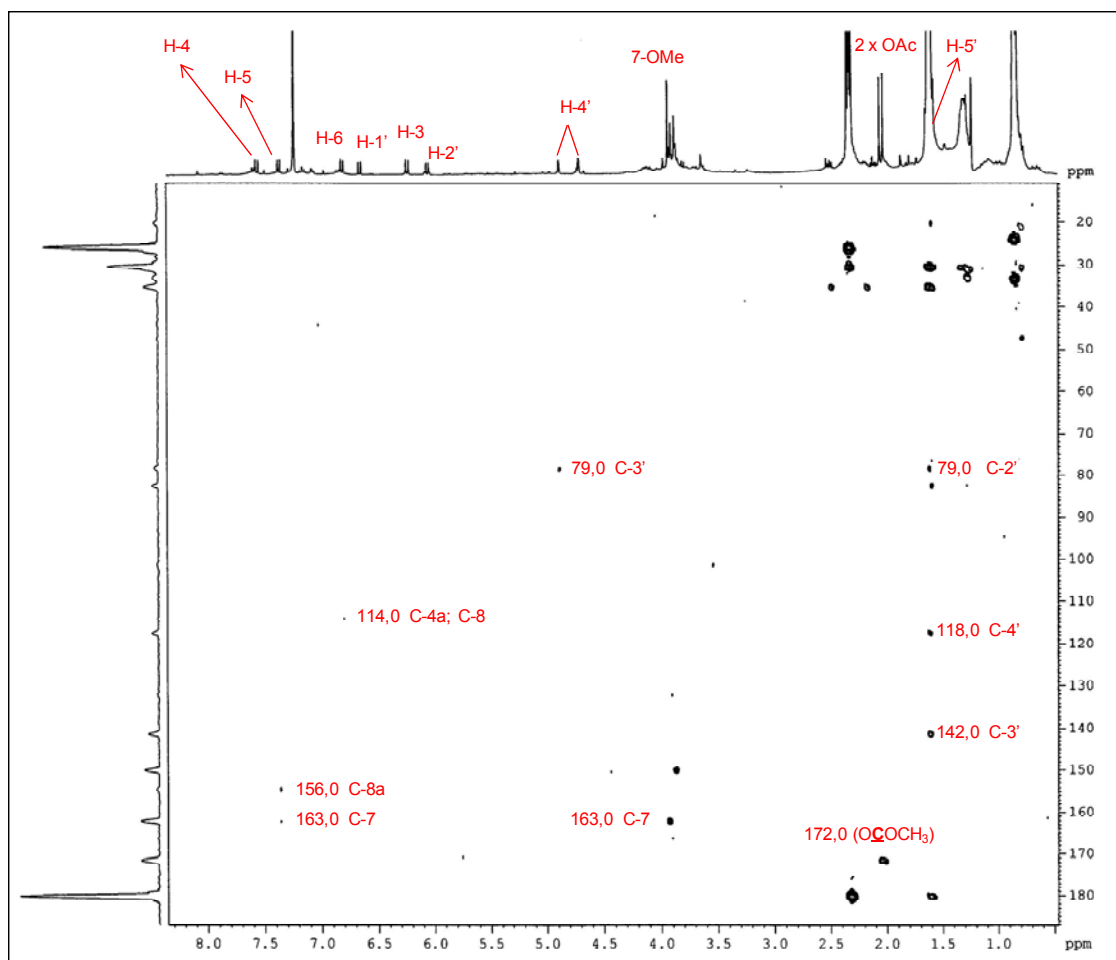


FIGURA 4.17: Mapa de correlações HMBC substâncias (VI-VIII) (CDCl₃, 400 MHz)

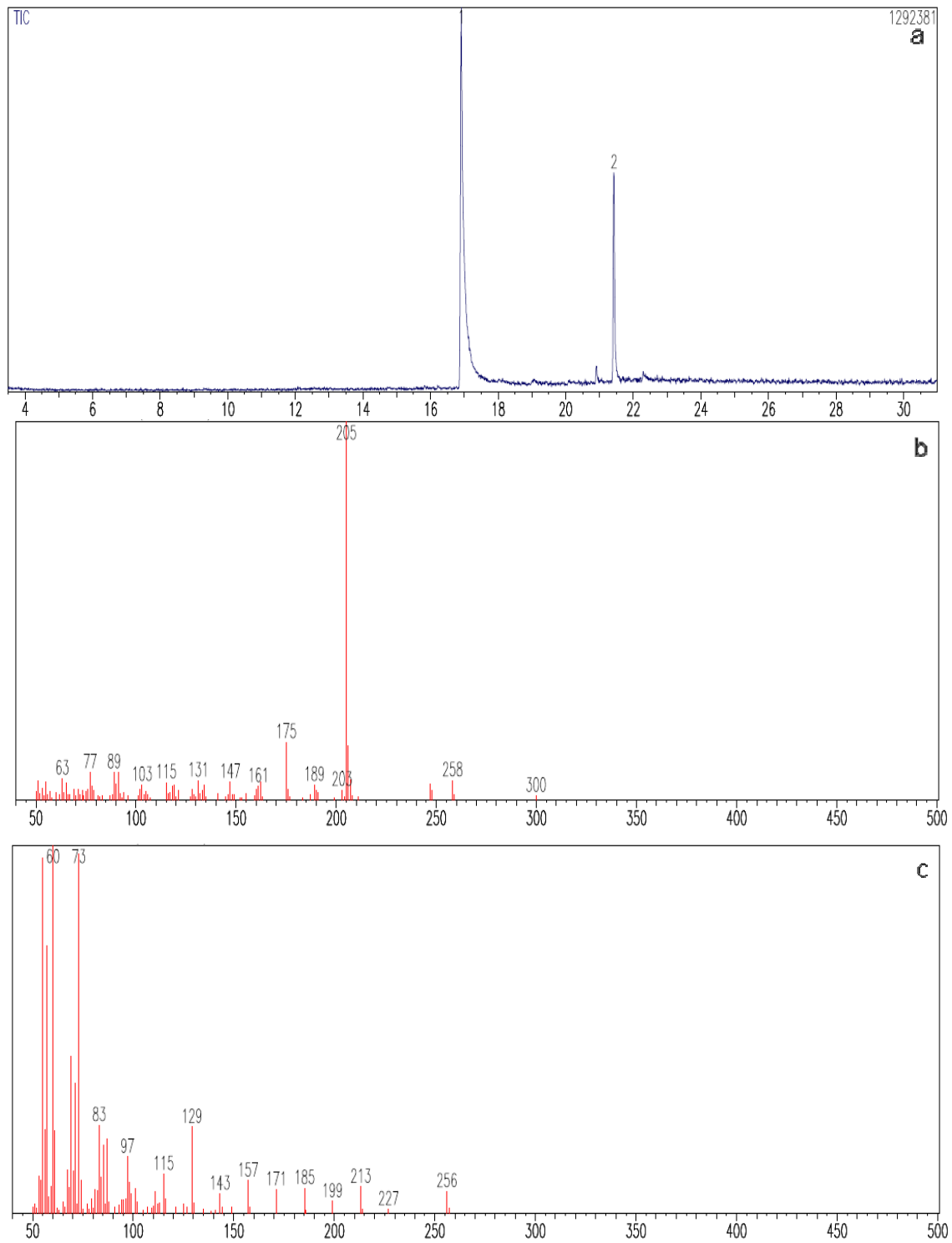
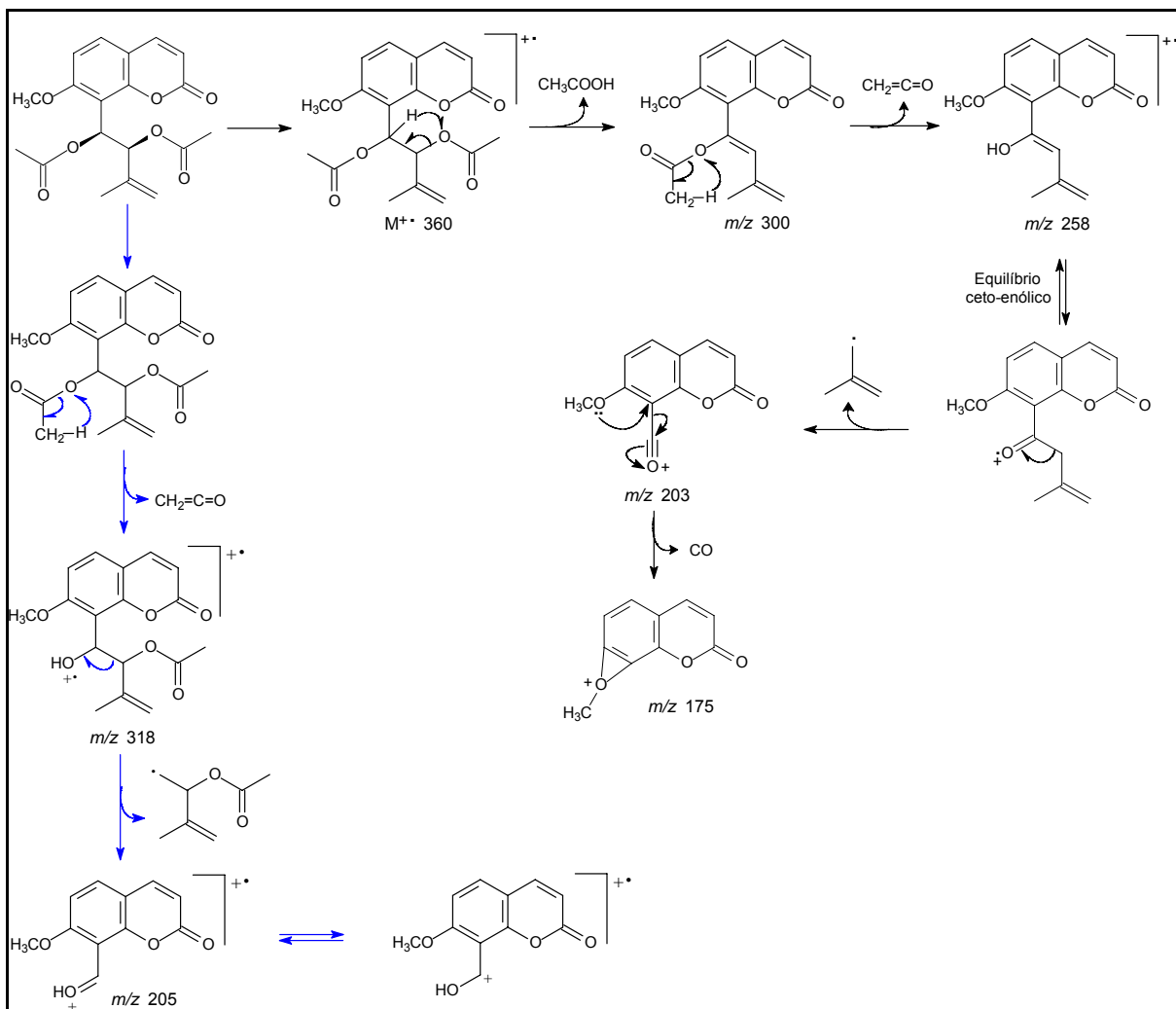
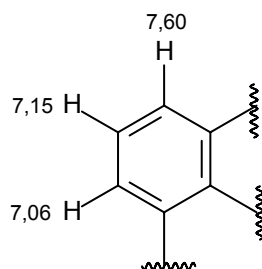


FIGURA 4.18: a) Cromatograma da fração contendo a mistura do ácido graxo (VII, banda 1) e da cumarina (VI, banda 2); b) EM do diacetato de murrangatina (VI) e c) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) do ácido palmítico (VII).



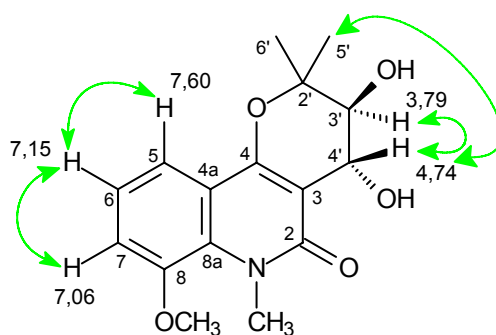
ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para o diacetato de murrangatina (VI).

Analisando o espectro de RMN 1H (FIGURAS 4.13-4.14, p. 118; TABELA 4.4, p. 104) pode-se verificar também a presença de um terceiro composto que apresenta na região dos sinais para hidrogênios aromáticos do espectro um duplo dubleto δ_H 7,60 (H-5, $J = 8,0; 1,6$ Hz), um triplete em δ_H 7,15 (H-6, $J = 8,0$ Hz) e outro duplo dubleto δ_H 7,06 (H-7, $J = 8,0; 1,6$ Hz) sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído.

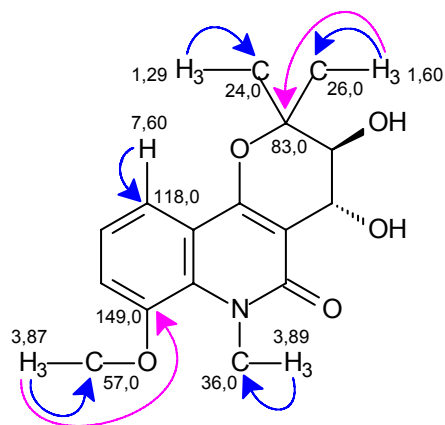


Observa-se ainda a presença de dois singletos em δ_H 3,89 (3H) e δ_H 3,87 (3H) os quais indicam dois grupos metilas ligados a heteroátomos (O ou N), além de dois sinais de prótons metínicos em δ_H 4,74 (H-4'), δ_H 3,79 (H-3') e dois multipletos na região entre 1,0 e 2,0 ppm do espectro de RMN 1H que sugerem a presença de duas metilas. Esses dados indicam a presença de uma unidade dihidrodiidropirano fundida a um núcleo 2-quinolona, alcalóide piranoquinolônico com anel pirano reduzido (CHEN *et al.*, 1997).

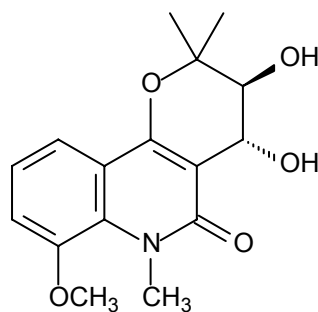
A constante de acoplamento, $J = 8,0$ Hz entre os hidrogênios H-3' (3,79) e H-4' (4,74), sugere a configuração relativa *trans* para o sistema diol (CHEN *et al.*, 1997). No espectro de COSY (FIGURA 4.15, p. 119) verifica-se a correlação entre os hidrogênios H-5 (7,60)/H-6 (7,15); H-5 (7,60)/H-7 (7,06); H-3' (3,79)/H-4' (4,74) e H-4' (4,74)/H-5' (1,60).



A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.16, p. 119) mostra as correlações dos hidrogênios com os carbonos diretamente ligados: δ_H 7,60 com δ_C 118,0 (C-5); δ_H 3,87 com δ_C 57,0 (OCH₃); δ_H 3,89 com δ_C 36,0 (NCH₃); δ_H 1,29 com δ_C 24,0 (C-6') e δ_H 1,60 com δ_C 26,0 (C-5'). Através da expansão do mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.17, p. 120) observou-se a correlação do hidrogênio δ_H 3,87 (OCH₃) com o carbono em δ_C 149,0 atribuído à C-8 e do hidrogênio em δ_H 1,60 (H-5') com um sinal em δ_C 83,0 referente à C-2'.



A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C observados e aqueles encontrados na literatura (CHEN *et al.*, 1997) indicaram a presença do alcalóide zantodiolina (**VIII**) nesta fração e estão representados na TABELA 4.4 (p. 125). Este alcalóide foi isolado também de *Rauia* sp por ALBARICI (2006).



Zantodiolina (**VIII**)

TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz; CDCl_3 + gotas de MeOD, 50 MHz) da zantodiolina (**VIII**)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	(VIII)	CHEN <i>et al.</i> , 1997	(VIII)	ALBARICI, 2006
2			*no	164,6
3			*no	105,9
4			*no	154,8
4^a			*no	118,1
5	7,60 (dd; 8,0; 1,6)	7,62 (dd; 8,0; 1,4)	118,0	116,1
6	7,15 (t; 8,0)	7,19 (t; 8,0)	*no	122,7
7	7,06 (dd; 8,0; 1,6)	7,09 (dd; 8,0; 1,4)	*no	114,2
8			149,0	148,0
8^a			*no	130,7
2'			83,0	80,9
3'	3,79 (d; 8,0)	3,83 (d; 7,8)	*no	74,9
4'	4,74 (m)	4,73 (d; 7,8)	*no	67,8
5'	1,60 (m)	1,62 (s)	26,0	26,0
6'	1,29 (m)	1,30 (s)	24,0	19,2
NCH₃	3,89 (s)	3,90 (s)	36,0	34,8
OCH₃	3,87 (s)	3,93 (s)	57,0	56,6

*no = não observado.

4.4.3 – Identificação estrutural da substância IX

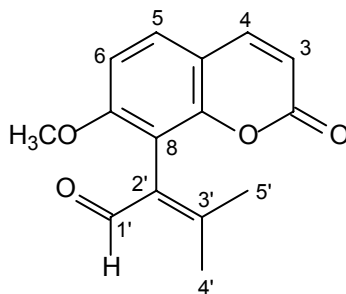
A substância **IX** foi isolada da fração **d** do extrato diclorometânico do caule (RCD_d) de *Rauia* sp conforme descrito no item 3.6.2 (p. 68). A identificação desta cumarina foi realizada através de dados dos espectros de RMN ^1H e CG-EM em comparação com dados da literatura (IMAI *et al.*, 1986; ITO e FURUKAWA 1990).

No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.19, p. 127; TABELA 4.5, p. 128) observou-se quatro dubletos na região do espectro de hidrogênios aromáticos, que indica a presença de um esqueleto cumarínico conforme discussão no

item 4.4 (p. 104) (MURRAY *et al.*, 1982). Desta forma atribuiu-se os deslocamentos δ_H 7,64 ($J = 9,5$ Hz), δ_H 7,44 ($J = 8,6$ Hz), δ_H 6,89 ($J = 8,6$ Hz) e δ_H 6,22 ($J = 9,5$ Hz) aos hidrogênios H-4, H-5, H-6 e H-3, respectivamente. Observou-se também um singlete em δ_H 3,83 atribuído a uma metoxila, e um singlete referente a um hidrogênio de aldeído em δ_H 10,22. Estes dados levam a supor que não houve ciclização entre os substituintes de C-7 e C-8. O espectro de RMN 1H (FIGURA 4.19, p. 127) apresentou ainda dois singletos em δ_H 2,43 e δ_H 1,79 referentes a duas metilas (H-4' e H-5') ligadas a um carbono sp^2 . Estas metilas possuem sinais diferentes devido à presença da carbonila, pois os elétrons π da ligação C=O blindam as zonas cônicas acima e abaixo do plano e desblindam as zonas laterais, desta forma o sinal da metila na posição *cis* à carbonila é mais desblindado (δ_H 2,43) do que o sinal da metila na posição *trans* (δ_H 1,79) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994). Os dados espectroscópicos de RMN observados e encontrados na literatura (ITO e FURUKAWA, 1990) para a murralongina (**IX**) estão apresentados na TABELA 4.5 (p. 128).

O espectro de massas (I.E.) (FIGURA 4.20, p.128) apresentou pico do íon molecular M^+ 258, condizente com sua fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_4$, que confirma a estrutura de murralongina (**IX**). No ESQUEMA 4.4 (p. 129) está representada a proposta para os principais fragmentos observados para esta cumarina.

Esta cumarina foi isolada anteriormente de *Rauia* sp (ALBARICI, 2006) e em outras plantas da família Rutaceae, como por exemplo, espécies do gênero *Murraya* (KINOSHITA *et al.*, 1996, ITO e FURUKAWA 1990; IMAI *et al.*, 1989; KINOSHITA *et al.*, 1989; ITO e FURUKAWA 1987; IMAI *et al.*, 1986; TALAPATRA *et al.*, 1973a, TALAPATRA *et al.*, 1973b).



Murralongina (IX)

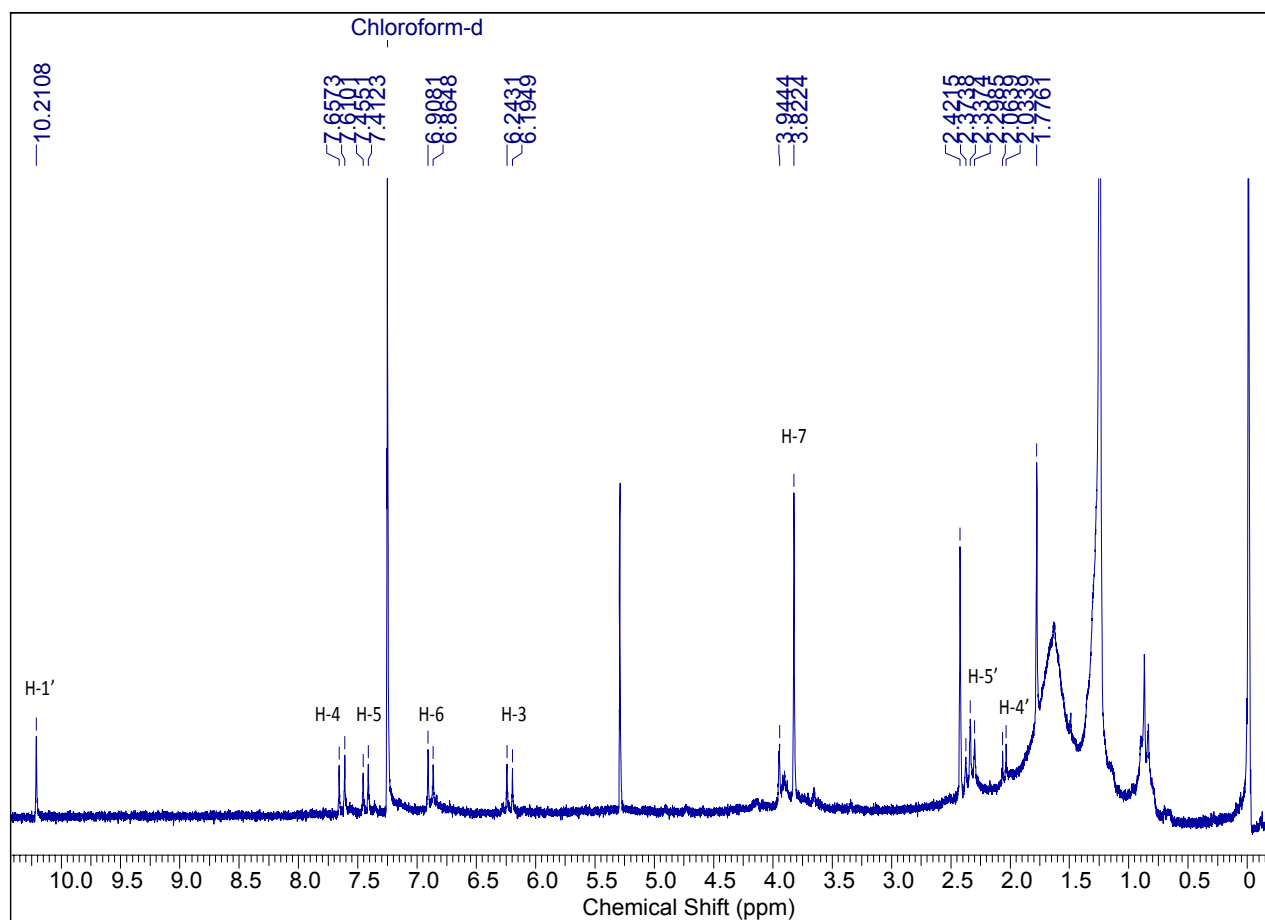
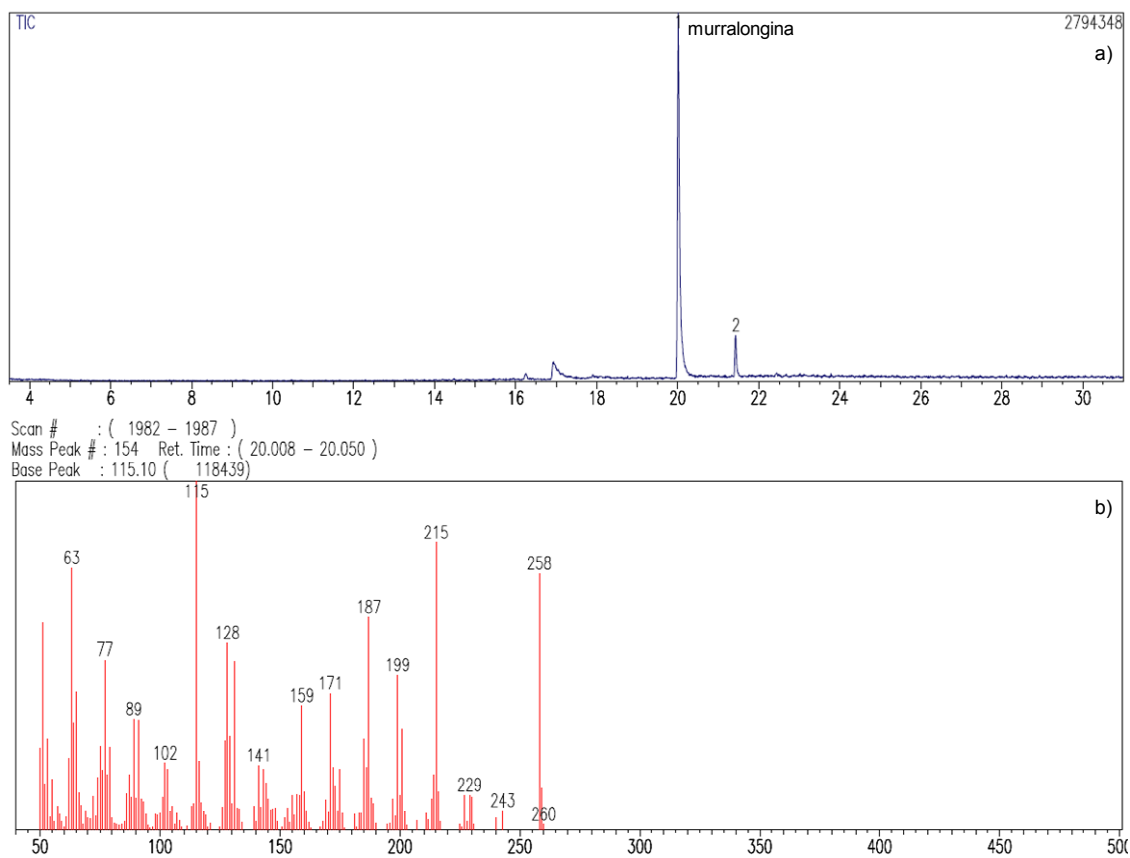
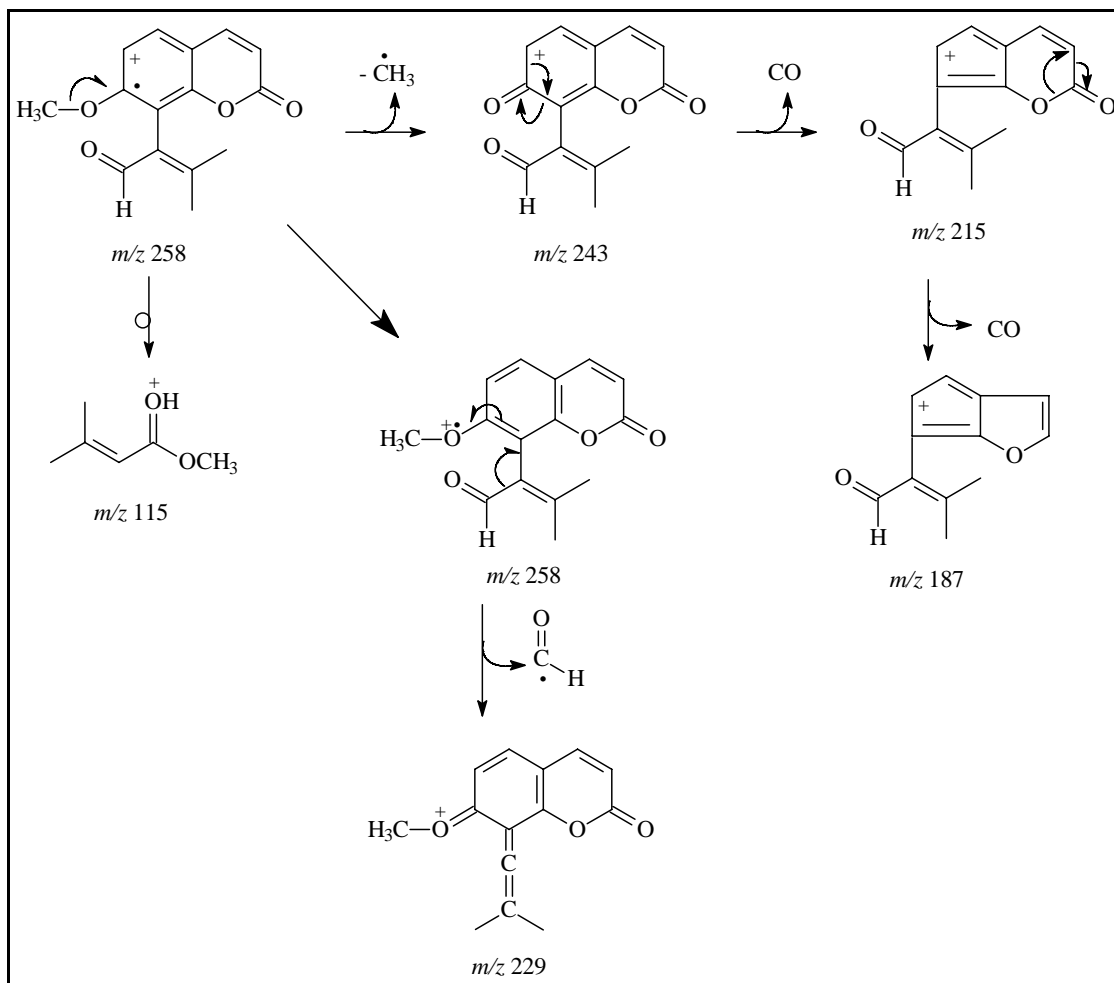


FIGURA 4.19: Espectro de RMN ^1H da murralongina (IX) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da murralongina (**IX**), CDCl_3 , 200 MHz.

H	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{H} (ppm), J (Hz), (ITO e FURUKAWA., 1990)
3	6,22 (d; 9,4)	6,23 (d; 9,4)
4	7,64 (d; 9,4)	7,65 (d; 9,4)
5	7,44 (d; 8,7)	7,50 (d; 8,7)
6	6,89 (d; 8,7)	6,92 (d; 8,7)
1'	10,21 (s)	10,22 (s)
4'	1,79 (s)	1,79 (s)
5'	2,43 (s)	2,43 (s)
7-OCH₃	3,83 (s)	3,83 (s)

**FIGURA 4.20:** a) Cromatograma da fração contendo a cumarina **IX**; b) espectro de massas (I.E. = 70 e.V.) de **IX** (murralongina, pico 1).



ESQUEMA 4.4: Proposta de fragmentação para a murralongina (IX).

4.4.4 – Biogênese das cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas em plantas da ordem Sapindales, principalmente nas famílias Rutaceae, Umbeliferae e Apiaceae, tanto na forma livre como glicosilada. Geralmente as cumarinas desta ordem são oxigenadas na posição C-7 e tem sua origem no ácido *trans-p*-hidroxicinâmico (*trans-p*-cumárico) que provem do caminho chiquimato e através de diversas transformações leva à formação da 7-hidroxycumarina (umbeliferona) (GRAY e WATERMAN, 1978).

O caminho chiquimato fornece uma rota alternativa para diversos compostos aromáticos, particularmente L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. Esta via é utilizada por microorganismos e plantas, mas não pelos animais,

conseqüentemente, os aminoácidos aromáticos essenciais para o homem devem ser obtidos pela dieta alimentar contendo vegetais. Fenilalanina e tirosina formam a base das unidades fenilpropano C_6C_3 encontradas em muitos produtos naturais, por exemplo, ácido cinâmico, lignanas, flavonóides e cumarinas, que juntamente com o triptofano são precursores de uma vasta gama de alcalóides. Além disso, é encontrado em muitos derivados simples do ácido benzóico, como por exemplo, ácido gálico, ácido *p*-benzóico e ácido *p*-aminobenzóico são produzidos através de ramificações na via do caminho chiquimato (DEWICK, 2001).

Na biossíntese das cumarinas, inicialmente ocorre a glicosilação da hidroxila em *para* do ácido cinâmico, com posterior oxidação na posição *orto* da cadeia lateral, seguida da glicosilação da hidroxila nesta posição (FIGURA 4.21, p. 131). Ocorre então a isomerização da dupla ligação da cadeia lateral e uma lactonização levando a formação da umbeliferona. A oxidação com posterior metilação na posição 6 da umbeliferona leva a formação da isoescopoletina. Todas as enzimas envolvidas nesta etapa já foram isoladas e caracterizadas (DEWICK, 2001, FIGURA 4.21, p. 131).

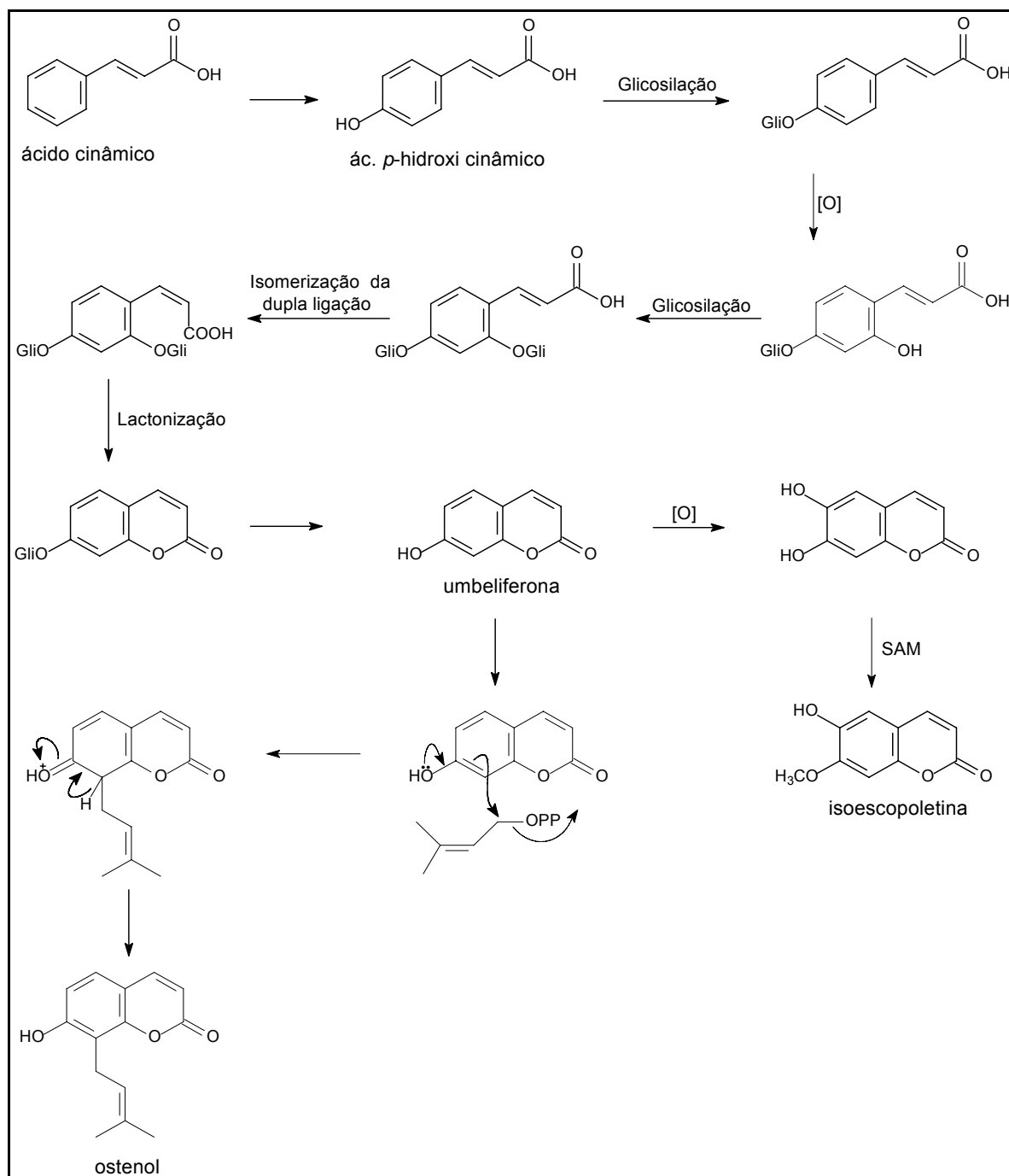


FIGURA 4.21: Proposta biogenética para as cumarinas (adaptada de DEWICK, 2001).

Como indicado na FIGURA 4.21 (p. 131) o esqueleto mais simples é o da umbeliferona e a maior característica de diversificação das cumarinas simples nas famílias Rutaceae e Umbelliferae é devido à incorporação de unidades de prenila. As prenilações nas posições 6 e 8 são comuns devido à presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador *orto* (DEWICK,

2001). Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico, o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações, geralmente iniciadas com a epoxidação da dupla ligação (FIGURA 4.22, p. 132). Em Rutaceae, a alquilação na posição 8 pode levar a uma série de estruturas com cadeias laterais oxidadas de forma estereoespecífica (GRAY e WATERMAN, 1978). Na FIGURA 4.22 (p. 132) tem-se a proposta biogenética para a formação das cumarinas identificadas: rauianina (V), diacetato de murrangatina (VI) e murralongina (IX).

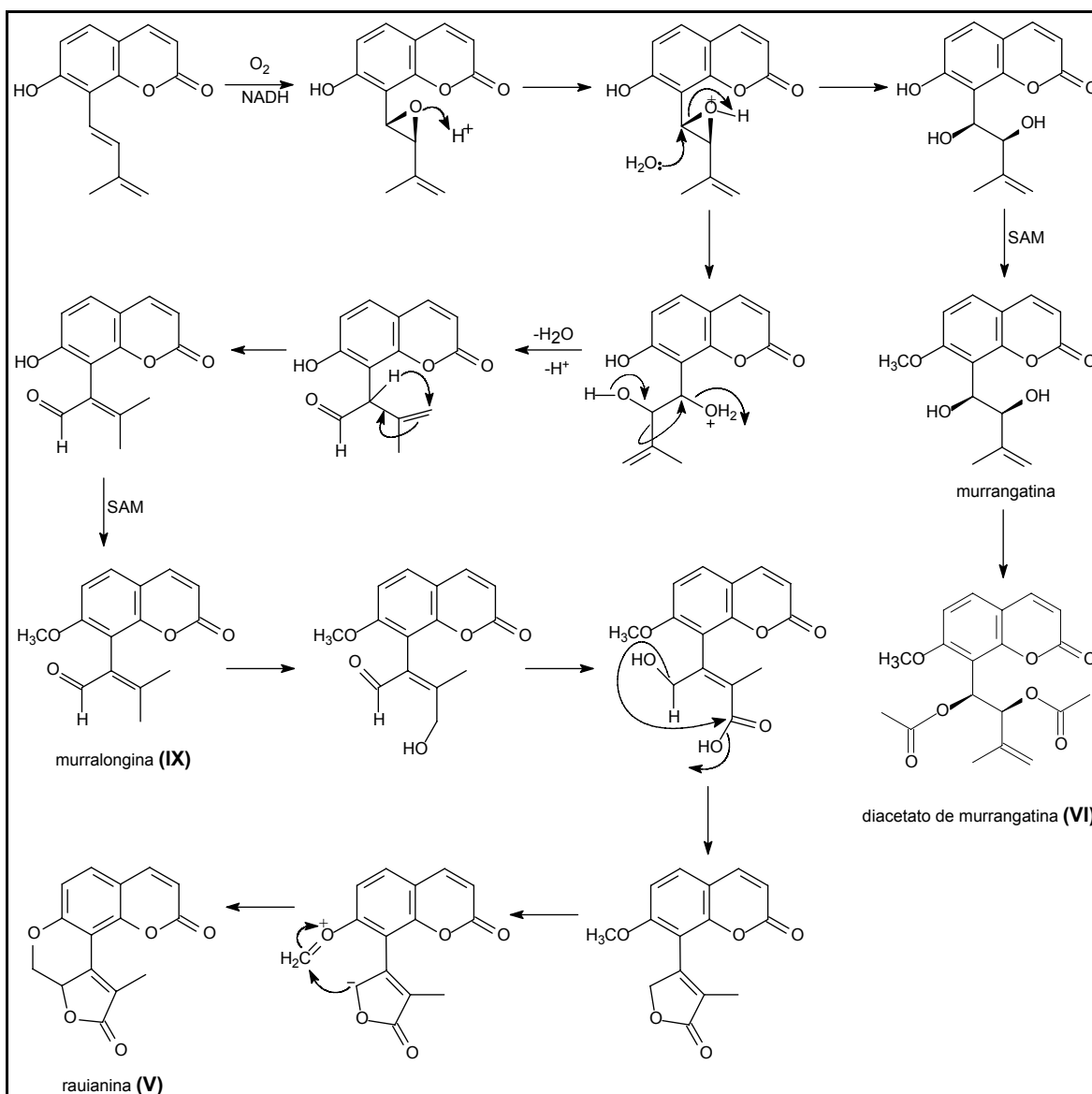


FIGURA 4.22: Proposta biogenética para as cumarinas V, VI e IX (adaptada de DEWICK, 2001).

4.5 – Flavonóides

Os flavonóides constituem uma grande categoria de metabólitos secundários de plantas encontrados em frutas, vegetais, cereais, plantas medicinais, nozes, especiarias, chá etc (ZHANG *et al.*, 2008; GATTUSO *et al.*, 2007). Eles são responsáveis pela cor, adstringência e amargura, por exemplo, em vinho (WANG e HUANG, 2004).

São heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo substâncias fenólicas do tipo C₆-C₃-C₆. Apresentam-se como sólidos coloridos, por exemplo, amarelos, ou ainda incolores e concentram-se mais nas partes aéreas das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e rizomas (DEWICK, 2001).

Os flavonóides estão divididos em oito subclasses: flavonas, flavonols, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonols (flavan-3-ols ou catequinas), chalconas e dihidrochalconas as quais são formadas a partir das variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (WANG e HUANG, 2004; LIN e HARNLY, 2008). As subclasses flavonoídicas e os padrões de glicosilação são fortemente correlacionados com a taxonomia da planta e fornecem uma ampla gama de diferentes propriedades químicas (LIN e HARNLY, 2008). As oito subclasses combinadas com glicosilação em múltiplos sítios e com uma grande variedade de sacarídeos produzem cerca de 4000 diferentes flavonóides já identificados, cuja lista ainda continua crescente (ZHANG *et al.*, 2005; LIN e HARNLY, 2008).

Embora os flavonóides sejam geralmente relacionados como agentes não nutrientes, esta classe tem atraído grande atenção dos pesquisadores pelas propriedades fisiológicas, farmacológicas e seus benefícios a saúde humana (ZHANG *et al.*, 2005; GATTUSO *et al.*, 2007). Os Estados Unidos recomendam um consumo diário de 250 mg de flavonóides de diferentes fontes: frutas, vegetais, sucos, suplementos de vitaminas e minerais (LIN e HARNLY, 2008).

Diante dos benefícios citados acima, existem aproximadamente 13000 relatos (artigos e livros) descrevendo as propriedades químicas, bioquímicas, o

papel farmacológico e nutricional dos flavonóides desde 1990 (GATTUSO *et al.*, 2007). Os flavonóides são usados em alguns remédios devido as suas propriedades espasmolítica, antialérgica e diurética. Presume-se que estas funções estejam relacionadas à capacidade de formação de radical estabilizado por ressonância pelas hidroxilas fenólicas. A atividade dos flavonóides é relacionada às variações em suas estruturas químicas como, por exemplo, hidroxilação, metoxilação, grau de polimerização e o tipo de conjugação (glicosilação, malonização e sulfonação) (WANG e HUANG, 2004).

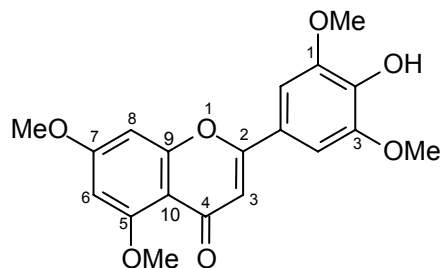
Esta classe mostra grande atividade antioxidante que parece estar associada com a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares e exibem ainda atividades antimicrobiana, antiviral e antiinflamatória. Entretanto, o mecanismo de ação *in vivo* ainda não é conhecido (GATTUSO *et al.*, 2007).

As flavonas e os flavonóis são flavonóides de particular importância por conterem atividade antioxidante em alimentos, além disso, estudos epidemiológicos indicaram que seu consumo diário assegura redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (WANG e HUANG, 2004).

4.5.1 – Nomenclatura dos Flavonóides

O esqueleto flavonoídico é composto por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico (cromona), a partir do qual é iniciada a numeração das estruturas conforme nomenclatura oficial IUPAC (1971).

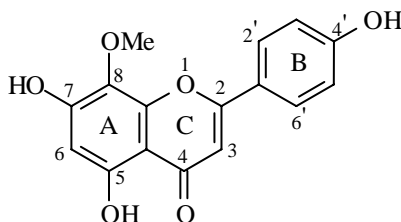
As flavonas, por exemplo, apresentam carbonila em C-4 e os dois anéis aromáticos são conectados com um anel pirano. Este sistema passa a receber a nomenclatura: 4H-1-benzopiran-4-ona. Os substituintes, desde que não formem anéis diretamente com o sistema benzopirânico, recebem a numeração e a nomenclatura sistemática (FIGURA 4.23, p. 135).



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

FIGURA 4.23: Nomenclatura IUPAC.

Na nomenclatura usual (MARKHAM, 1982) os anéis são designados como A, B e C e os átomos de carbono individuais são referidos por um sistema que utiliza números arábicos para os anéis A e C e números marcados com (') para o anel B (FIGURA 4.24, p. 135).



5,7,4'-trihidróxi-8-metoxiflavona

FIGURA 4.24: Nomenclatura usual.

Os grupos substituintes recebem um número de acordo com a posição em que se encontram, e a subclasse do flavonóide é especificado no final, conforme ilustra a FIGURA 4.24 (p. 135).

4.5.2 – RMN de flavonas e flavonóis

As flavonas são 2,3-dehidroderivadas das flavanonas. Nas flavonas os deslocamentos químicos de C-2 e C-3 são entre 157,4-165,8 e 102,3-113,7 ppm, característico da presença da ligação 2,3 oleofínica. Isto também resulta no maior deslocamento de C-4 que aparece em torno de 175,2-183,4 ppm (AGRAWAL, 1989).

As agliconas de flavonas estão resumidas na TABELA 4.6 (p. 136). A acacetina (**90**) e a diosmetina (**94**) possuem um grupo metoxila na posição C-4', enquanto em crisoeriol (**95**) o grupo metoxil está ligado em C-3'. Kampeferol

(92) e quercetina (93) possuem um grupo hidroxila na posição C-3 (R_1) e são freqüentemente referidas como flavonóis (GATTUSO *et al.*, 2007).

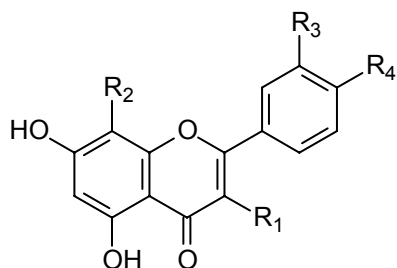


TABELA 4.6: Resumo das agliconas de flavonas e flavonóis

Composto	Nome	R1	R2	R3	R4
56	Apigenina (p. 47)	H	H	H	OH
57	Luteolina (p.47)	H	H	OH	OH
90	Acacetina	H	H	H	OMe
91	Isoescutelareina	H	OH	H	OH
92	Kampeferol	OH	H	H	OH
93	Quercetina	OH	H	OH	OH
94	Diosmetina	H	H	OH	OMe
95	Chrisoeriol	H	H	OMe	OH

A TABELA 4.7 (p. 137) sumariza um grupo classificado como polimetoxiflavonas (PMFs) os quais são usualmente encontrados como componentes nos óleos essenciais das cascas de *Citrus* (GATTUSO *et al.*, 2007).

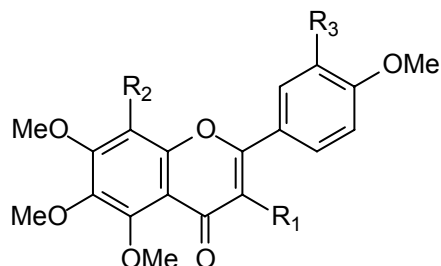


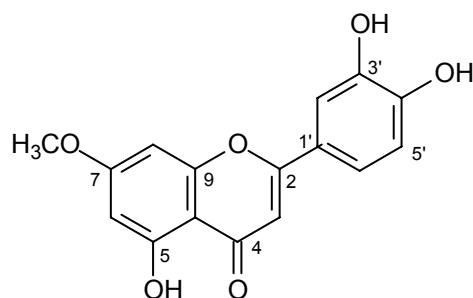
TABELA 4.7: Polimetoxiflavonas

Composto	Nome	R1	R2	R3
96	Quercetogetina	OMe	H	OMe
97	3,3',4',5,6,7,8-heptametoxiflavona	OMe	OMe	OMe
98	Natsudaïdaina	OH	OMe	OMe
99	Nobiletina	H	OMe	OMe
100	Sinensetina	H	H	OMe
101	Tangeretina	H	OMe	H
102	Tetrametilescutelareina	H	H	H

O deslocamento químico de C-3 para flavonas com as posições 2' e 6' não substituídas é em torno de 102,0 e 108,6 ppm, exceto em 5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona cujo deslocamento é de 100,4 ppm. Quando estas posições 2' e 6' estiverem substituídas por grupo hidroxil ou metoxil, o deslocamento de C-3 será entre δ_C 110,0 e 115,5. A presença da hidroxila na posição C-5 causa um deslocamento de 5,5 ppm em C-4 resultante da interação intramolecular que ocorre entre o grupo ceto (C-4) e a hidroxila em C-5 (AGRAWAL, 1989).

Os deslocamentos químicos de C-6 e C-8 em 5,7-dihidroxiflavonas, por exemplo, em crisina (49, p. 47) aparece em 99,2 e 94,4 ppm respectivamente, desta forma verifica-se que C-6 tem deslocamento químico com uma diferença de 4,8 ppm para uma região mais desblindada do espectro. A localização do grupo metoxil nas posições C-6 e C-8 em 5,7-dihidroxiflavonas pode ser diferenciado pela comparação dos deslocamentos no espectro de RMN ^{13}C quando estas posições estão sem substituintes (AGRAWAL, 1989).

Os deslocamentos químicos dos prótons do anel A de flavonas são ligeiramente influenciados pela substituição no anel B. Em 5,7-dihidroxiavonas os δ_H são na faixa de 6,16-6,25 para H-6 e 6,39-6,56 ppm para H-8. As metilações ou glicosilações em 7-OH deslocam estes sinais para 6,33-6,48 e 6,71-6,93 ppm, respectivamente. Entretanto, com a substituição em 5-OH os efeitos são diferentes, por exemplo, na luteolina 5-metil éter (**103**, p. 138) observa-se 6,37 para H-6 e 6,49 ppm para H-8 enquanto o correspondente 5-glucoside aparece em 6,69 e 6,79 ppm, respectivamente. O próton H-3 do anel C é influenciado pelos substituintes dos dois anéis, A e B (HARBONE, 1994).



Luteolina 5-metil éter (**103**)

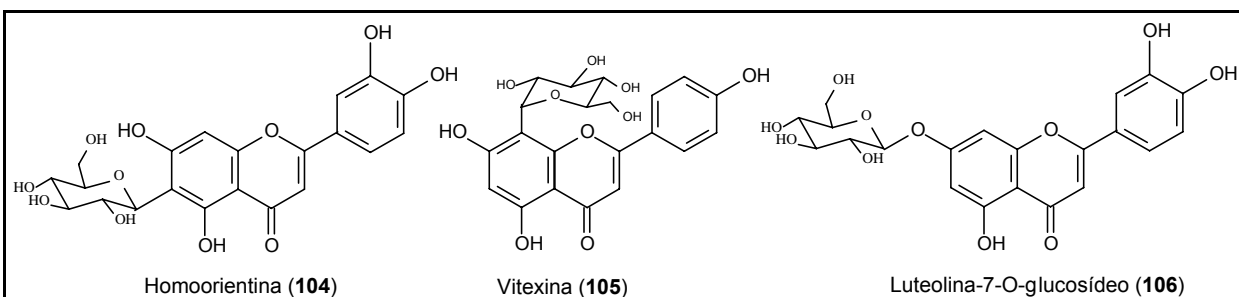
A hidroxilação, C-glicosilação ou alquilação em C-6 ou C-8 não causa grandes mudanças nos deslocamentos químicos dos prótons remanescentes do anel A. As flavonas são agrupadas de acordo com sua substituição no anel B, pois os valores dos deslocamentos dos prótons são bem característicos o que facilita a identificação da aglicona. A metilação de um grupo hidroxil causa deslocamento nos sinais dos prótons *orto* e *para* de 0,15 ppm para uma região mais blindada do espectro. Da mesma forma com glicosilação ocorre deslocamento sinais dos prótons, mas de forma mais pronunciada (0,3; 0,1 e 0,2 respectivamente para os sinais dos prótons nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel B). A presença de substituintes nas posições C-2' ou 6' assim como em C-3' e 5' pode dificultar a livre rotação do anel B (HARBONE, 1994).

Algumas espécies são importantes fontes de flavonas C-glicosiladas: os gêneros *Setaria* e *Arrhenatherum* (Gramineae), *Siphonoglossa* (Acanthaceae), *Passiflora* (Passifloraceae), *Zelkova* (Ulmaceae) e com relação à família

Rutaceae o gênero *Citrus* se destaca com uma grande quantidade de flavonóides isolados e identificados (HARBONE, 1994).

As flavonas O-glicosiladas encontradas em sucos de *Citrus* são geralmente 7-O-rutinosides ou 7-O-neohesperidosides, embora uma 3-O-rutinoside também tenha sido reportada, chamada rutina. Em *Citrus* também se encontram grandes quantidades de di-C-glicosídeos e uma pequena quantidade de mono-C-glicosídeos. Para estes compostos, a substituição ocorre geralmente nas posições C-6 e C-8 (GATTUSO *et al.*, 2007).

Várias atividades biológicas têm sido reportadas para esta subclasse de flavonóides, por exemplo, a atividade antimicrobiana de homoorientina (luteolina 6-glucoside, **104**), e atividade de vitexina (apigenina 8-glucoside, **105**) sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e o efeito protetor de luteolina-7-O-glucoside (**106**) sobre lesões hepáticas causadas pelo tetracloreto de carbono em ratos (ZHANG *et al.*, 2008, p. 139).



A identificação dos glucosídeos pode ser realizada através de dados de ressonância magnética nuclear de 1D e 2D. O sinal em torno de δ_H 5,0 ppm é característico de hidrogênio anomérico que, juntamente com os sinais na faixa de δ_H 4,0 e δ_H 3,0 ppm, indicam a presença de um glucosídeo. Um dubleto com deslocamento de aproximadamente δ_H 1,0 ppm ($J = 6,0$ Hz) relativo ao sinal de deslocamento químico de uma metila, indica a presença de uma unidade de raminose (HARBONE, 1994). Os espectros de RMN ^{13}C confirmam estas características com os sinais de deslocamentos químicos em torno de δ_C 100,0 ppm característico de carbono anomérico de uma ligação C-O

glicosídica e para uma ligação C-glicosídica tem-se o carbono em aproximadamente δ_C 73,0 ppm, os carbonos em torno de δ_C 61,0-70,0 ppm que são característicos de unidades de glicosídeos e o carbono em δ_C 17,0 ppm (metila) confirma a presença de uma unidade de raminose (AGRAWAL, 1989). A constante de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos freqüentemente indica a configuração do glicosídeo ligado a aglicona. A TABELA 4.8 (p. 140) indica algumas destas constantes de acoplamento e as estereoquímicas específicas das ligações entre os glucosídeos e a aglicona estão indicadas na FIGURA 4.25 (p. 141) (HARBONE, 1982).

TABELA 4.8 – Configuração dos glicosídeos (HARBONE, 1982)

Grupo	Glicosídeo	Configuração	J (Hz)
Piranosídeo	D – glicose, galactose, xilose	- β -	7 – 8
	D – glicose, galactose, xilose	- α -	3 – 4
	L – ramnose	- β -	1
	L – raminose	- α -	2
	L – arabinose	- β -	2,5
	L – arabinose	- α -	8
Furanosídeo	D – glicose, galactose, xilose	- β -	0 – 2
	D – glicose, galactose, xilose	- α -	4 – 4,5
	L – arabinose	- β -	4
	L – arabinose	- α -	1

Além dos monossacarídeos citados acima que ocorrem em associação com flavonas e flavonols tem-se no grupo das pentoses a apiose, no grupo das hexoses a alose e os ácidos D-galacturônico e D-glucurônico e este número aumentou de nove para dez com a reinclusão da mannose (HARBONE, 1994).

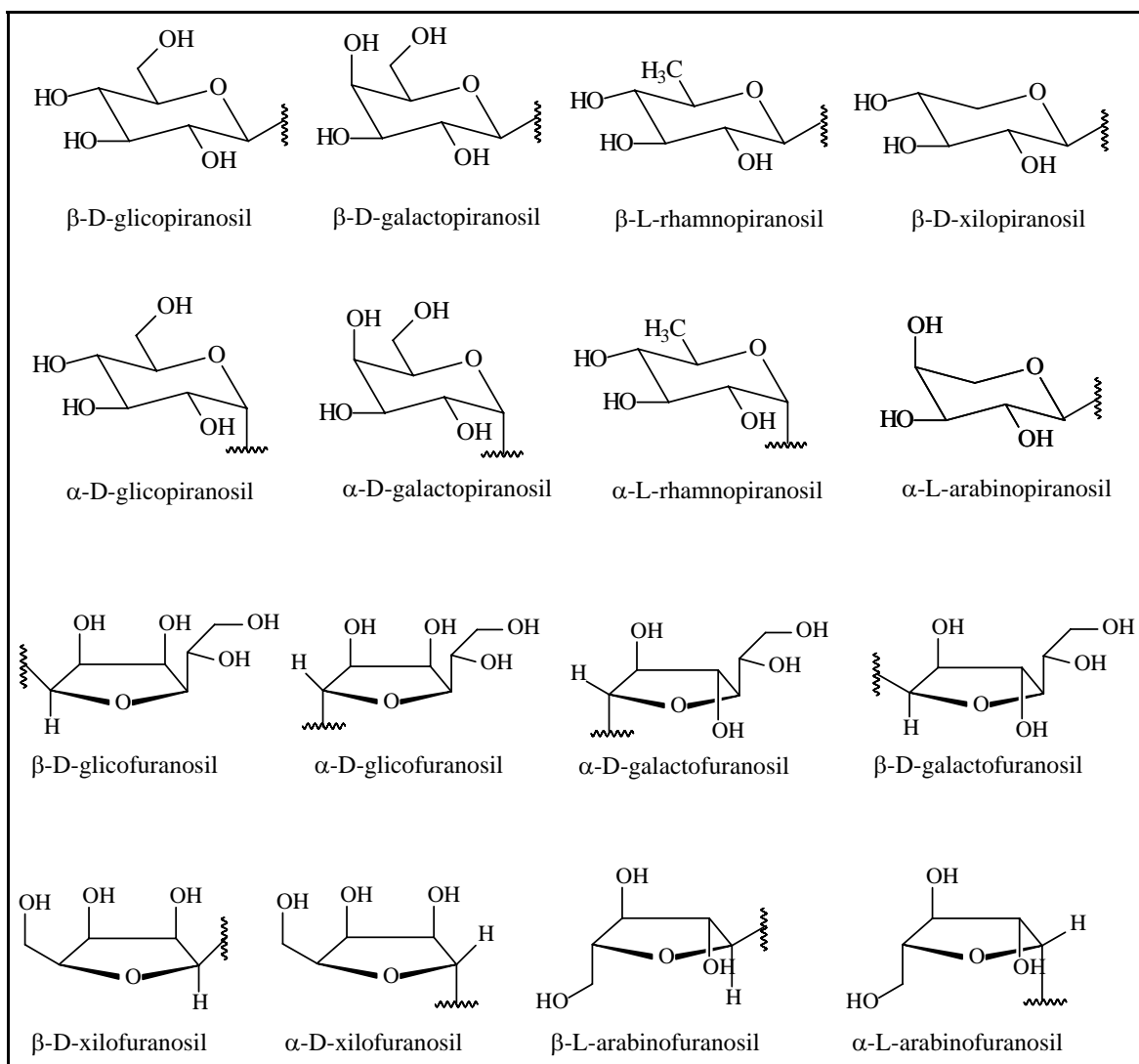


FIGURA 4.25: Estruturas dos glicosídeos

Para distinguir a posição na qual o glicosídeo está ligado pode-se utilizar o deslocamento químico do sinal do hidrogênio anomérico. A TABELA 4.9 (p. 142) mostra alguns destes deslocamentos químicos para C-glicosídeos e a TABELA 4.10 (p. 142) descreve os dissacarídeos encontrados em flavonas e flavonols no período de 1985 a 1991 (HARBONE, 1982).

TABELA 4.9 – Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento H1/H2 de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonóides (DMSO-*d*₆) (HARBONE, 1982)

Glicosídeo Primário	δ_H (ppm) [J (Hz)]	Glicosídeo secundário	δ_H (ppm) [J (Hz)]
6-C- β -D-Glucoside	4,58 – 4,90 [10] 4,70 4,77 – 4,81	2 ^G -O- α -L-Manosil (2 ^G -O-Acetilado)	4,30 [2]
6-C- α -L-Raminoside	4,85 – 5,26		
6-C- α -L-Arabinoside	4,67 [8,2]		
8-C- β -D-Glucoside	4,64 – 4,88 [10] 4,69 4,89 4,76 4,88 – 4,92	2 ^G -O-Apiofuranosil 2 ^G -O- α -L-raminosil 6 ^G -O-Apiofuranosil (2 ^G -O-Acetilado)	4,98 [1,8] 5,00 s 4,79 [3]
8-C- β -D-Xiloside	5,04 [8]		
8-C- β -L-Arabinoside	5,51 s		
8-C- α -L-Arabinoside	4,78 – 4,89[9]		
6,8-Di-C- β -D-Glucoside	4,84 sl		
6,8-Di-C- α -L-Arabinoside	4,70 – 4,83 [9,5] 4,52 – 4,66 [9,5]		

A letra G indica unidade de glicose e o número indica a posição na qual o segundo glicosídeo está ligado.

TABELA 4.10 – Dissacarídeos de flavonas e flavonols glicosilados (HARBONE, 1994)

Estrutura	Nome Trivial	Estrutura - Nome Trivial
Pentose-hexose		
2-O- α -L-raminosil-D-glicose	Neohesperidose	6-O- β -D-galactosil-D-glicose
3-O- α -L-raminosil-D-glicose	Rungiose	6-O- β -D-glicosil-D-galactose
6-O- α -L-raminosil-D-glicose	Rutinose	4-O- β -D-galactosil-D-galactose
2-O- β -D-xilosil-D-glicose	Sambubiose	6-O- β -D-galactosil-D-galactose
6-O- β -L-arabinosil-D-glicose	Vicianose	Hexose-pentose
6-O- β -L-raminosil-D-galactose	Robinobiose	2-O- α -D-glicosil-L-raminose
6-O- β -L-arabinosil-D-galactose		3-O- α -D-glicosil-L-raminose
6-O- β -D-xilosil-D-glicose		4-O- α -D-glicosil-L-raminose
2-O- β -D-xilosil-D-galactose	Latirose	2-O- β -D-glicosil-D-xilose
2-O- α -D-apiofuranosil-D-glicose		3-O- α -D-galactosil-L-raminose
2-O- α -D-apiofuranosil-D-galactose		4-O- α -D-galactosil-L-raminose
2-O- α -L-raminosil-D-galactose		Pentose-pentose
Hexose-hexose		4-O- α -L-raminosil-D-xylose
2-O- β -D-glicosil-D-glicose	Sophorose	3-O- α -D-xylosil-L-raminose
3-O- β -D-glicosil-D-glicose	Laminaribiose	4-O- α -D-xylosil-L-raminose
6-O- β -D-glicosil-D-glicose	Gentiobiose	2-O- α -L-raminosil-L-raminose
4-O- β -D-galactosil-D-glicose	Lactose	3-O- α -L-raminosil-L-raminose
2-O- β -D-manosil-D-glicose		4-O- α -L-raminosil-L-raminose
2-O- β -D-manosil-D-alose		2-O- α -L-raminosil-L-abinose
2-O- β -D-alosil-D-glicose		2-O- α -D-apiofuranosil-D-xylose

O espectro de ^1H -RMN de flavonóides C-glicosilados é particularmente interessante devido à presença de dois rotâmeros, resultado da livre rotação ao redor da ligação C-glicosílica. Este fato produz duplicação de picos nos espectros de RMN à temperatura ambiente, na qual um dos rotâmeros é majoritário e o outro minoritário (RAYYAN *et al.*, 2005; CARISTI *et al.*, 2003). Os sinais podem ser facilmente atribuídos aos respectivos flavonóides através do experimento de RMN com variação de temperatura (VT-RMN), como mostra a FIGURA 4.26 (p. 143), nos quais se verifica que os sinais encontrados são referentes aos dois confôrmeros e não de compostos diferentes (CARISTI *et al.*, 2003). Além disso, é interessante observar que os níveis de energia rotacional dos isômeros são freqüentemente diferentes (FERRERES *et al.*, 2004).

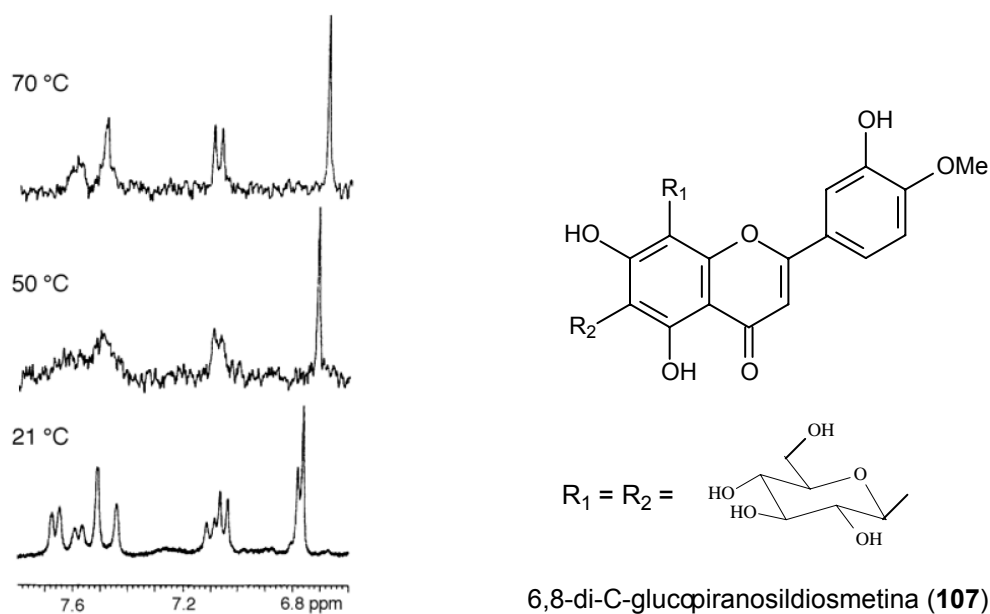


FIGURA 4.26: Espectro de RMN com variação da temperatura da flavona (**107**) di-C-glicosilada em DMSO a 300 MHz.

4.5.3 – IV, UV e EM de flavonóides

O espectro de infravermelho de todos os flavonóides e isoflavonóides apresenta uma banda de absorção na região $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ devido a ao anel

aromático, juntamente com a banda da carbonila em 1620-1670 cm^{-1} (AGRAWAL, 1989).

O espectro no infravermelho das flavonas contendo hidroxila na posição 5 apresenta uma banda característica do estiramento das carbonilas α - β insaturadas em torno de 1650 cm^{-1} e também uma banda intensa na região de 3500-3000 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação O-H (MARKHAM, 1982).

A natureza glicosídica de um flavonóide é refletida por bandas largas entre 3250 e 1060 cm^{-1} . Entretanto, embora estas bandas de absorção estejam presentes na maioria dos flavonóides glicosilados, elas podem ocorrer nos espectros dos polihidroflavonóides (AGRAWAL, 1989).

A TABELA 4.11 (p. 144) apresenta a faixa de absorção no UV característica para as bandas I e II das diferentes subclasses dos flavonóides. A maior vantagem deste método é a pequena quantidade de flavonóide requerida para a análise (0,1 mg) (AGRAWAL, 1989).

TABELA 4.11: Faixa de absorção no UV-Vis para flavonóides

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 pico em 320	Isoflavonas Isoflavonas
275-295	300-330 curto	Flavanonas e Dihidroflavonois
230-270 (baixa intensidade)	340-390	Chalconas
230-270 (baixa intensidade)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas e antocianinas

O espectro de UV de flavanonas e elas glicosiladas apresenta duas bandas com forte absorção referentes à banda I (300-380) e banda II (240-280). A banda I está associada com a presença do sistema cinamoil do anel B e a absorção da banda II ao sistema benzoil do anel A (FIGURA 4.27, p. 145). Substituições no anel A ou B podem produzir deslocamentos hipsocrômicos ou batocrômicos das bandas de absorção no UV, as quais podem ser úteis para o esclarecimento da estrutura (GATTUSO *et al.*, 2007; FIGUEIRINHA *et al.*, 2008).

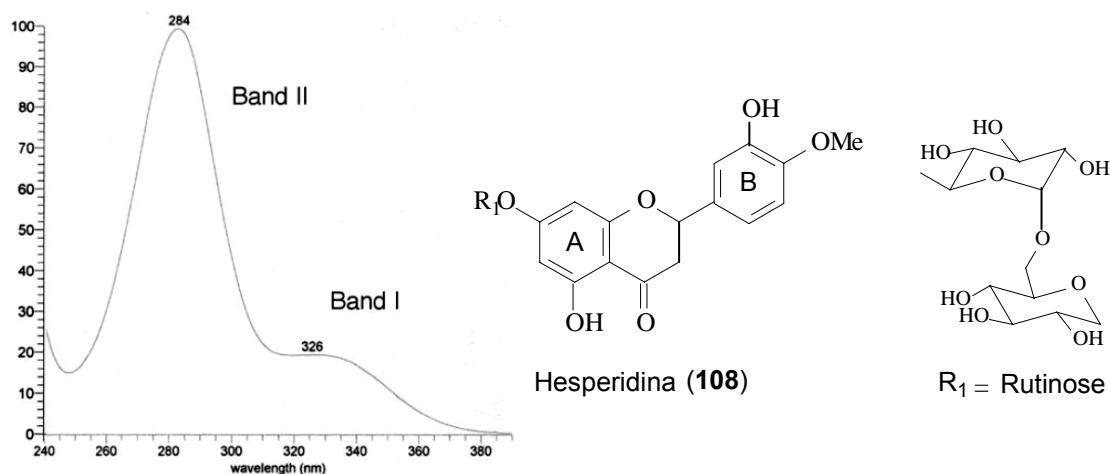


FIGURA 4.27: Espectro de UV da flavanona C-glicosilada.

A FIGURA 4.28 (p. 145) mostra o espectro de UV da quercetina (**93**), quercetina 3-O-glucoside (**109**) e quercetina 3,4'-di-O-glucoside (**110**) (flavonois). A banda I do composto (**109**) apresenta diminuição da absorção de aproximadamente 20 nm quando comparada com a quercetina devido ao efeito hipsocrômico causado pela substituição na posição C-3. O deslocamento hipsocrômico aumenta com a substituição 3,4' (GATTUSO *et al.*, 2007).

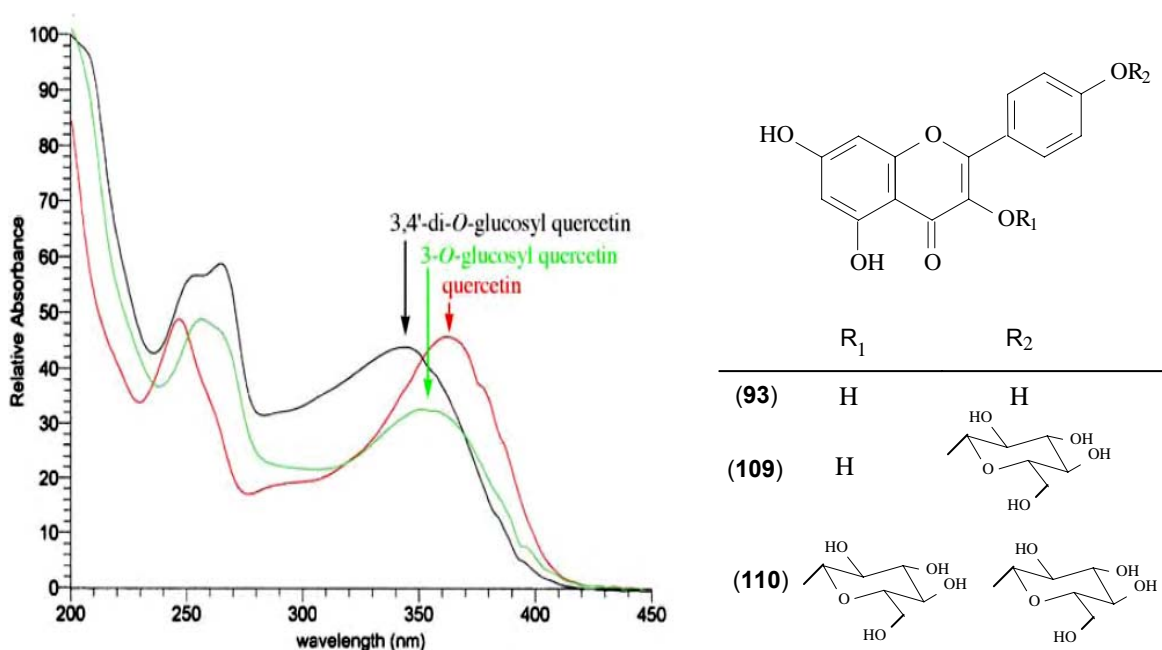


FIGURA 4.28: Espectro de UV da quercetina (**93**), quercetina 3-O-glucoside (**109**) e quercetina 3,4'-di-O-glucoside (**110**).

Sendo assim a absorção espectrofotométrica no UV pode ser usada como auxiliar na identificação do tipo de flavonóide, indicando o padrão de oxigenação. Além disso, de forma indireta, esta técnica pode ser usada para determinar a localização de glicosídeo ou do grupo metil substituindo uma hidroxila (MARKHAM, 1982).

O espectro de massas de flavonóides glicosilados tem um padrão característico, que depende principalmente do número ou natureza do sacarídeo e sua ligação C- ou O-glucosídeo. Na maioria dos casos, a fragmentação começa com a clivagem da ligação O-glucosídeo, este comportamento é útil para identificar a aglicona. A perda dos fragmentos com massa bem definida a partir do íon pseudomolecular pode fornecer informações precisas sobre o sacarídeo (GATTUSO *et al.*, 2007).

A hesperidina uma flavanona substituída com um O-dissacarídeo (**108**, FIGURAS 4.29a, p. 147 e 4.27, p. 145) possui o fragmento m/z 463 gerado pela perda de uma unidade de açúcar (raminose) a partir do íon pseudomolecular $[M-H]^-$ (m/z 609). Em seguida, ocorre a perda de uma segunda unidade de açúcar (glicose) gerando o íon m/z 301, referente à aglicona (GATTUSO *et al.*, 2007).

O espectro no modo positivo de **108** mostra um padrão diferente de fragmentação (FIGURA 4.29b, p. 147). O íon pseudomolecular $[M-H]^+$ sofreu um rearranjo parcial junto com um caminho de fragmentação peculiar para este tipo de composto. Este rearranjo leva a perda de um glicosídeo “interno” do dissacarídeo (glicose, no exemplo abaixo) demonstrado pela presença do íon $[M+H-162]^+$. Esta fragmentação, de qualquer forma é concomitante com o caminho esperado, ou seja, a perda da unidade de raminose (GATTUSO *et al.*, 2007).

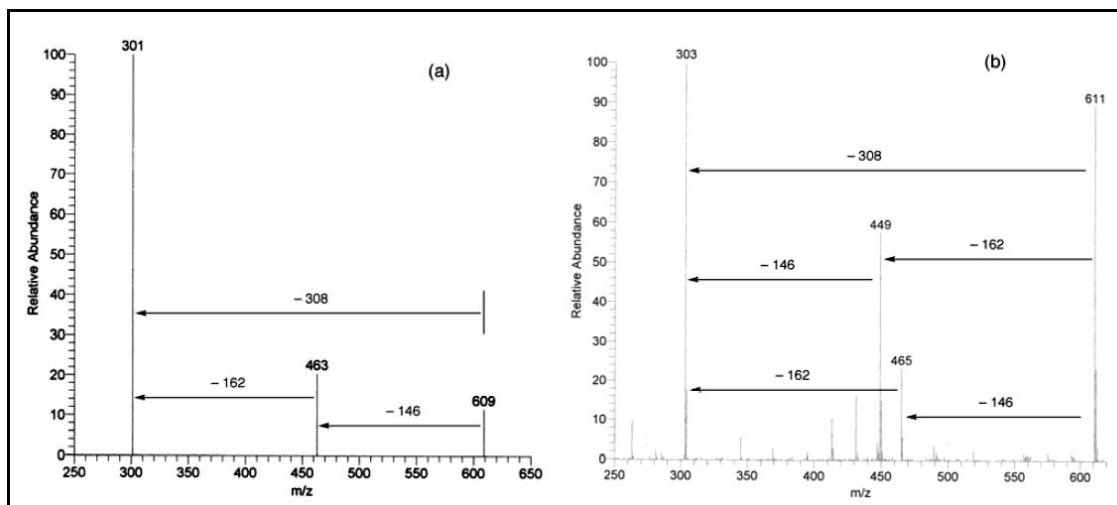


FIGURA 4.29: Espectro de massas da hesperidina (**108**) no modo negativo (a) e no modo positivo (b).

O experimento EM-EM é muito útil para a identificação da aglicona de um dado flavonóide. A análise do padrão de fragmentação possibilita a elucidação precisa da estrutura da aglicona juntamente com comparação dos dados de RMN da literatura, a FIGURA 4.30 (p. 147) mostra o espectro EM-EM no modo negativo da aglicona da hesperetina (**111**) (GATTUSO *et al.*, 2007).

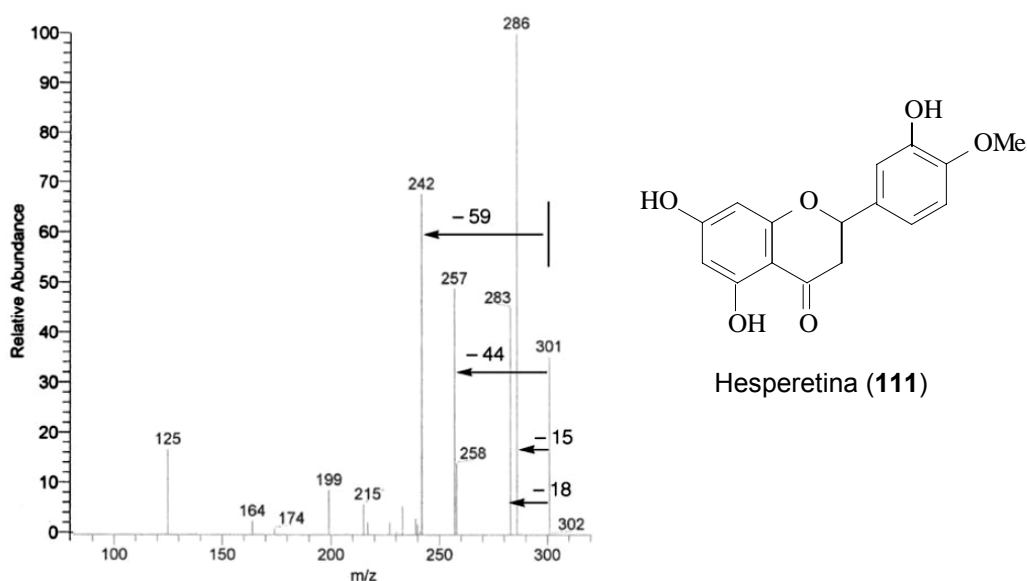


FIGURA 4.30: Espectro de massas da hesperetina (**111**) no modo negativo.

O espectro EM-EM dos flavonóides C-glicosilados, como por exemplo, da 6,8-di-C-glucopiranosildiosmetina (**107**, FIGURA 4.26, p. 143) também apresenta um padrão típico de fragmentação (FIGURA 4.31, p. 148) que se inicia a partir do sacarídeo, e segue com uma série bem definida de íons característicos: $[M-H-18]^-$, $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$, $[M-H-120-90]^-$, $[M-H-120-120]^-$ (CARISTI *et al.*, 2006; FERRERES *et al.*, 2003).

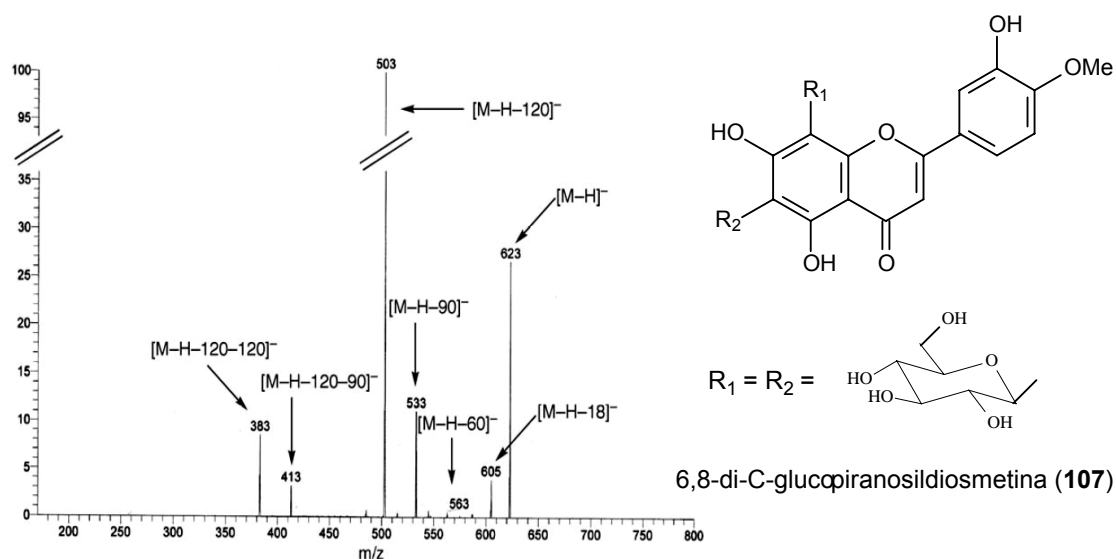


FIGURA 4.31: Espectro de EM-EM da diosmetina 6,8-di-C-glucoside (**107**) no modo negativo.

Alguns autores, como por exemplo, PICCINELLI *et al.* (2008), FIGUEIRINHA *et al.* (2008), MARCH *et al.* (2006), GATTUSO *et al.* (2006), KAZUNO *et al.* (2005), WARIDEL *et al.* (2001), HUGHES *et al.* (2001), discutem a diferenciação de isômeros de flavonóides glicosilados por espectrometria de massas. Esses autores avaliaram a diferença na fragmentação dos isômeros variando-se a energia de colisão, o modo de ionização (positivo ou negativo) e o tipo de experimento Q-TOF-MSⁿ, IT-MSⁿ e Tandem Massa, por exemplo (FIGURA 4.32, p. 149).

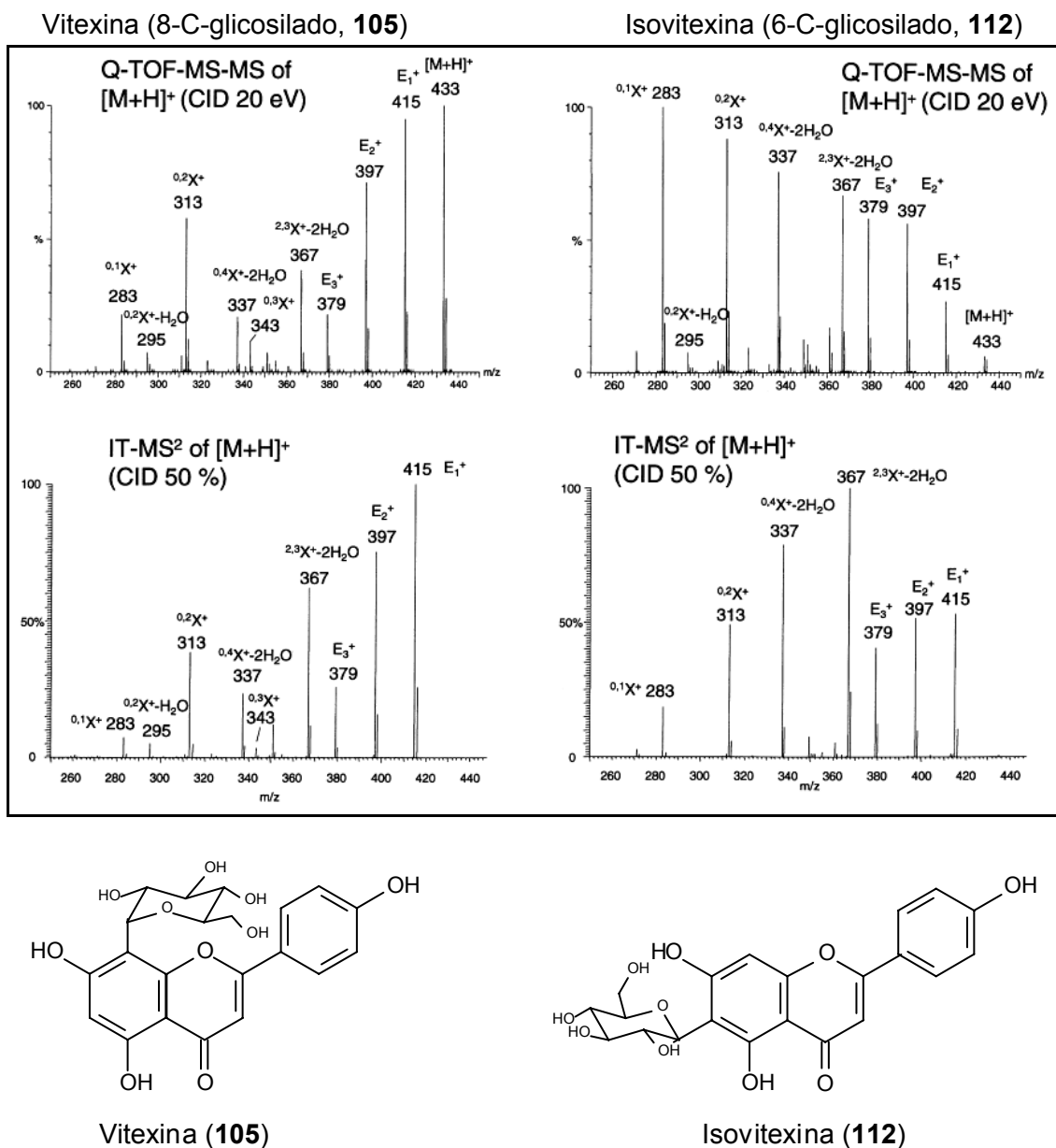
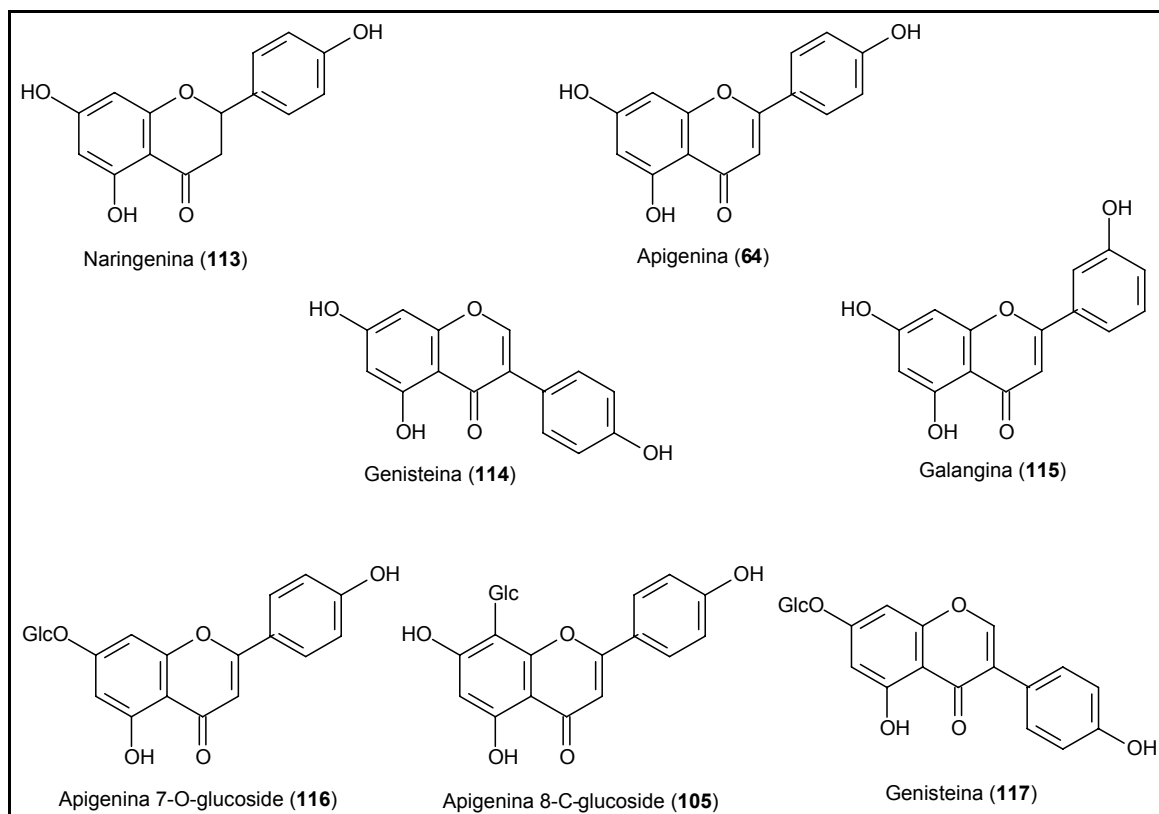


FIGURA 4.32: Espectro Q-TOF-MS-MS e IT-MS-MS com $[M+H]^+$ como íon precursor (m/z 433).

Os autores citados acima puderam concluir que há diferença nas intensidades de alguns picos o que possibilita diferenciar os respectivos isômeros, tanto os isômeros 6-C e 8-C glicosilados (PICCINELLI *et al.*, 2008; GATTUSO *et al.*, 2006; MARCH *et al.*, 2006; KAZUNO *et al.*, 2005; WARIDEL *et al.*, 2001), podendo diferenciar os flavonóides naringenina (**113**, flavanona,

p. 150), apigenina (**56**, flavona, p. 47), galangina (**114**, flavona, p. 150), genisteina (**115**, isoflavona, p. 150) (HUGHES *et al.*, 2001) além dos isômeros apigenina 7-O-glucoside (**116**, p. 150) da apigenina 8-C-glucoside (vitexina, **105**, p. 139) da genisteina 7-O-glucoside (**117**, p. 150) tanto com a molécula protonada como deprotonada dentre outros isômeros citados por MARCH *et al.* (2006).



Além disso, é possível diferenciar a glicose da galactose (MARCH *et al.*, 2006) e uma pentose de uma hexose (FIGUEIRINHA *et al.*, 2008). Estudos computacionais também auxiliam no estudo da fragmentação desta classe de compostos, através da melhor visualização das interações intramoleculares e das diferentes rotações do anel B como mostrado na FIGURA 4.33 (p. 151) (MARCH *et al.*, 2006).

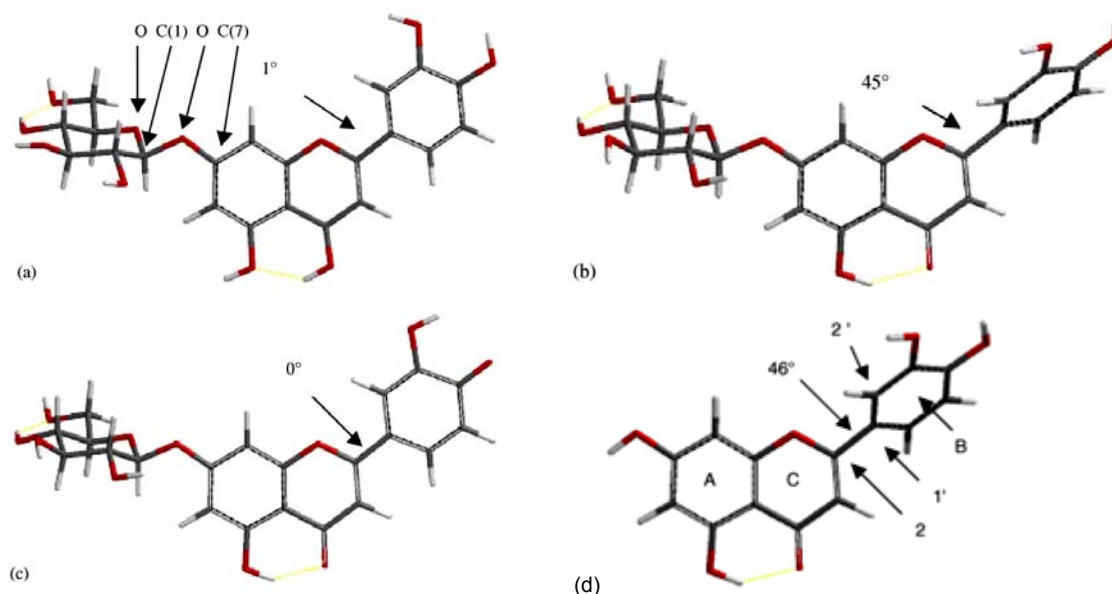


FIGURA 4.33: Estruturas computacionais de luteolina 7-O-glucosídeo (**106**, p. 139) (a) protonada, (b) neutra, (c) deprotonada (d) luteolina. As setas indicam o ângulo diedro para o anel B.

Estes estudos evidenciam que a espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta para a identificação de flavonóides, principalmente os glicosilados.

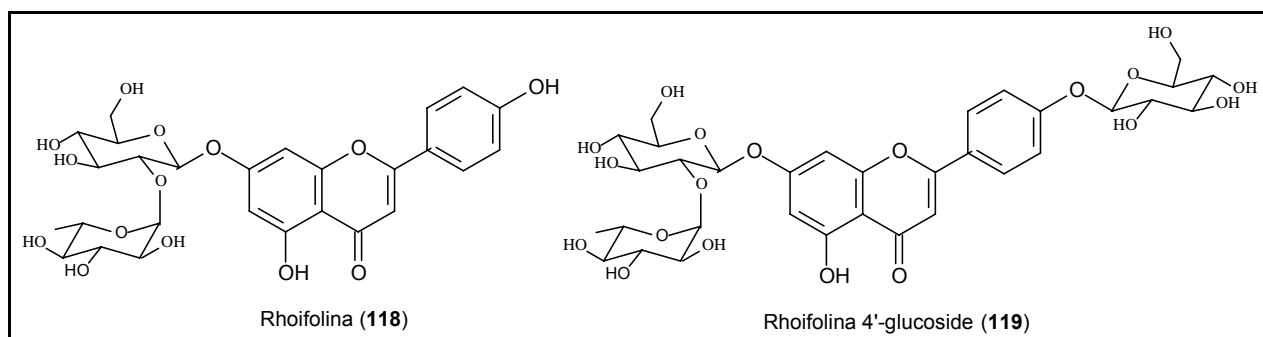
4.5.4 – Determinação estrutural das substâncias X

Através do estudo fitoquímico da fração hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp verificou-se grande quantidade de flavonóides glicosilados, sendo este o primeiro relato na literatura desta classe de metabólitos secundários neste gênero.

A substância **X** foi isolada na forma de dois isômeros conformacionais (ou rotâmeros) da subfração **B** da fração hidroetanólica do caule (RCMH_B) como descrito no item 3.6.6 (p. 73), apresentando-se como sólido amarelo. A identificação destes isômeros foi realizada através de RMN em uma e duas dimensões, CL-EM e comparação com dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2004; VELOZO *et al.*, 2009).

O experimento CL-EM foi realizado para obter mais dados sobre os flavonóides constituintes da subfração **B** e observou-se neste estudo que a proporção dos dois é aproximadamente de 60 : 40 (FIGURA 4.34a, p. 153) a qual foi confirmada pelo espectro de RMN ^1H . Os espectros de UV (DAD, FIGURA 4.34b-c, p. 153) dos dois constituintes da mistura são iguais ($\lambda = 215,7; 271,7; 338,7$ nm) e condizentes com os da flavona apigenina (**56**, p. 47; $\lambda = 268,5; 336,2$ nm; LI *et al.*, 2007), assim como também são iguais os espectros de massas cuja massa pseudomolecular obtida para os dois confôrmeros foi de 739 Daltons $[\text{M}-\text{H}]^-$, conforme mostra a FIGURA 4.34d-e (p. 153). Os valores de λ absorção obtidos no espectro de UV quando o glicosídeo está na posição C-4' são menores, pois ocorre deslocamento hipsocrômico na absorção da banda I e para a posição C-7 as absorções são aproximadamente $\lambda = 267,0; 337,0$ nm [rhoifolina = apigenina 7-O-neohesperidoside (**118**, p. 152)] (GATTUSO *et al.*, 2007).

GATTUSO *et al.* (2007) isolaram um composto com massa molar 740 Da [rhoifolina 4'-glucoside (**119**, p. 152)] cujas absorções no espectro de UV foram $\lambda = 268; 324$ nm, compatível com substituinte na posição C-4' no esqueleto da apigenina. O espectro de massas apresentou no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ 741 Daltons e mostrou os fragmentos 595, 433 e 271 (aglicona) resultante da perda sucessiva de uma unidade de raminose e duas unidades de glicoses, típico de um tri-O-glicosil flavonóide. O composto foi identificado como uma apigenina 7-O-neohesperidoside-4'-O-glicoside.



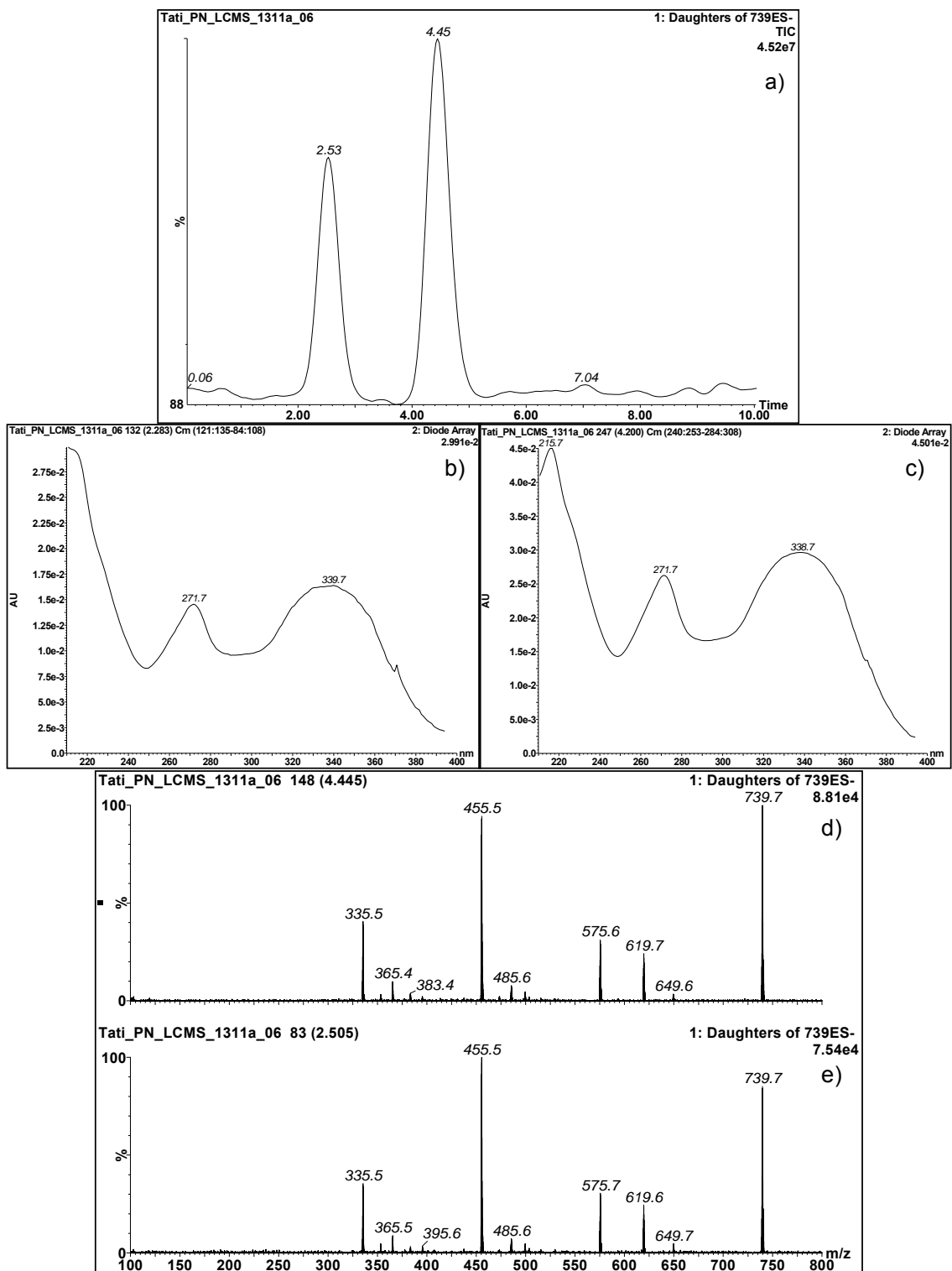


FIGURA 4.34: a) Cromatograma da subfração **B** b) Espectro de UV flavona **Xa** (t_R = 2,53 min); c) espectro de UV da flavona **Xb** (t_R = 4,45 min); d) Espectro de massas no modo negativo [M-H]⁻ da flavona **Xa** (t_R = 4,45 min); e) e da flavona **Xb** (t_R = 2,5 min).

Desta forma, com os resultados obtidos no espectro de massas (FIGURA 4.34d-e, p. 153) pode-se confirmar através da fragmentação que se trata de C-diglicosil flavonas, uma vez que os fragmentos característicos de O-diglicosil flavonóides são $[M-H-162-146]^-$ como pico base; $[M-H-162]^-$ e $[M-H-146]^-$ que são as perdas dos glicosídeos com a transferência do hidrogênio e retenção da carga na unidade da aglicona (FIGURA 4.35, p. 154). Os outros fragmentos são inexistentes ou abaixo de 10% (CUYCKENS *et al.*, 2001; BECCHI e FRAISSE 1989). Sendo assim, pode-se excluir a possibilidade que os glicosídeos estejam nas posições C-4', C-5 e C-7. Estes dois autores citados acima, dentre outros, apresentam guias de identificação para flavonóides C-glicosilados, O-glicosilados, C,O-glicosilados e também uma discussão sobre a identificação de ligações interglicosídicas, a qual permite por exemplo, distinguir uma rutinose (rha 1→6 glc) de uma neohesperidose (rha 1→2 glc).

A natureza (1→2) da ligação interglicosídica pode ser sugerida pela evidencia de que o fragmento $[M-H-308]^-$ é mais abundante que o fragmento $[M-H-146]^-$. A presença do dissacarídeo composto pela raminose e glicose é demonstrada pela perda consecutiva de 146 e 162 unidades de massa (GATTUSO *et al.*, 2007).

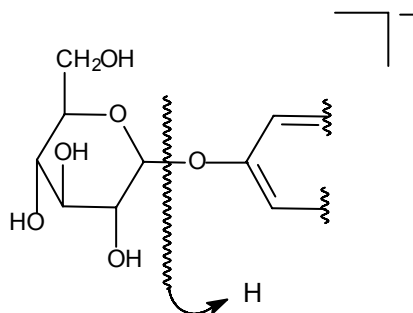


FIGURA 4.35: Fragmentação de O-glicosídeos.

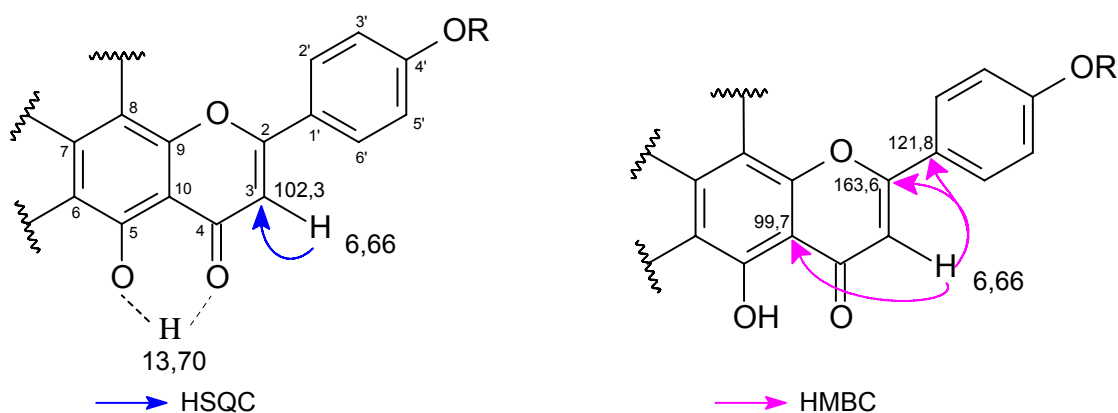
Além disso, a presença dos fragmentos Agl. + 113 (m/z 383,4) e Agl. + 83 (m/z 353,0) indicam a presença de C-diglicosil (FIGURA 4.34d-e, p. 153). Outra possibilidade ainda para verificar se a ligação da unidade de açúcar na aglicona é via O-glicosídeo ou C-glicosídeo é a realização de uma

hidrólise ácida e em seguida faz-se novamente a medida de absorção no UV. As flavonas C-glicosiladas são resistentes à hidrólise ácida enquanto que os O-glicosídeos são facilmente hidrolisados em meio ácido e assim apresentam variação da absorção máxima no espectro de UV (GATTUSO *et al.*, 2007; DJOUKENG *et al.*, 2008).

Vários autores (CUYCKENS *et al.*, 2004; BECCHI e FRAISSE 1989; WARIDEL *et al.*, 2001, dentre outros) discutem também a diferenciação de 6C-glicosídeo e 8C-glicosídeo. WARIDEL e colaboradores (2001), por exemplo, observou que a intensidade do fragmento $[M+H-120-18]^+$ é diferente nos isômeros, sendo que o 6C-isômero possui alta intensidade relativa enquanto que a o 8C-isômero é abaixo de 10 % de intensidade. Estes isômeros apresentam outras importantes perdas de moléculas pequenas que são específicas de cada isômero. Foi possível observar também que a intensidade do íon molecular é maior que 50 % para o isômero 6-C glicosilado. Como o tipo de experimento realizado por esses autores foram diferentes (LC-APCI-MS ou LC-ES-MS no modo negativo e positivo) dos realizados neste trabalho, os resultados não puderam ser perfeitamente comparados aos obtidos no espectro de massas (FIGURA 4.34d-e, p. 153).

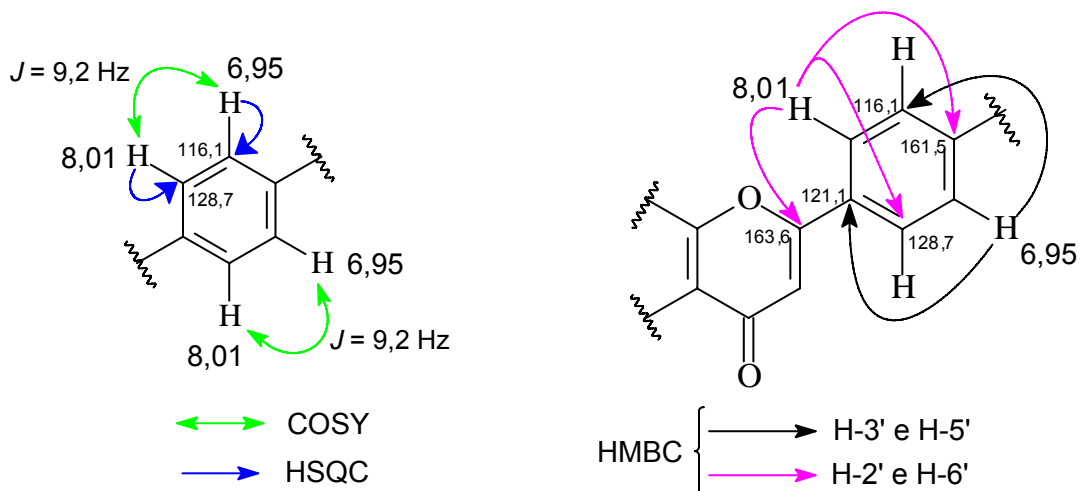
Os espectros de massas (FIGURA 4.34d-e, p. 153) exibem o mesmo tipo de fragmentação típica de C-glicosilflavonas conforme descrito no item 4.5.3 (p. 143) e discutido acima, os quais a partir do íon molecular $[M-H]^-$ verificou-se a perda dos fragmentos $[M-H-90]^-$; $[M-H-120]^-$; $[M-H-146-18]^-$ característicos de di-C-glicosilflavonas. Pode-se observar também a saída de $[M-H-146-18]^-$ a partir dos íons pseudomoleculares de m/z 649,6 e também de m/z 619,7 sendo que a partir deste tem-se o pico base (m/z 455,5). Ainda no espectro de massas verificou-se o fragmento m/z 335,5 referente à perda de $[M-H-120]^-$ a partir do pico base (m/z 455,5). Os fragmentos obtidos são todos das unidades glicosídicas. Não se observa fragmentações na aglicona apigenina (m/z 270). No ESQUEMA 4.5 (p. 173) no item 4.5.5 tem-se a proposta de fragmentação para a substância **XI**, sendo que os fragmentos obtidos e o caminho de fragmentação são iguais ao da substância **X**.

A análise do espectro de RMN ^1H permitiu observar um sinal em δ_{H} 13,72 (s, 1H; FIGURA 4.36, p. 162) característico de hidrogênio de hidroxila quando esta se encontra quelada na posição C-5. A presença de um singlete e δ_{H} 6,66 (s, 1H; FIGURAS 4.37, p. 162 e 4.38, p. 163) que se correlaciona com um carbono em δ_{C} 102,3 (HSQC, FIGURAS 4.39, p. 164 e 4.40, p. 164) é um sinal característico do hidrogênio H-3 de flavona. No mapa de correlações HMBC (FIGURAS 4.41, p. 164 e 4.42, p. 165) observou-se que este singlete (δ_{H} 6,66) se correlaciona com os carbonos em δ_{C} 121,8; δ_{C} 163,6 e δ_{C} 99,7 atribuídos à C-1'; C-2 e C-10, respectivamente.

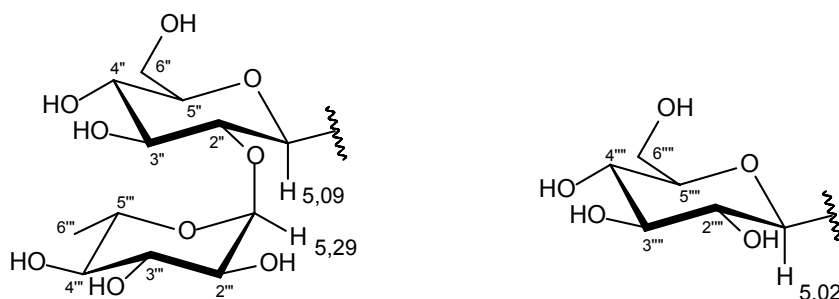


Ainda no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.37, p. 162 e 4.38, p. 163) têm-se um par de dubletos integrando para dois hidrogênios com deslocamentos em δ_{H} 8,01 (H-2', H-6') e δ_{H} 6,95 (H-3' e H-5') com constante de acoplamento *orto* ($J = 9,2$ Hz) os quais são quimicamente equivalentes devido à livre rotação do anel B. No espectro de HSQC (FIGURAS 4.39, p. 163 e 4.40, p. 164) verificou-se que estes dois hidrogênios se correlacionam com os carbonos δ_{C} 128,7 (C-2', C-6') e δ_{C} 116,1 (C-3' e C-5') e no espectro de HMBC (FIGURAS 4.41, p. 164 e 4.42, p. 165) observou-se a correlação do hidrogênio em δ_{H} 8,01 (H-2', H-6') com os carbonos δ_{C} 163,6 (C-2); δ_{C} 128,7 (C-2', C-6') e δ_{C} 161,5 (C-4'); o hidrogênio δ_{H} 6,95 (H-3' e H-5') mostra correlação com os carbonos em δ_{C} 116,1 (C-3' e C-5') e δ_{C} 121,8 (C-1'). Esses dados sugerem a presença da aglicona da apigenina com as posições C-6 e C-8 do anel A substituídas. A observação de sinais na região entre δ_{H} 3,0-5,0

do espectro (RMN ^1H , FIGURAS 4.37, p. 162) indicam a presença de glicosídeos.

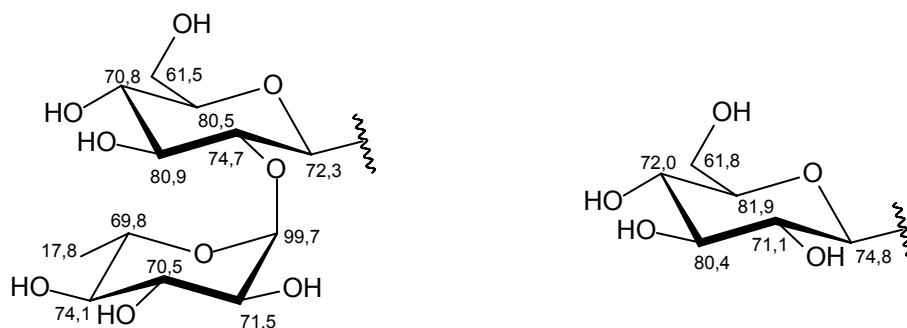


Através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.37, p. 162 e 4.38, p. 163) verificou-se a presença de três hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,29 (d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 1H); δ_{H} 5,09 (d, $J = 9,2 \text{ Hz}$, 1H) e δ_{H} 5,02 (d, $J = 10,0 \text{ Hz}$, 1H) a qual confirma a discussão acima com os dados do espectro de massas. O duplete em δ_{H} 0,61 (3H, H-6''', $J = 9,2 \text{ Hz}$) é característico de metila de uma unidade de ramnose e este se correlaciona com o hidrogênio em δ_{H} 5,29 no espectro de COSY (FIGURAS 4.43, p. 165 e 4.44, p. 166), sugerindo então a presença de duas unidades de glicoses e uma unidade de ramnose. Estes hidrogênios mostram correlação com os carbonos (HSQC, FIGURAS 4.39, p. 163 e 4.40, p. 164) em δ_{C} 74,8 (C-1''); δ_{C} 72,3 (C-1''') e δ_{C} 99,7 (C-1''''') a qual permite supor que as duas glicoses estão ligadas diretamente na aglicona e que a ramnose está ligada em uma das duas glicoses, ou seja, dois C-glicosídeos e um O-glicosídeo.



O espectro em 2D de correlação homonuclear de COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (FIGURA 4.44, p. 166, TABELA 4.12, p. 162) foi usado para a confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios das duas glicoses e da raminose, e dessa forma pode-se atribuir os valores de deslocamentos dos mesmos.

Para se determinar a posição na qual os glicosídeos estão ligados na aglicona utilizou-se as correlações do espectro de HMBC (FIGURA 4.42, p. 165) e observou-se que o hidrogênio em δ_{H} 5,09 se correlaciona com os carbonos em δ_{C} 159,3 e δ_{C} 74,7 atribuídos a C-5 e C-2"; o hidrogênio em δ_{H} 5,02 se correlaciona com o sinal em δ_{C} 107,6 (C-8) e δ_{H} 5,29 se correlaciona com os sinais em δ_{C} 69,8 (C-5'''); δ_{C} 71,5 (C-2''') e δ_{C} 70,5 (C-3'''). A ligação interglicosídica entre a raminose e a glicose na posição C-6 foi confirmada no carbono C-2 da unidade de glicose pelo valor do deslocamento químico do mesmo (δ_{C} 74,7), a qual apresenta um sinal de carbono com valor mais desblindado (efeito α), assim como pela desblindagem nos carbonos viscinais C-1 e C-3 (δ_{C} 72,3 e δ_{C} 80,9) os quais apresentam deslocamentos mais altos (efeito β ; HUSSEIN *et al.*, 1997) quando comparados aos carbonos correspondentes C-2" (δ_{C} 71,09); C-1" (δ_{C} 74,35) e C-3" (δ_{C} 78,72) da 6-C-glicosilapigenina (isovitexina, DMSO; RAYYAN *et al.*, 2004).

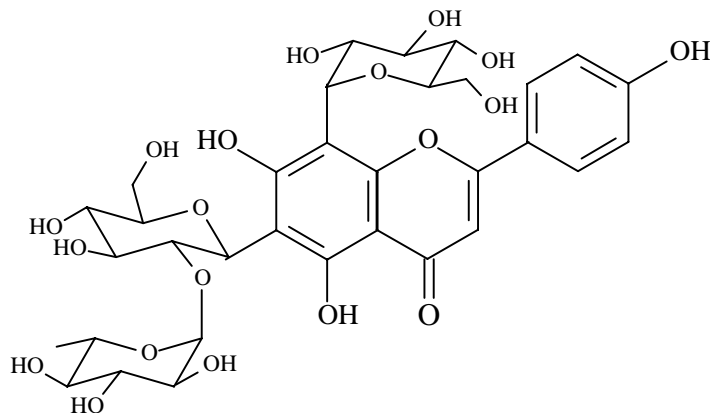


Através dos experimentos de HSQC (FIGURAS 4.39, p. 163 e 4.40, p. 164) e HMBC (FIGURAS 4.41, p. 164 e 4.42, p. 165) pode-se atribuir todos os carbonos da substância **Xa** (majoritária) que com a análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (RAYYAN *et al.*, 2004 e VELOZO *et al.*, 2009, TABELA 4.13, p. 161) indicaram ser a flavona apigenina 6-C-(2"-O- α -L-

raminopiranosil- β -D-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside ou apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside.

O confômero (rotâmero) minoritário **Xb** apresentou no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.37, p. 162 e 4.38, p. 163) o singlete δ_{H} 6,61 (H-3) que se correlaciona com o carbono em δ_{C} 104,5 (HSQC, FIGURA 4.39, p. 163) e o hidrogênio δ_{H} 13,79 atribuído à hidroxila em C-5, sendo estes sinais característicos de uma flavona. Observou-se também os dubletos δ_{H} 7,90 (2H, $J = 8,4$ Hz,); δ_{H} 6,93 (2H, $J = 8,4$ Hz,) e δ_{H} 5,30 (1H, $J = 2,4$ Hz,) atribuídos à H-2', H-6'; H-3', H-5'; o último sinal é referente ao hidrogênio anomérico da raminose e através do espectro de COSY (FIGURA 4.44, p. 166) foi possível determinar a sequência dos hidrogênios H-2'''' (δ_{H} 3,59); H-3'''' (δ_{H} 3,45); H-4'''' (δ_{H} 3,14), H-5'''' (δ_{H} 2,15) e H-6'''' (δ_{H} 0,68) os quais mostram correlações no espectro de HSQC com os carbonos em δ_{C} 100,5; δ_{C} 71,3; δ_{C} 72,1; δ_{C} 74,8; δ_{C} 69,0 e δ_{C} 18,0, respectivamente. Esses dados confirmam a presença do rotâmero **Xb**.

Os experimentos de RMN de 1D e 2D foram realizados em MeOD para melhor definição e atribuição dos sinais da região glicosídica, já o experimento de ^{13}C foi realizado em DMSO uma vez que a fração **B** é muito polar e solubiliza melhor quando em altas concentrações no segundo solvente citado. Assim há uma pequena diferença nos valores de deslocamentos químicos nestes dois solventes tanto para carbono quanto para próton (TABELAS 4.12, p. 160 e 4.13, p. 161).



Apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside (**X**)

TABELA 4.12: Dados de RMN de ^1H de apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside (**Xa** e **Xb**) e modelos utilizados na determinação da estrutura [Lit: a) RAYYAN *et al.*, 2004; rotâmero majoritário; b) VELOZO *et al.*, 2009; c) RAYYAN *et al.*, 2004; rotâmero minoritário].

H	δ_{H} (ppm), J (Hz) ¹				
	Xa MeOD, 400 MHz	Lit. a 2"-O-raminosil- isovitexina MeOD, 600 MHz	Lit. b Vicenin II DMSO 500 MHz	Xb MeOD, 400 MHz	Lit. c 2"-O-raminosil- isovitexina DMSO 600 MHz
2					
3	6,66 (s)	6,70 (s)	6,70 (s)	6,61 (s)	
4					
5	13,72 (s)		13,70 (s)	13,72 (s)	
6					
7					
8		6,62 (s)			6,48 (s)
9					
10					
1'					
2', 6'	8,01 (d, 9,2)	7,94 (d, 8,8)	8,00 (d, 8,9)	7,90 (d, 8,4)	
3', 5'	6,95 (d, 9,2)	7,02 (d, 8,8)	6,90 (d, 8,9)	6,93 (d, 8,4)	
4'					
1''	5,09 (d, 9,0)	4,03 (sl)	4,75 (d, 9,8)		4,66 (d, 9,7)
2''	4,31 (dd, 8,0; 8,3)	4,36 (m)	3,86 (m)		4,17 (t, 9,5)
3''	3,63 (m)	3,66 (m)	3,29 (m)		3,36 (m)
4''	3,43 (m)	4,66 (m)	3,29 (m)		
5''	3,30 (m)	3,47 (m)	3,30 (m)		3,11 (m)
6a''/b	a 3,95 (m) b 3,78 (m)	a 3,97 (m) b 3,81 (m)	a 3,50 (m) b 3,78 (m)		a 3,68 (m) b 3,41 (m)
1'''	5,02 (d, 10,0)		4,88 (d, 9,8)		
2'''	3,61 (m)		3,86 (m)		
3'''	3,42 (m)		3,38 (m)		
4'''	3,35 (m)		3,42 (m)		
5'''	3,40 (m)		3,25 (m)		
6'''a/b	a 3,92 (m) b 3,75 (m)		a 3,50 (m) b 3,78 (m)		
1''''	5,29 (d, 2,4)	5,32 (sl)		5,30 (d, 2,4)	5,02 (sl)
2''''	3,85 (m)	3,96 (dd, 1,8; 3,2)		3,59 (m)	3,61 (m)
3''''	3,31 (m)	3,51 (m)		3,45 (m)	3,09 (m)
4''''	3,11 (m)	3,21 (t, 9,7)		3,14 (m)	
5''''	2,13 (m)	2,64 (m)		2,15 (m)	
6''''	0,61 (d, 9,2)	0,84 (sl)		0,68 (d, 8,0)	0,59 (d, 6,1)

TABELA 4.13: Dados de RMN de ^{13}C de apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside (**Xa** e **Xb**) e modelos utilizados na determinação da estrutura [Lit: a) RAYYAN *et al.*, 2004; rotâmero majoritário; b) VELOZO *et al.*, 2009; c) RAYYAN *et al.*, 2004; rotâmero minoritário].

C	δ_c (ppm)						
	Xa (^{13}C) DMSO, 125 MHz	Xa (HSQC) MeOD 125 MHz	Lit. a		Lit. b		Lit. c
			DMSO 150 MHz	MeOD 150 MHz	DMSO 125 MHz	DMSO, 125 MHz	
2	163,6	167,0	163,2	166,2	163,9		
3	102,3	103,8	102,8	103,9	102,4	104,5	
4	181,8		181,4	184,1	182,0		182,5
5	159,3	157,0	161,3	164,6	158,3	160,5	160,0
6	105,5		109,0	109,6	108,3		108,7
7	160,5	161,5	162,6	164,8	161,3		163,5
8	107,6	109,0	93,0	95,1	105,1		94,3
9	157,0	155,4	156,2	158,8	155,1		156,4
10	99,7	103,0	103,8	105,5	102,4		103,5
1'	121,8	122,5	121,1	123,1	121,4		
2', 6'	128,7	130,0	128,4	129,5	128,8	129,2	
3', 5'	116,1	117,0	116,1	117,0	115,9	117,0	
4'	161,5	163,0	161,1	162,8	161,3		
1''	72,3	73,5	71,3	73,5	74,3		71,2
2''	74,7	75,8	74,6	77,5	71,9		75,8
3''	80,9	81,0	80,0	81,4	78,8		79,7
4''	70,8		70,9	77,2	70,3		70,9
5''	80,5		81,4	82,4	81,4		81,5
6''	61,5		61,9	62,9	61,1		61,3
1'''	74,8	75,9			73,9		
2'''	71,1				71,9		
3'''	80,4				78,8		
4'''	72,0				70,5		
5'''	81,9				81,8		
6'''	61,8				60,7		
1''''	99,7	101,0	100,4	101,9		100,5	100,7
2''''	71,5	71,5	72,3	72,0		71,3	70,6
3''''	70,5	70,0	72,0	72,3		72,1	70,3
4''''	74,1		73,1	73,9		74,8	
5''''	69,8	69,0	69,9	69,7		69,0	
6''''	17,8		18,0	18,0		18,0	17,7

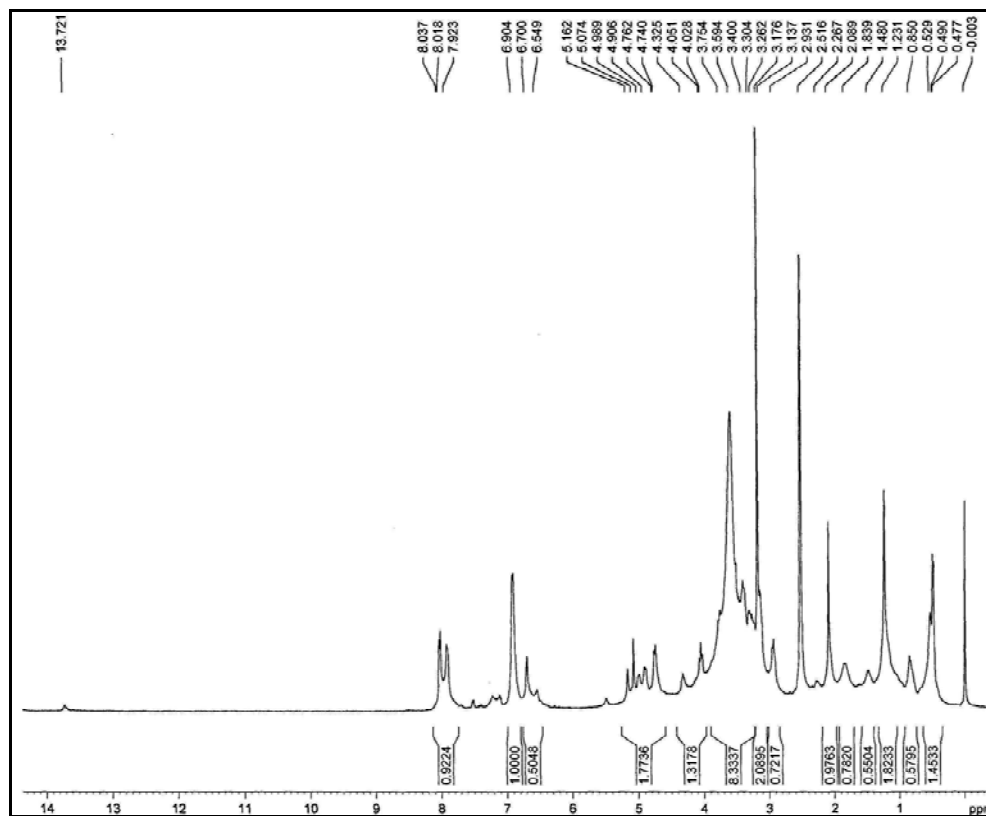


FIGURA 4.36: Espectro de RMN ^1H da flavona (X) (DMSO, 400 MHz).

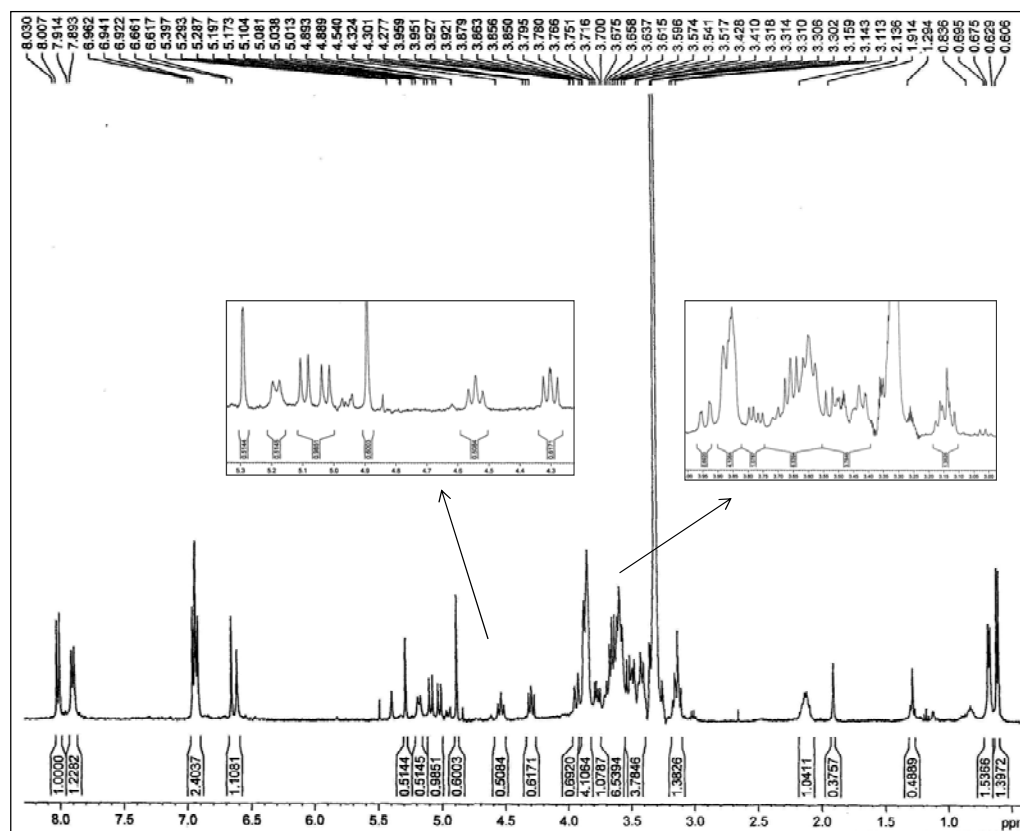


FIGURA 4.37: Espectro de RMN ^1H da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

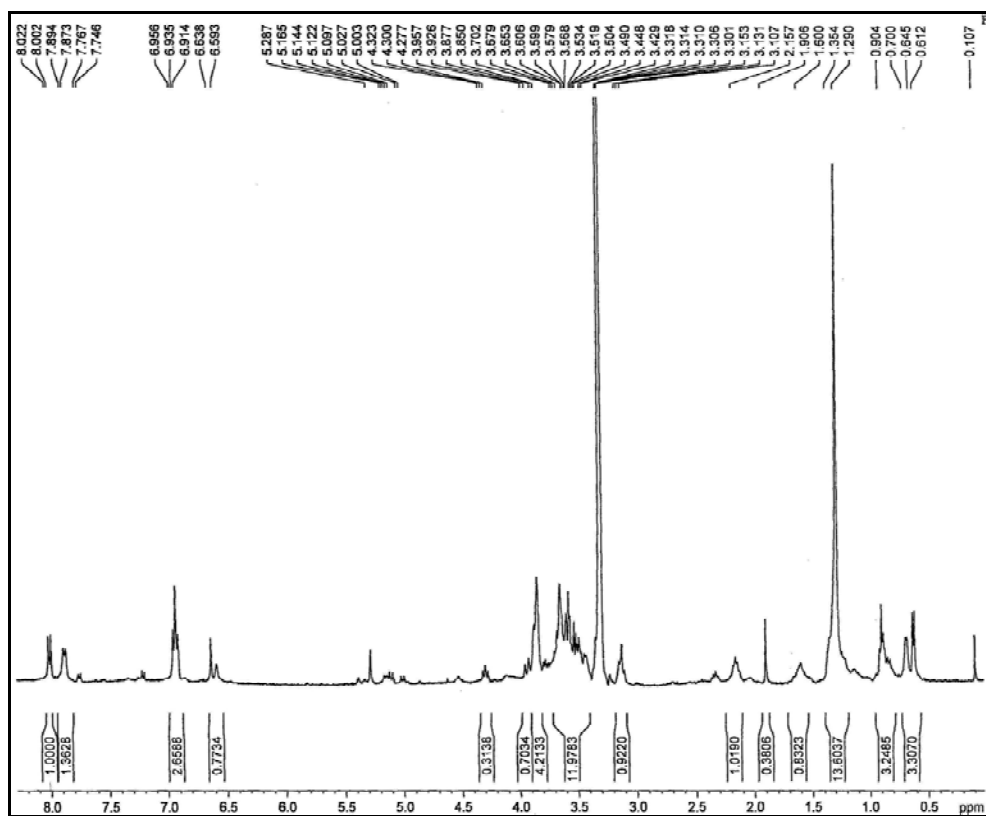


FIGURA 4.38: Espectro de RMN ^1H da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

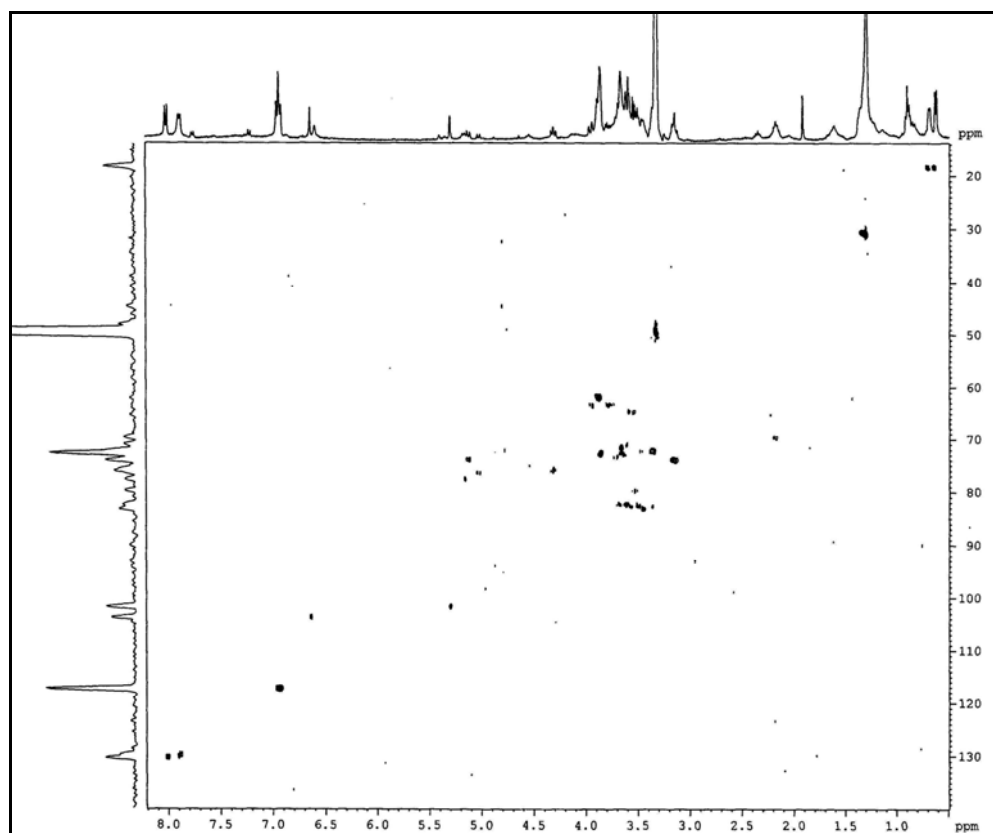


FIGURA 4.39: Mapa de correlações HSQC da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

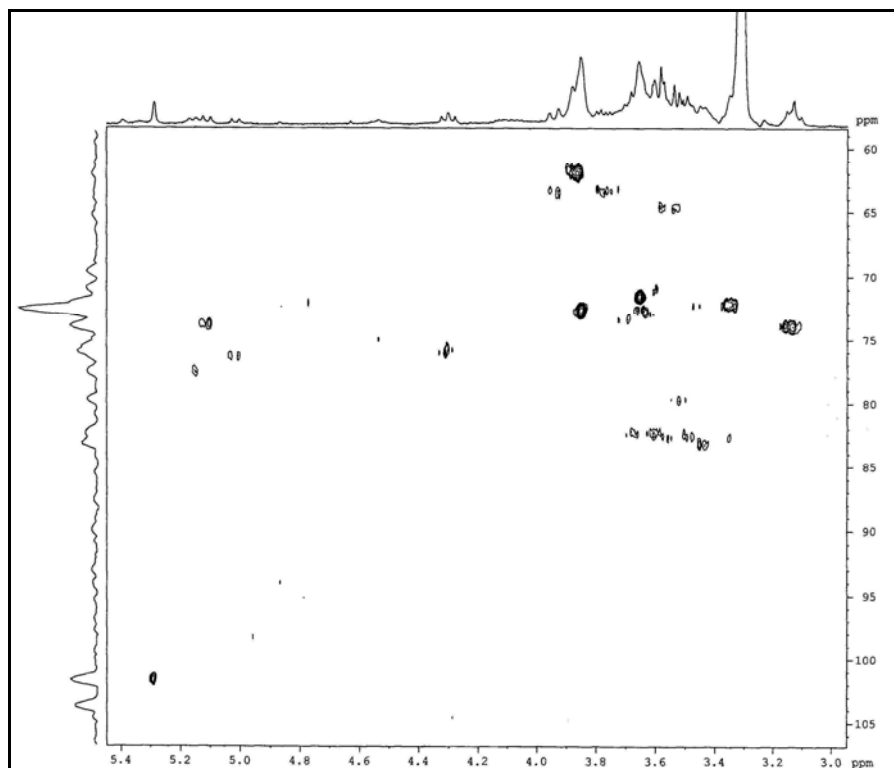


FIGURA 4.40: Ampliação do mapa de correlações HSQC da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

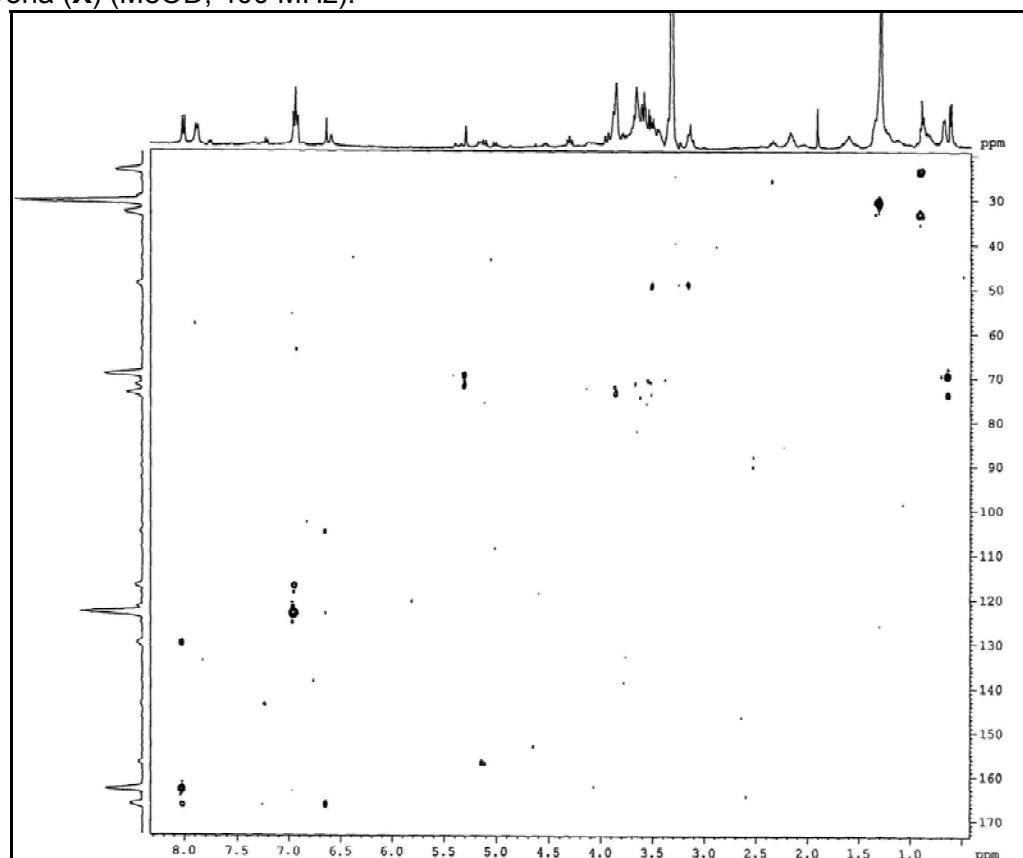


FIGURA 4.41: Mapa de correlação HMBC da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

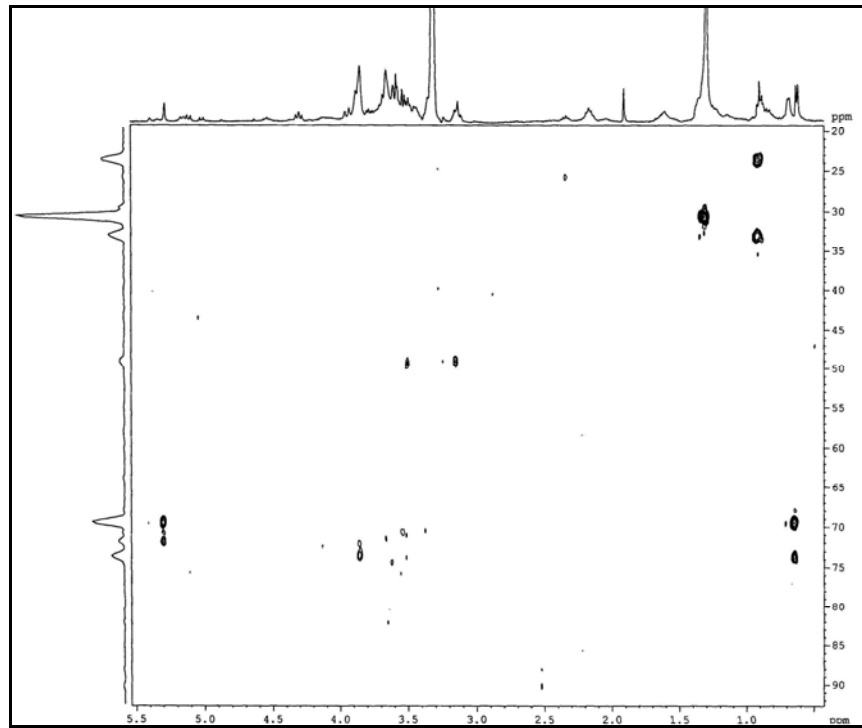


FIGURA 4.42: Ampliação do mapa de correlação HMBC da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

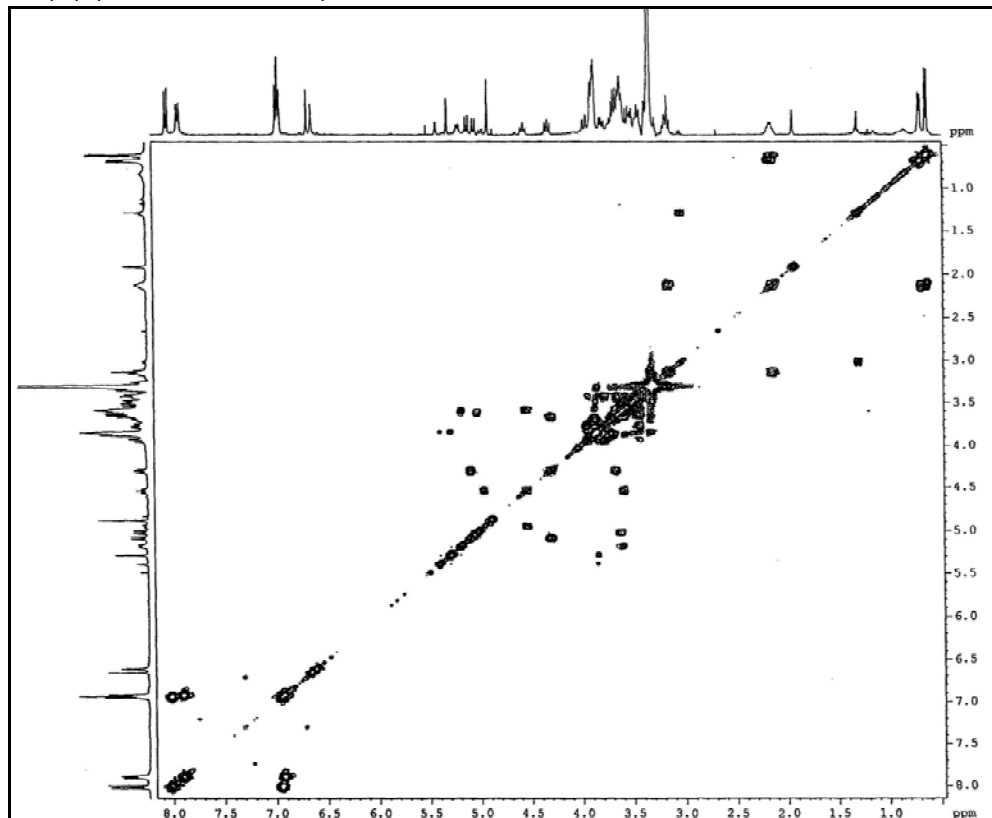


FIGURA 4.43: Espectro de COSY da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

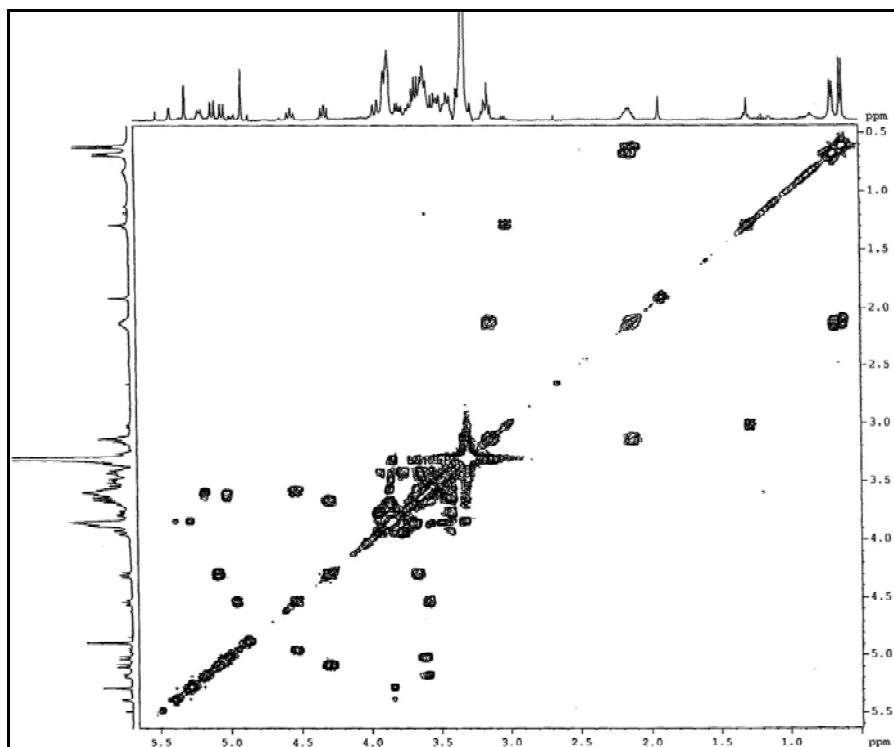


FIGURA 4.44: Ampliação do espectro de COSY da região dos açúcares da flavona (X) (MeOD, 400 MHz).

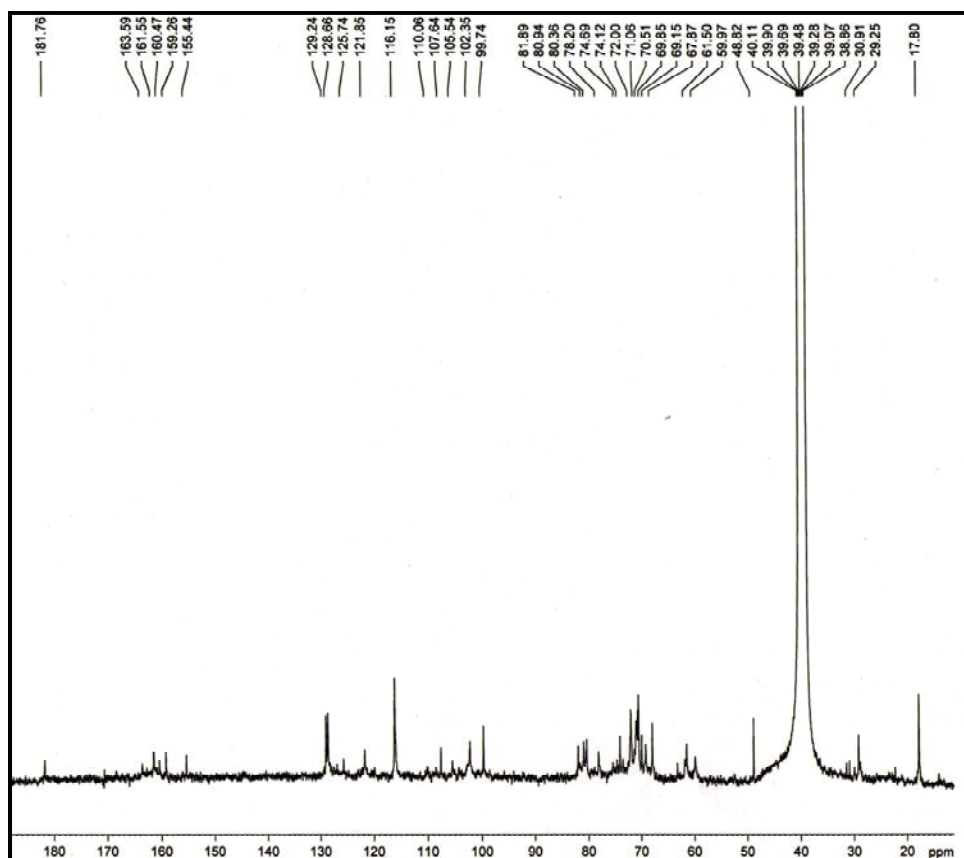


FIGURA 4.45: Espectro de ^{13}C da flavona (X) (DMSO, 400 MHz).

4.5.5 – Determinação estrutural da substância XI

A substância **XI** foi isolada na forma de dois isômeros conformacionais da subfração **C** (RCMH_C) conforme descrito no item 3.6.6 (p. 73), a qual apresentou-se como sólido amarelo. Esta substância foi identificada através de RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC, HMBC e LC-MS e comparação com dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2004; VELOZO *et al.*, 2009).

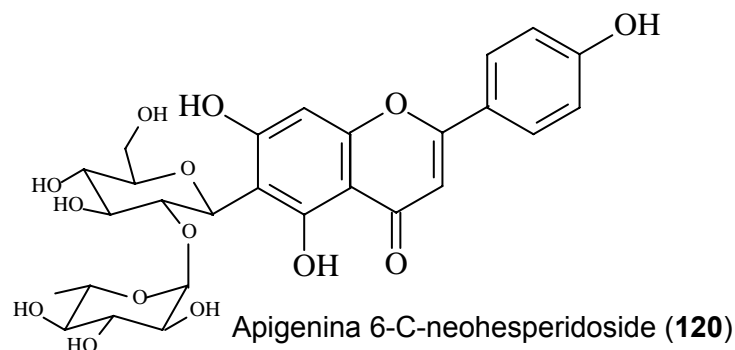
Através da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURAS 4.48-4.40, p. 175) desta subfração **C** verificou-se a presença de dois constituintes com sinais de deslocamentos químicos de flavonas glicosiladas na mesma e com predominância de um deles. Quando o espectro RMN ¹H (FIGURA 4.49, p. 175) foi adquirido em MeOD verificou-se a proporção 9 : 1, já para o espectro RMN ¹H (FIGURA 4.48, p. 175) adquirido em DMSO a proporção observada foi de 8 : 2.

Este comportamento foi descrito por RAYYAN *et al.* (2004) no qual verificou-se que a presença de rotâmeros leva a duplicação de sinais no espectro de RMN nas flavonas que contêm substituintes 8-C-hexosil. Isto ocorre devido às interações entre o anel B da flavona e o substituinte 8-C-hexosil que levam à rotação restrita do anel B e/ou da hexose dando a mistura de dois rotâmeros distinguíveis no espectro de RMN (MARKHAM *et al.*, 1987 *apud* RAYYAN *et al.*, 2004).

No caso das flavonas com 6-C-glicosídeos pode ser observada apenas quando o substituinte possui um grupo glicosil que é volumoso. Pode-se observar também a presença de rotâmeros para 6-C-glicosilflavonas nos casos em que a posição C-7 tenha como substituinte um grupo metoxila ou um O-glicosil (DAVOUST *et al.*, 1980; CHENG *et al.*, 2000; LEWIS *et al.*, 2000; NORBAEK *et al.*, 2000 *apud* RAYYAN *et al.*, 2004).

Ao introduzir uma segunda unidade de açúcar (raminosil) na posição 2” do grupo 8-C-glicosil da flavona, verificou-se que a proporção relativa diminuiu consideravelmente (de 0,06 para 0,26 do rotâmero minoritário) quando mudou-se o solvente de DMSO para o solvente MeOD, o que indica baixa barreira de energia rotacional no equilíbrio dos dois rotâmeros em MeOD comparado com

DMSO. Para a apigenina 6-C-neohesperidoside (**120**) observou-se uma proporção relativa dos rotâmeros de 1.00 : 0.88 quando solubilizada em DMSO e no solvente MeOD não detectou-se sinais distintos para os rotâmeros (RAYYAN *et al.*, 2004).



Para obter mais dados sobre os rotâmeros presentes na fração **C** realizou-se o experimento CL-EM, conforme indicado no item 3.6.6 (p. 73), e observou-se neste estudo que a proporção dos dois é aproximadamente de 83 : 17 (FIGURA 4.46a, p. 169). Esta proporção pode ser confirmada no espectro de RMN ^1H (DMSO, FIGURA 4.49). Os espectros de UV (DAD, FIGURA 4.47b-c, p. 169) dos dois constituintes da mistura são iguais ($\lambda = 215,7; 271,7; 339,7$ nm) e condizentes com a apigenina (**56**, p. 47, $\lambda = 268,5; 336,2$ nm; LI *et al.*, 2007), assim como também são iguais os espectros de massas cuja pseudomolecular obtida para os dois confôrmeros foi de 739 Daltons, conforme mostra a FIGURA 4.46a-b (p. 169).

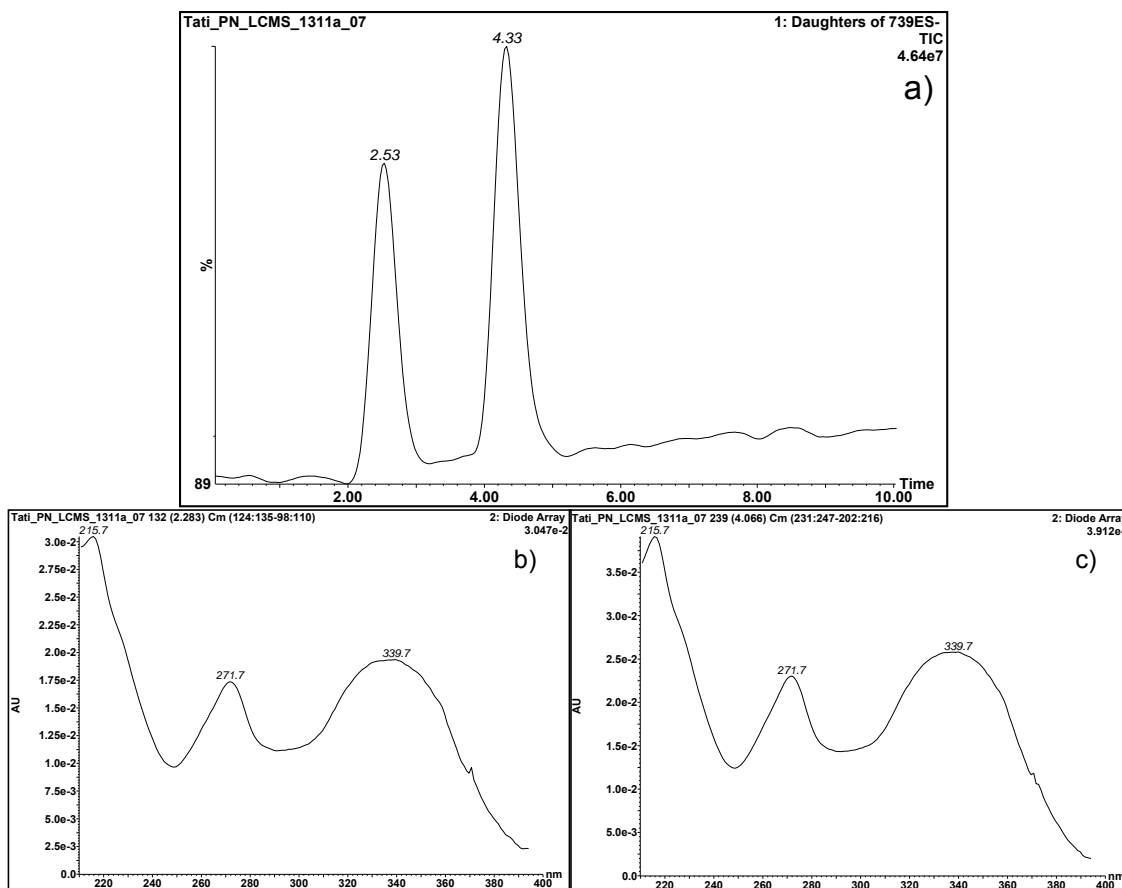


FIGURA 4.46: a) Cromatograma da subfração **C** b) Espectro de UV da flavona **XIa** ($t_R = 2,53$ min); c) espectro de UV da flavona **XIb** ($t_R = 4,33$ min).

Nos espectros de massas (FIGURA 4.47a-b, p. 170) pode-se verificar fragmentação característica de di-C-glicosilflavonas conforme discussão nos itens 4.5.3 (p. 143) e 4.5.4 (p. 151). Analisando a FIGURA 4.34d-e (p. 170) do item anterior (4.5.4, p. 151) pode-se observar ainda que os espectros de massas destas duas subfrações (**B** e **C**) são muito parecidos, diferenciando-se apenas pela intensidade de alguns picos, dentre eles o pico do íon molecular $[M-H]^-$ o que indica a presença de isômeros de posição entre as subfrações **B** e **C**. No ESQUEMA 4.5 (p. 173) tem-se a proposta de fragmentação da flavona (**XI**).

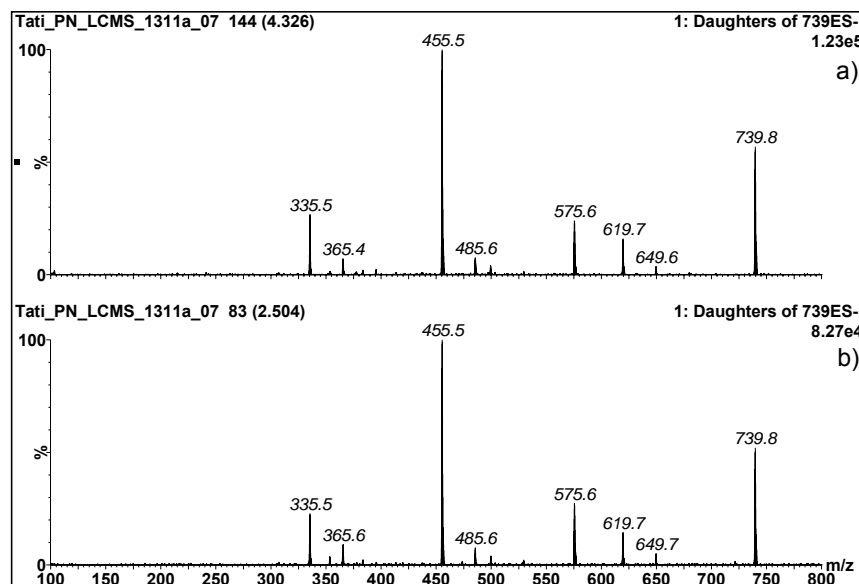
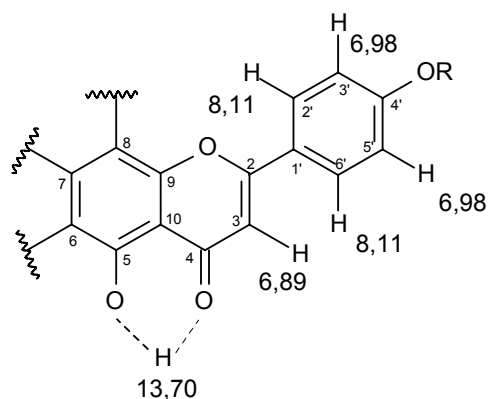


FIGURA 4.47: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ [ion pseudomolecular] da flavona **XIa** ($t_R = 4,45$ min); b) da flavona **XIb** ($t_R = 2,5$ min).

Analisando os espectros de RMN 1H (FIGURA 4.48-4.49, p. 175) observou-se um sinal em δ_H 13,70 (s, 1H) característico de hidrogênio de hidroxila quando esta se encontra quelada, posicionada em C-5. Os dubletos em δ_H 8,11 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H) e δ_H 6,98 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H) foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3' e H-5' os quais devido à livre rotação do anel B são quimicamente equivalentes. A presença de um singlete em δ_H 6,89 (s, 1H) é um sinal característico do hidrogênio H-3 em flavonas.



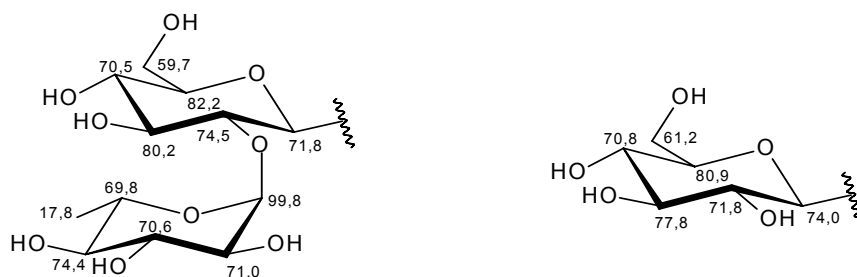
No espectro de HMBC (FIGURA 4.50, p. 176) foi observada a correlação do sinal δ_H 8,11 correspondente a H-2'/H-6', com o sinal em δ_C 161,6 referente à C-4'; δ_C 164,4 (C-2) e δ_C 130,0 (C-2'/C-6'). O sinal δ_H 6,98 (H-3'/H-5') mostra correlação com o sinal δ_C 121,6 atribuído à C-1'. O

hidrogênio H-3 (δ_{H} 6,89) se correlaciona com os carbonos δ_{C} 121,6 (C-1'); δ_{C} 107,4 (C-10) e δ_{C} 164,4 (C-2).

Analisando ainda, o espectro de HMBC (FIGURA 4.50, p. 176) verificou-se as correlações do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 4,86, d, $J = 9,6$ Hz) com os carbonos δ_{C} 71,8 (C-2''); δ_{C} 107,4 (C-10); δ_{C} 105,4 (C-6); δ_{C} 160,5 (C-5) e δ_{C} 158,9 (C-7) e no espectro de HSQC (FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177) este hidrogênio mostra correlação com o carbono δ_{C} 74,0 (C-1'') e desta forma verificou-se que este glicosídeo está ligado diretamente na posição C-6 da flavona.

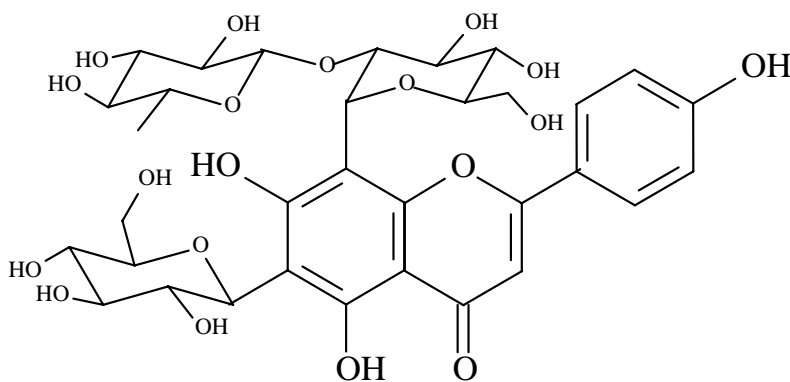
O outro hidrogênio anomérico com sinal em δ_{H} 4,88 (d, $J = 8,8$ Hz) mostra correlação com o carbono δ_{C} 71,8 (C-1'''); HSQC, FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177); δ_{C} 74,5 (C-2'''); δ_{C} 155,1 (C-9); δ_{C} 107,4 (C-10) no espectro de HMBC (FIGURA 4.50, p. 176). Estes dados indicam que esta glicose está ligada diretamente na posição C-8, e as duas glicoses apresentam configuração β devido à constante de acoplamento como mostra a TABELAS 4.8 (p. 140) e 4.9 (p. 142).

A terceira unidade de açúcar apresenta um singlete largo em δ_{H} 5,10 (RMN ^1H , FIGURA 4.49, p. 175) e mostra correlação no espectro de COSY (FIGURA 4.53, p. 177) com o dubleto em δ_{H} 0,50 (3H, $J = 6,0$ Hz) os quais são característicos de uma unidade de raminose. Este hidrogênio anomérico mostra no espectro de HSQC (FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177) correlação com carbono δ_{C} 99,8 (C-1''') a qual indica uma ligação O-glicosídeo. No espectro de HMBC (FIGURA 4.50, p. 176) mostra correlação com os carbonos δ_{C} 74,5 (C-2'''); δ_{C} 71,5 (C-2'''); δ_{C} 70,6 (C-3''') e δ_{C} 69,8 (C-5'''). Estes dados indicam a presença de uma neohesperidose (rha 1 \rightarrow 2 glu) na posição C-8 da flavona apigenina.



Através dos experimentos de RMN (FIGURAS 4.48 a 4.54, p. 175 a 178) pode-se atribuir todos os deslocamentos químicos da substância **XI** que com a análise do conjunto de dados de CL-EM em comparação com a literatura (RAYYAN *et al.*, 2004; VELOZO *et al.*, 2009; TABELA 4.14, p. 174) indicaram ser a flavona apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2''-O- α -L-raminopiranosil- β -D-glucopiranoside) ou apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside.

O confômero (rotâmero) minoritário **XIb** apresentou no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.48-4.49, p. 175) o singlete δ_{H} 6,79 (H-3) que se correlaciona com o carbono em δ_{C} 104,5 (HSQC, FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177) e o hidrogênio δ_{H} 13,79 atribuído à hidroxila em C-5, sendo estes sinais característicos de uma flavona. Observou-se também os dubletos δ_{H} 7,93 (2H, $J = 8,4$ Hz,); δ_{H} 6,95 (2H, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 0,68 ($J = 8,4$ Hz) e o multiplete δ_{H} 5,15 (m) atribuídos à H-2'/H-6'; H-3'/H-5' ao sinal da metila e ao hidrogênio anomérico da raminose. O espectro de HSQC (FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177) mostra a correlação do sinal em δ_{H} 7,93 (H-2'/H-6') com o sinal em δ_{C} 130,0 (C-2'/C-6'), do hidrogênio em δ_{H} 6,95 (H-3'/H-5') com o carbono em δ_{C} 116,0 (C-3'/C-5'). Os sinais em δ_{H} 0,68 (H-6''') e δ_{H} 5,15 (H-1''') mostram correlação com os carbonos δ_{C} 17,8 (C-6''') e δ_{C} 100,1 (C-1'''), respectivamente (HSQC, FIGURAS 4.51, p. 176 e 4.52, p. 177). Esses dados confirmam a presença do rotâmero **XIb**.



Apigenina 6-C-glicosil-8-C-neohesperidoside (**XI**)

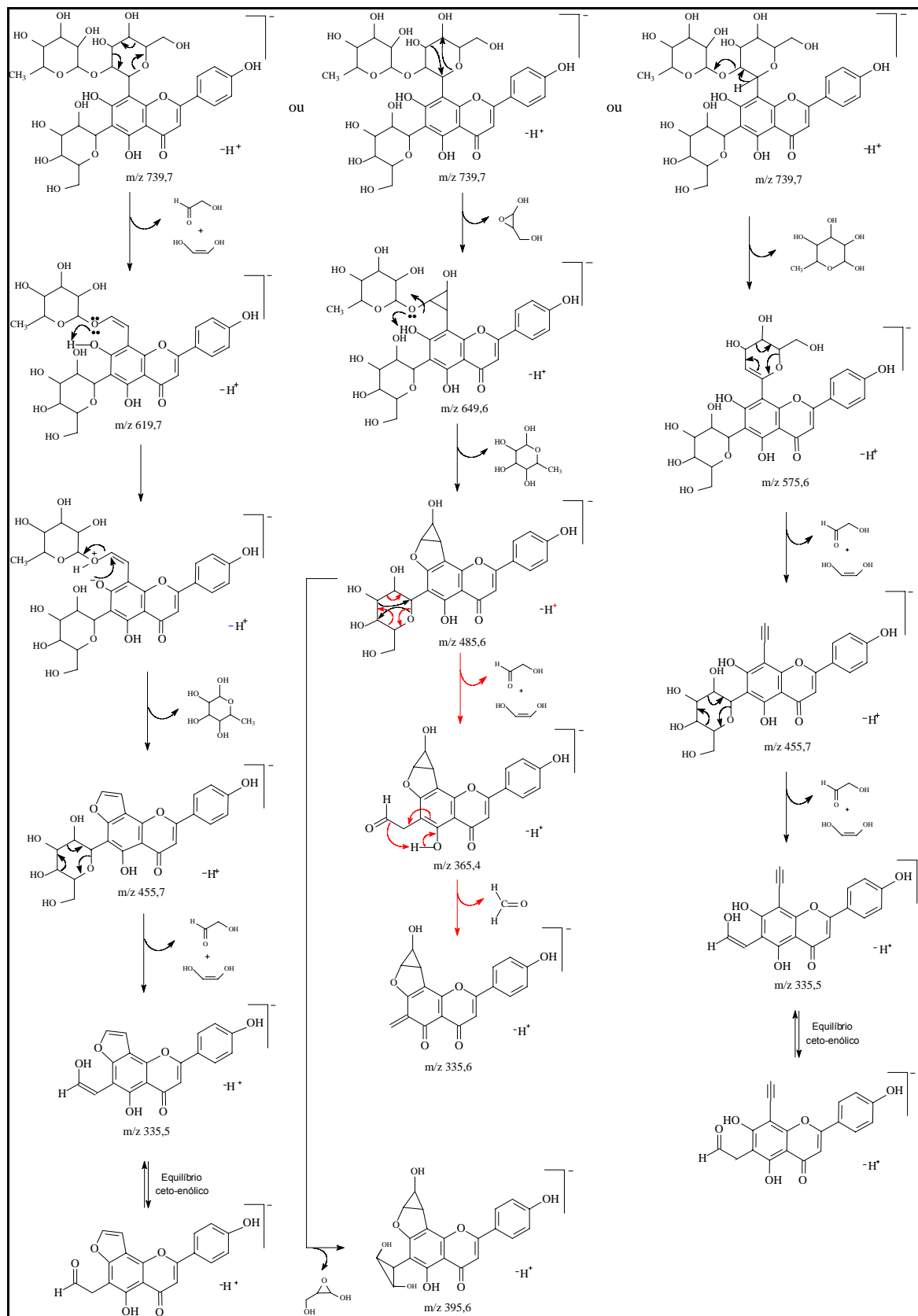


TABELA 4.14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside (**XIa**, DMSO 400/100 MHz; Lit: a) RAYYAN *et al.*, 2004, MeOD 600/300 MHz; b) VELOZO *et al.*, 2009, DMSO, 500/125 MHz).

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)			δ_{C} (ppm)		
	XIa	Lit. a 2''-O-raminosil- vitexina	Lit. b Vicenin II	XIa	Lit. a	Lit. b
2				164,42	166,53	163,91
3	6,89 (s)	6,66 (s)	6,70 (s)	102,67	103,53	102,40
4				182,44	183,99	182,01
5	13,70 (s)		13,70 (s)	160,50	162,56	158,27
6				105,41	99,81	108,27
7				158,86	164,12	161,28
8				104,08	105,52	105,09
9				155,08	157,77	155,09
10				107,42	105,89	102,40
1'				121,57	123,42	121,40
2', 6'	8,11 (d; 9,2)	8,04 (d; 8,7)	8,00 (d; 8,9)	130,0	129,89	128,76
3', 5'	6,98 (d; 9,2)	7,02 (d; 8,7)	6,90 (d; 8,9)	116,0	116,91	115,94
4'				161,61	162,56	161,28
1''	4,86 (d; 9,6)		4,75 (d; 9,8)	73,98		74,32
2''	3,60 m		3,86 m	71,76		71,87
3''	3,38 m		3,29 m	77,76		78,76
4''	3,46 m		3,29 m	70,79		70,32
5''	3,43 m		3,30 m	80,88		81,41
6a''/b	a 3,84 m b 3,59 m		a 3,50 m b 3,78 m	61,23		61,07
1'''	4,88 (d; 8,8)	5,12 (d; 9,9)	4,88 (d; 9,8)	71,76	73,59	73,86
2'''	4,11 (t; 8,8)	4,34 (dd; 9,9; 8,6)	3,86 m	74,50	78,04	71,87
3'''	3,53 m	3,74 m	3,38 m	80,21	81,48	78,84
4'''	3,56 m	3,74 m	3,42 m	70,48	72,12	70,54
5'''	3,30 m	3,55 m	3,25 m	82,21	82,68	81,78
6'''a/b	a 3,82 m b 3,58 m	a 4,06 m b 3,89 m	a 3,50 m b 3,78 m	59,68	63,01	60,66
1''''	5,10 (s)	5,32 sl		99,85	102,37	
2''''	4,70 m	3,96 (dd; 1,8; 3,2)		71,50	72,37	
3''''	3,10 m	3,51 m		70,63	71,84	
4''''	3,02 m	3,21 (t; 9,7)		74,45	73,43	
5''''	1,96 m	2,64 m		69,83	69,84	
6''''	0,50 (d; 6,0)	0,84 sl		17,78	17,97	

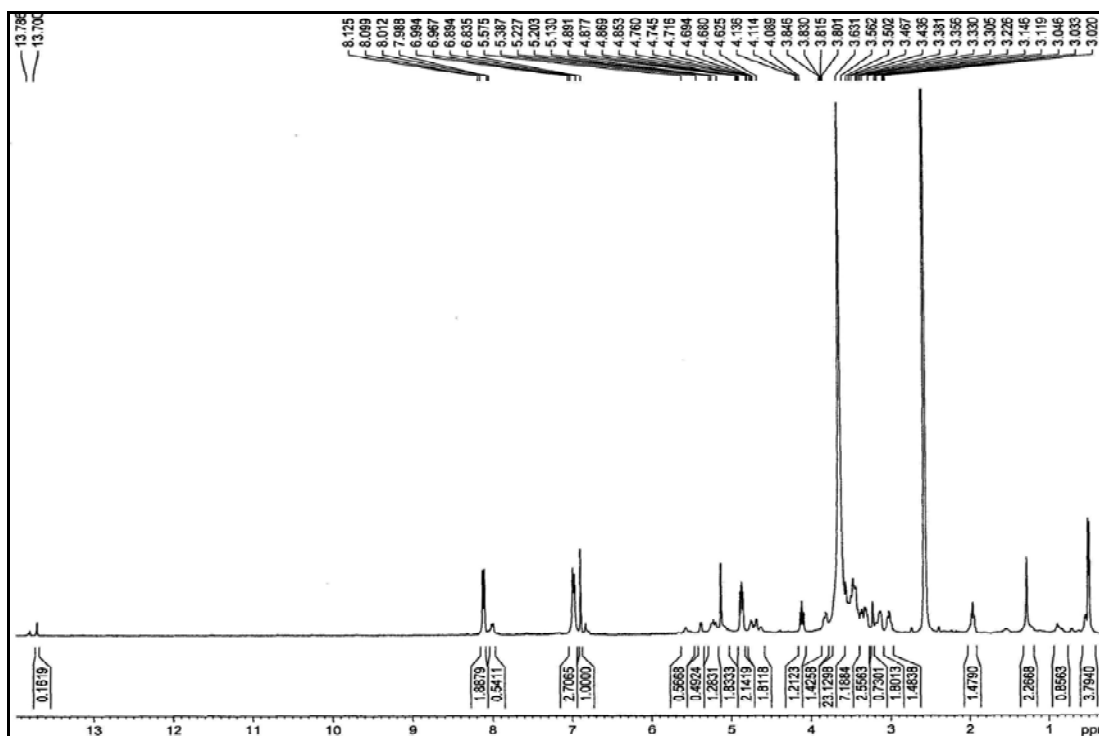


FIGURA 4.48: Espectro de RMN ^1H da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

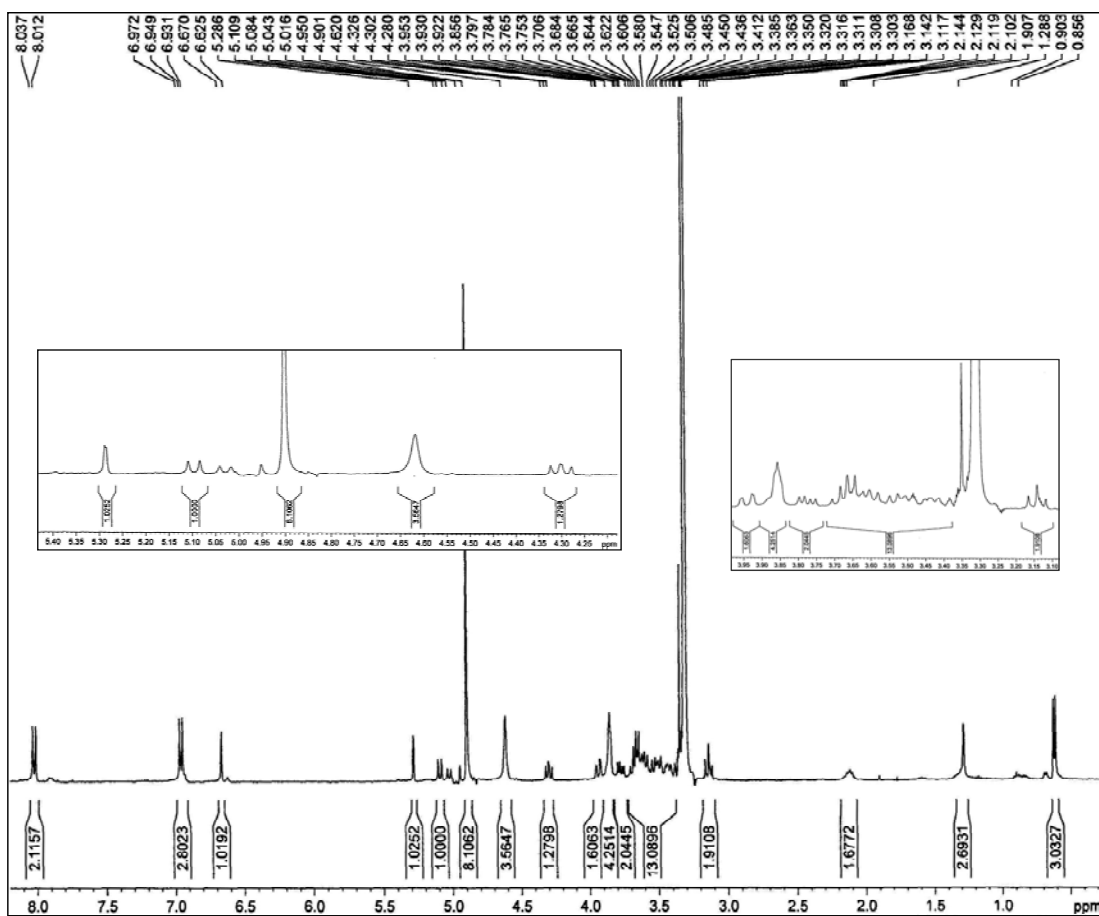


FIGURA 4.49: Espectro de RMN ^1H da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

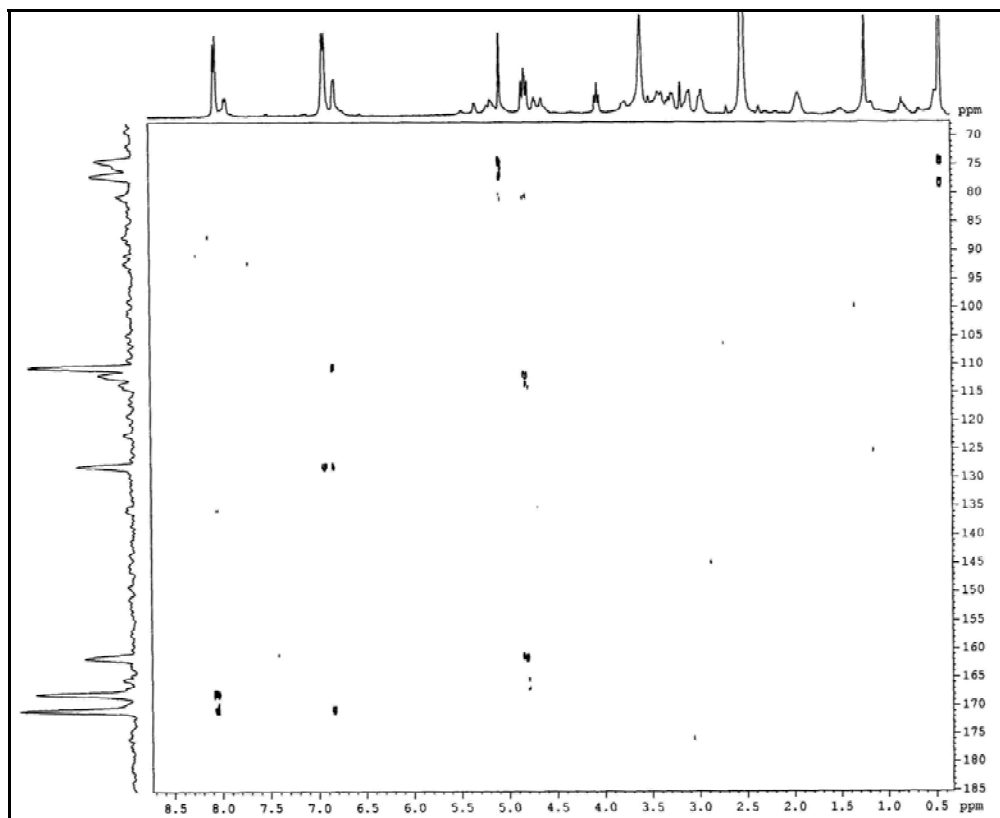


FIGURA 4.50: Mapa de correlação HMBC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

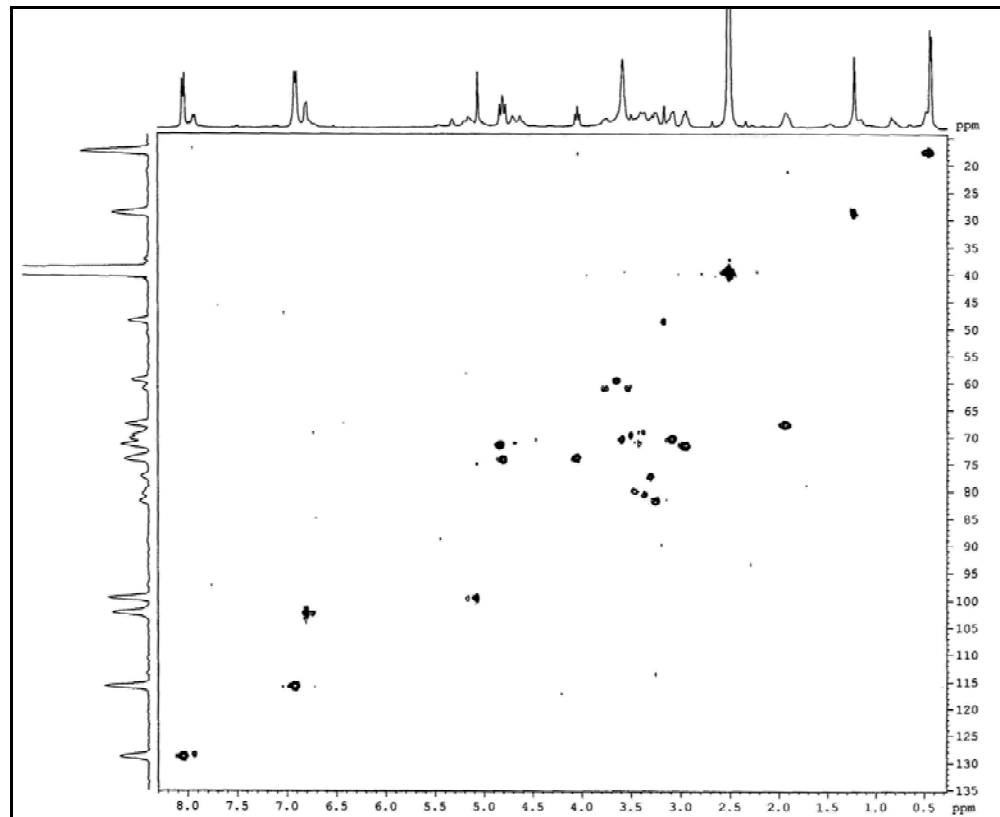


FIGURA 4.51: Mapa de correlações HSQC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

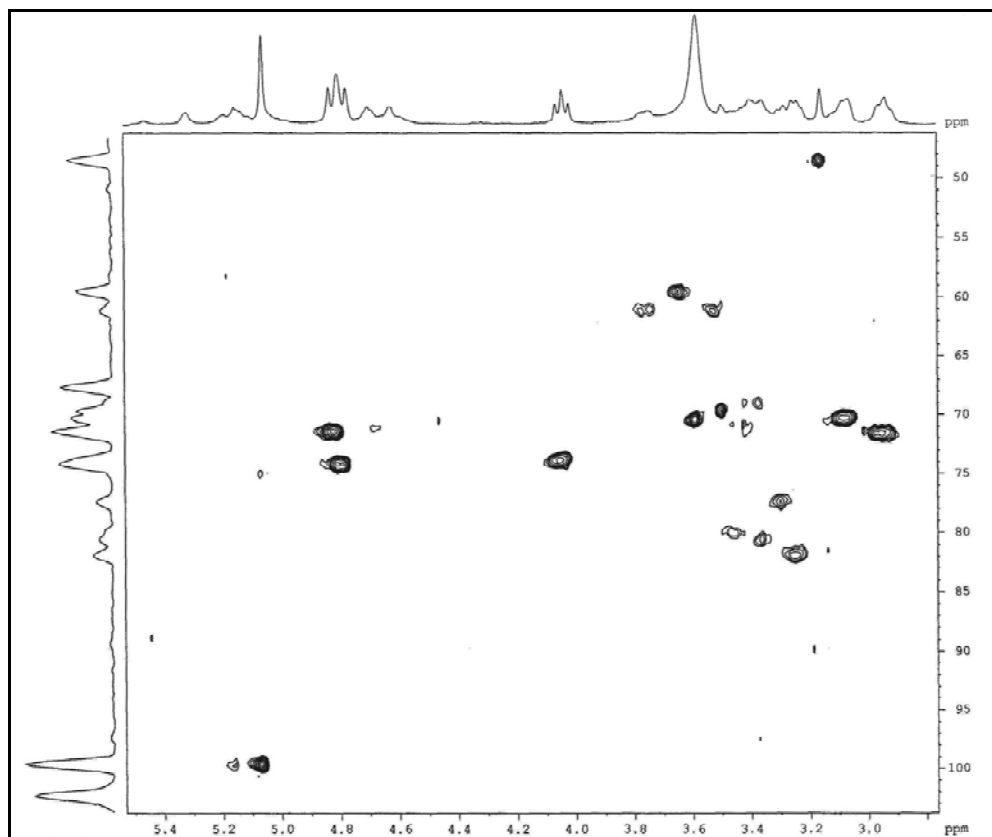


FIGURA 4.52: Ampliação do mapa de correlações HSQC da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

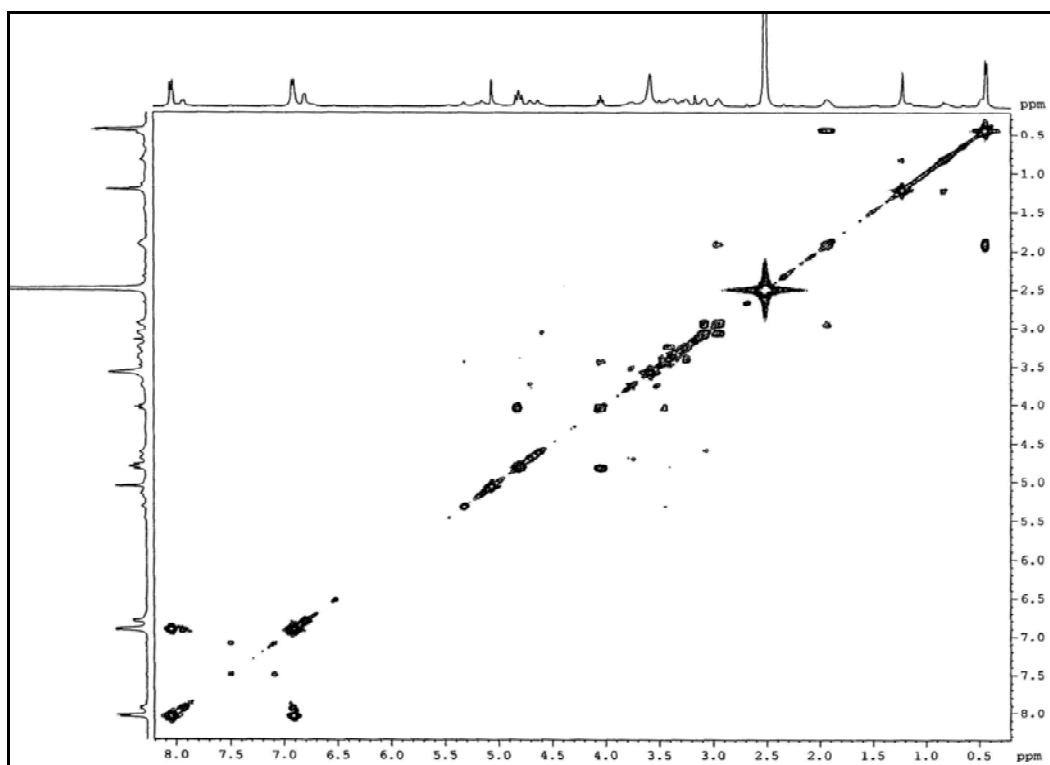


FIGURA 4.53: Espectro de COSY da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

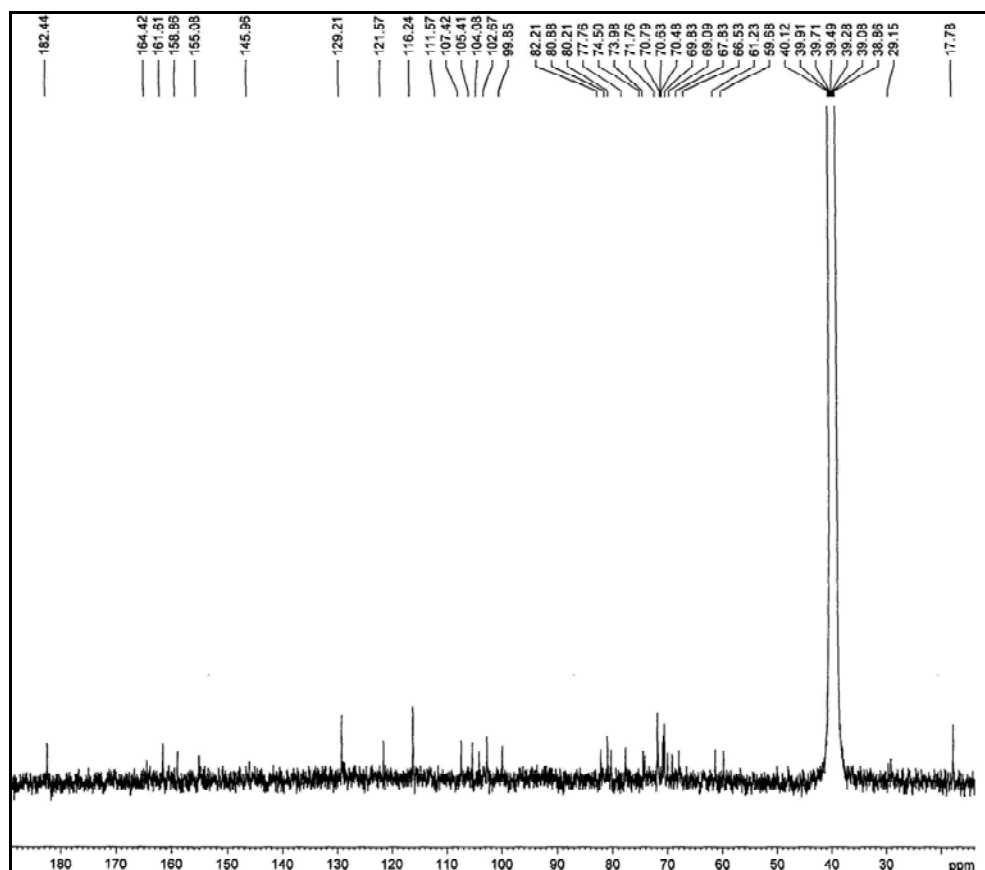


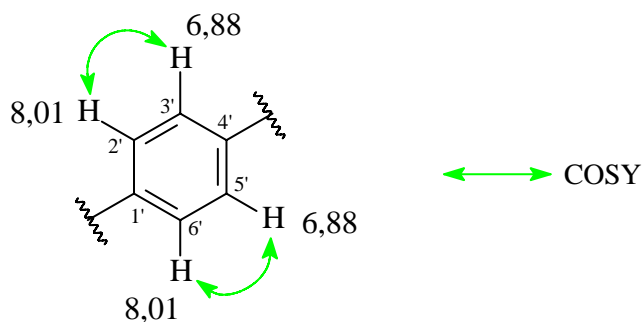
FIGURA 4.54: Espectro de ^{13}C da flavona (XI) (DMSO, 400 MHz).

4.5.6 – Identificação estrutural da substância XII

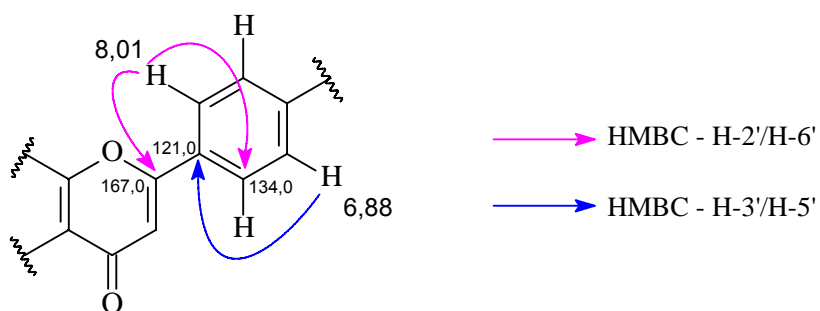
A substância **XII** apresentou-se como sólido amarelo, isolada da subfração **H** (RCMHd-H) como descrito no item 3.6.6 (p. 73) a qual foi identificada através de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC e LC-MS e comparados com dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2004, TABELAS 4.15, p. 187; 4.16, p. 188).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.55, p. 181) apresentou um dubleto δ_{H} 8,01 (d, 2H) e outro dubleto em δ_{H} 6,97 (d, 2H) com constante 10,0 Hz indicando acoplamento *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos à H-2', H-6', H-3' e H-5', respectivamente, cuja equivalência é ocasionada pela livre rotação do anel B. O dubleto correspondente a H-3' e H-5' aparece mais protegido em relação àquele correspondente a H-2' e H-6' devido ao efeito de proteção do substituinte em C-4'. No espectro de COSY

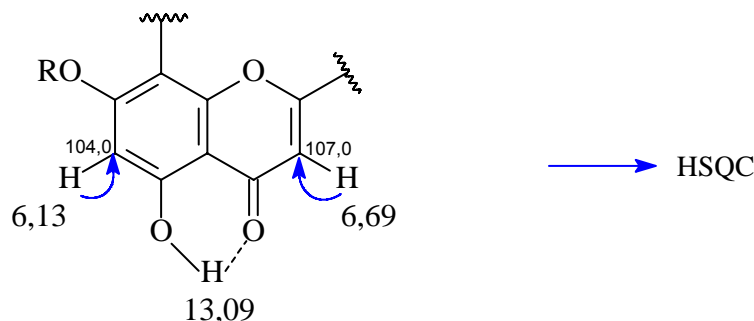
(FIGURA 4.56, p. 181) pode-se confirmar o acoplamento *orto* entre os hidrogênios H-2'-H-3' e H-5'-H-6'.



O espectro de HSQC (FIGURA 4.57, p. 182) mostra a correlação dos hidrogênios em δ_{H} 8,01 e δ_{H} 6,97 com os carbonos em δ_{C} 134,0 (C-2'/C-6') e δ_{C} 121,0 (C-3'/C-5'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (FIGURA 4.58, p. 182) mostra a correlação do sinal em δ_{H} 6,97 com o carbono em δ_{C} 127,0 atribuído a C-1' e do duplete em δ_{H} 8,01 com os carbonos em δ_{C} 134,0 (C-2'/C-6') e δ_{C} 167,0 (C-2) sendo este último um deslocamento de carbono- β de uma carbonila α - β insaturada o que evidencia a presença de uma flavona.



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.55, p. 181) confirmou-se a presença da flavona pelo singlete em δ_{H} 6,69 (1H) característico do hidrogênio H-3; têm-se ainda os singletos δ_{H} 6,13 (1H) atribuído a H-6, indicando a presença de um anel A pentasubstituído e δ_{H} 13,09 (s, 1H) do hidrogênio da hidroxila que se encontra quelada, posicionada em C-5. Através do espectro de HSQC (FIGURA 4.57, p. 182) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,69 com o carbono em δ_{C} 107,0 e δ_{H} 6,13 com δ_{C} 104,0.



A presença de sinais na região entre δ_{H} 3 e 5 ppm no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.55, p. 181) sugerem a presença de unidades de açúcar, as quais foram confirmadas pela presença de dois prótons anoméricos em δ_{H} 4,97 (sl, 1H) e δ_{H} 4,79 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz) o que indica uma unidade de glicose e uma unidade de raminose cuja presença é evidenciada pelo dubleto da metila em δ_{H} 0,49 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz).

A configuração das unidades glicosídicas foram determinadas de acordo com as constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (HARBONE, 1994), sendo então uma β -glicose ($J = 8,8$ Hz) e uma α -raminose devido à baixa constante de acoplamento entre o próton anomérico e o H-2”.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.57, p. 182) observa-se que o dubleto em δ_{H} 4,79 referente a β -D-glicose se correlaciona com o carbono δ_{C} 77,0 característicos de um flavonóide C-glicosilado e o sinal em δ_{H} 4,97 se correlaciona com o carbono δ_{C} 105,5 a qual indica uma ligação O-glicosídeo. Diante dos dados obtidos pode-se propor que a glicose está ligada na posição C-8 da aglicona e a raminose ligada na glicose ou nas posições com hidroxilas (C-4’, C-5, C-7). Os dados de RMN de uma e duas dimensões foram insuficientes para a determinação exata da posição da raminose.

Desta forma realizou-se o experimento LC-MS conforme indicado no item 3.6.6 (p. 73) a fim de obter mais dados sobre esta substância. No espectro de RMN 1D e 2D visualizou-se apenas um composto, entretanto no LC-MS verificou-se que trata-se de uma mistura isomérica.

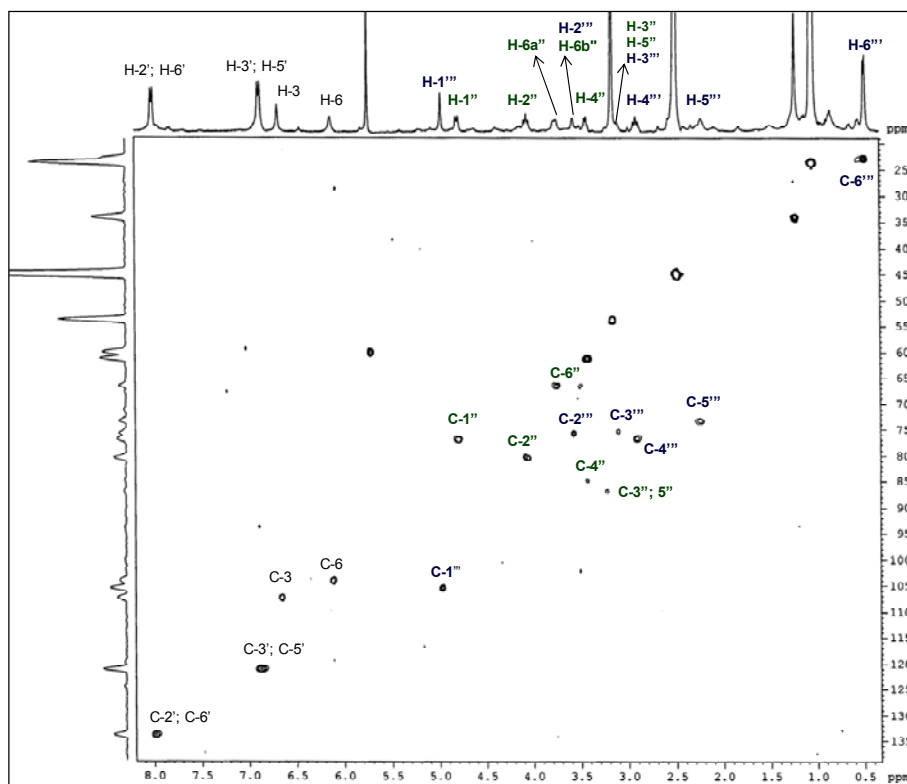


FIGURA 4.57: Mapa de correlações HSQC da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO, 400 MHz); os sinais em verde são referentes à glicose e os sinais em azul à raminose.

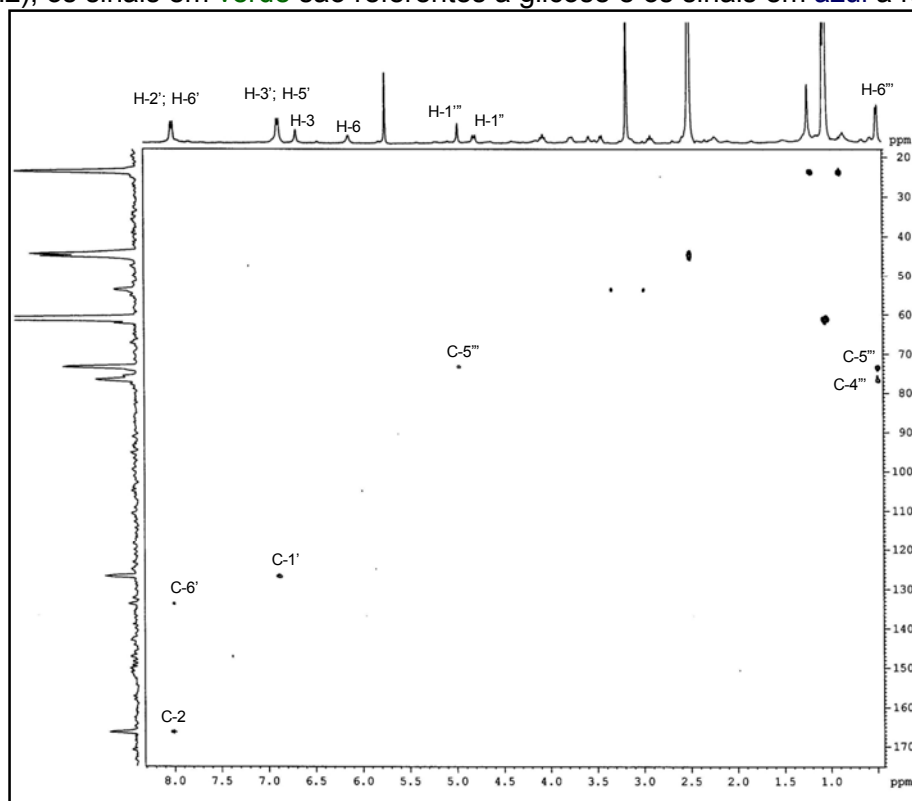


FIGURA 4.58: Mapa de correlações HMBC da 2''-O-raminosilvitexina (XII) (DMSO, 400 MHz); os sinais em verde são referentes à glicose e os sinais em azul à raminose.

Neste estudo verificou-se que a proporção dos dois é aproximadamente de 83 : 17 (FIGURA 4.59a, p. 183). Esta proporção não pode ser confirmada no espectro de RMN ^1H uma vez que no mesmo os sinais de água do solvente e do mesmo foram muito intensos e os sinais de um dos confôrmeros não pode ser integrado. Os espectros de UV (DAD, FIGURA 4.59b-c, p. 183) dos dois constituintes da mistura são iguais ($\lambda = 215,7; 271,7; 330,7$ nm) e condizentes com a absorção da flavona 2''-O-raminosilvitexina ($\lambda = 223$ sh; 269; 330 nm; NIKOLOV *et al.*, 1982), assim como também são iguais os espectros de massas cuja molecular obtida para os dois confôrmeros foi de 578 Daltons, conforme mostra a FIGURA 4.60a-b (p. 184).

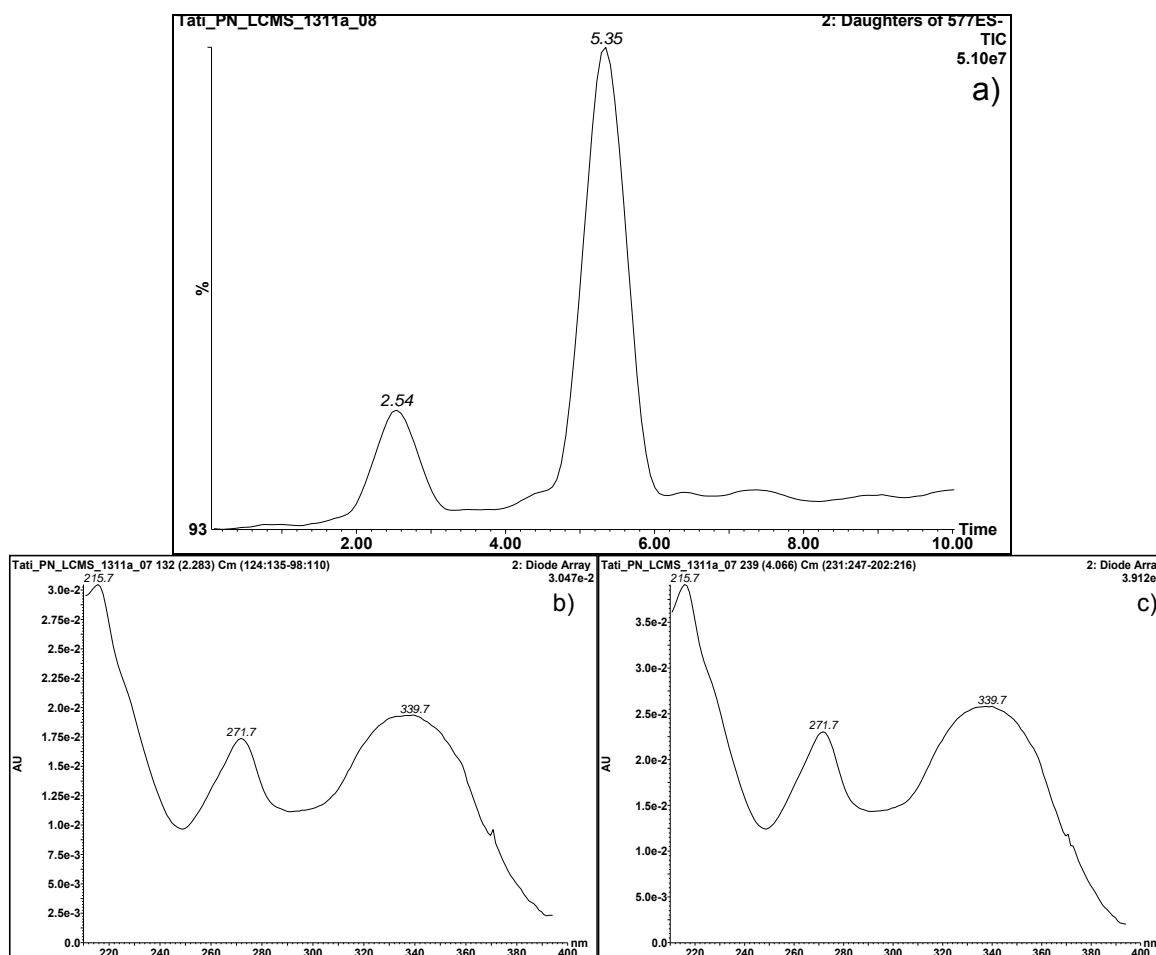


FIGURA 4.59: a) Cromatograma da subfração **H** b) espectro de UV flavona **XIIb** ($t_R = 2,54$ min); c) espectro de UV da flavona **XIIa** ($t_R = 5,35$ min).

No espectro de massas (FIGURA 4.60a-b, p. 184) pode-se verificar uma fragmentação característica de C-glicosil flavonas como descrito no item 4.5.3

(p. 143), na qual ocorrem perdas neutras, sendo inicialmente da unidade glicosilica mais externa $[M-H-164]^-$ referente à raminose. Em seguida, tem-se a saída do fragmento neutro $[M-H-120]^-$ através de um rearranjo na unidade de glicose (FIGURA 4.60b-c, p. 184). Pode-se observar também que estas perdas neutras podem ocorrer de forma inversa, ou seja, primeiro ocorre à saída do fragmento $[M-H-120]^-$ e depois de $[M-H-164]^-$. Outro fragmento observado é $[M-H-146]^-$ como mostra o ESQUEMA 4.6 (p. 186).

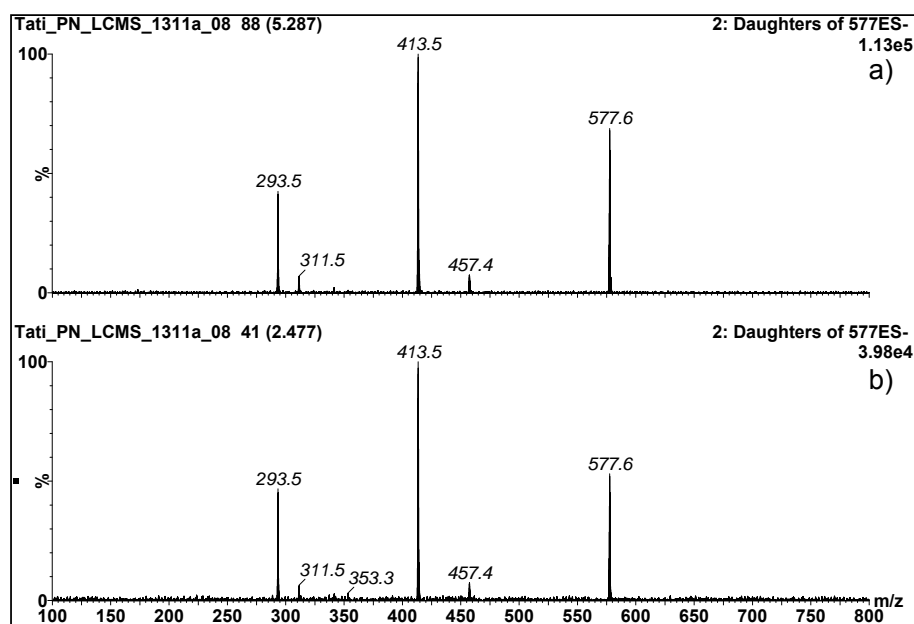
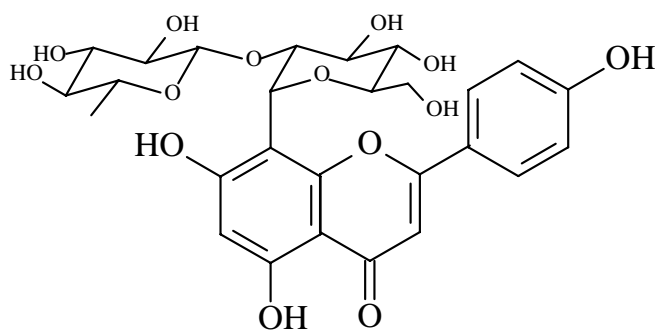


FIGURA 4.57: a) Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da flavona **XIIa** ($t_R = 5,35$ min) e b) da flavona **XIIb** ($t_R = 2,54$ min).

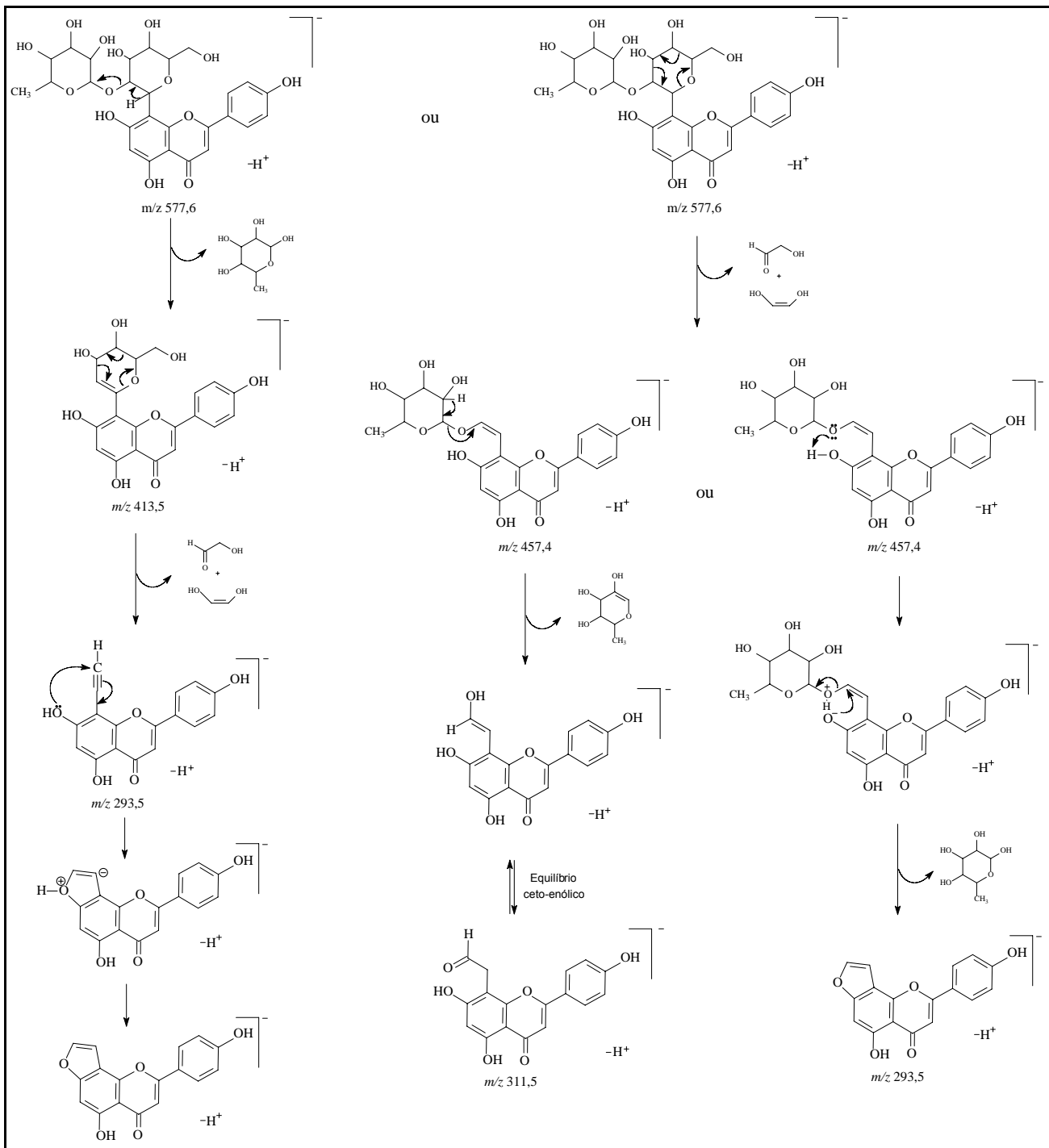
Os dados do espectro de massas (FIGURA 4.60, p. 184), comparados aos da literatura (RAYYAN *et al.*, 2004), revela a presença de dois isômeros conformacionais criados pelo impedimento rotacional na ligação $C(sp^3)-C(sp^2)$ entre o açúcar e a flavona. O que indica a presença dos confôrmeros e não de isômeros de posição, como discutido no item 4.5.3 (p. 143), cuja intensidade dos picos para as duas bandas cromatográficas é a mesma. Esse tipo de isomeria é característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida (GRILLI *et al.*, 2004), sendo frequentemente observado em flavonas C-glicosiladas com substituição na posição C-8 ou C-6 (RAYYAN *et al.*, 2004).

De acordo com as correlações observadas nos espectros RMN (FIGURA 4.55-4.58, p. 181 e 182; TABELAS 4.15, p. 187 e 4.16, p. 188) para substância **XII** e com as informações dos fragmentos gerados pela dissociação induzida por colisão (CID) no experimento LC-MS conforme descrito no item 3.6.6 (p. 73) pode-se atribuir a seguinte estrutura ao sacarídeo: rha (1→2) glc ligada a aglicona por uma ligação C-glicosídica na posição C-8 (WARIDEL *et al.*, 2001). Desta forma pode-se afirmar que se trata da flavona 2"-O-raminosilvitexina.



2''-O-raminosilvitexina (**XII**)

Há dados na literatura (YING *et al.*, 2008) sobre a grande atividade antioxidante de 2''-O-raminosilvitexina (**XII**), o que evidencia, segundo estudos, um papel preventivo sobre patogenidades humanas como, por exemplo, prevenir o aparecimento de células cancerígenas para este composto.



ESQUEMA 4.6: Fragmentação da 2''-O-raminosilvitexina (XII).

TABELA 4.15: Dados de RMN de ^1H de 2"-O-raminosi-vitexina [**XIIa**, confômero mais abundante, **XIIb**, confômero menos abundante DMSO, 400 MHz; Lit: a) RAYYAN *et al.*, 2004, MeOD, 600 MHz; b) DOYAMA *et al.*, 2005, DMSO, 200 MHz].

H	δ_{H}, J (Hz)				
	XIIa	RAYYAN et al., 2004	DOYAMA et al., 2005	XIIb	RAYYAN et al., 2004
2					
3	6,69 (s)	6,66 (s)	6,66 (s)	6,69 (s)	6,67 (s)
4					
5	13,09 (s)		13,13 (s)	12,90 (s)	
6	6,13 (s)	6,36 (s)	6,36 (s)	6,45 (s)	6,35 (s)
7					
8					
9					
10					
1'					
2', 6'	8,01 (d, $J = 10,0$)	8,04 (d, $J = 8,7$)	8,04 (d, $J = 8,7$)	7,90 (d, $J = 10,0$)	7,89 (d, $J = 8,7$)
3', 5'	6,88 (d, $J = 10,0$)	7,01 (d, $J = 8,7$)	7,01 (d, $J = 8,7$)	6,88 (d, $J = 10,0$)	7,00 (d, $J = 8,7$)
4'					
Glc-1''	4,79 (d, $J = 8,8$)	5,12 (d, $J = 9,9$)	5,12 (d, $J = 9,9$)	4,79 (d, $J = 8,8$)	5,21 (d, $J = 9,9$)
2''	4,06 (dd, $J = 8; 8,8$)	4,34 (dd, $J = 9,9; 8,6$)	4,34 (dd, $J = 9,9; 8,6$)	4,14 (m)	4,32 (t, $J = 9,0$)
3''	3,16 (m)	3,74 (m)	3,74 (m)	3,16 (m)	3,78 (m)
4''	3,44 (m)	3,74 (m)	3,74 (m)	3,44 (m)	3,78 (m)
5''	3,16 (m)	3,55 (m)	3,55 (m)	3,16 (m)	3,64 (m)
6a''-6 b''	a 3,75 (m) b 3,57 (m)	a 4,06 (m) b 3,89 (m)	a 4,06 (m) b 3,89 (m)	a 3,75 (m) b 3,57 (m)	a 4,03 (m) b 3,88 (m)
Rha-1'''	4,97 (sl)	5,19 (d, $J = 1,8$)	5,19 (d, $J = 1,8$)	5,08 (sl)	5,29 (d, $J = 1,8$)
2'''	3,57 (m)	3,94 (dd, $J = 1,8; 3,2$)	3,94 (dd, $J = 1,8; 3,2$)	3,57 (m)	3,88 (dd, $J = 1,8; 3,2$)
3'''	3,16 (sl)	3,49 (dd, $J = 3,2; 9,5$)	3,49 (dd, $J = 3,2; 9,5$)	3,16 (sl)	3,16 (m)
4'''	2,90 (t)	3,21 (t, $J = 9,5$)	3,21 (t, $J = 9,5$)	3,50 (m)	3,16 (m)
5'''	2,20 (m)	2,53 (dd, $J = 9,5; 6,3$)	2,53 (dd, $J = 9,5; 6,3$)	2,52 (m)	2,40 (dd, $J = 6,3; 9,5$)
6'''	0,49 (d, $J = 7,2$)	0,73 (d, $J = 6,3$)	0,73 (d, $J = 6,3$)	0,55 (m)	0,87 (d, $J = 6,3$)

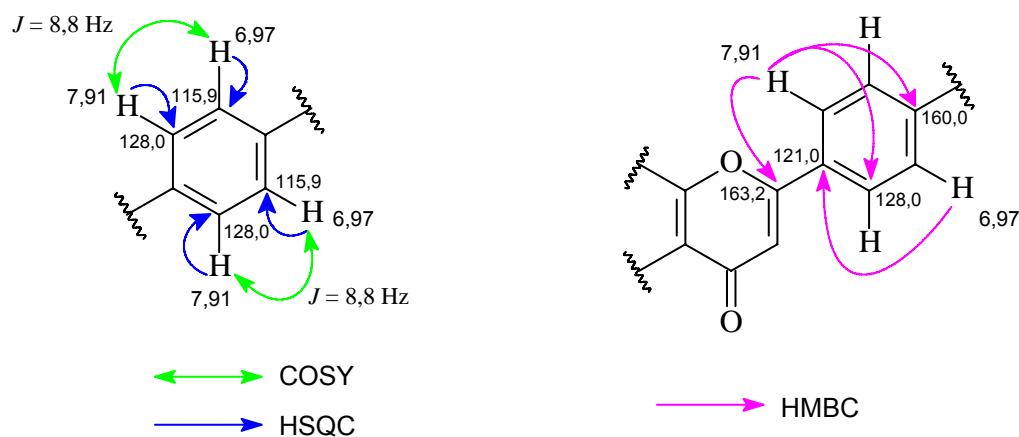
TABELA 4.16: Dados de RMN de ^{13}C de 2"-O-raminosilvitexina [**XIIa**, confômero mais abundante, **XIIb**, confômero menos abundante DMSO, 100 MHz; Lit: a) RAYYAN *et al.*, 2004, MeOD, 300 MHz; b) DOYAMA *et al.*, 2005, DMSO, 50 MHz].

C	$\delta_c, J (\text{Hz})$			
	XIIa	RAYYAN <i>et al.</i> , 2004	DOYAMA <i>et al.</i> , 2005	XIIb - RAYYAN <i>et al.</i> , 2004
2	167,0	166,7	163,9	165,7
3	107,0	103,6	102,3	103,5
4		184,1	181,9	-
5		162,8	160,5	162,5
6	104,0	99,8	98,2	101,1
7		164,1	162,1	164,5
8		105,8	104,3	105,4
9		157,8	155,7	156,6
10		105,9	104,1	105,9
1'	127,0	123,4	121,5	123,4
2', 6'	134,0	129,9	128,9	-
3', 5'	121,7	116,9	115,8	-
4'	160,0	162,6	161,0	162,5
Glicosil	77,0	73,6	71,4	74,9
2''	80,0	78,4	75,0	77,9
3''	87,0	81,5	79,8	81,2
4''	85,0	72,1	70,3	71,6
5''	87,0	82,6	81,7	82,7
6a''-6 b''	66,2	63,0	61,1	62,5
Raminosil	105,5	102,4	100,2	-
2'''	75,2	72,4	70,3	72,0
3'''	75,0	71,8	71,4	71,9
4'''	76,7	73,4	70,3	73,1
5'''	73,5	69,8	68,1	69,9
6'''	23,0	18,0	17,6	17,9

4.5.7 – Identificação estrutural da substância XIII

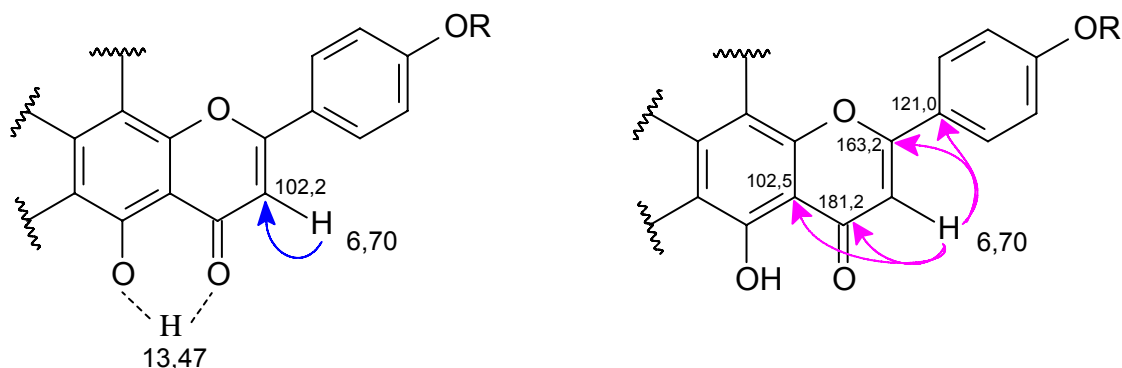
A substância **XIII** foi obtida em mistura com a substância **XIV** da subfração **K** (RCMH_K) conforme descrito no item 3.6.6 (p. 73) a qual foi identificada através da análise dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC e HMBC e comparados com dados da literatura (PENG *et al.*, 2008).

Os dois dubletos em δ_H 7,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) e δ_H 6,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) observados no espectro de RMN ¹H (FIGURAS 4.61-4.62, p. 193) possuem constante de acoplamento *orto*, confirmada pela correlação apresentada no espectro de COSY (FIGURA 4.64, p. 194), atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', H-3' e H-5', quimicamente equivalentes conforme relatado na determinação estrutural das flavonas anteriormente, indicando se tratar da aglicona apigenina. No espectro de HSQC (FIGURA 4.66, p. 195) verificou-se correlações dos hidrogênios δ_H 7,91 (H-2'/H-6') e δ_H 6,97 (H-3'/H-5') com os carbonos δ_C 128,0 e δ_C 115,9, respectivamente. No espectro de HMBC (FIGURA 4.67, p. 196) foi observada a correlação do sinal δ_H 7,91 (H-2'/H-6') com o sinal em δ_C 160,0 referente à C-4'; com o carbono em δ_C 163,2 correspondente a C-2 e δ_C 128,0 (C-2/C-6') e também o sinal para o hidrogênio em δ_H 6,97 (H-3'/H-5') com o carbono em δ_C 121,0 (C-1').

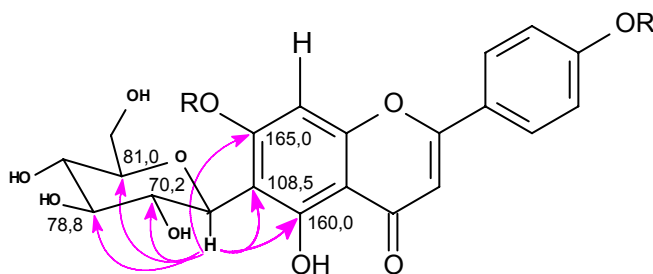


No espectro de RMN ¹H (FIGURAS 4.61-4.62, p. 193) observou-se um sinal em δ_H 13,47 (s, 1H) característico de hidroxila quando esta se encontra quelada, na posição C-5 e a presença de um singlete em δ_H 6,70 (s, 1H) evidencia a presença de uma flavona sendo este um sinal característico do

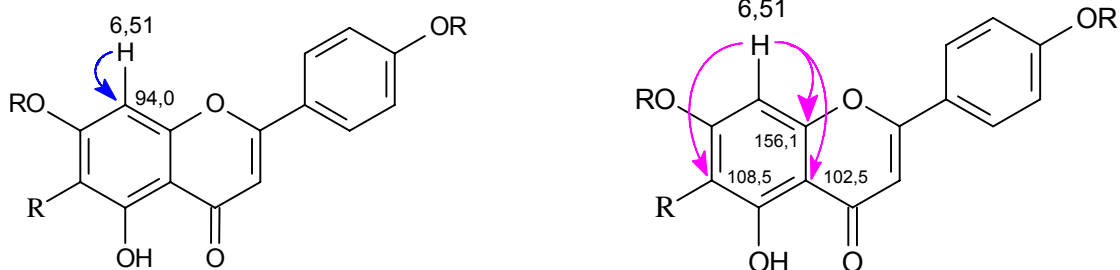
hidrogênio H-3. Este singlete (H-3) se correlaciona com os carbonos δ_C 102,2 (HSQC, FIGURA 4.66, p. 195), δ_C 163,2; δ_C 181,2 e δ_C 102,5 (C-2, C-4, C-10; HMBC, FIGURA 4.67, p. 196).



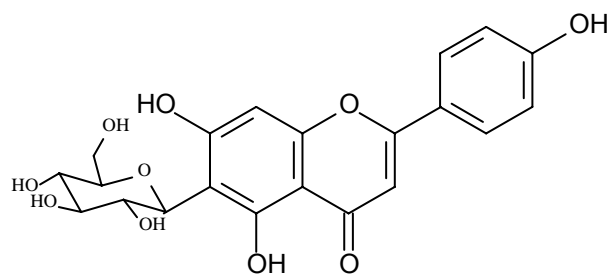
Ainda no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.61-4.62, p. 193 e 4.63, p. 194) foi observada a presença de um hidrogênio anomérico (H-1'') de glicosídeos, sendo que o sinal mais intenso δ_H 4,64 (d, $J = 9,0$, 1H) refere-se ao composto majoritário da mistura de flavonóides e se correlaciona com o sinal em δ_C 72,5 no espectro de HSQC (FIGURA 4.66, p. 195). A posição na qual este glicosídeo está ligado à aglicona foi atribuída através de suas correlações no espectro de HMBC (FIGURA 4.67, p. 196), no qual o hidrogênio H-1'' se correlaciona com os carbonos em δ_C 70,0; δ_C 78,8; δ_C 81,0; δ_C 108,5; δ_C 160,0 e δ_C 165,0 correspondentes a C-2'', C-3'', C-5'', C-6, C-5 e C-7, através de uma ligação C-glicopiranosídeo evidenciada pelo baixo deslocamento de C-6 ($\delta_C = 108,5$) para ser um O-glicosídeo, e muito alta para ser uma ligação C-H que é esperado estar entre δ_C 94,0 e 99,0 como discutido no item 4.5.2 (p. 135).



A suposição acima foi confirmada também pelas correlações do singlete em δ_H 6,51 (1H), correspondente então a H-8, com o carbono em δ_C 94,0 no espectro HSQC (FIGURA 4.66, p. 195) e com os carbonos δ_C 102,5, δ_C 108,5 e δ_C 156,1 referentes a C-10, C-6 e C-9 respectivamente, no espectro HMBC (FIGURA 4.67, p. 196).



Através dos experimentos de RMN 1D e 2D (FIGURAS 4.61-4.68, p. 193 a 196), pode-se atribuir todos os hidrogênios e carbonos da substância **XIII** que com a análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (PENG *et al.*, 2008; TABELA 4.17, p. 192) indicaram ser a flavona Isovitexina.



Isovitexina (**XIII**)

TABELA 4.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Isovitexina (**XIII**; DMSO 400/100 MHz; Lit: PENG *et al.*, 2008; DMSO 500/125 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	XIII	PENG <i>et al.</i> , 2008	XIII	PENG <i>et al.</i> , 2008
2			163,2	163,5
3	6,70 (s)	6,78 (s)	102,2	102,8
4			181,2	181,9
5	13,47 (s)	13,55 (s)	160,0	161,2
6			108,5	108,9
7			165,0	163,3
8	6,51 (s)	6,51 (s)	94,0	93,6
9			156,1	156,2
10			102,5	103,4
1'			121,0	121,1
2', 6'	7,91 (d; 8,8)	7,91 (d; 8,8)	128,0	128,5
3', 5'	6,97 (d; 8,8)	6,91 (d; 8,8)	115,9	116,0
4'			160,0	160,7
6-C-Glc	4,23-3,25 (6H, m)	4,03-3,11 (6H, m)		
1''	4,64 (d; 9,0)	4,58 (d; 9,0)	72,5	73,6
2''	4,12 (sl)		70,0	71,2
3''	3,27 (m)		78,8	78,9
4''	4,48 (m)		69,5	70,6
5''	3,25 (m)		81,0	81,6
6a''/6b''	a 3,72 (m) b 3,52 (m)		61,0	61,5

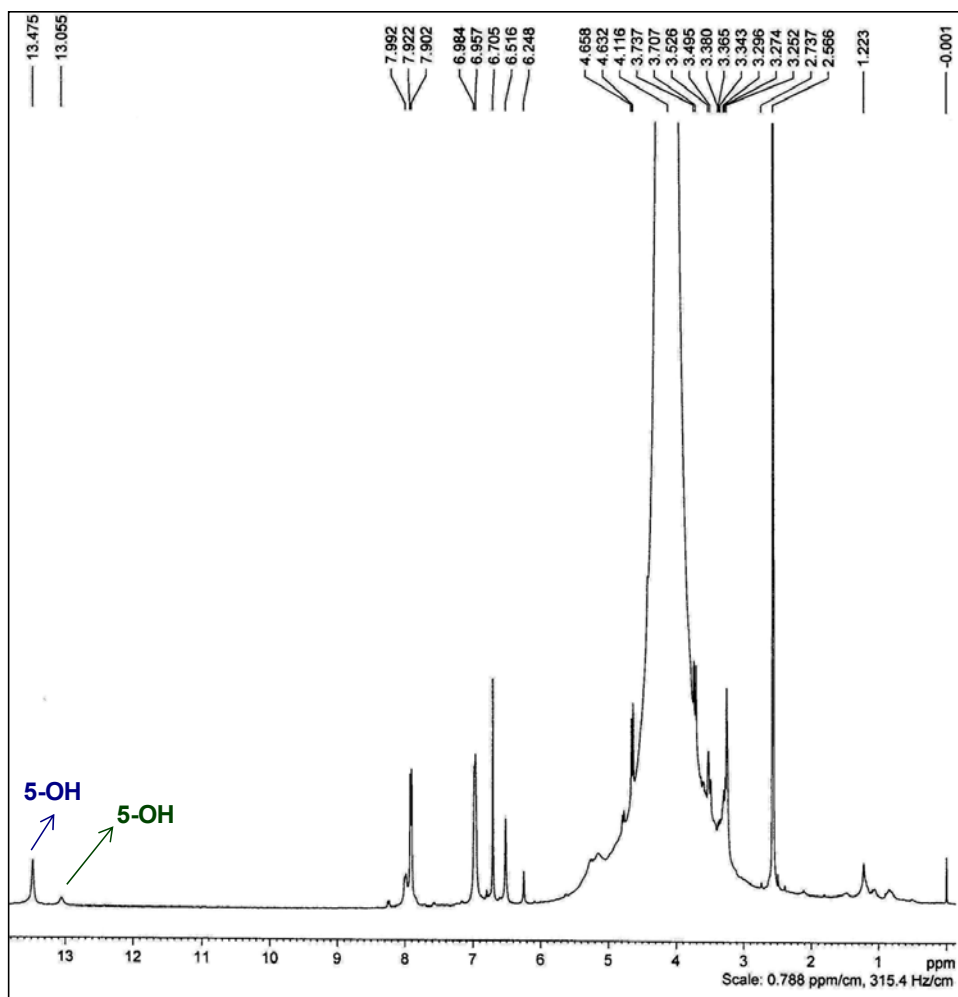


FIGURA 4.61: Espectro de RMN ^1H isovitexina (XIII) e vitexina (XIV) (DMSO, 400 MHz).

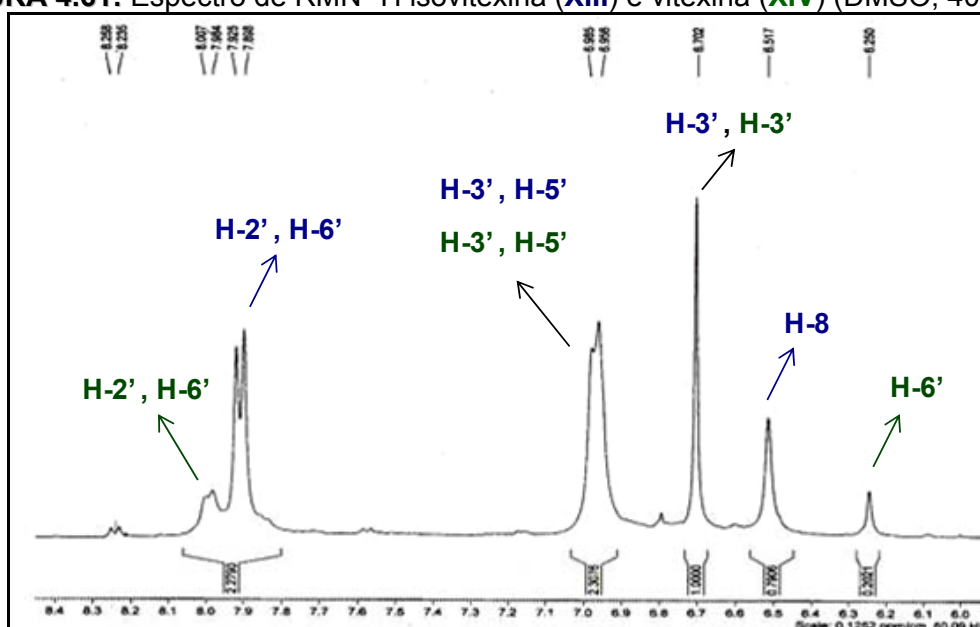


FIGURA 4.62: Expansão do espectro de RMN ^1H das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).

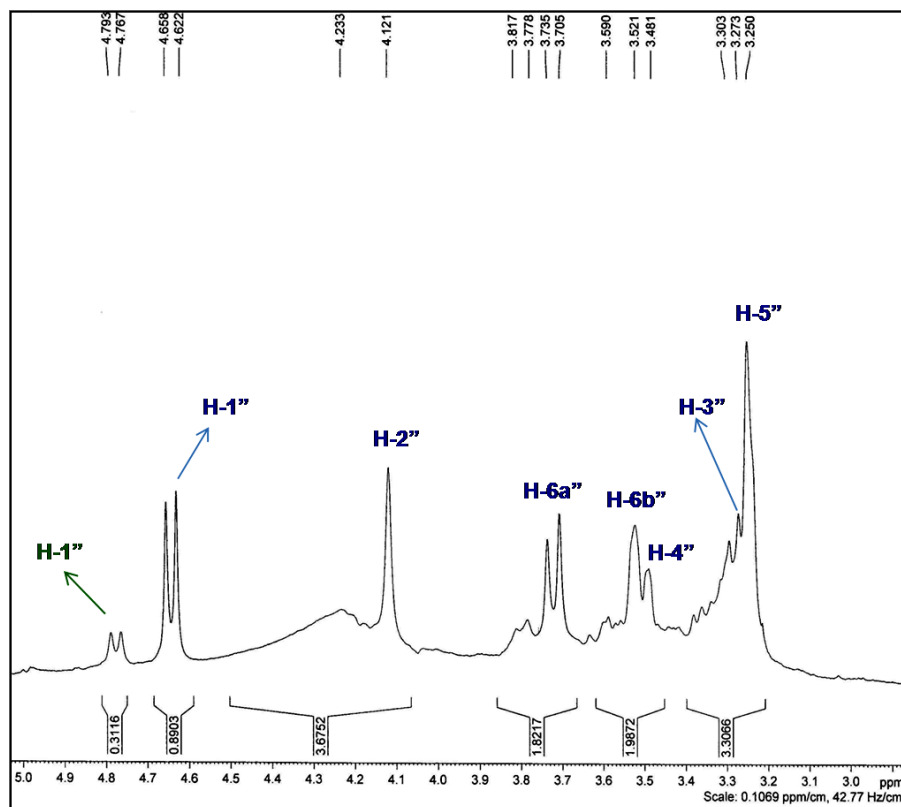


FIGURA 4.63: Expansão da região do açúcar do espectro de RMN ^1H das flavonas **XIII** e **XIV** (DMSO, 400 MHz).

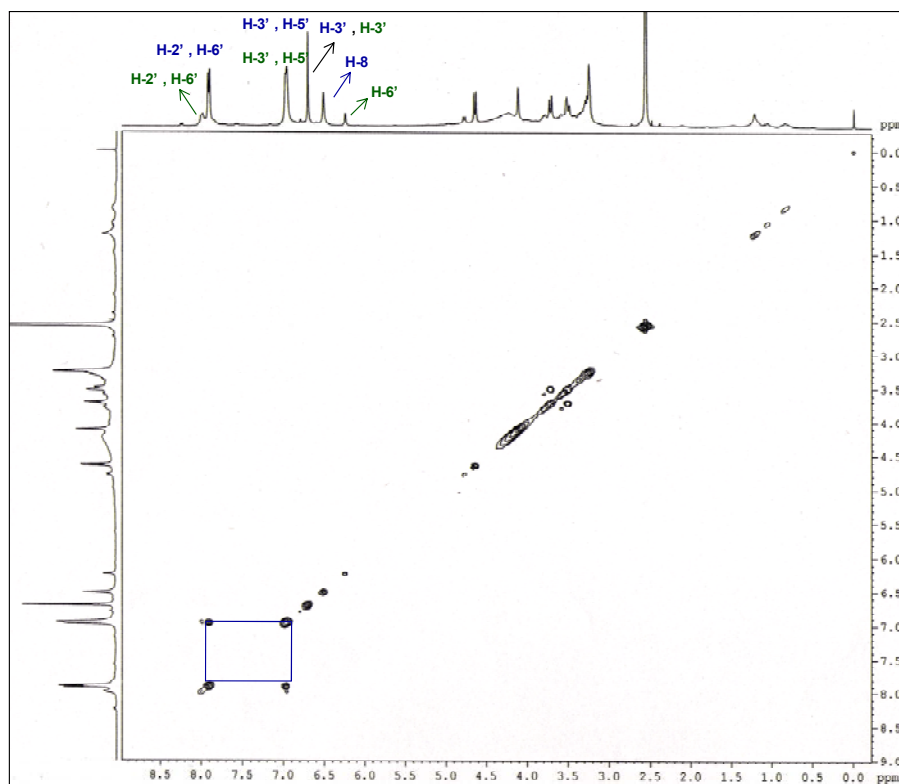


FIGURA 4.64: Espectro de COSY das flavonas **XIII** e **XIV** (DMSO, 400 MHz).

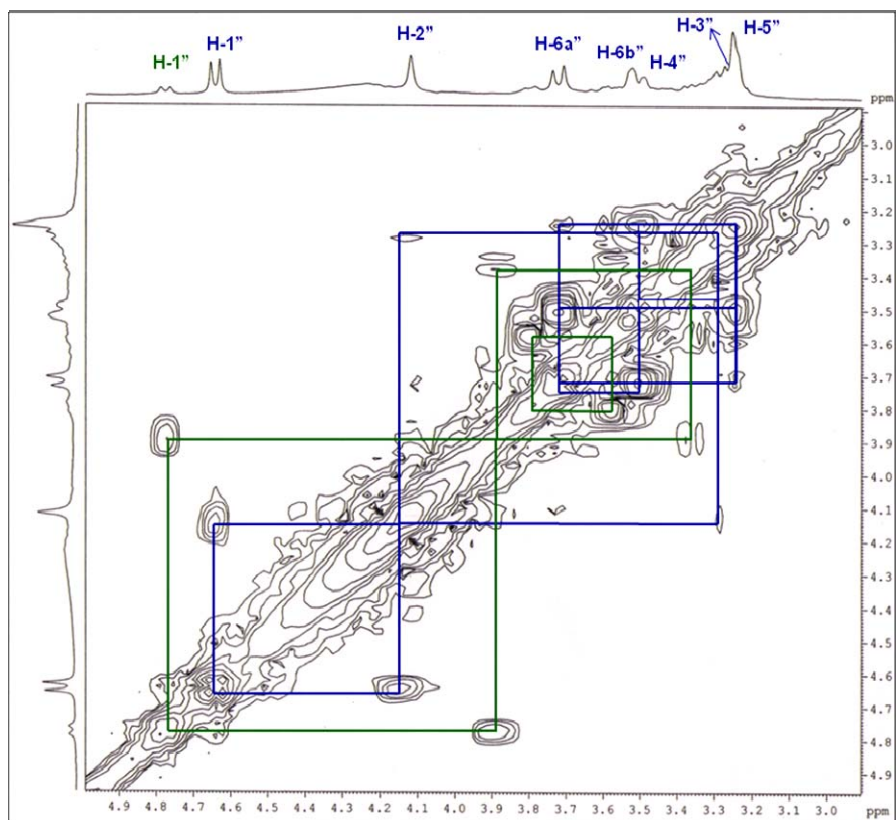


FIGURA 4.65: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY das flavonas **XIII** e **XIV** (DMSO, 400 MHz).

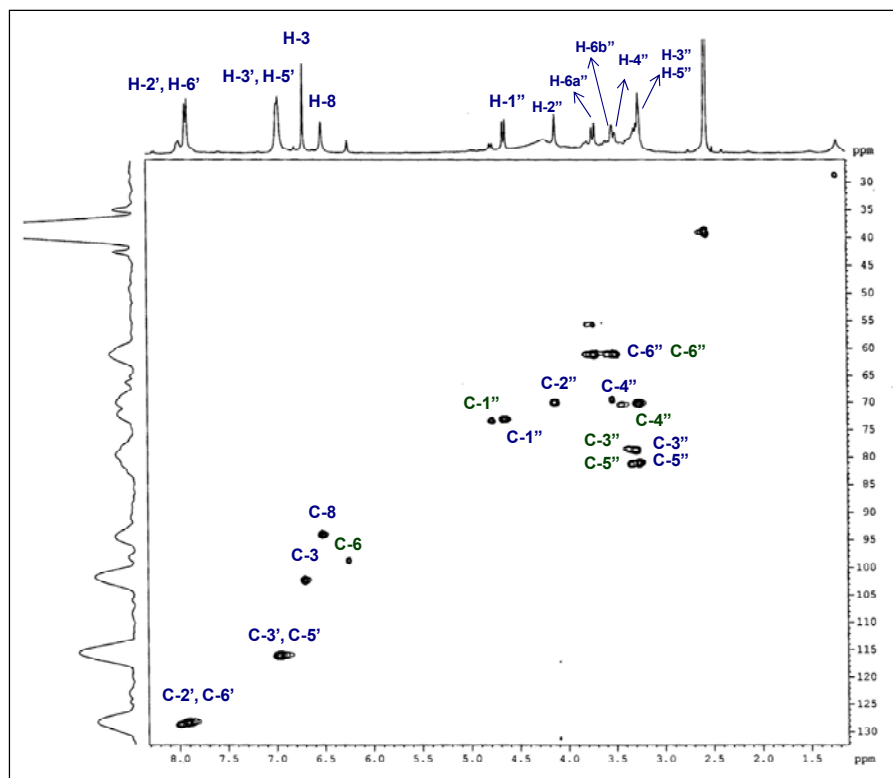


FIGURA 4.66: Mapa de correlações HSQC das flavonas **XIII** e **XIV** (DMSO, 400 MHz).

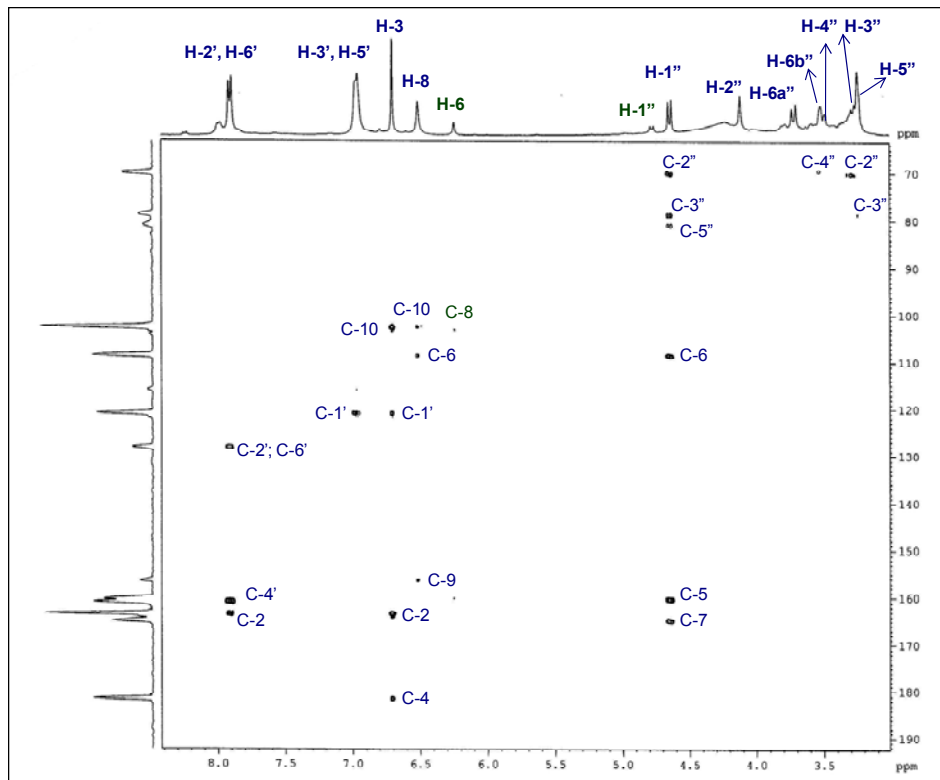


FIGURA 4.67: Mapa de correlações HMBC das flavonas XIII e XIV (DMSO, 400 MHz).

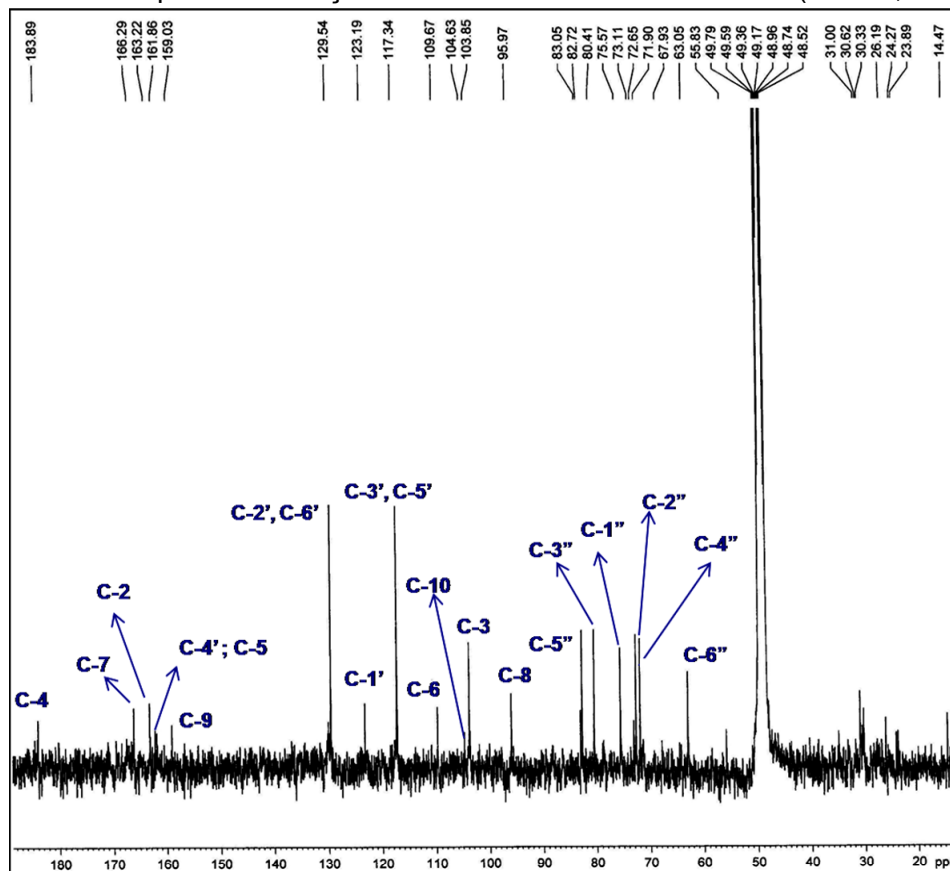
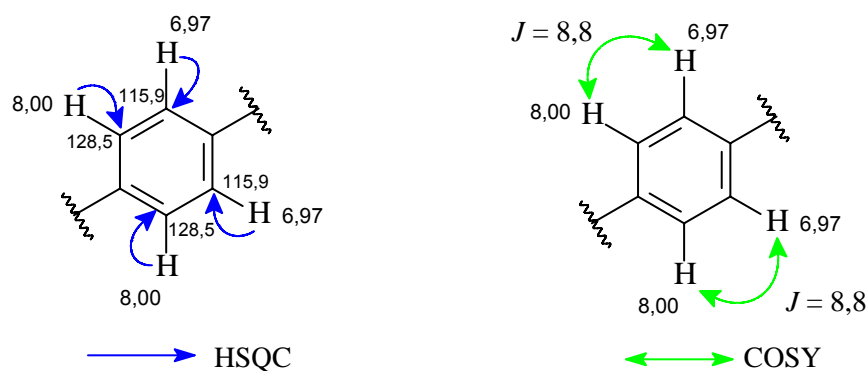


FIGURA 4.68: Espectro de RMN ^{13}C das flavonas XIII e XIV (MeOH, 400 MHz).

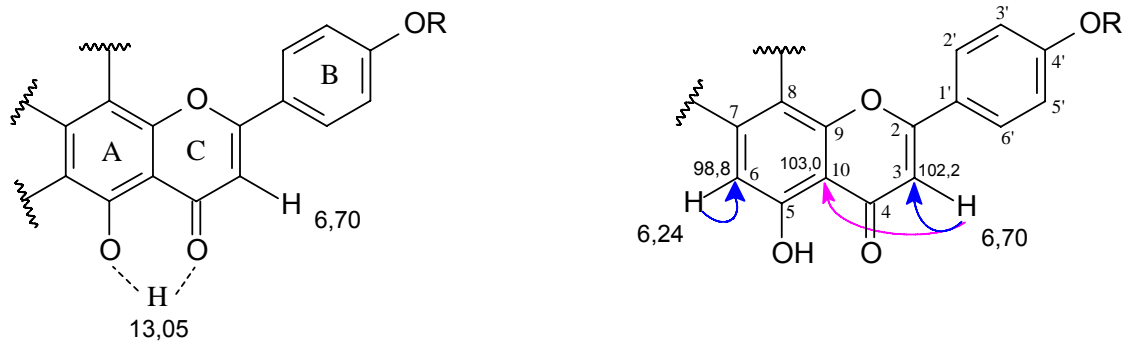
4.5.8 – Determinação estrutural da substância XIV

O flavonóide **XIV**, que foi isolado em mistura com **XIII**, apresentou no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.61-4.62, p. 193) dois dubletos com constante de acoplamento *orto* ($J = 8,8$ Hz) em δ_{H} 8,00 (d, 2H) e δ_{H} 6,97 (d, 2H) que foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', H-3' e H-5', respectivamente, os quais são quimicamente equivalentes. No espectro de HSQC (FIGURA 4.66, p. 195) verificou-se correlação do hidrogênio em δ_{H} 8,00 com o carbono em δ_{C} 128,5, enquanto que o hidrogênio em δ_{H} 6,97 se correlaciona com o carbono em δ_{C} 115,9.



No anel C observou-se um sinal em δ_{H} 13,05 (s, 1H) característico de hidroxila quando esta se encontra quelada, posicionada em C-5. Verifica-se a presença de uma flavona através do sinal característico desta, o hidrogênio H-3, um singlete em δ_{H} 6,70 (1H). Os três singletos apresentados no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.61-4.62, p. 193) são referentes aos hidrogênios: H-3, H-6 e H-8, dentre os quais apenas dois são da flavona **XIV**. O sinal de H-3 é o que está na região mais desblindado do espectro e o sinal H-6 o mais blindado devido ao efeito protetor dos substituintes em C-5 e C-7.

Desta forma o sinal em δ_{H} 6,24 (s, 1H) foi atribuído a H-6 que se correlaciona com o carbono δ_{C} 98,8 e o sinal em δ_{H} 6,70 com o carbono δ_{C} 102,2 (HSQC, FIGURA 4.66, p. 195) e com o carbono δ_{C} 103,0 (HMBC, FIGURA 4.67, p. 196). Sendo assim verifica-se que o glicosídeo está ligado então no anel A na posição C-8.



Observou-se a presença de um hidrogênio em δ_{H} 4,78 (d, $J = 10,0$, 1H) que se refere a H-1" do composto minoritário da mistura (**XIV**) se correlacionando com o carbono δ_{C} 73,0 (HSQC, FIGURA 4.66, p. 195). O deslocamento apresentado para este hidrogênio (H-1") é característico de uma ligação 8-C- β -D-glicopiranosídeo (RMN ^1H , FIGURA 4.63, p. 194) conforme a TABELA 4.18 (p. 199).

De acordo com os dados do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.63, p. 194), com o espectro de COSY (FIGURA 4.65, p. 195) e o mapa de correlações de HSQC (FIGURA 4.66, p. 195) na região dos sinais de hidrogênios referentes aos glicosídeos comparados com as constantes de acoplamento e deslocamento químico com os das TABELAS 4.8 (p. 140) e 4.9 (p. 142) juntamente com dados da literatura para ^{13}C de glicosídeos (AGRAWAL, 1989) pode-se confirmar a proposta.

Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelo mapa de correlações de HMBC por meio das correlações heteronucleares. De acordo com a análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (PENG *et al.*, 2008; TABELA 4.18, p. 199) pode-se atribuir todos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos da substância **XIV** os quais indicaram ser a flavona Vitexina.

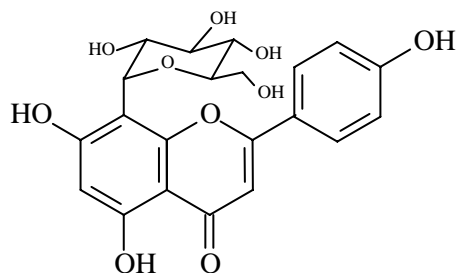
Vitexina (**XIV**)

TABELA 4.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Isovitexina (**XIV**; DMSO 400/100 MHz; Lit: PENG *et al.*, 2008; DMSO 500/125 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	XIV	PENG <i>et al.</i> , 2008	XIV	PENG <i>et al.</i> , 2008
2			164,0	164,0
3	6,70 (s)	6,76 (s)	102,2	102,5
4			181,2	182,2
5	13,05 (s)	13,15 (s)	160,0	160,5
6	6,24 (s)	6,27 (s)	98,8	98,3
7			*no	162,7
8			*no	104,1
9			*no	156,1
10			103,0	104,7
1'			121,0	121,7
2', 6'	8,0 (d; 8,8)	8,01 (d; 8,7)	128,5	129,0
3', 5'	6,97 (d; 8,8)	6,88 (d; 8,7)	115,9	115,9
4'			160,0	161,2
8-C-Glc	3,81-3,27 (6H, m)	3,85-3,22 (6H, m)		
1''	4,78 (d; 10,0)	4,58 (d; 9,0)	73,0	73,5
2''	3,27 (m)		70,3	70,9
3''	3,48 (m)		78,8	78,7
4''	3,52 (m)		69,9	70,6
5''	3,30 (m)		81,2	81,7
6''	3,48 (m)		61,0	61,4

*no= não observado.

4.5.9 – Determinação estrutural dos constituintes da subfração G

A subfração **G** (RCMH_G) foi obtida da fração hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp, a qual foi refractionada em 5 frações (G1 a G5), conforme descrito no item 3.6.6 (p. 73). A FIGURA 4.69 (p. 200) mostra os cromatogramas no modo analítico e preparativo com as cinco frações obtidas. Através do espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.70, p. 200) pode-se verificar que na fração G era constituída por flavonóides glicosilados.

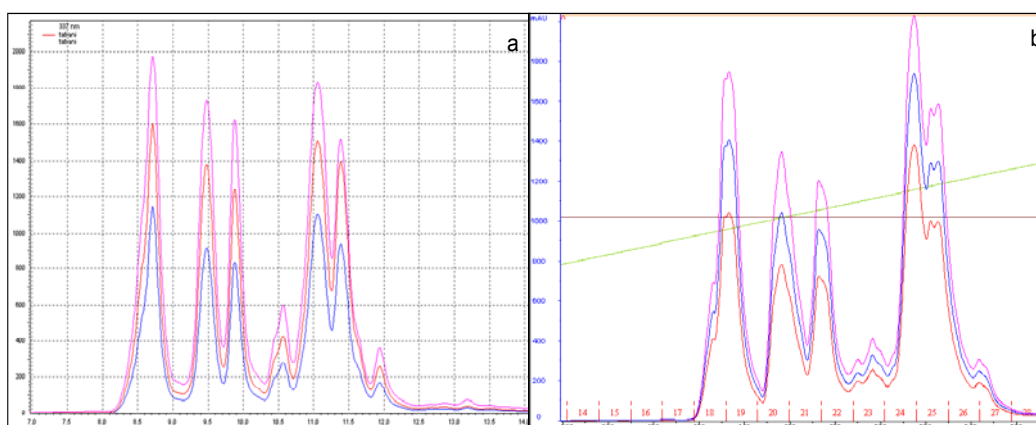


FIGURA 4.69: Cromatograma da subfração **G** a) modo analítico – HPLC; λ = 219 (rosa); 249 (azul); 336 (vermelho) nm; b) modo preparativo – Akta; λ = 217 (azul); 254 (vermelho); 336 (rosa) nm.

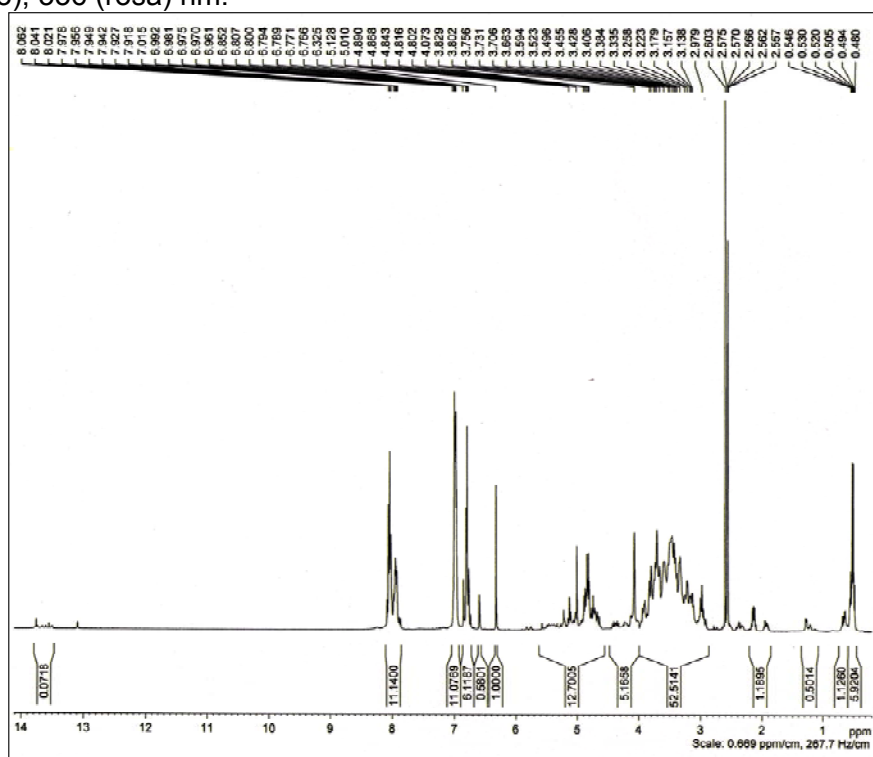


FIGURA 4.70: Espectro de RMN ¹H da fração **G** (DMSO, 400 MHz).

Os flavonóides ocorrem em maior proporção como O-glicosilados, em que um ou mais grupos hidroxila da aglicona estão ligados a um açúcar, formando uma ligação hemiacetal que é lábil em presença de ácido. A glicosilação torna os flavonóides menos reativos e mais solúveis em água, e assim, isto pode ser considerado como uma forma de proteção em plantas para prevenir danos às células citoplasmáticas (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

Os monossacarídeos mais encontrados são: glicose, galactose, raminose, xilose e arabinose e os açúcares manose, frutose, ácidos glucurônicos e galactônicos são raros (CUYCKENS e CLAEYS, 2004). Os flavonóides O-diglicosilados também são freqüentemente encontrados na análise fitoquímica de extratos de plantas. Os dois dissacarídeos mais comumente encontrados contêm glicose e raminose, por exemplo, rutinose [raminosil-(1→6)-glicose] e neohesperidose [raminosil-(1→2)-glicose] a qual difere apenas pelo tipo de ligação interglicosídica entre os dois tipos de monossacarídeos (MA *et al.*, 2001).

A espectroscopia de RMN ¹³C é geralmente utilizada para caracterização da ligação interglicosídica quando se tem disponível uma quantidade relativamente grande (2-10 mg) de material disponível. Em análises fitoquímicas, no entanto, normalmente não há disponibilidade de grandes quantidades de flavonóides glicosilados. Um método alternativo de diferenciação entre as ligações interglicosídicas 1→2 e 1→6 é o método possível para amostras metiladas baseado no método convencional de espectrometria de massas por impacto eletrônico (EI)-MS, a qual permite a tentativa de assinalar o tipo de ligação. Entretanto, a derivatização frequentemente forma uma mistura de compostos parcialmente derivatizados a qual requer posterior purificação (MA *et al.*, 2001). Desta forma novos métodos têm sido desenvolvidos e amplamente discutidos no mundo acadêmico para diferenciação de flavonóides glicosilados. Dentre eles, verifica-se a utilização da espectrometria de massas como uma ferramenta para a identificação tanto das ligações interglicosídicas de dissacarídeos como também diferenciação de

um C e O glicosídeo ou C, O glicosídeo de di-C glicosídeo dentre outras possibilidades.

Uma ferramenta utilizada neste trabalho para a identificação de flavonóides em mistura foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. A TABELA 4.19 (p. 202) mostra qual a massa molar das flavonas presentes em cada fração com as respectivas porcentagens (medidas pela área no cromatograma – DAD, FIGURA 4.71, p. 203) em cada fração, cujo experimento está descrito no item 3.6.6 (p. 73). A identificação destas flavonas presentes em cada fração será discutido nos próximos itens (4.5.9.1 a 4.5.9.3, p. 209 a 255).

TABELA 4.19: Massa molar e porcentagem (%) das flavonas em cada fração (G1-G5).

Fração	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
MM Composto					
725,6 (XV, XVI)	34,3	10,0			
593,4 (XVII)	61,2	73,3	10,4	1,7	
739,5 (X; XI)	4,5	16,6	65,7	8,1	
563,5 (XVIII; XIX, XX, XXI)			23,9	60,9	0,1
577,5 (XII; XXII)				29,3	XII – 89,1 XXII – 10,8

A TABELA 4.20 (p. 204) traz um levantamento bibliográfico dos isômeros com as massas molares iguais aos isômeros isolados neste trabalho cujas massas moleculares estão indicadas e todas as flavonas citadas possuem esqueleto da aglicona apigenina.

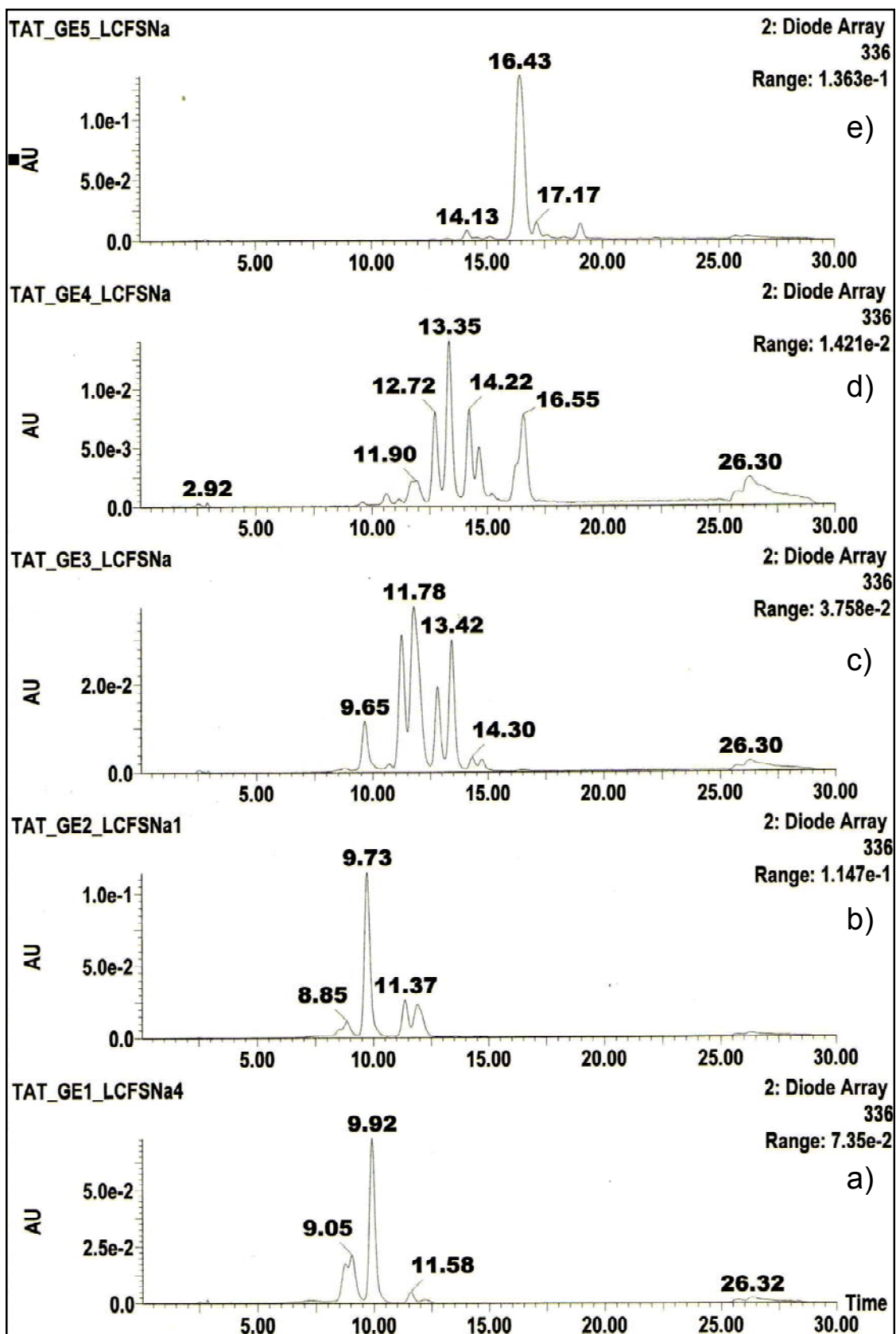


FIGURA 4.71: a→e Cromatogramas das subfrações G1 a G5.

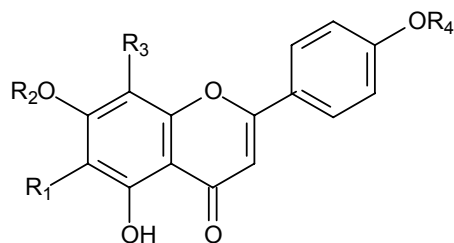
TABELA 4.20: Isômeros com esqueleto flavonoídico da apigenina.

593,4	725,6	739,5	563,5	577,5
XVII	XV, XVI	X e XI	XVIII, XIX, XX, XXI	XII e XXII
Vicenin-2 (121) EL-MOUSALLAMY <i>et al.</i> , 2000	Schaftoside 4'-O- glucoside (139) BATISTA e GOMES, 1993	Rhoifolina 4'-O- glucoside (119) GATTUSO <i>et al.</i> , 2007	Neoschaftoside (162) BESSION <i>et al.</i> , 1985	Rhoifolina (118) GATTUSO <i>et al.</i> , 2007
Isovitexina 2''-O- glucoside (122) ZERIHUN <i>et al.</i> , 1986	Schaftoside 6''-O- glucoside (140) BOUILLANT <i>et al.</i> , 1984	Vitexina 7-O- raminosil glucoside (154) *WILLIAMS <i>et al.</i> , 1973	Schaftoside (163) BESSION <i>et al.</i> , 1984	Isorhoifolina (185) GATTUSO <i>et al.</i> , 2007
Isovitexina 2''-O- galactoside (123) *DELLAMONICA <i>et</i> <i>al.</i> , 1983	Isochaftoside 4'- O-glucoside (141) BATISTA e GOMES, 1993	Vitexina 4'-O- raminosil glucoside (155) *LEWAK, 1966	Isochaftoside (164) JAY <i>et al.</i> , 1984	Vitexina 2''-O- raminoside (186) JHOO <i>et al.</i> , 2007
Isovitexina 7-O- glucopiranoside (124) (saponarin) ÖSTERDAHL, 1979	Isovitexina 7-O- glucosil 2''-O- arabinoside (142) *VAN BREDERODE e NIGTEVECHT 1972	Vitexina 4'-O- glucosil 2''-O- raminoside (156) ESCOBAR <i>et al.</i> , 1983	Neoischaftoside (165) ÖSTERDAHL, 1979	Vitexina 7-O- rhaminoside (187) VEITCH e GRAYER, 2008
Isovitexina 7-O- galactoside (125) (neosaponarin) WAGNER <i>et al.</i> , 1979	Isovitexina 7-O- xilosil 2''-O- glucoside (143) *STEYNS <i>et al.</i> , 1983	Isovitexina 7-O- raminosil glucoside (157) *AYANOGLU <i>et al.</i> , 1982	Corimboside (166) *BESSION <i>et al.</i> , 1979	Vitexina 4''-O- raminoside (188) *BATYUK <i>et al.</i> , 1966
Isovitexina 4'-O- glucopiranoside (126) (isosaponarin) *JURD <i>et al.</i> , 1957	Isovitexina 7-O- galactosil 2''-O- arabinoside (144) *VAN BREDERODE e NIGTEVECHT 1972	Isovitexina 7-O- glucosil 2''-O- raminoside (158) *VAN BREDERODE e NIGTEVECHT 1972	Isocorimboside (167) CHOPIN <i>et al.</i> , 1977b	Vitexina 6''-O- raminoside (189) *BATYUK <i>et al.</i> , 1966
Isovitexina 6''-O- arabinoside (127) *HOSTETTMANN e JACOT- GUILLARMOD, 1976	Isovitexina 7-O- arabinosil 2''-O- glucoside (145) *MASTENBROEK <i>et al.</i> , 1983	Isovitexina 7-O- galactosil 2''-O- raminoside (159) WAGNER <i>et al.</i> , 1979	Neocorimboside (168) *CHABOUD <i>et al.</i> , 1988	Isovitexina 2''-O- raminoside (120) PARKER <i>et al.</i> , 1979
Vitexina 2''-O- glucoside (128) HEINSBROEK <i>et</i> <i>al.</i> , 1980	Isovitexina 4'-O- glucosil 2''-O- arabinoside (146) *BAEVA <i>et al.</i> , 1974	X-O-Hex-2''-O- Rha-C-Hex- Apigenina (160) FERRERES <i>et al.</i> , 2007	Vicenin 1 (169) DUBOIS e MABRY, 1971	Isovitexina 7-O- raminoside (190) *HILSENBECK <i>et</i> <i>al.</i> , 1984

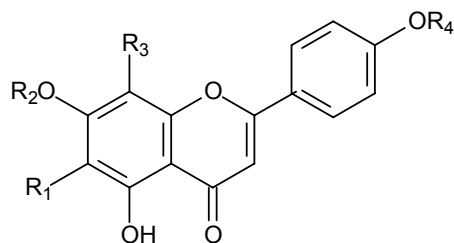
<p>Vitexina 2''-O-β-galactopiranoside (129) VEITCH e GRAYER, 2008</p> <p>Vitexina 4'-O-glucosil (130) ESCOBAR <i>et al.</i>, 1983</p> <p>Vitexina 7-O-glucopiranoside (131) KIM <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Vitexina 6''-O-glucoside (132) LIN <i>et al.</i>, 2008</p> <p>Apigenina 7-O-cellobioside (133) VEITCH <i>et al.</i>, 1998</p> <p>6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-galactopiranosil apigenina (134) DUBOIS. <i>et al.</i>, 1984</p> <p>7,4'-di-O-glucosil apigenina (135) VEITCH <i>et al.</i>, 1998</p> <p>3,6-di-C-glucosilapigenina (136) *MATSUBARA <i>et al.</i>, 1985a</p>	<p>Isovitexina 6''-O-xilosil 4'-O-glucoside (147) VEITCH e GRAYER, 2008</p> <p>Isomollupentina 7,2''-di-O-glucoside (148) *BOUILLANT <i>et al.</i>, 1979</p> <p>6-C-β-galactopiranosil apigenina 2''-O-β-xilopiranosil glucopiranosil 4'-O-glucoside (149) VEITCH e GRAYER, 2008</p> <p>X-O-Hex-6-C-Hex-8-C-Pent-Apigenina (150) FERRERES <i>et al.</i>, 2007</p> <p>7,2''-di-O-Glc-6-C-Arab-Apigenina (151) FERRERES <i>et al.</i>, 2007</p> <p>X-O-Hex-2''-O-Pent-6-C-Hex-Apigenina (152) FERRERES <i>et al.</i>, 2007</p> <p>X-O-Hex-2''-O-Pent-8-C-Hex-Apigenina (153) FERRERES <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>X-O-Hex-2''-O-Rha-8-C-Hex-Apigenina (161) FERRERES <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>Vicenin 3 (170) LIN e KONG, 2006</p> <p>7-O-glucosil-cerarvensina (171) DUBOIS <i>et al.</i>, 1982</p> <p>2''-O-arabinosil-6-C-glucosilapigenin (172) JAY e ISMAILI, 1989</p> <p>X''-O-glucosil-8-C-pentosilapigenina (173) JAY e ISMAILI, 1989</p> <p>6-C-galactopyranosil-8-C-arabinopiranosil apigenina (174) WAGNER <i>et al.</i>, 1980</p> <p>Isovitexina 4-O-arabinoside (175) *SMITH <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Isovitexina 2''-O-xiloside (176) *MATSUZAKI <i>et al.</i>, 1990</p> <p>Isovitexina 7-O-xiloside (177) *MASTENBROEK e BREDERODE, 1986</p>	<p>Violantina (191) CARNAT <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Isoviolantina (192) *CHOPIN <i>et al.</i>, 1974</p> <p>Violarvensina (193) CARNAT <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Isofurcataina (194) *MARKHAM <i>et al.</i>, 1982</p>
--	--	--	--	---

<p>3,8-di-C-glucosilapigenina (137) *MATSUBARA <i>et al.</i>, 1986</p>			<p>Isovitexina 2''-O-arabinoside (178) *CHOPIN <i>et al.</i>, 1977^a</p>	
<p>6,8-di-C-galactopiranosil apigenina (138) HILSENBECK e MABRY, 1990</p>			<p>Vitexina 2''-O-xiloside (179) GIL <i>et al.</i>, 1998</p>	
			<p>Vitexina 6''-O-xiloside (180) *DARMOGRAI <i>et al.</i>, 1968</p>	
			<p>Isomollupentina 4'-O-glucoside (181) *DUBOIS <i>et al.</i>, 1985</p>	
			<p>Isomollupentina 2''-O-glucoside (182) *DUBOIS <i>et al.</i>, 1985</p>	
			<p>Isomollupentina 7-O-glucoside (183) *DUBOIS <i>et al.</i>, 1985</p>	
			<p>Mollupentina X''-O-glucoside (184) JAY e ISMAILI, 1989</p>	

* (*apud* HARBONE, 1994)



Ap	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Ap	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
121	glc	H	glc	H	141	ara	H	glc	glc
122	2''-O-glc-glc	H	H	H	142	2''-O-glc-glc	glc	H	H
123	2''-O-gal-glc	H	H	H	143	2''-O-glc-glc	xyl	H	H
124	glc	glc	H	H	144	2''-O-ara-glc	gal	H	H
125	glc	gal	H	H	145	2''-O-glc-glc	ara	H	H
126	glc	H	H	glc	146	2''-O-ara-glc	H	H	glc
127	6''-O-ara-glc	H	H	H	147	6''-O-xyl-glc	H	H	glc
128	H	H	2''-O-glc-glc	H	148	ara	2''-O-glc-glc	H	H
129	H	H	2''-O-gal-glc	H	149	gal	H	H	2''-O-xyl-glc
130	H	H	glc	glc	150	X-O-Hex-Hex	H	Pent	H
131	H	glc	glc	H	151	ara	2''-O-glc-glc	H	H
132	H	H	6''-O-glc-glc	H	152	X-O-Hex-2''-O-Hex-C-Hex	H	H	H
133	H	4''-O-glc-glc	glc	H	153	H	H	X-O-Hex-2''-O-Hex-C-Hex	H
134	glc		gal	H	119	H	Nh	H	glc
135	H	glc	H	glc	154	H	O-rha-glc	glc	H
136	glc	H	H	H	155	H	H	glc	O-rha-glc
137	H	H	glc	H	156	H	H	2''-O-rha-glc	glc
138	gal	H	gal	H	157	2''-O-rha-glc	glc	H	H
139	glc	H	ara	glc	158	2''-O-rha-glc	gal	H	H
140	6''-O-glc-glc	H	ara	H	159	X-O-Hex-2''-O-rha-C-Hex	H	H	H



Ap	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Ap	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
160	H	H	X-O-Hex-2''-O-rha-C-Hex	H	178	H	H	2''-O-xyl-glc	H
161	glc	H	α-ara	H	179			6''-O-xyl-glc	
162	glc	H	β-ara	H	180	ara	H	H	glc
163	α-ara	H	β-glc	H	181	2''-O-glc-ara	H	H	H
164	β-ara	H	β-glc	H	182	ara	glc	H	H
165	α-ara	H	β-gal	H	184	H	H	X''-O-glc-ara	H
166	β-gal	H	α-ara	H	118	H	Nh	H	H
167	β-ara	H	β-gal	H	185	H	Ru	H	H
168	xyl	H	Gal	H	186	H	H	2''-O-rha-glc	H
169	gal	H	Xyl	H	187	H	rha	glc	H
170	xyl	H	Glc	H	188	H	H	4''-O-rha-glc	H
171	2-O-ara-glc	H	H	H	189	H	H	6''-O-rha-glc	H
172	gal	H	Ara	H	120	2''-O-rha-glc	H	H	H
173	glc	H	Ara	H	190	glc	rha	H	H
174	glc	H	H	ara	191	glc	H	rha	H
175	2''-O-xyl-glc	H	H	H	192	rha	H	glc	H
176	glc	H	H	xyl	193	deoxiglucopiranoside	H	glc	H
177	2''-O-ara-glc	H	H	H	194	rha	glc	H	H

4.5.9.1 – Determinação estrutural dos constituintes da fração G1 e G2 (substâncias X, XI, XV, XVI e XVII)

As substâncias **X**, **XI**, **XV**, **XVI** e **XVII** foram obtidas em mistura nas frações **G1** e **G2** (RCMH_{G1,G2}), sendo que as substâncias, **X**, **XI** e **XVII** foram obtidas também nas frações **G3** e **G4**. Os compostos foram identificados em mistura através da análise dos espectros dos espectros RMN ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC e CL-EM em comparação com dados da literatura (FIGUEIRINHA *et al.*, 2008; FERRERES *et al.*, 2007; VELOZO *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2003, PICCINELLI *et al.*, 2008).

Nas frações **G1** e **G2**, através dos dados obtidos por CL-EM, verificou-se a presença de três flavonóides com massas pseudomoleculares 739,7; 725,7 e 593,6 Daltons que terão suas estruturas discutidas neste item. De acordo com as massas moleculares correspondentes têm-se as respectivas fórmulas moleculares C₃₃H₄₀O₁₉; C₃₂H₃₈O₁₉ e C₂₇H₃₀O₁₅. Os compostos com massa pseudomolecular 739,7 Daltons foram identificados anteriormente na subfração **C** (RCMH_C), sendo estes os compostos **X** e **XI**, conforme descrito nos itens 4.5.4 (p. 151) e 4.5.5 (p. 167). Estes flavonóides estão em menor concentração na mistura na fração **G1** e foram determinados de forma qualitativa de acordo com a sua banda cromatográfica e pela integral do sinal característico da metila da raminose em δ_H 0,51 (d, $J = 6,0$ Hz; 3H).

A diferença das frações **G1** e **G2** é a concentração dos três flavonóides em discussão. O composto com massa pseudomolecular 593,6 Daltons (**XVII**) está em maior concentração em ambas as frações. As substâncias **XV** e **XVI** parecem não ter variação, já o composto com massa pseudomolecular 739,7 Daltons aumenta sua concentração de **G1** para **G2** cujo tempo de retenção é 11,37 minutos (**G2**).

Através do espectro de RMN ¹H (FIGURAS 4.77 a 4.80, p. 220 e 221) pode-se verificar a presença da aglicona apigenina de acordo com os sinais δ_H 8,08 (d, $J = 9,6$ Hz) e δ_H 6,96 (d, $J = 9,6$ Hz) característicos do anel B

p-substituído. A presença de apenas um singlete em δ_H 6,81 (H-3) indica a presença de uma flavona com substituintes nas posições C-6 e C-8.

Na análise do espectro de hidrogênio pode-se observar também que nas frações **G1** e **G2** existem várias unidades de açúcares, as quais dificultam a atribuição dos deslocamentos químicos das mesmas, devido à grande sobreposição de sinais na mistura.

Os substituintes das posições C-6 e C-8 são açúcares, com relação aos flavonóides com massa pseudomolecular 725,7 (**XV**, **XVI**) verifica-se a saída dos fragmentos neutros: $[M-H-120]^-$, $[M-H-120-150]^-$, $[M-H-120-150-120]^-$ referentes à saída de unidades glicosídicas (FIGURA 4.72, p. 211). Estes fragmentos são característicos de 6,8-di-C-glicosil flavonas conforme discussão no item 4.5.3 (p. 143). De acordo com esses fragmentos pode-se verificar ainda que trata-se de duas hexoses e uma pentose, que devido a perda do fragmento $[M-H-150]^-$ pode-se supor que a pentose está ligada na hexose por uma ligação O-glicosídica (FIGUEIRINHA *et al.*, 2008). Através da análise do cromatograma (FIGURA 73a-b, p. 212) juntamente com o espectro de massas (FIGURA 74a-b, p. 212) pode-se propor também que trata-se de isômeros de posição devido as diferenças nas intensidades do pico do íon pseudomolecular. Os espectros de UV destes compostos (**XV** e **XVI**; DAD, FIGURA 75a-b, p. 213) são iguais ($\lambda = 216,7; 271,7; 336,7$ nm) e condizentes com o da flavona apigenina (**56**, p. 47, $\lambda = 268,5; 336,2$ nm; LI *et al.*, 2007). Diante destes valores obtidos no espectro de UV é possível descartar a ligação de substituintes em C-4' e C-7 conforme discussão no item 4.5.3 (p. 143) e 4.5.4 (p. 151) e também na posição C-5 devido à presença do singlete em δ_H 13,79 característico de hidroxila quelatogênica.

FERRERES *et al.* (2007) verificaram que a perda do fragmento com m/z 150 $[M-H-132-18]^-$ é típico de derivados de 2"-O-pentossil flavonas. Quando ocorre a perda de um fragmento com m/z 164 o glicosídeo é uma raminose e com m/z 180 tem-se uma glicose. Além disso o íon da clivagem interna da unidade de açúcar de C-glicosilação derivados de arabinosil corresponde a perda de -60/-90 e para derivados de C-hexosil tem-se perdas de -90/-120.

Neste estudo foi possível observar também que essas perdas citadas acima são diferentes nas posições de C-glicosilação, na qual a abundancia relativa é maior quando o glicosídeo está ligado na posição C-6 do que quando está ligado na posição C-8 da aglicona. Os íons [aglicona + 41] e/ou [aglicona + 71] indica uma mono-C e [aglicona + 83] e/ou [aglicona + 113] indica um di-C flavonóide, cuja abundancia relativa pode ser um critério para diferenciar a posição de C-glicosilação (C-6/C-8) (FERRERES *et al.*, 2007).

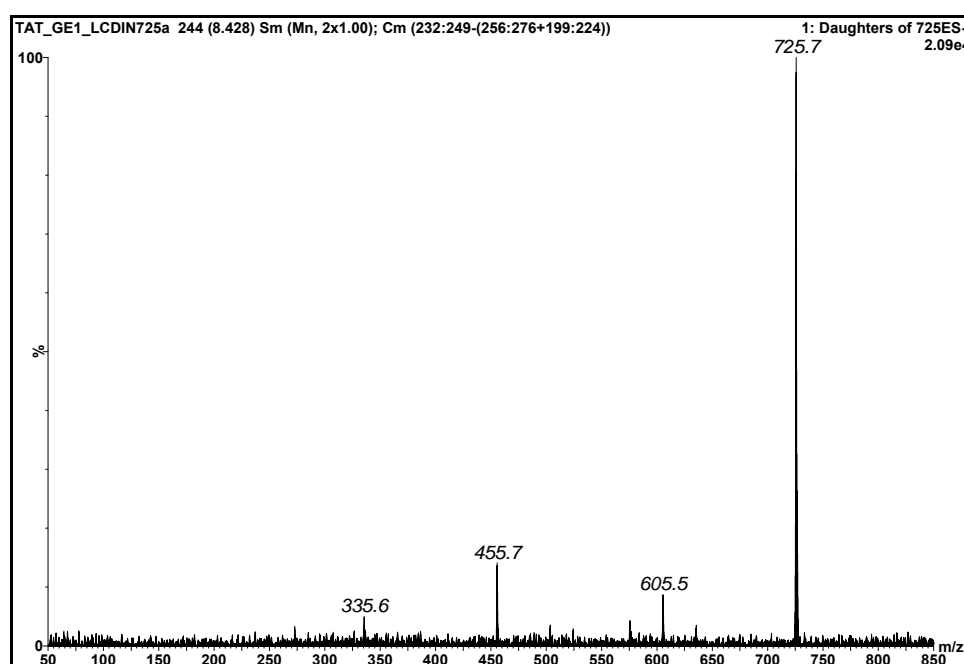


FIGURA 4.72: Espectro de massas no modo negativo $[M-H]^-$ (íon pseudomolecular) das flavonas **XV** e **XVI** ($t_R = 8,55$ min, **G1**) experimento de scan com íon filhos do composto com MM 725,6. Observação: não há resolução cromatográfica suficiente para realizar este experimento e verificar a fragmentação dos dois isômeros, uma vez que eles estão com tempo de retenção muito próximo, ou seja, praticamente coeluído.

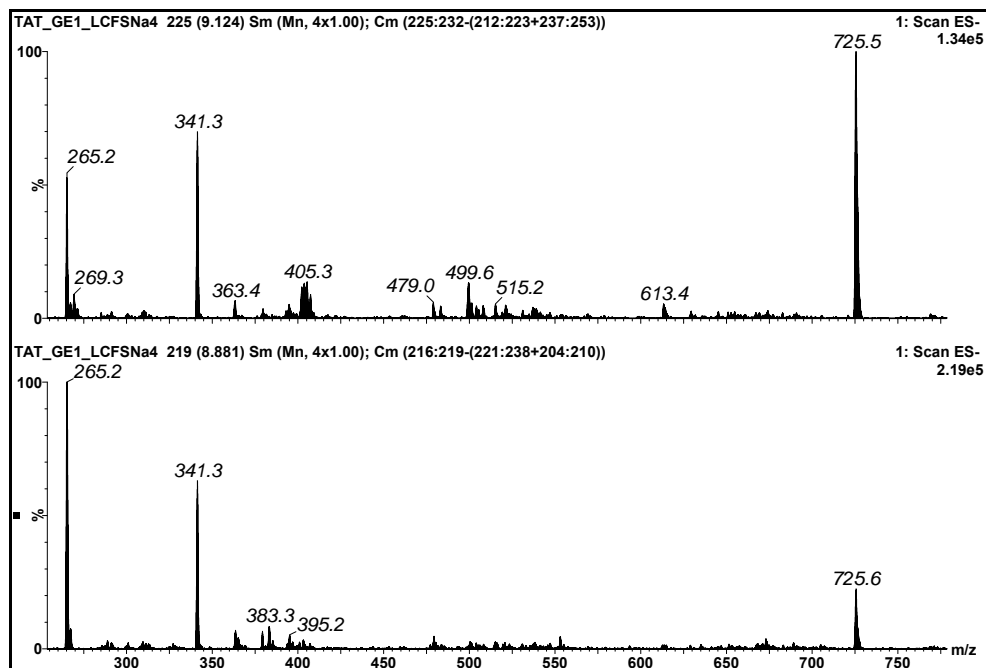


FIGURA 4.73: Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ (íon pseudomolecular) das flavonas a) **XVI** ($t_R = 9,12$ min, **G1**) e b) **XV** ($t_R = 8,88$ min, **G1**), experimento de scan com íon pseudomolecular de 725,6.

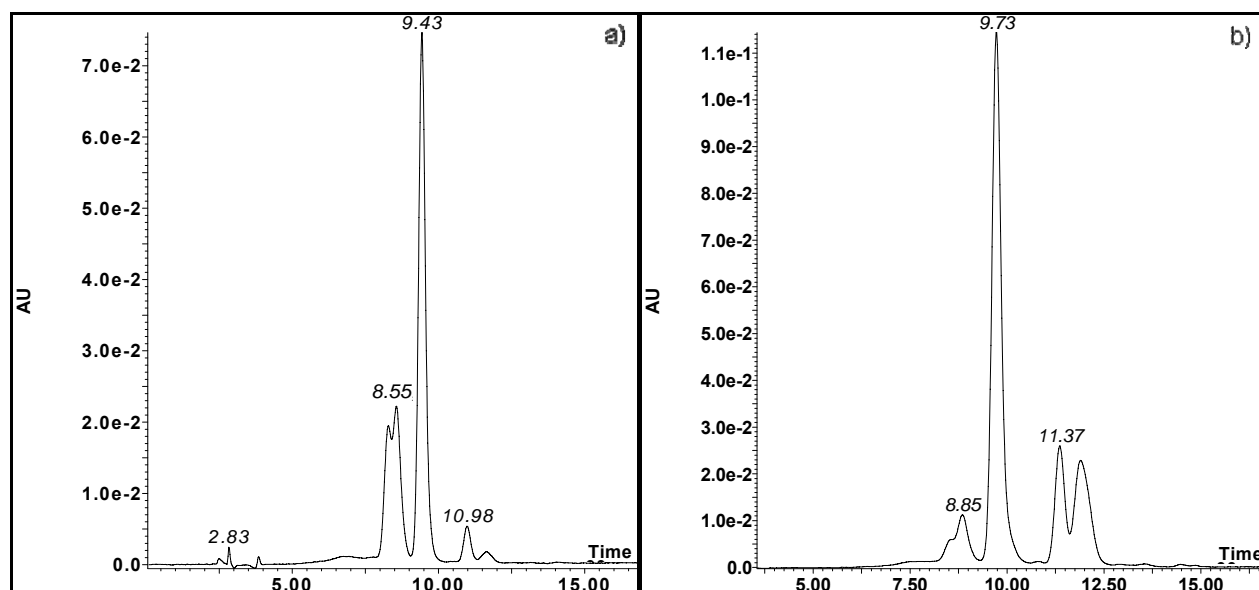


FIGURA 4.74: a) Cromatograma ($\lambda = 330$ nm) da subfração **G1**; b) Cromatograma ($\lambda = 330$ nm) da subfração **G2**;

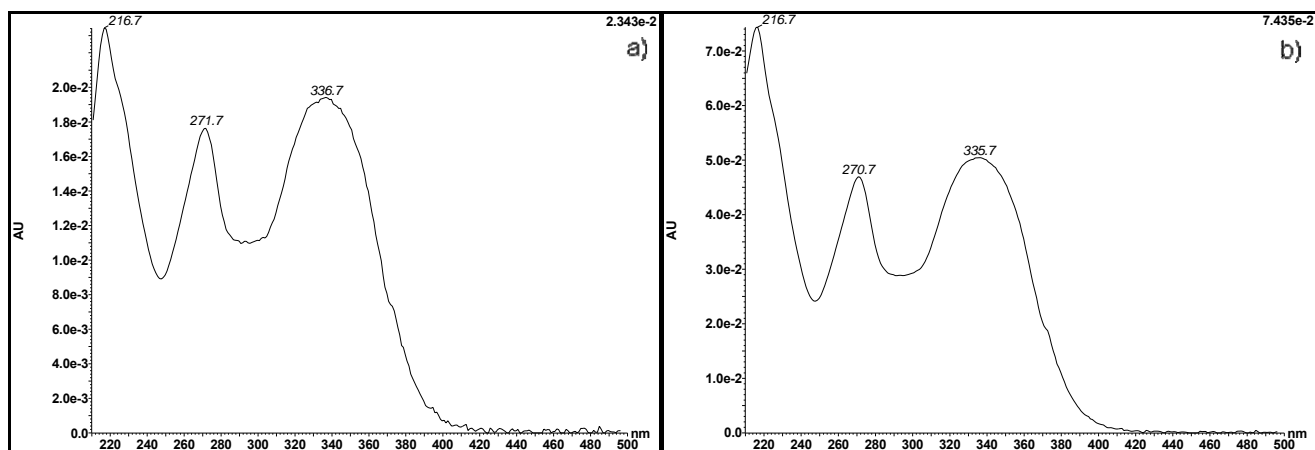


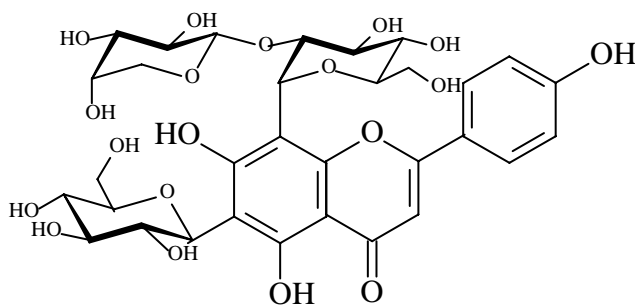
FIGURA 4.75: a) espectro de UV das flavonas **XV** e **XVI** ($t_R = 8,55$ min, **G1**);
b) espectro de UV da flavona **XVIII** ($t_R = 9,43$ min, **G1**)

Através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.77-4.78, p. 220, **G1**) verifica-se sinais característicos de uma C-glicosilação com um O-glicosídeo ligado na mesma. Os sinais em δ_H 4,74 (m) e δ_H 4,82 (m) correspondem às glicoses ligadas diretamente na aglicona devido aos sinais de seus carbonos em δ_C 71,0 e δ_C 71,5 respectivamente (HSQC, FIGURA 4.84, p. 223, **G1**). O hidrogênio em δ_H 4,74 correlaciona-se com o hidrogênio δ_H 4,40 (COSY, FIGURA 4.81, p. 222, **G1**). No espectro de HSQC, (FIGURA 4.84, p. 223, **G1**) verifica-se que o hidrogênio H-2''' da glicose (δ_H 4,40) se correlaciona com o carbono em δ_C 72,5. Através do espectro de COSY (FIGURA 4.81, p. 222, **G1**) observou-se que o hidrogênio em δ_H 4,82 correlaciona-se com o hidrogênio em δ_H 3,62 (H-2''') e este se correlaciona o carbono em δ_C 72,5 (HSQC, FIGURA 4.84, p. 223, **G1**).

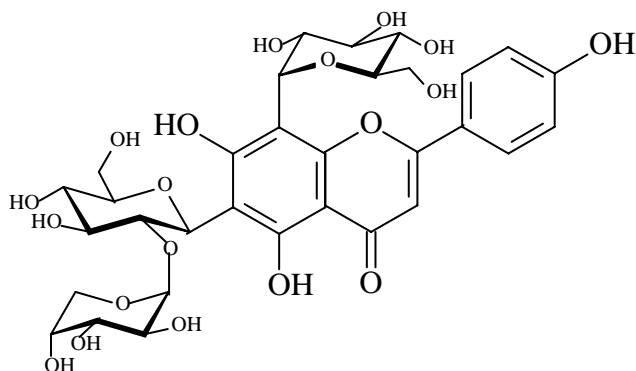
Ainda no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.77-4.78, p. 220, **G1**) foi possível observar os anoméricos da arabinopiranoside, cujos sinais de hidrogênios em δ_H 5,31 (sl) e δ_H 5,06 (sl) se correlacionam com os carbonos em δ_C 108,0 e δ_C 109,0 respectivamente (HSQC, FIGURA 4.84, p. 223, **G1**). De acordo com os deslocamentos observados para estes anoméricos pode-se supor que a respectiva configuração dos mesmos seja β , pois quando se tem uma C- α -Ara o sinal do hidrogênio possui deslocamento químico abaixo de δ_H 5 como um dubleto de constante alta ($\sim 9,4$ Hz), já uma C- β -Ara aparece

acima de δ_H 5 ppm na forma de singleto largo (XIE *et al.*, 2003, TABELAS 4.8 (p. 140) e 4.9 (p. 142)).

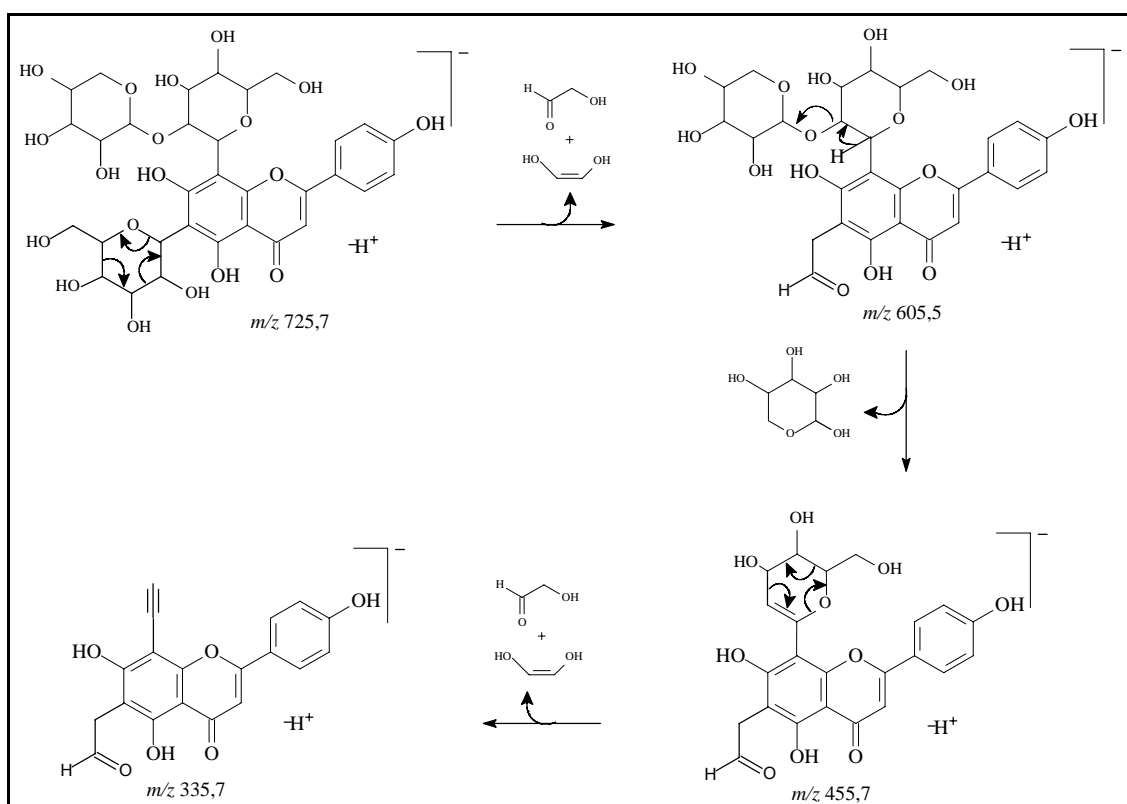
Com os experimentos de 1D e 2D obtidos das frações **G1** e **G2** não é possível atribuir exatamente a qual flavona **XV** e **XVI** correspondem estes valores de hidrogênios dos glicosídeos e se são relativos a posição C-6 ou C-8 da flavona. Entretanto, de acordo com os dados de CL-EM juntamente com o conjunto de dados dos experimentos de RMN em comparação com a literatura (FIGUEIRINHA *et al.*, 2008; FERRERES *et al.*, 2007; VELOZO *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2003) pode-se propor que a flavona **XV** é apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside) e a flavona **XVI** é a apigenina 6-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside, que pelo levantamento realizado na literatura são inéditas. No ESQUEMA 4.7 (p. 215) tem-se a proposta de fragmentação para a flavona **XV**. Neste experimento foi possível verificar a presença par isomérico **XV** e **XVI** e observar ainda a diferença na intensidade do pico do íon pseudomolecular para cada um dos isômeros de posição, sendo que o de maior intensidade corresponde isômero **XV**, no qual o diglicosídeo está ligado na posição C-6 da aglicona e no isômero **XVI** o diglicosídeo está ligado na posição C-8 da flavona cuja intensidade do pico do íon pseudomolecular é menor comparado ao seu isômero de posição **XV**.



Apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside) (**XV**)



Apigenina 6-C-(2'''-O-α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosil)-8-C-β-D-glucopiranoside (**XVI**)



ESQUEMA 4.7: Fragmentação da flavona **XV**.

A região aromática dos espectros de RMN ^1H (FIGURAS 4.77-4.80, p. 220 e 221) das frações **G1** e **G2** correspondente a flavona **XVII** apresenta o sistema AA'XX' correspondente aos hidrogênios 2'/6' (δ_{H} 8,14; d, $J = 9,6$ Hz) e 3'/5' (δ_{H} 6,97; d, $J = 9,6$ Hz). O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.90, p. 226, **G2**) confirma o esqueleto de flavona através dos deslocamentos químicos da

carbonila em δ_C 182,3 (C-4) e dos carbonos oleofínicos C-2 e C-3 em δ_C 164,3 e δ_C 102,6, respectivamente. Observa-se no espectro de RMN 1H (FIGURA 4.79-4.80, p. 221, **G2**) a presença dos singletos referentes ao H-3 (δ_H 6,82) da flavona e do hidrogênio HO-5 (δ_H 13,79; hidroxila quelatogênica) sugerindo um anel A completamente substituído.

A observação dos dois dubletos em δ_H 4,85 ($J = 10,0$ Hz) e em δ_H 4,89 ($J = 10,0$ Hz) e do multiplete entre δ_H 3,1-4,2 sugerem a presença de resíduos de unidades glicosídicas (RMN 1H , FIGURA 4.79-4.80, p. 221, **G2**). O mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.85-4.86, p. 224, **G2**) mostra a correlação destes hidrogênios com os carbonos em δ_C 71,7 (C-1''); δ_C 71,8 (C-1'') o que indica a presença de duas unidades C-glicosídicas. Desta forma pode-se supor que estes glicosídeos estão ligados nas posições C-6 e C-8 da aglicona, uma vez que não se observa os sinais de hidrogênios referentes a estas posições. Através das correlações no espectro de COSY (FIGURA 4.82, p. 222 e 4.83, p. 223, **G2**) e mapa de correlações HSQC (FIGURAS 4.85-4.86, p. 224, **G2**) em comparação com dados da literatura (VELOZO *et al.*, 2009) pode-se atribuir todos os sinais das unidades glicosídicas. As configurações β para as mesmas foram definidas com base no valor da constante de acoplamento ($J = 10,0$ Hz) dos dubletos relativos a H-1'' e H-1''', o qual sugeriu um acoplamento di-axial entre H-1''/H-2'' e H-1'''/H-2'''.

O espectro de UV do composto **XVII** ($\lambda = 216,7; 271,7; 336,7$ nm; DAD, FIGURA 75a-b, p. 213) confirma a presença de um derivado de flavona com um grupo hidroxila no anel B (trihidroxi-flavona; $\lambda = 268,5; 336,2$ nm; LI *et al.*, 2007). O espectro de massas (ESI-MS, FIGURA 4.76, p. 217) mostra o íon pseudomolecular 593,6 $[M-H]^-$. Através da análise do espectro (MS/MS, FIGURA 4.76, p. 217) verifica-se a saída dos fragmentos $[M-H-90]^-$, $[M-H-90-120]^-$, $[M-H-90-120-90]^-$, $[M-H-90-120-90-120]^-$ sendo esta fragmentação característica de 6,8-di-C-hexosil flavonas (PICCINELLI *et al.*, 2008). No espectro de massas (FIGURA 4.76, p. 217) verificou-se ainda a perda de H_2O $[M-H-18]^-$ a qual foi observada também por CARISTI *et al.* (2003). Os íons de

m/z 353 ($[aglicona + 83]^-$) e m/z 353 ($[aglicona + 113]^-$) indicam a aglicona trihidroxiflavona (apigenina; PICCINELLI *et al.*, 2008).

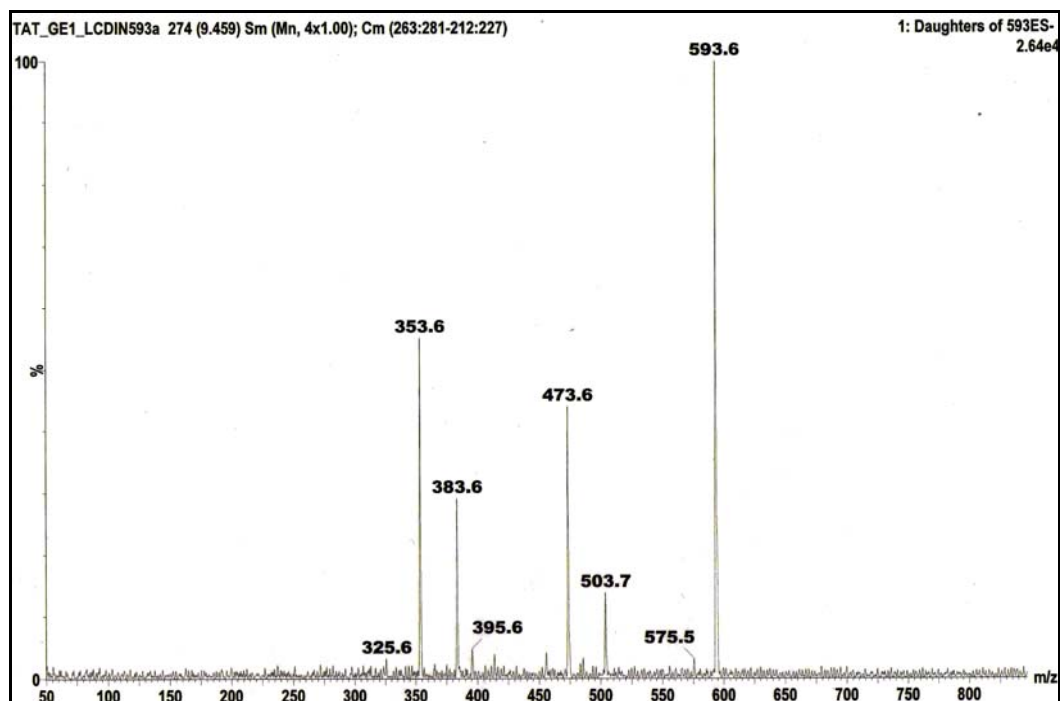
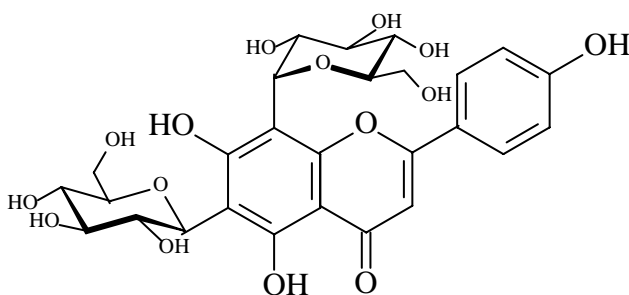
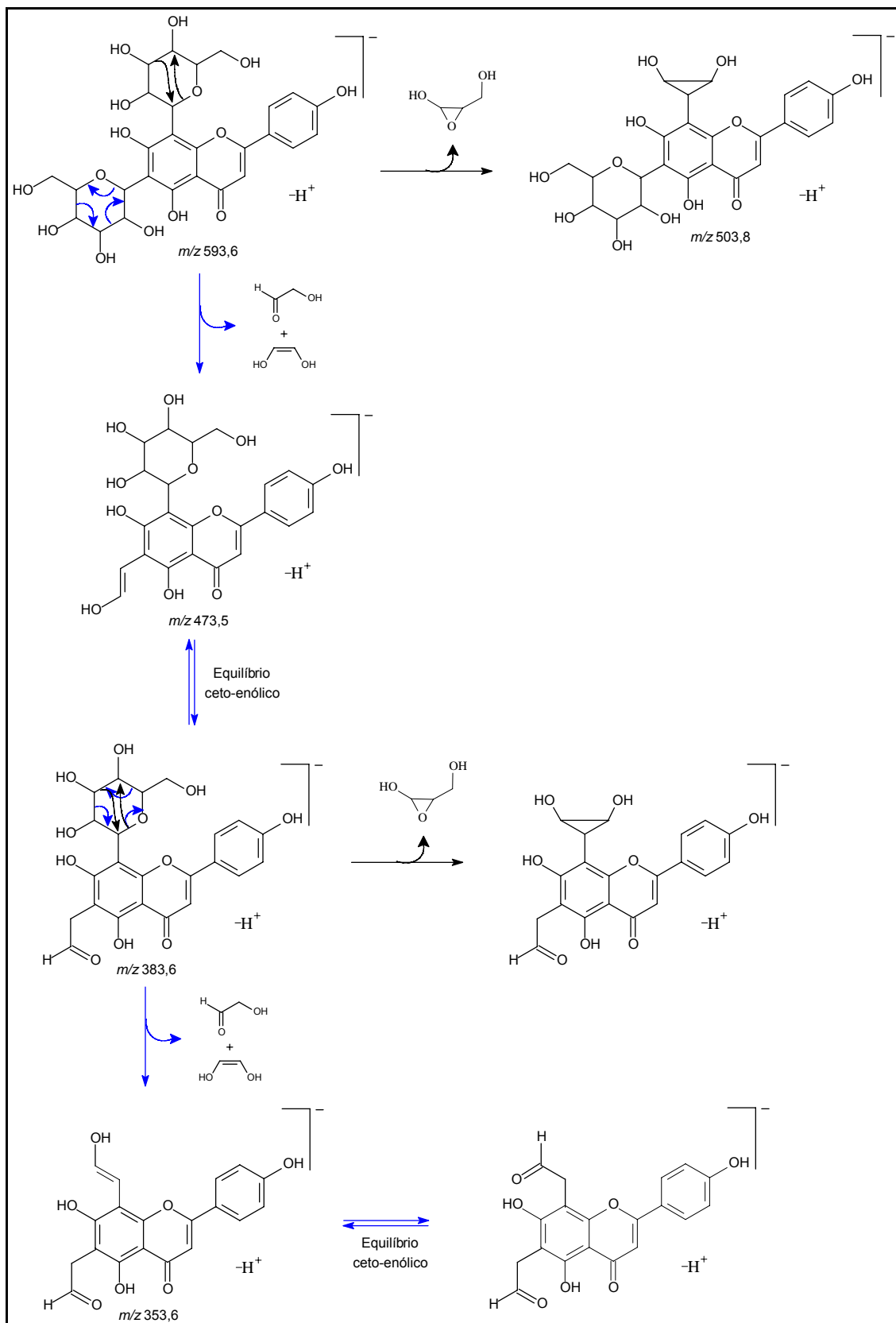


FIGURA 4.76: Espectro de massa no modo negativo $[M-H]^-$ (ion pseudomolecular) da flavona **XVIII** ($t_R = 9,92$ min, **G1**).

O conjunto de dados de UV e CL-EM, citados acima juntamente com os dados dos espectros de RMN de 1D e 2D (FIGURAS 4.77-4.90, p. 220 a 226, TABELA 4.21, p. 219) em comparação com dados da literatura (VELOZO *et al.*, 2009; PICCINELLI *et al.*, 2008) indicam que o composto **XVII** é a flavona conhecida como vicenin-2 (apigenina 6,8-Di-C- β -D-glucopiranoside). No ESQUEMA 4.8 (p. 218) tem-se a proposta de fragmentação para esta flavona (**XVII**).



Vicenin-2 (**XVII**)



ESQUEMA 4.8: Fragmentação da vicenin-2 (XVII).

TABELA 4.21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Vicenin-2 (**XVII**, DMSO 400/100 MHz; Lit: VELOZO *et al.*, 2009, DMSO, 500/125 MHz).

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	XVII	VELOZO <i>et al.</i> , 2009	XVII	VELOZO <i>et al.</i> , 2009
2			164,3	163,9
3	6,88 (s)	6,70 (s)	102,6	102,4
4			182,3	182,0
5	13,79 (sl)		161,5	158,3
6			107,4	108,3
7			163,0	161,3
8			105,3	105,1
9			155,0	155,1
10			102,6	102,4
1'			121,5	121,4
2', 6'	8,14 (d; 9,6)	8,00 (d; 8,9)	128,9	128,8
3', 5'	6,97 (d; 9,6)	6,90 (d; 8,9)	116,1	115,9
4'			161,3	161,3
1''	4,85 (d; 10,0)	4,75 (d; 9,8)	71,7	74,3
2''	3,95 (m)	3,86 (m)	74,1	71,9
3''	3,35 (m)	3,29 (m)	77,6	78,8
4''	3,17 (sl)	3,29 (m)	70,8	70,3
5''	3,40 (m)	3,30 (m)	80,9	81,4
6a''/b	a 3,81 (m) b 3,65 (m)	a 3,78 (m) b 3,50 (m)	61,3	61,1
1'''	4,89 (d; 10,0)	4,88 (d; 9,8)	71,8	73,9
2'''	4,10 (m)	3,86 (m)	74,4	71,9
3'''	3,50 (m)	3,38 (m)	78,9	78,8
4'''	3,40 (m)	3,42 (m)	70,5	70,5
5'''	3,25 (m)	3,25 (m)	80,2	81,8
6'''a/b	a 3,80 (m) b 3,58 (m)	a 3,78 (m) b 3,50 (m)	61,9	60,7

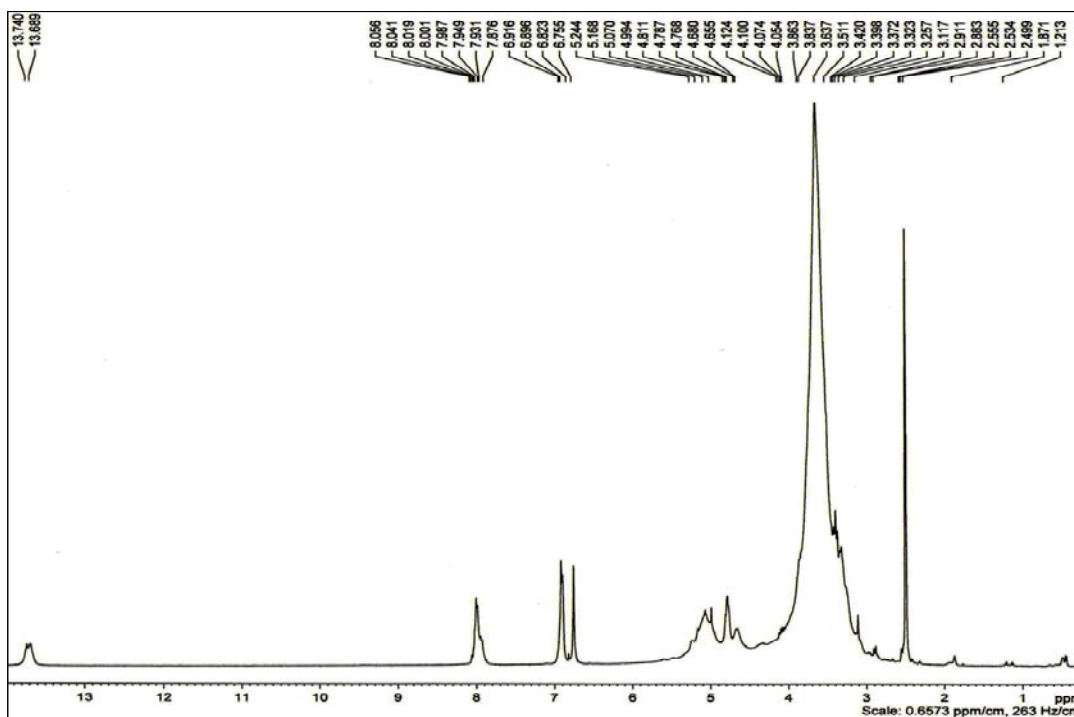


FIGURA 4.77: Espectro de RMN ^1H da fração **G1** (DMSO, 400 MHz).

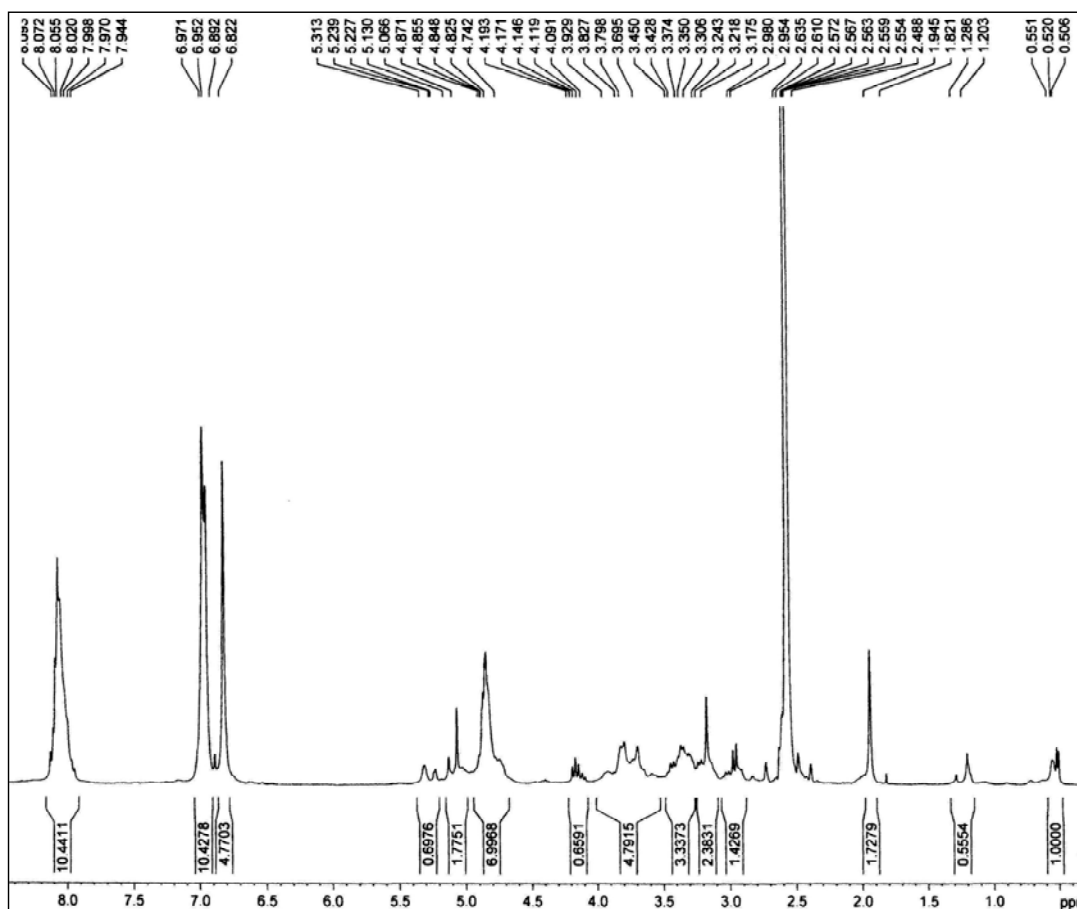


FIGURA 4.78: Ampliação do espectro de RMN ^1H da fração **G1** (DMSO, 400 MHz).

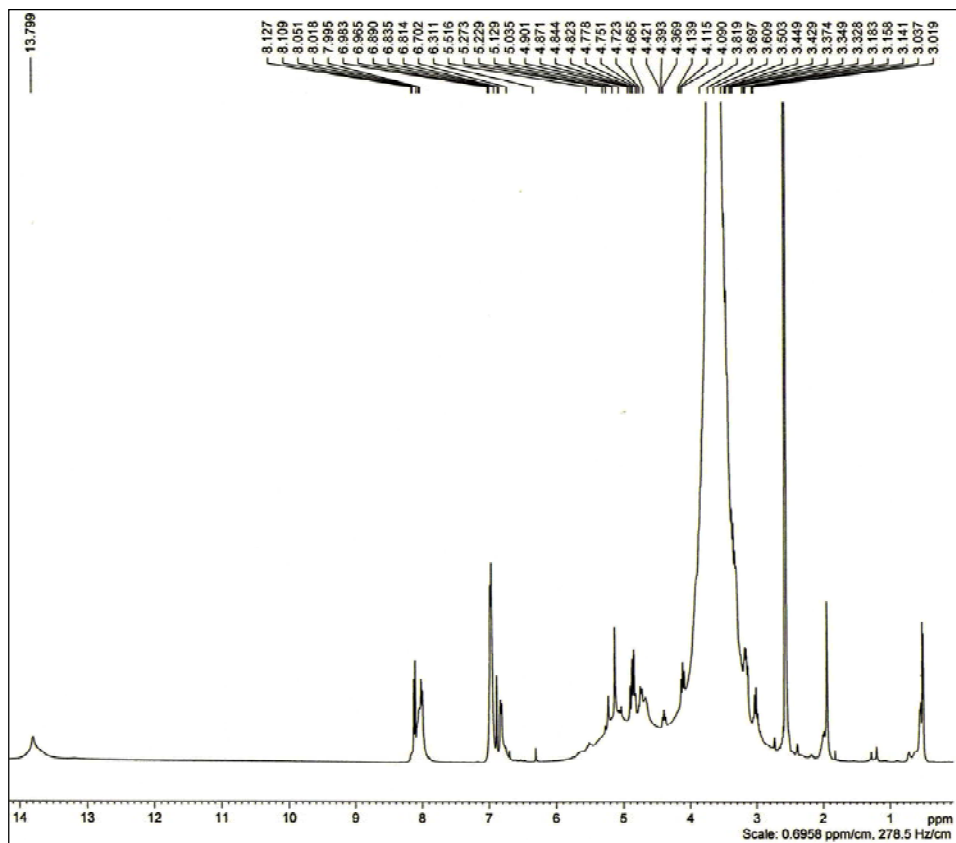


FIGURA 4.79: Espectro de RMN ^1H da fração **G2** (DMSO, 400 MHz).

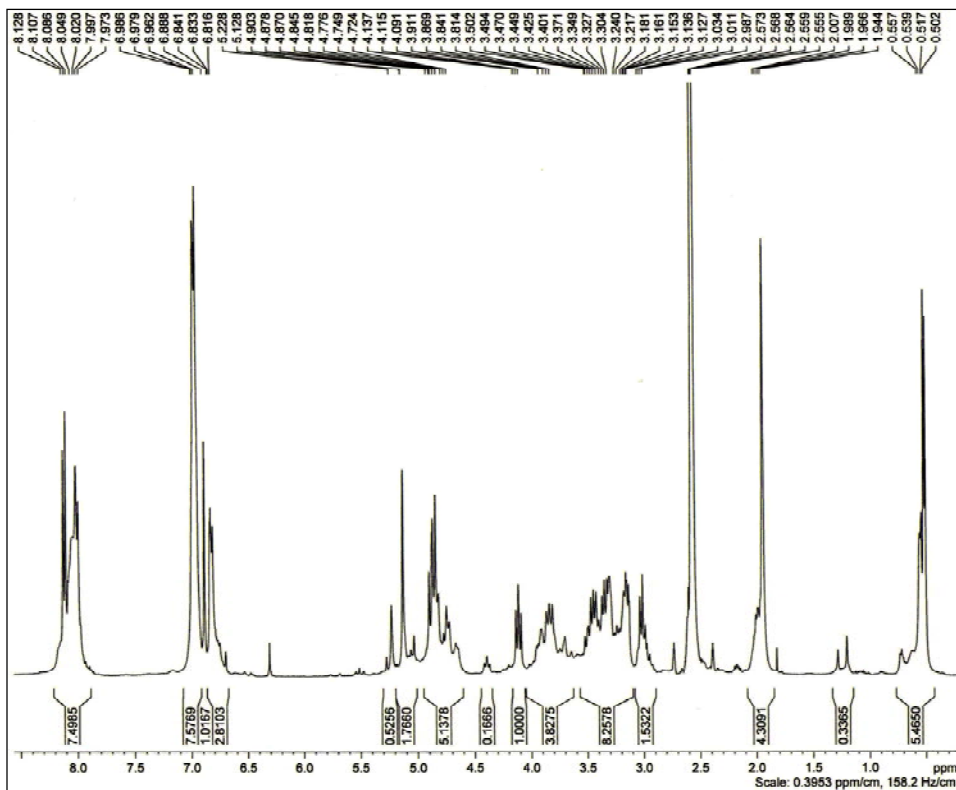


FIGURA 4.80: Espectro de RMN ^1H da fração **G2** (DMSO, 400 MHz).

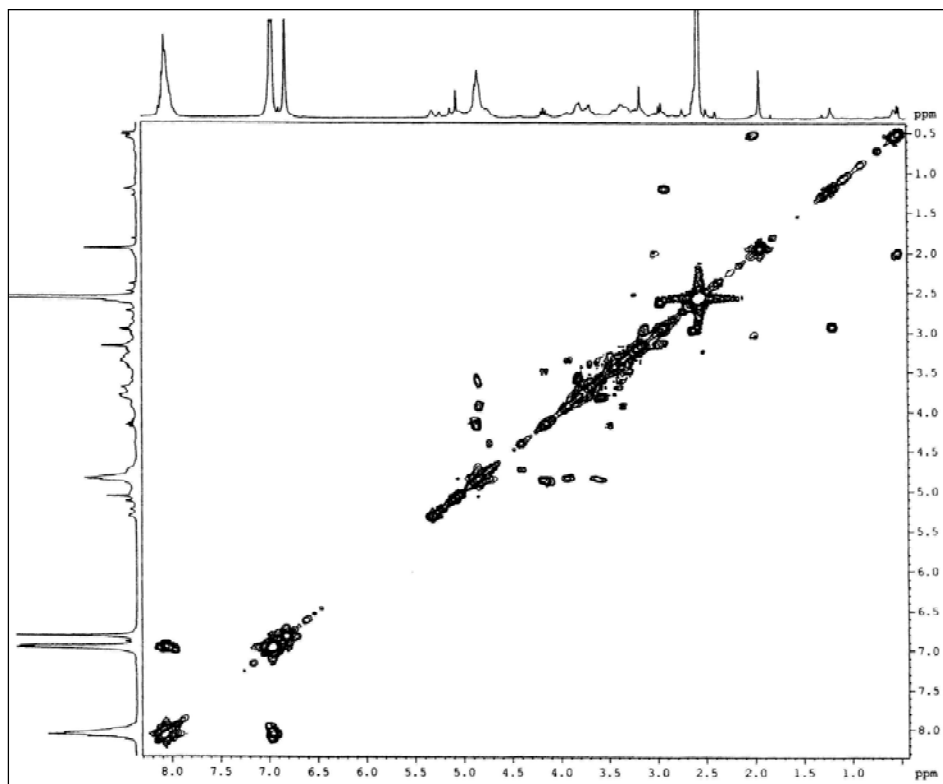


FIGURA 4.81: Espectro de COSY da fração **G1** (DMSO, 400 MHz).

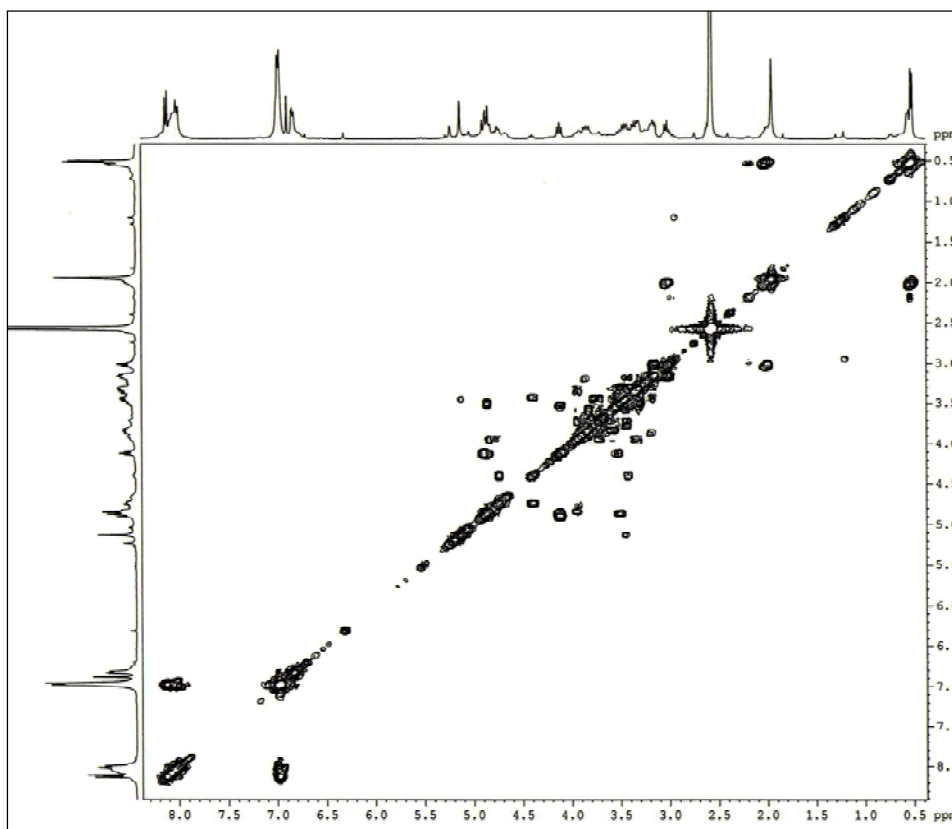


FIGURA 4.82: Espectro de COSY da fração **G2** (DMSO, 400 MHz).

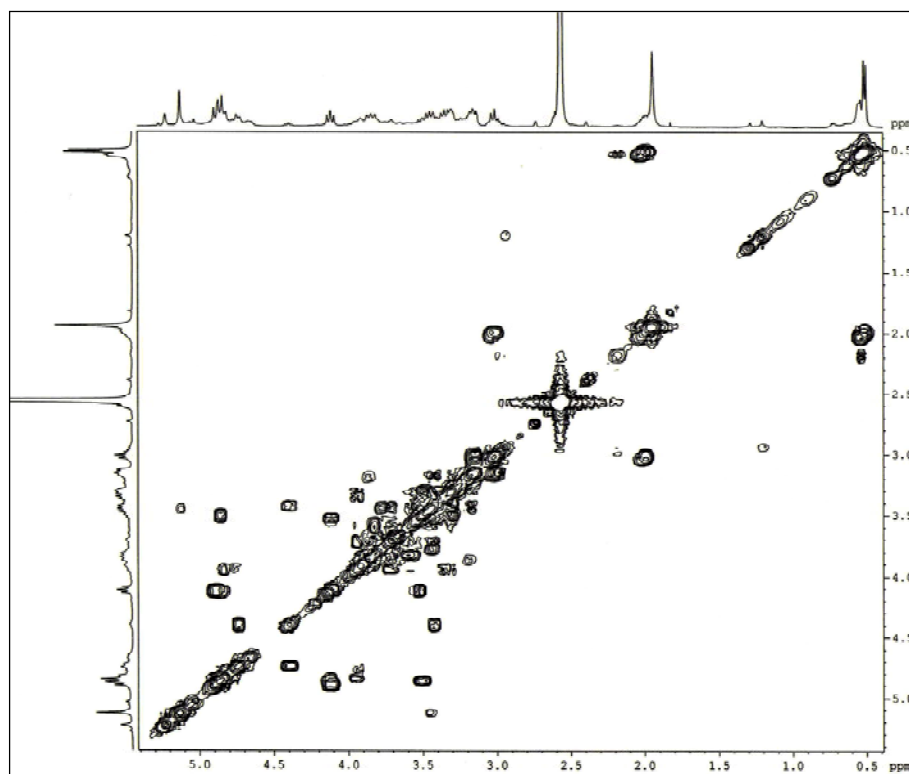


FIGURA 4.83: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY de **G2** (DMSO, 400 MHz).

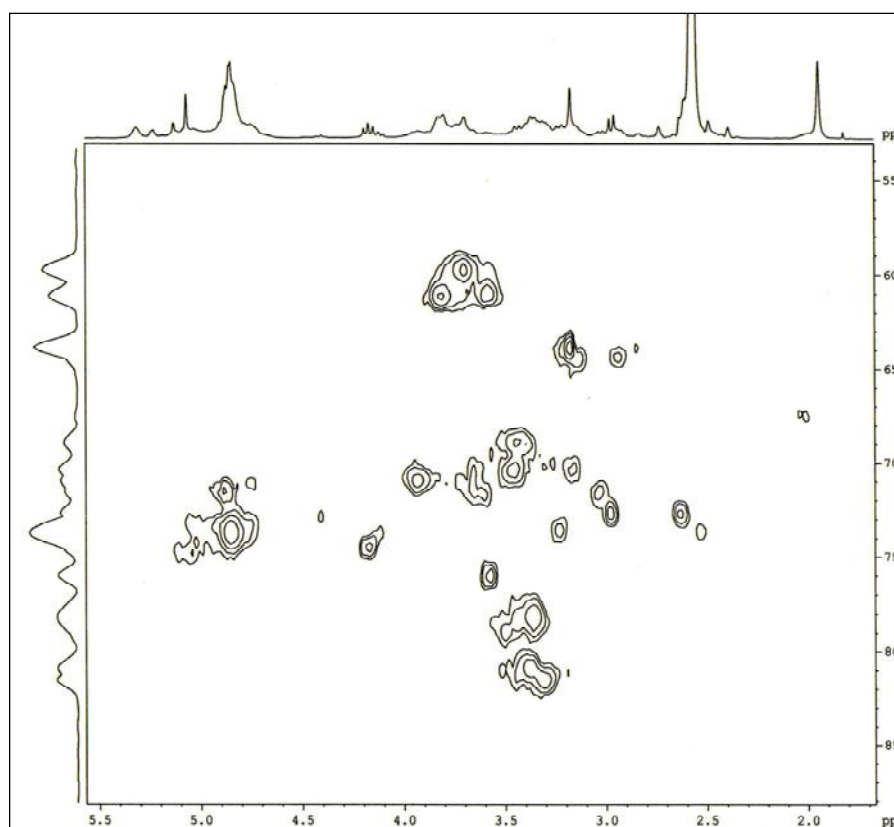


FIGURA 4.84: Mapa de correlações HSQC de **G1** (DMSO, 400 MHz).

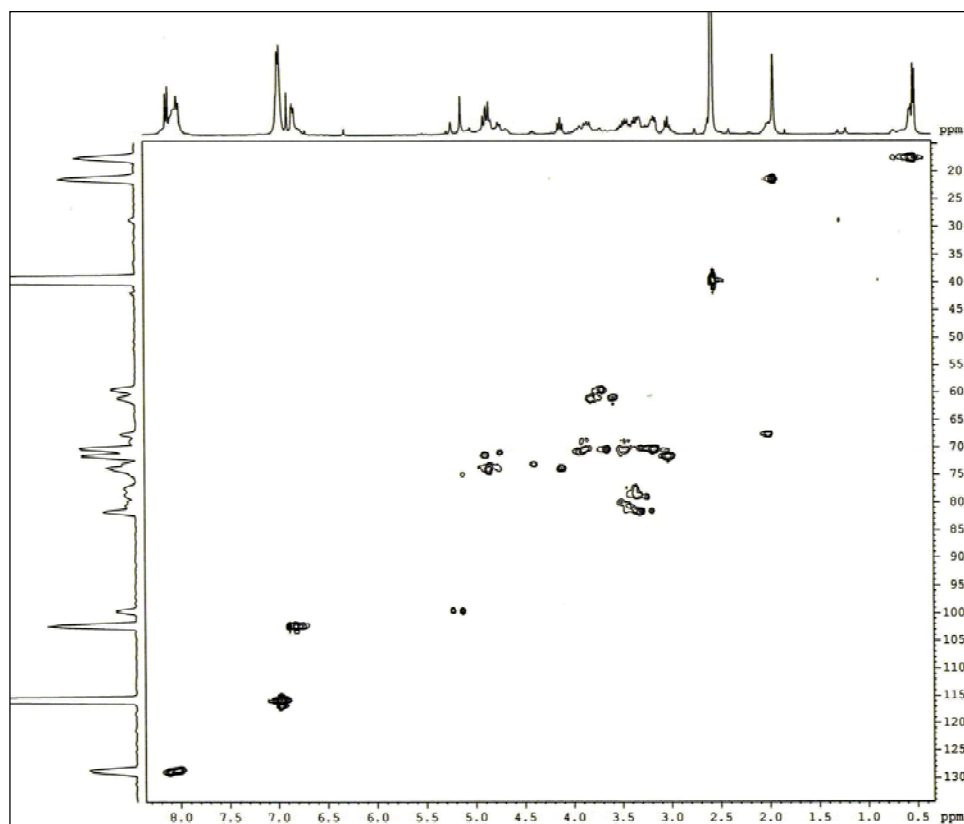


FIGURA 4.85: Mapa de correlações HSQC de **G2** (DMSO, 400 MHz).

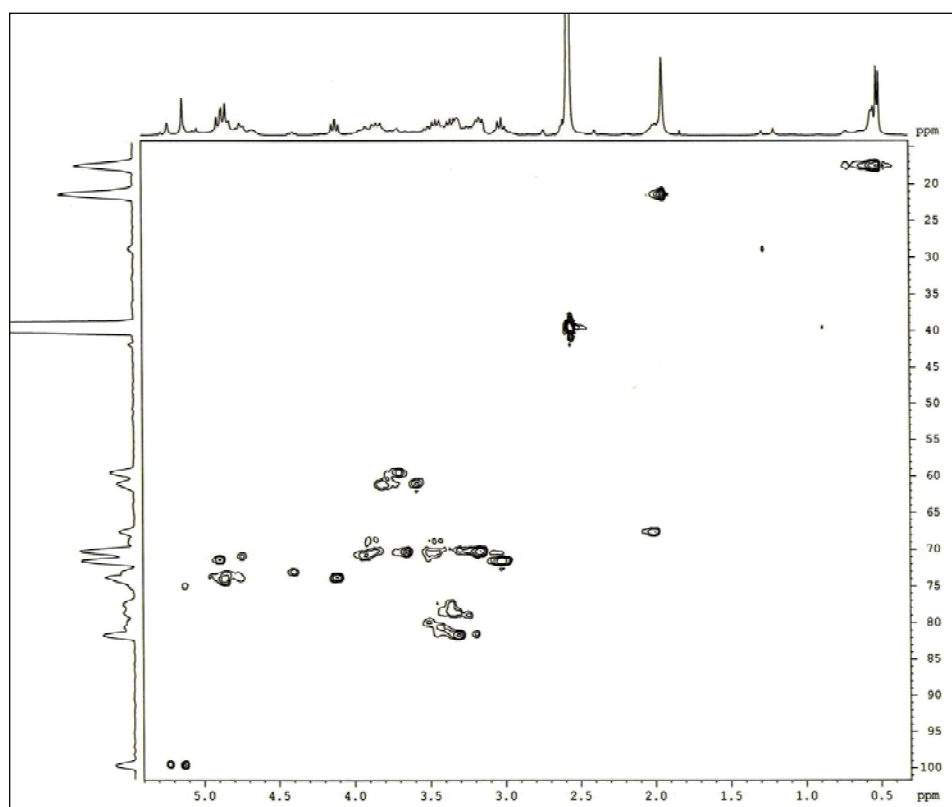


FIGURA 4.86: Ampliação do mapa de correlações HSQC de **G2** (DMSO, 400 MHz).

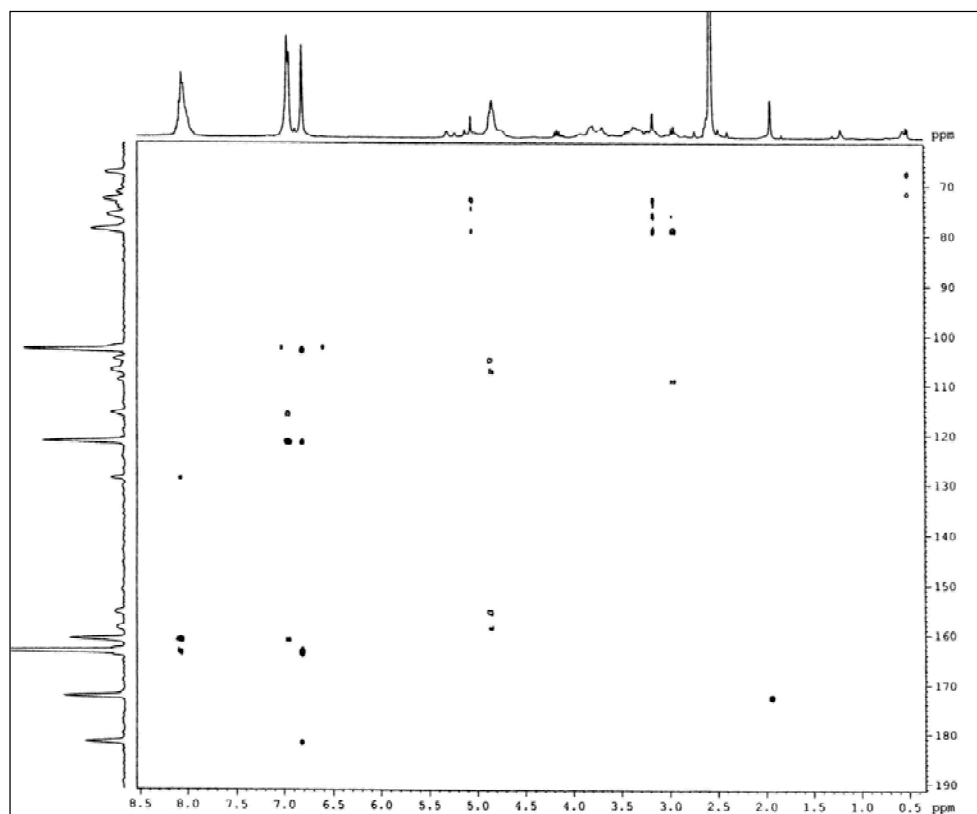


FIGURA 4.87: Mapa de correlação de HMBC de **G1** (DMSO, 400 MHz)

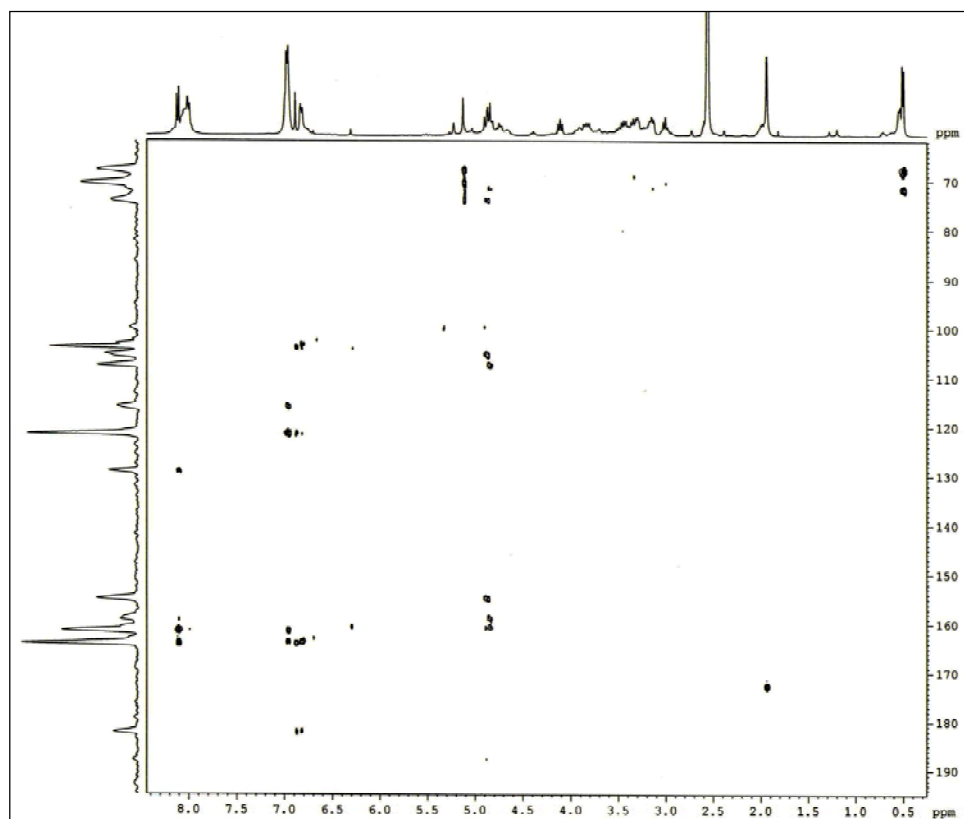


FIGURA 4.88: Mapa de correlação de HMBC de **G2** (DMSO, 400 MHz)

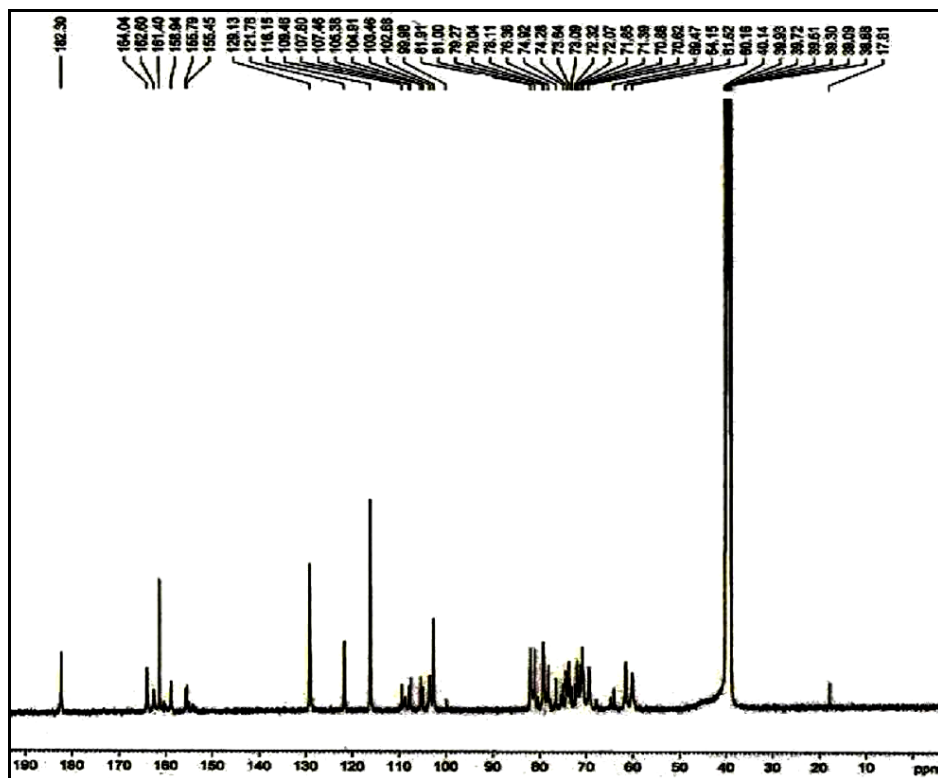


FIGURA 4.89: Espectro de RMN ^{13}C de **G1** (DMSO, 100 MHz).

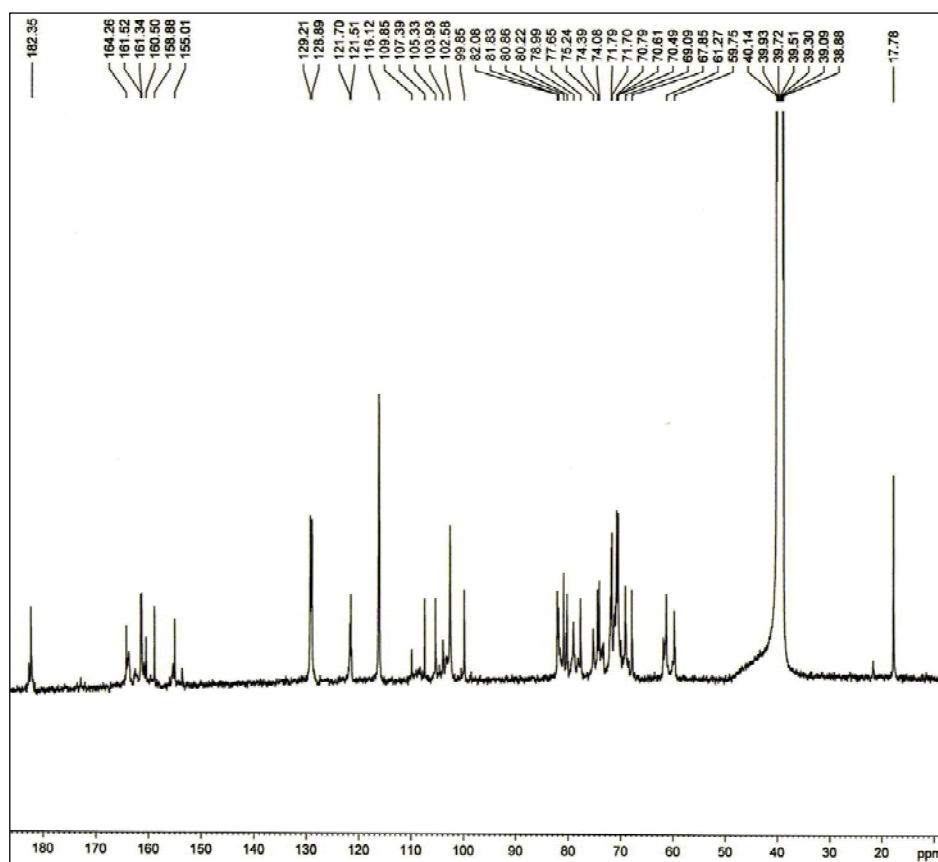


FIGURA 4.90: Espectro de RMN ^{13}C de **G2** (DMSO, 100 MHz).

4.5.9.2 – Determinação estrutural dos constituintes da fração G3 e G4 (substâncias XVIII, XIX, XX e XXI)

Na fração **G3** (RCMH_{G3}) há a mistura das substâncias **XVII** (massa pseudomolecular 593,6), **X**, **XII** (massa pseudomolecular 739,7), **XVIII**, **XIX**, **XX** e **XXI** (massa pseudomolecular 563,6) e a fração **G4** (RCMH_{G4}) contêm as substâncias citadas para **G3** e também as flavonas **XII** e **XXII** (massa pseudomolecular 577,6) conforme descrito na TABELA 4.19 (p. 202).

Uma vez que a proposta de estruturas para as substâncias **XVII**, **X**, **XII** e **XXI** já foram discutidas em itens anteriores, neste item será discutido a determinação estrutural das substâncias **XVIII**, **XIX**, **XX** e **XXI** que possuem massa pseudomolecular 563,6. Esta determinação foi realizada através da análise dos espectros RMN ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC e CL-EM em comparação com dados da literatura (XIE *et al.*, 2003).

No espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.94, p. 238, **G3**) observou-se um singlete em δ_H 6,78 (H-3) e dois dubletos em δ_H 8,06 (d, $J = 8,8$ Hz; 2H) e δ_H 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz; 2H) característicos do anel B *p*-substituído. Estes dados sugerem a presença da aglicona apigenina (**56**, p. 47). Através da análise do espectro de hidrogênio pode-se observar também que nas frações **G3** e **G4** há várias unidades glicosídicas as quais devem estar presentes como substituintes das posições C-6 e C-8, visto que estão ausentes os singletos entre δ_H 6,16 e δ_H 6,56 referentes à H-6 e H-8. A presença de uma grande quantidade de compostos dificultou a atribuição dos deslocamentos químicos dos respectivos valores de seus açúcares a cada uma das flavonas glicosiladas devido à grande sobreposição de sinais na mistura.

Neste contexto, os espectros de massas destas frações (**G3** e **G4**, FIGURAS 4.92, p. 229; 4.93, p. 230) auxiliaram na determinação de quantas unidades glicosídicas estão presentes em cada uma das flavonas e se é uma pentose e/ou uma hexose e determinar também se são ligações C,O-glicosídicas. Como as posições C-6 e C-8 estão substituídas e as massas pseudomoleculares dos compostos **XVIII**, **XIX**, **XX**, **XXI** é 563,6 Daltons

(FIGURAS 4.92, p. 229; 4.93, p. 230) pode-se propor inicialmente que se trata de 6,8-di-glicosilflavonas com uma pentose e uma hexose como substituintes. Além disso, os espectros de UV (DAD, FIGURA 91b-c, p. 228) dos dois constituintes da mistura são iguais ($\lambda = 215,7; 271,7; 330,7$ nm) e condizentes com a apigenina (**56**, p. 47, $\lambda = 268,5; 336,2$ nm; LI *et al.*, 2007) em que as posições C-4' e C-7 estão com hidroxilas livres, conforme discutido no item 4.5.3 (p. 143).

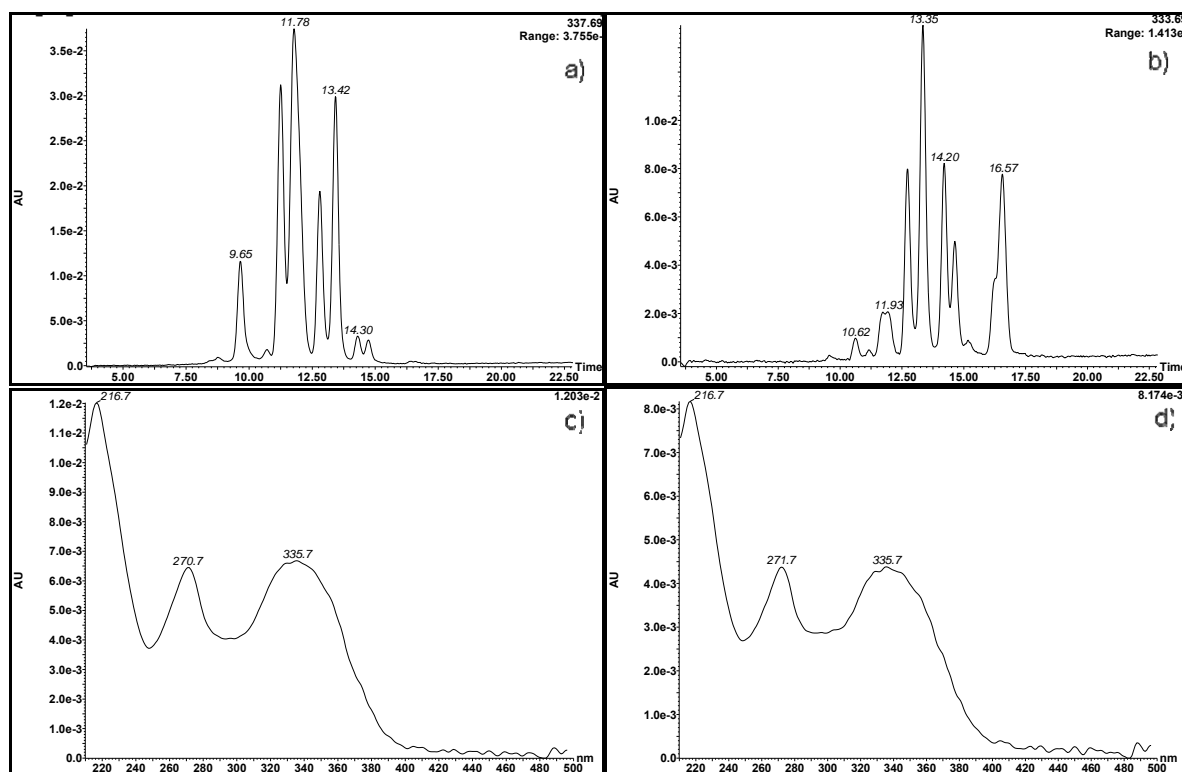


FIGURA 4.91: a) Cromatograma da subfração **G3**; b) Cromatograma da subfração **G4**; c) espectro de UV flavona **XX** e **XXI** ($t_R = 11,76$ min, **G3**); d) espectro de UV da flavona **XVIII** e **XIX** ($t_R = 13,35$ min, **G3**).

Há vários estudos que investigam métodos espectrais de massas para determinar o tipo de açúcar substituinte nas posições C-6 e C-8 em 6,8-di-C-glicosilflavonas. No modo de ionização negativo pode-se explorar a preferência da clivagem interna dos açúcares da posição C-6 comparada à posição C-8. Neste estudo verificou-se que o par isomérico possui íons com abundâncias relativas diferentes nos espectros de massas na qual os açúcares possuem posições diferentes (KITE *et al.*, 2006).

Os compostos **XVIII** e **XIX** apresentaram nos espectros de massas (FIGURA 4.92b-c, p. 229) os principais fragmentos 563 (100) $[M-H]^-$, 503,6 (5) $[M-H-60]^-$, 473,4 (10) $[M-H-90]^-$, 443,5 (31) $[M-H-120]^-$, 383,5 (40) $[(M-H-90-90); (M-H-120-60)]^-$, 353,4 (40) $[(M-H-90-120); (M-H-120-90)]^-$ o que indica a presença de uma unidade C-hexosil e uma unidade C-pentosil.

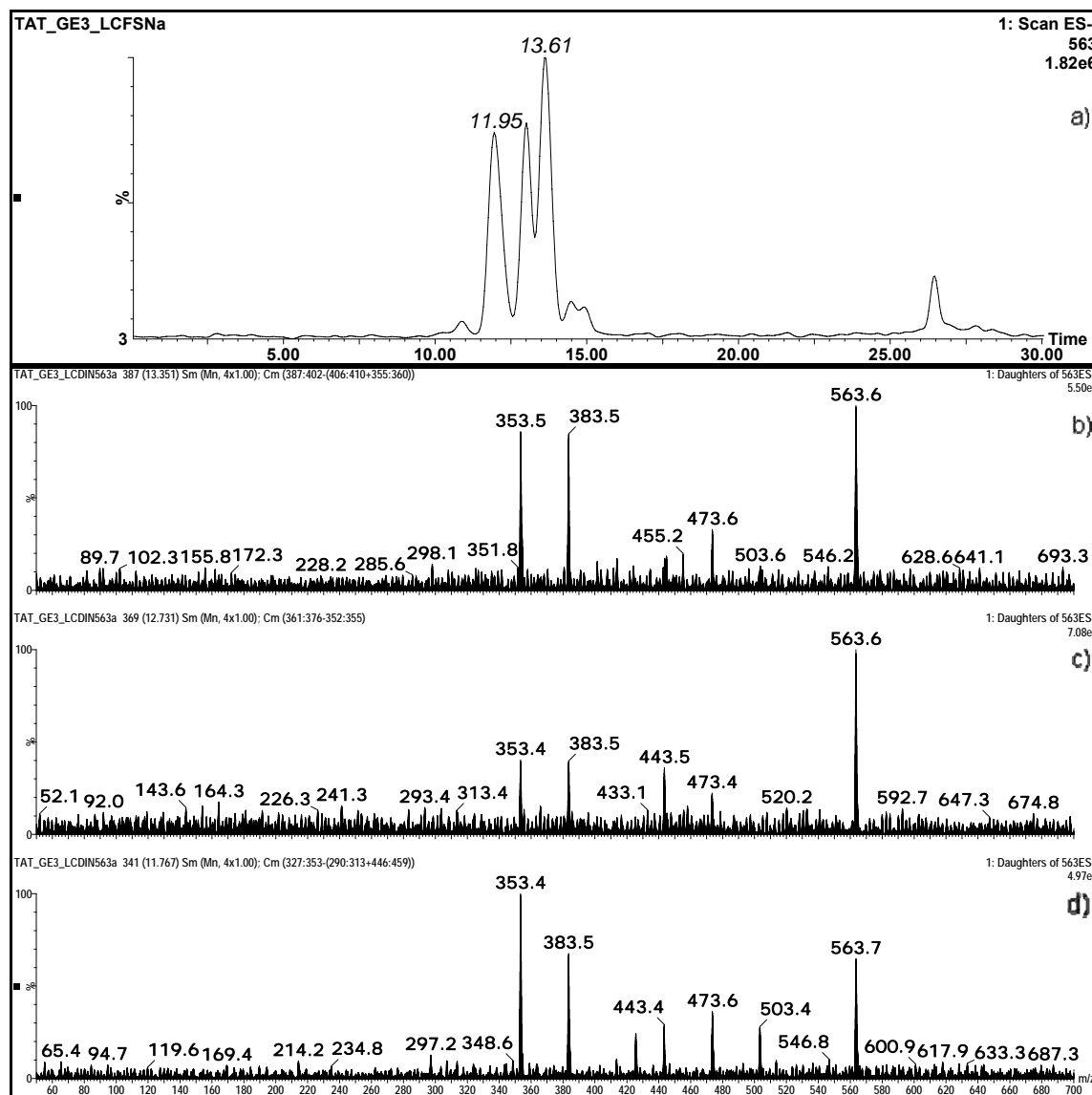


FIGURA 4.92: a) Cromatograma da subfração **G3**; b) espectros de massas no modo negativo $[M-H]^-$ da fração **G3** com o íon pseudomolecular 563,6 da flavona **XVIII**; c) de seu isômero **XIX**, d) e da flavona **XX**.

Para os compostos **XX** e **XXI** (FIGURAS 4.92d, p. 229 e 4.93b, p. 230) verificou-se os fragmentos 563 (66) $[M-H]^-$, 503 (27) $[M-H-60]^-$, 473,6 (39) $[M-$

$\text{H-90}]^-$, 443,0 (31) $[\text{M-H-120}]^-$, 423,0 (24) $[\text{M-H-140}]^-$, 383,5 (71) $[(\text{M-H-90-90})$; $(\text{M-H-120-60})]^-$, 353,4 (100) $[(\text{M-H-90-120})$; $(\text{M-H-120-90})]^-$ (FIGURA 4.92d, p. 229). Estes dados estão de acordo com a observação de KITE *et al.* (2004). De acordo com estas diferenças apresentadas nas intensidades dos picos pode-se supor que estão presentes na mistura isômeros de posição, ou seja, as unidades de pentose e hexose estão variando nas posições C-6 e C-8 na aglicona apigenina.

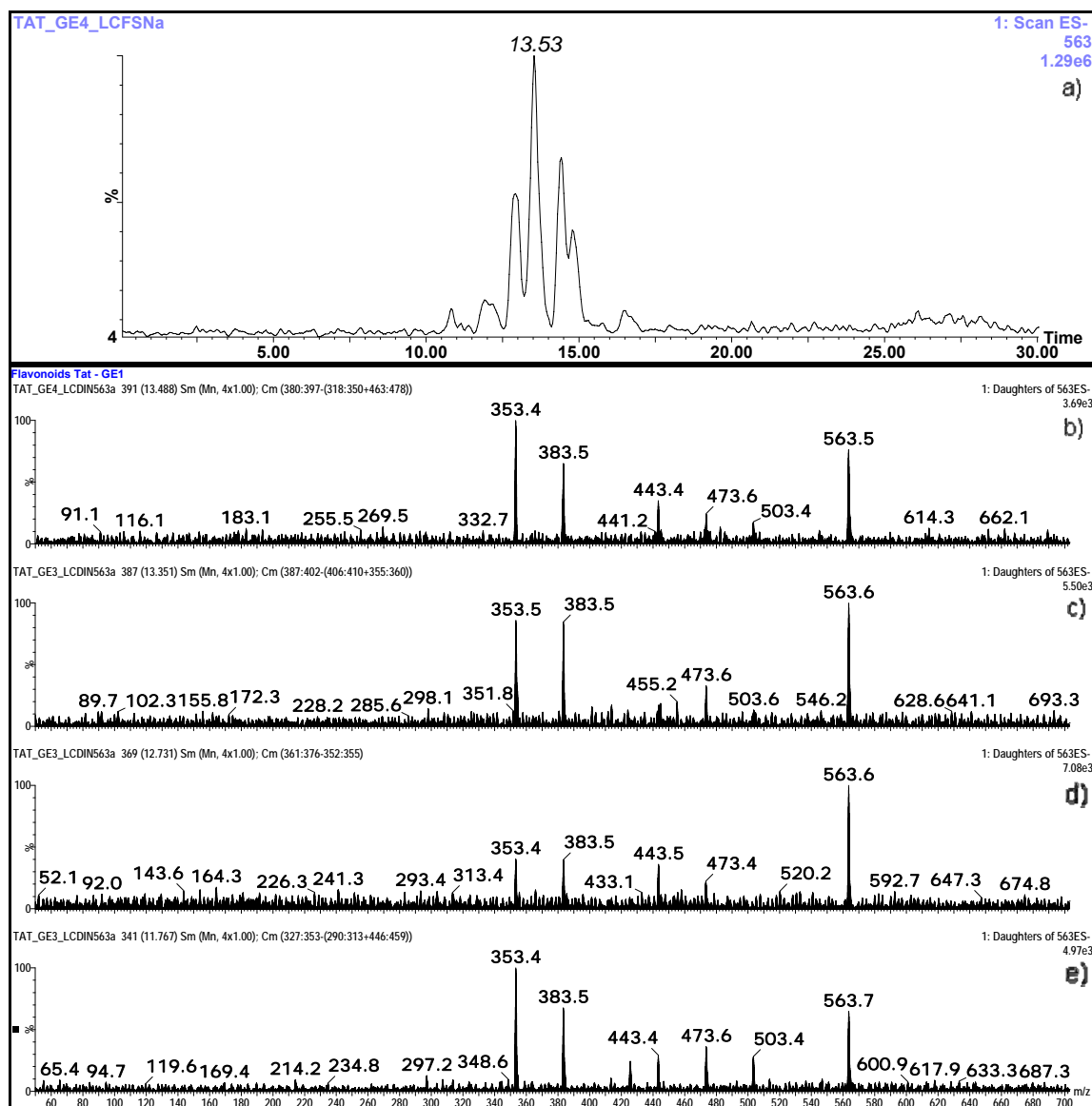


FIGURA 4.93: a) Cromatograma da subfração **G4**; b) espectros de massas no modo negativo $[\text{M-H}]^-$ da fração **G4** com o íon pseudomolecular 563,6 das flavona b) **XXI**; c) **XVIII**, d) **XIX** e) **XX**.

FERRERES *et al.* (2003) notou que schaftoside (apigenina 6-C- β -D-glucopiranoside-8-C- α -L-arabinopiranoside) e isochaftoside (apigenina 6-C- α -L-arabinopiranoside-8-C- β -D-glucopiranoside) podem ser diferenciadas usando o experimento MS/MS no modo negativo (Agilent, ion trap) a partir da diferença apresentada na abundancia relativa do íon característico da unidade de pentose [(M-H)-60]⁻. Como a fragmentação é preferencial na posição C-6, o íon [(M-H)-60]⁻ apresenta uma abundancia relativa de mais de 70% em relação ao espectro de isochaftoside comparado a menos de 10% no espectro de schaftoside. Em outro estudo utilizando um equipamento diferente (Finigan, íon trap) obteve-se abundancia relativa do íon [(M-H)-60]⁻ de mais de 80% para isochaftoside e 30% para schaftoside.

Quando utilizou-se triplo quadrupolo no modo negativo para o par isomérico verificou-se que os espectros de schaftoside e isochaftoside apresentaram maior fragmentação de modo que as diferenças entre os espectros dos mesmos foram sutis (LI *et al.*, 1991 *apud* KITE *et al.*, 2006).

Os espectros obtidos no modo positivo (íon trap) apresentaram maior distinção entre os isômeros do que no modo negativo. Os íons *m/z* 451, 457 e 469 no espectro de schaftoside estavam em baixa abundancia ou não observados, já no espectro da isochaftoside o íon *m/z* 427 é o pico base sendo que no espectro de schaftoside estava presente com abundancia relativa de apenas 15%. Neste estudo verificou-se ainda que o espectro da neoschaftoside (apigenina 6-C- β -D-glucopiranoside-8-C- β -L-arabinopiranoside) foi indistinguível do espectro de schaftoside, não foi realizado o experimento com a neoisochaftoside (apigenina 6-C- β -L-arabinopiranoside-8-C- β -D-glucopiranoside) pela falta de padrão disponível, mas acredita-se que o resultado seja similar ao da flavona isochaftoside (FERRERES *et al.*, 2003).

FIGUEIRINHA *et al.* (2008) observou a presença de uma unidade C-hexosil devido a presença do fragmento de *m/z* 473 [(M-H)-90]⁻ e *m/z* 443 [(M-H)-120]⁻. A presença dos fragmentos *m/z* 473 [(M-H)-90]⁻ como pico base e a alta abundância relativa do íon com *m/z* 503 [(M-H)-60]⁻ indicam a presença unidade 6-C-pentosil. Os íons de *m/z* 353 (aglicona + 83) e *m/z* 383

(aglicona + 113) sugerem que trata-se da aglicona apigenina (270 Daltons) e desta forma o composto foi identificado como correspondente a 6-C-pentosil-8-C-hexosil apigenina.

Estes dados citados acima são similares aos obtidos no presente estudo. Desta forma, como a abundancia relativa do fragmento $[(M-H)-60]^-$ é maior para os compostos **XX** e **XXI** e os fragmentos são similares pode-se propor que se trata da isochoaftoside e/ou neoisochoaftoside uma vez que os espectros desses isômeros são similares (FERRERES *et al.*, 2003; FIGUEIRINHA *et al.*, 2008) e assim os compostos **XVIII** e **XIX** são schaftoside e/ou neoschaftoside.

O isômero da flavona **XX** identificado como o composto **XXI** foi observado apenas na fração **G4** como mostra a FIGURA 4.93a-b (p. 230).

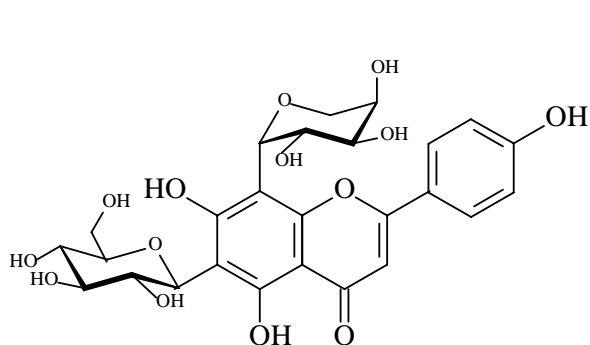
No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.94, p. 238, **G3**) observou-se os dois prótons anoméricos referentes a cada par de isômeros das flavonas cujos sinais aparecem em δ_{H} 4,77 (d, $J = 10,4$ Hz) e δ_{H} 5,48 (sl) referentes à glucopiranoside e arabinopiranoside das flavonas majoritárias na mistura (**XVIII** e **XIX**) e os sinais das flavonas **XX** e **XXI** (minoritárias na mistura) aparecem em δ_{H} 5,08 (sl) e δ_{H} 4,60 (m) atribuídos a arabinopiranoside e glucopiranoside. Estes valores observados estão de acordo com os dados observados nos espectros de massas (FIGURAS 4.92, p. 229; 4.93, p. 230) discutidos acima, no qual verificou-se a presença de duas unidades açúcares diferentes devido as perdas de 60 e 90 Da referentes a fragmentação da arabinopiranoside e 120 Da a partir da fragmentação da glucopiranoside.

A possibilidade da presença da xilopiranoside foi descartada de acordo com comparação dos dados de deslocamento químico na literatura, na qual XIE *et al.* (2003) observaram que para 8-C- β -Xyl o sinal aparece em δ_{H} 4,75 (d, $J = 9,8$ Hz) e para 6-C- β -Xyl em δ_{H} 4,57 (d, $J = 9,8$ Hz) e para uma 2"-O-xilosil flavona o sinal aparece em δ_{H} 3,87 (d, $J = 7,0$ Hz, GIL *et al.*, 2003), ou seja, o deslocamento da xilopiranoside aparece numa região mais blindada do espectro enquanto que o sinal do anomérico arabinopiranoside aparece acima de δ_{H} 5,00 no espectro de RMN ^1H .

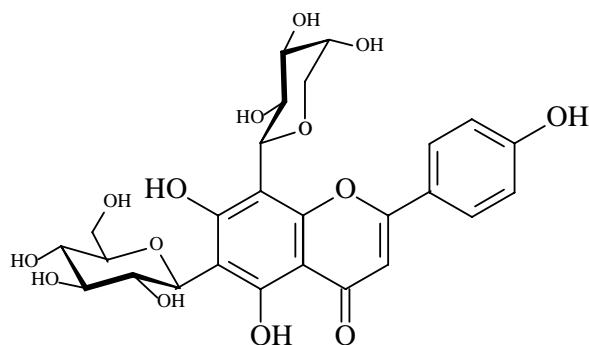
A unidade de glicose está ligada na posição C-6 da flavona majoritária (**XVIII**) a qual foi confirmada pela correlação entre H-1" da glicose δ_H 4,77 e o carbono C-6 da aglicona δ_C 108,2 que se correlaciona também com os dois carbonos em δ_C 161,5 e δ_C 161,1 atribuídos a C-5 e C-7, respectivamente (HMBC, FIGURA 4.103, p. 242, **G3**). O hidrogênio anomérico H-1" da arabinopiranosose (δ_H 5,08) da flavona minoritária na mistura (**XX**) mostra correlação no espectro de HMBC (FIGURA 4.103, p. 242, **G3**) com os carbonos δ_C 107,3 (C-6) e δ_C 161,1 (C-5) e ao hidrogênio anomérico da glicose (δ_H 4,60) mostra correlação com os carbonos δ_C 105,3 (C-8) e δ_C 161,1 (C-7). A diferença da flavona **XVIII** comparada a **XIX** e da flavona **XX** comparada a **XXI** é a configuração da arabinopiranoside que provavelmente possuem (**XIX**, **XXI**) configuração α cujos sinais dos hidrogênios anoméricos em δ_H 4,80 δ_H e 4,62, respectivamente, estão de acordo com dados da literatura (XIE *et al.*, 2003) mas não possuem definição suficiente para verificar a constante de acoplamento ($\sim 9,4$ Hz) uma vez que o sinal está próximo dos sinais dos anoméricos da glicose. O sinal de H-1" da schaftoside (8-C- α -Ara) está em δ_H 4,80 (d, $J = 9,5$ Hz) enquanto que da isoschaftoside está em (6-C- α -Ara) δ_H 4,61 (d, $J = 9,4$ Hz). Os outros sinais são muito semelhantes e desta forma nas TABELAS 4.22 (p. 236) e 4.23 (p. 237) foram colocados como referentes aos dois pares de isômeros com configurações α e β .

Através dos experimentos de RMN (FIGURAS 4.94 a 4.106, p. 238 a 244), pode-se atribuir todos os deslocamentos químicos das substâncias **XVIII** a **XXI** que com a análise do conjunto de dados de CL-EM em comparação com a literatura (XIE *et al.*, 2003; ÖSTERDHAL, 1979; TABELAS 4.22, p. 236 e 4.23, p. 237) indicaram serem as flavonas neoschaftoside (apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C- β -L-arabinopiranoside, **XVIII**), schaftoside (apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranoside, **XVIII**), neoisoschaftoside (apigenina 6-C- β -L-arabinopiranosil-8-C- β -D-glucopiranoside, **XX**) e isoschaftoside (apigenina 6-C- β -L-arabinopiranosil-8-C- α -D-glucopiranoside, **XXI**). O ESQUEMA 4.9 (p. 235) mostra a fragmentação da neoisoschaftoside (**XX**) e/ou

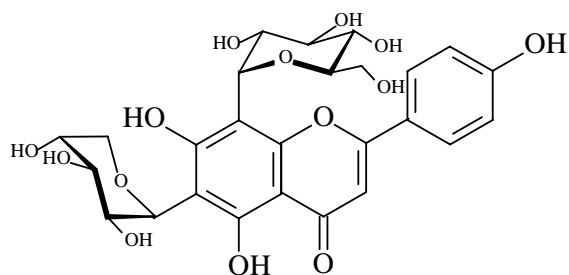
isoschaftoside (**XXI**) sendo que o caminho de fragmentação das outras flavonas (**XVIII**, **XIX**) é o mesmo.



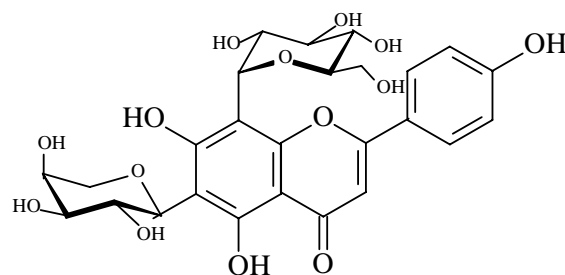
Neoschaftoside (**XVIII**)



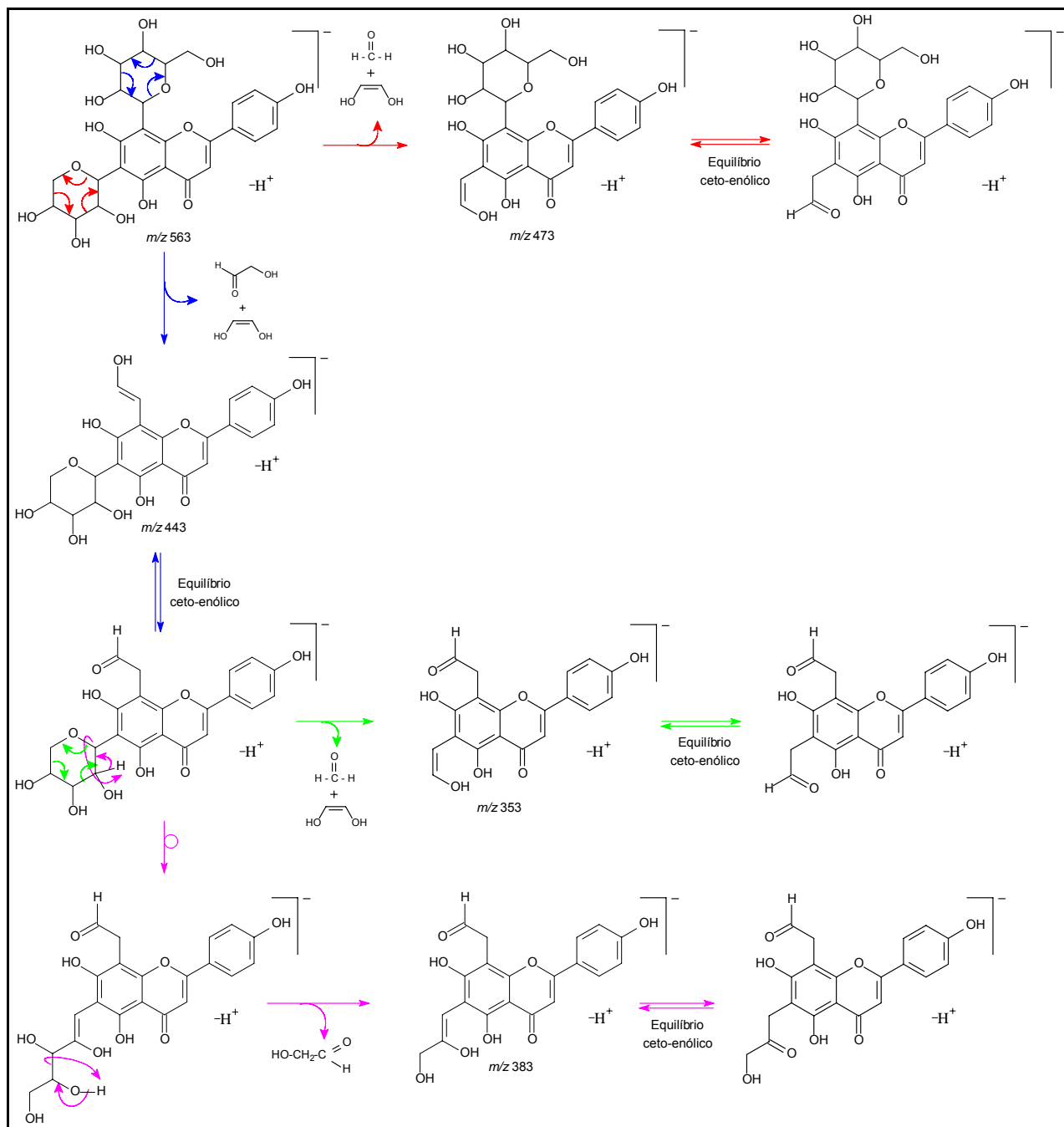
Schaftoside (**XIX**)



Neisoschaftoside (**XX**)



Isoschaftoside (**XXI**)



ESQUEMA 4.9: Fragmentação da neochaftoside (XVIII).

TABELA 4.22: Dados de RMN ^1H de neoschaftoside, schaftoside, neoisochaftoside e isochaftoside (**XVIII**, **XIX**, **XX** e **XXI**; DMSO, 400; Lit: XIE *et al.*, 2003; DMSO 400 MHz).

H	δ_{H} , J (Hz)			
	XVIII - XIX	Neoschaftoside XIE <i>et al.</i> , 2003; DMSO	XX - XXI	Isoschaftoside XIE <i>et al.</i> , 2003; DMSO
2				
3	6,78 (s)	6,77 (s)	6,76 (s)	6,66 (s)
4				
5-OH	13,66 (s)	13,58 (sl)		13,64 (s)
6				
7				
8				
9				
10				
1'				
2', 6'	8,06 (d; 8,8)	7,97 (d; 8,8)	7,93 (d; 8,0)	7,97 (d; 8,4)
3', 5'	6,84 (d; 8,8)	6,90 (d; 8,8)	6,90 (d; 8,0)	6,89 (d; 8,4)
4'				
6C-1''	4,77 (d; 10,4)	4,61 (d; 9,8)	5,08 sl	4,62 (d; 9,4)
2''	3,80 (m)	4,12 (m)	3,60 m	4,00 (m)
3''	3,28 (m)	3,20 (m)	3,28 sl	3,42 (m)
4''	3,45 (m)	3,11 (m)	2,90 (t; 9,6)	3,77 (m)
5a''/5b''	3,25 (m)	3,15 (m)	3,70 (m); 3,50 (m)	3,79 (m); 3,57 (m)
6a''/6b''	3,75 (m); 3,51 (m)	3,68 (m); 3,40 (m)	–	–
8C-1'''	5,48 (sl)	5,51 (sl)	4,60 m	4,81 (d; 9,9)
2'''	4,05 (m)	3,78 (m)	4,10 (m)	3,89 (m)
3'''	3,60 (m)	3,88 (m)	3,20 (m)	3,30 (m)
4'''	3,45 (m)	4,01 (t; 9,5)	3,40 (m)	3,36 (m)
5a'''/5b'''	3,54 (m); 3,40 (m)	3,74 (m); 3,64 (m)	3,12 (m)	3,27 (m)
6a'''/6b'''	–	–	3,68 (m); 3,40 (m)	3,74 (m); 3,52 (m)

TABELA 4.23: Dados de RMN ^{13}C de neoschaftoside, schaftoside, neoisochaftoside e isochaftoside (**XVIII**, **XIX**, **XX** e **XXI**; DMSO, 100 MHz; Lit: XIE *et al.*, 2003; DMSO, 125 MHz; ÖSTERDHAL, 1979; DMSO 100 MHz).

C	δ_{C} , J (Hz)					
	XVIII XIX	XIE <i>et al.</i> , 2003	ÖSTERDHAL, 1979)	XX XXI	XIE <i>et al.</i> , 2003	ÖSTERDHAL, 1979
		Neoschaftoside	Schafoside		Isoschafoside	
2	163,9		163,7	163,7		163,8
3	102,6	101,9	102,1	102,4	102,0	102,4
4	182,3		181,9	181,7		182,0
5	161,5		160,8	161,1		160,9
6	108,2		108,8	107,3		108,0
7	161,1		161,7	161,1		161,1
8	104,0		103,9	105,3		104,4
9	155,3		154,0	154,9		154,8
10	103,3		103,3	103,15		102,9
1'	121,7		121,1	121,5		121,4
2', 6'	128,9	128,0	128,6	128,9	128,7	128,5
3', 5'	116,1	115,5	115,7	115,9	115,7	115,7
4'	161,1		159,2	161,1		158,4
6C-1''	70,7	72,8	73,3	70,5	74,1	74,3
2''	71,1	69,7	70,5	69,6	69,0	74,0
3''	78,9	78,7	78,4	68,9	74,0	70,9
4''	70,2	70,5	70,0	61,8	68,5	69,6
5''	81,9	81,2	81,0	67,8	69,7	68,6
6a''/6b''	61,4	61,3	60,7	-	-	-
8C-1'''	71,1	71,0	74,8	73,4	73,8	73,3
2'''	70,7	72,1	74,3	70,8	71,0	70,7
3'''	70,5	69,6	70,8	81,2	78,8	78,9
4'''	61,8	62,8	68,9	70,9	70,4	70,5
5'''	69,0	66,7	68,5	81,5	81,5	82,0
6'''	-	-	-	61,2	61,0	61,4

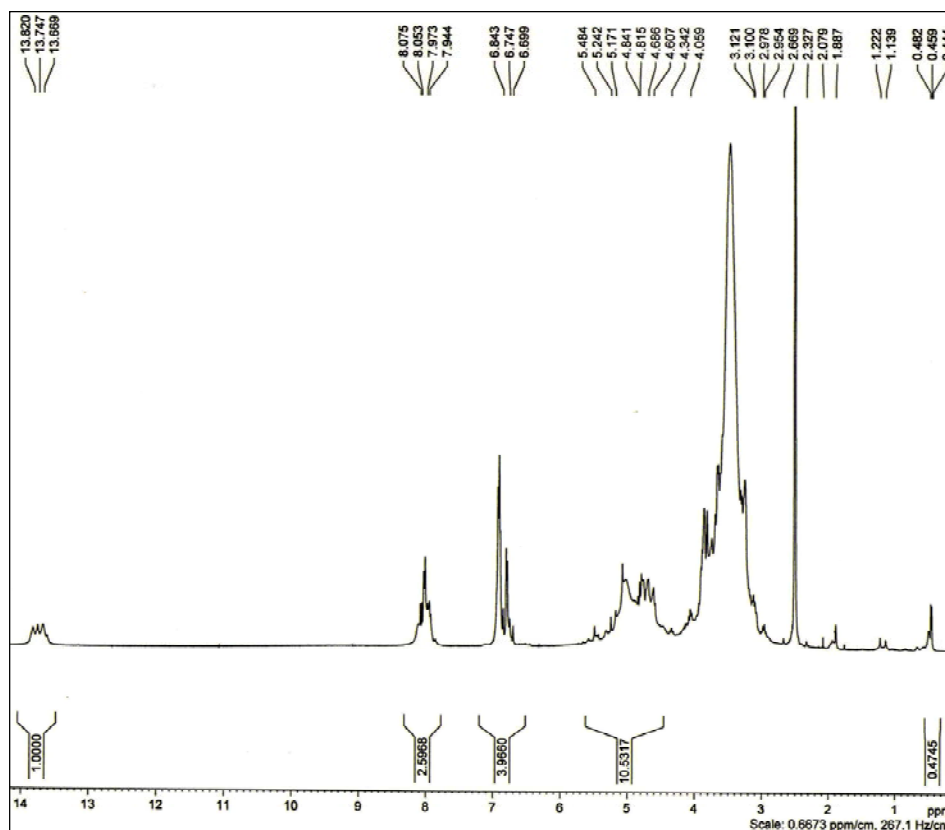


FIGURA 4.94: Espectro de RMN ^1H G3 (DMSO, 400 MHz).

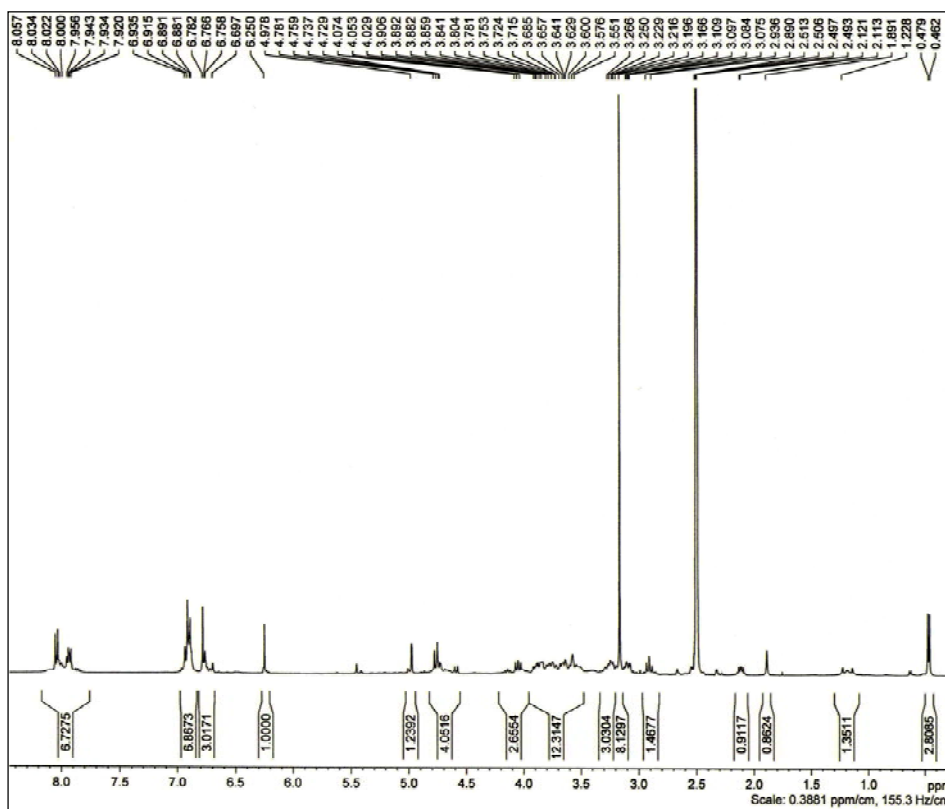


FIGURA 4.95: Espectro de RMN ^1H G4 (DMSO, 400 MHz).

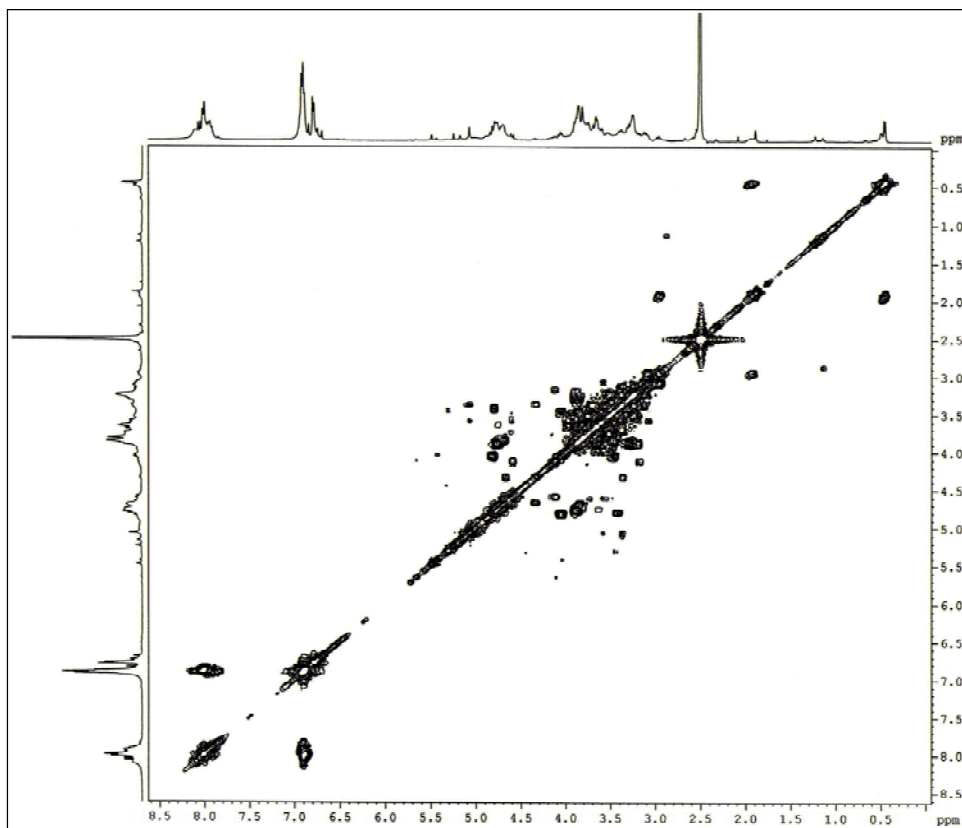


FIGURA 4.96: Espectro de COSY **G3** (DMSO, 400 MHz).

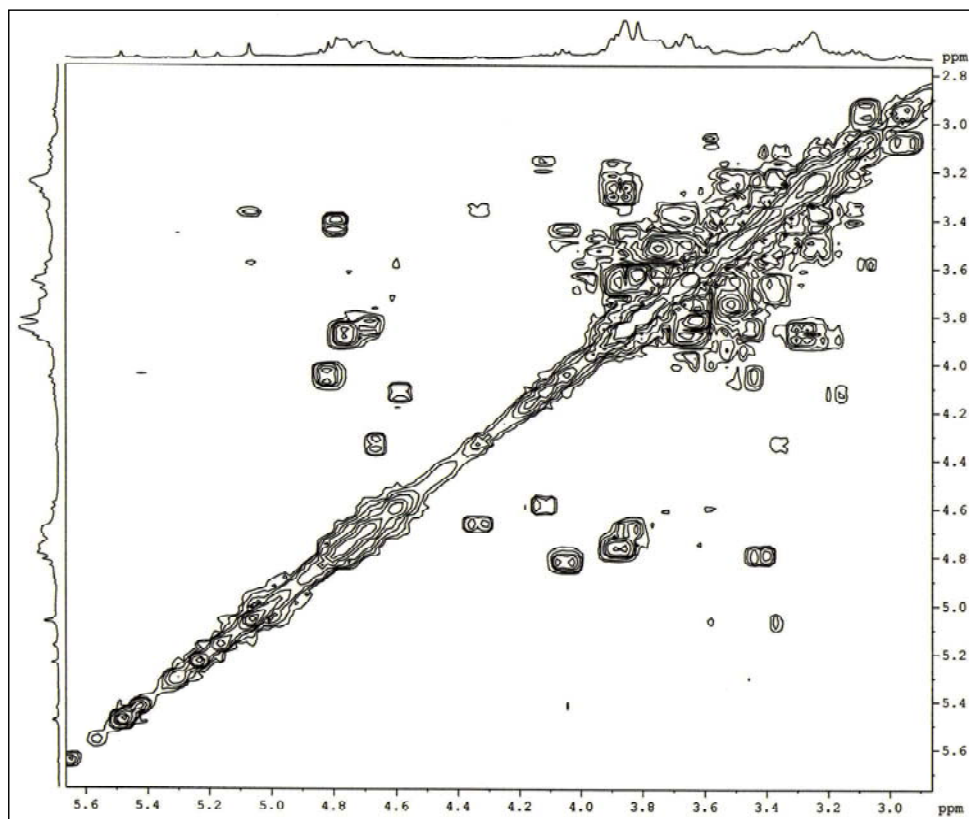


FIGURA 4.97: Ampliação do espectro de COSY **G3** (DMSO, 400 MHz).

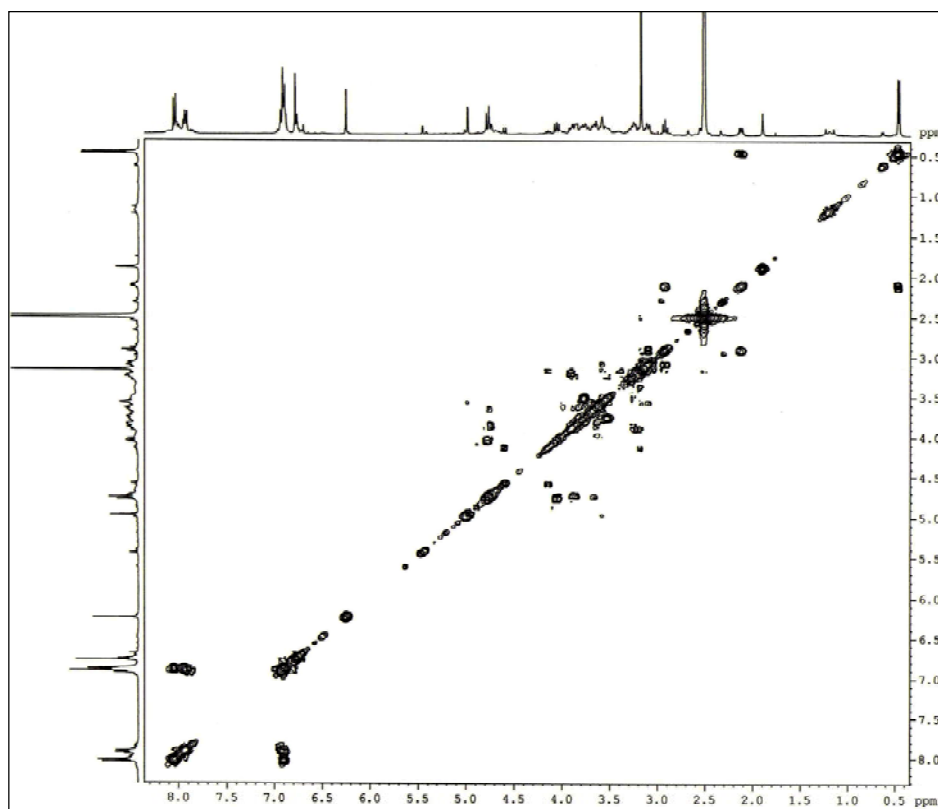


FIGURA 4.98: Espectro de COSY G4 (DMSO, 400 MHz).

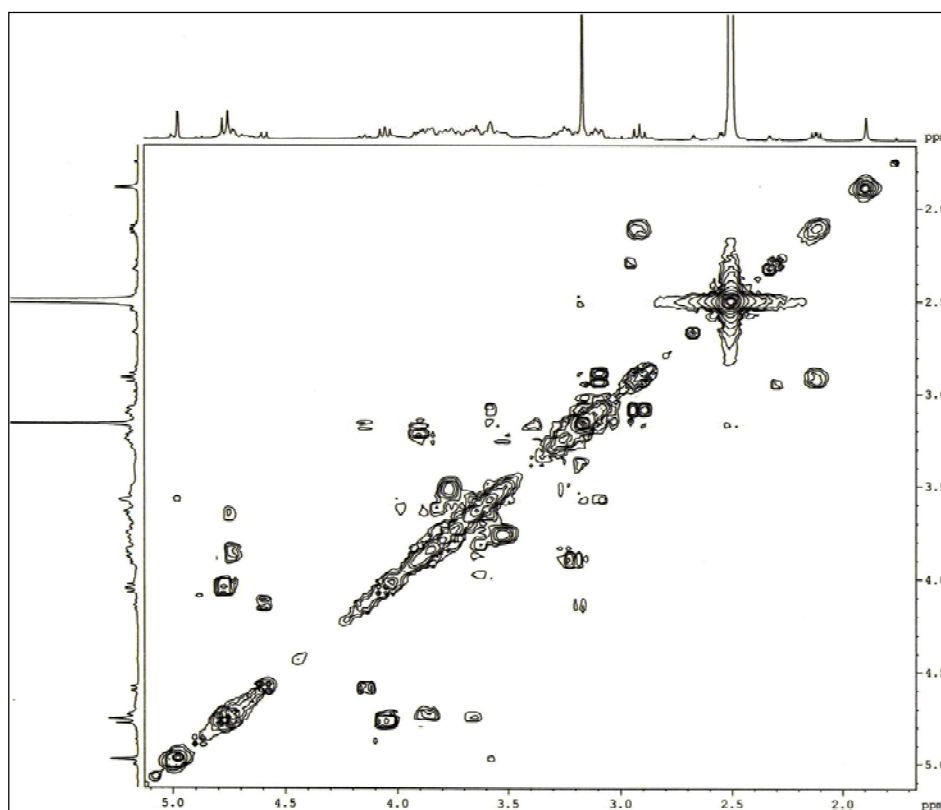


FIGURA 4.99: Ampliação do espectro de COSY G4 (DMSO, 400 MHz).

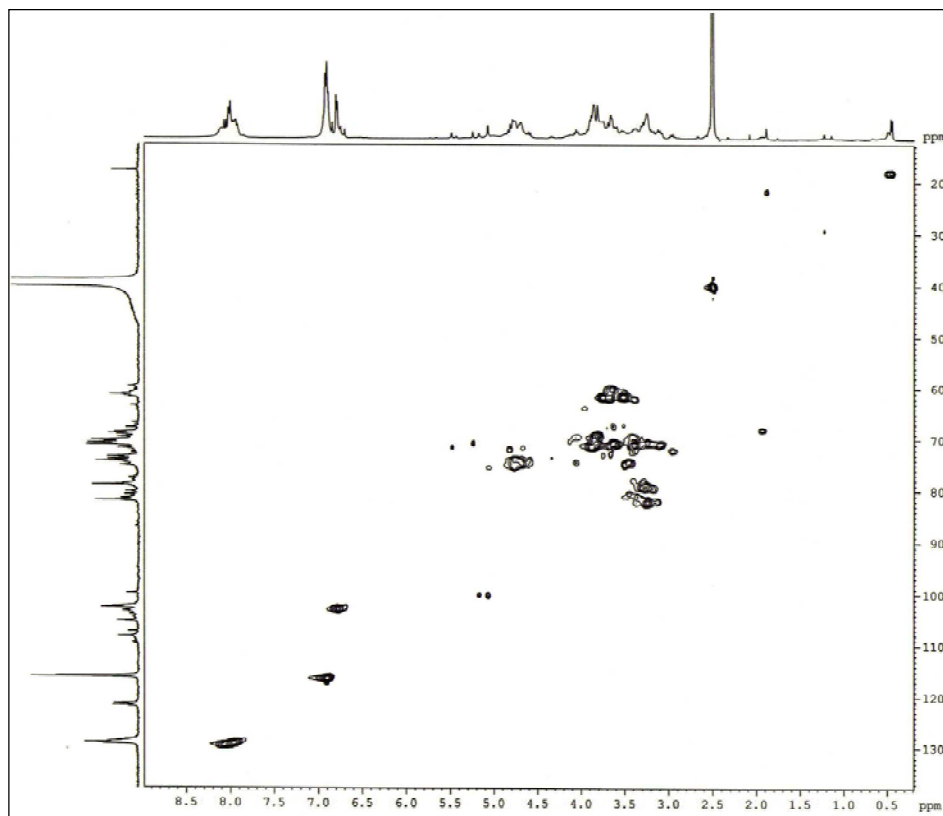


FIGURA 4.100: Mapa de correlações HSQC da **G3** (DMSO, 400 MHz).

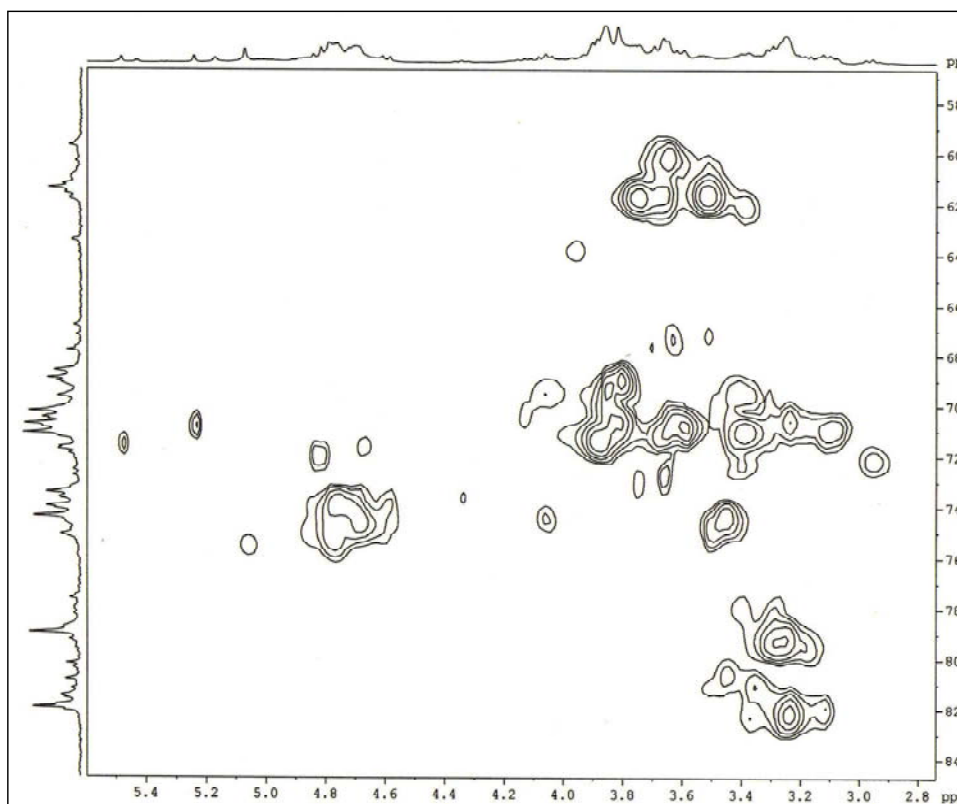


FIGURA 4.101: Ampliação do mapa de correlações HSQC da **G3** (DMSO, 400 MHz).

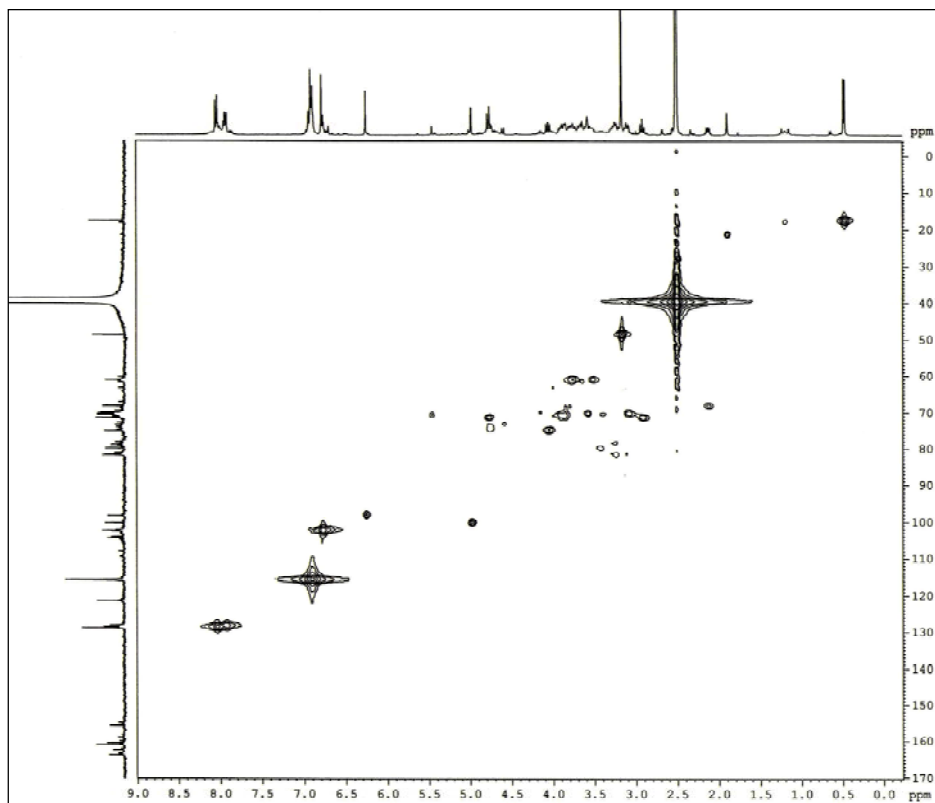


FIGURA 4.102: Mapa de correlações HSQC da **G4** (DMSO, 400 MHz).

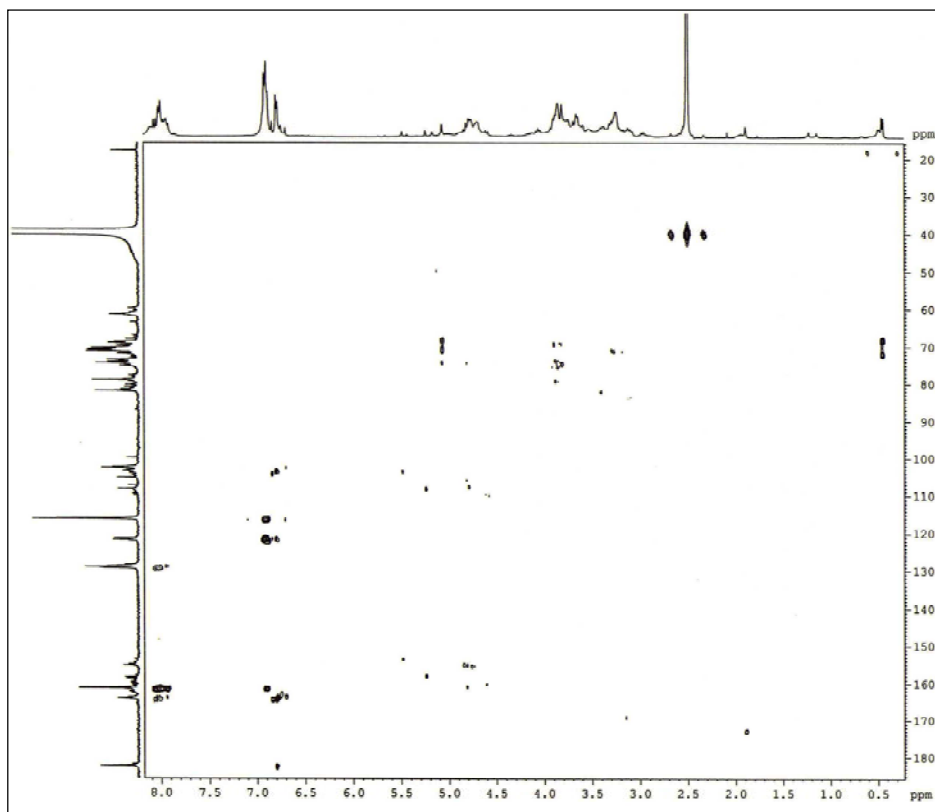


FIGURA 4.103: Mapa de correlações de HMBC da **G3** (DMSO, 400 MHz).

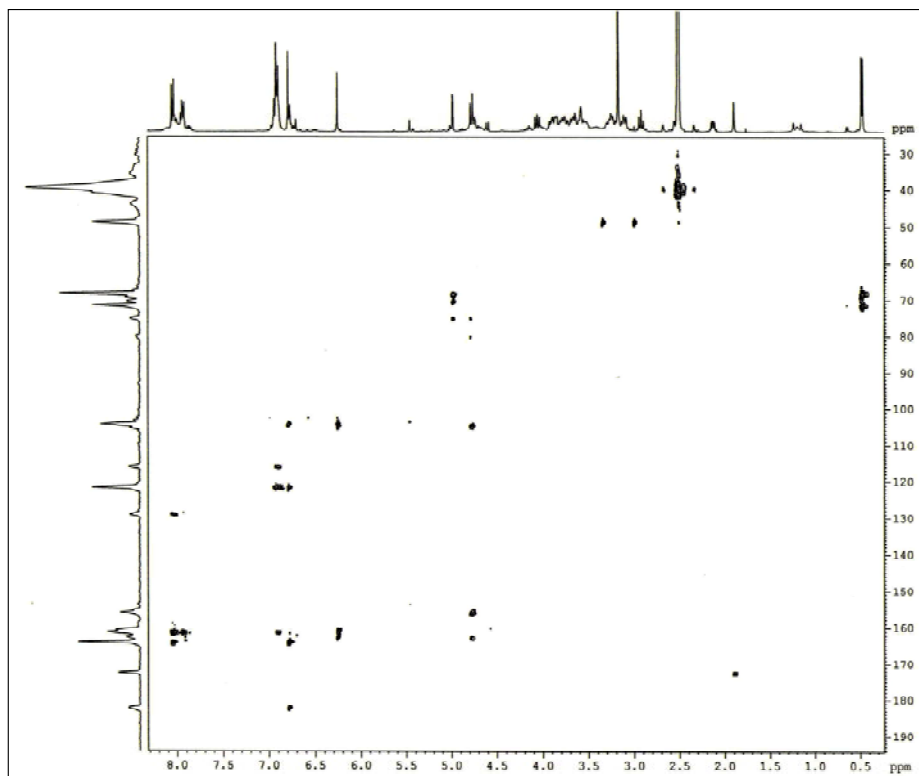


FIGURA 4.104: Mapa de correlações de HMBC da **G4** (DMSO, 400 MHz).

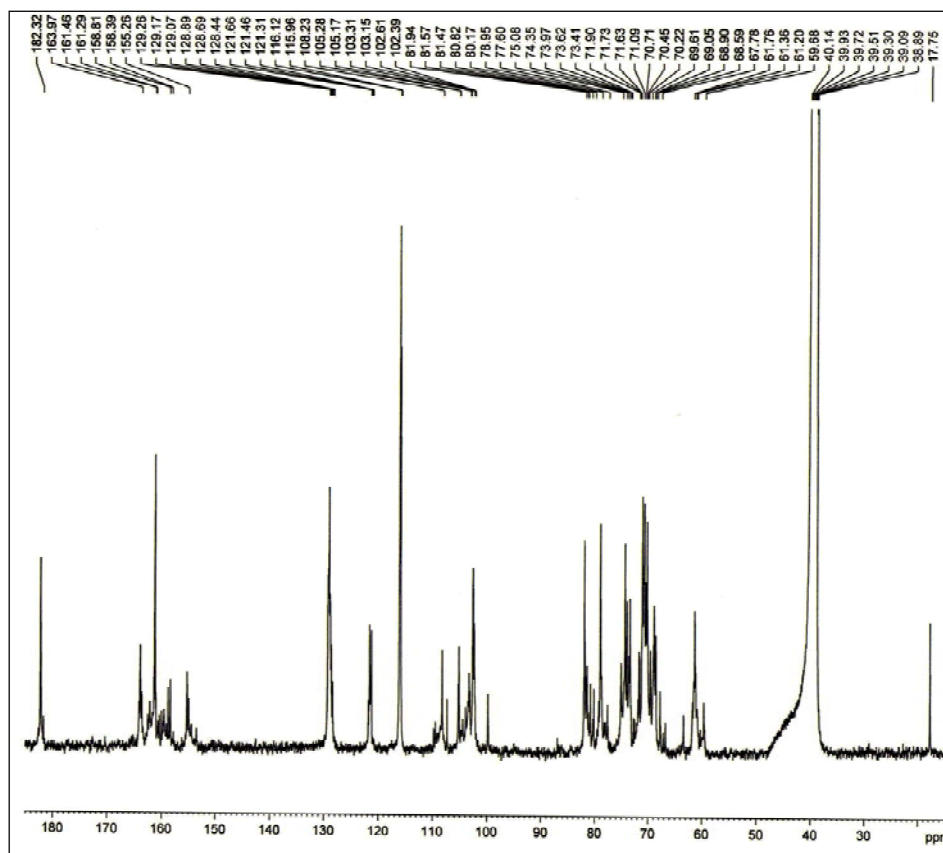


FIGURA 4.105: Espectro de RMN ^{13}C da **G3** (DMSO, 400 MHz).

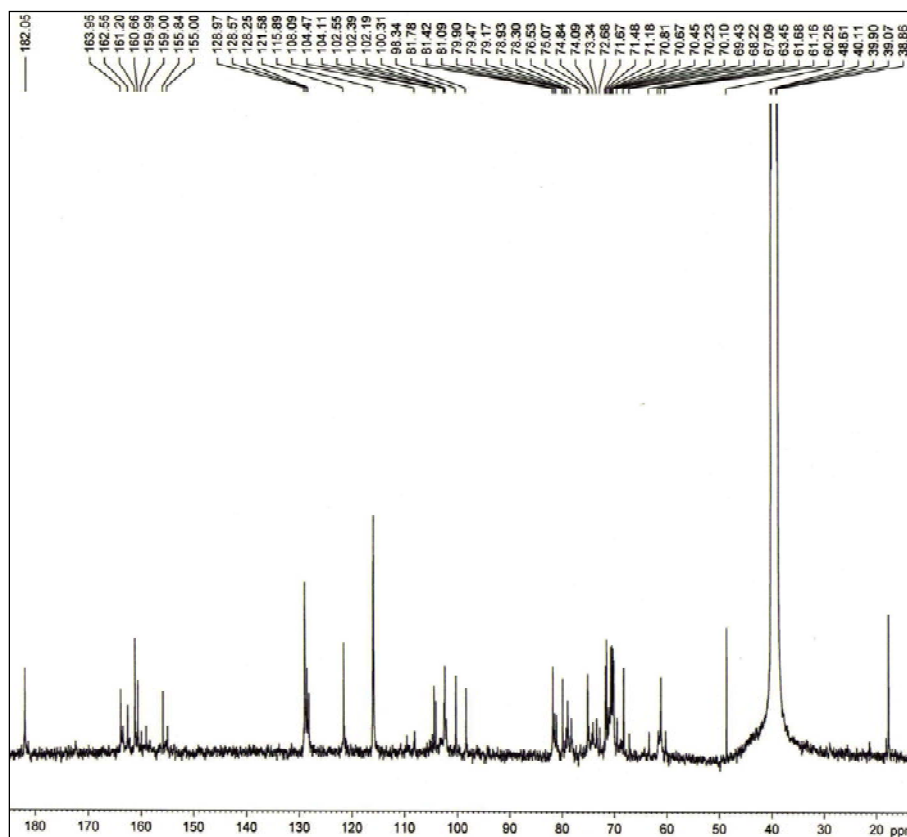


FIGURA 4.106: Espectro de RMN ¹³C da **G4** (DMSO, 400 MHz).

4.5.9.3 – Determinação estrutural dos constituintes da fração **G5** (substâncias **XII** e **XIX**)

Na fração **G5** os constituintes majoritários apresentaram-se como sólido amarelo, na forma de dois isômeros de posição como mostra a TABELAS 4.24 (p. 249) e 4.25 (p. 250). Estes foram isolados como descrito no item 3.6.6 (p. 73) e identificados através de RMN ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC e CL-EM e comparação com dados da literatura (DOYAMA *et al.*, 2005 , RAYYAN *et al.*, 2004).

Através da análise do espectro de massas (FIGURA 4.107, p. 245) verificou-se a presença de substâncias com massa molar (578 Daltons) igual a de um composto já identificado anteriormente (**XII**) no item 4.5.6 (p. 178). Analisando as fragmentações pode-se diferenciar os isômeros de posição nos quais a unidade de açúcar (neohesperidose) está na posição C-6 (**XXII**) ou na

posição C-8 (**XII**). Uma das diferenças que possibilitou diferenciá-los foi a intensidade do pico do íon pseudomolecular cuja intensidade é maior quando o substituinte encontra-se na posição C-6 da aglicona da flavona.

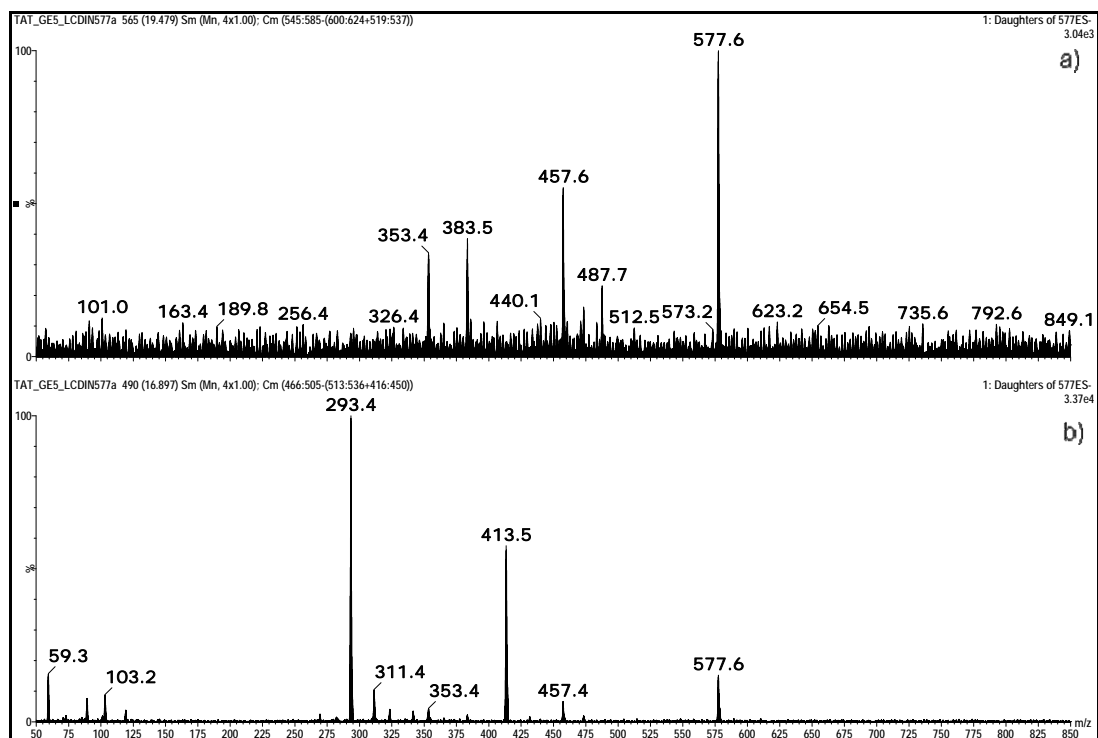


FIGURA 4.107: a) Espectros de massas no modo negativo $[M-H]^-$ como íon pseudomolecular das flavonas **XXI** ($t_R = 19,05$ min); e b) **XII** ($t_R = 16,43$ min).

Na análise do espectro de RMN 1H (FIGURA 4.109, p. 252) desta fração **G-5** observou-se que a proporção dos constituintes da mesma é de aproximadamente 8 : 2 enquanto que no cromatograma observou-se 9 : 1 sendo que o 2''-O-raminosilvitexina (**XII**) está em maior proporção (FIGURA 4.108, p. 246). A elucidação estrutural do composto majoritário foi descrita no item 4.5.6 (p. 178) e a diferença é que na fração **H** estão presentes isômeros conformacionais da flavona 2''-O-raminosil-vitexina e na fração **G-5** são isômeros de posição, ou seja, 2''-O-raminosilvitexina (**XII**) e 2''-O-raminosilisovitexina (**XXII**).

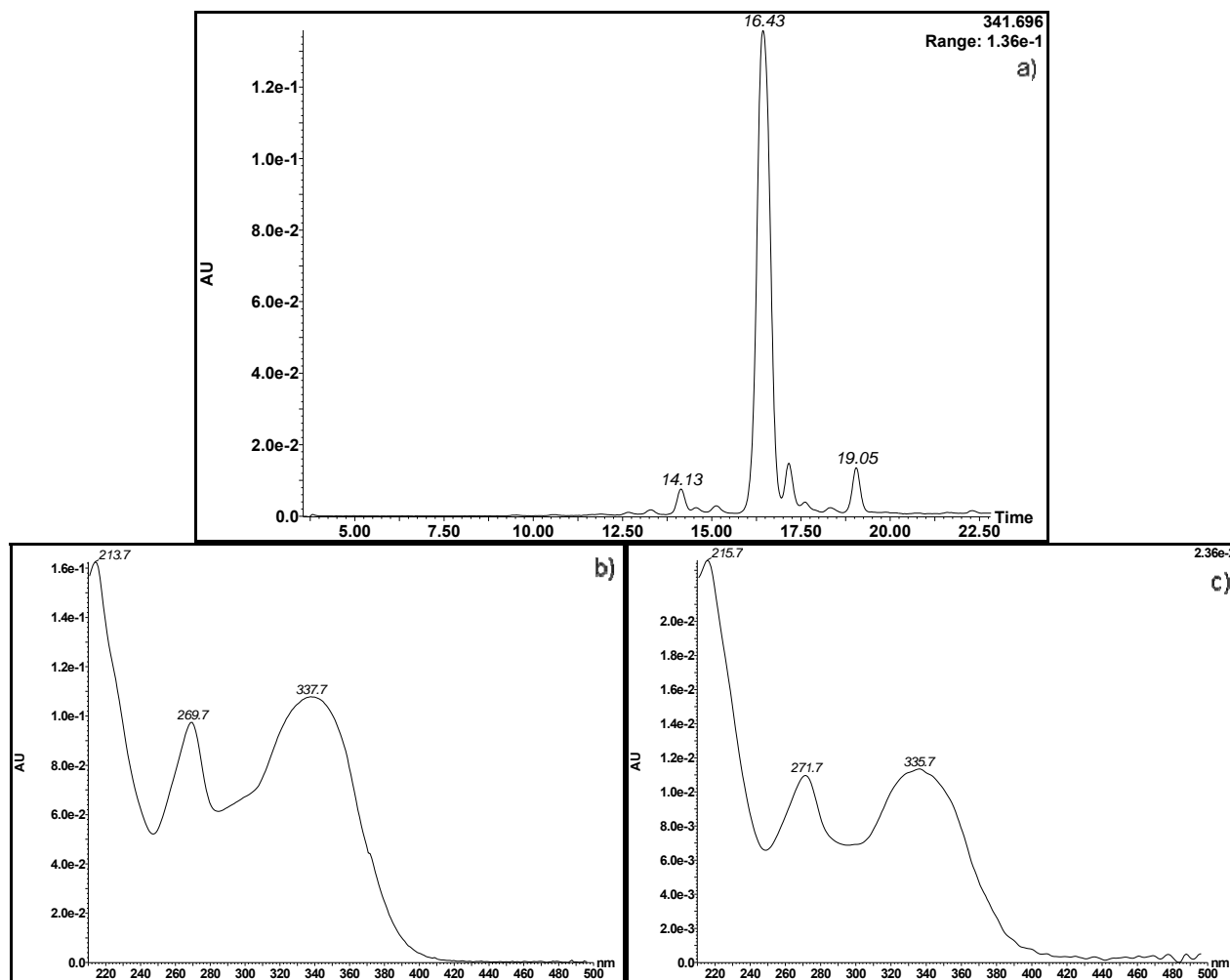
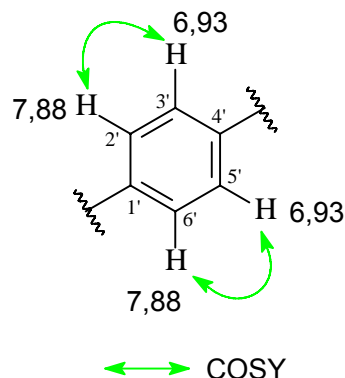
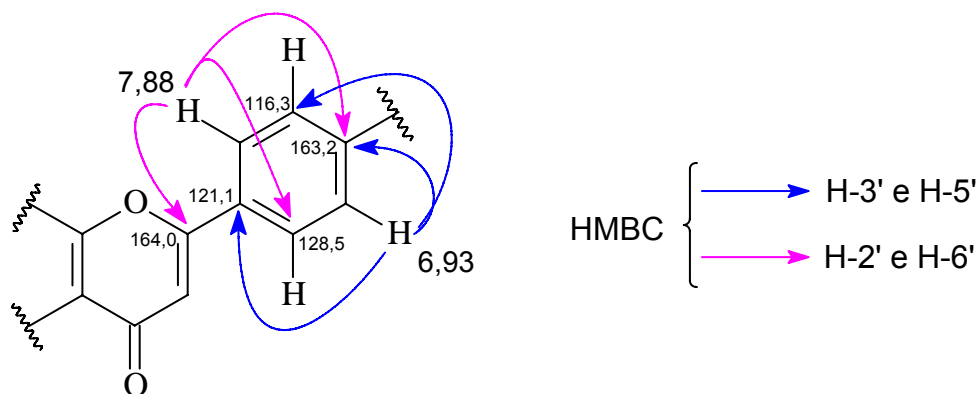


FIGURA 4.108: a) Cromatograma da subfração **G5** b) espectro de UV da flavona **XII** ($t_R = 16,43$ min); c) espectro de UV da flavona **XXII** ($t_R = 19,05$ min).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.109-4.110, p. 252) apresentou para o isômero **XXII** dubletos em δ_{H} 7,88 (d, $J = 9,2$, 2H) e em δ_{H} 6,93 (d, $J = 9,2$, 2H) cuja constante indica acoplamento *orto* entre esses hidrogênios H-2' e H-6, H-3' e H-5' respectivamente, devido à livre rotação do anel B. A correlação entre esses hidrogênios foi confirmada pelo espectro de COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$, FIGURA 4.112, p. 253)

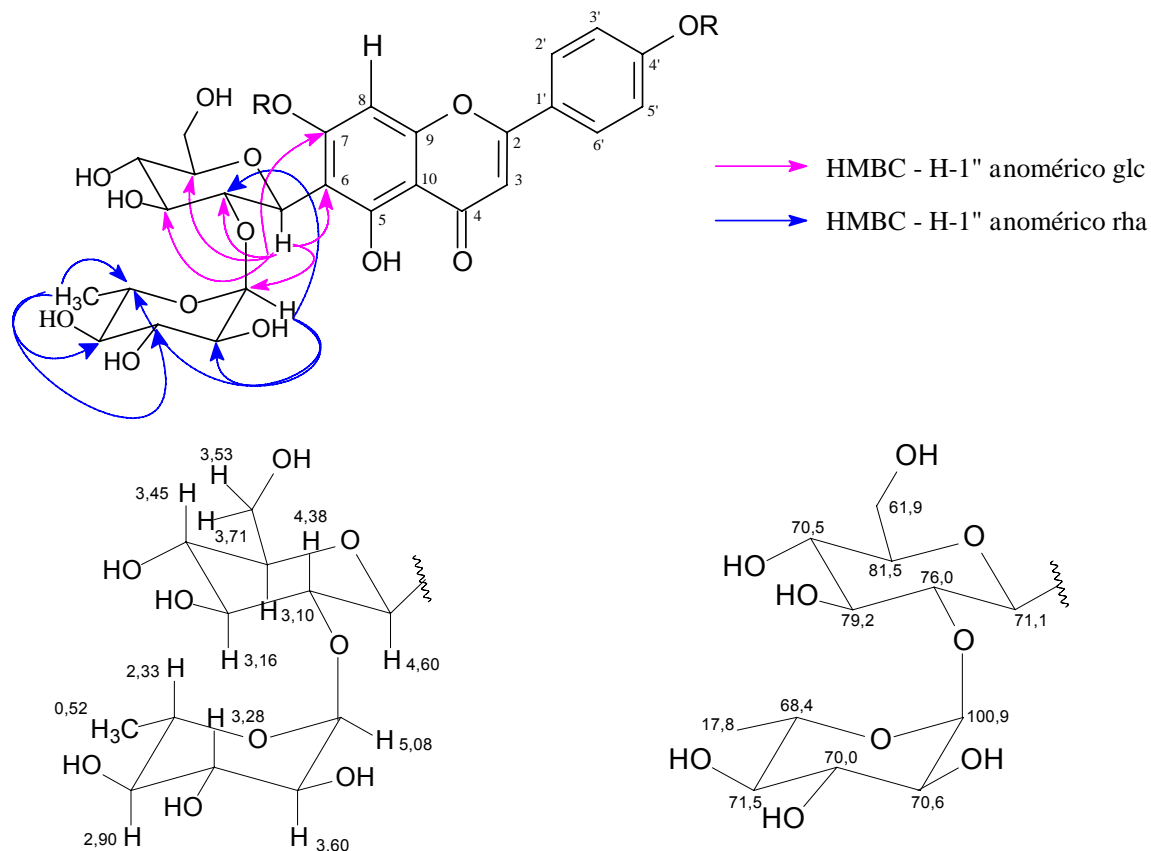


Através da análise do mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.114, p. 254) verificou-se a correlação do sinal em δ_H 6,93 com o carbono em δ_C 116,3 (C-3' e C-5') e do duplete em δ_H 7,88 com o carbono em δ_C 128,5 (C-2' e C-6'). O mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.115, p. 255) mostra a correlação do hidrogênio em δ_H 7,88 (H-2') com os carbonos em δ_C 128,5 (C-2' e C-6'); δ_C 164,0 (C-2) e δ_C 163,2 (C-4'), e o hidrogênio em δ_H 6,88 (H-3') com os carbonos em δ_C 116,3 (C-3' e C-5'); δ_C 163,2 (C-4') e δ_C 121,1 (C-1').



No espectro de RMN 1H (FIGURAS 4.109-4.110, p. 252) observou-se a presença de três singletos com sinais em δ_H 6,76 (1H) característico do hidrogênio H-3 de flavona, em δ_H 6,50 (1H) atribuído a H-8 o que sugere a presença de um anel A com substituinte na posição C-6 e em δ_H 13,54 (1H) relativo ao hidrogênio da hidroxila quelada na posição C-5 do esqueleto flavonoídico. Através do mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.114, p. 254) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_H 6,76 com o carbono em δ_C 102,8 e δ_H 6,50 com δ_C 93,2 e através do mapa de correlações HMBC

correlaciona com os carbonos δ_C 76,0 (C-2''); δ_C 70,6 (C-2'''); δ_C 68,4 (C-5''') e o sinal referente a metila da raminose (δ_H 0,52) se correlaciona com os carbonos δ_C 70,0 (C-3'''); δ_C 71,5 (C-4''') e δ_C 68,4 (C-5'''). Diante dos dados obtidos pode-se propor que a glicose está ligada na posição C-6 da aglicona e a raminose está ligada na glicose pela posição C-2''.



Através dos experimentos de RMN 1D e 2D (FIGURAS 4.109-4.116, p. 252 a 255, TABELAS 4.24, p. 250 e 4.25, p. 251), pode-se atribuir todos os hidrogênios e carbonos das substâncias **XII** e da substância **XXII** que, com a análise do conjunto de dados de CL-EM e comparação com a literatura (DOYAMA *et al.*, 2005, RAYYAN *et al.*, 2004) indicaram ser as flavonas 2''-O-rhamnosilvitexina [apigenina 8-C-(2''-O- α -raminopiranosil- β -glucopiranoside), **XII**] e 2''-O-rhamnosilisovitexina [apigenina 6-C-(2''-O- α -raminopiranosil- β -glucopiranoside), **XXII**].

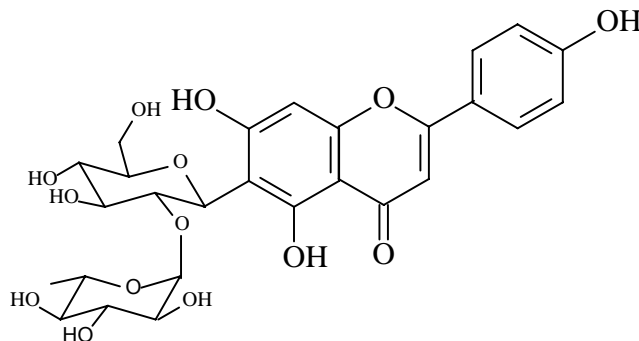
2''-O-rhamnosilovitexina (**XXII**)

TABELA 4.24: Dados de RMN ^1H de 2''-O-raminosil-vitexina (**XII**) e 2''-O-raminosil-ovitexina (**XXII**) (DMSO 400; Lit: DOYAMA *et al.*, 2005, DMSO 200 MHz; RAYYAN *et al.*, 2004, DMSO 600 MHz).

H	δ_{H}, J (Hz)			
	XII	DOYAMA <i>et al.</i> , 2005; DMSO	XXII	RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; DMSO
3	6,78 (s)	6,78 (s)	6,76 (s)	6,76 (s)
5-OH	13,13 (s)	13,13 (s)	13,54 (s)	
6	6,25 (s)	6,25 (s)		
8			6,50 (s)	6,50 (s)
2', 6'	8,04 (d; 8,4)	8,04 (d; 9,0)	7,88 (d; 9,2)	7,91 (d; 8,7)
3', 5'	6,92 (d; 8,4)	6,89 (d; 9,0)	6,93 (d; 9,2)	6,91 (d; 8,7)
Glu-1''	4,77 (d; 11,2)	4,76 (d; 10,0)	4,60 (d; 11,2)	4,61 (d; 9,8)
2''	4,05 (dd; 8,0; 8,8)		4,38 (dd; 8,0; 8,8)	4,37 (t; 9,5)
3''	3,16 (m)		3,16 (m)	3,32 (m)
4''	3,45 (m)		3,45 (m)	3,12 (m)
5''	3,10 (m)		3,10 (m)	3,16 (m)
6a''/b''	3,78 (m); 3,49 (m)		3,71 (m); 3,53 (m)	3,69 (m); 3,35 (m)
Rha-1'''	5,00 (sl)	4,97 (sl)	5,08 (sl)	5,08 (sl)
2'''	3,61 (m)		3,60 (m)	3,59 (m)
3'''	3,10 (m)		3,28 (m)	3,12 (m)
4'''	2,89 (t; 9,6)		2,90 (t; 9,6)	2,91 (m)
5'''	2,11 (m)		2,33 (m)	2,31 (m)
6'''	0,47 (d; 6,4)	0,46 (d; 6,0)	0,52 (d; 6,4)	0,51 (d; 6,1)

TABELA 4.25: Dados de RMN de ^{13}C de 2"-O-raminosil-vitexina (**XII**) e 2"-O-raminosil-isovitexina (**XXII**) (DMSO 100 MHz; Lit: DOYAMA *et al.*, 2005, DMSO 50 MHz; RAYYAN *et al.*, 2004, DMSO 300 MHz).

C	$\delta_{\text{C}}, J (\text{Hz})$			
	XII	DOYAMA <i>et al.</i> , 2005; DMSO	XXII	RAYYAN <i>et al.</i> , 2004; DMSO
2	164,1	163,9	164,0	163,2
3	102,5	102,3	102,8	102,8
4	182,1	181,9	182,0	181,4
5	161,5	160,5	162,6	161,3
6	98,6	98,2	109,2	109,0
7	161,5	162,1	163,5	162,6
8	104,1	104,3	93,2	92,7
9	156,0	155,7	156,5	156,2
10	104,6	104,1	104,3	103,8
1'	121,7	121,5	121,1	121,1
2', 6'	129,1	128,9	128,5	128,4
3', 5'	116,1	115,8	116,3	116,0
4'	160,8	161,0	163,2	161,1
Glu-1"	71,7	71,4	71,1	71,3
2"	75,3	75,0	76,0	74,6
3"	80,1	79,8	79,2	80,0
4"	70,4	70,3	70,5	70,9
5"	81,9	81,7	81,5	81,4
6a"/b"	61,4	61,1	61,9	61,8
Rha-1'''	100,5	100,2	100,9	100,4
2'''	70,7	70,3	70,6	70,6
3'''	70,9	71,4	70,0	70,9
4'''	71,9	70,3	71,5	71,6
5'''	68,4	68,1	68,4	68,3
6'''	17,9	17,6	17,8	17,7

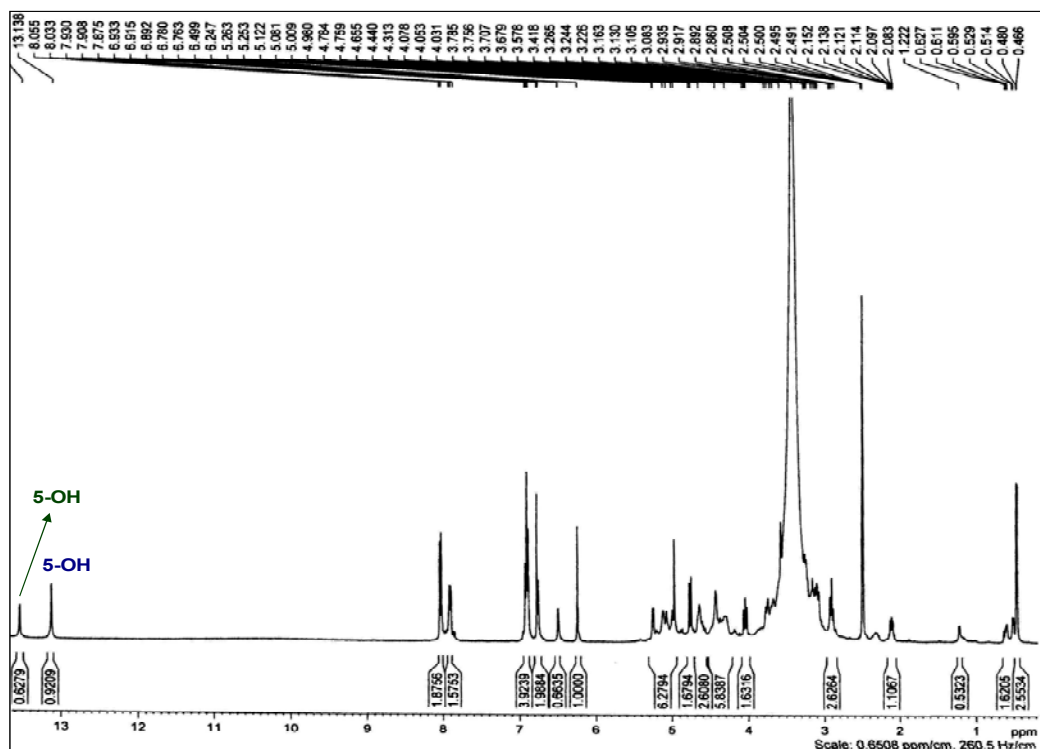


FIGURA 4.109: Espectro de RMN ^1H 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

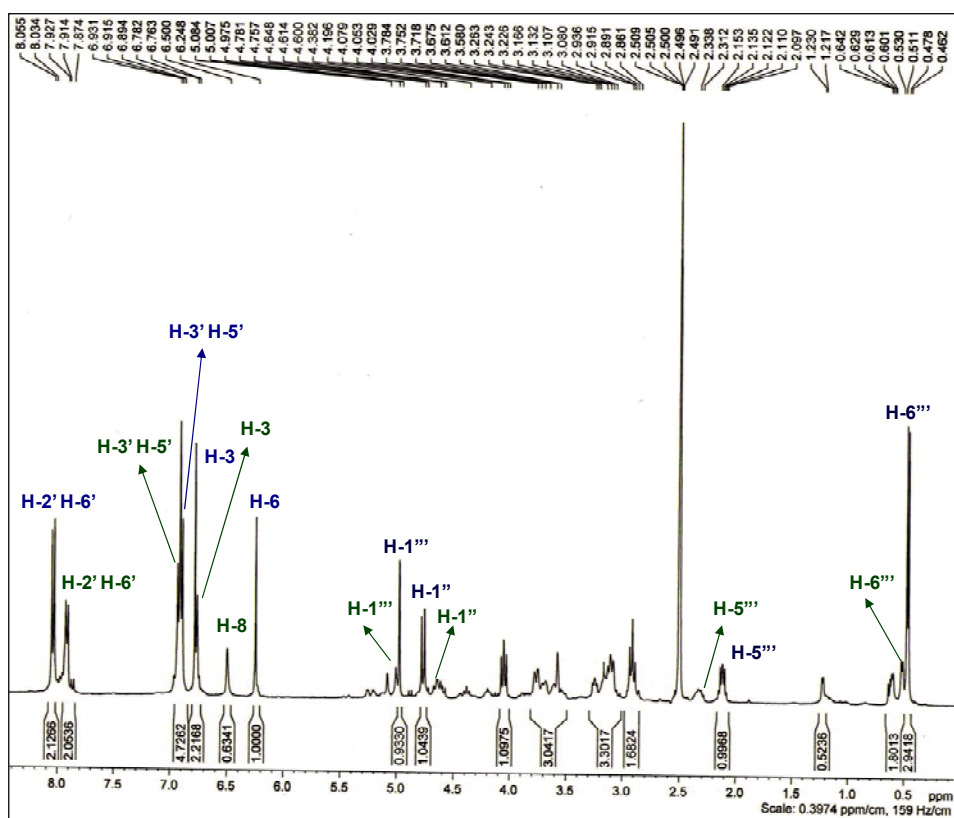


FIGURA 4.110: Expansão do espectro de RMN ^1H de 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilisovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

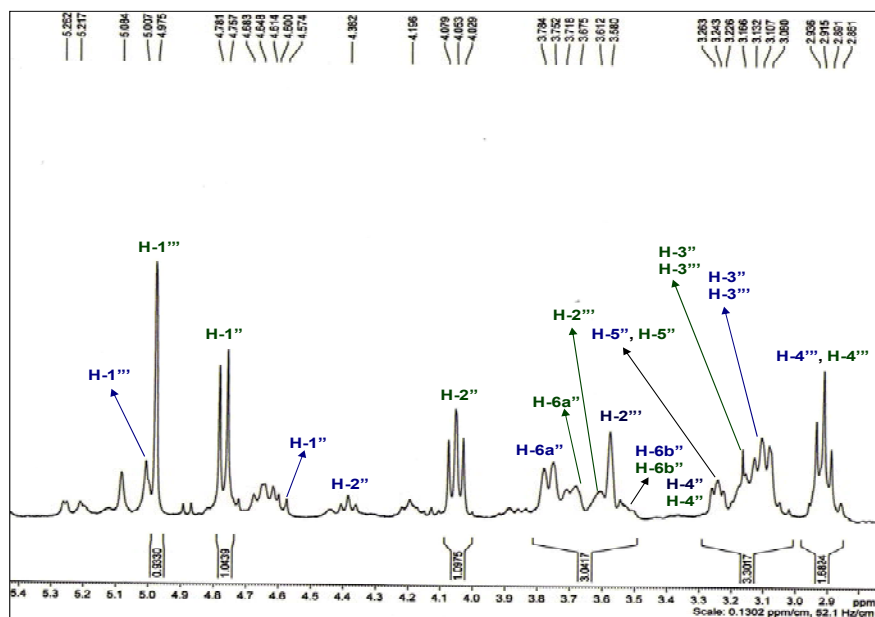


FIGURA 4.111: Expansão da região do açúcar do espectro de RMN ^1H 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

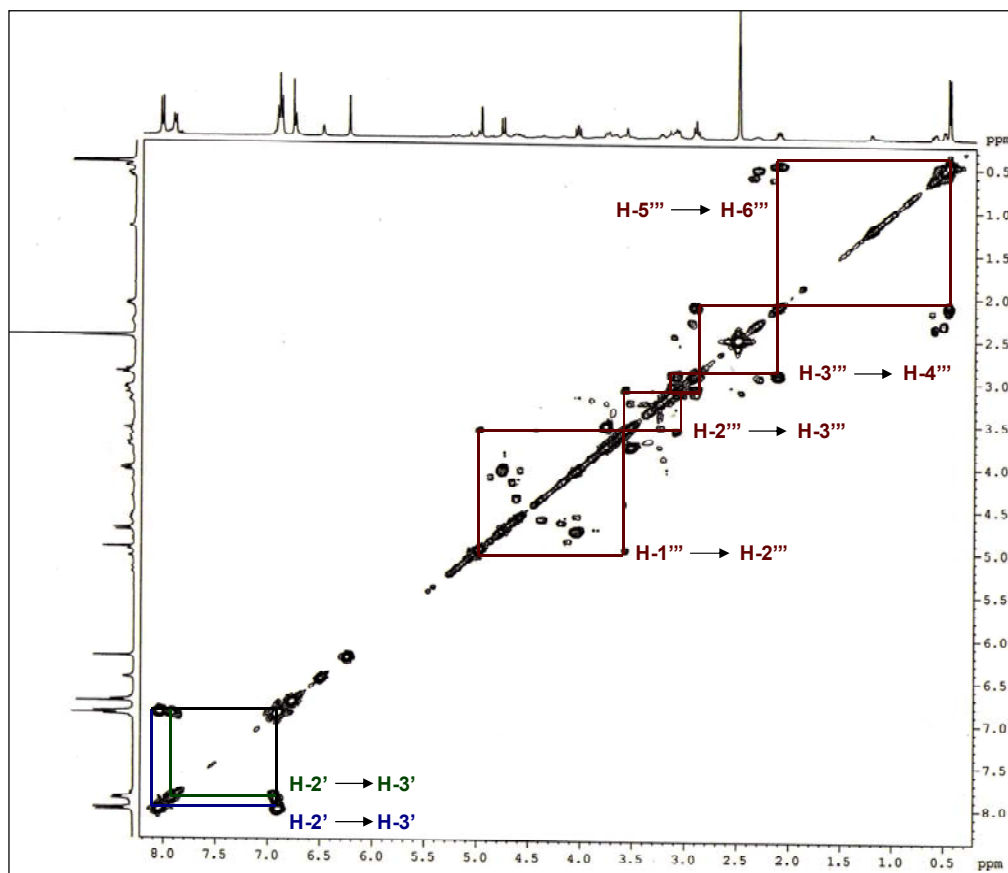


FIGURA 4.112: Espectro de COSY 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

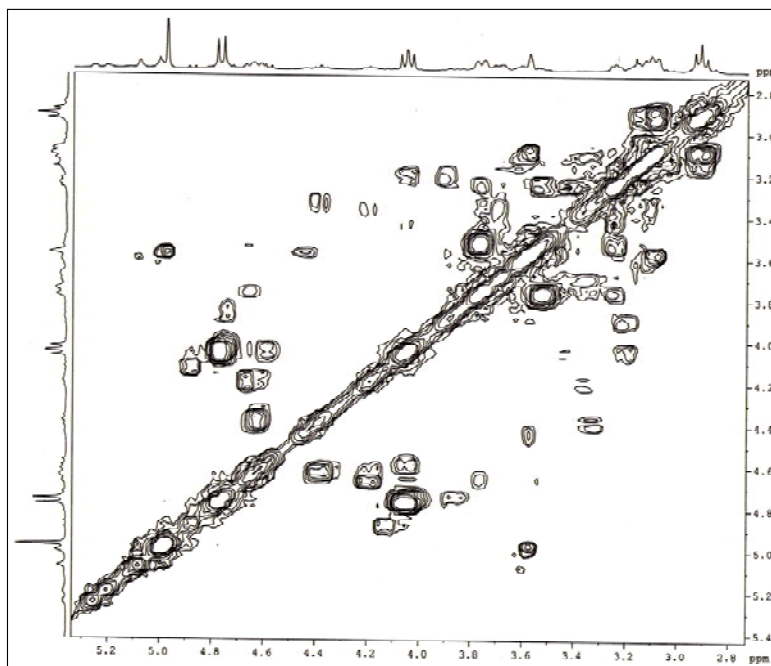


FIGURA 4.113: Expansão da região do açúcar do espectro de COSY (DMSO, 400 MHz)

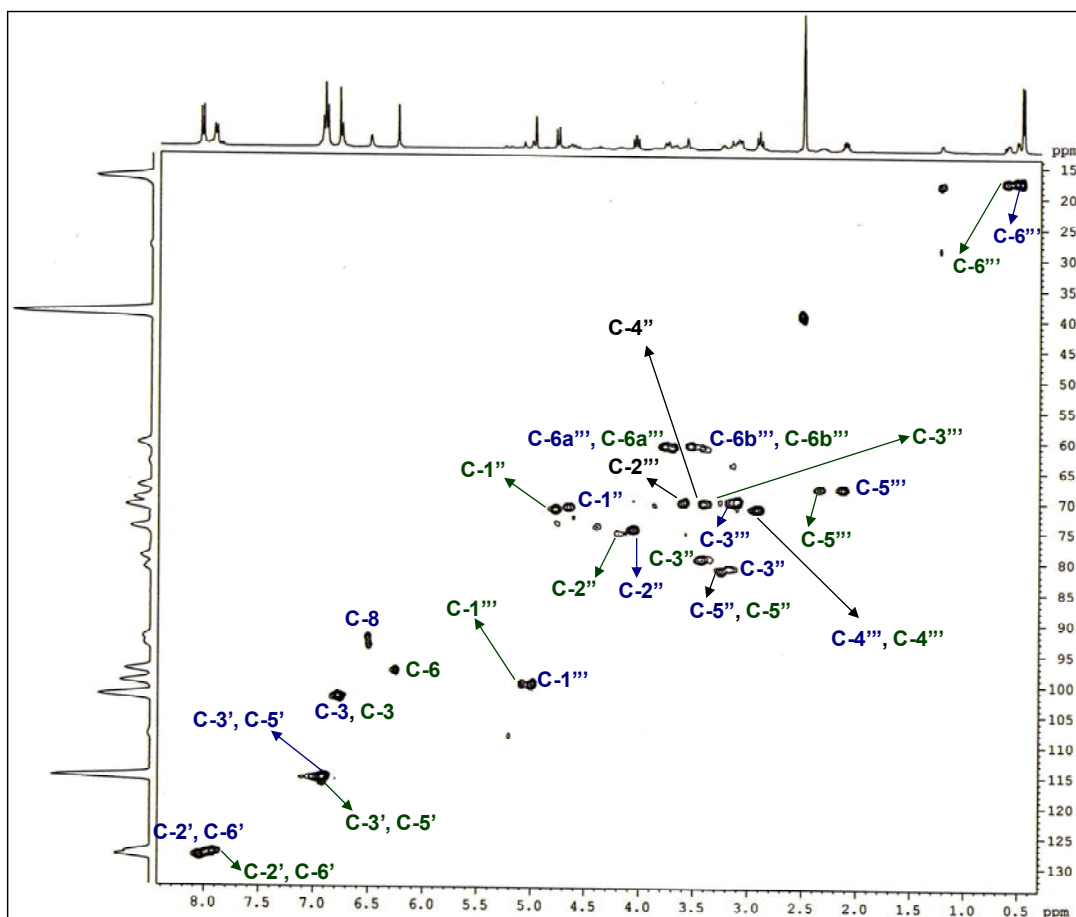


FIGURA 4.114: Mapa de correlações HSQC 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

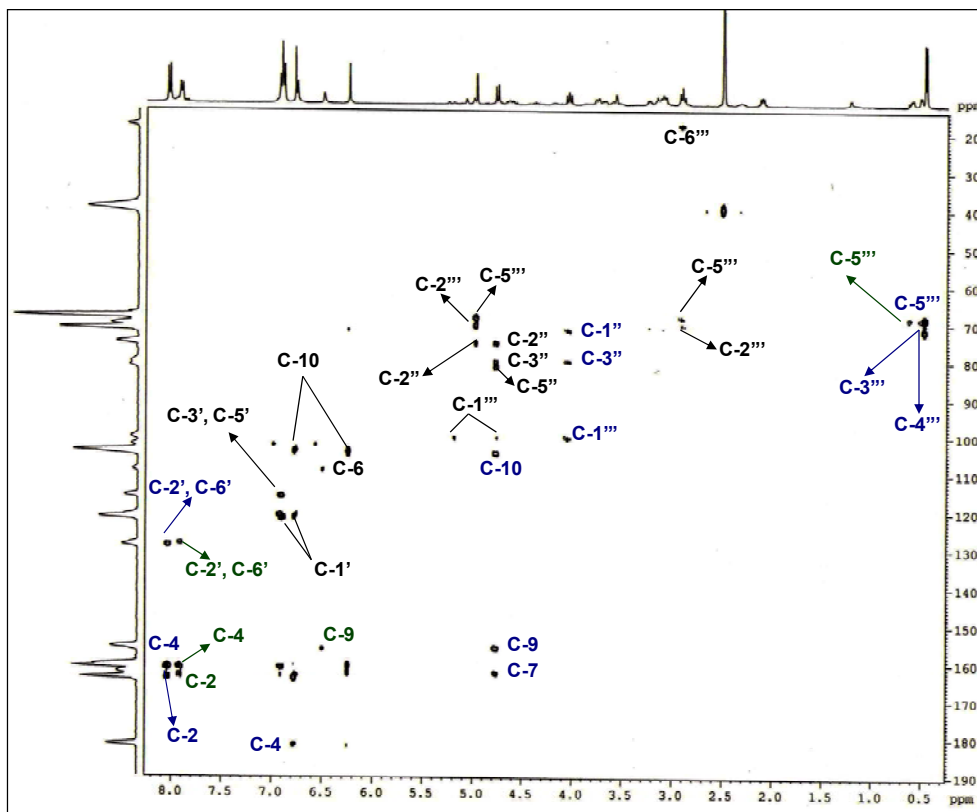


FIGURA 4.115: Mapa de correlações HMBC 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilovitexina (XXI) (DMSO, 400 MHz).

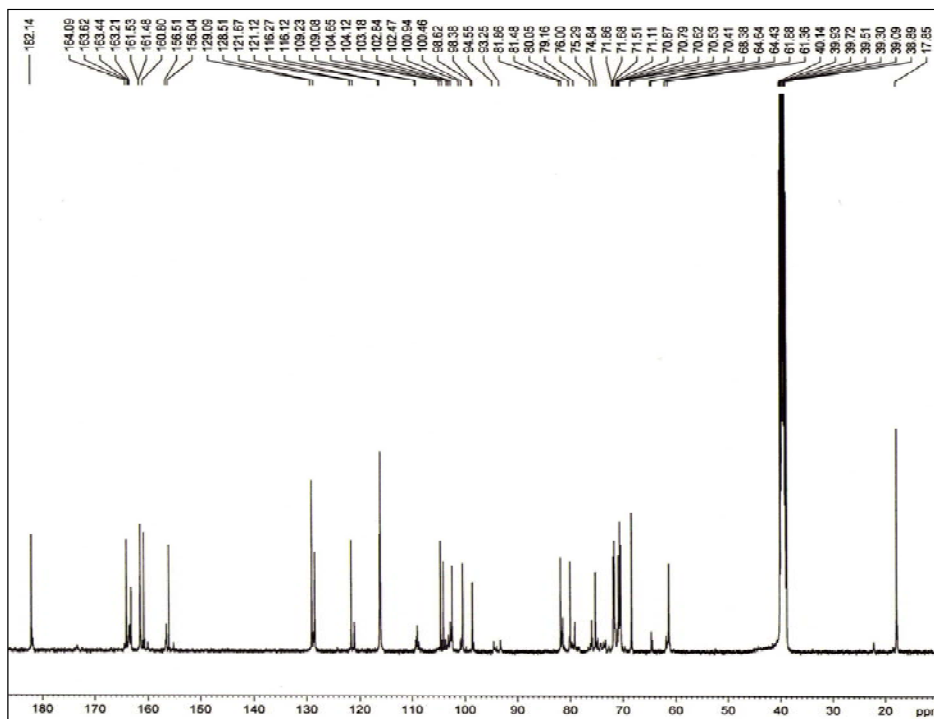


FIGURA 4.116: Espectro de ^{13}C 2''-O-raminosilvitexina (XII) e 2''-O-raminosilovitexina (XXII) (DMSO, 400 MHz).

4.5.10 – Biossíntese dos flavonóides

Os flavonóides são formados por uma série de reações de condensação entre o ácido cinâmico (átomos de carbono 2 e 3 do anel B e 4 do anel C) e resíduos malonil (anel A), a qual forma a estrutura de substâncias fenólicas do tipo C₆-C₃-C₆, sendo heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico. Os três carbonos que fazem a ponte entre o anel fenil são comumente ciclizados para formar um terceiro anel (anel C) como mostra a FIGURA 4.117 (p. 256) (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

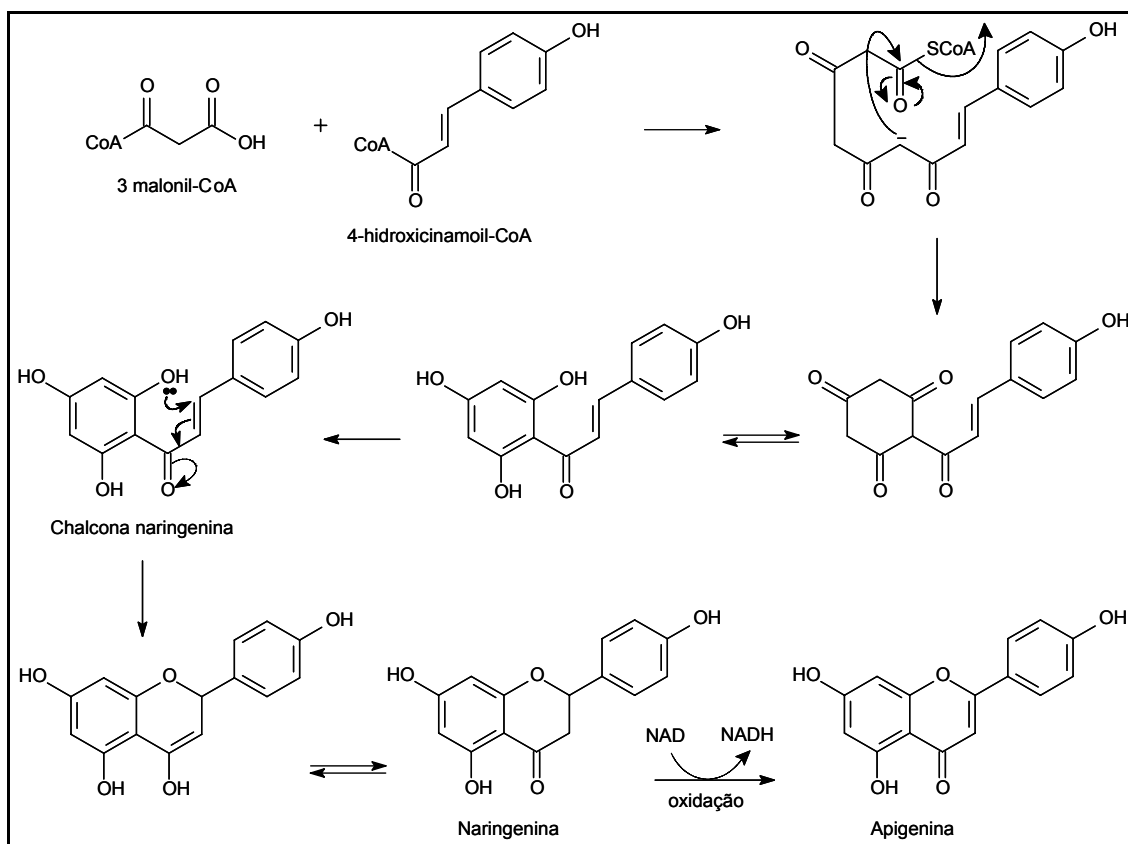


FIGURA 4.117: Biossíntese de flavonóides (adaptado de DEWICK, 2001).

Os flavonóides têm origem biossintética mista, ou seja, parte do seu esqueleto deriva do caminho do acetato e a outra parte deriva do caminho chiquimato, mais precisamente do ácido *p*-cumárico (DEWICK, 2001).

De acordo com a ciclização e o grau de insaturação e oxidação, os flavonóides podem ser classificados em vários grupos conforme discutido no item 4.5.1 (134). Em plantas, os flavonóides podem ocorrer de várias formas

modificadas com adições correspondentes à hidroxilação, metilação e glicosilação. Ocasionalmente, ácidos alifáticos e aromáticos, sulfato, prenila, metilenodioxila ou grupo isoprenila também podem atacar o núcleo flavonoídico e seus glicosídeos (DEWICK, 2001).

A princípio qualquer grupo hidroxila pode ser glicosilado, mas algumas posições são favorecidas: em flavonas, flavanonas e isoflavanonas a posição C-7; o grupo hidroxila da posição C-3 e C-5 em flavonols e flavanols e para antocianidinas as hidroxilas C-3 e C-5 são sítios de glicosilação (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

Os 5-O-glicosídeos são raros para compostos com um grupo carbonila na posição C-4, uma vez que o hidrogênio da hidroxila faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila adjacente. Como discutido no item 4.5.9 os dissacarídeos mais encontrados são rutinose e neohesperidose e ocasionalmente tri e tetrassacarídeos (MA *et al.*, 2001). Podem ser encontrados também glicosídeos acilados em que um ou mais grupos hidroxila do glicosídeo são esterificados com um ácido. A acilação é geralmente um evento tardio na biossíntese de flavonóides. Esta modificação é particularmente importante, pois diminui a solubilidade dos vários metabólitos em água, e pode servir como proteção para os glicosídeos contra a degradação pelas glucosidases, ou ainda para estabilizar as estruturas das antocianinas (DEWICK, 2001).

A glicosilação também pode ocorrer de forma direta no núcleo do flavonóide, por uma ligação C-C a qual é resistente à hidrólise ácida. Até o presente momento foram encontrados apenas C-glicosilação nas posições C-6 e/ou C-8 do esqueleto flavonoídico (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

4.6 – Efeito de *Rauia* sp nos ensaios de ação inseticida por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

4.6.1 – Efeito dos extratos brutos de folhas

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico de folhas de *Rauia* sp foram ensaiados sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no item 3.7.1.2 (p. 78).

Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise estatística dos resultados obtidos após um período de 25 dias de experimento, foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento com aquelas dos controles com dieta pura.

Os resultados obtidos estão apresentados no GRÁFICO 4.1 (curvas de sobrevivências, p. 259) e na TABELA 4.26 (p. 259). Nestes experimentos houve um acréscimo gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento com taxas de mortalidade significativas indicando alta atividade sobre as formigas cortadeiras.

Para os tratamentos com os extratos diclorometânico e metanólico observou-se mortalidade de 100% (TABELA 4.26, p. 259; GRAFICO 4.1, p. 259) das formigas no 25° e 10° dia respectivamente sendo que houve mortalidade acumulada (Md) de 50% no 4° dia de tratamento.

Ao tratar a dieta artificial com o extrato hexânico obteve-se mortalidade de 86% das formigas ao final do experimento. O controle com dieta pura teve 50% de saúvas mortas no 19° dia de tratamento, com mortalidade total acumulada de 62% no 25° dia.

Não há relatos na literatura de ensaio biológico sobre *Atta sexdens rubropilosa* com o gênero *Rauia*, reforçando assim a importância deste estudo.

TABELA 4.26: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	0	6	12	18	22	30	46	50	64	19a
Hexano	0	6	18	40	48	58	70	74	84	86	9b
Diclorometano	2	18	36	72	80	86	96	98	98	100	4b
Metanol	2	18	44	94	98	100	100	100	100	100	4b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

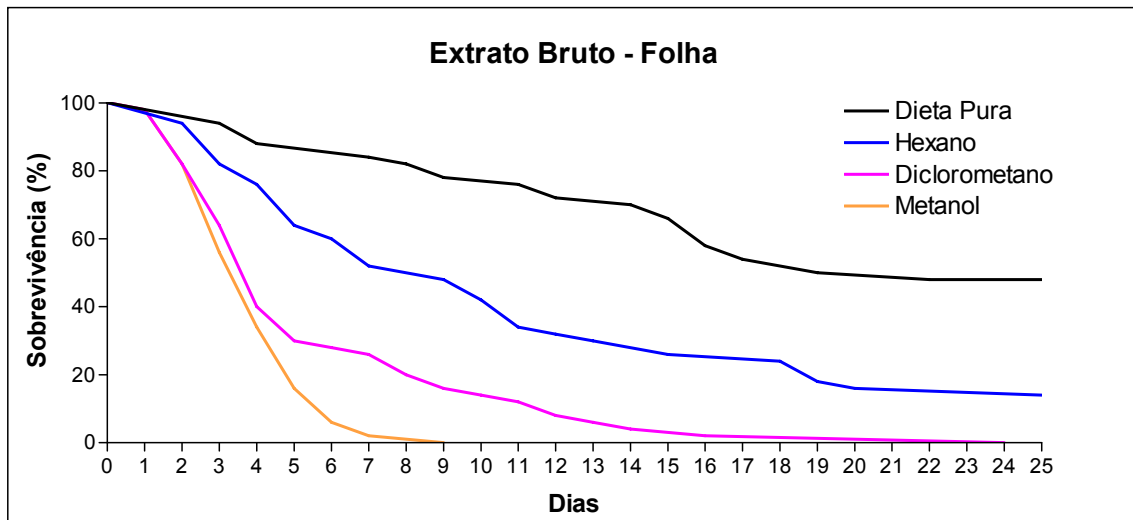


GRÁFICO 4.1: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas de *Rauia* sp.

4.6.2 – Efeito dos extratos brutos do caule

Os resultados obtidos no bioensaio por ingestão dos extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico do caule de *Rauia* sp incorporados na dieta artificial das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* estão apresentados

no GRÁFICO 4.2 (curvas de sobrevivência, 261) e na TABELA 4.27 (p. 261) que indicam as porcentagens acumuladas de sobrevivência mediana (Md) e interpretação do teste “log-rank”, segundo metodologia descrita no item 3.7.1.2 (p. 78).

No tratamento por ingestão dos extratos brutos de caule, houve um acréscimo gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia, durante o decorrer do experimento no qual se verificou mortalidade de 100% das formigas no 25° e 10° dia nos bioensaios com extratos hexânico e diclorometânico, respectivamente. O controle (dieta pura) apresentou taxa de mortalidade de 50% de saúvas no 19° dia e mortalidade total acumulada de 64% no 25° dia de tratamento.

No tratamento da dieta artificial com o extrato hexânico obteve-se mortalidade média de 50% de formigas no 5° dia do tratamento, sendo interpretado como significativamente diferente do controle com dieta pura pelo teste “log-rank”. Atingiu-se esta taxa de 50% mortalidade no 2° dia de bioensaio para tratamento da dieta artificial incorporada com o extrato diclorometânico.

Ao incorporar-se o extrato metanólico à dieta artificial, verificou-se mortalidade média atingida no 6° dia de experimento, considerado também significativamente diferente do controle com dieta pura.

Desta forma pode-se concluir que os extratos do caule possuem alta ação sobre a sobrevivência média dos indivíduos e uma alta atividade inseticida sobre as operárias de formigas cortadeiras.

Vale, novamente, ressaltar que não há relatos na literatura sobre atividade deste gênero (*Rauia*) sobre *A. sexdens rubropilosa*.

A fim de comparação entre os extratos de caules e folhas, o GRÁFICO 4.3 (p. 262) mostra que o mais ativo dos extratos testados foi o de diclorometano do caule, com Md de 2 dias (TABELA 4.27, p. 261).

FERNANDES *et al.* (2002) avaliaram a atividade inseticida de óleos extraídos de sementes de *Citrus sinensis*, *C. limon* e *C. reticulata* (Rutaceae) no desenvolvimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote de

formigas cortadeiras e também quanto à atividade inseticida por aplicação tópica. Dentre os óleos testados o mais promissor para possível aplicação como inseticida para formigas cortadeiras foi o da tangerina (*C. reticulata*). Em outro estudo (RIBEIRO *et al.*, 1998) verificou-se que os extratos obtidos com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol das folhas de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) inibiram 100% o crescimento do fungo *L. gongylophorus* na concentração de 2,5 mg mL⁻¹.

TABELA 4.27: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos brutos do caule de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	0	6	12	18	22	30	46	50	64	19a
Hexano	0	6	28	68	76	90	98	98	98	100	5b
Diclorometano	0	56	90	98	98	100	100	100	100	100	2b
Metanol	0	8	22	56	66	76	92	94	96	96	6b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” (p < 0,05).

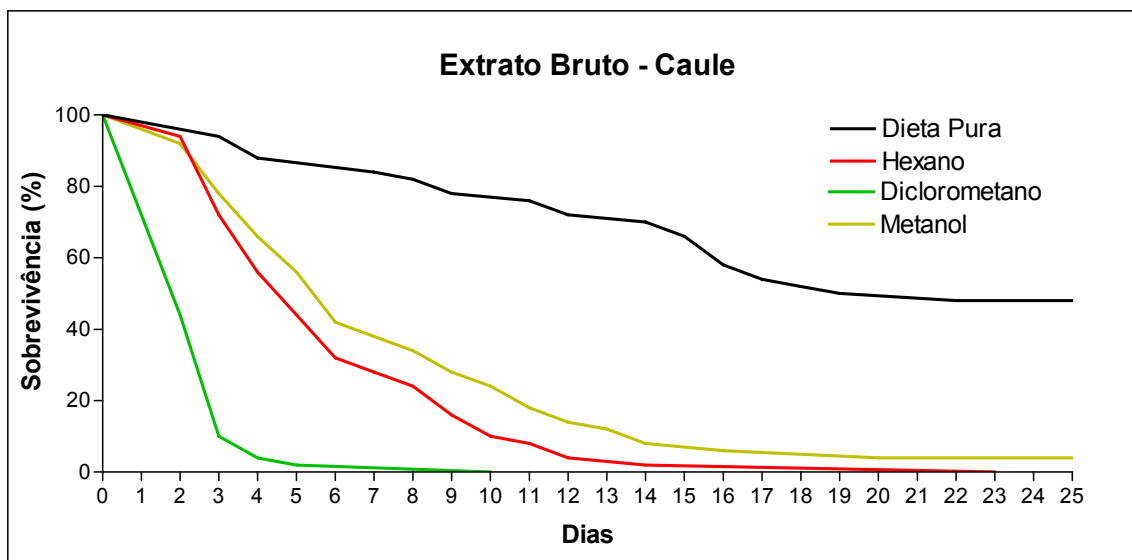


GRÁFICO 4.2: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos do caule de *Rauia* sp.

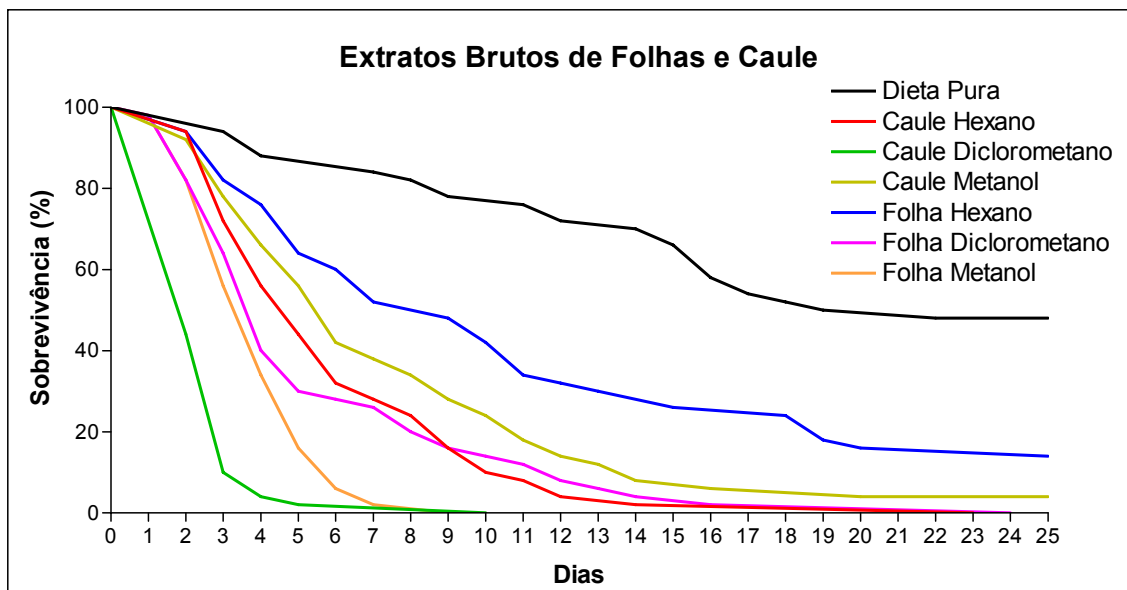


GRÁFICO 4.3: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

4.6.3 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico de folhas

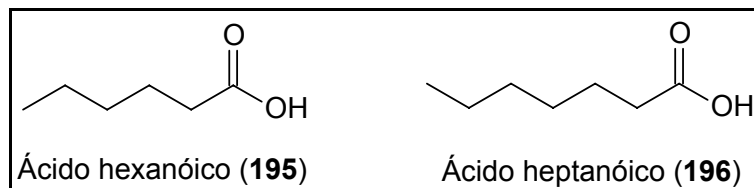
As frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp (RFD) foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no item 3.7.1.2 (p. 78).

Analisando os dados obtidos nos ensaios (GRÁFICO 4.4, p. 264; TABELA 4.28, p. 264) observou-se que as frações de RFDb (2) a RFDh (8) causaram taxa de mortalidade de 84 a 94% no 25º dia de experimento. Desta forma, pode-se concluir que se os metabólitos forem diferentes, estes apresentam mesma taxa de mortalidade.

Das frações testadas as que possuem a maior atividade sobre a sobrevivência média das formigas cortadeiras são RFDa (1) e RFDg (7) com mortalidade média atingida no 4º dia de experimento sendo que esta última fração apresentou 94% de mortalidade no 25º dia enquanto que o controle apresentou taxa de 62%.

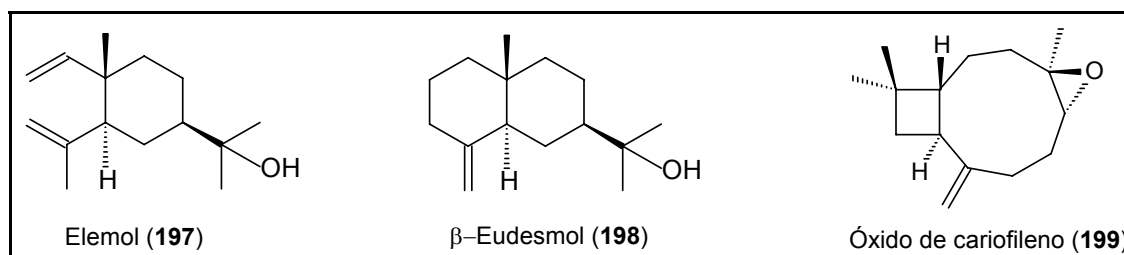
Nas frações d (4), e (5), f (6) identificou-se a presença de ácidos graxos como descrito no item 3.5.2 (p. 63) a 3.5.4 (p. 65). Há relatos na literatura

sobre a atividade tóxica dos ácidos graxos em insetos. PEÑAFLORES *et al.* (2004) realizaram ensaios de toxicidade por aplicação tópica com ácidos graxos comerciais com cadeias metilênicas entre 5 e 9 carbonos na dose de 0,1 mg/inseto em *A. sexdens rubropilosa*. Os ácidos graxos que apresentaram atividade tóxica para formiga cortadeira foram os ácidos hexanóico (**195**, p. 263) e heptanóico (**196**, p. 263), que diminuíram a longevidade mediana de 21 dias (controle) para 10 e 9 dias, respectivamente.



Sendo assim, pode-se atribuir a atividade inseticida destas frações à presença destes metabólitos secundários nas mesmas, comparadas ao controle (dieta pura).

Na fração f (6) também identificou-se o sesquiterpeno clovane-2 β ,9 α -diol. MARSARO *et al.* (2004) observaram que os sesquiterpenos elemol (**197**, p. 263) e β -eudesmol (**198**, p. 263) foram responsáveis pela resistência das folhas de *Eucalyptus maculata* ao ataque das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. De acordo com HUBBELL e WIEMER (1983 *apud* MARSARO *et al.*, 2004) o óxido de cariofileno (**199**, p. 263), um sesquiterpeno, extraído de *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) é tóxico ao fungo da formiga cortadeira e também repelente às formigas.



Através de uma reação em meio ácido com o epóxido de cariofileno foi obtido clovan-2 β ,9 α -diol (YANG *et al.*, 1993) e a inter-relação entre estas duas estruturas sugere que o clovane-2 β ,9 α -diol possa também ter ação repelente às formigas cortadeiras e ensaios devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

TABELA 4.28: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	2	2	22	38	42	50	50	58	62	18a
RFDa (1)	4	22	36	54	60	64	64	64	64	66	4b
RFDb (2)	0	8	24	50	58	70	76	80	82	84	6,5b
RFDc (3)	0	0	8	34	44	56	70	78	82	88	10b
RFDd (4)	2	14	26	40	46	56	70	70	74	84	9b
RFDe (5)	0	16	32	52	56	68	80	80	80	80	6b
RFDf (6)	2	20	40	58	64	72	84	92	92	94	5b
RFDg (7)	0	18	38	60	74	84	92	92	92	94	4b
RFDh (8)	0	12	22	48	54	64	76	88	90	90	7b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” (p < 0,05).

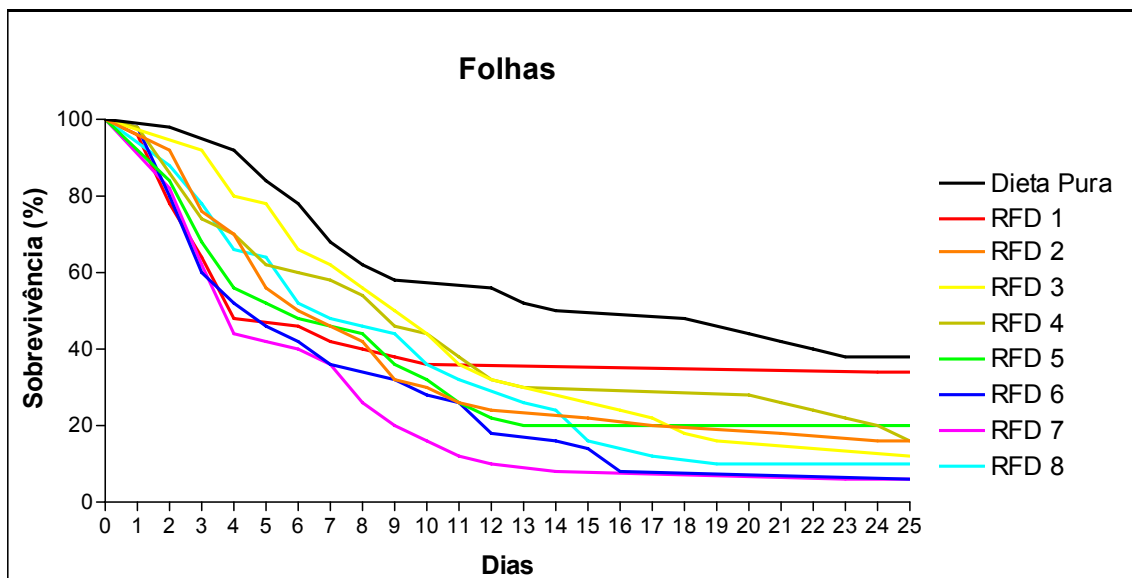


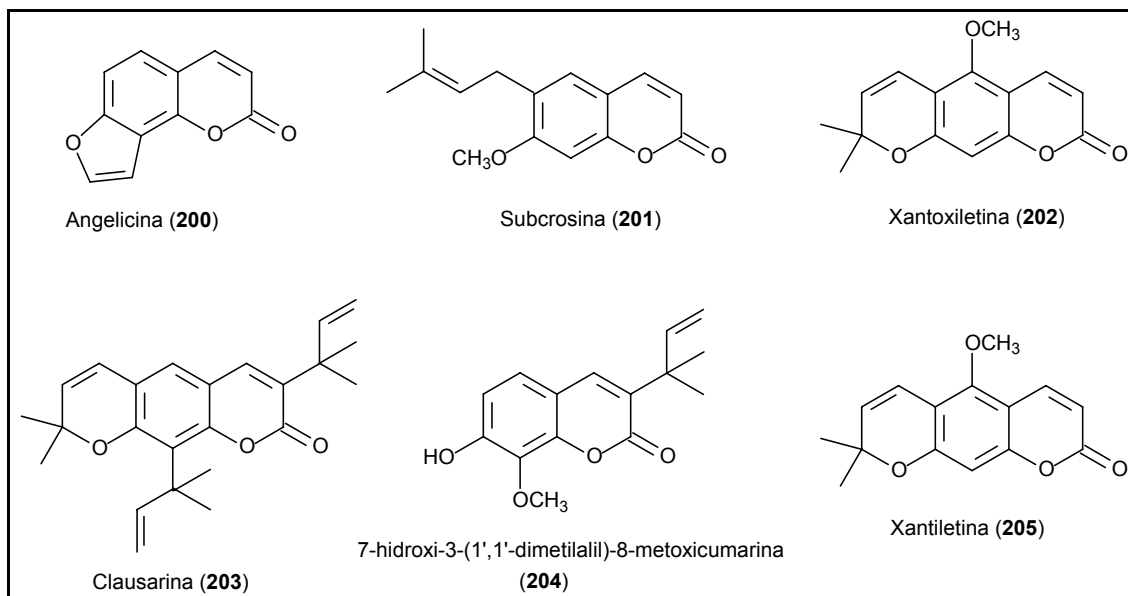
GRÁFICO 4.4: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp.

4.6.4 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico do caule

Nas frações do extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp (RCD) observou-se o mesmo comportamento das frações descritas no item 4.6.3 (262), na qual as frações causaram taxa de mortalidade semelhante, de 90 a 100% no 25º dia de experimento conforme dados apresentados na TABELA 4.29 (p. 268) e no GRÁFICO 4.5 (curvas de sobrevivência, p. 268).

Estas frações foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no item 3.7.1.2 (p. 78). Destas, a fração com resultado de atividade inseticida mais significativo foi RCDd (4) com 100% de mortalidade no 21º dia com sobrevivência mediana das operárias no 5º dia de experimento. Este resultado de ação lenta é mais interessante que o apresentado na fração RCDe (5) com sobrevivência mediana de dois dias e mortalidade de 96% no fim do experimento, pois como é muito tóxica e sendo reconhecida rapidamente pela formigas cortadeiras, poderá ser retirada do ninho, não atingindo assim a ação inseticida desejada.

Na fração RCDd (4) identificou-se a presença das cumarinas rauianina (**V**), diacetato de murrangatina (**VI**) e murralongina (**IX**) conforme descrito no item 3.6.2 (p. 68), a rauianina (**V**) foi identificada também na fração RCMD conforme descrito no item 3.6.5 (p. 72) GODOY *et al.* (2005) avaliaram a inibição do fungo simbionte da formiga cortadeira por cumarinas. Neste estudo verificou-se a atividade biológica de angelicina (**200**), subcrosina (**201**), xantoxiletina (**202**), clausarina (**203**), 7-hidroxi-3-(1',1'-dimetilalil)-8-metoxicumarina (**204**), xantiletina (**205**, p. 266) (p. 266), isopimpineline (**47**, p. 47) e umbeliferona (**33**, p. 7). Destas as cumarinas **201**, **202**, **47** e **205** apresentaram 100% de inibição do fungo *L. gongylophorus* nas concentrações 64, 70, 80, 25 µg mL⁻¹. Desta forma pode-se supor que a atividade desta fração está relacionada com a presença desta classe de metabólitos secundários nas frações obtidas do extrato diclorometânico do caule.



Na fração RCDd (4) identificou-se também a presença do alcalóide zantodiolina (**VIII**) conforme descrito no item 3.6.2 (p. 68, BIAVATTI *et al.*, 2002) constatou que os alcalóides também apresentam atividade fungicida sobre *L. gongylophorus*. Os alcalóides testados foram: esquiamina (**10**, p. 5), kokusaginina (**206**), maculina (**207**), flindersiamina (**208**), 2-n-nonil-4-quinolona (**209**), 1-metil-2-n-nonil-4-quinolona (**210**) e 1-metil-2-fenil-4-quinolona (**211**) (p. 267). Destes os alcalóides **10** e de **206** a **209** foram potentes inibidores do crescimento do fungo em meio de cultura na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

ALMEIDA *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade de extratos frações e substâncias puras de *Helietta puberula* (Rutaceae) para operárias médias de *Atta sexdens* L. cuja toxicidade foi determinada através de bioensaios por ingestão nas concentrações 1,0; 0,2 e 0,05 mg mL^{-1} e para seu fungo simbionte em meio de cultura contendo as substâncias pura na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Das substâncias puras testadas observou-se potente atividade inseticida dos alcalóides: kokusaginina (90%, **206**), maculina (74%, **207**), flindersiamina (80%, **208**) e dictamina (88%, **16**, p. 7). Desta forma verifica-se que dos alcalóides citados acima, três deles foram concomitantemente tóxicos para as saúvas e para o fungo simbionte: kokusaginina (80%, **206**), maculina (100%, **207**) e dictamina (100%, **16**).

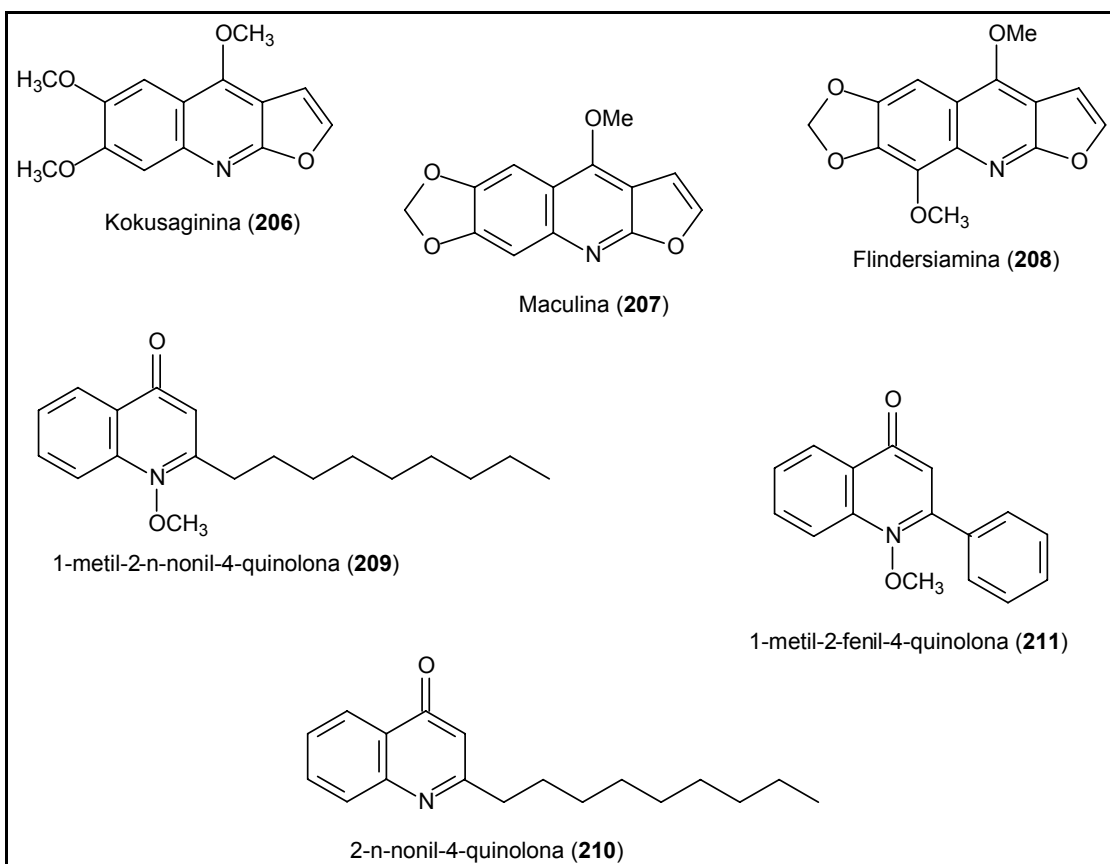


TABELA 4.29: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	4	4	14	16	24	34	36	44	52	23a
RCDd (4)	0	18	38	60	72	88	94	96	100	100	5b
RCDe (5)	12	52	64	88	88	88	92	92	94	96	2b
RCDf (6)	8	40	54	66	78	88	88	88	88	92	3b
RCDg (7)	16	36	48	68	72	76	82	82	88	96	4b
RCDh (8)	4	40	54	68	72	76	72	78	80	84	3b
RCDi (9)	22	48	78	88	88	90	90	90	90	90	3b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” (p < 0,05).

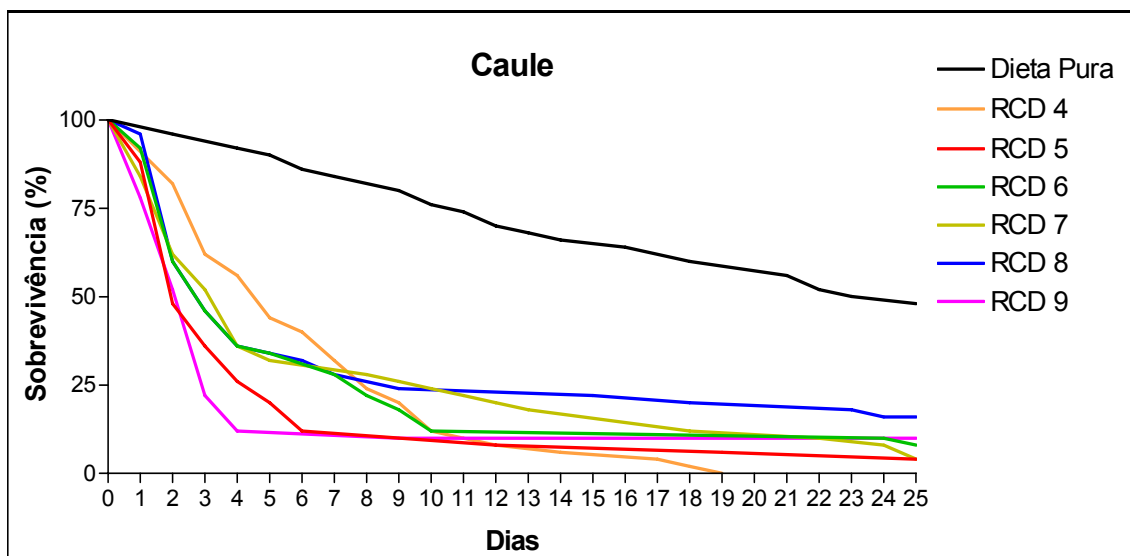


GRÁFICO 4.5: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com frações do extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp.

4.6.5 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico de folhas (RFM)

As frações obtidas do particionamento do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp, conforme metodologia descrita na seção 3.7.1.2 (p. 78), foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de formigas cortadeiras.

Analisando os resultados obtidos, apresentados na TABELA 4.30 (p. 269) e no GRÁFICO 4.6 (p. 270), observou-se que os valores não diferem muito do controle quanto ao tempo para mortalidade total. Das frações, a que se destaca com ação mais alta sobre a sobrevivência mediana dos indivíduos e mais alta atividade inseticida é a fração diclorometânica (RFMD), com valores de três dias para mortalidade de 50% das operárias e 100% de taxa de mortalidade no fim do experimento diferindo do controle pelo teste “log-rank” ($p < 0,05$).

Em razão da necessidade de concluir a dissertação de mestrado, estas frações não foram refractionadas e desta forma não foram identificados os seus metabólitos secundários.

TABELA 4.30: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	0	6	32	44	48	70	74	80	84	11a
Diclorometano	2	26	58	88	94	94	96	98	98	100	3b
Acetato de Etila	2	14	28	60	64	68	78	78	78	86	5a
Hidroetanólica	0	18	38	62	68	72	80	80	82	88	6b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

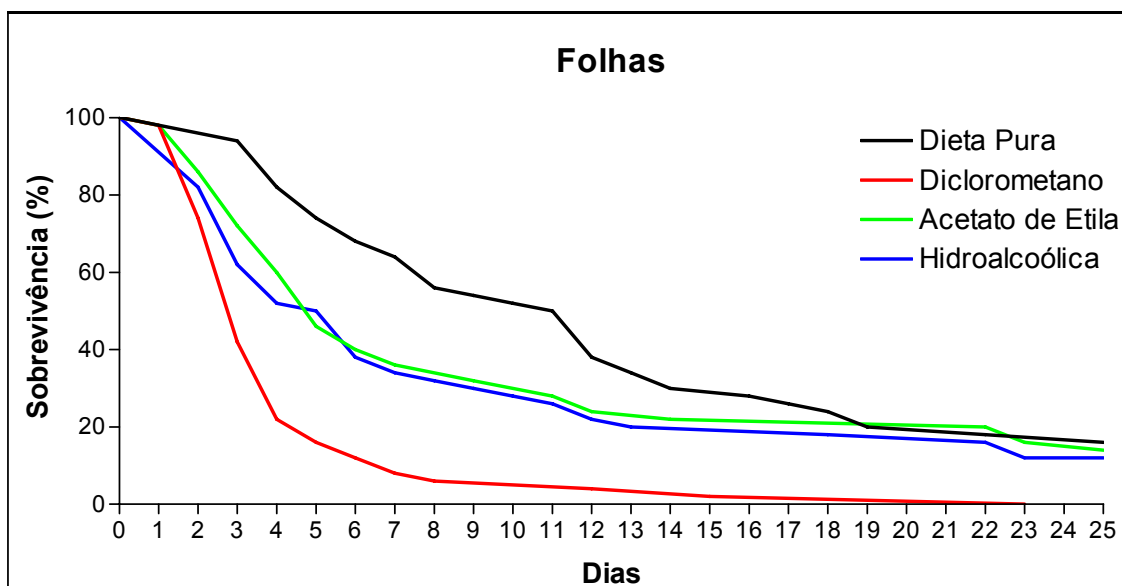


GRÁFICO 4.6: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com frações de partição líquido-líquido de extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp.

4.6.6 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico do caule (RCM)

As frações obtidas do particionamento do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* cuja metodologia foi descrita na seção 3.7.1.2 (p. 78).

Os dados obtidos ao tratar a dieta artificial das saúvas com as frações diclorometânica, acetato de etila e hidroetanólica (TABELA 4.31, p. 271 e no GRÁFICO 4.7, p. 271) foram semelhantes aos das respectivas frações de folhas descritas na seção anterior (4.6.5, p. 269). Da mesma maneira a fração com atividade inseticida mais significativa foi a diclorometânica (RCMD) que difere do controle pelo teste “log-rank” ($p < 0,05$) a qual causou 50% da mortalidade das operárias no 4º dia do experimento.

Na fração hidroetanólica identificou-se a presença de flavonas glicosiladas: apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside (**X**, p. 151), apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside (**XI**, p. 167), 2”-O-raminosil-vitexina (**XII**, p. 178), 2”-O-raminosil-isovitexina (**XXII**, p. 244), vitexina (**XIII**, p. 189), isovitexina (**XIV**, p. 197), apigenina 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-

(2''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside) (XV, p. 209), apigenina 6-C-(2''-O- α -L-arabinopiranosil-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside (XVI, p. 209), vicenin-2 (XVII, p. 209), schaftoside (XVIII, p. 227), neoschaftoside (XIX, p. 227), isoschaftoside (XX, p. 227) e neisoschaftoside (XXI, p. 227).

TABELA 4.31: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	4	14	24	34	44	68	80	88	90	12a
Diclorometano	6	20	48	82	90	90	96	98	100	100	4b
Acetato de Etila	0	10	22	48	60	62	74	78	90	96	7,5a
Hidroetanólica	2	16	28	52	62	62	80	82	90	94	6a

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” (p < 0,05).

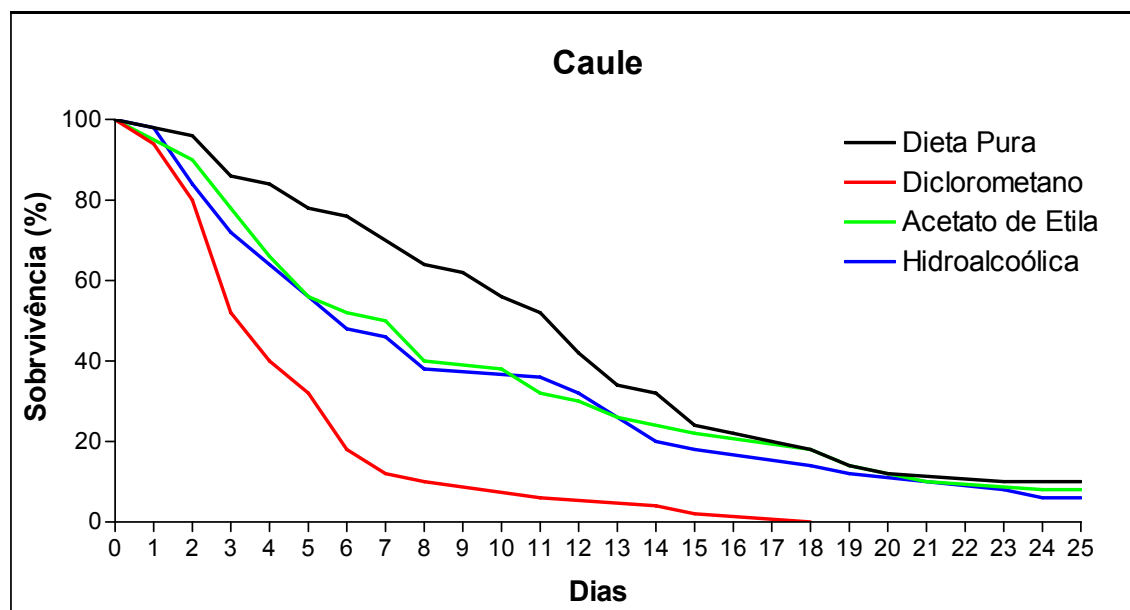


GRÁFICO 4.7: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com frações da partição líquido-líquido de extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp.

4.6.7 – Efeito da fração G e suas subfrações da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule (RCM)

Os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão da fração **G** e das respectivas subfrações (1 a 5) da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp incorporado à dieta artificial das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* está apresentado na TABELA 4.32 (p. 274). Ela resume as porcentagens acumuladas de sobrevivência mediana (Md) e a interpretação do teste “log-rank”. São mostrados também no GRÁFICO 4.8 (curvas de sobrevivência, p. 275), segundo metodologia descrita no item 3.7.1.2 (p. 78).

Ao tratar as formigas com a dieta artificial contendo as frações citadas acima houve um acréscimo gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia em todas as subfrações durante o decorrer do experimento além de apresentar diferença significativa comparada ao controle (dieta pura) de acordo com o teste “log-rank” ($p < 0,05$).

As subfrações **G3** e **G4** possuem as mais altas atividades inseticidas, 98 e 100% de taxa de mortalidade respectivamente e ação sobre a sobrevivência média das formigas cortadeiras com 50% de mortalidade no 3º dia para os dois tratamentos, enquanto que o controle apresentou mortalidade de 56% no 25º dia e sobrevivência média de 20 dias das operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Vale ressaltar que a fração **G** (74%) apresentou menor atividade quando comparada com as subfrações **G3** (98%) e **G4** (100%). Estas frações estão em quantidade minoritária em relação às outras subfrações como pode ser observado no item 3.6.6 (p. 73), sendo que, apesar das frações (G1 a G5) serem obtidas em porcentagens diferentes na fração **G**, todas as frações foram testadas sobre *A. sexdens rubropilosa* na mesma concentração (2 mg/mL) como descrito no item 3.6.6 (p. 73).

Nas frações **G1** e **G2** foram isoladas as flavonas apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside), apigenina 6-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside, vicenin-2,

apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside, apigenina 6-C-glucosil-8-C-neohesperidoside; nas frações **G3** e **G4** as flavonas vicenin-2, apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside, apigenina 6-C-glucosil-8-C-neohesperidoside, neoisoschaftoside, neoschaftoside e traços de 2"-O-rhaminosil-vitexina e 2"-O-rhaminosil-isovitexina e na fração **G5** em quantidade majoritária 2"-O-rhaminosil-vitexina e 2"-O-rhaminosil-isovitexina conforme indicado na TABELA 4.19 (p. 202) no item 4.5.9. As porcentagens (medidas pela área do cromatograma – DAD, FIGURA 4.71, p. 203) das flavonas presentes em cada fração (G1 a G5) está descrita na TABELA 4.19 (p. 202).

O flavonóide astilbina (**44**, p. 43) apresentou 100% de inibição no fungo simbiote mostrando ser potente agente fungicida (ALMEIDA, 2007). Cintra *et al.* (2005) verificaram que este flavonóide, astilbina (3- β -O-ramnosídeo 5,7,3',4'-tetraidroxi-2,3-diidroflavonol, **44**, p. 43), foi altamente tóxico no ensaio por ingestão sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Neste ensaio foram testadas diferentes concentrações: 0,1; 0,5; 1; 2 e 3% cuja concentração mais ativa sobre as formigas cortadeiras foi a de 2% (m/m) em relação à dieta.

Há relatos de ensaios biológicos de flavonóides sobre o fungo simbiote de formigas cortadeiras *Leucoagaricus gongylophorus*. GALLO (2004) avaliou a atividade da orientina (**212**) em mistura com isorientina (**213**) (p. 274) e luteolina (**57**, p. 47) que apresentaram respectivamente 20% e 40% de inibição do fungo simbiote das formigas cortadeiras na concentração de 50 μ g/mL. SIMOTE (2006) observou potente inibição do fungo simbiote no ensaio com a flavanona (**214**) (80%), no entanto a 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavona (**215**) (p. 274) foi inativa, ambas testadas na concentração de 10 μ g/mL. FACCHINI (2000) verificou que a flavona (**66**, p. 48) inibiu completamente (100%) o desenvolvimento do fungo simbiote das formigas cortadeiras na concentração de 50 μ g/mL.

Desta forma os flavonóides podem atuar de forma a controlar a população de saúvas tanto como inseticida, tanto como fungicida. No entanto, são necessários outros ensaios para que os mesmos sejam efetivamente utilizados no controle de formigas cortadeiras.

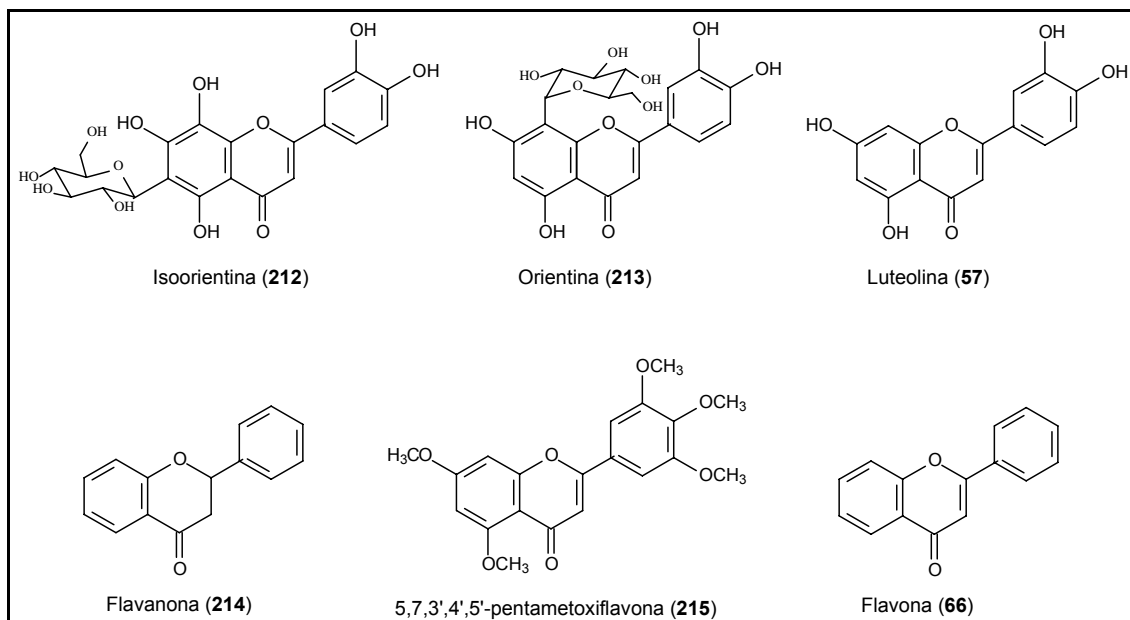


TABELA 4.32: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com a fração G e subfrações da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle	0	6	18	32	40	42	48	48	54	56	20a
Fração G	10	24	36	48	58	64	66	66	70	74	7b
Subfração G1	12	26	40	48	56	58	62	64	68	72	8b
Subfração G2	6	28	52	80	86	88	88	90	92	92	3b
Subfração G3	8	26	58	72	86	96	98	98	98	98	3b
Subfração G4	8	46	68	90	94	98	98	100	100	100	3b
Subfração G5	6	12	16	40	52	64	70	72	78	84	8b

Controle: dieta pura. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” (p < 0,05).

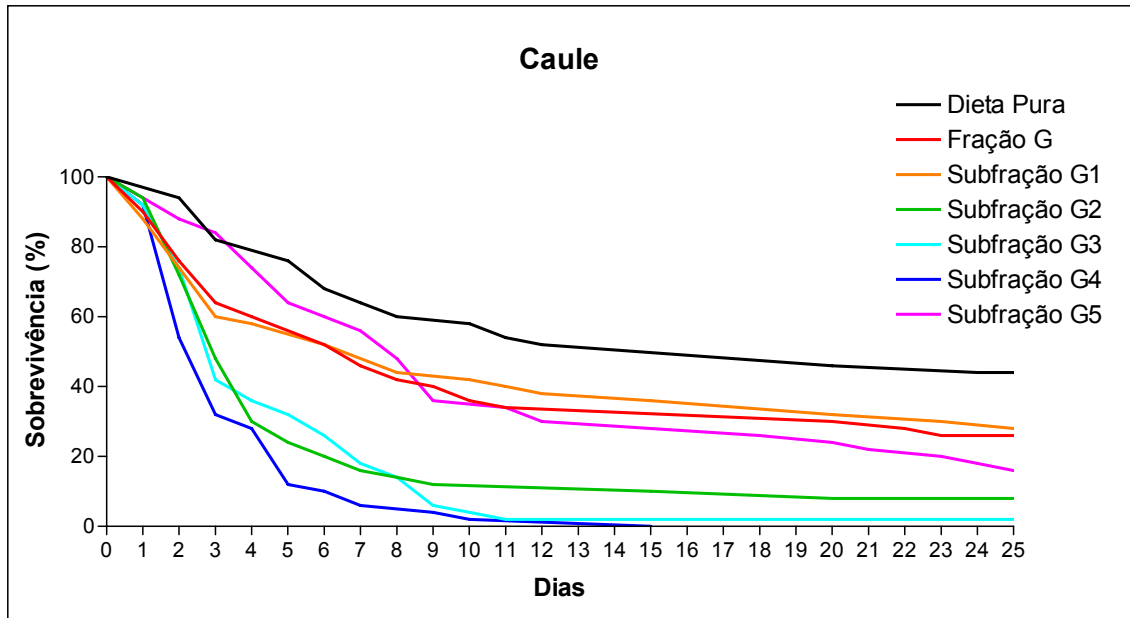


GRÁFICO 4.8: Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com a fração G e subfrações da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp.

4.7 – Efeito de *Rauia* sp no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* nos ensaios por ingestão

4.7.1 – Efeito dos extratos brutos de folhas

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico de folhas de *Rauia* sp foram ensaiados sobre a *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79). Os resultados obtidos com extratos das folhas (TABELA 4.33, p. 276; GRÁFICO 4.9, p. 276) mostraram-se bastante significativos. No experimento em que a dieta artificial foi tratada com o extrato diclorometânico ocorreu um alongamento da fase larval de aproximadamente de 10 dias quando comparado ao controle (ácido ascórbico + C₆H₁₄:CH₂Cl₂:MeOH 4:3:3) e mortalidade de 84% nesta mesma fase.

TABELA 4.33: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (±EP)	Fase Pupal Duração (dias) (±EP)	Ciclo Total Mortalidade (%) (±EP)
	Duração (dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)			
Extrato Bruto Hexânico	15,87 ± 1,24 c	73,33 ± 16,33 a	279,75 ± 10,78 a	11,16 ± 0,98 a	80,00 ± 12,64 a
Extrato Bruto Diclorometânico	26,00 ± 8,09 b	83,34 ± 15,05 a	269,60 ± 32,89 ab	9,80 ± 2,28 a	83,34 ± 15,05 a
Extrato Bruto Metanólico	21,41 ± 3,84 a	41,66 ± 4,08 b	221,82 ± 31,47 c	10,46 ± 1,76 a	52,50 ± 14,74 b
Controle	16,90 ± 1,09 c	26,66 ± 10,32 b	252,76 ± 16,22 b	10,38 ± 1,11 a	26,66 ± 10,32 c

Controle: (ácido ascórbico + C₆H₁₄ : CH₂Cl₂ : MeOH 4:3:3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

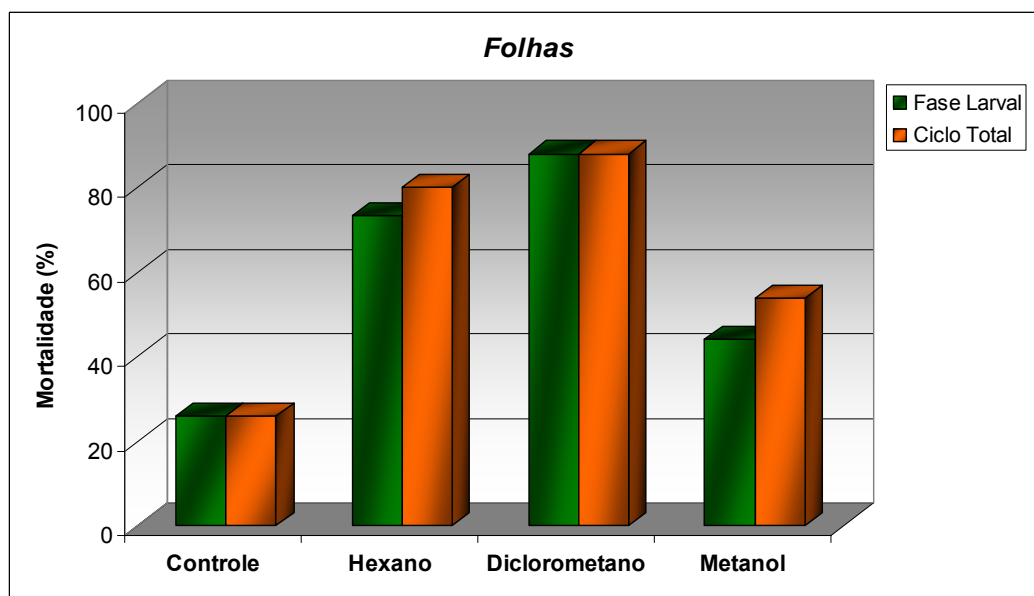


GRÁFICO 4.9: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

Ao tratar a dieta artificial com o extrato hexânico observou-se uma mortalidade larval de 74%, enquanto no tratamento com o extrato metanólico houve um alongamento da fase larval de aproximadamente 4 dias seguido de uma diminuição no peso pupal de 30 mg quando comparado ao controle.

Na primeira etapa dos experimentos os testes foram realizados a fim de verificar quais extratos da *Rauia* sp apresentavam atividade inseticida. Desta forma, o extrato diclorometânico das folhas, que apresentou maior atividade sobre a *S. frugiperda* foi o primeiro a ser fracionado e testado novamente.

Nos ensaios biológicos posteriores, porém, utilizou-se outra metodologia, ensaio por toxicidade aguda, devido a menor quantidade de massa obtida nos fracionamentos.

É importante ressaltar que uma maior duração da fase larval, em campo, manterá o inseto propenso ao ataque por mais tempo por inimigos naturais, além de levar à emergência de adultos com assincronia fenológica em relação à população normal, e diminuir o número de gerações do inseto no ciclo agrícola (TANZUBIL e MCCAFERRY, 1990).

Pupas menores produzirão adultos menores e mais fracos, com menor capacidade de competição para as atividades vitais da espécie (RODRIGUEZ e VENDRAMIN, 1997), podendo apresentar problemas na sua reprodução. Diversos autores já relataram que a ocorrência da esterilidade está geralmente associada a distúrbios alimentares e deficiência nutricional. O número de ovariolos, embora seja geneticamente determinado, pode ser modificado pela qualidade e quantidade de nutrientes obtidos durante a diferenciação dos ovários (COSTA *et al.*, 2004). Portanto, os adultos provenientes de pupas menores podem apresentar menor número de ovariolos por ovário, e conseqüentemente irão reduzir o potencial de produção de ovos. Dessa forma, haverá um decréscimo nos tamanhos das gerações subseqüentes da peste, e desde já, reduções na freqüência e severidade das destruições (COSTA *et al.*, 2004).

4.7.2 – Efeito dos extratos brutos do caule

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico do caule de *Rauia* sp foram ensaiados sobre a *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79). Nos resultados obtidos ao tratar a dieta artificial com extrato hexânico do caule observou-se um alongamento da fase larval de aproximadamente 1,7 dias, quando comparados ao controle (ácido ascórbico + C₆H₁₄:CH₂Cl₂:MeOH 4:3:3) e o extrato bruto metanólico mostrou atividade significativa comparada ao controle, pelo teste de Tuckey, com mortalidade no ciclo total de 48,83% conforme indicado na TABELA 4.34 (p. 278) e GRÁFICO 4.10 (p. 279).

Entretanto, os resultados de mortalidade dos extratos brutos do caule de *Rauia* sp não foram significativos quando comparados aos resultados obtidos com os extratos brutos de folhas.

TABELA 4.34: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S.frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos do caule de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR 70 ± 5% e fotofase de 12H.

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (±EP)	Fase Pupal Duração (dias) (±EP)	Ciclo Total Mortalidade (%) (±EP)
	Duração (dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)			
Extrato Bruto Hexânico	18,61 ± 1,57 c	15,00 ± 5,47 b	271,62 ± 23,17 a	11,12 ± 1,16 a	30,00 ± 8,94 b
Extato Bruto Diclorometânico	16,81 ± 1,00 b	26,66 ± 8,73 ab	255,77 ± 34,53 a	10,52 ± 1,21 a	40,00 ± 13,78 ab
Extrato Bruto Metanólico	14,45 ± 0,88 a	36,34 ± 6,21 a	253,25 ± 19,70 a	10,62 ± 0,80 a	48,83 ± 12,49 a
Controle	16,90 ± 1,09 b	26,66 ± 10,32 ab	252,76 ± 16,22 a	10,38 ± 1,11 a	26,66 ± 10,32 b

Controle: (ácido ascórbico + C₆H₁₄ : CH₂Cl₂: MeOH 4:3:3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey (p ≤ 0,05).

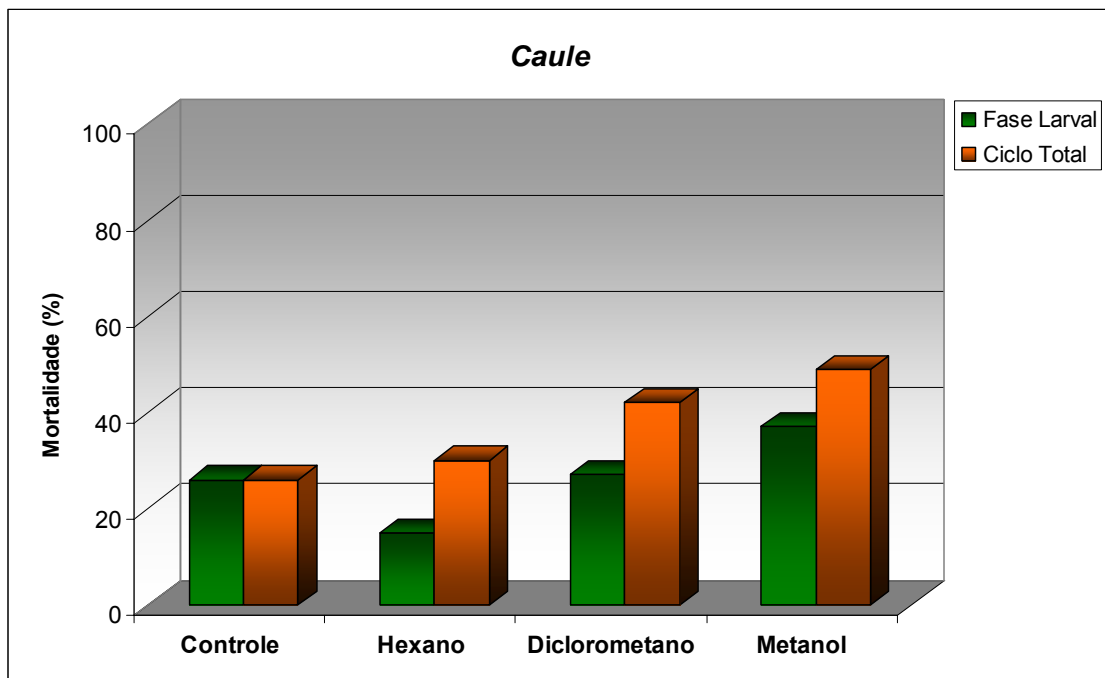
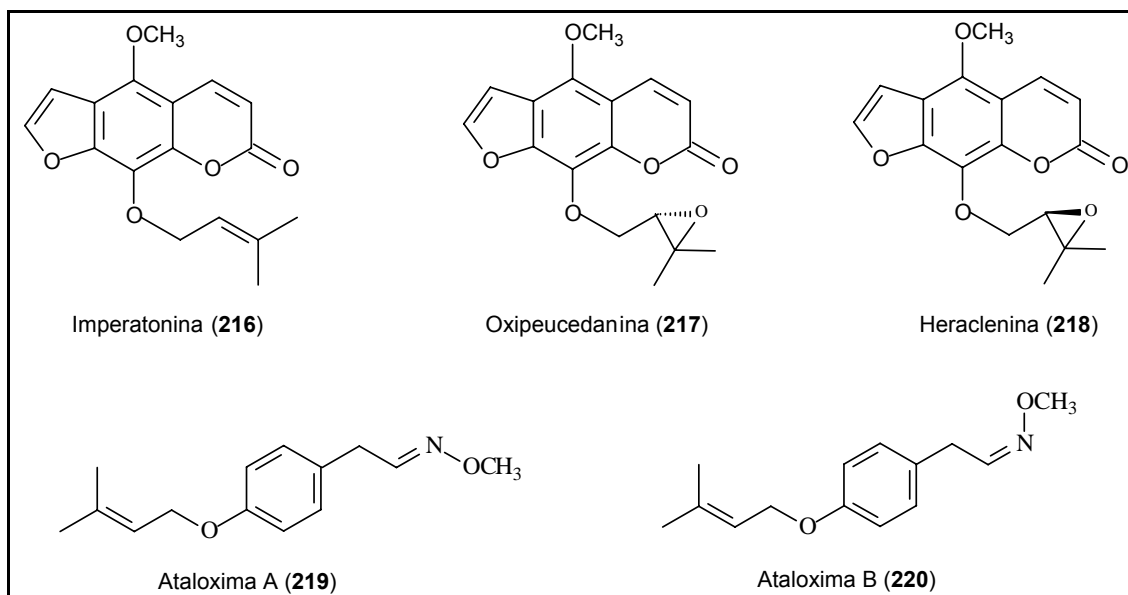


GRÁFICO 4.10: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos orgânicos do caule de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

Na fração RCDD (4) obtida do fracionamento do extrato bruto diclorometânico do caule identificou-se a presença das cumarinas rauianina (V), diacetato de murrangatina (VI) e murralongina (IX) conforme descrito no item 3.6.2 (p. 68). A rauianina (V) foi identificada também na fração RCMDi conforme descrito no item 3.6.5 (p. 72).

A seguir serão discutidos relatos da literatura sobre a atividade inseticida desta classe de metabólitos sobre *Spodoptera* ssp. O extrato lipofílico das sementes de *Atalantia ceylanica* (Rutaceae) apresentou atividade no ensaio por ingestão sobre *S. litoralis*. Os compostos isolados deste extrato foram as furanocumarinas xantotoxina (45), bergapteno (46) (p. 45), imperatonina (216), oxipeucedanina (217) e grande quantidade de heraclenina (218) e as oximas ataloxima A e B (219-220) (p. 280). Neste bioensaio foi verificado que a atividade antialimentar do extrato pode ser explicada pela presença das furanocumarinas cuja atividade já é conhecida. As oximas não apresentaram atividade antialimentar no ensaio por ingestão, no entanto foram

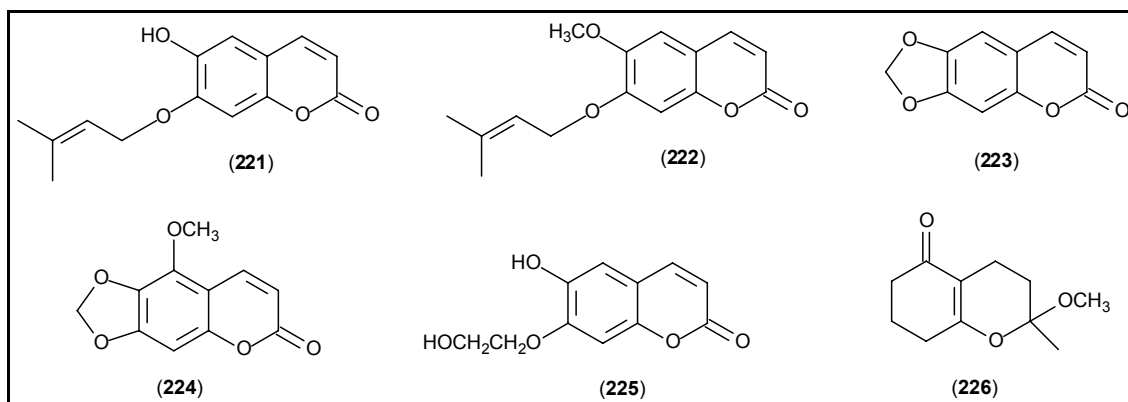
ativas no ensaio por toxicidade tópica com pronunciada taxa de mortalidade (BACHER *et al.*, 1999).



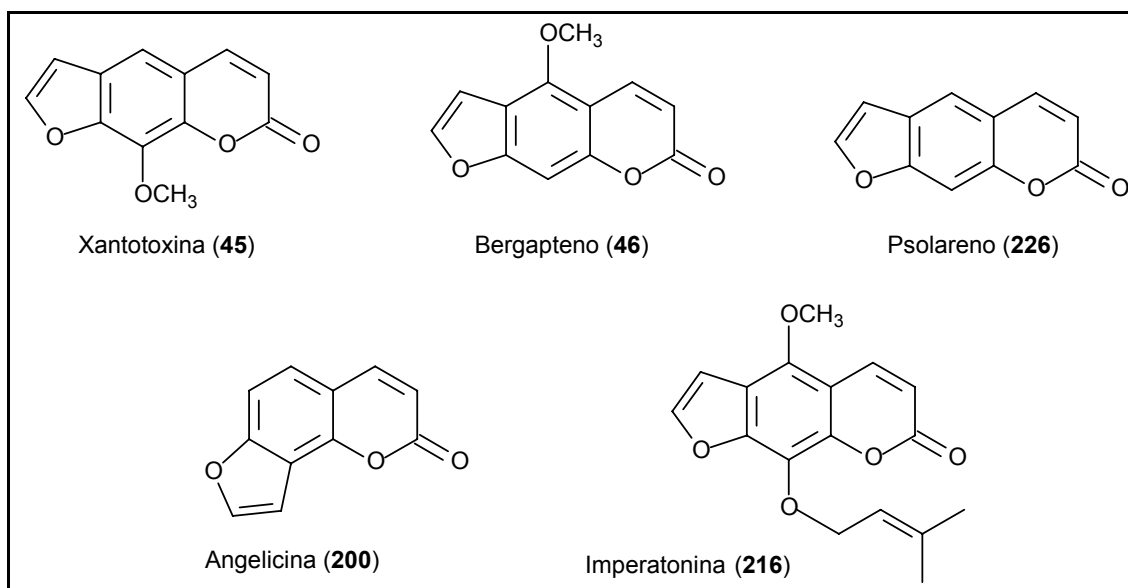
Há poucos relatos sobre a atividade de plantas da família Rutaceae sobre espécies de *Spodoptera*. Na literatura encontram-se bioensaios com várias outras famílias, por exemplo, MATOS *et al.* (2006) avaliaram a atividade inseticida dos extratos orgânicos hexânico, metanólico e hidrometanólico de ramos e folhas de *Trichilia clausenii*, *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua* (Meliaceae) sobre *S. frugiperda* incorporados à dieta artificial na concentração de 1000 mg/kg de dieta. Dos extratos testados o metanólico de *T. clausenii* apresentou resultados mais significativos causando 90% de mortalidade na fase total. Outros autores também relataram atividade biológica sobre *S. frugiperda* nas famílias Cactaceae (CÉSPEDES *et al.*, 2005) e Asteraceae (CÉSPEDES *et al.*, 2004) cuja atividade dos extratos estão relacionadas com a regulação do crescimento do inseto. KAMARAJ *et al.* (2008) observaram atividade antialimentar sobre *S. litura* dos extratos preparados com acetona, clorofórmio, acetato de etila, hexano e metanol de *Ocimum sanctum* Lin e *O. canum* Sims da família Labiatae e *Rhinacanthus nasatus* KURZ. da família Acanthaceae. Dos extratos testados o mais eficiente, com taxa de mortalidade de 100% sobre as larvas no quarto ínstar foram: extrato metanólico de *O.*

canum, o extrato de acetona de *O. sanctum* e o extrato metanólico de *R. nasatus*. O número de larvas mortas foi verificado 24 horas após exposição com os extratos das plantas.

VERA *et al.* (2006) avaliaram a atividade fago-inibidora de cinco cumarinas isoladas de *Pterocaulon polystachyum*: 6-hidroxi-7-isopreniloxicumarina (**221**), 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina (**222**), 6,7-metilenodioxicumarina (**223**), 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (**224**) e 6-metoxi-7-(2-hidroxietoxi)cumarina (**225**) e sintetizadas no laboratório 2-metoxi-2-metil-3,4,5,6,7,8-hexahidro-3H-cromen-5-ona (**226**) (p. 281) e escopoletina (**79**, p. 107) sobre *S. frugiperda*.



As cumarinas isoladas de *P. polystachyum* apresentaram 100% de atividade fago-inibidora na concentração de 200 µg por g de dieta. CALCAGNO *et al.* (2002) avaliaram o sinergismo de cinco furanocumarinas: xantotoxina (**45**), bergapteno (**46**) (p. 45), psoraleno (**227**, p. 281), imperatorina (**216**, p. 280) e angelicina (**200**, p. 266); isoladas de *Pilocarpus goudotianus* (Rutaceae) no efeito deterrente (fago-inibidor) sobre *S. littoralis*. Neste estudo verificou-se que as cinco foram ativas, na qual o grupo metoxila na posição C-5 ou C-8 aumenta a atividade. Sendo assim, obteve-se o seguinte efeito deterrente: xantotoxina = bergapteno > psoraleno = imperatorina = angelicina. Outros autores também descrevem a atividade antialimentar de cumarinas sobre *S. litura* (LUTHRIA *et al.*, 1989; YAJIMA e MUNAKATA, 1979) e sobre *S. exigua* (BERDEGUÉ *et al.*, 1997) dentre outros.



4.7.3 – Efeito das frações do extrato bruto diclorometânico de folhas

As frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp (RFD) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79). As frações analisadas foram aquelas com massa disponível para realizar o referido ensaio: **D** (extraída com Acetato de Etila 100 %), **E** (extraída com Acetato de Etila e Acetona 1:1), **F** (Acetona 100 %) e **G** (Acetona e Metanol 1:1) conforme item 3.5.1 (p. 61).

O ensaio biológico com a dieta artificial tratada com as frações do extrato diclorometânico de folhas se mostraram bastantes significativos. A fração **D** apresentou uma mortalidade na fase larval de aproximadamente 94% (TABELA 4.35, p. 283 e GRÁFICO 4.11, p. 284). Considerando o ciclo total de desenvolvimento observou-se mortalidades de aproximadamente 97, 80 e 77% nos ensaios realizados com as frações **D**, **E** e **F** respectivamente. Nas frações **D**, **E** e **F** identificou-se a presença de ácidos graxos conforme descrito no item 3.5.2 (p. 63) a 3.5.4 (p. 65). VANDERHERCHEN *et al.* (2005) relataram a atividade inseticida dos ácidos 7-fenileptanóico e 7-fenilept-4-enóico sobre *Manduca sexta* (Lepdoptera: Sphingidae), *Heliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae). Os ensaios foram realizados em lagartas de 4º ínstar de *M. sexta*, *H. zea* e *H. virescens* através

de injeção abdominal com os ácidos 7-fenileptanóico (**227**) e 7-fenilept-4-enóico (**228**) (p. 283) com dose de 50 µg/inseto. Para ambos ácidos e insetos observou-se mortalidades na faixa de 55,0 a 70,0%.

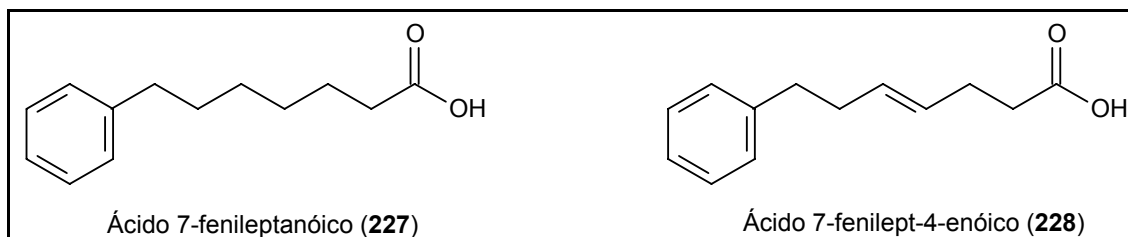


TABELA 4.35: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR 70 ± 5% e fotofase de 12H.

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (±EP)	Fase Pupal	Ciclo Total
	Duração (Dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)		Duração (Dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)
Fração D	21,0 ± 7,07 a	93,33 ± 10,32 a	250,5 ± 6,36 a	12,0 ± 0,0 a	96,66 ± 8,16 a
Fração E	17,5 ± 1,87 a	80,0 ± 21,90 ab	255,33 ± 22,34 a	11,0 ± 1,67 a	80,0 ± 21,90 ab
Fração F	16,9 ± 1,22 a	63,33 ± 15,05 ab	242,09 ± 37,40 a	12,28 ± 0,75 a	76,66 ± 15,05 ab
Fração G	16,3 ± 1,88 a	56,66 ± 29,43 b	266,61 ± 23,45 a	11,66 ± 1,11 a	70,0 ± 20,97 b
Controle	16,5 ± 2,63 a	6,66 ± 10,32 c	263,67 ± 45,08 a	11,84 ± 1,06 a	20,0 ± 0,0 c

Controle: (ácido ascórbico + C₆H₁₄ : CH₂Cl₂: MeOH 4:3:3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey (p ≤ 0,05).

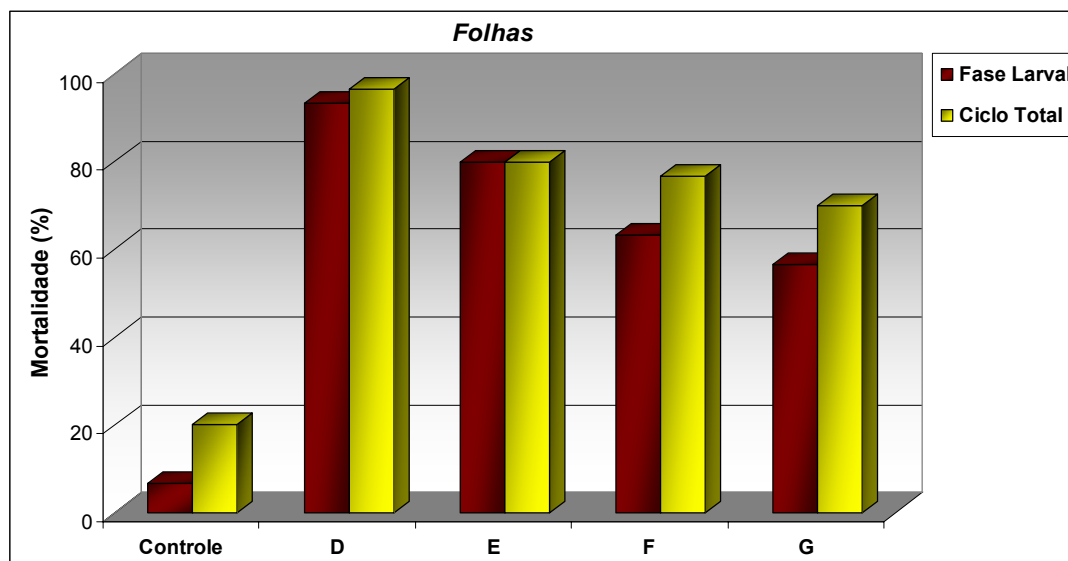


GRÁFICO 4.11: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

4.7.4 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico de folhas (RFM)

As frações diclorometânica, acetato de etila e hidroetanólica do extrato metanólico de folhas de *Rauia* sp (p. 66) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79). Os resultados obtidos ao tratar a dieta artificial com as frações diclorometânica, acetato de etila e hidroetanólica (TABELA 4.36, p. 286; GRÁFICO 4.12, p. 286), foram resultados relevantes comparados ao controle (ácido ascórbico + $C_6H_{14}:CH_2Cl_2:MeOH$ 4:3:3) no que se refere à mortalidade na fase larval com taxas de aproximadamente 74 e 57% para as frações acetato de etila e hidroetanólica, respectivamente. Nas frações obtidas da hidroetanólica houve aumento de 15 mg no peso da pupa em relação ao controle (TABELA 4.36, p. 286).

Com relação à duração da fase larval houve um alongamento de aproximadamente 7 dias no tratamento com a fração de acetato de etila e um alongamento de 3 dias na fase pupal (TABELA 4.36, p. 286).

No que se refere ao peso das pupas verificou-se que não houve variação das mesmas nos tratamentos com as frações comparadas ao controle (TABELA 4.36, p. 286).

Os flavonóides podem apresentar efeito fagoinibidor, conforme discussão nos itens 4.7.5 (p. 287) e 4.7.6 (p. 290) ou efeito fagoinibidor de acordo com BOUAZIZ *et al.* (2001). O extrato metanólico das folhas de *Hyparrhenia hirta* Stapf (Poaceae) apresentou atividade fagoestimulante sobre *S. frugiperda*. Deste extrato foram isolados quatro flavonóides: luteolina (**57**, p. 47), isoorientina (**212**, p. 274), tricina (**229**) e tricina 7-O-glucoside (**230**) (p. 285). Estes flavonóides foram inativos quando testados separadamente (BOUAZIZ *et al.*, 2001).

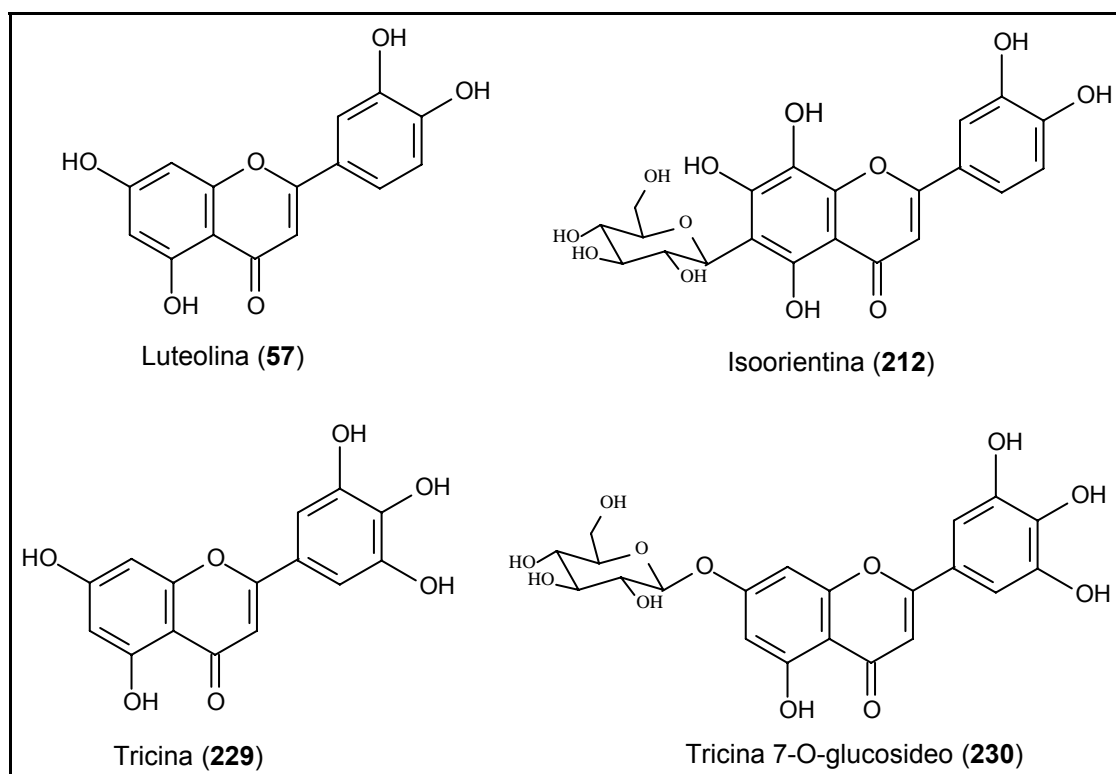


TABELA 4.36: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S.frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (\pm EP)	Fase Pupal Duração (Dias) (\pm EP)	Ciclo Total Mortalidade (%) (\pm EP)
	Duração (Dias) (\pm EP)	Mortalidade (%) (\pm EP)			
Diclorometano	22,77 \pm 2,41 a	36,66 \pm 15,05 bc	220,94 \pm 38,52 a	11,16 \pm 2,07 a	46,66 \pm 16,33 c
Acetato de Etila	25,75 \pm 3,84 a	73,33 \pm 16,33 a	216,0 \pm 27,24 a	12,5 \pm 1,60 a	73,33 \pm 16,33 a
Hidroalcoólica	24,46 \pm 4,57 a	56,66 \pm 19,66 ab	218,30 \pm 26,34 a	10,79 \pm 2,12 ab	56,66 \pm 19,66 ab
Controle	18,95 \pm 2,07 b	16,66 \pm 8,16 c	216,91 \pm 25,96 a	9,5 \pm 1,35 b	16,66 \pm 8,16 c

Controle: (ácido ascórbico + C_6H_{14} : CH_2Cl_2 : MeOH 4:3:3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

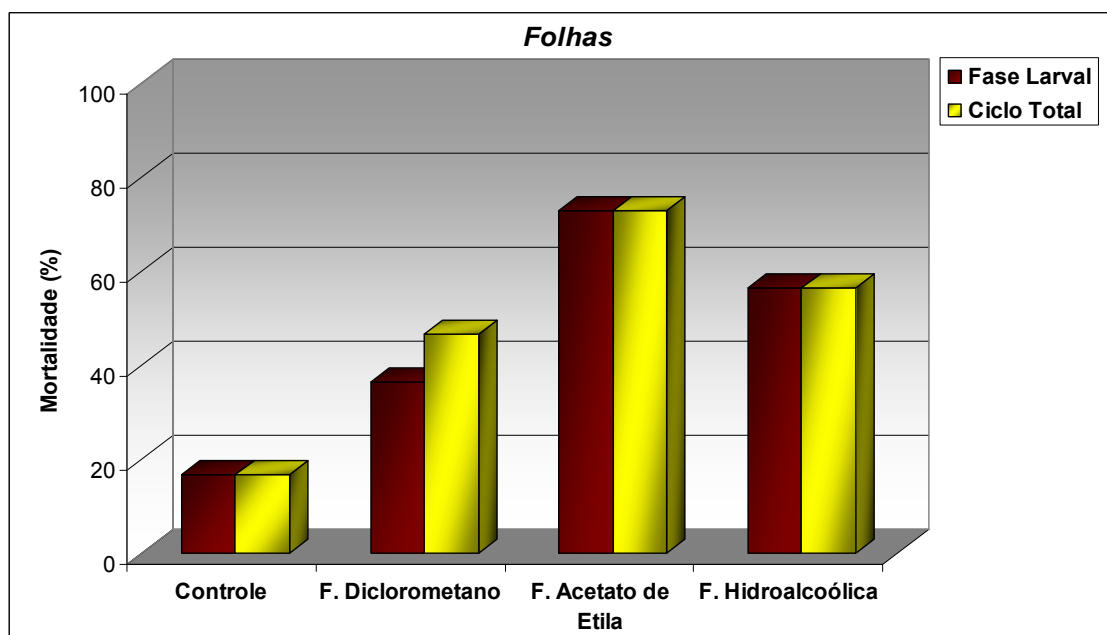


GRÁFICO 4.12: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

4.7.5 – Efeito das frações do extrato bruto metanólico do caule (RCM)

As frações diclorometânica, acetato de etila e hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (p. 71) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79). Com relação aos resultados obtidos com estas frações verificou-se que a fração acetato de etila apresentou resultados relevantes no que se refere à mortalidade na fase larval e no ciclo total com taxa de 56 e 60%, respectivamente como mostra a TABELA 4.37 (p. 287) e GRÁFICO 4.13 (p. 288).

As frações diclorometânica e hidroetanólica apresentaram taxa mortalidade de 33,33 e 46,66% no ciclo total de desenvolvimento.

TABELA 4.37: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (±EP)	Fase Pupal Duração (Dias) (±EP)	Ciclo Total Mortalidade (%) (±EP)
	Duração (Dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)			
Diclorometano	19,6 ± 3,69 a	26,66 ± 10,32 b	208,04 ± 23,37 a	11,16 ± 0,83 a	33,33 ± 16,33 ab
Acetato de Etila	17,90 ± 2,54 a	56,0 ± 26,07 a	216,36 ± 19,36 a	10,00 ± 1,14 a	60,0 ± 35,77 a
Hidroalcoólica	19,05 ± 2,89 a	33,33 ± 10,32 ab	202,07 ± 26,29 a	11,62 ± 0,88 a	46,66 ± 10,32 ab
Controle	18,70 ± 2,40 a	16,66 ± 8,16 b	218,00 ± 24,32 a	9,5 ± 2,79 a	16,66 ± 8,16 b

Controle: (ácido ascórbico + C₆H₁₄:CH₂Cl₂:MeOH 4:3:3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey (p ≤ 0,05).

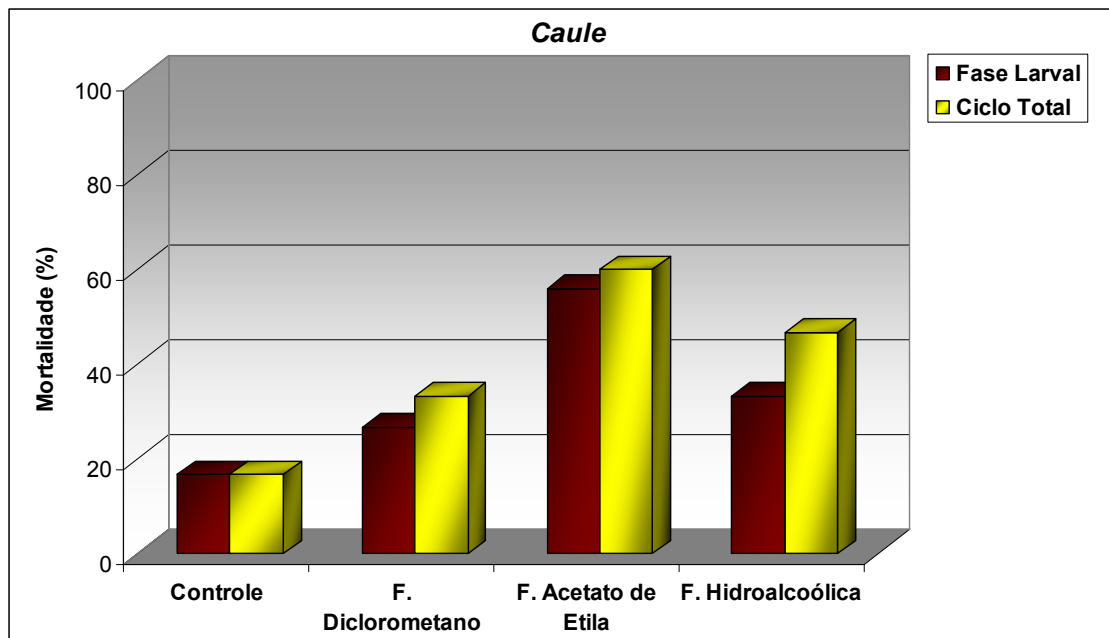
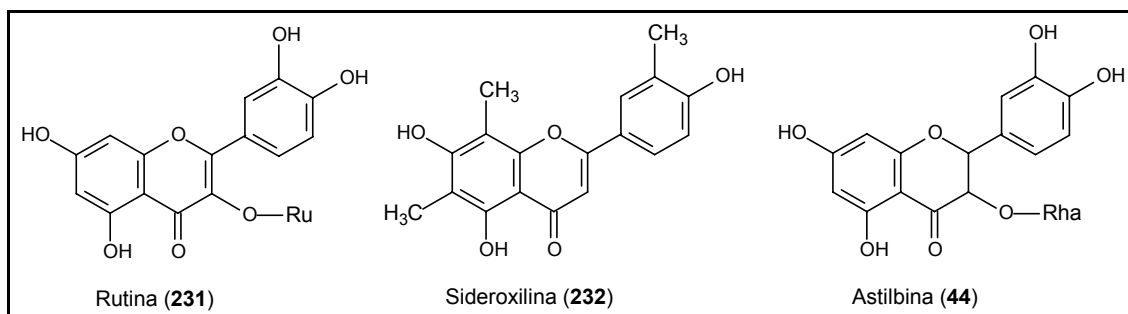


GRÁFICO 4.13: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

Na fração hidroetanólica estudada neste trabalho identificou-se a presença de flavonóides glicosilados. Segundo SIMMONDS (2001) flavonóides glicosilados podem atuar de diversas maneiras nos insetos, como por exemplo, inibidores alimentares ou fagoestimulantes; estimulantes da ovoposição, dentre outros. Por exemplo, rutina (231, p. 289) é um fagoestimulante para *Spodoptera littoralis*, *S. exigua* e *S. exempta* nas concentrações entre 10^{-4} e 10^{-5} M mas em altas concentrações seu efeito é “deterrente” (SIMMONDS, 2003). Em cultivares de zoyagrass (*Zoysia* ssp) derivados glicosilados de luteolin estão relacionados com resistência da planta à *S. frugiperda* (ANDERSON *et al.*, 2007). SARKER *et al.* (2001) sugerem que compostos fenólicos podem influenciar no comportamento alimentar de herbívoros em espécies de *Eucalyptus*. A flavona C-metilada sideroxilina (232, p. 289) isolada de *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae) apresentou atividade antialimentar em *S. exigua*.

PEREIRA *et al.* (2002) observaram potente ação inseticida do flavonóide astilbina (44, p. 43), o qual provocou redução de peso na fase larval

e prolongamento das fases larval e pupal no ensaio por ingestão sobre *S. frugiperda*. Muitos flavonóides polihidroxilados e compostos fenólicos possuem efeito deterrente sobre os herbívoros (HARBONE, 1988 *apud* MULLIN *et al.*, 1991). Este efeito deterrente pode estar relacionado à capacidade dos compostos fenólicos em precipitar proteínas o que causa sensação adstringente. As ações inibitórias destes compostos fenólicos freqüentemente requerem tanto alta concentração quanto presença de grupos hidroxílicos na posição orto (MULLIN *et al.*, 1991). Esses compostos podem agir também como inibidores da digestão, dissuasores de consumo foliar, além de serem formadores de radicais livres. A inibição da digestão pode ocorrer devido à formação de pontes de hidrogênio, ou ainda devido à formação de ligações covalentes dos grupos fenólicos com proteínas e enzimas digestivas. No entanto, as condições alcalinas ($\text{pH} > 9$) do sistema digestivo de vários insetos podem inibir a formação das pontes de hidrogênio o que torna esse efeito menos provável de ocorrer devido à formação de fenolatos (APPEL, 1993).



Desta forma, decidiu-se estudar inicialmente a fração hidroetanólica por conter substâncias destas classes citadas acima e uma vez que em estudos anteriores deste gênero pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar não realizou-se estudo fitoquímico nas frações mais polares.

4.7.6 – Efeito das frações da partição hidroetanólica do extrato metanólico do caule (RCMH)

As frações da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp (item 3.6.6, p. 73) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.1 (p. 79).

Foram obtidas 12 frações (**A** a **L**) nas quais apresentaram resultados significativos nos ensaios em *S. frugiperda* em algumas delas conforme dados da TABELA 4.38 (p. 293) e GRÁFICO 4.14 (p. 294). Após incorporar na dieta artificial a fração **C**, verificou-se diminuição no peso das pupas de aproximadamente 17 mg e taxas de mortalidade na fase larval e ciclo total de 56,7 e 63,3%, respectivamente.

A fração **D** também apresentou taxas de mortalidade significativas na fase larval e ciclo total de desenvolvimento da *S. frugiperda* de aproximadamente 63,0 e 67,0%, respectivamente (TABELA 4.38, p. 293).

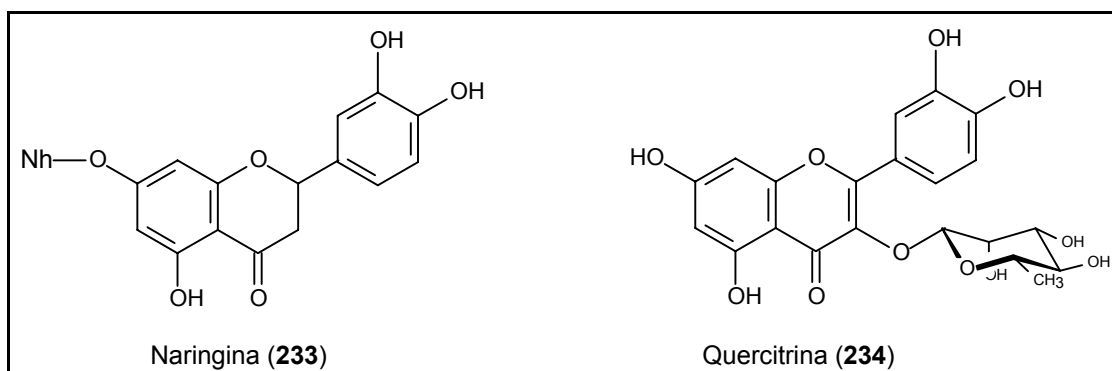
A fração **K** apresentou alongamento de fase larval de aproximadamente 5 dias seguido por uma diminuição do peso pupal de aproximadamente 26 mg e mortalidade de fase larval e ciclo total de desenvolvimento de 36,7 e 60,0%, respectivamente (TABELA 4.38, p. 293).

Nas frações **B**, **C**, **D**, **G** e **K** foram identificados flavonóides glicosilados: apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside (**X**, fração **B**, p. 151); apigenina 6-C- glucosil-8-C-neohesperidoside (**XI**, fração **C**, p. 167); 2"-O-raminosilvitexina (**XII**, fração **D_H**, p. 178); isovitexina (**XIII**, fração **K**, p. 189); vitexina (**XIV**, fração **K**, p. 197); e as flavonas glicosiladas (**XV** a **XXII**, p. 209 a 255) isoladas da fração **G** (**G1** a **G5**) conforme descrito no item 3.6.6 (p. 73).

De acordo com SIMMONDS (2001), compostos fenólicos ingeridos podem ser tolerados ou detoxificados dependendo dos níveis de antioxidantes, de enzimas monoxigenase e esterase do citocromo P450 presentes nos insetos e do pH do intestino. As enzimas do citocromo P450 são as mais numerosas envolvidas na biossíntese de compostos. Os flavonóides glicosilados com o esqueleto básico da quercetina (**93**, p. 136) ao serem

ingeridos por alguns insetos têm a ligação glicosídica hidrolisada. A quercetina (93, p. 136) liberada na hidrólise pode inibir a enzima mitocondrial ATPase e oxidases de função mista (MFO) dependentes do citocromo P450 destes insetos explicando o efeito deterrente que causam no desenvolvimento de larvas de *S. litura*. Os níveis de MFO aumentam com o grau de desenvolvimento de larvas, desta forma as larvas são mais susceptíveis nos seus estágios iniciais, quando não teriam quantidade de MFO suficiente para detoxificar a quercetina. Mas esta atividade é específica. A *S. eridania* e *S. litorallis* (polífagas) não sofrem influência destes flavonóides no seu comportamento alimentar, enquanto que a *S. exempta* (oligófaga) sofre deterrência causada por vários deles.

Segundo YU e ABO-ELGHAR (2000) flavonas, flavonol, flavanona e flavanonol são potentes inibidores das glutionas S-transferases (GSTs) com exceção da flavona (66, p. 49) e da naringina (233, p. 291). As GSTs são enzimas que participam da detoxificação inseticida nos lepidópteros, por exemplo, *S. frugiperda*, além de metabolizarem vários aleloquímicos tóxicos incluindo compostos carbonílicos α,β -insaturados (por exemplo, trans-cinamaldeído), isotiocianatos (ex., alil isotiocianato) e organotiocianato (ex., benziltiocianato). Os valores de I_{50} foram de $8,2 \times 10^{-7}$ a $2,1 \times 10^{-4}$ M e dentre os flavonoides testados apigenina (56, p. 47) foi o melhor inibidor (I_{50} 0,82 μ M). Foram testados também a quercetina (93, p. 136) (I_{50} 2,4 μ M), luteolina (57, p. 47) (I_{50} 5,5 μ M) e quercitrina (234, p. 291) (I_{50} 24 μ M), dentre outros.



MULLIN *et al.* (1991) relatam que ocasionalmente os mesmo compostos fenólicos que normalmente causam efeito inibitório podem para espécies de insetos adaptados ou devido à baixa concentração dos mesmos causar efeitos estimulantes o que explicaria o aumento do peso das pupas quando o esperado seria diminuição dos mesmos. Ao revisar processos oxidativos de compostos fenólicos, como por exemplo, flavonóides APPEL (1993) sugere que a oxidação dos grupos fenólicos para sistemas quinônicos sejam responsáveis, em alguns casos, por sua ação tóxica.

Diante dos dados de alta mortalidade na fase larval para as frações **C** e **D** e diminuição do peso pupal em relação ao controle pode-se supor que haja degradação dos tecidos do sistema digestivo destes insetos, com conseqüente diminuição da absorção de alimento e diminuição no ganho de peso durante seu desenvolvimento, sustentado pela hipótese de APPEL (1993). Vale ressaltar que trata-se de uma hipótese, para confirmá-la seriam necessários estudos com os sistema digestivo deste inseto, assim como também nas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* que apresentou alta taxa de mortalidade no ensaio por ingestão com frações nas quais identificou-se flavonóides.

Nas frações **G1** e **G2** foram isoladas as flavonas apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside), apigenina 6-C-(2''-O- α -L-arabinopiranosil-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside, vicenin-2, apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside, apigenina 6-C-glucosil-8-C-neohesperidoside; nas frações **G3** e **G4** as flavonas vicenin-2, apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucoside, apigenina 6-C-glucosil-8-C-neohesperidoside, neoisoschaftoside, neoschaftoside e traços de 2''-O-rhaminosil-vitexina e 2''-O-rhaminosil-isovitexina e na fração **G5** em quantidade majoritária 2''-O-rhaminosil-vitexina e 2''-O-rhaminosil-isovitexina conforme indicado na TABELA 4.19 (202) no item 4.5.9

TABELA 4.38: Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S.frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações da partição hidroetanólica do extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp.

Estágio Tratamento	Fase Larval		Peso (mg) (±EP)	Fase Pupal Duração (Dias) (±EP)	Ciclo Total Mortalidade (%) (±EP)
	Duração (Dias) (±EP)	Mortalidade (%) (±EP)			
Controle	18,7 ± 2,40 b	16,66 ± 8,16 b	218,00 ± 24,32 ab	9,5 ± 2,79 b	16,66 ± 8,16 b
A	18,47 ± 2,60 b	20,00 ± 0,00 b	217,34 ± 23,65 ab	11,86 ± 2,21 bc	23,33 ± 8,16 b
B	21,04 ± 3,91 a	20,00 ± 0,00 b	220,83 ± 33,27 ab	11,19 ± 1,40 ac	26,66 ± 10,32 b
C	19,61 ± 3,70 a	56,70 ± 15,05 a	200,92 ± 17,26 b	11,36 ± 1,36 ac	63,33 ± 15,05 a
D	19,72 ± 3,34 a	63,33 ± 15,05 a	211,09 ± 39,13 ab	11,11 ± 1,16 a	66,66 ± 16,33 a
E	17,18 ± 1,66 b	10,00 ± 10,95 b	225,40 ± 25,01 ab	10,32 ± 1,93 bc	20,00 ± 0,00 b
F	17,17 ± 1,24 b	6,66 ± 10,32 b	233,64 ± 20,12 a	9,16 ± 1,28 bc	20,00 ± 0,00 b
G	19,69 ± 2,91 b	26,67 ± 8,16 ab	219,78 ± 28,33 a	9,95 ± 1,22 b	40,0 ± 12,64 bc
H	17,79 ± 3,18 bc	20,00 ± 0,00 b	210,12 ± 21,61 ab	10,35 ± 1,84 ab	36,66 ± 15,05 b
I	20,36 ± 3,78 ab	16,67 ± 5,16 b	208,92 ± 21,90 a	10,56 ± 1,23 ac	30,0 ± 16,73 bc
J	21,41 ± 3,30 ab	3,33 ± 2,58 bc	209,31 ± 27,11 a	11,37 ± 1,47 a	10,0 ± 6,32 bc
K	23,10 ± 2,92 a	36,67 ± 13,67 a	191,89 ± 38,79 b	11,25 ± 1,96 ab	60,0 ± 12,64 a
L	19,07 ± 2,96 b	13,34 ± 5,16 bc	230,42 ± 20,01 a	11,69 ± 1,63 a	30,0 ± 10,95 bc

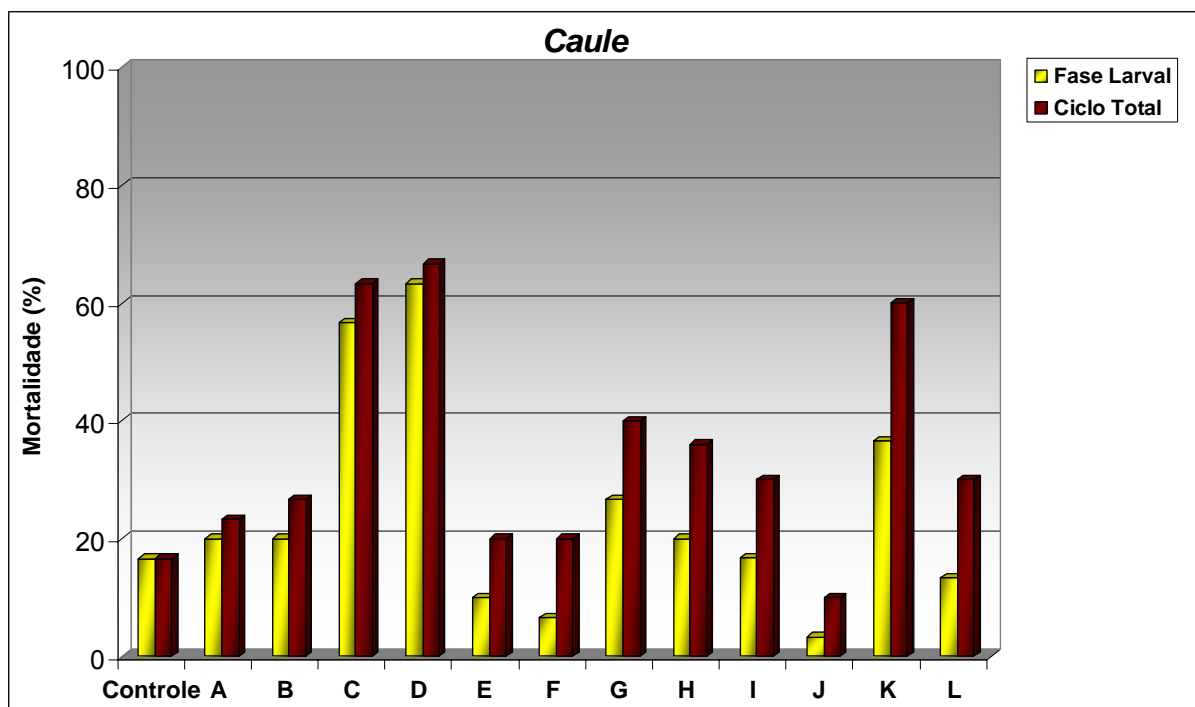


GRÁFICO 4.14: Médias da mortalidade da fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações da partição hidroetanólica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp. Temp.: 25 ± 1 °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12H.

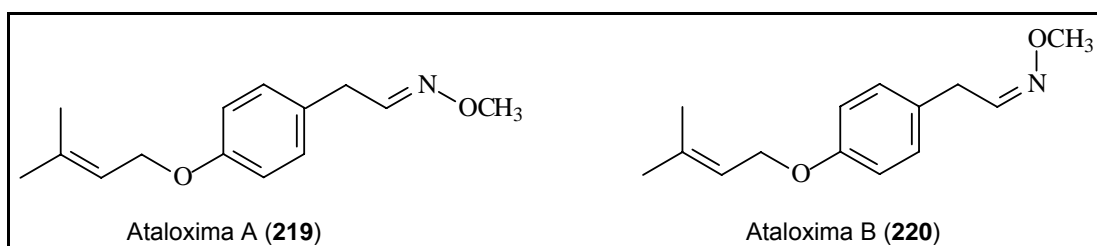
4.8 – Efeito de *Rauia* sp em *Spodoptera frugiperda* nos ensaios por toxicidade aguda

4.8.1 – Efeito dos extratos brutos

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico de folhas e caule de *Rauia* sp foram ensaiados sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.2 (p. 79). Comparando-se os resultados obtidos através dos ensaios com os extratos brutos de folhas com o controle (acetona 100%), na concentração de 10 mg/mL, com dose média de 9,91 µg/mg por larva, conclui-se que houve respostas significativas uma vez que os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico tiveram mortalidades de aproximadamente 40, 25 e 20%, respectivamente (TABELA 4.39 e GRÁFICO 4.15, p. 296).

Com relação aos resultados obtidos nos experimentos com extratos brutos de caule também houve respostas significativas comparando-se ao controle. O extrato diclorometânico obteve uma mortalidade mais alta (29,6%), seguida pelo extrato hexânico (25,5%) (TABELA 4.39, p. 296).

Há poucos trabalhos na literatura que descrevem ensaios em *Spodoptera* utilizando esta metodologia, sendo que ensaio com este gênero não há nenhum relato. BACHER *et al.* (1999) observaram que oximas ataloxima A (**225**, p. 295) e B (**226**, p. 295) isoladas de *Atalantia ceylanica* (Rutaceae) apresentaram pronunciada mortalidade no ensaio por contato tópico em larvas no quarto ínstar em contraste com inatividade apresentada quando administrada oralmente. Destes o mais ativo foi ataloxime B [LC₅₀ de 0,44 .µg cm⁻² (1,9 nmol cm⁻²)].



BATISTA-PEREIRA *et al.* (2006) utilizou esta metodologia para avaliar a atividade biológica de onze amidas sobre larvas *S. frugiperda* no segundo ínstar. A mortalidade foi verificada após 48 h de contato com as amidas nas concentrações 0,1; 10; 50 e 100 mg mL⁻¹ cuja dose final por larva foi 4. 10⁻², 4. 10⁻¹, 4, 40 e 4. 10². Das amidas testadas a que apresentou efeito mais potente foi *N*-[3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(*E*)-propenoil]piperidina (**235**, p. 295) com DL₅₀ por larva de 1,07 µg mg⁻¹.

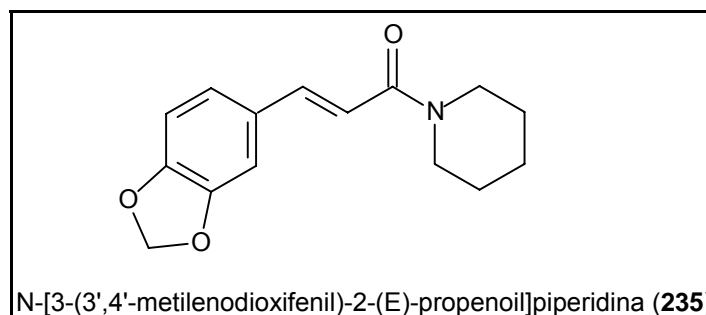


TABELA 4.39: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Mortalidade (%)
Controle (Acetona)	0,00 ± 0,00 c
Extrato hexânico (Folhas)	39,44 ± 4,10 a
Extrato hexânico (Caule)	25,50 ± 4,50 ab
Extrato diclorometânico (Folhas)	24,50 ± 4,27 b
Extrato diclorometânico (Caule)	29,66 ± 2,90 a
Extrato metanólico (Folhas)	20,55 ± 1,10 b
Extrato metanólico (Caule)	20,44 ± 0,98 b

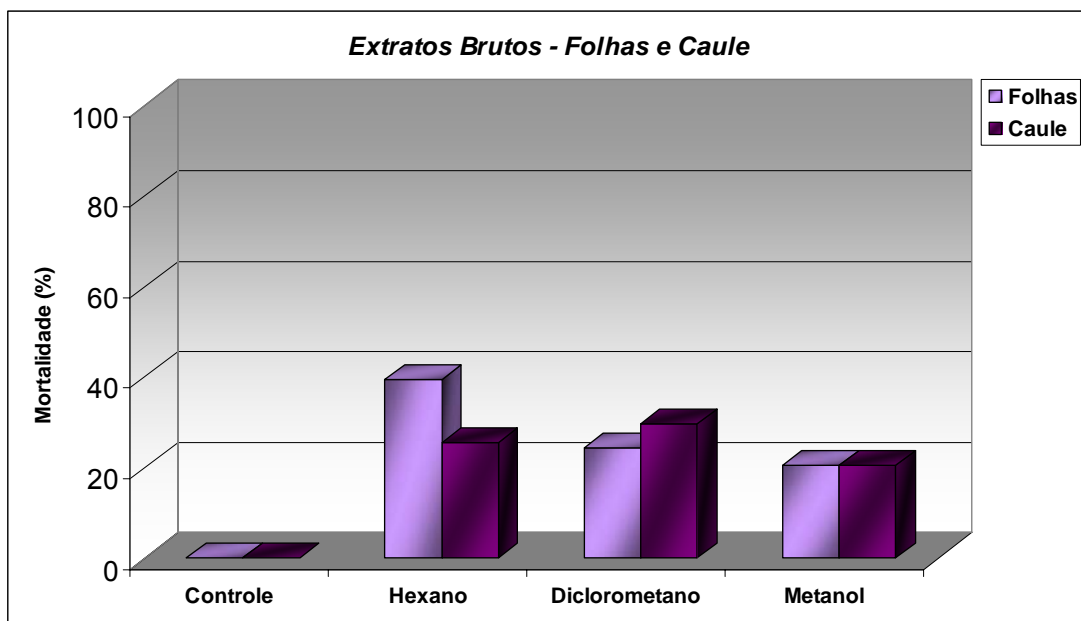


GRÁFICO 4.15: Médias da mortalidade do ensaio realizado com os extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL.

4.8.2 – Efeito das frações do extrato diclorometânico de folhas

As frações obtidas do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp (RFD, p. 61) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.2 (p. 79) na concentração de 10 mg/mL, com dose média de 10,62 µg/mg por larva.

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda das frações sobre *S. frugiperda* podem ser observados na TABELA 4.40 (p. 297) e no GRÁFICO 4.16 (p. 298). As frações **B** e **G** apresentaram os resultados mais significativos comparados ao controle (acetona 100%) com mortalidade de 20%.

Nos ensaios por ingestão realizados com as frações **D**, **E**, **F**, **G** obteve-se taxas de mortalidade significativas como descrito no item 4.7.3 (282). Desta forma pode-se concluir que os metabólitos secundários presentes nestas frações atuam com ação tóxica a *S. frugiperda*.

TABELA 4.40: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato diclorometânico de folhas de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Frações	Referente a:	Mortalidade (%)
Controle	Acetona 100%	0,0 ± 0,0 b
A	Hexano 100%	4,0 ± 5,47 b
B	Hexano : Acetato de Etila 7,5:2,5	20,0 ± 10,0 a
C	Hexano : Acetato de Etila 1:1	18,0 ± 4,47 a
D	Acetato de Etila 100%	12,0 ± 4,47 ab
E	Acetato de Etila : Acetona 1:1	10,85 ± 1,91 ab
F	Acetona 100%	12,0 ± 4,47 ab
G	Acetona : Metanol 1:1	20,0 ± 10,0 a
H	Metanol 100%	14,0 ± 11,4 a

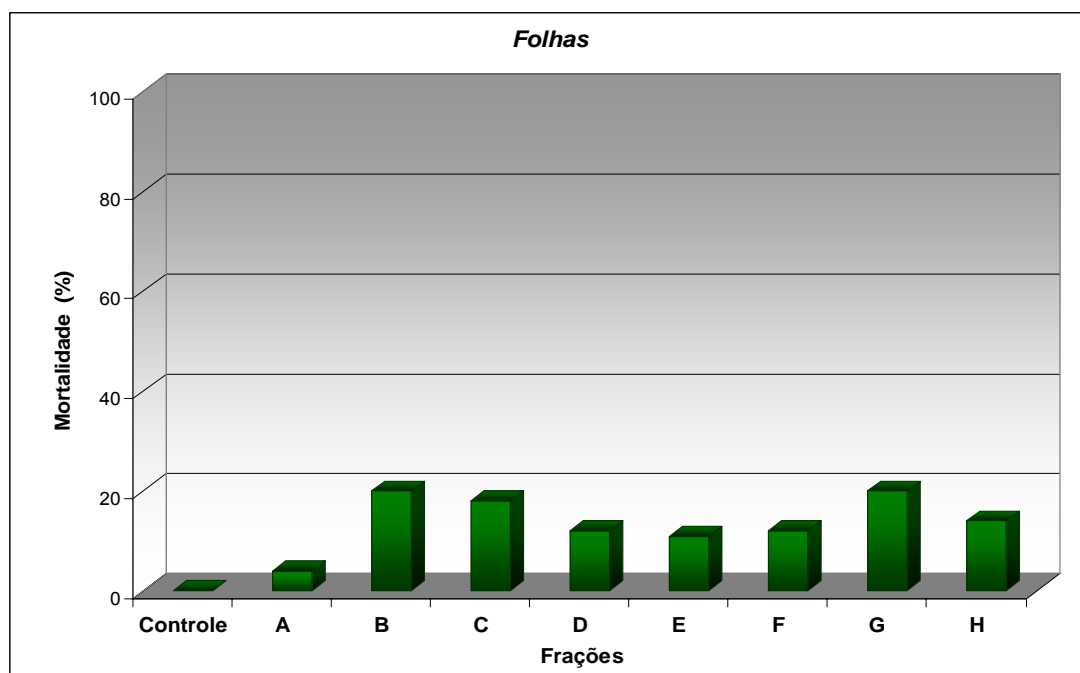


GRÁFICO 4.16: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato diclorometânico de folhas de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL.

4.8.3 – Efeito das frações do extrato diclorometânico do caule

As frações obtidas do extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp (RCD, p. 67) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.2 (p. 79). Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda das frações sobre *S. frugiperda* podem ser observados na TABELA 4.41 e no GRÁFICO 4.17 (p. 299).

Verificou-se que os resultados obtidos com as frações na concentração de 10 mg/mL, com dose média de 8,06 µg/mg por larva, foram satisfatórios quando comparados ao controle. A fração I apresentou mortalidade de 29,81% e 24,07 % para a fração H (TABELA 4.41 e GRÁFICO 4.17, p. 299).

Estas frações foram ensaiadas apenas por esta metodologia devido à massa necessária para o ensaio por ingestão (300 mg de cada fração). As taxas de mortalidade apresentadas no item 4.7.2 (p. 278) para o extrato bruto diclorometânico do caule no ensaio por ingestão não diferem muito das taxas de mortalidade observadas no ensaio por toxicidade aguda, sendo estas de aproximadamente 40 e 30 %, respectivamente.

TABELA 4.41: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato diclorometânico do caule de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Frações	Referente a:	Mortalidade (%)
Controle	Acetona 100%	3,33 ± 5,77 a
C	Hexano : Acetato de Etila 1:1	7,87 ± 6,85 a
D	Acetato de Etila 100%	10,37 ± 0,64 a
E	Acetato de Etila : Acetona 7,5:2,5	13,70 ± 5,48 ab
F	Acetato de Etila : Acetona 1:1	18,51 ± 16,97 ab
G	Acetona 100%	17,03 ± 5,13 ab
H	Acetona : Metanol 1:1	24,07 ± 5,25 ab
I	Metanol 100%	29,81 ± 12,91 b

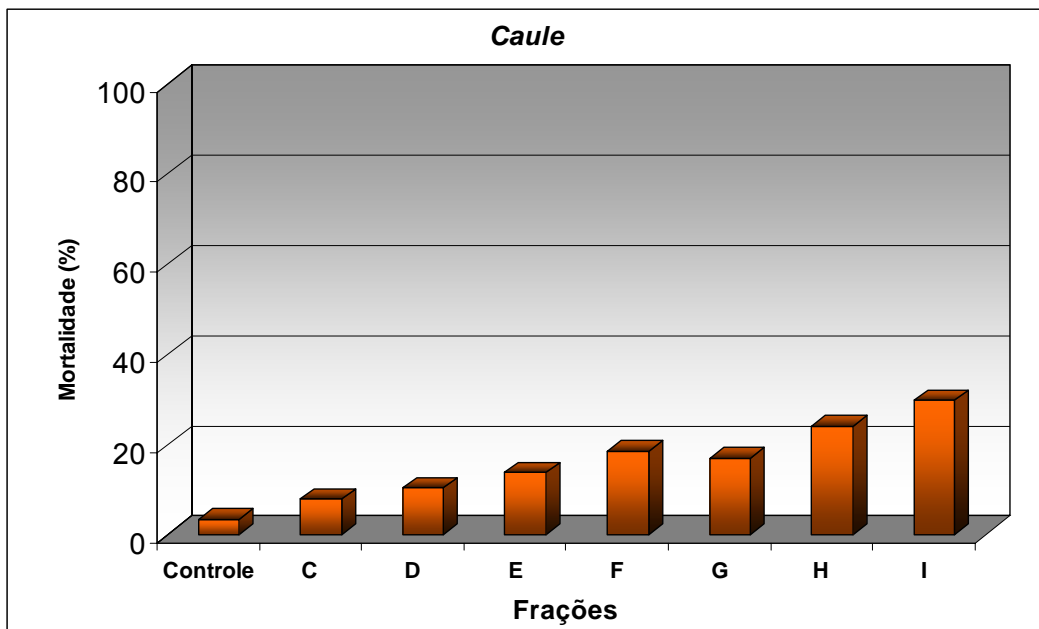


GRÁFICO 4.17: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato diclorometânico de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL.

4.8.4 – Efeito das frações do extrato metanólico de folhas e caule

Comparando-se os resultados obtidos através dos ensaios com as frações do extrato bruto metanólico de folhas (RFM, p. 66) e caule (RCM, p. 71) com o controle (acetona 100%), na concentração de 10 mg/mL, com dose média de 10,38 µg/mg por larva, verificou-se que a fração diclorometânica do caule apresentou mortalidade mais alta (64%) como mostra a TABELA 4.42 e o GRAFICO 4.18 (p. 301).

A taxa de mortalidade apresentada por esta fração no ensaio por ingestão foi menos significativa (33,33%) como descrito no item 4.7.5 (p. 287). Sendo assim verificam-se modos de ação diferenciados para as frações do caule e folhas nas duas metodologias testadas.

Com relação aos resultados obtidos nas outras frações houve também respostas significativas comparando-se ao controle. A fração acetato de etila do caule provocou mortalidade de 20,0%, seguida pela fração hidroetanólica das folhas com 16,66% e a fração diclorometânica das folhas com 15% (TABELA 4.42, p. 301).

As frações obtidas do extrato bruto metanólico de folhas e caule de *Rauia* sp foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, conforme a metodologia descrita no item 3.7.2.2 (p. 79).

TABELA 4.42: Resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado com as frações do extrato metanólico de folhas e caule de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Mortalidade (%)
Controle (Acetona)	0,00 ± 0,00 c
Fração diclorometânica (Folhas)	15,0 ± 4,10 b
Fração diclorometânica (Caule)	64,0 ± 5,47 a
Fração acetato de etila (Folhas)	8,0 ± 4,47 bc
Fração acetato de etila (Caule)	21,0 ± 3,1 b
Fração metanólica (Folhas)	16,66 ± 5,77 b
Fração metanólica (Caule)	9,4 ± 0,9 bc

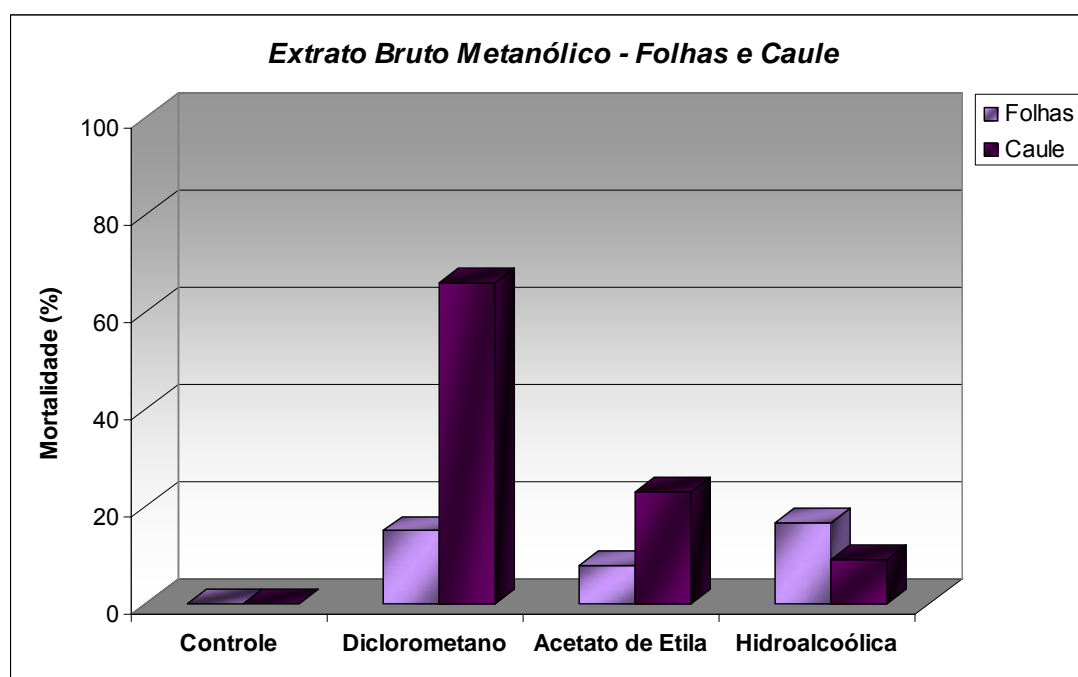


GRÁFICO 4.18: Médias da mortalidade dos ensaios realizados com as frações do extrato metanólico de folhas e do caule de *Rauia* sp na concentração de 10 mg/mL.

5 – CONCLUSÃO

5 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Rauia* sp proporcionou o isolamento e identificação de 3 esteróides, 1 sesquiterpeno, 3 cumarinas, 1 ácido graxo, 1 alcalóide e 13 flavonóides glicosilados.

O sesquiterpeno clovane-2 β ,9 α -diol e os flavonóides glicosilados apigenina 6-C-neohesperidosil-8-C-glucopiranoside, apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside, 2''-O-raminosil-vitexina, 2''-O-raminosil-isovitexina, vitexina, isovitexina, apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranoside), apigenina 6-C-(2'''-O- α -L-arabinopiranosil-glucopiranosil)-8-C- β -D-glucopiranoside, vicenin-2, schaftoside, neoschaftoside, isoschaftoside e neoisoschaftoside estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Rauia*.

Os ensaios realizados com os extratos brutos do caule e das folhas de *Rauia* sp sobre *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que os tratamentos mais ativos foram o extrato bruto metanólico de folhas e o extrato bruto diclorometano do caule, sendo que o extrato diclorometano apresentou o resultado mais significativo com Md (sobrevivência mediana das operárias de *A. sexdens rubropilosa*) de 2 dias e 100 % de mortalidade no décimo dia do experimento.

Das frações do extrato diclorometano ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* a que apresentou resultado de atividade inseticida mais significativo foi RCDd (4) com 100% de mortalidade no 21º dia, com sobrevivência mediana (Md) das operárias no 5º dia de experimento. Na fração RCDd (4) identificou-se a presença das cumarinas rauianina (**V**), diacetato de murrangatina (**VI**) e murralongina (**IX**), alcalóide zantodiolina (**VIII**) e o ácido hexadecanóico (**VII**). Visto que há relatos na literatura da atividade inseticida das classes identificadas (cumarinas e alcalóides) sobre a formiga cortadeira pode-se propor que a atividade desta fração esteja relacionada com a presença destes compostos na mesma.

No ensaio realizado com a fração **G** e as respectivas subfrações (1 a 5) observou-se que as subfrações **G3** e **G4** possuem as mais altas atividades inseticidas, 98 e 100% de taxa de mortalidade respectivamente; e ação sobre a sobrevivência média das formigas cortadeiras com 50% de mortalidade no 3º dia

para os dois tratamentos enquanto que o controle apresentou mortalidade de 56% no 25° e sobrevivência média de 20 dias das operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Nestas frações (**G3** e **G4**) foram identificadas flavonas di-C-glicosiladas sendo uma pentose e uma hexose, os quais foram mais tóxicas para as formigas cortadeiras que as outras flavonas presentes nas frações **G**. Com estes resultados verifica-se que os flavonóides podem atuar de forma a controlar a população de saúvas. No entanto, são necessários outros ensaios para que os mesmos sejam efetivamente utilizados como inseticidas para formigas cortadeiras.

Nos ensaios realizados com os extratos brutos do caule e das folhas de *Rauia* sp sobre *Spodoptera frugiperda* os tratamentos que mostraram os melhores resultados foram os realizados com os extratos brutos de folhas, na qual o ensaio com o extrato diclorometano trouxe um alongamento da fase larval e apresentou mortalidade de 83,3%. No tratamento com o extrato metanólico ocorreu uma diminuição do peso pupal e também uma mortalidade no ciclo total de 80% com o extrato hexânico.

As frações do extrato bruto diclorometânico das folhas de *Rauia* sp foram ensaiadas sobre *S. frugiperda*, sendo que a fração **D** foi a mais ativa e na qual foram identificadas as presenças de ácidos graxos e esteróides.

As frações da partição hidroalcoólica do extrato bruto metanólico do caule (**A** a **L**) foram ensaiadas sobre a *S. frugiperda*, cujos resultados mais significativos foram os obtidos com as frações **C** e **D**, com taxas de mortalidade no ciclo total de desenvolvimento de 63,3 e 67,0%, respectivamente. Na fração **C** identificou-se o flavonóide glicosilado apigenina 6-C-glucopiranosil-8-C-neohesperidoside (**XI**) e na fração **D** a 2"-O-raminosil-vitexina (**XII**). Estes dados são muito interessantes, uma vez que estas duas flavonas possuem uma unidade neohesperidose na posição C-8 da aglicona. Vale ressaltar que esta é uma observação inicial e mais estudos são necessários para uma efetiva conclusão sobre a relação estrutura-atividade das flavonas glicosiladas sobre *S. frugiperda*.

Os ensaios por toxicidade aguda sobre *S. frugiperda* foram realizados com os extratos brutos, com as frações do extrato diclorometano e com as frações do extrato metanólico de folhas e caule os quais não apresentaram altas taxas de

mortalidade. Sendo assim verificam-se modos de ação diferenciados para os extratos e frações nas duas metodologias testadas.

Pode-se concluir também que as frações do extrato bruto diclorometano do caule apresentaram resultados significativos sobre as formigas cortadeiras enquanto que sobre a lagarta-do-cartucho do milho foi o extrato bruto diclorometano das folhas. Os extratos brutos em geral possuem o mesmo perfil, ou seja, os extratos orgânicos do caule foram mais ativos sobre *A. sexdens rubropilosa* e os extratos orgânicos das folhas sobre *S. frugiperda*, possivelmente indicando modos de ações diferentes entre os insetos e novos estudos devem ser realizados para comprovar esta observação.

Não foi possível completar o estudo de todas as frações obtidas e desta forma não foram identificados e ensaiados todos os metabólitos secundários das diferentes partes da espécie em estudo.

O estudo fitoquímico biomonitoriado por ensaio biológico realizado neste trabalho contribuiu para a descoberta da atividade biológica de algumas frações e substâncias, mostrando ser uma ferramenta muito importante para a descoberta de compostos ativos para controlar insetos praga.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ELGHAR, G. E.; YU, S. J. Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **68**: 173-183, 2000.
- ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; TORKOMIAN, V. L. V.; DE GROOTE, S. T. C.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. G. F.; Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera: Formicidae) and to the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Pest Management Science*, **60**: 933-938, 2004.
- ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicidade de extratos foliares de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **41**: 239-243, 1998.
- ADDOR, R. W. "Insecticides." IN: GODFREY, C. R. A. (Ed.). *Agrochemicals from natural products*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 1-62.
- AGRAWAL, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier Sc. Publishers, Amsterdam: 444 p, 1989.
- ALBARICI, T. R. "Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllu* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2006. Tese de doutorado. 182 p.
- ALMEIDA, R. N. A., PENAFLORE, M. F. G., SIMOTE, S. Y., BUENO, O. C., HEBLING, M. J. A., PAGNOCCA, F. C., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., SILVA, M. F. DAS G. F. "Toxicity of Substances Isolated from *Heliopsis scabra* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller". *BioAssay*, **2**: 1-7, 2007.
- ALMEIDA, S. S. M. S. "Estudo Químico de Plantas com Atividade Inseticida sobre Insetos Sociais". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCAR, 2007. Tese de Doutorado. 277 p.
- AMANTE, E. Preliminary observation on the swarming behavior of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of the Georgia Entomological Society*, 1972.
- ANDERSON, W. F.; SNOOK, M. E.; JOHNSON, A. W. Flavonoids of Zoysiagrass (*Zoysia* spp.) Cultivars Varying in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) Resistance. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 1853-1861, 2007.
- ANDRADE, A. P. "Comportamento forrageiro e aprendizado de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera: Formicidae) em condições de

- campo e laboratório.*” Tese (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.
- ANDRADE, A. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiotic fungus culture. *Sociobiology*, **40**: 293-506, 2002.
- ANGELI-PAPA, J. La culture d’un champion par les fourmis Attines. *Cryptog. Micol.*, **5**: 147-154, 1984.
- APPEL, H. M. Phenolics in Ecological Interactions: The Importance of Oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, **19**: 1521-1552, 1993.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp – Hymenoptera: Formicidae) IV – O saúveiro depois da revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arq. Inst. Biol.*, **18**: 39-70, 1947.
- AUTORI, M. Longevidade de uma colônia de saúva (*Atta sexdens rubripilosa* Forel, 1903) em condições de laboratório. *Ciência e Cultura*, **2**: 285-286, 1950.
- BACHER, M., BRADER, G., HOFER, O., GREGER, H. Oximes from seeds of *Atalantia ceylanica*. *Phytochemistry*, **50**: 991-994, 1999.
- BAKIK, B. R.; DEY, A. K.; DAS, P. C.; CHATTERJEE, A.; SHOOLERY, J. N. Coumarins of *Murraya exotica* – Absolute Configuration of Auraptanol. *Phytochemistry*, **22**: 792-794, 1983.
- BAKIK, B. R.; KUNDU, A. B. A Cinnamic Acid Derivative and a Coumarin From *Murraya exotica*. *Phytochemistry*, **26**: 3319-3321, 1987.
- BASS, M. e CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entom.*, **20**: 1-6, 1995.
- BATISTA, M. P. e GOMES, E. T. C-Glycosyflavones from *Ceratonia siliqua* cotyledons. *Phytochemistry*, **34**: 1191-1193, 1993.
- BATISTA-PEREIRA, L. G., PETACCI, F., FERNANDES, J. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. G. F.; MALASPINA, O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. *Pest. Manag. Sci.*, **58**: 503, 2002.
- BATISTA-PEREIRA, L. G., CABRAL, T. C., SILVA, M. T. M., AMARAL, B. R., FERNANDES, J. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. G. F., Correa, A. G. Insecticidal activity of Synthetic of Amides on *Spodoptera frugiperda*. *Z. Naturforsch.*, **61**: 196-206, 2006.
- BECCHI, M.; FRAISSE, D. Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-activated Dissociation/Mass-analysed Ions Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **18**: 122-130, 1989.
- BERDEGUÉ, M.; WHITE, K. K.; TRUMBLE, J. Feeding Deterrence of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae by Low Concentrations of Linear Furanocoumarins. *Physiological and Chemical Ecology*, **26**: 912-919, 1997.

- BEREMBAUM, M. Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science*, **201**: 532-534, 1978.
- BESSON, E.; CHOPIN, J.; MARKHAM, K. R.; MUES, R.; WONG, H.; BOUILLANT, M. Identification of neoschaftoside as 6-C- β -D-Glucopyranosyl-8-C- β -L-Arabinopyranosylapigenin. *Phytochemistry*, **23**: 159-161, 1984.
- BESSON, E.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J.; MARKHAM, K. R.; WONG, H.; KIM, M.; KOH, H.; FUKAMI, H. C-Glycosylflavones from *Oryza sativa*. *Phytochemistry*, **24**: 1061-1064, 1985.
- BESTMANN, H. J.; ÚBLER, E.; HOLDOBLER, B. Pheromones. Part 107. First biosynthetic studies on trail pheromones in ants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**: 395-397, 1997.
- BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VICTOR, R. S.; PAGNOCCA, F. C.; DE ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I.; SCHPECTOR, J. Z. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersianmine. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**: 66-70, 2002.
- BIAVATTI, M. W.; WESTERLON, R.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; PENAFLORE, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxid-fraxinellone. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 1443-1447, 2005.
- BOARETTO, M, A. C. e FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997.
- BOARETTO, M, A. C.; FORTI, L. C.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B. Seletividade de *Atta capiguara* Gonçalves e *Atta bisphaerica* Forel, 1908, (Hymenoptera, Formicidae) por iscas granuladas contendo extratos orgânicos de gramíneas, em campo. *Naturalia*, **24**: 179-181, 1999a.
- BOARETTO, M, A. C.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B. Seletividade de *Atta capiguara* Gonçalves e *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera, Formicidae) por iscas granuladas contendo extratos orgânicos de gramíneas, em campo. *Naturalia*, **24**: 175-177, 1999b.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; AHMED, M.; WALLMEYER, M.; ROBINSON, H. E.; KING, R. M. Labdane derivatives from *Hemizonia* species. *Phytochemistry*, **20**: 2383-2387, 1981.
- BOLTON, B. *A New General Catalogue of the Ants of the World*. Cambridge, Harvard University Press. p. 504, 1995.
- BOUAZIZ, M.; SIMMONDS, M. S. J.; GRAYER, R. J.; KITE, G. C.; DAMAK, M. Flavonoids from *Hyparrhenia hirta* Stapf (Poaceae) growing in Tunisia. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 849-851, 2001.
- BOUILLANT, M. L.; ARCE, F. F.; FAVRE-BONVIN, J.; CHOPIN, J.; ZOLL, A.; MATHIEU, G. Structural Determination of 6-C-didlycosyl-8-C-GlycosylFlavones

- and 6-C-Glucosyl-8-C-diglycosylflavones by mass spectrometry of their permethyl Ethers. *Phytochemistry*, **23**: 2653-2657, 1984.
- BOYCE, A. M. "Insecticide synergism". IN: METCALF, R. L.; MCKELVEY Jr., J. J. (Eds). *The future of insecticides. Needs and prospects*. New York: John Willey & Sons, p. 524. 1974.
- 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*. **38**: 635-650, 2001.
- BUENO, F. C.; GODOY, M. P.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Cedreia fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. *Sociobiology*, **45**: 389-399, 2005.
- BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; CASTRO, S. L. R.; SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C.; MORINI, M. S. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. "Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus." IN: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. *Applied myrmecology: a world perspective*. San Francisco and Oxford: Westview Press, Boulder, 1990. p. 420-423.
- BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O.A.; MATENHAUER, A. M. C. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hym., Formicidae). *J. App. Entom.*, **119**: 341-343, 1995.
- BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O.A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial. *An. Soc. Entomol. Brasil*. **26**: 107, 1997.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BROCHINI, J.; SINHORI, K.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F.C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Activity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, **44**: 511-518, 2004a.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BROCHINI, J.; SINHORI, K.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Toxicity of sesame extracts to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, **44**: 599-606, 2004b.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; DINIZ, E. A.; SCHNEIDER, M. O. "Utilização de alimento pelas formigas-cortadeiras." IN: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. O.; LINO-NETO, J.; (Eds.). *Insetos Sociais: da biologia à aplicação*. Viçosa, MG. Editora UFV p.97-114, 2008.

- BUTTERWORTH, J. H. e MORGAN, E. D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 23-24, 1968.
- CAASI-LIT, M. T., TANNER, G. J., NAYUDU, M.; WHITECROSS, M. I. Isovitexin-2'-O-β-[6- O-E-p-coumaroylglucopyranoside] from UV-B irradiated leaves of rice, *Oryza sativa* L. inhibits fertility of *Helicoverpa armigera*. *Photochem. and Photob.*, **83**: 1167-1173, 2007.
- CAFARO, M. J. e CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Can. J. Microbiol.*, **51**: 441-446, 2005.
- CALCAGNO, M. P., COLL, J., LLORIA, J., FAINI, F., ALONSO-AMELOT, M. E. "Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*". *J. Chem. Ecol.*, **28**: 175-191, 2002.
- CARISTI, C., BELLOCCO, E., PANZERA, V., TOSCANO, G., VADALA, R., LEUZZI, U. "Flavonoids Detection by HPLC-DAD-MS-MS in Lemon Juices from Sicilian Cultivars". *J. Agric.Food Chem.*, **51**: 3528-3534, 2003.
- CARISTI, C., BELLOCCO, E., GARGIULLI, C., TOSCANO, G., LEUZZI, U. "Flavone-di-glycosides in citrus juices from Southern Italy". *Food Chemistry*, **95**: 431-437, 2006.
- CARNAT, A.; CARNAT, FRAISSE, D.; LAMAISON, J. Violarveensiin, a New Flavone Di-C-glycoside from *Viola arvensis*. *Journal of Natural Products*, **61**: 272-274, 1998.
- CARSON, R. *Primavera silenciosa*. Lisboa: Editorial Pórtico, (do original Silent spring, copyright), 1962. p. 359.
- CÉSPDES, C. L.; TORRES, P.; MARÍN, J. C.; ARCINIEGAS, A.; VIVAR, A. R.; PÉREZ-CASTORENA, A.; ARANDA, E. Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytochemistry*, **65**: 1963-1975, 2004.
- CÉSPDES, C. L.; SALAZAR, J. R.; MARTÍNEZ, M.; ARANDA, E. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*, **66**: 2841-2493, 2005.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. N. H. Biological activity of limonoids from Rutales. *Phytochemistry*, **31**: 377-394, 1992.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, **266**: 1691-1694, 1994.
- CHEN, I; TSAI, I.; THENG, C.; CHEN, J.; CHANG, Y.; KO, F.; LU, M.; PEZZUTO, J. Pyranoquinoline Alkaloids From *Zanthoxylum Simulans*. *Phytochemistry*, **46**: 535-529, 1997.

- CHERRETT, J. M. "The economic importance and control of leaf-cutting ants". IN: VINSON, B. (Ed.). *Economic impact and control of social insects*. New York: Praeger Publishers, p.165-190, 1986.
- CHOPIN, J.; DELLAMONICA, G.; BESSON, E.; SKRZYPCZAKOWA, L.; BUDZIANOWSKI, J.; MABRY, T. J. C-Galactosylflavones from *Polygonatum multiflorum*. *Phytochemistry*, **16**: 1999-2001, 1977.
- CHOU, J. e CHRISTOPHER, A. M. Distribution and Antifeedant Associations of Sesquiterpene Lactones in Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus L.*) on Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera LeConte*) *Bull. Journal of Chemical Ecology*, **19**: 1439-1453, 1993.
- CINTRA, P.; BUENO, F. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*, **45**: 347-353, 2005.
- CONNOLLY, J. D. "Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae." IN: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (Eds.). *Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales*. London: Academic Press, 1983, p. 175-211.
- CORRÊA, A. G. e SANT'ANA, J. "Fundamentos da comunicação química entre os insetos". IN: FERREIRA, J. T.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. *Produtos Naturais no controle de insetos*. São Carlos. Editora UFSCar, p. 9-19, 2001.
- COSTA, E. L. N., SILVA, R. F. P., FIÚZA, L. M., Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol. Leopoldensia*, **26**: 173-185, 2004.
- COSTA, J. M. D. A.; SANTOS, Z. F. A. F.; CORREIA, J. S., *Pragas da cultura do milho e meios de controle*. (EPABA, Circular Técnica nº 8). Salvador: EPABA. **19**, 1984.
- CROMBIE, L. Rotenoids and their biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, **1**: 3-19, 1984.
- CROMBIE, L. (Ed.). *Recent advances in the chemistry of insect control II*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1990. p. 296.
- CRONQUIST, A. J. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, NY. 1262 p. 1981
- CRONQUIST, A. J. *The evolution and classification of flowering plants*. 2nd. ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 1988.
- CROSBY, D. G. "Minor insecticides of plant origin." IN: JACOBSON, M.; CROSBY, D. G. (Eds.). *Naturally occurring insecticides*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., p. 177-178. 1971.
- CRUZ, I., *A lagarta-do-cartucho na cultura do milho*. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. (EMBRAPA-CNPMS, Circular técnica, n.21). 45p, 1995.
- CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M., *Cultivo do milho: pragas da fase vegetativa e reprodutiva*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS (EMBRAPA/CNPMS. Comunicado Técnico, n. 49). 8p. 2002.

- CRUZ, I.; SANTOS, J. P.; OLIVEIRA, A. C. Competição de inseticidas visando o controle químico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em milho. *Anais Soc. Entom. Brasil*, Jaboticabal, **12**: 235-242, 1983.
- CRUZ-LANDIM, C. e MORAES, R. L. M. Eletron microscopic study of flight muscle degeneration in queens of *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Cytobios*, **24**: 23, 1979.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCK, D. Fungus-growing ants use antibiotics-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, **398**: 701-704, 1999.
- CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**: 357-380, 2001.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, **299**: 386-388, 2003.
- CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MANDENHALL, J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, **311**: 81-83, 2006.
- CUYCKENS, F.; ROZEMBERG, R.; HOFFMANN, E.; CLAEYS, M. Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **36**: 1203-1210, 2001.
- CUYCKENS F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.*, **39**: 1-15, 2004.
- DAS, S.; BARUAH, R. H.; SHARMA, R. P.; BARUA, J. N.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. 7-methoxycoumarins From *Micromelum Minutum*. *Phytochemistry*, **23**: 2317-2321, 1984.
- DBO AGROTECNOLOGIA. Jacto: 60 anos de valores e tecnologia. Ano 4: **14**, 2008.
- DELLA LUCIA, T. M. C. e VILELA, E. F. "Métodos atuais de controle e perspectivas." IN: *As formigas cortadeiras*. DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p. 163-176, 1993.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; MOREIRA, D. D. O. "Feromônios de formigas pragas." IN: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds) *Feromônios de insetos*. Ribeirão Preto, SP: Holos, p. 73-82, 2001.
- DELLA LUCIA, T. M. C. "Hormigas de importancia econômica em la región Neotropical". IN: FERNÁNDEZ, F. (Eds). *Introducción a las hormigas de la región neotropical*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 337-349, 2003.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R. "Perspectivas no manejo de formigas cortadeiras". IN: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.;

- SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. O.; LINO-NETO, J.; (Eds.). *Insetos Sociais: da biologia à aplicação*. Viçosa, MG. Editora UFV p. 370-380, 2008.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons, 2ª ed., 507 p., 2001.
- DINIZ, E. A. “Comportamentos de preparação do substrato vegetal e cuidado com a rainha de *Atta sexdens*.” Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- DJOUKENG, J. D.; ARBONA, V.; ARGAMASILLA, R.; GOMEZ-CADENAS, A. Flavonoid Profiling in Leaves of Citrus Genotypes under Different Environmental Situations. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 11087-11097, 2008.
- DOYAMA J. T.; RODRIGUES H. G.; NOVELLI E. L. B.; CEREDA E.; VILEGAS W. Chemical investigation and effects of tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of ethnopharmacology* **96**: 371-374. 2005.
- DOW AGROSCIENCES. *Controle de formigas cortadeiras*. Folheto, 1998.
- DUBOIS, J.; MABRY, T. J. The C-Glycosylflavonoids of Flax, *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry*, **10**: 2839-2840, 1971.
- DUBOIS, M.; ZOLL, A.; BOUILLANT, M.; CHOPIN, J. New C-Glycosylflavones from *Cerastium arvense*. *Phytochemistry*, **21**: 1141-1143, 1982.
- DUBOIS, M. e ZOLL, A.; MARKHAM, K. R.; BOUILLANT, M. L.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. 6-C-β-D-Glucopyranosyl-8-C-β-D-Galactopyranosylapigenin from *Cerastium arvense*. *Phytochemistry*, **23**: 706-707, 1984.
- EL-MOUSALLAMY, A. M. D.; HOUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I.; NAWWAR, M. A. M. Unusual phenolic glycosides from *Cotoneaster orbicularis*. *Phytochemistry*, **53**: 699-704, 2000.
- ELLIOT, M.; JANES, N. F.; JEFFS, K. A. Pyrethrins and related compounds. X. Methyl-benzyl chrysanthemates. *Pest. Sci.*, **1**: 49-52, 1970.
- ENGLER, A. “Syllabus der pflanzenfamilien” 12a. ed., *Bornträger*, Berlin, 262p.
- ESCOBAR, L. K.; LIU, Y.; MABRY, T. J. C-Glycosylflavonoids from *Passiflora coactilis*. *Phytochemistry*, **22**: 796-797, 1983.
- FACCHINI, P. H. “Busca de substâncias de *Pilocarpus riedelianus* e dos oleos de sementes de Citrus com acao sobre o fungo simbiote das formigas cortadeiras”. Prof.Dr. Joao Batista Fernandes; Prof.Dr. Mauricio Bacci Junior; Prof.Dr. Edson Rodrigues Filho. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2005. Dissertação de Mestrado 109 p.
- FACCHINI, P. H. “*Quimica biomonitorada de Protium heptaphyllum, Tapirira guianensis, Rauia sp, Conchocarpus longifolius atividades de extratos e constituintes isolados contra bacterias, saúva limão e seu fungo simbiote*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2005. Tese de Doutorado. 240p.

- FEBVAY, G. & KERMARREC, A. Activites enzymatiques des glandes salivaires et le l'intestin moyen dune fourmi Attine (aductes et larves): *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae, Attini). *Arch. Biol.*, **92**: 299-316, 1981.
- FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. IN: *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. 1ª ed., Ed. UFSC E UFRGS, Florianópolis – Porto Alegre, 1999.
- FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; DA SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C.; GALHIANE, M. S.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; VICTOR, S. R.; DOS SANTOS, A. M. R. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. *Química Nova*, **25**: 1091-1095, 2002.
- FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; CORRÊA, A. G.; BACCI, Jr. M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. O futuro dos produtos naturais no controle de formigas. IN: XVIII Simpósio de Mirmecologia, São Paulo-SP. *Biológico*, **69**: 221-224, 2007.
- FERNANDES, J. B.; ZAVAN, C.; LEITE, A. C.; SIMOTE, S. Y.; FACCHINI, P. H.; TEREZAN, A. P.; GUERREIRO, G.; AMBROZIN, A. R. P.; ALMEIDA, S. S. M. S. DE; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F., BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, Jr. M.; PIRANI, J. R. “Produtos naturais no controle de formigas-cortadeiras” IN: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. DE O.; LINO-NETO, J. (Eds). *Insetos Sociais: da biologia à aplicação* Ed. UFV, Viçosa – MG. p. 381-396, 2008.
- FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, **98**: 2335-2350, 2007.
- FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M. A. Approach to the study of C-glycosyl Flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of Quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, **14**: 352-359, 2003.
- FERRERES, F.; LIORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and peentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **39**: 312-321, 2004.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass sprctrometry. *Journal of Chromatography A*, **1161**: 214-223, 2007.
- FIGUEIRINHA.; PARANHOS, A.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; SANTOS-BUELGA, C.; BATISTA, M. T. *Cymbopogon citrates* leaves: Characterization by HPLC-PDA-ESI-MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, **110**: 718-728, 2008.

- FORTI, L. C. e BOARETTO, M. A. C. *Formigas Cortadeiras. Biologia, Ecologia, Danos e Controle*. Botucatu – SP, 61 p, 1997.
- FORTI, L. C. e ANDRADE, A. P. P. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, **24**: 61-63, 1999.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; SILVA, V. P.; SAES, M. B. “Economic of grass-cutting ants.” IN: *Fire ants and leaf-cutting ants. Biology and management*. Lofgren, C.S.; Vandermeer, R.K. (Eds). Westview Press, Bolder, Colorado, and London. 18-35, 1986.
- FOWLER, H. G., FORTI, L. C., BRANDÃO C. R. F., DELABIE, J. H. C., VASCONCELOS, H. L. “Ecologia nutricional de formigas”. IN: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds). *Ecologia Nutricional de Insetos e suas Aplicações no Manejo de Pragas*. São Paulo, Manolé Ltda, p. 131-223, 1991.
- FUKAMI, H. e NAKAJIMA, M. Synthesis of b-Tubanol methyl ether. Synthesis of rotenoids. *Agric. Biol. Chem.*, **25**: 252-255, 1961.
- GALLO, D.; NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: Agronômica Ceres, 649p. 1988.
- GALLO, M. B. C. “Busca de produtos naturais bioativos de plantas das famílias *Mirtaceae* (*Siphonegena densiflora*) *Verbenaceae* (*Vitex polygama*)”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química UFSCar, 2004, Tese de Doutorado. 419p.
- GALLO, M.; GOMES, W.; CUNHA, U. S.; DIOGO, F. A; SILVA, F. C.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; BATISTA-PEREIRA, L. G. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex Polygama* (*Verbenaceae*) and *Siphoneugena densiflora* (*Myrtaceae*) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, **62**: 1072, 2006.
- GATTUSO, G., CARISTI, C., GARGIULLI, C., BELLOCCO, E., TOSCANO, G. LEUZZI, U. Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (*Citrus bergamia* Risso). *J. Agric. Fodd Chem.*, **54**: 3929-3935, 2006.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C. “Flavonoid Composition of *Citrus* Juices”. *Molecules*, **12**: 1641-1673, 2007.
- GIL, M. I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Effect of Modified Atmosphere Packaging on the Flavonoid and Vitamin C Content of Minimally Processed Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *J. Agric. Fods Chem.*, **46**: 2007-2012, 1998.
- GODOY, M. F. P.; SOUZA, R. C.; ZANCUL, M. S.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; DA SILVA, M. G. F. VIEIRA, P. C. Toxicidade de *Pilocarpus grandiflorus* para o

- fungo simbiote de *Atta sexdens*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **69**: 192-194, 2002.
- GODOY, M. F. P.; VICTOR, R. S.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 669-672, 2005.
- GRAY, A. I. e WATERMAN, P. G. "Review. Coumarins in Rutaceae". *Phytochemistry*, **17**: 845-863, 1978.
- GUERREIRO, G.; LIMA, J. E. S.; FERNANDES, J. B. F.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C. Sesquiterpenos do Caule de *Pilocarpus riedelianus* e Atividades Sobre Microorganismos. *Quim. Nova*, **28**: 986-990, 2005.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: 1-131, 1982.
- HARBORNE, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: 57-87; 337-365; 441-471; 499-526p, 1994.
- HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Entom. Res.*, **86**: 253-256, 1996.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Utilização de produtos naturais para o controle de formigas cortadeiras e ou seu fungo simbiote. *Naturalia*, **24**: 311-317, 1999.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* L. (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entom.*, **124**: 249-252, 2000a.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entom.*, **124**: 33-35, 2000b.
- HEINSBROEK, R.; BREDERODE, J. V.; GERRIT, V. N.; MAAS, J.; KAMSTEEG, J.; BESSON, E.; CHOPIN, J. the 2''-O-Glucosylation of vitexin and Isovitexin in Petals of *Silene alba* is Catalysed by two Different Enzymes. *Phytochemistry*, **19**: 1935-1937, 1980.
- HENRICK, C. A. Pyrethroids. IN: GODFREY, C. R. A. (Ed.). *Agrochemicals from natural products*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 63-146.
- HEYMANN, H.; TEZUCA, Y.; KIKUCHI, T.; SUPRIYATNA, S. Constituents of *Sindora sumatrana* Miq. I. Isolation and NMR Spectral Analysis os Sesquiterpenes from the Dried Pods. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**: 138-146, 1994.

- HILSENBECK, R. A.; MABRY, T. J. Flavonoid Chemistry of *Siphonoglossa*. *Phytochemistry*, **29**: 2181-2185, 1990.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The Ants*. Berlin: Springer-Verlag, p. 732, 1990.
- HOSSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. "A procura dos Princípios Ativos" IN: VIEIRA, P. C. "*Princípios Ativos de Plantas Superiores*". Série de Textos da Escola de Verão em Química IV. Editora UFSCar, p. 9-41, 2003.
- HOWARD, J. J. e WIEMER, D. F. "Chemical Ecology of Host Plant by the Leaf-cutting Ant *Atta cephalotes*". IN: *Fire Ants and Leaf-cutting Ants. Biology and Management*. LOFGREN, C. C. e VANDER MEER, R. K., (Eds). Londres, Westview Press, p. 260-273, 1986.
- HOWARD, J. J.; CAZIN, J. Jr.; WIEMER, D. F. Toxicity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. *J. Chem. Ecol.*, **14**: 59-69, 1988.
- HUBBEL, S. P. e WIEMER, D. F. "Host plant selection by an attine ant." IN: JAISSON, P. (Ed.). *Social insects in the tropics*. Paris: University of Paris Press, **2**: 133-154, 1983.
- HUGHES, R. J.; CROLEY, T. R.; METCALFE, C. D.; MARCH, R. E. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International J. Mass Spectrom.*, **210**: 371-385, 2001.
- IMAI, F.; KINOSHITA, T.; ITAI, A.; SANKAWA, U. Acid-catalyzed Rearrangement of an epoxy Coumarin Phebalosin the revised Structure of Murralongin. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**: 3978-3981, 1986.
- IMAI, F.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U. Constituents of the leaves of *Murraya paniculata* Collected in Taiwan. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**: 358-362, 1989.
- ITO, C. e FURUKAWA, H. Constituents of *Murraya exotica* L. Structure Elucidation of New Coumarins. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 4277-4285, 1987.
- ITO, C. e FURUKAWA, H.; ISHII, H.; ISHIKAWA, T.; HAGINIWA, J. The Chemical Composition of *Murraya paniculata*. The structure of Five New Coumarins and One New Alkaloid and the Stereochemistry of Murrangatin and Related Coumarins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**: 2047-2055, 1990.
- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; FURUKAWA, H.; TOKUDA, H.; OKUDA, Y.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; NISHINO, H. Anti-tumor-promoting effects of 8-substituted 7-methoxycoumarins on Epstein-Barr virus activation assay. *Cancer Letters*, **138**: 87-92, 1999.
- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; ONODA, S.; HOSOKAWA, A.; RUANGRUNGSI, N.; OKUDA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry*, **66**: 567-572, 2005.
- ISMAN, M. B. "Toxicity and fate of acetylchromones in pest insects." IN: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (Eds). *Insecticides of*

- plant origin*. ACS Series nº 387. Washington DC.: American Chemical Society, 1989. p. 44-58.
- JAFFÉ, K. e VILELA, E. F. "Formigas cortadeiras. A linguagem dos odores". *Ciência Hoje*, **35**: 26-31, 1987.
- JAY, M.; LAMETA-D'ARCY, A.; VIRICEL, M. C-Glycosylflavones from Roots of *Glycine max*. *Phytochemistry*, **23**: 1153-1155, 1984.
- JAY, M.; ISMAILI, A. Flavones and C-Glycosylflavones from the leaves of some *Arrhenatherum* species. *Phytochemistry*, **28**: 3035-3037, 1989.
- JHOO, J. W.; ANG, C. Y. W.; HEINZ, T. M.; DECK, J.; SCHANACKENBERG, L. K.; BERGER, R. D.; DRAGULI, K.; TANG, C. S. Identification of C-Glycoside Flavonoids as Potential Mutagenic Compounds in Kava. *Journal of Food Science*, **72**: 120-125, 2007.
- JUSTI-JUNIOR, J.; IMENES, S. de L.; BERGMANN, E. L.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. & ZORZENON, F. J. Formigas Cortadeiras. *Bol. Técn. Inst. Biol.*, **4**: 5-31, 1996.
- KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol Res.*, **103**: 325-331, 2008.
- KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Rev. Agric.*, **53**: 68-78, 1978.
- KAZUNO, S.; YANAGIDA, M.; SHINDO, N.; MURAYAMA, K. Mass Spectrometric Identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Analytical Biochemistry*, **347**: 182-192, 2005.
- KINOSHITA, T.; WU, J.; HO, F. The isolation of a prenylcoumarin of chemotaxonomic significance from *Murraya paniculata* var. *Omphalocarpa*. *Phytochemistry*, **43**: 125-128, 1996.
- KINOSHITA, T.; TATARA, S.; HO, F.; SANCAWA, U. 3-Prenylindoles from *Murraya paniculata* and their biogenetic significance. *Phytochemistry*, **28**: 147-151, 1989.
- KITAMURA, A. E.; HEBLING, M. J. A.; TAKAHASHI-DEL BIANCO, M.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Determinação da toxicidade da ricinina para operárias de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae), em laboratório. *Naturalia*, **24**: 307-309, 1999.
- KITE, G. C.; PORTER, E. A.; DENISON, F. C.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C.; BUTLER, I.; SIMMONDS, M. S. J. Data-directed scan sequence for the general assignment of c-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1104**: 123-131, 2006.

- KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomol.* **15**: 3–344, 1972.
- KERMARRECA, C. A.; DECHARME, M.; FEBVAY, G. “Leaf cutting ant symbiotic fungi: a synthesis of recent research.” IN: DELLA LUCIA, T. M. C. et al. *As Formigas Cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993.
- KIM, I.; CHIN, Y.; LIM, S. W.; KIM, W. C.; KIM, J. Norisoprenoids and Hepatoprotective Flavone Glycosides from the Aerial Parts of *Beta vulgaris* var. *cicla*. *Arch Pharm Res*, **27**: 600-603, 2004.
- KLOCKE, J. A.; BALANDRIM, M. F.; BARNBY, M. A.; YAMASAKI, R. B. “Limonoids, phenolics, and furanocoumarins as insect antifeedants, repellents, and growth inhibitory compounds.” IN: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (Eds). *Insecticides of plant origin*. ACS Series nº 387. Washington DC.: American Chemical Society, 1989. p. 136-149.
- KOST, C.; LAKATOS, T.; BOTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W. R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, **94**: 821-828, 2007.
- KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Letters*, **49**: 4067-4072, 2008.
- KRAUS, W.; BOKEL, M.; KLENK, A.; PÖHNL, H. The structure of azadirachtin and 22,23-dihydro-23b-methoxyazadirachtin. *Tetrahedron Letters*, **52**: 6435-6438, 1985.
- LAFORGE, F. B.; GERSDOFF, W. A.; GREEN, N.; SCHECHTER, M. S. Allethrin-type esters of cyclopropanecarboxylic acids and their relative toxicities to house flies. *J. Org. Chem.*, **17**: 381-389, 1952.
- LARA, W. H. e BATISTA, G. C. Pesticidas. *Química Nova*, **15**: 161-166, 1992.
- LARANJEIRO, A. J. e LOUZADA, R. M. Manejo de formigas cortadeiras em florestas. *Série técnica IPEF*, **13**: 115-124, 2000.
- LEE, S. M.; KLOCKE, J. A.; BARNABY, M. A.; YAMASAKI, R. B.; BALANDRIN, M. F. “Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae).” IN: HEDIN, P. H. (Ed.). *Naturally occurring pest bioregulators*. ACS Symposium Series 449, Washington DC.: American Chemical Society, 1991. p. 293-304.
- LEITE, A. C., “*Estudo químico de Sesamum indicum e Ricinus communis Relacionado ao controle de formigas cortadeiras*” São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2000. Dissertação de mestrado. 92 p.
- LEITE, A. C., OLIVEIRA, C. G.; GODOY, M. F. P.; BUENO, F. C.; DE OLIVEIRA, M. D. S. D.; FORIM, M. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M. Toxicity of *Cipadessa fruticosa* to leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa*

- (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungus. *Sociobiology*, **46**: 17-26, 2005a.
- LEITE, A. C., BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. G. F.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 1391-1395, 2005b.
- LEITE, A. C., MATOS, A. P., BATISTA-PEREIRA, L. G., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C. e DA SILVA, M. F. G. F. Activity of triterpenoids from *Cedrela fissilis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda*. *Biopesticides International*, **4**: 1-7, 2008
- LI, W.; DAI, R.; YU, Y.; LI, L.; WU, C.; LUAN, W.; MENG, W.; ZHANG, X.; DENG, Y. Antihyperglycemic Effect of *Cephalotaxus sinensis* Leaves and GLUT-4 Translocation Facilitating Activity of its Flavonoids Constituents. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**: 1123-1129, 2007.
- LIMA, J. S. DE. "Química e atividade antimicrobiana de *Pilocarpus riedelianus* (Rutaceae)" São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 229 p. 1996.
- LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J. M. New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. *J. Agric. Food. Chem.*, **56**: 8130-8140, 2008.
- LIN, Y.; KONG, L. Studies on the Chemical Constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. *Asian Journal of Traditional Medicines*, **1**: 34-36, 2006.
- LINEWEAVER, H. e BURK, D. The determination of the enzyme dissociation. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**: 685-666, 1934.
- LITTLEDYKE, M. e CHERRETT, J. M. Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull. Entomol. Res.*, **65**: 33-47, 1975.
- LITTLEDYKE, M. e CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bul. Entom. Res.*, **66**: 205-217, 1976.
- LOECK, A. E. e NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigatta* (Smith, 1858) (Hymenoptera – Formicidae), *O Solo*, **1**: 25-30, 1984.
- LUTHRIA, D. L.; RAMAKRISHNAN, V; VERMA, G. S.; PRABHU, B. R.; BANERJI, A. Insect Antifeedants from *Atalantia racemosa*. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 1435-1437, 1989.
- MA, Y.; CUYCKENS, F.; HEUVEL, H. V.; CLAEYS, M. Mass Spectrometry Methods for the Characterization and Differentiation of Isomeric O-diglycosyl Flavonoids. *Phytochem. Anal.*, **12**: 159-165, 2001.

- MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; SATDEY, C. J.; MIAO, X.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International J. Mass Spectrom.*, **248**: 61-85, 2006.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas*. São Paulo: Ceres, 1970.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas: insetos daninhos às plantas cultivadas*. 3. ed. São Paulo. Livraria Nobel, 251p, 1974.
- MARICONI, F. A. M. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. 3ª ed. São Paulo: Livraria Nobel S. A., 466p, 1976.
- MARICONI, F. A. M. “*Inseticidas e seu Emprego no Combate as Pragas*” (5ª ed.), Editora Nobel, São Paulo, 1: 122,305. 1981.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. *Bahia Agríc.*, **7**: 18-21, 2006.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press; London, UK; 113p, 1982.
- MARSARO, A. L.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; DE SOUZA, R. C.; DOS ANJOS, N.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Efeito de extratos e constituintes químicos presentes na folhas de *Eucalyptus maculata* sobre operárias de *Atta sexdens* F. *Naturalia*, **24**: 323-325, 1999.
- MARSARO, A. L.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical compounds of *Eucalyptus maculata* leaves. *J. Chem. Ecol.*, **30**: 1771-1780, 2004.
- MARTIN, M. M.; CARMAN, R. M.; MACCONNEL, J. G. Nutrients derived from de fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. America*, **62**: 1386-1387, 1969.
- MARTIN, M. M. e WEBER, N. A. The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by the Attini *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. America*, **62**: 1386-1387, 1969.
- MATOS, A. P., NEBO, L., CALEGARI, E. R., BATISTA-PEREIRA, G. L., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., SILVA, M. F. DAS G. F. DA., FERREIRA, P. FILHO, RODRIGUES, R. R. “Atividade Biológica de Extratos Orgânicos de *Trichilia* ssp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Dieta Artificial”. *BioAssay*, **7** :1-6, 2006.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES, R. R.. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae) Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Química Nova*, [no prelo], 2009a.
- MATOS, A. P.; LEITE, A. C.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Effects of Limonoids from *Cipadessa*

- fruticosa on Fall Armyworm. *Zeit Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, 2009b.
- MELO, M. e PIRES DA SILVA, R. F. “Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em três cultivares de milho (*Zea mays* L).” IN: *Congresso Brasileiro de Entomologia*, 10, 1986, Rio de Janeiro, Resumos. Soc. Entomol. Brasil p. 147, 1986.
- MENEZES, A. C. S. “Atividade inseticida e tripanocida de *Trichilia casaretti* e *Azadirachta indica*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, Tese de Doutorado. 177 p, 2002.
- MONTEIRO, M. R. TORKOMIAN, V. L. V.; PAGNOCCA, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Activity of extracts and fatty acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) against the fungus of the leaf-cutting ants *Atta sexdens*. *An. Acad. Bras. Ciên.*, **70**: 733-736, 1998.
- MOREIRA, A. A. e FORTI, L. C. Comparação entre o volume externo e interno de ninhos de *Atta laevigatta* (Hymenoptera:Formicidae). *Rev. Árvore*, **23**: 355-358, 1999.
- MORIMOTO, M., KUMEDA, S., KOMAI, K. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1888-1891, 2000.
- MORIMOTO, M., TANIMOTO, K., NAKANO, S., OZAKI, T., NAKANO, A., KOMAI, K. “Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*”. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 389-393, 2003.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*, **45**: 194-204, 2005
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Ação tóxica de ácidos graxos misturados a um triglicerídeo sobre operárias de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, **24**: 327-330, 1999.
- MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between Attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evolution*, 1558-5646. 2008.
- MULLIN, C. A.; ALFATAFTA, A. A.; HARMAN, J. L.; EVERETT, S. L.; SERINO, A. A. Feeding and Toxic Effects of Floral Sesquiterpene Lactones, Diterpenes, and Phenolics from Sunflower (*Helianthus annuus* L.) on Westworn Corn Rootworm. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2293-2299, 1991.
- MURRAY, R. D. H., MÉNDEZ, J. E BROWN, S. A. “*The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry*” 1ª ed. London, John Wiley & Sons, p. 36, 1982.
- NIGEL, C.; GRAYER, R.J. Flavonoids and their glucosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.*, **25**: 555-611, 2008.

- NIKOLOV, N.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H.; HOROWITZ, R. M.; GENTILI, B. New flavonoid glycosides from *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna*. *Planta Medica*, **44**: 50-53, 1982.
- NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends Ecol. Evol.* **12**: 386-389, 1997.
- OLIVEIRA, M. A. "Identificação de formigas cortadeiras e efeito do desfolhamento simulado em plantios de *Eucalyptus grandis*." Viçosa; Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa. MG, 72p. 1996.
- OLIVEIRA, D. J. "Constituintes químicos de *Rauia resinosa*". Belém, Programa de Pós Graduação em Química de Produtos Naturais, UFPA, Dissertação de Mestrado. 219p, 1996.
- OSTERDAHL, B. Chemical Studies on Bryophytes. 22. Flavonoid C-Glycosides of *Mnium undulatum*. *Acta Chemica Scandinavica B*, **33**: 400-404, 1979.
- PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; BERALDO, M. J. A. H.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bull. Entom. Res.*, **80**: 349-352, 1990.
- PAGNOCCA, F. C.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1325-1330, 1996.
- PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, F. C.; CRISÓSTOMOS, F. R.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; CORRÊA, A. G.; BACCI JR., M.; HEBLING, M. J. A.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. DA Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. *Agric. Forest Entom.*, **8**: 17-23, 2006.
- PANIZZI, A. R e PARRA, J. R. P. *Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas*. São Paulo, Editora Manolé Ltda, 359p, 1991.
- PARKER, W. H.; MAZE, J.; MCLACHLAN, D. G. Flavonoids of *Abies Amabilis* Needles. *Phytochemistry*, **18**: 508-510, 1979.
- PARRA, J. R. P. "Criação de insetos para estudos com patógenos", IN: S. B. Alves (Eds) *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Editora Manole, p 348-373. 1986.
- PATEL, P. N. "Estudos de fatores bióticos de controle natural da população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)". Campinas, Programa de Pós Graduação em Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado. 98 p, 1981.
- PAULA, V. F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A. J.; PILÓ-VELOSO, D.; PIKANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Manag. Sci.*, **56**: 168-174, 2000.

- PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; JÚNIOR, M. B.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; LEITE, A. C.; DA SILVA, M. F. G. V. Efeitos tóxicos de ácidos graxos para formigas cortadeiras, em laboratório. *Arq. Inst. Biol.*, **71**: 151, 2004.
- PENG, X., ZHENG, Z., CHENG, K., SHAN, F., REN, G., CHEN, F., WANG, M. "Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts". *Food Chem.*, **106**: 475-481, 2008.
- PEREIRA, A. "Química e atividade inseticida de *Trichilia catigua* em relação à lagarta do cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCAR, 2001. Dissertação de Mestrado. 103 p.
- PEREIRA, L. G. B.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; MALASPINA, O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag Sci*, **58**: 503-507, 2002.
- PEREIRA, A. M., "Busca de compostos inseticidas: estudo de espécies do gênero *Trichilia* (*Meliaceae*)". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2006. Tese de doutorado. 170 p.
- PEREIRA, L. G. B.; CASTRAL, T. C.; SILVA, M. T. M.; AMARAL, B. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; CORRÊA, A. G. Insecticidal Activity of Synthetic Amides on *Spodoptera frugiperda*. *Z. Naturforsch*, **61**: 196-202, 2006.
- PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; SOUZA, G. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M. Atratividade de ceras epicuticulares e de folhas para *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, **24**: 189-191, 1999.
- PICCINELLI, A. L.; MESA, M. G.; ARMENTEROS, D. M.; ALFONSO, M. A.; AREVALDO, A. C.; CAMPONE, L.; RASTRELLI, L. HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of c-Glycosyl Flavones in a Hydroalcoholic Extract of *Citrus aurantifolia* Leaves with Antiplatelet Activity. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 1574-1581, 2008.
- PIRANI, J. R. "A ordem Rutales na Serra do Cipó" Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Depto. de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade São Paulo. 31p. 1982.
- PIRANI, J. R.; A revision de *Helietta* and *Balfourodendron*. *Brittonia*, **50**: 348-380, 1998.
- POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. The effect of metapleural gland on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leaf-cutting ants. *Naturwissenschaften*, **90**: 406-409, 2003.

- PROKSCH, P. e RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofuranes of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochemistry*, **22**: 2335-2348, 1983.
- QUADER, M. A.; EL-TURBI, J. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins and Their Taxonomic value in the Genus *Phebalium*. *Phytochemistry*, **31**: 3083-3089, 1992.
- QUINLAN, R. J. e CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octopinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecol. Entom.*, **2**: 161-170, 1977.
- QUINLAN, R. J. & CHERRET, J. M. Studies on role of infrabuccal pocket of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym formicidae). *Insectes Cocciaux*, **25**: 237-245, 1978.
- QUINLAN, R. J. e CHERRET, J. M. Role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.*, **4**: 151-160, 1979.
- RANGEL, V. S. Plantas inseticidas do Brasil. *Bol. Min. Agric.*, **35**: 1-34, 1946.
- RAY, D. E. "Pesticides derived from plants and other organisms". IN: HAYES Jr., W. J.; LAWS Jr., E. R. (Eds.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. New York: Academia Press, Inc., **2-3**: 585-636. 1991.
- RAYYAN, S.; FOSSEN. H.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, O. M. Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, From The Herbal Drug "Crataegi Folium Cum Flore" (Hawthorn). *Phytochem Anal.*, **16**: 334-341, 2004.
- REMBOLD, H. "Azadirachtins." IN: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B.; MORAND, P. (Eds.). *Insecticides of plant origin*. ACS Symposium Series 387. Washington DC: American Chemical Society, 1989. p. 150-163.
- REYNOLDS, H. T. e CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attini ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, **96**: 955-959, 2004.
- RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, R. S.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. *An. Soc. Entom. Brasil*, **27**: 421-426, 1998.
- RIDLEY, P.; HOUSE, P. E.; JACKSON, C. W. Control of the behavior of leaf-cutting ants by their simbiotic fungus. *Experientia*, **52**: 631-635, 1996.
- ROCHA, W. C. "Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *Trichilia rubra* (Meliaceae)". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2005. Tese de doutorado. 221 p.
- ROCKWOOD, L. L. The effects of seasonality of foraging in two species of *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) in Guanacaste Province, Costa Rica. *Biotropica*, **7**: 176-193, 1975.

- ROCKWOOD, L. L. Plant selection foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology*, 173-188, 1976.
- RODRIGUES, A.; BACCI Jr., M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal "Weeds" in the Leafcutter Ant Symbiosis. *Microb. Ecol.*, **56**: 604-614, 2008.
- RODRIGUEZ-H, C e VENDRAMIM, J. D., Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Rev. Agric.* **72**: 305-318, 1997.
- ROY, M.; BHATTACHARYYA, P. K.; PAL, S.; CHAUDHURY, A.; ADITYACHAUDHURY, N. Dehydrodihydrotrotenone and flemichapparin-B in *Tephrosia candida*. *Phytochemistry*, **26**: 2423-2424, 1987.
- SANTOS, J. L.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M, A. C.; ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B. Seletividade de *Atta bisphaerica* Forel 1908, por extratos hexânicos de gramíneas, em laboratório. *Naturalia*, **24**: 185-187, 1999.
- SARKER, S. D.; BARTHOLOMEW, B.; NASH, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. Sideroxylin and 8-demethylsideroxulin from *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**: 759-762, 2001.
- SCHADE, F. H. "The ecology and control on the leaf-cutting ants of Paraguay." IN: Gorham, J. R. (Ed.). *Paraguay: ecological essays*. Miami: Academy of the Arts and Sciences of the Americas, p.76-95, 1973.
- SCHNEIDER, M. O.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. & PAGNOCCA, F. C. "Observations on brood care behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae)." IN: *Abstracts of the XX Intern. Cong. Entom.*, Foz do Iguaçu – PR: EMBRAPA-Soja. p. 895, 2000.
- SCHEIDER, M. O. "Comportamento de cuidado com a prole da saúva limão *Atta sexdens* FOREL, 1908 (Hymenoptera Formicidae)." Dissertação (Mestrado) - Departamento de Zoologia - Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Rio Claro – São Paulo, p. 80,2003.
- SCHOONHOVEN, L. M. "Biological Aspects of Ntifeedants". *Ent. Exp. & appl.*, **31**: 57-69, 1982.
- SCHULTZ, A. R. "Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática". 3ª. edição, v. II. Editora Globo. Porto Alegre. 1968, 426 p.
- SHMELTZ, I. "Nicotine and other tobacco alkaloids." IN: JACOBSON, M.; CROSBY, D. G. (Eds.). *Naturally occurring insecticides*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1971. p. 99-136.
- SILVA, A.; BACCI Jr. R.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* works on different food sources. *J. Insect Phys.*, **49**: 307-313, 2003.
- SILVA, M. F. DAS G. F. DA, GOTTLIEB, O. R., EHRENDORFER, F. Chemeosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy

- and evolutionary interpretation of the family. *Plant Syst. Evol.*, **161**: 97-134, 1988.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª Edição, 387 p., 1994.
- SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L. *Appl. Envir. Microb.*, **64**: 4820-4822. 1998.
- SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavanoids in insect-plant interactions : feeding and oviposition . *Phytochemistry*, **56**: 245-252, 2001.
- SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid-insect interactions : recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, **64**: 21-30, 2003.
- SIMOTE, S. Y. "Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos visando o controle de formigas cortadeiras". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2006. Tese de Doutorado. 200p.
- SOUZA, R. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; GODOY, M. F. P.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PIRANI, J. R. New imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus grandiflorus* and their antifungal activity. *Zeit. Naturf. A-B (J. Chem. Sci.)*, **60**: 787-791, 2005.
- SOUZA, J. C. e SOUZA, M. A. Lagarta-do-cartucho e besourinho-das-plântulas: principais pragas do milho em plantio direto no sul de Minas. *Boletim Técnico EPAMIG - Belo Horizonte*, **68**: 11-24, 2002.
- STEVENSON, P. C., SIMMONDS, M. S. J., YULE, M. A., VEITCH, N. C., KITE, G. C., IRWIN, D., LEGG, M. Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochemistry*, **63**: 41-46, 2003.
- STRADLING, D. J. "An introduction to the fungus growing ants Attini" IN: *Ant-plant Interactions*. HUXLEY, C. R. e CUTLER, D. F. (Eds). Oxford University Press, p. 15-18, 1991.
- STRADLING, D. J. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plants defense mechanisms. *J. Anim. Ecol.*, **47**: 173-188, 1978.
- SUAREZ, L. E. C. e MONACHE, F. D. Constituintes of *Murraya exótica* adapted in Colômbia. *Rev. Latinoamer. Quim.* **22**: 38-40, 1991.
- TAKAHASHI-DEL BIANCO, M.; MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Avaliação da metodologia empregada nos bioensaios com extratos orgânicos

- de plantas por *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae) utilizando inseticidas convencionais. *Naturalia*, **24**: 287-289, 1999.
- TALAPATRA, S. K.; DUTTA, L. N.; TALAPATRA, B. The Structure and Stereochemistry of Murrangatin. *Tetrahedron Letters*, **29**: 2811-2814, 1973a.
- TALAPATRA, S. K.; DUTTA, L. N.; TALAPATRA, B. Structure of murralongin, a novel monomeric coumarin from *Murraya elongata*: Stereochemistry and preferred conformation of its unique chain. *Tetrahedron Letters*, **50**: 5005-5008, 1973b.
- TANZUBIL, P. B. e MCCAFFERRY, A. R., Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. *Crop. Prot.*, **9**: 383-386. 1990.
- VALICENTE, F. H. Consumo foliar da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) infectada com vírus de g ou de poliedrose nuclear. *An. Soc. Entom. Brasil*, Jaboticabal, **17**: 347-357, 1988.
- VALICENTE, F. H. e CRUZ, I. *Controle biológico da lagarta-do-cartucho Spodoptera frugiperda com baculovirus*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. (EMBRAPA/CNPMS Circular Técnica, n. 115). 23p, 1991.
- VANDERHERCHEN, M. B.; ISHERWOOD, M.; THOMPSON, D. M.; LINDERMAN, R. J.; ROE, R. M. Toxicity of novel aromatic and aliphatic organic acid and ester analogs of trypsin modulating oostatic factor to larvae of the northern house mosquito, *Culex pipiens* complex, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Pest. Biochem. Physiol.*, **81**: 71, 2005.
- VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J.; IRWIN, J. L.; TAKEDA, K. Flavonoid Cellobiosides from *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry*, **48**: 389-393, 1998.
- VELOSO, E. DA SILVA. "Fitoquímica comparada dos Gêneros *Angostura*, *Almeidea* e *Rauia* (*Rutaceae*). Tese de Doutorado, PPGQ – UFSCar, 1995. 127 p.
- VELOSO, E. DA SILVA; OLIVEIRA, D. J.; ARRUDA, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. DAS G. F. DA.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Rauianin, a new coumarin from *Rauia resinosa*. *Nat. Prod. Letters*, **9**: 237-244, 1997.
- VELOSO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. C-glycosyl Flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia*, **80**: 119-122, 2009.
- VERA, N.; POPICH, S.; LUNA, L.; CRAVERO, R.; SIERRA, M. G.; BARDON, A. Toxicity and synergism in the feeding deterrence of some coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemistry & Biodiversity*, **3**: 21-26, 2006.
- VIANA, P. A.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Manejo de pragas em agroecossistemas sob plantio direto. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, **22**: 63-72, 2001.

- VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; FERNANDES, J. B.; CRISÓSTOMO, F. R.; RODRIGUES-GAMBOA, T. P. Toxicidade de substâncias de origem vegetal e de moléculas contendo uma porção piperonílica para o fungo simbiote de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, **24**: 333-335, 1999.
- VICTOR, S. R.; CRISÓSTOMO, F. R.; BUENO, F. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. DAS G. F. Toxicity piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Pest. Manag. Sci.*, **57**: 603-608, 2001.
- VIEGAS, C. Jr. Terpenos com Atividade Inseticida: Uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos. *Química Nova*. **26**: 390-400, 2003.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M.T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of Trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure Appl. Chem.*, **73**: 617-622, 2001.
- VILELA, E. F. "Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brasil." IN: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). *Fire leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder and London: Westview Press, p. 399-408, 1986.
- XIE, C.; VEITCH, N. C.; HOUGHTON, P. J.; SIMMONDS, M. S. J. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. *Bioresource Technology*, **98**: 2335-2350, 2003.
- WANG, S.; HUANG, K. Determination of Flavonoids by high-Performance Liquid Chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1032**: 273-179, 2004.
- WAGNER, H.; OBERMEIER, G.; SELIGMANN, O.; CHARI, V. M. Neue Flavon-C-O-Glycoside aus *Melandrium Album*. *Phytochemistry*, **18**: 907-910, 1979.
- WAGNER, H.; OBERMEIER, G.; CHARI, V. M.; GALLE, K. Flavonoid-C-Glycosids from *Triticum Aestivum* L. *Journal of Natural Products*, **43**: 583-587, 1980.
- WALLER, D. A. "The foraging Ecology of *Atta texana* in Texas". IN: LOFGREN, C. e VANDER MEER, R. K. *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder and London: Westview Press, p.146-158, 1986.
- WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J., HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-on-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *J. Chromatogr. A*, **926**: 29-41, 2001.
- WATERMAN, P. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and Systematic Significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **3**: 149-180, 1975.

- WATERMAN, P. G. e GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales*. Annual Proceedings of the Phytochemical society of Europe Number 22. Academic Press, p. 68, 1983.
- WEBER, N. A. Fungus growing ants. *Science*, **153**: 587-604, 1966.
- WEBER, N. A. *Gardening ants: The Attinis*. The American Philosophical Society, Philadelphia, p. 146, 1972.
- WILSON, E. O. Caste and division of labor in Leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). *Behav. Ecol. Sociob.*, **7**: 143-156, 1980.
- WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **7**: 143-156, 1998.
- YAJIMA, T. e MUNAKATA, K. Phloroglucinol-type Furocoumarins, a Group of Naturally-Occuring Insect Antifeedants. *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 1701-1706, 1979.
- YING, X., LI, H., XIONG, Z., SUN, Z., CAI, S., ZHU, W., BI, Y., LI, F. LC Determination of Malondialdehyde Concentrations in the Human Umbilical Vein Endothelial Cell Culture Medium: Application to the Antioxidant Effect of Vitexin-2''-O-rhamnoside. *Chromatographia*, **67**: 679-686, 2008.
- YANG, X., LEDERER, C., MCDANIEL, M., DEINZER, M. Hydrolysis Products of Caryophyllene Oxide in Hops and Beer. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 2082-2085, 1993.
- YU, S. J. e ABO-ELGHAR, G. E. Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **68**: 173-183, 2000.
- ZANNO, P. R.; MUIRA, I.; NAKANISHI, K.; ELDER, D. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Application of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**: 1975-1977, 1975.
- ZAVAN, C. “*Identificação de inibidores de pectinase fúngica para o controle de formigas cortadeiras.*” Rio Claro, SP: UNESP, 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológica) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ, USA, p. 133-139, 1984.
- ZHANG Y.; JIAO J.; LIU C.; WU X.; ZHANG Y. Isolation and purification of four flavones C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **107**: 1326-1336, 2008.
- ZERIHUN, B.; LOCKWOOD, G. B.; WAIGH, R. D. Flavonoids and a Diterpene from *Clusia abyssinica*. *Journal of Natural Products*, **50**: 322, 1986.
- ZUCCHI, R. A. Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba, FEALQ, 139p, 1993.

SITES: www.naturalrual.com.br/produtos acessado dia 19/01/09.
<http://flickr.com/photos/flaviocb/2031584865/> acessado dia 19/01/09
(en.wikipedia.org/wiki/Leafcutter_ant).