

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Astronium graveolens*  
(ANACARDIACEAE) E DA AÇÃO DE SEUS CONSTITUINTES SOBRE  
O FORMIGUEIRO DE *Atta sexdens rubropilosa***

**Aluna: Maria Fernanda Martinez Villari\***

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**

**2011**

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

V722ef

Villari, Maria Fernanda Martinez.

Estudo fitoquímico de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) e da ação de seus constituintes sobre o formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* / Maria Fernanda Martinez Villari. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
211 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Produtos naturais. 2. *Astronium graveolens*. 3. Formigas cortadeiras. 4. *Spodoptera frugiperda*. 5. Estudo de voláteis. I. Título.


CDD: 547.3 (20<sup>a</sup>)

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

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Maria***

***Fernanda Martinez Villari, realizada em 17 de junho de 2011:***



---

Prof. Dr. João Batista Fernandes



---

Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes



---

Profa. Dra. Andreia Pereira Matos

*Dedico este trabalho à meus pais, Antonio R. Martins Villari (In Memoriam e Eliana M. Martinez Villari, aos meus tios, Antonio Carlos, Regina, Romualdo e Rosangela pelo carinho, apoio e incentivo.*

*Ao meu namorado Diego, pelo companheirismo, carinho, atenção, amor e incentivo em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador Prof. Dr. João Batista Fernandes pela confiança, paciência, ensinamentos e amizade.*

*À minha co-orientadora Dra. Ana Paula Terezan pelos ensinamentos, amizade e seus alunos de iniciação pela contribuição nos ensaios biológicos*

*Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Paulo César Vieira e Edson Rodrigues Filho que participaram da evolução deste trabalho.*

*Ao professor Gilberto Ferreira e a técnica Luciana Vizotto pela contribuição e amizade.*

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

*A Andréia pela amizade e contribuição nos ensaios biológicos*

*Ao Prof. Dr. Odair Correia Bueno e seus alunos pela contribuição nos ensaios biológicos.*

*Aos amigos, Kátia, Evandro, Marsele, Murilo, Titi e Rodrigo pela amizade, paciência e ensinamentos.*

*E á todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar pela amizade, ensinamentos, apoio e por proporcionarem um ambiente de trabalho prazeroso e familiar.*

*À FAPESP pela bolsa concedida.*

## Abreviaturas e Símbolos

|                      |  |
|----------------------|--|
| Acetona- <i>d</i> -6 | Acetona deuterada  |
| ACT                  | Acetato de etila   |
| <i>A. graveolens</i> | <i>Astronium graveolens</i>  |
| CAR/PDMS             | Carboxen/Polidimetilsiloxano   |
| CCD                  | Cromatografia em camada delgada  |
| CG-EM                | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas               |
| CLAE                 | Cromatografia líquida de alta eficiência                               |
| COSY                 | Correlated spectroscopy  |
| <i>d</i>             | Dubleto  |
| <i>DC</i>            | Dicroísmo circular   |
| <i>dd</i>            | Duplo dubleto  |
| <i>ddd</i>           | Duplo-duplo-dubleto  |
| DMSO                 | Dimetilsulfóxido   |
| <i>Dq</i>            | Duplo quadrupeto   |
| E                    | Eluente  |
| ESI                  | Electrospray ionization  |
| EtOH                 | Etanol   |
| gNOESY               | Nuclear Overhauser effect spectroscopy                                 |
| gROESY               | Rotating-frame Overhanser Effect Spectroscopy                          |
| h                    | Altura da sephadex LH-20 na coluna                                     |
| HMBC                 | Heteronuclear multiple quantum correlation                             |
| HSQC                 | Heteronuclear single quantum correlation                               |
| Hz                   | Hertz  |
| IA                   | Índice aritmético  |
| <i>J</i>             | Constante de acoplamento   |
| Lit.                 | Dados da literatura  |
| M                    | Multipeto  |
| Md                   | <i>Sobrevivência mediana das operárias de Atta sexdens rubropilosa</i> |
| MHz                  | Mega-hertz   |

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| MeOD               | Metanol deuterado                           |
| MeOH               | Metanol                                     |
| p.                 | Página                                      |
| PDMS/DVB           | Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno          |
| RMN <sup>1</sup> H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| S                  | Singleto                                    |
| S <sub>50</sub>    | Sobrevivência mediana                       |
| SI                 | Singleto largo                              |
| S.sobrep.          | Sinal sobreposto                            |
| SPME               | Micro extração em fase sólida               |
| T                  | Tripleto                                    |
| T <sub>R</sub>     | Tempo de retenção                           |
| UV                 | Ultravioleta                                |
| UR                 | Umidade Relativa                            |
| φ                  | Diâmetro                                    |
| δ                  | Deslocamento químico                        |
| λ                  | Comprimento de onda                         |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1 - <i>Astronium graveolens</i> .....  | 5  |
| Figura 1.2 - Substâncias isoladas do caule de <i>A. graveolens</i> . ....   | 6  |
| Figura 1.3 - <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .....  | 7  |
| Figura 1.4 - <i>Spodoptera frugiperda</i> .....   | 11 |
| Figura 1.5 - Planta do milho após ataque de <i>Spodoptera frugiperda</i> . ....                                       | 12 |
| Figura 1.6 - Extração por headspace com utilização de fibra.....  | 14 |
| Figura 3.1 - Cromatograma da separação das substâncias VI, IX e X por CLAE.....                                       | 35 |
| Figura 3.2 - Extração dos voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> por Headspace. ....                             | 45 |
| Figura 4.1 - Núcleo fundamental das chalconas.....  | 54 |
| Figura 4.2 - Sistema benzopirânico ou cromeno. ....   | 55 |
| Figura 4.3 - Estrutura básica de um flavonóide. ....  | 55 |
| Figura 4.4 - Biossíntese dos flavonóides (DEWICK, 2001). ....   | 56 |
| Figura 4.5 - Classes de flavonóides (SIMÕES <i>et al.</i> , 2004).....  | 57 |
| Figura 4.6 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância I (MeOD, 400MHz). ....                                   | 58 |
| Figura 4.7 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância I (MeOD, 400 MHz).....                             | 59 |
| Figura 4.8 - Mapa de contorno HMBC da substância I (MeOD, 400 MHz).....   | 60 |
| Figura 4.9 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância I (MeOD, 400MHz).....                              | 62 |
| Figura 4.10 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância II (MeOD, 200MHz). ....                                 | 64 |
| Figura 4.11 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância III (MeOD, 400 MHz). ....                               | 65 |
| Figura 4.12 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância III (MeOD, 400 MHz).....                          | 66 |
| Figura 4.13- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância IV (DMSO, 400MHz). ....                                  | 69 |
| Figura 4.14 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância IV (DMSO, 400 MHz).....                           | 69 |
| Figura 4.15 - Mapa de contorno HSQC da substância IV (DMSO, 400 MHz). ....  | 70 |
| Figura 4.16 - Mapa de contorno HMBC da substância IV (DMSO, 400 MHz).....   | 70 |
| Figura 4.17 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância V (Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400MHz).....        | 74 |
| Figura 4.18 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância V (Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz)..... | 75 |



|  |     |
|--|-----|
| Figura 4.19 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância V (Acetona- <i>d</i> 6, 400 MHz). .....  | 76  |
| Figura 4.20 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância V (Acetona- <i>d</i> 6, 400 MHz). .....  | 76  |
| Figura 4.21 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância V (Acetona- <i>d</i> 6, 400 MHz). .....  | 80  |
| Figura 4.22 - Experimento de gNOESY da substância V (Acetona- <i>d</i> 6).....                               | 83  |
| Figura 4.23 - Espectro de infravermelho da substância V (Pastilha NaCl). .....                               | 85  |
| Figura 4.24 - Espectro de ultravioleta da substância V. ....   | 86  |
| Figura 4.25 - Espectro de massas de alta resolução da substância V no modo negativo. ....                    | 87  |
| Figura 4.26 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância VI (MeOD, 400MHz).....                         | 89  |
| Figura 4.27 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VI (MeOD, 400 MHz) .....                 | 90  |
| Figura 4.28 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância VI (MeOD, 400 MHz). ....                    | 90  |
| Figura 4.29 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VI (MeOD, 400 MHz) .....                    | 91  |
| Figura 4.30 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VI (MeOD, 400 MHz). ....                    | 94  |
| Figura 4.31 - Experimento de gROESY da substância VI (MeOD, 400 MHz). .....                                  | 97  |
| Figura 4.32 - Espectro de infravermelho da substância VI (Pastilha NaCl). .....                              | 98  |
| Figura 4.33 - Espectro de ultravioleta da substância VI. ....  | 99  |
| Figura 4. 34 - Espectro de massas de alta resolução da substância VI no modo negativo. ....                  | 100 |
| Figura 4. 35 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância VII (Acetona- <i>d</i> 6, 400MHz)..           | 104 |
| Figura 4.36 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VII (Acetona- <i>d</i> 6, 400MHz). ..... | 104 |
| Figura 4.37 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância VII (Acetona- <i>d</i> 6, 400MHz). ..... | 105 |
| Figura 4.38 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância VII (Acetona- <i>d</i> 6, 400MHz). ..... | 105 |
| Figura 4.39 - Experimento de gNOESY da substância VII (MeOD, 400 MHz). .....                                 | 107 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 4.40 - Espectro de infravermelho da substância VII (Pastilha NaCl). .....                              | 108 |
| Figura 4.41 - Espectro de ultravioleta da substância VII. ....  | 109 |
| Figura 4.42 - Espectro de massas de alta resolução da substância VII. ....                                    | 110 |
| Figura 4.43 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância VIII (MeOD, 400MHz).....                          | 112 |
| Figura 4.44 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VIII (MeOD 400MHz).....                   | 112 |
| Figura 4.45 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância VIII (MeOD, 600 MHz).....                    | 113 |
| Figura 4.46 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=8\text{Hz}$ , MeOD, 600 MHz).....  | 114 |
| Figura 4.47 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=4\text{Hz}$ MeOD, 600 MHz).....    | 116 |
| Figura 4.48 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=4\text{ Hz}$ , MeOD, 600 MHz)..... | 118 |
| Figura 4.49 - Espectro de infravermelho da substância VIII (Pastilha NaCl). .....                             | 120 |
| Figura 4.50 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância IX (MeOD, 400MHz).....                            | 122 |
| Figura 4.51 -Mapa de contorno do experimento de COSY da substância IX (MeOD 400MHz).....                      | 123 |
| Figura 4.52 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância IX (MeOD, 400MHz).....                       | 124 |
| Figura 4.53 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância IX (MeOD, 400MHz).....                       | 124 |
| Figura 4.54 - Espectro de MS/MS da substância X para o íon $m/z$ 521,2 Da.....                                | 127 |
| Figura 4.55 - Proposta de fragmentação MS/MS para o íon $m/z$ 532,2 Da da substância IX.....                  | 129 |
| Figura 4.56 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância X (MeOD, 400MHz).....                             | 130 |
| Figura 4.57 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância X (MeOD, 400 MHz).....                    | 131 |
| Figura 4.58 - Mapa de contorno de HSQC da substância X (MeOD, 400MHz).....                                    | 132 |
| Figura 4.59 - Mapa de contorno de HMBC da substância X (MeOD, 400MHz).....                                    | 133 |
| Figura 4.60 - Experimento de gNOESY da substância X. ....   | 137 |
| Figura 4.61 - Experimento de infravermelho da substância X. ....  | 138 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 4.62 - Espectro de massas “full scan” entre m/z 500 e 555 Da da substância X.....  | 139 |
| Figura 4.63 - Espectro de MS/MS da substância X para o íon m/z 533,2 Da.....  | 140 |
| Figura 4.64 - Proposta de fragmentação MS/MS para o íon m/z 532,2 Da da substância X.....   | 141 |
| Figura 4.65 - Espectro de MS/MS do íon m/z 511,2 Da da substância X.....  | 142 |
| Figura 4.66 - Proposta de fragmentação do íon m/z 511,2 DA da substância X. ...   | 143 |
| Figura 4.67 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância XI (DMSO, 400MHz). ....   | 145 |
| Figura 4.68 - Mapa de contorno de HSQC da substância XI (DMSO, 400MHz). ...   | 145 |
| Figura 4.69 - Mapa de contorno de HMBC da substância XI (DMSO, 400MHz). ...   | 146 |
| Figura 4.70 - Mapa de contorno do experimento de COSY da Substância XI (DMSO, 400 MHz).....   | 149 |
| Figura 4.71 - Espectro de MS/MS do íon m/z 505,9 Da da substância XI.....   | 149 |
| Figura 4.72 - Proposta de fragmentação do íon m/z 505,9 Da da substância XI....   | 150 |
| Figura 4.73 - Espectro de dicroísmo circular da substância V (MeOH). ....   | 155 |
| Figura 4.74 - Espectro de dicroísmo circular da substância VI (MeOH). ....  | 155 |
| Figura 4.75 - Espectro de dicroísmo circular da substância VII (MeOH). ....   | 156 |
| Figura 4.76 - Espectro de dicroísmo circular da substância VIII (MeOH). ....  | 156 |
| Figura 4.77 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> obtidos em quadruplicata com a fibra preta (CAR/PDMS – Carboxen/Polidimetilsiloxano) em 15, 30 e 45 minutos.....       | 182 |
| Figura 4.78 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> obtidos em quadruplicata com a fibra azul (PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno) em 15, 30 e 45 minutos. .... | 183 |
| Figura 4.79 - Espectros de massas dos compostos obtidos pelo CG-EM comparados com espectros da literatura (ADAMS, 2007) e NIST(2008).....   | 188 |
| Figura 4.80 - Compostos voláteis identificados da fibra azul.....   | 190 |
| Figura 4.81 - Cromatograma obtido da extração de voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> pelo método de aeração. ....   | 190 |
| Figura 4. 82 – Compostos voláteis das folhas obtido pelo método de aeração.....   | 191 |

## Lista de Tabelas

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 3.1 - Dados das massas dos extratos obtidos da planta <i>A. graveolens</i> e seus respectivos códigos .....   | 24  |
| Tabela 3.2 - Dados das massas das frações obtidos da raiz da planta <i>A. graveolens</i> e seus respectivos códigos.....   | 25  |
| Tabela 3.3 - Dados das massas das frações obtidos do caule da planta <i>A. graveolens</i> e seus respectivos códigos .....   | 36  |
| Tabela 3.4 - Descrição da dieta artificial para <i>S. frugiperda</i> para 50 tubos .....   | 42  |
| Tabela 3.5 - Condições de condicionamento para as fibras utilizadas .....  | 46  |
| Tabela 3.6 - Número de carbonos de cada hidrocarboneto e seus respectivos tempo de retenção.....   | 47  |
| Tabela 4.1 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo (substância I) juntamente com os dados encontrados na literatura..... | 63  |
| Tabela 4.2 - Dados de RMN $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (substância III) juntamente com os dados encontrados na literatura.....     | 67  |
| Tabela 4.3 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do ácido 5-O-cafeoilquínico (substância IV) juntamente com os dados encontrados na literatura.....              | 73  |
| Tabela 4.4 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância V juntamente com os dados encontrados na literatura .....   | 81  |
| Tabela 4.5 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância V .....   | 82  |
| Tabela 4.6 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substâncias VI e matosina (BANDEIRA <i>et al.</i> , 2003).....  | 96  |
| Tabela 4.7 - Dados obtidos do experimento gROESY da substância VI.....   | 97  |
| Tabela 4.8 - Dados de RMN $^1\text{H}$ das substâncias VI, VII e matosina (BANDEIRA <i>et al.</i> , 2003).....   | 102 |
| Tabela 4.9 - Dados de RMN $^{13}\text{C}$ das substâncias VI e VII e Matosina (BANDEIRA <i>et al.</i> , 2003).....   | 103 |
| Tabela 4.10 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância VII .....  | 106 |
| Tabela 4.11 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substância VIII e VII .....  | 119 |
| Tabela 4.12 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substâncias VIII e IX.....   | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 4.13 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância X e Lophirona L ((ANURADHA <i>et al.</i> , 2006).....  | 136 |
| Tabela 4.14 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância X.....   | 136 |
| Tabela 4.15 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância XI e ácido 4-O-galoilcrogênico (MA, J. <i>et al.</i> , 2003) .....   | 151 |
| Tabela 4.16 - Dados de $[\alpha]_D^*$ e Dicroísmo circular (nm) de V-X .....   | 154 |
| Tabela 4.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL.....                                      | 158 |
| Tabela 4.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de raízes de <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL .....     | 159 |
| Tabela 4.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de caule de <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL .....        | 160 |
| Tabela 4.20 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL.....                                      | 161 |
| Tabela 4.21 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com com galato de metila nas concentração de 2 mg/mL.....   | 162 |
| Tabela 4.22 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão de miricetrina na concentração de 0,1 mg/mL.....                                     | 164 |
| Tabela 4.23 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias IV-VII isoladas de <i>A. graveolens</i> .....                                  | 165 |
| Tabela 4. 24 - 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 etanólicos de <i>A. graveolens</i> . Temp.: $25\pm 1$ °C; UR $70\pm 5\%$ e fotofase de 12 h..... | 172 |

Tabela 4.25 - Médias da duração de fase larval e pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações das raízes de *A. graveolens*, a 1000 mg.kg<sup>-1</sup>. Temp.: 25 ± 10C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12 h ... 174

Tabela 4.26 - Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com galato de metila isolado de *A. graveolens*. Temp.: 25 ± 1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12 h 176

Tabela 4.27 - Mortalidade causada pelos extratos etanólicos e frações das raízes e dos galhos de *A. graveolens* sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*... 179

Tabela 4.28 - Mortalidade causada pela miricetrina (substância I) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* ..... 180

Tabela 4.29 - Mortalidade causada pelo galato de metila (substância II) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*..... 180

Tabela 4.30 - Compostos voláteis identificados em *A. graveolens*..... 189

Tabela 4.31 - Compostos voláteis das folhas de *A. graveolens* pelo método de aeração..... 191

## Lista de Fluxogramas

|  |    |
|--|----|
| Fluxograma 3.1 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta <i>A. graveolens</i> .....               | 26 |
| Fluxograma 3.2 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta <i>A. graveolens</i> .....               | 27 |
| Fluxograma 3.3 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta <i>A. graveolens</i> .....               | 28 |
| Fluxograma 3.4 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta <i>A. graveolens</i> .....               | 29 |
| Fluxograma 3.5 - Reunião das frações contendo a substância I.....  | 30 |
| Fluxograma 3.6 - Reunião das frações contendo a substância II.....   | 30 |
| Fluxograma 3.7 - Reunião das frações contendo a substância III.....  | 31 |
| Fluxograma 3.8 - Fração contendo a substância IV.....  | 31 |
| Fluxograma 3.9 - Reunião das frações contendo a substância V.....  | 32 |
| Fluxograma 3.10 - Reunião das frações contendo a substância VI.....  | 32 |
| Fluxograma 3.11 - Reunião das frações contendo a substância VII.....   | 33 |
| Fluxograma 3.12 - Reunião das frações contendo as substâncias VIII, IX, X. ....                                      | 34 |
| Fluxograma 3.13 - Fracionamento da fração acetato de etila do caule e de galhos da planta <i>A. graveolens</i> ..... | 37 |
| Fluxograma 3.14 - Fracionamento da fração acetato de etila do caule e galhos da planta <i>A. graveolens</i> .....    | 38 |
| Fluxograma 3.15 - Reunião das frações contendo a substância I.....   | 38 |
| Fluxograma 3.16 - Reunião das frações contendo a substância II.....  | 39 |
| Fluxograma 3.17 - Reunião das frações contendo a substância XI.....  | 39 |

## Lista de Gráficos

|   |     |
|---|-----|
| Gráfico 4.1 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos etanólicos de <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL.....           | 158 |
| Gráfico 4.2 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de raízes de <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL. .... | 159 |
| Gráfico 4.3 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de caule de <i>A. graveolens</i> nas concentrações de 2 mg/mL. ....  | 160 |
| Gráfico 4.4 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila nas concentrações de 0,1 mg/mL e 1mg/mL. ....                          | 162 |
| Gráfico 4.5 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila na concentração de 2 mg/mL. ....                                       | 163 |
| Gráfico 4.6 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com miricetrina na concentração de 0,1 mg/mL. ....  | 164 |
| Gráfico 4.7 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias IV-VII isoladas de <i>A. graveolens</i> . ....                           | 165 |
| Gráfico 4.8 - Efeito dos extratos CGV e GFV no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....   | 166 |
| Gráfico 4.9 - Efeito dos extratos de RV e FV de <i>A. graveolens</i> no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....  | 167 |
| Gráfico 4.10 - Efeito das frações RVH, RVACT e RVAQ de <i>A. graveolens</i> no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....   | 167 |
| Gráfico 4.11 - Efeito das frações CGVACT e CGVAQ de <i>A. graveolens</i> no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....  | 168 |



|  |     |
|--|-----|
| Gráfico 4.12 - Efeito da miricetrina no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....   | 169 |
| Gráfico 4.13 - Efeito de galato de metila no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....  | 169 |
| Gráfico 4.14 - Efeito da substância ácido 5-O-cafeoilquínico no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....   | 169 |
| Gráfico 4.15 - Efeito das chalconas diméricas V, VI e VII no crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....  | 170 |
| Gráfico 4.16 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de <i>A. graveolens</i> . Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.....                        | 172 |
| Gráfico 4.17 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de <i>A. graveolens</i> .Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h. ....                         | 172 |
| Gráfico 4.18 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com frações das raízes de <i>A. graveolens</i> . Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.....                         | 174 |
| Gráfico 4.19 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de <i>A. graveolens</i> .Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h. ....                         | 175 |
| Gráfico 4.20 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com a substância de galato de metila de <i>A. graveolens</i> . Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h. ....          | 176 |
| Gráfico 4.21 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com a substância de galato de metila de <i>A. graveolens</i> . Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h. ....              | 176 |
| Gráfico 4.22 - Médias da mortalidade causadas pelos extratos etanólicos e frações das raízes, do caule e dos galhos de <i>A.graveolens</i> sobre lagartas de segundo ínstar de <i>S. frugiperda</i> . Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h. .... | 178 |
| Gráfico 4.23 - Médias da mortalidade delagartas de segundo ínstar de <i>S. frugiperda</i> causa por miricetrina (substância I). Temp.: 25 ±1 °C; UR 70 ± 5% e fotofase de 12h. ....  | 179 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Gráfico 4.24 - Médias da mortalidade causada por galato de metila (substância II) sobre lagartas de segundo ínstar de <i>S. frugiperda</i> . Temp.: $25 \pm 1$ °C; UR $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h..... | 180 |
|---|-----|

## RESUMO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Astronium graveolens* E DA AÇÃO DE SEUS CONSTITUINTES SOBRE O FORMIGUEIRO de *Atta sexdens rubropilosa*** – O Brasil apresenta uma rica fauna e flora, por esse motivo é conhecido como um país megadiverso. Esta diversidade possibilita o isolamento e a identificação de substâncias que se tornam promissoras em diversas áreas e um exemplo é a atividade inseticida de diversas substâncias na agricultura. Este trabalho teve como resultados a identificação de voláteis das folhas, o estudo fitoquímico e os ensaios inseticidas e fungicidas dos extratos orgânicos da espécie *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) pertencente à Ordem Sapindales. Dentre os testes frente à formiga cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa*) e o seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*, as frações acetato de etila dos extratos etanólicos das raízes, caule e galhos se destacaram. Paralelamente foi avaliada a ação destas frações frente à *Spodoptera frugiperda*, entretanto, as frações não apresentaram atividades promissoras. O estudo fitoquímico da fração acetato de etila resultou no isolamento de 11 metabólitos secundários, divididos em: dois flavonóides, 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavona e miricetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo; três compostos fenólicos, galato de metila, ácido 5-O-cafeoilquínico, 3-O-galoil-5-O-cafeoilquínico (inérito na literatura); seis chalconas diméricas, (7''S,8''R)-(2',4,4',5,tetrahidroxichalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona; (7R,8S,7''S,8''R)-2', 4,4', 5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona; (7S,8R,7''S,8''S)-2',4,4',5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona; rel-(7R,8S,7''R,8''S)-tetrahydro-7,7''-bis(4-hidroxifenil)-8,8''-(furandiil)-bis-(2,4-dihidroxifenil); 4,5,4'dihidroxi-7,2'-oxo-chalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',4'',2''',4'''-trihidroxichalcona; 4,4'dihidroxi-7,2'-oxo-chalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',2''',4'''-tetrahidroxichalcona. As chalconas diméricas são inéditas no gênero e, exceto a primeira, na literatura.

## ABSTRACT

### PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Astronium graveolens* AND ACTION OF THEIRS CONSTITUENTS ON LEAF CUTTING ANTS NEST of *Atta sexdens rubropilosa* -

Brazil has a rich fauna and flora, for these reasons it is called as mega-diverse country. This diversity enables the isolation and identification of substances that become promising in several areas and an example is the insecticidal activity of various substances in agriculture. This study presents the identification of volatiles from leaves, the phytochemical study and insecticidal and fungicidal test of fractions of organic extracts of *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) that belong to the Order Sapindales. Among the fractions tested against leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa*) and their symbiotic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*, ethyl acetate fractions of ethanolic extracts of roots, stems and branches showed good activities. In parallel was evaluated the action of those fractions against *Spodoptera frugiperda*, however, those fractions did not showed promising activities. Phytochemical study of ethyl acetate fractions resulted in the isolation of 11 secondary metabolites, two flavonoids: 5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavone and myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhaminosídeo, three phenolic compounds: epigallocatechin methyl ester, 5-O-caffeoylquinic acid, 3-O-galoil-5-cafeoilchinic acid (inedited); six dimeric chalcones, (7S,8''R)-(2',4,4',5, tetrahydrochalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone; (7R,8S,7''S,8''R)-2',4,4',5,7-pentahydroxy-7,8-dihydrochalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''dihydrochalcone; (7S,8R,7''S,8''S)-2',4,4',5,7-pentahydroxy-7,8-dihydrochalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone; rel-(7S,8S,7''S,8S)-tetrahydro-7,7''-bis-(4-hydroxyphenyl)-7,7''(furandil)-8,8,2.4''-dihydroxiphenyl;4,5,4'dihydroxy-7,2'-oxo-chalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',4'',2''',4'''-trihydroxychalcone; 4,4'dihydroxy-7,2'-oxo-chalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',2''',4'''-tetrahydroxychalcone . The dimeric chalcones are new to the genera and, except first one, in the literature.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução.....   | 3  |
| 1.1 Sapindales.....  | 4  |
| 1.1.1 A Família Anacardiaceae e o Gênero <i>Astronium</i> .....                            | 4  |
| 1.1.2 <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .....  | 6  |
| 1.1.3 <i>Spodoptera frugiperda</i> .....   | 11 |
| 1.1.4 Microextração em fase sólida.....  | 13 |
| 2 - Objetivos.....   | 17 |
| 3 - Procedimento Experimental.....   | 21 |
| 3.1 - Materiais.....   | 21 |
| 3.1.1 - Fracionamento por cromatografia em coluna (CC), utilizando as seguintes fases..... | 21 |
| 3.1.1.1 - Cromatografia por adsorção.....  | 21 |
| 3.1.1.2 - Cromatografia por filtração em gel (exclusão) e adsorção.....                    | 21 |
| 3.1.2 - Solventes.....   | 21 |
| 3.1.3 - Placas Cromatográficas.....  | 21 |
| 3.1.4 - Substâncias Comerciais.....  | 21 |
| 3.1.5 - Reveladores.....   | 21 |
| 3.1.6 - Fibras (Fase estacionária).....  | 22 |
| 3.2 - Equipamentos utilizados.....   | 22 |
| 3.2.1 - Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear.....                               | 22 |
| 3.2.2 - Espectrofotômetro no Ultravioleta (UV).....  | 22 |
| 3.2.3 - Estufa de secagem e esterilização.....   | 22 |
| 3.2.4 - Balança analítica.....   | 22 |
| 3.2.5 - Rotaevaporadores.....  | 22 |
| 3.2.6 - Cromatógrafo por CLAE.....   | 23 |
| 3.2.7 - Detectores.....  | 23 |
| 3.2.8 - Espectrômetro de massas.....   | 23 |
| 3.2.9 – Espectrômetro de Massas de Alta Resolução.....                                     | 23 |
| 3.2.10 - Espectrofotômetro no Infravermelho (IV).....                                      | 23 |
| 3.2.11 - Espectrofotômetro no Infravermelho (UV).....                                      | 23 |
| 3.2.12 - Dicroísmo circular (DC).....  | 24 |
| 3.2.13 - Polarímetro.....  | 24 |
| 3.3 - Coleta do material botânico.....   | 24 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 3.4 - Metodologia de extração .....   | 24  |
| 3.5 - Fracionamento dos extratos etanólico da raiz da planta <i>A. graveolens</i> .....                             | 25  |
| 3.5.1 - Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila da raiz da planta <i>A. graveolens</i> (RVACT).....          | 25  |
| 3.5.1.1 - Reunião das frações e refracionamento.....  | 30  |
| 3.6 - Fracionamento dos extratos etanólico do caule da planta <i>A. graveolens</i> .....                            | 35  |
| 3.6.1 - Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila da caule/galhos da planta <i>A. graveolens</i> (CGVACT)..... | 36  |
| 3.6.1.1 - Reunião das frações e refracionamento.....  | 38  |
| 3.10 - Metodologia dos ensaios biológicos.....  | 40  |
| 3.10.1 - Ensaios biológicos com as formigas cortadeiras <i>Atta sexdens rubropilosa</i> ..                          | 40  |
| 3.10.2 - Ensaios biológicos com o fungo simbionte <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> ..                             | 41  |
| 3.10.3 - Ensaios Biológicos de <i>Astronium graveolens</i> no desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> ..... | 42  |
| 3.10.4 - Ensaios Biológicos de toxicidade aguda com extratos de plantas sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> .....    | 43  |
| 3.11 - Coleta e Análise dos voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> pela técnica de Headspace-SPME .....        | 45  |
| 3.11.1 - Determinação da fibra Ideal para análise de voláteis das folhas de A. ....                                 | 46  |
| 3.11.2 - Determinação do Tempo de Exposição Ideal.....  | 46  |
| 3.11.4 - Coleta dos voláteis das folhas de <i>Astronium graveolens</i> pelo método de aeração.....                  | 48  |
| 4 - Resultados e Discussão .....  | 51  |
| 4.1 – Substâncias Isoladas.....   | 51  |
| 4.2 - Estudo Fitoquímico.....   | 54  |
| 4.2.1 - Generalidades sobre Chalconas e Flavonóides .....   | 54  |
| 4.2.1.1 - Compostos Fenólicos Isolados.....   | 58  |
| 4.2.1.1.1 - Determinação estrutural da Substância I.....  | 58  |
| 4.2.1.1.2 - Determinação estrutural da Substância II.....   | 64  |
| 4.2.1.1.3 - Determinação estrutural da Substância III.....  | 65  |
| 4.2.1.1.4 - Determinação estrutural da Substância IV .....  | 68  |
| 4.2.1.1.5 - Determinação estrutural da Substância V .....   | 74  |
| 4.2.1.1.6 – Elucidação estrutural das Substâncias VI.....   | 88  |
| 4.2.1.1.7 - Elucidação estrutural das Substâncias VII .....   | 101 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.1.1.8 - Elucidação estrutural da Substância VIII .....  | 111 |
| 4.2.1.1.9 - Elucidação estrutural da Substância IX .....  | 122 |
| 4.2.1.1.10 - Elucidação estrutural da Substância X .....  | 130 |
| 4.2.1.1.11 - Elucidação estrutural da Substância XI .....   | 144 |
| 4.2.1.1.12 - Determinação da configuração absoluta de V-X .....   | 152 |
| 4.3 - Atividades Biológicas.....  | 157 |
| 4.3.1 - Ensaio biológico com as formigas cortadeiras <i>Atta sexdens rubropilosa</i> ..   | 157 |
| 4.3.1.1 - Efeito dos extratos brutos e frações de <i>A. graveolens</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> ..... | 157 |
| 4.3.1.2 Efeito das substâncias de <i>A. graveolens</i> nos ensaios por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .....               | 161 |
| 4.3.2 - Ensaio biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> , de <i>A. sexdens rubropilosa</i> .....                           | 166 |
| 4.3.2.1 - Efeitos de extratos brutos e frações de <i>A. graveolens</i> contra o fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....                        | 166 |
| 4.3.2.2 - Efeitos de substâncias isoladas de <i>A. graveolens</i> contra o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....                  | 168 |
| 4.3.3 - Ensaio biológico no desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....   | 171 |
| 4.3.3.1 - Efeito dos extratos brutos e frações de <i>A. graveolens</i> no desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....                             | 171 |
| 4.3.3.2 - Ensaio Biológico de toxicidade aguda com extratos de plantas sobre <i>S. frugiperda</i> .....   | 178 |
| 4.4 - Coleta e Análise dos voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> pela técnica de Headspace-SPME .....   | 182 |
| 4.4.1 - Determinação da Fibra Ideal .....   | 182 |
| 4.4.2 - Determinação do Tempo de Exposição Ideal.....   | 183 |
| 4.4.3 - Compostos identificados em <i>A. graveolens</i> por HS-SPME .....   | 184 |
| 4.4.4 - Coleta dos voláteis das folhas de <i>A. graveolens</i> pelo método de aeração...  | 190 |
| 5. Conclusões.....  | 195 |
| 6. Bibliografias .....  | 199 |

## **1- Introdução**

---





## 1. Introdução

O Brasil possui uma rica biodiversidade, pois possui entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta, com mais de 55 mil espécies descritas (22% do total mundial) (Ministério do Meio Ambiente, 2010).

Esta biodiversidade acaba se tornando insumo de diversas atividades, inclusive da pesquisa acadêmica que visa à busca por novas substâncias com o intuito de descobrir ações biológicas que tragam benefícios tanto para o homem como para o meio ambiente. Um exemplo é a procura de novos compostos que possuam ação inseticida (BIGI *et al.*, 2004; VIANNA & COSTA, 1998).

Esta busca é motivada pela ação tóxica, tanto ao homem quanto ao ambiente (VEIGA JR, 2003), de diversos pesticidas utilizados atualmente. Tais produtos são utilizados muitas vezes sem auxílio técnico, expondo o homem a doenças por exposição ocupacional (ARAUJO *et al.*, 2001), como no caso dos pesticidas organofosforados que causam diversos males após uma longa exposição: dores de cabeça, tremores, náuseas, câimbras abdominais, suores, sonolência, entre outros. Além disso, a ação de inseticidas leva à sérios problemas ambientais, como a permanência por um longo tempo no solo e o aumento da resistência nas populações da praga (ANDRADE & SARNO, 1990).

Neste contexto, os produtos naturais são de grande interesse, pois apresentam uma degradação mais rápida do que os produtos sintéticos, diminuindo conseqüentemente a quantidade de resíduos no meio ambiente (VIEIRA, *et al.*, 2001).

Assim, diversas espécies e famílias de plantas estão sendo estudadas, dentre as quais se podem destacar: a) *Trichilia pallens*, pertencente à família *Meliceae* que apresentou atividade contra a traça do tomateiro (DA CUNHA *et al.*, 2006); b) os limonóides, constituintes das famílias da ordem *Rutales*, apresentam ação antifúngica (CHAMPAGNE *et al.*, 1992); c) o óleo essencial de *Ageratum conyzoides* que apresenta atividade sobre a *Spodoptera frugiperda* (LIMA *et al.*, 2010), entre outros exemplos.

## 1.1 Sapindales

MUELLNER *et al.* (2003) restringem a ordem Sapindales às famílias Meliaceae, Rutaceae, Simaroubaceae e Sapindaceae de acordo com os dados filogenéticos moleculares baseados em seqüências de DNA nuclear e plastídeo.

Entretanto, CRONQUIST (1981, 1988) propõe que a ordem Sapindales é composta pelas famílias Staphyleaceae, Melianthaceae, Bretschneideraceae, Akaniaceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Aceraceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Julianiaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae, Meliaceae, Rutaceae e Zygophyllaceae. Nestas duas classificações, a maioria das espécies estudadas pelo grupo de produtos naturais da UFSCar são de Simaroubaceae, Meliaceae e Rutaceae.

### 1.1.1 A Família Anacardiaceae e o Gênero *Astronium*

A família Anacardiaceae está incluída na ordem Sapindales e é composta de aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies.

Dentre os representantes desta família, está incluído o gênero *Astronium* (Jacquin, 1760), nome característico dos frutos que apresentam cálice persistente e acrescente que resultam num aspecto estrelado (SANTIN, 1991; CORREIA *et al.*, 2006; CARMELLO-GUERREIRO & PAOLI, 2000).

Devido às diferenças entre tamanho e forma das sépalas nas flores e frutos, o gênero foi dividido em 2 subgêneros: *Macrocalix* com 1 espécie (*A. concinnum*) e *Astronium* com 7 espécies (*A. graveolens*, *A. fraxinifolium*, *A. ulei*, *A. lecointei*, *A. glaziovii*, *A. obliquum* e *A. nelson-rosae*), estes estão distribuídos desde o México, incluindo países da América Central e da América do Sul, indo até o Paraguai e o norte da Argentina, ou seja, sua distribuição é neotropical (CARMELLO-GUERREIRO & PAOLI, 2000; SANTIN, 1991).

Algumas de suas espécies têm estudos relevantes na literatura acadêmica, entre elas:

*Astronium fraxinifolium* Schott, com os seguintes constituintes identificados: taninos pirogálicos, esteróides, triterpenos, saponinas e flavonóides (leucoantocianidinas), sendo que o extrato desta espécie mostrou atividade contra as larvas de *Aedes aegypti* (COSTA *et al.*, 2007).

*Astronium urundeuva* é utilizado na medicinal popular devido a suas ações antiulcerogênicas e efeitos sobre o trato gastrointestinal, no entanto, os constituintes responsáveis por estas ações ainda não foram identificados (DESMARCHELIER *et al.*, 1999). Esta espécie foi restabelecida no gênero *Myracrodruon urundeuva* após estudos envolvendo o tipo de fruto e placenta (SANTIN & LEITÃO-FILHO, 1991), sendo reforçada através das diferenças de embriões por CARMELLO-GUERREIRO & PAOLI (2000);

*Astronium balanseae* apresentou atividade contra o microrganismo *Klebsiella penumoniae* (SALVAT *et al.*, 2004).

*Astronium graveolens* (**Figura 1.1**), conhecido popularmente como guaritá, gibatão, gonçalo alves, aroeirão, entre outros, será objeto de estudo nesta dissertação. No Brasil esta espécie é encontrada no sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná (LORENZI, 2002).

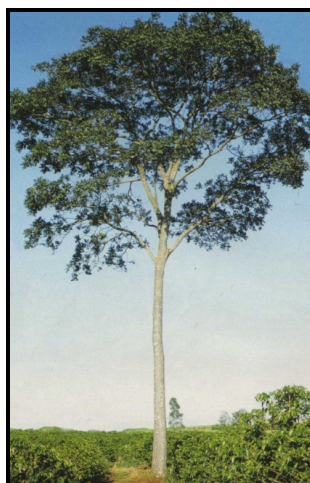


Figura 1.1 - *Astronium graveolens*.  
(LORENZI, 2002)

Sua importância econômica é representada pelo uso da madeira nobre, sendo apropriado na construção civil e paisagismo (LORENZI, 2002).

Um dos estudos envolvendo esta espécie foi realizado por SILVA *et al.* (2009) que identificaram nas folhas e caule de *Astronium graveolens* uma mistura de polifenóis, derivados de ácido gálico, flavonóides e ácido quínico (**Figura 1.2**).

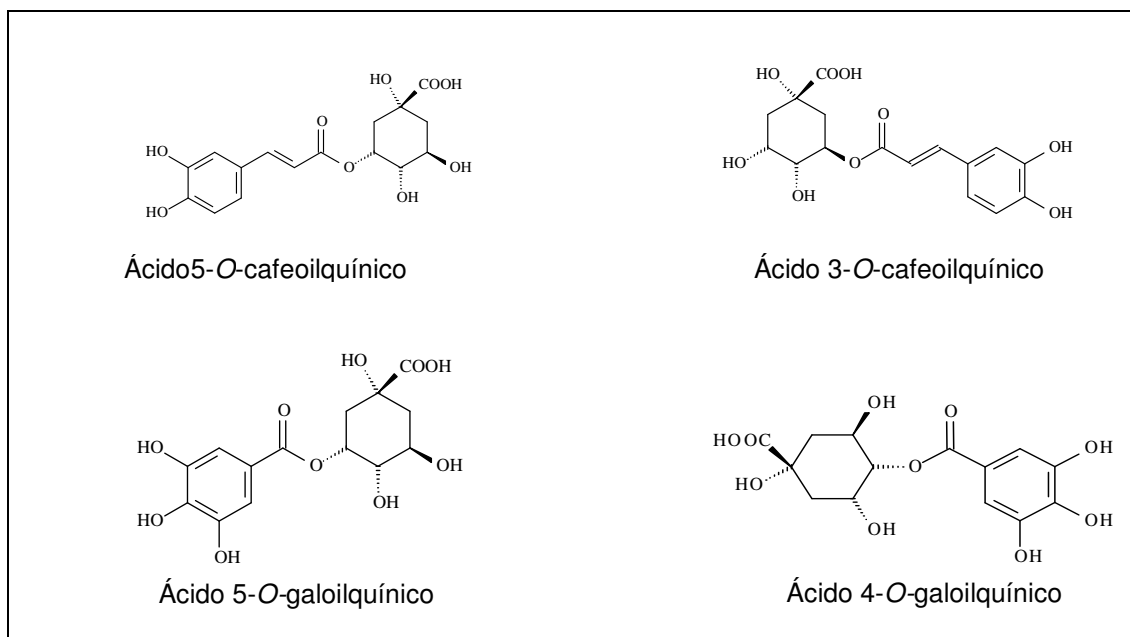


Figura 1.2 - Substâncias isoladas do caule de *A. graveolens*.

Além disso, CHEN *et al.* (1984) e FILHO *et al.* (2002) demonstraram que substâncias voláteis provenientes de *A. graveolens*, como o trans-beta-ocimeno [(E)-3,7-Dimetil-1,3,6-octatrieno], são repelentes para *Atta laevigata*.

Esta informação juntamente com o pouco conhecimento sobre a espécie impulsionou o trabalho que visou à busca de produtos naturais no controle de formigas, além da contribuição para a quimiosistemática da família Anacardiaceae.

### 1.1.2 *Atta sexdens rubropilosa*

As formigas estão presentes nas regiões neotropicais, América do Norte, Norte do México, Europa, África, Ásia, entre outros lugares. Elas compreendem 11 subfamílias, constituindo 297 gêneros e aproximadamente 8.800 espécies (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Estima-se que as formigas representam de 10 a 15% de toda a biomassa animal (RICO-GRAY & OLIVEIRA, 2007).

A tribo Attini, sub-família Myrmicinae, é composta por 12 gêneros e aproximadamente 210 espécies. Entre os gêneros se encontram *Atta* (Figura 1.3) e *Acromyrmex*, conhecidas respectivamente como saúvas e quenquéns (CURRIE *et al.*, 1999a; FOWLER & STILES, 1980; ALMADO, 2007, CURRIE, 2001). Elas ocorrem somente na América, sendo sua dispersão do sul dos Estados Unidos até a Argentina. No Brasil existem mais de 1000 espécies, sendo conhecidas mais de 40 espécies, somando estes dois gêneros (JACCOUD, 2000).

A *Atta sexdens rubropilosa* é encontrada em Minas Gerais (Sul e Centro), Espírito Santo, Rio de Janeiro, Sul do Mato Grosso, Sul de Goiás e Norte e Oeste do Paraná (DELLA LUCIA, 1993; JACCOUD, 2000).



Figura 1.3 - *Atta sexdens rubropilosa*.

(Fonte: <http://www.cbip.ufscar.br/index.html>. Acessado em 19/07/2010.)

As formigas são consideradas insetos eusociais, ou seja, as gerações se superpõem no mesmo ninho, ocorre o cuidado com a prole e também há divisão das tarefas entre as operárias. Estas ações tornam os saueiros bem desenvolvidos, sendo denominado por isso como superorganismos (HOLLDOBLER & WILSON, 1990). Estes apresentam acima dos ninhos, montes de terras granuladas resultantes das escavações que geram diversas galerias que interligam as câmaras, também denominados painéis, responsáveis por acomodar a rainha, o jardim de fungos e até mesmo lixo (JACCOUD, 2000).

As tarefas realizadas no ninho são determinadas pelo tamanho de cada indivíduo, sendo este um dos fatores determinantes para a divisão de castas (AUTORI, 1950).

As formigas menores são conhecidas como operárias jardineiras, sua função é alimentar os ovos, larvas e pupas que estão localizadas no jardim de fungos. As médias são denominadas operárias cortadeiras e entre as suas atividades estão: escavação do ninho, corte, transporte e cuidados iniciais dos vegetais, sendo este processo denominado forrageamento (MARICONI, 1976; JACCOUD, 2000). As maiores são as soldadas, estas são mais fortes e responsáveis por cuidar principalmente da defesa do formigueiro. As operárias têm uma expectativa de vida de 6 meses (JACCOUD, 2000).

A rainha é a única fêmea reprodutiva desde a fundação do formigueiro até sua morte. Pode viver por mais de 20 anos, de modo que a sua morte determina a extinção do ninho (JACCOUD, 2000).

Para garantir a proteção do formigueiro contra bactérias e fungos, alguns mecanismos são adotados, Lacerda (2008) observou em relação à câmara de lixo que as contaminações são evitadas através do processo de limpeza (“grooming”), inspeção e imobilização, possibilitando a operária lixeira transitar pela colônia. Além disso, as operárias que trabalham na parte externa, ou seja, transportadoras de lixo e forrageadoras apresentam uma glândula metapleurálica (responsável pela produção de antibióticos) mais desenvolvida, diminuindo a probabilidade de trazer contaminações ao formigueiro.

Porém, os compostos desta glândula não são eficientes contra *Escovopsis*, um parasita virulento encontrado no jardim de fungos (BOT *et al.*, 2002). Estudos sugerem que os nutrientes necessários para a permanência deste no ninho são obtidos através do micélio (*Leucoagaricus gongylophorus*). No ato de proteção do formigueiro contra este microorganismo, ocorre uma redução da massa de jardim de fungos, ou seja, partes afetadas pelo parasita são removidas pelas operárias. O não controle deste parasita pode ocasionar a devastação da colônia (CURRIE *et al.*, 1999b).

Assim, o controle ocorre através de um mutualista que atua inibindo através de antibióticos o crescimento do fungo *Escovopsis*, que trata-se de uma bactéria filamentosa pertencente ao gênero *Streptomyces* que habita apenas o corpo das formigas da tribo Attini (CURRIE *et al.*, 1999a).

Outra característica comum às espécies desta tribo é a associação que ocorre há 45-65 milhões de anos entre o fungo basidiomiceto, *Leucoagaricus gongylophorus* (jardim de fungos) e a formiga *Atta sexdens rubropilosa* (MUELLER *et al.*, 2001).

Antes da incorporação do fungo ao jardim, os fragmentos das folhas são limpos e raspados, quando cortados apresentam a seiva da folha e a saliva das formigas. Nestes fragmentos são depositadas gotas de fezes líquidas. O fragmento de folha então é inserido na matriz do jardim de fungo e vários tufo de micélio são plantados nele (MARTIN, 1970).

As folhas são fundamentais, pois apresentam armazenamento de amido (polímeros de glicose) que representam cerca de 5 a 8% do peso seco da folha

(BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Estes nutrientes são utilizados pelas formigas após serem assimilados pelo fungo simbiote (DE SIQUEIRA *et al.*, 1998), sendo capaz de fornecer até 9% da energia necessária para as operárias (BASS & CHERRETT, 1995).

RICHARD *et al.* (2005) observou que tanto o gênero *Atta* como *Acromyrmex* apresentam atividades enzimáticas complementares, enquanto as formigas degradam substratos de baixo peso molecular (oligossacarídeos e heterosídeos), o fungo degrada polissacarídeos devido à alta atividade da enzima polissacaridase, sendo esta atividade regulada através da concentração de glicose existente no ninho (SILVA *et al.*, 2006).

Assim, as operárias cortadeiras levam vegetais frescos, principalmente as folhas, que são utilizados para a alimentação das formigas e desenvolvimento do fungo, sendo este fonte de alimentação para as larvas (SILVA *et al.*, 2003 apud SILVA *et al.*, 2006; MARTIN, 1970). SILVA *et al.* (2003) sugerem que o ato de “lamber” o jardim de fungos, seria uma forma de ingerir os produtos hidrolisados das folhas.

O material vegetal não utilizado pelas formigas cortadeiras favorece o desenvolvimento das cadeias alimentares e mudanças nas características do solo (ABRIL & BUCHER, 2003).

ABRIL & BUCHER (2003) observaram que as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas devido ao grande volume de material vegetal para sustentar o ninho, este constituído por um fungo basidiomiceto típico biotrófico. As principais espécies herbívoras são dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, tornando-as responsáveis pelos prejuízos à agricultura e às áreas reflorestadas (GUSMÃO & LOECK, 1999; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; AMANTE, 1967; CURRIE, 2001).

*Atta sexdens rubropilosa* destaca-se como uma das principais pragas nas florestas de *Pinus* e *Eucalyptus* (BOARETTO & FORTI, 1997; ZANUNCIO, 1993, apud BIGI *et al.*, 2004). Quando o formigueiro não é controlado, as ações por parte das formigas cortadeiras podem levar a perda de até 30% do plantio em um período de um ano das árvores do gênero *Eucalyptus* (ALMADO, 2007).

OLIVEIRA *et al.* (2004) observou que há redução dos cortes quando a planta de eucalipto já sofreu ataque de outro herbívoro, indicando que compostos secundários poderiam estar atuando nesta ação.



FILHO *et al.* (2002), em estudos de atratividade, evidenciaram que dentre as plantas estudadas, as mais atrativas aos ataques por formigas foram as *Gmelina arborea* e *Caesalpinia ferrea*.

O método mais utilizado para controle das formigas cortadeiras é o uso de iscas que consistem na adição da substância tóxica, principalmente, ao óleo de soja (veículo) juntamente com um atrativo, cítricos desidratados, denominadas iscas granuladas, seguido pelo método de termonebulização (BOARRETO & FORTI, 1997; DELLA LUCIA, 1997; PETERNELLI *et al.*, 2008).

Atualmente os principais inseticidas utilizados no controle de formigas no Brasil são fipronil, deltametrina e sulfluramida, porém, estes compostos permanecem por muito tempo no ambiente e poluem o solo e as fontes de água (BOARETTO & FORTI, 1997, EMBRAPA, 2003).

Assim, a busca de novos inseticidas é cada vez maior, bem como de produtos que diminuam sua ação sobre o meio ambiente e que sejam mais seletivos em relação aos alvos. Neste contexto, algumas características de interesse foram observadas em componentes presentes em diversas plantas, que atuam no fungo e/ou na formiga. FERNANDES *et al.* (2002) demonstraram que o óleo extraído da semente de tangerina poderá ser utilizado como substância de ação inseticida sobre as formigas cortadeiras. ALMEIDA *et al.* (2007) mostraram que compostos isolados da *H. puberulla* (Rutaceae) foram eficientes contra a formiga cortadeira e o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. GODOY *et al.* (2005) demonstraram a atividade de cumarinas, entre elas a xantiletina contra o fungo simbiote.

SANTOS-OLIVEIRA *et al.* (2006) observaram que extratos obtidos da semente do Nim apresentaram-se tóxicos, via ingestão, as operárias de *A. sexdens rubropilosa*, embora DE SOUZA *et al.* (2009) observaram o ataque destas formigas a uma cultura de Nim (*Azadirachta indica*).

### 1.1.3 *Spodoptera frugiperda*

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), pertencente à ordem Lepidoptera, família Noctuidae, é conhecida como lagarta do cartucho do milho (**Figura 1.4**) e causa perdas em todos os estágios do desenvolvimento da planta (WILLIAMS & DAVIS, 1990; CRUZ & OLIVEIRA, 1997; CRUZ *et al.*, 2002). Esta praga também se manifesta na cultura do algodão (BARROS *et al.*, 2005) e do arroz (GIOLO *et al.*, 2002)



Figura 1.4 - *Spodoptera frugiperda*.

(Fonte: <http://www.cbip.ufscar.br/index.html>. Acessado em 10/07/2010.)

No Brasil cerca de 250 milhões de dólares são utilizados anualmente para a extinção de pragas do cultivo de milho. Estima-se que a lagarta do cartucho seja responsável por 25% das pragas que ocorrem na plantação do milho, levando a perda de até 38% da produção (WAQUIL & VILELLA, 2003).

Entre os danos causados pela lagarta se encontram a transparência das folhas, o retardamento do crescimento, a não formação de grãos e até mesmo a morte da planta. Estes danos ocorrem quando os ovos depositados por mariposas eclodem e entram no período larval, que dura cerca de 20 dias. Nesta fase as larvas atuam raspando as folhas até que essas se tornem transparentes (**Figura 1.5**). Posteriormente a lagarta se aloja no cartucho do vegetal, por onde atua até próximo ao estágio da pupa, neste estágio, as larvas afetam o crescimento da planta ou até mesmo causam sua morte. A lagarta então desenvolvida penetra no solo, fase pré pupal (duração de 1 dia), a fase pupal é atingida e dura cerca de 11 dias (CRUZ *et al.*, 2002; CRUZ, 2008).



Figura 1.5 - Planta do milho após ataque de *Spodoptera frugiperda*.  
([http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_5\\_ed/prvegetativa.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/prvegetativa.htm).  
Acessado dia 19/07/2010.)

O crescimento populacional da lagarta depende de diversos fatores, entre eles está à adaptação da lagarta aos diferentes hospedeiros. BUSATO *et al.* (2004) observaram a preferência das lagartas pelo milho do que a capim arroz, arroz irrigado e sorgo. GIOLO *et al.* (2002) observaram que as populações de *S. frugiperda* apresentavam duração do ciclo total e peso de pupas superior as populações coletadas sobre o hospedeiro arroz. As populações de *S. frugiperda* coletadas sobre o hospedeiro arroz apresentam viabilidade do ciclo total superior às populações coletadas sobre o hospedeiro milho.

Outro interferente no desenvolvimento da larva é o local: em regiões tropicais ocorre a sobreposição de gerações devido à temperatura não interferir no desenvolvimento da lagarta. Outros fatores também são levados em consideração como a ação dos outros agentes de controle, como os inimigos naturais ou o controle artificial feito pelo homem (WAQUIL & VILELLA, 2003).

Entre os controles biológicos a serem utilizados estão os parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* e pelo entomopatógeno *Baculovirus spodoptera* (REUNIÃO, 2005; MARTINAZZO *et al.*, 2007). Porém o uso de controle químico é um dos principais meios de se exterminar a praga. Orienta-se que este tipo de controle se inicie quando 20% das folhas apresentem os sinais de raspagem (REUNIÃO, 2005). Entre os inseticidas que se apresentaram eficientes estão teflubenzuron e spinosad, que se mostraram eficazes na fase inicial de desenvolvimento da cultura, reduzindo os danos desta (MARTINS *et al.*, 2006).

Outra alternativa é a utilização de híbridos do milho, como é o caso do milho Bt, que contem a expressão do gene Bt, este oriundo do gênero *Bacillus*, que produzem cristais denominados  $\delta$ -endotoxinas, que interagem no trato digestivo, levando a perda de fome e a morte do inseto por septicemia (LOGUERCIO *et al.*, 2002).

Porém, este método envolve questões econômicas e de biossegurança, deste modo, a procura de novos inseticidas de origem vegetal tem sido cada vez maior, visto a busca por produtos que sejam menos tóxicos para o homem como também para o meio ambiente (TORRECILLAS & VENDRAMIM, 2001; VIANA & PRATES, 2003). VIANA & PRATES (2003) observaram que os extratos das folhas de *Azadirachta* quando presentes nas folhas consumidas pelas lagartas acabavam interferindo no desenvolvimento e na mortalidade das lagartas. VIANA & PRATES (2003) também evidenciaram a ação inseticida das folhas de *Azadirachta*.

Outros extratos também apresentaram resultados promissores no controle de *S. frugiperda*, entre eles estão os extratos hexânico e metanólico de folhas e o hexânico de ramos de *Trichilia clausenii* (Meliaceae) (MATOS *et al.*, 2006), os extratos pertencentes às famílias Lauraceae (*Ocotea minarum* e *Nectandra megapotamica*), Malphiaceae (*Mascagnia pubiflora*), Combretaceae (*Terminalia argentea*), Bignoniaceae (*Tabebuia aurea*) (RODRIGUES *et al.*, 2008) e Piperaceae (*Piper tuberculatum*) (CASTRO *et al.*, 2008). Alguns óleos essenciais também apresentaram atividade, entre eles se encontra o de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) (LIMA *et al.*, 2010). Estas pesquisas incentivam a busca de produtos que diminuam os problemas causados por controles químicos, como o desequilíbrio ecológico e a poluição (POLANCZYK *et al.*, 2000).

#### 1.1.4 Microextração em fase sólida

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) tem como função analisar voláteis em determinadas amostras e sua aplicação tem se mostrado eficiente em diversas áreas, entre elas estão a ambiental (SILVA *et al.*, 1999; BARRINUEVO & LANÇAS, 2001; PARREIRA & CARDEAL, 2005), alimentícia (OLIVEIRA *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008), análises clínicas (PAIVA *et al.*, 2007), entre outras.

Esta técnica associada à espectrometria de massas tem sido cada vez mais utilizada, pois se mostrou rápida, prática e eficiente para amostras com baixas

concentrações devido a sua sensibilidade (BARRINUEVO *et al.*, 2001; GALLARDO *et al.*, 2009). Além disso, a ausência de solvente se torna uma vantagem, uma vez que os picos das amostras não são encobertas por este (VIEIRA *et al.*, 2001).

A SPME possibilita a extração por 3 maneiras:

-**Imersão direta:** a fibra é exposta diretamente na amostra (KOMATSU & VAZ, 2004, COSTA & SANT'ANA, 2008).

-**Membrana:** em que uma membrana encobre a fibra, para proteção desta (GALLARDO *et al.*, 2009).

-**"Headspace"**: que consiste em expor a fibra revestida por uma fase estacionária de substância adsorvente a uma fração de vapor em um sistema fechado, como demonstrado na **Figura 1.6**. Esta técnica se baseia em termodinâmicas e de transferência de massa (COSTA & SANT'ANA, 2008; GALLARDO *et al.*, 2009).

O revestimento da fibra é determinado de acordo com as características do analito. Encontram-se no mercado as de polidimetilsiloxano (PDMS) (HO *et al.*, 2006), polidimetilsiloxano/carboxen (PDMS/CAR) (LESTREMAU *et al.*, 2001), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) (VALLEJO-CORDOBA *et al.*, 2004), entre outras.

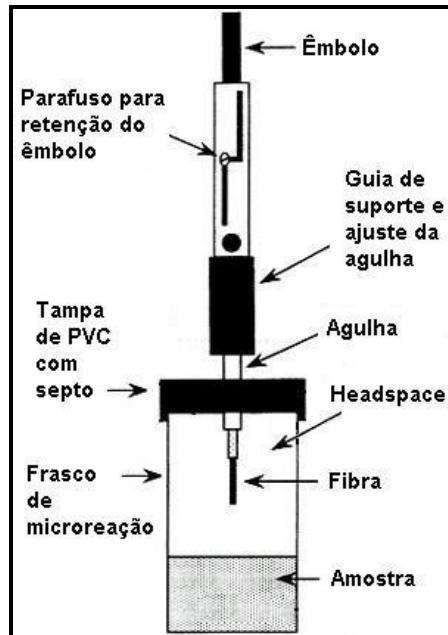


Figura 1.6 - Extração por headspace com utilização de fibra.

Fonte: ([http://amarillo.tamu.edu/programs/plantpath/karnal\\_bunt/index.html](http://amarillo.tamu.edu/programs/plantpath/karnal_bunt/index.html))

## **2 – Objetivos**

---



## 2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Estudo fitoquímico da raiz, caule e galhos da espécie *Astronium graveolens*;
- Avaliar a atividade dos constituintes químicos da planta *Astronium graveolens* sobre a formiga cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa*) e seu fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*);
- Determinar a ação dos constituintes químicos isolados sobre a lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*);
- Determinar componentes voláteis das folhas da *A. graveolens*.





### **3 - Procedimento Experimental**



### **3 - Procedimento Experimental**

#### **3.1 - Materiais**

##### **3.1.1 - Fracionamento por cromatografia em coluna (CC), utilizando as seguintes fases**

###### **3.1.1.1 - Cromatografia por adsorção**

-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária: fase reversa coluna Gemini C-18 (fase de sílica modificada com o catecilsilano), analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm; 31,0 x 1,0 cm) e Coluna Phenomenex – Luna fenil hexil, analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm; 30,0 x 0,8 cm).

###### **3.1.1.2 - Cromatografia por filtração em gel (exclusão) e adsorção**

-Sephadex LH-20, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB.

#### **3.1.2 - Solventes**

-BRENNTAG e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos;

-Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, AC ORGANICS, CIL CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para obtenção de espectros de RMN;

-Solventes grau HPLC, TEDIA e J.T.BECKER.

#### **3.1.3 - Placas Cromatográficas**

-Cromatoplaça de sílica gel 60 HF<sub>254</sub> em alumínio (CCDA), MERCK;

#### **3.1.4 - Substâncias Comerciais**

- Galato de Metila, Sigma-Aldrich.

#### **3.1.5 - Reveladores**

-Câmara de luz ( $\lambda=254$  nm e 365 nm);

-Solução de Vanilina.

### 3.1.6 - Fibras (Fase estacionária)

- Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), 75 µm, SUPELCO;
- Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB), 65 µm, SUPELCO.

## 3.2 - Equipamentos utilizados

### 3.2.1 - Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

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

- BRUKER modelo DRX 400 (9,4 Tesla);
- BRUKER modelo ARX 200 (4,7 Tesla);
- AVANCE III 400 NANO (9,4 Tesla).
- BRUKER Magneto Ultra Shield 600 com Crio Sonda Inversa (CTCI) e Amostrador G1329A 5mm.

### 3.2.2 - Espectrofotômetro no Ultravioleta (UV)

- E-Intralab, UV-Vis, DMS 100.

### 3.2.3 - Estufa de secagem e esterilização

- FANEM –315 SE

### 3.2.4 - Balança analítica

- Sartorius modelo BP210S.

### 3.2.5 - Rotaevaporadores

- BUCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C;
- BUCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

### 3.2.6 - Cromatógrafo por CLAE

-SHIMADZU SCL-10AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo) E “loop” de 200 µL;

-SHIMADZU SCL-6AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo) E “loop” de 200 µL.

### 3.2.7 - Detectores

-UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;

-UV-Vis Shimadzu SPD-6AV.

### 3.2.8 - Espectrômetro de massas

-CG-EM Shimadzu QP 5000-ionização por impacto eletrônico- DQ/UFSCar.

-Sistema LC/MS/MS, modelo API 2000, Applied Biosystems (AB Sciex), munido de um triplo quadrupolo (QqQ). Fontes de ionização: ESI Turbo Ion Spray, APCI e software Analyst.

-MICROMASS Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z-spray” e gás de arraste argônio, utilizado em LC acoplado ao cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695-LaBioMMi- DQ/UFSCar.

### 3.2.9 – Espectrômetro de Massas de Alta Resolução

Bruker Daltonics, Billerica, EUA; modelo UltrOTOF<sub>Q</sub> - ESI-TOF, modo de detecção positivo e negativo.

### 3.2.10 - Espectrofotômetro no Infravermelho (IV)

-BIOMEM (BM-Séries Aridzone), utilizando placas de sal (NaCl).

### 3.2.11 - Espectrofotômetro no Infravermelho (UV)

-8453 UV/Visible Spectrophotometer, G1103A, Agilent Technologies.

### 3.2.12 - Dicroísmo circular (DC)

-JASCO, J-815 CD spectrometer.

### 3.2.13 - Polarímetro

- PERKIN ELMER modelo 241 – UFSCar.

## 3.3 - Coleta do material botânico

*Astronium graveolens* foi coletado em junho de 2009 no Viveiro Camará, localizado na Estrada Municipal Água Vermelha, sendo responsável pela identificação a Dra. Maria Inês Salgueiro Lima do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos.

## 3.4 - Metodologia de extração

As partes (folhas, caule, pecíolo e raiz) da planta de *Astronium graveolens* coletadas recentemente foram colocadas em estufa de circulação de ar a 50°C, durante 24 horas no caso das folhas e cerca de 2 semanas para raiz, galhos e caule. Em seguida, pulverizadas em moinho, submetidas à extração com solvente etanol. Após repouso de três dias, o solvente foi filtrado e os extratos concentrados em rotaevaporadores. A torta restante permaneceu em repouso repetindo-se o procedimento até a terceira extração. As massas de cada extrato etanólico obtido das plantas estão representadas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Dados das massas dos extratos obtidos da planta *A. graveolens* e seus respectivos códigos

|                           | <b>Folhas<br/>(FVET)</b> | <b>Pecíolo<br/>(GFVET)</b> | <b>Raiz<br/>(RVET)</b> | <b>Caule<br/>(CGVET)</b> |
|---------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>Peso seco do órgão</b> | 1274,33g                 | 246,77 g                   | 1853,5g                | 2764,6 g                 |
| <b>Extrato Etanólico</b>  | 122,69 g                 | 13,28 g                    | 89,94 g                | 66,81 g                  |

Amostras dos extratos etanólicos foram enviadas para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química de São Carlos, para os ensaios com o

fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e a lagarta do cartucho-do-milho, e para o Centro de Estudos de Insetos Sociais- UNESP- Rio Claro para os ensaios com a formiga cortadeira.

### 3.5 - Fracionamento dos extratos etanólico da raiz da planta *A. graveolens*

Cerca de 75 g do extrato etanólico da raiz da planta *Astronium graveolens* foram submetidos a partição líquido-líquido resultando nas frações descritas na

#### Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Dados das massas das frações obtidos da raiz da planta *A. graveolens* e seus respectivos códigos

|                                | Código | Raiz   |
|--------------------------------|--------|--------|
| <b>Fração Hexânica</b>         | RVH    | 7,18g  |
| <b>Fração Diclorometânica</b>  | RVD    | 4,64g  |
| <b>Fração Acetato de Etila</b> | RVACT  | 40,72g |
| <b>Fração Hidroalcoólica</b>   | RVAQ   | 15,41g |

Após a obtenção das frações foram realizados os ensaios de toxicidade por ingestão com as operárias de *A. sexdens rubropilosa* no Centro de Estudos de Insetos Sociais- UNESP- Rio Claro, ensaios biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e com as lagartas do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química de São Carlos.

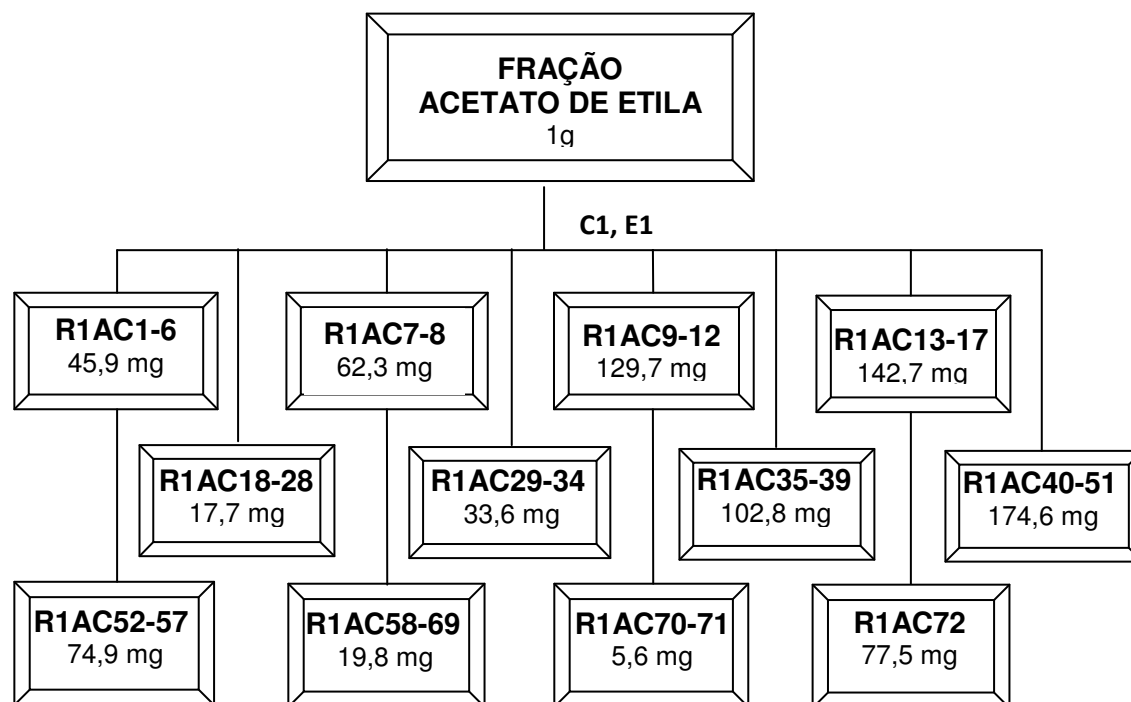
#### 3.5.1 - Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila da raiz da planta *A. graveolens* (RVACT)

A fração acetato de etila da raiz de *Astronium graveolens* (RVACT) (1g) foi fracionada utilizando cromatografia por exclusão Sephadex LH-20, proporcionando a obtenção de 72 subfrações nas quais foram reunidas através da CCDA



(**Fluxograma 3.1**). A fração foi previamente filtrada em algodão, antes da aplicação na coluna, para eliminar resíduos e impurezas que poderiam danificar a fase estacionária Sephadex LH-20.

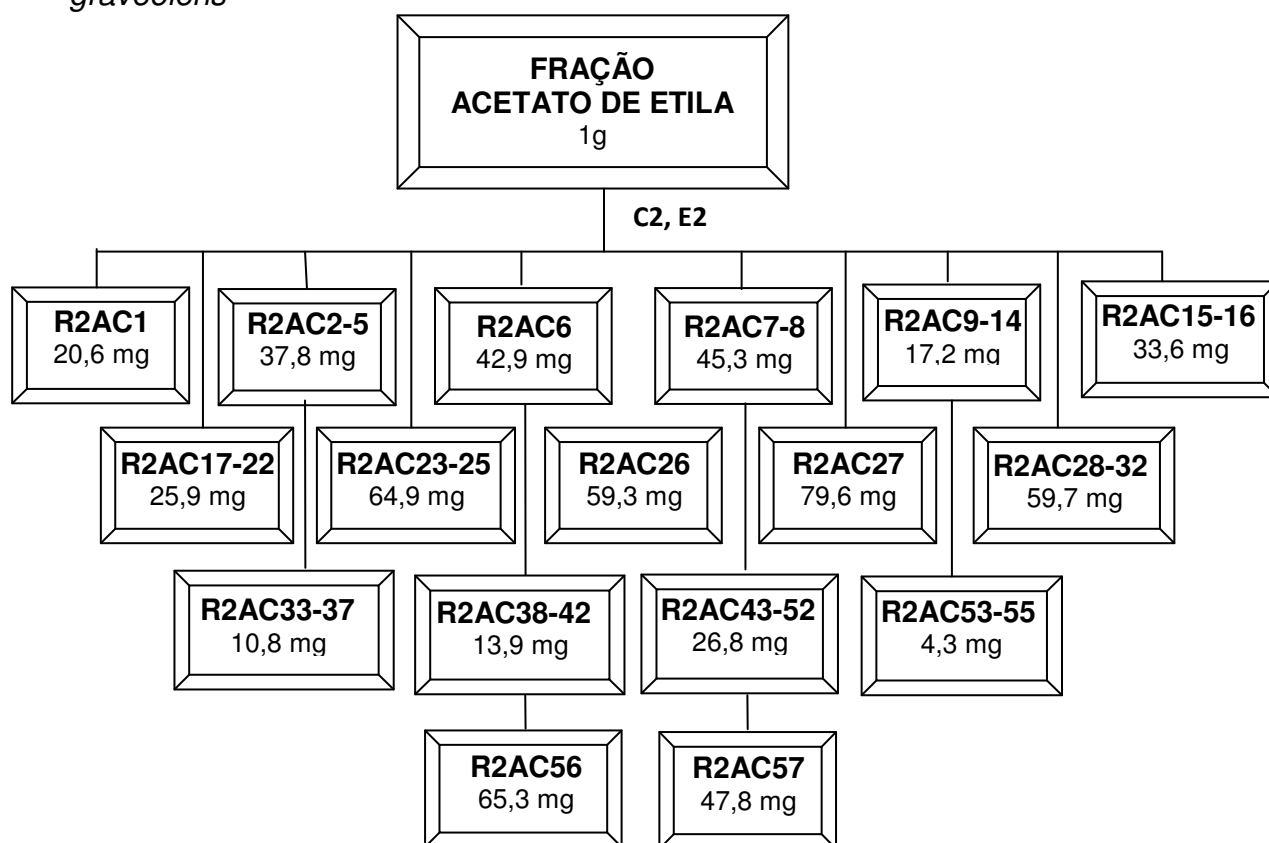
Fluxograma 3.1 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta *A. graveolens*



**C1** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=84 cm e  $\phi=3$  cm); **E1** 100% MeOH

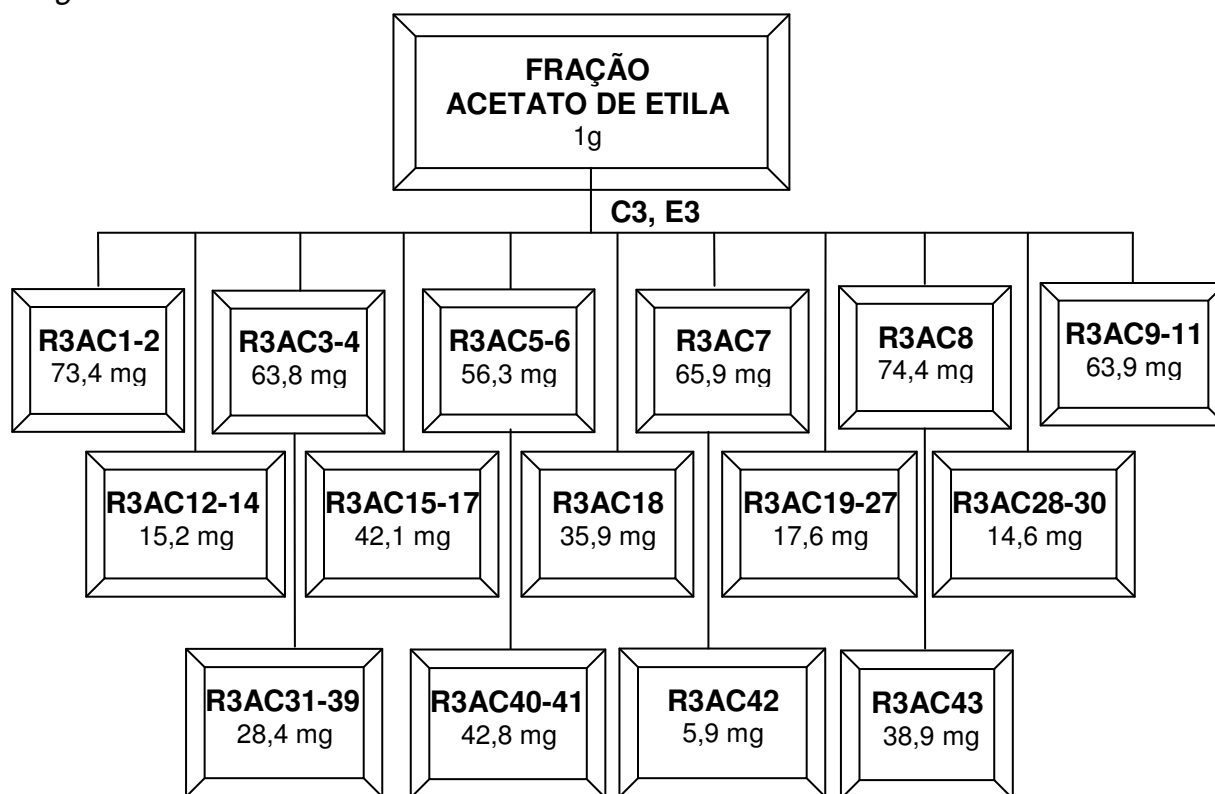
Devido a uma boa separação mais 3 g da fração acetato de etila foram submetidas ao fracionamento na Sephadex LH-20, como mostrado nos fluxogramas a seguir (**Fluxogramas 3.2, 3.3 e 3.4**).

Fluxograma 3.2 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta *A. graveolens*



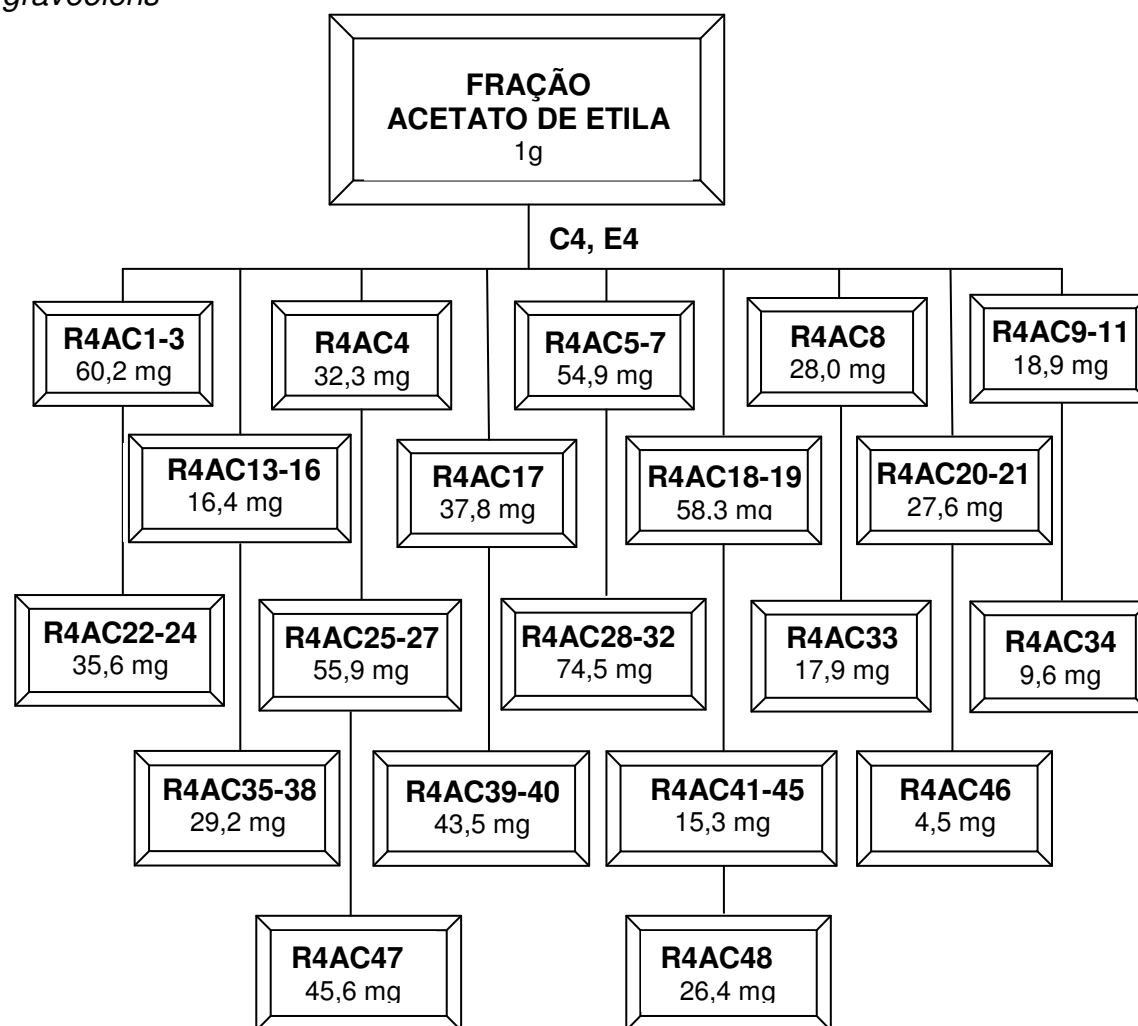
**C2** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=84 cm e  $\phi$ = 3,0 cm); **E2** 100% MeOH

Fluxograma 3.3 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta *A. graveolens*



**C3** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=84 cm e  $\phi= 3,0$  cm); **E3** 100% MeOH

Fluxograma 3.4 - Fracionamento da fração acetato de etila da raiz da planta *A. graveolens*

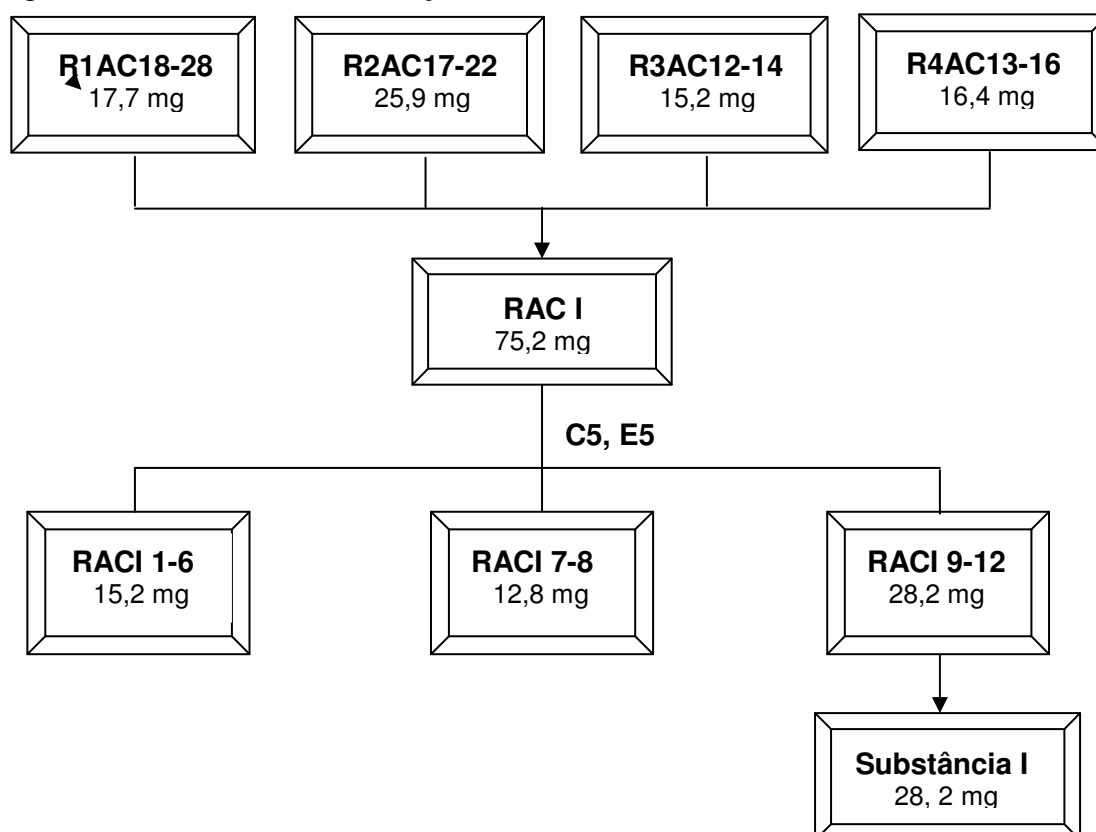


**C4** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=84 cm e  $\phi=3,0\text{cm}$ ); **E4** 100% MeOH

### 3.5.1.1 - Reunião das frações e refração

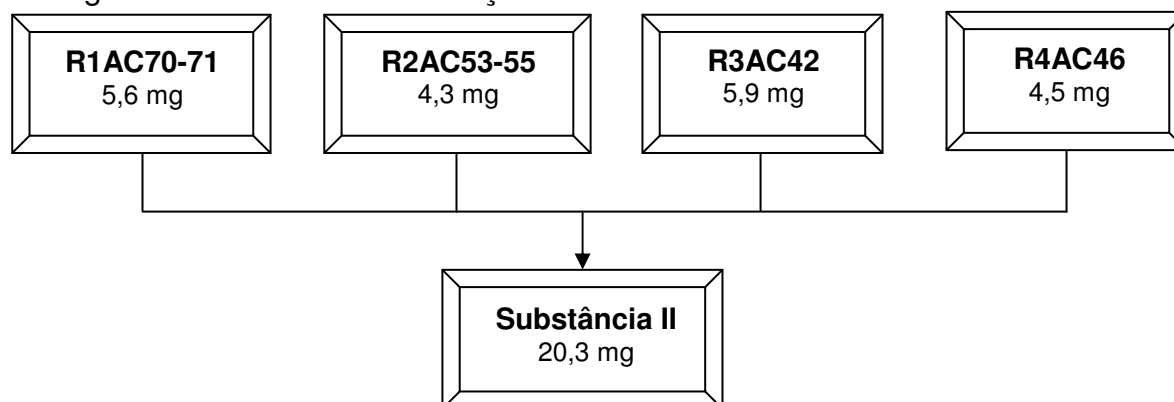
As frações foram reunidas através de experimentos de RMN <sup>1</sup>H, resultando nas seguintes reuniões mostradas nos **Fluxogramas 3.5-3.12** a seguir.

Fluxograma 3.5 - Reunião das frações contendo a substância I



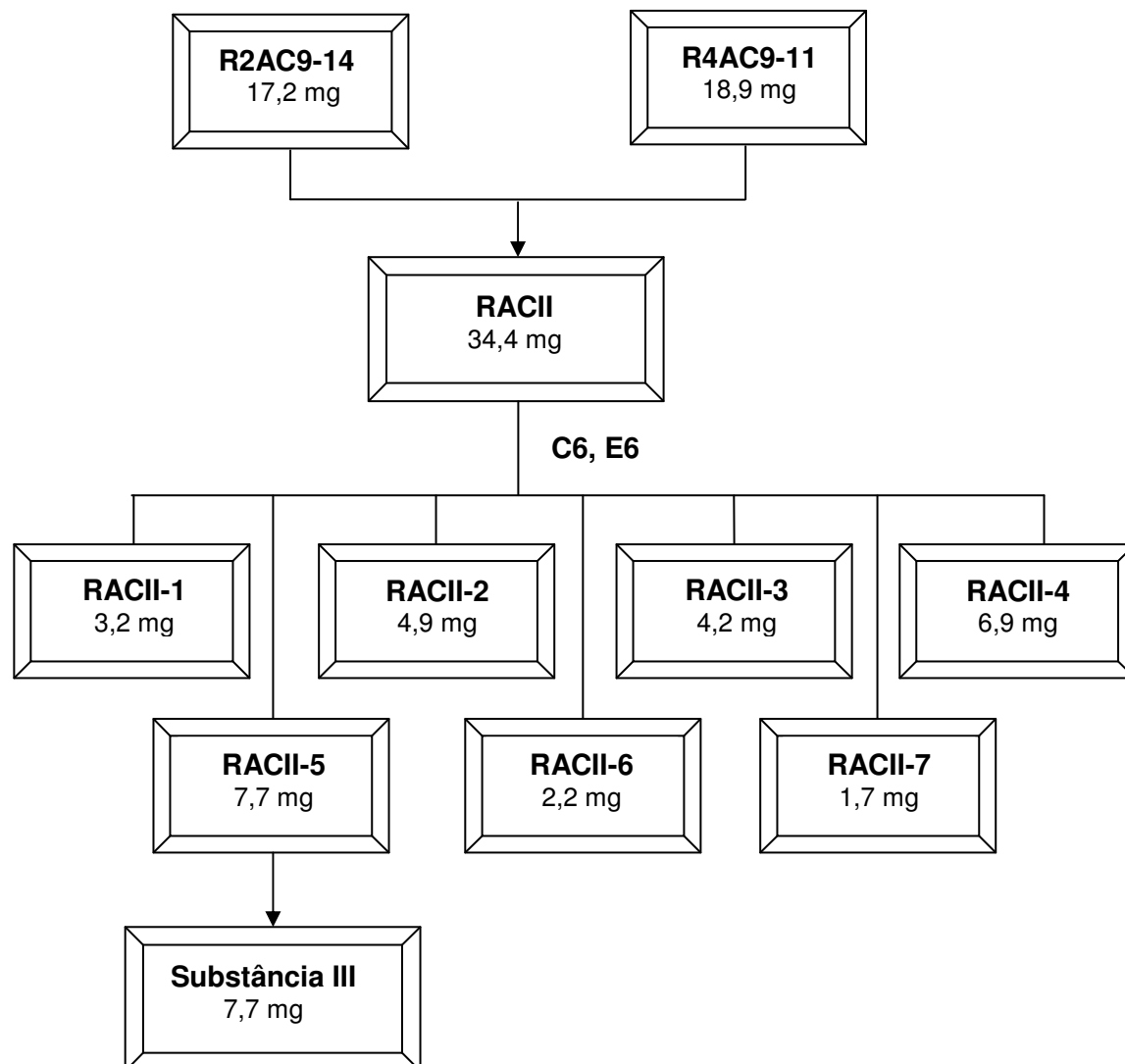
**C5** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=63 cm e φ=3,0cm); **E5** 100% MeOH

Fluxograma 3.6 - Reunião das frações contendo a substância II



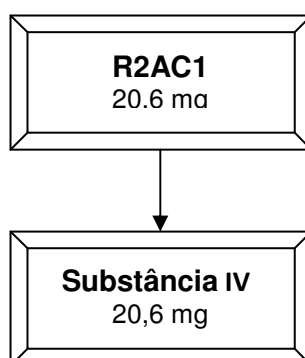
A substância II apresentou coloração vermelha, assim foi utilizada uma substância comercial para os ensaios biológicos, já que o laboratório de Produtos Naturais já continha o produto.

Fluxograma 3.7 - Reunião das frações contendo a substância III

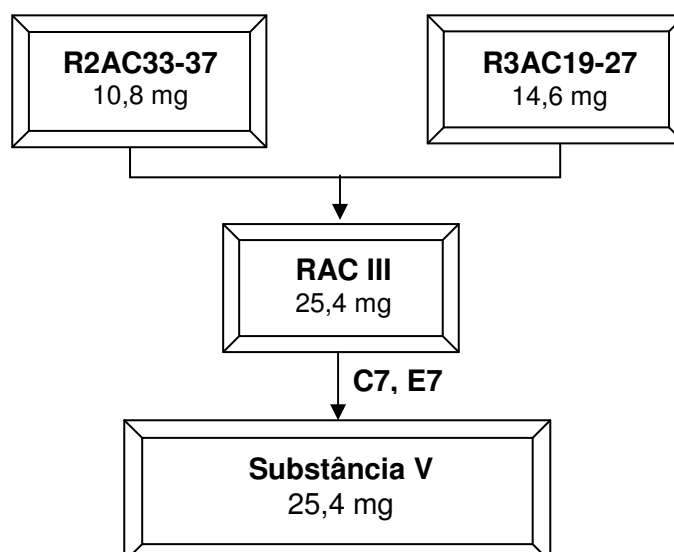


**C6** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=69 cm e  $\phi=2,3$ cm); **E6** 100% MeOH

Fluxograma 3.8 - Fração contendo a substância IV

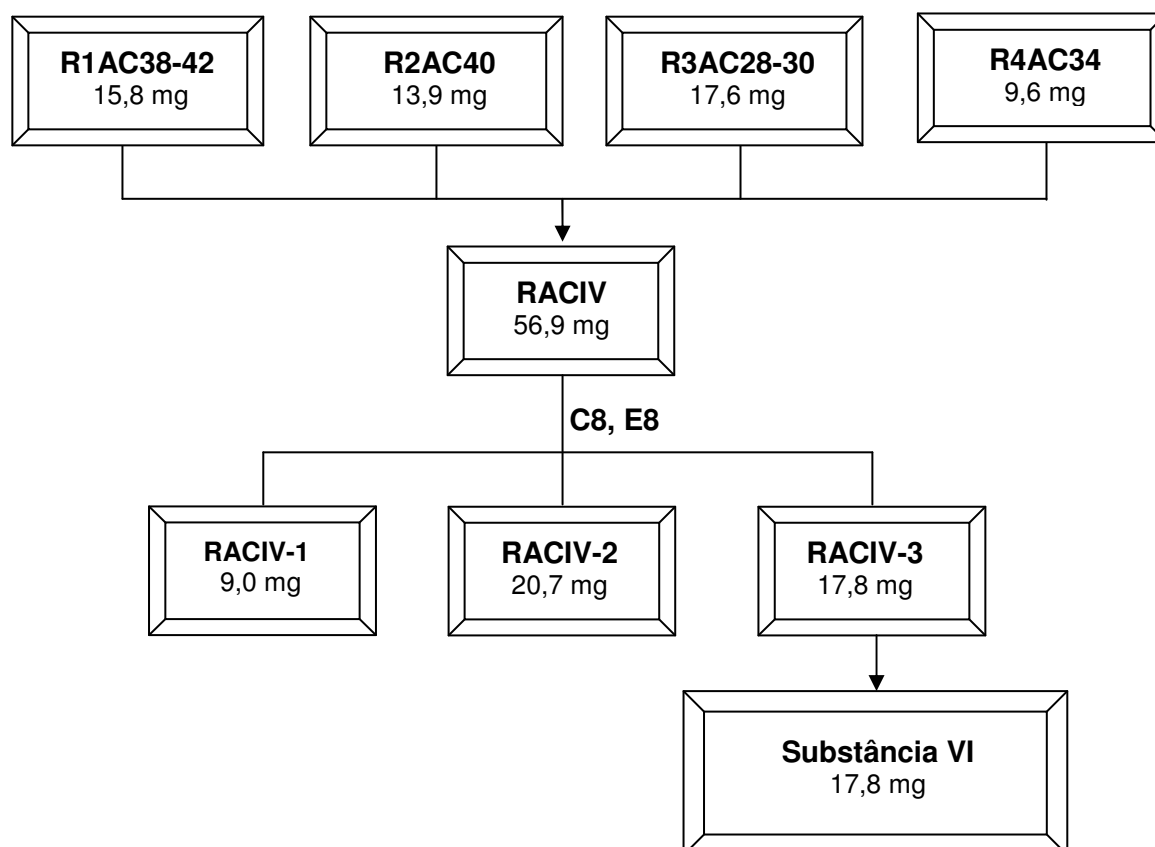


Fluxograma 3.9 - Reunião das frações contendo a substância V



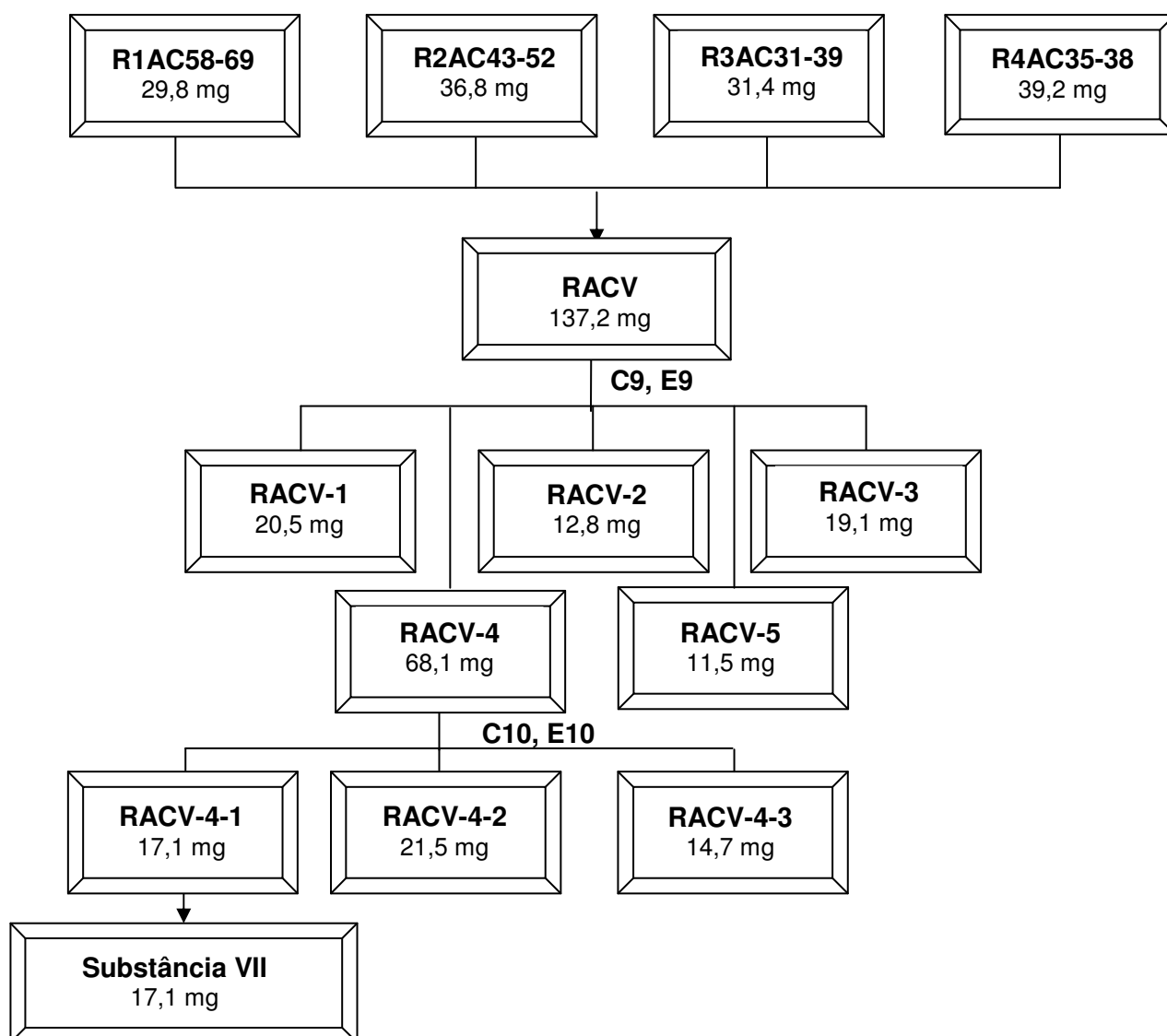
**C7** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=69 cm e  $\phi=2,3$ cm); **E7** 100% MeOH

Fluxograma 3.10 - Reunião das frações contendo a substância VI



**C8** CLAE, Coluna **C18** [(analítica/ 10  $\mu$ m; (10  $\mu$ m; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10  $\mu$ m; 31,0 x 1,0 cm). Loop: 200  $\mu$ L; **E 8**: Fase Reversa com Eluição Isocrática: MeOH: H<sub>2</sub>O: 1:1, Detector UV 254 nm, Vazão:0,8mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).

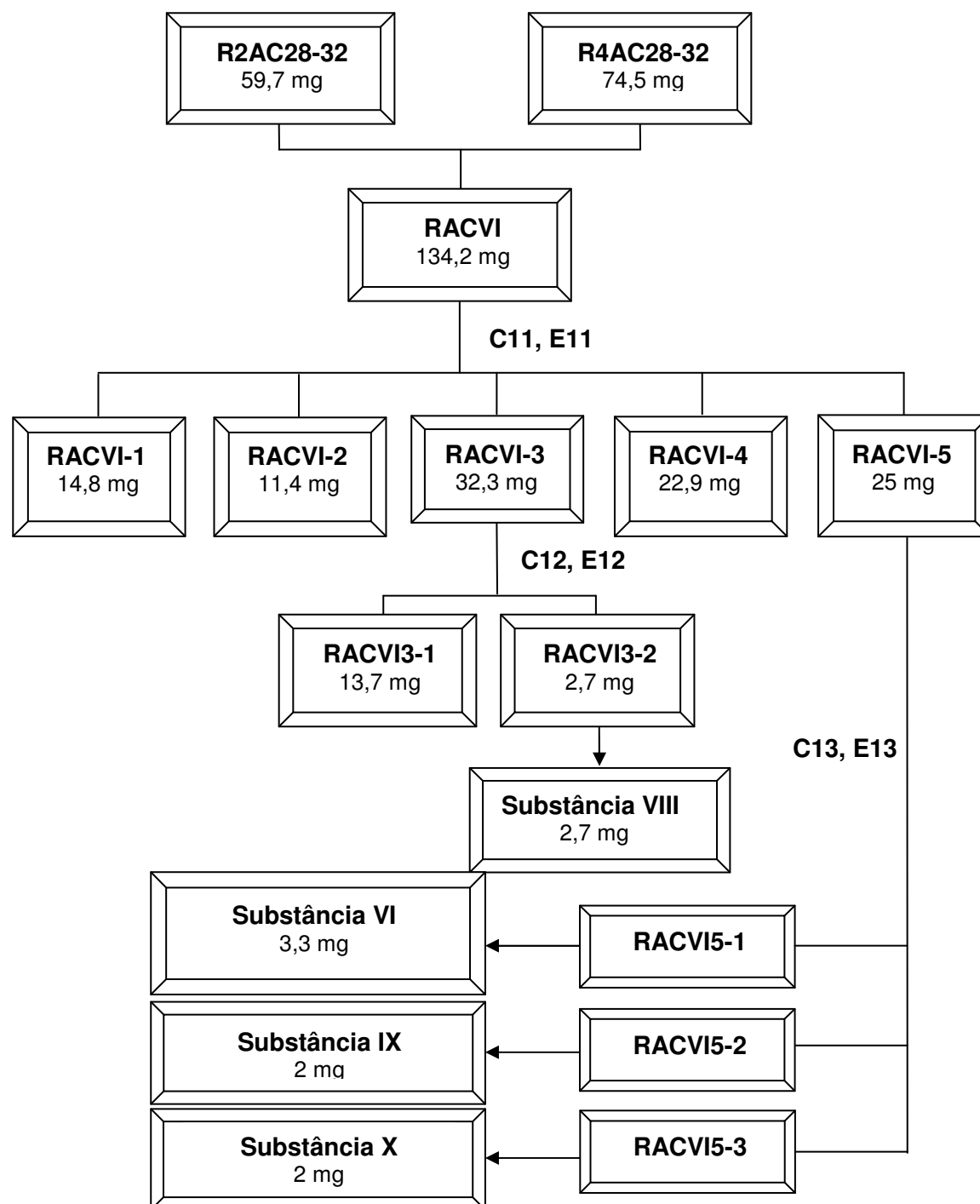
Fluxograma 3.11 - Reunião das frações contendo a substância VII



**C9** Cromatografia por exclusão Sephadex LH-20 (h=56 cm e  $\phi=2,0$ cm); **E9** 100% MeOH  
**C10** CLAE, Coluna **C18** [(analítica/ 10  $\mu$ m; (10  $\mu$ m; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10  $\mu$ m; 31,0 x 1,0 cm). Loop: 200  $\mu$ L; **E10**: Fase Reversa com Eluição Isocrática: MeOH: H<sub>2</sub>O: 5,5:4,5, Detector UV 254 nm, Vazão:0,8mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).



Fluxograma 3.12 - Reunião das frações contendo as substâncias VIII, IX, X.



**C11** CLAE, Coluna **C18** [(analítica/ 10 µm; (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10 µm; 30,0 x 0,78 cm). Loop: 200 µL; **E 11**: Fase Reversa com Eluição Isocrática: MeOH: H<sub>2</sub>O: 1:1, Detector UV 254 nm, Vazão:0,8mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).

**C12** CLAE, Coluna Phenomenex – Luna fenil hexil [(analítica/ 10  $\mu\text{m}$ ; (10  $\mu\text{m}$ ; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10  $\mu\text{m}$ ; 30,0 x 0,8 cm). Loop: 200  $\mu\text{L}$ ; **E 12**: Fase Normal com Eluição Isocrática: ACN: H<sub>2</sub>O: 0,63:1,37, Detector UV 254 nm, Vazão:0,8mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).

**C13** CLAE, Coluna Phenomenex – Luna fenil hexil [(analítica/ 10  $\mu\text{m}$ ; (10  $\mu\text{m}$ ; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10  $\mu\text{m}$ ; 30,0 x 0,8 cm). Loop: 200  $\mu\text{L}$ ; **E 13**: Fase Normal com Eluição Isocrática: ACN: H<sub>2</sub>O: 0,75:1,25, Detector UV 254 nm, Vazão:0,5mL/min (analítica) e 1,8 mL/min (preparativa).

O cromatograma da fração RACVI-5 obtido por Clae consta na **Figura 3.1**. Condições: Coluna Phenomenex – Luna fenil hexil [(analítica/ 10  $\mu\text{m}$ ; (10  $\mu\text{m}$ ; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10  $\mu\text{m}$ ; 30,0 x 0,8 cm). Loop: 200  $\mu\text{L}$ ; **E 13**: Fase Normal com Eluição Isocrática: ACN: H<sub>2</sub>O: 0,75:1,25, Detector UV 254 nm, Vazão:0,5mL/min (analítica) e 1,8 mL/min (preparativa).

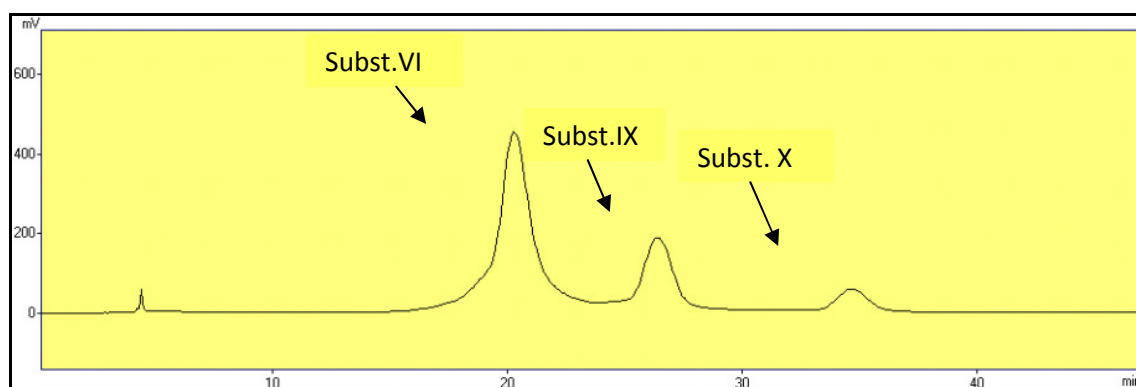


Figura 3.1 - Cromatograma da separação das substâncias VI, IX e X por CLAE.

### 3.6 - Fracionamento dos extratos etanólico do caule da planta *A. graveolens*

Cerca de 29 g do extrato etanólico do caule da planta *A. graveolens* foram submetidas a partição líquido-líquido resultando nas frações descritas na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 - Dados das massas das frações obtidos do caule da planta *A. graveolens* e seus respectivos códigos

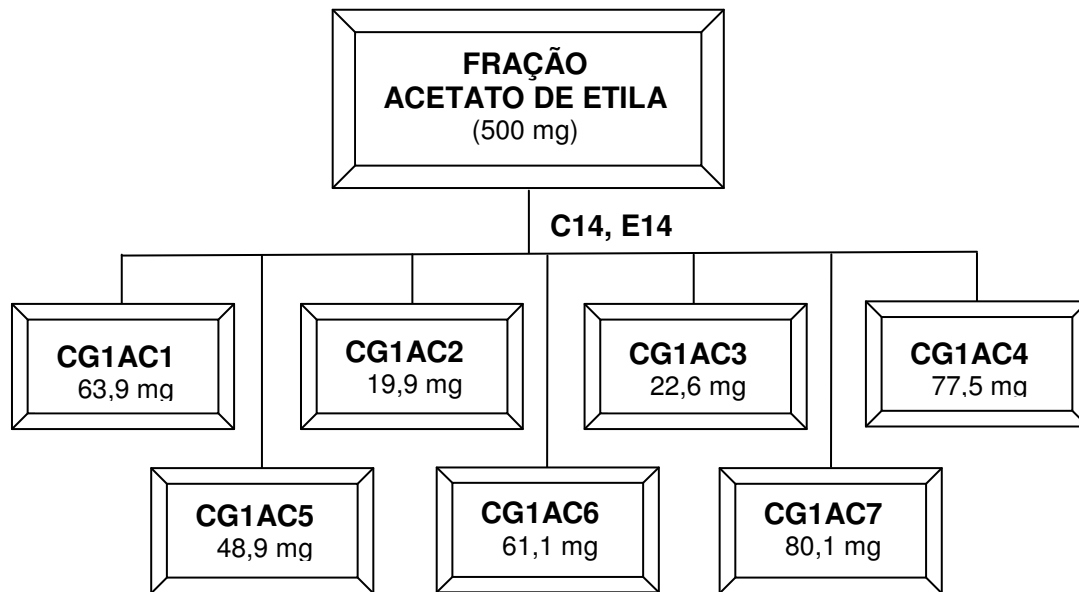
|                                | <b>Código</b> | <b>Raiz</b> |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>Fração Hexânica</b>         | CGVH          | 4,17g       |
| <b>Fração Acetato de Etila</b> | CGVACT        | 9,73g       |
| <b>Fração Hidroalcoólica</b>   | CGVAQ         | 10,88g      |

Após a obtenção das frações foram realizados os ensaios de toxicidade por ingestão com as operárias de *A. sexdens rubropilosa* no Centro de Estudos de Insetos Sociais- UNESP- Rio Claro, ensaios biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e com as lagartas do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química de São Carlos.

### **3.6.1 - Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila da caule/galhos da planta *A. graveolens* (CGVACT)**

A fração acetato de etila do caule e galhos de *A. graveolens* (RVACT) (500 mg) foi fracionada utilizando cromatografia por exclusão Sephadex LH-20, proporcionando a obtenção de 7 subfrações nas quais foram reunidas através da CCDA (**Fluxograma 3.13**). A fração foi previamente filtrada em algodão, antes da aplicação na coluna, para eliminar resíduos e impurezas que poderiam danificar a fase estacionária Sephadex LH-20.

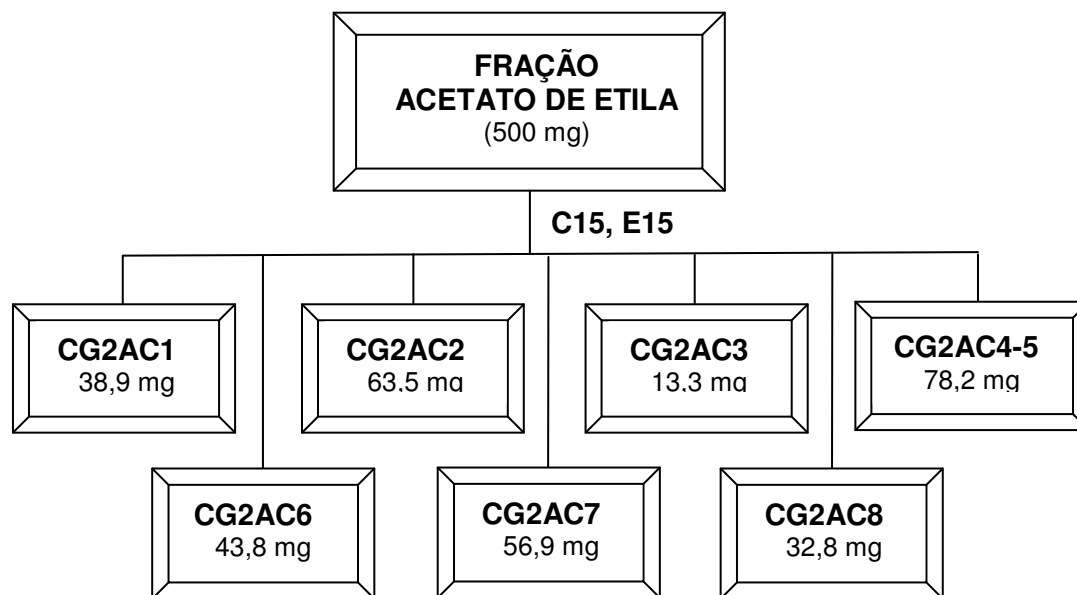
Fluxograma 3.13 - Fracionamento da fração acetato de etila do caule e de galhos da planta *A. graveolens*



**C14:** Sephadex LH 20 (h=84 cm e  $\phi=3$  cm); **E14:** 100% Metanol (MeOH)

Para aumentar as massas das frações obtidas, mais 500 mg da fração acetato de etila foi submetida ao fracionamento por Sephadex LH-20 (**Fluxograma 3.14**).

Fluxograma 3.14 - Fracionamento da fração acetato de etila do caule e galhos da planta *A. graveolens*

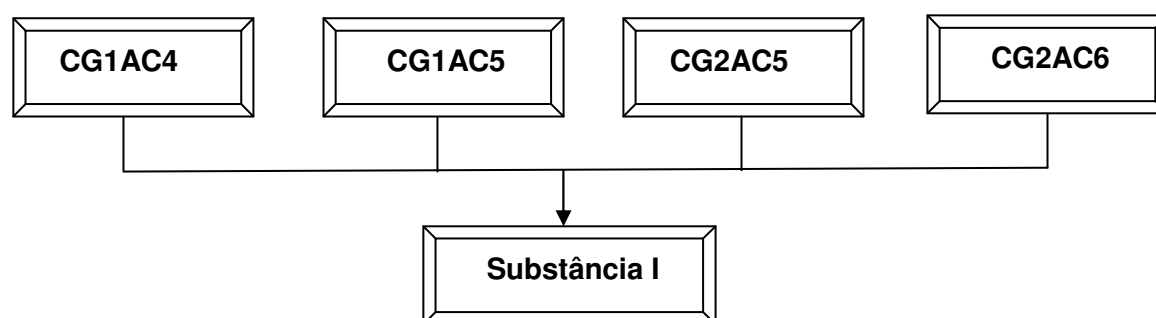


**C15:** Sephadex LH 20 (h= 84 cm e  $\phi$ = 3 cm); **E15:** 100% Metanol (MeOH)

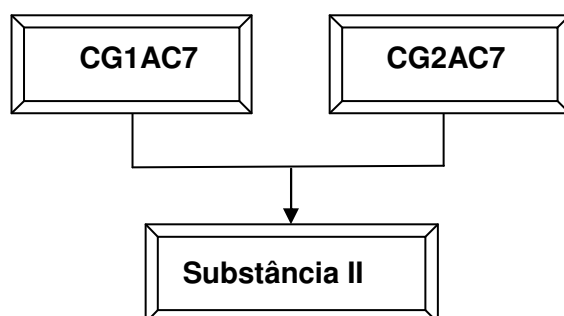
### 3.6.1.1 - Reunião das frações e refractionamento

As frações foram reunidas através de CCDA e experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , resultando nas seguintes reuniões mostradas nos **Fluxogramas 3.15-3.17**.

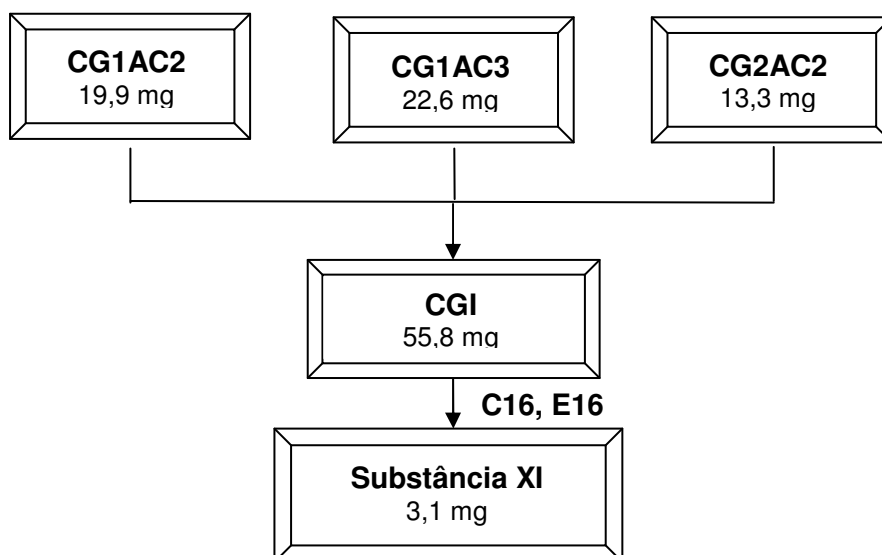
Fluxograma 3.15 - Reunião das frações contendo a substância I



Fluxograma 3.16 - Reunião das frações contendo a substância II



Fluxograma 3.17 - Reunião das frações contendo a substância XI



**C16:** CLAE, Coluna Phenomenex – Luna fenil hexil [(analítica/ 10 µm; (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa/ 10 µm; 30,0 x 0,8 cm). Loop: 200 µL; **E16:** Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: H<sub>2</sub>O: 1,25:0,75, Detector UV 254 nm, Vazão:0,5 mL/min (analítica) e 1,8 mL/min (preparativa).Sephadex LH 20 (h= 84 cm e φ= 3 cm).

### 3.10 - Metodologia dos ensaios biológicos

#### 3.10.1 - Ensaio biológico com as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão com as operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sócios (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pelos alunos Amanda Maria Picelli, Marcela Ceccato e Gustavo Araújo S. Vassão, sob a coordenação do prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

As operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório. Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida constituída por: 5% de glicose, 1% de peptona bacteriológica, 0,1 % de extrato de levedura e 1,5% ágar bacteriológico e 100 mL de água destilada. Após a mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno microondas por aproximadamente 4 minutos e logo em seguida, autoclavadas a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeiras, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para realização dos experimentos de toxicidade.

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 formigas para cada tratamento, agrupadas em 10 indivíduos e colocadas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro. Cada placa recebeu aproximadamente 0,4 g de dieta artificial (BUENO et al., 1997) acrescida da amostra a ser testada.

Essas placas foram mantidas em estufa B.O.D a 24 °C ( $\pm 1$ ) e umidade relativa 70% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas, troca de dieta artificial e do papel filtro. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para cada experimento. Os resultados foram apresentados na forma de sobrevivência mediana (S50).

Nestes ensaios foram utilizados dois controles: dieta pura e dieta com o solvente utilizado na incorporação do material a ser testado à dieta.

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

### 3.10.2 - Ensaio biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Os ensaios com o fungo simbiote *L. gongylophorus* foram realizados no Laboratório de bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela aluna Sonia Pinto Cardoso, sob coordenação da Dr<sup>a</sup> Ana Paula Terezan.

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

Os extratos submetidos ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporados ao meio de cultura e dissolvidos em água destilada, obtendo concentração final igual a 1000 g/mL. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120°C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos nas placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizadas durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*. Cada extrato foi preparado em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para o controle geral (meio de cultura e fungo simbiote). Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C foram realizadas as medidas do diâmetro médio final para cada placa, em cada extrato.

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste comparativo de Tukey, ao nível 5% de probabilidade, para verificar se há diferença significativa entre as médias. O software utilizado foi o Graph-Pad InStat 3.10.



### 3.10.3 - Ensaios Biológicos de *Astronium graveolens* no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios biológicos com os extratos brutos de *A. graveolens* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em colaboração com os alunos de iniciação científica Antonio Rogério Bernardo e Ana Carolina Volante sob coordenação da Dra. Andréia P. Matos. O Laboratório de Bioensaios foi mantido a  $25 \pm 1$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 5$  % e fotofase de 12 h. Para realização dos testes foram mantidas em laboratório criação de *S. frugiperda*, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial (**Tabela 3.4**) (KASTEN *et al.*, 1978).

Tabela 3.4 - 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 mL     |
| Tetraciclina      | 50 mg      |
| Agar              | 10,3 g     |
| Água              | 600 mL     |

A dieta artificial foi vertida em 24 poços de placas de poliestireno e deixada 20 minutos a temperatura ambiente sob condições de esterilização. Os poços possuem 3,4 mL de volume sendo 17 mm de profundidade por 15 mm de diâmetro com 1,9 cm<sup>2</sup> de área de cultura. Todos os compostos foram dissolvidos em solvente apropriado usando seis concentrações (1, 3, 7, 10, 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup>) e um controle. Para cada concentração e para o controle, uma única lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda* foi colocada em um poço por 7 dias e cada experimento teve 72 lagartas

no total (cada placa com 24 poços em triplicata). Após 7 dias, as lagartas sobreviventes foram medidas e pesadas e então transferidas para tubos de vidro (8,5 × 2,5 cm), previamente esterilizados, em estufa a 170 °C por 1h e em seguida tampados com algodão hidrófugo contendo dieta fresca. Variações no peso das lagartas e mortalidade foram medidas após 15 dias de incubação, já que a pupação ocorre entre 18 ± 1 dias. 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. Outras medidas do ciclo de vida foram realizadas como tempo para pupação (fase larval), mortalidade de larvas, emergência de adultos e deformidades.

#### **3.10.4 - Ensaio Biológico de toxicidade aguda com extratos de plantas sobre *Spodoptera frugiperda***

Os ensaios biológicos com os extratos etanólicos, partições e substâncias foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, a 25 ± 1 °C, UR de 70 ± 5 % e fotofase de 12h. Para realização dos testes, a criação de *S. frugiperda* (J. E. Smith) foi mantida em laboratório, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial (KASTEN *et al.*, 1978; PARRA, 1986) e os adultos com solução de mel a 10%.

Os ensaios de toxicidade aguda basearam-se na metodologia descrita por BATISTA-PEREIRA *et al.* (2006). Para realização dos bioensaios foram preparadas soluções dos extratos em acetona e água em concentrações diferentes.

Foram utilizados cinco grupos de 10 larvas de *S. frugiperda* no segundo instar (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 ou água, 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 sobre as mesmas condições, 1 µL de acetona ou água 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.

### 3.11 - Coleta e Análise dos voláteis das folhas de *A. graveolens* pela técnica de Headspace-SPME

Para a realização da extração dos voláteis foi necessário determinar a condição ideal de análise. Portanto, alguns parâmetros foram otimizados, como a fibra ideal para a extração dos voláteis (**Item 3.11.1**) e o tempo ideal de exposição da mesma (**Item 3.11.2**).

A extração dos compostos voláteis foi realizada a partir da inserção da fibra azul (**Item 3.11.1**) em um sistema fechado contendo as folhas (**Figura 3.2**). A fibra foi deixada neste sistema por 45 minutos (**Item 3.11.2**) e depois foi injetada no CG/EM (Shimadzu QP 5000) nas condições desenvolvidas baseadas em dados da literatura [ABDELNUR, 2006, temperatura do injetor (250 °C); temperatura do detector (280 °C); coluna (DB-5: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); programação de temperatura (40 °C/0 min, 6 °C/min, 250 °C por 5 minutos); velocidade linear (48,3); pressão da cabeça da coluna (100,0 kPa); fluxo de gás (1,8 mL/min); tempo entre as varreduras (0,50 scans/s) e intervalo de massas (50 a 650 uma)]. Inicialmente foi injetado os voláteis extraídos e em seguida as misturas de padrões de hidrocarbonetos. Esta mistura de padrões foi previamente preparada com os seguintes n-alcenos: C7/C9/C12/C14/C16/C18/C20 e C/22. A identificação dos componentes dos voláteis foi feita através da comparação de seus espectros de massas com a biblioteca (NIST, 2008) e cálculos de seus índices de retenção com aqueles encontrados na literatura (ADAMS, 2007). O índice aritmético (IA) foi calculado para cada componente detectado, segundo a equação de Vandendool e Kratz (VANDENDOOL & KRATZ, 1963). Os voláteis foram obtidos por aeração (**Item 3.11.4**).



Figura 3.2 - Extração dos voláteis das folhas de *A. graveolens* por Headspace.

### 3.11.1 - Determinação da fibra Ideal para análise de voláteis das folhas de *A. graveolens* pela técnica de Headspace-SPME

Foram testados dois tipos de fibra: fibra preta (CAR/PDMS – Carboxen/Polidimetilsiloxano 75  $\mu\text{m}$ ) e fibra azul (PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65  $\mu\text{m}$ ). Condicionou-as antes de iniciar o experimento em um cromatógrafo a gás utilizando condições específicas catalogadas para cada fibra (**Tabela 3.5**)

Tabela 3.5 - Condições de condicionamento para as fibras utilizadas

| Fibra*   | T injetor<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | T coluna<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | T detector<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | T<br>condicionamento<br>(min) |
|----------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| CAR/PDMS | 250                                 | 250                                | 280                                  | 60                            |
| PDMS/DVB | 250                                 | 250                                | 280                                  | 30                            |

\* Supelco.

As fibras foram inseridas em um sistema fechado contendo 10 folhas da planta *A. graveolens*, foram realizadas exposições em 15, 30 e 45 minutos (**Figura 3.2**). Após os períodos estipulados, as fibras foram diretamente injetadas em um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM), aparelho Shimadzu QP 5000, sob as seguintes condições citadas no **Item 3.11**.

Os cromatogramas foram obtidos em quadruplicata para as diferentes fibras, estes estão apresentados no **Item 4.3.1**.

### 3.11.2 - Determinação do Tempo de Exposição Ideal

Utilizando-se a fibra azul e preta, variou-se o tempo de exposição da mesma, em um sistema fechado contendo 10 folhas da planta para a verificação de um tempo ideal para o experimento. Os tempos de exposição testados para a fibra foram 15, 30 e 45 minutos. Posteriormente, as fibras foram injetadas diretamente em um CG-EM sob as mesmas condições utilizadas anteriormente (**Item 4.11.2**). Os

cromatogramas obtidos estão indicados no **item 4.11.1**. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

### 3.11.3 - Determinação do tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos

Injetou-se uma série de hidrocarbonetos conhecidos, C7/9/12/14/16/18/20/22, no CG-EM para posterior identificação dos compostos, a partir do cálculo do Índice de retenção, sob as condições citadas anteriormente (**Item 4.11.2**), porém com a rampa de 40 °C/3 min/6 °C min até 250 °C/5 min.

Tabela 3.6 - Número de carbonos de cada hidrocarboneto e seus respectivos tempo de retenção.

| Número de Carbonos | Tempo de retenção (min.) |
|--------------------|--------------------------|
| 7                  | 3,141                    |
| 9                  | 7,977                    |
| 12                 | 16,479                   |
| 14                 | 21,382                   |
| 16                 | 25,677                   |
| 18                 | 29,549                   |
| 20                 | 33,092                   |
| 22                 | 36,318                   |

A seguir encontram-se os tempos de retenção dos picos observados nos cromatogramas obtidos pelas extrações dos voláteis. Obteve-se a média dos tempos das replicatas, e aplicou-se a equação de Van Den Dool e Kratz, que considera o tempo de retenção de cada composto, e os tempos de retenção e os números de carbono dos hidrocarbonetos injetados no CG:

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

IA = índice aritmético

N = C<sub>n</sub> - C<sub>n-1</sub>

C<sub>n</sub> = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada

C<sub>n-1</sub> = número de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada

t<sub>x</sub> = tempo de retenção da substância analisada

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

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

Com isto, determinou-se o índice aritmético (IA) para cada pico. Cada composto foi identificado comparando-se seu índice e seu espectro de massas com a literatura (ADAMS, 2007) e o NIST-08.

### **3.11.4 - Coleta dos voláteis das folhas de *Astronium graveolens* pelo método de aeração**

As folhas de *A. graveolens* foram introduzidas em uma câmara de vidro hermeticamente fechada. Na entrada do sistema foi adaptada uma coluna contendo carvão ativado para que o ar fosse pré-filtrado. Os voláteis arrastados por um fluxo de ar produzido por uma bomba de vácuo e controlado por uma válvula foram adsorvidos em um polímero (Porapak Q ®) (SANT'ANA & STEIN, 2001). Após 3 horas de exposição, a linha de vácuo foi interrompida e a coluna contendo os voláteis adsorvidos foi desconectada do sistema. A dessorção das substâncias coletadas foi feita por meio da extração com solvente (hexano). Posteriormente o extrato foi concentrado e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os voláteis extraídos foram injetados e em seguida as misturas de padrões de hidrocarbonetos (**Tabela 3.6**). A identificação dos componentes dos voláteis foi feita através da comparação de seus espectros de massas e cálculos de seus índices de retenções com aqueles encontrados na literatura (ADAMS, 2007). O índice de aritmético foi calculado para cada componente detectado, segundo a equação de Vandendool e Kratz (VANDENDOOL & KRATZ, 1963).

## **4 – Resultados e Discussão**

---

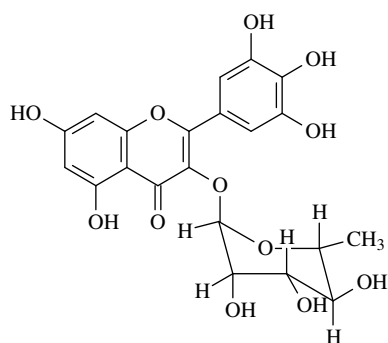




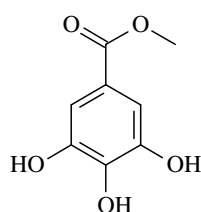
## 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 – Substâncias Isoladas

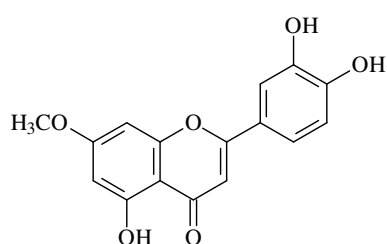
O estudo fitoquímico da planta *A. graveolens* possibilitou o isolamento e identificação de metabólitos secundários.



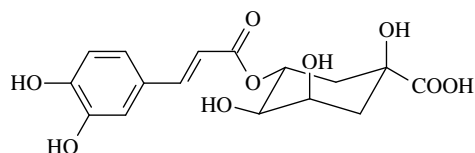
Miricetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo (I)  
 Procedência: Raiz, Caule e galhos (Fração acetato de etila)  
 Massa: 28,2 mg  
 Isolamento: p. 30, 38  
 Identificação: p. 58



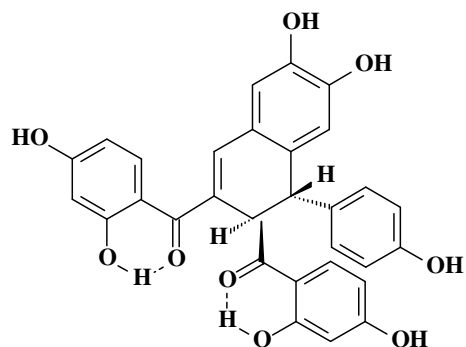
Galato de metila (II)  
 Procedência: Raiz , Caule e galhos (Fração acetato de etila)  
 Massa: 20,3 mg  
 Isolamento: p. 30, 39  
 Identificação: p.64



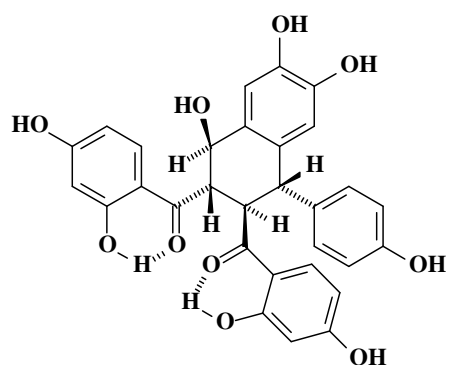
5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (III)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 7,7 mg  
 Isolamento: p.31  
 Identificação: p.65



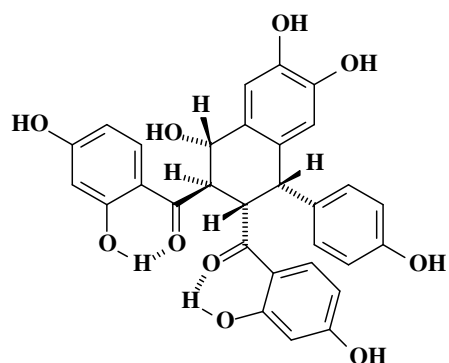
Ácido 5-*O*-cafeoilquínico (IV)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 20,6 mg  
 Isolamento: p. 31  
 Identificação: p.68



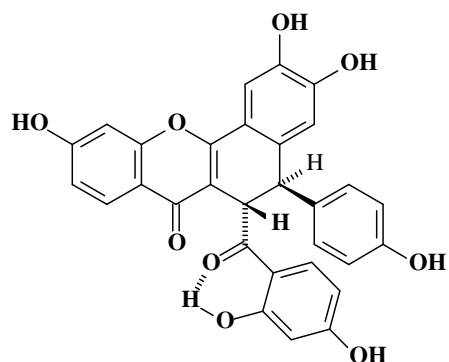
(7''*S*,8''*R*)-(2',4,4',5', tetrahydroxichalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona (V)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 25,4 mg  
 Isolamento: p.32  
 Identificação: p.74



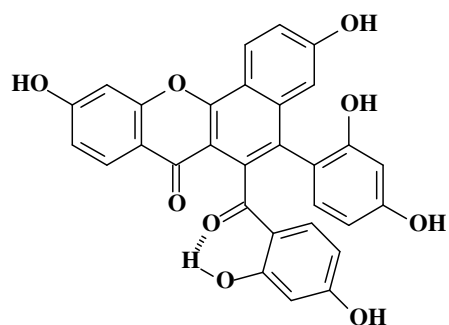
(7*R*,8*S*,7''*S*,8''*R*)-2',4,4',5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona (VI)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 20,8 mg  
 Isolamento: p. 32  
 Identificação: p.88



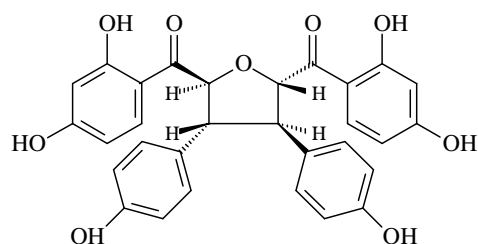
(7*S*,8*R*,7''*S*,8''*S*)-2',4,4',5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona (VII)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 17,1 mg  
 Isolamento: p.33  
 Identificação: p.101



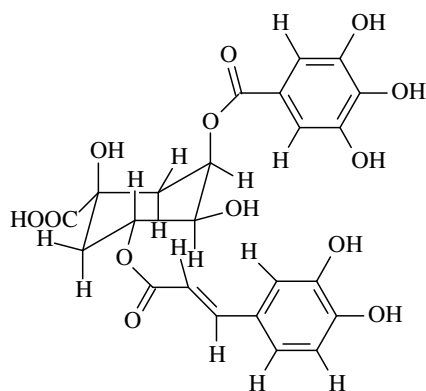
4,5,4'-dihidroxi-7,2'-oxo-chalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona (VIII)  
 Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
 Massa: 2,7 mg  
 Isolamento: p.34  
 Identificação: p.111



4,4'-dihydroxi-7,2'-oxo-chalcona-(2→7'',8-  
→8'')-2'',4'',2''',4'''-tetrahydroxichalcona (IX)  
Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
Massa: 2,0 mg  
Isolamento: p.34  
Identificação: p.122



rel-(7R,8S,7''R,8''S)-tetrahydro-7,7''-bis(4-  
hidroxifenil)-8,8''-(furandiil)-bis-(2,4-  
dihidroxifenil) (X)  
Procedência: Raiz (Fração acetato de etila)  
Massa: 2,0 mg  
Isolamento: p. 34  
Identificação: p.130



Ácido 3-O-galoil-5-O-cafeoilquínico (XI)  
Procedência: Caule e galhos (Fração  
acetato de etila)  
Massa: 3,1 mg  
Isolamento: p.39  
Identificação: p.144

## 4.2 - Estudo Fitoquímico

### 4.2.1 - Generalidades sobre Chalconas e Flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Eles podem ser encontrados em plantas de diversas famílias, entre elas, Fabaceae (AVULA *et al.*, 2010), Anacardiaceae (KIM *et al.*, 2003), Malvaceae (SILVA *et al.*, 2005), Leguminosae (DA SILVA *et al.*, 2008), Crassulaceae (TREVISAN *et al.*, 2006) entre outras. Eles apresentam-se como sólidos coloridos, por exemplo, amarelos, ou ainda incolores, ou como óleos viscosos e são encontrados nas frutas, pólen, caule e rizoma das plantas (PELTER *et al.*, 1976; ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Como precursores da via biossintética dos flavonóides se encontram as chalconas, que apresentam como núcleo fundamental 1,3-diarilpropano, sendo este modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento carbonílico e/ou de um grupo hidroxila.

A numeração da estrutura inicia-se no núcleo A com números ordinários seguidos de uma linha (') e o B com números ordinários (**Figura 4.1**), devido a sua comparação, inicialmente, com acetofenonas (SIMÕES *et al.*, 2004).

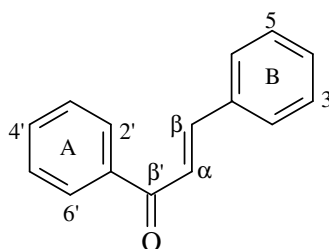


Figura 4.1 - Núcleo fundamental das chalconas.

Diferente das chalconas, a numeração da estrutura dos flavonóides se inicia a partir de um sistema benzopirânico denominado cronemo (**Figura 4.2**), sendo designados por números ordinários (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004), já que seu esqueleto básico possui quinze carbonos constituídos em três anéis do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ou seja, dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (PELTER *et al.*, 1976; ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

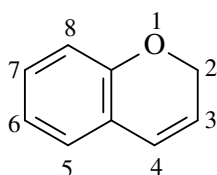


Figura 4.2 - Sistema benzopirânico ou cromeno.

Os núcleos B se diferenciam dos núcleos A e C através de uma linha (') e a numeração 9 e 10 podem ser substituídas por 8a e 4a, respectivamente (**Figura 4.3**) (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

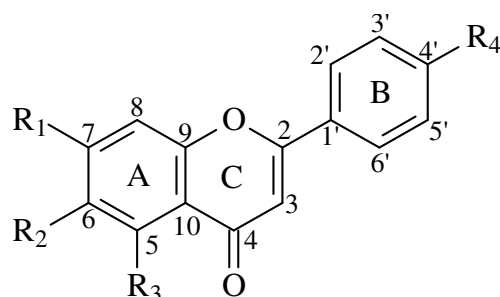


Figura 4.3 - Estrutura básica de um flavonóide.

A biossíntese dos flavonóides ocorre a partir da via dos fenilpropanóides, (sintetizado a partir do ácido chiquímico) que age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estruturas (**Figura 4.4**) (DEWICK, 2001). As subseqüentes condensações produzem diferentes formas de flavonóides, que diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C, entre os flavonóides de interesse se encontram as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-4-ol, isoflavonas e antocianidinas.

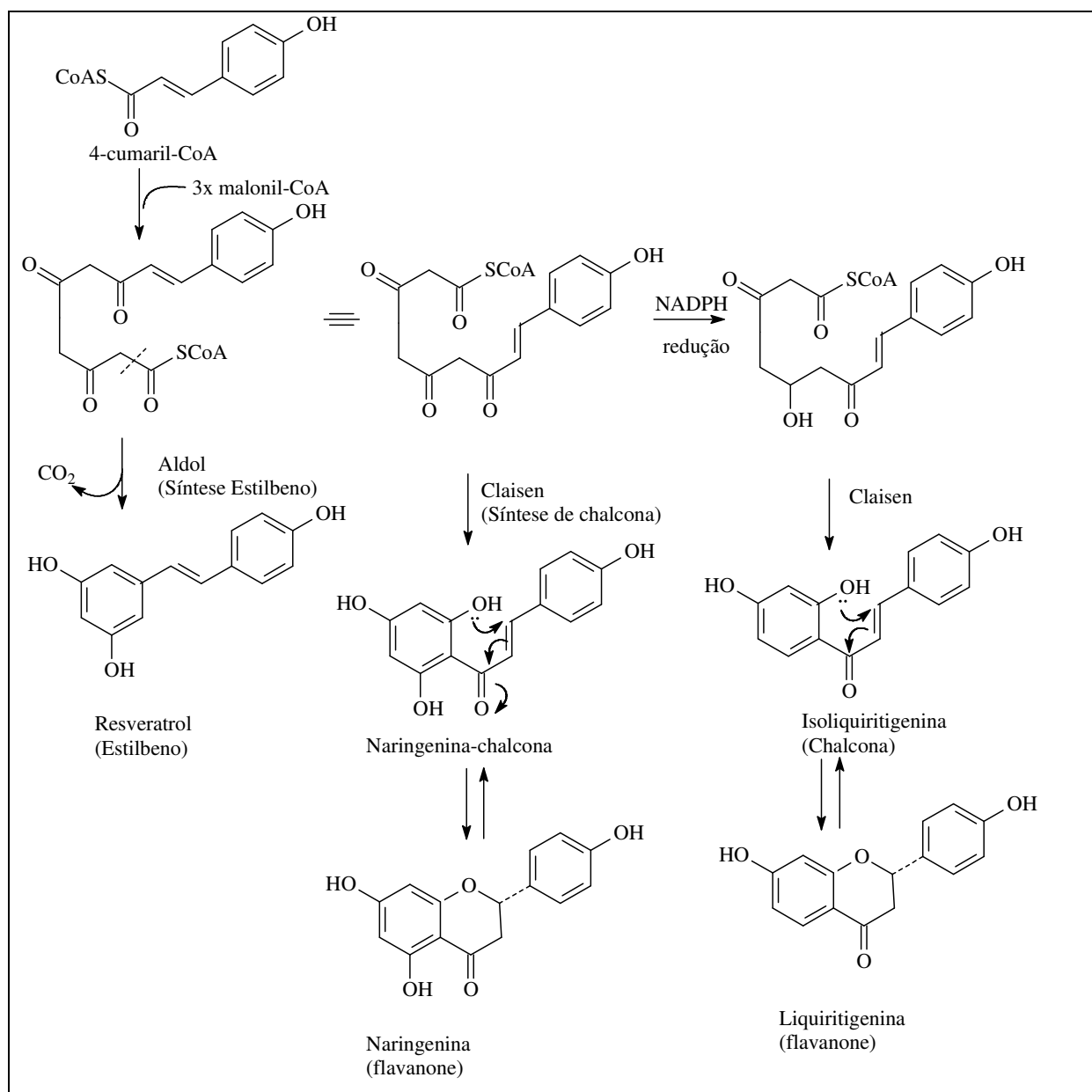


Figura 4.4 - Biossíntese dos flavonóides (DEWICK, 2001).

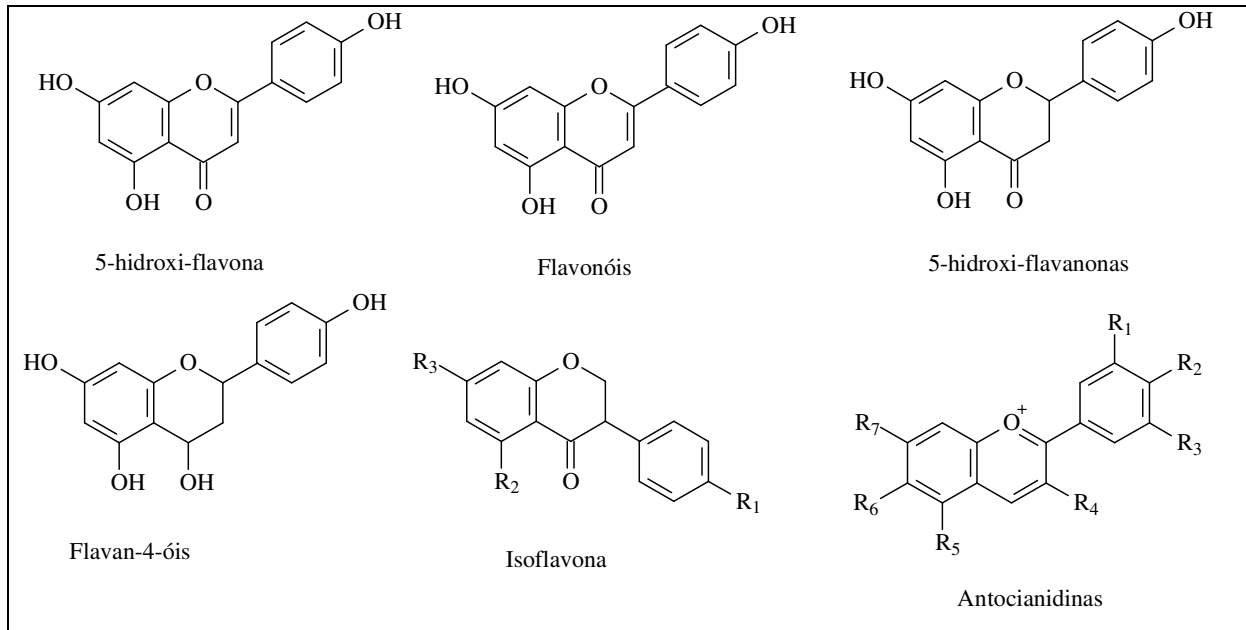


Figura 4.5 - Classes de flavonóides (SIMÕES *et al.*, 2004).

Entre as diversas atividades dos flavonóides se encontram, a ação antioxidante (HIDALGO *et al.*, 2009), atividade anti-helmíntica (DA SILVA *et al.*, 2008), inibição de enzima (acetilcolinesterase) (TREVISAN *et al.*, 2006), entre outras.



## 4.2.1.1 - Compostos Fenólicos Isolados

### 4.2.1.1.1 - Determinação estrutural da Substância I

A substância I foi isolada da fração RACI (p.30) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.5**, p.30). Esta substância apresentou-se como sólido amorfo amarelo e sua identificação foi realizada através de dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.6**), HSQC (**Figura 4.7**), HMBC (**Figura 4.8**), COSY (**Figura 4.9**) e dados da literatura (BRACA *et al.*, 2003, **Tabela 4.1**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.6**) apresentou sinal de deslocamento químico (daqui para frente indicado em todo o texto apenas como sinal) como singleto em  $\delta$  6,94 (2H) característico dos sinais dos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B de um flavonóide substituído nas posições 3', 4' e 5' e a equivalência dos mesmos é ocasionada pela livre rotação do anel e o plano de simetria deste.

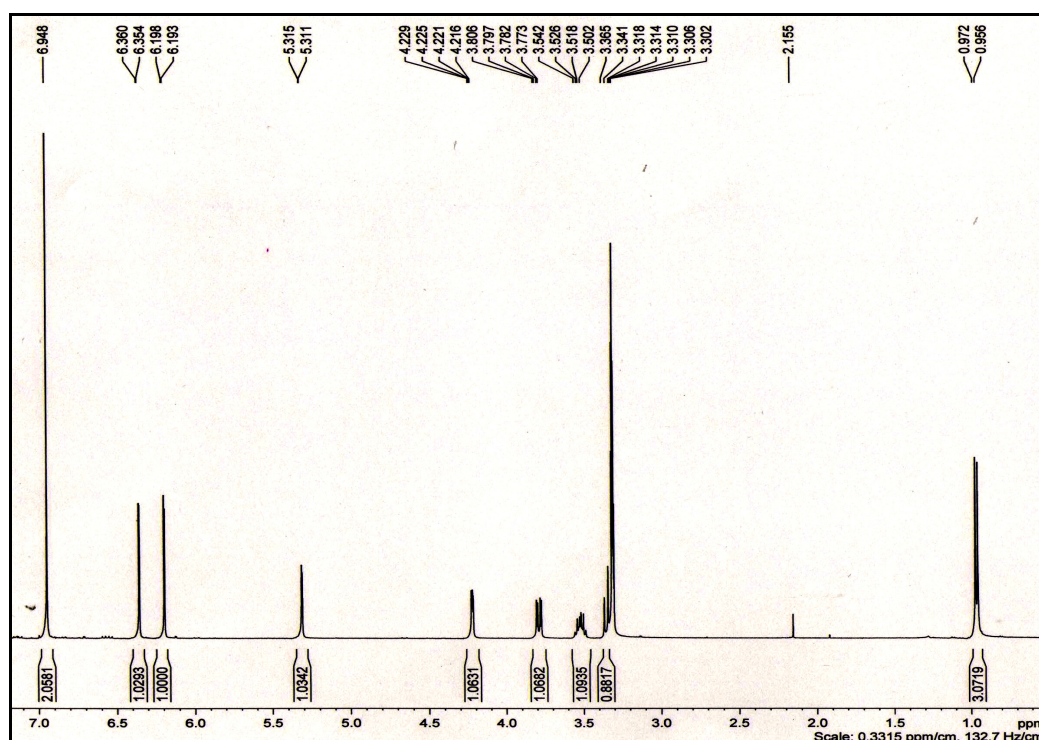
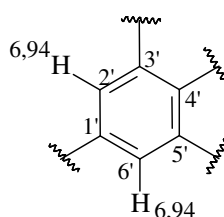


Figura 4.6 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância I (MeOD, 400MHz).

O espectro de HSQC (**Figura 4.7**) apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,94, com o do carbono em  $\delta_C$  110,1 (C-2' e C-6'). A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.8**) indicou a correlação do sinal em  $\delta_H$  6,94 com os dos carbonos em  $\delta_C$  110,1, atribuído ao C-2' e C-6',  $\delta_C$  147,2 atribuído ao C-3' e C-5',  $\delta_C$  138,2 atribuído ao C-4',  $\delta_C$  122,0 atribuído ao C-1' e  $\delta_C$  158,3 atribuído ao C-2, este de deslocamento é característico do carbono  $\beta$ , confirmando seu posicionamento.

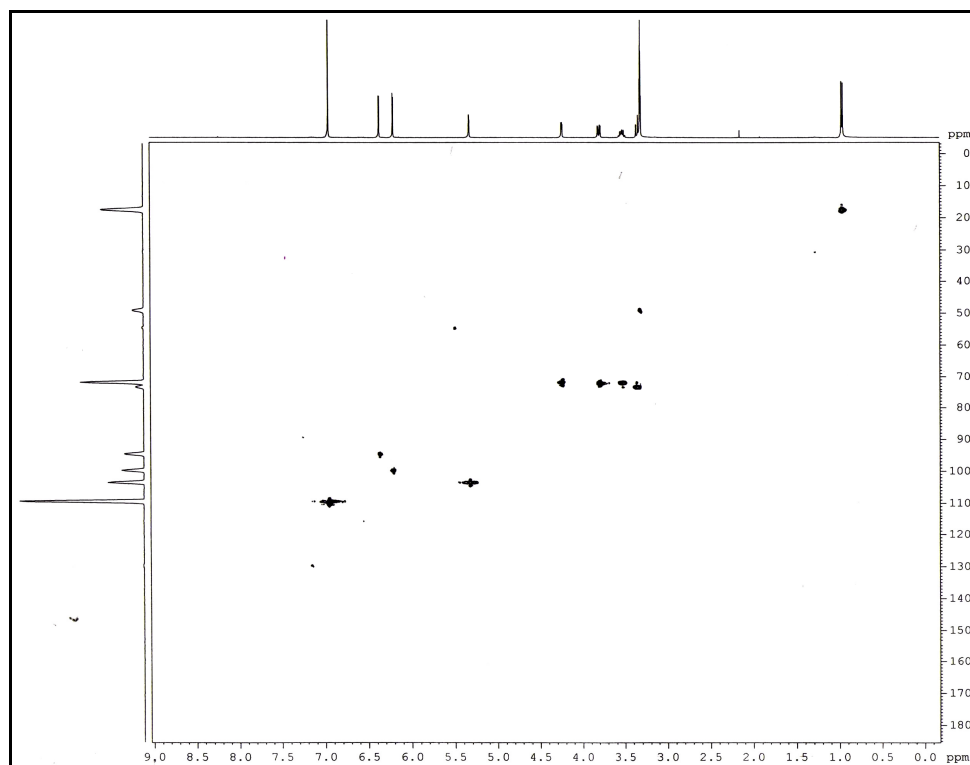
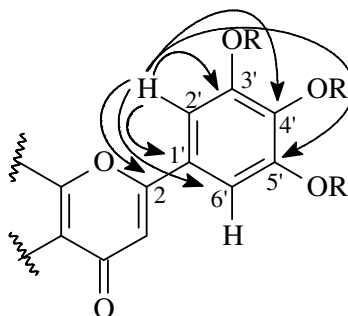


Figura 4.7 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância I (MeOD, 400 MHz).

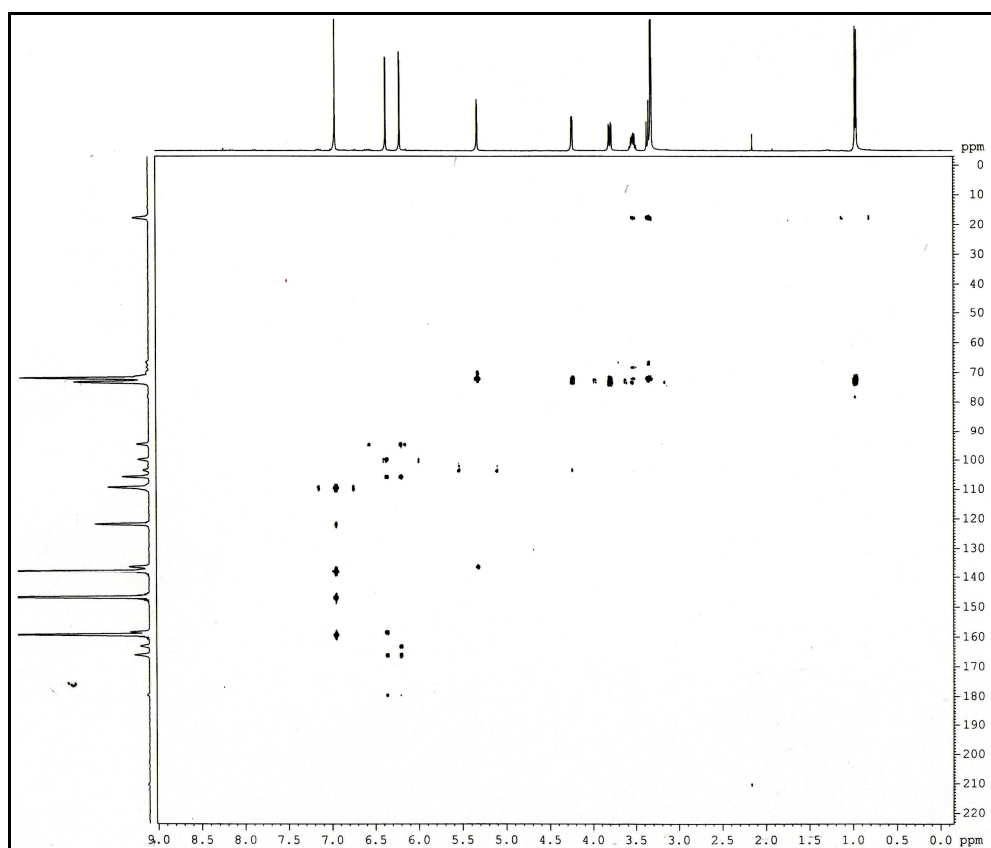
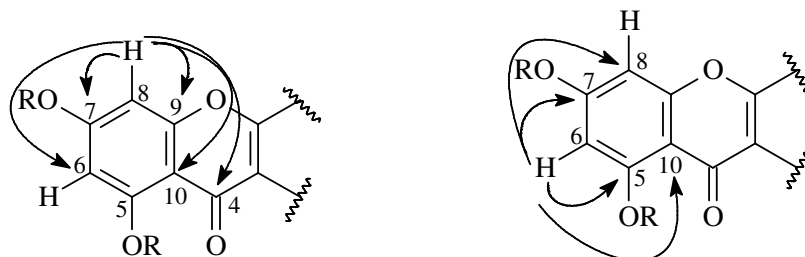


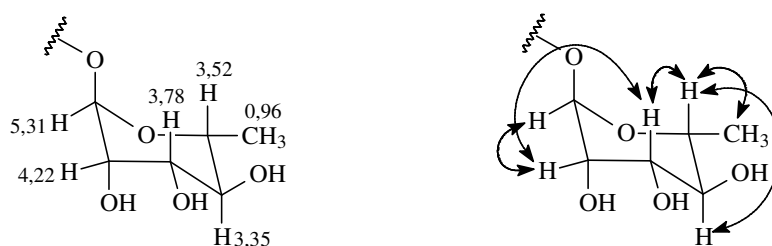
Figura 4.8 - Mapa de contorno HMBC da substância I (MeOD, 400 MHz).

O par de dubletos com  $J = 2,0$  Hz em  $\delta_H$  6,19 e  $\delta_H$  6,35 correspondem aos sinais dos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, que é bem característico do anel A dos flavonóides cuja biossíntese se dá pela via do acetato. O espectro de HSQC (**Figura 4.7**) apresenta a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,35 e  $\delta_H$  6,19 com os dos carbonos em  $\delta_C$  94,7 (C-8) e  $\delta_C$  100,1 (C-6), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.8**) apresentou a correlação do sinal do dubleto em  $\delta_H$  6,35 com os dos carbonos em  $\delta_C$  100,1 (C-6),  $\delta_C$  166,2 (C-7),  $\delta_C$  158,3 (C-9),  $\delta_C$  105,8 (C-10) e  $\delta_C$  179,7 (C-4) e, finalmente, o sinal dubleto em  $\delta_H$  6,19 com os dos carbonos em  $\delta_C$  94,7 (C-8),  $\delta_C$  163,6 (C-5),  $\delta_C$  166,2 (C-7) e  $\delta_C$  105,8 (C-10). Com a observação destas correlações pôde-se atribuir estes sinais aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de uma flavona.



A observação de sinais entre  $\delta_H$  3,0-4,4 sugeriu a presença de uma unidade de glicosídeo, devido à presença de sinais característicos de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos de glicosídeo. A confirmação deste deu-se através da observação do dubleto em  $\delta_H$  0,96 (3H, H-6'',  $J = 6,0$  Hz) característico da metila de uma unidade de ramnose e o dubleto em  $\delta_H$  5,31 (H-1'',  $J = 1,6$  Hz) correspondente ao hidrogênio anomérico deste glicosídeo. O deslocamento químico do hidrogênio anomérico, verificado acima de 5 ppm, indica tratar-se de *O*-ramnosídeo. Uma vez que a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico é de 1,6 Hz, pôde-se deduzir que se trata de uma  $\alpha$ -L-raminopiranosídeo, quando comparado com a literatura (HARBORNE, 1972).

O espectro de correlação homonuclear de gCOSY  $^1H \times ^1H$  (**Figura 4.9**) foi usado para confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios presentes no anel da ramnose. As interações entre os sinais destes hidrogênios encontram-se indicadas a seguir.



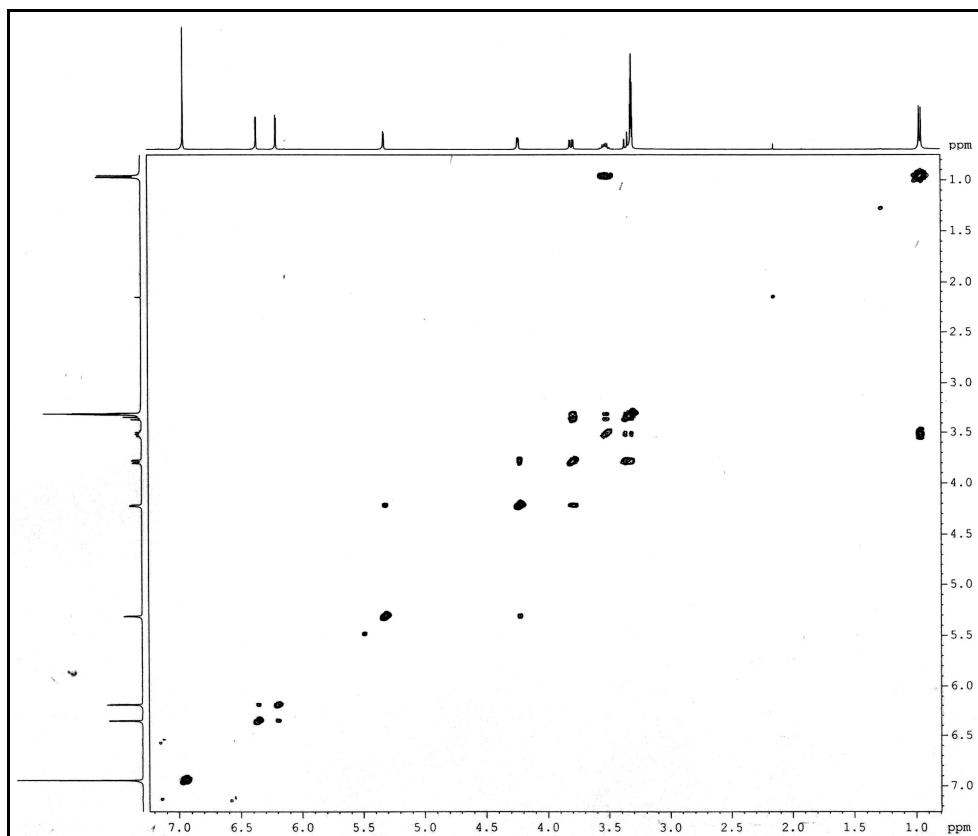
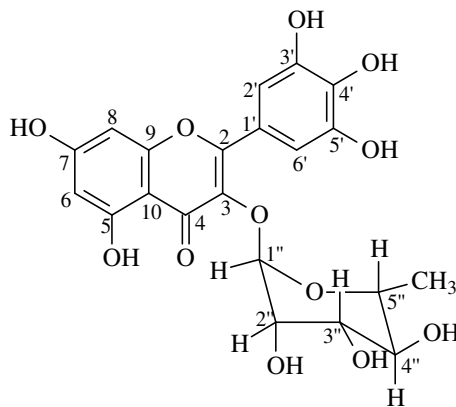


Figura 4.9 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância I (MeOD, 400MHz).

Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado na aglicona, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC (**Figura 4.8**) do hidrogênio anomérico com um carbono em  $\delta_C$  136,4 que foi atribuído ao C-3 do anel C da flavona, pois era o único que faltava ser atribuído. Estes dados juntamente com os encontrados na literatura (**Tabela 4.1**) permitiram a identificação inequívoca deste composto como sendo a da miricetina-3- O- $\alpha$ -L-ramnosídeo ou mericetrina (I).



I

Tabela 4.1 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da miricetina-3-*O*- $\alpha$ -*L*-ramnosídeo (substância I) juntamente com os dados encontrados na literatura

| H/C        | $\delta_{\text{H}}$ (ppm), <i>J</i> (Hz) |   | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) |   |
|------------|--|---|---------------------------|---|
|            | I <sup>a</sup>                           | BRACA <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup> | I <sup>a</sup>            | BRACA <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup> |
| 1          | ---                                      | ---                                     | ---                       | ---                                     |
| 2          | ---                                      | ---                                     | 158,3                     | 158,2                                   |
| 3          | ---                                      | ---                                     | 136,4                     | 134,4                                   |
| 4          | ---                                      | ---                                     | 179,7                     | 178,0                                   |
| 5          | ---                                      | ---                                     | 163,6                     | 163,2                                   |
| 6          | 6,19 (d; 2,06)                           | 6,12 (d; 2,0)                           | 100,1                     | 99,6                                    |
| 7          | ----                                     | ---                                     | 166,2                     | 165,4                                   |
| 8          | 6,35 (d; 2,06)                           | 6,38 (d; 2,0)                           | 94,7                      | 94,5                                    |
| 9          | ---                                      | ---                                     | 158,3                     | 157,5                                   |
| 10         | ---                                      | ---                                     | 105,8                     | 105,2                                   |
| 1'         | ---                                      | ---                                     | 122,1                     | 121,7                                   |
| 3' e 5'    | ---                                      | ---                                     | 147,2                     | 146,8                                   |
| 4'         | ---                                      | ---                                     | 138,2                     | 137,2                                   |
| 2' e 6'    | 6,94 s                                   | 7,08 s                                  | 110,1                     | 109,4                                   |
| 1''        | 5,31 (d; 1,6)                            | 5,32 (d; 1,8)                           | 103,9                     | 102,4                                   |
| 2''        | 4,22(dd;1,6;3,6)                         | ---                                     | 68,4                      | 70,8                                    |
| 3''        | 3,78(dd;3,6;9,6)                         | ---                                     | 71,9                      | 71,0                                    |
| 4''        | 3,35(t, 9,6)                             | ---                                     | 73,7                      | 71,8                                    |
| 5''        | 3,52(dq)                                 | ---                                     | 66,7                      | 70,5                                    |
| 6''        | 0,96 d (6,1)                             | 0,98 d (6,5)                            | 18,1                      | 17,3                                    |
| glicosídeo | 3,37-3,81 m                              | 3,27-3,89 m                             |                           |   |

<sup>a</sup> MeOD, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.

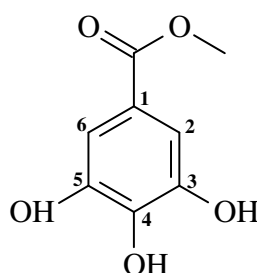
<sup>b</sup>  $^1\text{H}$  (MeOD, 200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz).

#### 4.2.1.1.2 - Determinação estrutural da Substância II

A substância II foi isolada de frações do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.6**, p. 30). Esta também foi identificada na fração acetato de etila do caule (**Fluxograma 3.16**, p.39). A substância apresentou-se como sólido amorfo vermelho decorrente da contaminação de pigmento.

A identificação foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.10**) e comparação com dados da literatura (CERUKS *et al.*, 2007).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.10**) apresentou um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7,03 integrando para dois hidrogênios (H-2 e H-6), sinal característico dos dois hidrogênios ligados a anel aromático tri-substituído, em que o singlete é observado devido ao plano de simetria. Este espectro revelou ainda um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,80, integrando para 3 hidrogênios, referente ao éster metílico. Estes valores foram comparados com a literatura (CERUKS *et al.*, 2007) permitindo a identificação inequívoca da substância II como sendo galato de metila.



II

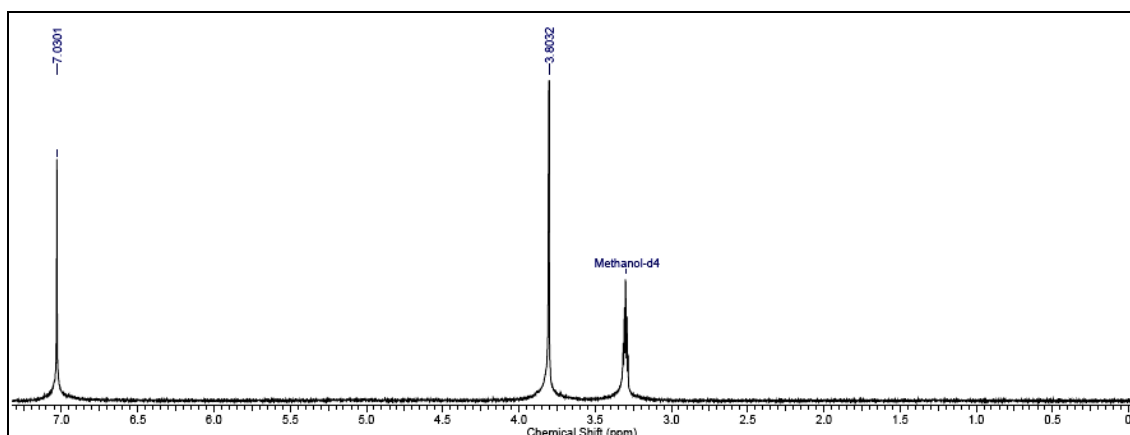


Figura 4.10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância II (MeOD, 200MHz).

### 4.2.1.1.3 - Determinação estrutural da Substância III

A substância III foi isolada da fração RACII (p.31) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.7**, p.31). A substância apresentou-se como sólido amorfo amarelo e sua identificação foi realizada através de dados de espectro RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.11**), HMBC (**Figura 4.12**) e dados da literatura (PAN *et al.*, 2000) (**Tabela 4.2**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.11**) apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,32 (H-2') e  $\delta_{\text{H}}$  6,89 (H-5'), com constantes de acoplamento  $J = 2,0$  Hz e  $J = 8,8$  Hz, respectivamente, e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,35 (H-6') com constantes de acoplamento  $J = 8,8$  Hz e 2,0 Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído, sendo que duas substituições são vizinhas e a terceira em posição meta trissubstituído.

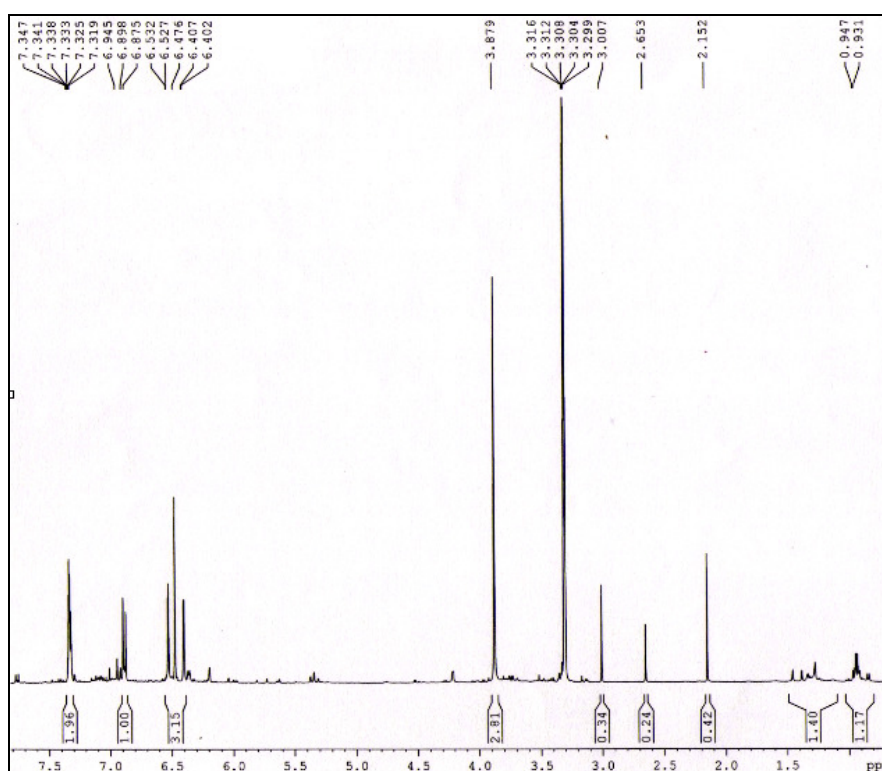


Figura 4.11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância III (MeOD, 400 MHz).

Observa-se ainda a presença de um par de dubletos com  $J = 2,4$  Hz em  $\delta_{\text{H}}$  6,53 e  $\delta_{\text{H}}$  6,40, estes correspondem aos sinais dos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, com acoplamento em meta característico do anel A dos



flavonóides. Além disso, há um singlete em  $\delta_H$  6,47 (1H) referente ao H-3, característico de uma flavona e um singlete em 3,88 (3H) de metoxila, a posição desta foi determinada pelo experimento de HMBC (**Figura 4.12**).

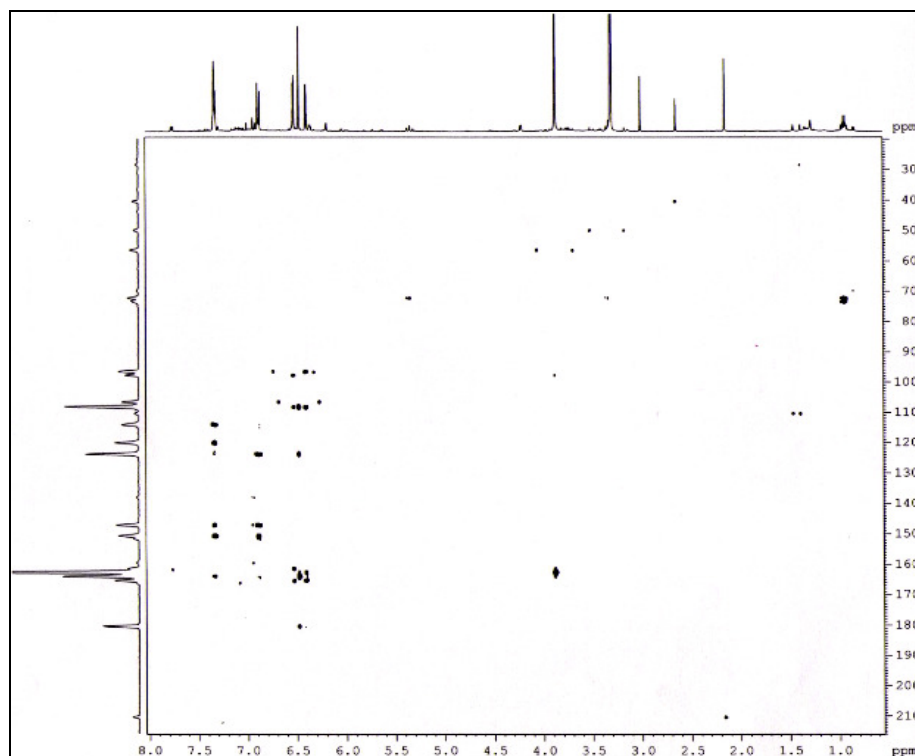


Figura 4.12 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância III (MeOD, 400 MHz).

A análise destes dados foram suficientes para propor que esta substância trata-se da flavona 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavona, quando comparada com a literatura (PAN *et al.*, 2000, **Tabela 4.2**).

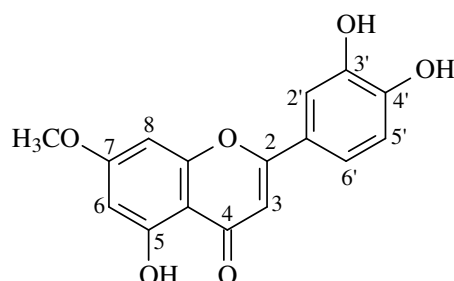


Tabela 4.2 - Dados de RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (substância III) juntamente com os dados encontrados na literatura

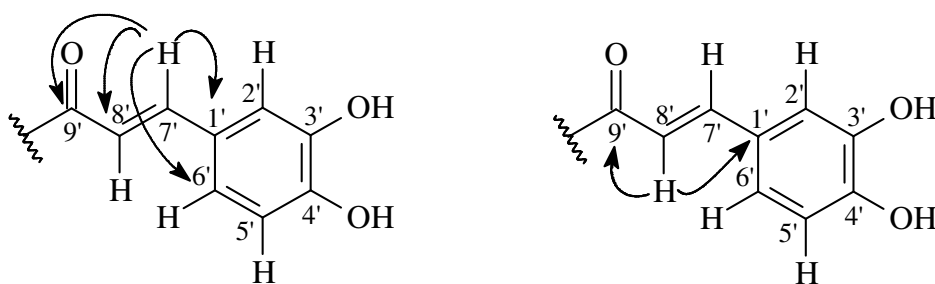
| H                | $\delta$ (ppm), J (Hz) |                                       |       |                                       |
|------------------|------------------------|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|
|                  | III                    | PAN <i>et al.</i> (2006) <sup>b</sup> | III   | PAN <i>et al.</i> (2006) <sup>b</sup> |
| 2                | ---                    | ---                                   | 163,9 | 164,3                                 |
| 3                | 6,47 s                 | 6,72 s                                | 97,8  | 103,1                                 |
| 4                | ---                    | ---                                   | 180,4 | 181,9                                 |
| 5                | ---                    | ---                                   | 159,4 | 157,3                                 |
| 6                | 6,53 (d; 2,4)          | 6,36 (d; 2,2)                         | 120,0 | 121,4                                 |
| 7                | ---                    | ---                                   | 165,3 | 165,2                                 |
| 8                | 6,40 (d; 2,4)          | 6,71 (d; 2,2)                         | 96,5  | 92,6                                  |
| 9                | ---                    | ---                                   | 161,4 | 161,2                                 |
| 10               | ---                    | ---                                   | 108,1 | 104,7                                 |
| 1'               | ---                    | ---                                   | 110,3 | 111,1                                 |
| 2'               | 7,32 (d; 2,0)          | 7,41 (d; 1,2)                         | 114,1 | 113,5                                 |
| 3'               | ---                    | ---                                   | 147,2 | 145,8                                 |
| 4'               | ---                    | ---                                   | 150,6 | 149,9                                 |
| 5'               | 6,89 (d; 8,8)          | 6,89 (d; 8,4)                         | 114,1 | 116,0                                 |
| 6'               | 7,35(dd; 8,8; 2,0)     | 7,43(dd; 8,4; 1,2)                    | 123,8 | 121,4                                 |
| OCH <sub>3</sub> | 3,88 s                 | 3,86 s                                | 56,4  | 56,0                                  |

<sup>a</sup> MeOD, 400 MHz. Dados retirados do HMBC.<sup>b</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz.

#### 4.2.1.1.4 - Determinação estrutural da Substância IV

A substância IV foi isolada de frações do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.8**, p.31). A substância apresentou-se como óleo viscoso de coloração marrom e sua identificação foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.13**), COSY (**Figura 4.14**), HSQC (**Figura 4.15**), HMBC (**Figura 4.16**) e comparação com os dados da literatura (DOS SANTOS *et al.*, 2004) (**Tabela 4.3**).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.13**) revelou sinais característicos de um grupo cafeoila devido à presença de acoplamento entre dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,45 ( $J = 15,9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,22 ( $J = 15,9$  Hz), hidrogênios olefínicos  $\alpha,\beta$  carbonílicos *trans* (H-7' e H-8', respectivamente). O espectro de HSQC (**Figura 4.15**) apresentou a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,45 e  $\delta_{\text{H}}$  6,22 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  146,7 (C-7') e  $\delta_{\text{C}}$  116,5 (C-8'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.16**) revelou a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,45 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  116,5, atribuído ao C-8';  $\delta_{\text{C}}$  123,2 atribuído ao C-6';  $\delta_{\text{C}}$  127,1 atribuído ao C-1' e  $\delta_{\text{C}}$  168,3 atribuído ao C-9'. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,22 apresentou correlações com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  127,1 atribuído ao C-1' e  $\delta_{\text{C}}$  168,3 atribuído ao C-9'.



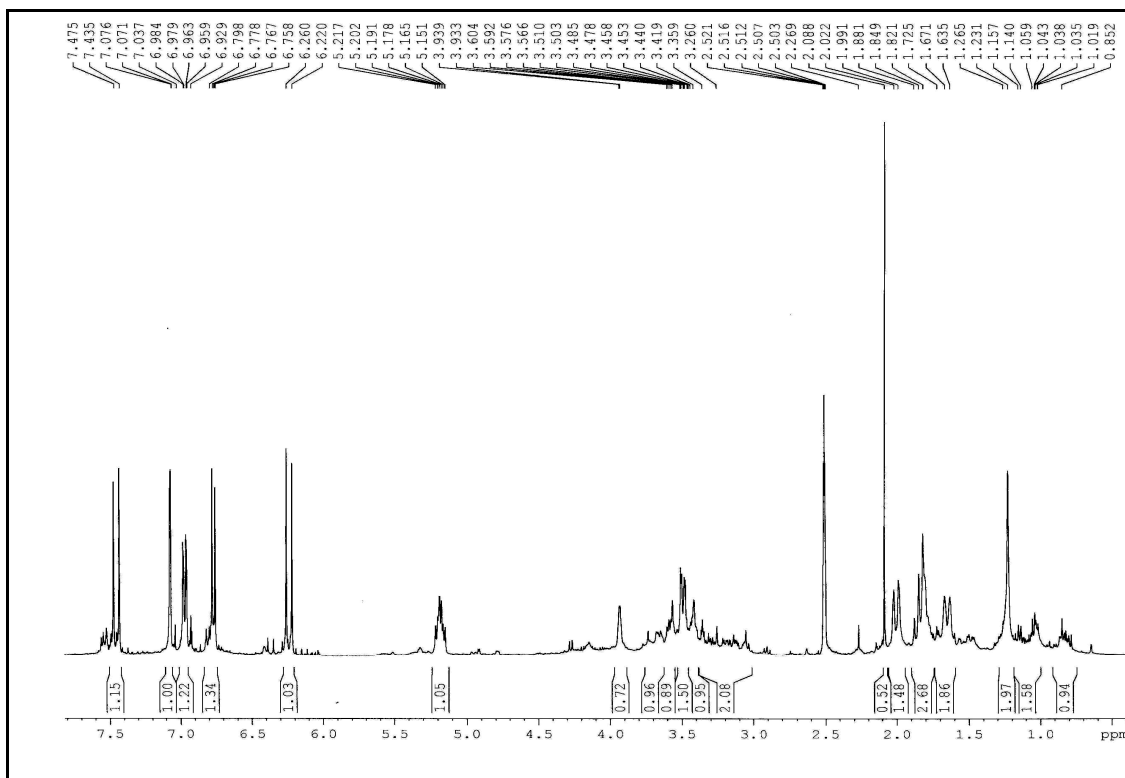


Figura 4.13- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV (DMSO, 400MHz).

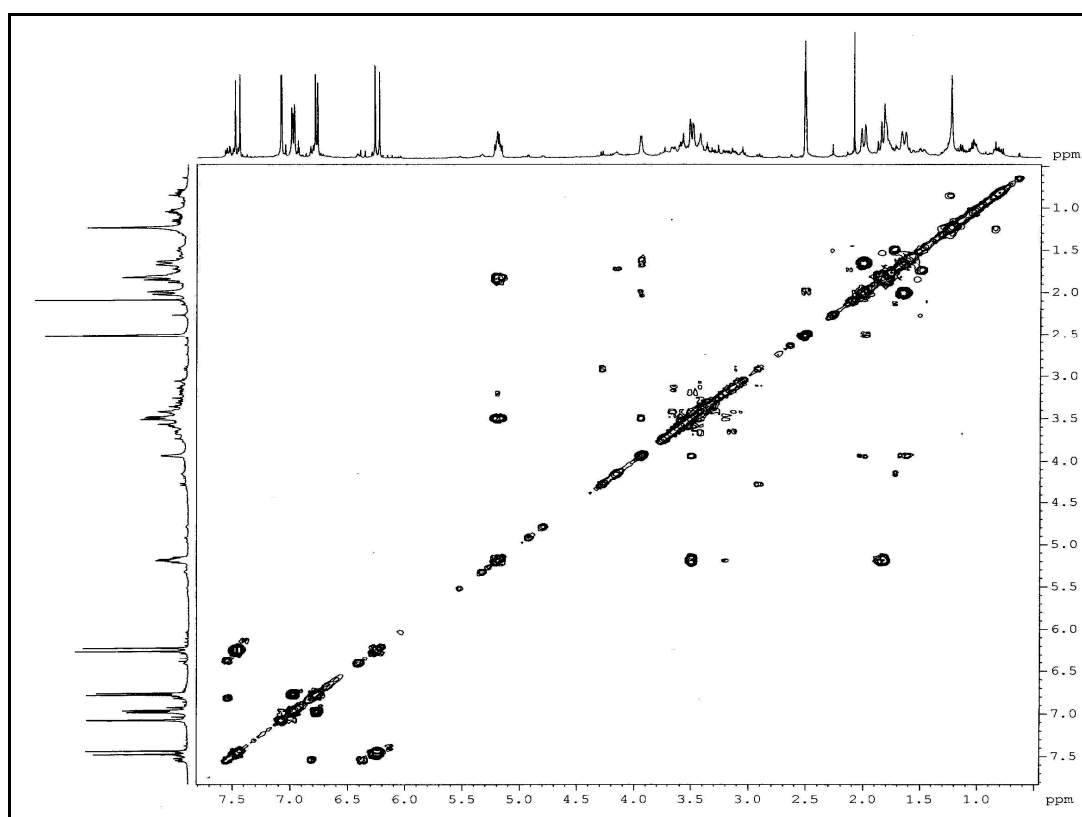


Figura 4.14 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância IV (DMSO, 400 MHz).

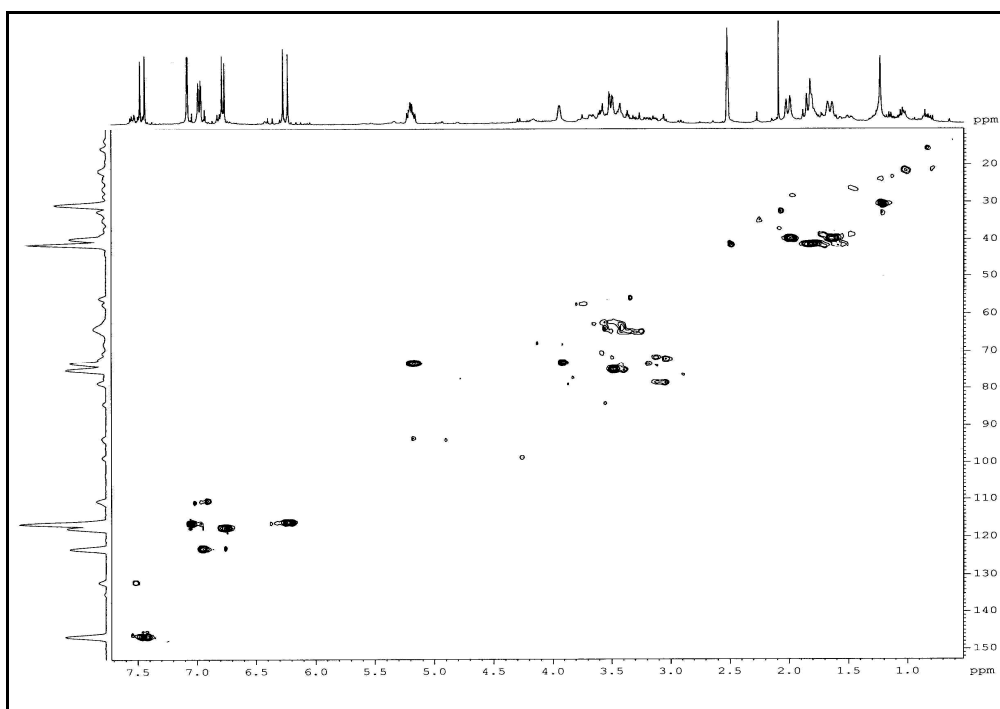


Figura 4.15 - Mapa de contorno HSQC da substância IV (DMSO, 400 MHz).

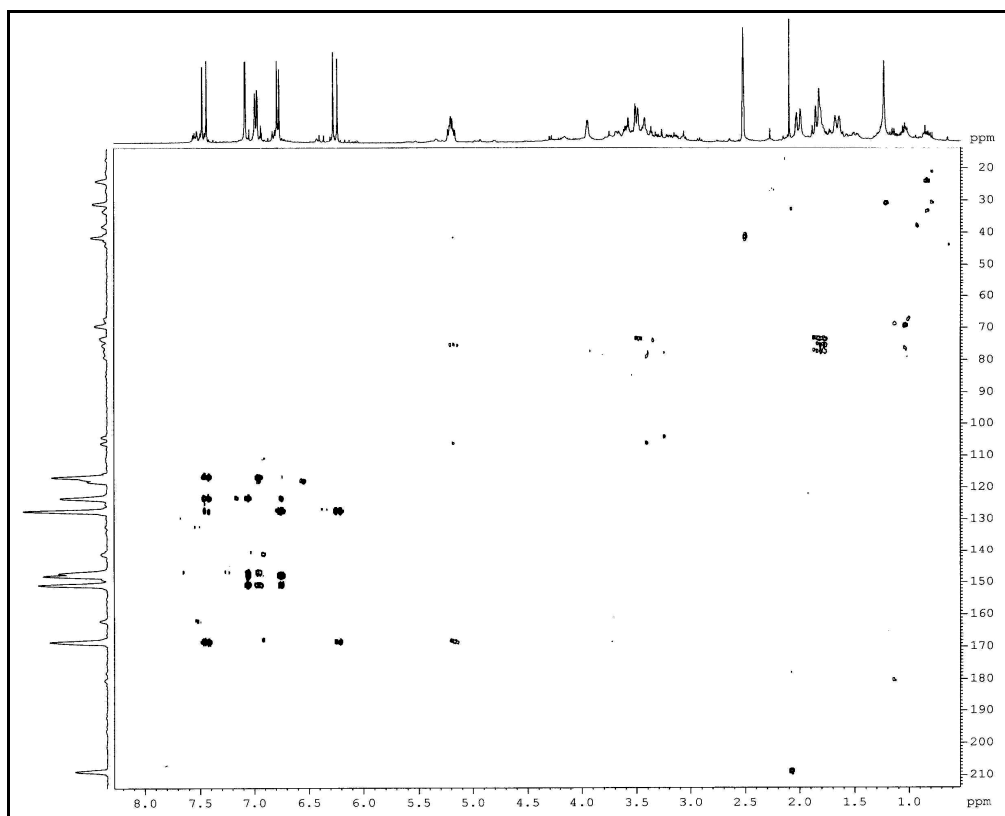
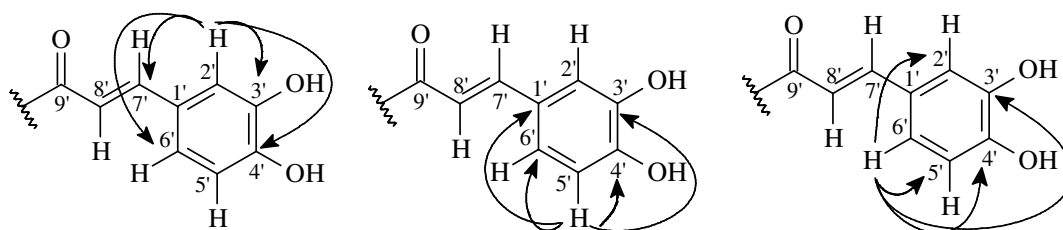


Figura 4.16 - Mapa de contorno HMBC da substância IV (DMSO, 400 MHz).

Estes sinais descritos, juntamente com os sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos como os dubletos em  $\delta$  7,08 ( $J = 1,8$  Hz, H-2') e 6,77 ( $J = 8,4$  Hz, H-5') e o duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,97 ( $J = 8,4; 1,8$  Hz, H-6') (**Figura 4.13**), caracterizaram uma unidade de cafeoila na estrutura da substância IV. O espectro de HSQC (**Figura 4.15**) apresentou a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  116,5 (C-2'),  $\delta_{\text{H}}$  6,77 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  117,8 (C-5') e o  $\delta_{\text{H}}$  6,97 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  123,2 (C-6'). A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.16**) revelou a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  123,2 atribuído ao C-6',  $\delta_{\text{C}}$  147,8 atribuído ao C-3',  $\delta_{\text{C}}$  150,6 atribuído ao C-4',  $\delta_{\text{C}}$  146,7 atribuído ao C-7'. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  123,2 (HSQC),  $\delta_{\text{C}}$  127,1,  $\delta_{\text{C}}$  147,8 e  $\delta_{\text{C}}$  150,6 atribuídos respectivamente aos C-1', 3' e 4' (HMBC). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,97 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  116,5,  $\delta_{\text{C}}$  117,8,  $\delta_{\text{C}}$  147,8 e  $\delta_{\text{C}}$  150,6, atribuídos respectivamente aos C-8', 5', 3' e 4'.



Foram observados ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  sinais que caracterizam uma unidade de ácido quínico, como dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,02 ( $J = 12,4$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  1,65 ( $J = 12,4$  Hz) característicos dos hidrogênios diastereotópicos H-2 axial (ax.) e equatorial (eq.), respectivamente. O espectro de HSQC apresentou a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,02 e  $\delta_{\text{H}}$  1,65 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  39,8 (C-2). Os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,50 (dd,  $J = 2,8$  e 11,2 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3,94 (d, 2,8 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  1,83 (m) tem correlações com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  75,1 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  73,2 (C-3) e  $\delta_{\text{C}}$  41,5 (C-6), respectivamente. A análise do espectro de HMBC revelou a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,50 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  73,5, atribuído ao C-3 e ao C-5. O sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,94 apresenta correlações com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  78,8 atribuído ao C-1. O sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,83 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  75,1 atribuído ao C-4,  $\delta_{\text{C}}$  73,2 ao C-3 e  $\delta_{\text{C}}$  78,8 ao C-1.

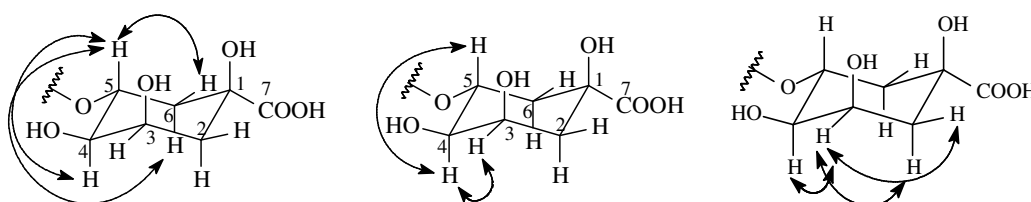
O sinal observado em  $\delta_{\text{H}}$  1,83 (m) refere-se aos hidrogênios H-6 axial e equatorial, aliado aos sinais  $\delta_{\text{H}}$  5,15 multipletto e outro sinal de dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ( $J$

= 2,4 Hz) característico dos hidrogênios H-5 e H-3, respectivamente. No espectro de HSQC observa-se a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 5,15$  e  $\delta_{\text{H}} 3,94$  com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 73,2$ . A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.16**) revelou a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}} 5,15$  com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 41,5$  atribuído ao C-6,  $\delta_{\text{C}} 73,2$  atribuído ao C-3 e  $\delta_{\text{C}} 168,3$  atribuído ao C-9'. O sinal  $\delta_{\text{H}} 3,93$  apresenta uma correlação fraca com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 78,8$ , atribuído ao C-1.

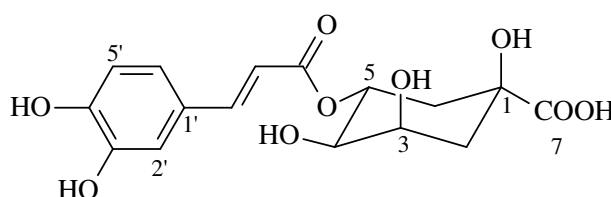
Através do espectro de COSY (**Figura 4.14**) pode-se observar que o sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 5,15$  (H-5, m) acopla com os sinais em  $\delta_{\text{H}} 3,50$  (H-4) e com o  $\delta_{\text{H}} 1,83$  (H-6 ax. e eq.).

O duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}} 3,50$  (H-4, dd,  $J = 2,8$  e  $11,2$  Hz) acopla com os  $\delta_{\text{H}} 3,94$  ( $J = 2,8$  Hz) (H-3) e com o multipletto  $\delta_{\text{H}} 5,15$  (H-5).

O sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 3,94$  (H-3, d,  $J = 2,8$ ) acopla com os sinais de hidrogênio  $\delta_{\text{H}} 2,02$  (H-2 ax),  $\delta_{\text{H}} 1,62$  (H-2 eq) e com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 3,5$  (H-4). Sendo este mapa de contorno um importante instrumento para determinar a posição do substituinte no ácido quínico, indicando a esterificação deste na posição 5, comprovado pela correlação observada no espectro de HMBC do sinal  $\delta_{\text{H}} 5,15$  com o sinal de carboxila do cafeato em  $\delta_{\text{C}} 168,3$ .



A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2D da substância IV e a comparação destes com a literatura (DOS SANTOS *et al.*, 2004) (**Tabela 4.3**) levou a identificação inequívoca desta substância como sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico.



IV

Tabela 4.3 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do ácido 5-O-cafeoilquínico (substância IV) juntamente com os dados encontrados na literatura

| C  | $\delta$ (ppm), $J$ (Hz) |   |                 |   |
|----|--------------------------|---|-----------------|---|
|    | IV <sup>a</sup>          | DOS SANTOS<br><i>et al.</i> (2004) <sup>b</sup> | IV <sup>a</sup> | DOS SANTOS<br><i>et al.</i> (2004) <sup>b</sup> |
| 1  | ---                      | ---   | 78,8            | 79,9  |
| 2  | H-ax 2,02<br>(dt,12,4)   | H-ax 2,05<br>(d, 12,0)                          | 39,8            | 40,2  |
|    | H-eq 1,65<br>(d, 12,4)   | H-eq 1,96<br>(d, 12,0)                          |                 |   |
| 3  | 3,94 (d, 2,8)            | 4,26 (d, 3,0)                                   | 73,2            | 73,8  |
| 4  | 3,50<br>(dd, 2,8; 11,2)  | 3,87<br>(dd, 3,0; 10,5)                         | 75,1            | 75,9  |
| 5  | 5,15 (m)                 | 5,33<br>(td,10,5; 10,5;4,6)                     | 73,2            | 74,2  |
| 6  | H-ax/eq 1,83 (m)         | H-ax/eq 2,15 (m)                                | 41,5            | 41,4  |
| 7  | ---                      | ---   | NO              | NO  |
| 1' | ---                      | ---   | 127,1           | 130,1   |
| 2' | 7,08(d, 1,8)             | 7,15 (d, 1,8)                                   | 116,5           | 118,2   |
| 3' | ---                      | ---   | 147,8           | 147,4   |
| 4' | ---                      | ---   | 150,6           | 150,2   |
| 5' | 6,77 (d, 8,4)            | 6,91 (d, 8,4)                                   | 117,8           | 119,3   |
| 6' | 6,97 (dd,1,8;8,4)        | 7,06 (dd, 1,8; 8,2)                             | 123,2           | 125,7   |
| 7' | 7,45 (d; 15,9)           | 7,60 (d, 15,9)                                  | 146,7           | 149,2   |
| 8' | 6,22 (d;15,9)            | 6,34 (d, 15,9)                                  | 116,5           | 117,8   |
| 9' | ---                      | ---   | 168,3           | 172,3   |

<sup>a</sup> DMSO, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.

<sup>b</sup> D<sub>2</sub>O, 300 MHz.

NO não observado



#### 4.2.1.1.5 - Determinação estrutural da Substância V

A substância V foi isolada da fração RACIII (p.32) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.9**, p.32). A substância apresentou-se como sólido amorfo amarelo e sua identificação foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.17**), COSY (**Figura 4.18**), HSQC (**Figura 4.19**), HMBC (**Figura 4.20, 4.21**) e comparação com dados da literatura (BANDEIRA *et al.* (2003), **Tabela 4.4**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.17**) revelou um duplo dubleto em  $\delta$  6,46 ( $J = 9,2$  e  $2,4$  Hz) referente ao H-5' acoplado em meta com um dubleto em  $\delta$  6,36 ( $J = 2,4$  Hz) do hidrogênio H-3' e em orto com um dubleto  $\delta$  7,83 ( $J = 9,2$  Hz) referente ao H-6'. Esses sinais remetem ao anel A de um flavonóide substituído nas posições 2' e 4', sendo estes acoplamentos confirmados pela análise do espectro de COSY (**Figura 4.18**).

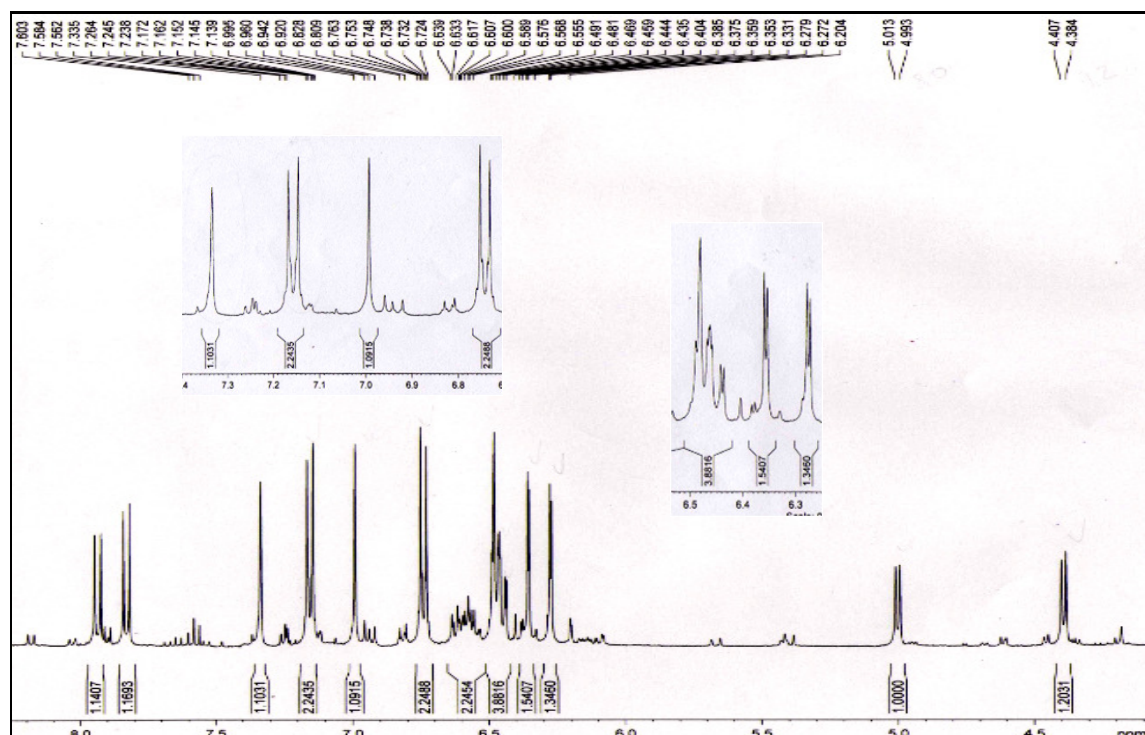
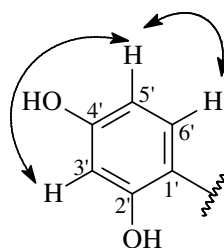


Figura 4.17 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância V (Acetona- $d_6$ , 400MHz).

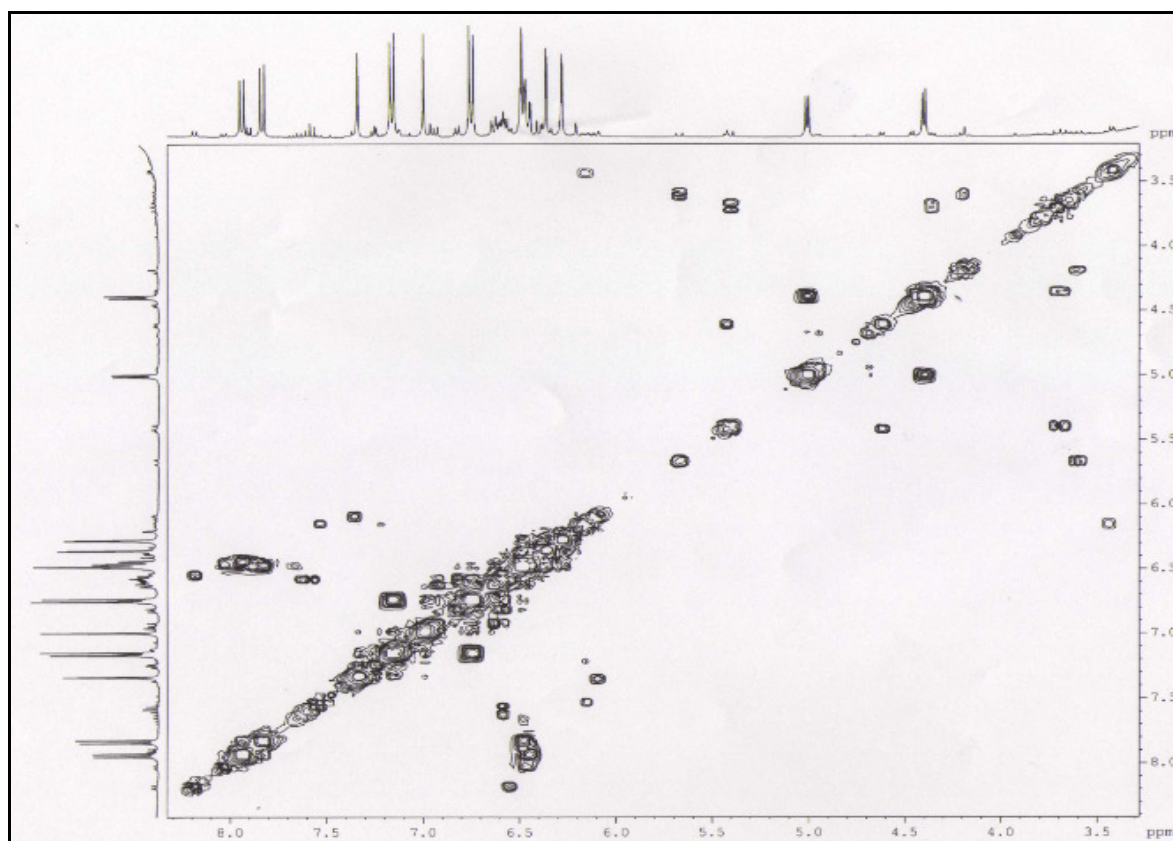
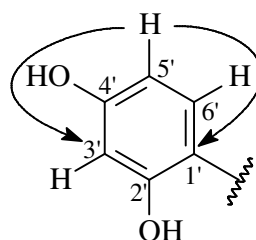


Figura 4.18 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância V (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,46 com o do carbono em  $\delta_C$  108,7 (C-5'). A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.20**) mostra a correlação do sinal em  $\delta_H$  6,46 com os dos carbonos em  $\delta_C$  103,8, atribuído ao C-3' e  $\delta_C$  113,3 atribuído ao C-1'.



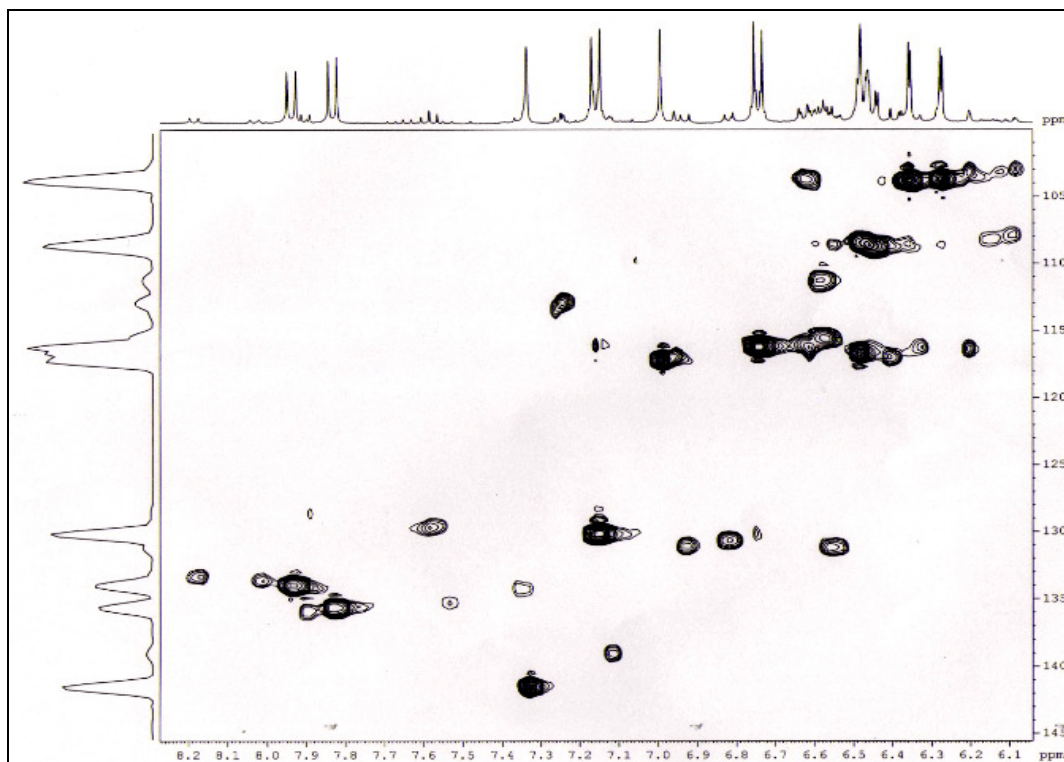


Figura 4.19 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância V (Acetona-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).

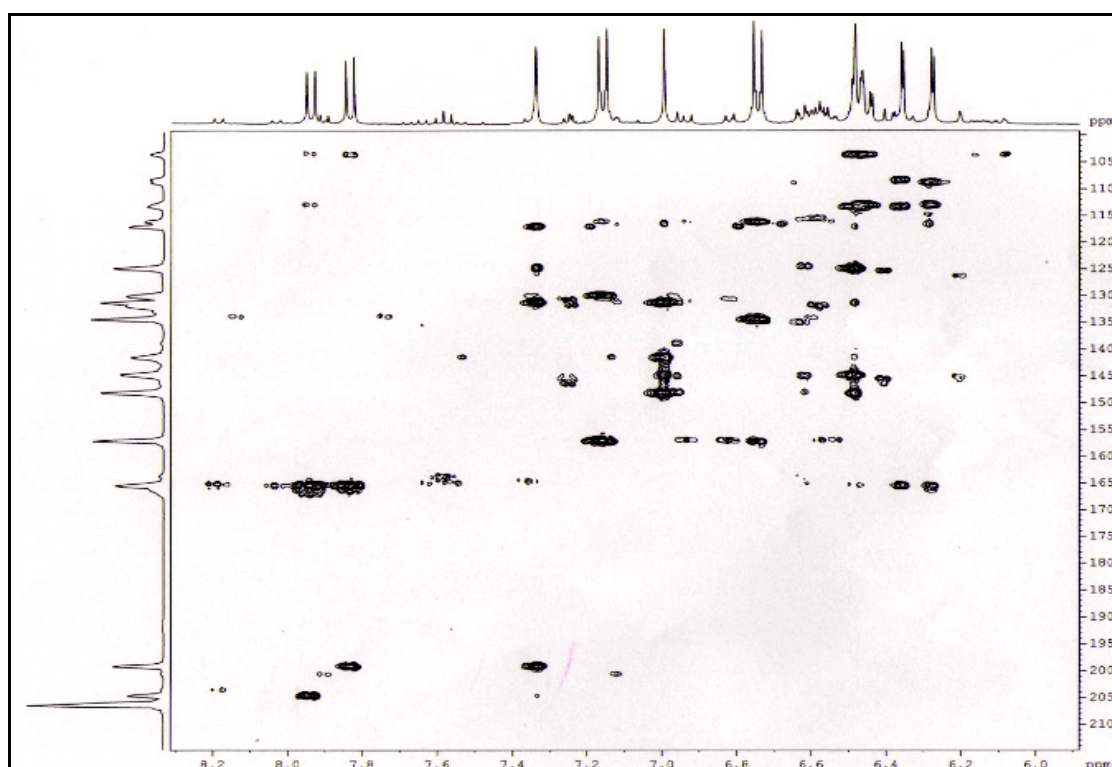
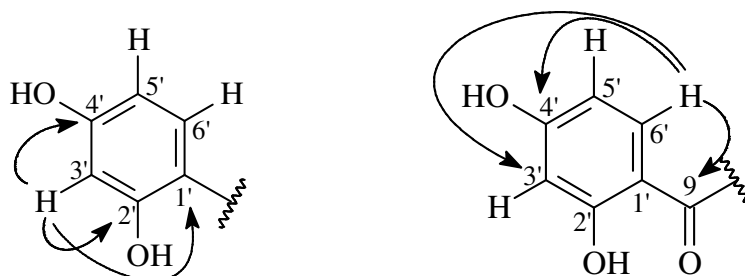
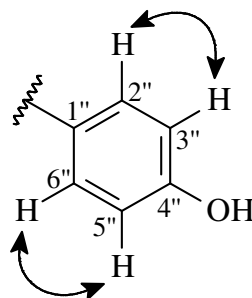


Figura 4.20 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância V (Acetona-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).

A presença de dois dubletos em  $\delta_H$  6,36 ( $J = 2,4$  Hz) e  $\delta_H$  7,83 ( $J = 9,2$  Hz) correspondentes aos sinais dos hidrogênios H-3' e H-6', respectivamente. O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) apresentou a correlação sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,36 e  $\delta_H$  7,83 com os carbonos em,  $\delta_C$  103,8 (C-3') e  $\delta_C$  135,6 (C-6'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.20**) revelou a correlação do sinal do dubleto em  $\delta_H$  6,36 com os dos carbonos  $\delta_C$  103,8 (C-3');  $\delta_C$  113,3 (C-1');  $\delta_C$  165,4 (C-2') e  $\delta_C$  166,4 (C-4'), sendo estes dois últimos pertencentes à função fenólica; e finalmente o dubleto em  $\delta_H$  7,83 correlaciona-se com os dos carbonos em  $\delta_C$  103,8 (C-3');  $\delta_C$  166,4 (C-4') e 199,2 (C-9), sendo este característico de uma carbonila conjugada. A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 6' e 3' do anel A de uma flavona.

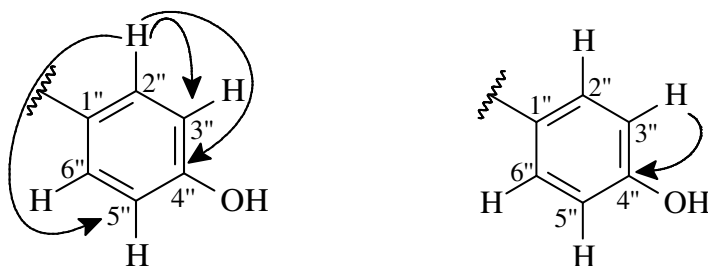


O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 4.17**) revelou um dubleto  $\delta_H$  7,25 (2H) ( $J = 8,4$  Hz), este acopla com outro dubleto em  $\delta_H$  6,75 (2H) ( $J = 8,4$  Hz), estes são característicos dos hidrogênios H-2''/H-6'' e 3''/5'', pois estes são quimicamente equivalentes devido a livre rotação do anel, sendo estes acoplamentos confirmados pela análise do espectro de COSY (**Figura 4.18**).

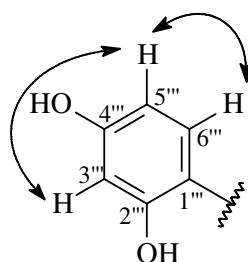


O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  7,25 e  $\delta_H$  6,75 com os dos carbonos em,  $\delta_C$  130,1 (C-2''/6'') e  $\delta_C$  116,2 (C-3''/5''), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.20**) revelou a correlação do sinal do duplo tripleto em  $\delta_H$  7,25 com os dos carbonos  $\delta_C$

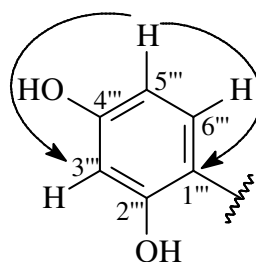
116,2 (C-3''/5'');  $\delta_C$  130,1 (C-2''/6'') e  $\delta_C$  157,1 (C-4''), este característico de carbono fenólico; e finalmente o  $\delta_H$  6,75 com o do carbono em  $\delta_C$  134,4 (C-1'').



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.17**) apresentou também um duplo dubleto em  $\delta_H$  6,44 ( $J = 2,8$  e  $9,6$  Hz) característico do hidrogênio H-5'', acoplando em meta com o dubleto em 6,27 ( $J = 2,8$  Hz) referente ao H-3'' e acoplando em orto com um dubleto em  $\delta$  7,95 ( $J = 9,6$  Hz) do H-6''.

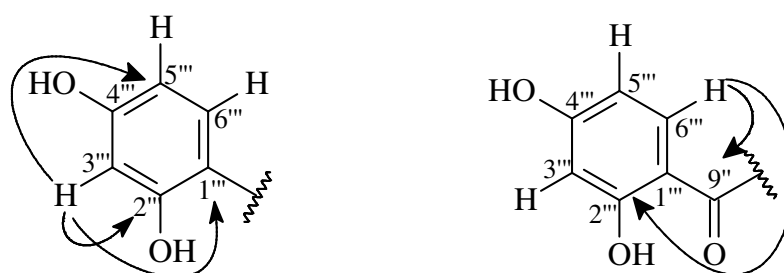


A análise do espectro de HSQC (**Figura 4.19**) mostrou a correlação do sinal em  $\delta_H$  6,44 com o do carbono em  $\delta_C$  108,8, atribuído ao C-5'''. A análise do espectro de HMBC revelou a correlação deste hidrogênio com os carbonos  $\delta_C$  103,8 (C-3''') e  $\delta_C$  113,3 (C-1''').

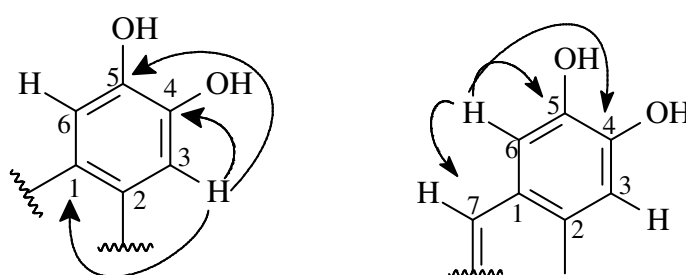


A presença de dubletos em  $\delta_H$  6,27 ( $J = 2,8$  Hz) e  $\delta_H$  7,95 ( $J = 9,6$  Hz) correspondem aos sinais dos hidrogênios H-3''' e H-6''', respectivamente. O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,27 e  $\delta_H$  7,95 com os dos carbonos em  $\delta_C$  103,8 (C-3''') e  $\delta_C$  134,0 (C-6'''),

respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.20**) revelou a correlação do sinal do duplete em  $\delta_H$  6,27 com os carbonos  $\delta_C$  108,8 (C-5''');  $\delta_C$  113,3 (C-1''') e  $\delta_C$  165,4 (C-2'''), sendo este último pertencente à função fenólica; e finalmente o duplete em  $\delta_H$  7,95 correlacionou com os dos carbonos em  $\delta_C$  165,4 (C-2'') e  $\delta_C$  204,7 (C-9''), sendo este característico de uma carbonila.



O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 4.17**) apresentou ainda dois singletos, um em  $\delta_H$  6,48 (1H) e outro em  $\delta_H$  6,99 (1H) característicos dos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente. O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) revelou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,48 e  $\delta_H$  6,99 com os dos carbonos em,  $\delta_C$  116,6 (C-3) e  $\delta_C$  117,3 (C-6), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.20**) apresentou a correlação do sinal do singlete em  $\delta_H$  6,48 com os carbonos  $\delta_C$  124,8 (C-1);  $\delta_C$  144,7 (C-5) e  $\delta_C$  148,1 (C-4), sendo estes dois últimos pertencentes à função fenólica; e finalmente o singlete em  $\delta_H$  6,99 com os carbonos em  $\delta_C$  131,3 (C-2);  $\delta_C$  144,7 (C-5);  $\delta_C$  148,1 (C-4) e  $\delta_C$  141,5 (C-7).



No espectro de RMN  $^1H$  pode se verificar ainda um singlete em  $\delta_H$  7,33 (1H) e os dubletos em  $\delta_H$  4,39 ( $J = 8,0$  Hz) e  $\delta_H$  5,00 ( $J = 8,0$  Hz) (**Figura 4.17**).

Através do espectro de COSY (**Figura 4.18**) pode-se observar que o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,39 acopla com o sinal em  $\delta_H$  5,00.

O espectro de HSQC (**Figura 4.19**) apresentou correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  7,33,  $\delta_H$  4,39 e  $\delta_H$  5,00 com os dos carbonos em  $\delta_C$  141,5 (C-7),  $\delta_C$  48,3 (C-7'') e  $\delta_C$  51,0 (C-8''), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.21**) mostra a correlação do singlete em  $\delta_H$  7,33 com sinais dos carbonos em  $\delta_C$  117,3 (C-6);  $\delta_C$  124,8 (C-1) e  $\delta_C$  131,3 (C-2) e  $\delta_C$  199,2 (C-9); o duplete em  $\delta_H$  4,39 com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  51,0 (C-8'');  $\delta_C$  117,3 (C-6);  $\delta_C$  124,8 (C-1);  $\delta_C$  199,2 (C-9) e  $\delta_C$  204,7 (C-9''); finalmente o duplete em  $\delta_H$  5,00 com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  48,3 (C-7'');  $\delta_C$  124,8 (C-1);  $\delta_C$  141,5 (C-7);  $\delta_C$  199,2 (C-9) e  $\delta_C$  204,7 (C-9'').

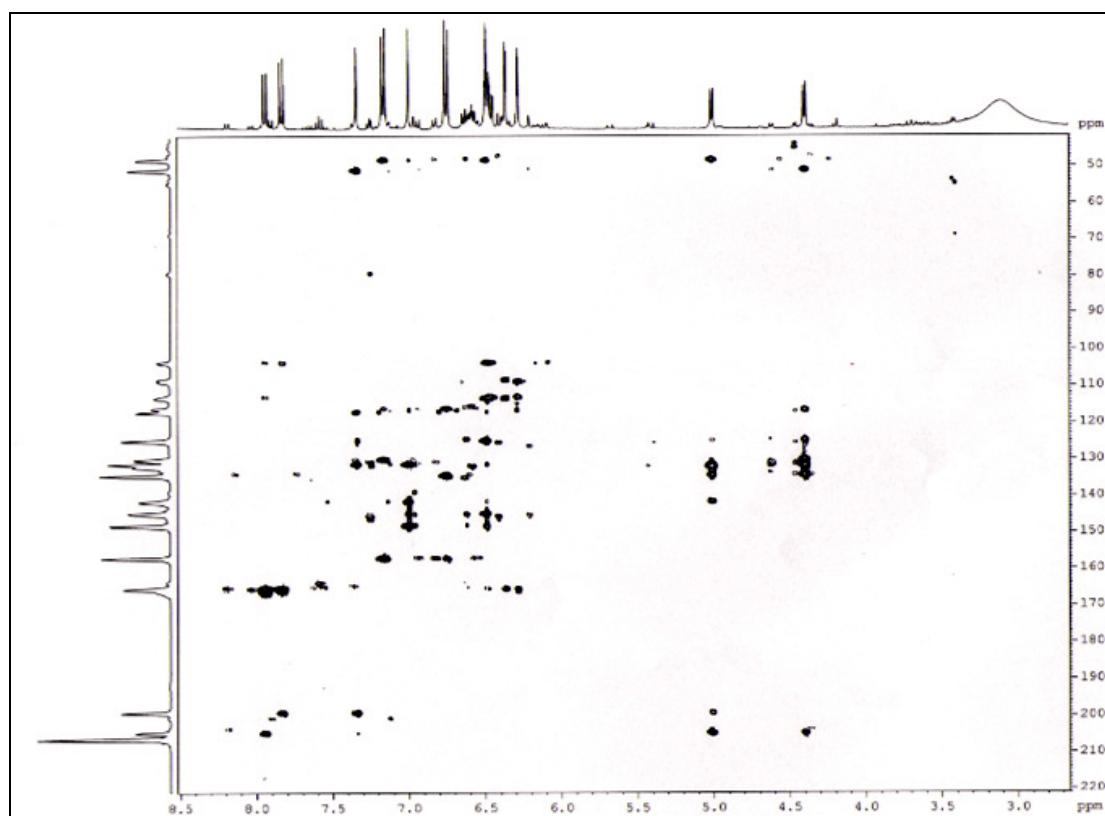


Figura 4.21 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância V (Acetona-*d*6, 400 MHz).

Tabela 4.4 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância V juntamente com os dados encontrados na literatura

| C    | $\delta$ (ppm), J (Hz) |   |                |   |
|------|------------------------|---|----------------|---|
|      | V <sup>a</sup>         | BANDEIRA<br><i>et al.</i> , 2003 <sup>b</sup> | V <sup>a</sup> | BANDEIRA<br><i>et al.</i> , 2003 <sup>b</sup> |
| 1    | ---                    | ---   | 124,8          | 124,8   |
| 2    | ---                    | ---   | 131,3          | 131,4   |
| 3    | 6,48 (s)               | 6,49 (s)                                      | 116,6          | 116,8   |
| 4    | ---                    | ---   | 148,1          | 148,7   |
| 5    | ---                    | ---   | 144,7          | 145,2   |
| 6    | 6,99 (s)               | 7,05 (s)                                      | 117,3          | 117,3   |
| 7    | 7,33 (s)               | 7,34 (s)                                      | 141,5          | 141,6   |
| 8    | ---                    | ---   | 124,8          | 124,8   |
| 9    | ---                    | ---   | 199,2          | 199,2   |
| 1'   | ---                    | ---   | 113,3          | 113,4   |
| 2'   | ---                    | ---   | 165,4          | 165,8   |
| 3'   | 6,36 (d, 2,4)          | 6,36 (d, 2,3)                                 | 103,8          | 103,9   |
| 4'   | ---                    | ---   | 166,4          | 166,9   |
| 5'   | 6,46 (dd, 9,2; 2,4)    | 6,48 (dd, 2,3; 8,7)                           | 108,7          | 108,6   |
| 6'   | 7,83 (d, 9,2)          | 7,83 (d, 8,7)                                 | 135,6          | 135,7   |
| 1''  | ---                    | ---   | 134,4          | 134,7   |
| 2''  | 7,25 (d, 8,4)          | 7,16 (d, 8,4)                                 | 130,1          | 130,2   |
| 6''  | ---                    | ---   | ---            | ---   |
| 3''  | 6,75 (d, 8,4)          | 6,75 (d, 8,4)                                 | 116,2          | 116,3   |
| 5''  | ---                    | ---   | ---            | ---   |
| 4''  | ---                    | ---   | 157,1          | 157,3   |
| 7''  | 4,39 (d, 8,0)          | 4,40 (d, 6,1)                                 | 48,3           | 48,4  |
| 8''  | 5,00 (d, 8,0)          | 5,01 (d, 6,1)                                 | 51,0           | 51,1  |
| 9''  | ---                    | ---   | 204,7          | 204,7   |
| 1''' | ---                    | ---   | 113,3          | 113,1   |
| 2''' | ---                    | ---   | 165,4          | 165,7   |
| 3''' | 6,27 (d, 2,8)          | 6,28 (d, 2,2)                                 | 103,8          | 103,8   |
| 4''' | ---                    | ---   | 166,4          | 166,4   |
| 5''' | 6,44 (dd, 2,8; 9,6)    | 6,46 (dd, 2,2, 9,1)                           | 108,8          | 108,9   |
| 6''' | 7,95 (d, 9,6)          | 7,94 (d, 9,1)                                 | 134,0          | 133,9   |

<sup>a</sup> Acetona-*d*<sub>6</sub>, 400MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.

<sup>b</sup> MeOD,  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz).

Para a determinação da configuração relativa do composto V, foram realizados os experimentos gNOESY (Tabela 4.5 e Figura 4.22). Nestes experimentos foram observados efeitos NOE quando foram irradiados os sinais de H-7'' em  $\delta_{\text{H}}$  4,39 para os sinais dos hidrogênios 5,00 (C-8''); 6,48 (C-3); 7,25 (C-2''/6''); 7,95 (C-6''') e  $\delta_{\text{H}}$  5,00 para os sinais dos hidrogênios 4,39 (C-7''), 7,25, (C-



2"/6") e 7,95 (C-6''') que exigem que estes hidrogênios estejam dos mesmos lados que os anéis aromáticos e portanto *trans* entre si. As demais irradiações confirmaram a estrutura proposta.

Tabela 4.5 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância V

| H ( $\delta_H$ ) Irradiado | g-NOESY ( $\delta_H$ )  |
|----------------------------|---|
| 7 (7,33)                   | 7,83 (C-6');<br>6,99 (C-6).                                       |
| 2" (7,25)                  | 6,75 (C-3'');<br>4,39 (C-7'');<br>5,00(C-8'').                    |
| 7" (4,39)                  | 5,00(C-8'');<br>6,48 (C-3);<br>7,25 (C-2"/6'');<br>7,95 (C-6'''). |
| 8" (5,00)                  | 4,39 (C-7'')<br>7,25, (C-2"/6'')<br>7,95 (C-6''')                 |

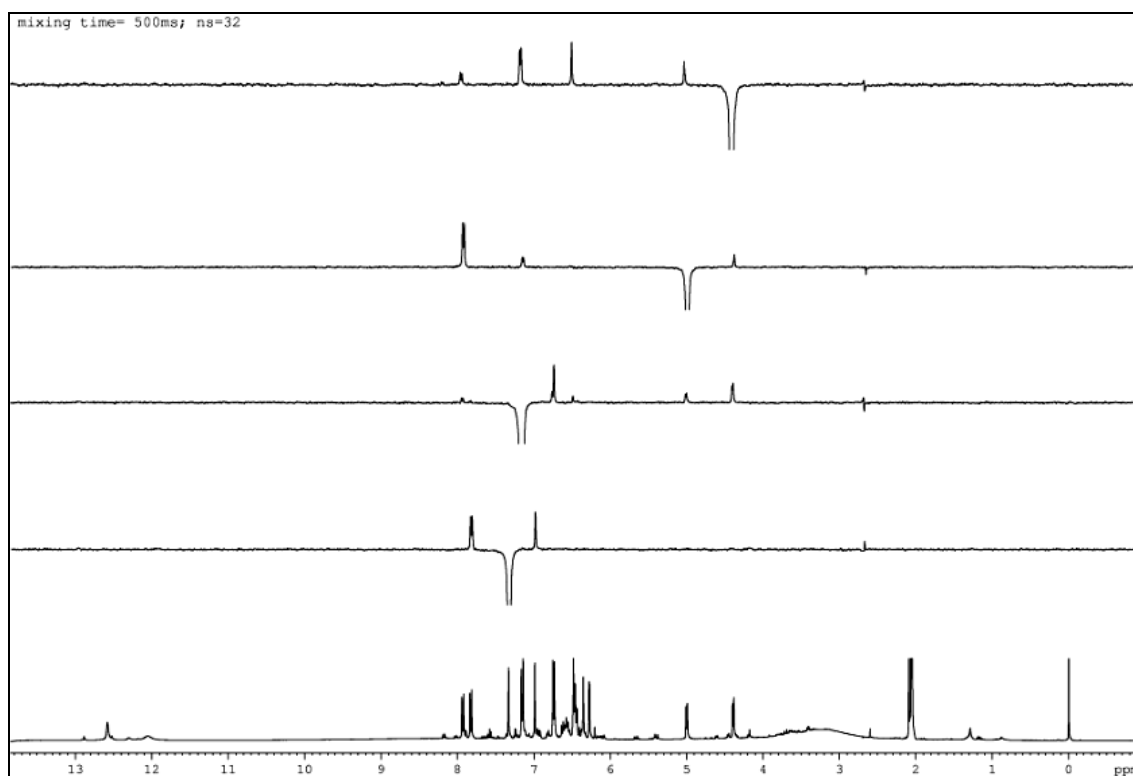
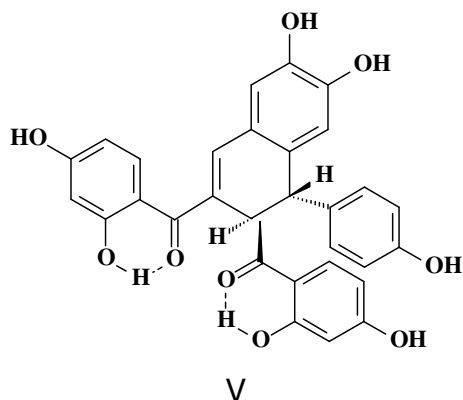


Figura 4.22 - Experimento de gNOESY da substância V (Acetona- $d_6$ ).

A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e experimentos bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) da substância V, juntamente com comparação com a literatura (BANDEIRA *et al.*, 2003) (**Tabela 4.4**) levou a identificação inequívoca desta substância como sendo rel-(7''S,8''R)-(2',4,4',5,tetrahidroxichalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona, conhecida como Urundeuvina A, porém com a estereoquímica entre 7'',8'' *trans*, e não *cis* como aparece na publicação de BANDEIRA *et al.* (2003) onde não houve a realização do experimento de gNOESY. Portanto na literatura devem ser trocadas as estereoquímicas relativas das estruturas de Urundeuvina A por C e vice versa, assim como as estereoquímicas absolutas como será discutido no **item 4.2.1.1.12**. A única diferença observada entre os dados de RMN é a constante de acoplamento entre os hidrogênios 7'' e 8'' de 8,1 Hz obtidos neste trabalho e 6,1 Hz na literatura que deve ter sido causada pelas ligações de hidrogênio do solvente metanol com a molécula alterando a conformação da mesma.



A análise do espectro de IV obtido em pastilhas de NaCl (**Figura 4.23**) indicou a presença de bandas de absorções: larga e intensa em  $3306\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento axial de hidroxila (O-H), estiramento axiais sobrepostos referente a ligação (C=O) e ligação  $\text{C-C}_{\text{sp}^2}$  em  $1614\text{ cm}^{-1}$ , sendo que este fato se deve a presença da dupla ligação conjugada que resulta na deformação axial assimétrica que produz uma absorbância de intensidade forte.

Na região entre  $1511\text{-}1446\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas de absorções referentes ao estiramento C=C dos anéis aromáticos. Entre  $1232\text{-}1106\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares no plano para ligações  $\text{C-H}_{\text{sp}^2}$  dos anéis aromáticos, enquanto entre  $882\text{-}606\text{ cm}^{-1}$  referem-se aos estiramentos angulares fora do plano. Essa região pode definir os padrões de substituições dos anéis aromáticos, porém para este composto não foi possível definir utilizando estes dados pela alta complexidade que a substância apresenta.

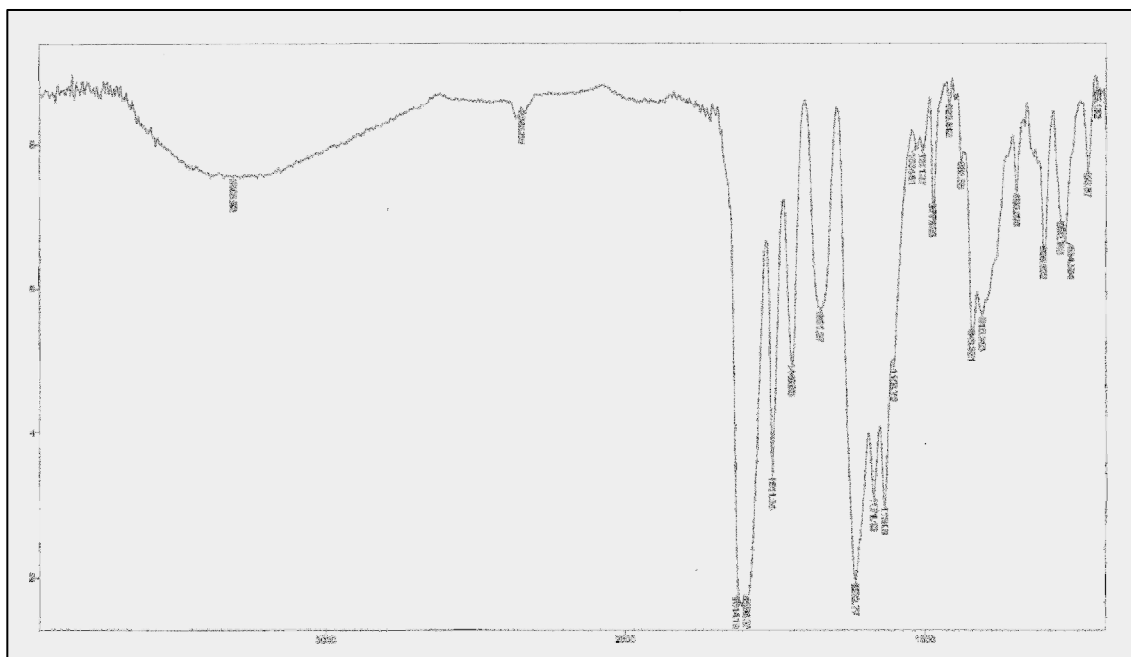
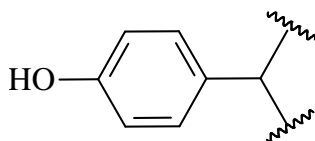


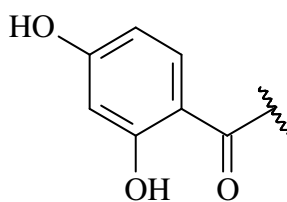
Figura 4.23 - Espectro de infravermelho da substância V (Pastilha NaCl).

No espectro de ultravioleta (**Figura 4.24**) foram observadas as bandas de absorção em 220, 278, 320 e 380 nm. Para a atribuição de cada uma das bandas citadas foram utilizadas informações daquelas características de sistemas aromáticos e cálculos teóricos para aqueles que têm carbonilas ligadas diretamente aos anéis (regras empíricas, SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2010). Aliado à análise de RMN, estes dados auxiliaram a elucidação estrutural de V.

Assim, analisando a banda em 220 nm, esta absorção se aproxima ao valor base correspondente ao cromóforo fenol (210 nm) com resíduo alquil na posição *para*.



Ainda no espectro de UV a banda em 278 nm, refere-se ao fragmento da molécula correspondente ao derivado do benzeno substituído com carbonila, tomando como base o valor de 246 nm (ArCOR), juntamente com os incrementos de duas hidroxilas nas posições *para* (+ 25 nm) e *orto* (+ 7 nm), resultando assim no valor teórico de 278 nm, confirmando o valor observado. A molécula utilizada para o cálculo teórico é a seguir.



As bandas 320 e 380 nm correspondem a 2,3-dihidroxi-naftaleno, de acordo com os dados de literatura (BUGRIN *et al.*, 2007).

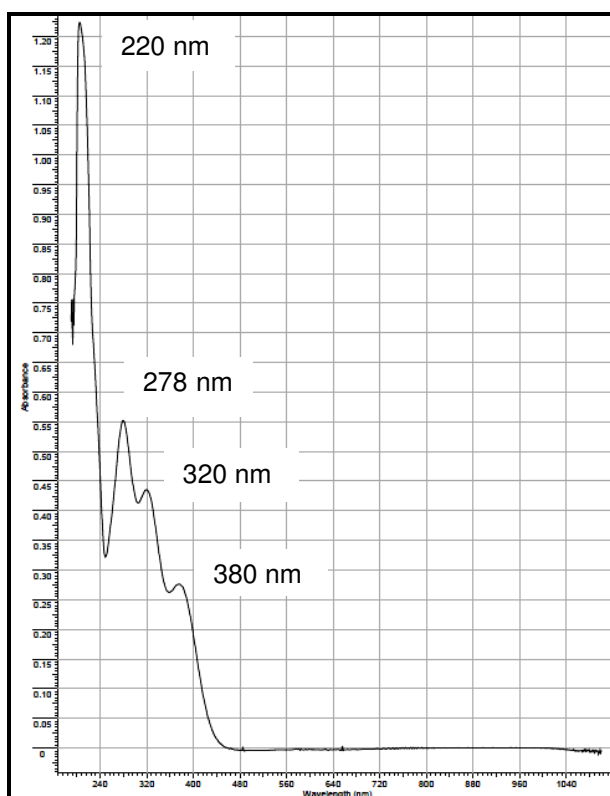


Figura 4.24 - Espectro de ultravioleta da substância V.

Para confirmar o peso molecular e como conseqüência a fórmula molecular da substância V, foi realizado o experimento de massas de alta resolução no modo positivo e negativo. O modo negativo (**Figura 4.25**) apresentou a melhor resolução, já que a molécula apresenta grupos hidroxilas, sendo que estas comportam melhor a perda do próton, tornando-as com carga negativa devido a grande eletronegatividade do átomo de oxigênio. Assim, através do resultado foi confirmando a massa de  $[M-H]^-$  525,1200 Da) que corresponde à fórmula molecular  $C_{30}H_{22}O_9$ .

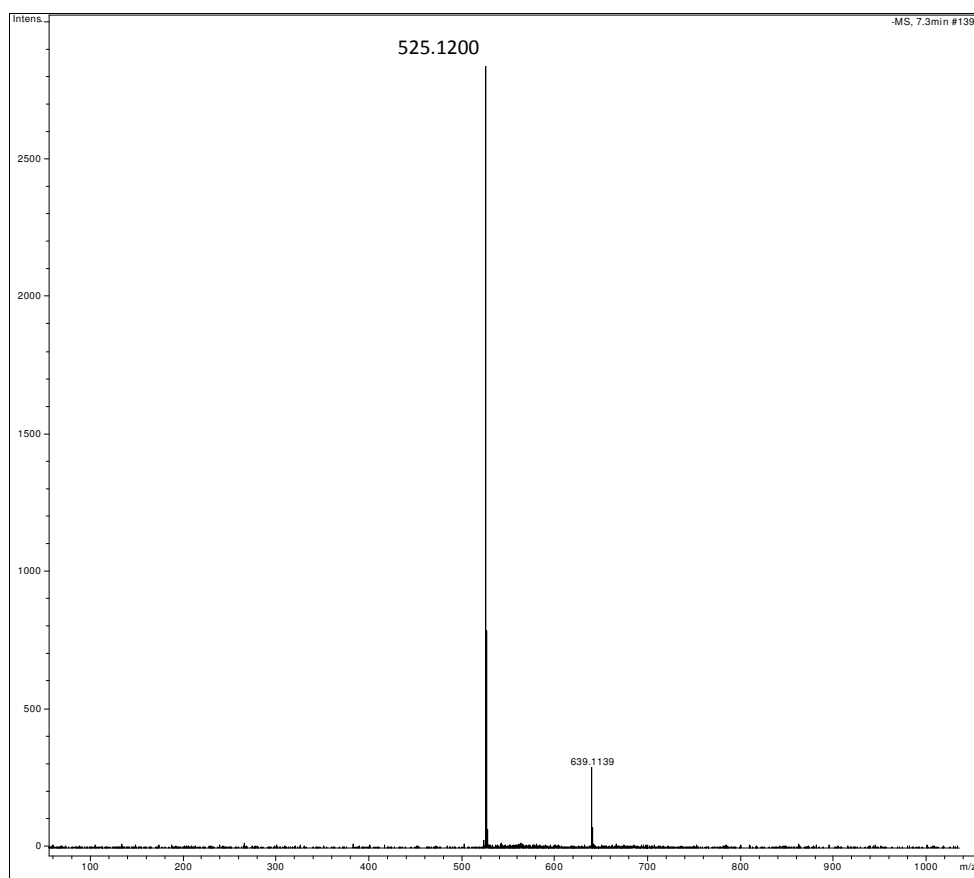
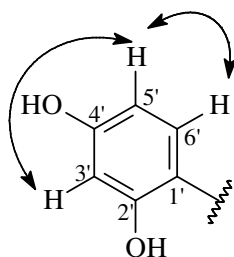


Figura 4.25 - Espectro de massas de alta resolução da substância V no modo negativo.

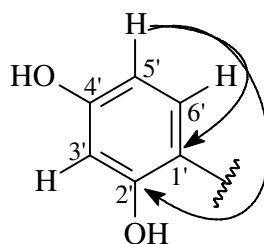
#### 4.2.1.1.6 – Elucidação estrutural das Substâncias VI

A substância V foi isolada da fração RVACIV (p.32) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.10**, p.32). A substância apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarela e sua elucidação estrutural foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**), COSY (**Figura 4.27**), HSQC (**Figura 4.28**), HMBC (**Figura 4.29, 4.30**) e comparação com os dados da literatura (BANDEIRA *et al.*, 2003, **Tabela 4.6**).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**) observou-se um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,48 ( $J = 8,4 \text{ Hz}$  e  $2,4 \text{ Hz}$ ) referente ao H-5' acoplado em *meta* com um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,50 ( $J = 2,4 \text{ Hz}$ ) referente ao hidrogênio H-3' e em *orto* com um dubleto  $\delta_{\text{H}}$  7,55 ( $J = 8,4 \text{ Hz}$ ) referente ao H-6'. Esses sinais remetem ao anel A de um flavonóide substituído nas posições 2' e 4', sendo estes acoplamentos confirmados pela análise do espectro de COSY (**Figura 4.27**).



O espectro de HSQC (**Figura 4.28**) revelou a correlação dos sinais do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,48 com o do carbono em  $\delta_{\text{C}}$  111,9 (C-5'). A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**) indicou a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,48 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  114,3, atribuído ao C-1' e  $\delta_{\text{C}}$  164,7 atribuído ao C-2'.



No espectro de HSQC (**Figura 4.28**) observou-se também a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,50 e  $\delta_{\text{H}}$  7,55 com os dos carbonos em,  $\delta_{\text{C}}$  104,1 (C-3') e  $\delta_{\text{C}}$  129,9 (C-6'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**) mostra a correlação do sinal do dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,50 com os dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  111,9 (C-5');  $\delta_{\text{C}}$

114,3 (C-1');  $\delta_C$  164,7 (C-2') e  $\delta_C$  167,6 (C-4'), sendo estes dois últimos referentes à função fenólica; e o duplete em  $\delta_H$  7,55 com os dois carbonos em  $\delta_C$  164,7 (C-2');  $\delta_C$  167,6 (C-4') e 193,2 (C-9), sendo este característico de uma carbonila. A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de uma flavona.

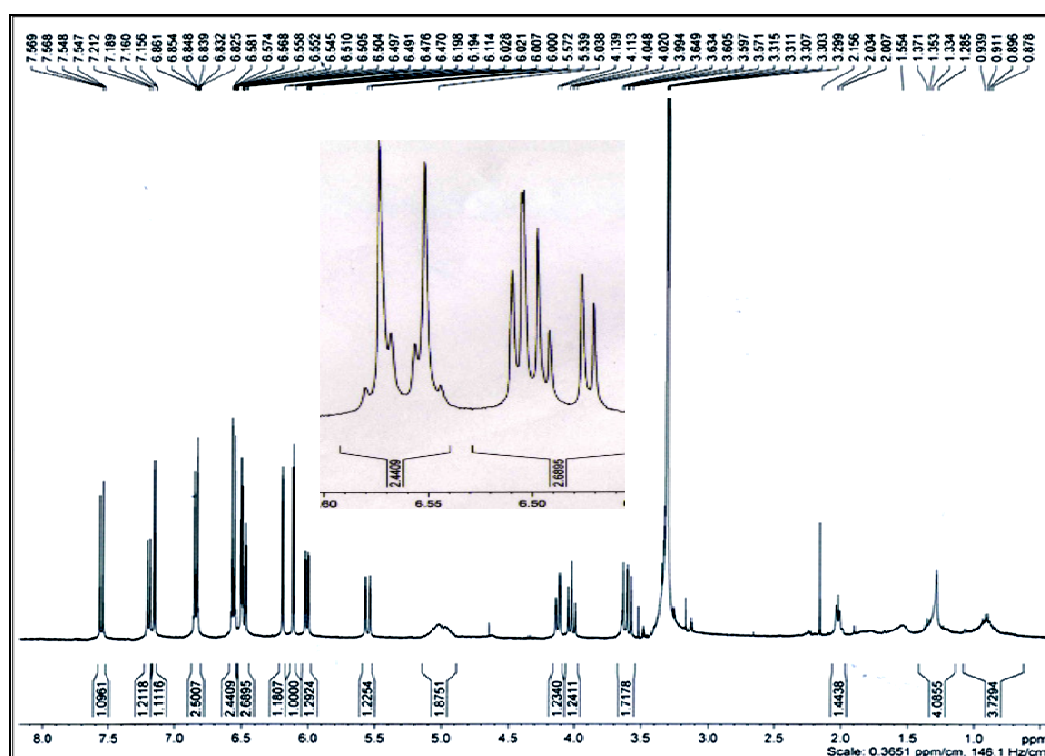
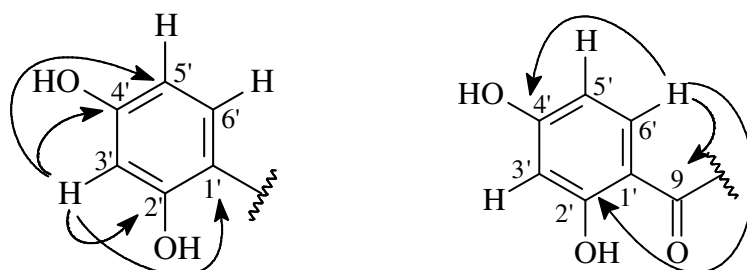


Figura 4.26 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VI (MeOD, 400MHz).



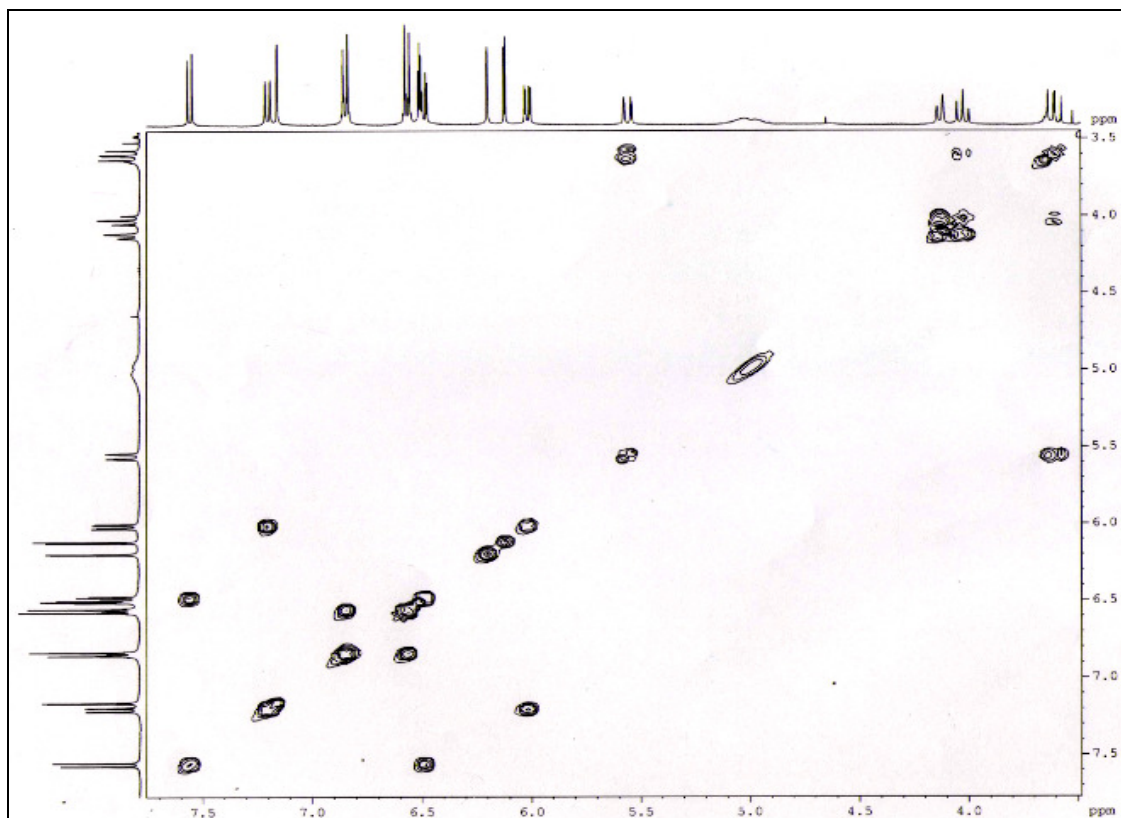


Figura 4.27 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VI (MeOD, 400 MHz)

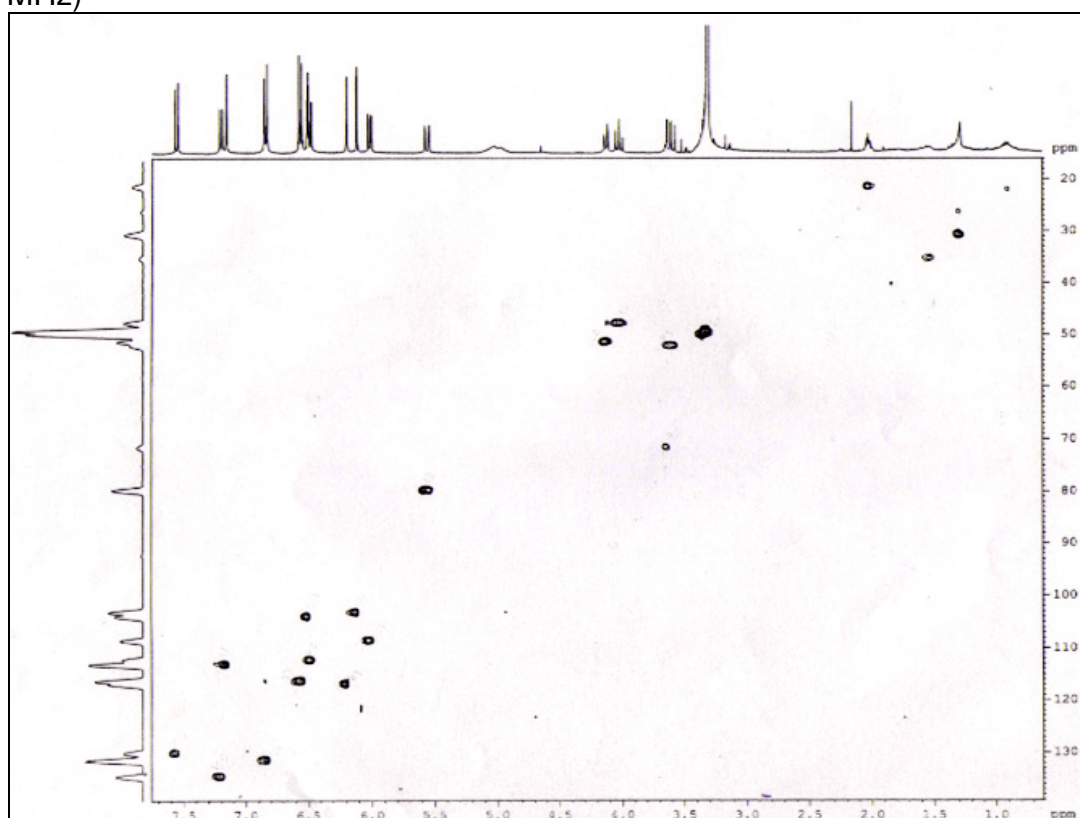


Figura 4.28 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância VI (MeOD, 400 MHz).

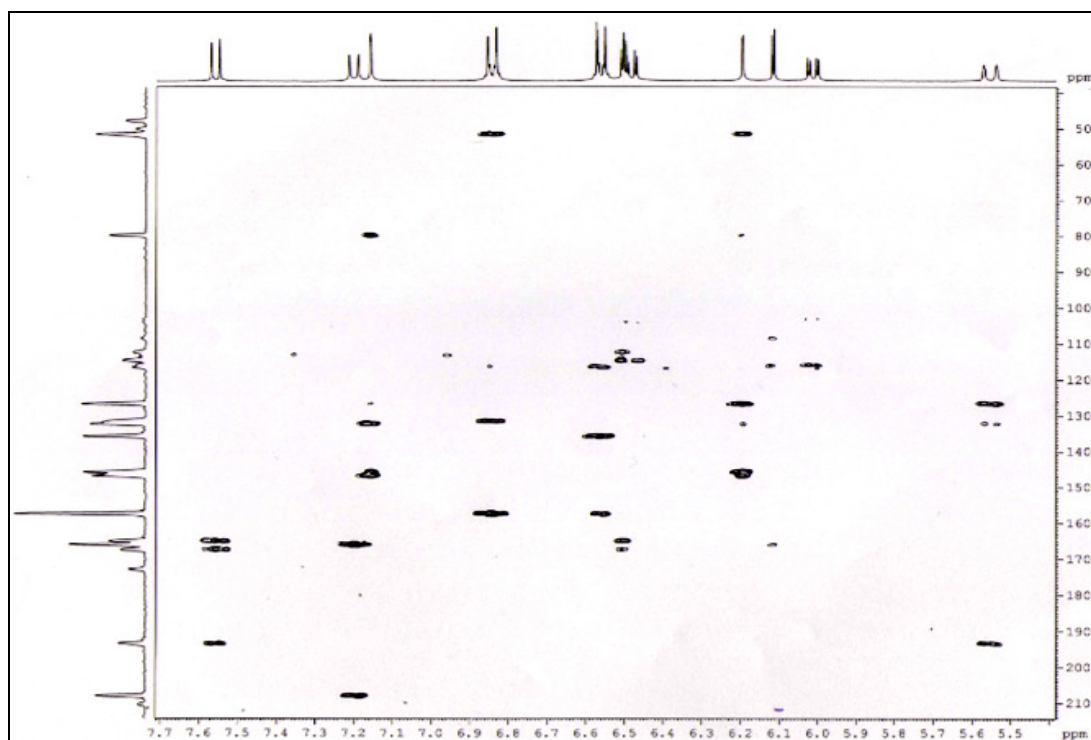
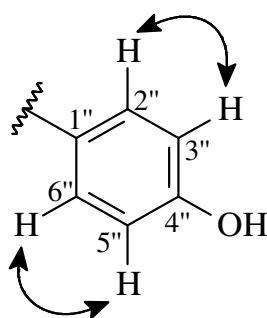


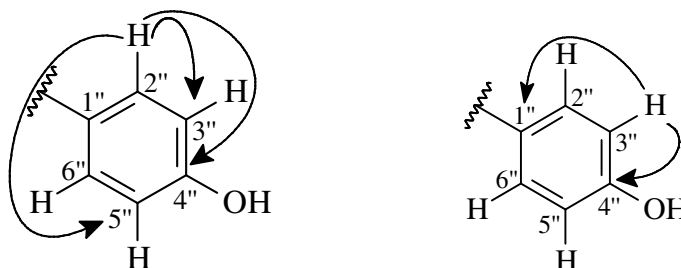
Figura 4.29 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VI (MeOD, 400 MHz)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**) mostrou também um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 (2H) ( $J = 8,8$  Hz) acoplado aquele com  $\delta_{\text{H}}$  6,56 (2H) ( $J = 8,8$  Hz), estes são característicos dos hidrogênios H-2''/H-6'' e H-3''/H-5'' e isto ocorre devido a livre rotação do anel que deixam os hidrogênios quimicamente equivalentes.

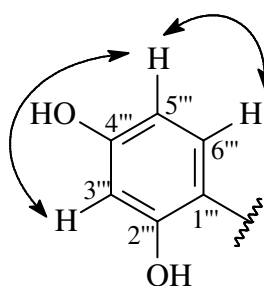


O espectro de HSQC (**Figura 4.28**) mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 e  $\delta_{\text{H}}$  6,56 com os carbonos em,  $\delta_{\text{C}}$  131,4 (C-2''/6'') e  $\delta_{\text{C}}$  116,2 (C-3''/5''), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**) mostra a correlação do sinal do duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 com os dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  116,2

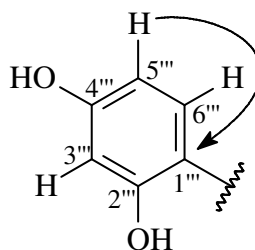
(C-3''/5'');  $\delta_C$  131,4 (C-2''/6'') e  $\delta_C$  157,5 (C-4''), este característico de carbono fenólico; e o duplete em  $\delta_H$  6,56 com os dos carbonos em  $\delta_C$  136,0 (C-1'') e  $\delta_C$  157,5 (C-4'').



O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 4.26**) mostrou, ainda, um duplo duplete em  $\delta_H$  6,02 ( $J = 3,6$  e  $9,2$  Hz) característico do hidrogênio H-5''' acoplado em *meta* com o duplete em  $\delta_H$  6,12 ( $J = 3,6$  Hz) referente ao H-3''' e em *orto* com um duplete em  $\delta_H$  7,20 ( $J = 9,2$  Hz) do H-6''', sendo estes acoplamentos confirmados pela análise do espectro de COSY (**Figura 4.27**).

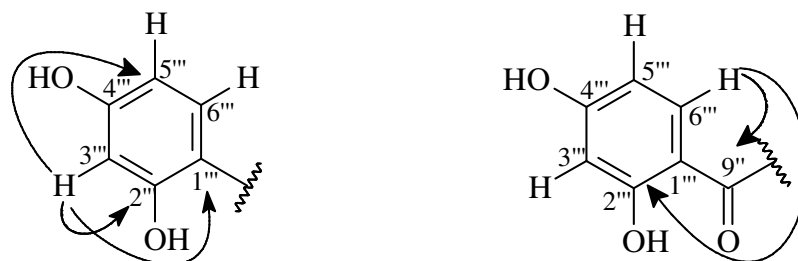


A análise do espectro de HSQC (**Figura 4.28**) mostra a correlação do sinal em  $\delta_H$  6,02 com o do carbono em  $\delta_C$  108,4, atribuído ao C-5'''. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**) mostra a correlação deste hidrogênio com o carbono  $\delta_C$  116,1 (C-1''').

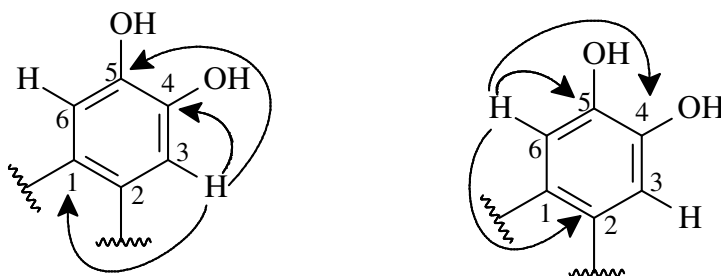


O espectro de HSQC (**Figura 4.28**) mostrou também a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,12 e  $\delta_H$  7,20 com os dos carbonos em,  $\delta_C$  102,9 (C-3''') e  $\delta_C$  134,6 (C-6'''), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**)

mostra a correlação do sinal do duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,12 com os dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  108,4 (C-5''');  $\delta_{\text{C}}$  116,1 (C-1''') e  $\delta_{\text{C}}$  165,8 (C-2'''), sendo este último pertencente à função fenólica; e o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,20 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  165,8 (C-2''') e  $\delta_{\text{C}}$  207,7 (C-9''), sendo este característico de uma carbonila.



A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**) indicou os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 ( $J = 1,6$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  7,15 ( $J = 1,6$  Hz) acoplado entre-si, característicos dos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente. O espectro de HSQC (**Figura 4.28**) mostrou a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 e  $\delta_{\text{H}}$  7,15 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  117,1 (C-3) e  $\delta_{\text{C}}$  112,9 (C-6), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.29**) mostrou a correlação do sinal duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 com os dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  126,6 (C-1);  $\delta_{\text{C}}$  145,7 (C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  147,0 (C-4), sendo estes dois últimos pertencentes à função fenólica; e do duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,15 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  132,5 (C-2);  $\delta_{\text{C}}$  145,7 (C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  147,0 (C-4).



Finalmente, a análise da região de sinais de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**), mostrou um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,62 ( $J = 10,8$  e  $14,8$  Hz, H-8) acoplado com um triplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,02 ( $J = 10,8$  Hz, H-8'') e com um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,55 ( $J = 14,8$  Hz, H-7), e estas constantes sugerem posições diaxiais entre eles. O duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,02 acopla também com o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,13 ( $J = 10,8$  Hz, H-7''), também diaxiais e, portanto, todos *trans* entre si. Estes acoplamentos são confirmados no espectro de COSY (**Figura 4.27**).

O espectro de HSQC (**Figura 4.28**) mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  3,62,  $\delta_H$  4,02,  $\delta_H$  4,13 e  $\delta_H$  5,55 com os carbonos em,  $\delta_C$  52,3 (C-8),  $\delta_C$  47,7 (C-8''),  $\delta_C$  52,2 (C-7'') e  $\delta_C$  79,7 (C-7) respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 4.30**) mostrou a correlação dos sinais: dubleto em  $\delta_H$  5,55 com os dos carbonos  $\delta_C$  126,6 (C-1),  $\delta_C$  132,5 (C-2) e  $\delta_C$  193,2 (C-9); duplo dubleto em  $\delta_H$  3,62 com os carbonos em  $\delta_C$  47,7 (C-8''),  $\delta_C$  79,7 (C-7) e  $\delta_C$  193,2 (C-9); tripleto em  $\delta_H$  4,02 com os carbonos  $\delta_C$  52,3 (C-8),  $\delta_C$  79,7 (C-7) e  $\delta_C$  136,0 (C-1'') e 207,7 (C-9'') e finalmente, dubleto em  $\delta_H$  4,13 com os dos carbonos  $\delta_C$  47,7 (C-8''),  $\delta_C$  132,5 (C-2),  $\delta_C$  136,0 (C-1'') e  $\delta_C$  207,7 (C-9''). A posição do anel para dissubstituído na posição 7'' pode ser confirmada pela correlação do H-2'' com o C-7''.

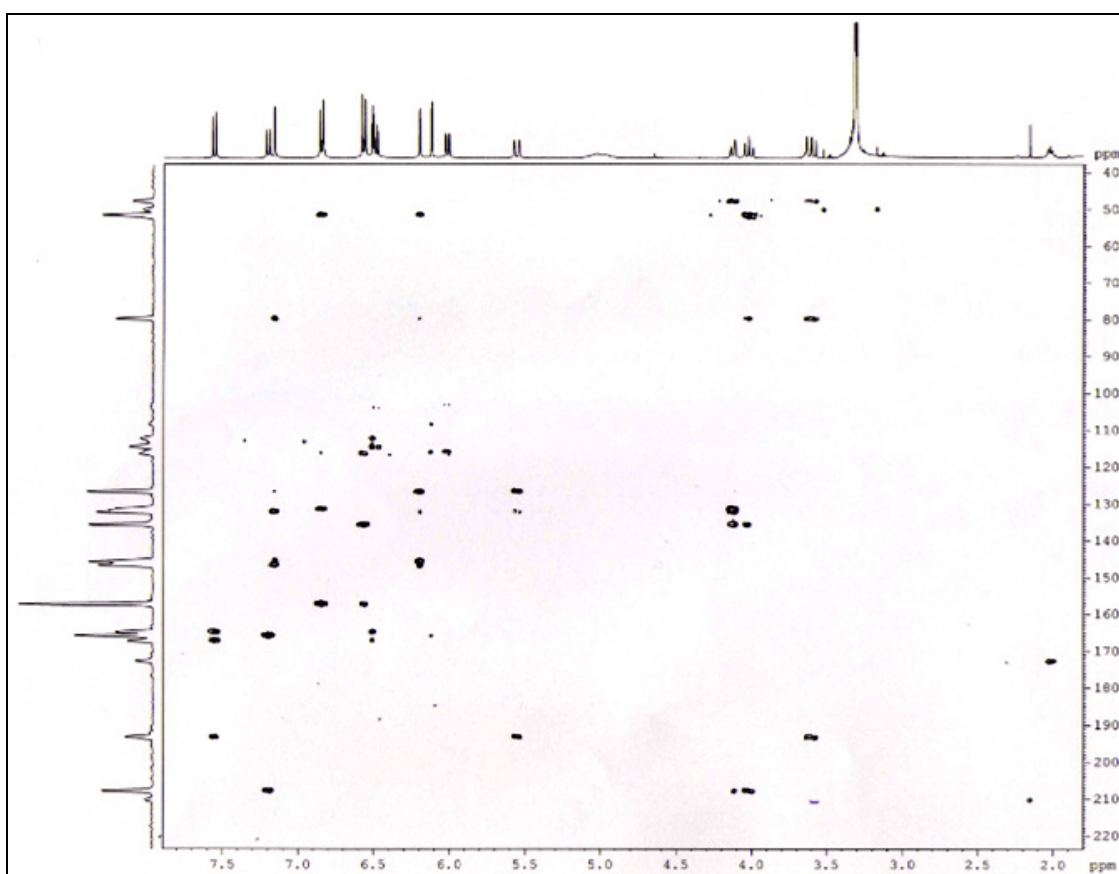
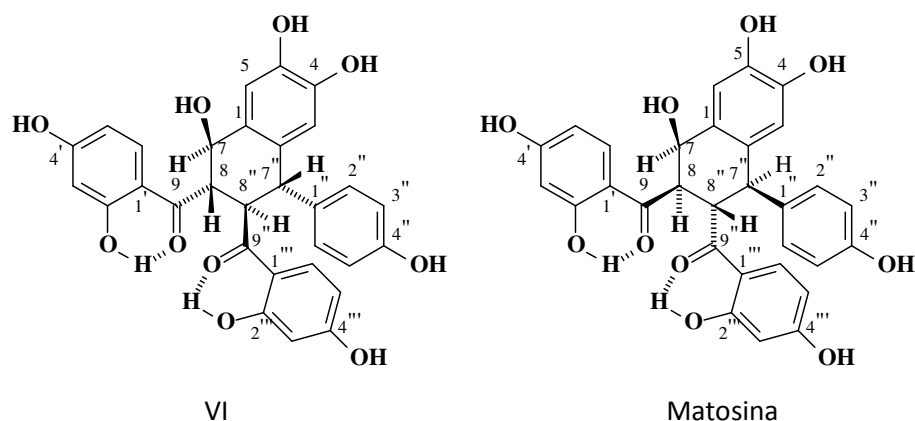


Figura 4.30 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VI (MeOD, 400 MHz).

A análise dos dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e experimentos bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) da substância VI, juntamente com comparação com a

literatura (**Tabela 4.6**) levou a determinação da estrutura desta substância como sendo (7<sup>\*R</sup>,8<sup>\*S</sup>,7<sup>''S</sup>,8<sup>''R</sup>)-2', 4,4', 5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'', 8''-dihidrochalcona, um isômero de matosina que possui a estereoquímica absoluta 7<sup>R</sup>,8<sup>R</sup>,7<sup>''R</sup>,8<sup>''S</sup>, conforme discutido no **item 4.2.1.1.12**.



A partir da constante de acoplamento foi possível propor os ângulos diedros entre os hidrogênios 7, 8, 7'' e 8'' utilizando o Diagrama de Karplus (SILVERSTEIN *et al.*, 1994) do composto VI. Os hidrogênios 7 e 8 com relação diaxial entre si e constante de acoplamento de 14,8 Hz, apresentam ângulo de 180°; entre 8 e 8'' e 7'' devem também ser diaxiais com ângulo entre eles próximos de 150°, já que constante de acoplamento entre eles é de 10,8 Hz, que é alta, indicando pequena distorção da conformação do anel. Esta análise permite explicar as diferenças de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos de VI e Matosine (**Tabela 4.6**). Para confirmar a determinação da configuração relativa do composto VI, foram realizados os experimentos gROESY (**Tabela 4.7 e Figura 4.31**) e os efeitos NOE observados de H-8 ( $\delta_H$  3,61) com H-7'' ( $\delta_H$  4,13), e H8'' ( $\delta_H$  4,02) com H-2''/6'' ( $\delta_H$  6,84) que os localizam *cis* entre si, confirmar a estereoquímica relativa proposta.

Tabela 4.6 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias VI e matosina (BANDEIRA *et al.*, 2003)

| C    | $\delta$ ppm, J Hz     |                       |                 |                       |
|------|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
|      | VI <sup>a</sup>        | Matosina <sup>b</sup> | VI <sup>a</sup> | Matosina <sup>b</sup> |
| 1    | ---                    | ---                   | 126,6           | 121.8                 |
| 2    | ---                    | ---                   | 132,5           | 130.5                 |
| 3    | 6,19 (d, 1,6)          | 6,28 (s)              | 117,1           | 113.9                 |
| 4    | ---                    | ---                   | 147,0           | 145.2                 |
| 5    | ---                    | ----                  | 145,7           | 142.5                 |
| 6    | 7,15 (d, 1,6)          | 6,88 (s)              | 112,9           | 114.6                 |
| 7    | 5,55 (d, 14,8)         | 5,38 (brs)            | 79,7            | 75.7                  |
| 8    | 3,62 (dd, 10,8 e 14,8) | 3,08 (brd 11.4)       | 52,3            | 48.6                  |
| 9    | ---                    | ---                   | 193,2           | 190.5                 |
| 1'   | ---                    | ---                   | 114,3           | 111.1                 |
| 2'   | ---                    | ---                   | 164,7           | 161.9                 |
| 3'   | 6,50 (d, 2,4)          | 6,46 (brs)            | 104,1           | 100.8                 |
| 4'   | ---                    | ---                   | 167,6           | 163.8                 |
| 5'   | 6,48 (dd, 2,4 e 8,4)   | 6,45 (brd 8.3)        | 111,9           | 109.5                 |
| 6'   | 7,55 (d, 8,4)          | 7,43 (d 8.3)          | 129,9           | 127.7                 |
| 1''  | ---                    | ---                   | 136,0           | 133.0                 |
| 2''  | 6,84 (d, 8,8)          | 6,95 (d 8.2)          | 131,4           | 128.4                 |
| 6''  |                        |                       |                 |                       |
| 3''  | 6,56 (d, 8,8)          | 6,62 (d 8.2)          | 116,2           | 113.6                 |
| 5''  |                        |                       |                 |                       |
| 4''  | ---                    | ---                   | 157,5           | 154.4                 |
| 7''  | 4,13 (d, 10,8 )        | 4,43 (d 10.6)         | 52,2            | 46.7                  |
| 8''  | 4,02 (t, 10,8)         | 4,34 (dd 10.6 e 11.4) | 47,7            | 43.2                  |
| 9''  | ---                    | ---                   | 207,7           | 202.4                 |
| 1''' | ---                    | ---                   | 116,1           | 112.7                 |
| 2''' | ---                    | ---                   | 165,8           | 163.8                 |
| 3''' | 6,12 (d, 3,6)          | 6,09 (brs)            | 102,9           | 100.7                 |
| 4''' | ---                    | ---                   | 167,6           | 164.4                 |
| 5''' | 6,02 (dd, 3,6 e 9,2)   | 5,80 (brd 9.0)        | 108,4           | 105.7                 |
| 6''' | 7,20 (d, 9,2)          | 6,75 (d 9.0)          | 134,6           | 130.1                 |

<sup>a</sup> MeOD, 400MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.<sup>b</sup> MeOD,  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz).

Tabela 4.7 - Dados obtidos do experimento gROESY da substância VI

| H ( $\delta_H$ ) Irradiado | gROESY<br>$\delta_H$ |
|----------------------------|----------------------|
| 7 (5,55)                   | ----                 |
| 8 (3,62)                   | 4,13 (H-7'')         |
|                            | 5,55 (H-7)           |
| 7'' (4,13)                 | 6,84(H2''/6'')       |
|                            | 3,62 (H-8)           |
| 8'' (4,02)                 | 7,20 (H-6''')        |
|                            | 6,84 (H-2''/6'')     |
|                            | 5,55 (H-7)           |

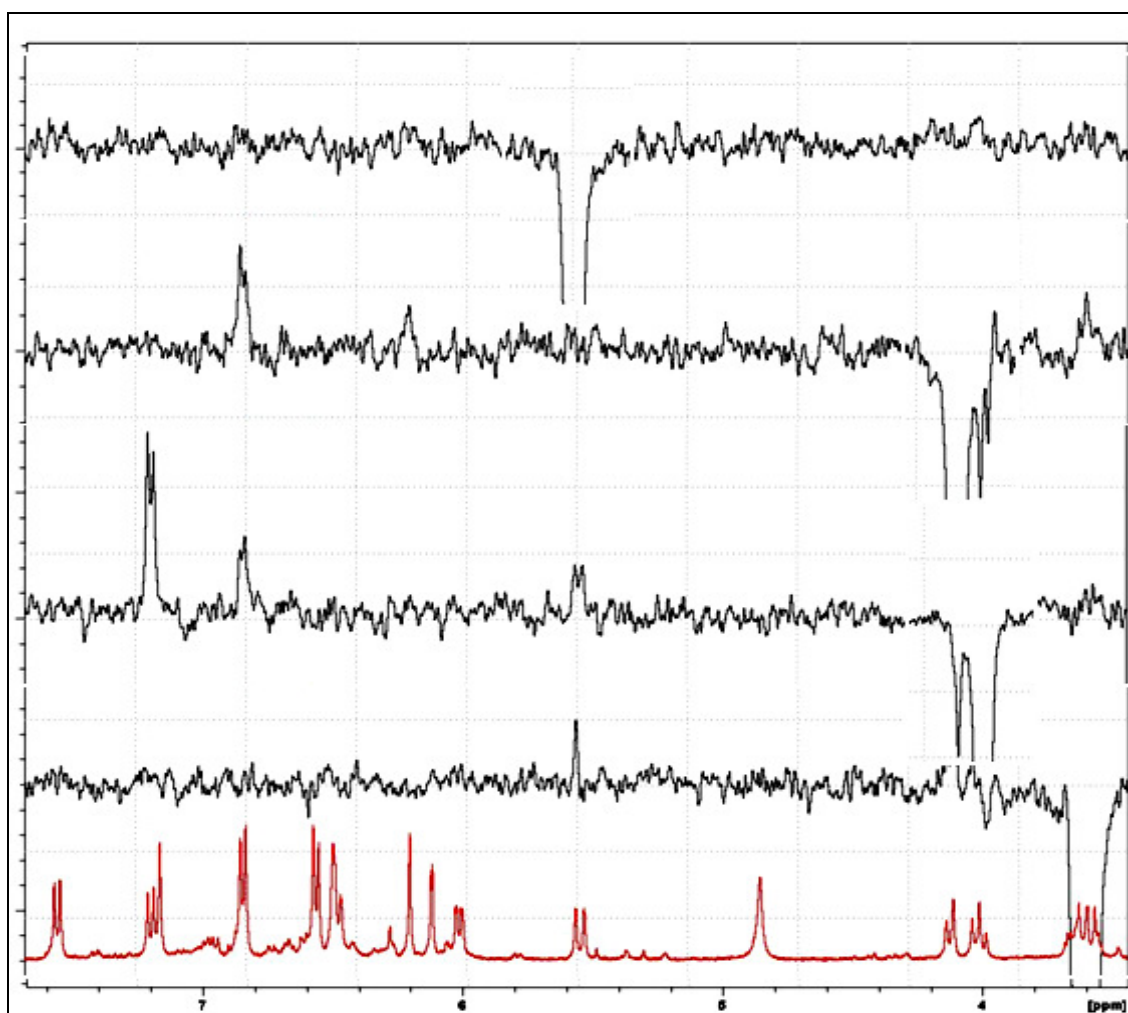


Figura 4.31 - Experimento de gROESY da substância VI (MeOD, 400 MHz).



A análise do espectro de IV obtido em pastilhas de NaCl (**Figura 4.32**) indicou a presença das seguintes bandas de absorção: larga e intensa em  $3404\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos axiais de hidroxilas (O-H), estiramento axiais sobrepostos referente a ligação (C=O) e ligação  $\text{C-C}_{\text{sp}^2}$  em  $1612\text{ cm}^{-1}$ , sendo que este fato se deve a presença da dupla ligação conjugada que resulta na deformação axial assimétrica que produz uma absorbância de intensidade forte, na região entre  $1508\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$  bandas referentes aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos, entre  $1237\text{-}1015\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares no plano para ligações  $\text{C-H}_{\text{sp}^2}$  dos anéis aromático; entre  $883\text{-}665\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento angular fora do plano (essa região pode definir o padrão de substituição dos anéis aromáticos, porém para este composto não foi possível utilizar este dado pela alta complexidade apresentada pela substância).

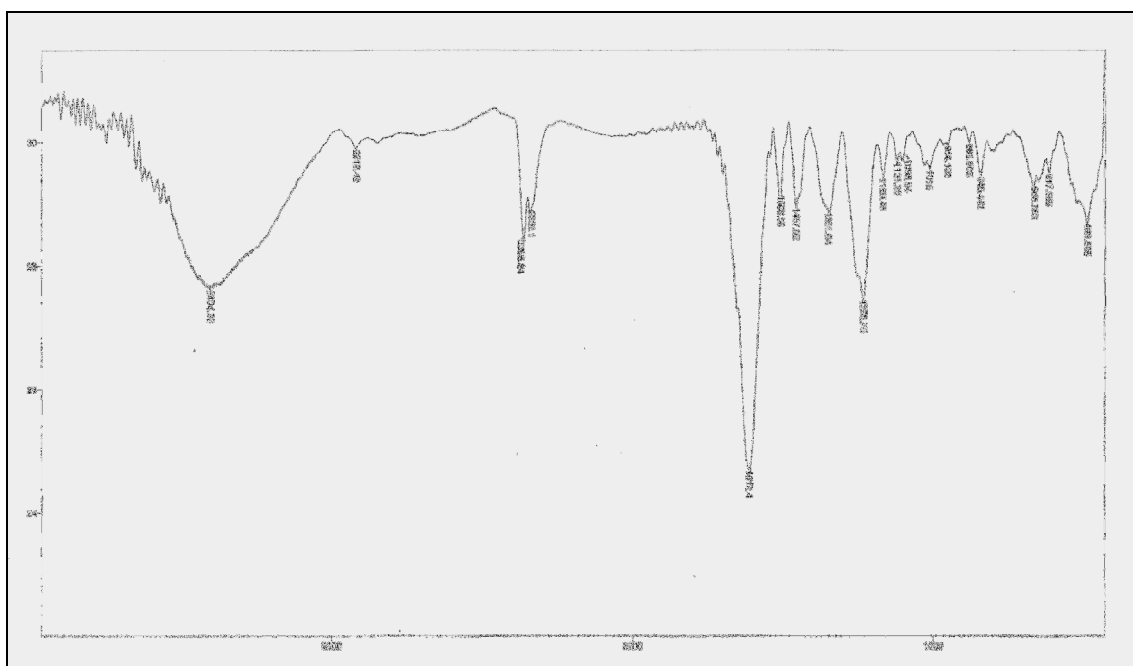


Figura 4.32 - Espectro de infravermelho da substância VI (Pastilha NaCl).

No espectro de ultravioleta (**Figura 4.33**) foram observadas as bandas de absorção em 210, 225, 280 e 318 nm. Para a atribuição de cada uma das bandas citadas foram utilizadas informações daquelas características de sistemas aromáticos e cálculos teóricos para aqueles que têm carbonilas ligadas diretamente aos anéis (regras empíricas, SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2010). Aliado

à análise de RMN, estes dados auxiliaram a elucidação estrutural de VI. As bandas em 210, 225 e 280 nm correspondem a 2,3-dihidroxi-5,6,7,8-tetrahidronaftaleno, de acordo com os dados de literatura (IVERSON *et al.*, 1995).

Ainda no espectro de UV a banda em 280 nm, refere-se ao fragmento da molécula correspondente ao derivado do benzeno substituído com carbonila, tomando como base o valor de 246 nm (ArCOR), juntamente com os incrementos de duas hidroxilas nas posições *para* (+ 25 nm) e *orto* (+ 7 nm), resultando assim no valor teórico de 278 nm, confirmando o valor observado.

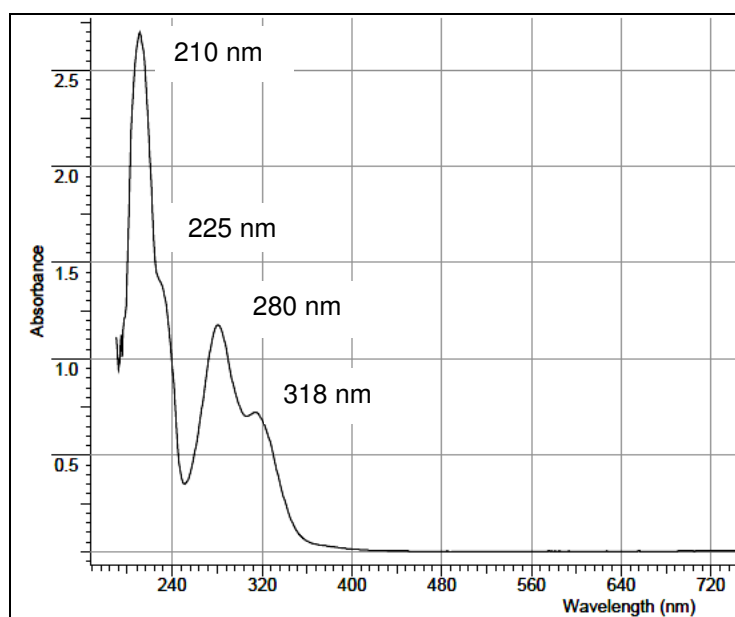


Figura 4.33 - Espectro de ultravioleta da substância VI.

Para confirmar o peso molecular e como conseqüência a fórmula molecular da substância VI, foi realizado o experimento espectrometria de massas de alta resolução no modo positivo e negativo. O modo negativo (**Figura 4.34**) apresentou a melhor resolução, já que a molécula apresenta grupos hidroxilas, sendo que estas comportam melhor a perda do próton, tornando-as com carga negativa devido a grande eletronegatividade do átomo de oxigênio. Assim, através do resultado foi confirmando a massa de  $([M-H - H_2O]^- 525,1323 \text{ Da})$  que corresponde à fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{10}$  da substância VI após a perda de água e próton.

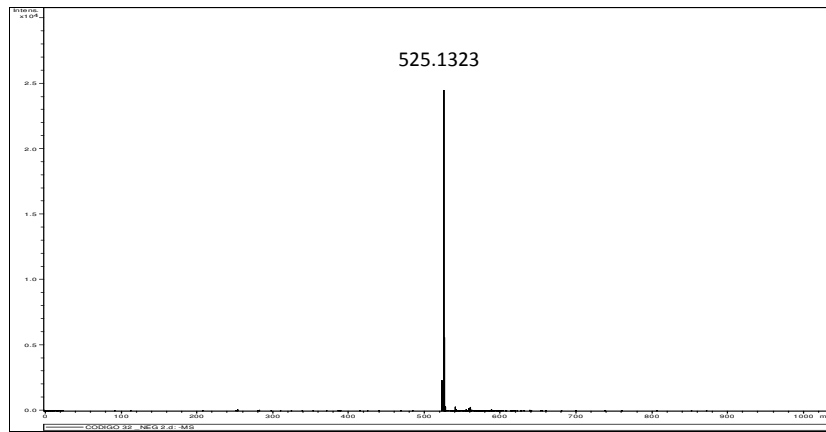
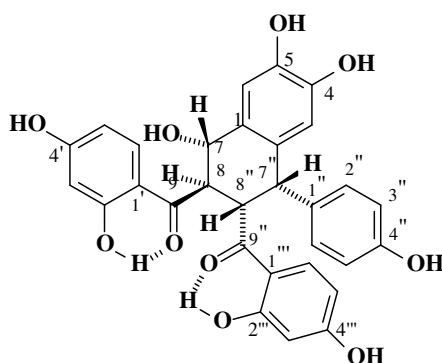


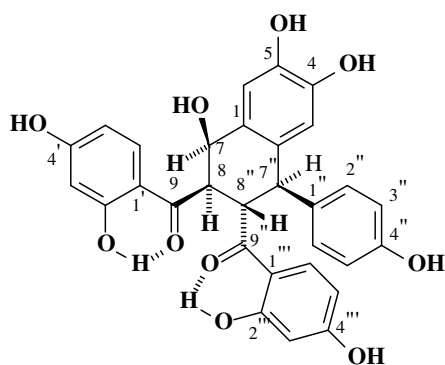
Figura 4. 34 - Espectro de massas de alta resolução da substância VI no modo negativo.

#### 4.2.1.1.7 - Elucidação estrutural das Substâncias VII

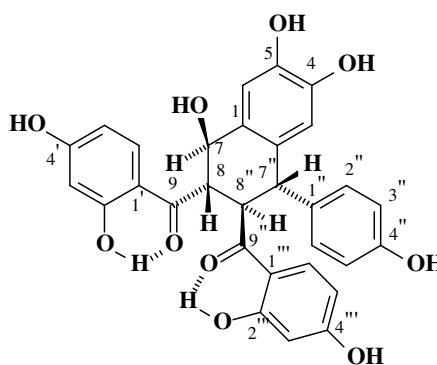
A substância VII foi isolada da fração RACV (p.33) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.11**, p.33). A substância apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarela. A análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.35**), COSY (**Figura 4.36**), HSQC (**Figura 4.37**), HMBC (**Figura 4.38**) comparação com dados da literatura (BANDEIRA *et al.* (2003), **Tabela 4.8 e 4.9**) levaram a mesma estrutura de VI, porém, estes experimentos revelaram que as configurações absoluta (**Item 4.2.1.1.12**) nos carbonos 7, 8, 7'' e 8'' diferem de VI e de matosina [(7R,8R,7''R,8''S)-2',4,4',5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',4'''-trihidroxi-7'', 8''-dihidrochalcona] isolada por BANDEIRA *et al.* (2003) de *Myracrodruon urundeuva* Rf. All. (sinonímia de *Astronium urundeuva* Engl.). Para a substância VII isolada no presente trabalho foi proposta a estereoquímica: 7S,8R,7''S,8''S e o nome da substância (7S,8R,7''S,8''S)-2',4,4',5,7-pentahidroxi-7,8-dihidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2'',4'',4'''-trihidroxi-7'', 8''-dihidrochalcona baseado principalmente nos dados de gNOESY e dicroísmo circular (**Item 4.2.1.1.12**) discutido adiante.



VII



Matosina



VI

Tabela 4.8 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias VI, VII e matosina (BANDEIRA *et al.*, 2003)

| H         | $\delta$ ppm, J Hz        |                          |                           |
|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|           | VI <sup>a</sup>           | Matosina <sup>b</sup>    | VII <sup>c</sup>          |
| 3         | 6,19 (d, 1,6)             | 6,28 (s)                 | 6,40 (s)                  |
| 6         | 7,15 (d, 1,6)             | 6,88 (s)                 | 7,40 (s)                  |
| 7         | 5,55 (d, 14,8)            | 5,38 (brs)               | 5,40 (d, 13,2)            |
| 8         | 3,62<br>(dd, 10,8 e 14,8) | 3,08 (brd 11.4)          | 3,68<br>(dd, 12,0 e 13,2) |
| 3'        | 6,50 (d, 2,4)             | 6,46 (brs)               | 6,63 (d, 1,6)             |
| 5'        | 6,48<br>(dd, 2,4 e 8,4)   | 6,45 (brd 8.3)           | 6,60 (m)                  |
| 6'        | 7,55 (d, 8,4)             | 7,43 (d 8.3)             | 7,57 (d, 8,8)             |
| 2'' e 6'' | 6,84 (dt, 8,8)            | 6.95 (d 8.2)             | 6,56 (s.sobrep)           |
| 3'' e 5'' | 6,56 (dt, 8,8)            | 6.62 (d 8.2)             | 6,56 (s.sobrep.)          |
| 7''       | 4,13 (d, 10,8)            | 4.43 (d 10.6)            | 4,45 (d, 5,6)             |
| 8''       | 4,02 (t, 10,8)            | 4.34<br>(dd 10.6 e 11.4) | 4,35<br>(dd, 5,6 e 12,0)  |
| 3'''      | 6,12 (d, 3,6)             | 6.09 (brs)               | 6,38 (d, 2,8)             |
| 5'''      | 6,02<br>(dd, 3,6 e 9,2)   | 5.80 (brd 9.0)           | 6,54 (m)                  |
| 6'''      | 7,20 (d, 9,2)             | 6.75 (d 9.0)             | 8,18(d, 8,8)              |

<sup>a</sup> MeOD, <sup>c</sup> Acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.

<sup>b</sup> MeOD,  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz).

s.sobrepost.: sinal sobreposto

Tabela 4. 9 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias VI e VII e Matosina (BANDEIRA *et al.*, 2003)

| C         | $\delta$ ppm    |                       |                  |
|-----------|-----------------|-----------------------|------------------|
|           | VI <sup>a</sup> | Matosina <sup>b</sup> | VII <sup>c</sup> |
| 1         | 126,6           | 121.8                 | 125,3            |
| 2         | 132,5           | 130.5                 | 131,5            |
| 3         | 117,1           | 113.9                 | 117,1            |
| 4         | 147,0           | 145.2                 | 145,6            |
| 5         | 145,7           | 142.5                 | 146,5            |
| 6         | 112,9           | 114.6                 | 113,0            |
| 7         | 79,7            | 75.7                  | 79,4             |
| 8         | 52,3            | 48.6                  | 44,9             |
| 9         | 193,2           | 190.5                 | 192,0            |
| 1'        | 114,3           | 111.1                 | 115,7            |
| 2'        | 164,7           | 161,9                 | 164,0            |
| 3'        | 104,1           | 100.8                 | 103,9            |
| 4'        | 167,6           | 163,8                 | 165,6            |
| 5'        | 111,9           | 109.5                 | 111,1            |
| 6'        | 129,9           | 127.7                 | 129,5            |
| 1''       | 136,0           | 133.0                 | 134,1            |
| 2'' e 6'' | 131,4           | 128.4                 | 131,2            |
| 3'' e 5'' | 116,2           | 113.6                 | 115,5            |
| 4''       | 157,5           | 154.4                 | 156,9            |
| 7''       | 52,2            | 46.7                  | 47,0             |
| 8''       | 47,7            | 43.2                  | 43,8             |
| 9''       | 207,7           | 202.4                 | 206,1            |
| 1'''      | 116,1           | 112.7                 | 114,4            |
| 2'''      | 165,8           | 163.8                 | 165,6            |
| 3'''      | 102,9           | 100.7                 | 103,9            |
| 4'''      | 167,6           | 164.4                 | 166,3            |
| 5'''      | 108,4           | 105.7                 | 108,8            |
| 6'''      | 134,6           | 130.1                 | 129,5            |

<sup>a</sup> MeOD, <sup>c</sup> Acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.

<sup>b</sup> MeOD, <sup>1</sup>H (500MHz) e <sup>13</sup>C (125MHz).

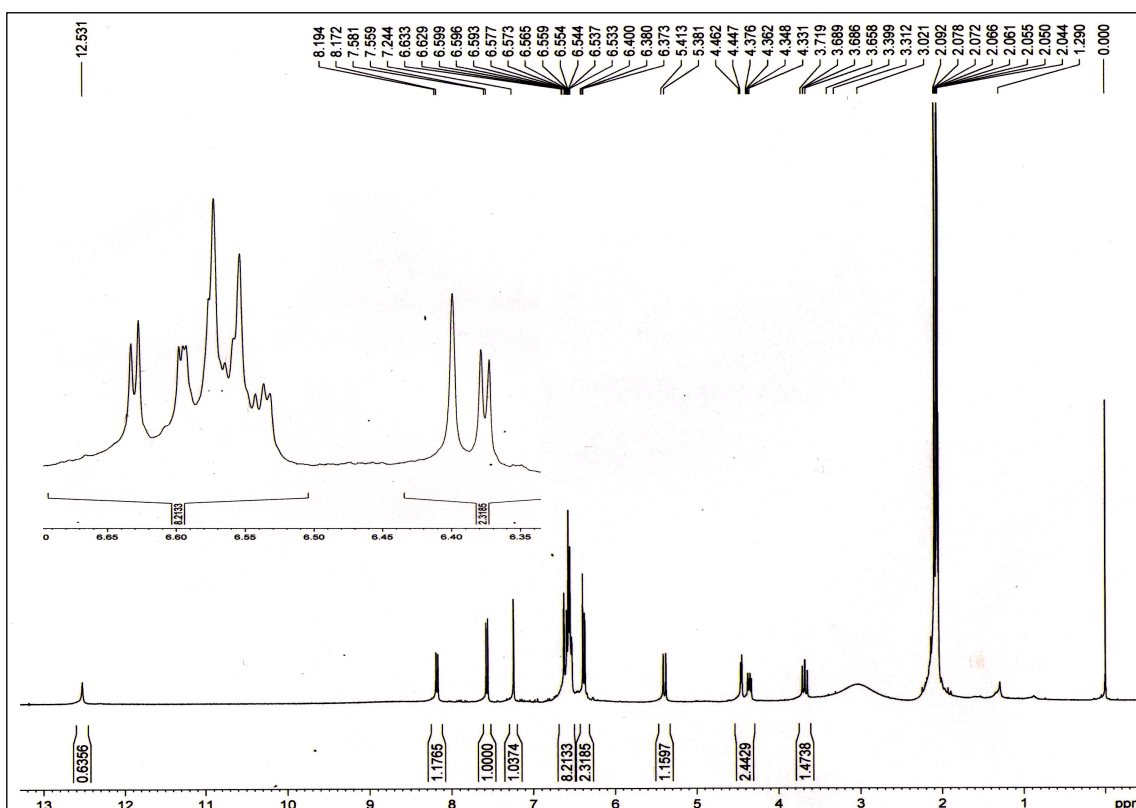


Figura 4. 35 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VII (Acetona- $d_6$ , 400MHz).

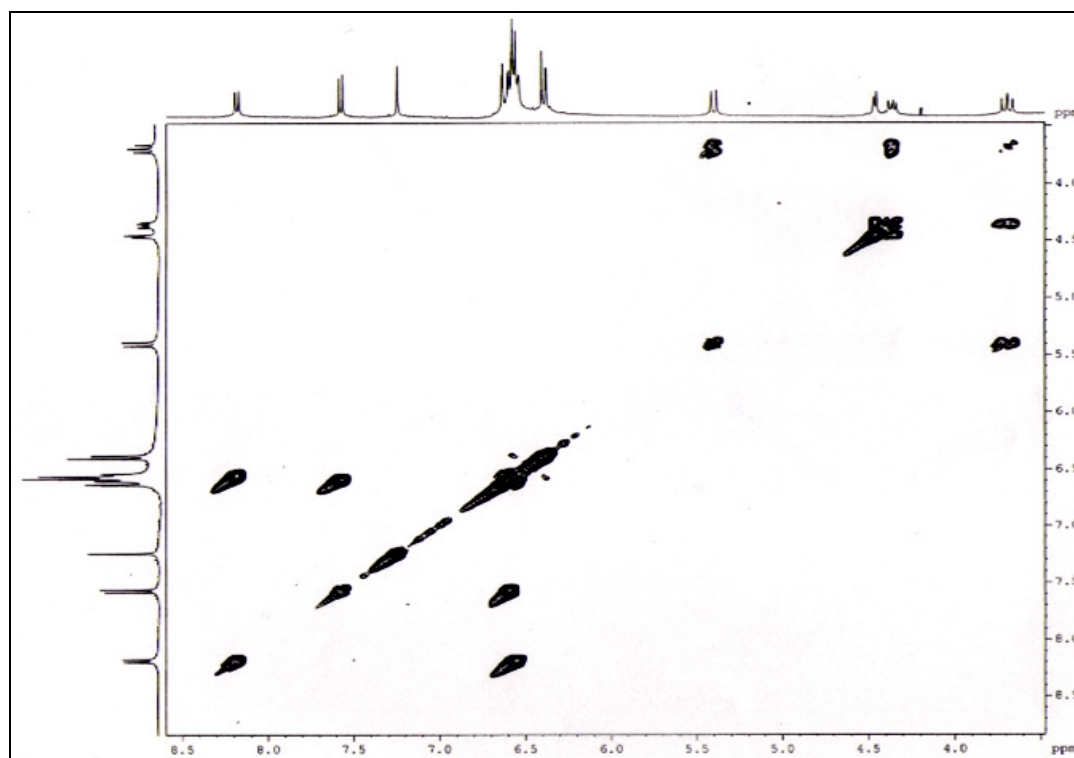


Figura 4.36 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VII (Acetona- $d_6$ , 400MHz).

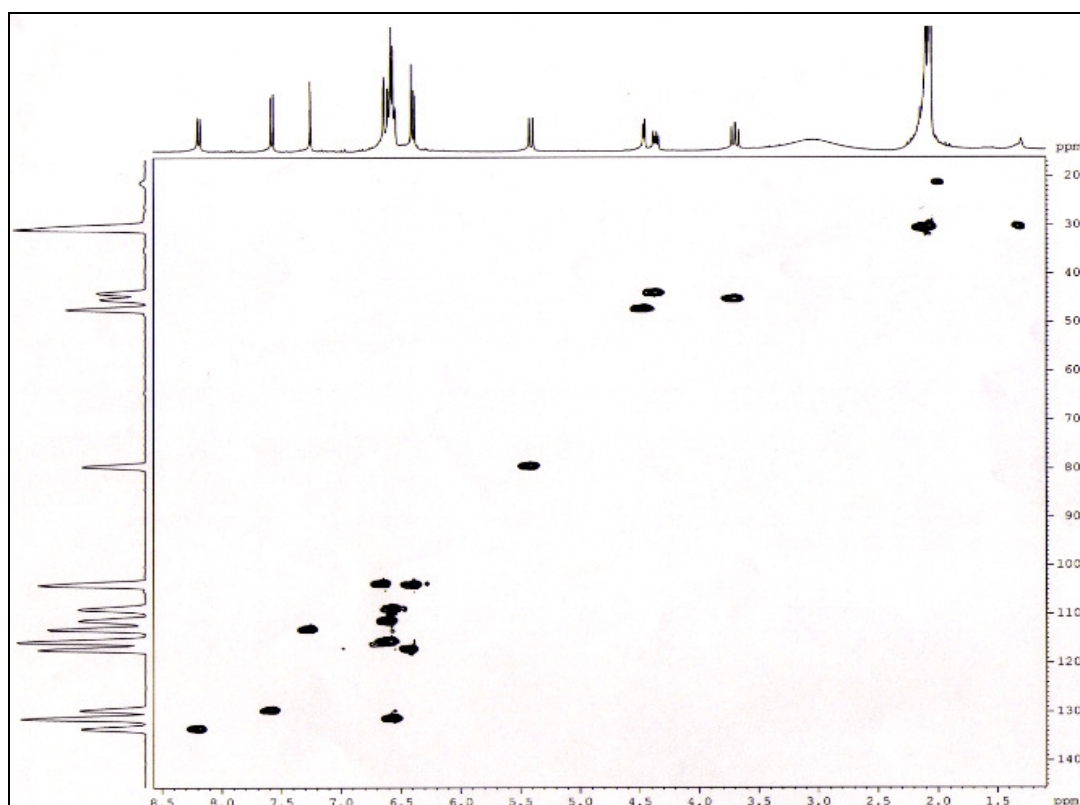


Figura 4.37 - Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância VII (Acetona-*d*6, 400MHz).

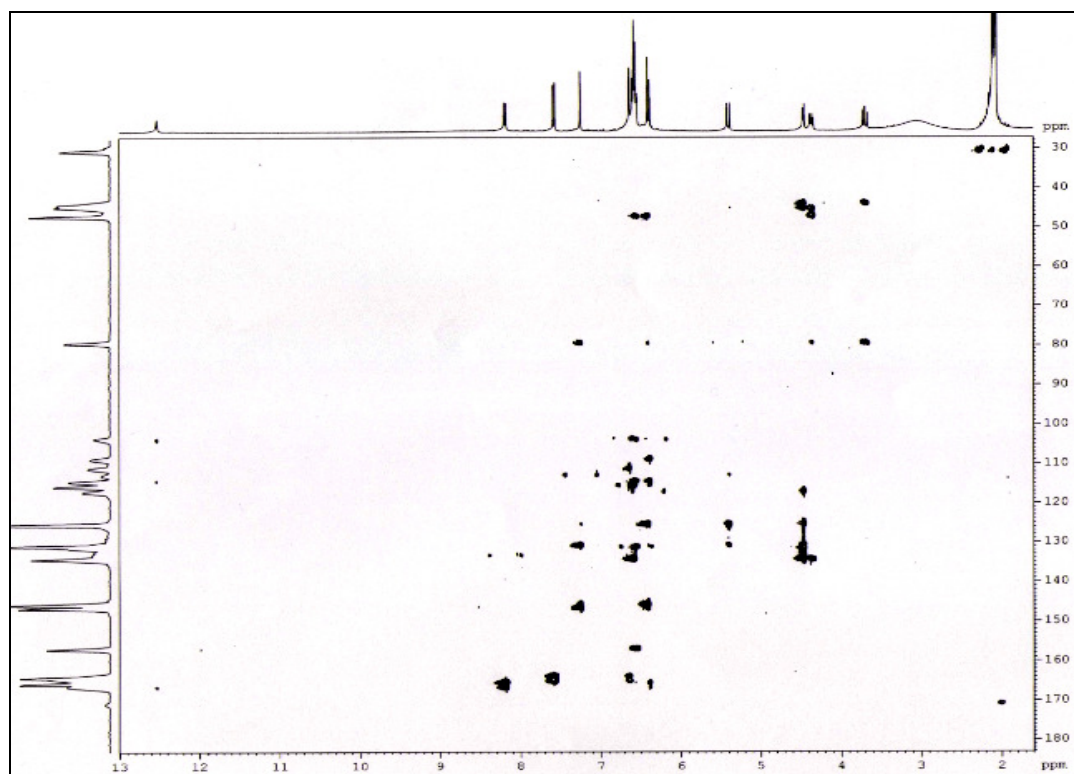


Figura 4.38 - Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância VII (Acetona-*d*6, 400MHz).



A atribuição dos dados de RMN<sup>1</sup>H foi realizada através da utilização dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, de COSY e os valores de constantes de acoplamento e utilizando os dados das substâncias VI, discutida no item anterior, e de matosina (BANDEIRA *et al.*, 2003) como modelo (**Tabela 4.8**). A atribuição dos dados de RMN<sup>13</sup>C foi realizada pela correlação entre hidrogênios e os carbonos aos quais estão diretamente ligados (HSQC) e a longa distância (HMBC) e constam da **Tabela 4.9**.

A partir da constante de acoplamento foi possível propor os ângulos diedros entre os hidrogênios 7, 8, 7'' e 8'' utilizando o diagrama de Karplus (SILVERSTEIN *et al.*, 1994) do composto VII. Os hidrogênios 7 e 8 com relação diaxial entre si e constante de acoplamento de 13,2 Hz, apresentam ângulo de aproximadamente 180°; entre 8 e 8'' devem também ser diaxiais com ângulo entre eles próximos de 160°, já que constante de acoplamento entre eles é de 12,0 Hz, que é alta, indicando pequena distorção da conformação do anel; entre 8'' e 7'' devem ser diequatorial com ângulo entre eles próximos de 45° levando ao valor de 5,6 Hz para a constante de acoplamento. Esta análise permite explicar as diferenças de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos de VII, VI e Matosina (**Tabela 4.8**). Para confirmar a determinação da configuração relativa do composto VII, foram realizados os experimentos gNOESY (**Tabela 4.10 e Figura 4.39**) e os efeitos NOE observados de H-7'' ( $\delta_H$  4,45) com H-6''' ( $\delta_H$  8,18), e H-7 ( $\delta_H$  5,40) com H-8 ( $\delta_H$  3,68) que os localizam *cis* entre si, confirmam a estereroquímica relativa proposta.

Tabela 4.10 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância VII

| H ( $\delta_H$ ) Irradiado | gNOESY<br>$\delta_H$ |
|----------------------------|----------------------|
| 7 (5,40)                   | 7,40 (H-6)           |
|                            | 4,35 (H-8'')         |
|                            | 3,68 (H-8)           |
| 7'' (4,45)                 | 6,40 (H-3)           |
|                            | 6,56 (H-2'' e 6'')   |
|                            | 8,18 (H-6''')        |
| 8'' (4,35)                 | 5,40 (H-7)           |
|                            | 8,18 (H-6''')        |

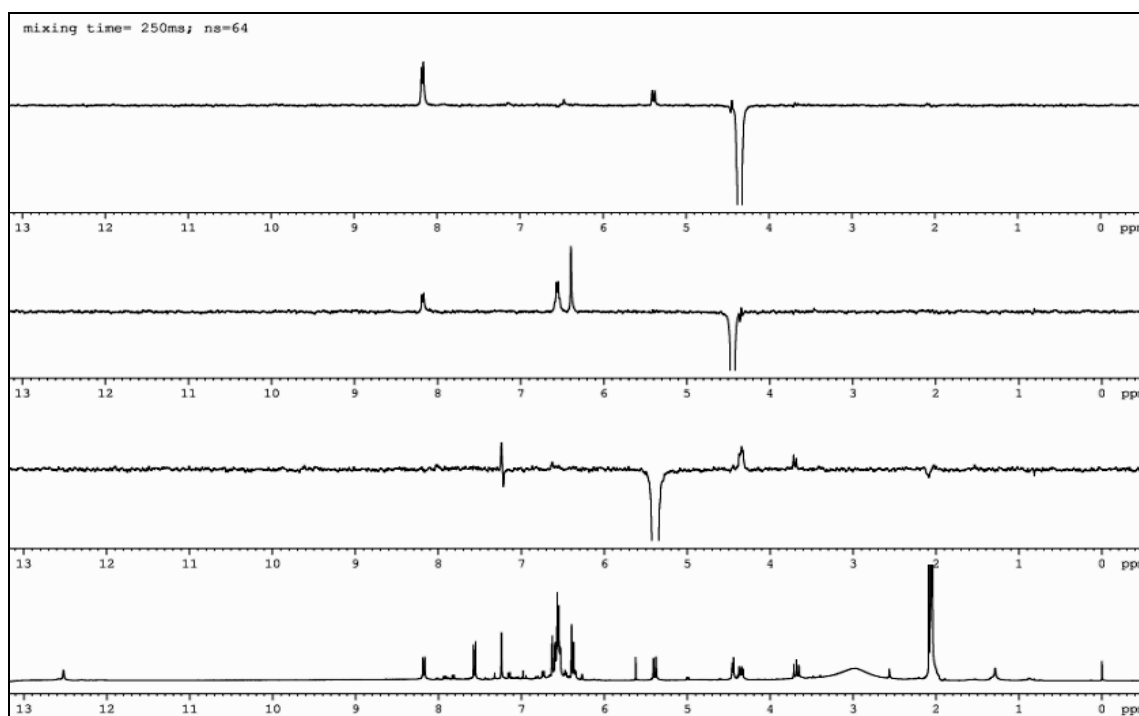


Figura 4.39 - Experimento de gNOESY da substância VII (MeOD, 400 MHz).

O espectro de IV registrado em pastilhas de NaCl (**Figura 4.40**) mostrou bandas de absorções: larga e intensa em  $3411\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento axial de hidroxila (O-H), estiramento axiais sobrepostos referente a ligação (C=O) e ligação  $\text{C-C}_{sp^2}$  em  $1609\text{ cm}^{-1}$ , sendo que este fato se deve a presença da dupla ligação conjugada que resulta na deformação axial assimétrica que produz uma absorbância de intensidade forte; na região entre  $1507\text{-}1451\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos; entre  $1230\text{-}1002\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares no plano dos hidrogênios das ligações  $\text{C-H}_{sp^2}$  dos anéis aromáticos; e entre  $915\text{-}691\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares fora do plano.

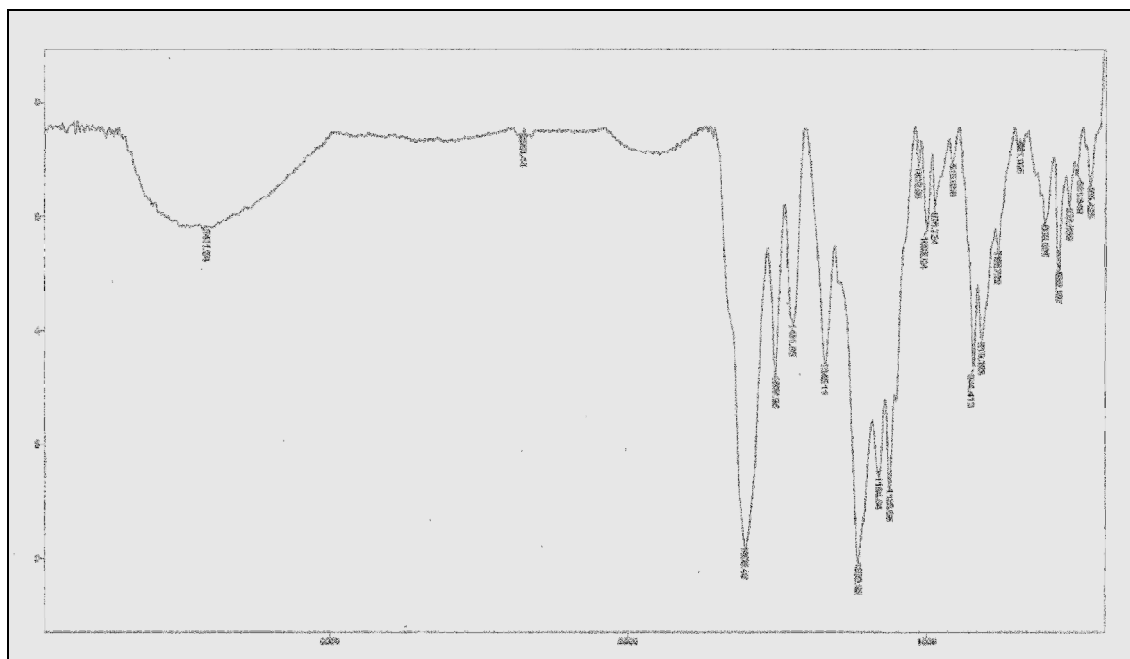


Figura 4.40 - Espectro de infravermelho da substância VII (Pastilha NaCl).

No espectro de ultravioleta (**Figura 4.41**) foram observadas as bandas de absorção em 210, 225, 280. Para a atribuição de cada uma das bandas citadas foram utilizadas informações daquelas características de sistemas aromáticos e cálculos teóricos para aqueles que têm carbonilas ligadas diretamente aos anéis (regras empíricas, SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2010). Aliado à análise de RMN, estes dados auxiliaram a elucidação estrutural de VI. As bandas em 210, 225 e 280 nm correspondem a 2,3-dihidroxi-5,6,7,8-tetrahidronaftaleno, de acordo com os dados de literatura (IVERSON *et al.*, 1995). A banda em 280 nm refere-se também ao fragmento da molécula correspondente ao derivado do benzeno substituído com carbonila (tomando como base o valor de 246 nm (ArCOR), juntamente com os incrementos de duas hidroxilas nas posições *para* (+ 25 nm) e *orto* (+ 7 nm), resultando assim no valor teórico de 278 nm, confirmando o valor observado).

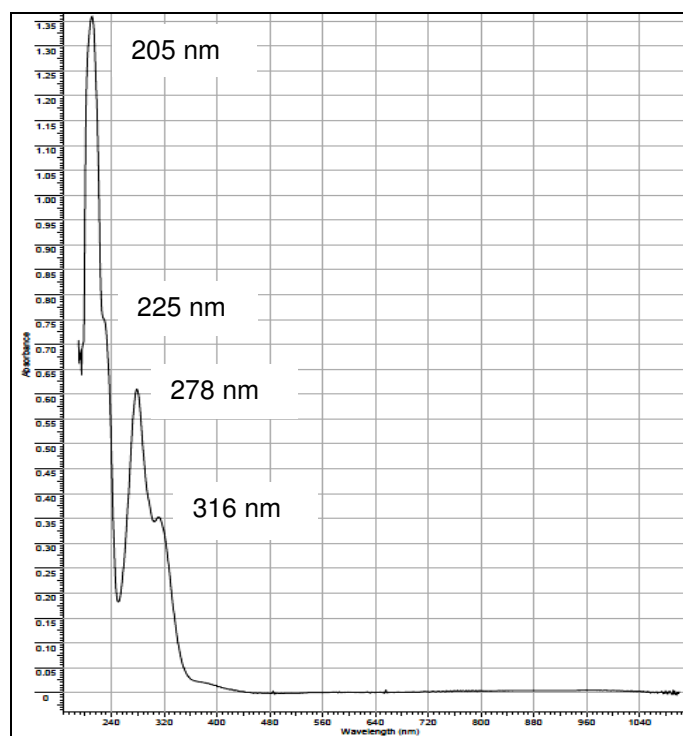


Figura 4.41 - Espectro de ultravioleta da substância VII.

Para confirmar o peso molecular e como conseqüência a fórmula molecular da substância VII, foi realizado o experimento espectrometria de massas de alta resolução no modo positivo e negativo. O modo positivo (**Figura 4.42**) apresentou a melhor resolução. Assim, através do resultado foi confirmando a massa de  $([M+H - H_2O]^+ 525,1060 \text{ Da})$  que corresponde à fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{10}$  da substância VII após ganho de próton seguido pela perda de água.

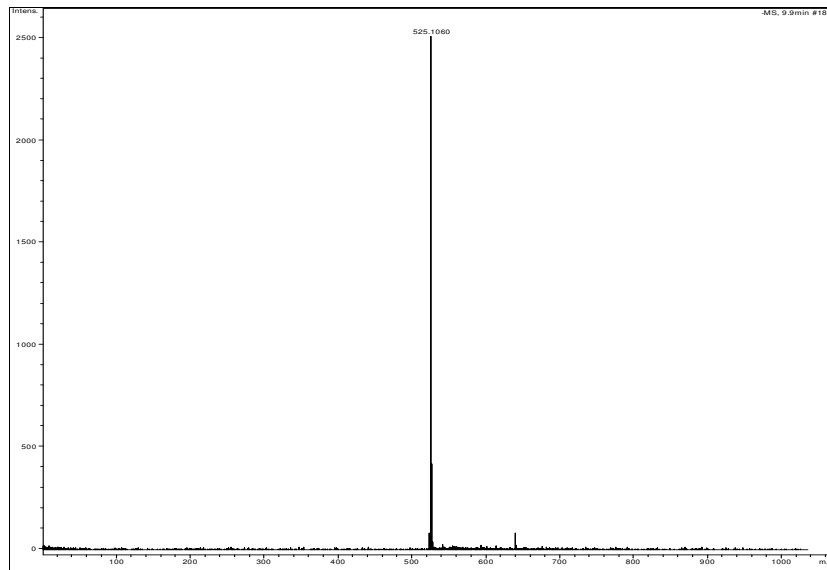


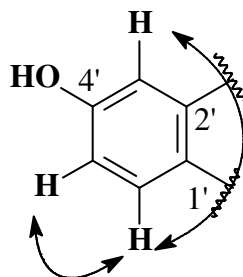
Figura 4.42 - Espectro de massas de alta resolução da substância VII.

#### 4.2.1.1.8 - Elucidação estrutural da Substância VIII

A substância VIII foi isolada da fração RACVI-3 (p.34) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.12**, p.34). A substância apresentou-se como sólido amorfo amarelo e sua elucidação estrutural foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.43**), COSY (**Figura 4.44**), HSQC (**Figura 4.45**), HMBC (**Figuras 4.46-48**) (**Tabela 4.11**).

O experimento de HMBC das **Figuras 4.46** foi obtido através de uma constante de acoplamento de 8 Hz, porém algumas correlações foram observadas através do experimento utilizando uma constante de 4 Hz (**Figura 4.47-48**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.43**, **Tabela 4.11**) apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,84 (H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (H-3'), com constantes de acoplamento  $J = 8,4$  e  $2,4$  Hz, respectivamente e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,87 (H-5') com a constante de  $J = 8,4$  e  $2,4$  Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído, sendo que duas substituições são vizinhas e a terceira em posição *meta*. Através do experimento COSY (**Figura 4.44**) pode-se observar que se trata de um sistema de spins acoplados.



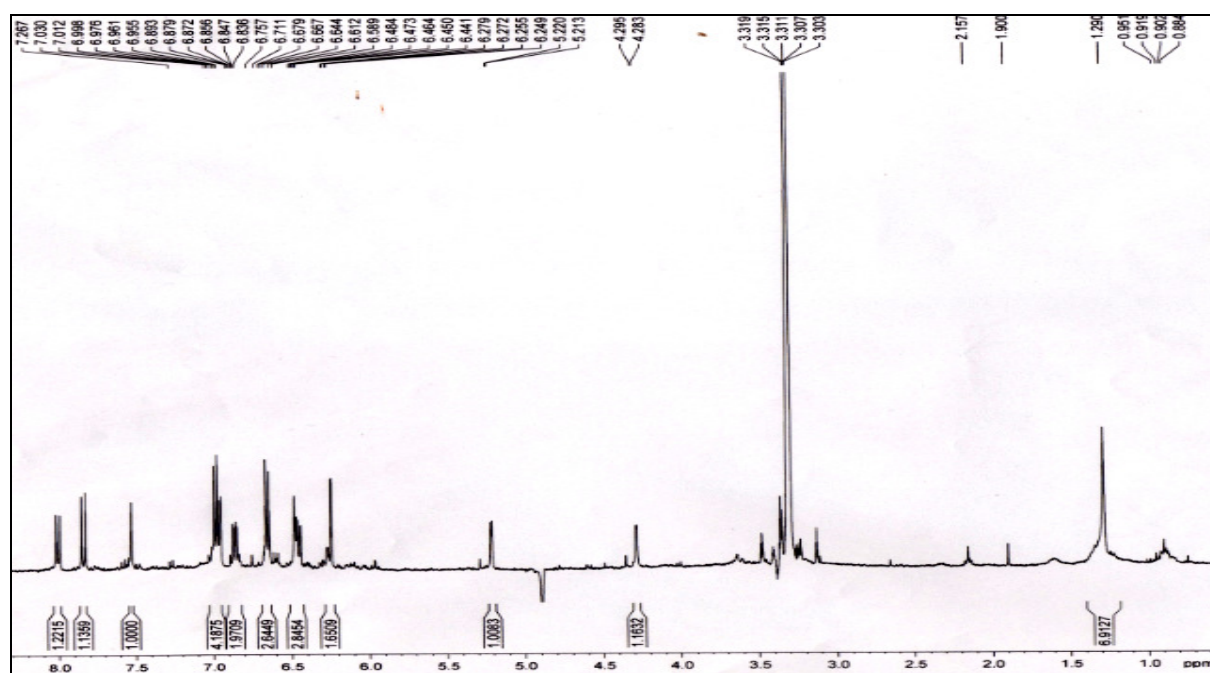


Figura 4.43 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VIII (MeOD, 400MHz).

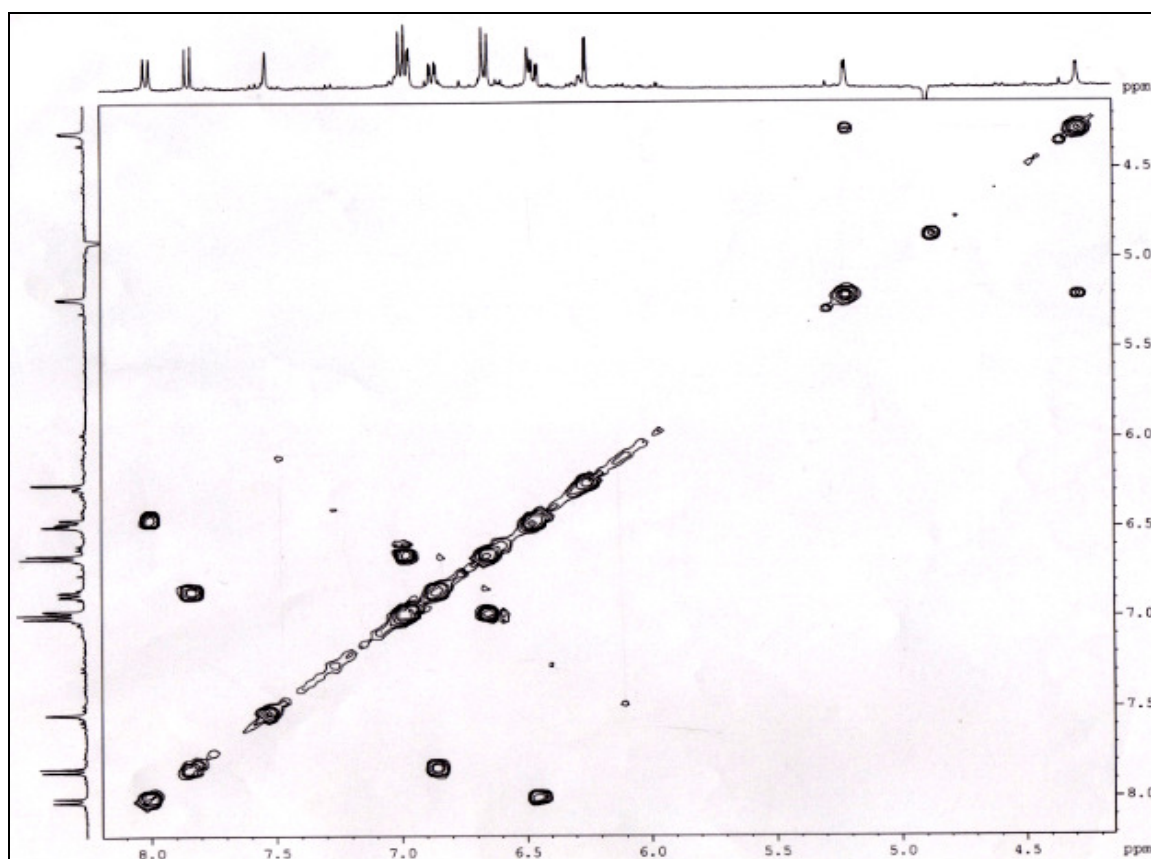


Figura 4.44 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância VIII (MeOD 400MHz).

O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.45**) mostrou as correlações dos sinais de hidrogênios em  $\delta_H$  6,87 com o do carbono em  $\delta_C$  111,8 (C-5'); os dois dubletos em  $\delta_H$  6,92 ( $J = 2,4$  Hz) e  $\delta_H$  7,84 ( $J = 8,4$  Hz) com os carbonos em  $\delta_C$  104,1 (C-3') e  $\delta_C$  127,5 (C-6') respectivamente. A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.46**) revelou as correlações dos sinais: dubleto em  $\delta_H$  6,92 com os carbonos  $\delta_C$  111,8 (C-5') e  $\delta_C$  159,1 (C-4'), sendo este último pertencente à função fenólica; o dubleto em  $\delta_H$  7,84 com os carbonos em  $\delta_C$  159,1 (C-4'),  $\delta_C$  165,0 (C-2'),  $\delta_C$  117,0 (C-1') e  $\delta_C$  178,0 (C-9), sendo este característico de uma carbonila conjugada.

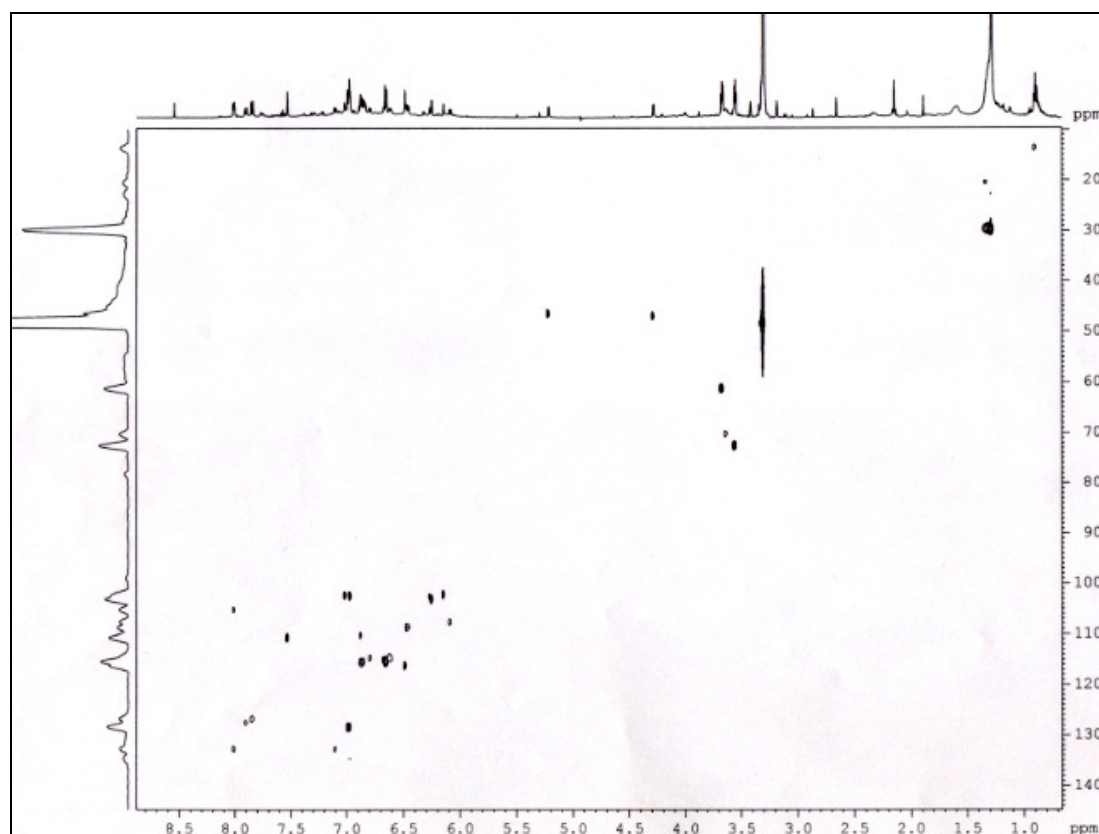
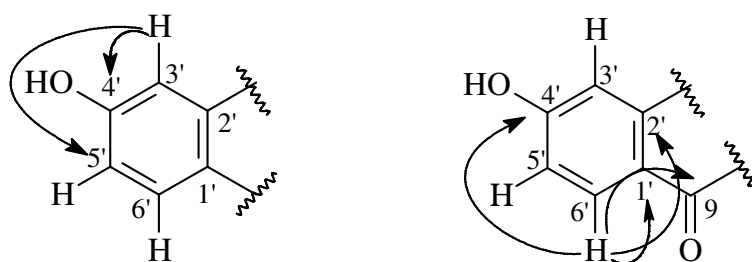


Figura 4.45 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância VIII (MeOD, 600 MHz).



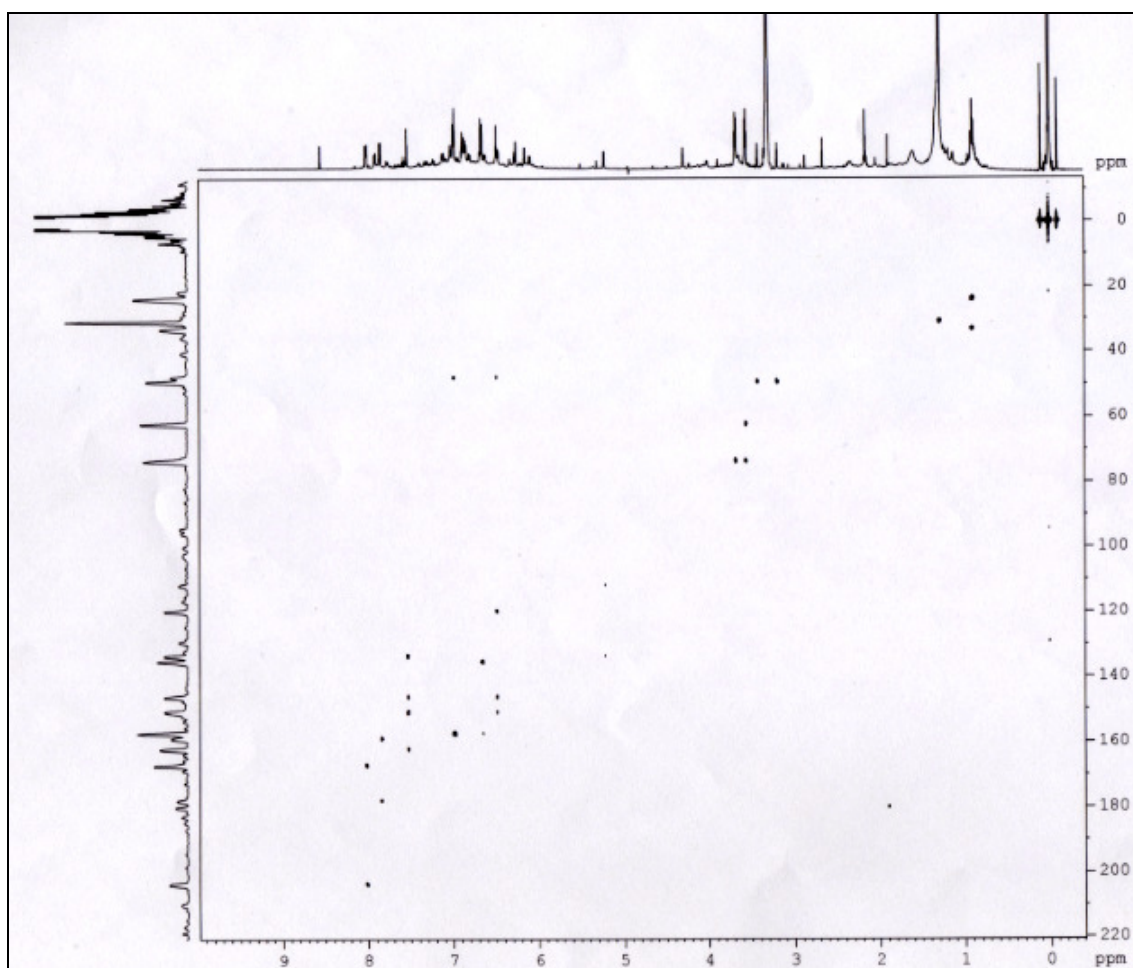
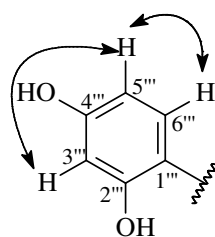
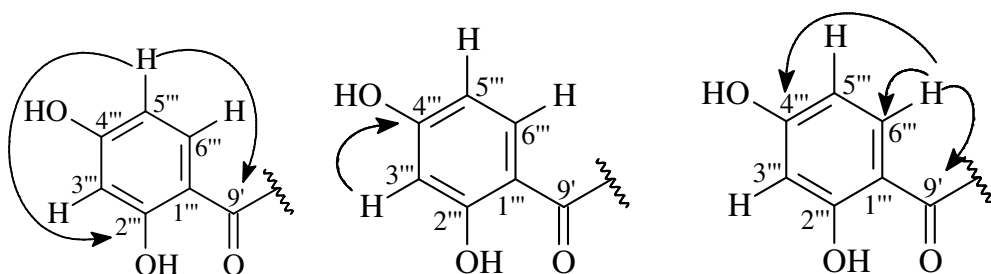


Figura 4.46 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=8\text{Hz}$ , MeOD, 600 MHz).

O espectro de COSY (**Figura 4.44**) revelou ainda, mais três sistemas de spins. O segundo sistema pode ser observado no espectro de RMNH  $^1\text{H}$  (**Figura 4.43**) em que apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  8,01 (H-6''') e  $\delta_{\text{H}}$  6,25 (H-3'''), com constantes de acoplamento de  $J = 9,2$  e  $3,6$  Hz, respectivamente e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 (H-5''') com a constante de  $J = 9,2/3,6$  Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído, sendo que duas substituições são vizinhas e a terceira em posição *meta*.



O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.45**) apresentou as correlações dos sinais dos hidrogênios do sistema acima discutido: em  $\delta_H$  6,46 (dd,  $J = 3,6$  e  $9,2$ ) com o do carbono em  $\delta_C$  109,6 (C-5'''); em  $\delta_C$  6,25 (d,  $J = 3,6$  Hz) e  $\delta_C$  8,01 (d,  $J = 9,2$  Hz) com os carbonos em,  $\delta_C$  104,1 (C-3''') e  $\delta_C$  133,4 (C-6'''), respectivamente. Na análise do espectro de HMBC, estes sinais apresentaram correlações com os dos carbonos:  $\delta_H$  6,46 com  $\delta_C$  203,3 (C-9'') (quando este experimento foi realizado com uma constante diferente, 4 Hz, pode-se observar também a correlação com  $\delta_C$  162,1 (C-2''') ); em  $\delta_H$  6,25 com o carbono  $\delta_C$  167,3 (C-4'''), sendo este último pertencente a função fenólica; e finalmente o dubleto em  $\delta_H$  8,01 com os carbonos em  $\delta_C$  133,4 (C-6''') e 203,3 (C-9''), sendo este característico de uma carbonila conjugada (HMBC em 4Hz, **Figura 4.47**).



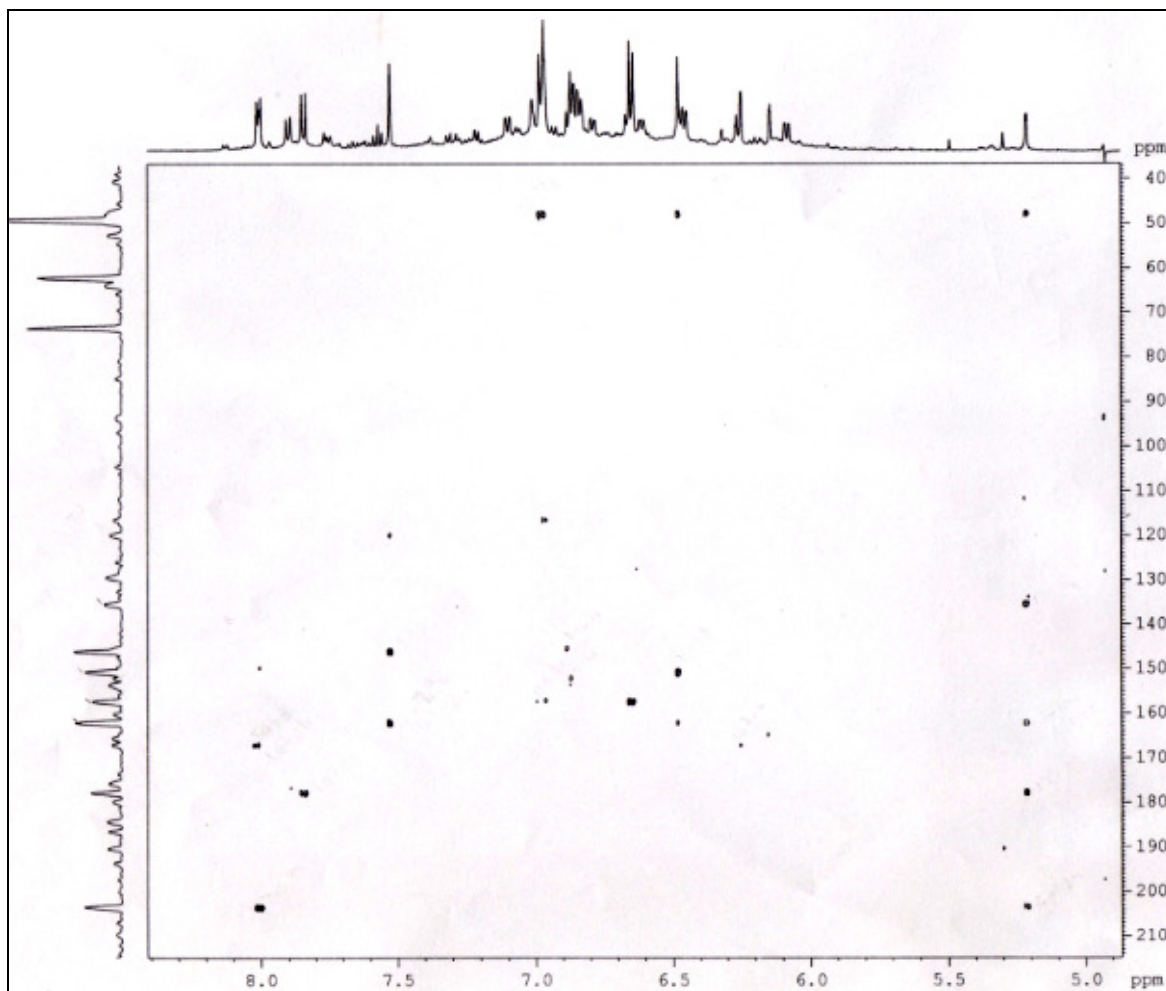
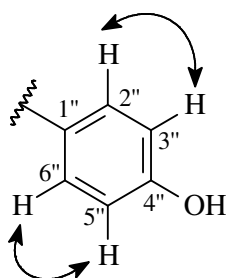
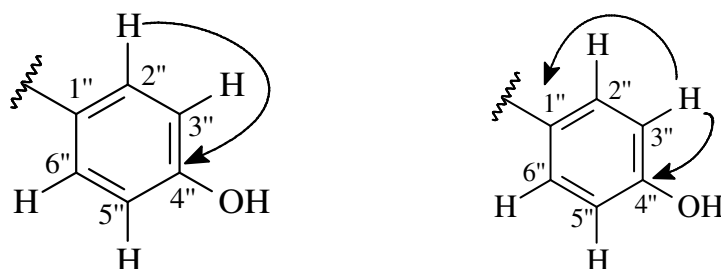


Figura 4.47 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=4$ Hz MeOD, 600 MHz).

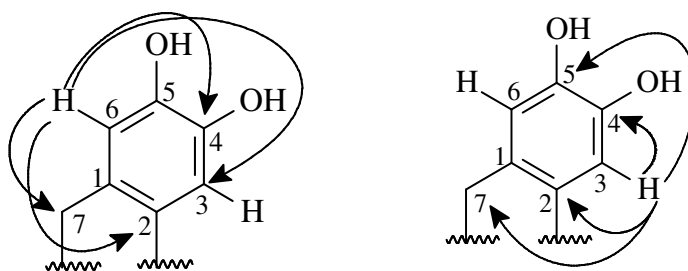
O terceiro sistema de spin observado no COSY (**Figura 4.44**) foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.43**) através de um duplete  $\delta_{\text{H}}$  6,98 (2H, H-2''/6'',  $J = 9,2$  Hz), este acopla com outro duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,66 (2H, H-3''/5'',  $J = 9,2$  Hz). Estes deslocamentos químicos são característicos dos hidrogênios H-2''/H-2''/6'' e 3''/5'', isto ocorre devido a livre rotação do anel que deixam os hidrogênios quimicamente equivalentes.



O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.45**) mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,98 e  $\delta_H$  6,66 com os carbonos em  $\delta_C$  129,3 (C-2''/6'') e  $\delta_C$  116,3 (C-3''/5''), respectivamente. A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.46**) mostra as correlações dos sinais dos dubletos: em  $\delta_H$  6,98 com o do carbono em  $\delta_C$  157,5 (C-4''), este característico de carbono fenólico; e em  $\delta_H$  6,66 com os dos carbonos em  $\delta_C$  135,3 (C-1'') e  $\delta_C$  157,5 (C-4'').



O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 4.43**) apresentou ainda dois singletos, em  $\delta_H$  7,50 (1H) e 6,48 (1H) característicos dos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente, que correlacionam com os dos carbonos em,  $\delta_C$  117,4 (C-3) e  $\delta_C$  111,8 (C-6), respectivamente (HSQC, **Figura 4.45**). A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.46**) mostra as correlações dos sinais em  $\delta_H$  6,48 com os dos carbonos  $\delta_C$  117,4 (C-3),  $\delta_C$  133,5 (C-2) e 150,6 (C-4), sendo este último pertencente à função fenólica; no experimento utilizando  $J$  de 4 Hz pode-se observar a correlação de  $\delta_H$  6,48  $\delta_C$  162,1 (C-7) (**Figura 4.47**); e finalmente  $\delta_H$  7,55 com os carbonos em  $\delta_C$  133,5 (C-2);  $\delta_C$  146,2 (C-5);  $\delta_C$  150,6 (C-4) e  $\delta_C$  162,1 (C-7).



O terceiro sistema observado no COSY está relacionado aos dois dubletos em  $\delta_H$  5,20 (1H, H-8'') e em  $\delta_H$  4,30 (1H, H-7'') com  $J = 4,8$  Hz (**Figura 4.44**). O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.45**) mostrou a correlação destes sinais com os carbonos em  $\delta_C$  47,5 (C-7'') e  $\delta_C$  49,5 (C-8''), respectivamente. A correlação obtida para o dubleto em  $\delta_H$  4,30 no espectro de HMBC só pode ser observado no experimento com constante de 4 Hz (**Figura 4.48**), em que demonstra a correlação

com os carbonos em  $\delta_c$  129,3 (C-1 e C-2''); e verifica-se também que o dubleto em  $\delta_H$  5,20 correlaciona-se com os dois carbonos em  $\delta_c$  49,5 (C-8'');  $\delta_c$  133,5 (C-2);  $\delta_c$  162,1 (C-7);  $\delta_c$  178,0 (C-9) e  $\delta_c$  203,3 (C-9'').

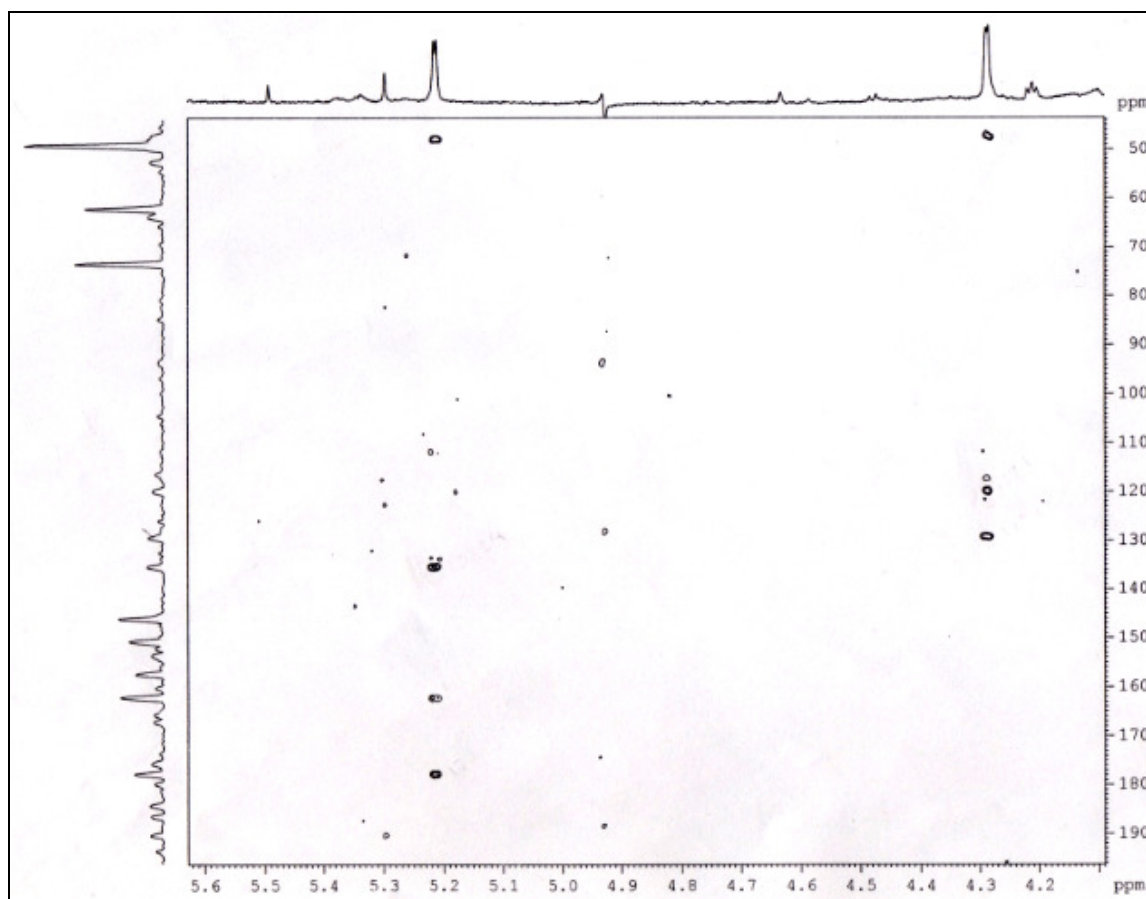
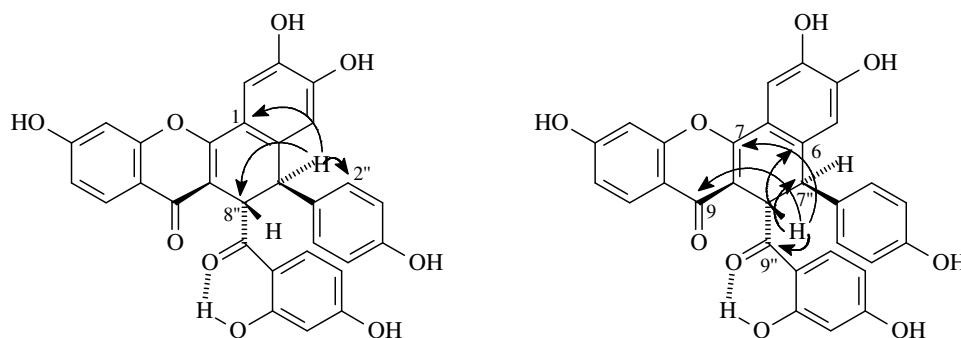


Figura 4.48 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância VIII ( $J=4$  Hz, MeOD, 600 MHz).

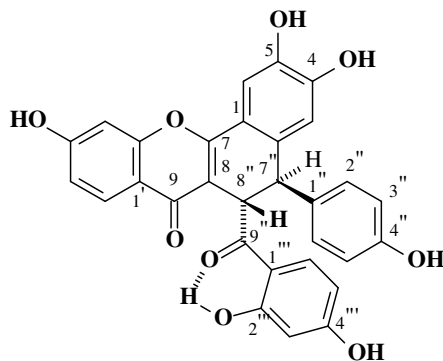
Tabela 4.11 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias VIII e VII

| C    | $\delta$ ppm, J Hz   |                           |                   |                  |
|------|----------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
|      | VIII <sup>a</sup>    | VII <sup>b</sup>          | VIII <sup>a</sup> | VII <sup>b</sup> |
| 1    | ---                  |                           | 129,3             | 125,3            |
| 2    | ---                  |                           | 133,5             | 131,5            |
| 3    | 6,48 (s)             | 6,40 (s)                  | 117,4             | 117,1            |
| 4    | ---                  |                           | 150,6             | 145,6            |
| 5    | ---                  |                           | 146,2             | 146,5            |
| 6    | 7,50 (s)             | 7,40 (s)                  | 111,8             | 113,0            |
| 7    | ---                  | 5,40 (d;13,2)             | 162,1             | 79,4             |
| 8    | ---                  | 3,68<br>(dd; 12,0 e 13,2) | 112,0             | 44,9             |
| 9    | ---                  |                           | 178,0             | 192,0            |
| 1'   | ---                  |                           | 117,0             | 134,1            |
| 2'   | ---                  |                           | 165,0             | 164,0            |
| 3'   | 6,92 (d; 2,4)        | 6,63 (d; 1,6)             | 104,1             | 103,9            |
| 4'   | ---                  |                           | 159,1             | 165,6            |
| 5'   | 6,87 (dd; 2,4 e 8,4) | 6,60 (m)                  | 111,8             | 111,1            |
| 6'   | 7,84 (d; 8,4)        | 7,57 (d; 8,8)             | 127,5             | 129,5            |
| 1''  | ---                  |                           | 135,3             | 134,1            |
| 2''  | 6,98 (d; 9,2)        | 6,56 (s)                  | 129,3             | 131,2            |
| 6''  |                      |                           |                   |                  |
| 3''  | 6,66 (d; 9,2)        | 6,56 (s)                  | 116,3             | 115,5            |
| 5''  |                      |                           |                   |                  |
| 4''  | ---                  |                           | 157,5             | 156,9            |
| 7''  | 4,30 (d; 4,8)        | 4,45 (d; 5,6)             | 47,5              | 47,0             |
| 8''  | 5,20 (d; 4,8)        | 4,35<br>(dd; 5,6 e 12,0)  | 49,5              | 43,8             |
| 9''  | ---                  |                           | 203,3             | 206,1            |
| 1''' | ---                  |                           | 111,9             | 114,4            |
| 2''' | ---                  |                           | 162,1             | 165,6            |
| 3''' | 6,25 (d; 3,6)        | 6,38 (d; 2,8)             | 104,1             | 103,9            |
| 4''' | ---                  |                           | 167,3             | 166,3            |
| 5''' | 6,46 (dd; 3,6 e 9,2) | 6,54 (m)                  | 109,6             | 108,8            |
| 6''' | 8,01 (d; 9,2)        | 8,18 (d; 8,8)             | 133,4             | 129,5            |

<sup>a</sup> MeOD, 400 e 600 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC

<sup>b</sup> MeOD, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC

Com base na análise dos dados discutidos acima de RMN, comparação com os dados de VII que foi utilizada como modelo, foi proposta a estrutura VIII, onde a estereoquímica dos carbonos 7'' e 8'' se baseou na constante de acoplamento que é característica de sistemas onde eles estão em *cis*.



O espectro de infravermelho obtido em pastilha de NaCl (**Figura 4.49**) apresenta as seguintes bandas de absorções: larga e intensa em  $3373\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos axiais de hidroxilas (O-H), estiramento axial da ligação C=O em  $1614\text{ cm}^{-1}$  (banda larga) referente a presença de carbonilas e C=C anéis aromáticos; entre  $1511\text{-}1405\text{ cm}^{-1}$  mostram bandas de absorções referentes aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos, entre  $1222\text{-}1109\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares no plano para ligações C-H  $sp^2$  dos anéis aromáticos, entre  $846\text{-}646\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares fora do plano.

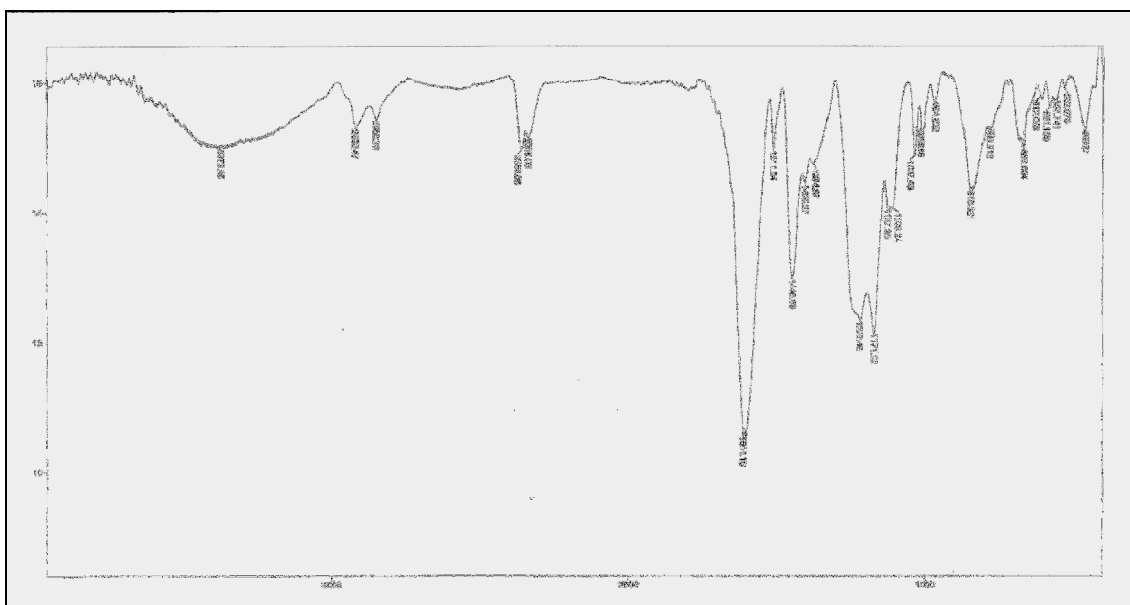


Figura 4.49 - Espectro de infravermelho da substância VIII (Pastilha NaCl).

Foi realizado o experimento de espectrometria de massas de alta resolução no modo positivo, confirmando massa molecular da substância  $[M+H+(-H_2O)]^+ 507,8363$  Da.



#### 4.2.1.1.9 - Elucidação estrutural da Substância IX

A substância IX foi isolada da fração RACVI (p.34) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.12**, p.34). Esta se apresentou como sólido de coloração amarela. A análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.50**), COSY (**Figura 4.51**), HSQC (**Figura 4.52**), HMBC (**Figura 4.53**) e comparação com dados da estrutura de VIII (**Tabela 4.12**) levaram a elucidação estrutural da substância IX.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.51**, **Tabela 4.11**) apresentou um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,90 (H-6') com constantes de acoplamento  $J = 8,8$  Hz, um singlete largo  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (H-3'), e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (H-5') com as constantes de  $J = 8,8$  e  $2,8$  Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído. Através do experimento COSY (**Figura 4.51**) pode-se observar que se trata de um sistema de spins acoplados.

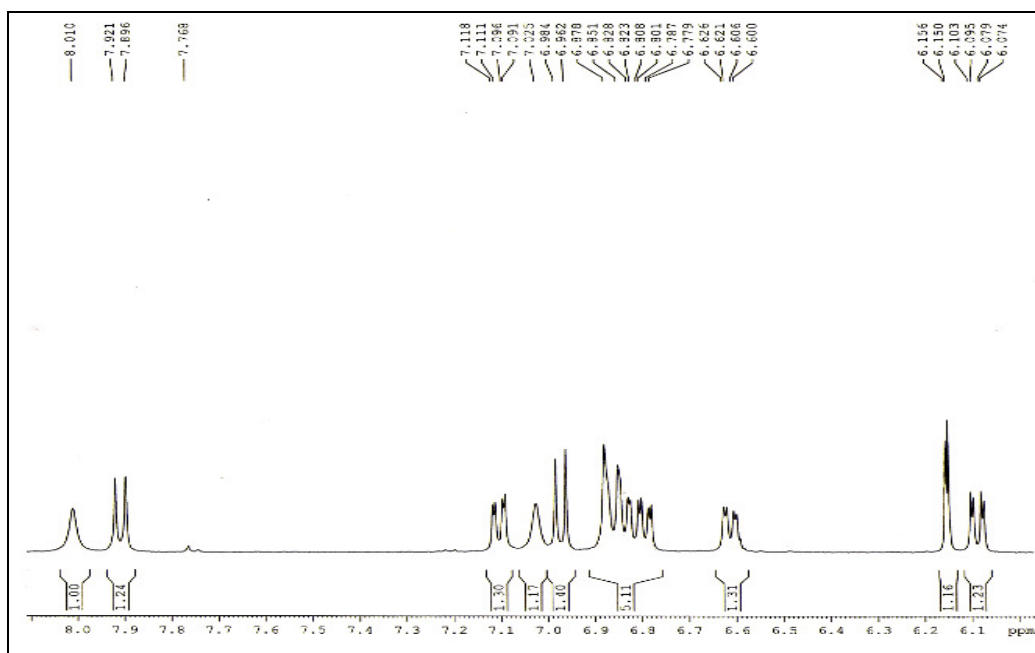
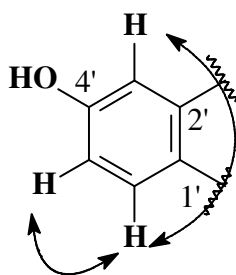


Figura 4.50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IX (MeOD, 400MHz).

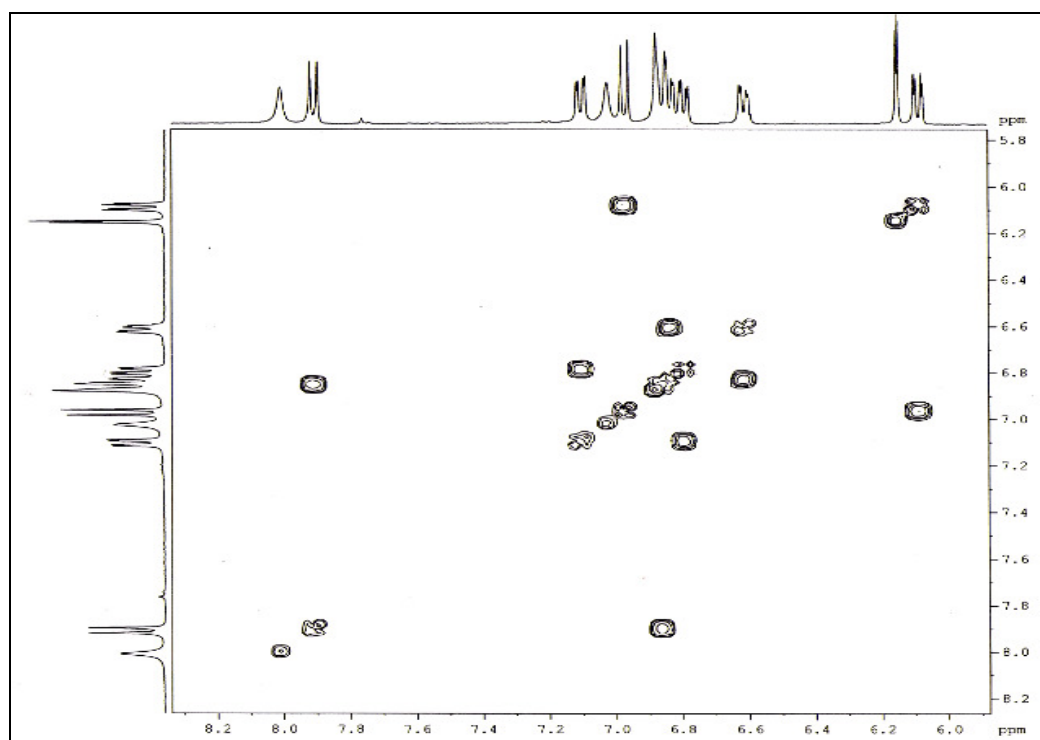
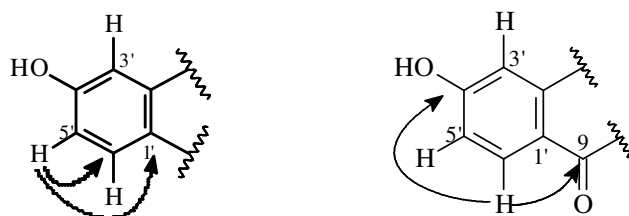


Figura 4.51 -Mapa de contorno do experimento de COSY da substância IX (MeOD 400MHz).

O sinal de deslocamento químico do hidrogênio em  $\delta_H$  6,77 (dd,  $J = 2,8; 8,8$  Hz) correlacionou-se com o sinal do carbono em  $\delta_C$  115,7 (C-5'), mapa de contorno de HSQC (**Figura 4.52**) e com os sinais de carbono em  $\delta_C$  115,3 (C-1') e  $\delta_C$  128,5 (C-6'), mapa de contorno HMBC. O sinal do hidrogênio em  $\delta_H$  7,90 (d,  $J = 8,8$  Hz) correlaciona-se com o sinal do carbono em  $\delta_C$  128,5 (C-6'), mapa de contorno HSQC e com os sinais de carbono em  $\delta_C$  159,2 (C-4') e 177,2 (C-9), HMBC, sendo estes característicos de carbono fenólico e de carbonila conjugada respectivamente. O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  7,03 (sl) correlacionou-se com o carbono em  $\delta_C$  103,1.



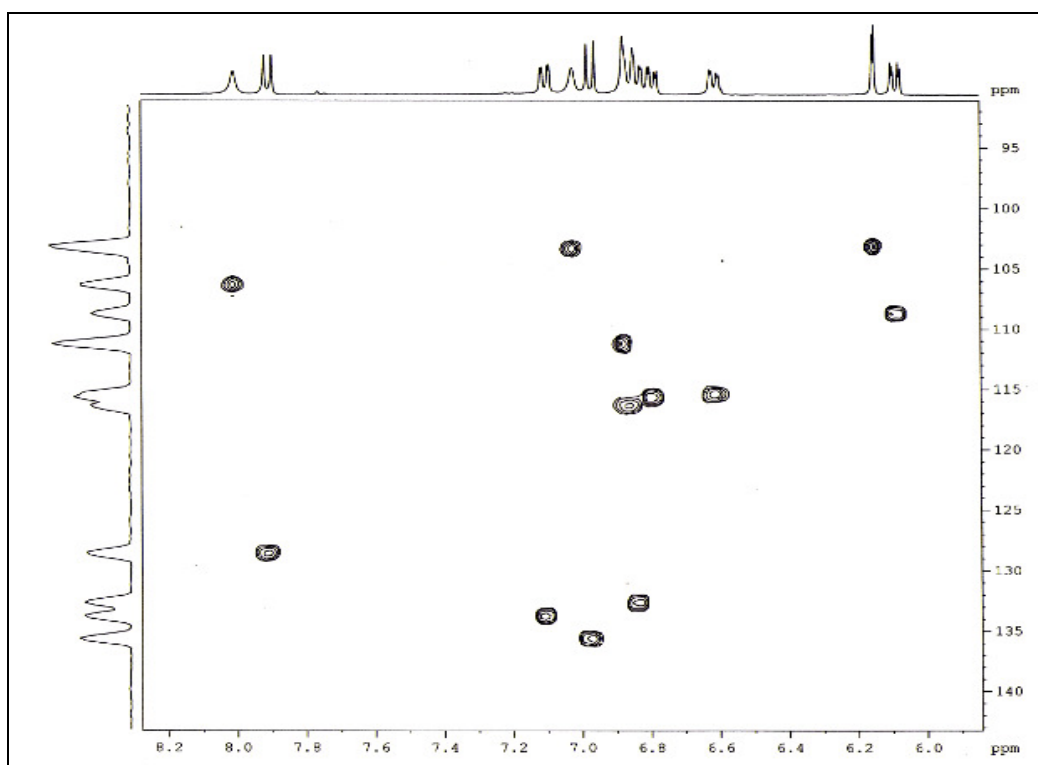


Figura 4.52 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância IX (MeOD, 400MHz).

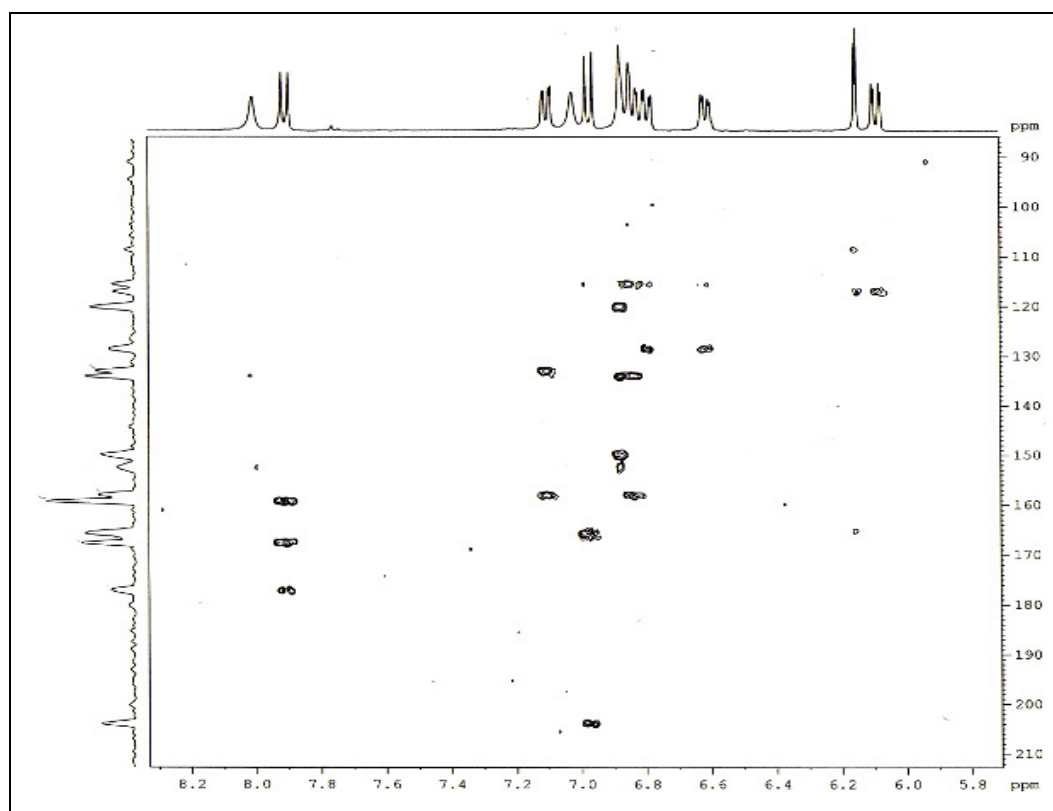
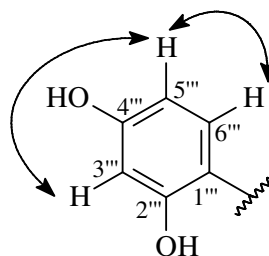
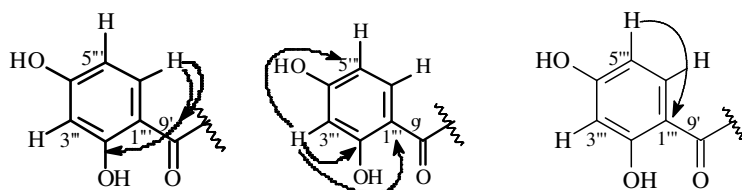


Figura 4.53 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância IX (MeOD, 400MHz).

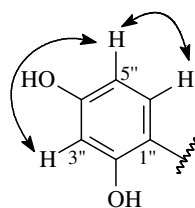
O espectro de COSY (**Figura 4.51**) revelou ainda, mais três sistemas de outro sistema de spins. O segundo sistema observado no espectro de RMNH  $^1\text{H}$  (**Figura 4.50**) apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,97 (H-6''') e  $\delta_{\text{H}}$  6,15 (H-3'''), com constantes de acoplamento de  $J = 8,8$  e  $2,4$  Hz, respectivamente e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,02 (H-5''') com as constantes de  $J = 8,8$  e  $2,4$  Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído, sendo que duas substituições são vizinhas e a terceira em posição *meta*.



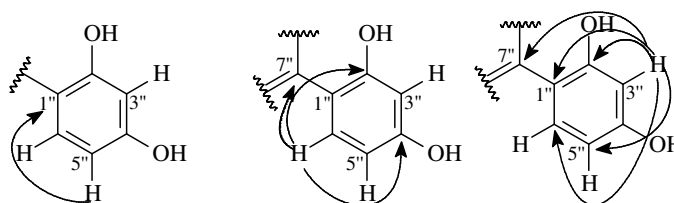
O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.52**) apresentou as correlações dos sinais dos hidrogênios do sistema acima discutido:  $\delta_{\text{H}}$  6,02 (dd,  $J = 2,4$  e  $8,8$ ) com o do carbono em  $\delta_{\text{C}}$  108,7 (C-5'''); em  $\delta_{\text{C}}$  6,15 (d,  $J = 2,4$  Hz) e  $\delta_{\text{C}}$  6,97 (d,  $J = 8,8$  Hz) com os carbonos em,  $\delta_{\text{C}}$  103,0 (C-3''') e  $\delta_{\text{C}}$  135,6 (C-6'''), respectivamente. Na análise do espectro de HMBC (**Figura 4.53**), o sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,97 correlacionou se com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  165,6 (C-2''') e 203,9 (C-9'), sendo estes característicos de carbono fenólico e de carbonila conjugada respectivamente, o sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,15 correlacionou  $\delta_{\text{C}}$  108,7 (C-5'''), 117,2 (C-1''') e 165,6 (C-2'''); e finalmente o duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,02 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  117,2 (C-1''').



O terceiro sistema de spin verificado no COSY (**Figura 4.51**) foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.50**) como dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,89 (H-3'') e  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (H-6''), com constantes de acoplamento de  $J = 2,4$  e  $8,8$  Hz, respectivamente e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,61 (H-5'') com as constantes de  $J = 8,8$  e  $2,4$  Hz, sugerindo-se assim a presença de um anel aromático trissubstituído, sendo que duas substituições são vizinhas e a terceira em posição *meta*.

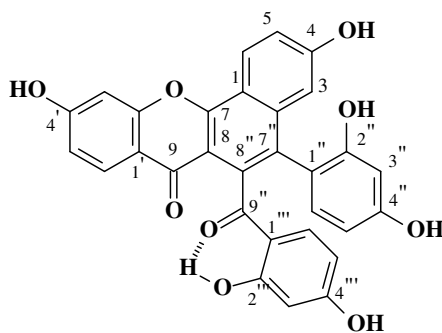


O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.52**) mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,87,  $\delta_H$  6,85 e  $\delta_H$  6,61 com os carbonos em  $\delta_C$  111,2 (C-3''),  $\delta_C$  132,5 (C-6'') e  $\delta_C$  115,6 (C-5''), respectivamente. A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.53**) mostra as correlações dos sinais de hidrogênio  $\delta_H$  6,61 com o carbono em  $\delta_C$  127,1 (C-1''), o  $\delta_H$  6,85 com o do carbono em  $\delta_C$  120,0 (C-7''),  $\delta_C$  149,0 (C-2''), 152,1 (C-4''); o  $\delta_H$  6,87 com o carbono em  $\delta_C$  120,0 (C-7''),  $\delta_C$  132,5 (C-6''),  $\delta_C$  127,3 (C-1''),  $\delta_C$  149,0 (C-2''), 152,1 (C-4''), sendo estes dois últimos característicos de carbono fenólico.



O espectro de RMN  $^1H$  apresentou ainda sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  6,85 (d,  $J = 8,4$ ),  $\delta_H$  8,02 (sl) e  $\delta_H$  7,11 (dd,  $J = 2,4$  e  $8,4$  Hz), característicos dos hidrogênios H-5, H-3 e H-6, respectivamente, que correlacionam com os carbonos em  $\delta_C$  116,3 (C-5),  $\delta_C$  106,3 (C-3) e  $\delta_C$  133,6 (C-6) pelo mapa de contorno HSQC. A análise do mapa de contorno HMBC mostra as correlações dos sinais em  $\delta_H$  6,85 com o carbono em  $\delta_C$  133,6 (C-6); e finalmente do sinal em  $\delta_H$  7,11 com os carbonos em  $\delta_C$  116,3 (C-5) e  $\delta_C$  157,9 (C-4), sendo este pertencente à função fenólica.

Através dos dados obtidos pelos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (1D, 2D) a estrutura da substância proposta é :



IX

A substância IX foi submetida à análise por espectrometria de massas no modo negativo e apresentou o pico do íon pseudo molecular com 521,2 Daltons  $[M-H]^-$ , indicando a fórmula molecular  $C_{30}H_{18}O_9$ . Foi também obtido o espectro de MS/MS (Figura 4.54) e a partir do mesmo foi proposta a fragmentação da substância XI (Figura 4.55), que auxilia na identificação da mesma.

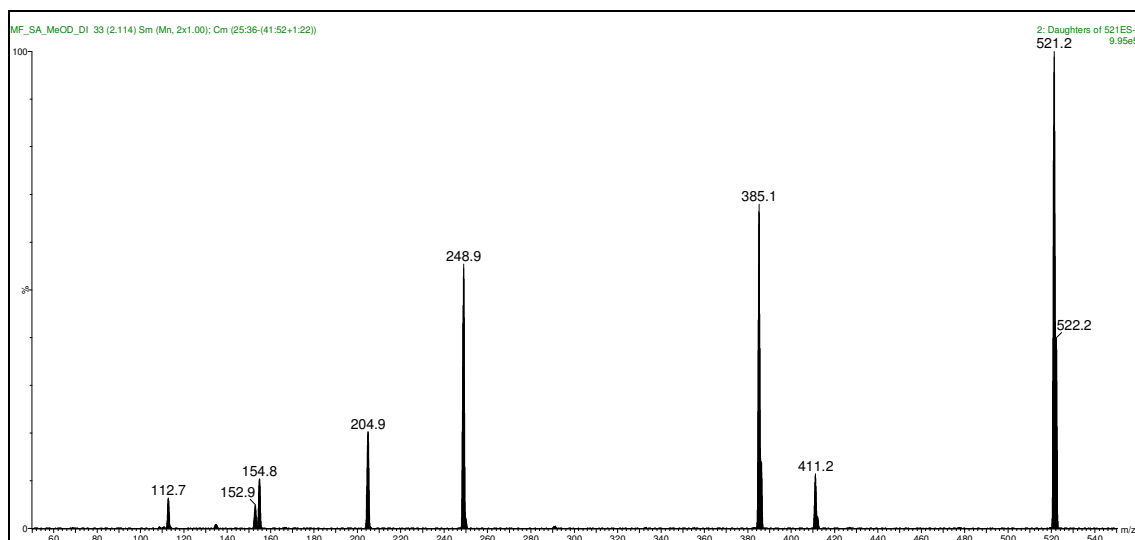


Figura 4.54 - Espectro de MS/MS da substância X para o íon  $m/z$  521,2 Da

Tabela 4.12 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias VIII e IX

| C    | $\delta$ ppm, J Hz   |                      |                   |                 |
|------|----------------------|----------------------|-------------------|-----------------|
|      | VIII <sup>a</sup>    | IX <sup>b</sup>      | VIII <sup>a</sup> | IX <sup>b</sup> |
| 1    | ---                  | ---                  | 129,3             | NO              |
| 2    | ---                  | ---                  | 133,5             | NO              |
| 3    | 6,48 (s)             | 8,02 sl              | 117,4             | 106,3           |
| 4    | ---                  | ---                  | 150,6             | 157,9           |
| 5    | ---                  | 6,85 d (8,4)         | 146,2             | 116,3           |
| 6    | 7,50 (s)             | 7,11 dd (2,4 e 8,4)  | 111,8             | 133,6           |
| 7    | ---                  | ---                  | 162,1             | NO              |
| 8    | ---                  | ---                  | 112,0             | NO              |
| 9    | ---                  | ---                  | 178,0             | 177,2           |
| 1'   | ---                  | ---                  | 117,0             | 115,3           |
| 2'   | ---                  | ---                  | 165,0             | 167,6           |
| 3'   | 6,92 (d, 2,4)        | 7,03 sl              | 104,1             | 103,1           |
| 4'   | ---                  | ---                  | 159,1             | 159,2           |
| 5'   | 6,87 (dd, 2,4 e 8,4) | 6,77 (dd, 2,8 e 8,8) | 111,8             | 115,7           |
| 6'   | 7,84 (d, 8,4)        | 7,90 (d, 8,8)        | 127,5             | 128,5           |
| 1''  | ---                  | ---                  | 135,3             | 127,3           |
| 2''  | 6,98 (d, 9,2)        | ---                  | 129,3             | 149,0           |
| 3''  | 6,66 (d, 9,2)        | 6,87 (d 2,4)         | 116,3             | 111,2           |
| 4''  | ---                  | ---                  | 157,5             | 152,1           |
| 5''  | 6,66 (d, 9,2)        | 6,61 (dd, 2,4 e 8,8) | 116,3             | 115,6           |
| 6''  | 6,98 (d, 9,2)        | 6,85 (d 8,8)         | 129,3             | 132,5           |
| 7''  | 4,30 (d, 4,8)        | ---                  | 47,5              | 120,0           |
| 8''  | 5,20 (d, 4,8)        | ---                  | 49,5              | ---             |
| 9''  | ---                  | ---                  | 203,3             | 203,9           |
| 1''' | ---                  | ---                  | 111,9             | 117,2           |
| 2''' | ---                  | ---                  | 162,1             | 165,6           |
| 3''' | 6,25 (d, 3,6)        | 6,15 (d, 2,4)        | 104,1             | 103,0           |
| 4''' | ---                  | ---                  | 167,3             | NO              |
| 5''' | 6,46 (dd, 3,6 e 9,2) | 6,08 (dd, 2,4 e 8,8) | 109,6             | 108,7           |
| 6''' | 8,01 (d, 9,2)        | 6,97 (d, 8,8)        | 133,4             | 135,6           |

<sup>a</sup> MeOD, 400 e 600 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC<sup>b</sup> MeOD, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC; NO não observado

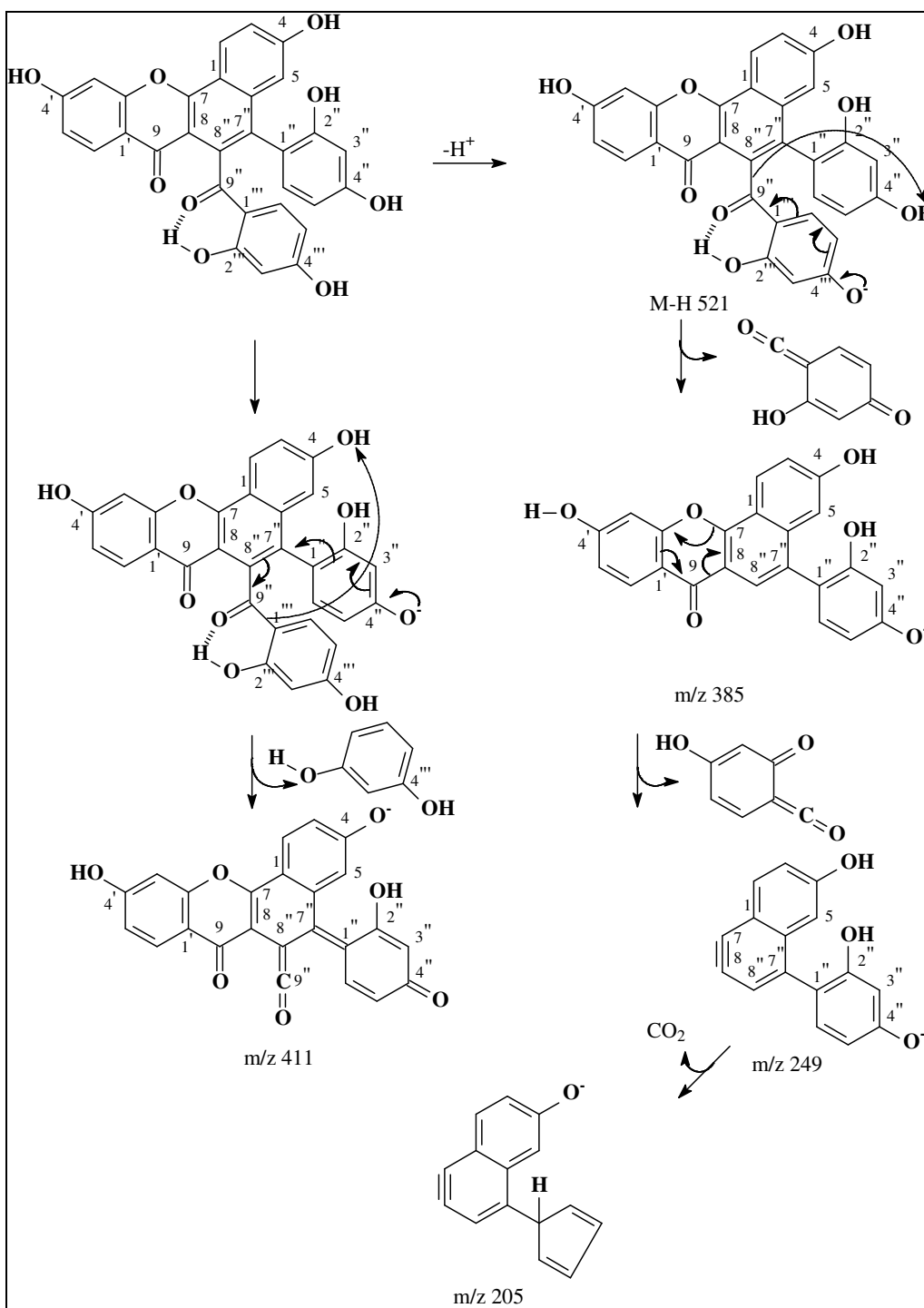


Figura 4.55 - Proposta de fragmentação MS/MS para o íon m/z 532,2 Da da substância IX.



#### 4.2.1.1.10 - Elucidação estrutural da Substância X

A substância X foi isolada da fração RACVI-5 (p.34) do extrato acetato de etila das raízes (**Fluxograma 3.12**, p.34). A substância apresentou-se como sólido amarelo e sua elucidação estrutural foi realizada através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.56**), de COSY (**Figura 4.57**), HSQC (**Figura 4.58**), HMBC (**Figura 4.59**) e comparação com os dados da literatura para o modelo Lophirona L (ANURADHA *et al.*, 2006, **Tabela 4.13**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.56**) da substância X mostrou um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ( $J = 8,8$  e  $2,0$  Hz) referente ao H-5' e 5''' acoplado em *meta* com um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 ( $J = 2,0$  Hz) característico do hidrogênio H-3' e 3''' e em *orto* com um dubleto  $\delta_{\text{H}}$  7,65 ( $J = 8,8$  Hz) referente ao H-6' e 6''' . Esses sinais remetem ao anel A de um flavonóide substituído nas posições 2'/2''' e 4'/4''' , sendo estes acoplamentos confirmados pela análise do espectro de COSY (**Figura 4.57**).

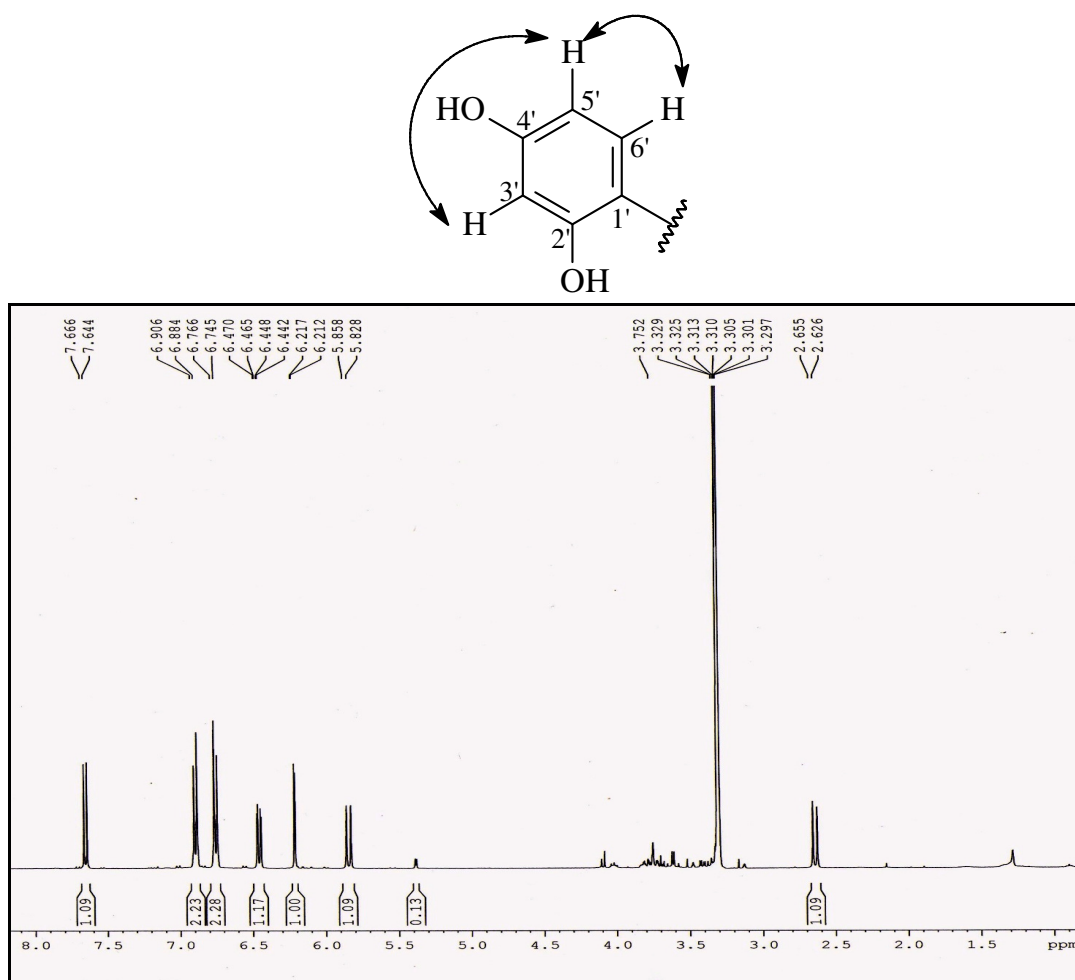


Figura 4.56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (MeOD, 400MHz).

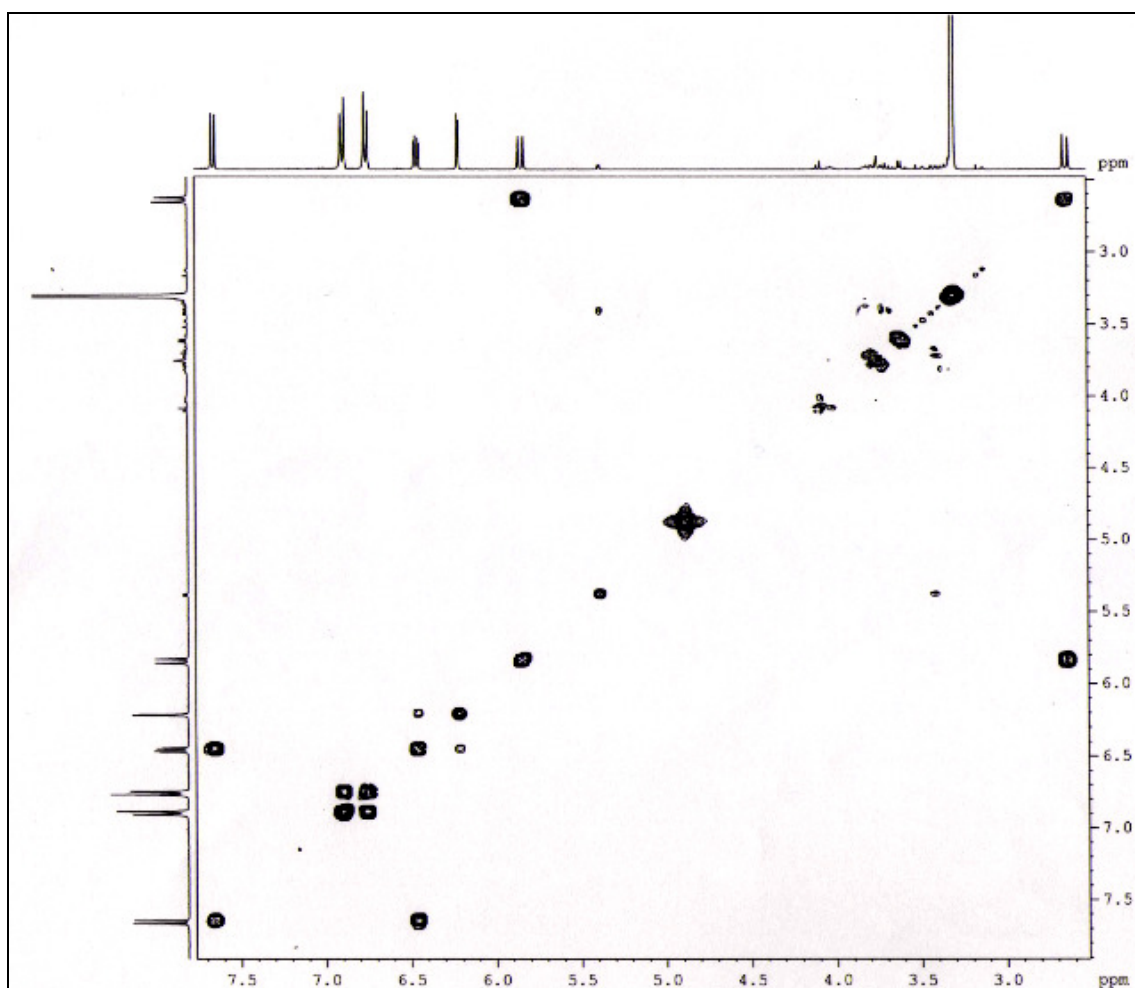
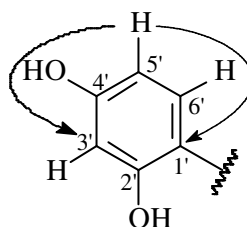


Figura 4.57 - Mapa de contorno do experimento de COSY da substância X (MeOD, 400 MHz).

O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.58**) mostra a correlação do sinal de deslocamento químico do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 com o do carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112,0 (C-5' e 5'''). A análise do mapa de contorno de HMBC (**Figura 4.59**) mostra a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  103,5 atribuído ao C-3'/3''' e  $\delta_{\text{C}}$  114,7 atribuído ao C-1'/1'''.



O mapa de correlações HSQC (**Figura 4.58**) mostrou a correlação dos sinais de hidrogênios em  $\delta_H$  6,21 e  $\delta_H$  7,65 com os dos carbonos em,  $\delta_C$  103,5 (C-3' e C-3'') e  $\delta_C$  130,1 (C-6' e C-6''), respectivamente. A análise do mapa de correlações de HMBC (**Figura 4.59**) mostra as correlações: do sinal do duplete em  $\delta_H$  6,21 com os carbonos  $\delta_C$  112,0 (C-5' e C-5''),  $\delta_C$  114,7 (C-1' e C-1''),  $\delta_C$  165,4 (C-2' e C-2'') e  $\delta_C$  168,3 (C-4' e C-4''), sendo estes dois últimos pertencentes à função fenólica; do duplete em  $\delta_H$  7,65 com os carbonos em  $\delta_C$  165,4 (C-2' e C-2''),  $\delta_C$  168,3 (C-4' e C-4'') e 193,6 (C-9 e C-9''), sendo este característico de uma carbonila. A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 3'/3'' e 6'/6'' do anel A de uma flavona.

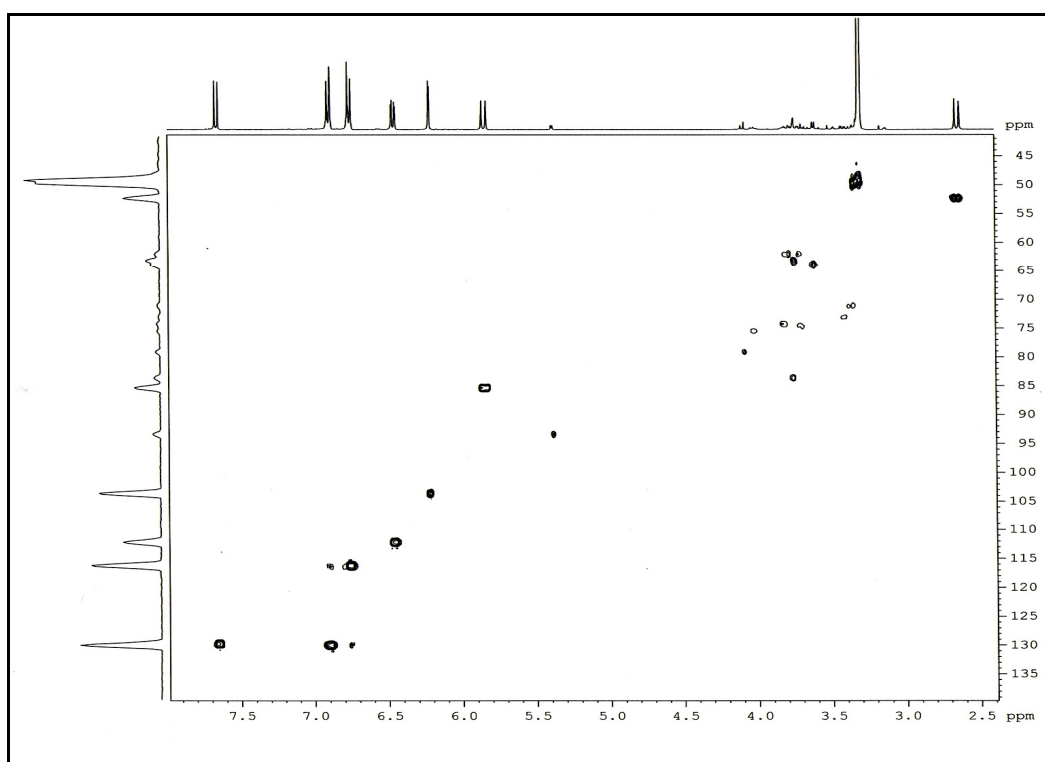
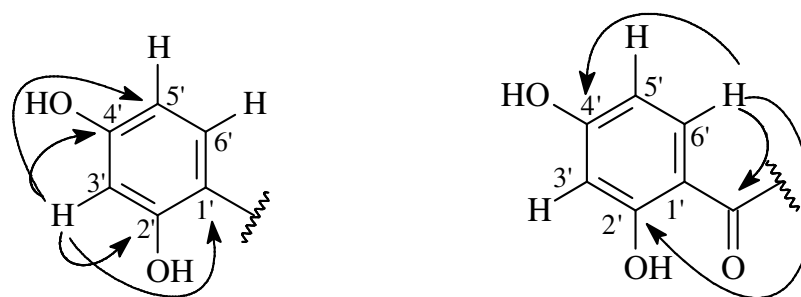


Figura 4.58 - Mapa de contorno de HSQC da substância X (MeOD, 400MHz).

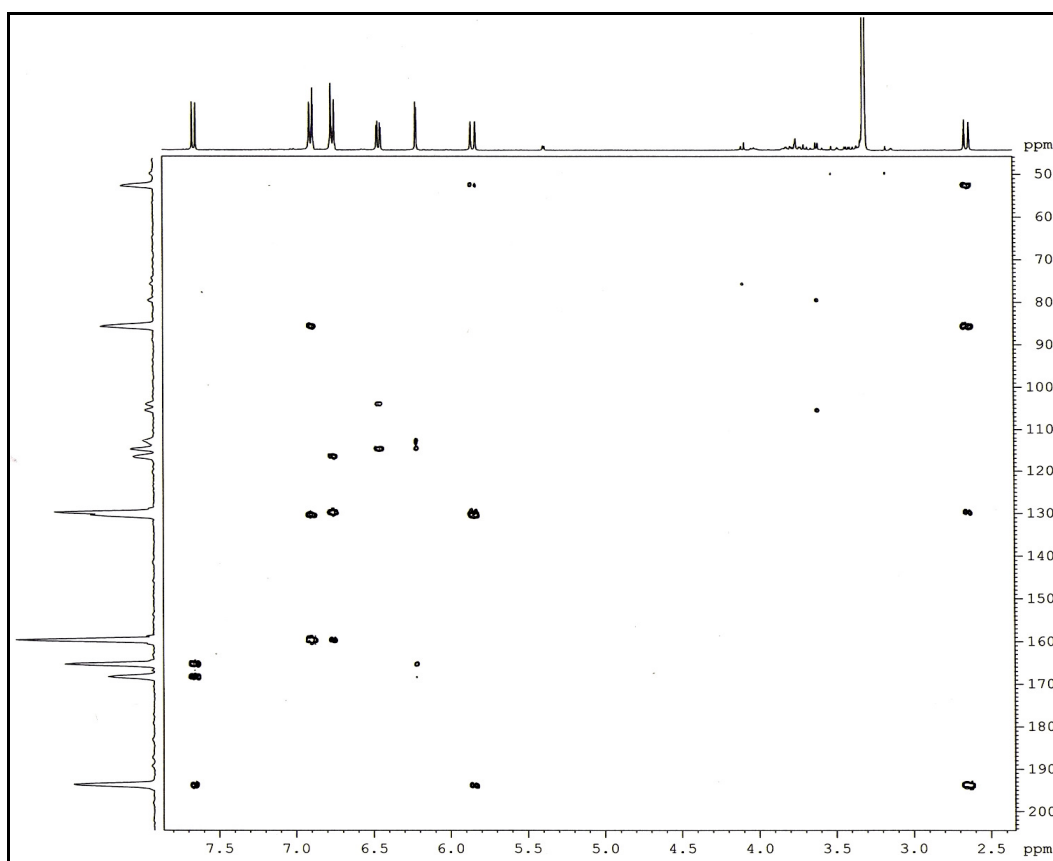
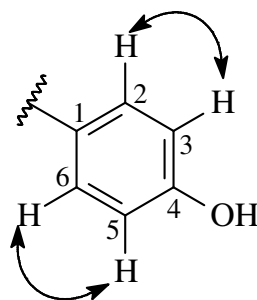


Figura 4.59 - Mapa de contorno de HMBC da substância X (MeOD, 400MHz).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.56**) apresentou também dupletos em  $\delta$  6,90 (2H) ( $J = 8,8$  Hz) e em 6,75 (2H) ( $J = 8,8$  Hz) característicos dos hidrogênios H-2, H-2''/H-6, H-6'' e H-3, H-3''/H-5, H-5'', que ocorre devido a livre rotação do anel aromático que deixam estes hidrogênios quimicamente equivalentes.



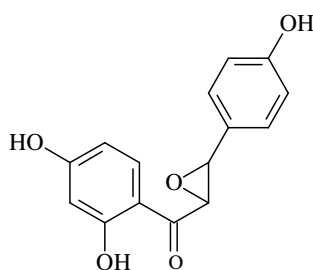
O mapa de contornos HSQC mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 e  $\delta_{\text{H}}$  6,75 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  129,7 (C-2, 2''/6, 6'') e  $\delta_{\text{C}}$  116,3 (C-3, 3''/5, 5''), respectivamente. A análise do mapa de correlações HMBC (**Figura 4.59**) mostra a correlação do sinal do duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  130,1 (C-1, 1''),  $\delta_{\text{C}}$  159,6 (C-4, 4''), este característico de carbono fenólico; e do sinal

em  $\delta_H$  6,75 com os carbonos em  $\delta_C$  129,7 (C-2,2''/6,6'');  $\delta_C$  130,1 (C-3,3''/5,5'') e  $\delta_C$  159,6 (C-4, 4'').



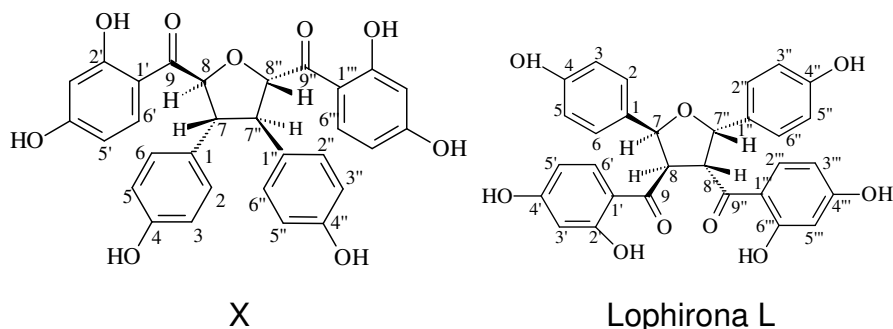
O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 4.56**) apresentou, ainda, um duplete em  $\delta_H$  2,64 ( $J = 11,8$  Hz, H- $\beta$ ) acoplado com um duplete em  $\delta_H$  5,83 ( $J = 11,8$  Hz, H- $\alpha$ ) característico de acoplamento em *trans* (ângulo diedro próximo de  $180^\circ$  entre estes hidrogênios).

O mapa de contornos HSQC (**Figura 4.58**) mostrou as correlações dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_H$  2,64 e  $\delta_H$  5,83 com os dos carbonos em,  $\delta_C$  52,6 (C- $\alpha$ ) e  $\delta_C$  85,7 (C- $\beta$ ), respectivamente. A análise do mapa de contornos HMBC (**Figura 4.59**) mostra a correlação do sinal duplete em  $\delta_H$  2,64 com os dos carbonos em  $\delta_C$  130,1 (C-1,1'') e  $\delta_C$  193,6 (C-9, 9''), este característico de carbono carbonílico; e o sinal duplete em  $\delta_H$  5,83 com os dos carbonos em  $\delta_C$  85,7 (C- $\beta$ );  $\delta_C$  130,1 (C-1,1'') e  $\delta_C$  193,6 (C-9, 9''). Uma vez confirmada a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  2,64 com o carbono em  $\delta_C$  130,1 (C-1) e do sinal  $\delta_H$  5,83 (H- $\alpha$ ) com o carbono carbonílico em  $\delta_C$  193,6, as duas partes da molécula comentadas anteriormente foram ligadas da seguinte maneira, onde foi primeiramente sugerido a presença de um epóxido substituindo a ligação dupla da chalcona.



Entretanto, consultando modelos para atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênios de epóxidos na literatura, foi constatado que o  $\delta_H$  2,64 na posição  $\beta$  encontra-se mais blindado que o usual, sugerindo assim dúvidas com relação à estrutura proposta, e tal hipótese foi confirmada pelo experimento de espectrometria de massas, onde não foi observado o íon  $m/z = 274$  Da, referente a estrutura proposta.

Uma vez que a ocorrência de dímeros em Anacardiaceae é comum foi proposta então uma segunda estrutura, na qual tem-se um dímero em que ocorre simetria entre as duas unidades e foi proposta a seguinte estrutura.



Nesta estrutura proposta, o deslocamento em  $\delta_H$  2,64 refere-se ao hidrogênio ligado em carbono não carbinólico e sofrendo blindagem devido ao efeito anisotrópico do anel aromático ligado ao carbono vizinho é coerente.

No espectro de gNOESY (**Tabela 4.14** e **Figura 4.60**) ao ser irradiado o sinal em  $\delta_H$  5,83 foi observado o incremento relativo ao efeito NOE em  $\delta_H$  6,90 (H-2/6) caracterizando uma relação entre eles *cis*, confirmando a hipótese de uma relação *trans* entre os anéis aromáticos.

Esta estrutura dimérica foi confirmada pelo espectro de massas através do íon  $m/z$  533,2 Da  $[M-H_2O+Na^+]$  e um estudo de fragmentação da mesma é apresentado no **item 4.2.1.10.1**.

Para a substância X isolada no presente trabalho foi proposta a estereoquímica: 7R,8S,7''R,8''S e o nome da substância rel-(7R,8S,7''R,8''S)-tetrahydro-7,7''-bis(4-hidroxifenil)-8,8''-(furandiil)-bis-(2,4-dihidroxifenil), baseado principalmente nos dados de gNOESY e dicrosimo circular (**Item 4.2.1.1.12**) discutido adiante.

Esta molécula é inédita na literatura.

Tabela 4.13 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância X e Lophirona L ((ANURADHA *et al.*, 2006)

| C                | $\delta$ (ppm), J (Hz) |                          |                |                          |
|------------------|------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
|                  | X <sup>a</sup>         | Lophirona L <sup>b</sup> | X <sup>a</sup> | Lophirona L <sup>b</sup> |
| 1 e 1''          | ---                    | ---                      | 130,1          | 131,4                    |
| 2/6 e<br>2''/6'' | 6,90 (d, 8,8)          | 7,40 (d, 8,0)            | 129,7          | 128,6                    |
| 3/5 e<br>3''/5'' | 6,75 (d, 8,8)          | 6,80 (d, 8,0)            | 116,3          | 115,6                    |
| 4 e 4''          | ---                    | ---                      | 159,6          | 157,3                    |
| 1' e 1'''        | ---                    | ---                      | 114,7          | 113,9                    |
| 2' e 2'''        | ---                    | ---                      | 165,4          | 164,9                    |
| 3' e 3'''        | 6,21 (d, 2,0)          | 6,08 (d, 2,0)            | 103,5          | 103,1                    |
| 4' e 4'''        | ---                    | ---                      | 168,3          | 165,7                    |
| 5' e 5'''        | 6,46(dd, 8,8 e<br>2,0) | 6,10 (dd, 8,0 e 2,0)     | 112,0          | 108,0                    |
| 6' e 6'''        | 7,65 (d, 8,8)          | 7,38 (d, 8,0)            | 130,1          | 132,4                    |
| 7 e 7''          | 2,64 (d, 11,8)         | 5,42 (dd, 8,0 e 1,2)     | 52,6           | 83,8                     |
| 8 e 8''          | 5,83 (d, 11,8)         | 4,72 (dd, 8,0 e 1,2)     | 85,7           | 58,7                     |
| 9 e 9''          | ---                    | ---                      | 193,6          | 201,4                    |

<sup>a</sup>MeOD, 400 MHz. Dados retirados do HSQC e HMBC.<sup>b</sup> $^1\text{H}$  (200MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75MHz), Acetona-*d*6.

Tabela 4.14 - Dados obtidos do experimento gNOESY da substância X.

| Hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) irradiado | g-NOESY<br>$\delta_{\text{H}}$   |
|--|----------------------------------|
| H-8 e 8'' (5,83)                             | 2,64 (H-7 e 7'')<br>6,90 (H-2/6) |
| H-7 e 7'' (2,64)                             | 5,83(H8/8'')<br>6,90 (C-2/6)     |

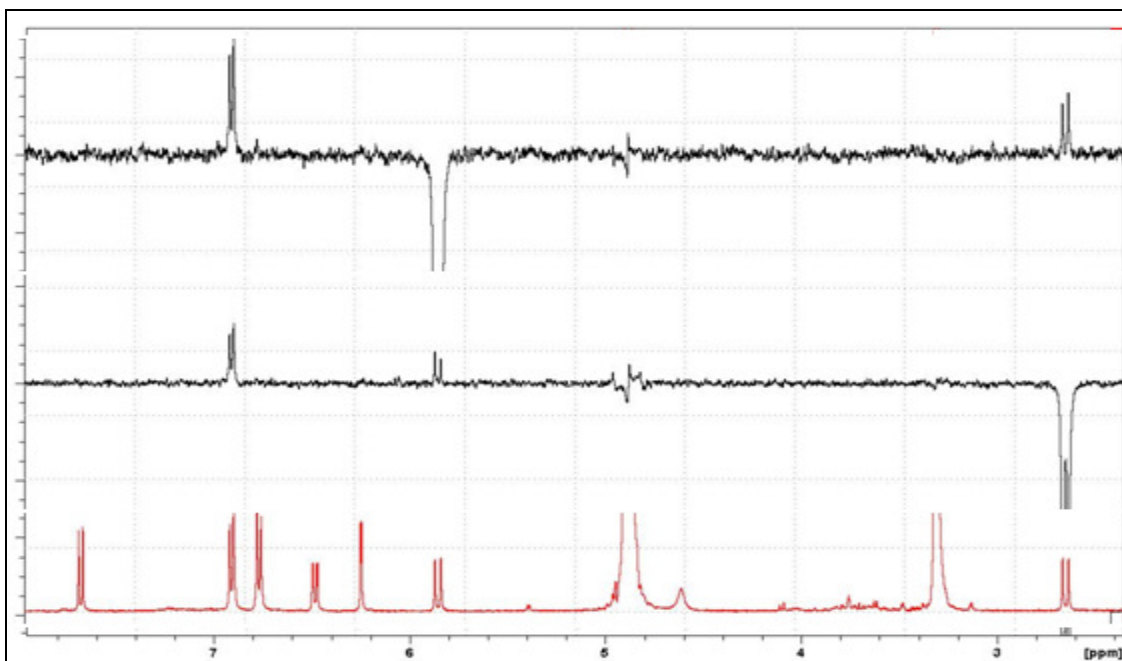


Figura 4.60 - Experimento de gNOESY da substância X.

O espectro de infravermelho, registrado em pastilhas de NaCl (**Figura 4.61**) apresentou bandas de absorções: larga e intensa em  $3353\text{ cm}^{-1}$  referente aos estiramentos axiais de hidroxilas (O-H); de estiramento axial de carbonila alfa beta insaturada (C=O) e C=C de anéis aromáticos em  $1598\text{ cm}^{-1}$  (banda larga), cuja frequência de absorção é baixa devido também a ligação de hidrogênio intramolecular; entre  $2853\text{-}2920$  que são referentes aos estiramentos axiais C-H  $sp^3$ ; na região entre  $1652\text{-}1456\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos; entre  $1247\text{-}1057\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares no plano das ligações C-H  $sp^2$ ; e entre  $885\text{-}666\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos angulares fora do plano (essa região pode definir o padrão de substituição do anel, porém para este composto não foi possível definir o mesmo pela alta complexidade da substância).



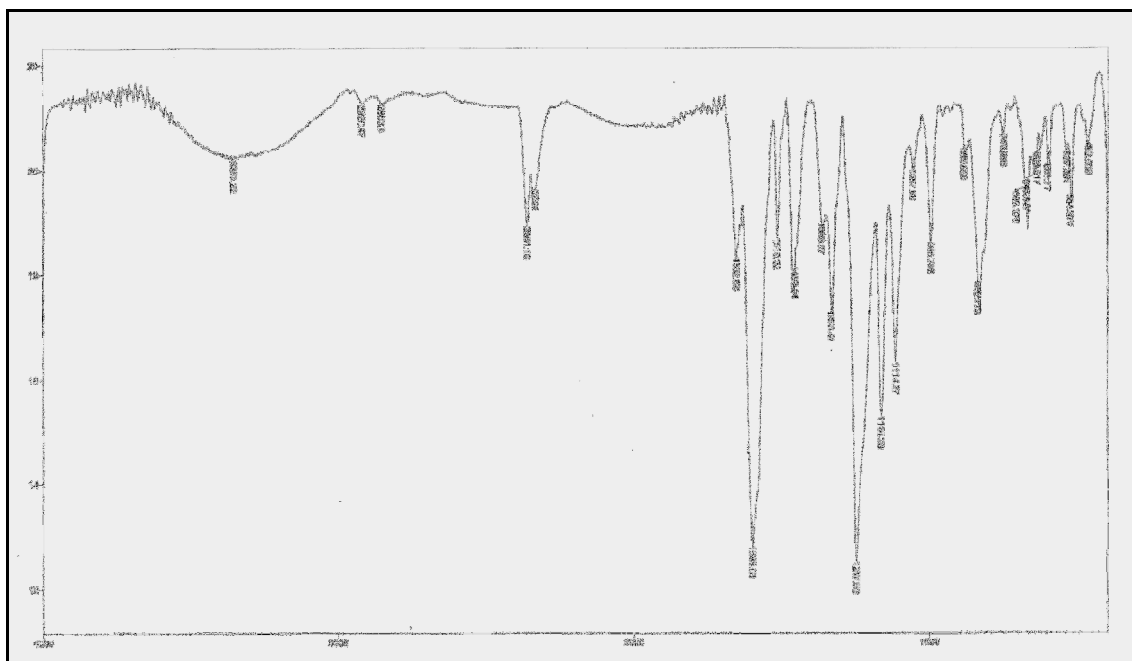


Figura 4.61 - Experimento de infravermelho da substância X.

#### 4.2.1.11- Análise do composto X via ESI-MS

O composto X foi analisado via ESI-MS através de inserção direta para a confirmação de sua massa molecular e estrutural. Foram realizados os experimentos em massa de baixa resolução para elucidação final de sua estrutura e futuramente será necessário a análise do mesmo por massas de alta resolução para publicação do artigo científico contendo o mesmo, uma vez que ele é inédito na literatura.

Após o ajuste de alguns parâmetros de condições experimentais do espectrômetro de massas, tais como, Declustering Potential (4,00), Focusing Potential (382,0), Entrance Potential (12,0) e Collision Energy (32,0) foi realizado um “full scan” entre  $m/z$  500 e 555 Da (**Figura 4.62**).

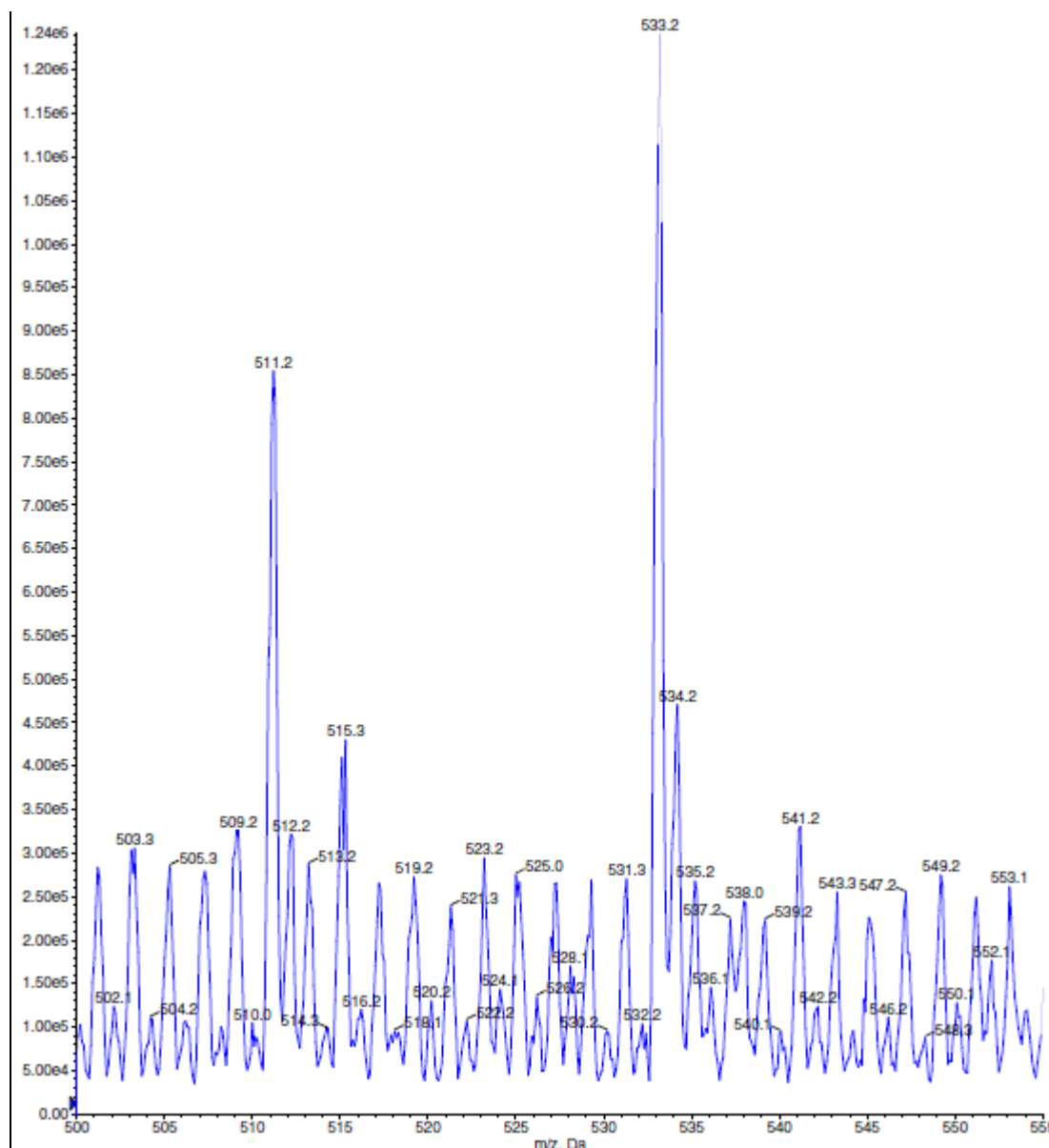


Figura 4.62 - Espectro de massas “full scan” entre  $m/z$  500 e 555 Da da substância X.

Analisando o espectro obtido, dois picos mais intensos são mostrados ( $m/z$  511,2 e 533,2 Da). Partindo-se da proposta estrutural apresentada no item anterior para X, estes picos são referentes à molécula protonada com perda de água e a molécula com a perda de água e com o aduto de sódio, respectivamente.

Assim estes sinais mais intensos foram estudados via MS/MS com o objetivo de confirmar o posicionamento dos substituintes.

Foi dado início ao estudo de MS/MS selecionando o pico mais intenso  $m/z$  533,2 Da ( $M-H_2O+Na$ )<sup>+</sup>, obtendo um espectro de íons produtos com poucas fragmentações, como era esperado pela alta estabilidade da molécula (**Figura 4.63**).

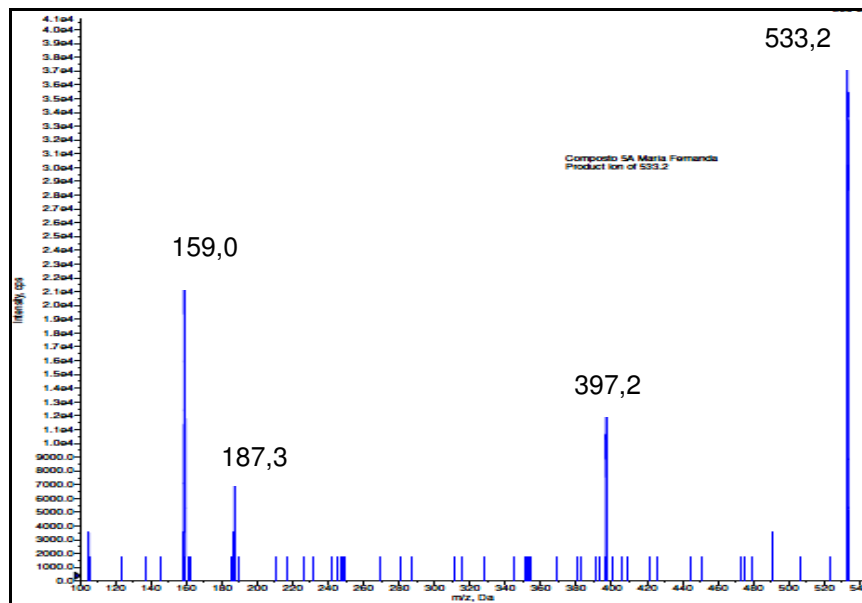


Figura 4.63 - Espectro de MS/MS da substância X para o íon  $m/z$  533,2 Da.

Assim, para os fragmentos apresentados foram realizadas as propostas de fragmentações para cada um, como mostrado na **Figura 4.64**.

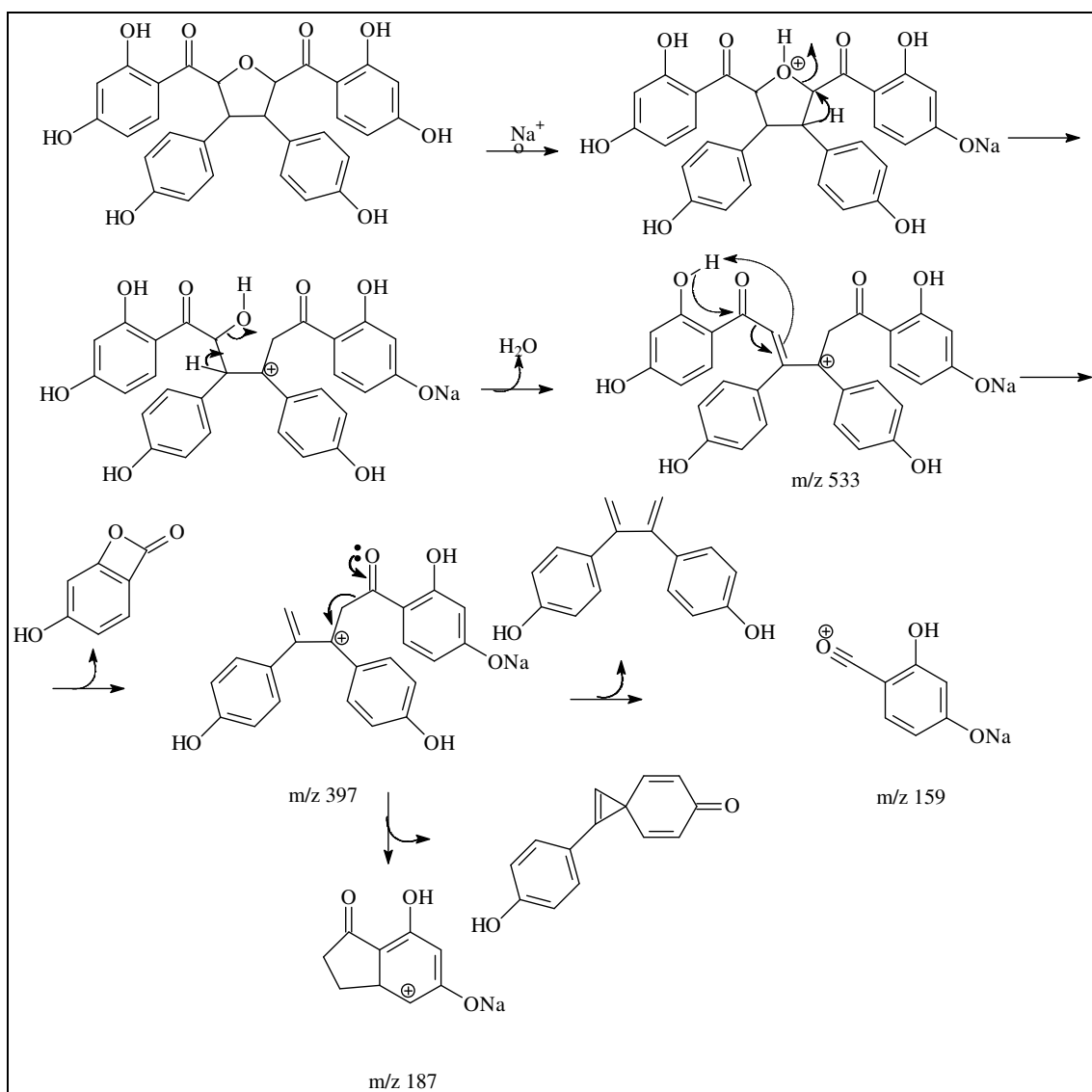


Figura 4.64 - Proposta de fragmentação MS/MS para o íon  $m/z$  532,2 Da da substância X.

Para o segundo pico mais intenso visto no “full scan”,  $m/z$  511,2 Da, foi também realizado o estudo de MS/MS, sendo que neste espectro observou-se mais fragmentações pela ausência de aduto, já que a presença deste fornece uma maior estabilidade ao mesmo (**Figura 4.65**).

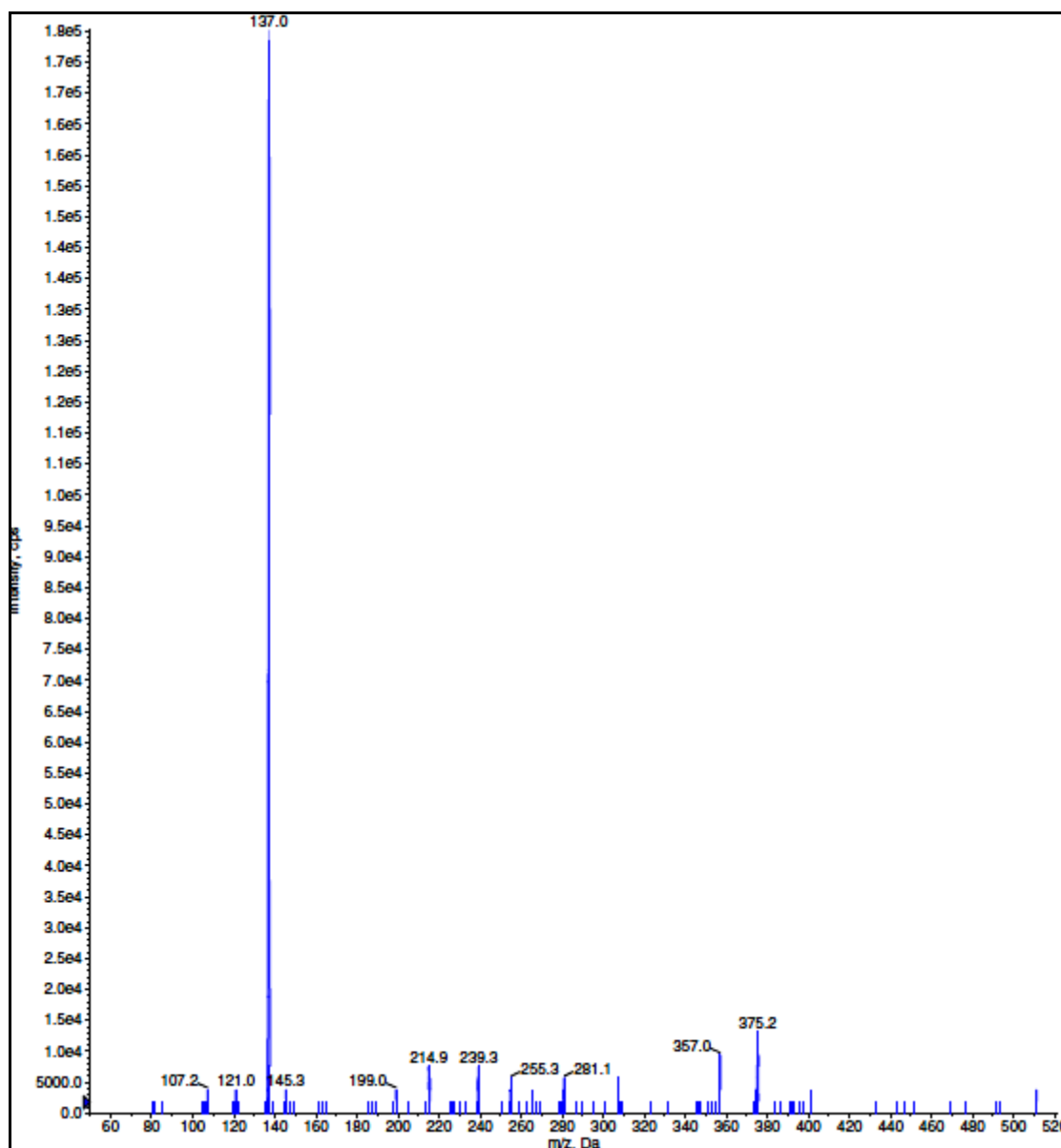


Figura 4.65 - Espectro de MS/MS do íon  $m/z$  511,2 Da da substância X.

A partir dos fragmentos dos íons produtos formados foi também realizado uma proposta de fragmentação (**Figura 4.66**).

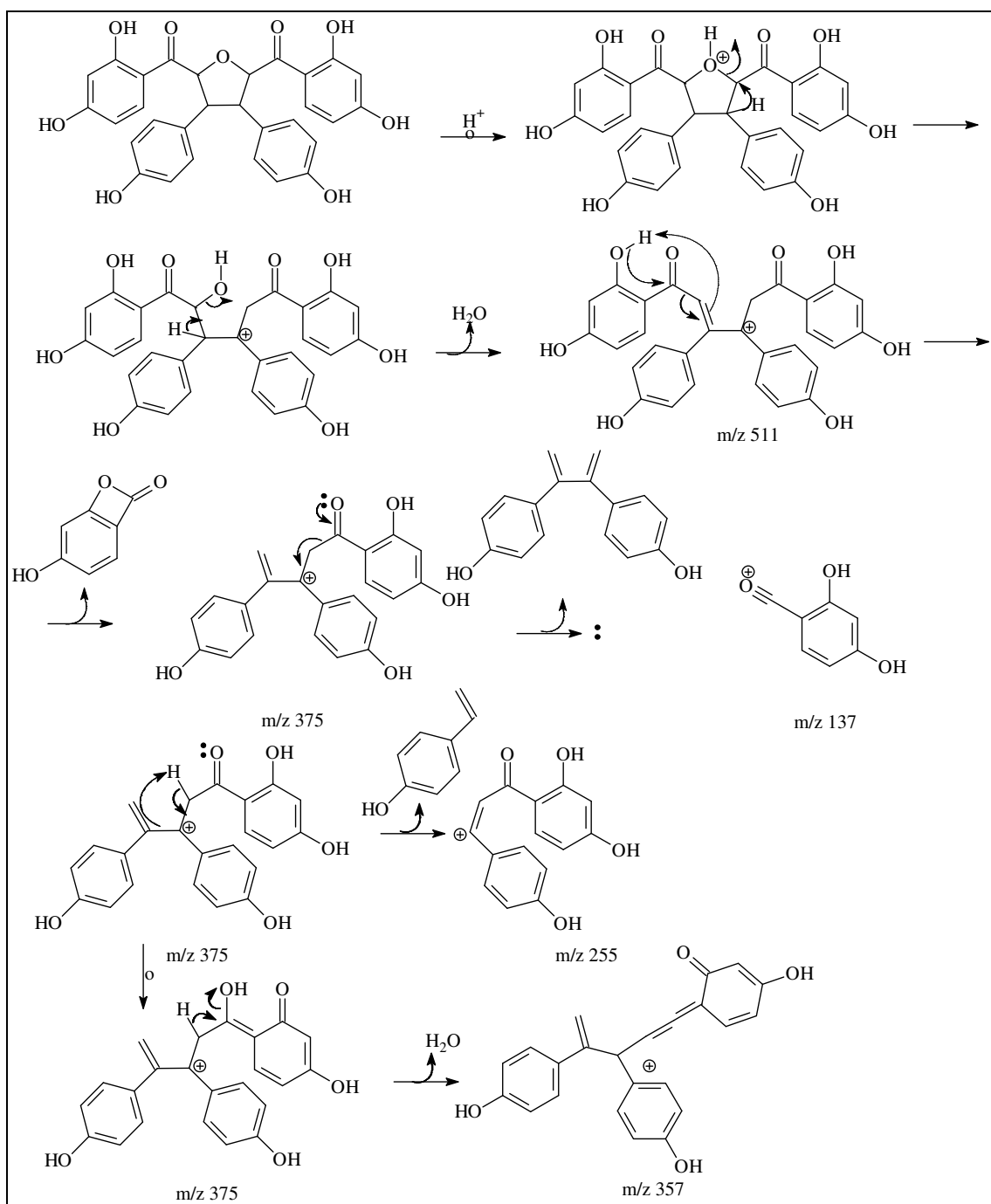
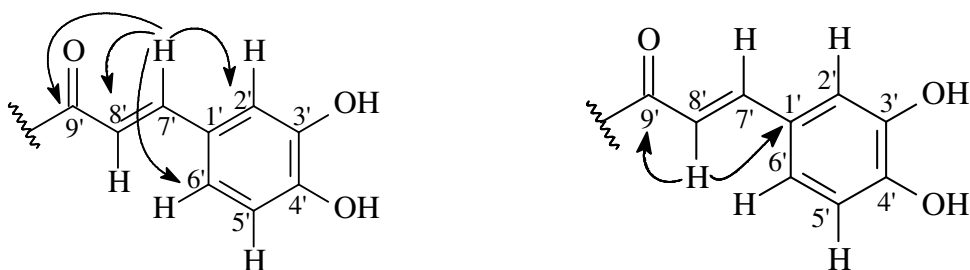


Figura 4.66 - Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  511,2 DA da substância X.

#### 4.2.1.1.11 - Elucidação estrutural da Substância XI

A substância XI foi isolada da fração CGI (p.39) do extrato acetato de etila do caule e dos galhos (**Fluxograma 3.17**, p.39). A substância apresentou-se como sólido amarelo e sua elucidação estrutural foi realizada através de dados de espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 4.67**), HSQC (**Figura 4.68**), HMBC (**Figura 4.69**) COSY (**Figura 4.70**) (**Tabela 4.15**).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância XI (**Figura 4.67**) revelou sinais característicos de um grupo cafeoila devido à presença de dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 ( $J = 16$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,20 ( $J = 16$  Hz), característicos de hidrogênios olefínicos  $\alpha,\beta$  carboxílicos *trans* (H-7' e H-8', respectivamente). O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.68**) apresenta as correlações destes hidrogênios com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  144,5 (C-7') e  $\delta_{\text{C}}$  114,4 (C-8'). A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.69**) mostra as correlações dos sinais: em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 com os dos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  114,4, (C-2' e C-8'),  $\delta_{\text{C}}$  121,7 (C-6') e  $\delta_{\text{C}}$  166,2 (C-9'); em  $\delta_{\text{H}}$  6,20 com os dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  125,9 (C-1') e  $\delta_{\text{C}}$  166,2 (C-9').



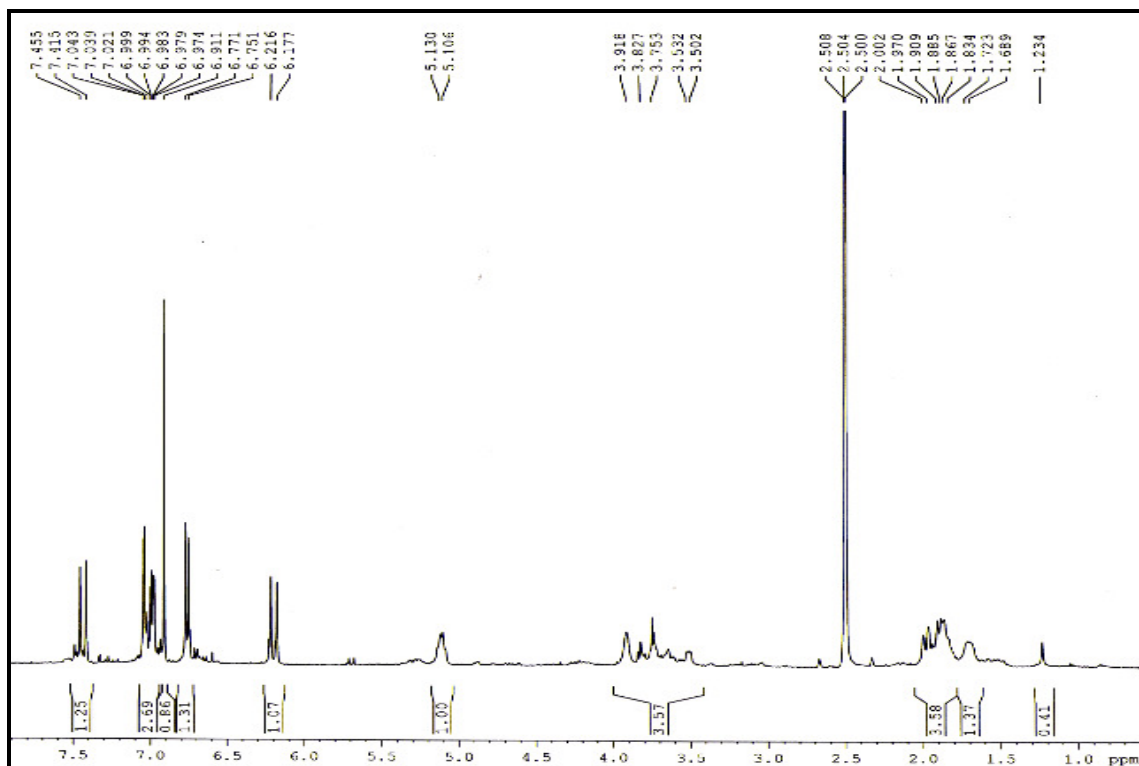


Figura 4.67 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância XI (DMSO, 400MHz).

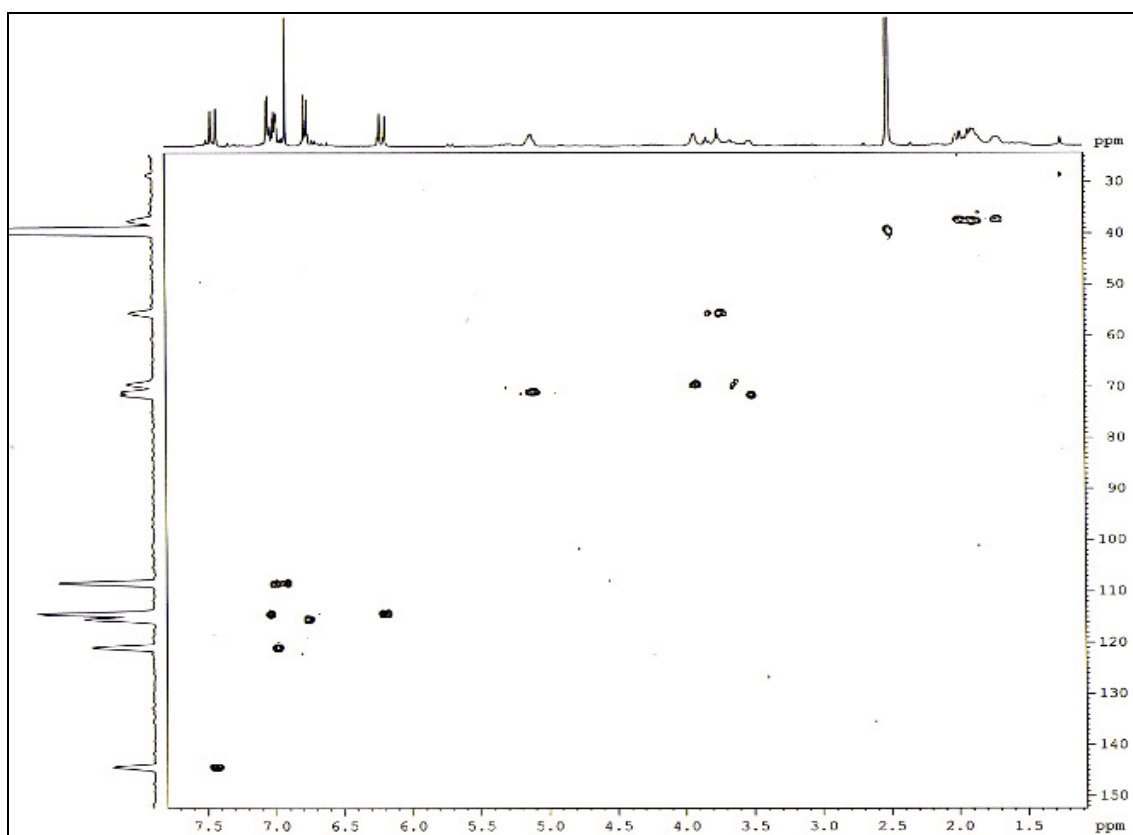


Figura 4.68 - Mapa de contorno de HSQC da substância XI (DMSO, 400MHz).



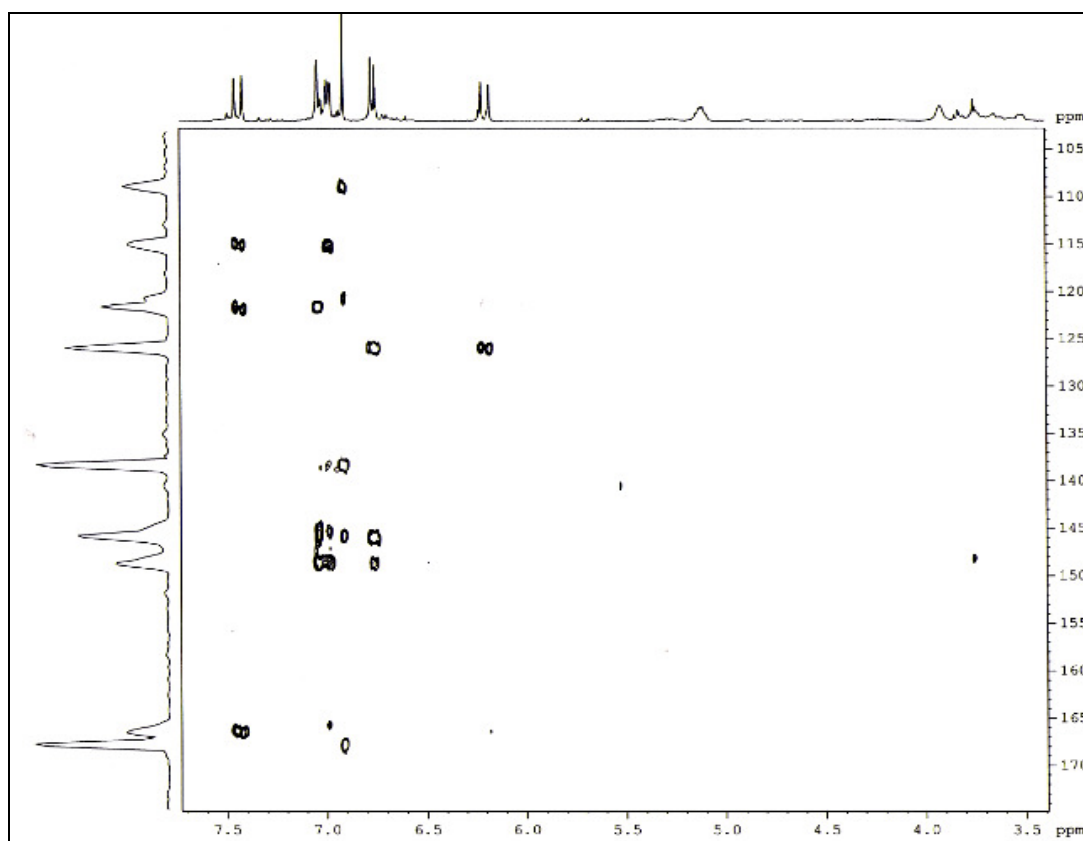
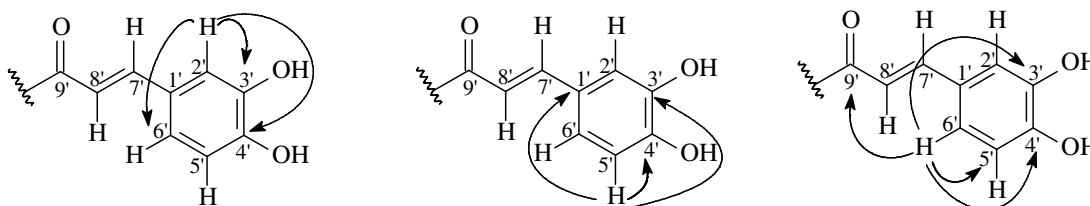
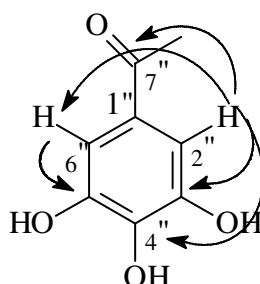


Figura 4.69 - Mapa de contorno de HMBC da substância XI (DMSO, 400MHz).

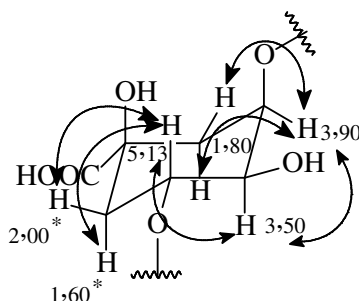
Os sinais correspondentes a hidrogênios ligados a anéis aromáticos dubletos em  $\delta_H$  7,04 ( $J = 2,0$  Hz, H-2') e 6,76 ( $J = 8,0$  Hz, H-5') e o duplo dubleto em  $\delta_H$  6,97 ( $J = 8,0$  e 2,0 Hz, H-6') caracterizam outro sistema de acoplamento na molécula e a unidade cafeoil da substância XI. O mapa de contornos HSQC (**Figura 4.68**) apresenta as correlações destes hidrogênios em  $\delta_H$  7,04 com o do carbono em  $\delta_C$  114,5 (C-2'),  $\delta_H$  6,76 com o do carbono em  $\delta_C$  115,3 (C-5') e o  $\delta_H$  6,97 com o carbono em  $\delta_C$  121,7 (C-6'). A análise do mapa de contornos HMBC (**Figura 4.69**) mostra as correlações dos sinais: em  $\delta_H$  7,04 com os carbonos em  $\delta_C$  121,7 (C-6'),  $\delta_C$  145,5 (C-3') e  $\delta_C$  148,9 (C-4'); em  $\delta_H$  6,76 com os dos carbonos em  $\delta_C$  125,9 (C-1'),  $\delta_C$  145,5 (C-3') e  $\delta_C$  148,9 (C-4'); em  $\delta_H$  6,97 com os dos carbonos em  $\delta_C$  115,3 (C-5'),  $\delta_C$  145,5 (C-3'),  $\delta_C$  148,9 (C-4') e  $\delta_C$  166,2 (C-9').



Foram observados ainda neste espectro sinais que caracterizam uma unidade de ácido gálico, como singlete em  $\delta_H$  6,91 (2H, H-2''/6'') característicos de hidrogênios quimicamente equivalentes. O mapa de contorno HSQC (**Figura 4.68**) apresenta a correlação destes hidrogênios com os dos carbonos em  $\delta_C$  108,5 (C-2''/C-6''). A análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 4.69**) mostra a correlação do sinal destes hidrogênios com os dos carbonos em  $\delta_C$  108,5 (C-2''/6''),  $\delta_C$  145,5 (C-3''/C-5''),  $\delta_C$  139,9 (C-4'') e  $\delta_C$  167,6 atribuído a carboxila (C-7'').



Através do espectro de COSY (**Figura 4.69**) é possível observar outro sistema de spin que caracteriza o ácido quínico presente na molécula XI, assim, é possível observar as correlações em  $\delta_H$  5,13 (ddd largo,  $J$  pequeno caracterizando sua posição equatorial, 1H, H-3) com os sinais de hidrogênios em  $\delta_H$  3,50 (1H, H-4) e  $\delta_H$  1,60,  $\delta_H$  2,00 (2H, multipletos centrados nestes deslocamentos, H-6 $\alpha$  e  $\beta$ ). O deslocamento em  $\delta_H$  5,13 também caracteriza a ligação entre a unidade quínica da molécula com uma carboxila nesta posição e também ocupando a posição axial. Observa-se também que  $\delta_H$  3,50 (1H, H-4); apresenta acoplamento com o hidrogênio com o múltiplo centrado em  $\delta_H$  3,90 (1H, H-5) e este último com multipletto centrado em  $\delta_H$  1,80 (2H, H-2).

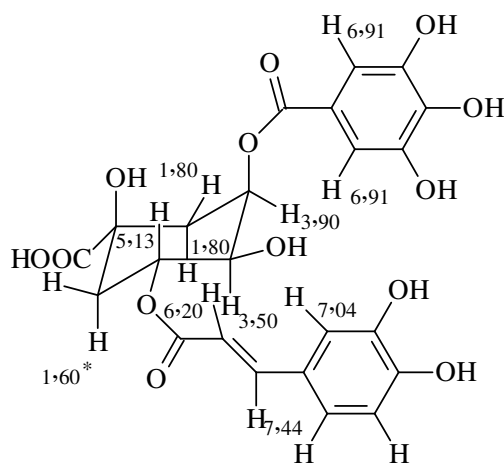


Através do mapa de contorno HSQC (**Figura 4.68**) foi possível correlacionar os sinais de hidrogênios descritos acima com os dos respectivos carbonos, assim, os sinais: em  $\delta_H$  5,13 se correlacionou com o do carbono em  $\delta_C$  70,9 (C-5);  $\delta_H$  3,90

correlacionou com o do carbono em  $\delta_C$  69,6 (C-3), o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  3,50 correlacionou-se com o carbono em  $\delta_C$  71,3 (C-4), todos estes característicos de carbonos oximetínicos. Os multipletos centrados em  $\delta_H$  1,60 e  $\delta_H$  2,00 correlacionaram com o do carbono em  $\delta_C$  37,5 e o multiplete centrado em  $\delta_H$  1,80 correlacionou com o carbono em  $\delta_C$  37,6.

Estes dados foram comparados com os do ácido 4-O-galoilclorogênico (MA, J. *et al.* 2003, **Tabela 4.15**), indicando a presença de uma unidade de ácido quínico na estrutura de XI, ligada a galoil e cafeoil, porém em posições diferentes. Tendo em vista que o experimento de HMBC não apresentou correlações dos sinais dos hidrogênios do ácido quínico com as carboxilas de galoil e cafeoil, propõe-se que o cafeoil ocupe a posição 5 (alfa) do ácido quínico uma vez que seus deslocamentos químicos dos hidrogênios são praticamente iguais nas duas estruturas e o galoil ocupa a posição 3 (beta) do ácido quínico. Esta estereoquímica permite que a carbonila e ou a dupla ligação do cafeoil blinde o hidrogênio ligado ao carbono 3 (alfa).

Estes dados levam a estrutura da substância XI como sendo ácido 3-O-galoil-5-cafeoilquínico.



XI

A substância XI foi analisada através de espectrometria de massas e MS/MS no modo negativo (**Figura 4.71**), confirmando a ligação de galoil e cafeoil ao ácido quínico. A **Figura 4.72** apresenta proposta de fragmentação para XI, onde pode-se observar a perda de galoil ou cafeoil que implica que os mesmos não podem estar

ligados entre si, confirmando portanto a estrutura proposta e a massa molecular de XI.

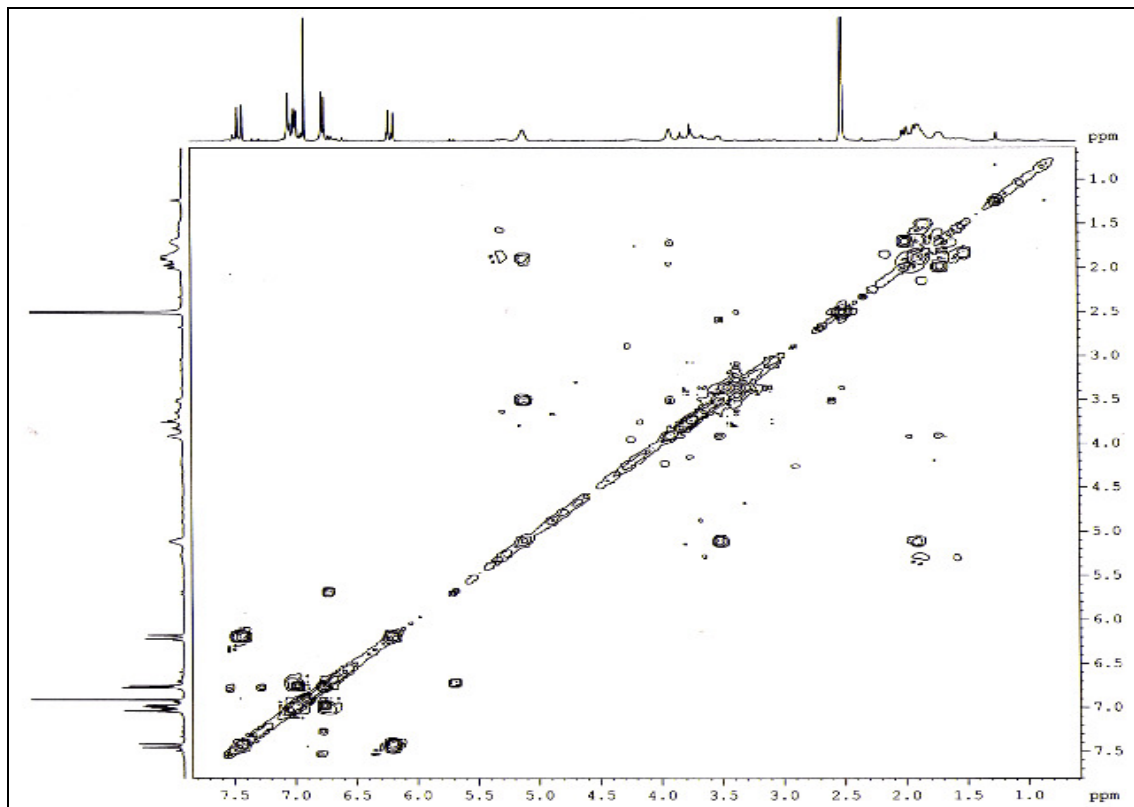


Figura 4.70 - Mapa de contorno do experimento de COSY da Substância XI (DMSO, 400 MHz).

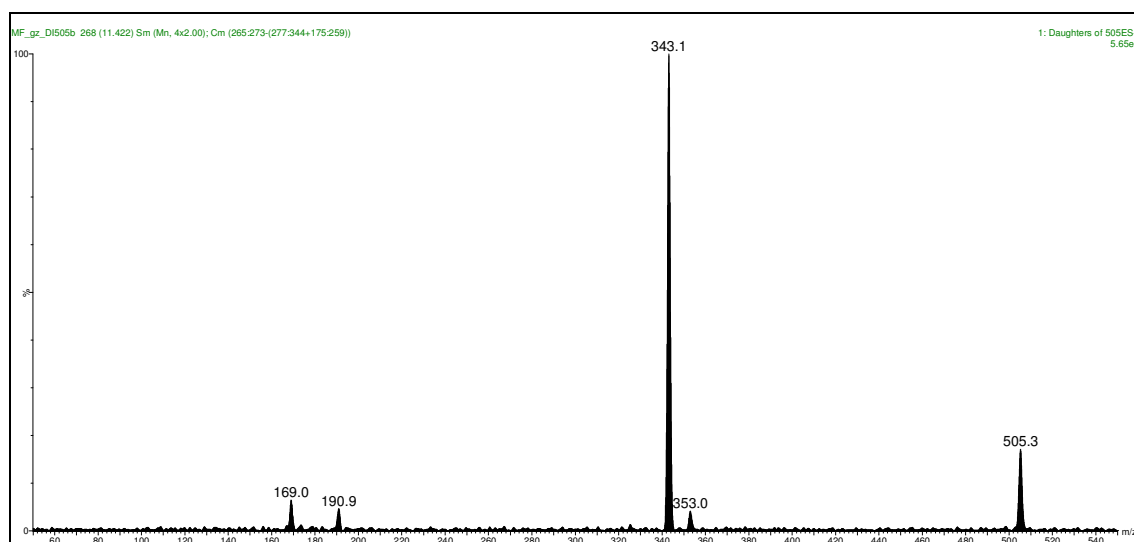


Figura 4.71 - Espectro de MS/MS do íon  $m/z$  505,9 Da da substância XI.

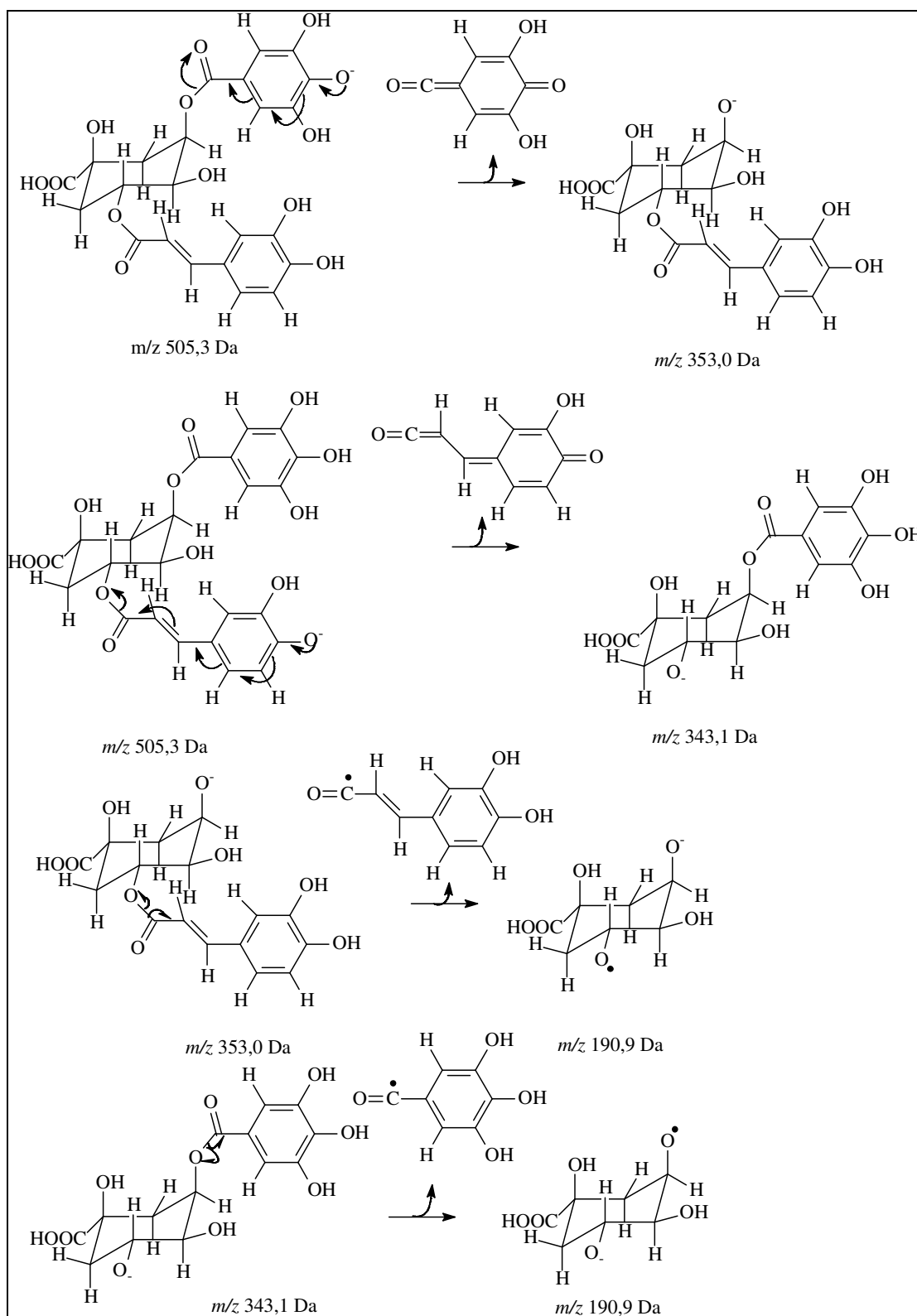


Figura 4.72 - Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  505,9 Da da substância XI.

Tabela 4.15 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância XI e ácido 4-O-galoilclorogênico (MA, J. *et al.*, 2003)

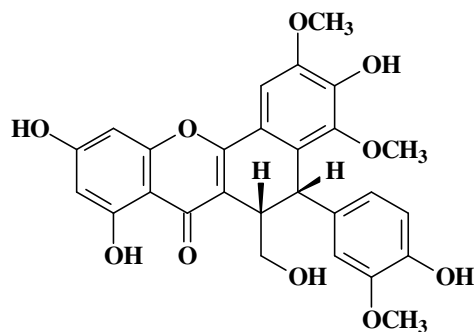
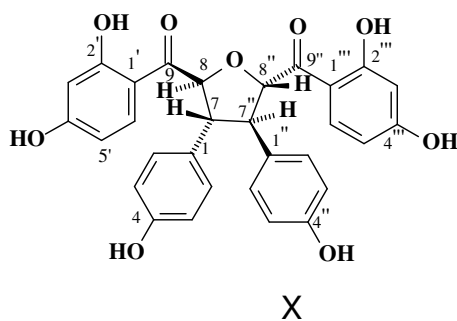
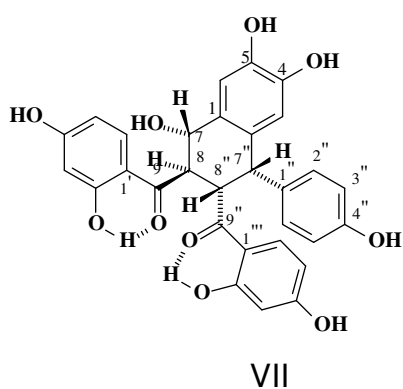
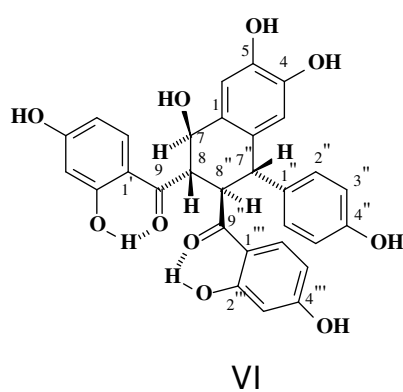
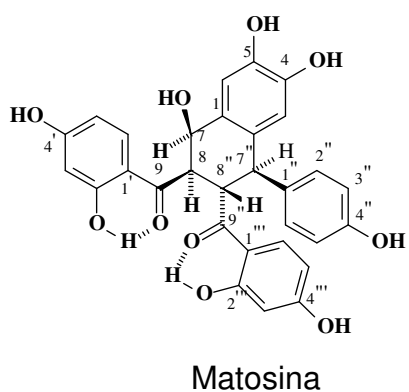
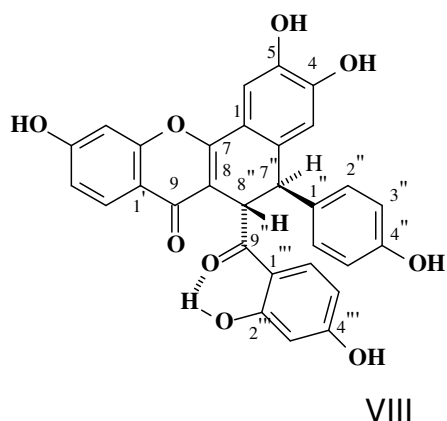
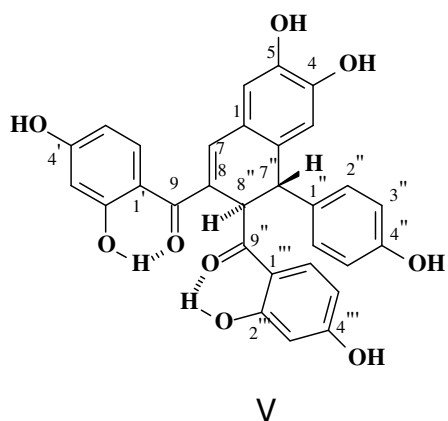
| $\delta$ (ppm), J (Hz) |                      |                    |                             |                             |
|------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| C                      | XI $^1\text{H}$      | XI $^{13}\text{C}$ | Ácido 4-O-galoilclorogênico | Ácido 4-O-galoilclorogênico |
| 1                      | ---                  | 79,0               | ---                         | 76,1                        |
| 2                      | 1,60 e 2,00 (2 m)    | 37,5               | 2,05-2,25 (m)               | 37,6                        |
| 3                      | 3,90 (s)             | 69,6               | 4,39 (m)                    | 69,2                        |
| 4                      | 3,50 (m)             | 71,3               | 5,14<br>(dd, 9,9 e 2,9)     | 76,1                        |
| 5                      | 5,13 (ddd largo)     | 70,9               | 5,75 (m)                    | 68,2                        |
| 6                      | 1,80 (m)             | 37,6               | 2,05-2,25 (m)               | 39,3                        |
| 7                      | ---                  | ND                 |                             | 179,1                       |
| 1'                     | ---                  | 125,9              |                             | 126,4                       |
| 2'                     | 7,04 (d, 2,0)        | 114,5              | 6,98 (d, 2,2)               | 113,8                       |
| 3'                     | ----                 | 145,5              |                             | 145,1                       |
| 4'                     | ---                  | 148,9              |                             | 148,2                       |
| 5'                     | 6,76 (d, 8,0)        | 115,3              | 6,74 (d, 8,2)               | 115,2                       |
| 6'                     | 6,97 (dd; 2,0 e 8,0) | 121,7              | 6,88<br>(dd, 8,2 e 2,2)     | 121,8                       |
| 7'                     | 7,44 (d, 16,0)       | 144,5              | 7,49 (d, 15,8)              | 146,0                       |
| 8'                     | 6,20 (d, 16,0)       | 114,4              | 6,17 (d, 15,8)              | 113,6                       |
| 9'                     | ---                  | 166,2              |                             | 167,3                       |
| 1''                    | ---                  | 120,9              |                             | 120,1                       |
| 2''                    | 6,91 (s)             | 108,5              | 7,10 (s)                    | 109,1                       |
| 3''                    | ---                  | 145,5              |                             | 145,5                       |
| 4''                    | ---                  | 139,9              |                             | 138,6                       |
| 5''                    | ---                  | 145,5              |                             | 145,4                       |
| 6''                    | 6,91 (s)             | 108,5              | 7,10 (s)                    | 109,1                       |
| 7''                    | ---                  | 167,6              |                             | 166,7                       |

<sup>a</sup>DMSO, 400 e 600 MHz. Dados obtidos pelo HSQC e HMBC.<sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) e 100 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

#### 4.2.1.1.12 - Determinação da configuração absoluta de V-X

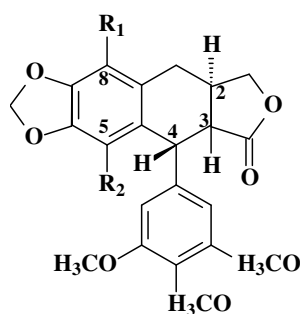
A configuração absoluta de V-VIII foi determinada baseado na regra dos quadrantes de compostos com carbonos benzílicos assimétricos (DE ANGELIS & WILDMAN, 1969), o modelo (-)-(5*S*,6*S*)-5,6-dihidro-3,8,10-trihidroxi-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-hidroximetil-2,4-dimetoxi-7*H*-benzo[*c*]xanthen-7-one (VIIa) e (2*R*,3*S*,4*S*)-2-hidroximetil-5-metoxi-6,7-metilenodioxo-4-(3',4',5'-trimetoxi-fenil)-1,2,3,4-ácido tetrahidronaftóico lactônico (VIIIa) (ARIMOTO & NISHIBE, 1996). A aplicação da regra dos quadrantes para o composto modelo VIIa e VIIIa em que o sinal na curva de dicroísmo circular (DC) em 268 é negativo, implica na estereoquímica absoluta no carbono 7''*S*. Como o composto VIII mostra sinal positivo para este valor na curva de DC, a estereoquímica do mesmo deve ser 7''*R*. A estereoquímica relativa deste composto foi determinada usando a constante de acoplamento entre os hidrogênios destes carbonos e experimento de gNOESY como sendo *trans* entre 7''-8'', o que leva a estereoquímica absoluta em 8''*S* para o carbono 8''.

Os compostos V-VII apresentam valores negativos de DC em aproximadamente 268, levando a estereoquímica absoluta dos carbonos 7''*S*. A estereoquímica absoluta dos demais carbonos foram obtidas através da relação entre o hidrogênio deste carbono e dos demais. Assim os compostos V-VII têm como estereoquímicas absolutas V: 7''*S*,8''*R*, VI: 7''*R*,8''*S*,7''*S*,8''*R* e VII: 7''*S*,8''*R*,7''*S*,8''*S*. A comparação destas estereoquímicas e o baixo valor negativo do  $[\alpha]_D$  de matosina, permite propor para ela a configuração absoluta: 7''*R*,8''*R*,7''*R*,8''*S*. A substância IX não apresenta carbono assimétrico, portanto, não apresenta atividade ótica. A substância X apresenta os carbonos 7, 7'', 8 e 8'' assimétricos com estereoquímicas iguais entre si e portanto apresenta atividade ótica.



(-)-(5*S*,6*S*)-5,6-dihidro-3,8,10-trihidroxi-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-hidroxi-metil-2,4-dimetoxi-7*H*-benzo[*c*]xanthen-7-one (VIIa).





(2R,3S,4S)-2-hidroxi-metil-5-metoxi-6,7-metilenodioxi-4-(3',4',5'-trimetoxi-fenil)-1,2,3,4-ácido tetrahidronaftóico lactônico (VIIIa).

Tabela 4.16 - Dados de  $[\alpha]_D^*$  e Dicroísmo circular (nm) de V-X

| Subst.              | UV $\lambda$ nm ( $\epsilon$ )             | $[\alpha]_D^*$       | CD $\lambda$ nm $[\theta]$ |            |            |            |                |            |            |
|---------------------|--|----------------------|----------------------------|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|
| <b>VII</b>          | 205,<br>225ombro,<br>278,316               | -46,18               | 210<br>neg                 | 224<br>pos | 239<br>neg | 268<br>neg | 298<br>pos     | 338<br>neg |            |
| <b>VI</b>           | 210,<br>225ombro,<br>280, 318              | -15,78               | 206<br>neg                 | 224<br>neg | 246<br>pos | 268<br>neg | 286<br>pos     | 338<br>neg |            |
| <b>Matosina</b>     |  | -2.00 <sup>#</sup>   |                            |            |            |            |                |            |            |
| <b>VIII</b>         | 215,<br>225ombro,<br>270, 288,<br>302, 360 | +1,56                | 206<br>neg                 | 220<br>pos | 236<br>neg | 260<br>pos | 284<br>pos     | 320<br>pos | 344<br>neg |
| <b>V</b>            | 202,<br>220ombro,<br>278, 320,<br>380      | -8,42                |                            |            | 232<br>pos | 254<br>neg | 278<br>pos     | 326<br>neg | 374<br>neg |
| <b>Urundevina C</b> |  | ND                   |                            |            |            |            |                |            |            |
| <b>VIIa</b>         | 271, 365                                   | -43,5 <sup>**</sup>  |                            |            |            | 261<br>neg | 298<br>zero    | 322<br>neg |            |
| <b>VIIIa</b>        |  |                      |                            |            |            |            | 280/290<br>Pos |            |            |
| <b>IX</b>           |  | 0                    |                            |            |            |            |                |            |            |
| <b>X</b>            |  | -37,5 <sup>***</sup> |                            |            |            |            |                |            |            |

\* $[\alpha]_D$ : V, VII, VIII = MeOH, c: 0,001; VI = Acetona.\*\*  $[\alpha]_{Hg}$  = MeOH, c: 0.1.

\*\*\* $[\alpha]_D$ : X = EtOH c: 1.

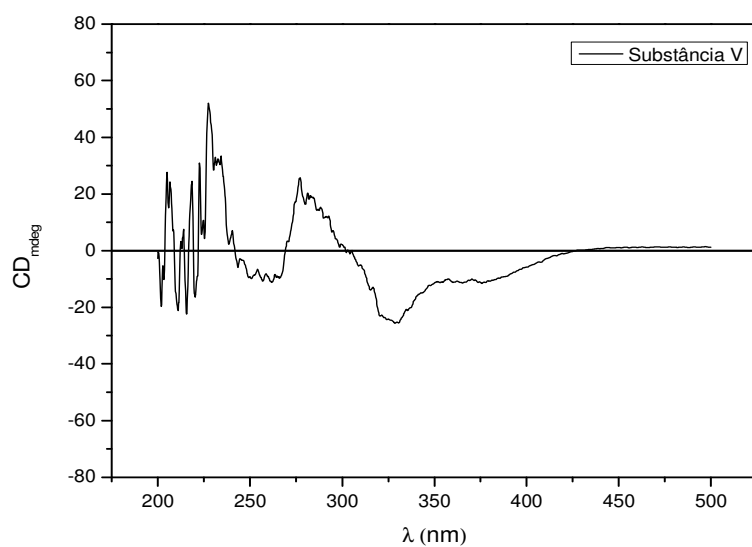


Figura 4.73 - Espectro de dicroísmo circular da substância V (MeOH).

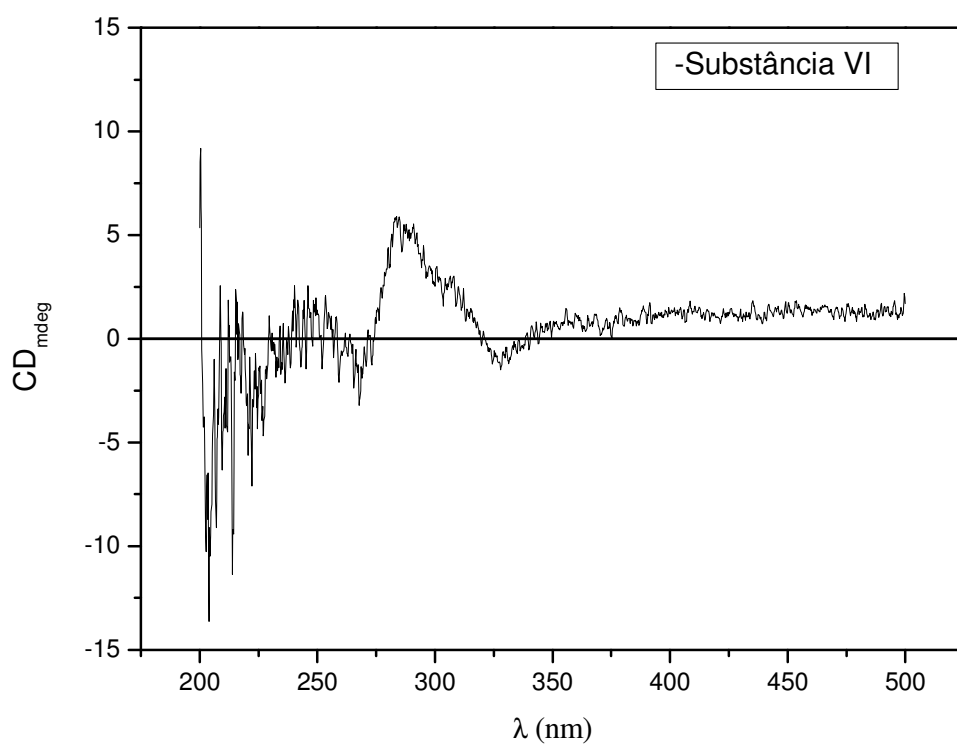


Figura 4.74 - Espectro de dicroísmo circular da substância VI (MeOH).

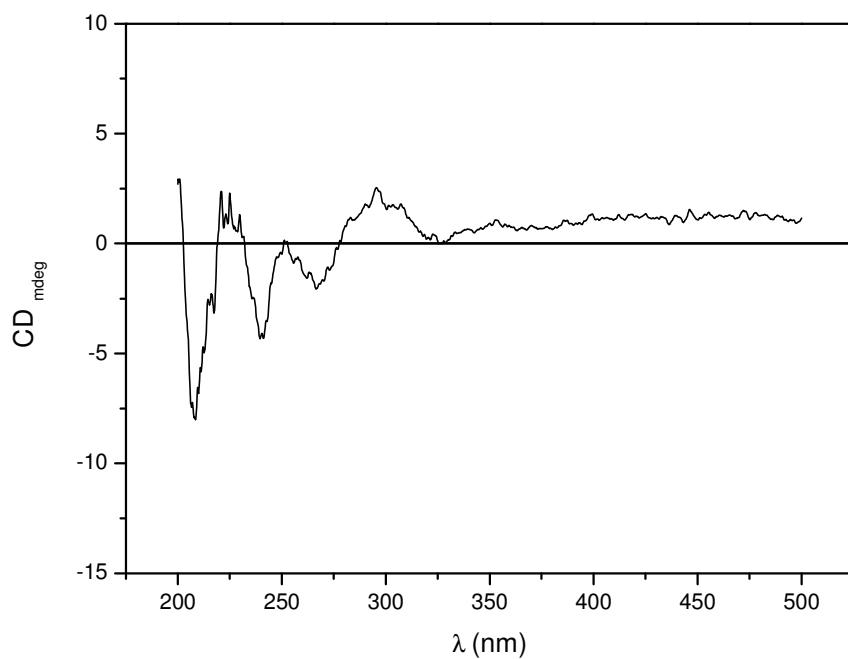


Figura 4.75 - Espectro de dicroísmo circular da substância VII (MeOH).

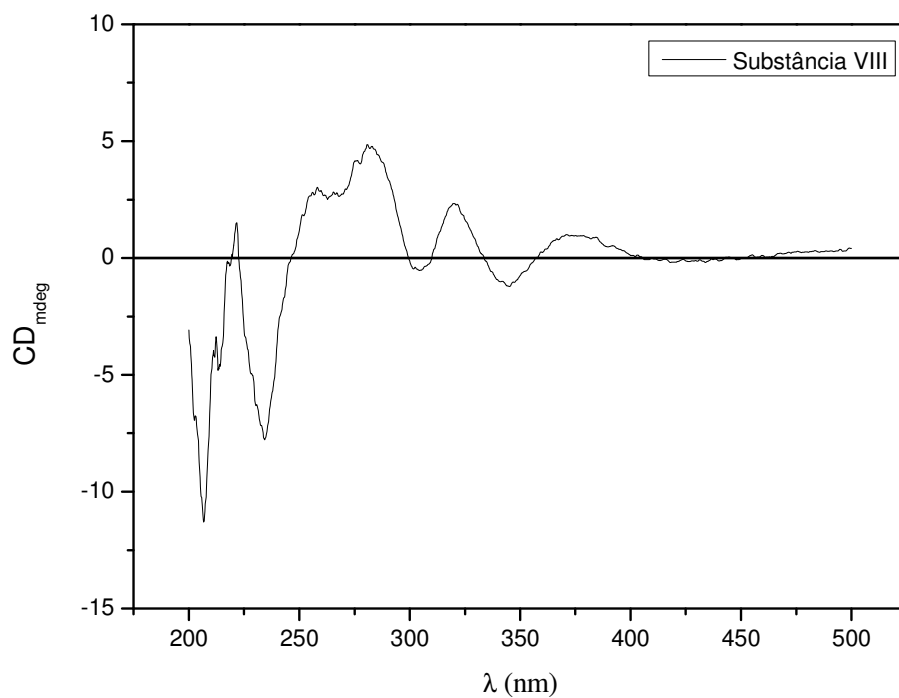


Figura 4.76 - Espectro de dicroísmo circular da substância VIII (MeOH).

### 4.3 - Atividades Biológicas

#### 4.3.1 - Ensaio biológico com as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*

##### 4.3.1.1 - Efeito dos extratos brutos e frações de *A. graveolens* nos ensaios por ingestão em operárias de *A. sexdens rubropilosa*

Os extratos etanólicos das folhas (FV), raiz (RV), pecíolo (GFV) e caule (CGV) de *A. graveolens* foram ensaiados sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no **item 3.10.1** (p. 40).

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.

Analisando os dados obtidos nos ensaios com os extratos etanólicos de *A. graveolens* (**Gráfico 4.1 e Tabela 4.17**), observou-se que os extratos FV e GFV causaram mortalidade superior a 50% ( $S_{50}$ ) entre o 6° e 8° dia de experimento.

Os extratos da raiz (RV) e do caule (CGV) causaram mortalidade superior a 50% ( $S_{50}$ ) dos indivíduos no 3° e 6° dia do experimento, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou esta mortalidade entre o 10° e 14° dia. Portanto, os extratos da raiz e do caule de *A. graveolens* possuem ação sobre a sobrevivência média das formigas cortadeiras ( $S_{50}$ , **Gráfico 4.1 e Tabela 4.17**), pois suas sobrevivências médias não estão próximas ao controle. Por este motivo estes extratos etanólicos foram particionados para a busca de possíveis substâncias com potencial inseticida.

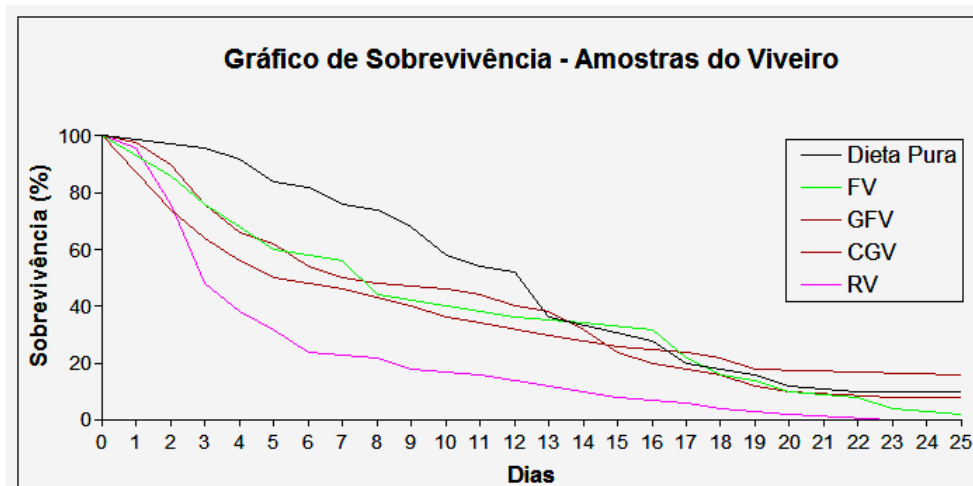


Gráfico 4.1 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos etanólicos de *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL.

Tabela 4.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL

| Tratamento          | % acumulada de mortalidade por dia |    |    |    |    |    |    |    |    |     | Md * |
|---------------------|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|------|
|                     | 1                                  | 2  | 3  | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21 | 25  |      |
| Controle Dieta Pura | 0                                  | 0  | 4  | 18 | 26 | 42 | 64 | 80 | 88 | 90  | 13a  |
| FV                  | 0                                  | 14 | 24 | 42 | 56 | 60 | 66 | 78 | 90 | 98  | 8b   |
| RV                  | 4                                  | 24 | 52 | 76 | 78 | 82 | 88 | 94 | 98 | 100 | 3b   |
| CGV                 | 0                                  | 26 | 36 | 52 | 54 | 64 | 72 | 76 | 84 | 86  | 5b   |
| GFV                 | 2                                  | 10 | 24 | 46 | 52 | 54 | 64 | 82 | 90 | 92  | 7b   |

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

As frações obtidas do particionamento do extrato bruto etanólico da raiz de *A. graveolens* (item 3.5, p.25) foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* cuja metodologia foi descrita no item 3.10.1 (p. 40).

Entre os resultados das frações, hexânica (RVH), acetato de etila (RVACT) e a hidroalcoólica (RVAQ) (Tabela 4.18 e Gráfico 4.2), a fração com melhor resultado inseticida foi a RVH que apresentou  $S_{50}$  entre o 17<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia, enquanto o controle não apresentou  $S_{50}$ .

Embora os ensaios perante a formiga cortadeira da fração RVACT tenha apresentado uma mortalidade de  $S_{50}$  entre o 17<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia, esta foi escolhida para o

tabalho devido a sua atividade significativa perante o fungo simbiote (**item 4.3.2.1**, p.166).

Tabela 4.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de raízes de *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL

| Tratamento          | % acumulada de mortalidade por dia |   |   |    |    |    |    |    |    |    | Md * |
|---------------------|------------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|------|
|                     | 1                                  | 2 | 3 | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 |      |
| Controle Dieta Pura | 0                                  | 6 | 6 | 8  | 10 | 10 | 10 | 10 | 12 | 20 | 25a  |
| RVH                 | 0                                  | 0 | 0 | 4  | 6  | 16 | 22 | 38 | 74 | 94 | 19b  |
| RVACT               | 0                                  | 0 | 2 | 4  | 4  | 10 | 28 | 42 | 58 | 64 | 19b  |
| RVAQ                | 0                                  | 2 | 2 | 10 | 12 | 12 | 16 | 16 | 24 | 30 | 30b  |

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

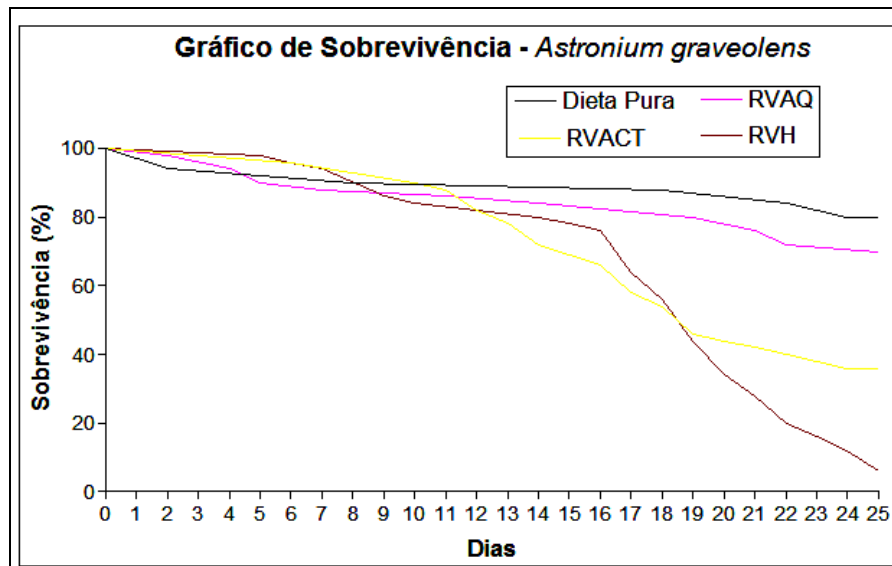


Gráfico 4.2 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de raízes de *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL.

As frações obtidas do particionamento do extrato bruto etanólico do caule (CGV) de *A. graveolens* (**Item 3.6**, p. 35) foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* cuja metodologia foi descrita no **item 3.10.1** (p. 40). A fração CGVACT (**Gráfico 4.3 e Tabela 4.19**) apresentou o melhor resultado quando comparado as outras frações da caule/galhos, visto a proximidade de  $S_{50}$  obtida e o controle da dieta. Esta fração também apresentou um bom resultado perante a formiga sendo, portanto, foi alvo de estudo para a busca de

possíveis substâncias com ação inseticida, já que há possibilidade de alguma substância estar inibindo a ação de outra, não se observando assim a atividade.

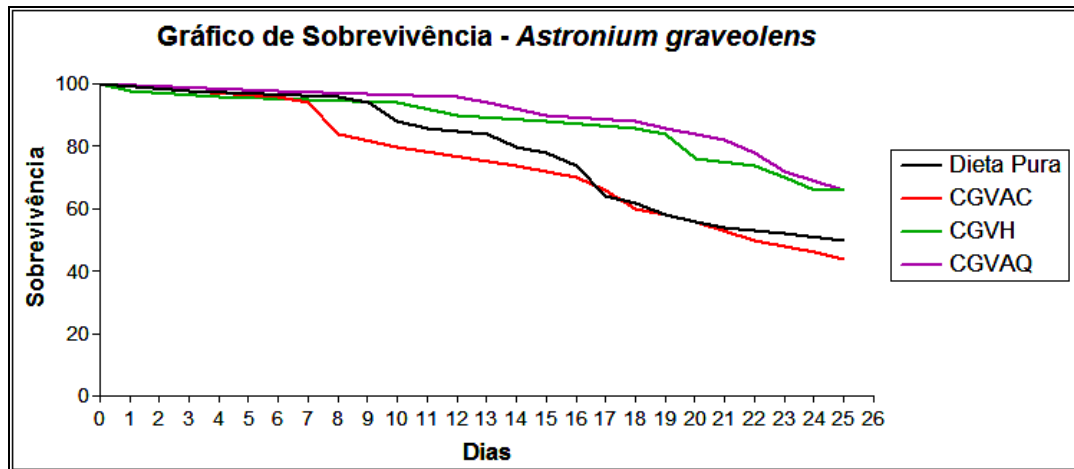


Gráfico 4.3 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de caule de *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL.

Tabela 4.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com frações do extrato de caule de *A. graveolens* nas concentrações de 2 mg/mL

| Tratamento          | % acumulada de mortalidade por dia |   |   |   |    |    |    |    |    |    | Md * |
|---------------------|------------------------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|------|
|                     | 1                                  | 2 | 3 | 6 | 8  | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 |      |
| Controle Dieta Pura | 0                                  | 0 | 2 | 2 | 4  | 12 | 20 | 36 | 46 | 50 | 25a  |
| CGVH                | 2                                  | 2 | 2 | 4 | 4  | 6  | 10 | 12 | 24 | 34 | >25a |
| CGVACT              | 0                                  | 0 | 2 | 4 | 16 | 20 | 26 | 34 | 44 | 56 | 22a  |
| CGVAQ               | 0                                  | 0 | 0 | 2 | 2  | 2  | 6  | 10 | 18 | 34 | >25b |

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

### 4.3.1.2 Efeito das substâncias de *A. graveolens* nos ensaios por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

As substâncias isoladas (itens 3.5.1 e 3.6.1) do extrato RVACT e CGVACT de *A. graveolens* foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* cuja metodologia foi descrita no item 3.10.1 (p.40).

Na fração RVACT identificou-se a presença de chalconas diméricas, flavonóides e outros compostos fenólicos (item 4.1, p.51). Na fração CGVACT foram identificados galato de metila e miricetrina, estes também isolados da fração RVACT.

Dados na literatura citam os compostos fenólicos com atividades antimicrobiana (SANOMIYA *et al.*, 2005), antioxidante (DUARTE *et al.*, 2009), e não apresentam nenhuma informação sobre a atividade inseticida.

O composto fenólico galato de metila (GM) (Substância II) foi ensaiado nas concentrações de 0,1, 1 e 2 mg/mL (Tabela 4.20 e Gráfico 4.4). Os resultados apresentados para 0,1 e 1mg/mL não foram satisfatórios, uma vez que pelo teste de “log rank” não apresentaram diferenças significativas, além disso, no 25° dia a mortalidade foi de 20 e 42%, respectivamente. Resultados não muito distantes do obtido pelo controle.

Tabela 4.20 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL

| Tratamento                 | % acumulada de mortalidade por dia |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Md *             |
|----------------------------|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------|
|                            | 1                                  | 2  | 3  | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 |                  |
| <b>Controle Dieta Pura</b> | 0                                  | 12 | 12 | 12 | 18 | 18 | 18 | 18 | 20 | 22 | >25 <sup>a</sup> |
| <b>0,1 mg/mL</b>           | 0                                  | 6  | 6  | 8  | 12 | 14 | 16 | 16 | 16 | 20 | >25 <sup>a</sup> |
| <b>GM 1,0 mg/mL</b>        | 4                                  | 24 | 24 | 28 | 34 | 34 | 34 | 38 | 40 | 42 | >25 <sup>a</sup> |

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



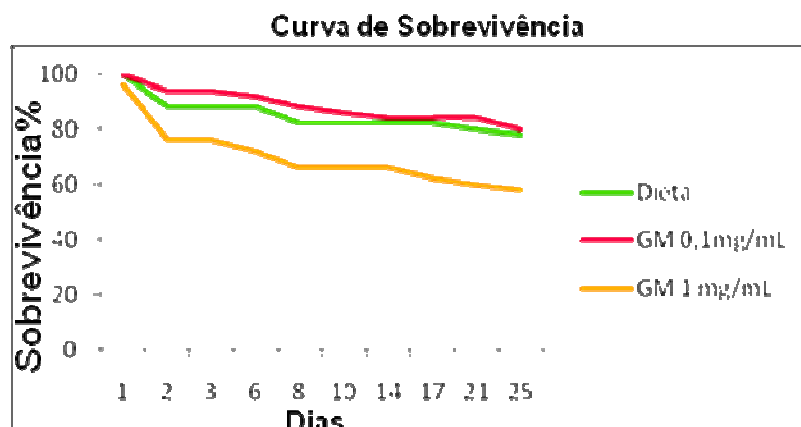


Gráfico 4.4 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila nas concentrações de 0,1 mg/mL e 1 mg/mL.

O experimento realizado com galato de metila na concentração de 2 mg/mL (Tabela 4.21 e Gráfico 4.5) apresentou no 10º dia uma mortalidade de 50% ( $S_{50}$ ), enquanto a dieta foi de 40%. No 21º dia a mortalidade atingiu 100%, enquanto o controle apresentou 56%, demonstrando que alterações na concentração podem aumentar a atividade inseticida deste.

Tabela 4.21 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com com galato de metila nas concentração de 2 mg/mL

| Tratamento                 | % acumulada de mortalidade por dia |   |    |    |    |    |    |    |     |     |       |
|----------------------------|------------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-------|
|                            | Md*                                |   |    |    |    |    |    |    |     |     |       |
|                            | 1                                  | 2 | 3  | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21  | 25  |       |
| <b>Controle Dieta Pura</b> | 0                                  | 2 | 12 | 30 | 34 | 40 | 42 | 46 | 56  | 56  | 19.5a |
| <b>GM</b>                  | 0                                  | 6 | 12 | 34 | 36 | 50 | 80 | 98 | 100 | 100 | 11b   |

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

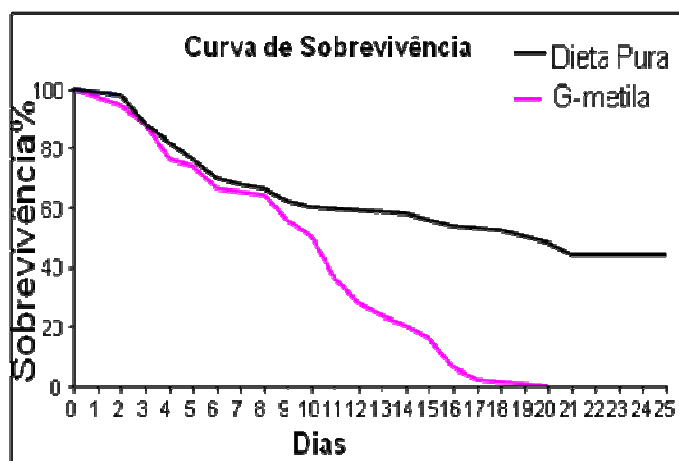


Gráfico 4.5 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de metila na concentração de 2 mg/mL.

Outros compostos fenólicos, como os flavonóides, apresentam diversos relatos de atividades na literatura, entre elas, antibacteriana (MOTA *et al.*, 2009), antiviral e fungicida (ALMEIDA, 2007).

Relatos mencionados à atividade inseticida são relacionados à flavonóides glicosilados, como quercetina e astilbina, que apresentam toxicidade frente à formiga em altas concentrações (SUGAYAMA *et al.*, 1997 *apud* FILHO *et al.*, 2002; CINTRA *et al.*, 2005).

O flavonóide glicosilado isolado (miricetrina, Substância I), foi ensaiado na concentração 0,1 mg/mL (**Gráfico 4.6 e Tabela 4.22**). Os resultados apresentados não foram satisfatórios, uma vez que  $S_{50}$  não foi atingido pela substância ensaiada nos 25 dias de experimento.

Para confirmar a ausência de atividade da miricetrina sobre a formiga seria necessário realizar o experimento em diferentes concentrações, como citado anteriormente estes compostos apresentaram atividade em altas concentrações.

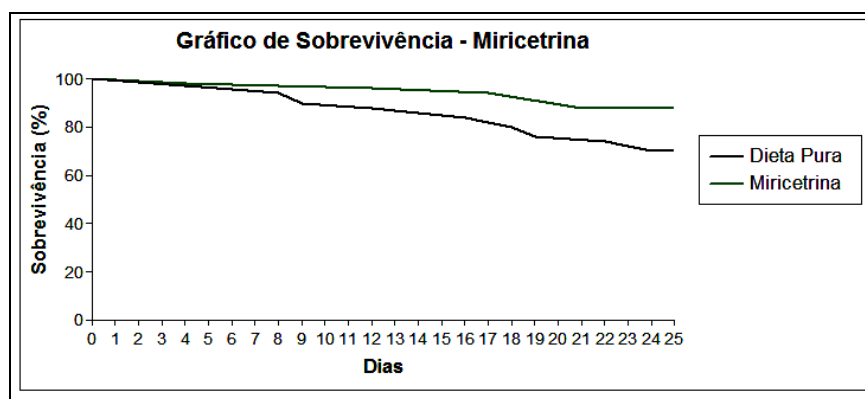


Gráfico 4.6 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com miricetrina na concentração de 0,1 mg/mL.

Tabela 4.22 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão de miricetrina na concentração de 0,1 mg/mL

| Tratamento            | % acumulada de mortalidade por dia |   |   |   |   |    |    |    |    |    | Md *             |
|-----------------------|------------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|------------------|
|                       | 1                                  | 2 | 3 | 6 | 8 | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 |                  |
| Dieta Pura            | 0                                  | 0 | 0 | 0 | 6 | 10 | 14 | 18 | 24 | 30 | >25 <sup>a</sup> |
| Miricetrina 0,1 mg/mL | 0                                  | 0 | 0 | 2 | 2 | 2  | 4  | 6  | 12 | 12 | >25 <sup>b</sup> |

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

Dando continuidade aos ensaios, outras substâncias foram isoladas e suas estruturas elucidadas, tais como as substâncias V, VI e VII que foram identificadas como chalconas diméricas e há pouco relato na literatura sobre esta classe de substância, sendo que o único estudo está relacionado à atividade antiinflamatória (BANDEIRA *et al.*, 2003).

Estas chalconas foram ensaiadas na concentração de 0,2 mg/mL e os resultados dos experimentos constam da **Figura 4.7** e **Tabela 4.23**. Os resultados não foram significativos, as substâncias V, VI e VII apresentaram  $S_{50}$  entre o 21 e 25° dia de experimento.

Outro composto presente neste estudo foi o ácido-5-O-cafeoilquínico (IV) (**Figura 4.7** e **Tabela 4.23**) que também não apresentou atividade relevante, uma vez que não atingiu o  $S_{50}$  nos 25 dias de experimento.

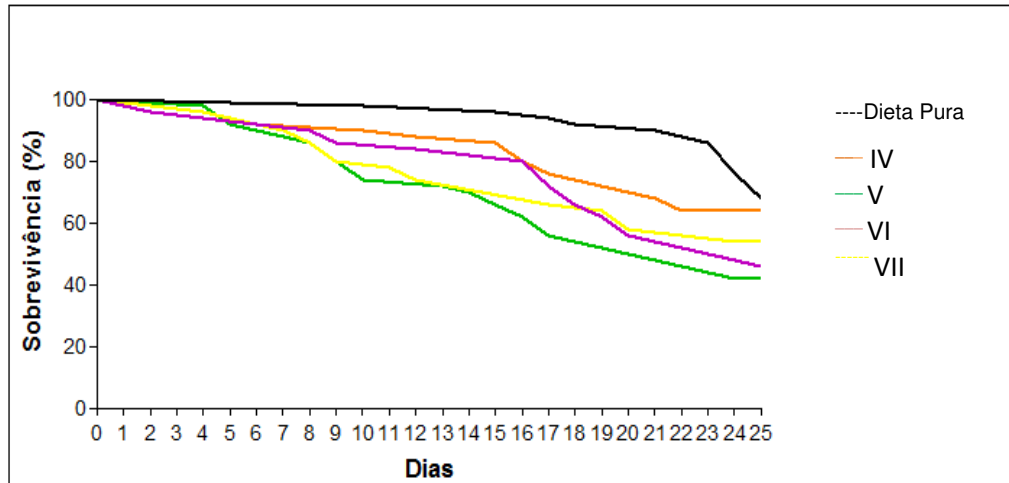


Gráfico 4.7 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias IV-VII isoladas de *A. graveolens*.

Tabela 4.23 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias IV-VII isoladas de *A. graveolens*

| Tratamento | % acumulada de mortalidade por dia |   |   |    |    |    |    |    |    |    | Md *   |
|------------|------------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--------|
|            | 1                                  | 2 | 3 | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 |        |
| Dieta Pura | 0                                  | 0 | 0 | 0  | 0  | 2  | 2  | 6  | 10 | 32 | >25 a  |
| IV         | 0                                  | 2 | 2 | 8  | 8  | 10 | 12 | 24 | 32 | 36 | >25 a  |
| V          | 0                                  | 0 | 0 | 10 | 14 | 26 | 30 | 44 | 52 | 58 | 20,5 b |
| VI         | 2                                  | 4 | 4 | 8  | 10 | 14 | 16 | 28 | 44 | 54 | 24 b   |
| VII        | 0                                  | 2 | 2 | 8  | 14 | 20 | 26 | 38 | 46 | 50 | >25 a  |

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

A baixa mortalidade observada nos ensaios das substâncias demonstra que pode estar ocorrendo sinergismo no extrato etanólico das raízes (RV) de *A. graveolens*, uma vez que o ensaio deste foi bem significativo, cerca de 94% de mortalidade.

É importante ressaltar que não há relatos na literatura de ensaio biológico sobre *A. sexdens rubropilosa* com o gênero *Astronium* e as substâncias isoladas, reforçando assim a importância deste estudo.

### 4.3.2 - Ensaios biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, de *A. sexdens rubropilosa*

#### 4.3.2.1 - Efeitos de extratos brutos e frações de *A. graveolens* contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*

Os extratos etanólicos das folhas (FV), raízes (RV), pecíolo (GFV) e caule (CGV) de *A. graveolens* foram ensaiados sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* conforme a metodologia descrita no **item 3.10.2** (p.41). Os experimentos com os extratos e frações foram realizados na concentração de 1000 µg/mL.

Analisando os dados obtidos com os extratos (**Gráfico 4.8**) observou-se que os extratos etanólicos do pecíolo (GFV) e do caule (CGV) apresentaram um baixo poder de inibição do fungo simbiote, 35% e 17%, respectivamente, frente ao controle.

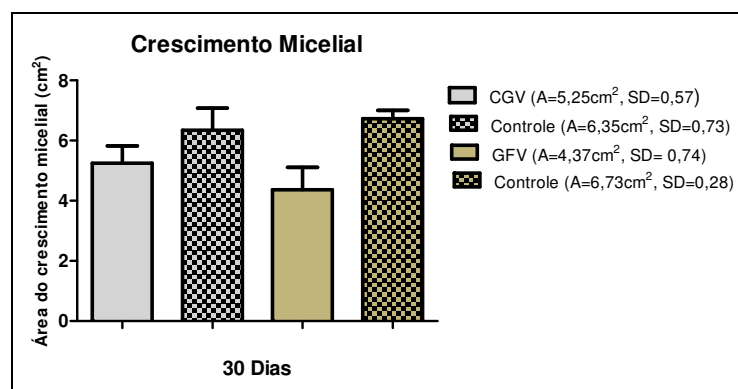


Gráfico 4.8 - Efeito dos extratos CGV e GFV no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Os extratos das raízes (RV) e das folhas (FV) (**Gráfico 4.9**) apresentaram os melhores resultados de inibição, aproximadamente 88 e 91%, respectivamente.

O extrato das raízes (RV) apresentou o maior poder de inibição do fungo simbiote dentre os ensaiados, e o do caule (CGV) frente às formigas e desta maneira, os extratos RV e CGV foram particionados (**item 3.5 e 3.6**, respectivamente) para a busca de possíveis substâncias com potencial inseticida.

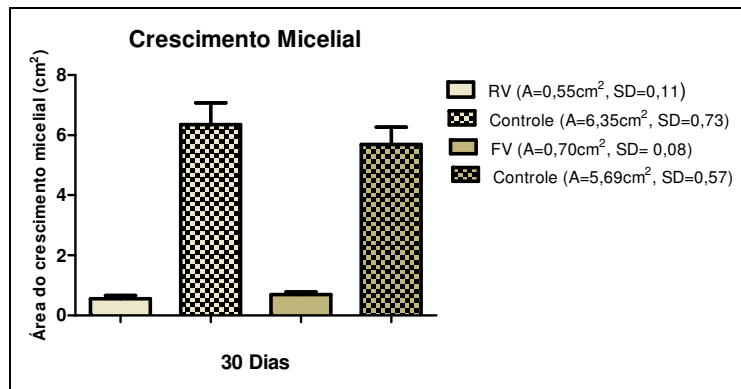


Gráfico 4.9 - Efeito dos extratos de RV e FV de *A. graveolens* no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*

As frações obtidas do particionamento do extrato RV de *A. graveolens* foram submetidas ao ensaio de inibição sobre o fungo simbiote da formiga cortadeira. O crescimento micelial do fungo simbiote ensaiado com as frações do extrato etanólico das raízes, hexânica (RVH), acetato de etila (RVACT) e a hidroalcoólica (RVAQ) (**Gráfico 4.10**), apresentaram inibição de 44, 90 e 77%, respectivamente. Devido à porcentagem de inibição demonstrada pela fração RVACT, esta foi escolhida para a busca de possíveis substâncias com potencial fungicida.

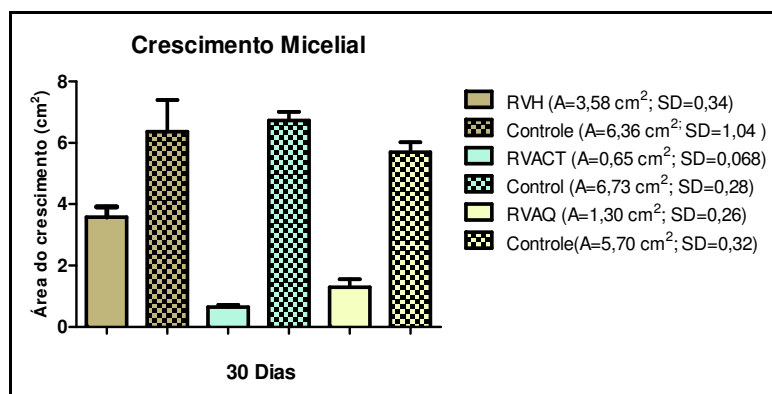


Gráfico 4.10 - Efeito das frações RVH, RVACT e RVAQ de *A. graveolens* no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

As frações obtidas do particionamento do extrato do caule CGV de *A. graveolens* (**Item 3.6**) foram submetidas ao ensaio de inibição sobre o fungo simbiote da formiga cortadeira. Os resultados das frações acetato de etila (CGVACT) e a hidroalcoólica (CGVAQ) (**Gráfico 4.11**), apresentaram uma inibição frente ao fungo simbiote de 41 e 28%, respectivamente. Devido à porcentagem de inibição demonstrada pela fração CGVACT, esta foi escolhida para a busca de possíveis substâncias com potencial fungicida.

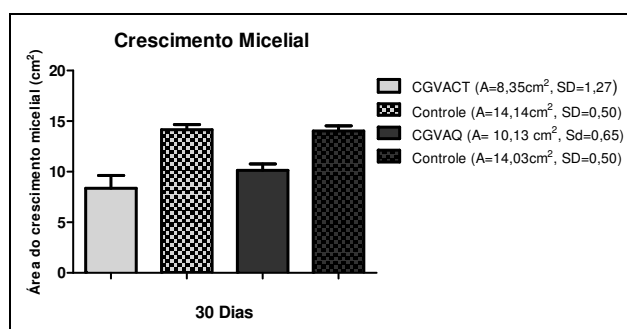


Gráfico 4.11 - Efeito das frações CGVACT e CGVAQ de *A. graveolens* no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

#### 4.3.2.2 - Efeitos de substâncias isoladas de *A. graveolens* contra o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

As substâncias isoladas do extrato RVACT e CGVACT de *A. graveolens* (Itens 3.5.1.1 e 3.6.1.1) foram submetidas ao ensaio de inibição com o fungo simbiote, cuja metodologia foi descrita no item 3.10.2 (p.41).

Os experimentos com os compostos foram realizados na concentração de 100 µg/mL, sendo que os resultados obtidos dos extratos das raízes de *A. graveolens* estão apresentados a seguir.

Devido a sua propriedade de inibição (90%), a fração acetato de etila (RVACT) (Gráfico 4.12), foi alvo de estudo fitoquímico, sendo que nesta fração foram isolados, galato de metila, miricetrina, chalconas diméricas e outros compostos fenólicos.

O flavonóide miricetrina apresentou 28% de inibição no fungo simbiote (Gráfico 4.12) mostrando pouca atividade fungicida.

Há relato na literatura do flavonóide glicosilado astilbina com ação fungicida sobre o fungo simbiote, sendo este capaz de inibir 100% o crescimento micelial do mesmo (ALMEIDA, 2007). Foi ainda avaliada a mistura de orientina com isoorientina (GALLO, 2004), estas apresentaram uma inibição de 40%, porém não há relatos do flavonóide miricetrina com atividade fungicida.

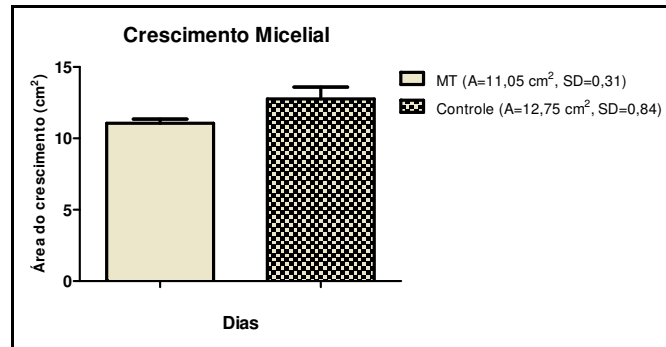


Gráfico 4.12 - Efeito da miricetrina no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*

O experimento realizado com galato de metila na concentração de 100 µg/mL (**Gráfico 4.13**) apresentou 25% de inibição. Na literatura existem apenas relatos envolvendo este composto à atividade antimicrobiana, *Staphylococcus aureus* (PENA *et. al*, 2001).

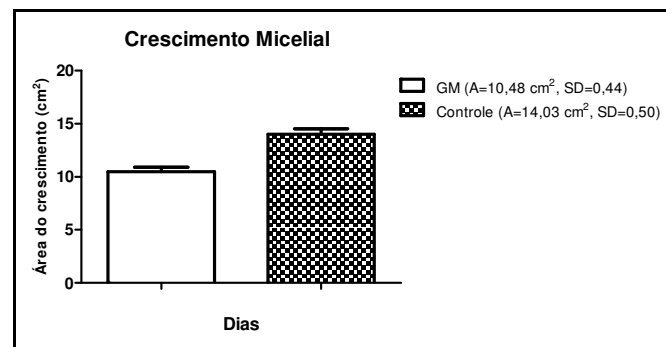


Gráfico 4.13 - Efeito de galato de metila no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*

Outra substância isolada neste estudo foi o ácido 5-O-cafeoilquínico (IV) (**Figura 4.14**), e ele não apresentou atividade inibitória, mas estimulou o crescimento do fungo em 7%.

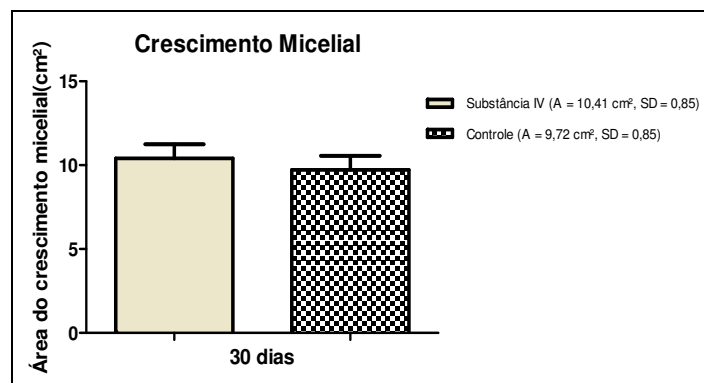


Gráfico 4.14 - Efeito da substância ácido 5-O-cafeoilquínico no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*



As substâncias V, VI e VII identificadas como chalconas diméricas, foram ensaiadas e os resultados dos experimentos constam na **Figura 4.15**. Os resultados não foram promissores, uma vez que, as substâncias V, VI e VII apresentaram 22, 23 e 8%, respectivamente, de inibição do fungo simbiote frente ao controle.

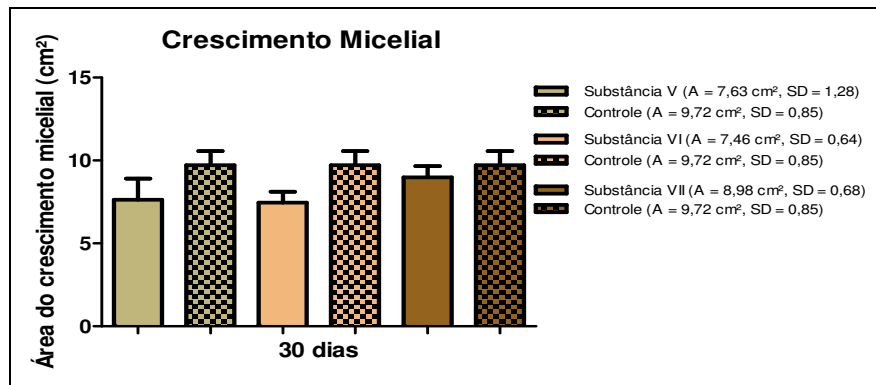


Gráfico 4.15 - Efeito das chalconas diméricas V, VI e VII no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*

Os resultados obtidos das substâncias isoladas demonstram que a inibição de 90% no crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus* proveniente da fração RVACT pode estar relacionada a sinergismo entre as substâncias isoladas, uma vez que as substâncias ensaiadas isoladamente não apresentaram resultados significativos.

### **4.3.3 - Ensaios biológicos no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda***

#### **4.3.3.1 - Efeito dos extratos brutos e frações de *A. graveolens* no desenvolvimento de *S. frugiperda***

Os extratos brutos e frações de *A. graveolens* foram ensaiados sobre *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no **item 3.10.3** (p.42). Os resultados obtidos com os extratos etanólicos de *A. graveolens* (**Tabela 4.24, Gráficos 4.16 e 4.17**) não se mostraram significativos. O melhor resultado obtido foi o tratamento realizado com o extrato do caule, que mostrou uma mortalidade de 54% na fase larval.

Em relação à mortalidade pupal, o tratamento com o pecíolo apresentou uma mortalidade pupal de 23% quando comparado ao controle que apresentou 13%, porém este resultado não apresenta significância pelo Teste Tukey. A análise dos resultados demonstra uma baixa ação tóxica dos extratos de *A. graveolens*.

Com relação ao peso pupal foi observado um aumento nos tratamentos com extratos das raízes e dos pecíolos. Este fato pode estar relacionado com a baixa concentração de compostos fenólicos identificados no estudo fitoquímico (**Item 4.1**, p. 51). A ação destes pode ter causado um efeito estimulante ao invés de inibitório (MULLIN *et al.*, 1991).

Outros parâmetros analisados, como redução de peso e prolongamento da fase larval (GIOLO *et al.*, 2002) não foram observados, porém merecem atenção.

Tabela 4. 24 - 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 etanólicos de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12 h

| Estágio<br>Tratamento | Fase Larval                          |  | Peso pupal<br>(mg)<br>(±EP) | Fase Pupal                           |                                       |
|-----------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
|                       | Duração (dias)<br>(±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade<br>(%)<br>(±EP) <sup>1</sup> |                             | Duração<br>(dias) (±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade<br>(%) (±EP) <sup>1</sup> |
| Folhas                | 32,04±5,56bc                         | 10,00±10,00c                             | 276,37±30,65b               | 11,68±1,75a                          | 7,40±12,82ab                          |
| Folhas MeOH           | 32,22±7,21b                          | 40±17,32bc                               | 270,17±45,53b               | 11,33±1,23a                          | 17,50±4,33b                           |
| Folhas Hex;DCM        | 43,86±6,57a                          | 76,67±15,27ab                            | 170,14±37,89c               | 11,00±0a                             | 83,33±28,69a                          |
| Caule                 | 27,77±2,98c                          | 53,70 ± 11,6b                            | 288,31±9,15ab               | 11,61±1,21a                          | 0 ± 0 b                               |
| Peciolo               | 25,36±1,36c                          | 26,27±15,27bc                            | 305,72±23,34a               | 11,55±0,98a                          | 22,57±25,35b                          |
| Raiz                  | 27,68±2,75c                          | 16,67±11,55c                             | 281,88±30,85ab              | 11,43±1,62a                          | 8,46±7,50b                            |
| Controle <sup>1</sup> | 27,68±2,15d                          | 0,00 ± 0c                                | 252,92±38,40b               | 11,77±1,17a                          | 13,33±5,77b                           |

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

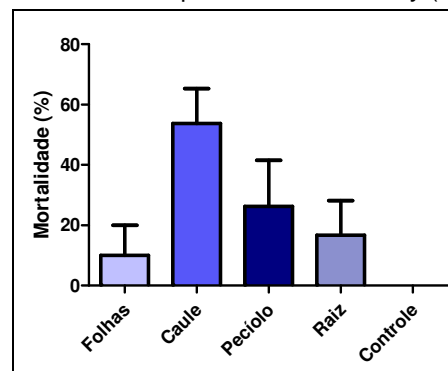
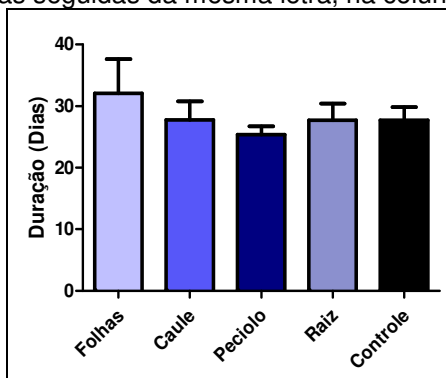


Gráfico 4.16 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.

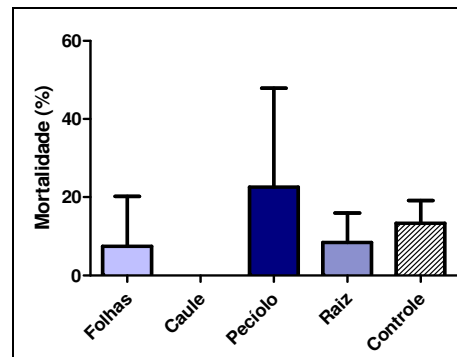
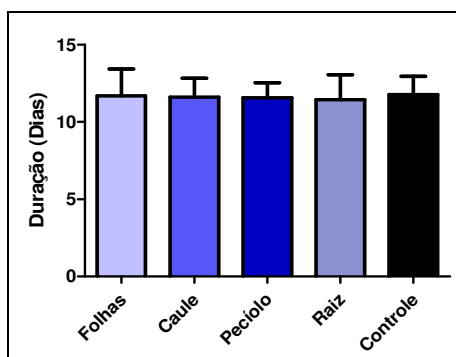


Gráfico 4.17 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.

Além das pesquisas citadas anteriormente, foram realizados estudos a fim de verificar a ação de extratos de plantas (Rutaceae, Malvaceae, entre outras) no intestino médio da *S. frugiperda*. KNAAK *et al.* (2010) realizaram uma análise histopatológica e observaram alterações nas microvilosidades, desorganização do intestino médio e a hipertrofia das células epiteliais, mostrando a ação dos extratos testados nestes locais dos insetos.

Outras alterações foram relatadas por MARTINEZ & EMDEN (2001) e tratam-se de deformidades morfológicas que afetam as atividades vitais dos insetos, tais como, de se alimentarem, caminharem ou voarem, que podem torná-los vulneráveis a diversos tipos de predadores e podem evitar que os mesmos causem danos às culturas.

Entre as possibilidades dos extratos testados não alcançarem os resultados relevantes contra *S. frugiperda* estão a baixa concentração de algumas substâncias ativas no extrato e/ou a presença de enzimas no intestino dos insetos, como as enzimas monoxigenase dependentes do citocromo P-450, glutathione S-transferase (GSTs) e carboxilesterases (COEs) que atuam na detoxificação dos compostos ensaiados (DESPRÉS *et al.*, 2007 *apud* Dourado, 2009).

Entre as atividades enzimáticas relatadas, pode ser citada a enzima GSTs que na *S. littoralis*, o aumento seu inibe a ação de piretróides, porém na presença de flavonas, flavonol, flavanona e flavanonol esta enzima é inibida (YU & ABO-ELGHAR, 2000).

Embora o extrato etanólico das raízes de *A. graveolens* não tenha apresentado atividade significativa frente à *S. frugiperda*, perante aos ensaios sobre a formiga cortadeira (**item 4.3.1.1**, p.157) e o fungo simbionte (**item 4.3.2.1**, p.166) os resultados foram promissores, portanto foi realizado o processo de partição líquido-líquido, utilizando solventes com diferentes polaridades (hexano, acetato de etila) como descrito no **item 3.5** (p.25) e estes foram ensaiados frente a *S. frugiperda*.

Os resultados dos ensaios das frações não foram significativos em relação à mortalidade larval e pupal (**Tabela 4.25**, **Gráficos 4.18-19**). Foi observado uma redução de 35 mg em relação ao peso larval de *S. frugiperda* na fração acetato de etila, resultado não observado no extrato etanólico.

A fração acetato de etila foi então escolhida para a obtenção das substâncias pela atividade apresentada contra a formiga, seu fungo simbionte e a lagarta.

Tabela 4.25 - Médias da duração de fase larval e pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações das raízes de *A. graveolens*, a 1000 mg.kg<sup>-1</sup>. Temp.: 25 ± 10°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12 h

| Estágio          | Fase Larval                       |                                    | Peso pupal (mg) (±EP) | Fase Pupal                        |                                    |
|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                  | Duração (dias) (±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade (%) (±EP) <sup>1</sup> |                       | Duração (dias) (±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade (%) (±EP) <sup>1</sup> |
| Tratamento       |                                   |                                    |                       |                                   |                                    |
| Hexano           | 19,18±0,79c                       | 26,67±15,27a                       | 279,09±21,46a         | 9,10±1,63a                        | 14,8±16,96 <sup>a</sup>            |
| Acetato de Etila | 27,65±4,04a                       | 33,33 ±15,27a                      | 243,55±42,37b         | 9,11±1,08a                        | 10,83±10,10a                       |
| Hidro-alcoólico  | 22,16 ±1,7b                       | 16,66 ±5,77a                       | 286,28±27,09a         | 9,16±1,09a                        | 3,7±6,41 <sup>a</sup>              |
| Controle         | 20,25±1,08d                       | 6,66±5,77a                         | 277,77±18,97a         | 8,24±1,45a                        | 10,36 ± 10,02a                     |

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<sub>≤</sub>0,05).

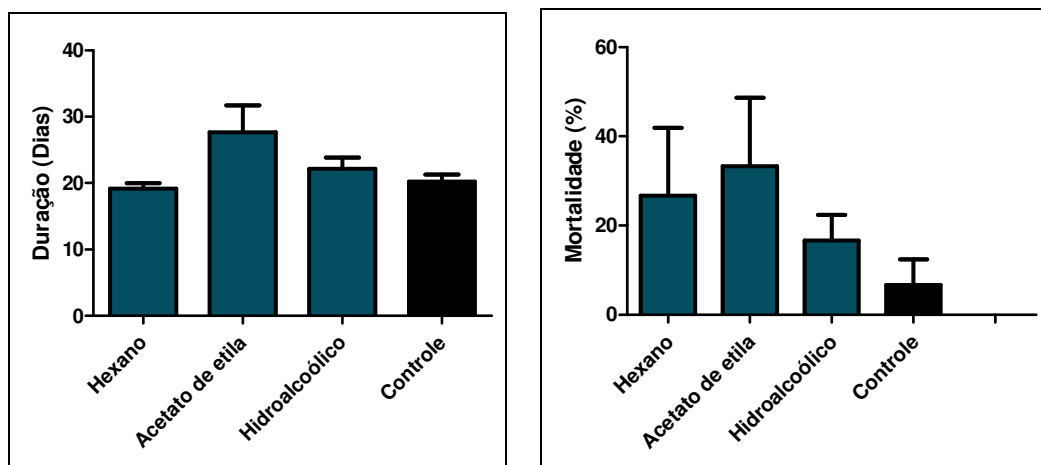


Gráfico 4.18 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações das raízes de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.

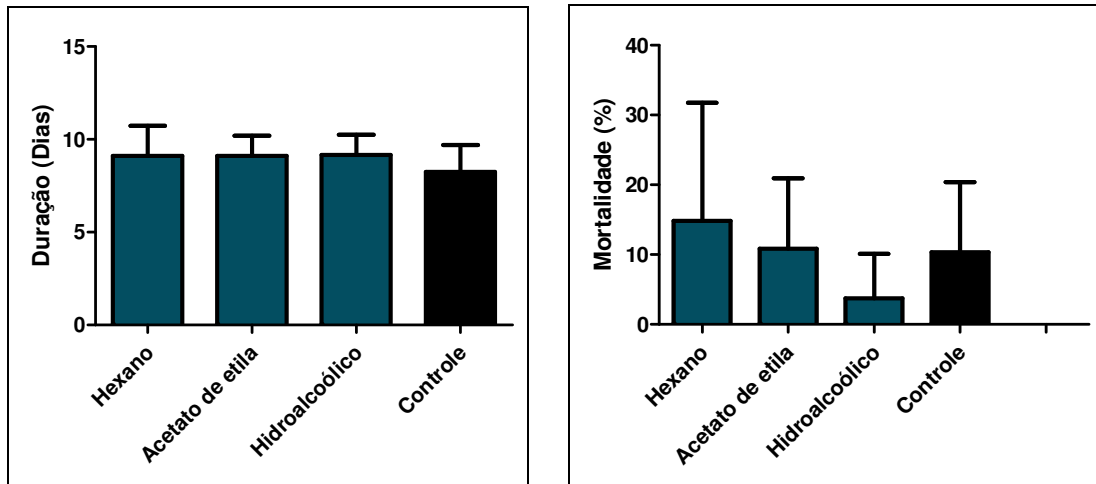


Gráfico 4.19 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos de *A. graveolens*. Temp.:  $25 \pm 1$  °C; UR  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12h.

RODRÍGUEZ & VENDRAMIM e TORRECILLAS & VENDRAMIM (1996 e 2001) observaram que a redução da ingestão de alimentos, devido à ação de substâncias deletérias, como também um inadequado substrato alimentar, pode gerar pupas de menor peso, ocasionando problemas de cópula com os indivíduos normais, dando origem a adultos pequenos.

Após o fracionamento da fração acetato de etila, a única substância ensaiada no experimento de ingestão foi o galato de metila (Sigma-Aldrich), nas concentrações 10 (3 mg), 50 (15 mg) e 100 ppm (30 mg) (**Gráficos 4.20-21** e **Tabela 4.26**). Nos ensaios biológicos posteriores, a metodologia de ensaio por toxicidade aguda, foi utilizada devido a menor quantidade de massa obtida nos fracionamentos.

Os resultados demonstram que o composto fenólico galato de metila não apresentou atividade significativa nas três concentrações pelo teste Tukey. Assim, a atividade relacionada à redução do peso não está relacionada a esta substância.

Nos ensaios de ingestão, classes fenólicas atuam na *S. eridania* aumentando a mortalidade e diminuindo a ingestão, resultando numa menor taxa de crescimento (LINDROTH & PETERSON, 1988 apud LABINAS & CROCOMO, 2002).

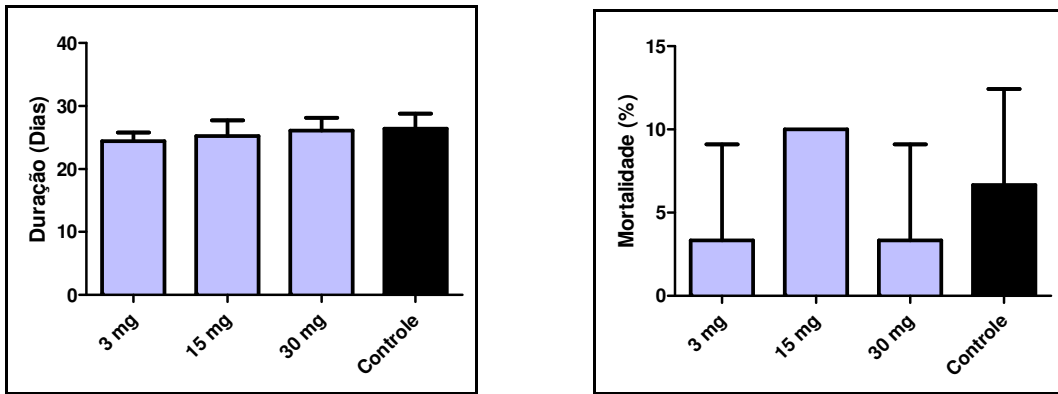


Gráfico 4.20 - Médias da duração e mortalidade da fase larval de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com a substância de galato de metila de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.

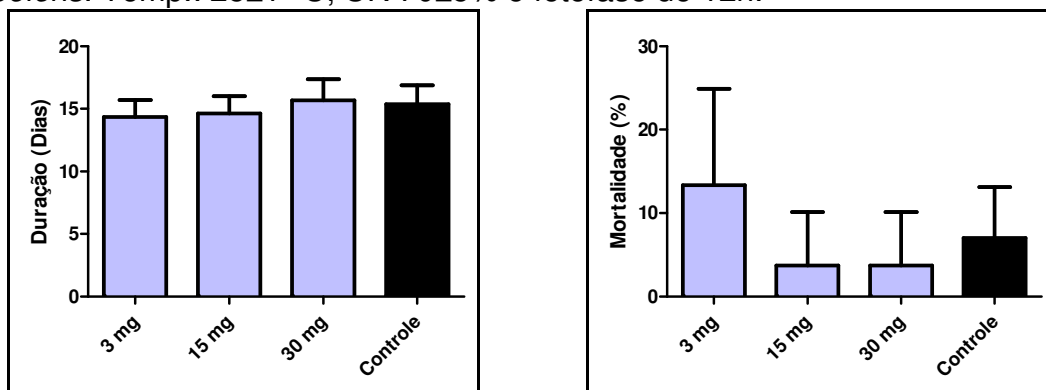


Gráfico 4.21 - Médias da duração e mortalidade da fase pupal *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com a substância de galato de metila de *A. graveolens*. Temp.: 25±1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12h.

Tabela 4.26 - Médias da duração da fase larval, do peso pupal e de mortalidade do ciclo total de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com galato de metila isolado de *A. graveolens*. Temp.: 25 ± 1 °C; UR 70±5% e fotofase de 12 h

| Estágio / Tratamento | Fase Larval                       |                                    | Peso pupal (mg) (±EP) | Fase Pupal                        |                                    |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                      | Duração (dias) (±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade (%) (±EP) <sup>1</sup> |                       | Duração (dias) (±EP) <sup>1</sup> | Mortalidade (%) (±EP) <sup>1</sup> |
| 3 mg                 | 24,41±1,48 b                      | 3,33±5,77 a                        | 311,03±18,04a         | 14,36±1,35 b                      | 13,33±11,55 <sup>a</sup>           |
| 15 mg                | 25,25±2,47ab                      | 10,00±0,00a                        | 306,51±21,90a         | 14,65±1,36ab                      | 3,70±6,41 <sup>a</sup>             |
| 30 mg                | 26,10±2,06 a                      | 3,33±5,77 a                        | 312,13±17,22a         | 15,67±1,70 a                      | 3,70±6,41 a                        |
| Controle 1           | 26,39±2,4 a                       | 6,66±5,77 <sup>a</sup>             | 312,71±28,85a         | 15,38±1,50 ab                     | 7,03 ± 6,12 a                      |

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Poucos são os relatos na literatura de experimentos de *S. frugiperda* envolvendo espécies da família Anacardiaceae. TIRELLI *et al.* (2010) observou que *Schinus terebinthifolius* causa uma redução na percentagem de sobrevivência

durante a fase de pupa, fato que pode ser decorrente devido a presença de frações tânicas, que apresentam atividade tóxica devido a interação com proteínas (ZUANAZZI *et al.*, 2004). Assim, uma das possibilidades poderia ser a atividade gerada por taninos, já que estes compostos estão presentes na família Anacardiaceae (TIRELLI *et al.*, 2010).



### 4.3.3.2 - Ensaios Biológicos de toxicidade aguda com extratos de plantas sobre *S. frugiperda*

Os extratos etanólicos das raízes (RV) e do caule (CGV) de *A. graveolens* foram ensaiados sobre a *S. frugiperda* conforme a metodologia descrita no **item 3.10.4** (p.43). Os resultados obtidos com os extratos (**Gráficos 4.22 e Tabela 4.27**) não apresentaram resultados significativos.

Embora os extratos etanólicos das raízes e caule não tenham apresentado atividade significativa frente à *S. frugiperda*, perante os ensaios sobre a formiga cortadeira (**item 4.3.1.1**, p.157) e o fungo simbiote (**item 4.3.2.1**, p.166), os resultados foram promissores, portanto foi realizado o processo de partição líquido-líquido, utilizando solventes com diferentes polaridades [hexano (RVH, CGVH), acetato de etila (RVACT, CGVACT)] como descrito nos **itens 3.5 e 3.6** (p.25 e 35, respectivamente).

Nenhuma das amostras ensaiadas apresentou resultado satisfatório (**Gráfico 4.22 e Tabela 4.27**), porém RVH apresentou resultado um pouco mais significativo quando comparada com o controle.

Os resultados não significantes podem ser decorrentes de baixas concentrações de substâncias que podem estar presentes nas frações testadas.

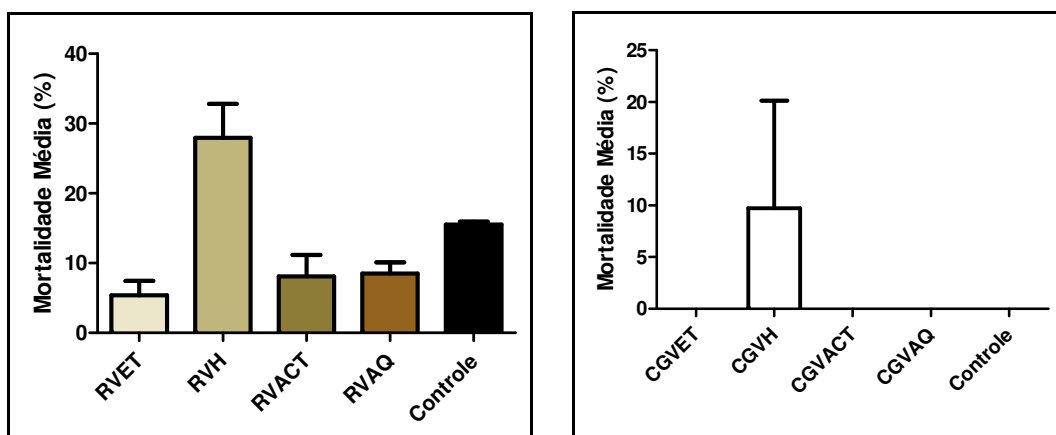


Gráfico 4.22 - Médias da mortalidade causadas pelos extratos etanólicos e frações das raízes, do caule e dos galhos de *A. graveolens* sobre lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Temp.:  $25 \pm 1$  °C; UR  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12h.

Tabela 4.27 - Mortalidade causada pelos extratos etanólicos e frações das raízes e dos galhos de *A. graveolens* sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*

| Extrato  | Mortalidade Média (%)<br>± DP | Extrato  | Mortalidade Média (%)<br>± DP |
|----------|-------------------------------|----------|-------------------------------|
| RVET     | 3,34 ± 7,45 <b>b</b>          | CGVH     | 9,72 ± 10,39 <b>a</b>         |
| RVH      | 32,82 ± 23,07 <b>a</b>        | CGVAQ    | 0 ± 0 <b>b</b>                |
| RVACT    | 5,0 ± 11,18 <b>b</b>          | CGVACT   | 0 ± 0 <b>b</b>                |
| RVAQ     | 6,94 ± 10,11 <b>ab</b>        | CGVET    | 0 ± 0 <b>b</b>                |
| Controle | 15,17 ± 15,95 <b>ab</b>       | Controle | 0 ± 0 <b>b</b>                |

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

De acordo com os dados promissores obtidos nos experimentos perante o fungo simbionte e a formiga cortadeira as frações RVACT e CGVACT foram submetidas ao fracionamento cromatográfico visando obter as substâncias presentes nos mesmos.

É importante ressaltar os possíveis mecanismos de ação do experimento tópico que é caracterizado pela exposição da amostra ao tegumento do inseto. Quando esta é absorvida, ela pode atuar nos reguladores do crescimento (ecdise), no metabolismo respiratório das células (síntese de ATP) e no sistema nervoso central, podendo causar a morte do inseto (PEREIRA, 2007).

Entre as substâncias isoladas das frações RV e CGVACT estão miricetrina e galato de metila, entretanto, os dados experimentais (**Gráficos 4.23, 4.24 e Tabela 4.28, 4.29**) dessas substâncias não apresentaram atividade significativa pelo teste tópico, como também não foram promissores nos ensaios por ingestão.

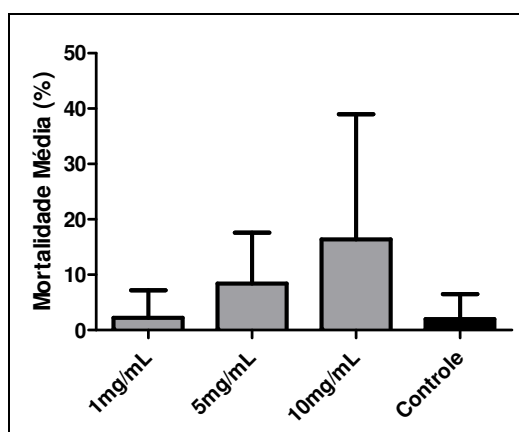


Gráfico 4.23 - Médias da mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* causa por miricetrina (substância I). Temp.:  $25 \pm 1$  °C; UR  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12h.

Tabela 4.28 - Mortalidade causada pela miricetrina (substância I) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*

| Miricetrina (mg/mL) | Mortalidade Média*(%)<br>± DP |
|---------------------|-------------------------------|
| 1                   | 2,22 ± 4,97 a                 |
| 5                   | 8,44 ± 9,18 a                 |
| 10                  | 16,39 ± 22,57 a               |
| Controle            | 2,00 ± 4,47 a                 |

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

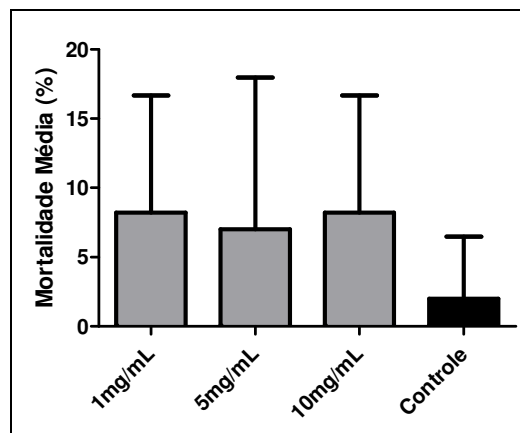


Gráfico 4.24 - Médias da mortalidade causada por galato de metila (substância II) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. Temp.:  $25 \pm 1$  °C; UR  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12h.

Tabela 4.29 - Mortalidade causada pelo galato de metila (substância II) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*

| Galato de metila (mg/mL) | Mortalidade Média*(%)<br>± DP |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1                        | 8,22 ± 8,45 a                 |
| 5                        | 7,00 ± 10,95 a                |
| 10                       | 8,22 ± 8,45 a                 |
| Controle                 | 2,00 ± 4,47 a                 |

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Tendo em vista as baixas atividades observadas nos ensaios realizados, seria necessário analisar outras substâncias que compõem os extratos do caule e das

raízes, realizando tanto o ensaio tópico quanto de ingestão. Estudos revelam maior atividade envolvendo ensaios de ingestão (VIANA & PRATES, 2003).

## 4.4 - Coleta e Análise dos voláteis das folhas de *A. graveolens* pela técnica de Headspace-SPME

### 4.4.1 - Determinação da Fibra Ideal

Os cromatogramas obtidos através das condições descritas no **item 3.11.1** (p.46) para as diferentes fibras (preta e azul) estão apresentados a seguir (**Figuras 4.77 e 4.78**).

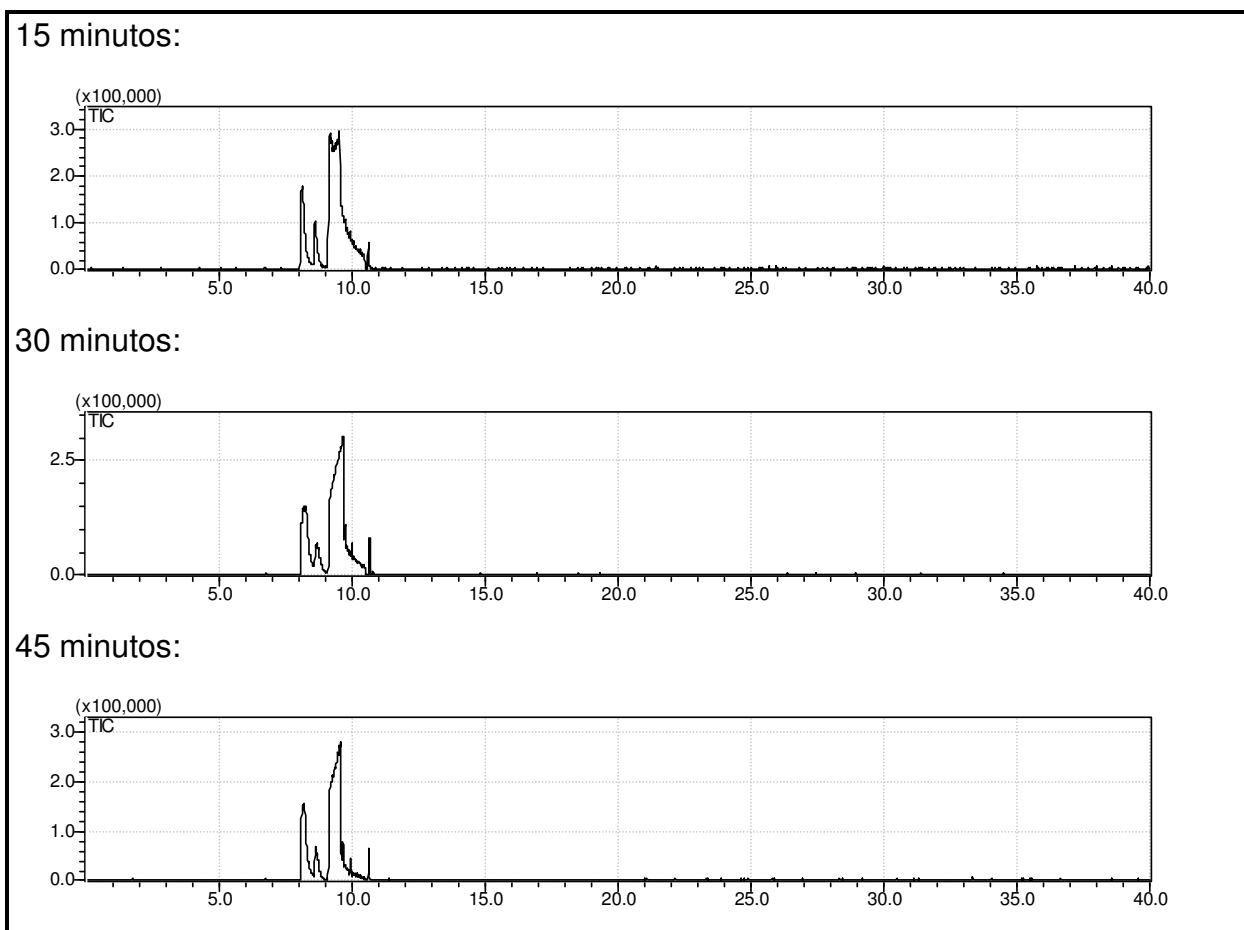


Figura 4.77 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de *A. graveolens* obtidos em quadruplicata com a fibra preta (CAR/PDMS – Carboxen/Polidimetilsiloxano) em 15, 30 e 45 minutos.

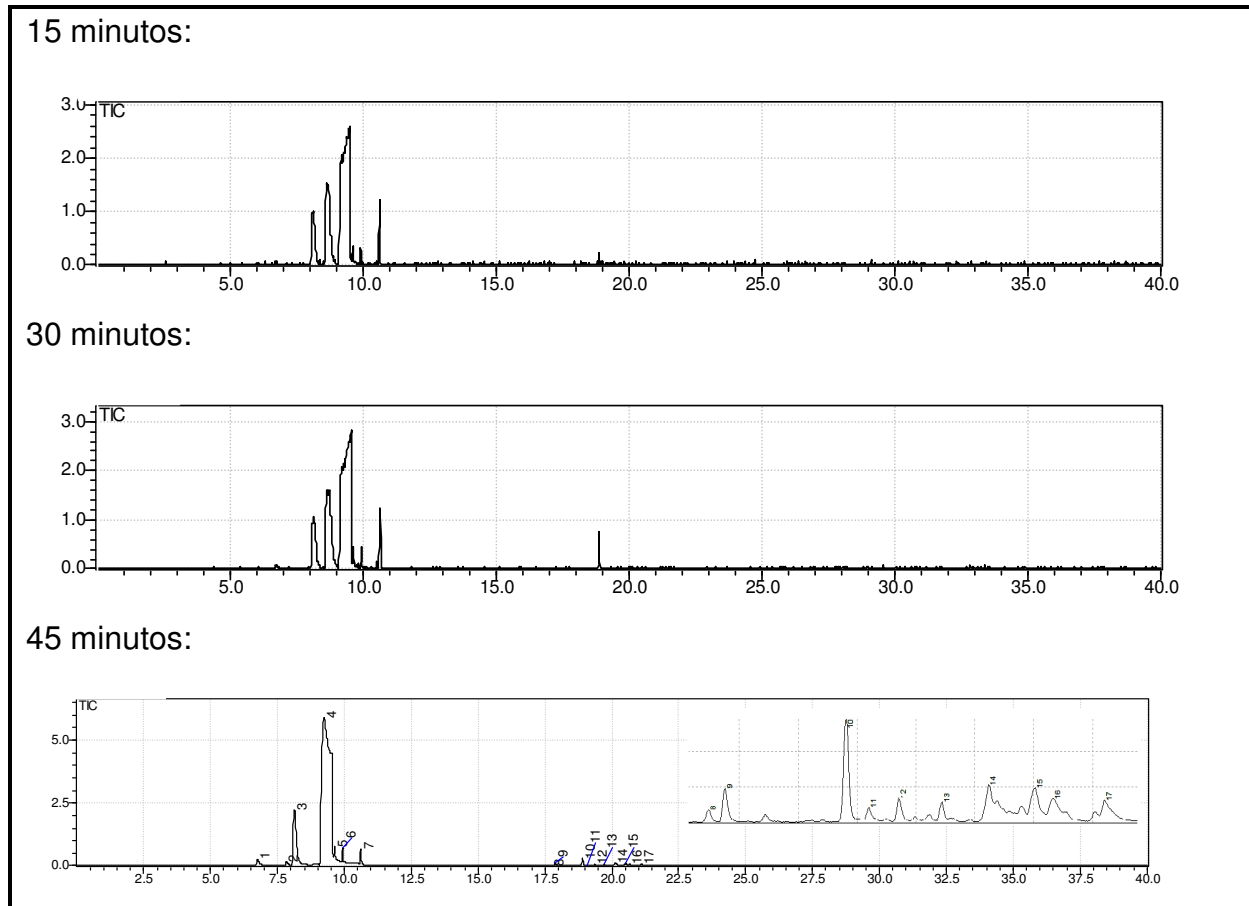


Figura 4.78 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de *A. graveolens* obtidos em quadruplicata com a fibra azul (PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno) em 15, 30 e 45 minutos.

Observando-se os cromatogramas, verificou-se que a fibra azul apresentou uma melhor adsorção dos compostos. As fibras apresentaram cromatogramas similares no início da corrida, no entanto, a fibra preta adsorveu poucos compostos em relação à fibra azul após 17,5 minutos. Portanto, determinou-se a fibra azul como ideal para este experimento.

#### 4.4.2 - Determinação do Tempo de Exposição Ideal

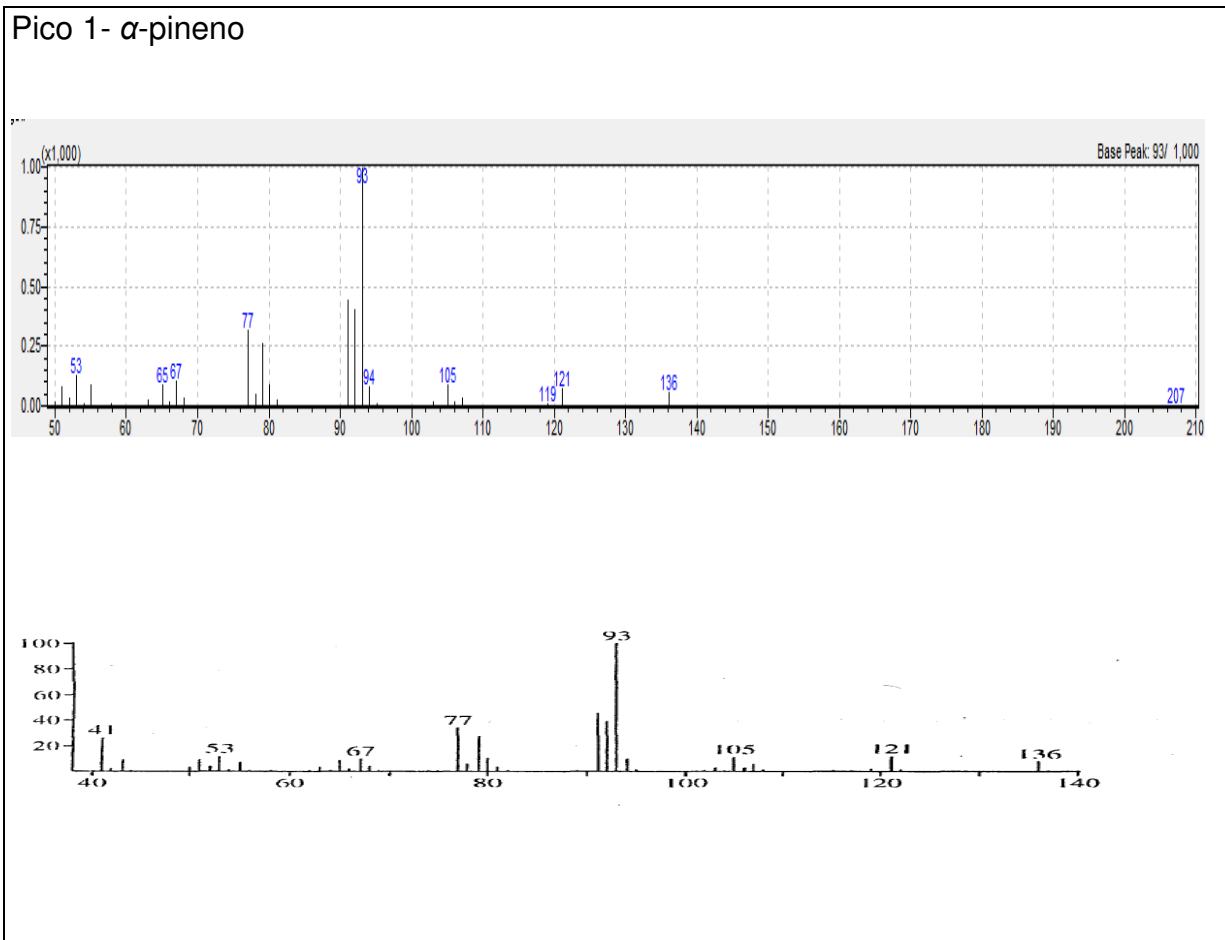
Verificou-se que para as condições empregadas (Item 3.11.2, p.46) que o tempo de exposição de 45 minutos é o tempo ideal, uma vez que a partir deste tempo mais compostos apareceram, como visto na **Figura 4.78**.

#### 4.4.3 - Compostos identificados em *A. graveolens* por HS-SPME

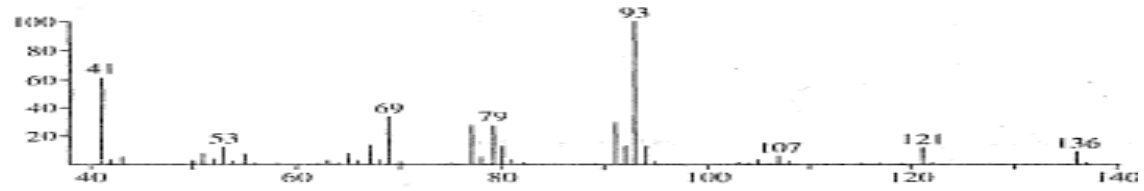
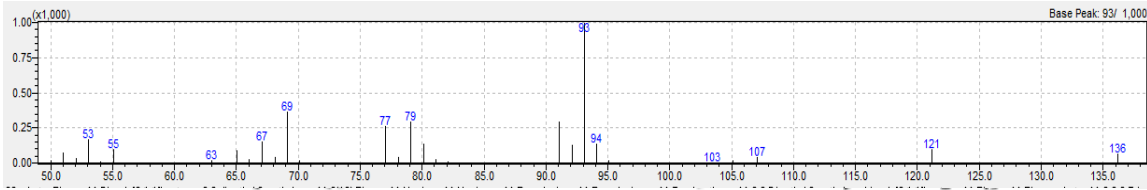
Realizou-se o experimento de extração dos voláteis de *A. graveolens* por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus IA e espectros de massas em comparação com a literatura (ADAMS, 2007) e NIST(2008).

Os compostos apresentaram um IA distante ao comparado com o IA da literatura (ADAMS, 2007), isto pode ser decorrente do livro utilizado para a comparação, pois este foi elaborado para identificação de compostos presentes em óleos essenciais. Assim, para identificar os compostos foram utilizados os espectros de massas obtidos pelo CG-EM e estes foram comparados com espectros da literatura (ADAMS, 2007) e NIST (2008)(**Figura 4.80**).

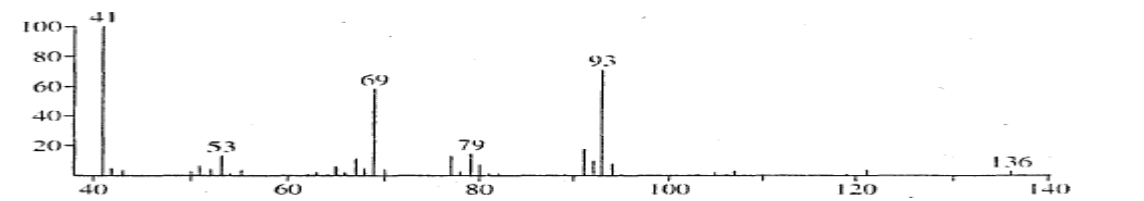
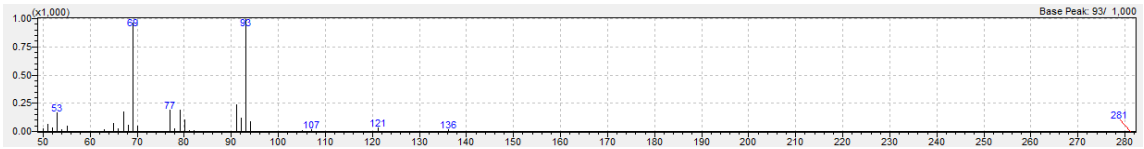
No total detectou-se 17 compostos, no entanto, identificou-se apenas 13, uma vez que os demais não apresentaram (**Figura 4.79-80 e Tabela 4.30**) espectros de massas semelhantes aos descritos na NIST (2008).



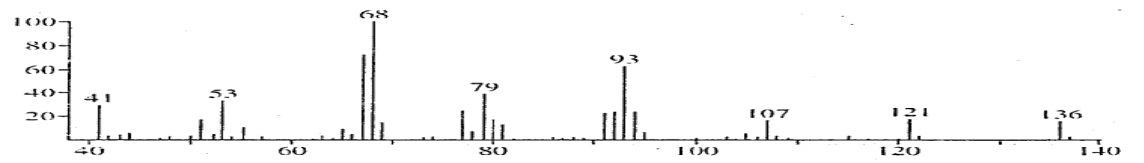
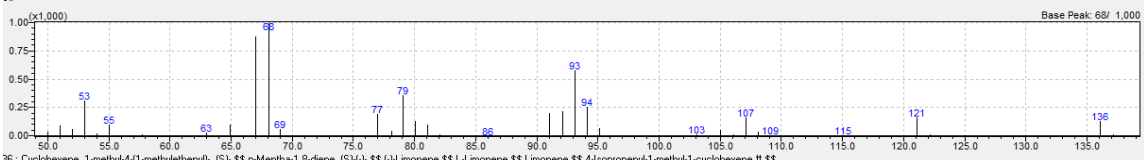
Pico 2-  $\beta$ -pineno



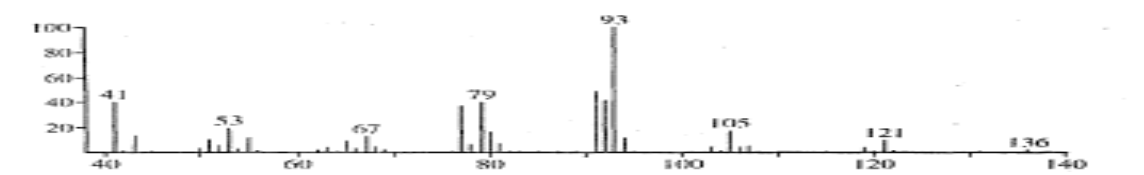
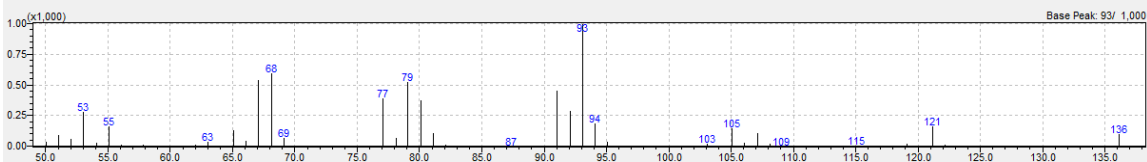
Pico 3 - Mirceno



Pico 4 - Limonemo

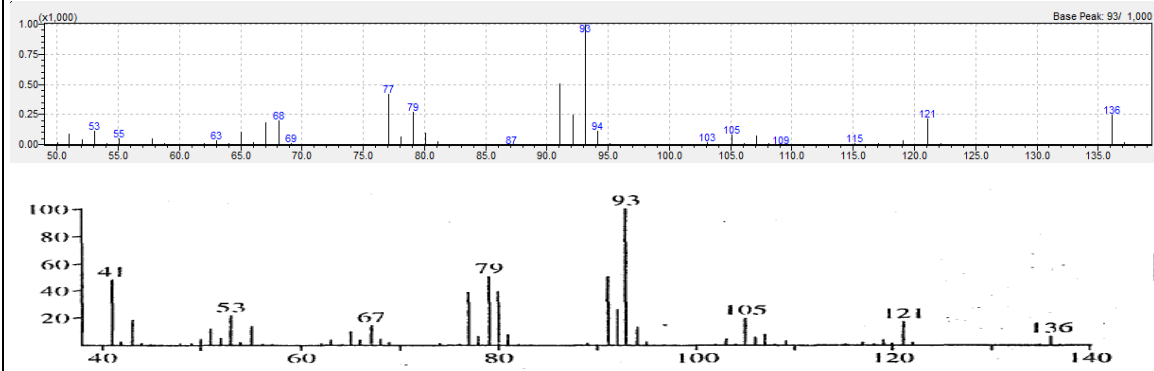


Pico 5-  $\beta$ -Ocimeno(Z)

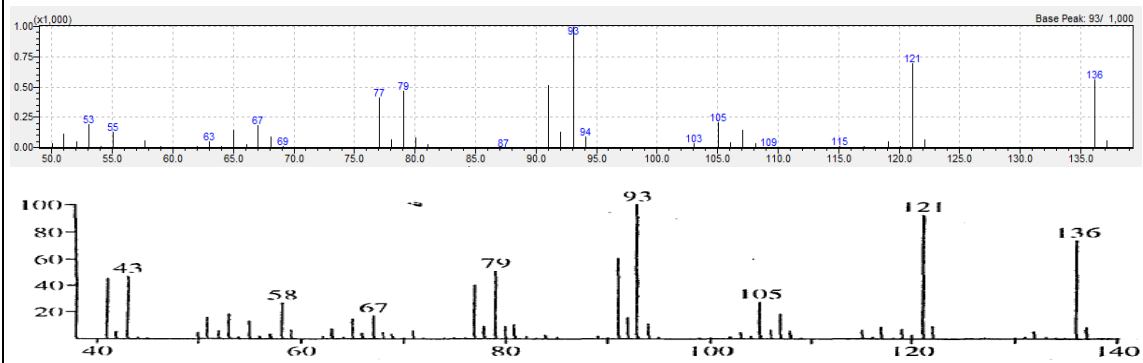




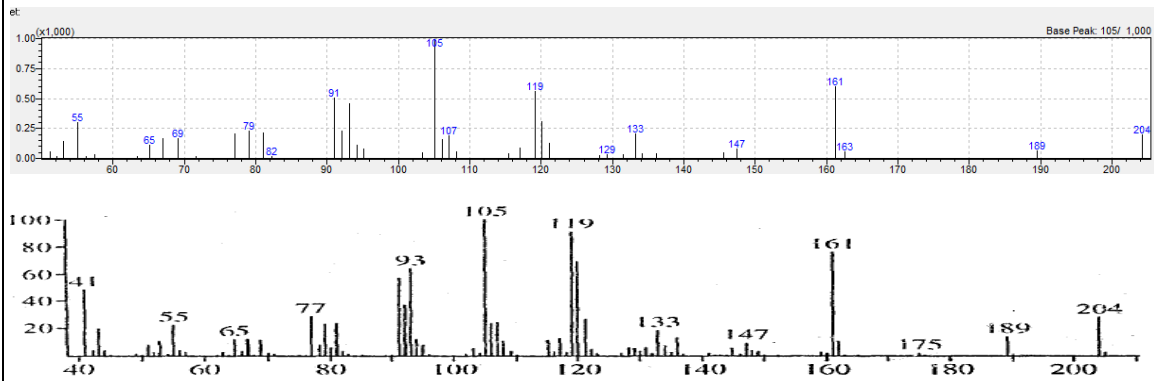
Pico 6-  $\beta$ -Ocimeno(E)



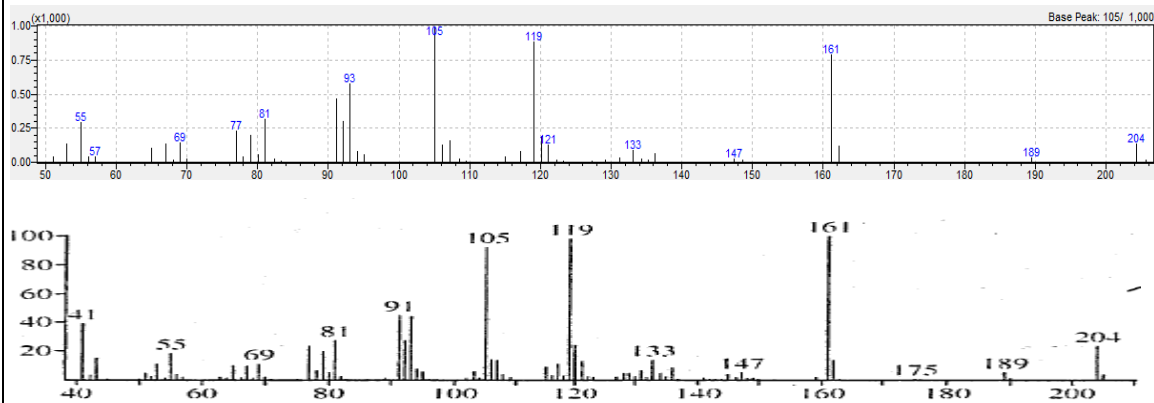
Pico 7 - Terpinoleno



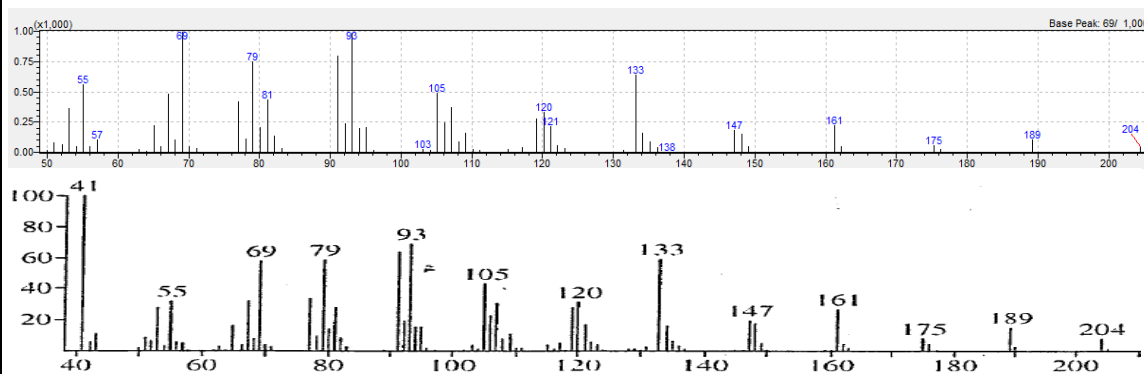
Pico 8 -  $\alpha$ -ylangeno



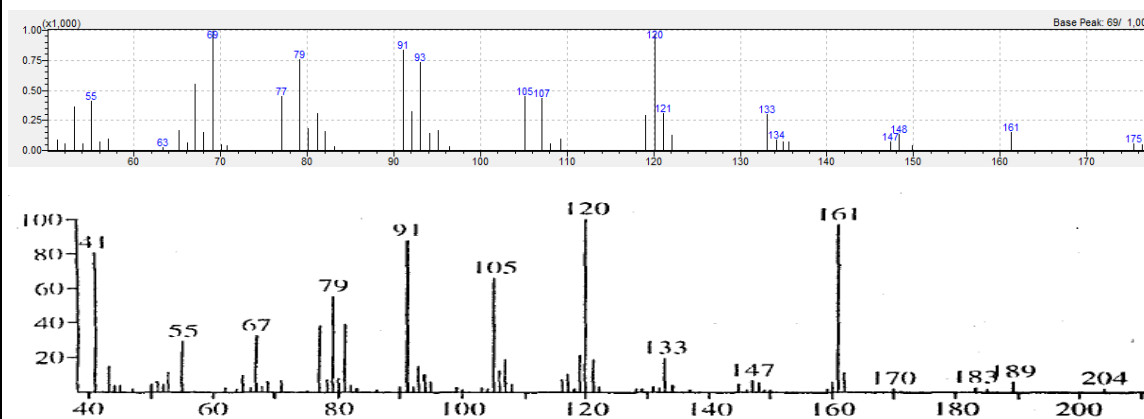
Pico 9 -  $\alpha$ -copaeno



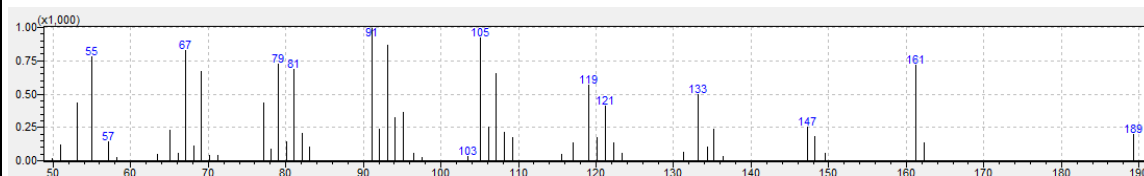
Pico 10- (*E*)-cariofileno



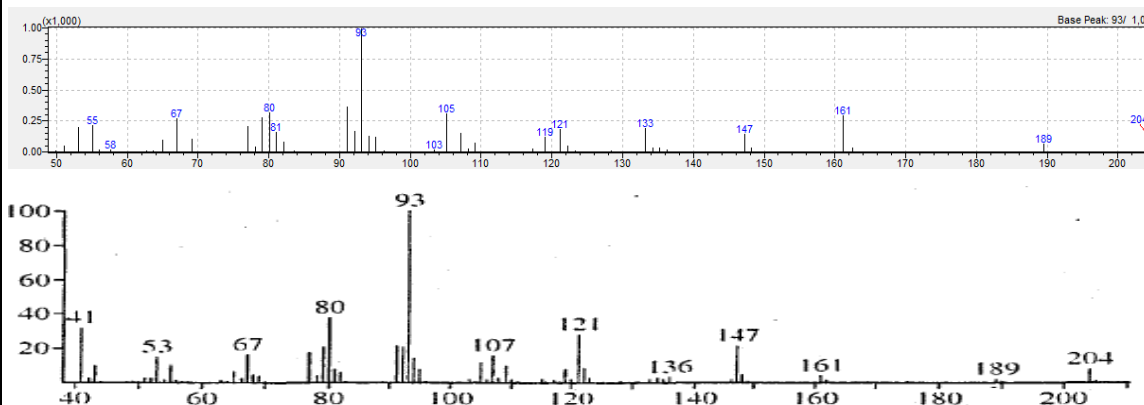
Pico 11 –  $\beta$ -ylangeno



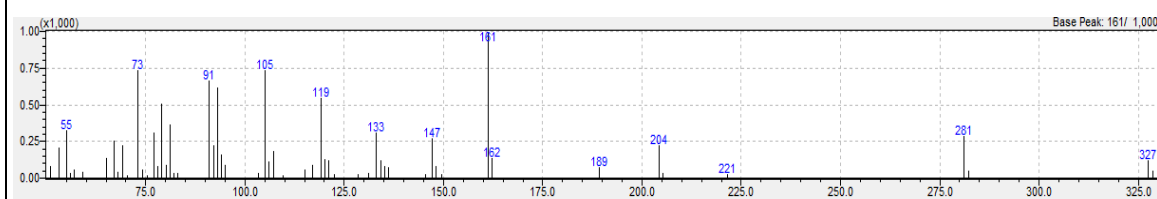
Pico 12-NI



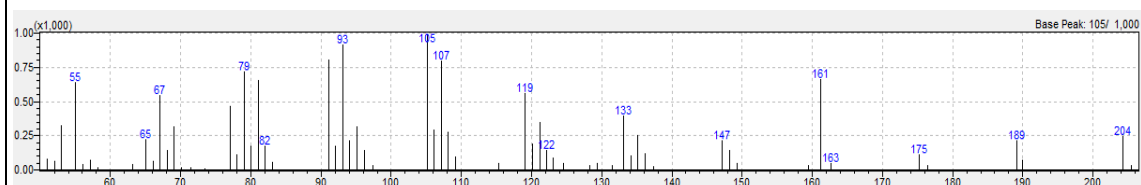
Pico 13 –  $\alpha$ -Humuuleno



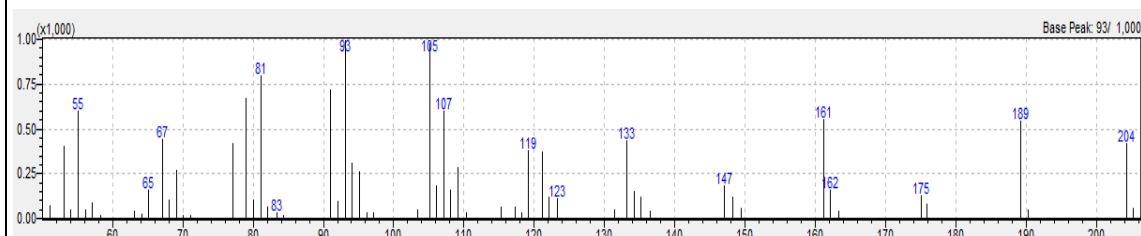
Pico 14-NI



Pico 15-NI



Pico 16- NI



Pico 17 –  $\gamma$ -cadineno

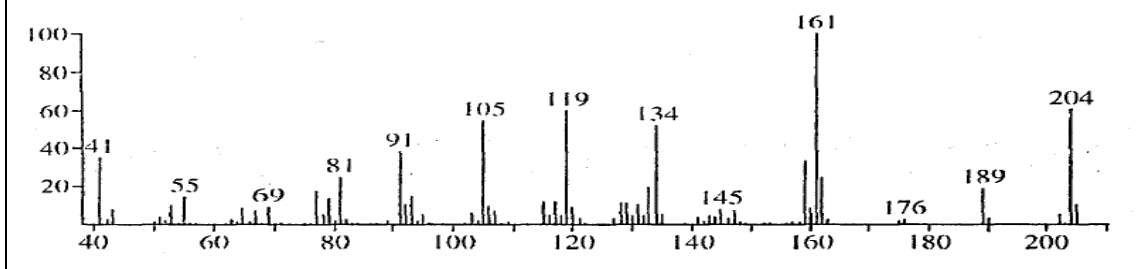
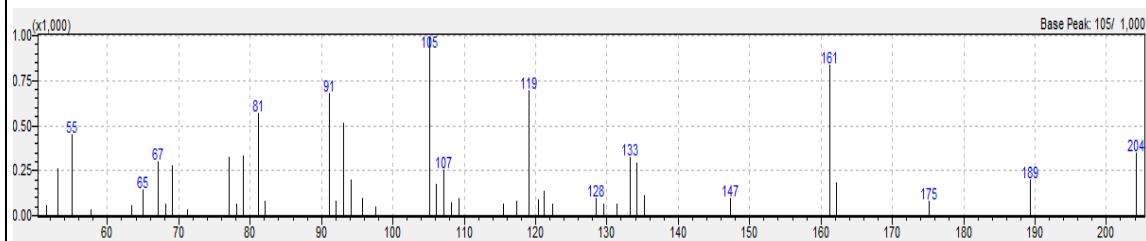


Figura 4.79 - Espectros de massas dos compostos obtidos pelo CG-EM comparados com espectros da literatura (ADAMS, 2007) e NIST(2008).

Tabela 4.30 - Compostos voláteis identificados em *A. graveolens*

| Pico | TR1    | IA   | IA<br>(ADAMS,<br>2007) | Compostos           | Teor (%) | PM  |
|------|--------|------|------------------------|---------------------|----------|-----|
| 1    | 6,754  | 849  | 932                    | $\alpha$ -pineno    | 2.54     | 136 |
| 2    | 7,834  | 894  | 974                    | $\beta$ -pineno     | 1.29     | 136 |
| 3    | 8,124  | 905  | 988                    | Mirceno             | 20.79    | 136 |
| 4    | 9,461  | 953  | 1024                   | Limoneno            | 54.11    | 136 |
| 5    | 9,683  | 961  | 1032                   | (Z)-Ocimeno         | 3.37     | 136 |
| 6    | 9,963  | 970  | 1044                   | (E)-Ocimeno         | 5.34     | 136 |
| 7    | 10,627 | 993  | 1086                   | Terpinoleno         | 5.63     | 136 |
| 8    | 17,728 | 1251 | 1373                   | $\alpha$ -ylangeno  | 0.19     | 204 |
| 9    | 17,871 | 1257 | 1374                   | $\alpha$ -Copaeno   | 0.81     | 204 |
| 10   | 18,898 | 1299 | 1417                   | (E)-cariofileno     | 2.83     | 204 |
| 11   | 19,093 | 1307 | 1419                   | $\beta$ -ylangeno   | 0.30     | 204 |
| 12   | 19,348 | 1317 | ---                    | NI                  | 0.50     | --  |
| 13   | 19,714 | 1332 | 1452                   | $\alpha$ -Humuuleno | 0.42     | 204 |
| 14   | 20,120 | 1348 | 1461                   | NI                  | 0.66     | --  |
| 15   | 20,499 | 1364 | 1345                   | NI                  | 0.60     | --  |
| 16   | 20,654 | 1371 | 1369                   | NI                  | 0.31     | --  |
| 17   | 21,096 | 1389 | 1522                   | $\delta$ -Cadineno  | 0.31     | 204 |

Tempo de retenção (TR<sub>M</sub>) obtido da quadruplicata, Índice aritmético calculado, Índice aritmético de ADAMS, 2007 (IA\*) e NI, Não identificado.

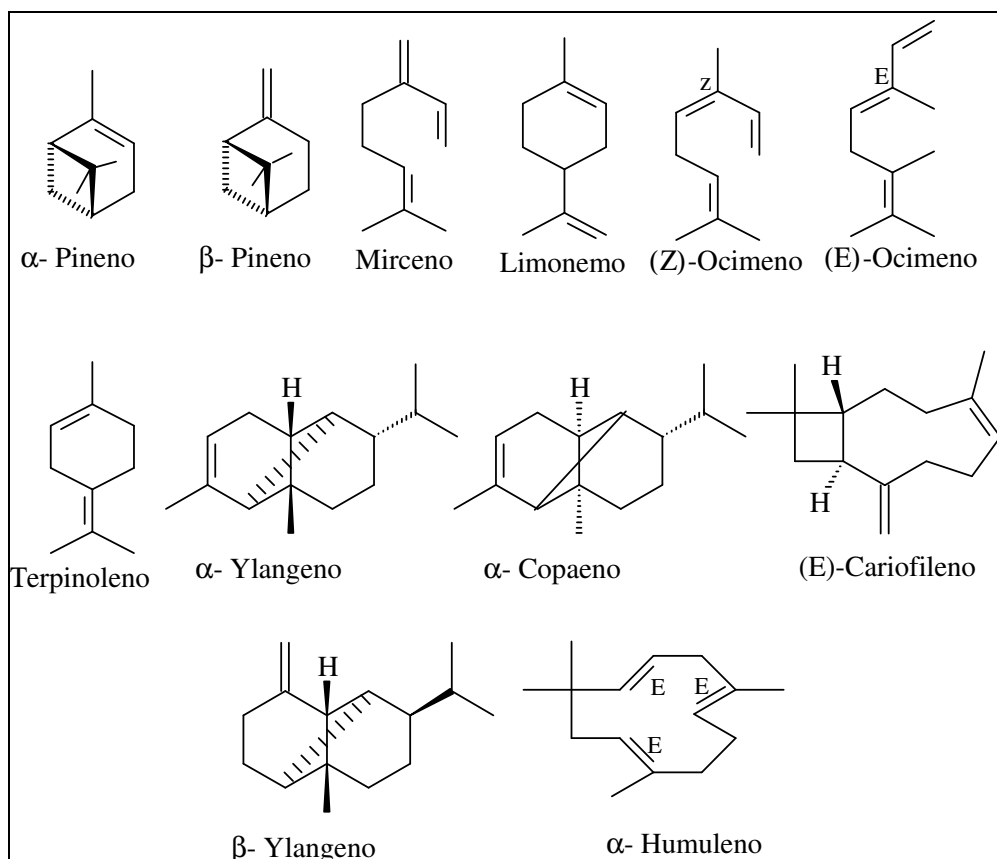


Figura 4.80 - Compostos voláteis identificados da fibra azul.

#### 4.4.4 - Coleta dos voláteis das folhas de *A. graveolens* pelo método de aeração

O cromatograma obtido pelo método de aeração através das condições descritas no **item 3.11.4** (p.48) está apresentado a seguir (**Figura 4.81-82 e Tabela 4.31**).

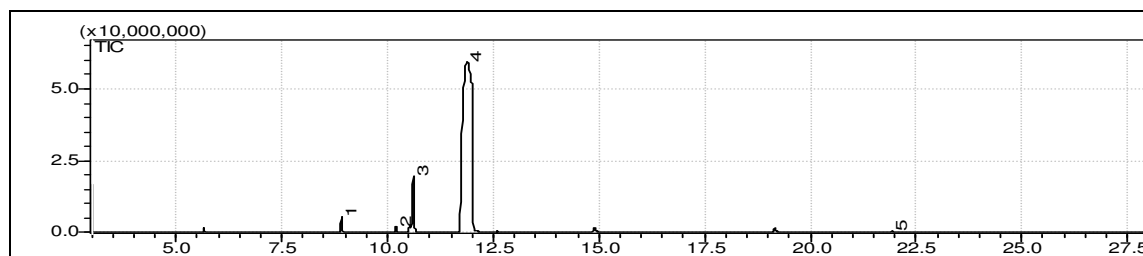


Figura 4.81 - Cromatograma obtido da extração de voláteis das folhas de *A. graveolens* pelo método de aeração.

Tabela 4.31 - Compostos voláteis das folhas de *A. graveolens* pelo método de aeração

| Pico | TR     | IA   | IR<br>(ADAMS,2007) | Composto         | PM  | Teor(%) |
|------|--------|------|--------------------|------------------|-----|---------|
| 1    | 8.915  | 933  | 932                | $\alpha$ -pineno | 136 | 6.07    |
| 2    | 10.208 | 978  | 974                | $\beta$ -pineno  | 136 | 2.60    |
| 3    | 10.612 | 993  | 988                | Mirceno          | 136 | 20.87   |
| 4    | 11.887 | 1037 | 1024               | Limoneno         | 136 | 69.84   |
| 5    | 21,931 | 1425 | 1417               | (E)-cariofileno  | 204 | 0.62    |

Tempo de retenção (TR), Índice de Aritmético calculado (IA) e Índice de Aritmético (IA) (ADAMS, 2007).

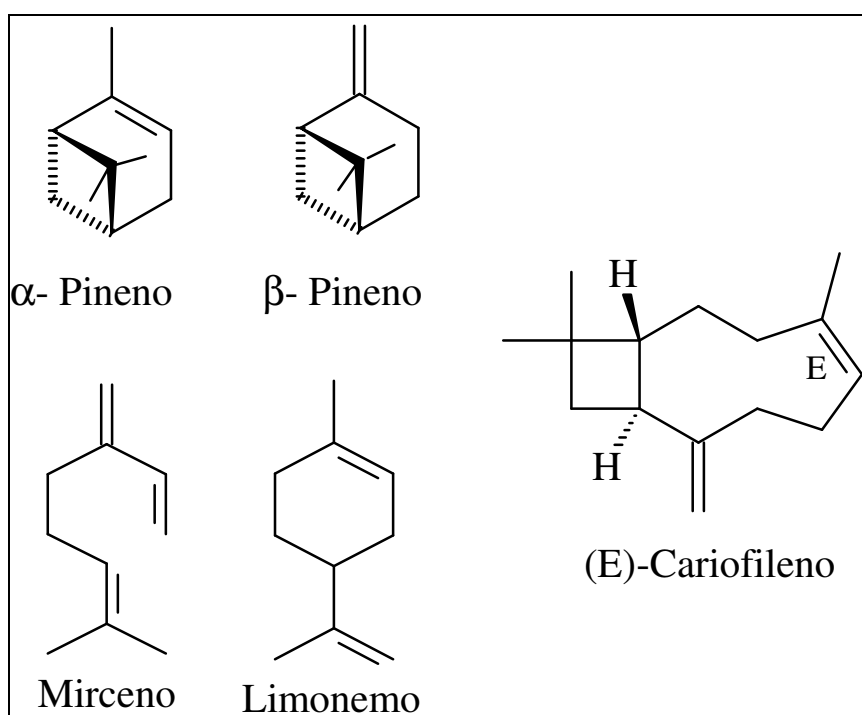


Figura 4. 82 – Compostos voláteis das folhas obtido pelo método de aeração.

Alguns compostos foram confirmados na extração por PORAPAK, entre eles estão,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, Mirceno, Limoneno e (E)-Cariofileno. Uma possibilidade para extração de mais alguns compostos seria a extração com outros solventes, uma vez que este experimento foi realizado apenas com hexano.

Vários são os relatos da ação de terpenos na literatura, entre os citados estão, o efeito antimicrobiano observado por LEITE *et al.* (2007) e BURT (2004), no qual compostos como  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno inibiram *Streptococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*.

A ação inseticida de monoterpenos foi observada contra *Sitophilus zeamais*, uma vez que, estes inibem a acetilcolinesterase nos insetos (JÚNIOR, 2003).

Efeitos de repelência foram demonstrados por ZACARIN *et al.* (2005), em que uma grande concentração destes compostos nos óleos essenciais provenientes das folhas de variedades de *citrus* causaram repulsão contra a *A. sexdens rubropilosa*, no entanto, este comportamento também foi observado por CHEN *et al.* (1984) com *Atta laevigata*, porém com voláteis de *A. graveolens*.

O composto *trans*- $\beta$ -ocimeno identificado entre os voláteis foi o responsável por esta ação observado por CHEN *et al.* descrita em 1984.

Devido a grande quantidade de monoterpenos (**Figura 481 e Tabela 4.30**) existentes nas folhas de *A. graveolens* é possível que estes apresentem a ação repelente contra *A. sexdens rubropilosa*, porém testes de atratividade devem ser realizados para confirmar a ação destes.

## **5 – Conclusões**

---





## 5. Conclusões

O estudo fitoquímico de *Astronium graveolens* proporcionou o isolamento e identificação de 11 metabólitos secundários: 6 chalconas diméricas, 2 flavonóides e 3 compostos fenólicos.

As chalconas diméricas estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Astronium* e, exceto a substância V, pela primeira vez na literatura.

Os ensaios realizados com os extratos brutos da raiz, caule e galhos de *A. graveolens* sobre *Atta sexdens rubropilosa* foram os tratamentos mais significativos com Md (sobrevivência mediana das operárias de *A. sexdens rubropilosa*) de 3 e 6 dias, respectivamente. Os ensaios das raízes perante o fungo simbionte *L. gongyophorus* foram promissores, os quais apresentaram uma inibição de 91%, entretanto, o extrato do caule e galhos apresentou apenas 35% frente ao controle.

As frações RVH e CGVACT, provenientes do extrato bruto da raiz, caule e galhos foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa* e apresentaram resultados de atividade inseticida mais significativa, 94 e 56% no 25º dia, respectivamente. Embora a fração RVH tenha apresentado um bom resultado de atividade inseticida, a fração RVACT foi particionada, pois apresentou uma inibição de 90% do fungo simbionte frente ao controle. Nesta fração identificou-se a presença das chalconas diméricas, flavonóides e outros compostos fenólicos. A fração CGVACT não apresentou uma inibição significativa, uma vez que inibiu apenas 41% do crescimento micelial frente ao controle. Nesta fração foram identificados um flavonóide e dois compostos fenólicos.

As substâncias ensaiadas frente à formiga cortadeira e o fungo simbionte não apresentaram resultados promissores, o efeito observado de RVACT e CGVACT pode estar relacionado ao sinergismo, ou há alguma substância não isolada e identificada.

Os resultados obtidos dos ensaios realizados com os extratos brutos de *A. graveolens* sobre *Spodoptera frugiperda* não se mostraram significativos, como também as substâncias testadas, como miricetrina e galato de metila não foram promissoras.

É importante ressaltar que não há relatos na literatura de ensaios biológicos com o gênero *Astronium* sobre *A. sexdens rubropilosa*, *L. gongylophorus* e *S. frugiperda*, reforçando assim a importância deste estudo.

Além disso, não foi possível completar o estudo de todos os extratos e frações obtidas, desta forma não foram identificados e ensaiados todos os metabólitos secundários das diferentes partes da espécie em estudo.

A análise de voláteis pela técnica Headspace-SPME levou a identificação de 13 compostos, tendo o relato na literatura de algumas delas com atividade repelente e inseticida.

A extração dos voláteis pelo método de aeração levou à identificação de 5 compostos, incluindo a presença de alguns já identificados pela técnica Headspace-SPME. Para determinar a atratividade ou a repelência seria necessário realizar os ensaios através de testes com olfâmetro em “Y” e Eletroantenográfica (EAG).

O estudo fitoquímico, acompanhado por ensaios biológicos e a identificação de voláteis realizados neste trabalho contribuíram para a descoberta da atividade biológica de algumas frações, que poderão ser utilizadas no controle insetos praga. Estas atividades têm possibilidades de serem causadas pela ação sinérgica dos constituintes químicos das mesmas, uma vez que os compostos testados apresentaram pouca atividade. Outra possibilidade que também deve ser comprovada com futuros estudos é a se alguma(s) substância(s) seja(m) muito ativa(s).

O isolamento de 6 substâncias, que pelo levantamento bibliográfico realizado, são inéditas na literatura contribuiu com a quimiosistemática da família Anarcadiaceae e na formação da mestrandia, pois as determinações das estruturas das mesmas apresentaram diversos desafios e envolveu diversas técnicas modernas de identificação de substâncias e seus isolamentos.

## **6- Bibliografias**

---



## 6. Bibliografias

- ABRIL, A. B. & BUCHER, E.H. "Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants". *Appl. Soil Ecol.*, **26**: 243–247, 2004 .
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation*, 4ª Edição, 804 p., 2010.
- ALMADO, R.P. Manejo de formigas cortadeiras na arcelormittal florestas. *Biológico*, **69**: 133-133, 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.
- ALMEIDA, R.N.A.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLIN, M. J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. & DA SILVA, M.F.G.F. "Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller". *BioAssay*, **2**: 1-8, 2007.
- AMANTE, E. "Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* no Estado de São Paulo". *Silvicultura em São Paulo*, **6**: 355-363, 1967.
- ANDRADE, J.B. & SARNO, P. "Química Ambiental em Ação: Uma Nova Abordagem para Tópicos de Química Relacionados com o Ambiente". *Quim. Nova*, **13**: 213-221, 1990.
- ANDRADE-NETO, M.; MENDES, P. H.; SILVEIRA, E.R. "An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*". *Phytochemistry*, **42**: 885-887, 1996.
- ANURADHA, V.; SRINIVAS, P.V.; RAO, R.R.; MANJULAYHA, K.; PUROHIT, M.G.; RAO, I.M. "Isolation and syntheses of analgesic and anti-inflammatory compounds from *Ochna squarrosa* L". *Bioorganic Med. Chem.*, **14**: 6820–6826, 2006.
- ARAUJO, S.M.M.; DE LEMOS, R.N.; DE QUEIROZ, M.E.R.; NUNES, G.S. "Uso de Inseticidas Organofosforados nos Pólos de Produção na Ilha de São Luís (MA): Condições de Trabalho e Contaminação de hortaliças". *Pestic.: R. Ecotoxicol. Meio Amb.*, **11**: 159-179, 2001.
- ARIMOTO, M. & NISHIBE, S. "Structure Elucidation and Synthesis of the Lignans from the Seeds of *Hernandia ovigera* L.". *Studies in Nat. Prod. Chem.*, **18**: 551-606, 1996.
- AUTORI, M. Longevidade de uma colônia de saúva (*Atta sexdens rubripilosa* Forel, 1903) em condições de laboratório. *Cien Cult.*, **2**: 285-286, 1950.
- AVULA, B.; WANG, Y.-H.; SMILLIE, T. J.; FU, X.; LI, X.C.; MABUSELA, W.; SYCE, J.; JOHNSON, Q.; FOLK, W.; KHAN, I.A. "Quantitative determination of flavonoids and cycloartanol glycosides from aerial parts of *Sutherlandia frutescens* (L.) R. BR. by

- using LC-UV/ELSD methods and confirmation by using LC-MS method". *J. of Pharmac. and Biomed. Analysis*, **52**: 173–180, 2010.
- BALUNAS, M. J. & KINGHORN, A.D. "Drug Discovery from Medicinal Plants", *Life Sciences*, **78**: 431-441, 2005.
- BANDEIRA, M.A.M; MATOS, F.J. de A.; BRAZ-FILHO, R. "Structural elucidation and total assignment of the  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of new chalcone dimers". *Magn. Reson. Chem.*, **41**: 1009–1014, 2003.
- BARRIONUEVO, W.R. & LANÇAS, F.M. "Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água". *Quim. Nova*, **24**: 172-175, 2001.
- BARROS, R.G.; ALBERNAZ, K.C.; TAKATSUKA, F.S.; CZEPAK, C.; FERNANDES, P.M.; TOFOLI, G.R." Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797)(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) na cultura do algodoeiro". *PAT*, **35**: 179-182, 2005.
- BASS, M. & CHERRETT, J.M. "Fungal Hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*" *Physiol. Ent.*, **20**: 1-6, 1995.
- BATISTA-PEREIRA, L.G.; PETACCI, F.; FERNANDES, J.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; MALASPINA, O. "Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*". *Pest. Manag. Sci*, **58**: 503, 2002.
- BERNAYS, E.A. & CHAPMAN, R.F. *Host-Plant selection by phytophagous insect*. Editora CHAPMAN & HELL, 16 p., 1994.
- BIGI, M.F.M.A.; TORKOMIAN, V.L.V.; GROOTE, S.T.C.S.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M. F.G.F. "Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*". *Pest. Manag. Sci.* , **60**: 933- 938, 2004.
- BOARETTO, M.A.C. & FORTI, L.C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". *Série Técnica Ipef*. Departamento de Defesa Fitossanitária DaFCA/UNESP, **11**: 31-46, 1997.
- BOT, A.N.M.; ORTIUS-LECHNER, D.; FINSTER, K.; MAILE, R.; BOOMSMA, J.J." Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants". *Insectes Soc.* **49**: 363–370, 2002.
- BURT, S. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods". *Int. J. Food Microbiol.*, **94**: 223-253, 2004.
- BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N.. "Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves". *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6689-6695, 2003.

- BRAGA, Y.F.B.; GRANGEIRO, T.B.; EDER, A.F.; LOPES, H.L.; BEZERRA, J.S.; ANDRADE-NETO, M.; LIMA, M. S.. "Insecticidal activity of 2-tridecanone against the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae)" *An. Acad. Bras. Cienc.*, **79**: 35-39, 2007.
- 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**: 107-113, 1997.
- BUGRIN, V.S.; KOZLOV, M.Y.; BASKIN, I.I.; MELIK-NUBAROV, N.S." Intermolecular Interactions Governing Solubilization in Micelles of Poly(alkylene oxide) Surfactants". *Polym. Sci., Ser. A*, **49**: 463-472, 2007.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; NÖRNBERG, S.D. "Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas". *Ciênc. Agrotec., Lavras*, **28**: 1278-1283, 2004.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; NÖRNBERG, S.D.; STEFANELLO, Jr.; GETULIO, J.; ZOTTI, M.J. "Preferência para alimentação de biótipos de *spodoptera frugiperda* (j.e. smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) por milho, sorgo, arroz e capim-arroz". *R. bras. Agrociência*, **10**: 215-218, 2004.
- CALDERON, J.S.; CÉSPEDES, C.L.; ROSAS, R.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; SALAZAR, J.R.; LINA, L.; ARANDA, E.; KUBO, I. "Acetylcholinesterase and insect growth inhibitory activities of *Gutierrezia microcephala* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)". *Z. Naturforschung C.*, **56c**: 382-394, 2001.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M. ; PAOLI, A.A.S. "Estrutura do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas". *Rev. Bras. Bot.*, **23**: 87-96, 2000.
- CARVALHO, J.E. "Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese". *Multi Ciência: Construindo a História dos Produtos Naturais*, p.7, 2006.
- CASTRO, M. DE J.P.; DA SILVA, P.H.S.; PÁDUA, L.E. DE M. "Atividade de extrato de *Piper tuberculatum* Jacq.(*Piperaceae*) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)". *Rev. Cienc. Agron.*, **39**: 437-442, 2008.
- CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. "Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* raddi (ANACARDIACEAE)". *Quim. Nova*. **30**: 597-599, 2007.
- CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G.H.N. "Biological activity of limonoids from the Rutales". *Phytochemistry*, **31**: 377-394, 1992.
- CINTRA, P.; BUENO, F.C.; BUENO, O.C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*, **45**: 347-353, 2005.



- CHEN, T. K.; WIEMER, D.F.; HOWARD, J.J. "A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*". *Naturwissenschaften*, **71**: 97-98, 1984.
- CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M.. "Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae". *Quim. Nova*, **29**:1287-1300, 2006.
- COSTA, L.L.F. & SANT'ANA, E.S. "Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de santa catarina através da SPME-GC-ECD". *Quim. Nova*, **31**: 79-83, 2008.
- COSTA, A.C.R.; SILVA, A.L.R.; SOUSA, C.R.; NASCIMENTO, R.R.G. In: CONGRESSO NACIONAL DE QUÍMICA do RN, 47. 2007, Rio Grande do ... Aborgagem Fitoquímica e Avaliação da Atividade Larvicida e Nematecida de *Astronium fraxinifolium* Schott. Natal: ABQ, 2007.
- CRONQUIST, A.J. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, NY. 1262 pp.1981.
- CRONQUIST, A.J. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 1262 p.,1988.
- CRUZ, I. & OLIVEIRA, A.C. "Flutuação populacional do predador *Doru luteipes scudder* em plantas de milho". *Pesq. Agrop. Bras.*, **32**: 363-368, 1997.
- CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J.C.; KARAM, D.; MAGALHÃES, P.C.; RESENDE, M.A. A Cultura do Milho. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, p. 304-362, 2008.
- CRUZ, I.; VIANA, P.A; WAQUIL, J.M. "Cultivo do milho: pragas da fase vegetativa e reprodutiva". Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. 2002. 8p. (EMBRAPA/CNPMS. Comunicado Técnico, n. 49).
- CURRIE, C.R. "A Community of ants, fungi and bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis". *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 357-80, 2001.
- CURRIE, C.R. & STUART, A.E. "Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants". *Proc. R. Soc. Lond. B*, **268**: 1033-1039, 2001.
- CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C.; MALLOCH, D. "Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites". *Nature*, **398**: 701-704, 1999a
- CURRIE, C.R.; MUELLER, U.G.; MALLOCH, D. "The agricultural pathology of ant fungus gardens". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 7998-8002, 1999b.
- CURRIE, C.R.; WONG, B.; STUART, A.E.; SCHULTZ, T.R.; REHNER, S.A.; MUELLER, U.G.; SUNG, G.H.; SPATAFORA, J.W.; STRAU, N.A. "Ancient Tripartite Coevolution in the Attine Ant-Microbe Symbiosis". *Science*, **299**: 386-388, 2003.
- DA SILVA, M.P.L.; ALVES, L.S.; CARVALHO, R. da S.; DA SILVA, F. da. "Atividade inseticida de Extrato Aquoso de Gengibre *Zingiber officinale* L. no Controle do Pulgão preto *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemíptera: Aphididae) em Citros". *Rev. Bras. Agroecol.*, **4**: 677-680, 2009a.

- DA SILVA, V.C.; DE CARVALHO, M.G.; BORBA, H.R.; SILVA, S.L. C. "Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**: 573-576, 2008.
- DA SILVA, V.C.; RODRIGUES, C.M.; DOS SANTOS, L.C; VILEGAS, W. "Derivados fenólicos isolados de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae)." *Livro de Resumos da 19a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza -CE, 2009. Resumo PN-145.
- DE ANGELIS, G.G. & WILDMAN, W.C. "Circular dichroism studies-I A quadrant rule for the optically active aromatic chromophore in rigid polycyclic systems". *Tetrahedron*, **25**: 5099-5112, 1969.
- DE SIQUEIRA, C.G.; JUNIOR, M.B.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. "Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L." *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4820-22, 1998.
- DE SOUZA, R.M.; DOS ANJOS, N.; CORDEIRO, G.; MOURÃO, S.A. "Primeiro registro de *Ata sexdens rubropilosa* forel atacando árvores de nim, *Azadirachta indica* a. juss". *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **76**: 729-733, 2009.
- DELLA LUCIA, T.M.C. "Leaf-cutting ant control in Brazil: state of the art". *Mirmecologia Tropical, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia*, Ilhéus Bahia, 147-151 p, 1997.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F.; ANJOS, N.; MOREIRA, D.O. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. IN: DELLA LUCIA, T.M.C. *As formigas cortadeiras*. Viçosa. Editora Folha de Viçosa, p 151-162, 1993.
- DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R.L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. "Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "Caatinga" region in the northeastern Brazil." *J. Ethnopharmacol.*, **67**: 69-77, 1999.
- DESPRÉS, L.; DAVID, J.P.; GALLET, C. "The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals". *Trends Ecol. Evol.*, **22**: 345-352, 2007.
- DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2 ed. England: John Wiley & Sons, LTD. 81pp. 2001.
- DI STASI, L.C. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar* São Paulo – Editora Unesp, 1996. p. 230.
- DOS SANTOS, A.R.; DE BARROS, M.P.; SANTIM, S.M. de OLIVEIRA; SARRAGIOTTO, M.H.; DE SOUZA, M.C.; EBERLIN, M.N.; MEURER, E.C. "Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (RUBIACEAE)". *Quim. Nova*, **27**: 525-527, 2004.
- DOURADO, P.M. Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e spinosad no Brasil. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, 2009. Dissertação de mestrado, 72 p.

- DUARTE, S.M. DA SILVEIRA; DE ABREU, C.M.P.; DE MENEZES, P.F.B.A.; PEREIRA, R.G.F.A.; GOUVÊA, C.M.C.P. "Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos". *Cienc. Tecn. Aliment.*, **29**: 703-708, 2009.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIAPA UVA E VINHO  
Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2011.
- FERNANDES, J.B.; DAVID, V.; FACCHINI, P.H.; DA SILVA M.F.G.F.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P.C. "Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote." *Quím. Nova*, **25**: 1091-1095, 2002.
- FILHO, O.P.; DORVAL, A.; FILHO, E. B. "Leaf cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) preference for different species under laboratory conditions." *Ciência Florestal*, Santa Maria, **1**: 1-7, 2002.
- FONSECA, R.B.F.; CARVALHO, L.M.J. DE; RANGEL, C.N.; BIZZO, H.R. "Microfibers for juice analysis by solid-phase microextraction" *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **28**: 166-169, 2008.
- FOWLER, H.G. & STILES, E.W. "Conservative resource management by leaf-cutting ants: the role of foraging territories and trails, and environmental patchiness." *Sociobiology*, **5**: 24-41, 1980.
- GAFNER, S; WOLFENDER, J.L.; NIANGA, M; STOECKLI-EVANS, H, HOSTETTMANN, K.. "Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots." *Phytochemistry* **42**: 1315-1320, 1996.
- GALLO, M.B.C. "Busca de produtos naturais bioativos de plantas das famílias *Mirtaceae* (*Siphonogena densiflora*) *Verbenaceae* (*Vitex polygama*)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química UFSCar, 2004, Tese de Doutorado. 419p.
- GALLARDO, E.; COSTA, S.; BARROSO, M.. "A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações". *Rev. Lusófona de C&T Saúde*, **1**: 105-124, 2009.
- GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; BUSATO, G.R. "Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (lep.:NOCTUIDAE) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros". *R. Bras. Agrociência*, **8**: 219-224, 2002.
- GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; JUNIOR, M.B.; DA SILVA, M.F.G.F, VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; PAGNOCCA, F.C. "Inhibition of the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants by Coumarins". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 669-672, 2005.
- GUERREIRO; C.S.M. & PAOLI, A.S. "Estrutura do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas". *Rev. Bras. Bot.*, **23**: 87-96, 2000.

- GUSMÃO, L.G. & LOECK, A.E. "Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (hymenoptera:formicidae) na zona sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil." *Rev. Bras. Agric.*, **5**: 64-67,1999
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. *The Flavonoids: Advances in Research*, University Press, Cambridge: 464, 1982.
- HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE PASCUAL-TERESA, S.. "Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity". *Food Chem.*: **121**: 691–696, 2010.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. "*The ants*". The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusets. 23, 732p.,1990.
- HOWARD, J.J. & WIEMER, D.F. "Chemical Ecology of Host Plant by the Leaf-cutting Ant *Atta cephalotes*". IN: *Fire Ants and Leaf-cutting Ants. Biology and Management*. 1986. Westview Press, 260-273.
- IMAI, T.; INOUE, S.; OHDAIRA, N.; MATSUSHITA, Y.; SUZUKI, R.; SAKURAI, M.; JESUS, J.M.H.; OZAKI, S.K.; FINGER, Z.; FUKUSHIMA, K. "Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipterys*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecoint* and their antioxidant activities." *J. Wood Sci*, **54**: 470-475, 2008.
- IVERSON, S.L.; HU, L.Q.; VUKOMANOVIC, V.; BOLTON, J.L. "The Influence of the p-Alkyl Substituent on the Isomerization of o-Quinones to p-Quinone Methides: Potential Bioactivation Mechanism for Catechols". *Chem. Res. Toxicol.*, **8**: 537-544, 1995.
- JACCOUD, D'A. de B. Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas. Ed. IBAMA, 56 p., 2000.
- JÚNIOR, C.V. "Terpenos com Atividade Inseticida: Uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos". *Quim. Nova*, **26**: 390-400, 2003.
- KNAAK, N.; TAGLIARI, M.S.; FIUZA, L.M. "Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)". *Arq. Inst. Biol.*, **77**: 83-89, 2010.
- 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.
- KIM, J.; KWON, Y.; CHUN, W.; KIM, T.; SUN, J.; YU, C.; KIM, M. "*Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and a-glucosidase inhibitory effect". *Food Chem.*, **120**: 539–543, 2010.
- KOMATSU, E. & AVZ, J.M. "otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida". *Quim. Nova*. **27**: 720-724, 2004.
- LABINAS, A.M. & CROCOMO, W.B. "Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae)". *Acta Sci.* **24**: 1401-1405, 2002.

- LACERDA, F.G. "Comportamento e Morfologia das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) envolvidas na manipulação de lixo das colônias" Viçosa, Programa de Pós Graduação em Entomologia, UFV, 2008. Tese de doutorado. 78 p.
- LEITE, A.C.; MATOS, A.P.; BATISTA-PEREIRA, L.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F. "Activity of triterpenoids from *Cedrela fissilis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda*". *Biopestic. Int.* **4**: 28–34, 2008.
- LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; DE SOUZA, E.L.; DINIZ, F.F.M.; TRAJANO, V.N.; DE MEDEIROS, I.A. "Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria." *Braz. J. Pharm. Sci.*, **43**: 121-126, 2007.
- LESTREMAU, F. & FANLO, J.L.. "Formation of artefacts during air analysis of volatile amines by solid-phase micro extraction". *Analyt.*, **126**: 1969–1973, 2001.
- LINDROTH, R.L.; PETERSON, S.S. "Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae." *Oecologia*, **75**: 185-189, 1988.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M. das G.; MORAES, J.C.; ANDRADE, M.A.; MELO, B.A.; RODRIGUES, V.G.. "Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)", **26**: 1-5, 2010.
- LOGUERCIO, L.L.; CARNEIRO, N.P.; CARNEIRO, A.A.. "Milho Bt: Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga." *Rev.Biotecnol. Ciênc. Desenvolvimento*, **24**: 46-52, 2002.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas nativas do Brasil*. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002. 19p.
- LUCIO, E.M.R.; SHARAPIN, N.; FRANÇA, H.S. "Estudo de alcalóides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire." *Rev. Bras. Farmacogn.*, **12**: 130-131, 2002.
- MA, J.; LUO, X.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA,C.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY. "Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota* (Sapodilla)". *J.Nat. Prod.*, **66**; 983-986, 2003.
- MARICONI, F.A.M. "*Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*". 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Livraria Nobel S. A., 466p, 1976.
- MARKHAM, K.R. & TENAI, B. "13C NMR of flavonoids – II, flavonoids other than flavone and flavonol aglycones". *Tetrahedron*, **32**: 2607-2612, 1976.
- MARTIN, M.M. "The Biochemical Basis of the Fungus-Attine Ant Symbiosis" *Science*, **169**: 16-20, 1970.
- MARTINAZZO, T.; PIETROWSKI, V.; CORDEIRO, E.S.; ECKSTEIN, B.; GRISA, S. "Liberação de *Trichogramma pretiosum* para controle biológico de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho". *Rev. Bras. Agroecol.*, **2**: 1657-1660, 2007.

- MARTINEZ, S.S. & EMDEN, H.F.V..” Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Caused by Azadirachtin” *Neotrop. Entomol.*, **30**: 113-125, 2001.
- MARTINS, G.L.M.; MARUYAMA, L.C.T.; TOMQUELSKI, G.V.; MARUYAMA, W.I. “Efeito de alguns inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: NOCTUIDAE) e *Dichelops* sp. (homoptera: PENTATOMIDAE) na fase inicial da cultura do milho”. *Rev. Cient. Eletr. Agron.*, **9**, 2006.
- MATOS, A.P.; NEBO, L.; CALEGARI, E.R., BATISTA-PEREIRA, L.G.; VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; FILHO, F.P.; RODRIGUES, R.R.” Atividade Biológica de Extratos Orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em Dieta Artificial”. *BioAssay*, **1**(7): 1-6 ,2006.
- Ministério do Meio Ambiente:  
<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=111>. Acesso dia 07/06/2010.
- MOTA, B.C.F.; SOUZA, L.M.; MERCADANTES-SIMÕES, M.O.; FERNANDES, M.F.G; SANTOS, H.C.M. Atividade Antifúngica e Antibacteriana de Metabólitos Secundários de Plantas. III Fórum gestão, pesquisa, ensino, extensão da Universidade Estadual de Montes Claros. 23-25 de setembro de 2009.
- MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M.; MALLOCH, D. “The Origin the Attine Ant-Fungus Mutualism”. *Q. Rev. Biol.*, **76**: 169-197, 2001.
- MUELLNER, A.N.; SAMUEL, R.; JOHNSON, S.A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T.D.; CHASE, M.W. “Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences”. *Am. J. Botany*, **90**: 471-480, 2003.
- 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 Westwrn Corn Rootworm”. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2293-2299, 1991.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. “Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.” *J. Nat. Prod.*, **66**: 1022-1037, 2003.
- OLIVEIRA, H.G; LACERDA, F.G.; MARINHO, C.G.S.; DELLA LUCIA, T.M.C..” Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyrinteina arnobia*” *Pesq. Agropec. Bras.*, **39**: 285-287, 2004.
- OLIVEIRA, E.R.M.; MOURA, B.S.; COELHO, G.L.V. ”Análise de *flavor* por microextração em fase sólida (spme)”. *Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Vida*, **27**: 01-09, 2007.
- PAIVA, M.J.N.; MARTINS; I.; DE SIQUEIRA. M.E.P.B. “Analysis of *ortho*-Cresol in Urine by Solid Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography” *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**: 1034-1039, 2007.

- PAN, S.; DING, H.; CHANG, W.; LIN, H. "Phenols from the Aerial Parts of *Leonurus sibiricus*." *J. Chin. Pharm.*, **58**: 35-40, 2006.
- PARREIRA, F.V. & CARDEAL, Z. DE L. "Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida". *Quim. Nova*, **28**: 646-654, 2005.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à Espectroscopia. Editora Cengage Learning, 4ª Edição, 227 p., 2010.
- PELTER, A.; WARD, R.S.; GRAY, T.I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Flavonoids and Related Compounds. *J. Chem. Perkin I*, **23**: 2475-2483, 1976.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUANES, MC; MUNOZ, J.D.; CRUANES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. "Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*". *J. Ethnopharmacol.*, **77**: 37-40, 2001.
- PEREIRA, L.G.B. "Táticas de Controle da Lagarta-do-Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda*." Minas Gerais: CETEC/MG, 2007.1-27p. (CETEC/MG. Dossiê Técnico)
- PETERNELLI, E.F.O.; BARBOSA, L.C.A.; DELLA LUCIA, T.M.C. "Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) from *Mabea fistulifera* ELAIOSOME". *Quim. Nova*, **31**: 475-478, 2008.
- PINHEIRO, C.U.B. "Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil." *Acta Bot. Bras.*, **6**: 141-150, 2002.
- PIZZOLATTI, M.G.; JUNIOR, A.C.; SZPOGANICZ, B.; DE SOUSA, E.. "Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (LEGUMINOSAE)". *Quim. Nova*, **26**: 466-469, 2003.
- POLANCZYK, R.A.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M.. "Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)". *J. Braz. Microbiol.*, **31**: 165-167, 2000.
- REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO DO RS (50 e 33: 2005: Porto Alegre). Indicações técnicas para cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul 2005/2006. Porto Alegre: FEPAGRO/Emater-RS/ASCAR, 2005. 155 p.
- RICHARD, F.J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. "Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material". *J. Comp. Physiol. B*, **175**: 297-303, 2005.
- RICO-GRAY, V. & OLIVEIRA, P.S. *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. The University of Chicago Press, Chicago, 1p., 2007.

- RODRIGUES, S.R.; COUTINHO, G.V.; GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.G, ZANELLA, D.P. DE F. "Atividade inseticida de extratos etanólicos de plantas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Agrarian*, **1**: 133-144, 2008.
- RODRÍGUEZ, H.C. & VENDRAMIM, J.D. "Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)." *Man. Integ. Plagas*, **42**: 14-22, 1996.
- SALATINO, A.; SUGAYAMA, R.L.; NEGRI, G.; VILELAS, W. "Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*". *Entomol. Exp. Appl.*, **86**: 261-266, 1998.
- SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. "Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina." *Phytomedicine*, **11**: 230-234, 2004.
- SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D.C.; RODRIGUES, C.M; SANTOS, L.C.; SALGADO, H.R.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.S.M.; VILEGAS, W. " *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study". *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **26**: 71-75, 2005.
- SANT'ANA, J. & STEIN, K. "Extração e Identificação de Substâncias Bioativas de Insetos", In: Ferreira, J. T. B., Corrêa, A. G.; & Vieira, P. C. (eds.) Série de textos da Escola de Verão em Química, Vol. 3, São Carlos, EDUFSCar, Capítulo 3, 2001.
- SANTIN, D.A. Revisão Taxonômica do Gênero *Astronium* Jacq. E Revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae). Campinas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UNICAMP, 1989. Dissertação de mestrado, 196 p.
- SANTIN, D.A. "*Astronium Nelson-rosae* - Nova Espécie de *Anacardiaceae*". *Rev. Bras. Bot.*, **14**: 103-106, 1991.
- SANTIN, D.A. & LEITÃO-FILHO, H.F."Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire-Allemão (Anacardiaceae)". *Rev. Bras. Bot.*, **14**: 133-145, 1991.
- SANTOS, A.P. & MORENO, P.R.H. "*Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities." *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, **40**: 115-137, 2004.
- SANTOS, F.A.; CUNHA, G.M.A.; VIANA, G.S.B.; RAO, V.S.N.; MANOEL, A.N.; SILVEIRA, E.R. "Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants". *Phytotherapy Res.*, **11**: 67- 69, 1999.
- SANTOS-OLIVEIRA, M.F.S.; BUENO, O.C.; MARINI, T.; REISS, I.C.; BUENO, F.C. "Toxicity of *Azadirachta indica* to Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)." *Sociobiology*, **47**: 1-9, 2006.
- SILVA, A.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. "Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants." *Microbiol. Res.*, **161**: 299-303, 2006.



- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; DE SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. "Survival of *Atta sexdens* on different food sources." *J. Insect Physiol*, **49**: 307–313, 2003.
- SILVA, D.A.; COSTA, D.A.; SILVA, D.F., SOUZA, M.F.V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRAZ-FILHO, R. "Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**: 23-29, 2005.
- SILVA, V.C.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. "Derivados fenólicos isolados de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae)". Livro de Resumos da 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza-CE, 2009. Resumo P-145.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. "*Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*". Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª Edição, 387 p., 1994.
- TIRELLI, A.A.; ALVES, D.S.; CARVALHO, G.A.; SÂMIA, R.R.; BRUM, S.S.; GUERREIRO, M.C. "Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)." *Ciênc. Agrotec.*, **34**: 1417-1424, 2010.
- TORRECILAS, S.M. & VENDRAMIM, J.D. "Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho". *Sci. Agric.*, **58**: 27-31, 2001.
- TREVISAN, M.T.S.; BEZERRA, M.Z.B.; SANTIAGO, G.M.; FEITOSA, C.M. "Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*". *Quim. Nova*, **29**: 415-418, 2006.
- VALEJJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; ESTRADA-MONTOYA, M. DEL C.. "Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis". *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 5567-5571, 2004.
- VALENTE, A.L.P. & AUGUSTO, F.. "Microextração por fase sólida". *Quim. Nova*, **23**: 523-530, 2000.
- VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. "Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus." Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2009. 1-14p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 114).
- VIANA, P.. & PRATES, H.T. "Desenvolvimento e mortalidade larval de *spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*." *Bragantia*, **62**: 69-74, 2003.
- VIANA, P.A. & COSTA, E.F. "Controle da Lagarta-do-Cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) na Cultura do Milho com Inseticidas Aplicados via Irrigação por Aspersão." *An. Soc. Entomol. Brasil*, **27**: 451-458, 1998.

- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. "Inseticidas de Origem Vegetal" IN: FERREIRA, J. T.; CORRÉA, A. G.; VIEIRA, P. C. *Produtos Naturais no controle de insetos*. São Carlos. Editora UFSCar, p 23, 2001.
- WAQUIL, J.M. & VILELLA, F.M.F.. Gene bom. *Rev. Cultivar*, **49**: 22-26, 2003.
- WILLIAMS, W.P. & DAVIS, F.M. "Response of corn to artificial infestation with fall armyworm and southwestern corn borer larvae" *Southw. Entomol.*, **15**: 163-166, 1990.
- YU, S.J. & ABO-ELGHAR, G.E. "Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm." *Pestic. Biochem. Physiol.*, **68**: 173-183, 2000.
- ZACARIN, G.G.; CORREA, A.G.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; CASSARO-SILVA, M. "Análise Química dos óleos essenciais das folhas de variedades de citros e avaliação da atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) frente a estes óleos". Livro de Resumos do IV Encontro Brasileiro de Ecologia Química, Piracicaba-SP, 2005. Resumos p.115.
- ZANUNCIO, J.C. "Lepidópteros desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle." *IPEF/SIF*, p.140, 1993.
- ZHANG, M.; CHAUDHURI, S. K.; KUBO, I. "Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents". *J. Chem. Ecol.*, **19**: 1109-1118, 1993.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. "Flavonóides" IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2 ed. Editora UFSC, p. 577, 2004.