

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Annona sylvatica*
(ANNONACEAE). AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES INSETICIDA E
FUNGICIDA FRENTE ÀS FORMIGAS CORTADEIRAS E SEU FUNGO
SIMBIONTE E AO GORGULHO DO MILHO**

Leila Gimenes*

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 CNPQ**

**São Carlos - SP
2013**

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

G491ef Gimenes, Leila.
 Estudo fitoquímico de *Annona sylvatica* (Annonaceae).
 avaliação das atividades inseticida e fungicida frente às
 formigas cortadeiras e seu fungo simbiote e ao gorgulho do
 milho / Leila Gimenes. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
 167 f.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
 Carlos, 2013.

 1. Química orgânica. 2. Formiga-cortadeira. 3. Gorgulho
 do milho. 4. *Annona sylvatica*. 5. Acetogenina. 6. Lignanias.
 I. Título.

CDD: 547 (20^a)

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

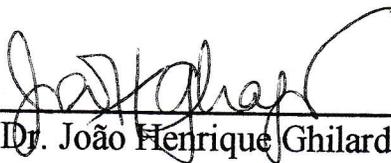
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Leila Gimenes**, realizada em 27 de março de 2013:*



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Profa. Dra. Paulete Romoff



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Aos meus pais Celso e Odila, por estarem sempre presentes em minha vida, por dedicarem tudo de si e me permitirem chegar onde estou, e aos meus irmãos Allyson, Philipi e Leandro, mostrando a verdadeira importância de se ter uma família.

Agradeço ao meu namorado Rodrigo, pelo seu amor, dedicação, companheirismo, apoio e carinho.

“Você pode sonhar, criar e construir a
idéia mais maravilhosa do mundo,
mas são necessárias pessoas para
fazer o sonho virar realidade.”

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força buscada nos momentos difíceis;

Ao meu orientador Prof. Dr. João Batista Fernandes, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas. Com certeza um exemplo de profissional, competente, sereno, ético e humano, que ouve, respeita e considera a opinião de todos. Agradeço muito sua dedicação com meu trabalho, sua paciência em ensinar, sua confiança e amizade. Levarei sempre comigo seus ensinamentos e seu exemplo de vida.

Ao professor João H. G. Lago e à professora Paulete Romoff, por disponibilizarem seu tempo para participarem da banca de minha defesa, pelos ensinamentos, pela amizade, pela oportunidade de ter trabalhado com pessoas incríveis e competentes. Agradeço muito vocês todo o aprendizado e toda a contribuição que deram para a minha formação acadêmica.

À minha família, principalmente aos meus pais Celso e Odila, por tudo que representam em minha vida, pela dedicação, atenção, amor, apoio, por darem tudo de si sem cobrar nada. Amo muito vocês.

Ao meu namorado Rodrigo O. S. Kitamura, só tenho a agradecer seu companheirismo, apoio, por todo ensinamento e dedicação, sempre disposto a ajudar, por se preocupar comigo. Muito obrigada por fazer parte da minha vida, pelo seu amor e carinho. Agradeço também sua grande contribuição com o meu trabalho, principalmente com a realização dos experimentos do HPLC-MS/MS. Seus esforços permitiram que eu crescesse muito profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Odair Correia Bueno e seus alunos, em especial à Marcela Ceccato, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) - Unesp – Rio Claro – SP, pela prestatividade e realização dos ensaios biológicos com as formigas cortadeiras.

À Dra. Ana Paula Terezan e todos os colaboradores, em especial à Dorai Periotto Zandonai, do Departamento de Química – UFSCar, São Carlos - SP pela realização dos ensaios com o fungo simbiote;

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim e ao aluno de doutorado Leandro do Prado Ribeiro do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – USP, Piracicaba – SP, pela realização dos ensaios biológicos com o gorgulho do milho;

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, Prof. Dr. Paulo César Vieira, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, que colaboraram com este trabalho.

Aos professores Prof. Dr. Tiago Venâncio e Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, pelas análises realizadas, pela utilização do espaço físico e dos equipamentos, principalmente o de Ressonância Magnética Nuclear 600 MHz acoplado ao HPLC. Agradeço muito à técnica Luciana Vizotto que está sempre disposta a ajudar, por sua amizade, e aos alunos Sérgio e Elenilson pela prestatividade na realização dos experimentos.

Ao Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Praga (INCT-CBIP) pelo uso dos equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear 400 e 600 MHz e HPLC-MS/MS (API 2000) para as análises dos experimentos realizados.

As secretarias da pós-graduação, Ariane, Cristina e Luciani, por estarem sempre dispostas a ajudar e esclarecer as dúvidas, por todo o trabalho realizado para o bom funcionamento da pós-graduação.

À Karlinha (Foo) pela grande contribuição nas análises no CG-EM, pelos bons momentos e por ser “uma amiga de todas as horas”.

Ao Marcondy pela contribuição dada no trabalho e por sua amizade, conversas e risadas.

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

À todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, em especial à Van, Fabi, Karlinha (Foo), Keylla, Jaque, Titi, Gabriel (Bié), Lucas, Marcela, Lia, Babi, Olivia, Wesley, Israel, Clayton (Goiano), Douglas, Suelem, James, pessoas de quem eu gosto muito, que contribuíram com apoio, conselhos, conversas, amizade e bons momentos vividos, deixando o ambiente de trabalho mais alegre

Ao CNPQ pela bolsa concedida, que permitiu que eu pudesse realizar este trabalho.

LISTA DOS PRINCIPAIS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Δ	Deslocamento químico em ppm
ϕ	Diâmetro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
Acetona-d₆	Acetona deuterada
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
C₁₈	Fase octadecil silano
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dubleto
DAD	<i>Detector Diode Array</i>
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
ddt	Duplo duplo tripleto
dt	Duplo tripleto
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
eV	Elétron Volts
g	Grama
Hex	Hexano

HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Ionização por impacto eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa-Massa
HPLC/NMR	Cromatografia Líquida acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa carga
Md	Sobrevivência mediana de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligrama
MHz	Mega hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
nm	Nanometro
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>q</i>	Quadruplete
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TIC	<i>Total Ion Current Chromatogram</i>
UV	Ultra Violeta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Distribuição geográfica e número de espécies de alguns gêneros da família Annonaceae (RICHARDSON et al., 2004).....	12
TABELA 1.2 – Biodiversidade de substâncias químicas isoladas de espécies da família Annonaceae	13
TABELA 1.3 - Atividade biológica de acetogeninas isoladas de diferentes espécies da família Annonaceae sobre insetos (CASTILHO-SÁNCHEZ et al., 2010).....	16
TABELA 3.1 - Massas dos extratos etanólicos de cada estrutura vegetal obtidos de <i>A. sylvatica</i>	27
TABELA 3.2 - Massas referentes a cada fase obtidas a partir da partição do extrato bruto etanólico das folhas de <i>A. sylvatica</i>	28
TABELA 3.3 - Fracionamento Cromatográfico da fase diclorometânica das folhas (AFD) de <i>A. sylvatica</i> (1,82 g)	29
TABELA 3.4 - Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04 proveniente da fase diclorometânica das folhas de <i>A. sylvatica</i>	30
TABELA 3.5 - Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04/02 de <i>A. sylvatica</i> .	31
TABELA 3.6– Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04/02/05 das folhas de <i>A. sylvatica</i>	34
TABELA 3.7 - Massas referentes a cada fase obtida do extrato bruto etanólico dos ramos de <i>A. sylvatica</i>	36
TABELA 3.8– Fracionamento Cromatográfico da fase Diclorometânica dos Ramos (ARD) de <i>A. sylvatica</i> (0,50g).....	37
TABELA 3.9- Fracionamento cromatográfico da fração ARD 04 proveniente da fase diclorometânica dos ramos de <i>A. sylvatica</i>	38
TABELA 3.10 - Fracionamento Cromatográfico da fração ARD 04/04 proveniente dos ramos de <i>A. sylvatica</i> (29,6 mg).....	39
TABELA 3.11 – Fracionamento cromatográfico da fração ARD 10 dos ramos de <i>A. sylvatica</i>	42
TABELA 3.12 - Massas referentes a cada fase obtida do extrato bruto etanólico das sementes de <i>A. sylvatica</i>	43
TABELA 3.13 - Fracionamento Cromatográfico da fase hidroalcoólica das sementes (ASHi) de <i>A. sylvatica</i> (4,6g).....	44

TABELA 3.14 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 03 provenientes das sementes (ASHi) de <i>A. sylvatica</i> (564,6 mg).....	45
TABELA 3.15 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 04 provenientes das sementes (ASHi) de <i>A. sylvatica</i> (555,4 mg).....	48
TABELA 3.16– Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 04/04 de <i>A. sylvatica</i>	50
TABELA 3.17 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 05 provenientes das sementes (ASHi) de <i>A. sylvatica</i> (1586,2 g).....	51
TABELA 3.18 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 05/03 provenientes das sementes (ASHi) de <i>A. sylvatica</i> (1092,7 g).....	51
TABELA 3.19 – Ingredientes contidos na dieta pura (controle) em 100 mL de água destilada utilizada no ensaio inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	54
TABELA 4.1– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 01 baseada no mapa de correlações HMBC	63
TABELA 4.2 – Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) para a substância 01 em comparação com a magnolina (MIYAZAWA et al., 1994: CDCl ₃ , 200 MHz para RMN ¹ H e 50 MHz para RMN ¹³ C).....	64
TABELA 4.3 – Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 02 baseada no mapa de correlações HMBC	73
TABELA 4.4 – Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) para a substância 02 em comparação com a eudesmina (IIDA et al., 1982: CDCl ₃ , 100MHz para RMN ¹ H e 25MHz para RMN ¹³ C)	74
TABELA 4.5– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 03 baseada no mapa de correlações HMBC	82
TABELA 4.6– Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) para a substância 03	86
TABELA 4.7– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 04 baseada no mapa de correlações HMBC	98
TABELA 4.8– Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) para a substância 04 em comparação com a substância syringaresinol (TULAKE et al., 2012: CDCl ₃ , 500MHz para RMN ¹ H e 125MHz para RMN ¹³ C).....	99
TABELA 4.9– Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHz) e ¹³ C (atribuídos por HSQC), para a substância 05 em comparação com a substância liriodenina (Wu et al., 2012: CDCl ₃ , 500MHz para RMN ¹ H e 125MHz para RMN ¹³ C).....	105

TABELA 4.10– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 06 baseada no mapa de correlações HMBC	110
TABELA 4.11– Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (atribuídos por HSQC e HMBC), para a substância 06 em comparação com a substância N-formilnornanteína (TANTISEWIE et al., 1989: CDCl ₃ , 500MHz para RMN ¹ H e 125MHz para RMN ¹³ C).....	111
TABELA 4.12– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância 07 baseada no mapa de correlações HMBC	113
TABELA 4.13– Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (atribuídos por HSQC e HMBC), para a substância 07	114
TABELA 4.14– Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) para a lactona tipo L-A da acetogenina isolada (substância 08) de <i>A. sylvatica</i> em comparação com os dados da literatura para a substância venezenina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1995: CDCl ₃ , 500MHz para RMN ¹ H e 125MHz para RMN ¹³ C).....	126
TABELA 4.15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos de <i>A. sylvatica</i>	142
TABELA 4.16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações dos ramos e sementes de <i>A. sylvatica</i>	143
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 as frações das folhas de <i>A. sylvatica</i>	144
TABELA 4.18– Média de mortalidade de <i>S. zmais</i> ao 10 ^o dia de experimento após exposição dos extratos de <i>A. sylvatica</i>	152
TABELA 4.19- Média de mortalidade de <i>S. zmais</i> ao 10 ^o dia de experimento após exposição das frações referentes a cada extrato etanólico de <i>A. sylvatica</i>	154
TABELA 4.20- Média de mortalidade de <i>S. zmais</i> ao 10 ^o dia de experimento após exposição da fração ASHi 04-04 de <i>A. sylvatica</i>	155
TABELA 4.21- Média de mortalidade de <i>S. zmais</i> ao 10 ^o dia de experimento após exposição das acetogeninas isoladas de <i>A. sylvatica</i>	156

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Formigas cortadeiras.....	2
FIGURA 1.2 – Fungo simbiote, <i>L. gongylophorus</i>	4
FIGURA 1.3 – Gorgulho do milho.	8
FIGURA 1.4 – Representação do ciclo biológico do gorgulho do milho.....	9
FIGURA 1.5 – Danos causados aos grãos de milho decorrentes do ataque de <i>S. zeamais</i>	10
FIGURA 1.6 – Galhos, folhas e frutos de <i>A. sylvatica</i>	18
FIGURA 3.1 – Fluxograma de preparo dos extratos das folhas, ramos e sementes de <i>A. sylvatica</i>	26
FIGURA 3.2 – Placa preparativa da fração AFD 04/02 proveniente da fase diclorometânica das folhas de <i>A. sylvatica</i> com seus respectivos grupos.	32
FIGURA 3.3 - Cromatograma referente à mistura das substâncias 01 e 02 utilizando coluna analítica de sílica C ₁₈	33
FIGURA 3.4 Cromatograma referente à mistura das substâncias 01 e 02 utilizando coluna preparativa polimérica Shodex.	34
FIGURA 3.5- Fluxograma dos procedimentos cromatográficos citados nos itens 3.3.3.1 à 3.3.3.4.	35
FIGURA 3.6 - Espectro de U.V. referente à amostra ARD 10.....	40
FIGURA 3.7 – Cromatograma referente à fração ARD 10 utilizando coluna analítica e semi-preparativa de sílica C ₁₈	41
FIGURA 3.8 - Fluxograma referente aos fracionamento realizados nos itens 3.3.4.1 à 3.3.4.4.	42
FIGURA 3.9 - Cromatograma referente à fração ASHi 03/06 utilizando coluna analítica de sílica C ₁₈	46
FIGURA 3.10- Cromatograma referente às frações ASHi 03/06 e ASHi 04/04 utilizando coluna analítica de sílica C ₁₈	49
FIGURA 3.11– Fluxograma referente aos itens 3.3.5.1 à 3.3.5.4.	53
FIGURA 4.1 – Numeração para o anel furofurânico presentes em lignanas furofurânicas.	59
FIGURA 4.2 - Posições dos grupos arilas para a unidade furofurânica das lignanas.	60

FIGURA 4.3– Estereoquímica para o anel furofurânico de lignanas (AHMED et al., 2002).....	61
FIGURA 4.4– Estereoquímica Epi para o anel furofurânico de lignanas (AHMED et al., 2002).....	61
FIGURA 4.5– Espectro de RMN ^1H referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3)....	65
FIGURA 4.6– Ampliações do espectro de RMN ^1H para a substância 01 (400 MHz, CDCl_3).....	65
FIGURA 4.7– Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3).....	66
FIGURA 4.8– Espectro de RMN ^{13}C referente à substância 01 (100 MHz, CDCl_3)..	66
FIGURA 4.9– Mapa de contorno HSQC referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3).	67
FIGURA 4.10– Mapa de contorno HMBC referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3).....	67
FIGURA 4.11– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3).	68
FIGURA 4.12– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 01 (400 MHz, CDCl_3).	68
FIGURA 4.13– Espectro de massas por ESI^+ no modo <i>product ion</i> para a substância 01	69
FIGURA 4.14– Propostas de fragmentação para o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ 417 referente à substância 01	71
FIGURA 4.15- Espectro de RMN ^1H e suas ampliações referentes à substância 02 (400 MHz, CDCl_3).	75
FIGURA 4.16- Espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância 02 (400 MHz, CDCl_3).....	75
FIGURA 4.17- Espectro de RMN ^{13}C referente à substância 02 (100 MHz, CDCl_3). 76	
FIGURA 4.18- Mapa de contorno HSQC referente à substância 02 (400 MHz, CDCl_3).....	76
FIGURA 4.19- Mapa de contorno HMBC referente à substância 02 (400 MHz, CDCl_3).....	77
FIGURA 4.20- Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 02 (400 MHz, CDCl_3).....	77

FIGURA 4.21- Expansão do mapa de contorno de HMBC referente à substância 02 (400 MHz, CDCl ₃).	78
FIGURA 4.22– Espectro de massas por ESI ⁺ no modo <i>product ion</i> para a substância 02	78
FIGURA 4.23– Propostas de fragmentação para o íon [M+H] ⁺ 387 referente à substância 02	80
FIGURA 4.24 Espectro de RMN ¹ H referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).....	87
FIGURA 4.25 - Ampliações do espectro de RMN ¹ H para a substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	88
FIGURA 4.26– Espectro de RMN ¹³ C referente à substância 03 (100MHz, CDCl ₃). 89	
FIGURA 4.27– Mapa de contorno HSQC referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	89
FIGURA 4.28– Mapa de contorno HMBC referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	90
FIGURA 4.29– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	90
FIGURA 4.30– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	91
FIGURA 4.31– Espectro de COSY ¹ H- ¹ H referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	91
FIGURA 4.32– Experimento de g-NOESY referente à substância 03 (400MHz, CDCl ₃).	92
FIGURA 4.33– Espectro de massas por EI para o íon <i>m/z</i> 450 referente à substância 03	93
FIGURA 4.34– Propostas de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 450 referente à substância 03	94
FIGURA 4.35– Espectro de massas por ESI ⁺ no modo <i>product ion</i> referente à substância 03	95
FIGURA 4.36– Proposta de fragmentação para o íon [M+H] ⁺ 451 referente à substância 03	96
FIGURA 4.37– Espectro de RMN ¹ H referente à substância 04 (400MHz, CDCl ₃). 100	
FIGURA 4.38– Ampliação do espectro de COSY ¹ H- ¹ H referente à substância 04 (400MHz, CDCl ₃).	100

FIGURA 4.39– Espectro de RMN ¹³ C referente à substância 04 (100MHz, CDCl ₃).	101
FIGURA 4.40– Mapa de contorno HSQC referente à substância 04 (400MHz, CDCl ₃).	101
FIGURA 4.41– Mapa de contorno HMBC referente à substância 04 (400MHz, CDCl ₃).	102
FIGURA 4.42– Espectro de massas por EI para o íon <i>m/z</i> 418 referente à substância 04	102
FIGURA 4.43– Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 418 referente à substância 04	103
FIGURA 4.44– Ampliação do espectro de RMN ¹ H referente à substância 05 (400MHz, CD ₃ OD).	106
FIGURA 4.45– Mapa de contorno HSQC referente à substância 05 (400MHz, CD ₃ OD).	106
FIGURA 4.46– Ampliação do espectro de COSY ¹ H- ¹ H referente à substância 05 (400MHz, CD ₃ OD).	107
FIGURA 4.47– Espectro de massas por EI para o íon <i>m/z</i> 275 referente à substância 05	107
FIGURA 4.48– Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 275 referente à substância 05	108
FIGURA 4.49– Cromatograma obtido por CG-EM referente à fração ARD 10-5 com os respectivos tempos de retenção referentes a cada banda cromatográfica.	109
FIGURA 4.50– Espectro de massas por EI para o íon <i>m/z</i> 353 referente à substância 06	112
FIGURA 4.51– Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 353 referente à substância 06	112
FIGURA 4.52– Espectro de massas por EI para o íon <i>m/z</i> 337 referente à substância 07	115
FIGURA 4.53– Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 337 referente à substância 07	115
FIGURA 4.54– Espectro de RMN ¹ H referente às substâncias 06 e 07 (400MHz, CDCl ₃).	116
FIGURA 4.55– Ampliação do espectro de RMN ¹ H referente às substâncias 06 e 07 (400MHz, CDCl ₃).	116

FIGURA 4.56– Mapa de contorno HSQC referente às substâncias 06 e 07 (400MHz, CDCl ₃).....	117
FIGURA 4.57– Mapa de contorno HMBC referente às substâncias 06 e 07 (400MHz, CDCl ₃).....	117
FIGURA 4.58– Expansão do mapa de contorno HMBC referente às substâncias 06 e 07 (400MHz, CDCl ₃).	118
FIGURA 4.59– Classificação dos diversos tipos de acetogeninas.....	120
FIGURA 4.60– Proposta do caminho biossintético para formação mono-THF α -hidroxilados e α,α -hidroxilados (ZENG et al., 1996).....	121
FIGURA 4.61– Proposta do caminho biossintético para formação bis-THF adjacentes α,α -hidroxilados (ZENG et al., 1996).....	122
FIGURA 4.62– Proposta do caminho biossintético para formação bis-THF não adjacentes α -hidroxilados e α,α -hidroxilados (ZENG et al., 1996).....	122
FIGURA 4.63– Lactona α,β - insaturada, do tipo L-A.....	125
FIGURA 4.64– Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para o anel THF referentes a algumas acetogeninas (CORTES et al., 1993).....	128
FIGURA 4.65– Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para os anéis THF e os grupos hidroxilas referentes à substância 08 (sylvateina) obtida de <i>A. sylvatica</i>	129
FIGURA 4.66- Espectro de RMN ¹ H referente à substância 08 (600MHz, CDCl ₃).	129
FIGURA 4.67- Ampliações do espectro de RMN ¹ H para a substância 08 (600MHz, CDCl ₃).....	130
FIGURA 4.68– Espectro de RMN ¹³ C referente à substância 08 (150MHz, CDCl ₃).	131
FIGURA 4.69– Mapa de contorno HSQC referente à substância 08 (600MHz, CDCl ₃).	131
FIGURA 4.70– Mapa de contorno HMBC referente à substância 08 (600MHz, CDCl ₃).....	132
FIGURA 4.71– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância 08 (600MHz, CDCl ₃).	132
FIGURA 4.72–Espectro de COSY ¹ H- ¹ H referente à substância 08 (600MHz, CDCl ₃).	133
FIGURA 4.73– Espectro de massas obtido no modo <i>full scan</i> para a mistura de acetogeninas de <i>A. sylvatica</i> . A) Fonte de ionização ESI. B) Fonte de ionização APCI.....	133

FIGURA 4.74– Espectro de massas por ESI ⁺ no modo <i>product ion</i> referente à substância 08	134
FIGURA 4.75– Espectro de massas por APCI ⁺ no modo <i>product ion</i> referente à substância 08	134
FIGURA 4.76– Proposta de fragmentação para o íon [M+H] ⁺ 639 referente à substância 08	137
FIGURA 4.77- Espectro de RMN ¹ H referente à mistura dos esteroides presentes na fração ASHi05/03/04 (400MHz, acetona-d ₆).	139
FIGURA 4.78- Ampliações do espectro de RMN ¹ H referente à mistura dos esteroides presentes na fração ASHi05/03/04 (400MHz, acetona-d ₆).	139
FIGURA 4.79– Cromatograma obtido por CG-EM juntamente com os espectros de massas referentes à primeira banda cromatográfica (A); segunda banda cromatográfica (B) e terceira banda cromatográfica (C).	140
FIGURA 4.80- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos de <i>A. sylvatica</i>	141
FIGURA 4.81- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações dos ramos e sementes de <i>A. sylvatica</i>	143
FIGURA 4.82- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações das folhas de <i>A. sylvatica</i>	144
FIGURA 4.83– Efeito dos extratos etanólicos de <i>A. sylvatica</i> sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	146
FIGURA 4.84- Efeito das frações hexânica (AFHe), diclorometânica (AFD), em acetato de etila (AFA) e hidroalcoólica (AFHi) das folhas de <i>A. sylvatica</i> sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	148
FIGURA 4.85- Efeito das frações hexânica (ARHe), diclorometânica (ARD), em acetato de etila (ARA) e hidroalcoólica (ARHi) dos ramos de <i>A. sylvatica</i> sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	149
FIGURA 4.86- Efeito das frações hexânica (ASHe) e hidroalcoólica (ASHi) das sementes de <i>A. sylvatica</i> sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	149
FIGURA 4.87- Efeito das lignanas magnolina (AFD 04/02/05/01, roxo) e eudesmina (AFD 04/02/05/02, verde) isoladas de <i>A. sylvatica</i> sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	151

FIGURA 4.88– Mortalidade de *S. zeamais* expostos aos extratos de *A. sylvatica*. 152

FIGURA 4.89- Mortalidade de *S. zeamais* expostos às frações do extrato etanólico das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*. 153

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Annona Sylvatica* (ANNONACEAE). AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES INSETICIDA E FUNGICIDA FRENTE ÀS FORMIGAS CORTADEIRAS E SEU FUNGO SIMBIONTE E AO GORGULHO DO MILHO – As formigas cortadeiras são espécies sociais, vivendo em colônias permanentes. Os gêneros de maior importância econômica, *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), são as principais pragas da agricultura brasileira, por causarem sérios danos pela sua grande e descontrolada herbivoria, o que gera sérios prejuízos econômicos para muitos agroecossistemas. Nessa mesma vertente, o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, pertencente à família Curculionídea, é a principal espécie praga do milho armazenado. Os grãos são perfurados e danificados pelas larvas e adultos, inutilizando sua comercialização. Como consequência, o controle eficaz de tais pragas é de extrema importância para a agricultura e economia do país que visa oferecer ao mercado nacional e internacional produtos de qualidade e alto valor comercial. Nesse contexto, o estudo fitoquímico de *Annona sylvatica* fornece uma forma alternativa de controle a estas pragas, uma vez que estudos destas espécies mostraram uma ampla variedade de produtos naturais com atividades promissoras, entre elas, inseticida e fungicida, devido à ampla presença de acetogeninas e lignanas como metabólitos secundários. Este estudo resultou no isolamento de 14 compostos (quatro lignanas, quatro acetogeninas, três alcaloides e três esteroides), no entanto, foram identificados 11 compostos, devido à alta complexidade estrutural apresentada para as acetogeninas. As técnicas de identificação utilizadas foram através dos espectros uni e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C e por Espectrometria de Massas (HPLC/NMR; HPLC/ESI-MS/MS e HPLC/APCI-MS/MS). Para os ensaios biológicos, o extrato etanólico das sementes destacou-se como potencial tóxico frente aos três bioensaios citados acima. As frações diclorometânicas das folhas e ramos obtidas através do particionamento líquido-líquido dos extratos foram tóxicas para as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote. Dentre as acetogeninas isoladas, apenas uma apresentou uma atividade significativa frente ao gorgulho do milho.

Palavras chave: formigas cortadeiras, gorgulho do milho, *Annona sylvatica*, acetogenina, lignana, alcaloide.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY STUDY OF *Annona Sylvatica* (ANNONACEAE). EVALUATION OF INSECTICIDE AND FUNGICIDE ACTIVITIES AGAINST LEAF- CUTTING ANTS AND YOUR SYMBIOTIC FUNGUS AND THE CORN MAIZE

WEEVIL – The leaf-cutting ants are social species, living in permanent colonies. The genera of the greater importance, *Atta* (*saúvas*) and *Acromyrmex* (*quenquéns*), are the major plagues of Brazilian agriculture, to cause serious damages by its large and uncontrolled grazing, which leads to serious economic losses for many agro-systems. In the same way, the corn maize weevil, *Sitophilus zeamais*, belonging to the family Curculionidae, is the major pest species of stored corn. The corn grains are drilled and damaged by larvae and adults, causing numerous qualitative and quantitative losses of corn grains disabling its marketing. As the consequence, the effective control of these plagues is extremely important for agriculture and economy that aims to provide the nacional and international market quality products with high commercial value. In this context, the phytochemistry study of *Annona sylvatica* provides an alternative way to control these plagues, since that studies of these species showed a wide variety of natural products with promising activities, including, insecticide and fungicide, due to the large presence of acetogenins and lignans as secondary metabolites. This study allowed the isolation of fourteen compounds (four lignans, four acetogenins, three alkaloids and three steroids), however were identified eleven compounds due to the high structural complexity presented for the acetogenins. The identification techniques employed have been using single and two-dimensional spectra of ^1H and ^{13}C NMR and Mass Spectrometry (HPLC/NMR; HPLC/ESI-MS/MS e HPLC/APCI-MS/MS). For the biological tests, the ethanolic extract of the seeds stood out as potentially toxic to three bioassays cited above. The leaves and branches dichlorometanic fractions obtained by liquid-liquid partitioning of the extracts were toxic for leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. Among the acetogenins isolated, only one of them showed a significant activity against corn maize weevil.

Key words: leaf-cutting ants, corn maize weevil, *Annona sylvatica*, acetogenin, lignan, alkaloid.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Formigas cortadeiras.....	1
1.1.1 – Características biológicas - Relação de simbiose com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	3
1.1.2 – Métodos de controle.....	5
1.2 - O gorgulho do milho.....	7
1.2.1 – Métodos de controle.....	10
1.3 – Família Annonaceae	12
1.3.1 – O gênero <i>Annona</i>	17
1.3.2 – <i>Annona sylvatica</i>	18
2 - OBJETIVOS.....	19
3 – EXPERIMENTAL	21
3.1 – Materiais	21
3.1.1 – Solventes	21
3.1.2 – Balança Analítica	21
3.1.3 – Material Cromatográfico:.....	22
3.1.4 – Reveladores Cromatográficos.....	22
3.2 – Equipamentos.....	23
3.2.1 – Evaporadores rotativos	23
3.2.2 – Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear.....	23
3.2.3 – Cromatógrafo para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	23
3.2.4 – Cromatógrafo CG-EM	24
3.2.5 – Espectrômetro de Massas	24
3.2.6 – Estufa.....	25
3.3 – Estudo fitoquímico	25
3.3.1 – Material vegetal.....	25
3.3.2 – Obtenção dos extratos de <i>A. sylvatica</i>	26
3.3.3 – Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>A. sylvatica</i>	27
3.3.3.1 – Fracionamento da fase diclorometânica das folhas (AFD) de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	28

3.3.3.2 – Fracionamento da fração AFD 04 de <i>A. sylvatica</i>	29
3.3.3.3 – Fracionamento da fração AFD 04/02 de <i>A. sylvatica</i>	30
3.3.3.4 – Purificação das substâncias 01+02 presentes na fração AFD 04/02/05 (43,4 mg) de <i>A. sylvatica</i>	32
3.3.4 – Fracionamento do extrato etanólico dos ramos de <i>A. sylvatica</i>	35
3.3.4.1 – Fracionamento da fase diclorometânica dos ramos (ARD) de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	36
3.3.4.2 – Fracionamento da fração ARD 04 de <i>A. sylvatica</i>	37
3.3.4.3 – Fracionamento da fração ARD 04/04 de <i>A. sylvatica</i>	38
3.3.4.4 – Fracionamento da fração ARD 10 de <i>A. sylvatica</i>	39
3.3.5 – Fracionamento do extrato etanólico das sementes de <i>A. sylvatica</i>	43
3.3.5.1 – Fracionamento da fase hidroalcoólica das sementes (ASHi) de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	44
3.3.5.2 – Fracionamento da fração ASHi 03 das sementes de <i>A. sylvatica</i>	45
3.3.5.3 – Fracionamento da fração ASHi 04 das sementes de <i>A. sylvatica</i>	47
3.3.5.4 – Fracionamento da fração ASHi 05 das sementes de <i>A. sylvatica</i>	50
3.4 – Metodologia dos ensaios biológicos.....	54
3.4.1 – Ensaio inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	54
3.4.2 – Ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbionte <i>L.</i> <i>gongylophorus</i>	55
3.4.3 – Ensaio inseticida frente <i>S. zeamais</i>	56
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
4.1 – Identificações e Determinações Estruturais.....	59
4.1.1 – Identificações e Determinação Estrutural de Lignanais	59
4.1.1.1 – Identificação estrutural da Substância 01	60
4.1.1.2 – Identificação estrutural da Substância 02	72
4.1.1.3 – Determinação estrutural da Substância 03	80
4.1.1.4 – Identificação estrutural da Substância 04	97
4.1.2 – Identificação estrutural de alcaloide	104
4.1.2.1 – Identificação estrutural da substância 05	104
4.1.2.2 – Identificação estrutural das substâncias 06 e 07 presentes na mistura ARD10-5.....	109
4.1.3 – Identificação estrutural de acetogenina	119

4.1.3.1. Hipóteses da origem biossintética de acetogeninas	121
4.1.3.2. Elucidação estrutural de acetogeninas	123
4.1.3.3. Elucidação estrutural da substância 08	124
4.1.4 – Identificação estrutural de esteroides	138
4.1.4.1- Identificação estrutural da mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol	138
4.2 – Atividade biológica	141
4.2.1 – Ensaio inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	141
4.2.1.1 – Efeito dos extratos brutos de <i>A. sylvatica</i>	141
4.2.1.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	142
4.2.2 – Atividade fungicida frente ao fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	146
4.2.2.1 – Efeito dos extratos brutos de <i>A. sylvatica</i>	146
4.2.2.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	147
4.2.2.3 – Efeitos das lignanas obtidas das folhas de <i>A. sylvatica</i>	150
4.2.3 – Atividade inseticida frente a <i>S. zmais</i>	151
4.2.3.1 – Efeito dos extratos brutos de <i>A. sylvatica</i>	151
4.2.3.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	153
4.2.3.3 – Efeitos da fração ASHi 04-04 e das acetogeninas puras de <i>A.</i> <i>sylvatica</i>	155
5 - CONCLUSÃO	157
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Formigas cortadeiras

As formigas são consideradas um dos mais bem sucedidos grupos de insetos, sendo organismos dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres (ILHA et al., 2009; MARINHO et al., 2006). São pertencentes à classe Insecta, ordem Hymenoptera e família Formicidae (REIS FILHO et al., 2007).

A tribo Attini (inserida dentro da subfamília Myrmicinae) abrange aproximadamente 13 gêneros. Todos os gêneros inseridos nesta tribo são considerados formigas cortadeiras, sendo que os gêneros mais evoluídos são *Atta*, popularmente conhecidas por saúvas (FIGURA 1.1), e *Acromyrmex*, conhecidas por quenquéns. Sua distribuição geográfica se dá desde o Sul dos Estados Unidos e o norte do México até o Uruguai e região Central da Argentina, excluindo a região dos Andes e algumas ilhas das Antilhas (MYASHIRA, 2007; REIS FILHO et al., 2007).

O Brasil é o país que possui o maior número de saúvas na América do Sul, onde são encontradas onze espécies (de um total de quinze) e três subespécies de *Atta*, ocorrendo principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Paraná (MYASHIRA, 2007).

São consideradas cortadeiras porque elas cortam diversos materiais vegetais ou se utilizam das porções já desprendidas como flores, folhas e galhos finos, sendo este material vegetal então carregado para dentro do ninho (FERNANDES et al, 2002; REIS FILHO et al., 2007).

Graves danos à agricultura e silvicultura são proporcionados pelo corte desse material vegetal. Prejuízos de âmbito econômico e ambiental são acarretados, uma vez que quase todas as culturas são atacadas e danificadas pelas formigas cortadeiras, podendo atacar plantas de todas as idades e destruí-las completamente (ALMEIDA et al., 2007; FERNANDES et al., 2007).



(Fonte: Foto do autor)



(Fonte: hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2009/combate-a-formiga-cortadeira-em-plantios-florestais. Acesso em 14/11/12)

FIGURA 1.1- Formigas cortadeiras.

Estima-se que em sistemas tropicais, cerca de 17% da produção florestal é consumida, havendo um consumo nacional de aproximadamente 12.000 toneladas/ano de iscas tóxicas na tentativa de controlar e minimizar os efeitos negativos destes insetos (BOARETTO & FORTI, 1997; FERNANDES et al., 2007).

Desta forma, estes herbívoros são considerados as principais pragas para a agricultura brasileira. Para se ter ideia do grau de danos ecológicos e econômicos atingidos, são listados alguns de seus prejuízos, segundo BOARETTO & FORTI (1997) e PICANÇO (2010):

- As culturas de *Pinus* e *Eucalyptus* são as mais atacadas, especialmente nas fases de pré-corte e imediatamente após o plantio ou no início da condução de brotação;

- Para *Atta bisphaerica*, um saueiro adulto provoca a perda de 36 toneladas de cana-de-açúcar/ha/ano, ocasionando perdas de aproximadamente 450 Kg de

açúcar ou 300 litros de álcool. Prejuízos ainda maiores de cerca de US\$ 630 milhões/ano são decorrentes de um consumo de mais de 10 toneladas/ha/ano.

- Cerca de 10 sauveiros adultos/ha chegam a cortar 25 kg de forragem/dia em pastagens.

- Para um formigueiro de saúva limão (*A. sexdens rubropilosa*), em reflorestamentos, há um consumo de uma tonelada de folhas verdes/ano, equivalente a 80 árvores/ano. Infestações de 200 formigueiros da quenquém/ha provocam a perda de 30% das brotações novas de eucalipto de rebrota.

- Em pomares, as árvores em formação podem ter suas folhas totalmente cortadas durante uma noite.

Assim, efetuar um controle efetivo desses insetos visa garantir a produtividade das culturas. Essa é uma preocupação constante para muitos agroecossistemas, sendo que as formigas cortadeiras estão sendo alvos de diversos estudos e pesquisas para o desenvolvimento de metodologias de controle. Entretanto, para abordar técnicas de controle atualmente utilizadas é necessário, antes, conhecer o estudo da sua biologia e comportamento, obtendo-se a possibilidade de êxito no desenvolvimento de técnicas eficientes para o seu controle (BOARETTO & FORTI, 1997; MARINHO et al., 2006).

1.1.1 – Características biológicas - Relação de simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

As formigas cortadeiras vivem em simbiose com o fungo *L. gongylophorus*. Essa é uma relação interespecífica de mutualismo, havendo uma total dependência entre ambos (FIGURA 1.2). Dessa forma, o material vegetal que as formigas cortam e introduzem dentro do ninho, mais especificamente na câmara do jardim do fungo, serve como substrato para manutenção e crescimento do mesmo (ANJOS et al., 2008; BACCI JR. et al., 1998; FERNANDES et al., 2002). O fungo, por sua vez, serve como fonte de alimento único para as larvas e a rainha, além de produzir enzimas que degradam polissacarídeos em açúcares menores, servindo como alimento também para as operárias adultas. Cabe ressaltar aqui, que a fonte de alimento para as operárias adultas, além do fungo simbiote, se dá

também pela ingestão da seiva das folhas no momento em que estas realizam o corte do material vegetal (BOULOGNE et al., 2012; RICHARD et al., 2005; SILVA et al., 2003).



(Fonte: BOULOGNE et al., 2012)

FIGURA 1.2 – Fungo simbiote, *L. gongylophorus*.

Para garantir o sucesso e o crescimento da colônia, as operárias selecionam as plantas a serem cortadas. O objetivo é a escolha daquelas que apresentem o valor nutricional exigido pelo fungo simbiote, além da rejeição daquelas que contenham substâncias tóxicas para as operárias, fungo ou mesmo para ambos (MARINHO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2004).

Dentre características biológicas das formigas, se encontra o fato de serem insetos sociais. Comportamento como o de cuidado cooperativo com a prole e entre as companheiras do ninho, divisão de tarefas por castas em que cada uma realiza sua função, sobreposição de duas ou mais gerações, indivíduos estéreis e reprodutivos, são características que lhes proporcionam vantagens em relação aos outros herbívoros, favorecendo o seu sucesso, reprodução e sobrevivência, sendo denominados por isso, como superorganismos (MARINHO et al., 2006).

Outros fatores também se destacam como responsáveis por esta denominação: capacidade de defesa química, bem como a comunicação química, a sensibilidade olfativa, capacidade de aprendizagem, seletividade e produção de substâncias antibióticas com a finalidade de reduzir o crescimento de outros fungos e bactérias presentes do ninho, são exemplos (MARINHO et al., 2006).

As formigas cortadeiras ocorrem o ano todo, apresentam facilidade de formação e estabilização de novas colônias, além de mostrarem alta complexidade quando o formigueiro é adulto (MARINHO et al., 2006; PICANÇO, 2010; WEBER, 1972). Sauveiros bem desenvolvidos geram diversas galerias que interligam as câmaras (panelas) em que são acomodadas a rainha, o fungo, larvas e pupa e o lixo (JACCOUD, 2000).

Diante dessas características biológicas e comportamentais, nota-se a complexidade estrutural e comportamental que as formigas cortadeiras apresentam tornando difícil a utilização de técnicas para o seu controle efetivo.

Portanto, a persistência em estudos mais aprofundados, assim como a utilização de novas moléculas de origem natural que gerem menor prejuízo ambiental e apresentem maior êxito em seu controle pela alta especificidade, são ferramentas importantes na tentativa de contornar os obstáculos que estes insetos impõem. Alguns dos métodos de controle já utilizados são apresentados a seguir.

1.1.2 – Métodos de controle

As formigas cortadeiras são importantes na transformação do solo. Quando ecologicamente equilibradas, elas realizam o corte natural das plantas, estimulando o seu crescimento, auxiliam na dispersão de sementes e na aeração e infiltração da água devido ao sistema de túneis, permitindo o ciclo de nutrientes e o aumento da circulação de diversos elementos químicos. O solo ao redor de um formigueiro apresenta altos níveis de carbono, nitrogênio e fósforo (ILHA et al., 2009; MYASHIRA, 2007). Dessa forma, considerando seus aspectos positivos ao meio ambiente, o emprego de técnicas alternativas de controle a esses insetos são mais adequadas a se pensar em relação ao seu combate.

Alguns métodos de controle podem ser citados: mecânico, biológico e químico (ARAÚJO et al., 2003). O controle mecânico se baseia na escavação do formigueiro até localizar e matar a rainha, destruindo os ninhos. Essa técnica praticamente não é utilizada por se restringir a formigueiros pequenos com até quatro meses de idade. Já o controle biológico consiste na utilização de predadores, parasitoides e micro-organismos que utilizam a formiga como hospedeira. No entanto, mais conhecimentos acerca dessa técnica ainda são necessários para que

essa possa ser aplicada com segurança. Os métodos químicos são os mais utilizados, sendo o seu procedimento básico a utilização de um produto tóxico sintético nas formulações de pó, líquidos nebulizáveis ou como iscas granuladas, aplicado diretamente nos ninhos (BOARETTO & FORTI, 1997; DELLA LUCIA & VILELA, 1993).

Atualmente, o emprego de iscas granuladas tem se destacado por ser considerado eficiente, prático, e econômico, além de oferecer maior segurança ao operador, dispensar mão de obra e equipamentos especializados e permitir o tratamento de formigueiros de difícil acesso. Estas iscas são compostas de um substrato atrativo (geralmente polpa cítrica desidratada) em mistura com um princípio ativo sintético tóxico, dissolvidos em óleo de soja, com formulação em *pellets* (BOARETTO & FORTI, 1997).

A polpa cítrica provavelmente é apropriada para o desenvolvimento do fungo simbiote, uma vez que ela se apresenta levemente ácida, com alto conteúdo de carboidrato, contendo nitrogênio e grande variedade de vitamina e microelementos. Essas características são importantes para eficiência das iscas granuladas, uma vez que há muitos relatos de devolução e/ou rejeição do material pelas formigas, provavelmente relacionados à baixa atratividade do substrato (BOARETTO & FORTI, 1997).

Para o princípio ativo tóxico, destaca-se a utilização de fipronil e sufluramida. No entanto, a utilização de compostos sintéticos clorados e fosforados torna-se preocupante por resultar em problemas de contaminação ao meio ambiente, solo e lençóis freáticos, além de acarretar um desequilíbrio ecológico, uma vez que espécies não-alvo são atingidas por se tratar de produtos não seletivos (BOULOGNE et al., 2012).

Nesse contexto, a busca por um método de controle que vise à aplicação de substâncias que sejam mais seletivas e menos prejudiciais ao meio ambiente, torna-se de extrema relevância na tentativa de minimizar os efeitos prejudiciais causados por estes insetos, atualmente considerados como pragas de difícil controle. Essas características podem ser encontradas nos estudos de plantas que apresentem relatos na literatura da atividade inseticida e/ou fungicida, buscando o isolamento das substâncias naturais responsáveis por estas atividades (BOULOGNE et al., 2012). Considera-se então, um método alternativo de controle, sendo por este motivo estudado no Laboratório de Produtos Naturais da

Universidade Federal de São Carlos em parceria com o Centro de Estudos de insetos Sociais (CEIS-UNESP) em Rio Claro.

1.2 - O gorgulho do milho

O milho representa o segundo cereal mais importante em termos de produção mundial, suplantado apenas pelo trigo. Cultivado na maioria dos países, sendo os Estados Unidos, China e Brasil os principais produtores e consumidores, e no Brasil, cerca de 45% da produção destina-se para a indústria de ração de aves e suínos (MARSARO JÚNIOR et al, 2005).

Visando garantir o abastecimento de milho para sua utilização ao longo do ano, prevenindo eventuais períodos de escassez e proporcionando maior estabilidade dos preços, torna-se necessário o seu armazenamento. No entanto, ao armazenar os grãos, estes também servem como alimento abundante para várias espécies de insetos, além de protegê-los da influência de temperaturas letais (MARSARO JÚNIOR et al, 2005; POTENZA et al, 2004). Assim, os esforços concentrados no aumento da produção de grãos são desperdiçados caso não haja uma melhoria nas condições de armazenamento e controle destas pragas (FONTES et al, 2003).

Diante desta problemática, uma das principais pragas de grãos armazenados é o *Sitophilus zeamais*, popularmente conhecido como gorgulho do milho. Coleóptero pertencente à família Curculionidae, foi descrito por Motschulsky, 1855, e é classificado como uma praga primária por atacar grãos inteiros e sadios. Quando adultos, são pequenos besouros medindo de 2,0 a 3,5 mm, de coloração castanho-escura com manchas avermelhadas nos élitros (asas anteriores, FIGURA 1.3). Possuem aparelho bucal do tipo mastigador e suas mandíbulas são fortes o suficiente para romperem a dureza dos grãos armazenados (LORINI et al, 2010; UKEH et al., 2012).

São encontrados em regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, particularmente nas Américas e África, e, apesar da cultura do milho ser a principal opção de alimentação para *S. zeamais*, diversos outros grãos armazenados podem ser atacados, como por exemplo trigo, arroz, aveia, cevada, centeio, feijão, sorgo e raízes de mandioca seca, podendo também se desenvolver em alimentos

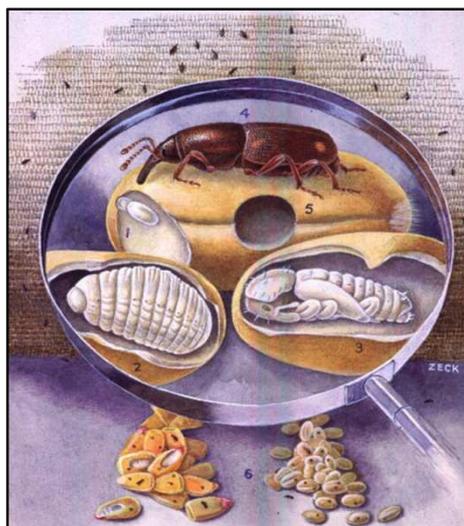
processados como massas alimentícias, biscoitos e bolo endurecido (UKEH et al., 2012).



(Fonte: http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/gorgulho_1902.html/ Acessado em 16/11/12)

FIGURA 1.3 – Gorgulho do milho.

O ciclo biológico destes insetos se inicia quando a fêmea utiliza suas mandíbulas para perfurar o grão, fazendo um orifício por onde é depositado um ovo. Logo após a cavidade aberta e o ovo introduzido no seu interior, ela é coberta por uma secreção gelatinosa produzida por glândulas associadas ao ovopositor, que endurece rapidamente permanecendo os orifícios de postura de difícil visualização (DANHO, 2002). Após a eclosão, a larva se desenvolve e se alimenta do interior do grão, escavando-o à medida que cresce. Seu estágio larval (quatro instares) é completado dentro do próprio grão, transformando-se em pupa, culminando com a emergência do adulto do seu interior. Caso ocorra a postura de mais de um ovo por grão, a larva mais forte irá se sobrepor às demais, ocorrendo, assim, apenas uma emergência de adulto por grão. O inseto adulto então deixa o grão e ocorre o acasalamento dois a três dias após sua saída, iniciando-se novamente seu ciclo biológico (FIGURA 1.4; BOTTON et al., 2005; GALLO et al, 2002). Vale ressaltar que a fêmea tem sua postura inibida em grãos com umidade inferior a 12,5% devido ao fato de quanto mais seco estiver o grão, maior é sua dureza e assim a resistência ao ataque do inseto (SMIDERLE & CICERO, 1999).



(Fonte: <http://old.padil.gov.au/pbt/index.php?q=node/23&pbtID=209/> Acessado em 16/11/12)

FIGURA 1.4 – Representação do ciclo biológico do gorgulho do milho.

O gorgulho do milho é considerado uma das espécies-praga mais destrutivas de grãos armazenados, e dentre as que atacam os grãos de milho, uma das mais importantes, tendo em vista os danos quantitativos e qualitativos que acarretam (ALMEIDA et al., 1999; SANTOS et al., 2002). Prejuízos são principalmente de perda de peso, perda da qualidade em termos de consumo e do valor nutritivo, desvalorização comercial dos grãos, e perda do poder germinativo das sementes (MARSARO JÚNIOR et al, 2005; UKEH et al, 2012). Além disso, a contaminação por ácaros e fungos pode ocorrer em virtude dos grãos danificados se tornarem mais vulneráveis, havendo a presença de água e temperatura adequada favorecendo o crescimento dos mesmos (LORINI et al, 2010; MARSARO JÚNIOR et al, 2005; POTENZA et al., 2004).

Os danos causados por estes insetos-pragas, assim, são decorrentes de uma série de características apresentadas: seu elevado potencial de reprodução, grande número de hospedeiros, capacidade de penetração em massa e capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto em depósitos (infestação cruzada), podendo ser causados tanto pelas formas jovens (larvas) que se desenvolvem dentro do grão, quanto pela forma adulta (FIGURA 1.5; ESTRELA et al., 2006; FONTES, 2003; LORINI et al, 2010).



(Fonte: http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/gorgulho_1902.html/ Acessado em 16/11/12)

FIGURA 1.5 – Danos causados aos grãos de milho decorrentes do ataque de *S. zeamais*.

Por apresentar infestação cruzada, danos sofridos pela planta em desenvolvimento podem ser compensados, em parte, pela recuperação da planta danificada e pelo aumento de produção de plantas não atacadas. Danos sofridos pelos grãos armazenados, porém, são irrecuperáveis e definitivos. Em decorrência dos prejuízos mencionados, faz-se necessária a aplicação de medidas de controle (FONTES et al, 2003).

1.2.1 – Métodos de controle

O controle químico por meio de inseticidas sintéticos é comumente utilizado, principalmente por meio de fumigantes. A fumigação é uma técnica empregada para eliminar qualquer infestação de praga mediante uso de gás tóxico. O inseticida bastante utilizado pela sua eficácia e facilidade de uso é a fosfina (BOTTON, 2005). Entretanto, apesar de eficazes, de baixo custo e de fácil manejo, diversos problemas são acarretados pela utilização desses inseticidas sintéticos, principalmente quando seu uso é indiscriminado, havendo problemas de contaminação de alimentos com resíduos de ingredientes ativos, possibilidade de intoxicação dos aplicadores, contaminação ao meio ambiente e o crescente surgimento de populações de insetos resistentes (ALMEIDA et al, 1999; COITINHO et al, 2006; SANTOS et al, 2002).

Outro método de controle muito utilizado, em que houve um aumento nos últimos anos, foi o de pós-inertes. São substâncias provenientes de alguns minerais extraídos de rochas e moídos, que ao serem misturados aos grãos causam a morte dos insetos por dessecação. A terra diatomácea é um tipo de pó inerte proveniente de fósseis de algas diatomáceas, que possui dióxido de silício (sílica) como principal ingrediente. Seu preparo para uso comercial é feito por extração, secagem e moagem do material fóssil, o qual resulta em pó seco de fina granulometria. A sílica tem a capacidade de secar o ambiente, e em consequência, os insetos, matando-os (BOTTON et al., 2005; PAIXÃO et al., 2009). Como suas limitações, destacam-se o desgaste de equipamentos e os problemas de saúde, especificamente ao sistema respiratório humano devido à exposição à sílica (FIELDS, 1998).

Desta forma, o emprego de plantas que apresentem características de resistência a insetos (compostos secundários bioativos com propriedades inseticidas) mostra-se como uma medida de controle alternativo, além de apresentar uma série de vantagens em relação aos controles já citados: mais seletivos, menos tóxicos a organismos não-alvo, maior nível de proteção da saúde humana e menor impacto ambiental (MARSARO JÚNIOR et al, 2005; SANTOS et al, 2002). O controle pode ser por meio de produtos com formulação em pó, óleos e extratos, apresentando toxicidade via contato, ingestão e fumigação. Diversos efeitos sobre as pragas podem ocorrer, como mortalidade, repelência, deterrência na alimentação e ovoposição, e redução no crescimento (COITINHO, et al., 2011; ESTRELA et al., 2006).

Muitos estudos têm mostrado a atividade de inseticidas obtidos de fontes naturais frente a *S. zeamais*, principalmente dos que utilizam óleos essenciais. ESTRELA et al. (2006) destacam a toxicidade de óleos essenciais de espécies de *Piper* (Piperaceae) por ação de contato, fumigação e tópica. Já SUTHISUT et al. (2011) mostram um estudo de toxicidade por contato, redução da alimentação e repelência dos óleos essenciais de plantas da família Zingiberaceae. Na família Annonaceae, os constituintes do óleo essencial de *Xylopia aetiopica* mostraram 100% de mortalidade frente aos gorgulhos (ASAWALAM et al., 2008).

Considerando a diversidade de metabólitos secundários de plantas da família Annonaceae, estas têm despertado o interesse no estudo como uma forma

alternativa e promissora na busca por novos compostos, naturais e biodegradáveis que controlem as pragas, como o gorgulho do milho e as formigas cortadeiras.

1.3 – Família Annonaceae

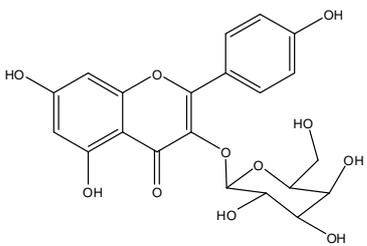
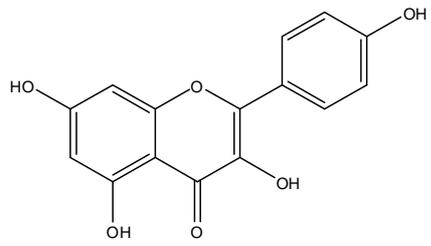
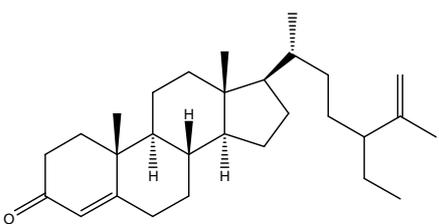
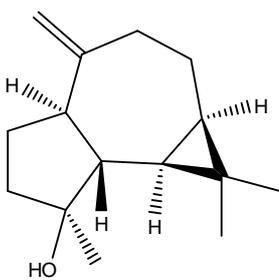
A família Annonaceae, caracterizada por árvores, arbustos e escaladores, pertence ao grupo das plantas Eudicotiledôneas e é a principal família do clado Magnoliales. Esta família compreende um grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa de regiões tropicais ou subtropicais, possuindo aproximadamente 135 gêneros e mais de 2300 espécies, sendo 39 gêneros endêmicos na América, 40 na África e 50 na Ásia. Exemplos de alguns gêneros da família, suas distribuições geográficas e número de espécies são mostrados na TABELA 1.1. No Brasil, é representada por 26 gêneros e cerca de 265 espécies (LOBÃO & MELLO-SILVA, 2007; NUNES et al., 2012; RICHARDSON et al., 2004).

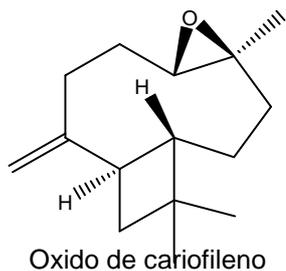
TABELA 1.1 - Distribuição geográfica e número de espécies de alguns gêneros da família Annonaceae (RICHARDSON et al., 2004)

	Distribuição	Espécies
<i>Xylopia</i>	Pantropical	100
<i>Guatteria</i>	Neotropical	250
<i>Annona</i>	América tropical e África	100
<i>Uvaria</i>	Paleotropical	100
<i>Goniothalamus</i>	Indo-malaia	115
<i>Artabotrys</i>	Paleotropical	100

Estudos fitoquímicos da família Annonaceae mostram uma diversidade estrutural de metabólitos naturais encontrados em suas espécies, como alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, esteroides, lignanas e acetogeninas (TABELA 1.2).

TABELA 1.2 – Biodiversidade de substâncias químicas isoladas de espécies da família Annonaceae

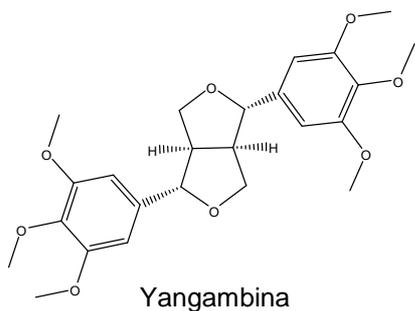
Classe de substância (exemplo)	Órgão (Planta)	Referência
FLAVONOIDES		
 <p>3-O-β-galactopiranosil-caempferol</p>	Folhas (<i>Annona dioica</i>)	VEGA et al., 2007.
 <p>Caempferol</p>	Folhas (<i>Annona dioica</i>)	VEGA et al., 2007.
ESTEROIDES		
 <p>Estigmasta-4,25-dien-3-ona</p>	Galhos (<i>Porcelia macrocarpa</i>)	CHAVES et al., 2004.
SESQUITERPENOS		
 <p>Espatulenol</p>	Folhas (<i>Annona pickelii</i>)	DUTRA et al., 2012.



Folhas
(*Annona pickelii*)

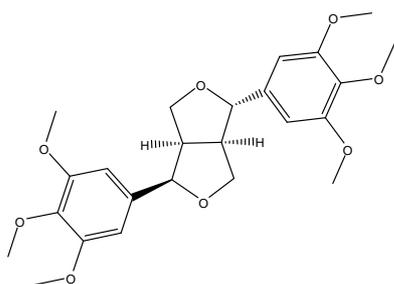
DUTRA et al., 2012.

LIGNANAS



Folhas
(*Rollinia mucosa*)

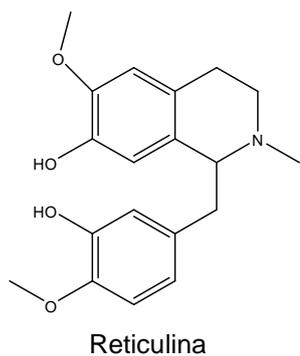
FIGUEIREDO et al., 1999.



Folhas
(*Rollinia mucosa*)

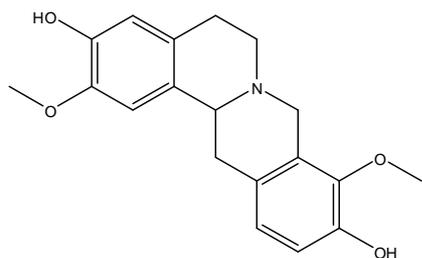
FIGUEIREDO et al., 1999.

ALCALOIDES



Folhas e galhos finos
(*Duguetia trunciflora*)

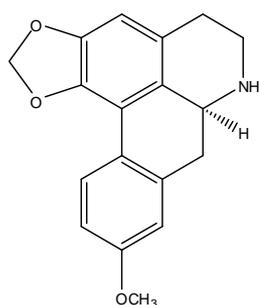
FECHINE et al., 2002.



Discretamina

Folhas e galhos finos
(*Duguetia trunciflora*)

FECHINE et al., 2002.

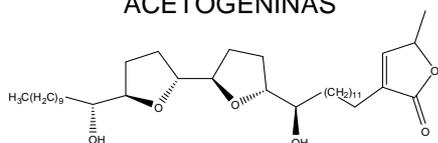


Xylopina

Caule
(*Xylopia
langsдорfiana*)

SILVA et al., 2009.

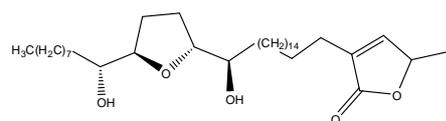
ACETOGENINAS



Esquamocina

Sementes
(*Annona
cornifolia*)

SANTOS et al., 2007.



Laurifolina

Folhas
(*Rollinia laurifolia*)

PIMENTA et al., 2001.

Além da diversidade estrutural encontrada nesta família, uma ampla gama de atividades biológicas referentes a estes metabólitos naturais são relatadas, principalmente as relacionadas às acetogeninas.

As acetogeninas pertencem a uma classe de metabólitos secundários presentes exclusivamente na família Annonaceae, e tem atraído muita atenção dos pesquisadores por apresentarem uma variedade de atividade biológicas, tais como,

citotóxica, antitumoral, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana, imunossupressoras e inseticida (CASTILHO-SÁNCHEZ et al., 2010).

Destacando-se a atividade inseticida, exemplos da atividade dessas substâncias sobre alguns insetos são apresentados na TABELA 1.3. Em diversas espécies são relatados esses compostos, contudo é no gênero *Annona* onde está registrado o maior número destas substâncias, como *A. cherimolia*, *A. montana* (COLOM et al., 2008), *A. muricata* (KIM et al., 1998), *A. reticulata*, *A. montana*, *A. bullata*, *A. densicoma*, *A. squamosa*, *Rollinia membranacea*, *R. mucosa*, *Xylopiia aromatica*, *Uvaria narum*, *U. acuminata*, *Goniothalamus giganteus*, entre outros (BERMEJO et al., 2005).

TABELA 1.3 - Atividade biológica de acetogeninas isoladas de diferentes espécies da família Annonaceae sobre insetos (CASTILHO-SÁNCHEZ et al., 2010)

Nome Científico	Composto ativo	Órgão	Inseto	Atividade
<i>Annona cherimolia</i>	Esquamocina, Asimicina, Neoannonina	Sementes	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Inseticida Inibição alimentar
<i>Annona montana</i>	Anonacina	Folhas e ramos	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Inseticida
<i>Annona muricata</i>	Anomontacina, Bulatalicina, Esquamocina, Anonacina	Sementes	<i>Blatella germanica</i> , <i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Leptinotarsa decemlineata</i> , <i>Aedes aegypti</i>	Inseticida, Inibição alimentar, Inibição do crescimento, Repelente
<i>Annona squamosa</i>	Esquamocina	Sementes	<i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Tribolium castaneum</i>	Inseticida

1.3.1 – O gênero *Annona*

O gênero *Annona* é representado por cerca de 140 espécies tropicais encontradas nas Américas e cerca de 130 distribuídas no continente africano. O nome do gênero *Annona* deriva de *Anon*, nome popular da planta no Haiti e que significa “colheita do ano” (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Por serem tipicamente de clima tropical e adaptadas a essas condições, muitas destas espécies produzem frutos comestíveis que são cultivadas em vários países, apresentando boas perspectivas econômicas para a região Nordeste do Brasil. As mais conhecidas e de maior importância econômica são: *A. Muricata* L., (popularmente chamada de graviola), *A. squamosa* L., (conhecida no Brasil como fruta-do-conde), *A. reticulata* L. (fruta-da-condessa), *A. cherimolla* Mill (cherimólia), que produzem frutos bastante aromáticos de sabor agradável, açucarados e ligeiramente ácidos. Seus frutos suprem a demanda crescente no mercado interno e externo. Os mais importantes são: a graviola para a indústria de suco e polpa e para consumo *in natura*, a fruta-do-conde, atemóia e fruta-da-condessa (ALVES et al., 2000; MOSCA et al., 2006).

Além da sua importância econômica, o perfil químico de espécies desse gênero se destaca pela presença de produtos naturais com importantes atividades biológicas, como atividade sedativa, analgésica, antimalárica, citotóxica e inseticida de *A. muricata*, antibiótica e antifúngica de *A. salzmanii*, citotóxica de *A. montana*, ação larvicida e quimioesterilizante contra mosquitos do gênero *Anopheles* de *A. squamosa*, efeitos vasodilatores e antimicrobiana de *A. cherimolia*, atividade inseticida de *A. reticulata*, entre outros (DI-STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Do ponto de vista químico, o gênero *Annona* segue o mesmo perfil da família. Dentre seus principais metabólitos secundários, destacam-se flavonoides, lignanas, esteroides, alcaloides e acetogeninas (BERMEJO et al., 2005, DI-STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; NUNES et al., 2012).

1.3.2 – *Annona sylvatica*

A. sylvatica (antigo nome *Rollinia sylvatica*) é uma espécie nativa do Brasil, encontrada nos estados de Minas Gerais e de São Paulo até o Rio Grande do Sul. É conhecida como araticum, araticum-do-mato, cortiça e cortiça-amarela. Suas folhas têm sido usadas na medicina popular contra febre, tosse, úlceras causados por sífilis, espasmos musculares, angina e diarreia (FIGURA 1.6; FORMAGIO et al., 2013).

Poucos estudos químicos para esta espécie encontra-se na literatura. O primeiro relata o isolamento do composto sylvaticina, uma acetogenina dos frutos de *R. sylvatica*, apresentando atividade citotóxica para células humanas tumorais, além de ter mostrado atividade inseticida contra as larvas do microcrustáceo marinho, *Artemia salina* (MIKOLAJCZAK et al., 1989). O último relata a composição química do óleo essencial das folhas de *A. sylvatica* e avaliação das atividades anti-inflamatória e anticâncer (FORMAGIO et al., 2013).



(Fonte: Martin Molz - http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1215/Acessado em 08-10-12)

FIGURA 1.6 – Galhos, folhas e frutos de *A. sylvatica*.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principais objetivos:

- Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado das sementes, folhas e ramos da planta *A. sylvatica*, permitindo o isolamento e identificação estrutural de metabólitos;
- Avaliar o potencial tóxico dos extratos, partições e substâncias isoladas de *A. sylvatica* sobre a formiga cortadeira (*A. sexdens rubropilosa*), seu fungo simbionte (*L. gongylophorus*) e ao gorgulho do milho (*S. zeamais*);
- Isolar e caracterizar os compostos que não apresentarem as atividades supracitadas, contribuindo com informações sobre a quimiosistemática da espécie estudada, por esta ser pouco conhecida sobre o ponto de vista químico.

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais

3.1.1 – Solventes

Grau P.A. (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol e metanol) para Cromatografia em Coluna (CC) foram destilados no próprio Departamento de Química.

Grau HPLC (Metanol e Acetonitrila) das marcas J.T.Baker e Panreac foram utilizados como fase móvel para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e ácido fórmico grau HPLC-MS da marca TCI America como aditivos na utilização do Espectrômetro de Massa.

Água deionizada ultra pura proveniente de sistemas de filtragem e osmose reversa (0,08 μ S) obtida através do equipamento da marca Gehaka (modelo Master System) foi utilizado como fase móvel para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Metanol grau MS da marca J.T.Baker e Tedia e acetonitrila grau MS da marca Tedia foram utilizados no preparo das soluções para a realização de infusão direta no Espectrômetro de Massa.

Solventes deuterados (clorofórmio, e metanol) das marcas Cambridge Isotope Laboratories Inc., Merck e Aldrich, foram utilizados para o preparo das amostras para realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais

3.1.2 – Balança Analítica

Balança analítica da marca A&D Company, modelo GH-202, pertencente ao Laboratório de Bioensaios – Universidade Federal de São Carlos;

3.1.3 – Material Cromatográfico:

Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram utilizadas folhas de alumínio com sílica gel 60 UV₂₅₄ com 0,2 mm de espessura das marcas Aldrich, Merck e Macherey-Nagel GmbH & Co.

Para Cromatografia em Coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 (63 - 230 µm) e gel de sílica tipo flash (40 – 63 µm), ambos da marca Acros Organics, além de Sephadex® LH-20 da marca Amersham Biosciences Inc.

Para Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizadas as colunas analítica Luna - C₁₈ 10 µm (φ 4,6 x 250 mm) e semi-preparativa Luna - C₁₈ 10 µm (φ 10 x 250 mm) com fase estacionária de sílica de fase reversa da marca Phenomenex empacotadas no próprio departamento e coluna preparativa Shodex GS-310 2G Asahipak empacotada com fase polimérica (φ 25 x 400 mm, 10 µm). Para as análises de HPLC-MS/MS foi utilizada coluna analítica da marca Agilent, modelo Zorbax Eclipse XDB-18 (φ 4,6 x 150 mm, 5 µm) munida de uma coluna de segurança (pré-coluna) composta pela mesma fase estacionária da marca Phenomenex. Esta coluna foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Moacir Rossi Forim durante o trabalho.

3.1.4 – Reveladores Cromatográficos

Para as revelações dos cromatogramas em CCDA foram utilizadas:

- Câmaras de luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 356 nm;
- Solução de vanilina em ácido sulfúrico, através da utilização de um borrifador e sob aquecimento.

3.2 – Equipamentos

3.2.1 – Evaporadores rotativos

Os rotaevaporadores utilizados foram da marca Büchi, modelos rotaevaporador R-200, R-114 e R-205, equipado com banho Büchi B-490 e B-480, recirculador refrigerado da marca Thermo Scientific, modelos Neslab CFT-25 e Neslab Thermo Felix 900, todos mantidos a 5°C e acoplados às bombas de vácuo da marca Sibata Scientific Technologies.

3.2.2 – Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

As análises em RMN foram registradas nos aparelhos: marca Bruker, modelos DRX 400 e Avance III operando a 400 MHz para núcleo de ^1H e 100 MHz para ^{13}C (9,4 Tesla); marca Bruker, modelo Avance III *Ultrasield Plus* operando a 600 MHz para núcleo de ^1H e 150 MHz para ^{13}C (14,1 Tesla) com cryo-sonda de 5 mm, o que propicia o aumento da sensibilidade comparável a um equipamento de 21,1 Tesla (900 MHz para frequência do hidrogênio).

3.2.3 – Cromatógrafo para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises realizadas via CLAE foram registradas nos seguintes equipamentos:

- Shimadzu modelo LC – 1 0AD, modelo SPD – M 10A VP, munido de detector trabalhando com dois comprimentos de onda, modelo SPD 10AD. A comunicação detector/computador foi realizada através de um módulo CBM – 10A e programa SHIMADZU Class – VP.

- Agilent Technologies, modelo Agilent 1200 series, configurado com um degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto injetor G1367B, compartimento de coluna termostatizado (forno) G1316A e um detector U.V. G1316A com software EZI Chrome;
- Agilent Technologies, modelo Agilent 1260 series configurado com os mesmos compartimentos supracitados operando com software OpenLab.
- Agilent Technologies, modelo Agilent 1200 series equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, e detector por DAD G1315D. A fase estacionária dos cartuchos SPE utilizados foi HySphereResin GP-1012 μm .

3.2.4 – Cromatógrafo CG-EM

As análises em CG-EM foram registradas em espectrômetro Shimadzu GC/MS – QP 5000 (Gas Chromatography Mass Spectrometer), equipado com coluna da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Optima-5 de 30 m de comprimento e ϕ 0,25 mm com 0,25 μm , operando com ionização no modo positivo por impacto eletrônico (IE) a 70 eV. O software utilizado para tratamento dos dados foi o GCMS *Real Time Analysis*.

3.2.5 – Espectrômetro de Massas

As análises feitas em Espectrômetro de Massas foram registradas, via acoplamento com cromatografia líquida ou por infusão direta:

- Equipamento da marca Applied Biosystems Life Technologies (AB/MDS Sciex), sob a plataforma API™ 2000, munido de analisador triplo quadrupolo e com duas fontes de ionização: ionização por *electrospray* (fonte TurbolonSpray®) (ESI-MS) e ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS). A parte acoplada com cromatográfica líquida foi realizada em um equipamento da marca Agilent, modelo 1200 series nas mesmas

configurações já supracitadas para o mesmo modelo. O software utilizado para tratamento dos dados foi o *Analyst* versão 1.5.1.

Para as filtrações das amostras injetadas no HPLC e HPLC-MS/MS, foram usadas filtros das marcas Agela Technologies de 0,45 μm - ϕ 25 mm constituído de PVDF e da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Chromafil O-20/15 MS constituído de PTFE de 0,20 μm - ϕ 15 mm, com a utilização de uma seringa descartável de 1 mL.

3.2.6 – Estufa

Para a realização do ensaio fungicida frente *Leucoagaricus gongylophorus* foi utilizado estufa incubadora FANEM - 347 CD e estufa de secagem e esterilização FANEM - 315 SE, pertencente ao Laboratório de Bioensaios – Universidade Federal de São Carlos.

3.3 – Estudo fitoquímico

3.3.1 – Material vegetal

As partes vegetais utilizadas no estudo (folhas, ramos e sementes) foram coletadas em 25 de abril de 2011, de um exemplar de *Annona sylvatica* cultivado em um pomar doméstico no município de Erval Seco, RS, Brasil. Uma exsicata do espécime coletado encontra-se depositada no herbário ESA do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP sob registro número 121205, em Piracicaba, SP, Brasil. A confirmação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Renato Mello-Silva (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, USP).

3.3.2 – Obtenção dos extratos de *A. sylvatica*

Para a preparação dos extratos brutos, as partes vegetais da planta, como folhas, ramos e sementes foram secas em estufa de circulação a 40 °C e posteriormente reduzidas a pó por trituração em moinho. Em seguida, os extratos brutos foram preparados submetendo o material vegetal, seco e moído das folhas, ramos e sementes a três extrações consecutivas em etanol, com um intervalo de três dias entre cada extração. O solvente foi então, filtrado e os extratos concentrados em rotaevaporadores (FIGURA 3.1). As massas de cada extrato etanólico obtidos das três estruturas vegetais estão apresentadas na TABELA 3.1.

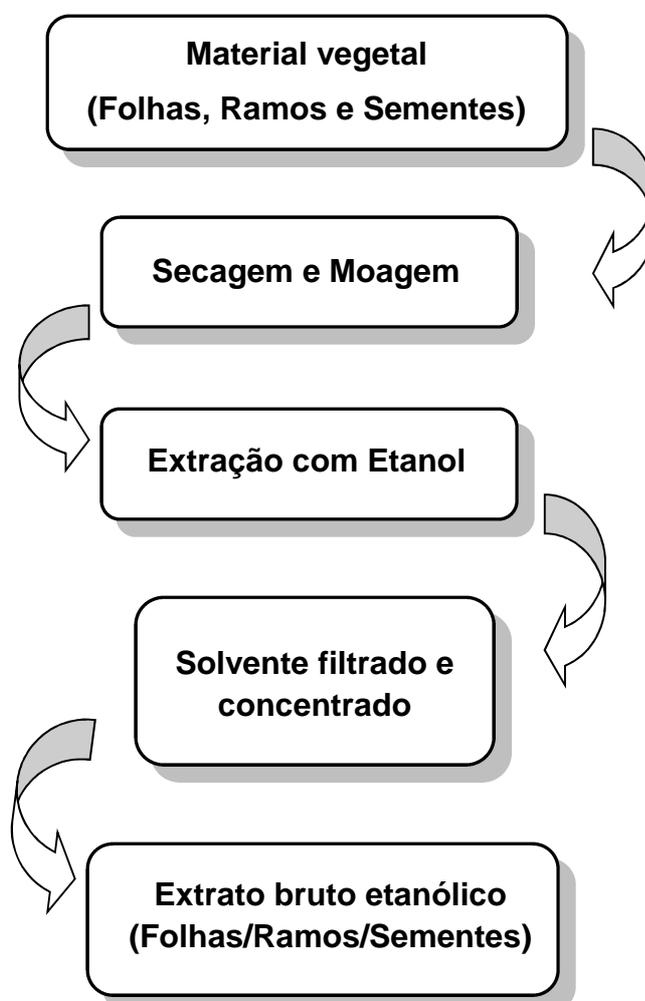


FIGURA 3.1 – Fluxograma de preparo dos extratos das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*.

TABELA 3.1 - Massas dos extratos etanólicos de cada estrutura vegetal obtidos de *A. sylvatica*

	Folhas	Ramos	Sementes
Peso seco do órgão (g)	472,15	958,43	242,73
Extrato etanólico (g)	66,32	42,26	67,04

As amostras referentes a cada extrato etanólico foram enviadas para o Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) Unesp - Rio Claro para realização do ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, para o Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – USP, Piracicaba – SP para a realização do ensaio inseticida frente à *S. zeamais*, e para Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, para realização do ensaio fungicida, frente ao *L. gongylophorus*. A partir dos resultados obtidos, iniciou-se o fracionamento de cada extrato etanólico.

3.3.3 – Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *A. sylvatica*

O extrato etanólico das folhas (62,0 g) foi submetido à partição líquido-líquido resultando nas frações descritas na TABELA 3.2, com seus respectivos códigos. A metodologia empregada para o preparo da partição líquido-líquido baseou-se no preparo de uma solução hidroalcolica do extrato, solubilizando-o em uma solução MeOH/H₂O (1:3) sendo extraídos subsequentemente com solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila. Cada fase foi então concentrada em evaporador rotatório até eliminação completa dos solventes.

TABELA 3.2 - Massas referentes a cada fase obtidas a partir da partição do extrato bruto etanólico das folhas de *A. sylvatica*

Fases	Massas (g)	Código
Hexânica	22,84	AFHe
Diclorometânica	2,12	AFD
Acetato de Etila	3,27	AFA
Hidroalcóolica	26,46	AFHi

Obtendo-se cada fase, as mesmas foram enviadas para a realização dos bioensaios frente às formigas cortadeiras e seu fungo simbiote, e ao gorgulho do milho.

A partir dos resultados obtidos com cada bioensaio, notou-se que a fase diclorometânica das folhas apresentou atividade frente às formigas cortadeiras e ao fungo simbiote, dando-se prosseguimento ao seu fracionamento visando à busca dos compostos responsáveis por estas atividades.

3.3.3.1 – Fracionamento da fase diclorometânica das folhas (AFD) de *A. sylvatica*

A fase diclorometânica das folhas de *A. sylvatica* (AFD) (cerca 1,82 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel inicial para a eluição hexano, seguido de Hex:AcOEt 9:1, aumentando o gradiente de eluição em 10% e, por último, MeOH. Foram coletadas 30 subfrações, as quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 11 grupos, mostrado na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 - Fracionamento Cromatográfico da fase diclorometânica das folhas (AFD) de *A. sylvatica* (1,82 g)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
AFD01	01-04	32,1
AFD02	05-06	45,3
AFD03	07	428,2
AFD04	08-10	73,5
AFD05	11-14	275,5
AFD06	15-17	182,4
AFD07	18-19	113,6
AFD08	20-21	208,4
AFD09	22-23	35,6
AFD10	24-25	91,8
AFD11	26-30	79,5

A partir das análises via CCDA para reunião das subfrações semelhantes em seus perfis cromatográficos, notou-se que as subfrações 08 a 10 (AFD 04) apresentaram uma mancha de coloração rosa escuro após revelação em vanilina sulfúrica. Essa fração foi avaliada também por RMN ^1H apresentando sinais característicos de lignanas furofurânicas, dando-se prosseguimento cromatográfico então para esse grupo.

3.3.3.2 – Fracionamento da fração AFD 04 de *A. sylvatica*

Uma vez que se trata de uma fração proveniente das folhas, a fração AFD 04 foi fracionada através de cromatografia por exclusão Sephadex LH-20, com o objetivo de eliminar ou reduzir a quantidade de clorofila presente na amostra. Assim, este fracionamento resultou em 19 subfrações que foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos em 4 grupos, conforme mostrado na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 - Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04 proveniente da fase diclorometânica das folhas de *A. sylvatica*

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
AFD 04/01	01-09	4,2
AFD 04/02	10-13	62,3
AFD 04/03	14-16	3,4
AFD 04/04	17-19	2,1

Antes da aplicação na coluna, a amostra foi previamente filtrada em algodão para eliminação de quaisquer resíduos e impurezas que pudessem danificar a fase estacionária Sephadex LH-20, sendo a mesma eluída a seguir com MeOH puro. O grupo AFD 04/02 apresentou a mesma mancha rosa escuro após revelação em vanilina sulfúrica, assim como os sinais no espectro de RMN ^1H característicos de lignanas furofurânicas estavam presentes nesta fração. Assim, este grupo foi escolhido para prosseguimento dos métodos cromatográficos para posterior purificação destes compostos.

3.3.3.3 – Fracionamento da fração AFD 04/02 de *A. sylvatica*

A escolha do tipo de fracionamento para o grupo AFD 04/02 se deu devido a uma boa separação apresentada em CCDA, principalmente em relação à clorofila ainda presente na amostra, sendo realizada assim, através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando sílica como suporte de adsorção. Dessa forma, foi testado o melhor eluente a ser aplicado para melhor separação dos constituintes, sendo escolhido o sistema Hex:DCM:MeOH (8:1,5:0,5), e a amostra dividida para duas placas preparativas, aplicando-se em cada uma cerca de 31 mg .

Apesar da boa separação cromatográfica analisada previamente por CCDA, notou-se que para CCDP seria necessário um maior número de eluições para que houvesse a separação desejada, uma vez que as manchas estavam todas concentradas na base da placa preparativa logo após a primeira eluição. Seguiu-se

então, com mais 10 eluições no mesmo sistema, e posterior raspagem da sílica, transferindo-se para um suporte contendo funil analítico e papel de filtro para a extração dos compostos impregnados na sílica, realizada com os solventes DCM, AcOEt e Acetona. Esse procedimento resultou em 7 grupos (TABELA 3.5).

A FIGURA 3.2 mostra a placa preparativa utilizada, com os respectivos grupos indicados. Apesar de não ter ocorrido uma boa separação mesmo com as 10 eluições realizadas, cada camada referente a cada grupo foi retirada cuidadosamente com uma espátula e extraídas com solvente, como mencionado anteriormente, resultando no isolamento do composto AFD 04/02/03 (Substância **03**) e da fração AFD 04/02/05 (Substâncias **01 + 02**).

TABELA 3.5 - Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04/02 de *A. sylvatica*

Grupos	Massa (mg)
AFD 04/02/01	1,3
AFD 04/02/02	1,5
AFD 04/02/03	2,1
AFD 04/02/04	2,2
AFD 04/02/05	43,4
AFD 04/02/06	1,5
AFD 04/02/07	3,4

Todos os grupos foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C assim como por seus espectros bidimensionais. O grupo AFD 04/02/05 foi também analisado por espectrometria de massas através da injeção da amostra por inserção direta utilizando fonte de ionização por ESI realizado no modo positivo. A substância **03**, além de ter sido analisada pelas técnicas mencionadas, teve seu espectro de massas registrado por CG-EM, uma vez que se trata de uma substância nunca relatada em literatura.

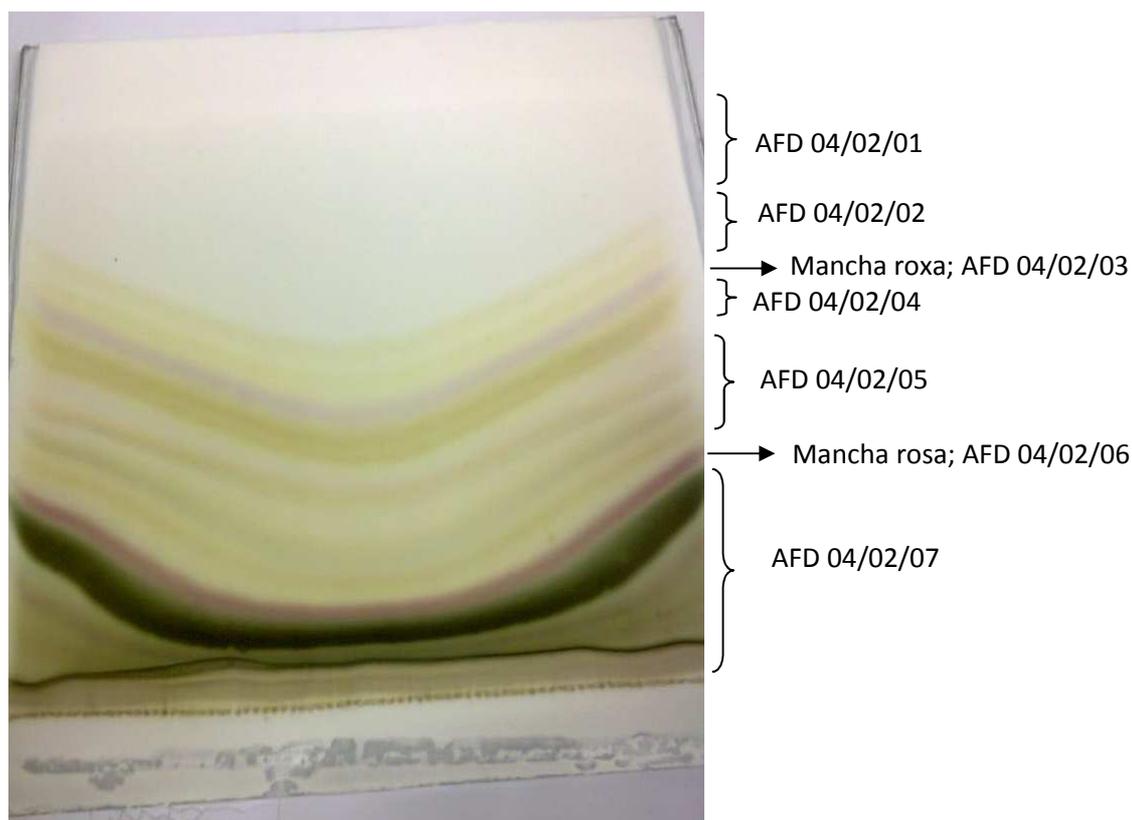
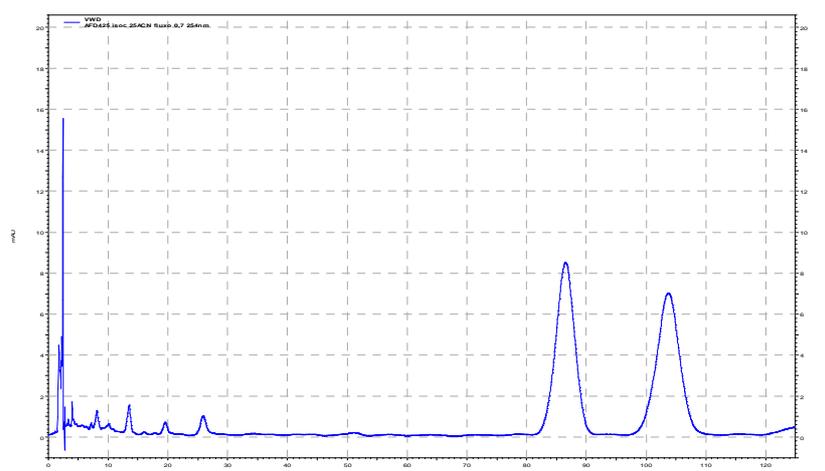


FIGURA 3.2 – Placa preparativa da fração AFD 04/02 proveniente da fase diclorometânica das folhas de *A. sylvatica* com seus respectivos grupos.

3.3.3.4 – Purificação das substâncias 01+02 presentes na fração AFD 04/02/05 (43,4 mg) de *A. sylvatica*

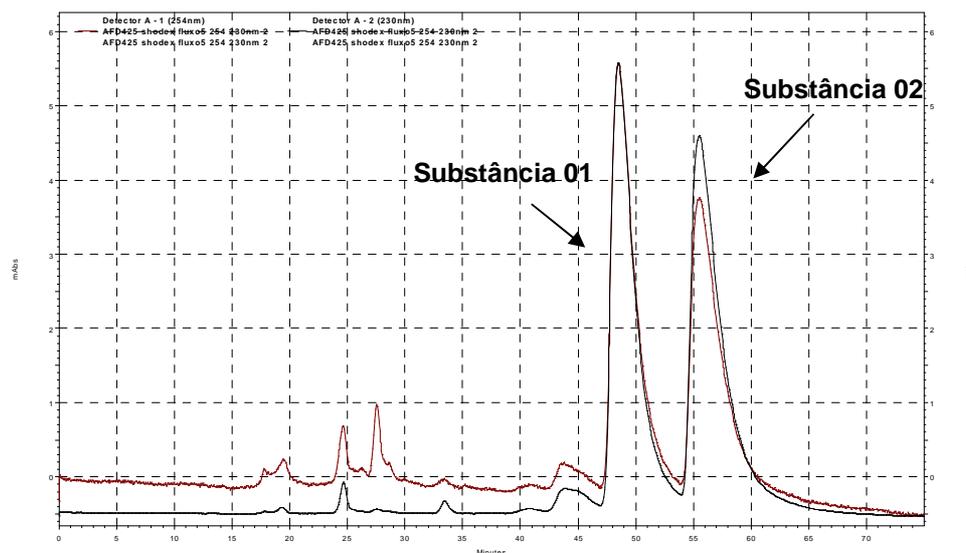
Notando-se a presença de duas lignanas furofurânicas presentes na fração AFD 04/02/05, prosseguiu-se com os métodos cromatográficos para purificação dessas substâncias. Devido à diferença de um substituinte metoxila entre as duas lignanas (analisadas por RMN ^1H e pelos espectros de massas), o tempo de retenção entre esses dois compostos em coluna de C_{18} analisado por CLAE era muito próximo. Para obter uma boa separação seria necessário cromatografia no modo isocrático, com fluxo mais baixo (0,7 mL/min), resultando em um tempo total de corrida muito longo (110 min). Além disso, várias injeções em coluna semi-preparativa seriam necessárias para purificação de toda a amostra (FIGURA 3.3). Assim, o prosseguimento para purificação desses compostos se deu pela utilização da coluna de fase polimérica Shodex, (com dimensões maiores em relação à coluna

semi-preparativa anteriormente citada), com *loop* de 200 μL , fase móvel em MeOH 100% e utilizando os comprimentos de onda a 254 e 230 nm para detecção. Apesar das substâncias apresentarem pesos moleculares muito próximos e conseqüentemente tempos de retenção próximos também para esta fase estacionária, quando se utilizou esta coluna, o tempo total de corrida foi mais curto (65 min), obtendo-se separação das duas bandas cromatográficas sem precisar utilizar a técnica de reciclo (FIGURA 3.4).



Condições cromatográficas: Coluna analítica com fase estacionária de sílica C_{18} - 10 μm (ϕ 4,6 x 250 mm), fase móvel isocrática constituída por ACN:H₂O (25:75), injeção 20 μL , detector U.V. 254nm, fluxo 0,7mL/min).

FIGURA 3.3 - Cromatograma referente à mistura das substâncias **01** e **02** utilizando coluna analítica de sílica C_{18} .



Condições Cromatográficas: Coluna preparativa polimérica Shodex 10 μ (ϕ 25 x 400 mm), eluição isocrática MeOH puro, detector U.V. 230 e 254nm, loop 200 μ L, fluxo 5 mL/min.

FIGURA 3.4 Cromatograma referente à mistura das substâncias **01** e **02** utilizando coluna preparativa polimérica Shodex.

A numeração dos compostos se deu pela ordem sucessiva das bandas coletadas. As massas referentes a cada banda são mostradas na TABELA 3.6.

TABELA 3.6– Fracionamento cromatográfico da fração AFD 04/02/05 das folhas de *A. sylvatica*

Grupos	Substância	Intervalo recolhido (min)	Massa (mg)
AFD04/02/05/01	01	47-54	17,0
AFD04/02/05/02	02	55-63	15,4

O intervalo de corrida de 0 a 47 min foi coletado em um único frasco, e por apresentar uma mistura com pouca massa, o mesmo não foi analisado. Após a obtenção das substâncias puras, as mesmas foram enviadas para a realização do

ensaio fungicida frente ao *L. gongylophorus*. A FIGURA 3.5 mostra o fluxograma de todos os procedimentos cromatográficos citados nos itens 3.3.3.1 a 3.3.3.4.

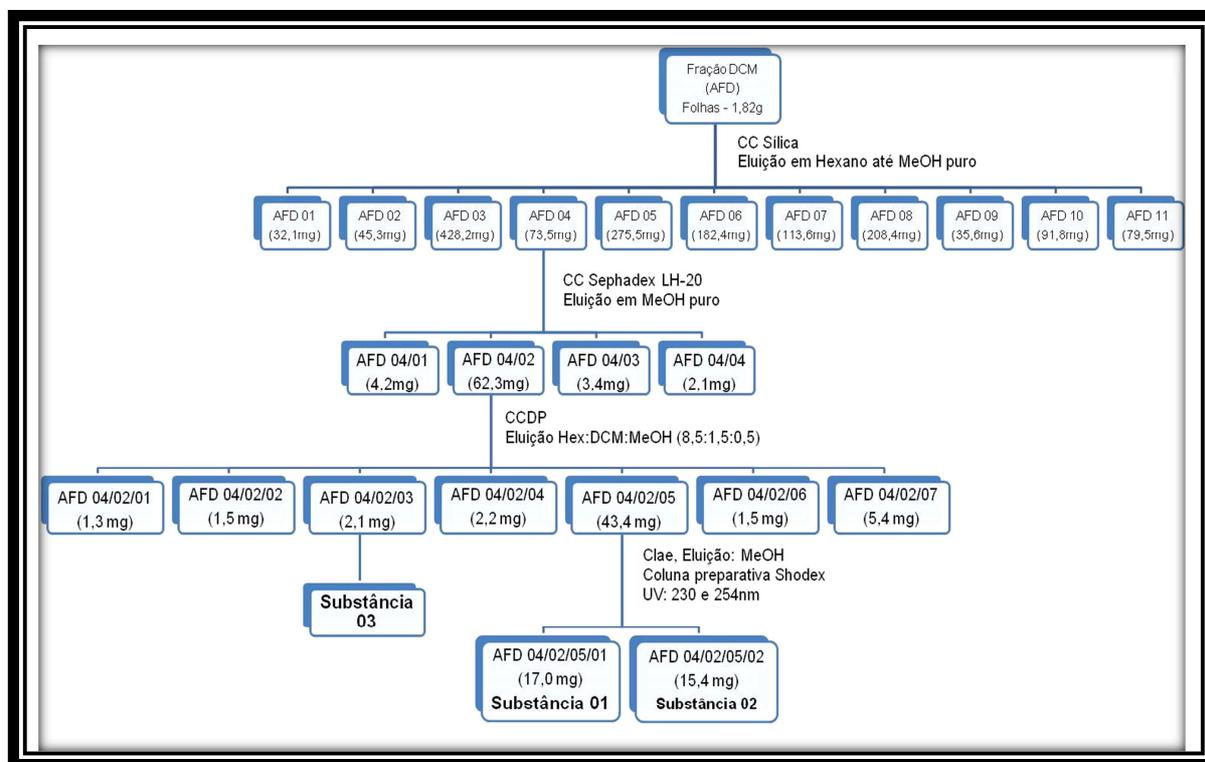


FIGURA 3.5- Fluxograma dos procedimentos cromatográficos citados nos itens 3.3.3.1 à 3.3.3.4.

3.3.4 – Fracionamento do extrato etanólico dos ramos de *A. sylvatica*

O extrato etanólico dos ramos (40 g) foi submetido à partição líquido-líquido resultando nas frações descritas na TABELA 3.7, com seus respectivos códigos. A metodologia empregada para o preparo da partição líquido-líquido foi a mesma que a utilizada para a partição do extrato etanólico das folhas, baseando-se no preparo de uma solução hidroalcolólica do extrato, solubilizado-o em uma solução MeOH/H₂O (1:3) sendo extraídos subsequentemente com solventes em ordem crescente de polaridade e concentradas em evaporador rotatório.

TABELA 3.7 - Massas referentes a cada fase obtida do extrato bruto etanólico dos ramos de *A. sylvatica*

Fases	Massas (g)	Código
Hexânica	6,18	ARHe
Diclorometânica	3,18	ARD
Acetato de Etila	2,56	ARA
Hidroalcolólica	25,33	ARHi

Todas as fases obtidas foram enviadas para a realização dos bioensaios inseticidas e fungicida, frente às formigas cortadeiras e seu fungo simbionte, e ao gorgulho do milho. A partir destes resultados, foi escolhida para estudo a fase diclorometânica por esta apresentar atividade significativa frente aos três bioensaios supracitados, com o intuito de isolar e caracterizar os compostos responsáveis pelas atividades observadas.

3.3.4.1 – Fracionamento da fase diclorometânica dos ramos (ARD) de *A. sylvatica*

A fase diclorometânica dos ramos de *A. sylvatica* (ARD) (0,50 g) foi fracionada utilizando cromatografia por exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária, tendo como fase móvel para eluição um sistema isocrático constituído por MeOH:DCM (7:3). A escolha da fase móvel utilizada se deu pela melhor solubilidade da amostra nesse sistema.

Foram coletadas 38 subfrações, nas quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 11 grupos, mostrado na TABELA 3.8.

TABELA 3.8– Fracionamento Cromatográfico da fase Diclorometânica dos Ramos (ARD) de *A. sylvatica* (0,50g)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ARD01	01-06	17,1
ARD02	07-09	24,9
ARD03	10-14	120,3
ARD04	15-17	62,4
ARD05	18-21	115,7
ARD06	22-25	42,4
ARD07	26	5,5
ARD08	27-29	8,4
ARD09	30-31	4,6
ARD10	32-34	12,8
ARD11	35-38	8,8

Todos os grupos obtidos foram analisados através dos espectros de RMN ^1H e por CCDA. Para o grupo ARD 04 foi observada a presença de sinais na região aromática e referentes a hidrogênios carbinólicos e metínicos. Para o grupo ARD 10, foi observado em seu espectro de RMN ^1H a presença de uma substância majoritária, além de sinais na região aromática, sinais característicos aos hidrogênios ligados ao carbono metilenodioxílico, sinais bastantes intensos referentes às metoxilas e multipletos em δ_{H} 2,4 a 3,0 ppm. Deu-se prosseguimento então, para a purificação destes dois grupos.

3.3.4.2 – Fracionamento da fração ARD 04 de *A. sylvatica*

O fracionamento da fração ARD 04 (62,4 mg) seguiu-se com a utilização de cromatografia por exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária, com o intuito de purificar a fração de um material graxo presente na amostra, uma vez observado pelo espectro de RMN ^1H sinais característicos de compostos de cadeia alifática com deslocamentos químicos em δ_{H} 1,28. A escolha

da fase móvel para eluição foi devido também à melhor solubilidade da amostra no sistema escolhido, utilizando-se um sistema isocrático constituído por MeOH:DCM (7:3).

Esse fracionamento resultou na coleta de 22 subfrações que foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos, em 5 grupos, conforme mostrado na TABELA 3.9.

TABELA 3.9- Fracionamento cromatográfico da fração ARD 04 proveniente da fase diclorometânica dos ramos de *A. sylvatica*

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ARD 04/01	01-07	2,8
ARD 04/02	08-12	12,9
ARD 04/03	13-14	15,3
ARD 04/04	15-20	29,6
ARD 04/05	21-22	1,2

Todos os grupos foram analisados através dos espectros de RMN ^1H e por CCDA. O grupo ARD 04/04 mostrou sinais no espectro de RMN ^1H muito parecidos com as lignanas já isoladas provenientes da fase diclorometânica das folhas, como sinais na região aromática, sinais referente a hidrogênios carbinólicos e multiplete referente aos hidrogênios metínicos. Esses sinais são característicos de lignanas furofurânicas e por isso, seguiu-se com o fracionamento deste grupo visando purificação desses compostos.

3.3.4.3 – Fracionamento da fração ARD 04/04 de *A. sylvatica*

A fração ARD 04/04 proveniente dos ramos de *A. sylvatica* (29,6 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel um sistema de eluição começando em AcOEt:DCM (4:6), aumentando-se gradativamente até chegar em 100% de MeOH. Foram coletadas 62

subfrações, nas quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 08 grupos, mostrado na TABELA 3.10.

Ao analisar o espectro de RMN ^1H de cada grupo, notou-se que o espectro da fração ARD 04/04/02 era idêntica ao espectro referente à substância **02** (isolada depois de vários fracionamentos da partição diclorometânica das folhas). Já para a fração ARD 04/04/04, esta apresentou uma única mancha analisada por CCDA, assim como a integração dos sinais no espectro de RMN ^1H corresponderam a uma única substância, tratando-se de outra lignana furofurânica (substância **04**). Para esta substância, foram realizados todos os experimentos de RMN uni e bidimensionais, assim como a análise no CG-EM para confirmação de sua massa molecular.

TABELA 3.10 - Fracionamento Cromatográfico da fração ARD 04/04 proveniente dos ramos de *A. sylvatica* (29,6 mg)

Grupos	Substâncias	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ARD04/04/01	--	01-04	0,8
ARD04/04/02	02	05-11	2,4
ARD04/04/03	--	12-14	1,2
ARD04/04/04	04	15-24	3,0
ARD04/04/05	--	35-38	3,1
ARD04/04/06	--	39-48	2,3
ARD04/04/07	--	49-55	6,7
ARD04/04/08	--	56-62	6,1

3.3.4.4 – Fracionamento da fração ARD 10 de *A. sylvatica*

A fração ARD 10 (12,8 mg) foi purificada por CLAE, resultando no isolamento de dois alcaloides e de uma fração com cinco alcaloides em mistura.

A fase móvel utilizada na corrida cromatográfica para esta fração foi testada primeiramente em sistemas empregando MeOH:H₂O nas proporções 7:3 e 1:1, porém, mesmo após a diminuição da força do solvente, notou-se que as bandas cromatográficas estavam sobrepostas. Dessa forma, testou-se uma eluição com um sistema empregando ACN e H₂O, onde houve uma melhor separação com a proporção ACN:H₂O (4:6), sendo esta então utilizada. O espectro de U.V. dessa amostra foi realizado, obtendo-se o máximo de absorção, para posterior utilização na separação por HPLC (FIGURA 3.6).

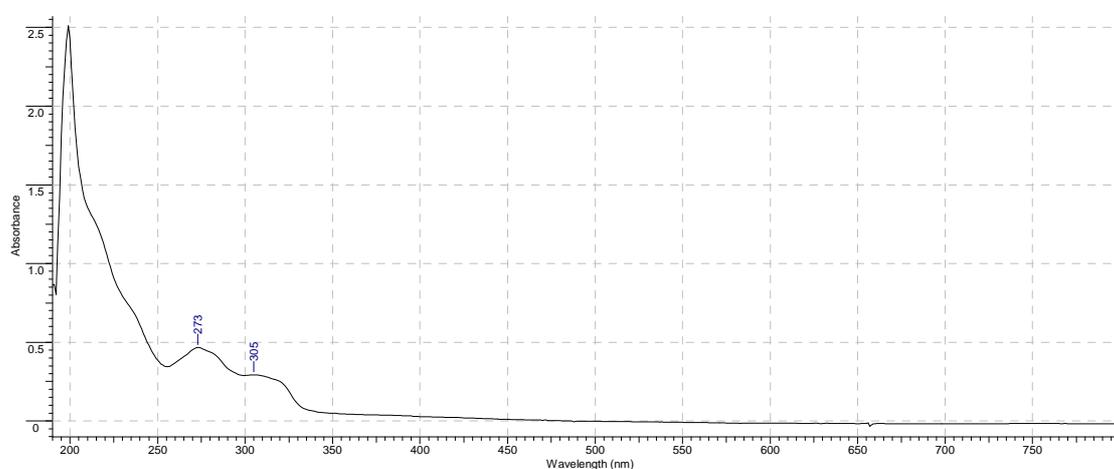
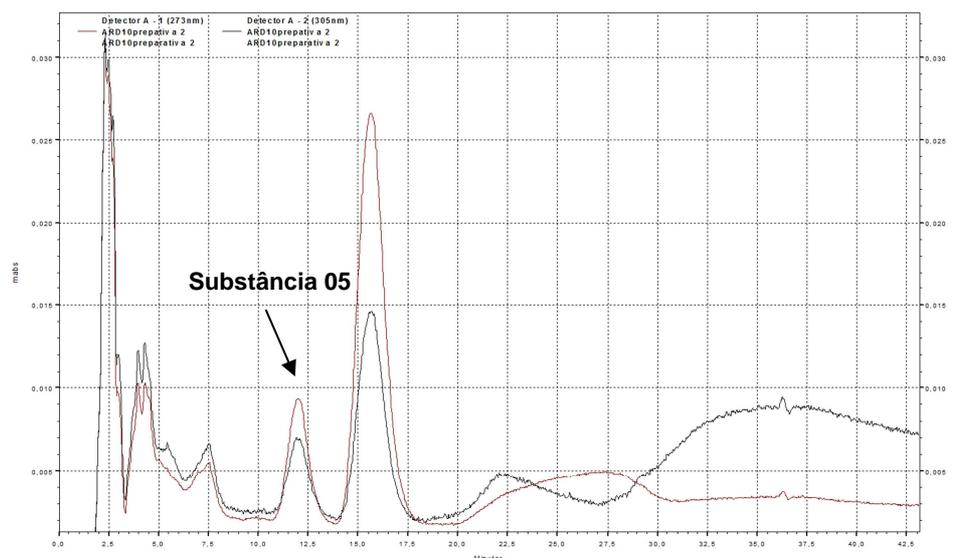


FIGURA 3.6 - Espectro de U.V. referente à amostra ARD 10.

Após ter determinado a melhor condição cromatográfica em coluna analítica para separação, partiu-se então para purificação da fração em coluna semi-preparativa. Para isso, o fluxo escolhido foi calculado através da fórmula que representa o fator de escalonamento (S), dada pela equação (1), onde R_p e L_p são, respectivamente, diâmetro e comprimento da coluna preparativa e R_a e L_a , diâmetro e comprimento da coluna analítica.

$$S = \frac{R_p^2 \times L_p}{R_a^2 \times L_a} \quad (1)$$

O cromatograma obtido desta fração, assim como as condições cromatográficas utilizadas, é mostrado na FIGURA 3.7.



Condições Cromatográficas: Coluna com fase estacionária sílica de fase reversa C₁₈ - analítica Luna - 10µm, (φ 4,6 x 250 mm) e semi-preparativa Luna - 10 µm, (φ 10 x 250 mm), eluição isocrática ACN:H₂O (4:6), detector U.V. 273 e 305 nm, loop 200µL, fluxo 1,0 mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (semi-preparativa).

FIGURA 3.7 – Cromatograma referente à fração ARD 10 utilizando coluna analítica e semi-preparativa de sílica C₁₈.

A numeração dos compostos se deu pela ordem sucessiva das bandas coletadas. As massas referentes a cada banda são mostradas na TABELA 3.11.

Todos os grupos foram analisados por RMN ¹H, sendo que os intervalos de corrida de 0 a 4,5 min e 4,5 a 10,5 min foram coletados em frascos separados, e após análise por RMN ¹H conclui-se se tratar de pigmentos, sendo então reunidos em um único grupo (ARD 10/01+02). O grupo ARD 10/03 após ser analisado pelas técnicas de RMN ¹H, COSY, HSQC e CG-EM mostrou se tratar de um alcaloide oxoaporfínico (substância **05**). O grupo ARD 10/04 foi analisado por RMN ¹H e também indicava se tratar de um alcaloide oxoaporfínico, porém ao preparar a amostra para a realização das análises de RMN bidimensionais para o mesmo, este foi degradado ao adicionar CDCl₃, que estava levemente acidificado (o CDCl₃ se decompõe ao longo do tempo, mesmo mantido em temperatura ambiente, formando HCl). O grupo ARD 10/05 apresentou-se como uma mistura de alcaloides, sendo estas analisadas pelos espectros de RMN uni e bidimensionais e por CG-EM.

TABELA 3.11 – Fracionamento cromatográfico da fração ARD 10 dos ramos de *A. sylvatica*

Fração	Substância	Intervalo recolhido (min)	Massa (mg)
ARD 10/ 01+02	--	0 - 10,5	2,7
ARD 10/03	05	10,7 - 13,7	1,5
ARD 10/04	Decompôs	14 - 17,5	1,4
ARD 10/05	Mistura de alcalóides	17,5 - final	3,1
Limpeza em Metanol	--	--	3,2

A FIGURA 3.8 mostra o fluxograma dos fracionamentos realizados nos itens 3.3.4.1 à 3.3.4.4 para a fração diclorometânica dos ramos.

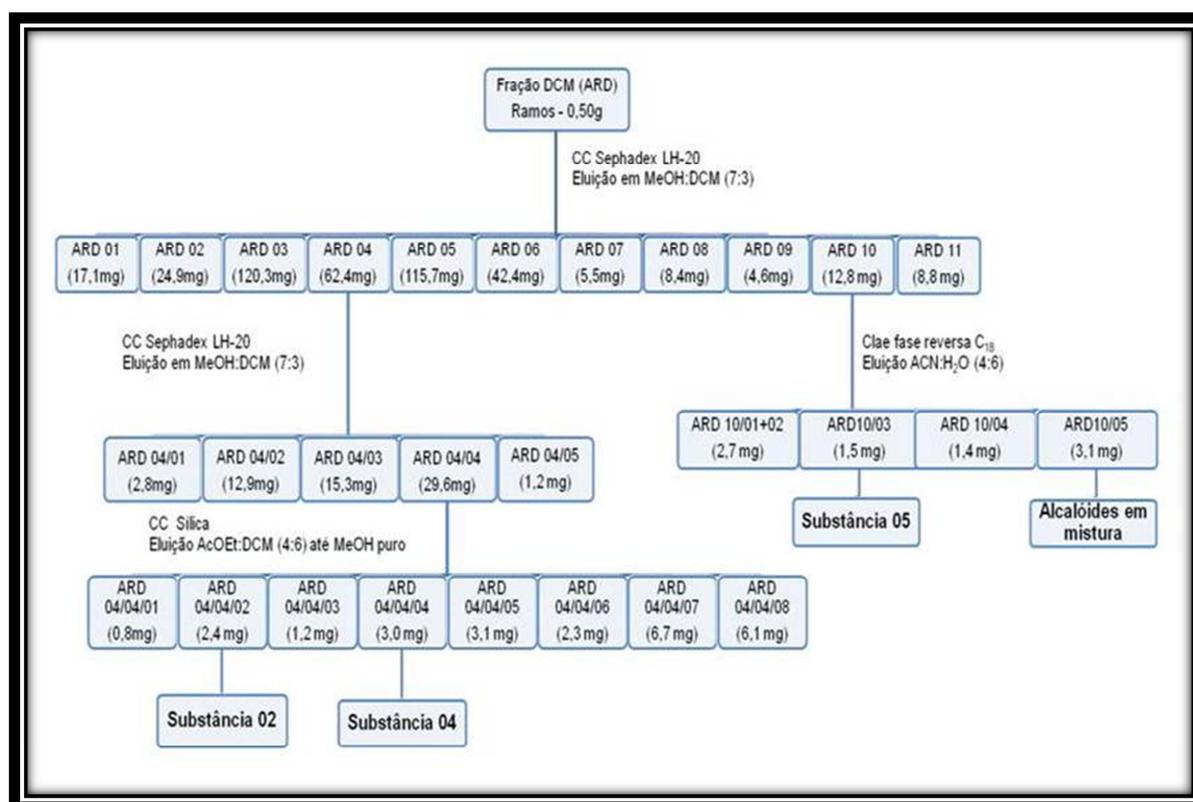


FIGURA 3.8 - Fluxograma referente aos fracionamentos realizados nos itens 3.3.4.1 à 3.3.4.4.

Como apresentado acima, os sucessivos fracionamentos levaram ao isolamento e identificação dos compostos supracitados, porém com baixa quantidade de massa. Assim, o restante da fração original foi refracionada seguindo os mesmos protocolos de separação descritos, e reunidas via CCDA em comparação com o trabalho realizado anteriormente. Sendo assim, foram obtidas frações novamente ricas em lignanas e alcaloides em maior quantidade de massa. Essas frações serão alvos de investigações futuras visando à identificação de outros compostos presentes nessas frações, contribuindo para a quimiosistemática do gênero *Annona*, além de permitirem novas publicações.

3.3.5 – Fracionamento do extrato etanólico das sementes de *A. sylvatica*

O extrato etanólico das sementes (62,0 g) foi submetido à partição líquido-líquido, resultando nas frações descritas na TABELA 3.12, com seus respectivos códigos. A metodologia empregada para o preparo da partição líquido-líquido baseou-se no preparo de uma solução hidroalcoólica do extrato, solubilizando-o em uma solução MeOH/H₂O (8:2) sendo extraído subsequentemente apenas com Hexano. As duas fases obtidas foram concentradas em evaporador rotatório até eliminação completa dos solventes.

TABELA 3.12 - Massas referentes a cada fase obtida do extrato bruto etanólico das sementes de *A. sylvatica*

Fase	Massa (g)	Código
Hexânica	48,11	ASHe
Hidroalcoólica	9,21	ASHi

As duas fases obtidas foram enviadas para a realização dos bioensaios inseticidas e fungicidas, frente às formigas cortadeiras e seu fungo simbionte, e ao gorgulho do milho. Os resultados obtidos mostraram-se promissores para a continuidade do estudo fitoquímico da fase hidroalcoólica por esta ter apresentado

significativa atividade frente aos três bioensaios supracitados, principalmente para o ensaio fungicida frente a *L. gongylophorus* e ao ensaio inseticida frente a *S. zeamais*. Sabendo-se que frações oriundas de sementes de *Annona* destacam-se pela presença de acetogeninas (CORTES et al., 1993), o alvo para o estudo desta fração foi à busca por estas substâncias, com o intuito de isolar, caracterizar e ensaiá-las separadamente verificando quais substâncias são as responsáveis pela atividade observada.

3.3.5.1 – Fracionamento da fase hidroalcoólica das sementes (ASHi) de *A. sylvatica*

A fase hidroalcoólica das sementes de *A. sylvatica* (ASHi) (4,6 g) foi fracionada utilizando cromatografia por exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária, utilizando como fase móvel para eluição um sistema isocrático constituído por MeOH:DCM (7:3). Foram coletadas 38 subfrações, as quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 06 grupos (TABELA 3.13).

TABELA 3.13 - Fracionamento Cromatográfico da fase hidroalcoólica das sementes (ASHi) de *A. sylvatica* (4,6g)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ASHi 01	01-03	42,2
ASHi 02	04-05	137,2
ASHi 03	06-08	564,6
ASHi 04	09-12	555,4
ASHi 05	13-24	1586,2
ASHi 06	24-38	1362,9

Todos os grupos obtidos foram analisados através dos espectros de RMN ¹H e por CCDA. O prosseguimento dos métodos de fracionamentos foram

realizados para os grupos ASHi 03, 04 e 05 devido a melhor separação dos constituintes observados por CCDA e pelas análises dos espectros de RMN ^1H de cada fração.

3.3.5.2 – Fracionamento da fração ASHi 03 das sementes de *A. sylvatica*

Deu-se prosseguimento ao fracionamento do grupo ASHi 03 (564,6 mg) através de uma coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel inicial para a eluição Hex:Acetona 9:1, aumentando o gradiente de eluição em 10% até 100% MeOH. Foram coletadas 69 subfrações, as quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 09 grupos, mostrado na TABELA 3.14.

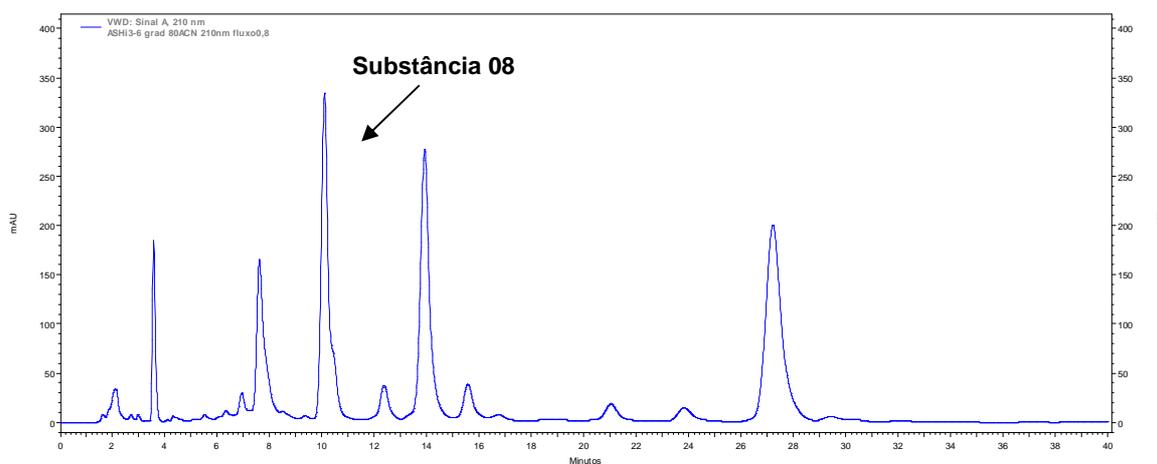
TABELA 3.14 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 03 provenientes das sementes (ASHi) de *A. sylvatica* (564,6 mg)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ASHi 03/01	01-11	5,3
ASHi 03/02	12-19	37,3
ASHi 03/03	20-24	17,4
ASHi 03/04	25-35	19,4
ASHi 03/05	36-52	37,2
ASHi 03/06	53-59	307,5
ASHi 03/07	60-63	22,8
ASHi 03/08	64-65	39,5
ASHi 03/09	65-69	52,3

A partir das análises via CCDA para reunião das subfrações semelhantes nos perfis cromatográficos, notou-se que as frações ASHi 03/02, 03/03, 03/04, 03/05 e 03/06 apresentaram manchas de coloração marrom-escuras após revelação em vanilina sulfúrica. Todas as frações foram analisadas por RMN ^1H , porém a análise dos espectros de RMN ^1H para o grupo ASHi 03/06 mostrou-se

como uma fração rica em acetogeninas devido a presença de alguns sinais característicos dessa classe de compostos, como: δ_H 7,28 (q); δ_H 5,05 (qq); δ_H 4,42 – 3,08 (m); δ_H 1,38 (d). As análises das outras frações também mostraram a presença desses compostos, sendo as frações iniciais em mistura com triglicerídeos, e as frações finais em uma mistura mais complexa com outros compostos mais polares.

Assim, a fração ASHi 03/06 foi analisada seu perfil cromatográfico em CLAE nas condições cromatográficas mostradas na FIGURA 3.9.



Condições cromatográficas: Coluna com fase estacionária sílica de fase reversa C₁₈ - analítica Agilent, modelo Eclipse XDB-18 - 5 μ m, (ϕ 4,6 x 150 mm) eluição isocrática ACN:H₂O (8:2), detector U.V. 210 nm, injeção 20 μ L, fluxo 0,8 mL/min.

FIGURA 3.9 - Cromatograma referente à fração ASHi 03/06 utilizando coluna analítica de sílica C₁₈.

Devido à boa separação e resolução dos compostos presentes nesta fração em HPLC, a mesma foi escolhida para análise por HPLC-SPE-NMR utilizando as mesmas condições supracitadas e uma concentração de 5 mg/mL da amostra, sendo as bandas cromatográficas trapezadas em cartuchos SPE e extraídas com solvente deuterado para posterior obtenção de seus espectros. Uma vez que estes compostos mostraram-se de alta complexidade em suas determinações estruturais, a técnica de HPLC-MS foi uma ferramenta de extrema importância para complementação dos dados obtidos e auxílio na determinação estrutural. Para isso, a análise foi realizada utilizando fonte de ionização por ESI (com a adição de ácido

fórmico 0,01% na fase aquosa) e APCI, ambos no modo positivo, nas mesmas condições cromatográficas supracitadas e utilizando concentração de 500 µg/mL e 1 mg/mL.

Devido à ausência de trabalhos na literatura (ou trabalhos com dados incompletos) que tragam as condições de energias e parâmetros utilizados para a realização deste experimento, seria necessário o isolamento destes compostos para posterior análise por inserção direta no espectrômetro de massas para otimização dos parâmetros necessários para a análise. Além disso, o isolamento destes compostos também seria de grande importância para realização dos ensaios biológicos e avaliação de suas atividades.

O isolamento destes compostos se deu através da fração ASHi 04/04, descrita no item abaixo, por esta fração ter se apresentado, após análises em seus perfis cromatográficos, seus espectros de RMN ¹H e por HPLC-MS idêntica a à descrita neste item.

Após a obtenção dos espectros de RMN ¹H, HSQC e HMBC, pelo HPLC-NMR, assim como a obtenção dos espectros de massas no modo *product ion*, e modo positivo através da ionização por ESI e APCI, a elucidação estrutural apenas de uma substância (substância **08**) foi possível até o presente momento, devido à complexidade para determinação estrutural dessa classe de compostos associada ao tempo gasto necessário para uma análise mais detalhada.

Vale ressaltar aqui, que a realização do experimento HPLC-NMR resultou no isolamento e obtenção dos espectros de RMN para os quatro compostos de melhor absorção mostrados no cromatograma da FIGURA 3.9. As quatro acetogeninas de menor absorção não foram trapeadas, uma vez que, para ser trapeada, uma banda deve apresentar boa absorção no U.V.

3.3.5.3 – Fracionamento da fração ASHi 04 das sementes de *A. sylvatica*

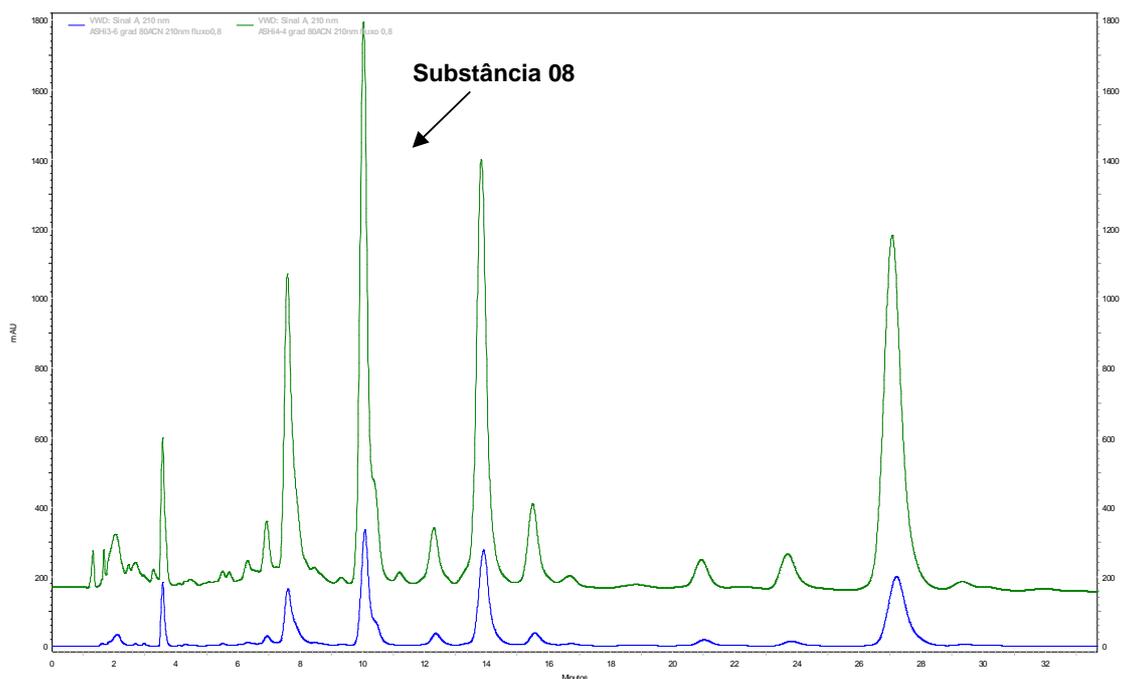
O grupo ASHi 04 (555,4 mg) foi fracionado em uma coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel inicial para a eluição Hex:Acetona 9:1, aumentando o gradiente de eluição em 10%

até 100% MeOH. Este procedimento foi o mesmo utilizado para a fração ASHi 03. Foram coletadas 31 subfrações, as quais foram reunidas por semelhança em seus perfis cromatográficos por CCDA em 07 grupos, mostrado na TABELA 3.15.

TABELA 3.15 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 04 provenientes das sementes (ASHi) de *A. sylvatica* (555,4 mg)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ASHi 04/01	01-02	6,2
ASHi 04/02	03-05	32,3
ASHi 04/03	06-11	72,5
ASHi 04/04	12-21	203,2
ASHi 04/05	22-27	98,2
ASHi 04/06	28-29	32,4
ASHi 04/07	30-31	27,8

Da mesma forma que o observado para as subfrações oriundas da fração ASHi 03, as análises via CCDA das frações ASHi 04/02, 04/03 e 04/04, apresentaram manchas de coloração marrom-escuras após revelação em vanilina sulfúrica. Todas as frações foram analisadas por RMN ^1H , sendo os sinais observados no espectro de RMN ^1H para o grupo ASHi 04/04 igual aos sinais observados no espectro de RMN ^1H para o grupo ASHi 03/06, apresentando-se como uma fração rica em acetogeninas. O perfil cromatográfico para essa fração também foi analisado em HPLC, mostrando-se idêntico em seus constituintes e tempos de retenção. A FIGURA 3.10 mostra a comparação das duas amostras com seus cromatogramas sobrepostos, realizado nas mesmas condições citadas para a FIGURA 3.9.



Condições cromatográficas: Coluna com fase estacionária sílica de fase reversa C₁₈ - analítica Agilent, modelo Eclipse XDB-18 - 5 μm, (φ 4,6 x 150 mm) eluição isocrática ACN:H₂O (8:2), detector U.V. 210 nm, injeção 20 μL, fluxo 0,8 mL/min. Cromatograma verde: ASHi 04/04, azul: ASHi 03/06.

FIGURA 3.10- Cromatograma referente às frações ASHi 03/06 e ASHi 04/04 utilizando coluna analítica de sílica C₁₈.

A análise pelo modo *full scan* por HPLC-MS também foi realizada e comparada com a fração ASHi 03/06, confirmando se tratarem dos mesmos compostos em mistura. Assim, o prosseguimento de purificação para estes compostos se deu através da fração ASHi 04/04, sendo essa amostra purificada em coluna semi-preparativa com fase estacionária de sílica de fase reversa C₁₈ - 10 μm, (φ 10 x 250 mm), nas mesmas condições citadas na FIGURA 3.9, com loop 200 μL, e fluxo 3,5 mL/min, calculado pelo fator de escalonamento dada na Equação (1). Foram realizadas 05 injeções com concentração de 100 mg/mL, sendo reunidas pelos intervalos de tempo referentes a cada banda cromatográfica. Este procedimento permitiu o isolamento de 04 acetogeninas (TABELA 3.16)

As acetogeninas que apresentaram menor intensidade de absorção no cromatograma mostrado na FIGURA 3.9 apresentaram-se também em menor

quantidade de massa isolada, impossibilitando a obtenção de seus espectros de RMN bidimensionais. No entanto, todas as acetogeninas isoladas serão identificadas para fins de publicação, uma vez que conseguiu-se obter a ionização e conseqüentemente as fragmentações de todas as substâncias presentes na amostra, através do HPLC-MS (nos modos de aquisição *product ion*, *neutral loss* e *precursor ion*).

TABELA 3.16– Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 04/04 de *A. sylvatica*

Fração	Substância	Intervalo recolhido (min)	Massa (mg)
ASHi 04/04/01	*	7,2 - 8,2	13,3
ASHi 04/04/02	08	9,8 – 11	16,6
ASHi 04/04/03	*	13,4 – 14,8	19,5
ASHi 04/04/04	*	26,4 – 28,8	22,4

* Substâncias não identificadas até o momento

Após este fracionamento e isolamento das substâncias, estas foram enviadas para o Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” / Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), para o ensaio inseticida frente à *S. zmais*.

3.3.5.4 – Fracionamento da fração ASHi 05 das sementes de *A. sylvatica*

O grupo ASHi 05 apresentou-se, de acordo com CCDA, como uma fração mais polar, sendo o seu fracionamento realizado através de cromatografia por exclusão Sephadex LH-20, utilizando como eluente MeOH:DCM na proporção 8:2. Foram coletados 20 subfrações sendo reunidas através da semelhança em seus perfis cromatográficos em 5 grupos, conforme TABELA 3.17.

TABELA 3.17 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 05 provenientes das sementes (ASHi) de *A. sylvatica* (1586,2 g)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ASHi 05/01	01-04	11,5
ASHi 05/02	05-08	261,3
ASHi 05/03	09-14	1092,7
ASHi 05/04	15-16	61,4
ASHi 05/05	17-20	14,6

O grupo ASHi 05/03 foi fracionado através de cromatografia por adsorção com sílica como fase estacionária, uma vez que os grupos oriundo do fracionamento descrito acima com Sephadex LH-20 não forneceu uma eficiente separação de seus constituintes. Para eluição, foi utilizado Hex:DCM na proporção 1:1, escolhido com base na melhor separação apresentada por CCDA, até MeOH puro. Foram recolhidas 74 subfrações reunidas em 10 grupos pela análise por CCDA, conforme TABELA 3.18.

TABELA 3.18 - Fracionamento Cromatográfico da fração ASHi 05/03 provenientes das sementes (ASHi) de *A. sylvatica* (1092,7 g)

Grupos	Subfrações Reunidas	Massa (mg)
ASHi 05/03/01	01-09	6,6
ASHi 05/03/02	10-23	3,7
ASHi 05/03/03	24-33	7,1
ASHi 05/03/04	34-35	6,1
ASHi 05/03/05	36-39	35,4
ASHi 05/03/06	40-54	120,5
ASHi 05/03/07	55	10,9
ASHi 05/03/08	56-57	12,2
ASHi 05/03/09	58-67	17,2
ASHi 05/03/10	67-74	692,3

Todas as frações obtidas foram analisadas por CCDA e por RMN ^1H . A fração ASHi 05/03/04 resultou em uma mistura dos esteroides estigmasterol, sitosterol e campesterol, que foram posteriormente confirmados através da análise de seus espectros de massas e cromatogramas obtidos por CG-EM. A fração ASHi 05/03/07 foi purificada por HPLC e permitiu o isolamento de dois alcaloides. No entanto, os mesmos não serão descritos neste trabalho por estes estarem em fase de determinação estrutural.

A FIGURA 3.11 mostra o fluxograma para os fracionamentos realizados nos itens **3.3.5.1** à **3.3.5.4**.

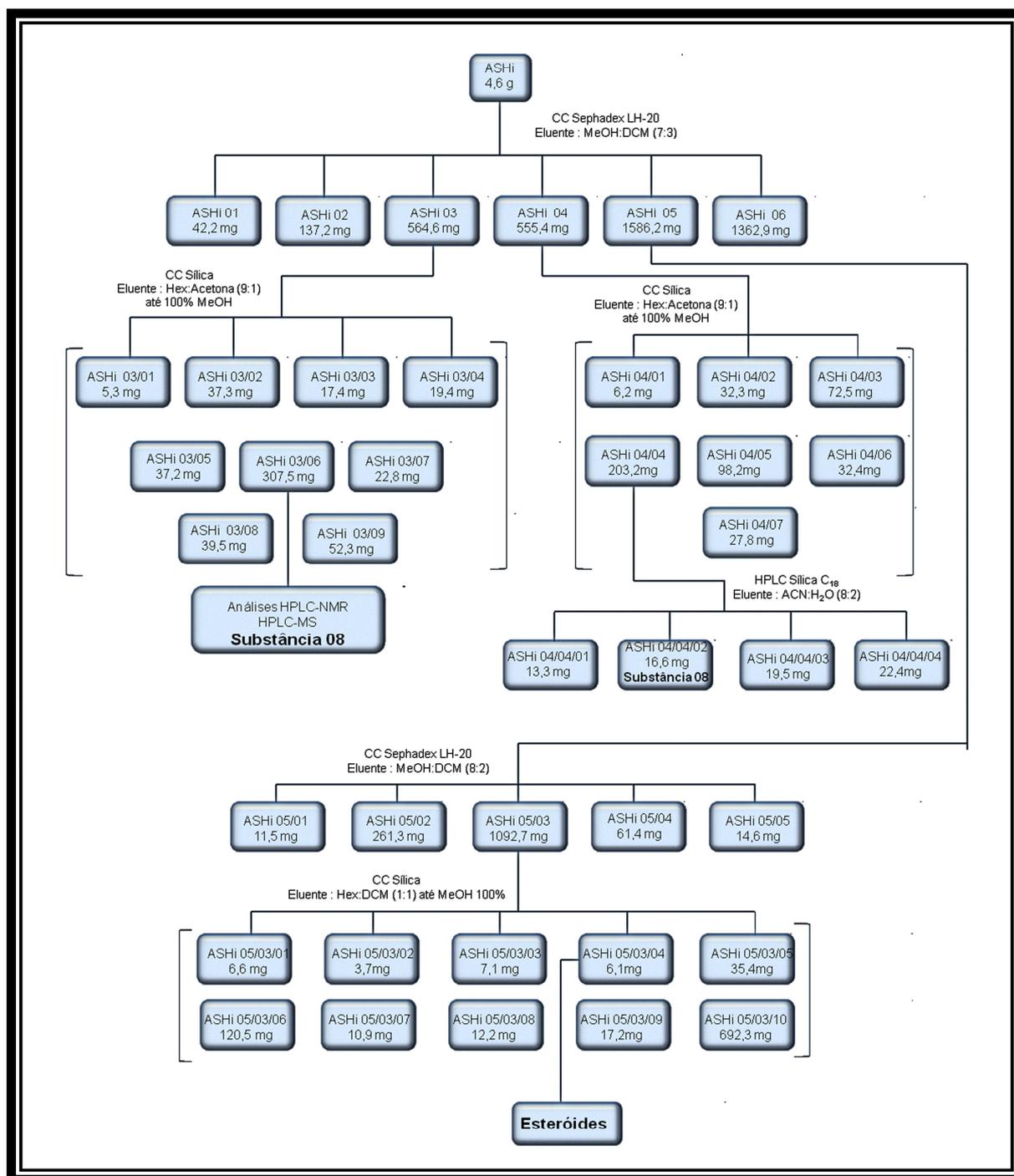


FIGURA 3.11– Fuxograma referente aos itens 3.3.5.1 à 3.3.5.4.

3.4 – Metodologia dos ensaios biológicos

3.4.1 – Ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão dos extratos e frações com as operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP – Rio Claro, sob supervisão do Prof. Dr. Odair Correa Bueno e das alunas responsáveis pelos ensaios, coordenadas pela Marcela Ceccato.

Para este ensaio, as formigas operárias foram retiradas aleatoriamente de um formigueiro mantido em laboratório. Para o controle deste ensaio, foi utilizado uma dieta pura pré-estabelecida pelo grupo (BUENO et al., 1997), como mostra a TABELA 3.19. Esta dieta é isenta de qualquer extrato ou composto, servindo como a melhor alternativa de manutenção das mesmas quando desprovidas de sua dieta natural. A duração do experimento à base desta dieta é de 25 dias, que é o tempo de vida médio de uma formiga.

TABELA 3.19 – Ingredientes contidos na dieta pura (controle) em 100 mL de água destilada utilizada no ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*

	Ingredientes (%)
Glicose	5
Peptona bacteriológica	1,0
Extrato de levedura	0,1
Ágar bacteriológico	1,5

Conforme metodologia desenvolvida por BUENO et al., (1989), a dieta, após a mistura dos componentes descritos na TABELA 3.19, foi levada ao forno de micro-ondas por 4 minutos e em seguida autoclavada a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e, após o resfriamento e solidificação, foram embrulhadas em papel filme e mantidas

em geladeira para serem utilizadas no dia do experimento. As amostras submetidas ao ensaio com as operárias foram incorporadas na dieta preestabelecida (aproximadamente 0,5 g de dieta por placa) na concentração de 2 mg/mL para extratos brutos e partições. Em seguida, ocorreu a transferência das formigas para placas de Petri contendo a dieta. Foram utilizadas 50 operárias distribuídas em grupos de 10 formigas para cada placa de Petri e mantidas em estufa de B.O.D. a 24 ± 1 °C com umidade relativa acima de 70%, sendo a dieta renovada a cada 24 horas. A avaliação diária da mortalidade das formigas foi realizada durante os 25 dias de experimento.

As taxas de sobrevivência diária para cada tratamento a partir dos dados obtidos foram calculadas construindo uma curva de longevidade, a qual foi aplicada a análise de variância, onde o número médio de dias de sobrevivência das formigas de cada placa foi calculado e utilizado como observação nas análises. Para a análise dos dados, foi utilizado o software Graph-Pad Prism 3.0.

3.4.2 – Ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. 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), sob coordenação da Dra. 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).

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporadas ao meio de cultura e dissolvidas em água destilada, obtendo concentração final em torno de 1000 µg/mL para os extratos e partições e 100 µg/mL para as substâncias puras. Em seguida, em cada tubo de ensaio, foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaios com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavadas nas condições 120 °C, 1,0 atm

por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de culturas foram vertidos nas placas de Petri dentro da capela de fluxo laminar, previamente esterilizada 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 simbionte *L. gongylophorus*.

Cada amostra foi preparada em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para o controle geral (meio de cultura e fungo simbionte). Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C (± 2) foram realizadas as medidas do diâmetro médio final e calculado a área do crescimento micelial para cada placa, em cada amostra, sendo que esta metodologia é uma adaptação do artigo base (MIYASHIRA, 2007). As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbionte dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbionte.

3.4.3 – Ensaio inseticida frente *S. zeamais*

Para o ensaio inseticida de *S. zeamais*, seguiu-se a metodologia utilizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” / Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), sendo realizado pelo aluno de doutorado Leandro Prado Ribeiro, sob orientação do Prof. Dr. Djair Vendramim.

O bioensaio foi conduzido em sala climatizada à temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$, e luminosidade média de 200 lux. Foram utilizados grãos de milho inteiros, previamente selecionados manualmente, obtidos de cultivos realizados na área experimental do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

Este ensaio se baseia na aplicação de cada amostra, solubilizada em um solvente apropriado, sobre os grãos de milho através de um microatomizador acoplado a uma bomba pneumática, ajustada para propiciar uma pressão de 0,5 kgf/cm² por meio de um volume de calda de 30 L/t. Após a pulverização, a mistura

dos grãos com os extratos/substâncias foi feita manualmente, em sacos plásticos com capacidade para dois litros, os quais foram agitados por um minuto. Para cada tratamento foram utilizados sacos individuais, sendo posteriormente os grãos deixados em capela por um período de 72 horas a 38 °C para evaporação completa do solvente. A concentração utilizada para a realização do ensaio foi determinada através de ensaios preliminares, sendo os extratos testados na concentração de 1500 ppm (correspondendo a 1500 mg de extrato/kg de milho), estipulada segundo RIBEIRO (2010). Assim, as amostras que apresentaram os resultados mais promissores foram testadas estimando a CL_{50} (concentração necessária para matar 50% da população de gorgulhos). Foram utilizadas placas de Petri de 6 cm de diâmetro contendo amostras de 10 g de milho, as quais foram tratadas, separadamente, com os respectivos extratos vegetais, frações e substâncias puras, além de uma testemunha, onde foi mantido apenas o substrato de criação tratado com o respectivo solvente utilizado na resuspensão das amostras. Cada caixa plástica foi infestada por 20 adultos, não sexados, utilizando-se 10 repetições por tratamento. A sobrevivência dos adultos foi avaliada ao décimo dia após a infestação. Foi considerado morto o indivíduo cujas extremidades ficaram completamente estendidas e que não apresentaram reação ao contato com um pincel durante o período de um minuto.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Identificações e Determinações Estruturais

4.1.1 – Identificações e Determinação Estrutural de Lignanas

As lignanas são metabólitos secundários derivados da via biossintética do ácido chiquímico. São formadas, em geral, por dimerização de grupos fenilpropânicos (C_6-C_3) através de condensações oxidativas e encontram-se amplamente distribuídas nas plantas. Por apresentarem uma ampla variedade de atividades biológicas como, antitumoral, antiviral, inibidor de enzimas, anti-inflamatórias, destacando-se a atividade antifúngica, elas têm sido alvo de muitos estudos ao longo dos anos (DEWICK, 2002; MACÍAS, et al., 2004; SILVA, et al., 2009).

A nomenclatura para o grupo das lignanas furofurânicas podem ser estabelecidas para cada unidade fenilpropânica (C_6-C_3) separadamente. Assim, a primeira unidade fenilpropânica é numerada de 1 a 9 enquanto a segunda unidade, numerada de 1' a 9'. Conseqüentemente, os átomos de carbono α , β e γ em relação ao primeiro anel aromático recebem a numeração 7, 8 e 9 respectivamente. Para a relação com o segundo anel aromático, a numeração segue-se da mesma forma, diferenciando os mesmos por 7', 8' e 9' (FIGURA 4.1).

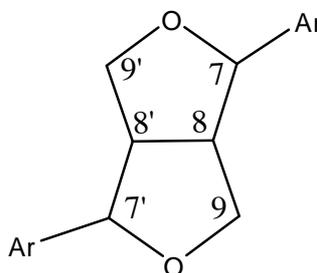


FIGURA 4.1 – Numeração para o anel furofurânico presentes em lignanas furofurânicas.

4.1.1.1 – Identificação estrutural da Substância 01

A substância **01** foi identificada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC. A análise por EM através de inserção direta na fonte de ionização por ESI contribuiu para a confirmação da substância e de sua massa molecular. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (MIYAZAWA et al., 1994).

A análise do espectro de RMN ^1H apresentou sinais referentes a oito hidrogênios alifáticos (dois oxi-benzílicos, dois metínicos e quatro carbinólicos), permitindo estabelecer o esqueleto furofurânico presente em lignanas para a substância: δ_{H} 4,76 (*d*, $J = 4,5$ Hz, 1H); δ_{H} 4,74 (*d*, $J = 4,5$ Hz, 1H); δ_{H} 4,28 (*dd*, $J = 6,8$ e $9,1$ Hz, 1H); δ_{H} 4,27 (*dd*, $J = 6,8$ e $9,1$ Hz, 1H); δ_{H} 3,91 (*m*, 2H); δ_{H} 3,10 (*m*, 2H). Para este esqueleto, são possíveis três séries, onde os grupos arilas se encontram nas posições pseudodiequatoriais; pseudodiaxiais; pseudoequatorial e pseudoaxial (*epi*) (FIGURA 4.2).

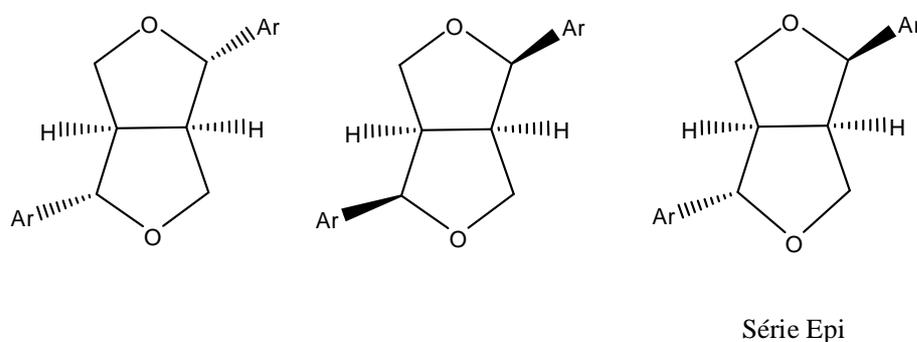


FIGURA 4.2 - Posições dos grupos arilas para a unidade furofurânica das lignanas.

Quando o esqueleto furofurânico é pseudodiaxial ou pseudodiequatorialmente substituído, observa-se a simplificação do espectro de RMN ^1H , sendo que os prótons oxi-benzílicos, metínicos e carbinólicos apresentam deslocamentos aos pares. Ou seja, os hidrogênios 7/7', 8/8' e 9/9' mostram-se equivalentes em seus sinais de ressonância. Esta observação se deve ao fato de que estes hidrogênios encontram-se no mesmo ambiente magnético (FIGURA 4.3).

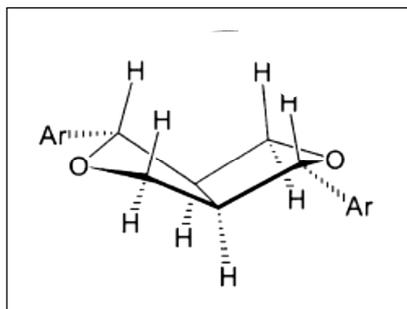


FIGURA 4.3– Estereoquímica para o anel furofurânico de lignanas (AHMED et al., 2002).

Para a série epi, por sua vez, estes prótons tornam-se distintos. Quando um dos prótons H-7 se encontra em pseudo-axial, por exemplo, este sofre diretamente o efeito anisotrópico de proteção do grupo arila pseudo-axial em C-7' (FIGURA 4.4).

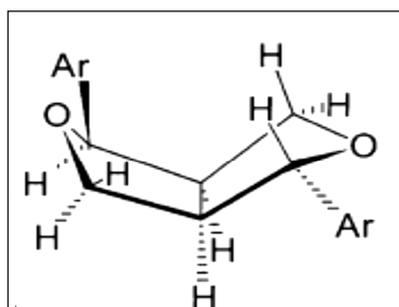


FIGURA 4.4– Estereoquímica Epi para o anel furofurânico de lignanas (AHMED et al., 2002).

Assim, essas características permitem atribuir a estereoquímica dos anéis aromáticos para a substância **01** como pseudo-diaxial ou pseudo-diaequatorial.

Conforme numeração descrita na FIGURA 4.1, o hidrogênio H-7, acopla com o H-8, resultando em um dubleto, com constante de acoplamento $J = 4,5$ Hz. Da mesma forma, observa-se o mesmo comportamento para o acoplamento entre o H-7' e o H8' (d , $J = 4,5$ Hz, 1H). Os hidrogênios H-9 (H-9_{ax} e H-9_{eq}), no entanto, são diastereotópicos. Isto significa que eles acoplam entre si com a constante de acoplamento mais alta ($J = 9,1$ Hz). Esse mesmo comportamento é

observado para os hidrogênios H-9' (acoplamento entre H-9'_{ax} e H-9'_{eq}) (FIGURA 4.5 e 4.6). As constantes de $J = 6,8$ Hz para os valores de deslocamentos em δ_H 4,28 e δ_H 4,27, se devem aos acoplamentos entre um dos hidrogênios H-9 (H-9_{ax} ou H-9_{eq}) com o hidrogênio H-8, assim como para o outro lado da substância, um dos hidrogênios H-9' (H-9'_{ax} ou H-9'_{eq}) acopla com o hidrogênio H-8'. Uma vez que estes acoplamentos são com as constantes maiores, através da correlação de Karplus, consegue-se estabelecer que se trata do acoplamento dos hidrogênios H-9 e H-9' em pseudoequatoriais com H-8 e H-8', respectivamente, que estão presentes do mesmo lado da substância. MIYAZAWA et al., (1994) mostra a menor constante em $J = 4,0$ Hz para o acoplamento entre os hidrogênios em δ_H 3,92, H-9_{ax} e H-9'_{ax} com H8/8'. Considerando que os sinais no espectro em δ_H 3,91 estão muito próximos da região das metoxilas nesta estrutura, isto dificultou o cálculo da constante de acoplamento menor para esta substância. Assim, pode-se atribuir os valores de deslocamentos químicos em δ_H 4,28 e δ_H 4,27 representando os hidrogênios H-9_{eq} e H-9'_{eq} e o valor em δ_H 3,91 para os hidrogênios H-9_{ax} e H-9'_{ax}. Os acoplamentos entre os hidrogênios do anel furofurânico também são confirmados analisando-se as correlações hidrogênio-hidrogênio, COSY (FIGURA 4.7). As correlações mostradas no espectro indicam os acoplamentos entre os hidrogênios. Observa-se que os hidrogênios H-9/H-9' acoplam entre si e com os hidrogênios H8/H8', sendo estes, por sua vez, acoplando com os hidrogênios H7/H7'.

Para o restante do espectro de RMN ¹H, nota-se os seguintes sinais na região aromática: δ_H 6,90 (*d*, $J = 1,7$ Hz, 1H), acoplando em meta; δ_H 6,87 (*dd*, $J = 1,7$ e 8,2 Hz, 1H), acoplando em meta e orto; δ_H 6,84 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H), acoplando em orto, característicos de um anel aromático trissubstituído. O valor em δ_H 6,57 (*s*, 2H) corresponde aos hidrogênios equivalentes pertencentes ao outro anel aromático.

Os valores de deslocamentos químicos de carbono para esta substância puderam ser atribuídos através dos experimentos de RMN ¹³C (FIGURA 4.8); HSQC (FIGURA 4.9) e HMBC (FIGURA 4.10, 4.11 e 4.12). Através do mapa de contornos HSQC foi possível correlacionar os sinais de hidrogênios descritos acima com os dos respectivos carbonos, assim, as correlações carbono-hidrogênio diretamente ligados são: δ_H 6,90 e δ_C 109,20; δ_H 6,87 e δ_C 118,22; δ_H 6,84 e δ_C

111,02; δ_H 6,57 e δ_C 102,79; δ_H 4,76 e δ_C 85,69; δ_H 4,74 e δ_C 86,01. Uma vez que os valores em δ_H 4,28, δ_H 4,26 e δ_H 3,91 encontram-se sobrepostos, tornou-se difícil especificar a correlação carbono-hidrogênio diretamente ligado. Por este motivo estes sinais serão abordados conforme MIYAZAWA et al., 1994. Através do experimento HMBC, observou-se as correlações indicadas na TABELA 4.1.

TABELA 4.1– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **01** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
6,90 (H-2)	85,69 (C-7); 118,22 (C-6); 133,42 (C-1); 148,64 (C-3); 149,18 (C-4);
6,87 (H-6)	85,69 (C-7); 109,20 (C-2); 133,42 (C-1)
6,84 (H-5)	118, 22 (C-6); 133,42 (C-1); 148,64 (C-3); 149,18 (C-4)
6,57 (H-2'/6')	86,01 (C-7'); 102,79 (C-2'/6'); 136,79 (C-1'); 137,43 (C-4'); 153,41 (C-3'/5')
4,76 (H-7)	54,39 (C-8); 71,73 (C-9'); 109,20 (C-2); 118,22 (C-6) e 133,42 (C-1)
4,74 (H-7')	54,07 (C-8'); 71,91 (C-9); 102,79 (C-2'/6') e 136,79 (C-1')

A TABELA 4.2 apresenta a atribuição dos sinais de RMN 1H e ^{13}C comparando os dados com a literatura. O espectro de massas através ESI e suas respectivas fragmentações são mostrados na FIGURA 4.13 e 4.14. Assim, a estrutura com suas respectivas numerações são mostradas a seguir:

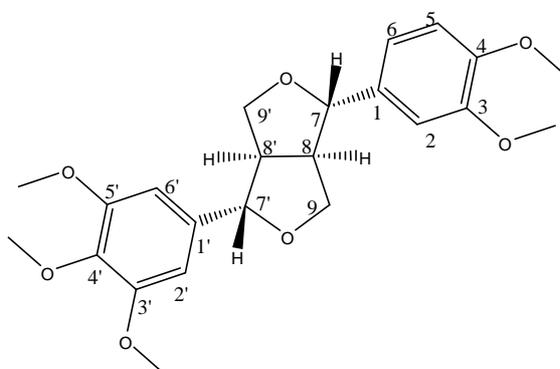


TABELA 4.2 – Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) para a substância **01** em comparação com a magnolina (MIYAZAWA et al., 1994: CDCl_3 , 200 MHz para RMN ^1H e 50 MHz para RMN ^{13}C)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Substância 01	MIYAZAWA et al., 1994	Substância 01	MIYAZAWA et al., 1994
1	--	--	133,43	133,5
2	6,90 (<i>d</i> , 1,7)	6,91 (<i>d</i> , 2,0)	109,20	109,20
3	--	--	148,64	148,70
4	--	--	149,18	149,00
5	6,84 (<i>d</i> , 8,2)	6,84 (<i>d</i> , 8,0)	111,02	111,10
6	6,87 (<i>dd</i> , 1,7 e 8,2)	6,89 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,0)	118,22	118,20
1'	--	--	136,79	136,80
2'/6'	6,57 (<i>s</i>)	6,58 (<i>s</i>)	102,79	102,80
3'/5'	--	--	153,41	153,40
4'	--	--	137,43	137,50
7	4,76 (<i>d</i> , 4,5)	4,77 (<i>d</i> , 5,0)	85, 69	85,70
8	3,10 (<i>m</i>)	3,11(<i>m</i>)	54,39	54,40
9 _{ax}	3,91 (<i>m</i>)	3,92 (<i>dd</i> , 4,0 e 9,0)	71,91	71,90
9 _{eq}	4,28 (<i>dd</i> , 6,8 e 9,1)	4,29 (<i>dd</i> , 7,0 e 9,0)		
7'	4,74 (<i>d</i> , 4,5)	4,75 (<i>d</i> , 5,0)	86,01	86,00
8'	3,10 (<i>m</i>)	3,11 (<i>m</i>)	54,07	54,10
9' _{ax}	3,91 (<i>m</i>)	3,92 (<i>dd</i> , 4,0 e 9,0)	71,73	71,70
9' _{eq}	4,26 (<i>dd</i> , 6,8 e 9,1)	4,28 (<i>dd</i> , 7,0 e 9,0)		
OMe	3,82 (<i>s</i>)	3,84 (<i>s</i>)	60,81	60,90
OMe	3,86 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	56,16	56,20
OMe	3,86 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	56,15	56,20
OMe	3,89 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	55,90	55,90
OMe	3,89 (<i>s</i>)	3,91 (<i>s</i>)	55,91	55,90

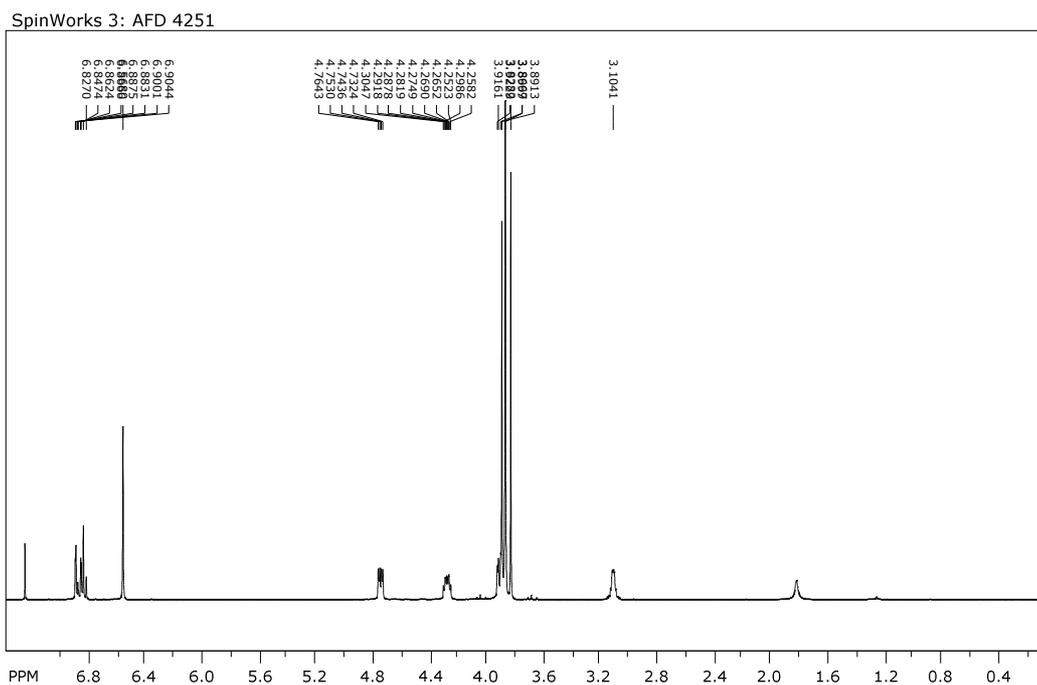


FIGURA 4.5– Espectro de RMN ^1H referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

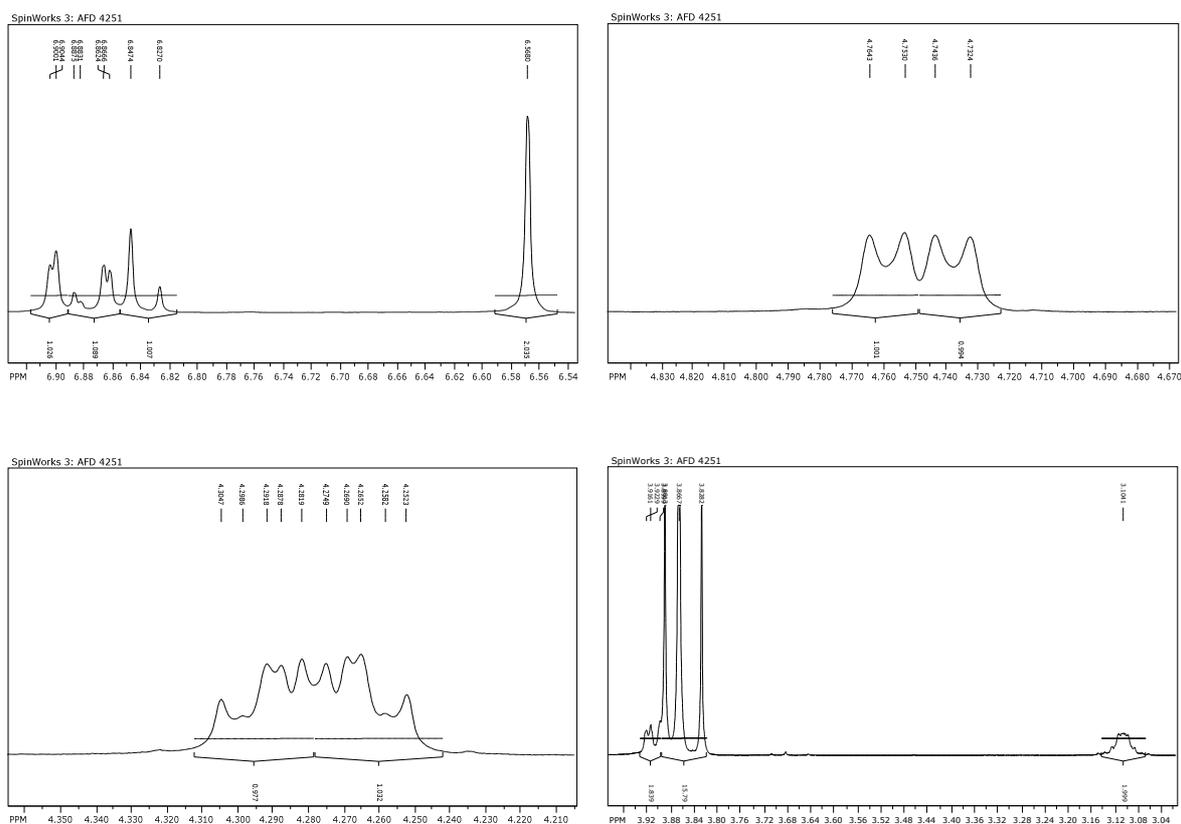


FIGURA 4.6– Ampliações do espectro de RMN ^1H para a substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

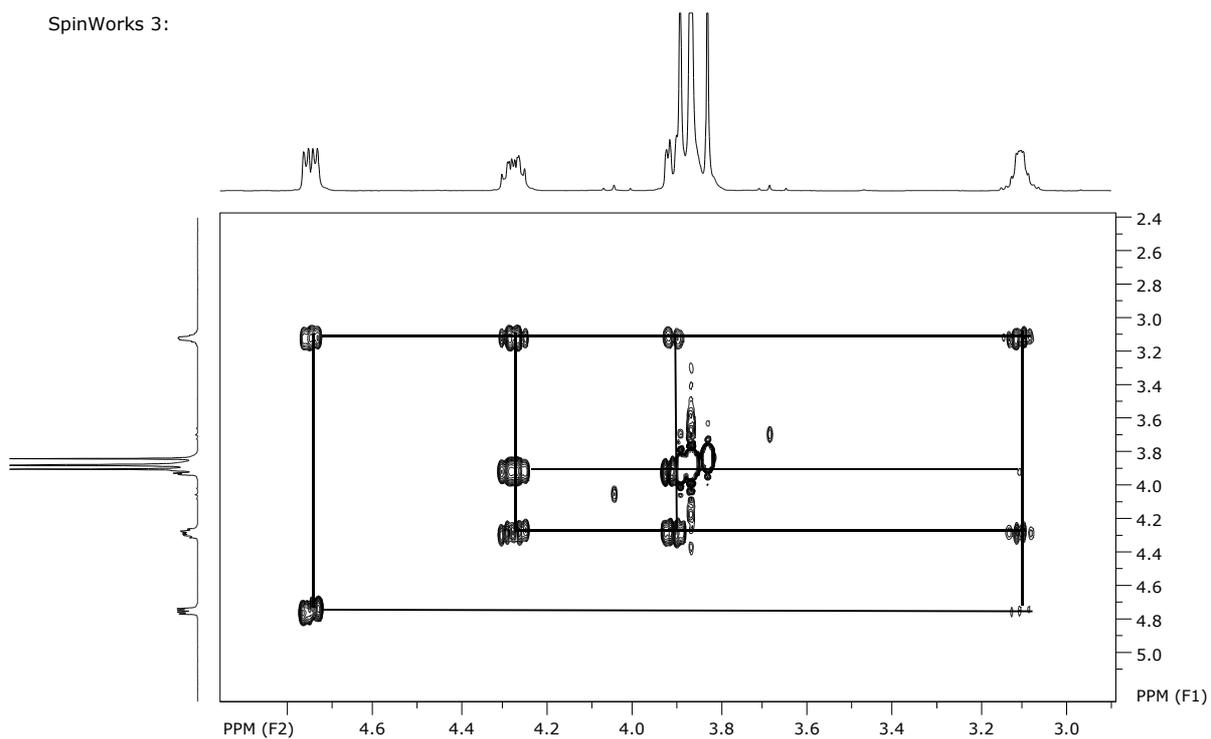


FIGURA 4.7– Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

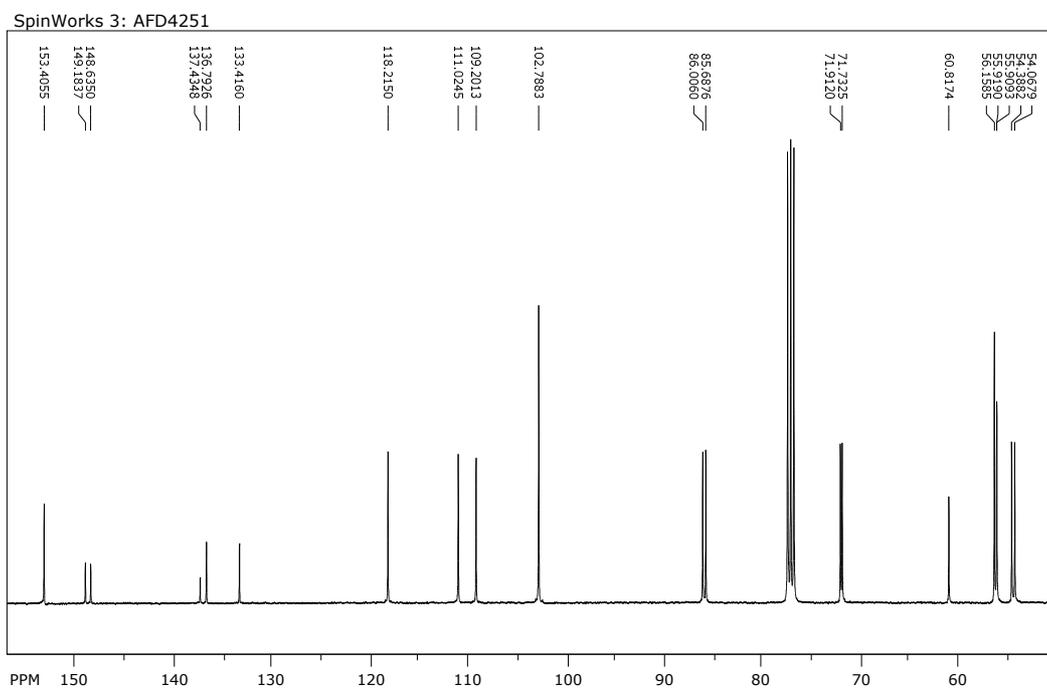


FIGURA 4.8– Espectro de RMN ^{13}C referente à substância **01** (100 MHz, CDCl_3).

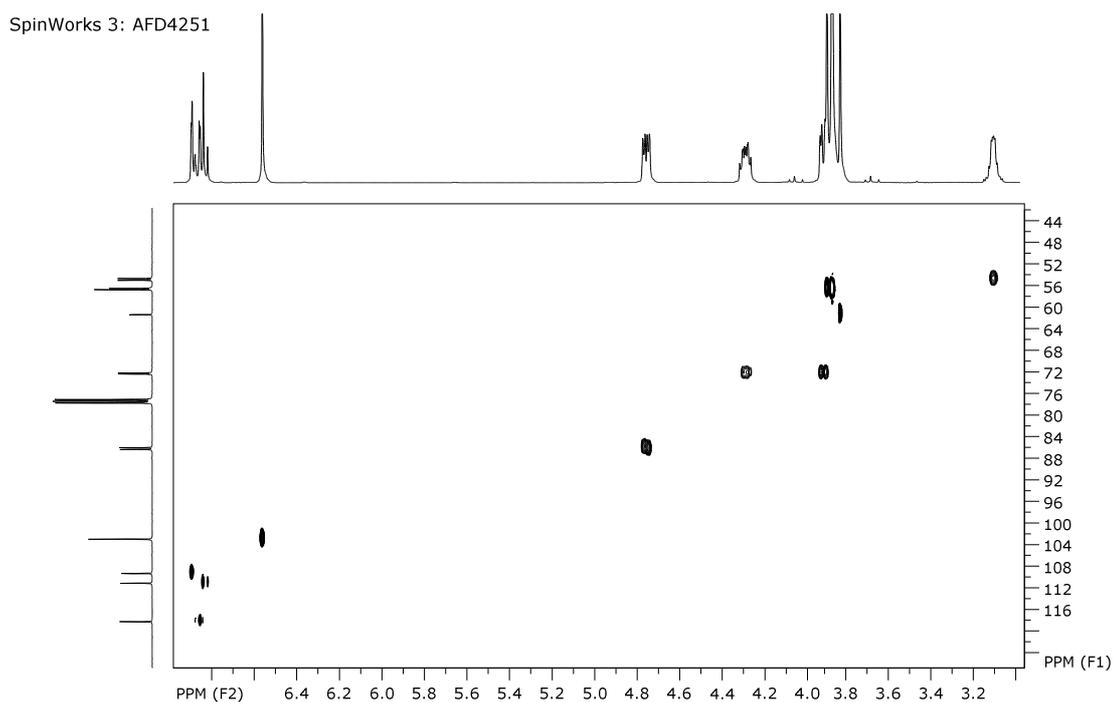


FIGURA 4.9– Mapa de contorno HSQC referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

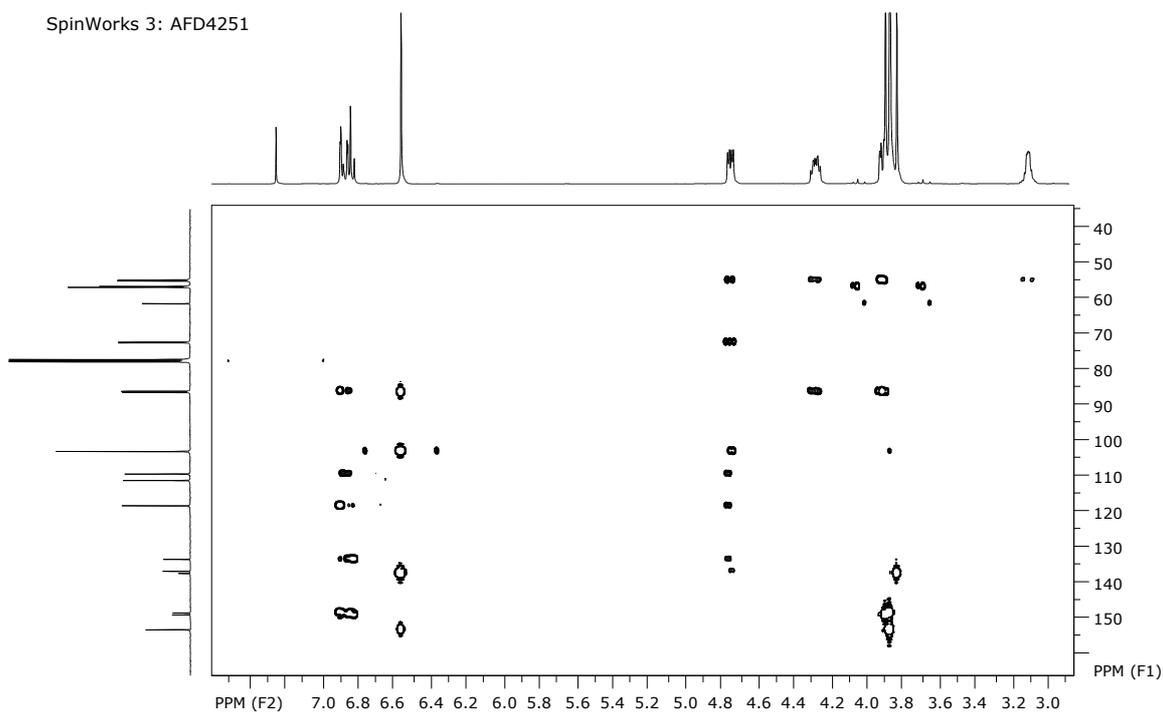


FIGURA 4.10– Mapa de contorno HMBC referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

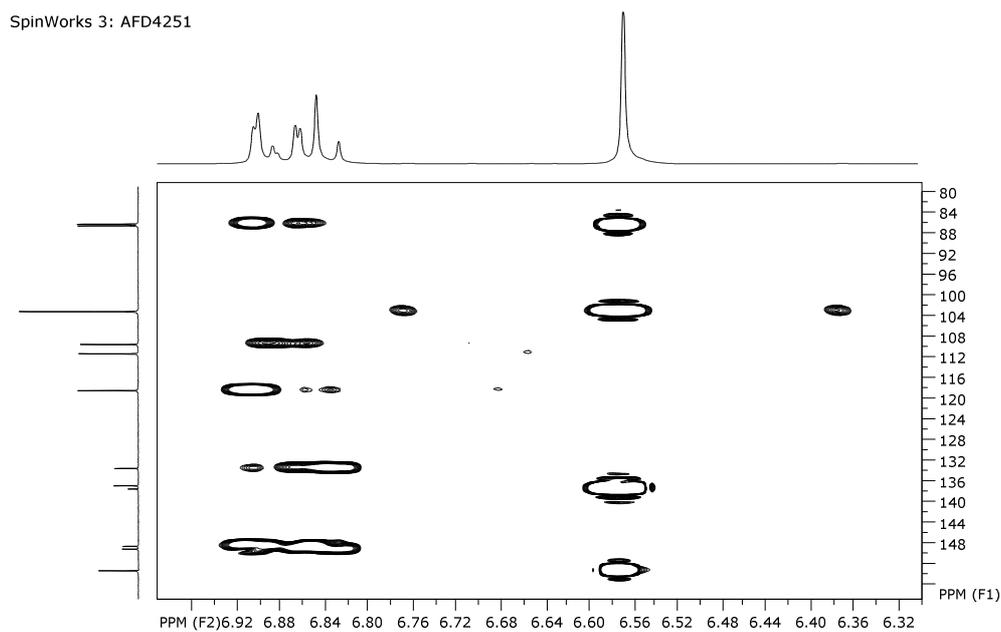


FIGURA 4.11– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

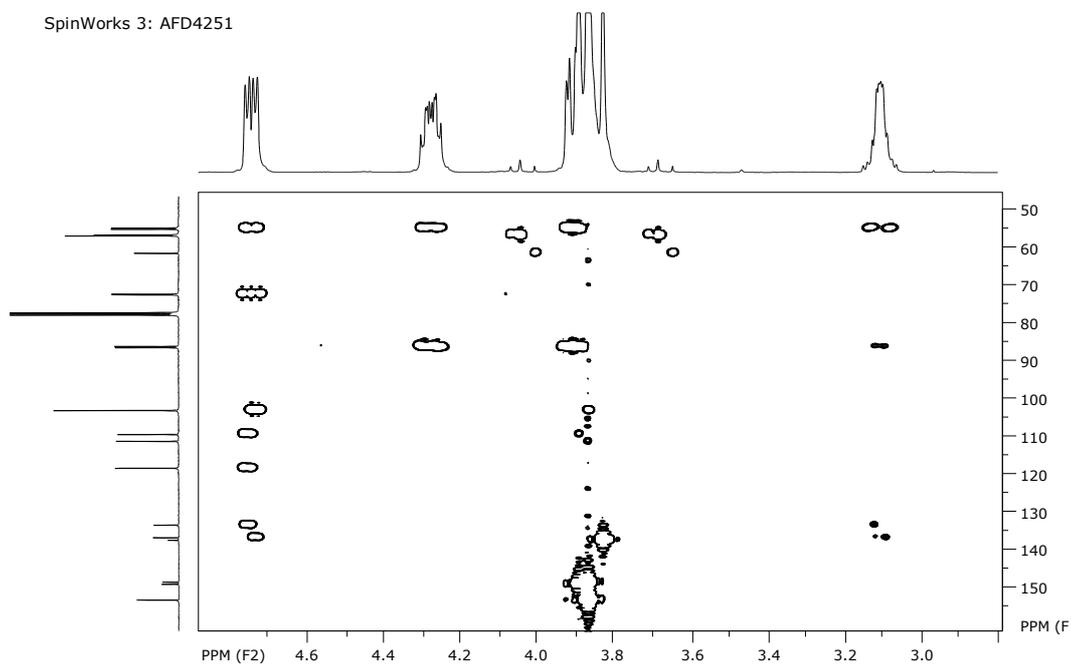


FIGURA 4.12– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **01** (400 MHz, CDCl_3).

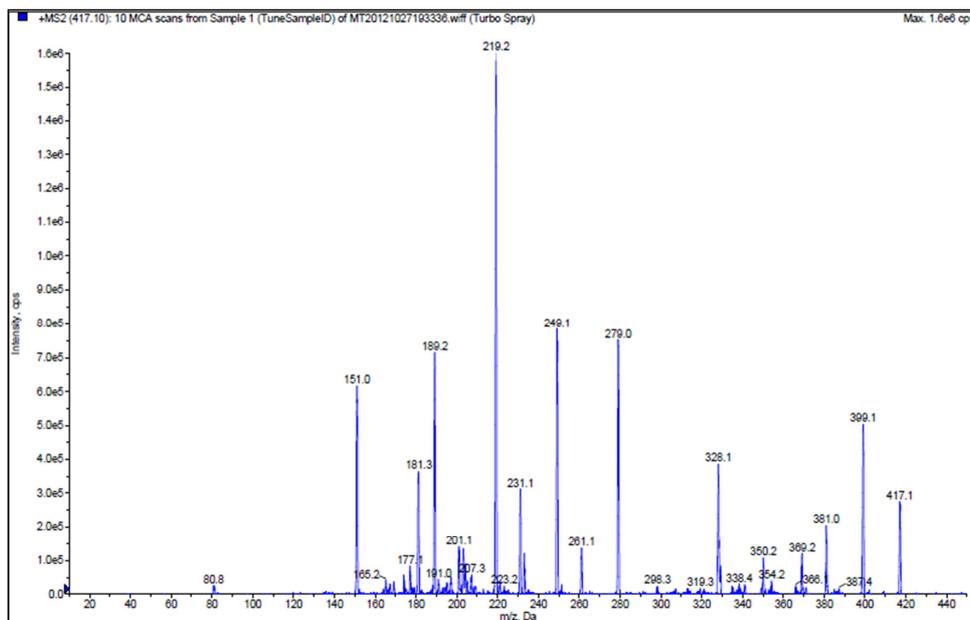
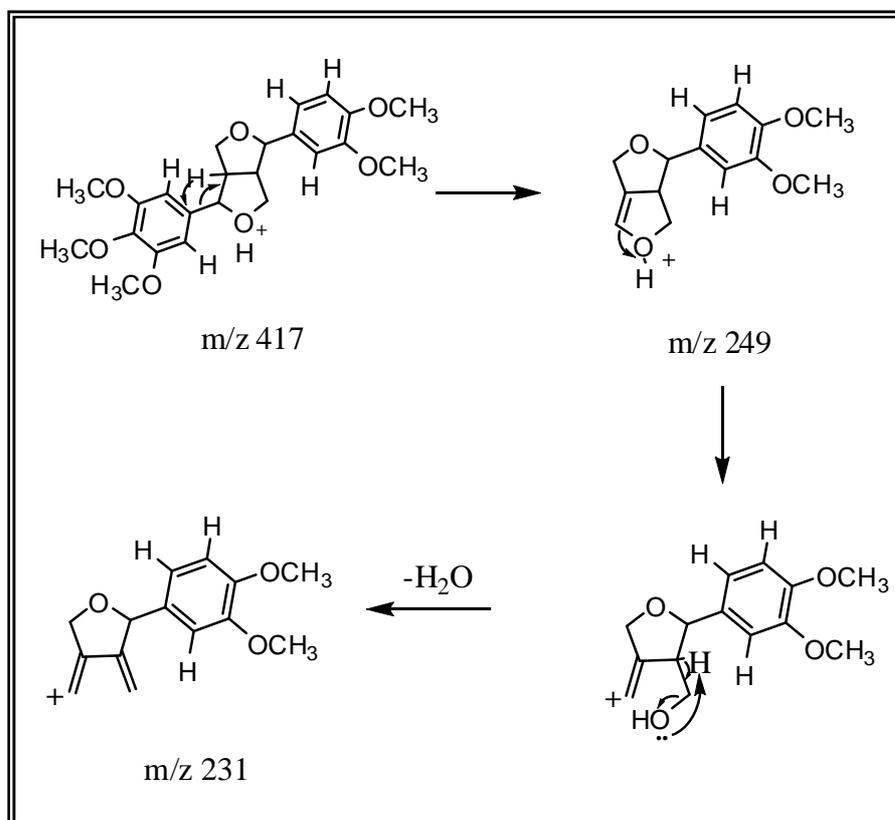
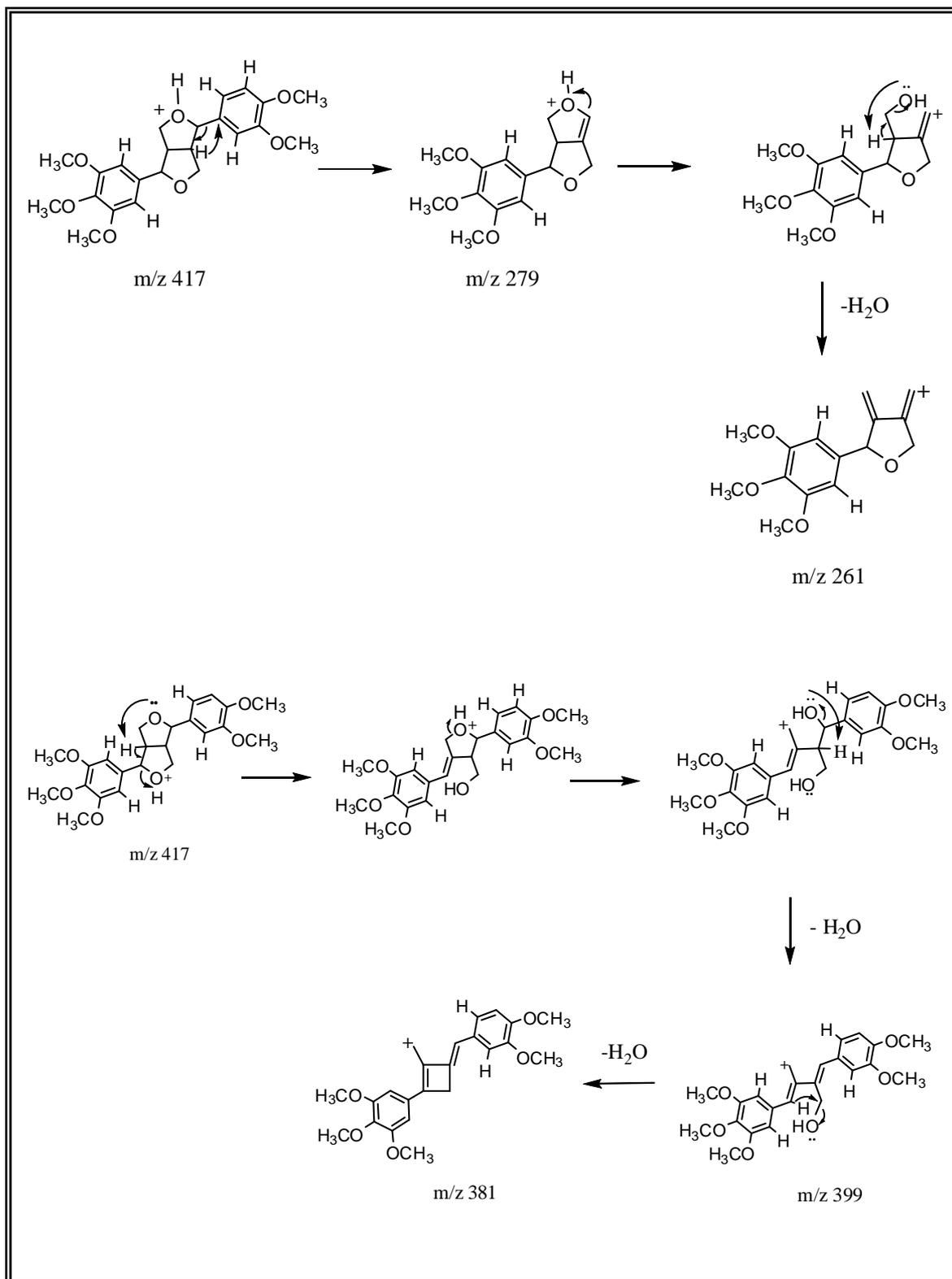


FIGURA 4.13– Espectro de massas por ESI⁺ no modo *product ion* para a substância **01**.

Proposta de fragmentação para o íon [M+H]⁺ 417 para a substância **01** é apresentada na FIGURA 4.14.





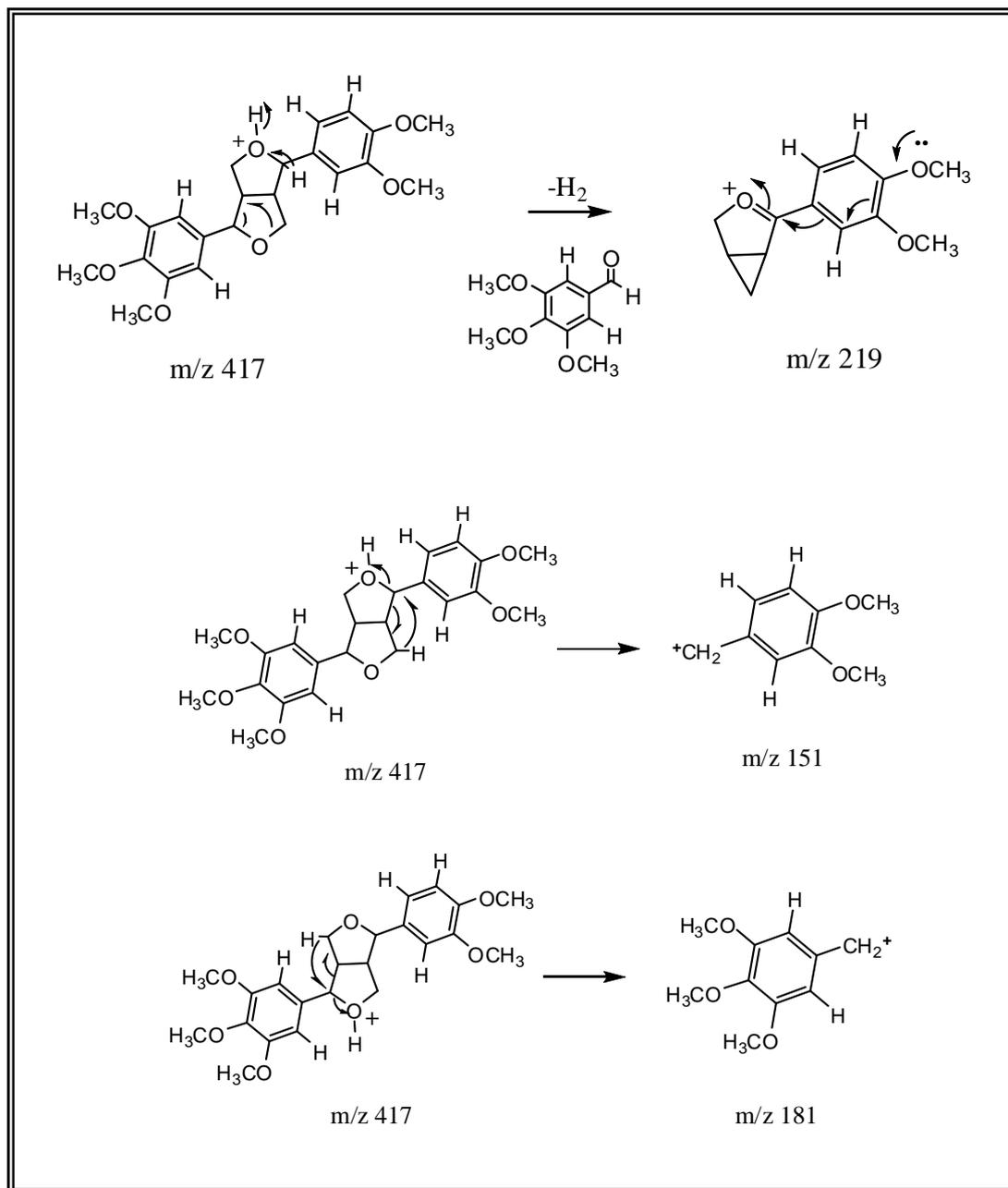


FIGURA 4.14– Propostas de fragmentação para o íon $[M+H]^+$ 417 referente à substância **01**.

4.1.1.2 – Identificação estrutural da Substância 02

A substância **02** foi identificada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC e por EM. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (IIDA et al., 1982).

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.15) apresentou os seguintes sinais característicos de anéis furofurânicos presentes em lignanas: δ_{H} 4,76 (*d*, $J = 4,32$ Hz, 2H); δ_{H} 4,25 (*dd*, $J = 6,9$ e $9,1$ Hz, 2H); δ_{H} 3,88 - 3,91 (*m*, 2H); δ_{H} 3,11 (*m*, 2H), o que indica a estereoquímica de seus anéis aromáticos como pseudoequatorial ou pseudodiaxial. Da mesma forma descrita no item 4.1.1.1., os hidrogênios H-7/7' (δ_{H} 4,76; 2H) acoplam com o H-8/8' (δ_{H} 3,11; 2H), resultando em um dubleto, com constante de acoplamento $J = 4,32$ Hz. Os hidrogênios H-9 e H-9' em δ_{H} 4,25 são diasterotópicos e acoplam entre si com a constante de acoplamento mais alta ($J = 9,1$ Hz). A constante de $J = 6,9$ Hz se deve aos acoplamentos de um dos hidrogênios H9/9' com os hidrogênios H-8/8' presentes no mesmo lado da substância. A constante que resulta do acoplamento do outro hidrogênio em H9 e H9' (em δ_{H} 3,88 - 3,91) com H8/8' em lados opostos da substância (constante de menor valor) não pôde ser calculada uma vez que seus sinais estão coalescidos com os sinais das metoxilas presentes na molécula. Os valores de integração para H-7/7', H-8/8' e H-9/9' mostram-se equivalentes quimicamente, o que permite concluir que a substância é simétrica. As correlações hidrogênio-hidrogênio, COSY, confirmaram os acoplamentos entre os hidrogênios do anel furofurânico citados (FIGURA 4.16). Observa-se que os hidrogênios H-9/H-9' acomplam entre si e com os hidrogênios H8/H8', sendo estes, por sua vez, acoplando com os hidrogênios H7/H7'.

Para a região aromática, estão presentes os seguintes sinais: δ_{H} 6,91 (*d*, $J = 1,7$ Hz, 2H); δ_{H} 6,88 (*dd*, $J = 1,7$ e $8,2$ Hz, 2H); δ_{H} 6,84 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 2H). Esses valores de deslocamentos e da integração são característicos da presença de dois anéis 1,3,4-trissubstituídos na estrutura, reafirmando a sua simetria.

O espectro de RMN ^{13}C é mostrado na FIGURA 4.17. Para as correlações carbono-hidrogênio diretamente ligados (HSQC) (FIGURA 4.18), as

seguintes correlações foram observadas: δ_H 6,91 com δ_C 109,20; δ_H 6,88 com δ_C 118,20; δ_H 6,84 com δ_C 111,0; δ_H 4,76 e δ_C 85,74; δ_H 4,25 e δ_H 3,88-3,91 com δ_C 71,67 e δ_H 3,11 com δ_C 54,11.

Através do experimento HMBC (FIGURAS 4.19, 4.20 e 4.21), observou-se as correlações indicadas na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 – Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **02** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
6,91(H-2/2')	85,74 (C-7/7'); 118,20 (C-6/6'); 133,49 (C-1/1'); 148,58 (C-3/3'); 149,15 (C-4/4')
6,88 (H-6/6')	85,74 (C-7/7'); 109,20 (C-2/2'); 111,00 (C-5/5'); 133,49 (C-1/1'); 149,15 (C-4/4')
6,84 (H-5/5')	109,20 (C-2/2'); 118,20 (C-6/6'); 133,49 (C-1/1'); 148,58 (C-3/3'), 149,15 (C-4/4')
4,76 (H-7/7')	54,11 (C-8/8'); 71,67 (C-9/9'); 109,20 (C-2/2'); 133,49 (C-1/1')
4,25/3,88- 3,91(H-9/9')	54,11 (C-8/8'); 85,74 (C-7/7')
3,11 (H-8/8')	71,67 (C-9/9'); 85,74 (C-7/7'); 133,49 (C-1/1')

A TABELA 4.4 apresenta a atribuição dos sinais de RMN 1H e ^{13}C comparando os dados com a literatura. O espectro de massas através ESI⁺ é mostrado nas FIGURAS 4.22 e 4.23. Assim, a estrutura com suas respectivas numerações é:

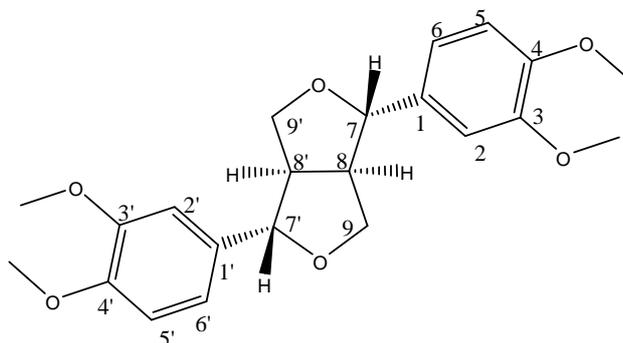


Tabela 4.4 – Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) para a substância **02** em comparação com a eudesmina (IIDA et al., 1982: CDCl_3 , 100MHz para RMN ^1H e 25MHz para RMN ^{13}C)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Substância 02	IIDA et al., 1982	Substância 02	IIDA et al., 1982
1/1'	--	--	133,49	133,30
2/2'	6,91 (<i>d</i> , 1,7)	(6,84 – 6,92)*	109,20	*
3/3'	--	--	148,58	*
4/4'	--	--	149,15	*
5/5'	6,84 (<i>d</i> , 8,2)	(6,84 – 6,92)*	111,00	110,90
6/6'	6,88 (<i>dd</i> , 1,7 e 8,2)	(6,84 – 6,92)*	118,20	*
7/7'	4,76 (<i>d</i> , 4,3)	4,76 (<i>d</i> , 4,0)	85,74	85,50
8/8'	3,11 (<i>m</i>)	3,12 (<i>m</i>)	54,11	54,00
9 _{ax} /9' _{ax}	3,88 – 3,91 (<i>m</i>)	3,86 - 3,96 (<i>m</i>)	71,67	71,50
9 _{eq} /9' _{eq}	4,25 (<i>dd</i> , 6,9 e 9,1)	4,26 (<i>dd</i> , 7,0 e 9,0)		
OMe	3,86 (<i>s</i>)	3,86*	55,87	*
OMe	3,89 (<i>s</i>)	3,90*	55,89	*

* Dados não fornecidos pelo autor.

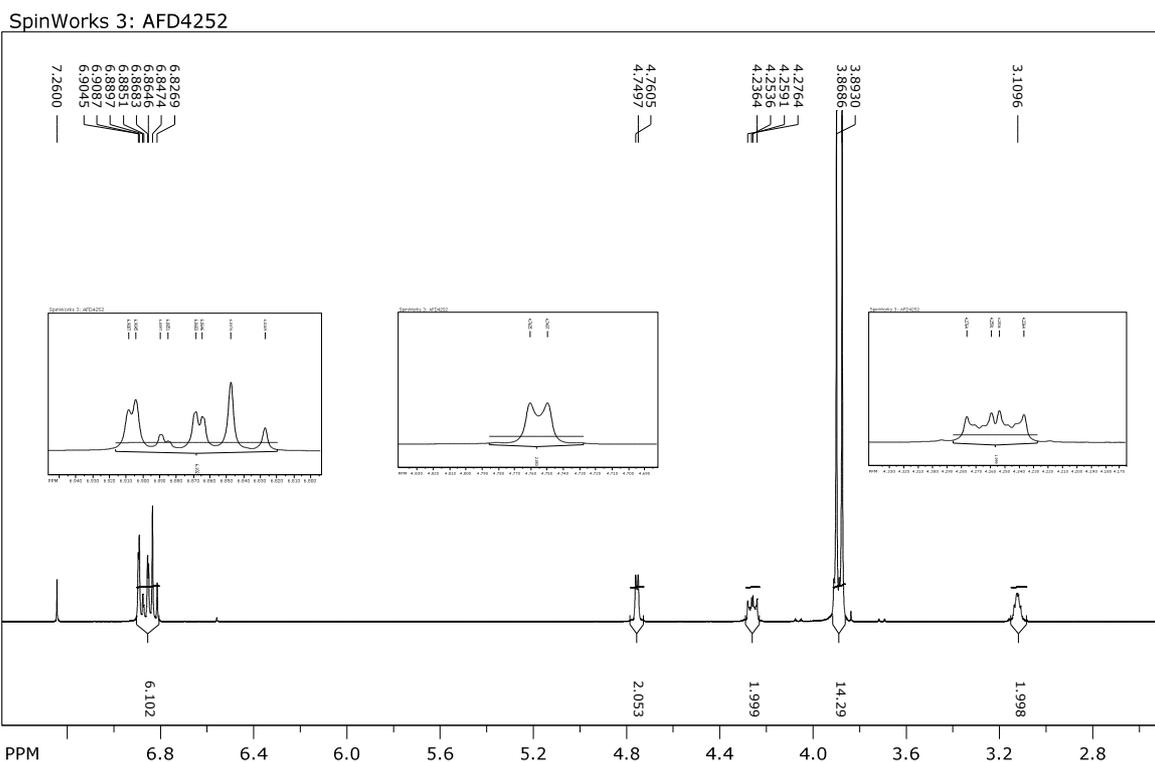


FIGURA 4.15- Espectro de RMN ^1H e suas ampliações referentes à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

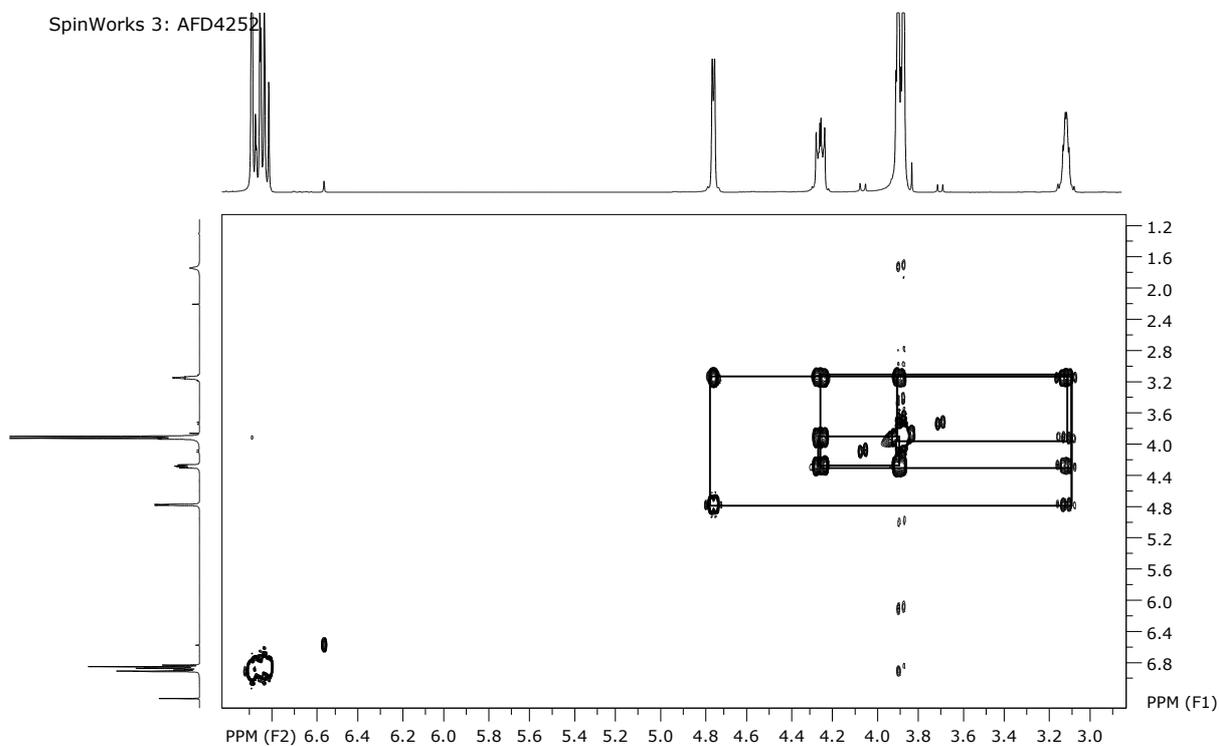


FIGURA 4.16- Espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

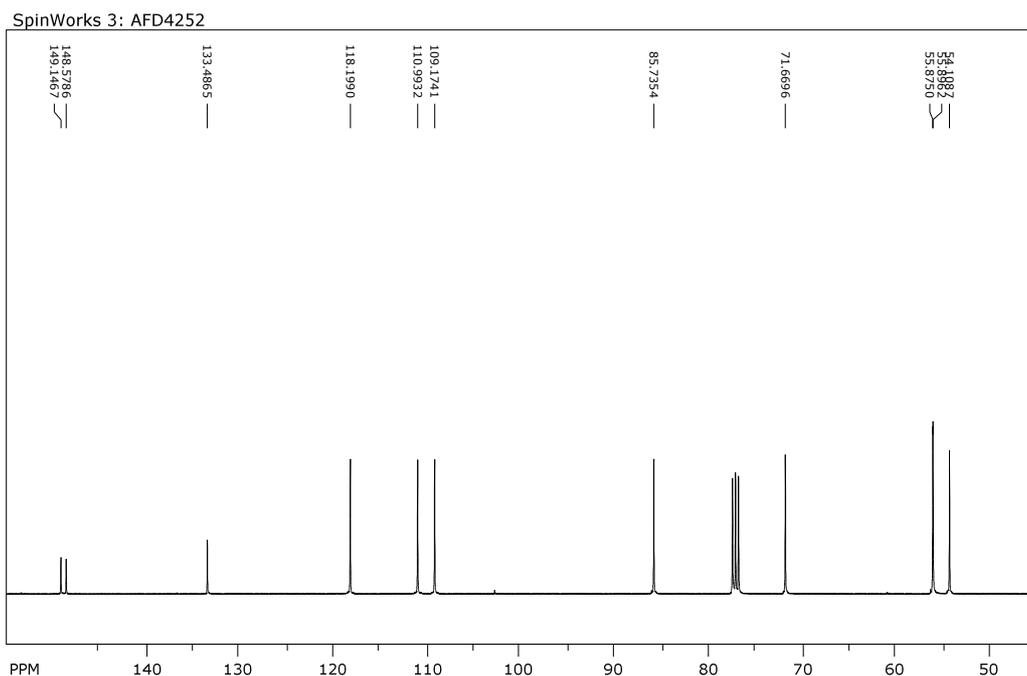


FIGURA 4.17- Espectro de RMN ^{13}C referente à substância **02** (100 MHz, CDCl_3).

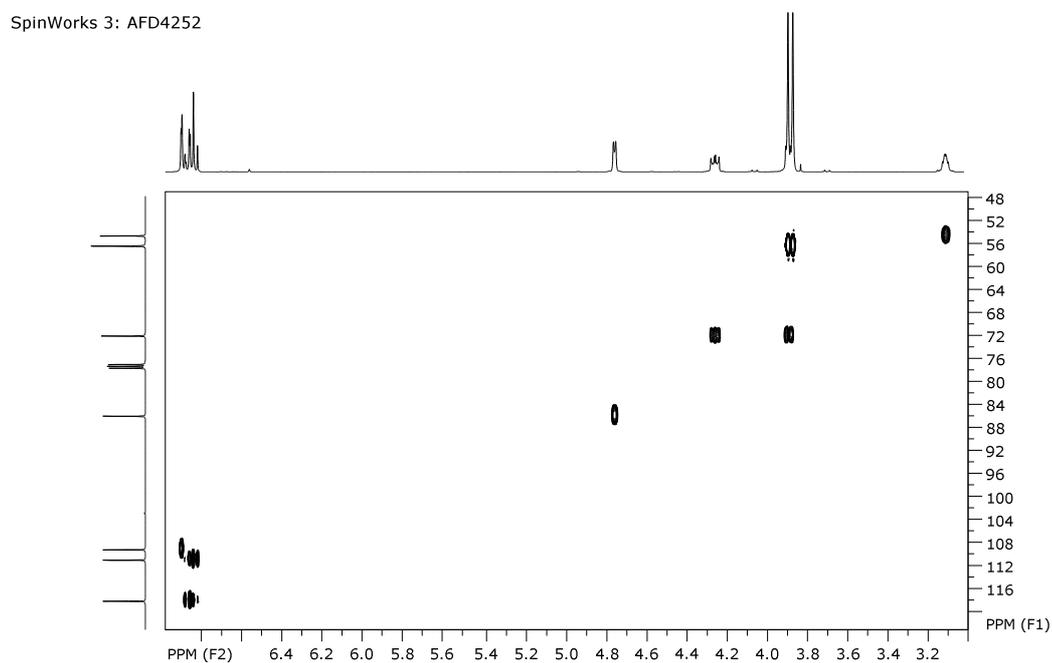


FIGURA 4.18- Mapa de contorno HSQC referente à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

SpinWorks 3: AFD4252

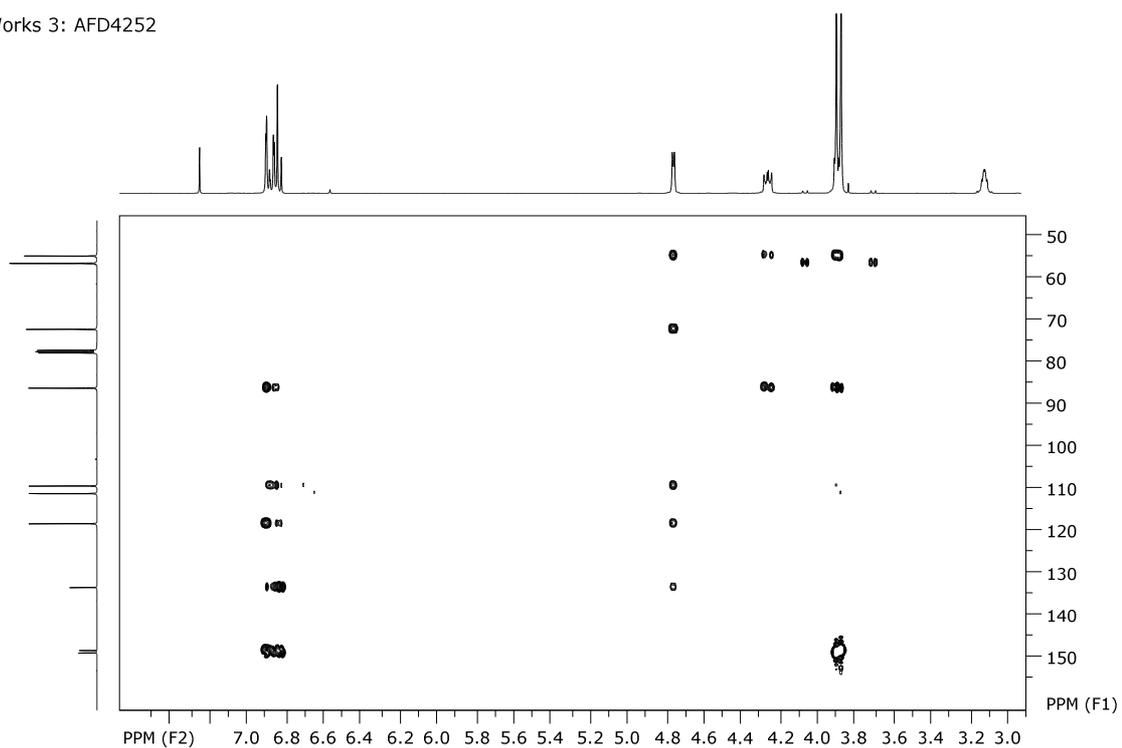


FIGURA 4.19- Mapa de contorno HMBC referente à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

SpinWorks 3: AFD4252

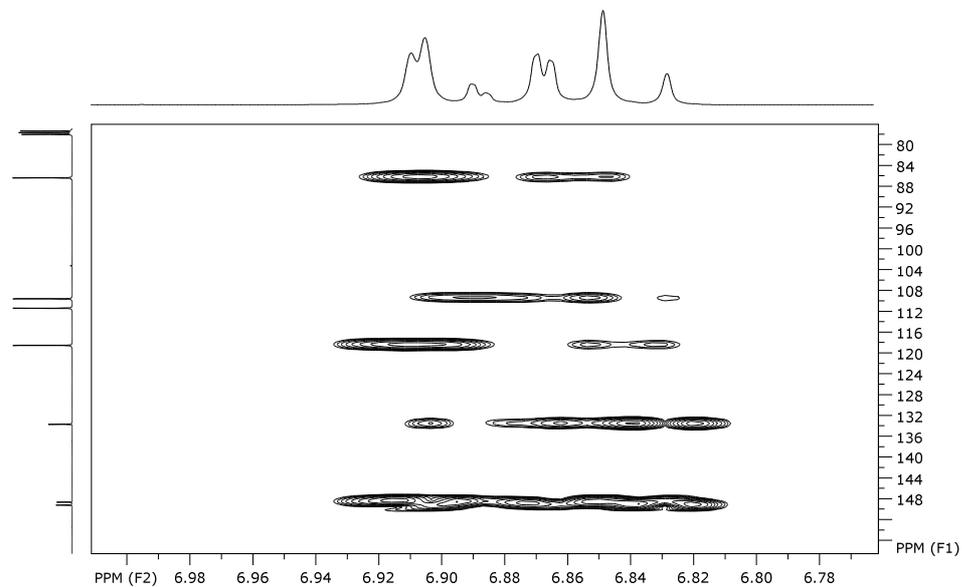


FIGURA 4.20- Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

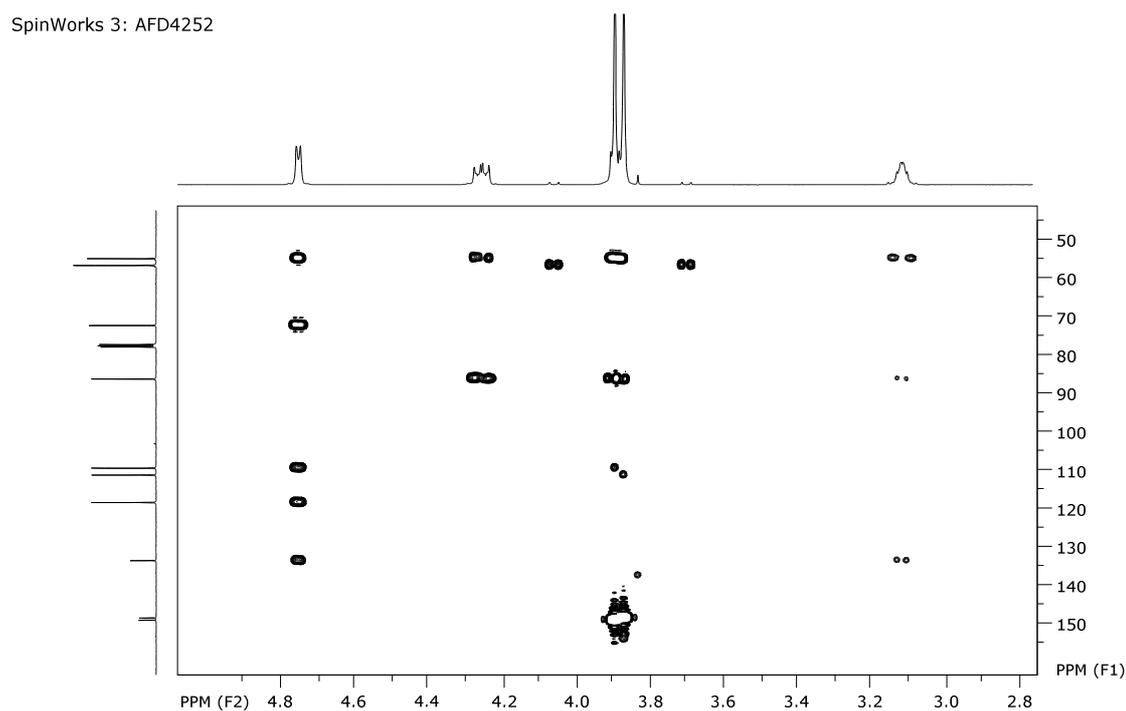


FIGURA 4.21- Expansão do mapa de contorno de HMBC referente à substância **02** (400 MHz, CDCl_3).

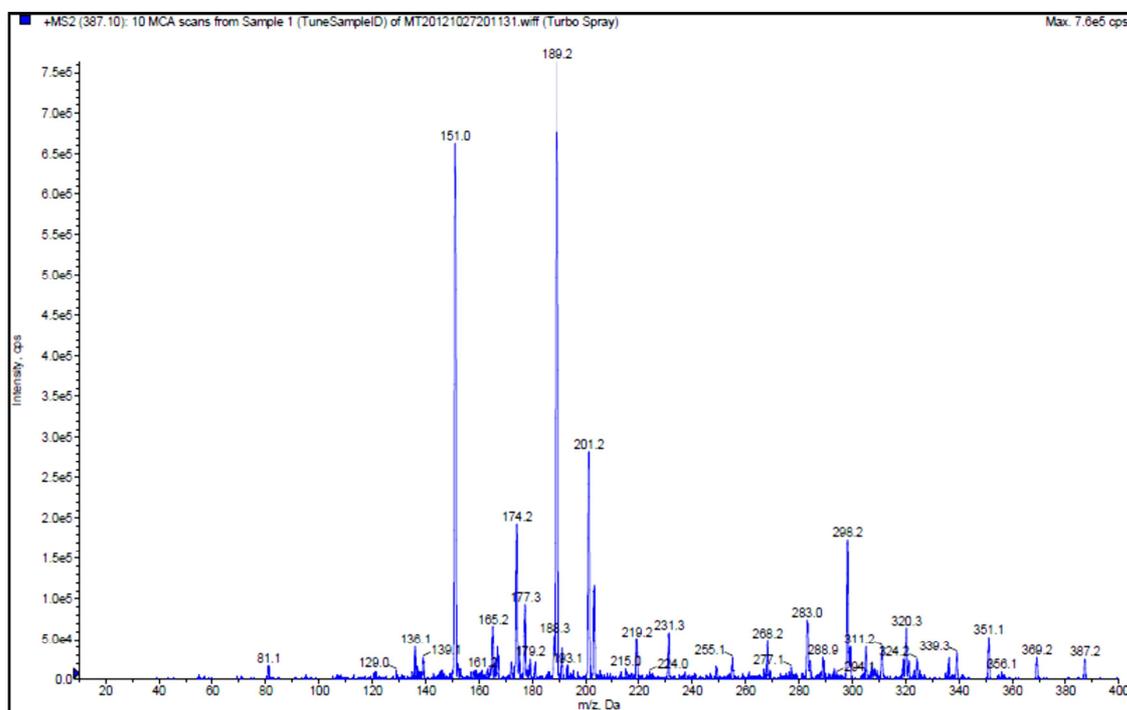
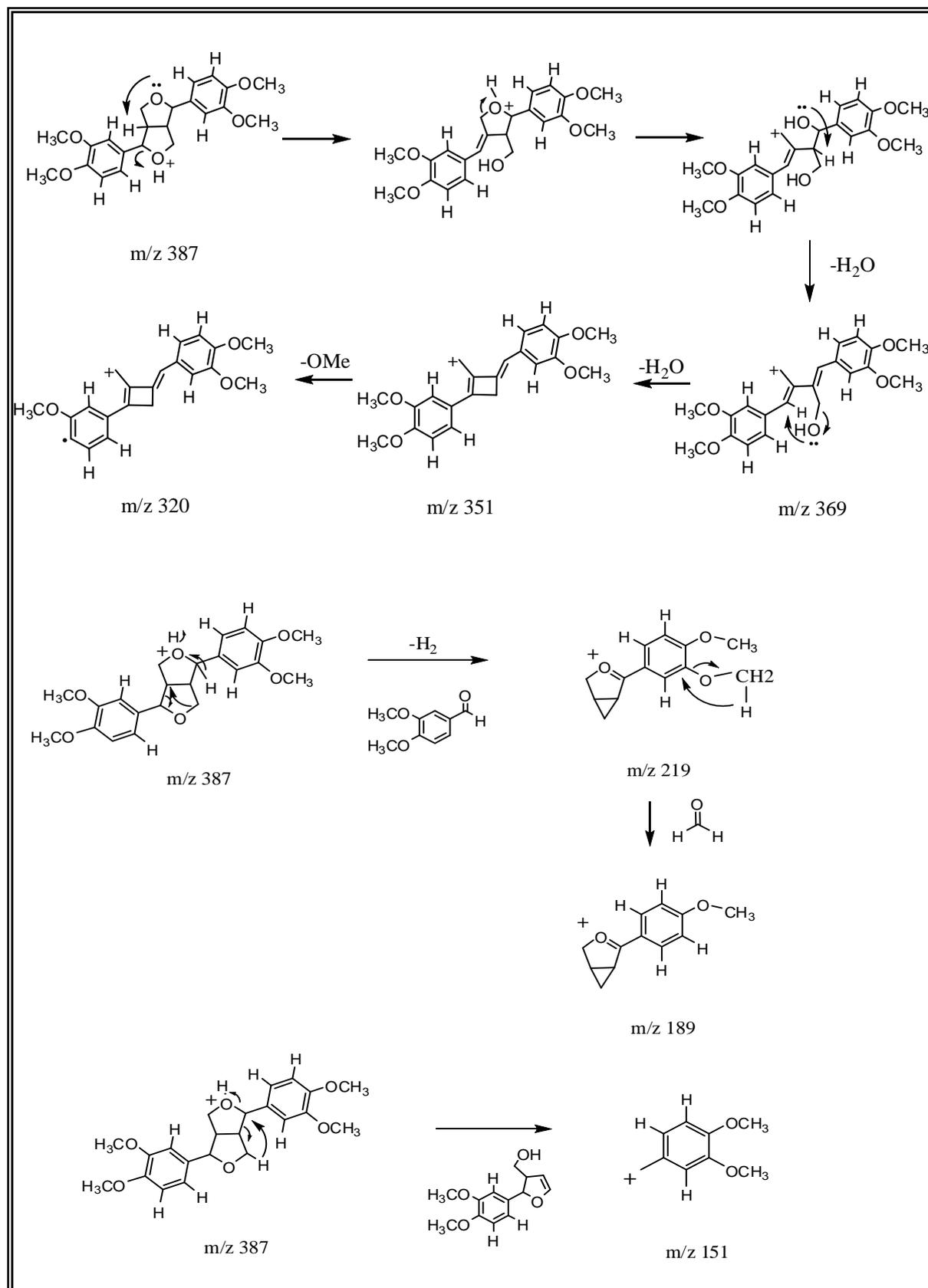


FIGURA 4.22– Espectro de massas por ESI^+ no modo *product ion* para a substância **02**.

A FIGURA 4.23 apresenta propostas de fragmentação para o íon $[M+H]^+$ 387 referente à substância **02**.



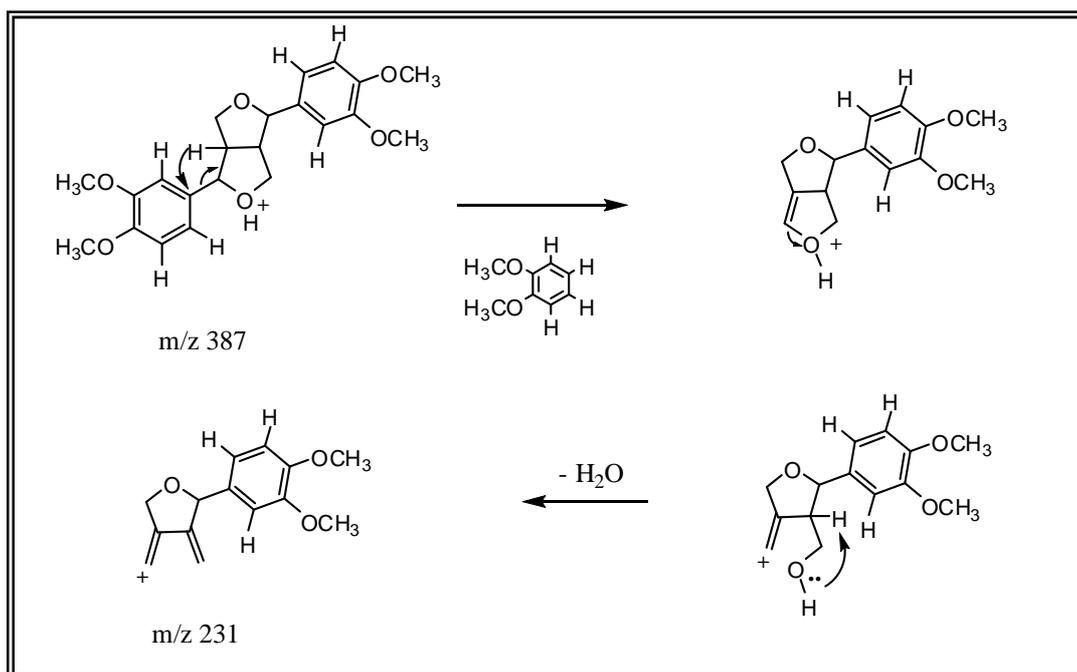


FIGURA 4.23– Propostas de fragmentação para o íon $[M+H]^+$ 387 referente à substância **02**.

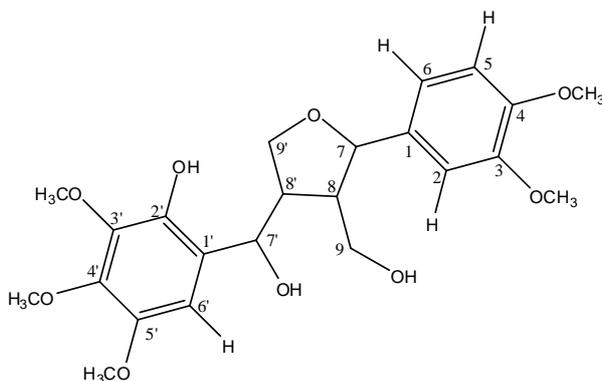
4.1.1.3 – Determinação estrutural da Substância 03

A determinação estrutural da substância **03** foi realizada através de experimentos de RMN 1H e ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC e por g-NOESY. A análise por EM através de inserção direta na fonte de ionização ESI e principalmente por CG-EM através da fonte de ionização por impacto eletrônico (EI) foram fundamentais para a elucidação estrutural da substância.

A análise do espectro de RMN 1H (FIGURA 4.24 e 4.25) apresentou os seguintes sinais: a) referentes a hidrogênios aromáticos (mostrando um padrão de substituição semelhante à substância **01**): δ_H 6,91 (*d*, $J = 1,8$ Hz, 1H; H-2); δ_H 6,88 (*dd*, $J = 1,8$ e 8,1 Hz, 1H; H-6); δ_H 6,84 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H; H-5) indicando a presença de um anel 1,3,4 trissubstituído, e δ_H 6,83 (*s*, 1H; H-6') indicando a presença de um anel pentassubstituído; b) sinais referentes a oito prótons alifáticos (dois oxibenzílicos, dois metínicos e quatro carbinólicos): δ_H 5,15 (*d*, $J = 4,0$ Hz, 1H; H-7'); δ_H 4,68 (*d*, $J = 6,2$ Hz, 1H; H-7); δ_H 4,48 (*dd*, $J = 7,8$ e 9,1 Hz, 1H; H-9'); δ_H 4,27 (*dd*, $J =$

6,5 e 9,1 Hz, 1H; H-9); δ_H 4,10 (*dd*, $J = 5,5$ e 9,1 Hz, 1H; H-9'); δ_H 4,03 (*dd*, $J = 3,8$ e 9,1 Hz, 1H; H-9) δ_H 3,08 (*m*, 1H; H-8'); δ_H 2,97 (*m*, 1H; H-8), e cinco sinais referentes aos grupos metoxilas, que integram para 15: δ_H 3,91; δ_H 3,89; δ_H 3,88; δ_H 3,87 e δ_H 3,86.

Estes sinais mostraram-se característicos de lignanas furofurânicas. No entanto, para sua confirmação estrutural, esta substância foi analisada por CG-EM e por inserção direta pela fonte de ionização ESI. A análise obtida pelo CG-EM apresentou m/z 450, indicando a fórmula molecular $C_{23}H_{30}O_9$ e um IDH = 9. Esses dados sugerem a abertura de um dos anéis furânicos presentes na lignana, concluindo se tratar de um esqueleto de uma lignana tetrahydrofuranóide, como mostrado abaixo:



O espectro de RMN ^{13}C apresentou oito carbonos quaternários, oito carbonos metínicos, sendo quatro aromáticos, dois carbonos metilênicos e cinco metoxílicos (FIGURA 4.26). O mapa de contorno HSQC apresentou as seguintes correlações: δ_H 6,91 (H-2) com δ_C 109,20; δ_H 6,88 (H-6) com δ_C 118,37; δ_H 6,84 (H-5) com δ_C 111,01; δ_H 6,83 (H-6') com δ_C 104,45; δ_H 5,15 (H-7') com δ_C 84,00; δ_H 4,68 (H-7) com δ_C 85,34; δ_H 4,48 e δ_H 4,10 (H-9') com δ_C 73,89; δ_H 4,27 e δ_H 4,03 (H-9) com δ_C 71,73; δ_H 3,91 com δ_C 61,14; δ_H 3,89 com δ_C 55,92; δ_H 3,88 com δ_C 61,12; δ_H 3,87 com δ_C 55,93.; δ_H 3,86 com δ_C 56,20; δ_H 3,08 (H-8') com δ_C 54,36; e δ_H 2,97 (H-8) com δ_C 54,41 (FIGURA 4.27).

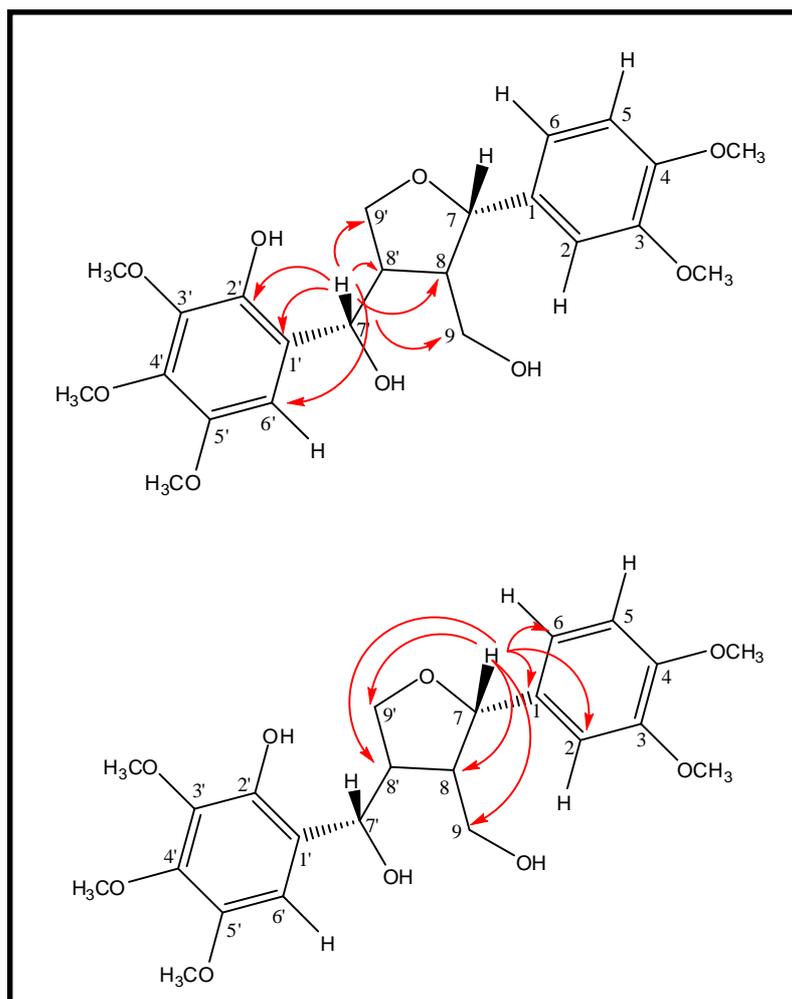
A TABELA 4.5 e o esquema seguinte à tabela apresentam as correlações observadas através do mapa de contornos HMBC (FIGURAS 4.28, 4.29 e 4.30). Essas correlações confirmam se tratar da estrutura pré-estabelecida

indicando o posicionamento dos anéis aromáticos em relação à distribuição dos hidrogênios alifáticos (carbinólicos, metínicos e oxi-benzílicos).

Tabela 4.5– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **03** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
6,91 (H-2)	85,34 (C-7); 118,37 (C-6); 133,29 (C-1); 148,73 (C-3)
6,88 (H-6)	109,20 (C-2); 149,23 (C-4)
6,84 (H-5)	133,29 (C-1); 149,23 (C-4)
6,83 (H-6')	84,00 (C-7'); 117,31 (C-2'); 135,71 (C-1'); 142,22 (C-4'); 152,29 (C-3')
5,15 (H-7')	54,36 (C-8'); 54,41 (C-8); 71,73 (C-9); 73,89 (C-9'); 104,45 (C-6'); 117,31 (C-2'); 135,71 (C-1')
4,68 (H-7)	54,36 (C-8'); 54,41 (C-8); 71,73 (C-9); 73,89 (C-9'); 109,20 (C-2); 118,37 (C-6); 133,29 (C-1)
4,48 (H-9')	54,36 (C-8'); 54,41 (C-8); 84,00 (C-7'); 85,3 (C-7)
4,27 (H-9)	84,0 (C-7'); 85,34 (C-7)
4,10 (H-9')	54,36 (C-8'); 84,00 (C-7'); 85,34 (C-7)
4,03 (H-9)	54,41 (C-8), 84,00 (C-7'); 85,34 (C-7)
3,91 (OMe)	150,19 (C-3')
3,89 (OMe)	149,23 (C4)
3,88 (OMe)	142,23 (C-4')
3,87 (OMe)	148,73 (C-3)
3,86 (OMe)	152,29 (C-5')
3,08 (H-8')	*
2,97 (H-8)	*

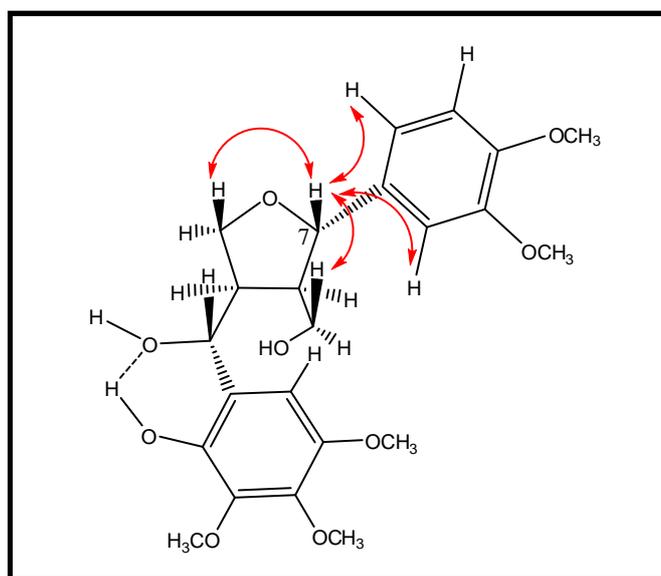
*Correlações não observadas.

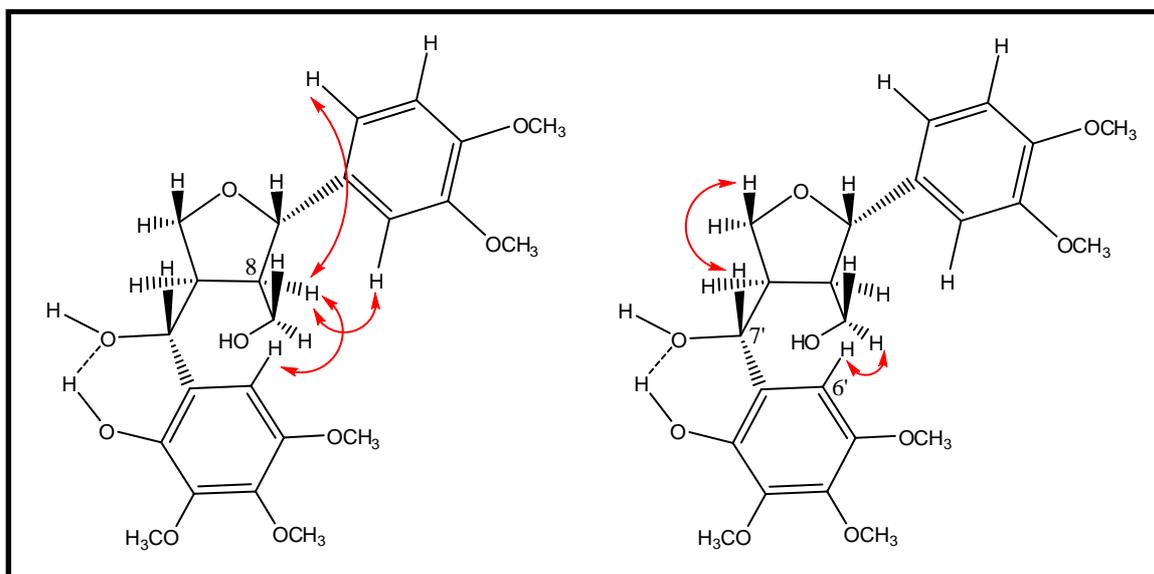


Através do espectro de COSY foi possível observar as correlações dos hidrogênios em δ_H 4,03 (H-9_{ax}) e em δ_H 4,27 (H-9_{eq}) acoplando entre si e com o hidrogênio em δ_H 2,97 (H-8). O mesmo é observado para o outro lado da substância, os hidrogênios em δ_H 4,10 (H-9'_{ax}) e em δ_H 4,48 (H-9'_{eq}) acoplam entre si e com o hidrogênio em δ_H 3,08 (H-8'). Os hidrogênios H-8 (δ_H 2,97) e H-8' (δ_H 3,08) acoplam entre si e com os hidrogênios H-7 (δ_H 4,68) e H-7' (δ_H 5,15) respectivamente (FIGURA 4.31).

A estereoquímica da estrutura, assim como a abertura do anel furofurânico pode ser justificada analisando o experimento de g-NOESY (FIGURA 4.32) juntamente com um modelo molecular, conforme apresentado nos esquemas a seguir. Ao ser irradiado o hidrogênio em δ_H 5,15 (H-7'), observou-se um incremento relativo ao efeito NOE em δ_H 4,10 (H-9'_{ax}). Da mesma forma, a irradiação do

hidrogênio em δ_H 4,68 (H-7) mostra um incremento relativo ao efeito NOE com os hidrogênios em δ_H 4,03 (H-9_{ax}); δ_H 4,10 (H-9'_{ax}) e com os hidrogênios aromáticos em δ_H 6,91 (H-2) e δ_H 6,88 (H-6). Esses valores indicam os hidrogênios em δ_H 5,15; δ_H 4,68; δ_H 4,10 e δ_H 4,03 estão presentes do mesmo lado na substância (pseudo-axial). Para a confirmação da abertura do anel, esta pode ser justificada analisando o efeito NOE para o hidrogênio em δ_H 6,83 (H-6'). Uma vez que este anel apresenta giro livre, a irradiação do hidrogênio em δ_H 6,83 (H-6') mostrou um pequeno incremento relativo ao efeito NOE para o hidrogênio em δ_H 4,27 (H-9), indicando a posição do anel aromático e deste hidrogênio estar na posição pseudo-equatorial, em concordância com o já observado para hidrogênio em δ_H 4,03 (em pseudo-axial). Além disso, a irradiação do hidrogênio em δ_H 2,97 (H-8) mostrou um incremento para os hidrogênios em δ_H 6,83 (H-6'); δ_H 6,88 (H-6) e δ_H 6,91 (H-2). Os efeitos observados entre os hidrogênios em δ_H 6,83 (H-6'); δ_H 4,27 (H-9) e δ_H 2,97 (H-8) somente são possíveis, uma vez que o anel apresenta giro livre em consequência da abertura do anel furofurânico como representado, confirmando a proposta pré-estabelecida. A desblindagem observada para o carbono C-7', portanto, pode ser justificada através da ligação de hidrogênio entre as hidroxilas do anel aromático e a do carbono C-7'. Para o carbono C-9, no entanto, é consequência da estereoquímica assumida pela substância através de suas interações espaciais observadas pelo experimento de g-NOESY, permitindo que o carbono C-9 caia fora do cone de blindagem do anel aromático.





Esta substância é, portanto, inédita na literatura, sendo denominada por annonaticina. As fragmentações propostas por CG-EM (FIGURAS 4.33 e 4.34) e ESI⁺ no modo *product ion* (FIGURA 4.35 e 4.36) confirmam a estrutura. A TABELA 4.6 apresenta a atribuição dos valores de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios de acordo com a numeração estabelecida para a substância isolada como apresentado abaixo.

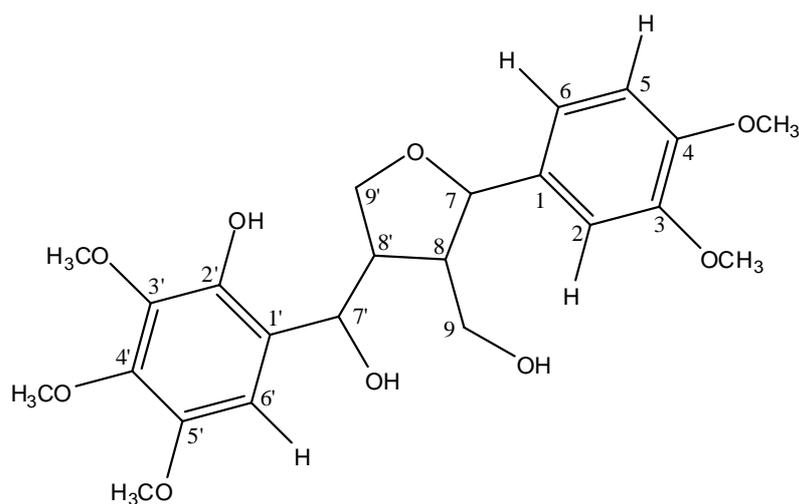


TABELA 4.6– Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) para a substância **03**

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	--	133,29
2	6,91 (<i>d</i> , 1,8)	109,20
3	--	148,73
4	--	149,23
5	6,84 (<i>d</i> , 8,1)	111,01
6	6,88 (<i>dd</i> , 1,8 e 8,1)	118,37
1'	--	135,71
2'	--	117,31
3'	--	150,19
4'	--	142,23
5'	--	152,29
6'	6,83 (<i>s</i>)	104,45
7	4,68 (<i>d</i> , 6,2)	85,35
8	2,97 (<i>m</i>)	54,41
9 _{ax}	4,03 (<i>dd</i> , 3,8 e 9,1)	71,73
9 _{eq}	4,27 (<i>dd</i> , 6,5 e 9,1)	"
7'	5,15 (<i>d</i> , 4,0Hz)	84,00
8'	3,08 (<i>m</i>)	54,36
9' _{ax}	4,10 (<i>dd</i> , 5,5 e 9,1)	73,89
9' _{eq}	4,48 (<i>dd</i> , 7,8 e 9,1)	"
OMe	3,91	61,14
OMe	3,89	55,92
OMe	3,88	61,12
OMe	3,87	55,93
OMe	3,86	56,20

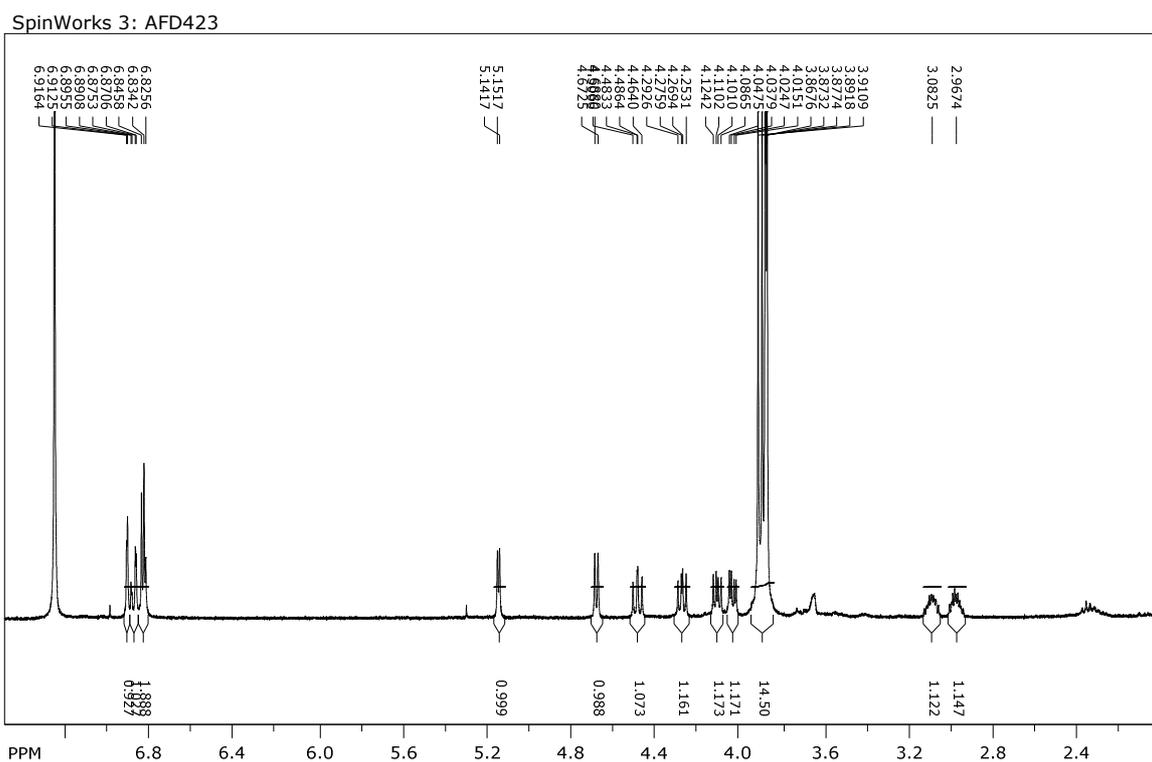


FIGURA 4.24 Espectro de RMN ^1H referente à substância **03** (400MHz, CDCl_3).

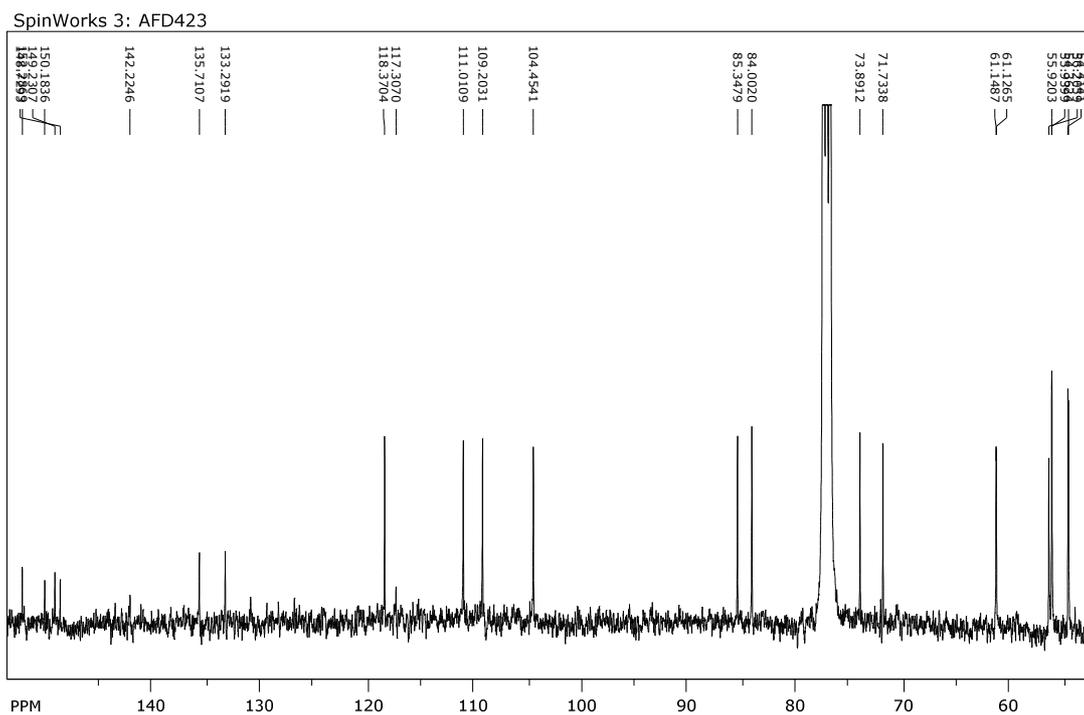


FIGURA 4.26– Espectro de RMN ^{13}C referente à substância **03** (100MHz, CDCl_3).

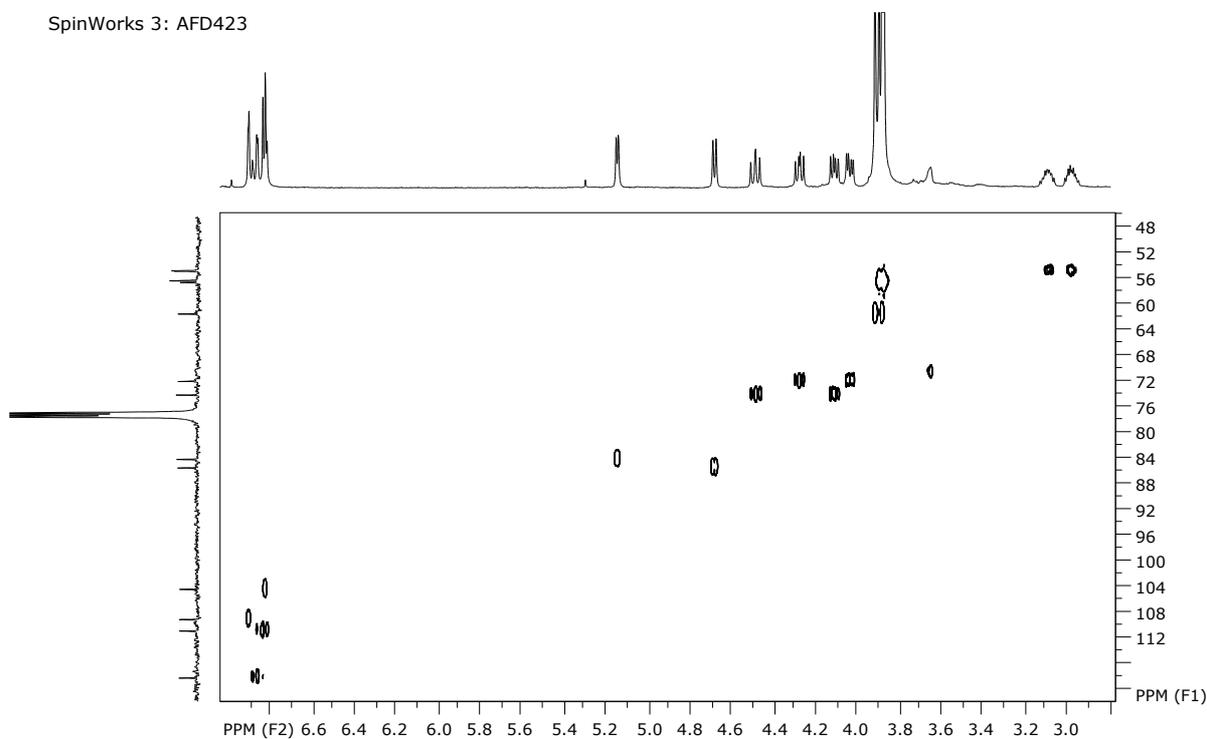


FIGURA 4.27– Mapa de contorno HSQC referente à substância **03** (400MHz, CDCl_3).

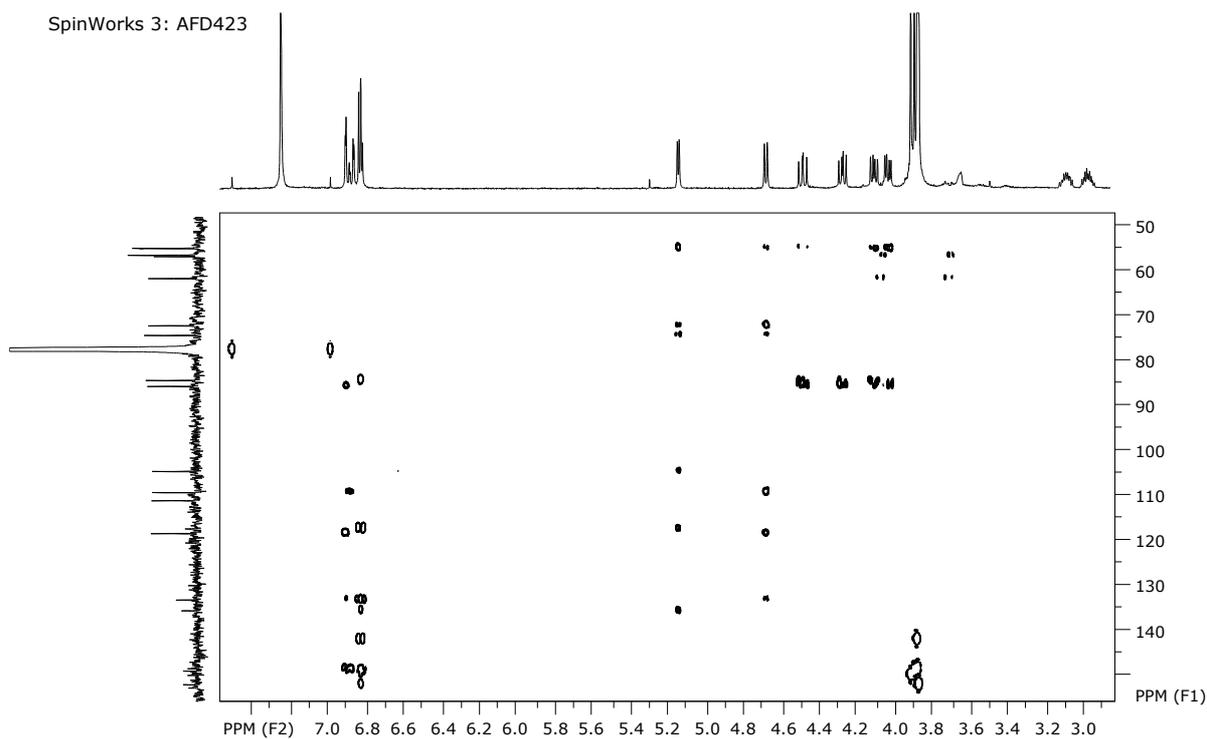


FIGURA 4.28– Mapa de contorno HMBC referente à substância **03** (400MHz, CDCl₃).

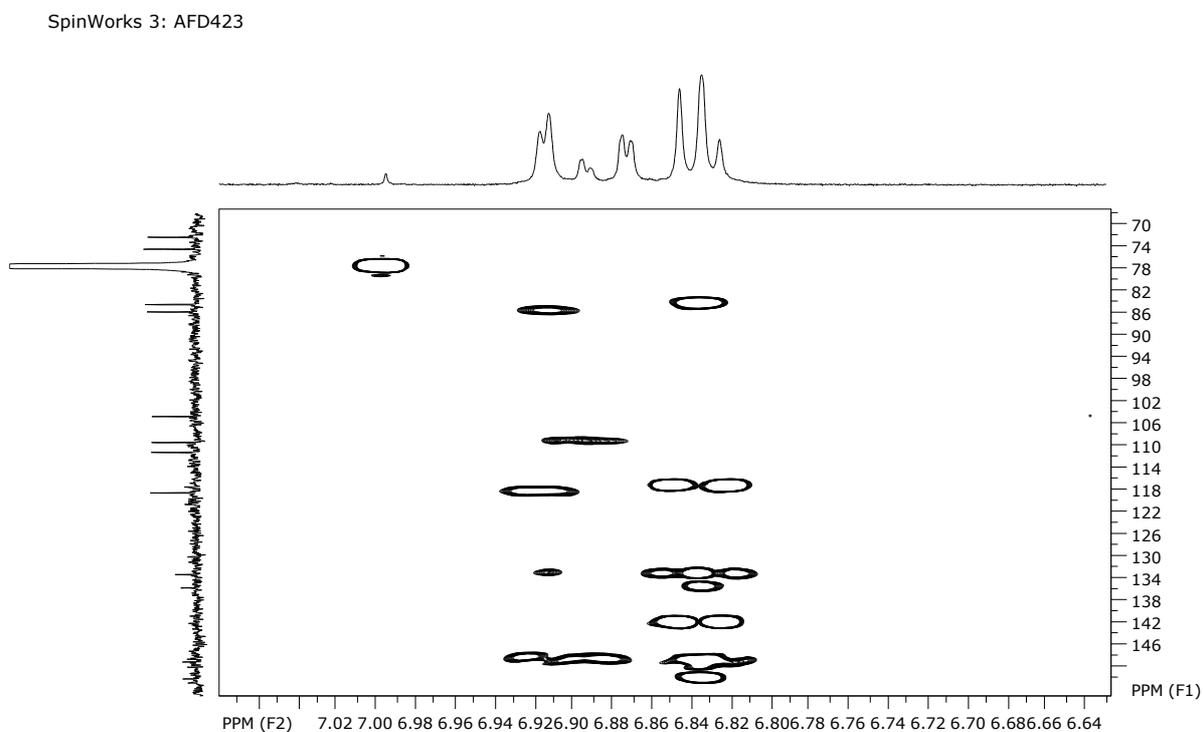


FIGURA 4.29– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **03** (400MHz, CDCl₃).

SpinWorks 3: AFD423

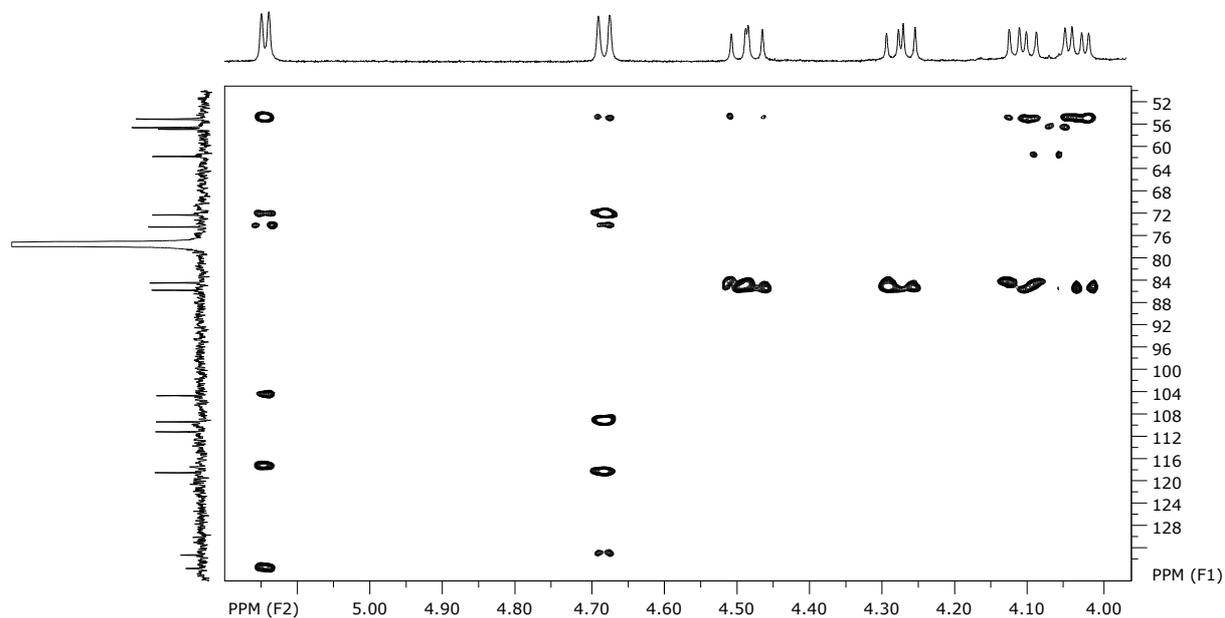


FIGURA 4.30– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **03** (400MHz, CDCl₃).

SpinWorks 3: AFD423

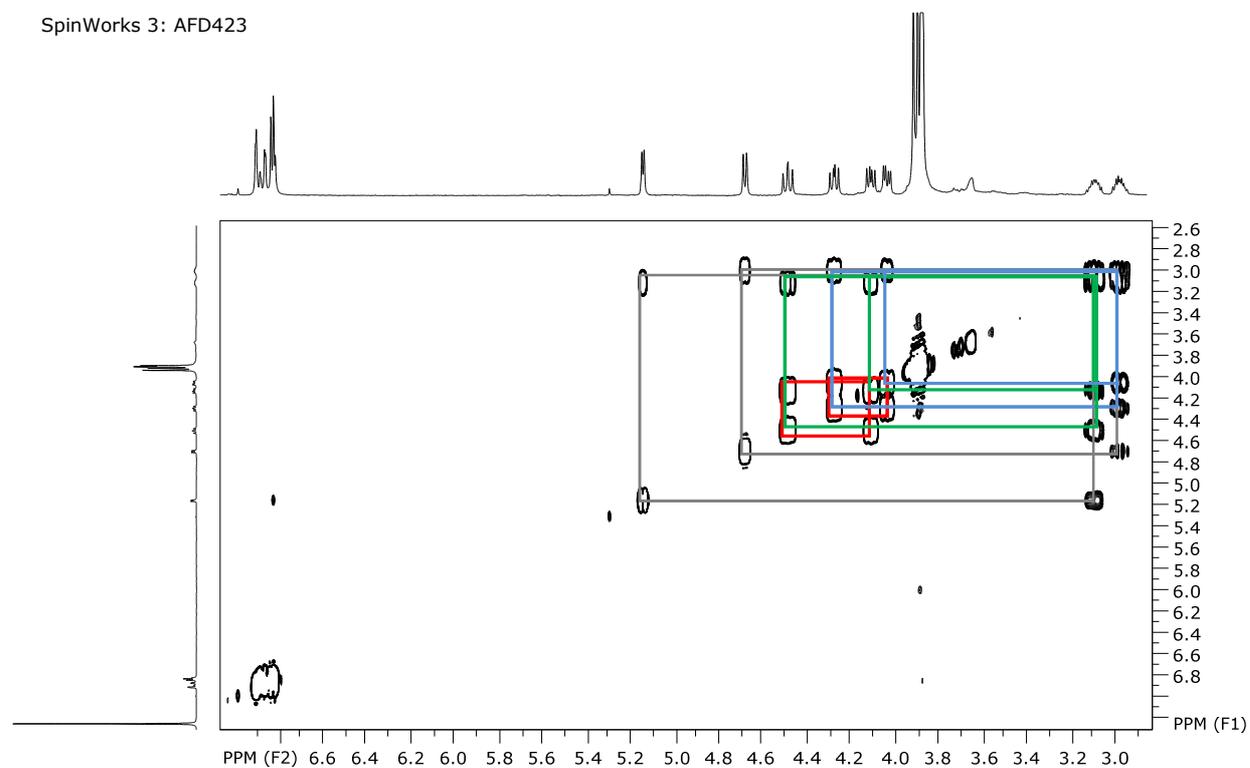


FIGURA 4.31– Espectro de COSY ¹H-¹H referente à substância **03** (400MHz, CDCl₃).

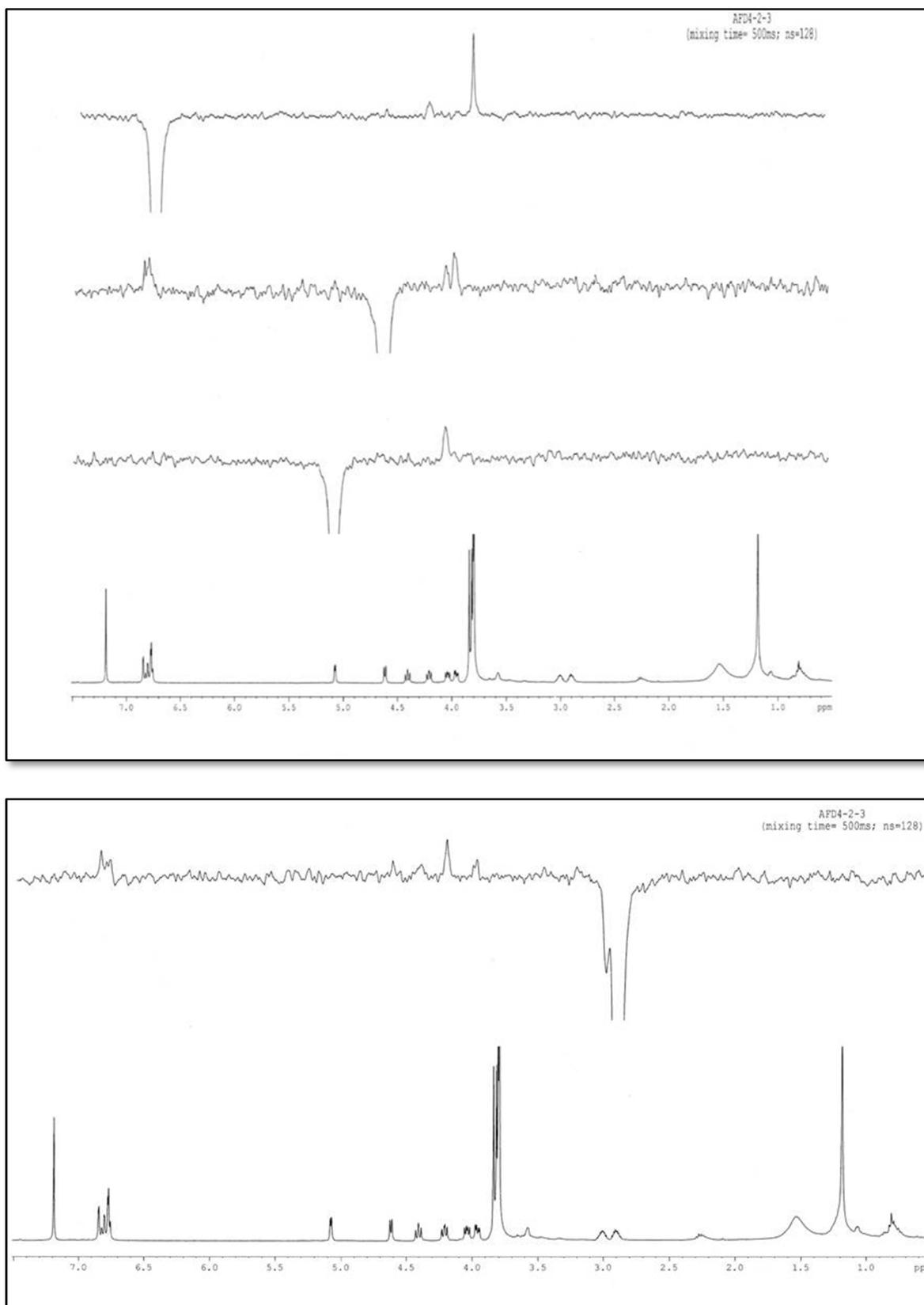


FIGURA 4.32– Experimento de g-NOESY referente à substância **03** (400MHz, CDCl₃).

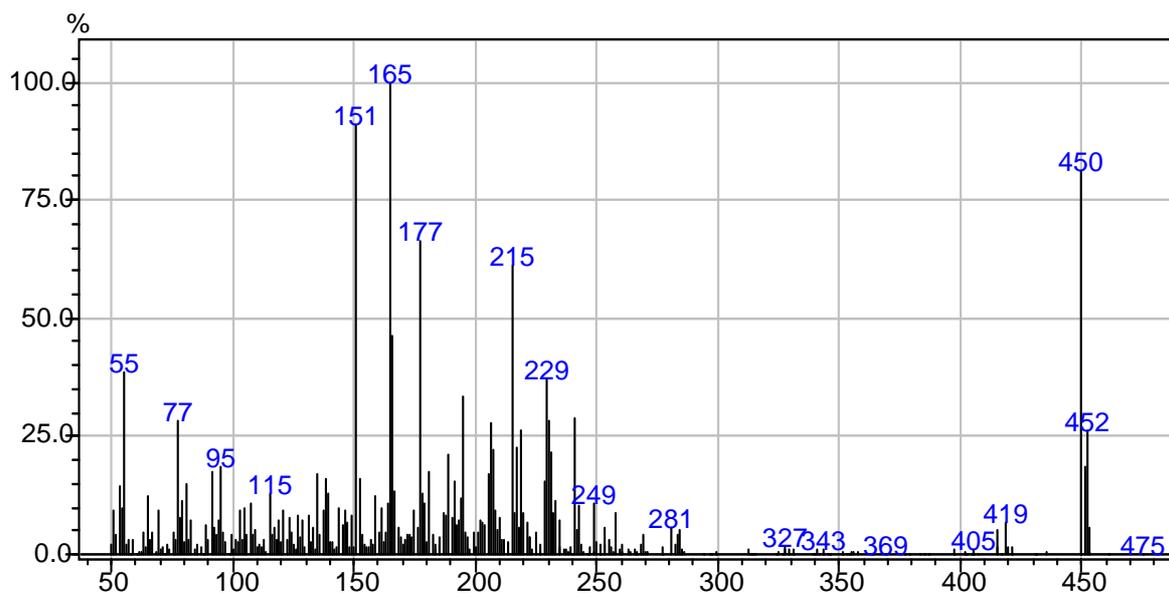
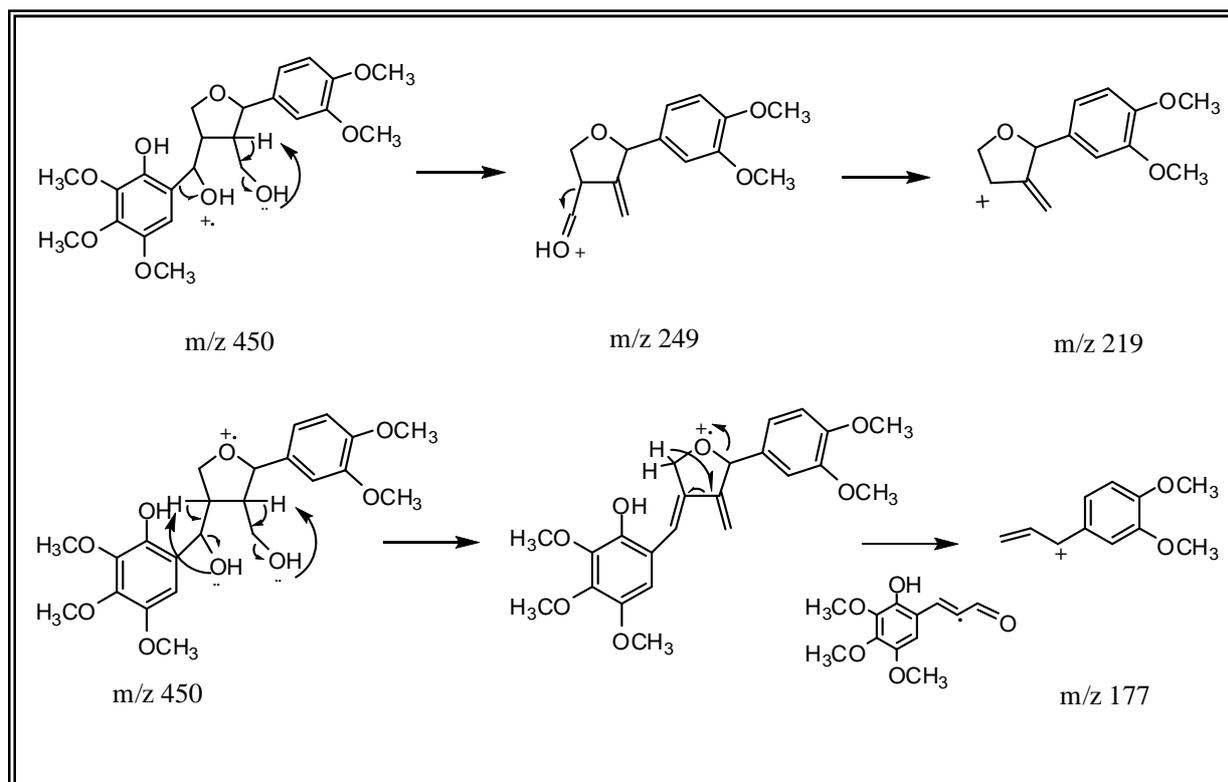


FIGURA 4.33– Espectro de massas por EI para o íon m/z 450 referente à substância **03**.



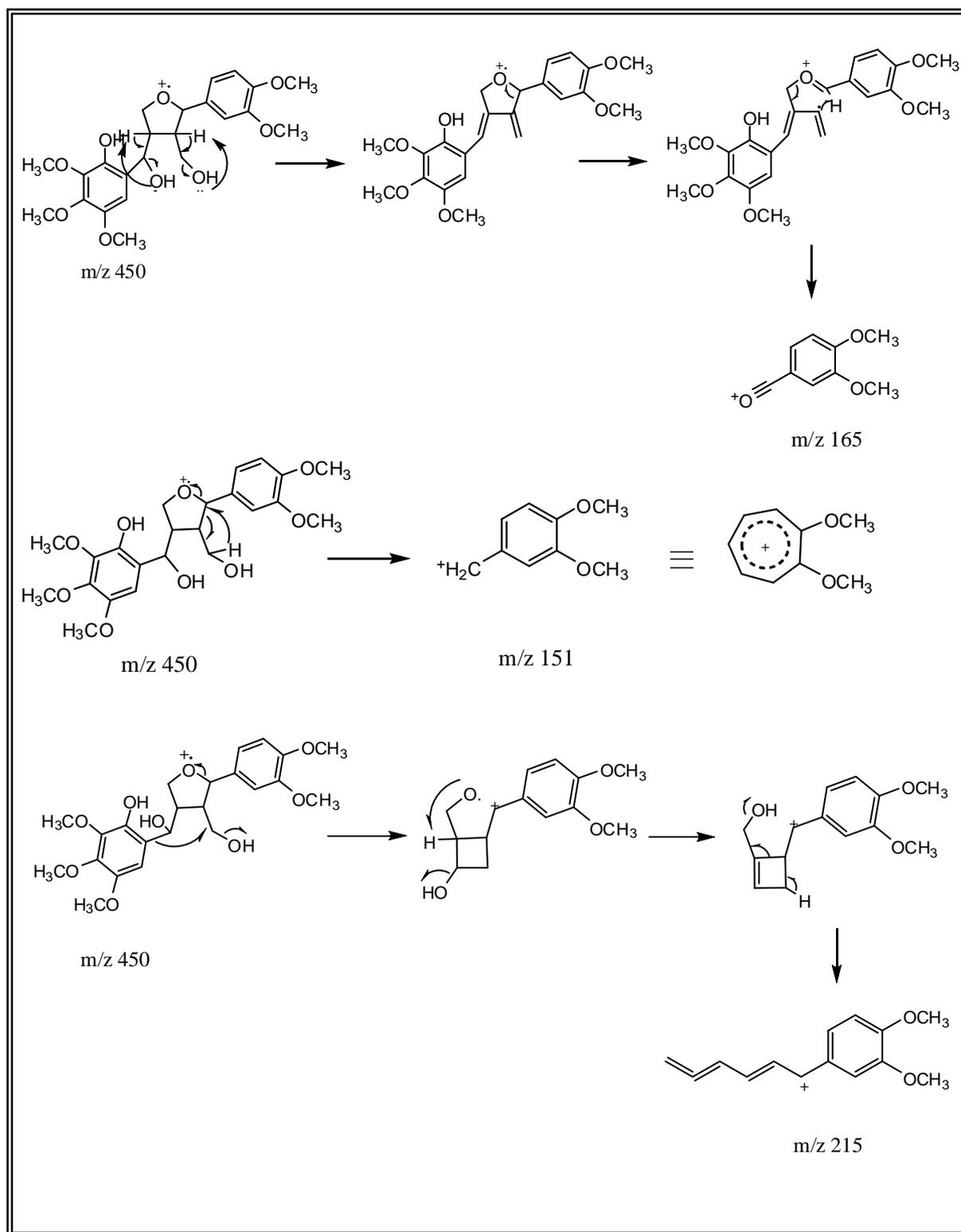


FIGURA 4.34– Propostas de fragmentação para o íon m/z 450 referente à substância **03**.

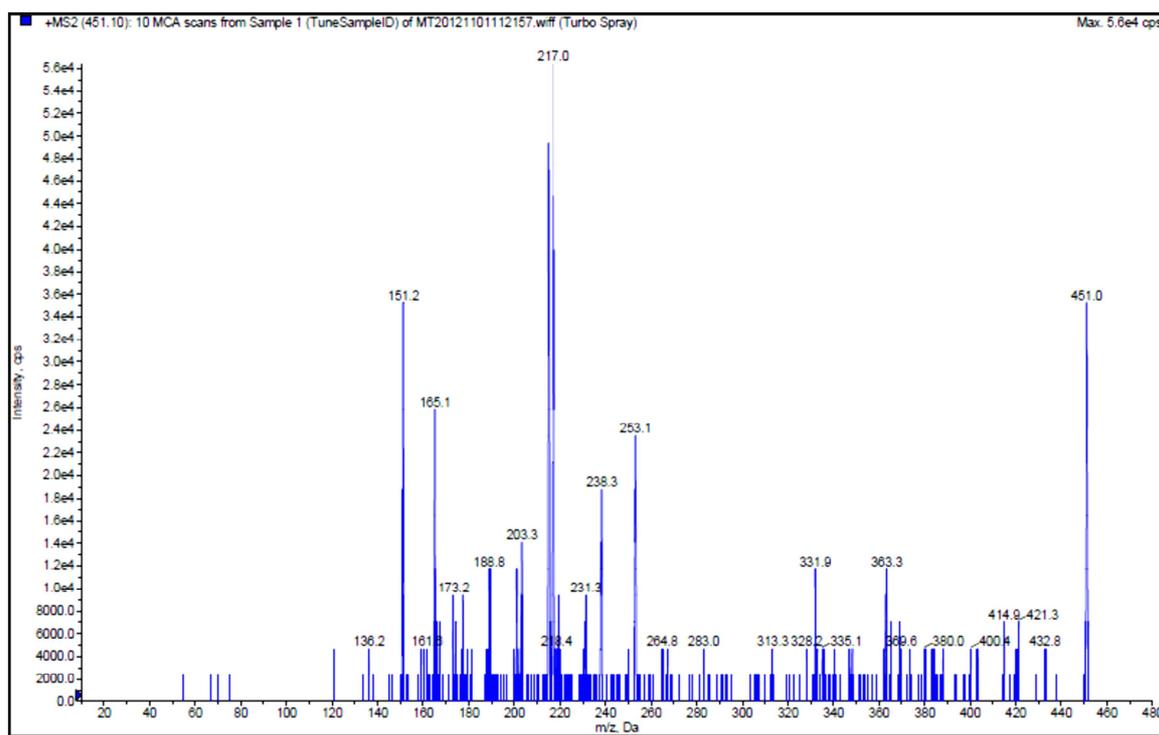
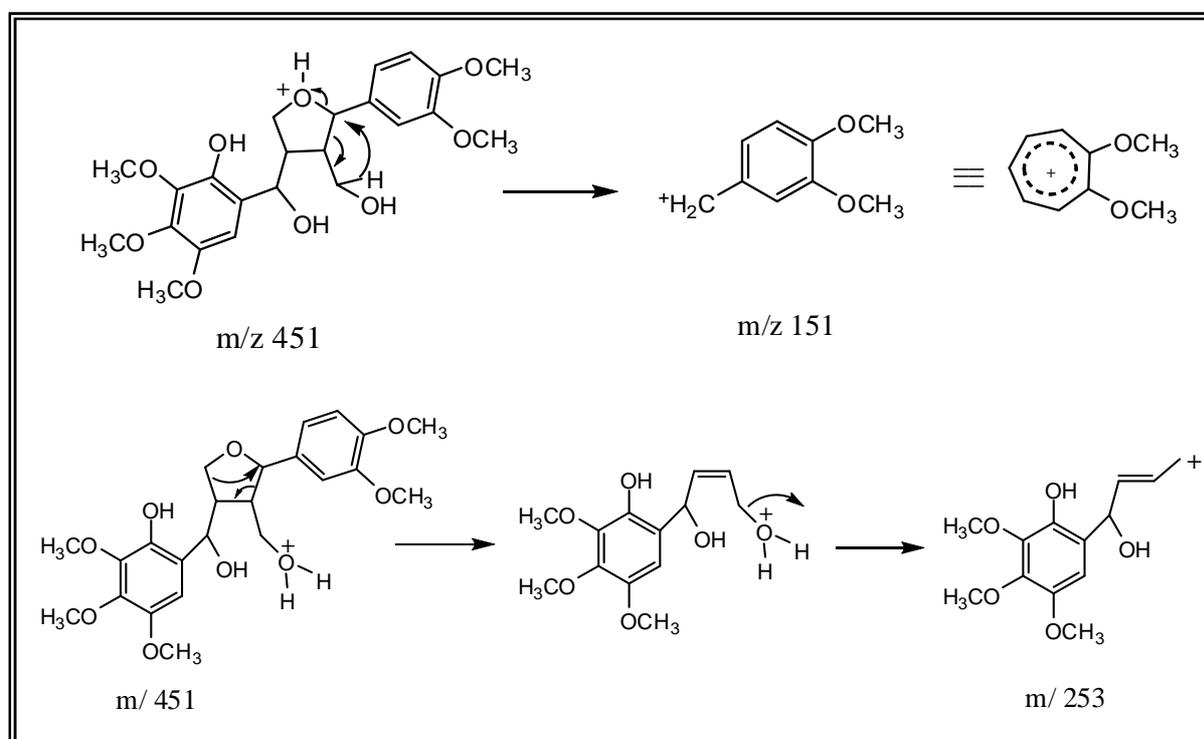


FIGURA 4.35– Espectro de massas por ESI⁺ no modo *product ion* referente à substância **03**.



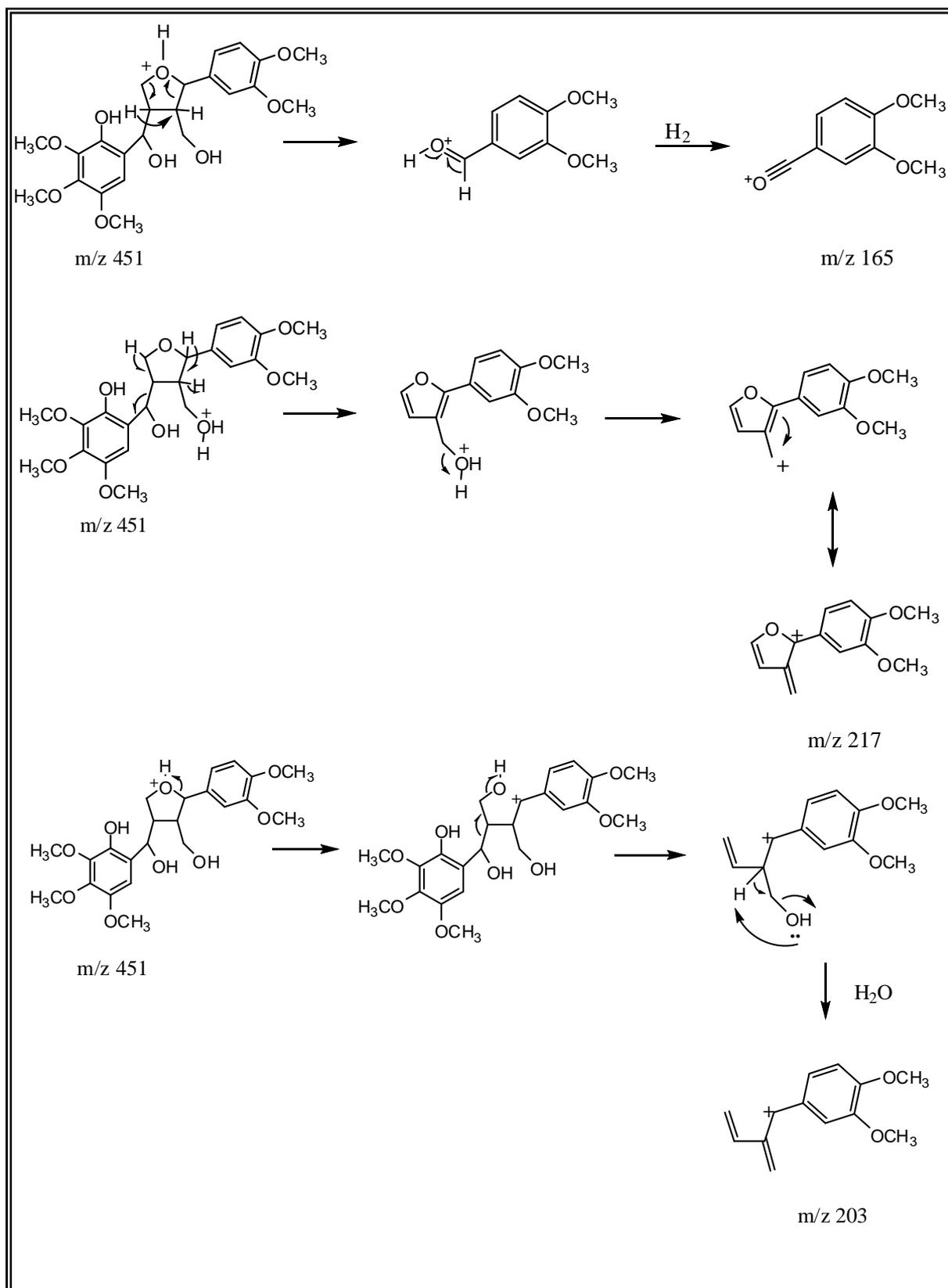


FIGURA 4.36– Proposta de fragmentação para o íon $[M+H]^+$ 451 referente à substância **03**.

4.1.1.4 – Identificação estrutural da Substância 04

A substância **04** foi identificada através de experimentos de RMN ^1H , COSY, HMBC e HSQC e por CG-EM. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (TULAKE et al., 2012).

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.37) apresentou os seguintes sinais, com seus respectivos valores de integração e constantes de acoplamentos, que indicaram se tratar, assim como para substância **02**, de uma lignana simétrica: δ_{H} 6,58 (s, 4H) caracterizam os hidrogênios equivalentes quimicamente pertencentes aos dois anéis aromáticos, δ_{H} 5,49 (sl, 2H) referentes às duas hidroxilas presentes na substância, δ_{H} 4,73 (d, $J = 4,4$ Hz, 2H); δ_{H} 4,28 (dd, $J = 6,8$ e $9,1$ Hz, 2H); δ_{H} 3,92 - 3,97 (m, 2H) ; δ_{H} 3,09 (m, 2H), caracterizam o anel tetrahydrofurânico. Sua estereoquímica, devido às características apresentadas no item 4.1.1.1 indica ser pseudo-equatorial ou pseudo-axial.

Da mesma forma descrita para a substância **02**, os hidrogênios H-7/7' (δ_{H} 4,73; 2H) acoplam com o H-8/8' (δ_{H} 3,09; 2H), resultando em um dubleto, com constante de acoplamento $J = 4,4$ Hz. Os hidrogênios H-9 e H-9' (diasterotópicos) em δ_{H} 4,28 acoplam entre si com a constante de acoplamento mais alta ($J = 9,1$ Hz). A constante em $J = 6,8$ Hz se deve aos acoplamentos de um dos hidrogênios H9/9' com os hidrogênios H-8/8' presentes no mesmo lado da substância. A constante que resulta do acoplamento do outro hidrogênio em H9 e H9' (em δ_{H} 3,92 - 3,97) com H8/8' em lados opostos da substância (constante de menor valor) não pôde ser calculada uma vez que seus sinais estão coalescidos com os sinais das metoxilas presentes na molécula. Os valores de integração para H-7/7', H-8/8' e H-9/9' mostram-se equivalentes quimicamente e por isso a consideração de que a substância é simétrica, descrita acima.

As correlações hidrogênio-hidrogênio, COSY, confirmam os acoplamentos entre os hidrogênios do anel furofurânico citados (FIGURA 4.38). Observa-se que os hidrogênios H-9/H-9' acoplam entre si e com os hidrogênios H8/H8', sendo estes, por sua vez, acoplando com os hidrogênios H7/H7'.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou quatro sinais aromáticos, três sinais referentes ao anel furofurânico e um sinal referente à metoxila (FIGURA 4.39). Para as correlações carbono-hidrogênio diretamente ligados (HSQC) (FIGURA 4.40), as seguintes correlações foram observadas: δ_{H} 6,58 com δ_{C} 102,68; δ_{H} 4,73 e δ_{C} 86,08; δ_{H} 4,28 e δ_{H} 3,92-3,97 com δ_{C} 71,81 e δ_{H} 3,09 com δ_{C} 54,35.

Através do experimento HMBC (FIGURA 4.41), as correlações verificadas são apresentadas na TABELA 4.7.

TABELA 4.7– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **04** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
6,58	86,08; 102,68; 132,09; 134,29; 147,16
4,73	54,35; 71,28; 102,68
4,28/3,92-3,97	86,08
3,09	*

*Não foram observadas correlações para esta região.

A TABELA 4.8 mostra a atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C comparando os dados com a literatura. O espectro de massas pelo CG-EM mostrou M^+ 418, representando a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$, como mostrado na FIGURA 4.42 e 4.43. Assim, a estrutura com suas respectivas numerações é:

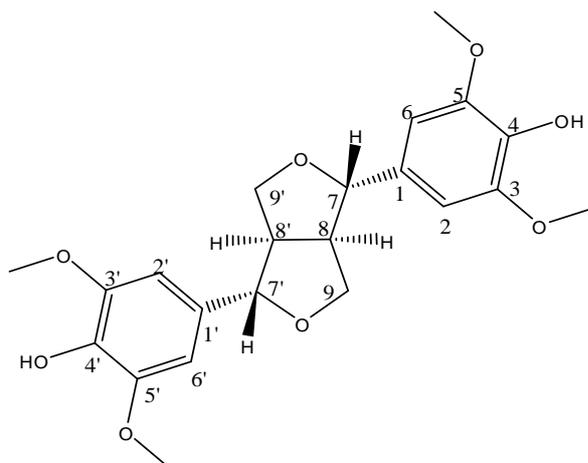


TABELA 4.8– Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) para a substância **04** em comparação com a substância syringaresinol (TULAKE et al., 2012: CDCl_3 , 500MHz para RMN ^1H e 125MHz para RMN ^{13}C)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Substância 04	TULAKE et al., 2012	Substância 04	TULAKE et al., 2012
1/1'	--	--	132,1	132,1
2/6/2'/6'	6,58 (s)	6,59 (s)	102,7	102,7
3/5/3'/5'	--	--	147,2	147,1
4/4'	--	--	134,3	134,3
7/7'	4,73 (d, 4,4)	4,74 (d, 4,0)	86,1	86,0
8/8'	3,09 (m)	3,10 (m)	54,3	54,3
9 _{ax} /9' _{ax}	3,92 – 3,97 (m)	3,92 (dd, 2,9 e 8,5)	71,8	71,8
9 _{eq} /9' _{eq}	4,28 (dd, 6,8 e 9,1)	4,29 (dd, 6,5 e 8,5)	--	--
OH	5,49 (s)	5,52 (s)	--	--
OMe	3,90 (s)	3,90 (s)	56,40	56,4

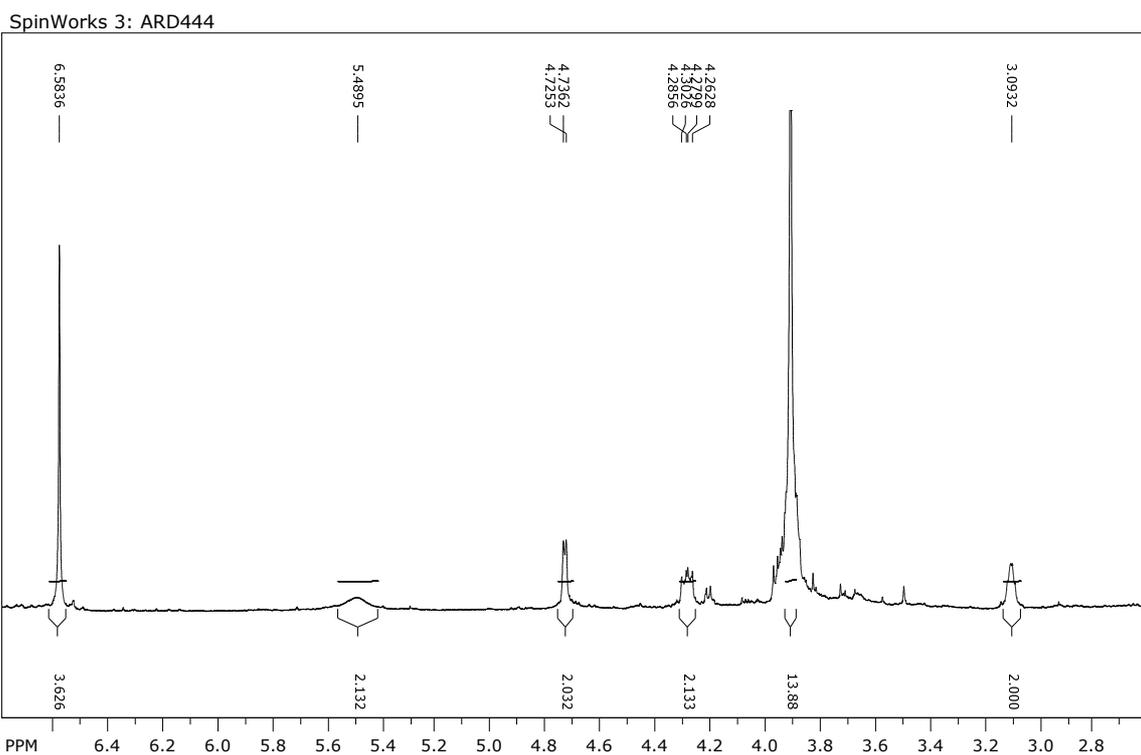


FIGURA 4.37– Espectro de RMN ^1H referente à substância **04** (400MHz, CDCl_3).

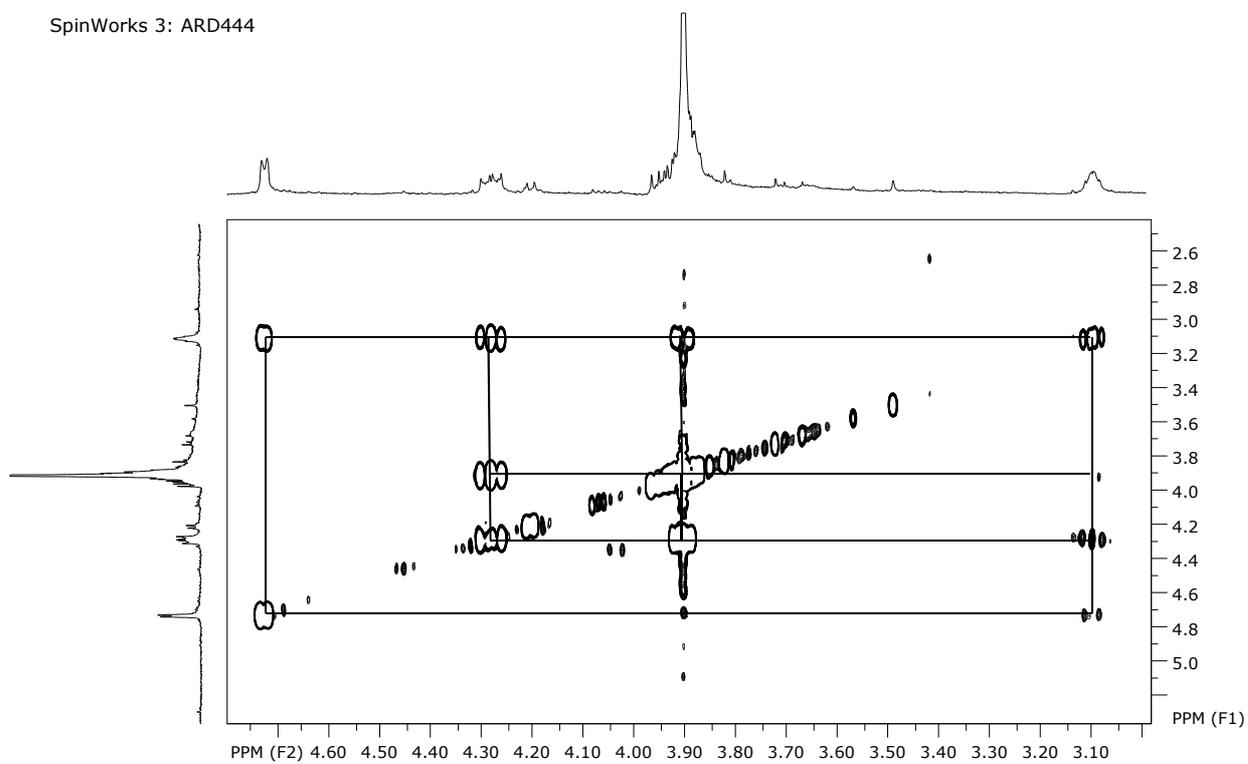


FIGURA 4.38– Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância **04** (400MHz, CDCl_3).

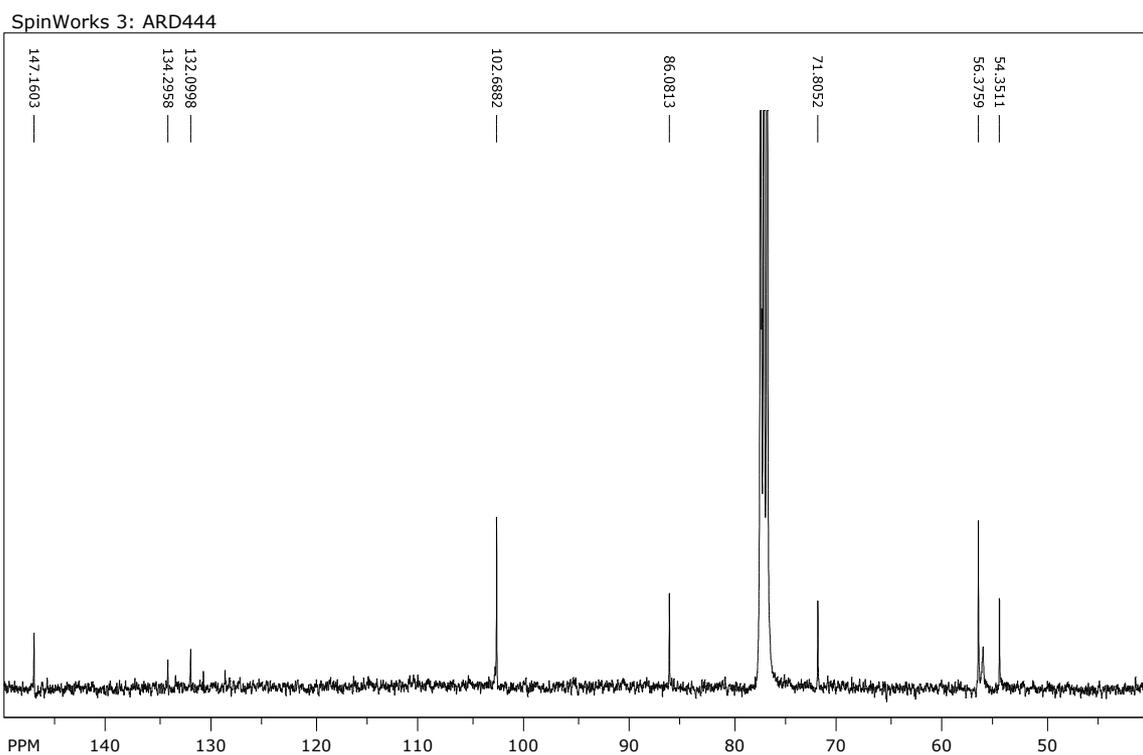


FIGURA 4.39– Espectro de RMN ^{13}C referente à substância **04** (100MHz, CDCl_3).

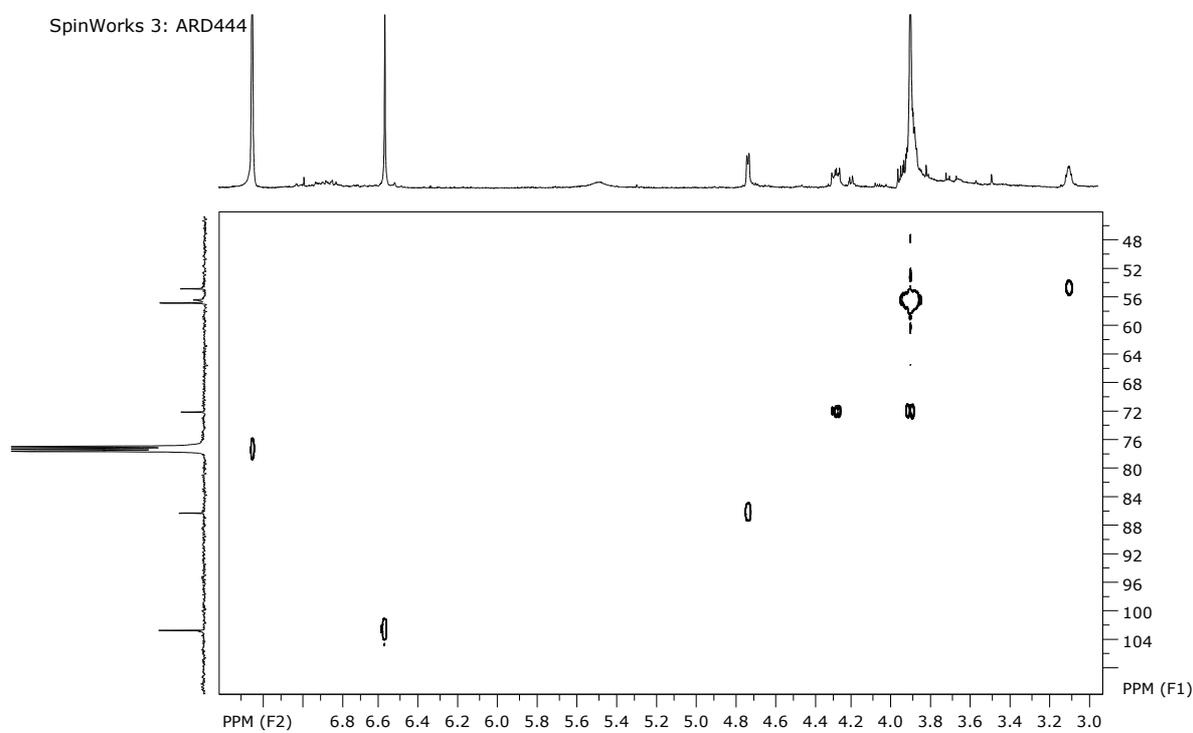


FIGURA 4.40– Mapa de contorno HSQC referente à substância **04** (400MHz, CDCl_3).

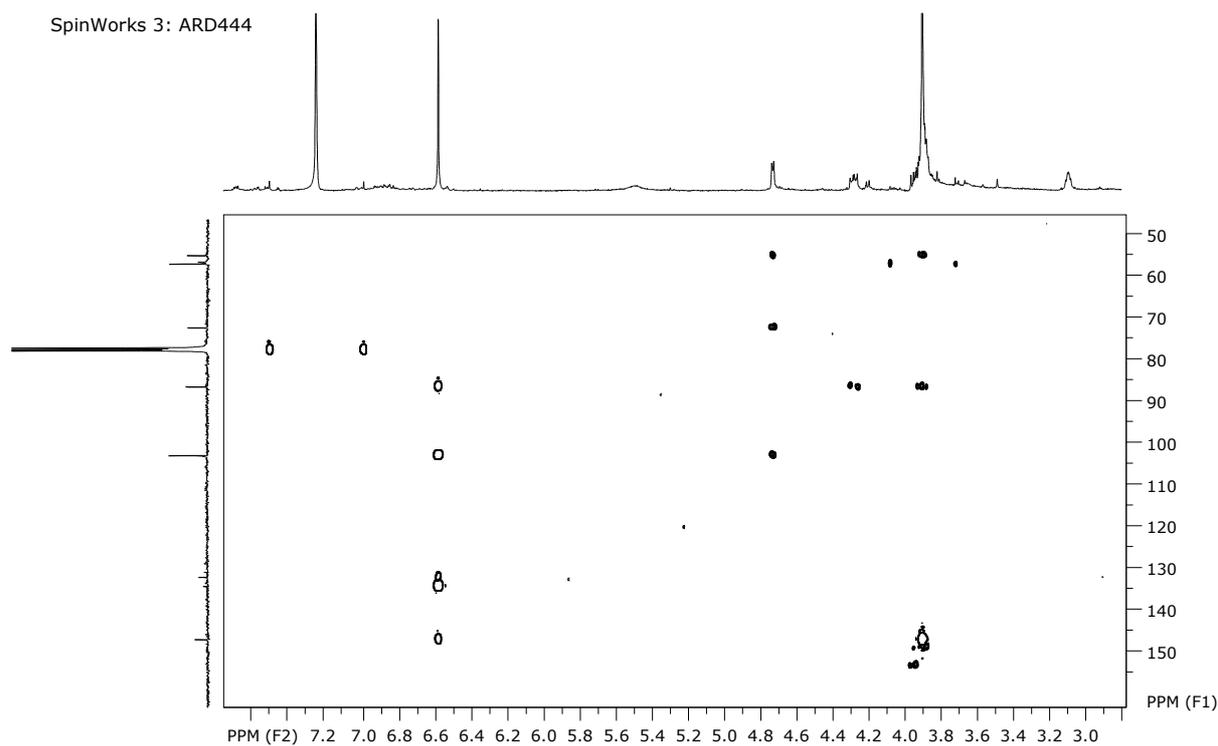


FIGURA 4.41– Mapa de contorno HMBC referente à substância **04** (400MHz, CDCl_3).

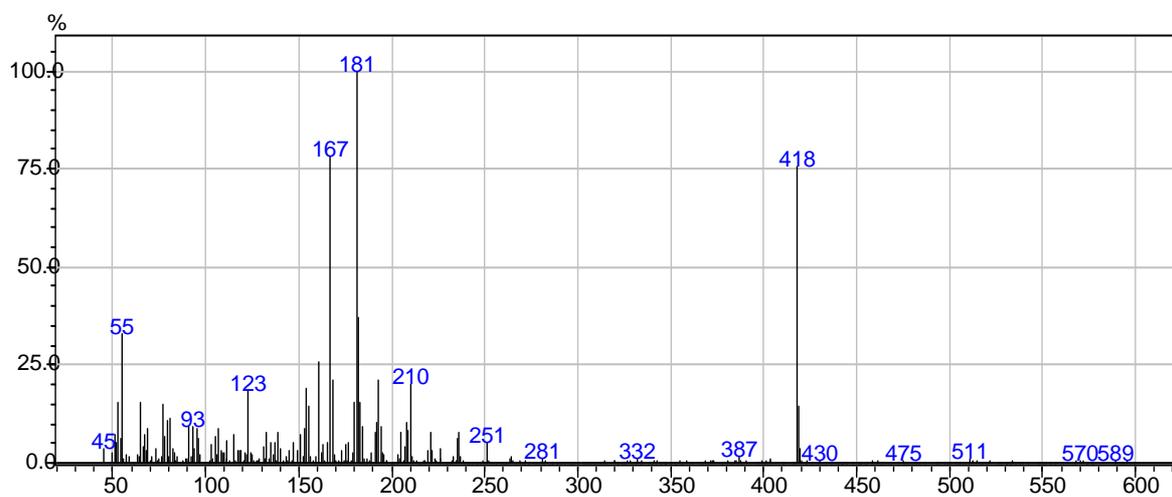


FIGURA 4.42– Espectro de massas por EI para o íon m/z 418 referente à substância **04**.

A FIGURA 4.43 apresenta a proposta de fragmentação para o íon m/z 418 referente à substância **04**.

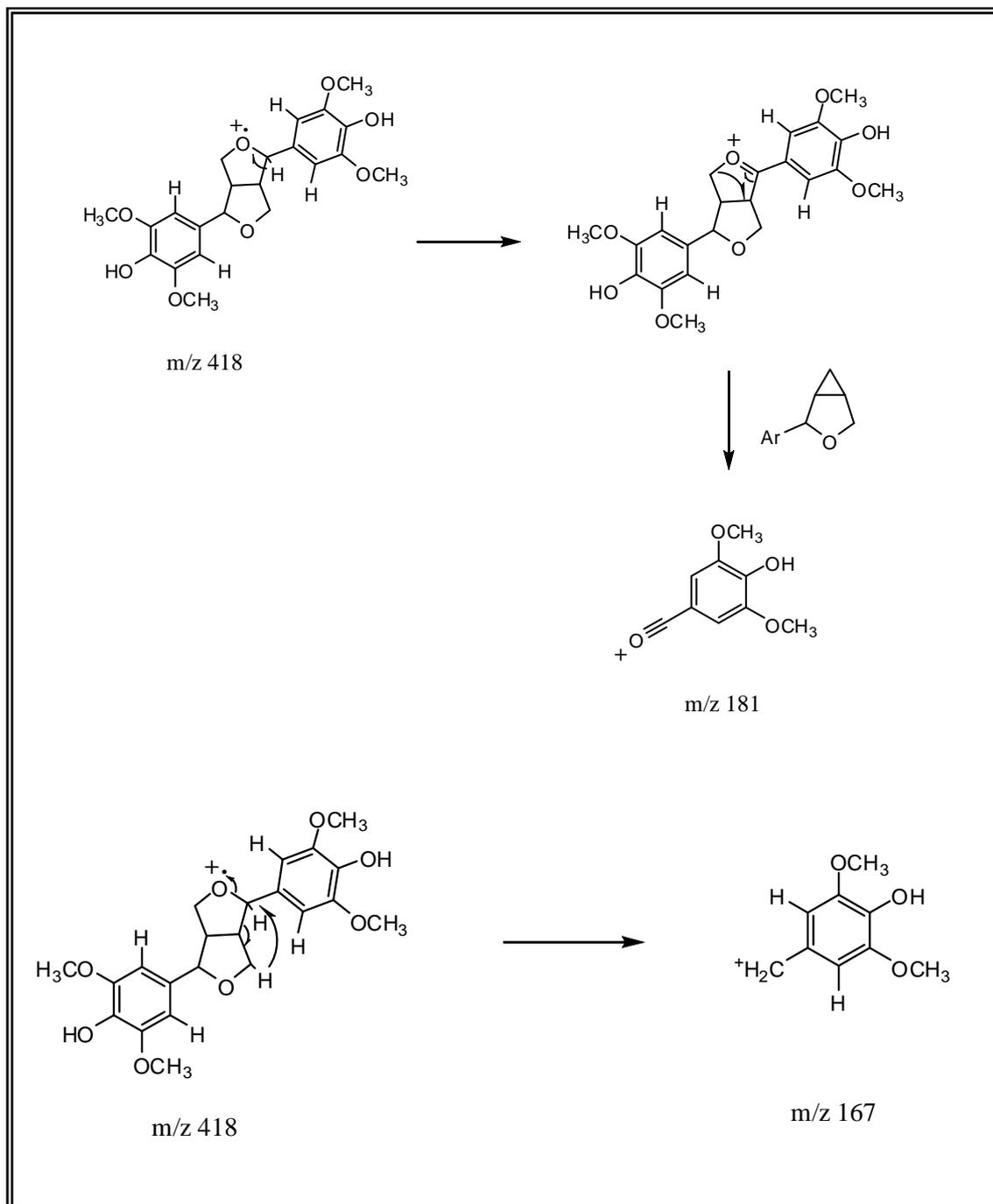


FIGURA 4.43– Proposta de fragmentação para o íon m/z 418 referente à substância 04.

4.1.2 – Identificação estrutural de alcaloide

4.1.2.1 – Identificação estrutural da substância 05

A substância **05** foi obtida como um sólido amarelo, apresentando coloração laranja em CCDA após ser revelada com o reagente Dragendorff. Esta substância foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H , HSQC e COSY, sendo a confirmação estrutural realizada por CG-EM. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (Wu et al., 2012).

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.44) apresentou sinais, com seus respectivos valores de integração e constantes de acoplamento característicos de um alcaloide do tipo oxoaporfínico, ou seja, quatro sinais de hidrogênios aromáticos caracterizando o anel D dissubstituído do esqueleto oxoaporfínico: δ_{H} 8,72 (*dd*, $J = 8,0$ e $1,4$ Hz, 1H), δ_{H} 8,45 (*dd*, $J = 8,0$ e $1,4$ Hz, 1H); δ_{H} 7,83 (*td*, $J = 8,0$ e $1,4$ Hz, 1H); δ_{H} 7,62 (*td*, $J = 8,0$ e $1,4$ Hz, 1H), dois hidrogênios piridínicos: δ_{H} 8,73 (*d*, $J = 5,1$ Hz, 1H), δ_{H} 7,98 (*d*, $J = 5,1$ Hz, 1H), um hidrogênio aromático típico do hidrogênio H-3: δ_{H} 7,37 (*s*, 1H), e um sinal referente ao grupamento metilenodióxi: δ_{H} 6,46 (*s*, 2H). Estes hidrogênios, através do mapa de contornos HSQC (FIGURA 4.45) mostram os seguintes acoplamentos: δ_{H} 8,73 com δ_{C} 145,22; δ_{H} 8,72 com δ_{C} 128,88; δ_{H} 8,45 com δ_{C} 129,12; δ_{H} 7,98 com δ_{C} 126,84; δ_{H} 7,83 com δ_{C} 136,00; δ_{H} 7,62 com δ_{C} 129,80; δ_{H} 7,37 com δ_{C} 104,40; δ_{H} 6,46 com δ_{C} 105,01. Estes dados permitem caracterizar a substância **05** como sendo a substância liriodenina (Wu et al., 2012; TABELA 4.9).

O espectro de COSY (FIGURA 4.46) mostrou correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares dos átomos de hidrogênios, confirmando a estrutura proposta: δ_{H} 8,73 (H- 5) com δ_{H} 7,98 (H-4); δ_{H} 8,72 (H-11) com δ_{H} 7,83 (H-10); δ_{H} 8,45 (H-8) com δ_{H} 7,62 (H-9); δ_{H} 7,98 (H-4) com δ_{H} 8,73 (H-5); δ_{H} 7,83 (H-10) com δ_{H} 8,72 (H-11) e δ_{H} 7,62 (H-9); δ_{H} 7,62 (H-9) com δ_{H} 8,45 (H-8) e δ_{H} 7,83 (H- 10).

O espectro de massas obtido por CG-EM (FIGURA 4.47) apresentou m/z 275, correspondente com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_3$, IDH = 14. A FIGURA 4.48 apresenta proposta de fragmentação para o composto **05**.

A TABELA 4.9 mostra a atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C comparando os dados com a literatura e a estrutura com suas respectivas numerações aparece a seguir.

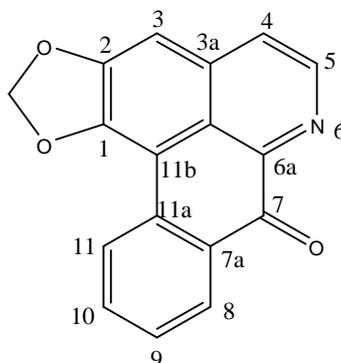


TABELA 4.9– Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) e ^{13}C (atribuídos por HSQC), para a substância **05** em comparação com a substância liriodenina (Wu et al., 2012: CDCl_3 , 500MHz para RMN ^1H e 125MHz para RMN ^{13}C)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Substância 05	Wu et al., 2012	Substância 05	Wu et al., 2012
3	7,37 (s)	7,15 (s)	104,4	103,2
4	7,98 (d, 5,12)	7,74 (d, 5,2)	126,8	124,2
5	8,73 (d, 5,12)	8,86 (d, 5,2)	145,2	144,9
8	8,45 (dd, 1,4 e 8,0)	8,56 (dd, 1,5 e 8,0)	129,1	128,8
9	7,62 (td, 1,4 e 8,0)	7,56 (td, 1,5 e 8,0)	129,8	128,6
10	7,83 (td, 1,4 e 8,0)	7,70 (td, 1,5 e 8,0)	136,0	133,9
11	8,72 (dd, 1,4 e 8,0)	8,61 (dd, 1,5 e 8,0)	128,9	127,3
OCH_2O	6,46 (s)	6,34 (s)	105,0	102,4

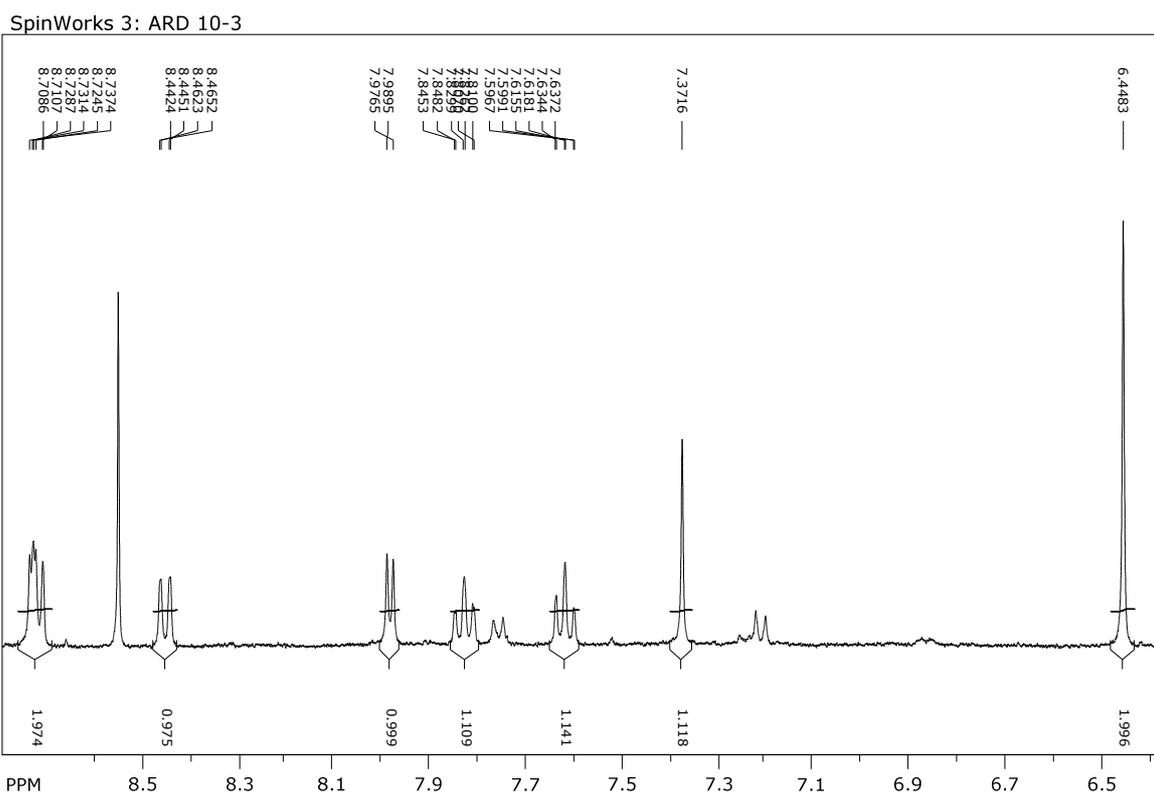


FIGURA 4.44– Ampliação do espectro de RMN ^1H referente à substância **05** (400MHz, CD_3OD).

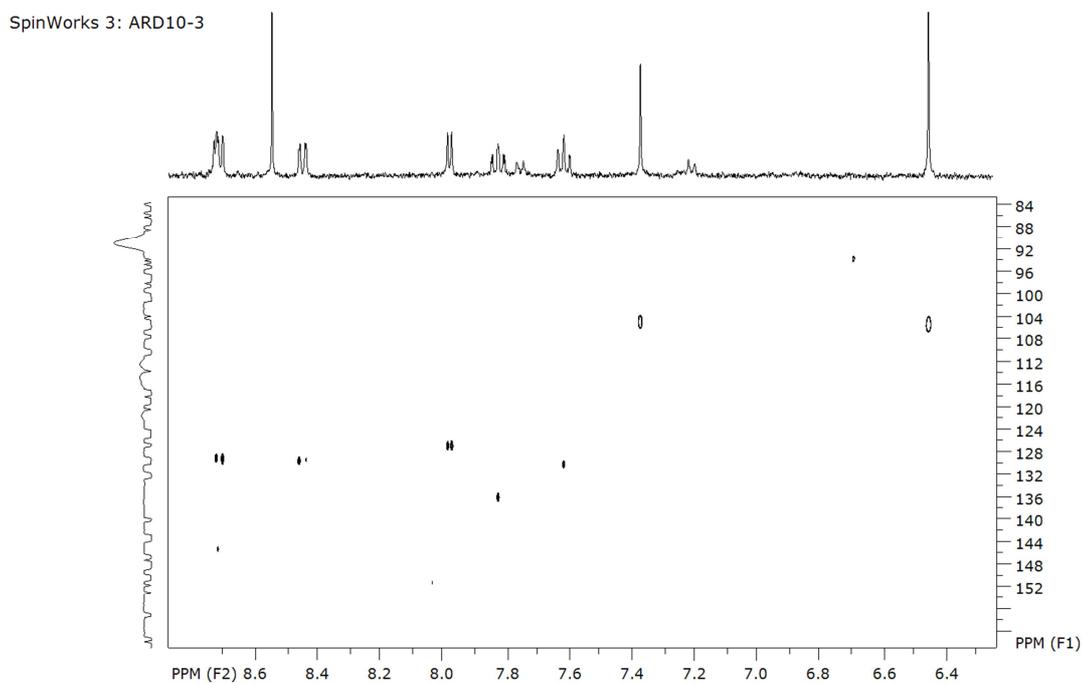


FIGURA 4.45– Mapa de contorno HSQC referente à substância **05** (400MHz, CD_3OD).

SpinWorks 3:

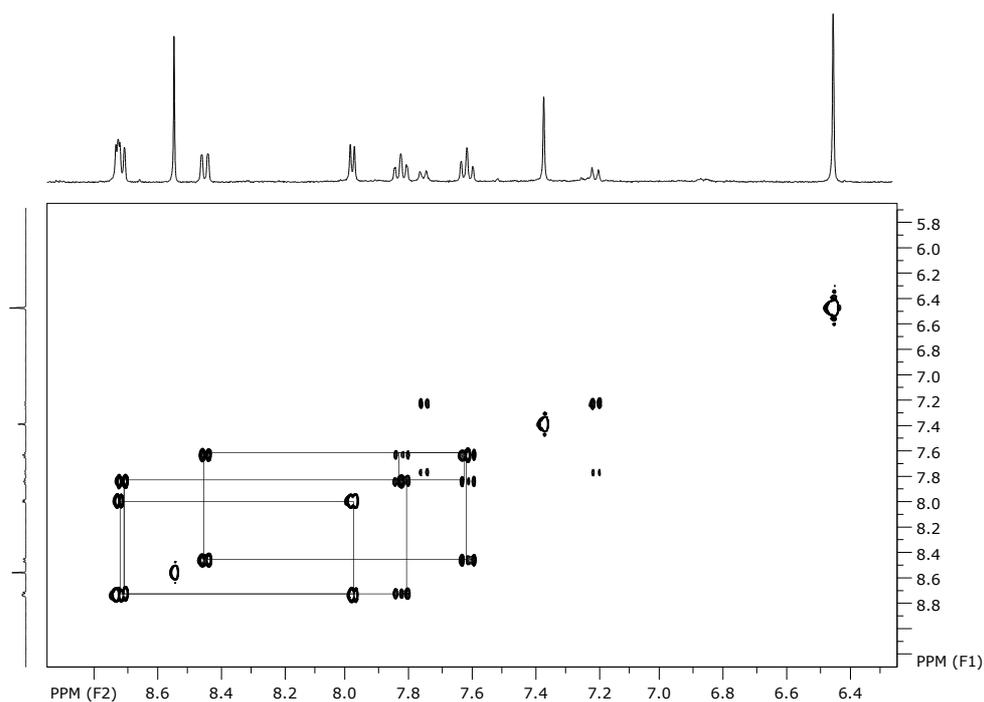


FIGURA 4.46– Ampliação do espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância **05** (400MHz, CD_3OD).

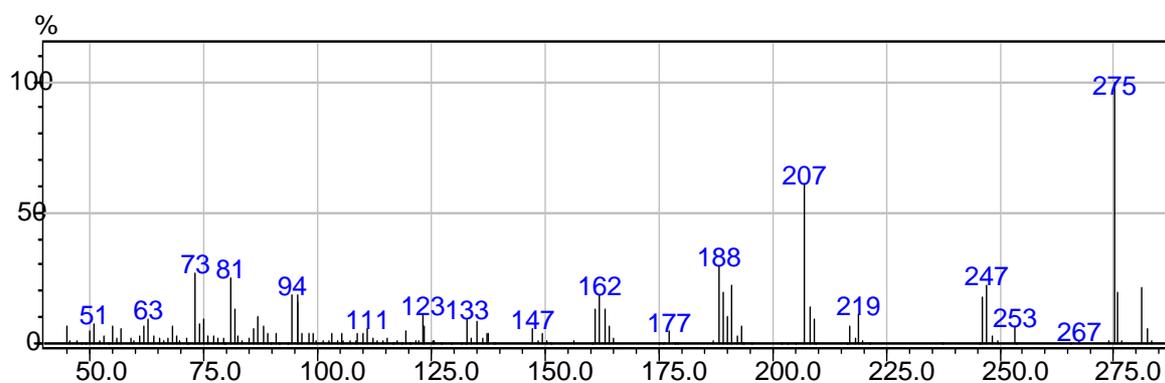


FIGURA 4.47– Espectro de massas por EI para o íon m/z 275 referente à substância **05**.

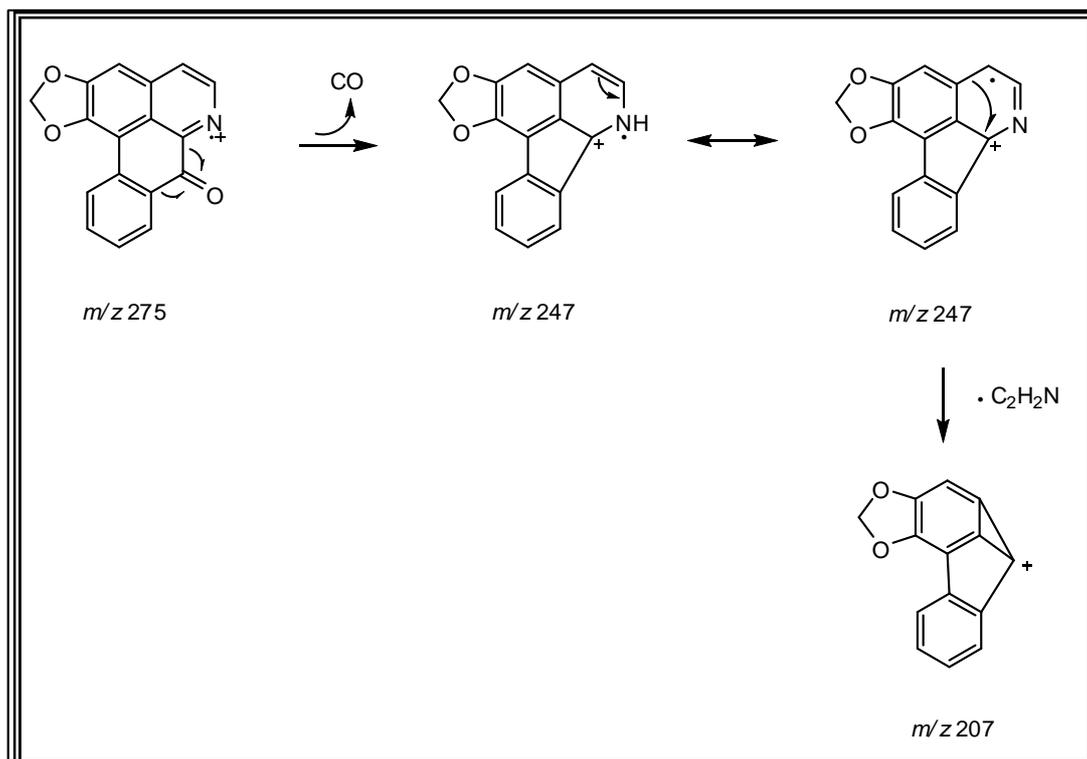


FIGURA 4.48– Proposta de fragmentação para o íon m/z 275 referente à substância 05.

4.1.2.2 – Identificação estrutural das substâncias 06 e 07 presentes na mistura ARD10-5

A mistura de alcaloides da fração ARD 10-5 apresentou coloração laranja em CCDA após ser revelada com o reagente Dragendorff. Os compostos presentes nesta fração foram analisados pelos espectros de RMN ^1H , HSQC e HMBC e por CG-EM. O cromatograma obtido por CG-EM apresentou cinco picos cromatográficos, sendo realizada para este trabalho, a determinação estrutural de duas das substâncias presentes na mistura. Assim, as bandas cromatográficas estudadas foram as referentes aos tempos de retenção em 28,78 min (banda 03) e em 29,23 min (banda 05) (FIGURA 4.49).

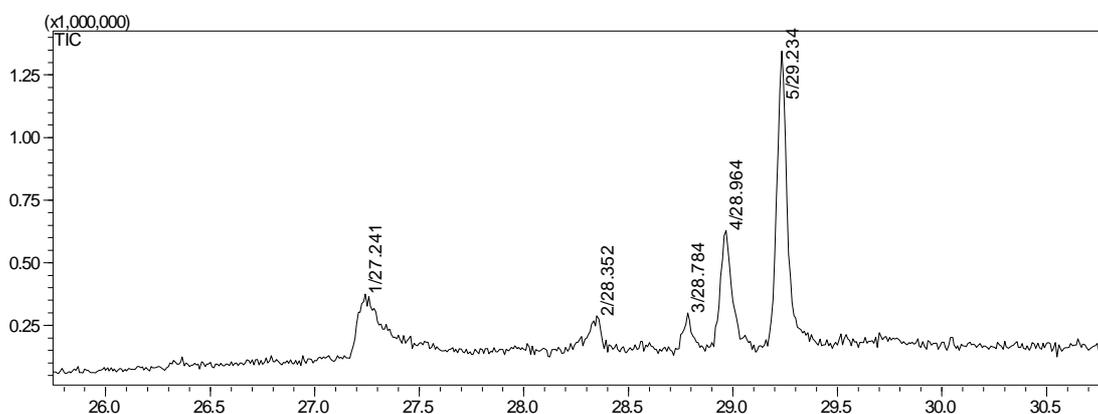


FIGURA 4.49– Cromatograma obtido por CG-EM referente à fração ARD 10-5 com os respectivos tempos de retenção referentes a cada banda cromatográfica.

Iniciando a discussão para a banda cromatográfica 05 (substância **06**), o espectro de RMN ^1H apresentou os seguintes sinais, característicos de um alcaloide do tipo aporfínico: δ_{H} 7,95 (s); δ_{H} 6,72 (s) e δ_{H} 6,60 (s) referentes aos hidrogênios aromáticos; δ_{H} 4,88 (m); δ_{H} 3,94 (m); δ_{H} 3,17 (m); δ_{H} 3,09 (dd, $J = 3,0$ e 13 Hz); δ_{H} 2,77 (dd, $J = 3,0$ e 13 Hz); δ_{H} 2,70 (m), referentes aos hidrogênios metilênicos; δ_{H} 5,97 e δ_{H} 5,98 referentes ao grupamento metilenodioxílico; δ_{H} 3,88 (s) e δ_{H} 3,66 (s), referentes às metoxilas. Estes hidrogênios, através do mapa de contornos HSQC mostram as seguintes correlações: δ_{H} 7,95 com δ_{C} 108,85; δ_{H} 6,72 com δ_{C} 108,12; δ_{H} 6,60 com δ_{C} 110,80; δ_{H} 3,94 com δ_{C} 35,84; δ_{H} 3,17 e δ_{H} 2,70 com δ_{C} 27,61; δ_{H} 3,09 e δ_{H} 2,77 com δ_{C} 35,28; δ_{H} 3,88 com δ_{C} 55,60; δ_{H} 3,66 com δ_{C}

59,95. O mapa de contornos HMBC apresentou as correlações apresentadas na TABELA 4.10.

TABELA 4.10– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **06** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
7,95 (H-11)	126,24 (C-11a); 129,27(C-7a); 146,62 (C-9 e C-10)
6,72 (H-8)	35,28 (C-7); 126,24 (C-11a); 146,62 (C-9 e C-10)
6,60 (H-3)	27,61 (C-4); 124,43 (C-11c); 125,39 (C-3a); 145,22 (C-1); 152,81 (C-2)
3,88 (OCH ₃)	152,81 (C-2)
3,66 (OCH ₃)	145, 22 (C-1)

O espectro de massas obtido por CG-EM mostrou o pico do íon molecular para esta substância em m/z 353 (condizente com a fórmula molecular C₂₀H₁₉NO₅ e IDH = 12) e um pico base em m/z 295, característico da perda de (CH₂NHCHO)⁺ (FIGURAS 4.50 e 4.51). Estes dados permitiram caracterizar a substância **06** como sendo a substância N-formilnornantenina (TANTISEWIE et al., 1989). A substância, com suas respectivas numerações, é mostrada a seguir. Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e de carbono (atribuídos com base nos espectros de HSQC e HMBC) foram comparados com a literatura (TABELA 4.11).

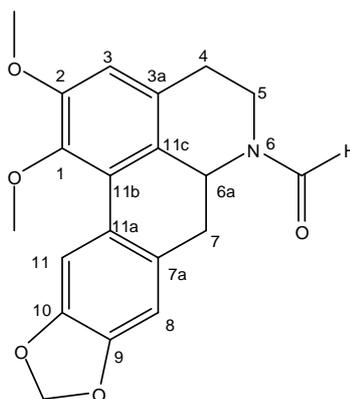


TABELA 4.11– Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (atribuídos por HSQC e HMBC), para a substância **06** em comparação com a substância N-formilnornanteína (TANTISEWIE et al., 1989: CDCl_3 , 500MHz para RMN ^1H e 125MHz para RMN ^{13}C)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm)	
	Substância 06	TANTISEWIE et al., 1989	Substância 06	TANTISEWIE et al., 1989
1	--	--	145,22	145,2
2	--	--	152,81	152,5
3	6,60 (s)	6,65 (s)	110,80	111,0
3a	--	--	125,39	129,4
4	3,17 (m); 2,70 (m)	2,82 (m); 2,77 (m)	27,61	29,6
5	3,94 (m)	4,42 (m); 3,16 (m)	35,84	35,1
6a	4,88 (m)	4,45 (dd, 3,0 e 14,0)	--	53,6
7	3,09 (dd, 3,0 e 13); 2,77 (dd, 3,0 e 13)	3,04 (dd, 3,0 e 14); 2,70 (dd, 3,0 e 14)	35,28	38,0
7a	--	--	129,27	129,8
8	6,72 (s)	6,75 (s)	108,12	108,4
9	--	--	146,60	146,8
10	--	--	146,60	146,9
11	7,95 (s)	7,99 (s)	108,85	109,1
11a	--	--	126,24	124,0
11c	--	--	124,43	125,1
OCH ₂ O	5,97 (d, 1,0); 5,98 (d, 1,0)	5,99 (d, 1,3); 6,00 (d, 1,3)	100,70	101,1
OCH ₃ (C-1)	3,66 (s)	3,67 (s)	59,95	60,0
OCH ₃ (C-2)	3,88 (s)	3,89 (s)	55,60	55,9

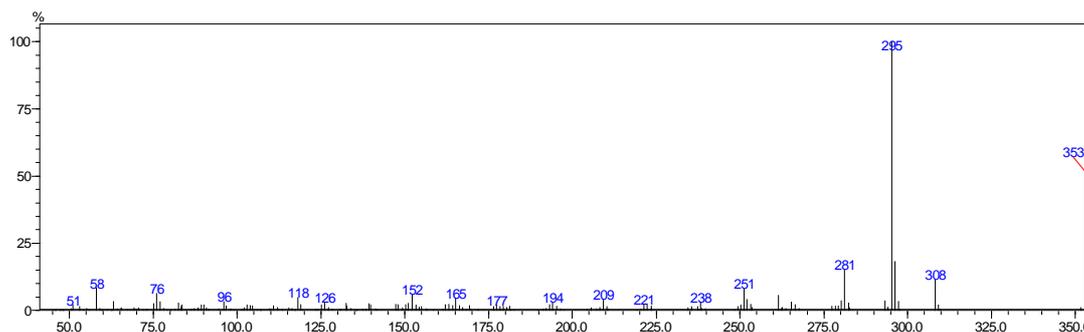


FIGURA 4.50– Espectro de massas por EI para o íon m/z 353 referente à substância **06**.

A FIGURA 4.51 apresenta a proposta de fragmentação para o íon m/z 353 referente à substância **06**.

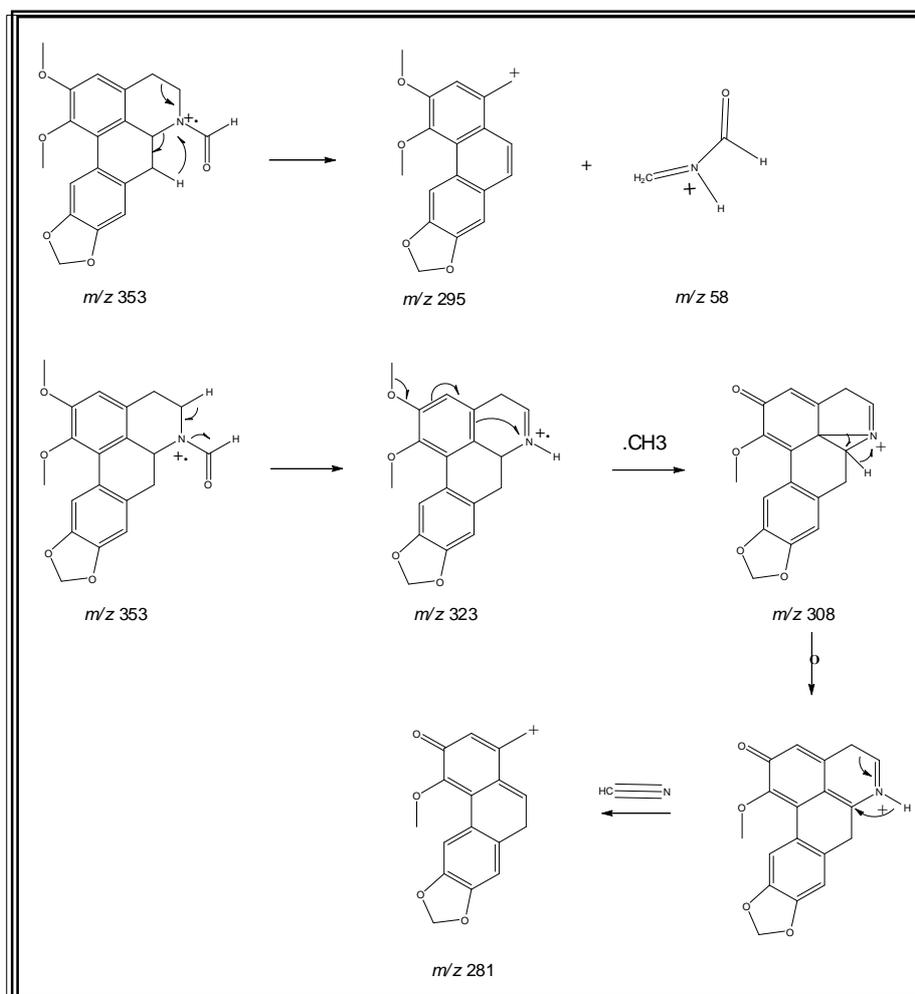


FIGURA 4.51– Proposta de fragmentação para o íon m/z 353 referente à substância **06**.

Para a banda cromatográfica 03 (substância **07**), o espectro de RMN ^1H apresentou sinais, com seus respectivos valores de integração e constantes de acoplamento característicos de um alcaloide do tipo oxoaporfínico. Ou seja, três sinais de hidrogênios aromáticos caracterizando o anel D e A, respectivamente, tetrassubstituído do esqueleto oxoaporfínico: δ_{H} 8,69 (s) e δ_{H} 8,01 (s); δ_{H} 7,20 (s), dois hidrogênios piridínicos: δ_{H} 8,92 (d, $J = 5,2$ Hz) e δ_{H} 7,79 (d, $J = 5,2$ Hz), um sinal em δ_{H} 3,58 (s) referente à um hidrogênio metínico, um sinal referente ao grupamento metilenodioxílico: δ_{H} 6,16 (s) e sinais referentes aos grupos metoxilas em δ_{H} 4,01 (s) e δ_{H} 4,10 (s). Estes hidrogênios, através do mapa de contornos HSQC mostraram as seguintes correlações: δ_{H} 8,69 com δ_{C} 107,28; δ_{H} 8,01 com δ_{C} 107,57; δ_{H} 7,20 com δ_{C} 106,21; δ_{H} 8,92 com δ_{C} 144,73; δ_{H} 7,79 com δ_{C} 123,06; δ_{H} 6,16 com δ_{C} 102,00; δ_{H} 3,58 com δ_{C} 60,13; δ_{H} 4,10 com δ_{C} 60,85 e δ_{H} 4,01 com δ_{C} 55,70. O mapa de contornos HMBC apresentou as correlações apresentadas na TABELA 4.12.

TABELA 4.12– Correlações Carbono-Hidrogênio atribuídas para a substância **07** baseada no mapa de correlações HMBC

δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
8,92 (H-5)	--
8,69 (H-11)	119,52 (C-11b); 130,97 (C-7a); 147,98 (C-11a); 153,05 (C-10)
8,01 (H-8)	130,97 (C-7a); 152,98 (C-9); 181,05 (C-7)
7,79 (H-4)	--
7,20 (H-3)	121,37 (C-3a); 123,41 (C-11c); 151,48 (C-2); 157,44 (C-1)
4,10 (OCH ₃)	157,44 (C-1)
4,01 (OCH ₃)	151,48 (C-2)

O espectro de massas obtido por CG-EM (FIGURA 4.52) apresentou pico do íon molecular em m/z 337, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ e IDH = 13, sendo suas fragmentações apresentadas na FIGURA 4.53. Esta substância é inédita na literatura, sendo denominada por isadenina, e seus valores

de deslocamento químicos para hidrogênio e carbono são apresentados na TABELA 4.13.

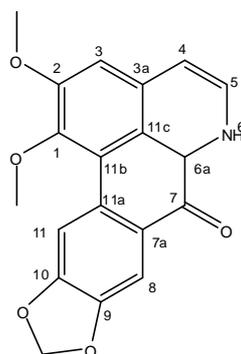


Tabela 4.13– Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) e ^{13}C (atribuídos por HSQC e HMBC), para a substância **07**

Substância 07		
H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	--	157,44
2	--	151,48
3	7,20 (s)	106,21
3a	--	121,37
4	7,79 (d, 5,2)	123,06
5	8,92 (d, 5,2)	144,73
6a	3,58 (s)	60,13
7	--	181,05
7a	--	130,97
8	8,01 (s)	107,57
9	--	152,98
10	--	153,06
11	8,69 (s)	107,28
11a	--	147,98
11b	--	119,52
OCH ₂ O	6,16 (s)	102,00
OCH ₃	4,10 (s)	60,85
OCH ₃	4,01 (s)	55,70

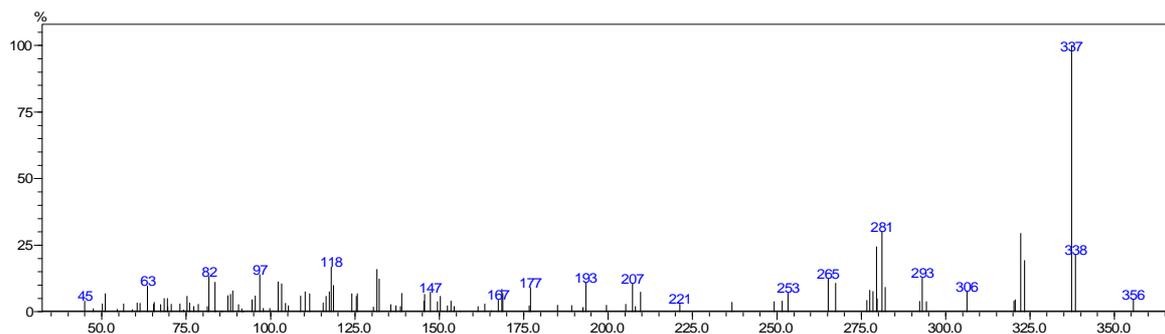


FIGURA 4.52– Espectro de massas por EI para o íon m/z 337 referente à substância 07.

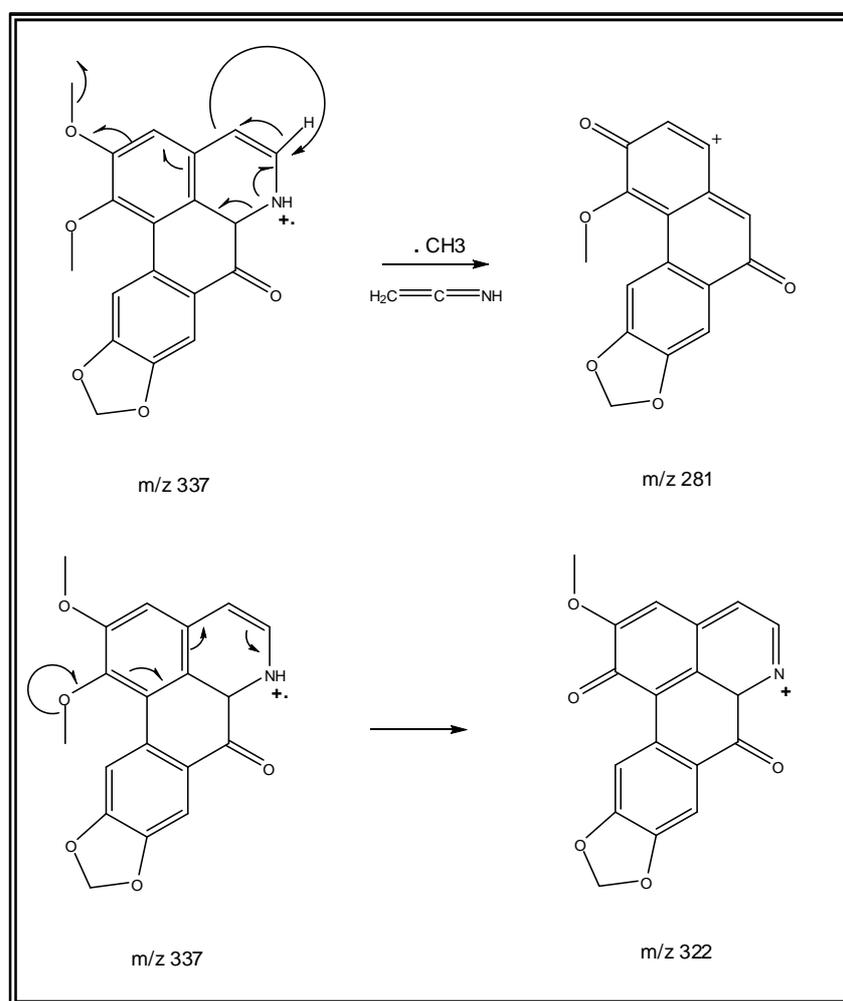


FIGURA 4.53– Proposta de fragmentação para o íon m/z 337 referente à substância 07.

Os espectros de RMN ^1H , HSQC e HMBC são apresentados nas FIGURAS 4.54; 4.55; 4.56; 4.57; 4.58.

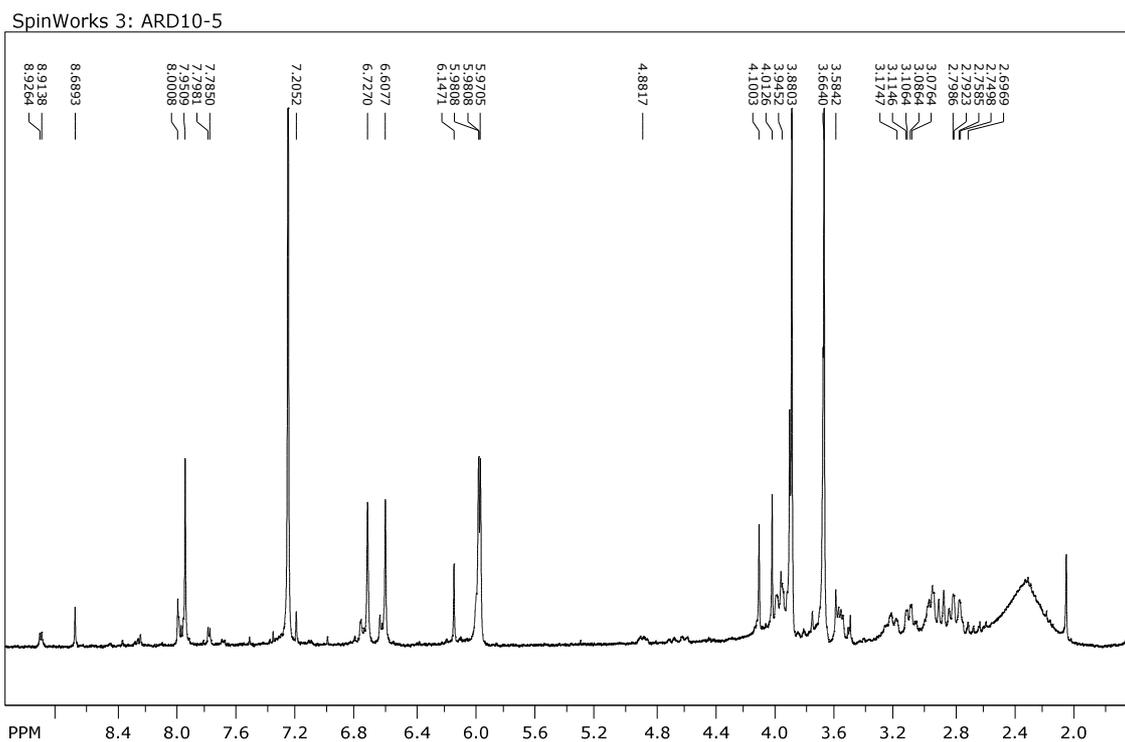


FIGURA 4.54– Espectro de RMN ^1H referente às substâncias **06** e **07** (400MHz, CDCl_3).

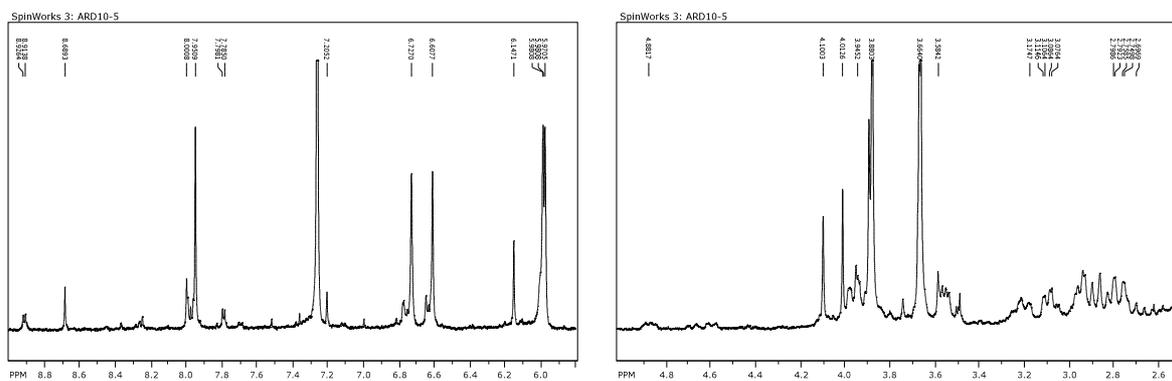


FIGURA 4.55– Ampliação do espectro de RMN ^1H referente às substâncias **06** e **07** (400MHz, CDCl_3).

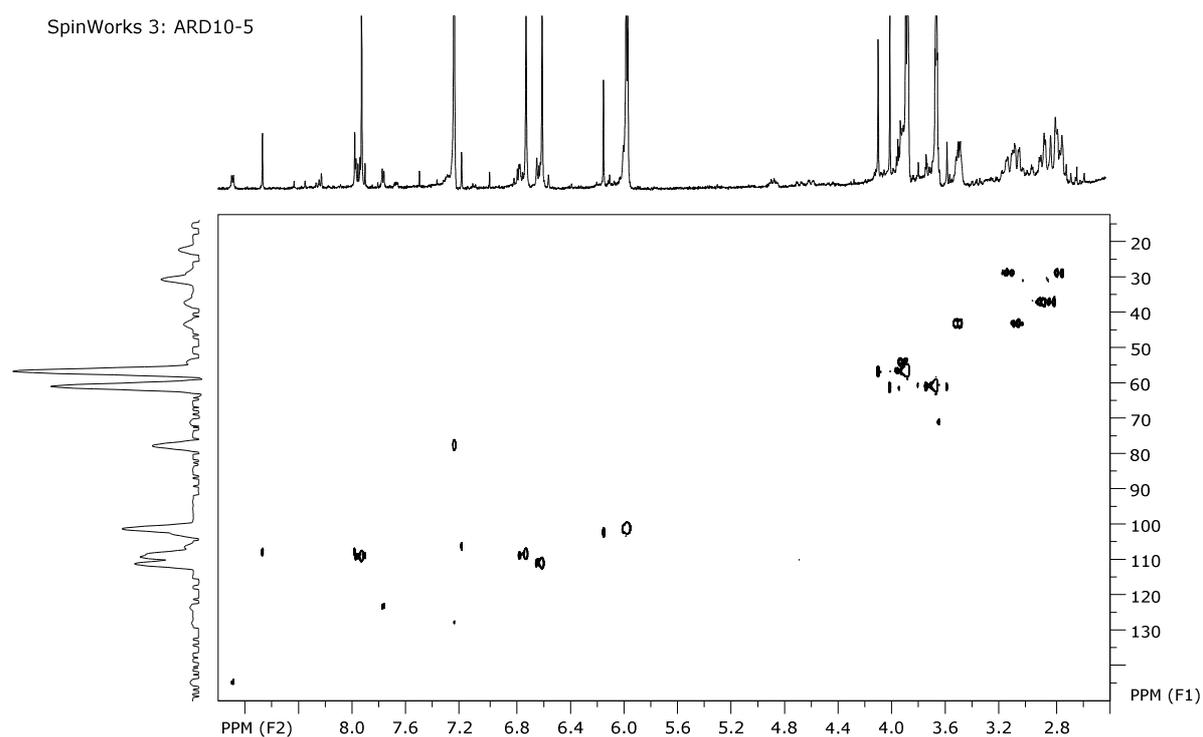


FIGURA 4.56– Mapa de contorno HSQC referente às substâncias **06** e **07** (400MHz, CDCl_3).

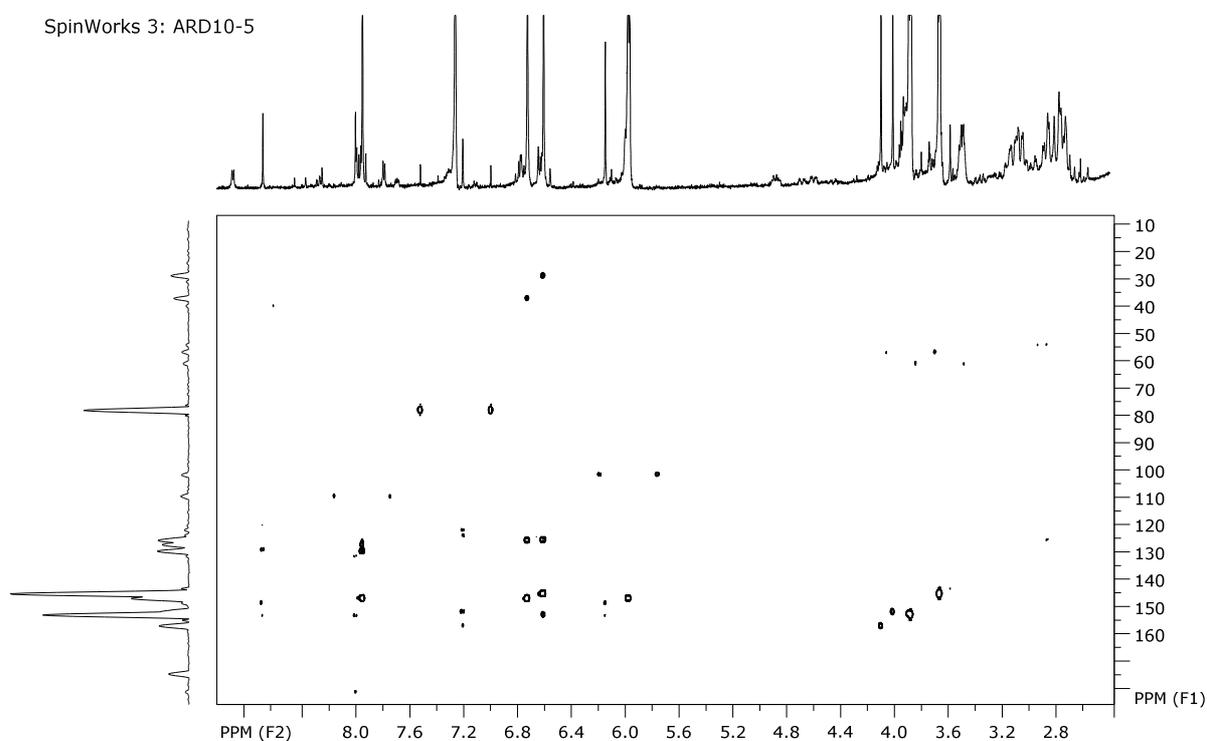


FIGURA 4.57– Mapa de contorno HMBC referente às substâncias **06** e **07** (400MHz, CDCl_3).

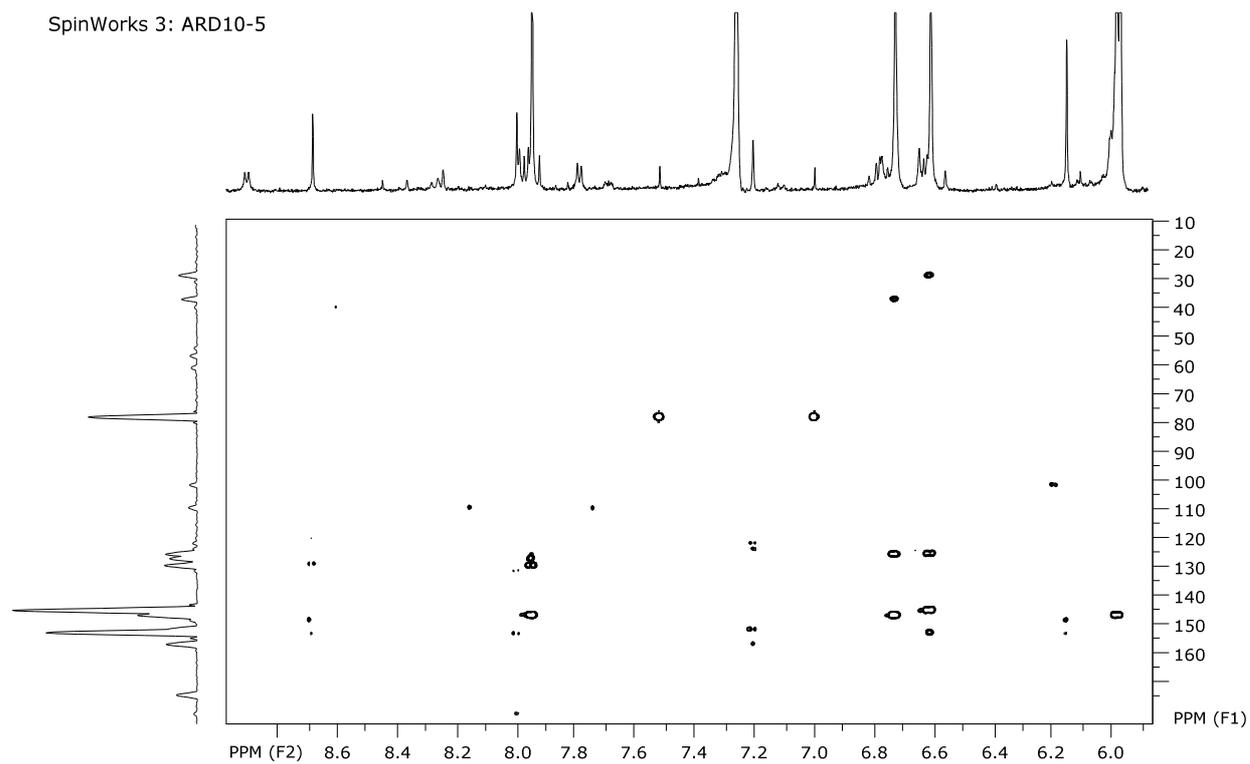
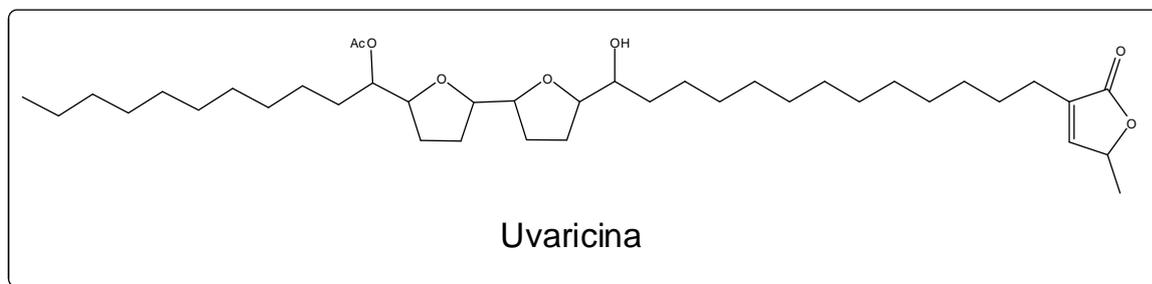


FIGURA 4.58– Expansão do mapa de contorno HMBC referente às substâncias **06** e **07** (400MHz, CDCl₃).

4.1.3 – Identificação estrutural de acetogenina

Antes de 1982, as investigações químicas da família Annonaceae eram voltadas para os alcaloides isoquinolínicos, sendo muitas espécies desta família utilizadas na medicina tradicional para várias finalidades. No entanto, a maioria dos estudos fitoquímicos anteriores não tentavam explicar seus usos populares através de testes de atividades biológicas. O estudo baseado no isolamento direcionado pela bioatividade é assim, fortemente sugerido na busca de metabólitos secundários bioativos nas plantas.

Foi a partir dos testes de leucemia de um extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata* em 1982 que conduziram ao isolamento e elucidação estrutural da uvaricina, um composto que apresentou atividade *in vivo* antileucêmica. A uvaricina foi então, o primeiro exemplo de uma classe de compostos extremamente bioativos que são referidos como acetogeninas. Desde então, esses compostos têm ganhado muita atenção por causa de sua ampla gama de potentes atividades biológicas apresentadas (RUPPRECHET et al., 1990; ALALI, 1999).



As acetogeninas, dessa forma, constituem uma série de produtos naturais isolados exclusivamente a partir de espécies da família Annonaceae. Estas substâncias apresentam em sua estrutura básica 35 a 37 átomos de carbono, sendo caracterizados por apresentarem uma longa cadeia alifática possuindo um anel lactônico terminal. Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, dois, ou três anéis tetrahidrofurânicos (THF), grupos funcionais oxigenados como hidroxilas, cetonas, epóxidos, além de ligações duplas ou triplas. Um número menor desses compostos apresenta anel tetrahidropirano (THP) (ALALI, et al., 1999). A

classificação de alguns dos diferentes tipos de acetogeninas é feita de acordo com as características estruturais das subunidades lactona terminal 2,4- substituída (classificadas pela letra L), assim como pelo número e rearranjo dos anéis tetrahydrofurânico (THF, classificados pela letra T) e/ou tetrahidropirano (THP, classificados também pela letra T) e anéis epóxidos (classificados pela letra E), conforme FIGURA 4.59 (BERMEJO, et al., 2005).

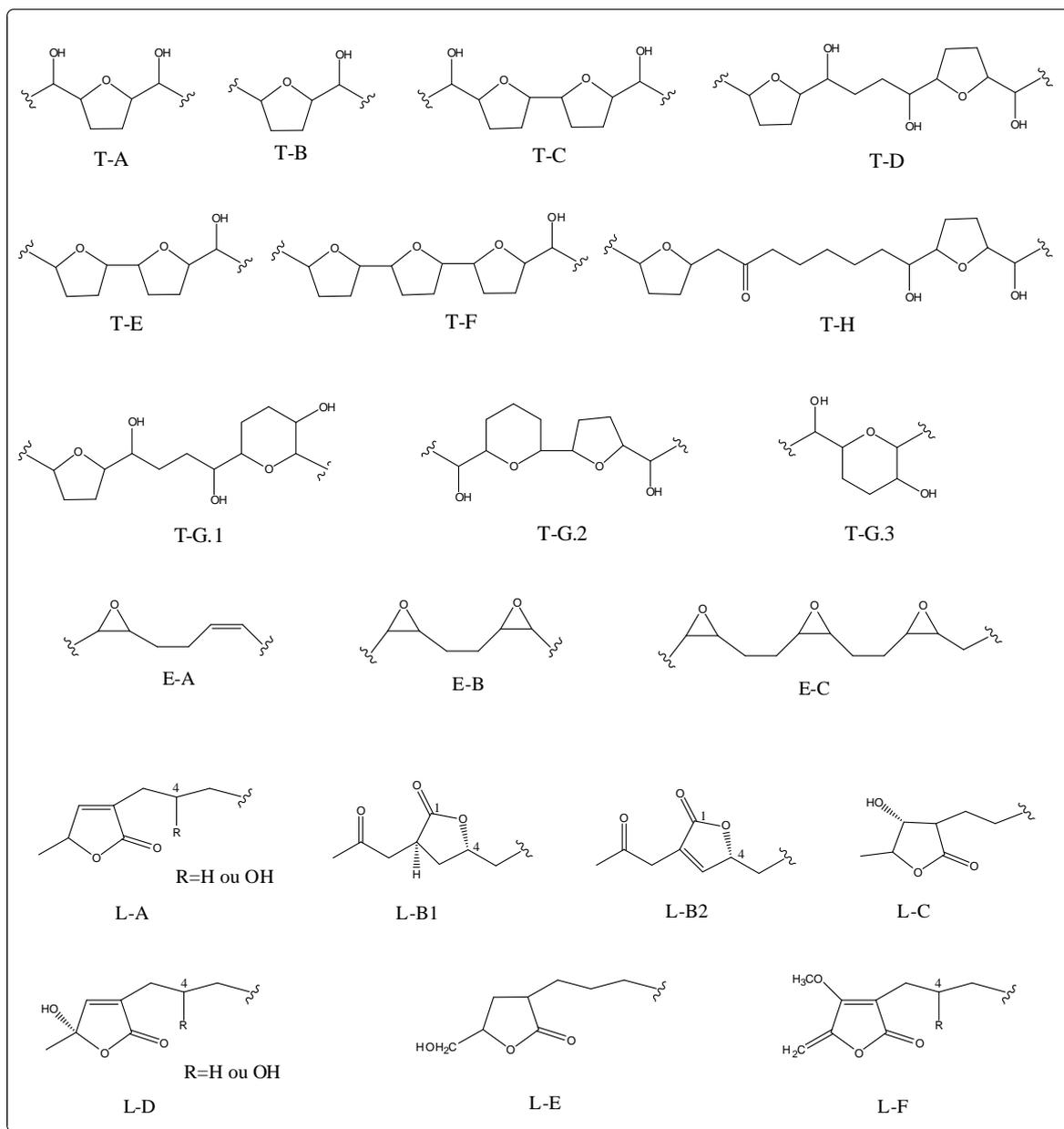


FIGURA 4.59– Classificação dos diversos tipos de acetogeninas.

4.1.3.1. Hipóteses da origem biossintética de acetogeninas

Embora nenhum estudo experimental sobre a biossíntese das acetogeninas tenha sido relatado até o momento, muitas propostas para a origem natural dos anéis THF foram feitas, sugerindo que sua origem seja policetídica. A análise retrossintética de compostos conhecidos indica que seu precursor poderia ter sido preparado pelas combinações lineares de duas ou três unidades de carbono (ácido acético e propanóico) via acetil-CoA, malonil-CoA e propanil-CoA, através de mecanismos análogos à via biossintética de ácidos graxos (RUPPRECHET et al., 1990).

Os anéis tetrahidrofurânicos podem ser obtidos pela epoxidação de intermediários dieno, trieno e cetodieno (por meio de redução do grupo ceto), sendo a posição das ligações duplas, da face da epoxidação e da forma de abertura e fechamento dos anéis epóxidos, determinantes da estereoquímica dos anéis THF e dos grupos hidroxilas adjacentes (FIGURAS 4.60; 4.61 e 4.62; RUPPRECHET et al., 1990).

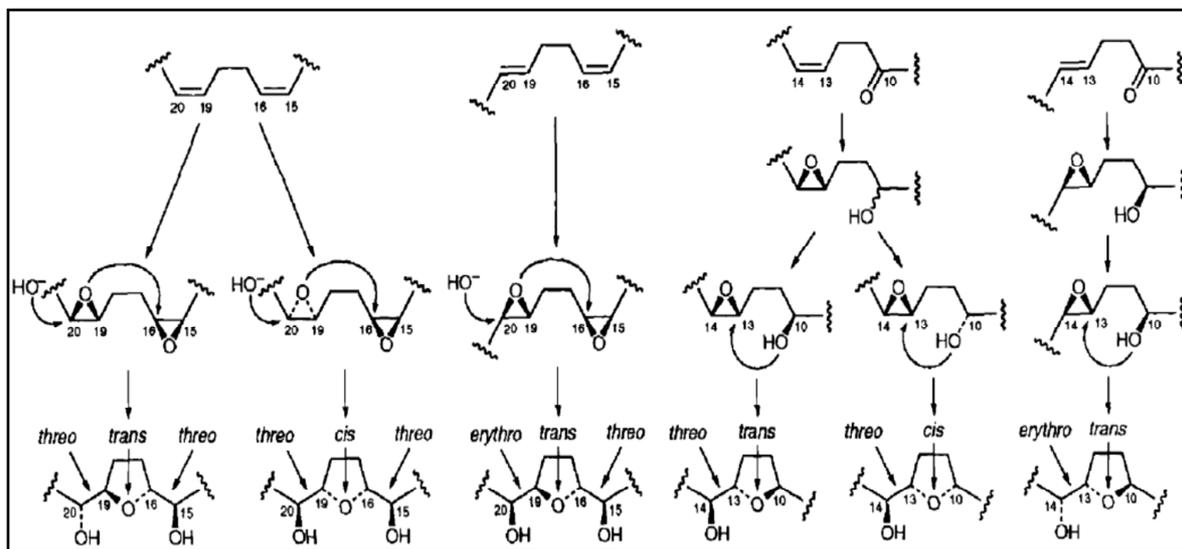


FIGURA 4.60– Proposta do caminho biossintético para formação mono-THF α -hidroxilados e α,α -hidroxilados (ZENG et al., 1996).

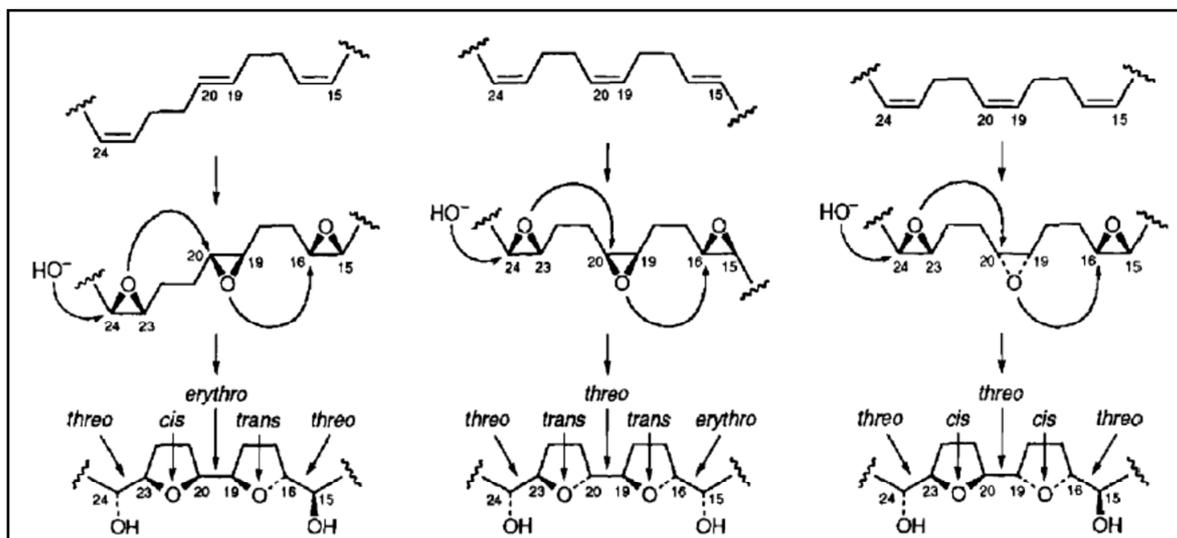


FIGURA 4.61– Proposta do caminho biossintético para formação bis-THF adjacentes α,α -hidroxiados (ZENGE et al., 1996).

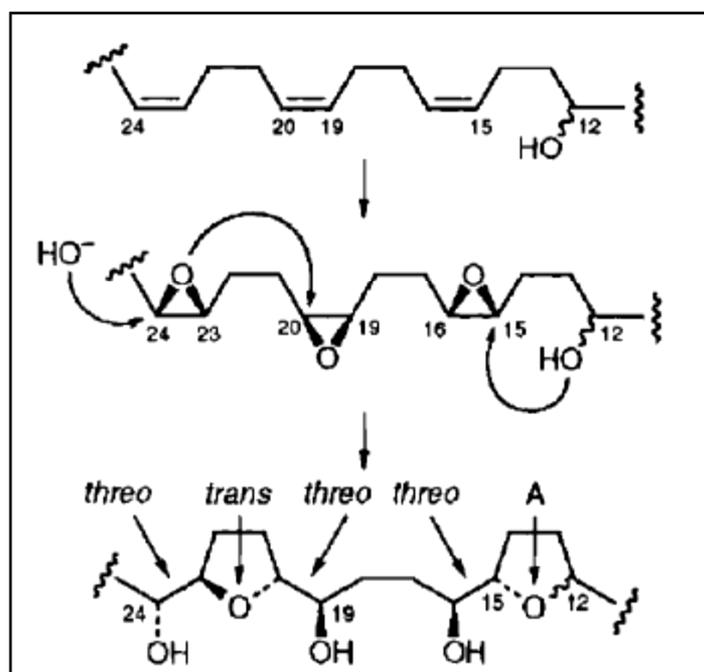


FIGURA 4.62– Proposta do caminho biossintético para formação bis-THF não adjacentes α -hidroxiados e α,α -hidroxiados (ZENGE et al., 1996).

4.1.3.2. Elucidação estrutural de acetogeninas

Segundo ARAYA (2004), as acetogeninas apresentam algumas características que tornam essa classe de compostos de difícil elucidação estrutural:

- 1) Muitos carbonos assimétricos estão presentes, o que pode gerar muitos estereoisômeros;
- 2) As posições dos grupos funcionais (anéis THF e hidroxilas) não podem ser facilmente deduzidas por RMN uma vez que os sinais de prótons referentes aos carbonos oximetínicos são significativamente sobrepostos;
- 3) Devido ao seu aspecto oleoso, definido muitas vezes como uma “cera branca”, esses compostos não são adequados para análise de cristalografia de raio X.

Os problemas enfrentados para elucidação de suas estruturas são principalmente:

- 1) Determinação da posição de seus grupos funcionais (anéis THF, THP, epóxidos e hidroxilas);
- 2) Determinação da estereoquímica (estereoquímica relativa e absoluta);

Em geral, as análises por espectrometria de massas para essas substâncias são essenciais para determinação de sua estrutura planar e localização de seus grupos funcionais oxigenados ao longo da cadeia alquílica.

Devido à complexidade apresentada para estes compostos, além de um tempo maior requerido para uma análise mais detalhada para elucidação dos mesmos, para este trabalho, portanto, foi possível até o presente momento, a elucidação estrutural de uma, das quatro acetogeninas isoladas de *A. sylvatica*.

4.1.3.3. Elucidação estrutural da substância 08

Para a determinação estrutural da substância **08**, após a realização do experimento HPLC-NMR, foram utilizadas as análises dos espectros unidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C e espectros bidimensionais, HSQC, HMBC e COSY. Após a realização do experimento de HPLC-MS, obtiveram-se os espectros no modo *full scan* para a mistura de acetogeninas, apresentando uma melhor ionização quando utilizado a fonte APCI para as acetogeninas minoritárias presentes na amostra. Os espectros no modo *product ion* referente à substância **08** foram obtidos através das fontes de ionização ESI e APCI e mostraram muita semelhança em seus fragmentos, indicando boa ionização da substância quando utilizado os dois métodos.

O espectro de RMN ^1H desta substância apresentou os seguintes sinais que, associados com a análise do mapa de contorno HSQC, permitiram caracterizar a presença da unidade lactona α,β - insaturada: δ_{H} 7,18 (*q*, $J = 1,4$ Hz, 1H) correlacionando para o carbono olefínico em δ_{C} 151,64; δ_{H} 5,05 (*qq*, $J = 1,4$ e 6,8 Hz, 1H) correlacionando para o carbono em δ_{C} 77,76; δ_{H} 1,41 (*d*, $J = 6,8$ Hz, 1H) correlacionando para o carbono em δ_{C} 19,08.

O mapa de contorno HMBC apresentou os seguintes acoplamentos: hidrogênio em δ_{H} 7,18 (H-35) com os carbonos δ_{C} 174,64 (C-1); δ_{C} 131,11 (C-2); δ_{C} 77,76 (C-36); δ_{C} 33,08 (C-3); δ_{C} 19,08 (C-37); hidrogênio em δ_{H} 5,05 (H-36) com os carbonos δ_{C} 174,64 (C-1); δ_{C} 151,64 (C-35); δ_{C} 131,11 (C-2); δ_{C} 19,08 (C-37); hidrogênio em δ_{H} 1,41 (H-37) com os carbonos δ_{C} 151,64 (C-35) e δ_{C} 77,76 (C-36).

Os hidrogênios em δ_{H} 2,49 e em δ_{H} 2,37 são diasterotópicos (H-3_a e 3_b) e acoplam entre si com $J_{\text{gem}} = 15,1$ Hz. Estes hidrogênios acoplam também com o H-4 com $J_{3a/4} = 3,4$ Hz e $J_{3b/4} = 8,3$ e com os hidrogênios H-35 e H-36 com igual constante de acoplamento, ($J_{3a/33} = J_{3a/34} = 1,7$ Hz) e ($J_{3b/33} = J_{3b/34} = 1,2$ Hz), resultando em um duplo duplo tripleto (*ddt*) para cada um. Esses hidrogênios, através do mapa de contorno HSQC, estão diretamente ligados ao carbono em δ_{C} 33,08, e correlacionam através da análise do experimento HMBC com os carbonos em δ_{C} 174,64 (C-1); δ_{C} 151,64 (C-35); δ_{C} 131,11 (C-2); δ_{C} 69,58 (C-4) e δ_{C} 37,05 (C-5). Essas correlações indicam a presença de um grupo hidroxila na posição C-4, uma vez que há uma correlação com um carbono oximetínico (δ_{C} 69,58). Essas

correlações também confirmam a presença de uma lactona α,β - insaturada, sendo compatíveis com o tipo L-A (FIGURA 4.63).

Outra característica definidora para a presença de uma função hidroxila posicionada no carbono C-4 é em relação ao valor de deslocamento do hidrogênio vinílico H-35 e do carbono C-1. Quando um grupo hidroxila está em C-4, há provavelmente a formação de ligação de hidrogênio intramolecular formando um anel de sete membros, envolvendo o oxigênio da carbonila em C-1, além do efeito da conjugação da dupla (CH-35 e C-2) com a carbonila em C-1. Tal observação experimental revela maior desblindagem do hidrogênio vinílico H-35, de seu carbono C-35 e do carbono C-1, quando comparados às acetogeninas sem a hidroxila em C-4 (que mostram os valores de deslocamentos para H-35 e C-35 em δ_H 6,96 e δ_C 148,8 respectivamente e para C-1 em δ_C 173,8; LIMA et al., 2010; RUPPRECHET, et al., 1990).

O espectro de COSY mostrou correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares dos átomos de hidrogênios: δ_H 7,18 (H- 35) com δ_H 5,05 (H-36); δ_H 5,05 (H-36) com δ_H 7,18 (H-35) e δ_H 1,41 (H-37), de acordo com o anel lactônico α,β - insaturado proposto.

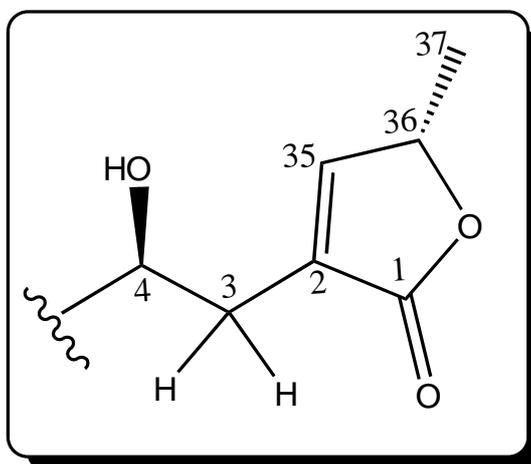


FIGURA 4.63– Lactona α,β - insaturada, do tipo L-A.

A TABELA 4.14 apresenta os dados obtidos referentes aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbono do anel lactônico do tipo L-A em

O sistema bis-tetrahidrofurânico não adjacente α -hidroxilado foi sugerido pela presença nos espectros de RMN ^{13}C de nove sinais referentes aos carbonos oximetínicos, sendo dois deles mencionados acima pertencentes ao anel lactônico tipo L-A. Estes sinais, através do mapa de contorno HSQC apresentaram as seguintes correlações: δ_{H} 3,41 (*ddd*, $J = 2,3; 7,2$ e $9,4$ Hz, 1H) com δ_{C} 74,40; δ_{H} 3,47 (*dt*, $J = 4,0$ e $8,0$ Hz, 1H) com δ_{C} 74,12; δ_{H} 3,77 (*q*, $J = 7,2$ Hz, 1H) com δ_{C} 81,80; δ_{H} 3,83 (*m*, 1H) com δ_{C} 72,38; δ_{H} 3,84 (*m*, 1H) com δ_{C} 82,42; δ_{H} 3,85 (*m*, 1H) com δ_{C} 79,28; e δ_{H} 3,90 (*td*, $J = 2,7$ e $7,4$ Hz, 1H) com δ_{C} 82,98.

A associação destas informações com as obtidas através do mapa de contornos HMBC permitiu fazer as seguintes atribuições, confirmando o esqueleto bis-THF: δ_{H} 3,41 (H-19) correlacionando com os carbonos δ_{C} 81,80 (C-20) e δ_{C} 82,42 (C-18); δ_{H} 3,47 (H-12) correlacionando com o carbono δ_{C} 72,38 (C-14); δ_{H} 3,77 (H-20) correlacionando com os carbonos δ_{C} 79,28 (C-23) e δ_{C} 74,40 (C-19); δ_{H} 3,83 (H-14) correlacionando com os carbonos δ_{C} 74,12 (C-12) e δ_{C} 82,98 (C-15); δ_{H} 3,84 (H-18) correlacionando com os carbonos δ_{C} 74,40 (C-19) e δ_{C} 82,98 (C-15); δ_{H} 3,85 (H-23) correlacionando com o carbono δ_{C} 81,80 (C-20) e δ_{H} 3,90 (H-15) correlacionando com os carbonos δ_{C} 72,38 (C-14) e δ_{C} 82,42 (C-18).

O espectro de COSY mostrou correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares dos átomos de hidrogênios: δ_{H} 3,41 (H-19) com δ_{H} 3,84 (H-18) e δ_{H} 3,77 (H-20); δ_{H} 3,47 (H-12) com δ_{H} 3,83 (H-14); δ_{H} 3,83 (H-14) com δ_{H} 3,47 (H-12) e δ_{H} 3,90 (H-15); δ_{H} 3,84 (H-18) com δ_{H} 3,90 (H-15) e δ_{H} 3,41 (H-19); δ_{H} 3,85 (H-23) e δ_{H} 3,77 (H-20); δ_{H} 3,90 (H-15) com δ_{H} 3,83 (H-14) e δ_{H} 3,84 (H-18).

As informações adicionais obtidas pelo espectro de massas permitiram localizar a posição dos anéis tetrahidrofurânicos e das funções hidroxilas presentes. O espectro obtido no modo positivo pela fonte de ESI e APCI através do modo *product ion* apresentou m/z 639, indicando a fórmula molecular protonada $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$ e IDH = 5. Esses dados são condizentes com a presença dos dois anéis THF e um anel lactônico contendo duas insaturações. A configuração relativa para estes anéis foram atribuídas com base na comparação de deslocamento químico de hidrogênio e carbono obtidos em relação aos valores encontrados na literatura (FIGURA 4.64).

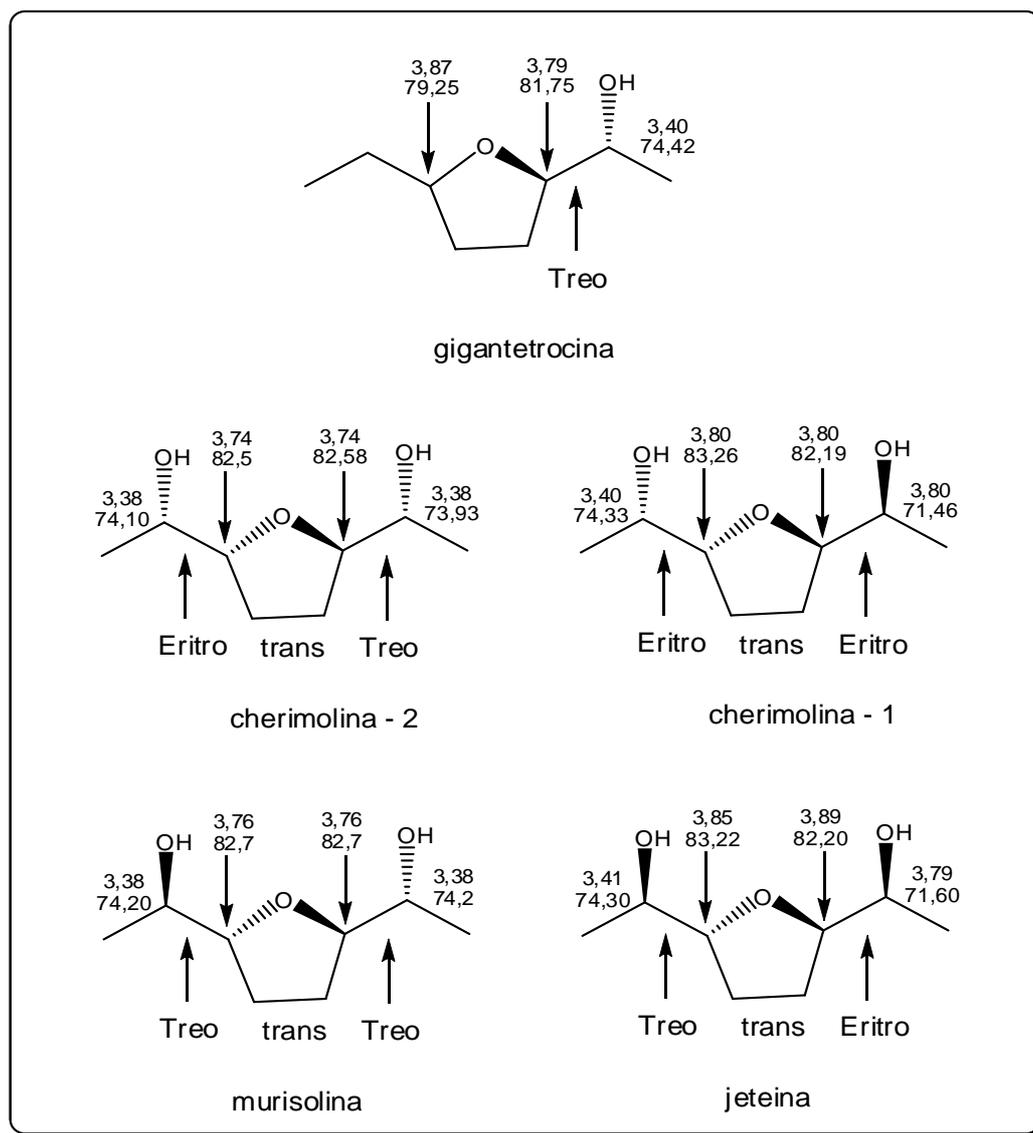


FIGURA 4.64– Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o anel THF referentes a algumas acetogeninas (CORTES et al., 1993).

Assim, os valores que mais se aproximaram para a substância **08** foram os referentes à gigantetrocina e à jeteina. Esta substância é inédita na literatura, sendo denominada sylvateina (FIGURA 4.65)

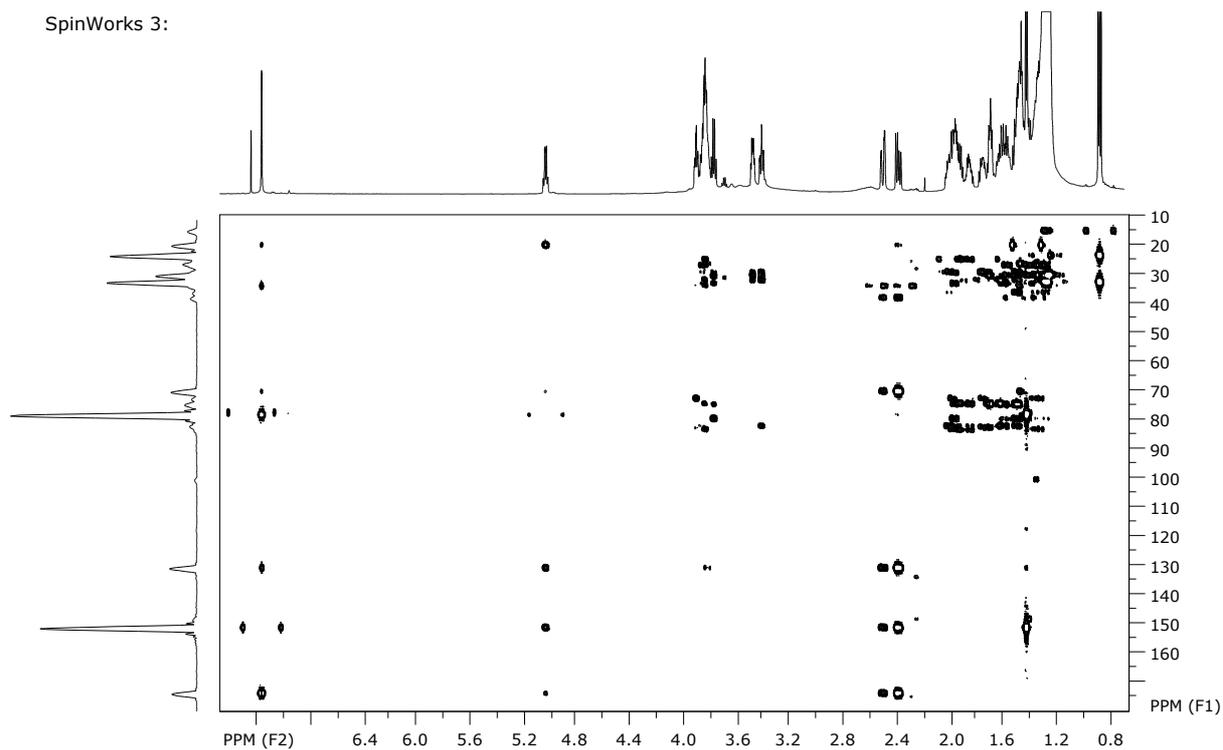


FIGURA 4.70– Mapa de contorno HMBC referente à substância 08 (600MHz, CDCl_3).

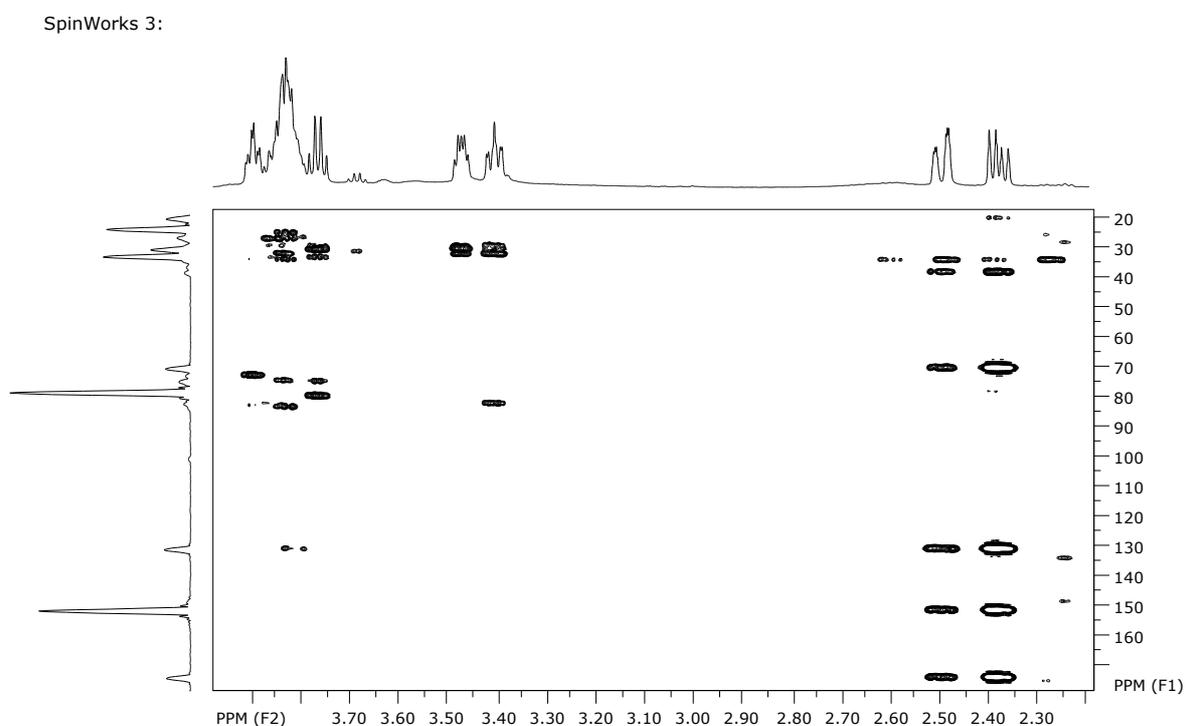


FIGURA 4.71– Expansão do mapa de contorno HMBC referente à substância **08** (600MHz, CDCl_3).

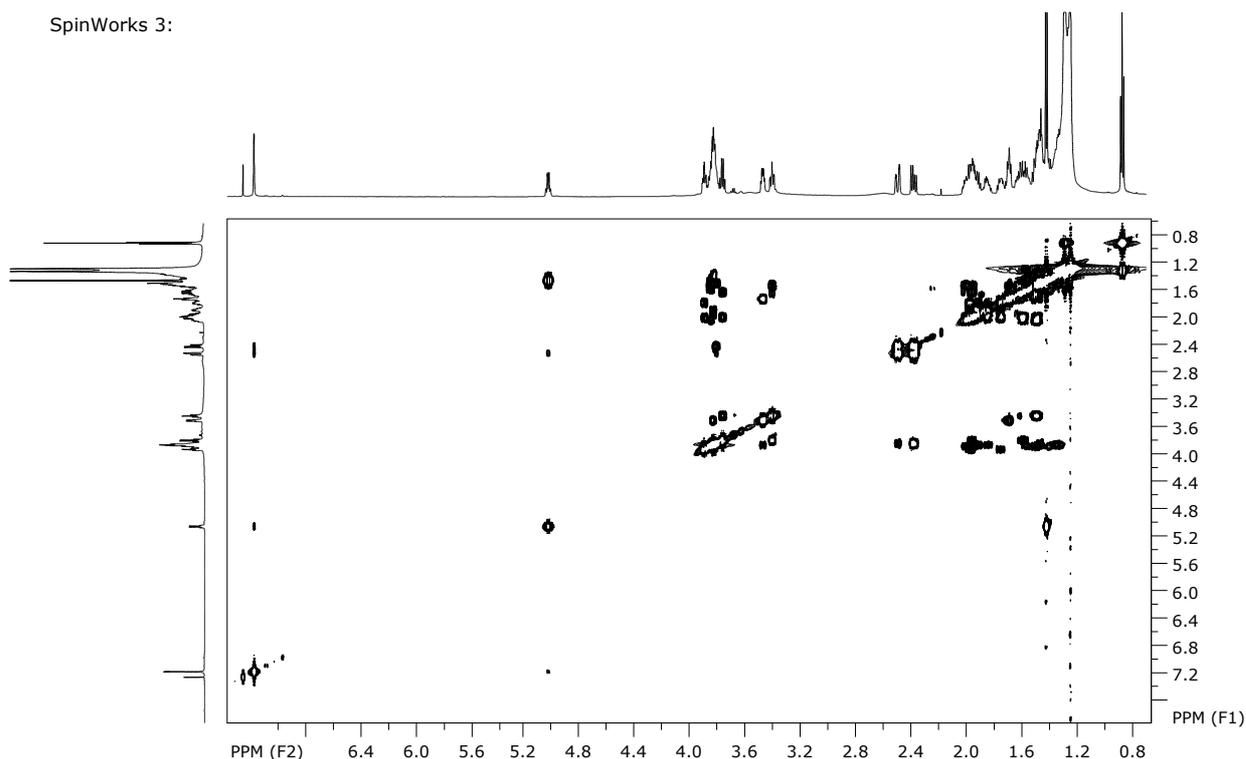


FIGURA 4.72–Espectro de COSY ^1H - ^1H referente à substância **08** (600MHz, CDCl_3).

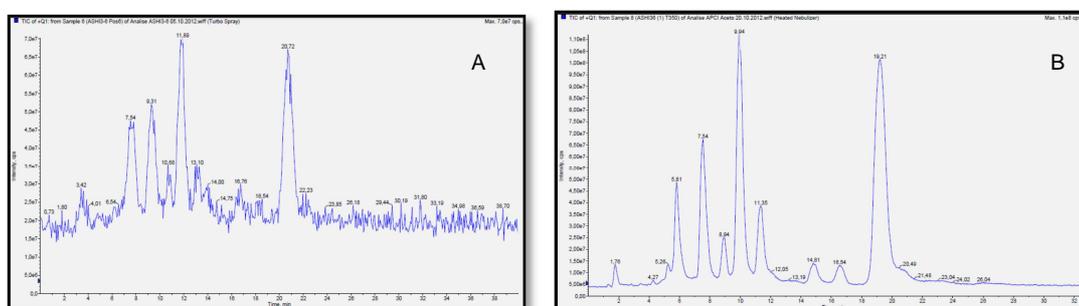


FIGURA 4.73– Espectro de massas obtido no modo *full scan* para a mistura de acetogeninas de *A. sylvatica*. A) Fonte de ionização ESI. B) Fonte de ionização APCI.

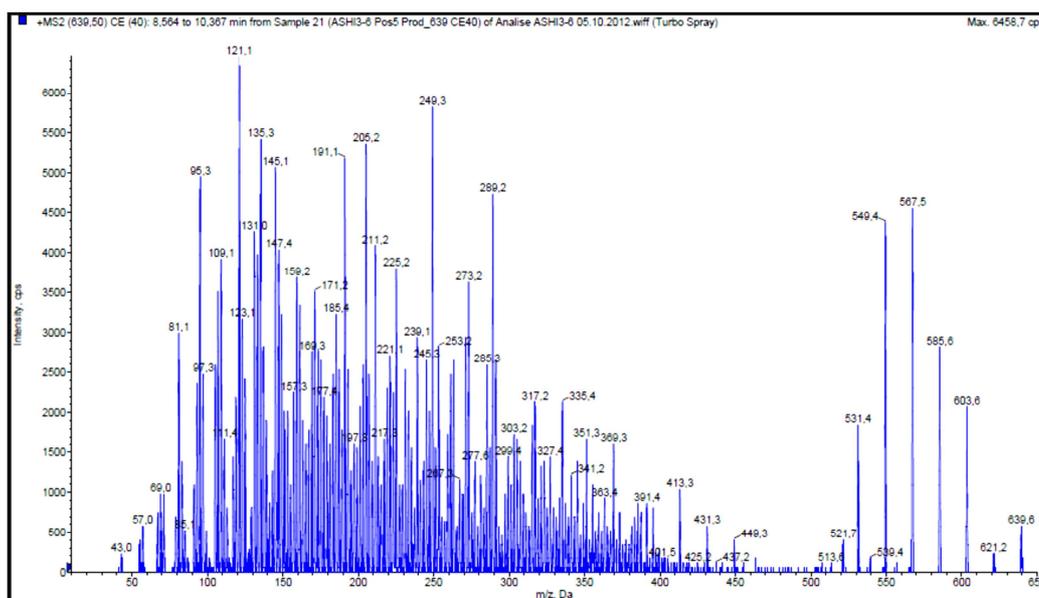


FIGURA 4.74– Espectro de massas por ESI⁺ no modo *product ion* referente à substância **08**.

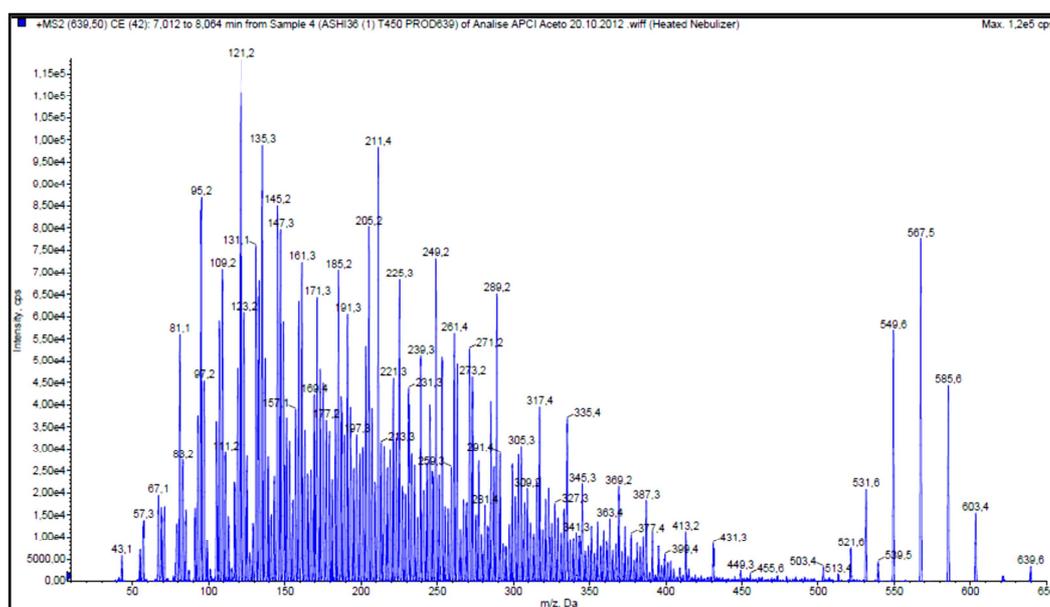
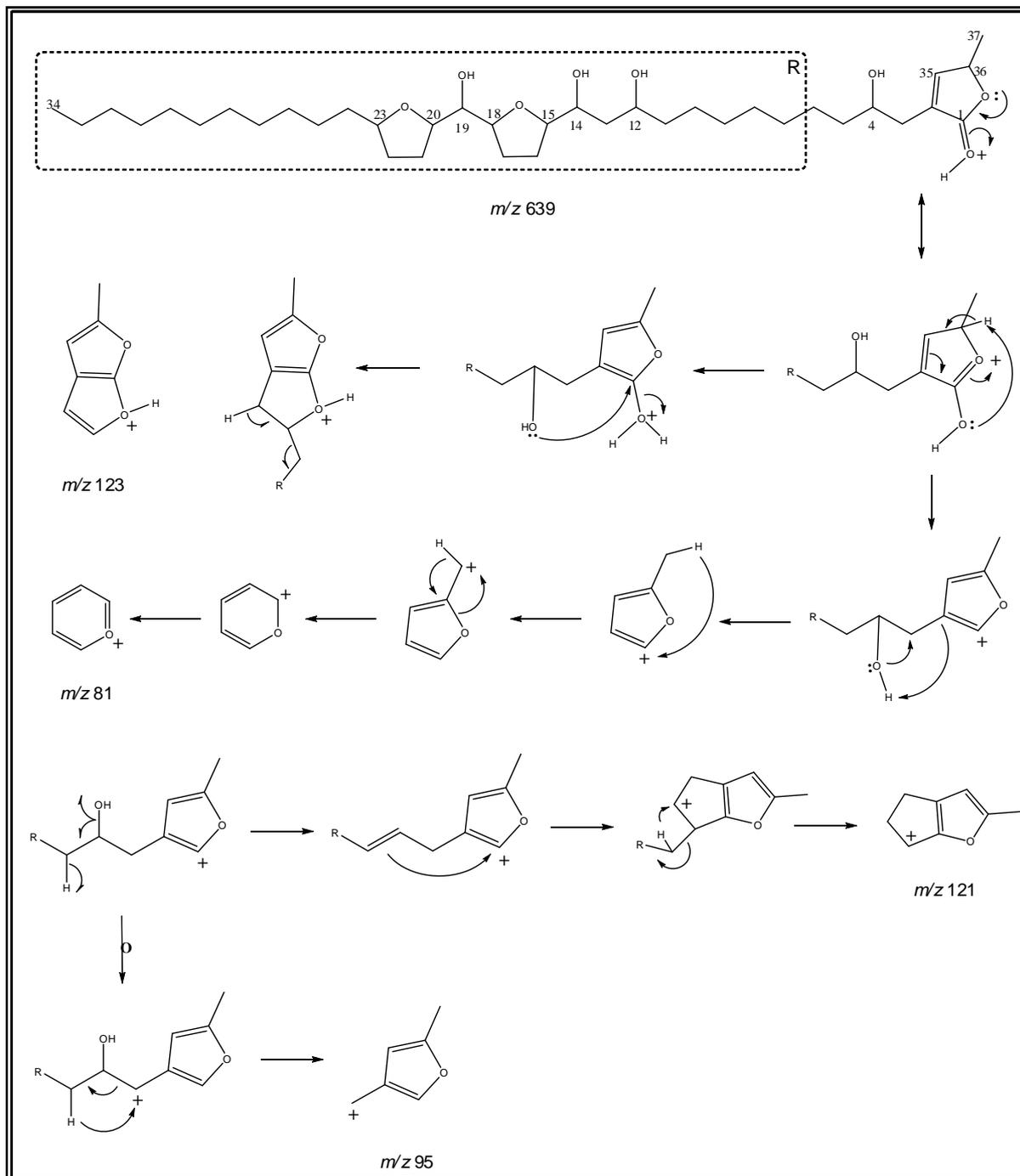
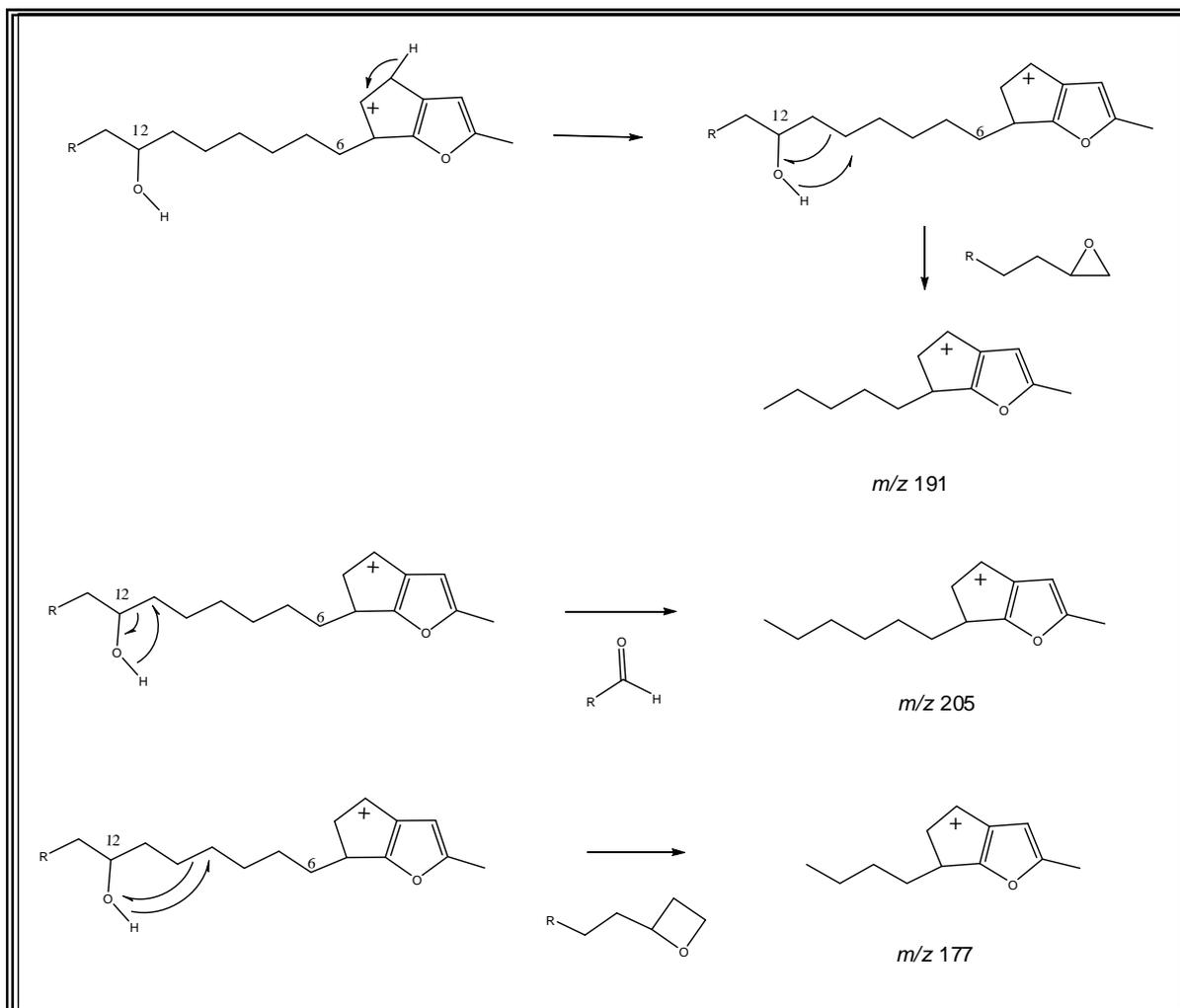


FIGURA 4.75– Espectro de massas por APCI⁺ no modo *product ion* referente à substância **08**.





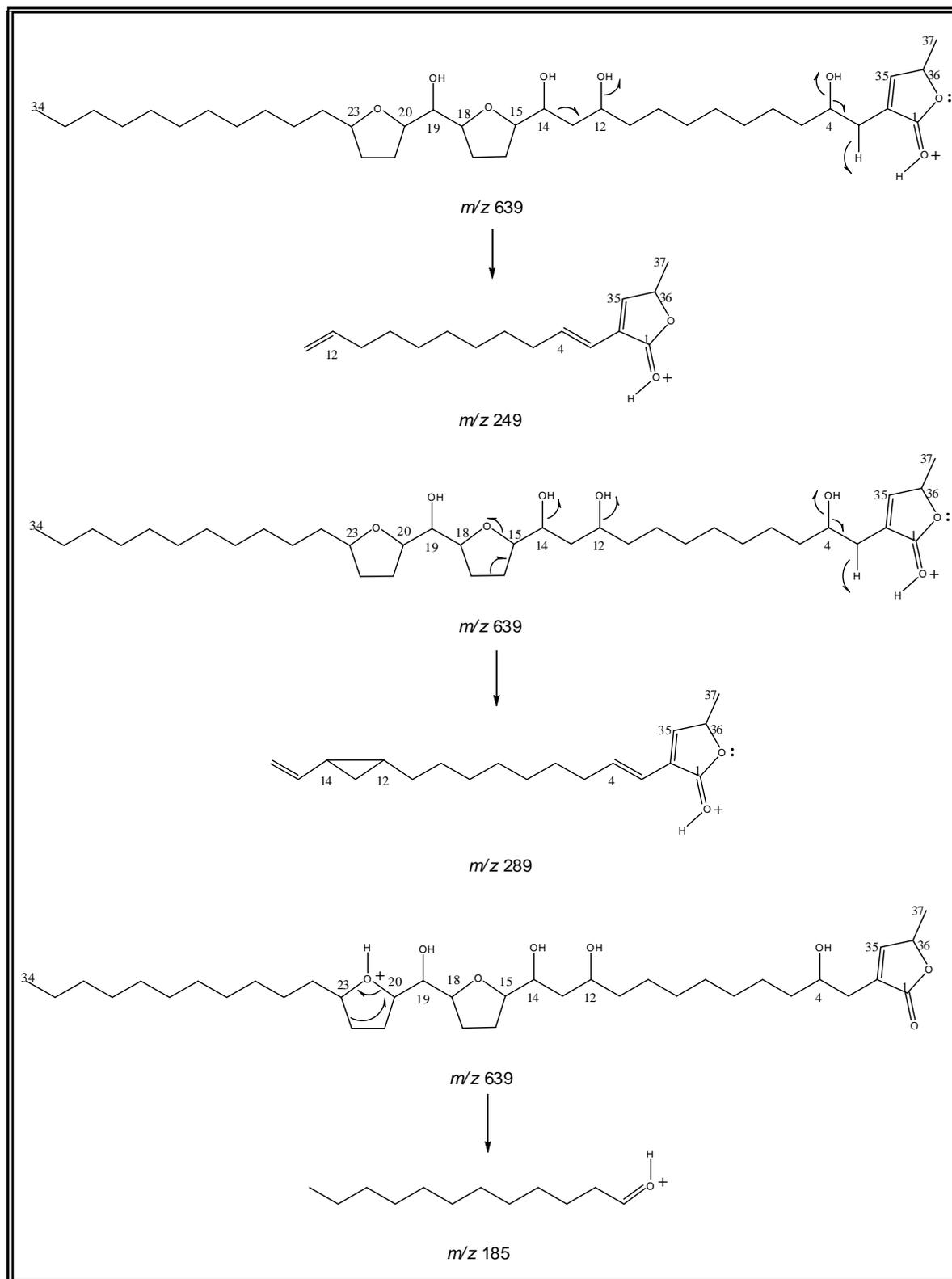
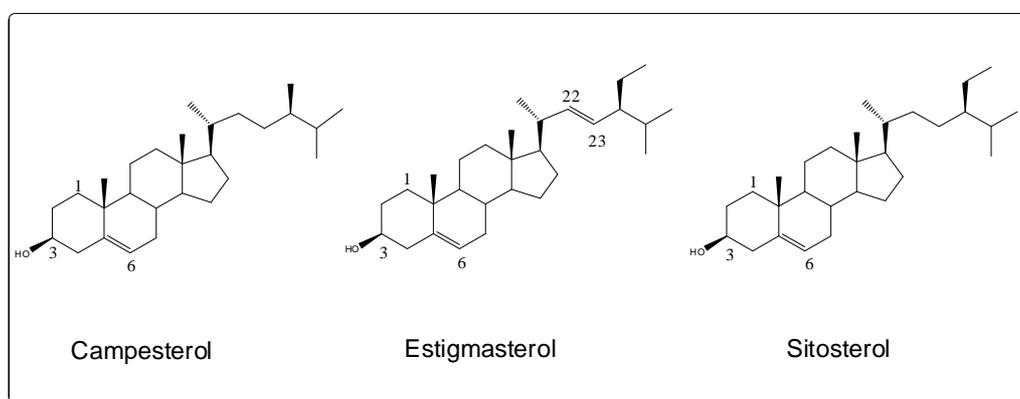


FIGURA 4.76– Proposta de fragmentação para o íon $[M+H]^+$ 639 referente à substância **08**.

4.1.4 – Identificação estrutural de esteroides

4.1.4.1- Identificação estrutural da mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol

Os processos de purificação das frações das sementes de *A. sylvatica* resultaram em uma fração (ASHi 05/03/04) constituída por uma mistura ternária dos esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol, sendo estes identificados a partir das análises dos espectros de RMN ^1H e, principalmente pelos espectros de massas por CG-EM.



A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURAS 4.77 e 4.78), que apresentou sinais na região de núcleo blindado no espectro, referentes aos prótons metílicos, metilênicos e metínicos entre δ_{H} 2,2 a 0,7, indicou a presença do esqueleto esteroidal. A presença de um multiplete em δ_{H} 3,39 indicou os grupos oximetínicos, devido à presença das hidroxilas em C-3, o dubleto em δ_{H} 5,31 ($J = 5,2$ Hz) é referente aos hidrogênios H-6 das duplas ligações presentes nos três compostos e os sinais em δ_{H} 5,07 ($dd, J = 15,2; 8,5$ Hz) e 5,21 ($dd, J = 15,2; 8,5$ Hz) referentes aos hidrogênios da dupla ligação localizada em C-22 e C-23 do estigmasterol, confirmando o sistema vinílico de sua cadeia lateral.

O cromatograma e os espectros de massas por CG-EM (FIGURA 4.79), mostraram a presença das três substâncias em mistura, confirmando os compostos descritos acima através das fragmentações e suas massas moleculares, com base na comparação do banco de dados do próprio programa (*National Institute of Standards and Technology, NIST*). Assim, a primeira banda mostrada foi definida para o composto campesterol, apresentando o pico do íon molecular m/z 400, sendo

a segunda para o composto estigmasterol com m/z 412 e a terceira para sitosterol com m/z 414, diferindo em 2 u.m.a. em relação ao anterior pela ausência dos hidrogênios vinílicos na cadeia lateral.

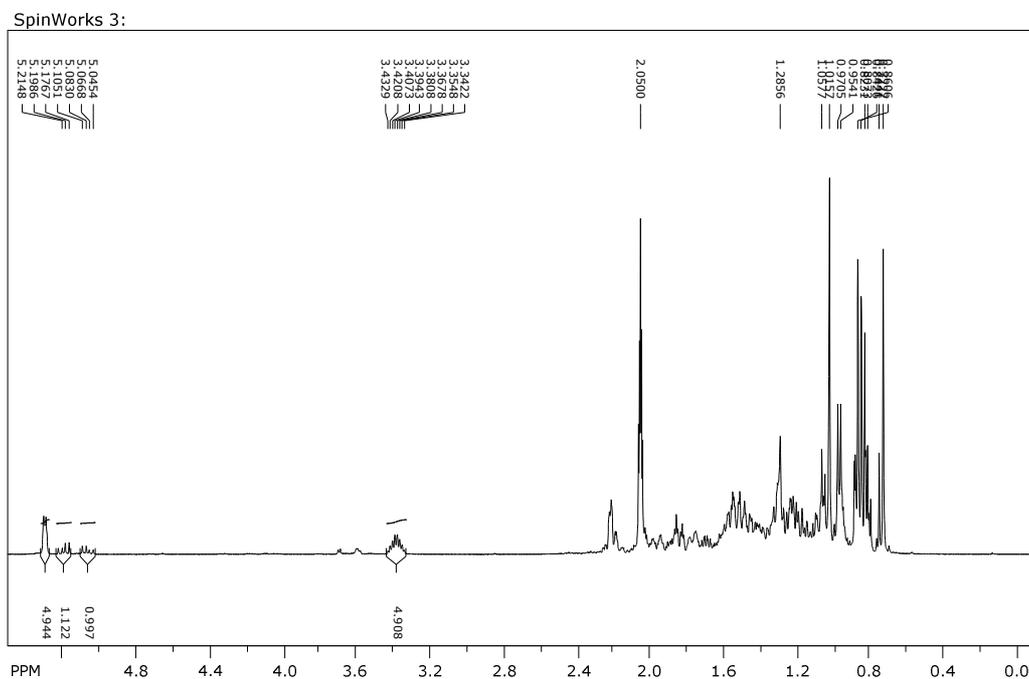


FIGURA 4.77- Espectro de RMN ^1H referente à mistura dos esteroides presentes na fração ASHi05/03/04 (400MHz, acetona- d_6).

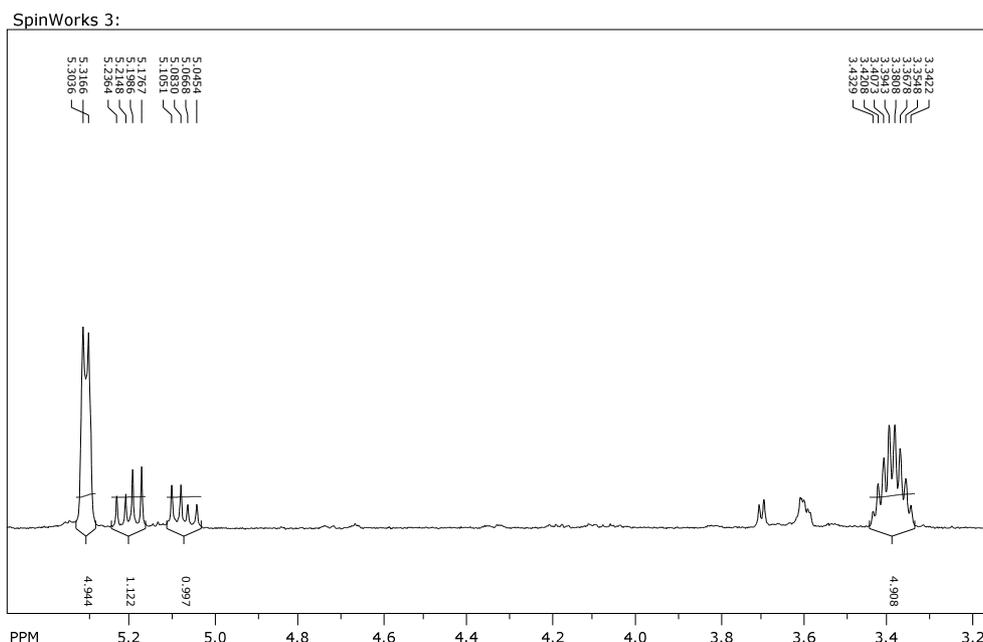


FIGURA 4.78- Ampliações do espectro de RMN ^1H referente à mistura dos esteroides presentes na fração ASHi05/03/04 (400MHz, acetona- d_6).

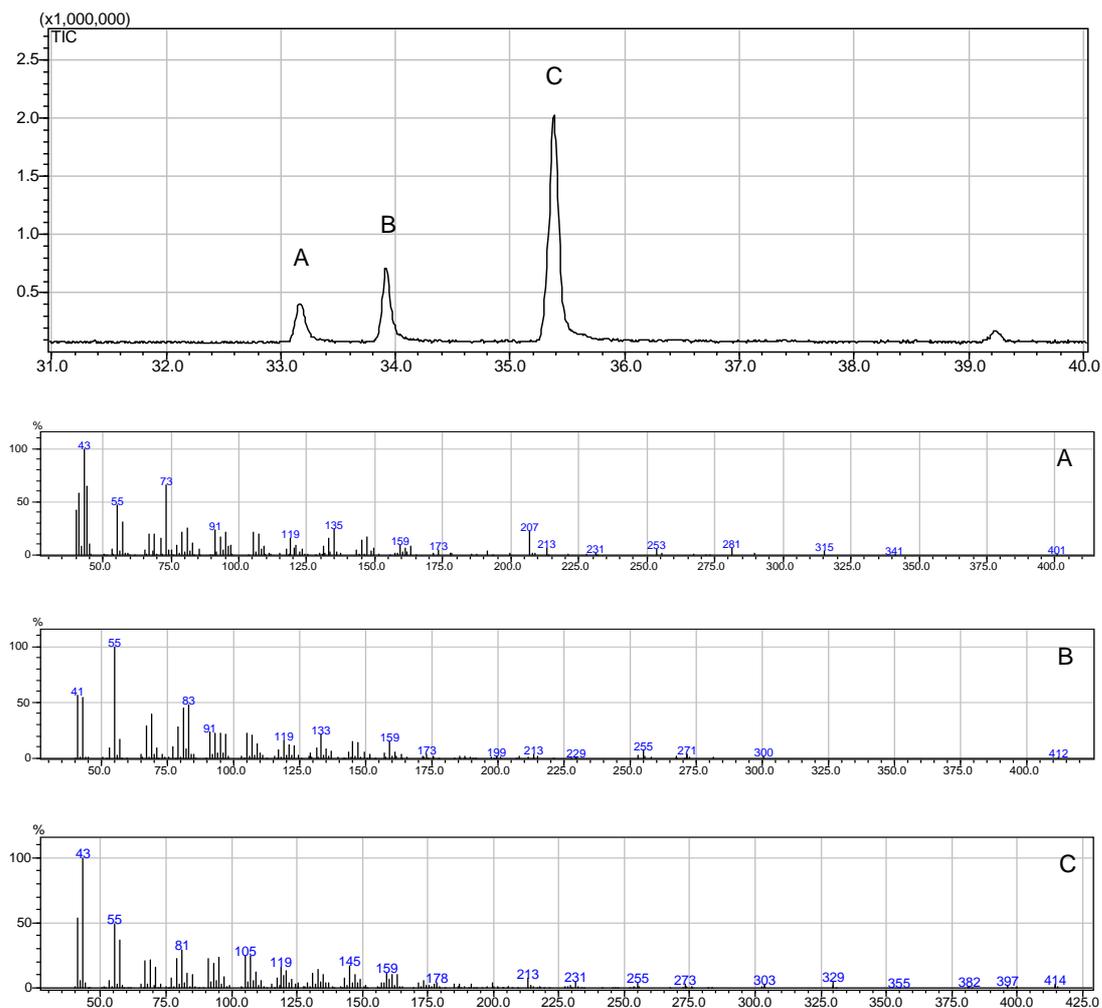


FIGURA 4.79– Cromatograma obtido por CG-EM juntamente com os espectros de massas referentes à primeira banda cromatográfica (A); segunda banda cromatográfica (B) e terceira banda cromatográfica (C).

4.2 – Atividade biológica

4.2.1 – Ensaio inseticidas frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*

4.2.1.1 – Efeito dos extratos brutos de *A. sylvatica*

Os extratos etanólicos das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica* foram enviados ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), na UNESP – Rio Claro, sob os cuidados do Prof. Dr. Odair Correa Bueno, e ensaiados sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*, conforme a metodologia descrita no item 3.4.1. Para análise dos resultados obtidos, são mostradas as curvas de sobrevivência das formigas submetidas ao tratamento por ingestão dos extratos incorporados à dieta, comparando-se com a curva obtida do controle contendo apenas a dieta pura, após um período de 25 dias de experimento. A FIGURA 4.80 e a TABELA 4.15 representam os resultados obtidos.

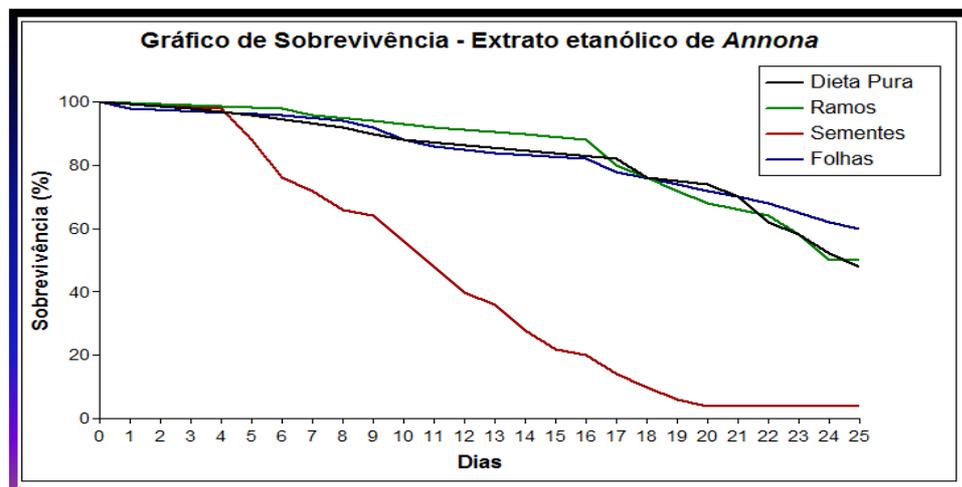


FIGURA 4.80- Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos de *A. sylvatica*.

TABELA 4.15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos de *A. sylvatica*.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	8	12	12	18	30	52	25a
Ramos	0	0	0	2	4	6	10	20	32	50	24a
Sementes	0	0	0	24	34	44	72	86	96	98	11b
Folhas	0	0	0	4	6	12	16	22	30	40	>25a

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

Para este experimento, apenas o extrato etanólico das sementes apresentou um potencial tóxico às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Comparando-se com o controle, houve mortalidade de 50% em 11 dias para este extrato, chegando a 98% de formigas mortas ao final dos 25 dias de experimentos. Os extratos das folhas e ramos apresentaram-se muito semelhantes com o controle da dieta pura, não mostrando atividade significativa.

Com estes resultados, notou-se uma atividade potencial para as sementes de *A. sylvatica*. No entanto, para dar prosseguimento ao trabalho, foram realizadas as partições de todos os extratos obtidos, referentes a cada estrutura vegetal, e ensaiadas para uma nova avaliação da mortalidade.

4.2.1.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*

As frações obtidas a partir de cada extrato etanólico foram enviadas para a avaliação do ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Foram ensaiadas a partições hexânica (AFHe, ARHe e ASHe), diclorometânica (AFD e ARD), em acetato de etila (AFA e ARA) e hidroalcoólicas (AFHi, ARHi e ASHi) das

folhas, ramos e sementes. Os resultados obtidos estão representados nas FIGURAS 4.81 e 4.82 e nas TABELAS 4.16 e 4.17.

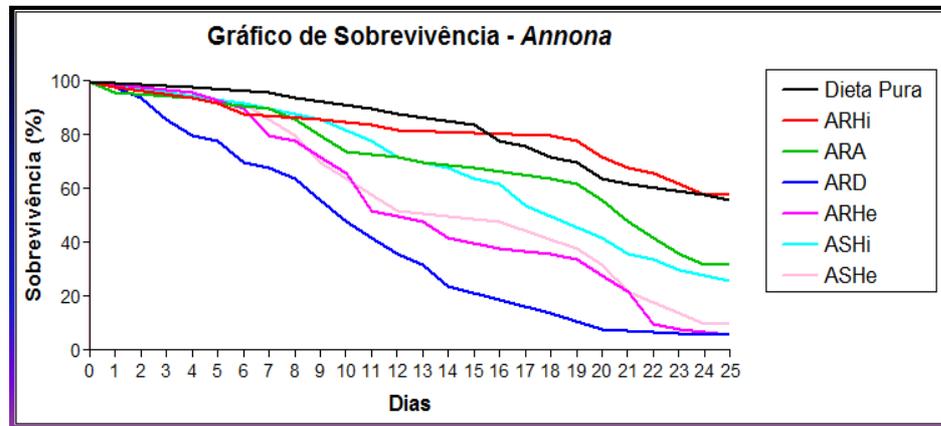


FIGURA 4.81- Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações dos ramos e sementes de *A. sylvatica*.

TABELA 4.16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações dos ramos e sementes de *A. sylvatica*.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	6	6	12	24	38	44	> 25 a
ARHi	2	2	2	12	12	14	18	18	32	42	> 25 a
ARA	4	4	4	8	14	26	30	32	52	68	21 b
ARD	2	6	14	30	36	52	76	76	92	94	10 b
ARHe	0	0	0	10	22	34	58	62	78	94	12 b
ASHi	0	0	4	8	12	14	32	46	64	74	19 b
ASHe	0	2	4	8	20	36	50	52	78	90	15 b

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

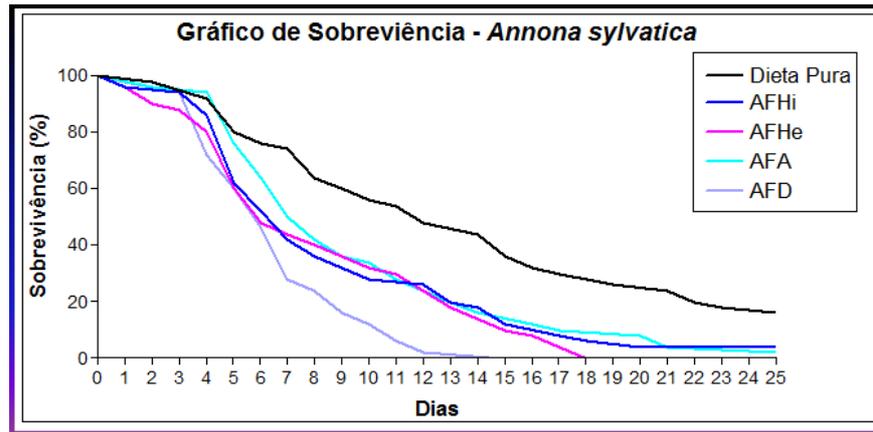


FIGURA 4.82- Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações das folhas de *A. sylvatica*.

TABELA 4.17- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações das folhas de *A. sylvatica*.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	24	36	44	56	70	76	84	12 a
AFHi	4	4	6	48	64	72	82	92	96	96	7 b
AFHe	4	10	12	52	60	68	86	96	100	100	6 b
AFA	0	4	4	36	58	66	84	90	96	98	7,5 b
AFD	2	2	6	54	76	88	98	100	100	100	6 b

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

A partir dos resultados descritos acima, após o fracionamento, a mortalidade antes não vista para ramos e folhas, agora foi verificada nas frações hexânicas (ARHe e AFHe) e diclorometânica (ARD e AFD).

A toxicidade às operárias de *A. sexdens rubropilosa* para frações dos ramos ocasionou a mortalidade de 50% das formigas no 10º dia de experimento para ARD e no 12º dia de experimento para AFHe, chegando a 94% de formigas mortas nos 25 dias de experimento para ambas. Esses resultados indicam que houve uma concentração dos constituintes ativos presentes nos extratos para essas frações, justificando a atividade observada.

Para as frações das folhas, no entanto, todas as frações apresentaram altos índices de atividade acumulada (>96%), mostrando diferenças significativas em relação ao controle, o que indica uma atividade em potencial destas frações frente às operárias. As frações hidroalcoólica (AFHi) e em acetato de etila (AFA), apresentaram mortalidade de 50% das operárias vista no 7º dia de experimento, chegando a 96% e 98% de formigas mortas no final dos 25 dias de experimento para AFHi e AFA respectivamente. Para as frações hexânica (AFHe) e diclorometânica (AFD), porém, essa atividade foi mais acentuada a curto prazo, ocasionando a mortalidade das formigas em 50% no 6º dia de experimento, e chegando a mortalidade total (100%) das operárias após os 25 dias de experimentos para ambas as frações.

Para as frações das sementes de *A. sylvatica*, no entanto, a mortalidade vista nos extratos foi diminuída. A fração hexânica (ASHe) mostrou mortalidade de 50% das operárias no 15º dia, chegando a 90% de formigas mortas no final do experimento. Já a fração hidroalcoólica (ASHi), a mortalidade total observada ao final dos 25 dias de experimentos foi de 74%. Esses dados indicam que pode ter havido sinergismo para a atividade apresentada no extrato, justificando a diminuição da atividade e consequentemente da mortalidade das formigas observada após o ensaio por ingestão com as frações.

Estes resultados, assim como as análises obtidas pelos espectros de RMN ¹H de todas as frações, guiaram o estudo fitoquímico de *A. sylvatica* para o fracionamento das frações ARD e AFD dos ramos e folhas, respectivamente. Porém, devido à baixa quantidade de massa das substâncias isoladas (com exceção das lignanas **01** e **02**, que serão ensaiadas futuramente), estas não foram ensaiadas frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, uma vez que para estes ensaios são necessários 5 mg de cada substância pura.

A fração hidroalcoólica das sementes (ASHi) também foi fracionada apesar do decréscimo da atividade comparada com o extrato. A presença de acetogeninas motivou a continuidade do estudo desta fração, sendo realizados vários processos para purificação destes compostos. As acetogeninas isoladas serão ensaiadas, portanto, logo após a finalização de suas determinações estruturais.

4.2.2 – Atividade fungicida frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus*

4.2.2.1 – Efeito dos extratos brutos de *A. sylvatica*

Os extratos etanólicos das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica* foram submetidos aos ensaios *in vitro* com o fungo simbiote *L. gongylophorus*, realizado no Departamento de Química do Laboratório de Bioensaios da UFSCar sob a supervisão da Dra. Ana Paula Terezan, conforme a metodologia descrita no item 3.4.2. As amostras foram incorporadas ao meio de cultura na concentração final de 1mg/mL e a inibição do crescimento micelial para estes extratos foram avaliadas em um intervalo de 30 dias, mostrados na FIGURA 4.83.

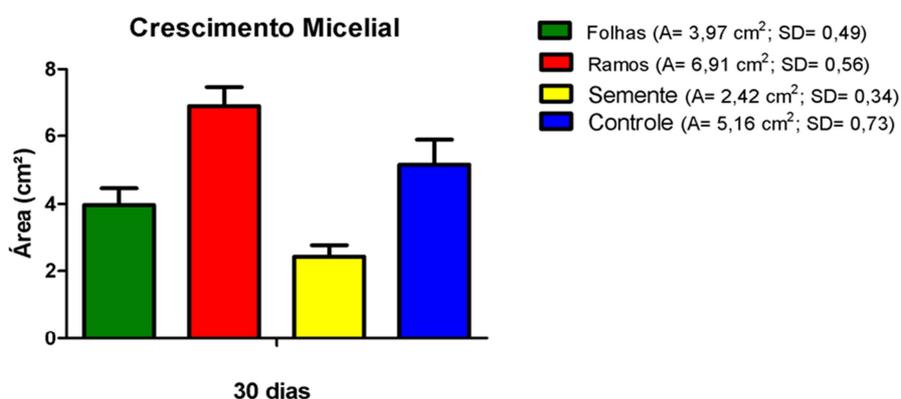


FIGURA 4.83– Efeito dos extratos etanólicos de *A. sylvatica* sobre a inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Dentre os extratos avaliados, o extrato etanólico das sementes foi o mais ativo, inibindo 53% do crescimento micelial. Para o extrato etanólico das folhas, a inibição causada no fungo foi de apenas 23%, e para o extrato etanólico dos ramos não houve inibição, ao invés disso, este extrato estimulou o crescimento do fungo em 34%.

A partir desses resultados, assim como os resultados obtidos no ensaio inseticida frente às formigas cortadeiras, seguiu-se com o particionamento de todos os extratos obtidos para avaliação da atividade fungicida das frações.

4.2.2.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*

As frações obtidas a partir de cada extrato etanólico foram enviadas para a avaliação do ensaio fungicida frente ao *L. gongylophorus*. As amostras a serem ensaiadas foram incorporadas ao meio de cultura na concentração final de 1mg/mL e a inibição do crescimento micelial para estas frações foram avaliadas em um intervalo de 30 dias. Os resultados obtidos estão representados nas FIGURAS 4.84 e 4.85 e 4.86.

FOLHAS

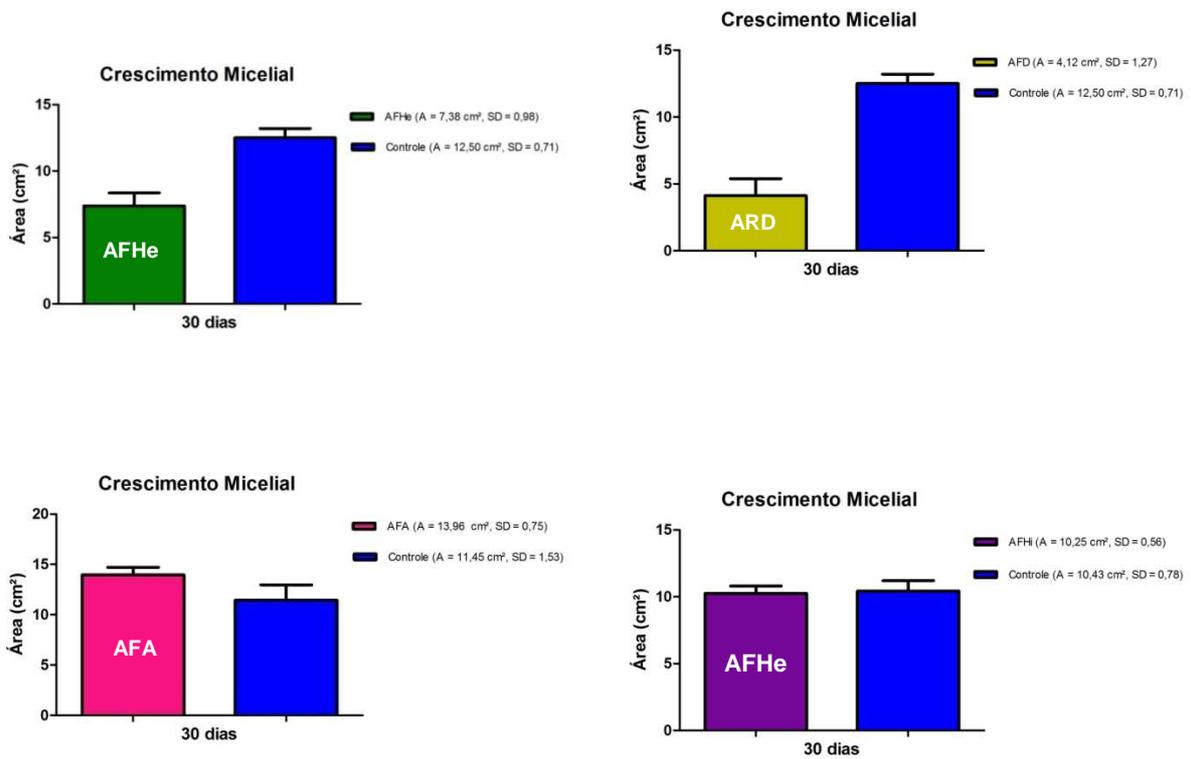


FIGURA 4.84- Efeito das frações hexânica (AFHe), diclorometânica (AFD), em acetato de etila (AFA) e hidroalcoólica (AFHi) das folhas de *A. sylvatica* sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbionte *L. gongylophorus*.

RAMOS

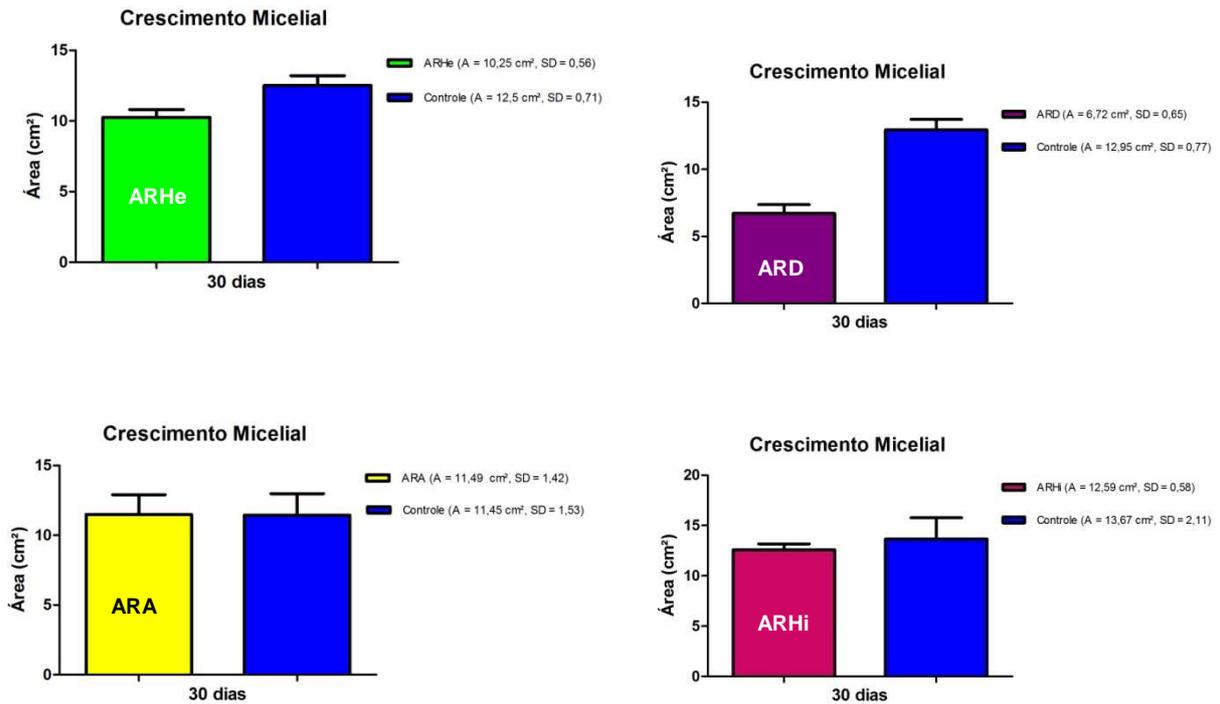


FIGURA 4.85- Efeito das frações hexânica (ARHe), diclorometânica (ARD), em acetato de etila (ARA) e hidroalcoólica (ARHi) dos ramos de *A. sylvatica* sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

SEMENTES

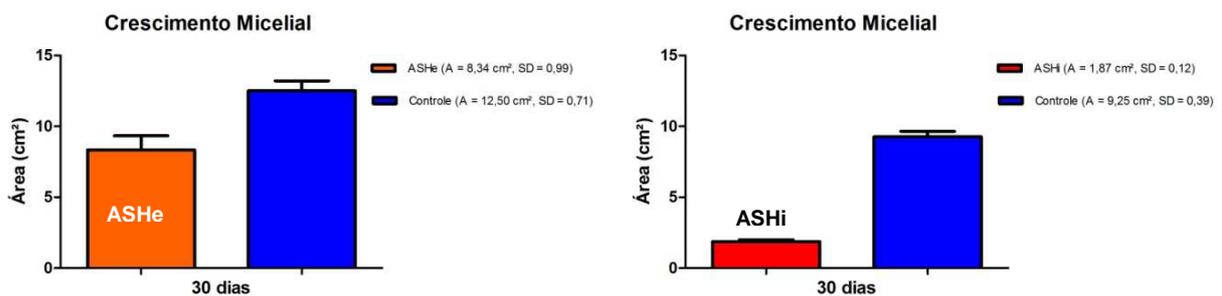


FIGURA 4.86- Efeito das frações hexânica (ASHe) e hidroalcoólica (ASHi) das sementes de *A. sylvatica* sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Analisando os resultados obtidos para as frações dos três extratos etanólicos, pode-se notar que em todas as estruturas vegetais, pelo menos uma das frações obtidas apresentou inibição do crescimento micelial do fungo simbiote. Assim, para as frações das folhas, a fração AFHe apresentou 41% de inibição do crescimento micelial, e para a fração AFD, ocorreu uma inibição de 67%. Para os ramos, a fração ARD foi a mais ativa, apresentando 48% de inibição micelial. Finalmente para as sementes, a fração hidroalcoólica (ASHi) apresentou uma atividade em potencial, ocorrendo inibição micelial de 80%.

Estes resultados mostraram-se muito promissores para a continuidade do estudo, o que indica a associação destas atividades observadas com a presença dos compostos majoritários nestas frações, como lignanas (para frações dos ramos e folhas) e acetogeninas (frações das sementes). Deu-se prosseguimento, então, aos fracionamentos dos grupos AFD, ARD e ASHi.

4.2.2.3 – Efeitos das lignanas obtidas das folhas de *A. sylvatica*

O fracionamento do grupo AFD resultou no isolamento de três lignanas, no entanto, apenas duas foram obtidas em quantidade de massa suficiente para o ensaio fungicida, sendo testadas na concentração de 100 µg/mL. As substâncias magnolina (AFD04/02/05/01) e eudesmina (AFD04/02/05/02) mostraram uma atividade inibitória do crescimento micelial em 27% e 16%, respectivamente (FIGURA 4.87). Estes resultados indicam uma possível associação de todas as lignanas presentes na fração AFD (inclusive as não isoladas) em contribuição para a atividade observada da mesma, havendo um possível efeito sinérgico entre esses compostos.

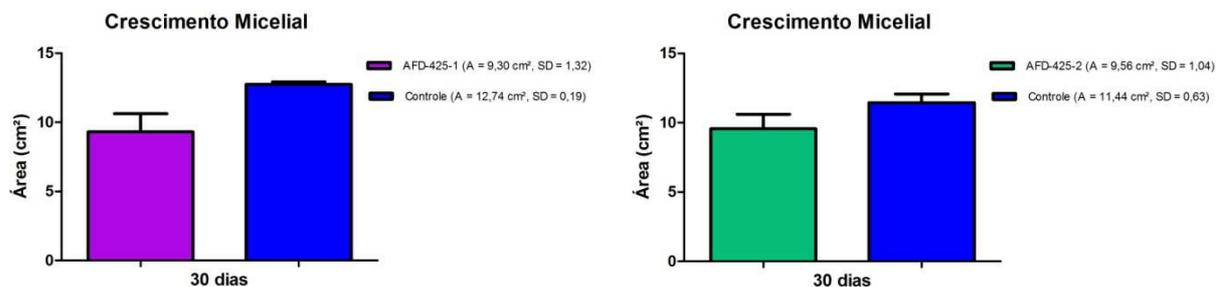


FIGURA 4.87- Efeito das lignanas magnolina (AFD 04/02/05/01, roxo) e eudesmina (AFD 04/02/05/02, verde) isoladas de *A. sylvatica* sobre à inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*.

4.2.3 – Atividade inseticida frente a *S. zmais*

4.2.3.1 – Efeito dos extratos brutos de *A. sylvatica*

Os extratos etanólicos das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica* foram enviados para realização dos ensaios inseticidas frente a *S. zmais*, para o Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” / Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), sendo realizado pelo aluno de doutorado Leandro Prado Ribeiro, sob orientação do Prof. Dr. Djair Vendramim.

Os grãos de milho foram tratados com os extratos na concentração de 1500 ppm, avaliando a mortalidade dos gorgulhos ao final do 10º dia de experimento em relação ao controle. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 4.88 e na TABELA 4.18.

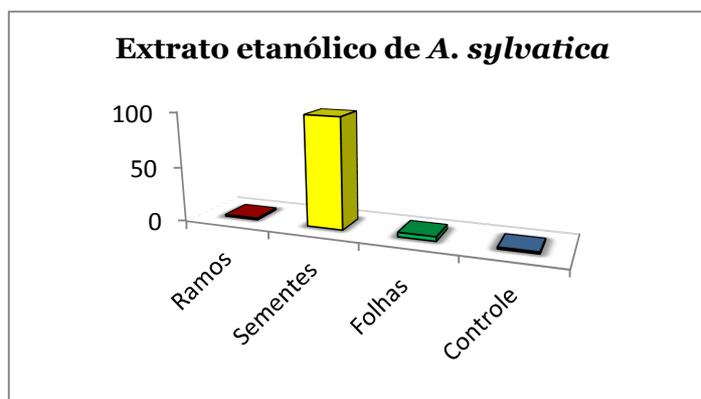


FIGURA 4.88– Mortalidade de *S. zeamais* expostos aos extratos de *A. sylvatica*.

TABELA 4.18– Média de mortalidade de *S. zeamais* ao 10^o dia de experimento após exposição dos extratos de *A. sylvatica*

Extratos etanólicos (1500 ppm)	
Estrutura vegetal	Mortalidade (%)
Folhas	4,00 ± 1,63
Ramos	1,50 ± 1,50
Sementes	100,00 ± 0,00
Controle (Acetona:Metanol 1:1)	1,50 ± 0,76

Para a concentração de 1500 ppm houve mortalidade dos gorgulhos do milho de 100% para o extrato etanólico das sementes, indicando uma atividade inseticida em potencial. Para os extratos das folhas e ramos, no entanto, não foi verificada atividade inseticida.

4.2.3.2 – Efeitos das frações obtidas das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*

Após o particionamento de cada extrato etanólico e obtenção das respectivas frações, as mesmas foram ensaiadas frente a *S. zeamais* (FIGURA 4.89 e TABELA 4.19).

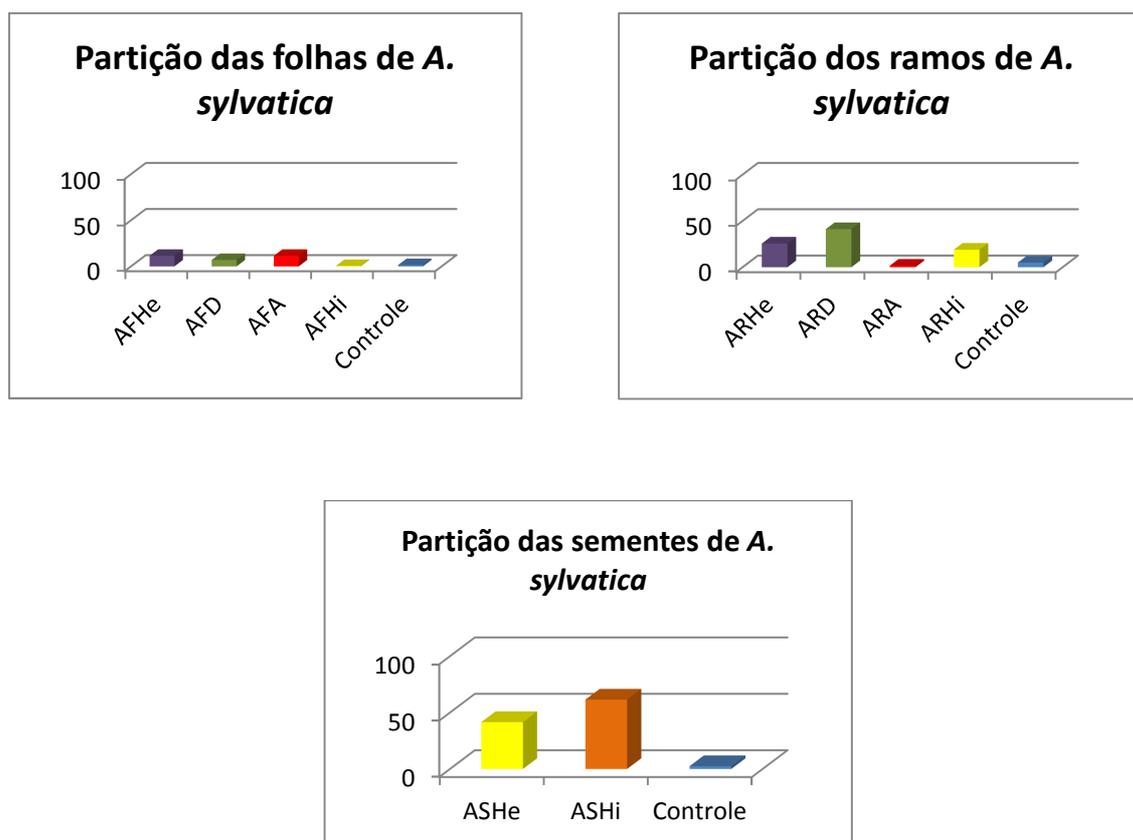


FIGURA 4.89- Mortalidade de *S. zeamais* expostos às frações do extrato etanólico das folhas, ramos e sementes de *A. sylvatica*.

TABELA 4.19- Média de mortalidade de *S. zemais* ao 10º dia de experimento após exposição das frações referentes a cada extrato etanólico de *A. sylvatica*

Folhas (1500 ppm)	Mortalidade (%)	Ramos (1500 ppm)	Mortalidade (%)
AFHe	11,50 ± 2,98	ARHe	25,55 ± 4,96
AFD	7,00 ± 2,38	ARD	41,11 ± 6,97
AFA	11,50 ± 1,83	ARA	1,66 ± 0,79
AFHi	0,50 ± 0,50	ARHi	18,88 ± 5,52
Controle (Acetona:Metanol 1:1)	1,50 ± 0,76	Controle (Acetona:Metanol 1:1)	5,00 ± 1,58

Sementes (560 ppm)	Mortalidade (%)
ASHe	41,50 ± 5,16
ASHi	61,50 ± 4,77
Controle (Acetona:Metanol 1:1)	2,50 ± 0,83

Devido o extrato das sementes ter apresentado atividade (TABELA 4.18 e FIGURA 4.88), foi realizada a determinação letal média (CL50) para o ensaio de suas frações, sendo determinado, portanto, a concentração de 560 ppm. A letalidade foi observada de 61,50% dos gorgulhos para a fração hidroalcoólica (ASHi) e 41,50% para a fração hexânica (ASHe) ao final do 10º dia de experimento, podendo-se inferir que os composto presentes em ambas as frações interagiram sinergicamente para resultar na atividade observada para o extrato bruto.

Para as frações das folhas e ramos, por sua vez, o ensaio foi realizado na concentração de 1500 ppm uma vez que seus extratos de origem não apresentaram atividade. Assim, a fração mais ativa foi a fração diclorometânica dos ramos, apresentando letalidade de 41,11% dos gorgulhos.

O prosseguimento dos fracionamentos da partição hidroalcoólica das sementes forneceu uma fração rica em acetogeninas, e posteriormente as acetogeninas puras, que foram ensaiadas baseadas na determinação letal média (CL50).

4.2.3.3 – Efeitos da fração ASHi 04-04 e das acetogeninas puras de *A. sylvatica*

A fração ASHi 04-04, assim como as substâncias isoladas resultantes desta amostra foram submetidas ao ensaio inseticida frente a *S. zmais*. Para a fração ASHi 04-04, na concentração de 55 ppm ocasionou uma letalidade bastante alta, de 75,84% dos gorgulhos (TABELA 4.20). Este resultado indica a potencial atividade dos compostos presentes nesta fração, que são ricas em acetogeninas.

Após a purificação e obtenção das substâncias puras, porém, observou que apenas uma delas (ASHi 04-04-04) apresentou atividade na concentração de 28 ppm (TABELA 4.21), indicando que a atividade observada para a fração de origem pode ter sofrido efeito de sinergismo. Além disso, estes resultados mostraram-se bastante satisfatórios e estão em concordância, uma vez que a concentração testada foi baixa, indicando também, após a caracterização, que possa haver alguma relação entre estrutura-atividade observada para estas substâncias.

TABELA 4.20- Média de mortalidade de *S. zmais* ao 10^o dia de experimento após exposição da fração ASHi 04-04 de *A. sylvatica*

ASHi 04-04 (55 ppm)	Mortalidade (%)
ASHi 04-04	75,84 ± 4,32
Controle (Acetona)	1,50 ± 0,76

TABELA 4.21- Média de mortalidade de *S. zmais* ao 10^o dia de experimento após exposição das acetogeninas isoladas de *A. sylvatica*

Acetogeninas (28 ppm)	Mortalidade (%)
ASHi 04-04-01	3,50 ± 1,30
ASHi 04-04-02	1,00 ± 1,00
ASHi 04-04-03	5,50 ± 2,16
ASHi 04-04-04	30,50 ± 4,62
Controle (Acetona:Metanol 1:1)	0,50 ± 0,50

5 - CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *A. sylvatica* levou ao isolamento de quatro lignanas, quatro acetogeninas, seis alcaloides, sendo cinco alcaloides presentes em mistura, e três esteroides. No entanto, até o momento foi possível a identificação de quatro lignanas, uma acetogenina, três alcaloides e três esteroides. A elucidação estrutural para a lignana 03, para o alcaloide 07, e para a acetogenina 08, permitiu concluir que as mesmas são inéditas na literatura, sendo que alguns experimentos serão realizados para essa confirmação, principalmente a obtenção de um espectro de massas de alta resolução, realização da medida de rotação óptica específica (α_D) e dicroísmo circular. Esses resultados contribuem significativamente para o perfil químico desta espécie, uma vez que há apenas dois trabalhos descritos na literatura para o isolamento e identificação de seus constituintes.

A técnica de HPLC-NMR mostrou-se uma ferramenta eficiente e prática na separação de misturas de acetogeninas, além de ser uma técnica rápida, que necessita de baixa quantidade de amostra e reduzido gasto de solventes. Tais vantagens citadas permitem concluir que esta ferramenta é muito valiosa para o estudo fitoquímico de determinado material vegetal em que se disponibilize de pouca quantidade de material de partida, além de evitar os gastos com os solventes empregados nos inúmeros fracionamentos necessários para separação e identificação das substâncias presentes em mistura, fornecendo novas perspectivas de trabalho para os estudos fitoquímicos futuros.

Os ensaios biológicos realizados com as diferentes estruturas vegetais de *A. sylvatica* forneceram resultados muito satisfatórios quando se visa à busca por compostos naturais que forneçam novas perspectivas no desenvolvimento de inseticidas naturais, específicos ao alvo escolhido, menos prejudiciais ao meio ambiente e aos mamíferos. Assim, os extratos das sementes de *A. sylvatica*, e sua fração hidroalcoólica (ASHi) foram os mais ativos frente aos três bioensaios relatados neste trabalho, dando-se destaque para o ensaio do extrato etanólico das sementes frente a *S. zernisi*, que ocasionou mortalidade total dos gorgulhos. Para as folhas e ramos, destacam-se as frações ARD mostrando potencial tóxico para os três bioensaios relatados, e as frações AFD e AFHe, apresentando atividade frente às formigas cortadeiras e ao seu fungo simbionte. As lignanas magnolina e

eudesmina, isoladas em maior quantidade da fração AFD foram ensaiadas frente ao fungo simbiote e mostraram uma pequena inibição do crescimento micelial do mesmo, indicando um possível efeito sinérgico entre os compostos presentes de sua fração original.

O processo de purificação da fração ASHi resultou em acetogeninas que foram ensaiadas frente *S. zeamais*, sendo que, somente uma mostrou potencial tóxico promissor ao mesmo. Esse resultado indica que pode ter havido, também, um efeito de sinérgico justificando as atividades bastantes significativas observadas em seu extrato e frações de origem. A conclusão na determinação estrutural do restante das substâncias indicará se há relação entre estrutura-atividade desses compostos para o efeito da atividade. Conseqüentemente, em termos de preservação do meio ambiente, tema muito abordado atualmente a nível mundial, aliado ao manejo integrado de pragas, o estudo desta classe de compostos torna-se muito promissor como um método alternativo de controle biológico por produtos naturais, já que a utilização de produtos sintéticos inseticidas deverá ser quase que totalmente banidos no futuro.

Para as acetogeninas isoladas da mesma fração que a substância 08, que estão em fase de determinação/elucidação estrutural devido à alta complexidade estrutural destes compostos, aliado ao fator tempo, há grandes chances de serem também inéditas na literatura, uma vez que seus espectros de massas realizados por ESI e APCI mostraram fragmentos muito parecidos, indicando a possibilidade de se tratar de estereoisômeros.

Uma análise mais cuidadosa de todas as acetogeninas presentes nesta fração, incluindo as que estão presentes em menor quantidade na amostra, será de extrema importância para fins de publicações, principalmente por ter se utilizado de técnicas como HPLC-NMR e HPLC-MS por se tratar de experimentos sensíveis, de alta tecnologia, que requerem baixa quantidade de amostra, permitem análises rápidas para a separação e identificação simultaneamente dos compostos presentes, e que requerem menor quantidade de solventes utilizados (o que contribuem para a preservação ambiental muito questionada nos atuais dias).

Comparando-se as fontes de ionização por ESI e APCI, a utilização de ambas permitiu boa ionização dos compostos majoritários presentes na amostra. No

entanto, para as acetogeninas minoritárias presentes na mesma fração, apenas a fonte de ionização por APCI permitiu uma melhor ionização dos mesmos. Esta observação pode ser explicada (uma vez que para a realização do experimento HPLC-MS/MS foi utilizado as mesmas concentrações da amostra quando empregado as duas fontes de ionização) devido a fonte de ionização por APCI ser mais adequada para compostos de baixa polaridade. Assim, devido as características da longa cadeia alquílica destes compostos, a fonte por APCI mostrou-se mais sensível em termos de ionização de todos os compostos presentes na mistura, comprovando uma melhor eficiência desta fonte para os compostos desse gênero.

Este trabalho também possibilitou adquirir valiosos conhecimentos, importantes para a formação acadêmica, sobre as várias técnicas cromatográficas utilizadas durante o isolamento e purificação dos compostos ao longo do curso, além de oferecer um desafio e aprendizado nas determinações estruturais, principalmente de acetogeninas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.A.; MAHMOUD, A.A.; ALI, E.T.; TZAKOU, O.; COULADS, M.; MABRY, T.J.; GÁTI, T.; TÓTH, G. "Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*". *Phytochemistry*. **59**: 851-856, 2012.

ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; MACLAUGHLIN, J.L. "Annonaceous acetogenins: recent progress." *J. Nat. Prod.* **62**: 504-540, 1999.

ALMEIDA, F.A.C.; GOLDFARB, A.C.; GOUVEIA, J.P.G. "Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus spp*". *Rev. Bras. Prod. Agroind.* **1**: 13-20, 1999.

ALMEIDA, R.N.A.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. & 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.

ALVES, R.E.; FILGUIERAS, H.A.C.; MOURA, C.F.H. Org. "Caracterização de frutas nativas da América Latina." *Jaboticabal: UNESP/SBF*, 2000.

ANJOS, N.; ARNHOLD, A.; CORRÊA, G.V.V.; STUMPF, K. "Árvores e formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) em Viçosa, Minas Gerais. *Rev. Trópica, Ciên. Agr. Biol.*, **2**: 11-16, 2008.

ARAYA, H. "Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds." *Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci.* **23**: 77-149, 2004.

ARAÚJO, M.S.; LÚCIA, T.M.C.D. & SOUZA, D.J. "Estratégias alternativas de controle de formigas cortadeiras". *Bahia Agric.*, **6**: 71-74, 2003.

ASAWALAM, E.F.; EMOSAIRUE, S.O.; HASSANALI, A. "Contribution of different constituents to the toxicity of the essential oil constituents of *Vernonia amygdalina* (Compositae) and *Xylopiya aetiopica* (Annonaceae) on maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)". *Afr. J. Biotechnol.* **7**: 2957-2962, 2008.

BACCI, JR. M.; SIQUEIRA, C.G.; 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*". *Appl. Environ. Microb.* **64**: 4820-4822, 1998.

BERMEJO, A.; FIGADÉRE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. "Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action." *Nat. Prod. Rep.* **22**: 269-303, 2005.

BOARETTO, M.A. & FORTI, M.C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". *Série Técnica, IPEF* **11**: 31-46, 1997.

- BOTTON, M.; LORINI, I.; LOECK, A.E.; AFONSO, A.P.S. O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado. *Circular Técnica – Embrapa, Bento Gonçalves – RS*, 2005.
- BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. "Insecticidal and antifungal chemical produced by plants: a review". *Environ. Chem. Lett.* **10**: 325-347, 2012.
- BUENO, O.C.; BERALDO, M.J.A.H.; SILVA, O.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B. & VIEIRA, P.C. "Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus". In: Meer, R.K.V.; Jaffe, K. and Cedeno, A. *Applied Myrmecology, A World Perspective*. Westview Press, 1989.
- 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 dietas artificiais". *An. Soc. Entomol. Bras.* **26**: 107-113, 1997.
- CASTILHO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M.A. "Secondary metabolites of the Annonaceae Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects." *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* **12**: 445-462, 2010.
- COITINHO, R.L.B.C.; OLIVEIRA, J.B.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A.G. "Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. Em milho armazenado". *Caatinga (Mossoró, Brasil)* **19**: 183-191, 2006.
- COITINHO, R.L.B.C.; OLIVEIRA, J.B.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A.G. "Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae)". *Ciênc. Agrotec.* **35**: 172-178, 2011.
- COLMAN-SAZARBITORIA, T.; GU, Z.M.; ZHAO, G.X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J.F.; MCLAUGHLIN, J.L. "Venezenin: a new bioactive annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopiá aromática*." *J. Nat Prod.* **58**: 532-539, 1995.
- COLOM, O.A.; NESKE, A.; CHAHBOUNE, N.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARDÓN, A. "Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona Montana*, as potent inhibitor of mitochondrial complex I." *Chem. Biodivers.* **6**: 335-340, 2009.
- CORTES, D.; MYINT, S.H.; DUPONT, B.; DAVOUST, D. "Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*". *Phytochemistry*, **32**: 1475-1482, 1993.
- DANHO, M.; GASPAR, C.; HAUBRUGE, E. "The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *J. Stored Prod. Res.* **38**: 259-266, 2002.
- DELLA LUCIA, T.M.C. e VILELA, E.F. "Métodos atuais de controle e perspectivas". IN: *As formigas cortadeiras*. DELLA LUCIA, T.M.C. Ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p 163-176, 1993.

- DEWICK, P.M. "Medicinal Natural Products. "A Biosynthetic Approach". Wiley, 2ª Ed., 2002.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. "Plantas medicinais na Amazônica e na mata atlântica". Ed. UNESP, 2ª Ed. 89-109, 2002.
- DUTRA, L.M.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; VENDRAMIN, M.E.; BARISON, A.; PRATA, A.P.N. "Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae)". *Biochem. Syst. Ecol.* **41**: 115-118, 2012.
- ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. "Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*" *Pesq. Agropec. Bras.* **41**: 217-222, 2006.
- FECHINE, IM.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; BARBOSA FILHO, J.M.; AGRA, M.F. "Alcalóides isolados *Hornschuchia obliqua* (Annonaceae)". *Rev. Bras. Farmacog.* **12**: 121-122, 2002.
- FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; 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 rubropilosa* e seu fungo simbionte". *Quím. Nova*, **25**: 1091-1095, 2002.
- FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; CORREA, A.G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. "O futuro dos produtos naturais no controle de formigas". *Biológico*, São Paulo, **69**: 221-224, 2007.
- FIELDS, P.G. "Diatomaceous earth: Advantages and limitations". Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection – Volume 1- Agriculture and AgricFood Canadá, p 781-784, 1998.
- FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; TRUGO, L.C.; KAPLAN, M.A.C.; & KRUL, W.R. "Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. – Annonaceae". *Plant. Cell.* **56**: 121-124, 1999.
- FONTES, L.S.; FILHO, A.J.A.; ATHUR, V. "Danos causados por *Sitophilus oryzae* (LINNÉ, 1763) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) em cultivares de arroz (*Oriza sativa* L.)". *Arq. Inst. Biol.* **70**: 303-307, 2003.
- FORMAGIO, A.S.N.; VIEIRA, M.C.; SANTOS, L.A.C.; CARDOSO, C.A.L.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; ANDRADE-SILVA, M.; KASSUYA, C.A.L. "Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St. Hill". *J. Med. Food.* **16**: 20-25, 2013.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. *Manual de Entomologia Agrícola*. 2ª ed., São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, p 659, 2002.
- IIDA, T.; NAKANO, M.; ITO, K. "Hidroperoxisquiterpene and lignan constituents of *Magnolia kobus*". *Phytochemistry.* **21**: 673-675, 1982.

- ILHA, C.; LUTINSKY, J.A.; PEREIRA, D.V.M.; GARCIA, F.R.M. "Riqueza de formigas (Hymenoptera: Formicidae) da Bacia Sanga Caramuru, município de Chapecó- SC". *Biotemas*, **22**: 95-105, 2009.
- JACCOUD, D'A.B. "Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas". Ed. IBAMA, p 56, 2000.
- KIM, G.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.E.; MCLAUGHLIN, J.L.; SASTRODIHARDJO, S. "Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*." *J. Nat. Prod.* **61**: 432-436, 1998.
- LIMA, L.A.R.S.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. "Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity." *Food Chem.* **122**: 1129-1138, 2010.
- LOBÃO, A.Q. & MELLO-SILVA, R. "*Guatteria* (Annonaceae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil." *Rodriguésia*. **58**: 859-884, 2007.
- LORINI, I.; KRZYZANOWSKY, F.C.; NETO, J.B.F.; HENNING, A.A. "Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento – Série Sementes". *Circular Técnica*, Embrapa, Londrina – PR, 2010.
- MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. "Bioactive lignans from a cultivar of *Helianthus annuus*". *J. Agric. Food. Chem.* **52**: 6443-6447, 2004.
- MARINHO, C.G.S.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; PICANÇO, M.C. "Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras". *Bahia Agríc.* **7**: 18-21, 2006.
- MARSARO JÚNIOR, A.L.; LAZZARI, S.M.N.; KADOZAWA, P.; HIROOKA, E.Y.; GERAGE, A.C. "Avaliação da resistência de híbridos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no grão armazenado". *Semina: Ciênc. Agr., Londrina.* **26**: 173-178, 2005.
- MIKOLAJCZAK, K.J.; MADRIGAL, R.V.; RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; LIU, Y.M.; SMITH, D.L.; MCLAUGHLIN, J.L. "Sylvaticin: a new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae)". *Experientia.* **46**: 324-327, 1990.
- MIYASHIRA, C.H. Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – USP. 2007.
- MIYAZAWA, M.; ISHIKAWA, Y.; KASAHARA, H.; YAMANAKA, J.; KAMEOKA, H. "Na insect growth inhibitory lignin from flower buds of *Magnolia fargesii*". *Phytochemistry.* **35**: 611-613, 1994.
- MOSCA, J.L.; CAVALCANTE, C.E.B.; DANTAS, T.M. "Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação." *Embrapa Agroindústria Tropical*, Fortaleza, CE, 2006.

- NUNES, C.R.; BERNARDES, N.R.; GLÓRIA, L.L.; OLIVEIRA, D.B. "Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas". *Vértices, Campos dos Goytacazes/RJ*. **14**: 39-57, 2012.
- OLIVEIRA, H.G.; LACERDA, F.G.; MARINHO, C.G.S.; DELLA-LÚCIA, T.M.C. Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyreoxena arnobia*. *Pesq. Agropec. Bras.*, **39**: 285-287, 2004.
- PAIXÃO, M.F.; AHRENS, D.C.; BIANCO, R.; OHLSON, O.C.; SKORA NETO, F.; SILVA, F.A.; CAIEIRO, J.T.; NAZARENO, N.R.X. "Controle alternativo do gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais*, em armazenamento com subprodutos do processamento do xisto, no Paraná, Brasil". *Rev. Bras. Agroecol.* **4**: 67-75, 2009.
- PICANÇO, M.C. "Apostila de Entomologia Agrícola – Manejo Integrado das formigas cortadeiras, (LIMA, C.A)". Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Biologia Animal, Setor de Entomologia, p 281-287, 2010.
- PIMENTA, L.P.S.; NASCIMENTO, F.C.; ASSUNÇÃO, A.C.S.; OLIVEIRA, A.B.; BOAVENTURA, M.A.D. "Laurifolin, a novel acetogenin from *Rollinia laurifolia* leaves". *Tetra. Letters.* **42**: 8488-8434, 2001.
- POTENZA, M.R.; ARTHUR, V.; FELICIO, J.D.; ROSSI, M.H.; SAKITA, M.N.; SILVESTRE, D.F.; GOMES, D.H.P. "Efeito de produtos naturais irradiados sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)". *Arq. Inst. Biol.* **71**: 477-484, 2004.
- REIS FILHO, W.; IEDE, E.T.; NICKELE, M.A.; CALDATO, M.; FERREIRA, A.C. "Reconhecimento dos danos causados por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em plantios iniciais de *Pinus taeda* no Sul do Brasil". *Comunicado Técnico 189 – Embrapa*, p 1-4, 2007.
- RIBEIRO, L.P. "Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)". Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- RICHARD, F.J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. "Digestive capacities of leafcutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material". *J. Comp. Physiol. B*, **175**: 297–303, 2005.
- RICHARDSON, J.E.; CHATROU, L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J.; PIRIE, M.D. "Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae." *Phil. Trans. R. Soc.* **359**: 1495-1508, 2004.
- RUPPRECHET, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. "Annonaceous acetogenins: a review." *J. Nat. Prod.* **53**: 237-278, 1990.
- SANTOS, A.K.; FARONI, L.R.D.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, J.P.; ROZAZDO, A.F. "Nível de dano econômico de *Sitophilus zeamais* (M.) em trigo armazenado". *Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.* **6**: 273-279, 2002.

- SANTOS, L.A.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. "Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cornifolia* A. St. – Hill". *Rev. Bras. Panta. Med.* **9**: 48-51, 2007.
- SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. "Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach". *Quím. Nova.* **21**: 557-559, 1998.
- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". *J. Insect Physiol.*, **49**: 307-313, 2003.
- SILVA, M.L.A.; MARTINS, C.H.G.; LUCARINI, R.; SATO, D.N.; PAVAN, F.R.; FREITAS, N.H.A.; ANDRADE, L.N.; PEREIRA, A.C.; BIANCO, T.N.C.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHA, W.R.; BASTOS, J.K.; SILVA, R.; SILVA FILHO, A.A. "Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic lignans". *Z. Naturforsch.* **64c**: 779-784, 2009.
- SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; QUEIROGA, K.F.; AGRA, M.F.; FILHO, J.M.B.; ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, S.A.S. "Alcalóides e outros constituintes de *Xylopija langsdorffiana* (Annonaceae)". *Quím. Nova.* **32**: 1566-1570, 2009.
- SMIDERLE, O.J. & CICERO, S.M. "Tratamento inseticida e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento". *Scientia Agric.* **56**: 1245-1254, 1999.
- SUTHISUT, D.; FIELDS, P.G.; CHNDRAPATYA, A. "Contact toxicity, feeding reduction, and repellency of essential oils from three plants from the Ginger family (Zingiberaceae) and their major components against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*". *J. Econ. Entomol.* **104**: 1445-1454, 2011.
- TANTISEWIE, B.; PHARADAI, T.; PANDHUGANONT, M.; GUINAUDEAU, H.; FREYERA, A.; SHAMMA, M. "(+)-N-formyl-nornantenine, a new aporphine alkaloid from *Cyclea atjehensis*." *J. Nat. Prod.* **52**: 652-654, 1989.
- TULAKE, A.; JIANG, Y.; TU, P. "Nine lignans from *Artemisia absinthium* L.". *J. Chin. Pharm. Sci.* **21**: 360-364, 2012.
- UKEH, D.A.; WOODCOCK, C.M.; PICKETT, J.A.; BIRKETT, M.A. "Identification of Host Kairomones from Maize, *Zea mays*, for the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais*". *J. Chem. Ecol.* **38**: 1402-1409, 2012.
- VEGA, M.R.G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I.J.C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. "Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II". *J. Braz. Chem. Soc.* **18**: 1554-1559, 2007.
- WEBER, N. A. "Gardening ants: the Attines". *Mem. Am. Philos. Soc.*, **92**: 1-146, 1972.
- WU, C.C.; WU, C.L.; HUANG, S.L.; CHANG, H.T. "Antifungal activity of liriodenine from *Michelia formosana* heartwood against wood-rotting fungi." *Wood Sci. Technol.* **46**: 737-747, 2012.

ZENG, L.; Ye, Q.; OBERLIES, N.H.; SHI, G.; GU, Z.M.; He, K.; MCLAUGHLIN, J.L.
“Recent advances in annonaceous acetogenins.” *Nat. Prod. Rep.* **13**: 275-306, 1996.