

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

**ESTUDO QUÍMICO DE *Spiranthera odoratissima* E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM FORMIGUEIROS DE *Atta  
sexdens rubropilosa*.**

**ANA PAULA TEREZAN\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
DOUTOR EM QUÍMICA, na área de  
concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes  
\*Bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2007**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

T316eq

Terezan, Ana Paula.

Estudo químico de *Spiranthera odoratissima* e atividades biológicas em formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* / Ana Paula Terezan. -- São Carlos : UFSCar, 2007.  
142 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Atividade inseticida. 2. *Spiranthera odoratissima*. 3. *Atta sexdens rubropilosa*. 4. *Leucoagaricus gongylophorus*. I. Título.

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

*Dedico este trabalho à minha mãe  
Clarice e às minhas irmãs Alessandra  
e Luciana, pelo carinho e amor.*

## *Agradecimentos*

*Ao professor Dr. João Batista Fernandes pela orientação e amizade prestada durante a realização deste trabalho.*

*Às alunas Roberta N. A. Almeida, Cinthia Zavan, Raquel Andrade Rossi e a técnica Itamar Cristina Reiss do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Rio Claro- SP, pela realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras.*

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

*Aos professores Dra. Maria Fátima das Graças F. da Silva, Dr. Paulo César Vieira e Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos e contribuição na execução deste trabalho.*

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos transmitidos.*

*Ao corpo Técnico do Departamento de Química da UFSCar pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho.*

*Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, pela convivência durante todo o período de trabalho.*

*As minhas amigas Andréia, Francinete, Karine, Lisandra, Regina, Tatiane e Simone.*

*Ao Beto pelo amor, companheirismo, carinho e paciência.*

*À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.*

*Ao CNPq pela Bolsa Concedida.*

## RESUMO

### ESTUDO QUÍMICO DE *Spiranthera odoratissima* E ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM FORMIGUEIROS DE *Atta sexdens rubropilosa*.

Esta tese apresenta o estudo fitoquímico da planta *Spiranthera odoratissima* (RUTACEAE), biomonitorado por ensaios biológicos com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*, a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* e as enzimas pectinases do fluido fecal da formiga cortadeira. O estudo fitoquímico dos extratos ativos levou a identificação de 15 substâncias: lupeol, lupenona, sitosterol, estigmasterol, campesterol, dictamina,  $\gamma$ -fagarina, esquimianina, 4,8-dimetoxifuro[2,3-B]quinolina-5-7-diol, 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona, 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona, limonina, ácido limonéxico, ácido *iso*-limonéxico e 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina. Sendo 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona, ácido *iso*-limonéxico e 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina inéditas na literatura e 4,8-dimetoxifuro[2,3-B]quinolina-5-7-diol, 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona, limonina e ácido limonéxico isoladas pela primeira vez no gênero *Spiranthera*. Os extratos dos galhos da planta *S. odoratissima* apresentaram 100% de inibição no desenvolvimento do fungo simbionte *L. gongylophorus* e ação sobre a sobrevivência média de 5,5 dias em um experimento de 25 dias com as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Os ensaios antimicrobianos mostraram a baixa potencialidade da planta *S. odoratissima* contra os microrganismos testados.

Os estudos de biotransformação da flavona realizados com o fungo simbionte *L. gongylophorus* nos meios líquidos YNB, meio sólido e no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa* mostraram a possível degradação da flavona pelos sistemas enzimáticos do fungo simbionte *L. gongylophorus* e de outros microrganismos presentes no lixo do formigueiro.

## ABSTRACT

### PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Spiranthera odoratissima* AND BIOLOGICAL ACTIVITY IN ANTS NEST OF *Atta sexdens rubropilosa*.

This work describes the bioassay-guided phytochemical study of *Spiranthera odoratissima* (RUTACEAE), with test against the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* and pectinases enzymes of the faecal fluid of leaf-cutting ant. The phytochemical study of active extracts allowed the identification of 15 substances: lupeol, lupenone, sitosterol, estigmasterol, campesterol, dictamine,  $\gamma$ -fagarine, esquimianine, 4,8-dimethoxyfuro[2,3-B]quinoline-5-7-diol, 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone, 1-methyl-8-methoxy-2-phenyl-quinolin-4-one, limonine, limonexic acid, *iso*-limonexic acid e 23-hydroxy-21-oxo-dihydroodoratine. The compounds 1-methyl-8-methoxy-2-phenyl-quinolin-4-one, *iso*-limonexic acid e 23-hydroxy-21-oxo-dihydroodoratine are described for the first time in the literature. 4,8-Dimethoxyfuro[2,3-B]quinoline-5-7-diol, 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone, limonine and limonexic acid were isolated for first time from the *Spiranthera* genus. The branch extracts of the *S. odoratissima* were active against the *L. gongylophorus* fungus, inhibiting 100% of its growth and showed insecticide activity against leaf-cutting ants in survival bioassay, with significant reduction leaf-cutting ants lifetime (5,5 days) when compared with the control group (25 days). The antimicrobial tests showed low activity of *S. odoratissima* against the microorganisms tested.

The flavone biotransformation studies carried out with the symbiotic fungus *L. gongylophorus* on YNB liquid medium, solid medium and on the ants nest of the *A. sexdens rubropilosa* showed degradation of flavone. This degradation probably is done by the enzymatic system of the symbiotic fungus *L. gongylophorus* and others microorganisms presents on waste of ants nest.

---

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACN - Acetonitrila

AcOET - Acetato de etila

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada

CIM - Concentração inibitória mínima

COSY - Correlation spectroscopy

GC – Gas Chromatography

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

d - Dubleto

dd - Duplo dubleto

DEPT - Distortionless enhancement by polarization transfer

DMSO - Dimetilsulfóxido

ESI – Eletrospray

g - grama

HMBC - Heteronuclear multi bond correlation

HSQC - Heteronuclear single quantum coherence

Hz - Hertz

EI – Eletronic impact

IV - Infravermelho

*J* - Constante de acoplamento (em Hertz)

l – Comprimento

L – Litro

m - Multipleteo

Me – Metila

mg – Miligrama

µg - micrograma

MeOH - Metanol

MHz - Mega-Hertz

Min – Minutos

mL - Mililitro

MS – Mass Spectrometry

*m/z* - Relação massa/carga

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear de carbono-13

s - Singleto

SPE - Extração em fase sólida

TR - Tempo de retenção

TTC – Cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC – Unidades formadoras de colônias

UV - Ultravioleta visível

YNB – Yeast Nitrogen Base

YMA – Yeast Extract Malt Agar

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

$M^+$  - Pico do íon molecular

$\delta$  - Deslocamento químico em partes por milhão

$\phi$  - Diâmetro

$\lambda$  - Comprimento de onda

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 3.1- Dados das massas dos extratos obtidos da planta *S. odoratissima* e seus respectivos códigos. 17
- TABELA 3.2: Fracionamento cromatográfico rápida do extrato hexânico 17 das folhas da planta *Spiranthera odoratissima*.
- TABELA 3.3: Fracionamento cromatográfico rápido do extrato 19 diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima*.
- TABELA 3.4: Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato 24 metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima*.
- TABELA 3.5: Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos e 31 seus respectivos antibióticos de referências e suas concentrações
- TABELA 3.6: Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos e 33 seus respectivos antibióticos de referências com as concentrações iniciais utilizadas nas placas de microdiluição e as concentrações mínimas inibitórias (CMI).
- TABELA 4.1 A: Dados de RMN  $^1\text{H}$  para as substâncias **T1** e **T2** ( $\text{CDCl}_3$ , 52 200MHz).
- TABELA 4.1 B: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **T1** e **T2** ( $\text{CDCl}_3$ , 53 200MHz).
- TABELA 4.2: Dados de RMN  $^1\text{H}$  dos alcalóides furoquinolínicos **A1**, **A2** e 65 **A3**.
- TABELA 4.3: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos alcalóides furoquinolínicos **A1**, **A2** 66 e **A3**.
- TABELA 4.4: Dados de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóides furoquinolínico **A4**. 68
- TABELA 4.5: Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC do alcalóides **A5**. 74
- TABELA 4.6: Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóides **A6**. 79
- TABELA 4.7: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC do limonóide **L1**. 87
- TABELA 4.8: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (400 93 MHz) do limonóide **L2**.
- TABELA 4.9: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (400 99 MHz) do limonóide **L3**.
- TABELA 4.10: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e 107 HMBC (400 MHz) do limonóide **L4**.
- TABELA 4.11: Porcentagem de Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* 110 *rubropilosa* alimentadas com extratos da planta *Spiranthera odoratissima*.

TABELA 4.12: Porcentagem de Mortalidade de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> alimentadas com alcalóides incorporados à dieta na concentração de 0,1 mg/mL.	112
TABELA 4.13: Valores do teste de atratividade com a substância dictamina realizado em três formigueiros de tamanho médio.	113
TABELA 4.14: Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos de <i>Spiranthera odoratissima</i> .	117
TABELA 4.15: Dados de RMN <sup>1</sup> H da flavona isolada do micélio do fungo simbiote e do meio líquido do experimento comparada com a flavona padrão.	122

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: (A) A rainha no jardim de fuga; (B) representa o fungo cultivado pela formiga; (C) O microfungo no quadro representa o parasita <i>Escovopsis</i> ; (D) Representa o actinomiceto que cresce na cutícula da formiga e produz antibióticos que suprimem o crescimento do <i>Escovopsis</i> . <u>Seta dupla</u> : representa a relação mutualista; <u>Seta única</u> : representa uma interação negativa.	4
FIGURA 1.2: Foto da planta <i>S. odoratissima</i> St. Hil. na fase adulta.	7
FIGURA 1.3: Alcalóides furoquinolínicos e indolopiridoquinazolínicos isolados das raízes da planta <i>S. odoratissima</i> .	8
FIGURA 1.4: Limonóides, terpeno e cumarina isolados das raízes da planta <i>S. odoratissima</i> .	9
FIGURA 1.5: Produtos de biotransformação microbiana da flavanona.	11
FIGURA 3.1: Foto do fluxo laminar com o material necessário para o repique mensal do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> : (A) tubos com meio e o fungo simbiote que foi repicado, (B) tubos com o meio que recebeu o fungo repicado, (C) alça e (D) bico de Bunsen.	28
FIGURA 4.1: Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância T1 (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).	50
FIGURA 4.2: Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância T1 (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).	50
FIGURA 4.3: Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância T2 (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).	51
FIGURA 4.4: Espectro de PENDANT da substância T2 (CDCl <sub>3</sub> , 200 Hz).	51

- FIGURA 4.5: Ampliação do espectro de PENDANT da substância T2 na região de 0-60 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 52
- FIGURA 4.6: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de substâncias E1, E2 e E3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 56
- FIGURA 4.7: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura de substâncias E1, E2 e E3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 57
- FIGURA 4.8: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância E1 no tempo de retenção 33,14 minutos. 57
- FIGURA 4.9: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância E2 no tempo de retenção 31,17 minutos. 58
- FIGURA 4.10: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância E3 no tempo de retenção 30,28 minutos. 58
- FIGURA 4.11: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 62
- FIGURA 4.12: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 62
- FIGURA 4.13: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 63
- FIGURA 4.14: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 63
- FIGURA 4.15: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 64
- FIGURA 4.16: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A3 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 64
- FIGURA 4.17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A3 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 65
- FIGURA 4.18: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A4 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 67
- FIGURA 4.19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 70
- FIGURA 4.20: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 71
- FIGURA 4.21: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 71
- FIGURA 4.22: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 72
- FIGURA 4.23: Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 72
- FIGURA 4.24: Mapa de contorno de HSQC da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 73
- FIGURA 4.25: Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 73
- FIGURA 4.26: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância A5 no tempo de retenção 27,39 minutos. 74
- FIGURA 4.27: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A6 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz). 77
- FIGURA 4.28: Espectro de PENDANT da substância A6 (Acetona- $\text{d}_6$ , 200 MHz). 77

- FIGURA 4.29: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância 78 A6 no tempo de retenção 31,07 minutos.
- FIGURA 4.30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). 84
- FIGURA 4.31: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L1 84 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).
- FIGURA 4.32: Mapa de contorno de HSQC da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 85 MHz).
- FIGURA 4.33: Mapa de contorno de HMBC da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 85 MHz).
- FIGURA 4.34: Espectro de massas obtido por ESI negativo da substância 876 L1.
- FIGURA 4.35: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 90 MHz).
- FIGURA 4.36: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 90 400 MHz).
- FIGURA 4.37: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 91 MHz).
- FIGURA 4.38: Mapa de contorno de HSQC da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 91 400 MHz)..
- FIGURA 4.39: Mapa de contorno de HMBC da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 92 400 MHz).
- FIGURA 4.40: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 96 MHz).
- FIGURA 4.41: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 96 400 MHz).
- FIGURA 4.42: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 97 MHz).
- FIGURA 4.43: Mapa de contorno de HSQC da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 97 400 MHz).
- FIGURA 4.44: Mapa de contorno de HMBC da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 98 400 MHz).
- FIGURA 4.45: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 103 MHz).
- FIGURA 4.46: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 104 400 MHz).
- FIGURA 4.47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 104 MHz).
- FIGURA 4.48: Mapa de contorno de HSQC da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 105

- 400 MHz).
- FIGURA 4.49: Mapa de contorno de HMBC da substância L4 (Acetona-d<sub>6</sub>, 105 400 MHz).
- FIGURA 4.50: Espectro de massas obtido por ESI negativo da substância 106 L4.
- FIGURA 4.51: Estrutura química da flavona. 118
- FIGURA 4.52: Espectro de RNM <sup>1</sup>H da flavona isolada do extrato do 121 micélio de fungo simbiote desenvolvido em meio líquido YNB (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).
- FIGURA 4.53: Espectro de RNM <sup>1</sup>H da flavona isolada do meio líquido do 121 Experimento 1 (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).
- FIGURA 4.54: Experimentos de toxicidade com 500 µL de solução da 123 flavona em etanol na concentração de 30 µg/mL: A, experimento com inóculo do fungo simbiote + flavona em etanol (30 µg/mL), B, controle com apenas o meio, C, controle meio + solvente + inóculo do fungo, D controle meio A + flavona em etanol (30 µg/mL) e E, controle meio + inóculo do fungo.
- FIGURA 4.55: (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona 125 incorporada não autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada não autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica (Controle) não autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol/acetonitrila (2:1:1), fluxo de 1mL/min, volume de
- FIGURA 4.56: (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona 127 incorporada autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica (Controle) autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol/acetonitrila (2:1:1), fluxo de 1mL/min, volume de injeção 20 µL, λ= 254 nm).
- FIGURA 4.57: (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona 128 incorporada autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica

(Controle) autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol (1:1), fluxo de 1mL/min, volume de injeção 20  $\mu$ L,  $\lambda$ = 254 nm).

FIGURA 4.58: Cromatogramas dos ninhos do formigueiro com iscas com 130 flavonas incorporadas ( $\lambda$  = 254 nm).

FIGURA 4.59: Cromatogramas dos lixos dos ninhos do formigueiro com 131 iscas com flavonas incorporadas ( $\lambda$  = 254 nm).

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1: Experimento de biotransformação da flavona incorporada 39  
no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*.

ESQUEMA 4.1: Proposta da biogênese dos triterpenos pentacíclicos **T1** e 54  
**T2**.

ESQUEMA 4.2: Proposta da biogênese dos alcalóides **A1**, **A2**, **A3** e **A4**. 80

ESQUEMA 4.3: Proposta da biogênese do limonóide Limonina (**L1**). 108

---

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 4.1: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com os extratos das folhas e galhos da planta *S. odoratissima* na concentração de 2,0 mg/mL e dieta pura (controle). 111
- GRÁFICO 4.2: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com os alcalóides dictamina (A1) e fagarina (A2) na concentração de 0,1 mg/mL e dieta pura (controle). 112
- GRÁFICO 4.3: Número acumulado de flocos de arroz carregados pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* incorporados com a substância dictamina dissolvida em solvente diclorometano na concentração de 5 mg/mL e apenas solvente (diclorometano) no grupo controle. 113
- GRÁFICO 4.4: Inibição do crescimento do fungo simbiote *Leucoagariucs gongylophorus* da formiga *Atta sexdens rubropilosa* pelos extratos da planta *Spiranthera odoratissima*. 114
- GRÁFICO 4.5: Inibição da atividade da enzima pectinase do fluido fecal da formiga *Atta sexdens rubropilosa* pelos extratos da planta *Spiranthera odoratissima*. 116
- GRÁFICO 4.6: Curva de calibração por padronização externa para a flavona. 132
- GRÁFICO 4.7: Variação da concentração da flavona nos ninhos e nos lixos dos ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*. 133

---

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- FLUXOGRAMA 3.1: Pré-purificação das frações SoFH-4 e SoFH-8 do 18 extrato hexânico da folha da planta *S. odoratissima*.
- FLUXOGRAMA 3.2: Pré-purificação das frações SoGD-4 e SoGD-5 do 20 extrato diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima*.
- FLUXOGRAMA 3.3: Isolamento de substâncias da fração SoGD5I do 21 extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).
- FLUXOGRAMA 3.4: Isolamento de substâncias da fração SoGD5J do 22 extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).
- FLUXOGRAMA 3.5: Isolamento de substâncias da fração SoGD 5J34 do 23 extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).
- FLUXOGRAMA 3.6: Metodologia utilizada na partição dos extratos 24 metanólicos.
- FLUXOGRAMA 3.7: Isolamento de substâncias da fração SoGMD do 25 extrato metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima*.

## SUMÁRIO

1.0. Introdução	1
1.1. Formigas cortadeiras	1
1.1.1 Características gerais	1
1.1.2. Relações formiga-fungo simbiote	2
1.2. Controle das formigas cortadeiras	5
1.3. Família Rutaceae	6
1.3.1. Gênero <i>Spiranthera</i>	7
1.3.1.1. <i>Spiranthera odoratissima</i>	7
1.4. Atividade antimicrobiana das plantas	9
1.5. Biotransformação microbiológica	10
2.0. Objetivos	12
3.0. Parte experimental	13
3.1. Materiais	13
3.2. Equipamentos utilizados	14
3.3. Coleta do material botânico	16
3.4. Metodologia de extração	16
3.5. Fracionamento dos extratos brutos da planta <i>S. odoratissima</i>	17
3.5.1. Extrato hexânico das folhas (SoFH)	17
3.5.1.1. Purificação das frações SoFH-4 e SoFH-8	18
3.5.2. Extrato diclorometânico dos galhos (SoGD)	19
3.5.2.1. Re-purificação das frações SoGD.	19
3.5.3. Pré-purificação do extrato metanólico dos galhos de <i>S. odoratissima</i> (SoGM).	24
3.5.3.1. Purificação da fração metanólica/diclorometânica (SoGMD)	25
3.6. Metodologia dos ensaios biológicos	26
3.6.1. Ensaios biológicos com as formigas cortadeiras <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	26
3.6.2. Ensaios biológicos com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	27
3.6.3. Ensaio com as enzimas presentes no fluido fecal das formigas cortadeiras	28
3.6.4. Ensaios antimicrobianos	29
3.6.4.1. Metodologia por difusão em ágar utilizando discos	29
3.6.4.2. Metodologia por microdiluição em placa de Elisa	31
3.7. Experimentos de biotransformação da flavona pelo fungo simbiote da formiga <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .	33

---

3.7.1. Experimento com cultivo do fungo simbiote em meio líquido	33
3.7.2. Experimento com cultivo do fungo simbiote em meio sólido	36
3.8. Experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .	37
3.8.1. Metodologia de análises por HPLC/UV das amostras coletadas no experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	39
3.8.1.1. Preparo da amostra	39
3.8.1.2. Análises por HPLC/UV	40
3.8.1.3. Preparação da coluna analítica	40
3.8.1.4. Curva de calibração externa	41
4.0. Resultados e Discussões	42
4.1. Substâncias isoladas da planta <i>Spiranthera odoratissima</i>	42
4.2. Triterpenos	47
4.2.1. Identificação das substâncias T1 e T2	47
4.2.2. Biossíntese dos triterpenos	54
4.3. Esteróides	55
4.3.1. Identificação das substâncias E1, E2 e E3	55
4.4. Alcalóides	59
4.4.1. Identificação das substâncias A1, A2 e A3	59
4.4.2. Identificação da substância A4	66
4.4.3. Identificação da substância A5	68
4.4.4. Identificação da substância A6	75
4.4.5. Biossíntese dos alcalóides	80
4.5. Limonóides	81
4.5.1 Identificação da substância L1	82
4.5.2 Identificação da substância L2	88
4.5.3 Identificação da substância L3	94
4.5.4 Identificação da substância L4	100
4.5.5. Biossíntese dos Limonóides	108
4.6. Ensaio biológicos	109
4.6.1. Ensaio biológicos com as formigas cortadeiras <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	109
4.6.2. Ensaio biológicos com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	114
4.6.3. Ensaio com as enzimas presentes no fluido fecal das formigas cortadeiras	115
4.6.4. Ensaio antimicrobianos	116

4.7. Experimentos de biotransformação da flavona pelo fungo simbionte da formiga <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	118
4.7.1. Experimento com cultivo do fungo simbionte em meio líquido	119
4.7.2. Experimento com cultivo do fungo simbionte em meio sólido	122
4.8. Experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	123
4.8.1. Metodologia de análises por HPLC/UV	124
4.8.2. Análises por HPLC/UV das amostras coletadas no ninho do formigueiro de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	129
5.0. Conclusões	134
6.0. Referências Bibliográficas	137

# **1-INTRODUÇÃO**

---

## 1.1- Formigas cortadeiras

### 1.1.1- Características gerais

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e família Formicidae. São insetos eusociais por apresentarem três características: sobreposição de gerações (apresentam mais de uma geração em determinado momento da vida da colônia); divisão de trabalhos (castas) e cuidados com a prole (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

As formigas cortadeiras são insetos causadores de danos à agricultura, sendo que a importância do seu estudo deve-se aos prejuízos causados às plantações, ao elevado número de colônias que uma determinada área pode apresentar, à sua vasta distribuição e ao controle difícil e oneroso das mesmas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

São consideradas “formigas cortadeiras” todas as espécies dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) e também algumas dos gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma*. Os ninhos dos três últimos gêneros citados são muitos pequenos e o dano que causam é insignificante (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Estima-se que existam cerca de 15.000 espécies de formigas, das quais aproximadamente 12.080 estão descritas. Destas, menos de 3.000 foram registradas na região neotropical (América do Sul, Central e Antilhas). O Brasil é o país da América do Sul que possui o maior número de espécies de saúvas (12 espécies) seguido da Argentina e Paraguai (STRADLING, 1991). No estado de São Paulo são descritas quatro espécies: *Atta bisphaerica* (saúva-mata-pasto), *Atta capiguara* (saúva-parda) *Atta laevigata* (saúva-cabeça-de-vidro) e *Atta sexdens rubropilosa* (saúva-limão) (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

A população das saúvas é composta por indivíduos de tamanhos e formas diferentes. Os machos férteis são chamados de bitus, as fêmeas férteis

são conhecidas como içás, tanajuras ou rainhas e constituem a casta reprodutiva do sauveiro. As fêmeas estéreis são denominadas operárias, constituem a grande maioria do sauveiro e estão divididas em três categorias:

- a) Jardineiras: possuem menor tamanho, trituram partes de vegetais dentro da colônia, dispondo-as para o cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em câmaras especiais (panelas). Possuem grandes capacidades olfativas, percebendo qualquer material estranho que tenha sido trazido ao formigueiro (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Também exercem papel importante na alimentação tanto da rainha como das larvas (FOWLER et al., 1977; HERVEY, 1977).
- b) Cortadeiras: possuem tamanho médio, cortam e transportam pedaços de vegetais para dentro da colônia através de suas mandíbulas.
- c) Soldados: possuem tamanho grande, cabeça e mandíbulas bem desenvolvidas e sua função é proteger a colônia (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

### **1.1.2- Relações formiga-fungo simbiote**

As formigas cortadeiras cultivam os fungos que se desenvolvem rapidamente graças aos vegetais que as formigas cortam e recolhem. Os vegetais são levados ao interior do ninho e submetidos a um tratamento especial: são lambidos completamente, reduzidos à pequenos fragmentos, mastigados e colocados semeados com o fungo próximo uns aos outros formando massas esponjosas. Na superfície destas “esponjas” cresce o fungo simbiote *L. gongylophorus* do qual toda a colônia se alimenta, predominantemente as larvas e a rainha (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Segundo PAGNOCCA et al. (1996) no formigueiro a massa fúngica é dividida em duas partes distintas, sendo a parte mais nova chamada de “jardim de fungo”, constituída de folhas relativamente frescas e de micélios de fungo recém implantados; “esponja velha”, que seria uma parte do formigueiro onde o

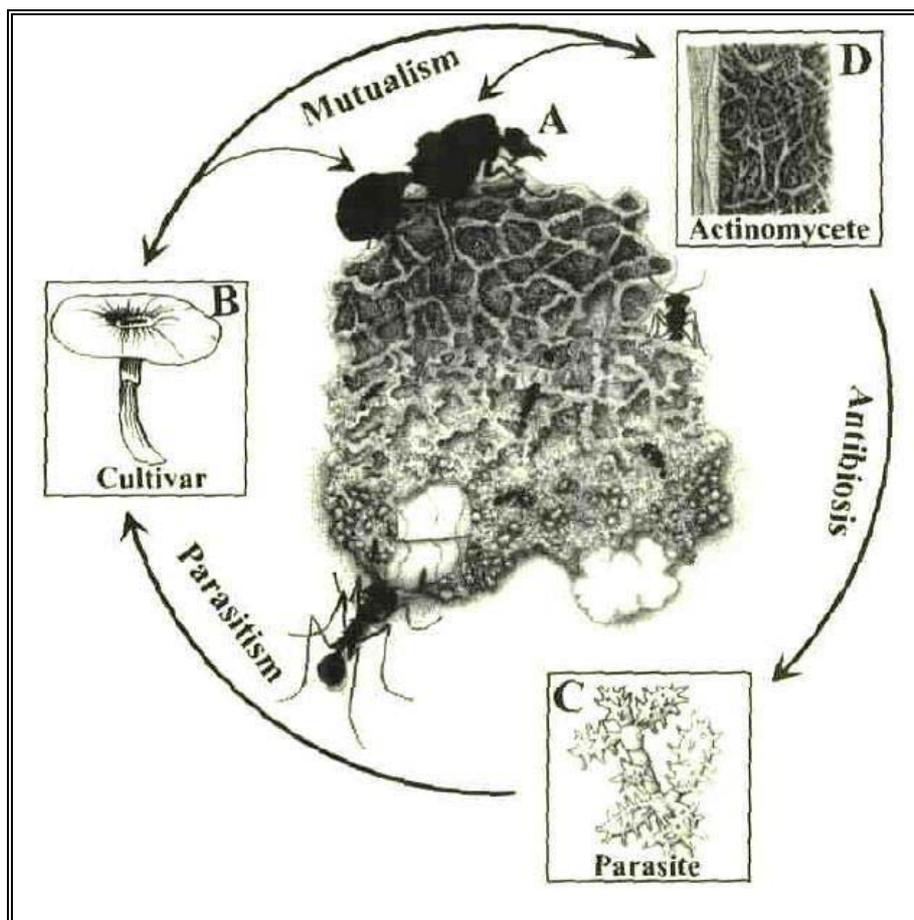
fungo já está estabelecido há mais tempo e, por isso, o material vegetal é visualmente mais degradado e há também o “lixo”, que é o descarte do formigueiro, incluindo fragmentos da esponja velha, formigas mortas e tudo o que não tenha utilidade no formigueiro.

A princípio, o fungo simbiote das formigas cortadeiras, *L. gongylophorus*, tem como papel principal a digestão de polissacarídeos do material vegetal para formas monoméricas de açúcares que são mais palatáveis para as formigas (BACCI et al., 1998). Uma outra função atribuída ao *L. gongylophorus* é a de inativar alguns metabólitos secundários tóxicos ao formigueiro através de sistemas enzimáticos bastante eficazes (DOWD, 1992; NICHOLS-ORIAN, 1991a e 1991b). Por digerir os polissacarídeos, foi atribuído à *L. gongylophorus* o papel de “estômago da colônia” (MARTIN & WEBER, 1969).

Estas enzimas proteolíticas originárias do fungo estão presentes no fluido fecal das formigas, promovendo a degradação dos componentes vegetais onde é depositado, facilitando a penetração do micélio fúngico no substrato (BOYD & MARTIN, 1975).

Essa associação entre formigas cortadeiras e fungos aproximadamente remonta de 50 milhões de anos. Aparentemente houve uma co-evolução entre este fungo e as formigas, o que tornou os organismos desta simbiose dependentes um do outro (MUELLER, 2002).

Vários estudos têm mostrado a existência de outros microrganismos no jardim de fungo dos formigueiros (PAGNOCCA et al., 1996; CARREIRO et al., 1997). Nesta interação existe também um parasita do gênero *Escovopsis* e um actinomiceto (bactéria filamentosa). Segundo CURRIE (1999), o *Escovopsis* é patógeno do fungo simbiote da formiga, enquanto o actinomiceto mantém uma relação mutualista com a formiga produzindo antibióticos específicos que suprimem o crescimento do parasita *Escovopsis*. A FIGURA 1.1 representa esta associação multilateral descrita acima.



**FIGURA 1.1:** (A) A rainha no jardim de fungo; (B) representa o fungo cultivado pela formiga; (C) O microfungo no quadro representa o parasita *Escovopsis*; (D) Representa o actinomiceto que cresce na cutícula da formiga e produz antibióticos que suprimem o crescimento do *Escovopsis*. Seta dupla: representa a relação mutualista; Seta única: representa uma interação negativa (Fonte: CURRIE, 2001).

As associações mutualistas entre microrganismos e macrorganismos são ricas fontes de metabólitos secundários. A descoberta de novos compostos a partir destas interações pode ser ilustrada por vários exemplos, como o isolamento de Taxol, um potente agente anticancerígeno, a partir de um fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*. Estas relações simbióticas que produzem

compostos biologicamente ativos ocorrem por algumas razões: a) se há uma simbiose, os dois organismos devem ter benefícios químicos mútuos; b) simbioses são interações ecológicas bastante fortes e por isso os organismos são sujeitos a forte seleção e rápida evolução e c) co-evolução entre os organismos os levam a produção de metabólitos de efeito modulatório específico (STIERLE et al., 1993).

## **1.2- Controle das formigas cortadeiras**

As formigas cortadeira quando estão em ambientes ecologicamente equilibrados, fazem o corte natural das plantas, contribuem para a estabilidade do solo, além de realizar polinizações e dispersão de sementes. Porém, podem se tornar pragas agrícolas causando danos econômicos, como citado na seção 1.1.1.

O controle das formigas cortadeiras pode ser feito através de métodos mecânicos, culturais, biológicos e químicos. O controle mecânico praticamente não é utilizado em virtude de ser de viabilidade restrita a pequenas áreas e ninhos com até 4 meses de idade (BOARETTO & FORTI, 1997).

Os métodos químicos para o controle das formigas cortadeiras são os mais freqüentemente utilizados, sendo o produto químico tóxico aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações pó, líquido nebulizáveis, ou apresentando na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades das colônias (BOARETTO & FORTI, 1997).

O emprego de iscas tóxicas granuladas é considerado eficiente, prático e econômico. Oferecem maior segurança ao operador, dispensam mão-de-obra e equipamentos especializados e permitem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK & NAKANO, 1984).

As primeiras iscas tóxicas continham o aldrim, como princípio ativo; posteriormente, vários trabalhos indicaram maior eficiência do dodecacloro em relação ao aldrim. Com a proibição dos inseticidas clorados,

devido aos seus efeitos prejudiciais ao meio ambiente, o dodecacloro foi substituído pela sulfluramida (BOARETTO & FORTI, 1997).

Segundo MARICONI (1976), Os inseticidas utilizados para o controle desses insetos não têm ação específica, sendo tóxicos também ao homem, aves e animais domésticos; podendo ter longo poder residual, causando poluição ao solo, água e vegetais.

Nas últimas décadas, têm-se buscado métodos alternativos de controles de formigas cortadeiras. Por este motivo, o Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos associado ao Centro de Insetos Sociais da Universidade Estadual de São Paulo de Rio Claro, vêm estudando os efeitos de plantas potencialmente tóxicas para o formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa*, visando a obtenção de produtos naturais inseticidas e/ou fungicidas mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente.

### 1.3- Família Rutaceae

A família Rutaceae é constituída por plantas sub-arbustiva ou arbóreas compostas de cerca de 1.600 espécies distribuídas em aproximadamente 150 gêneros pelas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo estes gêneros mais abundantes na América Tropical, Sul da África e Austrália (PIRANI, 1982; WATERMAN & GRUNDON, 1983). Na região neotropical ocorrem 52 gêneros, sendo 33 destes no Brasil, com centro de diversidade desses gêneros na Amazônia e na mata atlântica (RIBEIRO et al., 1999).

A diversidade de constituintes químicos e a ampla atividade biológica dos metabólicos secundários das plantas da família Rutaceae fazem crescer cada vez mais os interesses dos seus estudos fitoquímicos. Os metabólitos secundários que têm sido relatados na família são alcalóides (derivados do ácido antranílico), cumarinas (principalmente furano-cumarinas e

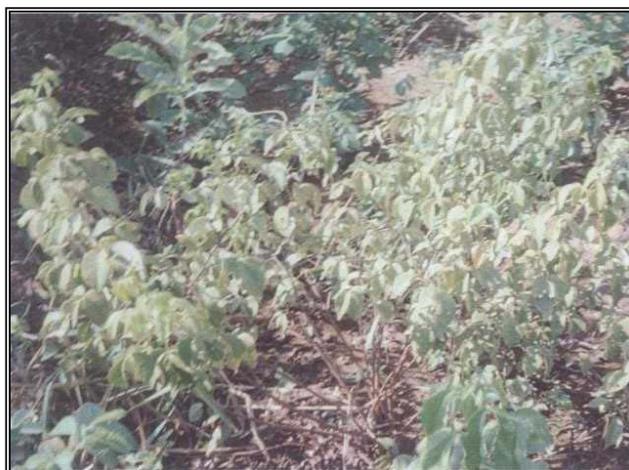
pirano-cumarinas), flavonóides e limonóides. Outros metabólitos secundários como as lignanas, cromenos e terpenóides (monoterpenos e triterpenos) também são encontrados nesta família (WATERMAN, 1999).

### 1.3.1- Gênero *Spiranthera*

O gênero *Spiranthera* é constituído por árvores ou arbustos encontrado na região neotropical (região amazônica, cerrado e campos do Brasil) com 4 espécies descritas: *S. guianensis* Sandwinth, *S. parviflora* Sandwinth, *S. muricata* Pirani e *S. odoratissima* St. Hil. (PIRANI, 1999).

#### 1.3.1.1- *Spiranthera odoratissima*

A espécie *Spiranthera odoratissima* (FIGURA 1.2) é uma planta da família Rutaceae encontrada nos cerrados e campos do Brasil (Rondônia, Mato Grosso, Pará, Maranhão, Piauí, Distrito Federal, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais) e na Bolívia (PIRANI, 1999).

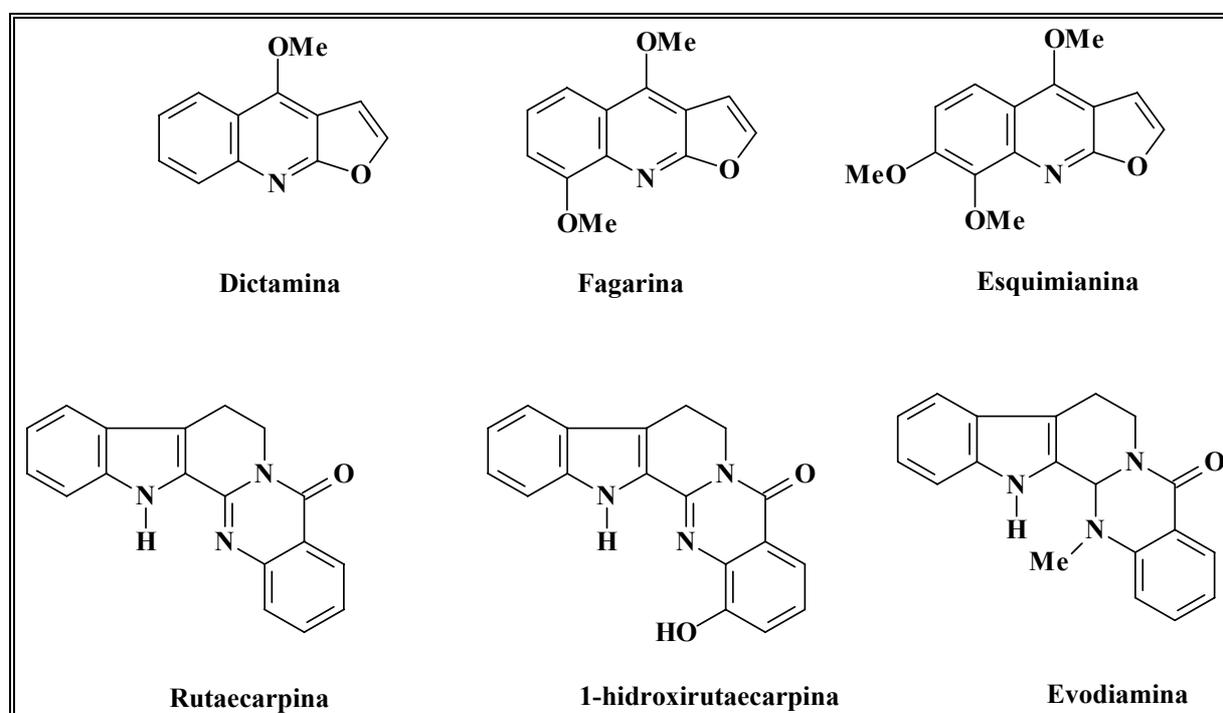


**FIGURA 1.2:** Foto da planta *S. odoratissima* St. Hil. na fase adulta (Fonte: Dissertação da aluna Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro, 2002).

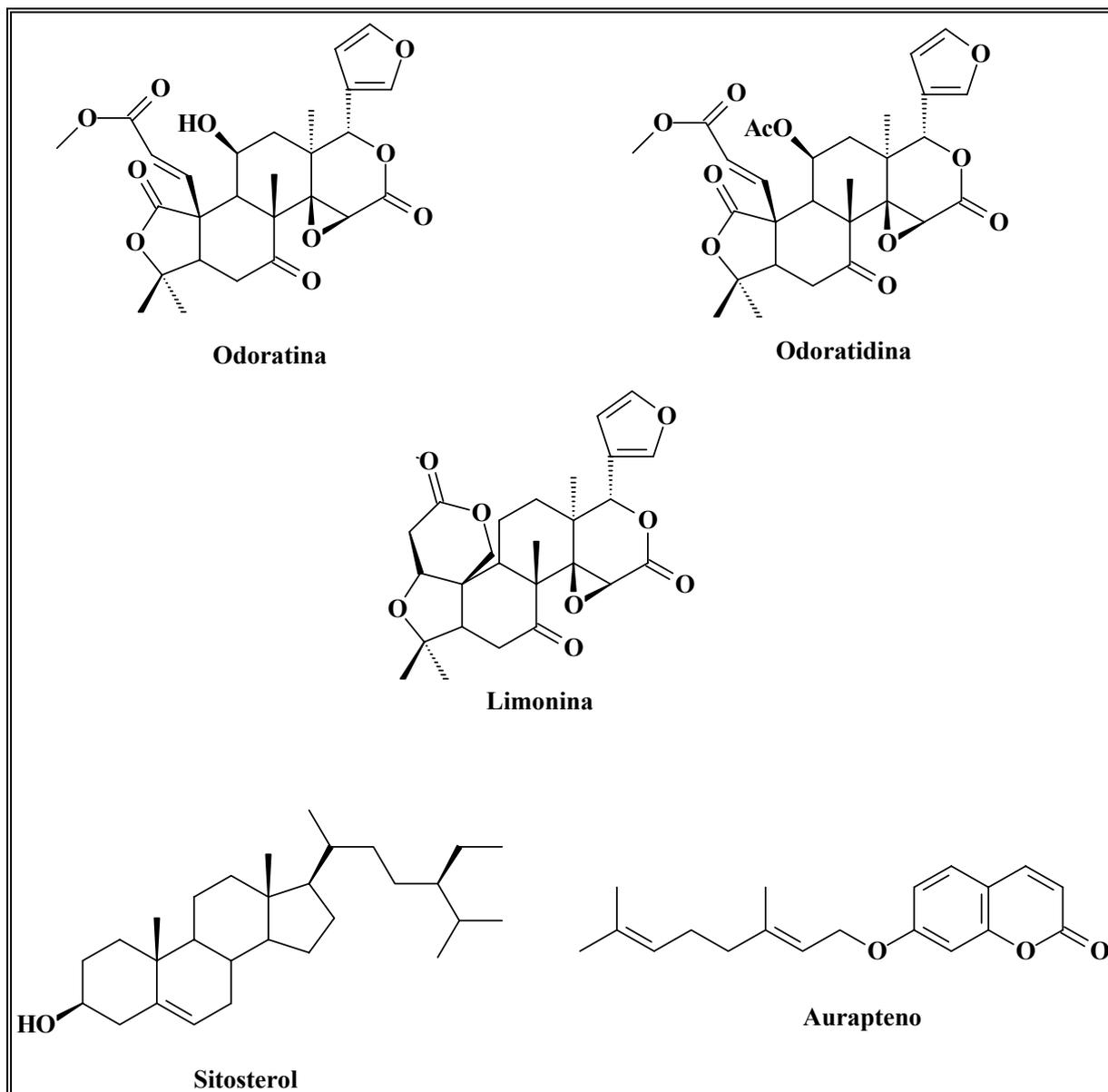
A *S. odoratissima*, conhecida com o nome vulgar “manacá”

(PIRANI, 1999), é utilizada na medicina popular no tratamento de reumatismo, gota, infecção dos rins, retenção urinária, dor abdominal, acne e furúnculo (DE LA CRUZ, 1997), e segundo MATOS et al. (2005) o extrato etanólico da raiz da planta possui atividade analgésica e anti-inflamatória.

Os estudos fitoquímicos da espécie *S. odoratissima* são poucos e recentes, como mostrou os levantamentos bibliográficos feitos para este estudo; sendo já isolados das folhas monoterpenos e sesquiterpenos, e das raízes alcalóides furoquinolínicos e indolopiridoquinazolínicos, limonóides, cumarinas e terpenos (FREITAS et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005 (FIGURA 1.3 e 1.4)).



**FIGURA 1.3:** Alcalóides furoquinolínicos e indolopiridoquinazolínicos isolados das raízes da planta *S. odoratissima* (FREITAS et al, 2003; RIBEIRO, 2002).



**FIGURA 1.4:** Limonóides, terpeno e cumarina isolados das raízes da planta *S. odoratissima* (FREITAS et al, 2003; RIBEIRO, 2002).

## 1.4 – Atividade antimicrobiana das plantas

Desde da antiguidade, o homem tem usado as plantas para tratar doenças infecciosas comuns. O uso de fitoterápicos como *Asctostaphylos uvaursi*, *Vaccinium macrocarpon*, *Allium sativum*, entre outros; são descritos como grandes agentes antimicrobianos (RIOS & RECIO, 2005).

As pesquisas científicas em busca de compostos isolados de extratos de plantas utilizadas na medicina popular com atividades antimicrobianas têm sido crescente na última década (RIOS & RECIO, 2005).

Alguns exemplos desta busca por compostos com atividade antimicrobiana isolados de extratos de plantas, tais como os óleos essenciais, alcalóides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas, diterpenos, triterpenos, são: a planta *Oriciopsis glaberrina* Engl. (Rutaceae) utilizada contra infecções, micoses, dermatites e outras doenças, têm como constituintes químicos tetranortriterpenóides, alcalóides furoquinolínicos, alcalóides acridônicos e xantonas (WANSI et al, 2006); *Senna racemosa* (Fabaceae) utilizada contra diarreia e infecções nos olhos tem como constituinte antimicrobiano alcalóide (SANSORES-PERAZA et al, 2000); *Himatanthus lancifolius* (Apocynaceae) na fração de alcalóides indóis possui atividade antimicrobiana (SOUZA et al, 2004); *Baijsea axillaries* Hua (Apocynaceae) utilizada para infertilidade em mulheres, anti-hipertensivo, diabete, seus constituintes químicos são taninos, alcalóides, saponinas glicosiladas e derivados de antracenos, com potencialidades antimicrobianas (ABERE & AGOREYO, 2006).

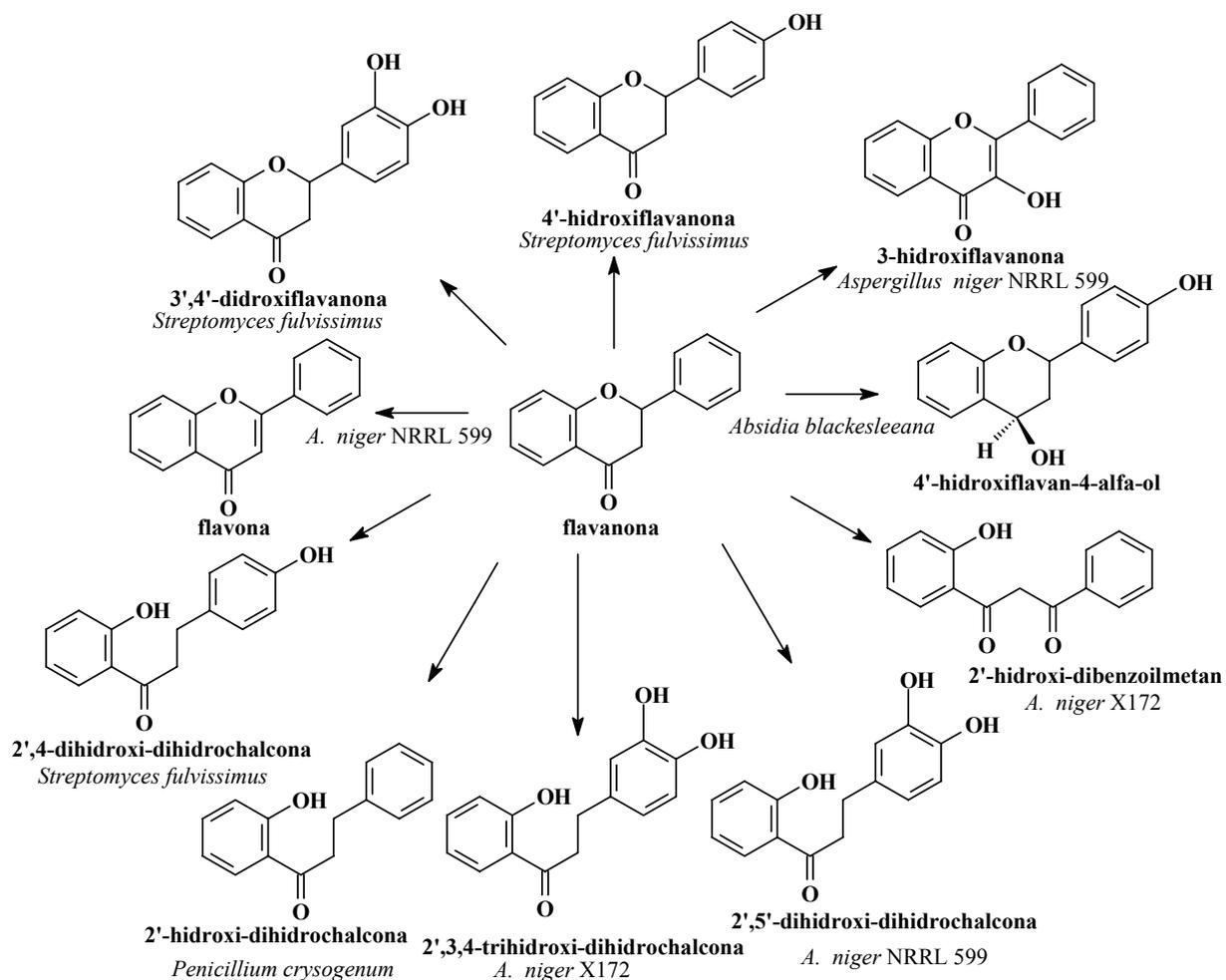
## **1.5 – Biotransformação microbiológica**

Flavonóides constituem um grupo de produtos naturais de plantas biosintetizados por precursores derivado do acetato e fenilpropanóides. Nas plantas os flavonóides possuem um papel importante no seu crescimento, desenvolvimento e na defesa contra microrganismos (CHUN et al, 2003).

Udupa e colaboradores (UDUPA et al, 1969), em estudos com biotransformações com microrganismos, obtiveram vários produtos de chalconas e diidrochalconas com hidroxilação nas posições 4' e 3'-4', assim como produtos de redução da carbonila .

Outros estudos de biotransformações com vários microrganismos

(IBRAHIM & ABUL-HAJJ, 1990) mostraram hidroxilação nas posições 4' e 3'-4' de flavonas e isoflavonas, glicosilação na posição 3' (IBRAHIM et. al, 1997) e modificações estruturais nas flavanonas e isoflavanonas (Figura 1.5).



**FIGURA 1.5:** Produtos de biotransformação microbiana da flavanona (IBRAHIM & ABUL-HAJJ, 1990).

## **2-OBJETIVOS**

---

---

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Isolamento biomonitorado de substâncias da planta *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae), com ações inseticidas e/ ou fungicidas no formigueiro e identificação dessas substâncias através de técnicas cromatográficas hifenizadas e espectroscópicas;
- Investigação da capacidade de biotransformação das enzimas do fluido fecal da formiga cortadeira e do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* ;
- Investigar as atividades antibacterianas e antifúngicas dos extratos da planta *S. odoratissima*.

## **3-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

---

---

### 3.1- Materiais

#### a) Suportes para cromatografia:

- Sílica gel 230-400 mesh (Sílica gel Flash), para cromatografia em coluna (CC)
- Sílica gel 70-230 mesh (Sílica gel Comum), para cromatografia em coluna (CC)
- Sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (230-400 mesh), para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- Sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (375 mesh), para cromatografia circular de adsorção (cromatotron)
- Sephadex LH-20

#### b) Eluentes para cromatografia:

- Foram utilizados solventes comerciais, destilados no DQ-UFSCar;
- Em alguns casos foram usados solventes PA da Merck.
- Solventes de grau cromatográfico Tedia utilizados para as análises de CLAE.

#### c) Solventes utilizados para obtenção de espectros de RMN:

- Solventes da Cambridge Isotope Laboratories, Inc e Isotec Inc (RMN) 98-99,9% deuterados.

#### d) Substâncias utilizadas para o cultivo do fungo:

- Alcool 70%
- Dextrose – Mallinckrodt
- Ágar bacteriológico – DIFCO, Acumedia
- Cloreto de sódio – Sigma
- Peptona – DIFCO
- Extrato de Malte – DIFCO

- YNB – Mallinckrodt
- Flavona – Acros

**e) Material utilizado nos ensaios antimicrobianos:**

- Caldo Mueller Hinton – DIFCO
- Ágar Mueller Hinton – DIFCO
- Caldo Sabouraud – DIFCO
- Cloreto de sódio – Sigma
- Solução Reveladora TTC( sal de 2,3,5-trimetil-tetrazólio) – Mallinckrodt
- Dimetilsulfóxido – Sigma
- Placas 96 well (placas de ELISA)
- Tubo padrão de sulfato de bário (0.5 da escala de McFarland:  $10^8$  UFC/mL)
- Antibióticos padrões:
  - Nistatina
  - Cloridrato de Vancomicina - VANCOCINA CP (ABL)
  - Cloridrato de Tetraciclina – TETRACLIN (TEUTO)

### **3.2- Equipamentos utilizados**

**a) Cromatógrafo para HPLC:**

Shimadzu LC-10AD (Preparative Liquid Chromatograph)

Detector: Shimadzu SPD-6AV; UV-VIS Spectrophotometric detector

Coluna de fase estacionária fenil-hexil Phenomenex (250 x 4,6 mm), fase reversa.

Coluna de fase estacionária C-18 ODS Phenomenex (150 x 4,6 mm), fase reversa.

**b) Cromatógrafo a gás:**

GCMS(EI)-QP5000 Shimadzu

Coluna para CG: DB 5MS (30 m, 0,25 mm id, film 0,25  $\mu\text{m}$ )

**c) Espectrofotômetro no UV-VIS:**

*Hewlett Packard 8452 A – Diode Array Spectrophotometer*

**d) Espectrômetro de Massas:**

Experimentos de ESI-EM: MICROMASS Quattro LC

**e) Espectrômetro de RMN:**

Brüker ARX-200

Brüker DRX-400

**f) Estufa de secagem e esterilização:**

FANEM –315 SE

**g) Balança analítica:**

Mettler P163

**h) Câmara de fluxo laminar:**

Veco VL FS – 12M

**i) Estufa incubadora:**

FANEM 347 CD

**j) Autoclave vertical:**

Phoenix AV 75

**k) Rotaevaporadores:**

Rotaevaporador Büchi 461 – Waterbath (B- 480)

### **3.3– Coleta do material botânico**

A coleta da planta *Spiranthera odoratissima* (código de identificação 4778) foi realizada no Rio Verde em Jataí (GO) em janeiro de 2001. As partes vegetais, galhos e folhas, de *S. odoratissima* foram coletadas pelo grupo de Produtos Naturais de Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), juntamente com o professor Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica da USP – São Paulo, o responsável pela identificação da planta.

### **3.4– Metodologia de extração**

As partes da planta *S. odoratissima* foram separadamente secas em uma estufa de circulação de ar a 45°C e pulverizadas em moinho Willey. Em seguida foram feitas extrações, separadamente, de ambas as partes da planta com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) por 3 dias em cada solvente. Após os 3 dias foram submetidos à filtração e evaporação do solvente. As massas de cada extrato obtido estão representadas na Tabela 3.1.

**TABELA 3.1-** Dados das massas dos extratos obtidos da planta *S. odoratissima* e seus respectivos códigos.

	<b>Código</b>	<b>Galhos</b>	<b>Código</b>	<b>Folhas</b>
<b>Peso seco do órgão</b>	SoG	1092,78 g	SoF	708,93 g
<b>Extrato Hexânico</b>	SoGH	1,90 g	SoFH	44,01 g
<b>Extrato Diclorometânico</b>	SoGD	7,19 g	SoFD	43,34 g
<b>Extrato Metanólico</b>	SoGM	16,69 g	SoFM	106,48 g

### 3.5– Fracionamento dos extratos brutos da planta *S. odoratissima*

#### 3.5.1– Extrato hexânico das folhas (SoFH)

O extrato hexânico com massa 44,01g das folhas da planta *S. odoratissima*, foi submetido a uma cromatografia rápida com sílica gel comum (h= 26 cm,  $\phi$ = 7 cm) com as eluições gradientes descritas na Tabela 3.2.

**TABELA 3.2:** Fracionamento cromatográfico rápida do extrato hexânico das folhas da planta *Spiranthera odoratissima*.

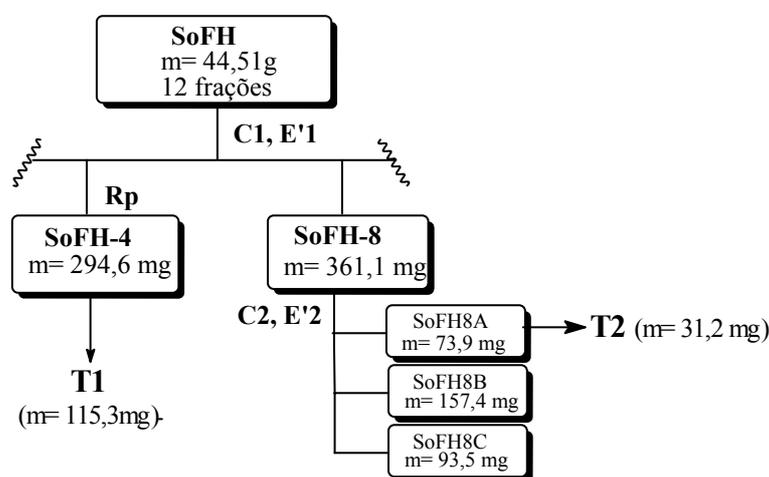
<b>ELUENTE</b>	<b>PROPORÇÃO (%)</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>MASSAS (mg)</b>
Hexano	100	SoFH-1	648,5
Hexano/Diclorometano	80:20	SoFH-2	2245,0
Hexano/Diclorometano	50:50 A	SoFH-3	149,0
	50:50 B	SoFH-4	294,6
Hexano/Diclorometano	20:80	SoFH-5	2701,7
Diclorometano	100	SoFH-6	449,8
Diclorometano/Acetato de Etila	80:20 V(verde)	SoFH-7	843,6
	80:20 A (amarelo)	SoFH-8	336,1
Diclorometano/Acetato de Etila	50:50	SoFH-9	234,1
Acetato de Etila	100	SoFH-10	249,5
Acetato de Etila/Metanol	50:50	SoFH-11	2730,2

Metanol	100	SoFH-12	41,5
---------	-----	---------	------

### 3.5.1.1- Purificação das frações SoFH-4 e SoFH-8

O fluxograma 3.1 apresenta de maneira sucinta a purificação das frações SoFH-4 e SoFH-8

**FLUXOGRAMA 3.1:** Pré-purificação das frações SoFH-4 e SoFH-8 do extrato hexânico da folha da planta *S. odoratissima*.



**C1**– h = 26,0 cm;  $\phi$  = 7 cm (Sílica gel 70-230 mesh)

**E'1** – Hexano (100), Hexano/Diclorometano (8:2), Hexano/Diclorometano (1:1), Hexano/Diclorometano (2:8), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (1:1), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**C2**– h = 38,0 cm;  $\phi$  = 3,7 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'2**–Hexano/Diclorometano (8:2), Hexano/Diclorometano (1:1), Hexano/Diclorometano (2:8), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (1:1), Diclorometano/Acetato de Etila (2:8), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**Rp** – Re-precipitação com metanol com aquecimento.

### 3.5.2– Extrato diclorometânico dos galhos (SoGD)

O extrato diclorometano com massa 7,19 g dos galhos da planta *S. odoratissima* foi submetido a cromatografia rápida com sílica gel comum (h= 26 cm,  $\phi$ = 7 cm) com as eluições gradientes descritas na Tabela 3.3.

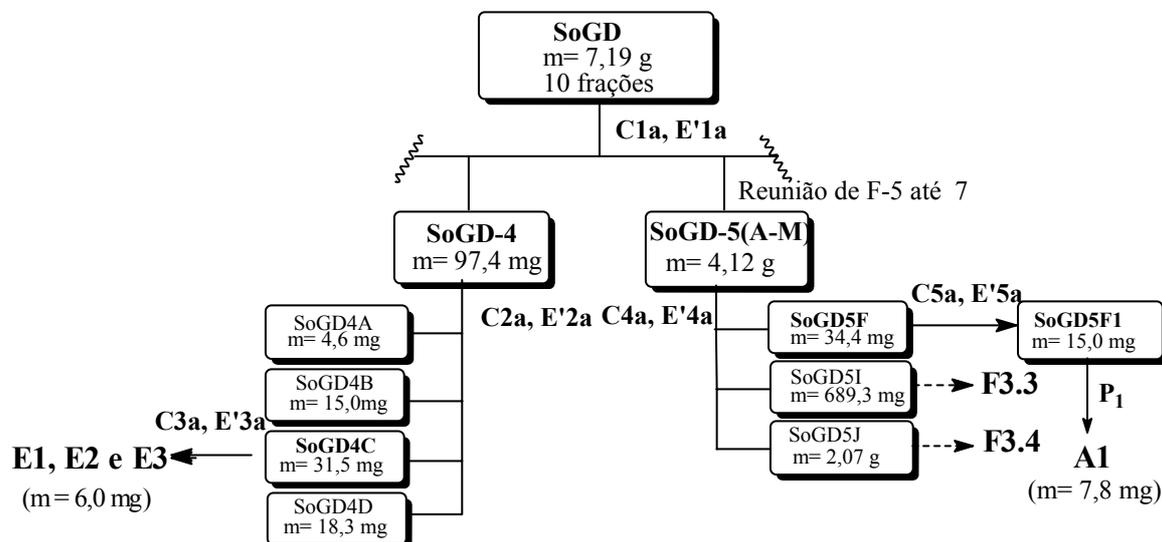
**TABELA 3.3:** Fracionamento cromatográfico rápido do extrato diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima*.

ELUENTE	PROPORÇÃO (%)	AMOSTRA	MASSAS (mg)
Hexano	100	SoGD-1	24,9
Hexano/Diclorometano	20:80	SoGD-2	15,1
Hexano/Diclorometano	50:50	SoGD-3	31,0
Diclorometano	100	SoGD-4	97,4
Diclorometano/Acetato de Etila	80:20	SoGD-5	2981,0
Diclorometano/Acetato de Etila	50:50	SoGD-6	849,3
Diclorometano/Acetato de Etila	20:80	SoGD-7	285,9
Acetato de Etila	100	SoGD-8	73,1
Acetato de Etila/Metanol	50:50	SoGD-9	798,9
Metanol	100	SoGD-10	250,1

#### 3.5.2.1– Re-purificação das frações SoGD.

Os fluxogramas 3.2-3.5 apresentam de maneira sucinta a purificação das frações SoGD-4 e SoGD-5

**FLUXOGRAMA 3.2:** Pré-purificação das frações SoGD-4 e SoGD-5 do extrato diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima*.



**C1a**– h = 26,0 cm;  $\phi$  = 7 cm (Sílica gel 70-230 mesh)

**E'1a** – Hexano (100), Hexano/Diclorometano (8:2), Hexano/Diclorometano (1:1), Hexano/Diclorometano (2:8), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (1:1), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**C2a**– h = 54,0 cm;  $\phi$  = 3,0 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'2a** – Hexano/Diclorometano (8:2), Hexano/Diclorometano (1:1), Hexano/Diclorometano (2:8), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (6:4), Diclorometano/Acetato de Etila (2:8), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (8:2), Metanol (100).

**C3a**– h = 19,0 cm;  $\phi$  = 2,3 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'3a** – Hexano/Diclorometano (3:7), Hexano/Diclorometano (2:8), Hexano/Diclorometano (1:9), Diclorometano (100), Diclorometano/Metanol (9:1), Metanol (100).

**C4a** (Sílica gel) - h = 29,5 cm;  $\phi$  = 5,2 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

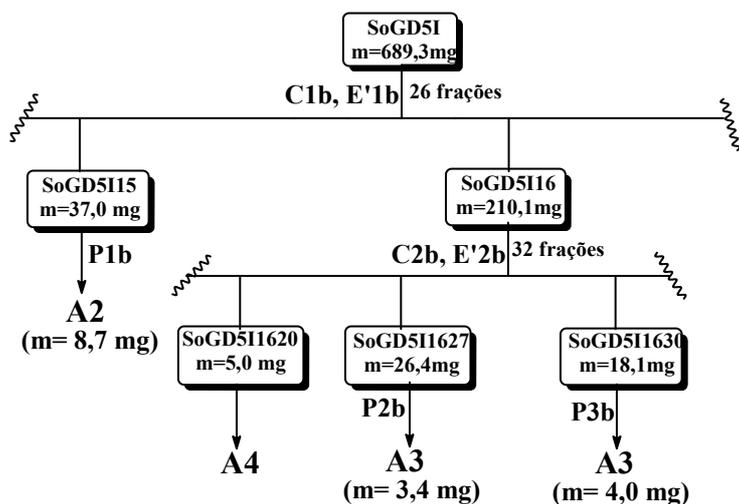
**E'4a** – Hexano/Diclorometano (2:8), Hexano/Diclorometano (1:9), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (1:1), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila /Metanol (9:1), Acetato de Etila /Metanol (8:2), Acetato de Etila /Metanol (2:8), Metanol (100).

**C5a** - h = 26,7 cm;  $\phi$  = 3,0 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'5a** – Hexano/Diclorometano (2:8), Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (8:2), Diclorometano/Acetato de Etila (1:1), Metanol (100).

**P1** - Hexano/Diclorometano (2:8) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

**FLUXOGRAMA 3.3 (F3.3):** Isolamento de substâncias da fração SoGD5I do extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).



**C1b** - h = 33,0 cm;  $\phi$  = 5,0 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'1b**- Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (9:1), Diclorometano/Acetato de Etila (7:3), Diclorometano/Acetato de Etila (6:4), Diclorometano/Acetato de Etila (4:6), Diclorometano/Acetato de Etila (2:8), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (9,5:0,5), Acetato de Etila/Metanol (9:1), Acetato de Etila/Metanol (7:3), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**C2b** - h = 25,0 cm;  $\phi$  = 5,0 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

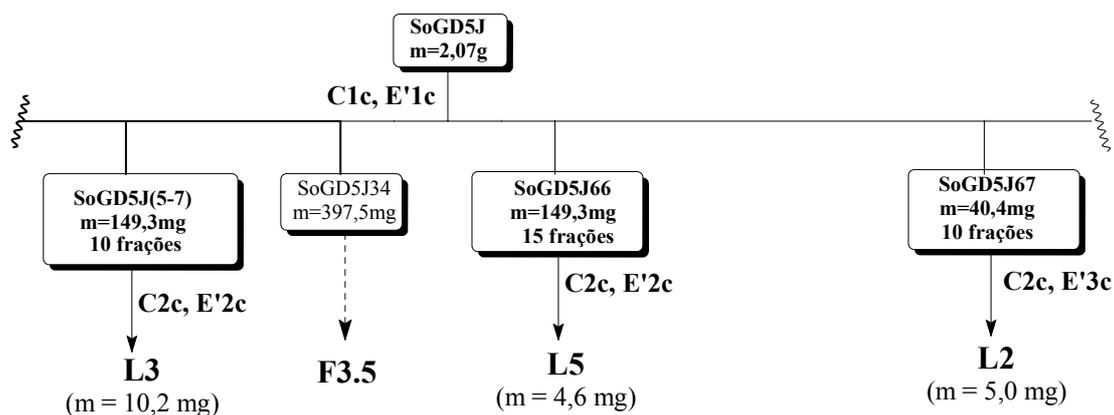
**E'2b**—Hexano/Diclorometano/Acetona (3,5:6:0,5).

**P1b** - Hexano/Diclorometano (2:8) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

**P2b** - Hexano/Diclorometano/Acetonitrila (3:6:1) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

**P3b** - Hexano/Diclorometano/Acetona (1:8:1) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

**FLUXOGRAMA 3.4 (F3.4):** Isolamento de substâncias da fração SoGD5J do extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).



**C1c** - h = 25,0 cm;  $\phi$  = 4,5 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

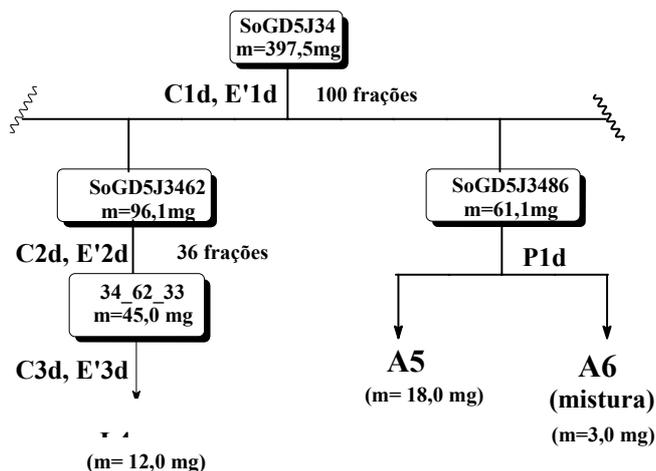
**E'1c**- Hexano/Diclorometano (1:9), Hexano/Diclorometano/Acetona (1:8:1), Hexano/Diclorometano/Acetona (1:7:2), Hexano/Diclorometano/Acetona (1:6:3), Diclorometano/Acetona (7:3), Acetona (100), Metanol (100).

**C2c** - h = 70,5 cm;  $\phi$  = 2,5 cm (Sephadex LH-20)

**E'2c**-Diclorometano/Metanol (1:1).

**E'3c**- Diclorometano/Metanol (4:6).

**FLUXOGRAMA 3.5 (F3.5):** Isolamento de substâncias da fração SoGD 5J34 do extrato diclorometânico dos galhos (SoGD).



**C1d** - h = 16,0 cm;  $\phi$  = 4,5 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'1d** - Diclorometano (100), Hexano/Diclorometano/Acetona (1:8,5:0,5), Hexano/Diclorometano/Acetona (1:8:1), Diclorometano/Acetona (8:2), Diclorometano/Acetona (1:1), Acetona (100), Metanol (100).

**C2d** - h = 27,0 cm;  $\phi$  = 3,3 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

**E'2d** - Diclorometano/Acetona (8:2), Diclorometano/Acetona (1:1), Acetona (100), Metanol (100).

**C3d** - h = 17,2 cm;  $\phi$  = 4,5 cm (Sílica gel 230-400 mesh)

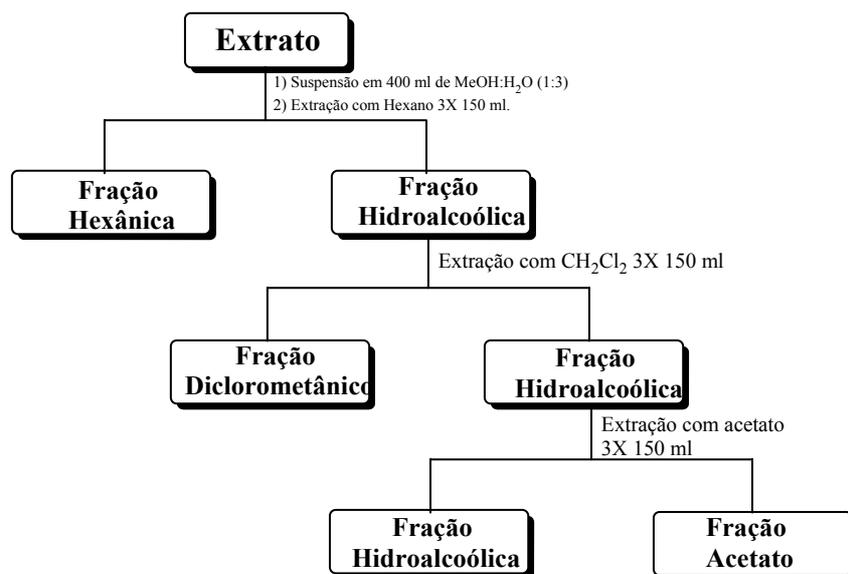
**E'3d** - Diclorometano/Acetato de etila (8:2), Diclorometano/Acetato de etila (1:1), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (9,5:0,5), Acetato de Etila/Metanol (9:1), Acetato de Etila/Metanol (7:3), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**P1d** - Diclorometano/Acetona (8:2) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

### 3.5.3– Pré-purificação do extrato metanólico dos galhos de *S. odoratissima* (SoGM)

O extrato metanólico com massa 16,69 g dos galhos da planta *S. odoratissima* foi submetido à partição líquido-líquido (Fluxograma 3.6) originando 3 frações (Tabela 3.4), após a reunião das frações hexânica e diclorometânica por apresentarem os mesmos constituintes químicos quando analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

**FLUXOGRAMA 3.6:** Metodologia utilizada na partição dos extratos metanólicos.



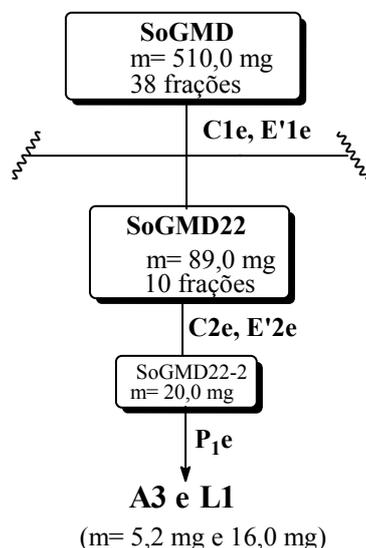
**TABELA 3.4:** Frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima*.

FRAÇÕES	AMOSTRA	MASSAS
Hexano	SoGMD	510 mg
Diclorometano		
Acetato de Etila	SoGMAc	3,5g
Metanol	SoGMM	2,0 g

### 3.5.3.1– Purificação da fração metanólica/diclorometânica (SoGMD)

O fluxograma 3.7 apresenta de maneira sucinta a purificação da fração SoGMD.

**FLUXOGRAMA 3.7:** Isolamento de substâncias da fração SoGMD do extrato metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima*.



**C1e** - h = 70,5 cm;  $\phi$  = 2,5 cm (Sephadex LH-20)

**E'1e**- Metanol (100), Metanol/Diclorometano (8:2), Metanol/Diclorometano (6:4), Metanol/Diclorometano (1:1).

**C2e** – Cromatroton: h = 26,0 cm (Sílica gel 375 mesh, PF<sub>254</sub>, 1mm)

**E'2e**– Diclorometano (100), Diclorometano/Acetato de Etila (9:1), Diclorometano/Acetato de Etila (7:3), Diclorometano/Acetato de Etila (6:4), Diclorometano/Acetato de Etila (4:6), Diclorometano/Acetato de Etila (2:8), Acetato de Etila (100), Acetato de Etila/Metanol (9:1), Acetato de Etila/Metanol (7:3), Acetato de Etila/Metanol (1:1), Metanol (100).

**P1e** - Hexano/Diclorometano/Acetona (1:8:1) (Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>)

### 3.6- Metodologia dos ensaios biológicos

#### 3.6.1- Ensaios biológicos com as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão com as operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sócios (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pela aluna Raquel Andrade Rossi, sob a coordenação do prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

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

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

Essas placas foram mantidas em estufa B.O.D a 24 °C ( $\pm$  1) e umidade relativa 70%, e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas, troca de dieta artificial e do papel filtro. Foi

estipulado um período máximo de 25 dias para cada experimento. Os resultados foram apresentados na forma de sobrevivência mediana ( $S_{50}$ ).

Neste ensaio foram considerados dois controles: dieta pura e dieta com o solvente utilizando na incorporação do material a ser testado à dieta. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ( $p < 0,05$ ), utilizando-se software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

### **3.6.2- Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus***

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

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 dextrose (10 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), peptona (5 g/L) extrato de malte (10 g/L) e agar (13.5 g/L); sendo que o pH do meio foi mantido em  $6,0 \pm 0,2$ , como ilustrado na Figura 3.1.

As amostras submetidas aos ensaios foram preparadas e adicionadas ao meio de cultura, segundo a metodologia descrita por PAGNOCCA et al. (1990). Para cada amostra foram preparadas de 8 a 10 réplicas de tubos de cultura (massa fúngica), havendo um número idêntico de réplicas para o solvente e para o controle geral. Após o tempo de incubação de 30 dias, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ) foram realizadas as observações visuais do crescimento do micélio, comparando-se a massa fúngica do controle com a massa fúngica da amostra.



**FIGURA 3.1-** Foto do fluxo laminar com o material necessário para o repique mensal do fungo simbiote *L. gongylophorus*: (A) tubos com meio e o fungo simbiote que foi repicado, (B) tubos com o meio que recebeu o fungo repicado, (C) alça e (D) bico de Bunsen.

### **3.6.3- Ensaio com as enzimas presentes no fluido fecal das formigas cortadeiras**

Os ensaios frente às pectinases presentes no fluido fecal das formigas *A. sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro pela aluna Cinthia Zavan, sob a coordenação do Prof. Dr. Maurício Bacci Junior.

Inicialmente, 4  $\mu\text{L}$  de uma solução em DMSO (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) da amostra a ser testada foram adicionados ao meio reacional (300  $\mu\text{L}$ ) constituído

por 150  $\mu\text{L}$  de pectina cítrica a 2 g.1000  $\text{mL}^{-1}$  (Sigma P-9135) em 50 mmol/L de tampão citrato-fosfato (pH = 5); 75  $\mu\text{L}$  de fluido fecal (contendo pectinase) diluído 500 vezes e 71  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura. Como controle, foi preparada a mesma mistura reacional sem a adição da amostra a ser testada. As misturas reacionais foram incubadas a 37 °C sob agitação por 30 minutos, sendo que alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram coletadas nos tempos de incubação zero e final. Estas alíquotas foram adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de reagentes ADNS (ácido dinitrosalisílico) (Miller, 1959) e 100  $\mu\text{L}$  de água. A mistura resultante foi fervida por 5 minutos, centrifugada por 3 minutos (15000 g) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da densidade ótica (DO) a 540 nm. As diferenças de DO no tempo zero e final foram calculados para os experimentos com a amostra testada ( $\text{DO}_E$ ) e para o controle ( $\text{DO}_C$ ). A atividade inibitória pectinásica foi calculada através da fórmula  $I = 1 - (\text{TC}^{-1})$ , onde T e C correspondem, respectivamente, à atividade pectinásica medida na presença e na ausência da amostra testada. Os resultados das densidades óticas foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney (SIEGL, 1956).

### **3.6.4- Ensaios antimicrobianos**

#### **3.6.4.1- Metodologia por difusão em ágar utilizando discos**

Os ensaios antimicrobianos por difusão em ágar utilizando discos, foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pela aluna Roberta N. A. Almeida, sob orientação do prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

Para os ensaios com microrganismos foi utilizado o método por difusão em ágar utilizando discos (BAUER et al, 1966), onde os extratos foram classificados quanto à sua atividade antimicrobiana comparando os diâmetros

dos halos de inibição com a padronização pré-estabelecida.

Como controle, discos foram embebidos com os respectivos solventes e tratados da mesma forma que os discos contendo extrato. Os meios utilizados nos ensaios foram Muller Hinton para as bactérias e YMA (Yeast Extract Malt Agar) para os fungos.

Os fungos foram desenvolvidos em Ágar Sabourand por 48 horas/25 °C e as bactérias desenvolvidas em Nutrient Ágar por 24 horas/35 °C antes do preparo do inóculo. Em seguida uma suspensão dos microrganismos foram preparadas com solução fisiológica 0,85% e a concentração ajustada frente ao tubo 0.5 McFarland de turbidez padrão ( $10^8$  unidades formadoras de colônias – UFC/mL). Em seguida uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi espalhada na superfície do meio que foi anteriormente adicionado na placa de Petri.

Após um período de 10 a 15 minutos, os discos (doze discos com  $\phi = 5$  mm/placa) foram regularmente distribuídos na superfície das placas com pinça e cuidadosamente pressionados sobre o ágar. Foi mantida uma distância de 1,5 cm entre os discos e de 1 cm da borda para evitar interferência entre os halos de inibição. Quinze minutos após a semeadura, as placas foram invertidas e incubadas.

Após 24 horas de incubação foi realizada uma leitura dos resultados das bactérias, enquanto que os fungos as leituras foram realizadas após 48, 72 e 98 horas. Cada ensaio é realizado em duplicata e repetido pelo menos uma vez.

Os discos contendo os antibióticos controles, tetraciclina e nistatina, foram preparados da mesma maneira de modo a conter respectivamente uma concentração de 20 e 10 µg/disco.

Os extratos foram classificados quanto à sua atividade antimicrobiana comparando os diâmetros dos halos de inibição com dos antibióticos padrões. A Tabela 3.5 relaciona os microrganismos utilizados neste ensaio, os antibióticos controles e suas respectivas concentrações.

**TABELA 3.5:** Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos e seus respectivos antibióticos de referências e suas concentrações.

<b>Bactérias</b>	<b>Antibióticos de referências</b>	<b>Concentrações (µg/disco)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC/6538	Tetraciclina	20
<i>Escherichia coli</i> CCT/1457	Tetraciclina	20
<i>Bacillus cereus</i> CCT/1436	Tetraciclina	20
<i>Micrococcus roseu</i> CCT/1469	Tetraciclina	20
<i>Cândida albicans</i>	Nistatina	10
<i>Cryptococcus laurentii</i> RJ/50359	Tetraciclina	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT/0758	Nistatina	20
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Nistatina	10

### 3.6.4.2- Metodologia por microdiluição em placa de Elisa

Os ensaios antimicrobianos por microdiluições foram realizados no Laboratório de bioensaios do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Esses ensaios foram realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória, segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 1997.

As cepas da American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisa de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (ELISA), onde diluições seriadas em duplicata das amostras e antibióticos de referência foram preparadas usando caldo de Mueller-Hinton para o crescimento das bactérias. As amostras foram transferidos para as placas de microdiluição depois de dissolvidas em DMSO (100µl) e caldo seletivo de crescimento bacteriano numa concentração inicial de 1000 µg/mL para as amostras testadas. Os inóculos

bacterianos foram preparados nestes meios e a concentração ajustada frente ao tubo 0.5 McFarland de turbidez padrão ( $10^8$  unidades formadoras de colônias – UFC/mL) e respectivamente diluídos nas razões de 1:10 no caldo, para o procedimento de microdiluição.

Porções de 5  $\mu$ L de cada suspensão bacteriana foram transferidas para todos os poços da placa de microdiluição contendo 100  $\mu$ L da amostra a ser testada ou do antibiótico de referência (controle). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o crescimento e leitura dos resultados em cada poço da placa foram adicionados 10  $\mu$ L de revelador de crescimento bacteriano – o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). O TTC muda de coloração (incolor pra vermelho) quando há crescimentos bacterianos, tornando as culturas de bactérias avermelhadas.

A concentração inibitória mínima (CIM) nestes ensaios foi considerada a menor concentração da amostra que impede visivelmente o crescimento microbiano. A Tabela 3.6 relaciona os microrganismos utilizados neste ensaio, os antibióticos controles e suas respectivas concentrações inibitórias.

**TABELA 3.6:** Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos e seus respectivos antibióticos de referências com as concentrações iniciais utilizadas nas placas de microdiluição e as concentrações mínimas inibitórias (CMI).

<b>Bactérias</b>	<b>Antibióticos de referências</b>	<b>Concentrações iniciais (µg/mL)</b>	<b>CMI (µg/mL)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Tetraciclina	3,0	0,75
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Tetraciclina	25,0	3,125
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6623	Vancomicina	3,0	0,0046
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Tetraciclina	25,0	1,5625
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Tetraciclina	3,0	0,1875
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Nistatina	100,0	6,25

### **3.7- Experimentos de biotransformação da flavona pelo fungo simbionte da formiga *Atta sexdens rubropilosa*.**

#### **3.7.1 - Experimento com cultivo do fungo simbionte em meio líquido**

O experimento com cultivo do fungo simbionte em meio líquido foi realizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, sob orientação do prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e do prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar).

##### **a) Preparação do inóculo do fungo *L. gongylophorus***

O material utilizado foi esterilizado na estufa (180 °C/2 horas) enquanto a água peptonada (0,1%) autoclavada a 121 °C por 15 minutos.

Preparou-se 50 mL de inóculo utilizando-se 2 tubos grandes

(25x175 mm) de fungo. O micélio foi retirado do tubo de ensaio com uma alça e colocado no tissue-grinder estéril com um pouco de água peptonada (0,1%) para ser macerado. Depois de macerado o inóculo foi colocado em um frasco com tampa estéril. A maceração foi feita com o micélio do fungo dos dois tubos de ensaio obtendo 50 mL de inóculo.

Com 10 mL de inóculo fez-se o peso seco do fungo em mg/mL. Pipetou-se 5 mL do inóculo em um vidro de relógio e também 5 mL só da água peptonada em outro vidro de relógio (duplicatas). Em seguida foi colocado na estufa para secar à 103°C por 3 horas ou 70°C por 24 horas.

Para obter o peso seco foi subtraído do peso seco do inóculo o peso seco da água peptonada. O valor do peso seco foi mantido entre 4-6 mg/mL.

## **b) Cultivo em meio líquido**

O meio de cultivo líquido utilizado para esse experimento foi o YNB que continha todos os nutrientes e fonte de carbono (glucose) necessário para o crescimento fúngico.

### **b.1) Substrato**

O substrato utilizado foi a flavona de origem comercial ou isolada de plantas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### **b.2) Cultivo**

O experimento de biotransformação da flavona foi dividido em duas partes: na primeira parte do experimento foi adicionado no 1º dia o substrato em cada Erlenmeyer contendo meio líquido e inóculo do fungo *L.*

*gongylophorus* (Experimento 1); na segunda parte do experimento somente foi adicionado no 30° dia de desenvolvimento do fungo *L. gongylophorus* o substrato em cada Erlenmeyer (Experimento 2).

Em 18 frascos de Erlenmeyers de 500 mL foram colocados 40 mL de meio de cultivo líquido, autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Em seguida foram adicionados 10 mL do inóculo do fungo *L. gongylophorus* nos frascos de Erlenmeyers de ambos os experimentos. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados a 25 °C com duração de 30 dias para o Experimento 1 e 60 dias para o Experimento 2 que teve o inóculo apenas adicionado no 30° dia.

Para cada parte do experimento foi adicionado o substrato em quintuplicata, com concentração final dentro de cada Erlenmeyer de 30 µg/mL.

Cada parte do experimento constituiu de 9 frascos de Erlenmeyers, utilizando como controle 3 frascos de Erlenmeyers com meio, 4 frascos de Erlenmeyers com meio, fungo e solvente e 2 frascos de Erlenmeyers com meio e substrato.

### **c) Extração dos produtos de biotransformação**

Terminado o período de biotransformação, os meios líquidos, sem e com substrato foram separados do fungo por filtração a vácuo e submetidos à partição com acetato de etila e água, cujas fases orgânicas foram evaporadas.

Os micélios, após a separação do meio líquido, foram desidratados em uma estufa a 50 °C, moídos e submetidos a extrações com diclorometano, diclorometano/metanol (1:1) e metanol durante 15 minutos, com auxílio de um sonicador, por duas vezes com cada solvente. Em seguida foram feitos a pré-purificação da união desses extratos em coluna utilizando sílica gel flash.

O meio líquido de ambos os experimentos, que será denominado

durante o texto de MLE1 para o Experimento 1 e MLE2 para o Experimento 2, foram pré-purificados utilizando uma coluna com sílica gel flash (h=21,0 cm,  $\phi$ = 3,6 cm) com as eluições com diclorometano/acetona (9,5/0,5; 9/1; 8/2; 1/1;) acetona (100) e metanol (100).

Os extratos dos micélios reunidos (MiE) com massa 28,7 mg foi pré-purificado utilizando uma coluna com sílica gel flash (h=21,0 cm,  $\phi$ = 3,6 cm) com as eluições com diclorometano/acetona (9,5/0,5; 9/1; 8/2; 1/1;) acetona (100) e metanol (100).

### **3.7.2- Experimento com cultivo do fungo simbiote em meio sólido**

Os experimentos com cultivo do fungo simbiote em meio sólido foram realizados no Laboratório de bioensaios do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, sob orientação do prof. Dr. João Batista Fernandes e do prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca (UNESP- Rio Claro).

#### **a) Preparação do inóculo do fungo *L. gongylophorus***

A preparação do inóculo está descrita na seção 3.7.1 (a).

#### **b) Cultivo em meio sólido**

O fungo foi isolado do ninho ASR 5L (18/03/2004) de formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* e foi mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura (composição em g/L: dextrose = 10; cloreto de sódio = 5; peptona = 5; extrato de malte = 10 e ágar = 17). O pH do meio foi mantido em aproximadamente 6,5, como descrito anteriormente na seção 3.6.2.

1 mL de solução de flavona dissolvida em etanol/água (1:1) (30 µg/mL) foi adicionada em tubos de ensaios com 9 mL de meio. Em seguida 1 mL do inóculo (5 mg/mL) foi adicionado e os tubos foram inclinados. Também foram preparadas réplicas com solventes, além do controle geral.

Após o tempo de incubação de 30 dias a uma temperatura de 25 °C, as avaliações dos resultados foram feitas por observação visual do crescimento do micélio, determinando-se a porcentagem de inibição do mesmo (PAGNOCCA et al., 1990).

### **3.8- Experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa*.**

O experimento de biotransformação da flavona (iscas) incorporada no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa* foi montado no Centro de Estudos de Insetos Sócios (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pela técnica Itamar Cristina Reiss, sob a coordenação do prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

#### **a) Substrato**

O substrato utilizado foi a flavona, de origem comercial ou isolada de plantas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Neste experimento o substrato foi incorporado em iscas de polpa cítrica.

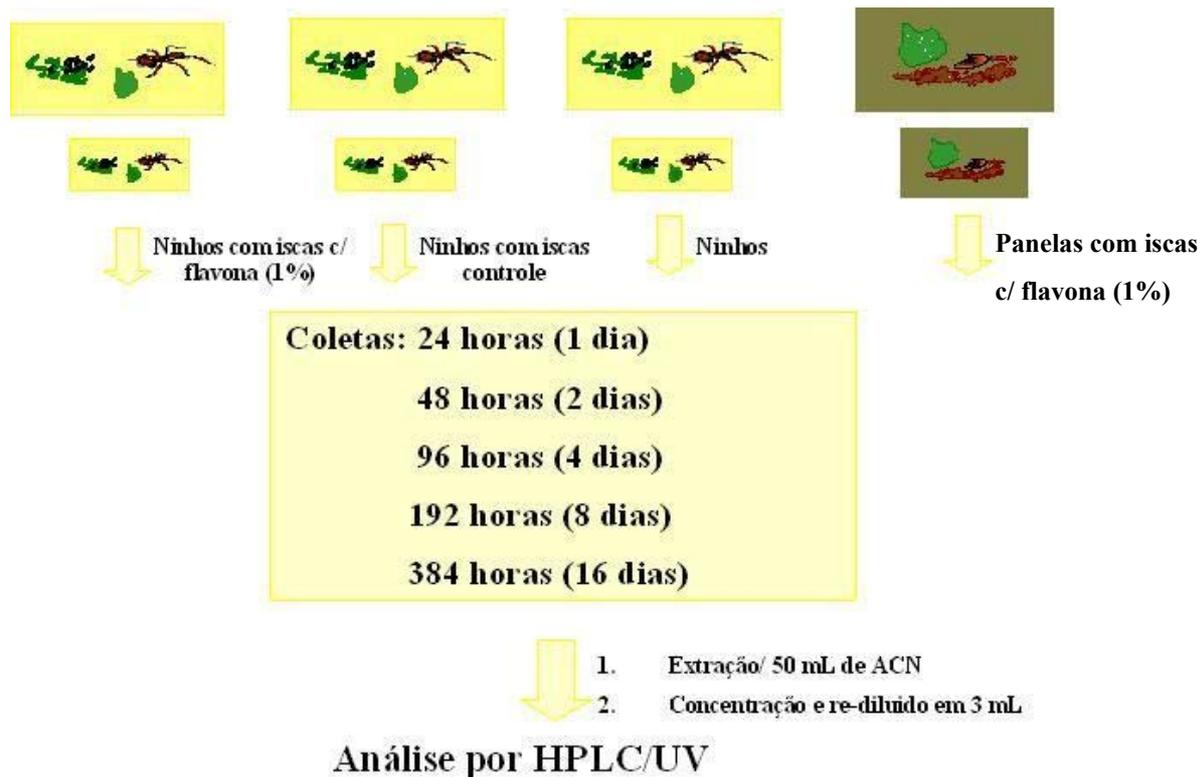
## **b) Incorporação das iscas com flavona**

Os formigueiros de *A. sexdens rubropilosa* utilizados foram os mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP.

O experimento realizado consistiu na incorporação das iscas com flavona (1%) e sem flavona nos formigueiros e painéis (terra+folhas) mantidos em laboratório. Foram utilizados 6 ninhos e 2 painéis, em dois ninhos (médio e pequeno) e duas painéis (média e pequena) foram incorporados iscas com flavona (1%) e em outros dois ninhos foram incorporados iscas sem flavona (controle). Nos dois ninhos que restaram não foram incorporadas iscas (controle), como demonstrado no Esquema 3.1.

Esse experimento teve duração de 16 dias, no qual foram coletadas amostras dos formigueiros, lixo dos formigueiros e painéis no 1º dia, 2º dia, 4º dia, 8º dia e 16º dia, para monitoramento das modificações ocorridas no substrato.

A cada coleta das amostras dos formigueiros, lixo dos formigueiros e painéis, esse material foi submetido à extração, concentração e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível (HPLC/UV).



ESQUEMA 3.1- Experimento de biotransformação da flavona incorporada no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*.

### 3.8.1- Metodologia de análises por HPLC/UV das amostras coletadas no experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*

#### 3.8.1.1-Preparo da amostra

As amostras coletadas (2,0 g) foram submetidas à extração com acetonitrila (50 mL) por duas horas. Em seguida foram filtradas, concentradas e re-dissolvidas em 3 mL de acetonitrila (ACN).

### 3.8.1.2-Análises por HPLC/UV

Metodologias de análise para as amostras coletas foram desenvolvidas por HPLC/UV (ZHANG, J. et al, 2005; MOULY, P. et al, 1998; NIELSEN, S. E. et al, 2000). Duas colunas de fases diferentes (fenil-hexil Phenomenex e C-18 ODS Phenomenex) foram testadas em vários fluxos e volume de injeção de amostra, assim como métodos de preparo de amostra e variação da fase móvel.

As condições estabelecidas foram:

Coluna analítica: C-18 ODS

Fase móvel: Água/Metanol (1:1)

Faixa de detecção do UV:  $\lambda = 217$  e  $254$  nm

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 20  $\mu$ L

### 3.8.1.3-Preparação da coluna analítica

A sílica C-18 ODS Phenomenex 10  $\mu$ m (2,5 g) foi suspensa em 45 mL de metanol grau HPLC, previamente filtrado, e sonicada por 2 minutos.

Uma coluna de aço inox de 150 x 4,6 mm (DI) foi limpa interiormente com algodão embebido em metanol. Em seguida foi acoplada ao aparelho empacotador de colunas e a suspensão de sílica foi transferida para o interior da coluna com o auxílio de um funil. A seguir, o sistema foi fechado e foram bombeados 100 mL de metanol através da coluna no sentido de cima para baixo e 150 mL de metanol no sentido inverso, para retirar possíveis bolhas formadas. Depois, desligou-se o aparelho e esperou-se a pressão (7000 psi) zerar para abrir o sistema, observando se a cabeça da coluna estava completa com a fase estacionária.

Terminado o empacotamento, a coluna foi acoplada ao HPLC e condicionada por quatro horas em metanol, com fluxo 0,5 mL/min. Depois de condicionada, uma solução de padrões (benzamida (3,7 mg), acetofenona (0,6 mg) e benzofenona (0,7 mg) em solução 70% metanol) foi injetada para verificar se o empacotamento da coluna estava adequado. As condições foram:

Fase móvel: Água/Metanol (1:1)

Faixa de detecção do UV:  $\lambda = 254$  nm

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 10  $\mu$ L

### **3.8.1.4- Curva de calibração externa**

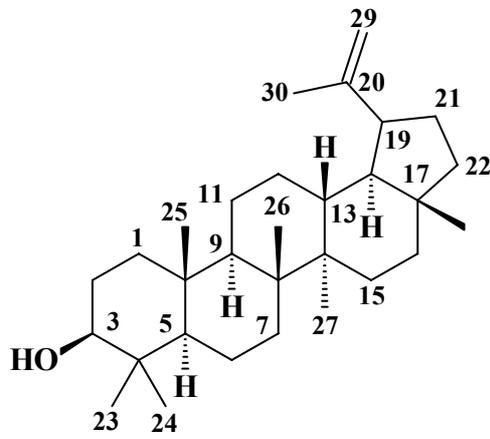
Uma amostra padrão de flavona (1000  $\mu$ g/mL) foi preparada e acondicionada sob refrigeração (4 °C). Em seguida alíquotas de 50, 100, 200, 400 e 700  $\mu$ L foram transferidos para eppendorfs, completados para 1 mL com acetonitrila e agitados em vortex por 10 segundos para obter as concentrações de 50, 100, 200, 400 e 700  $\mu$ g/mL.

Essas amostras padrões foram preparadas em triplicata e injetadas nas condições descritas na seção 3.8.1.2. Os dados obtidos foram usados na determinação da curva de calibração externa, a qual foi construída plotando-se as concentrações da amostra padrão de flavona pelas áreas.

## **4-RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

#### 4.1- Substâncias isoladas da planta *Spiranthera odoratissima*



(T1)

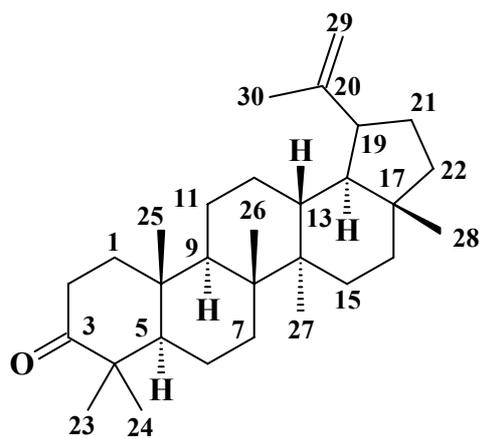
**Lupeol (T1)**

m= 115,8 mg

Procedência: folhas

Isolamento: p. 17 e 18

Identificação: p. 47



(T2)

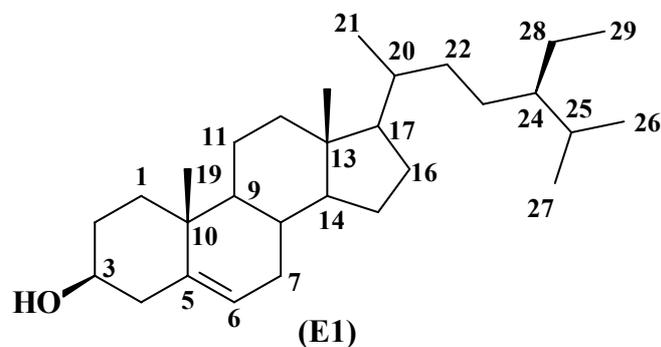
**Lupenona (T2)**

m= 31,2 mg

Procedência: folhas

Isolamento: p.17 e 18

Identificação: p. 47



(E1)

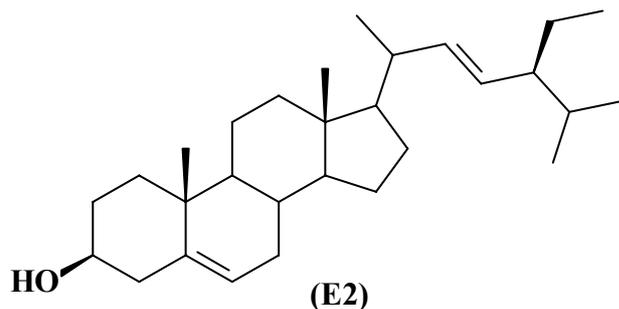
**Sitosterol (E1)**

m= 6,0 mg (mistura)

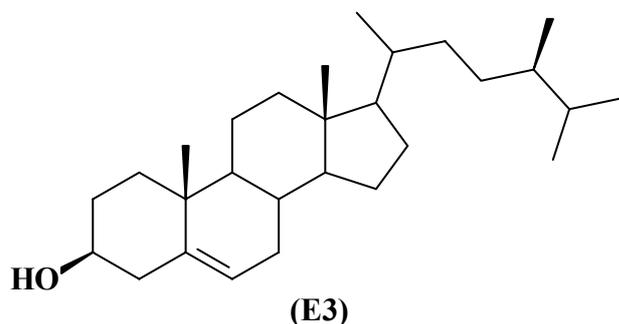
Procedência: galhos

Isolamento: p. 19 e 22

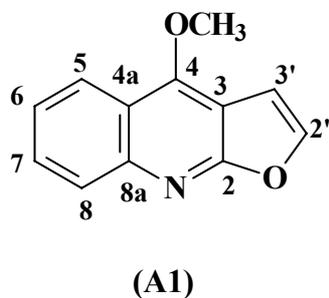
Identificação: p. 55



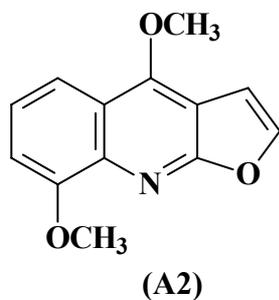
**Estigmasterol (E2)**  
 m= 6,0 mg (mistura)  
 Procedência: galhos  
 Isolamento: p. 19 e 20  
 Identificação: p. 55



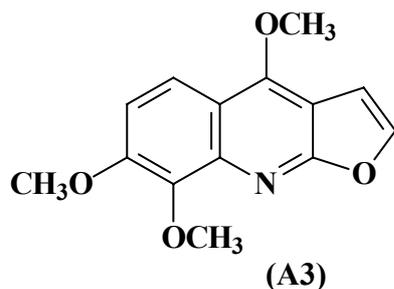
**Campesterol (E3)**  
 m= 6,0 mg (mistura)  
 Procedência: galhos  
 Isolamento: p. 19 e 20  
 Identificação: p. 55



**Dictamina (A1)**  
 m= 7,8 mg  
 Procedência: galhos  
 Isolamento: p. 19 e 20  
 Identificação: p. 59



**Fagarina (A2)**  
 m= 8,7 mg  
 Procedência: galhos  
 Isolamento: p. 19, 20 e 21  
 Identificação: p. 59



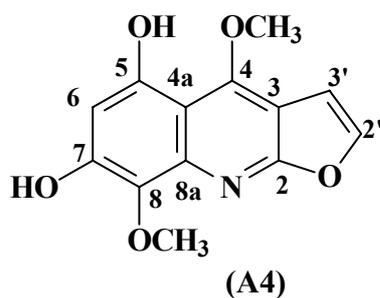
**Esquimianina (A3)**

m= 12,6 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20, 21,  
24 e 25

Identificação: p. 59

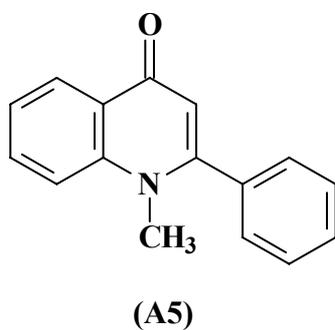


**4,8-metoxifuro[2,3-B]quinolina-5-  
7-diol (A4)**

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20 e 21

Identificação: p. 66



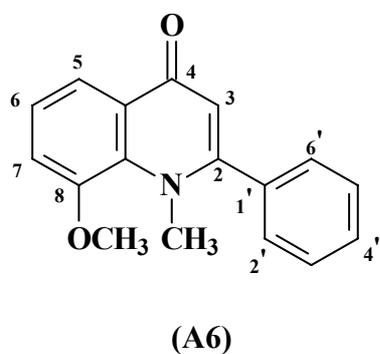
**2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (A5)**

m= 18,0 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 20, 21, 23, e 24

Identificação: p. 69



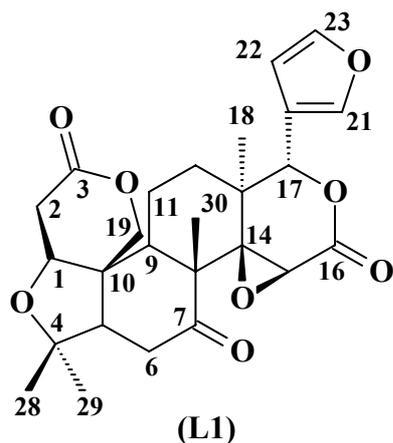
**2-fenil-1-metil-8-metoxi-4-quinolin-4-  
ona (A6)**

m= 3,0 mg (mistura)

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20, 22, e 23

Identificação: p. 75



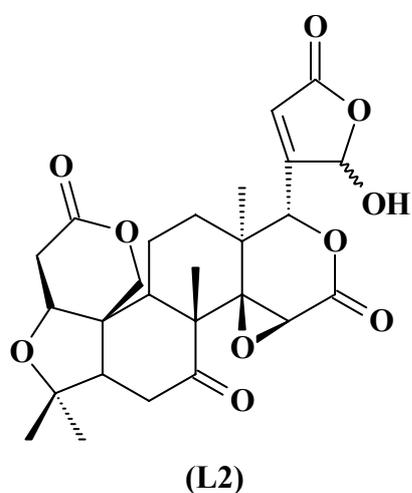
**Limonina (L1)**

m= 16,0 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 24 e 25

Identificação: p. 82



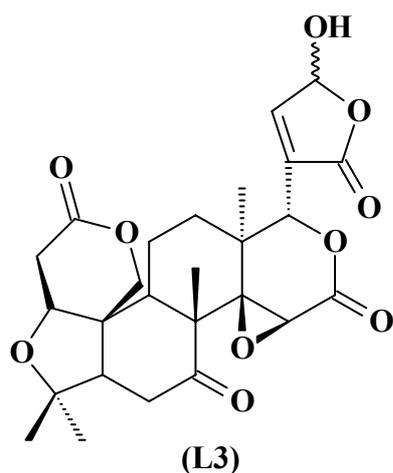
**Ácido limonéxico (L2)**

m= 5,0 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20 e 22

Identificação: p. 88



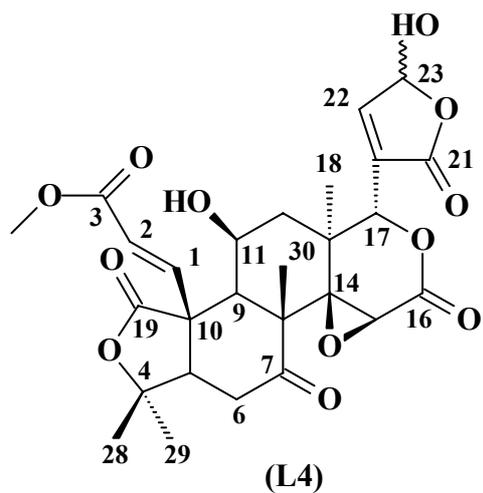
**Ácido iso-limonéxico (L3)**

m= 10,2 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20 e 22

Identificação: p. 94



**Spirantina ou 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina (L4)**

m= 12,0 mg

Procedência: galhos

Isolamento: p. 19, 20, 22 e 23

Identificação: p. 100

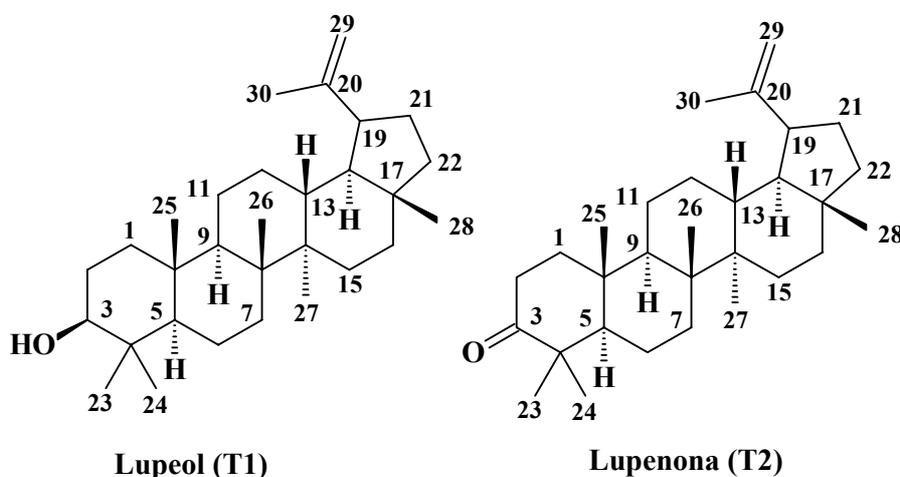
## 4.2- Triterpenos

Os triterpenos são compostos contendo 30 átomos de carbonos. Podem ser formados através da junção de duas unidades de farnesilpirofosfato, formando o esqualeno, cuja ciclização resulta em diferentes tipos de esqueleto, sendo conhecidos mais de 4000 triterpenos naturais. As principais classes encontradas de triterpenos são: os tetracíclicos (mais comuns em Rutaceae) e os pentacíclicos (DEWICK, 2001).

Neste trabalho foram isolados dois triterpenos: lupeol (**T1**) e a lupenona (**T2**).

### 4.2.1- Identificação das substâncias T1 e T2

As substâncias **T1** e **T2** foram isoladas das frações SoFH-4 e SoFH-8, respectivamente, originadas do extrato hexânico das folhas de *S. odoratissima*. Suas estruturas foram determinadas com base nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4.1).



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **T1** (Figura 4.1 e Tabela 4.1 A) mostrou a presença de seis singletos na região  $\delta$  0,76-1,04, referentes aos hidrogênios metílicos ligados aos carbonos terciários e um singlete em  $\delta$  1,67, que corresponde aos hidrogênios metílicos ligado a carbono de hibridação  $\text{sp}^2$ . Os sinais em  $\delta$  4,57 (*dd*,  $J=2,4$  e  $1,4$  Hz) e  $\delta$  4,69 (*d*,  $J= 2,4$  Hz) juntamente com o sinal em  $\delta$  3,19 (*dd*,  $J=9.8$  e  $5,2$  Hz ), mostraram respectivamente a presença dos hidrogênios de dupla exocíclica e carbinólicos. A partir desses sinais pôde-se sugerir que a substância **T1** tratava de um triterpeno com esqueleto lupânico com um grupo hidroxila no C-3.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **T1** (Figura 4.2) observou-se à presença de 30 sinais para carbonos (Tabela 4.1 B). Os sinais em  $\delta$  151,1, 109,5 e 79,2 confirmaram a presença dos carbonos da ligação dupla exocíclica e o carbono carbinólico, respectivamente.

A partir dos dados espectrais obtidos comparados com os da literatura (MAHATO et al, 1994) pôde-se propor a estrutura do triterpeno pentacíclico lupeol (**T1**).

Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **T2** (Figura 4.3 e Tabela 4.1 A) observou-se a presença de seis singletos na região  $\delta$  0,78-1,05, referentes aos hidrogênios metílicos ligados aos carbonos terciários e um singlete em  $\delta$  1,66; que corresponde aos hidrogênios metílicos ligado a carbono de hibridação  $\text{sp}^2$ . Observaram-se também os sinais em  $\delta$  4,55 (*dl*,  $J=2,0$  Hz) e  $\delta$  4,67 (*d*,  $J= 2,0$  Hz) referentes aos hidrogênios de dupla exocíclica, mas não se observou o sinal na região de  $\delta$  3,19 do hidrogênio carbinólico.

O espectro de PENDANT da substância **T2** (Figura 4.4) mostrou os sinais em  $\delta$  150,7 e 109,3 dos carbonos da ligação dupla exocíclica e em  $\delta$  217,9 de carbono carbonílico. Os dados do espectro de PENDANT (Tabela 4.1) mostraram a presença de 7 sinais de carbono metílicos, 11 carbonos metilênicos,

5 carbonos metínicos, carbonos quaternários, um carbono carbonílico e dois carbonos olefínicos.

A ausência do hidrogênio carbinólico no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **T2** (Figura 4.3) e a presença de um sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  217,9 no espectro de PENDANT (Figura 4.4), sugeriu da substância **T2** ser a lupenona, que foi confirmado pela comparação de seus dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4.1 B) com dados da literatura (MAHATO et al, 1994).

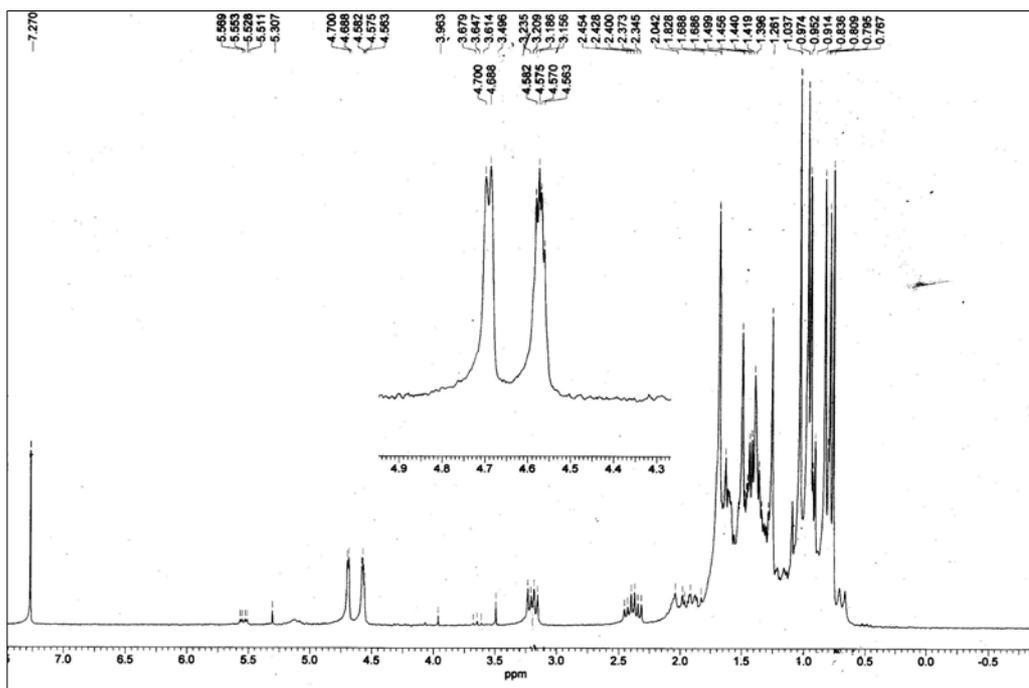


FIGURA 4.1: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância T1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

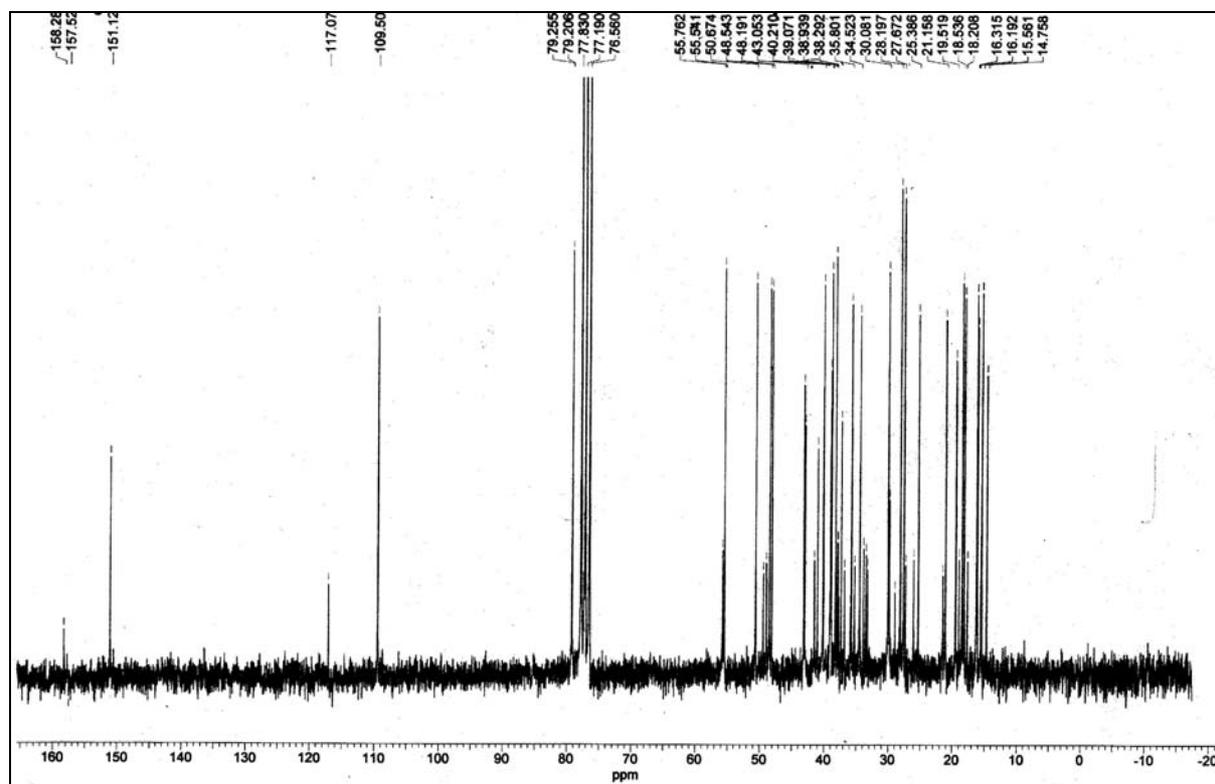


FIGURA 4.2: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância T1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

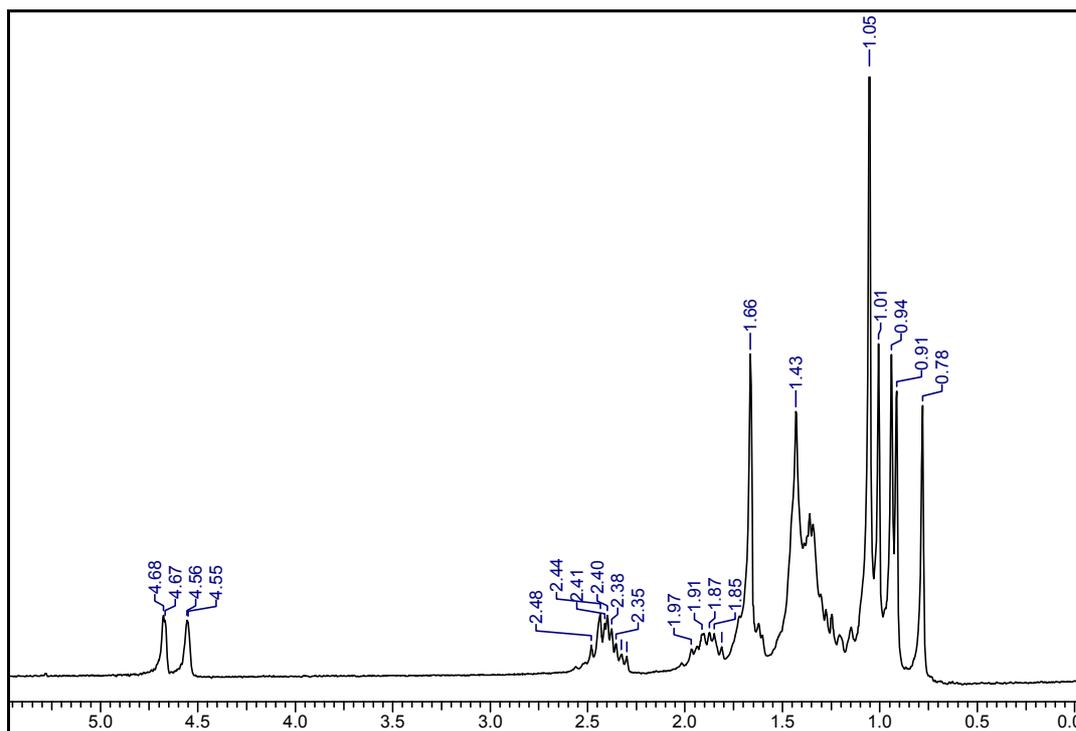


FIGURA 4.3: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância T2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

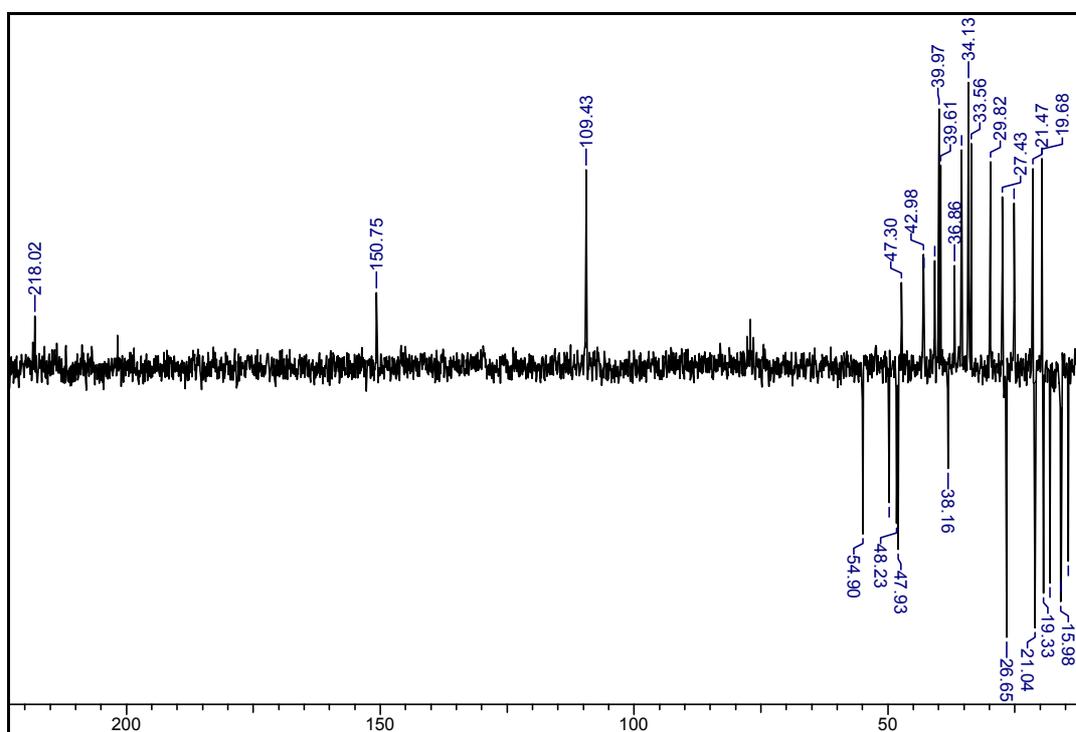
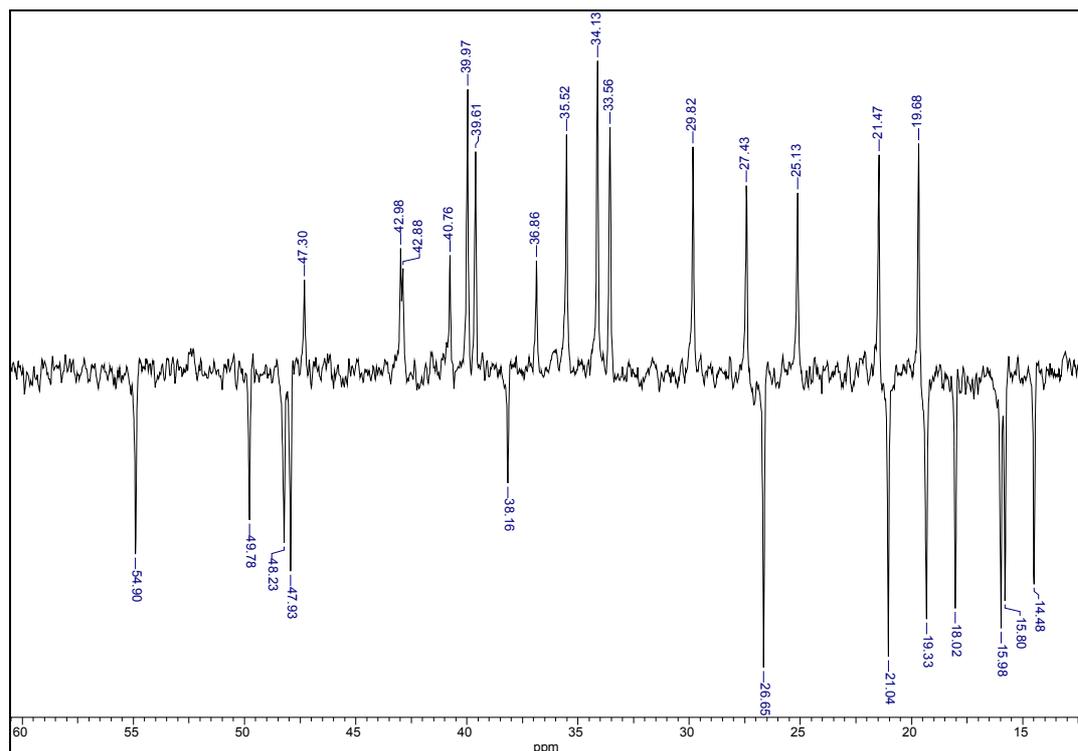


FIGURA 4.4: Espectro de PENDANT da substância T2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



**FIGURA 4.5:** Ampliação do espectro de PENDANT da substância **T2** na região de 0-60 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

**TABELA 4.1 A:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  para as substâncias **T1** e **T2** ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz).

Posição	T1 ( $\delta_{\text{H}}$ )	T2 ( $\delta_{\text{H}}$ )
3	3,19 ( <i>dd</i> , $J=9.8$ e $5,2$ Hz)	-
19	2,38 ( <i>m</i> )	2,40 ( <i>m</i> )
23		
24		
25	0,79 ( <i>s</i> ), 0,83 ( <i>s</i> ), 0,95 ( <i>s</i> ),	0,78 ( <i>s</i> ), 0,91 ( <i>s</i> ), 0,94 ( <i>s</i> ),
26	0,97 ( <i>s</i> ), 1,03 ( <i>s</i> )	1,01 ( <i>s</i> ), 1,05 ( <i>s</i> )
27		
28		
29	4,57 ( <i>dd</i> , $J=2,4$ e $1,4$ Hz) e 4,69 ( <i>d</i> , $J=2,4$ Hz)	4,55 ( <i>dl</i> , $J=2,0$ Hz) e 4,67 ( <i>d</i> , $J=2,0$ Hz)
30	1,67 ( <i>s</i> )	1,66 ( <i>s</i> )

(\*) ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

**TABELA 4.1 B:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **T1** e **T2** ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz).

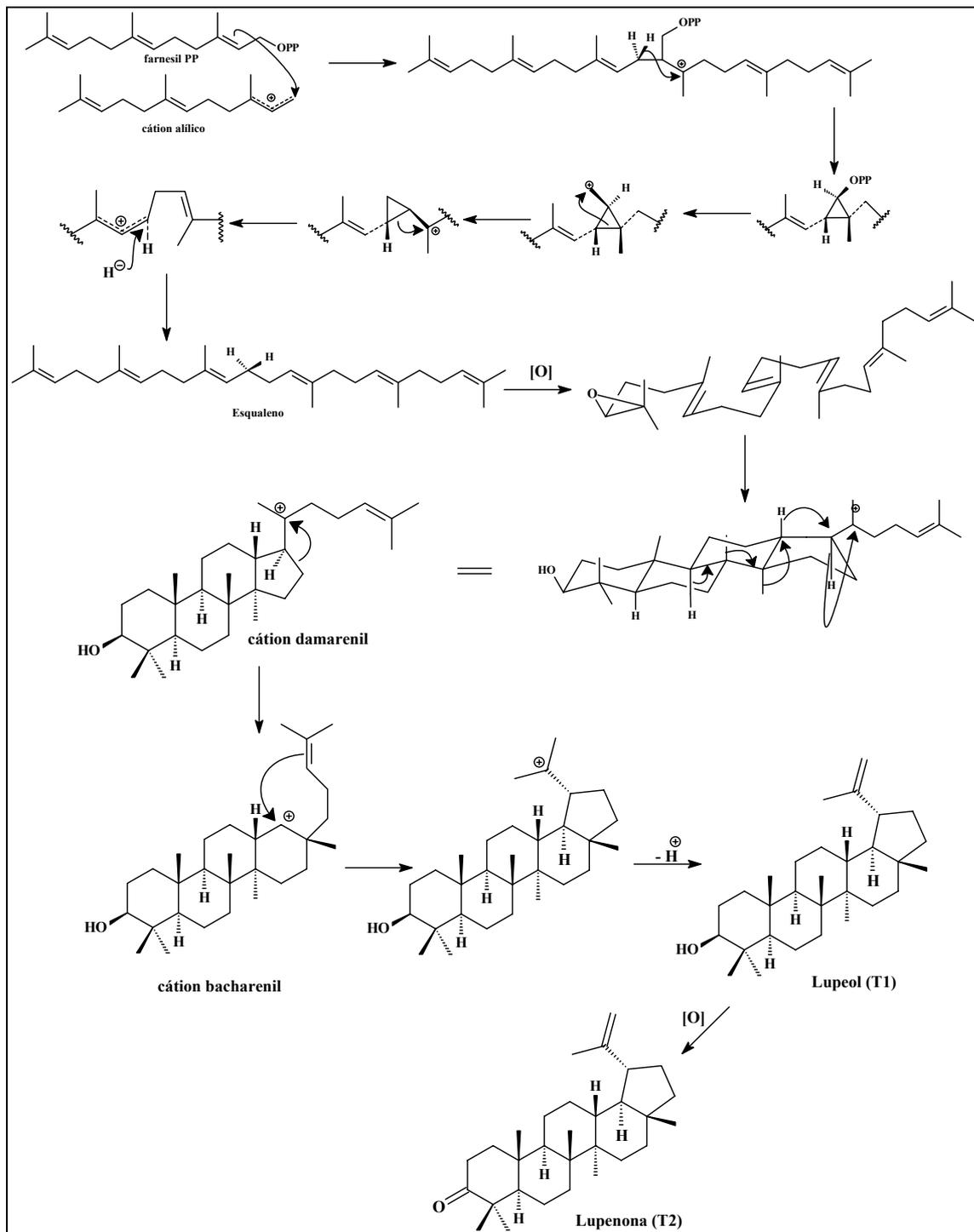
<b>Posição</b>	<b>T1</b> ( $\delta_{\text{C}}$ )	<b>MAHATO et al.,</b> <b>1994(*)</b> ( $\delta_{\text{C}}$ )	<b>T2</b> ( $\delta_{\text{C}}$ )	<b>MAHATO et al.,</b> <b>1994(*)</b> ( $\delta_{\text{C}}$ )
<b>1</b>	38,9	38,7	39,6	39,7
<b>2</b>	27,7	27,4	34,1	34,2
<b>3</b>	79,2	78,9	218,0	217,0
<b>4</b>	39,1	38,8	47,3	47,4
<b>5</b>	55,5	55,3	54,9	55,0
<b>6</b>	18,5	18,3	19,7	20,0
<b>7</b>	34,5	34,2	33,6	33,7
<b>8</b>	40,2	40,8	40,8	40,1
<b>9</b>	50,7	50,4	49,8	50,0
<b>10</b>	-	37,1	36,9	37,0
<b>11</b>	21,1	20,9	21,5	21,5
<b>12</b>	25,3	25,1	25,1	25,3
<b>13</b>	38,3	38,0	38,2	38,8
<b>14</b>	43,0	42,8	42,9	43,0
<b>15</b>	27,7	27,4	27,4	28,0
<b>16</b>	35,8	35,5	35,5	35,6
<b>17</b>	43,0	43,0	43,0	43,0
<b>18</b>	48,5	48,2	48,2	48,4
<b>19</b>	48,2	47,9	47,9	48,0
<b>20</b>	151,5	150,9	150,7	150,8
<b>21</b>	30,1	29,8	29,8	30,0
<b>22</b>	40,2	40,0	39,97	40,0
<b>23</b>	28,2	28,0	26,6	26,7
<b>24</b>	15,6	15,4	21,0	21,0
<b>25</b>	16,2	16,1	16,0	15,9
<b>26</b>	16,3	15,9	15,8	15,9
<b>27</b>	14,7	14,5	14,5	14,5
<b>28</b>	18,2	18,0	18,0	18,0
<b>29</b>	109,5	109,3	109,4	109,4
<b>30</b>	19,5	19,3	19,3	19,4

(\*) ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

(-) não observou sinal

## 4.2.2- Biossíntese dos triterpenos

O Esquema 4.1 apresenta a proposta de biossíntese dos triterpenos (DEWICK, 2001).



ESQUEMA 4.1: Proposta da biossíntese dos triterpenos pentacíclicos T1 e T2.

### 4.3- Esteróides

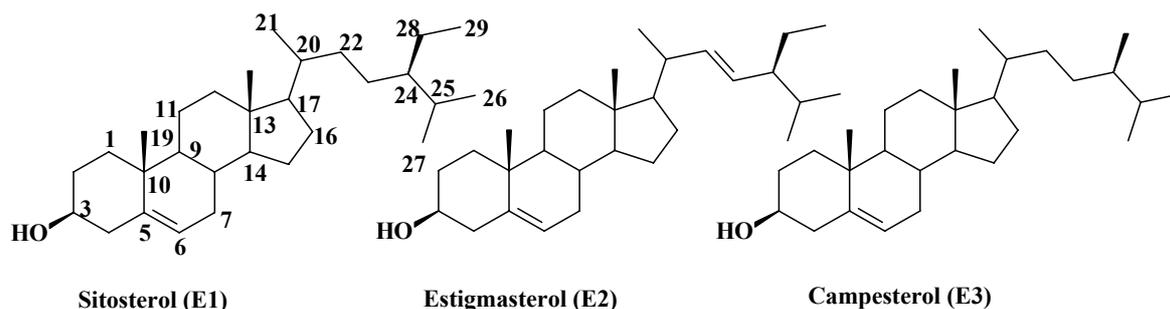
Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14 (DEWICK, 2001).

O fitoesteróide mais comum nas plantas é o  $\beta$ -sitosterol (stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol) (**E1**).

Neste trabalho foram isolados três esteróides:  $\beta$ -sitosterol (**E1**), estigmasterol (**E2**) e campesterol (**E3**).

#### 4.3.1- Identificação das substâncias E1, E2 e E3

As substâncias **E1**, **E2** e **E3** foram encontradas em mistura na fração SoGD-4 do extrato diclorometânico dos galhos de *S. odoratissima*. Suas estruturas foram determinadas com base nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e GC/MS(EI).



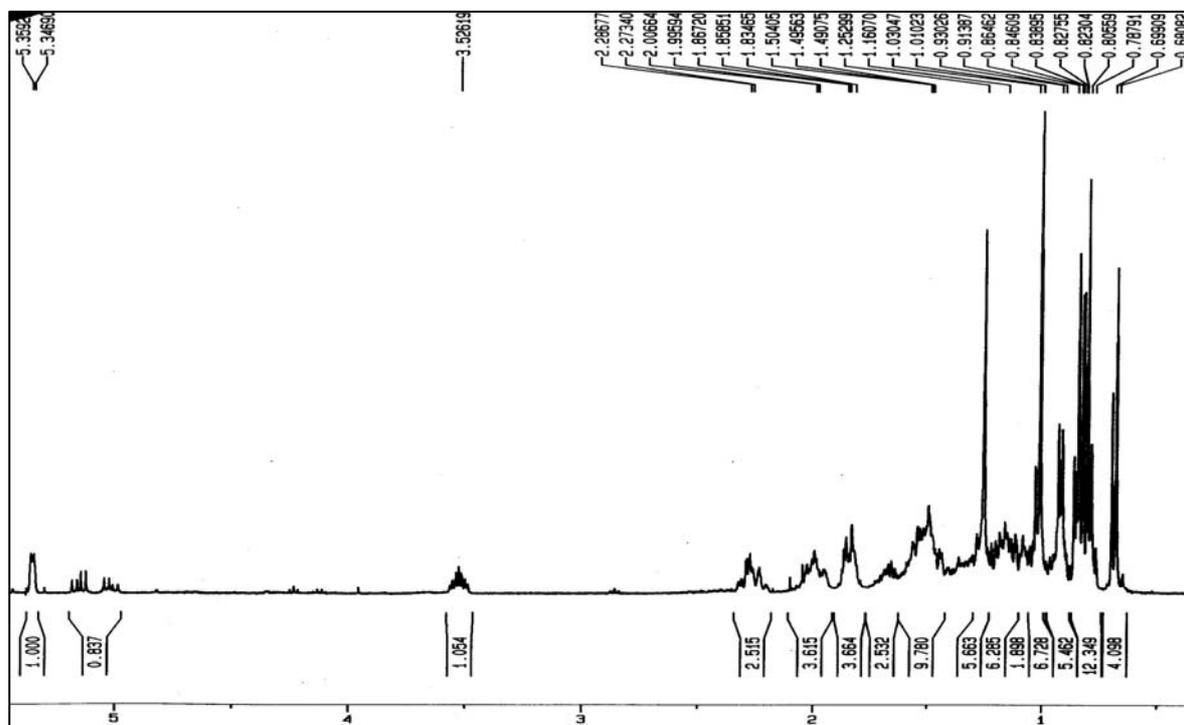
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **E1**, **E2** e **E3** (Figura 4.6) mostrou a presença dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos na região  $\delta$  0,68-2,30. Os sinais em  $\delta$  3,53 (*m*) e  $\delta$  5,35 (*dl*,  $J= 4,9$ ) foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-6, hidrogênio carbinólico e hidrogênio ligado à carbono  $\text{sp}^2$ , respectivamente; e os sinais em  $\delta$  5,06 (*dd*,  $J= 15,2$  e 8,6

Hz) e  $\delta$  5,15 (*dd*,  $J = 15,2$  e  $8,6$  Hz) aos hidrogênios vinílicos, que sugeriram a presença do estigmasterol na mistura.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias **E1**, **E2** e **E3** (Figura 4.7) mostrou a presença de sinais em  $\delta$  140,7 e  $\delta$  121,7 referentes aos C-5 e C-6 do  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol, e sinais em  $\delta$  129,3 e  $\delta$  138,3 referentes aos C-23 e C-22 do estigmasterol.

A mistura das substâncias **E1**, **E2** e **E3** foram analisadas por GC/MS(EI), cujo os picos do íon molecular em  $[\text{M}^+]$   $m/z$  414, 412 e 400 confirmaram a presença do sitosterol, estigmasterol e campesterol, respectivamente.

Portanto, analisando os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  juntamente com os espectros de massas obtidos por GC/EM(EI) (Figuras 4.8, 4.9 e 4.10) da amostra pode-se chegar a identificação da mistura dos esteróides sitosterol, estigmasterol e campesterol.



**FIGURA 4.6:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de substâncias **E1**, **E2** e **E3** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

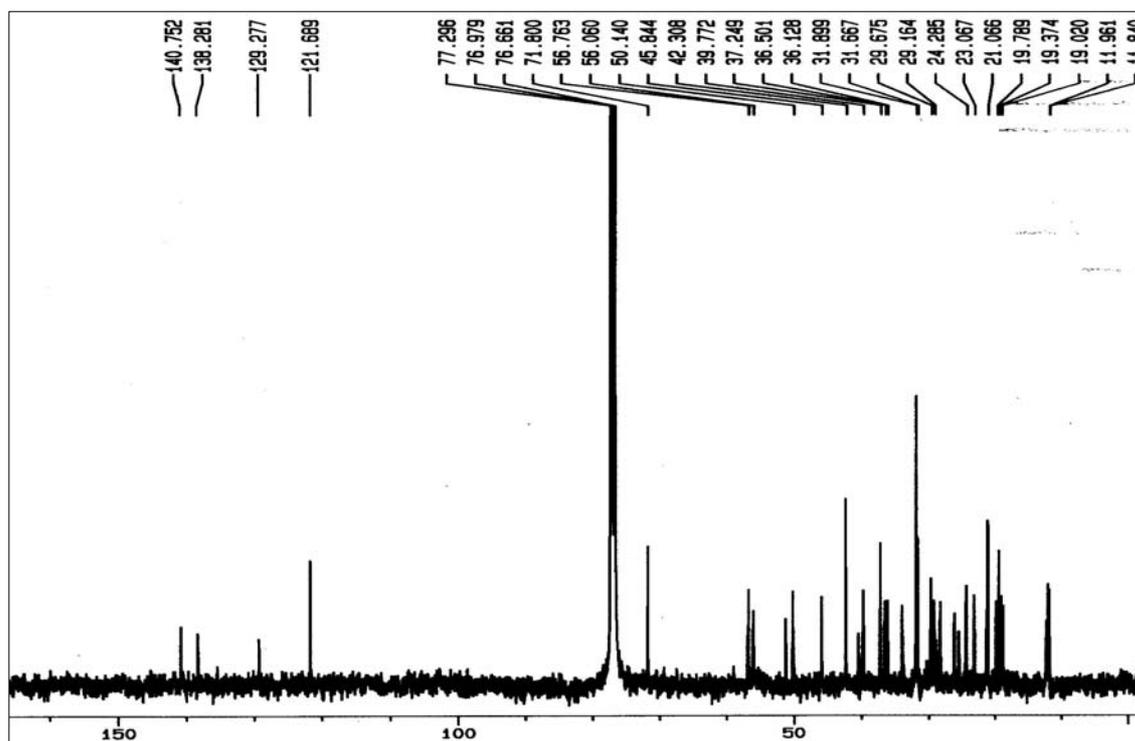


FIGURA 4.7: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura de substâncias E1, E2 e E3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

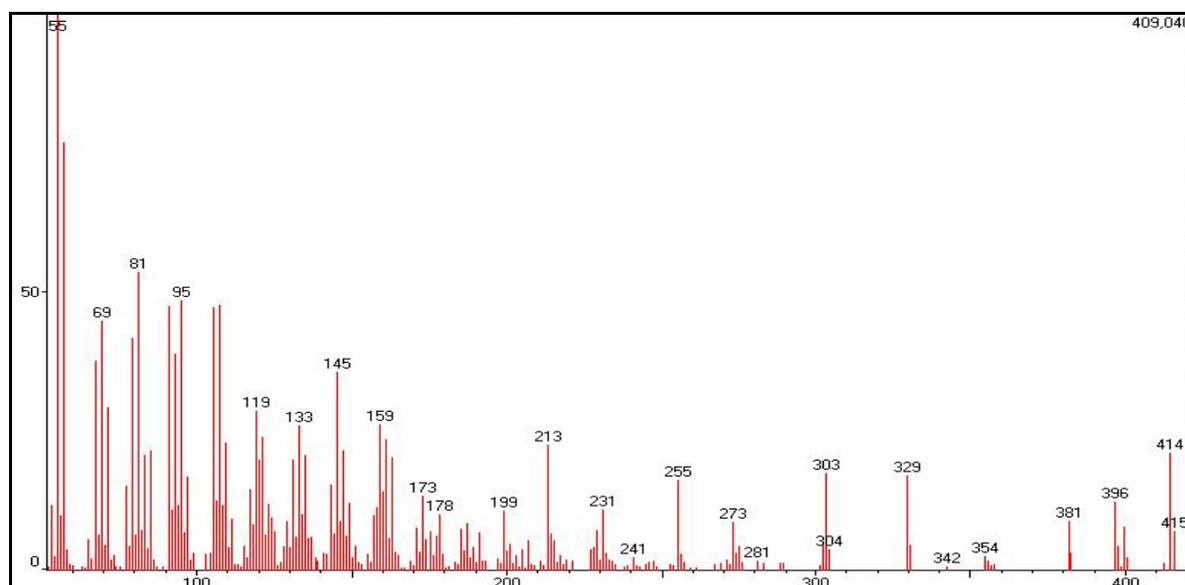
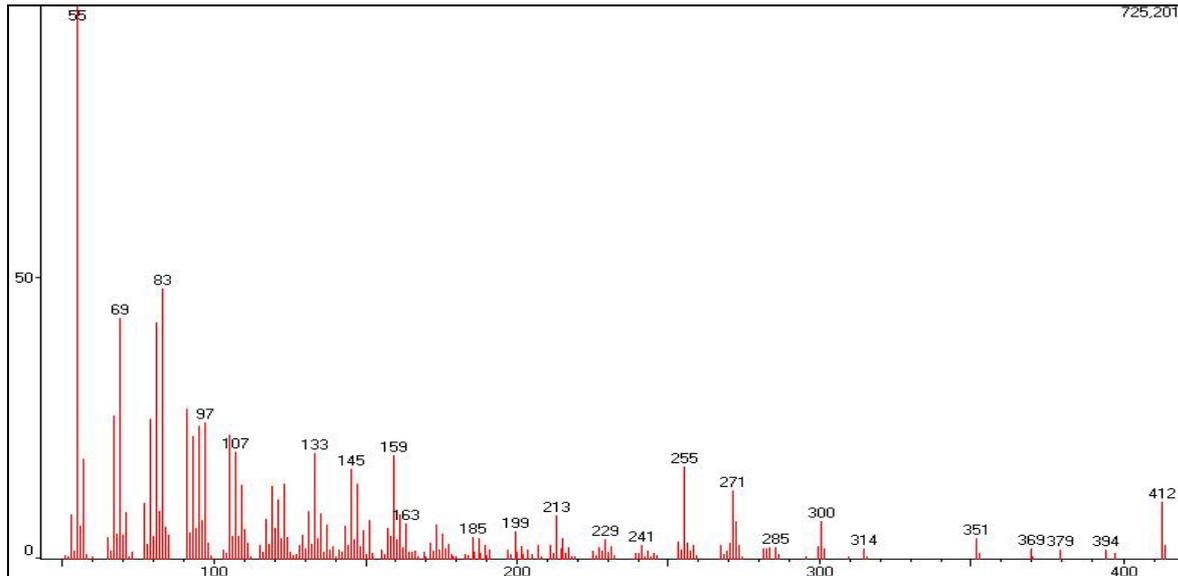
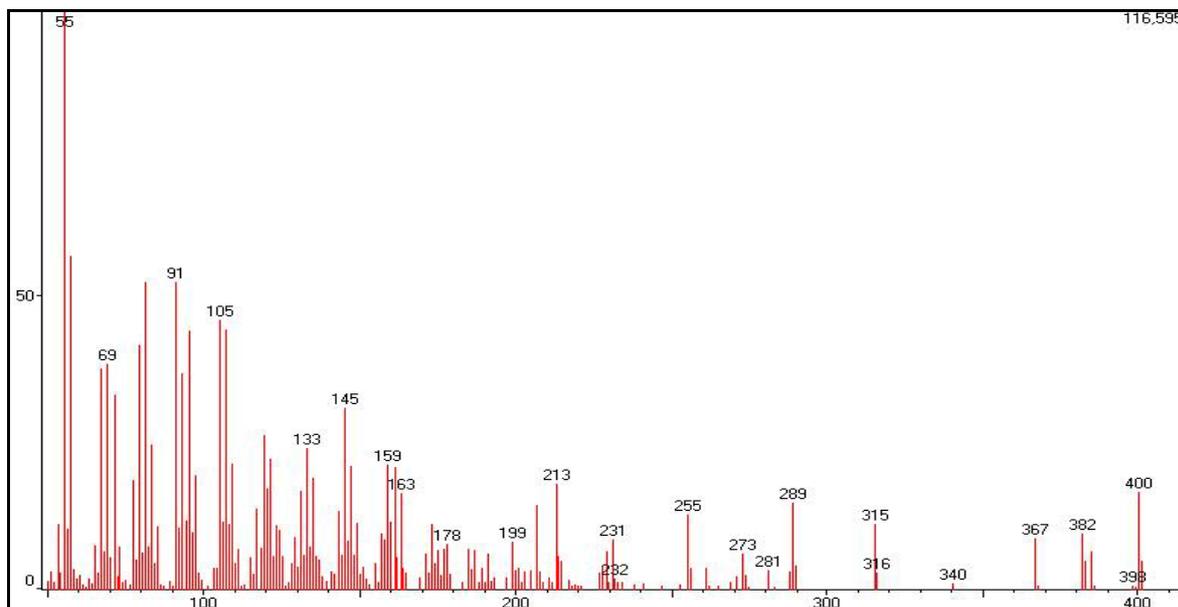


FIGURA 4.8: Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância E1 no tempo de retenção 33,14 minutos.



**FIGURA 4.9:** Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância **E2** no tempo de retenção 31,17 minutos.



**FIGURA 4.10:** Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância **E3** no tempo de retenção 30,28 minutos.

#### 4.4- Alcalóides

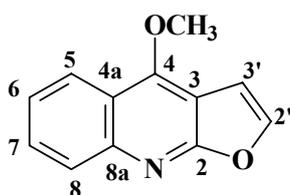
Na família Rutaceae são relatados os maiores números de ocorrências de alcalóides com grande diversidade estrutural, sendo os derivados do ácido antranílico considerados marcadores quimiotaxômicos, já que não são encontrados em outras famílias da ordem Rurales (WATERMAN,1999).

Os alcalóides derivados do ácido antranílico podem ser classificados em quatro tipos: quinolínicos, furano e piranoquinolínicos, acridônicos, quinazolínicos e indolopiridoquinazolínicos.

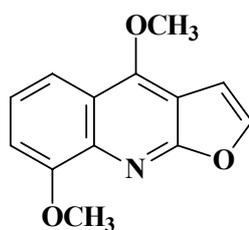
Neste trabalho foram isolados quatro alcalóides furoquinolínicos: dictamina (**A1**),  $\gamma$ -fagarina (**A2**), esquimianina (**A3**) e 4,8-dimetoxifurano[2,3-B]quinolina-5,7-diol (**A4**); dois alcalóides quinolônicos: 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**A5**) e 2-fenil-1-metil-8-metoxi-4-quinolona (**A6**).

##### 4.4.1- Identificação das substâncias A1, A2 e A3

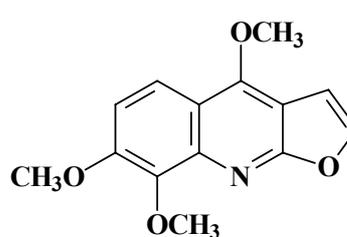
As substâncias **A1**, **A2** e **A3** foram isoladas do extrato de diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima* nas frações SoGD5F1, SoGD5I15, SoGD5I16-27 e SoEG5I16-30 e identificadas por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O alcalóide **A3** foi também isolado do extrato metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima*.



Dictamina (A1)



Fagarina (A2)



Esquimianina (A3)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **A1**, **A2**, e **A3** (Figuras 4.11, 4.13 e 4.16, respectivamente) mostraram a presença de um singlete em  $\delta$

4,41, relativo a uma metoxila em C-4 e dois dubletos ( $J = 2,8$  Hz) em  $\delta$  7,63 (H-2') e  $\delta$  7,09 (H-3') dos hidrogênios furânicos, sinais característicos de alcalóides furoquinolínicos comuns na família Rutaceae.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A1** (Figura 4.11) pôde-se observar também os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,28 (H-5, *ddd*,  $J = 9,8; 1,5$  e  $0,6$  Hz),  $\delta$  8,02 (H-8, *ddd*,  $J = 8,5; 1,2$  e  $0,6$  Hz),  $\delta$  7,69 (H-6, *m*) e  $\delta$  7,45 (H-7, *m*) e a ausência de outros sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram que **A1** era um alcalóide furoquinolínico não substituído chamado dictamina. As atribuições dos valores dos hidrogênios (Tabela 4.2) foram comparados com os da literatura (RIBEIRO, 2002; AMBROZIM, 2004).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **A1** (Figura 4.12) pôde-se observar a presença de 12 carbonos, sendo cinco carbonos quaternários (C-2, C-3, C-4, C-4 a e C-8 a), cujo carbono C-4 pelo valor do seu deslocamento de  $\delta$  156,9 (Tabela 4.3) constatou-se estar ligado a uma metoxila em  $\delta$  59,9. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  juntamente com dados da literatura (RIBEIRO, 2002; AMBROZIM, 2004), chegou-se ao alcalóide chamado dictamina (**A1**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide **A2** (Figura 4.13, Tabela 4.2) apresentou em  $\delta$  4,44 (*s*) e  $\delta$  4,08 (*s*) relativos às metoxilas, e sinais em  $\delta$  7,64 (*d*,  $J = 2,6$ ) e  $\delta$  7,07 (*d*,  $J = 2,6$ ) dos hidrogênios furânicos H-2' e H-3'.

O duplodoubleto do hidrogênio aromáticos mais desblindado em  $\delta$  7,84 (*dd*,  $J = 8,6$  e  $0,8$  Hz) refere-se ao H-5, devido ao efeito da metoxila do C-4; que sugere com sua multiplicidade a presença de H-6 em  $\delta$  7,35 (*dd*,  $J = 8,6$  e  $7,6$ ) por apresentar constantes de acoplamentos grandes em orto; e H-7 com  $\delta$  7,06 (*dl*,  $J = 7,6$ ) (Figura 4.14).

As metoxilas foram definidas ligadas aos C-4 em  $\delta$  4,44 e do C-8 em  $\delta$  4,08 através da presença do hidrogênio H-5 mais desblindado e das multiplicidades dos hidrogênios H-5, H-6 e H-7.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do alcalóide **A2** (Figura 4.15) mostrou a presença de 13 carbonos, sendo 6 carbonos quaternários (C-2, C-3, C-4, C-4 a, C-8 e C-8 a), constatando que os carbonos C-4 ( $\delta$  156,9) e C-8 ( $\delta$  137,5) estão ligados às metoxilas com  $\delta$  58,9 e 55,9, respectivamente (Tabela 4.3). A análise desses dados, juntamente com dados da literatura (RIBEIRO, 2002; AMBROZIM, 2004), levou a identificação do alcalóide chamado  $\gamma$ -fagarina (**A2**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide **A3** (Figura 4.16, Tabela 4.2) apresentou sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,02 (H-5/ *d*,  $J = 10,0$  Hz) e  $\delta$  7,24 (H-6/ *d*,  $J = 10,0$  Hz) que indicam a presença de dois hidrogênios em orto. Portanto, esses dados indicaram que a posição do C-7 e C-8 deveriam ser substituídas. Esse dado foi confirmado com a presença de dois singletos em  $\delta$  4,04 (C-7) e  $\delta$  4,12 (C-8) relativos às metoxilas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.17) do alcalóide **A3** mostrou a presença de 14 carbonos, sendo 7 carbonos quaternários (C-2, C-3, C-4, C-4 a, C-7, C-8 e C-8 a), confirmando que os carbonos C-4 ( $\delta$  157,3), C-7 ( $\delta$  142,0) e C-8 ( $\delta$  141,3) estavam ligados às metoxilas com  $\delta$  59,0, 56,8 e 61,7, respectivamente (Tabela 4.3). Portanto, com análise desses dados comparados como os dados da literatura (RIBEIRO, 2002; AMBROZIM, 2004), chegou-se ao alcalóide chamado esquimianina (**A3**).

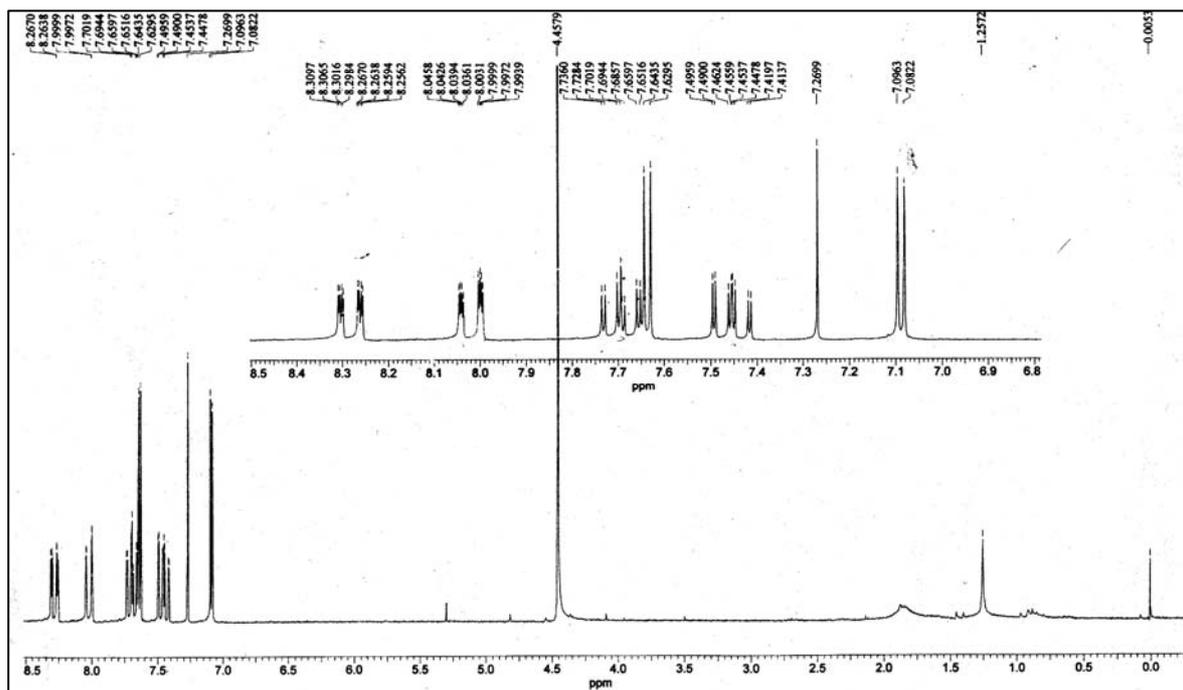


FIGURA 4.11: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

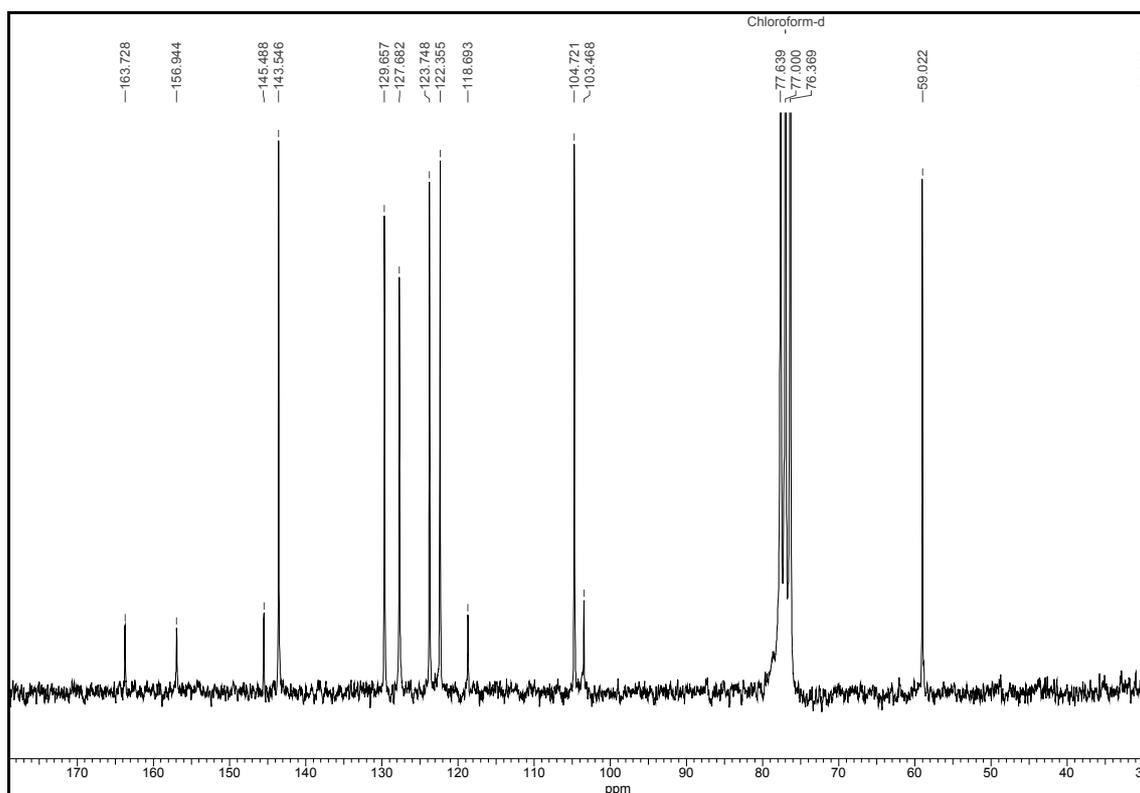


FIGURA 4.12: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

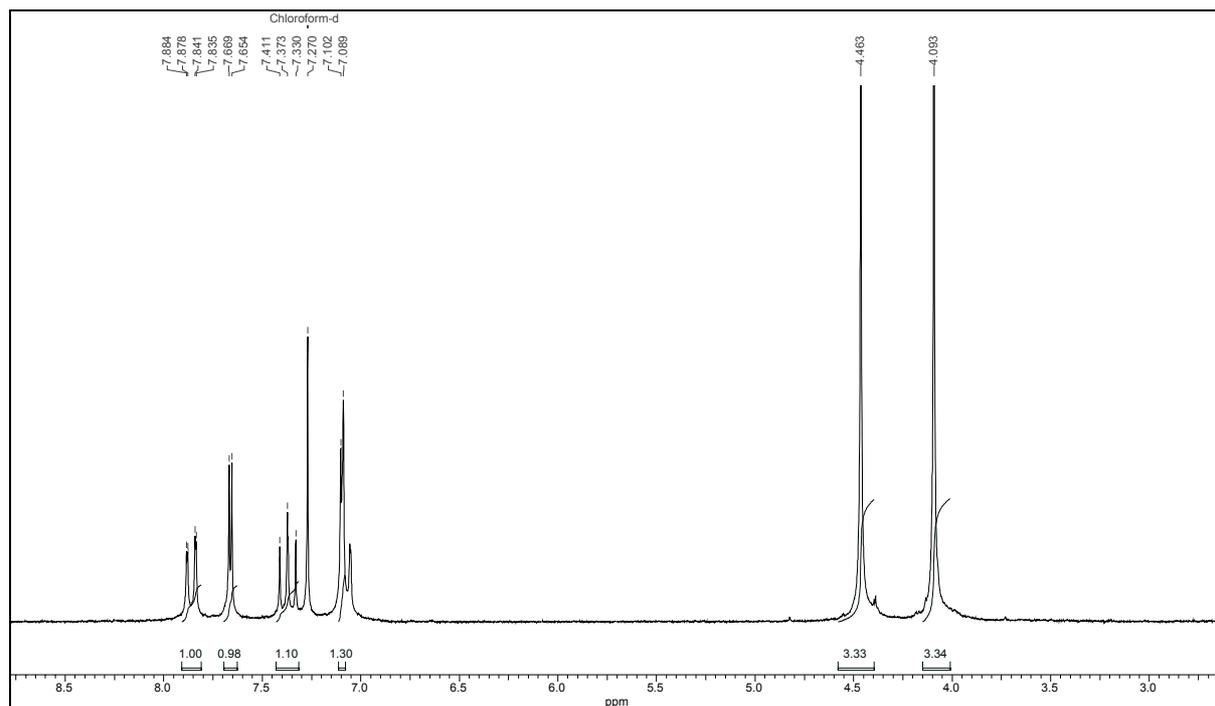


FIGURA 4.13: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

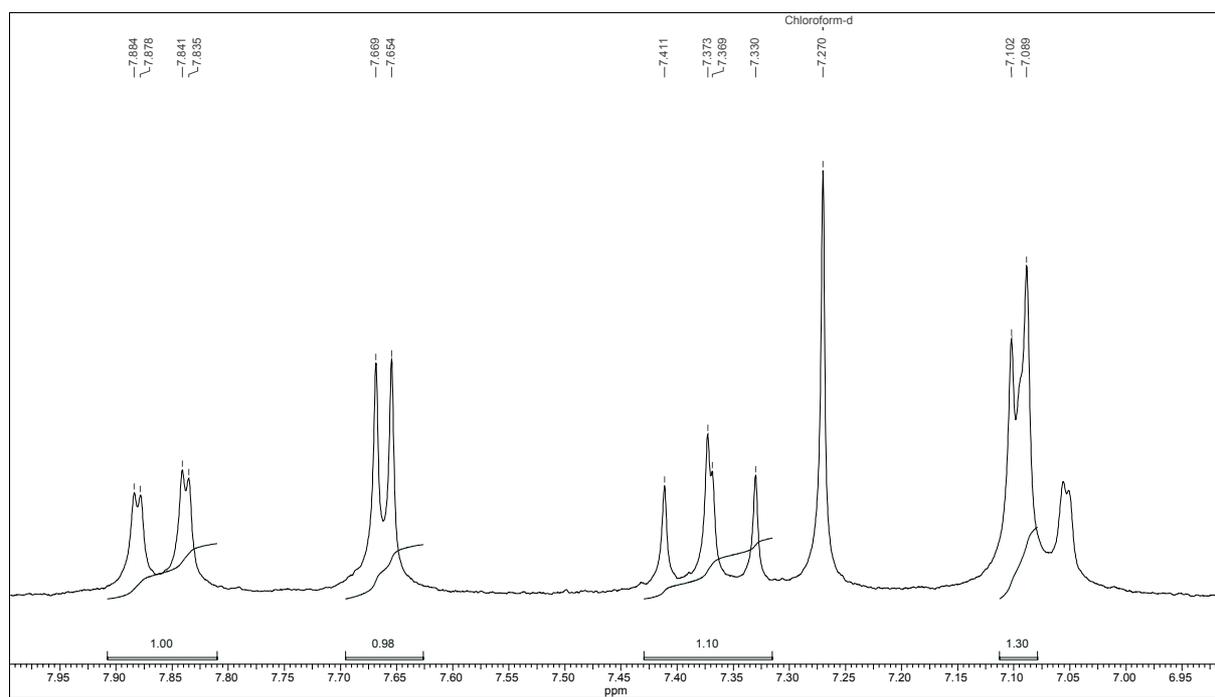


FIGURA 4.14: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

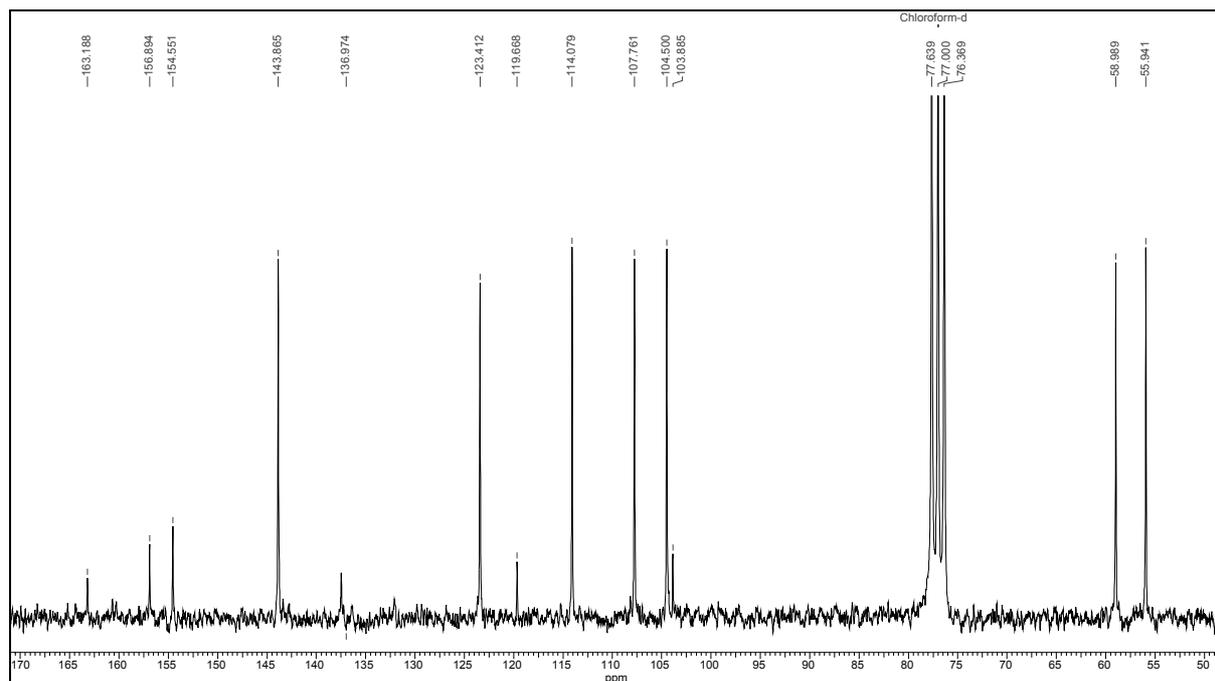


FIGURA 4.15: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

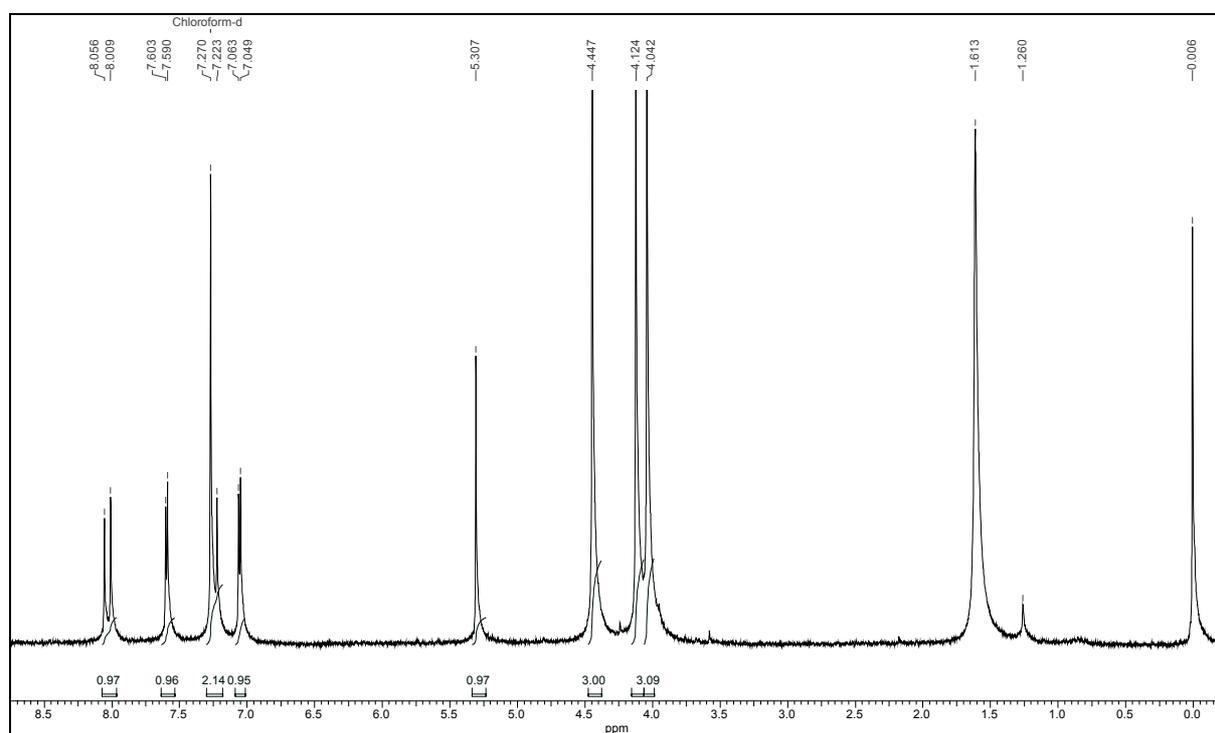


FIGURA 4.16: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A3 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

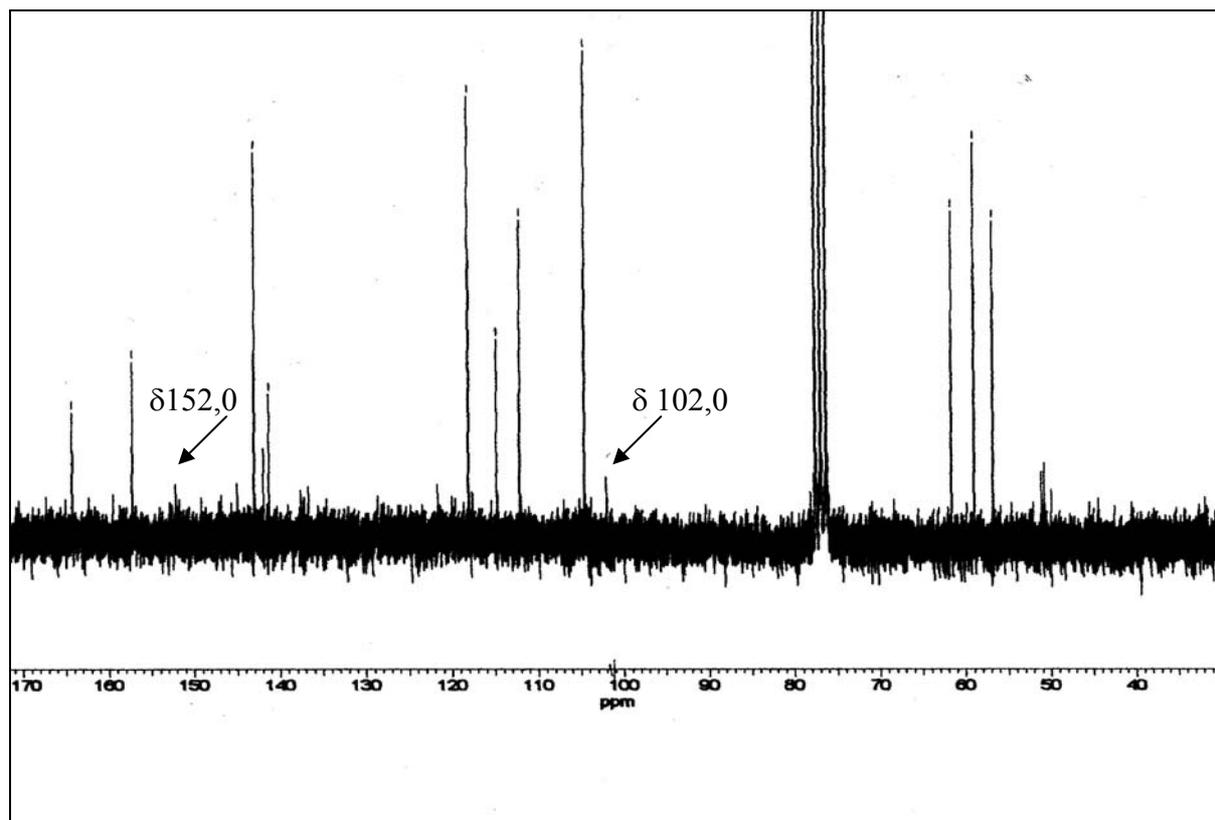


FIGURA 4.17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A3 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

TABELA 4.2: Dados de RMN  $^1\text{H}$  dos alcalóides furoquinolínicos A1, A2 e A3.

Hidrogênio	$\delta_{\text{H}}$ (J)		
	A1	A2	A3
2'	7,63 ( <i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,64 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)	7,60 ( <i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)
3'	7,09 ( <i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)	7,07 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)	7,06 ( <i>d</i> , $J = 2,8$ Hz)
5	8,28 ( <i>ddd</i> , $J = 9,8; 1,5; 0,6$ Hz)	7,84 ( <i>dd</i> , $J = 8,6; 0,8$ Hz)	8,02 ( <i>d</i> , $J = 10$ Hz)
6	7,69 <i>m</i>	7,35 ( <i>dd</i> , $J = 8,6; 7,6$ Hz)	7,24 ( <i>d</i> , $J = 10$ Hz)
7	7,45 <i>m</i>	7,06 <i>dl</i> ( $J = 7,6$ Hz)	-
8	8,02 ( <i>ddd</i> , $J = 8,5; 1,2; 0,6$ Hz)	-	-
8a	-	-	-
4-OMe	4,41 ( <i>s</i> )	4,44 ( <i>s</i> )	4,45 ( <i>s</i> )
7-OMe	-	-	4,04 ( <i>s</i> )
8-OMe	-	4,08 ( <i>s</i> )	4,12 ( <i>s</i> )

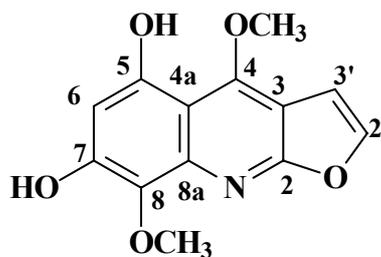
TABELA 4.3: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos alcalóides furoquinolínicos A1, A2 e A3.

Carbono	$\delta_{\text{C}}$					
	A1	RIBEIRO, 2002 (*)	A2	RIBEIRO, 2002 (*)	A3	RIBEIRO, 2002 (*)
2'	143,5	143,5	143,7	143,7	143,1	142,9
3'	104,7	104,7	104,5	104,4	104,6	104,5
2	163,7	163,8	163,3	163,1	164,3	164,0
3	118,3	118,6	119,6	119,5	114,9	114,9
4	156,9	156,8	156,9	156,8	157,3	157,1
4a	103,4	103,3	103,9	103,7	102,0	102,0
5	122,3	122,3	114,1	114,0	118,2	118,0
6	123,7	123,7	123,4	123,3	112,2	112,1
7	129,6	129,5	107,7	107,6	142,0	142,0
8	127,6	127,7	137,5	137,4	141,3	139,8
8a	145,5	145,5	154,5	154,8	152,0	152,1
4-OMe	59,9	58,9	58,9	58,7	59,0	58,9
7-OMe	-	-	-	-	56,8	56,8
8-OMe	-	-	55,9	55,8	61,7	61,6

(\*) ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

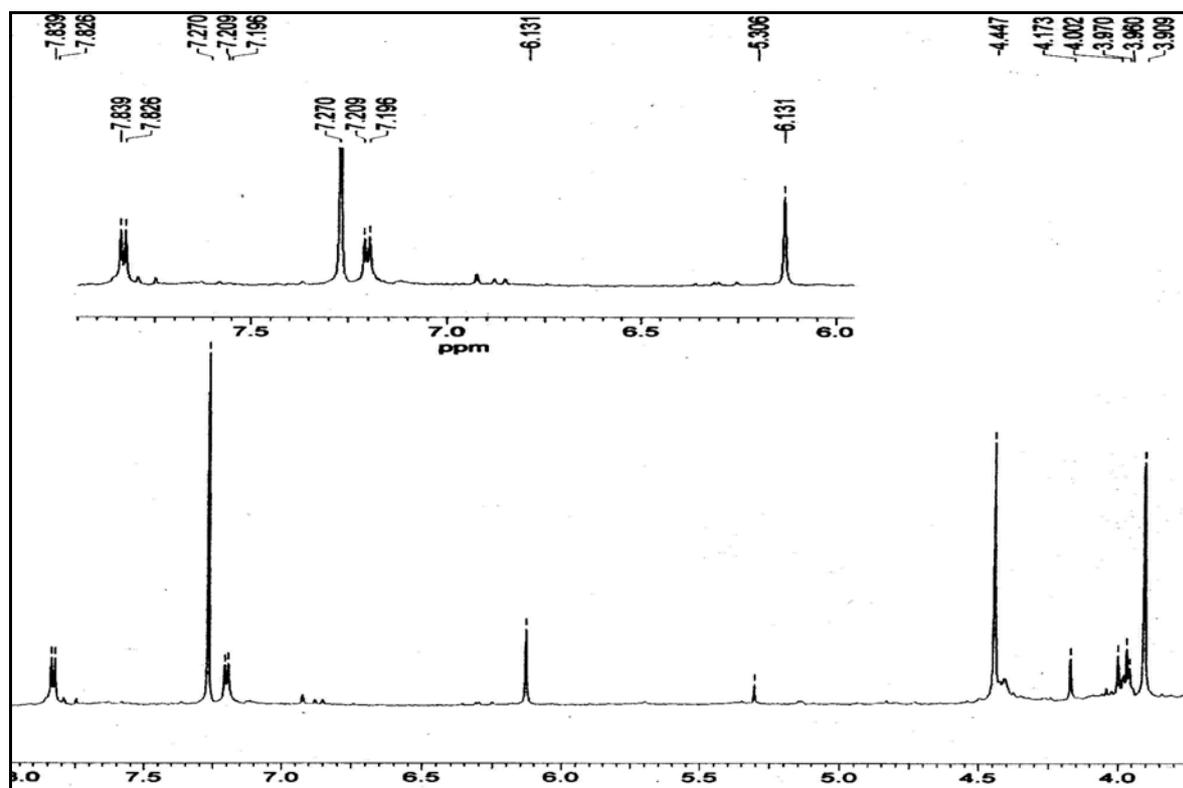
#### 4.4.2- Identificação da substância A4

A substância A4 foi isolada do extrato de diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoEG5I16-20 e sua estrutura química foi sugerida através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  comparado com a literatura BIAVATTI (2001) (Tabela 4.4). Os outros experimentos de 1D e 2D não puderam ser realizados devido a degradação da substância quando dissolvida no solvente deuterado  $\text{CDCl}_3$ .



4,8-dimetoxifuro[2,3-B]quinolona-5,7-diol  
(A4)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A4** (Figuras 4.18, Tabela 4.4) mostrou a presença de sinais em  $\delta$  3,91 (s) e 4,95 (s) relativos às metoxilas, que foram atribuídos para às metoxilas ligadas nos C-8 e C-4, respectivamente. Observaram-se também sinais em  $\delta$  7,83 (H-2'/d,  $J= 2,6$ ) e  $\delta$  7,20 (H-3'/d,  $J= 2,6$ ) dos hidrogênios furânicos e um sinal em  $\delta$  6,12 (s) que foi atribuído ao hidrogênio ligado no C-6, indicando que o anel aromático é pentassubstituído.



**FIGURA 4.18:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A4** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

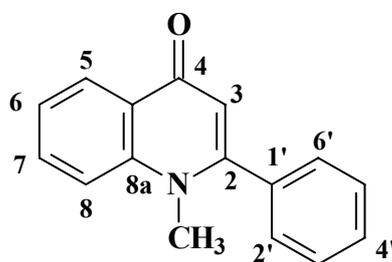
TABELA 4.4: Dados de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóides furoquinolínico A4.

Posições	$\delta_{\text{H}}$	
	A4	BIAVATTI (2001) (*)
2'	7,83 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)	7,82 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)
3'	7,20 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)	7,19 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)
2	-	-
3	-	-
4	-	-
4a	-	-
5	-	-
6	6,12 ( <i>s</i> )	6,16 ( <i>s</i> )
7	-	-
8	-	-
8a	-	-
4-OMe	4,45 ( <i>s</i> )	4,44 ( <i>s</i> )
8-OMe	3,91 ( <i>s</i> )	3,91 ( <i>s</i> )

(\*) ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

#### 4.4.3- Identificação da substância A5

A substância A5 foi isolada do extrato de diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoGD 5J3486 e identificado por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC e GC/MS(EI) comparados com dados da literatura (BIAVATTI et al, 2002).



**2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona**  
(A5)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A5** (Figuras 4.19) mostrou a presença de sinais em  $\delta$  3,62 (*s*) e 6,32 (*s*), relativos a um hidrogênio ligado ao carbono que se liga ao heteroátomo e um hidrogênio olefínico, respectivamente. Analisando o mapa de contorno de HSQC (Figuras 4.24), observou-se a correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,62 com o carbono em  $\delta$  37,2, determinando a existência do grupo *N*-CH<sub>3</sub>.

Através do sinal em  $\delta$  6,32 (*s*) no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , pôde-se determinar que a substância **A5** trata-se de um alcalóide 2-*R*-4-quinolona, pois se tratasse de um alcalóide 4-*R*-2-quinolona o H-3 seria mais desblindado.

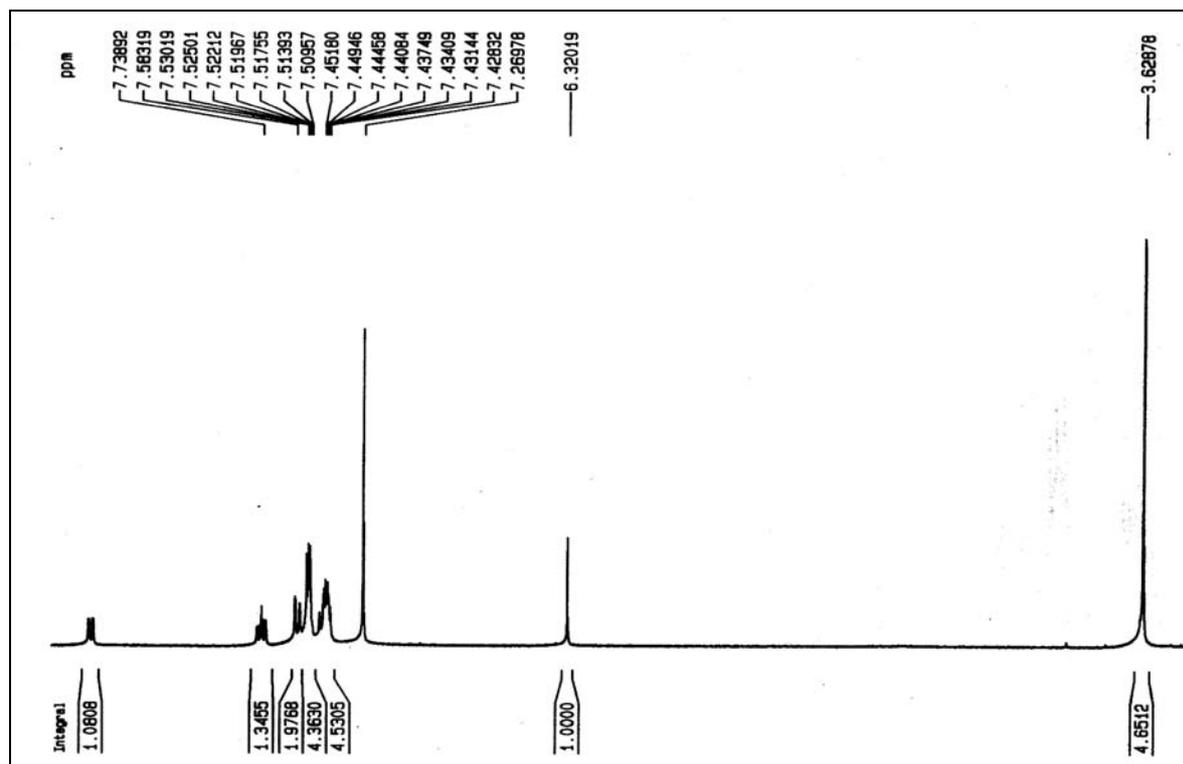
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A5** (Figura 4.19) também foram observados os sinais de nove hidrogênios aromáticos, definindo dessa forma a existência de dois anéis aromáticos (Figura 4.19 e 4.20, Tabela 4.5). Os sinais dos hidrogênios aromáticos observados foram em  $\delta$  8,53 (*dd*,  $J = 8,0$  e  $1,7$  Hz) referente H-5,  $\delta$  7,73 (*ddd*,  $J = 8,6$ ,  $7,0$  e  $1,7$  Hz) referente H-7,  $\delta$  7,57 (*dl*,  $J = 8,6$ ) referente H-8,  $\delta$  7,52 (*m*) referentes H-3' e H-5', e  $\delta$  7,44 (*m*) H-6, H-2' e H-6', indicando através da suas multiplicidades e as suas correlações no mapa de contorno de HSQC (Figura 4.24 e 4.25) que um anel aromático é dissubstituído e o outro monosubstituído, sendo que os hidrogênios referentes ao monosubstituído são observados em  $\delta$  7,52 (*m*) e  $\delta$  7,44 (*m*) (Tabela 4.5).

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 4.21) mostrou correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos  $\delta$  8,53,  $\delta$  7,73,  $\delta$  7,57 e  $\delta$  7,44, confirmando a presença do anel aromático orto dissubstituído.

A análise conjunta do mapa de contorno de HSQC (Figuras 4.24 e 4.25) e do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.22 e 4.23) permitiu que fosse definido os deslocamentos químicos de toda a estrutura e identificando o alcalóide 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**A5**).

A estrutura do alcalóide **A5** pôde ser confirmada com o espectro de massas obtido por GC/MS-EI (Figura 4.26). O espectro de massas do alcalóide **A5** (Figura 4.26) apresentou pico do íon molecular e base  $[\text{M}^+] = 235$ , indicando

a presença de nitrogênio na estrutura e o pico  $m/z$  207 indicando perda de 28 u.m.a, atribuído à saída de CO do núcleo quinolônico. Observou-se também  $m/z$  77 atribuído à formação do íon fenila.



**FIGURA 4.19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

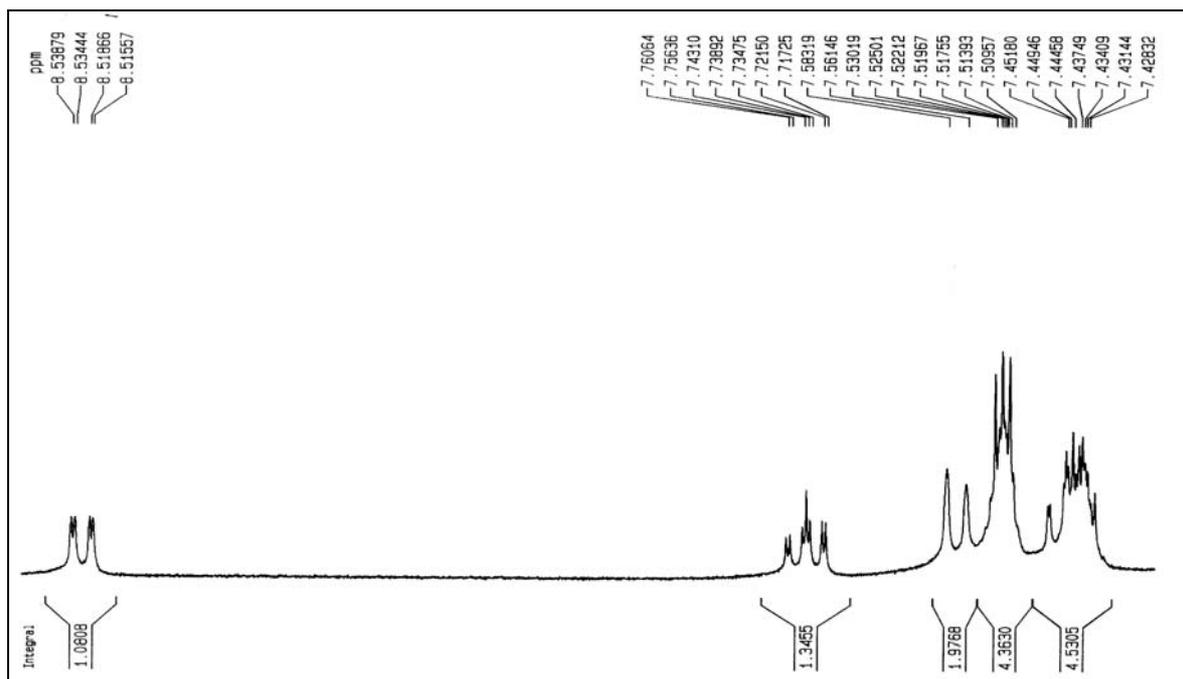


FIGURA 4.20: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

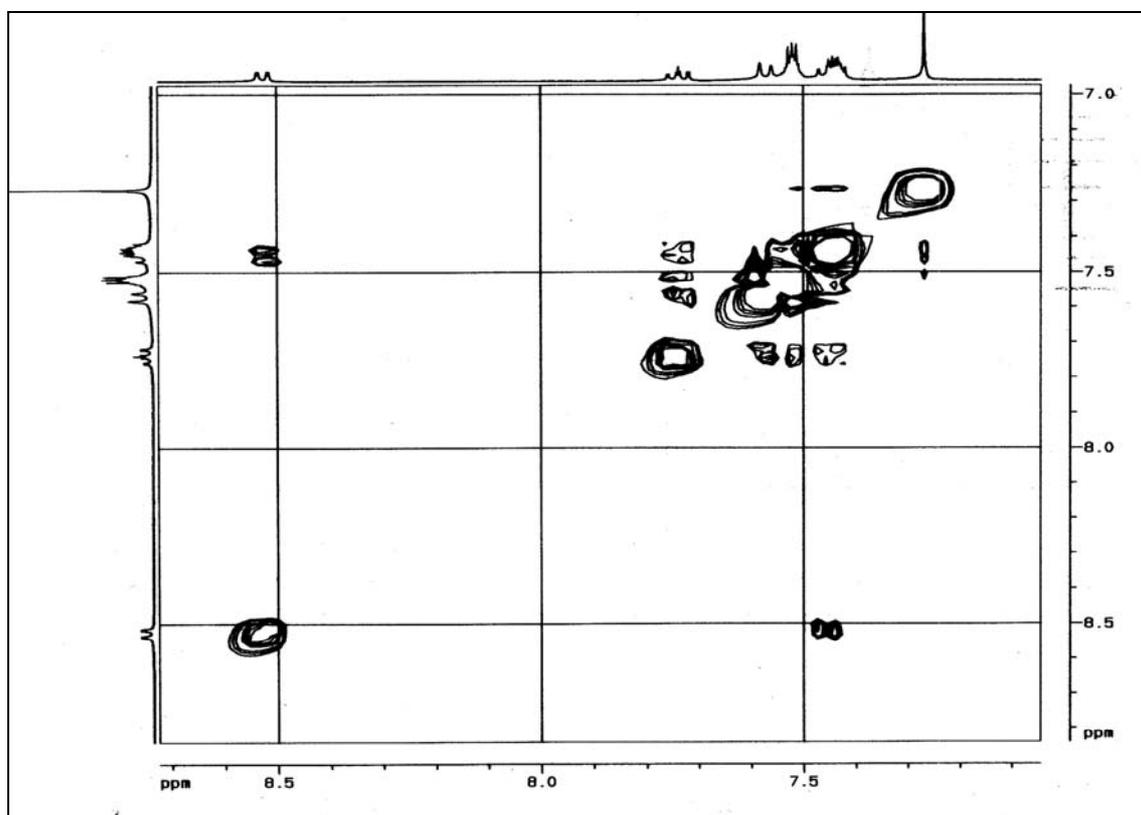


FIGURA 4.21: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

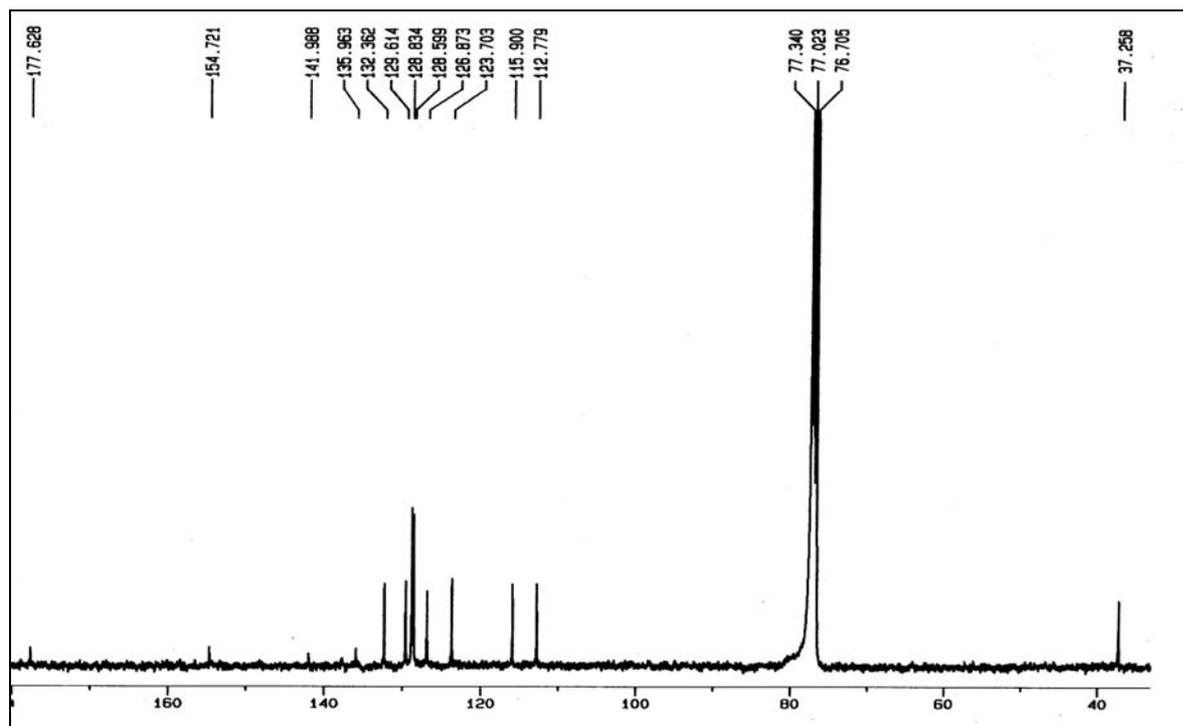


FIGURA 4.22: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

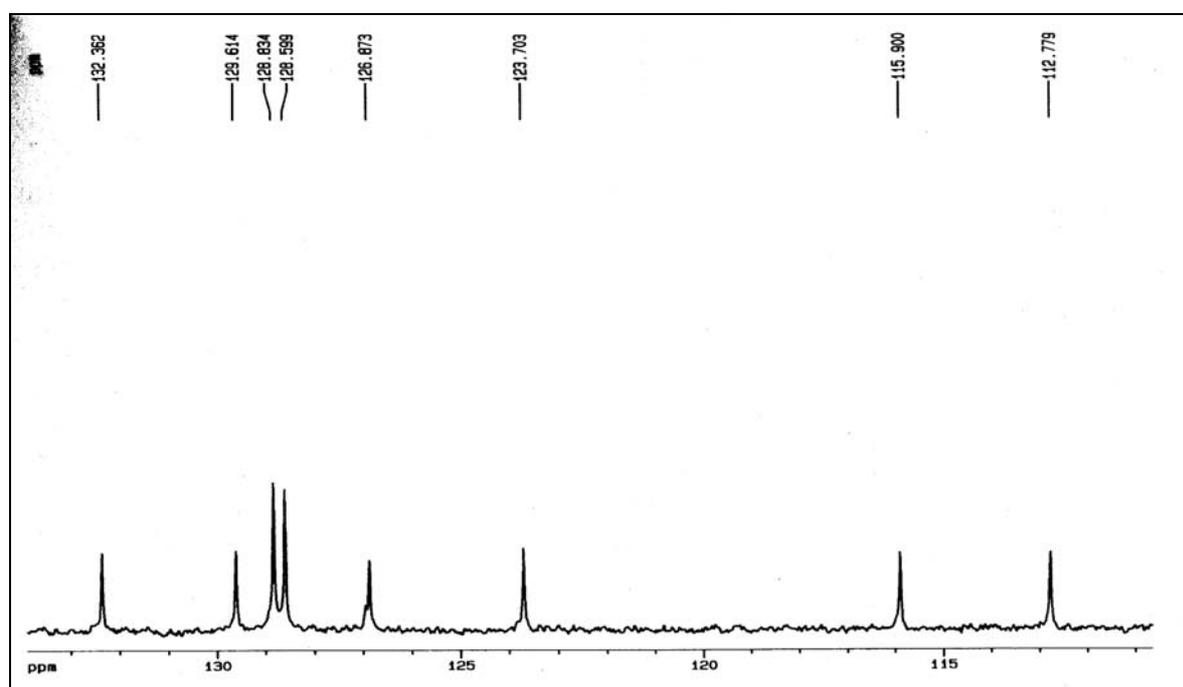


FIGURA 4.23: Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância A5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

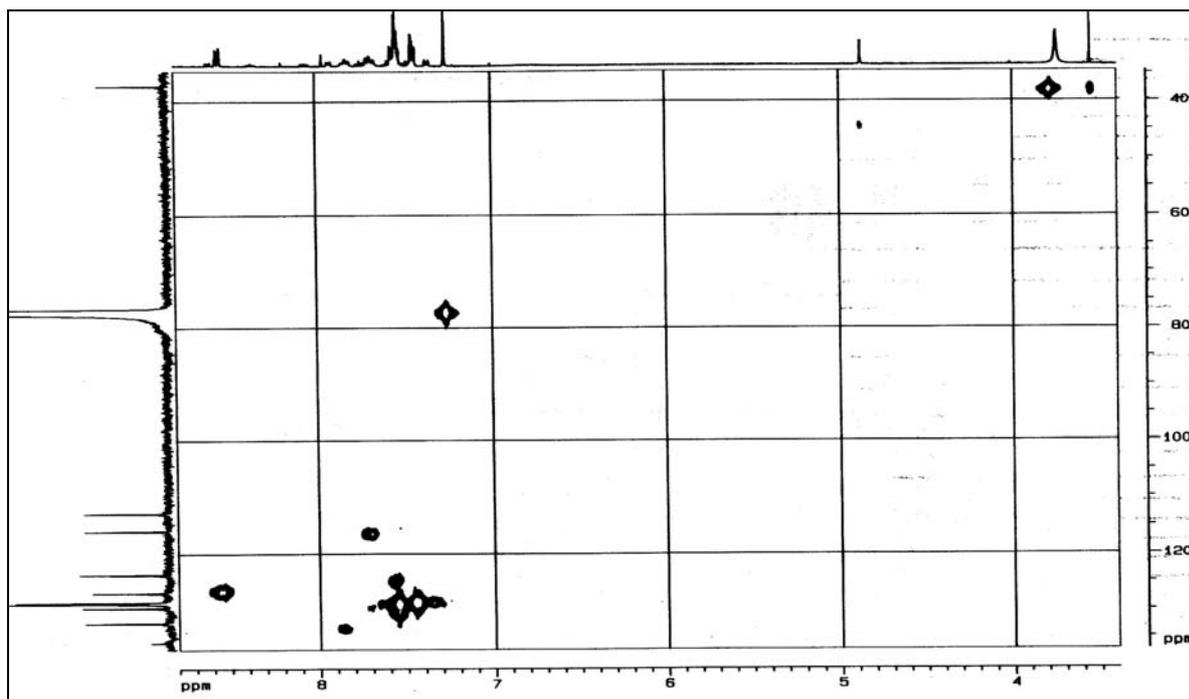


FIGURA 4.24: Mapa de contorno de HSQC da substância A5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

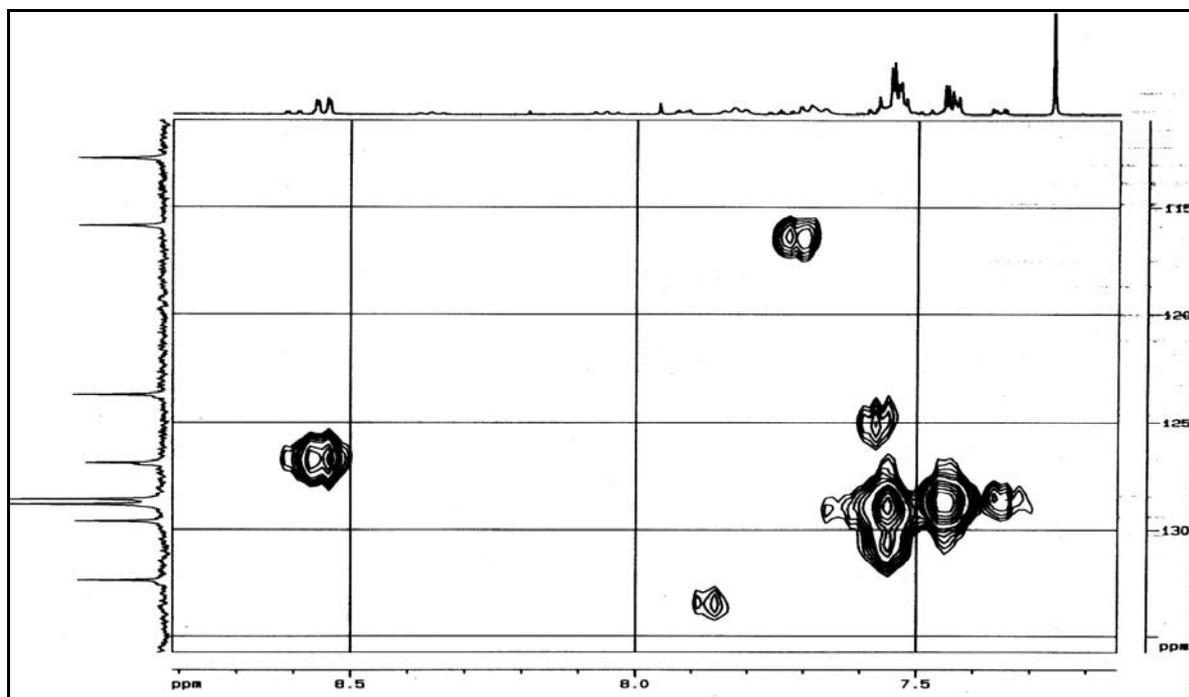
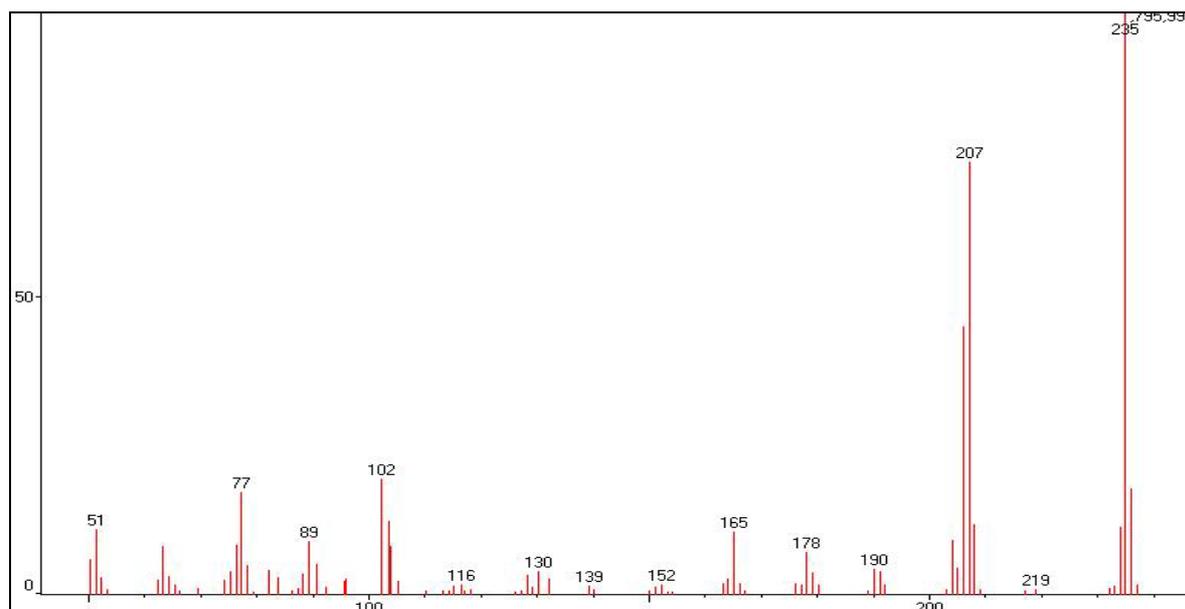


FIGURA 4.25: Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância A5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



**FIGURA 4.26:** Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância **A5** no tempo de retenção 27,39 minutos.

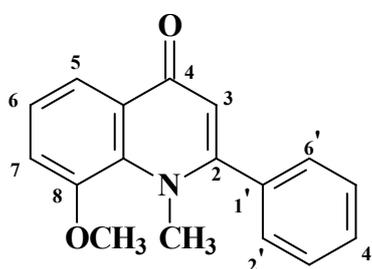
**TABELA 4.5:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC do alcalóides **A5**.

Posições	$\delta_{\text{H}}$ (J)		$\delta_{\text{C}}$	
	A5	BIAVATTI et al, 2002 (*)	A5	BIAVATTI et al, 2002 (*)
2	-	-	154,7	154,8
3	6,32 (s)	6,31 (s)	112,8	112,7
4	-	-	177,6	177,6
4a	-	-	126,9	126,8
5	8,53 (dd, J= 8,0 e 1,7 Hz)	8,51 (dd, J= 8,0 e 1,6 Hz)	126,9	126,8
6	7,44 (m)	7,45 (m)	123,7	123,8
7	7,73 (ddd, J= 8,6, 7,0 e 1,7 Hz)	7,73 (ddd, J= 8,5, 7,8 e 1,6 Hz)	132,4	132,3
8	7,57 (dl, J= 8,6)	7,57 (dl, J= 8,5)	115,9	115,9
8a	-	-	142,0	141,9
1'	-	-	136,0	135,9
2'	7,44 (m),	7,42 (m),	128,6	128,5
3'	7,52 (m)	7,52 (m)	128,8	128,8
4'	7,52 (m)	7,52 (m)	129,6	129,6
5'	7,52 (m)	7,52 (m)	128,8	128,8
6'	7,44 (m),	7,42 (m),	128,6	128,5
N-CH <sub>3</sub>	3,62 (s)	3,62 (s)	37,2	37,3

(\*) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

#### 4.4.4- Identificação da substância A6

A substância **A6** foi isolada do extrato de diclorometano dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoGD 5J3486 em mistura com o alcalóide **A5**, identificado anteriormente (seção 4.4.5). A identificação da substância **A6** foi sugerida analisando os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , PENDANT e GC/MS(EI) (Tabela 4.6).



(A6)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A6** em mistura com **A5** (Figuras 4.27) mostrou a presença de sinais em  $\delta$  3,62 (*s*),  $\delta$  3,63 (*s*), 3,98 (*s*),  $\delta$  6,36 (*s*) e 6,31(*s*), relativos aos hidrogênios ligados a heteroátomos e hidrogênios olefínico. Pôde-se também observar no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.27) os sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,53 (*dd*,  $J= 8,0$  e 1,7 Hz) referente H-5 de **A5**,  $\delta$  8,05 (*dd*,  $J= 8,0$  e 1,4 Hz) referente H-5 de **A6**,  $\delta$  7,73 (*ddd*,  $J= 8,6$ , 7,0 e 1,7 Hz) referente H-7 de **A5**,  $\delta$  7,57 (*dl*,  $J= 8,7$  Hz) referente H-8 de **A5**,  $\delta$  7,52 (*m*) referentes H-3', H-4' e H-5' de **A5** e **A6**, e  $\delta$  7,44 (*m*) referentes H-2' e H-6' de **A5** e **A6** (Tabela 4.6).

O sinal dos hidrogênios atribuídos à **A6** ligados a heteroátomos em  $\delta$  3,63 foi atribuído para *N*-CH<sub>3</sub> e o sinal em  $\delta$  3,98 para a metoxila. O deslocamento químico dos hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,36 sugeriu que a substância **A6** trata-se de um alcalóide 2-fenil-4-quinolona como o alcalóide **A5** presente na mistura.

O espectro de PENDANT (Figura 4.28) mostrou a presença do sinal em  $\delta$  37,6 referente a metila ligada ao nitrogênio, em  $\delta$  56,7 referente a metoxila e dos carbonos metínicos dos anéis aromáticos (Tabela 4.6).

O aparecimento do sinal em  $\delta$  8,05 (H-5/ *dd*,  $J= 8,0$  e  $1,4$  Hz) no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.27), que não aparece no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **A5** anteriormente isolada (Figura 4.19 e 4.20, seção 4.4.5), indicou uma substituição na posição C-8 na estrutura química da substância **A6**. Os sinais em  $\delta$  7,17 (H-7/ *dd*,  $J= 8,0$  e  $1,4$  Hz) e  $\delta$  7,34 (H-6/ *t*,  $J= 8,0$  Hz) acoplando entre si e com H-5 permite confirmar a hipótese acima.

Essa proposta pôde ser comprovada com a análise por GC/MS(EI) (Figura 4.29) que apresentou no seu espectro de massas o pico do íon molecular  $[\text{M}^+] = 265$ , indicando o acréscimo de um grupo metoxila no peso molecular do alcalóide 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**A5**) (PM = 235 g/mol).

Dessa forma, pôde-se confirmar com o espectro de massas obtido por GC/MS(EI) (Figura 4.29) a estrutura do alcalóide 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**A6**).

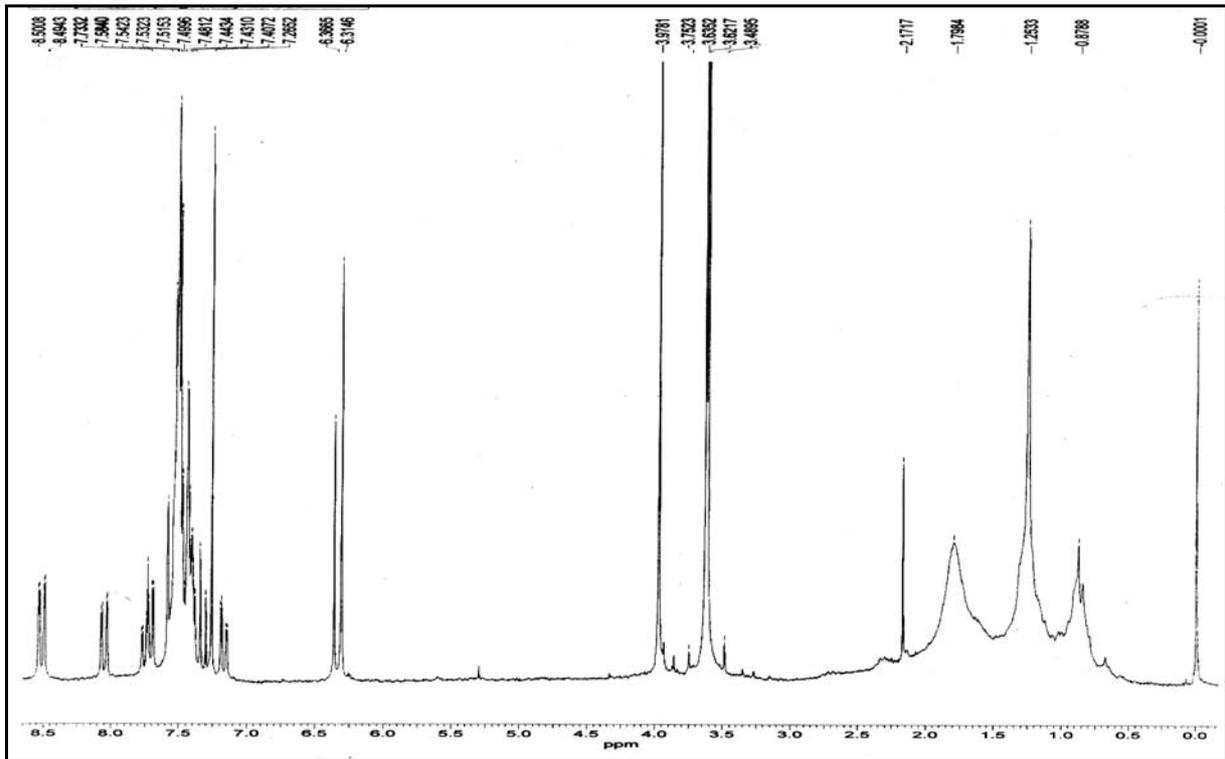


FIGURA 4.27: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância A6 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

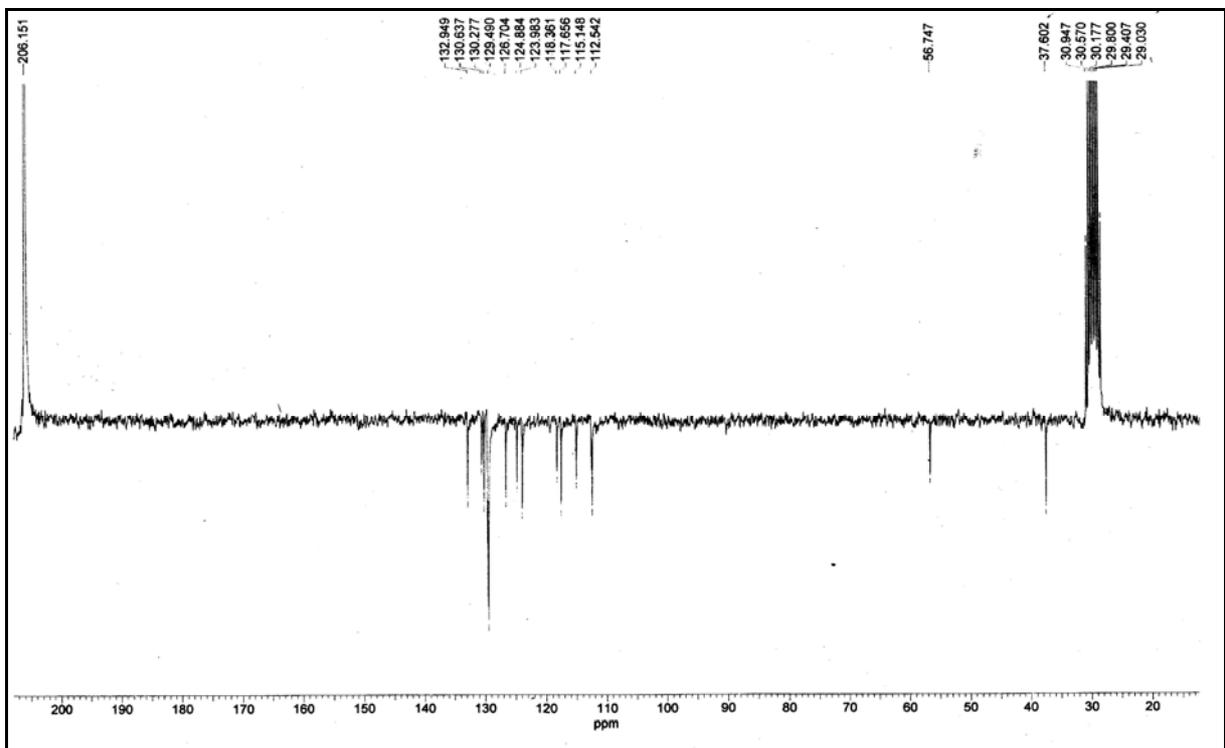
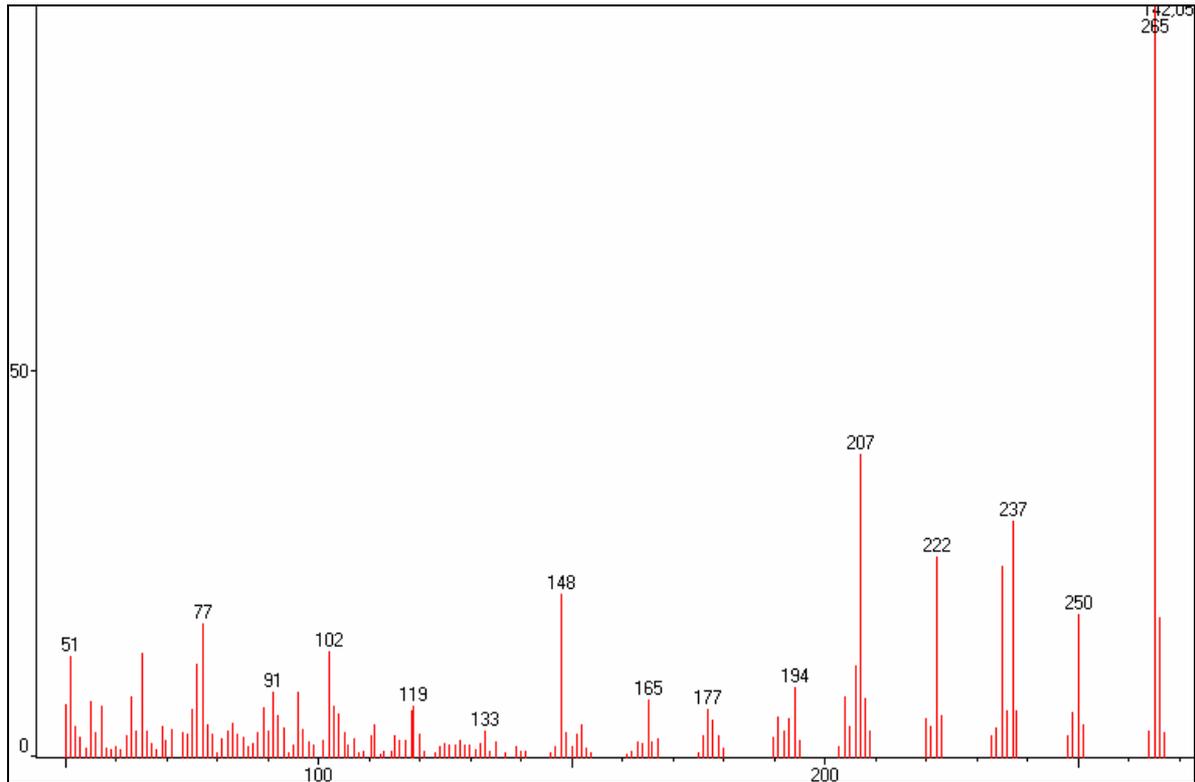


FIGURA 4.28: Espectro de PENDANT da substância A6 (Acetona- $d_6$ , 200 MHz).



**FIGURA 4.29:** Espectro de massas obtido por GC/MS(EI) da substância **A6** no tempo de retenção 31,07 minutos.

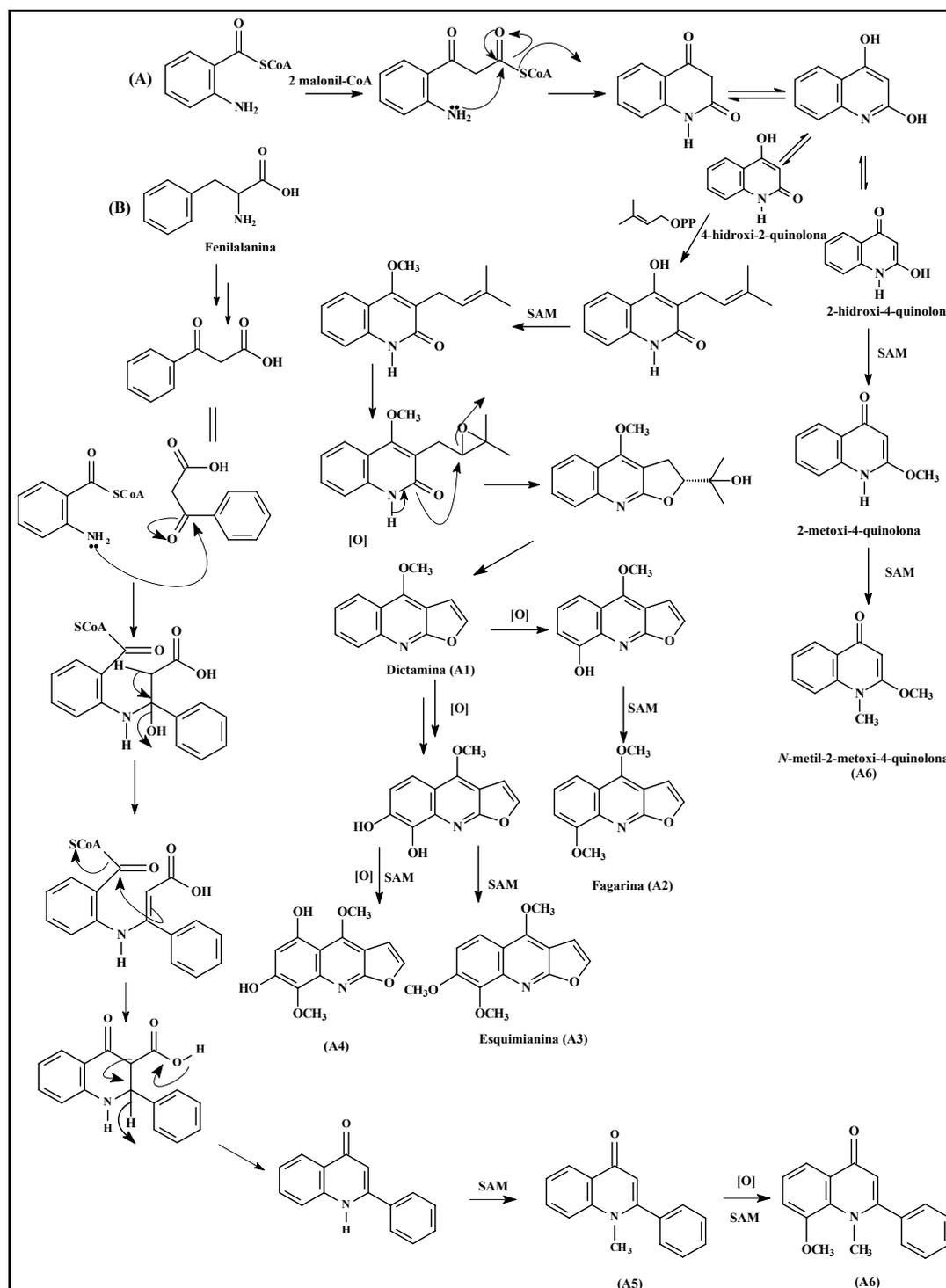
TABELA 4.6: Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóides A6.

Posições	$\delta_{\text{H}} (J)$		$\delta_{\text{C}}$	
	A6 <sup>(*)</sup>	A5 <sup>(*)</sup>	A6 <sup>(*)</sup>	A5 <sup>(**)</sup>
2	-	-	ND	154,7
3	6,36 (s)	6,32 (s)	112,5	112,8
4	-	-	ND	177,6
4a	-	-	ND	126,9
5	8,05 (dd, $J=8,0$ e 1,4 Hz)	8,53 (dd, $J=8,0$ e 1,7 Hz)	126,7	126,9
6	7,34 (t, $J=8,0$ Hz)	7,44 (m)	123,9	123,7
7	7,17 (dd, $J=8,0$ e 1,4 Hz)	7,73 (ddd, $J=8,6, 7,0$ e 1,7 Hz)	132,9	132,4
8	-	7,57 (dl, $J=8,6$ )	115,1	115,9
8a	-	-	ND	142,0
1'	-	-	ND	136,0
2'	7,44 (m),	7,44 (m),	129,4	128,6
3'	7,52 (m)	7,52 (m)	130,2	128,8
4'	7,52 (m)	7,52 (m)	ND	129,6
5'	7,52 (m)	7,52 (m)	130,2	128,8
6'	7,44 (m),	7,44 (m),	129,4	128,6
O-CH <sub>3</sub>	3,98 (s)	-	56,7	-
N-CH <sub>3</sub>	3,63 (s)	3,62 (s)	37,6	37,2

(\*) (Acetona-d<sub>6</sub>, 200MHz)(\*\*) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

### 4.4.5- Biossíntese dos alcalóides

O Esquema 4.2 apresenta as propostas de biossíntese e biogênese dos alcalóides (DEWICK, 2001; BLASCHKE-COBET&LUCKNER, 1973).

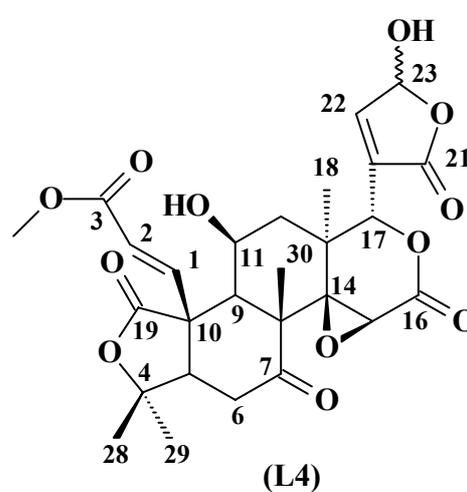
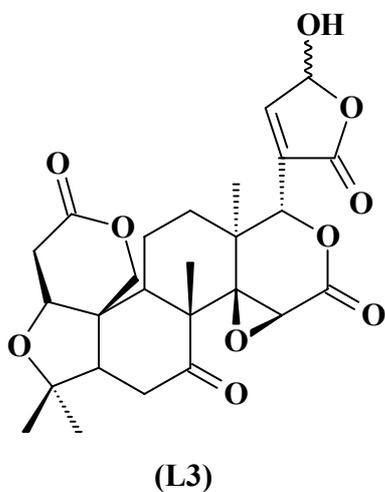
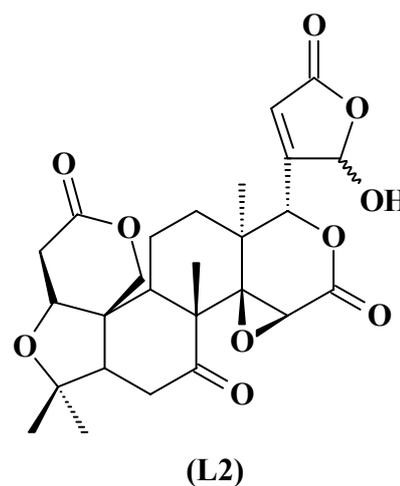
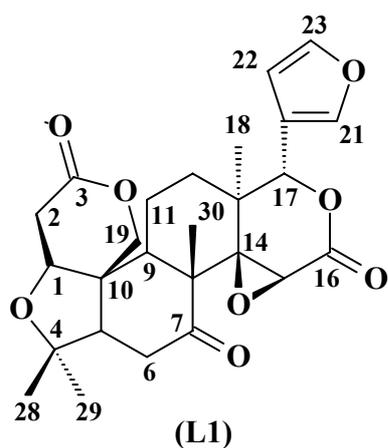


**ESQUEMA 4.2:** Proposta (A) biossíntese dos alcalóides A1, A2, A3 e A4 e (B) biogênese dos alcalóides A5 e A6.

## 4.5- Limonóides

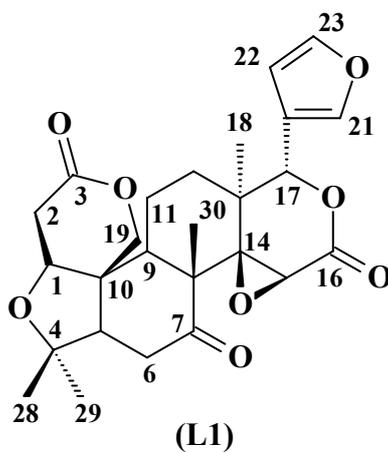
Os limonóides são triterpenos modificados, sendo a maioria com 26 átomos de carbono (tetranortriterpenóides), produzidos em plantas pertencentes à ordem Rutales, mais freqüentemente encontrados em Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae (CHAMPAGNE et al, 1992).

Neste trabalho foram identificados quatro limonóides: limonina (L1), Ácido limonéxico (L2), Ácido iso-limonéxico (L3) e 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina (L4).



#### 4.5.1- Identificação da substância L1

A substância **L1** foi isolada do extrato metanólico dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoGMD e identificado por RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC e ESI negativo.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L1** (Figura 4.30) mostrou a presença de um sinal em  $\delta$  7,40 (m) e outro em  $\delta$  6,34 (*dd*,  $J = 2,0$  e  $0,8$  Hz), referentes aos hidrogênios H-21 e H-23  $\alpha$ -furanos e H-22  $\beta$ -furano. Observou-se também um sinal em  $\delta$  5,47 (s) referente ao hidrogênio H-17, dois sinais em  $\delta$  4,77 (*d*,  $J = 12,8$  Hz) e  $\delta$  4,46 (*d*,  $J = 12,8$  Hz) referentes aos dois hidrogênios geminais H-19 e outro sinal em  $\delta$  4,04 (s) referente ao H-15 (Tabela 4.7), característicos de limonóides com esqueleto A-D seco.

Na região de  $\delta$  1,07-1,30 foram observados quatro sinais em  $\delta$  1,07,  $\delta$  1,17,  $\delta$  1,18 e  $\delta$  1,30, referentes as quatro metilas existentes na estrutura, sugerindo ser a limonina a substância **L1**.

Na ampliação dos sinais entre  $\delta$  2,20-3,01 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.31) foram observados os sinais dos hidrogênios metilênicos e metínicos com suas multiplicidades, como descrito na Tabela 4.7.

Analisando o mapa de contorno de HSQC (Figura 4.30) pôde-se observar as correlações dos hidrogênios furânicos H-21, H- 22 e H-23 com seus respectivos carbonos em  $\delta$  140,0, 110,0 e 143,0 e dos hidrogênios geminais H-19 em  $\delta$  4,77 (*d*,  $J = 12,8$  Hz) e  $\delta$  4,46 (*d*,  $J = 12,8$  Hz) correlacionando com o carbono  $\delta$  65,0. Observou-se também os sinais dos carbonos metínicos ligados a heteroátomos H-1, H-15 e o H-17 correlacionado respectivamente com os seus carbonos em  $\delta$  79,9, 53,0 e 78,0.

Os carbonos das metilas também foram definidos com os mapas de contornos de HSQC e HMBC (Figuras 4.32 e 4.33), C-18 ( $\delta$  1,17) em  $\delta$  21,0, C-28 ( $\delta$  1,30) em  $\delta$  30,5, C-29 ( $\delta$  1,18) em  $\delta$  21,0 e C-30 ( $\delta$  1,07) em  $\delta$  18,0.

No mapa de contorno de HMBC (Figura 4.33) pôde-se observar os sinais dos carbonos quaternários C-3, C-7, C-16 e C-20 em  $\delta$  169,0, 205,1, 167,0 e 119,0 e carbonos quaternários ligados a heteroátomos C-4 e C-14 em  $\delta$  81,0 e 66,0, respectivamente.

O espectro de massas obtido por ESI negativo do limonóide **L1** (Figura 4.34) apresentou o pico do íon molecular  $[\text{M-H}]^- = 469,0$ , comprovando ser a limonina o limonóide **L1**.

Analisando os dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC e ESI negativo e comparando com a literatura (BIAVATTI, 2001) pôde-se chegar a estrutura da limonina (**L1**).

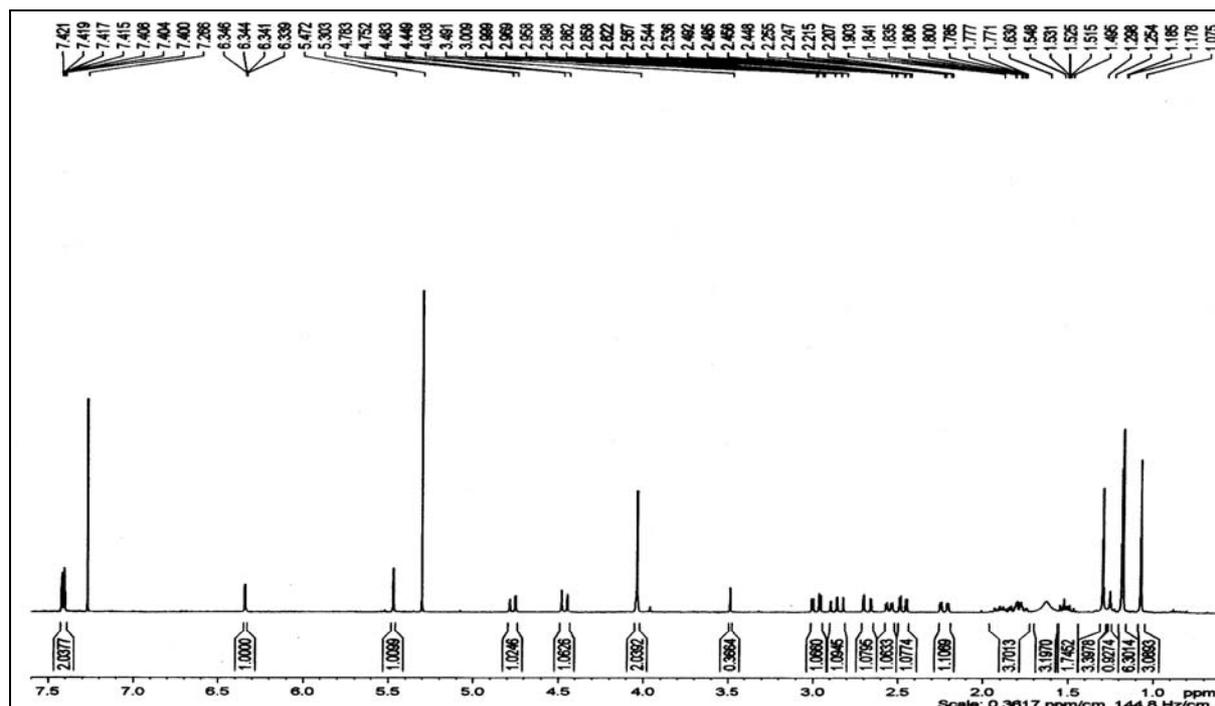


FIGURA 4.30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

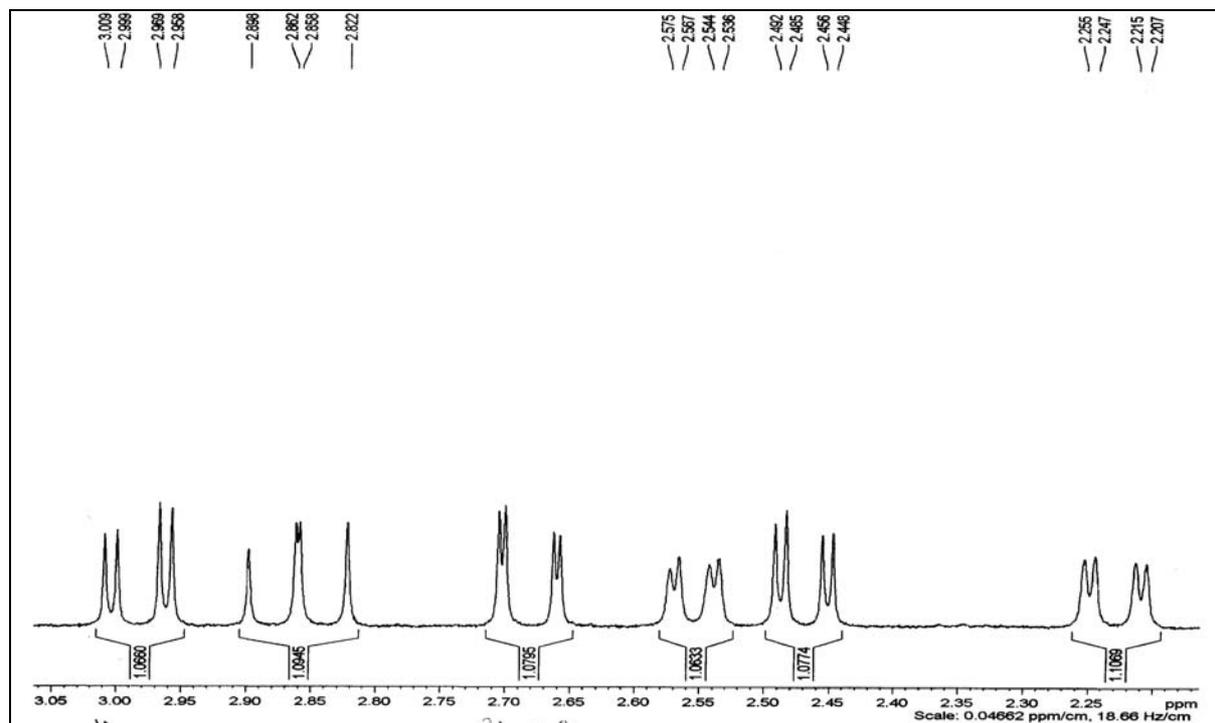
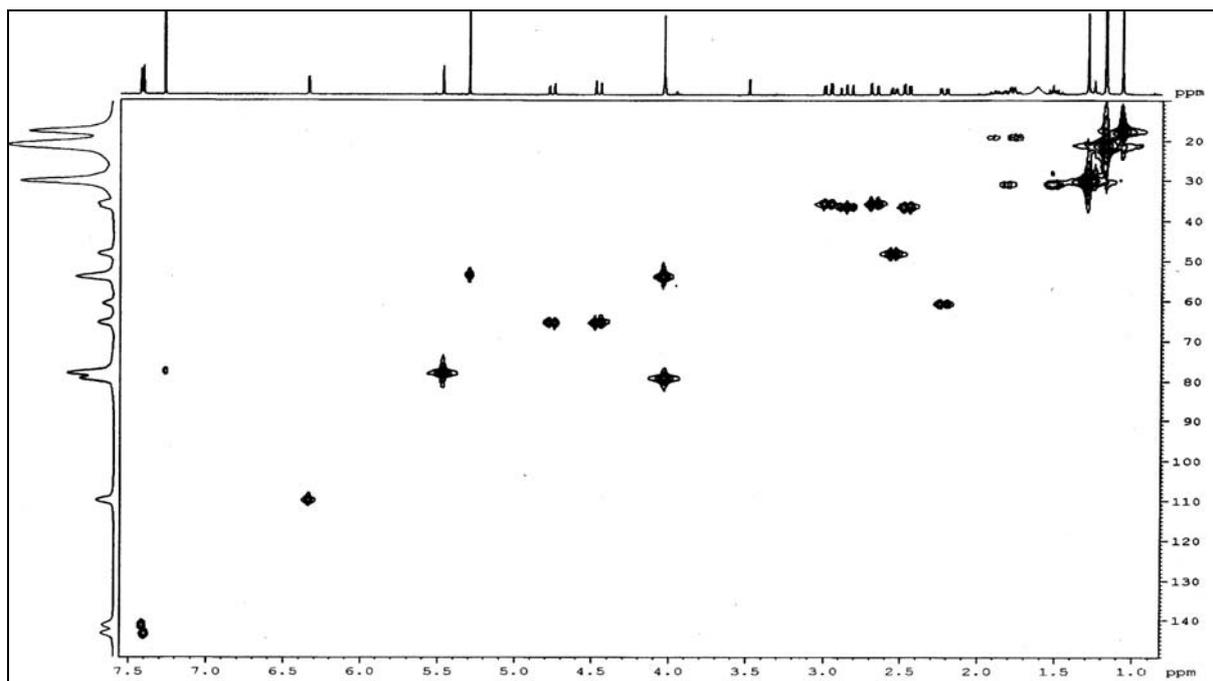
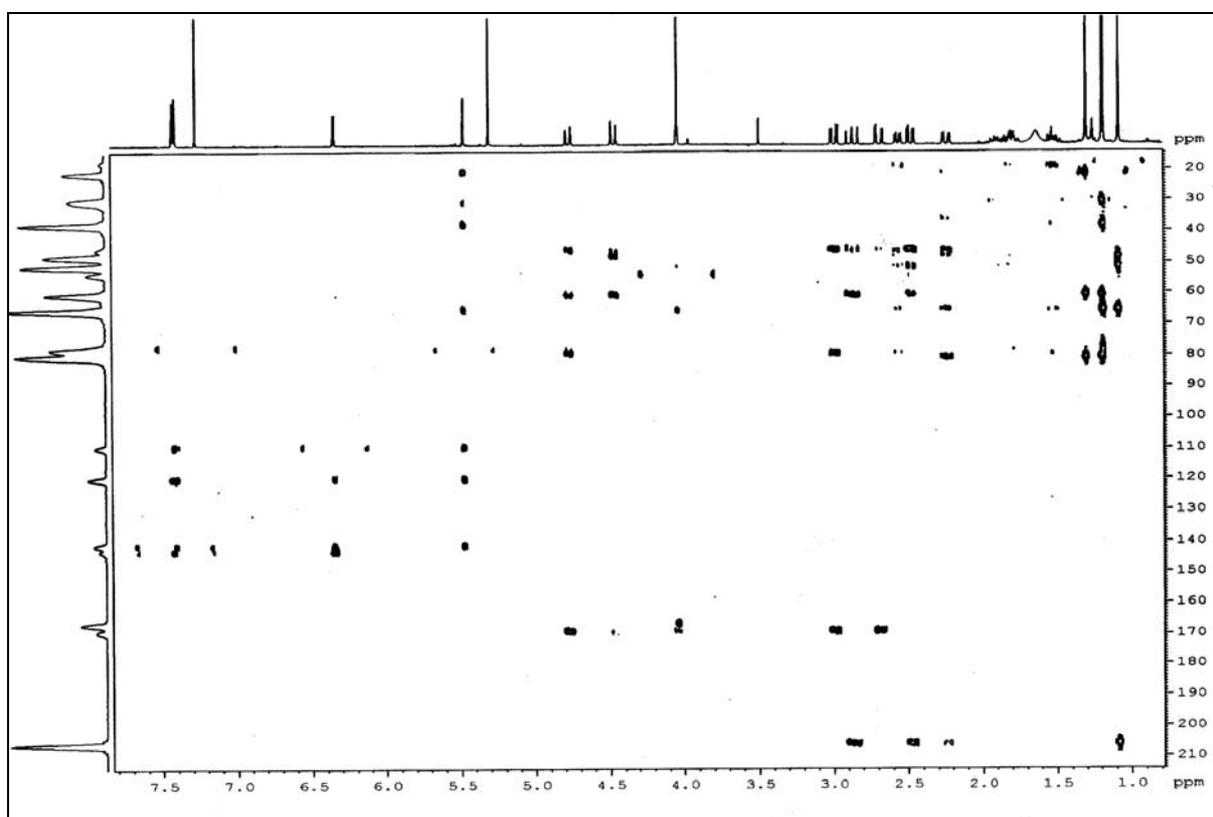


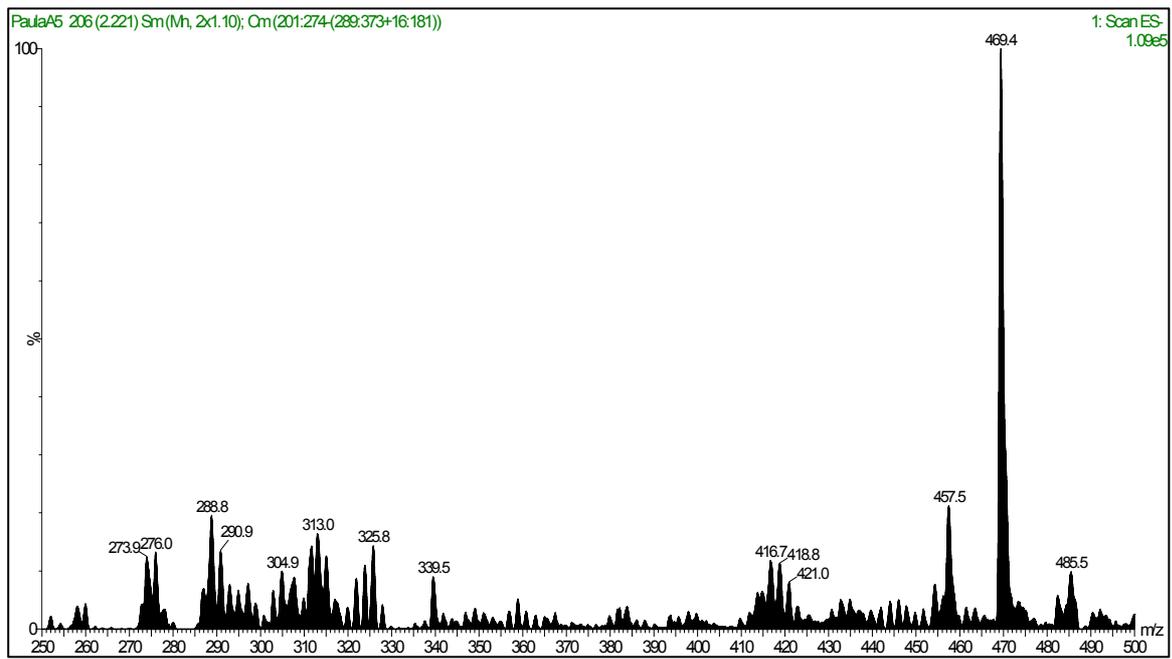
FIGURA 4.31: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.32:** Mapa de contorno de HSQC da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.33:** Mapa de contorno de HMBC da substância L1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.34:** Espectro de massas obtido por ESI negativo da substância L1.

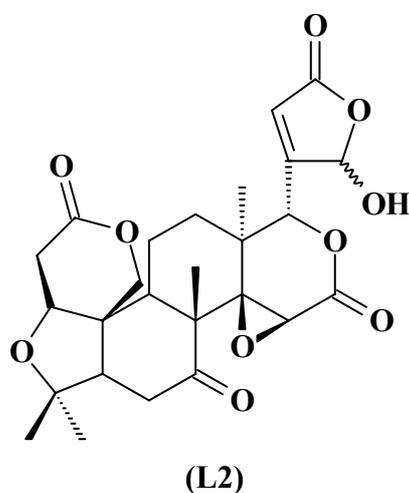
TABELA 4.7: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC do limonóide L1.

Posições	$\delta_{\text{H}}$ (J)		$\delta_{\text{C}}$	
	L1	BIAVATTI, 2001 (*)	L1	BIAVATTI, 2001 (*)
1	4,03 (s)	4,03 (s)	79,9	80,3
2	2,68 (dd, J = 16,8 e 2,0 Hz)	2,69 (d, J = 16,8 Hz)	35,5	35,6
	2,98 (dd, J = 16,8 e 4,0 Hz)	2,97 (d, J = 16,7 e 3,6 Hz)		
3	-	-	169,0	169,1
4	-	-	81,0	79,1
5	2,23 (dd, J = 16,0 e 3,2 Hz)	2,23 (dd, J = 15,7 e 2,8 Hz)	60,9	60,5
6 ax	2,86 (dd, J = 16,0 e 14,4 Hz)	2,86 (t, J = 15,3 Hz)	36,1	36,4
6 eq	2,47 (dd, J = 14,0 e 3,2 Hz)	2,47 (dd, J = 14,5 e 3,0 Hz)		
7	-	-	206,0	206,1
8	-	-	51,5	51,3
9	2,55 (dd, J = 12,0 e 3,2 Hz)	2,54 (dd, J = 10,9 e 2,0 Hz)	48,1	48,1
10	-	-	46,0	45,9
11	1,85 (m)	1,85 (m)	19,0	18,9
12	1,51 (m)	1,50 (m)	31,0	30,8
13	-	-	38,0	37,9
14	-	-	66,0	65,3
15	4,04 (s)	4,03 (s)	53,0	53,8
16	-	-	167,0	166,6
17	5,47 (s)	5,47 (s)	78,0	77,7
18	1,17 (s)	1,17 (s)	21,0	21,3
19	4,77 (d, J = 12,8 Hz)	4,77 (d, J = 13,0 Hz)	65,0	65,7
	4,46 (d, J = 12,8 Hz)	4,47 (d, J = 13,0 Hz)		
20	-	-	119,0	119,9
21	7,40 (m)	7,41 (d, J = 5,3 Hz)	140,0	141,1
22	6,34 (dd, J = 2,0 e 0,8 Hz)	6,34 (s)	110,0	109,6
23	7,40 (m)	7,41 (d, J = 5,3 Hz)	143,0	143,2
28	1,30 (s)	1,29 (s)	30,5	30,1
29	1,18 (s)	1,18 (s)	21,0	20,7
30	1,07 (s)	1,07 (s)	18,0	17,6

(\*) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

#### 4.5.2- Identificação da substâncias L2

A substâncias **L2** foi isolada do extrato diclorometânico dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoGD5J67 e sua identificação estrutural foi determinada através das análises por RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L2** (Figura 4.35) mostrou sinais em  $\delta$  6,26 (*sl*) e outro em  $\delta$  6,18 (*sl*), referentes aos hidrogênios H-22 e H-21. Observou-se também um sinal em  $\delta$  5,36 (*s*) referente ao hidrogênio H-17 e outro sinal em  $\delta$  4,00 (*s*) referente ao H-15. Estes sinais são característicos de limonóide com esqueleto derivado da limonina (**L1**).

Os deslocamentos químicos do anel furano modificado da substância **L2** diferenciam-se da limonina, pois a substância **L2** possui singletos largos em  $\delta$  6,26 e  $\delta$  6,18, sugerindo que o anel furano seja oxidado.

No mapa de correlação de HSQC da substância **L2** (Figura 4.38) observou-se a correlação dos hidrogênios furânicos H-21 e H-22 com seus respectivos carbonos em  $\delta$  98,0 e  $\delta$  123,4, e dos hidrogênios geminais H-19 em

$\delta$  5,02 (*d*,  $J = 13,1$  Hz) e  $\delta$  4,62 (*d*,  $J = 13,1$  Hz). Na posição 23 observou no mapa de contorno de HMBC (Figura 4.39) o sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  169,0 que correlacionava com  $\delta$  6,26 (H-22). Dessa forma, confirma-se a suposição da oxidação do anel furano da substância **L2**.

Na região de  $\delta$  1,07-1,30 dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L2** (Figura 4.35) foram observados quatro sinais referentes às metilas existentes na estrutura, que foram atribuídos seus deslocamentos químicos de carbonos através dos mapas de contorno de HSQC (Figuras 4.38 e Tabelas 4.8).

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância **L2** (Figura 4.36) pôde-se observar as correlações entre os hidrogênios do C-19.

Analisando o mapa de contorno de HSQC (Figura 4.39) juntamente com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.38) da substância **L2** observou-se os sinais dos carbonos metínicos ligados a heteroátomos H-1, H-15 e o H-17 correlacionado respectivamente com os seus carbonos em  $\delta$  80,0, 54,1 e 79,9.

Na ampliação da região entre  $\delta$  2,20-3,01 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L2** (Figura 4.35) foram observados os sinais dos hidrogênios metilênicos e metínicos com suas multiplicidades, como descrito na Tabela 4.8.

Analisando o mapa de contorno de HMBC da substância **L2** (Figura 4.39) pôde-se observar também os sinais dos carbonos quaternários C-3, C-7, C-16 e C-20 em  $\delta$  169,9, 207,9, 166,4 e 164,3, e carbonos quaternários ligados a heteroátomos C-4 e C-14 em  $\delta$  78,7 e 67,0, respectivamente.

Com a análise dos dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC pôde-se chegar a estrutura da substância **L2** denominada ácido limonéxico (BIAVATTI, 2001).

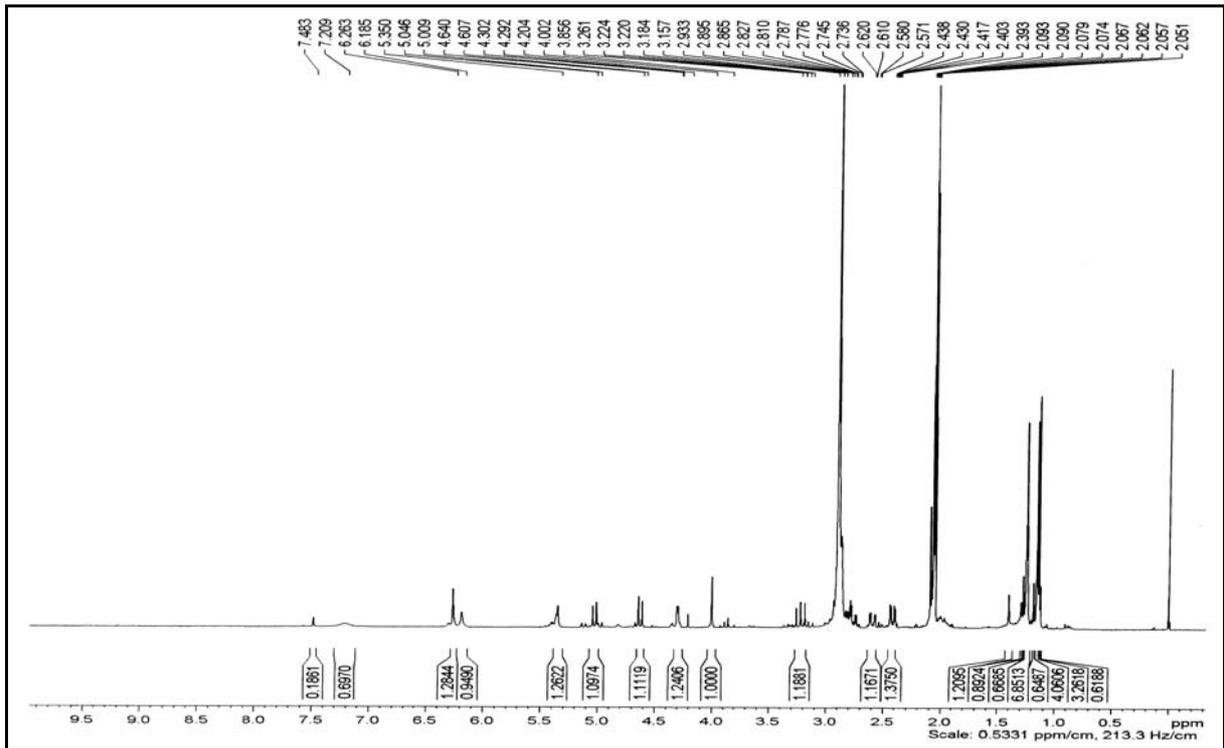


FIGURA 4.35: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).

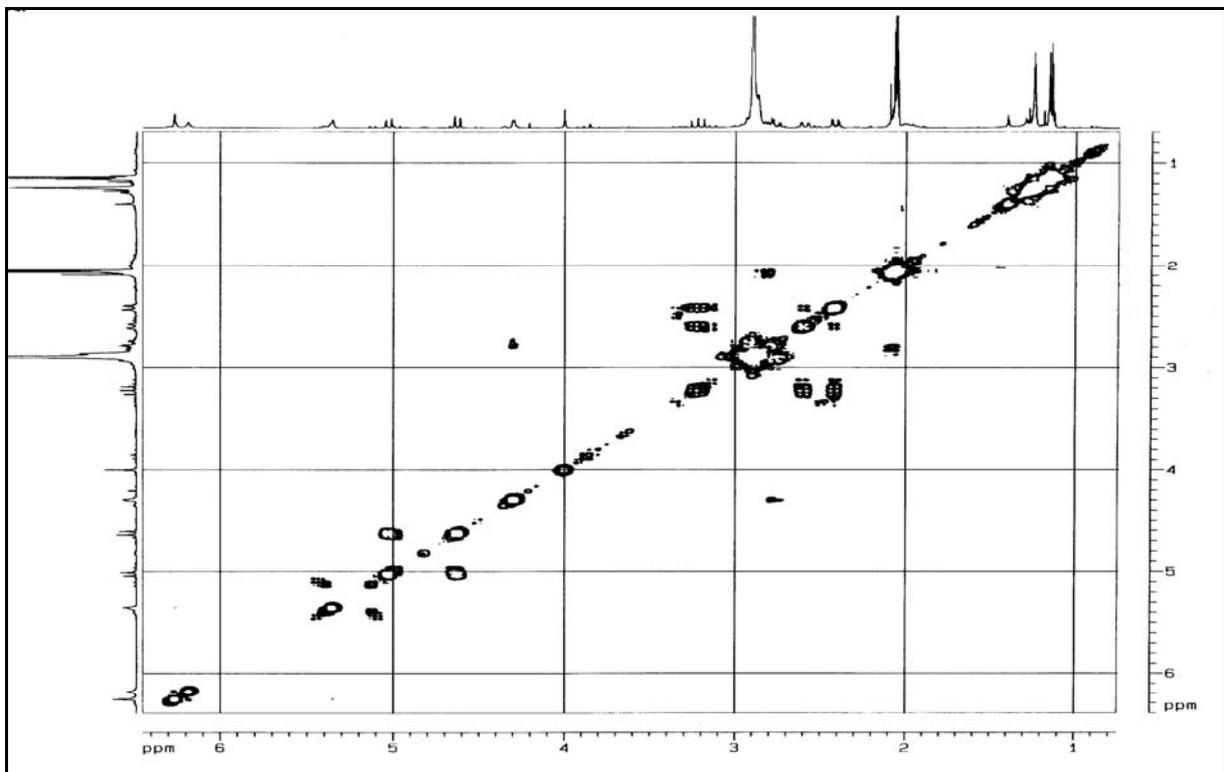


FIGURA 4.36: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).

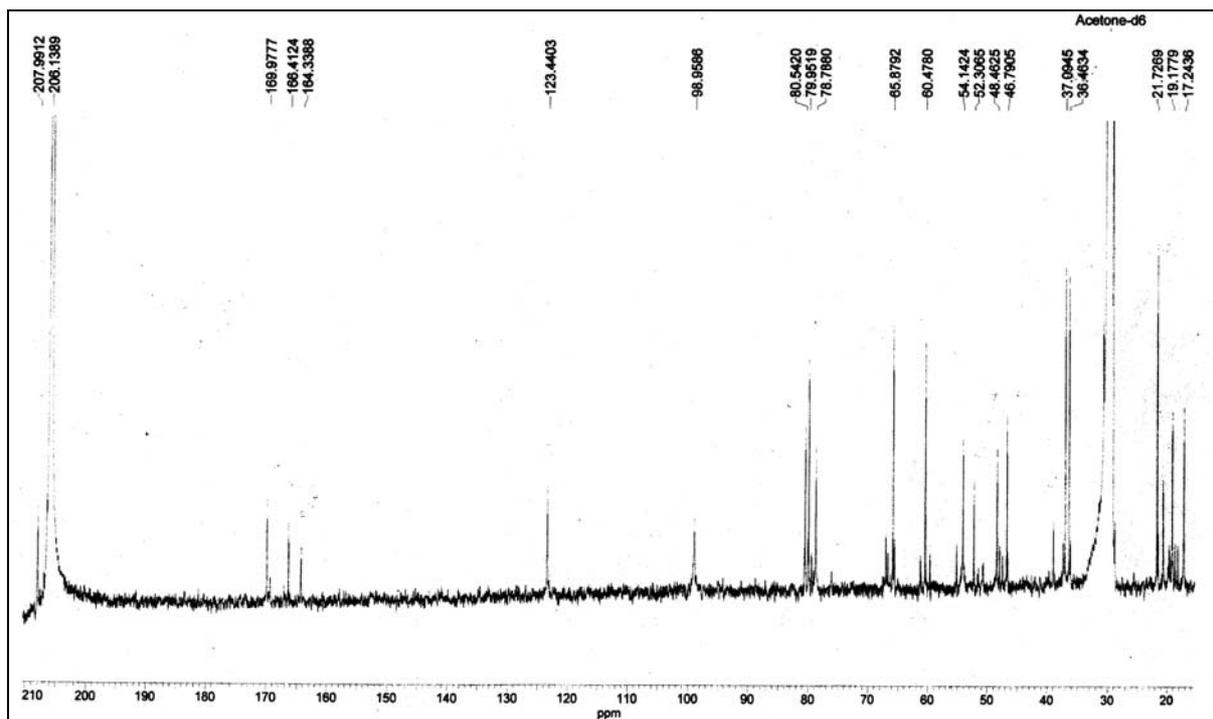


FIGURA 4.37: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).

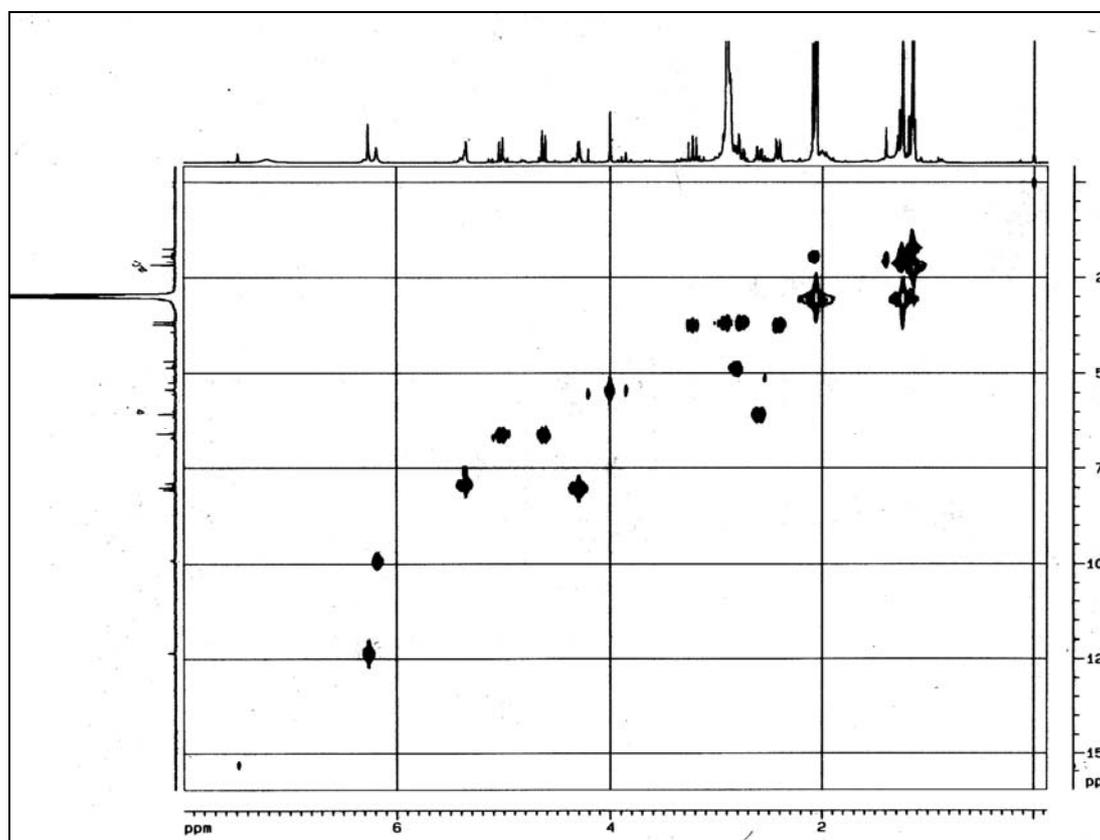
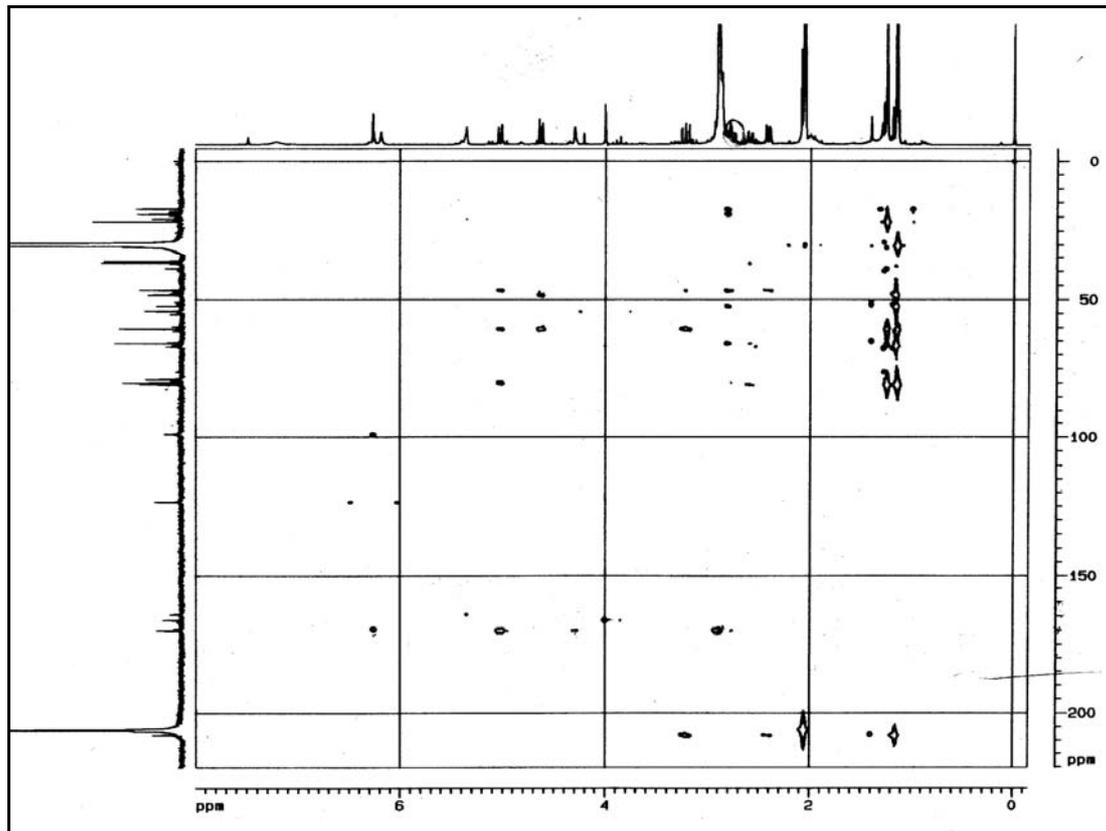


FIGURA 4.38: Mapa de contorno de HSQC da substância L2 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).



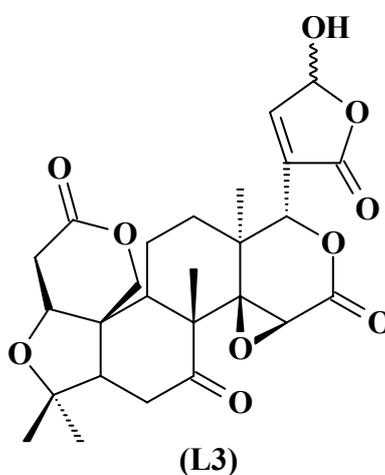
**FIGURA 4.39:** Mapa de contorno de HMBC da substância **L2** (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

**TABELA 4.8:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (400 MHz) do limonóide L2.

Posições	$\delta_{\text{H}}$ (J)		$\delta_{\text{C}}$	
	L2 (Acetona- $\text{d}_6$ )	BIAVATTI, 2001 ( $\text{CDCl}_3$ )	L2 (Acetona- $\text{d}_6$ )	BIAVATTI, 2001 ( $\text{CDCl}_3$ )
1	4,28 ( <i>sl</i> )	4,14 ( <i>sl</i> )	80,0	79,2
2	2,73 ( <i>m</i> ) 2,90 ( <i>m</i> )	2,79 ( <i>d</i> , $J = 16,9$ Hz) 2,90 ( <i>dd</i> , $J = 16,7$ e 3,6 Hz)	36,4	35,5
3	-	-	169,9	168,6
4	-	-	78,7	77,1
5	2,59 ( <i>dd</i> , $J = 15,7$ e 3,4 Hz)	2,34 ( <i>dd</i> , $J = 15,9$ e 2,8 Hz)	60,5	59,2
6 ax	3,22 ( <i>dd</i> , $J = 15,7$ e 14,5 Hz)	3,01 ( <i>t</i> , $J = 15,0$ Hz)	37,0	34,9
6 eq	2,42 ( <i>dd</i> , $J = 15,7$ e 3,4 Hz)	2,41 ( <i>dd</i> , $J = 14,1$ e 3,0 Hz)		
7	-	-	207,9	205,8
8	-	-	46,7	44,9
9	2,77 ( <i>m</i> )	2,54 ( <i>dd</i> , $J = 10,5$ e 3,7 Hz)	48,4	46,8
10	-	-	52,3	50,6
11	2,00 ( <i>m</i> )	1,95 ( <i>m</i> )	19,1	17,7
12	1,95 ( <i>m</i> )	1,70 ( <i>m</i> )	30,0	29,4
13	-	-	39,0	37,0
14	-	-	67,0	64,4
15	4,00 ( <i>s</i> )	3,87 ( <i>s</i> )	54,1	52,1
16	-	-	166,4	164,9
17	5,36 ( <i>s</i> )	5,32 ( <i>s</i> )	79,9	77,9
18	1,15 ( <i>s</i> )	1,17 ( <i>s</i> )	21,7	20,4
19	5,02 ( <i>d</i> , $J = 13,1$ Hz) 4,62 ( <i>d</i> , $J = 13,1$ Hz)	4,86 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz) 4,49 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz)	65,8	64,4
20	-	-	164,3	162,6
21	6,18 ( <i>sl</i> )	6,01 ( <i>d</i> , $J = 5,3$ Hz)	98,0	97,4
22	6,26 ( <i>sl</i> )	6,24 ( <i>s</i> )	123,4	121,7
23	-	-	169,0	168,2
28	1,25 ( <i>s</i> )	1,29 ( <i>s</i> )	30,5	29,1
29	1,26 ( <i>s</i> )	1,16 ( <i>s</i> )	20,5	19,9
30	1,17 ( <i>s</i> )	1,04 ( <i>s</i> )	17,2	15,9

### 4.5.3- Identificação da substâncias L3

A substâncias **L3** foi isolada do extrato diclorometânico dos galhos da planta *S. odoratissima* na fração SoGD5J(5-7) e sua identificação estrutural foi determinada através das análises por RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L3** (Figura 4.40) mostrou sinais em  $\delta$  7,48 (*sl*) e outro em  $\delta$  6,23 (*sl*), referentes aos hidrogênios H-22 e H-23. Observou-se também um sinal em  $\delta$  5,36 (*s*) referente ao hidrogênio H-17 e outro sinal em  $\delta$  4,20 (*s*) referente ao H-15. Estes sinais são característicos de limonóide com esqueleto derivado da limonina (**L1**).

Os deslocamentos químicos do anel furano modificado da substância **L3** diferenciam-se da limonina, pois a substância **L3** possui singletos largos em  $\delta$  7,48 e  $\delta$  6,23, sugerindo que o anel furano seja oxidado (MATOS, 2006).

No mapa de correlação de HSQC da substância **L3** (Figura 4.43) observou-se a correlação dos hidrogênios furânicos H-23 e H-22 com seus

respectivos carbonos em  $\delta$  98,0 e  $\delta$  152,9, e dos hidrogênios geminais H-19 em  $\delta$  4,77 (*d*,  $J = 12,8$  Hz) e  $\delta$  4,46 (*d*,  $J = 12,8$  Hz). Na posição 21 observou no mapa de contorno de HMBC (Figura 4.44) o sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  169,0 que correlacionava com  $\delta$  7,48 (H-22),  $\delta$  5,36 (H-17). Dessa forma, confirma-se a suposição da oxidação do anel furano da substância **L3**.

Na região de  $\delta$  1,07-1,30 dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L3** (Figura 4.40) foram observados quatro sinais referentes às metilas existentes na estrutura, que foram atribuídos seus deslocamentos químicos de carbonos através dos mapas de contorno de HSQC (Figuras 4.43 e Tabelas 4.9).

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância **L3** (Figura 4.41) pôde-se observar as correlações entre os hidrogênios do anel furano H-23 e H-22; e também as correlações entre os hidrogênios do C-19.

Analisando o mapa de contorno de HSQC (Figura 4.43) juntamente com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.42) da substância **L3** observou-se os sinais dos carbonos metínicos ligados a heteroátomos H-1, H-15 e o H-17 correlacionado respectivamente com os seus carbonos em  $\delta$  79,9, 54,4 e 76,0.

Na ampliação da região entre  $\delta$  2,20-3,01 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L3** (Figura 4.40) foram observados os sinais dos hidrogênios metilênicos e metínicos com suas multiplicidades, como descrito na Tabela 4.9.

Analisando o mapa de contorno de HMBC da substância **L3** (Figura 4.44) pôde-se observar também os sinais dos carbonos quaternários C-3, C-7, C-16 e C-20 em  $\delta$  169,0, 206,0, 167,0 e 133,0 e carbonos quaternários ligados a heteroátomos C-4 e C-14 em  $\delta$  79,4 e 67,0, respectivamente.

Com a análise dos dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC pôde-se chegar a estrutura da substância **L3** que corresponde ao isômero do ácido limonético (**L2**) (BIAVATTI, 2001) e foi denominada ácido iso-limonético (**L3**).

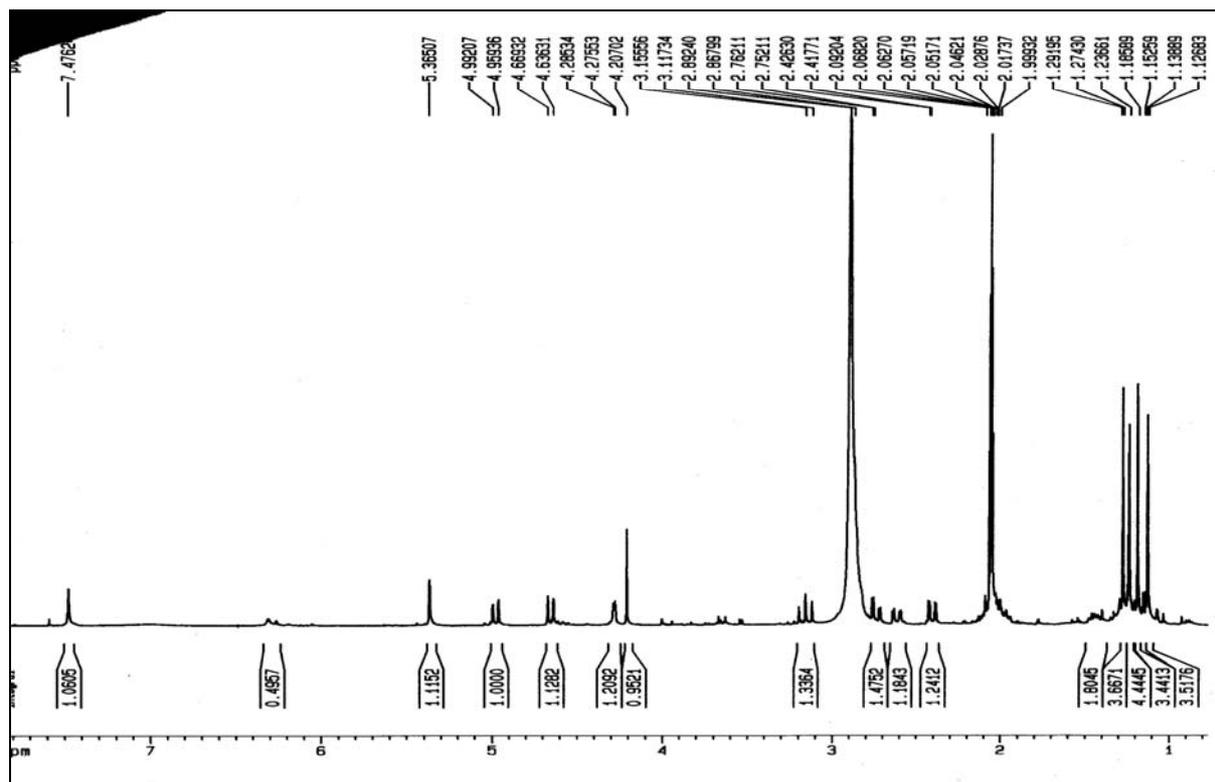


FIGURA 4.40: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância L3 (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

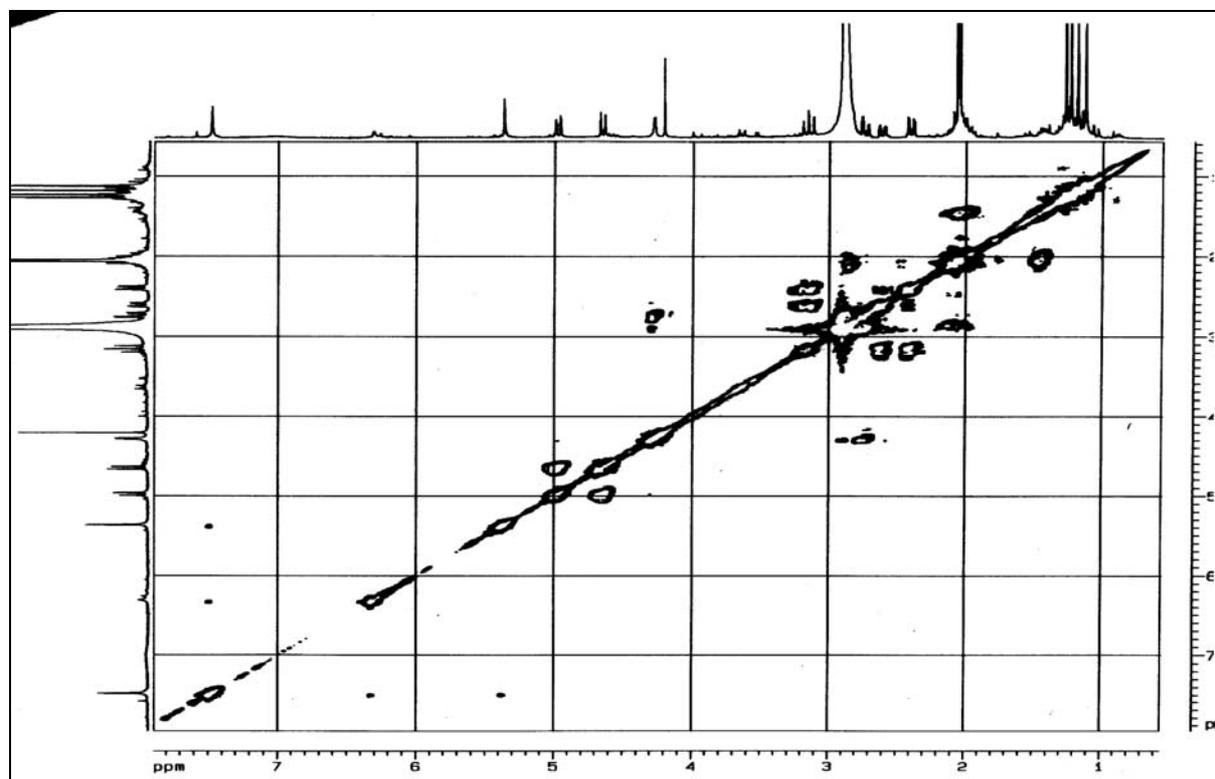


FIGURA 4.41: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L3 (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

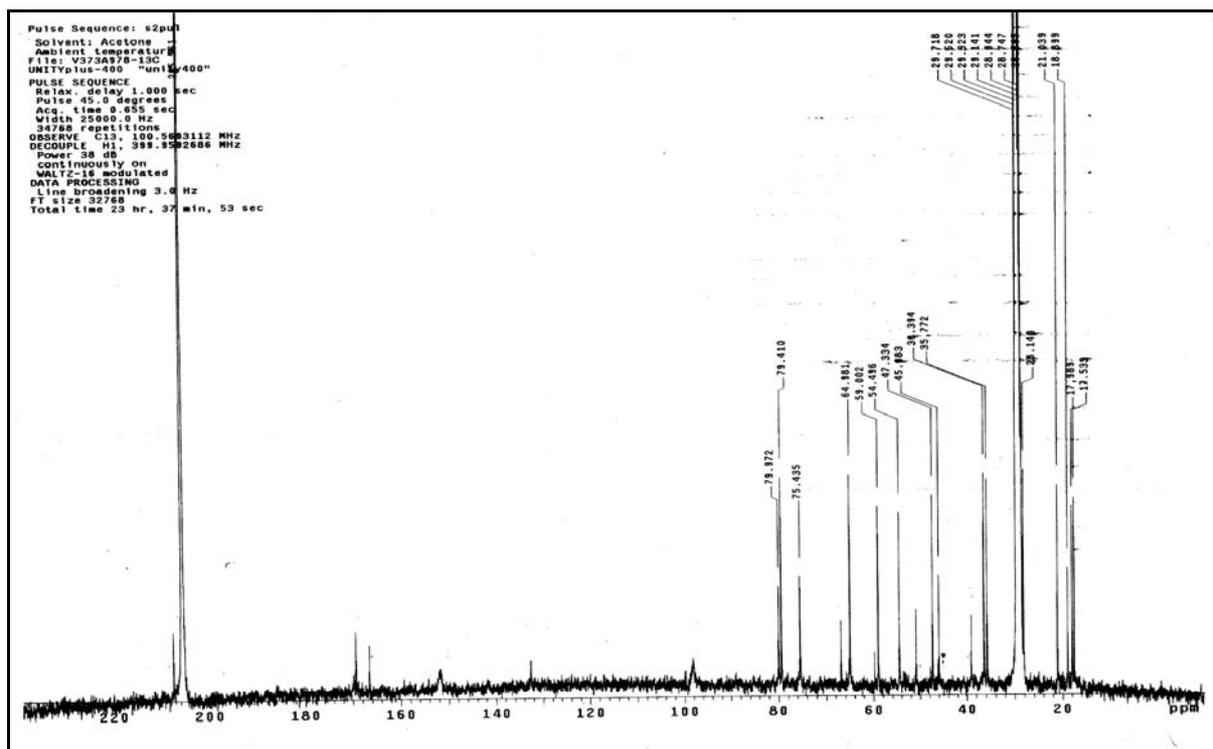


FIGURA 4.42: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).

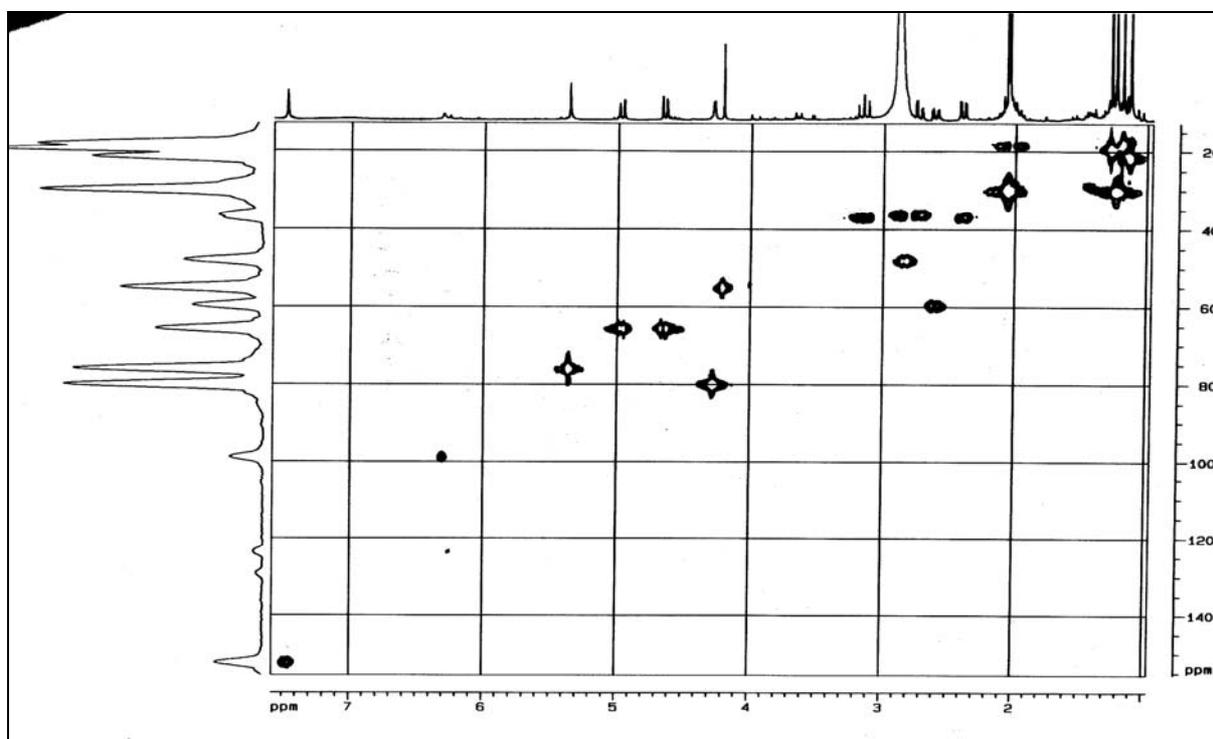
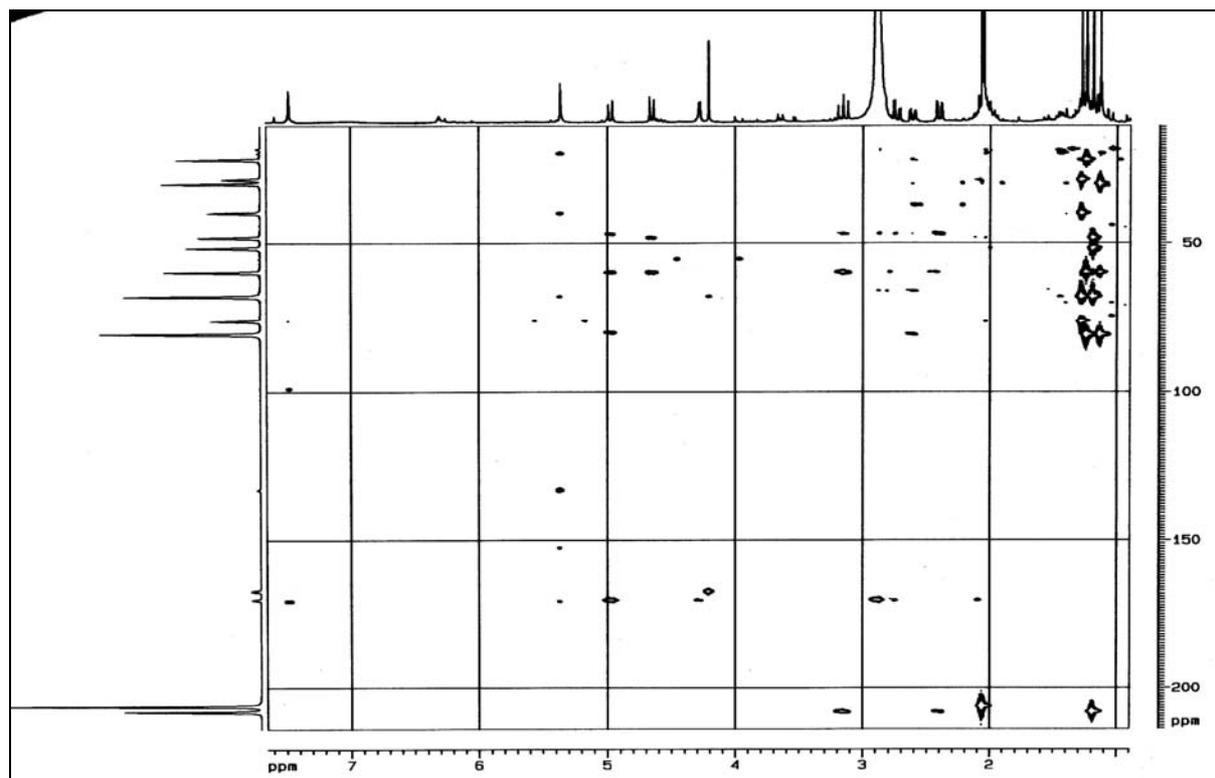


FIGURA 4.43: Mapa de contorno de HSQC da substância L3 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.44:** Mapa de contorno de HMBC da substância **L3** (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

**TABELA 4.9:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (400 MHz) do limonóide **L3**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (J)			$\delta_{\text{C}}$		
	L3 (Acetona- $\text{d}_6$ )	BIAVATTI, 2001 ( $\text{CDCl}_3$ )	MATOS, 2006 ( $\text{CDCl}_3$ )	L3 (Acetona- $\text{d}_6$ )	BIAVATTI, 2001 ( $\text{CDCl}_3$ )	MATOS, 2006 ( $\text{CDCl}_3$ )
1	4,28 ( <i>sl</i> )	4,14 ( <i>sl</i> )		79,9	79,2	
2	2,74 ( <i>dd</i> , $J = 16,6$ e 4,0 Hz) 2,85 ( <i>m</i> )	2,79 ( <i>d</i> , $J = 16,9$ Hz) 2,90 ( <i>dd</i> , $J = 16,7$ e 3,6 Hz)		35,7	35,5	
3	-	-		169,0	168,6	
4	-	-		79,4	77,1	
5	2,61 ( <i>dd</i> , $J = 15,6$ e 3,4 Hz)	2,34 ( <i>dd</i> , $J = 15,9$ e 2,8 Hz)		59,0	59,2	
6 ax	3,15 ( <i>t</i> , $J = 15,6$ Hz)	3,01 ( <i>t</i> , $J = 15,0$ Hz)		36,3	34,9	
6 eq	2,40 ( <i>dd</i> , $J = 15,6$ e 3,4 Hz)	2,41 ( <i>dd</i> , $J = 14,1$ e 3,0 Hz)				
7	-	-		206,0	205,8	
8	-	-		45,9	44,9	
9	2,80 ( <i>m</i> )	2,54 ( <i>dd</i> , $J = 10,5$ e 3,7 Hz)		47,3	46,8	
10	-	-		51,0	50,6	
11	1,95 ( <i>m</i> )	1,95 ( <i>m</i> )		17,9	17,7	
12	1,48 ( <i>m</i> )	1,70 ( <i>m</i> )		30,0	29,4	
13	-	-		39,0	37,0	
14	-	-		67,0	64,4	
15	4,20 ( <i>s</i> )	3,87 ( <i>s</i> )		54,4	52,1	
16	-	-		167,0	164,9	
17	5,36 ( <i>s</i> )	5,32 ( <i>s</i> )		76,0	77,9	
18	1,12 ( <i>s</i> )	1,17 ( <i>s</i> )		21,0	20,4	
19	4,77 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz) 4,46 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz)	4,86 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz) 4,49 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz)		64,9	64,4	
20	-	-		133,0		133,3
21	-	-		170,0		169,8
22	7,48 ( <i>sl</i> )		7,35 ( <i>sl</i> )	152,9		151,2
23	6,23 ( <i>-sl</i> )		6,22 ( <i>sl</i> )	98,0		97,9
28	1,23 ( <i>s</i> )	1,29 ( <i>s</i> )		30,0	29,1	
29	1,27 ( <i>s</i> )	1,16 ( <i>s</i> )		18,9	19,9	
30	1,18 ( <i>s</i> )	1,04 ( <i>s</i> )		17,5	15,9	



5,34 (s) referentes aos hidrogênio H-17 da mistura epimérica de **L4** e outro sinal em  $\delta$  3,93 (s) referente ao H-15.

Os deslocamentos químicos do anel furano da substância **L4** diferencia da limonina (**L1**), pois possui singletos largos em  $\delta$  7,48 e  $\delta$  6,23, sugerindo que o anel furano seja oxidado.

Analisando o mapa de correlação de HSQC (Figura 4.48) pôde-se observar a correlação dos hidrogênios furânicos H-23 e H-22 com seus respectivos carbonos epiméricos em  $\delta$  98,9 / 98,3 e  $\delta$  152,9 / 152,7. Para a posição 21, observou-se no mapa de contorno de HMBC (Figura 4.49) sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  170,1 / 170,0 que correlacionavam com  $\delta$  7,48 (H-22),  $\delta$  5,36 (H-17). Dessa forma, confirma-se a suposição da oxidação do anel furano da substância **L4**.

Comparando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **L4** (Figura 4.45) com dados da literatura de limonóides com esqueleto A-D seco (RIBEIRO, 2002; BIAVATTI, 2001), como a limonina (**L1**, seção 4.6.1, Figura 4.35), observou-se que a substância **L4** também apresentou uma clivagem oxidativa no anel A, isto é, o acréscimo de uma metoxila (C-31) ligada ao C-3, uma insaturação entre os carbonos C-1 e C-2 e uma carbonila em C-19.

Limonóide com esse esqueleto descrito acima já foi isolado da raiz de *S. odoratissima* (RIBEIRO, 2002), odoratina (**L4 a**), mas ainda não foi descrito na literatura com as oxidações no anel furano. Desta forma, as comparações com a literatura (RIBEIRO, 2002) apresentadas na Tabela 4.10 foram apenas para os anéis A, B, C e D do limonóide **L4**.

Os sinais duplicados dos H-1 e H-2 foram observados em  $\delta$  6,80 e 6,78 (*d*,  $J = 12,0$  Hz) e  $\delta$  6,28 e 6,27 (*d*,  $J = 12,0$  Hz), confirmando sua geometria *trans* devido a constante de acoplamento ser 12,0 Hz. Com o espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 4.46) pôde observar as correlações entre os hidrogênios olefinicos H-1 e H-2.

A partir da análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.48) pôde-se determinar os deslocamentos químicos de carbonos do H-1 e H-2 em  $\delta$  152,1 e 123,9 / 124,0, respectivamente.

A metoxila (C-31) ligada à C-3 originada da clivagem oxidativa do anel teve o deslocamento químico no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.45) em  $\delta$  3,72 / 3,71 (s). Com a análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.48) observou-se à correlação com o carbono em  $\delta$  52,5 (Tabela 4.10).

Através do mapa de contorno de HMBC (Figuras 4.49) observou-se o sinal do carbono carbonílico C-19 em  $\delta$  183,4 correlacionando com  $\delta$  6,80/6,78 (H-1).

Na região de  $\delta$  1,08-1,58 foram observados quatro sinais em  $\delta$  1,09,  $\delta$  1,20,  $\delta$  1,45 e  $\delta$  1,54, referentes as quatro metilas existentes na estrutura. Os carbonos das metilas também foram definidos com os mapas de contornos de HSQC e HMBC (Figuras 4.48 e 4.49), C-18 ( $\delta$  1,09) em  $\delta$  18,9, C-28 ( $\delta$  1,54) em  $\delta$  24,5, C-29 ( $\delta$  1,45) em  $\delta$  32,6 e C-30 ( $\delta$  1,20) em  $\delta$  17,1.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.45) mostrou através do sinal em  $\delta$  4,51 (*tl* 7,00 Hz, H-11) a existência de uma hidroxila em C-11 com  $\delta$  65,0, que pode ser confirmado com o mapa de contorno de HSQC (Figura 4.48) através das correlações com  $\delta$  40,0 (C-12) e  $\delta$  18,9 (C-18) (Tabela 4.10).

No mapa de contorno de HMBC (Figura 4.49) pôde-se observar também os sinais dos carbonos quaternários C-3, C-7, C-16 e C-20 em  $\delta$  169,9, 208,1, 167,0 e 132,9 e os sinais dos carbonos quaternários ligados a heteroátomos C-4 e C-14 em  $\delta$  88,0 e  $\delta$  65,5, respectivamente. Todas essas atribuições foram feitas através das correlações observadas de cada carbono no mapa de contorno de HMBC e confirmadas com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.47, Tabela 4.10)

O espectro de massas obtido por ESI negativo do limonóide **L4** (Figura 4.50) apresentou o pico do íon molecular  $[M-H]^- = 545$ , comprovando ser um derivado da odoratina (**L4 a**).

Analisando os dados espectroscópicos RMN  $^1H$ , COSY  $^1H-^1H$ , HSQC, HMBC e ESI negativo e comparando com a literatura (RIBEIRO, 2002; MATOS, 2006) pôde-se chegar à estrutura que foi denominada 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina (**L4**).

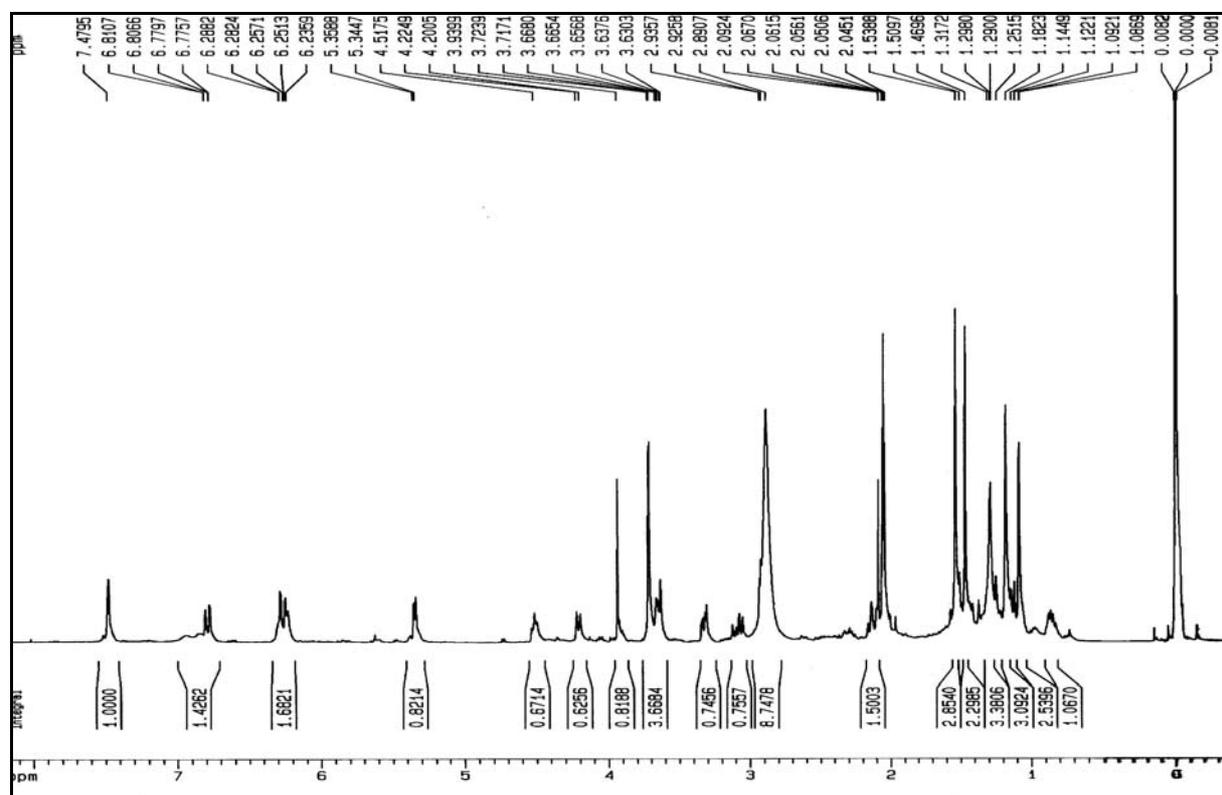


FIGURA 4.45: Espectro de RMN  $^1H$  da substância **L4** (Acetona- $d_6$ , 400 MHz).

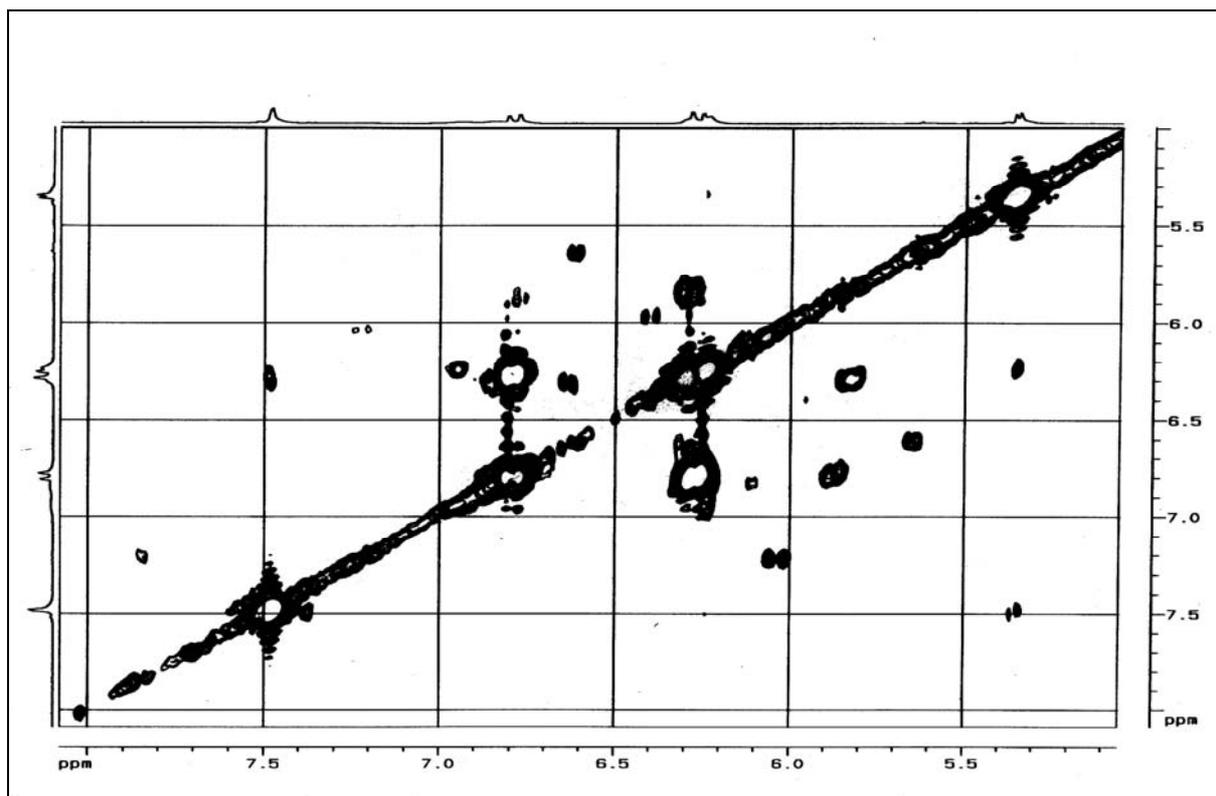


FIGURA 4.46: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).

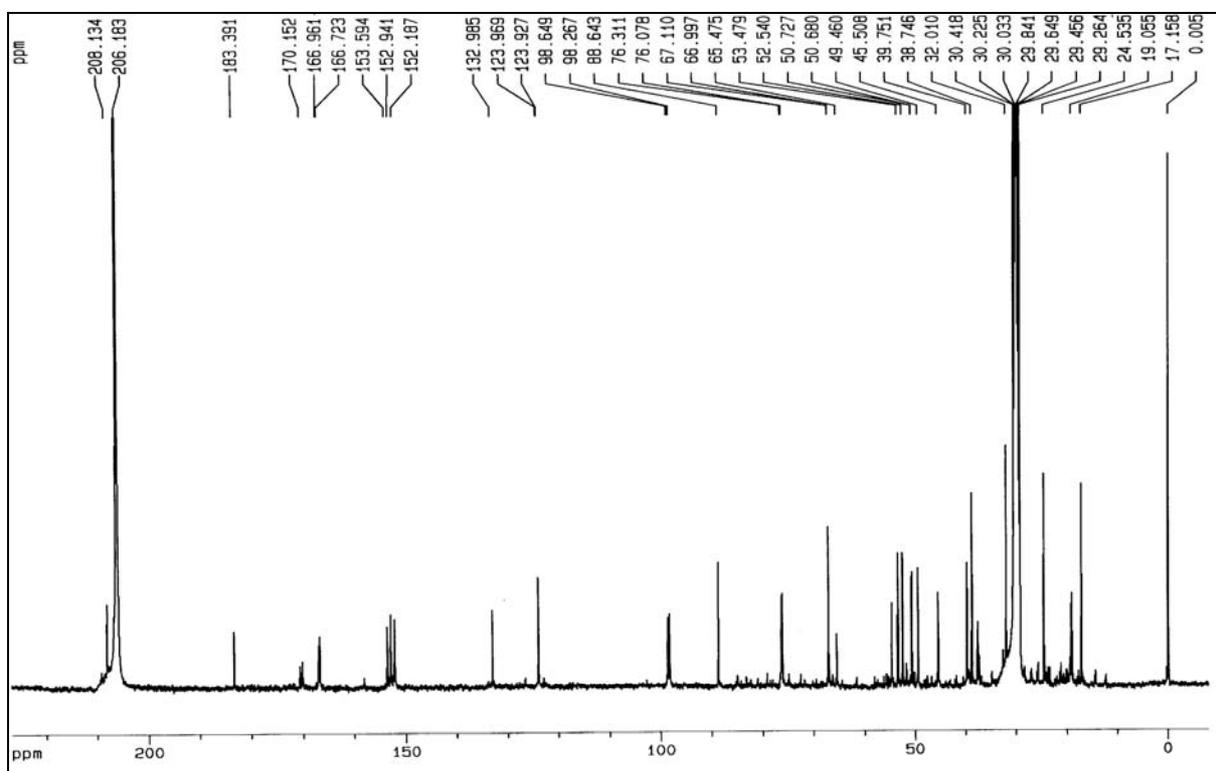
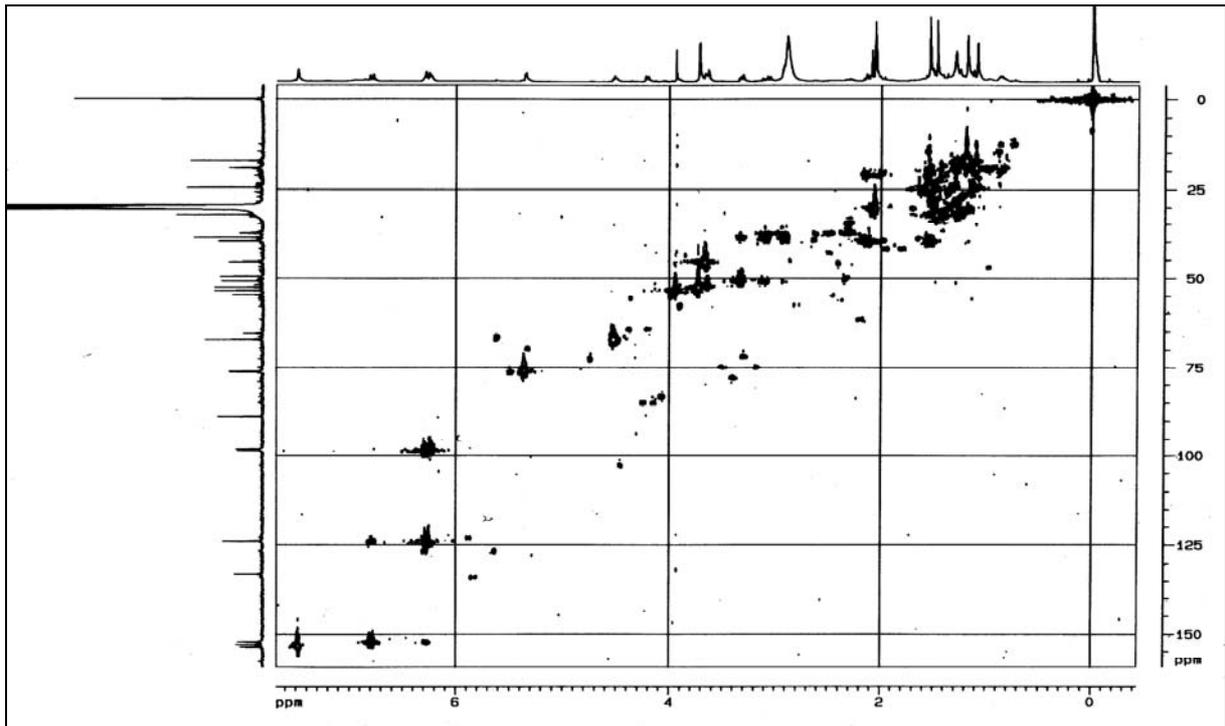
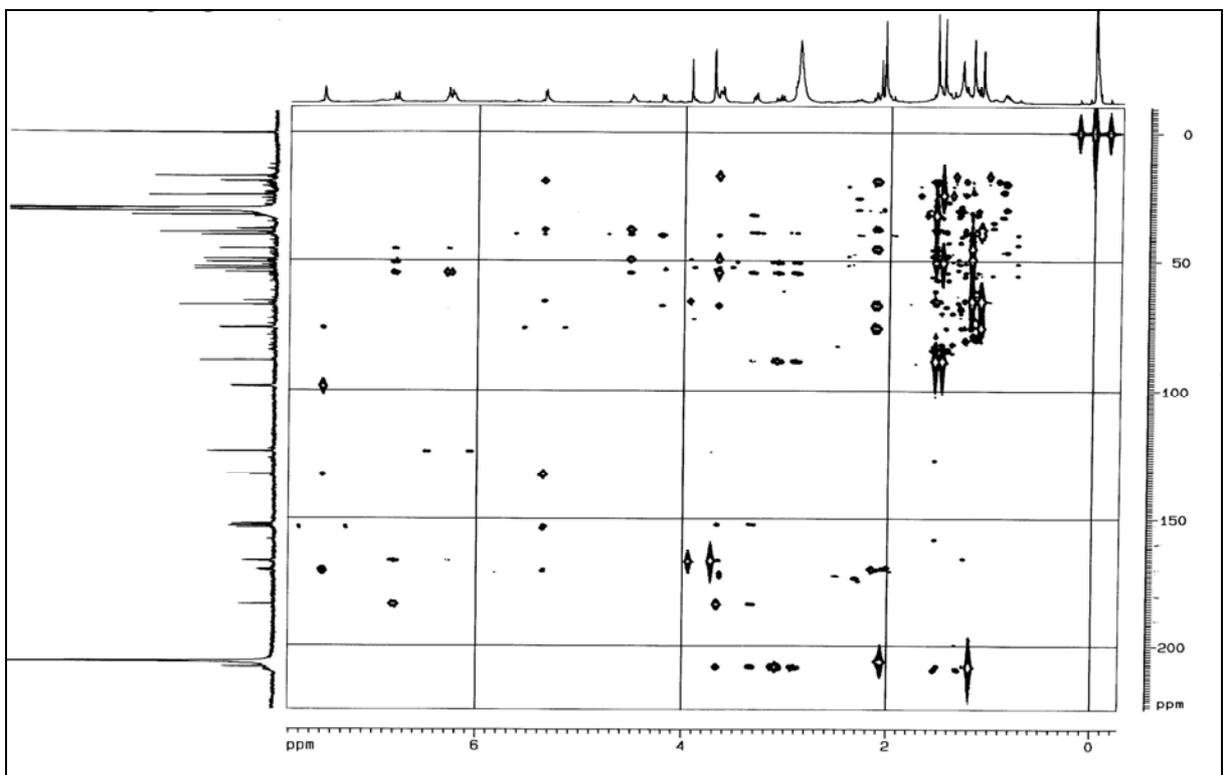


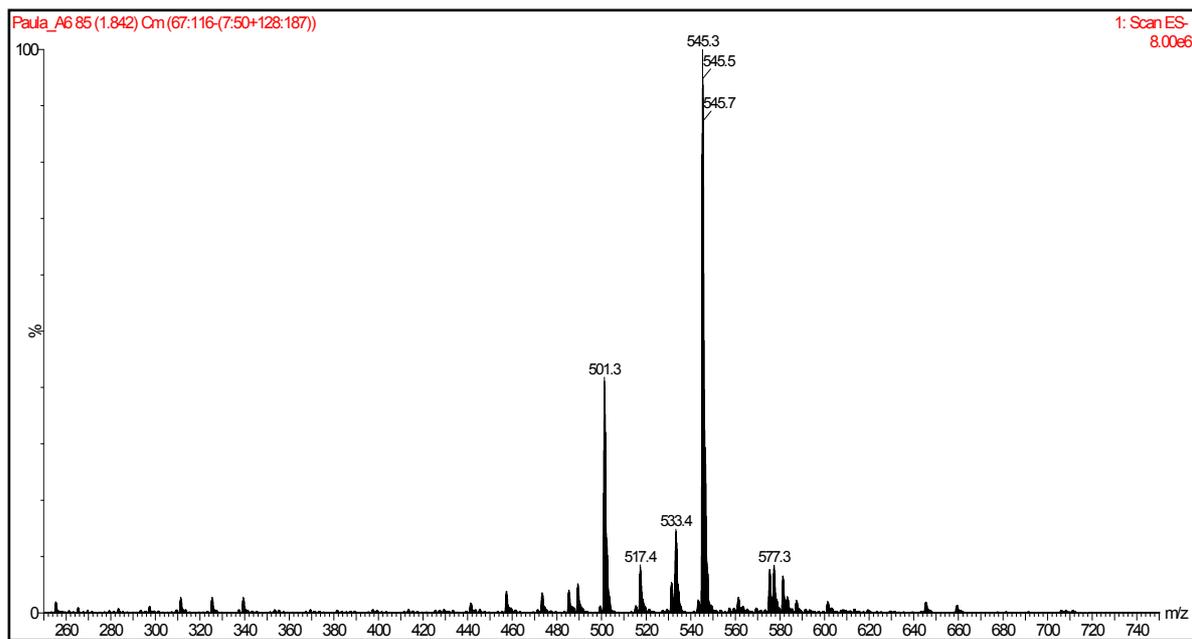
FIGURA 4.47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância L4 (Acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.48:** Mapa de contorno de HSQC da substância L4 (Acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz).



**FIGURA 4.49:** Mapa de contorno de HMBC da substância L4 (Acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz).



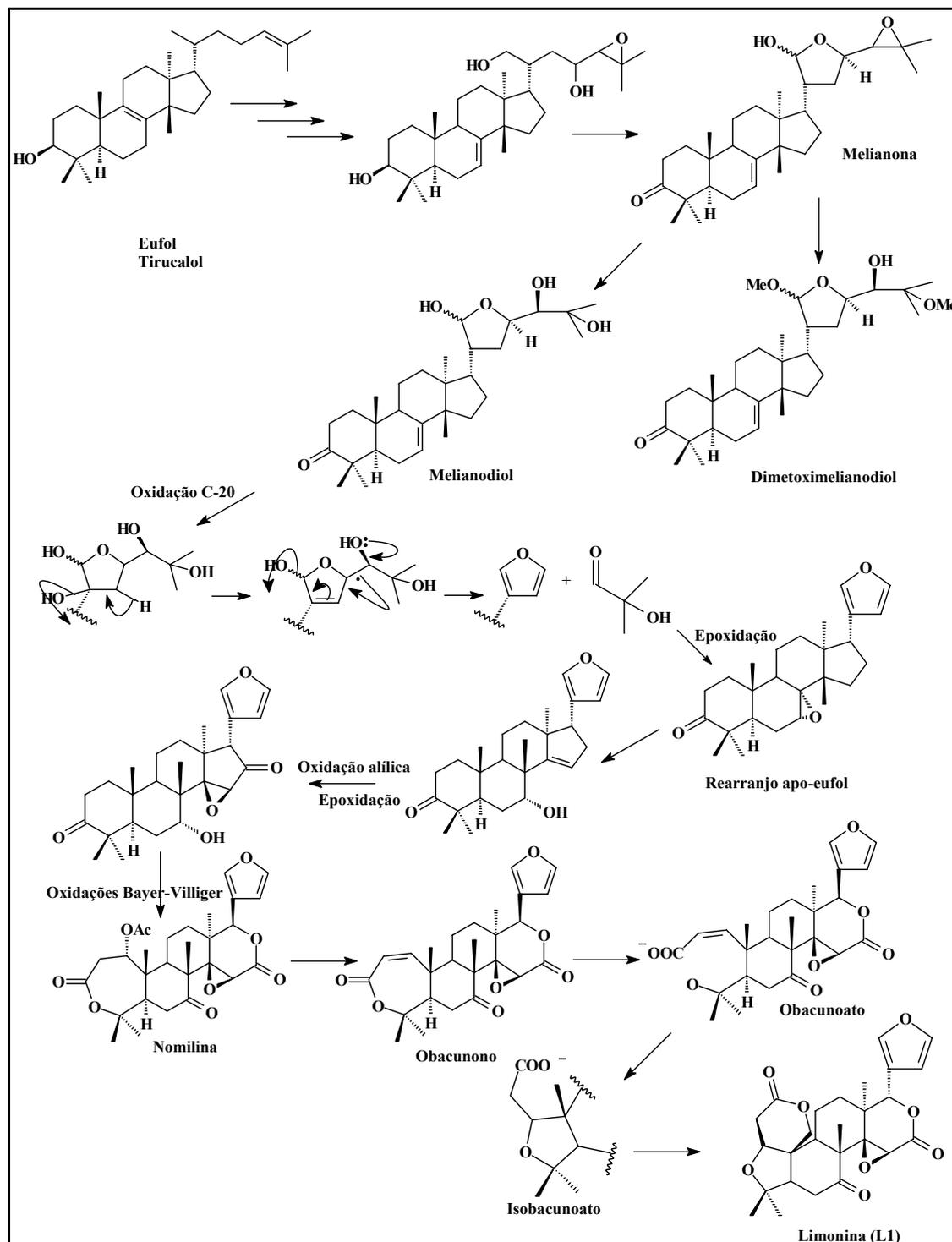
**FIGURA 4.50:** Espectro de massas obtido por ESI negativo da substância **L4**.

**TABELA 4.10:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC (400 MHz) do limonóide **L4**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (J)			$\delta_{\text{C}}$		
	L4 (Acetona- $\text{d}_6$ )	RIBEIRO, 2002 ( $\text{CDCl}_3$ )	MATOS, 2006 ( $\text{CDCl}_3$ )	L4 (Acetona- $\text{d}_6$ )	RIBEIRO, 2002 ( $\text{CDCl}_3$ )	MATOS, 2006 ( $\text{CDCl}_3$ )
<b>1</b>	6,80/6,78 ( <i>d</i> , $J=12,0$ Hz)	6,65 ( <i>d</i> , $J=12,4$ Hz)		152,1	151,6	
<b>2</b>	6,28/6,27 ( <i>d</i> , $J=12,0$ Hz)	6,12 ( <i>d</i> , $J=12,4$ Hz)		123,9/124,0	123,2	
<b>3</b>	-	-		169,9	165,5	
<b>4</b>	-	-		88,0	87,6	
<b>5</b>	3,09 ( <i>dd</i> , $J=10,4$ e $2,5$ Hz)	3,09 ( <i>dd</i> , $J=10,4$ e $2,5$ Hz)		50,7	49,9	
<b>6 ax</b>	3,32 ( <i>dd</i> , $J=8,0$ e $3,9$ Hz)	3,24 ( <i>dd</i> , $J=18,4$ e $10,4$ Hz)		38,7	38,1	
<b>6 eq</b>	2,89 ( <i>sinal</i> )	2,74 ( <i>dd</i> , $J=18,4$ e $2,5$ Hz)				
<b>7</b>	-	-		208,1	207,3	
<b>8</b>	-	-		49,5	48,5	
<b>9</b>	3,63 ( <i>m</i> )	3,60 ( <i>s</i> )		45,5	43,9	
<b>10</b>	-	-		54,7	53,6	
<b>11</b>	4,51 ( <i>t</i> , $J=8,0$ , $7,2$ , e $6,9$ Hz)	4,51 ( <i>dl</i> , $J=6,7$ Hz)		65,0	66,4	
<b>12ax</b>	2,06 ( <i>sinal</i> )	1,83 ( <i>d</i> , $J=15,0$ )		40,0	41,2	
<b>12 eq</b>		1,61 ( <i>sinal</i> )				
<b>13</b>	-	-		39,7	36,5	
<b>14</b>	-	-		65,5	65,1	
<b>15</b>	3,93 ( <i>s</i> )	4,17 ( <i>s</i> )		53,4	52,6	
<b>16</b>	-	-		167,0	166,9	
<b>17</b>	5,36/5,34 ( <i>s</i> )	5,54 ( <i>s</i> )		76,3	77,8	
<b>18</b>	1,09 ( <i>s</i> )	1,02 ( <i>s</i> )		18,9	19,2	
<b>19</b>	-	-		183,4	182,5	
<b>20</b>	-	-	-	132,0		133,3
<b>21</b>	-	-	-	170,1/170,0		169,8
<b>22</b>	7,48 ( <i>sl</i> )		7,35 ( <i>sl</i> )	152,9/152,7		151,2
<b>23</b>	6,23 ( <i>sl</i> )		6,22 ( <i>sl</i> )	98,9/98,3		97,9
<b>28</b>	1,54 ( <i>s</i> )	1,49 ( <i>s</i> )		24,5	24,4	
<b>29</b>	1,45 ( <i>s</i> )	1,44 ( <i>s</i> )		32,6	32,4	
<b>30</b>	1,20 ( <i>s</i> )	1,16 ( <i>s</i> )		17,1	16,7	
<b>31</b>	3,72/3,71 ( <i>s</i> )	3,71 ( <i>s</i> )		52,5	52,3	

### 4.5.4- Biossíntese dos Limonóides

O Esquema 4.3 apresenta a proposta de biossíntese dos limonóides (CHAMPAGNE et al, 1992, DREYER, 1983).



ESQUEMA 4.3: Proposta da biossíntese do limonóide Limonina (L1).

## 4.6- Ensaio biológicos

### 4.6.1- Ensaio biológicos com as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*

Os extratos das folhas e dos galhos obtidos da planta *S. odoratissima*, descrito na seção 3.6.1, foram submetidos ao ensaio inseticida contra as formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa*.

Analisando os dados obtidos nos ensaios com os extratos das folhas e galhos de *S. odoratissima* (Tabela 4.11), observou-se que os extratos das folhas (SoFH, SoFD e SoFM) causaram 50% da mortalidade dos indivíduos entre o 17º e 21º dia do experimento, semelhante ao controle. Portanto, os extratos das folhas de *S. odoratissima* não possuem ação sobre a sobrevivência média das formigas cortadeiras ( $S_{50}$ , Tabela 4.11), pois suas sobrevivências médias são próximas ao controle. Conclui-se que os extratos das folhas SoFH, SoFD e SoFM não possuem atividades inseticidas significativas contra as formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* (Gráfico 4.1).

Os dados obtidos nos ensaios dos extratos dos galhos de *S. odoratissima* (Tabela 4.11) indicaram que os extratos dos galhos SoGD e SoGM provocaram 50 % de mortalidade dos indivíduos entre o 5º e 6º dia do experimento e 100 % da mortalidade dos indivíduos já no 21º dia do experimento. Portanto, os extratos dos galhos SoGD e SoGM possuem uma alta ação sobre a sobrevivência média dos indivíduos e uma alta atividade inseticida contra as formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa*. Esses resultados promissores dos dois extratos podem ser observados nas curvas de sobrevivência do Gráfico 4.1 e na Tabela 4.10, através da comparação das sobrevivências médias dos indivíduos dos extratos SoGD, SoGM e do controle ( $S_{50}$ ).

Analisando as curvas do extrato dos galhos SoGH (Gráfico 4.1), juntamente com a Tabela 4.11, observa-se que 50% da mortalidade dos

indivíduos acontecem entre o 14° e 17° dia do experimento, semelhante à sobrevivência média do controle. Portanto, esse extrato SoGH não possui atividade inseticida significativa contra as formigas cortadeiras, *A. sexdens rubropilosa*.

**TABELA 4.11:** Porcentagem de Mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* alimentadas com extratos da planta *Spiranthera odoratissima*.

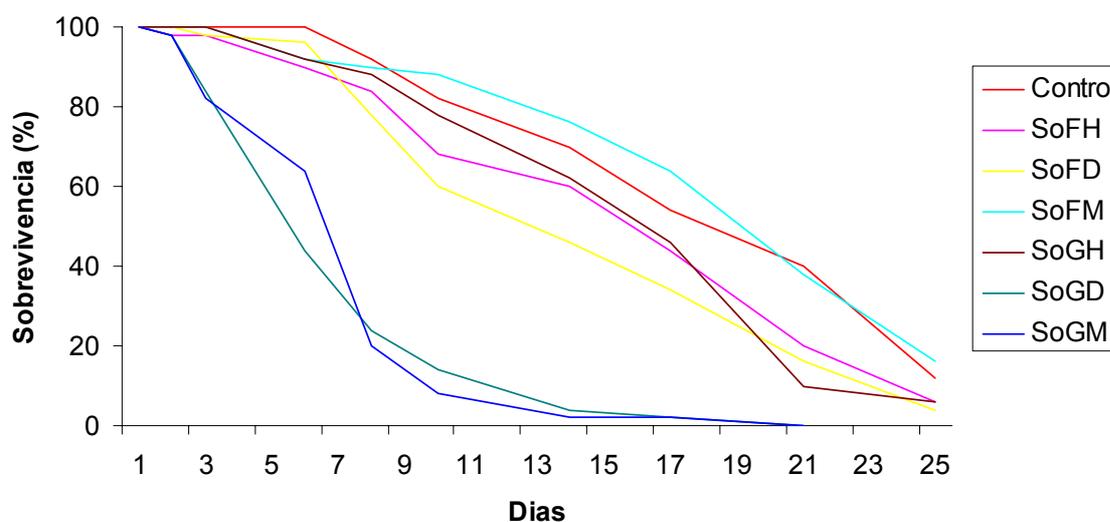
Órgão	Extrato	Dias										
		1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	S <sub>50</sub>
	<b>Controle</b>	0	0	0	0	8	18	30	46	60	88	<b>18,0a</b>
Folhas	Hexano	0	2	2	10	16	32	40	56	80	94	<b>17,0a</b>
Galhos	Hexano	0	0	0	8	12	22	38	54	90	94	<b>17,0b</b>
Folhas	Dicloro	0	0	2	4	22	40	52	66	84	96	<b>14,0b</b>
Galhos	Dicloro	0	2	16	56	76	86	96	98	100	-	<b>5,50c</b>
Folhas	Metanol	0	0	0	8	10	12	24	36	62	84	<b>19,0a</b>
Galhos	Metanol	0	2	18	36	80	92	98	98	100	-	<b>5,0c</b>

S<sub>50</sub> = sobrevivência média. Letras após o valor do S<sub>50</sub> mostram diferenças significativas de acordo com o long-test (b= 0,01<p<0,05; c= p<0,01).

Em razão desta atividade foi realizado estudo biomonitorado para o isolamento de substâncias ativas no formigueiro. O extrato dos galhos SoGD da planta *S. odoratissima* foi fracionado (seção 3.5.2.1) isolando alcalóides furoquinolínicos. Os alcalóides isolados, dictamina (A1) e fagarina (A2), foram submetidos ao ensaio inseticida contra as formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa*.

Analisando os dados obtidos no ensaio com dictamina (A1) e fagarina (A2) (Tabela 4.12), observou-se que os dois alcalóides furoquinolínicos tiveram 50% da mortalidade dos indivíduos entre o 10° e 14° dia do experimento, enquanto no controle 50% da mortalidade dos indivíduos foi entre o 14° e 17° dia do experimento. Mas observando a sobrevivência média dos dois

alcalóides furoquinolínicos juntamente com o controle, apenas o grupo tratado com a dictamina (A1) teve uma sobrevivência média significativa. Isto ocorreu devido a crescente mortalidade na presença da dictamina (A1) no decorrer do 21º ao 25º dia do experimento em comparação com a mortalidade ocorrida neste mesmo intervalo na presença da fagarina (A2) e da dieta pura (controle) (Gráfico 4.2).



**GRÁFICO 4.1:** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com os extratos das folhas e galhos da planta *S. odoratissima* na concentração de 2,0 mg/mL e dieta pura (controle).

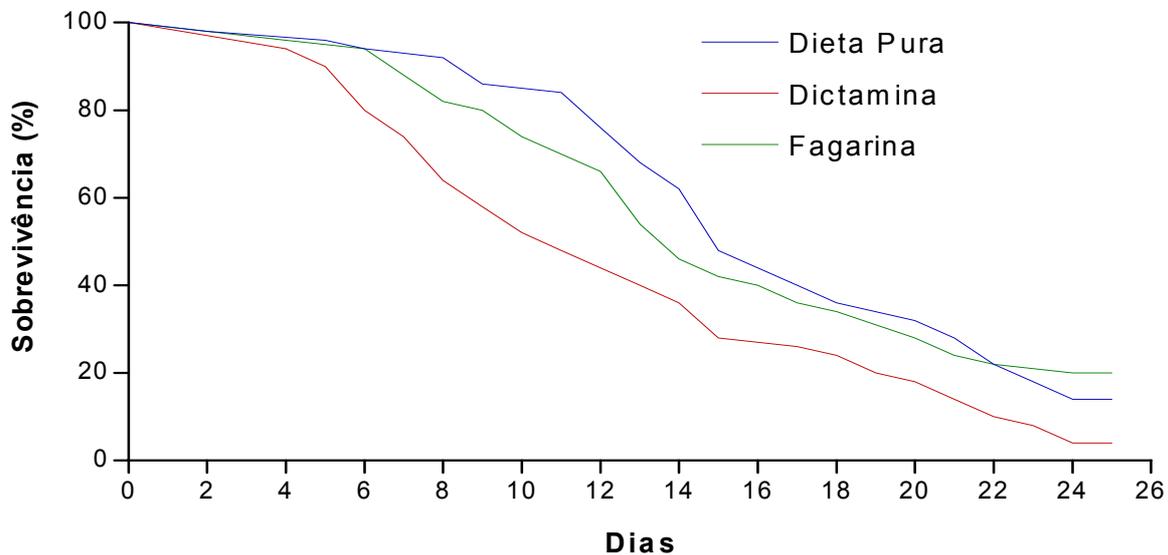
Devido à sobrevivência média ( $S_{50}$ ) da dictamina (A1) ser significativa em relação ao controle (Tabela 4.12 e Gráfico 4.2), foi realizado com esse alcalóide furoquinolínico um teste de atratividade (Tabela 4.13 e Gráfico 4.3). Neste teste pôde-se observar que os indivíduos carregaram metade do número de flocos controle (solvente) em um tempo menor que os flocos incorporados a dictamina (A1), como demonstrado na Tabela 4.13. No Gráfico 4.3 pôde-se também observar no intervalo de 60 minutos que os flocos controles foram carregados num número maior em menor tempo em relação aos flocos incorporados dictamina (A1).

Portanto, com esses dados conclui-se que a dictamina (A1) apresenta menor atrativa para as formigas e causa mortalidade significativa dos indivíduos do formigueiro.

**TABELA 4.12:** Porcentagem de Mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* alimentadas com alcalóides incorporados à dieta na concentração de 0,1 mg/mL.

Substâncias	Dias										
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	S <sub>50</sub>
Controle	0	2	2	6	8	14	38	60	72	86	15,0a
Dictamina	0	0	0	20	36	48	64	74	86	96	11,0b
Fagarina	0	0	0	6	18	26	54	64	76	80	14,0a

S<sub>50</sub> = sobrevivência média. Letras, diferentes a do controle, após o valor do S50 mostram diferenças significativas de acordo com o “long-rank test” (b=p<0,05).

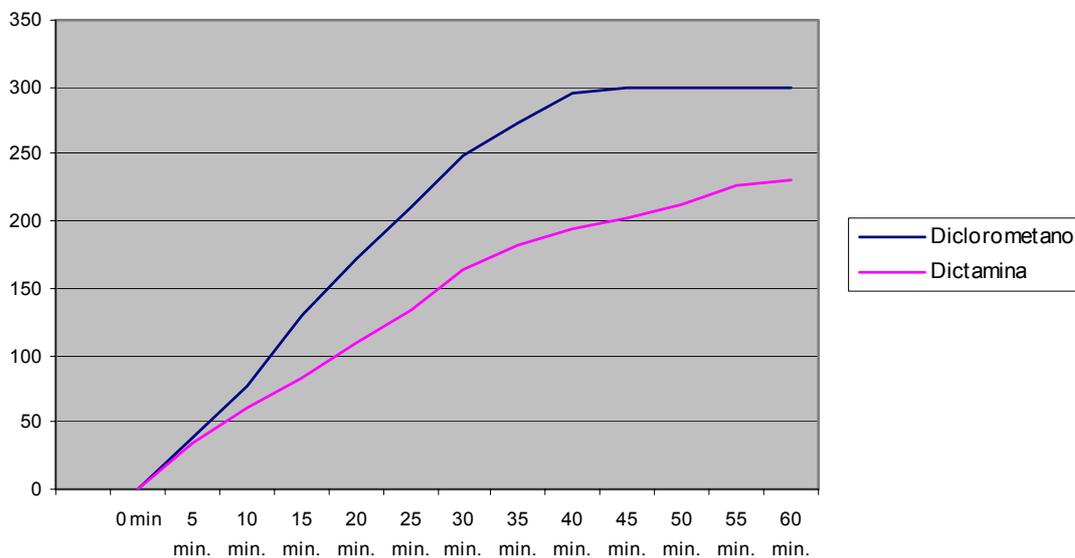


**GRÁFICO 4.2:** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com os alcalóides dictamina (A1) e fagarina (A2) na concentração de 0,1 mg/mL e dieta pura (controle).

**TABELA 4.13:** Valores do teste de atratividade com a substância dictamina realizado em três formigueiros de tamanho médio.

Tratamento	T <sub>50</sub>	EM (flocos/min)	X <sup>2</sup>
Controle	20	6,6	
Dictamina	30	3,85	6,62*

EM – estimativa de flocos carregados por minuto; T<sub>50</sub> – tempo em que metade do n° de flocos foram transportados; \* X<sup>2</sup> significativo à 5%

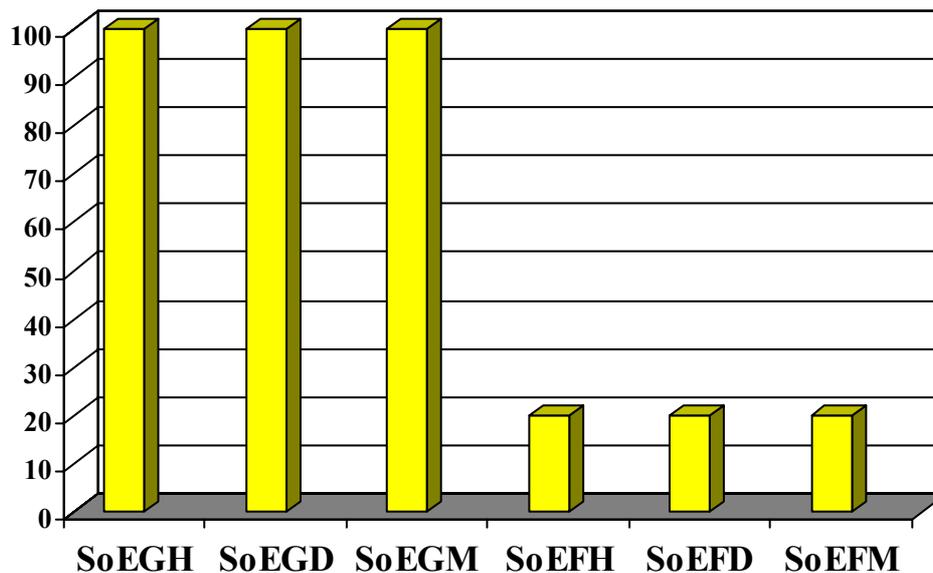


**GRÁFICO 4.3:** Número acumulado de flocos de arroz carregados pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* incorporados com a substância dictamina dissolvida em solvente diclorometano na concentração de 5 mg/mL e apenas solvente (diclorometano) no grupo controle.

#### 4.6.2- Ensaios biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Os extratos das folhas e dos galhos obtidos da planta *S. odoratissima*, descrito na seção 3.6.1, foram submetidos ao ensaio fungicida contra o fungo simbiote da formiga cortadeira *L. gongylophorus*.

Analisando o Gráfico 4.4 observou-se que os extratos dos galhos SoGH, SoGD e SoGM da planta *S. odoratissima* na concentração de 1000 µg/mL inibiram 100% o desenvolvimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*, enquanto os extratos da folhas SoFH, SoFD e SoFM apenas inibiram 20% do desenvolvimento.



**GRÁFICO 4.4:** Inibição do crescimento do fungo simbiote *Leucoagariucus gongylophorus* da formiga *Atta sexdens rubropilosa* pelos extratos da planta *Spiranthera odoratissima*.

A maior inibição do desenvolvimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* na presença do extrato dos galhos SoGD, levou ao

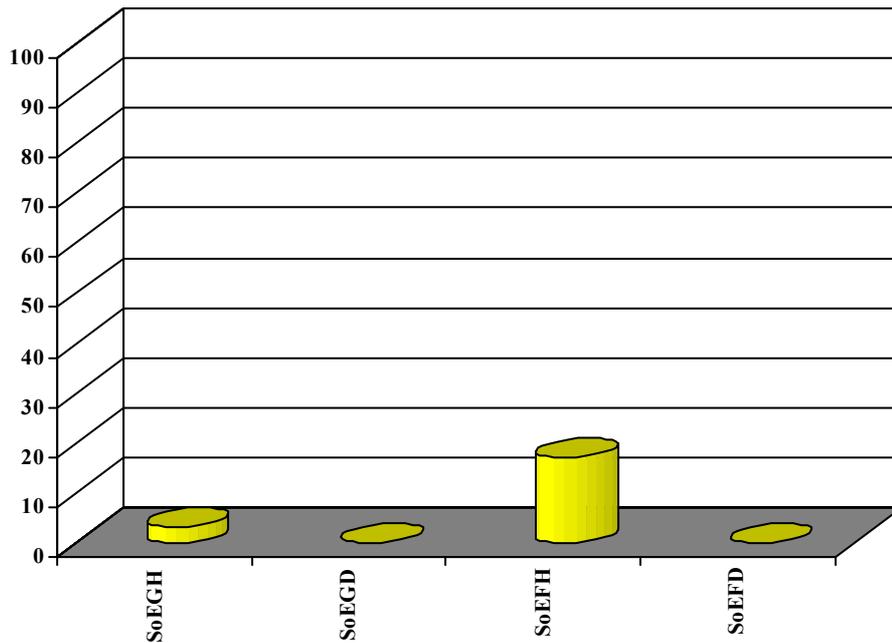
fracionamento deste extrato (seção 3.6.1) isolando-se alcalóides furoquinolínicos que foram submetidos ao ensaio fungicida.

Os alcalóides furoquinolínicos isolados, dictamina (A1), fagarina (A2) e esquimianina (A3) apresentaram uma alta atividade fungicida contra o fungo simbiote na concentração de 50 µg/mL, inibindo o desenvolvimento do fungo *L. gongylophorus* em 100%, 100% e 80%, respectivamente.

#### **4.6.3- Ensaio com as enzimas presentes no fluido fecal das formigas cortadeiras**

Os extratos (hexânico e diclorometânico) das folhas e dos galhos obtidos da planta *S. odoratissima*, descrito na seção 3.6.1, foram submetidos ao ensaio com as enzimas pectinases extraídas do fluido fecal das formigas *Atta sexdens rubropilosa*.

Analisando o Gráfico 4.5 pôde-se observar que os extratos SoFH, SoFD, SoGH e SoGD inibiram pouco a atividade das enzimas pectinases extraídas do fluido fecal das formigas cortadeiras. O Gráfico 4.5 indica que os extratos SoFH e SoGH inibiram a atividade das enzimas pectinases em 3% e 17%, respectivamente. Os extratos SoFD e SoFG não causaram nenhuma inibição na atividade das enzimas pectinases.



**GRÁFICO 4.5:** Inibição da atividade da enzima pectinase do fluido fecal da formiga *Atta sexdens rubropilosa* pelos extratos da planta *Spiranthera odoratissima*.

#### 4.6.4- Ensaios antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos realizados através do método por difusão em disco (BAUER et al, 1996), descrito na seção 3.6.4.1, foi aplicado para os extratos SoFH, SoFD, SoGH e SoGD (Tabela 4.14).

Os extratos testados neste ensaio antimicrobiano não apresentaram resultados promissores, nem mesmo os extratos dos galhos de *S. odoratissima* que inibiram 100% o fungo simbiote *L. gongylophorus* apresentou bons resultados nas atividades antimicrobianas.

Analisando a Tabela 4.14 pôde-ser observar que os extratos SoFH, SoFD, SoGH e SoGD apresentaram baixa atividade antimicrobiana no microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Também pôde-se observar que o extrato SoGH apresentou baixa atividade antimicrobiana nos microrganismos

*Escherichia coli* (*Ec*) e *Bacillus cereus* (*Bc*) e o extrato SoGD apresentou baixa atividade antimicrobiana no microrganismo *Bacillus cereus* (*Bc*).

**TABELA 4.14:** Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos de *Spiranthera odoratissima*.

Estrutura	Extrato	Microrganismos (milímetros)							
		Bc	Ec	Mr	Sa	Ca	Cl	Sc	Tc
Caule	Hexano	0	0	0	7	0	0	0	0
	Dicloro	0	0	0	9	0	0	0	0
Folhas	Hexano	7	8	0	8	0	0	0	0
	Dicloro	8	0	0	8	0	0	0	0
<b>Controle</b> (tetraciclina e nistatina)		21	22	35	30	20	19	20	29

Concentração dos extratos = [1000 µg/disco]; *Candida albicans* - Ca; *Cryptococcus laurentii* -Cl  
*Saccharomyces cerevisiae* -Sc; *Trichosporon cutaneum* -Tc; *Staphylococcus aureus* -Sa  
*Escherichia coli* - Ec ; *Bacillus cereus* - Bc; *Micrococcus roseu* - M r

O ensaio antimicrobiano foi realizado também através do método de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997), descrito na seção 3.6.4.2. Assim este ensaio foi aplicado para as substâncias isoladas dos extratos SoGD e SoGMD (seção 3.5.2.1 e 3.5.3.1): 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**A5**), limonina (**L1**), ácido limonéxico (**L2**) e ácido *iso*-limonéxico (**L3**) outro limonóide com esqueleto tipo A-D seco não identificado neste trabalho (**L5**).

As cinco substâncias testadas na concentração inicial de 1000 µg/mL foram inativas contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

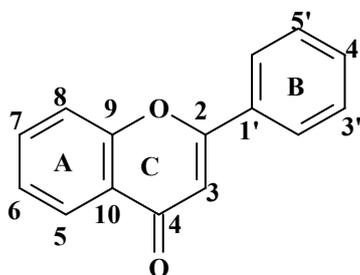
Os resultados acima apresentados não foram positivos, apesar de se esperar alguma atividade dessas classes de substâncias, pois são descritas na literatura com amplas atividades, inclusive atividades antimicrobianas (WANSI et al, 2006; SANSORES-PERAZA et al, 2000, SOUZA et al, 2004).

As substâncias testadas foram acompanhadas por experimentos de controles do solvente da amostra e dos antibióticos padrões, controle positivo e controle de precipitação, evitando possibilidade de resultados falso-negativo ou falso positivo.

#### 4.7- Experimentos de biotransformação da flavona pelo fungo simbiote da formiga *Atta sexdens rubropilosa*

Neste estudo de biotransformação realizada com o fungo *L. gongylophorus*, a flavona (Figura 4.51) foi o substrato escolhido devido a sua atividade fungicida contra o fungo simbiote da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*.

Em ensaios realizados em outro trabalho do Grupo de Produtos da UFSCar (FACCHINI, 2000) foi relatado que a flavona inibiu o desenvolvimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* em 20% e 100% nas concentrações 22 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.



**FIGURA 4.51:** Estrutura química da flavona.

### 4.7.1 - Experimento com cultivo do fungo simbiote em meio líquido

A concentração utilizada do substrato (flavona) de 30 µg/mL no experimento de biotransformação feita pelo fungo simbiote *L. gongylophorus* foi determinada de uma maneira que não inibisse totalmente o crescimento do fungo simbiote, mas que apenas estimulasse o seu sistema enzimático com a presença de uma substância tóxica no meio.

Durante os experimentos de biotransformação em meio líquido, feito com o fungo simbiote da formiga cortadeira, pôde-se notar como o *L. gongylophorus* se desenvolveu com o decorrer dos trinta primeiros dias do experimento na presença e ausência do substrato.

Comparando o Experimento 1 (com substrato) com o Experimento 2 (sem substrato) no 30° dia observou-se que o desenvolvimento do fungo simbiote no Experimento 2 havia sido maior, indicando que o substrato já adicionado no 1° dia do Experimento 1 causou uma pequena inibição no seu desenvolvimento. Também se observou que após adicionar o substrato no Experimento 2 no 30° dia de experimento, após trinta dias da adição do substrato o fungo simbiote estava com o seu desenvolvimento estacionário, isto é, como há trinta dias atrás.

Comparando a massa 51,0 mg do micélio formado do fungo simbiote desidratado do Experimento 1 (meio + inóculo do fungo + flavona/etanol) com a massa 52,9 mg do micélio formado do fungo simbiote desidratado controle do solvente 1 (meio + inóculo do fungo + etanol) pôde-se concluir que a inibição do fungo simbiote ocorreu pela toxicidade do solvente (etanol).

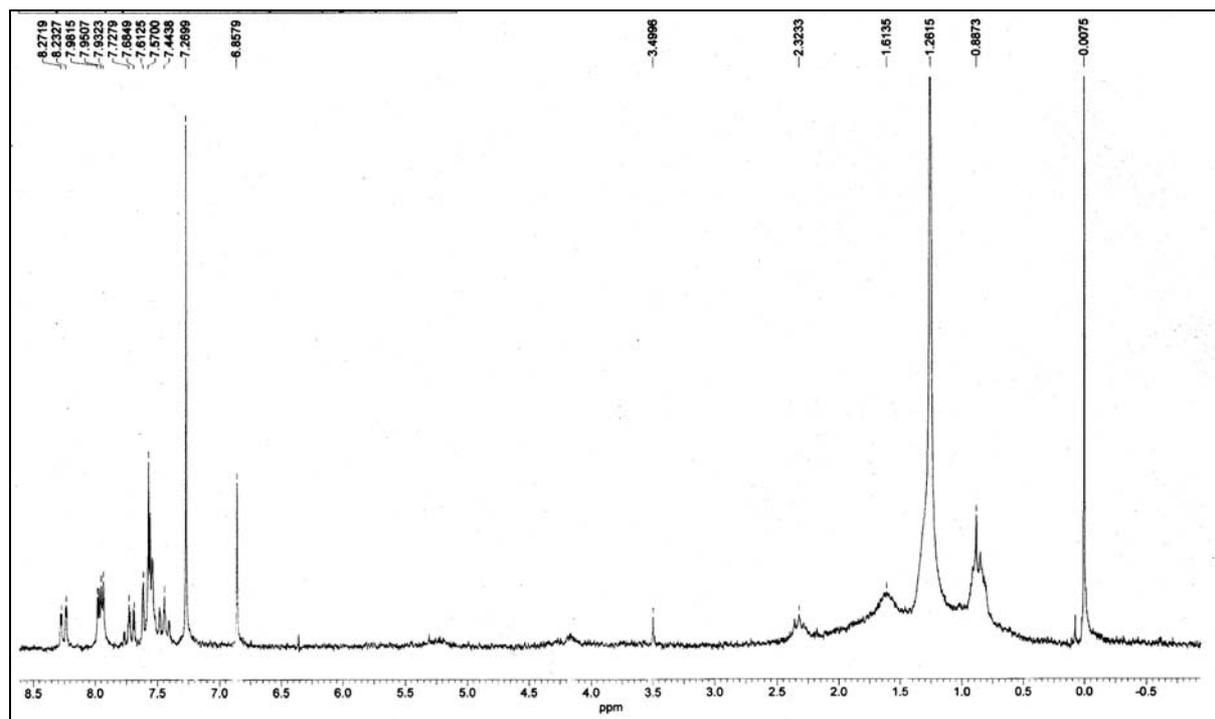
Os extratos dos micélios dos experimentos 1 (5 mg) e 2 (23,7 mg), foram analisados por RMN <sup>1</sup>H e observou a presença sem alterações estruturais da flavona. Em razão de ambos os extratos conterem o mesmo constituinte e

massas dos extratos baixas, eles foram reunidos. Após o fracionamento da união dos extratos, como descrito na seção 3.7.1.c, as frações foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.52, Tabela 4.15) e observou-se também nas frações a presença de ácidos graxos e do substrato (flavona,  $m = 2$  mg).

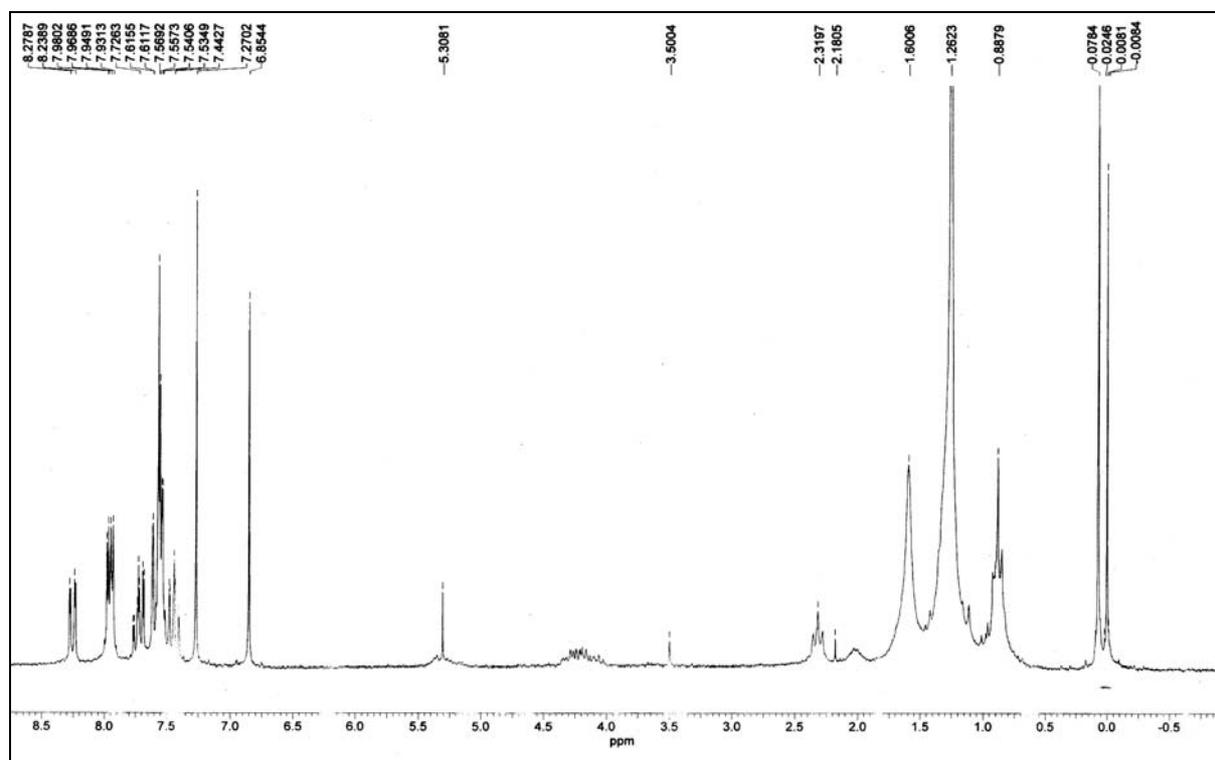
Com os meios líquidos das duas partes do experimento foram realizadas partições gerando após evaporação do acetato de etila, no Experimento 1 (80,0 mg) e no Experimento 2 (95,7mg), que foram submetidos separadamente à fracionamento cromatográfico, como descrito na seção 3.7.1.c, e observou-se através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.53, Tabela 4.15) das frações a presença de ácidos graxos, triglicerídeos e do substrato (flavona, experimento 1 + experimento 2 = 5,9 mg).

Para realização do experimento em cada frasco foi adicionado 1,5 mg da flavona para obter a concentração final de  $30\mu\text{g/mL}$ , portanto em cada experimento (Experimento 1 e 2) existiam 7,5 mg da flavona. Analisando o total de massa final (recuperada) da flavona nos experimentos 1 e 2 de 7,9 mg e massa inicial de 15,0 mg, observa-se que 7,1 mg da flavona não foi recuperada, podendo sugerir que houve degradação pelo fungo simbiote *L. gongylophorus* durante o experimento realizado, hipótese que deve ser comprovada com novos experimentos. Não se pode descartar também que parte deste material tenha sido perdido durante as extrações e separações cromatográficas.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da flavona isolada do extrato do micélio (Figura 4.52 e Tabela 4.15) apresentou os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos do anel A em  $\delta$  8,25 (*dd*,  $J = 8,0$  e  $2,0$  Hz),  $\delta$  7,90 (*dd*,  $J = 7,0$  e  $2,0$  Hz),  $\delta$  7,65 (*ddd*,  $J = 8,0$ ,  $7,0$  e  $2,0$  Hz),  $\delta$  7,45 (*m*) e do anel B em  $\delta$  7,60 (*m*),  $\delta$  7,55(*m*) e  $\delta$  7,50 (*m*). Observou-se também o sinal em  $\delta$  6,06 (*s*) referente ao hidrogênio olefínico na posição 3 do anel C da flavona (Tabela 4.15).



**FIGURA 4.52:** Espectro de RNM  $^1\text{H}$  da flavona isolada do extrato do micélio de fungo simbiote desenvolvido em meio líquido YNB ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



**FIGURA 4.53:** Espectro de RNM  $^1\text{H}$  da flavona isolada do meio líquido do Experimento 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

**TABELA 4.15:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  da flavona isolada do micélio do fungo simbiote e do meio líquido do experimento comparada com a flavona padrão.

Posições	Flavona (micélio)	FACCHINI, 2000 (*)
3	6,86 (s)	6,84 (s)
5	8,25 (dd, $J= 8,0$ e $2,0$ Hz)	8,25 (dd, $J= 7,9$ e $1,6$ Hz)
6	7,45 (m)	7,44 (td, $J= 7,9$ , e $0,8$ Hz)
7	7,65 (ddd, $J= 8,0$ , $7,0$ e $2,0$ Hz)	7,72 (td, $J= 7,9$ , e $1,7$ Hz)
8	7,90 (dd, $J= 8,0$ e $2,0$ Hz)	7,59 (dl, $J= 7,9$ Hz)
2'	7,60 (m)	7,95(m)
3'	7,55(m)	7,55 (m)
4'	7,50 (m)	7,55 (m)
5'	7,55 (m)	7,55 (m)
6'	7,60 (m)	7,95(m)

(\*) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

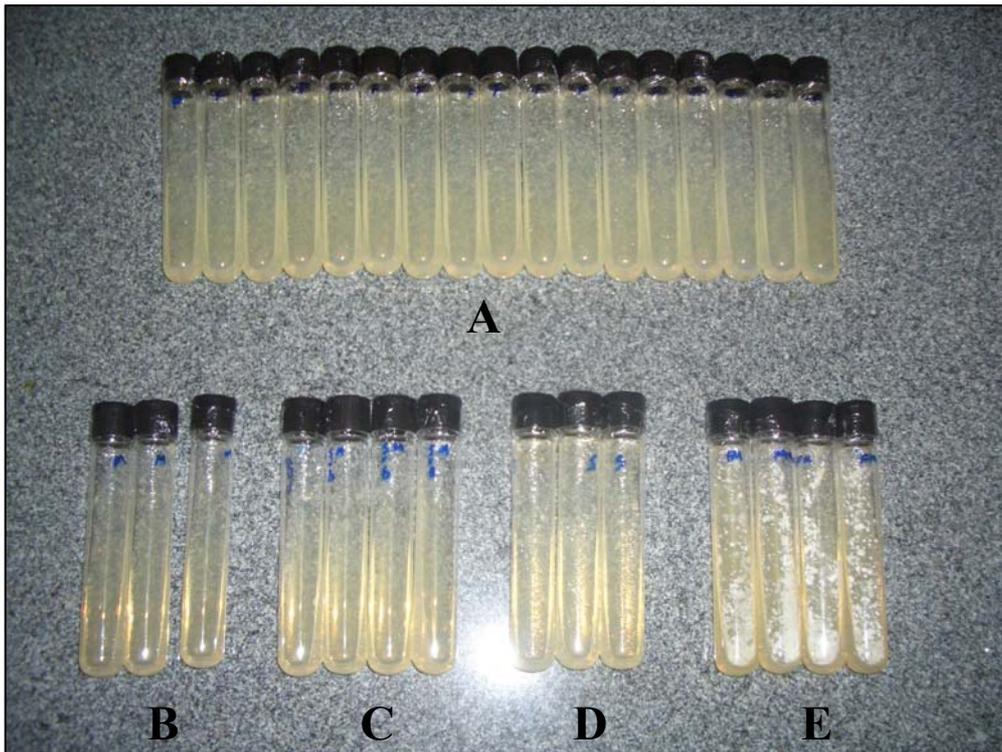
#### 4.7.2- Experimento com cultivo do fungo simbiote em meio sólido

A toxicidade do solvente (etanol) interferindo no desenvolvimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* no experimento em meio líquido YNB, fez com que fossem testados outros solventes miscíveis em água para dissolução do substrato. Assim, realizaram-se experimentos para escolha dos solventes utilizando acetona/água (1:1, 3:7), acetona e etanol/água (1:1, 3:7) e etanol.

Em todos os experimentos para a escolha do solvente houve 100% de inibição do desenvolvimento do fungo simbiote comparando com o controle (meio e fungo).

Como em meio líquido YNB o etanol não chegou a inibir em 100% o desenvolvimento do fungo simbiote, foi realizado outro experimento utilizando uma concentração maior de flavona em volumes menores de solvente.

Os volumes adicionados da flavona em etanol na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  foram de 500  $\mu\text{L}$  e 200  $\mu\text{L}$ , mas os resultados não foram promissores como esperado em nenhum dos volumes testados. A Figura 4.54 mostra os resultados dos experimentos na contração de 500  $\mu\text{L}$ .



**FIGURA 4.54:** Experimentos de toxicidade com 500  $\mu\text{L}$  de solução da flavona em etanol na concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : **A**, experimento com inóculo do fungo simbiote + flavona em etanol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), **B**, controle com apenas o meio, **C**, controle meio + solvente + inóculo do fungo, **D** controle meio A + flavona em etanol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e **E**, controle meio + inóculo do fungo.

#### **4.8- Experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa*.**

Partindo da evidência da capacidade do fungo simbiote *L. gongylophorus* de detoxificar metabólitos secundários de plantas tóxicas para as formigas cortadeiras no seu ninho (DOWD, 1992; BOYD & MARTIN, 1975), foi realizado um experimento de biotransformação da flavona no ninho de laboratório da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*.

Diferentemente dos experimentos em meio líquido YNB e meio sólido realizado com o fungo simbionte *L. gongylophorus*, o experimento foi realizado diretamente no formigueiro experimental das formigas cortadeiras, não sofrendo, assim, influência de condições inadequadas de umidade e temperatura, e de toxicidade do solvente nos resultados do experimento.

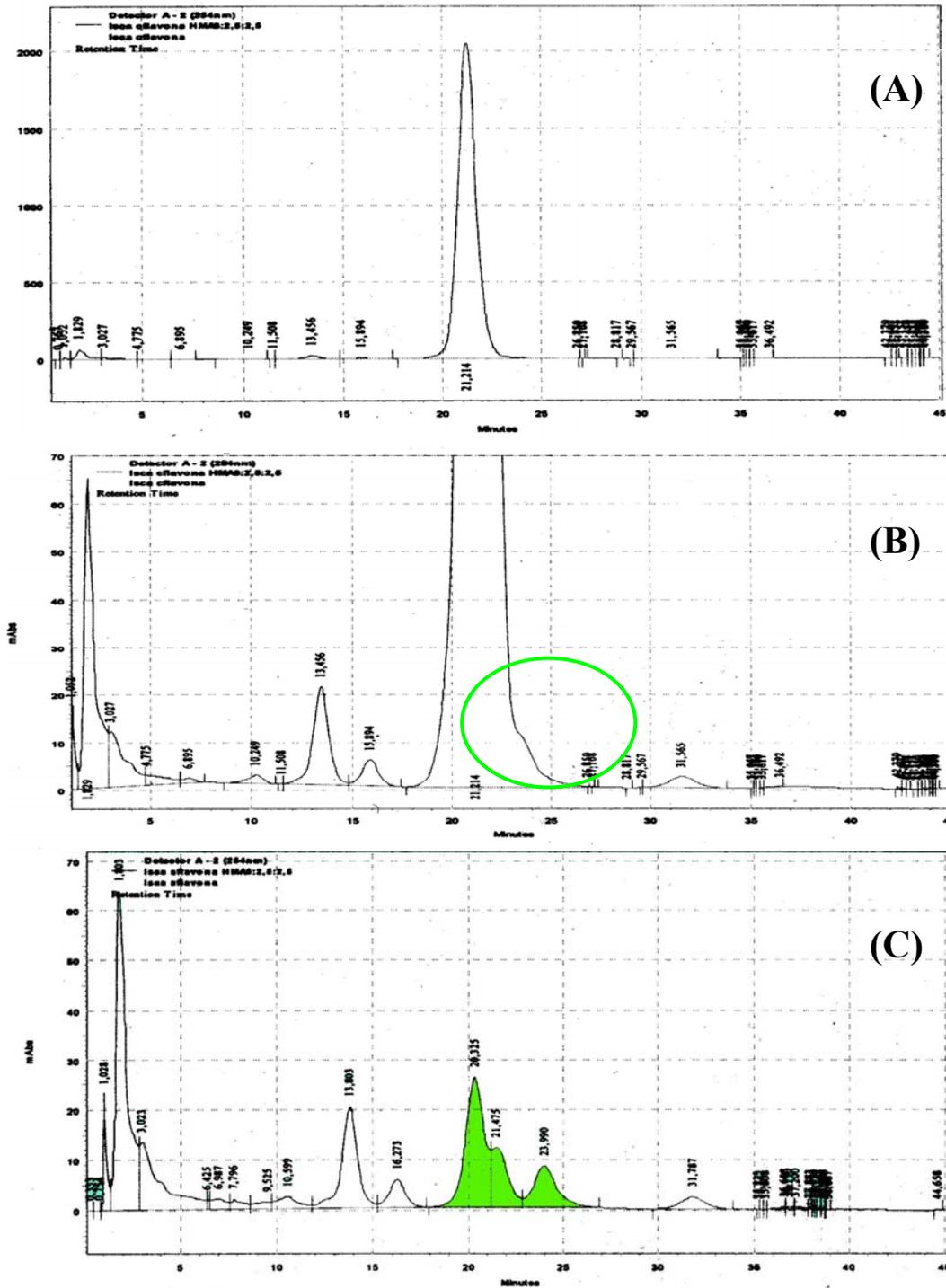
#### 4.8.1- Metodologia de análises por HPLC/UV

Durante o desenvolvimento da metodologia de análise por HPLC/UV das amostras coletadas no experimento de biotransformação da flavona no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*, foram testadas colunas, métodos de preparo de amostras, fluxo, volume de injeção e fase móvel. Todas essas otimizações para a análise por HPLC/UV foram realizadas estudando a matriz na qual estava incorporada a flavona e os possíveis produtos de biotransformação da flavona (IBRAHIM & ABUL-HAJJ, 1990).

As iscas preparadas com polpas cítricas, atrativas para a formiga cortadeira, foram as matrizes nas quais a flavona foi incorporada. Devido à presença de flavonóides na polpa cítrica o preparo de amostras era importante para separar os flavonóides da polpa cítrica do substrato (flavona).

Na primeira otimização da análise por HPLC/UV, apenas filtrando a amostra após a extração e concentração, observou-se através do cromatograma do controle (isca com polpa cítrica) (Figura 4.55-C) que os flavonóides presentes na polpa cítrica tinham o mesmo tempo de retenção de 21,2 minutos que o substrato (flavona) (Figura 4.55-A e B).

Portanto, várias otimizações foram feitas no preparo de amostras utilizando extração de fase sólida (SPE) de fase reversa (CN e C-18), mas nenhuma otimização foi eficiente para separar os flavonóides da isca cítrica do substrato (flavona).

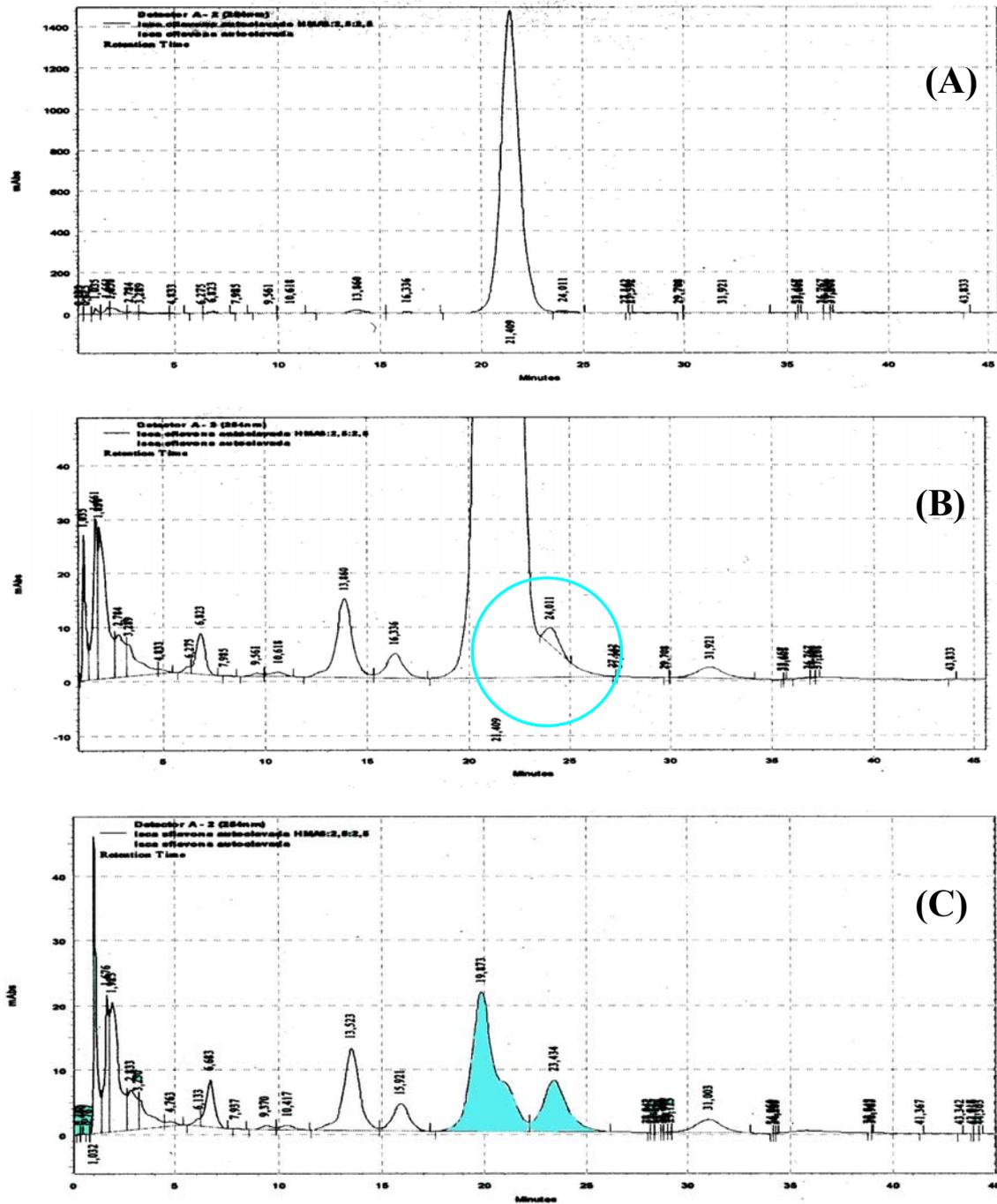


**FIGURA 4.55:** (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada não autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada não autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica (Controle) não autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol/acetonitrila (2:1:1), fluxo de 1mL/min, volume de injeção 20 µL,  $\lambda = 254$  nm).

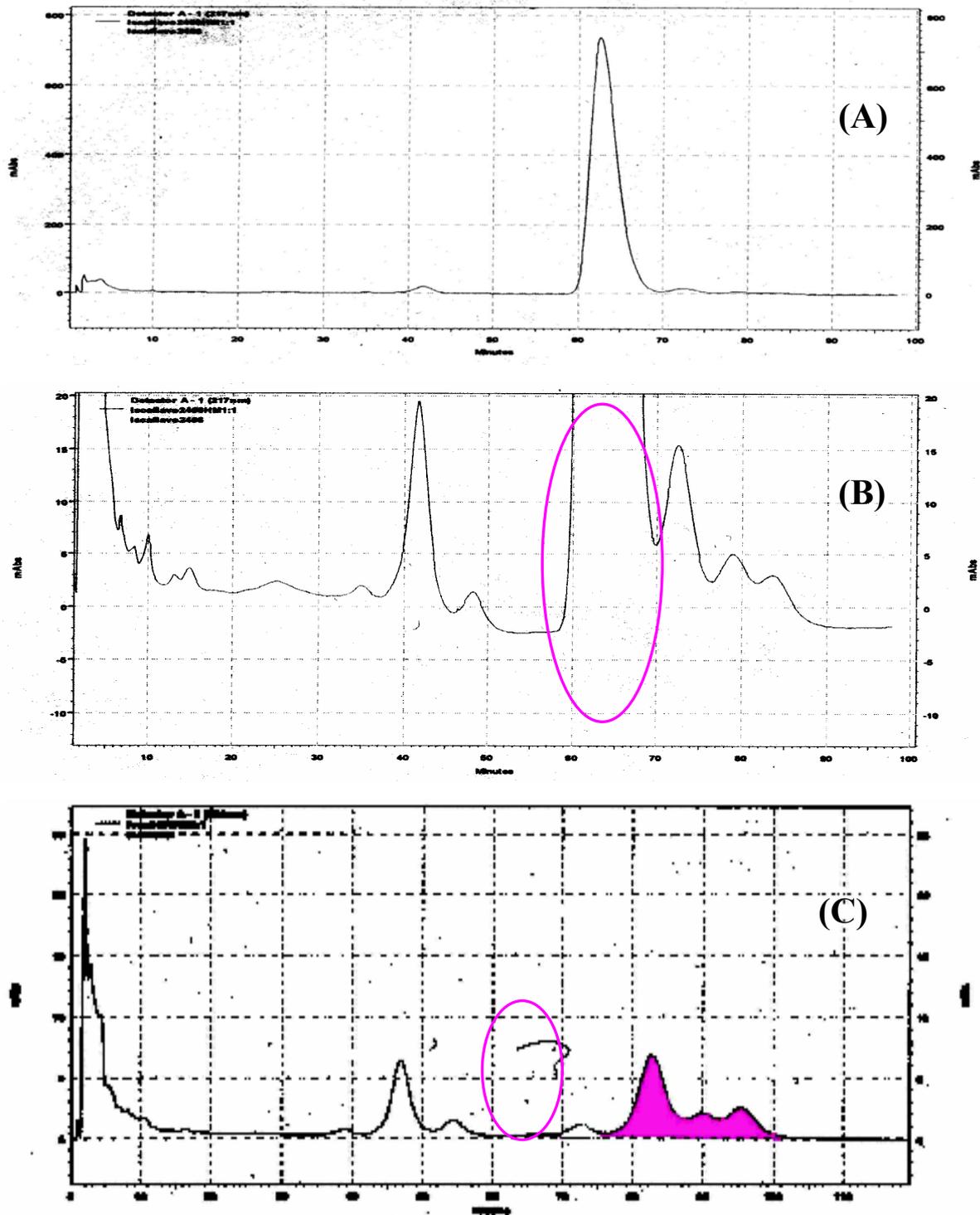
Nesta primeira otimização das análises por HPLC/UV, também foram feitas análises para observar se havia degradação da flavona incorporada (substrato) nas iscas de polpa cítrica quando autoclavadas. Comparando os cromatogramas das iscas não autoclavadas (Figura 4.55) com os das iscas autoclavadas (Figuras 4.56), pôde-se observar que não houve degradação da flavona incorporada quando submetida a 121°C e 1 atm.

A solução para que não houvesse co-eluição das substâncias da isca de polpa cítrica com o substrato (flavona) foi encontrar as melhores condições de análises por HPLC/UV.

Após várias modificações nos parâmetros das análises, chegaram-se as condições descritas na seção 3.8.1.2. Essas condições de análise por HPLC/UV fizeram com que não houvesse a co-eluição das substâncias da isca de polpa cítrica (TR = 72,5 min, 79,0 min, 89,0 min) com a flavona incorporada na isca (TR = 65,0 minutos), como mostra a Figura 4.57.



**FIGURA 4.56:** (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica (Controle) autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol/acetonitrila (2:1:1), fluxo de 1mL/min, volume de injeção 20  $\mu$ L,  $\lambda = 254$  nm).



**FIGURA 4.57:** (A) Cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada, (B) ampliação do cromatograma da isca de polpa cítrica com flavona incorporada autoclavada e (C) cromatograma da isca de polpa cítrica (Controle) autoclavada (coluna C-18 Phenomex, água/metanol (1:1), fluxo de 1mL/min, volume de injeção 20  $\mu$ L,  $\lambda$ = 254 nm).

#### 4.8.2- Análises por HPLC/UV das amostras coletadas no ninho do formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*

Durante o experimento no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa*, foram feitas cinco coletas das amostras dos ninhos, lixo dos ninhos, ninho controle, lixo do ninho controle e da panela, como descrito na seção 3.8 b. Todas as amostras, logo que coletadas, foram analisadas por HPLC/UV.

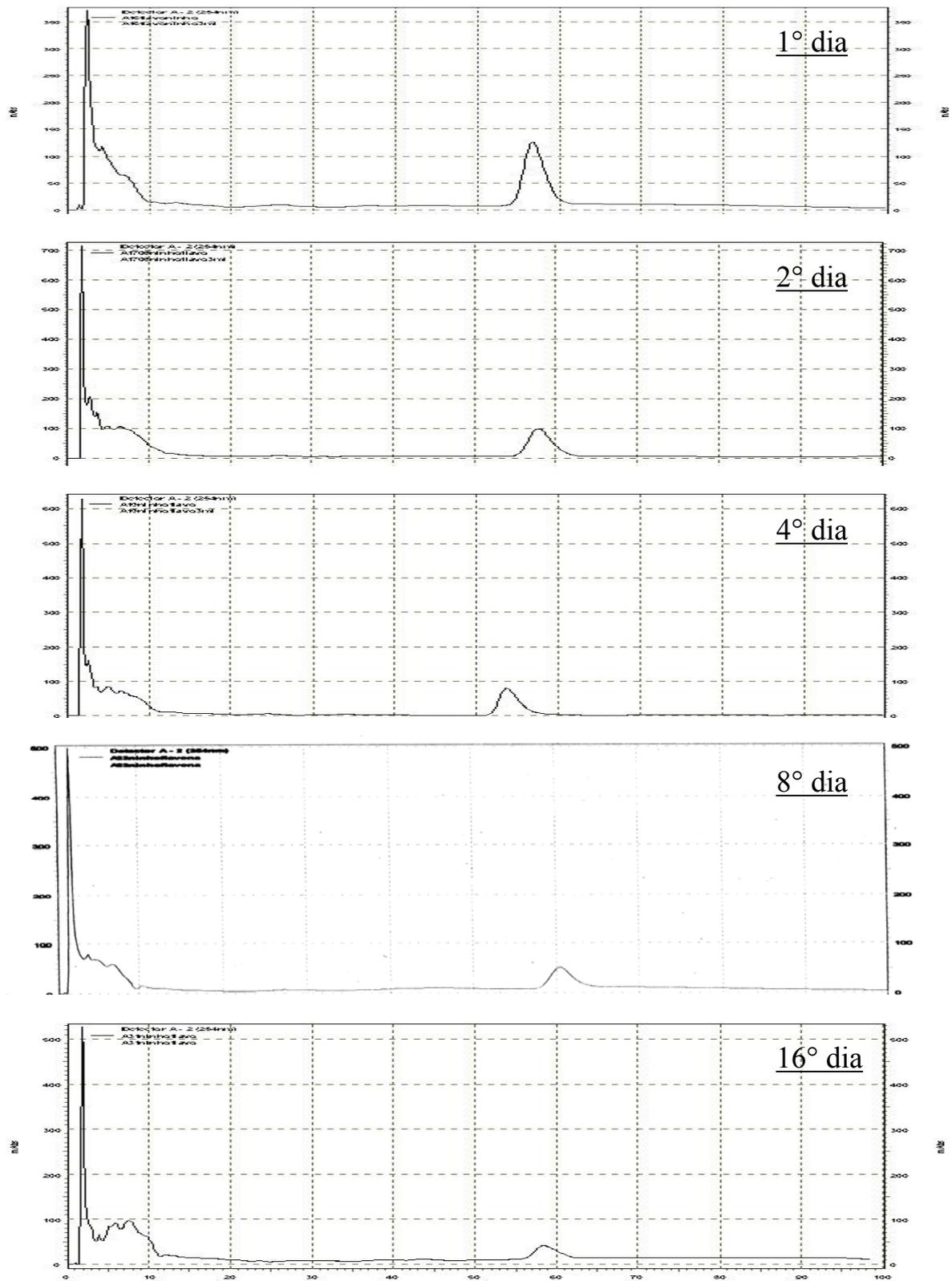
Após o término do experimento no formigueiro e das análises por HPLC/UV das amostras coletadas, analisaram-se os cromatogramas obtidos das amostras dos ninhos com iscas (com flavona) incorporadas e seus respectivos lixos. Nestas análises foram observadas apenas a presença da flavona incorporada (Figura 4.58 e 4.59).

Todos os cromatogramas dos ninhos com iscas (com flavona) incorporadas e seus respectivos lixos foram comparados com os controles (ninhos e lixos).

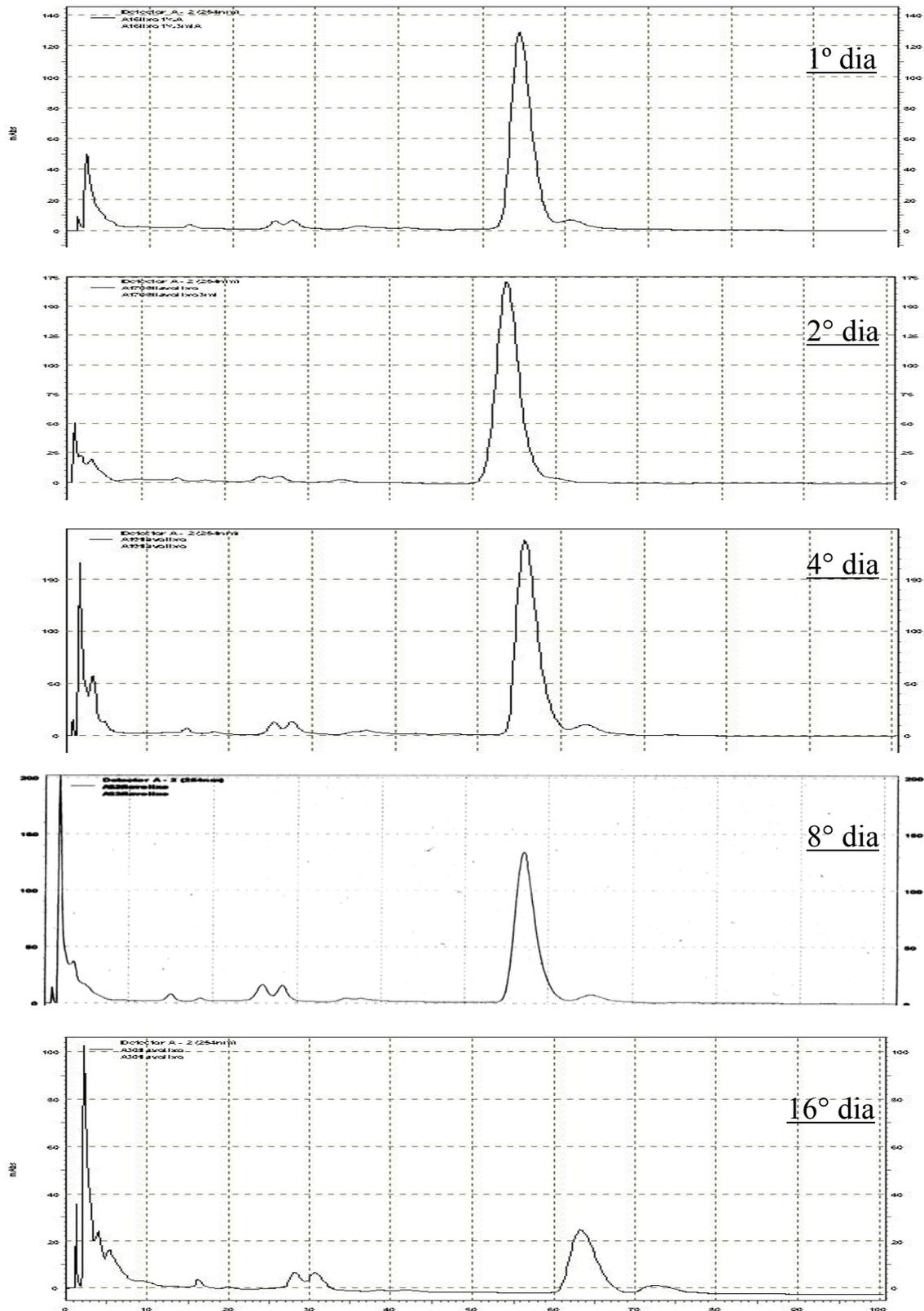
Para analisar os dados obtidos nas análises por HPLC/UV dos ninhos com iscas (com flavona) incorporadas e dos lixos dos ninhos com iscas (com flavona) incorporadas, foi construído um gráfico da variação da área dos picos versus os dias do experimento de biotransformação da flavona feita pelo fungo simbiote *L. gongylophorus* no formigueiro da formiga.

Portanto, foi necessário construir uma curva de calibração para a flavona (Gráfico 4.6) nas concentrações de 50, 100, 200, 400 e 700  $\mu\text{g/mL}$  (injetadas em triplicata), plotando o gráfico concentração versus área das bandas cromatográficas.

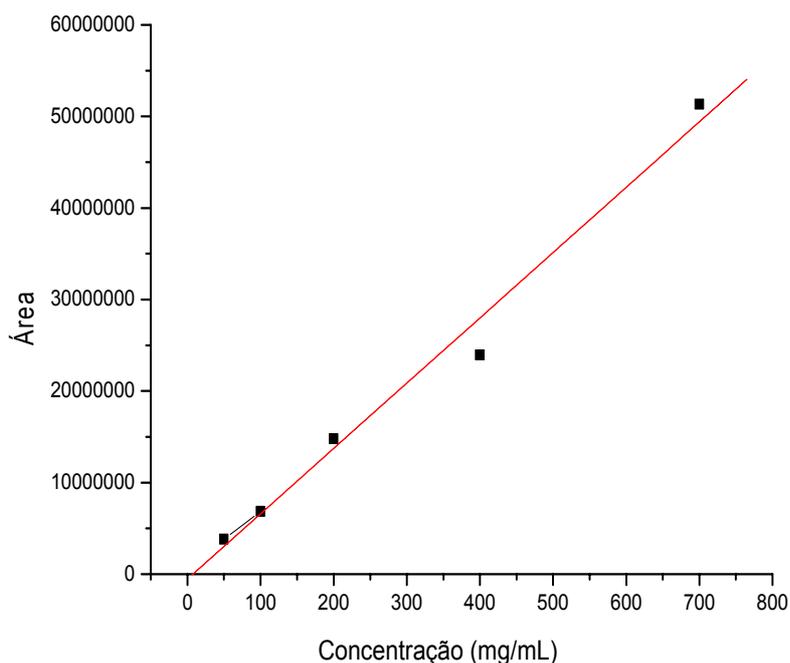
A curva de calibração da flavona apresentou uma boa linearidade, com coeficiente de correlação 0,99244 (Gráfico 4.6).



**FIGURA 4.58:** Cromatogramas dos ninhos do formigueiro com iscas com flavonas incorporadas ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).



**FIGURA 4.59:** Cromatogramas dos lixos dos ninhos do formigueiro com iscas com flavonas incorporadas ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).



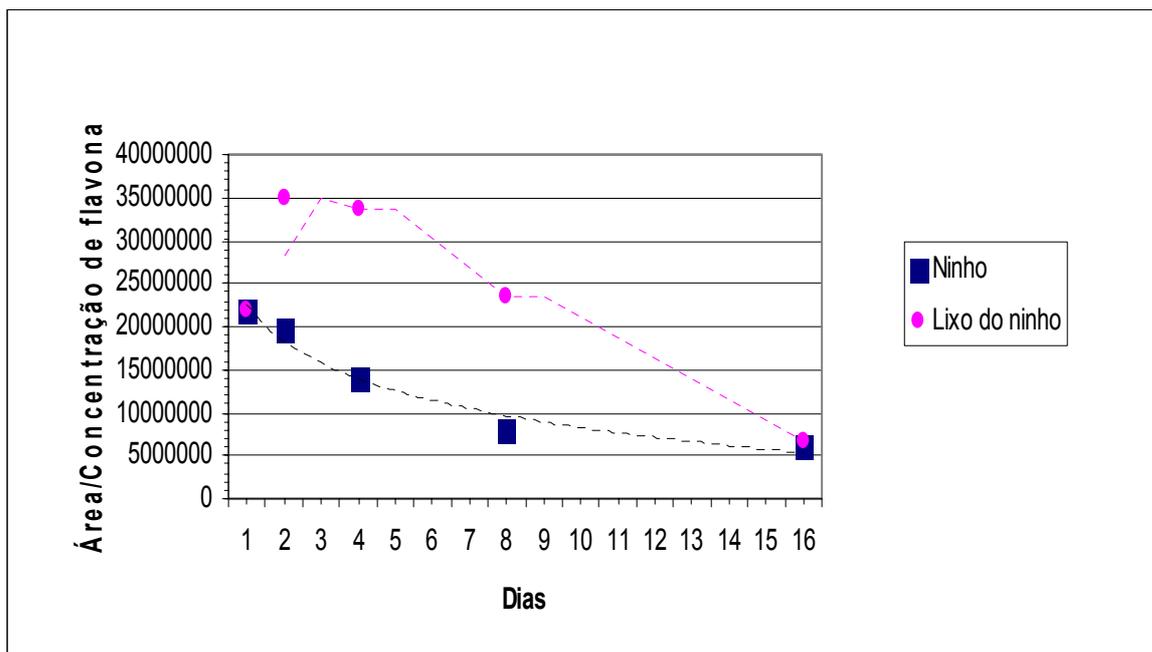
**GRÁFICO 4.6:** Curva de calibração por padronização externa para a flavona.

Analisando o Gráfico 4.7 das amostras coletas dos ninhos com iscas (com flavona) incorporadas e dos seus respectivos lixos, pôde-se observar que as concentrações da flavona incorporada nos ninhos foram diminuindo gradativamente no decorrer dos dias; enquanto as concentrações da flavona nos lixos dos ninhos nos quatro primeiros dias aumentaram, mas a partir do quarto dia do experimento começaram também a diminuir.

Esses resultados apresentados no Gráfico 4.7 mostraram que as formigas cortadeiras no 1º dia após as iscas com flavona serem incorporadas, já descartaram uma alta concentração da flavona intacta no lixo dos ninhos, devido à toxicidade da flavona para o fungo simbiote. Também pôde ser observado que durante os quatro primeiros dias do experimento, as formigas continuaram descartando a flavona nos lixos dos ninhos, conseqüentemente aumentando a concentração da flavona nos lixos. Mas a partir do quinto dia de experimento, mesmo com o contínuo descarte de lixo nos ninhos, observou-se a diminuição da concentração da flavona no lixo.

A diminuição da concentração da flavona no lixo dos ninhos sugere que ocorreu uma degradação da flavona. Essa degradação pode ter sido provocada por microrganismos existentes no lixo, já que as formigas não lançam lá seu fluido fecal ou saliva.

A hipótese da degradação ocorrer por causa do meio ambiente (temperatura, umidade, solo) foi descartada através dos resultados das análises por HPLC/UV com as iscas com flavona colocadas nas panelas (controle). Estas análises mostraram que não houve alteração significativa nas concentrações da flavona do 1º dia do experimento (Área = 345060086) até o 16º dia (Área = 315599248) nas panelas (controle), como nos ninhos e lixos dos ninhos (Gráfico 4.7).



**GRÁFICO 4.7:** Variação da concentração da flavona nos ninhos e nos lixos dos ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*.

## **5-CONCLUSÕES**

---

---

O estudo fitoquímico das folhas e galhos da planta *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) juntamente com estudo biomonitorado dos ensaios biológicos fungicida contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*, inseticida na formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* e de inibição da atividade das enzimas pectinases do fungo simbiote presentes no fluido fecal da formiga cortadeira, possibilitou o isolamento e identificação de 15 metabólitos secundários: lupeol (T1), lupenona (T2), sitosterol (E1), estigmasterol (E2), campesterol (E3), dictamina (A1),  $\gamma$ -fagarina (A2), esquimianina (A3), 4,8-dimetoxifuro[2,3-B]quinolina-5-7-diol (A4), 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (A5), 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (A6), limonina (L1), ácido limonéxico (L2), ácido *iso*-limonéxico (L3) e 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina (L4).

Entre os metabólitos secundários isolados três são inéditos: 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (A6), ácido *iso*-limonéxico (L3) e 23-hidroxi-21-oxo-diidroodoratina (L4), quatro metabólitos secundários foram pela primeira vez relatado no gênero *Spiranthera*: lupeol (T1), lupenona (T2), estigmasterol (E2), campesterol (E3), e três metabólitos secundários são inéditos no gênero *Spiranthera*: 4,8-dimetoxifuro[2,3-B]quinolina-5-7-diol (A4), 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (A5) e ácido limonéxico (L2).

Os ensaios biológicos fungicida contra o fungo simbiote da formiga cortadeira mostraram que os extratos dos galhos SoGH, SoGD e SoGM inibiram 100 % o desenvolvimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. E quando fracionados os extratos SoGD e SoGM obtiveram frações ricas em alcalóides e limonóides, que são substâncias com alto potencial fungicida e inseticida.

Os ensaios inseticidas contra a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que os extratos dos galhos SoGD e SoGM também foram os mais ativos contra as formigas cortadeiras.

Os alcalóides furoquinolínicos **A1**, **A2** e **A3** isolados do extrato dos galhos SoGD (**A3** também isolado do extrato dos galhos SoGM) quando testados nos ensaios biológicos fungicida e inseticida, mostraram alta atividade contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*, apresentando inibição de 100%, 100% e 80% no desenvolvimento do fungo, respectivamente. Apenas o alcalóide **A1** mostrou atividade contra a formiga cortadeira apresentando uma ação média de sobrevivência considerada significativa comparada com o controle e nenhuma atividade para a formiga cortadeira.

Os ensaios das enzimas pectinases do fluido fecal das formigas cortadeira mostraram que nenhum extrato da planta *S. odoratissima* teve potencialidade na inibição das enzimas.

Os resultados obtidos dos ensaios biológicos fungicida contra o fungo simbiote *L. gongylophorus* juntamente com a identificação estrutural das substâncias isoladas mostraram que os alcalóides furoquinolínicos foram as substâncias potencialmente ativas no ensaio fungicida contra o fungo simbiote da formiga cortadeira.

Nos ensaios inseticidas contra a formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* pôde-se constatar que o alcalóide **A1** teve uma potencialidade na atividade do extrato dos galhos SoGD, mas a maior potencialidade de atividade sugere que seja dos limonóides, especificamente do ácido limonéxico. Isto porque em trabalhos anteriores (BIAVATTI et al, 2005) o ácido limonéxico (**L2**) foi testado contra a formiga cortadeira causando 50% da mortalidade dos indivíduos no 5º dia do experimento e 98 % da mortalidade dos indivíduos no 13º dia do experimento, enquanto o controle teve 50% da mortalidade dos indivíduos no 16º dia do experimento e 86% mortalidade dos indivíduos no 22º dia do experimento.

Os ensaios antimicrobianos realizados com os extratos das folhas e dos galhos da planta *S. odoratissima* apresentaram baixa atividade antimicrobiana em alguns dos microrganismos ensaiados *Saccharomyces*

*cerevisiae* (Sc). *Escherichia coli* (Ec) e *Bacillus cereus* (Bc). E os ensaios antimicrobianos realizados com as substâncias **A5**, **L1**, **L2** e **L3** mostraram inatividade contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*. Esses resultados mostraram que a planta *S. odoratissima* que é utilizada na medicina popular (folhas e raízes) no tratamento de infecções, não apresentou potencialidade antimicrobiana nos extratos das folhas, dos galhos e das substâncias isoladas dos extratos dos galhos.

Os estudos de biotransformação da flavona realizados com o fungo simbiote *L. gongylophorus* nos meios líquidos YNB e no formigueiro de *A. sexdens rubropilosa* mostraram que houve degradação da flavona e infere-se pela análise dos espectros de RMN que não houve oxidações e/ou reduções no esqueleto básico da flavona como na maioria das biotransformações realizadas por outros microrganismos.

Os resultados desse estudo indicaram que a degradação da flavona não ocorre apenas na presença do fungo simbiote *L. gongylophorus*, mas na presença de outros microrganismos existentes no lixo dos ninhos. Sugeriu, também, que as enzimas presentes no fluído fecal das formigas cortadeiras e/ou nos sistemas enzimáticos de outros microrganismos existentes no lixo do ninho degradam a flavona para detoxificação do ninho.

## **6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- ABERE, T. & AGOREYO, F. O. “Antimicrobial and toxicological evaluation of the leaves of *Baissea axillaries* Hua used in the management of HIV/AIDS patients”. *BMC Comp. Alternative Med.*, **6**: 22-26, 2006.
- AMBROZIN, A. R. P. “*Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásico e antileishmanioses*”. Tese de doutorado, UFSCar, 2004.
- 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. and Envir. Microb.*, **64**: 4820-4822, 1998.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. N.; SHERRIS, J. C. & TURK, M. “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk metodo”. *J. Am. Clin. Pathol.*, **45(4)**, 493-496, 1966.
- BIAVATTI, M. W. “*Química e bioatividade de Raulinoa echinata, espécie endêmica do Vale do Itajaí - SC*”. Tese de doutorado, UFSCar, 2001.
- BIAVATTI, M. W., WESTERLON, R., VIEIRA, P. C., SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., PEÑAFLORES, M. F. G. V., VIEIRA, O. C. & ELLENA, J. “Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxy-fraxinellone”. *J. Braz. Chem. Soc.* **16(6B)**: 1443-1447, 2005.
- BLASCHKE-COBET, M. & LUCKNER, M. “Zur biosynthese des graveolins bei *Ruta Angustifolia*”. *Phytochemistry*. **12**: 2393-2398, 1973.
- BOARETTO, M. A. C. & FORTI, L. C. “Perspectivas no controle de formigas cortadeiras”. *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997.
- BOYD, N. D. & MARTIN M. M. “Faecal proteinase of the fungus-growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin”. *Insect Biochem*, **5**: 619-635, 1975.

- BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. & SILVA, O. A. "Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial". *An. Soc. Entomol. Brasil*, **26**: 107 p., 1997.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JR. M.; HEBLING, M. J. A. & SILVA, O. A. "Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908". *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**: 243-248, 1997.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. "Biological activity of limonoids from the Rutales". *Phytochemistry*, **31**: 377-394, 1992.
- CHUN, H. K.; OHNISHI, Y.; SHINDO, K.; MISAWA, N.; FURUKAWA, K. & HORINOUCI, S. "Biotransformation of flavone and flavanone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes". *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **23**: 113-121, 2003.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C. & MALLOCH, D. "Fungus-growing ants use antibiotics-producing bacteria to control garden parasites". *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**: 357-380, 2001.
- CURRIE, C. R. "A community of ants, fungi, and bacteria: A Multilateral approach to studying symbiosis". *Nature*, **398**: 701-704, 1999.
- DE-LA CRUZ, M. G. F. *Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e da doença*. Dissertação de Mestrado, Cuiabá-MT (UFMT), 1997. 251p.
- DEWICK, P. M. "Medicinal natural products: biosynthetic approach". New York: John Wiley & Sons, 2ªed., 2001.
- DOWD, P. F. "Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes". *J. Ind. Microb.*, **9**: 149-161, 1992.
- DREYER, D. L. "Botanical distribution and chemotaxonomy in the Rutaceae". *Phytochemistry*, **5**: 367-378, 1966.

- FACCHINI, P. H. “Busca de substância de *Pilocarpus riedelianus* e dos óleos de sementes de *Citrus* com ação sobre o fungo simbiote das formigas cortadeiras”. Dissertação de Mestrado, UFSCar, 2000.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C. & VASCONCELOS, H. L. *Ecologia nutricional de formigas – Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas*. São Paulo, Ed. Manolé Ltda, Cap. 5: 131-134, 1977.
- FREITAS, C. M. D.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F.S. & VELOZO, E.D. “Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae)”. *Bioch. Syst. Ecol.* **31**(7): 805-807, 2003.
- HERVEY, A. & NAIR, M. S. R. “Antibiotic metabolite of fungus cultivated by gardening ants”. *Mycologia*, **29**: 226-236, 1977.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. *The ants*. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
- IBRAHIM, R. A. & ABUL-HAJJ, J. Y. “Microbiological transformation of (±)-flavanone and (±) isoflavanone”. *J. Natural Products*, **53** (3): 644-656, 1990.
- IBRAHIM, R. A. S.; GALAL, A. M. MOSSA, J. S. & EL-FERALY, F. S. “Glucose-conjugation of the flavones of *Psiadia arabica* by *Cunninghamella elegans*”. *Phytochemistry*, **46** (7): 1193-1195, 1997.
- LOECK, A. E. & NAKATO, O. “Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae)”. *O Solo*, **1**: 25-30, 1984.
- MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P. “<sup>13</sup>C nmr spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features”. *Phytochemistry*, **37**: 1517-1575, 1994.
- MARICONE, F. A. M. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo, Livraria Nobel S. A., **2**: 21 1976.

- MARTIN, M. M. & WEBER, N. A. “The cellulose utilizing capability of the fungus cultures by the Attini and *Atta colombia tonsipes*”. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **62**: 1-13, 1969.
- MATOS, A. “Busca de compostos inseticidas: estudos de espécies do gênero *Trichilia* (MELIACEAE)”. Tese de doutorado, UFSCar, 2006.
- MATOS, L. G.; PONTES, I. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. & COSTA, E. A. “Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. ST. Hillaire (Manacá) roots”. *Phytot. Res.*, **18**: 963-966, 2005.
- MOULY, P.; GAYDOU, E. M. & AUFRAY, A. “Simultaneous separation of flavonone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography”. *J. Chromatography*, **800**: 171-179, 1998.
- MUELLER, U. G. “Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus symbiosis”. *The Amer. Natur.*, **160**: S67-S97, 2002.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4<sup>th</sup> ed., Approved Standard (M7-A4), *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, Wayne, P. A., 1997.
- NICHOLS-ORIAN, C. “Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of Attini symbiotic fungus”. *J. Chem. Ecol.*, **17**: 1177-1195, 1991 a.
- NICHOLS-ORIAN, C. “Condensed tannins, Attini ants, and performance of symbiotic fungus”. *J. Chem. Ecol.*, **17**: 1811-1819, 1991 b.
- NIELSEN, S. E.; BREINHOLT, V.; CORNETT, C. & DRAGSTED, L. O. “Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus”. *Food chem. toxicol.*, **38**: 739-746, 2000.

- PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. & DA SILVA, O. A. “Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves”. *J. Appl. Entom.*, **120**: 317-320, 1996.
- PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. D.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. “Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants”. *Bul. Ent. Res.*, **80**: 349-352, 1990.
- PIRANI, J. R. *Estudo Taxonômicos de Rutaceae*. Departamento de Biociências – USP. Tese (Livre Docência), 1999. 191 p.
- PIRANI, J. R. *A ordem Rutales na Serra Cipó, Minas Gerais, Brasil*. São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Biologia – USP. Dissertação de Mestrado, 1982.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTIN, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R. & PROCÓPIO, L. C. *Flora da reserva Ducke: Guia da identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. 1ª ed. Manaus, DFID, 1999. 816 p.
- RIBEIRO, T. A. N., NDIAYE, E. A. S., VELOZO, E. S., VIERA, P. C., ELLENA, J. & JÚNIOR P. T. S. “Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16** (6b): 1347-1352, 2005.
- RIBEIRO, T. A.N. “*Estudo químico-farmacológico das raízes de Spiranthera odoratissima ST. HILL (RUTACEAE)*”. Dissertação de Mestrado, Cuiabá-MT (UFMT), 2002.
- RIOS, J. L. & RECIO, M. C. “Medicinal plants and antimicrobial activity”. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 80-84, 2005.
- SANSORES-PERAZA, P.; ROSADO-VALLADO, M.; BRITO-LOEZA, W.; MENA-REJÓN, G. J. & QUIJANO, L. “Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*”. *Fitoterapia*, **71**: 690-692, 2000.
- SIEGL, S. *Non parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, MacGraw – still, New york, 1956.

- SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M. & SANTOS, C. A. M. “Antimicrobial activity of alkooidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*”. *Fitoterapia*. **75**: 750-753, 2004.
- STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. “Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew”. *Science*. **260**: 214-216, 1993.
- STRADLING, D. J. *An introduction to the fungus growing ants. Attini*. In: *Ant-plant interactions*. HUXLEY, C. R.; CUTLER, D. F. (eds). Oxford: Oxford University Press, p. 15-18, 1991.
- WANSI, J. D.; WANDJI, J.; WAFFO, A. F. K.; NGEUFA, H. E.; NDOM, J. C.; FOTSO, S.; MASKEY, R. P.; NJAMEN, D.; FOMUM, T. Z. & LAATSCH, H. “Alkaloids from *Oriciopsis glaberrima* Engl. (Rutaceae)”. *Phytochemistry*. **67**: 475-480, 2006.
- WATERMAN, P. G. “The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer”. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**: 395-406, 1999.
- WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, p. 24-27, 1983.
- UDUPA, R. S.; BANERJI, A. & CHADHA, M. S. *Tetrahedron*. **25**: 5415, 1969.
- ZHANG, J.; YANG, J.; DUAN, J.; LIANG, Z.; ZHANG, L.; HUO, Y. & ZHANG, Y. “Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection”. *Anal. Chim. Acta*, **532**: 97-104, 2005.