

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Virola sebifera* ASSOCIADO AO
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS**

KEYLLA UTHERDYANY BICALHO *

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, na área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

* Bolsista CAPES

São Carlos – SP
2011

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

B583ef

Bicalho, Keylla Utherdyany.

Estudo fitoquímico de *Virola sebifera* associado ao controle de formigas cortadeiras / Keylla Utherdyany Bicalho. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

166 f.

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

1. Produtos naturais. 2. *Virola sebifera*. 3. Formigas cortadeiras. 4. Cromatografia contracorrente. I. Título.

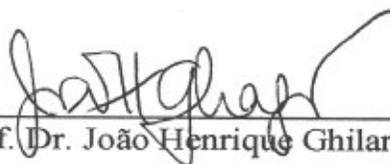
CDD: 547.3 (20^a)

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

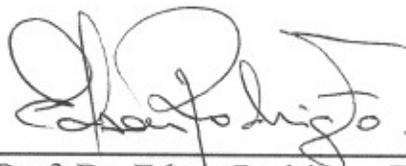
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Keylla Utherdyany Bicalho, realizada em 25 de fevereiro de 2011:



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

Dedico esta dissertação...

*Aos meus pais, que por muitas vezes abriram
mão de seus sonhos para realização dos meus,
ao meu irmão pelo apoio incondicional e à
minha sobrinha por todo seu amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e proteção;

Aos meus pais Maria José e João, pelo amor e compreensão;

Ao meu irmão Cleubson e minha sobrinha Gabrielly por compreenderem minha ausência e me apoiarem incondicionalmente;

À tia Lia pelo carinho, dedicação e por ser sempre meu porto seguro;

Ao professor Dr. João Batista Fernandes, exemplo de profissional e ser humano, pela orientação, amizade e ensinamentos;

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. Edson Rodrigues Filho, Dr. Paulo Cezar Vieira e Dr. Moacir Rossi Forim pela colaboração e contribuição para a conclusão deste trabalho;

À Dra. Cristiane de Melo Cazal pela constante colaboração durante o trabalho e principalmente pela amizade;

Ao professor Dr. Odair Corrêa Bueno e as alunas Tais Garcia Freitas, Marcela Ceccato e Nathalia Lorenzon, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Rio Claro – SP, pela colaboração na realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras;

À Dra. Ana Paula Terezan e as alunas Sônia P. Cardoso e Denise C. Martins pela realização dos ensaios com o fungo simbiote;

À técnica Luciana, do Laboratório de RMN, pela grande colaboração durante a realização deste trabalho;

Aos professores da banca, Dr. João Henrique Ghilardi Lago e Dr. Edson Rodrigues Filho pela disponibilidade e contribuição na conclusão deste trabalho;

À grande família Laboratório de Produtos Naturais, pelas muitas risadas, momentos “sem foco” e contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho;

Às minhas grandes amigas Bruna, Renata e Priscila por tudo que significam pra mim e por serem minha família em São Carlos;

À CAPES pela bolsa concedida;

À todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------|--|
| δ_H | Deslocamento químico de hidrogênio |
| δ_C | Deslocamento químico de carbono |
| ϕ | diâmetro |
| λ | Comprimento de onda |
| ACN | Acetonitrila |
| AcOEt | Acetato de Etila |
| alil. | alílico |
| APG | Angiosperm Phylogeny Group |
| Atm | atmosferas |
| BSA | N,O-bis(trimetilsilil)acetamida |
| CC | Cromatografia em coluna |
| CCC | Cromatografia contracorrente |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| $CDCl_3$ | Clorofórmio deuterado |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| COSY | Correlated spectroscopy |
| $^{\circ}C$ | Graus Celsius |
| <i>d</i> | Dubleto |
| <i>dd</i> | Duplo-dubleto |
| <i>ddt</i> | Duplo-duplo tripleto |
| $DMSO-d_6$ | Dimetil sulfóxido deuterado |
| ESI | Electrospray |
| EtOH | Etanol |
| EtOEt | Éter etílico |
| e.V | Eletron volt |
| H_2O | Água |
| h | Altura |
| Hex | Hexano |
| HMBC | Heteronuclear multiple quantum correlation |
| HSCCC | High-Speed Counter-Current Chromatography |
| HSQC | Heteronuclear single quantum correlation |
| Hz | Hertz |
| IE | Impacto eletrônico |

| | |
|---------------------|---|
| i.d. | Diâmetro interno |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| <i>K</i> | Coeficiente de partição |
| LC-EM | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas |
| <i>M</i> | Multiplete |
| <i>m/z</i> | Relação massa/carga |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Mega hertz |
| n-BuOH | n-Butanol |
| nm | Nanômetro |
| o.d. | Diâmetro externo |
| olef. | olefínico |
| <i>ppm</i> | Partes por milhão |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| <i>qt</i> | quintuplete |
| RMN ¹³ C | Ressonância magnética nuclear de carbono |
| RMN ¹ H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| rpm | Rotações por minuto |
| <i>s</i> | Singleto |
| sin. | Sinônimo |
| <i>sl</i> | Singleto largo |
| <i>t</i> | Triplete |
| T | Tesla |
| TMCS | Cloreto de trimetilsilano |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-vísivel |
| v/v | Proporção volume/volume |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| TABELA 4.1 – Sistemas de solventes testados no primeiro teste (Teste 1)..... | 37 |
| TABELA 4.2 – Sistemas de solventes testados no segundo teste (Teste 2)..... | 38 |
| TABELA 4.3 – Sistemas de solventes testados no terceiro teste (Teste 3)..... | 39 |
| TABELA 4.4 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da fração C (mistura de substâncias I , II e III) e comparação com o (4' <i>Z</i>)-hexadecanoil-2,6-dihydrobenzeno (KATO <i>et al.</i> , 1985: CDCl_3 , 60 MHz para RMN de ^1H / 20 MHz para RMN de ^{13}C)..... | 52 |
| TABELA 4.5 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância IV e comparação com a sesamina (WANG <i>et al.</i> , 2009: CDCl_3 , 600 MHz para RMN de ^1H / 150 MHz para RMN de ^{13}C). | 61 |
| TABELA 4.6 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância V e comparação com a (-)-hinokinina (ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007: CDCl_3 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C). | 69 |
| TABELA 4.7 – Dados de RMN de ^1H para os hidrogênios diastereotópicos das substâncias V e VI , δ_{H} (ppm) e J (Hz). | 73 |
| TABELA 4.8 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância VI e comparação com os dados da (-)-hinokinina (ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007: CDCl_3 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C). | 74 |
| TABELA 4.9 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância VII e comparação com a kusunokinina (MESSIANO <i>et al.</i> , 2008: CDCl_3 , 500 MHz para RMN de ^1H ; LOPES <i>et al.</i> , 1983: CDCl_3 , 20 MHz para RMN de ^{13}C). | 82 |
| TABELA 1.10 - Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982).... | 89 |
| TABELA 4.11 – Comparação de valores de deslocamentos para C-2 e C3 em $\text{DMSO}-d_6$ | 91 |
| TABELA 4.12 – Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) e de projeção de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da substância VIII e comparação com a quercetina-3- <i>O</i> - α -L-raminosídeo (SANTOS <i>et al.</i> , 2005: $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para ^{13}C) | 94 |
| TABELA 4.13 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) e de projeção de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da substância IX e comparação com a quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo (BENNINI <i>et al.</i> , 1992: $\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz para RMN de ^1H /75 MHz para ^{13}C)..... | 101 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 4.14 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância X e comparação com a quercetina-3-O- β -D-glicose-6''-O- α -L-raminopiranosil (FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006: DMSO- d_6 , 200 MHz para RMN de ^1H / 50 MHz para RMN de ^{13}C)..... | 108 |
| TABELA 4.15 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância XI e comparação com a quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo (KRENN <i>et al.</i> , 2003: MeOD, 300 MHz para RMN de ^1H / 75 MHz para RMN de ^{13}C). | 115 |
| TABELA 4.16 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância XII e comparação com o kaemferol-3-O- α -L-raminosídeo (GOHAR <i>et al.</i> , 2009: DMSO- d_6 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C). | 122 |
| TABELA 4.17 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos de partes vegetais de <i>Virola sebifera</i> | 127 |
| TABELA 4.18 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato VSFM de <i>Virola sebifera</i> | 128 |
| TABELA 4.19 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com a mistura de acilresorcínóis (I , II e III). | 130 |
| TABELA 4.20 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as lignanas IV , V e VII e com os flavonóides VIII , IX e XI | 131 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.1 – Árvore e frutos de <i>Virola surinamenses</i> (Fonte: www.ayahuasca-info.com Acesso em: 16/10/2010)..... | 4 |
| FIGURA 1.2 – Alguns flavonóides isolados de plantas do gênero <i>Virola</i> (BLUMENTHAL <i>et al.</i> , 1997; BRAZ FILHO, <i>et al.</i> , 1976; KATO <i>et al.</i> , 1992; SANTOS e CARVALHO, 1995)..... | 5 |
| FIGURA 1.3 – Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos de lignanas isoladas do gênero <i>Virola</i> (BLUMENTHAL <i>et al.</i> , 1997; LOPES <i>et al.</i> , 1996; MARTINEZ e TORRES, 1997; MOSS, 2000)..... | 6 |
| FIGURA 1.4 – Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos das neolignanas isoladas do gênero <i>Virola</i> (FERRI e BARATA, 1992; KAWANISHI <i>et al.</i> , 1982b; MORAIS <i>et al.</i> , 2009; MOSS, 2000)..... | 7 |
| FIGURA 1.5 – Foto ilustrativa de <i>Virola sebifera</i> (Fonte: www.arvores.brasil.nom.br)..... | 8 |
| FIGURA 1.6 – Substâncias isoladas de <i>Virola sebifera</i> (DANELUTTE <i>et al.</i> , 2000; DENNY <i>et al.</i> , 2008; KATO <i>et al.</i> , 1985; KAWANISHI <i>et al.</i> , 1985; LOPES <i>et al.</i> , 1982; 1983; 1984a)..... | 9 |
| FIGURA 1.7 – Substâncias isoladas de <i>Virola sebifera</i> (HARROWVEN <i>et al.</i> , 1998; LOPES <i>et al.</i> , 1984a e b; MARTINEZ <i>et al.</i> , 1999b; REZENDE e KATO, 2002)..... | 10 |
| FIGURA 1.8 – Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO <i>et al.</i> , 2006) | 11 |
| FIGURA 1.9 – Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo <i>L. gongylophorus</i> | 13 |
| FIGURA 4.1 – Cromatogramada fração FMDH (FMH e FMD reunidas) modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (10 μ m, 25,0 x 0,46 cm); eluente MeOH:H ₂ O 10-100% por 55 minutos; fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ e detector ultravioleta 254 nm..... | 37 |
| FIGURA 4.2 – Cromatograma gasoso da fração C, contendo as substâncias I, II e III. | 47 |
| FIGURA 4.3 – Espectros de massas das substâncias I, II e III (EI = 70 e.V) | 48 |
| FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ¹ H da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl ₃)..... | 53 |
| FIGURA 4.5 - Mapa de contornos COSY da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl ₃)..... | 54 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 4.6 - Mapa de correlações HSQC da fração C, contendo as substâncias I , II e III (400 MHz, CDCl ₃)..... | 54 |
| FIGURA 4.7 - Mapa de correlações HMBC da fração C, contendo as substâncias I , II e III (400 MHz, CDCl ₃)..... | 55 |
| FIGURA 4.8 – Espectro de RMN de ¹³ C da fração C, contendo as substâncias I , II e III (400 MHz, CDCl ₃)..... | 55 |
| FIGURA 4.9 – Classificação das lignanas em grupos..... | 58 |
| FIGURA 4.10 - Espectro de RMN de ¹ H da substância IV (400 MHz, CDCl ₃)..... | 62 |
| FIGURA 4.11 - Mapa de correlações HSQC da substância IV (400 MHz, CDCl ₃)..... | 63 |
| FIGURA 4.12 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, CDCl ₃)..... | 63 |
| FIGURA 4.13 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, CDCl ₃)..... | 64 |
| FIGURA 4.14 – Correlações HMBC para os anéis aromáticos..... | 67 |
| FIGURA 4.15 – Cromatograma da mistura das substâncias V e VI no modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (10 μm, 25,0 x 0,46 cm); eluente MeOH:H ₂ O 8:2; fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ e detector ultravioleta 254 nm..... | 70 |
| FIGURA 4.16 – Cromatograma obtido no CG-EM para a mistura das substâncias V e VI . Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 180 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 15 °C/min. até 270 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 min., posteriormente aumentou de 5 °C/min. até 300 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min..... | 72 |
| FIGURA 4.17 – Espectro de massas das substâncias V e VI (IE = 70 e.V)..... | 72 |
| FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de ¹ H das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl ₃)..... | 75 |
| FIGURA 4.19 – Expansão do mapas de contornos COSY das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl ₃)..... | 76 |
| FIGURA 4.20 – Expansão do mapa de contornos COSY das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl ₃)..... | 76 |
| FIGURA 4.21 - Mapa de correlações HSQC das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl ₃)..... | 77 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 4.22 – Mapa de correlações HMBC das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl ₃). | 77 |
| FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ¹ H da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 83 |
| FIGURA 4.24 – Expansão do mapa de contornos COSY da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 84 |
| FIGURA 4.25 – Expansão do mapa de contornos COSY da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 84 |
| FIGURA 4.26 - Mapa de correlações HSQC da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 85 |
| FIGURA 4.27 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 85 |
| FIGURA 4.28 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância VII (400 MHz, CDCl ₃). | 86 |
| FIGURA 4.29 – Classificação dos flavonóides por subclasses. | 87 |
| FIGURA 4.30 – Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual. | 88 |
| FIGURA 4.31 – Espectro de massas no modo negativo da substância VIII . | 92 |
| FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ¹ H da substância VIII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 95 |
| FIGURA 4.33 - Mapa de contornos COSY da substância VIII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 96 |
| FIGURA 4.34 - Mapa de correlações HSQC da substância VIII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 96 |
| FIGURA 4.35 - Mapa de correlações HMBC (expansão) da substância VIII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 97 |
| FIGURA 4.36 – Espectro de massas no modo negativo da substância IX . | 100 |
| FIGURA 4.37 - Espectro de RMN de ¹ H da substância IX (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 102 |
| FIGURA 4.38 - Mapa de contornos COSY da substância IX (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 103 |
| FIGURA 4.39 - Mapa de correlações HSQC da substância IX (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). | 103 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.40 - Mapa de correlações HMBC da substância IX (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 104 |
| FIGURA 4.41 – Espectro de massas no modo negativo da substância X | 107 |
| FIGURA 4.42 - Espectro de RMN de ¹ H da substância X (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)... .. | 109 |
| FIGURA 4.43 - Mapa de correlações HSQC da substância X (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 110 |
| FIGURA 4.44 - Mapa de correlações HMBC da substância X (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 110 |
| FIGURA 4.45 – Espectro de massas no modo negativo da substância XI | 113 |
| FIGURA 4.46 - Espectro de RMN de ¹ H da substância XI (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 116 |
| FIGURA 4.47 - Mapa de correlações HSQC da substância XI (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 117 |
| FIGURA 4.48 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância XI (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 117 |
| FIGURA 4.49 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância XI (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 118 |
| FIGURA 4.50 – Espectro de massas no modo negativo da substância XII | 121 |
| FIGURA 4.51 - Espectro de RMN de ¹ H da substância XII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 123 |
| FIGURA 4.52 - Mapa de contornos COSY da substância XII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 124 |
| FIGURA 4.53 - Mapa de correlações HSQC da substância XII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 124 |
| FIGURA 4.54 - Mapa de correlações HMBC da substância XII (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 125 |
| FIGURA 4.55 - Efeito das frações hexânica (FMH), diclorometânica (FMD), acetato de etila (FMA) e hidroalcolólica (FMHa) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 132 |
| FIGURA 4.56 - Efeito da mistura de acilresorcnois (I , II , e III) e das lignanas sesamina (IV), (-)-hinokinina (V) e (-)-kusunokinina (VII) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 134 |
| FIGURA 4.57 – Imagens do fungo simbiote na presença das lignanas IV (100 µg. mL ⁻¹), V (100 µg. mL ⁻¹), VII (120 µg. mL ⁻¹) e respectivos controles..... | 134 |

FIGURA 4.58 – Efeito do flavonóide quercitrina (**VIII**) sobre o crescimento do 135
fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.....

LISTA DE FLUXOGRAMAS

| | |
|---|----|
| FUXOGRAMA 3.1 – Fluxograma de preparo dos extratos de folhas de <i>Viola sebifera</i> | 25 |
| FLUXOGRAMA 3.2 – Fluxograma de preparo do extrato de galhos de <i>Viola sebifera</i> | 25 |
| FLUXOGRAMA 3.3 – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido..... | 26 |
| FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração FMDH..... | 29 |
| FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento de FMA..... | 30 |
| FLUXOGRAMA 3.6 – Fracionamento de S1-F..... | 31 |
| FLUXOGRAMA 3.7 – Fracionamento dos flavonóides VIII-XII | 32 |
| FLUXOGRAMA 3.8 – Fracionamento de S3-20..... | 33 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|-----|
| ESQUEMA 4.1 – Proposta de fragmentação para as substâncias I e II | 50 |
| ESQUEMA 4.2 – Proposta de fragmentação para a substância VIII | 93 |
| ESQUEMA 4.3 – Proposta de fragmentação para a substância IX | 100 |
| ESQUEMA 4.4 – Proposta de fragmentação para a substância X | 107 |
| ESQUEMA 4.5 – Proposta de fragmentação para a substância XI | 114 |
| ESQUEMA 4.6 – Proposta de fragmentação para a substância XII | 121 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|-----|
| GRÁFICO 4.1 - Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com extratos de partes vegetais de <i>Virola sebifera</i> | 126 |
| GRÁFICO 4.2 - Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato VSFM de <i>Virola sebifera</i> | 128 |
| GRÁFICO 4.3 - Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com a mistura de acilresorcinóis (I, II e III). | 129 |
| GRÁFICO 4.4 - Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as lignanas IV, V e VII e com os flavonóides VIII, IX e XI..... | 130 |

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Virola sebifera* ASSOCIADO AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS – As formigas cortadeiras são consideradas uma das principais pragas que afetam a agricultura brasileira. Para o controle desses insetos são empregados, na maioria das vezes, compostos halogenados, sulfurados e fosforados. No entanto, a utilização contínua desses compostos gera problemas como o aparecimento de resistência por parte dos insetos, contaminação de solo e lençóis freáticos e muitos deles atingem espécies não-alvo podendo provocar um desequilíbrio ecológico e despertando assim, a necessidade de buscar-se novos compostos mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente. Nessa perspectiva, o presente trabalho apresenta o estudo fitoquímico da espécie *Virola sebifera* e avaliação do potencial inseticida e/ou fungicida dos extratos, frações e substâncias obtidos frente às formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Uma das técnicas empregadas para realização do estudo fitoquímico foi cromatografia em contracorrente de alta velocidade onde se comprovou a eficiência desta técnica e a importância da escolha de um sistema de solventes bifásico adequado para a separação desejada. Foram isolados e/ou identificados neste trabalho três acilresorcinóis, quatro lignanas e cinco flavonóides sendo todos os flavonóides pela primeira vez relatados para a espécie em questão. A partir dos ensaios biológicos realizados com as operárias de formigas cortadeiras, verificou-se que o extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* e suas frações apresentaram atividade inseticida como resultado do efeito sinérgico da sua composição química. Os ensaios com o fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus*, revelaram grande potencial fungicida das lignanas isoladas, principalmente a lignana (-)-kusunokinina, a qual apresentou 100% de inibição do crescimento micelial do fungo.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Virola sebifera* ASSOCIATED WITH LEAF-CUTTING ANTS CONTROL – Leaf-cutting ants are considered one of the main pests that affect Brazilian agriculture. To control this pest are employed, most often, halogenated, sulfurous and phosphorus compounds. However, the continued use of these compounds leads to problems such as the emergence of resistance by insects, soil and underwater contamination e most of them affect many non-target species, may cause environmental imbalance and thus raising the needed of search for new compounds that are more selective and less damaging to the environment. From this perspective, the present work presents a phytochemical study of the specie *Virola sebifera* and evaluation of the insecticide and/or fungicide potential of the crude extracts, fractions and isolated compounds against the leaf-cutting ants, *Atta sexdens rubropilosa*, and its symbiotic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*. One of the techniques employed to the phytochemical study was the high-speed counter-current chromatography and it was confirmed the efficiency of this technique and the importance of choosing a suitable biphasic solvent system for the desired separation. In this work were isolated and/or identified three acylresorcinols, four lignans and five flavonoids, being all the flavonoids the first time reported for this specie. From the biological tests with leaf-cutting ants, it was found that the methanol extract of leaves of *Virola sebifera* and theirs fractions showed insecticidal activity as a result of the synergistic effect of their chemical composition. The bioassay with the symbiotic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*, revealed great fungicide potential of the isolated lignans, mainly the lignan (-)-kusunokinin, which exhibited 100% of inhibition of mycelial growth.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 – Produtos Naturais como Fonte para Novos Inseticidas..... | 1 |
| 1.2 – Ordem Magnoliales | 2 |
| 1.3 – Família Myristicaceae..... | 2 |
| 1.4 – Gênero <i>Virola</i> | 3 |
| 1.4.1 – <i>Virola sebifera</i> | 8 |
| 1.5 – Formigas Cortadeiras | 11 |
| 1.5.1 – Simbiose..... | 13 |
| 1.5.2 – Métodos de Controle de Formigas Cortadeiras..... | 14 |
| 1.6 – Cromatografia Contracorrente..... | 17 |
| 1.6.1 – Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade e Escolha do Sistema de Solventes..... | 18 |
| 2 - OBJETIVOS..... | 20 |
| 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 21 |
| 3.1 - Materiais..... | 21 |
| 3.1.1 – Material Cromatográfico | 21 |
| 3.1.2 – Solventes..... | 21 |
| 3.1.3 – Reveladores | 22 |
| 3.2 - Equipamentos | 22 |
| 3.2.1 – Evaporadores Rotatórios..... | 22 |
| 3.2.2 – Balança Analítica..... | 22 |
| 3.2.3 – Câmara de UV..... | 22 |
| 3.2.4 – Centrífuga..... | 22 |
| 3.2.5 – Concentrador – Speed-Vac..... | 22 |
| 3.2.6 – Cromatógrafos para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... | 23 |
| 3.2.7 – Detectores | 23 |
| 3.2.8 – Cromatógrafo para Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade ... | 23 |
| 3.2.9 – Cromatógrafos de CG-EM..... | 23 |
| 3.2.10 – Cromatógrafos de LC-EM..... | 24 |
| 3.2.11 – Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear | 24 |
| 3.3 – Material Botânico..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4 – Obtenção dos Extratos de <i>Virola sebifera</i> | 24 |
| 3.5 – Fracionamento dos Extratos e Frações de <i>Virola sebifera</i> | 26 |
| 3.5.1 – Partição Líquido-Líquido do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Virola sebifera</i> | 26 |
| 3.5.2 – Fracionamento da Fração FMHD (Fração Hexânica + Fração Diclorometânica) por Cromatografia Contracorrente | 27 |
| 3.5.2.1 – Teste de Sistema de Solventes | 27 |
| 3.5.2.2 – Cálculo do Coeficiente de Partição por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 27 |
| 3.5.2.3 – Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia Contracorrente | 28 |
| 3.5.2.4 – Separação dos Constituintes da Fração FMHD (Fração Hexânica + Fração Diclorometânica) de Folhas de <i>Virola sebifera</i> | 28 |
| 3.5.2.5 – Procedimento de derivatização de hidroxilas fenólicas | 30 |
| 3.5.3 – Fracionamento da Fração FMA (Fração Acetato de Etila) | 30 |
| 3.5.4 – Metodologia dos Ensaio Biológicos | 34 |
| 3.5.4.1 – Ensaio por ingestão com as operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 34 |
| 3.5.4.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 35 |
| 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 4.1 – Estudo Fitoquímico de <i>Virola sebifera</i> (FMDH) por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade | 36 |
| 4.1.1 – Escolha do Sistema de Solventes e Separação dos Constituintes da Fração FMHD | 36 |
| 4.2 – Substâncias Identificadas | 40 |
| 4.3 – Identificação Estrutural | 45 |
| 4.3.1 – Policetídeos - Acilresorcinóis | 45 |
| 4.3.1.1 – Identificação Estrutural das Substâncias I, II e III. | 45 |
| 4.3.2 – Lignanas | 56 |
| 4.3.2.1 – Identificação Estrutural da Substância IV. | 59 |
| 4.3.2.2 – Identificação Estrutural das Substâncias V e VI. | 65 |
| 4.3.2.2.1 - Identificação Estrutural da Substância Majoritária V | 65 |
| 4.3.2.2.2 - Identificação Estrutural da Substância Minoritária VI | 70 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2.3 – Identificação Estrutural da Substância VII. | 78 |
| 4.3.3 – Flavonóides | 87 |
| 4.3.3.1 – Identificação Estrutural da Substância VIII. | 90 |
| 4.3.3.2 – Identificação Estrutural da Substância IX. | 98 |
| 4.3.3.3 – Identificação Estrutural da Substância X. | 105 |
| 4.3.3.4 – Identificação Estrutural da Substância XI. | 111 |
| 4.3.3.5 – Identificação Estrutural da Substância XII. | 119 |
| 4.4 – Ensaio Biológico. | 126 |
| 4.4.1 – Ensaio por Ingestão com as Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> . . | 126 |
| 4.4.1.1 – Efeito dos Extratos de <i>Virola sebifera</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 126 |
| 4.4.1.2 – Efeito das Frações do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Virola sebifera</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 127 |
| 4.4.1.3 – Efeito das Substâncias e Misturas Obtidas de <i>Virola sebifera</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 129 |
| 4.4.2 – Ensaio com o Fungo Simbionte <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 132 |
| 4.4.2.1 – Atividades Inibitórias das Frações do Extrato Metanólico de <i>Virola sebifera</i> sobre o Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 132 |
| 4.4.2.2 – Atividades Inibitórias das Substâncias Obtidas de <i>Virola sebifera</i> sobre o Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | 133 |
| 5 – CONCLUSÕES | 136 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 138 |

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Produtos Naturais como Fonte para Novos Inseticidas

A agricultura desempenha papel fundamental na economia de vários países, sendo um deles o Brasil. Além dos expressivos ganhos de produtividade observados nos últimos anos, o Brasil, que ocupa hoje um lugar de destaque no abastecimento mundial de produtos agropecuários (VELASCO e CAPANEMA, 2006) conta ainda com clima diversificado, energia solar abundante, chuvas regulares, quase 13% de toda água doce existente no planeta e grandes extensões de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004). No entanto, diversas perdas podem ocorrer durante o processo produtivo que prejudicam a produção agropecuária de um país, destacando-se o aparecimento de pragas como insetos, fungos e plantas daninhas.

Com o objetivo de se obter melhores resultados de produtividade, diversas técnicas são empregadas na agricultura dentre as quais se destaca o controle químico dessas pragas em diversas culturas. Este controle é feito através do uso de agroquímicos, um grupo de substâncias que podem atuar no controle de insetos (inseticidas), de fungos (fungicida) e de plantas daninhas (herbicidas).

A busca na natureza por compostos com atividades biológicas diversas está cada vez mais difundida. Uma expressiva porcentagem das substâncias químicas descobertas nos últimos anos são produtos naturais e derivados ou moléculas sintetizadas utilizando produtos naturais como modelo (BALUNAS e KINGHORN, 2005; CARVALHO, 2006).

Nessa perspectiva, a atual busca por compostos inseticidas na natureza se baseia no fato destes compostos se degradarem com maior velocidade que os sintéticos, não deixando resíduos no meio ambiente ou nos alimentos e a grande riqueza da flora brasileira.

No Brasil, existem cerca de 200.000 espécies vegetais que produzem uma grande variedade de substâncias com propriedades biológicas. Assim, a natureza passa a ser um enorme atrativo na busca de substâncias para controlar insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela dessas foi investigada com esta finalidade.

1.2 – Ordem Magnoliales

A ordem Magnoliales, pertence ao grupo das angiospermas, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae (TAKHTAJAN, 1980). Segundo o APG (Angiosperm Phylogeny Group) esta ordem é constituída por 2700 a 3250 espécies distribuídas em seis famílias de clima tropical a temperado: Annonaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae, Himantandraceae, Magnoliaceae e Myristicaceae (APG, 2009; SAUQUET *et al.*, 2003).

1.3 – Família Myristicaceae

A família Myristicaceae, família de plantas angiospérmicas, morfologicamente considerada uma das mais primitivas famílias deste grupo, é pertencente à subordem Myristicineae, ordem Magnoliales (CHATROU, 2003; VALDERRAMA, 2000). Composta por 21 gêneros e aproximadamente 500 espécies, esta família tem ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo representada no território brasileiro por 59 espécies (LENZA e OLIVEIRA, 2006; SAUQUET *et al.*, 2003).

As espécies desta família se caracterizam por apresentar folhas alternas, simples, inteiras, peninérveas, às vezes coriáceas, sem estípulas. Inflorescência cimosas, racemosas ou paniculadas, com flores vistosas e unissexuadas. Seus frutos ocorrem em cápsulas, sendo constituídos por um pericarpo lenhoso geralmente deiscente ao longo de suas suturas ventrais e dorsais. Suas sementes são oleaginosas, revestidas por um arilo delgado ou polposo, comumente vermelho, rico em lipídeos (SOUZA e LORENZI, 2005; VAN ROOSMALEN *et al.*, 1996).

No Brasil, esta família é representada por cinco gêneros, *Compsonera*, *Iryanthera*, *Osteophloeum*, *Otoba* (sin. *Dialyanthera*) e *Virola*, os quais estão concentrados na Região Amazônica (SOUZA e LORENZI, 2005; VAN ROOSMALEN *et al.*, 1996). Destes, os gêneros mais endêmicos são *Virola* e *Iryanthera* sendo o gênero *Virola* o mais amplamente disperso (RODRIGUES, 1980).

Nos anos cinquenta, após Schultes divulgar que certas tribos indígenas da Amazônia usavam as cascas e a resina de algumas espécies de *Virola* no preparo de rapés alucinógenos e no envenenamento de flechas para caça, as miristicáceas passaram a ser alvo de intensos estudos (RODRIGUES, 1980).

O estudo fitoquímico desta família revelou-a como fonte de uma grande diversidade de metabólitos secundários. Dentre eles podem-se destacar lignóides (lignanas e neolignanas), lignoflavonóides, flavonóides, terpenóides, lactonas e policetídeos (BLUMENTHAL *et al.*, 1997; BRAZ FILHO *et al.*, 1976; CAVALCANTE *et al.*, 1985; CONSERVA *et al.*, 1990; FORTI *et al.*, 2000; GOTTLIEB, 1976; KATO *et al.*, 1992; VIEIRA *et al.*, 1983;).

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para os metabólitos secundários isolados de plantas pertencentes à família Myristicaceae como citotóxica, antioxidante, antifúngica, antibactericida, antiproliferativa dentre outras (FILLEUR *et al.*, 2001; MING *et al.*, 2002; PHAM *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; ZAHIR *et al.*, 1993).

1.4 – Gênero *Virola*

Em geral, as espécies do gênero *Virola* são popularmente conhecidas no Brasil como “úcuuba” em toda a região amazônica, “urucuba” no nordeste e “bicuíba” na região sul. *Virola* é um gênero circunscrito à flora neotropical, sendo o gênero mais amplamente disperso pela América, é encontrado desde a Guatemala e Antilhas Menores até o Brasil Meridional (Rio Grande do Sul) e da costa acidental da Colômbia e do equador até a do Atlântico. A bacia amazônica é considerada o centro de distribuição deste gênero, pois é onde se encontra o maior número de espécies (RODRIGUES, 1980).

As espécies deste gênero têm reconhecido valor comercial, principalmente valor madeireiro como *Virola oleifera*, *Virola sebifera*, *Virola bicuhyba*, *Virola subsessilis* e *Virola surinamensis* (Figura 1.1), sendo amplamente empregada na fabricação de compensados e conseqüentemente, na indústria de celulose, pois os resíduos gerados na fabricação dos compensados são utilizados na produção de papel do tipo Kraft de boa qualidade (ÂNGELO *et al.*, 2001). As sementes das espécies deste gênero produzem ainda uma gordura contendo triglicerídeos, onde ácidos graxos saturados e insaturados esterificam o glicerol. Dentre os componentes desta gordura encontra-se a trimeristina, um triglicerídeo de elevado valor na confecção de produtos farmacêuticos de elevado preço comercial (RODRIGUES, 1980).



FIGURA 1.1 – Árvore e frutos de *Virola surinamenses* (Fonte: www.ayahuasca-info.com Acesso em: 16/10/2010)

Muitos estudos envolvendo a fitoquímica das virolas já foram realizados e foram relatadas para os metabólitos secundários deste gênero diversas atividades biológicas tais como antifúngica, alelopática, analgésica, alucinógena, anti-inflamatória, antiproliferativa, antimalárica e leishmanicida (BARATA *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 1999; DENNY *et al.*, 2008; KAWANISHI *et al.*, 1985; KUROSHIMA *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 1999a e b).

O estudo fitoquímico deste gênero levou ao isolamento de diversos metabólitos secundários como lignóides (lignanas e neolignanas), flavonóides, alcalóides, derivados de acilresorcinóis e butenolídeos (BARATA *et al.*, 1978, 2000; BLUMENTHAL *et al.*, 1997; BRAZ FILHO, *et al.*, 1976; CARVALHO *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 1993; FERRI e BARATA, 1992; GOTTLIEB, 1976; KATO *et al.*, 1986; 1990; 1992; KAWANISHI *et al.*, 1982a e b; 1983; LOPES *et al.*, 1996; 1999b; MACRAE e TOWERS, 1985; MARTINEZ *et al.*, 1985a e b; MARTINEZ e CUCA, 1987; MARTINEZ e TORRES, 1997; MORAIS *et al.*, 2009; SANTOS e CARVALHO, 1995; SARTORELLI *et al.*, 1998) (Figuras 1.2-1.4).

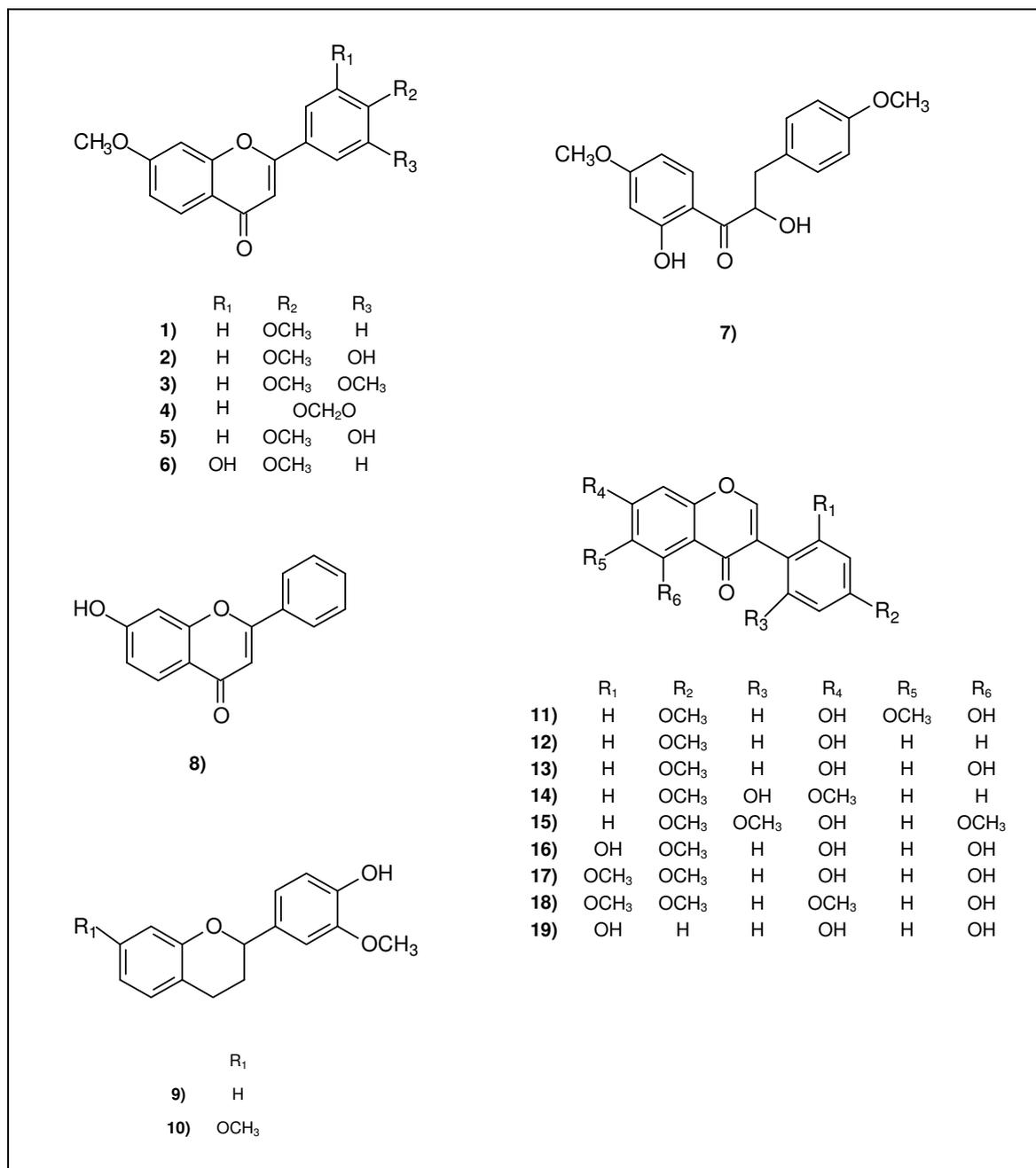


FIGURA 1.2 – Alguns flavonóides isolados de plantas do gênero *Viola* (BLUMENTHAL *et al.*, 1997; BRAZ FILHO, *et al.*, 1976; KATO *et al.*, 1992; SANTOS e CARVALHO, 1995).

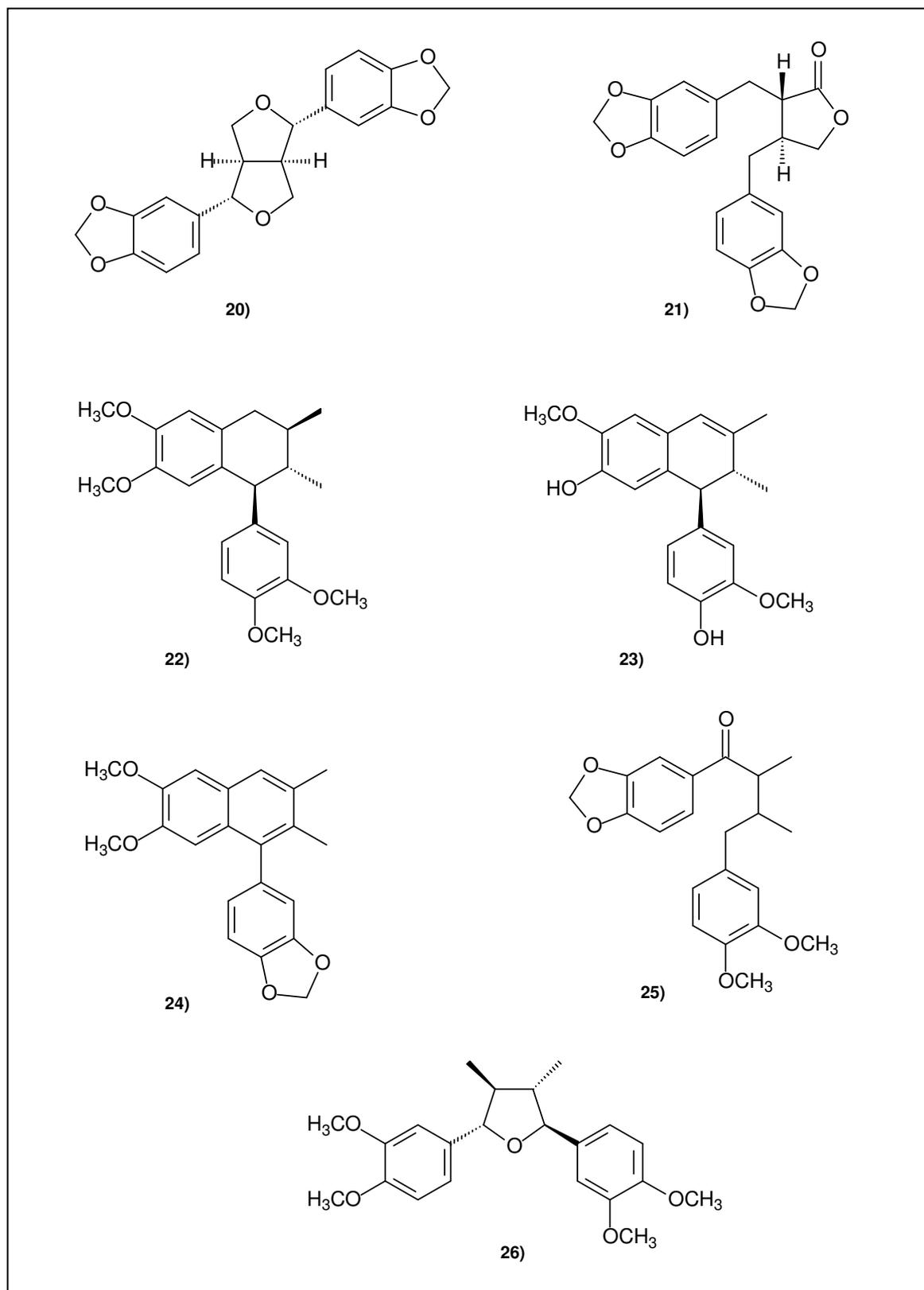


FIGURA 1.3 – Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos de lignanas isoladas do gênero *Virola* (BLUMENTHAL *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 1996; MARTINEZ e TORRES, 1997; MOSS, 2000).

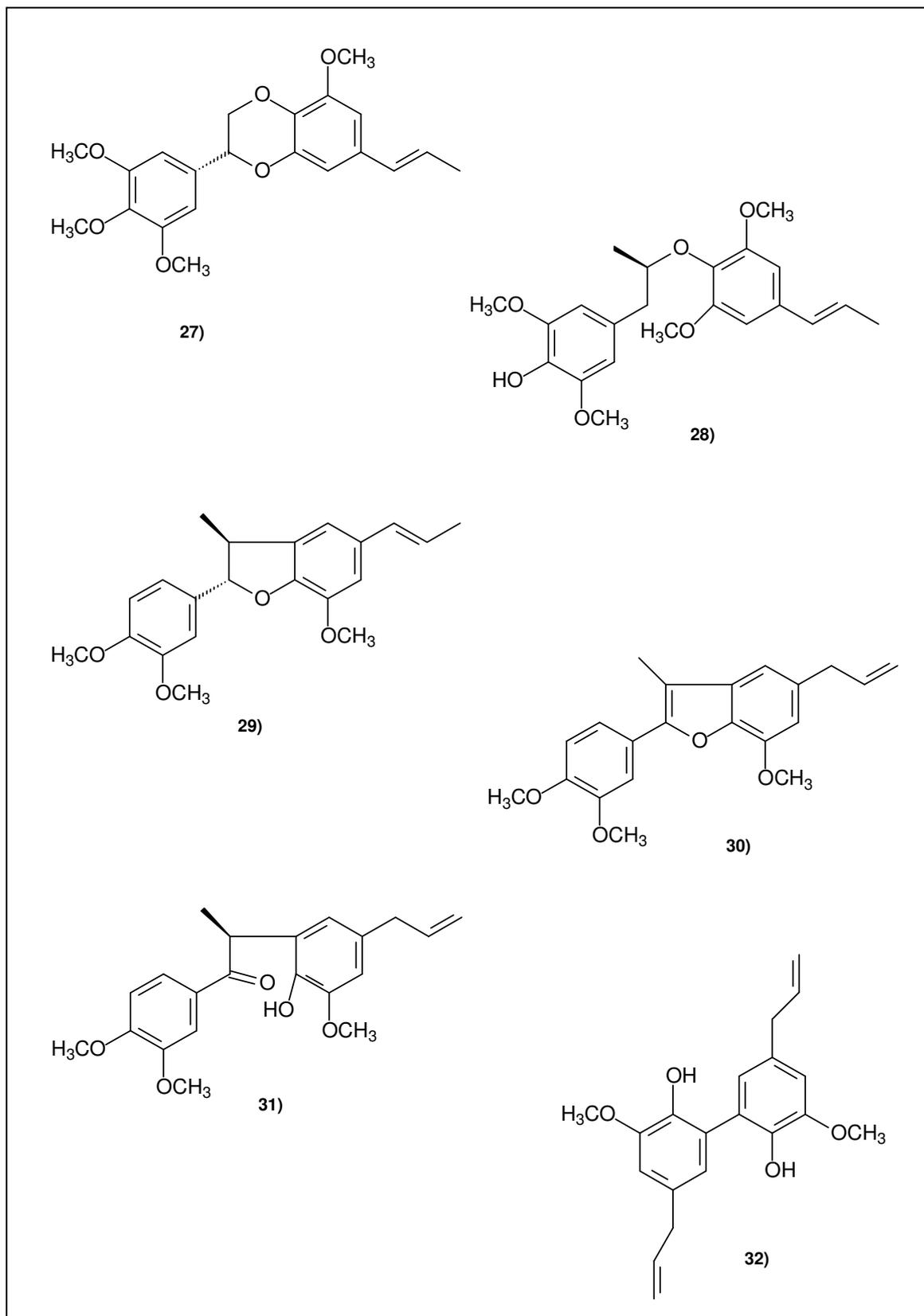


FIGURA 1.4 – Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos das neolignanas isoladas do gênero *Viola* (FERRI e BARATA, 1992; KAWANISHI *et al.*, 1982b; MORAIS *et al.*, 2009; MOSS, 2000).

1.4.1 – *Virola sebifera*

Dentre as espécies de virolas encontradas no Brasil, a espécie *Virola sebifera* é a mais dispersa pelo território brasileiro ocorrendo do estado do Pará até São Paulo, sendo comum em matas mesofíticas e de galeria do Brasil Central (LENZA e OLIVEIRA, 2006).

É uma árvore de porte pequeno a grande com até 30m de altura, troncos com até 1,3m de diâmetro e distingue-se das outras na paisagem pela tonalidade alaranjada de suas flores e folhas, conhecida popularmente como ucuúba ou pau de sebo (Figura 1.5, RODRIGUES, 1980).



FIGURA 1.5 – Foto ilustrativa de *Virola sebifera* (Fonte:www.arvores.brasil.nom.br).

Esta espécie é famosa pela vasta gama de atividade biológica apresentada. Na medicina popular ela é empregada no tratamento de desordens gastrointestinais, como anti-inflamatório, no preparo de alucinógenos, antiviral, imunossupressora, anticancerígena e na indústria cosmética (DENNY *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 1999a; REZENDE e KATO, 2002; RIOS *et al.*, 2002). Estudos sobre o perfil fitoquímico de *Virola sebifera* mostraram que nesta espécie são encontradas muitas lignanas e neolignanas presentes nos frutos, nas folhas, na casca da árvore e nas sementes (Figuras 1.6-1.7, DENNY *et al.*, 2008).

Uma das atividades reportadas para as lignanas isoladas é a considerável ação fungicida destas contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo simbiote da formiga cortadeira da espécie *Atta sexdens rubropilosa* (PAGNOCCA *et al.*, 1996).

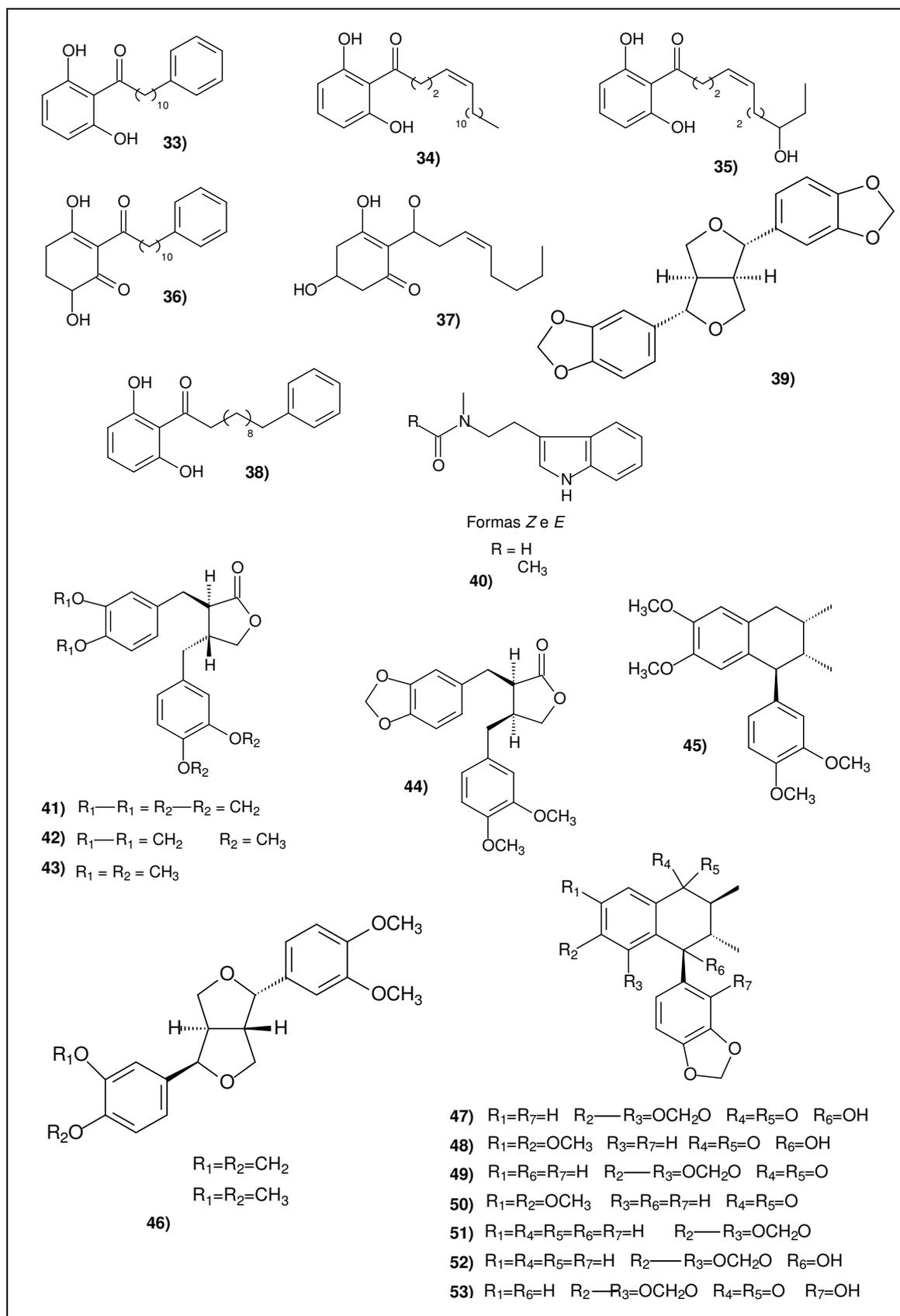


FIGURA 1.6 – Substâncias isoladas de *Virola sebifera* (DANELUTTE *et al.*, 2000; DENNY *et al.*, 2008; KATO *et al.*, 1985; KAWANISHI *et al.*, 1985; LOPES *et al.*, 1982; 1983; 1984a).

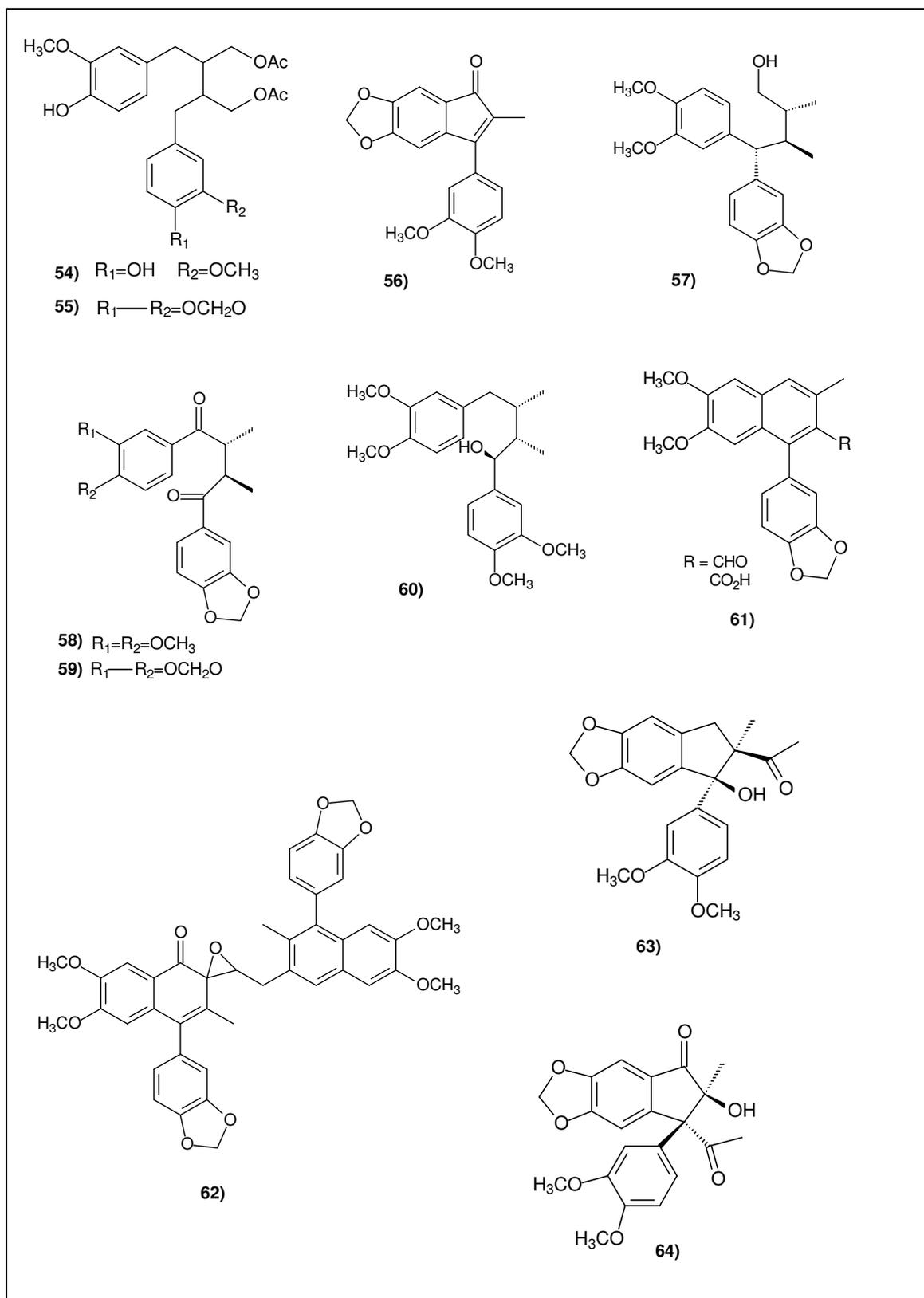


FIGURA 1.7 – Substâncias isoladas de *Virola sebifera* (HARROWVEN *et al.*, 1998; LOPES *et al.*, 1984a e b; MARTINEZ *et al.*, 1999b; REZENDE e KATO, 2002).

1.5 – Formigas Cortadeiras

As formigas, grupos de insetos mais abundantes na biosfera pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e estão reunidas na família Formicidae. São chamadas de insetos eussociais por apresentarem três características definidoras do comportamento dito social em insetos: sobreposição de gerações, divisão de trabalhos e cuidados com a prole (ALMADO, 2007; WILSON, 1971)

Dentro da subfamília Myrmicinae, tribo Attini, são consideradas formigas cortadeiras (Figura 1.8) as espécies do gênero *Atta*, conhecidas popularmente como saúvas e as do gênero *Acromyrmex* conhecidas como quenquéns e também algumas *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma* (DELLA LUCIA e VILELA, 1993; JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996; MARICONI, 1970).

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



FIGURA 1.8 – Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO *et al.*, 2006)

Conhecidas pelo poder de destruição de um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura principalmente em florestas implantadas de *Pinus* e de *Eucalyptus* nas fases de pré-corte e imediatamente após o plantio (FORTI e BOARETTO, 1997). São consideradas uma das principais ameaças à produção agrícola brasileira (MARSARO *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2007).

As Attini são restritas ao Novo Mundo e constituem um grupo essencialmente de clima tropical (BERTI FILHO *et al.*, 1992; MARICONI, 1970). Sua

distribuição geográfica vai desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina não ocorrendo nas regiões transandinas da América do Sul e em algumas ilhas das Antilhas (FARJI-BRENNER e RUGGIERO, 1994; NORTH *et al.*, 1997; WEBER, 1972).

O Brasil é o país com maior ocorrência de saúvas seguido pela Argentina e Paraguai, onde são encontradas 10 espécies, de um total de 15 do gênero, ocorrendo principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (FORTI e BOARETTO, 1997).

As formigas pertencentes à tribo Attini são caracterizadas por apresentarem simbiose obrigatória com um fungo específico, cultivado em substrato de origem vegetal (FOWLER *et al.*, 1991). Os gêneros da tribo Attini podem ser subdivididos de acordo com o tamanho da colônia, do polimorfismo de suas operárias e do tipo de substrato que usam para cultivar seu fungo simbiote (WILSON, 1980). Os gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) são os mais evoluídos, possuem colônias bem desenvolvidas, polimorfismo funcional das operárias e uma distinta casta de soldados nas espécies do gênero *Atta* (STRADLING, 1991).

Estes gêneros utilizam material vegetal fresco para cultivar seu fungo sendo, portanto, consideradas herbívoras (WEBER, 1966). As formigas cortam partes vegetais, principalmente folhas, o que as torna conhecidas como formigas cortadeiras, e essas partes vegetais são utilizadas como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (FERNANDES *et al.*, 2002; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Trabalhos recentes indicam que as formigas têm suas principais fontes de alimentos diretamente dos produtos de hidrólise dos polissacarídeos vegetais, que são gerados nos jardins de fungo pela ação das polissacaridases que são produzidas pelo fungo simbiote (SILVA *et al.*, 2003). Estudos mostraram que as formigas adultas sustentam seu trabalho predominantemente com energia extraída de carboidratos, essencialmente os polissacarídeos que representam 60% da matéria sólida vegetal (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

1.5.1 – Simbiose

A relação mutualística entre a formiga cortadeira e seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*, é muito forte e existe uma total dependência entre ambos. Nesta relação, a formiga corta materiais vegetais frescos que servem como alimento para o fungo, este por sua vez, produz enzimas que degradam polissacarídeos em açúcares menores que servem como alimento para as operárias adultas (CURRIE *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2002).

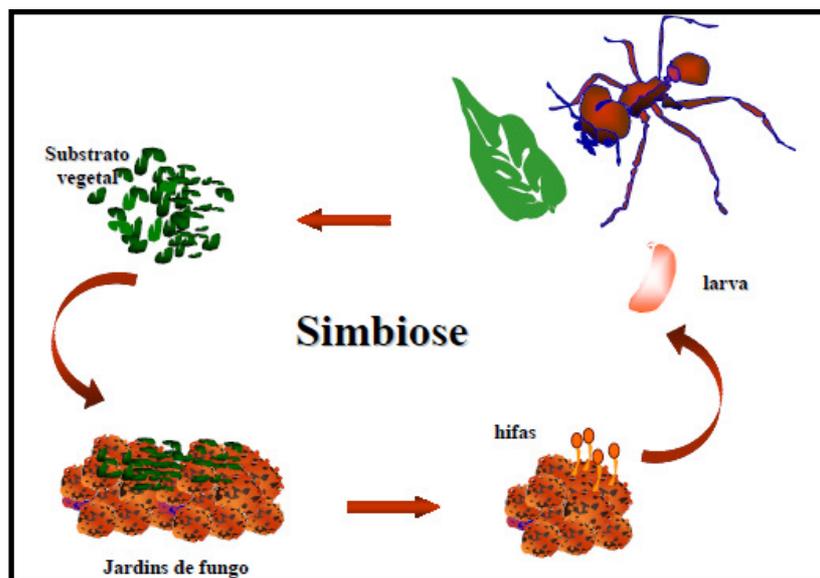


FIGURA 1.9 – Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo *L. gongylophorus*.

O fungo constitui a única fonte de alimento para as larvas da formiga, entretanto, fornece apenas 9% da necessidade energética das operárias adultas. Alguns estudos relatam que as operárias adultas também ingerem seiva diretamente das plantas no momento do corte do material vegetal (FISCHER *et al.*, 1994; FORTI e ANDRADE, 1999; QUINLAN e CHERRETT, 1979 apud FERNANDES *et al.*, 2002).

Assim, as necessidades energéticas das operárias são supridas predominantemente com a energia obtida de carboidratos, principalmente polissacarídeos que representam a maior porcentagem em massa do material sólido vegetal (MARTIN *et al.*, 1969; SIQUEIRA *et al.*, 1998; WEBER, 1972). O fungo possui enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas como pectinase, amilase, xilanase, β -glicosidase e manosidase (FEBVAY & KERMARREC, 1981; MARICONI, 1974). Segundo SILVA *et al.*, 2003, a glicose

resultante do metabolismo do fungo é responsável por 50% das necessidades energéticas das operárias.

SIQUEIRA *et al.*, 1998, mostraram as diferentes atividades metabólicas do fungo cultivado pela formiga *Atta sexdens rubropilosa* a qual degradou em maior quantidade o polissacarídeo pectina, seguido de amido, xilana, carboximetilcelulose e celulose. Por outro lado, a formiga também realiza atividades benéficas ao fungo uma vez que produz compostos antimicrobianos que reduzem o crescimento de outros fungos e bactérias contaminantes dos ninhos (FOWLER *et al.*, 1986).

As formigas cortadeiras quando em ambientes ecologicamente equilibrados, fazem o corte natural das plantas, realizam polinização e dispersão de sementes, exercem importante papel na aeração do solo e incorporam matéria orgânica à terra. No entanto, as formigas cortadeiras são vistas também como importantes pragas agrícolas sendo consideradas como o inseto que mais causa danos à agricultura.

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

Desse modo, torna-se necessário o controle desses insetos. Entretanto, uma grande dificuldade encontrada no controle das formigas cortadeiras se deve à ocorrência delas o ano todo, a facilidade de formação e estabilização de novas colônias e pela complexidade de um formigueiro adulto (WEBER, 1972).

1.5.2 – Métodos de Controle de Formigas Cortadeiras

Os prejuízos causados pelas formigas cortadeiras são consideráveis, podendo destruir completamente as plantas e em sistemas tropicais chegam a consumir até 17% da produção florestal (CHERRET, 1986).

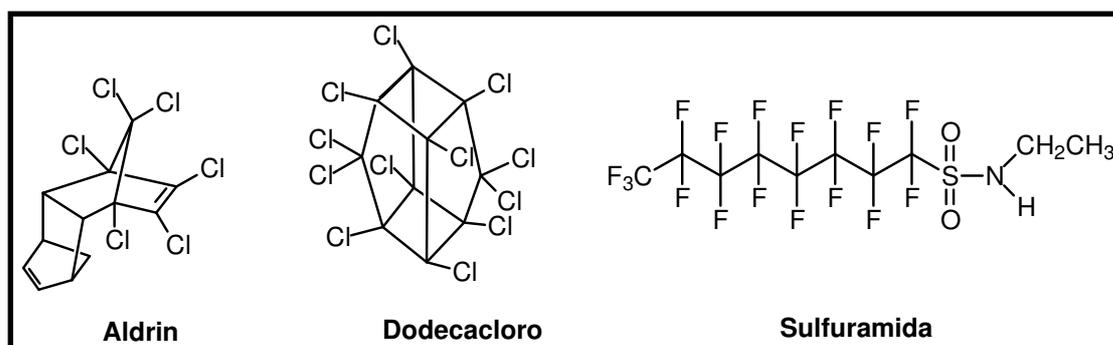
Sabendo-se que a ação das formigas cortadeiras também apresenta aspectos positivos ao meio ambiente, como citado anteriormente, o combate a esses insetos não seria uma alternativa adequada e sim o seu controle.

O controle das formigas pode ser feito através de métodos mecânicos, químicos e biológicos. O controle mecânico consiste na destruição dos ninhos da

área através de escavação do formigueiro até que a rainha seja localizada e morta. Esta técnica é praticamente não utilizada uma vez que é de viabilidade restrita a pequenas áreas e ninhos com até quatro meses de idade (BOARETTO e FORTI, 1997; DELLA LUCIA e VILELA, 1993). O controle biológico baseia-se no emprego de predadores, parasitóides e microorganismos que utilizam a formiga cortadeira como hospedeira. No entanto, ainda são necessários mais conhecimentos acerca desta técnica para que possa ser aplicada com segurança, principalmente em relação ao meio ambiente. Os métodos químicos são os mais frequentemente utilizados, sendo o produto tóxico aplicado diretamente nos ninhos em formas de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós secos e iscas granuladas (BOARETTO e FORTI, 1997).

Atualmente o emprego de iscas granuladas tem sido o método mais empregado, pois oferece maior segurança ao operador, dispensa mão-de-obra e equipamentos especializados e permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK & NAKANO, 1984; PETERNELLI *et al.*, 2008). Estas iscas são constituídas de óleo de soja como veículo, um atrativo, um suporte sólido e um ingrediente ativo como princípio tóxico. O substrato atrativo e de suporte sólido mais utilizado é a polpa cítrica desidratada embora outros materiais orgânicos já tenham sido utilizados, como por exemplo, milho, folha de eucalipto, farinha de mandioca, farelo de soja, farinha de trigo, bagaço e melão de cana.

As primeiras iscas tóxicas foram formuladas com aldrin como princípio ativo. Este foi posteriormente substituído por dodecacloro que era mais eficiente. Entretanto, devido à proibição de inseticidas clorados, uma vez que estes eram prejudiciais ao meio ambiente, o dodecacloro foi então substituído por sulfuramida (DELLA LUCIA, 1997; ALMEIDA, 2007).



O uso indiscriminado de inseticidas sintéticos, que são em sua maioria compostos halogenados, sulfurados e fosforados resulta em problemas como o aparecimento de resistência, contaminação do meio ambiente, solo e lençóis freáticos e o fato de muitos deles serem não específicos atingindo espécies não-alvo podendo provocar desequilíbrio ecológico.

Nesse contexto, torna-se cada vez mais relevante a busca por inseticidas e/ou fungicidas mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente. Nessa perspectiva, o Grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar juntamente com o Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS)-Unesp de Rio Claro têm estudado plantas potencialmente tóxicas às formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote.

Dessa forma, diversas plantas utilizadas popularmente como inseticidas ou com atividade já relatada em literatura têm sido estudadas com o objetivo de se isolar e identificar substâncias ativas contra as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e inibidoras de pectinases no grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar.

O estudo das plantas *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) e *Virola sebifera* (Myristicaceae) levou ao isolamento da lignana sesamina que é altamente tóxica ao fungo *L. gongylophorus* (PAGNOCCA *et al.*, 1996). A xantiletina, uma cumarina isolada do caule de *Pilocarpus riedelianus* (Rutaceae), assim como os ácidos graxos obtidos das sementes de *Sesamum indicum* são também tóxicos ao fungo simbiote (GODOY *et al.*, 2005; MORINI *et al.*, 2005). HEBLING *et al.*, 1996, ao alimentar ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* com folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), observou decréscimo no volume do jardim de fungo e uma alta taxa de mortalidade das operárias adultas. O estudo fitoquímico desta planta revelou-a como uma rica fonte do alcalóide ricinina, responsável pela toxicidade da mesma (BIGI *et al.*, 2004). Extratos brutos de partes vegetais de *Cipadessa fruticosa* e *Cedrela fissilis* (Meliaceae) se mostraram altamente tóxicos às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote (BUENO *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005).

Para o desenvolvimento de estudos fitoquímicos a técnica de cromatografia contracorrente tem sido amplamente utilizada devido às diversas vantagens que apresenta destacando-se entre elas, menor tempo de análise e

menor gasto de solventes quando comparada às técnicas cromatográficas convencionais.

1.6 – Cromatografia Contracorrente

A cromatografia contracorrente é basicamente uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no aparelho sem a utilização de um suporte sólido (BERTHOD, 1991; CONWAY, 1990). Nesta técnica, um campo gravitacional variável é produzido pelo movimento giratório de um eixo duplo e um arranjo de colunas que geralmente são tubos enrolados em bobinas.

A cromatografia em contracorrente é um tipo de cromatografia onde as duas fases são líquidas. Uma das fases é retida no aparelho pela força centrífuga gerada pelo movimento de rotação atuando então como fase estacionária, enquanto a outra fase é bombeada para o aparelho passando através da fase estacionária e atuando como fase móvel (MARSTON e HOSTETTMANN, 1994; 2006; STICHER, 2008; SUTHERLAND e FISHER, 2009).

O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo a proporção relativa de soluto que passa para cada fase determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (K) (MARSTON e HOSTETTMANN, 1994). Esta técnica é comparável a se realizar repetidas partições de um analito entre duas fases imiscíveis, uma versão automatizada da extração líquido-líquido (WINTERHALTER, 2007).

Desde sua introdução (ITO e BOWMAN, 1970), a cromatografia contracorrente evoluiu rapidamente. Dois tipos de aparelhos são disponíveis comercialmente: CCC hidrodinâmico e CCC hidrostático. O primeiro utiliza um campo gravitacional variável, devido ao movimento planetário do eixo duplo o campo centrífugo muda em intensidade e direção. Quando a intensidade deste campo é alta, ocorre decantação das fases e quando o campo muda de direção as fases separadas se misturam formando um estado de emulsão. O CCC hidrostático utiliza um campo gravitacional constante produzido pelo mecanismo de rotação de um eixo simples (ITO, 1991; STICHER, 2008).

A CCC apresenta várias vantagens em relação às técnicas cromatográficas convencionais empregadas na purificação de produtos naturais

(CONWAY, 1990; MARSTON e HOSTETTMANN, 1994; STICHER, 2008): (i) Versatilidade, a análise por esta técnica independe da polaridade da amostra, o modo de eluição pode ser normal ou reverso e, além disso, os sistemas de solventes podem ser compostos por inúmeros solventes em diferentes proporções; (ii) Eficiência e rapidez; (iii) Economia, é necessário somente o investimento inicial da compra do aparelho, as colunas não praticamente indestrutíveis e os sistemas de solventes utilizados são em sua maioria aquosos; (iv) Previsibilidade e reprodutibilidade: a separação das substâncias é determinada pelo seu coeficiente de partição; (v) Recuperação total da amostra: como não há utilização de suporte sólido, não há problemas como adsorção irreversível da amostra, podendo esta ser totalmente recuperada sem danos à sua composição química e atividade biológica.

1.6.1 – Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade e Escolha do Sistema de Solventes

A cromatografia contracorrente de alta velocidade (*ing.* HSCCC) é o ápice do desenvolvimento da cromatografia contracorrente em termos de resolução, tempo de separação e quantidade de amostra a ser trabalhada. É uma técnica preparativa de grande eficiência na purificação de produtos naturais, mas que requer alguns conhecimentos básicos desde a seleção das condições experimentais e o processo de separação que é bem característico.

ITO, 2005, apresenta uma prática e efetiva estratégia para a seleção, etapa por etapa, das condições experimentais para a cromatografia contracorrente que inclui a seleção do sistema de solventes bifásico, determinação do coeficiente de partição (K) dos analitos, preparo do sistema de solventes bifásico e da solução da amostra a ser estudada, seleção do modo de eluição, fluxo da fase móvel, velocidade de rotação e monitoramento das frações.

A seleção do sistema de solventes é o passo fundamental dentre os citados anteriormente, chegando a corresponder a 90% de todo trabalho despendido nesta técnica. O uso de um sistema bifásico resulta em um enorme número de possibilidades de solventes a serem escolhidos. Um sistema de solventes bifásico adequado para a separação por cromatografia contracorrente de alta velocidade deve satisfazer as seguintes condições (CONWAY, 1990; MARSTON e HOSTETTMANN, 2006; STICHER, 2008): (i) O analito deve ser solúvel e estável no

sistema; (ii) O sistema de solventes deve formar duas fases e preferencialmente gerar volumes iguais das fases aquosa e orgânica para evitar desperdício; (iii) O tempo de separação das fases após a agitação deve ser inferior a 30 s para assegurar uma retenção satisfatória da fase estacionária; (iv) O coeficiente de partição (K) das substâncias deve estar na faixa $0,2 \leq K \leq 5,0$ para a cromatografia contracorrente de alta velocidade.

2 - OBJETIVOS

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* com isolamento e identificação estrutural de seus constituintes químicos;
- Avaliar o potencial tóxico dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais

3.1.1 – Material Cromatográfico

- Cromatografia em camada delgada (CCD), usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, com 0,2 mm de espessura da Merck.
- Cromatografia por adsorção:
 - Cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh da ACROS ORGANICS;
 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária a fase reversa Phenomenex Luna C-18, analítica (10 µm, 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm, 25,0 x 1,0 cm);
 - Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando como fase estacionária (5%-fenil)-metilpolisiloxano, coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).
- Cromatografia por exclusão:
 - Cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, da Amersham Pharmacia Biotech AB.

3.1.2 – Solventes

- Solventes comerciais BRENNTAG, MERCK, SINTH, VETEC, LABSYNTH e solventes destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar;
- Solventes grau CLAE da MERCK, TEDIA e da J. T. BECKER;
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, com % de deuterério de 99,8% para CDCl₃ e MeOD e 99,9% para DMSO-*d*₆.

3.1.3 – Reveladores

- Câmara de luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm);
- Solução de vanilina.

3.2 - Equipamentos

3.2.1 – Evaporadores Rotatórios

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

3.2.2 – Balança Analítica

- Sartorius modelo BP210S.

3.2.3 – Câmara de UV

- Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C.

3.2.4 – Centrífuga

- Centrífuga Comb-spin FVL 2400.

3.2.5 – Concentrador – Speed-Vac

- Savant Speedvac Plus SC 10 A acoplado com um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bomba a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant.

3.2.6 – Cromatógrafos para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

- SHIMADZU LC-6AV, condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo e “loop” de 200 µL.
- Agilent Technologies modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1322A e detector UltraVioleta G1314B. Equipamento acoplado a uma interface G1369A, software EZChrom Ellite.

3.2.7 – Detectores

- UV-Vis Shimadzu SPD-6AV;
- UV-Vis G1314B

3.2.8 – Cromatógrafo para Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade

- MK5 Quattro Quik-Prep (AECS Ltda. Reino Unido) equipado com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em politetraflouroetileno (PTFE) com diâmetro interno de 0,5 mm i.d. e diâmetro externo de 1,58 mm o.d., capacidade total de aproximadamente 500 mL. A velocidade de rotação é ajustável entre 0 a 1000 rpm e plano de rotação vertical. Aparelho com alça de injeção de 5 mL e sistema equipado com bomba de fluxo contínuo LabAlliance.

3.2.9 – Cromatógrafos de CG-EM

- CG-EM SHIMADZU QP 5000 – ionização por impacto eletrônico (70 e.V) – DQ/UFSCar.

3.2.10 – Cromatógrafos de LC-EM

- MICROMASS QUATTRO LC – Modo de ionização Eletrospray (ESI) (modo negativo).

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos LaBioMMi – DQ/UFSCar.

3.2.11 – Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

- Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para ^{13}C) – DQ/UFSCar;
- AVANCE III 400NANO Varian 9,4 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para ^{13}C) – DQ/UFSCar.

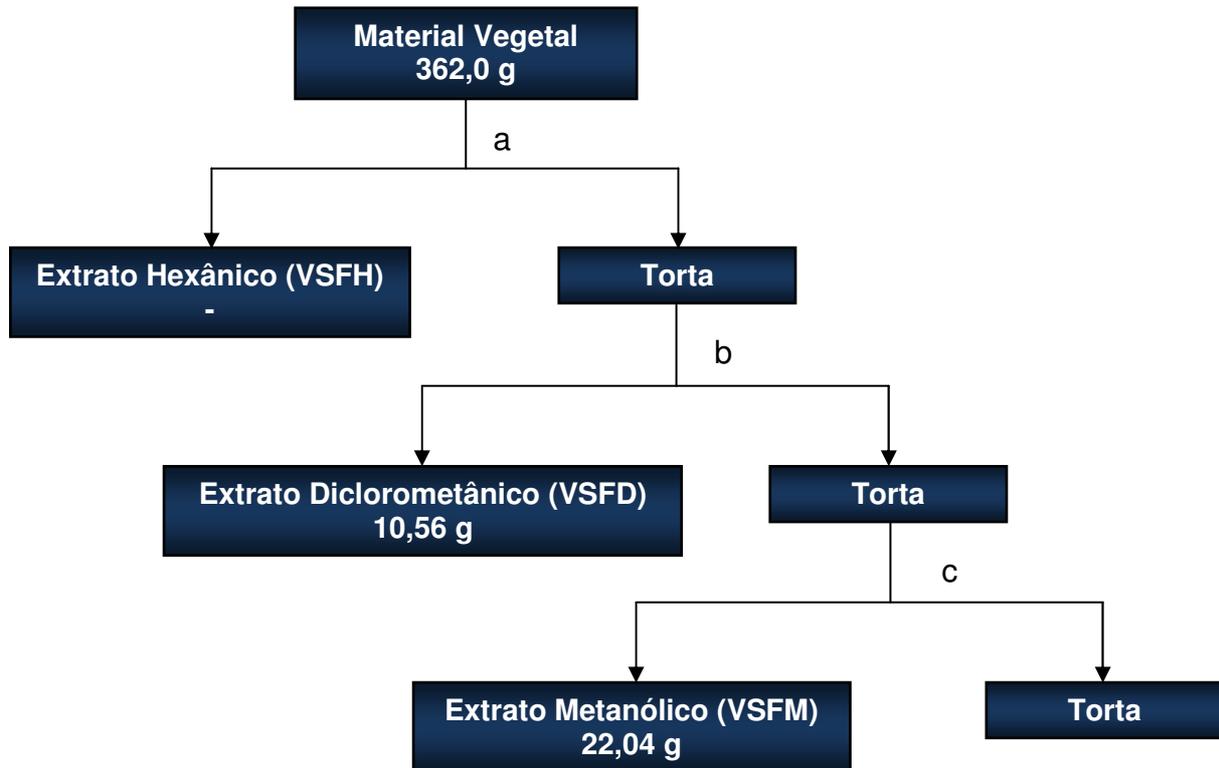
3.3 – Material Botânico

As partes vegetais de *Viola sebifera* foram coletadas na reserva de cerrado da Fazenda Canchim pelo professor Dr. João Batista Fernandes. A identificação da espécie foi feita pela Dr. Maria Helena Antunes de Oliveira e Souza, professora do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, onde podem ser encontradas exsicatas das mesmas.

3.4 – Obtenção dos Extratos de *Viola sebifera*

Os extratos brutos foram preparados anteriormente pela técnica Dorai Periotto Zandonai do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As partes vegetais, folhas e galhos, foram secas em estufa de circulação a 40 °C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material vegetal seco e moído das folhas foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada extração utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade Hexano (VSFH), Diclorometano (VSFD), Metanol (VSFM) (Fluxograma 3.1).

O material vegetal dos galhos foi submetido à extração apenas com Etanol (VSGE) seguindo o procedimento descrito anteriormente (Fluxograma 3.2).



FLUXOGRAMA 3.1 – Fluxograma de preparo dos extratos de folhas de *Virola sebifera*.

- a) Extração com Hexano
- b) Extração com Diclorometano
- c) Extração com Metanol



FLUXOGRAMA 3.2 – Fluxograma de preparo do extrato de galhos de *Virola sebifera*.

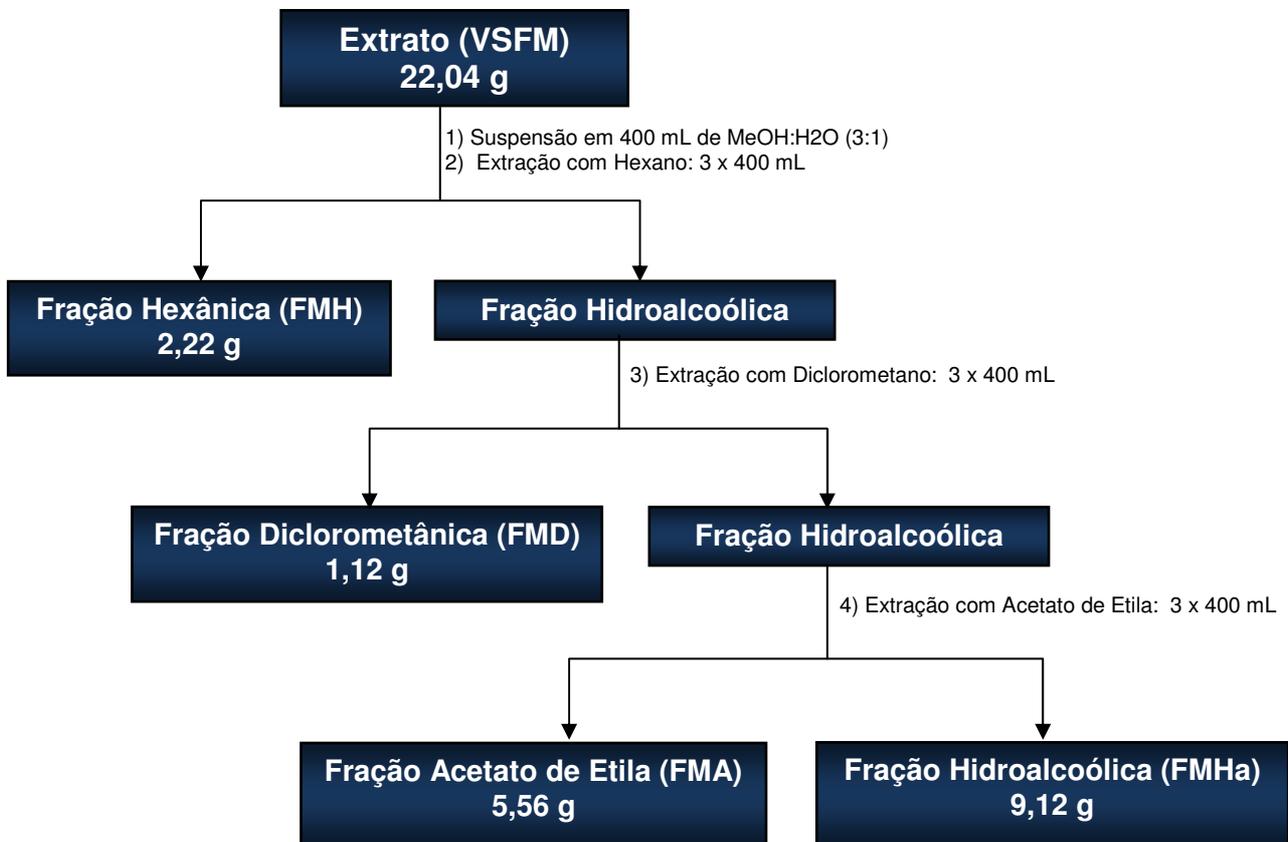
- a) Extração com Etanol

3.5 – Fracionamento dos Extratos e Frações de *Virola sebifera*

Os extratos citados anteriormente foram submetidos ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e, a partir dos resultados obtidos, iniciou-se o trabalho de fracionamento do extrato metanólico das folhas (VSFM).

3.5.1 – Partição Líquido-Líquido do Extrato Metanólico das Folhas de *Virola sebifera*

A metodologia empregada na partição líquido-líquido baseou-se no preparo de uma solução hidroalcoólica do extrato em questão onde este foi solubilizado em uma solução Metanol/H₂O (1:3) e subsequentemente extraído com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo-se quatro frações (Fluxograma 3.3). As frações foram então concentradas em evaporador rotatório até a eliminação completa dos solventes.



FLUXOGRAMA 3.3 – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido.

A partir da análise dos espectros de RMN de ^1H , as frações hexânica e diclorometânica foram reunidas (FMHD) para estudo devido à similaridade entre essas. A fração acetato de etila também foi escolhida para estudo com base no espectro de RMN de ^1H .

3.5.2 – Fracionamento da Fração FMHD (Fração Hexânica + Fração Diclorometânica) por Cromatografia Contracorrente

3.5.2.1 – Teste de Sistema de Solventes

De posse dos sistemas de solventes bifásicos a serem testados, estes foram preparados em tubos de ensaio, agitados em vortex e após o sistema entrar em equilíbrio, as fases aquosa e orgânica foram separadas. Adicionaram-se 2,0 mL de cada uma dessas fases a um tubo contendo 10 mg da fração FMHD. O tubo contendo a amostra e os solventes foi novamente agitado em vortex e, após o sistema entrar em equilíbrio, foi centrifugado. As fases orgânica e aquosa, contendo a amostra particionada, foram separadas. Iguais volumes de cada uma dessas fases foram secos em Speed-Vac, ressuspensos em MeOH e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.5.2.2 – Cálculo do Coeficiente de Partição por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O coeficiente de partição (K) é definido pela razão da concentração dos constituintes da amostra na fase móvel pela concentração desses constituintes na fase estacionária.

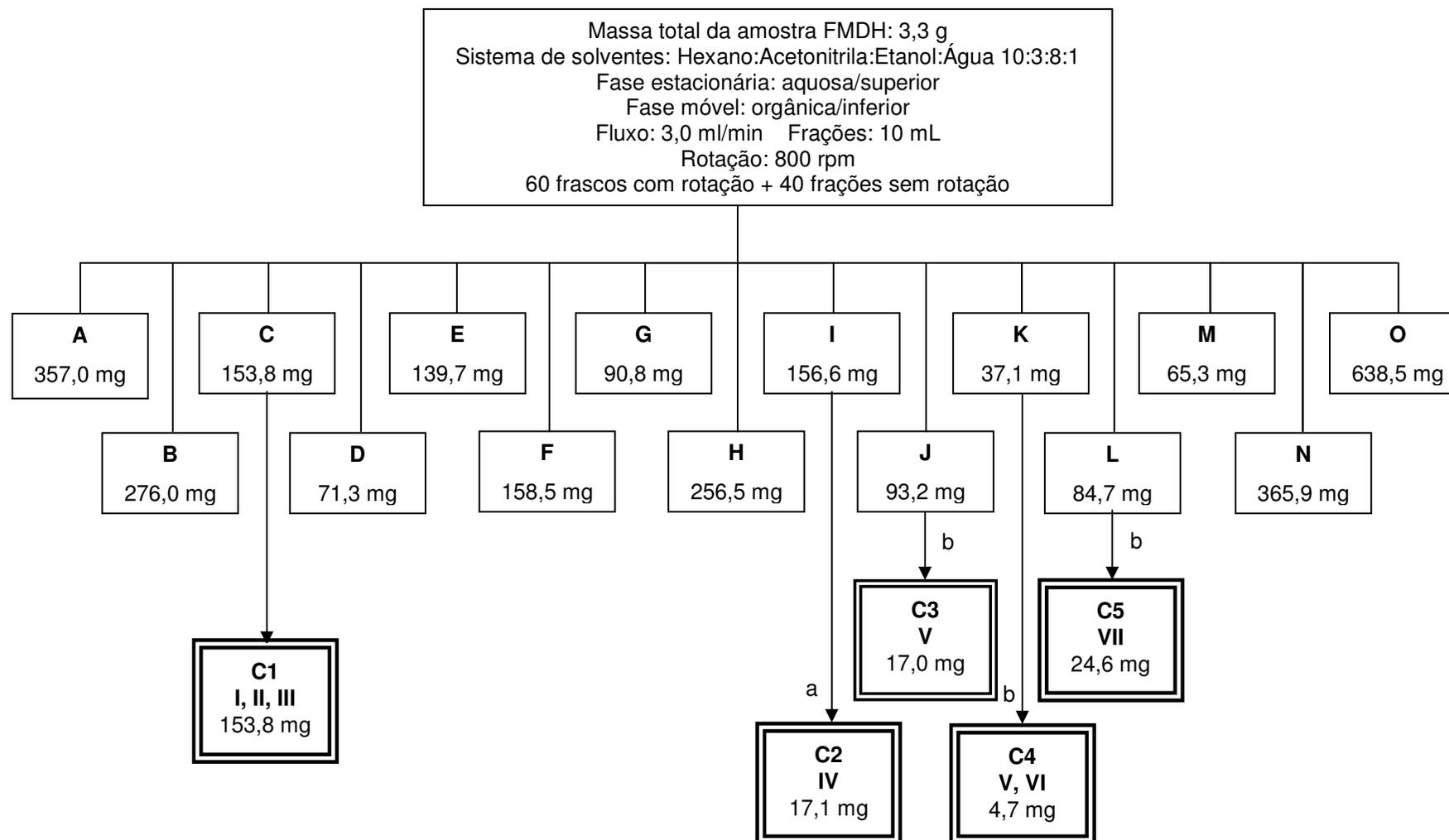
No trabalho em questão, dada a quantidade de compostos presentes na amostra, foi feita apenas uma análise qualitativa dos cromatogramas, onde se avaliou a intensidade e distribuição dos picos nos dois cromatogramas.

3.5.2.3 – Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia Contracorrente

Os sistemas de solventes selecionados para a separação por CCC foram misturados nas proporções definidas e equilibradas em funil de separação à temperatura ambiente. As fases superior e inferior foram separadas antes de serem utilizadas e desgaseificadas em aparelho de ultra-som por 15 min. A solução contendo a amostra foi preparada por solubilização da amostra em mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes.

3.5.2.4 – Separação dos Constituintes da Fração FMHD (Fração Hexânica + Fração Dilorometânica) de Folhas de *Virola sebifera*

O fracionamento da fração FMHD foi desenvolvido utilizando o sistema de solventes hexano:acetonitrila:etanol:água 10:3:8:1, no modo de eluição normal (cauda-cabeça), fluxo de 3,0 mL/min, rotação de 800 rpm. No total, foram realizados 6 fracionamentos para se obter massas adequadas para estudos posteriores das frações. Para cada fracionamento a massa de amostra solubilizada era de aproximadamente 550 mg da fração FMHD. Foram coletadas para cada fracionamento, frações de 10 mL cada, sendo 60 frações com a rotação ligada e 40 frações com a rotação desligada. As frações coletadas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD gerando 15 frações. As frações obtidas foram repurificadas por cromatografia em coluna utilizando sílica-gel como fase estacionária. Todo esse processo de separação gerou o isolamento de uma mistura de acilresorcinóis (substâncias **I**, **II** e **III**) e 4 lignanas (substâncias **IV**, **V**, **VI** e **VII**) (Fluxograma 3.4). Nas frações A e B observou-se apenas a presença de ácidos graxos o que não despertou o interesse por essas frações. As demais frações, que são ainda ricas em lignanas, não foram estudadas devido ao tempo, mas deverão ser investigadas a fins de publicações.



FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração FMDH.

- a) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ($\phi = 2,3$ cm, $h = 40$ cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), frações de 20 mL, eluição gradiente: Hexano:Diclorometano:Metanol
- b) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ($\phi = 2,3$ cm, $h = 30$ cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), frações de 20 mL, eluição gradiente: Hexano:Diclorometano:Metanol

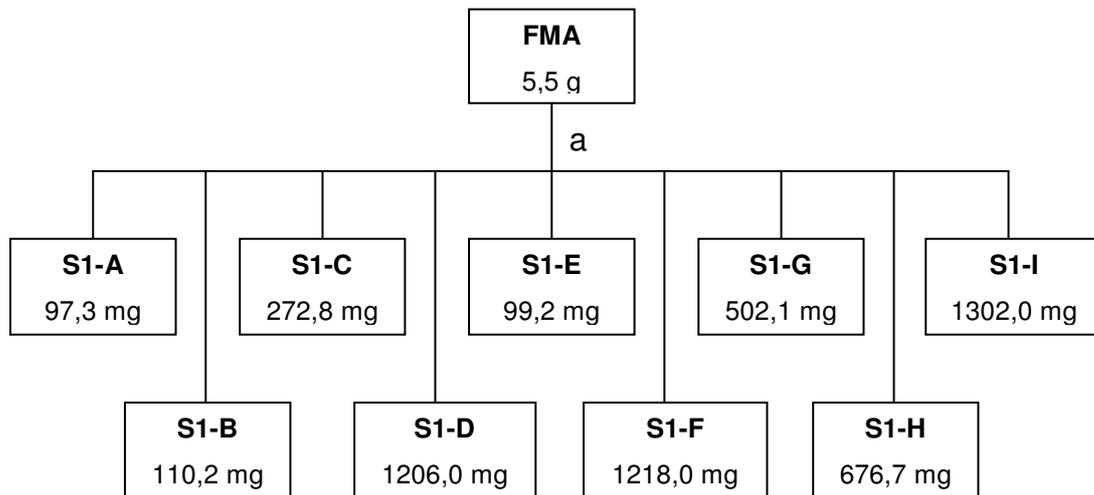
3.5.2.5 – Procedimento de derivatização de hidroxilas fenólicas

A fração C foi derivatizada para análise no CG-EM através de silição de hidroxilas utilizando BSA e piridina.

A um tubo de ensaio contendo 1,0 mg da amostra, adicionou-se 250 µL de BSA, 250 µL de TMCS e 100 µL de piridina. Em seguida, aqueceu-se a mistura reacional a 60 °C por aproximadamente 45 min. Após o resfriamento, adicionou-se 200 µL de ciclohexano e 1000 µL de água. Após a completa decantação, fase orgânica límpida, retirou-se uma alíquota dessa fase e esta foi analisada por CG-EM (IE).

3.5.3– Fracionamento da Fração FMA (Fração Acetato de Etila)

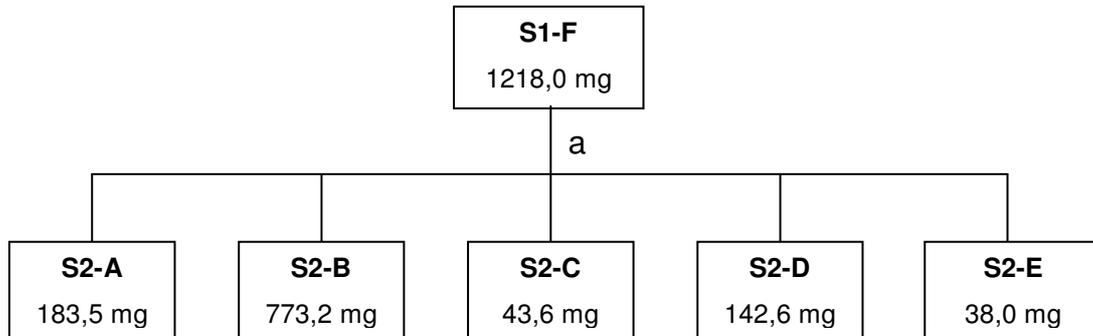
A fração acetato de etila (FMA) do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* foi submetida a sucessivos processos de purificação por cromatografia por exclusão utilizando sephadex-LH 20 como fase estacionária. No primeiro processo (Fluxograma 3.5), obtiveram-se 9 frações e após a análise por CCD apenas a fração F foi trabalhada. As demais frações continham principalmente pigmentos.



FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento de FMA.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ($\phi = 3$ cm, $h = 88$ cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

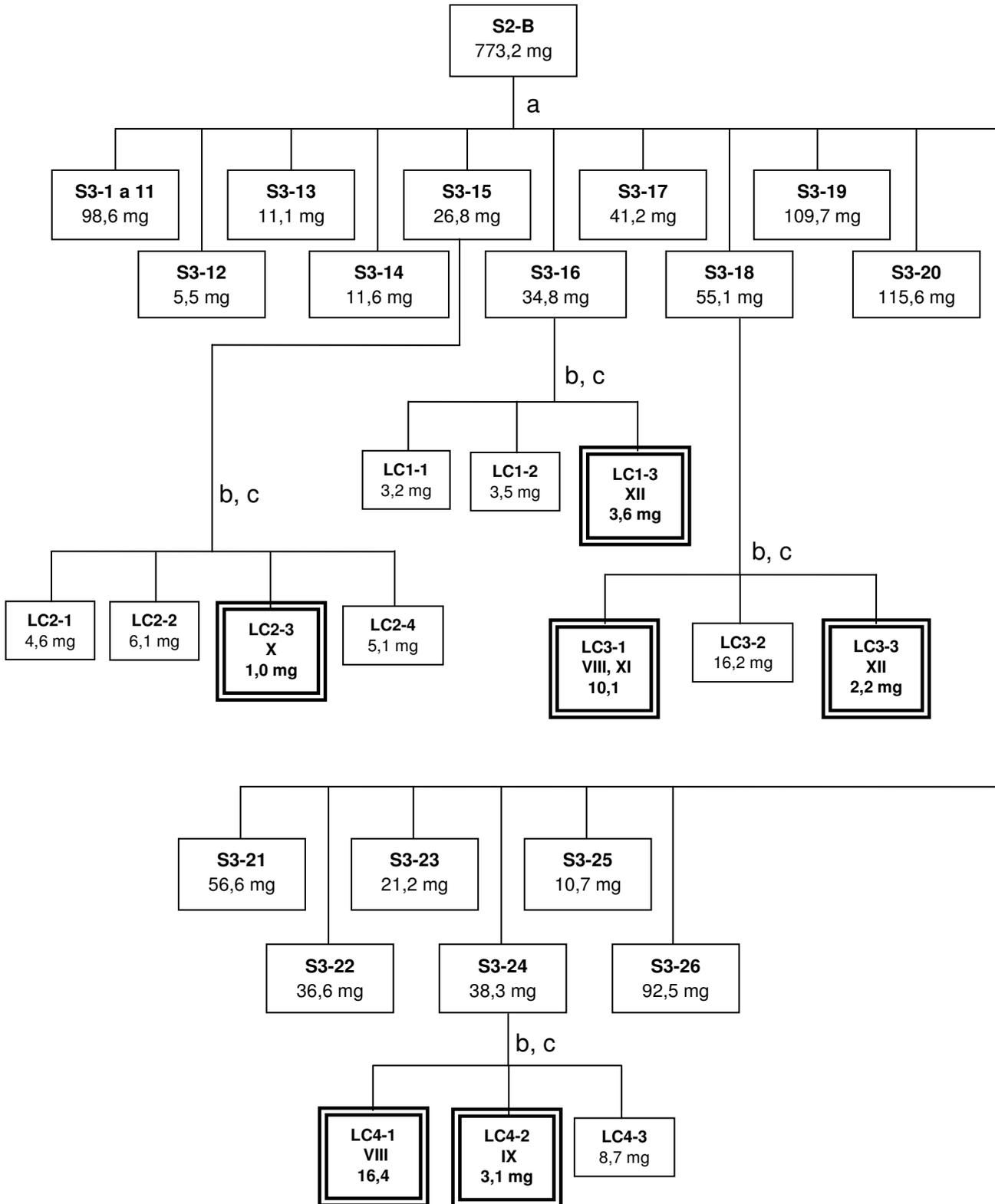
No segundo processo, a fração S1-F obtida do primeiro fracionamento da fração acetato do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera*, foi novamente fracionada por cromatografia por exclusão utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária (Fluxograma 3.6) onde se obtiveram 5 frações. Após a análise por CCD a fração S2-B foi trabalhada e as demais continham pigmentos.



FLUXOGRAMA 3.6 – Fracionamento de S1-F.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ($\phi = 3$ cm, $h = 88$ cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

Seguiu-se o trabalho de fracionamento apenas com a fração S2-B. Esta foi então submetida a uma nova cromatografia por exclusão utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária (Fluxograma 3.7), onde se obteve 16 frações.



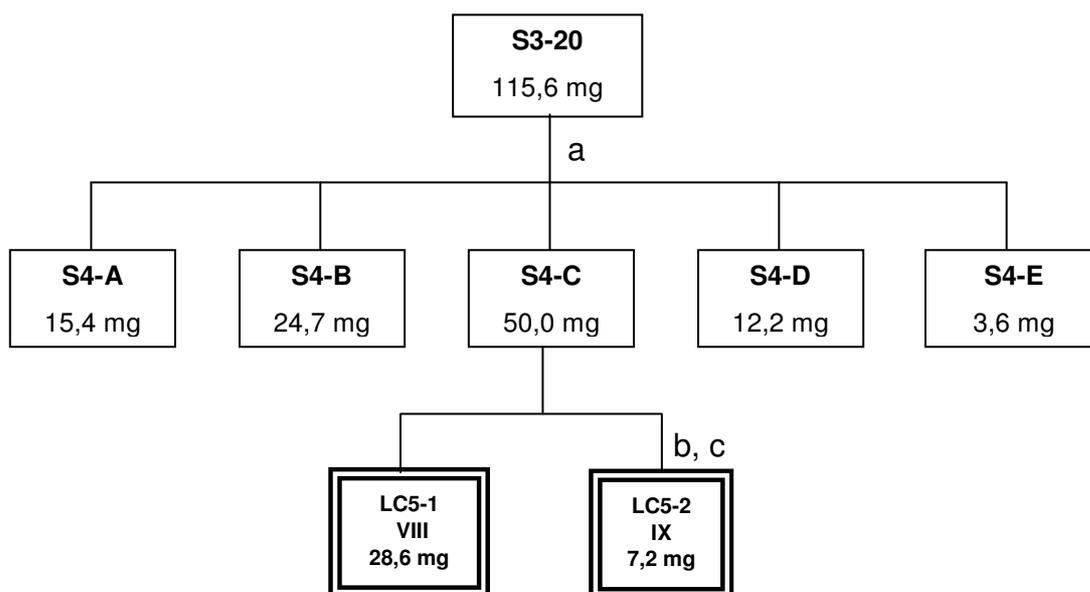
FLUXOGRAMA 3.7 – Fracionamento dos flavonóides VIII-XII.

Condições do Fluxograma 3.7:

- a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ($\varnothing = 3$ cm, $h = 88$ cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.
- b) CLAE analítico: coluna C-18 Phenomenex Luna 10 μm ($\varnothing = 0,46$ cm, $h = 25$ cm), gradiente de eluição MeOH:H₂O 10-100% A por 55 minutos com 0,1% de ácido acético v/v, volume de injeção: 20 μL , fluxo: 1,0 mL/min, λ : 254 nm.
- c) CLAE preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna 10 μm ($\varnothing = 1,0$ cm, $h = 25$ cm), eluição isocrática MeOH:H₂O 40:60 com 0,1% de ácido acético v/v, loop de 200 μL , fluxo: 4,5 mL/min, λ : 254 nm.

Dentre as frações obtidas do fracionamento de S2-B, algumas foram trabalhadas por CLAE, frações S3-15, S3-16, S3-18 e S3-24, onde se identificou alguns flavonóides puros e em mistura, substâncias **VIII**, **IX**, **X**, **XI** e **XII**. Dessas análises obtiveram-se também amostras com outros flavonóides em mistura de difícil identificação.

A amostra S3-20 foi submetida a um novo fracionamento por cromatografia de exclusão utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária e das frações obtidas, a fração S4-C foi trabalhada por CLAE resultando no isolamento dos flavonóides já obtidos **VIII** e **IX** (Fluxograma 3.8) nas mesmas condições descritas para o Fluxograma 3.6.



FLUXOGRAMA 3.8 – Fracionamento de S3-20.

3.5.4 – Metodologia dos Ensaio Biológicos

3.5.4.1 – Ensaio por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizadas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pelas alunas Tais Garcia Freitas, Marcela Ceccato e Nathalia Lorenzon sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

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

A dieta para manutenção das formigas (Controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 e 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada. O material a ser testado foi pesado, dissolvido no mesmo solvente em que ocorreu sua extração e incorporado na dieta (BUENO *et al.*, 2005).

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento divididas em grupos de dez formigas e mantidas em 5 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa acima de 70,0% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ($p < 0,05$), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

3.5.4.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Os ensaios com o fungo simbiote *L. gongylophorus* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela alunas Denise C. Martins e Sônia P. Cardoso, sob coordenação da Dra. Ana Paula Terezan.

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

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporadas ao meio de cultura e solubilizados em água destilada. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120 °C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*. As amostras foram preparadas em réplicas. O tempo de incubação foi de aproximadamente 30 dias, a 25 °C (± 2), onde foram realizados os cálculos das áreas do crescimento micelial do fungo simbiote em cada amostra (adaptação MIYASHIRA, 2007). As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbiote dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbiote.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Estudo Fitoquímico de *Virola sebifera* (FMDH) por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade

4.1.1 – Escolha do Sistema de Solventes e Separação dos Constituintes da Fração FMHD

A seleção do sistema de solventes é a etapa mais importante da cromatografia contracorrente. Como a CCC utiliza sistemas de solventes bifásicos isto resulta em um grande número de combinações de solventes com ampla faixa de polaridade (STICHER, 2008).

Os sistemas de solventes bifásicos para utilização em CCC foram organizados em famílias que são compostas por solventes misturados em diferentes proporções. Estas famílias distinguem-se uma da outra pela faixa de polaridade que abrangem, fornecendo meios metodológicos de busca do sistema de solventes ideal (FRIESEN & PAULI, 2007).

Foi feita uma análise inicial da amostra onde esta foi submetida a um gradiente exploratório CLAE MeOH:H₂O 10-100% por 55 minutos (Figura 4.1) onde verificou-se a presença de muitas substâncias diferentes na mesma, o que tornava difícil o cálculo do coeficiente de partição (K) para as substâncias em cada sistema testado. Por este motivo, foi feita apenas análise qualitativa dos cromatogramas, onde eram avaliadas a intensidade e distribuição dos picos nos cromatogramas referentes às fases orgânica e aquosa.

Partindo dos dados de literatura que revelam a grande ocorrência de lignanas e neolignanas em plantas do gênero *Virola*, os primeiros sistemas de solventes testados para o estudo da fração FMDH foram escolhidos com base em sistemas de solventes para purificação de lignanas por cromatografia contracorrente já descritos em literatura. Inicialmente foram testados oito sistemas obtidos da literatura conforme descrito na Tabela 4.1.

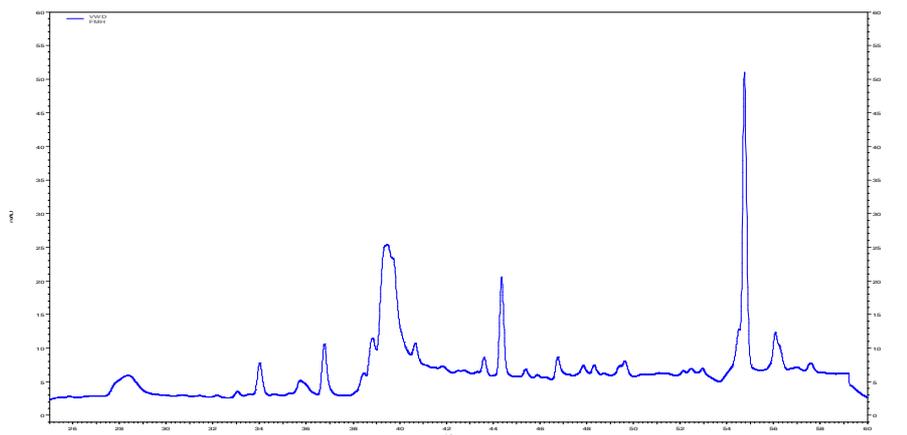


FIGURA 4.1 - Cromatograma da fração FMDH (FMH e FMD reunidas) modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (10 μm , 25,0 x 0,46 cm); eluente MeOH:H₂O 10-100% por 55 minutos; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detector ultravioleta 254 nm.

TABELA 4.1 – Sistemas de solventes testados no primeiro teste (Teste 1)

| Sistemas de solventes | Proporções | Literatura |
|------------------------------------|-------------|-----------------------------|
| AcOEt:n-BuOH:H ₂ O | 2:5:7 | SHUYUN <i>et al.</i> , 2008 |
| AcOEt:n-BuOH:H ₂ O | 2:7:9 | PENG <i>et al.</i> , 2005b |
| AcOEt:n-BuOH:EtOH:H ₂ O | 10:1:2:10 | WANG <i>et al.</i> , 2005 |
| Hex:AcOEt:MeOH:H ₂ O | 6:4:5:5 | GNABRE <i>et al.</i> , 1996 |
| Hex:AcOEt:MeOH:H ₂ O | 1:0,9:0,9:1 | PENG <i>et al.</i> , 2005a |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 1:9:1:9 | LI e CHEN, 2005 |
| Hex:MeOH:H ₂ O | 35:30:3 | HUANG <i>et al.</i> , 2005 |
| EtOEt:AcOEt:MeOH:H ₂ O | 1:0,4:1:0,5 | WANG <i>et al.</i> , 2009 |

Esses sistemas foram então testados nas proporções acima indicadas pelo teste de partição em tubo falcon seguido de análise por CLAE onde o melhor resultado obtido foi para o sistema Hex:AcOEt:EtOH:H₂O 1:9:1:9. No entanto a concentração dos compostos na fase orgânica foi consideravelmente maior que na fase aquosa, indicando a necessidade de diminuir a polaridade do sistema.

A diminuição da polaridade do sistema é feita com o aumento da proporção de hexano relativa à de acetato de etila e/ou diminuição da proporção de água relativa à de etanol. Inversamente, o aumento da polaridade do sistema é feita com a diminuição da proporção de hexano relativa à de acetato de etila e/ou diminuição da proporção de etanol relativa à de água.

No caso em questão, para promover a diminuição da polaridade do sistema, poderia diminuir as quantidades de acetato de etila e/ou de água, ou aumentar as quantidades de hexano e/ou etanol. Foram então propostos sete novos sistemas onde diminuiu-se gradativamente a quantidade de acetato de etila ou aumentou-se a quantidade de hexano (Tabela 4.2)

TABELA 4.2 – Sistemas de solventes testados no segundo teste (Teste 2)

| Sistemas de solventes | Proporções |
|---------------------------------|------------|
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 1:8,5:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 1:8:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 1:7:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 1:6:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 2:8:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 2:7:1:9 |
| Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O | 2:6:1:9 |

Os resultados mostraram que a partição das substâncias entre as fases orgânica e aquosa melhorava à medida que se diminuía a polaridade dos sistemas. No entanto, nenhum desses sistemas mostrou ainda uma partição adequada entre as duas fases, a maior parte das substâncias permanecia ainda na fase orgânica.

O solvente acetonitrila é conhecido por sua seletividade e, consultando literatura verificou-se que no trabalho de DEGENHARDT *et al.*, 2002 a utilização deste solvente em um sistema empregado na purificação de lignanas por cromatografia contracorrente. Dessa forma, foi feita a substituição do solvente acetato de etila por acetonitrila testando-se inicialmente, um sistema de baixa polaridade, hexano:acetonitrila:etanol:água 10:1:8:1.

De posse dos resultados, observou-se a necessidade de aumentar a polaridade do sistema e isto foi conseguido pelo aumento gradativo na proporção de acetonitrila, conforme descrito na Tabela 4.3. Dos sistemas testados o sistema hexano:acetonitrila:etanol:água 10:3:8:1 mostrou melhor resultado e foi selecionado para início dos trabalhos por CCC.

TABELA 4.3 – Sistemas de solventes testados no terceiro teste (Teste 3)

| Sistemas de solventes | Proporções |
|------------------------------------|-----------------|
| Hex:ACN:EtOH:H ₂ O | 10:1:8:1 |
| Hex:ACN:EtOH:H ₂ O | 10:2:8:1 |
| Hex:ACN:EtOH:H₂O | 10:3:8:1 |
| Hex:ACN:EtOH:H ₂ O | 10:4:8:1 |
| Hex:ACN:EtOH:H ₂ O | 10:5:8:1 |
| Hex:ACN:EtOH:H ₂ O | 10:6:8:1 |

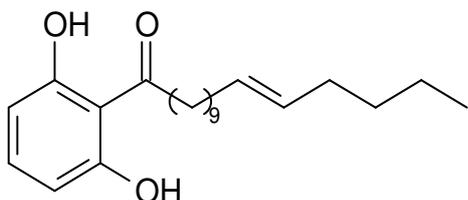
A purificação da amostra FMDH por cromatografia contracorrente resultou na obtenção de quatro lignanas, uma do tipo furofurânica, sesamina e três do tipo dibenzilbutirolactônicas, (-)-hinokinina, (+)-isohinokinina e (-)-kusunokinina e uma mistura de acilresorcinóis.

As demais frações obtidas das injeções no cromatógrafo contracorrente apresentam ainda grande potencial para serem estudadas, pois as análises preliminares de RMN de ¹H indicaram a presença de mais compostos, possivelmente liganas por apresentarem sinais de hidrogênios aromáticos, grupos metoxila e metilenodióxi, e sinais característicos dos anéis furofurânicos e/ou butirolactônicos.

4.2 – Substâncias Identificadas

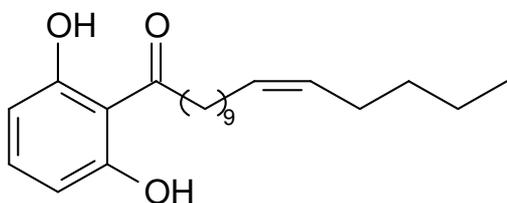
O estudo fitoquímico de *Virola sebifera* permitiu o isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes: policetídeos (acilresorcinóis), lignanas e flavonóides. Para facilitar a identificação estrutural dos metabólicos isolados, estes serão discutidos por classes.

Acilresorcinóis



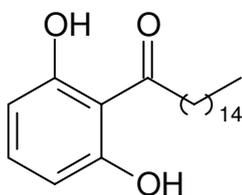
I

(11'*E*)-1-hexadec-11'-enoil-2,6-dihidroxi-benzeno
Massa: 153,8 mg (em mistura)
Isolamento: p. 34
Identificação: p. 50



II

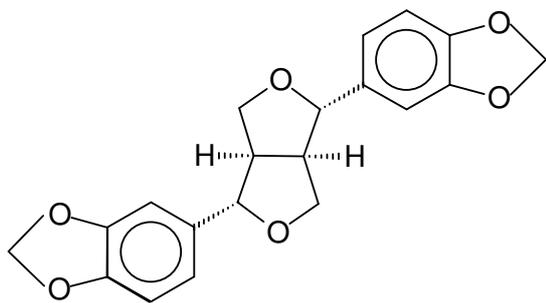
(11'*Z*)-1-hexadec-11'-enoil-2,6-dihidroxi-benzeno
Massa: 153,8 mg (em mistura)
Isolamento: p. 34
Identificação: p. 50



III

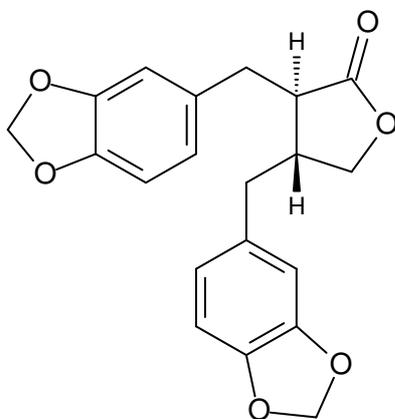
1-hexadecanoil-2,6-dihidroxi-benzeno
Massa: 153,8 mg (em mistura)
Isolamento: p. 34
Identificação: p. 50

Lignanas



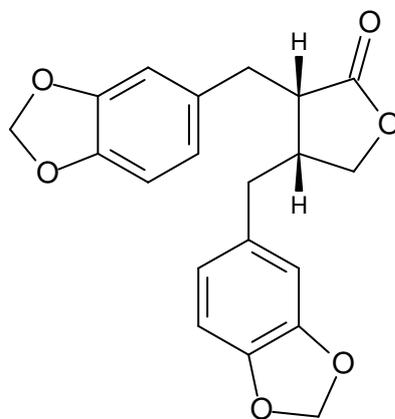
IV

Sesamina
 Massa: 17,1 mg
 Isolamento: p. 34
 Identificação: p. 61



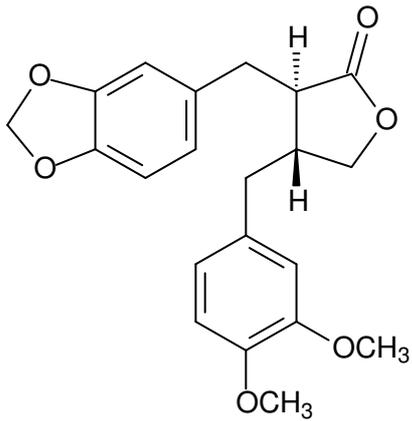
V

(-)-Hinokinina
 Massa: 4,7 mg (em mistura) e 17,0 mg (pura)
 Isolamento: p. 34
 Identificação: p. 67



VI

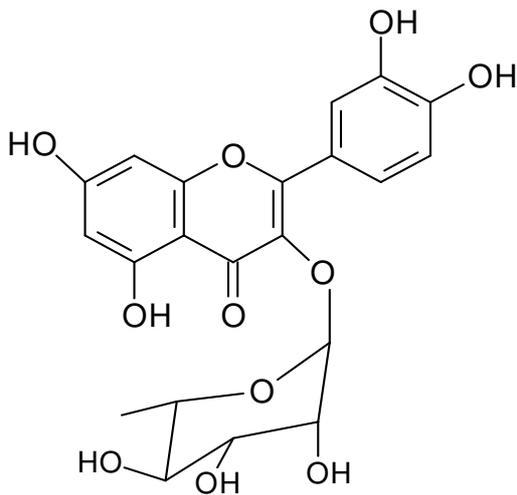
(+)-Isohinokinina
 Massa: 4,7 mg (em mistura)
 Isolamento: p. 34
 Identificação: p. 67



VII

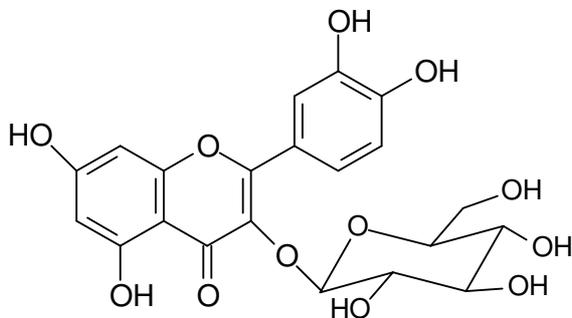
(-)-Kusunokina
 Massa: 24,6 mg
 Isolamento: p. 34
 Identificação: p. 79

Flavonóides



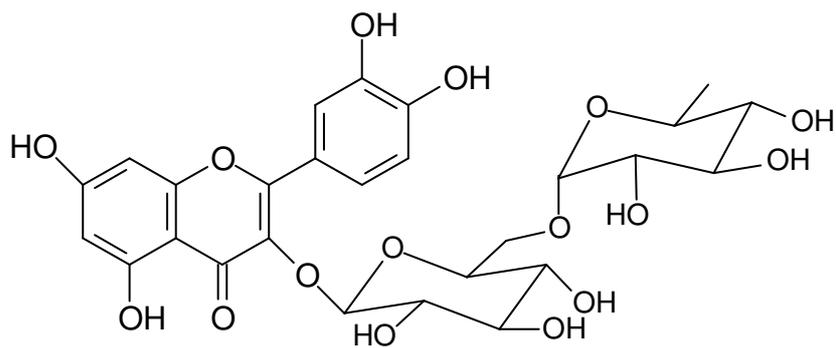
VIII

Quercitrina (Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo)
 Massa: 10,1 mg (em mistura) e 45,0 mg (puro)
 Isolamento: p. 37 e 38
 Identificação: p. 88



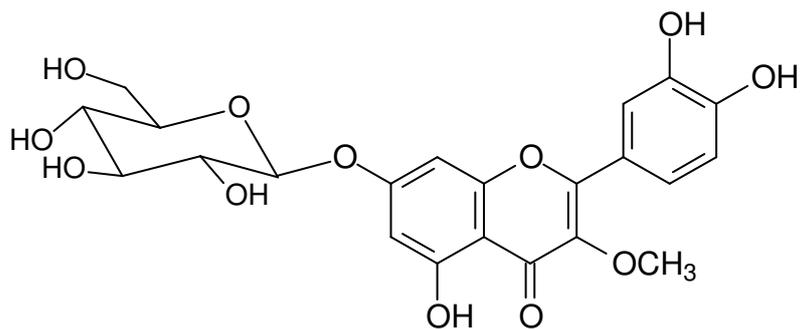
IX

Isoquercetina (Quercetina-3-O- β -D-glicosídeo)
 Massa: 10,3 mg
 Isolamento: p. 37 e 38
 Identificação: p. 96



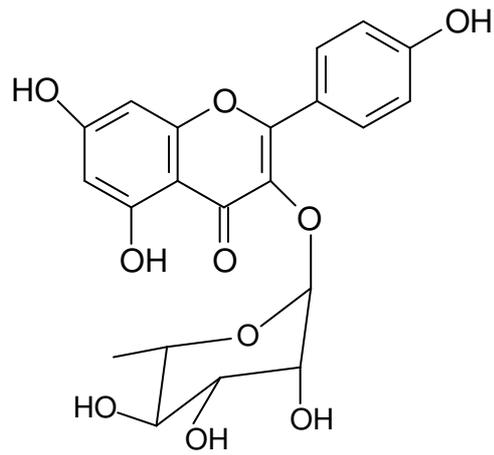
X

Rutina (Quercetina-3-O- β -D-glicose-6"-O- α -L-raminosil
 Massa: 1,0 mg
 Isolamento: p. 37
 Identificação: p. 103



XI

Quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo
 Massa: 10,1 mg (em mistura)
 Isolamento: p. 37
 Identificação: p. 109



XII

Afzelina (Kaempferol-3-*O*- α -L-raminoiranosídeo)

Massa: 5,8 mg

Isolamento: p. 37

Identificação: p. 117

4.3 – Identificação Estrutural

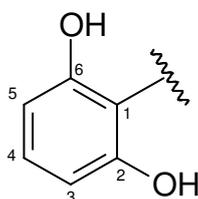
4.3.1 – Policetídeos - Acilresorcinóis

4.3.1.1 – Identificação Estrutural das Substâncias I, II e III.

A fração C, obtida das injeções realizadas no cromatógrafo contracorrente continha as substâncias I, II e III. Essas substâncias foram estruturalmente identificadas por experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, CG-EM e comparação com a literatura (KATO *et al.*, 1985).

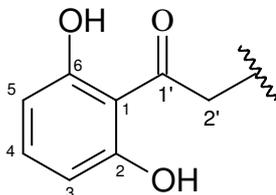
Os dados do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.4) indicavam tratar-se de uma única substância e, somente depois da análise por CG-EM é que se confirmou que se tratava de uma mistura. Isto indica que as substâncias presentes na mistura apresentam estrutura química geral similar. Por este motivo, serão discutidos inicialmente os dados de ressonância magnética nuclear pra identificar esta estrutura geral.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H foram observados sinais de hidrogênios aromáticos característicos de sistema 2,6-substituído: δ_{H} 7,19 (*t*, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,39 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 2H), o primeiro sinal atribuído ao hidrogênio H-4 do anel acopla em *orto* com os hidrogênios H-3 e H-5, atribuídos ao segundo sinal. Este acoplamento pode ser observado pela correlação entre esses sinais no mapa de contornos COSY (Figura 4.5).



Através do espectro de HSQC (Figura 4.6) os carbonos δ_{C} 108,3 (C-3/C-5) e δ_{C} 136,0 (C-4) puderam ser atribuídos. No mapa de correlações HMBC (Figura 4.7), o sinal do hidrogênio H-4 apresentou correlações com os sinais dos carbonos δ_{C} 108,3 (C-3/C-5); δ_{C} 110,1 (C-1) e δ_{C} 161,4 (C-2/C-6) e o dos hidrogênios H-3 e H-5 apresentaram correlações com os sinais dos carbonos δ_{C} 110,1 (C-1); δ_{C} 161,4 (C-2/C-6) e com um sinal de carbono carbonílico (C-1') em δ_{C} 208,7, indicando ter um grupo carbonílico α ao anel aromático. Os sinais de

hidrogênios δ_H 3,13 (*t*, $J = 7,2$ Hz, 2H) (H-2'), grupo CH_2 , também apresentaram correlação com o sinal de carbono carbonílico indicando ser um grupo vizinho a esta carbonila (α -carbonílico).



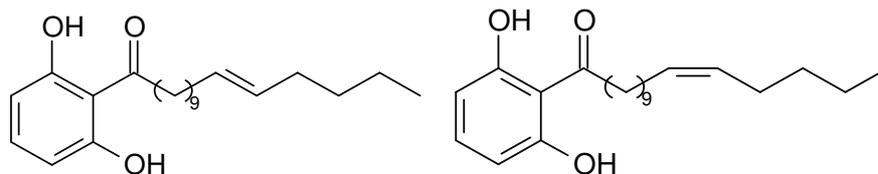
No mapa de contornos COSY os sinais dos hidrogênios H-2' apresentaram correlação com um segundo grupo CH_2 , δ_H 1,67 (*qt*, $J = 7,2$ Hz, 2H; H-3') (β -carbonílico), e este por sua vez apresentou correlação com o multipletto δ_H 1,22-1,35, integrado para 18H, que indica 9 grupos CH_2 . Essas correlações indicam ter no mínimo três grupos CH_2 em cadeia ligados ao grupo carbonílico.

A observação do sinal δ_H 5,32 (*m*, 2H), no espectro de RMN de ^1H , caracteriza a presença de uma dupla ligação na cadeia lateral da substância em questão. Foi observado ainda, um multipletto em δ_H 1,99 integrado para quatro hidrogênios e, a correlação entre este sinal e os hidrogênios da dupla ligação, δ_H 5,32, indica que o primeiro sinal refere-se aos dois grupos CH_2 vizinhos a esta ligação dupla.

Assim, como os dados do mapa de contornos COSY indicam existirem no mínimo três grupos CH_2 em cadeia ligados ao grupo carbonílico, e os dados de RMN de ^1H mostram mais dois grupos CH_2 alílicos diferentes desses três grupos iniciais, esses dados sugerem que há no mínimo quatro grupos CH_2 entre o grupo carbonílico (C-1') e a dupla ligação.

Esses dados conflitam com a literatura para acilresorcinóis isolados de *Virola sebifera* uma vez que o autor propõe a dupla ligação separada do grupo carbonílico por apenas dois grupos CH_2 . O autor se baseia na observação de sinais para dois α -prótons e para quatro prótons alílicos.

As correlações no COSY: do sinal correspondente a metila da cadeia longa em δ_H 0,85 atribuída aos isômeros insaturados com o sinal em δ_H 1,28, do sinal correspondente ao hidrogênio alílico δ_H 1,97 com δ_H 1,29 e deste último com o anterior (δ_H 1,28), sugerem que a dupla deve estar localizada nos carbonos 11' e 12'.



As integrações 1,75 e 2,0 para os sinais de hidrogênios olefínicos, δ_H 5,32 (*m*) (H-11'/H-12'), e α -carbonílicos, (H-2) δ_H 3,13 (*t*, $J = 7,2$ Hz), respectivamente, indicam que a relação entre o composto saturado e os insaturados é de aproximadamente 22,5 : 87,5%.

A amostra foi então submetida à análise por CLAE, onde o cromatograma confirmou se tratar de uma mistura de compostos. Após reação de silição com BSA em piridina (procedimento p. 35), a amostra derivatizada foi analisada por CG-EM (Figuras 4.2 e 4.3).

Os espectros de massas das substâncias I e II são exatamente iguais, com mesmo valor massa/carga (m/z) para o íon molecular e possuem mesmo padrão de fragmentação, indicando tratar-se de isômeros. O pico do íon molecular m/z 490 confirma a fórmula molecular $C_{28}H_{50}O_3Si_2$, que está de acordo com a estrutura geral apresentada abaixo, onde $m + n = 12$.

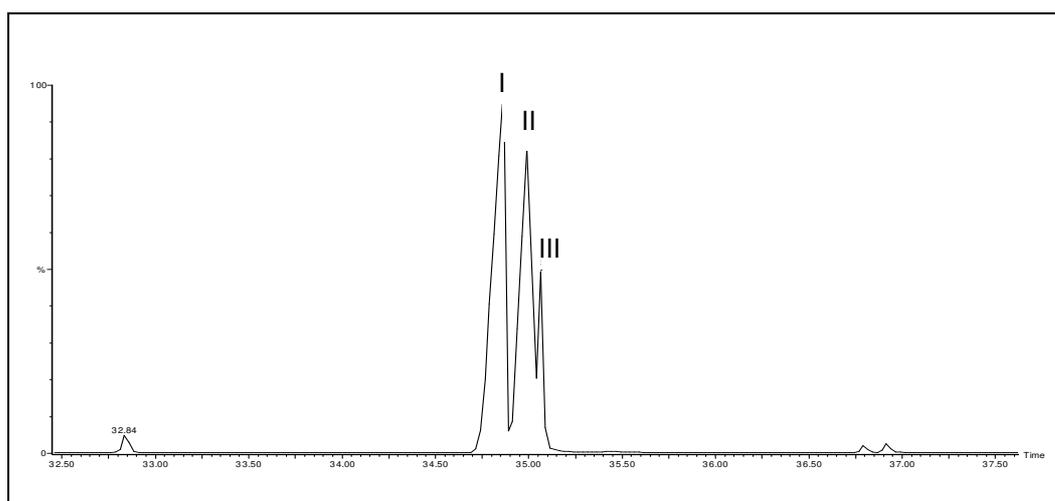
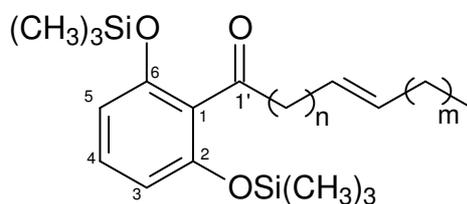


FIGURA 4.2 – Cromatograma gasoso da fração C, contendo as substâncias I, II e III.

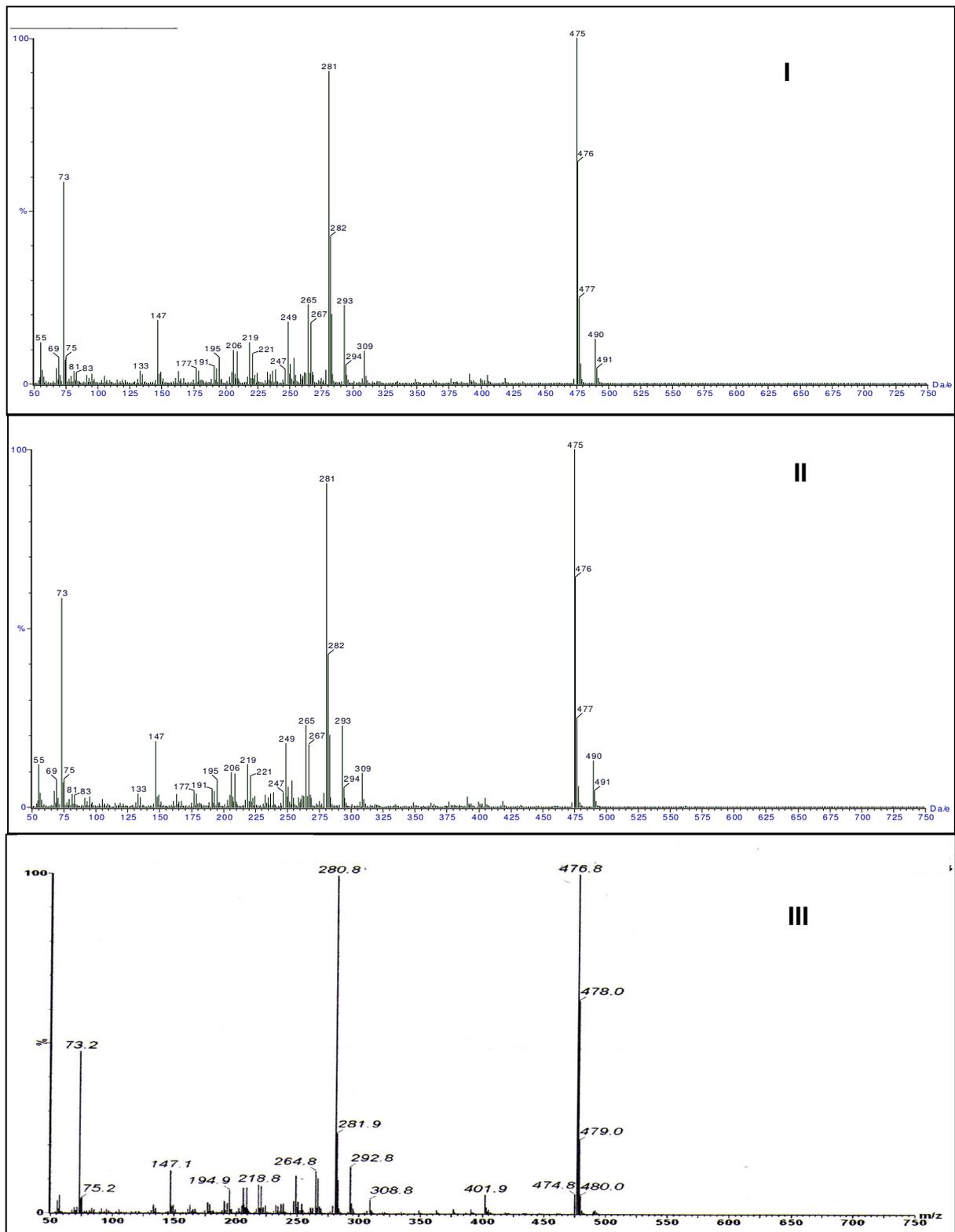


FIGURA 4.3 – Espectros de massas das substâncias I, II e III (EI = 70 e.V).

Os dados de espectrometria de massas não estão de acordo com o sugerido pela integração dos sinais no espectro de RMN de ^1H , pois o primeiro indica apenas 12 grupos CH_2 na estrutura, enquanto o segundo indica 13 grupos. O resultado mais confiável é o fornecido pelo espectro de massas, uma vez que o espectro de RMN de ^1H refere-se à mistura de três compostos.

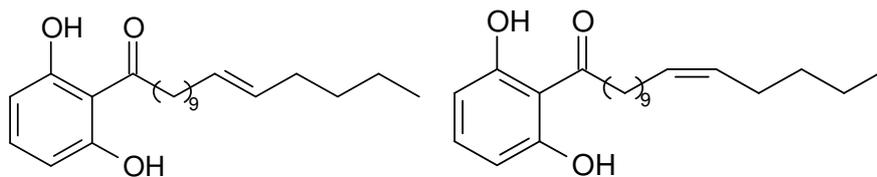
Foi proposto pela integração dos sinais de RMN de ^1H que a relação entre os isômeros saturado e os insaturados é de aproximadamente 22,5 : 87,5% e as áreas do cromatograma gasoso (Figura 4.2) indicam também esta proporção e que a relação entre os insaturados é de 60:40%, porém não foi possível determinar os isômeros *E* e *Z* dada a completa similaridade dos espectros.

As fragmentações que dão origem aos íons dos picos m/z 490, 475, 281 e 73, nos espectros de massas, estão representados no Esquema 4.1.

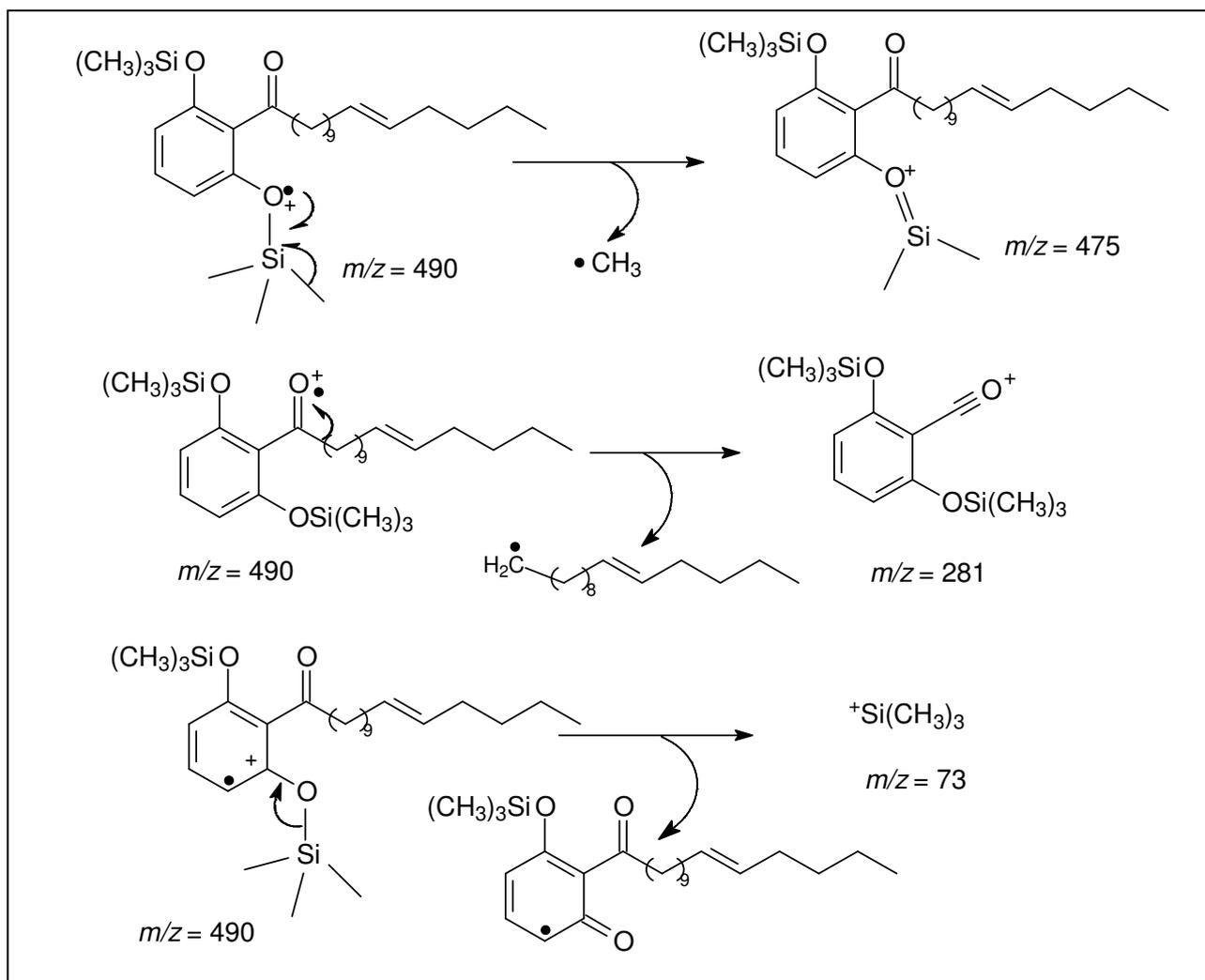
Para a confirmação da posição da dupla ligação necessita-se que essa fragmentação seja confirmada através de uma reação de derivatização da dupla ligação com dimetildissulfeto em solução de iodo. Esta derivatização tem sido utilizada com sucesso na localização de duplas insaturações (CARBALLEIRA e CRUZ, 1996; JHAM *et al.*, 2005; ROCHUT *et al.*, 2002; YUAN e YAN, 2002). A posição da dupla ligação nesses derivados pode ser facilmente determinada por espectrometria de massas devido à clivagem preferencial entre os carbonos sulfurados.

Para os compostos em questão era necessário derivatizar primeiro os grupos hidroxila, através de metilação desses grupos, para ser possível se analisar a amostra por CG-EM. As tentativas de se realizar estas duas reações não foram bem sucedidas devido à dificuldade de metilar a hidroxila quelada com o grupo carbonílico. Novas metodologias para esta reação deverão ser testadas a fim de se confirmar efetivamente a posição da insaturação.

Como os espectros de massa para as substâncias **I** e **II** confirmam que são isômeros, a proposta para estas substâncias é que sejam isômeros *cis/trans*, não sendo possível fazer a distinção entre eles baseado nos dados de RMN de ^{13}C , uma vez que esses dados foram obtidos para a mistura dos compostos o que impossibilitou a distinção entre os sinais referentes às duplas *cis* e *trans*. Assim, propõem-se para essas substâncias as estruturas químicas mostradas abaixo, onde a posição da ligação dupla está entre os carbonos C-11' e C-12'.

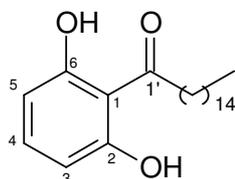


(11'E)-1-hexadec-11'-enoil-2,6-dihidroxi-benzeno e
(11'Z)-1-hexadec-11'-enoil-2,6-dihidroxi-benzeno (I e II)



ESQUEMA 4.1 – Proposta de fragmentação para as substâncias I e II.

No espectro de massas da substância **III** (Figura 4.3) não foi observado o pico do íon molecular devido à rápida fragmentação deste. Foi observado o pico m/z 477 bastante intenso e referente ao íon resultante da primeira fragmentação do íon molecular. Como a primeira fragmentação para os compostos sililados é a perda de uma metila do grupo trimetilsilano, a relação m/z para o íon molecular da substância **III** é 492. Este valor indica que a substância **III** apresenta estrutura similar às substâncias **I** e **II**, mas sem a insaturação. Esta proposta é ainda confirmada pelo padrão de fragmentação desta substância que é semelhante ao apresentado pelas duas primeiras substâncias, com picos principais m/z 293, 281, 265, 147 e 73. O mecanismo de fragmentação proposto para esta substância também é o mesmo apresentado para as substâncias **I** e **II**.



1-hexadecanoil-2,6-dihidroxibenzeno (**III**)

TABELA 4.4 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da fração C (mistura de substâncias I, II e III) e comparação com o (4'*Z*)-hexadecanoil-2,6-dihydrobenzeno (KATO *et al.*, 1985: CDCl_3 , 60 MHz para RMN de ^1H / 20 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz) | | H/C | δ_{C} (ppm) | |
|-----------------|--|---------------------------|-----------------|--|---------------------------|
| | Fração C | KATO <i>et al.</i> , 1985 | | Fração C | KATO <i>et al.</i> , 1985 |
| 1 | - | - | 1 | 110,1 | 110,3 |
| 2 | - | - | 2 | 161,4 | 161,5 |
| 3 | 6,39 (<i>d</i> , 8,0) | 6,40 (<i>d</i> , 8,0) | 3 | 108,3 | 108,4 |
| 4 | 7,19 (<i>t</i> , 8,0) | 7,23 (<i>t</i> , 8,0) | 4 | 136,0 | 135,9 |
| 5 | 6,39 (<i>d</i> , 8,0) | 6,40 (<i>d</i> , 8,0) | 5 | 108,3 | 108,4 |
| 6 | - | - | 6 | 161,4 | 161,5 |
| 1' | - | - | 1' | 208,7 | 208,6 |
| 2' | 3,13 (<i>t</i> , 7,2) | 3,15 (<i>t</i> , 7,0) | 2' | 44,8 | 44,8 |
| H olef. | 5,32 (<i>m</i>) | 5,36 (<i>t</i> , 4,0) | H olef. | 129,8; 129,9 e 130,0 | 128,4-129,9 |
| H alil. | 1,99 (<i>m</i>) | 1,6-2,1 (<i>m</i>) | H alil. | 22,3; 22,7; 27,2 e 26,9 24,5; 29,0; 29,2; 29,3; | 24,6 e 27,3 |
| CH ₂ | 1,22-1,35 | 1,31 (<i>m</i>) | CH ₂ | 29,4; 29,5; 29,6; 29,8; 31,8 e 32,0 | 29,0-32,0 |
| 16' | 0,86 (<i>t</i>) | 0,89 (<i>t</i>) | 16' | 14,1 | 14,1 |
| -OH | 10,36 (<i>s</i>) | 8,92 (<i>s</i>) | - | - | - |

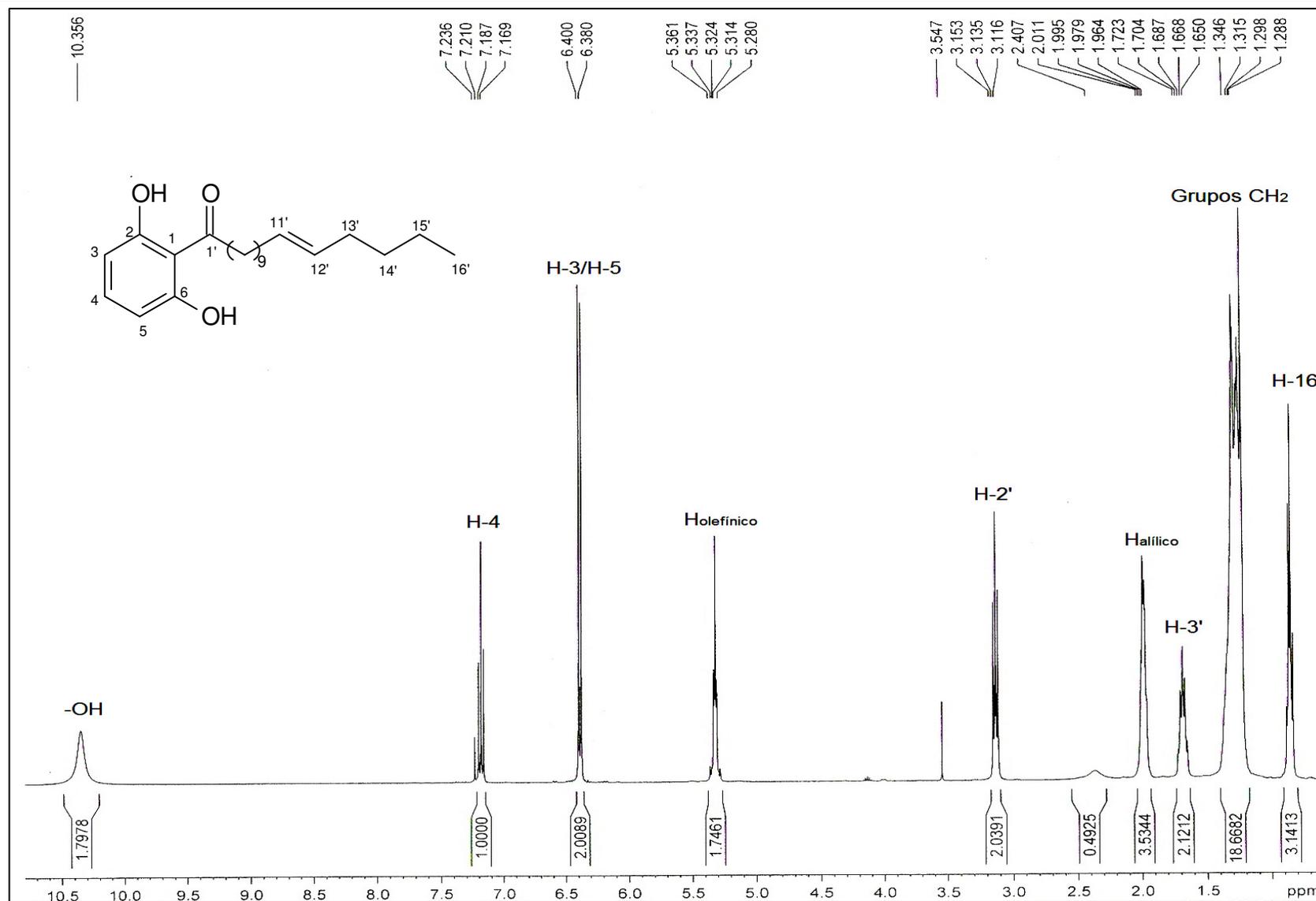


FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ^1H da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl_3).

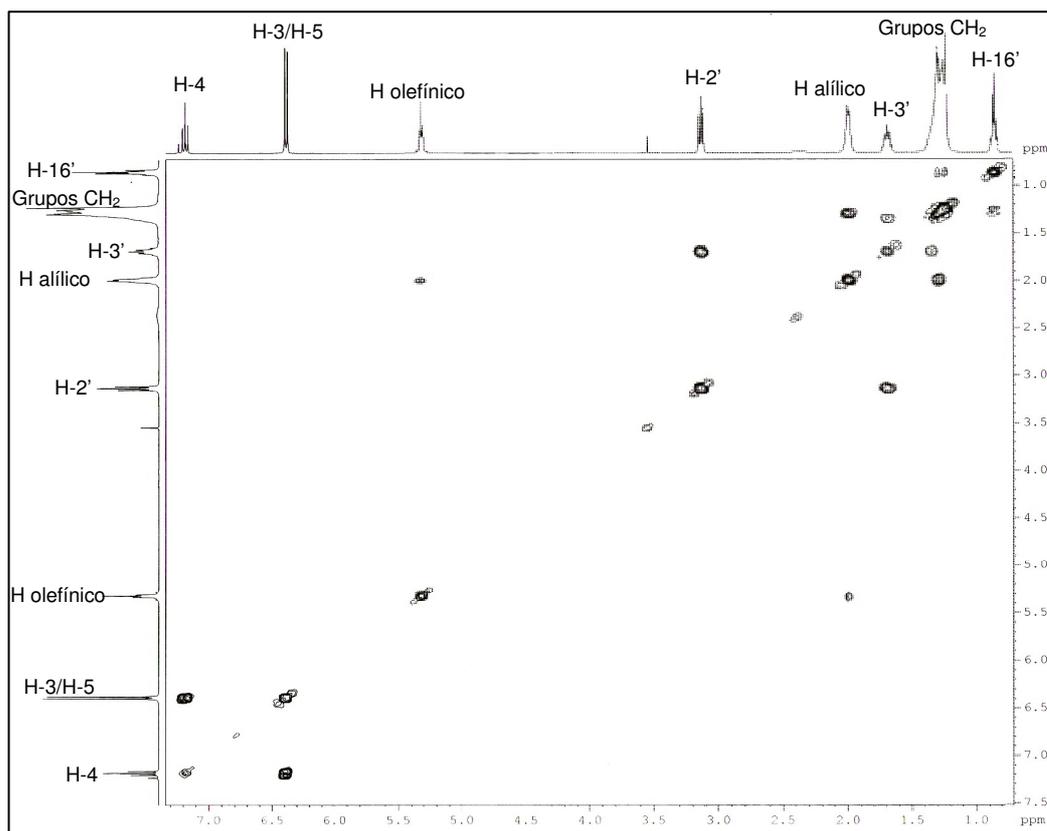


FIGURA 4.5 - Mapa de contornos COSY da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl₃).

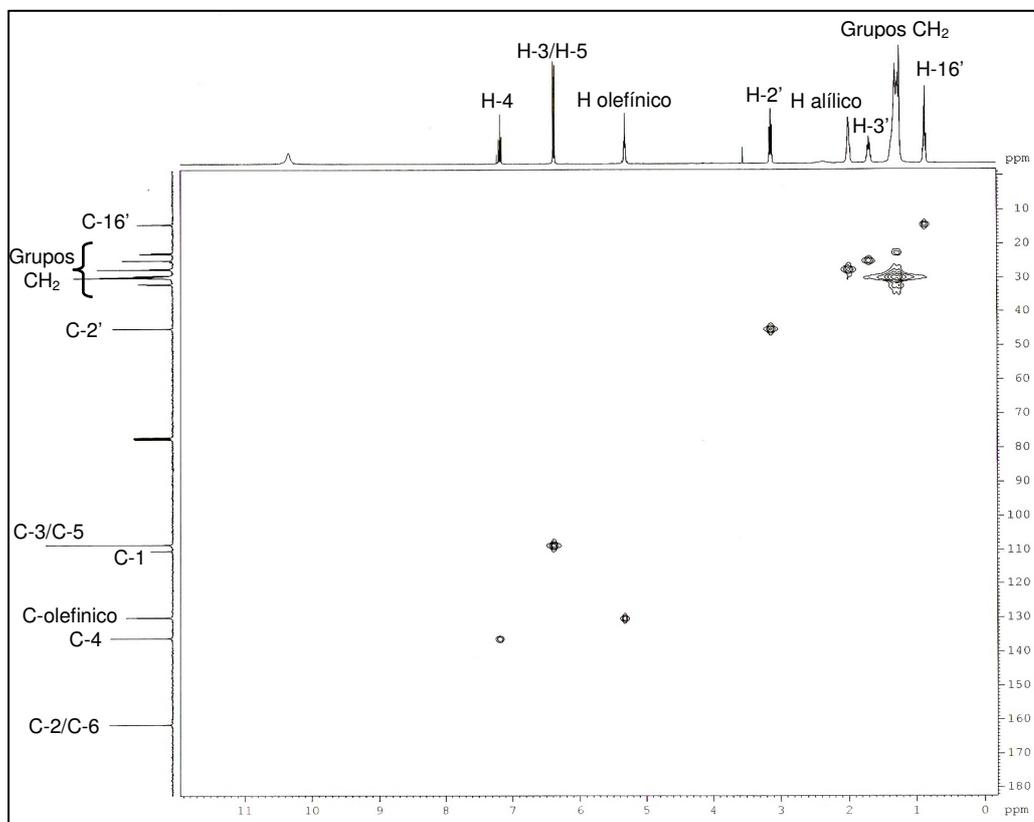


FIGURA 4.6 - Mapa de correlações HSQC da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl₃).

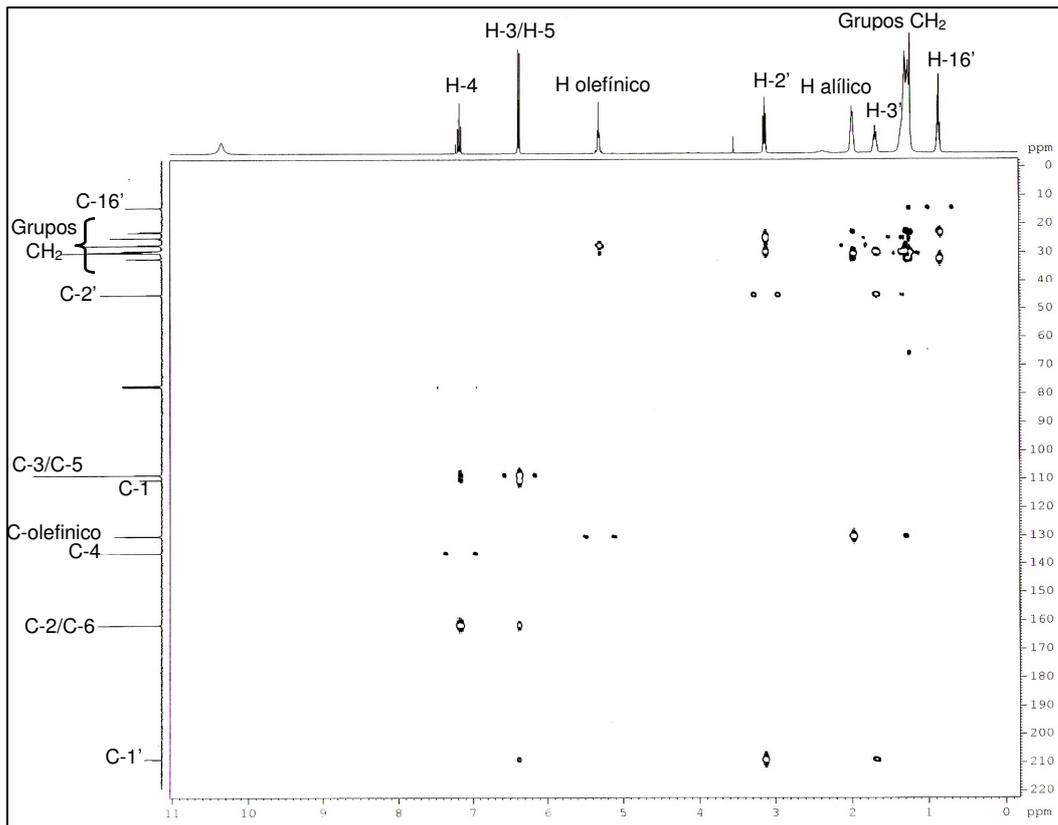


FIGURA 4.7 - Mapa de correlações HMBC da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl_3).

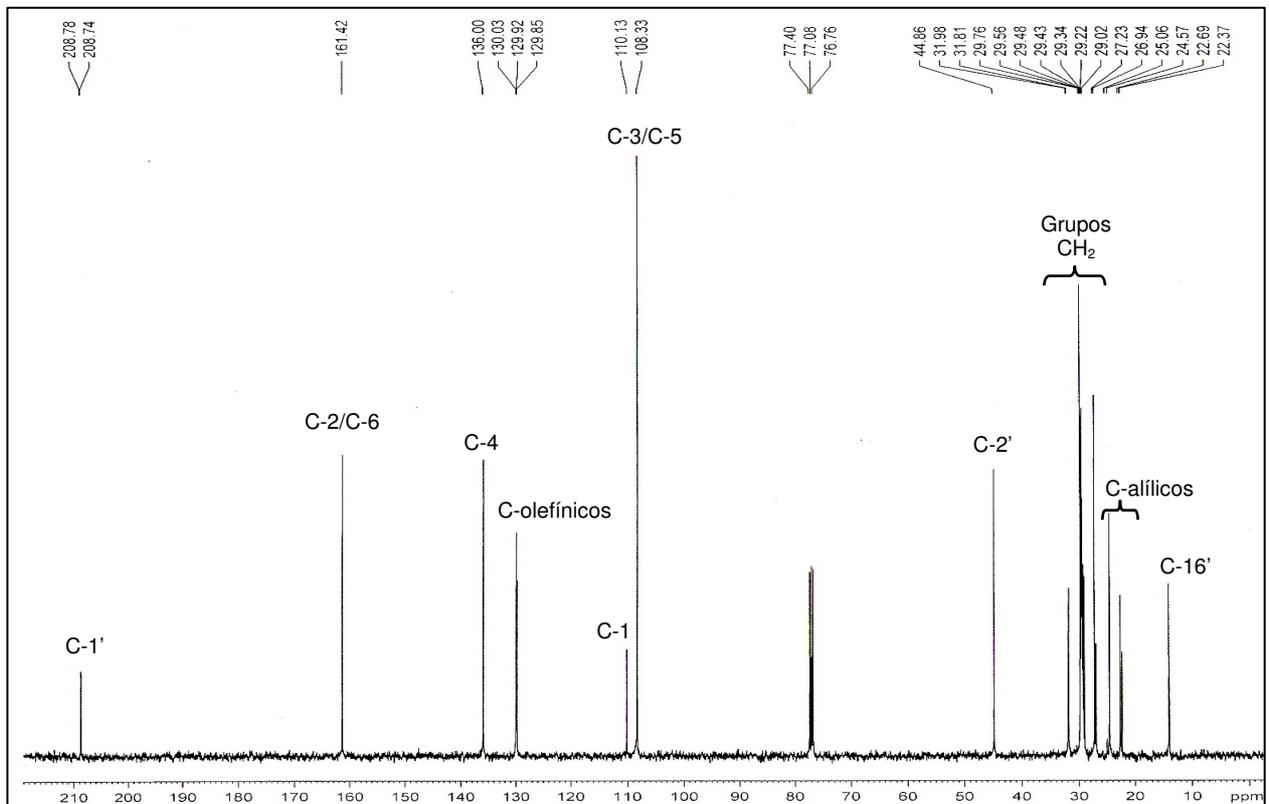


FIGURA 4.8 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração C, contendo as substâncias I, II e III (400 MHz, CDCl_3).

4.3.2 – Lignanas

Os lignóides constituem uma importante classe de produtos naturais, cujos compostos possuem o esqueleto formado pelo grupo fenilpropânico (C_6C_3). A grande maioria dos lignóides pertence ao grupo das lignanas e neolignanas (GOTTLIEB e YOSHIDA, 1984).

O termo lignana foi introduzido por HARWORTH em 1936 para um grupo de produtos naturais que apresentavam como característica em comum, dois grupos C_6C_3 (grupo fenilpropânico) conectados por uma ligação entre os átomos de carbono centrais (β) de cada cadeia (HAWORTH, 1936 apud MOSS, 2000). Em 1969, MCCREDIE *et al.* propuseram que a definição de lignanas fosse estendida a todos os produtos naturais de baixo peso molecular que originem primariamente, do acoplamento oxidativo de unidades fenilpropânicas (MCCREDIE *et al.*, 1969 apud AGRAWAL e THAKUR, 1985).

A IUPAC recomenda o uso do termo lignana para os dímeros de unidades C_6C_3 ligadas pelos carbonos β, β' de suas respectivas cadeias laterais, enquanto o termo neoligana é reservado para designar os dímeros unidos por outros carbonos (m, m' ; γ, γ' ; β, γ' , etc., MOSS, 2000).

Para a nomenclatura da grande diversidade de estruturas classificadas como lignanas e neolignanas foi necessário um sistema de numeração apropriado para o nome sistemático das estruturas. FREUDENBERG e WEINGES propuseram que a primeira unidade fenilpropânica (C_6C_3) fosse numerada de 1 a 9, enquanto a segunda unidade fosse numerada de 1' a 9' para gerar assim, um sistema de numeração consistente (FREUDENBERG e WEINGES, 1961 apud MOSS, 2000). Esse sistema é recomendado pela IUPAC e através dele os átomos de carbono α , β e γ , em relação ao anel aromático, recebem a numeração 7, 8 e 9, respectivamente, para a primeira unidade fenilpropânica, e 7', 8' e 9', respectivamente, para a segunda unidade fenilpropânica (MOSS, 2000).

Atualmente, aproximadamente 3000 diferentes estruturas de lignanas e outros produtos naturais relacionados como neolignanas e flavonolignanas são conhecidos (SCHMIDT *et al.*, 2008). As lignanas são divididas em cinco grupos: derivadas do 1,4-diarilbutano, derivadas da 2,3-dibenzilbutirolactona, derivadas do tetrahidrofurano, derivadas do tetrahidrofurofurano e derivadas do 4-ariltetrahidronaftaleno (HEARON e MACGREGOR, 1955, Figura 4.9).

As lignanas, um dos grupos de produtos naturais mais antigos, têm atraído muito interesse dos cientistas ao longo dos anos e ainda hoje são extensivamente estudadas devido à sua ampla ocorrência na natureza, principalmente no reino vegetal, e também à ampla gama de atividades biológicas com potencial terapêutico (ENDERS e MILOVANOVIC, 2007; SILVA *et al.*, 2009).

O papel biológico das lignanas nas plantas está ainda em discussão, mas é geralmente aceito que elas desempenham um papel de defesa nas plantas contra doenças e pestes e no controle de crescimento vegetal. Em adição ao seu papel na natureza, lignanas também possuem significantes atividades farmacológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, imunossupressora, tripanocida, antioxidante, antiviral, dentre outras (ANDRADE *et al.*, 2009; BAYINDIR *et al.*, 2008; DINELLI *et al.*, 2007).

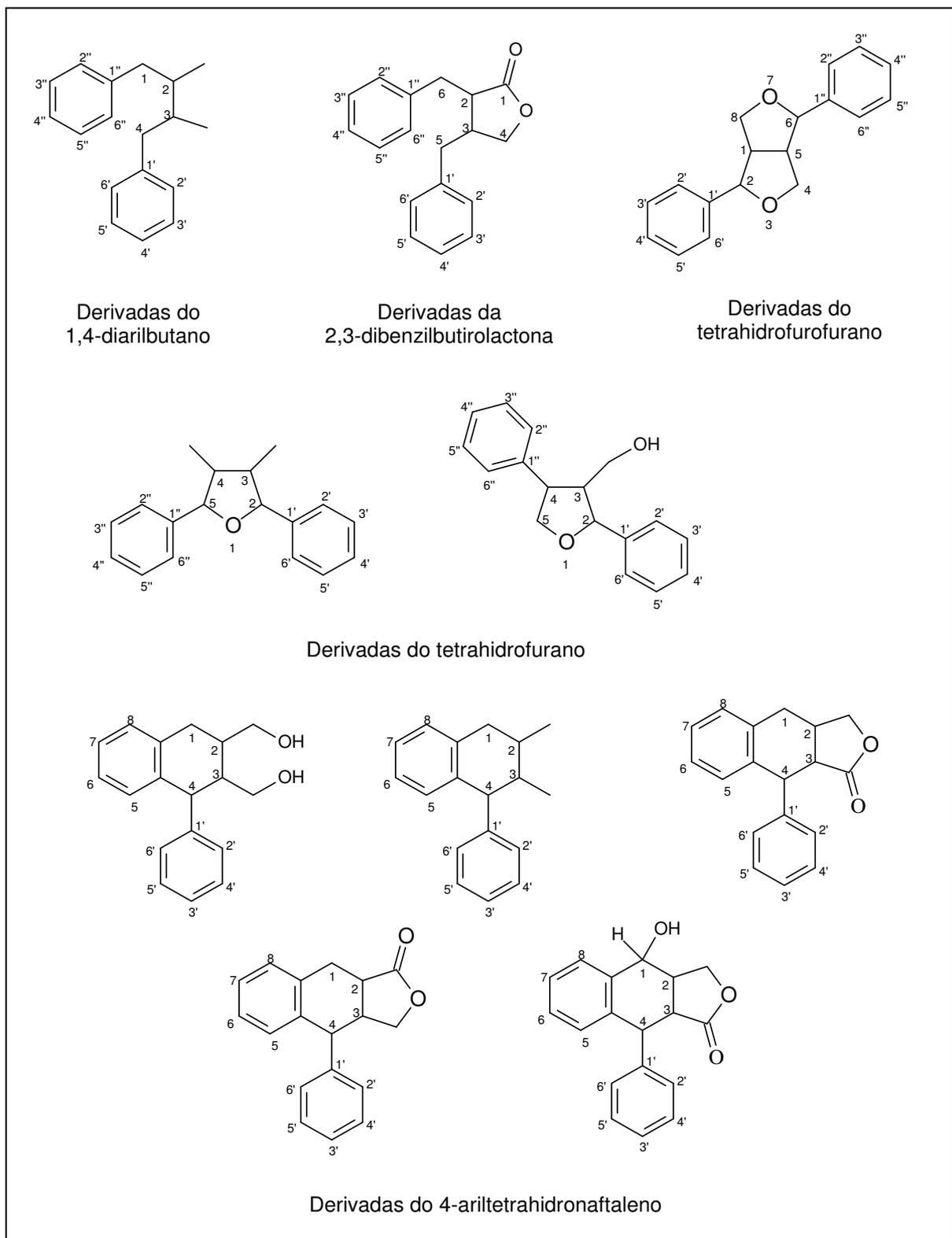
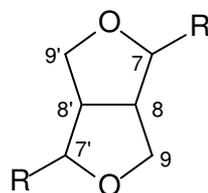


FIGURA 4.9 – Classificação das lignanas em grupos.

4.3.2.1 – Identificação Estrutural da Substância IV.

A substância **IV** foi obtida da fração I das injeções realizadas no cromatógrafo contracorrente e foi estruturalmente identificada por experimentos de RMN de ^1H , HSQC e HMBC e comparação com a literatura (WANG *et al.*, 2009).

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.10), observaram-se os seguintes sinais: δ_{H} 4,72 (*d*, $J = 4,8$ Hz, 2H); δ_{H} 4,23 (*dd*, $J = 6,8$ e $9,2$ Hz, 2H); δ_{H} 3,86 (*dd*, $J = 3,6$ e $9,2$, 2H) e δ_{H} 3,04 (*m*, 2H). Esses sinais, com esses valores de deslocamentos, de constantes de acoplamento e multiplicidades, caracterizam sistemas furofurânicos presentes em muitas lignanas (WANG *et al.*, 2009).



Com base na estrutura geral proposta acima, os sinais descritos podem ser atribuídos da seguinte forma. O hidrogênio H-7 acopla com o hidrogênio H-8, gerando um duplete com constante de acoplamento $J = 4,8$ Hz, δ_{H} 4,72 (H-7). Os hidrogênios H-9 são diastereotópicos (H-9 α e H-9 β) e acoplam entre si com constante de acoplamento de $9,2$ Hz. Esses hidrogênios, H-9 α e H-9 β , também acoplam com H-8 com constantes de $3,6$ e $6,8$ Hz, respectivamente. O mesmo comportamento é observado para os hidrogênios (H-7', H-8' e H-9'). Com base nos valores de integração, observa-se que os hidrogênios H-X' apresentam valores idênticos aos respectivos H-X, indicando assim, total equivalência química entre esses hidrogênios, o que permite afirmar que a molécula é simétrica.

A especificação dos hidrogênios δ_{H} 3,86 (*dd*, $J = 3,6$ e $9,2$) e δ_{H} 4,23 (*dd*, $J = 6,8$ e $9,2$ Hz), como sendo os hidrogênios H-9 α e H-9 β , respectivamente pode ser justificada através das análises de suas constantes de acoplamento destes com o hidrogênio H-8. Como H-8 acopla com H-9 β ($6,8$ Hz) a uma constante maior do que com H-9 α ($3,6$ Hz), conclui-se que eles se encontram do mesmo lado da molécula.

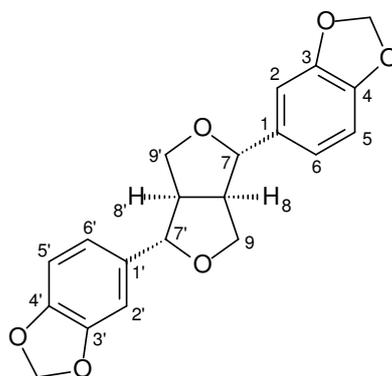
A observação, no espectro de RMN de ^1H , de um singlete em δ_{H} 5,95 integrado para 4 hidrogênios e do multiplete em δ_{H} 6,79-6,85 integrado para 6 hidrogênios, reafirma a simetria da molécula, onde se tem como grupos -R, anéis

aromáticos 3,4-substituídos por grupos metilenodióxi. A posição 3,4 de substituição destes grupos metilenodióxi, é determinada pelo caminho biossintético das lignanas (DEWICK, 2002; BAYINDIR *et al.*, 2008).

Os deslocamentos de carbono da molécula puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de HSQC (Figura 4.11) e HMBC (Figuras 4.12 e 4.13). Através das correlações observadas no HSQC, tem-se H-7 e H-7' correlacionando com δ_C 85,9 (C-7/C-7'), H-9(α e β) e H-9'(α e β) correlacionando com δ_C 71,6 (C-9/C-9'), H-8 e H-8' correlacionando com δ_C 54,2 (C-8/C-8') e o multipletto de hidrogênios aromáticos correlacionando com δ_C 106,5 (C-2/C-2'), com δ_C 108,2 (C-5/C-5') e com δ_C 119,2 (C-6/C-6'). Uma última correlação entre os hidrogênios dos grupos metilenodióxi com o carbono δ_C 101,0 permite atribuir este sinal ao carbono (OCH₂O).

No mapa de correlações HMBC, as correlações do multipletto de hidrogênios aromáticos com o sinal de carbono quaternário δ_C 135,1 (C-1/C-1') e com o sinal em δ_C 147,5 (C-3/C-3'/C-4/C-4') estão de acordo com a literatura (WANG *et al.*, 2009). A atribuição do sinal δ_C 147,5 aos quatro carbonos C-3, C-3', C-4 e C-4' pode ser justificada pela proximidade dos valores de deslocamentos químicos para estes carbonos na literatura e pela intensidade do sinal observado no mapa de correlações HMBC.

A configuração absoluta da molécula foi determinada pela medida de α_D da substância onde o valor encontrado foi de $\alpha_D = + 55,7^\circ$ (CHCl₃), que comparado com a literatura, $\alpha_D = + 69,0^\circ$ (CHCl₃) (WANG *et al.*, 2009), confirma ser a sesamina.



Sesamina (IV)

TABELA 4.5 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **IV** e comparação com a sesamina (WANG *et al.*, 2009: CDCl_3 , 600 MHz para RMN de ^1H / 150 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| | Substância IV | WANG <i>et al.</i> , 2009 | Substância IV | WANG <i>et al.</i> , 2009 |
| 1/1' | - | - | 135,1 | 135,2 |
| 2/2' | 6,79-6,85 (<i>m</i>) | 6,77-6,84 (<i>m</i>) | 106,5 | 106,7 |
| 3/3' | - | - | 147,5 | 148,1 |
| 4/4' | - | - | 147,5 | 147,3 |
| 5/5' | 6,79-6,85 (<i>m</i>) | 6,77-6,84 (<i>m</i>) | 108,2 | 108,4 |
| 6/6' | 6,79-6,85 (<i>m</i>) | 6,77-6,84 (<i>m</i>) | 119,2 | 119,5 |
| 7/7' | 4,72 (<i>d</i> , 4,8) | 4,71 (<i>d</i> , 3,6) | 85,9 | 85,9 |
| 8/8' | 3,04 (<i>m</i>) | 3,04 (<i>m</i>) | 54,2 | 54,5 |
| 9 α /9' α | 3,86 (<i>dd</i> , 3,6 e 9,2) | 3,86 (<i>dd</i> , 4,6 e 9,0) | 71,6 | 71,9 |
| 9 β /9' β | 4,23 (<i>dd</i> , 6,8 e 9,2) | 4,22 (<i>dd</i> , 6,6 e 9,0) | 71,6 | 71,9 |
| OCH ₂ O | 5,95 (<i>s</i>) | 5,94 (<i>s</i>) | 101,0 | 101,3 |

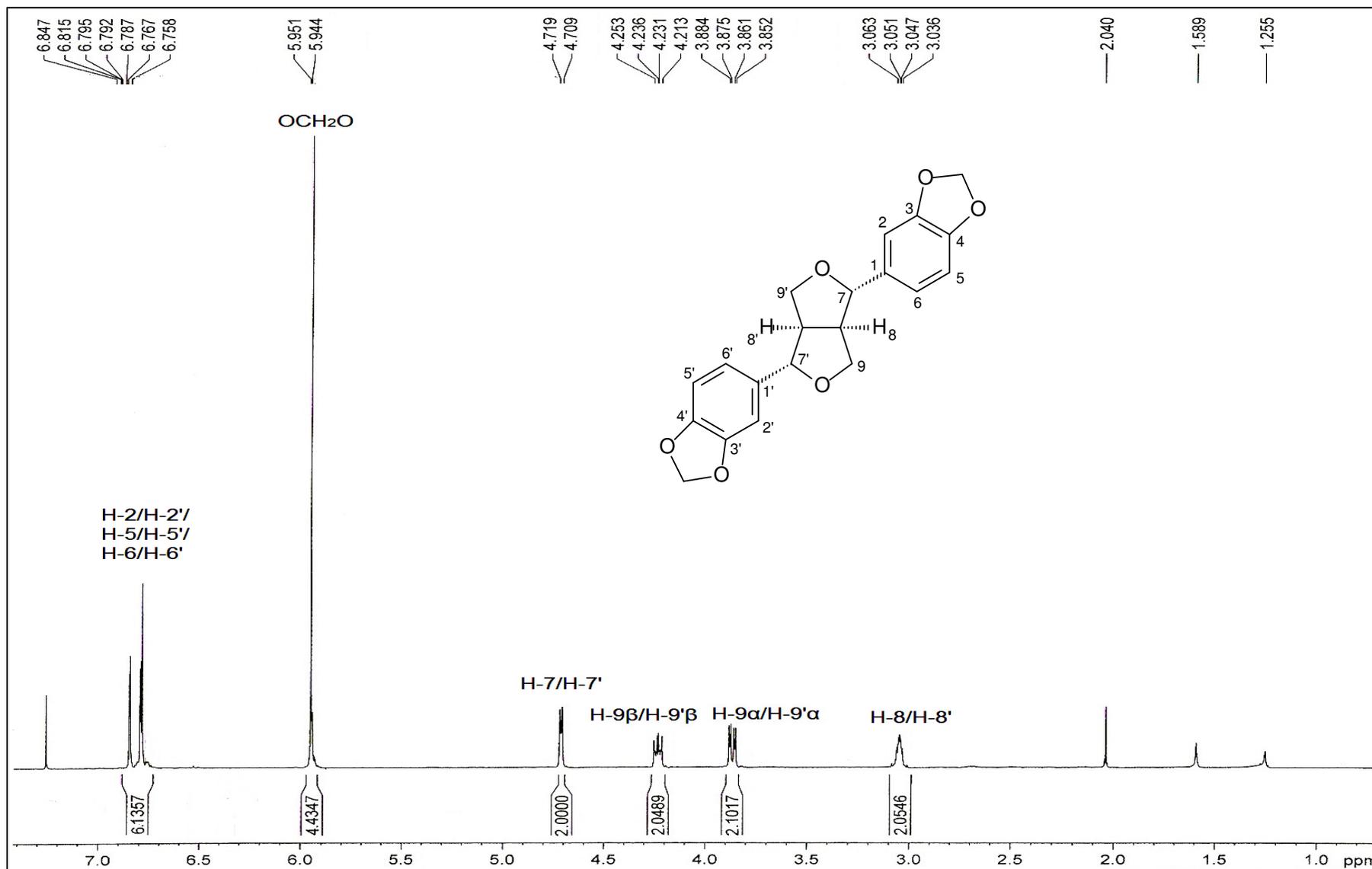


FIGURA 4.10 - Espectro de RMN de ¹H da substância IV (400 MHz, CDCl₃).

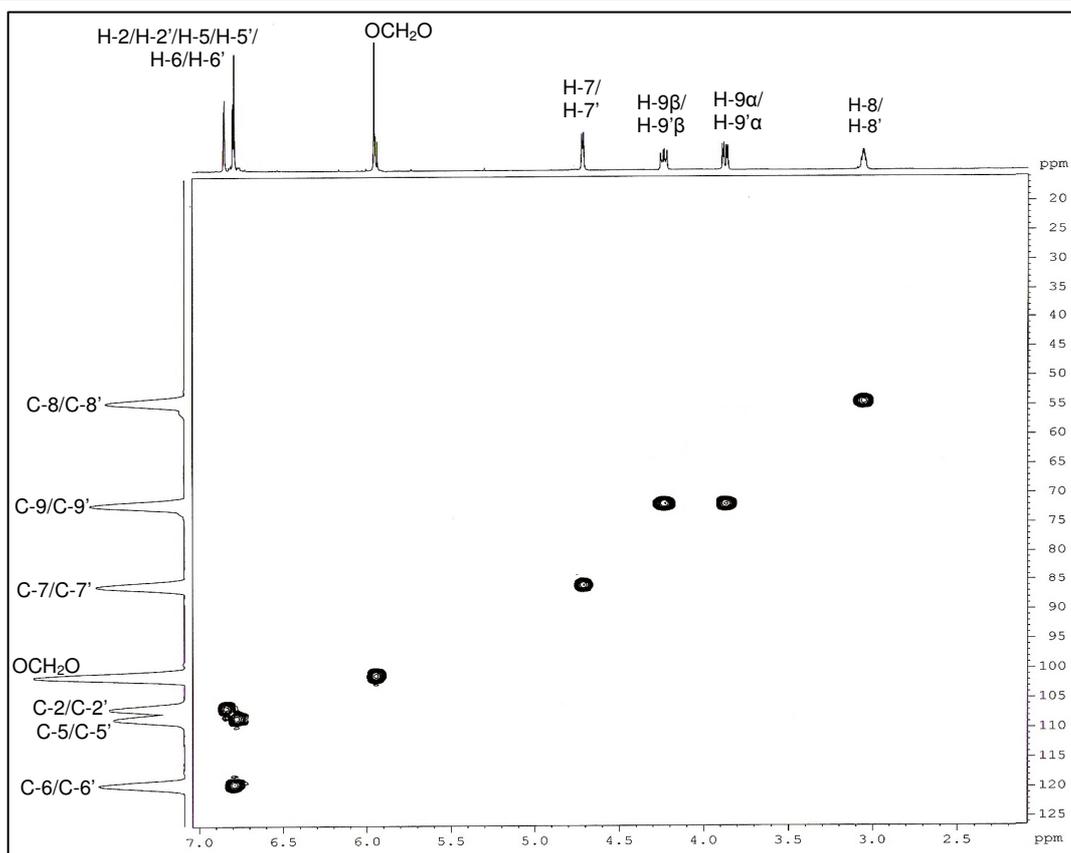


FIGURA 4.11 - Mapa de correlações HSQC da substância IV (400 MHz, CDCl_3).

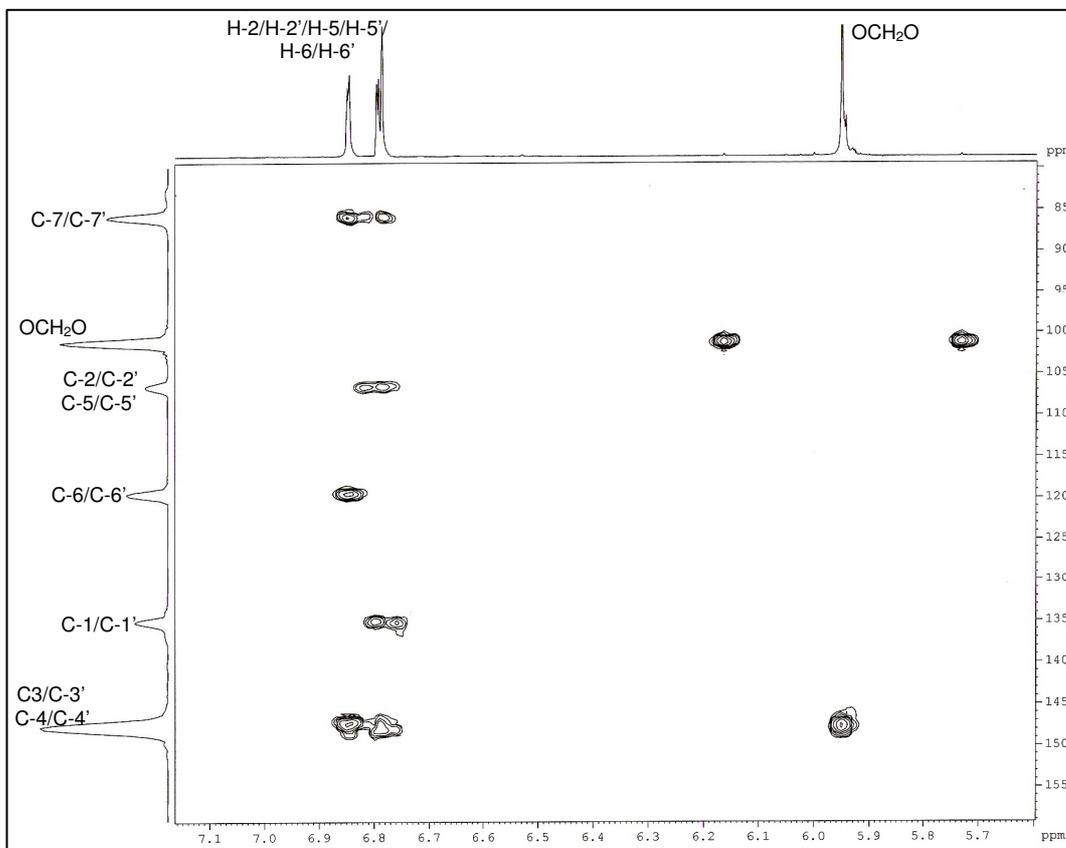


FIGURA 4.12 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, CDCl_3).

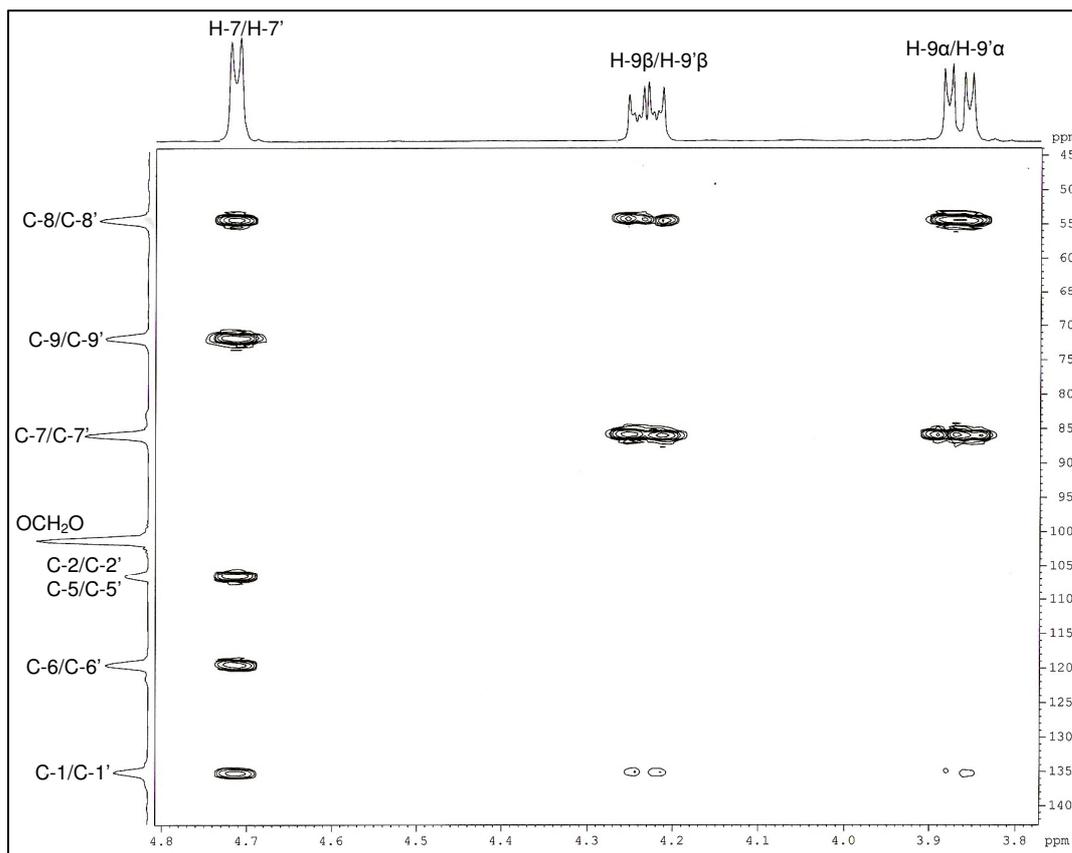


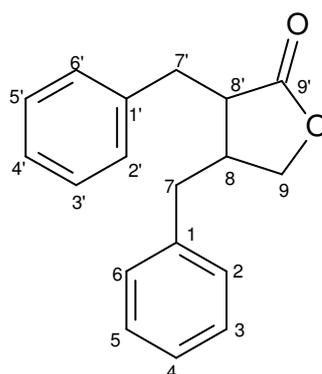
FIGURA 4.13 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, CDCl₃).

4.3.2.2 – Identificação Estrutural das Substâncias V e VI.

As substâncias **V** e **VI** foram obtidas em mistura da fração K, sendo a substância **V** isolada pura posteriormente da fração J, e essas frações foram obtidas das injeções realizadas no cromatógrafo contracorrente. A identificação estrutural dessas duas substâncias foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC, CG-EM e comparação com a literatura (ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007).

4.3.2.2.1 - Identificação Estrutural da Substância Majoritária V.

Pela análise no espectro de RMN de ^1H (Figura 4.18), dos sinais referentes ao composto majoritário **V**, foram observados sinais na região de aromáticos, sinais com deslocamento químico de δ_{H} 5,9 característicos de grupos metilenodióxi, sinais em torno de δ_{H} 3,8-4,2 aproximadamente, que indicam hidrogênio ligado diretamente ao carbono que se liga a oxigênio de grupos ésteres ($-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{R}$), e sinais em torno de δ_{H} 2,8 característicos de grupos α -fenil (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Essas observações dão uma idéia geral do esqueleto da substância em questão, lignana, uma vez que dentre os esqueletos mais comuns encontrados na literatura apenas um apresenta grupo éster, que são as lignanas do tipo dibenzilbutirolactônicas (MOSS, 2000; HARMATHA e NAWROT 2002).



Foram observados no espectro de RMN de ^1H , dois duplos dupletos δ_{H} 4,14 (*dd*, $J = 6,8$ e $8,8$ Hz) e δ_{H} 3,87 (*dd*, $J = 7,2$ e $8,8$ Hz), cada integrado para um hidrogênio. Ao analisar o mapa de correlações HSQC (Figura 4.21), observou que esses dois hidrogênios estão ligados diretamente a apenas um carbono, δ_{C} 71,2, indicando que se trata de hidrogênios diastereotópicos e pelo deslocamento

químico, os sinais δ_{H} 4,14 e 3,87 referem-se aos hidrogênios H-9 α e H-9 β . Essa atribuição é ainda confirmada pelo mapa de correlações HMBC (Figura 4.22), onde se observa correlação desses dois hidrogênios com o carbono carboxílico C-9' (δ_{C} 178,2). No mapa de contornos COSY (Figuras 4.19 e 4.20) observa-se a correlação entre esses dois hidrogênios, e essa correlação é descrita pela constante de acoplamento $J = 8,8$ Hz.

Ainda analisando o mapa de correlações HBMC, observa-se que os sinais referentes aos hidrogênios H-9 se correlacionam com outros três carbonos, δ_{C} 38,3; δ_{C} 41,2 e δ_{C} 46,3 que, pela análise do mapa de correlações HSQC, referem-se a carbonos de um grupo CH₂ e dois grupos CH, respectivamente. Assim, pela análise da estrutura geral proposta para a substância **V** e com base nos dados fornecidos pelo HSQC, esses sinais referem-se aos carbonos C-7 (δ_{C} 38,3), C-8 (δ_{C} 41,2) e C-8' (δ_{C} 46,3).

A distinção entre os carbonos C-8 e C-8' e seus respectivos deslocamentos químicos, se baseia na literatura e nas correlações observadas para H-8 e H-8'. Esses hidrogênios são representados no espectro de RMN de ¹H pelo multipeto em δ_{H} 2,42-2,62, mas em regiões bem distintas. No espectro de HMBC apenas uma dessas regiões se correlaciona com o carbono carboxílico C-9', a região correspondente ao carbono δ_{C} 46,3. Desta forma, este deslocamento químico foi atribuído como C-8' e o deslocamento químico δ_{C} 41,2 atribuído ao carbono C-8. Este mutipeto, integrado para quatro hidrogênios, correlaciona-se no mapa de correlações HSQC com os três carbonos δ_{C} 38,3; δ_{C} 41,2 e δ_{C} 46,3 e assim, este mutipeto foi atribuído aos hidrogênios H-7, H-8 e H-8'.

Dois outros duplos dubletos foram observados no RMN de ¹H, δ_{H} 2,99 (*dd*, $J = 5,2$ e $14,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 2,85 (*dd*, $J = 7,2$ e $14,0$ Hz, 1H). Esses são hidrogênios diastereotópicos, pois se correlacionam com apenas um carbono no mapa de correlações HSQC, o carbono δ_{C} 34,9. Através da correlação destes hidrogênios com os carbonos C-8 e C-8' no experimento de HMBC eles foram atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-7.

Na região dos sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos foram observado os sinais δ_{H} 6,74 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H); δ_{H} 6,71 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H); δ_{H} 6,64 (*d*, $J = 1,6$ Hz, 1H); δ_{H} 6,60 (*dd*, $J = 1,6$ e $8,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,48 (*m*, 2H). O hidrogênio δ_{H} 6,74 acopla em *orto* ($J = 8,0$ Hz) com o hidrogênio δ_{H} 6,60 e este acopla em *meta* ($J = 1,6$ Hz) com o hidrogênio δ_{H} 6,64. Esses acoplamentos foram confirmados no

mapa de contornos COSY onde se observa as correlações que descrevem estes acoplamentos. Esses três hidrogênios descrevem um anel aromático 3,4-substituído.

Através do mapa de correlações HSQC, os hidrogênios δ_H 6,74; δ_H 6,61 e δ_H 6,64 estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 108,0; δ_C 122,0 e δ_C 109,5. Analisando o mapa de correlações HMBC foram observadas as correlações dos sinais de hidrogênios δ_H 6,74 e δ_H 6,64 com os carbonos δ_C 146,0 e δ_C 147,0, enquanto o hidrogênio δ_H 6,64 correlaciona-se apenas com o carbono δ_C 146,0. Observou-se ainda a correlação entre o sinal de hidrogênio δ_H 6,74 com o do carbono quaternário δ_C 131,0. Através dessas correlações foi possível atribuir os sinais de carbonos e hidrogênios de um dos anéis aromáticos conforme ilustrado na Figura 4.14.

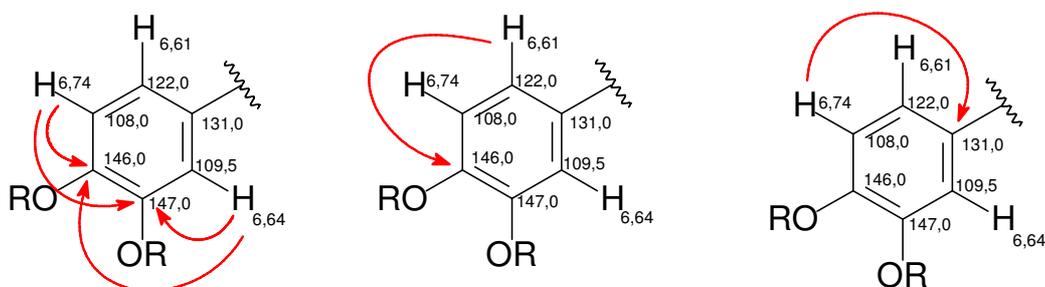


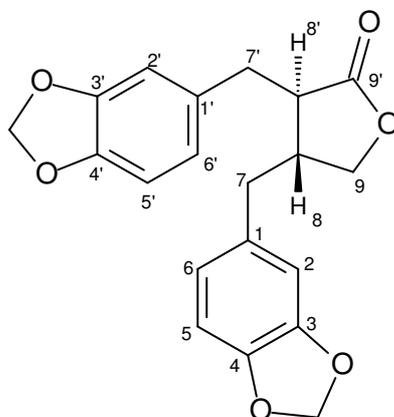
FIGURA 4.14 – Correlações HMBC para os anéis aromáticos.

A correlação observada entre o sinal do hidrogênio H-7' e o do carbono quaternário δ_C 131,0 no mapa de correlações HMBC permitiu atribuir os sinais de carbonos e hidrogênios deste anel. Os hidrogênios H-2' (δ_H 6,64), H-5' (δ_H 6,74) e H-6' (δ_H 6,61) foram atribuídos assim como correlacionando com os sinais dos carbonos C-1' (δ_C 131,0); C-2' (δ_C 109,5); C-3' (δ_C 147,0); C-4' (δ_C 146,0); C-5' (δ_C 108,0) e C-6' (δ_C 122,0).

Os demais sinais de hidrogênios ligados ao anel aromático, δ_H 6,71 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_H 6,48 (*m*, 2H) referem-se ao segundo anel aromático da estrutura. Onde δ_H 6,71 refere-se ao hidrogênio H-5 e o multiplete em δ_H 6,47-6,49 refere-se aos hidrogênios H-2 e H-6. Novamente, através do mapa de correlações HSQC os carbonos C-2 (δ_C 109,0); C-5 (δ_C 108,0) e C-6 (δ_C 121,0) foram atribuídos. No mapa de correlações HMBC as mesmas correlações descritas acima foram observadas para os correspondentes hidrogênios e carbonos (C-X e H-X) o que permitiu a atribuição dos sinais C-1 (δ_C 132,0); C-3 (δ_C 147,0) e C-4 (δ_C 146,0).

No espectro de RMN de ^1H foi observado sinal em δ_{H} 5,95, integrando para quatro hidrogênios, característico de hidrogênios de grupos metilenodióxí. Esse sinal apresentou correlação, no mapa de correlações HMBC com os carbonos δ_{C} 147,0 e δ_{C} 146,0 que confirma a substituição, nos dois anéis aromáticos, por dois grupos 3,4-metilenodióxí. Tal sinal correlaciona-se no mapa de correlações HSQC com o sinal do carbono δ_{C} 100,9. Concluindo-se assim, que a estrutura em questão é a lignana hinokinina.

Para determinar a configuração absoluta da substância **V**, foi realizado experimento de α_{D} onde se obteve o valor de $\alpha_{\text{D}} = -35,9^\circ$, que comparado com a literatura, $\alpha_{\text{D}} = -34,7^\circ$ (BATTERBEE *et al.*, 1969) trata-se da (-)-hinokinina.



(-)-Hinokinina (**V**)

TABELA 4.6 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **V** e comparação com a (-)-hinokinina (ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007: CDCl_3 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | Substância V | ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007 | Substância V | ENDERS e MILOVANOVIĆ, 2007 |
| 1 | - | - | 132,0 | 131,4 |
| 1' | - | - | 131,0 | 131,1 |
| 2 | 6,47-6,49 (<i>m</i>) | 6,46 (<i>m</i>) | 109,0 | 108,6 |
| 2' | 6,64 (<i>d</i> , 1,6) | 6,62 (<i>d</i> , 1,6) | 109,5 | 109,3 |
| 3 | - | - | 147,0 | 147,6 |
| 3' | - | - | 147,0 | 147,7 |
| 4 | - | - | 146,0 | 146,1 |
| 4' | - | - | 146,0 | 146,3 |
| 5 | 6,71 (<i>d</i> , 8,0) | 6,69 (<i>d</i> , 8,2) | 108,0 | 108,1 |
| 5' | 6,74 (<i>d</i> , 8,0) | 6,73 (<i>d</i> , 7,7) | 108,0 | 108,2 |
| 6 | 6,47-6,49 (<i>m</i>) | 6,46 (<i>m</i>) | 121,0 | 121,3 |
| 6' | 6,60 (<i>dd</i> , 1,6 e 8,0) | 6,60 (<i>dd</i> , 1,6 e 7,9) | 122,0 | 122,0 |
| 7 | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 38,3 | 38,3 |
| 7' α | 2,99 (<i>dd</i> , 5,2 e 14,0) | 2,98 (<i>dd</i> , 4,9 e 14,0) | 34,9 | 34,8 |
| 7' β | 2,85 (<i>dd</i> , 7,2 e 14,0) | 2,84 (<i>dd</i> , 7,1 e 14,0) | | |
| 8 | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 41,2 | 41,2 |
| 8' | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 46,3 | 46,4 |
| 9 α | 4,14 (<i>dd</i> , 6,8 e 8,8) | 4,12 (<i>dd</i> , 7,1 e 9,0) | 71,2 | 71,0 |
| 9 β | 3,87 (<i>dd</i> , 7,2 e 8,8) | 3,85 (<i>dd</i> , 7,4 e 9,0) | | |
| 9' | - | - | 178,2 | 178,1 |
| OCH ₂ O | 5,95 (<i>m</i>) | 5,93 (<i>s</i>) | 100,9 | 100,9 |

4.3.2.2.2 - Identificação Estrutural da Substância Minoritária VI.

Pela análise no espectro de RMN de ^1H (Figura 4.18), observa-se uma segunda substância na amostra, composto **VI**. A amostra foi então submetida à análise por CLAE, onde verificou-se dois picos referentes às duas substâncias. As áreas dos picos observados no cromatograma (Figura 4.15) indicam a proporção de 1:0,2 entre as substâncias **V** e **VI**, e que foi confirmada pelos valores de integração dos sinais no espectro de RMN de ^1H . Assim, todos os sinais integrados para 0,20 neste espectro referem-se a um hidrogênio para o composto minoritário.

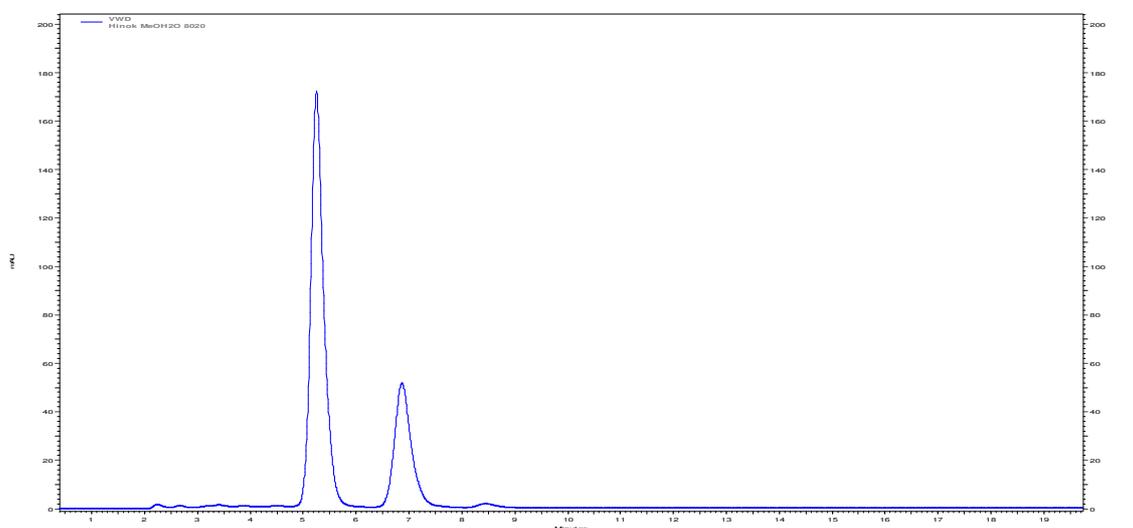


FIGURA 4.15 - Cromatograma da mistura das substâncias **V** e **VI** no modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (10 μm , 25,0 x 0,46 cm); eluente MeOH:H₂O 8:2; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detector ultravioleta 254 nm.

Foram observados, no espectro de RMN de ^1H , sinais similares aos observados para a substância **V**. Dois duplos dupletos δ_{H} 4,21 (*dd*, $J = 7,2$ e $8,8$ Hz; 1H) e δ_{H} 3,89 (*dd*, $J = 7,6$ e $8,8$ Hz; 1H) cada um referente a um hidrogênio, correlacionam entre si no mapa de contornos COSY (Figura 4.19 e 4.20). No mapa de correlações HSQC (Figura 4.21) foi possível observar a correlação desses dois hidrogênios com o sinal em δ_{C} 71,2, indicando que se trata de hidrogênios diastereotópicos, assim como observado para o composto majoritário. Não foi possível verificar, no mapa de correlações HMBC (Figura 4.22), as correlações para esses hidrogênios. Assim, a atribuição foi feita conforme feito para a substância **V**, e

os sinais δ_H 4,21 e δ_H 3,89 foram atribuídos a hidrogênios H-9 α e H-9 β e o carbono δ_C 71,2 atribuído ao carbono C-9.

O multiplete observado no espectro de RMN de 1H em δ_H 2,42-2,62 (*m*) apresenta integração para 4,9H, que indica quatro hidrogênios do composto majoritário (4 x 1,0) e quatro hidrogênios do composto minoritário (4 x 0,20). A correlação entre uma região desse multiplete e os hidrogênios H-9 α e H-9 β no mapa de contornos COSY e uma fraca correlação observada com o carbono δ_C 71,2, atribuído ao C-9 permitiu que esses hidrogênios fossem atribuídos a H-7, H-8 e H-8'.

Dois outros duplos dubletos foram observados, δ_H 3,23 (*dd*, $J = 5,2$ e $14,0$ Hz; 1H) e δ_H 2,95 (*dd*, $J = 8,0$ e $14,0$ Hz; 1H), cada um referente a um hidrogênio assim como no composto majoritário. No mapa de correlações HSQC, esses dois sinais se correlacionam com o carbono δ_C 32,8, o que indica que são hidrogênios diastereotópicos. O acoplamento entre esses dois hidrogênios é confirmado ainda pela correlação entre eles no mapa de contornos COSY. Com base nesses dados, esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-7, conforme a atribuição feita para o composto majoritário.

Na região dos sinais de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de 1H , não foi possível observar os sinais definidos para o composto minoritário, no entanto, a integração total dos sinais resultou em 7,2H aproximadamente, o que corresponde a seis hidrogênios do composto majoritário (6 x 1,0) e seis hidrogênios do minoritário (6 x 0,2). A integração do sinal referente aos hidrogênios do grupo metilenodióxi, 4,5H aproximadamente, também indica ter-se dois grupos metilenodióxi como substituintes nos anéis aromáticos do composto minoritário.

Dada a similaridade entre os sinais de RMN de 1H para as duas substâncias, **V** e **VI**, a proposta para a substância **VI** era que esta seria um isômero de **V** e, para a confirmação dessa proposta, realizou-se a análise de CG-EM da amostra.

Apesar da pouca resolução obtida no cromatograma gasoso (Figura 4.16), foi possível observar a presença de dois picos parcialmente sobrepostos nos tempos de retenção 24,4 e 24,7 minutos. Os espectros de massas (Figura 4.17) dos dois picos revelaram substâncias com íon molecular e pico base semelhantes, m/z 354 e 135, respectivamente. Assim, os dados de espectrometria de massas confirmaram a proposta de que a substância **VI** é um isômero da substância **V**.

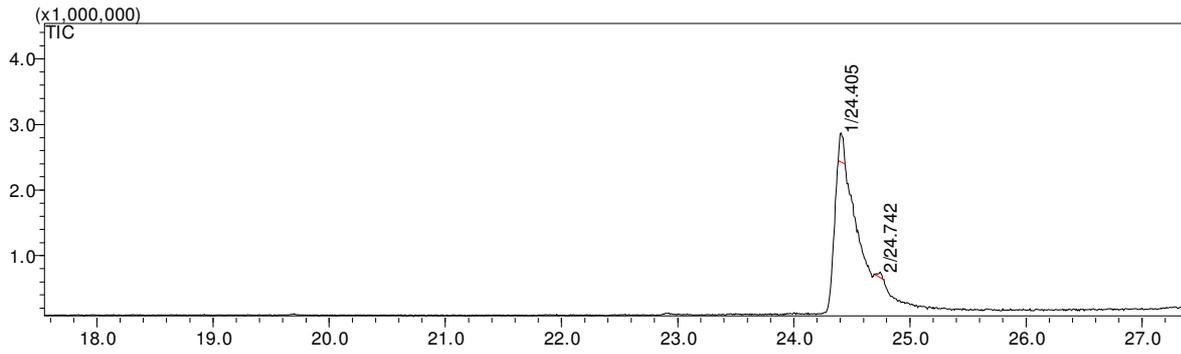


FIGURA 4.16 – Cromatograma obtido no CG-EM para a mistura das substâncias **V** e **VI**. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 180 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 15 °C/min. até 270 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 min., posteriormente aumentou de 5 °C/min. até 300 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min.

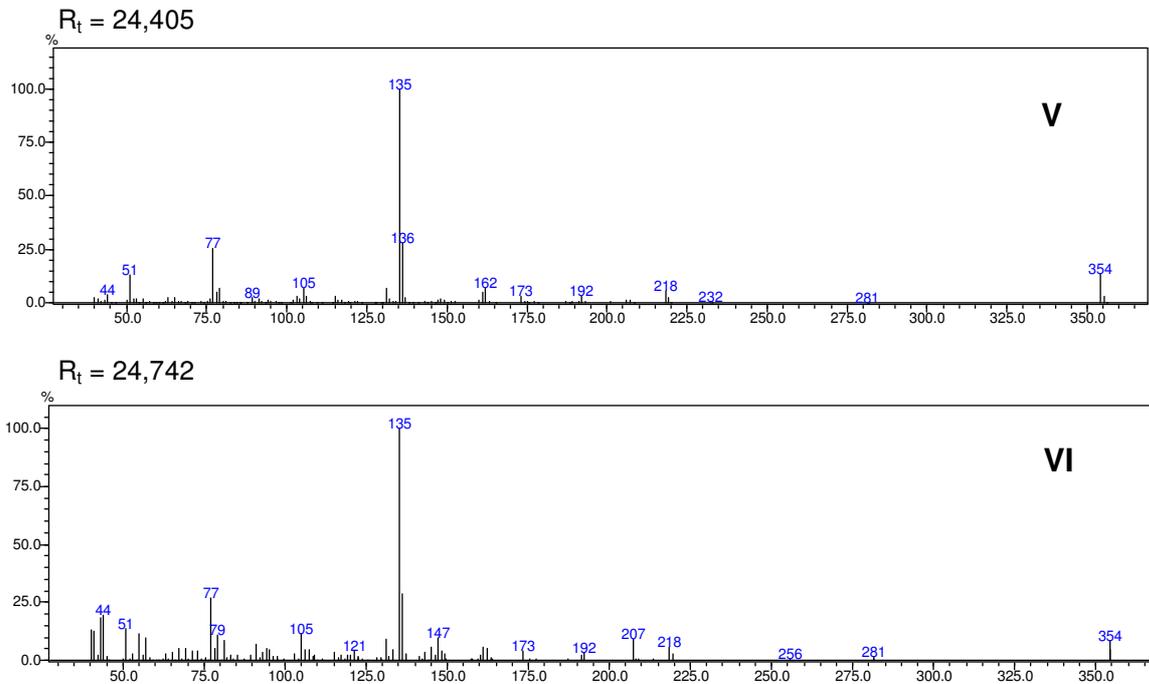


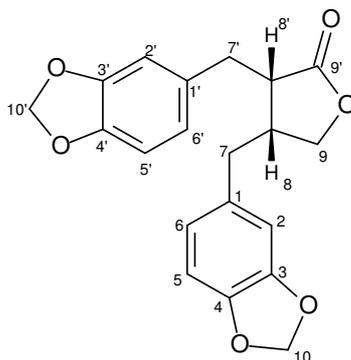
FIGURA 4.17 – Espectro de massas das substâncias **V** e **VI** (IE = 70 e.V).

A estereoquímica da substância **VI** foi proposta após comparação entre os sinais dos hidrogênios diastereotópicos H-7' e H-9, para as substâncias **V** e **VI** (Tabela 4.7).

TABELA 4.7 – Dados de RMN de ^1H para os hidrogênios diastereotópicos das substâncias **V** e **VI**, δ_{H} (ppm) e J (Hz)

| Hidrogênio | Majoritário | Minoritário |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| H-9 α | 4,12 ($J = 9,0$ e $7,1$ Hz) | 4,21 ($J = 8,8$ e $7,2$ Hz) |
| H-9 β | 3,85 ($J = 9,0$ e $7,4$ Hz) | 3,91 ($J = 8,8$ e $7,6$ Hz) |
| H-7' α | 2,98 ($J = 14,0$ e $4,9$ Hz) | 3,23 ($J = 14,0$ e $5,2$ Hz) |
| H-7' β | 2,84 ($J = 14,0$ e $7,1$ Hz) | 2,95 ($J = 14,0$ e $8,0$ Hz) |

De forma geral, os sinais são bastante similares, mais a maior discrepância é observada para os sinais dos hidrogênios H-7' o que sugeriu que o hidrogênio H-8' seria o que muda de configuração. Assim, a proposta para a substância **VI**, isolada de *Virola sebifera*, é que se trata da (+)-Isohinokinina.



(+)-Isohinokinina (**VI**)

TABELA 4.8 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **VI** e comparação com os dados da (-)-hinokinina (ENDERS e MILOVANOVÍČ, 2007: CDCl_3 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|--------------------|--|--|---------------------------|--|
| | Substância VI | ENDERS e MILOVANOVÍČ, 2007 [(-)-hinokinina] | Substância VI | ENDERS e MILOVANOVÍČ, 2007 [(-)-hinokinina] |
| 1 | - | - | 132,0 | 131,4 |
| 1' | - | - | 131,0 | 131,1 |
| 2 | 6,47-6,49 (<i>m</i>) | 6,46 (<i>m</i>) | 109,0 | 108,6 |
| 2' | 6,60-6,65 (<i>m</i>) | 6,62 (<i>d</i> , 1,6) | 109,5 | 109,3 |
| 3 | - | - | 147,0 | 147,6 |
| 3' | - | - | 147,0 | 147,7 |
| 4 | - | - | 146,0 | 146,1 |
| 4' | - | - | 146,0 | 146,3 |
| 5 | 6,70-6,77 (<i>m</i>) | 6,69 (<i>d</i> , 8,2) | 108,0 | 108,1 |
| 5' | 6,70-6,77 (<i>m</i>) | 6,73 (<i>d</i> , 7,7) | 108,0 | 108,2 |
| 6 | 6,47-6,49 (<i>m</i>) | 6,46 (<i>m</i>) | 121,0 | 121,3 |
| 6' | 6,60-6,65 (<i>m</i>) | 6,60 (<i>dd</i> , 1,6 e 7,9) | 122,0 | 122,0 |
| 7 | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 38,3 | 38,3 |
| 7' α | 3,23 (<i>dd</i> , 5,2 e 14,0) | 2,98 (<i>dd</i> , 4,9 e 14,0) | 32,8 | 34,8 |
| 7' β | 2,95 (<i>dd</i> , 8,0 e 14,0) | 2,84 (<i>dd</i> , 7,1 e 14,0) | | |
| 8 | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 41,2 | 41,2 |
| 8' | 2,42-2,62 (<i>m</i>) | 2,41-2,62 (<i>m</i>) | 45,2 | 46,4 |
| 9 α | 4,21 (<i>dd</i> , 7,2 e 8,8) | 4,12 (<i>dd</i> , 7,1 e 9,0) | 71,2 | 71,0 |
| 9 β | 3,91 (<i>dd</i> , 7,6 e 8,8) | 3,85 (<i>dd</i> , 7,4 e 9,0) | | |
| 9' | - | - | 178,2 | 178,1 |
| OCH ₂ O | 5,98 (<i>m</i>) | 5,93 (<i>s</i>) | 100,9 | 100,9 |

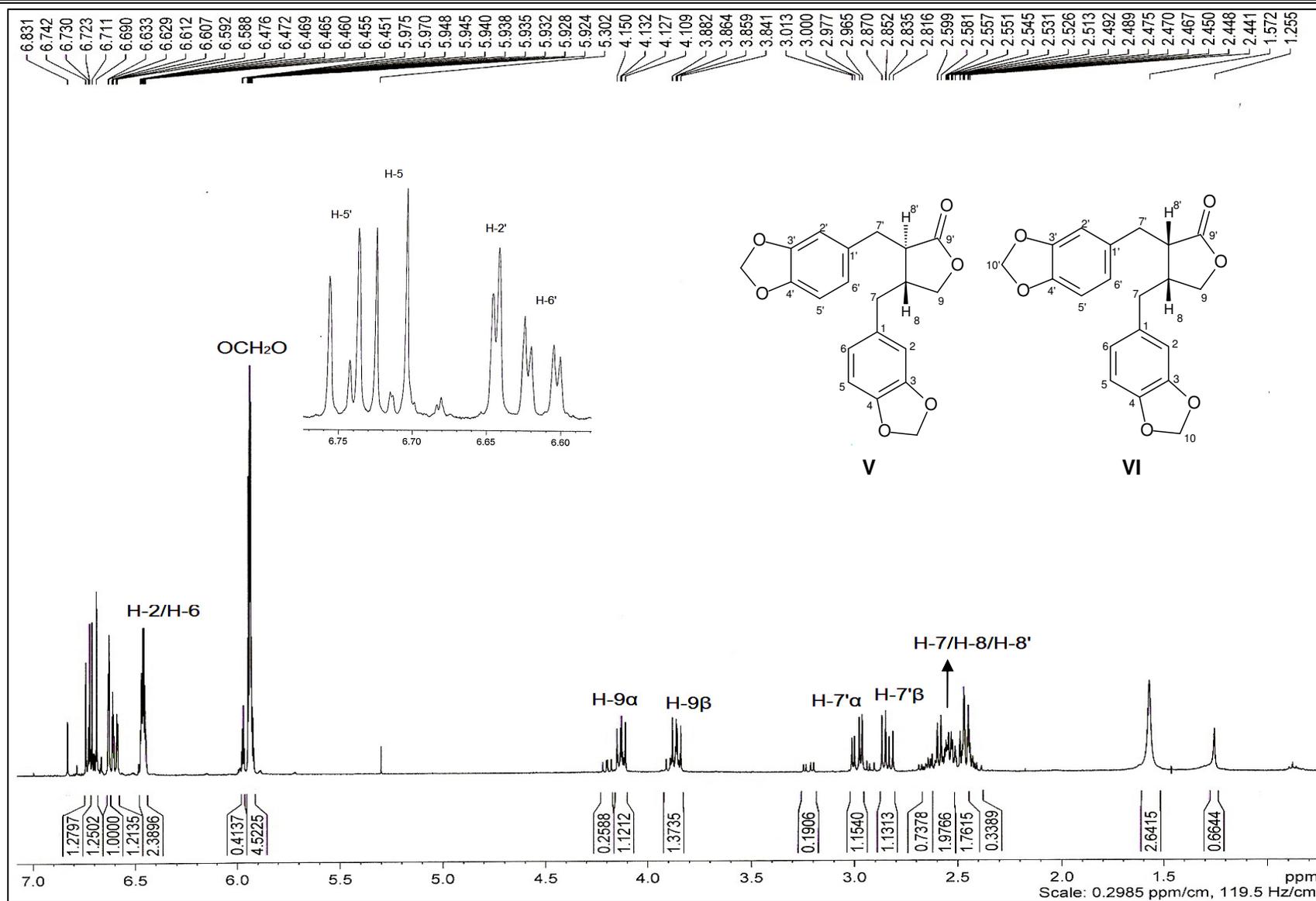


FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de ¹H das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl₃).

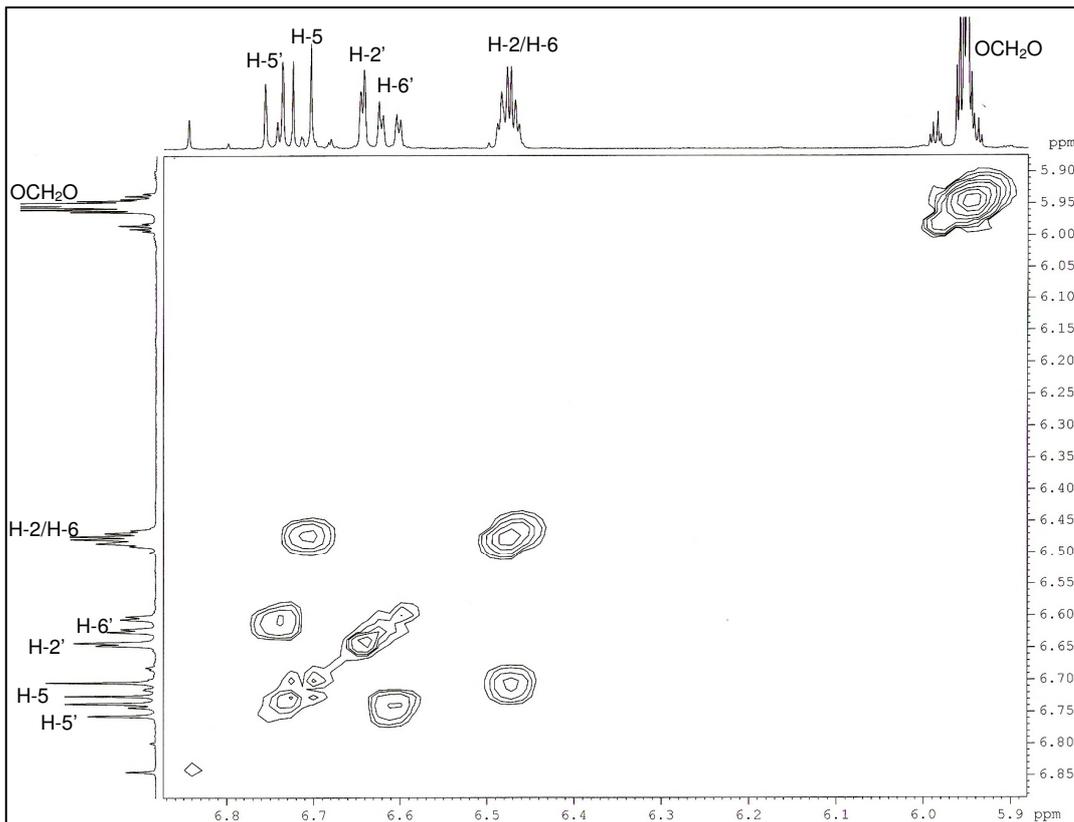


FIGURA 4.19 – Expansão do mapa de contornos COSY das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, CDCl₃).

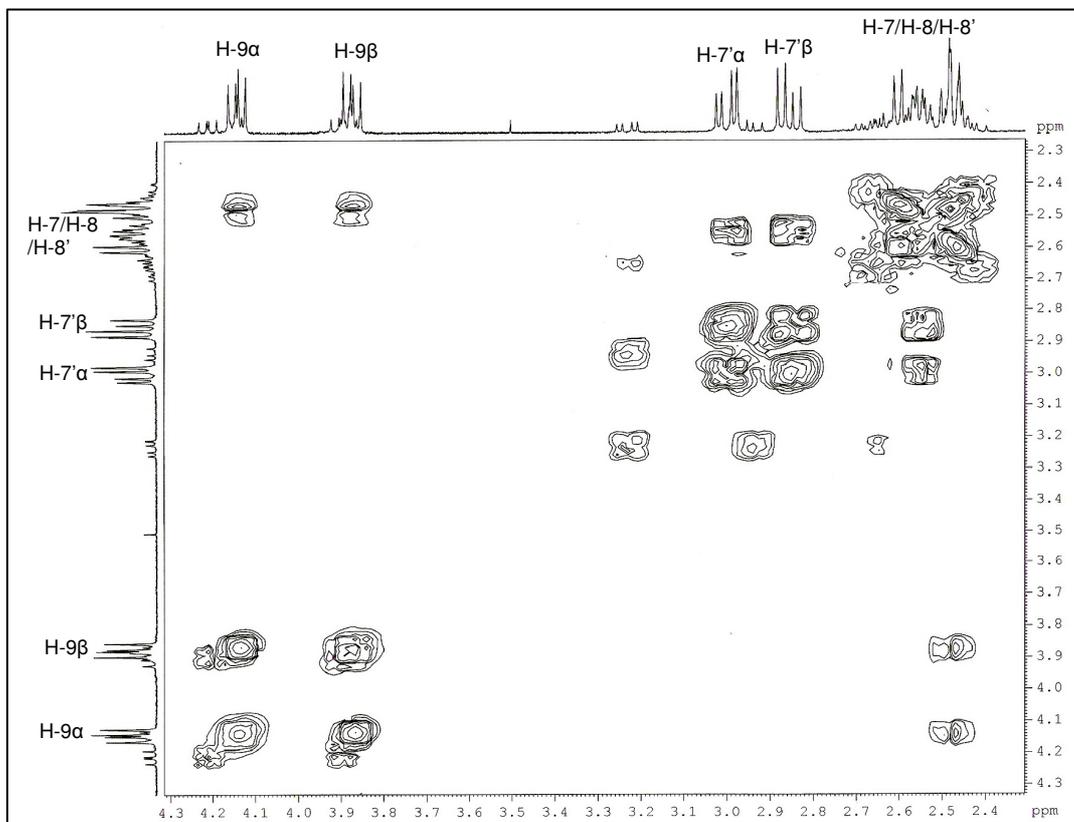


FIGURA 4.20 – Expansão do mapa de contornos COSY das substâncias **V** e **VI** (400 MHz, CDCl₃).

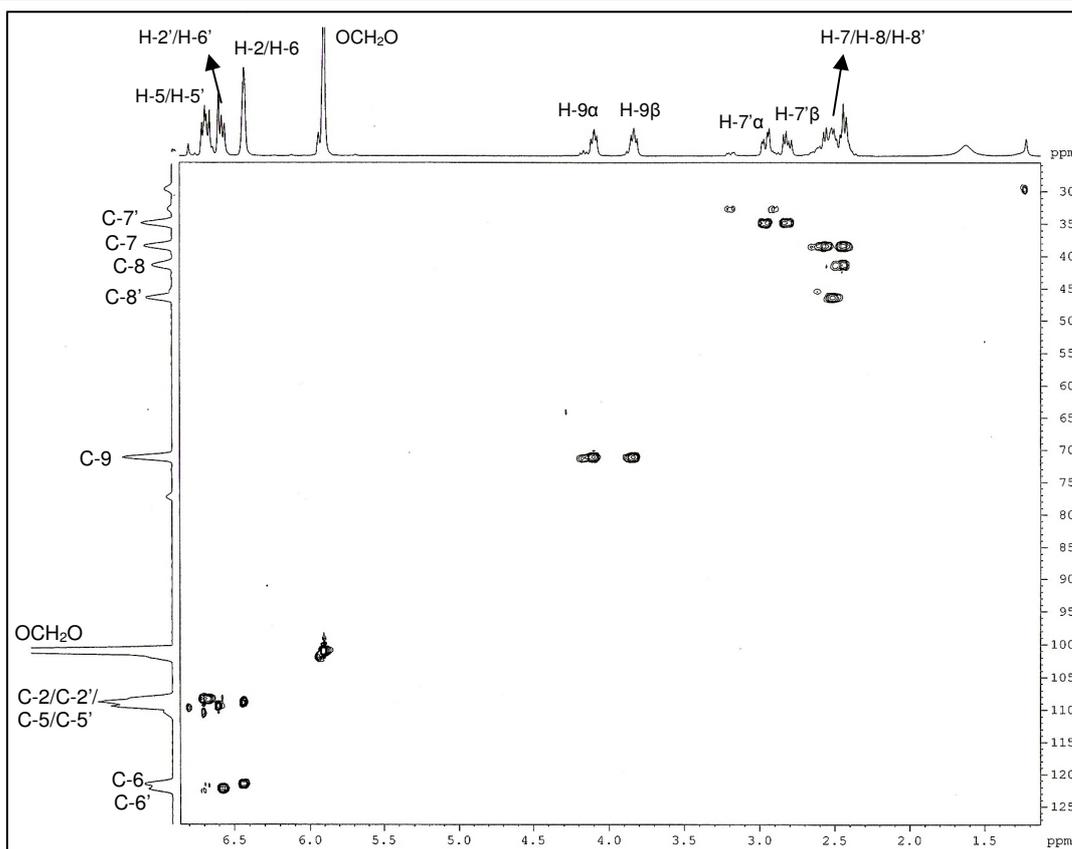


FIGURA 4.21 - Mapa de correlações HSQC das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl₃).

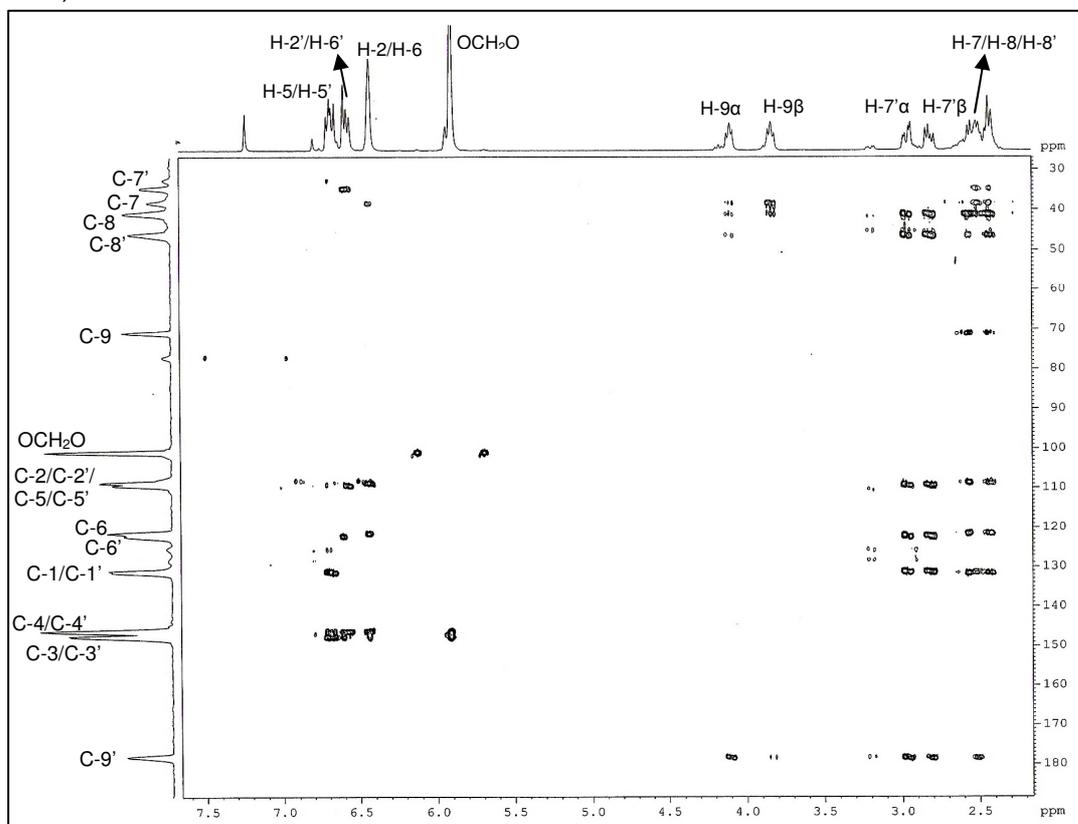
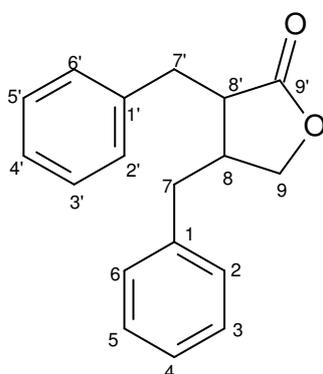


FIGURA 4.22 – Mapa de correlações HMBC das substâncias V e VI (400 MHz, CDCl₃).

4.3.2.3 – Identificação Estrutural da Substância VII.

A substância **VII** foi isolada da fração L, obtida das injeções no cromatógrafo contracorrente. A identificação estrutural dessa substância foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura (LOPES *et al.*, 1983; MESSIANO *et al.*, 2008)

Ao analisar os sinais do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.23), foram observados sinais similares àqueles observados para a substância **V**, que indicavam que a substância **VII** também é uma lignana dibenzilbutirolactônica.



Os sinais referentes aos hidrogênios H-9 α e H-9 β , foram observados em deslocamentos químicos δ_{H} 4,15 e δ_{H} 3,81-3,90, respectivamente. O primeiro, um duplo dubleto com constantes de acoplamento de $J = 6,8$ e $8,8$ Hz; o segundo sinal, que deveria ser um duplo dubleto, se apresentou como um multipletto por estar sobreposto com dois singletos intensos, característicos de grupos metoxílicos. Pelo mapa de correlações HSQC (Figura 4.26), esses dois hidrogênios estão ligados diretamente ao carbono δ_{C} 71,2, indicando que se trata de hidrogênios diastereotópicos. O acoplamento entre esses dois hidrogênios é confirmado ainda pela correlação observada do mapa de contornos COSY (Figuras 4.24 e 4.25).

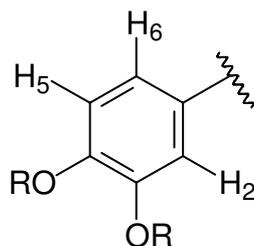
No mapa de correlações HMBC (Figura 4.27 e 4.28), os sinais desses hidrogênios correlacionam-se com o do carbono carboxílico C-9' (δ_{C} 178,7) e com outros três carbonos, δ_{C} 38,4; δ_{C} 41,4 e δ_{C} 46,6. Novamente, a análise do mapa de correlações HSQC revelou que esses sinais de carbonos referem-se a carbonos de grupo CH_2 e dois grupos CH , respectivamente. Dessa forma, com base nesses dados de HSQC e na estrutura geral proposta, esses sinais referem-se aos carbonos C-7 (δ_{C} 38,3), C-8 (δ_{C} 41,2) e C-8' (δ_{C} 46,3).

Os carbonos C-8 e C-8' foram distinguidos, novamente, através das correlações observadas para os respectivos hidrogênios. Os hidrogênios H-7, H-8 e H-8' são representados, no espectro de RMN de ^1H , pelo multipletto δ_{H} 2,47-2,63 e, apenas a região correspondente ao carbono de deslocamento δ_{C} 46,3 apresentou correlação com o sinal do carbono carboxílico C-9', permitindo assim, que este valor de deslocamento químico fosse atribuído ao C-8', e por conseqüência, os deslocamentos δ_{C} 41,2 e δ_{C} 38,3 atribuídos a C-8 e C-7, respectivamente.

Dois outros duplos dubletos foram observados no RMN de ^1H , δ_{H} 2,96 (*dd*, $J = 5,2$ e $14,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 2,85 (*dd*, $J = 7,2$ e $14,0$ Hz, 1H). Esses hidrogênios são diastereotópicos, ligados ao carbono δ_{C} 34,8, e apresentam correlação com os carbonos C-8 e C-8', sendo assim atribuídos como hidrogênios H-7' α e H-7' β .

Na região dos sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos no espectro de RMN de ^1H , os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios e de seus respectivos carbonos (mapa de correlações HSQC), são: δ_{H} 6,76 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_{C} 111,0; δ_{H} 6,71 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_{C} 108,0; δ_{H} 6,60 (*m*, 1H) e δ_{C} 109,5; δ_{H} 6,58 (*m*, 1H) e δ_{C} 122,3; δ_{H} 6,56 (*m*, 1H) e δ_{C} 120,6; δ_{H} 6,47 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H) e δ_{C} 111,7.

No mapa de contornos COSY foram observadas correlações do sinal δ_{H} 6,76 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) com o sinal δ_{H} 6,56 (*m*, 1H) e deste com o sinal δ_{H} 6,47 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H). Através das constantes e multiplicidades desses sinais é possível afirmar que se trata de um anel aromático 3,4-substituído.

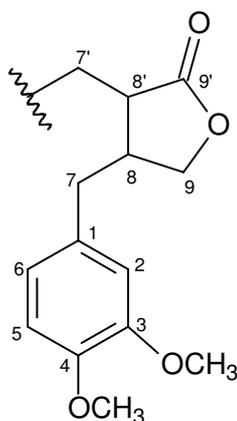


Os sinais podem então ser atribuídos com base nas constantes de acoplamento, que são características de acoplamento *orto* (8,0 Hz) e *meta* (2,0 Hz): o hidrogênio δ_{H} 6,76 (H-5) acopla em *orto* com o hidrogênio δ_{H} 6,56 (H-6) e este acopla em *meta* com o hidrogênio δ_{H} 6,47 (H-2) e seus respectivos carbonos δ_{C} 111,0 (C-5); δ_{C} 120,6 (C-6) e δ_{C} 111,7 (C-2).

No mapa de contornos HMBC, os sinais dos hidrogênios H-7 apresentaram correlações com os carbonos δ_{C} 111,7 (C-2); δ_{C} 120,6 (C-6) e δ_{C} 130,6 (C-1), confirmando a qual dos anéis aromáticos pertence tais hidrogênios e

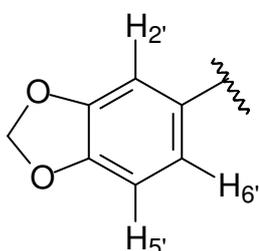
carbonos. Ainda no HMBC, tem-se também, os sinais dos hidrogênios H-5 e H-2 correlacionando com os dos carbonos δ_C 148,0 (C-4) e δ_C 149,2 (C-3) e o do hidrogênio H-6 correlacionando-se apenas com δ_C 148,0 (C-4).

Foram observados no espectro de RMN de ^1H dois singletos bastante intensos em δ_H 3,85 e δ_H 3,83, ambos integrados para três hidrogênios, caracterizando a presença de dois grupos metoxilícos como substituintes na estrutura, ligados ao carbono δ_C 55,6 (OCH₃) pela correlação observada no mapa de correlações HSQC. No mapa de correlações HMBC esses singletos se correlacionam com os dois sinais de carbonos δ_C 148,0 (C-4) e δ_C 149,2 (C-3), confirmando a estrutura deste anel aromático.



Os demais sinais δ_H 6,71 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_C 108,0; δ_H 6,60 (*m*, 1H) e δ_C 109,5; δ_H 6,58 (*m*, 1H) e δ_C 122,3 referem-se aos hidrogênios do segundo anel aromático.

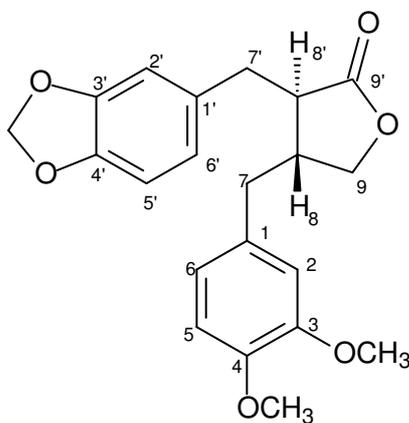
Também foram observados no espectro de RMN de ^1H dois dubletos em δ_H 5,94 e δ_H 5,93, ambos integrados para um hidrogênio e com constantes de acoplamento de 1,2 Hz, indicando que acoplam entre si. Esses sinais correlacionam com apenas um carbono no espectro de HSQC, δ_C 100,9, indicando serem hidrogênios diastereotópicos. Esses dados confirmam que se trata de um grupo metilenodióxi e, este é substituinte no segundo anel aromático. Assim, tendo um grupo metilenodióxi como substituinte, o segundo anel aromático é um também sistema 3,4-substituído.



O dubleto em δ_H 6,71 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H), com valor de constante de acoplamento característico de acoplamento *orto* foi atribuído ao hidrogênio H-5'. No mapa de contornos COSY esse hidrogênio se correlaciona com o sinal δ_H 6,58 atribuído ao hidrogênio H-6' e este por sua vez correlaciona com o hidrogênio δ_H 6,60 atribuído ao H-2'. A partir dessas atribuições foram assinalados os deslocamentos químicos de carbonos δ_C 108,0 (C-5'); δ_C 109,5 (C-2') e δ_C 122,3 (C-6').

No mapa de correlações HMBC, os sinais dos hidrogênios H-7' apresentaram correlações com os dos carbonos δ_C 109,5 (C-2'); δ_C 122,3 (C-6') e δ_C 131,6 (C-1'), os dos hidrogênios H-5' e H-2' correlacionam-se com os dos carbonos δ_C 146,6 (C-3') e δ_C 148,0 (C-4') e o hidrogênio H-6' correlacionando-se apenas com δ_C 148,0 (C-4'). O segundo anel aromático é um sistema 3',4'-metilenodioxibenzilíco. Assim, a substância **VII** foi identificada como a lignana kusunokinina.

Para determinar a configuração absoluta da substância **VII**, foi realizado um experimento de medida de rotação óptica específica (α_D) onde se obteve o valor de $\alpha_D = -36,4^\circ$ (CHCl_3), que comparado com a literatura $\alpha_D = -40,0^\circ$ (CHCl_3), (MESSIANO *et al.*, 2008), trata-se da (-)-kusunokinina.



(-)-Kusunokinina (**VII**)

TABELA 4.9 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **VII** e comparação com a kusunokina (MESSIANO *et al.*, 2008: CDCl_3 , 500 MHz para RMN de ^1H ; LOPES *et al.*, 1983: CDCl_3 , 20 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Substância VII | MESSIANO <i>et al.</i> , 2008 | Substância VII | LOPES <i>et al.</i> , 1983 |
| 1 | - | - | 130,6 | 130,3 |
| 1' | - | - | 131,6 | 131,1 |
| 2 | 6,47 (<i>d</i> , 2,0) | 6,42 (<i>d</i> , 2,0) | 111,7 | 111,9 |
| 2' | 6,60 (<i>m</i>) | 6,54 (<i>d</i> , 2,0) | 109,5 | 109,1 |
| 3 | - | - | 149,2 | 149,0 |
| 3' | - | - | 146,6 | 147,2 |
| 4 | - | - | 148,0 | 147,2 |
| 4' | - | - | 148,0 | 145,6 |
| 5 | 6,76 (<i>d</i> , 8,0) | 6,70 (<i>d</i> , 8,5) | 111,0 | 111,5 |
| 5' | 6,71 (<i>d</i> , 8,0) | 6,65 (<i>d</i> , 8,0) | 108,0 | 107,8 |
| 6 | 6,56 (<i>m</i>) | 6,51 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,5) | 120,6 | 120,4 |
| 6' | 6,58 (<i>m</i>) | 6,53 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,0) | 122,3 | 121,9 |
| 7α | 2,47-2,63 (<i>m</i>) | 2,55 (<i>dd</i> , 5,5 e 12,5) | 38,3 | 37,9 |
| 7β | | 2,44 (<i>d</i> , 12,5) | | |
| 7'α | 2,96 (<i>dd</i> , 5,2 e 14,0) | 2,90 (<i>dd</i> , 5,5 e 14,0) | 34,8 | 34,5 |
| 7'β | 2,85 (<i>dd</i> , 7,2 e 14,0) | 2,79 (<i>dd</i> , 7,0 e 14,0) | | |
| 8 | 2,47-2,63 (<i>m</i>) | 2,44 (<i>ddt</i> , 5,5; 7,0; 8,7) | 41,2 | 41,0 |
| 8' | 2,47-2,63 (<i>m</i>) | 2,47 (<i>ddt</i> , 5,5; 7,0; 8,7) | 46,3 | 46,1 |
| 9α | 4,15 (<i>dd</i> , 6,8 e 8,8) | 4,07 (<i>dd</i> , 7,0 e 9,0) | 71,2 | 70,7 |
| 9β | 3,81-3,90 (<i>m</i>) | 3,81 (<i>dd</i> , 7,0 e 9,0) | 178,2 | 178,0 |
| 9' | - | - | | |
| OCH₂O | 5,93 (<i>d</i> , 1,2) | 5,87 (<i>d</i> , 1,5) | 100,9 | 100,9 |
| OCH₂O | 5,94 (<i>d</i> , 1,2) | 5,88 (<i>d</i> , 1,5) | | |
| 3'-OCH₃ | 3,85 (<i>s</i>) | 3,77 (<i>s</i>) | 55,6 | 55,7 |
| 4'-OCH₃ | 3,83 (<i>s</i>) | 3,79 (<i>s</i>) | | |

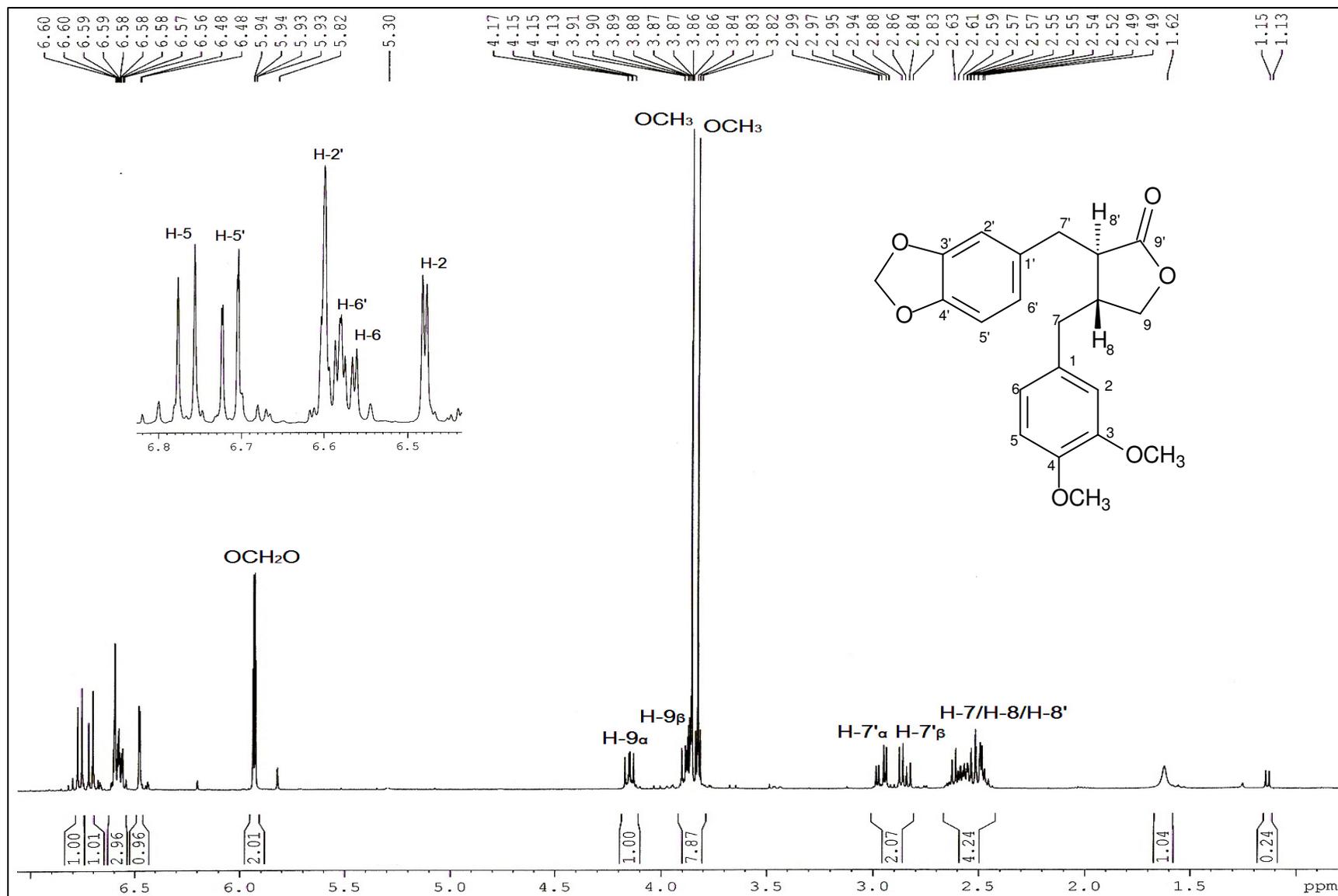


FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ^1H da substância VII (400 MHz, CDCl_3).

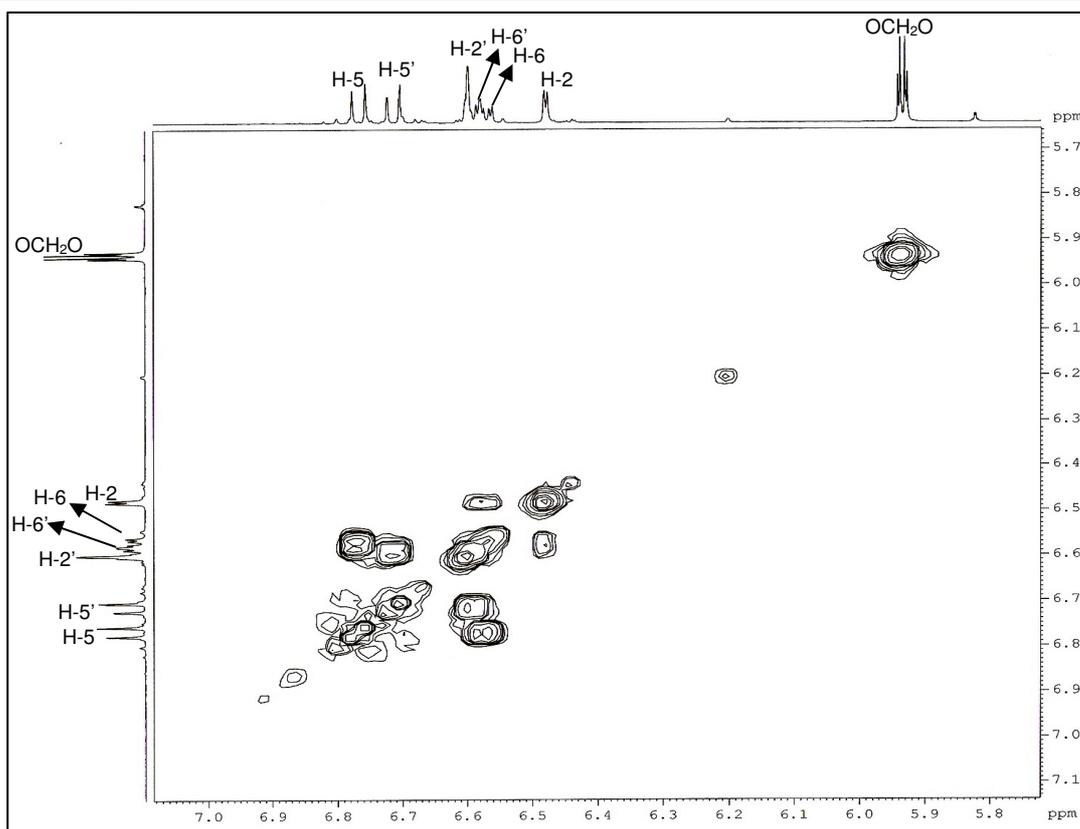


FIGURA 4.24 – Expansão do mapa de contornos COSY da substância VII (400 MHz, CDCl₃).

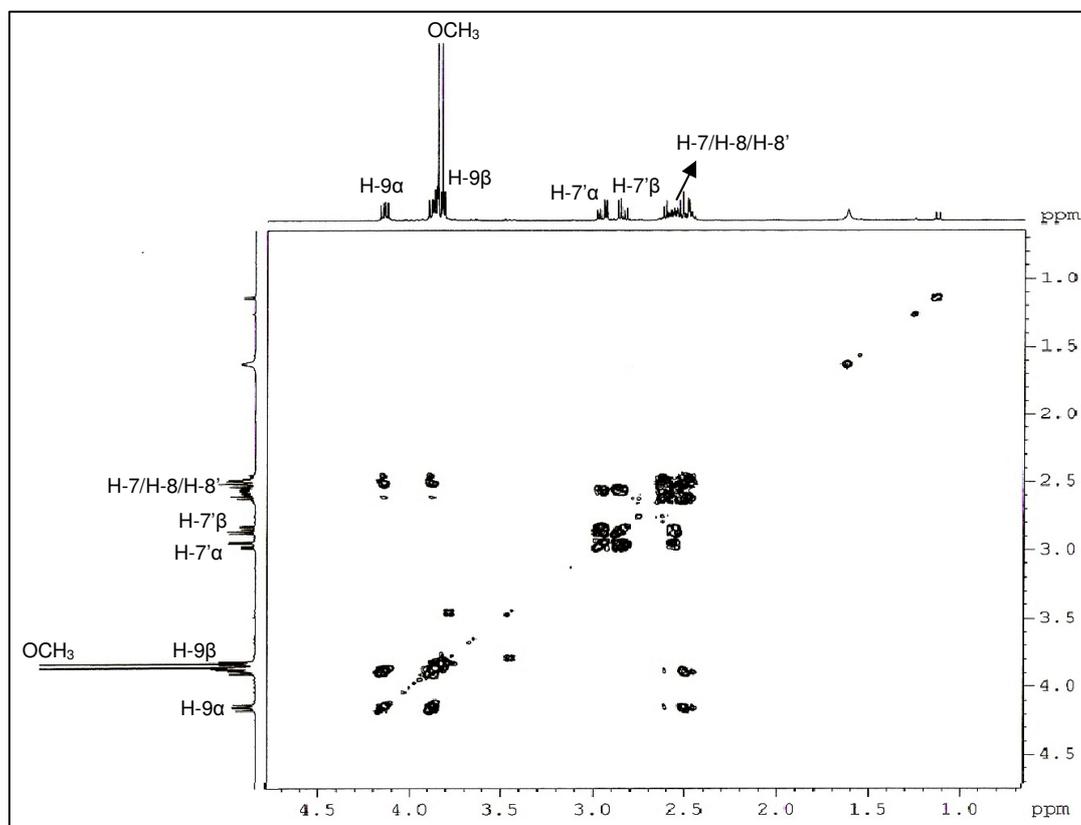


FIGURA 4.25 – Expansão do mapa de contornos COSY da substância VII (400 MHz, CDCl₃).

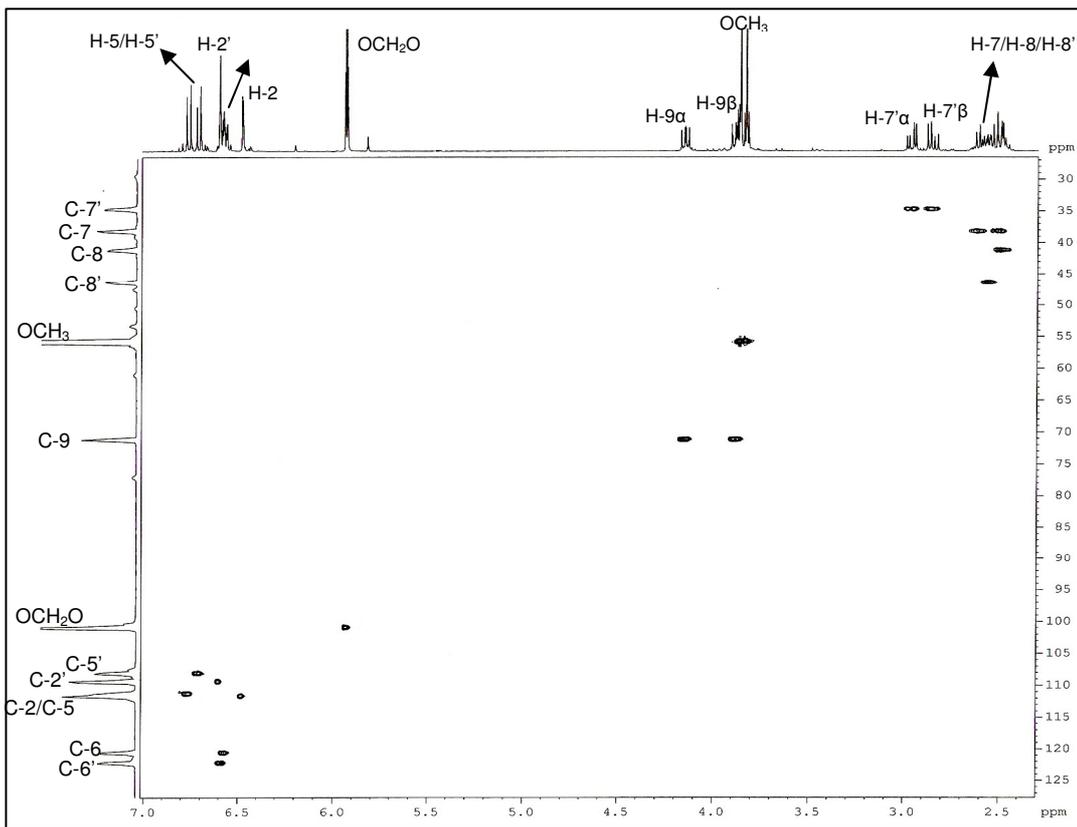


FIGURA 4.26 - Mapa de correlações HSQC da substância VII (400 MHz, CDCl₃).

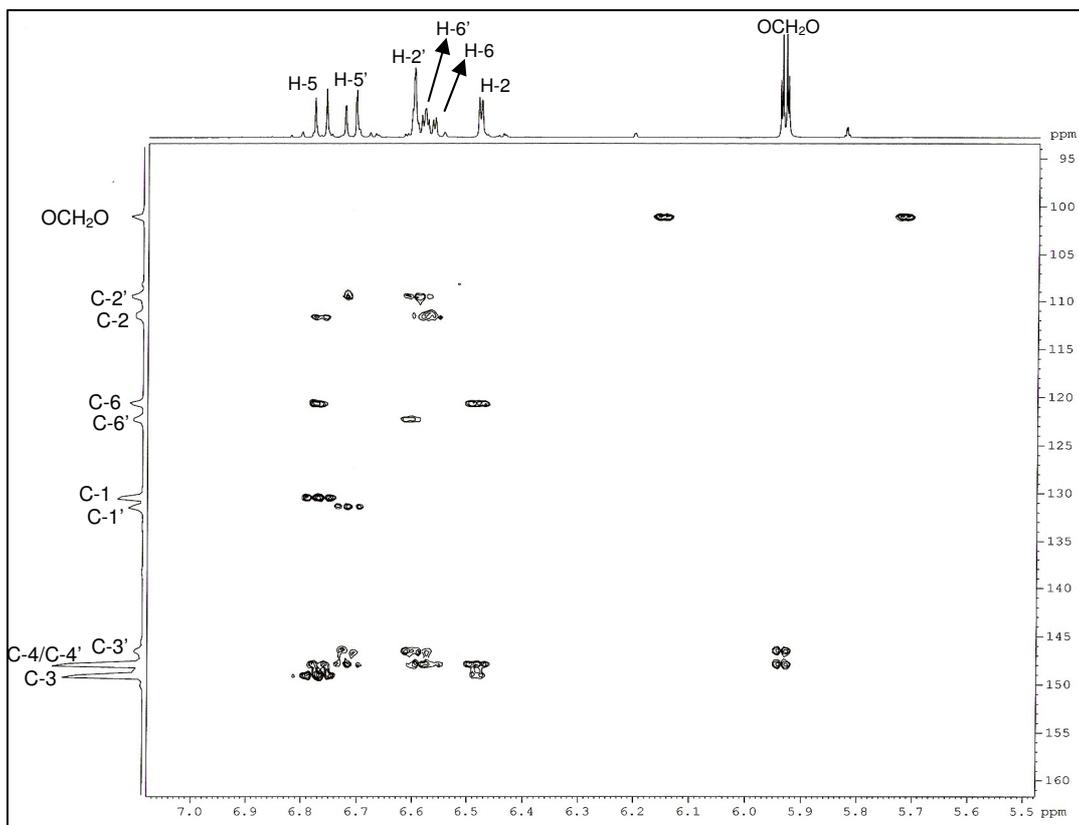


FIGURA 4.27 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância VII (400 MHz, CDCl₃).

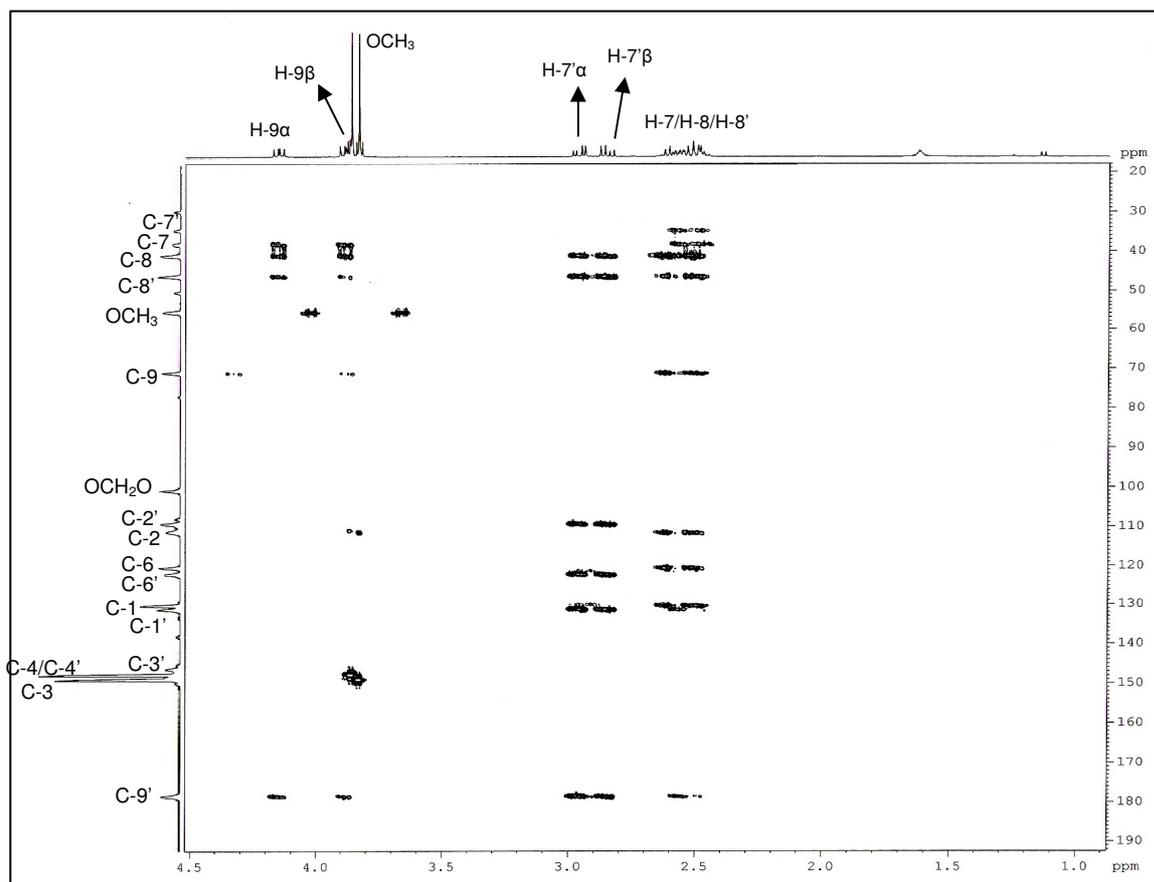


FIGURA 4.28 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância **VII** (400 MHz, CDCl₃).

4.3.3 – Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de metabólitos secundários de ampla ocorrência na natureza. São encontrados em frutas, vegetais, cereais e plantas medicinais (GATTUSO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). Esta classe de substâncias naturais tem atraído a atenção de pesquisadores devido às propriedades biológicas e farmacológicas que apresenta. Além da grande atividade antioxidante, apresentam também atividades anti-inflamatórias, antivirais, antimicrobianas, propriedade estrogênica, dentre outras (GATTUSO *et al.*, 2007; HARBONE e WILLIAMS, 2000; ZHANG *et al.*, 2005).

Os flavonóides estão divididos em nove subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonóis (flavan-3-ol ou catequinas) chalconas e dihidrochalconas (Figura 4.29) que são diferenciadas entre si por variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (WANG e HUANG, 2004; LIN *et al.*, 2008). A combinação das nove subclasses com glicosilações em diferentes sítios e a grande variedade de açúcares produz um enorme número de diferentes compostos para esta classe de substâncias naturais.

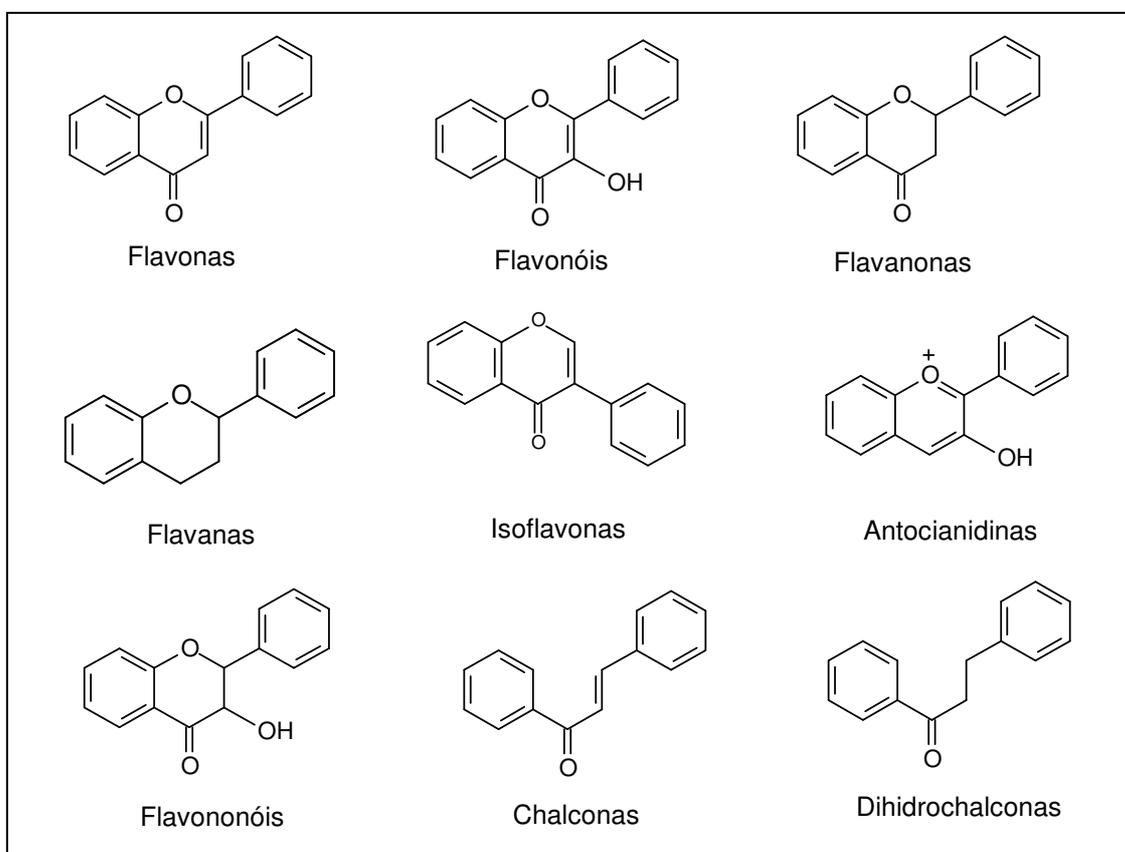


FIGURA 4.29 – Classificação dos flavonóides por subclasses.

O esqueleto flavonoídico é composto por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico, a partir do qual é iniciada a numeração dos carbonos e determinada a nomenclatura sistemática oficial IUPAC. No caso das flavonas, que apresentam um grupo carbonila na posição C-4 e os dois anéis aromáticos são conectados com um anel pirano, o sistema passa a receber a nomenclatura 4H-1-benzopiran-4-ona e os substituintes recebem a numeração sistêmica. Na nomenclatura usual (MARKHAN, 1982) os anéis são designados como A, B e C (Figura 4.30) e os átomos de carbono individuais são numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e algarismos marcados linha (') para o anel B, na seqüência os substituintes recebem numeração de acordo com a posição e a subclasse flavonoídica é então especificada.

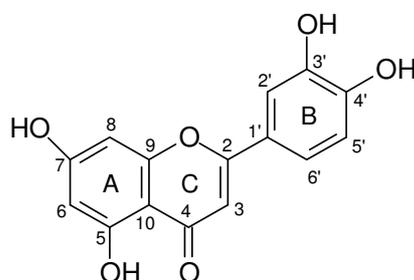


FIGURA 4.30 – Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual.

A substituição, nos esqueletos flavonoídicos, por unidades glicosídicas é muito comum e aumenta significativamente a quantidade de diferentes flavonóides possíveis e/ou existentes. A confirmação da presença de glicosídeos como substituintes pode ser obtida através de dados de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. O sinal em torno de δ_{H} 5,0 ppm é característico de hidrogênio anomérico e, sinais na faixa de δ_{H} 4,0 e δ_{H} 3,0 ppm são característicos dos demais hidrogênios de glicosídeos. A presença de uma unidade de raminose pode ser confirmada através da observação de um dubleto com deslocamento químico de aproximadamente δ_{H} 1,0 ppm ($J = 6,0$ Hz) (HARBONE e MABRY, 1982). Nos espectros de RMN de ^{13}C observam-se os sinais com deslocamentos químicos em torno de δ_{C} 100,0 ppm característico de carbono anomérico para uma ligação C-O glicosídica e em torno de δ_{C} 73,0 ppm para carbono anomérico de ligação C-C glicosídica. Sinais na faixa δ_{C} 61,0-70,0 ppm são característicos dos demais carbonos de unidades de glicosídeos. Novamente, uma unidade de raminose pode

ser confirmada pelo sinal de carbono de metila em δ_C 17,0 ppm (AGRAWAL, 1989). A configuração do glicosídeo ligado à aglicona pode ser determinada pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico. A Tabela 4.10 traz a relação entre as constantes de acoplamento e as estereoquímicas relativas das ligações entre os glicosídeos e a aglicona.

TABELA 4.10 – Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982)

| Grupo | Glicosídeo | Configuração | $J_{H-1''/H-2''}$ (Hz) |
|--------------------|-----------------------|--------------|------------------------|
| Piranosídeo | D-glicose, galactose, | $-\beta-$ | 7-8 |
| | D-glicose, galactose, | $-\alpha-$ | 3-4 |
| | L-raminose | $-\beta-$ | 1 |
| | L-raminose | $-\alpha-$ | 2 |
| | L-arabinose | $-\beta-$ | 2,5 |
| | L-arabinose | $-\alpha-$ | 8 |
| Furanosídeo | D-glicose, galactose, | $-\beta-$ | 0-2 |
| | D-glicose, galactose, | $-\alpha-$ | 4-4,5 |
| | L-arabinose | $-\beta-$ | 4 |
| | L-arabinose | $-\alpha-$ | 1 |

4.3.3.1 – Identificação Estrutural da Substância VIII.

O estudo da fração acetato de etila obtida do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* revelou ser esta fração rica em flavonóides, sendo este o primeiro relato em literatura desta classe de compostos nesta espécie.

A substância **VIII** foi isolada das frações S3-20 e S3-24, sendo obtida também em mistura na fração S3-18, isolada como um óleo amarelo e como sendo a substância majoritária na fração acetato de etila (FMA). A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (SANTOS *et al.*, 2005).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.32) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B com sinais em δ_{H} 7,30 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-2'); δ_{H} 7,25 (*dd*, $J = 2,4$ e 8,8 Hz, H-6') e δ_{H} 6,86 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-5'). Os valores das constantes estão de acordo com o acoplamento em *orto* ($J = 8,8$ Hz) entre H-6' e H-5' e acoplamento em *meta* ($J = 2,4$ Hz) entre os hidrogênios H-6' e H-2'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,38 (*sl*, H-8) e δ_{H} 6,19 (*sl*, H-6) e esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel.

No mapa de contornos COSY (Figura 4.33) os acoplamentos para o anel B são confirmados onde se observa que o hidrogênio em δ_{H} 7,30 se correlaciona com o do hidrogênio δ_{H} 7,25 e este por sua vez se correlaciona com o do hidrogênio δ_{H} 6,86. Através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.34) os sinais dos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' indicam que estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 115,5 (C-2'), δ_{C} 120,9 (C-6') e δ_{C} 115,5 (C-5') respectivamente. No mapa de correlações HMBC (Figura 4.35) o sinal do hidrogênio H-2' se correlaciona com os carbonos δ_{C} 120,7 (C-1') δ_{C} 145,1 (C-3'), δ_{C} 148,4 (C-4') e δ_{C} 157,5 (C-2), o do hidrogênio H-6' se correlaciona com os carbonos δ_{C} 115,5 (C-5'); δ_{C} 148,4 (C-4') e δ_{C} 157,5 (C-2) e o do hidrogênio H-5' se correlaciona com os carbonos δ_{C} 120,9 (C-6') δ_{C} 145,1 (C-3'), δ_{C} 148,4 (C-4') e uma fraca correlação com δ_{C} 157,5 (C-2), permitindo assim, a atribuição de todos os carbonos do anel B.

Para o anel A, observa-se, no mapa de contornos COSY o acoplamento entre os hidrogênios H-6 e H-8 e no mapa de correlações HSQC que

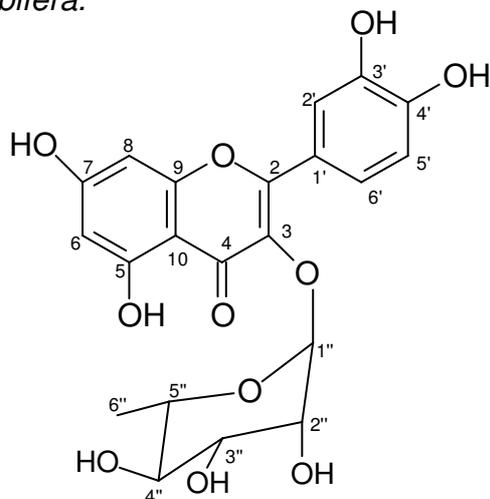
esses hidrogênios estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 93,3 (C-8) e δ_C 98,6 (C-6) respectivamente. Os demais carbonos podem ser atribuídos segundo as correlações observadas no mapa de correlações HMBC onde o sinal do hidrogênio H-6 se correlaciona com os carbonos δ_C 93,3 (C-8), δ_C 104,1 (C-10), δ_C 161,3 (C-5) e δ_C 164,6 (C-7) e o do hidrogênio H-8 se correlaciona com os carbonos δ_C 98,6 (C-6), δ_C 104,1 (C-10), δ_C 156,4 (C-9) e δ_C 164,6 (C-7).

Observou-se no espectro de RMN de ^1H o sinal de deslocamento químico característico de metila de raminose δ_H 0,81 (*d*, $J = 6,4$ Hz, H-6'') indicando ter-se um glicosídeo como substituinte no esqueleto flavonoídico. O sinal em δ_H 5,26 (*d*, $J = 1,4$ Hz, H-1'') refere-se ao hidrogênio anomérico e este valor de constante de acoplamento é característico de α -L-raminosídeo (SANTOS *et al.*, 2005). Através do mapa de contornos COSY o hidrogênio anomérico H-1'' acopla diretamente com o hidrogênio δ_H 3,98 (*sl*, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,51 (*dd*, $J = 2,8$ e $9,2$ Hz, H-3''). O hidrogênio H-3'' se correlaciona com o multiplete δ_H 3,20 integrado para dois hidrogênios que se refere aos hidrogênios H-4'' e H-5''. Através do mapa de correlações HSQC os hidrogênios H-1'' e H-6'' estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 101,7 (C-1'') e δ_C 17,3 (C-6''), respectivamente. Os demais hidrogênios glicosídicos estão ligados a carbonos na faixa δ_C 69,8-71,2; deslocamentos característicos de carbonos carbinólicos. No mapa de correlações HMBC, o sinal do hidrogênio anomérico H-1'' se correlaciona com o do carbono δ_C 134,6 (C-3), confirmando a posição de substituição da unidade raminose. A substituição nesta posição pode ser confirmada também, por comparação entre os valores de deslocamentos de C-2 e C-3 para a aglicona quercetina e para a quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo encontrados na literatura (Tabela 4.11) (AGRAWAL, 1989).

TABELA 4.11 – Comparação de valores de deslocamentos para C-2 e C-3 em DMSO- d_6

| | C-2 (ppm) | C-3 (ppm) |
|--|-----------|-----------|
| Quercetina | 147,5 | 136,5 |
| Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-raminosídeo | 156,4 | 134,4 |
| Substância VIII | 157,5 | 134,6 |

Com base nos dados descritos acima, a substância **VIII** foi identificada como a flavona quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (quercitrina), primeira vez relatada para a espécie *Virola sebifera*.



Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (quercitrina) (**VIII**)

No espectro de massas (Figura 4.31), o pico m/z 447 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular da quercitrina. O fragmento $[M-H-147]^-$, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade raminosídica e os demais fragmentos $[M-H-147-29]^-$, $[M-H-147-121]^-$ e $[M-H-147-149]^-$ são referentes a quebras no anel C. A proposta de fragmentação para formação desses fragmentos está representada no Esquema 4.2.

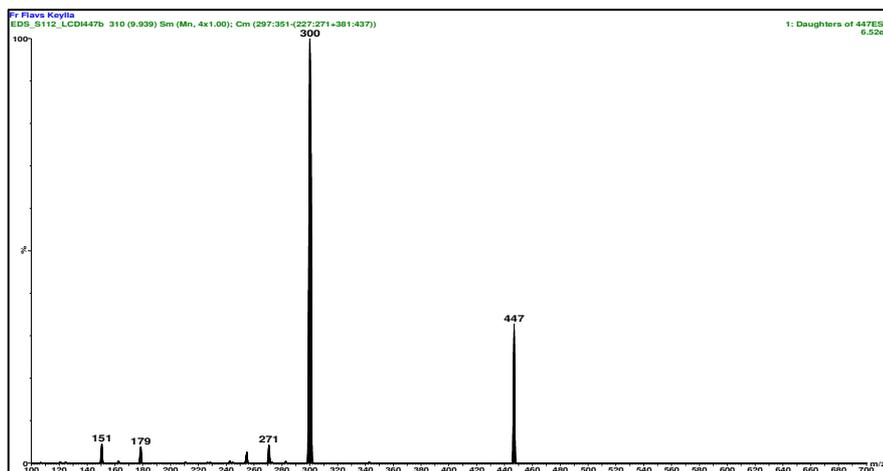
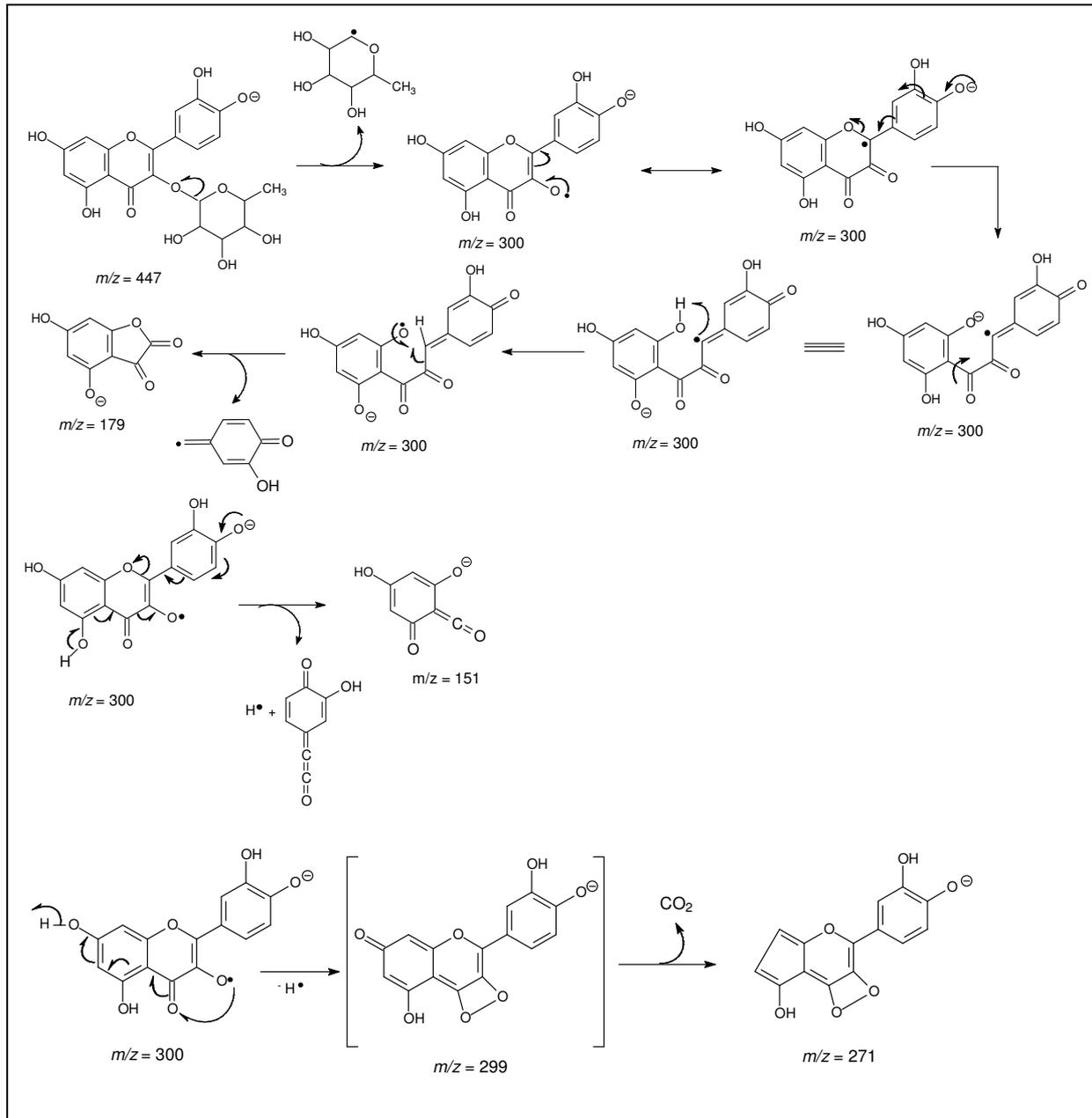


FIGURA 4.31 – Espectro de massas no modo negativo da substância **VIII**.



ESQUEMA 4.2 – Proposta de fragmentação para a substância VIII.

TABELA 4.12 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância **VIII** e comparação com a quercetina-3- O - α -L-raminosídeo (SANTOS *et al.*, 2005: DMSO- d_6 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|-----|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| | Substância VIII | SANTOS <i>et al.</i> , 2005 | Substância VIII | SANTOS <i>et al.</i> , 2005 |
| 2 | - | - | 157,5 | 156,8 |
| 3 | - | - | 134,6 | 134,7 |
| 4 | - | - | 178,0 | 178,2 |
| 5 | - | - | 161,3 | 161,8 |
| 6 | 6,19 (<i>s</i>) | 6,20 (<i>d</i> , 2,2) | 98,6 | 99,3 |
| 7 | - | - | 164,6 | 164,9 |
| 8 | 6,38 (<i>s</i>) | 6,38 (<i>d</i> , 2,2) | 93,3 | 94,2 |
| 9 | - | - | 156,4 | 157,0 |
| 10 | - | - | 104,1 | 104,5 |
| 1' | - | - | 120,7 | 121,3 |
| 2' | 7,30 (<i>d</i> , 2,4) | 7,29 (<i>d</i> , 2,2) | 115,5 | 116,2 |
| 3' | - | - | 145,1 | 145,7 |
| 4' | - | - | 148,4 | 149,0 |
| 5' | 6,86 (<i>d</i> , 8,8) | 6,88 (<i>d</i> , 8,0) | 115,5 | 116,0 |
| 6' | 7,25 (<i>dd</i> , 2,4 e 8,8) | 7,25 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,2) | 120,9 | 121,7 |
| 1'' | 5,26 (<i>d</i> , 1,4) | 5,28 (<i>d</i> , 1,4) | 101,7 | 102,4 |
| 2'' | 3,98 (<i>s</i>) | 3,98 (<i>m</i>) | 69,8-71,2 | 70,6 |
| 3'' | 3,51 (<i>dd</i> , 2,8 e 9,2) | 3,75 (<i>m</i>) | 69,8-71,2 | 71,7 |
| 4'' | 3,20 (<i>m</i>) | 3,21 (<i>m</i>) | 69,8-71,2 | 71,1 |
| 5'' | 3,20 (<i>m</i>) | 3,50 (<i>m</i>) | 69,8-71,2 | 70,9 |
| 6'' | 0,81 (<i>d</i> , 6,4) | 0,80 (<i>s</i>) | 17,3 | 18,0 |

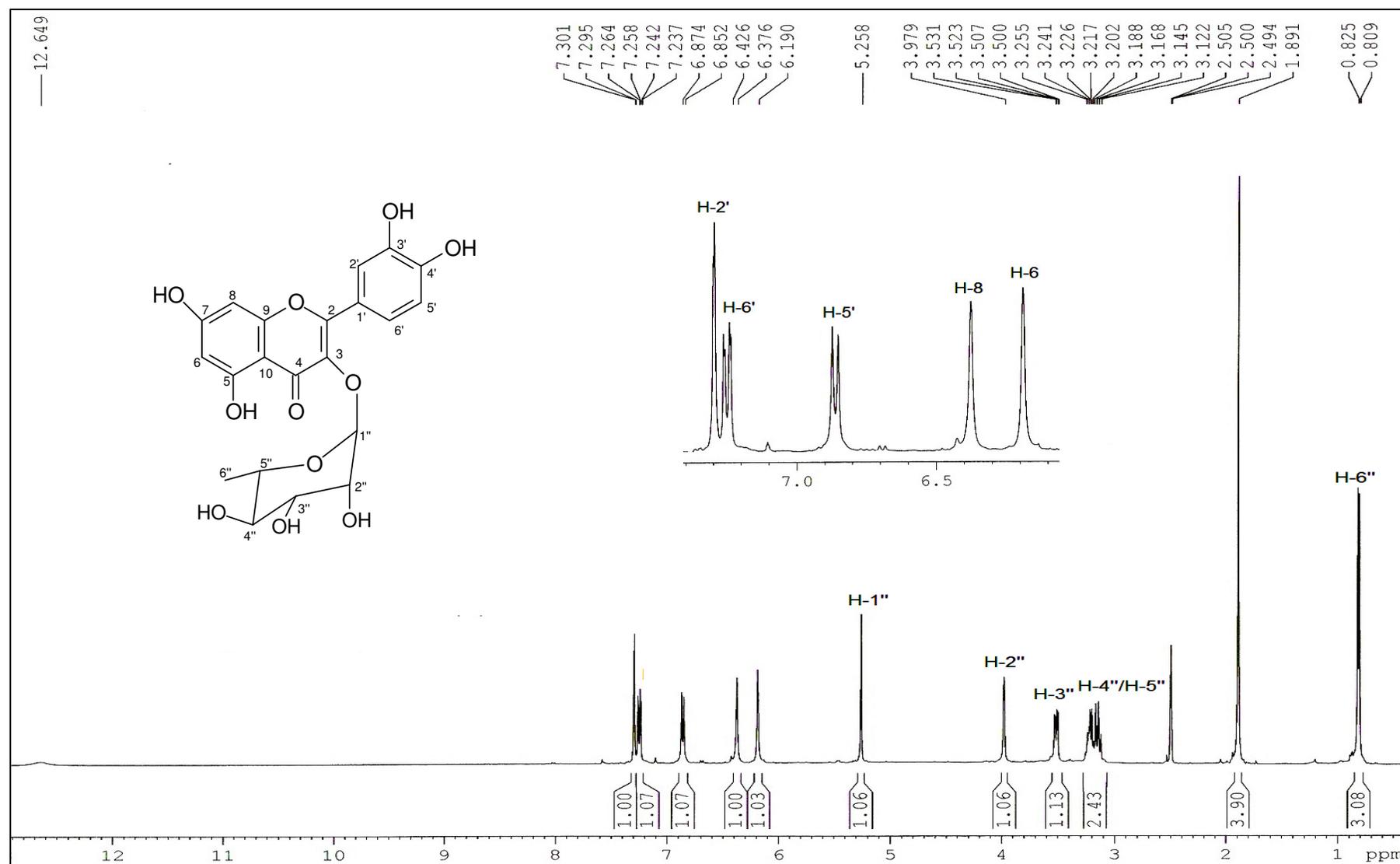


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ^1H da substância VIII (400 MHz, DMSO-d_6).

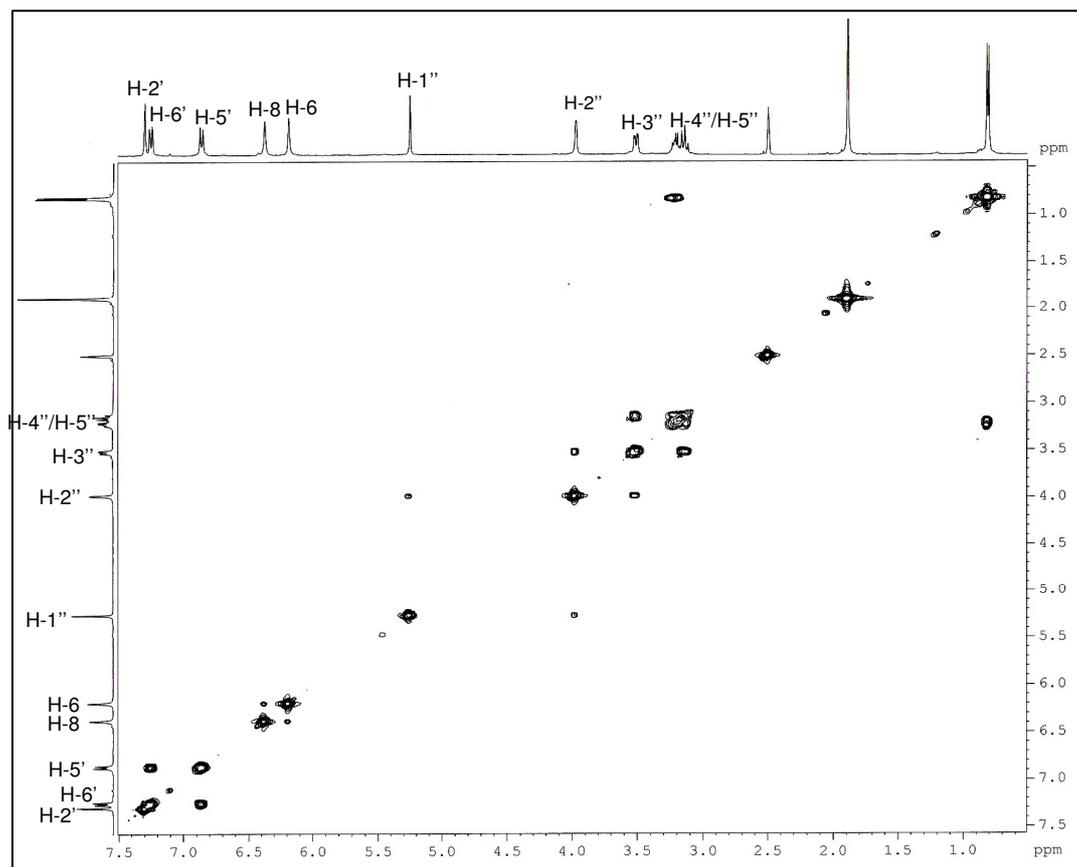


FIGURA 4.33 - Mapa de contornos COSY da substância VIII (400 MHz, DMSO-*d*₆).

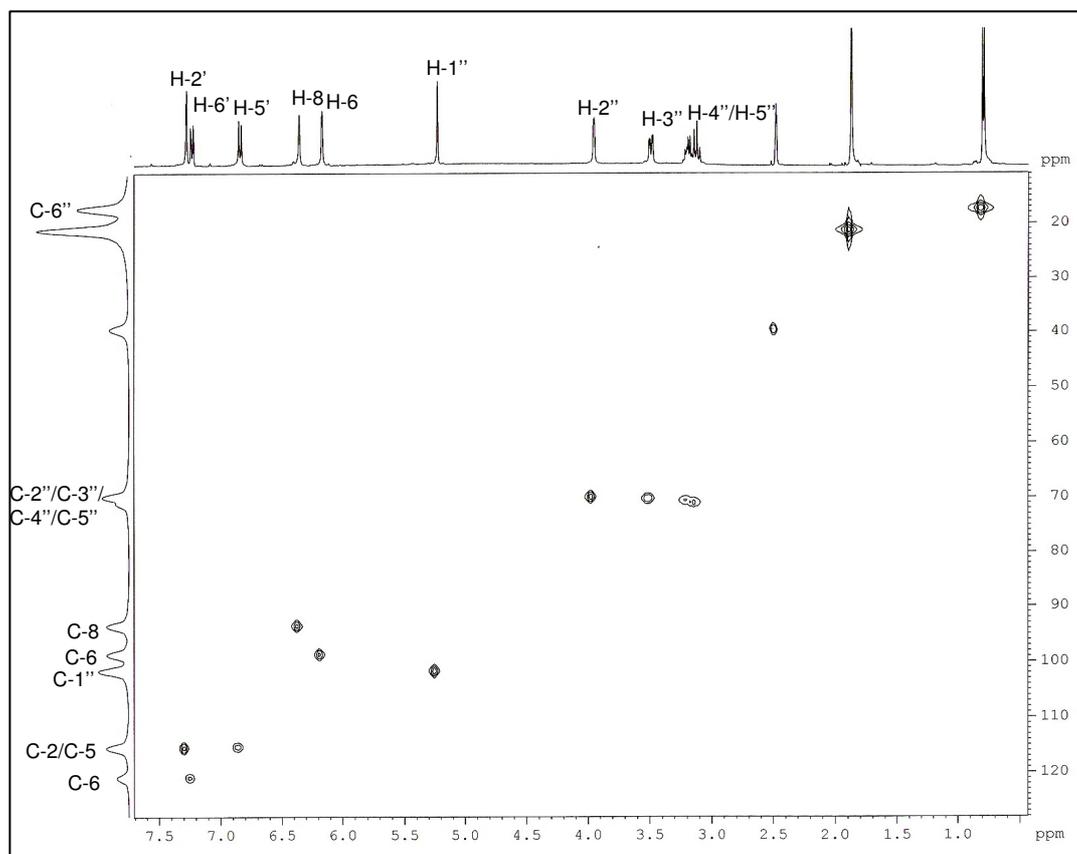


FIGURA 4.34 - Mapa de correlações HSQC da substância VIII (400 MHz, DMSO-*d*₆).

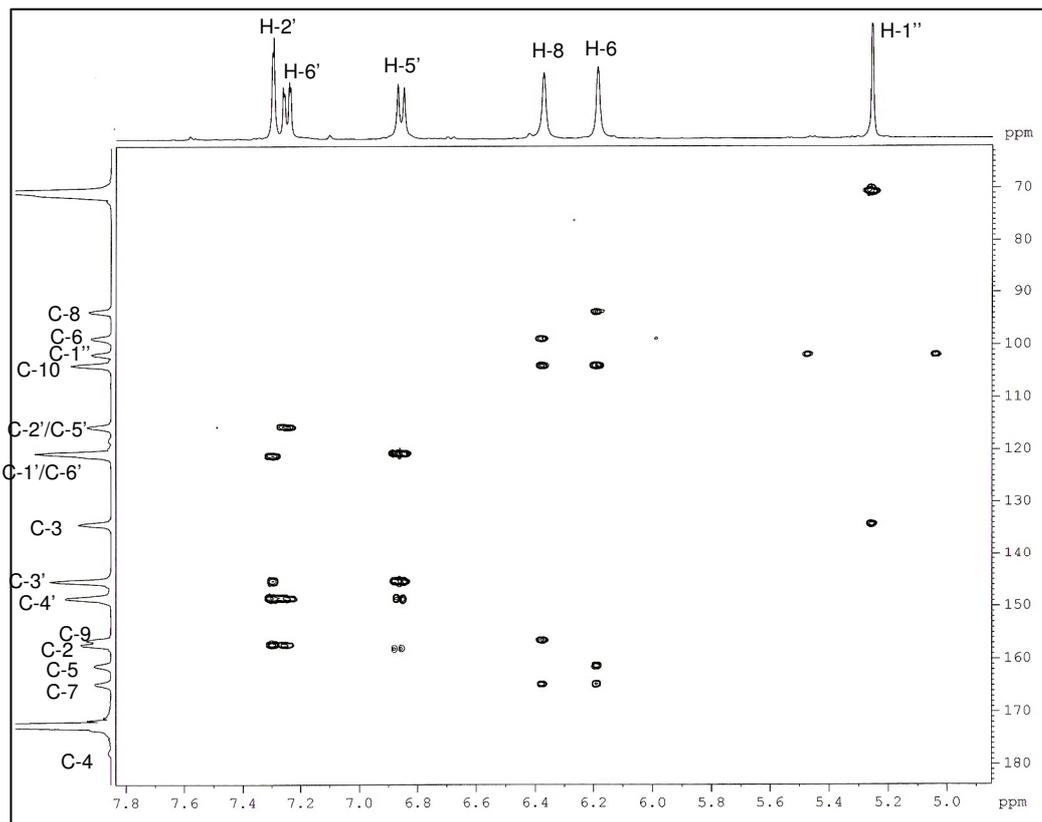


FIGURA 4.35 - Mapa de correlações HMBC (expansão) da substância **VIII** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

4.3.3.2 – Identificação Estrutural da Substância IX.

A substância **IX** foi isolada das frações S3-20 e S3-24 como um óleo amarelo. A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (BENNINI *et al.*, 1992).

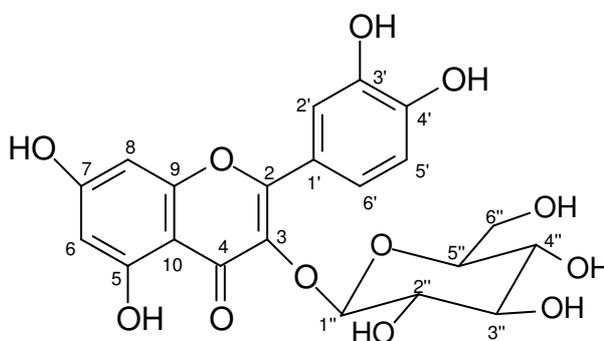
A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.37) mostrou sinais, de forma geral, similares aos apresentados para a substância **VIII**, indicando tratar-se de uma aglicona quercetina. No entanto, houve sobreposição entre os sinais referentes aos hidrogênios H-2' e H-6' e se observou um multiplete, δ_{H} 7,52, integrando para dois hidrogênios. O sinal δ_{H} 6,81 (*d*, $J = 7,2$ Hz) com constante característica de acoplamento *orto* refere-se ao hidrogênio H-5'. Através do mapa de contornos COSY (Figura 4.38) foi possível verificar a correlação entre esse sinal e o multiplete δ_{H} 7,52 indicando que o hidrogênio H-5' acopla em *orto* com um dos hidrogênios do multiplete, nesse caso, o hidrogênio H-6'. Foram observados, também, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,27 (*s*, H-8) e δ_{H} 6,07 (*s*, H-6), esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel, e este acoplamento é confirmado através da correlação entre esses dois sinais no mapa de contornos COSY. Através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.39), os hidrogênios H-2', H-6' e H-5' estão diretamente ligados aos respectivos carbonos que apresentam os seguintes deslocamentos químicos δ_{C} 115,8 (C-2'), δ_{C} 121,4 (C-6') e δ_{C} 115,5 (C-5') e os hidrogênios H-6 e H-8 ligados aos carbonos δ_{C} 99,0 (C-6) e δ_{C} 94,0 (C-8), respectivamente.

No mapa de correlações HMBC (Figura 4.40) o sinal do hidrogênio H-2' se correlaciona com os carbonos δ_{C} 121,0 (C-1'), δ_{C} 146,0 (C-3'), δ_{C} 147,2 (C-4') e δ_{C} 157,7 (C-2), o do hidrogênio H-6' se correlaciona com os carbonos δ_{C} 115,5 (C-5'), δ_{C} 147,2 (C-4') e δ_{C} 157,7 (C-2) e do hidrogênio H-5' se correlaciona com os dos carbonos δ_{C} 121,4 (C-6') δ_{C} 146,0 (C-3'), δ_{C} 147,3 (C-4') concluindo assim, as atribuições de carbonos e hidrogênios do anel B. Para o anel A observou-se, no mapa de contornos COSY o acoplamento entre os hidrogênios H-6 e H-8 e no mapa de correlações HSQC, esses hidrogênios estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 94,0 (C-8) e δ_{C} 99,0 (C-6) respectivamente. No mapa de correlações HMBC, apenas as correlações do hidrogênio H-6 com os carbonos δ_{C} 94,0 (C-8) e δ_{C} 104,0 (C-10)

foram observadas e não foi possível detectar assim os sinais dos carbonos C-5, C-7 e C-9.

Foram observados no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de hidrogênios glicosídicos. A presença de um dubleto em δ_{H} 5,30 com constante de 7,2 Hz caracteriza hidrogênio anomérico (H-1'') de β -D-glicose, os hidrogênios H-6'' apresentaram sinais em δ_{H} 2,95 (*m*) e δ_{H} 3,63 (*m*), os demais hidrogênios glicosídicos apresentaram sinais na faixa δ_{H} 3,17-3,50 e os respectivos carbonos em δ_{C} 101,9 (C-1''); δ_{C} 65,0 (C-6'') e δ_{C} 69,3-75,9 (C-2''/C-3''/C-4''/C-5'') que foram atribuídos através do mapa de correlações HSQC.

A substituição deste resíduo de açúcar na posição C-3 do esqueleto flavonoídico foi atribuída com base no valor de deslocamento químico para o C-2 uma vez que não foi observada no espectro de HMBC a correlação necessária entre o H-1'' e o carbono da aglicona ao qual está ligado. O carbono C-2 do flavonol quercetina apresenta deslocamento químico δ_{C} 147,5; mas sofre uma desblindagem quando a posição C-3 está substituída por um resíduo de açúcar, apresentando assim, deslocamento de δ_{C} 157,7 (AGRAWAL, 1989). A substância **IX** foi assim identificada como a quercetina-3-*O*- β -D-glicosídeo e este sendo o primeiro relato desta substância para a espécie *Virola sebifera*.



Quercetina-3-*O*- β -D-glicosídeo (isoquercetina) (**IX**)

No espectro de massas (Figura 4.36), o pico m/z 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$ confirmou a massa molecular da substância **IX**, isoquercetina. O fragmento $[\text{M}-\text{H}-163]^-$, pico m/z 300, confirma a perda de uma unidade glicosídica e os demais fragmentos $[\text{M}-\text{H}-147-29]^-$, $[\text{M}-\text{H}-147-122]^-$ e $[\text{M}-\text{H}-147-149]^-$ são referentes a quebras no anel C. A proposta de fragmentação para formação desses fragmentos é similar àquela apresentada para a substância **VIII** e está representada no Esquema 4.3.

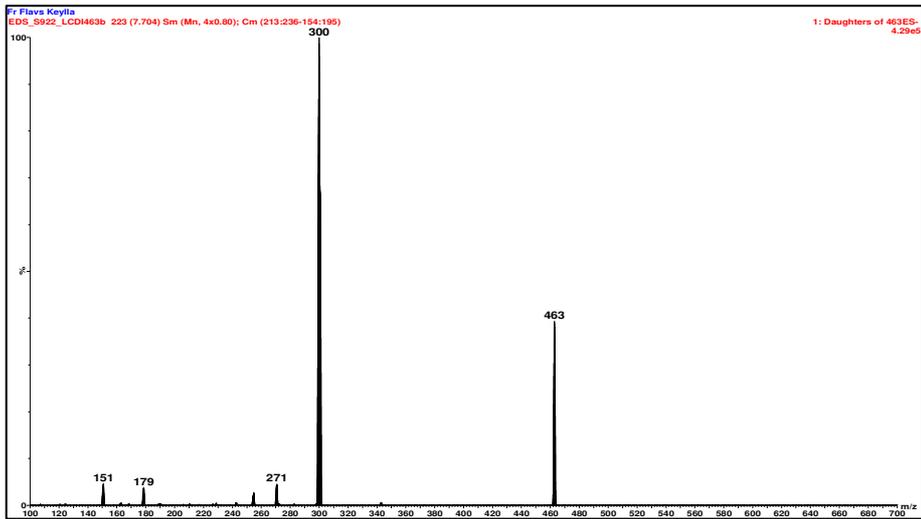
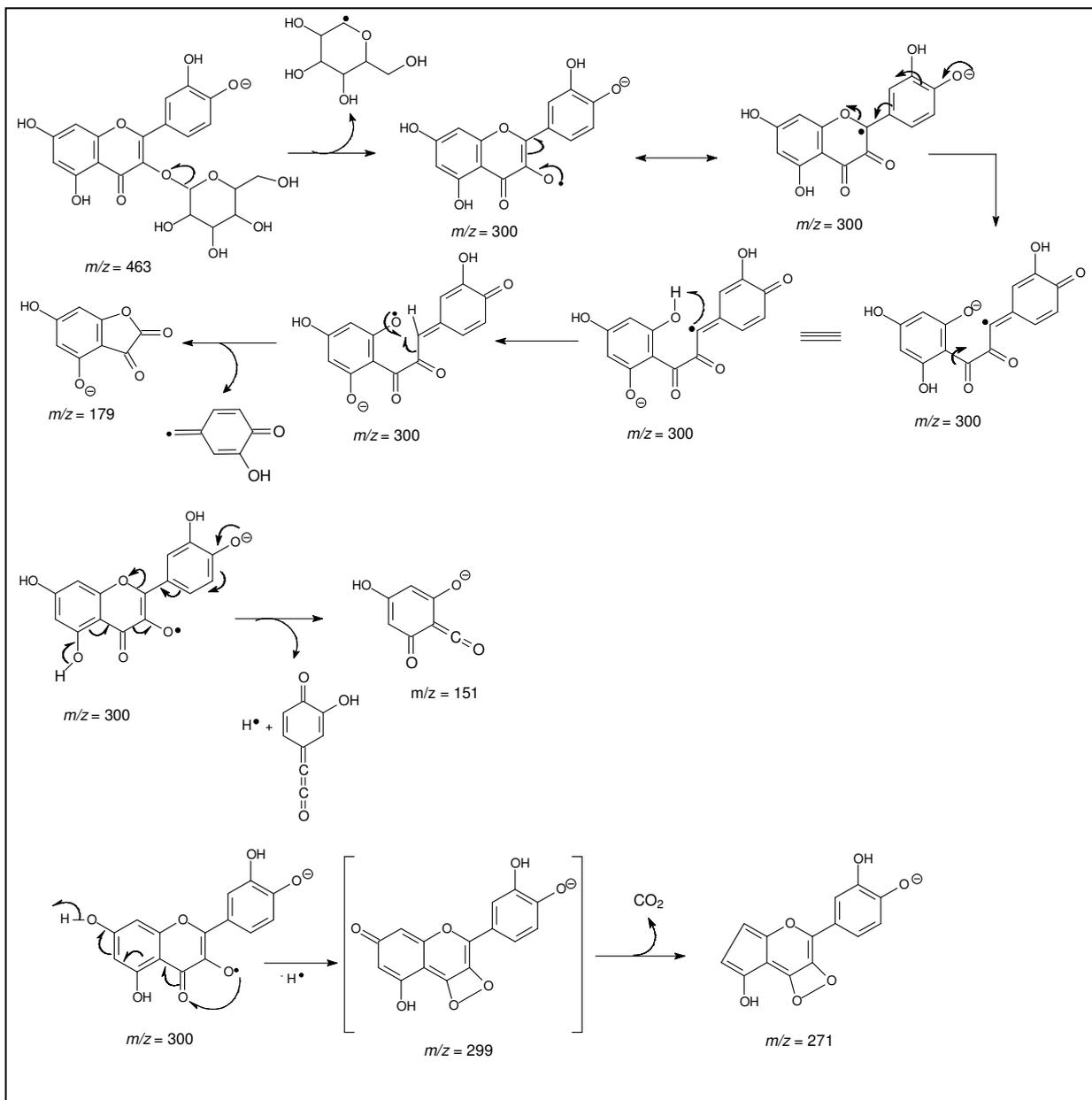


FIGURA 4.36 – Espectro de massas no modo negativo da substância IX.



ESQUEMA 4.3 – Proposta de fragmentação para a substância IX.

TABELA 4.13 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância **IX** e comparação com a quercetina-3-O- β -D-glicosídeo (BENNINI *et al.*, 1992; DMSO- d_6 , 300 MHz para RMN de ^1H /75 MHz para ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|-----|--------------------------------------|--|---------------------------|------------------------------|
| | Substância IX | BENNINI <i>et al.</i> , 1992 | Substância IX | BENNINI <i>et al.</i> , 1992 |
| 2 | - | - | 157,7 | 156,3 |
| 3 | - | - | NI | 133,5 |
| 4 | - | - | 180,5 | 177,5 |
| 5 | - | - | NI | 161,2 |
| 6 | 6,07 (<i>s</i>) | 6,20 (<i>d</i> , $J = 1,9$) | 99,0 | 98,7 |
| 7 | - | - | NI | 164,2 |
| 8 | 6,27 (<i>s</i>) | 6,40 (<i>d</i> , $J = 1,9$) | 94,0 | 93,5 |
| 9 | - | - | NI | 156,3 |
| 10 | - | - | 104,0 | 103,9 |
| 1' | - | - | 121,0 | 121,1 |
| 2' | 7,52 (<i>m</i>) | 7,52 (<i>d</i> , $J = 2,1$) | 115,8 | 115,2 |
| 3' | - | - | 146,0 | 144,8 |
| 4' | - | - | 147,2 | 148,4 |
| 5' | 6,81 (<i>d</i> , $J = 7,2$) | 6,81 (<i>d</i> , $J = 8,5$) | 115,6 | 116,0 |
| 6' | 7,52 (<i>m</i>) | 7,65 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,1$) | 121,4 | 122,0 |
| 1'' | 5,30 (<i>d</i> , $J = 7,2$) | 5,38 (<i>d</i> , $J = 7,6$) | 101,9 | 101,0 |
| 2'' | 3,17-3,50 (<i>m</i>) | 3,70-3,20 (<i>m</i>) | 69,3-75,9 | 74,1 |
| 3'' | 3,17-3,50 (<i>m</i>) | 3,70-3,20 (<i>m</i>) | 69,3-75,9 | 76,2 |
| 4'' | 3,17-3,50 (<i>m</i>) | 3,70-3,20 (<i>m</i>) | 69,3-75,9 | 70,0 |
| 5'' | 3,17-3,50 (<i>m</i>) | 3,70-3,20 (<i>m</i>) | 69,3-75,9 | 77,5 |
| 6'' | 2,95 (<i>m</i>)/ 3,63 (<i>m</i>) | 3,70-3,20 (<i>m</i>) | 65,0 | 60,8 |

NI = Não identificado

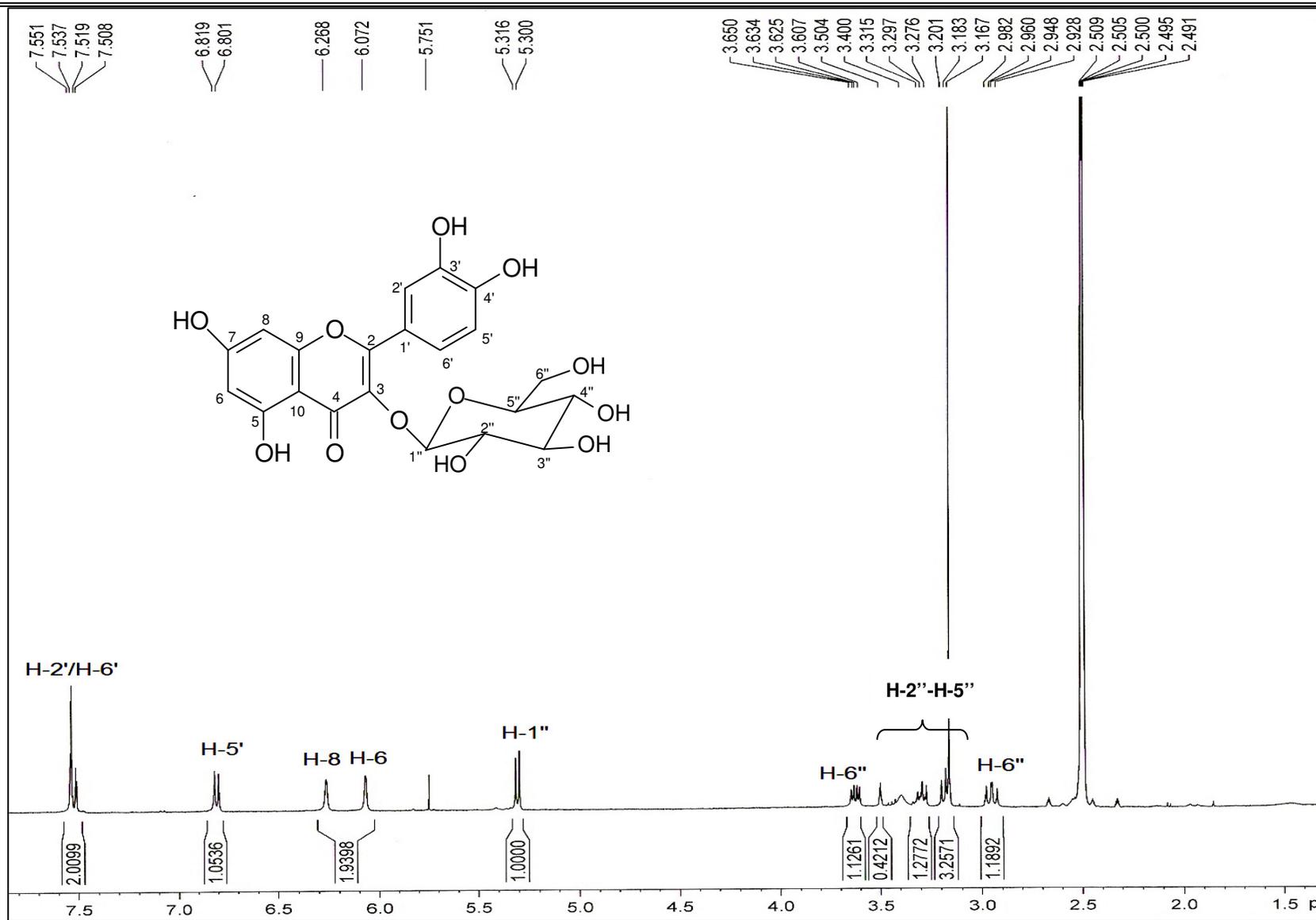


FIGURA 4.37 - Espectro de RMN de ^1H da substância IX (400 MHz, DMSO-d_6).

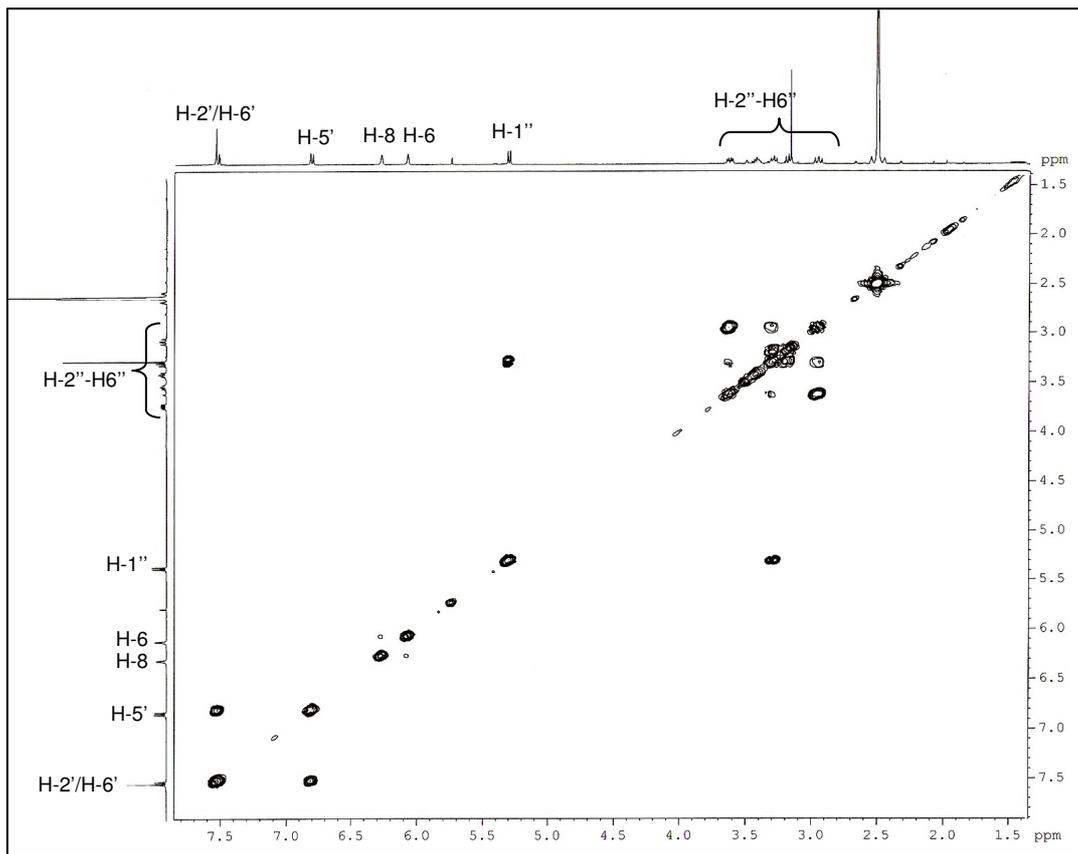


FIGURA 4.38 - Mapa de contornos COSY da substância IX (400 MHz, DMSO-*d*₆).

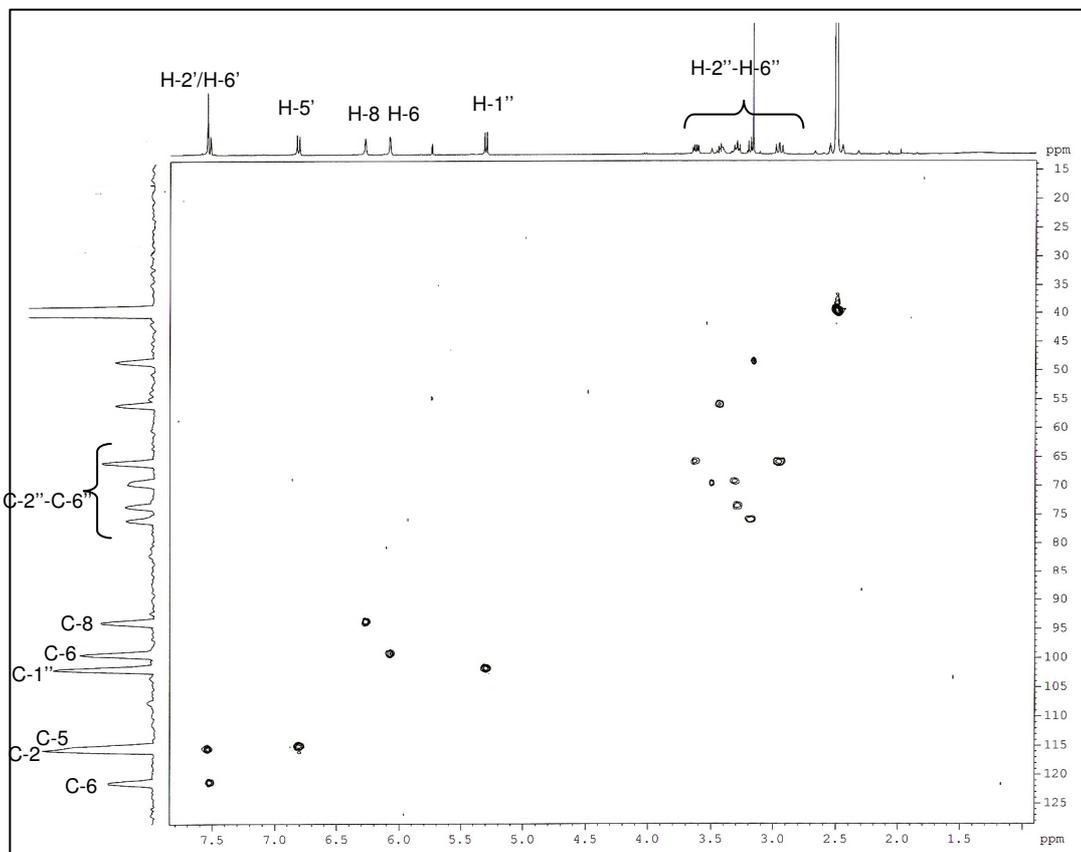


FIGURA 4.39 - Mapa de correlações HSQC da substância IX (400 MHz, DMSO-*d*₆).

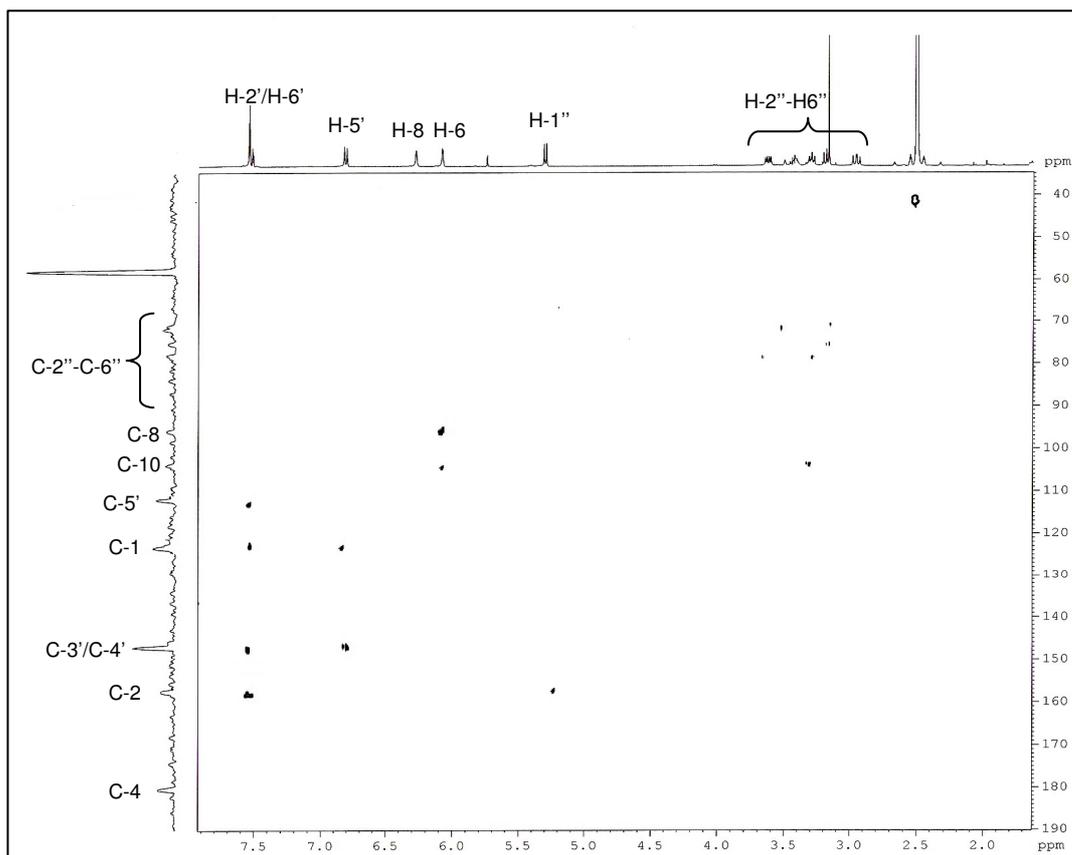


FIGURA 4.40 - Mapa de correlações HMBC da substância IX (400 MHz, DMSO-*d*₆).

4.3.3.3 – Identificação Estrutural da Substância X.

A substância **X** foi isolada das frações S3-15 como um óleo amarelo. A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , HSQC e HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (FATHIAZAD *et al.*, 2006).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.42) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina assim como as substâncias anteriores. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B com sinais em δ_{H} 7,54 (*dd*, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, H-6'); δ_{H} 7,49 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-2') e δ_{H} 6,79 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'). As constantes de acoplamento estão de acordo com os valores para acoplamentos *orto* e *meta*. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,28 (*s*, H-8) e δ_{H} 6,09 (*s*, H-6), esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel.

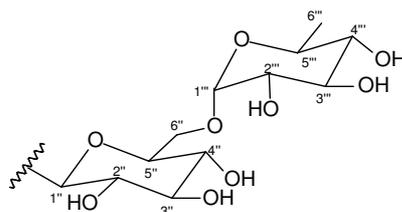
Através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.43) verificou-se que os hidrogênios H-6', H-2' e H-5' estão diretamente ligados aos carbonos com deslocamentos químicos δ_{C} 120,8 (C-6'), δ_{C} 114,4 (C-2') e δ_{C} 115,6 (C-5') respectivamente e os hidrogênios H-8 e H-6 ligados diretamente aos carbonos δ_{C} 93,5 (C-8) e δ_{C} 98,7 (C-6).

No mapa de correlações HMBC (Figura 4.44) não foram observadas todas as correlações esperadas devido à pouca massa obtida no isolamento o que dificultou a sensibilidade do aparelho. Para o hidrogênio H-6' observou-se apenas uma correlação, com o carbono δ_{C} 114,4 (C-2'), para o hidrogênio H-2' observaram-se correlações com os carbonos δ_{C} 121,5 (C-1'), δ_{C} 145,0 (C-3'), δ_{C} 148,9 (C-4') e δ_{C} 156,3 (C-2) e para o hidrogênio H-5' observou-se apenas duas correlações, com os carbonos δ_{C} 120,8 (C-6'), δ_{C} 145,0 (C-3') e δ_{C} 148,9 (C-4') concluindo assim, as atribuições de todos os carbonos do anel B.

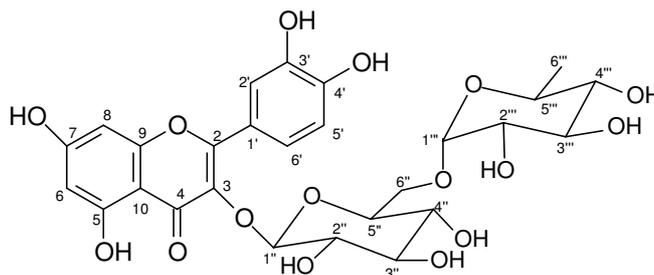
Para os hidrogênios do anel A não foram observadas todas as correlações HMBC. Apenas duas correlações foram verificadas para o hidrogênio H-8, com os carbonos δ_{C} 98,7 (C-6) e δ_{C} 157,0 (C-9), e para o hidrogênio H-6 observou-se apenas as correlações com os carbonos com deslocamentos químicos δ_{C} 93,5 (C-8) e δ_{C} 103,4 (C-10), não sendo possível assim, a atribuição de deslocamento químico para os carbonos C5 e C-7.

No espectro de RMN de ^1H , a observação de dois sinais de hidrogênios anoméricos confirma a presença de dois glicosídeos como substituintes na estrutura em questão. O sinal δ_{H} 5,28 se apresenta como um dubleto com constante de acoplamento de 7,2 Hz que é característica de hidrogênio anomérico de β -D-glicose, enquanto o sinal de hidrogênio anomérico δ_{H} 4,38 (s) juntamente com o dubleto em δ_{H} 0,99 ($J = 6,2$), característico de metila de raminose, indicam a presença de uma unidade α -L-raminose. Os demais hidrogênios carbinólicos das unidades glicosídicas estão entre δ_{H} 3,02-3,38.

Os valores de deslocamentos químicos para os carbonos glicosídicos, todos na faixa δ_{C} 66,7-76,1; confirmaram a unidade de raminose como açúcar ligado diretamente à glicose pela posição C-6'' (grupo CH_2 da glicose) numa ligação O-glicosídica. Isto pode ser explicado devido à desblindagem do carbono C-6'' em δ_{C} 66,7; que geralmente, quando não há substituintes nesta posição são blindados em torno de δ_{C} 60,0. Através do espectro de HSQC, foram atribuídos os carbonos δ_{C} em 100,4 (C-1''), δ_{C} 102,0 (C-1''') e δ_{C} 17,4 (C-6''').



A substituição deste resíduo de açúcar na posição C-3 do esqueleto flavonoídico foi atribuída com base no valor de deslocamento químico para o C-2 uma vez que não foi observada no espectro de HMBC a correlação necessária entre o H-1'' e o carbono da aglicona ao qual está ligado. O carbono C-2 do flavonol quercetina apresenta deslocamento químico δ_{C} 147,5; mas sofre uma desblindagem quando a posição C-3 está substituída por um resíduo de açúcar, apresentando assim, deslocamento de δ_{C} 156,3 (AGRAWAL, 1989). Assim, a substância **X** trata-se da flavona quercetina-3-O- β -D-glicose-6''-O- α -L-raminosil (rutina), primeira vez relatada para a espécie *Virola sebifera*.



Quercetina-3-O- β -D-glicose-6''-O- α -L-raminosil (rutina) (**X**)

No espectro de massas (Figura 4.41), foram observados apenas o pico m/z 609 $[M-H]^-$ que confirmou a massa molecular da substância **X**, rutina, e o pico m/z 300 $[M-H-147-163]^-$ que confirma a perda das duas unidades glicosídicas. A proposta de fragmentação para a substância **X** está representada no Esquema 4.4.

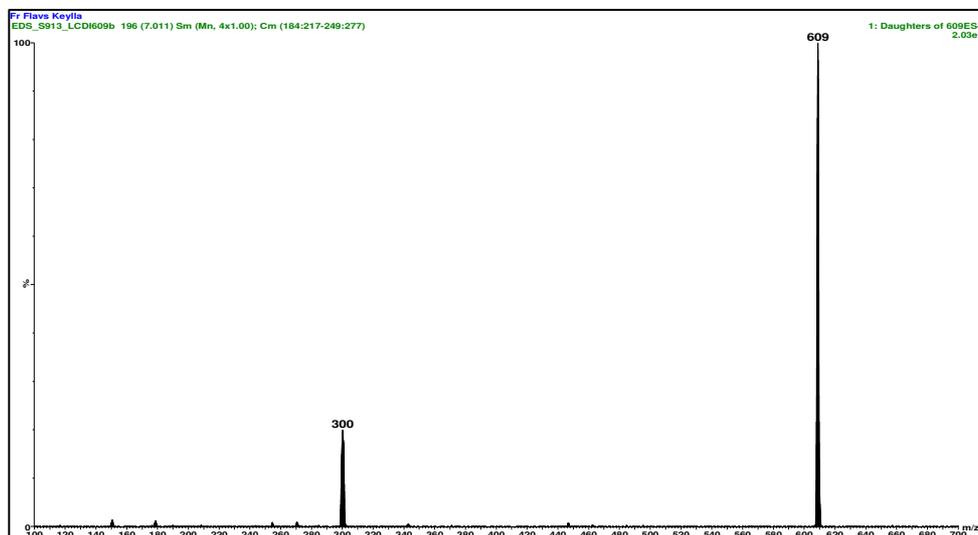
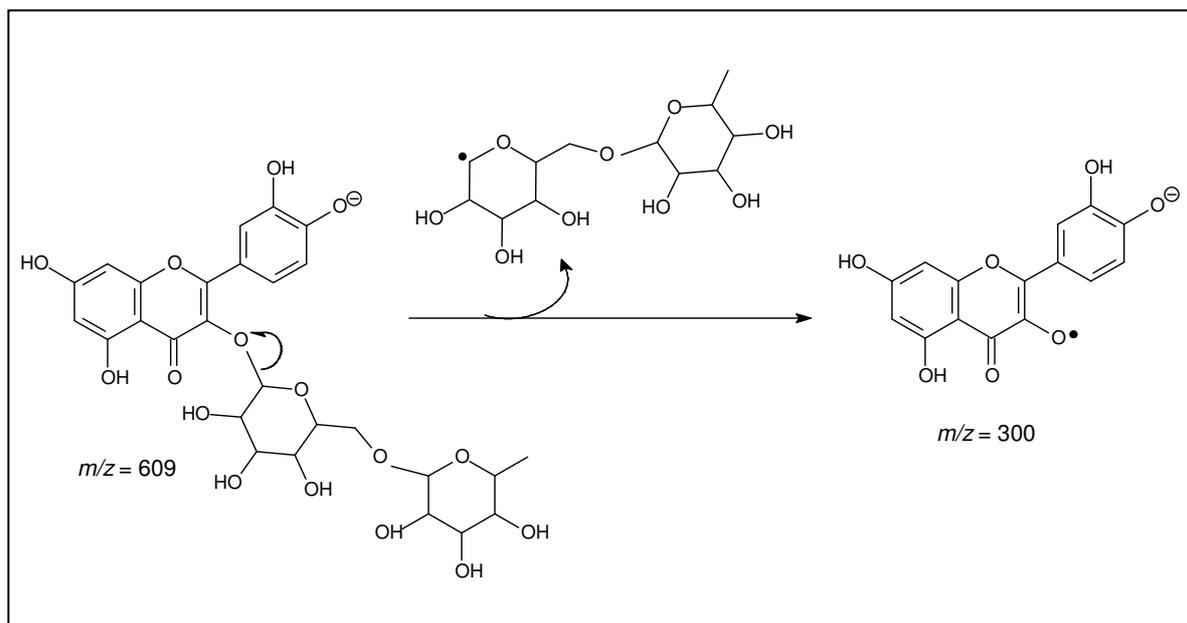


FIGURA 4.41 – Espectro de massas no modo negativo da substância **X**.



ESQUEMA 4.4 – Proposta de fragmentação para a substância **X**.

TABELA 4.14 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância **X** e comparação com a quercetina-3- O - β -D-glicose-6''- O - α -L-raminopiranosil (FATHIAZAD *et al.*, 2006: DMSO- d_6 , 200 MHz para RMN de ^1H / 50 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| | Substância X | FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006 | Substância X | FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006 |
| 2 | - | - | 156,3 | 157,3 |
| 3 | - | - | NI | 134,1 |
| 4 | - | - | 177,4 | 178,2 |
| 5 | - | - | NI | 157,5 |
| 6 | 6,09 (<i>sl</i>) | 6,21 (<i>d</i> , 2,0) | 98,7 | 99,5 |
| 7 | - | - | NI | 164,9 |
| 8 | 6,28 (<i>sl</i>) | 6,40 (<i>d</i> , 2,0) | 93,5 | 94,5 |
| 9 | - | - | 157,0 | 162,1 |
| 10 | - | - | 103,4 | 104,8 |
| 1' | - | - | 121,5 | 122,5 |
| 2' | 7,49 (<i>d</i> , 2,4) | 7,55 (<i>d</i> , 2,1) | 114,4 | 116,1 |
| 3' | - | - | 145,0 | 145,6 |
| 4' | - | - | 148,9 | 149,3 |
| 5' | 6,79 (<i>d</i> , 8,4) | 6,86 (<i>d</i> , 9,0) | 115,6 | 117,1 |
| 6' | 7,54 (<i>dd</i> , 2,4 e 8,4) | 7,56 (<i>dd</i> , 9,0 e 2,1) | 120,8 | 122,0 |
| 1'' | 5,28 (<i>d</i> , 7,2) | 5,35 (<i>d</i> , 7,4) | 100,4 | 101,6 |
| 2'' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 74,9 |
| 3'' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 77,3 |
| 4'' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 72,7 |
| 5'' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 76,7 |
| 6'' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7 | 67,9 |
| 1''' | 4,38 (<i>sl</i>) | 5,12 (<i>d</i> , 1,9) | 102,0 | 102,2 |
| 2''' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 70,8 |
| 3''' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 71,2 |
| 4''' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 71,4 |
| 5''' | 3,02-3,38 (<i>m</i>) | ND | 66,7-76,1 | 69,1 |
| 6''' | 0,99 (<i>d</i> , 6,2) | 1,0 (<i>d</i> , 6,1) | 17,4 | 18,6 |

ND = Não descrito; NI = Não identificado

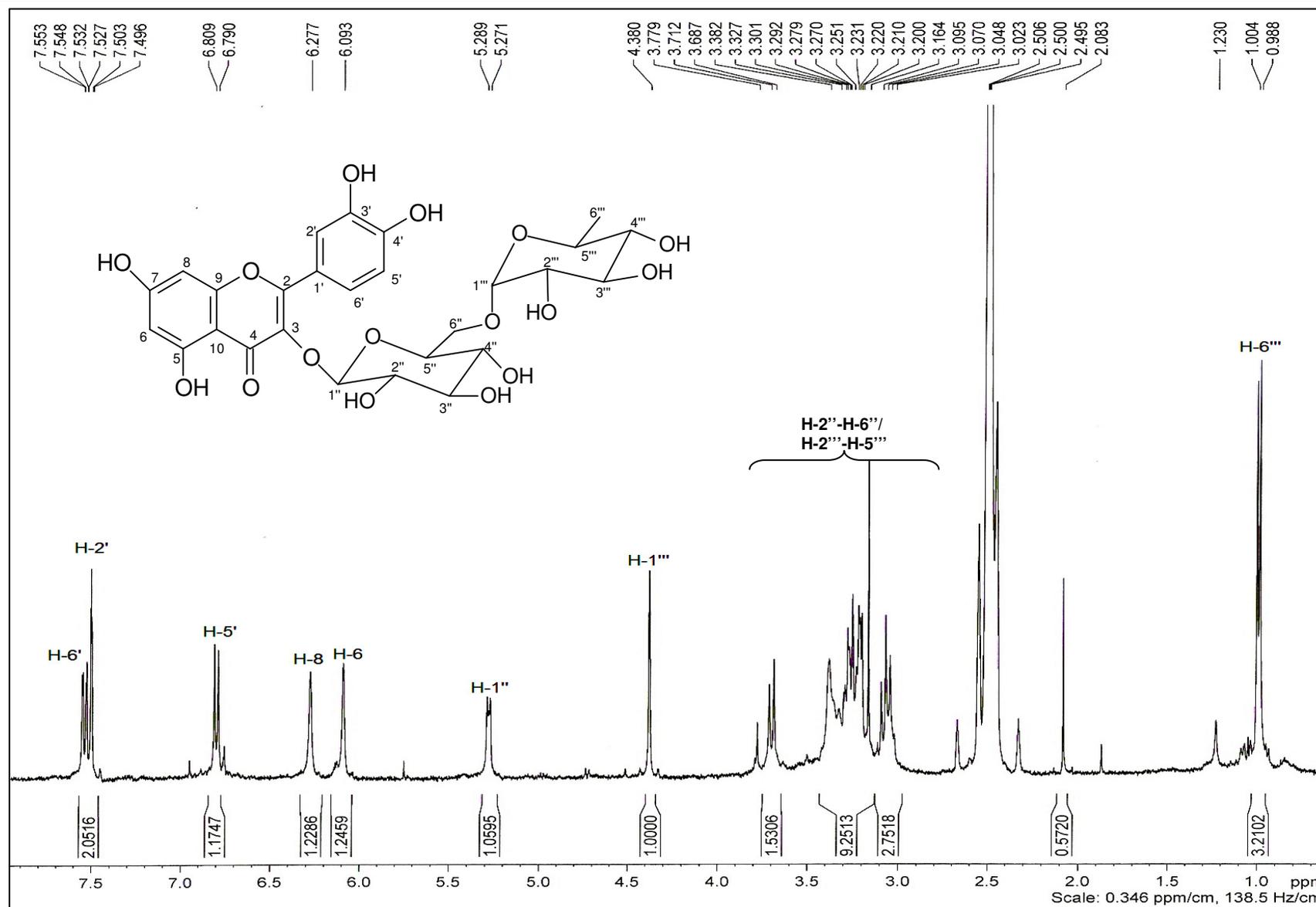


FIGURA 4.42 - Espectro de RMN de ¹H da substância X (400 MHz, DMSO-d₆).

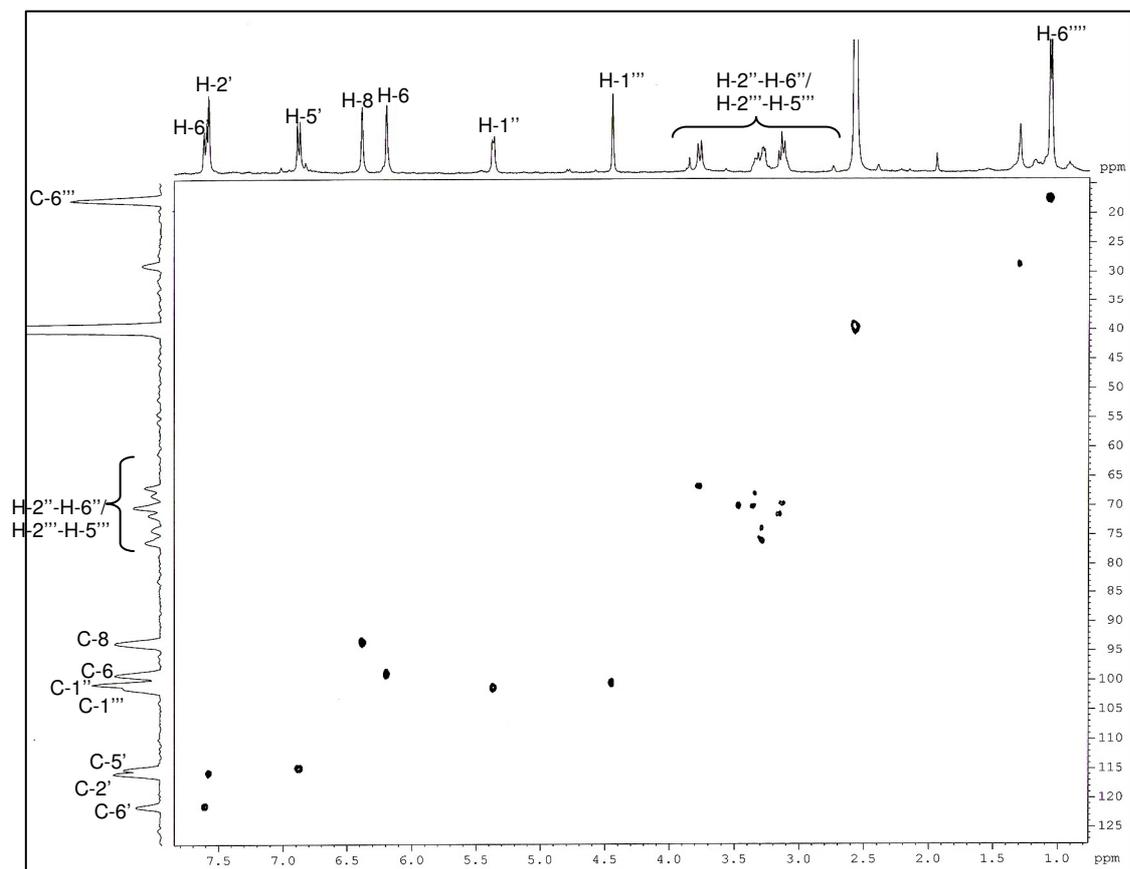


FIGURA 4.43 - Mapa de correlações HSQC da substância X (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

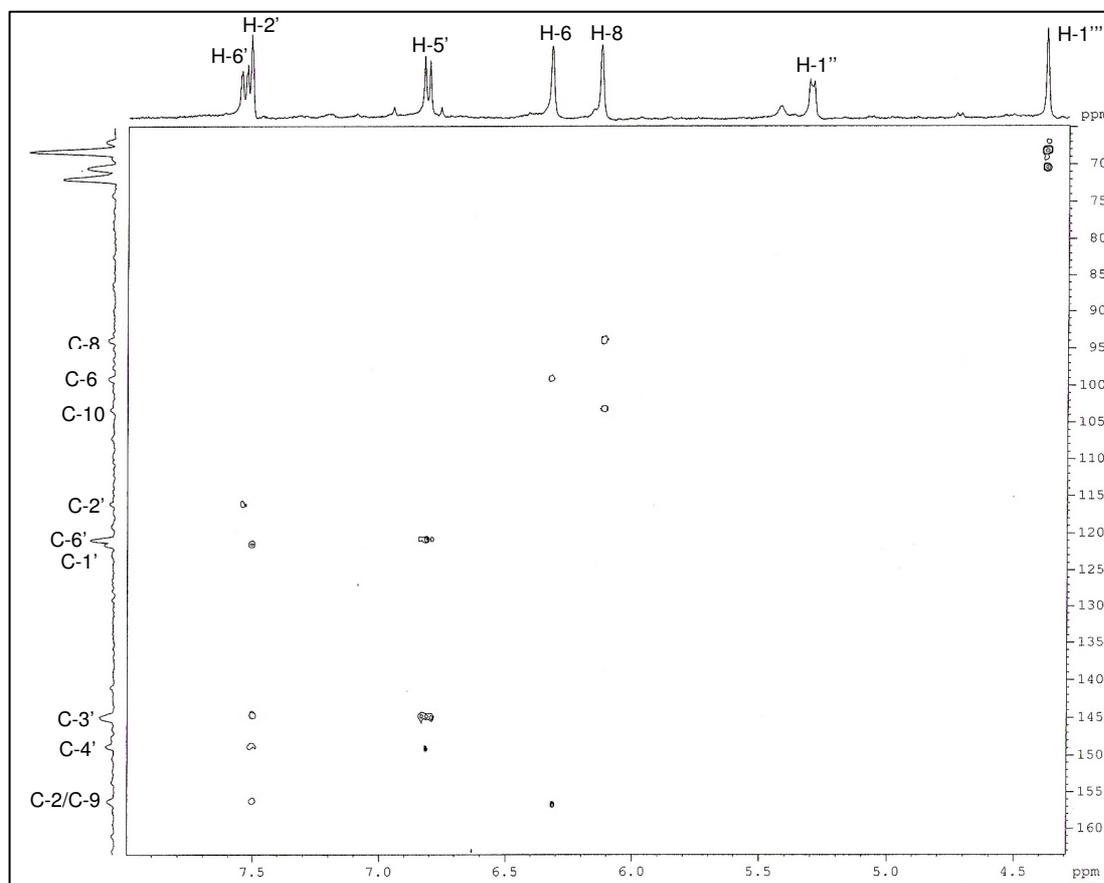


FIGURA 4.44 - Mapa de correlações HMBC da substância X (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

4.3.3.4 – Identificação Estrutural da Substância XI.

A substância **XI** foi identificada em mistura com a substância **VIII** (quercitrina), onde a amostra se apresentou como um óleo amarelo. A identificação estrutural foi realizada através de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , HSQC e HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (KRENN *et al.*, 2003).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.46) foram observados dois sinais de hidrogênios anoméricos δ_{H} 5,25 (*s*) e δ_{H} 5,06 (*d*, $J = 7,6$ Hz) com integração de 0,4:1 respectivamente. O primeiro sinal de hidrogênio anomérico, integrado para 0,4H, aproximadamente, refere-se ao anomérico de uma raminose, o que está de acordo com o sinal em δ_{H} 0,81 (*d*, $J = 6,0$ Hz) integrado para 1,6H, característico de metila de raminose, que indica que o composto minoritário na mistura apresenta uma unidade de raminose como açúcar substituinte. A análise dos sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos mostra sinais com integração correspondente ao composto minoritário, característicos da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B, δ_{H} 7,28 (*d*, $J = 2,8$ Hz, H-2'); δ_{H} 7,24 (*dd*, $J = 2,8$ e 8,4 Hz, H-6') e δ_{H} 6,85 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-5') e os sinais correspondentes aos dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,36 (*sl*, H-8) e δ_{H} 6,17 (*sl*, H-6), confirmando assim, que o composto minoritário é a quercetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (quercitrina).

Como a identificação da quercitrina (**VIII**) já foi discutida anteriormente, a discussão detalhada dos dados espectroscópicos será apenas em relação ao composto majoritário.

Para o majoritário, a análise do espectro de RMN de ^1H , indicou tratar-se da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B, em δ_{H} 7,57 (*d*, $J = 2,8$ Hz, H-2'); δ_{H} 7,46 (*dd*, $J = 2,8$ e 8,8 Hz, H-6') e δ_{H} 6,90 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-5') todos integrados para um hidrogênio. Os valores das constantes de acoplamento estão de acordo com acoplamentos *orto* e *meta*, característicos do sistema de substituição 3',4'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes aos dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,77 (*sl*, H-8) e δ_{H} 6,43 (*sl*, H-6), cada um deles integrado para um hidrogênio. Esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel.

Pela análise do mapa de correlações HSQC (Figura 4.47) foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados. São eles, δ_{C} 115,9 (C-2'), δ_{C} 121,0 (C-6'), δ_{C} 116,0 (C-5'), δ_{C} 94,8 (C-8), δ_{C} 98,8 (C-6).

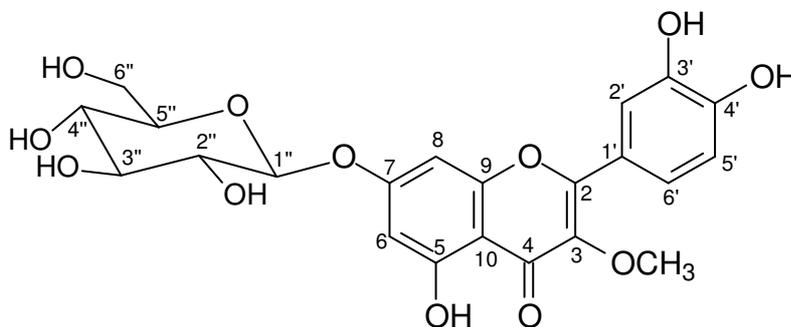
Através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC (Figuras 4.48 e 4.49) foi possível atribuir os demais carbonos do esqueleto flavonoídico. Foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio H-2' e os dos carbonos δ_C 121,0 (C-1') e δ_C 146,1 (C-3') e δ_C 150,2 (C-4') e entre o sinal do hidrogênio H-6' e os dos carbonos δ_C 116,3 (C-5') e δ_C 150,2 (C-4'), esses sinais de dos hidrogênios H-2' e H-6' também apresentaram correlação com o do carbono de deslocamento δ_C 156,7 que foi atribuído ao carbono C-2.

Foi observado um singleto bastante intenso no espectro de RMN de ^1H em δ_H 3,79, integrando para três hidrogênios, característico de grupos metoxila e, pela integração, trata-se de um substituinte pertencente ao composto majoritário (substância **XI**). Através da análise do mapa de correlações HSQC foi observada a presença de uma correlação entre este sinal e o do carbono em δ_C 60,4, característico de carbono oximetílico. No mapa de correlações HMBC, foi observada a correlação do sinal de hidrogênio δ_H 3,79 (-OCH₃) com o do carbono δ_C 138,4, atribuído ao carbono C-3, permitindo determinar a posição de substituição deste grupo metoxila. Tal atribuição é ainda reforçada pelo valor de deslocamento desse grupo metoxílico, δ_C 60,4, característico de metoxilas estritamente impedida, o que permite inferir que a única posição para o grupo -OCH₃ é em C-3.

Para o anel A, foram observadas, no mapa de correlações HSQC, correlações dos sinais dos hidrogênios H-6 (δ_H 6,43) e H-8 (δ_H 6,77) com os sinais de carbonos δ_C 98,8 (C-6) e δ_C 94,8 (C-8), respectivamente. Através do mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos do anel A, pois se observou correlações entre o sinal do hidrogênio H-8 e os sinais de carbonos em δ_C 98,8 (C-6); δ_C 106,3 (C-10); δ_C 157,1 (C-9) e δ_C 163,7 (C-7); e entre sinal do hidrogênio H-6 e os sinais de carbonos δ_C 94,8 (C-8); δ_C 106,3 (C-10); δ_C 162,3 (C-5) e δ_C 163,7 (C-7), concluindo assim, as atribuições de hidrogênios e carbonos do anel A.

A presença de um dubleto em δ_H 5,07 com constante de 7,2 Hz caracterizou o hidrogênio anomérico (H-1'') de β -D-glicose e, a integração deste sinal para um hidrogênio, confirma ser esta, uma unidade glicosídica substituinte na substância em questão, o composto majoritário. Uma correlação entre este sinal e o sinal de carbono δ_C 163,7 (C-7) no mapa de correlações HMBC confirmou a posição de substituição desta glicose no carbono C-7 e, através do mapa de correlações HSQC, determinou-se que H-1'' está diretamente ligado ao carbono δ_C 100,2. Os demais hidrogênios ligados ao glicosídeo foram representados no RMN de ^1H pelos sinais na faixa δ_H 3,09-3,97 juntamente com os sinais dos hidrogênios da unidade raminosídica

da quercitrina, substância minoritária na amostra, e os respectivos carbonos representados por sinais na faixa δ_C 60,0-77,4. Assim, a estrutura **XI** foi identificada como a flavona quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo, primeira vez relatada para a espécie *Virola sebifera*.



Quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo (**XI**)

No espectro de massas (Figura 4.45), o pico m/z 477 $[M-H]^-$ confirmou a massa molecular da substância **XI**. O fragmento $[M-H-15]^-$, pico m/z 462, confirma a perda da metila do grupo metoxila, o fragmento $[M-H-162]^-$, pico m/z 315, confirma a perda de uma unidade glicosídica e o fragmento $[M-H-15-162]^-$, pico m/z 299, confirma a perda desses dois grupos. A proposta de fragmentação para os principais picos está representada no Esquema 4.5.

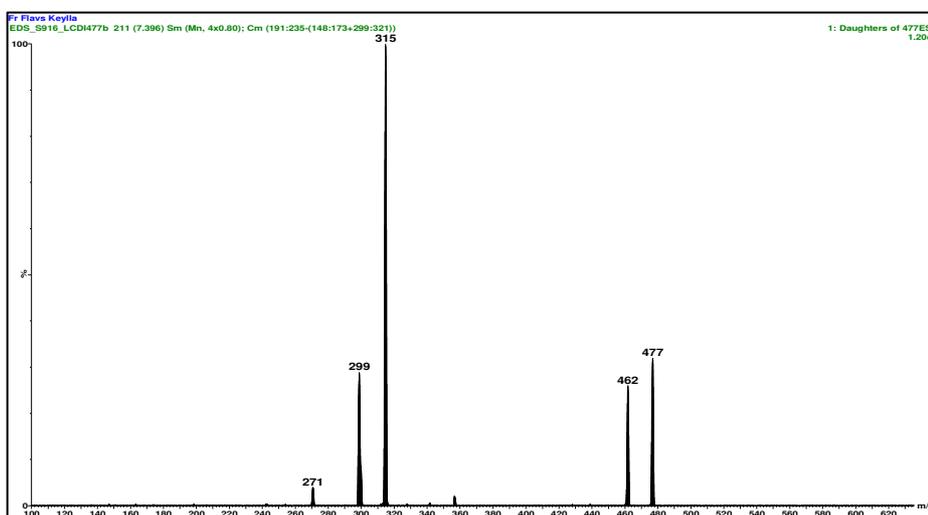
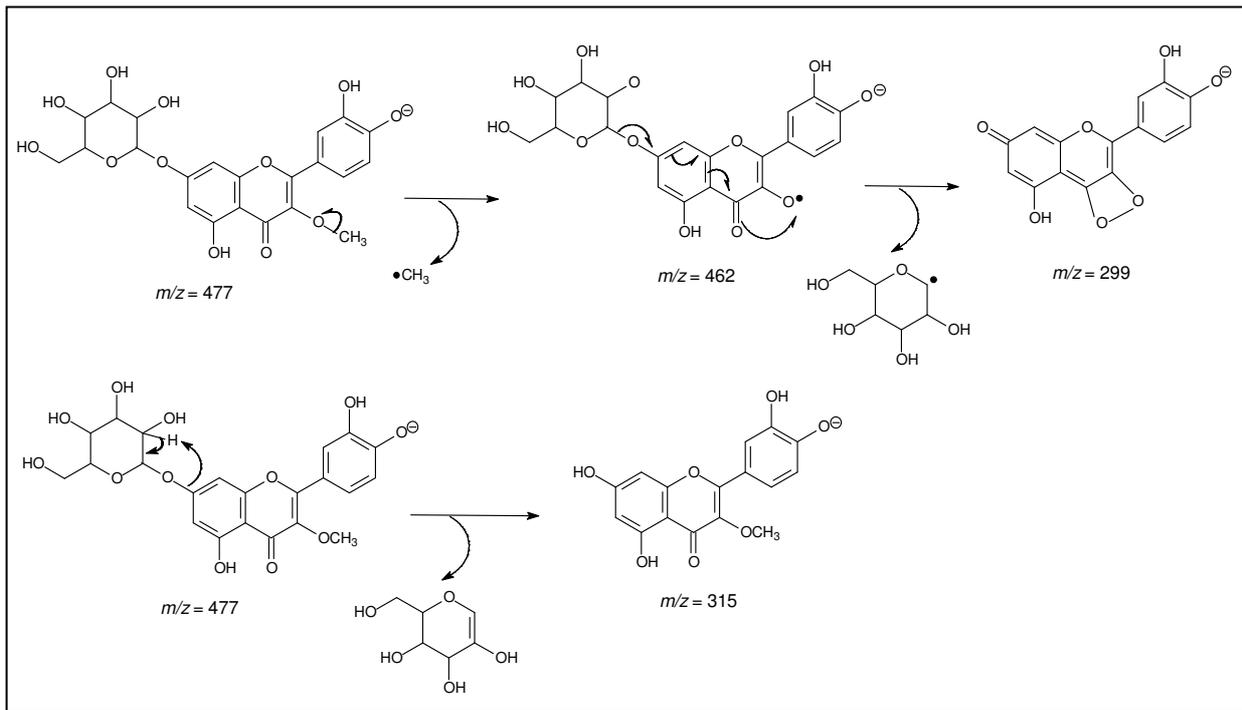


FIGURA 4.45 – Espectro de massas no modo negativo da substância **XI**.



ESQUEMA 4.5 – Proposta de fragmentação para a substância XI.

TABELA 4.15 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância **XI** e comparação com a quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo (KRENN *et al.*, 2003: MeOD, 300 MHz para RMN de ^1H / 75 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|----------------------------|
| | Substância XI | KRENN <i>et al.</i> , 2003 | Substância XI | KRENN <i>et al.</i> , 2003 |
| 2 | - | - | 156,7 | 157,7 |
| 3 | - | - | 138,4 | 139,5 |
| 4 | - | - | 176,1 | 179,7 |
| 5 | - | - | 162,3 | 162,4 |
| 6 | 6,43 (<i>sl</i>) | 6,47 (<i>d</i> , 2,1) | 98,8 | 100,3 |
| 7 | - | - | 163,7 | 164,3 |
| 8 | 6,77 (<i>sl</i>) | 6,80 (<i>d</i> , 2,1) | 94,8 | 95,5 |
| 9 | - | - | 157,1 | 157,5 |
| 10 | - | - | 106,3 | 107,3 |
| 1' | - | - | 121,0 | 122,2 |
| 2' | 7,57 (<i>d</i> , 2,8) | 7,68 (<i>d</i> , 2,0) | 115,9 | 116,1 |
| 3' | - | - | 146,1 | 146,3 |
| 4' | - | - | 150,2 | 150,1 |
| 5' | 6,90 (<i>d</i> , 8,8) | 6,94 (<i>d</i> , 10,0) | 116,3 | 116,2 |
| 6' | 7,46 (<i>dd</i> , 2,8 e 8,8) | 7,60 (<i>dd</i> , 2,0 e 10,0) | 121,0 | 122,3 |
| 1'' | 5,07 (<i>d</i> , 7,2) | 5,12 (<i>d</i> , 7,5) | 100,2 | 101,4 |
| 2'' | 3,09-3,97 (<i>m</i>) | 3,49 (<i>t</i>) | 60,0-77,4 | 74,4 |
| 3'' | 3,09-3,97 (<i>m</i>) | 3,53 (<i>t</i>) | 60,0-77,4 | 77,6 |
| 4'' | 3,09-3,97 (<i>m</i>) | 3,45 (<i>t</i>) | 60,0-77,4 | 71,0 |
| 5'' | 3,09-3,97 (<i>m</i>) | 3,62 (<i>m</i>) | 60,0-77,4 | 78,0 |
| 6'' | 3,09-3,97 (<i>m</i>) | 3,72 (<i>dd</i>) 3,92 (<i>dd</i>) | 60,0-77,4 | 62,3 |
| OCH ₃ | 3,79 (<i>s</i>) | 3,81 (<i>s</i>) | 60,4 | 60,2 |

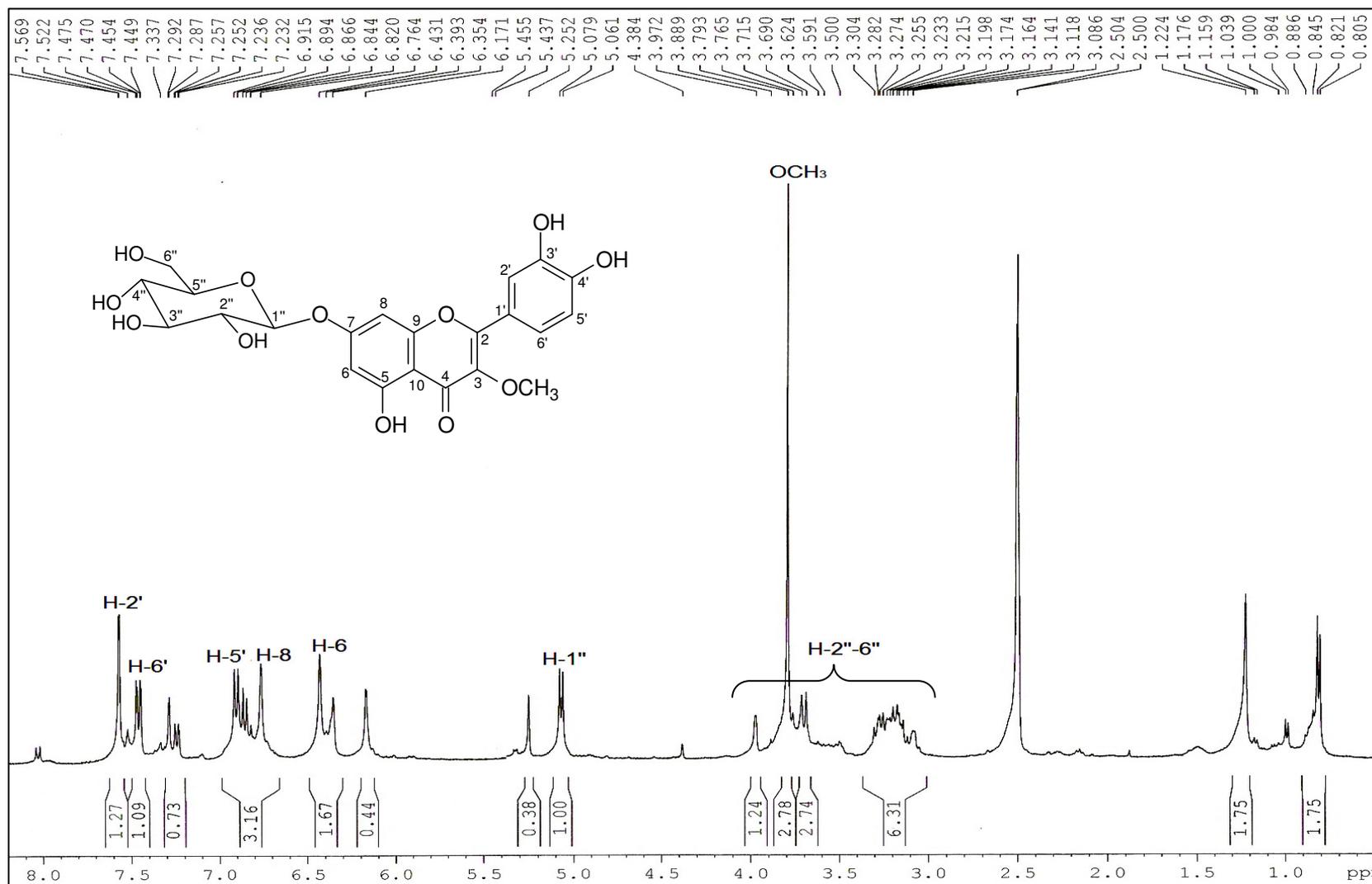


FIGURA 4.46 - Espectro de RMN de ^1H da substância XI (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

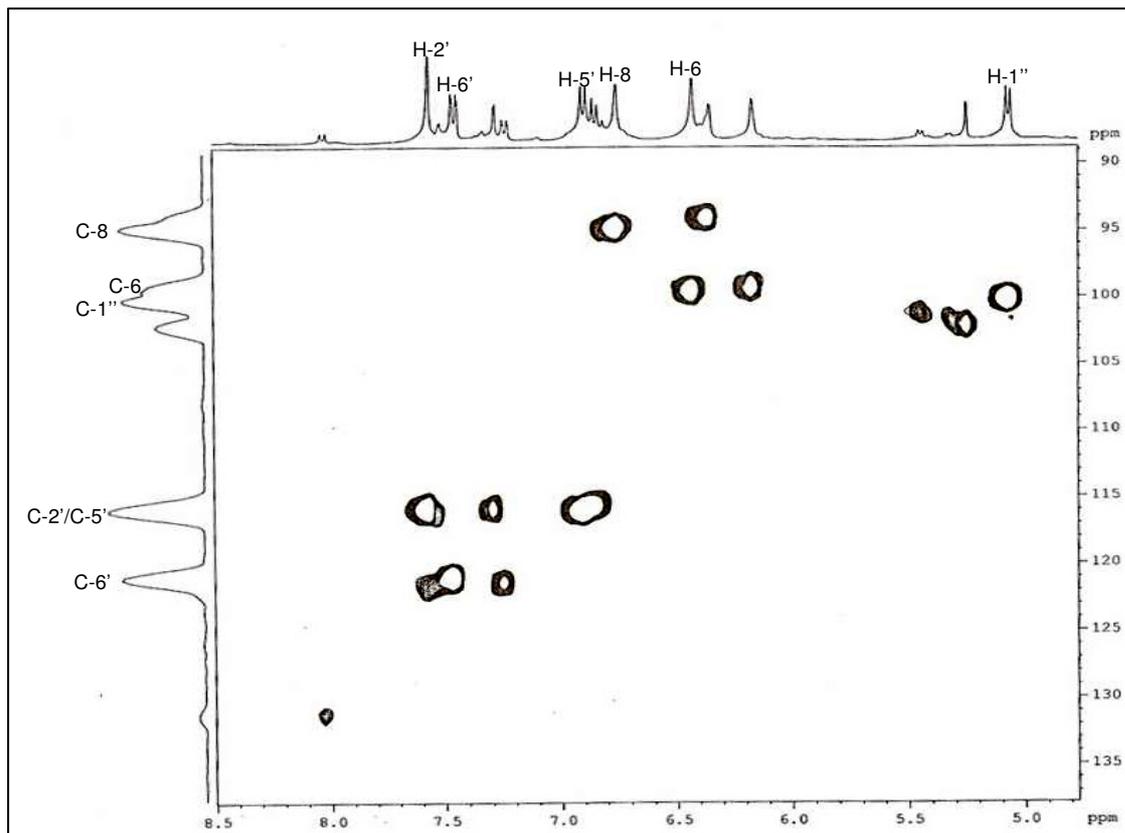


FIGURA 4.47 - Mapa de correlações HSQC da substância XI (400 MHz, DMSO- d_6).

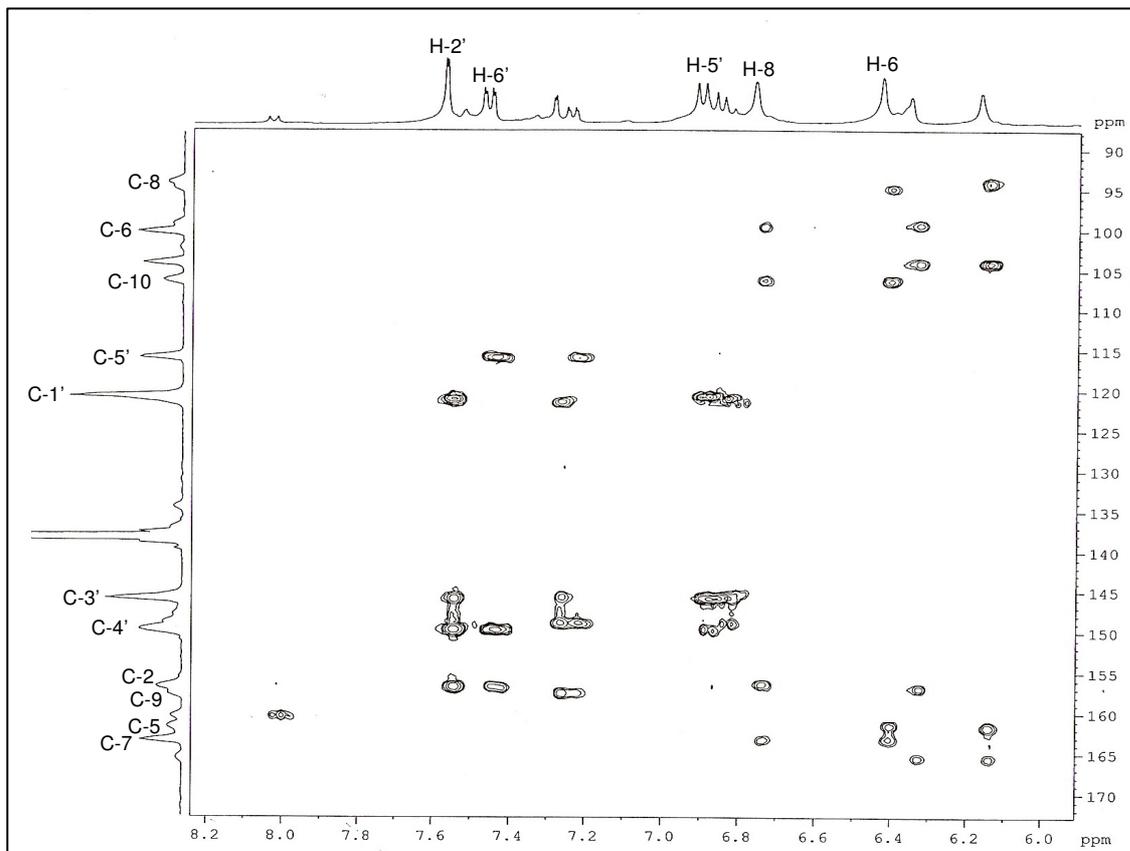


FIGURA 4.48 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância XI (400 MHz, DMSO- d_6).

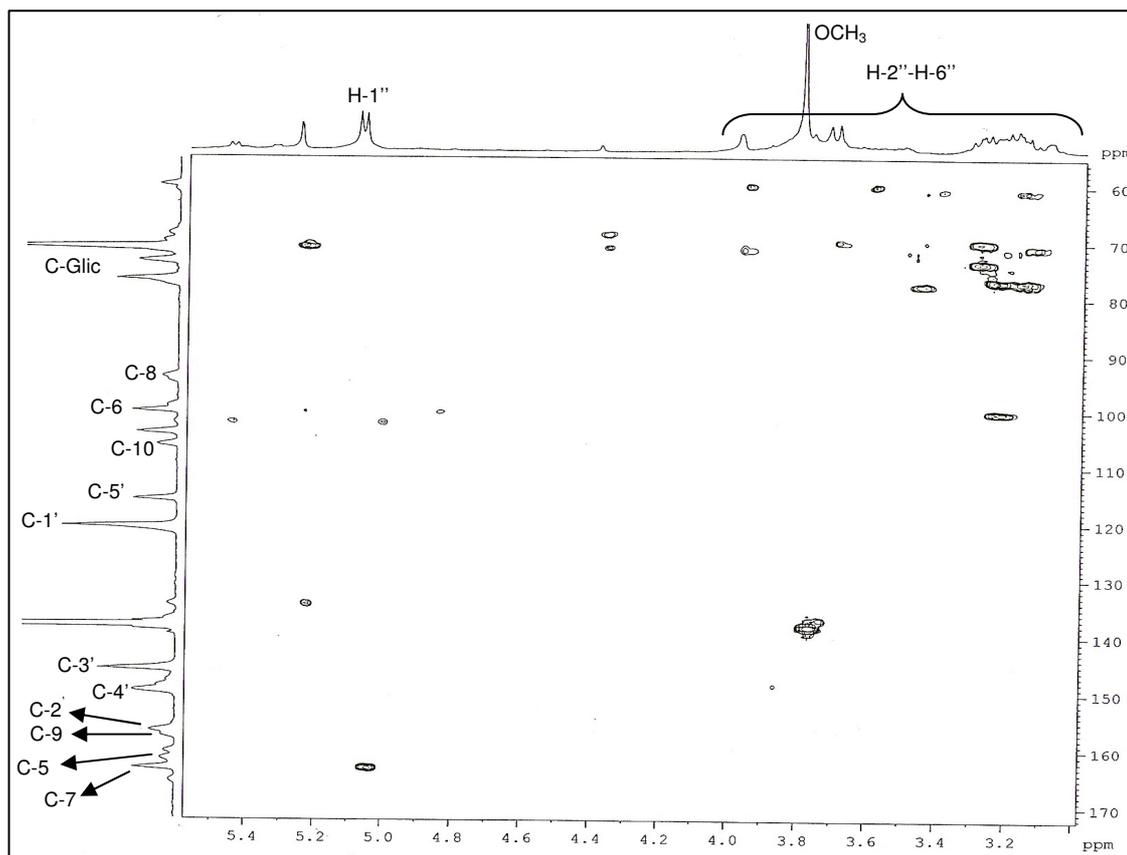


FIGURA 4.49 – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância **XI** (400 MHz, DMSO-*d*₆).

4.3.3.5 – Identificação Estrutural da Substância XII.

A substância **XII** foi isolada das frações S3-16 e S3-18 e se apresentou como um óleo amarelo. A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (GOHAR *et al.*, 2009).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.51) mostrou sinais característicos da aglicona kaemferol. Foram observados dois dubletos bastante intensos na região dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos, que indicou o padrão de substituição do anel B do flavonoíde em questão. Sinais em δ_{H} 7,71 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-2' e H-6') e δ_{H} 6,87 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5') confirmam o padrão de substituição *para* no anel B. Este padrão é caracterizado por apresentar sinais em um mesmo deslocamento químico, devido à simetria do anel B e sua livre rotação e assim, o mesmo ambiente químico, sendo estes hidrogênios considerados como equivalentes. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,38 (*sl*, H-8) e δ_{H} 6,19 (*sl*, H-6) esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel.

O mapa de correlações HSQC (Figura 4.53) mostra a correlação dos hidrogênios H-2' e H-6' com os dos carbonos em δ_{C} 132,2 (C-2' e C-6') e dos hidrogênios H-3' e H-5' com os dos carbonos em δ_{C} 115,4 (C-3' e C-5'). No mapa de correlações HMBC (Figura 4.54) foram observadas correlações dos sinais δ_{H} 7,71 e δ_{H} 6,87 com o do carbono δ_{C} 160,4 que foi atribuído ao carbono C-4'. Esta atribuição é confirmada devido à desblindagem do carbono C-4' quando substituído por grupos -OH. Foram observadas ainda correlações, dos sinais dos hidrogênios H-2' e H-6' (δ_{H} 7,71) com o do carbono δ_{C} 157,0 (C-2) e dos hidrogênios H-3' e H-5' (δ_{H} 6,87) com o do carbono δ_{C} 120,8 (C-1') que permitiram concluir assim, as atribuições do anel B.

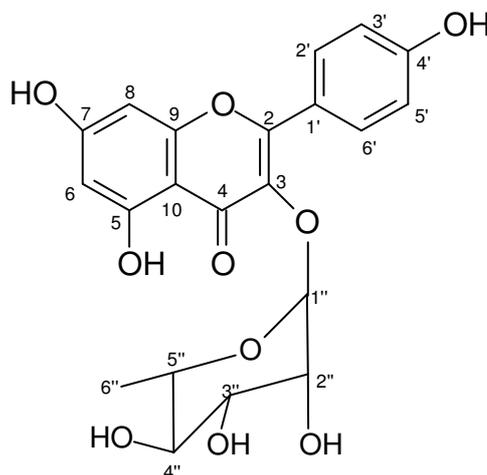
Ainda analisando o espectro de HMBC foi observada uma correlação fraca entre o sinal do hidrogênio H-6 e o sinal de carbono δ_{C} 161,0 atribuído ao carbono C-5. Este sinal está sobreposto com o sinal em δ_{C} 160,4 gerando um sinal largo. Não foram observadas correlações que permitam atribuir o deslocamento químico do C-7, por isso esse carbono não foi identificado. Foram observadas também, correlações do sinal do hidrogênio H-8 com os dos carbonos δ_{C} 156,9 e δ_{C}

103,7 que foram atribuídos aos carbonos C-9 e C-10, respectivamente, a partir de comparação com a literatura (GOHAR *et al.*, 2009).

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais característicos de unidades glicosídicas, sugerindo a presença de um resíduo de açúcar como substituinte no esqueleto flavonoídico. Foi observado um duplete em δ_{H} 0,77 ($J = 5,6$ Hz) característico de metila de raminose (H-6'') e o sinal do hidrogênio anomérico, singlete largo em δ_{H} 5,29 (H-1'') está de acordo com a literatura para o α -L-raminosídeo.

No mapa de contornos COSY (Figura 4.52), a correlação entre o hidrogênio anomérico δ_{H} 5,29 (H-1'') com o multiplete em δ_{H} 3,97 permite atribuir este último sinal ao hidrogênio glicosídico H-2''. Os demais hidrogênios do glicosídeo estão na faixa δ_{H} 3,03-3,15 e, as correlações no mapa de correlações HSQC permitiram atribuir os sinais na faixa δ_{C} 71,9-73,5 aos carbonos do glicosídeo, e os sinais em δ_{C} 17,5 e δ_{C} 101,4 aos carbonos C-6'' e C-1'', respectivamente.

A posição de substituição da unidade de raminose no flavonóide em questão foi determinada com base na correlação observada no mapa de correlações HMBC (entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o carbono C-3 (δ_{C} 134,5)). Assim, a substância **XII** foi identificada como kaemferol-3-O- α -L-raminosídeo (afzelina), primeira vez relatada para a espécie *Virola sebifera*.



Kaemferol-3-O- α -L-raminosídeo (afzelina) (**XII**)

No espectro de massas (Figura 4.50), o pico m/z 431 $[\text{M}-\text{H}]^-$ confirmou a massa molecular da substância **XII**, afzelina. O fragmento $[\text{M}-\text{H}-147]$, pico m/z 284, confirma a perda da unidade raminosídica, e este valor de relação massa/carga

284 está de acordo com a aglicona kaemferol. A proposta de fragmentação para os principais picos está representada no Esquema 4.6.

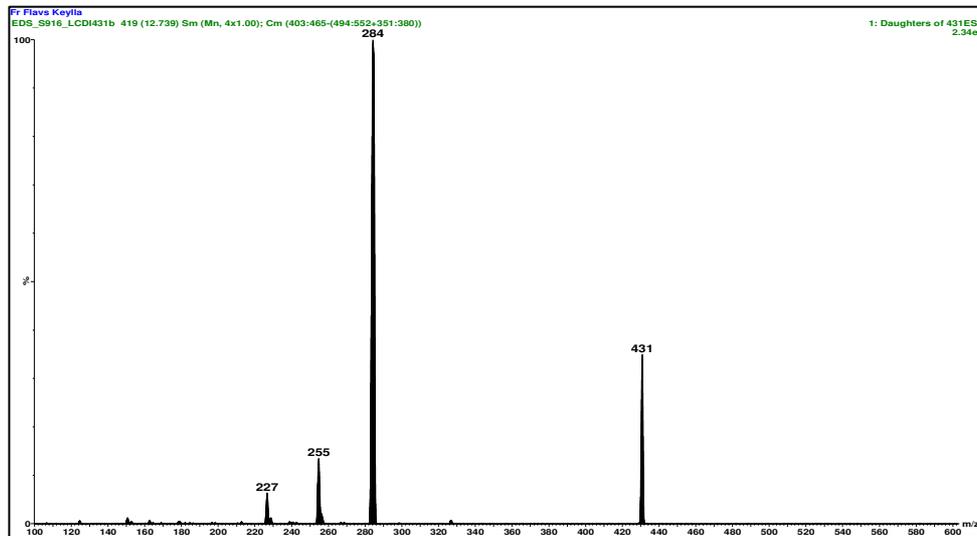
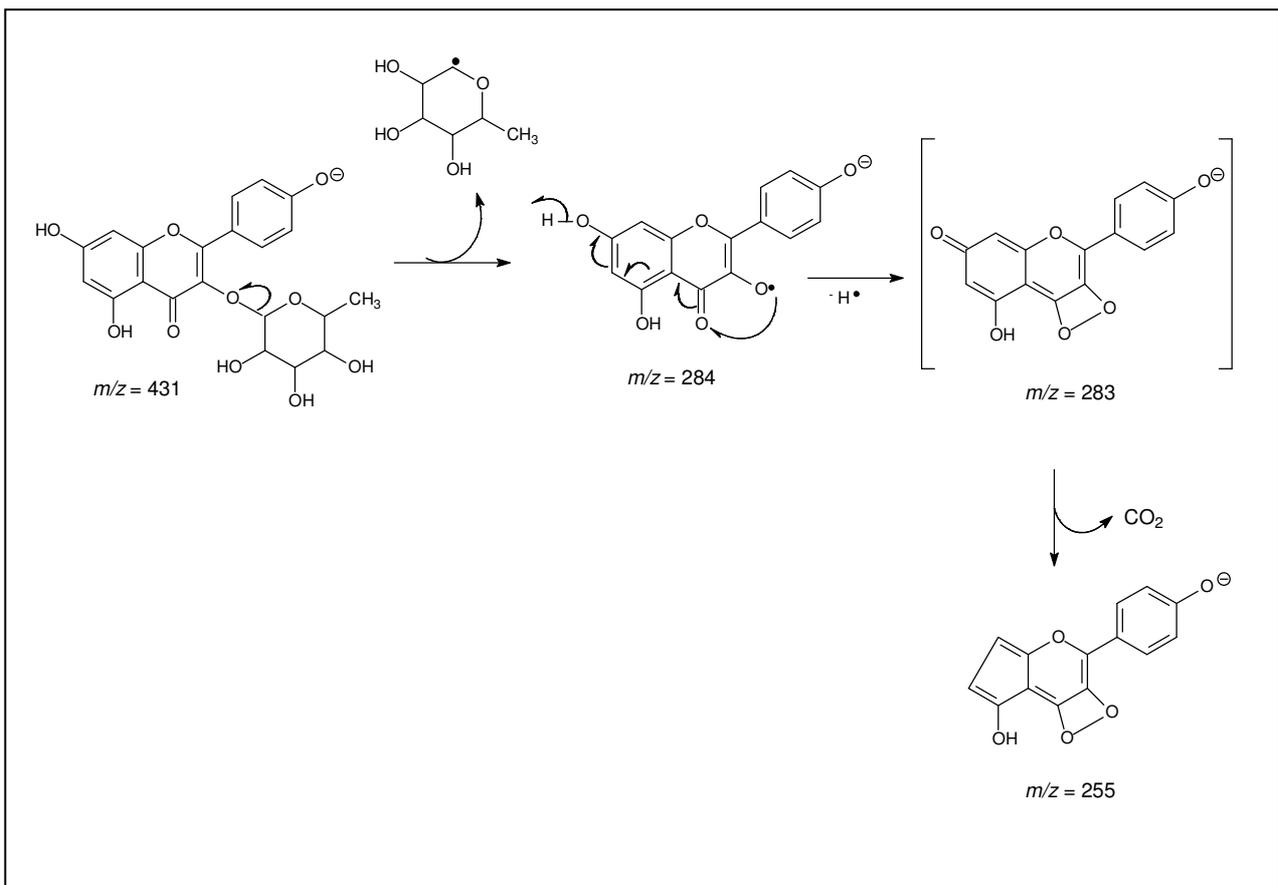


FIGURA 4.50 – Espectro de massas no modo negativo da substância XII.



ESQUEMA 4.6 – Proposta de fragmentação para a substância XII.

TABELA 4.16 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de projeção de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância **XII** e comparação com o kaemferol-3- O - α -L-raminosídeo (GOHAR *et al.*, 2009: DMSO- d_6 , 400 MHz para RMN de ^1H / 100 MHz para RMN de ^{13}C)

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|-----|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Substância XII | GOHAR <i>et al.</i> , 2009 | Substância XII | GOHAR <i>et al.</i> , 2009 |
| 2 | - | - | 157,0 | 157,8 |
| 3 | - | - | 134,5 | 134,0 |
| 4 | - | - | 178,0 | 177,6 |
| 5 | - | - | 161,0 | 161,9 |
| 6 | 6,19 (<i>s</i>) | 6,19 (<i>s</i>) | 99,5 | 98,5 |
| 7 | - | - | NI | 164,1 |
| 8 | 6,38 (<i>s</i>) | 6,39 (<i>s</i>) | 94,3 | 93,4 |
| 9 | - | - | 156,9 | 156,8 |
| 10 | - | - | 103,7 | 104,1 |
| 1' | - | - | 120,8 | 121,7 |
| 2' | 7,71 (<i>d</i> , 8,8) | 7,76 (<i>d</i> , 8,4) | 132,2 | 130,2 |
| 3' | 6,87 (<i>d</i> , 8,8) | 6,91 (<i>d</i> , 8,4) | 115,4 | 115,4 |
| 4' | - | - | 160,4 | 161,5 |
| 5' | 6,87 (<i>d</i> , 8,8) | 6,91 (<i>d</i> , 8,4) | 115,4 | 115,4 |
| 6' | 7,71 (<i>d</i> , 8,8) | 7,76 (<i>d</i> , 8,4) | 132,2 | 130,2 |
| 1'' | 5,29 (<i>s</i>) | 5,36 (<i>s</i>) | 101,4 | 102,0 |
| 2'' | 3,97 (<i>m</i>) | 4,22 (<i>dd</i> , 1,83 e 3,34) | 71,9-73,9 | 70,5 |
| 3'' | 3,03-3,15 (<i>m</i>) | 3,33-3,70 (<i>m</i>) | 71,9-73,9 | 70,7 |
| 4'' | 3,03-3,15 (<i>m</i>) | 3,33-3,70 (<i>m</i>) | 71,9-73,9 | 70,8 |
| 5'' | 3,03-3,15 (<i>m</i>) | 3,33-3,70 (<i>m</i>) | 71,9-73,9 | 69,9 |
| 6'' | 0,77 (<i>d</i> , 5,6) | 0,91 (<i>d</i> , 5,4) | 17,5 | 16,4 |

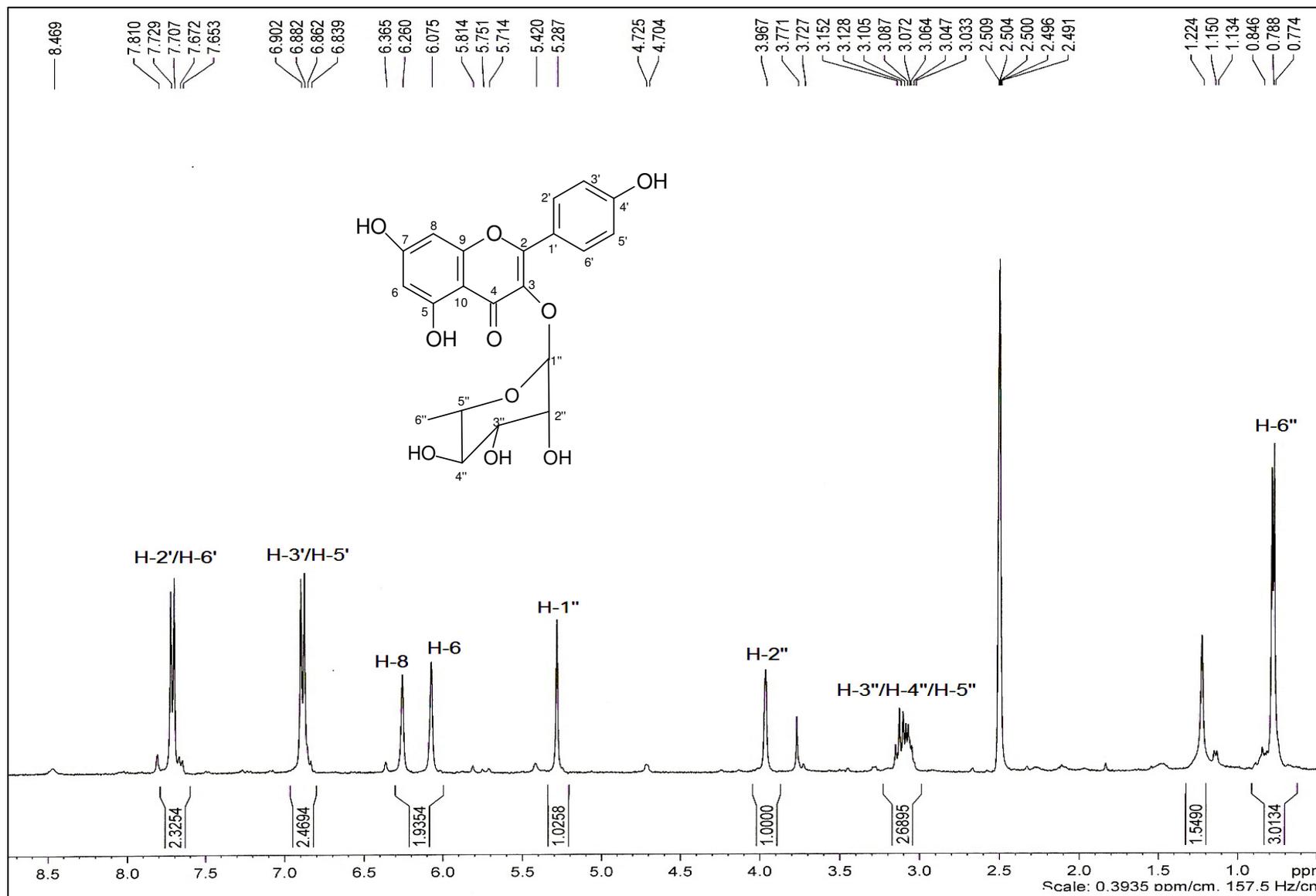


FIGURA 4.51 - Espectro de RMN de ^1H da substância XII (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

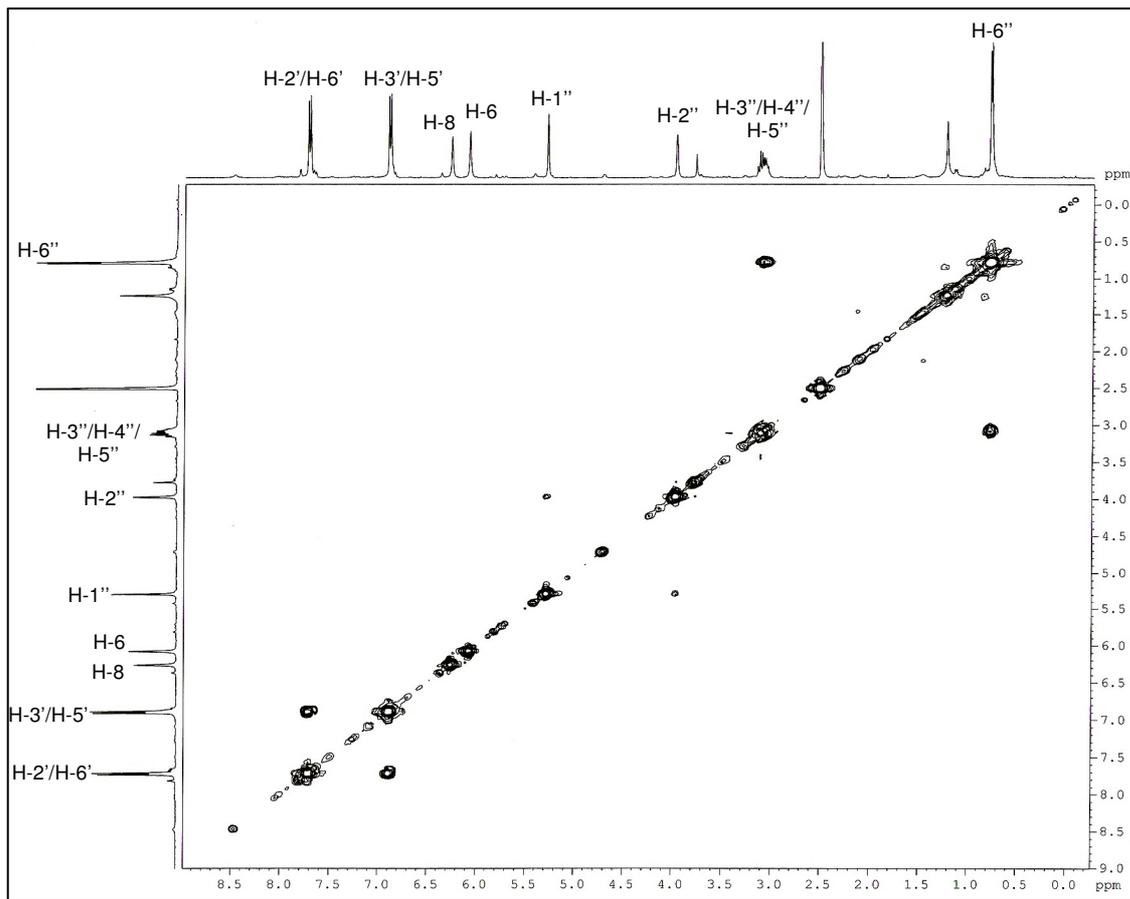


FIGURA 4.52 - Mapa de contornos COSY da substância XII (400 MHz, DMSO- d_6).

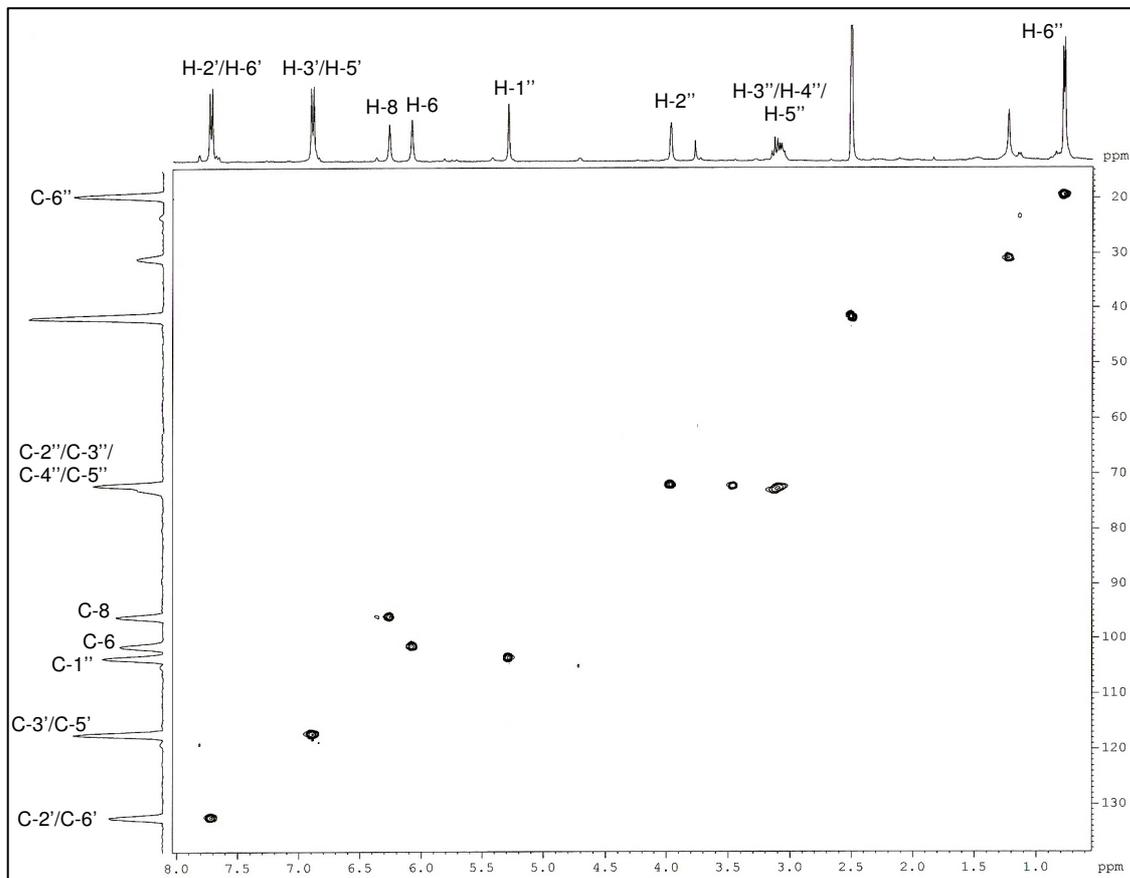


FIGURA 4.53 - Mapa de correlações HSQC da substância XII (400 MHz, DMSO- d_6).

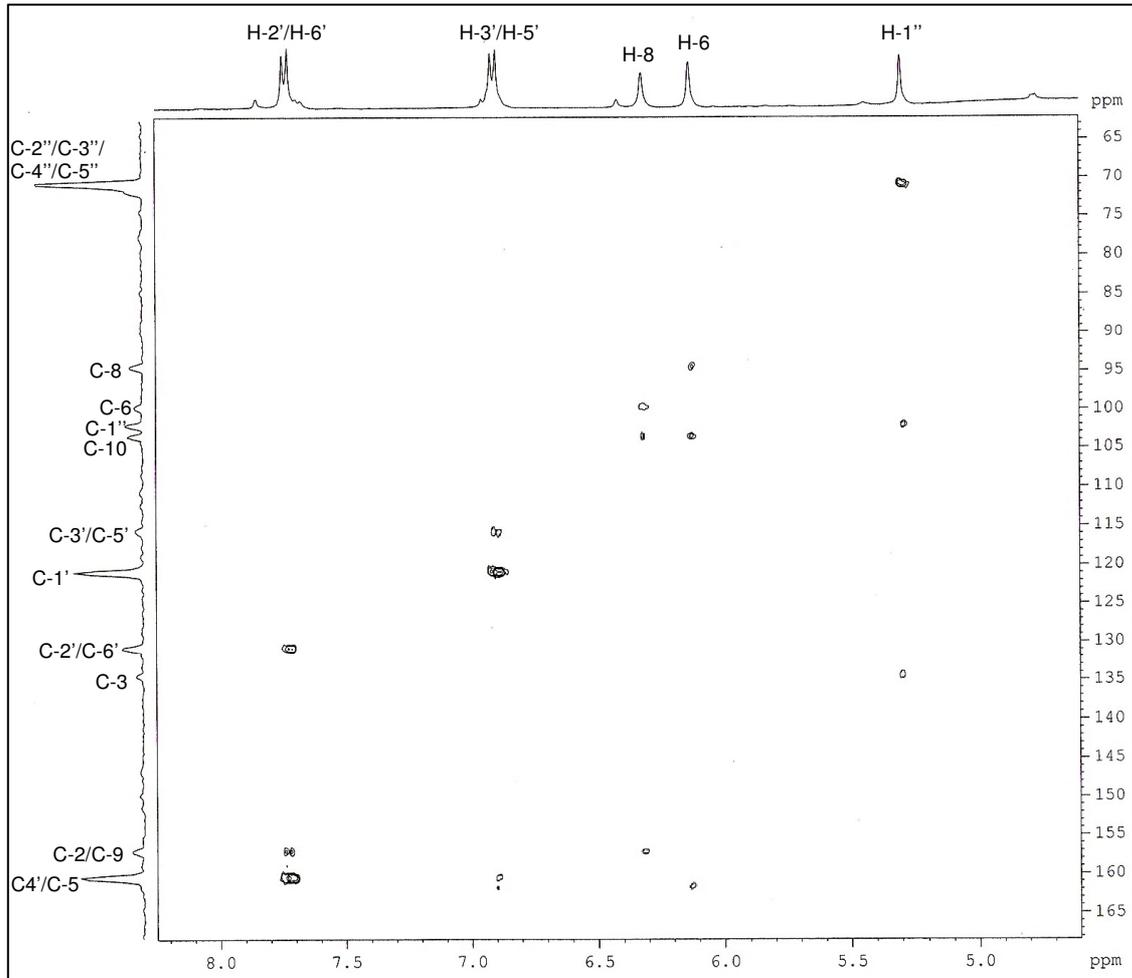


FIGURA 4.54 - Mapa de correlações HMBC da substância XII (400 MHz, DMSO-*d*₆).

4.4 – Ensaios Biológicos.

4.4.1 – Ensaios por Ingestão com as Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

4.4.1.1 – Efeito dos Extratos de *Virola sebifera* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Os extratos brutos diclorometânico e metanólico das folhas e etanólico dos galhos de *Virola sebifera* foram ensaiados sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no item 3.5.4.1. Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise estatística dos resultados obtidos após um período de 25 dias de experimento, foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento com aquelas dos controles com dieta pura. Os resultados obtidos estão apresentados no GRÁFICO 4.1 (curvas de sobrevivência) e na Tabela 4.17.

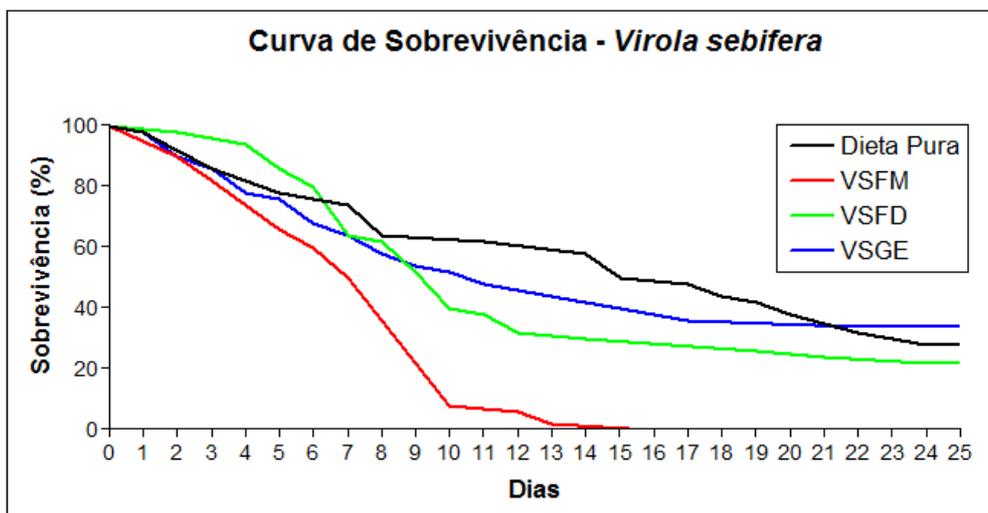


GRÁFICO 4.1 - Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com extratos de partes vegetais de *Virola sebifera*.

TABELA 4.17 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com extratos de partes vegetais de *Virola sebifera*

| Substância | Mortalidade acumulada (%) por dia | | | | | | | | | | Md* |
|---------------------|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|
| | 1 | 2 | 3 | 6 | 8 | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 | |
| Controle Dieta Pura | 2 | 8 | 14 | 22 | 36 | 36 | 42 | 52 | 62 | 72 | 17a |
| VSBM | 0 | 10 | 18 | 40 | 64 | 92 | 98 | 100 | 100 | 100 | 7.5b |
| VSBF | 0 | 2 | 4 | 20 | 38 | 60 | 70 | 70 | 76 | 78 | 10a |
| VSBG | 2 | 10 | 14 | 32 | 42 | 48 | 58 | 64 | 64 | 66 | 11a |

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

Nesses experimentos houve um aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento, no entanto, apenas o extrato metanólico das folhas apresentou diferença significativa em relação ao controle, mostrando um potencial tóxico às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Nesse tratamento a mortalidade chegou a 100% de formigas mortas no 17° dia enquanto o controle com dieta pura apresentou 72% de mortalidade ao fim dos 25 dias de experimento. Os tratamentos com extratos diclorometânico das folhas e etanólico dos galhos apresentaram 78% e 66% de mortalidade, respectivamente, resultados estes que não são significativos frente ao resultado apresentado pelo controle.

De posse desses resultados então, o extrato metanólico das folhas foi escolhido para início dos trabalhos de purificação, e foi submetido à partição líquido-líquido gerando as frações FMH, FMD, FMA e FMHa que foram novamente enviadas para ensaio.

4.4.1.2 – Efeito das Frações do Extrato Metanólico das Folhas de *Virola sebifera* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

As frações, obtidas da partição líquido-líquido do extrato VSBM, foram submetidas ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras conforme metodologia descrita no item 3.5.4.1. Foram ensaiadas as frações hexânica (FMH), diclorometânica (FMD), acetato de etila (FMA) e hidroalcolica (FMHa). Os resultados obtidos após 25 dias de experimento foram representados

através de curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle, que estão representadas no Gráfico 4.2, e na Tabela 4.18.

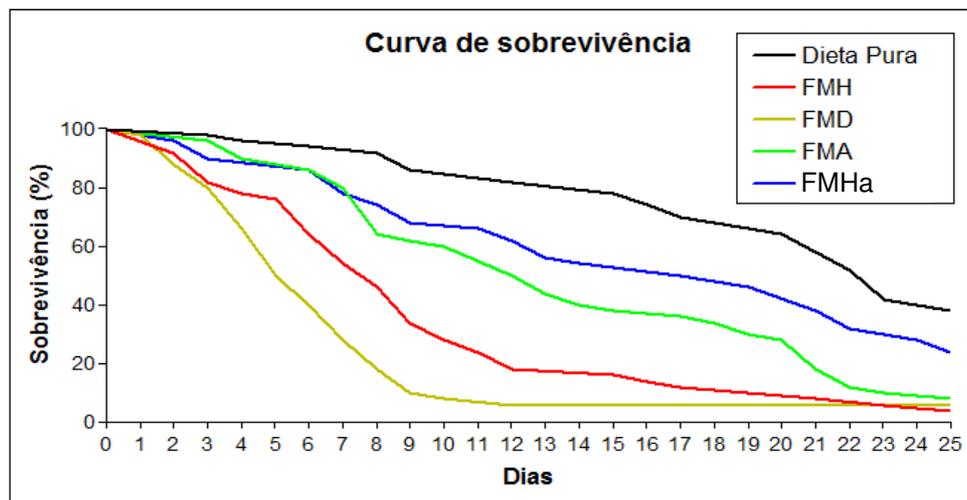


GRÁFICO 4.2 - Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato VSFM de *Virola sebifera*.

TABELA 4.18 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato VSFM de *Virola sebifera*

| Substância | Mortalidade acumulada (%) por dia | | | | | | | | | | Md* |
|---------------------|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 6 | 8 | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 | |
| Controle Dieta Pura | 0 | 0 | 2 | 6 | 8 | 14 | 18 | 30 | 42 | 62 | 23a |
| FMH | 0 | 8 | 18 | 36 | 54 | 72 | 82 | 88 | 92 | 94 | 8b |
| FMD | 2 | 12 | 20 | 60 | 82 | 92 | 94 | 94 | 94 | 94 | 5b |
| FMA | 0 | 0 | 4 | 14 | 36 | 40 | 60 | 64 | 82 | 92 | 12b |
| FMHa | 2 | 3 | 10 | 14 | 26 | 32 | 46 | 50 | 62 | 76 | 17b |

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

Nesses experimentos houve um aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento com taxas de mortalidade significativas, indicando potencial tóxico dessas frações contras as formigas cortadeiras. Todas as frações apresentaram diferença significativa em relação ao controle, no entanto, destacam-se as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila que apresentaram altos índices de mortalidade acumulada, 94%,

94% e 92% de formigas mortas no 25° dia de experimento, respectivamente. As frações hexânica e diclorometânica foram as que apresentaram maior atividade a curto prazo, enquanto o controle apresentou apenas 16% de mortalidade acumulada em 12 dias de experimento, as frações hexânica e diclorometânica já apresentavam 82% e 94% de mortalidade acumulada nesse mesmo período. Esse comportamento semelhante observado para essas duas frações está de acordo com a análise por RMN de ^1H feita para essas amostras que revelou similaridade na composição química destas, ambas eram ricas em lignanas e acilresorcinóis.

Os resultados obtidos indicam potencial inseticida das três frações, hexânica, diclorometânica e acetato de etila. Todas essas frações foram submetidas a processos de purificações cromatográficas onde foram isoladas e/ou identificados acilresorcinóis, lignanas e flavonóides descritos anteriormente.

4.4.1.3 – Efeito das Substâncias e Misturas Obtidas de *Virola sebifera* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

As substâncias obtidas, puras ou em mistura foram submetidas ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras conforme metodologia descrita no item 3.5.4.1. Inicialmente foram ensaiados os acilresorcinóis I, II e III, obtidos em mistura, na concentração de $100 \mu\text{mL}^{-1}$. Os dados estão representados em curvas de sobrevivência (Gráfico 4.3) e na Tabela 4.19.

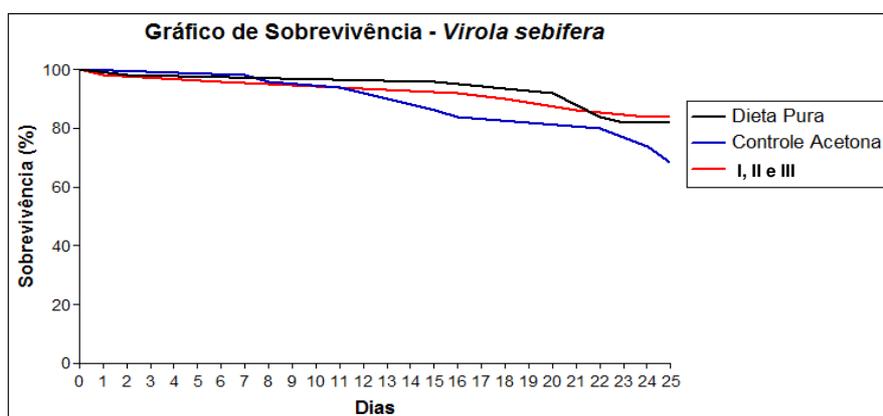


GRÁFICO 4.3 - Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com a mistura de acilresorcinóis (I, II e III).

TABELA 4.19 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com a mistura de acilresorcínóis (I, II e III)

| Substância | Mortalidade acumulada (%) por dia | | | | | | | | | | Md* |
|-----------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 6 | 8 | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 | |
| Controle Dieta Pura | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 8 | 18 | > 25 ^a |
| Controle Acetona | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 12 | 16 | 18 | 34 | > 25 ^a |
| Mistura (I, II e III) | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 8 | 14 | 16 | > 25 ^a |

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

A mistura contendo os acilresorcínóis não se mostrou tóxica na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Este resultado desperta uma discussão acerca da correlação estrutura-atividade de compostos naturais frente às formigas cortadeiras, uma vez que os acilresorcínóis são estruturalmente similares aos ácidos anacárdicos substâncias potencialmente tóxicas às formigas cortadeiras.

Dentre as demais substâncias, as lignanas **IV** (sesamina), **V** [(-)-hinokinina] e **VII** [(-)-kusunokinina] e os flavonóides **VIII** (quercitrina), **IX** (isoquercetina) e **XI** (quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo em mistura com quercitrina) foram submetidas ao ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras conforme metodologia descrita no item 3.5.4.1 na concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Os resultados obtidos estão apresentados no GRÁFICO 4.4 (curvas de sobrevivência) e na Tabela 4.20.

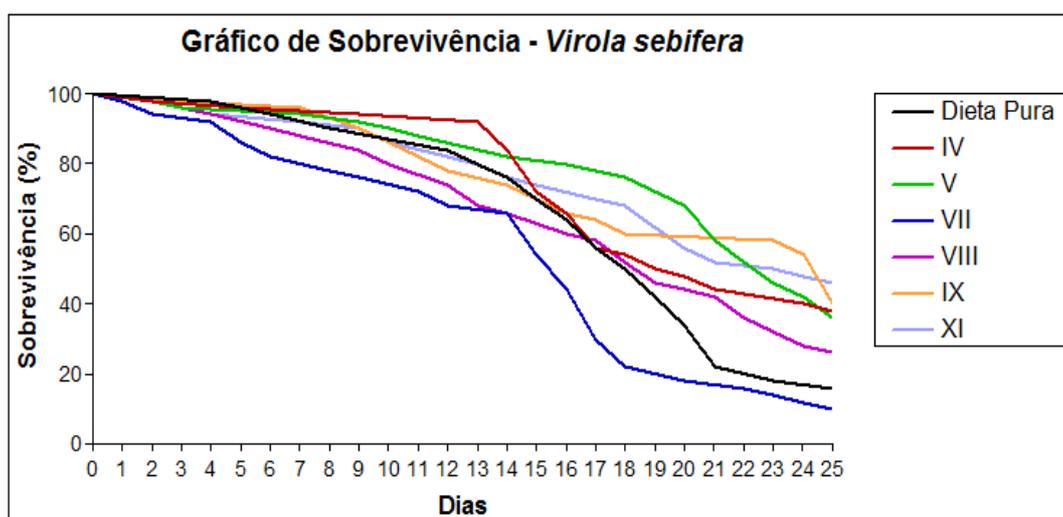


GRÁFICO 4.4 - Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as lignanas **IV**, **V** e **VII** e com os flavonóides **VIII**, **IX** e **XI**.

TABELA 4.20 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as lignanas **IV**, **V** e **VII** e com os flavonóides **VIII**, **IX** e **XI**

| Substância | Mortalidade acumulada (%) por dia | | | | | | | | | | Md* |
|---------------------|-----------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 6 | 8 | 10 | 14 | 17 | 21 | 25 | |
| Controle Dieta Pura | 0 | 0 | 0 | 6 | 10 | 10 | 24 | 44 | 78 | 84 | 18,5 a |
| IV | 0 | 2 | 2 | 4 | 4 | 6 | 16 | 44 | 56 | 62 | 19 b |
| V | 0 | 2 | 4 | 4 | 6 | 10 | 18 | 22 | 42 | 64 | 23 b |
| VII | 2 | 6 | 6 | 18 | 22 | 24 | 34 | 70 | 82 | 90 | 16 b |
| VIII | 0 | 2 | 4 | 10 | 12 | 20 | 34 | 42 | 58 | 74 | 19 a |
| IX | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 14 | 26 | 36 | 40 | 60 | 25 b |
| XI | 0 | 2 | 2 | 6 | 8 | 14 | 24 | 30 | 48 | 54 | 23 b |

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

Para as substâncias ensaiadas observou-se que apenas o tratamento com a lignana **VII** resultou em maior mortalidade acumulada, 90%, do que o controle com dieta pura, 84%. Todas as demais substâncias ensaiadas apresentaram menor mortalidade acumulada. Esses resultados indicam que nenhuma das substâncias testadas apresentou potencial tóxico às operárias de formigas cortadeiras e por isso não foram consideradas ativas.

Assim, comparando os resultados obtidos para as frações FMH, FMD, FMA e FMHa com os obtidos para as substâncias, acilresorcínóis, lignanas e flavonóides, propõe-se que a atividade apresentada pelas frações seria consequência de efeito sinérgico.

4.4.2 – Ensaios com o Fungo Simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.4.2.1 – Atividades Inibitórias das Frações do Extrato Metanólico de *Virola sebifera* sobre o Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

As frações hexânica (FMH), diclorometânica (FMD), acetato de etila (FMA) e hidroalcolica (FMHa) obtidas da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* foram submetidas a ensaios *in vitro* com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* na concentração de $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 4.5).

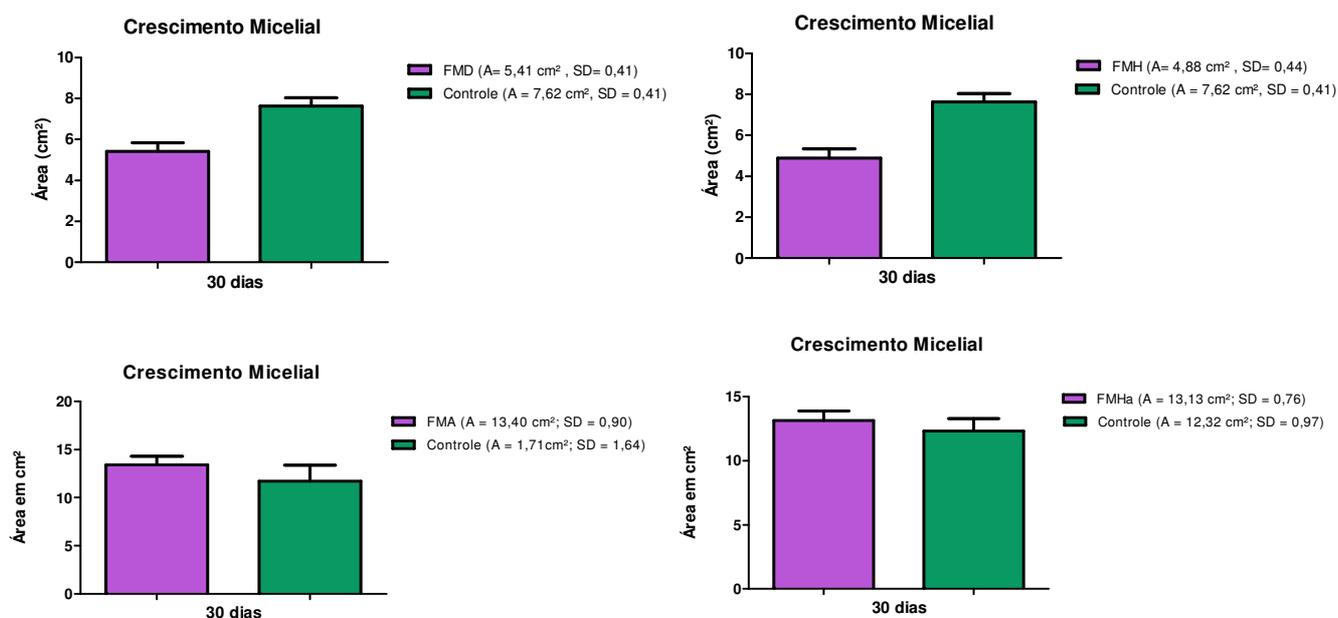


FIGURA 4.55 - Efeito das frações hexânica (FMH), diclorometânica (FMD), acetato de etila (FMA) e hidroalcolica (FMHa) sobre o crescimento do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

As frações hexânica (FMH) e diclorometânica (FMD) apresentaram inibição de 36,0% e 29,0% do crescimento do fungo simbionte, respectivamente. Enquanto as frações acetato de etila (FMA) e hidroalcolica (FMHa) promoveram o crescimento do fungo em 14,0% e 7%, respectivamente.

Esses dados mostram comportamentos diferentes para amostras de polaridades diferentes. As frações FMH e FMD apresentaram uma pequena inibição o que indica que provavelmente, os compostos presentes nessas amostras, majoritariamente lignanas e acilresorcinóis, poderiam então, apresentar alguma inibição no crescimento do fungo. As frações FMA, rica em flavonóides, e FMHa promoveram o crescimento do fungo simbiote, indicando baixa ação fungicida para os compostos mais polares. Seguiu-se assim, a avaliação das atividades inibitórias dos compostos isolados, acilresorcinóis, lignanas e flavonóides.

4.4.2.2 – Atividades Inibitórias das Substâncias Obtidas de *Virola sebifera* sobre o Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

Dentre as substâncias obtidas de *Virola sebifera*, apenas algumas delas foram ensaiadas devido à insuficiência de massa: os acilresorcinóis **I**, **II** e **III** em mistura, as lignanas **IV** (sesamina), **V** [(-)-hinokinina] e **VII** [(-)-kusunokinina], obtidos das frações FMH e FMD, e os flavonóides **VIII** (quercitrina) e **IX** (isoquercetina) e **XI** (quercetina-3-metóxi-7-O-β-D-glicosídeo em mistura com **VIII**) obtidos da fração FMA.

A mistura de acilresorcinóis (**I**, **II**, e **III**) apresentou 41% de inibição do crescimento do fungo enquanto as lignanas sesamina (**IV**), (-)-hinokinina (**V**) e (-)-kusunokinina (**VII**) apresentaram 74%, 72% e 100% de inibição do crescimento do mesmo nas concentrações de 120 µg.mL⁻¹ para a (-)-kusunokinina e de 100 µg.mL⁻¹ para os demais (Figuras 4.56 e 4.57).

As lignanas apresentaram considerável potencial tóxico ao fungo simbiote enquanto as frações FMH e FMD, que deram origem às mesmas, apresentaram pequena inibição no crescimento do fungo, possivelmente pela menor concentração das mesmas nas frações.

A toxicidade de lignanas ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus* já foi relatada anteriormente, onde estas inibiram o crescimento *in vitro* deste fungo, onde foi verificada a toxicidade das lignanas sesamina e epigalgavrina (PAGNOCCA *et al.*, 1996).

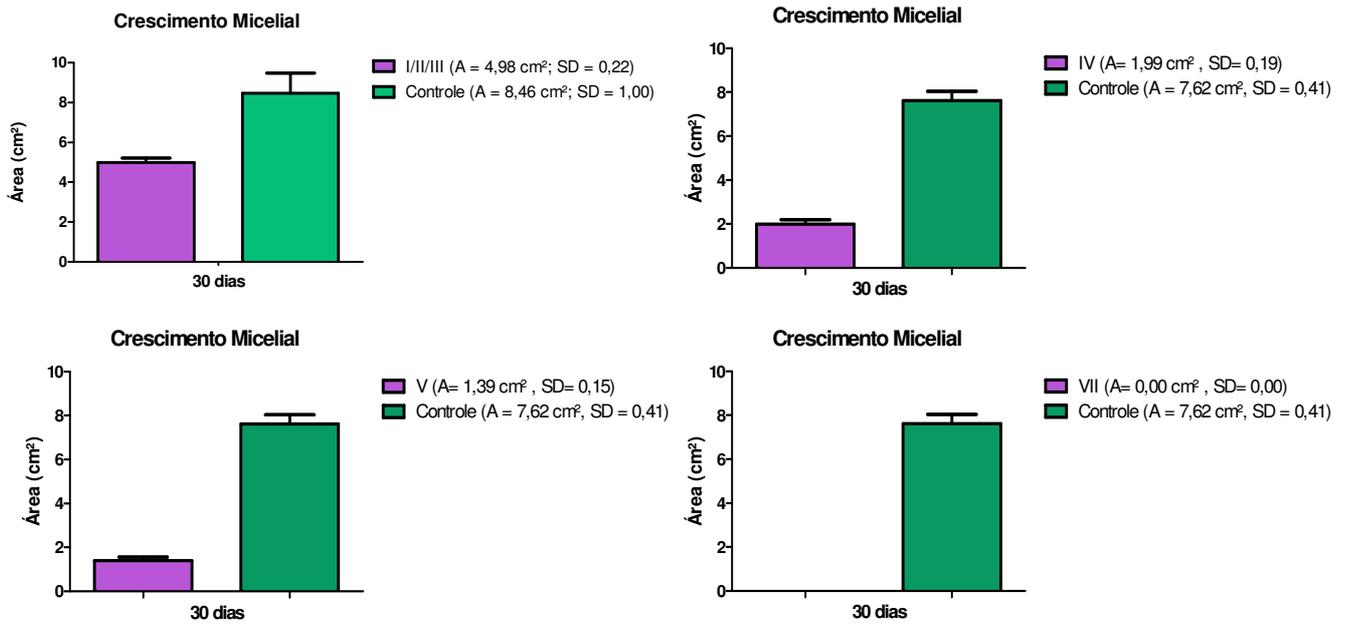


FIGURA 4.56 - Efeito da mistura de acilresorcnoóis (I, II, e III) e das lignanas sesamina (IV), (-)-hinokinina (V) e (-)-kusunokinina (VII) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

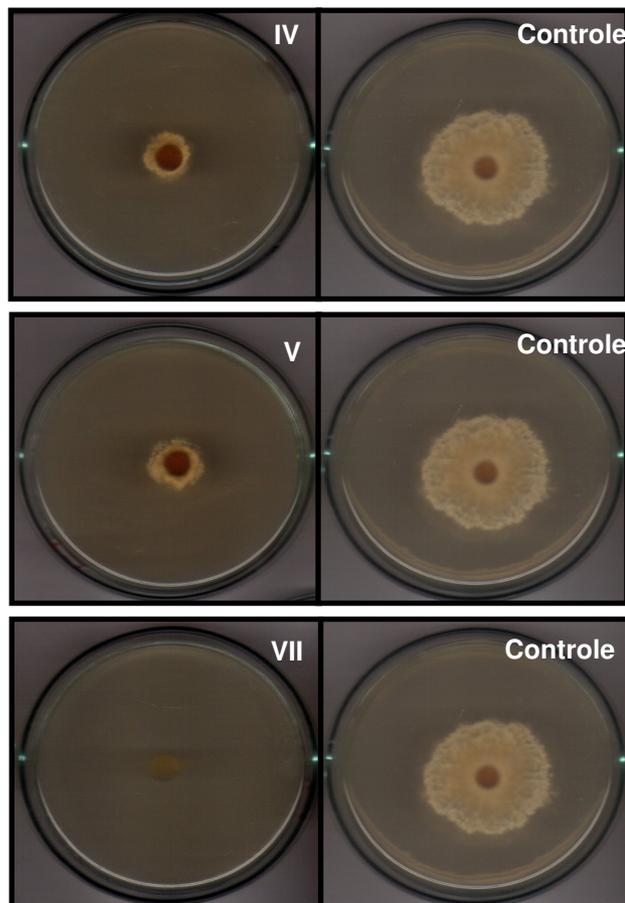


FIGURA 4.57 – Imagens do fungo simbiote na presença das lignanas IV (100 µg. mL⁻¹), V (100 µg. mL⁻¹), VII (120 µg. mL⁻¹) e respectivos controles.

Dentre os flavonóides testados, **VIII** (quercitrina), **IX** (isoquercetina) e **XI** (quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo em mistura com **VIII**), os resultados para a isoquercetina e a mistura de quercetina-3-metóxi-7-O- β -D-glicosídeo com quercitrina deram indícios de uma pequena atividade dessas amostras. No entanto, os bioensaios necessitam ser repetidos uma vez que os experimentos não foram reproduzíveis entre as réplicas feitas para cada uma dessas amostras, devido a problemas nas condições experimentais (possivelmente variação de temperatura). O bioensaio com a quercitrina (Figura 4.58) resultou em pequena inibição do crescimento do fungo (44%), o que indica novamente, efeito menor da mesma quando em mistura, uma vez que a fração FMA induziu o crescimento do fungo.

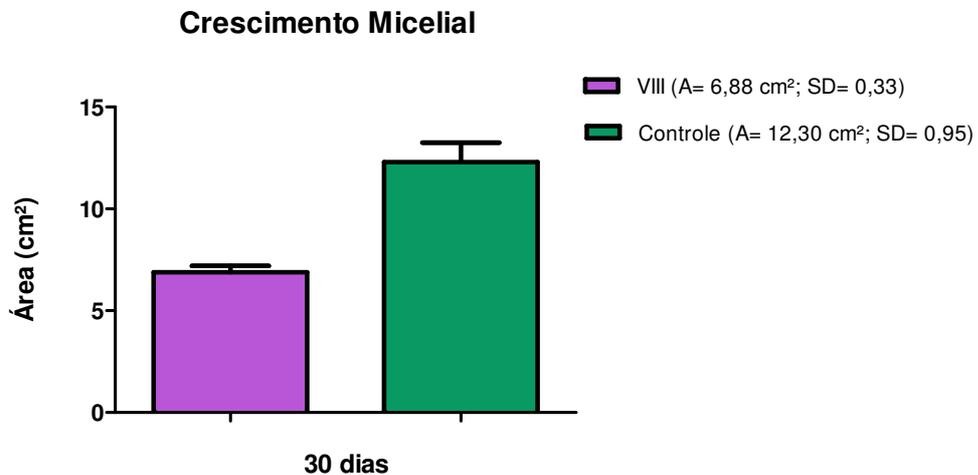


FIGURA 4.58 – Efeito do flavonóide quercitrina (**VIII**) sobre o crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

5 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Virola sebifera* levou ao isolamento e/ou identificação de três acilresorcinóis, quatro lignanas e cinco flavonóides sendo todos esses flavonóides inéditos para a espécie *Virola sebifera*, o que contribui significativamente para o perfil químico desta espécie.

O processo de purificação das frações apolares, hexânica e diclorometânica envolveu o emprego da técnica de cromatografia em contra corrente e uma busca cuidadosa pelo sistema de solventes a ser empregado na purificação das amostras. Este trabalho mostrou que esta técnica, apesar de ser majoritariamente empregada na literatura em trabalhos com frações de maior polaridade, é também eficiente na purificação de amostra apolar rica em acilresorcinóis e lignanas. Foi novamente comprovado que o sucesso desta técnica está condicionado a um estudo minucioso na busca do melhor sistema de solventes a ser utilizado.

Os ensaios por ingestão dos extratos de *Virola sebifera* com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que o tratamento mais ativo foi com o extrato metanólico das folhas. E dentre as frações obtidas da partição líquido-líquido deste extrato, as frações hexânica, diclorometânica e acetato e elita apresentaram potencial tóxico às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. O processo de purificação dessas frações gerou substâncias que não foram ativas frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e, assim, o potencial tóxico apresentado pelas frações foi atribuído ao efeito sinérgico.

Essas mesmas frações foram também submetidas a ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbiote das formigas cortadeiras, o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. Os dados mostraram resultados distintos para as diferentes frações, enquanto as frações hexânica e diclorometânica apresentaram inibição de 36,0% e 29,0% do crescimento do fungo simbiote, respectivamente, as frações acetato de etila e hidroalcolica promoveram o crescimento do mesmo em 14,0% e 7%, respectivamente.

Dentre as substâncias isoladas, as lignanas apresentaram grande potencial fungicida contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* chegando a porcentagens significativas de inibição do crescimento do fungo como 74%, 72% e

100% de inibição para a sesamina (**IV**), (-)-hinokinina (**V**) e (-)-kusunokinina (**VII**), respectivamente. As demais substâncias ensaiadas, mistura de acilresorcinóis (**I**, **II** e **III**) e flavonóide quercitrina (**VIII**) não apresentaram potencial tóxico contra este fungo.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier Sc. Publishers Amsterdam: 444p., 1989.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. “¹³C NMR spectroscopy of lignin and neolignan derivatives”. *Magn. Reson. Chem.*, **23**: 6: 389-418, 1985.
- ALMADO, R. P. “Manejo de formigas cortadeiras na ArcelorMittal florestas”. *Biológico*, **69**: 133-133, 2007.
- ALMEIDA, R. N. A.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y. ; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C. & SILVA, M. F. G. F. “Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller”. *BioAssay*, **2**: 1-8, 2007.
- ANDRADE, L. N.; BIZAIA, N.; CAETANO, B. L.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; SILVA FILHO, A. A.; CALEFI, P. S.; NASSAR, E. J.; BASTOS, J. K.; CIUFFI, K. J. “Synthesis of (-)-hinokinin by oxidation of (-)-cubebin catalyzed by biomimetic metalloporphyrin catalytic systems”. *Catal. Commun.*, **10**: 669-672, 2009.
- ÂNGELO, H.; BRASIL, A. A.; SANTOS, J. “Madeiras tropicais: análise econômica das principais florestas exportadas”. *Acta Amazônica*, **31**: 237-248, 2001.
- APG – THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. “An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III”. *Bot. J. Linn. Soc.*, **161**: 105-121, 2009.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. “Drug discovery from medicinal plants”. *Life Sci.*, **78**: 431-441, 2005.
- BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RÚVEDA, E. A. “Neolignans of *Virola surinamenses*”. *Phytochemistry*, **17**: 783-786, 1978.
- BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. “Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues”. *Phytochemistry*, **55**: 589-595, 2000.
- BATTERBEE, J. E.; BURDEN, R. S.; CROMBIE, L.; WHITING, D. A. “Chemistry and synthesis of the lignan (-)-cubebin”. *J. Chem. Soc.*, **C**: 2470-2477, 1969.
- BAYINDIR, U.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. “Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb”. *The Plant Journal*, **55**: 810-820, 2008.
- BENNINI, B. B.; CHULIA, A. J.; KAOUADJI, M.; THOMASSON, F. “Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*”. *Phytochemistry*, **31**: 7: 2483-2486, 1992.
- BERTHOD, A. “Practical approach to high-speed counter-current chromatography”. *J. Chromatogr. A*, **550**: 677-693, 1991.
- BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L. C.; NAKANO, O. “Curso de entomologia aplicada à agricultura”. IN: *Formigas Cortadeiras e Cupins*, Piracicaba, FEALQ, 1992, p. 631-671.
- BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; DE GROOTE, S. T. C.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. G. F. “Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera: Formicidae) and to the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller”. *Pest Manag. Sci.*, **60**: 933-938, 2004.
- BLUMENTHAL, E. E. A.; SILVA, M. S.; YOSHIDA, M. “Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamenses*”. *Phytochemistry*, **46**: 745-749, 1997.

- BOARETTO, M, A. C.; FORTI, L. C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997.
- BORGES, F. C.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J. C.; OLIVEIRA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S. "Potencial alelopático de duas lignanas isoladas de folhas de *Virola surinamenses* (Myristicaceae)". *Planta Daninha*, **25**: 51-59, 2007.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. "A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n. with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae)". *Sociobiology*, **38**: 635-650, 2001.
- BRAZ FILHO, R.; PEDREIRA, G.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. "Isoflavones from *Virola caducifolia*". *Phytochemistry*, **15**: 1029-1030, 1976.
- BUENO, F. A.; GODOY, M. P. F.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI Jr, M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. "Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus". *Sociobiology*, **45**: 389-399, 2005.
- CARBALLEIRA, N. M.; CRUZ, C. "Dimethyl disulfide derivatization of ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate and ethyl (9E,12E)-9,12-octadecadienoate". *Chem. Phys. Lipids*, **84**: 81-85, 1996.
- CARVALHO, J. C. T.; FERREIRA, L. P.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J. C.; CAMPOS, L. M. O.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. "Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel". *J. Ethnopharmacol.*, **64**: 173-177, 1999.
- CARVALHO, J. E. "Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese". *Multi Ciência: Construindo a história dos produtos naturais*, **7**, 2006.
- CAVALCANTE, S. H.; FERNANDES, D.; FILHO, H. F. P.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Lignoids from the fruit of three *Virola* species". *Phytochemistry*, **24**: 1865-1866, 1985.
- CHATROU, L. W. "Myristicineae, a new suborder within Magnoliales". *Taxon*, **52**: 277-279, 2003.
- CHERRETT, J. M. "The economic importance and control of leaf-cutting ants". IN: VINSON, B. (Ed.). *Economic impact and control of social insects*. New York: Praeger Publishers, 1986, p.165-190.
- CONSERVA, L. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; MARTINEZ, J. C.; GOTTLIEB, H. E. "Iryantherins, lignoflavonoids of novel structural types from the Myristicaceae". *Phytochemistry*, **29**: 3911-3918, 1990.
- CONWAY, W. D. *Counter-Current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications*. VCH Publishers Inc., New York, 1990.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C. & MALLOCH, D. "Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites". *Nature*, **398**: 701-704, 1999.
- DANELUTTE, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. "Lignoids in seedlings of *Virola sebifera*". *Phytochem. Anal.*, **11**: 383-386, 2000.
- DEGENHARDT, A.; HABBEN, S.; WINTERHALTER, P. "Isolation of lignan secoislariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography". *J. Chrom. A*, **943**: 299-302, 2002.
- DELLA LUCIA, T. M. C. Leaf-cutting ant control in Brazil: state of the art. *Mirmecologia Tropical, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia*, Ilhéus Bahia, p. 147-151, 1997.
- DELLA LUCIA, T. M. C. e VILELA, E. F. "Métodos atuais de controle e perspectivas". IN: *As formigas cortadeiras*. DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993, p. 163-176.

- DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; RUIZ, A. L. T. G.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V.; KOHN, L. K.; SOUZA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. "Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Viola sebifera* leaves". *Phytother. Res.*, **22**: 127-130, 2008.
- DEWICK, P.M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*; England, John Wiley & Sons, 2002.
- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BOSI, S.; BENEDETTELLI, S.; GHISELLI, L.; CORTACERO-RAMÍREZ, S.; CARRASCO-PANCORBO, A.; SEGURACARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. "Lignan profile in seeds of modern and old Italian soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars as revealed by CE-MS analyses". *Electrophoresis*, **28**: 4212-4219-2007.
- ENDERS, D.; MILOVANOVIC, M. "Asymmetric synthesis of (+)-hinokinin, (+)-dehydrocubebin and cubebin dimethyl ether, a new lignin from *Phyllanthus niruri*". *Z. Naturforsch.*, **62b**: 117-120, 2007.
- FARJI-BRENNER, A. G. F.; RUGGIERO, A. "Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geotropical range sizes". *J. Biogeogr.*, **21**: 391-399, 1994.
- FATHIAZAD, F.; DELAZAR, A.; AMIRI, R.; SARKER, S. D.; "Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves". *Iran. J. Pharm. Res.*, **3**: 222-227, 2006.
- FEBVAY, G. & KERMARREC, A. "Activites enzymatiques des glandes salivaires et de l'intestin moyen d'une fourmi *Atta* (adultes et larves): *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae, Attini)". *Arch. Biol.*, **92**: 299-316, 1981.
- FERNANDES, A. M. A. P.; BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. "Lignans and a neolignan from *Viola oleifera* leaves". *Phytochemistry*, **32**: 1567-1572, 1993.
- FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C. "Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbionte". *Quim. Nova*, **25**: 1091-1095, 2002.
- FERRI, P. H.; BARATA, L. E. S. "Neolignans and a phenylpropanoid from *Viola pavonis* leaves". *Phytochemistry*, **31**: 1375-1377, 1992.
- FILLEUR, F.; LE BAIL, J. C.; DUROUX, J. L.; SIMON, A.; CHULIA, A. J. "Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17 β -HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myristica argentea*". *Planta Med.*, **67**: 700-704, 2001.
- FISCHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. "*Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*". *Mycol. Res.*, **98**: 884-888, 1994.
- FORTI, D. M.; UBILLAS, R. P.; MENDEZ, C. D.; JOLAD, S. D.; INMAN, W. D.; CARNEY, J. R.; CHEN, J. L.; IANIRI, T. T.; HASBUN, C.; BRUENING, R. C.; LUO, J.; REED, M. J.; IWU, M.; CARLSON, T. J.; KING, S. R.; BIERER, D. E.; COOPER, R. "Novel antihyperglycemic terpenoid-quinones from *Pycnanthus angolensis*". *J. Org. Chem.*, **65**: 6534-6539, 2000.
- FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P. "Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório". *Naturalia*, **24**: 61-63, 1999.
- FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. *Formigas Cortadeiras. Biologia, Ecologia, Danos e Controle*. Botucatu – SP, 61p., 1997.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C. F.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. "Ecologia nutricional de formigas". IN: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. *Ecologia Nutricional de Insetos e suas Aplicações no Manejo de Pragas*. São Paulo, Manolé Ltda, 1991, p. 131-223.

- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; SILVA, V. P.; SAES, M. B. "Economic of grasscutting ants." IN: *Fire Ants and Leaf-cutting Ants. Biology and Management*. Lofgren, C.S.; Vandermeer, R.K. (Eds). Westview Press, Bolder, Colorado, and London, 1986, p. 18-35.
- FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. "Rational development of solvent system families in counter-current chromatography". *J. Chrom. A*, **1151**: 51-59, 2007.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C. "Flavonoid Composition of *Citrus* Juices". *Molecules*, **12**: 1641-1673, 2007.
- GNABRE, J. N.; ITO, Y.; MA Y.; HUANG, R. C. "Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentate* by counter-current chromatography". *J. Chrom. A*, **719**: 353-364, 1996.
- GODOY, M. F. P.; VICTOR, R. S.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. "Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 669-672, 2005.
- GOHAR, A.; GEDARA, S. R.; BARAKA, H. N. "New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds". *J. Med. Plants Res.*, **3**: 5: 424-428, 2009.
- GOTTLIEB, O. R. "Neolignans from *Virola carinata*". *Phytochemistry*, **15**: 773-774, 1976.
- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. "Lignóides com atenção especial à química das neoliganas". *Quím. Nova*, **7**: 4: 250-273, 1984.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: 535p., 1982.
- HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504, 2000.
- HARMATHA, J.; NAWROT, J. "Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety". *Entomol. Exp. Appl.*, **104**: 51-60, 2002.
- HARROWVEN, D. C.; NEWMAN, N. A.; KNIGHT, C. A. "On the identity of a neolignan from the fruits of *Virola sebifera*". *Tetrahedron Lett.*, **39**: 6757-6760, 1998.
- HEARON, W. M.; MACGREGOR, W. S. "The naturally occurring lignans". *Chem. Rev.*, **55**: 5: 957-1068, 1955.
- HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C. "Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Bull. Entom. Res.*, **86**: 253-256, 1996.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The Ants*. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
- HUANG, T.; SHEN, P.; SHEN, Y. "Preparative separation and purification of deoxyschisandrin and γ -schisandrin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography". *J. Chrom. A.*, **1066**: 239-242, 2005.
- ITO, Y.; BOWNAM, R. L. "Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support". *Science*, **167**: 281-283, 1970.
- ITO, Y. "Golden rules and pitfalls in selecting conditions for high speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A.*, **1065**: 145-168, 2005.
- ITO, Y. "Recent advances in counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, **538**: 3-25, 1991.

- JHAM, G. N.; ATTYGALLE, A. B.; MEINWALD, J. "Location of double bonds in diene and triene acetates by partial reduction followed by methylthiolation". *J. Chrom. A*, **1077**: 57-67, 2005.
- JUSTI-JUNIOR, J.; IMENES, S. de L.; BERGMANN, E. L.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. & ZORZENON, F. J. "Formigas Cortadeiras". *Bol. Técn. Inst. Biol.*, **4**: 5-31, 1996.
- KATO, M. J.; LOPES, L. M. X.; PAULINO FILHO, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*". *Phytochemistry*, **24**: 533-536, 1985.
- KATO, M. J.; PAULINO FILHO, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Neolignans from fruits of *Virola elongata*". *Phytochemistry*, **25**: 279-280, 1986.
- KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Flavones and lignans in flowers, fruits and seedlings of *Virola venosa*". *Phytochemistry*, **31**: 283-287, 1992.
- KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Lignoids and arylalkanones from fruits of *Virola elongata*". *Phytochemistry*, **29**: 1799-1810, 1990.
- KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. "Alkaloids from the hallucinogenic plant *Virola sebifera*". *Phytochemistry*, **24**: 1373-1375, 1985.
- KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. "Neolignans of *Virola carinata* bark". *Phytochemistry*, **21**: 2725-2728, 1982a
- KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. "The neolignans (-)-carinatone and carinatin from *Virola carinata*". *Phytochemistry*, **21**: 929-931, 1982b.
- KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. "The neolignans, carinatidin, dihydrocarinatidin, carinatidiol and dehydrodieugenol B from *Virola carinata*". *Phytochemistry*, **22**: 2277-2280, 1983.
- KEMPF, W. W. "Catálogo abreviado das formigas da região notropical (Hymenoptera: Formicidae)". *Studia Entomol.*, **15**: 3-334, 1972.
- KRENN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; PETR U.; KOPP, B. "Flavonoids from *Achillea nobilis* L". *Z. Naturforsch.*, **58c**: 11-16, 2003.
- KUROSHIMA, K. N.; CAMPOS, F.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; FILHO, V. C. "Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves". *Z. Naturforsch.*, **56**: 703-706, 2001.
- LEITE, A. C.; OLIVEIRA, C. G.; GODOY, M. P.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, F. S. S.; FORIM, M. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F., BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI Jr., M. "Toxicity of *Cipadessa fruticosa* to the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungus". *Sociobiology*, **46**: **1**: 17-26, 2005.
- LENZA, E.; OLIVEIRA, P. E. "Biologia reprodutiva e fenologia de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) em mata mesofítica de Uberlândia, MG, Brasil". *Rev. Bras. Bot.* **29**: 443-451, 2006.
- LI, H. B.; CHEN, F. "Preparative isolation and purification of phillyrin from the medicinal plant *Forsythia suspense* by high-speed counter-current chromatography". *J. Chrom. A*, **1083**: 1-2: 102-105, 2005.
- LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J. M. New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. *J. Agric. Food. Chem.*, **56**: 8130-8140, 2008.
- LOECK, A. E.; NAKANO, O. "Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigatta* (Smith, 1858) (Hymenoptera – Formicidae)". *O solo*, **1**: 25-30, 1984.

- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "1,11-diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*, **21**: 751-755, 1982.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Aryltetralone and arlindanone neolignans from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*, **23**: 2021-2024, 1984b.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*, **22**: 1516-1518, 1983.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Further lignoids from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*, **23**: 2647-2652, 1984a.
- LOPES, N. P.; BLUMENTHAL, E. E. A.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. "Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Virola surinamenses*". *Phytochemistry*, **43**: 1089-1092, 1996.
- LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A. R.; KATZIN, A. M. "Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamenses* (Rol.) Warb. By Waiãpi amazon Indians". *J. Ethnopharmacol.*, **67**: 313-319, 1999a.
- LOPES, N. P.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; "Antifungal constituents from roots of *Virola surinamenses*". *Phytochemistry*, **51**: 29-33, 1999b.
- MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. "Non-alkaloidal constituents of *Virola elongata* bark". *Phytochemistry*, **24**: 561-566, 1985.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas*. São Paulo: Ceres, 1970.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas: insetos daninhos às plantas cultivadas*, 3ª Ed., São Paulo. Livraria Nobel, 251p., 1974.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. *Bahia Agríc.*, **7**: 18-21, 2006.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press; London, UK; 113p., 1982.
- MARSARO, A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, SILVA, M. F. G. F.; VEIRA, P. C. "Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculate* leaves". *J. Chem. Ecol.*, **30**: 1771-1780, 2004.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. "Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives". *J. Chromatogr. A*, **658**: 315-341, 1994.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. "Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis". *J. Chromatogr. A*, **1112**: 181-194, 2006.
- MARTIN, M. M.; CARMAN, R. M.; MACCONNEL, J. G. "Nutrients derived from the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes*". *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **62**: 1386-1387, 1969.
- MARTINEZ, J. C.; ALDANA, M. I.; CUCA, L. E. "Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* species". *Phytochemistry*, **50**: 883-886, 1999b.
- MARTINEZ, J. C.; ALDANA, M. I.; CUCA, L. E. "The chemistry of colombian Myristicaceae. Part 14, Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves". *Phytochemistry*, **50**: 883-886, 1999a.
- MARTINEZ, J. C.; CUCA, L. E. "Flavonoids from *Virola calophylloidea*". *J. Nat. Prod.*, **50**: 1045-1047, 1987.
- MARTINEZ, J. C.; CUCA, L. E.; SANTANA, A. J.; POMBO-VILLAR, E.; GOLDING, B. T. "Neolignans from *Virola elongata*". *Phytochemistry*, **24**: 1612-1614, 1985a.
- MARTINEZ, J. C.; CUCA, L. E.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Neolignans from *Virola calophylloidea*". *Phytochemistry*, **24**: 1867-1868, 1985b.

- MARTINEZ, J. C.; TORRES, R. "Lignans from *Viola* *cf.* *Pavonis* leaves". *Phytochemistry*, **44**: 1179-1182, 1997.
- MESSIANO, G. B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X.; BORTOLI, S. A.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. "Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*". *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 2655-2659, 2008.
- MING, D. S.; LÓPEZ, A.; HILLHOUSE, B. J.; FRENCH, C. J.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. "Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*". *J. Nat. Prod.*, **65**: 1412-1416, 2002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: *Uma oportunidade de investimentos*. 2004. Disponível em: <<http://www./ministério da agricultura>>. Acesso em: 14 nov 2010.
- MIYASHIRA, C. H. "Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista". Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 2007.
- MORAIS, S. K. R.; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. E. S.; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; LINDOSO, J. A. L.; YOSHIDA, M. "Biological activities of lignoids from amazon Myristicaceae species: *Viola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis*, *Iryanthera juruensis*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **20**: 1110-1118, 2009.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. "Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)". *Sociobiology*, **45**: 194-204, 2005.
- MOSS, G. P. "Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC recommendations 2000)". *Pure Appl. Chem.*, **72**: 1493-1523, 2000.
- NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. "Evolutionary aspects of antifungus interactions in leaf-cutting ants". *Trends Ecol. Evol.*, **12**: 386-389, 1997.
- PAGNOCCA, F. C.; RIBEIRO, S. B.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. "Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants". *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1325-1330, 1996.
- PENG, J.; FAN, G.; QU, L.; ZHOU, Y.; WU Y. "Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisin A from *Schisandra chinensis*". *J. Chrom. A*, **1082**: 203-207, 2005a
- PENG, J.; FAN, G.; WU Y. "Isolation and purification of clemastanin B and indigoticoside A from *Radix Isatidis* by high-speed counter-current chromatography". *J. Chrom. A*, **1091**: 89-93, 2005b.
- PETERNELLI, E. F. O.; BARBOSA, L. C. A.; DELLA LUCIA; T. M. C. Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) from *Mabea fistulifera* ELAIOSOME. *Quim. Nova*, **31**: 475-478, 2008.
- PHAM, V. C.; JOSSANG, A.; SÉVENET, T.; BODO, B. "Cytotoxic acylphenols from *Myristica maingayi*". *Tetrahedron*, **56**: 1707-1713, 2000.
- REZENDE, K. R.; KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of *Viola sebifera*. *Phytochemistry*, **61**: 427-432, 2002.
- RIOS, J. L.; GINER, R. M.; PIETRO, J. M. "New findings on the bioactivity of lignans". *Stud. Nat. Prod. Chem.*, **26**: 183-292, 2002.

- ROCHUT, S.; DIF, K.; PAUMARD, J. P.; PEPE, C. "The location of the double bonds in substituted conjugated alkadienes by using the ethanethiol and gas chromatography/mass spectrometry". *C. R. Chim.*, **5**: 157-162, 2002.
- RODRIGUES, W. A. "Revisão taxônomica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil". *Acta Amazonica*, **10**: 5-127, 1980.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. "Flavonoídes O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**: 4: 321-325, 2005.
- SANTOS, S. A.; CARVALHO, M. G. "Unambiguous ¹H- and ¹³C-NMR assignments of isoflavones from *Virola caducifolia*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **6**: 349-352, 1995.
- SARTORELLI, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. "Antifungal lignans from the arils of *Virola oleifera*". *Phytochemistry*, **47**: 1003-1006, 1998.
- SAUQUET, H.; DOYLE, J. A.; SCHARASCHKIN, T.; BORSCH, T.; HILU, K. W.; CHATROU, L. W.; THOMAS, A. L. "Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution". *Bot. J. Linn. Soc.*, **142**: 125-186, 2003.
- SCHMIDT, T. J.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. "High-performance liquid chromatography-mass spectrometric identification of dibenylbutyrolactone-type lignans: insights into electrospray ionization tandem mass spectrometric fragmentation of lign-7-eno-9,9'-lactones and application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. (Common Flax)". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**: 3642-3650, 2008.
- SHUYUN, S.; ZHANG, Y.; HUANG, K.; LIU, S.; ZHAO, Y. "Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of lignans from *Taraxacum mongolicum*". *Food Chem.*, **18**: 402-406, 2008.
- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". *J. Insect Physiol.*, **49**: 307-313, 2003.
- SILVA, D. H. S.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; YOSHIDA, M. "Lipophilic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits". *Phytochemistry*, **57**: 442-437, 2001.
- SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; LUCARINI, R.; SATO, D. N.; PAVAN, F. R.; FREITAS, N. H. A.; ANDRADE, L. N.; PEREIRA, A. C.; BIANCO, T. N. C.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; SILVA, R.; SILVA FILHO, A. A. "Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic lignans". *Z. Naturforsch.* **64c**: 779-784, 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7^a ed.; Wiley, 2005.
- SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. "Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L". *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4820-4822, 1998.
- SOUTO, L. S.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SILVA, W. L. "Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado". *R. Árvore*, **31**: 163-167, 2007.
- SOUZA V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005, 639p.
- STICHER, O. "Natural product isolation". *Nat. Prod. Rep.*, **25**: 517-554, 2008.

- STRADLING, D. J. „An introduction to the fungus growing ants Attini“ IN: HUXLEY, C. R. e CUTLER, D. F. *Ant-plant Interactions*. Oxford University Press, 1991, p. 15-18.
- SUTHERLAND, I. A.; FISHER, D. “Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines”. *J. Chromatogr. A*, **1216**: 740-753, 2009.
- TAKHTAJAN, A. L. “Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta)”. *Bot. Rev.*, **46**: 225-359, 1980.
- VALDERRAMA, J. C. M. “Distribution of flavonoids in the Myristicaceae”. *Phytochemistry*, **55**: 505-511, 2000.
- VAN ROOSMALEN, M. G. M.; BARDALES M. P. D.; GARCIA, O. M. C. G. “Frutos da floresta amazônica. Parte I: Myristicaceae”. *Acta Amazonica*, **26**: 209-264, 1996.
- VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. “O setor de agroquímicos”. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, **24**: 69-96, 2006.
- VIEIRA, P. C.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; FILHO, H. F. P.; NAGEM, T. J.; FILHO, R. B. “ γ -Lactones from *Iryanthera* species”. *Phytochemistry*, **22**: 711-713, 1983.
- VILELA, E. F. “Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brasil.” IN: *Fire leaf-cutting ants: biology and management*. LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). Boulder and London: Westview Press, 1986, p. 399-408.
- WANG, S.; HUANG, K. Determination of Flavonoids by high-Performance Liquid Chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chrom. A*, **1032**: 273-179, 2004.
- WANG, X.; LI F.; SUN, Q.; YUAN, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. “Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of arctiin from *Fructus Arctii*”. *J. Chrom. A*, **1063**: 1-2: 247-251, 2005.
- WANG, X.; LIN, Y.; GENG, Y.; LI, F.; WANG, D. “Preparative separation and purification of sesamin and sesamolins from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography”. *Cereal Chem.*, **86**: 1: 23-25, 2009.
- WEBER, N. A. “Fungus-growing ants”. *Science*, **153**: 587-604, 1966.
- WEBER, N. A. “Gardening ants: the Attines”. *Mem. Am. Philos. Soc.*, **92**: 146, 1972.
- WILSON, E. O. “Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*”. *Behav. Ecol Sociobiol.*, **7**: 143-156, 1980
- WILSON, E. O. *The Insects Societies*. Harvard University, Cambridge: Belknap Press, 548p., 1971.
- WINTERHALTER, P. “Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments”. *Trends Food Sci. Technol.*, **18**: 507-513, 2007.
- YUAN, G.; YAN, J. “A method for the identification of the double-bond position of isomeric linear tetradecenols and related compounds based on mass spectra of dimethyl disulfide derivatives”. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**: 11-14, 2002.
- ZAHIR, A.; JOSSANG, A.; BODO, B. “Knerachelins A and B, antibacterial phenylacetylphenols from *Knema furfuracea*”. *J. Nat. Prod.*, **56**: 1634-1637, 1993.
- ZHANG Y.; JIAO J.; LIU C.; WU X.; ZHANG Y. Isolation and purification of four flavones C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* **107**: 1326-1336, 2008.