

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vismia brasiliensis*
CHOISY (CLUSIACEAE)**

RAFAEL CÉSAR RUSSO CHAGAS

2009

RAFAEL CÉSAR RUSSO CHAGAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vismia brasiliensis* CHOISY
(CLUSIACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção
do título de “Doutor”

Orientador

Prof. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Chagas, Rafael César Russo.
Estudo fitoquímico de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae) /
Rafael César Russo Chagas. – Lavras : UFLA, 2009.
253 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.
Bibliografia.

1. *Vismia brasiliensis*. 2. Xantonas. 3. *Aspergillus ochraceus*. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.624072

RAFAEL CÉSAR RUSSO CHAGAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vismia brasiliensis* CHOISY
(CLUSIACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção
do título de “Doutor”

APROVADA em 05 de março de 2009.

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi UFMG

Dr. Flaviano Oliveira Silvério UFV

Profa. Luciana de Matos Alves Pinto UFLA

Profa. Esther Maria Ferreira Lucas UFLA

Prof. Denilson Ferreira de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Dedico esta dissertação
às pessoas mais importantes da minha vida:

Priscila, minha esposa;

Onélia, minha mãe;

Jorge, meu pai (saudades);

André e Úrsula, meus irmãos.

*“Porque é o Senhor quem dá a
sabedoria, de sua boca procedem a
ciência e o discernimento”*

(Pv. 2:6)

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, provedor de misericórdia, graça e honra sem fim, o qual me ampara em todos os meus bons e maus momentos.

À minha amada esposa, por todo carinho, dedicação e ajuda durante esta caminhada

Aos meus pais e irmãos, por estarem sempre ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Estudos.

Ao Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, paciência e instrução durante estes três anos.

Aos membros da Banca Examinadora: Dr. Flaviano, Dra. Jacqueline, Dra. Esther e Dra. Luciana.

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFLA pela amizade e ajuda dispensada.

Obrigado também a todos os funcionários do Departamento de Química e a todos os colegas pela amizade.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Plantas com atividade biológica contra patógenos de animais e do homem... 4	
2.2 Plantas biologicamente ativas contra pragas e doenças de plantas..... 5	
2.3 Substâncias de origem vegetal com atividade biológica contra patógenos de animais e do homem	7
2.4 Substâncias de origem vegetal com atividade contra pragas e doenças de plantas	9
2.5 <i>Vismia</i> spp.....	11
3 Referências Bibliográficas.....	15
CAPITULO 2: Substâncias isoladas da fração solúvel em acetato de etila do extrato metanólico das folhas de <i>Vismia brasiliensis</i> Choisy (Clusiaceae)	19
1 Resumo	19
2 Abstract.....	20
3 Introdução	21
4 Referencial Teórico.....	22
4.1 Xantonas	22
5 Materiais e Métodos.....	24
5.1 Materiais e equipamentos utilizados.....	24
5.2 Coleta de material botânico.	24
5.3 Obtenção do extrato bruto para purificação.....	25

5.4 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes.	25
5.5 Fracionamento da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01).....	26
5.5.1 Fracionamento de RC1-07-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	26
5.5.2 Fracionamento de RC1-31-05 e RC1-31-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	27
5.5.3 Fracionamento de RC1-59-04 em CLAE-DAD preparativo	28
5.5.4 Fracionamento de RC1-31-08 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	28
5.5.5 Fracionamento de RC1-62-04 em CLAE-DAD preparativo	29
5.6 Análises espectrométricas das substâncias isoladas.....	30
5.6.1 Espectrometria de massas	30
5.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	30
5.7 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> , das frações resultantes da lavagem com solventes e das substâncias isoladas da fração solúvel em acetato de etila.....	31
6 Resultados e Discussão.....	32
6.1 Extrato bruto das folhas de <i>V. brasiliensis</i>	32
6.2 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes	32
6.3 Fracionamento da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01).....	32
6.3.1 Fracionamento de RC1-07-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	32
6.3.2 Fracionamento de RC1-31-05 e RC1-31-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	33
6.3.3 Fracionamento RC1-59-04 em CLAE-DAD preparativo	34
6.3.4 Fracionamento de RC1-31-08 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel.....	37
6.3.5 Fracionamento de RC1-62-04 em CLAE-DAD preparativo	38

6.4 Elucidações estruturais das substâncias isoladas	41
6.4.1 Elucidação estrutural de RC1-112-02 (Vismiofuranoxantona)	41
6.4.2 Elucidação estrutural de RC1-112-03 (isojacareubina)	44
6.4.3 Elucidação estrutural de RC1-117-02 (epicatequina)	48
6.5 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> , da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01) e das substâncias isoladas da mesma frente a <i>Aspergillus ochraceus</i>	51
7 Conclusão	53
8 Referências Bibliográficas	54
CAPÍTULO 3: Estudo fitoquímico da fração solúvel em hexano do extrato metanólico das folhas de <i>Vismia brasiliensis</i> Choisy (Clusiaceae)	57
1 Resumo	57
2 Abstract	58
3 Introdução	59
4 Referencial Teórico	60
5 Materiais e Métodos	62
5.1 Materiais e equipamentos utilizados	62
5.2 Fracionamento da fração solúvel em hexano (RC1-06-01)	62
5.2.1 Fracionamento de RC1-06-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	62
5.2.2 Fracionamento de RC1-37-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	63
5.2.3 Fracionamento de RC1-42-02 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	63
5.2.4 Fracionamento de RC1-37-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	64
5.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	65
5.3.1 Espectroscopia de infravermelho	65

5.3.2 Espectrometria de massas	65
5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	66
5.4 Teste de oviposição	66
6 Resultados e Discussão	68
6.1 Fracionamento da fração solúvel em hexano (RC1-06-01)	68
6.1.1 Fracionamento de RC1-06-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	68
6.1.2 Fracionamento de RC1-37-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	69
6.1.3 Fracionamento de RC1-42-02 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	69
6.1.4 Fracionamento de RC1-37-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel	70
6.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	71
6.2.1 Elucidação estrutural da fração RC1-69-02 (actinoquinona).....	71
6.2.2 Elucidação estrutural de RC1-89-05 ((Z)-icos-13-enoato de 2,3-diidroxipropila)	76
6.3 Teste de oviposição	80
7 Conclusão	81
8 Referências Bibliográficas	82
CAPÍTULO 4: Flavonóides isolados da fração solúvel em metanol do extrato metanólico das folhas de <i>Vismia brasiliensis</i> Choisy (Clusiaceae)	84
1 Resumo	84
2 Abstract	85
3 Introdução	86
4 Referencial Teórico	87
5 Materiais e Métodos	89
5.1 Materiais e equipamentos utilizados	89

5.2 Fracionamento da fração solúvel em metanol (RC1-07-02).....	89
5.2.1 Fracionamento de RC1-07-02 por cromatografia líquida em coluna de resina de poliestireno Amberlite XAD-16	89
5.2.2 Análise em CLAE-DAD da fração RC1-45-03.	90
5.2.3 Fracionamento de RC1-45-03 por cromatografia líquida em coluna de sílica-C18.....	90
5.2.4 Fracionamento de RC1-129-03 em CLAE-DAD preparativo	91
5.2.5 Fracionamento de RC1-129-06 em CLAE-DAD preparativo	91
5.2.6 Fracionamento de RC1-129-08 em CLAE-DAD preparativo	92
5.3 Análises espectrométricas das substâncias isoladas.....	92
5.3.1 Espectrometria de massas.	92
5.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	93
5.4 Teste de verificação da atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> (RC1-04-01)	93
5.5 Teste da atividade do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> , da fração solúvel em metanol (RC1-07-02) e das substâncias isoladas da mesma contra o fungo <i>Aspergillus ochraceus</i>	95
6 Resultados e Discussão	96
6.1 Fracionamento da fração solúvel em metanol (RC1-07-02).....	96
6.1.1 Fracionamento de RC1-07-02 por cromatografia líquida em coluna de resina de poliestireno Amberlite XAD-16	96
6.1.2 Análise em CLAE-DAD analítico da fração RC1-45-03.....	97
6.1.3 Fracionamento de RC1-45-03 por cromatografia líquida em coluna de sílica-C18.....	98
6.1.4 Fracionamento de RC1-129-03 em CLAE-DAD preparativo	98
6.1.5 Fracionamento de RC1-129-06 em CLAE-DAD preparativo	101
6.1.6 Fracionamento de RC1-129-08 em CLAE-DAD preparativo	104
6.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	106

6.2.1 Elucidação estrutural da fração RC1-129-03-02 (epicatequina).....	106
6.2.2 Elucidação estrutural da fração RC1-129-06-03 (vitexina)	110
6.2.3 Elucidação estrutural da fração RC1-129-08-01 (quercitrina).....	113
6.3 Teste de verificação da atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> (RC1-04-01)	117
6.4 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de <i>V. brasiliensis</i> , da fração solúvel em metanol (RC1-07-02) e das substâncias isoladas da mesma frente <i>Aspergillus ochraceus</i>	118
7 Conclusão	120
8 Referências Bibliográficas	121
9 Conclusões Gerais.....	124
ANEXOS	125

RESUMO GERAL

CHAGAS, Rafael César Russo. **Estudo fitoquímico de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae)**. 2009. 253p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Apesar de diversas plantas do gênero *Vismia* serem conhecidas por suas atividades contra diferentes tipos de fitopatógenos, ainda não havia qualquer relato na literatura sobre as propriedades biológicas *Vismia brasiliensis* Choisy. Conseqüentemente, foram realizados testes biológicos com o extrato metanólico das folhas de tal espécie vegetal com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle de pragas e doenças em geral. Como o extrato se mostrou ativo contra as bactérias *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, o fungo *Aspergillus ochraceus* e o inseto *Leucoptera coffeella* (bicho mineiro do cafeeiro), realizou-se um estudo fitoquímico do mesmo para a identificação dos compostos responsáveis por tais atividades. As substâncias isoladas foram identificadas por espectrometria de ressonância magnética nuclear, de massas, de ultravioleta e de infravermelho. Da fração do extrato metanólico solúvel em hexano foram isolados o (*Z*)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila e uma substância com atividade conhecida contra o bicho mineiro, cujos dados indicam ser a actinoquinona. Da fração solúvel em acetato de etila foram isoladas duas substâncias já conhecidas (epicatequina e isojacareubina) e uma inédita, que foi denominada vismifuranoxantona. As três substâncias apresentaram atividade contra *A. ochraceus*. Da fração do extrato metanólico solúvel em metanol foram isoladas três substâncias já conhecidas: a epicatequina, a vitexina e a quercitrina. Todas elas são conhecidas por apresentarem propriedades antifúngicas e antibacterianas.

*Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

GENERAL ABSTRACT

CHAGAS, Rafael César Russo. **Phytochemical studies of *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae)**. 2009. 253p. Thesis (Doctor in Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Although the activity against several phytopathogens by plants of the *Vismia* genus was reported in the literature, no report about the biological activities of *Vismia brasiliensis* Choisy could be found. Consequently, biological assays were carried out with the methanol extract of leaves from this plant species to contribute to the development of new methods to control pests and diseases. Since the methanol extract was active against the bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, the fungus *Aspergillus ochraceus* and the insect *Leucoptera coffeella* (coffee leaf miner), it underwent a phytochemical study aimed to identify the substances accounting for such activities. The isolated compounds were identified by spectrometric methods: nuclear magnetic resonance, mass, ultraviolet and infrared. Two substances were isolated from the hexane soluble fraction of the methanol extract: 2,3-dihydroxypropyl (*Z*)-icos-11-enoate and a compound active against the coffee leaf miner, which apparently is the actinoquinone. From the ethyl acetate soluble fraction were isolated two known substances (epicatechin and isojacareubin) and a new one, which was named vismifuranexanthone. The three substances were active against *A. ochraceus*. From the methanol soluble fraction were obtained three substances well-known for their activities against fungi and bacteria: epicatechin, vitexin and quercitrine.

*Advisor: Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde os tempos mais remotos, encontram-se relatos na literatura da utilização de espécies vegetais para variados fins. Para exemplificar, é possível citar a romã (*Punica granatum* L.), cujas propriedades medicinais são conhecidas desde a antiguidade, sendo descritas no Papiro de Ebers. A literatura descreve a romã principalmente como um potente tenífugo, sendo suas propriedades anti-helmínticas assinaladas há séculos por Dioscorides e outros naturalistas da antiguidade. Ademais, o chá feito com as folhas de romã é usado contra irritação nos olhos, enquanto aquele produzido com as cascas dos frutos é empregado no tratamento, na forma de gargarejo, de infecções de garganta. Em diarréias e desinterias crônicas, o chá das cascas da raiz da romãzeira é freqüentemente usado em combinação com tintura de ópio (Pinto & Correia, 2007).

Quando, no século XVI, os exploradores e missionários espanhóis começaram a penetrar nas regiões mais remotas do território mexicano, tiveram os primeiros contatos com uma pequena planta verde, esférica, macia e sem espinhos, que formava colônias de pequenos botões, chamada "peyotl" ("hículi, huatari"). Os indígenas a consideravam divina, pois ao usá-la podiam comunicar-se com seus deuses e a empregavam para curar suas enfermidades, prever o futuro, dar força e coragem nas batalhas ou executar tarefas prodigiosas. Essa planta, que conhecemos como peiote, tem o nome botânico *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) J. M. Coult. e pertence à família Cactaceae. A primeira publicação a respeito da química do peiote foi feita pelo farmacologista alemão Louis Lewin, em 1888. Ele extraiu da planta, fornecida pela Companhia Parke-Davis, uma substância que chamou anhalonina por causa

da classificação botânica incorreta do peiote naquela época: *Anhalonium lewinii*. Embora se acreditasse tratar de uma substância pura, provavelmente era uma mistura de alcalóides que, ao contrário do esperado, não produzia efeitos alucinógenos (Silva & Valente, 2000).

Outros farmacologistas alemães começaram a estudar o peiote e, em 1897, Arthur Heffter publicou o isolamento e as propriedades farmacológicas de cinco alcalóides presentes nele. Por experimentação em animais e auto-experimentação ele determinou que um deles era a principal substância psicoativa da planta, a qual denominou mescalina. Esse foi o primeiro estudo sistemático de um material psicodélico de ocorrência natural (Silva & Valente, 2000).

Durante o Renascimento houve um grande aumento de interesse por plantas medicinais, sendo que dentre as publicações existentes, a mais popular foi *The Herball, or General Historie of Plants*, de John Gerard, em 1597. Uma das poucas que continuou sendo impressa na língua inglesa por cerca de 400 anos. O livro, com 1.392 páginas e 2.200 imagens de plantas medicinais, foi apreciado por diversas autoridades no assunto e muitos médicos prescreviam a enfermos plantas ali relacionadas, incluindo *Digitalis purpurea* L. Mais de 30 glicosídeos cardiotônicos já foram isolados das folhas de *D. purpurea* e *Digitalis lanata* Ehrhart, incluindo a digoxina e a digitoxina, que são as principais substâncias ativas. Nenhuma dessas estruturas foi até hoje comercialmente sintetizada e ambas ainda são extraídas das folhas dessas espécies, sendo que atualmente há, na Europa, alguns cultivares geneticamente melhorados, cujo rendimento de tais substâncias é bem superior ao da planta nativa. A cada ano, cerca de 1.500 kg de digoxina e 200 kg de digitoxina são prescritas para centenas de milhares de pacientes em todo o mundo. Embora novas drogas tenham sido somadas ao vasto repertório de produtos cardíacos, a *Digitalis* spp. ainda salva muitas vidas a cada ano (Costa, 2007).

Além de poderem ser empregadas diretamente na fabricação de medicamentos, as plantas também apresentam potencial para serem utilizadas na obtenção de substâncias biologicamente ativas para serem empregadas com grande eficácia contra diversas pragas e doenças de importância agropecuária. Em decorrência, vários estudos têm sido efetuados com vistas ao desenvolvimento de novos produtos de origem vegetal com atividade inseticida, antimicrobiana, nematicida etc (Paula, 2007).

O referido potencial das plantas é de grande importância para o Brasil, que possui a maior biodiversidade do planeta, pois representa 20% do total de espécies estimadas. Para tanto, o estado de Minas Gerais contribui enormemente, já que graças ao seu clima, relevo, recursos hídricos e à sua vasta extensão territorial, possui uma cobertura vegetal extremamente diversa. Os dois biomas mais representativos desse estado, a mata atlântica e o cerrado, com elevados índices de endemismos, constituem mundialmente algumas das regiões mais ricas e ameaçadas pela devastação (Fundação Biodiversitas & Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 2000). Apesar de tamanha diversidade, são poucos os estudos sobre as espécies vegetais encontradas no mencionado estado.

Tendo em mente o grande potencial das plantas para o desenvolvimento de novos produtos com diversas atividades biológicas e a falta de estudos sobre a rica flora mineira, este trabalho visa a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos com atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida, pela purificação e identificação de substâncias do extrato das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae), encontrada na floresta estacional semidecídua montana, da Reserva Florestal da Universidade Federal de Lavras, que também é conhecida como “Matinha da UFLA”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas com atividade biológica contra patógenos de animais e do homem

Encontram-se na literatura vários trabalhos sobre as atividades de diversas espécies vegetais frente a diferentes parasitas de animais e do homem, tais como fungos, bactérias, nematóides e insetos. Para exemplificar pode-se citar o estudo de *Phyllostachys edulis* Carrière ex Makino, que resultou em patente sobre a aplicação desta planta em formulações de cremes dentais, para o controle de bactérias do gênero *Streptococcus*, que podem acarretar o desenvolvimento de processos cariogênicos (Pereira, 2006).

Também se pode mencionar um trabalho com o extrato metanólico da parte aérea de *Ajuta remota* Benth., durante o qual foi isolado um triterpeno com concentração inibitória mínima (CIM) igual a 1 µg/mL em testes com *Mycobacterium tuberculosis* (Cantrell et al., 1999). Também foram isolados vários triterpenos com atividade antimicobacteriana do extrato das partes aéreas de *Junellia tridens* (Lag.) Moldenke, coletada na Argentina (Caldwell et al., 2000). Outro exemplo de planta ativa contra micobactérias consiste no trabalho realizado com *Physalis angulata* L.. Observou-se que o extrato em clorofórmio de tal planta possuía atividade contra *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense* e *M. intracellulare* (Pietro et al., 2000).

Holetz et al. (2002) testaram extratos de 13 plantas medicinais brasileiras. Com isso, verificaram que *Piper regnellii* (Miq.) C. DC., conhecida como Pariparoba, apresentava atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Já *Punica granatum* L., popularmente conhecida como romã, mostrou-se ativa contra *S. aureus*. Neste mesmo trabalho se testou a atividade destes extratos frente a *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Observou-se que nove extratos (*Psidium guajava* L., *Eugenia uniflora*

L., *Punica granatum* L., *Arctium lappa* L., *Tanacetum vulgare* L., *Mikania glomerata* Spreng., *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. e *Plantago major* L.) apresentavam atividade contra os fungos supracitados (Holetz et al., 2002).

Em outro trabalho envolvendo fungos dermatófitos, mostrou-se que o extrato metanólico de *Piper solmsianum* var. *solmsianum* C. DC. apresentava atividade contra *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, com CIM de 20 µg/mL; e contra *Trichophyton rubrum* com CIM de 60 µg/mL (Campos et al., 2005).

2.2 Plantas biologicamente ativas contra pragas e doenças de plantas

Devido ao uso indiscriminado de pesticidas sintéticos, verificam-se contínuas reduções nas eficácias de tais produtos em controlar organismos prejudiciais às plantas. Conseqüentemente, observam-se investimentos no desenvolvimento de novos pesticidas de origem vegetal. Para ilustrar é possível mencionar o trabalho desenvolvido por Nathan et al. (2006), que detectaram a atividade contra o inseto *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae), um vetor da malária, por parte do extrato metanólico de folhas de *Dysoxylum malabaricum* Bedd..

Outro exemplo do potencial de espécies vegetais para o desenvolvimento de produtos ativos contra insetos é encontrado no trabalho de Ciccia et al. (2000). Os extratos de algumas plantas sul-americanas foram testadas contra o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Díptera: Culicidae), vetor da febre amarela e da dengue hemorrágica, o que permitiu observar que os extratos em diclorometano das plantas *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith. e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling., que tinham sido os mais ativos, apresentavam valores de CL₅₀ iguais a 2,6 µg/mL e 9,2 µg/mL, respectivamente.

Uma das espécies mais empregadas no controle de insetos é o neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Composições do extrato seco de sementes dessa planta com sacarose e celulose se mostraram eficientes na obtenção de produtos estáveis para o controle de algumas pragas agrícolas. Segundo os estudos realizados isso se deve principalmente à presença de uma substância chamada azadiractina, que é produzida em quantidade considerável pela planta e tem forte efeito sobre os insetos (Paula, 2007).

Apesar de os insetos poderem causar enormes prejuízos aos agricultores em geral, não são o único motivo para o desenvolvimento de novos pesticidas. Há também, os nematóides parasitas de plantas, que atacam várias culturas importantes em todo o mundo. Atualmente, tais animais são moderadamente controlados por meios agrotécnicos, químicos e genéticos. Entretanto, o uso destes meios é limitado devido ao alto custo, eficácia incompleta e especificidade inadequada (Bar-Eyal et al., 2006).

Segundo Chitwood (2002), vários extratos brutos têm aplicação prática contra nematóides, sendo o Sincocin um dos mais estudados. Trata-se de um produto contendo uma mistura de *Opuntia engelmannii* Salm-Dyck ex Engelm., *Quercus falcata* Minchx., *Rhus aromatica* Aiton e *Rhizophora mangle* L.. Em situações de campo, Sincocin controlou *Tylenchulus semipenetrans* (nematóide do citrus) em laranja, *Rotylenchulus reniformis* em girassol e *Heterodera schachtii* em beterraba.

Bar-Eyal et al. (2006) utilizaram *Chrysanthemum coronarium* L. como adubo natural de tomateiros e verificaram uma alta atividade contra os nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Observou-se também, que o extrato aquoso de *C. coronarium* apresentava atividade nematicida. De modo semelhante, San Martin & Magunacelaya (2005) observaram que extratos aquosos de *Quillaja saponaria* Molina eram ativos contra os nematóides

Xiphinema index, *X. americanum*, *M. hapla*, *M. ethiopica*, *Pratylenchus thornei*, *Tylenchorhynchus* sp., *Criconemoides xenoplax* e *Helicotylenchus* sp..

Os fungos podem ser extremamente benéficos ou prejudiciais na agricultura, pois se de um lado acarretam prejuízos de milhões de dólares devido às enfermidades causadas na lavoura, de outro aumentam a fertilidade do solo, decompondo matéria orgânica.

Existem vários trabalhos na literatura sobre extratos de plantas com atividade sobre fungos patógenos de plantas. Widmer & Laurent (2006), por exemplo, observaram que os extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller) e sálvia (*Salvia officinalis* L.), inibiam a germinação de zoósporos de *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya* e *P. capsici*, que são fungos causadores de doenças no cacau (*Theobroma cacao* L.). O mais afetado foi *P. megakarya*, que teve sua germinação completamente inibida pelo extrato, mesmo quando diluído.

2.3 Substâncias de origem vegetal com atividade biológica contra patógenos de animais e do homem

Várias substâncias biologicamente ativas têm sido isoladas a partir de extratos de plantas, para serem usadas como bactericidas, fungicidas, nematicidas, antitumorais, anti-HIV etc. A atropina (Figura 1), por exemplo, é um alcalóide tropanico extraído de *Atropa belladonna* L., que age nos músculos e glândulas regulados pelo sistema nervoso central parassimpático, reduzindo a atividade “contração-relaxação”. Este efeito é extremamente utilizado principalmente para combater a ciclopegia ou paralisação do músculo ciliar e para o tratamento de bradicardia ou batimento extremamente lento do coração e ataque cardíaco (Simões, 2000; Zareh, 2008). Já a capsaicina (Figura 1), um capsaicinóide encontrado em diversas espécies de pimenta (*Capsicum* spp.), é responsável pela ardência das pimentas, além de ser muito utilizado para tratamento de dores e artrites na forma de um anestésico (Simões, 2000).

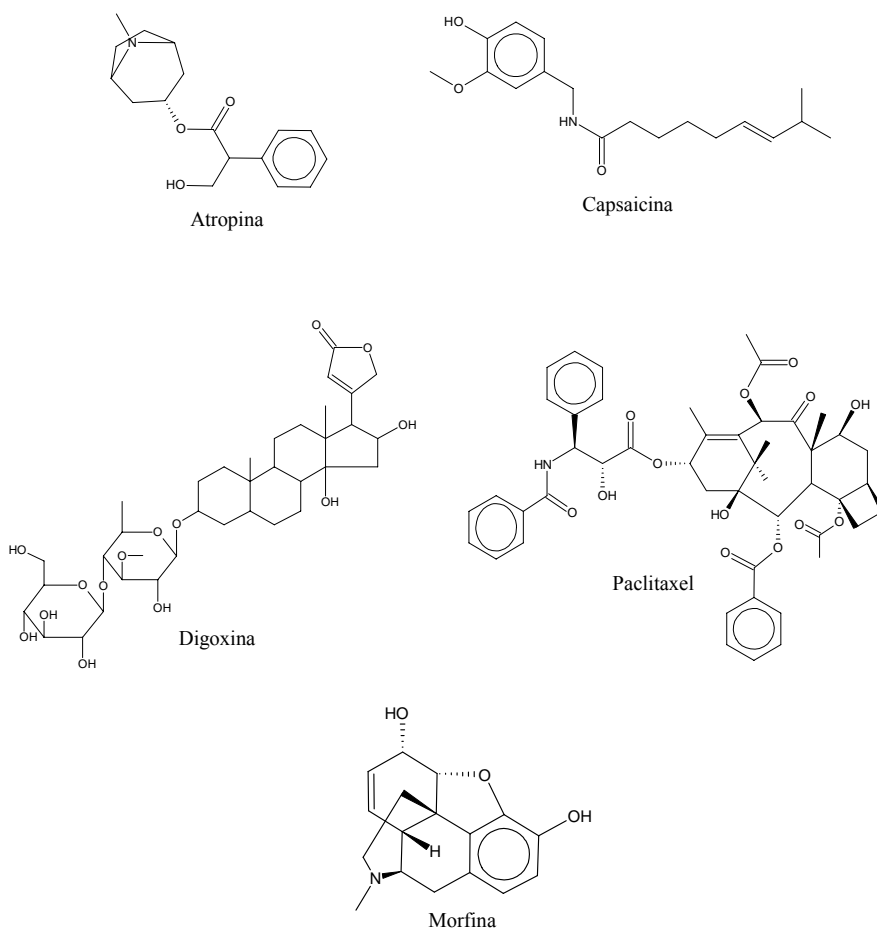


FIGURA 1 Estrutura de fármacos isolados de plantas.

Outras substâncias extraídas de plantas são: a digoxina (Figura 1), um glicosídeo cardíaco produzido por *Digitalis purpurea* L.; a morfina (Figura 1), um alcalóide anestésico extremamente conhecido, que pode ser extraído de *Papaver somniferum* L.; e o paclitaxel (Figura 1), comercializado com o nome de Taxol[®], um antitumoral extraído da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Pereira, 2006).

Um dos mais importantes alvos na área de antibióticos é a bactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, o que tem impulsionado vários grupos de pesquisa na busca de substâncias de origem vegetal mais eficazes contra a referida bactéria. Assim, obtiveram-se a deidrocostuslactona, 12-dimetilmulticaulina, 6 β -hidroxikulactona e o (*E*)-fitol, a partir de *Saussurea lappa* (Decne.) Sch. Bip., *Salvia multicaulis* Vahl, *Melia volkensii* Gürke, respectivamente (Cantrell et al., 2001). Também foram isoladas várias substâncias ativas contra *M. tuberculosis* do extrato das partes aéreas de *Sapium haematospermum* Müll. Arg.. Dentre essas, a mais ativa foi o lecheronol A, que se tratava de um pimarano com CIM igual a 4 μ g/mL em experimentos com a mencionada bactéria (Woldemichael et al., 2004).

Do extrato clorofórmico da parte aérea de *Limnophila geoffrayi* Bonati foram isoladas as flavonas nevadensin e isotimusina. Ambas com atividade contra *M. tuberculosis* (Suksamrarn et al., 2003). De forma análoga, também foram isoladas duas substâncias com atividade antimicobacteriana do extrato de *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Puntumchai et al., 2004).

Um exemplo de substância ativa contra fungos patógenos de animais e do homem isolada de planta é a xantoxilina, que se mostrou ativa contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophytum floccosum*. Esta substância foi isolada de *Sebastiania schottiana* (Müll. Arg.) Müll. Arg. por Cechinel et al. (1996).

2.4 Substâncias de origem vegetal com atividade contra pragas e doenças de plantas

Existe um grande esforço entre vários grupos de pesquisa na busca de novas substâncias isoladas de plantas com atividade inseticida. Entre alguns exemplos encontrados na literatura pode-se citar o trabalho de Gao et al. (2004), que isolaram do extrato em éter de petróleo de *Juniperus sabina* L. um composto

identificado como deoxipodofilotoxina, que foi ativo contra larvas do inseto *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae). Um outro exemplo que pode ser citado é o trabalho de Reyes-Chilpa et al. (2003), que isolaram do extrato hexânico de *Hippocratea excelsia* o terpenóide pristimerina. Tal substância se mostrou ativa contra *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), que se trata de uma praga que ataca grãos estocados.

Cientes do grande potencial de plantas para o controle de fungos, vários autores têm buscado isolar e identificar as substâncias responsáveis por tal comportamento. Para exemplificar, pode-se citar Athukoralage et al. (2001), que obtiveram o 3-formil-2,4-diidroxi-6-metilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetil-4-(metoxicarbonil)fenila de *Gardenia dassanayakei* L. Tal substância apresentou considerável atividade contra os fungos *Crynespora cassiicola*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Também é possível mencionar o trabalho desenvolvido por Villarroel et al. (2001), que isolaram o filifolinol de *Heliotropium huascoense* I. M. Johnst.. Nesse caso, a atividade da substância isolada foi observada contra *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger*.

De forma relativamente análoga, ao trabalhar com a planta *Sebastiania schottiana* (Müll. Arg.) Müll. Arg., Cechinel et al. (1996) isolaram a xantoxilina, que se mostrou ativa contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Penicillium* sp.

Várias substâncias isoladas de plantas, com atividade nematicida, são mostradas na Figura 2. Dentre estas pode-se destacar o α -tertienil, extraído de *Tagetes* spp.; a monocrotalina, extraída de *Crotalaria spectabilis* Roth; e o dhurrin, um glicosídeo extraído de *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Chitwood, 2002).

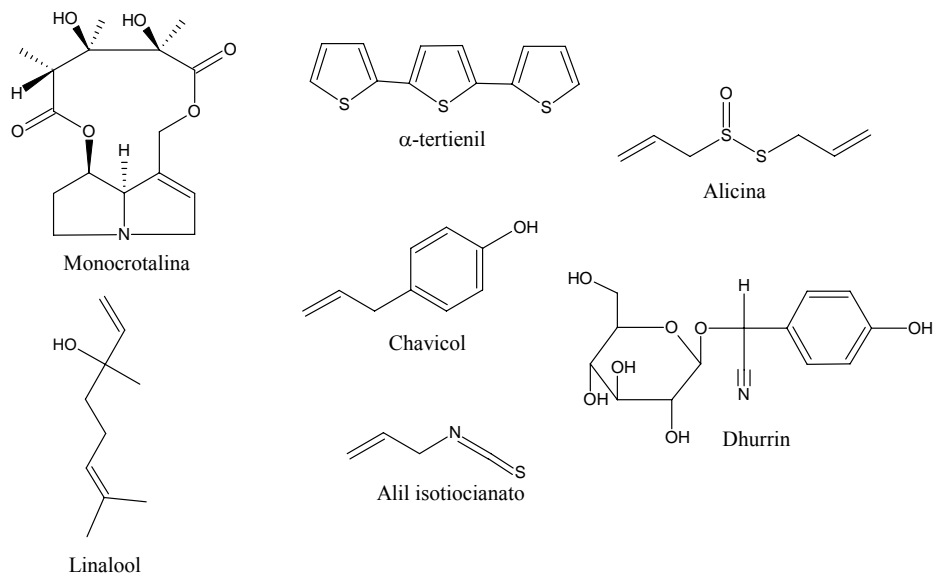


FIGURA 2 Estrutura de algumas substâncias isoladas de espécies vegetais com atividades nematocidas.

2.5 *Vismia* spp.

Pertencente à família Clusiaceae, os componentes do gênero *Vismia* são encontrados em fragmentos de florestas do mundo inteiro. Medicinalmente, algumas espécies de *Vismia* são apreciadas por seu látex laranja, que é usado por tribos da bacia do Amazonas para o tratamento de feridas e, de forma menos comum, contra herpes labial e fungo de pele. Também se sabe que o óleo dessas plantas é usado para tratar doenças de pele de origem fúngica e que os Crioulos da Guiana colocam folhas de *Vismia* nos pés para se protegerem de mordida de cobra (Nguemeving et al., 2006).

Várias substâncias com atividade biológica foram isoladas de diferentes espécies do gênero *Vismia*. Nguemeving et al. (2006), por exemplo, isolaram de *V. laurentii* De Wild. duas substâncias denominadas laurentixantonas A e B,

que apresentaram atividade antimicrobiana (Figura 3), principalmente contra *Streptococcus faecalis* e *Candida gabrata*. Do extrato metanólico das folhas e raízes desta mesma planta, Kuete et al. (2007) isolaram nove substâncias, entre elas as antraquinonas vismiaquinona e vismiaquinona C, a xantona 6-deoxiisojacareubina, o triterpeno friedelina e o flavanóide kaempferol (Figura 3). Todas as substâncias isoladas apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Seo et al. (1996) isolaram cinco novas benzofenonas do extrato em clorofórmio de *V. guianensis* (Aubl.) Seem., entre elas a vismioguianona A (Figura 3), sendo todas moderadamente citotóxicas segundo testes com células KB. François et al. (1999) isolaram a vismiona H (Figura 3) do extrato em éter de petróleo da mesma espécie. Essa antraquinona se mostrou ativa frente a *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária.

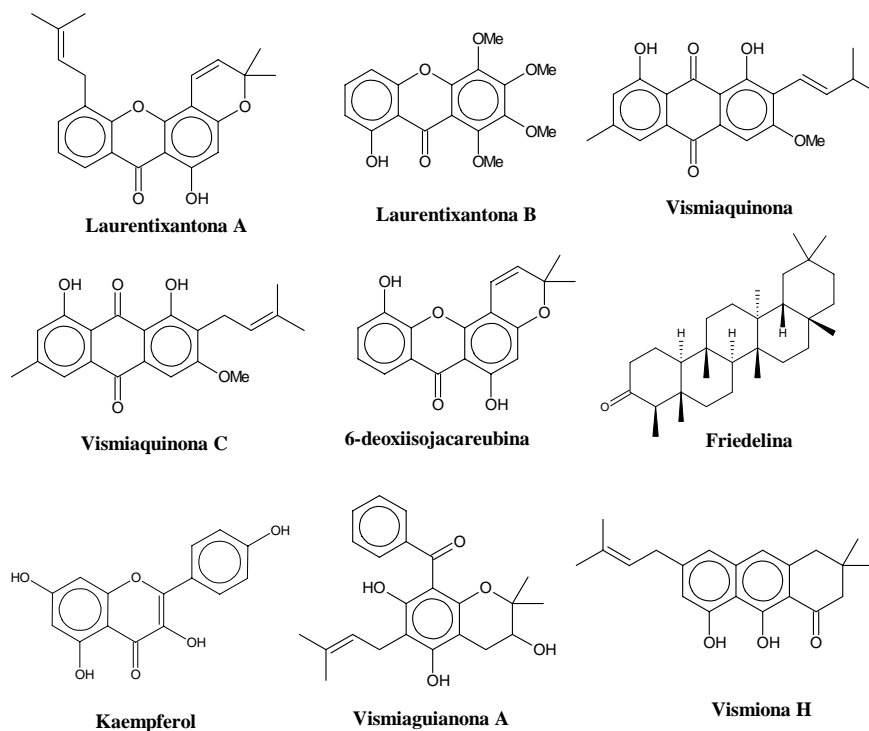


FIGURA 3 Estrutura de substâncias isoladas de plantas do gênero *Vismia* com atividade biológica relatada na literatura.

Também vale mencionar o trabalho de Doriguetto et al. (2001), que isolaram a 6-deoxijacareubina das folhas de *Vismia latifolia* autoridade. Dos frutos de *Vismia micrantha* Mart. ex A. St.-Hil. foram isoladas a biantrona e a madagascina, enquanto das folhas da mesma espécie se isolaram a vismiaquinona B, ácido hexacosanóico, β -sitosterol e n-octacosanol. Das cascas foram isoladas a euxantona e o ácido betulínico (Nagem & Ferreira, 1993). Vismiona A e B foram isoladas de *V. baccifera* (L.) Triana & Planch. (Delle Monache et al., 1979). As estruturas destas substâncias são mostradas na Figura 4.

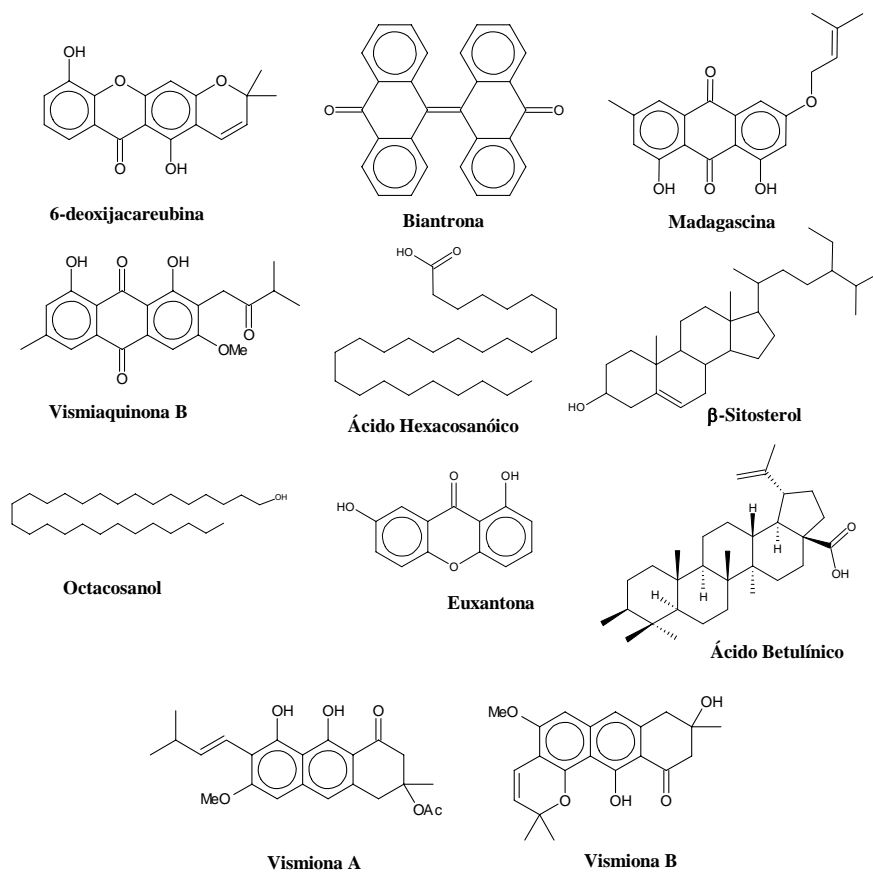


FIGURA 4 Estruturas de substâncias isoladas de plantas do gênero *Vismia*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATHUKORALAGE, P.S.; HERATH, H.M.T.B.; DERANIYAGALA, S.A. Antifungal constituent from *Gordonia dassanayakei*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, n. 1, p. 565-567, giug. 2001.
- BAR-EYAL, M.; SHARON, E.; SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of *Chrysanthemum coronarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 4, p. 427-433, Apr. 2006.
- CALDWELL, C. G.; FRANZBLAU, S. G.; SUAREZ, E. Oleanane triterpenes from *Junellia tridens*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 12, p. 1611-1614, Oct. 2000.
- CAMPOS, M.P.; CECHINEL FILHO, V.; SILVA, R.Z. Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 28, n. 8, p. 1527-1530, Jan. 2005.
- CANTRELL, C.L.; FRANSBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Medica**, New York, v. 67, n. 8, p. 685-694, Nov. 2001.
- CANTRELL, C.L.; RAJAB, M.S.; FRANSBLAU, S.G. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuta remota*. **Planta Medica**, New York, v. 65, n. 8, p. 732-734, Dec. 1999.
- CECHINEL, V.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 53, n. 3, p. 171-173, Sept. 1996.
- CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Sept. 2002.
- CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, n. 1/2, p. 185-189, Sept. 2000.
- COSTA, F. B. **Digitalis e Hidropsia**: do empirismo do século XVI à indústria farmacêutica do século XX. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <www.s bq.org.br/PN-NET/causos.htm>. Acesso em: 28 mar. 2007.

DELLE MONACHE, F.; FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO, G. Vismiones from *Vismia baccifera* var. dealdadta (H.B.K.): chemistry and x-ray structure determination. **Gazzetta Chimica Italiana**, Rome, v. 109, n. 6-7, p. 301-310, 1979.

DORIGUETTO, A.; SANTOS, M.H.; ELLENA, J.A. 6-Deoxyjacareubin. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 57, n. 9, p. 1095-1097, Sept. 2001.

FRANÇOIS, G.; STEENACKERS, T.; ASSI, L. A. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 7, p. 582-588, May 1999.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS; FUNDAÇÃO ZOO-BOTÂNICA DE BELO HORIZONTE. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2000. 160 p.

GAO, R.; GAO, C.; TIAN, X. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 11, p. 1131-1136, Nov. 2004.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, out. 2002.

KUETE, V.; NGUEMEVING, J.R.; BENG, V.P. Antimicrobial activity of methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 4, p. 372-379, Feb. 2007.

NAGEN, T.J.; FERREIRA, A. Constituentes of *Vismia micrantha*. **Fitoterapia**, Milano, v. 64, n. 2, p. 382-383, mag. 1993.

NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K.; SEHOON, K. Effects of *Dysoxylum malabaricum* Bedd. (Meliaceae) extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 16, p. 2077-2083, Nov. 2006.

NGUEMEVING, J.R.; AZEBAZE, A.G.B.; KUETE, V. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, New York, v. 67, n. 13, p. 1341-1346, July 2006.

PAULA, P. **Estudo fitoquímico de plantas ativas contra o bicho mineiro do cafeeiro**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, A.C. **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras**, 2006. 216 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIETRO, R.C.L.R.; KASHIMA, S.; SATO, D.N. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, Jena, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

PINTO, A.C.; CORREIA, M.B. **Romã**: da antiguidade ao uso atual na medicina popular. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <www.sbq.org.br/PN-NET/causos.htm>. Acesso em: 28 mar.2007.

PUNTUMCHAI, A.; KITTAKOOP, P.; RAJVIROONGIT, S.; VIMUTTIPONG, S.; LIKHIWITAYAWUID, K.; THEBTARANONTH, Y. Lakoochins A and B, new antimycobacterial stilbene derivatives from *Artocarpus lakoocha*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, n. 3, p. 485-486, Jan. 2004.

REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; CRISTOBAL-TELESFORO, E. Natural insecticides from *Hippocratea excelsa* and *Hippocratea celastroides*. **Economic Botany**, St. Louis, v. 57, n. 1, p. 54-64, Mar. 2003.

SAN MARTIN, R.; MAGUNACELAYA, J.C. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. **Nematology**, Leiden, v. 7, n. 4, p. 577-585, 2005.

SEO, E-K.; WANIA, M.C.; WALLA, M.E. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 513-520, Sept. 1996.

SILVA, G. C.; VALENTE, L. M. M. **Peiote, o cacto sagrado**. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <www.sbq.org.br/PN-NET/causos.htm>. Acesso em: 28 mar.2007.

SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Florianópolis: Pharmabooks, 2000. 1102 p.

SUKSAMRARN, A.; POOMSING, P.; AROONRERK, N.; PUNJANON, T.; SUKSAMRARN, S.; KONGKUN S. Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*. **Archives of Pharmaceutical Research**, Seul, v. 26, n. 10, p. 816-820, Oct. 2003.

VILLARROEL, L.; TORRES, R.; URZÚA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLONIA, A. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 9, p. 1123-1126, Aug. 2001.

WIDMER, T.L.; LAURENT, N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, n. 4, p. 377-388, Aug. 2006.

WOLDEMICHAEL, G.M.; GUTIERREZ-LUGO, M.T.; FRANZBLAU, S.G.; WANG, Y.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B.N. *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haemospermum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, n. 4, p. 598-603, Mar. 2004.

ZAREH, M.M. Atropine-selective membrane electrodes and relative selectivity concept. **Analytical Sciencis**, Tokio, v. 24, n. 7, p. 889-894, Oct. 2008.

CAPÍTULO 2

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ACETATO DE ETILA DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Vismia* *brasiliensis* CHOISY (CLUSIACEAE)

1 RESUMO

O extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy apresentou atividade antifúngica quando submetido a testes em laboratório com o fungo *Aspergillus ochraceus*. Fracionou-se então, o referido extrato por lavagem com solventes de diferentes polaridades e a fração solúvel em acetato de etila se mostrou ativa contra *A. ochraceus*. Em decorrência, tal fração foi submetida a estudo fitoquímico, resultando na obtenção de três substâncias: uma xantona inédita, denominada vismiofuranoxantona, a epicatequina e uma xantona cujos dados indicam ser a isojacareubina. Todas as substâncias isoladas apresentaram atividade contra *A. ochraceus*.

**SUBSTANCES ISOLATED FROM THE ETHYL ACETATE SOLUBLE
FRACTION OF THE METHANOLIC EXTRACT OF LEAVES FROM
VISMIA BRASILIENSIS CHOISY (CLUSIACEAE).**

2 ABSTRACT

The methanolic extract of leaves from *Vismia brasiliensis* Choisy presented antifungal activity when used in an assay with the fungus *Aspergillus ochraceus*. Consequently, such extract was fractionated by washings with solvents of different polarities and the ethyl acetate soluble fraction was active against *A. ochraceus*. This fraction underwent phytochemical studies, to afford three substances: a new xanthone that was named vismifuranexanthone, epicatechin and a xanthone, which is probably isojacareubin. All the isolated substances showed antifungal activity against *Aspergillus ochraceus*.

3 INTRODUÇÃO

Sabe-se que as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de várias substâncias de interesse comercial. Acredita-se que uma das espécies potencialmente útil nessa área é *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae), que pode ser encontrada na floresta estacional semidecídua montana, da Reserva Florestal da Universidade Federal de Lavras, que também é conhecida como “Matinha da UFLA”, no município de Lavras – MG. Apesar de tal espécie não possuir estudos a respeito de sua composição e atividade biológica, encontram-se relatos na literatura da presença de substâncias com atividade antifúngica em extratos de outras plantas do mesmo gênero (Kuetze et al., 2007; Nagen & Ferreira, 1993).

Uma vez que um dos principais problemas da cultura cafeeira é a presença do fungo *Aspergillus ochraceus* nos grãos de café, o que leva à contaminação da bebida correspondente por ocratoxinas, substâncias consideradas nocivas ao homem mesmo em baixas quantidades (Bayman et al., 2002), buscou-se averiguar a capacidade de *V. brasiliensis* para produzir substâncias ativas contra o referido fungo. A seguir, o objetivo principal deste trabalho consistiu em isolar as substâncias antifúngicas produzidas pela planta. Para tanto, optou-se por trabalhar com a fração do extrato bruto das folhas da referida planta que era solúvel em acetato de etila, na qual poderiam estar presentes xantonas idênticas ou análogas aquelas com atividade antifúngica que tinham sido isoladas de outras espécies do gênero *Vismia* (Nagen & Ferreira, 1993).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Xantonas

Xantonas são metabólitos secundários derivados da dibenzo- γ -pirona. O nome desse grupo de substâncias é proveniente do grego *xanthos*, cujo significado é amarelo, que se trata da coloração característica dessas substâncias (proveniente da absorção da luz visível na região de 400 nm). Possuem como origem biossintética a combinação das vias do chiquimato e do acetato. Elas se distribuem no reino vegetal principalmente entre as plantas pertencentes às famílias Clusiaceae e Gentianaceae, sendo consideradas potenciais marcadores sistemáticos (Kuster & Rocha, 2000; Rath et al., 1996).

São encontradas na literatura várias xantonas com diversas propriedades biológicas, incluindo atividades citotóxicas, antitumorais, antimutagênicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Uma das atividades mais interessantes dessa classe de substâncias é a ação inibitória da enzima monoamino-oxidase (MAO), que está relacionada aos estados depressivos em seres humanos (Kuster & Rocha, 2000; Rath et al., 1996).

Como exemplo de xantonas com propriedades biológicas se pode citar a 1,3,6,8-tetraidroxi-2,5-dimetoxixantona (Figura 1), isolada por Meyer et al. (2008) da fração solúvel em acetona de raízes secas de *Securidaca longepedunculata* Fresen. Tal composto estimulou um relaxamento de 97% de músculos dos corpos cavernosos em seres humanos, o que pode ser de grande valia para o tratamento da disfunção erétil. Para efeito de comparação, a testemunha positiva (Viagra®) teve um efeito de 100% de relaxação desses músculos (Meyer et al., 2008). Já Azebaze et al. (2007), trabalhando com o extrato das folhas de *Allanblackia monticola* Staner L. C., isolaram diversas xantonas com atividades antimaláricas, dentre as quais se menciona aqui a α -

mangostina (Figura 1), que apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum* e propriedade vasorelaxadora.

Leet et al. (2008) isolaram duas xantonas do extrato de *Psorospermum molluscum* (Pers.) Hochr.: a 3',4'-deoxi-4'-cloropsoroxanti-3',5'-diol e a psoroxantina (Figura 1), que apresentaram atividade citotóxica frente a células do tipo ABAE. As xantonas blancoxantona e piranojacareubina (Figura 1), isoladas por Shen et al. (2005) das raízes de *Calophyllum blancoi* Planch. & Triana também se mostraram citotóxicas frente as mesmas células.

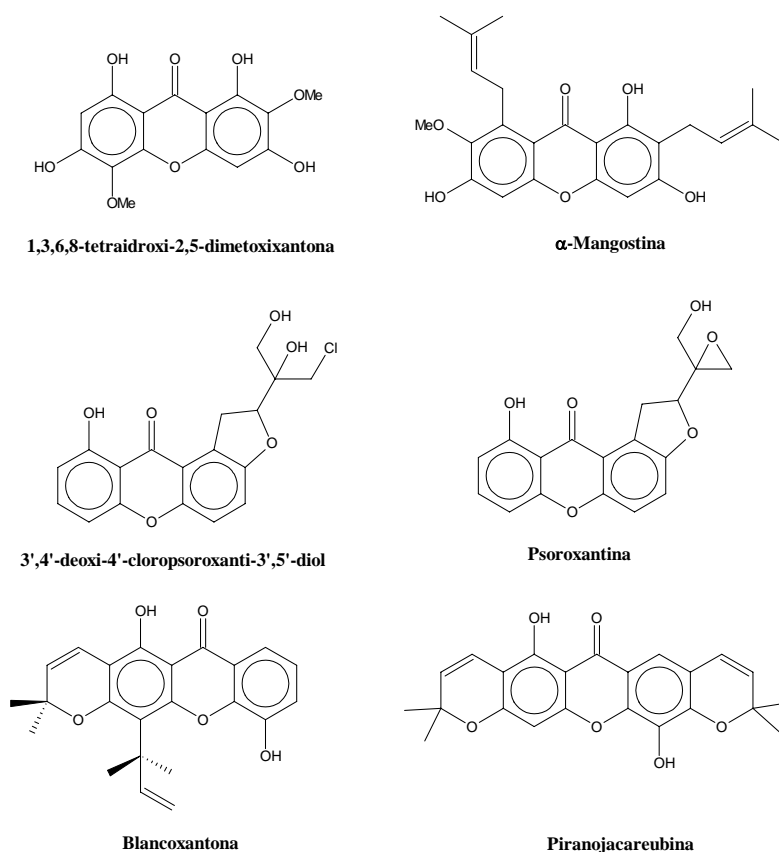


FIGURA 1 Estruturas de xantonas biologicamente ativas, isoladas de plantas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais e equipamentos utilizados.

Exceto quando mencionado de outra forma no texto, hexano, acetato de etila, metanol, etanol, ácido acético e ácido clorídrico eram de grau analítico (P.A.), enquanto a água empregada era destilada. Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica-gel (Alugram) ou com sílica-C18 (Merck) com indicador de fluorescência UV 254. Os reveladores empregados nestas análises foram: luz UV, vapor de iodo e solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol. Sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck) foi empregada nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC). As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em aparelho semi-preparativo da marca Shimadzu, equipado com detector de UV-visível do tipo DAD SPD-M20A, com duas bombas LC-6AD, injetor manual do tipo Rheodyne 7725i, coluna de sílica-C18 Phenomenex Gemini semi-preparativa (21,2 mm x 250 mm x 5 μ m) e analítica (4,6 mm x 250 mm x 5 μ m). Para tanto, utilizou-se água (H₂O) ultrapura do tipo I e solventes grau CLAE-UV: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e ácido acético (AcOH).

5.2 Coleta de material botânico.

Folhas de vários indivíduos de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae) foram coletadas na floresta estacional semidecídua montana, da Reserva Florestal da Universidade Federal de Lavras, que também é conhecida como “Matinha da UFLA”, no município de Lavras – MG no dia 23/10/2006 e levadas ao Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde teve início o processo de purificação e identificação de substâncias da espécie. Uma parte da amostra foi

encaminhada ao Departamento de Biologia (DBI) da UFLA para identificação botânica por comparações com exsicatas no Herbário ESAL e consulta ao Professor Doutor Douglas Antônio de Carvalho do mesmo Departamento.

5.3 Obtenção do extrato bruto para purificação.

Secaram-se as folhas coletadas em estufa com ventilação e renovação de ar, por no mínimo 48 horas, na temperatura de aproximadamente 40 °C, para que a seguir as mesmas fossem moídas. Assim, obtiveram-se 568 g de material seco e moído, que foi armazenado em *freezer* a -10 °C. O 380 g deste material foram submetidos à extração exaustiva com metanol por processos de maceração seguidos de filtração em algodão. As fases líquidas obtidas foram combinadas e concentradas até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadora, resultando em 75,4 g (19,8 %) de extrato bruto liofilizado (RC1-04-01).

5.4 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes.

O fracionamento por extração com solventes do extrato bruto seco das folhas de *V. brasiliensis* (RC1-04-01) seguiu o esquema mostrado na Figura 2.

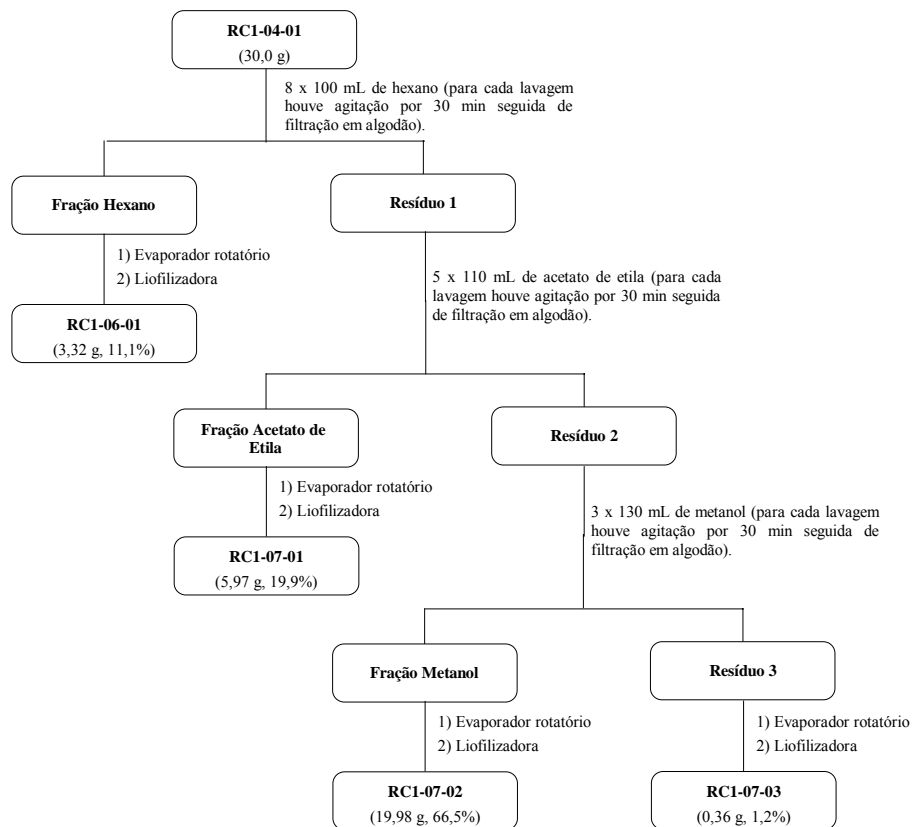


FIGURA 2 Esquema do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto de *Vismia brasiliensis*.

5.5 Fracionamento da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01)

5.5.1 Fracionamento de RC1-07-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

A fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01), obtida do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto de *V. brasiliensis* (item 3.4), foi analisada por CCD em placas com sílica gel, empregando-se como eluente hexano/acetato de etila, contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, em diferentes proporções, o que permitiu obter vários perfis cromatográficos.

Posteriormente, a fração RC1-07-01 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 4,0 x 15,0 cm de sílica gel 60. Para tanto, 3,87 g de amostra foram dissolvidos em 50 mL de acetato de etila e colocou-se a solução resultante em balão de fundo redondo de 100 mL contendo 7,75 g de sílica. A mistura obtida foi concentrada até a secura em evaporador rotatório e colocou-se o resíduo sólido no topo da coluna. Através desta, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram eluídas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (5:1, 200 mL; 4:1, 200 mL; 3:1, 200 mL; 2:1, 200 mL; 1:1, 200mL e 0:1, 200 mL) e de acetato de etila/metanol (1:1, 200 mL e 0:1, 200 mL) também contendo 0,1 % de ácido acético. Foram coletadas 33 frações de 50 mL que, após serem analisadas por CCD em placas de alumínio recobertas com sílica-gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 11 frações (RC1-31-01 a RC1-31-11, Tabela 1 do item 6.3.1).

5.5.2 Fracionamento de RC1-31-05 e RC1-31-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Após análise por CCD em sílica das amostras RC1-31-05 e RC1-31-06, estas foram combinadas, dando origem à fração RC1-59-01. Após análise por CCD em sílica para otimização dos eluentes a serem empregados na cromatografia em coluna, RC1-59-01 (532,0 mg) foi dissolvida em 10 mL de acetato de etila e colocou-se a solução obtida em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 1,23 g de sílica. A mistura foi concentrada até a secura em evaporador rotatório e colocada no topo de uma coluna com 4,0 x 15 cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram eluídas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (3:1, 150 mL; 2:1, 300 mL; 1:1, 150 mL e 1:2, 150 mL), além de acetato de etila (200 mL) e metanol (250 mL). Coletaram-se 26 frações de 30 mL mais as frações acetato de etila, metanol 1 (correspondente à mancha mais

escura da coluna) e metanol 2 que, após serem analisadas por CCD em placas de alumínio recobertas com sílica-gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 24 horas, resultando em 11 frações (RC1-59-01 a RC1-59-11, Tabela 2 do item 6.3.2).

5.5.3 Fracionamento de RC1-59-04 em CLAE-DAD preparativo

Após ajuste das condições em CLAE-DAD com a coluna analítica, a fração RC1-59-04 foi fracionada em CLAE-DAD pelo uso da coluna semi-preparativa e combinações de metanol/água contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, com fluxo de 15 L/min, como eluente: MeOH 80 % por 9 minutos; MeOH 80 % a MeOH 100 % em 0,10 minutos; e MeOH 100 % por 16 minutos. Para tanto, RC1-59-04 (53,4 mg) foi dissolvida em 10 mL de solução aquosa de MeOH/H₂O (75:25), contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 5,4 mg/mL de material. Foram coletadas cinco frações (RC1-112-01 a RC1-112-05, Tabela 5 do item 4.3.3), sendo que, após análise por CLAE-DAD (coluna analítica, MeOH 80 % por 3 minutos; MeOH 80 % a MeOH 100 % em 17 minutos; MeOH 100 % por 10 minutos; todos os eluentes com 0,1 % (v/v) de ácido acético; fluxo de 0,75 mL/minuto; varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm), as amostras RC1-112-02 e RC1-112-03 (item 6.3.3) foram consideradas puras e submetidas à análises por métodos espectrométricos.

5.5.4 Fracionamento de RC1-31-08 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Após análise por CCD em sílica para a otimização dos eluentes a serem empregados na cromatografia em coluna, RC1-31-08 (728,4 mg) foi solubilizada em 15 mL de acetato de etila e colocou-se a solução obtida em balão de fundo redondo de 100 mL contendo 1,59 g de sílica. A

mistura obtida foi concentrada até a secura em evaporador rotatório e colocada no topo de uma coluna com 3,0 x 15 cm de sílica gel 60. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram eluídas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (1:1, 200 mL; 1:2, 200 mL; e 1:5, 200 mL), além de acetato de etila (250 mL) e metanol (250 mL). Foram coletadas 29 frações de 20 mL mais as frações acetato de etila e metanol que, após serem analisadas por CCD em placas de alumínio recobertas com sílica-gel, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 24 horas, resultando em 10 frações (RC1-62-01 a RC1-62-10, Tabela 3 do item 6.3.4).

5.5.5 Fracionamento de RC1-62-04 em CLAE-DAD preparativo

Após ajuste das condições em CLAE-DAD com o uso da coluna analítica, a fração RC1-62-04 foi fracionada em coluna semi-preparativa empregando-se MeOH 45 % por 6 minutos, MeOH 45 % a MeOH 100 % em 0,1 minutos e MeOH 100 % por 19 minutos. Todos os eluentes continham 0,1 % (v/v) de ácido acético e foram mantidos com fluxo de 15 mL/minuto. Para tanto, RC1-62-04 (97,2 mg) foi dissolvida em 10 mL de solução aquosa de MeOH/H₂O (75:25), contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, o que resultou em concentração de aproximadamente 9,7 mg/mL de material. Foram coletadas três frações (RC1-117-01 a RC1-117-03, Tabela 4 do item 6.3.5), sendo que, após análise por CLAE-DAD (coluna analítica, MeOH 40 % por 3 minutos, MeOH 40 % à MeOH 100 % por 17 minutos e MeOH 100 % por 10 minutos; fluxo de 0,75 mL/minuto; varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm; os eluentes continham 0,1% (v/v) de ácido acético), a amostra RC1-117-02 foi considerada pura e submetida às análises espectrométricas.

5.6 Análises espectrométricas das substâncias isoladas

As elucidações estruturais das substâncias isoladas foram feitas por meio de espectrometria de massas (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de ultravioleta, cujos espectros correspondentes foram diretamente obtidos do CLAE-DAD.

5.6.1 Espectrometria de massas

Foram feitas análises no modo positivo e no modo negativo, do tipo MS¹, MS² e MS³, em aparelho Agilent 1100 LC/MS Trap equipado com interface do tipo *electrospray* (EM-ES). Cerca de 0,5 mg de RC1-112-02 e RC1-117-02 foram dissolvidos em 1 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. Injetaram-se 20 µL das soluções diretamente na interface do espectrômetro de massas com fluxo de 0,5 mL/minuto. A pressão do nebulizador (N₂) era de 15 psi (*pound-force per square inch*), enquanto o fluxo de gás de secagem (N₂) era mantido em 10 L/minutos e sua temperatura era de 300 °C. A voltagem da agulha era de 3500 V.

5.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por RMN foram realizadas em espectrômetro Varian Inova 600, operando a 600 MHz para ¹H e 151 MHz para ¹³C. As substâncias foram dissolvidas em DMSO-*d*₆ e colocadas em tubos de RMN de 5,0 mm de diâmetro. Realizaram-se experimentos unidimensionais e bidimensionais, empregando-se o pico do solvente como referência: δ_H 2,50 ppm e δ_C 39,43 ppm. Os sinais de RMN de ¹³C foram adquiridos indiretamente, a partir do HMBC e HMQC.

5.7 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de *V. brasiliensis*, das frações resultantes da lavagem com solventes e das substâncias isoladas da fração solúvel em acetato de etila

Para se testar a atividade contra *A. ochraceus*, o extrato bruto (2 mg), a fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01; 2 mg) e as substâncias isoladas (0,5 mg), foram dissolvidas em 500 µL de uma solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹). Aliquotas de 200 µL de todas as soluções obtidas foram adicionadas a 40 µL de uma suspensão de esporos de *A. ochraceus* a 5,0 x 10⁶ esporos/mL, que foi preparada conforme descrito por Carvalho (2008). Aliquotas de 20 µL das suspensões resultantes foram adicionadas a 200 µL de meio de cultura Czapeck-ágar (Carvalho, 2008) previamente autoclavado a 120 °C durante 15 minutos, que estava contido em cavidades de 300 µL de placas de polipropileno com 96 cavidades. Após 48 horas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h em uma câmara de germinação artificial, as amostras que preveniram o crescimento fúngico foram consideradas ativas. Este experimento foi realizado em duplicata, usando solução de Tween 80 a 1 % (g/mL) como controle negativo e solução de cloreto de benzalcônio a 1,0 g/mL em Tween 80 a 1 % como controle positivo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extrato bruto das folhas de *V. brasiliensis*

Ao se submeter 380,0 g de folhas secas e moídas de *V. brasiliensis* à extração com metanol (item 5.3) obtiveram-se 75,4 g de extrato liofilizado de coloração verde escuro (RC1-04-01), com rendimento de aproximadamente 19,8%.

6.2 Fracionamento do extrato bruto por extração com solventes

Após o fracionamento por extração com solventes do extrato bruto (RC1-04-01, item 5.4), observou-se a fração de maior massa era aquela solúvel em MeOH, o que parecia de acordo com resultados para outras espécies vegetais. Aparentemente, grande parte da referida fração se trata de carboidratos (referência).

6.3 Fracionamento da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01)

6.3.1 Fracionamento de RC1-07-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Dentre as várias frações obtidas após a eluição de RC1-07-01 (Tabela 1) através de coluna de sílica gel, conforme descrito no item 5.5.1., observou-se em análises por CCD que aquelas denominadas RC1-31-05 e RC1-31-06 eram bem similares e, assim como a fração RC1-31-08, apresentavam boa relação massa/complexidade, tendo sido, portanto, selecionadas para serem submetidas a novos fracionamentos conforme descrito nos itens 5.5.2 e 5.5.4.

TABELA 1 Frações resultantes do fracionamento da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01) por cromatografia em coluna de sílica

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
1, 2	RC1-31-01	19,2
3, 4	RC1-31-02	93,1
5-7	RC1-31-03	88,2
8-11	RC1-31-04	115,2
12-14	RC1-31-05	094,5
15-20	RC1-31-06	437,5
21, 22	RC1-31-07	160,1
23, 24	RC1-31-08	728,9
25, 26	RC1-31-09	234,6
27-29	RC1-31-10	1551,9
30-33	RC1-31-11	90,8

6.3.2 Fracionamento de RC1-31-05 e RC1-31-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Análises por CCD em placa com sílica gel das frações obtidas do fracionamento em coluna de sílica gel de RC1-57-01 (item 5.5.2; Tabela 2) permitiram observar que apenas a fração RC1-59-04 (147,3 mg) possuía uma boa relação massa/complexidade, sendo submetida a novo fracionamento conforme descrito no item 5.5.3.

TABELA 2 Frações resultantes do fracionamento de RC1-57-01 por cromatografia em coluna de sílica gel

Frações eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
4	RC1-59-01	2,0
5-7	RC1-59-02	9,1
8-9	RC1-59-03	34,7
10-12	RC1-59-04	147,3
13-14	RC1-59-05	60,4
15-16	RC1-59-06	47,3
17-21	RC1-59-07	117,9
22-26	RC1-59-08	36,6
AcOEt	RC1-59-09	26,8
MeOH 1	RC1-59-10	16,8
MeOH 2	RC1-59-11	25,5

6.3.3 Fracionamento RC1-59-04 em CLAE-DAD preparativo

Considerando-se a massa obtida da fração RC1-59-04 e seu perfil cromatográfico (Figura 3), que deixavam evidente a boa relação massa/complexidade para tal fração, optou-se por dar prosseguimento ao fracionamento da mesma em CLAE-DAD preparativo, sendo obtido o cromatograma mostrado na Figura 4.

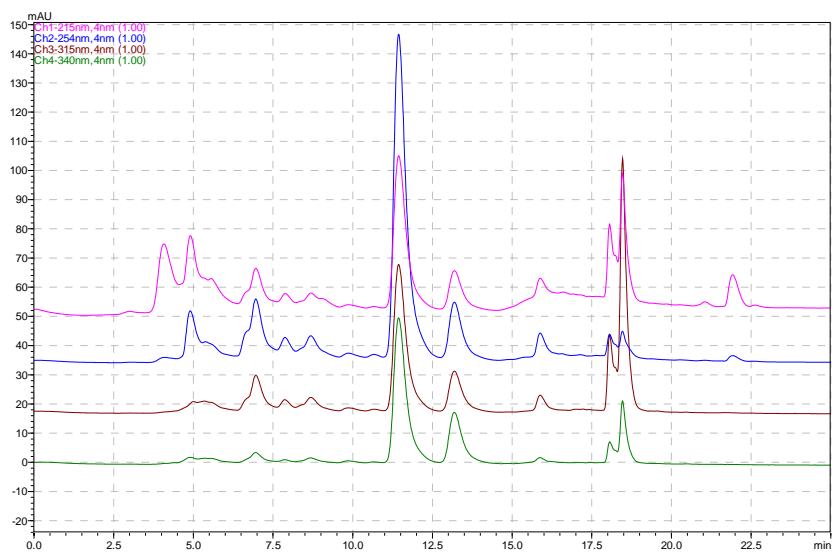


FIGURA 3 Cromatograma da fração RC1-59-04, obtido em CLAE-DAD com o uso de coluna de sílica-C18 na versão analítica. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 80 % 9 min, MeOH 80 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 16 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

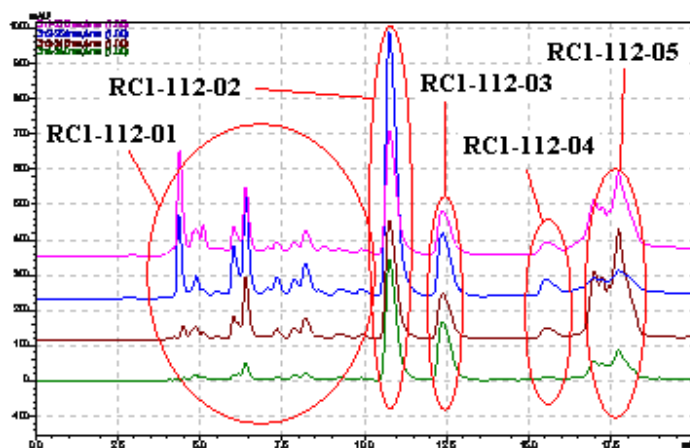


FIGURA 4 Cromatograma da fração RC1-59-04, obtido em CLAE-DAD com o uso de coluna de sílica -C18 na versão semi-preparativa. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 80% 9 min, MeOH 80 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 16 min. Fluxo: 15 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

Dentre as frações obtidas, aquelas denominadas RC1-112-02 e RC1-112-03, com massas apresentadas na Tabela 3, foram analisadas em CLAE-DAD com o uso de coluna analítica (Figura 5), o que permitiu observar que se tratavam de substâncias com grau de pureza satisfatório para que pudessem ser submetidas aos métodos espectrométricos com vistas a elucidar suas estruturas .

TABELA 3 Dados obtidos para as frações provenientes do fracionamento da amostra RC1-59-04 em CLAE-DAD

Código	Fração	Tempo (min)	Massa (mg)
RC1-112-01	1	4,18-10,28	6,0
RC1-112-02	2	10,45-11,11	5,5
RC1-112-03	3	12,26-12,70	4,8
RC1-112-04	4	15,23-15,89	4,0
RC1-112-05	5	16,66-18,26	30,2

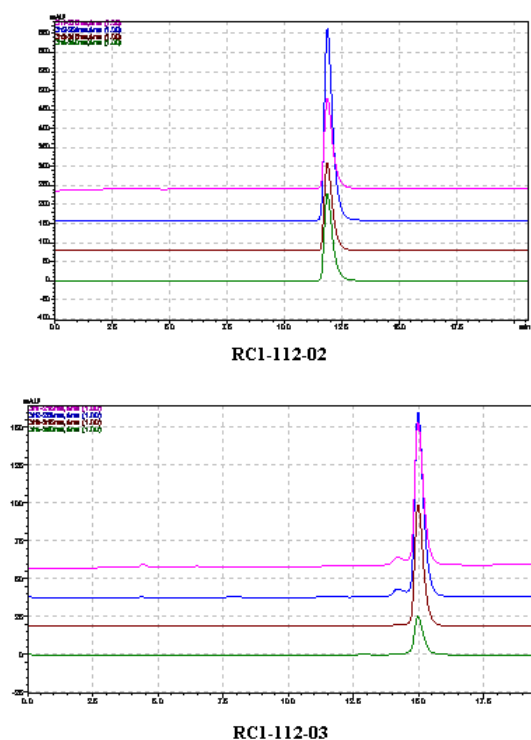


FIGURA 5 Cromatogramas das frações RC1-112-02 e RC1-112-03, obtidos em CLAE-DAD com uso de coluna de sílica-C18 na versão analítica. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 80% 3 min, MeOH 80 % → MeOH 100 % 17 min, MeOH 100 % 5 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.3.4 Fracionamento de RC1-31-08 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Análises por CCD em placa com sílica gel das frações combinadas, obtidas do fracionamento em coluna de sílica gel de RC1-38-01 (item 5.5.4; Tabela 4), permitiram observar que as frações RC1-62-04 (142,3 mg) e RC1-62-03 (141,4 mg) possuíam boas relações massa/complexidade, sendo submetidas a novos fracionamentos conforme descrito no item 5.5.5.

TABELA 4 Frações resultantes do fracionamento de RC1-31-08 por cromatografia em coluna de sílica gel

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
3-4	RC1-62-01	4,9
5-7	RC1-62-02	23,4
8-12	RC1-62-03	141,4
13-14	RC1-62-04	142,3
15-18	RC1-62-05	149,4
19-22	RC1-62-06	65,8
23-25	RC1-62-07	42,2
26-29	RC1-62-08	18,2
AcOEt	RC1-62-09	24,3
MeOH	RC1-62-10	70,7

6.3.5 Fracionamento de RC1-62-04 em CLAE-DAD preparativo

Ao se submeter a fração RC1-62-04 à análise em CLAE-DAD com o uso de coluna analítica, observou-se maior complexidade que a inicialmente esperada para a fração (Figura 6). No entanto, julgou-se que seria possível purificar a substância correspondente ao pico em aproximadamente 6,5 minutos. Em decorrência, tal fração foi submetida a novo fracionamento em CLAE-DAD com o uso de coluna semi-preparativa (Figura 7).

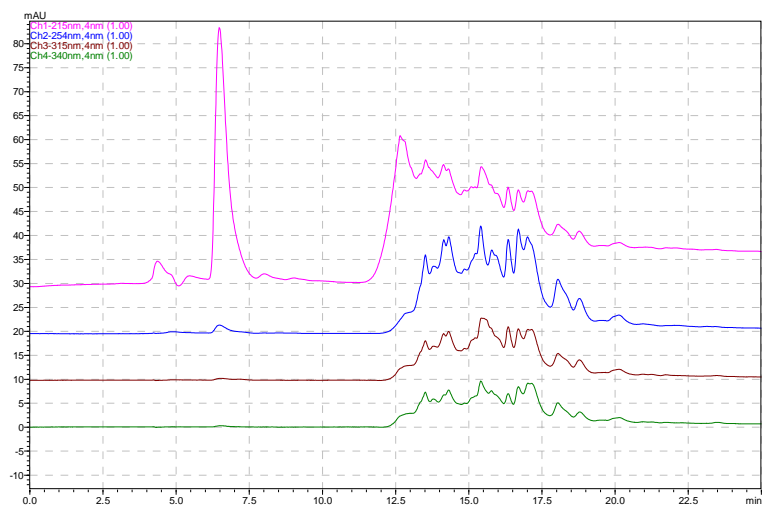


FIGURA 6 Cromatograma da fração RC1-62-04, obtido em CLAE-DAD com o uso de coluna de sílica-C18 na versão analítica. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 45% 6 min, MeOH 45 % → MeOH 100 % 0,1 min, MeOH 100 % 19 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

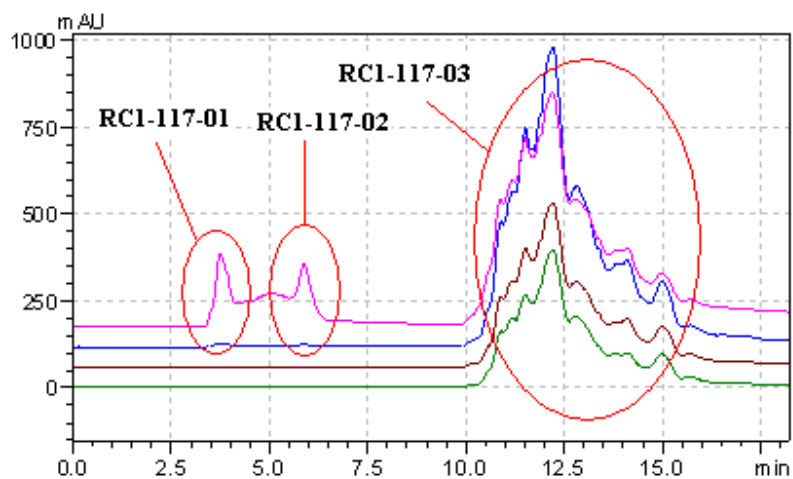


FIGURA 7 Cromatograma da fração RC1-62-04, obtido em CLAE-DAD com o uso de coluna de sílica-C18 na versão semi-preparativa. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 45% 6 min, MeOH 45 % → MeOH 100 % 0,1 min, MeOH 100 % 19 min. Fluxo: 15 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

Ao se analisar a fração RC1-117-02 (Tabela 5), que parecia corresponder ao pico em aproximadamente 6,5 minutos da Figura 6, observou-se apenas um pico no cromatograma (Figura 8), o que sugeria tratar-se de uma substância pura.

TABELA 5 Dados obtidos para as frações provenientes do fracionamento da amostra RC1-62-04 em CLAE-DAD.

Código	Fração	Tempo (min)	Massa (mg)
RC1-117-01	1	3,40-4,65	6,3
RC1-117-02	2	4,75-6,45	6,7
RC1-117-03	3	10,60-15,50	67,1

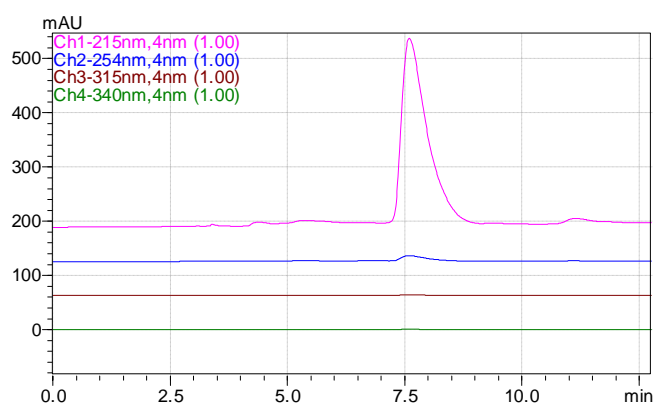


FIGURA 8 Cromatograma da fração RC1-117-02, obtido em CLAE-DAD com o uso de coluna de sílica-C18 na versão analítica. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 40% 3 min, MeOH 40 % → MeOH 100 % 17 min, MeOH 100 % 10 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.4 Elucidações estruturais das substâncias isoladas

As substâncias isoladas da fração solúvel em acetato de etila do extrato bruto de *V. brasiliensis* foram analisadas por espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (conforme descrito nos itens 5.6.1 e 5.6.2). Todas foram identificadas, conforme apresentado nos itens de 6.2.1 a 6.2.3.

6.4.1 Elucidação estrutural de RC1-112-02 (Vismiofuranoxantona)

No espectro de massas da fração RC1-112-02 se observou um sinal em m/z 327 dalton no modo positivo (Figura 15A, página 151), atribuído a $[\text{M}+\text{H}]^+$, e um sinal em m/z 325 dalton no modo negativo (Figura 17A, página 152), atribuído a $[\text{M}-\text{H}]^-$. A partir destas informações, pressupôs-se que esse composto possuía massa molecular igual a 326 dalton.

O espectro de ultravioleta (Figura 14A, página 151) apresentava máximos de absorção em 252, 283 e 327 nm que, segundo Wu et al. (1998), indicavam a presença de um núcleo xantônico. No espectro de RMN de ^1H (Figura 1A, página 138), dois dupletos em δ 7,48 ppm e δ 6,88 ppm eram devidos a átomos de hidrogênio aromáticos em posição orto ($J= 8,7$ Hz) (Silverstein & Webster, 2000), enquanto o simpleto em δ 6,49 ppm se devia provavelmente ao átomo de hidrogênio ligado a C2 (Tabela 6) (Wu et al., 1998).

A presença do grupo isopropenil e do anel diidrofurânico foram confirmados pelo duplo duplete em δ 5,44 ppm ($dd, J= 7,8; 9,6$ Hz); por dois sinais de átomos de hidrogênio geminais em δ 3,34 ppm ($dd, J= 9,6; 15,6$ Hz) e δ 2,92 ppm ($dd, J= 7,8; 15,6$ Hz), sendo que o sinal em δ 2,92 ppm possuía configuração *cis* em relação ao hidrogênio em δ 5,44 ppm por causa do valor de J (7,8 Hz); por dois sinais de átomos de hidrogênio olefínicos em δ 5,09 ppm e δ 4,95 ppm, que apareceram como simpletos largos e por um sinal em δ 1,73 ppm

(grupos metila da posição 3''), com integração correspondente a três átomos de hidrogênio (Ingham et al., 1986).

Os dados encontrados nos experimentos bidimensionais (Figuras 5A à 13A) confirmaram a proposta apresentada na Tabela 6. No HMBC, notou-se acoplamento à longa distância entre H2 (6,49 ppm) e C1, C3 e C9a. Outro acoplamento importante foi observado entre H2' (5,44 ppm) e C3' e C4. Ademais, verificou-se que havia acoplamento da posição 3' com C2' e C2''.

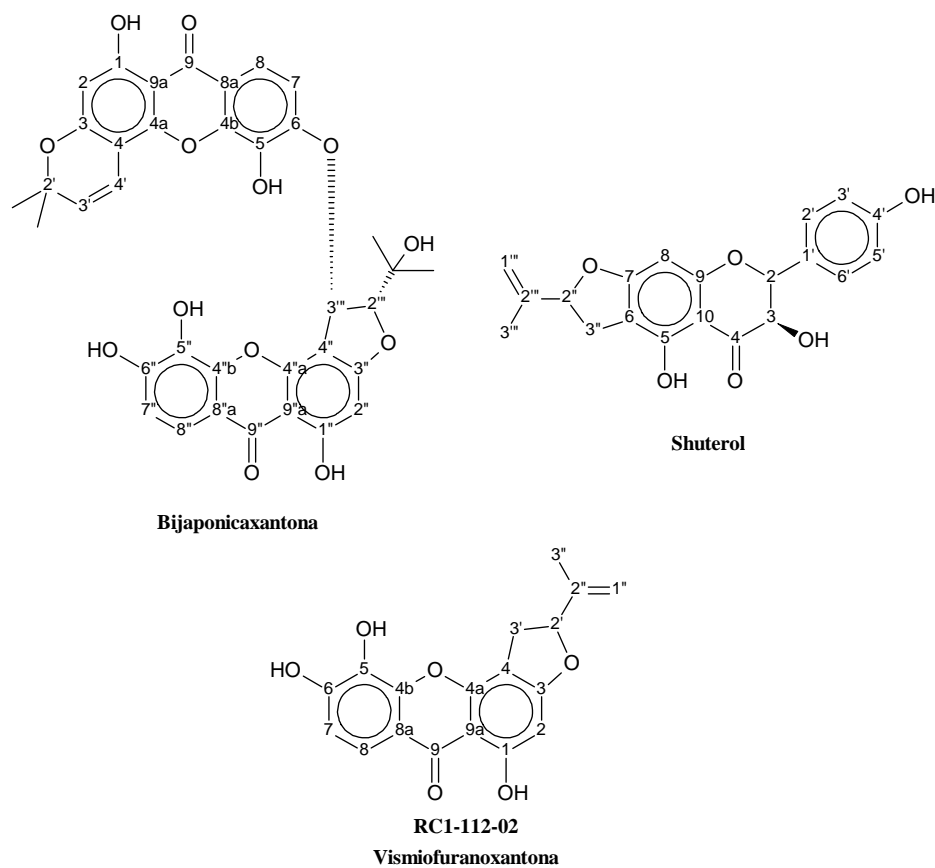


FIGURA 9 Estrutura da bijaponicaxantona, do shuterol e da RC1-112-02 (vismiofuranoxantona)

TABELA 6 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais e constantes de acoplamento em Hz, obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e por correlação heteronuclear $^1\text{H}\text{x}^{13}\text{C}$ a curta (HSQC) e longa distância (HMBC) da fração RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) e das substâncias bijaponicaxantona¹ e shuterol² (Figura 13) (Inghan et al., 1986; Wu et al., 1998) em $\text{DMSO-}d_6$.

	RC1-112-02 (vismiofuranoxantona)				Bijaponicaxantona ¹ e shuterol ²	
	^1H (600 MHz)	^{13}C (150 MHz)	HMBC	COSY	^1H (300 MHz)	^{13}C (75 MHz)
1		161,5				162,9 ¹
2	6,49 (1H, <i>s</i>)	88,5	C1, C3, C9a		6,29 (<i>s</i>) ¹	97,7 ¹
3		157,8				159,8 ¹
4		102,2				101,4 ¹
5		134,3				132,7 ¹
6		152,4				152,0 ¹
7	6,88 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$ Hz)	113,0	C5, C6	H5	6,92 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz) ¹	113,1 ¹
8	7,48 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$ Hz)	115,4	C6, C4b, C8a, C9	H6	7,54 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz) ¹	115,7 ¹
9		180,0				179,9 ¹
4a		149,8				151,0 ¹
4b		145,3				146,0 ¹
8a		111,1				*
9a		103,7				103,0 ¹
2'	5,44 (1H, <i>dd</i> , $J=7,8; 9,6$ Hz)	87,2	C3', C4	H3'a, H3'b	5,39 (<i>tl</i> , $J=8,3$ Hz) ²	*
3'	3,34 (1H, <i>dd</i> , $J=9,6; 15,6$ Hz)	29,5	C2', C2''	H2', H3'a, H3'b	3,31 (<i>dd</i> , $J=9,5; 15,4$ Hz) ²	*
	2,92 (1H, <i>dd</i> , $J=7,8; 15,6$ Hz)				2,86 (<i>dd</i> , $J=7,6; 15,4$ Hz) ²	
1''	5,09 (1H, <i>sl</i>)	112,0	C2''	H3''	5,08 (<i>sl</i>) ²	*
	4,95 (1H, <i>sl</i>)				4,93 (<i>sl</i>) ²	
2''		143,1				*
3''	1,73 (3H, <i>sl</i>)	16,7	C2', C2''	H1''a, H1''b	1,76 (<i>s</i>) ²	*

* Dados não fornecidos pelos autores.

Esses valores foram similares aos encontrados em outros trabalhos com estruturas semelhantes (Inghan et al., 1986; Wu et al., 1998; Leet et al., 2008) (Figura 6). Entretanto, após exaustiva pesquisa na literatura, a estrutura proposta para RC1-112-02 não foi encontrada, levando a crer que se tratava de uma substância inédita, cujo nome segundo as regras da IUPAC era 1,5,6-triidroxi-3,4-(2'-isopropenildiidrofurano)xantona, sendo batizada de vismiofuranoxantona. Para a confirmação desta estrutura provavelmente será necessária a realização de análise por espectrometria de massas de alta resolução, RMN de ^{13}C e NOESY, além de análise por difração de Raios-X.

6.4.2 Elucidação estrutural de RC1-112-03 (isojacareubina)

O espectro de ultravioleta da fração RC1-112-03 (Figura 31A, página 164) apresentou máximos de absorção em 277 e 332 nm que, segundo Wu et al. (1998), indicavam a presença de um núcleo xantônico. No seu espectro de RMN de ^1H (Figura 20A) também se observaram sinais de átomos de hidrogênio aromáticos em posição orto (7,48 ppm e 6,88 ppm, $J= 7,8$ Hz). Observava-se também um simpleto em 6,36 ppm, que foi atribuído ao átomo de hidrogênio ligado a C2 (Wu et al., 1998). Pôde-se perceber ainda, a presença de sinais em 6,61 ppm, 5,76 ppm e 1,44 ppm (6 H), o que indicava, segundo dados da literatura (Wu et al., 1998), a presença do anel 2,2-dimetilpirânico. Apesar de não terem sido observados os valores dos deslocamentos químicos de C5, C6, C4b e C8a, os experimentos de RMN bidimensionais (Figuras 22A a 30A, páginas 155 a 163) estavam de acordo com a estrutura proposta na Figura 7. Ademais, uma simulação do espectro de RMN de ^1H para a estrutura proposta foi realizada no 1H Predictor do programa ChemSketch versão 4.04, da Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Canadá). O resultado obtido, mostrado na Figura 10, possuía boa correlação com os dados de RMN de ^1H obtidos para a fração RC1-112-03.

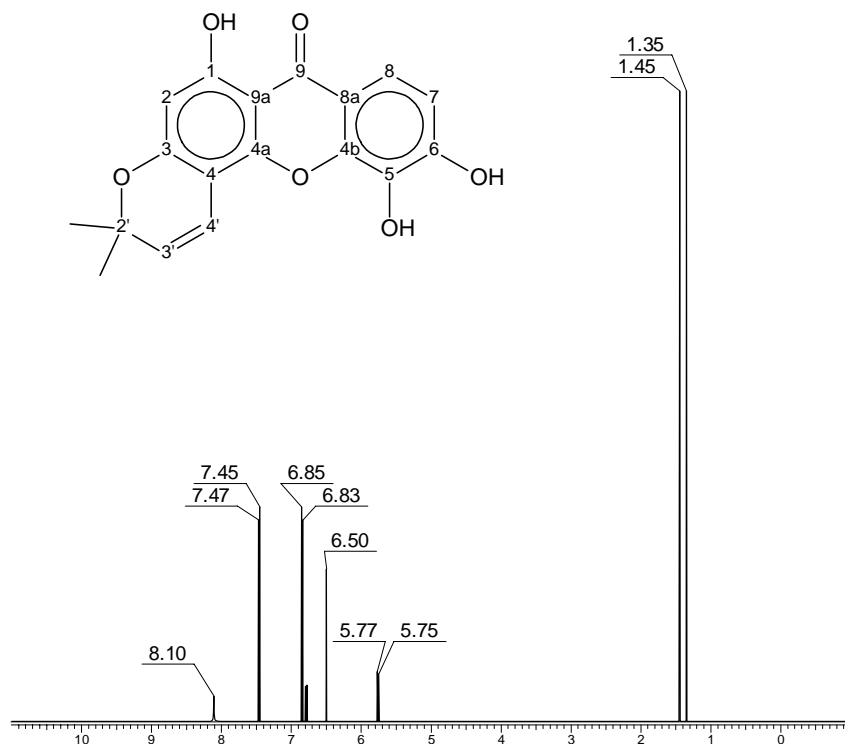


FIGURA 10 Espectro de RMN de ¹H simulado e estrutura da isojacareubina.

Todos estes indícios apontavam para a estrutura mostrada na Figura 7, que era conhecida como isojacareubina e já foi isolada de outras plantas da família Clusiaceae. Entretanto, alguns dados de RMN de ¹³C encontrados para a fração, apresentados na Tabela 7, estão em desacordo com o encontrado na literatura para esta estrutura (Wu et al., 1998). Como os dados de RMN de ¹³C foram obtidos indiretamente a partir dos experimentos bidimensionais, estes valores podem encontrar-se deslocados dos valores reais, uma vez que é difícil a determinação do centro da curva no mapa de contorno de tais experimentos.

Torna-se necessário então a realização de experimentos de RMN de ^{13}C para permitir a elucidação inequívoca da estrutura da fração RC1-112-03.

TABELA 7 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (s: simpleto; d: duplete; t: tripleto; dd: duplo duplete; m: multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hz, obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C) da fração RC1-112-03 e da isojacareubina (Wu et al., 1998), em $\text{DMSO}-d_6$.

	RC1-112-03			Isojacareubina		
	^1H (500 MHz)	^{13}C (125 MHz)	HMBC	COSY	^1H	^{13}C
1		156,3	C2			162,7
2	6,36 (1H, s)	94,2	C3, C1, C4		6,27 (s)	98,7
3		159,3				160,0
4		103,1				102,6
5		n.o.				132,9
6		n.o.				152,7
7	6,88 (1H, <i>sl</i>)	113,0		H8	6,92 (<i>d</i> , $J = 7,7$ Hz)	115,4
8	7,48 (1H, <i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	115,6		H7	7,54 (<i>d</i> , $J = 7,7$ Hz)	116,5
9		180,2				180,4
4a		156,9				151,6
4b		n.o.				146,4
8a		n.o.				113,3
9a		101,9				101,3
2'		78,0				78,5
3'	5,76 (1H, <i>d</i> , $J = 10,2$ Hz)	127,7	Me	H4'	5,78 (<i>d</i> , $J = 10,2$ Hz)	127,6
4'	6,61 (1H, <i>d</i> , $J = 10,2$ Hz)	114,2	C3, C4, C4a, C2'	H3'	6,70 (<i>d</i> , $J = 10,2$ Hz)	113,7
2'-Me	1,44 (6H, s)	27,6	C2', C3'		1,44 (s)	28,2

n.o.- Não observado. Dados de ^{13}C foram obtidos indiretamente a partir de experimento de HMBC e HSQC.

Como mencionado, a isojacareubina já foi isolada de outras plantas da família Clusiaceae tais como a *Hypericum japonicum* Thunb., da qual foi isolada pela primeira vez (Ishiguro et al., 1993), de *Hypericum roeperianum* Schimp. ex A. Rich. (Rath et al., 1996), *H. acmosepalum* N. Robson (Luo et al., 2006), *Garcinia xishuanbannaensis* Y. H. Li (Han et al., 2008b) e de *Garcinia lancilimba* C.Y. Wu ex Y. H. Li (Han et al., 2008a). No trabalho de Rath et al. (1996) foi demonstrado que tal substância possui atividade moderada contra *Candida albicans*, que se trata de um fungo responsável por infecções vaginais em mulheres.

6.4.3 Elucidação estrutural de RC1-117-02 (epicatequina)

No espectro de massas obtido no modo positivo (Figura 45A, página 177) foi observado um pico em m/z 291 dalton, que foi atribuído a $[M+H]$. Verificou-se também que o íon podia ser fragmentado para gerar quatro sinais. Um deles, em m/z 279 dalton, correspondia a perda de 18 dalton, que parecia corresponder a uma molécula de água. Os outros três fragmentos, com m/z 165, 139 e 123 u, eram coerentes com os dados da literatura para a fragmentação dos flavonóides epicatequina e catequina (Figura 11), que se tratam de isômeros diferenciados apenas pela configuração do carbono na posição 3 (Ek et al., 2006).

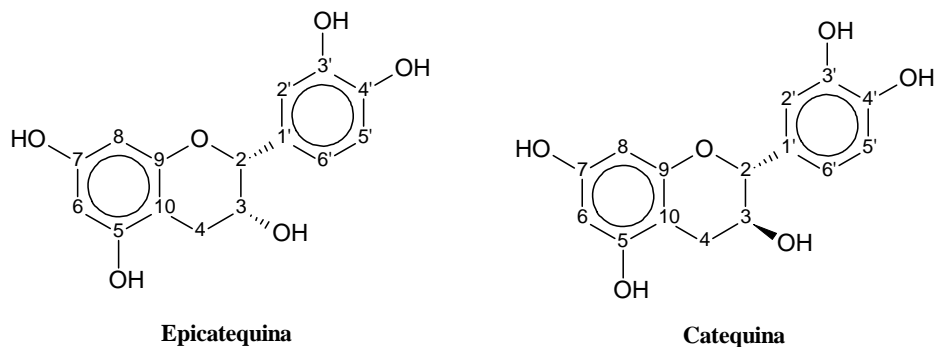


FIGURA 11 Estruturas dos isômeros catequina e epicatequina (RC1-117-02). Tal como a epicatequina, a fração RC1-117-02 apresentava, no espectro de RMN de ^1H (Figura 32A, pág. 165) sinais em δ 6,85 ppm, δ 6,64 ppm, δ 5,89 ppm e δ 5,71 ppm (Tabela 8), que foram atribuídos aos átomos de hidrogênios aromáticos.

Os sinais dos átomos de hidrogênio das posições 2 e 3 do núcleo do flavonóide são de extrema importância para diferenciar a epicatequina da catequina, pois para a primeira estes sinais se encontram em δ 4,74 ppm e δ 4,00 ppm, respectivamente. Já para a catequina, encontram-se em δ 4,54 ppm e δ 3,52 ppm, respectivamente (Watanabe, 1998). Para o composto isolado RC1-117-02, estes sinais se encontravam em δ 4,72 ppm e δ 4,00 ppm, indicando tratar-se da epicatequina.

Os resultados acima mencionados foram corroborados pelo deslocamento químico do carbono da posição 2 da amostra RC1-117-02 (76 ppm), pois segundo Souza et al. (2008) o mesmo átomo de carbono da catequina e da epicatequina tem deslocamento químico de 84 e 76 ppm, respectivamente.

TABELA 8 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (*s*: simpleto; *d*: duplete; *t*: tripleto; *dd*: duplo duplete; *m*: multiplete) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz, obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono treze (¹³C) da fração RC1-117-02 e da epicatequina (Watanabe, 1998), em DMSO-*d*₆

	RC1-117-02	Epicatequina		RC1-117-02	
	¹ H (600 MHz)	¹ H (500 MHz)	¹³ C (150 MHz)	HMBC	COSY
2	4,72 (1H, <i>sl</i>)	4,74 (1H, <i>s</i>)	77,6 (CH)	C1'	H4a, H4b
3	4,00 (1H, <i>sl</i>)	3,99 (1H, <i>m</i>)	64,6 (CH)	C4	H2, H4a, H4b
4a	2,67 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4.4; 16.4 Hz,)	2,46-2,71 (2H, <i>m</i>)	28,0 (CH ₂)	C3, C10	H3
4b	2,47 (2 H, <i>m</i>)	2,46-2,71 (2H, <i>m</i>)	28,0 (CH ₂)	C3, C10	H3
5			155,1 (C)		
6	5,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	5,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	93,5 (CH)	C6, C8	H8
7			155,1 (C)		
8	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	94,6 (CH)	C9	H6
9			156,3 (C)		
10			101,0 (C)		
1'			130,6 (C)		
2'	6,64 (2H, <i>m</i>)	6,68 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	114,5 (CH)	C1', C4', C5'	
3'			144,8 (C)		
4'			144,8 (C)		
5'	6,85 (1H, <i>sl</i>)	6,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	114,7 (CH)	C4'	*
6'	6,64 (2H, <i>m</i>)	6,68 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	117,1 (CH)	C1', C4', C5'	*

*- Não observado

A epicatequina é muito conhecida, tendo sido isolada de diferentes espécies. Como exemplo, pode-se citar *Vismia guianensis* (Aubl.) Seem. (Gonzales Gonzales et al., 1980), *Allanblackia monticola* Mildbr. Ex Engl. (Ngouela et al., 2005), *A. gabonensis* Bamps (Azebaze et al., 2008), *Calophyllum brasilienses* Cambess. (Pretto et al., 2004), *Mesua ferrea* L. (Singh et al., 1993) e *Vangueria infausta* Burch. (Mbukwa et al., 2007). Neste último trabalho são mostrados dados que comprovam a atividade da epicatequina contra *Candida mycoderma* e *C. mycoderma*, além da atividade antioxidante desta substância (Mbukwa et al., 2007).

6.5 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de *V. brasiliensis*, da fração solúvel em acetato de etila (RC1-07-01) e das substâncias isoladas da mesma frente a *Aspergillus ochraceus*

Um dos fatores que motivaram o estudo do extrato bruto de *V. brasiliensis* foi a atividade antifúngica relatada na literatura para outras espécies do gênero *Vismia* (Kuede et al., 2007; Nagen & Ferreira, 1993). Em decorrência, realizaram-se estudos preliminares de tal extrato, o que permitiu observar que o mesmo era capaz de impedir o crescimento do fungo *Aspergillus ochraceus*, que acarreta a contaminação de grãos de café com substâncias de elevada toxicidade (Bayman et al., 2002). Como algumas xantonas com atividade antifúngica já tinham sido isoladas de outras espécies do gênero *Vismia* (Bayman et al., 2002), propôs-se trabalhar com a fração de polaridade intermediária do extrato bruto de *V. brasiliensis* com vistas a isolar xantonas ou análogos com atividade contra *A. ochraceus*. De fato, tanto o extrato bruto quanto a fração do mesmo solúvel em acetato de etila se mostraram ativas contra o referido fungo quando empregadas em concentração única, no teste realizado em laboratório. De forma análoga, observou-se que as três substâncias isoladas (vismiofuranoxantona (RC1-112-02), isojacareubina (RC1-112-03) e epicatequina (RC1-117-02)) também eram ativas contra o fungo. No caso da isojacareubina e da epicatequina, os resultados

estavam de acordo com dados da literatura, segundo os quais tais substâncias tinham apresentado atividade contra os fungos *C. albicans* e *C. mycoderma*. Quanto a RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), nenhum relato foi encontrado já que se trata de uma substância inédita. Os resultados apresentados deixam óbvio que o extrato bruto, a sua fração solúvel em acetato de etila e as substâncias isoladas de tal fração eram ativas *in vitro* contra *A. ochraceus*. Logo, apresentaram potencial para uso futuro no desenvolvimento de produtos para o controle do referido fungo, o que sugere que novos estudos devam ser realizados com *V. brasiliensis* a fim de se averiguar melhor a atividade antifúngica de seus metabólitos.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* possui atividade contra o fungo *Aspergillus ochraceus*, confirmando a atividade antifúngica prevista para plantas do gênero *Vismia*. Foi demonstrado também a atividade antifúngica da fração do extrato metanólico solúvel em acetato de etila, confirmando a ação esperada de tal fração, uma vez que estudos anteriores demonstraram que em tal fração de outras plantas do mesmo gênero poderiam ser encontradas substâncias com atividade antifúngica.

O estudo fitoquímico da fração solúvel em acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* permitiu a purificação e identificação de uma xantona inédita, a vismiofuranoxantona. Dados de RMN indicam a presença da xantona isojacareubina, sendo esta a primeira vez que tal substância é encontrada em plantas do gênero *Vismia*. Entretanto, outros experimentos serão necessários para a confirmação da referida estrutura. Além disso, também foi isolado um flavan-3-ol, a epicatequina. Todas as três substâncias são parcialmente responsáveis pela atividade do extrato metanólico e da fração solúvel em acetato de etila contra *Aspergillus ochraceus*, uma vez que todas elas apresentaram atividade contra o referido fungo em testes *in vitro*. Esses resultados confirmam a atividade antifúngica esperada para a isojacareubina e para a epicatequina, pois foram encontrados relatos na literatura da atividade destas substâncias contra outros fungos. Novos testes deverão ser realizados para explorar o potencial uso de tais substâncias no controle de *Aspergillus ochraceus* em grãos de café.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEBAZE, A.G.B.; DONGMO, A.B.M.; OUAHOUE, B.M.W. Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, London, v. 101, n. 1, p. 23-30, Jan. 2007.

AZEBAZE, A.G.B.; OUAHOUE, B.M.W.; VARDAMIDES, J.C.; VALENTIN, A.; KUETE, V.; ACEBEY, L.; BENG, V.P.; NKENGFAK, A.E.; MEYER, M. Antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 44, n. 5, p. 582-587, Sept. 2008.

BAYMAN, P.; BAKER, M.A.D.; MICHAELIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, May 2002.

CARVALHO, D. D. C. **Conidial production and reaction of *Alternaria alternata* f. sp. Citri to plant extracts**. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

EK, S.; KARTIMO, H.; MATTILA, S.; TOLONEN, A. Characterization of phenolic compounds from Lingoberry (*Vaccinium vitis-idaea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 9834-9842, Nov. 2006.

GONZALES GONZALES, J.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; MARINE BETOLLO, G.B. Chemistry of the genus *Vismia*. VII: Vismione a from the leaves of *Vismia guianensis*. **Planta Medica**. New York, v. 40, n. 4, p. 347-350, 1980.

HAN, Q-B.; YANG, N-Y.; TIAN, H-L.; QIAO, C-F.; SONG, J-Z.; CHANG, D.C.; CHEN, S-L.; LUO, K.Q.; XU, H-X. Xanthenes with growth inhibition against HeLa cells from *Garcinia xishuanbannaensis*. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 11, p. 2187-2192, Aug. 2008a.

HAN, Q-B.; YANG, N-Y.; TIAN, H-L.; QIAO, C-F.; SONG, J-Z.; CHANG, D. C.; CHEN, S-L.; LUO, K.Q.; XU, H-X. Polyprenylated xanthenes from *Garcinia lancilimba* showing apoptotic effects against HeLa-C3 cells. **Chemistry & Biodiversity**, Amsterdam, v. 5, n. 12, p. 2710-2717, Dec. 2008b.

INGHAN, J.L.; TAHARA, S; DZIEDZIC, S.Z. New 3-hydroxyflavanone (dihydroflavonol) phytoalexins from the papilionate legume *Shutteria vestita*. **Journal of Natural Products**, New York, v. 49, n. 4, p. 631-638, July 1986.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, M.; ISOI, K.; OYAMA, Y. A flavanonol rhamnoside from *Hypericum japonicum*: part 7: an isopentenylated flavonol from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, New York, v. 32, n. 6, p. 1583-1585, Mar. 1993.

KUETE, V.; NGUEMEVING, J.R.; BENG, V.P. Antimicrobial activity of methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 3, p. 372-379, Feb. 2007.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Pharmabooks, 2000. p. 567-589.

LEET, J.E.; LIU, X.; DRERLER, D.M. Citotoxic xanthenes from *Psorospermun molluscum* from the Madagascar Rain Forest. **Journal of Natural Products**, New York, v. 71, n. 3, p. 460-463, Feb. 2008.

LUO, L.; ZHANG, Y.; PAN, Z-H.; LI, Z-Q. Xanthenes from *Hypericum acmosepalum*. **Yunnan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban**, Pequin, v. 28, n. 4, p. 337-339, 2006.

MBUKWA, E.; CHACHA, M.; MAJINDA, R.R.T. Phytochemical constituents of *Vangueria infausta*: their radical scavenging and antimicrobial activities. **ARKIVOC**, Gainesville, v. 9, n. 1, p. 104-112, Nov. 2007.

MEYER, J.J.M.; RAKUUAMBO, N.C.; HUSSEIN, A.A. Novel xanthenes from *Securidaca longepedunculat* with activity against erectile dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 599-603, Oct. 2008.

NAGEN, T.J.; FERREIRA, A. Constituentes of *Vismia micrantha*. **Fitoterapia**, Milano, v. 64, n. 3, p. 382-383, mag. 1993.

NGOUELA, S.; ZELEFACK, F.; LENTA, B.N.; NGOUAMEGNE, E.T.; TCHAMO, D.N.; TSAMO, E.; CONNOLY, J.D. Xanthones and other constituents of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). **Natural Product Research**, Abingdon, v. 19, n. 7, p. 685-688, Sept. 2005.

PRETTO, J.B.; CECHINEL- FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; SARTORI, M.R.K.; ISAIAS, D.E.B.; CRUZ, A.B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift fuer Naturforschung C: Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 59, n. 9/10, p. 657-662, Oct. 2004.

RATH, G.; POTTERAT, O.; MAVI, S. Xanthones from *Hypericum roeperianum*. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 1, p. 35-42, Feb. 1996.

SHEN, Y.; WANG, L.; KHALIL, A.T. Bioactive pyranoxanthones from roots of *Calophyllum blancoi*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 53, n. 2, p. 244-247, Jan. 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: Livro Técnico e Científicos, 2000. 460 p.

SINGH, S.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Mesuabixanthone-A and mesuabixanthone-B: novel *bis*-xanthones from the stem bark of *Mesua ferrea* (Guttiferae). **Natural Products Letters**, Washington, v. 3, n. 1, p. 53-58, Jan. 1993.

SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; IACOMONI, M.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extracts from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 59-67, May 2008.

WATANABE, M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 839-845, Feb. 1998.

WU, Q.; WANG, S.; DU, L. Xanthones from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 5, p. 1395-1402, Nov. 1998.

CAPÍTULO 3

ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM HEXANO DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Vismia brasiliensis* CHOISY (CLUSIACEAE)

1 RESUMO

O bicho mineiro do cafeeiro causa grande prejuízo aos cafeicultores brasileiros, já que seu ataque às folhas das plantas diminui a produtividade das mesmas. Por isso, buscou-se contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle deste inseto pelo estudo do extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae), que se trata de uma planta encontrada no sul do estado de Minas Gerais. Verificou-se que tal extrato inibiu de maneira moderada a oviposição do bicho mineiro do cafeeiro nas folhas de cafeeiro em testes *in vitro*. Como em estudos preliminares foram encontradas substâncias com atividade contra o bicho mineiro do cafeeiro na fração solúvel em hexano do extrato metanólico de outras plantas, realizou-se um estudo fitoquímico dos metabólitos de *V. brasiliensis* solúveis em hexano. Em decorrência, isolou-se um monoacil éster do glicerol e uma diidronaftoquinona, cuja estrutura parece idêntica a uma substância ativa contra o bicho mineiro do cafeeiro segundo dados da literatura.

**PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE HEXANE SOLUBLE FRACTION
FROM THE METHANOLIC EXTRACT OF *VISMIA BRASILIENSIS*
CHOISY (CLUSIACEAE) LEAVES**

2 ABSTRACT

The coffee leaf miner causes great losses to Brazilian coffee farmers, since the coffee production is reduced by the attacks of this insect to plant leaves. Thus, this work was aimed to contribute to the development of new methods to control the coffee leaf miner by studying the methanolic extract of leaves from *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae), which is widespread in the south of Minas Gerais State. When submitted to *in vitro* assays with coffee leaves, this extract inhibited moderately the oviposition of the insect. Since in preliminary studies with other plant species substances active against the coffee leaf miner had been found in the hexane soluble fraction of plant extracts, a phytochemical study was carried out with those metabolites produced by *V. brasiliensis* that were soluble in hexane. Consequently, two substances were isolated: a glycerol monoacyl ester and a dihydronaphthoquinone the structure of which seems identical to a substance active against the coffee leaf miner previously reported in the literature.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor de café do mundo, tendo produzido, somente no ano de 2008, 2,5 milhões de toneladas desta *commodity*. Deste montante, 1,3 milhões de toneladas foram exportadas, o que resultou na entrada de 2,5 bilhões de dólares no país. O principal estado produtor de café no Brasil é Minas Gerais, que responde por 51,8 % da produção brasileira de café (Centro de Inteligência do Café – CIC, 2009).

Apesar dos altos índices de produtividade, o bicho mineiro do cafeeiro ocasiona perdas de cerca de 180 mil toneladas de café por ano ao Brasil, o que corresponde a aproximadamente 10% de prejuízos na produção nacional do café. Em decorrência, existe uma demanda por novos métodos de controle do referido inseto, que talvez possa ser atendida pelo emprego de produtos de origem vegetal, já que as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de várias substâncias de interesse comercial (Paula, 2007). Entretanto, há um pequeno número de espécies vegetais estudadas no Brasil, especialmente no estado de Minas Gerais, cuja maior parte é coberta pelo bioma cerrado (Paula, 2007). Com vistas a contribuir para mudar este quadro e para o desenvolvimento de novos produtos para o controle do bicho mineiro, buscou-se realizar um estudo fitoquímico das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae), que se trata de uma espécie encontrada na floresta estacional semidecídua montana, da Reserva florestal da Universidade Federal de Lavras, que também é conhecida como “Matinha da UFLA”.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O bicho mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guèrin-Mèneville & Perrottett, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), é considerado praga-chave da cultura cafeeira (Moraes, 1998), que é de grande importância econômica e social para o Brasil (Reis et al., 1984; Souza et al., 1998). O referido inseto causa significativos danos às plantas em decorrência das desfolhas que promove, podendo ocasionar perdas na produtividade em torno de 50% (Reis et al., 1984; Reis, 1990). Seu controle vem sendo realizado principalmente por meio de inseticidas sintéticos que, por possuírem largo espectro de ação, também podem promover desequilíbrios ambientais, contaminação do ambiente, intoxicação dos aplicadores e o aumento do custo de produção (Souza et al., 1998).

Uma das possíveis alternativas para contornar o problema consiste no emprego de produtos de origem vegetal, já que é notória a capacidade de produção de substâncias inseticidas por algumas espécies de plantas. Para exemplificar se pode citar o trabalho descrito por Hernández & Vendramim (1997), que avaliaram a bioatividade de extratos aquosos de doze espécies de plantas da família Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda*. Dentre as espécies estudadas, 67% (*Azadirachta indica* A. Juss., *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Cedrela odorata* L., *Guarea macrophylla* Vahl, *Melia azedarach* L., *Swietenia macrophylla* King, *Toona ciliata* M. Roem. e *Trichilia clausenii* C. DC.) apresentaram em alguma parte da planta substância com atividade tóxica sobre *S. frugiperda*. *C. odorata* e *T. clausenii* apresentaram, em seus caules, substâncias que afetaram o desenvolvimento da praga, causando alongamento da fase imatura e/ou diminuição do peso das pupas. As sementes de *A. indica* e *C. odorata* e os frutos de *M. azedarach* foram altamente tóxicos às larvas de *S. frugiperda*, causando mortalidade acima de 80%.

Uma das espécies mais empregadas no controle de insetos é o neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Composições do extrato seco de sementes desta planta se mostraram eficientes na obtenção de produtos estáveis para o controle de algumas pragas agrícolas. Segundo os estudos realizados, isso se deve principalmente à presença de uma substância chamada azadiractina, que é produzida em quantidade considerável pela planta e tem forte efeito sobre os insetos (Paula, 2007).

Em geral, os resultados obtidos com produtos de origem vegetal têm refletido em várias patentes nessa área. Para exemplificar, pode-se citar o uso de frações de baixa polaridade de plantas do gênero *Alpina* para o controle de *Coptotermis formosanus* (Paula, 2007). Também é possível mencionar o emprego de extratos de *Perilla frutescens* var. *acuta* (Odash) Kudô para a obtenção de produtos com propriedades inseticidas (Paula, 2007).

Consequentemente, em trabalho preliminar os extratos de várias espécies vegetais foram submetidos a testes com o bicho mineiro, o que permitiu observar a atividade de extratos provenientes das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae). Considerando-se a inexistência de estudos fitoquímicos sobre *V. brasiliensis*, bem como a atividade preliminarmente observada do extrato da mesma contra o bicho mineiro do cafeeiro, buscou-se purificar e identificar substâncias desta planta com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de novos inseticidas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais e equipamentos utilizados

Exceto quando mencionado de outra forma, hexano, acetato de etila, metanol, ácido acético e ácido clorídrico eram de grau analítico (P.A.), enquanto a água empregada foi destilada. Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica-gel (Alugram) com indicador de fluorescência UV 254. Os reveladores empregados em tais análises foram: luz UV, vapor de iodo e solução de ácido fosfomolibdico a 5% (g/mL) em etanol. Sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck) foi empregada nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC).

5.2 Fracionamento da fração solúvel em hexano (RC1-06-01)

5.2.1 Fracionamento de RC1-06-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

A fração solúvel em hexano (RC1-06-01), obtida do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto das folhas de *V. brasiliensis* (ver item 5.4 do capítulo 2), foi analisada por CCD em placas com sílica gel, empregando-se, como eluentes, diferentes combinações de hexano/acetato de etila, contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, o que permitiu obter vários perfis cromatográficos. Posteriormente, a fração RC1-06-01 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 4,5 x 15,0 cm de sílica gel 60. Para tanto, 3,00 g de amostra foram solubilizados em 50 mL de hexano e a solução resultante foi colocada em balão de fundo redondo de 100 mL contendo 6,54 g de sílica gel. A mistura obtida foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório. O resíduo final foi adicionado ao topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passadas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (10:1, 300 mL;

5:1, 300 mL; 3:1, 300 mL; 1:1, 300 mL; 0:1, 300 mL), e 300 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. Coletaram-se 28 frações de 50 mL, além de uma fração eluída com metanol. Após análises das mesmas por CCD, as frações foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 8 frações (RC1-37-01 a RC1-37-08, Tabela 1 do item 6.1.1).

5.2.2 Fracionamento de RC1-37-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Inicialmente, a fração RC1-37-01, obtida do fracionamento anterior (item 5.2.1), foi analisada por CCD em placas com sílica gel. Com base nos resultados obtidos, a fração RC1-37-01 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 2,0 x 15,0 cm de sílica gel 60. Para tanto, 463 mg de amostra foram solubilizados em 50 mL de hexano e a solução resultante foi colocada em balão de fundo redondo de 100 mL contendo 1,05 g de sílica gel. A mistura obtida foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório. O resíduo final foi adicionado ao topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passadas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1% (v/v) de ácido acético (60:1, 200 mL; 50:1, 200 mL; 40:1, 100 mL) e 200 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. Coletaram-se 33 frações de 10 mL e a fração eluída com metanol. Após análise das mesmas por CCD, as frações foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 8 frações (RC1-42-01 a RC1-42-08, Tabela 2 do item 6.1.2).

5.2.3 Fracionamento de RC1-42-02 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

A fração RC1-42-02, obtida do fracionamento anterior (item 5.2.2) foi analisada por CCD em placas com sílica gel. Com base nos resultados obtidos, a

fração RC1-42-02 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 1,5 x 15,0 cm de sílica gel 60. Para tanto, 23,9 mg de amostra foram solubilizados em 1,3 mL de uma solução de hexano/acetato de etila na proporção de 40:1 e adicionada no topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passados 100 mL uma solução de hexano/acetato de etila na proporção de 40:1, 150 mL de acetato de etila e 150 mL de uma solução de metanol. Todos estes eluentes continham 0,1 % (v/v) de ácido acético. Foram coletadas 22 frações de 5 mL que, após serem analisadas por CCD, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 4 frações (RC1-69-01 a RC1-69-04, Tabela 3 do item 6.1.3).

Como a fração RC1-69-02 se apresentou pura segundo análises por CCD, foi submetida as análises para elucidação da sua estrutura (ver item 5.3).

5.2.4 Fracionamento de RC1-37-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

A fração RC1-37-06, obtida no fracionamento da fração hexano (ver item 5.2.1) foi analisada por CCD em placas com sílica gel. Com base nos resultados obtidos, a fração RC1-37-06 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 2,0 x 15,0 cm de sílica gel 60. Para tanto, 110,5 mg de amostra foram solubilizados em 10 mL de acetato de etila e a solução resultante foi colocada em balão de fundo redondo de 100 mL contendo 220,1 mg de sílica gel. A mistura obtida foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório. O resíduo final foi adicionado ao topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passadas soluções de hexano/acetato de etila contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (1:1, 100 mL; 150 mL, 1:6), e 100 mL de acetato de etila contendo 0,1 % de ácido acético. Coletaram-se 35 frações de 10 mL e uma fração eluída com metanol. Após análises das mesmas por CCD, as frações foram agrupadas conforme a

semelhança, concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 11 frações (RC1-89-01 a RC1-89-11, Tabela 4 do item 6.1.4).

Como a fração RC1-89-05 se apresentou pura segundo análises por CCD, foi submetida às análises espectrométricas para elucidação da sua estrutura (ver item 5.3).

5.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi feita por meio de espectrometria de infravermelho, de massas (EM) e de ressonância magnética nuclear (RMN).

5.3.1 Espectroscopia de infravermelho

Para a análise por infravermelho, a fração RC1-69-02 foi dissolvida em hexano e aplicada na superfície de uma janela de Irtran-2[®] (Sigma-Aldrich). Após a remoção do solvente sob vácuo, obteve-se o espectro em aparelho Digilab Excalibur FTS 3000, com resolução de 4 cm⁻¹ e número de onda de 4000 a 500 cm⁻¹.

5.3.2 Espectrometria de massas

Dissolveu-se 1,0 mg da fração RC1-69-02 em 1,0 mL de uma solução resultante da combinação de metanol/propan-2-ol/água (12:8:1) com hexano/propan-2-ol (7:3) na proporção de 6:4, contendo na solução resultante 10 µg.mL⁻¹ de iodeto de potássio P.A. Parte (20 µL) da solução resultante foi diretamente inserida em espectrômetro de massas Agilent 1100 Series LC/MSD Trap equipado com uma interface do tipo *electrospray* e analisador do tipo *ion trap*. O fluxo do gás secante e sua temperatura foram de 6,0 L.min⁻¹ e 275 °C, respectivamente. A voltagem da agulha foi de 4500 V. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL.min⁻¹.

Uma alíquota (0,5 mg) da fração RC1-89-05 foi dissolvida em 1 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. A seguir, 20 µL da solução resultante foram diretamente inseridos na interface do equipamento mencionado acima, com fluxo de 0,5 mL/min de metanol contendo 0,1 % de ácido acético. Manteve-se o gás secante com fluxo de 10 L/min e temperatura de secagem de 300 °C. A voltagem da agulha era de 3500 V.

Para todas as amostras foram obtidos espectros no modo positivo, sendo os íons obtidos submetidos à fragmentação.

5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises por RMN foram realizadas em aparelhos Varian Inova 500 para a fração RC1-69-02 (^1H : 500, ^{13}C : 126 MHz) e Bruker DRX 400 para a fração RC1-89-05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz). Todas as amostras foram dissolvidas em CDCl_3 . Realizaram-se experimentos unidimensionais e bidimensionais, empregando-se os picos dos solventes como referência: δ_{H} 7,26 e δ_{C} 77,0.

5.4 Teste de oviposição

Folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Topázio) sem minas do bicho-mineiro foram coletadas no campus da UFLA, lavadas com água destilada e limpas com algodão úmido para a eliminação de possíveis ovos do bicho mineiro do cafeeiro. Pincelou-se a solução do extrato bruto (18 mg dissolvidos em 2,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g.mL⁻¹) nas faces superiores das folhas, sendo cada uma delas fixada em uma placa de Petri na qual já se encontrava uma folha sem qualquer tratamento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo Tween 80 a 0,01 g.mL⁻¹ e Lorsban[®] 480 BR a 0,2% g.mL⁻¹ (Dow Agrosiences Industrial Ltda) empregados como testemunha negativa e positiva, respectivamente. Cada

parcela correspondeu a uma placa de Petri, que foi individualizada em uma gaiola de PVC, na qual foram colocados dois casais de adultos de *Leucoptera coffeella* com idade variando de um a três dias, provenientes de criação em laboratório (Reis Júnior et al., 2000). Após 72 h em câmara climática ($25\pm 1^\circ$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 h), contaram-se os ovos nas folhas. Converteram-se os valores em percentagens ($\% \text{ ovos na folha tratada} = 100 \times \frac{\text{número de ovos na folha tratada}}{\text{número de ovos na folha tratada mais os da folha não tratada}}$) para a realização da análise de variância e comparação das médias pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fracionamento da fração solúvel em hexano (RC1-06-01)

6.1.1 Fracionamento de RC1-06-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

No fracionamento da fração do extrato bruto solúvel em hexano, obtiveram-se 23 frações, que foram combinadas em 8 frações segundo análise por CCD (Tabela 1). As frações RC1-37-01 e RC1-37-06 foram submetidas a novos fracionamentos conforme itens 5.2.2 e 5.2.4 respectivamente, já que apresentavam uma boa relação massa/complexidade.

TABELA 1 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica da fração solúvel em hexano (RC1-06-01).

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
1-5	RC1-37-01	463,5
6-9	RC1-37-02	654,8
10-12	RC1-37-03	579,5
13-18	RC1-37-04	495,8
19-21	RC1-37-05	231,3
22-25	RC1-37-06	110,5
26-28	RC1-37-07	64,5
Metanol	RC1-37-08	275,7

6.1.2 Fracionamento de RC1-37-01 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Análises por CCD em placa com sílica gel das frações combinadas, obtidas do fracionamento em coluna de sílica gel de RC1-37-01 (item 5.2.2; Tabela 2), permitiram observar que apenas a fração RC1-42-02 (23,9 mg) possuía uma boa relação massa/complexidade, sendo submetida a novo fracionamento conforme descrito no item 5.2.3.

TABELA 2 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica da fração RC1-37-01

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
1-4	RC1-42-01	316,3
5	RC1-42-02	23,9
6-8	RC1-42-03	34,3
9-10	RC1-42-04	9,0
11-19	RC1-42-05	16,3
20-28	RC1-42-06	25,1
29-33	RC1-42-07	5,7
Metanol	RC1-42-08	10,0

6.1.3 Fracionamento de RC1-42-02 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Das quatro frações combinadas, obtidas do fracionamento em coluna de sílica gel de RC1-42-02 (item 5.2.3; Tabela 3), a fração RC1-69-02 (18,3 mg) era a única que se apresentava pura de acordo análises por CCD, sendo submetida às análises espectrométricas para elucidação da sua estrutura (itens 5.3.1; 5.3.2 e 5.3.3).

TABELA 3 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica da fração RC1-42-02

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
3	RC1-69-01	0,3
4-5	RC1-69-02	18,3
6	RC1-69-03	0,1
22	RC1-69-04	0,5

6.1.4 Fracionamento de RC1-37-06 por cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Obtiveram-se onze novas frações no fracionamento da fração RC1-37-06 (item 5.2.4; Tabela 4), sendo aquela denominada RC1-89-05 (18,0 mg) a única que se apresentava pura de acordo com análises por CCD. Em decorrência, foi sendo submetida às análises espectrométricas (itens 5.3.2 e 5.3.3).

TABELA 4 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica da fração RC1-37-06

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
2	RC1-89-01	2,1
3	RC1-89-02	5,7
4-6	RC1-89-03	43,7
7	RC1-89-04	11,7
8-10	RC1-89-05	18,0
11-12	RC1-89-06	6,6
14-16	RC1-89-07	4,7
17-21	RC1-89-08	3,4
22-25	RC1-89-09	1,5
25-37	RC1-89-10	3,4
MeOH	RC1-89-11	8,2

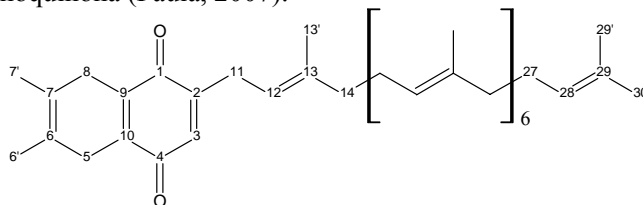
6.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias isoladas da fração solúvel em hexano do extrato de *V. brasiliensis*, RC1-69-02 (actinoquinona) e RC1-89-05 ((*Z*)-icos-13-enoato de 2,3-diidroxipropila), foram analisadas por espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C (conforme descrito nos itens 5.3.2 e 5.3.3). No caso específico da substância RC1-69-02, também foi feita análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR). As substâncias RC1-69-02 e RC1-89-05 foram identificadas conforme apresentado nos itens 6.2.1 e 6.2.2, respectivamente.

6.2.1 Elucidação estrutural da fração RC1-69-02 (actinoquinona)

No espectro de infravermelho de RC1-69-02 (Figura 66A, página 197) era nítida a presença de uma banda em 1720 cm^{-1} , provavelmente decorrente de estiramento C=O de cetonas. Também eram bastante visíveis duas bandas entre $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, que sugeriam a presença de ligações C=C conjugadas em sistemas assimétricos (Silverstein & Webster, 2000). Tais resultados pareciam de acordo com o observado nas análises por RMN, já que no espectro de ^1H (Figura 48A, página 179) se observavam sinais em δ 5,11 ppm, referentes a átomos de hidrogênio olefínicos (Tabela 5). De forma análoga, no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53A) eram nítidos os sinais em δ 187,7 ppm e 187,6 ppm, referentes a átomos de carbono de grupos carbonílicos (Tabela 5). Os dados sugeriam que a estrutura correspondesse a uma cetona aromática com uma longa cadeia isoprênica.

TABELA 5 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (*s*: simpleto; *d*: duplete; *t*: tripleto; *dd*: duplo duplete; *dl*: duplete largo; *m*: multiplete) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz, obtidos em CDCl₃ por RMN de hidrogênio (¹H) e de carbono treze (¹³C) da fração RC1-69-02 e de dados da literatura para a actinoquinona (Paula, 2007).



Nº	RC1-69-02		Actinoquinona		HMBC de H para C
	¹ H	¹³ C	¹ H Ref.	¹³ C Ref.	
1	-	187,8 (C) ^A	-	187,7 (C) ^A	
2	-	148,0 (C)	-	147,9 (C)	
3	6,46 (1 H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,7; 1,7 Hz)	132,0 (CH)	6,46 (1 H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,7; 1,7 Hz)	132,0 (CH)	C1, C2, C10, C11
4	-	187,7 (C) ^A	-	187,6 (C) ^A	
5	2,02 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,6 (CH ₂) ^B	C4, C6, C10
6	-	134,9 (C) ^C	-	134,8 (C) ^C	
7	-	135,0 (C) ^C	-	134,9 (C) ^C	
8	2,02 (<i>m</i>)	39,6 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,6 (CH ₂) ^B	C1, C7, C9
9	-	140,6 (C) ^d	-	140,5 (C) ^d	
10	-	141,0 (C) ^d	-	140,9 (C) ^d	
11	3,12 (2 H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	27,5 (CH ₂)	3,12 (2 H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,0; 7,5 Hz)	27,4 (CH ₂)	C1, C2, C3, C12
12	5,16 (1 H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 1,2; 2,5; 7,5)	118,2 (CH)	5,16 (1 H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 1,0; 2,5; 7,5)	118,1 (CH)	C11, C13, C33
13	-	134,9 (C) ^E	-	134,9 (C) ^E	

...continua...

"TABELA 5, Cont."

14	2,02 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	C13, C15, C16, C33
15	2,02 (<i>m</i>)	26,6 (CH ₂) ^F	2,04 (<i>m</i>)	26,5 (CH ₂) ^F	C14, C16, C-17
16	5,11 (<i>m</i>)	123,8 (CH) ^G	5,11 (<i>m</i>)	123,8 (CH) ^G	C14, C15, C34
17	-	134,9 (C) ^E	-	134,9 (C) ^E	
18	2,02 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	C17, C19, C20, C34
19	2,02 (<i>m</i>)	26,6 (CH ₂) ^F	2,04 (<i>m</i>)	26,6 (CH ₂) ^F	C18, C20, C21
20	5,11(<i>m</i>)	124,2 (CH) ^G	5,11 (<i>m</i>)	124,2 (CH) ^G	C18, C19, C35
21	-	135,4 (C) ^E	-	135,4 (C) ^E	
22	2,02 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	C21, C23, C24, C35
23	2,02 (<i>m</i>)	26,7(CH ₂) ^F	2,04 (<i>m</i>)	26,7(CH ₂) ^F	C22, C24, C25
24	5,11 (<i>m</i>)	124,2 (CH) ^G	5,11 (<i>m</i>)	124,2 (CH) ^G	C22, C23, C36
25	-	139,6 (C) ^E	-	139,6 (C) ^E	
26	2,02 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	2,04 (<i>m</i>)	39,7 (CH ₂) ^B	C25, C27, C28, C36
27	2,02 (<i>m</i>)	26,7 (CH ₂) ^F	2,04 (<i>m</i>)	26,7 (CH ₂) ^F	C26, C28
28	5,11 (<i>m</i>)	124,4 (CH) ^G	5,11 (<i>m</i>)	124,4 (CH) ^G	C26, C27
29	-	131,2 (C)	-	131,2 (C)	
30	1,68 (<i>d</i> largo, <i>J</i> = 1 Hz)	25,6 (CH ₃)	1,67 (<i>d</i> largo, <i>J</i> = 1 Hz)	25,6 (CH ₃)	C28, C29, C37
6'	2,02 (<i>m</i>)	12,3 (CH ₃) ^H	2,04 (<i>m</i>)	12,3 (CH ₃) ^H	C5, C6, C7
7'	2,02 (<i>m</i>)	12,0 (CH ₃) ^H	2,04 (<i>m</i>)	12,0 (CH ₃) ^H	C6, C7, C8
13'	1,62 (<i>m</i>)	15,9 (CH ₃) ^I	1,62 (<i>m</i>)	15,9 (CH ₃) ^I	C12, C13, C14
17'	1,60 (<i>m</i>)	16,0 (CH ₃) ^I	1,60 (<i>m</i>)	16,0 (CH ₃) ^I	C15, C16 C17, C18
21'	1,60 (<i>m</i>)	16,1 (CH ₃) ^I	1,60 (<i>m</i>)	16,0 (CH ₃) ^I	C19, C20, C21, C22
25'	1,60 (<i>m</i>)	16,2 (CH ₃) ^I	1,60 (<i>m</i>)	16,1 (CH ₃) ^I	C23, C24, C25, C26
29'	1,55 (<i>s</i> largo)	17,7 (CH ₃)	1,55 (<i>s</i> largo)	17,6 (CH ₃)	C27, C28, C29, C30

Ao se examinar a Tabela 5, foi possível notar semelhanças com os dados de RMN da substância plastoquinona-9 (Figura 1), uma quinona que é parte importante no transporte de elétrons durante a fotossíntese realizada por plantas, algas e cianobactérias, que possui uma longa cadeia com nove unidades isoprênicas (Boers et al., 2002).

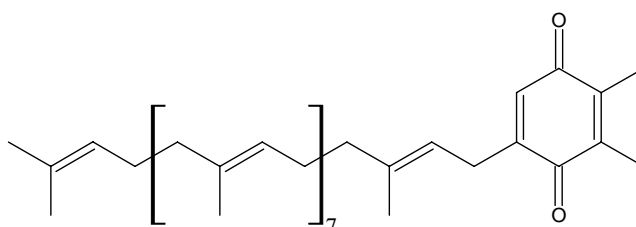


FIGURA 1 Estrutura da plastoquinona-9.

Enquanto no espectro da plastoquinona-9 se observava um largo tripleto ($J = 1,7$ Hz) em δ 6,47 ppm para o hidrogênio ligado ao anel, na actinoquinona o hidrogênio correspondente ocasionava um duplo duplete ($J = 1,7; 1,7$ Hz) em δ 6,46 ppm, o que parecia bastante razoável para a estrutura proposta. Outra evidência que dava suporte à proposta apresentada era o sinal mais largo para a fração RC1-69-02 que se encontrava em δ 1,60 ppm e foi atribuído aos grupos metila (17', 21', 25'). Valores estes de acordo com aqueles encontrados para os grupos metila semelhantes da plastoquinona-9. Os grupos metila terminais da substância RC1-69-02 corresponderam às absorções em 1,68 ppm (C-30) e 1,55 ppm (C-29), o que estava em plena coerência com sinais em 1,68 ppm e 1,55 ppm para os grupos metila análogos da plastoquinona-9 (Boers et al.; 2002). Já o sinal dos hidrogênios do C-13', grupo metila mais próximo ao anel, é encontrado

em δ 1,62 ppm tanto para a RC1-69-02 quanto para a plastoquinona-9 (Boers et al., 2002).

O sinal de hidrogênio do grupo metileno ligado ao anel (δ 3,12 ppm) se apresenta como um duplete largo com constante de acoplamento igual a 7,5 Hz. Estes valores também são encontrados para este grupo na plastoquinona-9 (δ 3,12 ppm; $J=$ 1,7; 7,2 Hz). De forma análoga, os sinais dos outros grupos metilenos e dos grupos metínicos da cadeia isoprenóide também estão de acordo com o encontrado na literatura para a plastoquinona-9 (Boers et al., 2002).

Entretanto, existem no espectro de RC1-69-02 sinais em δ 134,8 ppm e δ 135,0 ppm, que não são observados para a plastoquinona-9. Segundo o DEPT, tratam-se de átomos de carbono de hibridização sp^2 que não estão ligados a hidrogênio. Há também, a presença de sinais em δ 39,6 ppm (CH_2 segundo o DEPT) que estão ligados aos átomos de carbono citados acima (segundo experimento de HMBC), além dos grupos CH_3 ligados ao anel quinônico. Com base nestes fatos, pode-se inferir que a fração RC1-69-02 apresenta em sua estrutura o anel de uma diidronaftoquinona, diferente do anel da plastoquinona-9.

O espectro de massas da fração RC1-69-02 (Figura 67A, página 197), diferentemente do apresentado na literatura para a actinoquinona (Paula, 2007), não permitiu visualizar os picos dos íons $[M+H]^+$, $[M+K]^+$ ou mesmo $[M+Na]^+$, que indicariam a massa molecular do composto. Entretanto foi possível a visualização de um pico com m/z 187 dalton, que pôde ser atribuído ao fragmento do anel diidronaftoquinônico sozinho. Também foi possível identificar picos que podiam ser atribuídos à perda de unidades isoprênicas, confirmando a possibilidade da estrutura se tratar de uma diidronaftoquinona ligada a unidades isoprênicas, apesar de não ser possível confirmar o número destas unidades.

Além das várias semelhanças da amostra RC1-69-02 com a plastoquinona-9 que foram salientadas acima, vale relatar que a referida amostra deu origem a sinais de ^1H e ^{13}C que eram perfeitamente coincidentes com os descritos para a actinoquinona (Paula, 2007), que foi isolada pela primeira vez da fração solúvel em hexano das folhas de *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). Em decorrência, propôs-se que teria sido esta a substância isolada.

6.2.2 Elucidação estrutural de RC1-89-05 ((Z)-icos-13-enoato de 2,3-diidroxipropila)

A fração RC1-89-05 foi isolada na forma de um óleo incolor, cujo espectro de massas (Figura 86A) apresentou picos com m/z 385 dalton ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 407 dalton ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). De acordo com os dados do espectro de RMN de ^1H (Figura 68A), este composto mostrava absorções características de ácido graxo, com um pico intenso em δ 1,26 ppm, atribuído a grupos metileno da cadeia do ácido graxo (Tabela 6). Havia um duplo duplete em δ 0,87 ppm, atribuído a um grupo metila terminal, e outro duplo duplete em δ 2,34 devido ao metileno na posição α em relação à carbonila. Também podiam ser observados sinais em δ 5,34 ppm, que eram característicos de hidrogênios olefinicos. Todos estes sinais estavam de acordo com o encontrado na literatura para um ácido graxo monoinsaturado (Liu et al., 2006). Além disso, sinais parecidos com os de uma unidade de glicerol eram observados [δ 4,19 ppm (1H; *dd*; $J= 4,8; 11,6$ Hz), δ 4,16 ppm (1H; *dd*; $J= 6; 11,6$ Hz), δ 3,93 ppm (1H, *m*), δ 3,69 ppm (1H; *dd*; $J= 4; 11,6$ Hz), δ 3,59 ppm (1H; *dd*; $J= 6; 11,6$ Hz)], o que sugeria a presença de um éster desse álcool (Liu et al., 2006).

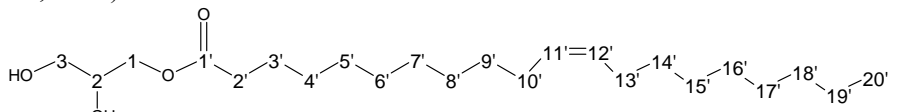
Os dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 71A, página 201) corroboraram os resultados acima descritos (Tabela 6), pois os sinais em δ 63,3 ppm, δ 65,1 ppm e δ 70,2 ppm estavam de acordo com átomos de carbono de

gliceróis monossubstituídos, com a unidade acila ligado ao carbono 1 do glicerol (Vlahov, 1999). Além disso, o valor de deslocamento químico encontrado para os átomos de carbono alílicos (δ 27,2 ppm) indicavam que a porção acila possuía uma ligação dupla de configuração *cis*, uma vez que esta configuração desloca os sinais dos grupos metilênicos centrais não-perturbados ($\sim\delta$ 29 ppm) cerca de δ 2,5 ppm para a baixa frequência devido à forte interação estérica γ entre tais grupos. Já a dupla ligação na configuração *trans* desloca os sinais cerca de δ 5,3 ppm para a alta frequência em relação ao isômero *cis* (Vlahov, 1999).

Comparando-se os dados obtidos com os encontrados na literatura, concluiu-se que a fração RC1-89-05 podia ser identificada como sendo o éster (*Z*)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila (Vlahov et al., 2002). Entretanto, outros experimentos deverão ser realizados para confirmar a posição da dupla ligação, uma vez que os dados descritos para o éster (*Z*)-icos-13-enoato de 2,3-diidroxipropila também são muito próximos aos encontrados para RC1-89-05. Poderão ser feitas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) ou medição do valor de T_1 (tempo de relaxação longitudinal) em experimentos de RMN de ^{13}C , pois segundo Vlahov (1999) este parâmetro indica a posição da dupla ligação e triacilgliceróis e ácidos graxos insaturados.

O éster (*Z*)-icos-13-enoato de 2,3-diidroxipropila é encontrado em misturas de óleos e ácidos graxos encontrados em diversas plantas, tais como *Moringa oleifera* (Vlahov et al., 2002). Entretanto, esta é a primeira vez que tal composto é isolado de uma espécie do gênero *Vismia*. Não são encontrados na literatura dados sobre a atividade de tal substância frente a diferentes pragas e doenças.

TABELA 6 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (*s*: simpleto; *d*: duplete; *t*: tripleto; *dd*: duplo duplete; *ddl*: duplo duplete largo; *quint*: quinteto, *m*: multiplete) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz, obtidos em CDCl₃ por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono treze (¹³C) da fração RC1-89-05 e do (*Z*)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila (Liu et al., 2006; Vlahov et al., 2002).



	RC1-89-05	(<i>Z</i>)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila	RC1-89-05	(<i>Z</i>)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila
C	¹H	¹H Ref.	¹³C	¹³C Ref.
1	4,19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,8; 11,6 Hz)	4,22 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5; 11,5 Hz) ¹		
	4,16 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,0; 11,6 Hz)	4,16 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,5; 11,5 Hz) ¹	65.1 (CH ₂)	
2	3,93 (1H, <i>m</i>)	3,94 (1 H, <i>m</i>) ¹	70.2 (CH)	
3	3,69 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0; 11,6 Hz)	3,70 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0; 11,0 Hz) ¹		
	3,59 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,0; 11,6 Hz)	3,61 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,0; 11,0 Hz) ¹	63.3 (CH ₂)	
1'			174.3 (C)	173.3 ²
2'	2,34 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 7,0 Hz)	2,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz) ¹	34.1 (CH ₂)	34.0 ²
3'	1,62 (2H, <i>ddl</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	1,64 (2H, <i>quint</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz) ¹	24.9 (CH ₂)	24.8 ²
4'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.22 (CH ₂)*	n.f.a
5'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.74 (CH ₂)*	n.f.a

...continua...

“TABELA 6, Cont.”

6'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.67 (CH ₂) [*]	n.f.a
7'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.63 (CH ₂) [*]	n.f.a
8'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.58 (CH ₂) [*]	n.f.a
9'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.50 (CH ₂) [*]	n.f.a
10'	2,00 (4H, <i>m</i>)	2,01 (4H, <i>m</i>) ¹	27.2 (CH ₂)	27.2 ²
11'			129.9 (CH)	129.9 ²
12'	5,34 (2H, <i>m</i>)	5,36 (2H, <i>m</i>) ¹	129.8 (CH)	129.8 ²
13'	2,00 (4H, <i>m</i>)	2,01 (4H, <i>m</i>) ¹	27.2 (CH ₂)	27.2 ²
14'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.29 (CH ₂) [*]	n.f.a
15'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.25 (CH ₂) [*]	n.f.a
16'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.46 (CH ₂) [*]	n.f.a
17'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	29.40 (CH ₂) [*]	n.f.a
18'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	31.9 (CH ₂)	31.9 ²
19'	1,26 (24H, <i>m</i>)	1,26-1,36 (<i>m</i>) ¹	22.7 (CH ₂)	22.7 ²
20'	0,87 (3H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6.8, 6.8 Hz)	0,87 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz) ¹	14.1 (CH ₃)	14.1 ²

* Intercambiáveis; ¹ Liu et al., 2006, ²Vlahov et al., 2002; n.f.a.- não fornecido pelo autor

6.3 Teste de oviposição

Observou-se em testes preliminares realizados com vários extratos vegetais para a seleção daqueles ativos contra o bicho mineiro do cafeeiro, que aquele proveniente de *V. brasiliensis* reduzia a oviposição do referido inseto em folhas de cafeeiro. De fato, ao se repetir o teste com o extrato bruto, observou-se grande redução na oviposição do inseto (Tabela 7) que, aparentemente, se deu em decorrência da presença da actinoquinona na sua composição.

TABELA 7 Efeito do extrato das folhas de *Vismia brasiliensis* sobre a oviposição de *Leucoptera coffeella*.

Tratamentos	Ovos nas folhas tratadas (%) [*]
Lorsban (testemunha positiva)	0,0 ^A
Extrato vegetal	33,8 ^B
Tween 80 (testemunha negativa)	59,4 ^C

*-Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente segundo o teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de significância.

Segundo trabalho desenvolvido no Grupo de Pesquisas de Produtos Naturais do DQI/UFLA, a substância actinoquinona, isolada tanto de *Vismia brasiliensis* quanto de *Actinostemon concolor*, apresentou atividade de inibição de oviposição de bicho mineiro idêntica a observada para Lorsban[®], que se trata de um inseticida de uso comercial (Paula, 2007). Este resultado indica que a atividade de *V. brasiliensis* contra o bicho mineiro possa ser devido à presença desta substância na composição do extrato metanólico de suas folhas. Novos testes deverão ser realizados para investigar a potencial utilização da actinoquinona no controle do bicho mineiro do cafeeiro.

7 CONCLUSÃO

Um estudo inicial permitiu verificar a atividade do extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* na oviposição do bicho mineiro do cafeeiro em folhas de cafeeiro.

O estudo fitoquímico da fração do extrato solúvel em hexano das folhas de *Vismia brasiliensis* levou à purificação e identificação parcial de uma diidronaftoquinona e de um éster monoacílico do glicerol, sendo que uma substância idêntica ou análoga a primeira é responsável por parte da atividade inseticida do extrato metanólico das folhas de *Actinostemon concolor* contra o bicho mineiro do cafeeiro. Portanto esta substância também deve ser responsável por parte da atividade inseticida do extrato metanólico das folhas de *V. brasiliensis*.

Estudos futuros deverão ser realizados com o objetivo de elucidar totalmente as estruturas das substâncias mencionadas e de avaliar melhor a eficiência das mesmas e do extrato bruto de *V. brasiliensis* no controle do referido inseto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOERS, R.B.; RANDULFE, Y.P.; HASS, H.N.S. van der; ROSSUN-BAAN, M. van; LUGTENBURG, M. Synthesis and spectroscopical characterization of 1-¹³C- and 4-¹³C-plastoquinone-9. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 13, n. 12, p. 2094-2108, July 2002.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO CAFÉ. **Sistema de banco de dados de planilhas com informação sobre café**. São Paulo, 2009. Disponível em <<http://www.cicbr.org.br>> Acesso em: 11 mai.2009.

HERNÁNDEZ, C.R.; VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 72, n. 3, p. 305-318, jun. 1997.

LIU, Y.; JUNG, J.H.; JI, H.; ZHANG, S. Glycerolipids from a *Sarcotragus* species sponge. **Molecules**, Basel, v. 11, n. 4, p. 714-719, Apr. 2006.

MORAES, J.C. **Pragas do cafeeiro: importância e métodos alternativos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 45 p.

PAULA, P. **Estudo fitoquímico de plantas ativas contra o bicho mineiro do cafeeiro**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

REIS JUNIOR, R.; LIMA, E.R.; VILELA, E.F.; BARROS, R.S. Method for maintenance of coffee leaves in vitro for mass rearing of *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera:Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 29, n. 6, p. 849-854, set. 2000.

REIS, P.R. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. In: FERNANDES, O.A.; CORREA, A.C.B.; BORTOLI, S.A. (Ed.). **Manejo integrado de pragas e nematóides**. Jaboticabal: Funep, 1990. p. 39-57.

REIS, P.R.; SOUZA, J.C.; MELLES, C.C.A. Pragas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 109, p. 2-57, set. 1984.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometric**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Apr. 1974.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L.O. **Bicho mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. Belo Horizonte: Epamig, 1998. 48 p.

VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Pacific Grove, v. 35, n. 4, p. 341-357, Dec. 1999.

VLAHOV, G.; CHEPKWONY, P.K.; NDALUT, P.K. ¹³C NMR characterization of *Moringa oleifera* seed oil: an "Oleic-Vaccenic Acid" oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 5, p. 970-975, Feb. 2002.

CAPÍTULO 4

FLAVONÓIDES ISOLADOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM METANOL DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Vismia brasiliensis* CHOISY (CLUSIACEAE)

1 RESUMO

Como algumas plantas do gênero *Vismia* são conhecidas por apresentarem atividade antibacteriana e antifúngica, o extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae) foi testado contra as bactérias *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e contra o fungo *Aspergillus ochraceus*. Como o extrato se mostrou ativo contra *A. hydrophila*, *B. subtilis* e *A. ochraceus*, e geralmente a fração solúvel em metanol de extratos vegetais possui vários flavonóides, que são substâncias conhecidas por apresentarem atividade contra fungos e bactérias, realizou-se um estudo fitoquímico desta fração para se isolar as substâncias presentes em *V. brasiliensis* responsáveis por suas atividades antifúngicas e antibacterianas. Consequentemente, isolaram-se três flavonóides: epicatequina, vitexina e a quercitrina, sendo todos conhecidos por possuírem atividade antibacteriana. Como tais substâncias também se mostraram ativas contra *A. ochraceus*, foram consideradas responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *V. brasiliensis*.

**FLAVONOIDS ISOLATED FROM THE METHANOL SOLUBLE
FRACTION OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *VISMIA
BRASILIENSIS* CHOISY (CLUSIACEAE) LEAVES**

2 ABSTRACT

Due to the antibacterial and antifungal activities presented by plant species of the *Vismia* genus, the methanolic extract of leaves from *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae) was tested against the bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and the fungus *Aspergillus ochraceus*. Since the extract was active against *A. hydrophila*, *B. subtilis* and *A. ochraceus*, and the methanolic soluble fraction of plant extracts usually contains flavonoids, which are well-known by their activities against fungi and bacteria, a phytochemical study was carried out in order to isolate the antifungal and antibacterial substances present in *V. brasiliensis*. Consequently, three flavonoids with antibacterial activities previously described in the literature were isolated: epicatechin, vitexin and quercitrin. Since these substances also showed activity against *A. ochraceus*, the antimicrobial activity of the *V. brasiliensis* extract was attributed to such flavonoids

3 INTRODUÇÃO

Apesar de haver várias classes antimicrobianos disponíveis para uso agrônomico e farmacológico, muitas doenças vêm tornando-se de difícil controle. Entre as causas deste problema está o uso incorreto de antimicrobianos que pode, por exemplo, acarretar o surgimento de organismos resistentes aos produtos atualmente disponíveis. O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural, sendo acentuado pelo uso desmedido e irracional dos produtos. A resistência bacteriana é preocupação mundial e, dentre as medidas que devem ser tomadas para evitá-la ou diminuí-la, está o desenvolvimento de novos antibacterianos (Wannmacher, 2004).

Como as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, tem-se nos produtos de origem vegetal uma fonte importante de várias estruturas químicas como alcalóides, saponinas, flavonóides e taninos. Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte das substâncias ativas permanece sendo obtida a partir de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade em se obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, seja pela inviabilidade econômica (Calixto, 2000).

Consequentemente, buscou-se contribuir para o desenvolvimento de novos antimicrobianos a partir do estudo do extrato de *Vismia brasiliensis* Choisy, já que, apesar de outras espécies do mesmo gênero terem apresentado atividades contra bactérias e fungos, não havia relato de atividade antibacteriana ou antifúngica por parte de tal planta. Em decorrência, inicialmente se testou a atividade do extrato metanólico das folhas de *V. brasiliensis* contra alguns microorganismos de importância agrônômica e farmacológica e, a seguir, e realizou-se um estudo fitoquímico da fração solúvel em metanol do extrato bruto.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. São onipresentes em células fotossintetizantes e podem ser comumente encontrados em frutas, folhas, sementes, talos, chás, vinhos, própolis e mel. Por séculos, preparações nas quais estes compostos são os principais constituintes ativos fisiologicamente têm sido usadas para o tratamento de várias pragas e moléstias. Conseqüentemente, essa classe de produtos naturais se tornou alvo de muitas pesquisas com vistas ao desenvolvimento de novos fármacos, o que resultou na identificação de vários flavonóides com atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana. Para exemplificar se pode citar o trabalho de Rao et al. (2007), que isolaram das raízes de *Saussurea lappa* (Decne.) Sch. Bip. diversos flavonóides glicosilados com atividade contra *Aspergillus ochraceus*, fungo responsável pela contaminação de grãos de café com ocratoxinas, substâncias neurotóxicas. Já Lu et al. (2002) isolaram das partes aéreas de *Hypericum perforatum* L. os flavonóides quercitrina, rutina, kaempferol, entre outros, que apresentaram atividade contra *Helminthosporium sativum*, fungo causador da sarna prateada na batata. Tal praga desenvolveu resistência contra o principal fungicida comercial, o benztiazol, elevando a sarna prateada ao nível de principal doença no cultivo da batata. Também trabalhando com fungos que atacam o cultivo da batata, Chiruvella et al. (2007) observaram que o flavonóide glicosilado luteolin-7-O-glicosídeo se mostrou ativo contra *Alternaria alternata*, que se trata de um fungo responsável por doenças em várias culturas. A galantangina, um flavonol comumente encontrado em amostras de própolis, mostrou atividade inibidora contra *Aspergillus tamaru*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (Afolayan & Meyer, 1997).

Existem também diversos estudos sobre a atividade de flavonóides contra bactérias. No trabalho de Kuete et al. (2008), com *Ficus chlamydocarpa* Mildbr. & Burret e *F. cordata* Thunb., por exemplo, foram isolados, entre outros compostos, os flavonóides genisteína, luteolina e catequina. Todos estes compostos foram ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Já Rigano et al. (2007), comprovaram o efeito de quercetina-3-*O*- β -D-rutinosídeo, narigenina-7-*O*- β -D-glucosídeo e kaempferol-3-*O*- β -D-rutinosídeo, extraídos de *Marrubium globosum* Montbr. Et Auch. Ex Benth como os principais agentes antibacterianos desta planta, que se mostrou ativa contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas syringae*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais e equipamentos utilizados

A não ser quando mencionado de outra forma no texto, hexano, acetato de etila, metanol e ácido acético eram de grau analítico (P.A.), enquanto a água empregada foi destilada. Nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) se empregou a resina de poliestireno Amberlite XAD-16 (Sigma-Aldrich) e sílica-C18 (Phenomenex). No fracionamento por CC utilizando sílica-C18 foram utilizados água (H₂O) ultrapura do tipo I e solventes de grau CLAE-UV: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e ácido acético (AcOH). As análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em aparelho semi-preparativo da marca Shimadzu, equipado com detector de UV-visível do tipo DAD SPD-M20A, com duas bombas LC-6AD, injetor manual do tipo Rheodyne 7725i, coluna de sílica-C18 Phenomenex Gemini[®] semi-preparativa (21,2 mm x 250 mm x 5 μm) e analítica (4,6 mm x 250 mm x 5 μm). Para tanto, empregou-se água (H₂O) ultrapura do tipo I e os solventes de grau CLAE-UV acima mencionados.

5.2 Fracionamento da fração solúvel em metanol (RC1-07-02)

5.2.1 Fracionamento de RC1-07-02 por cromatografia líquida em coluna de resina de poliestireno Amberlite XAD-16

A fração do extrato bruto solúvel em metanol (RC1-07-02), obtida do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto de *V. brasiliensis* (ver item 5.4 do capítulo 2), foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna com 5,0 x 20,0 cm de Amberlite XAD-16. Para tanto, 8,07 g de amostra foram solubilizados em 50 mL de metanol e colocou-se a solução resultante em balão de fundo redondo de 250 mL contendo 16,0 g de Amberlite XAD-16. A mistura obtida foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório.

O resíduo final foi adicionado ao topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passados 500 mL de água, 500 mL de metanol, 500 mL de acetato de etila e 500 mL de hexano/acetato de etila 3:1. Coletaram-se 4 frações de 500 mL que foram concentradas e liofilizadas por 48 horas (RC1-45-02 a RC1-45-05, Tabela 1 do item 6.1.1).

5.2.2 Análise em CLAE-DAD da fração RC1-45-03.

A fim de se verificar o perfil cromatográfico da fração RC1-45-03, realizou-se análise em CLAE-DAD com o uso da coluna analítica. Para tanto, RC1-45-03 (5,0 mg) foi dissolvida em 10 mL de água contendo 0,1 % de ácido acético, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 0,5 mg/mL de material. Foram injetados 20 µL da amostra. Realizou-se um gradiente exploratório, com fluxo de 0,75 mL/min, de MeOH 0% por 3 minutos; MeOH 0 % à MeOH 100 % em 27 minutos; e MeOH 100 % por 10 minutos (item 6.1.2).

5.2.3 Fracionamento de RC1-45-03 por cromatografia líquida em coluna de sílica-C18

A fração RC1-45-03 foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna com 5,0 x 15,0 cm de sílica-C18. Para tanto, 1,85 g de amostra foram dissolvidos em 5,0 mL de uma solução de metanol/água 20:80 contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. Esta solução foi então adicionada ao topo da coluna, através da qual, com velocidade linear aproximada de 5,1 cm/min, foram passadas soluções de metanol/água contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético (20:80, 300 mL; 50:50, 300 mL; 80:20, 200 mL) e 200 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético. Coletaram-se 23 frações de 50 mL, que foram agrupadas conforme semelhança após análise de seu perfil cromatográfico por CLAE-DAD com o uso da coluna analítica. As soluções obtidas foram concentradas e liofilizadas por 48 horas, resultando em 10 frações (RC1-129-01 a RC1-129-10, Tabela 2 do item 6.1.3).

5.2.4 Fracionamento de RC1-129-03 em CLAE-DAD preparativo

Após ajuste das condições em CLAE-DAD com o uso da coluna analítica, a fração RC1-129-03 foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna semi-preparativa e combinações de metanol/água contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, com fluxo de 15 mL/min, como eluente: MeOH 35 % por 10 minutos; MeOH 35 % a MeOH 100 % em 0,10 minutos; e MeOH 100 % por 15 minutos. Para tanto, RC1-129-03 (497,9 mg) foi dissolvida em 10 mL de solução aquosa de MeOH/H₂O (35:65), contendo 0,1 % de ácido acético, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 49,8 mg/mL de material. Foram coletadas 3 frações (RC1-129-03-01 a RC1-129-03-03, Tabela 11 do item 6.1.4), sendo que, após análise em CLAE-DAD (coluna analítica, MeOH 10 % por 3 minutos; MeOH 10 % a MeOH 100 % em 17 minutos; MeOH 100 % por 10 minutos; todos os eluentes com 0,1 % (v/v) de ácido acético; fluxo de 0,75 mL/minuto; varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm), a amostra RC1-129-03-02 foi considerada pura e submetida às análises por métodos espectrométricos.

5.2.5 Fracionamento de RC1-129-06 em CLAE-DAD preparativo

Após ajuste das condições em CLAE-DAD equipado com a coluna analítica, a fração RC1-129-06 foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna semi-preparativa e combinações de metanol/água contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, com fluxo de 15 mL/min, como eluente: MeOH 50 % por 11 minutos; MeOH 50 % a MeOH 100 % em 0,10 minutos; e MeOH 100 % por 9 minutos. Para tanto, RC1-129-06 (97,5 mg) foi dissolvida em 10 mL de solução aquosa de MeOH/H₂O (45:55), contendo 0,1 % de ácido acético, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 9,8 mg/mL de material. Foram coletadas 6 frações (RC1-129-06-01 a RC1-129-06-06, Tabela 3 do item 6.1.6), sendo que, após análise em CLAE-DAD (coluna analítica; MeOH 45 %

por 15 minutos; MeOH 45 % à MeOH 100 % em 0,1 minutos; MeOH 100 % por 10 minutos; todos os eluentes contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético; fluxo de 0,75 mL/minuto; varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm) a amostra RC1-129-06-03 foi considerada pura e submetida às análises por métodos espectrométricos.

5.2.6 Fracionamento de RC1-129-08 em CLAE-DAD preparativo

Após o ajuste das condições em CLAE-DAD com o uso da coluna analítica, a fração RC1-129-08 foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se a coluna semi-preparativa e metanol/água 65:35 contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético, com fluxo de 15 mL/min, como eluente. Para tanto, RC1-129-08 (111,1 mg) foi dissolvida em 10 mL de solução aquosa de MeOH/H₂O (65:35), contendo 0,1 % de ácido acético, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 11,1 mg/mL de material. Foi coletada uma fração (RC1-129-08-01), sendo que, após análise por CLAE-DAD (coluna analítica; MeOH 65 % contendo 0,1 % (v/v) de ácido acético por 20 minutos; fluxo de 0,75 mL/minuto; varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm), a amostra RC1-129-08-01 foi considerada pura e submetida às análises por métodos espectrométricos.

5.3 Análises espectrométricas das substâncias isoladas

As elucidações estruturais das substâncias isoladas foram feitas por meio de espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de ultravioleta, cujos espectros correspondentes foram diretamente obtidos do CLAE-DAD.

5.3.1 Espectrometria de massas

Foram feitas análises no modo positivo e no modo negativo, do tipo MS¹, MS² e MS³, em aparelho Agilent 1100 LC/MS Trap equipado com

interface do tipo *electrospray* (EM-ES). Cerca de 0,5 mg das substâncias isoladas foram dissolvidos em 1 mL de metanol contendo 0,1 % de ácido acético. Injetaram-se 20 µL diretamente na interface com fluxo de 0,5 mL/minutos. A pressão do nebulizador (N₂) era de 15 psi (*pound-force per square inch*), enquanto o fluxo e a temperatura do gás de secagem (N₂) eram mantidos em 10 L/minutos e 300 °C. A voltagem da agulha foi de 3500 V.

5.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises por RMN foram realizadas em espectrômetro Bruker DRX400 Avance, operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. As substâncias foram dissolvidas em DMSO-*d*₆ e colocadas em tubos de RMN de 5 mm. Realizaram-se experimentos unidimensionais e bidimensionais, empregando-se os picos dos solventes como referência: δ_H 2,50 ppm e δ_C 39,43 ppm.

5.4 Teste de verificação da atividade antibacteriana do extrato bruto de *V. brasiliensis* (RC1-04-01)

Para a realização do trabalho foram empregados quatro isolados obtidos da American Type of Culture Collection (ATCC): *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Inicialmente, tais bactérias foram espalhadas em meio TSA, contido em placas de Petri. Após 24 horas a 28 °C, transferiu-se uma colônia de cada bactéria para tubo contendo uma solução formada por 10 mL de caldo Müller-Hilton (Becton Dickison, lote 41404193) enriquecido com solução aquosa de MgCl₂.6H₂O (0,8 g/mL) e CaCl₂.2H₂O (0,7 g/mL). Após 24 horas a 37 °C, as suspensões resultantes foram diluídas com água destilada estéril até alcançarem o valor de 0,5 da escala MacFarland, que era equivalente à 1x10⁸ UFC/mL. 0,1 mL de cada suspensão resultante foi adicionada a 0,9 mL de caldo Müller-Hilton suplementado com cátions

divalentes conforme mencionado acima, e se utilizaram as suspensões finais nos experimentos.

Dissolveu-se o extrato (20 mg) em 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido P.A.) durante 40 minutos e, a seguir, adicionaram-se 6 µL da solução resultante a 184 µL de caldo Müller-Hilton suplementado com os cátions divalentes, que estavam contidos nas cavidades da primeira coluna de uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Nas colunas de 2 a 7 foram colocados 95 µL do caldo suplementado com os cátions e se transferiram 95 µL das cavidades da primeira para as da segunda coluna. Após homogeneizar os conteúdos das cavidades da segunda coluna, 95 µL de cada uma delas foram transferidos para a terceira coluna e se repetiu o processo até a sétima coluna. A seguir, adicionaram-se 5 µL de cada suspensão bacteriana a 1×10^7 UFC/mL (uma bactéria por linha) e se manteve a placa a 37 °C durante 24 h. A menor concentração do extrato que não permitia o crescimento bacteriano, segundo avaliação visual, foi denominada concentração inibitória mínima (CIM). Para facilitar tal avaliação, adicionaram-se 25 µL de solução aquosa de cloridrato de trifeniltetrazolium (Sigma) a 2 mg/mL ao conteúdo de cada cavidade, para que aquelas sem a presença de bactérias ativas apresentassem coloração rosada após cinco minutos.

Os experimentos foram realizados em duplicata, tendo DMSO e cloranfenicol (Sigma) a 400 µg/mL em caldo Müller-Hilton como testemunhas negativa e positiva, respectivamente. Para esterilizar a solução de cloranfenicol passou-se a mesma por membrana de 0,22 µm (Milipore, 25 mm de diâmetro, hidrofílica). Além disso, em uma fileira se empregou apenas o meio de cultura e em outra a solução do extrato e meio de cultura sem qualquer adição de antibiótico ou das suspensões de bactéria. Como nenhum crescimento microbiano foi observado nas cavidades correspondentes, ficou claro que não estava havendo contaminações do experimento com outros microrganismos.

Imediatamente após a supracitada avaliação, transferiram-se 100 µL do conteúdo de cada cavidade para placa de Petri contendo meio de cultura soja-triptcaseína-ágar (TSA, Merck) e espalhou-se o líquido com o uso de alça de Drigalski. Após 24 h a 37 °C, avaliou-se o experimento por observação visual. A menor concentração de cada amostra na cavidade que evitou o crescimento bacteriano no meio TSA foi denominada concentração bactericida mínima (CBM).

5.5 Teste da atividade do extrato bruto de *V. brasiliensis*, da fração solúvel em metanol (RC1-07-02) e das substâncias isoladas da mesma contra o fungo *Aspergillus ochraceus*

O extrato (2 mg) e as substâncias isoladas (0,5 mg) foram dissolvidos em 500 µL de uma solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹), resultando em soluções das quais se removeram alíquotas de 200µL para serem misturadas a 40 µL de uma suspensão de esporos de *A. ochraceus* a 5,0 x 10⁶ esporos/mL. Nas cavidades de placa Elisa de 96 cavidades, previamente esterilizada e carregada com 200 µL de meio de cultura CYA autoclavado (500 mL de água destilada, 0,5 g de K₂HPO₄, 5 mL de concentrado Czapeck, 0,5 mL de solução de metais Czapeck, 2,5g de extrato de levedura, 15 g de sacarose e 7,5 g de Agar bacteriológico) em cada cavidade, foram acrescentados 20 µL das suspensões de amostras a serem avaliadas mais os esporos. Após 48 horas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, em uma câmara de germinação artificial, as amostras que preveniram o crescimento fúngico segundo avaliação visual foram consideradas ativas. Este experimento foi realizado em duplicata, usando solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g/mL) como controle negativo e solução aquosa de cloreto de benzalcônio a 1,0 g/mL como controle positivo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fracionamento da fração solúvel em metanol (RC1-07-02)

6.1.1 Fracionamento de RC1-07-02 por cromatografia líquida em coluna de resina de poliestireno Amberlite XAD-16

Dentre as várias frações obtidas após eluição de RC1-07-02 (Tabela 4) através de coluna de Amberlite XAD-16, conforme descrito no item 5.2.1, optou-se por não trabalhar com a denominada RC1-45-02 (fração aquosa, Tabela 1), pois segundo a experiência adquirida pelo Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais do DQI/UFLA com o estudo de outras plantas, a maior parte do conteúdo de tal fração deveria ser composta por carboidratos, que não eram o alvo do presente trabalho. Dentre as outras frações, a de código RC1-45-03 apresentava a maior massa, sendo por isto, submetida à análise cromatográfica em CLAE-DAD com a coluna analítica conforme descrito no item 5.2.2.

TABELA 1 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de resina de poliestireno-divinilbenzeno Amberlite XAD-16 da fração solúvel em metanol (RC1-07-02).

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
Água	RC1-45-02	1257,9
Metanol	RC1-45-03	1978,9
acetato de etila	RC1-45-04	602,0
Hexano/ Acetato de etila (3:1)	RC1-45-05	214,8

6.1.2 Análise em CLAE-DAD analítico da fração RC1-45-03

Observou-se a presença de várias substâncias (Figura 1) com o perfil de flavonóides segundo os espectros de ultravioleta obtidos. Em decorrência, procedeu-se a novo fracionamento conforme descrito nos itens 3.2.2 e 3.2.3. Como a massa da fração era muito elevada para a coluna semi-preparativa disponível para o fracionamento em CLAE-DAD, optou-se pela realização de um fracionamento em coluna de sílica-C18 em bancada.

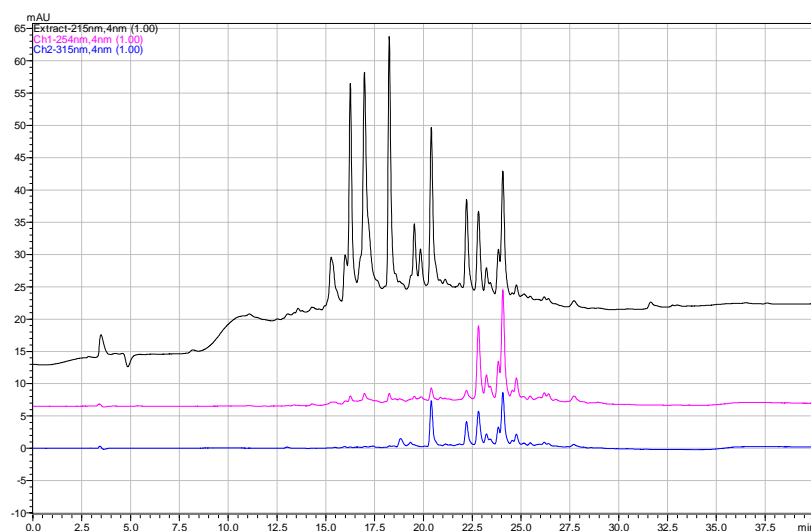


FIGURA 1 Cromatograma da fração RC1-45-03, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 0 % 3 min, MeOH 0 % → MeOH 100 % 27 min, MeOH 100 % 10 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.1.3 Fracionamento de RC1-45-03 por cromatografia líquida em coluna de sílica-C18

Análises em CLAE-DAD das frações provenientes do fracionamento por cromatografia em coluna de RC1-45-03 (item 5.2.3; Tabela 2) permitiram observar que aquelas denominadas RC1-129-03, RC1-129-06 e RC1-129-08 possuíam boas relações massa/complexidade, tendo sido submetidas a novos fracionamentos conforme descrito nos itens 5.2.4, 5.2.5 e 5.2.6.

TABELA 2 Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-C18 da fração RC1-45-03

Fração eluída da coluna	Código da fração resultante	Massa (mg)
3-5	RC1-129-01	133,2
6-8	RC1-129-02	20,1
9	RC1-129-03	497,9
10	RC1-129-04	362,2
11	RC1-129-05	121,3
12-13	RC1-129-06	97,5
14	RC1-129-07	55,9
15-17	RC1-129-08	111,1
18-20	RC1-129-09	269,3
21-23	RC1-129-10	28,0

6.1.4 Fracionamento de RC1-129-03 em CLAE-DAD preparativo

Tendo como objetivo principal purificar as substâncias correspondentes aos picos com tempos de retenção de 11 min e 16,5 min (Figura 2), submeteu-se a fração RC1-129-03 a fracionamento em CLAE-DAD preparativo, sendo obtido o cromatograma mostrado na Figura 3.

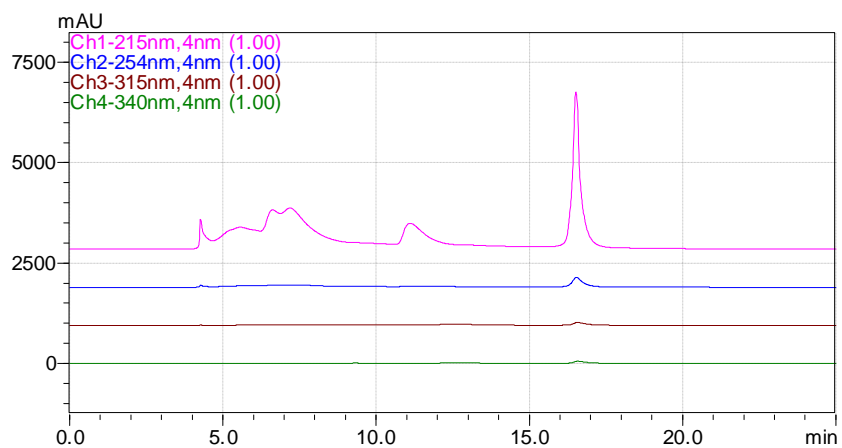


FIGURA 2 Cromatograma da fração RC1-129-03, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 35 % 10 min, MeOH 35 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 15 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

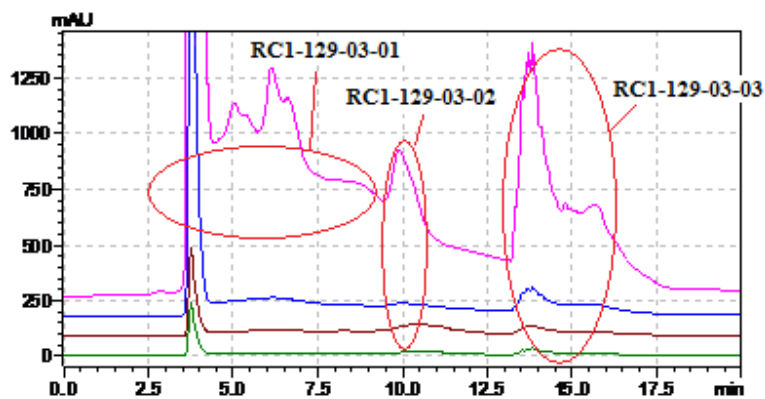


FIGURA 3 Cromatograma da fração RC1-129-03, obtido durante fracionamento em CLAE-DAD equipado com coluna semi-preparativa de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 35 % 10 min, MeOH 35 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 15 min. Fluxo: 15 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

Dentre as três frações obtidas, ficou claro no cromatograma (Figura 3) que a primeira e a última fração não se tratavam de substâncias puras. Já aquela denominada RC1-129-03-02, com massa apresentada na Tabela 3, foi analisada em CLAE-DAD com coluna analítica, o que permitiu observar a presença de apenas um pico no cromatograma correspondente (Figura 4).

TABELA 3 Dados obtidos para as frações da amostra RC1-129-03

Código	Fração	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
RC1-129-03-01	1	3,48-7,50	114,3
RC1-129-03-02	2	7,50-10,83	16,1
RC1-129-03-03	3	16,66-18,26	334,6

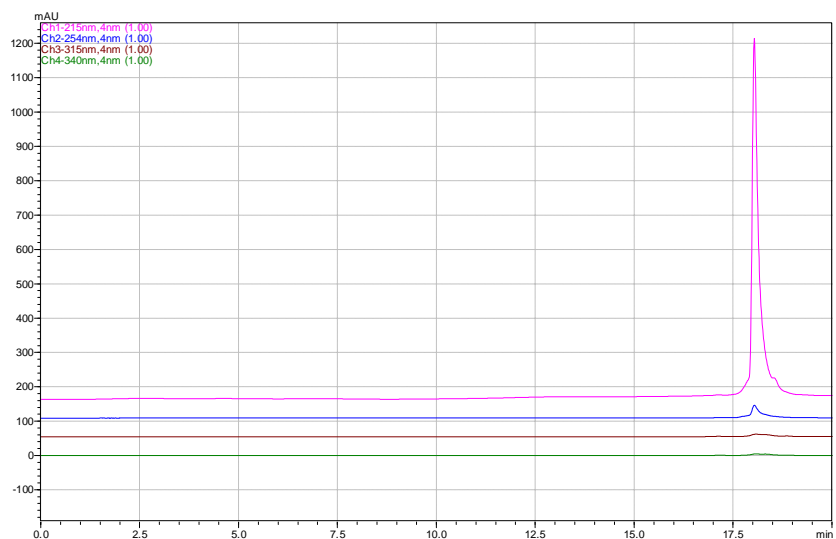


FIGURA 4 Cromatograma da fração RC1-129-03-02, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 10% 3 min, MeOH 10% → MeOH 100% 17 min, MeOH 100% 5 min. Fluxo: 0,75 mL/min. λ monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.1.5 Fracionamento de RC1-129-06 em CLAE-DAD preparativo

Apesar da fração RC1-129-06 não ter sido a de maior massa durante o fracionamento de RC1-45-03, o seu perfil cromatográfico (Figura 5) era bastante simples, o que motivou o seu fracionamento em CLAE-DAD. Os alvos principais eram as substâncias correspondentes aos picos em 9 min e 11 min (Figura 5). Inicialmente, pensou-se também na possibilidade de se isolar as substâncias correspondentes aos picos em 4 min e 21 min, mas como pode ser observado no cromatograma obtido durante o fracionamento (Figura 6), o último pico parecia devido a mais de uma substância, o que também foi verificado para o pico em 11 min. Já para o primeiro pico, a massa de material correspondente era muito pequena (Tabela 4). Apesar da massa ser menor que a esperada, a fração

RC1-129-06-03 (Tabela 4) se mostrou pura segundo análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica (Figura 7).

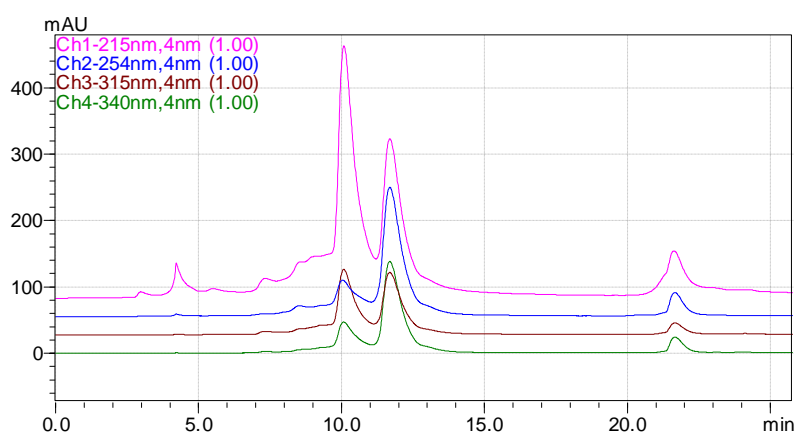


FIGURA 5 Cromatograma da fração RC1-129-06, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 50 % 11 min, MeOH 50 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 9 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

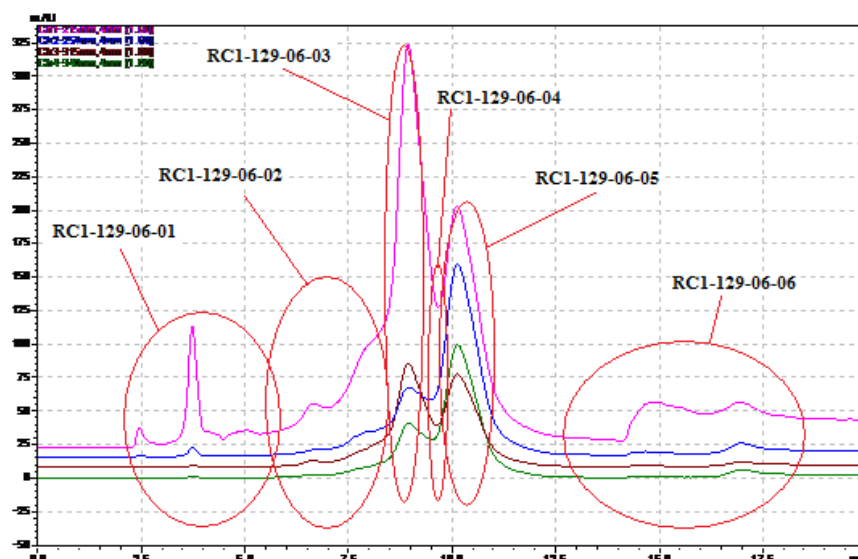


FIGURA 6 Cromatograma da fração RC1-129-06, obtido durante fracionamento em CLAE-DAD equipado com coluna semi-preparativa de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 50 % 11 min, MeOH 50 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 9 min. Fluxo: 15 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

TABELA 4 Dados obtidos para as frações da amostra RC1-129-06

Código	Fração	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
RC1-129-06-01	1	2.39-5.25	2,5
RC1-129-06-02	2	5.25-8.63	18,3
RC1-129-06-03	3	8.63-9.12	4,6
RC1-129-06-04	4	9.12-9.63	18,6
RC1-129-06-05	5	9.63-10.78	3,2
RC1-129-06-06	6	12.48-18.94	48,4

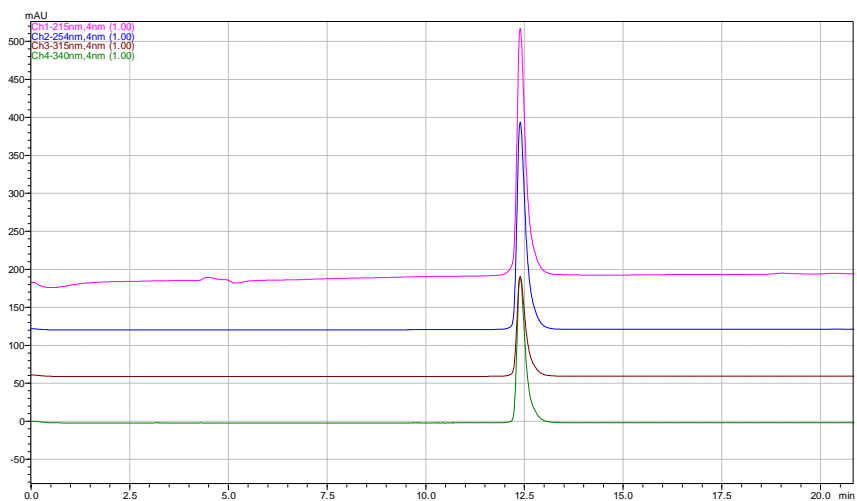


FIGURA 7 Cromatograma da frações RC1-129-06-03, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 45 % 15 min, MeOH 45 % → MeOH 100 % 0,1 min, MeOH 100 % 10 min. Fluxo: 0,75 mL/min. λ monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.1.6 Fracionamento de RC1-129-08 em CLAE-DAD preparativo

Ao se fracionar a fração RC1-129-08 o alvo principal era a substância correspondente ao pico em 6,5 min (Figura 8), que já parecia corresponder a grande parte da fração. Para tanto, fizeram-se várias injeções sequenciais no CLAE-DAD e coletou-se sempre o pico de maior intensidade (Figura 9).

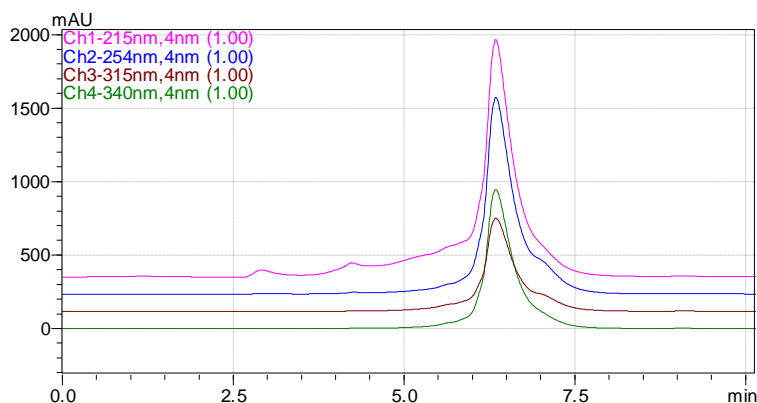


FIGURA 8 Cromatograma da fração RC1-129-08, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Gradiente MeOH/H₂O: MeOH 65 % 15 min, MeOH 65 % → MeOH 100 % 0,10 min, MeOH 100 % 10 min. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

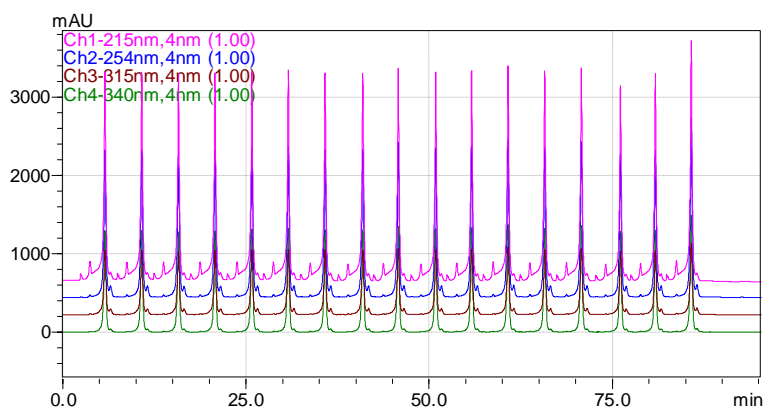


FIGURA 9 Cromatograma da fração RC1-129-08, obtido durante o seu fracionamento em CLAE-DAD equipado com coluna semipreparativa de sílica-C18. Isocrática MeOH/H₂O: MeOH 65 % 11 min. Fluxo: 15 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm. Foram feitas injeções da amostra a cada 2,5 minutos.

Por se mostrar pura segundo análise em CLAE-DAD (Figura 10), a fração RC1-129-08-01, com massa de 40,7 mg, foi analisada pelo emprego de métodos espectrométricos.

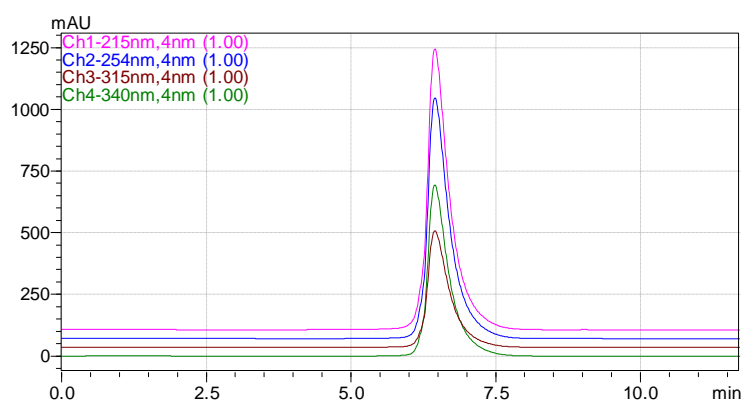


FIGURA 10 Cromatogramas da fração RC1-129-08-01, obtido durante análise em CLAE-DAD equipado com coluna analítica de sílica-C18. Isocrática MeOH/H₂O: MeOH 65 %. Fluxo: 0,75 mL/min. Comprimentos de onda monitorados: 215, 254, 315 e 340 nm.

6.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias isoladas da fração solúvel em metanol do extrato metanólico de *V. brasiliensis*, RC1-129-03-02, RC1-129-06-03 e RC1-129-08-01, foram analisadas por espectrometria de massas (EM) e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C, conforme descrito nos itens 5.3.2 e 5.3.3.

6.2.1 Elucidação estrutural da fração RC1-129-03-02 (epicatequina)

No espectro de massas obtido no modo positivo (Figura 102A, página 229) foi observado um pico em m/z 291 dalton, que foi atribuído a $[M+H]^+$.

Verificou-se também que o íon podia ser fragmentado para gerar quatro sinais. Um deles, em m/z 279 dalton, correspondia a perda de 18 dalton, que foi atribuída a perda de uma molécula de água. Os outros três fragmentos, com m/z 165, 139 e 123 dalton, eram coerentes com os dados da literatura para a fragmentação dos flavonóides epicatequina e catequina (Ek et al., 2006). Estes dados eram semelhantes aos encontrados para a fração RC1-117-02, identificada como epicatequina no item 4.4.3, do capítulo 2 da presente tese.

Tal como a epicatequina, a fração RC1-129-03-02 apresentava, no espectro de RMN de ^1H (Figura 89A, página 217), sinais em δ 6,85 ppm, δ 6,64 ppm, δ 5,89 ppm e δ 5,71 ppm, que foram atribuídos aos átomos de hidrogênios aromáticos (Tabela 5).

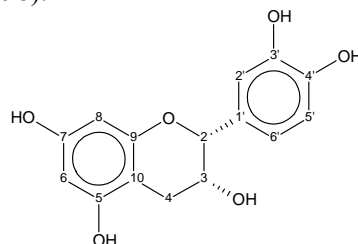
Os sinais dos átomos de hidrogênio das posições 2 e 3 do núcleo flavonóide são de extrema importância para diferenciar a epicatequina da catequina, pois para a primeira estes sinais se encontram em δ 4,74 ppm e δ 4,00 ppm respectivamente. Já para a catequina, encontram-se em δ 4,54 ppm e δ 3,52 ppm, respectivamente (Watanabe, 1998). Para o composto isolado, RC1-129-03-02, estes sinais se encontravam em δ 4,72 ppm e δ 4,00 ppm, indicando tratar-se da epicatequina.

Os resultados acima mencionados foram corroborados pelo deslocamento químico do carbono da posição 2 da amostra RC1-129-03-02 (76 ppm), pois segundo Souza et al. (2008) o mesmo átomo de carbono da catequina e da epicatequina tem deslocamento químico de 84 e 76 ppm, respectivamente.

A epicatequina é muito conhecida, tendo sido isolada de diferentes espécies. Como exemplo se pode citar *Vismia guianensis* (Aubl.) Seem. (Gonzales Gonzales et al., 1980), *Allanblackia monticola* Mildbr. Ex Engl. (Ngouela et al., 2005), *A. gabonensis* Bamps (Azebaze et al., 2008), *Calophyllum brasilienses* Cambess. (Pretto et al., 2004), *Mesua ferrea* L. (Singh et al., 1993) e *Vangueria infausta* Burch. (Mbukwa et al., 2007). Neste último

trabalho são mostrados dados que comprovam a atividade da epicatequina contra *Candida albicans* e *C. mycoderma*, além da atividade antioxidante desta substância (Mbukwa et al., 2007).

TABELA 5 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (*s*: simpleto; *d*: duplete; *t*: tripleto; *dd*: duplo duplete; *m*: multiplete) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz, obtidos em DMSO-*d*₆ por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono treze (¹³C) da fração RC1-129-03-02 e da epicatequina (Watanabe, 1998).



	RC1-129-03-02	Epicatequina	RC1-129-03-02		
	¹ H	¹ H Ref.	¹³ C		
				HMBC	
				COSY	
2	4,73 (1H, <i>sl</i>)	4,74 (1H, <i>s</i>)	78,1 (CH)	C2', C3', C6', C4	H4a, H4b
3	4,00 (1H, <i>sl</i>)	3,99 (1H, <i>m</i>)	64,9 (CH)	C4	H2, H4a, H4b
4a	2,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,4; 16,4 Hz,)	2,46-2,71 (2H, <i>m</i>)	28,2 (CH ₂)	C2	H3
4b	2,47 (*)	2,46-2,71 (2H, <i>m</i>)	28,2 (CH ₂)	C2	H3
5			156,2 (C)		
6	5,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	5,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	94,1 (CH)	C8	H8
7			155,8 (C)		
8	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	95,1 (CH)	C6	H6
9			156,5 (C)		
10			98,5 (C)		
1'			130,6 (C)		
2'	6,67 (2H, <i>m</i>)	6,68 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	114,8(CH)	C2, C3', C6'	
3'			144,4 (C)		
4'			144,5 (C)		
5'	6,90 (1H, <i>sl</i>)	6,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	114,9(CH)	C2, C2', C3'	
6'	6,67 (2H, <i>m</i>)	6,68 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	118,0 (CH)	C2, C3', C6'	

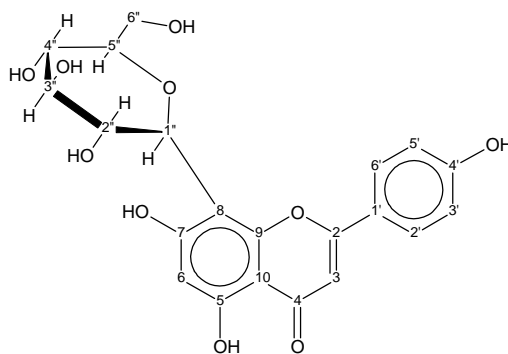
6.2.2 Elucidação estrutural da fração RC1-129-06-03 (vitexina)

No espectro de RMN de ^1H (Figura 105A, página 231) de RC1-129-06-03, dois sinais em δ 7,94 ppm (*d*, $J = 8,5$ Hz, H2' e H6') e δ 6,88 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H3' e H5') sugeriam um anel B de flavonóides tipo A_2B_2 . Além disso, dois simplesos observados em δ 6,66 ppm e δ 6,18 ppm foram atribuídos a átomos de hidrogênio nas posições 3 e 6 do núcleo do flavonóide, respectivamente. O sinal em δ 4,69 ppm foi atribuído ao hidrogênio anomérico da glicose. Notavam-se também, outros sinais que foram atribuídos a uma unidade glicosídica (Tabela 6).

No espectro de ^{13}C (Figura 108A, página 234), o carbono da carbonila foi detectado em δ 181,6 ppm, enquanto os outros sinais de carbonos sp^2 se encontravam entre δ 95,0 ppm e δ 165,0 ppm. Apesar dos sinais referentes aos deslocamentos dos carbonos 10, 6 e 1'', para a vitexina, não poderem ser observados no espectro de RMN de ^{13}C , eram nitidamente detectados nos experimentos bidimensionais de correlação a curta (HMQC) e longa distância (HMBC) entre ^1H e ^{13}C (Figuras 123A a 126A, páginas 247 a 250). Logo, todos os dados de RMN indicavam que a fração RC1-129-06-03 se tratava de um flavonóide C-glicosídico, com os seis sinais de carbono sp^3 da porção glicosídica fornecendo sinais em δ 81,6 ppm, δ 78,7 ppm, δ 73,4 ppm, δ 70,9 ppm, δ 70,5 ppm e δ 61,2 ppm.

Desse modo, a interpretação dos dados dos espectros de RMN levou à atribuição da estrutura do flavonóide glicosilado vitexina à substância isolada, o que estava em pleno acordo com os dados apresentados na literatura (Krafczyk & Glomb, 2008). Tais resultados foram corroborados pelas análises por espectrometria de massas (Figuras 116A e 117A, página 242), já que foram obtidos picos com m/z 431 dalton $[\text{M} - \text{H}]^-$ no modo negativo e m/z 433 dalton $[\text{M} + \text{H}]^+$ no modo positivo.

TABELA 6 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (s: simpleto; d: duplete; t: tripleto; dd: duplo duplete; m: multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hz, obtidos em DMSO- d_6 por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C) da fração RC1-129-06-03 e da vitexina (Krafczyk & Glomb, 2008).



111

	RC1-129-06-03		Vitexina	
	^1H	^{13}C	^1H Ref.	^{13}C Ref.
2		163,5		163,9
3	6,66 (1H, s)	102,2	6,70 (1H, s)	102,4
4		181,6		182,0
5		155,9		156,0
6	6,18 (1H, s)	98,1	6,22 (1H, s)	98,1

...continua...

“TABELA 6, Cont.”

7		163,5		162,5
8		104,6		104,0
9		160,3		160,4
10		103,0		104,6
1'		121,5		121,6
2'	7,94 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	128,7	8,01 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	128,9
3'	6,88 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	115,1	6,87 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	115,8
4'		161,1		161,1
5'	6,88 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	115,1	6,87 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	115,8
6'	7,94 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	128,7	8,01 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	128,9
1''	4,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0 Hz)	73,4	4,67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	73,3
2''	3,86 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0; 9,0 Hz)	70,9	3,81 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,7 Hz)	70,8
3''	3,28 (2H, <i>m</i>)	78,7	3,29 (1H, <i>m</i>)	78,6
4''	3,37 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,7; 8,7 Hz)	70,5	3,37 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,2 Hz)	70,5
5''	3,28 (2H, <i>m</i>)	81,6	3,23 (1H, <i>m</i>)	81,8
6''	3,76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,0 Hz) e 3,53 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,7; 11,7 Hz)	61,2	3,75 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2; 11,9 Hz) e 3,51 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,0; 11,7 Hz)	61,3

Apesar de a substância já ter sido isolada de *Onobrychis montana* subsp. Scardica (Griseb.) P.W. Ball (Godevac et al., 2008), *Crataegus pinnatifida* var. major N.E.Br (Liu & Yu, 2006) e *Commelina communis* L. (Shibano et al., 2008), este é o primeiro relato da sua produção por uma planta do gênero *Vismia*. Encontra-se na literatura relato de atividade da vitexina contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Aeromonas hydrophila*, além de sua atividade contra *Candida albicans* (Kuetze et al., 2008; Lu et al., 2008).

6.2.3 Elucidação estrutural da fração RC1-129-08-01 (quercitrina)

No espectro de RMN de ^1H da fração RC1-129-08-01 (Figura 119A, página 243) eram observados sinais em δ 7,33 ppm, δ 7,28 ppm e δ 6,89 ppm, que foram atribuídos a átomos de hidrogênio do anel B de um flavonóide. Observavam-se também, sinais em δ 6,41 ppm e δ 6,23 ppm, que foram atribuídos a átomos de hidrogênio do anel C de um flavonóide. Estes dados indicavam a que a aglicona do composto isolado se trata de um flavonóide tetrahidroxilado ou pentahidroxilado. A ausência de sinais que pudessem ser atribuídos a átomos de hidrogênio nas posições 2 e 3 do anel A indicavam a presença de uma dupla ligação entre os átomos de carbono 2 e 3, além da existência de uma hidroxila na posição 3. Portanto, este flavonóide, na verdade um flavonol, possuía como aglicona uma 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona, conhecida como quercetina (Ek et al., 2006).

A presença de sinais entre δ 3,00 ppm e δ 5,50 ppm indicava a presença de uma ou mais unidades glicosídicas. A presença de um sinal em δ 0,84 ppm, que correspondia a três átomos de hidrogênio, mostrava que provavelmente a unidade glicosídica ligada à aglicona se tratava de uma ramnose.

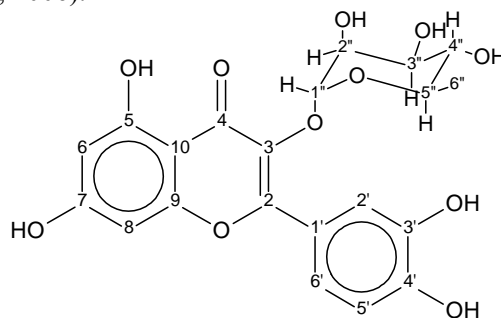
O espectro de ^{13}C (Figura 122A, página 246) confirmou os dados encontrados no espectro de RMN de ^1H . O carbono da carbonila foi detectado em δ 177,7 ppm e os outros sinais de carbono sp^2 foram detectados entre δ 98.0

e δ 165.0 ppm. É importante salientar que os sinais de carbono das posições 2 e 3 não apareciam no DEPT 135°, confirmando que se tratavam de átomos de carbono de hibridização sp^2 sem átomos de hidrogênio ligados a eles, conforme mencionado anteriormente. Os átomos de carbono sp^3 da porção glicosídica tinham deslocamento químico iguais a δ 101,8 ppm, δ 71,2 ppm, δ 70,5 ppm, δ 70,3 ppm, δ 70,0 ppm e δ 17,5 ppm, sendo que este último sinal confirmava a presença da ramnose.

Comparando-se os dados obtidos no presente trabalho com dados da literatura (Ek et al., 2006), pôde-se concluir que a fração RC1-129-08-01 se tratava do flavonóide O-glicosilado Quercetina-3-O-L-ramnose, também conhecido como quercitrina. Os dados de EM (Figura 129A) confirmaram esta estrutura, uma vez que foram observados sinais em m/z 447 dalton no modo negativo, que foram atribuídos a $[M-H]^-$.

Apesar de esta estrutura ser conhecida, este é o primeiro relato de tal substância no gênero *Vismia*. Encontram-se na literatura relatos de atividade da quercetrina contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Aeromonas hydrophila*, além de sua atividade contra *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Candida albicans* e outros fungos (Kuethe et al., 2008; Lu et al., 2008).

TABELA 7 Deslocamentos químicos (ppm), número de hidrogênios, multiplicidade dos sinais (s: simpleto; d: duplete; t: tripleto; dd: duplo duplete; m: multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hz, obtidos em DMSO-*d*₆ por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono treze (¹³C) da fração RC1-129-08-01 e da quercitrina (Ek et al., 2006).



	RC1-129-08-01		Quercitrina	
	¹ H	¹³ C	¹ H Ref.	¹³ C Ref.
2		157,2 (C)		157,3
3		134,2 (C)		134,0
4		177,7 (C)		178,2
5		161,2 (C)		161,0
6	6,23 (1H, <i>sl</i>)	98,7 (CH)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	98,5
7		164,2 (C)		163,9

...continua...

"TABELA 7, Cont."

8	6,41 (1H, <i>sl</i>)	93,6 (CH)	6,39 (<i>d</i> , $J= 2,1$ Hz)	93,5
9		156,4 (C)		156,3
10		104,0 (C)		104,0
1'		120,7 (C)		120,7
2'	7,33 (1H, <i>d</i> , $J=1,6$ Hz)	115,6 (CH)	7,29 (<i>d</i> , $J= 2,1$ Hz)	115,4
3'		145,2 (C)		144,8
4'		148,4 (C)		148,1
5'	6,89 (1H, <i>d</i> , $J= 8,2$ Hz)	115,4 (CH)	6,86 (<i>d</i> , $J= 8,3$ Hz)	115,2
6'	7,28 (1H, <i>dd</i> , $J= 1,6; 8,2$ Hz)	121,0 (C)	7,25 (<i>dd</i> , $J= 8,3; 2,1$ Hz)	120,9
1''	5,28 (1H, <i>s</i>)	101,8 (CH)	5,25 (<i>d</i> , $J= 1,6$ Hz)	101,6
2''	4,00 (1H, <i>sl</i>)	70,0 (CH)	3,97 (<i>d</i> , $J= 3,3$ Hz)	69,9
3''	3,54 (1H, <i>dd</i> , $J= 3, 9$ Hz)	70,3 (CH)	3,5 (<i>dd</i> , $J= 9,3$ Hz)	70,2
4''	3,17 (1H, <i>dd</i> , $J= 9, 9$ Hz)	71,2 (CH)	3,14 (<i>dd</i> , $J= 9,4$ Hz)	71,0
5''	3,21 (1H, <i>m</i>)	70,5 (CH)	3,2 (<i>m</i> , $J= 6$ Hz)	70,5
6''	0,84 (3H, <i>d</i> , $J= 6$ Hz)	17,5 (CH ₃)	0,81 (<i>d</i> , $J= 6,1$ Hz)	17,3

6.3 Teste de verificação da atividade antibacteriana do extrato bruto de *V. brasiliensis* (RC1-04-01)

Observou-se em testes preliminares realizados com vários extratos vegetais para a seleção daqueles com potencial atividade antibacteriana, que aquele proveniente de diferentes espécies do gênero *Vismia* reduzia o crescimento bacteriano de algumas espécies. Entretanto não havia dados a respeito de atividade antibacteriana de *Vismia brasiliensis*. Portanto, foram realizados testes do extrato bruto (RC1-04-01) contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Tabela 8).

TABELA 8 Atividade do extrato bruto de *Vismia brasiliensis* (RC1-04-01) contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Bactéria	RC1-04-01		Cloranfenicol
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>A. hydrophila</i>	750	750	23,75
<i>B. subtilis</i>	187,5	187,5	47,5
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	
<i>S. aureus</i>	*	*	95

* Não inibiram o crescimento nas concentrações testadas. Logo, não se realizou o experimento para determinar CBM.

Observou-se atividade inibitória do extrato RC1-04-01 apenas para *A. hydrophila* e *B. subtilis*, com CIM de 750 µg/mL e 187,5 µg/mL, respectivamente. Tal atividade pode ser parcialmente atribuída à presença das substâncias catequina, vitexina e quercitrina na composição do extrato bruto, uma vez que são encontrados relatos na literatura das atividades destas

substâncias frente a bactérias (Basile et al., 1999; Ogundipe et al., 2001; Sadik et al., 2003).

6.4 Teste da atividade antifúngica do extrato bruto de *V. brasiliensis*, da fração solúvel em metanol (RC1-07-02) e das substâncias isoladas da mesma frente *Aspergillus ochraceus*

Como mencionado anteriormente, um dos fatores que motivaram o estudo do extrato bruto de *V. brasiliensis* foi a atividade antifúngica relatada na literatura para outras espécies do gênero *Vismia* (Kuete et al., 2007; Nagen & Ferreira, 1993). Em decorrência, realizaram-se estudos preliminares de tal extrato, o que permitiu observar que o mesmo era capaz de impedir o crescimento do fungo *Aspergillus ochraceus*, que acarreta a contaminação de grãos de café com substâncias de elevada toxicidade (Bayman et al., 2002). Como a fração solúvel em metanol de plantas em geral é rica em flavonóides, que são substâncias com conhecida atividade antifúngica (Chiruvella et al., 2007; Lu et al., 2007; Rao et al. 2007), propôs-se trabalhar com esta fração do extrato bruto de *V. brasiliensis* com vistas a isolar flavonóides ou análogos com atividade contra *A. ochraceus*. De fato, tanto o extrato bruto quanto a fração do mesmo que era solúvel em metanol se mostraram ativas contra o referido fungo quando empregadas em concentração única, no teste realizado em laboratório. De forma análoga, observou-se que as três substâncias isoladas (epicatequina (RC1-129-03-02), vitexina (RC1-129-06-03) e quercitrina (RC1-129-08-01)) também eram ativas contra o fungo. Os resultados encontrados para as três substâncias estavam de acordo com dados da literatura, segundo os quais tais substâncias tinham apresentado atividade contra os fungos *Helminthosporium sativa* e *Candida albicans* (Mbukwa et al. 2007; Rao et al., 2007). Os resultados apresentados deixam óbvio que o extrato bruto, a sua fração solúvel em metanol e as substâncias isoladas de tal fração eram ativas *in vitro* contra *A. ochraceus*. Logo, apresentaram potencial para uso futuro no desenvolvimento de produtos

para o controle do referido fungo, o que sugere que novos estudos devam ser realizados com *V. brasiliensis* a fim de se averiguar melhor a atividade antifúngica de seus metabólitos.

7 CONCLUSÃO

O trabalho realizado confirmou a ação esperada do extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* contra bactérias e fungos. Tal atividade era esperada, pois foram isoladas de outras espécies deste gênero substâncias com atividades antifúngicas e antibacterianas. A fração solúvel em metanol também teve sua atividade contra *Aspergillus ochraceus* comprovada. Esta atividade era esperada, uma vez que é conhecido que a fração metanólica do extrato metanólico de diversas plantas são ricas em flavonóides, que se tratam de substâncias com atividade comprovada contra diversos fungos, sejam eles fitopatogênicos ou patogênicos ao homem.

O estudo fitoquímico da fração do extrato solúvel em metanol das folhas de *Vismia brasiliensis* permitiu a purificação e identificação de um flavan-3-ol (epicatequina), uma flavona C-glicosilada (Vitexina) e um flavonol O-glicosilado (Quercitrina). Todas as três substâncias possuem atividade antibacterianas e antifúngicas descritas na literatura, sendo responsáveis por parte das atividades antifúngica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *V. brasiliensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLAYAN, A.J.; MEYER, J.J. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoot of *Helichrysum aureonites*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 57, n. 3, p. 177-181, Aug. 1997.
- AZEBAZE, A.G.B.; OUAHOUE, B.M.W.; VARDAMIDES, J.C.; VALENTIN, A.; KUETE, V.; ACEBEY, L.; BENG, V.P.; NKENGFAK, A.E.; MEYER, M. Antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 44, n. 5, p. 582-587, Sept. 2008.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LOPEZ-SAEZ, J.C.; COBIANCHI, R.C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, New York, v. 52, n. 8, p. 1479-1482, Dec. 1999.
- BAYMAN, P.; BAKER, M.A.D.; MICHAILIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, May 2002.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, mar. 2000.
- CHIRUVELLA, K.K.; MOHAMMED, A.; DAMPURI, G.; GHANTA, R.G.; RAGHAVAN, S.C. Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-*O*-glucoside isolated from callus culture of *Soymida febrifuga*. **International Journal of Biomedical Science**, Monterey Park, v. 3, n. 4, p. 269-278, Dec. 2007.
- EK, S.; KARTIMO, H.; TOLONRN, A. Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 9834-9842, Nov. 2006.
- GODEVAC, D.; PEJIN, B.; ZDUNIC, G.; SAVIKIN, K.; STESEVIC, D.; VAJS, V.; MILOSAVLJEVIC, S. Flavonoids from the aerial parts of *Onobrychis montana* subsp. *scardica*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 73, n. 5, p. 525-529, Sept. 2008.

GONZALES GONZALES, J.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONHACHE, G.; MARINE BETOLLO, G. B. Chemistry of the genus *Vismia*. VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guinensis*. **Planta Medica**. New York, v. 40, n. 4, p. 347-350, 1980.

KRAFczyk, N.; GLOMB, M. Characterization of phenolic compound in rooibos tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 3368-3376, Apr. 2008.

KUETE, N.B.; SIMO, C.C.F.; TANKEU, R.K.; NGADJUI, B.T.; MEYER, J.J.M.; LALL, N.; KUIATE, J.R. Antimicrobial activity of crude extract and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 1, p. 17-24, Oct. 2007.

LIU, R.; YU, B. Study on chemical constituents of leaves from *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br. **Zhongyaocai**, Pequin, v. 30, n. 3, p. 317-323, 2006.

LU, Y, ZHANG, Z.; SHI, G; MENG, J.; TAN, R. New antifungal flavonol glycoside from *Hypericum perforatum*. **Acta Botanica Sinica**, Peiping, v. 44, n. 6, p. 743-745, 2008.

MBUKWA, E.; CHACHA, M.; MAJINDA, R. R. T. Phytochemical constituents of *Vangueria infausta*: their radical scavenging and antimicrobial activities. **ARKIVOC**, Gainesville, v. 9, n. 1, p. 104-112, Nov. 2007.

NAGEN, T.J.; FERREIRA, A. Constituentes of *Vismia micrantha*. **Fitoterapia**, Milano, v. 64, n. 2, p. 382-383, mag. 1993.

NGOUELA, S.; ZELEFACK, F.; LENTA, B.N.; NGOUAMEGNE, E.T.; TCHAMO, D.N.; TSAMO, E.; CONNOLY, J.D. Xanthones and other constituents of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). **Natural Product Research**, Abingdon, v. 19, n. 7, p. 685-688, Sept. 2005.

OGUNDIPE, O.O.; MOODY, J.O.; HOUGHTON, P.J.; ODELOLA, H.A. Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, n. 3, p. 275-280, Aug. 2001.

PRETTO, J.B.; CECHINEL- FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; SARTORI, M.R.K.; ISAIAS, D.E.B.; CRUZ, A.B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift fuer Naturforschung C: Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 59, n. 9/10, p. 657-662, Oct. 2004.

RAO, K.S.; BABU, G.V.; RAMNAREDDY, Y.V. Acylated flavone glycosides from the roots of *Saussurea lappa* and their antifungal activity. **Molecules**, New York, v. 12, n. 3, p. 328-344, Mar. 2007.

RIGANO, D.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; LAVITOLA, A.; SENATORE, F.; ROSSELI, S.; BRUNO, M. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 4, p. 395-397, Feb. 2007.

SADIK, G.; ISLAM, R.; RAHMAN, M.M.; KHONDKAR, P.; RASHID, M.A.; SARKER, S.D. Antimicrobial and cytotoxic constituents of *Loranthus globosus*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 3, p. 308-311, giug. 2003.

SHIBANO, M.; KAKUTNI, K.; TANIGUCHI, M.; YASUDA, M.; BABA, K. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase-inhibitory activity. **Journal of Natural Medicines**, Heidelberg, v. 62, n. 3, p. 349-353, 2008.

SINGH, S.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Mesuabixanthone-A and mesuabixanthone-B: novel bis-xanthenes from the stem bark of *Mesua ferrea* (Guttiferae). **Natural Products Letters**, Washington, v. 3, n. 1, p. 53-58, Jan. 1993.

SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; IACOMONI, M.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extracts from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 59-67, May 2008.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 1-6, out. 2004.

WATANABE, M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 839-845, Feb. 1998.

9 CONCLUSÕES GERAIS

O extrato metanólico das folhas de *Vismia brasiliensis* Choisy (Clusiaceae) se mostrou extremamente promissor para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de pragas e doenças, uma vez que apresentou atividade contra fungo (*Aspergillus ochraceus*), bactérias (*Aeromonas hydrophila* e *Bacillus subtilis*) e inseto (bicho mineiro do cafeeiro).

O estudo fitoquímico do referido extrato permitiu um aumento no número de informações sobre as plantas do gênero *Vismia*, já que foram isoladas e identificadas duas xantonas, três flavonóides, uma diidronaftoquinona e um monoaciléster do glicerol. Todas estas substâncias apresentaram atividades biológicas, podendo vir a serem utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novas estruturas químicas com atividades mais pronunciadas contra insetos e microrganismos. Destas substâncias, uma delas (vismiofuranoxantona) se trata de uma substância inédita, com atividade contra *Aspergillus ochraceus*, que é um fungo responsável por perdas na cultura cafeeira. Experimentos deverão ser realizados no futuro para avaliar o real potencial destas substâncias e de *V. brasiliensis* para emprego na obtenção de produtos mais eficientes que aqueles atualmente disponíveis para o controle de insetos, fungo e bactérias causadores de pragas e doenças em geral.

ANEXOS

ANEXO A		Página
FIGURA 1A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	138
FIGURA 2A	Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	139
FIGURA 3A	Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	140
FIGURA 4A	Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	141
FIGURA 5A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$	142
FIGURA 6A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$	143
FIGURA 7A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$	144
FIGURA 8A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$	145
FIGURA 9A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$	146
FIGURA 10A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de	

	longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em DMSO- d_6 .	147
FIGURA 11A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	148
FIGURA 12A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times$ ^1H (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	149
FIGURA 13A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times$ ^1H (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	150
FIGURA 14A	Espectro de ultravioleta de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), obtido em metanol durante análise em CLAE-DAD.....	151
FIGURA 15A	Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) no modo positivo.....	151
FIGURA 16A	Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 327 dalton por impacto com átomos de hélio.....	151
FIGURA 17A	Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo.....	152
FIGURA 18A	Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 325 dalton por impacto com átomos de helio.....	152
FIGURA 19A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo, após	

	fragmentação do íon com m/z 325 dalton por impacto com átomos de hélio, o que gerou o íon com m/z 309 dalton, que também foi fragmentado por impacto com átomos de hélio.....	152
FIGURA 20A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	153
FIGURA 21A	Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	154
FIGURA 22A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	155
FIGURA 23A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	156
FIGURA 24A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	157
FIGURA 25A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	158
FIGURA 26A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	159
FIGURA 27A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$	160
FIGURA 28A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600	

	MHz).....	161
FIGURA 29A	Expansão do mapa de correlação homonuclear ^1H x ^1H (gCOSY) de RC1-112-03 (isojacareubina) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	162
FIGURA 30A	Expansão do mapa de correlação homonuclear ^1H x ^1H (gCOSY) de RC1-112-03 (isojacareubina) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	163
FIGURA 31A	Espectro de ultravioleta de RC1-112-03 (isojacareubina), obtido em metanol, durante análise em CLAE-DAD.....	164
FIGURA 32A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	165
FIGURA 33A	Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	166
FIGURA 34A	Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 (600 MHz).....	167
FIGURA 35A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	168
FIGURA 36A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	169
FIGURA 37A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	170
FIGURA 38A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	171

FIGURA 39A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$	172
FIGURA 40A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$	173
FIGURA 41A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	174
FIGURA 42A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	175
FIGURA 43A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).....	176
FIGURA 44A	Espectro de ultravioleta de RC1-117-02 (epicatequina), obtido em metanol, durante análise em CLAE-DAD.....	177
FIGURA 45A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo positivo.....	177
FIGURA 46A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 291 dalton no por impacto com átomos de hélio.....	178
FIGURA 47A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo negativo.....	178
FIGURA 48A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	179

FIGURA 49A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	180
FIGURA 50A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	181
FIGURA 51A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	182
FIGURA 52A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	183
FIGURA 53A	Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.....	184
FIGURA 54A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.....	185
FIGURA 55A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.....	186
FIGURA 56A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.....	187
FIGURA 57A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	188
FIGURA 58A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	189
FIGURA 59A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	190
FIGURA 60A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	191

FIGURA 61A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	192
FIGURA 62A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	193
FIGURA 63A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3	194
FIGURA 64A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz...	195
FIGURA 65A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.....	196
FIGURA 66A	Espectro vibracional no infravermelho de RC1-69-02 (actinoquinona) em janela de Irtran-2.....	197
FIGURA 67A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-69-02 (actinoquinona), obtido no modo positivo.....	197
FIGURA 68A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz....	198
FIGURA 69A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz.....	199
FIGURA 70A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz.....	200
FIGURA 71A	Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 100 MHz....	201

FIGURA 72A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.....	202
FIGURA 73A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.....	203
FIGURA 74A	Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.....	204
FIGURA 75A	DEPT 135° de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.....	205
FIGURA 76A	Expansão de DEPT 135° de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz....	206
FIGURA 77A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 .	207
FIGURA 78A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3	208
FIGURA 79A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3	209
FIGURA 80A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 .	210
FIGURA 81A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de	

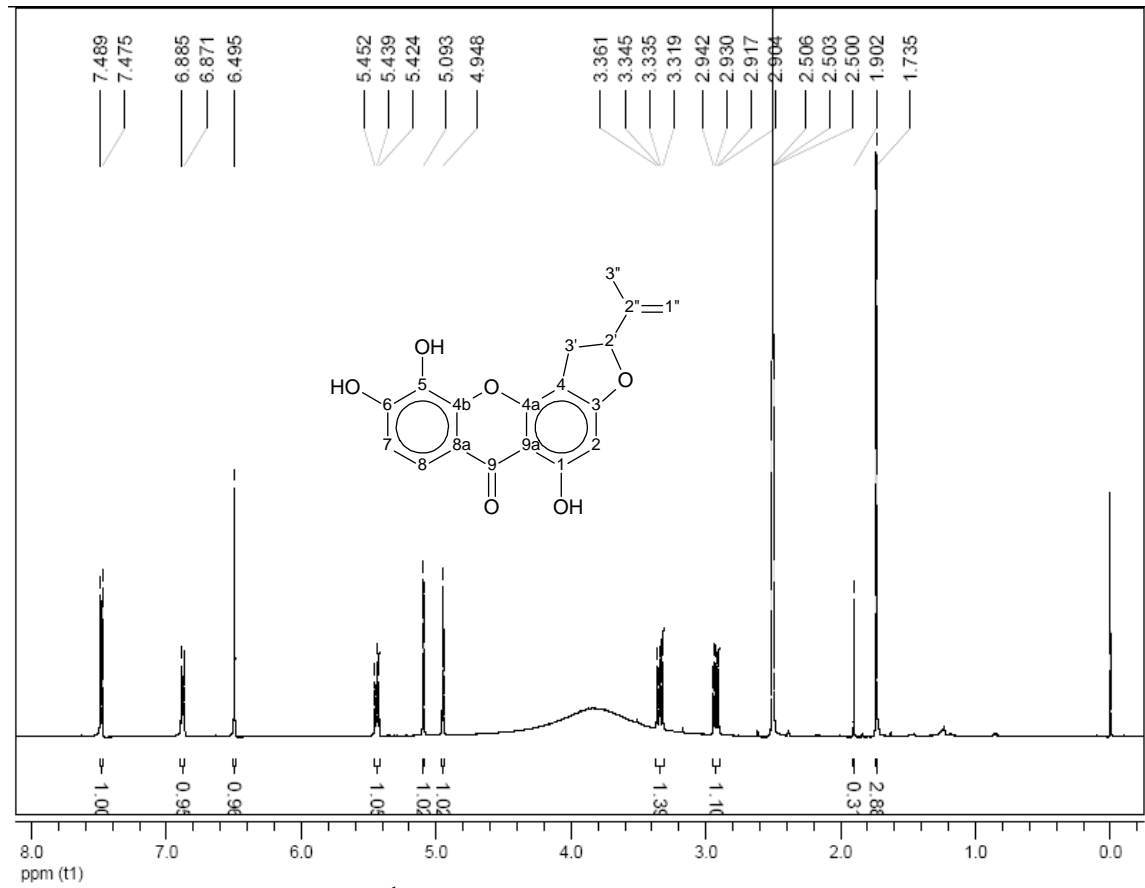
	longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3	211
FIGURA 82A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3	212
FIGURA 83A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3 , 400 MHz.....	213
FIGURA 84A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3 , 400 MHz.....	214
FIGURA 85A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3 , 400 MHz.....	215
FIGURA 86A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila), obtido no modo positivo.	216
FIGURA 87A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 385 dalton por impacto com átomos de hélio.....	216
FIGURA 88A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 385 dalton por impacto com átomos de hélio.....	216
FIGURA 89A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02	

	(epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	217
FIGURA 90A	Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	218
FIGURA 91A	Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	219
FIGURA 92A	Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	220
FIGURA 93A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	221
FIGURA 94A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	222
FIGURA 95A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	223
FIGURA 96A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	224
FIGURA 97A	Expansão de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	225
FIGURA 98A	Expansão de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6	226
FIGURA 99A	Mapa de correlação homonuclear ^1H x ^1H (gCOSY) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	227

FIGURA 100A	Expansão de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	228
FIGURA 101A	Espectro de ultravioleta de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido em metanol durante análise em CLAE-DAD.....	229
FIGURA 102A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo positivo.....	229
FIGURA 103A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 291 dalton por impacto com átomos de hélio.....	230
FIGURA 104A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo negativo.....	230
FIGURA 105A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	231
FIGURA 106A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	232
FIGURA 107A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	233
FIGURA 108A	Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 , 100 MHz.....	234
FIGURA 109A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	235
FIGURA 110A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	236

FIGURA 111A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	237
FIGURA 112A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	238
FIGURA 113A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	239
FIGURA 114A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6	240
FIGURA 115A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 , 400 MHz	241
FIGURA 116A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo positivo.....	242
FIGURA 117A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo negativo.....	242
FIGURA 118A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 431 dalton, por impacto com átomos de hélio.....	242
FIGURA 119A	Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	243
FIGURA 120A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	244
FIGURA 121A	Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em DMSO- d_6 , 400 MHz.....	245

FIGURA 122A	Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.....	246
FIGURA 123A	Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$	247
FIGURA 124A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$	248
FIGURA 125A	Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$	249
FIGURA 126A	Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$	250
FIGURA 127A	Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.....	251
FIGURA 128A	Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.....	252
FIGURA 129A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01 (quercitrina), obtido no modo negativo.....	253
FIGURA 130A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01, obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 447 dalton por impacto com átomos de hélio.	253
FIGURA 131A	Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01, obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 325 dalton.....	253

FIGURA 1A Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

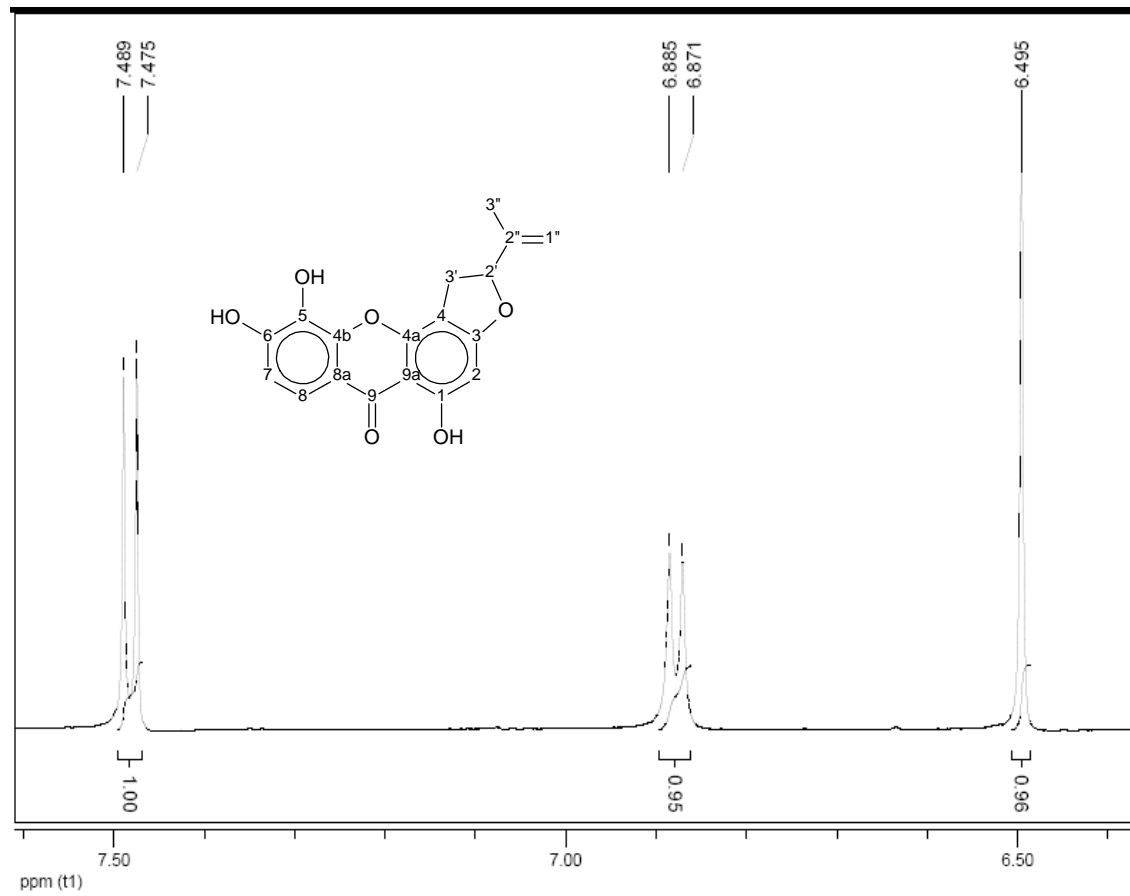


FIGURA 2A Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

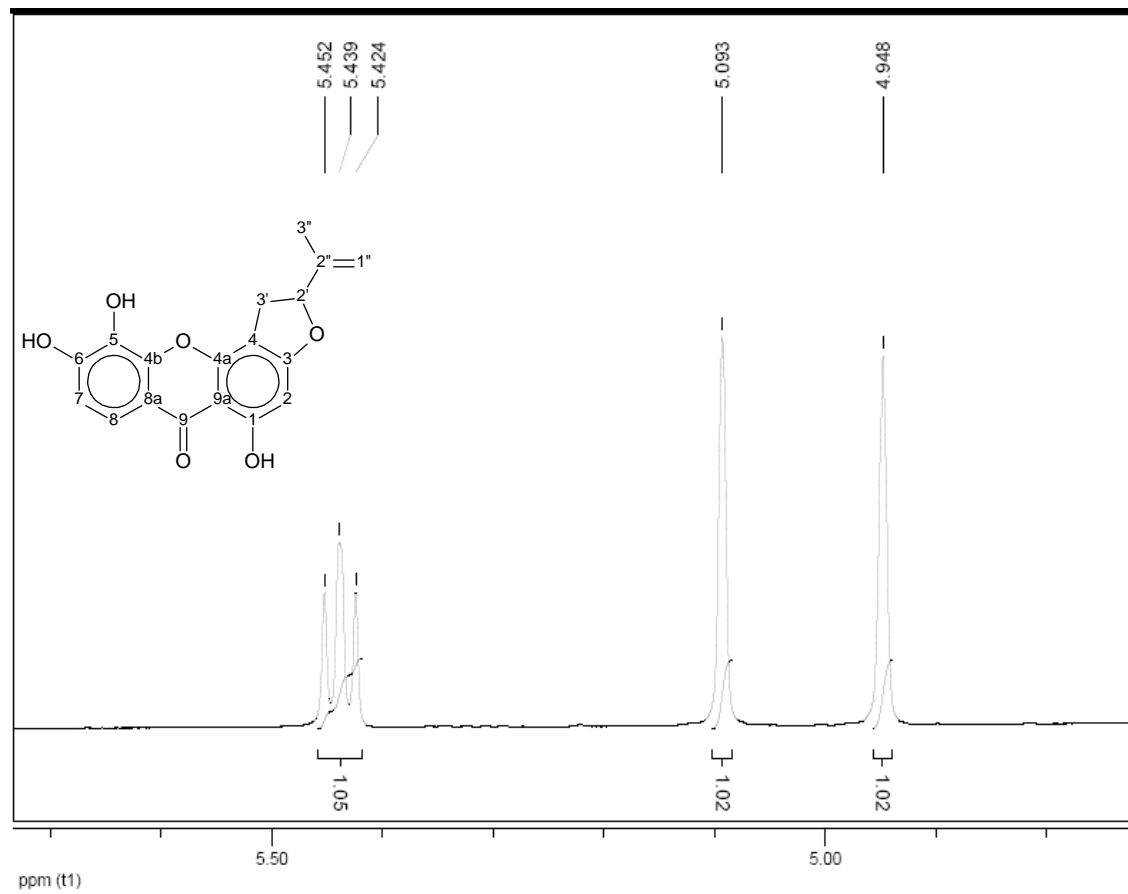


FIGURA 3A Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

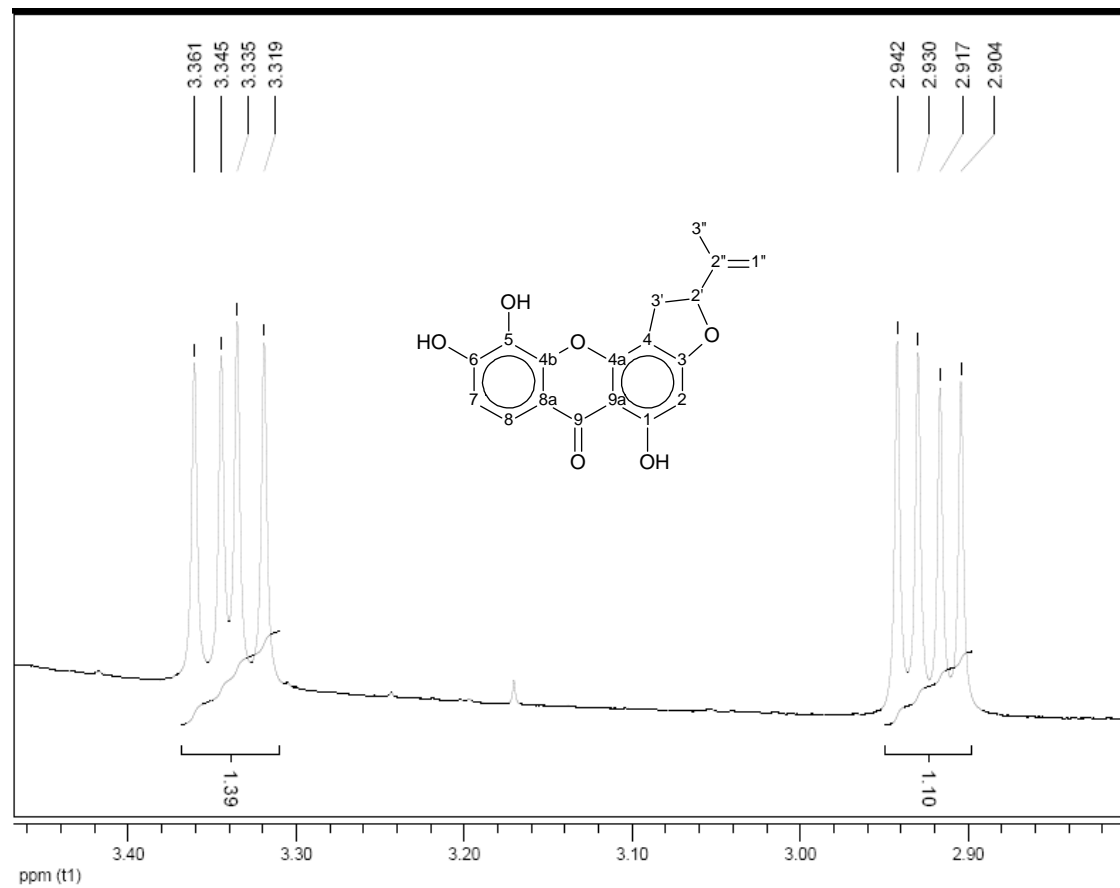


FIGURA 4A Expansão do Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

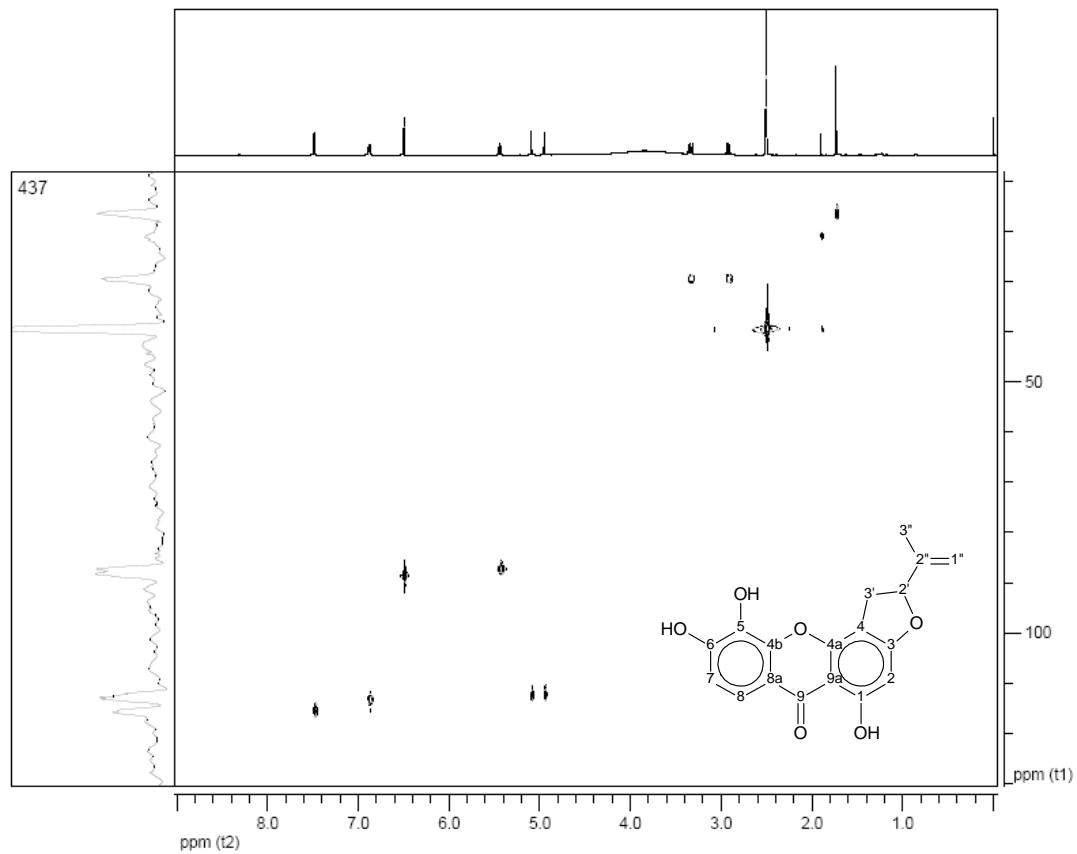


FIGURA 5A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ¹H x ¹³C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (visiofuranoxantona) em DMSO-*d*₆.

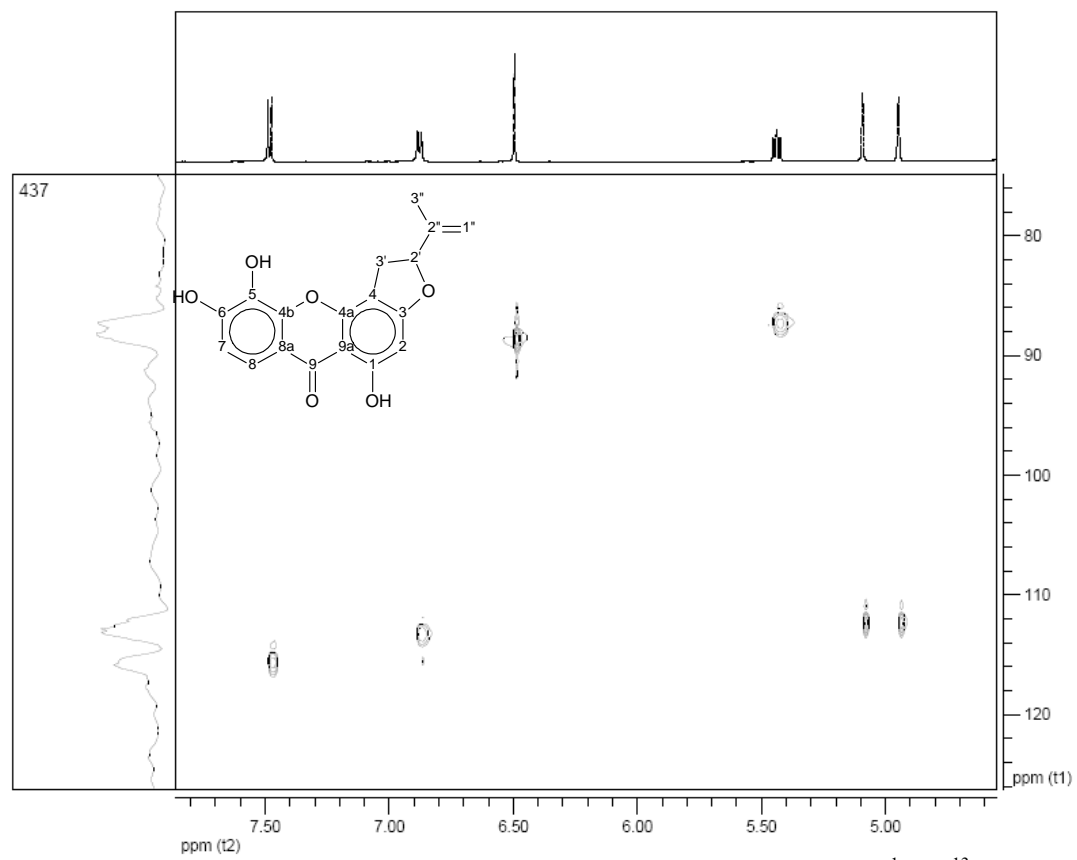


FIGURA 6A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO}-d_6$.

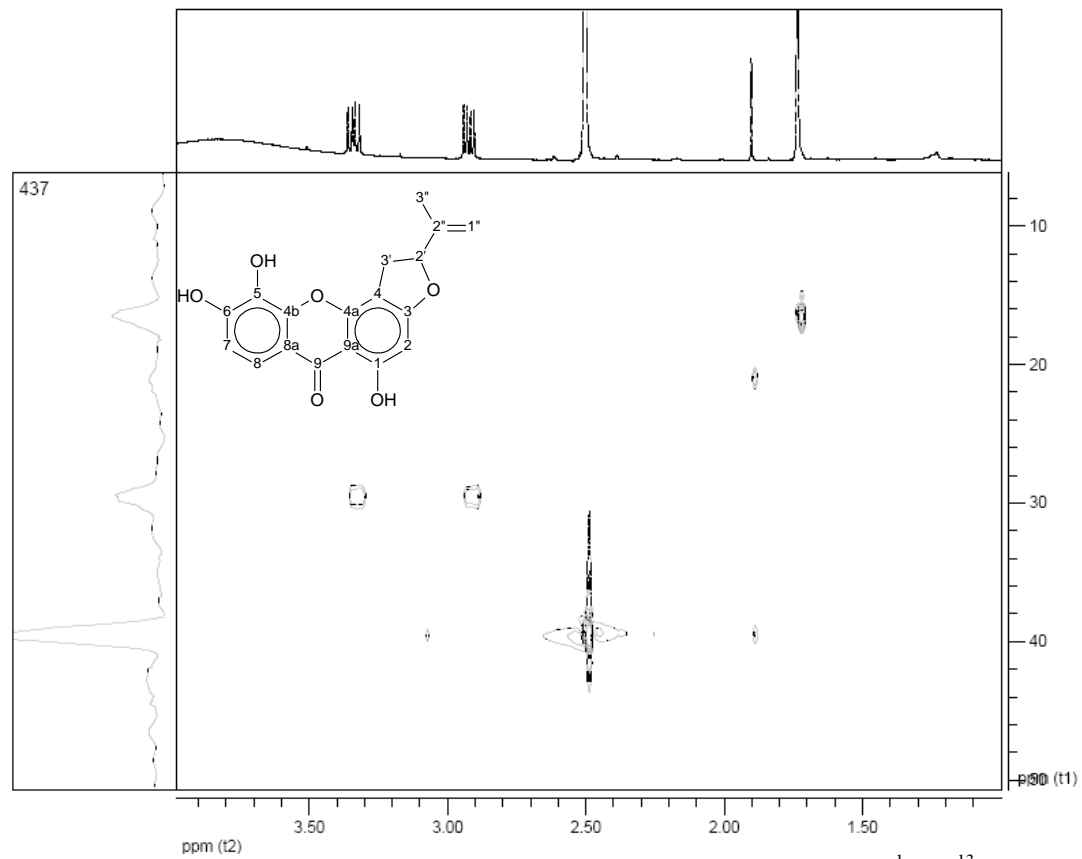


FIGURA 7A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO}-d_6$.

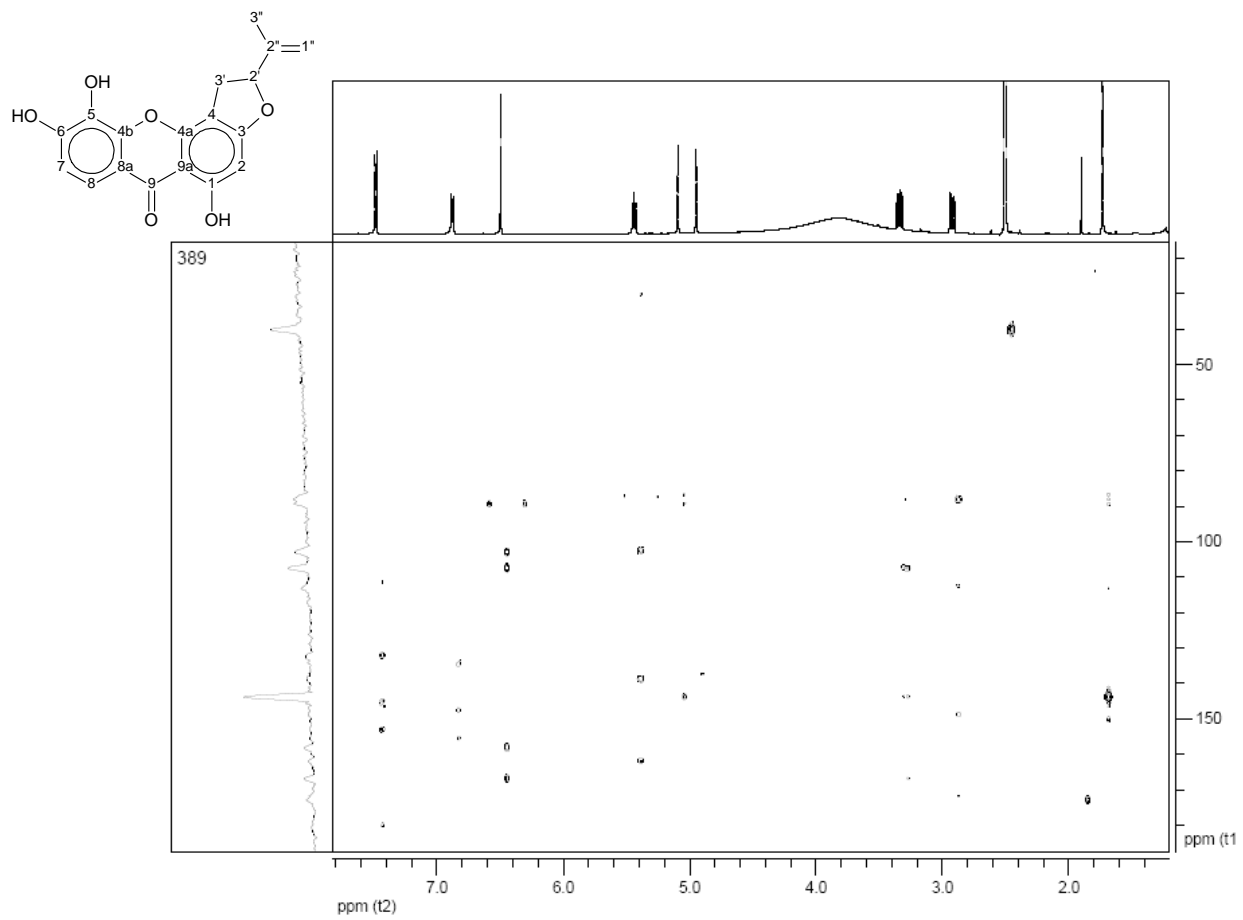
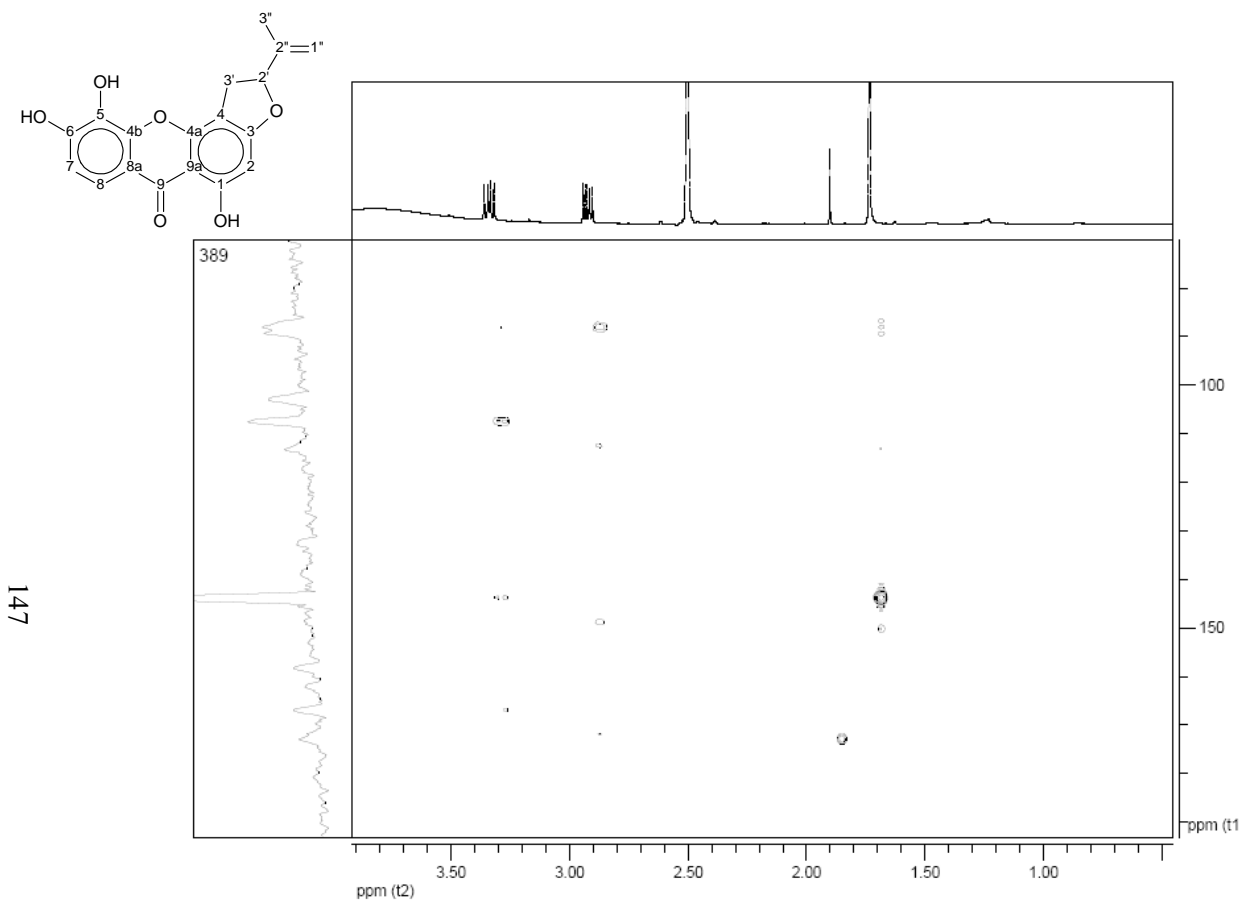
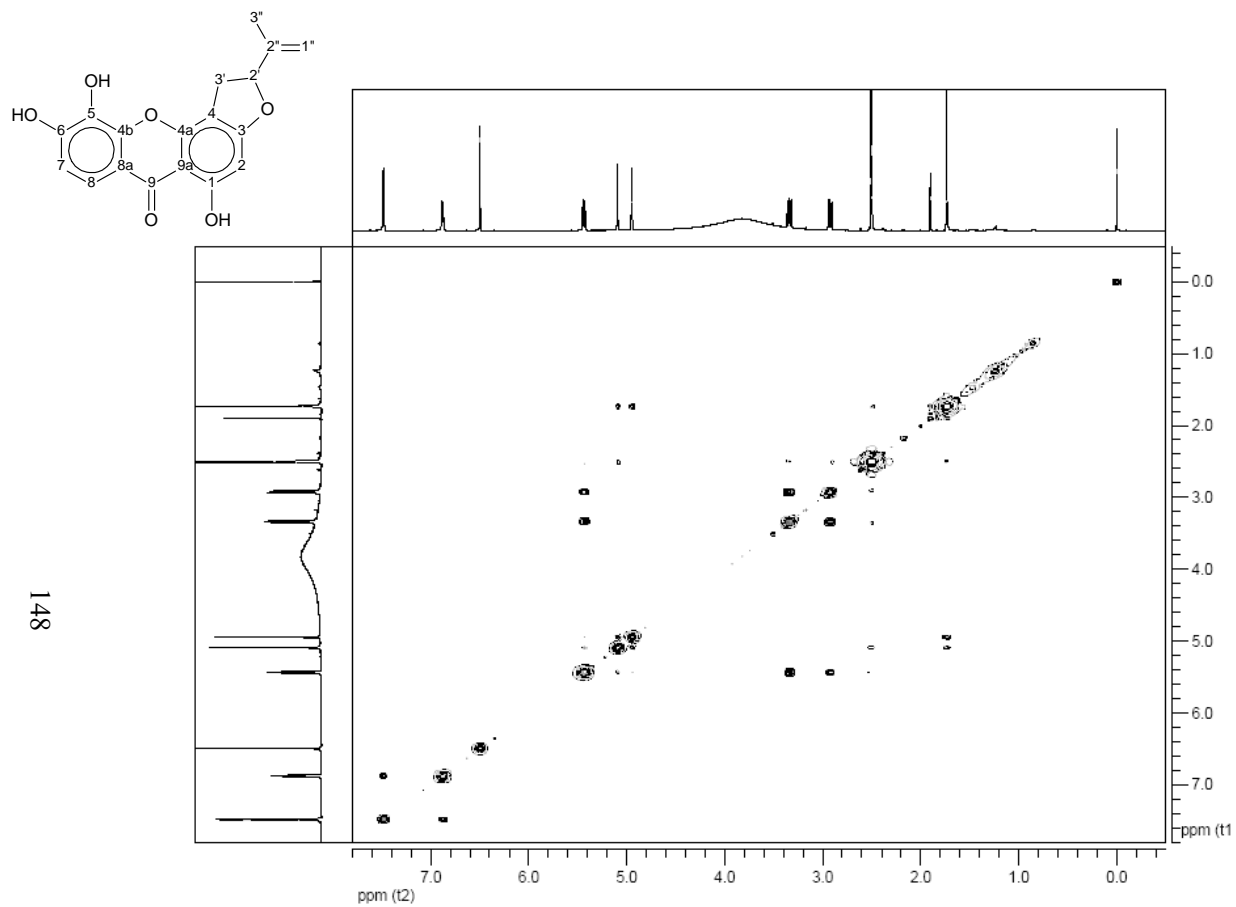


FIGURA 8A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO}-d_6$.



147

FIGURA 10A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), em $\text{DMSO-}d_6$.



148

FIGURA 11A Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

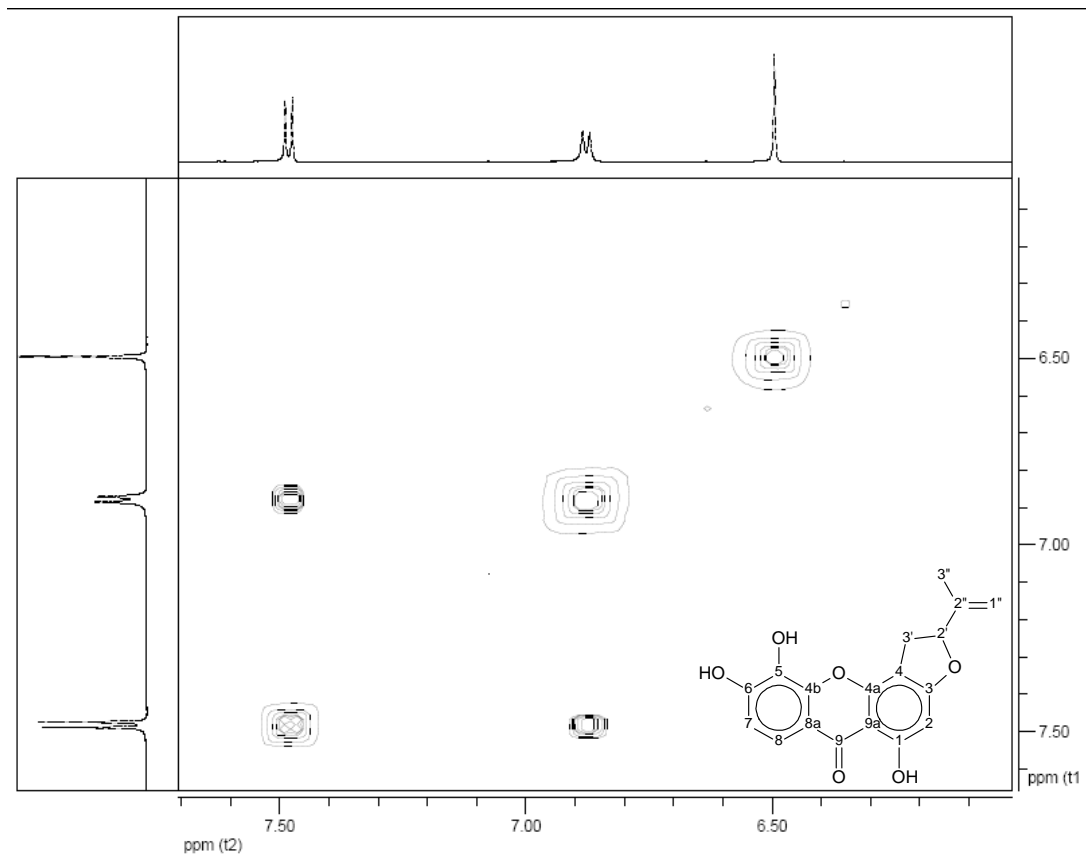


FIGURA 12A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

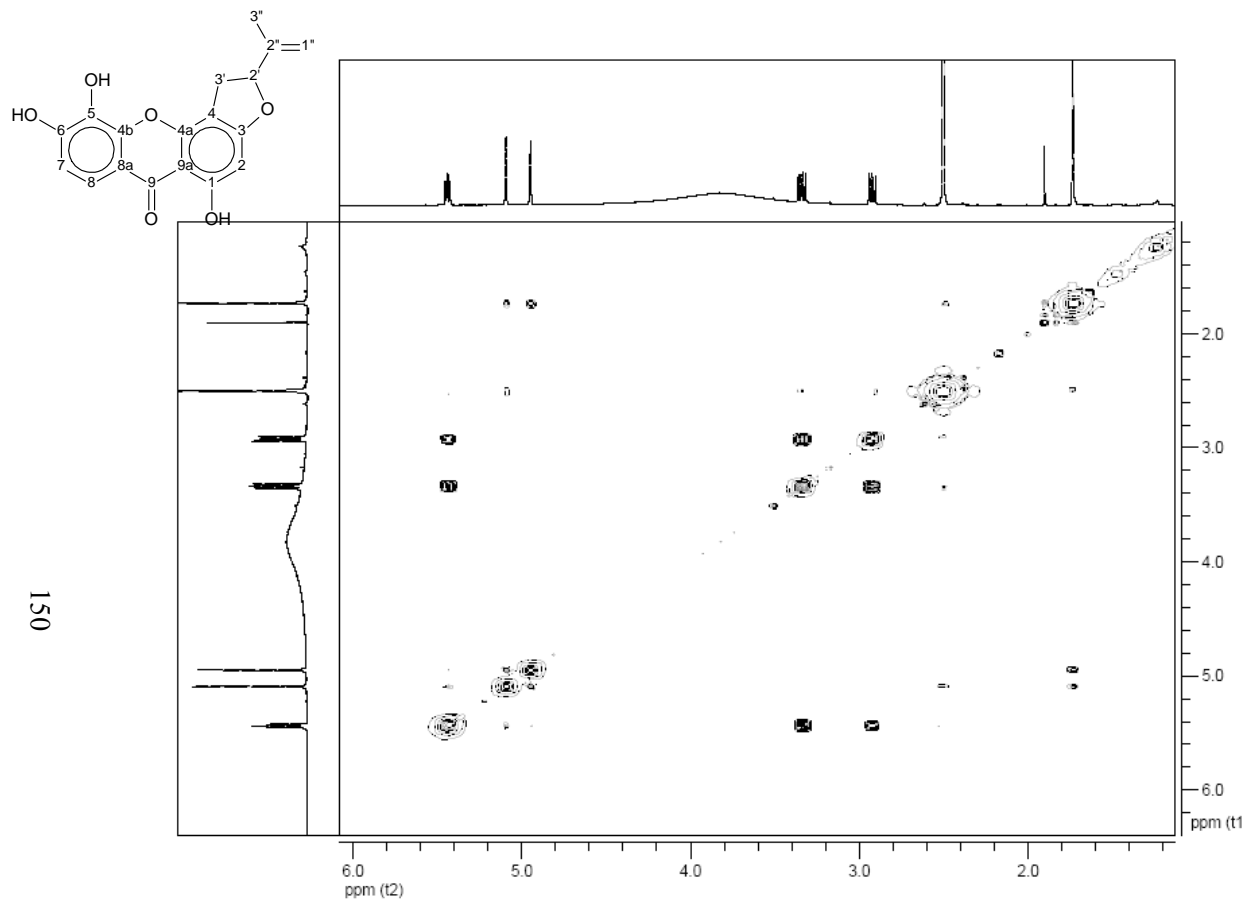


FIGURA 13A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz

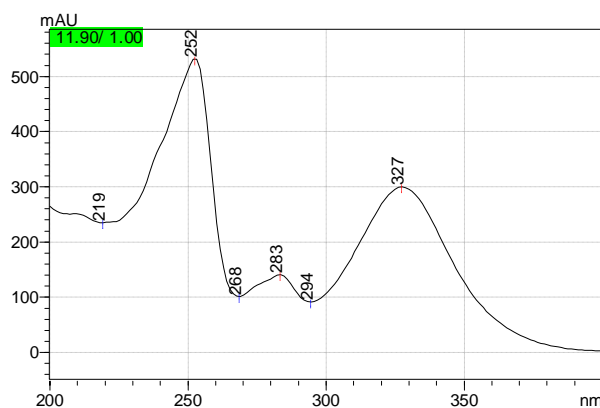


FIGURA 14A Espectro de ultravioleta de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), obtido em metanol durante análise em CLAE-DAD.

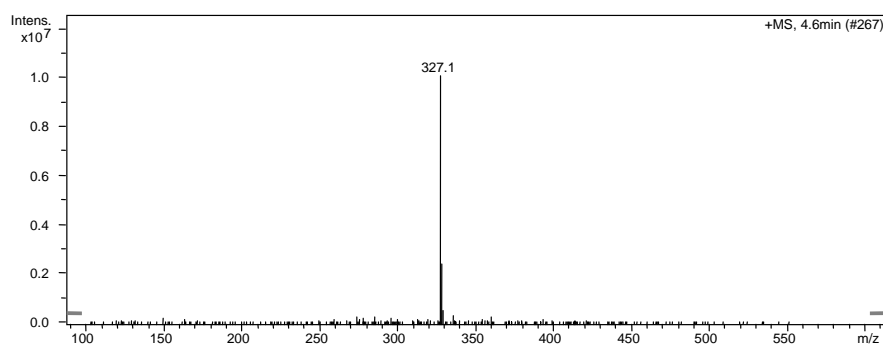


FIGURA 15A Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) no modo positivo.

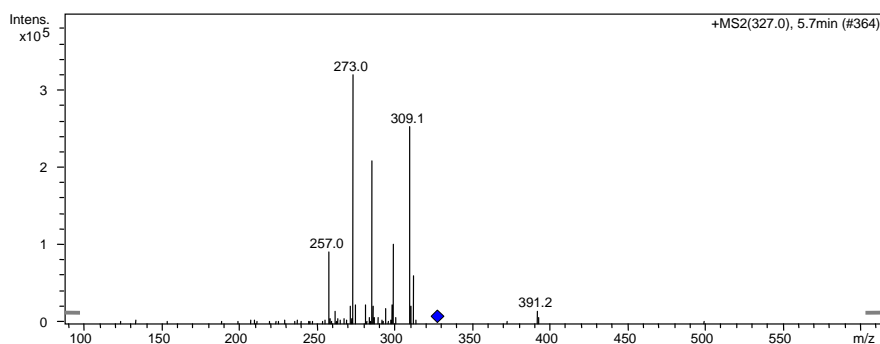


FIGURA 16A Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 327 dalton por impacto com átomos de hélio.

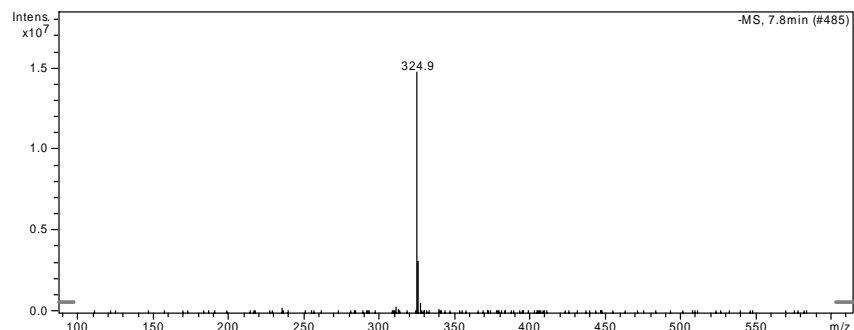


FIGURA 17A Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo.

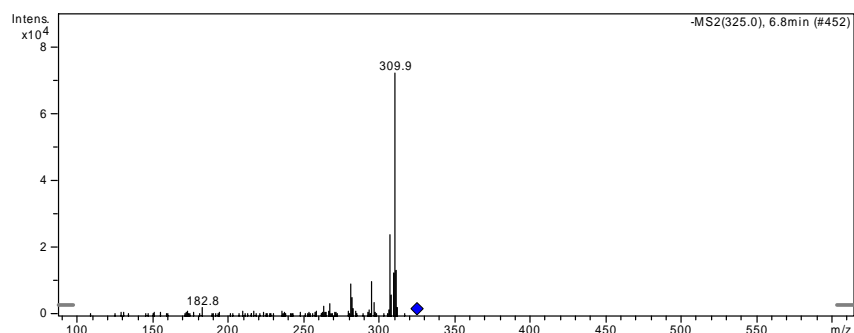


FIGURA 18A Espectro de massas de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 325 dalton por impacto com átomos de hélio.

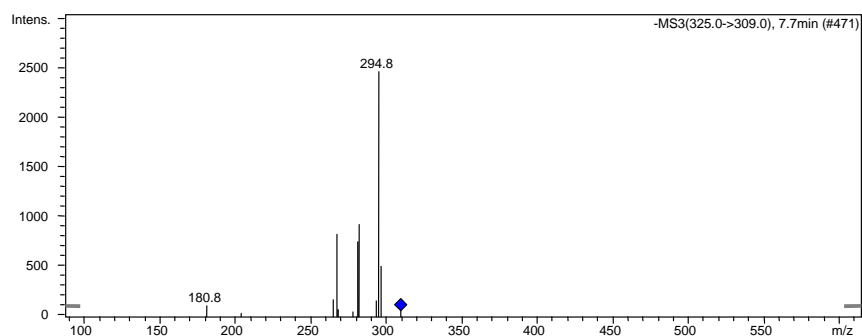
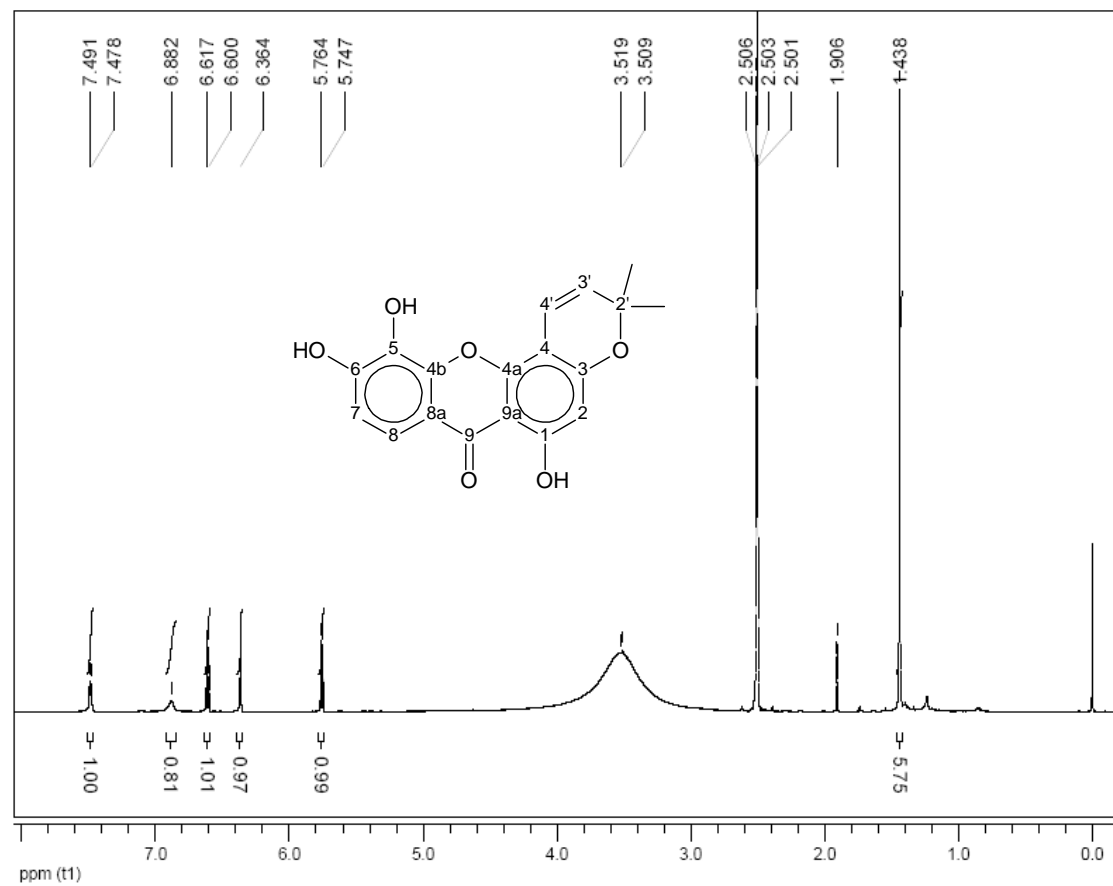


FIGURA 19A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-112-02 (vismiofuranoxantona) obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 325 dalton por impacto com átomos de hélio, o que gerou o íon com m/z 309 dalton, que também foi fragmentado por impacto com átomos de hélio.

FIGURA 20A Espectro de RMN de ^1H de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

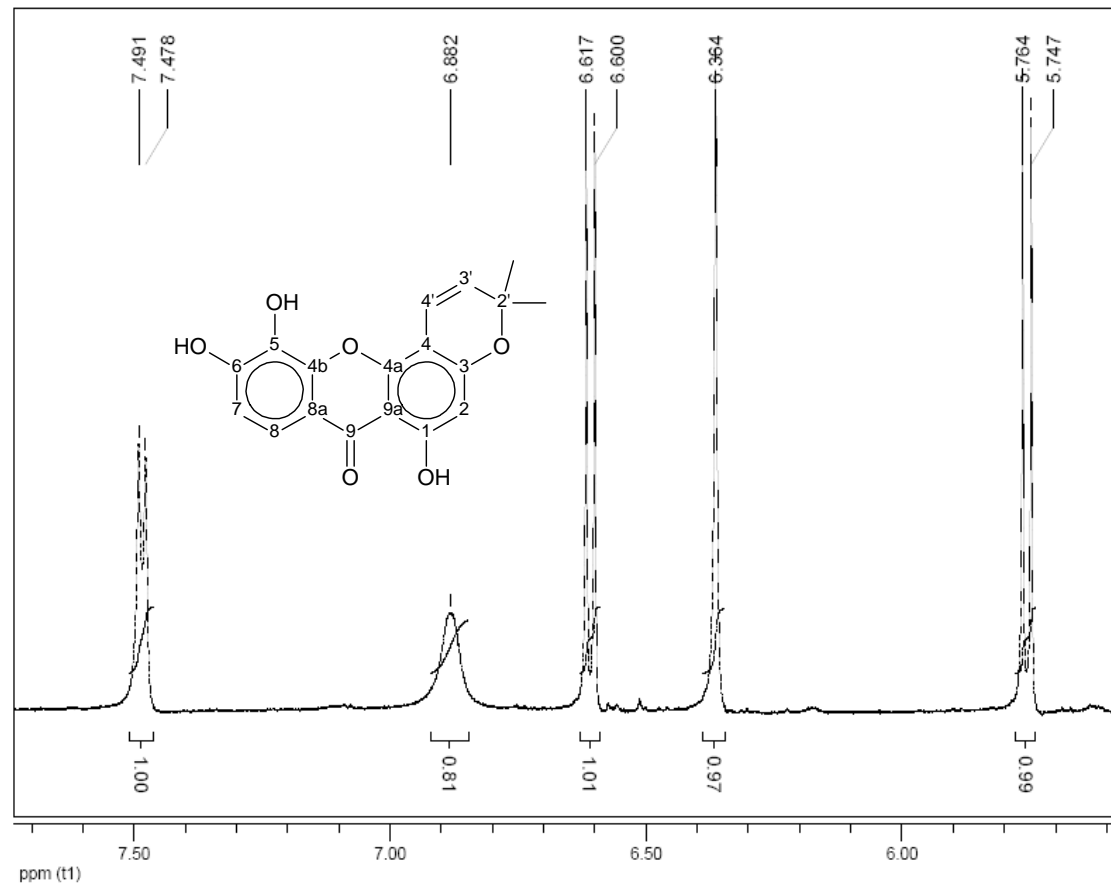


FIGURA 21A Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

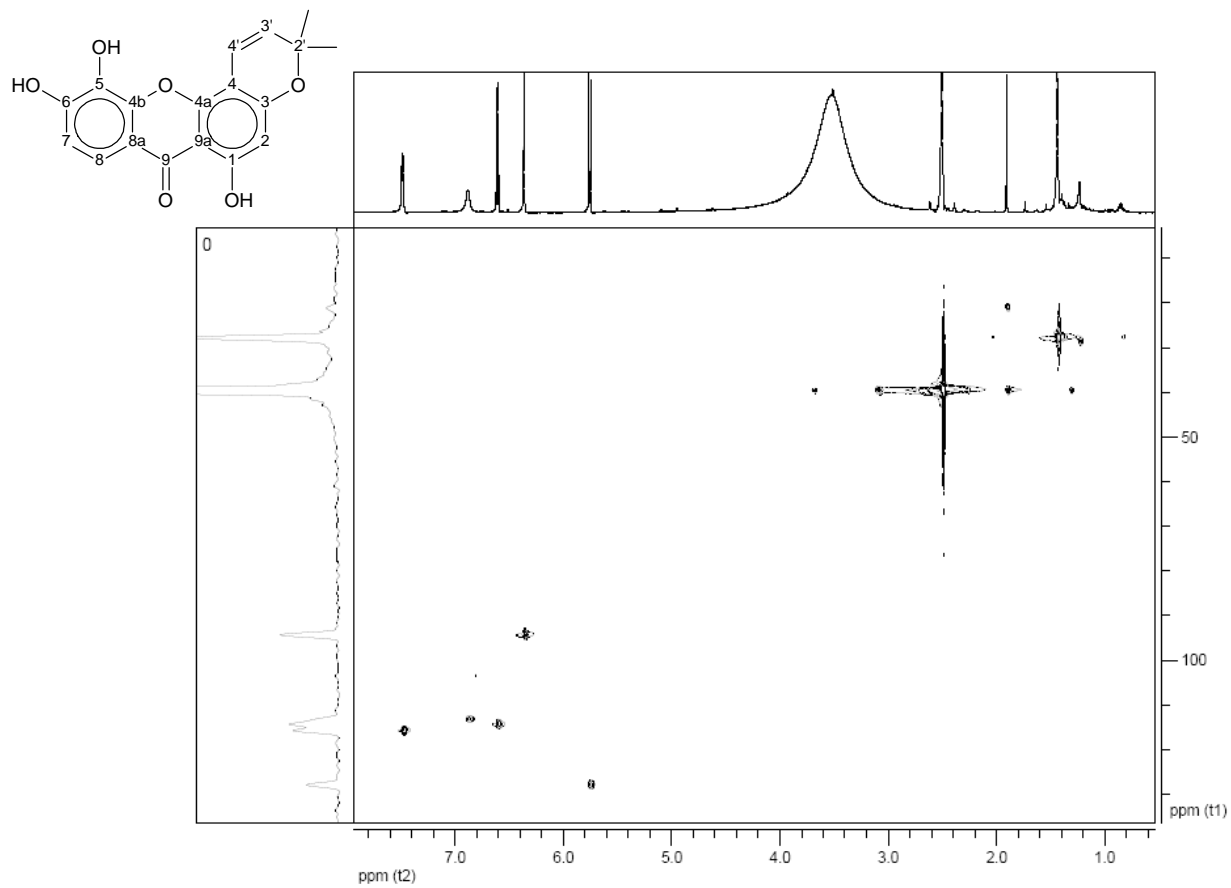


FIGURA 22A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO}-d_6$.

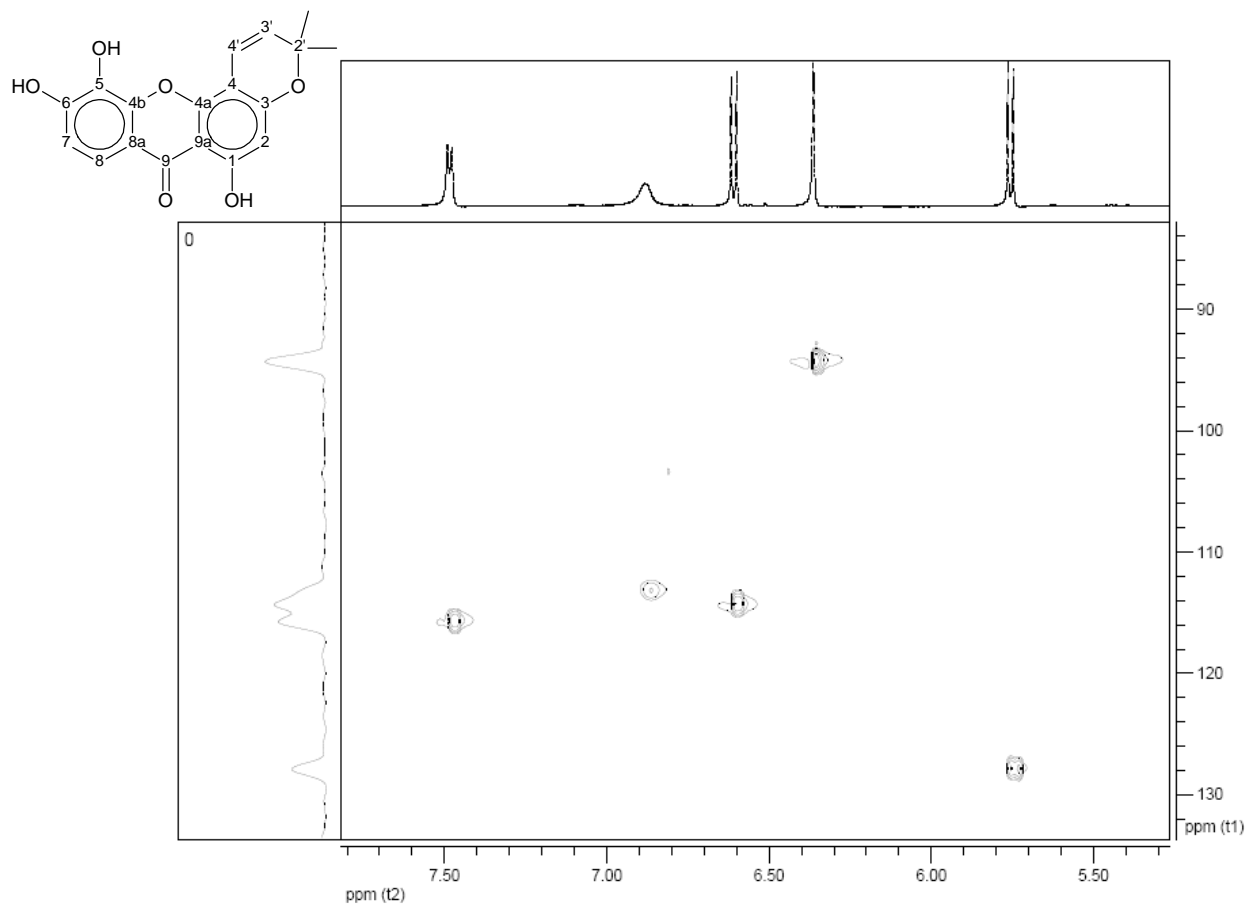


FIGURA 23A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$.

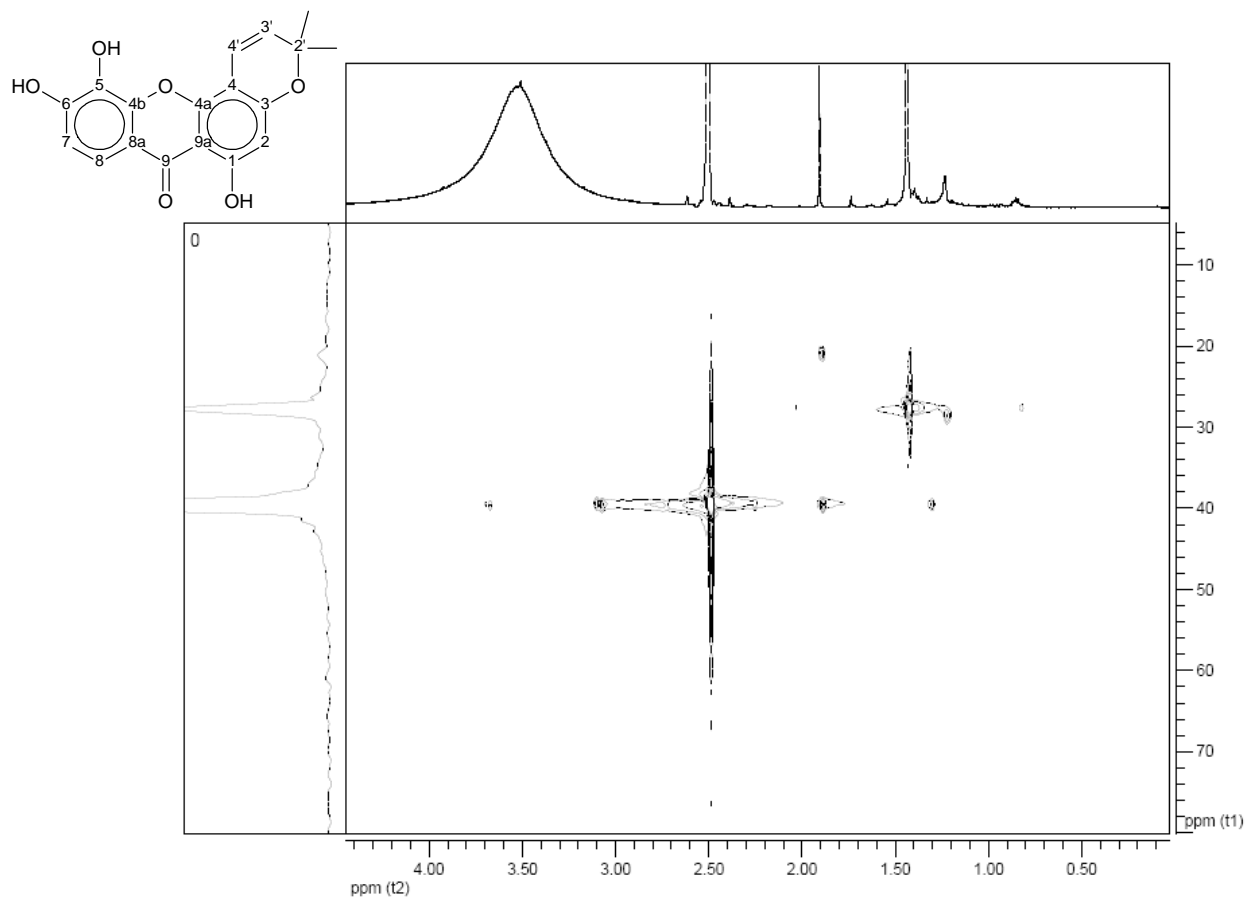


FIGURA 24A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO}-d_6$.

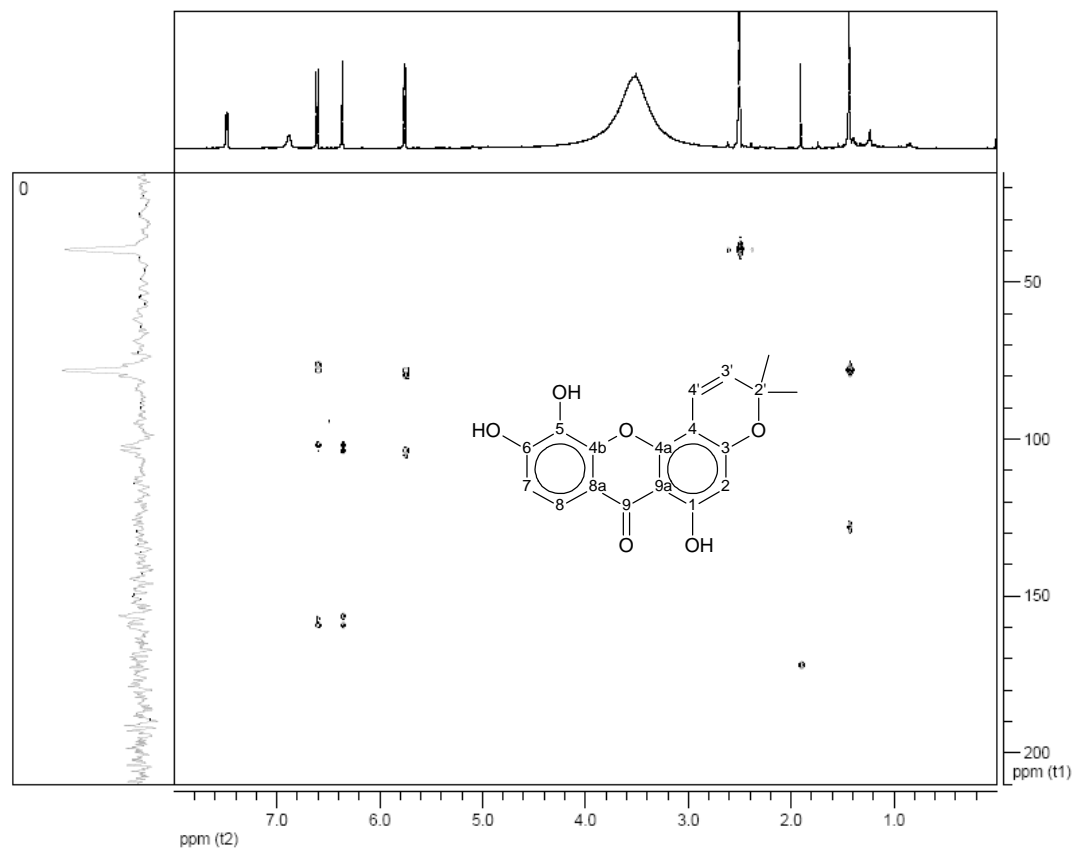


FIGURA 25A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO}-d_6$.

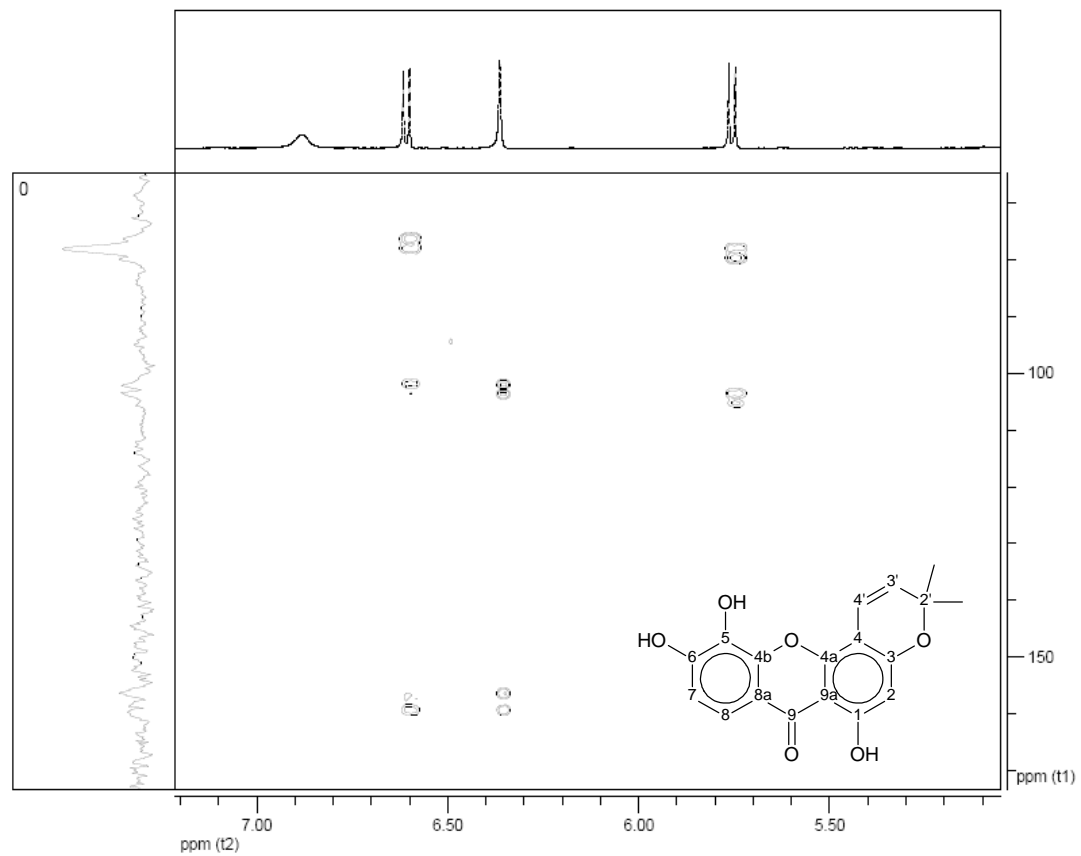


FIGURA 26A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$.

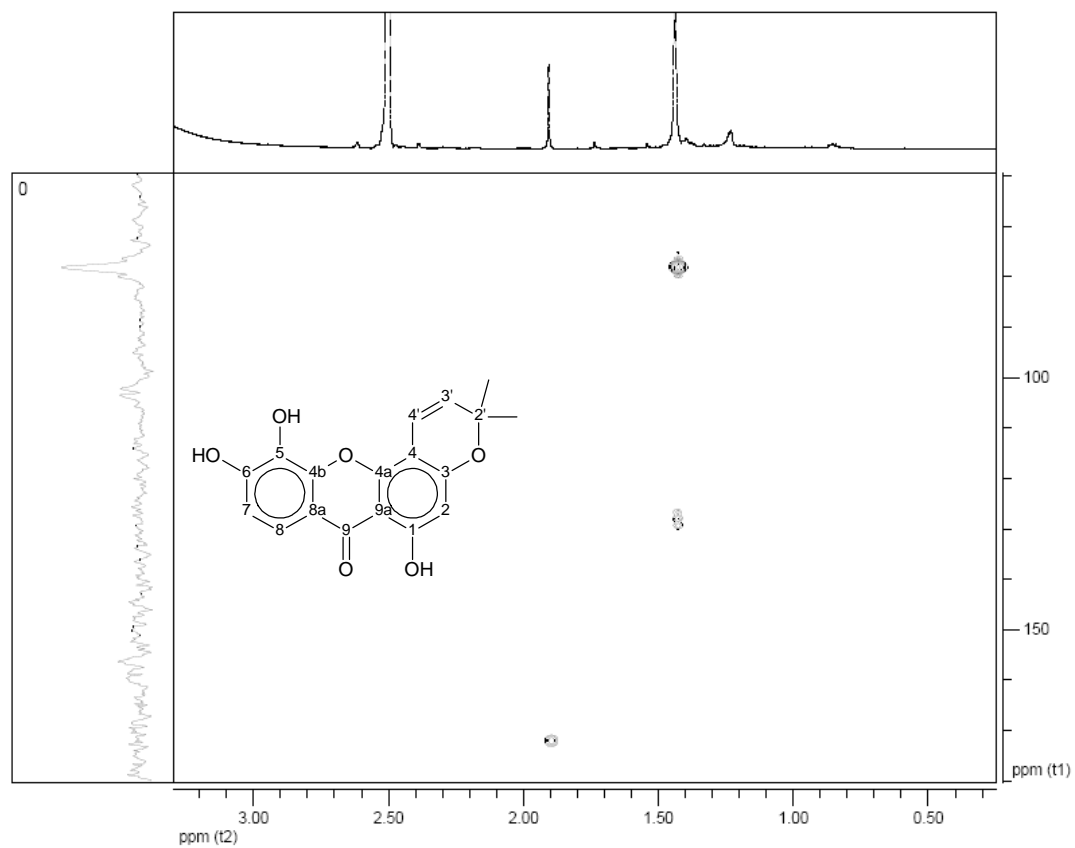


FIGURA 27A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO}-d_6$.

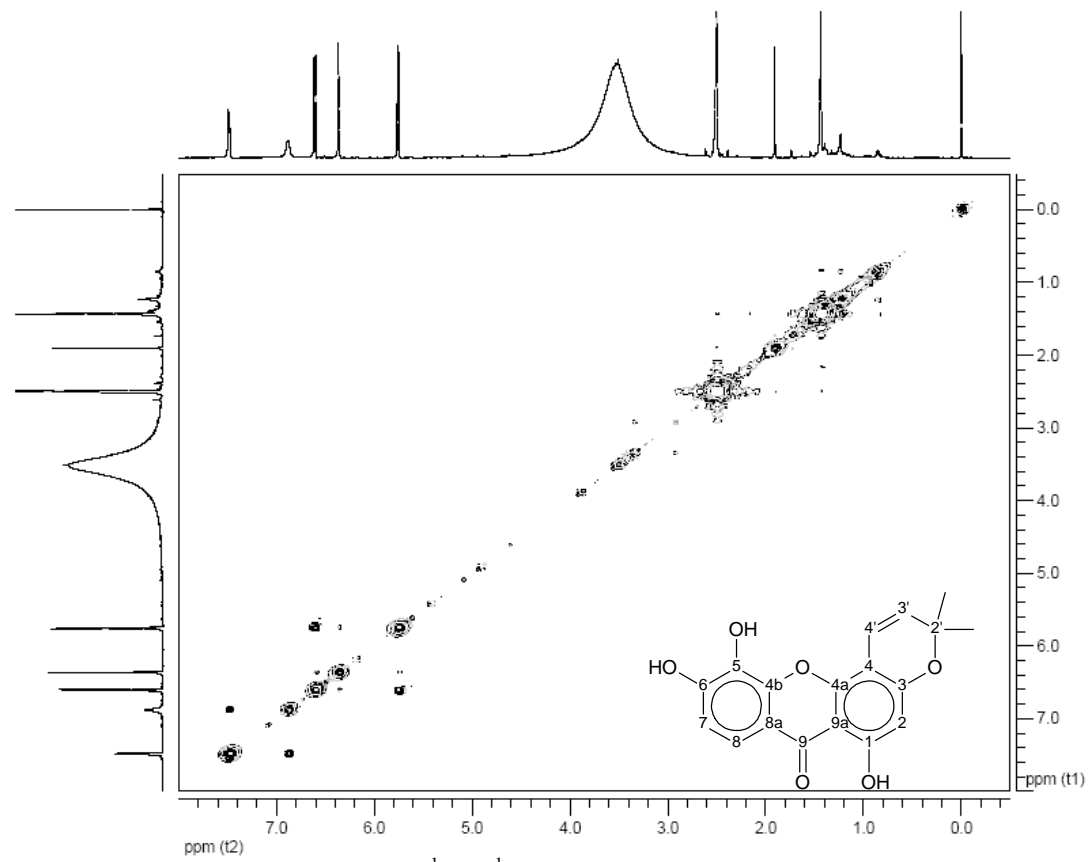


FIGURA 28A Mapa de correlação homonuclear ¹H x ¹H (gCOSY) de RC1-112-03(isojacareubina) em DMSO-*d*₆, 600 MHz.

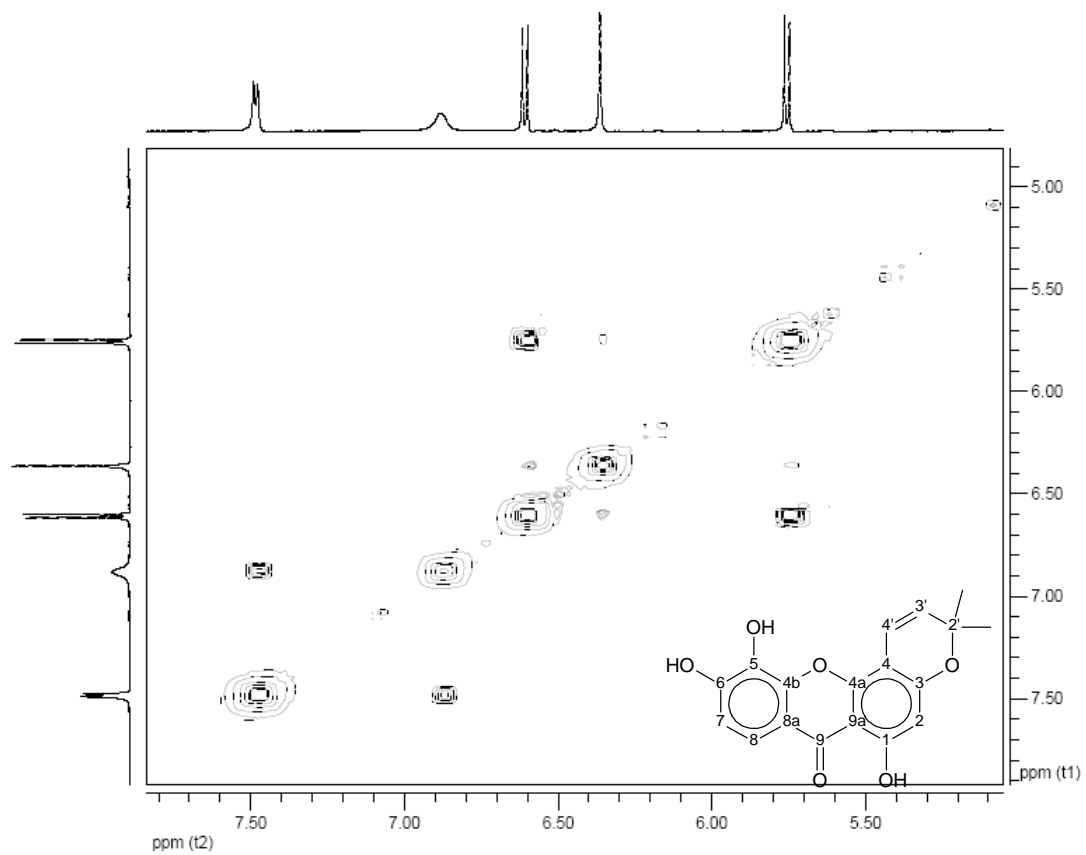


FIGURA 29A Expansão do mapa de correlação homonuclear ¹H x ¹H (gCOSY) de RC1-112-03 (isojacareubina) em DMSO-*d*₆, 600 MHz.

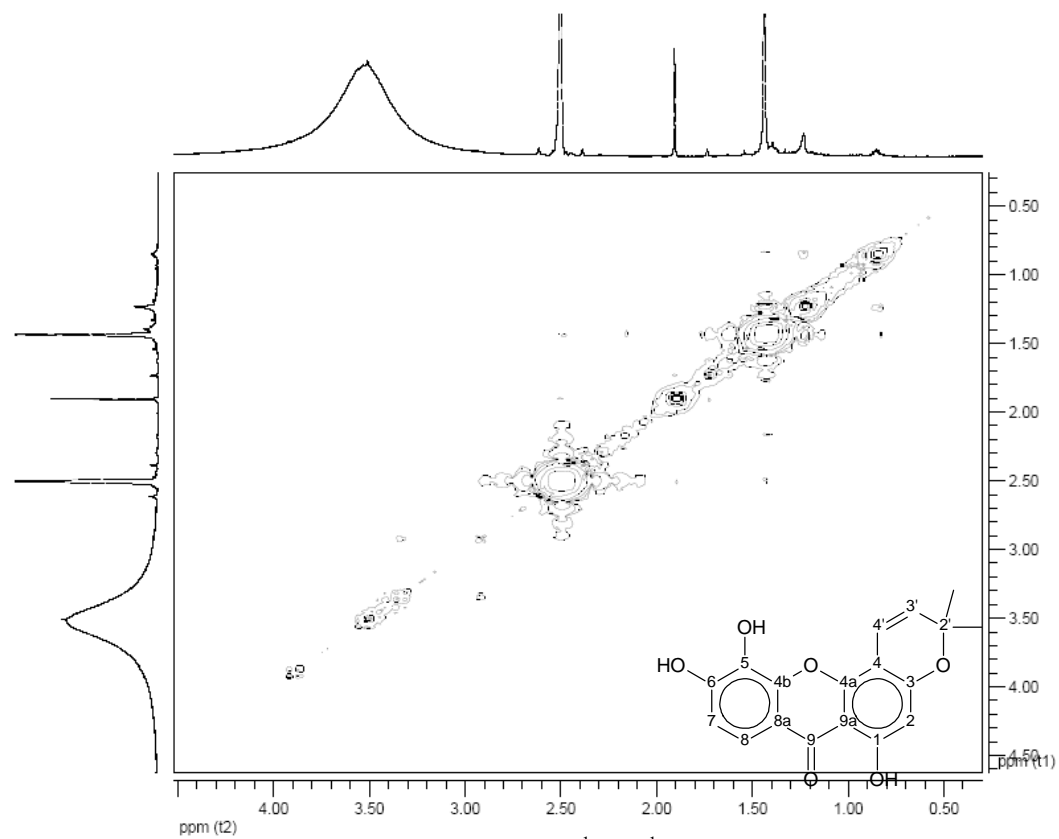


FIGURA 30A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-112-03 (isojacareubina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

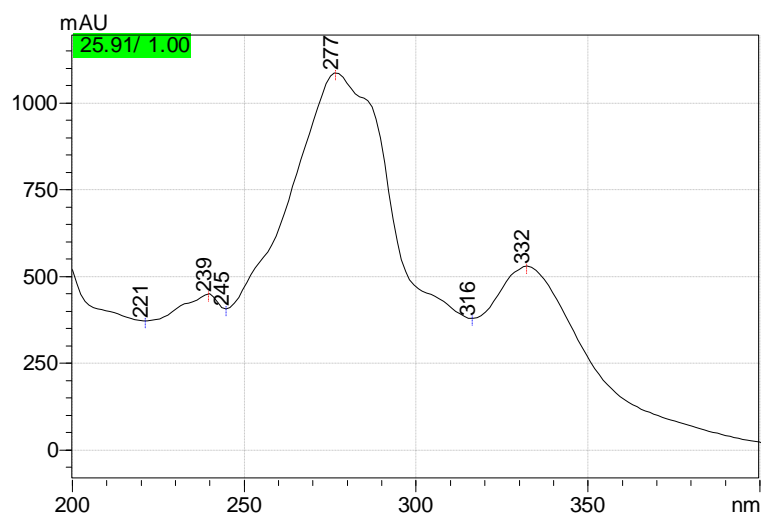
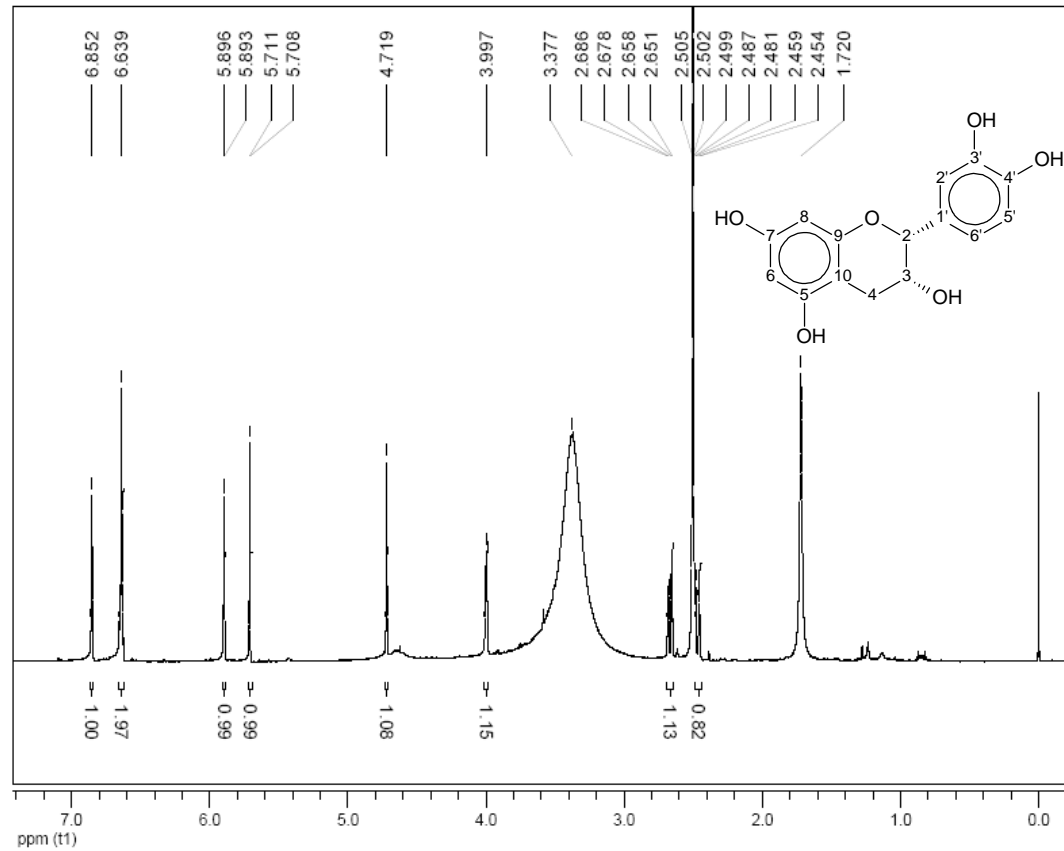


FIGURA 31A Espectro de ultravioleta de RC1-112-03 (isojacareubina), obtido em metanol, durante análise em CLAE-DAD

FIGURA 32A Espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

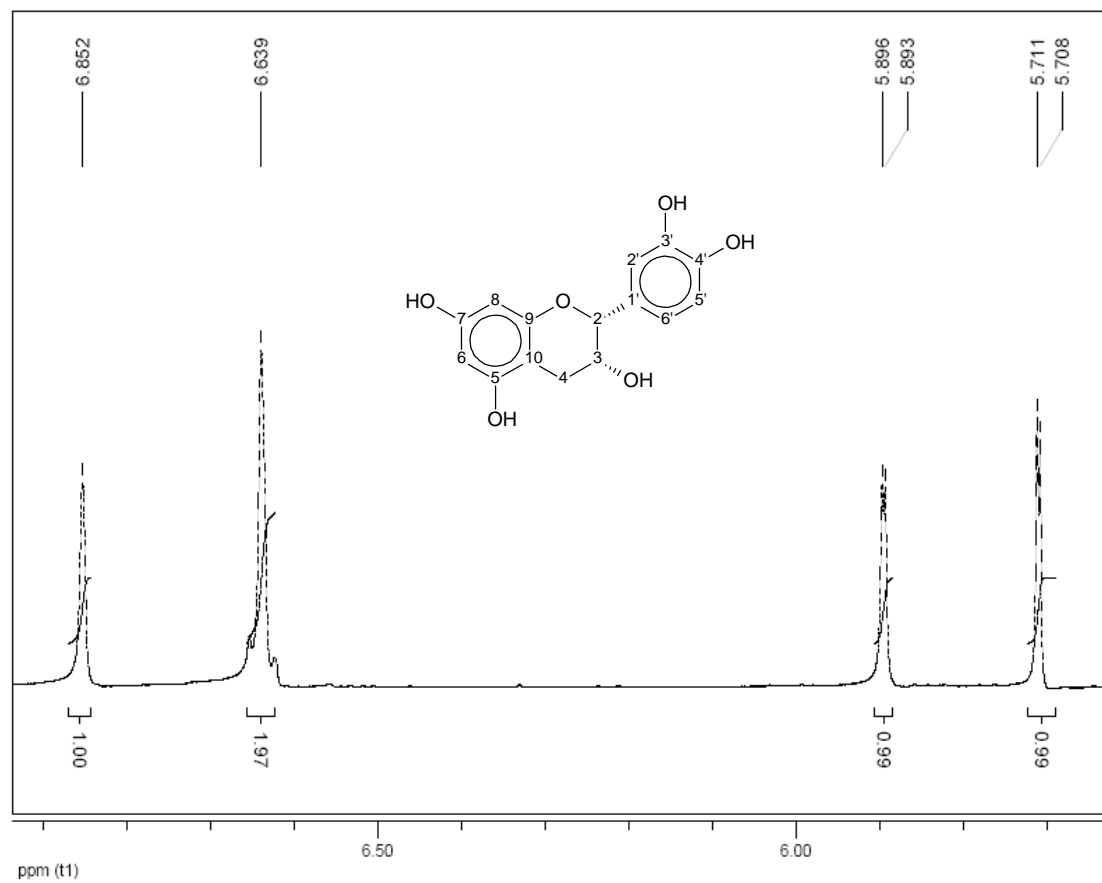
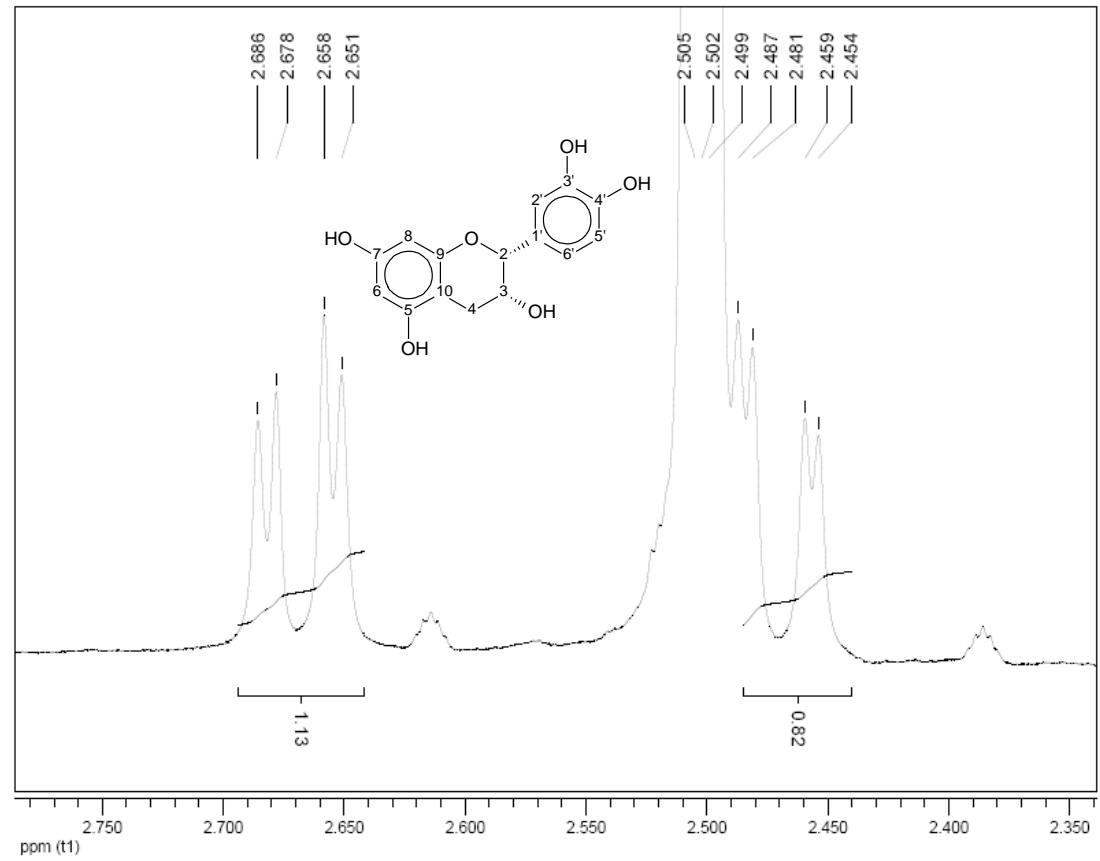


FIGURA 33A Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

FIGURA 34A Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-117-02 em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

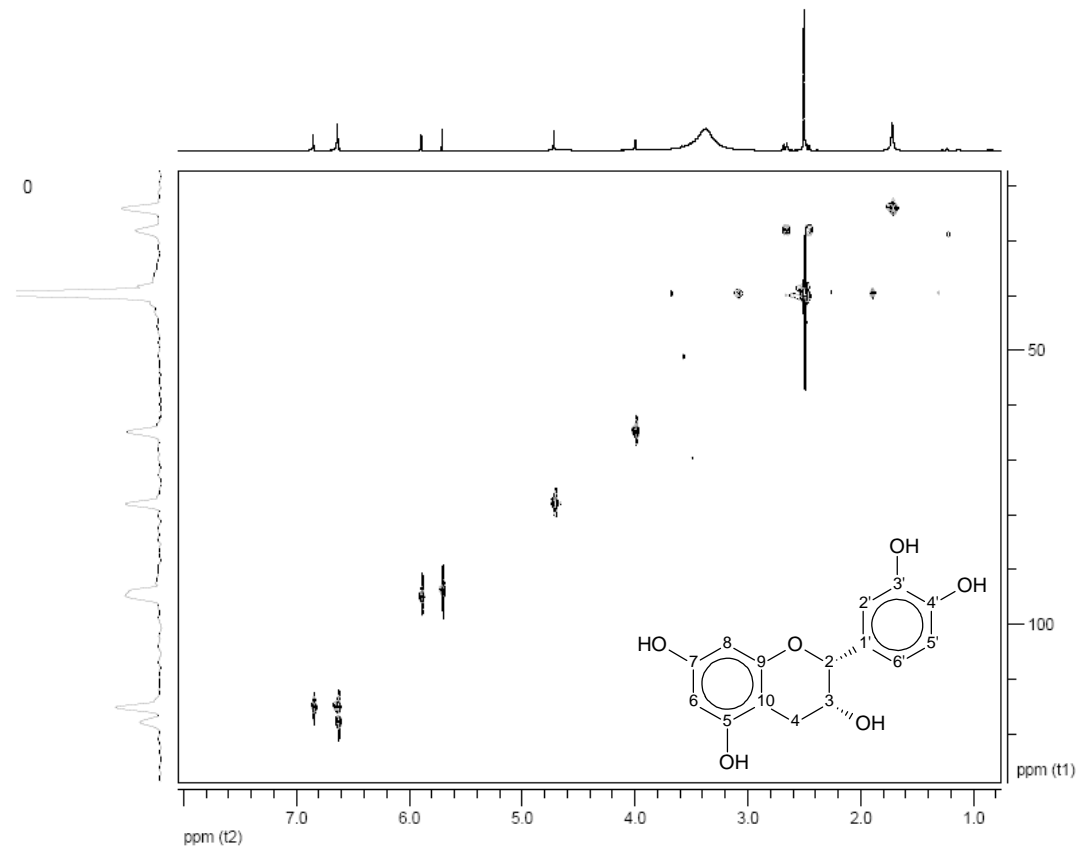


FIGURA 35A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ¹H x ¹³C (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO-d₆.

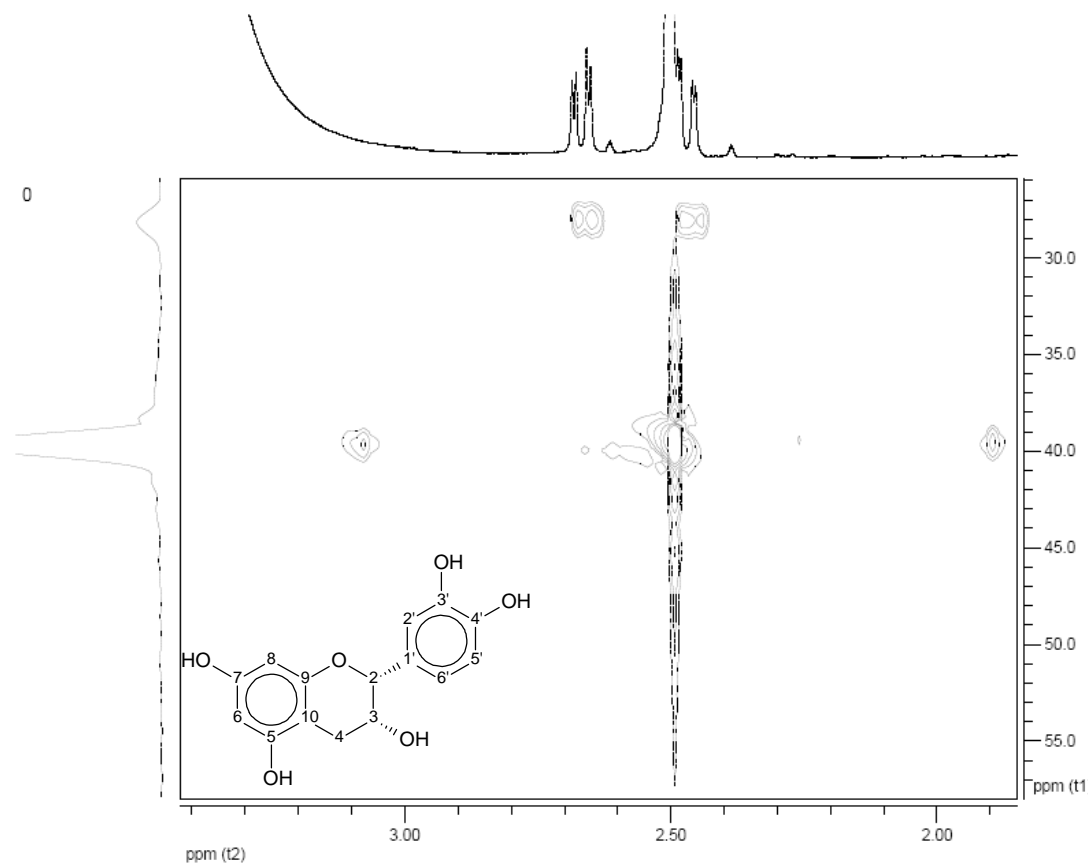


FIGURA 36A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

170

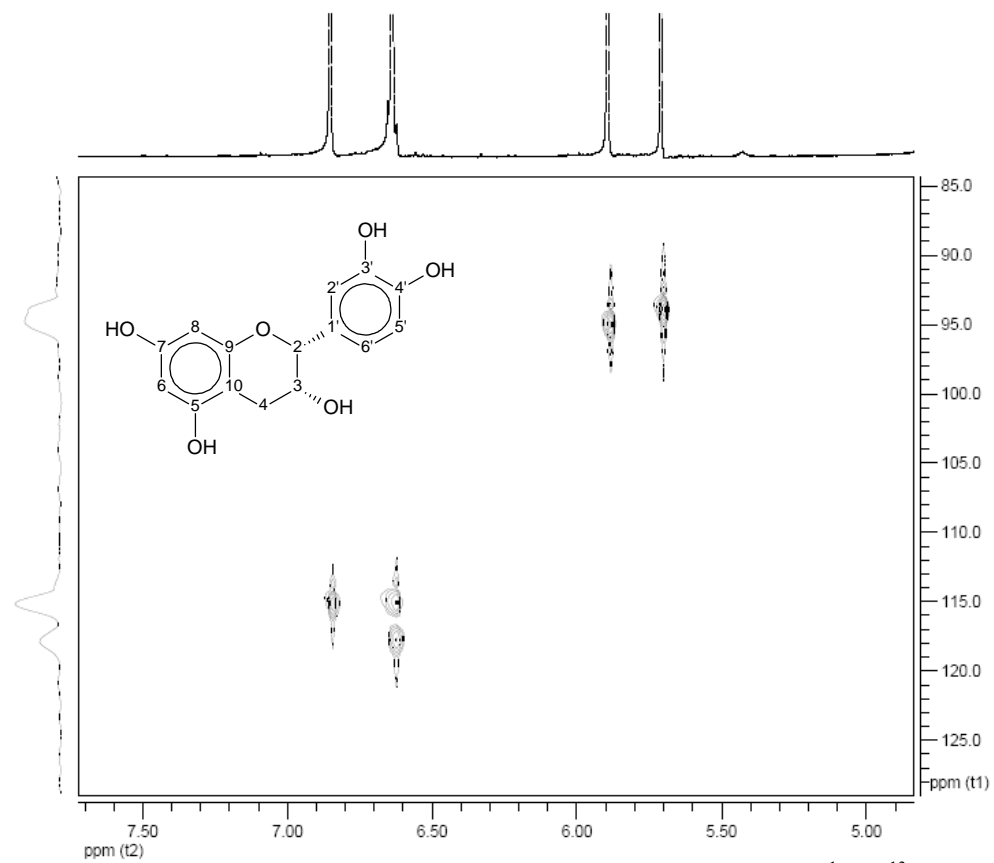


FIGURA 37A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

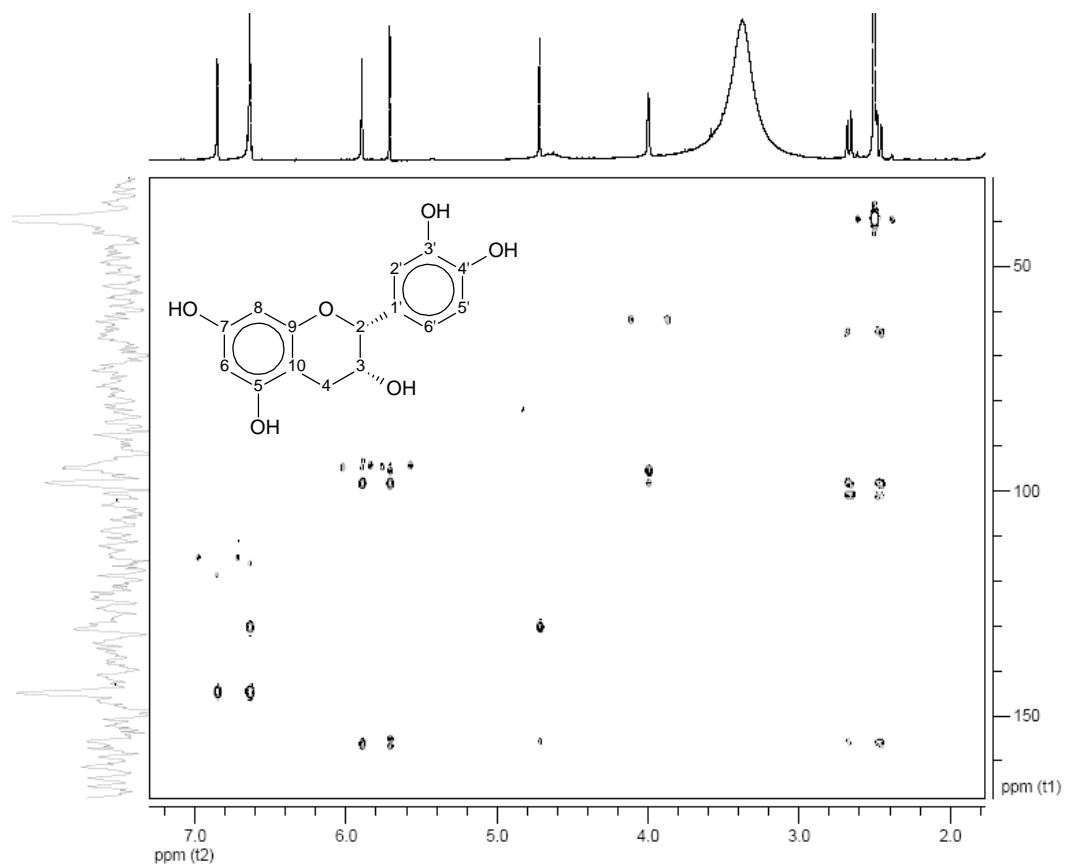


FIGURA 38A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO}-d_6$.

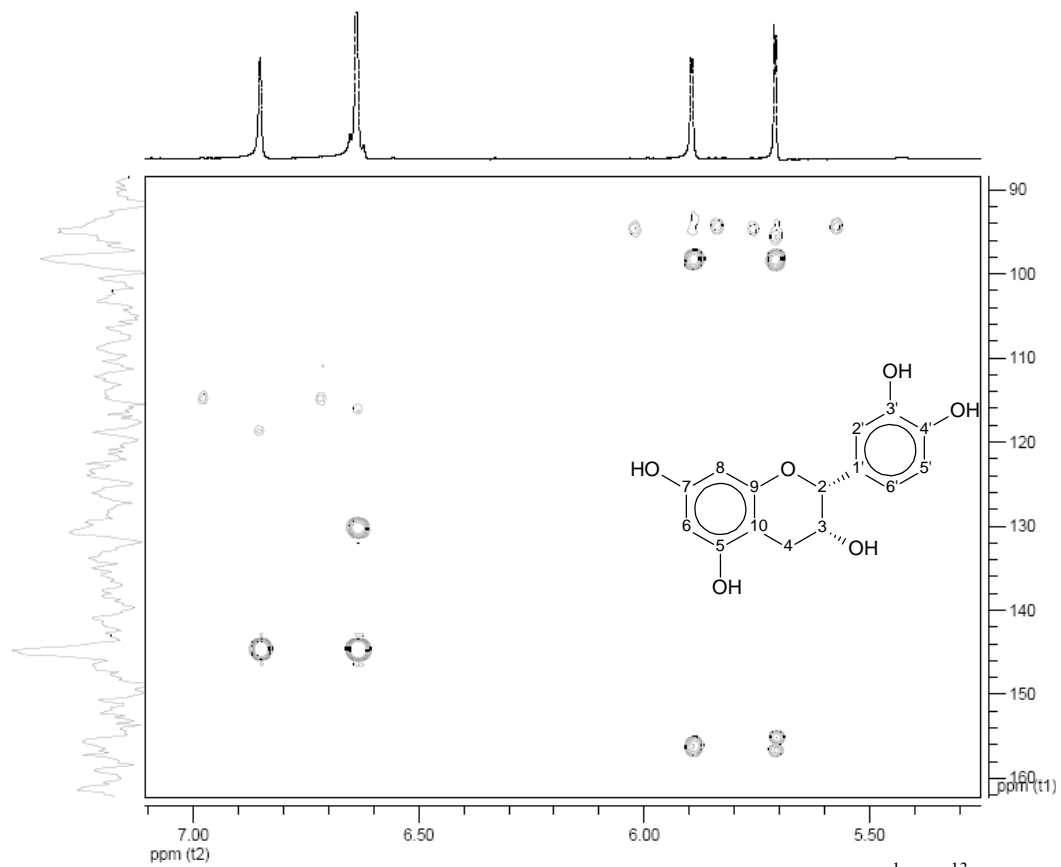


FIGURA 39A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

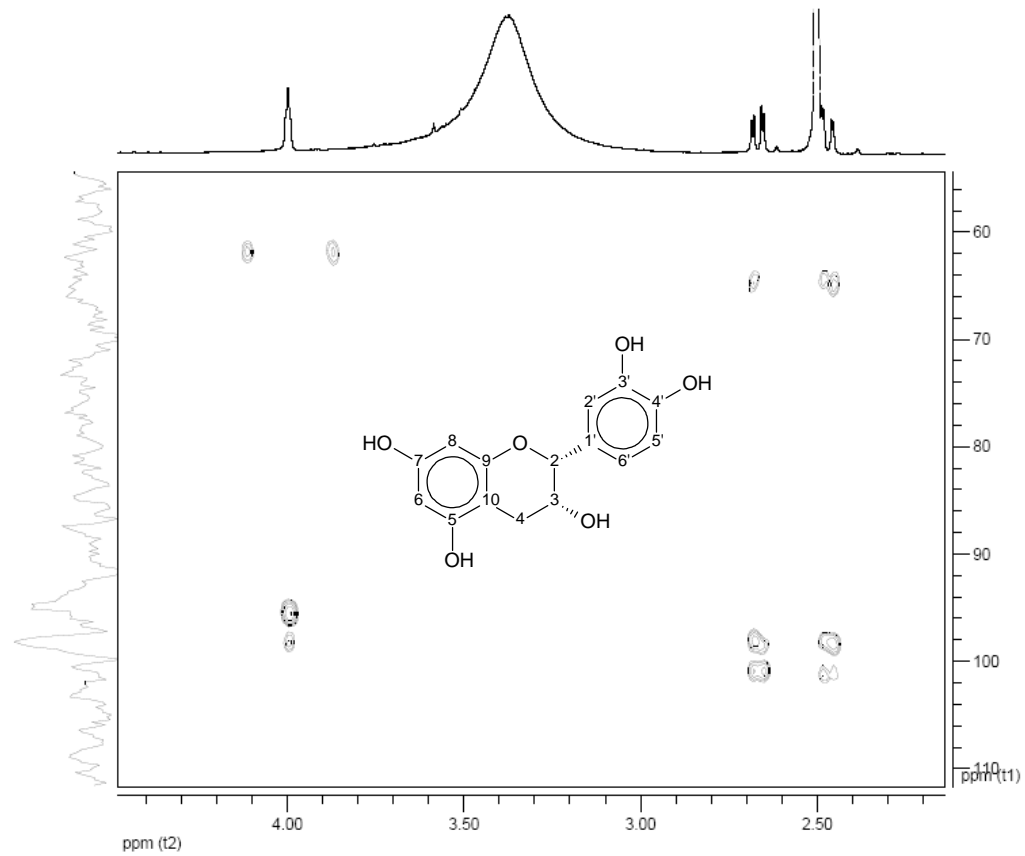


FIGURA 40A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

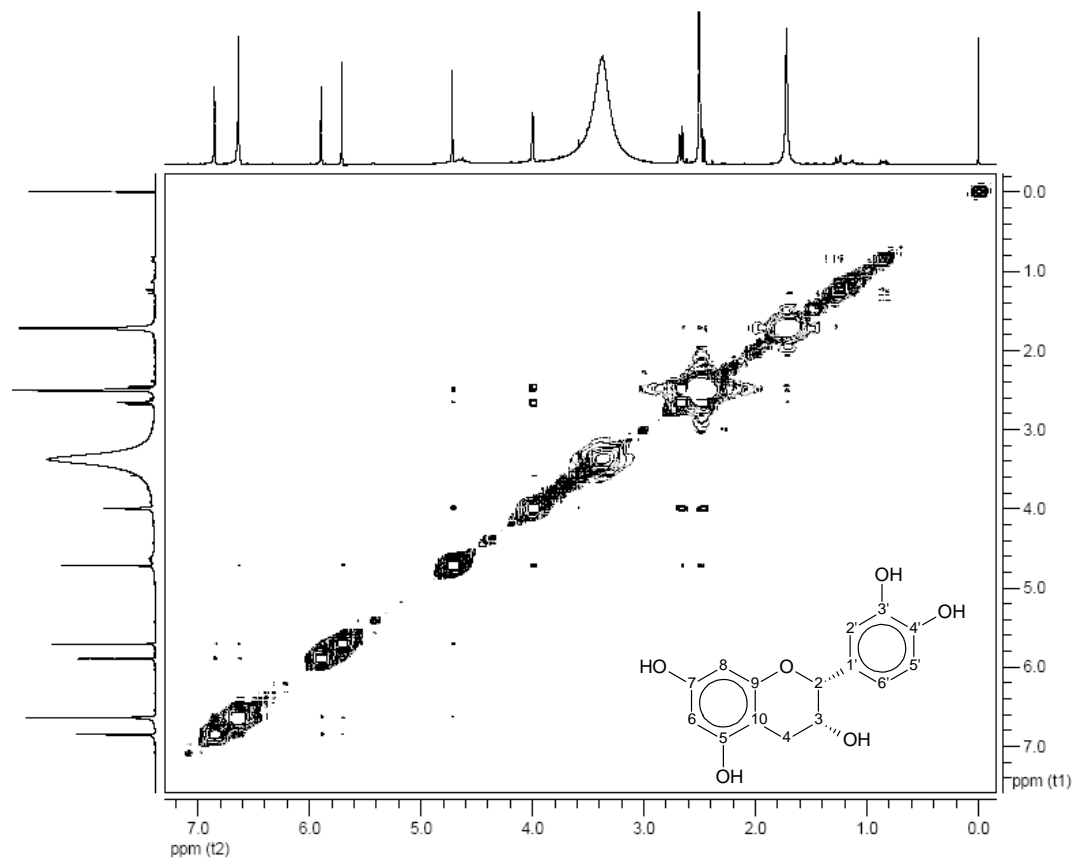


FIGURA 41A Mapa de correlação homonuclear ¹H x ¹H (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em DMSO-*d*₆, 600 MHz.

175

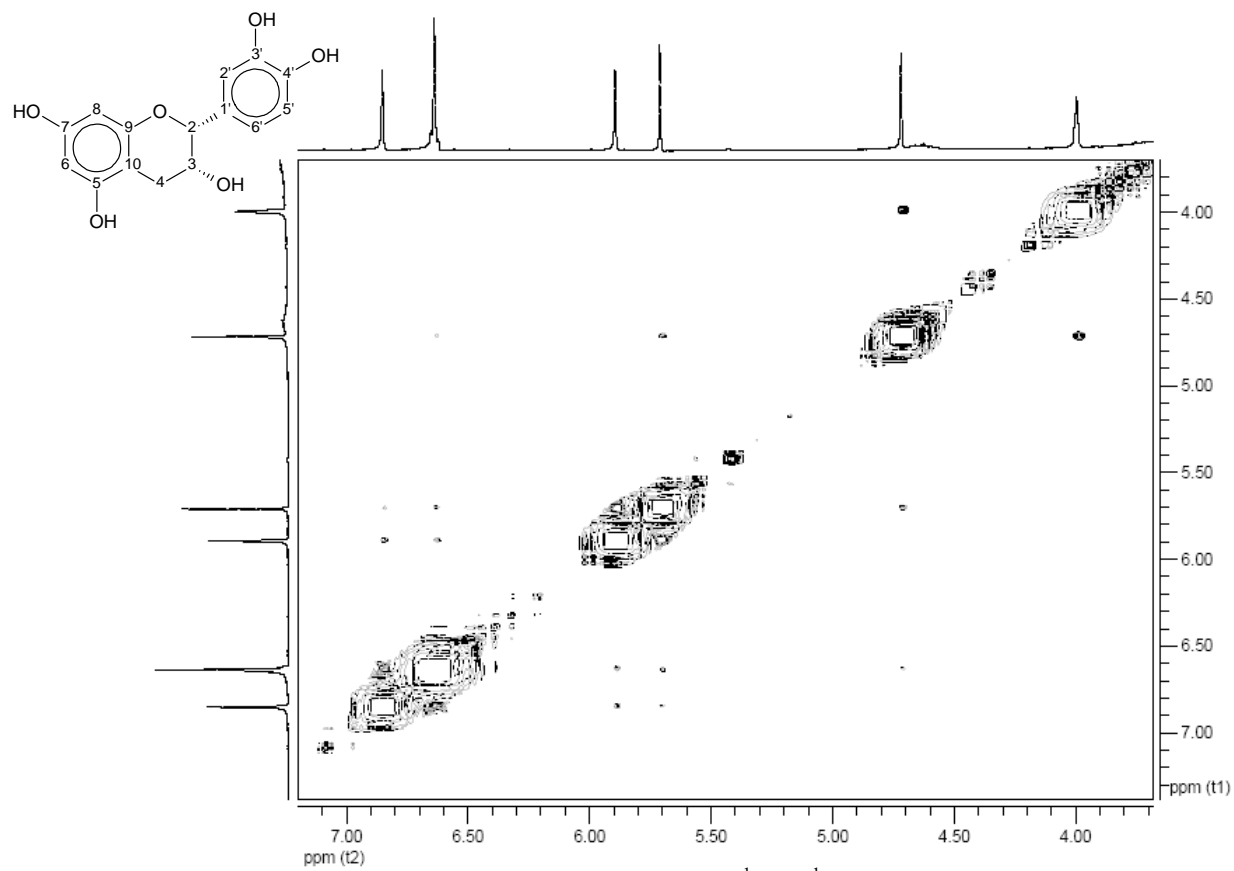


FIGURA 42A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

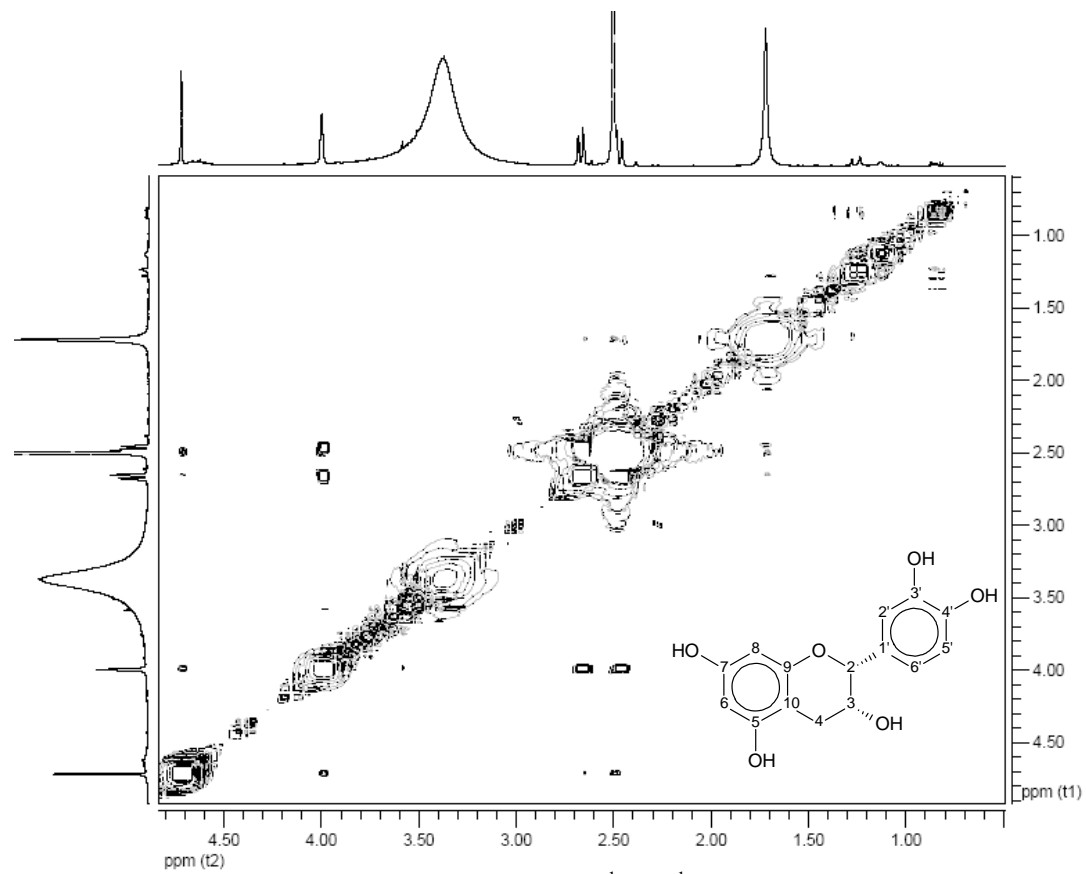


FIGURA 43A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-117-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

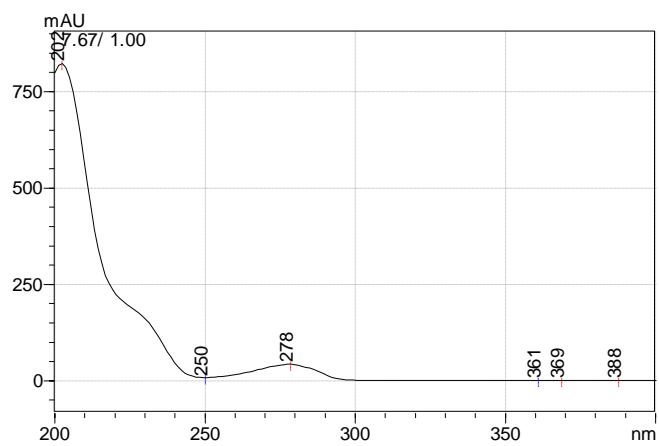


FIGURA 44A Espectro de ultravioleta de RC1-117-02 (epicatequina), obtido em metanol, durante análise em CLAE-DAD.

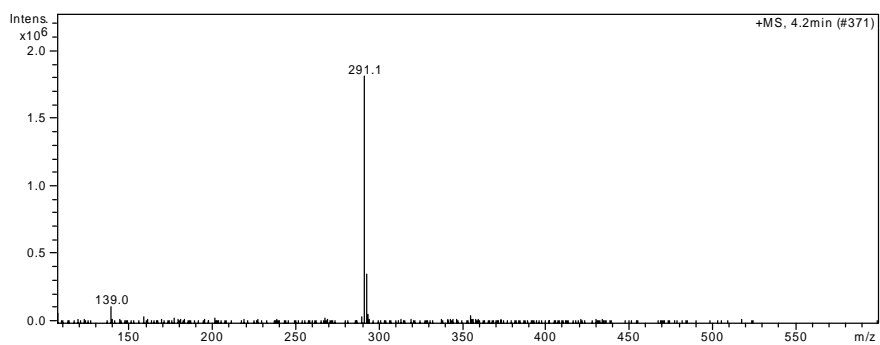


FIGURA 45A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo positivo.

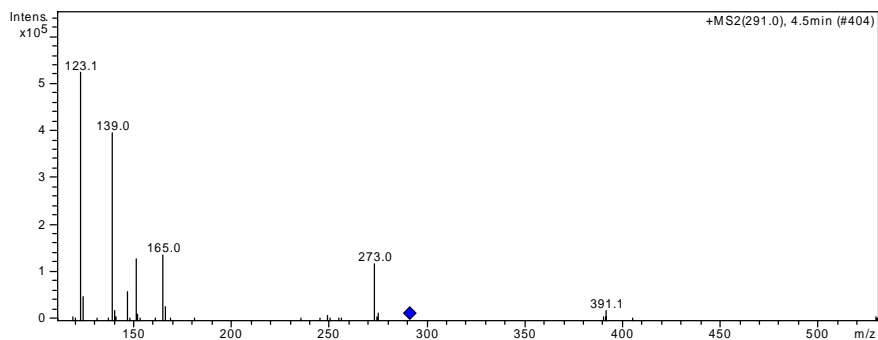


FIGURA 46A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 291 dalton no por impacto com átomos de hélio.

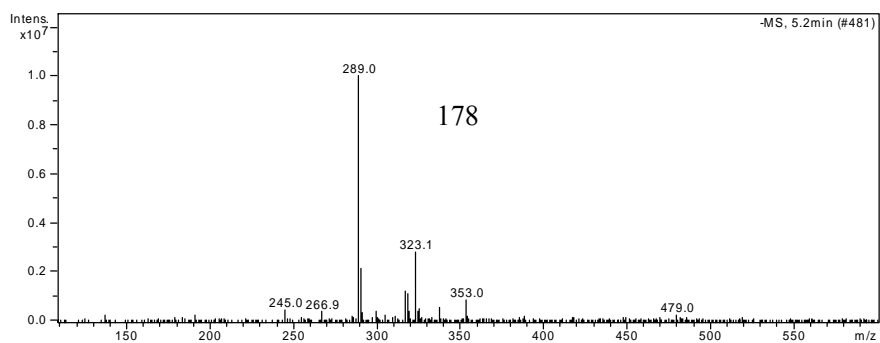


FIGURA 47A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-117-02 (epicatequina), obtido no modo negativo.

179

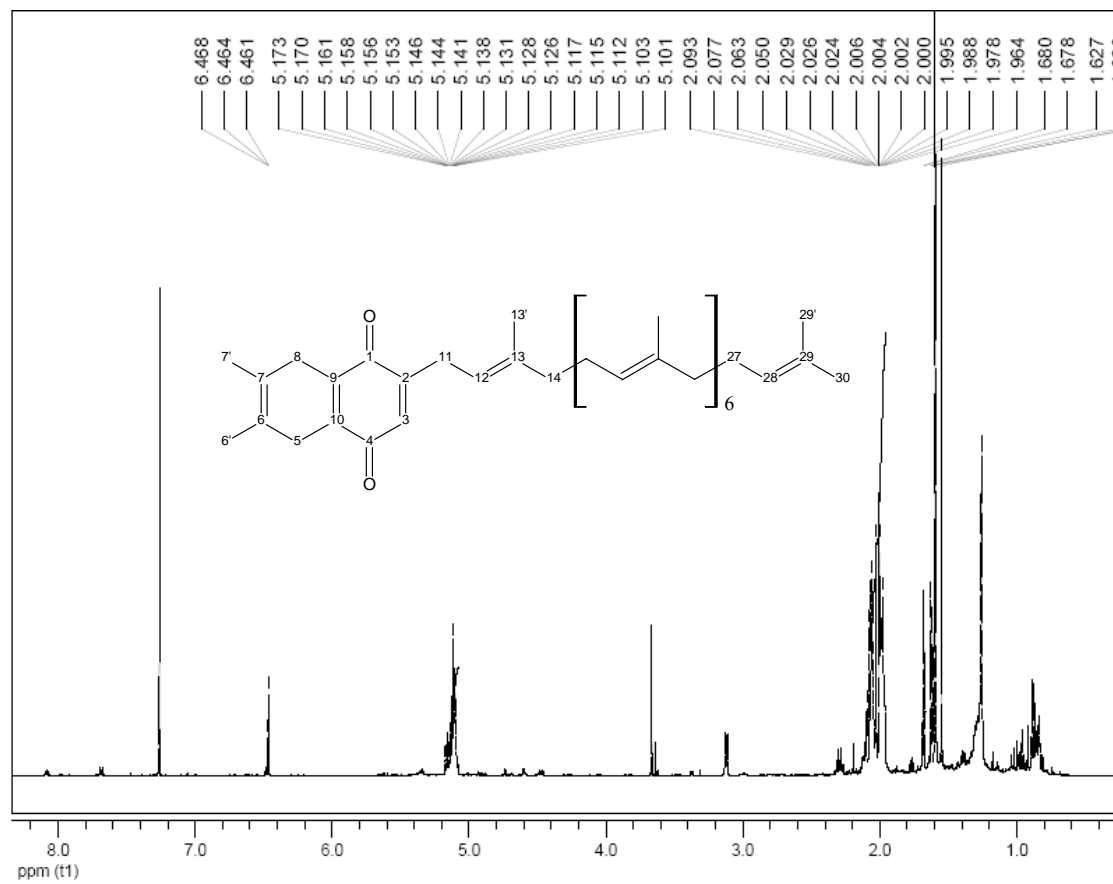


FIGURA 48A Espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.

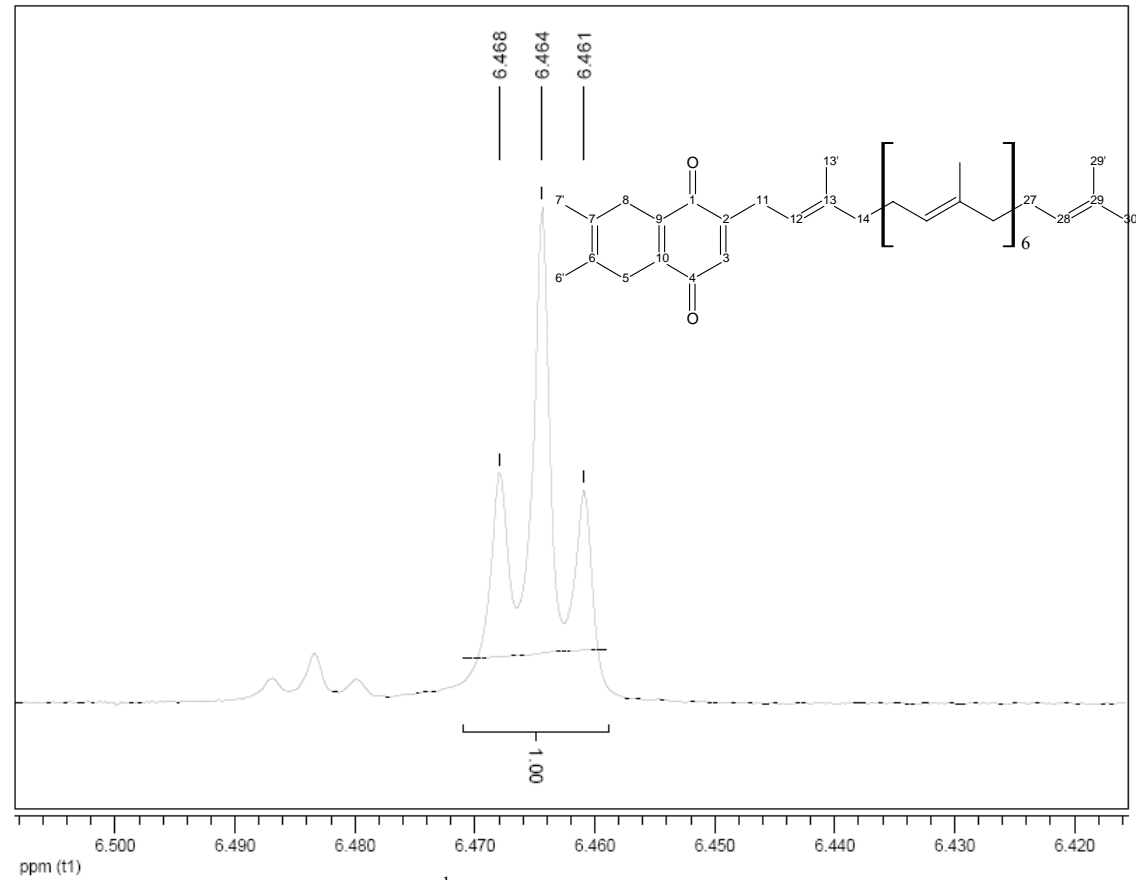
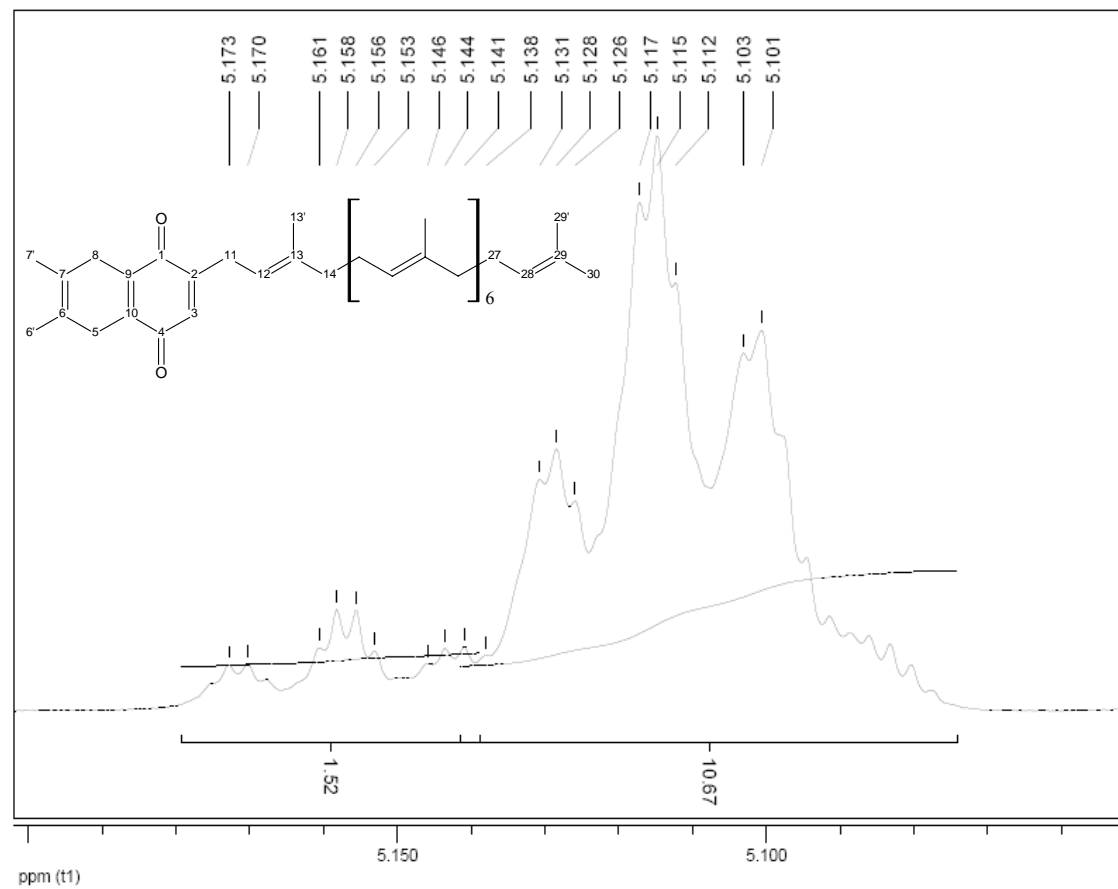
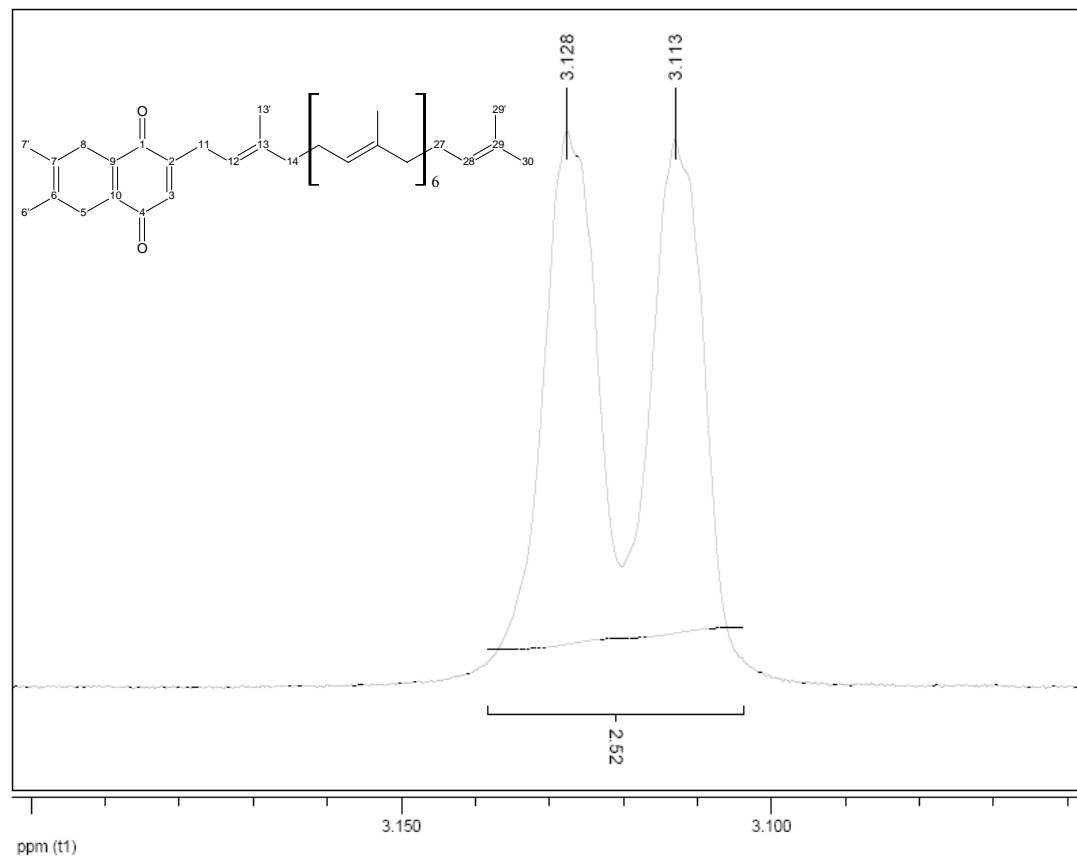
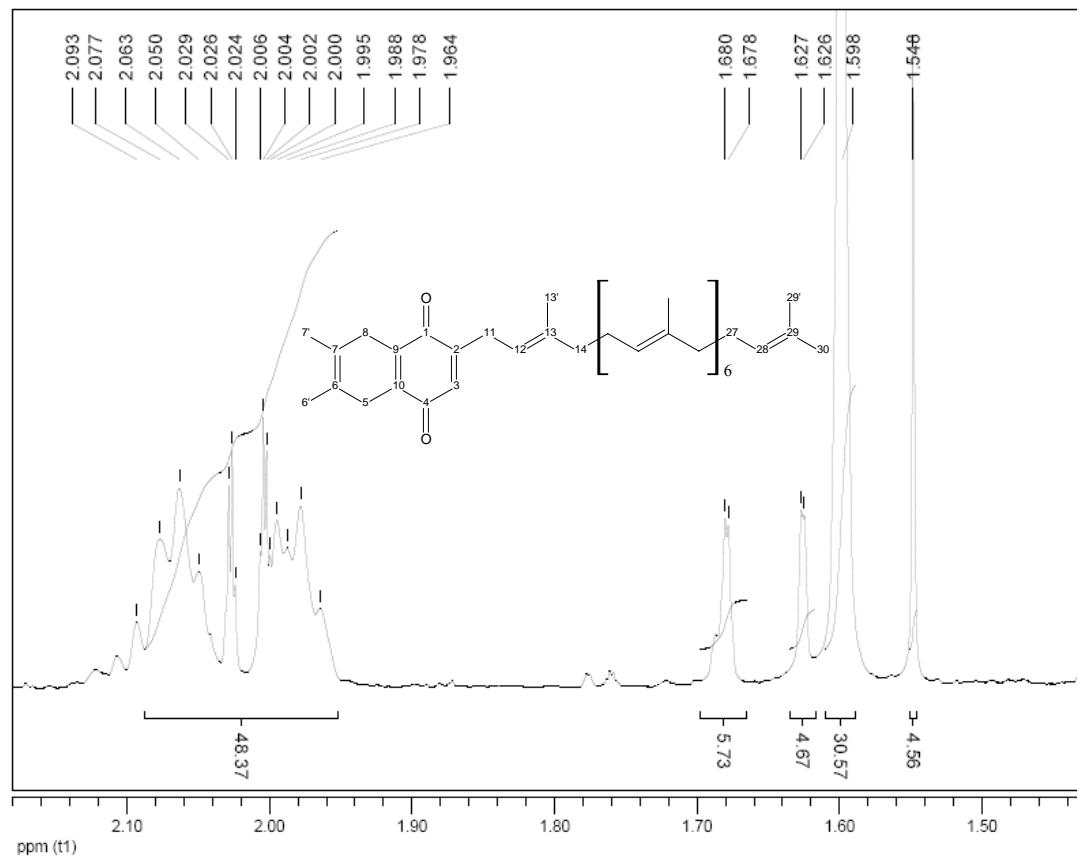
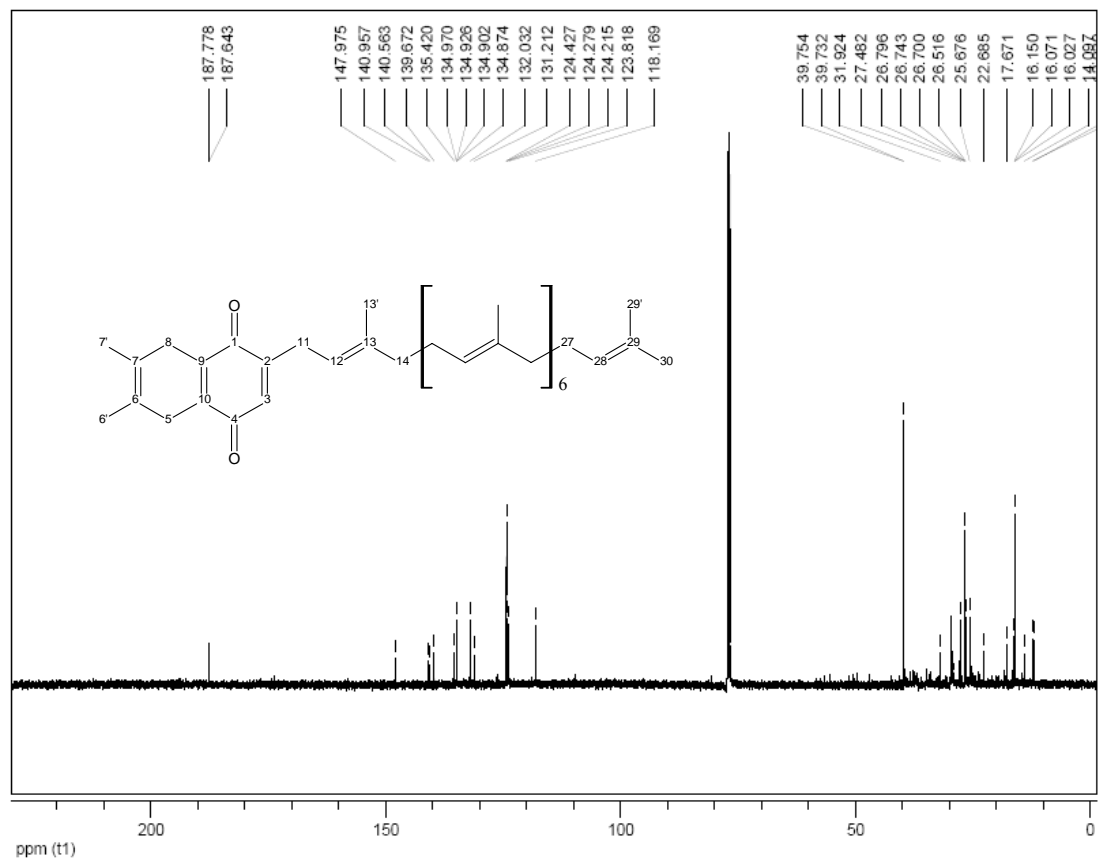


FIGURA 49A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.

FIGURA 50A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.

FIGURA 51A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.

FIGURA 52A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 500 MHz.

FIGURA 53A Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.

185

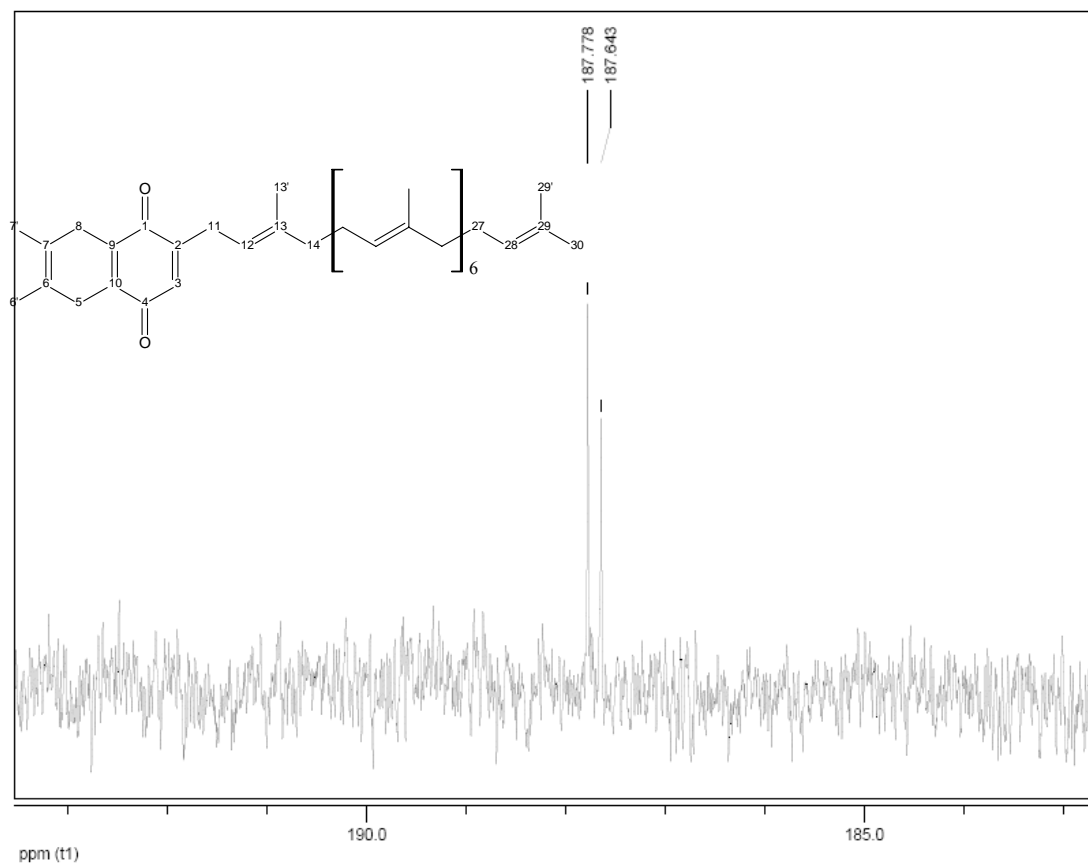
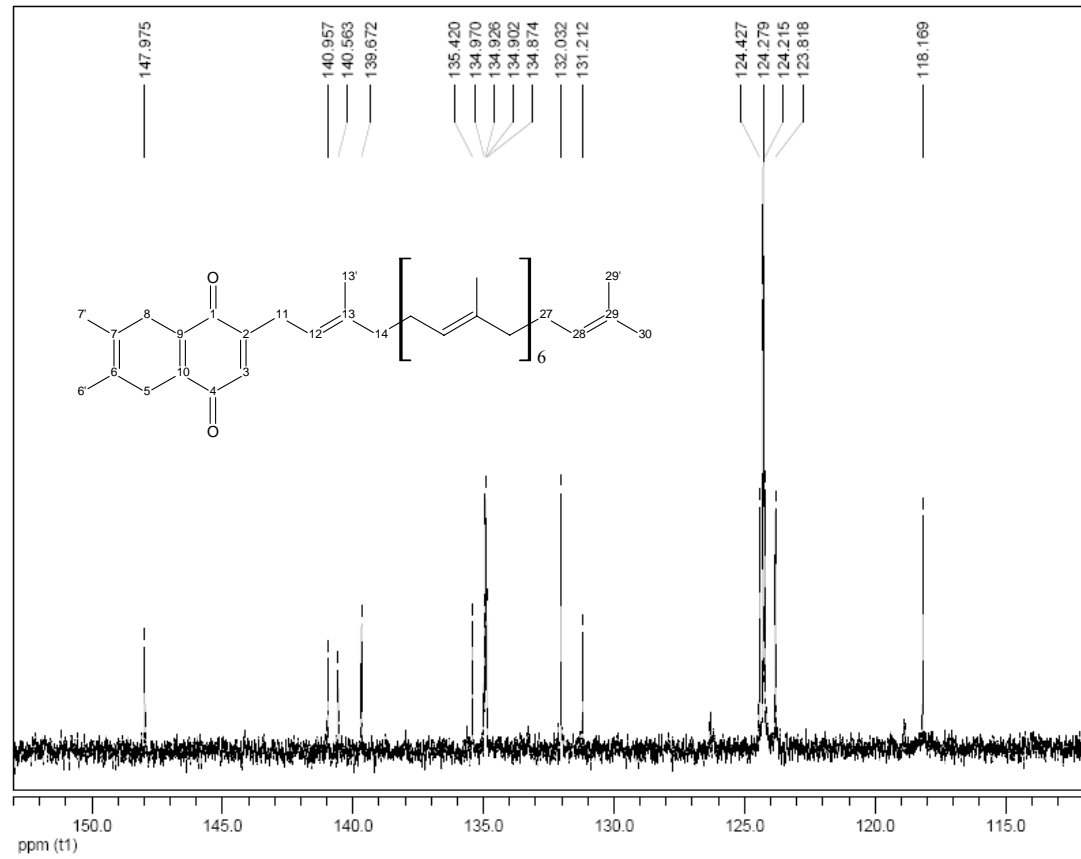


FIGURA 54A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.

FIGURA 55A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.

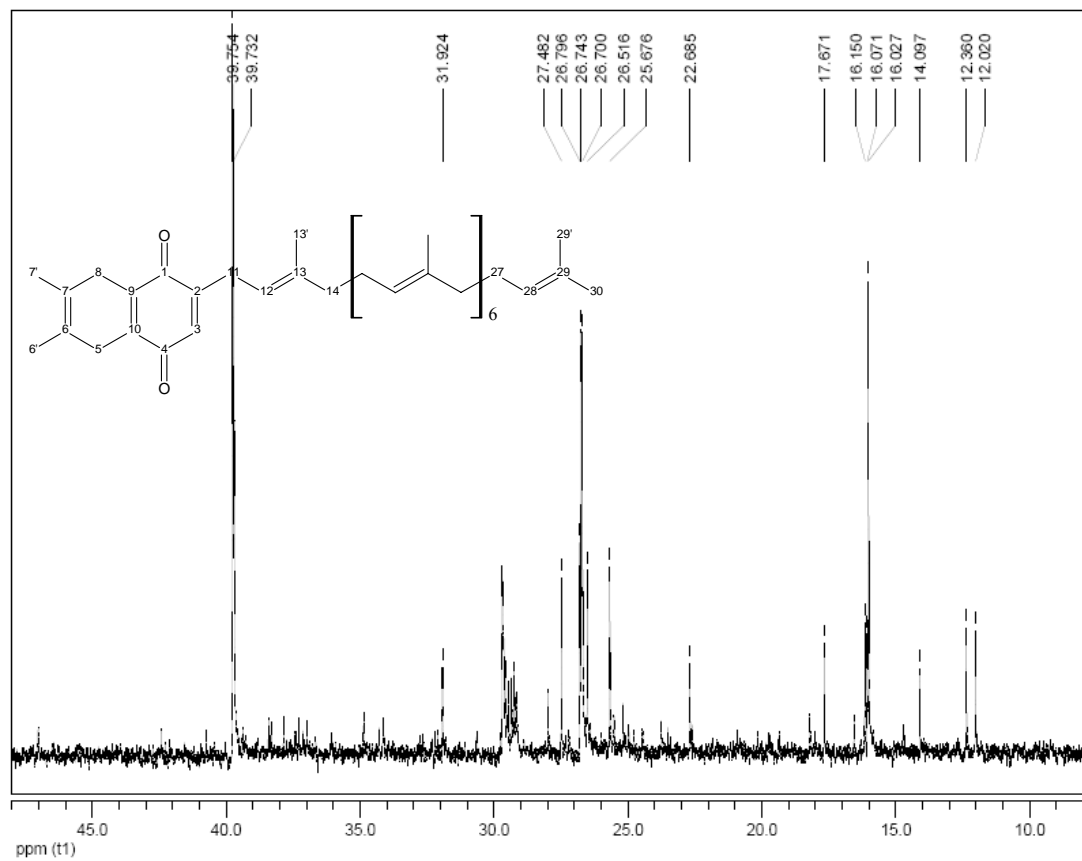


FIGURA 56A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl_3 , 126 MHz.

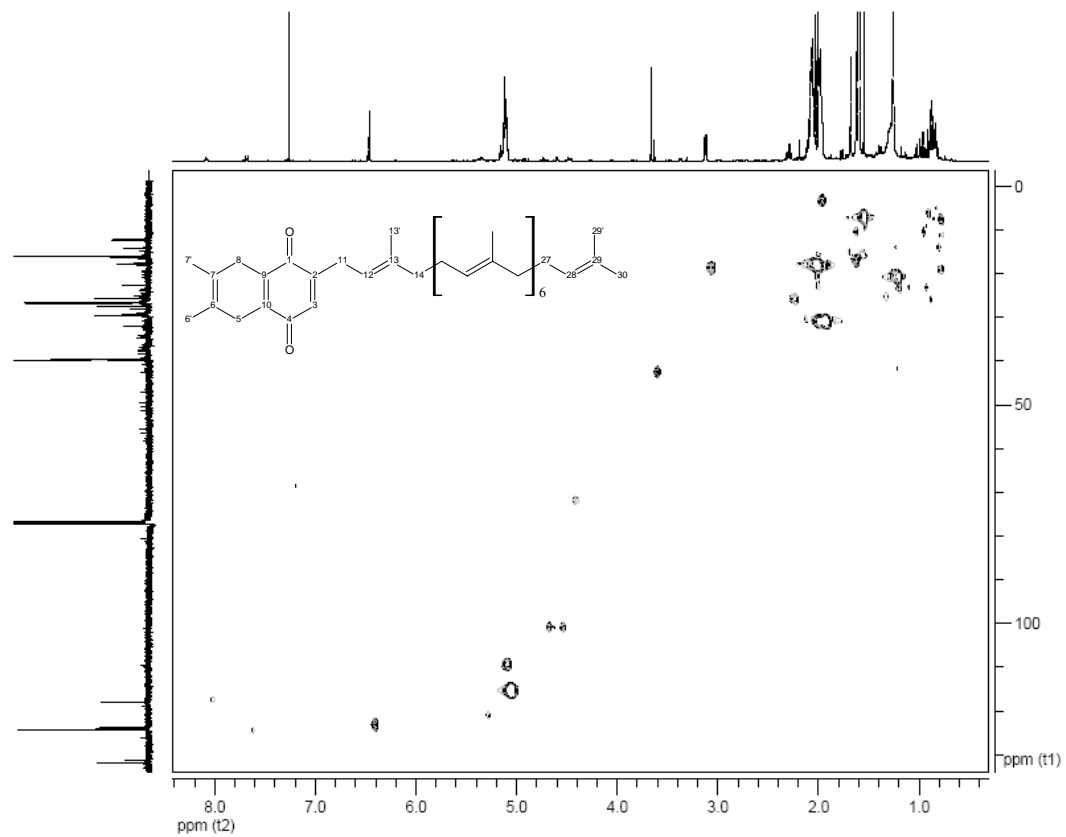


FIGURA 57A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) ¹H x ¹³C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl₃.

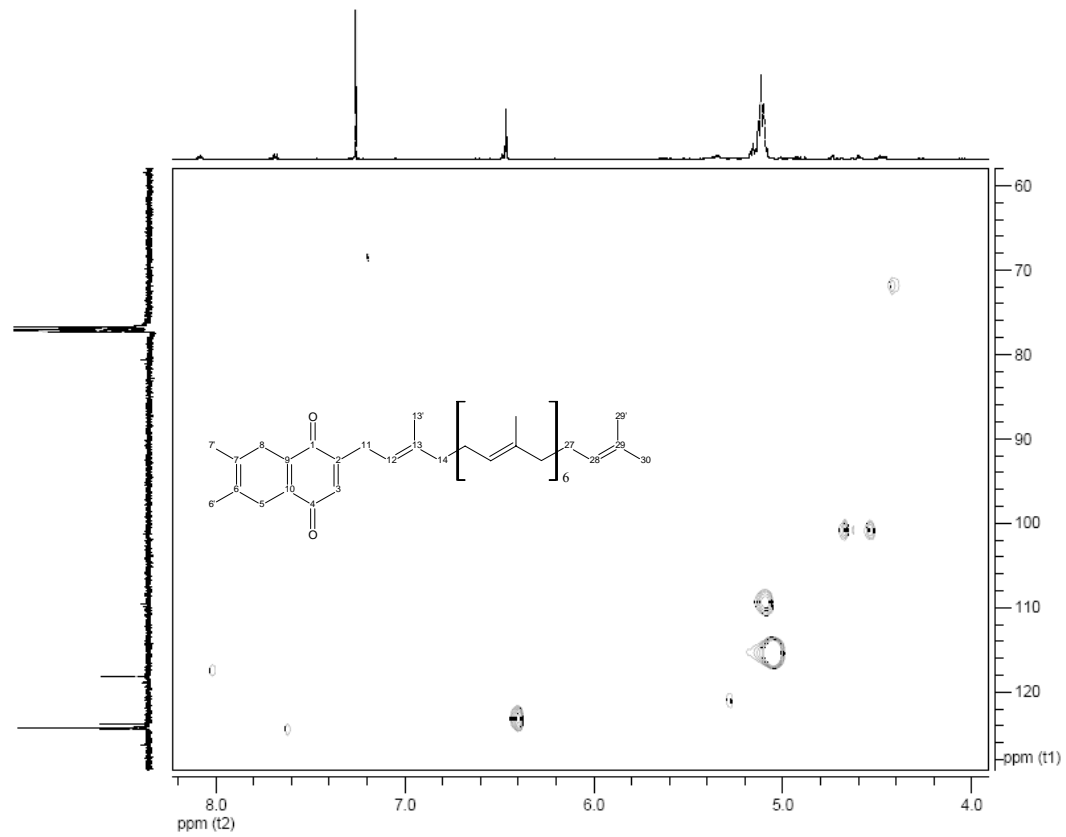


FIGURA 58A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) ¹H x ¹³C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl₃.

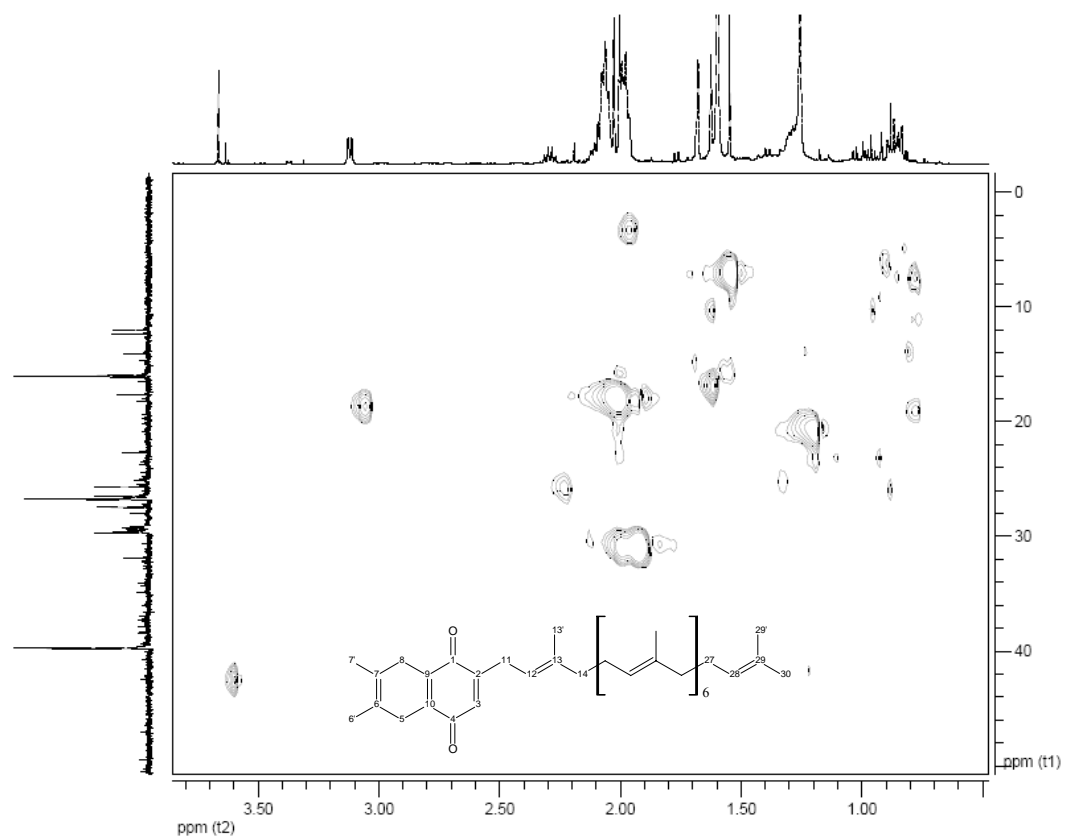


FIGURA 59A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 .

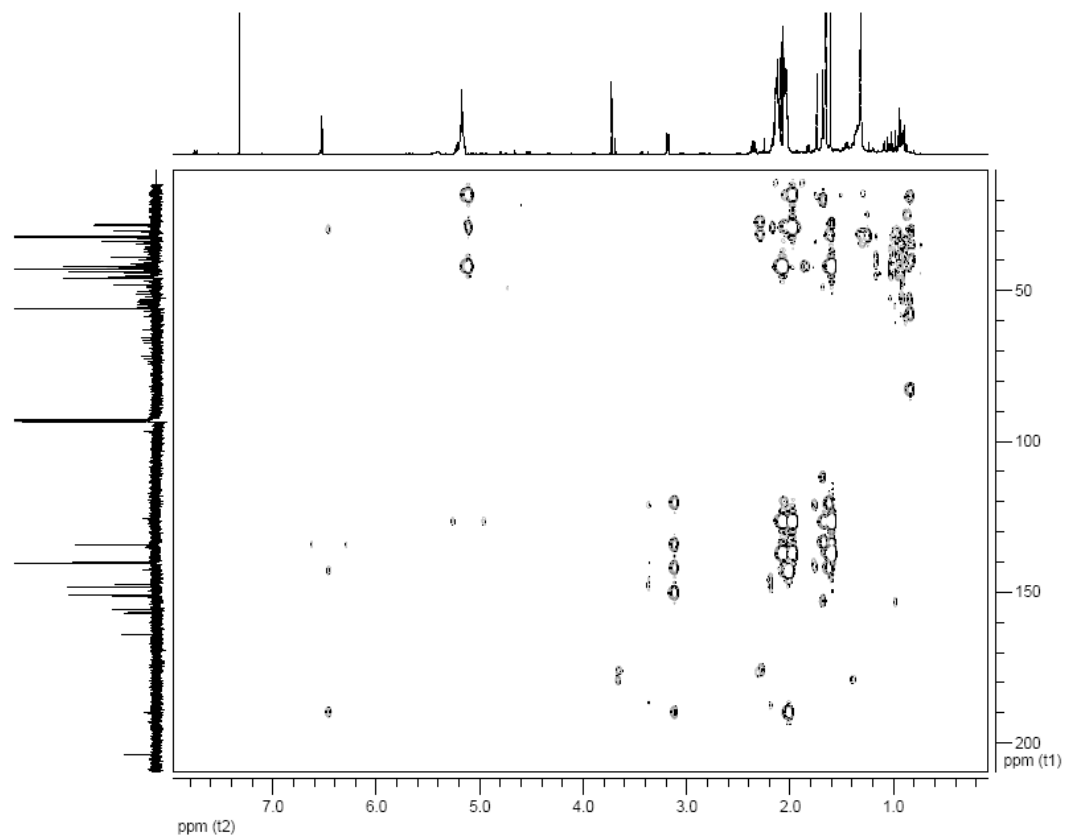


FIGURA 60A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ¹H x ¹³C (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquinona) em CDCl₃.

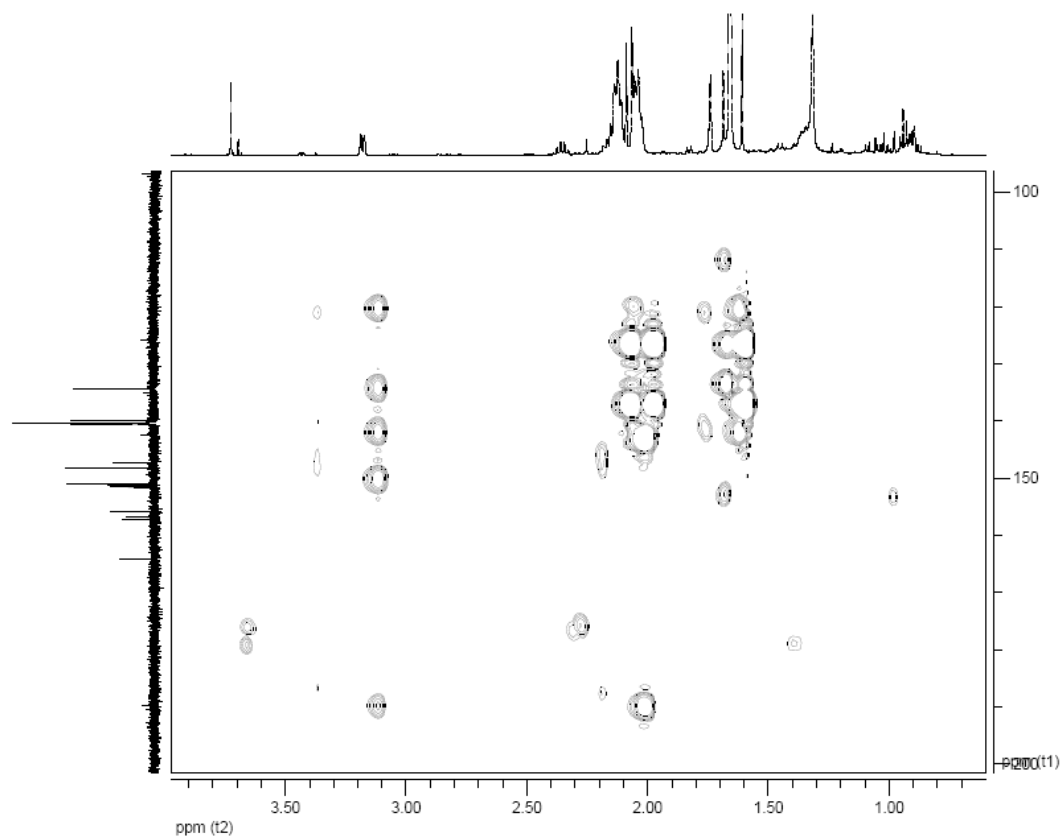


FIGURA 61A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 .

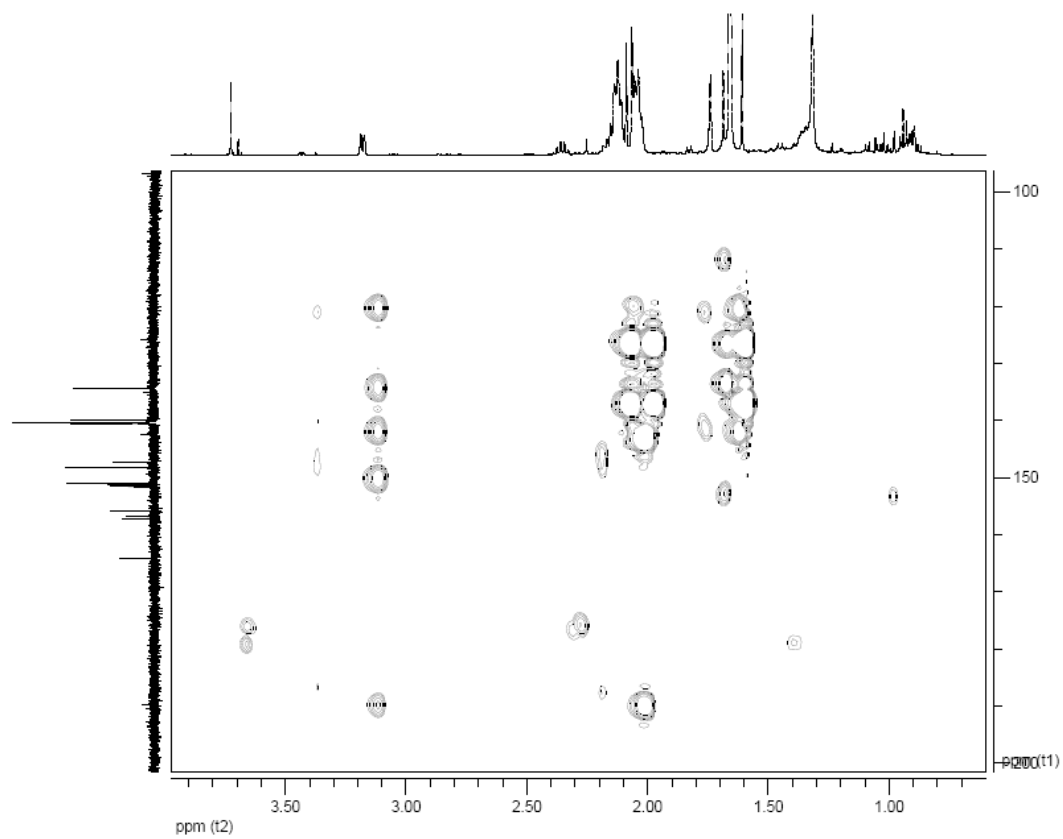


FIGURA 62A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 .

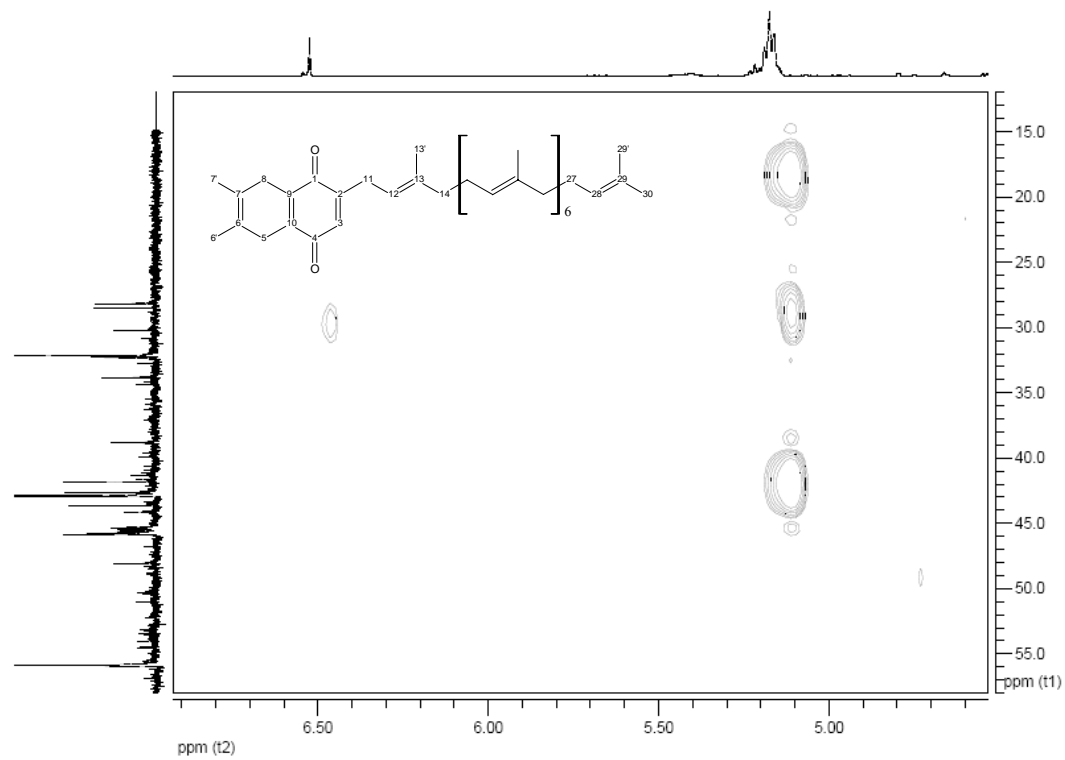


FIGURA 63A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 .

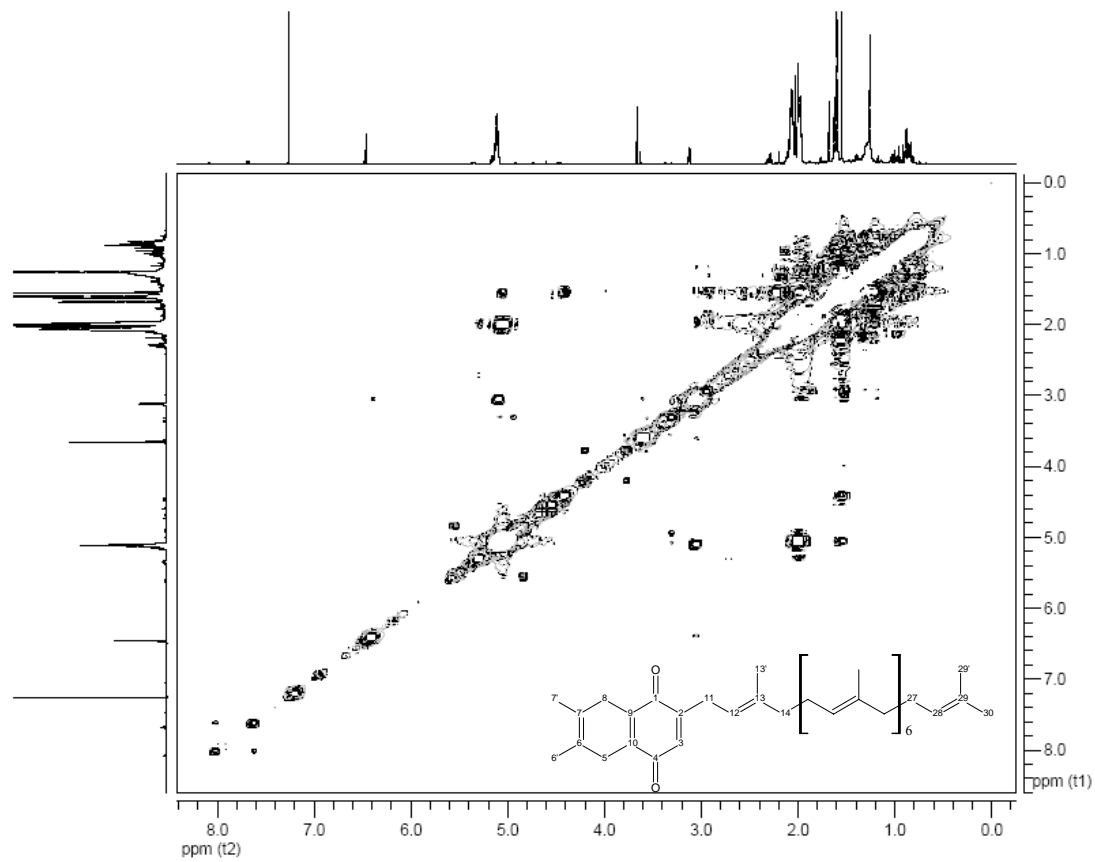


FIGURA 64A Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 , 500 MHz.

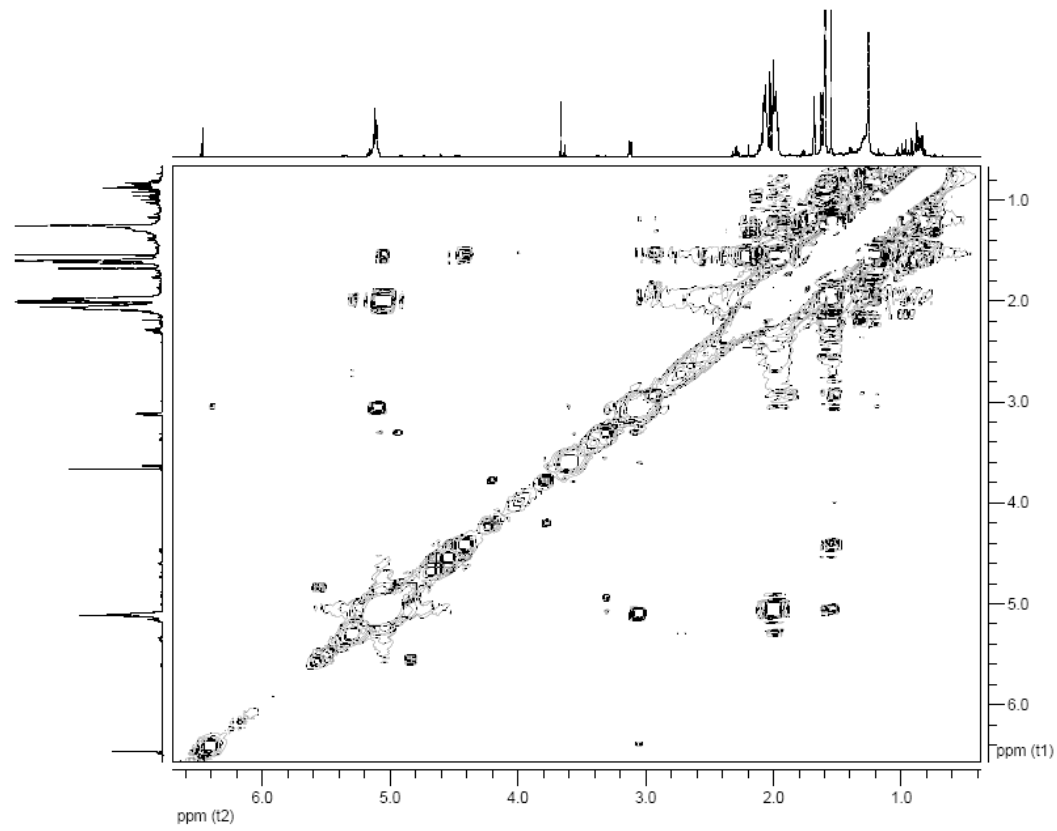


FIGURA 65A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-69-02 (actinoquina) em CDCl_3 , 500 MHz.

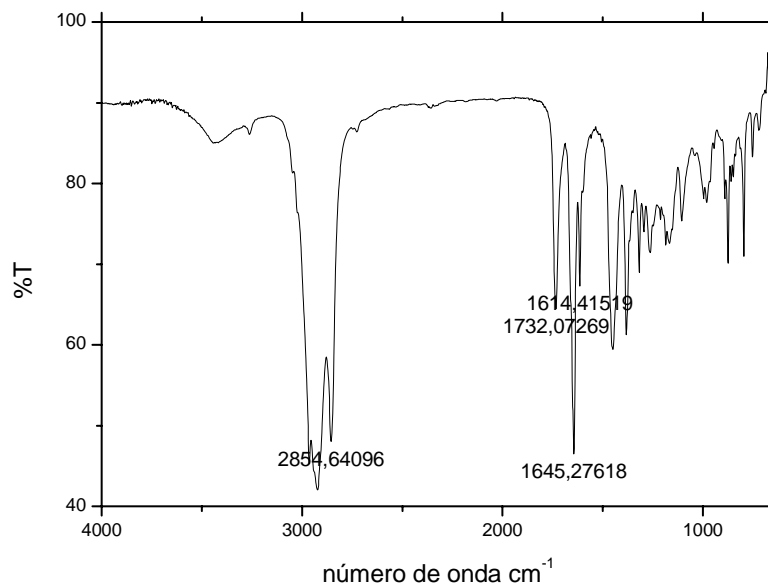


FIGURA 66A Espectro vibracional no infravermelho de RC1-69-02 (actinoquinona) em janela de Irtran-2.

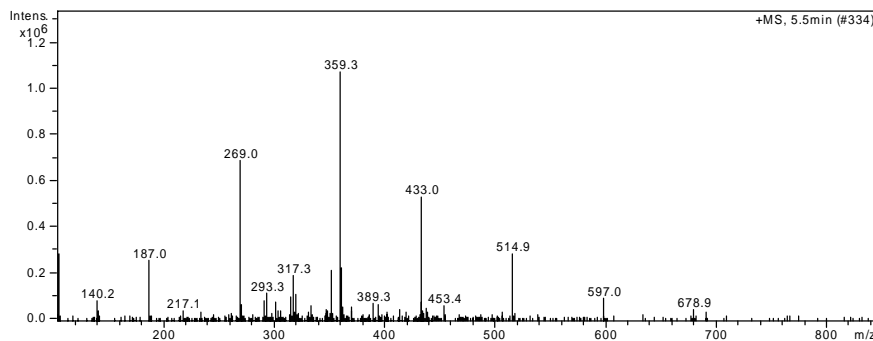


FIGURA 67A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-69-02 (actinoquinona), obtido no modo positivo.

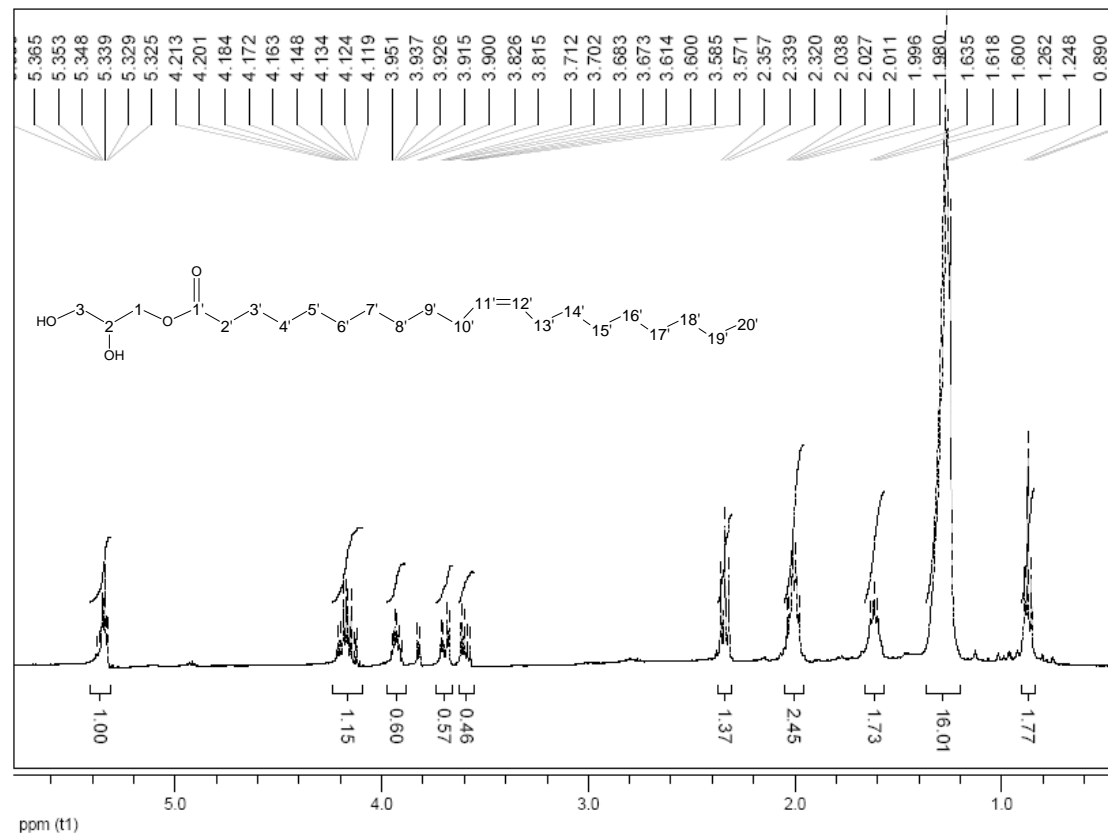


FIGURA 68A Espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz.

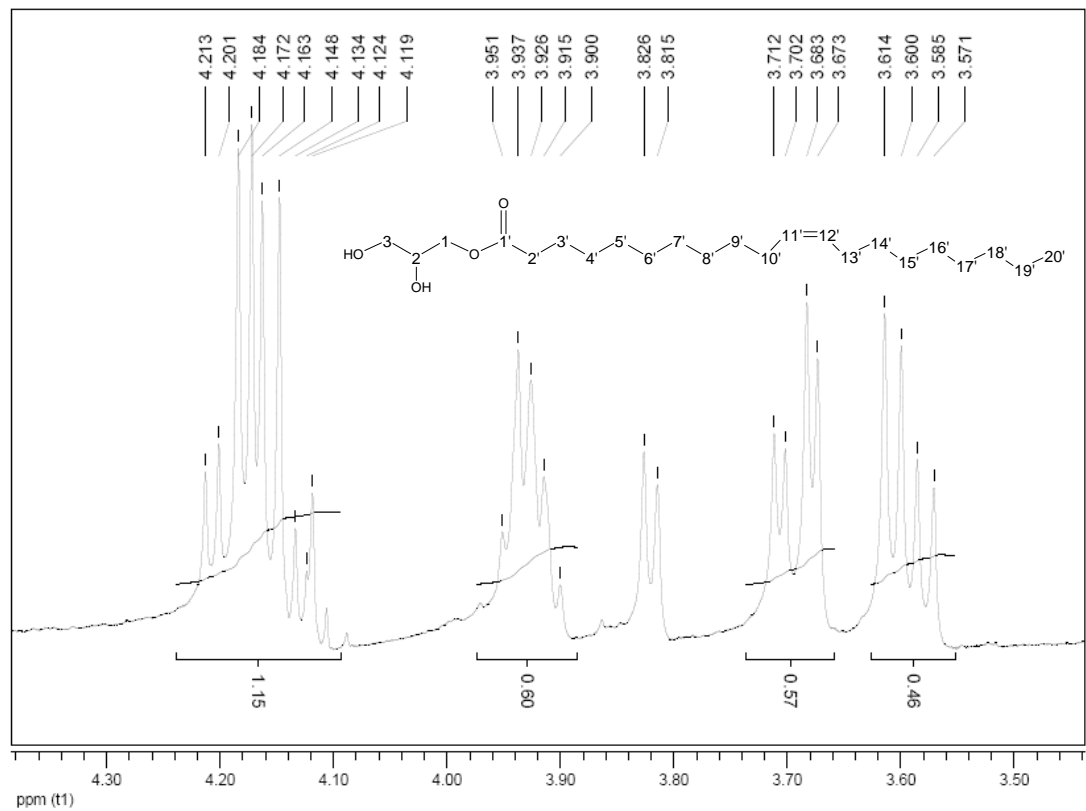


FIGURA 69A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 400 MHz.

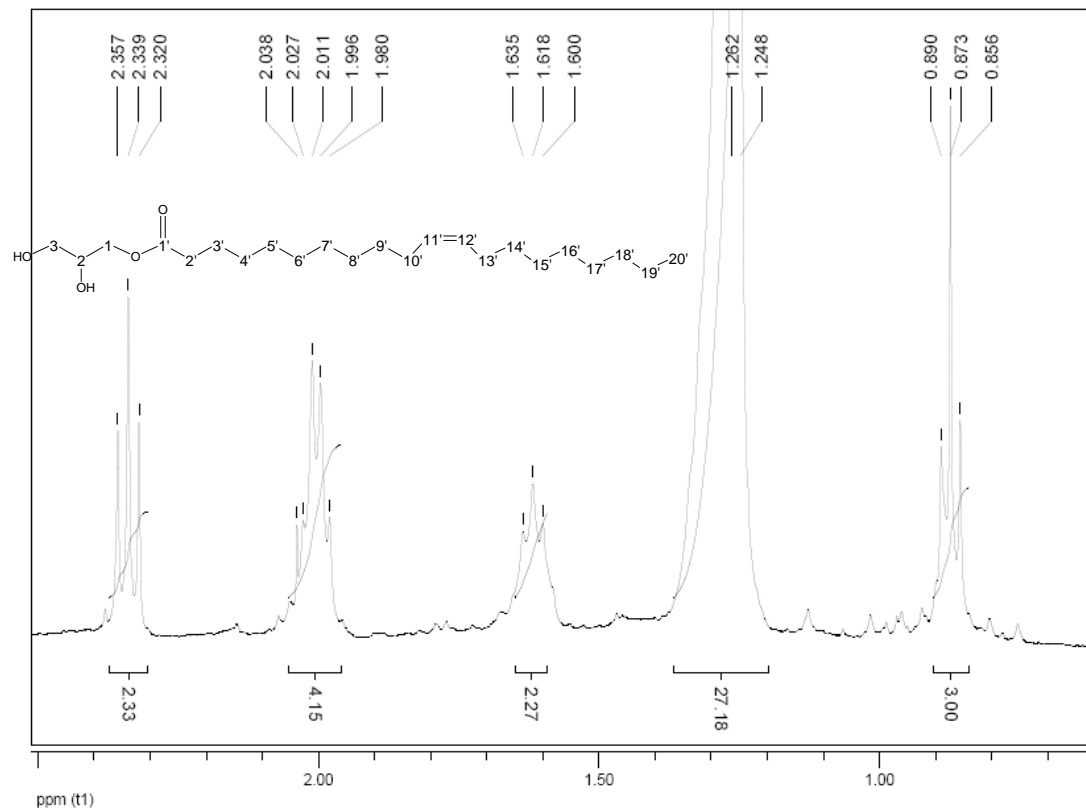


FIGURA 70A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 400 MHz.

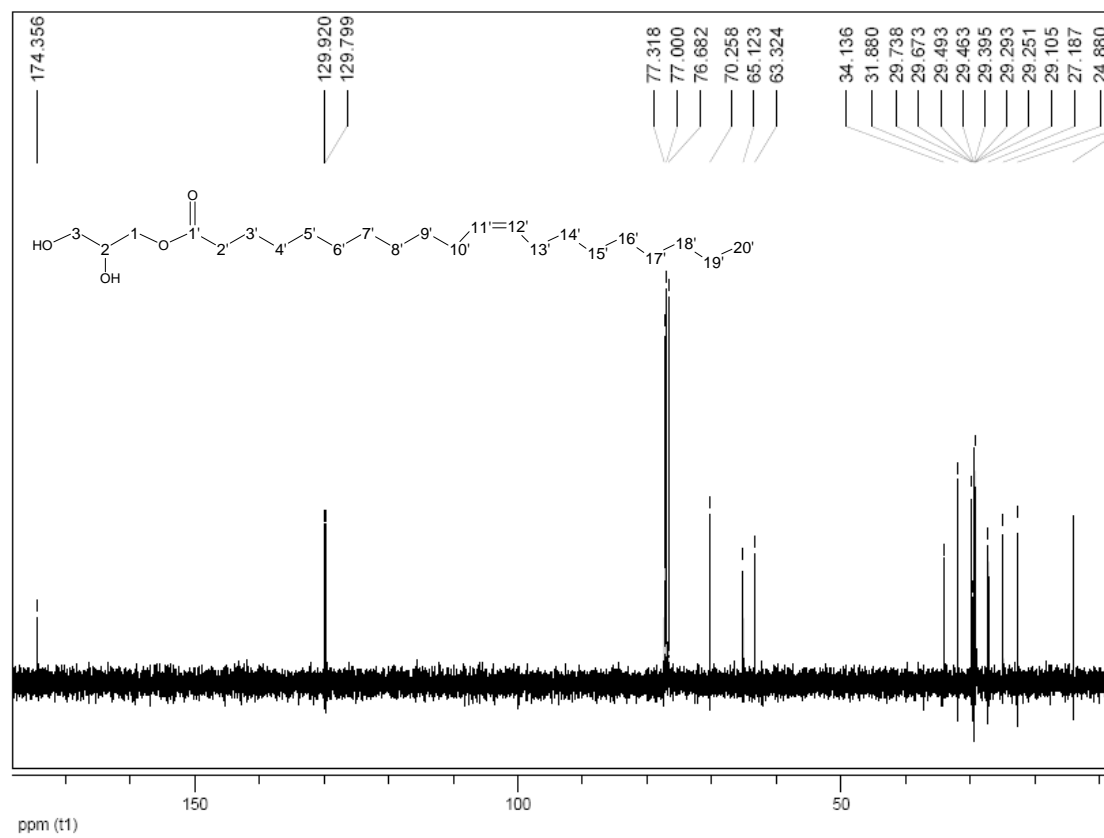


FIGURA 71A Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.

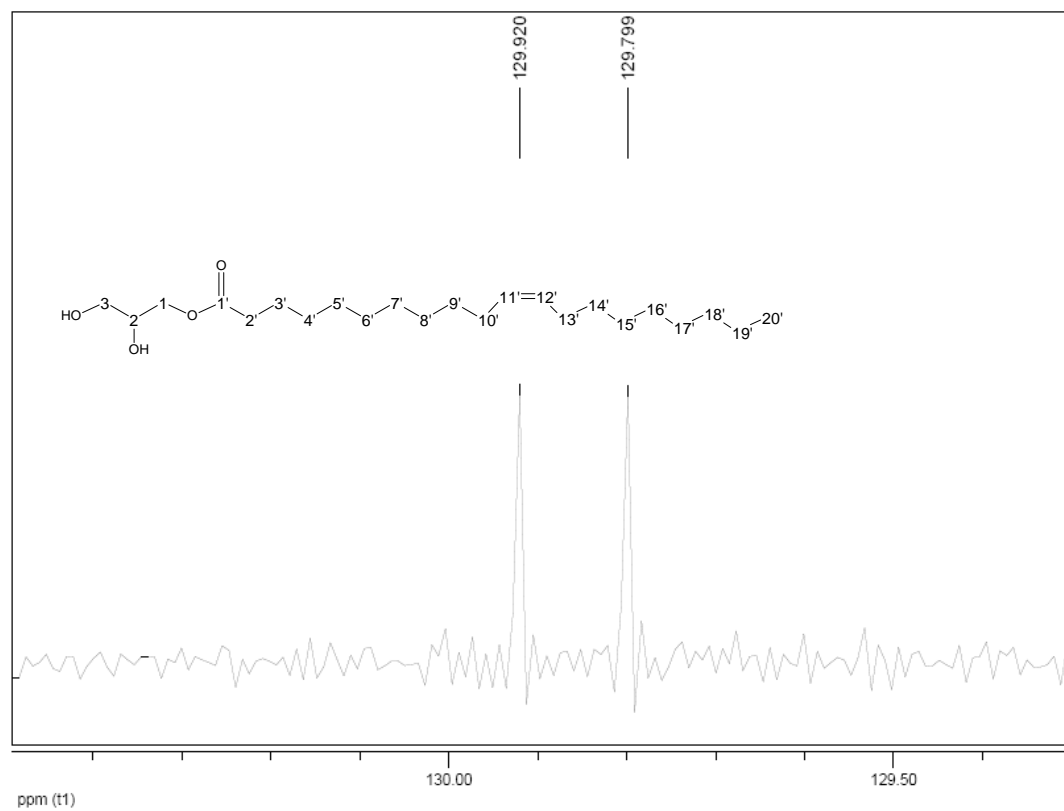


FIGURA 72A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipirila) em CDCl_3 , 100 MHz.

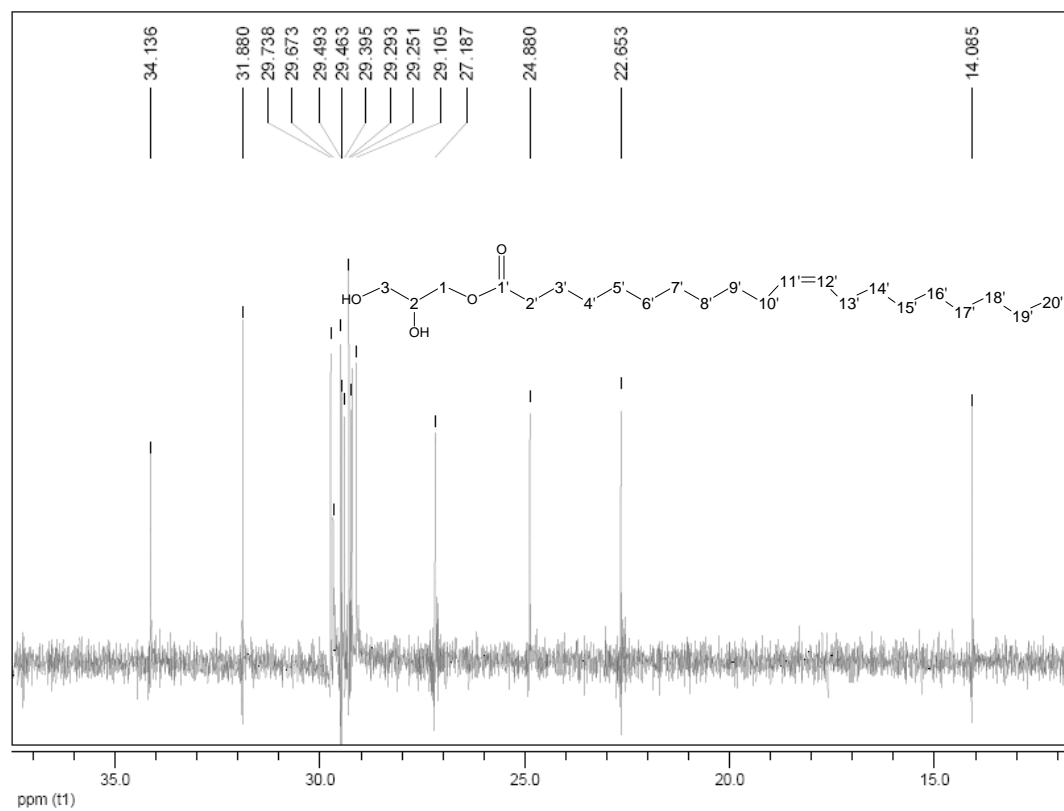


FIGURA 73A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.

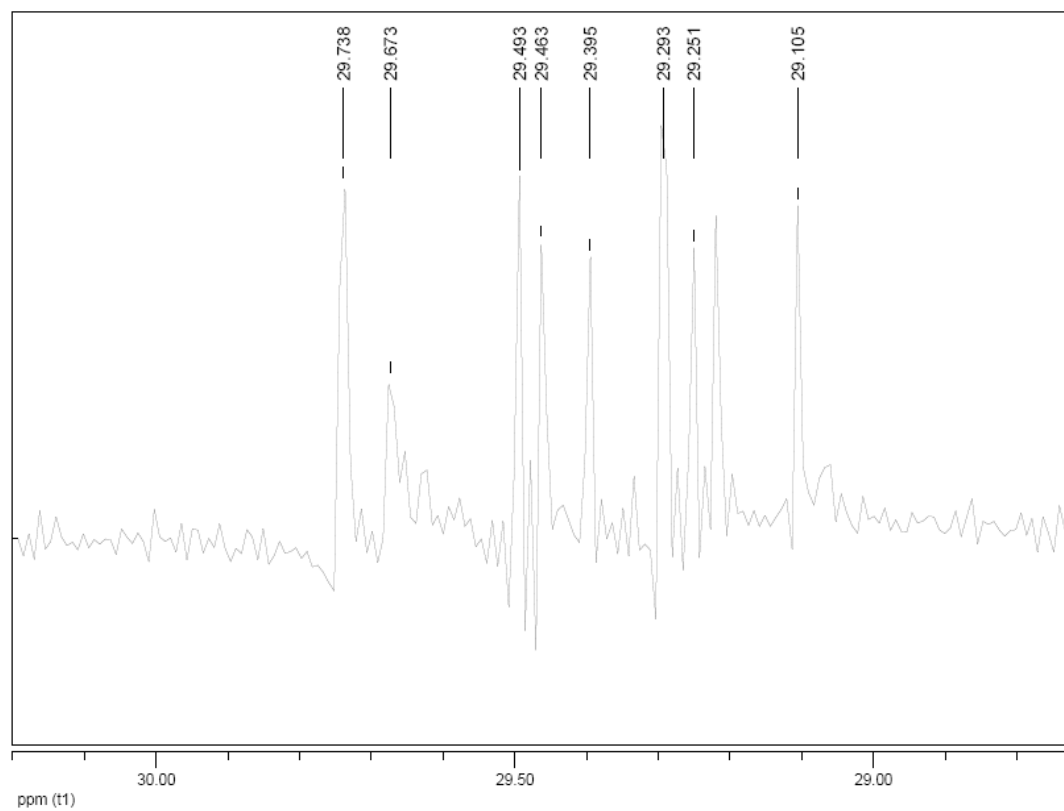


FIGURA 74A Expansão de espectro de RMN de ^{13}C de RC1-89-05 ((*Z*)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl_3 , 100 MHz.

205

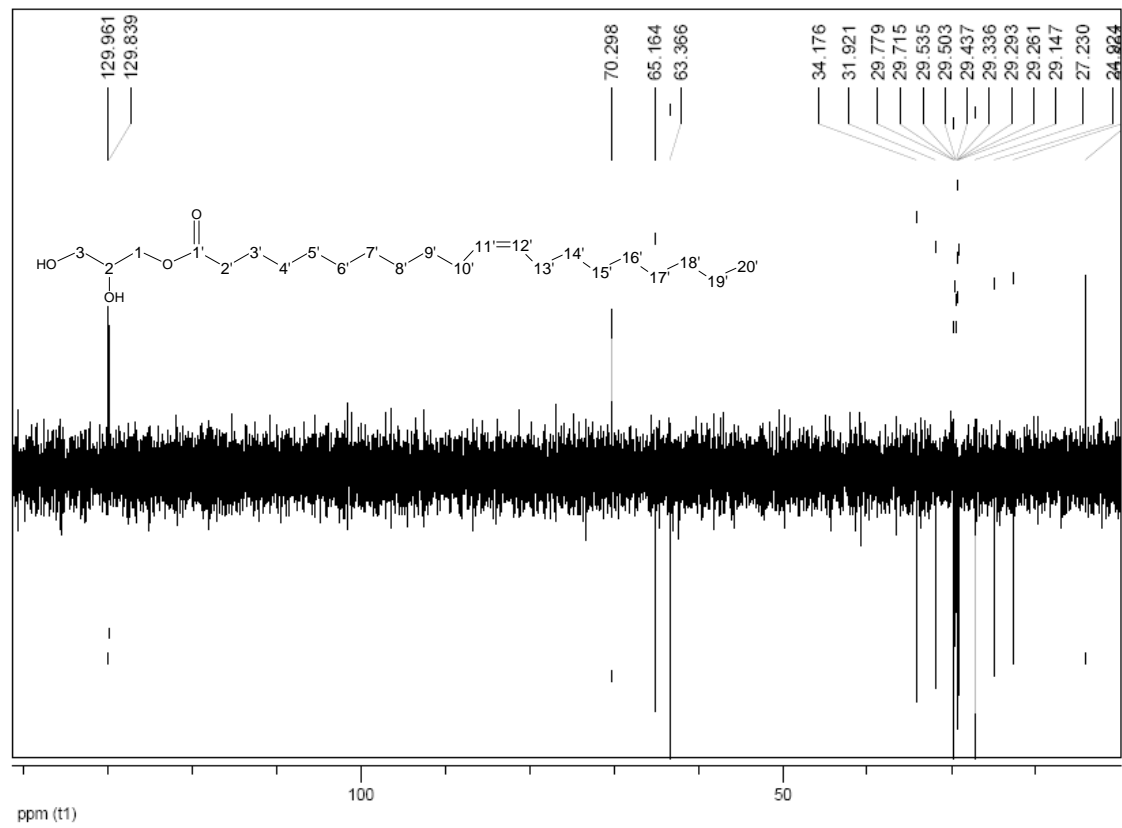


FIGURA 75A DEPT 135° de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl₃, 100 MHz.

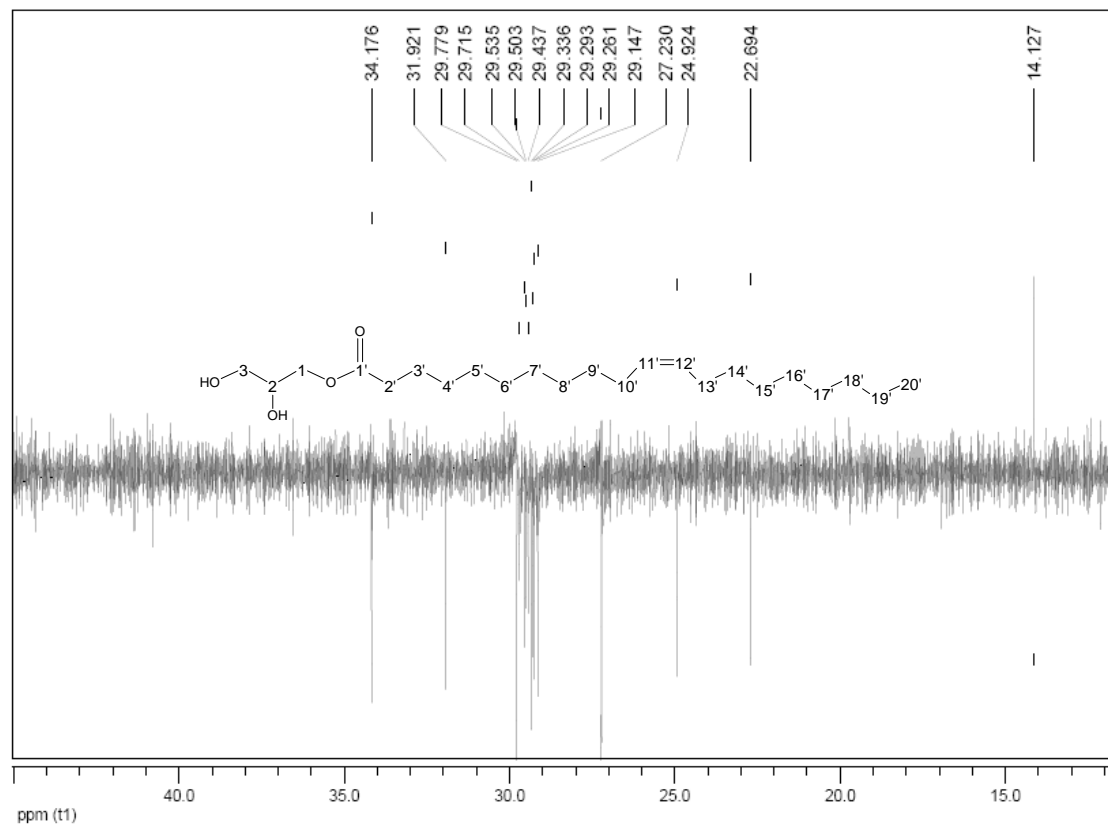


FIGURA 76A Expansão de DEPT 135° de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxipropila) em CDCl₃, 100 MHz.

207

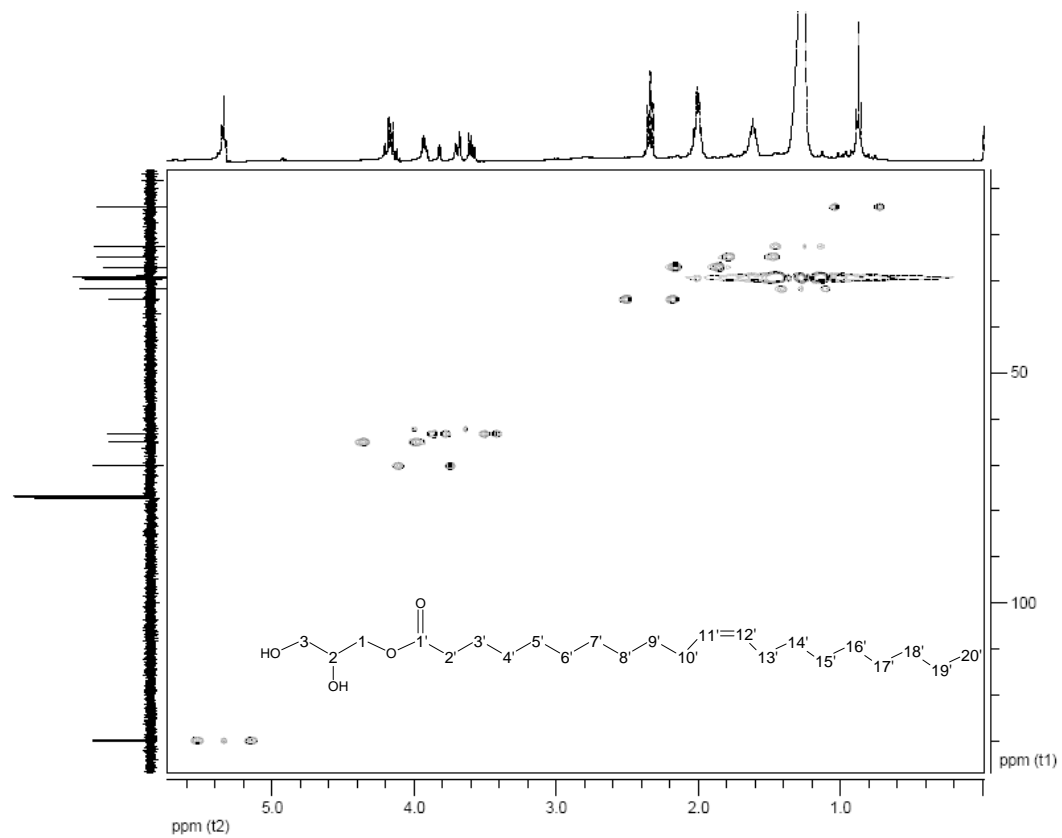


FIGURA 77A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) ¹H x ¹³C (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidropropila) em CDCl₃.

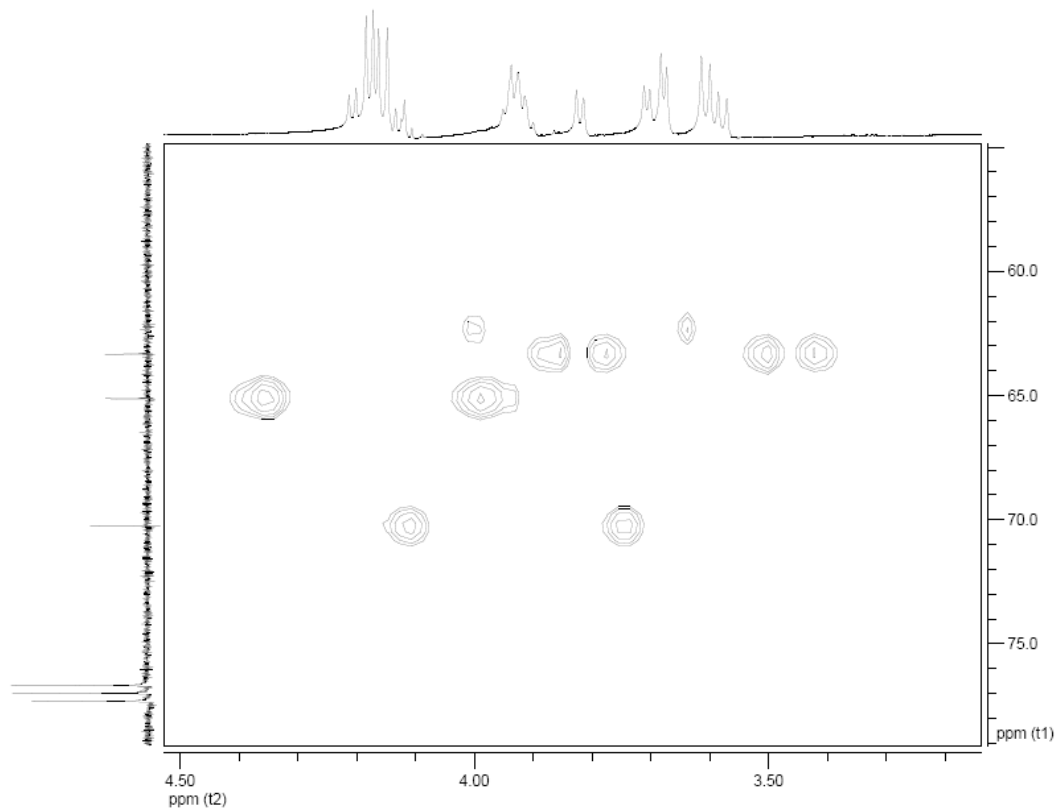


FIGURA 78A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-dihidroxipropila) em CDCl_3 .

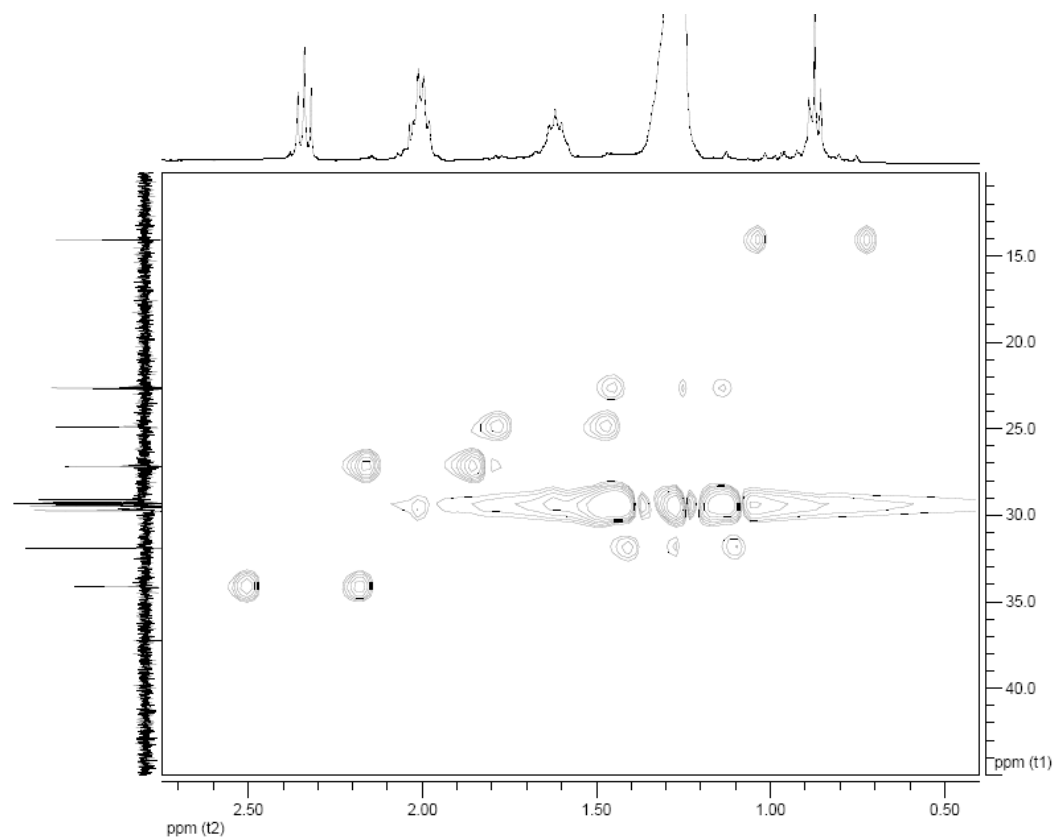


FIGURA 79A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-dihidropropila) em CDCl_3 .

210

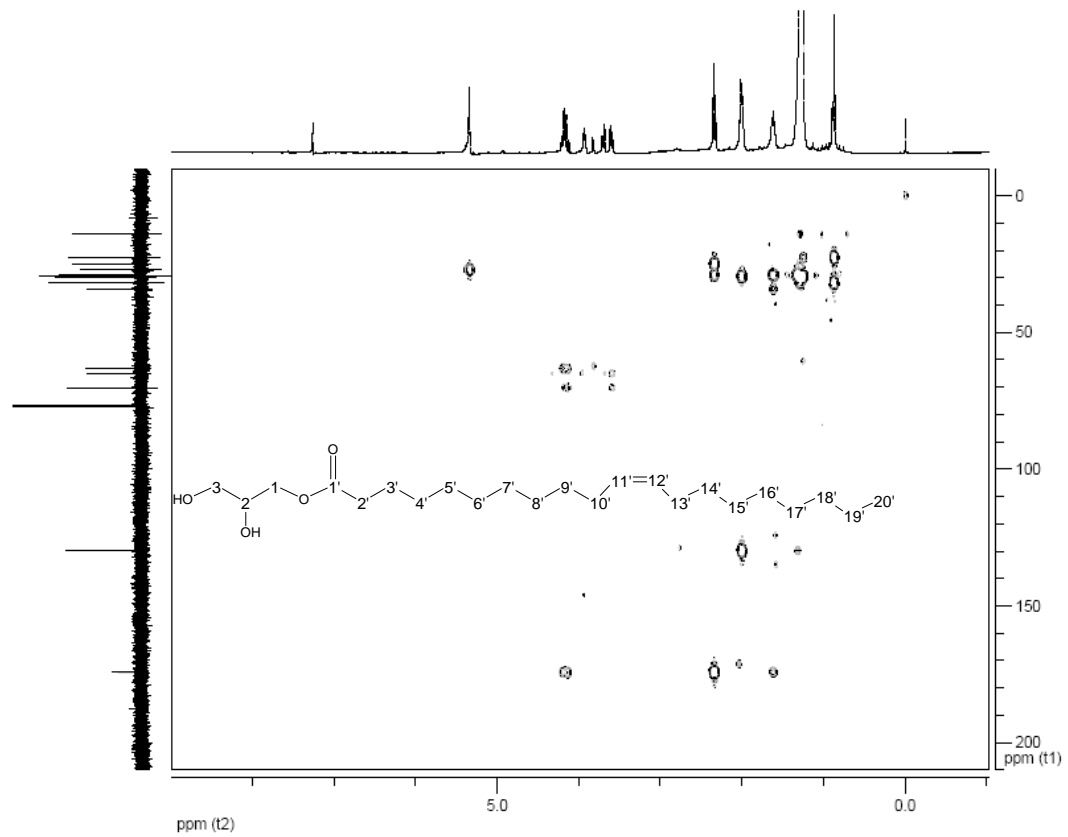


FIGURA 80A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopila) em CDCl_3 .

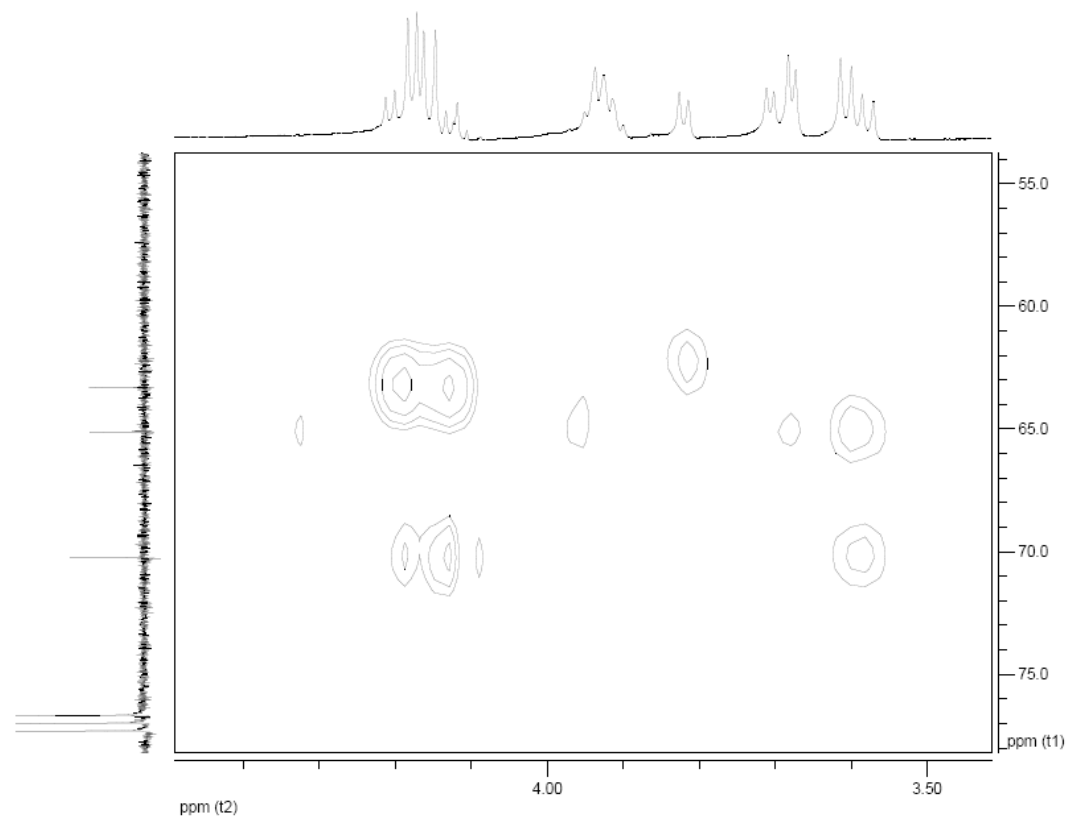


FIGURA 81A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-dihidropropila) em CDCl_3 .

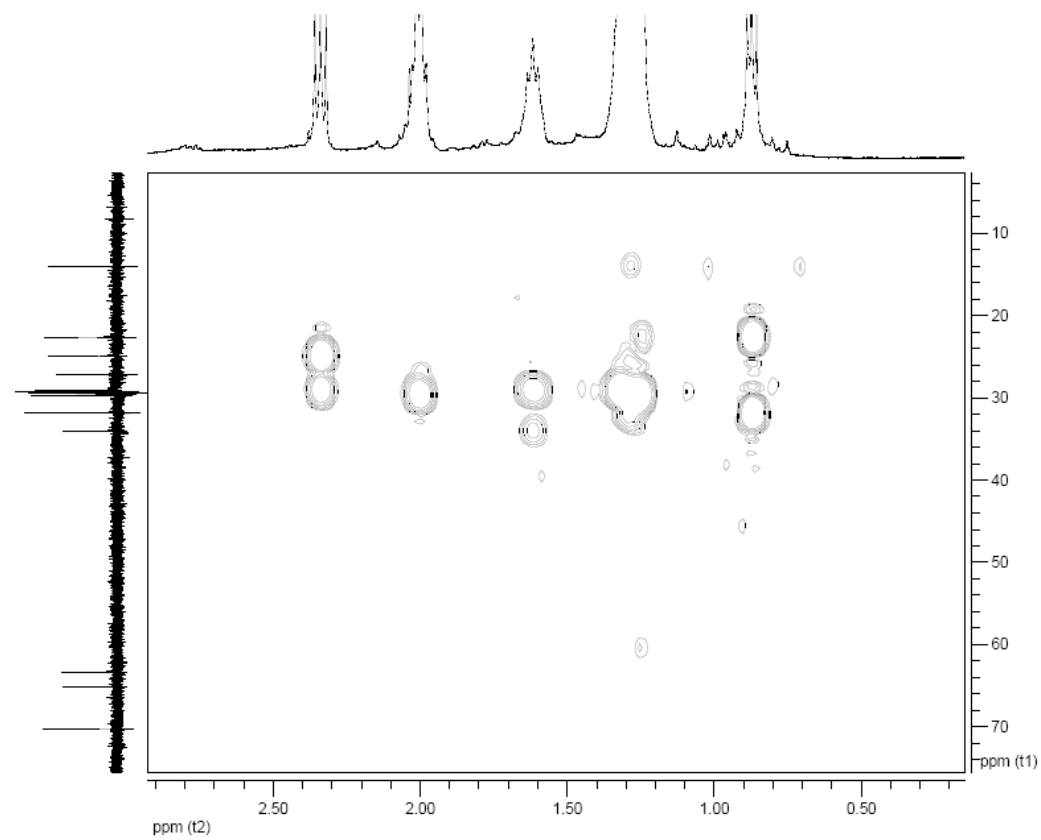


FIGURA 82A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-dihidroxiopropila) em CDCl_3 .

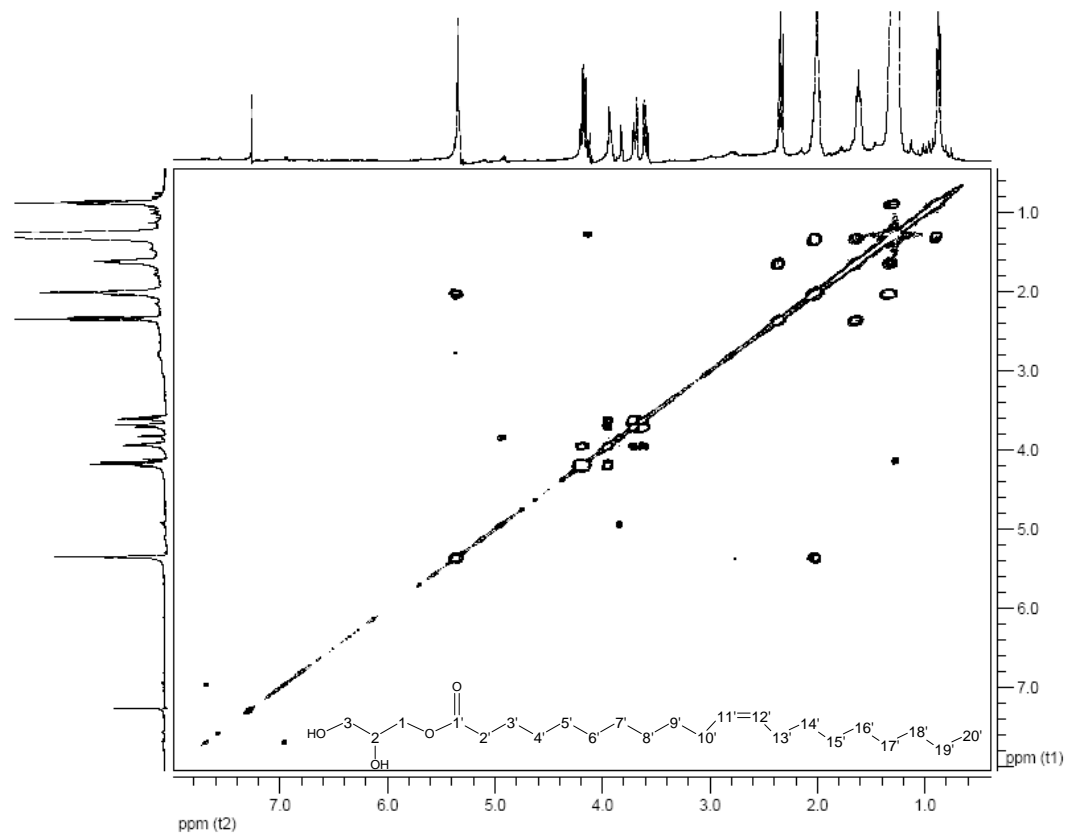


FIGURA 83A Mapa de correlação homonuclear ¹H x ¹H (gCOSY) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidropropila) em CDCl₃, 400 MHz.

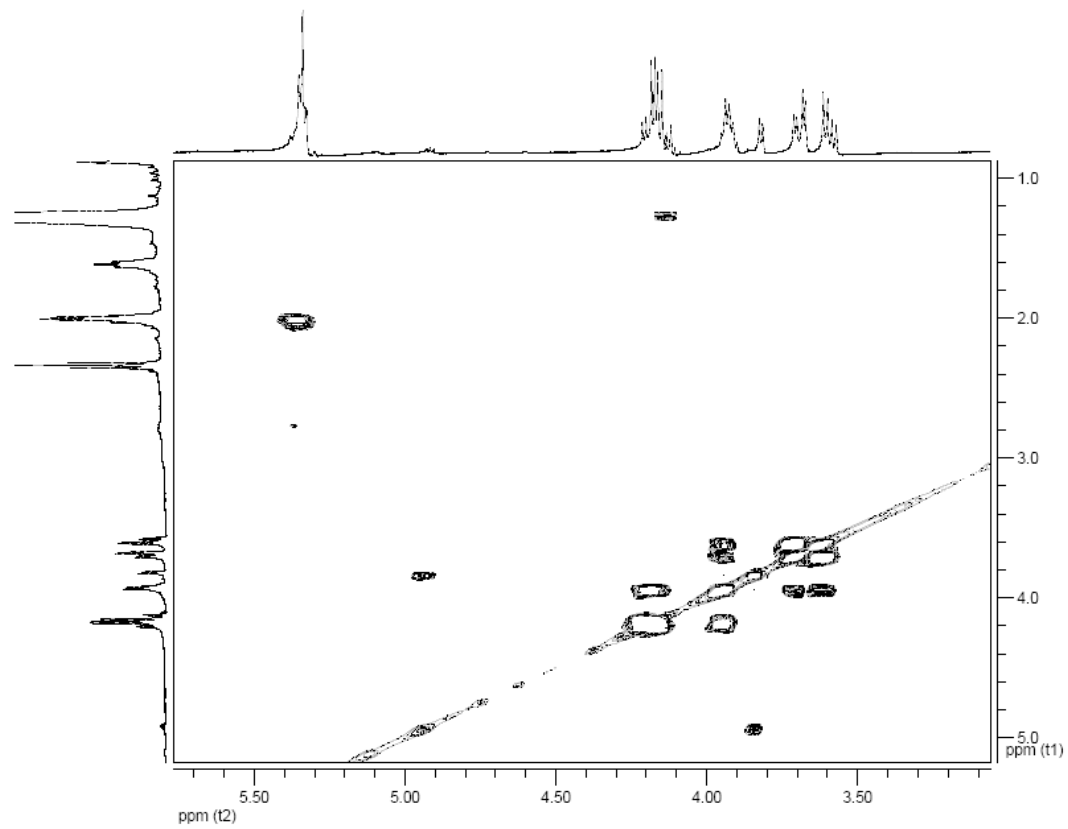


FIGURA 84A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-89-05 ((*Z*)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz.

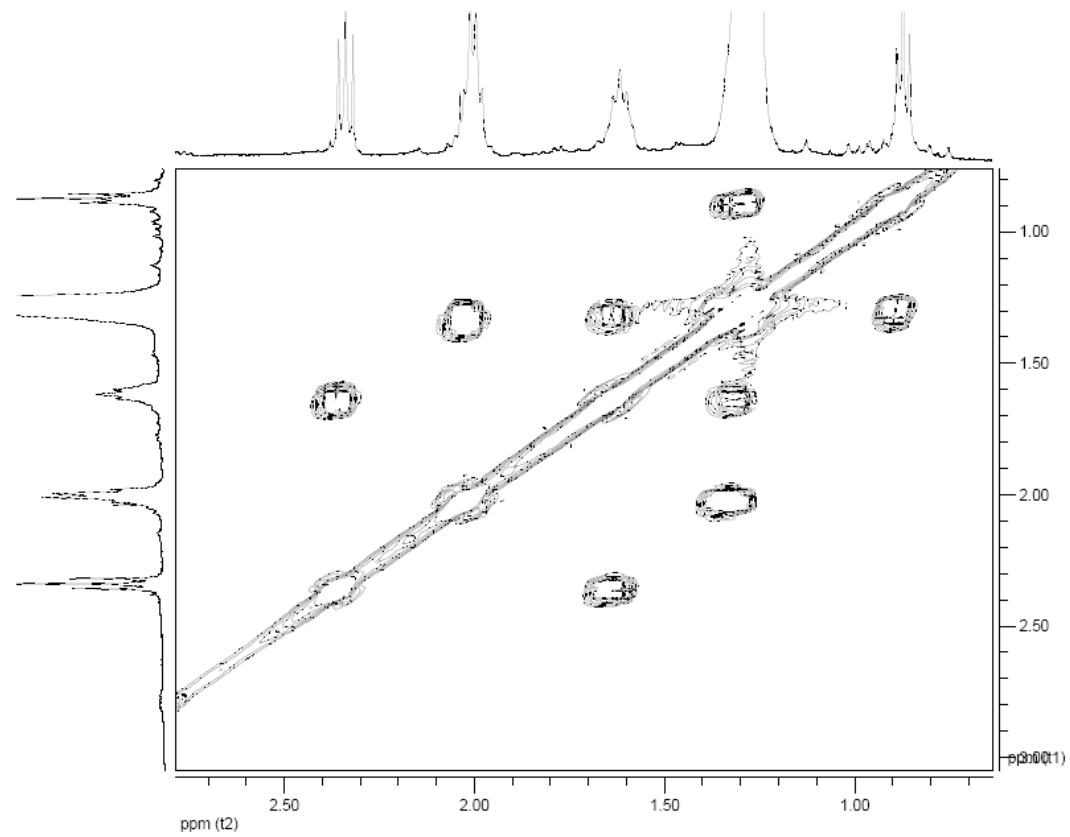


FIGURA 85A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila) em CDCl_3 , 400 MHz.

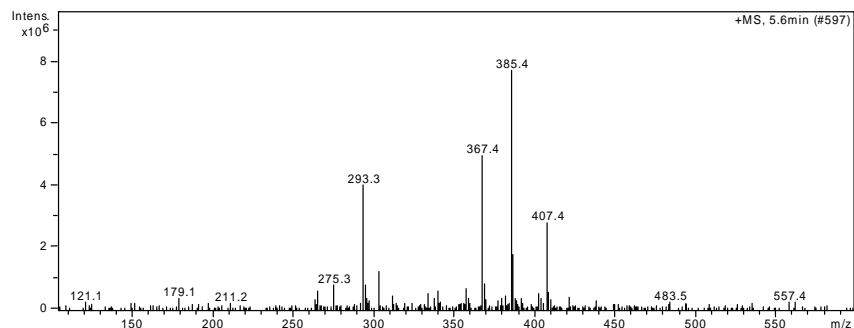


FIGURA 86A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila), obtido no modo positivo.

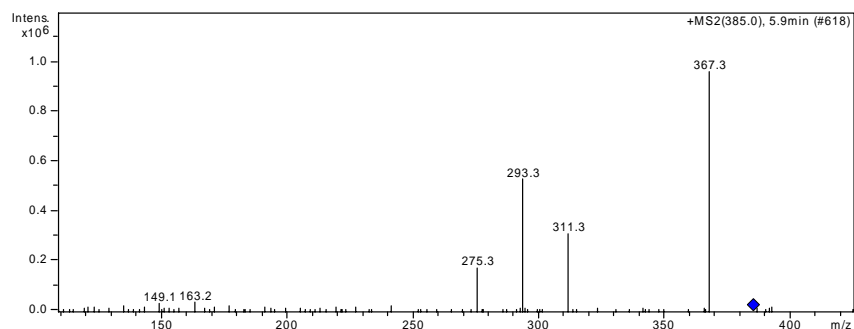


FIGURA 87A. Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 385 dalton por impacto com átomos de hélio.

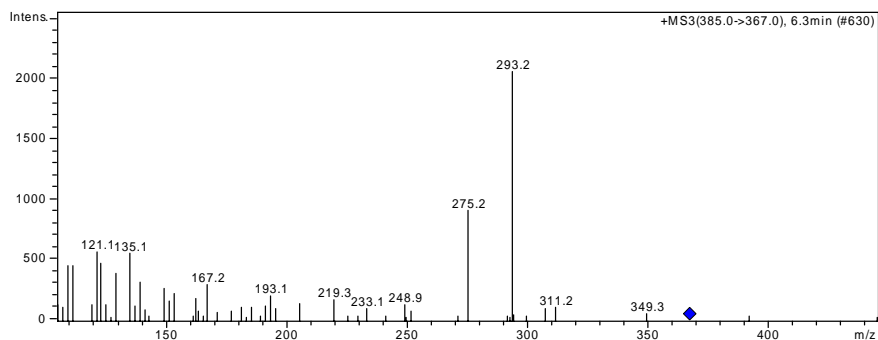
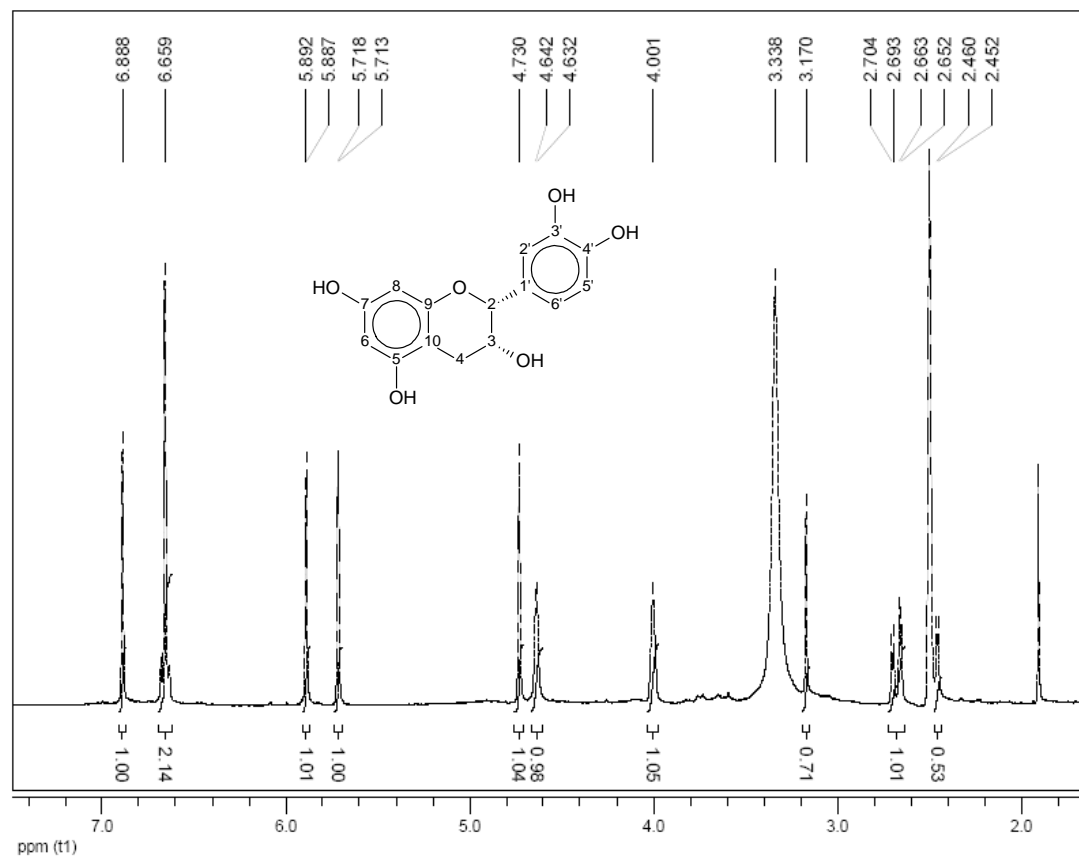


FIGURA 88A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-89-05 ((Z)-icos-11-enoato de 2,3-diidroxiopropila), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 385 dalton por impacto com átomos de hélio.

FIGURA 89A Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

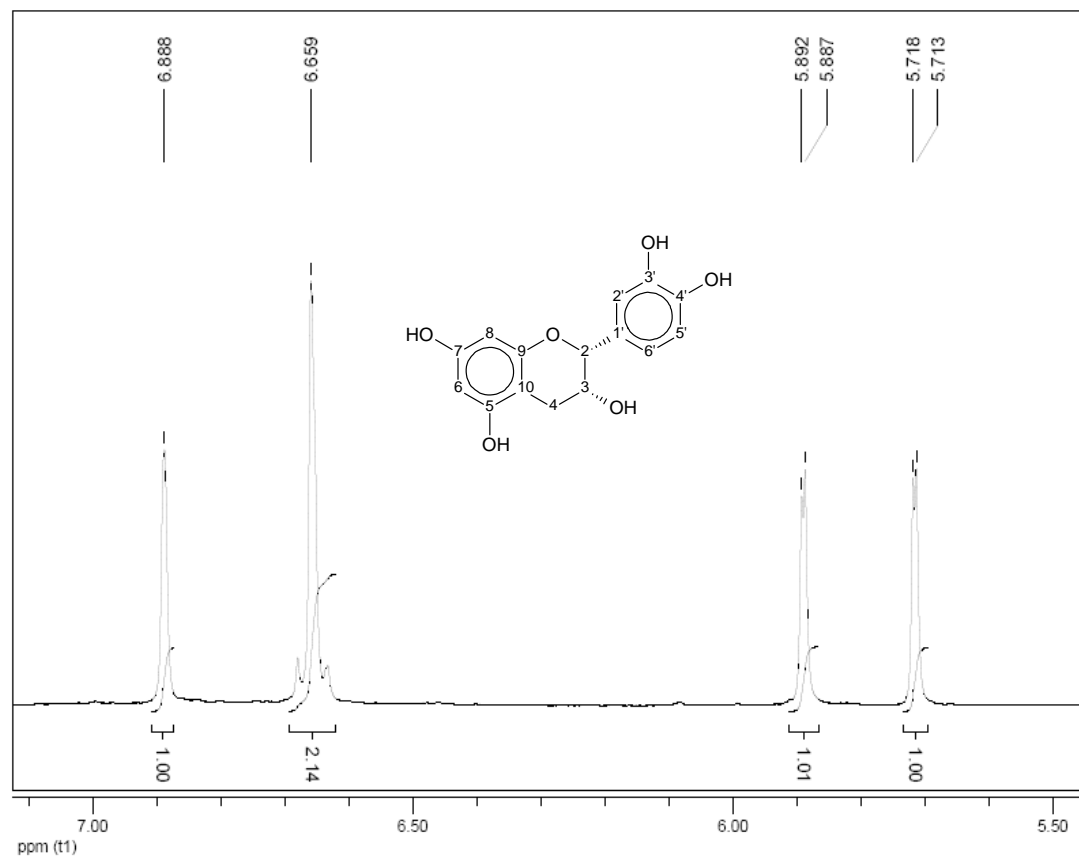
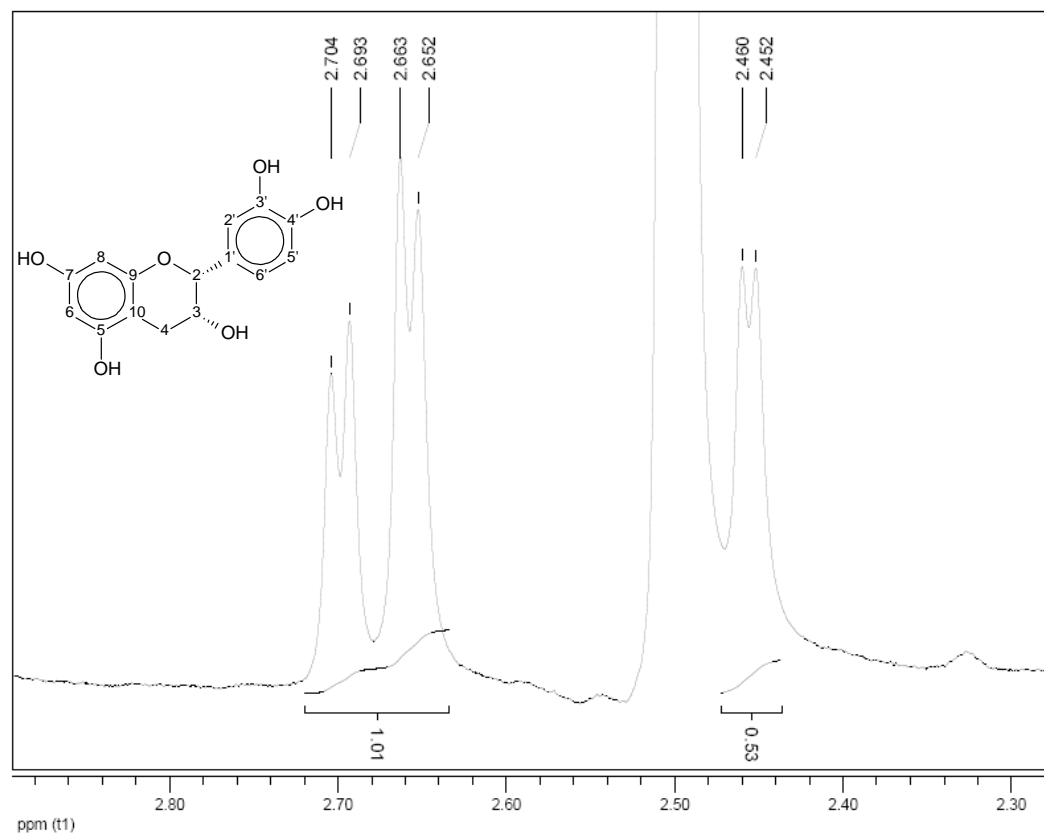
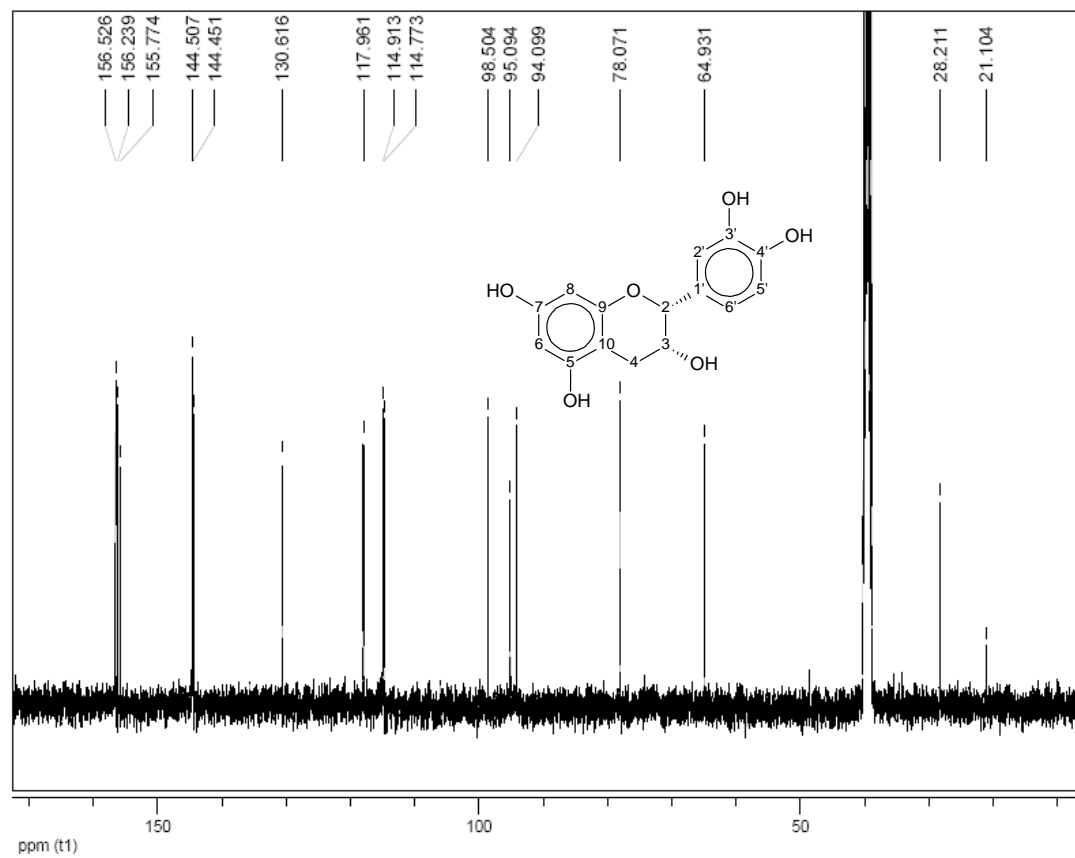


FIGURA 90A Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

FIGURA 91A Expansão do espectro de RMN de ^1H de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



FUGURA 92A Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

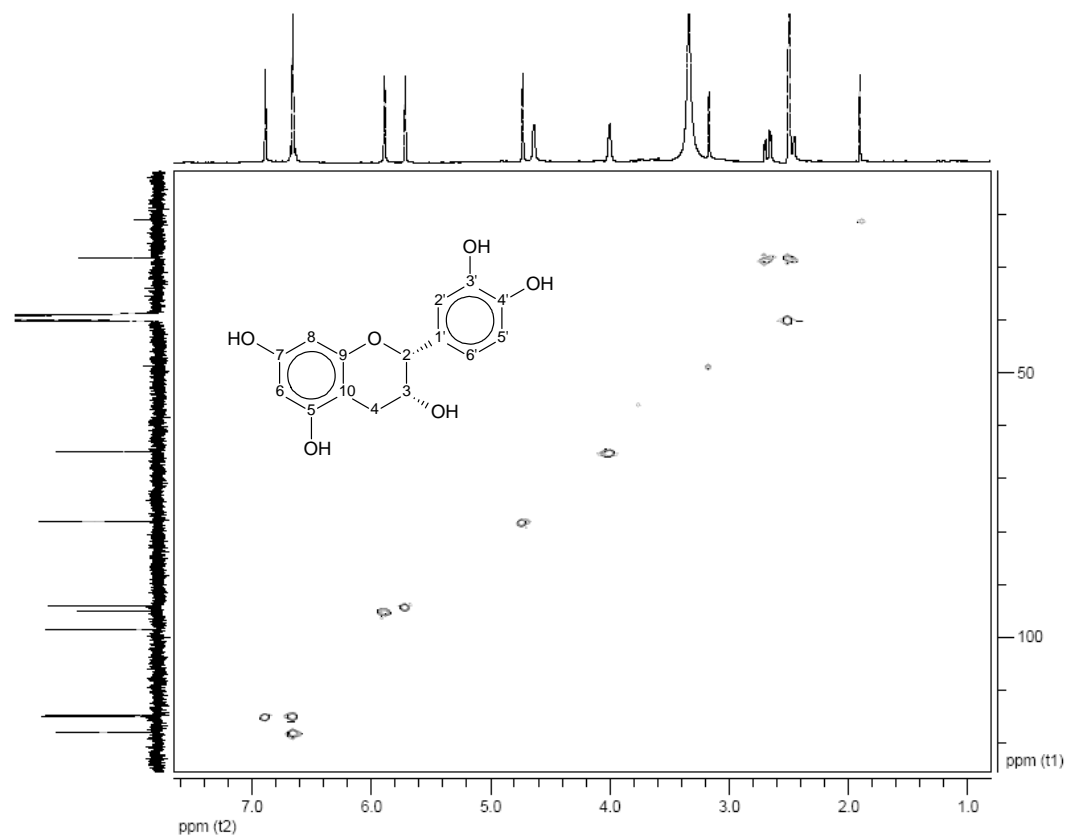


FIGURA 93A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO}-d_6$.

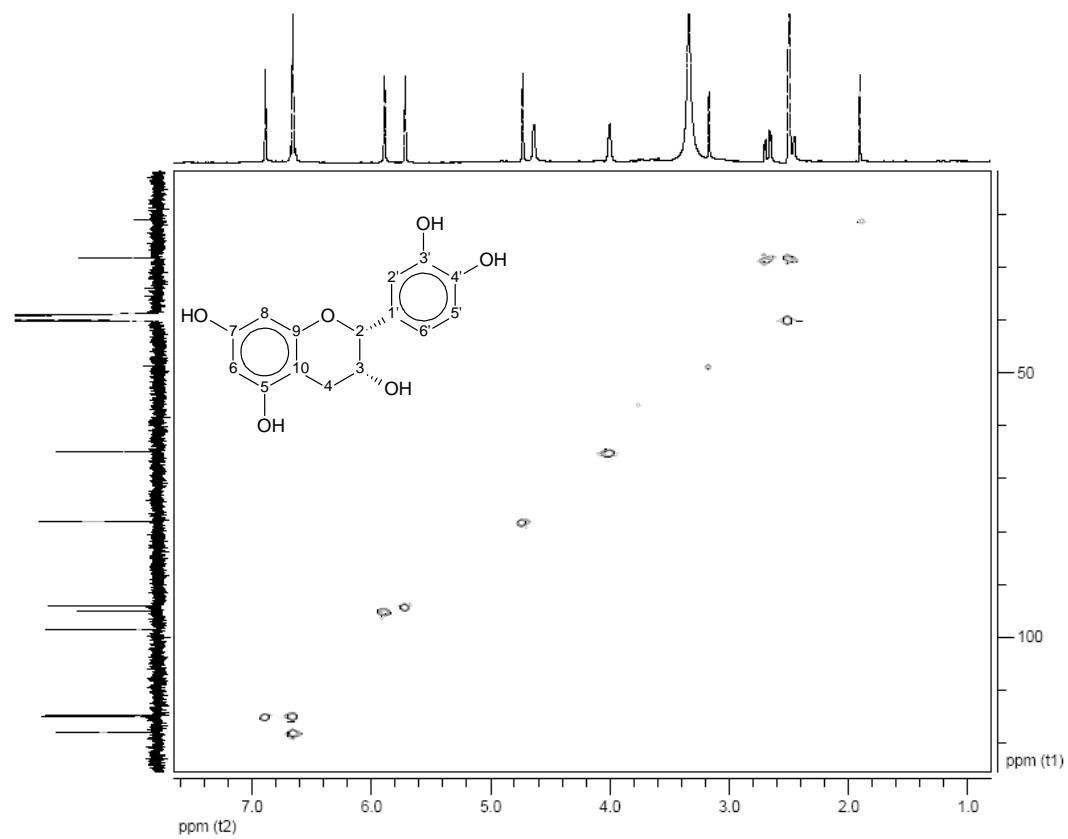


FIGURA 94A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

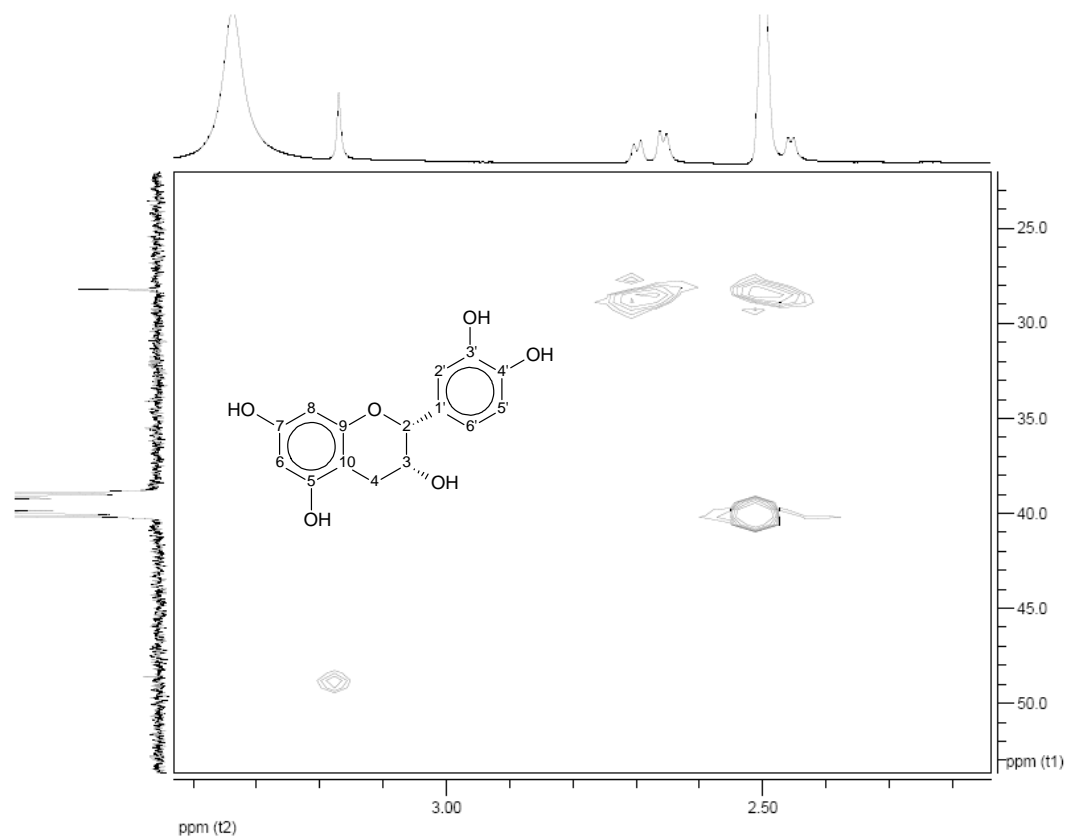


FIGURA 95A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ¹H x ¹³C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em DMSO-*d*₆.

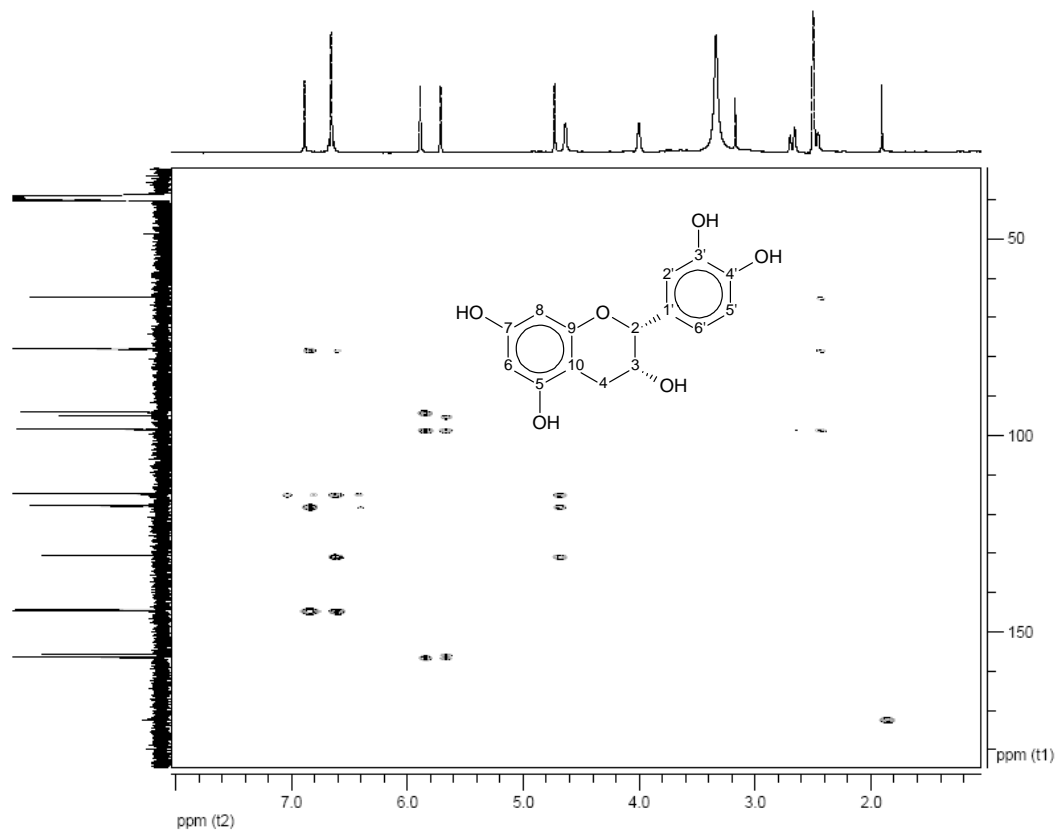


FIGURA 96A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) ^1H x ^{13}C (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO}-d_6$.

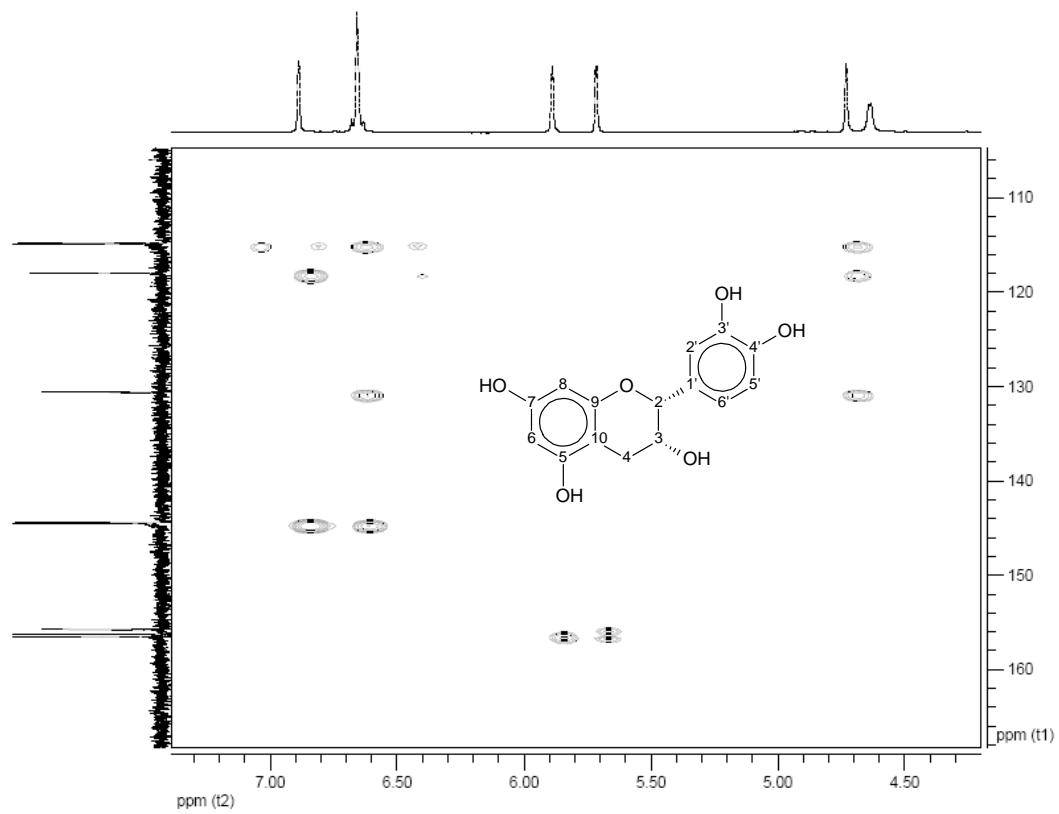


FIGURA 97A Expansão de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$.

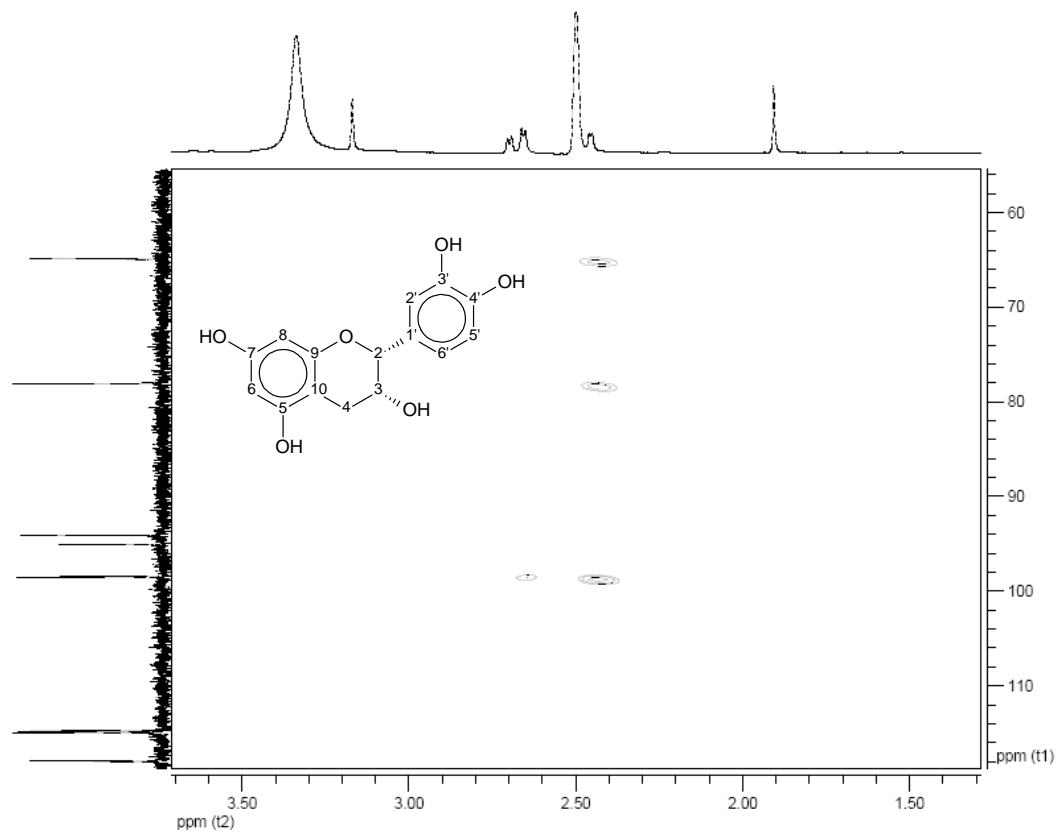


FIGURA 98A Expansão de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO}-d_6$.

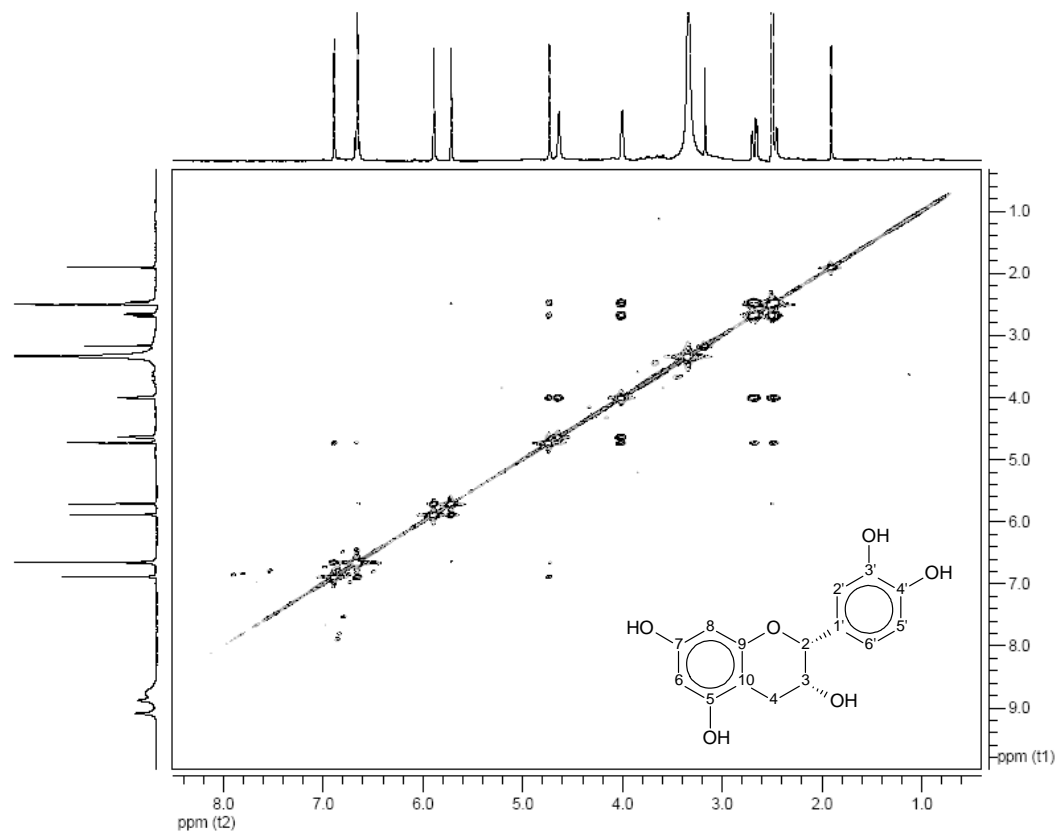


FIGURA 99A Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-03-02 (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

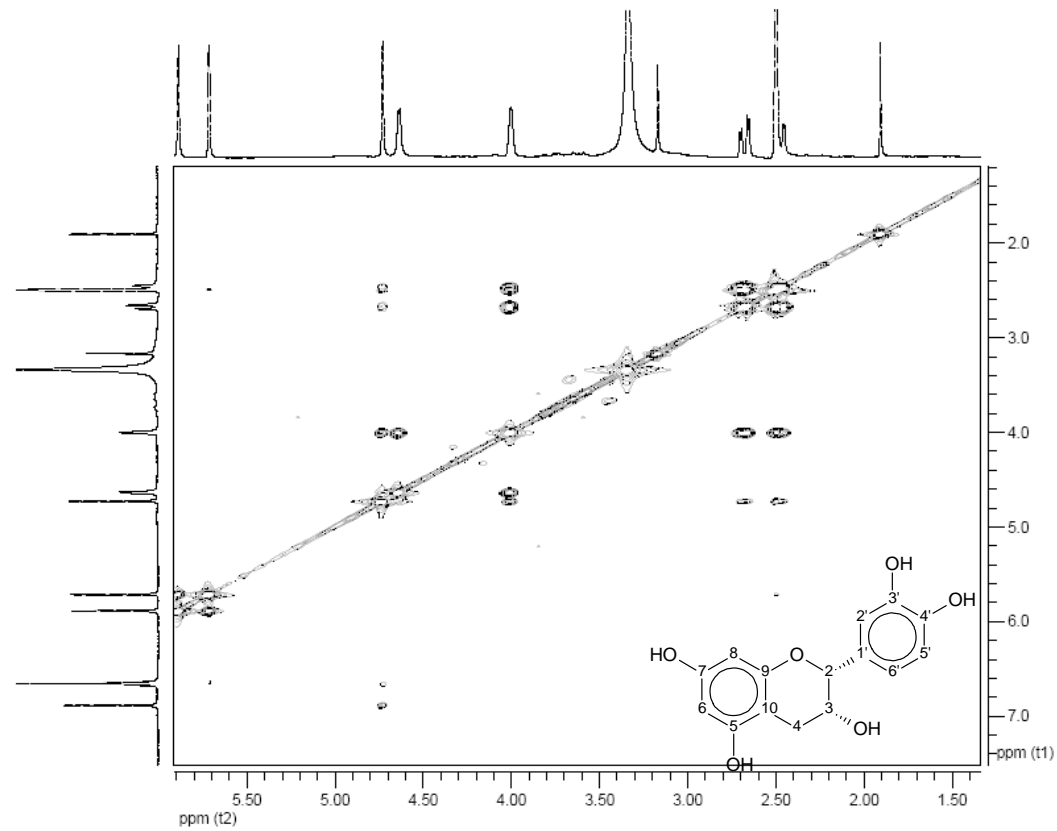


FIGURA 100A Expansão de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-03-02, (epicatequina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

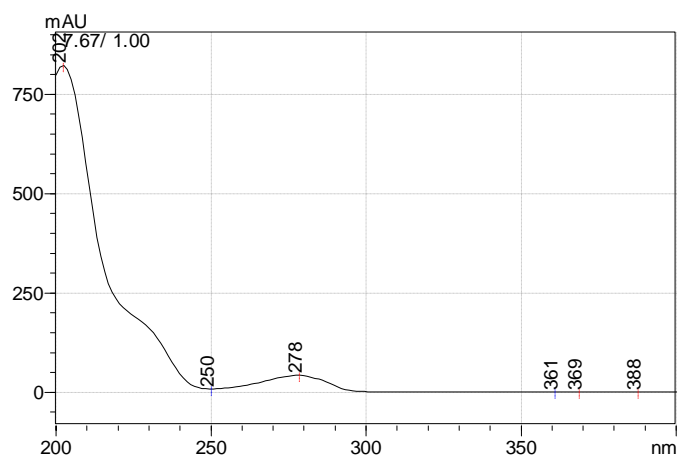


FIGURA 101A Espectro de ultravioleta de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido em metanol durante análise em CLAE-DAD.

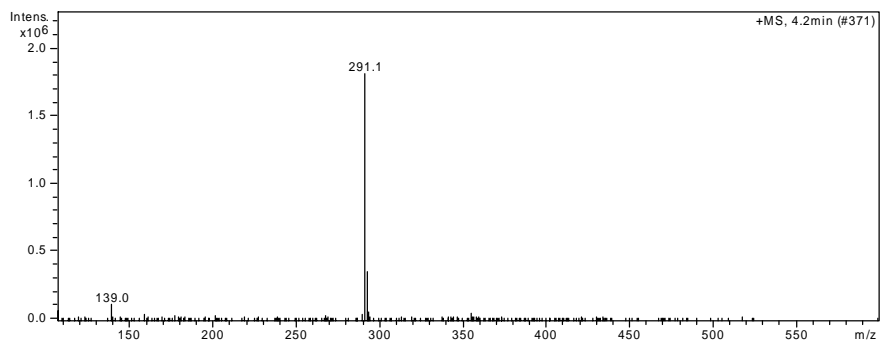


FIGURA 102A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo positivo.

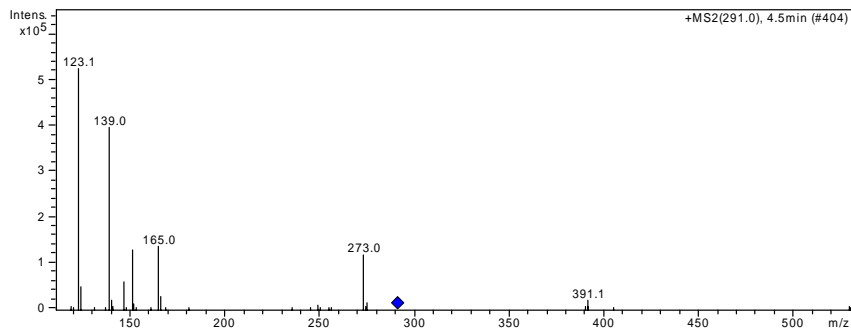


FIGURA 103A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo positivo, após fragmentação do íon com m/z 291 dalton por impacto com átomos de hélio.

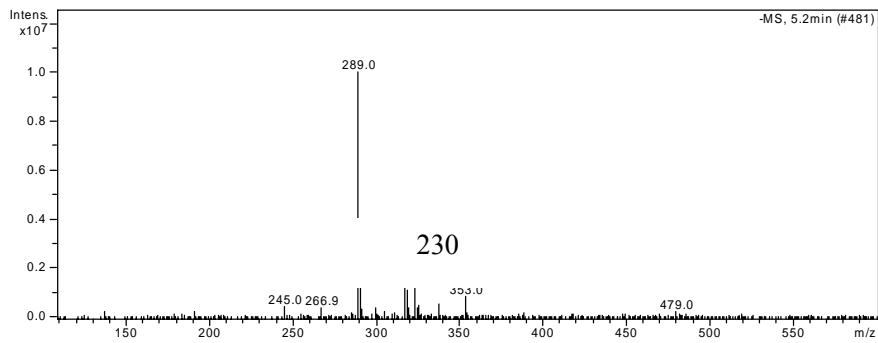


FIGURA 104A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-03-02 (epicatequina), obtido no modo negativo.

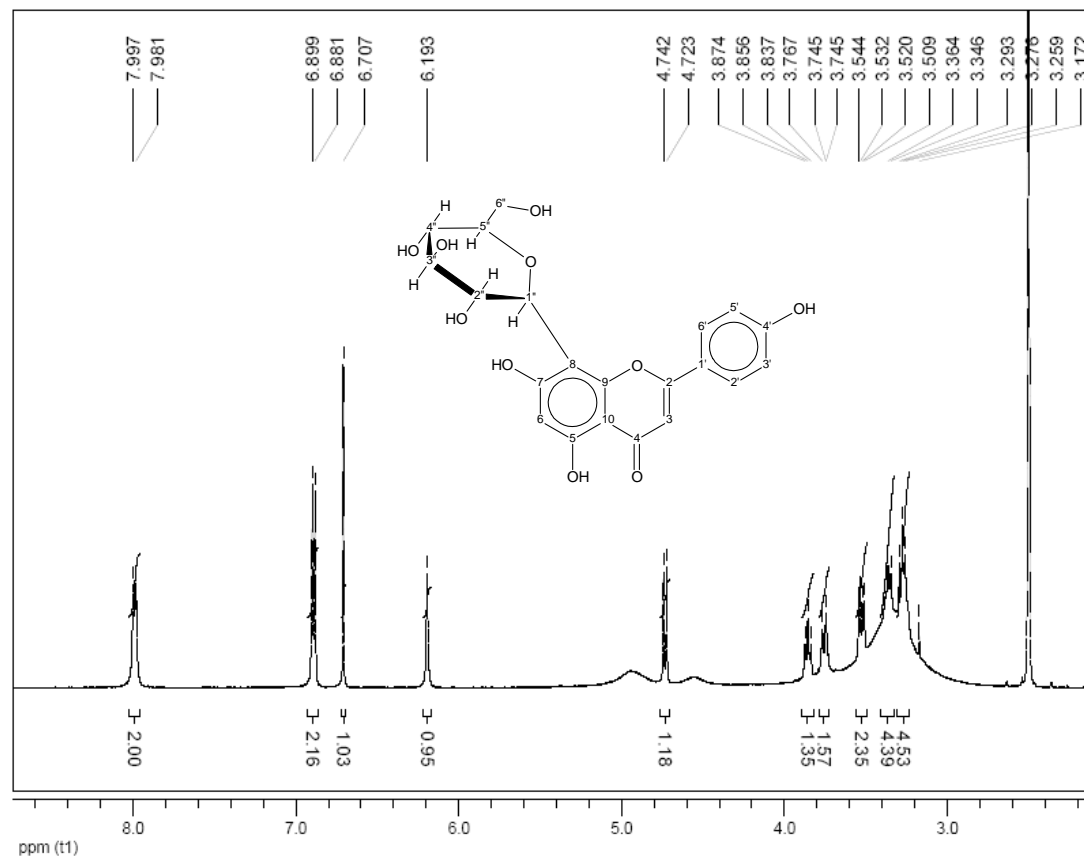
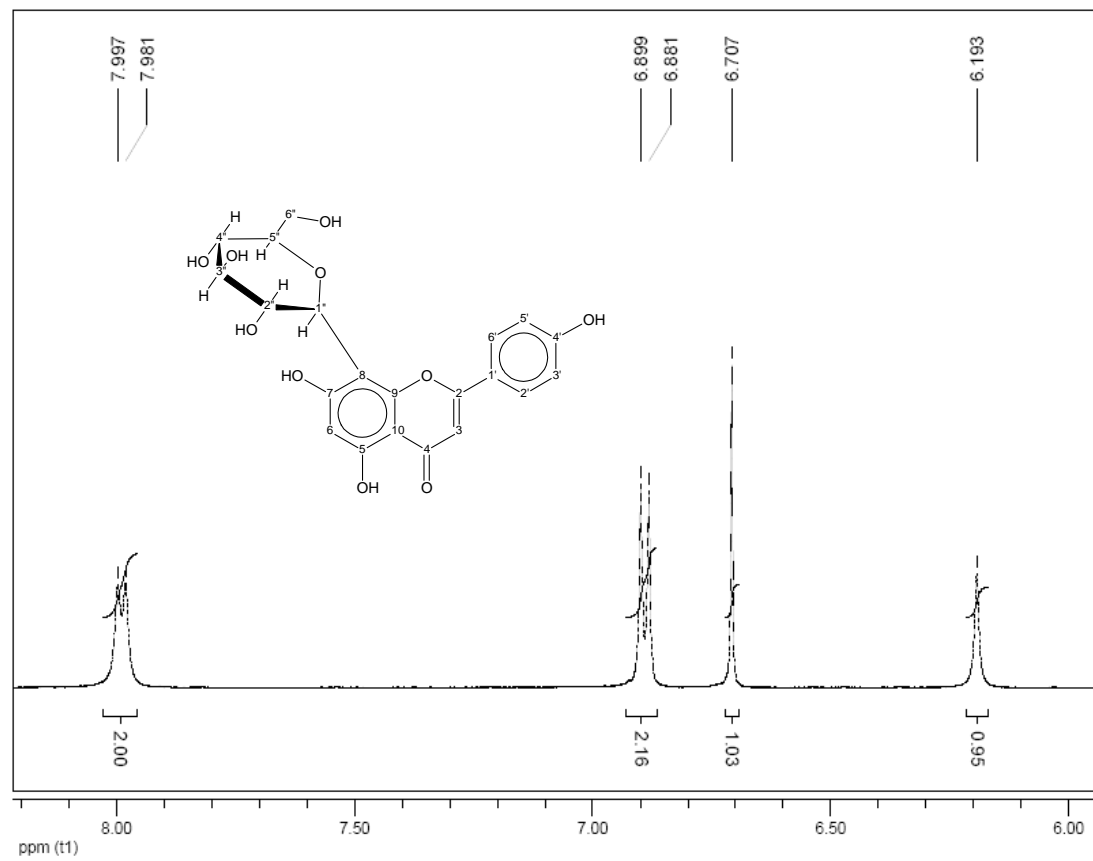


FIGURA 105A Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

FIGURA 106A Expansão de espectro de RMN de ¹H de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO-d₆, 400 MHz.

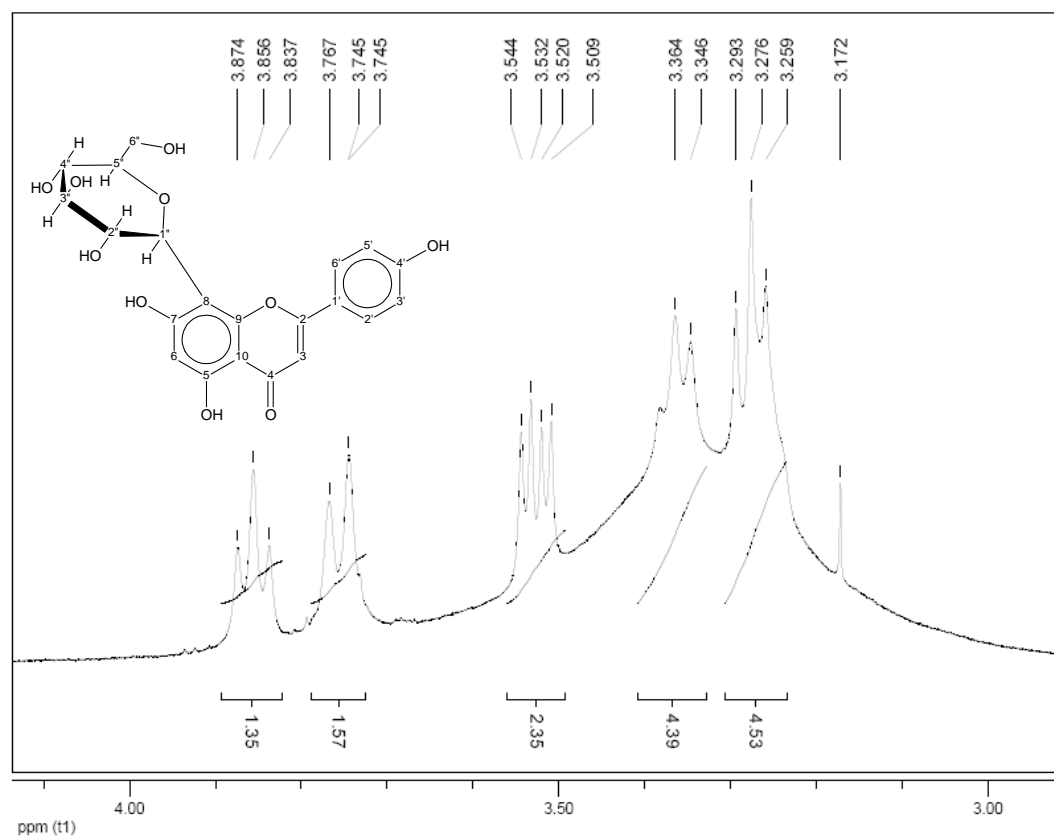


FIGURA 107A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

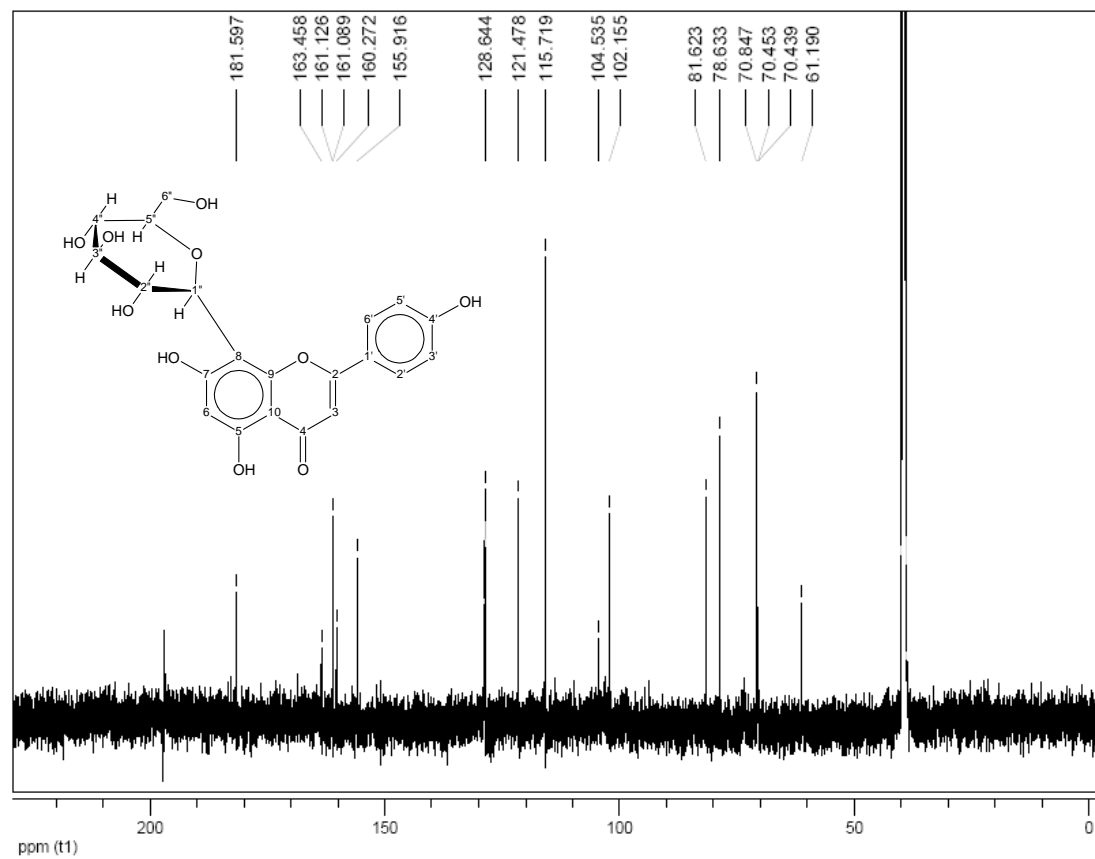


FIGURA 108A Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

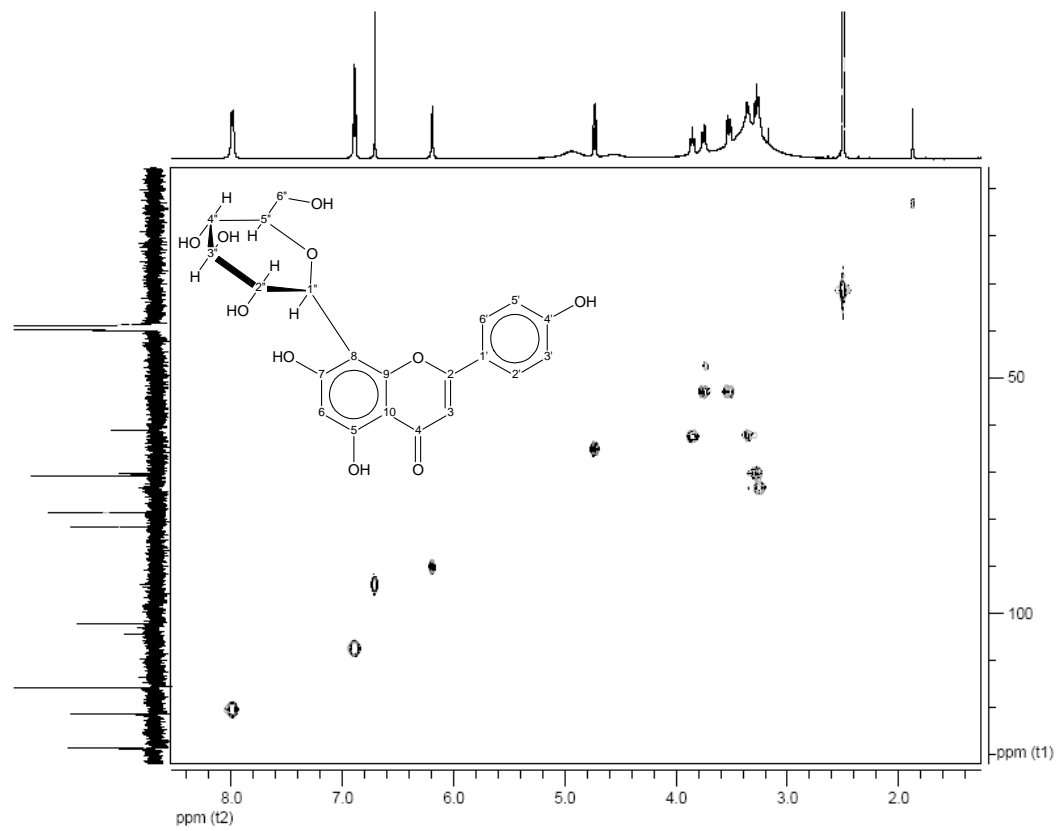


FIGURA 109A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO}-d_6$.

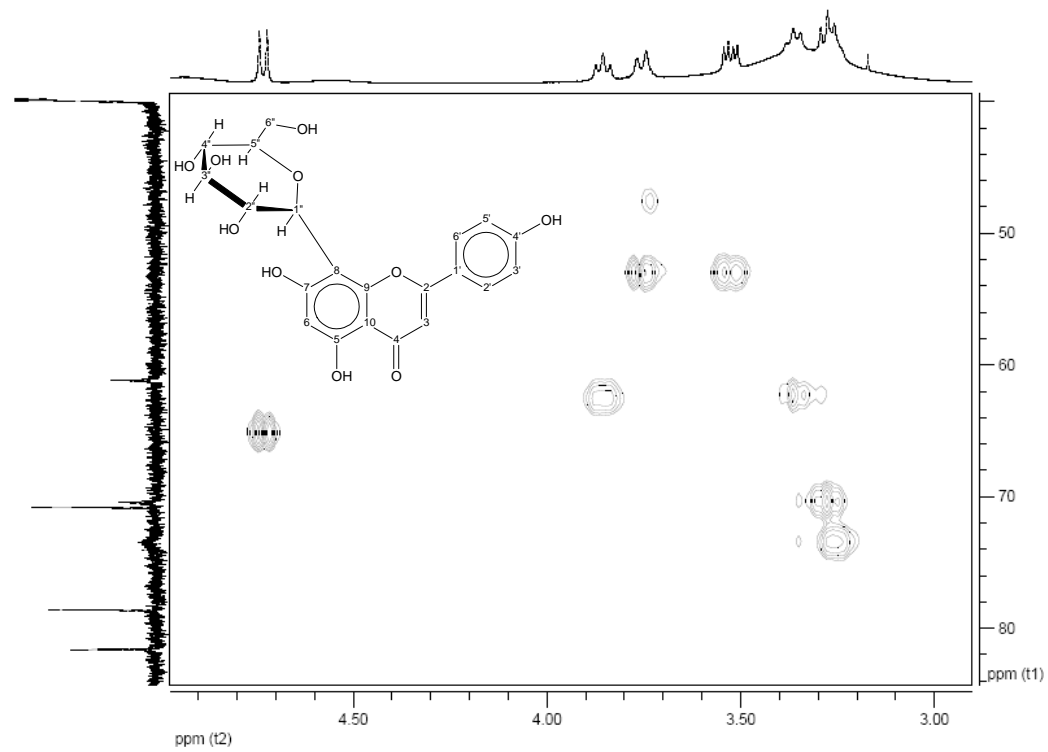


FIGURA 110A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO- d_6 .

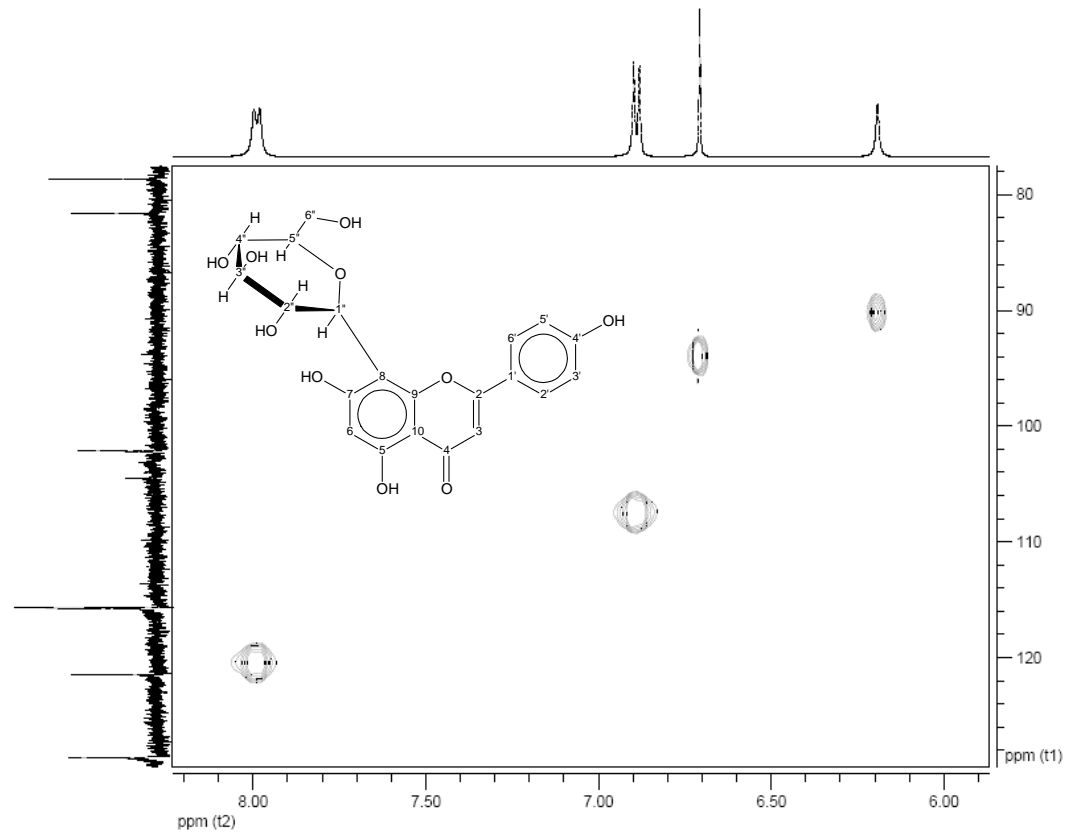


FIGURA 111A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ¹H x ¹³C (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em DMSO-*d*₆.

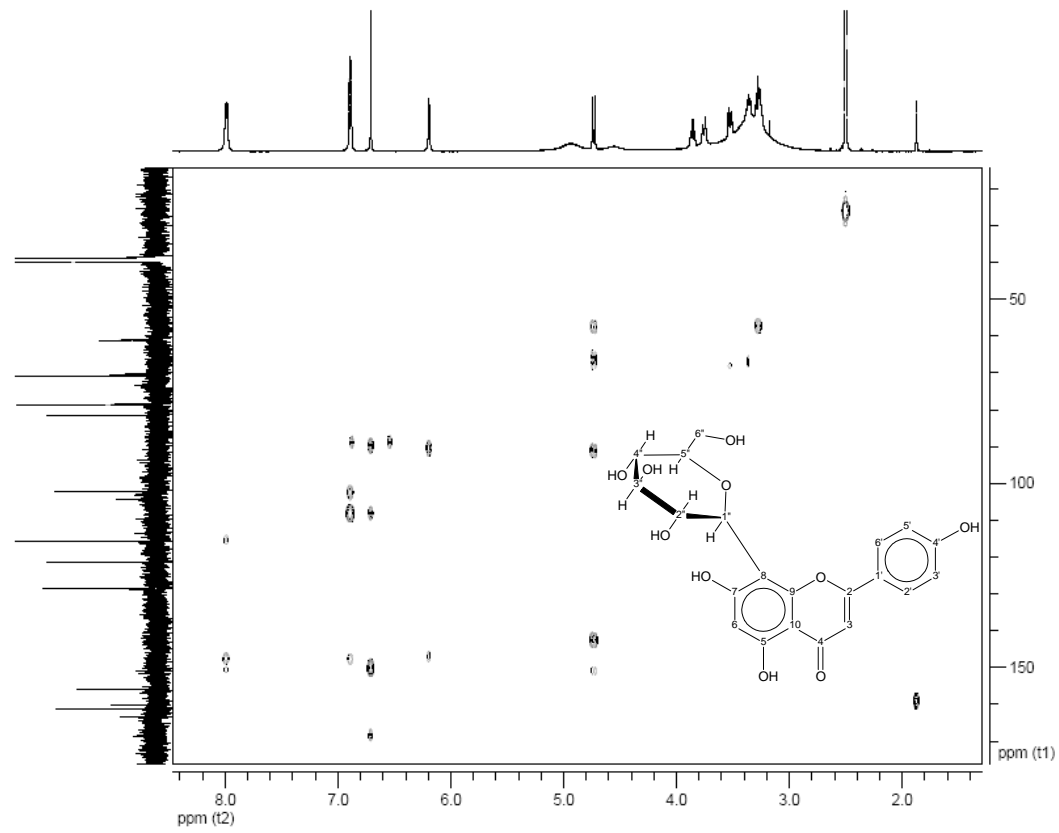


FIGURA 112A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO-}d_6$.

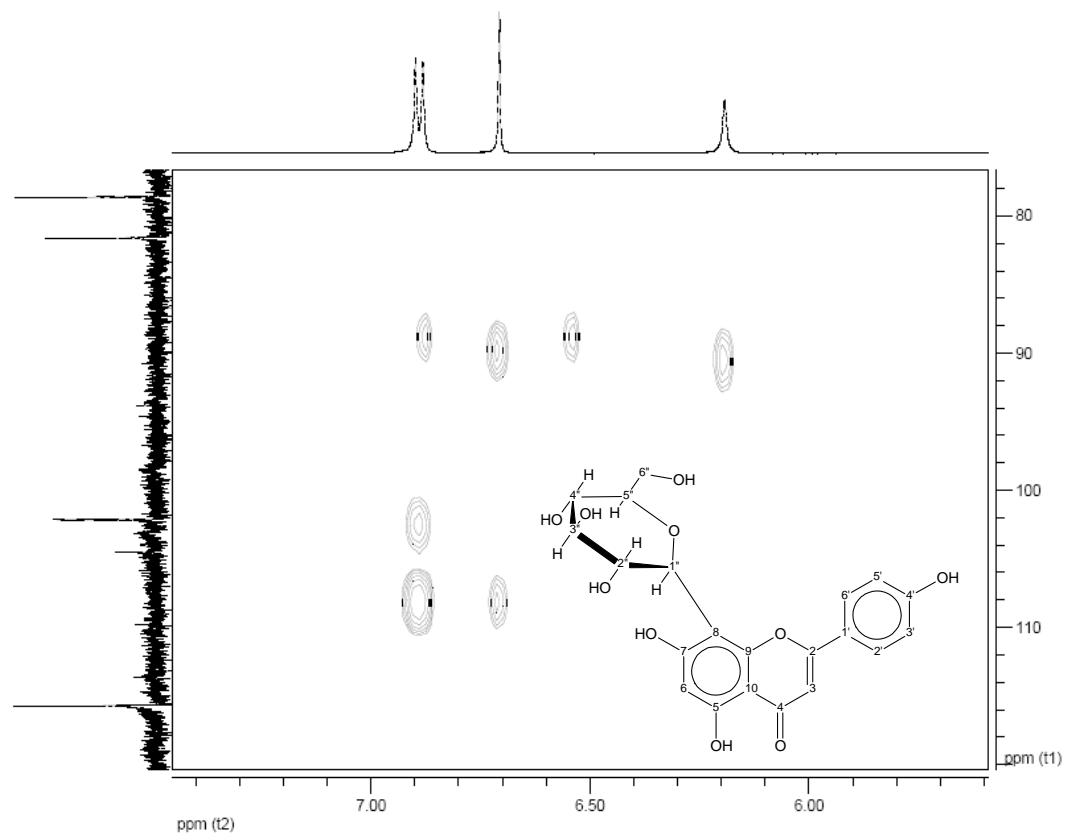


FIGURA 113A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO}-d_6$.

240

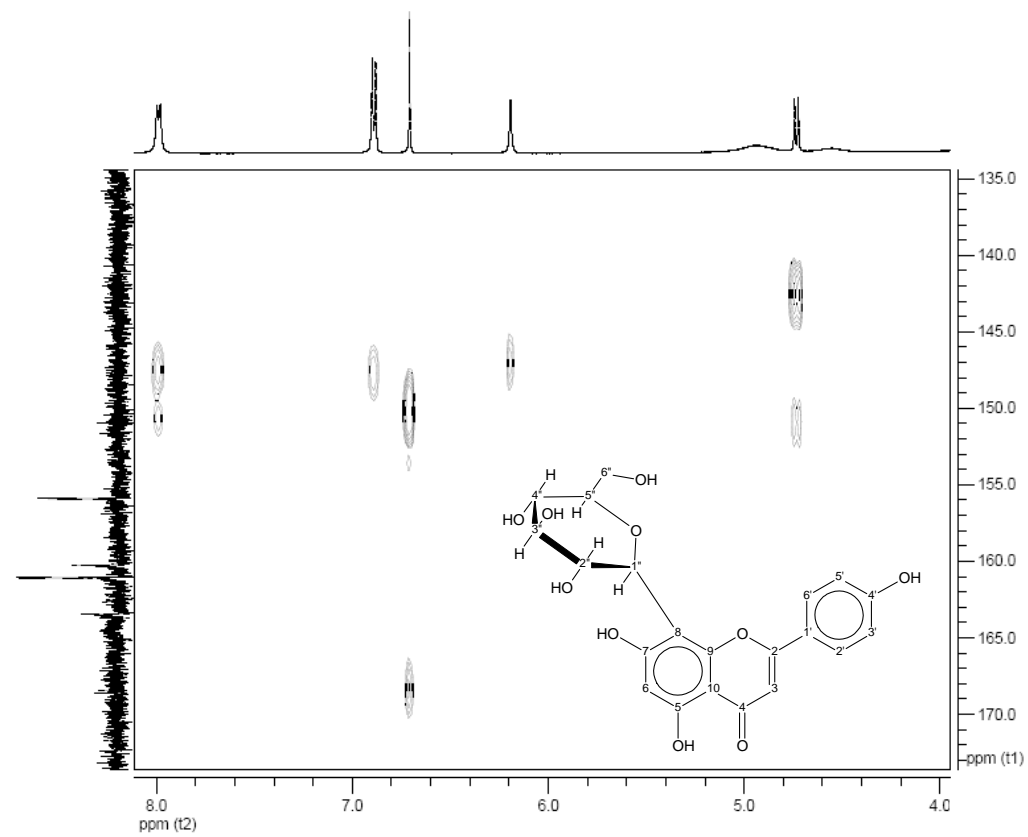


FIGURA 114A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-06-03 (vitexina) em $\text{DMSO}-d_6$.

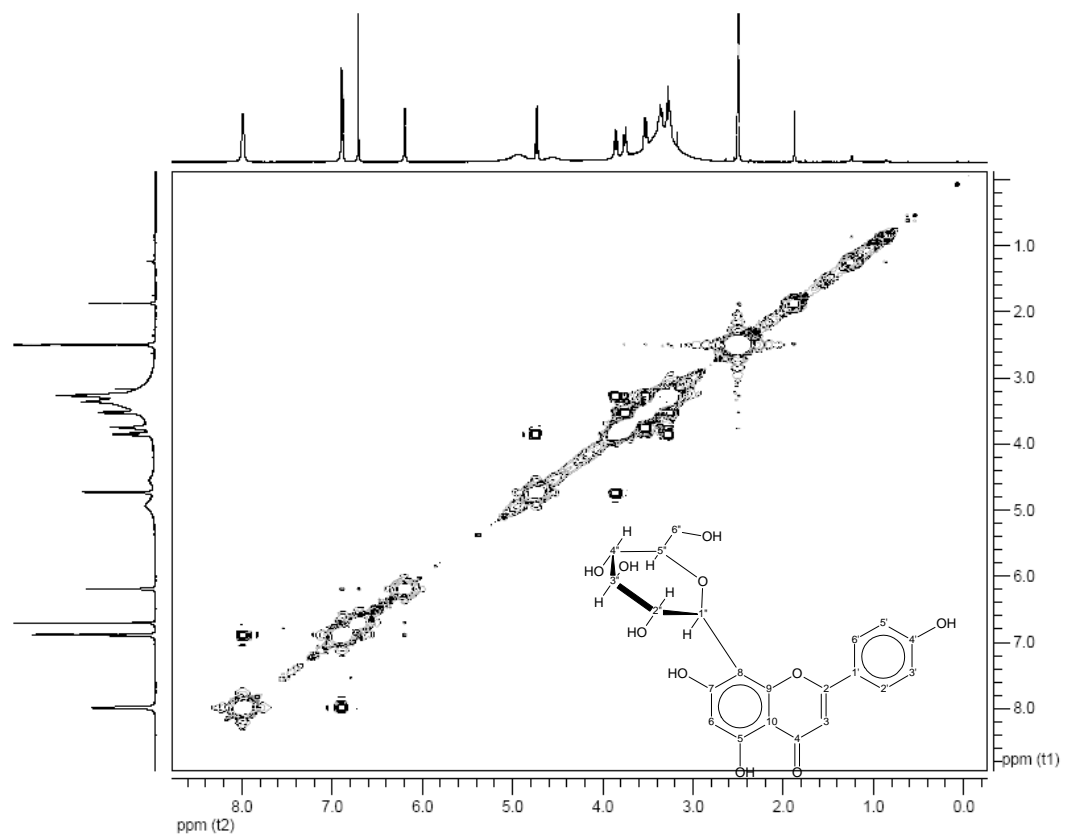


FIGURA 115A Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-06-02 (vitexina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

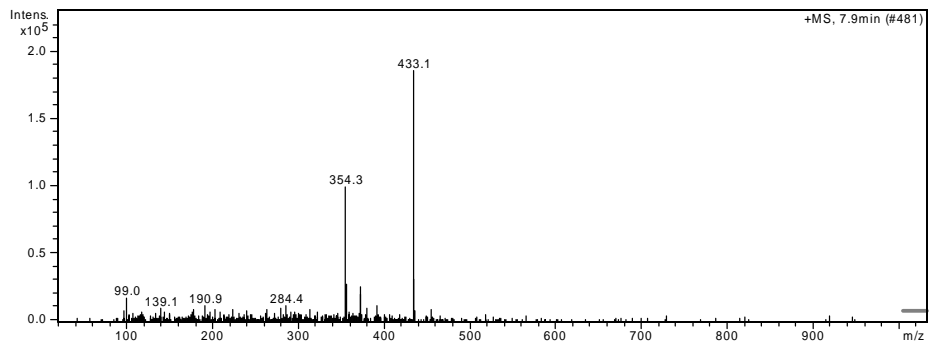


FIGURA 116A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo positivo.

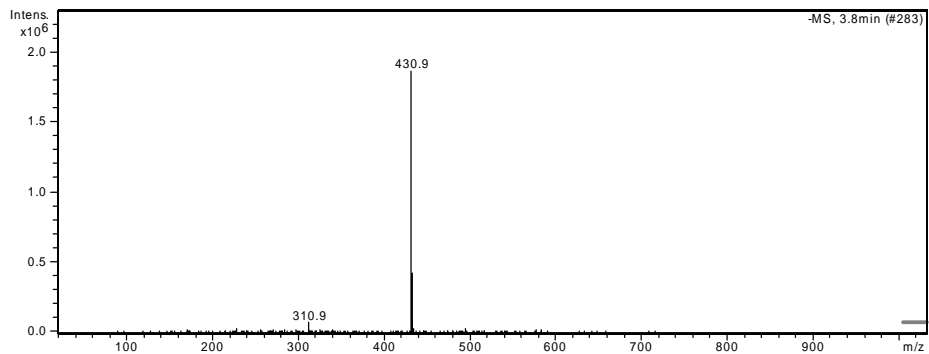


FIGURA 117A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo negativo.

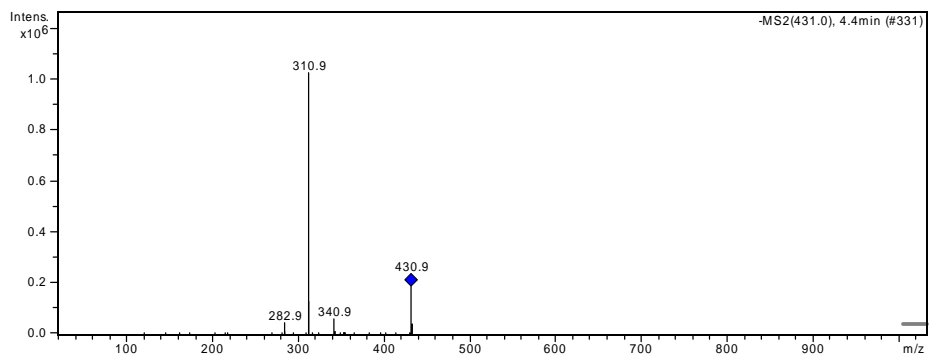


FIGURA 118A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-06-03 (vitexina), obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 431 dalton, por impacto com átomos de hélio.

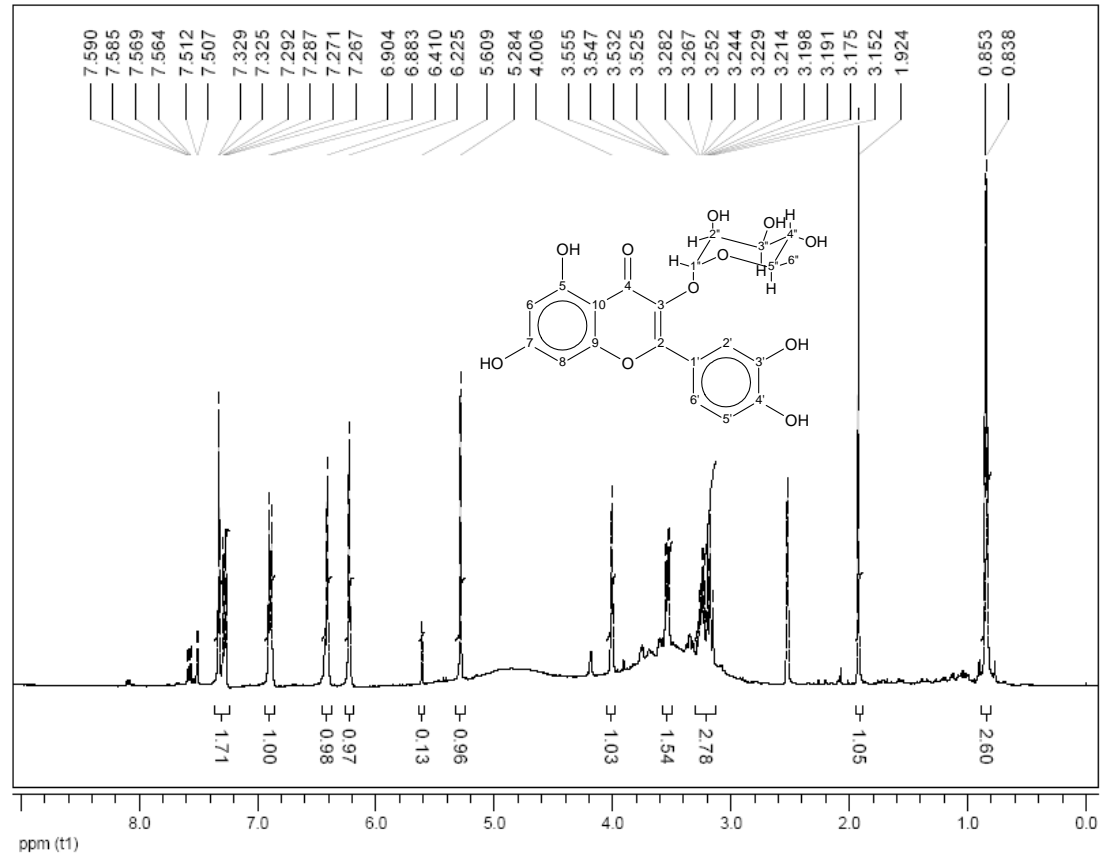
FIGURA 119A Espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



FIGURA 120A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

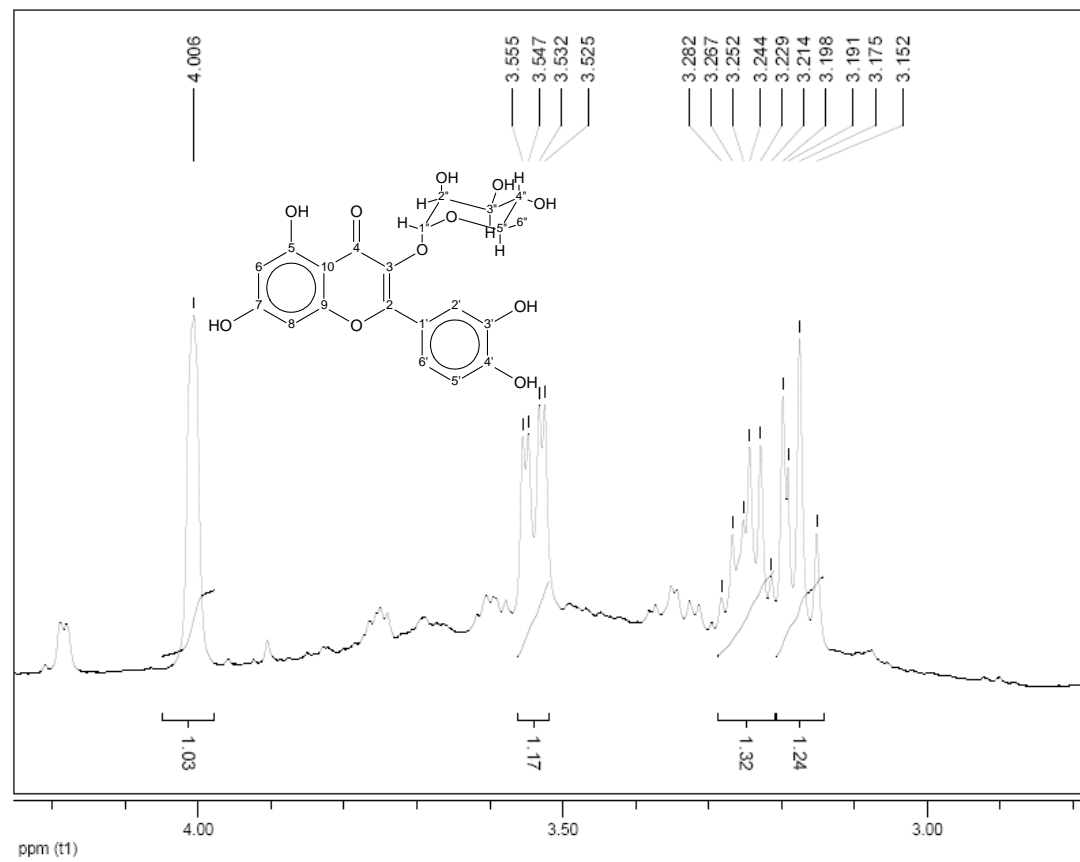


FIGURA 121A Expansão de espectro de RMN de ^1H de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz.

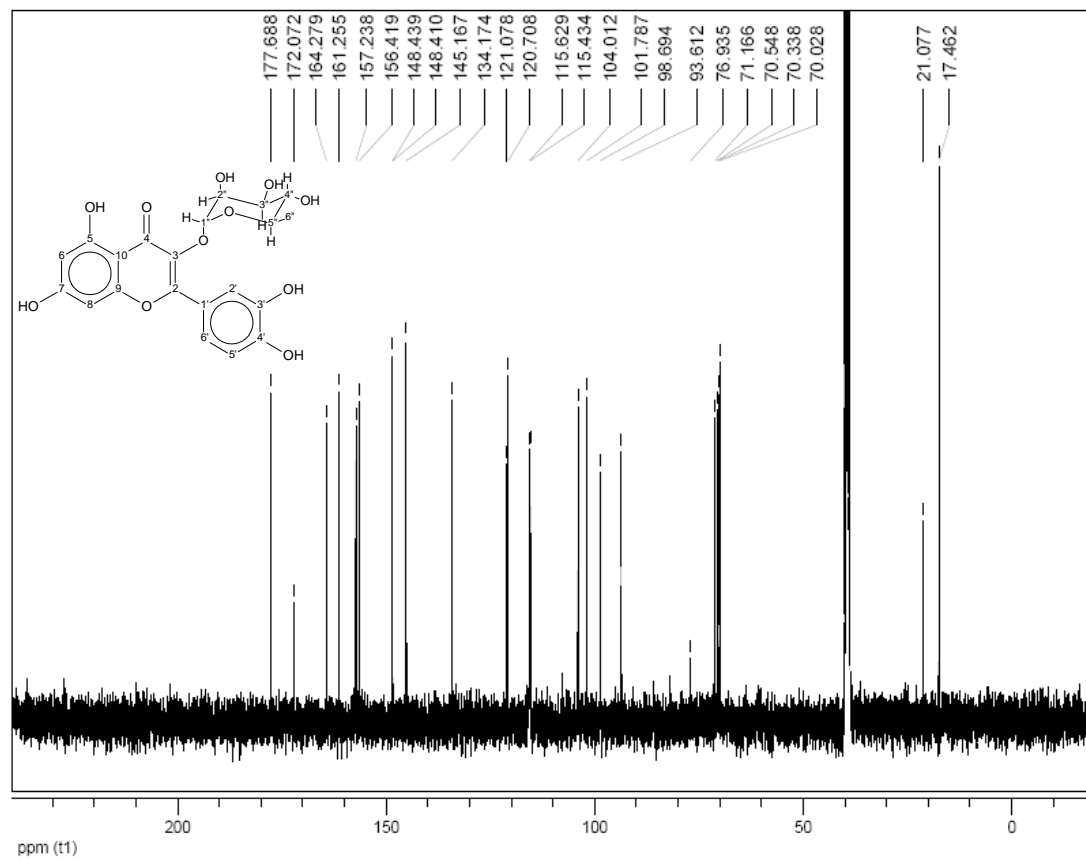


FIGURA 122A Espectro de RMN de ^{13}C de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz.

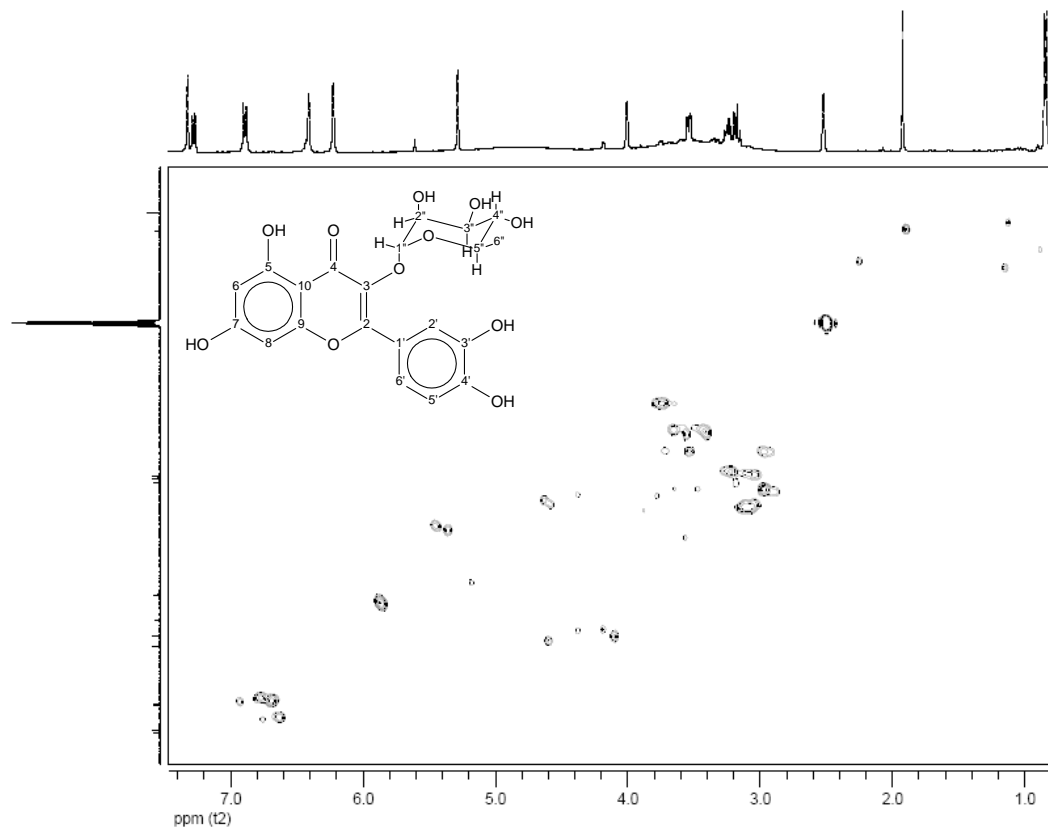


FIGURA 123A Mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO}-d_6$.

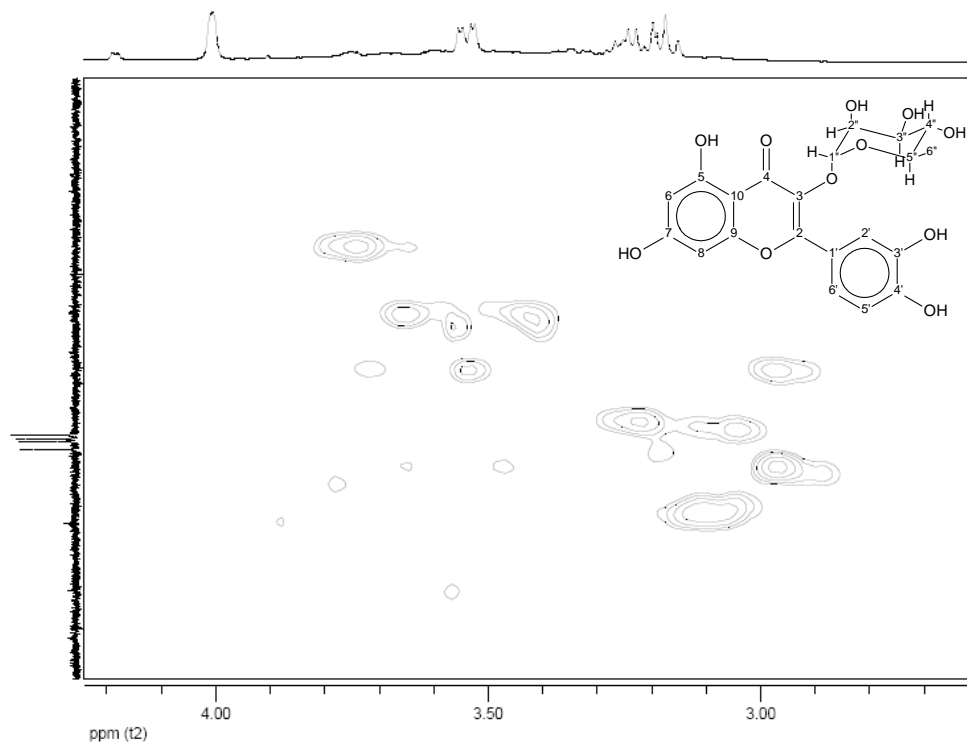


FIGURA 124A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de curta distância (gHSQC) ¹H x ¹³C (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em DMSO-*d*₆.

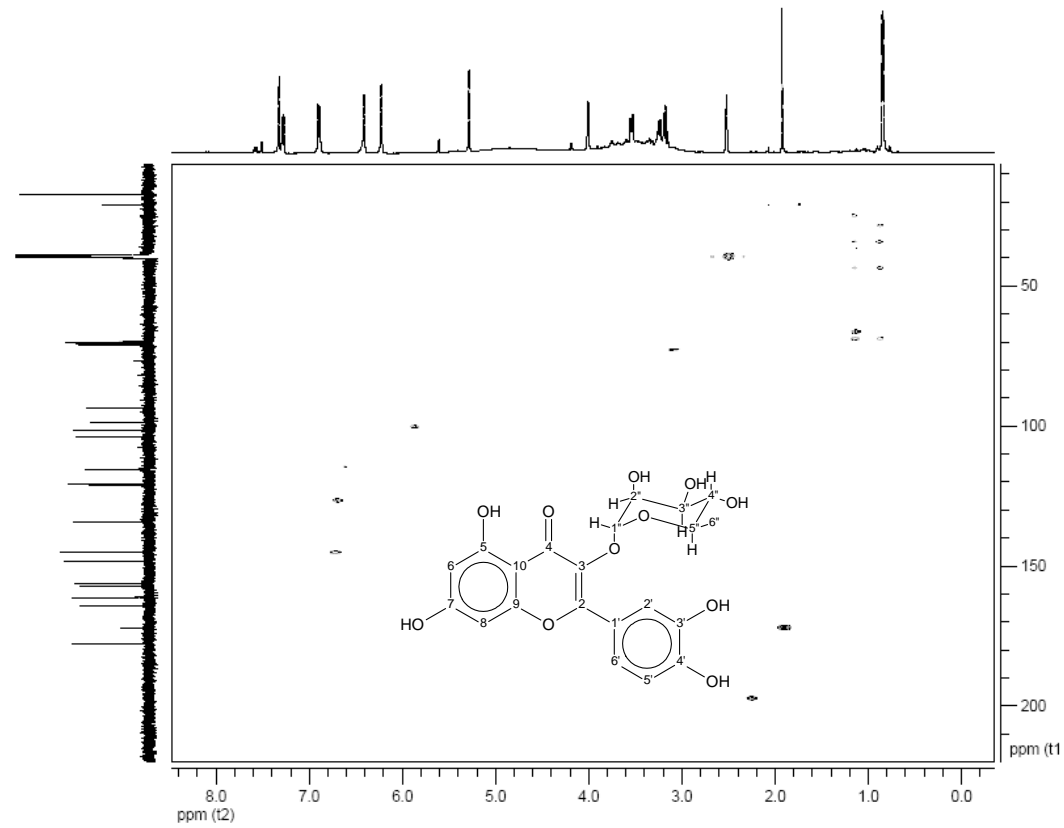


FIGURA 125A Mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$.

250

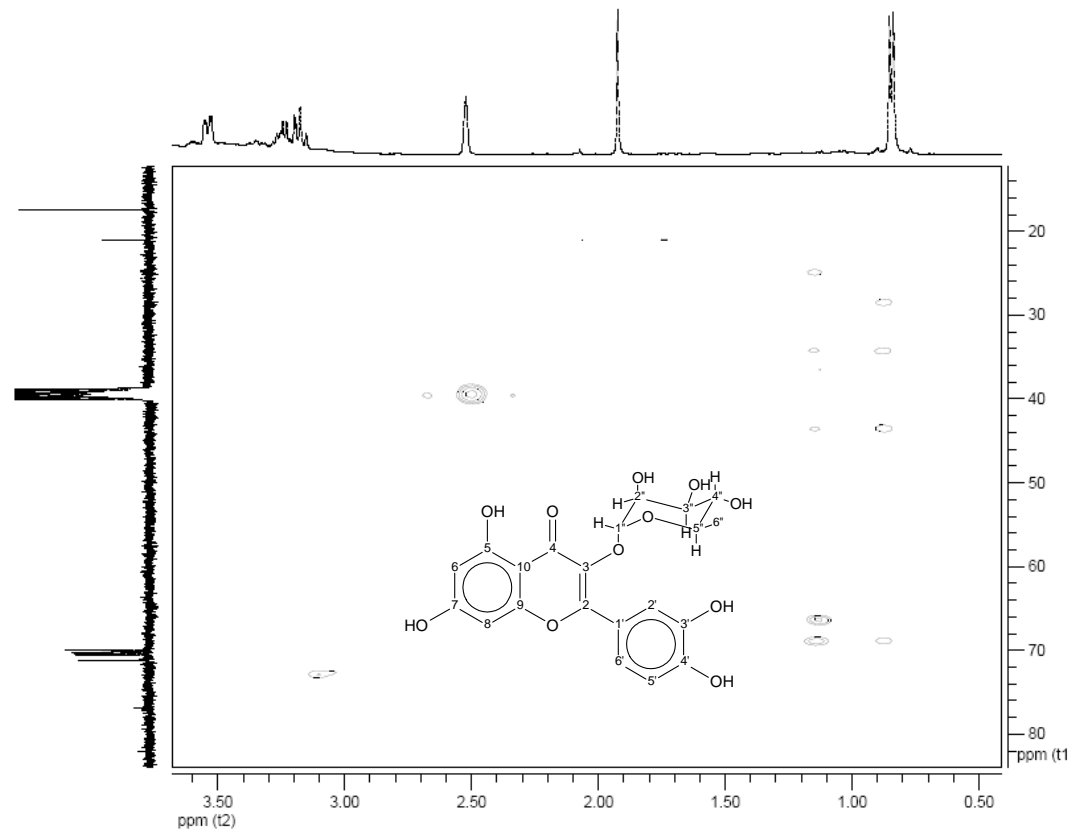


FIGURA 126A Expansão do mapa de correlação heteronuclear de longa distância (gHMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 x 100 MHz) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO}-d_6$.

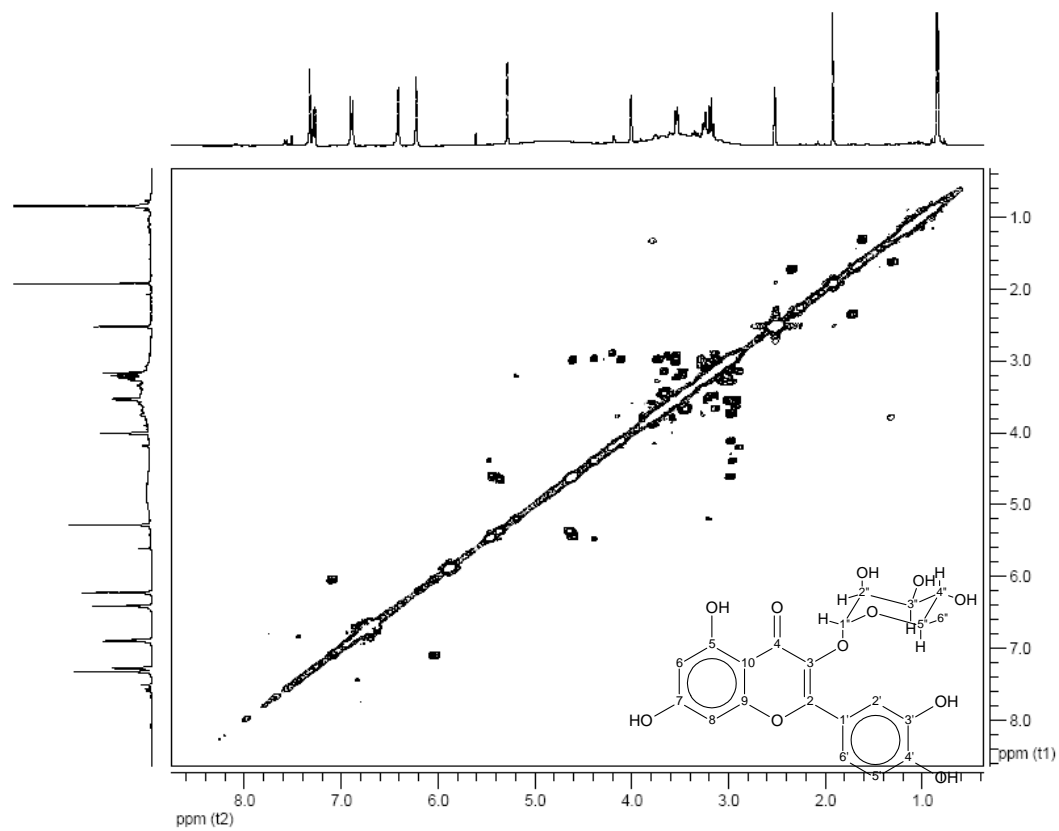


FIGURA 127A Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

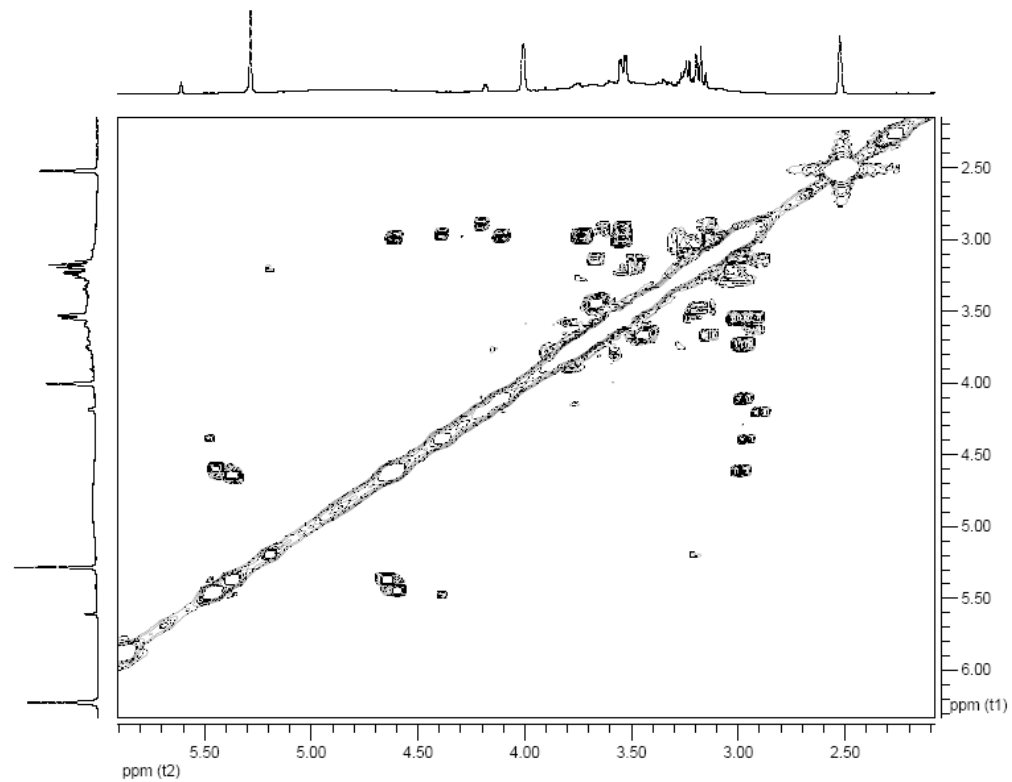


FIGURA 128A Expansão do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (gCOSY) de RC1-129-08-01 (quercitrina) em DMSO-*d*₆, 400 MHz.

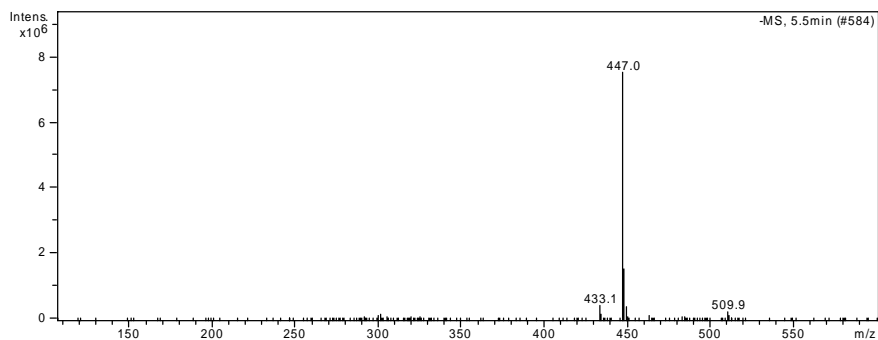


FIGURA 129A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01 (quercitrina), obtido no modo negativo.

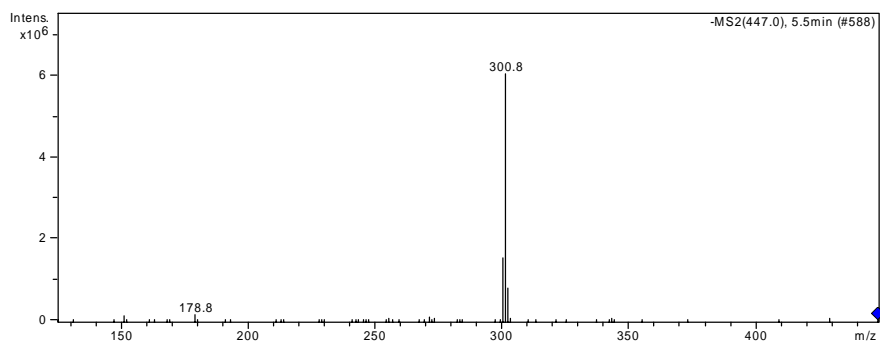


FIGURA 130A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01, obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 447 dalton por impacto com átomos de hélio.

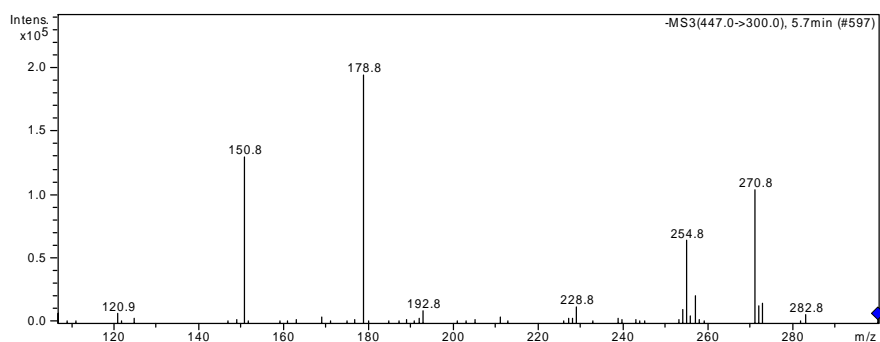


FIGURA 131A Espectro de massas (EM-ES) de RC1-129-08-01, obtido no modo negativo, após fragmentação do íon com m/z 325 dalton.