



VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS
SUBSTÂNCIAS ATIVAS CONTRA O FUNGO
Alternaria alternata (FR.) Keissler PRODUZIDAS
POR *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN
(Fabaceae)**

LAVRAS - MG

2012

VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS
CONTRA O FUNGO *Alternaria alternata* (FR.) Keissler PRODUZIDAS
POR *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN (Fabaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS - MG

2011

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

Campos, Viviane Aparecida Costa.

Purificação e identificação das substâncias ativas contra o fungo
Alternaria alternata (Fr.) Keissler produzidas por *Anadenanthera*
colubrina (Vell.) Brenan (Fabaceae) / Viviane Aparecida Costa
Campos. – Lavras : UFLA, 2011.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. Tangerina. 2. Mancha-marrom-de-alternaria. 3. Controle
alternativo. 4. Atividade antifúngica. 5. Extratos vegetais. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.952

VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS
CONTRA O FUNGO *Alternaria alternata* (FR.) Keissler PRODUZIDAS
POR *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN (Fabaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 01 de novembro de 2011.

Dr. Márcio Pozzobon Pedroso UFLA

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

LAVRAS - MG

2011

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela realização dos testes biológicos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), onde foram realizadas as análises de RMN.

À CAPES, pela concessão de bolsa.

Ao professor Denilson, pela orientação, ensinamentos, amizade e confiança.

Aos funcionários do Departamento de Química.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais e também a DeJane, Helvécio, Amanda e Fabiano.

A minha mãe, Sebastiana, pelo amor e dedicação, pois sem ela nada seria possível.

Ao meu irmão, Leandro, meu eterno amigo, pelo exemplo e apoio.

A minha filha, Júlia, pelo carinho, amor e alegria.

Ao meu pai, Fernando (*in memoriam*), que partiu muito cedo.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

RESUMO

Em estudo previamente realizado pelo Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal de Lavras, o extrato de *Anadenanthera colubrina* apresentou toxicidade frente ao fungo *Alternaria alternata* f. sp. *Citri*. Este fungo é responsável por grandes perdas na citricultura, na qual se faz uso de produtos com propriedades antifúngicas que aumentam o custo de produção e contaminam o homem e o ambiente com substâncias de elevada toxicidade. Consequentemente, objetivou-se dar continuidade ao referido estudo pelo fracionamento do extrato metanólico de *A. colubrina*, para purificar e identificar a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade contra *A. alternata* f. sp. *citri*. Inicialmente, o mencionado extrato foi submetido a lavagens com solventes de diferentes polaridades, o que resultou na obtenção de três frações solúveis em hexano, acetato de etila ou em metanol. Como a fração hexânica era a única ativa, submeteu-se a mesma a vários fracionamentos subsequentes por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash*, o que resultou na purificação de seis substâncias, sendo três ativas contra o fungo. Verificou-se, por microscopia eletrônica de varredura, que tais substâncias inibiam a elongação do tubo germinativo e da hifa de *A. alternata*, além de fazerem com que as referidas hifas sofressem extravasamento e deterioração. Para a elucidação estrutural, as substâncias foram submetidas a experimentos uni e bidimensionais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono treze, o que permitiu verificar que duas das substâncias ativas correspondiam ao β -sitosterol e ao linoleato de β -sitosterila, enquanto uma das inativas correspondia a trilinoleína. Portanto, com o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos importantes resultados para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *A. alternata*.

Palavras-chave: *Anadenanthera colubrina*. *Alternaria alternata*. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

In a previous study by the Research Group of Natural Products at Federal University of Lavras, *Anadenanthera colubrina* extract showed toxicity against the fungus *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, which is responsible for major losses in the citrus culture that makes use of products with antifungal properties that increase the cost of production and contaminate human beings and the environment with substances of high toxicity. As a consequence, this study was continued by fractionating the methanol extract of *A. colubrina* to purify and identify the substances accounting for the activity against *A. alternata* f. sp. *citri*. Initially, the extract underwent washings with solvents of different polarities, which resulted in three fractions soluble in hexane, ethyl acetate or methanol. As the hexane fraction was the active, it was submitted to several subsequent fractionations by flash column chromatography on silica gel, resulting in the purification of six substances, three of them being active against the fungus. According to analyses by scanning electron microscopy, these substances inhibited the elongation of germ tubes and hyphae of *A. alternata*, and caused leakage and deterioration to these hyphae. In order to elucidate the structures of these substances, they were submitted to one- and two-dimensional experiments by hydrogen and carbon thirteen nuclear magnetic resonance spectroscopy, which showed that two of the active substances corresponded to the β -sitosterol and β -sitosteryl linoleate, while one of the inactive substances was trilinolein. Therefore, this study afforded important results for the development of new products for the control of *A. alternata*.

Keywords: *Anadenanthera colubrina*. *Alternaria alternata*. Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mancha-marrom-de-alternaria em folhas e frutos de tangerina (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009)	14
Figura 2	Sustâncias de origem vegetal com propriedades antifúngicas.....	20
Figura 3	Ilustrações da espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	21
Figura 4	Frutos e sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i>	22
Figura 5	Substâncias isoladas de <i>A. colubrina</i>	23
Figura 6	Esquema do fracionamento dos frutos frescos de <i>A. colubrina</i>	26
Figura 7	Electromicrografias de varredura de estruturas de <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>citri</i> submetidas aos tratamentos compostos pela: substância Vi-02-69-06 (A e B); substância Vi-02-24-02 (C); substância Vi-02-53-02 (D); fração Vi-02-24-08 (E); testemunha contendo meio líquido BD adicionado de DMSO na concentração inicial de 2,5% (v/v) (F); fungicida Nativo [®] (trifloxistrobina 100 g L ⁻¹ e tebucanazol 200 g L ⁻¹ de produto comercial) (G); fungicida Recop [®] (oxicloreto de cobre 840g kg ⁻¹ de produto comercial) (H). Setas: inibição de crescimento do tubo germinativo e hifas. Seta com estrela: grânulos de oxicloreto de cobre	41
Figura 8	Estrutura do β -sitosterol (Vi-02-69-06).....	43
Figura 9	Estrutura do linoleato de β -sitosterila (Vi-02-24-02)	48
Figura 10	Estrutura do linoleato de colesterila (1) e do linoleato de etila (2)..	49
Figura 11	Estrutura da trilinoleína (Vi-02-24-06).....	54
Figura 12	Resumo do trabalho realizado	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C	Carbono treze
^1H	Hidrogênio
AcOEt	Acetato de etila
BD2	Batata, dextrose e água
BDA	Batata, dextrose, ágar e água
BOD	Biochemical oxygen demand
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dt	Duplo tripleto
ddt	Duplo duplo tripleto
DMSO	Dimetilssulfóxido
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento, cuja unidade será sempre Hertz
m	Multiplete
MMA	Mancha-marrom-de-alternaria
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto

RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROESY	Rotating frame Overhause effect spectroscopy
s	Singleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total correlation spectroscopy
δ _H	Deslocamento químico de hidrogênio, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)
δ _C	Deslocamento químico de carbono treze, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Produção brasileira de tangerinas	13
2.2	A mancha-marrom-de-alternaria	14
2.3	O fungo <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>citri</i>	16
2.4	Controle da mancha-marrom-de-alternaria	17
2.5	Produtos de origem vegetal com propriedades antifúngicas	18
2.6	A espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	21
3	OBJETIVO	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Coleta das amostras de <i>A. colubrina</i>	25
4.2	Preparo dos extratos de <i>A. colubrina</i>	26
4.3	Obtenção de inóculo de <i>A. alternata</i>	27
4.4	Determinação da capacidade inibitória dos extratos de <i>A. colubrina</i> e de suas frações	27
4.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de <i>A. colubrina</i>, das suas frações e das substâncias isoladas	28
4.6	Fracionamento de <i>A. colubrina</i>	30
4.6.2	Fracionamento das amostras Vi-02-24-09 e Vi-02-24-10	31
4.6.3	Fracionamento da amostra Vi-02-24-11	32
4.7	Identificação das substâncias purificadas	32
4.8	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os principais países produtores de citros são Brasil, Estados Unidos, México, Espanha e China, sendo o Brasil o maior produtor mundial de laranja. Dentre os estados brasileiros, se destacam São Paulo e Minas Gerais, que formam o cinturão citrícola do país. Em 2009, o PIB (produto interno bruto) do setor citrícola brasileiro ficou em torno de US\$ 6,5 bilhões, tendo as exportações do complexo citros somado 2,9 milhões de toneladas, com mais da metade desta produção destinada ao suco concentrado de laranja. Neste mesmo ano, foram exportados US\$ 241 milhões em óleos essenciais, provenientes da laranja, lima, limão e tangerina, dentre outros (NEVES et al., 2010).

Apesar dos números expressivos acima apresentados, a citricultura brasileira tem sido alvo constante de pragas e doenças, que foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores na última década. A mortalidade das plantas saltou de 4% para preocupantes 7,5%, nos últimos dez anos. Apenas as doenças foram responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas de frutas por ano, sendo grande parte dessas perdas causada pelas doenças de origem fúngica. Em decorrência, quando comparada às outras culturas, a citricultura ocupou o segundo lugar com relação à quantidade de defensivos agrícolas utilizados no Brasil em 2009 (NEVES et al., 2010). Em relação ao ano de 2008, houve um aumento de 7,7% no volume de tais defensivos para uso na citricultura no ano de 2009, durante o qual houve um gasto total de R\$ 201 milhões na aquisição dos referidos agroquímicos.

Dentre os defensivos mais utilizados na citricultura, destacam-se os fungicidas de aplicação foliar que, assim como os outros produtos para o controle de fungos fitopatogênicos, aumentam os custos de produção e podem contaminar o ambiente e o homem com substâncias de elevada toxicidade (FENG; ZHENG, 2007).

Dentre os principais fungos que acometem os citros se destaca *Alternaria alternata* f. sp. *citri* que, em tangerinas e seus híbridos, causa uma patologia conhecida como mancha-marrom-de-alternaria e representa um sério problema para os produtores em várias regiões do Brasil e em outros países (PEEVER et al., 2004; PRATES, 2011; TIMMER et al., 2003; VICENT et al., 2000). Consequentemente, existe uma crescente demanda por novos métodos de controle de *A. alternata*. Para tanto, uma possível alternativa diz respeito ao emprego de produtos de origem vegetal, já que as plantas são capazes de produzir várias substâncias com atividade antifúngica (ATHUKORALAGE et al., 2001; VILLARROEL et al., 2001).

Em decorrência, o Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) realizou, previamente, um estudo para identificar espécies vegetais produtoras de substâncias ativas contra *A. alternata* f. sp. *Citri* (CARVALHO et al., 2011). Com isso, foi possível selecionar *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae), cujo extrato metanólico se mostrou mais tóxico para o referido patógeno do que os fungicidas comerciais Dacobre® e Amistar®. Dessa forma, com vistas a contribuir para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de *A. alternata* f. sp. *citri* em citros, buscou-se, neste trabalho, purificar e identificar a(s) substância(s) de *A. colubrina* com atividade antifúngica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção brasileira de tangerinas

A citricultura brasileira, que é líder mundial, tem se destacado por alavancar o crescimento sócio-econômico, contribuindo com a balança comercial e, principalmente, gerando empregos diretos e indiretos na área rural (NEVES et al., 2010). O Brasil é, atualmente, o maior produtor mundial de laranja e o quarto maior produtor de tangerina, atrás apenas de China, Espanha e Japão. Em 2010, a produção brasileira de tangerina foi superior a 1,5 milhão de toneladas, sendo 90% deste montante destinados ao mercado da fruta fresca para consumo interno e para exportação para vários países, dentre os quais se destacam Canadá, Indonésia e Rússia. Os principais estados brasileiros produtores de tangerina são São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, que respondem por mais de 80% de toda a produção no país (VIANA, 2010).

Entre os problemas encontrados pelos produtores estão as doenças causadas por vários fitopatógenos, que contribuem, em grande escala, para que a produção de frutas cítricas de boa qualidade seja um enorme desafio. Das várias doenças que afetam a cultura, a mancha-marrom-de-alternaria (MMA), que tem como agente causal *A. alternata* f. sp. *citri*, vem trazendo preocupação desde 2001. Tal doença foi relatada, pela primeira vez, no Rio de Janeiro, provocando danos em tangerinas e em alguns de seus híbridos (SPÓSITO, 2003).

O aparecimento dessa doença nos pomares tem elevado significativamente os custos de produção em função do manejo adotado para o controle da mesma (SPÓSITO, 2003). Destaca-se, ainda, que os altos custos dos fungicidas específicos para o controle desse fungo têm levado pequenos produtores de algumas regiões a desistirem do cultivo de

tangerinas, principalmente das variedades mais suscetíveis à doença (SPÓSITO, 2006).

2.2 A mancha-marrom-de-alternaria

A MMA (Figura 1) foi constatada, pela primeira vez, no Brasil, durante o ano de 2001, em tangerinas ‘Dancy’, no estado do Rio de Janeiro (GÓES; OCA; REIS, 2001). Em 2003, já estava nos municípios de Campanha (sul de Minas Gerais), Montenegro (Rio Grande do Sul) e em outros sete municípios de São Paulo (SPÓSITO, 2003). Esta doença também já foi relatada na Austrália, Estados Unidos, África do Sul, Israel, Turquia, Espanha e Colômbia, onde vem causando sérios prejuízos para a citricultura (GRUPO CULTIVAR, 2011).



Figura 1 Mancha-marrom-de-alternaria em folhas e frutos de tangerina (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009)

A MMA é causada por *A. alternata* f. sp. *citri* (Fr:Fr) Keissler, que se trata de um fungo de difícil controle. Esse patógeno produz uma toxina específica, conhecida simplesmente como ACT, que é responsável pelos sintomas em tangerinas e seus híbridos (tangelos e tangores). A doença causa sintomas apenas em tecidos jovens de folhas, ramos e frutos, podendo levar à

queda de folhas, seca de ramos e queda prematura de frutos (FEITCHENBERGER, 2003; SPÓSITO, 2003; TIMER et al., 2000).

Nas folhas jovens, as lesões são necróticas e, inicialmente, pequenas, de coloração marrom ou preta, apresentando halo amarelado ao seu redor. Com o tempo, as lesões aumentam de tamanho, podendo tomar grandes áreas das superfícies das folhas, as quais são suscetíveis quando estão em expansão, tornando-se resistentes ao atingirem a maturidade (FEITCHENBERGER et al., 2005). Nos ramos novos, as lesões são necróticas, de tamanho variável e coloração marrom-escuro. Quando a doença causa queda de folhas, os ramos secam (SPÓSITO, 2006). Já em frutos jovens, as lesões são marrom-escuras, inicialmente deprimidas no centro e circundadas por um halo amarelado. Os frutos podem, também, apresentar lesões com o centro corticoso e saliente, formando manchas que se destacam facilmente, deixando orifícios na superfície do fruto (FEITCHENBERGER et al., 2005).

O fungo *A. alternata* f. sp. *citri* também é o agente causador da mancha-foliar-de-alternaria (MFA), que afeta somente folhas de limoeiros ‘Rugoso’ e ‘Cravo’, sendo importante em viveiros e coleções de matrizes e borbulheiras desses porta-enxertos. Também é o agente causal da podridão-negra, que afeta laranjas doces, limões, tangerinas, tangores, tangelos e pomelos, causando podridão de frutos. A utilização pela indústria de frutos com a podridão torna o suco amargo e de aspecto ruim, devido à sua contaminação por fragmentos de tecidos de frutos infectados. As três doenças são descritas como tendo o mesmo agente causal, com idênticas características morfológicas, porém, com patogenicidades diferentes (FEITCHENBERGER et al., 2005).

No Brasil, a doença vem afetando severamente cultivos comerciais de tangerina ‘Dancy’, no estado do Rio de Janeiro; de ‘Tangor Murcott’, nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul e, com menor severidade, plantas comerciais de tangerinas ‘Ponkan’, nos estados de São Paulo

e Minas Gerais (SPÓSITO, 2006). As cultivares que vêm se mostrando resistentes à mancha-marrom são a ‘Thomas’ e ‘Fremont’ (ALTERNATIVA..., 2005).

2.3 O fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*

Este fungo produz conídios de forma e tamanhos variáveis (22-40 x 15-22 μm), de cor oliva a marrom-escuro, dotados de quatro a seis septos transversais e um ou mais septos longitudinais. O patógeno se desenvolve saprofiticamente em tecidos cítricos mortos ou em outros substratos, produzindo grande número de conídios, que podem ser carregados pelo vento até as superfícies de frutos, folhas e outros órgãos susceptíveis. No caso da MMA e da MFA, dois patótipos deste fungo estão envolvidos. O patótipo “tangerina”, responsável pela MMA, causa necrose dos tecidos de tangerineiras, tangoreiros e tangeleiros, decorrente da ação de uma toxina específica produzida pelo fungo, denominada toxina ACT. No caso do patótipo “limão rugoso”, responsável pela MFA, a necrose de folhas é causada pela ação da toxina ACRL. A toxina produzida pelo fungo é a responsável pelo aumento das áreas necrosadas dos tecidos atacados e o tamanho das lesões e a extensão da necrose podem variar em função da suscetibilidade da variedade de citros (SPÓSITO, 2007).

Na podridão-negra, nenhuma toxina específica está envolvida no processo de infecção. O fungo penetra nos tecidos de frutos por ferimentos ou por aberturas naturais. A manifestação da doença no campo é favorecida quando a colheita é atrasada, ou quando as plantas são submetidas a condições adversas, como, por exemplo, geadas, secas prolongadas e queimaduras pelo sol (FEITCHENBERGER et al., 2005).

O ciclo da MMA tem início pela sobrevivência do patógeno nos tecidos vegetais afetados, presentes nas plantas ou caídos no solo. Os conídios, esporos

assexuais produzidos nesses tecidos, são liberados após as chuvas ou molhamento dos mesmos por orvalho, em locais onde ocorrem mudanças na umidade relativa. A disseminação a longas distâncias se dá pela ação do vento. As condições ambientais favoráveis à infecção ocorrem quando o período de molhamento é de 12-14 horas e a temperatura se situa entre 20 °C e 30 °C (TIMMER, 1999). Na germinação, os conídios de *A. alternata* liberam toxinas ACT, específicas para tangerinas e seus híbridos, que matam as células antes da infecção. A expressão dos sintomas ocorre entre 24 e 36 horas após a infecção (SPÓSITO, 2006).

A disseminação do fungo está altamente relacionada às condições ambientais. Em áreas com alta umidade, são necessárias várias aplicações com fungicidas para reduzir a severidade da doença (TIMMER et al., 2003), o que aumenta significativamente os custos de produção e pode tornar inviável o cultivo de variedades suscetíveis nessas regiões (TIMMER, 1999).

2.4 Controle da mancha-marrom-de-alternaria

Dentre as principais medidas de manejo recomendadas para a mancha-marrom-de-alternaria, é possível citar os tratamentos culturais, tais como formação de pomares em áreas com bastante circulação de ar, maior espaçamento entre as plantas e cuidados com a adubação, sobretudo a nitrogenada, que induz um grande crescimento vegetativo da planta. Como o fungo só se multiplica em tecidos mortos, também é recomendável a execução de uma poda de limpeza, eliminando-se os restos do pomar e as podas no inverno para melhorar a aeração da planta (TIMMER et al., 2003).

Quanto ao método químico de controle, ainda não existem produtos registrados para o controle dessa doença na cultura de citros (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS - AGROFIT, 2010). Em decorrência,

os agricultores utilizam, em citros, produtos recomendados para o controle de *A. alternata* em outras culturas, como, por exemplo, aqueles à base de cobre, as estrubilurinas, dicarboximidas, triazóis e os ditiocarbamatos (BASTIANEL et al., 2005). Dentre tais produtos se encontram os benzimidazóis, que não apresentam eficácia no controle da doença, podendo até agravá-la em algumas situações (FEITCHENBERGER et al., 2005).

Apesar de as medidas acima descritas serem importantes para o manejo da doença, tem-se observado, muitas vezes, no campo, que o controle da mesma não tem sido eficiente, levando diversos produtores a fazerem aplicações excessivas de fungicidas, o que pode resultar na contaminação do ambiente com elevadas quantidades residuais de substâncias tóxicas. Segundo Fioravanço e Paiva (2005), para a eficácia do controle de doenças de origem fúngica, faz-se necessário o aumento no número de aplicações de produtos químicos, o que ocasiona maiores danos ambientais e o desenvolvimento de resistência ao patógeno.

2.5 Produtos de origem vegetal com propriedades antifúngicas

O isolamento e a identificação de substâncias de origem vegetal com atividade antifúngica têm sido os objetivos de várias pesquisas. Para exemplificar, podem-se citar Athukoralage et al. (2001), que obtiveram o 3-formil-2,4-diidroxil-6-metilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetil-4-(metoxicarbonil) fenila (Figura 2), proveniente de *Gordonia dassanayakei* Wadhwa & Weeras (Lecythydaceae). Tal substância apresentou considerável atividade contra fungos patógenos de plantas, como *Crynespora cassiicola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*, e também contra fungos causadores de doenças em humanos, como *Curvularia* sp.

Também é possível mencionar o trabalho desenvolvido por Villarroel et al. (2001), que isolaram o filifolinol (Figura 2) de *Heliotropium huascoense* Johnst. (Boraginaceae). Nesse caso, a atividade da substância isolada foi observada contra *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger*, que são fungos fitopatogênicos.

Do extrato bruto de *Mahonia aquifolium* Nutt. (Berberidaceae) foi possível isolar o alcaloide berberina (Figura 2), que apresentou atividade contra vários isolados de *Candida* spp. De forma análoga, isolou-se do extrato das raízes de *Vernonanthura tweediana* (Baker) H. Rob. (Asteraceae) o sesquiterpeno 6-cinamoxi-1-hidroxi-4-en-3-ona (Figura 2), que se mostrou ativo contra *Trichophyton mentagrophytes* (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007). Vale ressaltar que os referidos fungos causam doenças dermatológicas ao homem.

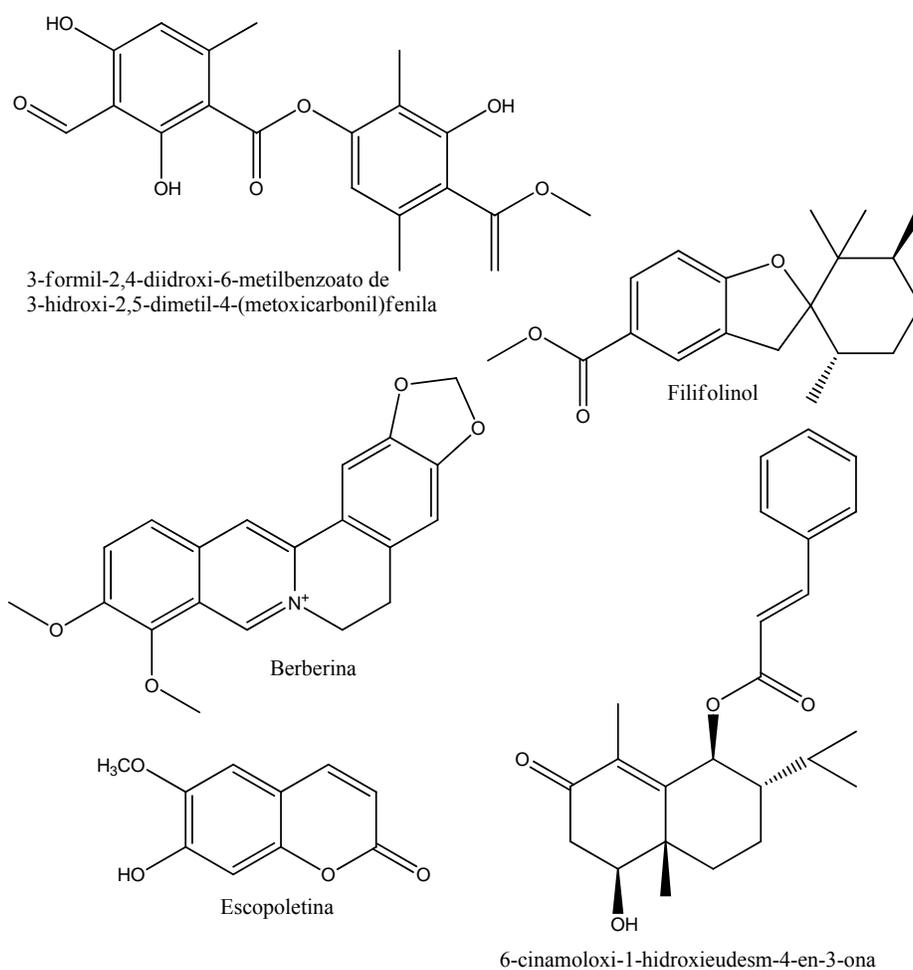


Figura 2 Sustâncias de origem vegetal com propriedades antifúngicas

Em estudo realizado com *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae), Zeid (2002) observou que as folhas da referida planta produziam várias substâncias antifúngicas ao serem inoculadas com uma suspensão de esporos do fungo *Helminthosporium turcicum*, que é um agente causador de doenças em plantas. Dentre tais substâncias se destaca a escopoletina (Figura 2), que também apresentou, neste mesmo trabalho, atividade contra outros fungos e bactérias.

Silva et al. (2009) avaliaram os efeitos dos extratos das cascas de *A. colubrina* e observaram baixo índice de crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp *Tracheiphilum*, que causa a fusariose, uma doença de grande importância para a cultura do feijoeiro.

2.6 A espécie *Anadenanthera colubrina*



Figura 3 Ilustrações da espécie *Anadenanthera colubrina* (ANADENANTHERA..., 2011)



Figura 4 Frutos e sementes de *Anadenanthera colubrina* (PRAÇA..., 2011)

A espécie vegetal *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan Engl. (Figura 3), conhecida popularmente como angico e angico-vermelho, entre outros nomes, é nativa da América do Sul, possui copa densa e, no nordeste do Brasil, pode chegar a até 7 m de altura. As folhas de suas árvores são conhecidas por apresentarem propriedades antimicrobianas, sendo muito utilizadas na medicina popular (DANTAS et al., 2010). O fruto (Figura 4) é do tipo folículo, com comprimento variando de 13,5 a 39,5 cm, de cor marrom-clara, evidenciando os lóculos, nos quais estão alojadas as sementes, de 9 a 14, lisas e escuras (BARRETTO; FERREIRA, 2011).

Por meio de estudos clínicos realizados com essa espécie vegetal, observaram-se atividades alucinógena e hipnótica, por parte dos seus constituintes (PACHTER; ZACHARIAS; RIBEIRO, 1959). Estudos fitoquímicos resultaram nas purificações de fenóis (flavonoides e taninos) (SIQUEIRA et al., 2011), esteroides (β -sitosterol, Figura 5) e triterpenoides (lupenona e lupeol, Figura 5) (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004). Também foi encontrado o alcaloide bufotenina (Figura 5) em sementes de *A. colubrina*, as quais eram muito utilizadas pelos índios da Argentina e do Peru, nos tempos pré-coloniais, em suas atividades culturais, devido às suas propriedades alucinógenas (PACHTER; ZACHARIAS; RIBEIRO, 1959).

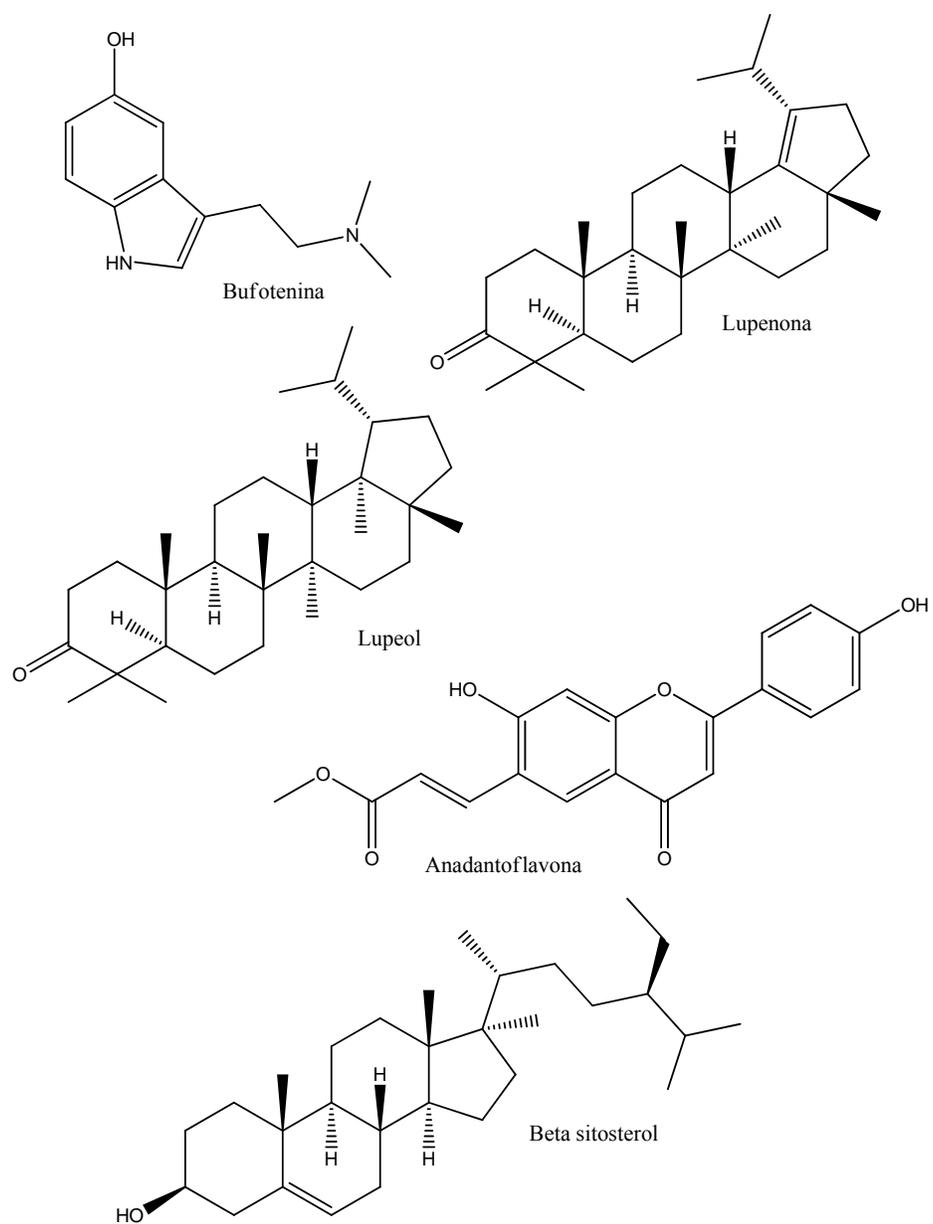


Figura 5 Substâncias isoladas de *A. colubrina*

3 OBJETIVO

Considerando-se que, em testes previamente realizados, o extrato de *A. colubrina* apresentou elevada atividade contra o fungo *A. alternata* f. sp. *citri*, o que evidenciou o potencial dessa planta para o desenvolvimento de novos produtos para o controle deste fungo, buscou-se, neste trabalho, fracionar o extrato de *A. colubrina* com vistas a purificar e identificar a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade contra *A. alternata* f. sp. *citri*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras de *A. colubrina*

Os frutos de *A. colubrina* foram coletados no campus da Universidade Federal de Lavras, no período de abril a maio de 2009. As partes coletadas foram numeradas e acondicionadas em caixas de compensado. Simultaneamente à coleta do material botânico no campo, foi preenchida uma ficha padrão, na qual foram mencionados: local da coleta, hábitat, data da coleta, horário, condições do tempo, parte colhida, fase de desenvolvimento da planta, tipo de solo, ocorrência de pragas ou doenças e outras informações complementares que foram julgadas necessárias.

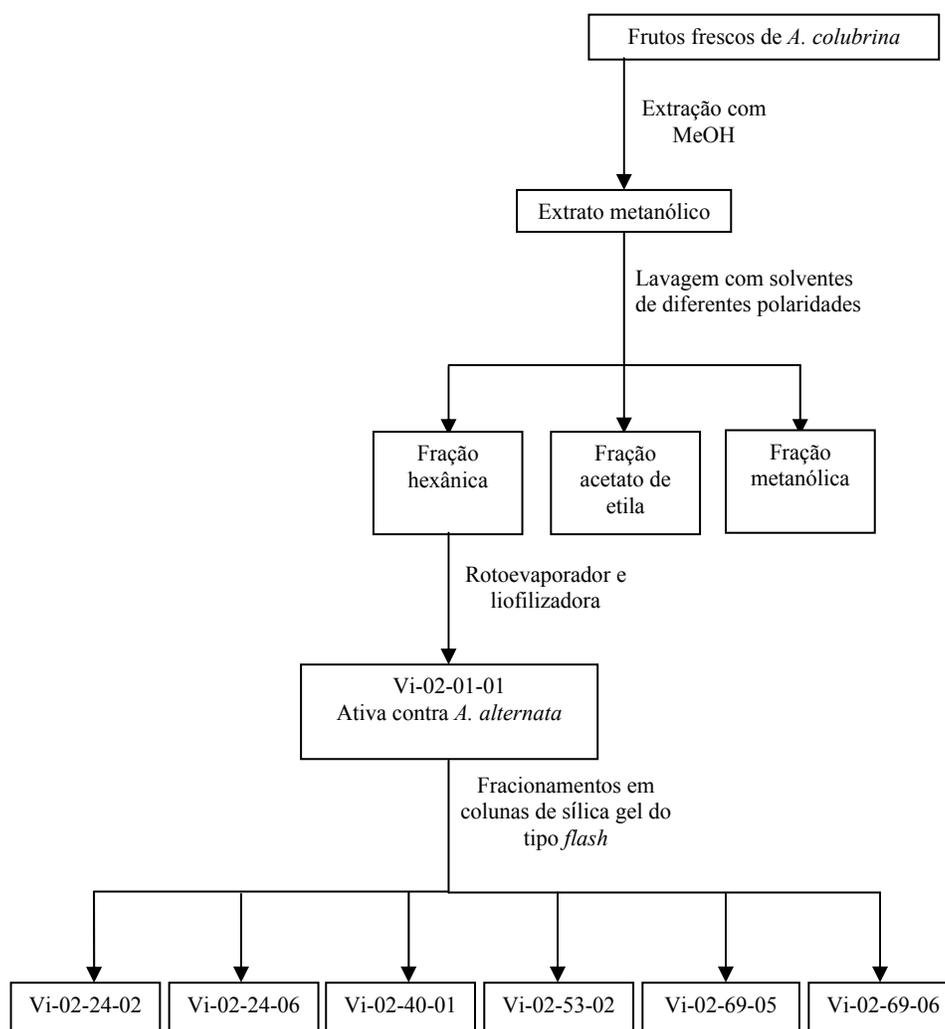


Figura 6 Esquema do fracionamento dos frutos frescos de *A. colubrina*

4.2 Preparo dos extratos de *A. colubrina*

Os frutos frescos (aproximadamente 405 g) de *A. colubrina* foram picados e submetidos à maceração com 400 mL de metanol (MeOH), durante 48 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura obtida foi filtrada em

algodão. Para a extração do máximo possível de substâncias dos tecidos vegetais, este processo foi realizado mais duas vezes, dando origem a soluções, das quais os solventes foram removidos em evaporador rotatório. A seguir, para a total remoção da umidade, os resíduos obtidos foram submetidos ao processo de liofilização, o que resultou em um material marron com massa correspondente a 42,20 g.

4.3 Obtenção de inóculo de *A. alternata*

Foram utilizados os isolados obtidos por Carvalho (2008) de frutos e folhas de tangerina ‘Murcot’ (A1-03-04) e ‘Ponkan’ (B-52-01 e B-62-04), que se encontravam conservados, pelo método Castellani, no Departamento de Fitopatologia da UFLA .

4.4 Determinação da capacidade inibitória dos extratos de *A. colubrina* e de suas frações

O extrato (2 mg) obtido conforme descrito no item 4.2 foi dissolvido em 0,5 mL de Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹) (preparado com água destilada esterilizada, no momento da montagem do experimento) e, logo em seguida, a solução obtida foi misturada com 100 µL de suspensão contendo 2,6 - 3,0 x 10⁵ conídios de *Alternaria alternata* por mililitro (CARVALHO et al., 2007), que foi previamente obtida pela adição de 10 mL de Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹) em placas de Petri com 24 horas de estressamento do fungo, seguida de raspagem das colônias com alça de Drigalski, filtragem da suspensão resultante em gaze e contagem do número de conídios em câmara de Neubauer (BALBI-PEÑA et al., 2006). Da suspensão resultante (extrato + conídios), cuja concentração foi de 4,3-5,0 x 10⁴ conídios mL⁻¹ (SAKS; BARKAI-GOLAN, 1995), foram retiradas

quatro alíquotas de 20 μL para serem colocadas em cavidades de uma placa de polipropileno com 96 cavidades de 350 μL , contendo 160 μL de meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1 L de água) com antibiótico tetraciclina (origem: Bunker, concentração: 100 mg/180 mL de meio BDA quente) (SOUZA et al., 2006) em cada cavidade. As placas foram envolvidas com Rolopac e incubadas em estufa para BOD, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas por dia (BÓVEDA, 1986). Após três dias, a ausência de qualquer crescimento segundo observação visual caracterizou a atividade antifúngica da amostra sob avaliação. Para o preparo do controle positivo seguiu-se a dosagem recomendada por Andrei (2005), que correspondia à dissolução de massa igual a 14 mg de Dacobre PM (clorotalonil 250 g kg^{-1} e oxiclureto de cobre 504 g kg^{-1}), fabricado pela Iharabras S.A. Indústrias Químicas, em 4 mL de solução de Tween 80 a 1% (solução b). Em seguida, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL da solução (b) para serem adicionadas a amostras de 100 μL da suspensão de esporos de *A. alternata*, originando uma suspensão (c) da qual quatro alíquotas de 20 μL foram retiradas para serem colocadas nas cavidades da placa de polipropileno contendo o meio BDA. Como controle negativo foi empregada solução aquosa de Tween 80 a 1 % ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *A. colubrina*, das suas frações e das substâncias isoladas

O extrato metanólico de *A. colubrina* (obtido conforme descrito no item 4.2) e as frações obtidas após lavagem do referido extrato com solventes de diferentes polaridades (60 mg de cada amostra) foram dissolvidos em 312 μL de DMSO. De cada solução obtida retiraram-se 62,4 μL para serem colocados em tubos de ensaio estéreis, nos quais também foram colocados 1137,6 μL de meio de cultura líquido BD (200g batata/20g dextrose) com concentração duas vezes

maior que o meio BD comum BD2- (400g de batata/40g de dextrose), obtendo-se, assim, uma solução inicial a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As frações obtidas durante o procedimento de purificação do extrato metanólico em coluna de sílica gel do tipo *flash* (3,6 mg) e as substâncias isoladas (0,7 mg) foram dissolvidas em 36 e 35 μL de DMSO, respectivamente. Às soluções resultantes foram respectivamente adicionados 684 e 665 μL de meio de cultura líquido BD2 (200 g de batata e 20 g de dextrose para cada litro de água), cujos constituintes se encontram em concentrações duas vezes maiores que as observadas para o meio BD comum. Com isso, obtiveram-se soluções iniciais a $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (frações do extrato) e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (substâncias puras).

De todas as soluções preparadas com meio BD (extrato, frações e substâncias puras), foram retiradas alíquotas de 200 μL para serem colocadas nas primeiras cavidades de placa de polipropileno de 96 cavidades, com três replicatas para cada amostra a ser avaliada. Em seguida, 100 μL das soluções contidas nas primeiras cavidades foram transferidos para as cavidades da segunda linha, nas quais se colocaram, logo em seguida, 100 μL de meio de cultura BD2 e se homogeneizaram as misturas resultantes por agitações com a sucção e despejo ininterruptos das mesmas com o uso de uma pipeta automática. Em seguida, 100 μL de cada solução da segunda linha foram transferidos para a cavidade da terceira fila, para que o mesmo procedimento fosse repetido até as cavidades da décima segunda fila. Ao final, adicionaram-se 100 μL de suspensão contendo $2,0 \cdot 10^5$ conídios de *Alternaria alternata* por mililitro de água estéril ao conteúdo de cada cavidade da placa, fazendo com que as concentrações dos componentes do meio de cultura fossem reduzidas para o valor do BD comum nas cavidades da placa.

O mesmo procedimento foi realizado para os controles positivos, que corresponderam aos fungicidas comerciais Recop[®] (840 g de oxicloreto de cobre

por quilograma do produto comercial) e Nativo[®] (100 g de trifloxistrobina e 200 g tebuconazol por litro do produto comercial), nas concentrações de 2.500 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Ressaltando que, como havia em princípio a intenção de realizar testes *in vivo*, fez-se necessário utilizar estes referidos fungicidas e não mais o Dacobre (item 4.4), já que o mesmo não é recomendado para a cultura de citros. Como controle negativo se empregou apenas DMSO (35 μL), que foi adicionado a 665 μL de meio de cultura líquido BD2. O uso do DMSO, neste item, foi justificado pelos testes de solubilidade, pois as amostras se apresentaram completamente solúveis neste solvente e baixa solubilidade em Tween 80 (item 4.4).

A seguir, as placas foram incubadas em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas por dia. Após 72 horas (três dias) e 84 horas (três dias e meio) de incubação, procedeu-se a avaliação do crescimento micelial pela observação visual do crescimento fúngico.

4.6 Fracionamento de *A. colubrina*

O extrato metanólico liofilizado (40 g) dos frutos de *A. colubrina*, obtido conforme descrito no item 4.2, foi submetido a lavagens sucessivas com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e MeOH (4 x 300 mL para cada solvente), sob agitação magnética, em um período de 15 minutos. Após este tempo, a mistura foi filtrada em algodão sob vácuo e os filtrados para cada solvente foram combinados, concentrados em evaporador rotatório e liofilizados para a remoção completa de umidade. Alíquotas (60 mg) de cada uma das três frações obtidas foram solubilizadas em 312 μL de DMSO, para serem submetidas ao teste com *A. alternata* conforme descrito no item 4.5.4.6.1 **Fracionamento da fração solúvel em hexano (Vi-02-01-01)**

Como a fração solúvel em hexano foi a única que se mostrou ativa contra o fungo *A. alternata*, foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. Para tanto, submeteu-se uma parte (587 mg) dessa fração a fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (4 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando-se um gradiente de Hex/AcOEt (97:03, 600 mL; 95:05, 360 mL; 90:10, 360 mL; 0:100, 360 mL). As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), com placas de alumínio recobertas com sílica gel 60 impregnada com material fluorescente. Para revelar as substâncias, foi empregada luz ultravioleta (254 nm), vapor de iodo e solução ácido fosfomolibdico a 5% (g.mL⁻¹) em etanol. As frações apresentando o mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, originando 13 novas frações (Vi-02-24-01 a Vi-02-24-13; Tabela 2). Dentre elas, as frações 09 (Vi-02-24-09), 10 (Vi-02-24-10) e 11 (Vi-02-24-11) foram submetidas a novo fracionamento por ainda se apresentarem impuras e com massa suficiente para dar continuidade ao trabalho.

4.6.2 Fracionamento das amostras Vi-02-24-09 e Vi-02-24-10

As amostras Vi-02-24-09 e Vi-02-24-10 foram combinadas, pois, de acordo com análises prévias de CCD, apresentavam-se cromatograficamente semelhantes. A massa total obtida (57,3 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (2 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando-se diferentes combinações de Hex/AcOEt (88:12, 200 mL; 0:100, 140 mL). As frações coletadas foram também analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade cromatográfica, originando nove novas frações (Vi-02-53-01 a Vi-02-53-09; Tabela 3).

4.6.3 Fracionamento da amostra Vi-02-24-11

A amostra Vi-02-24-11 (160 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (3 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando um gradiente de Hex/AcOEt (90:10, 400 mL; 85:15, 400 mL; 80:20, 400 mL; 0:100, 400 mL). As frações coletadas foram analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade, originando 12 novas frações (Vi-02-39-01 a Vi-02-40-05; Tabela 4), tendo a fração 4 (Vi-02-39-04) sido a escolhida para novo fracionamento, por apresentar maior massa e menor complexidade que as demais. Aproximadamente 80 mg desta amostra foram submetidos a cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (2 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando diferentes combinações de Hex/AcOEt (84:16, 200 mL; 0:100, 140 mL) contendo 1% (v. v⁻¹) de trietilamina, utilizada para interagir com a amostra, já que, em análise prévia por CCD, foi possível observar um rastro que indicava forte interação entre a substância a ser purificada e a fase estacionária. As frações coletadas também foram analisadas por CCD e combinadas de acordo com o perfil cromatográfico, o que resultou em nove novas frações (Vi-02-69-01 a Vi-02-69-09; Tabela 5).

4.7 Identificação das substâncias purificadas

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e carbono (¹³C) foram realizadas em um equipamento Varian AS 500 (500 MHz), no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Além dos espectros unidimensionais, também foram obtidos mapas de contorno de COSY, HMBC, HSQC, TOCSY e ROESY (Anexo 1). Para tanto, todas as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência.

4.8 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o término do experimento para a determinação da CIM (item 4.5), retiraram-se 30 μL de suspensão da cavidade da placa, para serem adicionados a lamínulas circulares (7 mm) previamente impregnadas com poli-L-lisina, composto adicionado com a finalidade de garantir a aderência das estruturas fúngicas. Em seguida, as lamínulas circulares foram imersas em solução fixativa de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% (v.v⁻¹) e formaldeído 2,5 % (g.v⁻¹) em tampão cacodilato de sódio a 0,05 mol L⁻¹ com pH 7,2, contendo CaCl₂ a 0,001 mol L⁻¹), por um período de 24 horas. Após esta fixação, o material foi três vezes imerso, durante 10 minutos, no referido tampão. Posteriormente, foi mantido em solução contrastante de tetróxido de ósmio a 1% (g.v⁻¹), por 1 hora. Na sequência, foi feita a desidratação em gradiente crescente de concentração de acetona em água (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Nesse procedimento o tempo de exposição de cada tratamento às soluções foi de 10 minutos para cada concentração de acetona, em ordem crescente. Finalmente, os tratamentos foram levados para secagem completa no aparelho de ponto crítico CPD 030.

Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, denominados *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película envoltória de papel alumínio. Finalmente, as amostras foram metalizadas em aparelho evaporador de ouro Balzers SCD 050, para posterior observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP. Diversas imagens foram geradas e registradas digitalmente por meio do programa computacional LEO EVO 40, nas condições de trabalho de 20 kV e distância de trabalho de 22 mm. As imagens geradas foram editadas em meio digital, no software Photopaint do pacote Corel Draw 12[®], para posterior inclusão nos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com vistas a verificar se a atividade antifúngica era similar à observada em trabalho anterior (CARVALHO et al., 2007), o extrato metanólico de *A. colubrina* foi diluído em Tween 80 a $0,01 \text{ g mL}^{-1}$, para ser submetido ao teste *in vitro* com *A. alternata*. O resultado obtido foi bastante semelhante ao relatado pelo referido autor, sugerindo que o extrato preparado no presente trabalho e aquele obtido por Carvalho et al. (2007) tinham as mesmas propriedades antifúngicas.

Para quantificar a mencionada atividade antifúngica, o extrato metanólico proveniente dos frutos de *A. colubrina* também foi dissolvido em DMSO para a obtenção da CIM contra *A. alternata*. Com isso, observou-se que tal extrato apresentava atividade antifúngica *in vitro* similar à observada para o fungicida comercial Recop (Tabela 1). De forma semelhante ao constatado no presente estudo, outras plantas pertencentes à família Fabaceae também apresentam atividade antifúngica (ARABI; SARDARI, 2010; AROKIYARAJ; PERINBAM, 2010) que, em vários casos, é atribuída a compostos como terpenos (BHAKSHU; RAJU, 2009), flavonoides (CECHINEL FILHO, 2009), alcaloides (SAMOYLENKO et al., 2009) ou, ainda, ácidos graxos (WAGH et al., 2007).

Diante da atividade do extrato metanólico de *A. colubrina*, o mesmo foi submetido a processo de lavagem com solventes de diferentes polaridades. Em decorrência, obtiveram-se três frações: solúvel em hexano (V1-02-01-01: 0,6724 g), solúvel em acetato de etila (V1-02-01-02: 3,2537g) e solúvel em metanol (V1-02-01-03: 33,9147g). Das frações originadas desse processo, somente a fração hexânica se apresentou ativa contra *A. alternata* (Tabela 1). Este resultado corrobora os trabalhos realizados por outros autores, nos quais se constatou a atividade antifúngica de frações apolares de Fabaceas. Para

exemplificar, é possível mencionar que, a partir do extrato hexânico da madeira de *Swartzia apetala* Raddi var. *Glabra*, foram isolados um estilbeno, uma flavanona e um pterocarpano, que apresentaram atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida* (ARAUJO et al., 2009).

Tabela 1 Concentração inibitória mínima (CIM) contra o fungo *Alternaria alternata* do extrato metanólico dos frutos de *Anadenanthera colubrina* e das suas frações

Tratamento	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Extrato metanólico de <i>A. Colubrina</i>	2500
Fração solúvel em hexano (V1-02-01-01)	2500
Fração solúvel acetato de etila (V1-02-01-02)	---
Fração solúvel em metanol (V1-02-01-03)	---
DMSO (testemunha negativa)	---
Recop (fungicida comercial)	2500
Nativo (fungicida comercial)	300

---a sem inibição

Como o objetivo, neste trabalho, era, especificamente, purificar e identificar as substâncias com propriedades antifúngicas, apenas a fração Vi-02-01-01 (fração solúvel em hexano) foi submetida aos fracionamentos seguintes. Na primeira etapa realizada obtiveram-se 13 frações (Tabela 2), dentre as quais duas se mostravam cromatograficamente puras: Vi-02-24-02 (35,9 mg) e Vi-02-24-06 (72,9 mg). Quanto às outras frações (Vi-02-24-01, Vi-02-24-03, Vi-02-24-04, Vi-02-24-05, Vi-02-24-07, Vi-02-24-08, Vi-02-24-12 e Vi-02-24-13), elas se mostravam muito complexas, segundo as análises cromatográficas e, como apresentavam pouca massa, foram armazenadas para possíveis trabalhos

futuros. Como as frações Vi-02-24-09, Vi-02-24-10 e Vi-02-24-11 apresentavam boa relação massa/complexidade, foram submetidas a novos fracionamentos.

Tabela 2 Frações obtidas durante o fracionamento da fração solúvel em hexano (Vi-02-01-01) do extrato de *Anadenanthera colubrina*

Código	Massa (mg)
VI-02-24-01	3,0
VI-02-24-02	35,9
VI-02-24-03	21,0
VI-02-24-04	5,1
VI-02-24-05	43,3
VI-02-24-06	72,9
VI-02-24-07	6,2
VI-02-24-08	5,0
VI-02-24-09	29,6
VI-02-24-10	27,7
VI-02-24-11	166,2
VI-02-24-12	8,8
VI-02-24-13	0,1

Uma análise minuciosa por CCD das frações Vi-02-24-09 e Vi-02-24-10 permitiu observar que elas eram mais similares do que havia sido percebido da primeira vez em que foram analisadas. Em decorrência, foram combinadas para serem submetidas ao novo fracionamento. Dentre as frações obtidas (Tabela 3), apenas a denominada Vi-02-53-02 se mostrou cromatograficamente pura. Quanto às outras frações, as massas não eram suficientes para dar continuidade aos seus fracionamentos.

Tabela 3 Frações obtidas durante o fracionamento das frações Vi-02-24-09 e Vi-02-24-10

Código	Massa (mg)
VI-02-53-01	1,7
VI-02-53-02	1,1
VI-02-53-03	2,8
VI-02-53-04	4,2
VI-02-53-05	27,5
VI-02-53-06	5,0
VI-02-53-07	1,6
VI-02-53-08	3,0
VI-02-53-09	0,1

Tabela 4 Frações obtidas durante o fracionamento da fração Vi-02-24-11

Código	Massa (mg)
VI-02-39-01	3,1
VI-02-39-02	22,2
VI-02-39-03	5,5
VI-02-39-04	81,5
VI-02-39-05	1,2
VI-02-39-06	16,3
VI-02-39-07	0,7
VI-02-40-01	13
VI-02-40-02	0,3
VI-02-40-03	1,9
VI-02-40-04	6,9
VI-02-40-05	0,1

Quanto ao fracionamento da amostra Vi-02-24-11, ele resultou em 12 frações (Tabela 4), sendo apenas uma fração cromatograficamente pura (Vi-02-40-01).

Como a fração Vi-02-39-04 apresentava relação massa/complexidade favorável, foi submetida a novo fracionamento, originando nove frações (Tabela 5), dentre as quais as denominadas Vi-02-69-05 e Vi-02-69-06 se mostravam cromatograficamente puras. As outras frações apresentavam pouca massa e se mostravam muito complexas. Em decorrência, foram armazenadas para possíveis trabalhos futuros.

Tabela 5 Frações obtidas a partir do fracionamento da fração Vi-02-39-04

Código	Massa (mg)
VI-02-69-01	1,6
VI-02-69-02	0,5
VI-02-69-03	0,6
VI-02-69-04	1,0
VI-02-69-05	2,7
VI-02-69-06	68,1
VI-02-69-07	4,7
VI-02-69-08	12,8
VI-02-69-09	31,0

Para confirmar se as substâncias isoladas estariam contribuindo para a atividade final da fração hexânica do extrato dos frutos de *A. colubrina*, foi realizado um teste *in vitro* com o fungo, o que permitiu observar que as atividades fungicidas para três das substâncias eram bem mais intensas que aquela correspondente ao fungicida comercial Recop[®] na concentração de 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 6), que corresponde à recomendada pelo fabricante. Para este

teste, utilizou-se apenas o produto comercial Recop[®], já que as amostras apresentaram resultado de CIM mais próximo deste fungicida, sugerindo que, talvez, o modo de ação das mesmas seja parecido com o modo de ação do Recop[®] e não com o do Nativo, fungicida utilizado anteriormente. Logo, parece razoável considerar que tais substâncias tenham grande potencial para uso no desenvolvimento de novos produtos para o controle de *A. alternaria*.

Tabela 6 Concentração inibitória mínima (CIM) contra o fungo *Alternaria alternata* de cada substância purificada a partir do extrato de *Anadenanthera colubrina*

Amostras	Ci ¹	Cf ²	CIM ³
	(µg.mL ⁻¹)		
Vi-02-24-02	500	0,24	500
Vi-02-24-06	500	0,24	--
Vi-02-40-01	500	0,24	--
Vi-02-53-02	500	0,24	500
Vi-02-69-05	500	0,24	--
Vi-02-69-06	500	0,24	250
Fungicida	2500	1,22	1250
Testemunha 1	--	--	--
Testemunha 2	--	--	--

⁽¹⁾Ci: concentração inicial em µg mL⁻¹ das substâncias testadas; ⁽²⁾Cf: concentração final em µg mL⁻¹ obtida na última cavidade da placa com cavidades de 350 mL; ⁽³⁾CIM: concentração inibitória mínima de cada substância; Testemunha 1: testemunha contendo apenas meio líquido BD; Testemunha 2: testemunha contendo meio líquido BD e DMSO na concentração inicial de 2,5% (v v⁻¹); Fungicida : Recop[®] (oxiclureto de cobre 840 g kg⁻¹)

Nas observações realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), pode-se constatar que nos tratamentos da testemunha composta apenas por meio de cultura BD acrescido de DMSO (Figura 7F), as estruturas de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* se apresentaram morfológicamente intactas, com elevado desenvolvimento do tubo germinativo e ramificação abundante das hifas. Este perfil se mostrou em claro contraste com os demais tratamentos compostos pelas substâncias Vi-02-69-06 (Figura 7A e 7B), Vi-02-24-02 (Figura 7C), Vi-02-53-02 (Figura 7D), Vi-02-24-08 (Figura 7E) e o fungicida Recop® (Figura 7H).

No tratamento composto pela substância Vi-02-69-06 (Figura 7A e 7B), observou-se uma evidente inibição da elongação do tubo germinativo e da hifa de *A. alternata*. Foi observada, ainda, a presença constante de hifas extravasadas e deterioradas. Esta deterioração foi observada também nos tratamentos compostos pela substância Vi-02-24-02 (Figura 7C). De forma semelhante, para o tratamento composto pela substância Vi-02-53-02, também foi observada inibição na elongação do tubo germinativo e da hifa de *A. alternata* (Figura 7D). Nos tratamentos compostos pelos fungicidas Nativo® (Figura 7G) e Recop® (Figura 7H), também foi possível observar a inibição da elongação da hifa. Especificamente no caso do Recop®, foi constatada a presença constante de grânulos de oxiclreto de cobre (seta com estrela).

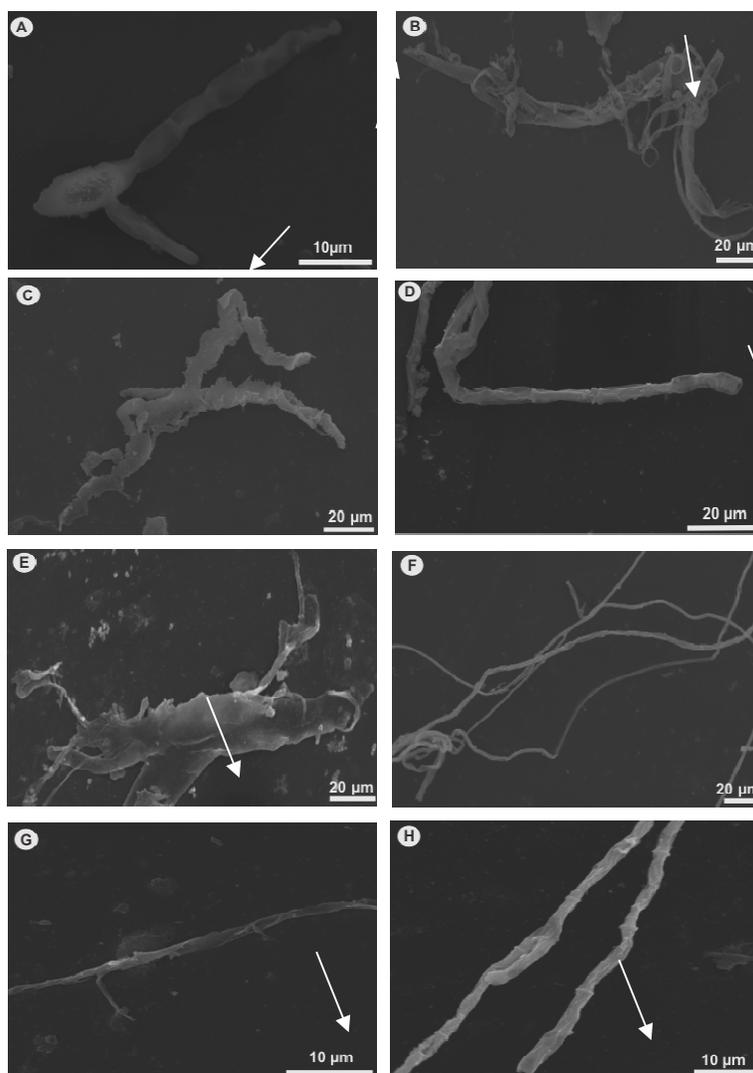


Figura 7 Eletromicrografias de varredura de estruturas de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* submetidas aos tratamentos compostos pela: substância Vi-02-69-06 (A e B), substância Vi-02-24-02 (C), substância Vi-02-53-02 (D), fração Vi-02-24-08 (E), testemunha contendo meio líquido BD adicionado de DMSO na concentração inicial de 2,5% (v/v) (F), fungicida Nativo[®] (trifloxistrobina 100 g L⁻¹ e tebuconazol 200 g L⁻¹ de produto comercial) (G) e fungicida Recop[®] (oxiclureto de cobre 840 g kg⁻¹ de produto comercial) (H). Setas: inibição de crescimento do tubo germinativo e hifas. Seta com estrela: grânulos de oxiclureto de cobre

Alterações morfológicas em fungos submetidos a tratamentos com produtos de origem vegetal já foram objeto de estudo de outros autores, embora ainda não se tenha verificado boa correlação entre tais alterações e as estruturas químicas que as causam. Acredita-se que a redução do crescimento micelial seja decorrente da ação de ácidos graxos e terpenos sobre o fungo. Especificamente nos casos de danos na membrana celular, supõe-se que sejam causados por compostos lipofílicos (COWAN, 1999). De qualquer forma, mesmo que ainda não se tenha uma boa correlação entre as alterações morfológicas em *A. alternaria* observadas no presente trabalho e as estruturas químicas que as causam, mais uma vez ficou claro o grande potencial das substâncias isoladas de *A. colubrina*.

Conforme mencionado na parte experimental, as substâncias isoladas foram submetidas a várias análises por ressonância magnética nuclear (Anexo 1). No caso da substância Vi-24-69-06, observaram-se 29 sinais de carbono no espectro de RMN ^{13}C , sendo dois deles acima de 100 ppm (140,75 e 121,70 ppm), o que sugeria a presença de uma dupla ligação C=C. Havia, nitidamente, um sinal em 71,8 ppm, o que era indicativo de átomo de carbono sp^3 ligado a oxigênio de álcool. Os sinais no espectro de RMN ^1H em 5,35 e 3,52 ppm, corroboravam tais indícios. Além disso, deixaram evidente que um dos átomos de Csp^2 estava ligado a um átomo de hidrogênio, enquanto o outro não tinha qualquer átomo de hidrogênio a ele ligado. Quanto aos outros átomos de carbono da molécula, pareciam ser todos saturados e não ligados a heteroátomos. A interpretação do espectro de RMN ^1H se mostrou bastante difícil, já que muitos sinais estavam sobrepostos. Em decorrência, o mapa de contorno de HSQC, correlação bidimensional ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) a uma ligação, foi de grande importância para este trabalho, pois, além de permitir verificar a qual hidrogênio cada átomo de carbono estava conectado, como foi obtido com sensibilidade de fase, também foi possível determinar a multiplicidade de cada

carbono e de vários átomos de hidrogênio. Somando-se tais informações às obtidas a partir dos mapas de contorno do ROESY (correlação espacial homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)), COSY (correlação bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)) e HMBC (correlação bidimensional ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) a duas ou três ligações), foi possível observar que a substância Vi-24-69-06 se tratava de uma estrutura esteroidal. Em decorrência, compararam-se os dados obtidos com aqueles presentes na literatura (MAKIN; GOWER, 2010; RAO et al., 2011), o que permitiu observar que a substância se tratava do β -sitosterol (Figura 8, Tabela 7)

O β -sitosterol é um dos fitosteróis mais importantes para os vegetais, os quais desempenham funções análogas às do colesterol nos tecidos animais. Acredita-se que possam competir com o colesterol no momento da absorção intestinal, reduzindo, portanto, a concentração plasmática deste. Nos alimentos, é extraído, principalmente, dos óleos vegetais (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002). O β -sitosterol apresenta comprovadas atividades biológicas, dentre elas, antibacteriana (BELTRAME et al., 2002), antifúngica (KIPRONO et al., 2000) e anticâncer, mais especificamente contra câncer de mama (AWAD et al., 2008), de próstata (AWAD; BURR; FINK, 2005) e de colo (AWAD et al., 1998).

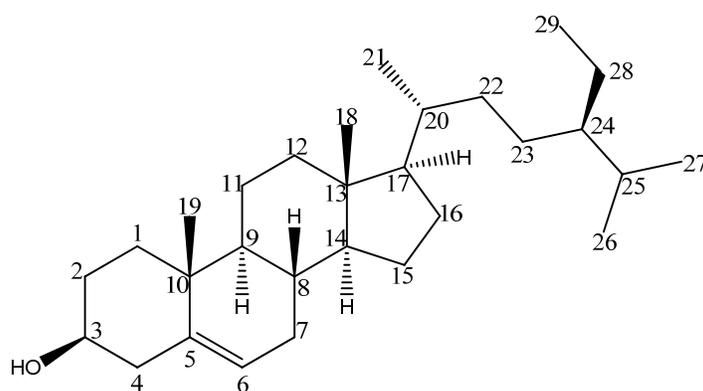


Figura 8 Estrutura do β -sitosterol (Vi-02-69-06)

Tabela 7 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (126 MHz) obtidos para Vi-02-69-06 e dados encontrados na literatura para o β -sitosterol

Posição	β -sitosterol		Vi-02-69-06	
	δ_{C}^*	$\delta_{\text{H}}^{**}; ***$	δ_{C}	δ_{H}
1	37,24	1,07 e 1,84	37,28	1,07 (1H; dt, J=3,5/14,0) e 1,84 (1H; dt, J=3,0/13,5)
2	31,56	1,5 e 1,83	31,68	1,83 (1H; m) e 1,50 (1H; m)
3	71,79	3,58 (1H; tt, J=4,7/10,8)	71,83	3,52 (1H; tt, J=4,7/11,2)
4	42,29	2,24 e 2,29	42,35	2,30 (1H; dd, J=2,1/5,0) e 2,28 (1H; dd, J=1,9/5,0)
5	140,75	---	140,78	---
6	121,70	5,35 (1H; s)	121,72	5,35 (1H; t, J=2,1)
7	31,85	1,53 e 1,97	31,93	1,95 (1H; dt, J=2,7/5,1) e 1,99 (1H; dt, J=2,7/5,1)
8	31,85	1,46	31,93	1,45 (1H; dd, J=5,0/11,0)
9	50,12	0,93 (1H, J=5,08)	50,16	0,93 (1H; dt, J=5,3/11,7)
10	36,49	---	36,53	---
11	21,07	1,48	21,09	1,47 (2H; m)
12	39,76	1,15 e 2,01	39,80	1,15 (1H; dt, J=4,8/13,0) e 2,01(1H; d, J=13,5)
13	42,30	---	---	---
14	56,75	0,99 (1H, s)	56,79	0,99 (1H; dt, J=7,7/11,6)
15	24,28	1,06 e 1,58	24,33	1,56 (1H; m) e 1,58 (1H; m)

Tabela 7, conclusão

16	28,23	1,25 e 1,82	29,18	1,30 (2H; m) ou 1,66 (2H; dq, J=2,0/6,5)
17	56,04	1,09	56,08	1,10 (1H; J=q ou sext, J=5,8)
18	11,87	0,68 (3H; s)	11,88	0,68 (3H; s)
19	19,38	1,01 (3H; s)	19,42	1,00 (3H; s)
20	36,13	1,37	36,17	1,36 (1H; q, J=7,7)
21	19,02	0,91 (3H; J=5,08)	18,80	0,92 (3H; d, J=6,5)
22	33,92	1,00 (s) e 1,33	33,97	1,01 (1H; m) e 1,32 (1H; m)
23	29,11	1,17-2,39	28,27	1,84 (2H; ddt, J=6,2/9,5/13,7)
24	45,82	1,17-2,39	45,86	0,92 (1H; q ou sext, J=5,8)
25	26,05	1,17-2,39	26,10	1,15 (2H; m)
26	18,76	0,82 (3H; d, J=7,6)	19,06	0,81 (3H; d, J=7,0)
27	19,81	0,84 (3H; d, 7,8)	19,84	0,83 (3H; d, J=6,5)
28	23,05	1,17-2,39	23,09	1,25 (1H; q, J=7,9) e
29	11,97	0,83 (d, J=3,6)	12,00	0,84 (3H; d, J=3,9)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz

*Rao et al. (2011); **Makin e Gower (2010); ***Bagri et al. (2009)

O espectro de RMN ^{13}C (Anexo 1, Figura 1B) da amostra Vi-02-24-02 mostrou sinais importantes como aquele presente em 172,2 ppm, que foi atribuído ao carbono de um grupo éster e em 138,7 e 121,5 ppm, que são sinais característicos de carbonos vinílicos. Pode-se mencionar também o sinal em 72,6 ppm, indicando a presença de um carbono carbinólico. Havia um sinal em 13,1 ppm, que devia corresponder a uma metila primária e ainda se observavam

indicativos de carbonos sp^2 , pertencentes a um sistema de duplas não conjugadas, já que eram claros os sinais em 126,9, 127,0, 129,0 e 129,2 ppm. O espectro de RMN 1H corroborava os dados de ^{13}C , pois apresentava sinais característicos de esteroides, tais como os de hidrogênios olefínicos em 5,35 ppm e o acúmulo de sinais na região de 0,6 a 2,4 ppm, referente aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. O espectro de 1H permitiu, ainda, identificar sinais de grupos metila na região entre 0,67 e 1,02 ppm; sinais em 5,37 ppm, atribuídos a hidrogênios ligados a carbono sp^2 ; um multiplete em 4,6 ppm, típico de hidrogênio ligado a carbono que, por sua vez, estaria conectado a um grupo éster por meio do átomo de oxigênio e outro multiplete na região de 1,25 ppm, correspondente aos hidrogênios de vários grupos CH_2 . Sinais em 0,68 e 1,01 ppm foram atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos quaternários. Vários sinais também são observados em uma faixa de 0,8 a 0,9 ppm, devido a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos terciário e secundário. A presença de sinais em 2,27 ppm foi atribuída aos prótons do grupo metileno adjacente a um grupo éster, enquanto os prótons dos grupos metínicos, provavelmente, estavam localizados entre 1,1 a 1,8 ppm. Vale ressaltar que alguns sinais presentes nos espectros de ^{13}C (30,91, 21,68 e 10,83 ppm) não correspondem à substância e, sim, ao contaminante hexano, que foi empregado durante o processo de purificação das substâncias presentes no extrato de *A. colubrina*.

Os dados obtidos sugeriam que a estrutura se tratava de um éster de ácido graxo do β -sitosterol, provavelmente o linoleato de β -sitosterila (Figura 9). Embora um árduo levantamento bibliográfico tenha sido feito, não foi possível encontrar dados de RMN para esta substância. Em decorrência, utilizaram-se o β -sitosterol (Figura 8) (RAO et al., 2011), o linoleato de colesterila (Figura 10 (1)) (SEARS et al., 1976) e o linoleato de etila (Figura 10 (2)) (OYMAN; MING; LINDE, 2006) como modelos para comparação dos dados (Tabela 8), o

que permitiu confirmar que a substância Vi-02-24-02, de fato, se tratava do linoleato de β -sitosterila. Esta substância já foi isolada de espécies vegetais (CHAVES et al., 2010) e apresenta atividade antibacteriana e antioxidante (MOKBEL et al., 2006).

Vale mencionar, ainda, que a substância Vi-02-24-02 não apresenta sinais em aproximadamente 42,4 e 36,6 ppm (Tabela 8). Átomos de hidrogênio de esteroides relaxam por meio de mecanismo de dipolo-dipolo. Logo, devido ao rígido esqueleto dos esteroides, os hidrogênios dos grupos CH relaxam mais lentamente do que os hidrogênio dos grupos CH₂. Conseqüentemente, os tempos de relaxação dos átomos de carbono dependem do número de hidrogênios diretamente a eles ligados e também do tempo de correlação entre os átomos. Os carbonos quaternários, por sua vez, têm os tempos de relaxação muito mais longos que os dos átomos de carbono dos grupos anteriormente citados (MAKIN; GOWER, 2010), dificultando a sua visualização quando não são empregados longos tempos entre os pulsos ou de aquisição de dados no aparelho de RMN.

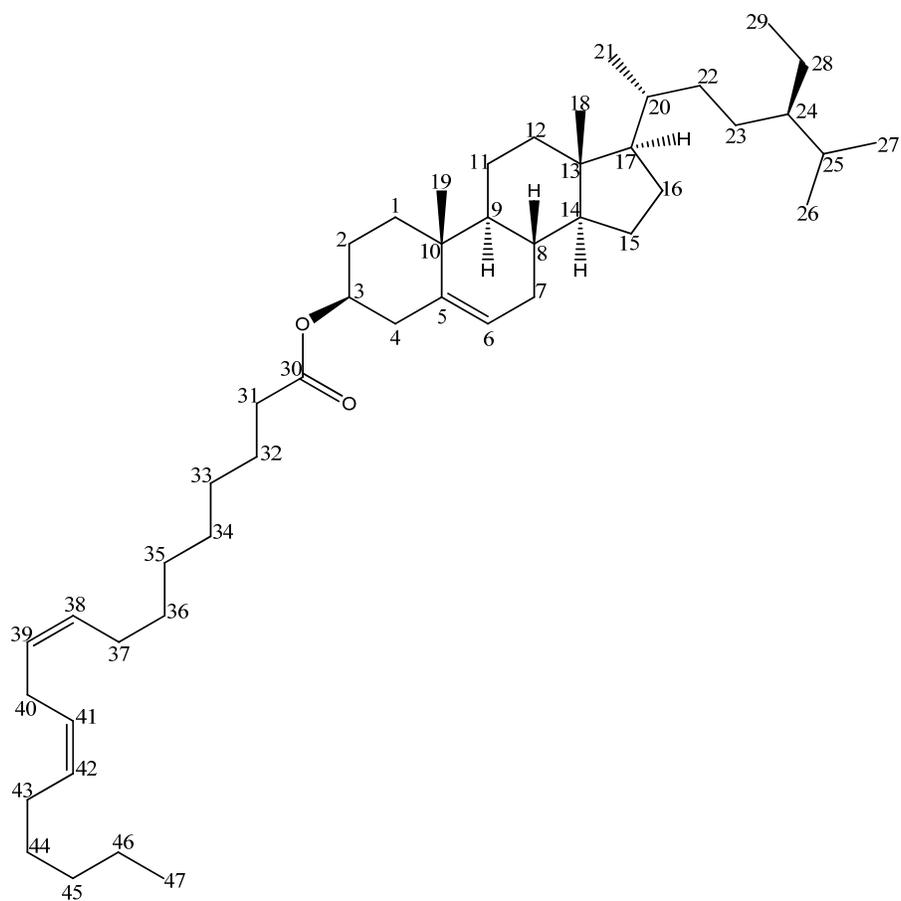


Figura 9 Estrutura do linoleato de β -sitosterila (Vi-02-24-02)

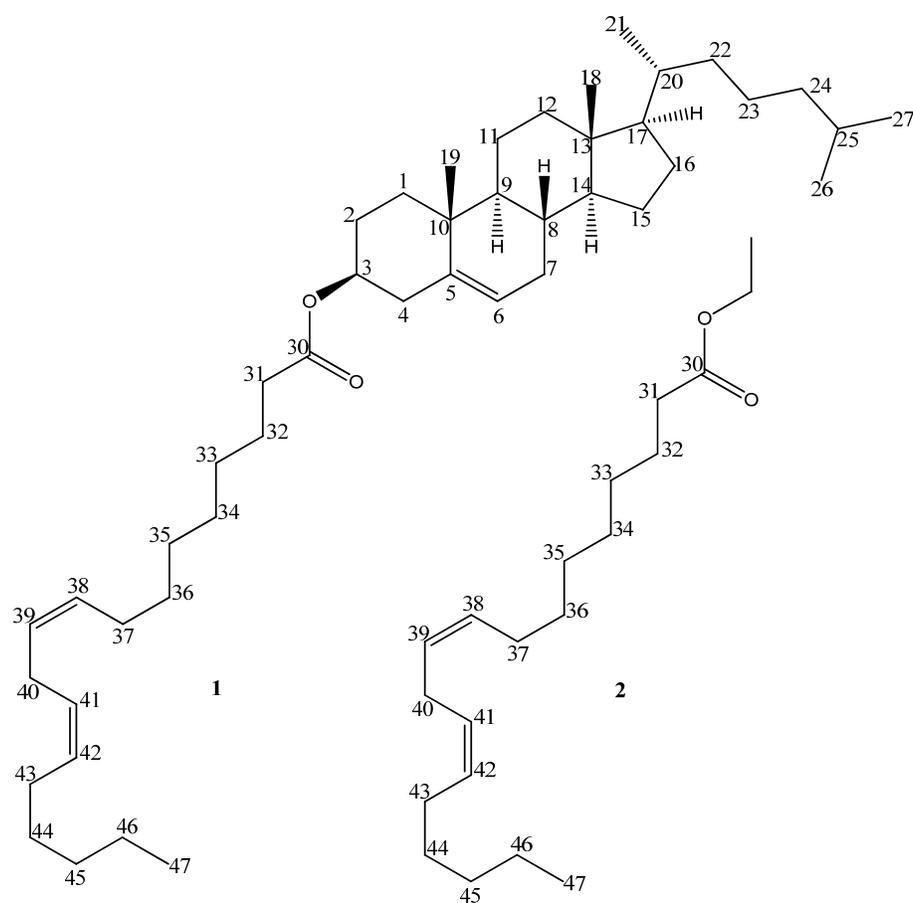


Figura 10 Estrutura do linoleato de colesterila (1) e do linoleato de etila (2)

Tabela 8 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (126 MHz) obtidos para Vi-02-24-02 e dados encontrados na literatura para o linoleato de colesterila, linoleato de etila e β -sitosterol

Posição	Vi-02-24-02		Linoleato de colesterila*	Linoleato de etila**	β -sitosterol***	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}^{****}
1	37,15	2,30 (2H; d, J=7,5)	37,1	---	37,20	1,07 e 1,84
2	28,07	1,30 (2H; d, J=3,5)	---	---	31,57	1,50 e 1,83
3	72,67	4,60 (1H; m)	73,7	---	71,78	4,60 (1H; m)
4	38,71	2,12 (2H; m)	38,2	---	42,20	2,24 e 2,29
5	138,72	---	139,8	---	140,69	---
6	121,57	5,35 (1H; d, J=4)	122,6	---	121,70	5,35 (1H; s)
7	30,89	1,56 (2H; s)	---	---	31,87	1,53 e 1,97
8	32,93	---	---	---	31,85	1,46
9	49,02	0,94 a 0,96 (1H; m)	50,2	---	50,06	0,93 (1H, J=5,08)
10	---	---	36,6	---	36,46	---
11	21,56	1,30 (2H; d, J=3,58)	21,1	---	21,04	1,48
12	41,30	---	39,8	---	39,73	1,15 e 2,01
13	---	---	42,4	---	42,27	---
14	55,68	0,99-1,03 (1H; m)	56,8	---	56,71	0,99 (1H, s)
15	25,08	---	24,3	---	24,26	1,06 e 1,58
16	28,15	1,35 (2H; d, J=3,58)	28,3	---	28,21	1,25 e 1,82
17	55,03	1,09-1,13 (1H; m)	56,3	---	56,09	1,09
18	10,84	0,67 3H; s)	11,9	---	11,83	0,68 (3H; s)
19	18,80	0,90 (3H; m)	19,3	---	19,37	1,01 (3H; s)

Tabela 8, continuação

20	35,99	1,19-1,38 (2H; m)	36,3	---	34,0	1,37
21	18,31	0,95 (3H; s)	18,8	---	18,8	0,91 (3H; J=5,08)
22	35,14	1,19-1,38 (1H; m)	35,8	---	35,76	1,00 (s) e 1,33
23	26,18	1,92-2,12 (2H; m)	23,9	---	26,4	1,17-2,39
24	---	---	39,6	---	---	1,17-2,39
24	44,83	0,87 (1H; m)	---	---	45,90	1,17-2,39
25	28,09	1,30 (2H; d, J=3,58)	28,0	---	29,0	1,17-2,39
26	18,02	0,79-0,90 (3H; m)	22,7	---	19,6	0,84 (3H; d, 7,8)
27	17,76	0,91-0,93 (3H; d, J=6,5)	22,6	---	19,0	1,17-2,39
28	24,62	---	---	---	23,1	0,83 (d, J=3,6)
29	10,96	0,90 (3H; m)	---	---	12,0	1,07 e 1,84
30	172,27	---	173,4	173,7	---	---
31	33,70	2,26 (2H; t, J=7,5)	34,7	34,5	---	2,31(t, J=7,5)
32	24,03	1,55 (2H;m)	25,1	25,0	---	1,61(m)
33	28,34	---	29,1	28,5 a 30,0	---	1,25-1,39 (m)
34	28,35	---	29,1	28,5 a 30,0	---	1,25-1,39 (m)
35	28,58	---	29,1	28,5 a 30,0	---	1,25-1,39 (m)
36	28,69	1,25 (2H; s)	29,1	28,5 a 30,0	---	1,25-1,39 (m)
37	26,81	---	27,2	27,5	---	2,04 (quarteto, J=não especificado)
38	129,04	5,34 (1H; d, J=5,6)	128,0	127,7 a 131,5	---	5,29-5,41 (m)
39	127,02	5,34 (1H; m)	130,0	127,7 a 131,5	---	5,29-5,41 (m)

Tabela 8, conclusão

40	26,19	2,78 (2H; t, J=6,6)	25,7	26,0	---	2,76 (dd; J=6,3)
41	126,90	5,34 (1H; m)	130,0	127,7 a 131,5	---	5,29-5,41 (m)
42	129,20	5,35 (1H; d, J=4)	128,0	127,7 a 131,5	---	5,29-5,41 (m)
43	26,96	---	27,2	27,6	---	2,04 (quarteto, J=não especificado)
44	28,65	1,25 (2H; s)	29,1	28,5 a 30,0	---	1,25-1,39 (m)
45	30,86	1,20 (2H; m)	31,9	31,5	---	1,25-1,39 (m)
46	22,05	---	22,7	22,5	---	1,25-1,39 (m)
47	13,06	0,79-0,90 (3H; m)	14,1	14,0	---	0,88 (t, J=7)
Hex	30,91	---	---	---	---	---
Hex	21,68	---	---	---	---	---
Hex	13,10	---	---	---	---	---

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz

*Sears et al. (1976); **Oyman, Ming e Linde (2006); *** Makin e Gower (2010); ****Alemany (2002)

No espectro de ^{13}C da substância Vi-02-24-06 (Anexo 1, Figura 2B), se observava a presença dos sinais dos carbonos saturados na região de 14 a 34 ppm, que pareciam provenientes da cadeia de um ácido graxo. Os sinais em 62,1 e 68,9 ppm, que indicavam a ligação de átomos de carbonos sp^3 a átomos de oxigênio, foram atribuídos à presença de um resíduo do glicerol na molécula. Observaram-se também sinais entre 127,9 e 130,2 ppm, que foram atribuídos aos carbonos insaturados da cadeia do ácido graxo e em 172,8 e 173,2 ppm, que sugeriam a presença de duas carbonilas. O espectro de ^1H (Anexo 1, Figura 2A) apresentava sinais referentes aos hidrogênios do grupo metilênico ligado ao oxigênio de função éster em 5,28 a 5,24 ppm. Os deslocamentos de hidrogênio

observados na região entre 4,3 e 4,12 ppm também pareciam característicos dos prótons dos grupos CH₂ ligados ao átomo de oxigênio de grupo éster (C 8). Podia ser observado, ainda, um sinal em 2,76 ppm, que parecia ser um tripleto característico dos prótons do grupo metileno localizado entre duas duplas de um ácido graxo. Sinais de hidrogênios na região de 2,3 ppm evidenciavam a presença de prótons de grupo CH₂ adjacentes à carbonila. Foram observados também sinais em 0,8 a 0,9 ppm, que sugeriam prótons de grupos metilas. As multiplicidades dos átomos de hidrogênio foram comparadas com as da literatura.

Vale ressaltar, ainda, que os sinais em 31,92, 22,69 e 14,12 ppm (Tabela 9), presentes no espectro de ¹³C, não apresentavam correlação com os dados da substância Vi-02-24-02 (Tabela 9), pois correspondiam aos deslocamentos químicos dos átomos do hexano, solvente empregado no processo de purificação da referida substância. Portanto, com base nos dados de RMN (Anexo 1), se atribuiu a estrutura da trilinoleína (Figura 11) à substância Vi-02-24-02, o que foi confirmado após comparação com os dados da literatura para este triglicerídeo (MANNINA et al., 2000).

Trilinoleína é um triacilglicerol de origem natural isolado de *Panax notoginseng*, uma espécie vegetal muito utilizada na medicina tradicional chinesa. Este triglicerídeo é responsável por efeitos benéficos no sistema cardiovascular e no tratamento de distúrbios circulatórios (CHAN; PAI-FENG-KAO; TOMLINSON, 2005). Em estudo realizado por Chou et al. (2011) observou-se que a trilinoleína inibiu o crescimento de carcinomas de pulmão e induziu a apoptose das células cancerígenas.

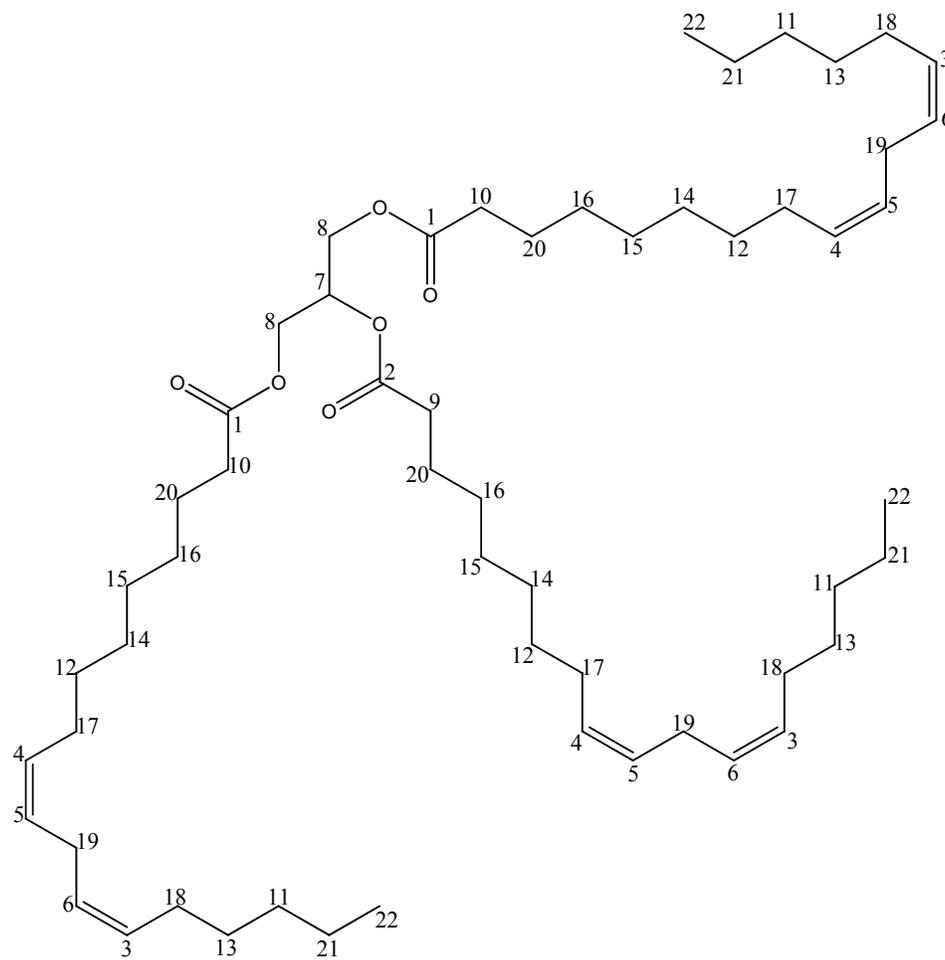


Figura 11 Estrutura da trilinoleína (Vi-02-24-06)

Tabela 9 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) obtidos para Vi-02-24-06 e dados encontrados na literatura para a trilinoleína

Posição	Vi-02-24-06		Trilinoleína	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^*	δ_{H}^{**}
1	173,26	---	173,21	---
	173,26	---	173,21	---
2	172,84	---	172,81	---
3	130,24	5,39-5,31 (12H; m)	130,21	5,29-5,41 (m)
	130,24	5,39-5,31 (12H; m)	130,21	5,29-5,41 (m)
	130,23	5,39-5,31 (12H; m)	130,22	5,29-5,41 (m)
4	130,028	5,39-5,31 (12H; m)	130,00	5,29-5,41 (m)
	130,028	5,39-5,31 (12H; m)	130,00	5,29-5,41 (m)
	130,021	5,39-5,31 (12H; m)	129,78	5,29-5,41 (m)
5	129,99	5,39-5,31 (12H; m)	128,09	5,29-5,41 (m)
	128,10	5,39-5,31 (12H; m)	128,09	5,29-5,41 (m)
	128,08	5,39-5,31 (12H; m)	128,11	5,29-5,41 (m)
6	127,91	5,39-5,31 (12H; m)	127,92	5,29-5,41 (m)
	127,91	5,39-5,31 (12H; m)	127,92	5,29-5,41 (m)
	127,90	5,39-5,31 (12H; m)	127,91	5,29-5,41 (m)
7	68,90	5,26 (1H; tt, J=4,4/5,6)	68,93	5,26 (dd, J=4,32/5,97)
8	62,11	4,28 (1H; dd, J=4,30/11,89) e 4,14 (1H; dd, J=5,9/11,90)	62,12	4,29 (dd, J=4,32/1189) e 4,14 (dd, J=5,97/11,89)
	62,11	4,28 (1H; dd, J=4,30/11,89) e 4,14 (1H; dd, J=5,9/11,90)	62,12	4,29 (dd, J=4,32/1189) e 4,14 (dd, J=5,97/11,89)
	34,20	2,31(2H; dt, J=7,5/15,0)	34,20	2,31(t, J=7,5)
10	34,04	2,31(2H; dt, J=7,5/15,0)	34,03	2,31(t, J=7,5)
	34,04	2,31(2H; dt, J=7,5/15,0)	34,03	2,31(t, J=7,5)
	31,92	---	---	---

Tabela 9, continuação

11	31,54	1,30 (2H; m)	31,55	1,25-1,39 (m)
	31,54	1,30 (2H; m)	31,55	1,25-1,39 (m)
	31,54	1,30 (2H; m)	31,55	1,25-1,39 (m)
12	29,78	1,25 (2H; m)	29,63	1,25-1,39 (m)
	29,72	1,25 (2H; m)	29,63	1,25-1,39 (m)
	29,64	1,25 (2H; m)	29,64	1,25-1,39 (m)
13	29,62	1,25 (2H; m)	29,37	1,25-1,39 (m)
	29,54	1,25 (2H; m)	29,37	1,25-1,39 (m)
	29,36	1,25 (2H; m)	29,37	1,25-1,39 (m)
14	29,34	1,30 (2H; m)	29,13	1,25-1,39 (m)
	29,33	1,30 (2H; m)	29,13	1,25-1,39 (m)
	29,21	1,30 (2H; m)	29,15	1,25-1,39 (m)
15	29,19	1,30 (2H; m)	29,19	1,25-1,39 (m)
	29,14	1,30 (2H; m)	29,19	1,25-1,39 (m)
	29,13	1,30 (2H; m)	29,21	1,25-1,39 (m)
16	29,10	1,30 (2H; m)	29,10	1,25-1,39 (m)
	29,10	1,30 (2H; m)	29,10	1,25-1,39 (m)
	29,06	1,30 (2H; m)	29,06	1,25-1,39 (m)
17	27,21	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,22	2,04 (quarteto, J=não especificado)
	27,21	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,22	2,04 (quarteto, J=não especificado)
	27,21	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,22	2,04 (quarteto, J=não especificado)
18	27,20	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,21	2,04 (quarteto, J=não especificado)
	27,20	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,21	2,04 (quarteto, J=não especificado)
	27,20	2,03 (2H; dt, J=6,5/14)	27,21	2,04 (quarteto, J=não especificado)

Tabela 9, conclusão

19	25,64	2,76 (2H; t, J=6,3/13,2)	25,65	2,76 (dd; J=6,3)
	25,64	2,76 (2H; t, J=6,3/13,2)	25,65	2,76 (dd; J=6,3)
	25,64	2,76 (2H; t, J=6,3/13,2)	25,65	2,76 (dd; J=6,3)
20	24,89	1,60 (2H; m)	24,86	1,61(m)
	24,85	1,60 (2H; m)	24,86	1,61(m)
	24,85	1,60 (2H; m)	24,89	1,61(m)
	22,69	---	---	---
21	22,58	1,30 (2H; m)	22,59	1,25-1,39 (m)
	22,58	1,30 (2H; m)	22,59	1,25-1,39 (m)
	22,58	1,30 (2H; m)	22,59	1,25-1,39 (m)
	14,12	---	---	---
22	14,08	0,86-0,90 (3H; m)	14,07	0,88 (t, J=7)
	14,08	0,86-0,90 (3H; m)	14,07	0,88 (t, J=7)
	14,08	0,86-0,90 (3H; m)	14,07	0,88 (t, J=7)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm e constante de acoplamento (J), em Hz

* Mannina et al. (2000); ** SDBS; Alemany (2002)

6 CONCLUSÃO

Como o extrato metanólico dos frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *A. alternata* f. sp. *citri*, foi submetido a fracionamentos por extração com hexano, acetato de etila e metanol, o que resultou em uma fração ativa (solúvel em hexano), que apresentou uma CIM igual a $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tendo, portanto, sido a escolhida para dar continuidade ao trabalho. Os fracionamentos posteriores por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* permitiram isolar seis substâncias, das quais três apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra *A. alternata*. Por meio dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foi possível elucidar as estruturas de três substâncias, β -sitosterol, linoleato de β -sitosterila e trilinoleína, sendo as duas primeiras ativas contra o fungo *A. alternata* com CIMs iguais a 500 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Confirma-se, assim, que a espécie vegetal *A. colubrina* tem grande potencial para o desenvolvimento de novos métodos de controle do referido fungo, que causa tantos prejuízos à citricultura brasileira.

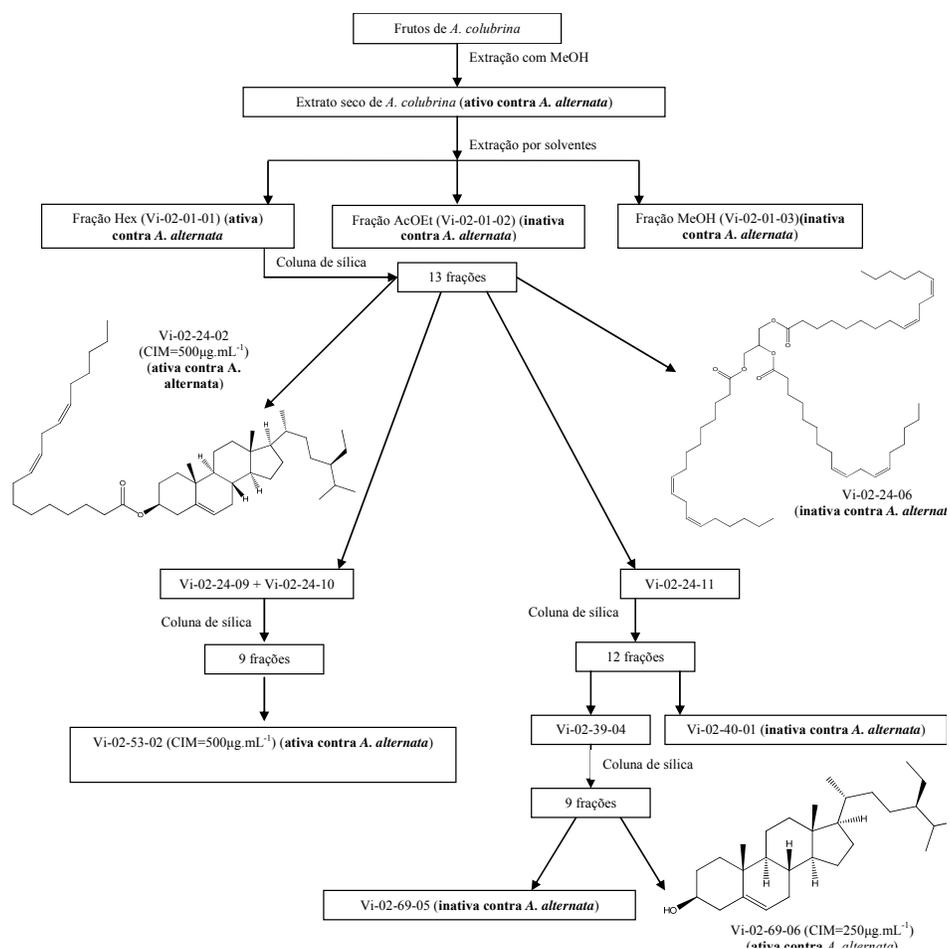


Figura 12 Resumo do trabalho realizado

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, Madrid, v. 7, n. 1, p. 116-145, 2007.

ALEMANY, L. B. Using simple ¹³C NMR linewidth and relaxation measurements to make detailed chemical shift assignments in triacylglycerols and related compounds. **Chemistry and Physics of Lipids**, Davis, v. 120, n. 1/2, p. 33-44, Apr. 2002.

ALTERNATIVA de controle. **Revista do Fundecitrus**, Itápolis, n. 129, p. 12-15, 2005.

ANADENANTHERA colubrina. Disponível em:

<<http://www.google.com.br/search?q=anadenanthera+colubrina&hl=ptBR&pwst=1&prmd=imvns&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=O1rJTpbADYThggeHuOhR&sqi=2&ved=0CDsQsAQ&biw=960&bih=610>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 7. ed. São Paulo: Organização Andrei, 2005. 1141 p.

ARABI, Z.; SARDARI, S. An investigation into the antifungal property of fabaceae using bioinformatics tools *Avicenna*. **Journal of Medical Biotechnology**, Durham, v. 2, n. 2, p. 93-100, Feb. 2010.

ARAUJO, M. F. et al. Chemical constituents from *Swartzia apetala* Raddi var. *glabra* and evaluation of their antifungal activity against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 2A, p. 366-369, 2009.

AROKIYARAJ, S.; PERINBAM, K. Antifungal activity of *Pterocarpus santalinus*: an in vitro study. **Biomedical and Pharmacology Journal**, Bhopal, v. 3, n. 1, p. 263-265, Mar. 2010.

ATHUKORALAGE, P. S. et al. Antifungal constituent from *Gordonia dassanayakei*. **Fitopatologia**, Brasília, v. 72, n. 5, p. 565-567, set./out. 2001.

AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, Davis, v. 72, n. 3, p. 219-226, June 2005.

AWAD, A. B. et al. Beta-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 4, p. 419-426, Apr. 2008.

_____. Beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. **Anticancer Research**, Davis, v. 18, n. 1A, p. 471-473, Jan. 1998.

BAGRI, P. et al. New sterol esters from the flowers of *Punica granatum* Linn. **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 11, n. 8, p. 710-715, Aug. 2009.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina: I., avaliação *in vitro*. **Fitopatologia**, Brasileira, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, maio/jun. 2006.

BARRETTO, S. S. B.; FERREIRA, R. A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosa e Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 223-232, mar./abr. 2011.

BASTIANEL, M. et al. Mancha marrom de alternaria: uma interação fungo, toxina e tangerina. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 2, p. 323-336, 2005.

BELTRAME, F. L. et al. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.

BHAKSHU, L. M.; RAJU, R. R. V. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Rhynchosia heynei*, an endemic medicinal plant from Eastern Ghats of India. **Pharmaceutical Biology**, Basel, v. 47, n. 11, p. 1067-1070, Nov. 2009.

BÓVEDA, R. R. M. **Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas *in vitro* de *Alternaria solani* (Ell.& Mart.) Jones e Grout e *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler de solanáceas**. 1986. 106 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1986.

CARVALHO, D. D. C. **Conidial production and reaction of *Alternaria alternate* f. sp. *citri* to plant extracts**. Lavras: UFLA, 2008. 58 p.

CARVALHO, D. D. C. et al. Bioensaios para a identificação de extratos vegetais com propriedades fungitóxicas. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 16., 2007, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007. 1 CD-ROM.

_____. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tanger fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 28, n. 4, p. 173-178, 2011.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the Genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research Phytother**, Durham, v. 23, n. 10, p. 1347-1354, Oct. 2009.

CHAN, P.; PAI-FENG-KAO, P.; TOMLINSON, B. Cardiovascular effects of trilinolein, a natural triglyceride isolated from the herb sanchi (*Panax Notoginseng*). **Acta Cardiologica Sinica**, Peking, v. 21, n. 1, p. 71-76, Feb. 2005.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2010.

CHOU, P. Y. et al. Trilinolein inhibits proliferation of human non-small cell lung carcinoma a549 through the modulation of PI3K/Akt pathway. **The American Journal of Chinese Medicine**, Washington, v. 39, n. 4, p. 803-815, Apr. 2011.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Apr. 1999.

DANTAS, P. J. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcolóico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Porto Alegre, v. 42, n. 1, p. 33-37, jan./fev. 2010.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 76-86, 2003. Suplemento.

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 9, p. 1126-1130, Sept. 2007.

FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, M. C. Sigatoka-negra da bananeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 135-141, mar./abr. 2005.

GOES, A.; OCA, A. G. M. de; REIS, R. F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* em mandarina “Dancy” em el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 386, 2001. Suplemento.

GRUPO CULTIVAR. **Risco marrom**. Disponível em:
<<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=505>>.
Acesso em: 10 dez. 2011.

GUTIERREZ-LUGO, M. T. et al. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 3, p. 263-265, June 2004.

KIPRONO, P. C. et al. The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 55, n. 5/6, p. 485-488, Dec. 2000.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C. de; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de-alternaria: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 23-27, 2009.

MAKIN, H. L. J.; GOWER, D. B. **Steroid analysis**. Davis: Springer, 2010. 106 p.

MANNINA, L. et al. Concentration dependence of ¹³C NMR spectra of triglycerides: implications for the NMR analysis of olive oils. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Ohio, v. 38, n. 10, p. 886-890, Oct. 2000.

MOKBEL, M. S. et al. Purification of the antioxidant and antimicrobial substance of ethyl acetate extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit peel. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, New York, v. 9, n. 1, p. 146-150, Jan. 2006.

NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p.

OYMAN, Z. O.; MING, W.; LINDE, R. van der. Oxidation of ^{13}C -labeled ethyl linoleate monitored and quantitatively analyzed by ^{13}C NMR. **European Polymer Journal**, New York, v. 42, n. 6, p. 1342-1348, Dec. 2006.

PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*. **Journal Organic Chemistry**, New York, v. 24, n. 9, p. 1285-1287, 1959.

PEEVER, T. L. et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* spp. **Mycologia**, Wentworthville, v. 96, n. 1, p. 119-134, Feb. 2004.

PRAÇA Rafael Sapienza. Disponível em:
<http://www.vilamada.com.br/conteudo/vila_viva/arvores_praca.htm>. Acesso em: 20 dez. 2011.

PRATES, H. S. **Mancha de alternaria das tangerinas**. Disponível em:
<http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/doencas_de_plantas/alternaria/mancha_alternaria.htm>. Acesso em: 10 dez. 2011.

RAO, G. V. et al. Chemical constituents and melanin promotion activity of *Cissus quadrangularis* Linn. **Research Journal of Chemical Sciences**, Indore, v. 1, n. 2, p. 25-29, Apr. 2011.

RIQUE, A. B.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 244-254, nov./dez. 2002.

SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. *Aloe Vera* gel activity against plant pathogenic fungi. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 159-165, Apr. 1995.

SAMOYLENKO, V. et al. Antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic spermine alkaloids from *Albizia schimperiana*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 4, n. 6, p. 791-796, Dec. 2009.

SEARS, B. et al. Temperature-dependent ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of human serum low density lipoproteins. **Biochemistry**, New York, v. 15, n. 19, p. 4151-4157, 1976.

SILVA, J. A. da et al. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 611-616, mar./abr. 2009.

SIQUEIRA, C. F. Q. et al. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Bethesda, v. 2012, p. 1-8, 2011.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Apresentação**.

Disponível em:

<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 nov. 2011.

SOUSA, C. S. et al. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, dez. 2006.

SPÓSITO, M. B. Diagnose e controle da pinta-preta e mancha-marrom dos citros. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 259-269.

_____. **Dinâmica temporal e espacial da mancha-preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 2003. 112 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

_____. Mancha-marrom-de-alternária. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R. B. (Ed.). **Doenças quarentenárias dos citros**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 109-116.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal Organic Chemistry**, New York, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: _____. **Citrus health management**. Saint Paul: APS, 1999. p. 107-115.

TIMMER, L. W. et al. Alternaria brown spot of mandarin. In: TIMMERS, L. W.; GANSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Minnesota: APS, 2000. p. 19-20.

_____. Alternaria diseases of citrus: novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, Florence, v. 42, n. 2, p. 99-112, 2003.

VIANA, M. M. **Citricultura brasileira tangerina 'Ponkan'**. São Paulo: Hortifruti Brasil, 2010. 53 p.

VICENT, A. et al. First report of alternaria brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, Quebec, v. 84, n. 9, p. 1044-1049, Sept. 2000.

VILLARROEL, L. et al. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. **Journal of Natural Products**, Davis, v. 64, n. 9, p. 11123-1126, Sept. 2001.

WAGH, P. et al. Bio-activity of oils of *Trigonella foenum-graecum* and *Pongamia pinnata*. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 6, n. 13, p. 1592-1596, Dec. 2007.

ZEID, A. H. S. A. Stress metabolites from *Corchorus olitorius* L. leaves in response to certain stress agents. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 2, p. 187-195, Feb. 2002.

ANEXOS

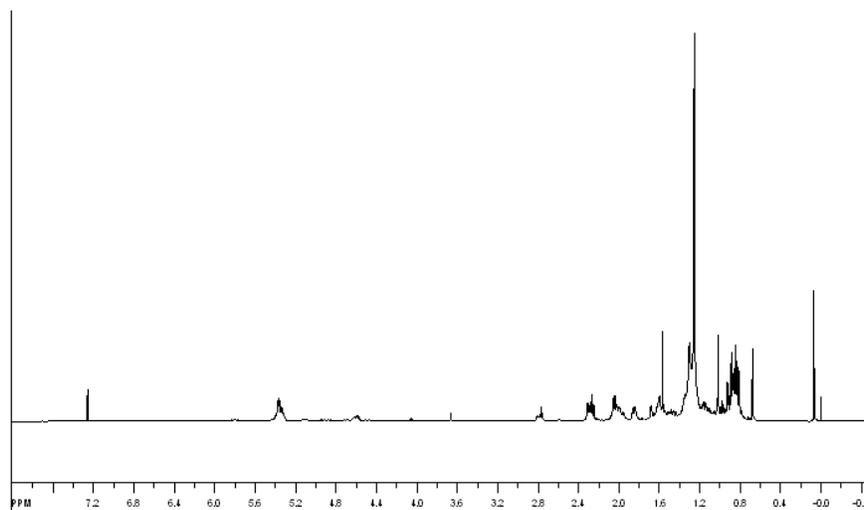


Gráfico 1A Espectro de RMN ¹H de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl₃, 500 MHz

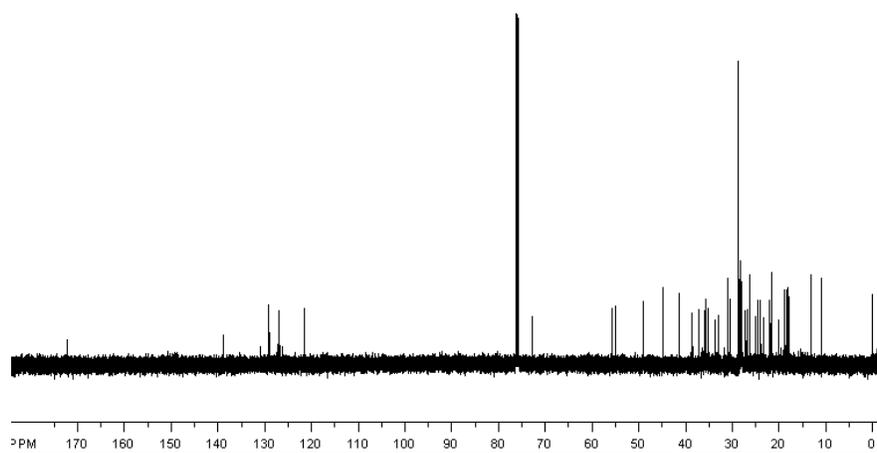


Gráfico 1B Espectro de RMN ¹³C de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl₃, 126 MHz

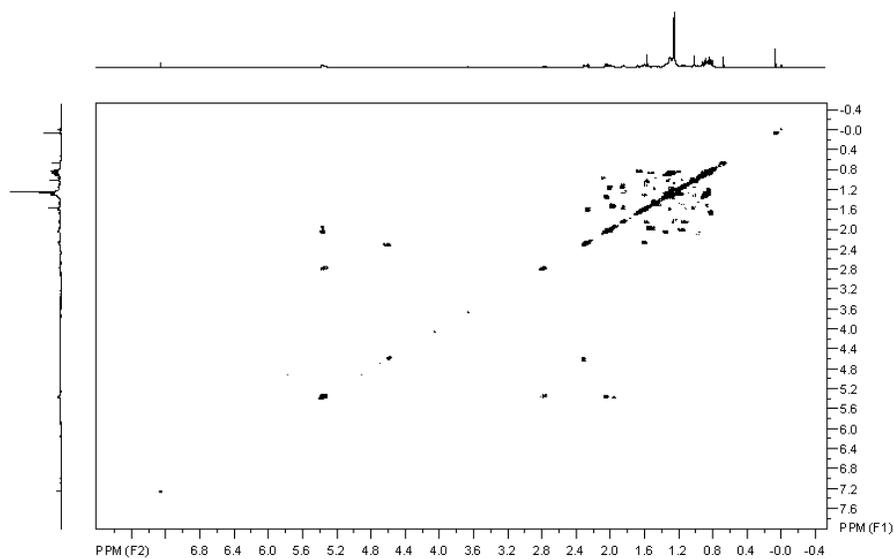


Gráfico 1C Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl_3 , 500 MHz

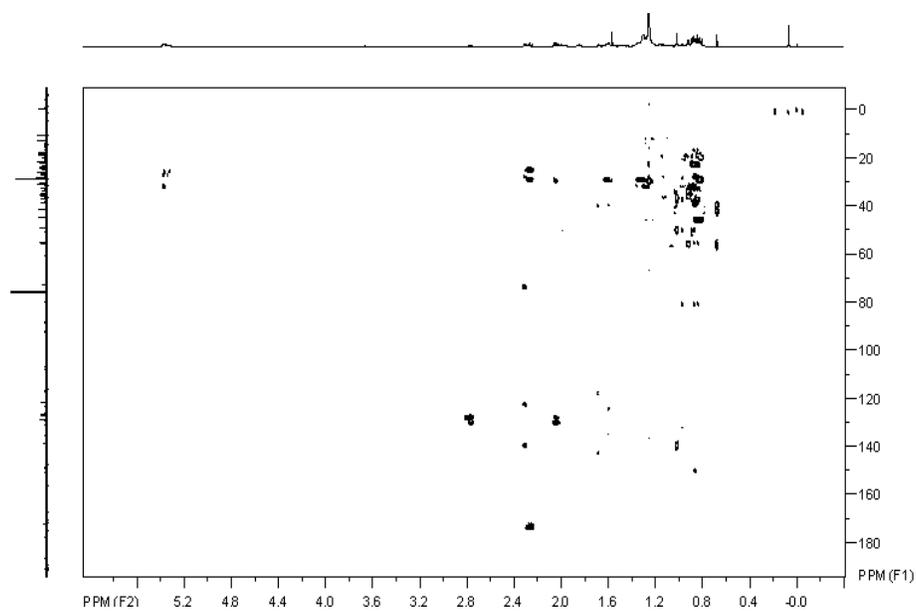


Gráfico 1D Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl_3 , 500x126 MHz

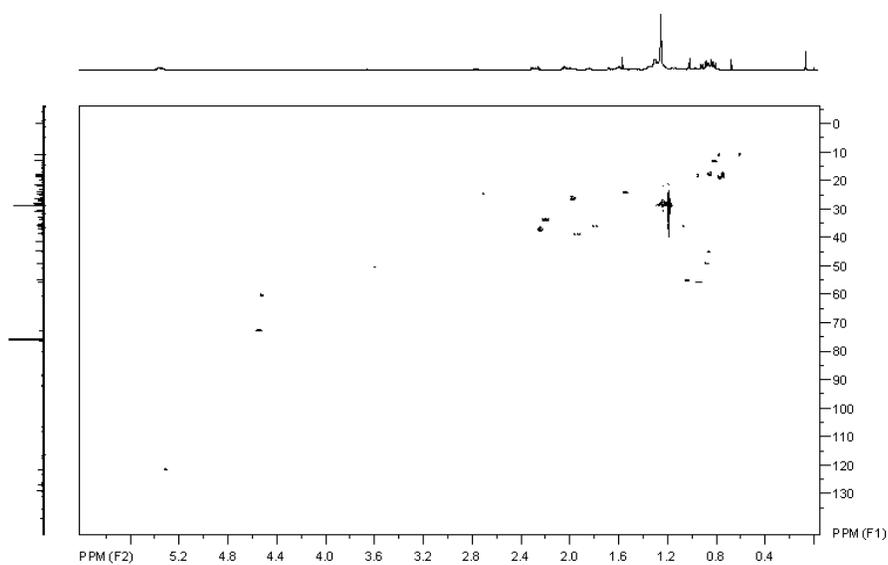


Gráfico 1E Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl_3 , 500x126 MHz

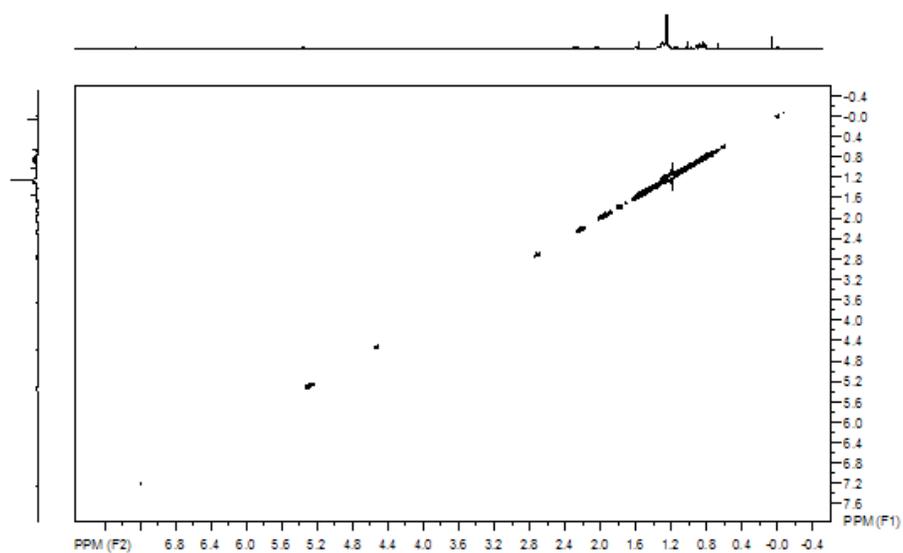


Gráfico 1F Mapa da correlação espacial homonuclear espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl_3 , 500 MHz

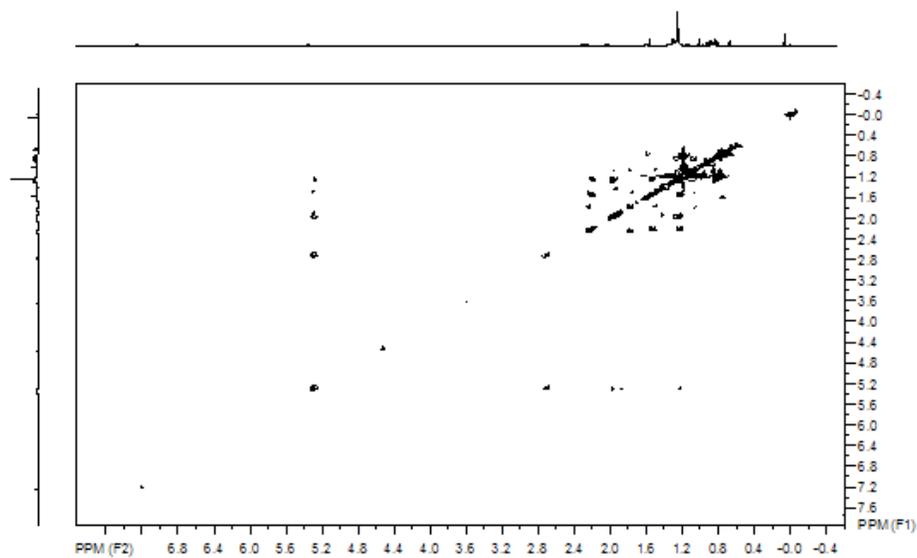


Gráfico 1G Mapa da correlação escalar TOCSY ($^1\text{H}\times^1\text{H}$) de Vi-02-24-02 (linoleato de β -sitosterila) em CDCl_3 , 500 MHz

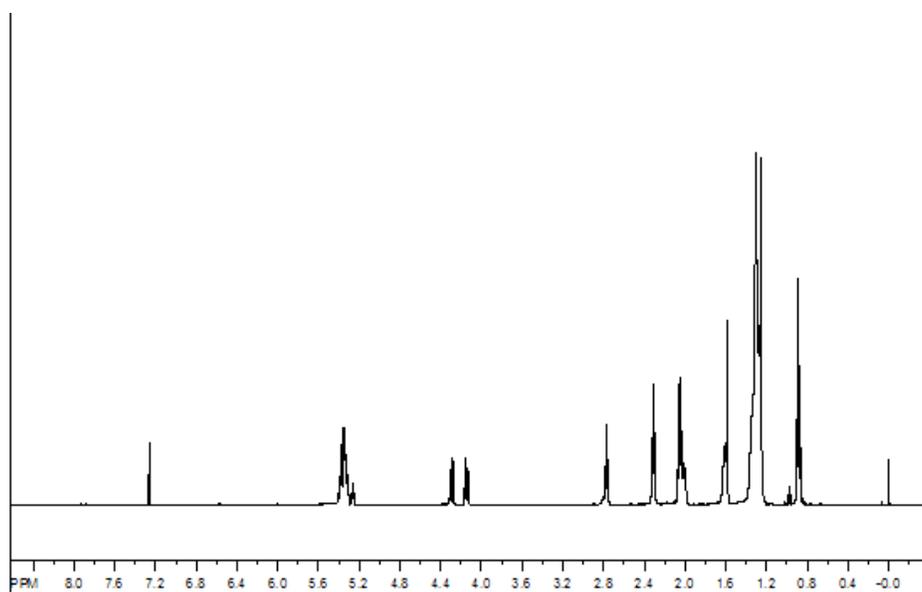


Gráfico 2A Espectro de RMN ^1H de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500 MHz

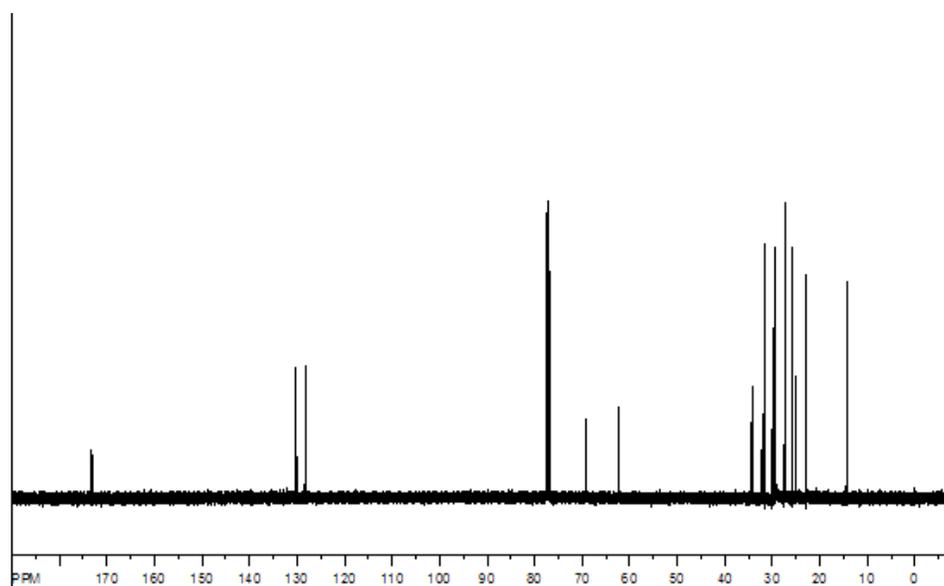


Gráfico 2B Espectro de RMN ^{13}C de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 126 MHz

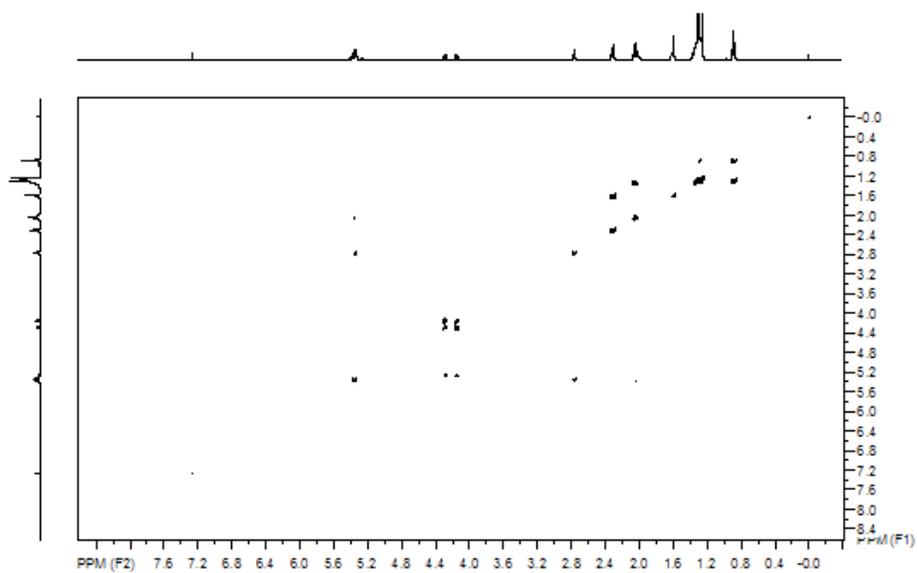


Gráfico 2C Mapa da correlação homonuclear ^1H x ^1H (COSY) de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500 MHz

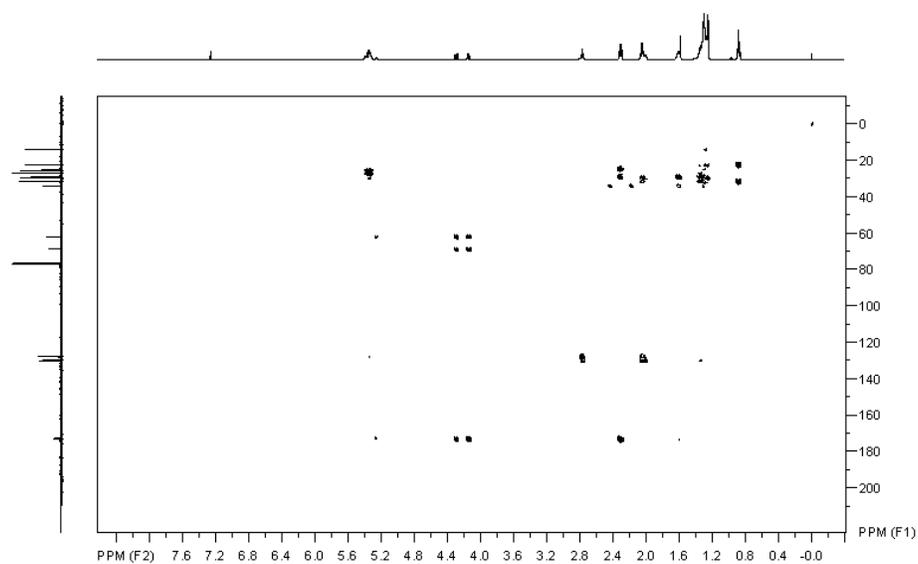


Gráfico 2D Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500x126 MHz

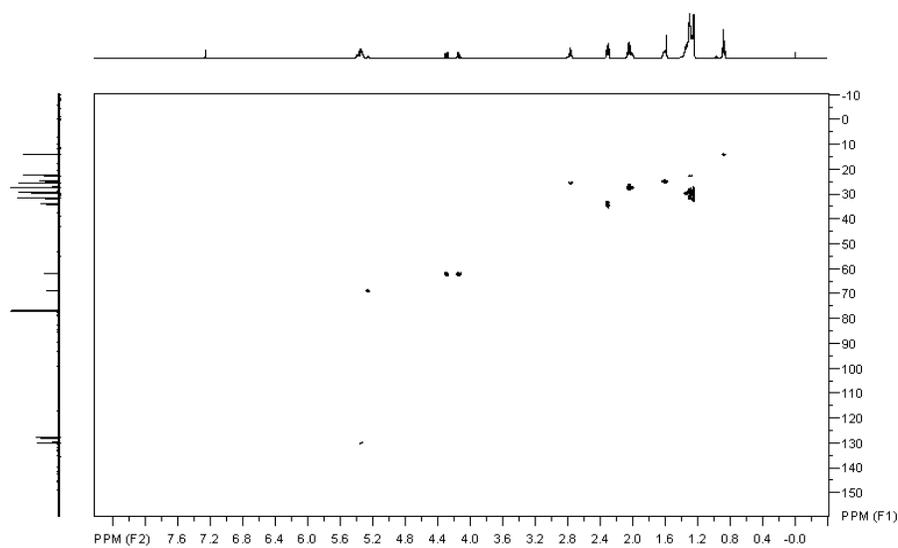


Gráfico 2E Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500x126 MHz

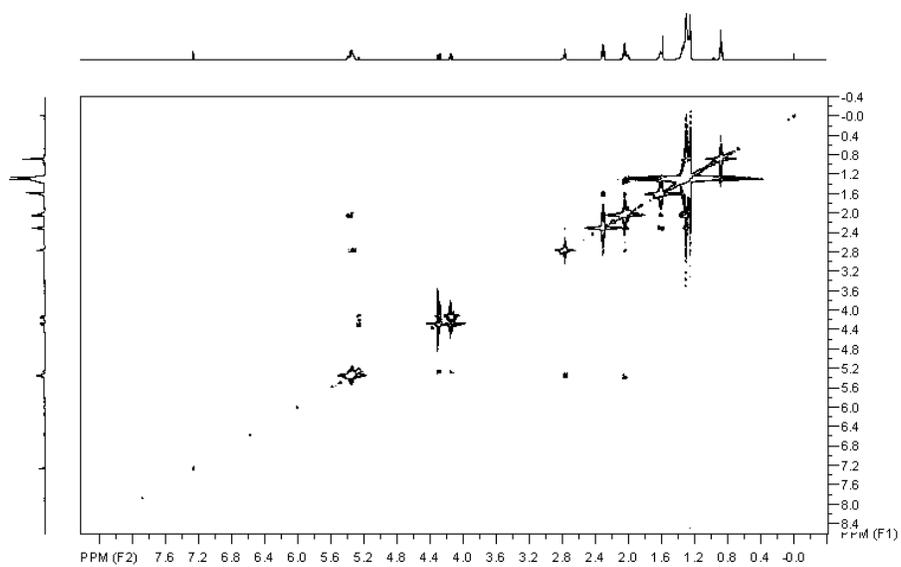


Gráfico 2F Mapa da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500 MHz

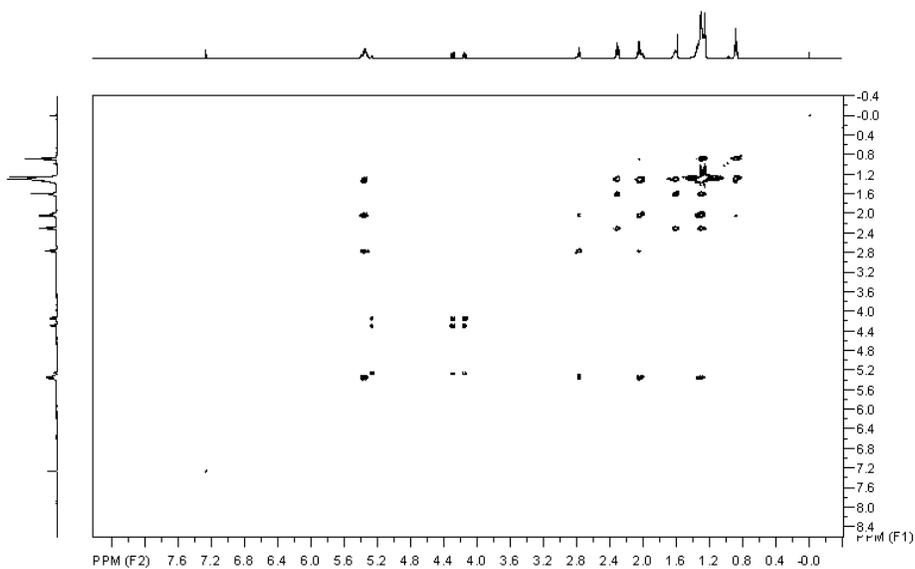


Gráfico 2G Mapa da correlação escalar TOCSY 1D, Vi-02-24-06 (trilinoleína) em CDCl_3 , 500 MHz

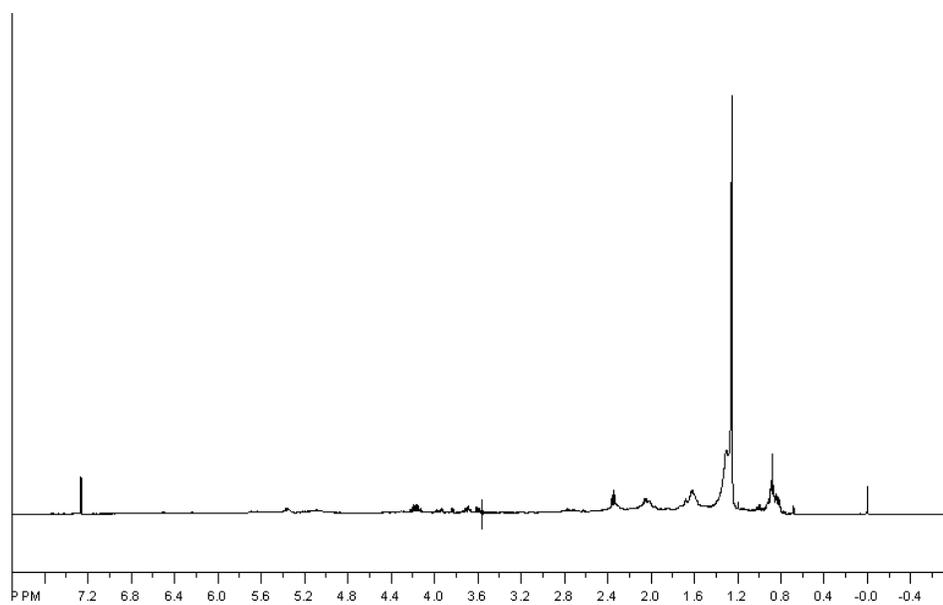


Gráfico 3A Espectro de RMN ^1H de V1-02-40-01 em CDCl_3 , 500 MHz

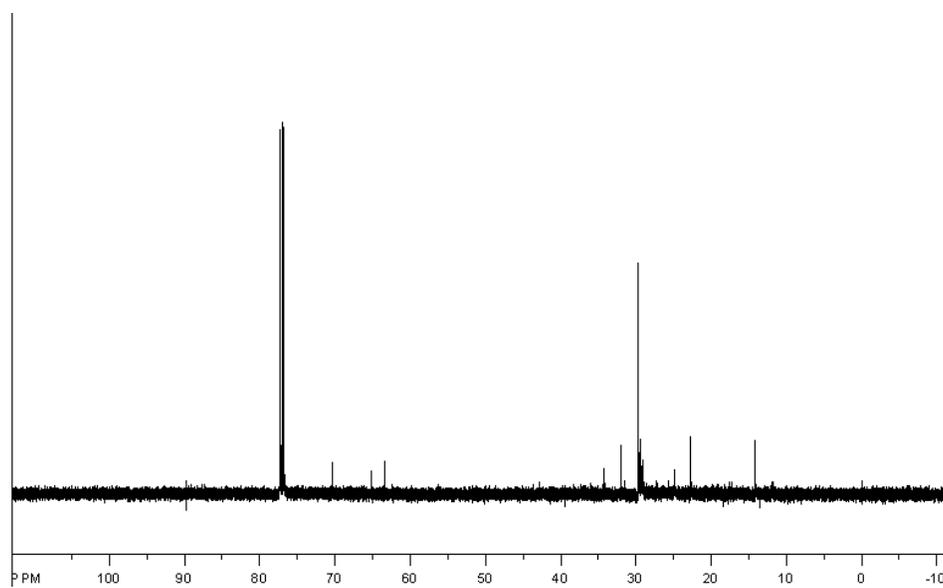


Gráfico 3B Espectro de RMN ^{13}C de V1-02-40-01 em CDCl_3 , 126 MHz

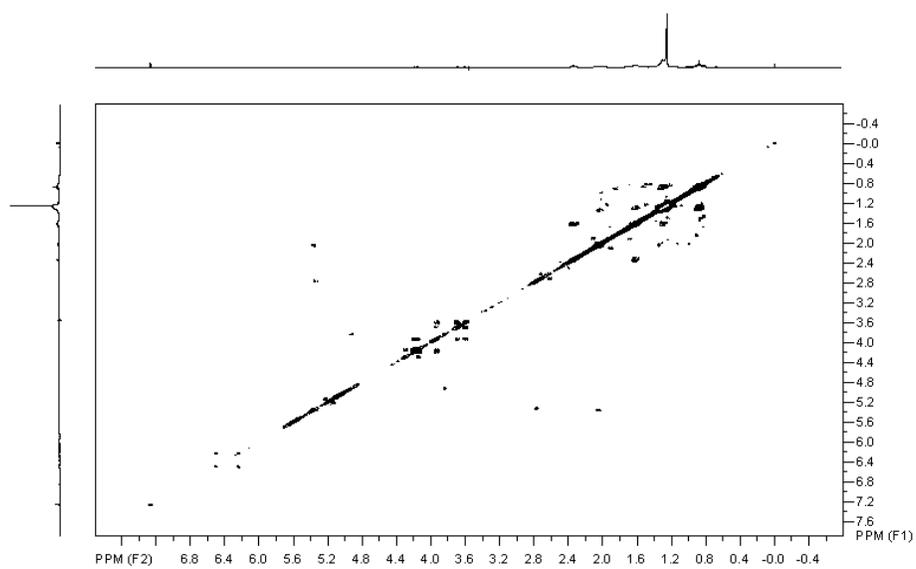


Gráfico 3C Mapa da correlação homonuclear ¹H x ¹H (COSY) de Vi-02-40-01 em CDCl₃, 500 MHz

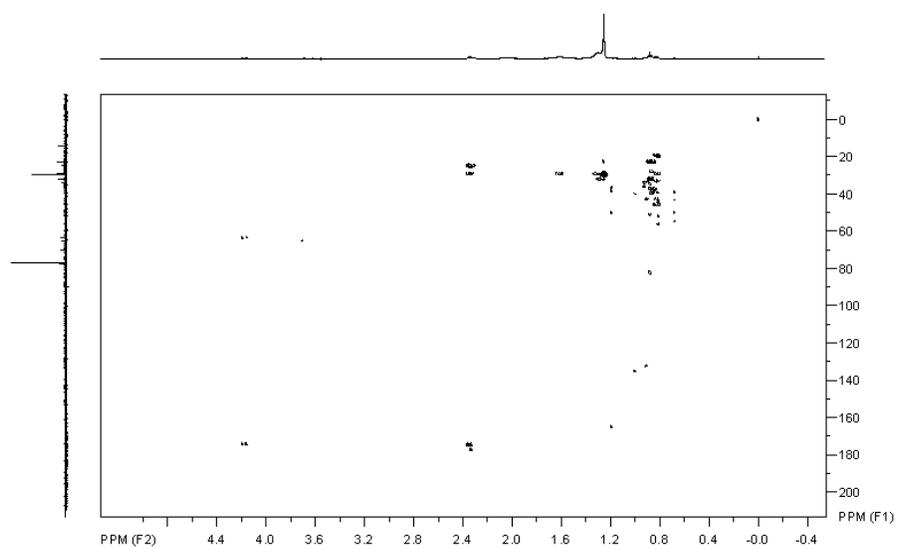


Gráfico 3D Mapa da correlação heteronuclear ¹H x ¹³C (HSQC) de Vi-02-40-01 em CDCl₃, 500 MHz

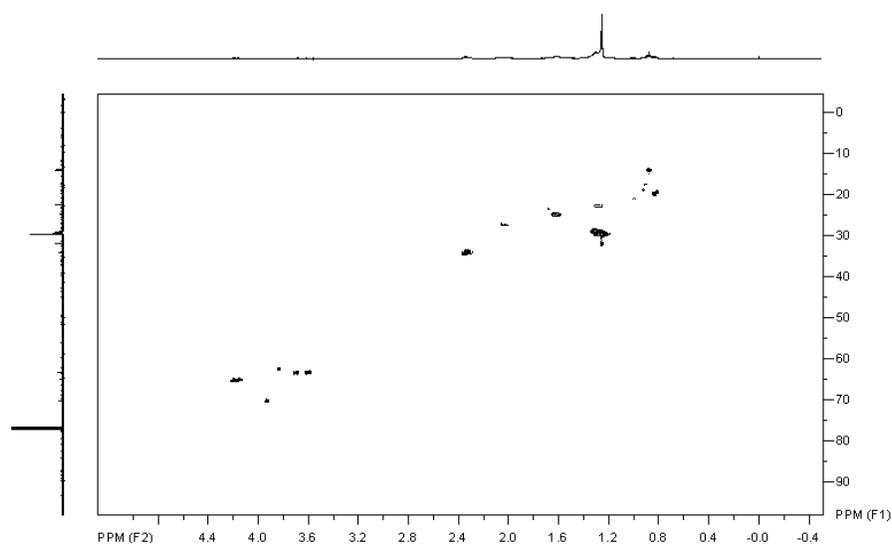


Gráfico 3E Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de Vi-02-40-01 em CDCl_3 , 500 MHz

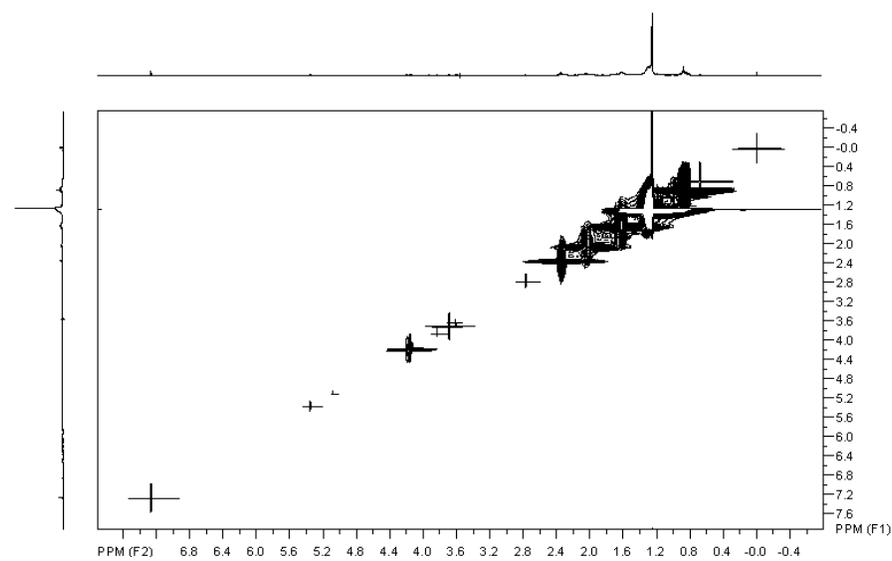


Gráfico 3F Mapa da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Vi-02-40-01 em CDCl_3 , 500 MHz

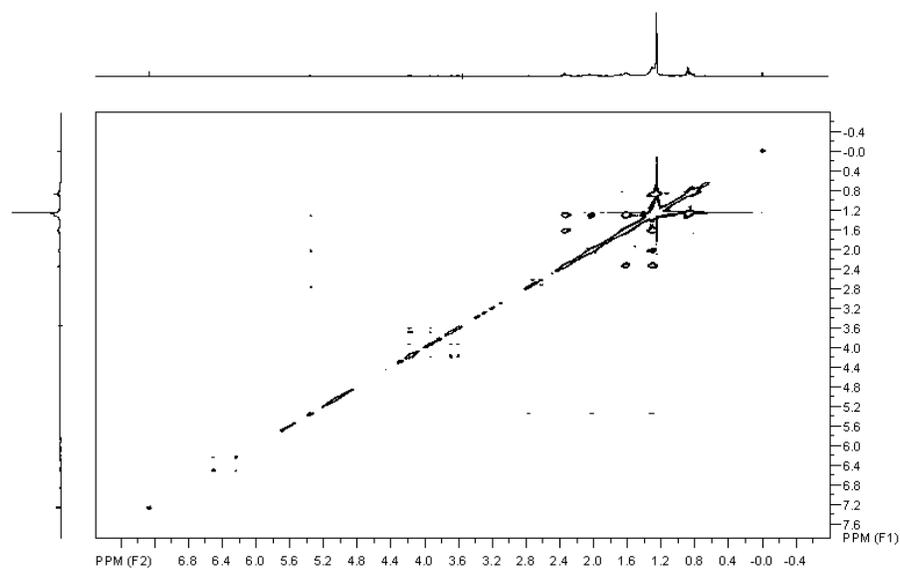


Gráfico 3G Mapa da correlação escalar TOCSY 1D de Vi-02-40-01 em CDCl₃, 500 MHz

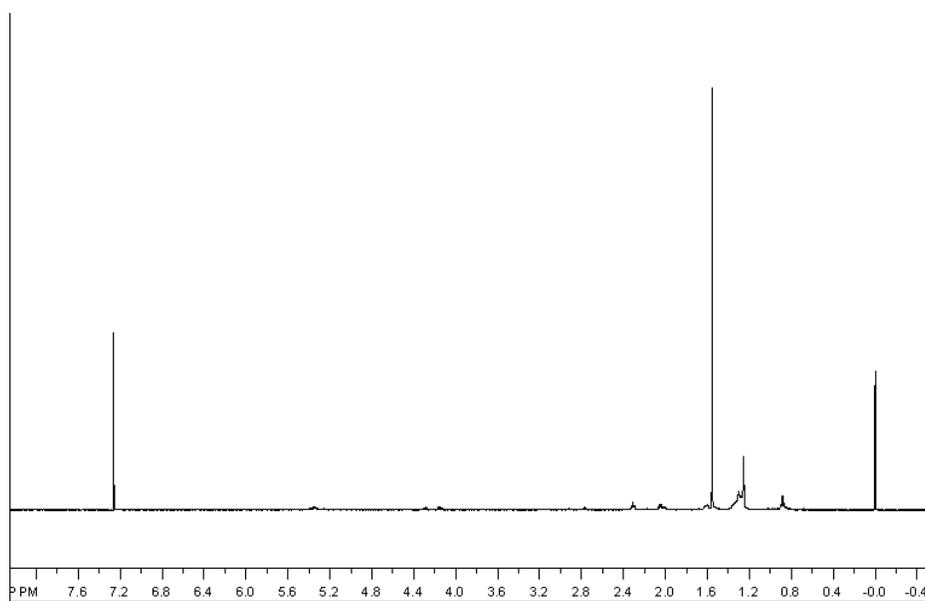


Gráfico 4A Espectro de RMN ¹H de Vi-02-53-02 em CDCl₃, 500 MHz

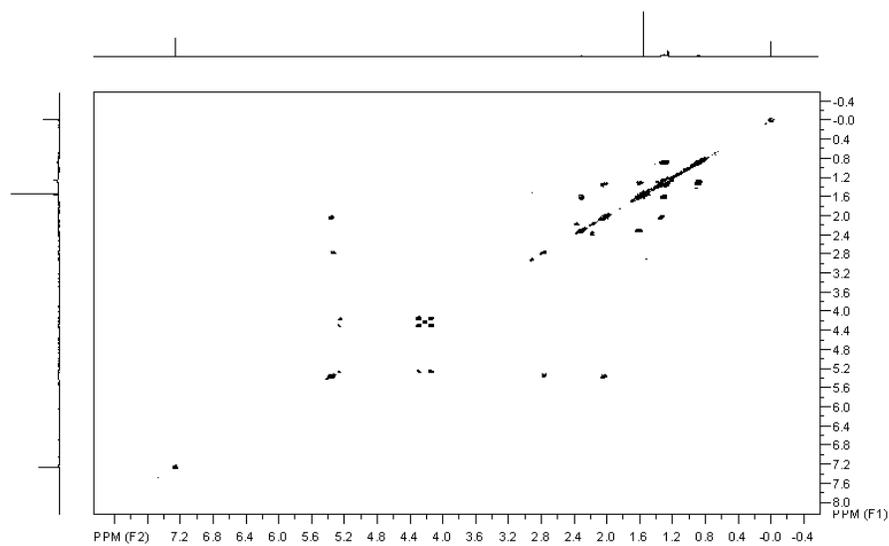


Gráfico 4B Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Vi-02-53-02 em CDCl_3 , 500 MHz

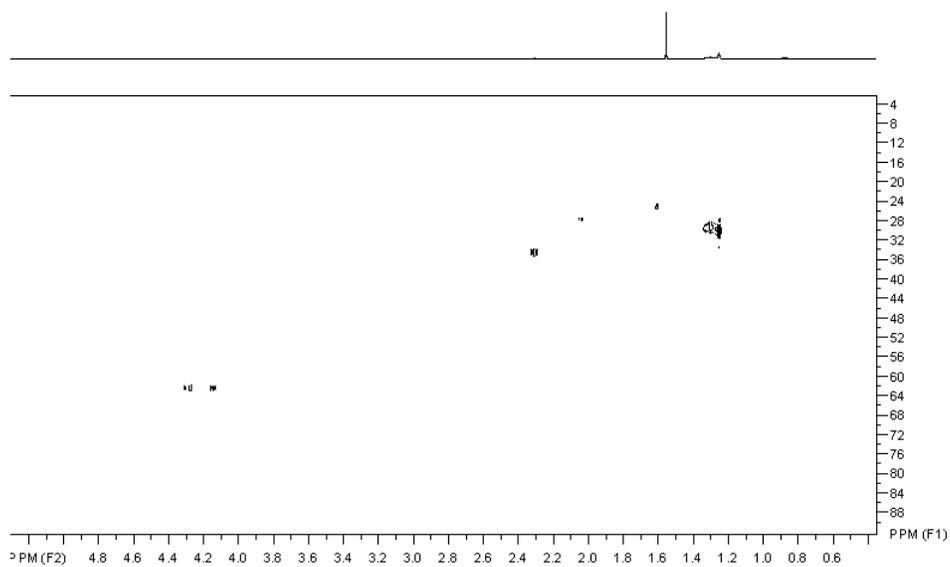


Gráfico 4C Mapa da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Vi-02-53-02 em CDCl_3

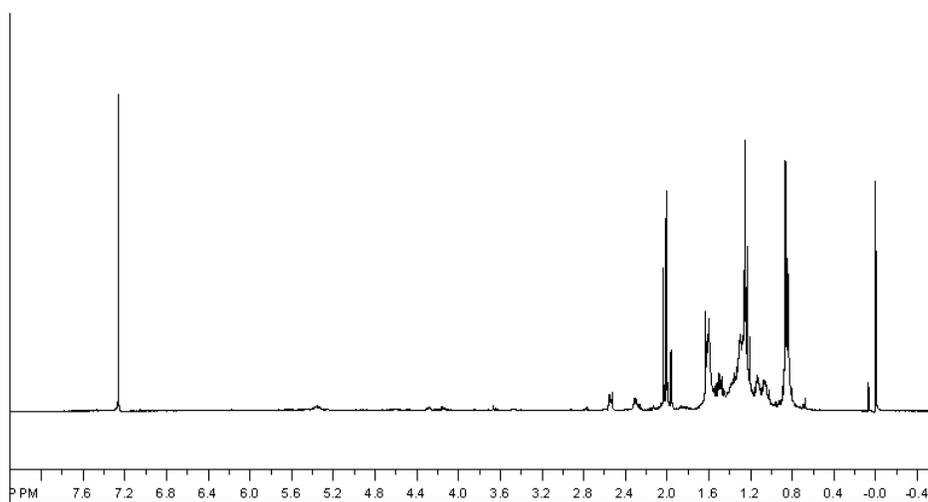


Gráfico 5A Espectro de RMN ^1H de Vi-02-69-05 em CDCl_3 , 500 MHz

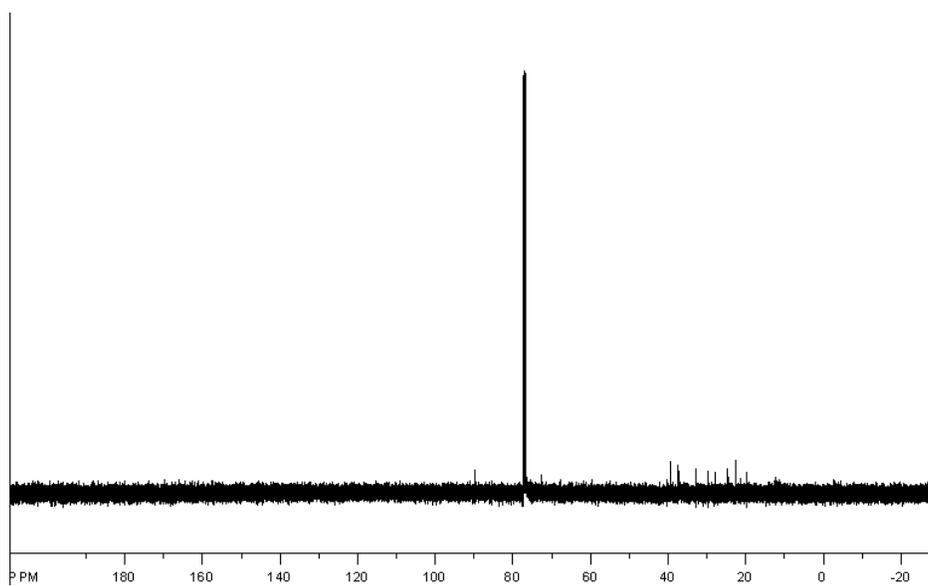


Gráfico 5B Espectro de RMN ^{13}C de Vi-02-69-05 em CDCl_3 , 500 MHz

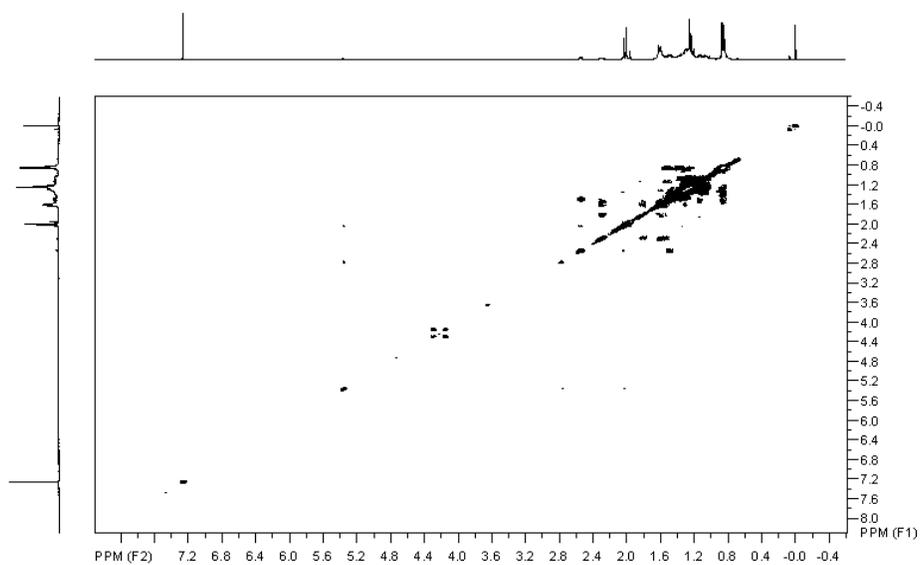


Gráfico 5C Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Vi-02-69-05 em CDCl_3 , 500 MHz

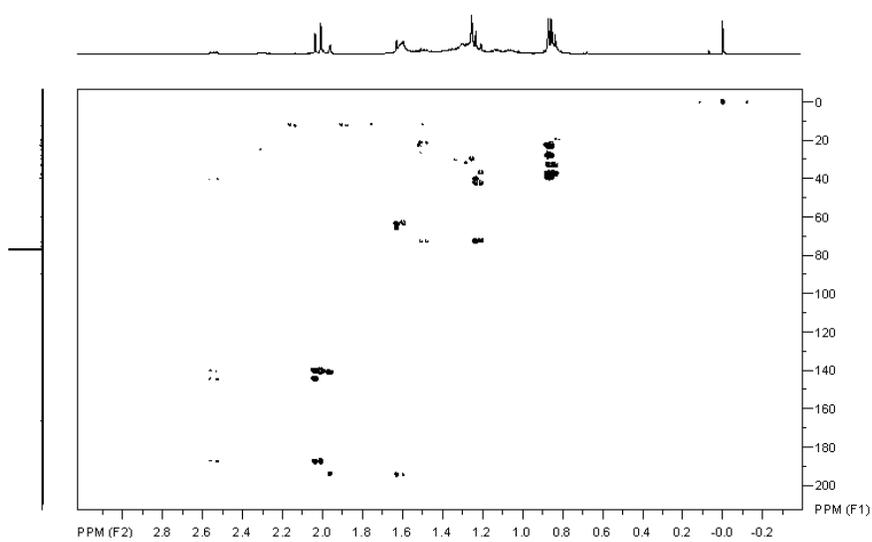


Gráfico 5D Mapa da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Vi-02-69-05 em CDCl_3

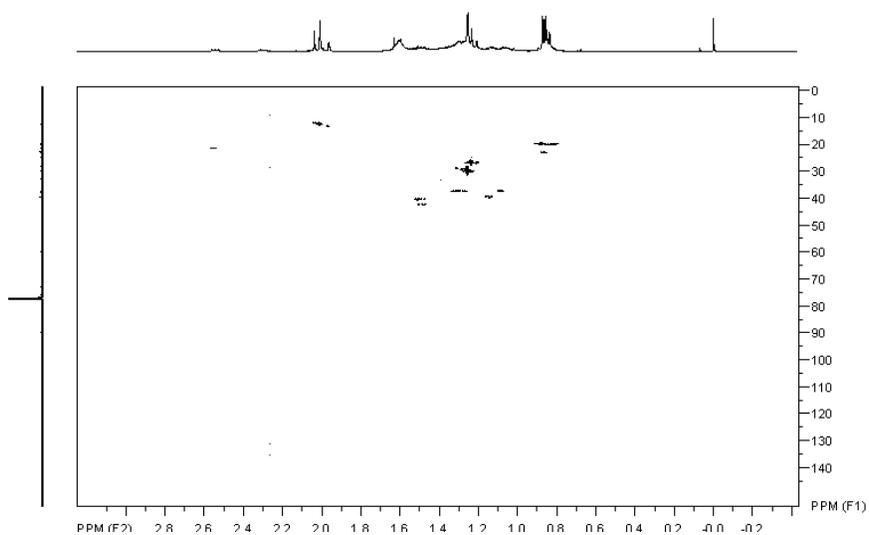


Gráfico 5E Mapa da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Vi-02-69-05 em CDCl_3

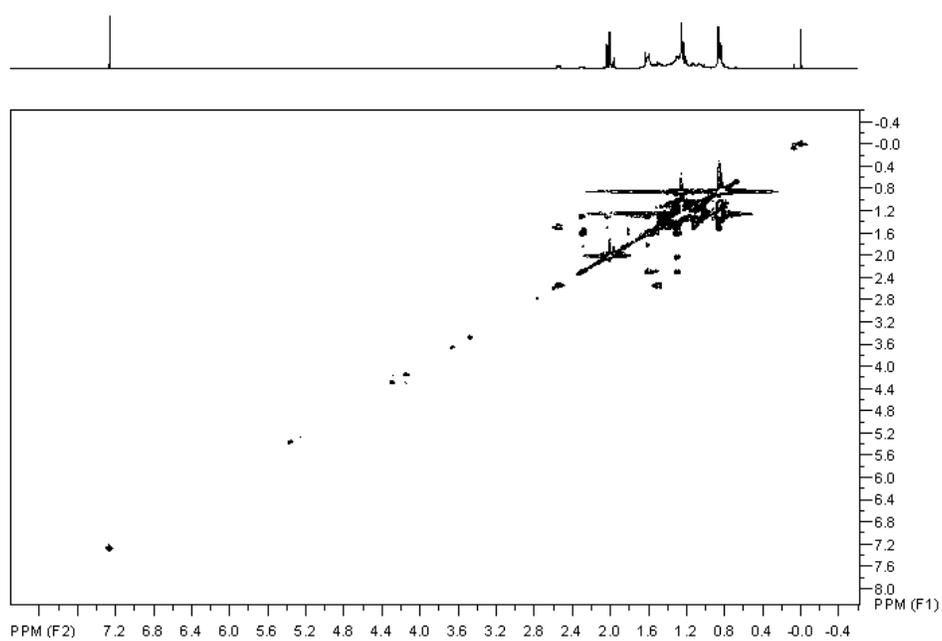


Gráfico 5F Mapa da correlação escalar TOCSY 1D de Vi-02-69-05 em CDCl_3 , 500 MHz

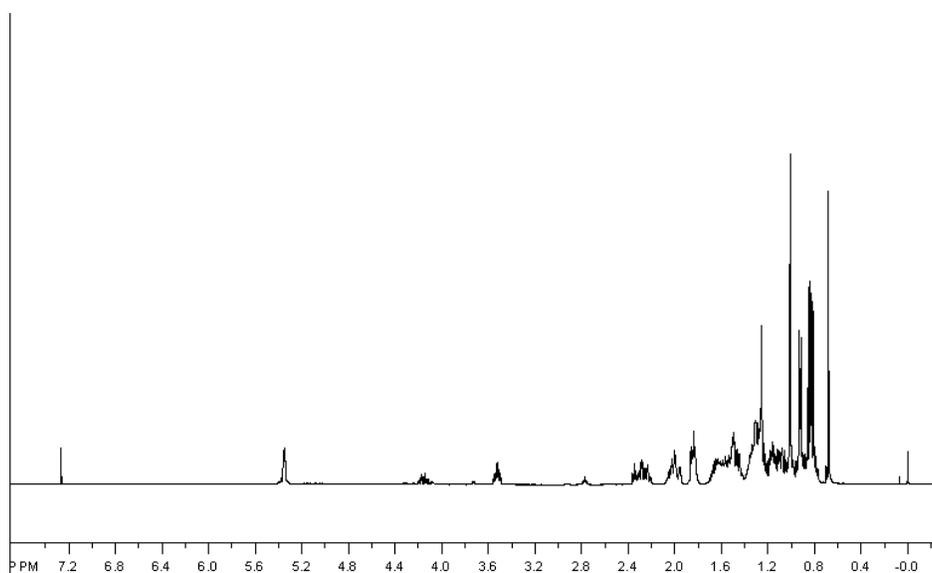


Gráfico 6A Espectro de RMN ¹H de Vi-02-69-06 (*β*-sitosterol) em CDCl₃, 500 MHz

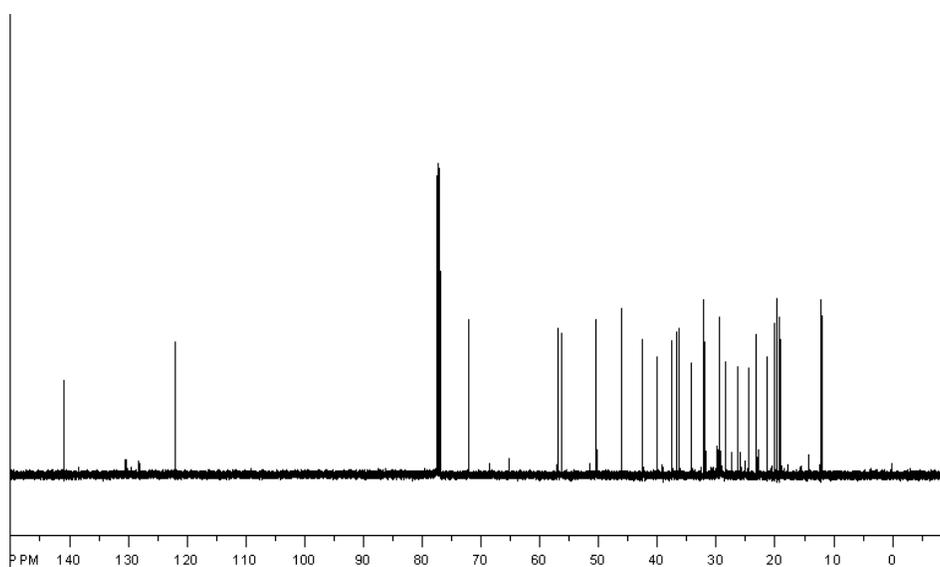


Gráfico 6B Espectro de RMN ¹³C de Vi-02-69-06 (*β*-sitosterol) em CDCl₃, 126 MHz

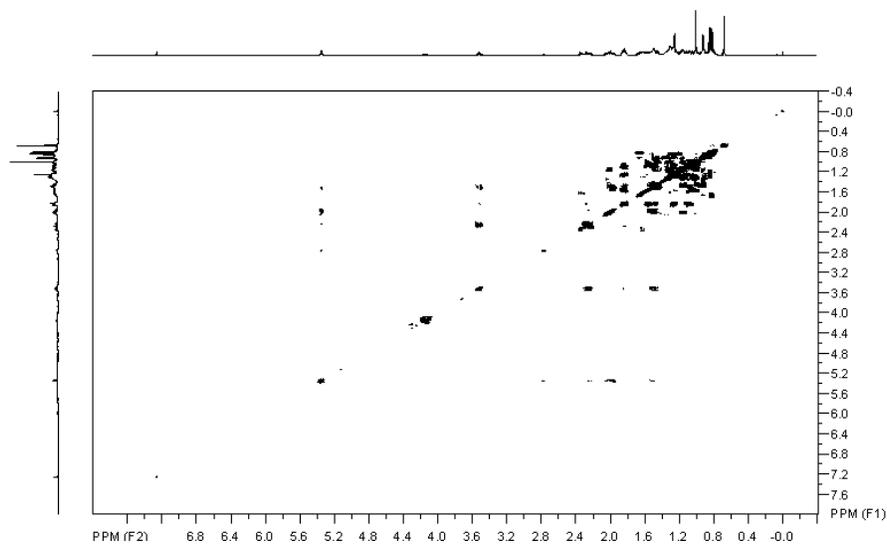


Gráfico 6C Mapa da correlação homonuclear ¹H x ¹H (COSY) de Vi-02-69-06 (β -sitosterol) em CDCl₃, 500 MHz

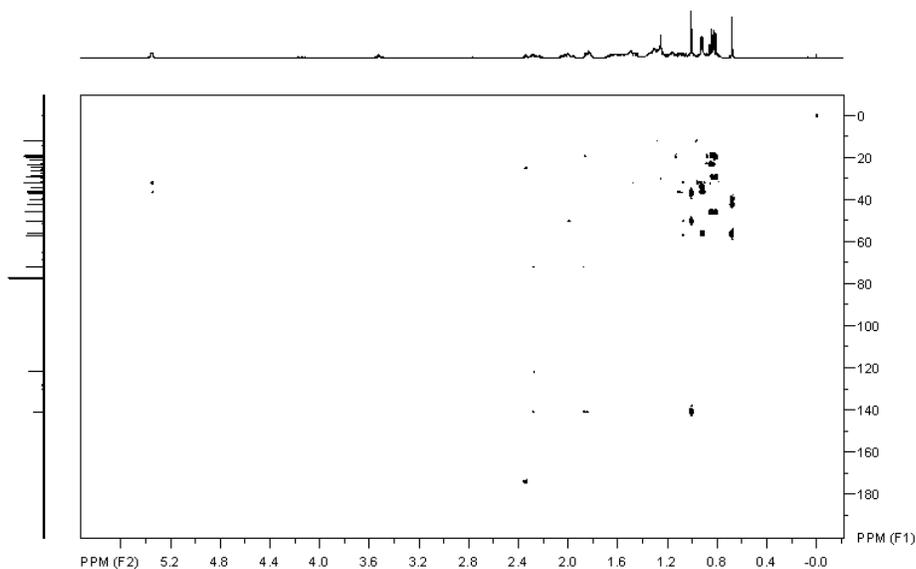


Gráfico 6D Mapa da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹H x ¹³C (500 x 126 MHz) de Vi-02-69-06 (β -sitosterol) em CDCl₃

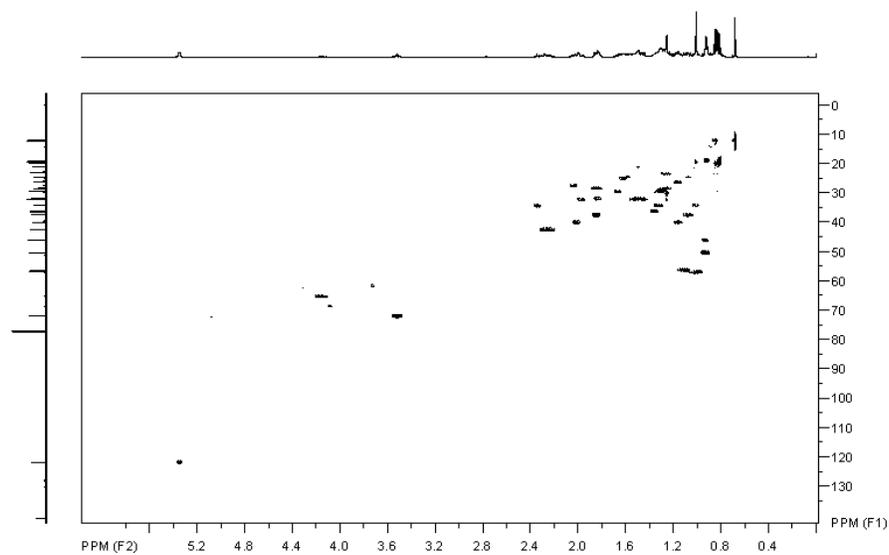


Gráfico 6E Mapa da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Vi-02-69-06 (β -sitosterol) em CDCl_3

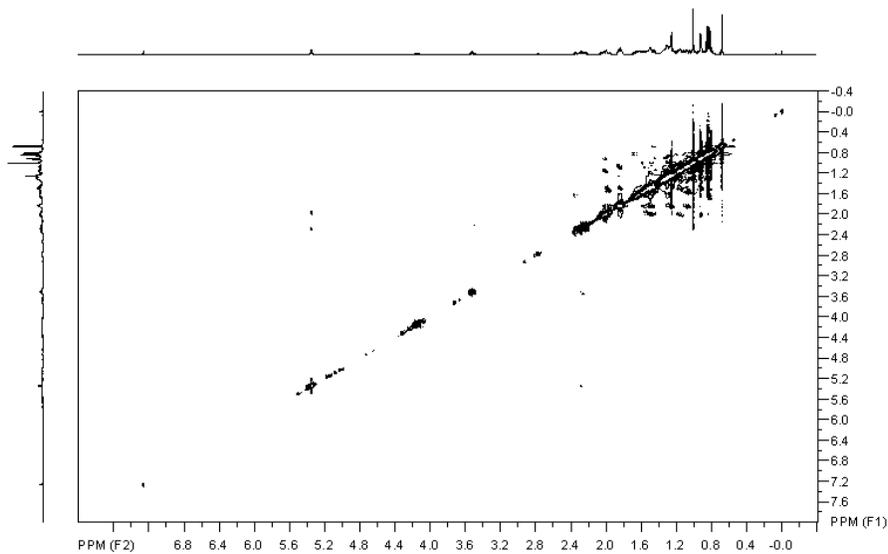


Gráfico 6F Mapa da correlação espacial homonuclear ^1H x ^1H (ROESY) de Vi-02-69-06 (β -sitosterol) em CDCl_3 , 500 MHz

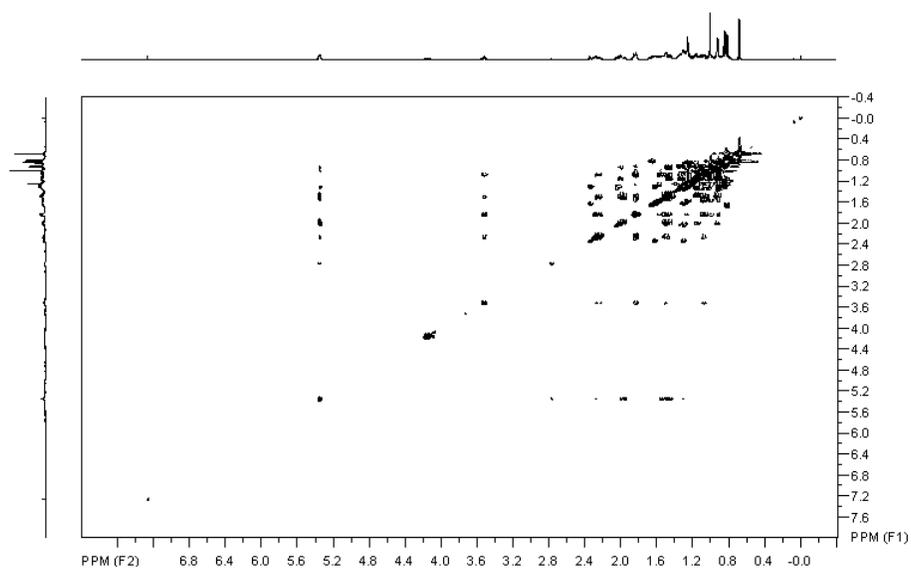


Gráfico 6G Mapa da correlação escalar TOCSY 1D de Vi-02-69-06 (β -sitosterol) em CDCl_3 , 500 MHz