

ESTUDO EM RAIZ E RÁQUIS FOLIAR DE *Spathelia excelsa*: FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FRENTE AO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* ASSOCIADO AO CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*)#

Loretta Ennes de Carvalho, Maria da Paz Lima\*, Ariane da Costa Máximo, Elaine Cristina da Silva Pereira e Wagner Alan dos Santos Moreira

Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, CP 478, 69060-001 Manaus – AM, Brasil

Antônio Gilberto Ferreira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Solange de Mello Vêras

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus – AM, Brasil

Maria Geralda de Souza

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CP 319, 69011-970 Manaus – AM, Brasil

Recebido em 27/4/12; aceite em 15/8/12; publicado na web em 28/9/12

STUDY OF ROOT AND LEAF RACHIS OF *Spathelia excelsa*: PHYTOCHEMISTRY AND ACTIVITY AGAINST FUNGUS *Moniliophthora perniciosa* ASSOCIATED WITH CUPUASSU (*Theobroma grandiflorum*). The chemical composition of *Spathelia excelsa* (Krause) R. S. Cowan & Brizicky was investigated and the limonoids harrisonin (**1**) and deacetylspathelin (**2**), alkaloids folinin and casimiroin mixture (**3a,b**), plus a further casimiroin (**3b**) were identified in methanol extract from root. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract from the rachis yielded protolimonoid 3β-angeloyl-21,24-epoxy-7α,21α,23α,25-tetrahydroxy-4α,4β,8β,10β-tetramethyl-25-dimethyl-14,18-cyclo-5α,13α,14α,17α-cholestane (**4**), and methanol extract, the limonoids limonin diosphenol (**5**) and perforatin (**6**), as well as the chromone biflorin (**7**). Harrisonin and biflorin were isolated for the first time in this genus. On the antifungal assay against witches' broom (*Moniliophthora perniciosa*) compound **3b** was found to be active.

Keywords: *Spathelia*; alkaloids; *Moniliophthora perniciosa*.

## INTRODUÇÃO

O cupuaçu é o fruto do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.], família Sterculiaceae (= Malvaceae) que, pelas características muito agradáveis de sabor ácido e aroma intenso de sua polpa, se tornou um dos frutos nativos mais populares e consumidos da Amazônia, sendo muito usado na preparação de sucos, sorvetes e outras sobremesas. Devido ao aumento da demanda pela polpa desse fruto, principalmente na forma congelada, tem crescido o interesse pelo seu cultivo em muitas áreas da Amazônia brasileira.<sup>1</sup> No entanto, nos últimos anos, têm-se observado a redução da produtividade nos cultivos da região amazônica<sup>2</sup> devido, principalmente, à ocorrência de vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, cujo principal método de controle é a poda fitossanitária. Assim, métodos que envolvam produtos naturais são alternativas importantes na busca da ação antagonista para o controle dessa doença.

*Spathelia excelsa* (Krause) R. S. Cowan & Brizicky [sin. *Sohnroyia excelsa* K.] é conhecida como Surucucumirá, uma planta hapaxanta ou monocárpica de ocorrência no Amazonas que, similar às demais espécies do gênero, se caracteriza pelo aspecto de árvore sem ramificação no tronco (aparência de palmeira).<sup>3,4</sup> As contribuições fornecidas para o conhecimento químico de *S. excelsa* são referentes aos estudos fitoquímicos do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de raiz e extrato MeOH de folhas e caule que conduziram à identificação de alcaloides, limonoides e cromonas. Tais estudos forneceram subsídios para o posicionamento do gênero em Rutaceae, além de permitir a detecção do potencial antiprotozoário e da atividade larvicida em *Aedes aegypti*<sup>5-7</sup> que consistem nos poucos relatos sobre substâncias

ativas registrados em *Spathelia*. No presente trabalho descreve-se a fitoquímica dos extratos MeOH da raiz e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH do ráquis foliar e avalia-se a atividade antifúngica sobre *M. perniciosa*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Substâncias identificadas nos extratos de *S. excelsa*

O extrato metanólico da raiz de *S. excelsa* forneceu o isolamento de β-sitosterol, dos limonoides harrisonina (**1**), desacetilspathelina (**2**), a mistura dos alcaloides folinina e casimiroina (**3a,b**), além da casimiroina pura. O extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> do ráquis foliar forneceu um protolimonóide (**4**) e, a partir do extrato metanólico, foram isolados os limonoides limonina diosfenol (**5**) e perforatina (**6**), e a cromona biflorina (**7**), Figura 1.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos limonoides **1**, **2**, **5** e **6** mostraram sinais típicos de anel furano na região de δ 7,45-7,40 (H-21), 6,37-6,33 (H-22) e 7,43-7,39 (H-23). Os singletos referentes ao H-15 em δ 4,29 (**1**), 4,16 (**2**), 4,13 (**5**) e 4,65 (**6**) aliados aos sinais de H-17 em δ 5,68 (**1** e **6**), 5,48 (**2**) e 5,44 (**5**) são coerentes para limonóide com anel 14,15-epóxi D lactona. As carbonilas das lactonas do anel D foram observadas nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C em δ 167,0 (**1**), 167,4 (**2**), 166,4 (**5**) e 167,5 (**6**) e as carbonilas de éster do anel A verificadas em δ 166,7 (**1**), 166,0 (**2**) e 169,1 (**5**), além da lactona α,β insaturada em δ 160,2 (**6**). Outros sinais típicos de carbonilas de cetona ocorreram em δ 216,0 (**1**) e 208,0 (**2**), diosfenol em δ 195,2 (**5**) e δ 201,8 da carbonila de **6**. Os espectros em 2D (COSY, HSQC e HMBC) confirmaram a estrutura da harrisonina para **1**. O HMBC mostrou a correlação do hidrogênio em δ 5,07 (C-6-OH) com os carbonos em δ 88,58 (C-6), 108,28 (C-7), 49,70 (C-10) e do hidrogênio em δ 3,61 (C-7-OH) com δ 108,28 (C-7) e 88,58 (C-6), confirmando a formação dos anéis A e B. Os dados obtidos nos espectros, aliados à

\*e-mail: mdapaz@inpa.gov.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

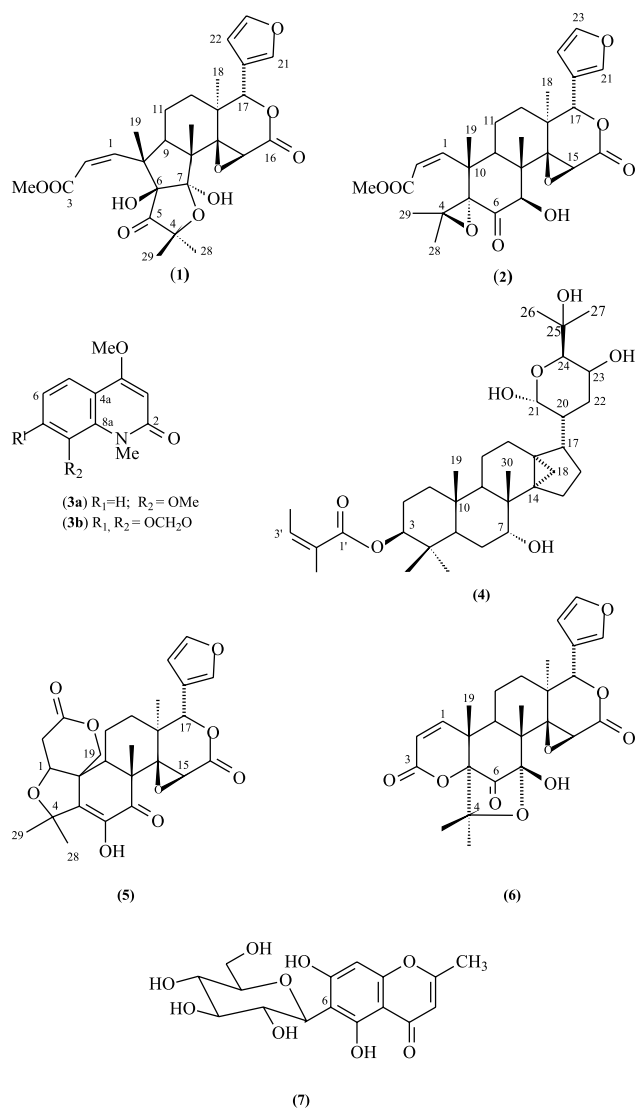


Figura 1. Substâncias obtidas de raiz e ráquis foliar de *Spathelia excelsa*

comparao com literatura permitiram identificar os limonoides como harrisonina (1),<sup>8</sup> desacetilspathelina (2),<sup>7</sup> limonina diosfenol (5)<sup>9</sup> e perforatina (6).<sup>10</sup> Harrisonina foi previamente isolada em *Harrisonia abyssinica* (Simaroubaceae), sendo este o primeiro registro em Rutaceae. Os dados dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C obtidos para 4 foram compatíveis com o protolimonoido identificado,<sup>7</sup> sendo a presença do grupo angeloil ligado a C-3 evidenciada pelos sinais de hidrognios em  $\delta$  5,99 (H-3'), 2,05 (H-5') e 1,95 (H-4').

Os dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiram a identificao dos alcaloides folinina e casimiroina (3a,b),<sup>11</sup> em mistura, bem como da casimiroina isolada (3b). Com base nas intensidades dos sinais, da folinina ( $\delta$  7,52; 7,06, e 7,01) e da casimiroina ( $\delta$  7,46 e 6,71), a folinina  predominante (aprox. 60%) na mistura.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 7, o sinal de metila como duplete ( $\delta$  2,36) associado ao sinal de hidrogênio como quarteto ( $\delta$  6,08,  $J = 0,8$  Hz) caracterizaram a parte 2-metil-pirona da molécula. O sinal de hidrogênio aromático foi observado como singlete em  $\delta$  6,37. Sinais de hidrognios carbinólicos na região entre  $\delta$  4,16-3,40, além do sinal em  $\delta$  4,85 como duplete ( $J = 7,2$  Hz) sugeriram a presença de glicosídeo na molécula. Pelo espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi possível propor uma unidade 5,7-dihidroxicromona devido  presença dos sinais em  $\delta$  162,2 e 165,3. A comparao dos dados espectrais obtidos com os da literatura<sup>12,13</sup>

sugere a estrutura da biflorina que se constitui no primeiro registro de cromona C-glucosilada em *Spathelia*.

### Atividade antifúngica *in vitro*

No ensaio antifúngico *in vitro* avaliou-se o efeito das diferentes concentraes das substâncias predominantes (2 e 3b) no extrato metanólico da raiz de *S. excelsa* contra o fungo fitopatogênico isolado de *Theobroma grandiflorum*. Os níveis de inibio máxima do limonoido 2 foram de 52,46 e 38,3% para as concentraes de 200 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, não evidenciando antagonismo promissor contra o fungo nas concentraes testadas. A casimiroina (3b) mostrou excelente atividade antifúngica ( $\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Oliva et al.<sup>14</sup> também encontraram alcaloides do tipo quinolona com potencial antifúngico contra patognicos de plantas. Os alcaloides isolados em *Ruta graveolens* (Rutaceae) mostraram 100% de inibio do crescimento de *Botrytis cinerea* e *Phomopsis obscurans* a 30  $\mu\text{M}$ . No entanto, para os fungos *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *Fusarium oxysporum* a inibio dos alcaloides foi observada entre 50-57% (a 300  $\mu\text{M}$ ).

 importante ressaltar a carência de estudos na busca de fitoconstituintes com ao sobre *M. pernicioso*. Silva e Bastos<sup>15</sup> relatam a fungitoxicidade de óleos essenciais de quatro espécies de *Piper* em vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Não há relatos prévios da ao de substâncias voláteis e não voláteis em vassoura-de-bruxa do cupuzeiro. Assim, o antagonismo revelado pela substância 3b  considerado promissor para o controle da *M. pernicioso* de *Theobroma grandiflorum*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrmetro Bruker DRX-400, utilizando-se solventes deuteraados na dissoluo das amostras e TMS como padrão interno. Para as cromatografias em coluna utilizou-se gel de sílica (70-230 e 230-400 mesh da Merck) e Sephadex LH-20 (Sigma). Nas análises em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatofolhas de alumínio com sílica-gel 60 (Merck), reveladas com luz UV e soluço alcoólica de vanilina e ácido sulfúrico.

### Material vegetal

Partes vegetativas (raiz e ráquis foliar) de *Spathelia excelsa* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, km 26, AM 010, em 29/11/2005. Esta espécie foi previamente mapeada e identificada pelo Prof. Dr. J. R. Pirani, da Universidade de São Paulo, durante a execuo do projeto Flora da Reserva Adolpho Ducke. A exsicata de número 4227 utilizada na comparao encontra-se depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

### Extrao e isolamento dos constituintes químicos

Amostras de raiz (735,0 g) e ráquis foliar (650,0 g), após secagem e pulverizao, foram individualmente submetidas  macerao sucessiva em hexano, diclorometano e metanol (7 dias em cada solvente). O extrato metanólico (9,87 g) da raiz foi fracionado em coluna (h x  $\varnothing = 19,0 \times 3,5$  cm) utilizando-se gel de sílica (70-230 mesh), eluída em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) e MeOH, gerando 40 fraes. As fraes agrupadas 14-17 (RSM-14) e 23-26 (RSM-23) foram submetidas a novos fracionamentos. RSM-14 (950 mg) foi fracionada em coluna (h x  $\varnothing = 15,0 \times 3,5$  cm) de gel de sílica (70-230 mesh), eluída

em hexano:AcOEt (5-30%) fornecendo 46 subfraoes, das quais, as subfraoes 12-14 (RSM-14A), 24-27 (RSM-14B) e 28-34 (RSM-14C) foram submetidas aos seguintes procedimentos: RSM-14A tratada em MeOH forneceu o  $\beta$ -sosterol (18 mg); RSM-14B fracionada em coluna (h x  $\varnothing$  = 18,0 x 2,0 cm) de gel de sílica (230-400 mesh) eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (2-50%) forneceu **1** (14 mg); RSM-14C fracionada em coluna de gel de sílica (70-230 mesh; h x  $\varnothing$  = 18,0 x 2,0 cm), eluída em hexano:AcOEt (5 a 50%), AcOEt e MeOH, forneceu 16 subfraoes; as subfraoes 9-10, eluídas em hexano:AcOEt (6:4), tratadas com MeOH a quente resultaram no isolamento de **2** (33 mg). RSM-23 (3,78 g) foi fracionada em coluna (h x  $\varnothing$  = 26,0 x 3,0 cm) empregando-se gel de sílica (70-230 mesh), eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (10-40%), acetona, acetona:MeOH (10-50%) e MeOH, obtendo-se 31 fraoes. A subfraao 5, após filtraao em Sephadex LH-20, eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:5) seguida por coluna (h x  $\varnothing$  = 28,0 x 1,0 cm) em gel de sílica (230-400 mesh), utilizando-se como eluentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (10-100%), resultou na obtenao da mistura **3a,b** (12 mg) e no isolamento de **3b** (26 mg).

O extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10,34 g) dos ráquis foliar foi fracionado em coluna de gel de sílica (h x  $\varnothing$  = 26,5 x 4,7 cm), eluída em hexano, hex:AcOEt (2 -50%), AcOEt e MeOH, originando 43 fraoes. A fraao 40 após tratamento com acetona resultou no isolamento de **4** (14 mg). O extrato metanólico (75,4 g) foi submetido a fracionamento em coluna (h x  $\varnothing$  = 22,5 x 4,2 cm) de gel de sílica (70-230 mesh), eluída em hexano, hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10-50%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (10-50%), AcOEt, AcOEt:MeOH (10-50%) e MeOH, resultando em 56 fraoes; a fraao SCHM-43 (43-47; 2,79 g) foi fracionada em coluna (h x  $\varnothing$  = 39,5 x 2,8 cm) de gel de sílica (70-230 mesh), utilizando como eluentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (1-50%), AcOEt, AcOEt:MeOH (10 a 50%) e MeOH, fornecendo 35 subfraoes: subfraao 11-14 (SCHM-43A) cromatografada em coluna (h x  $\varnothing$  = 28,0 x 1,0 cm) de gel de sílica (230-400 mesh), eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (1-50%), AcOEt, AcOEt:MeOH (1-50%) fornecendo **5** (14 mg) e **6** (5 mg); subfr.27-29 (SCHM-43B) foi fracionada em coluna (h x  $\varnothing$  = 37,5 x 1,7 cm) de gel de sílica (230-400 mesh), eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (5-50%), AcOEt, acetona, acetona:MeOH (50%) e MeOH resultando no isolamento de **7** (3 mg).

## Dados de RMN e algumas características das substâncias 1-7

### Harrisonina (**1**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,42 (m; H-21), 7,41 (m; H-23), 6,33 (dd;  $J$  = 1,6 e 0,8 Hz; H-22), 6,02 (d;  $J$  = 12,4 Hz; H-1), 5,78 (d;  $J$  = 12,4 Hz; H-2), 5,68 (s; H-17), 5,07 (s; OH-7), 4,29 (s; H-15), 3,80 (s; OMe), 3,61 (s; OH-6), 3,02 (dd;  $J$  = 113,6 e 6,0 Hz; H-9), 1,92 (m; H-11 $\alpha$ ), 1,75 (m; H-11 $\beta$ /H-12 $\alpha$ ), 1,57 (m; H-12 $\beta$ ), 1,51 (s; H-19), 1,37 (s; H-29), 1,28 (s; H-18), 1,19 (s; H-28), 1,16 (s; H-30). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  216,0 (C-5), 167,0 (C-16), 166,7 (C-3), 153,9 (C-1), 142,9 (C-23), 141,2 (C-21), 123,2 (C-2), 121,0 (C-20), 109,9 (C-22), 108,3 (C-7), 88,6 (C-6), 80,9 (C-4), 78,4 (C-17), 68,6 (C-14), 57,3 (C-15), 52,0 (OMe), 49,9 (C-8), 49,7 (C-10), 46,8 (C-9), 39,5 (C-13), 27,4 (C-29), 26,3 (C-12), 24,1 (C-28), 18,3 (C-18), 17,3 (C-19), 15,2 (C-11), 14,7 (C-30). COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,42 $\rightarrow$ 6,33; 6,02 $\rightarrow$ 5,78; 3,02 $\rightarrow$ 1,92/1,75. HSQC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): texto. HMBC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): texto.

### Desacetilspathelina (**2**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,40 (m; H-21), 7,39 (m; H-23), 6,37 (dd;  $J$  = 1,6 e 0,8 Hz; H-22), 6,20 (d;  $J$  = 12,4 Hz; H-1), 5,81 (d;  $J$  = 12,4 Hz; H-2), 5,48 (s; H-17), 5,02 (sl; H-7), 4,16 (s; H-15), 3,66 (s; OMe); 3,09 (dl; H-9); 1,87-1,65 (m; H-11); 1,87-1,65 (m; H-12); 1,30 (s; H-29), 1,25 (s; H-19), 1,22 (s; H-18), 1,18 (s; H-28) 0,68 (s; H-30). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  208,0 (C-6), 167,4 (C-16),

166,0 (C-3), 161,0 (C-1), 143,0 (C-23), 141,0 (C-21), 120,3 (C-20), 118,8 (C-2), 110,0 (C-22), 81,1 (C-7), 78,1 (C-17), 70,8 (C-5), 69,4 (C-4), 67,0 (C-14), 51,8 (OMe), 51,4 (C-15), 45,7 (C-9), 45,0 (C-10), 44,6 (C-8), 37,8 (C-13), 32,8 (C-12), 29,0 (C-28), 22,6 (C-19), 21,4 (C-11), 20,2 (C-18), 19,7 (C-29), 12,5 (C-30).

### Folinina e casimiroina (**3a, 3b**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,52 [dd;  $J$  = 8,0 e 1,6 Hz; H-5 (3a)], 7,46 [d;  $J$  = 8,4 Hz; H-5 (3b)], 7,06 [t;  $J$  = 8,0 Hz; H-6 (3a)], 6,71 [d;  $J$  = 8,0 Hz; H-6 (3b)], 7,01 [dd;  $J$  = 8,0 e 1,6 Hz; H-7 (3a)], 5,97 [s; H-3 (3a)], 5,96 [s;  $\overline{\text{CH}}_2\text{-O}$  (3b)], 5,81 [s; H-3 (3b)], 3,85 e 3,83 [s; OMe (3a)]; 3,84 [s; OMe (3b)], 3,81 [s; N- $\overline{\text{CH}}_3$  (3a)], 3,76 [s; N- $\overline{\text{CH}}_3$  (3b)]. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  165,0 (C-2, 3a), 164,1 (C-2, 3b), 162,4 (C-4, 3a), 162,6 (C-4, 3b), 149,9 (C-7, 3b), 148,6 (C-8, 3a), 133,5 (C-8, 3b), 131,4 (C-8a, 3a), 126,5 (C-8a,3b), 122,2 (C-6, 3a), 119,1 (C-4a, 3a), 104,3 (C-6, 3b), 118,5 (C-5, 3b), 115,6 (C-5, 3a), 114,4 (C-7, 3a), 112,9 (C-4a, 3b), 101,0 ( $\overline{\text{CH}}_2\text{-O}$ , 3b), 96,7 (C-3, 3a), 94,5 (C-3, 3b), 34,9 (N- $\overline{\text{CH}}_3$ , 3a), 31,9 (N- $\overline{\text{CH}}_3$ , 3b).

### 3 $\beta$ -angeloil-21,24-epoxi-7 $\alpha$ ,21 $\alpha$ ,23 $\alpha$ ,25-tetra-hidroxi-4 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,8 $\beta$ ,10 $\beta$ -tetrametil-25-dimetil-14, 18 -ciclo-5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -colestano (**4**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>3</sub>N):  $\delta$  5,99 (dq;  $J$  = 7,2 e 1,2 Hz; H-3'), 5,87 (sl; H-21), 4,84 (dd;  $J$  = 11,6 e 4,8 Hz; H-3), 4,50 (sl; H-23), 4,11 (sl; H-24), 3,93 (sl; H-7), 2,50 (m; H-5), 2,43 e 1,79 (m; H-2), 2,30 (m; H-20), 2,14 e 2,01 (m; H-22), 2,05 (dd; H-5'), 1,95 (t; H-4'), 1,90 e 1,68 (m; H-12), 1,90 (m; H-17), 1,79 e 1,66 (m; H-15), 1,75 e 1,68 (m; H-6), 1,68 (m; H-16), 1,56 (s; H-27), 1,54 (s; H-26), 1,45 (m; H-1), 1,38 (m; H-9), 1,28 e 1,13 (m; H-11), 1,15 (s; H-30), 1,00 (s; H-28), 0,95 (s; H-19), 0,92 e 0,63 (d; 5,6 Hz; H-18), 0,86 (s; H-29). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>3</sub>N):  $\delta$  167,6 (C-1'), 137,3 (C-3'), 128,9 (C-2'), 94,2 (C-21), 80,9 (C-3), 74,1 (C-7), 73,3 (C-25), 73,2 (C-24), 66,4 (C-23), 47,8 (C-20), 46,2 (C-17), 44,5 (C-9), 39,3 (C-14), 39,0 (C-5), 38,5 (C-1), 37,7 (C-8), 37,3 (C-4), 37,3 (C-10), 31,5 (C-22), 28,4 (C-16), 28,1 (C-27), 28,0 (C-28), 27,7 (C-2), 27,6 (C-13), 27,1 (C-26), 26,4 (C-12), 25,6 (C-15), 24,1 (C-6), 20,9 (C-4'), 20,2 (C-30), 17,3 (C-11), 17,3 (C-19), 16,2 (C-29), 16,0 (C-5'), 15,3 (C-18).

### Limonina diosfenol (**5**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,41 (dd;  $J$  = 1,6 e 0,8 Hz; H-21), 7,40 (tl;  $J$  = 1,6 Hz; H-23), 6,34 (dd;  $J$  = 2,0 e 0,8 Hz; H-22), 6,26 (sl; OH), 5,44 (s; H-17), 4,65 (m; H-19), 4,13 (s; H-15), 4,09 (tl; H-1), 2,98 (dd;  $J$  = 18,0 e 2,8 Hz; H-2) e 2,85 (dd;  $J$  = 18,0 e 4,4 Hz; H-2), 2,68 (dd;  $J$  = 12,8 e 2,0 Hz; H-9) 1,86-1,80 (m; H-11), 1,72-1,69 (m; H-12), 1,55 (m; H-29), 1,50 (s; H-28), 1,16 (s; H-30), 1,05 (s; H-18). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 195,2 (C-7), 169,1 (C-3), 166,4 (C-16), 143,3 (C-23), 141,1 (C-21), 140,2 (C-5), 139,4 (C-6), 119,8 (C-20), 109,6 (C-22), 81,8 (C-4), 79,2 (C-1), 77,7 (C-17), 68,6 (C-19), 65,3 (C-14), 52,1 (C-15), 48,4 (C-10), 46,8 (C-8), 46,4 (C-9), 37,4 (C-13), 34,8 (C-2), 31,7 (C-12), 25,7 (C-29), 25,2 (C-28), 20,6 (C-11), 20,5 (C-18), 18,1 (C-30).

### Perforatina (**6**)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,45 (m; H-21), 7,43 (t;  $J$  = 1,6 Hz; H-23), 6,94 (d;  $J$  = 9,6 Hz; H-1), 6,43 (s; OH), 6,33 (m; H-22), 5,91 (d;  $J$  = 9,6 Hz; H-2), 5,68 (s; H-17), 4,65 (s; H-15), 3,16 (dd;  $J$  = 12,8 e 9,6 Hz; H-9), 1,41 (s; H-28), 1,39 (s; H-18), 1,32 (s; H-29), 1,29 (s; H-30), 1,20 (s; H-19). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 201,8 (C-6), 167,5 (C-16), 160,2 (C-3), 150,1 (C-1), 143,2 (C-23), 141,3 (C-21), 120,6 (C-20), 119,1 (C-2), 109,7 (C-22), 99,1 (C-7), 88,8 (C-4), 80,5 (C-5), 76,7 (C-17), 70,2 (C-14), 58,3 (C-15), 51,6 (C-8), 44,1 (C-10), 39,8 (C-13), 35,4 (C-9), 27,8 (C-28), 27,6 (C-29), 25,2 (C-12), 19,7 (C-30), 19,3 (C-18), 15,5 (C-11), 15,1 (C-19).

*Biflorina* (7)

Sólido cristalino, pf 287-290 °C. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD): δ 6,37 (s; H-8), 6,08 (q; *J* = 0,8 Hz; H-3), 4,85 (d; *J* = 7,2; H-1'), 4,16 - 3,40 (m; H-2' a H-6'), 2,36 (d; *J* = 0,8 Hz; Me) RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD): 184,2 (C-4), 169,3 (C-2), 165,3 (C-7), 162,2 (C-5), 159,3 (C-8a), 109,2 (C-6), 109,1 (C-3), 104,9 (C-4a), 95,3 (C-8), 82,7 (C-5'), 80,2 (C-3'), 75,3 (C-1'), 72,6 (C-2'), 71,8 (C-4'), 62,9 (C-6'), 20,3 (Me).

**Ensaio antifúngico**

O fungo *M. pernicioso* foi obtido da vassoura-de-bruxa seca do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), cujos esporos foram germinados a partir de basidiocarpos crescidos no campo experimental da EMBRAPA Ocidental (AM-010, km-29). A cultura fúngica obtida em batata-dextrose-agar (BDA) é conservada em solução de glicerol 70% e batata-dextrose (1:1). Para avaliação da atividade antifúngica, alíquotas em quantidades apropriadas para diferentes concentrações (200 e 100 µg/mL da substância **2**; 100 a 0,5 µg/mL de **3b**, solubilizadas em DMSO) foram incorporadas separadamente no meio de cultura BDA fundente. As amostras foram vertidas em placa de Petri de 9,0 cm e após a solidificação do meio, discos miceliais (0,8 cm de diâmetro) foram removidos da borda da cultura fúngica e colocados no centro da placa de Petri. As placas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D. à 25 °C e na ausência de luz, até que o crescimento das placas do controle (sem substâncias) atingissem toda a superfície do meio (17 dias). As placas foram preparadas em triplicata para cada tratamento. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC)<sup>16</sup> foi calculada com base no crescimento da placa controle utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{P.I.C.} = [C - T] / C \times 100,$$

onde C e T referem-se ao crescimento (mm) do fungo nas placas do controle e tratamento, respectivamente.

**AGRADECIMENTOS**

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro e pelas bolsas concedidas a A. da C. Máximo, L. E. de Carvalho e E. C. da S. Pereira, à CAPES pela bolsa concedida a W. A. dos S. Moreira.

**REFERÊNCIAS**

- Bastos, M. S. R.; Gurgel, T. E. P.; Sousa-Filho, M. S. M.; *Rev. Bras. Frutic.* **2002**, *24*, 240.
- Souza, A. G. C.; *Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro*, Manaus: Embrapa Amazônia Oriental: Manaus, 2007.
- Pirani, J. R.; *Rodriguésia* **2005**, *56*, 189.
- Silva, M. F.; Lisbôa, P. L. B.; Lisbôa, R. C. L.; *Nomes vulgares de plantas amazônicas*, CNPq/INPA: Manaus, 1977.
- Lima, M. P.; Rosas, L. V.; Silva, M. F. G. F.; Ferreira, A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1560.
- Moreira, W. A. S.; Lima, M. P.; Ferreira, A. G.; Ferreira, I. C. P.; Nakamura, C. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1089.
- Freitas, A. C.; Lima, M. P.; Ferreira, A. G.; Tadei, W. P.; Pinto, A. C. S.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2068.
- Rajab, M. S.; Rugutt, J. K.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 822.
- Nakatani, M.; Takao, H.; Iwashita, T.; Naoki, H.; Hase, T.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1429.
- Byrne, L. T.; Tri, M. V.; Phuong, N. M.; Sargent, M. V.; Skelton, B. W.; White, A. H.; *Aust. J. Chem.* **1991**, *44*, 165.
- Ito, A.; Shamon, L. A.; Yu, B.; Mata-Greenwood, E.; Lee, S. K.; Breemen, R. B.; Mehta, R. G.; Farnsworth, N. R.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3509.
- Zhang, Y.; Chen, Y.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 401.
- Ghosal, S.; Kumar, Y.; Shripati, S.; Ahad, K.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2591.
- Oliva, A.; Meepagala, K. M.; Wedge, D. E.; Harries, D.; Hale, A. L.; Aliotta, G.; Duke, S. O.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 890.
- Silva, D. M. M. H.; Bastos, C. N.; *Fitopatol. Bras.* **2007**, *32*, 143.
- Edgington, L. V.; Knew, K. L.; Barron, G. L.; *Phytopathology* **1971**, *6*, 42.